

En la reacción de primer orden $A \rightarrow B$ la concentración de A en el tiempo cero es de 0.5 mM. Al cabo de 2 s es de 0.25 mM. ¿Cuál será al cabo de 5 s?

$$t = 0 \text{ s, } [A]_0 = 0.50 \text{ mM} \qquad t = 2 \text{ s, } [A] = 0.25 \text{ mM}$$

$$0.693/2 = k = 0.3465 \text{ s}^{-1}$$

$$[A] = 0.5 \times e^{-(0.3465 \times 5)} = 0.5 \times e^{-1.7325}$$

$$[A] = 0.088 \text{ mM}$$

A) ¿Cuál será la constante de velocidad k de una reacción de primer orden cuyo tiempo mitad es de 0.3 s?

$$t_{1/2} = 0.3 \text{ s} = 0.693/k$$
$$k = 0.693/0.3 = 2.32 \text{ s}^{-1}$$

B) ¿Qué intervalo de tiempo deberá transcurrir para que desaparezca el 95% del reactivo?

$$[A]/ [A]_0 = e^{-kt}$$
$$0.05 = e^{-(2.31 \times t)}$$
$$\text{Ln}0.05 = -2.3 \times t$$
$$t = 1.29 \text{ s}$$

C) Con estos datos, ¿podría calcular la constante de velocidad si la reacción fuese de segundo orden?

No. En ese caso se requiere además conocer $[A]_0$

- A) La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato a expensas de bicarbonato, produciendo oxaloacetato y Pi. Esta enzima se inactiva cuando se incubaba a temperatura ambiente en presencia de un reactivo específico para histidinas, el dietilpicrocarbonato (DEPC). En un experimento de inactivación en el que se usó una concentración de enzima de $0.5 \mu\text{M}$ y de DEPC de $100 \mu\text{M}$, en ausencia y presencia de una concentración fija saturante del sustrato MgPEP, se obtuvieron los siguientes valores de velocidad inicial cuando alícuotas del medio de incubación se ensayaron a concentraciones saturantes de los sustratos. Conociendo que la enzima es estable en ausencia de DEPC, conteste: A) De qué orden es la reacción de inactivación por DEPC?



Dadas las condiciones del experimento, la reacción es de pseudoprimer orden con respecto a la concentración de enzima

- B) Determinar las constantes de velocidad y el orden de la reacción de inactivación para ambas condiciones.

Ausencia de MgPEP, $k = (8.0 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Presencia de MgPEP, $k = (7.9 \pm 0.4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

- C) Qué conclusiones puede sacar de los resultados?

El sustrato MgPEP protege frente a la inactivación por DEPC. Es probable que se esté modificando un residuo de histidina en o cerca del sitio activo

Una enzima dimérica purificada a homogeneidad es inestable a 42 °C. A esa temperatura tiene una vida media de 6.9 min, independientemente de la concentración de enzima incubada. A) Determinar el orden y la constante de velocidad de la inactivación.

Dado que el $t_{1/2}$ es independiente de la concentración de enzima, la reacción es de orden 1

$$t_{1/2} = 6.9 \text{ min} = \ln 2/k \quad k = \ln 2/6.9 = 0.693/6.9 = 0.1 \text{ min}^{-1}$$

Esta enzima también se inactiva a 0 °C, siendo su vida media igualmente independiente de la concentración de enzima. Sin embargo, recupera su actividad cuando la temperatura del medio de incubación se regresa a 20 °C. El tiempo medio del proceso de reactivación resultó ser inversamente proporcional a la concentración de enzima incubada. B) ¿Cuál es el orden de la reacción de reactivación?

Orden 2

C) ¿Cómo calcularía la constante de velocidad de este proceso?

Determinando la actividad recuperada a lo largo el tiempo y aplicando la ecuación

$$1/[A] = 1/[A]_0 + kt,$$

en donde A = porcentaje de enzima inactiva

D) ¿Qué nos dicen estos datos acerca del mecanismo de inactivación y reactivación de la enzima?

Cuando la enzima se inactiva por calor no cambia su estado de asociación, mientras que se disocia al inactivarse por frío

La hidrólisis de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa presenta el siguiente curso temporal.

A) Determinar la constante de primer orden y el tiempo medio de la reacción.

$$k = 2.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \quad t_{1/2} = 0.693 / 2.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} = 247.5 \text{ min} = 4.125 \text{ h}$$

B) ¿Por qué esta reacción bimolecular sigue una cinética de primer orden?

Porque el segundo reactivo es el agua que está muy en exceso (55.5 M)

C) ¿Cuánto tiempo llevará el hidrolizar el 99% de la sacarosa presente al inicio?

$$[A]/[A]_0 = 0.01, \ln 0.01 = -kt_{99}, t_{99} = -4.6 / -0.0028 \text{ min}^{-1} = 1645 \text{ min} = 27.4 \text{ h}$$

En la reacción $A \leftrightarrow B$, la constante de velocidad para el paso $A \rightarrow B$ es $k_1 = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y la constante de velocidad para el paso $B \rightarrow A$ es $k_{-1} = 10^{-7} \text{ s}^{-1}$

(A) Calcular el valor de la K_{eq} para la reacción anterior.

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{10^{-4} \text{ s}^{-1}}{10^{-7} \text{ s}^{-1}} = 10^3$$

(B) Suponga que se agrega una enzima que aumenta el valor de k_1 por un factor de 10^9 , ¿cuál será el valor de K_{eq} ? ¿cuál será el valor de k_{-1} ?

$$K_{\text{eq}} = 10^3$$

$$k_{-1} = 10^2 \text{ s}^{-1}$$

Para una enzima que sigue la cinética de Michaelis Menten calcular:
a) La concentración de sustrato, expresada como $[S]/K_m$, a la que la velocidad inicial es el 10% de la V_{max} ; b) aquella a la que es el 90% y c) la razón $[S]_{90}/[S]_{10}$.

a)

$$v = V_{max}[S]_{10} / (K_m + [S]_{10}) = 0.1V_{max}$$

$$[S]_{10} = 0.1K_m + 0.1[S]_{10} \qquad \frac{[S]_{10}}{K_m} = 0.111$$

b)

$$v = V_{max}[S]_{90} / (K_m + [S]_{90}) = 0.9V_{max}$$

$$[S]_{90} = 0.9K_m + 0.9[S]_{10} \qquad \frac{[S]_{90}}{K_m} = 9$$

c)

$$\frac{[S]_{90}}{[S]_{10}} = 81$$

En una reacción enzimática monosustrato se determinaron las siguientes constantes de velocidad: $k_1=5\times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1}= 2\times 10^2 \text{ s}^{-1}$ y $k_2 (k_{\text{cat}}) = 4\times 10^4 \text{ s}^{-1}$.
(A) Calcular K_s y K_m para esta reacción.

$$K_s = 2\times 10^2 \text{ s}^{-1} / 5\times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 4\times 10^{-6} \text{ M}$$
$$K_m = (4\times 10^4 \text{ s}^{-1} + 2\times 10^2 \text{ s}^{-1}) / 5\times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 8.04\times 10^{-4} \text{ M}$$

(B) La unión del sustrato, ¿alcanza el equilibrio o el estado estacionario?

Estado estacionario

(C) ¿Puede k_1 ser mucho más grande que k_{cat} ? Razónelo.

Estas constantes de velocidad no se pueden comparar por ser de diferente orden.

Se puede comparar $k_{\text{cat}}[\text{ES}]$ con $k_1[\text{E}][\text{S}]$ y la primera velocidad lógicamente no puede ser mayor que la segunda

Quando se diseña un ensayo de actividad para una enzima es deseable que la velocidad inicial sea insensible a pequeños errores en la concentración de sustrato. ¿Qué valor debe tener la razón $[S]/K_m$ en una enzima que sigue cinética michaeliana para que un error del 10% en $[S]$ se transmita a v como un error de menos del 1%?

$$[S]_{\text{exp}} = 0.9[S]_{\text{teor}} \qquad \frac{v_{\text{exp}}}{v_{\text{teor}}} = 0.99$$

$$\frac{v_{\text{exp}}}{v_{\text{teor}}} = \frac{V_{\text{max}} 0.9[S]/(K_m + 0.9[S])}{V_{\text{max}}[S]/(K_m + [S])} = \frac{0.9(K_m + [S])}{(K_m + 0.9[S])} = 0.99$$

$$0.9(K_m + [S]) = 0.99 (K_m + 0.9[S])$$

$$0.009[S] = 0.09 K_m$$

$$\boxed{\frac{[S]}{K_m} = 10}$$

Una enzima central de una ruta metabólica se ha encontrado mutada en un paciente de manera que la K_m para su único sustrato es el doble de lo normal. Si no hay ningún otro cambio, ¿cuánto debe la concentración de sustrato cambiar para que se mantenga la velocidad del flujo a través de esta ruta metabólica?: a) exactamente la mitad; b) exactamente el doble; c) más del doble; d) menos de la mitad; e) entre la mitad y el doble.

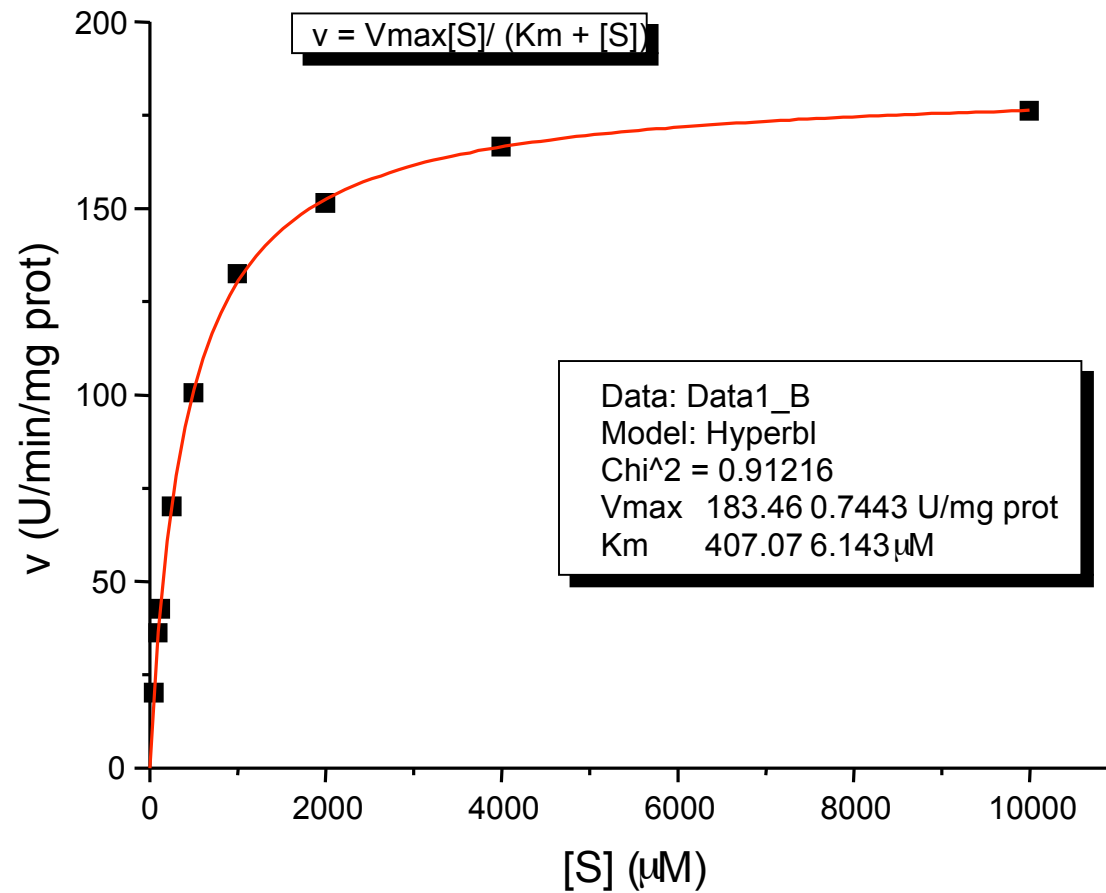
$$v = V_{max}[S]/(K_m + [S]) = V_{max}\alpha[S]/(2K_m + \alpha[S])$$

$$\alpha = 2$$

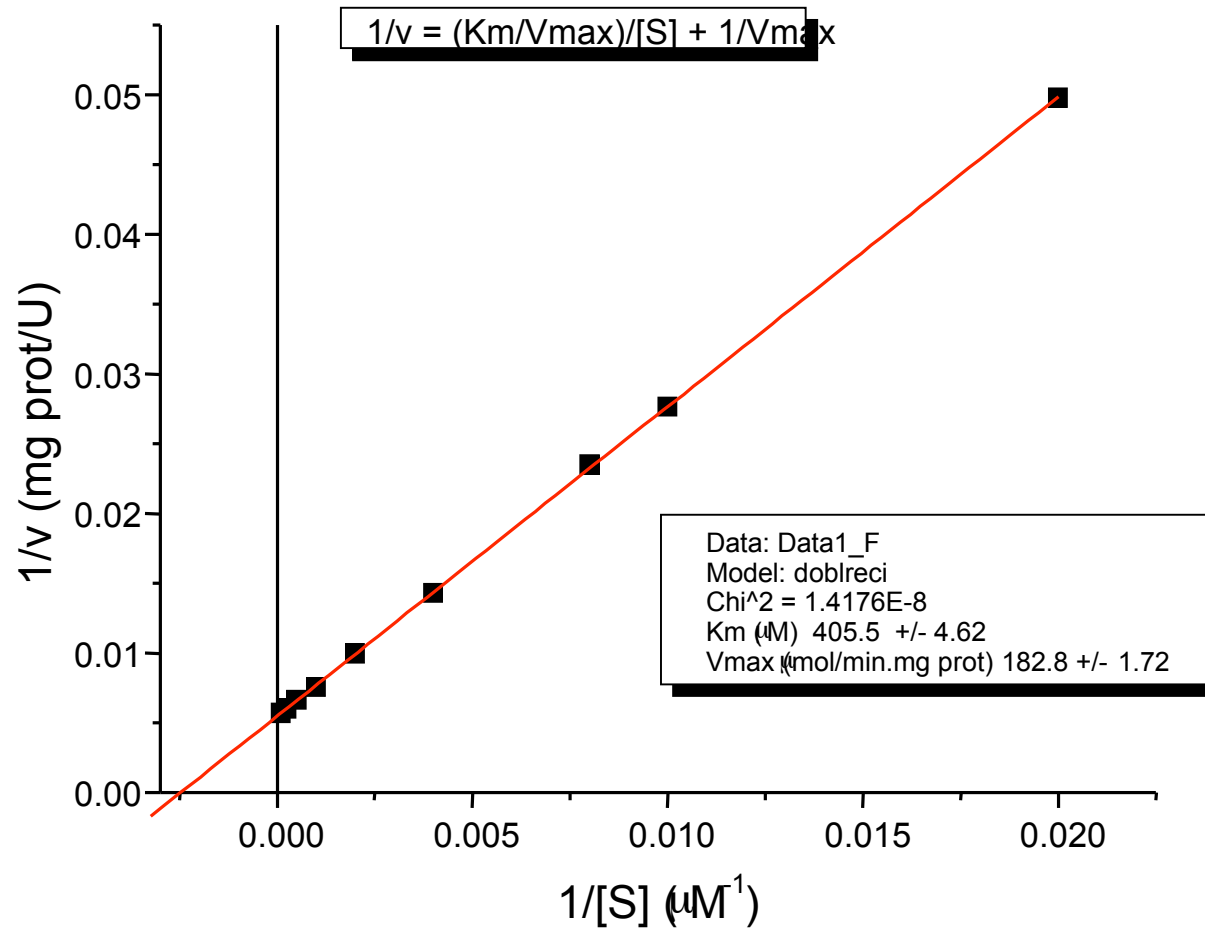
$$v = V_{max}2[S]/(2K_m + 2[S])$$

La concentración de sustrato debe ser exactamente el doble

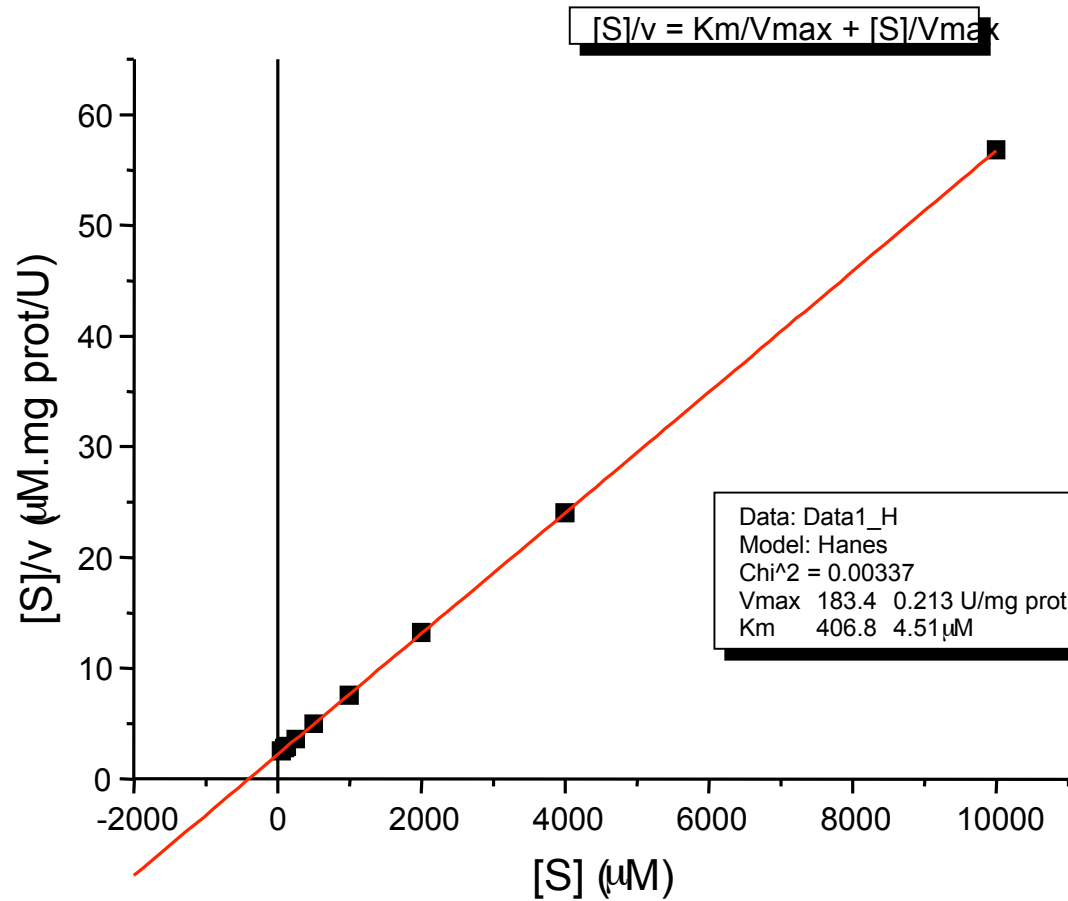
La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD⁺ como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD⁺ era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Hacer un análisis gráfico de los datos experimentales usando las transformaciones lineales a la ecuación de Michaelis-Menten: dobles recíprocos, Hanes y Eadie-Hofstee



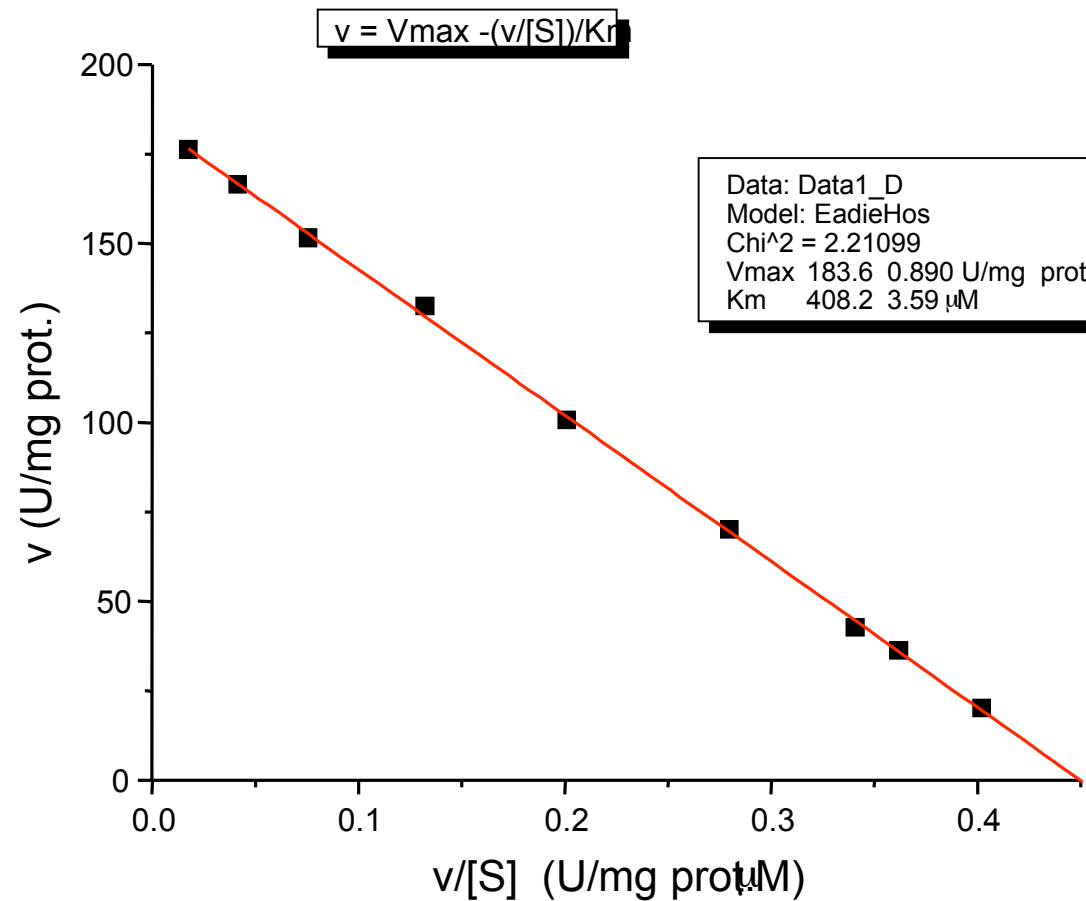
La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD^+ como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD^+ era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Hacer un análisis gráfico de los datos experimentales usando las transformaciones lineales a la ecuación de Michaelis-Menten: dobles recíprocos, Hanes y Eadie-Hofstee



La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD^+ como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD^+ era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Hacer un análisis gráfico de los datos experimentales usando las transformaciones lineales a la ecuación de Michaelis-Menten: dobles recíprocos, Hanes y Eadie-Hofstee



La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD^+ como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD^+ era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Hacer un análisis gráfico de los datos experimentales usando las transformaciones lineales a la ecuación de Michaelis-Menten: dobles recíprocos, Hanes y Eadie-Hofstee



La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD^+ como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD^+ era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Los datos de velocidad inicial obtenidos son los siguientes.

B) Calcular k_{cat} y k_{cat}/K_m

$$V_{\text{max}} = 182.5 \text{ U / mg prot} \quad K_m = 407 \text{ } \mu\text{M}$$

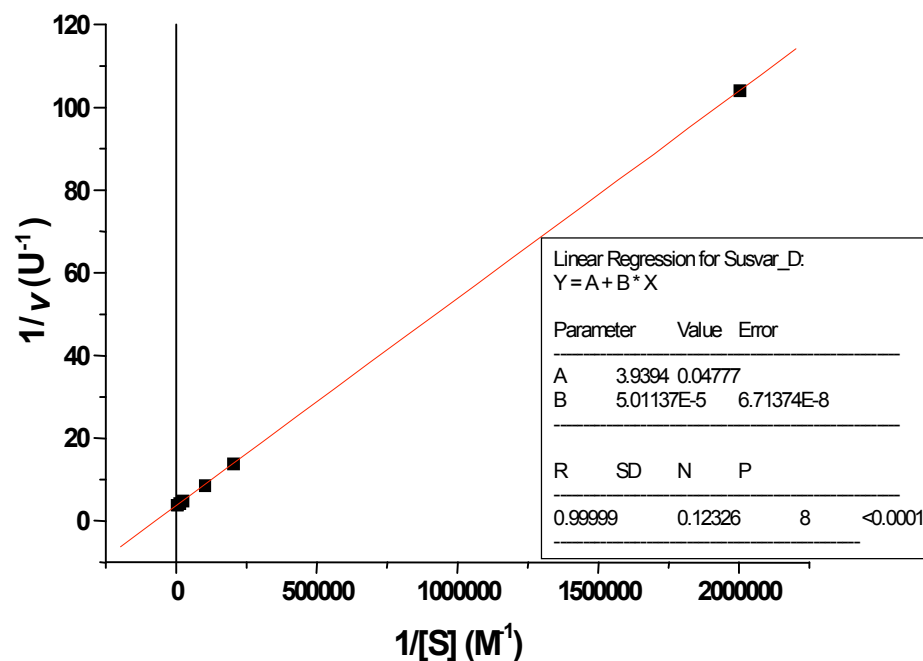
$$V_{\text{max}} = 182.5 \text{ } \mu\text{mol producto min}^{-1} / \text{mg prot}$$

$$125 \text{ mg proteína} = 1 \text{ } \mu\text{mol} \quad 1 \text{ mg proteína} = 8 \text{ nmoles}$$

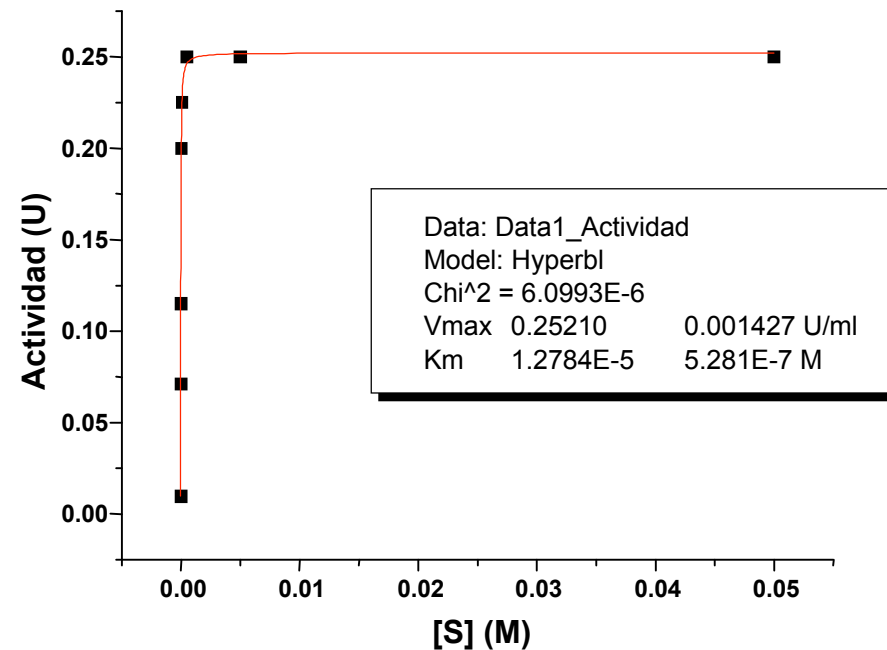
$$k_{\text{cat}} = 182.5 \text{ } \mu\text{mol producto min}^{-1} / 0.008 \text{ } \mu\text{mol} = 2.28 \times 10^4 \text{ min}^{-1} = 3.8 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} / K_m = 3.8 \times 10^2 \text{ s}^{-1} / 407 \text{ } \mu\text{M} = 9.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

En ensayos de actividad realizados con 0.1 ml de una preparación enzimática en un volumen final de 1 ml se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales a las concentraciones de sustrato indicadas. A) Demuestre si esta reacción sigue o no la cinética de Michaelis-Menten por análisis gráfico y, si procede, determine K_m para el sustrato y V_{max} y V_{max}/K_m para esta concentración de enzima



En ensayos de actividad realizados con 0.1 ml de una preparación enzimática en un volumen final de 1 ml se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales a las concentraciones de sustrato indicadas. A) Demuestre si esta reacción sigue o no la cinética de Michaelis-Menten por análisis gráfico y, si procede, determine K_m para el sustrato y V_{max} y V_{max}/K_m para esta concentración de enzima



En ensayos de actividad realizados con 0.1 ml de una preparación enzimática en un volumen final de 1 ml se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales a las concentraciones de sustrato indicadas. A) Demuestre si esta reacción sigue o no la cinética de Michaelis-Menten por análisis gráfico y, si procede, determine K_m para el sustrato y V_{max} y V_{max}/K_m para esta concentración de enzima

$$V_{max} = 0.252 \pm 0.001 \mu\text{mol min}^{-1}$$

$$K_m = 12.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$$

Puesto que la reacción se hizo con 0.1 ml de enzima,

$$V_{max}/K_m = 0.197 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1} = 197 \text{ min}^{-1}$$

B) ¿Cuáles son las velocidades iniciales a $[S]=1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ y a $[S]=1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$?

$$v = 0.252 \times [S] / (12.8 + [S])$$

$$[S] = 1.0 \mu\text{M} \quad v = 0.018 \mu\text{mol min}^{-1}$$

$$[S] = 1000 \mu\text{M} \quad v = 0.249 \mu\text{mol min}^{-1}$$

C) Calcule la cantidad total de producto formado durante los primeros 5 min a $[S]=2.0\times 10^{-3}$ M y a $[S]= 2.0\times 10^{-6}$ M

A una $[S]=2.0\times 10^{-3}$ M se tienen 6.0 μ moles del sustrato. Puesto que el sustrato es saturante, en 5 min se formarían $0.252 \mu\text{moles min}^{-1} \times 5 \text{ min} = 1.26 \mu\text{moles}$ de producto, quedando 4.74 μ moles de sustrato, es decir $[S]_5 = 1.58\times 10^{-3}$ M, concentración que sigue siendo saturante

A una $[S]=2.0\times 10^{-6}$ M se tienen 6.0 nmoles del sustrato. Si se mantuviera la velocidad inicial de $0.034 \mu\text{mol min}^{-1}$, en 5 min se formarían 0.17 μ moles de producto, lo que es más que la cantidad de S inicial. A esta concentración la reacción catalizada es de primer orden y por tanto

$$[S] = [S]_0 \exp\{-(V_{\max}/K_m) t\}$$

$$[S]_5 = 2.0\times 10^{-6} \text{ M} \times \exp\{-197 \text{ min}^{-1} \times 5 \text{ min}\} = 2.0\times 10^{-6} \text{ M} \times 1.67 \times 0 = 0 \mu\text{M}, \text{ es decir todo el sustrato ha sido transformado en producto.}$$

D) Suponga que la concentración de enzima en cada mezcla de reacción se aumenta por un factor de 4, ¿cuál sería el valor de K_m y de V_{max} ?

K_m no cambia, V_{max} será cuatro veces mayor

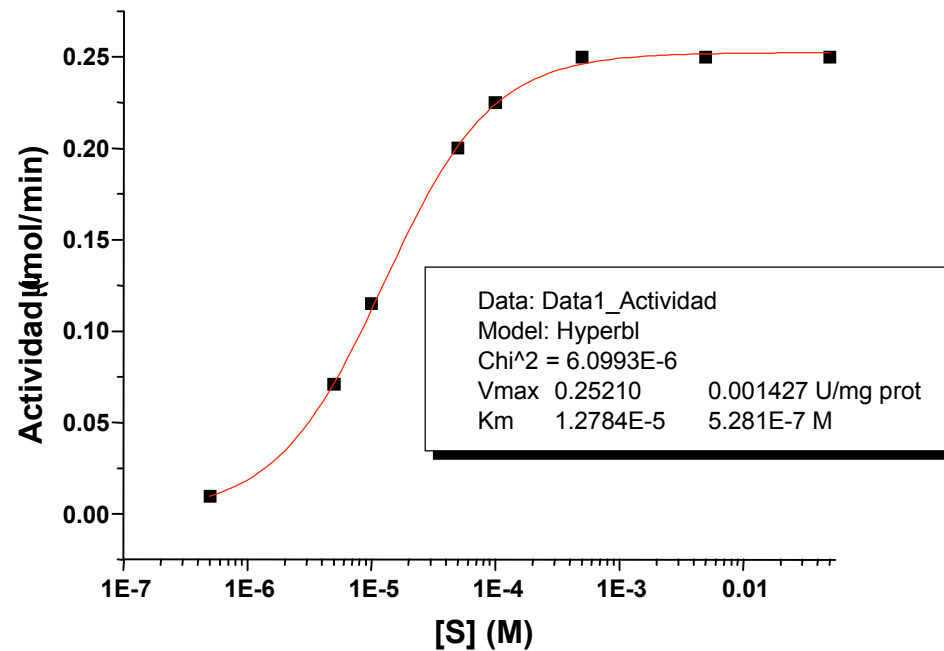
$$K_m = 12.8 \pm 0.05 \mu\text{M} \qquad V_{max} = 1.008 \mu\text{mol min}^{-1}$$

E) ¿Cuál sería, bajo estas nuevas condiciones, el valor inicial de v a $[\text{S}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$?

$$v = 1.008 \mu\text{mol min}^{-1} \times 5 \mu\text{M} / (12.8 \mu\text{M} + 5 \mu\text{M}) = 0.283 \mu\text{mol min}^{-1}$$

F) Graficar los datos experimentales como v_0 frente a $[S]$ haciendo que el eje de abscisas tenga la escala en forma logarítmica en base 10. ¿Qué tipo de curva se obtiene?

Sigmoidal



Quimotripsina puede hidrolizar además de enlaces peptídicos, enlaces amidos y ésteres. A) Determinar cuál es el orden de preferencia con el que quimotripsina catalizará la hidrólisis de estos sustratos si los tres se encuentran presentes a la misma concentración. B) ¿Cuál será la razón entre las velocidades de producción de N-acetilvalina y N-acetiltirosina si en el medio de reacción se encuentran presentes los dos sustratos correspondientes a la misma concentración? C) ¿Qué conclusión puede obtener acerca del sitio activo de esta enzima a partir del análisis de estos datos?

A)

k_{cat}/K_m	Sustrato
0.1159 M ⁻¹ s ⁻¹	N-acetilglicina
1.93 M ⁻¹ s ⁻¹	N-acetilvalina
2.88×10^4 M ⁻¹ s ⁻¹	N-acetiltirosina

B)

$$v_{\text{Tyr}}/v_{\text{Val}} = 1.49 \times 10^4$$

C) El sitio activo de la enzima reconoce grupos aromáticos

La enzima acetilcolinesterasa tiene una K_m para acetilcolina de $9.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y una k_{cat} de $1.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, mientras que la enzima catalasa tiene una K_m para el H_2O_2 de $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ y una k_{cat} de $1.0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. ¿Cuál de las dos enzimas está más próxima a la perfección catalítica?

A)

k_{cat}/K_m	Enzima
$1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Acetil colinesterasa
$4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Catalasa

B)

Catalasa (tiene más alta k_{cat}/K_m y los valores individuales de k_{cat} y K_m)

Para el mecanismo más simple de reacción catalizada por una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten, $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$, (a) ¿cuál es el valor máximo que puede alcanzar k_{cat}/K_m expresado en términos de constantes de velocidad de la reacción catalizada? (b) ¿Bajo qué condiciones se alcanzará este valor máximo? (c) Razone si este valor puede sobrepasar al valor máximo que podría alcanzar la constante de velocidad de una reacción de segundo orden no catalizada. (d) ¿Cuál es el valor mínimo, igualmente expresado en términos de constantes de velocidad, y bajo qué condiciones se alcanzará? (e) Para un valor de k_1 igual en los dos casos, ¿qué condición, equilibrio rápido o estado estacionario, permitirá una mayor eficiencia catalítica? (f) Si la reacción fuese reversible y tuviera una constante de equilibrio (K_{eq}) de 0.1 ¿podría la enzima que cataliza esta reacción alcanzar la perfección catalítica en el sentido de formación de P?

A)

k_1 ya que $k_{\text{cat}}/K_m = k_{\text{cat}}k_1/(k_{-1} + k_{\text{cat}})$ y $k_{\text{cat}}/(k_{-1} + k_{\text{cat}}) < 1$

B)

Cuando $k_{\text{cat}} \gg k_{-1}$ condiciones de estado estacionario

C)

NO (Límite impuesto por la constante de velocidad de la difusión $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Para el mecanismo más simple de reacción catalizada por una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten, $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$, (a) ¿cuál es el valor máximo que puede alcanzar k_{cat}/K_m expresado en términos de constantes de velocidad de la reacción catalizada? (b) ¿Bajo qué condiciones se alcanzará este valor máximo? (c) Razone si este valor puede sobrepasar al valor máximo que podría alcanzar la constante de velocidad de una reacción de segundo orden no catalizada. (d) ¿Cuál es el valor mínimo, igualmente expresado en términos de constantes de velocidad, y bajo que condiciones se alcanzará? (e) Para un valor de k_1 igual en los dos casos, ¿qué condición, equilibrio rápido o estado estacionario, permitirá una mayor eficiencia catalítica? (f) Si la reacción fuese reversible y tuviera una constante de equilibrio (K_{eq}) de 0.1 ¿podría la enzima que cataliza esta reacción alcanzar la perfección catalítica en el sentido de formación de P?

D)

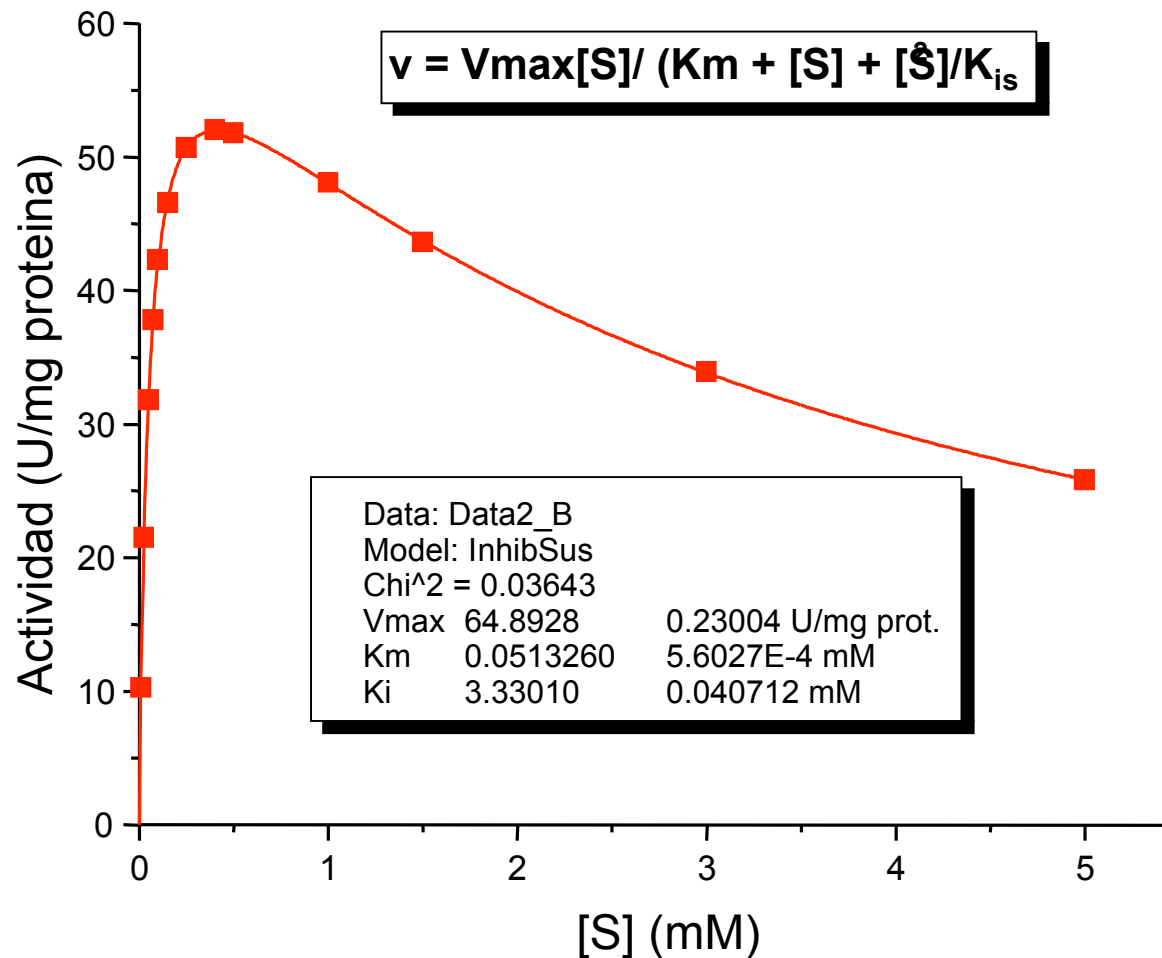
$k_{cat}k_1/k_{-1}$ cuando $k_{cat} \ll k_{-1}$ ya que $k_{cat}/k_{-1} \ll 1$

E)

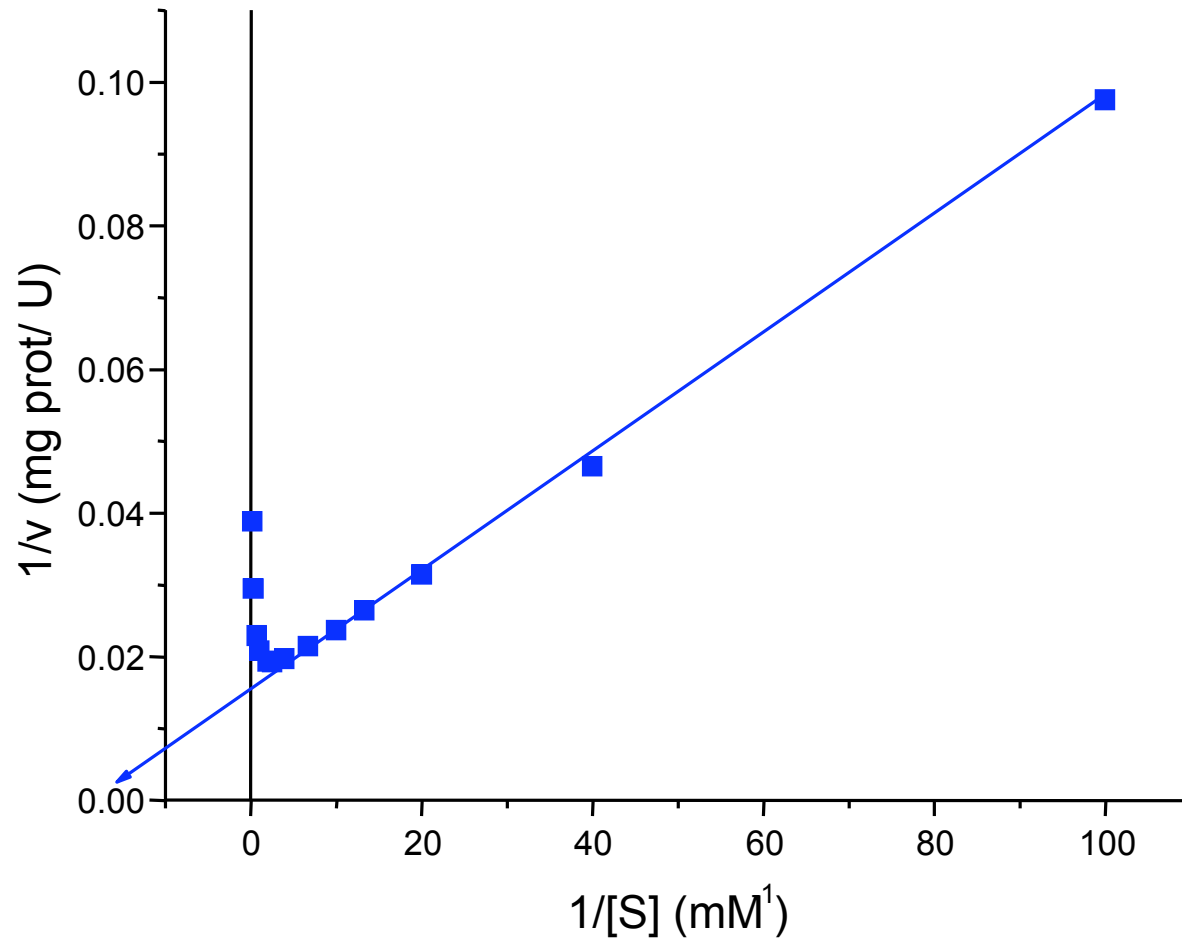
Condiciones de estado estacionario

F) NO porque $(k_{cat}/K_m)s/(k_{cat}/K_m)p = K_{eq} = 0.1$

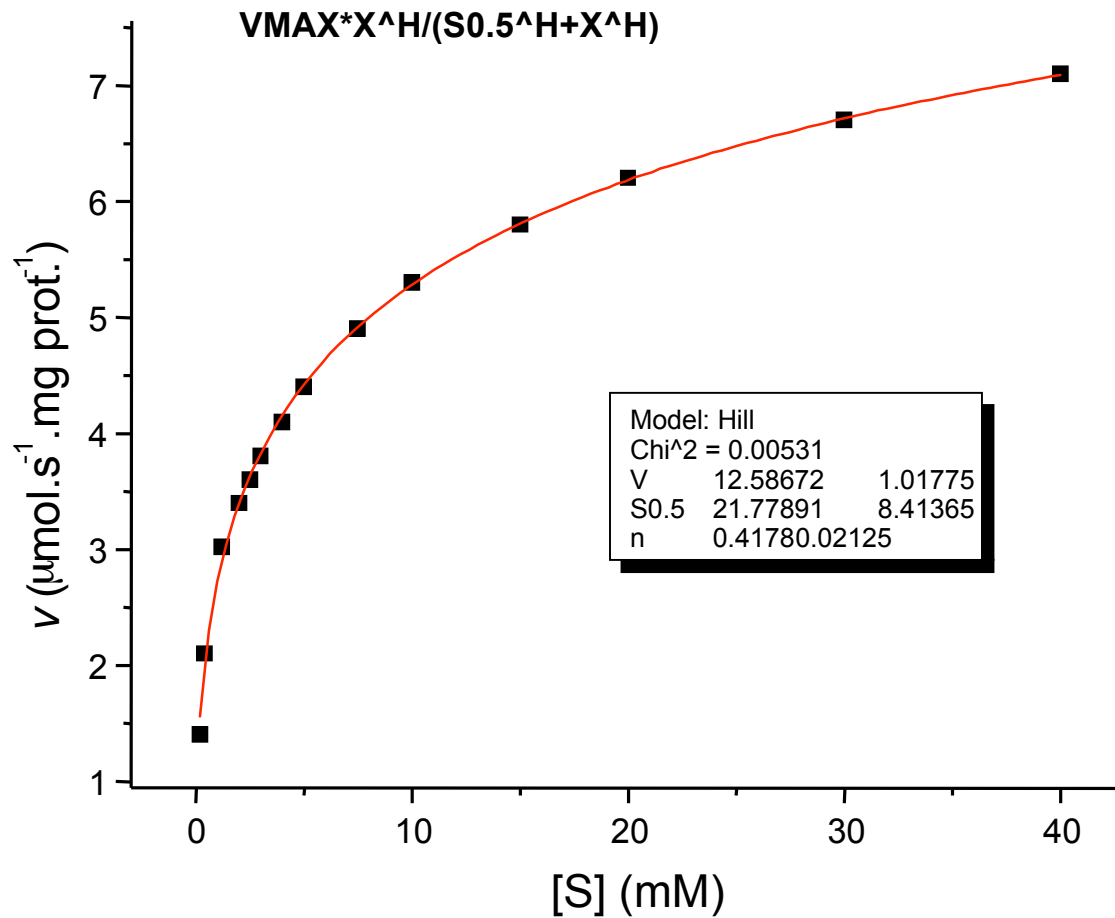
En un experimento de saturación de una enzima por su sustrato se obtuvieron los siguientes resultados de velocidad inicial. (A) Determinar por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima. B) Qué particularidad muestra el mecanismo cinético de esta enzima?



En un experimento de saturación de una enzima por su sustrato se obtuvieron los siguientes resultados de velocidad inicial. (A) Determinar por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima. B) Qué particularidad muestra el mecanismo cinético de esta enzima?

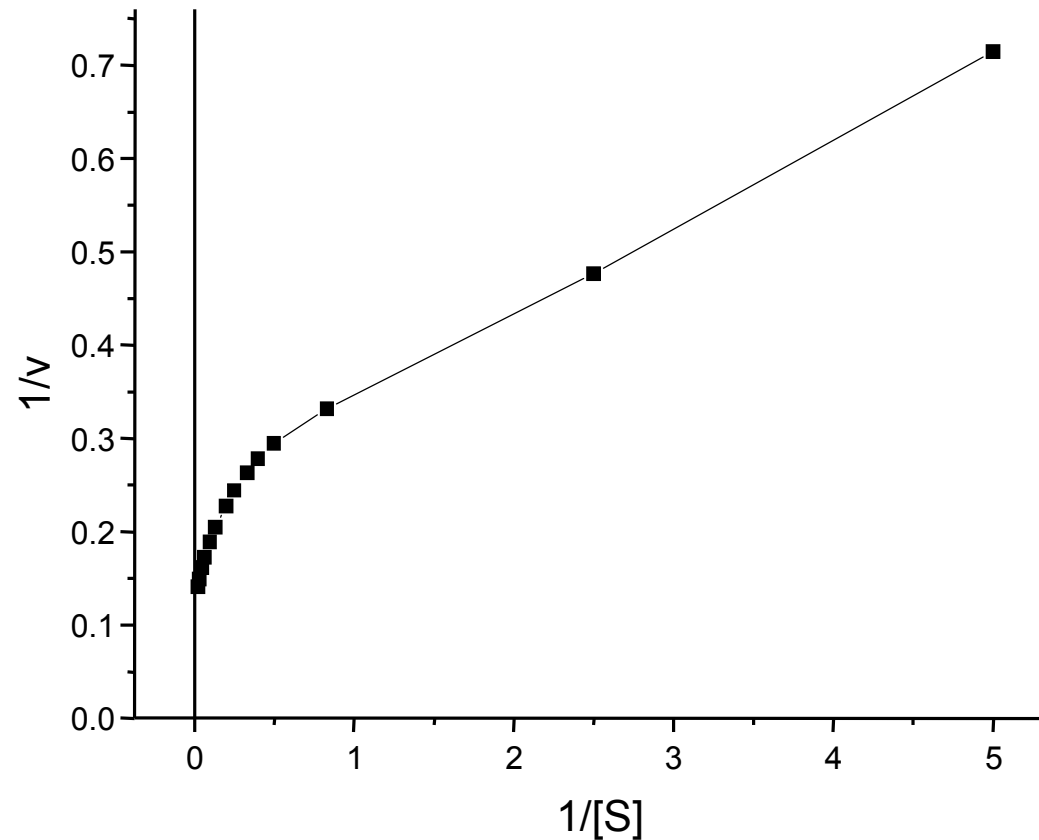


La caracterización cinética de una actividad enzimática en una preparación parcialmente pura proporcionó los siguientes datos de velocidad inicial. A) Determine por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima. B) ¿Podría calcular estas constantes por regresión lineal? C) ¿Qué conclusión o conclusiones podría derivar del análisis de los resultados?



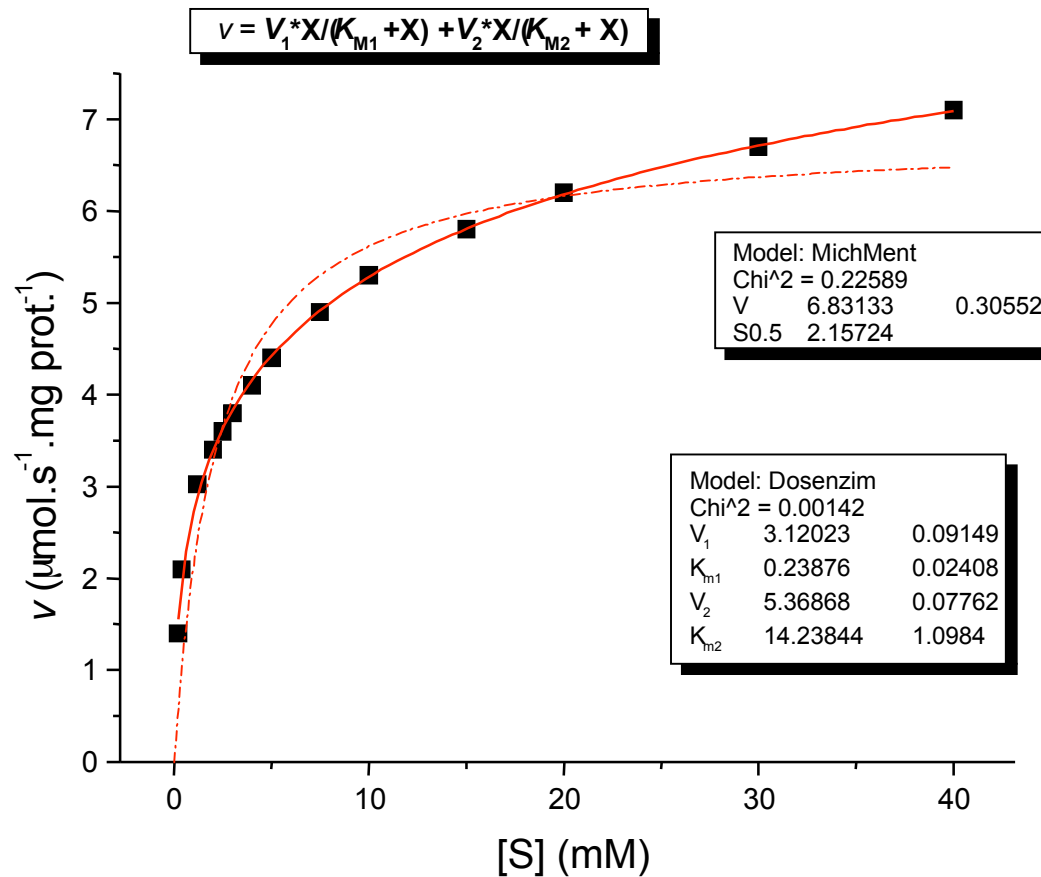
La caracterización cinética de una actividad enzimática en una preparación parcialmente pura proporcionó los siguientes datos de velocidad inicial.

- A) Determine por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima.
- B) ¿Podría calcular estas constantes por regresión lineal?
- C) ¿Qué conclusión o conclusiones podría derivar del análisis de los resultados?



La caracterización cinética de una actividad enzimática en una preparación parcialmente pura proporcionó los siguientes datos de velocidad inicial.

- A) Determine por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima.
- B) ¿Podría calcular estas constantes por regresión lineal?
- C) ¿Qué conclusión o conclusiones podría derivar del análisis de los resultados?



La K_{eq} para la reacción $S \leftrightarrow P$ es 5. Suponga que tenemos una mezcla de $[S] = 2 \times 10^{-4}$ M y $[P] = 3 \times 10^{-4}$ M. A) ¿En qué dirección procederá la reacción si se le agrega a esta mezcla una enzima capaz de catalizar esta reacción? B) Si las constantes cinéticas de esta enzima son: $K_s = 3 \times 10^{-5}$ M, $V_{max\ ida} = 2$ U/mg proteína y $V_{max\ regreso} = 4$ U/mg proteína, ¿a qué velocidad inicial comenzará la reacción hacia el equilibrio?

$$v_{neta} = \frac{V_s [S]/K_s - V_p [P]/K_p}{1 + [S]/K_s + [P]/K_p}$$

A)

$$K_{eq} = 5 \quad [P_0]/[S_0] = 1.5 \quad S \longrightarrow P$$

B)

$$K_{eq} = (V_{max1}/K_s) / (V_{max2}/K_p) = 2 \text{ U mg prot}^{-1} \times K_p / 4 \text{ U mg prot}^{-1} \times 3 \times 10^{-5} \text{ M} = 5$$

$$K_p = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$v_{neta} = \{2 \text{ U mg prot}^{-1} (2 \times 10^{-4} \text{ M} / 3 \times 10^{-5} \text{ M}) - 4 \text{ U mg prot}^{-1} (3 \times 10^{-4} \text{ M} / 3 \times 10^{-4} \text{ M})\} \\ \{1 + (2 \times 10^{-4} \text{ M} / 3 \times 10^{-5} \text{ M}) + (3 \times 10^{-4} \text{ M} / 3 \times 10^{-4} \text{ M})\}$$

$$v_{neta} = 1.08 \text{ U mg prot}^{-1}$$

La reacción $S \leftrightarrow P$ posee una constante de equilibrio (K_{eq}) de 0.1. Para la reacción catalizada por una enzima se han determinado las siguientes constantes cinéticas: $k_{cat\ ida} = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat\ regreso} = 4.6 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, $K_{ma} = 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$, $K_{mp} = 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$.

(A) ¿Son compatibles estos parámetros cinéticos con la termodinámica de la reacción?

$$\frac{(k_{cat1}/K_s)}{(k_{cat2}/K_p)} = K_{eq} = 0.1$$

$$\frac{(k_{cat1}/K_s)}{(k_{cat2}/K_p)} = (3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} / 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}) / (4.6 \times 10^2 \text{ s}^{-1} / 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}) = 0.1$$

SI

(B) ¿En cuál de las dos direcciones pueden alcanzarse velocidades iniciales de reacción más altas?

En el sentido de ida, a [S] saturante, porque $k_{cat1} \gg k_{cat2}$

C) ¿Cuál será la velocidad neta de la reacción cuando $[S] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ y $[P] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$?

$$[P] / [S] = 1 \times 10^{-3} \text{ M} / 1 \times 10^{-2} \text{ M} = 0.1 = K_{eq}$$

$$V_{neta} = V_{ida} - V_{regreso} = 0$$

(D) ¿Cuál es la razón $v_{\text{ida}}/v_{\text{regreso}}$ si $[S] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ y $[P] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$?

$$k_{\text{cat1}}/K_s = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat2}}/K_p = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$
$$v_{\text{ida}} / v_{\text{regreso}} = ([E]_t k_{\text{cat1}}/K_s) [S] / ([E]_t k_{\text{cat2}}/K_p) [P] = 10$$

(E) ¿Cuál será la velocidad neta de la reacción a estas concentraciones de sustrato y producto, si la concentración de enzima es $1 \times 10^{-8} \text{ M}$?

$$v_{\text{net}} = \frac{(3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \times 1 \times 10^{-8} \text{ M} \times 1 \times 10^{-2} \text{ M} / 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}) - (4.6 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \times 1 \times 10^{-8} \text{ M} \times 1 \times 10^{-4} \text{ M} / 2.3 \times 10^{-6} \text{ M})}{(1 + 1 \times 10^{-2} \text{ M} / 1.5 \times 10^{-2} \text{ M} + 1 \times 10^{-4} \text{ M} / 2.3 \times 10^{-6} \text{ M})}$$
$$v_{\text{neta}} = 1.8 \times 10^{-3} \text{ M s}^{-1}$$

F) Si usted pudiese cambiar los parámetros cinéticos de la enzima de manera que maximizara la velocidad neta inicial en el sentido de producción de P manteniendo las mismas concentraciones de S y de P que en el inciso D, ¿qué cambios haría?

$$K_{\text{eq}} = 0.1 = (k_{\text{cat1}}/K_s) / (k_{\text{cat2}}/K_p) = k_{\text{cat1}} K_p / k_{\text{cat2}} K_s$$

Aumentar k_{cat1} y disminuir K_p por el mismo factor hasta que k_{cat2}/K_s alcance el límite permitido, manteniendo que $(k_{\text{cat1}}/K_s) / (k_{\text{cat2}}/K_p) = K_{\text{eq}} = 0.1$ y que $k_{\text{cat2}}/K_p < \text{límite impuesto por la difusión}$

En la siguiente tabla se incluyen las velocidades iniciales de una reacción catalizada por una enzima que sigue cinética de Michaelis Menten, medidas en ausencia (1), y en presencia de dos diferentes inhibidores totales (1 y 2), ambos a una concentración de 10 mM. Se usó la misma concentración de enzima en todas las determinaciones. (A) Determinar las constantes cinéticas de la enzima en ausencia y presencia de los inhibidores. (B) Para cada inhibidor determinar el tipo de inhibición y K_i . (C) ¿Qué información adicional requeriría para calcular el número de recambio (k_{cat}) de la enzima?

A) y B)

Enzima sin inhibidor

$$V_{max} = 9.75 \mu\text{M s}^{-1} \quad K_s = 2.83 \text{ mM} \quad V_{max}/K_s = 3.44 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

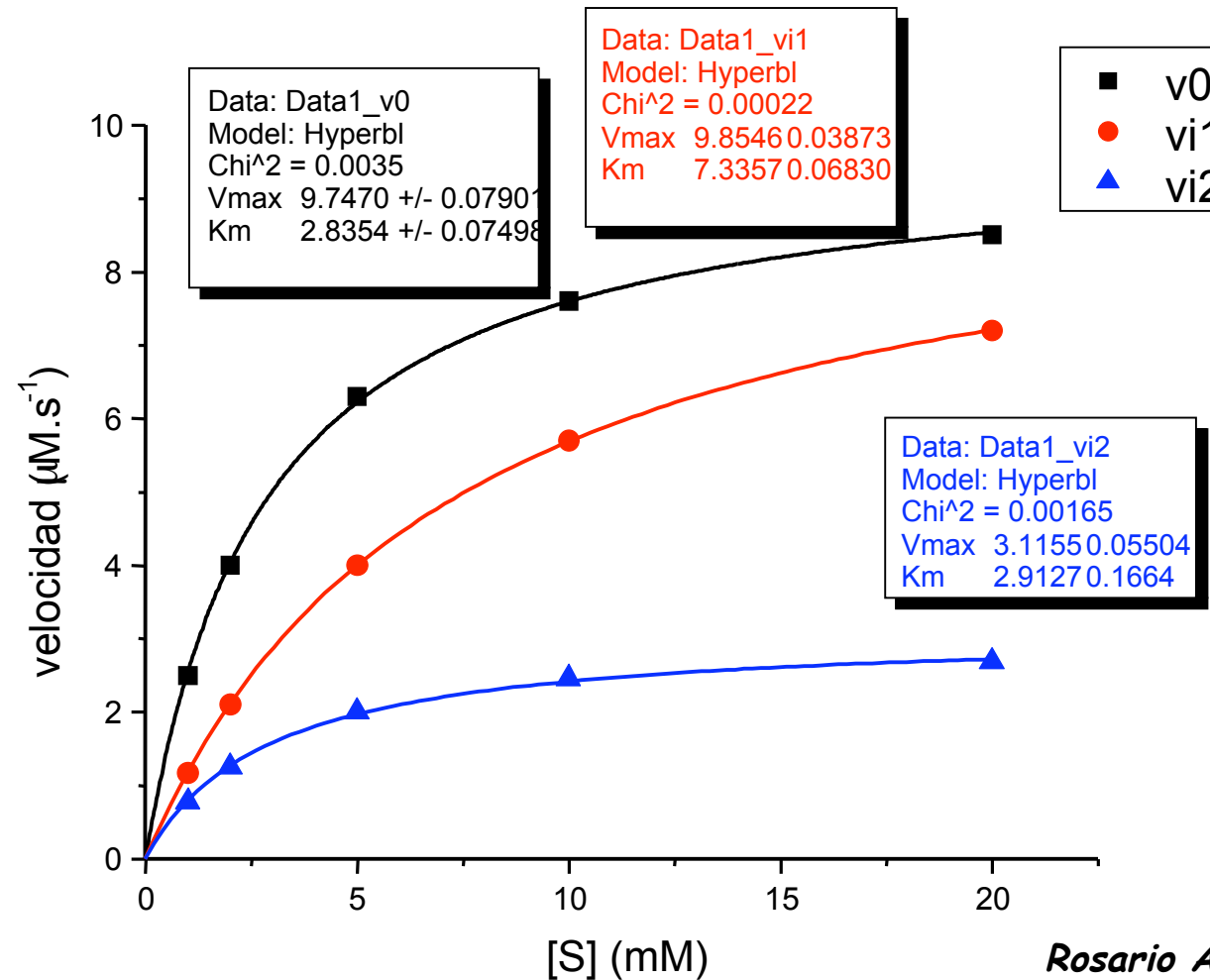
Enzima con inhibidor 1

$$\begin{aligned} (V_{max}/K_s)_{ap} &= (V_{max}/K_s)/(1 + [I]/K_{ic}) \\ (V_{max}/K_s)_{ap} &= 1.34 \times 10^{-3} = 3.44 \times 10^{-3}/(1 + 10/K_{ic}) \\ K_{ic} &= 6.38 \text{ mM} \end{aligned}$$

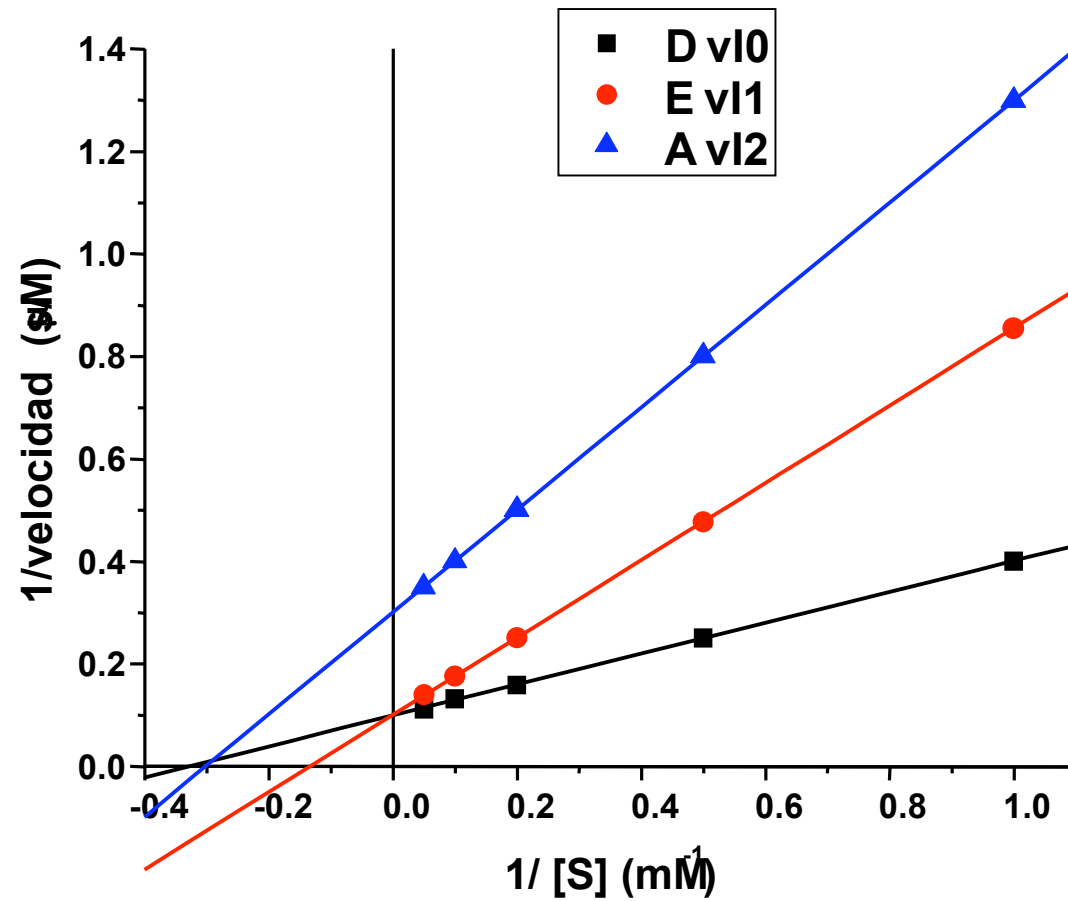
Enzima con inhibidor 2

$$\begin{aligned} V_{max ap} &= V_{max} / (1 + [I]/K_{iu}) \\ V_{max ap} &= 3.11 = 9.75 / (1 + 10/K_{iu}) \\ K_{iu} &= 4.68 \text{ mM} = K_{ic} \end{aligned}$$

En la siguiente tabla se incluyen las velocidades iniciales de una reacción catalizada por una enzima que sigue cinética de Michaelis Menten, medidas en ausencia (1), y en la presencia de dos diferentes inhibidores totales (1 y 2), ambos a una concentración de 10 mM. Se usó la misma concentración de enzima en todas las determinaciones. (A) Determinar las constantes cinéticas de la enzima en ausencia y presencia de los inhibidores. (B) Para cada inhibidor determinar el tipo de inhibición y K_i .



(C) Mostrar el patrón de inhibición en forma de dobles recíprocos.



(D) Si [S] es 5 mM, ¿qué fracción de las moléculas de enzima estarán unidas al sustrato en forma productiva en ausencia de inhibidor, o en presencia de 10 mM del inhibidor tipo 1 o tipo 2?

Enzima sin inhibidor

$$v = k_{cat} [ES], \text{ luego } [ES] / [E]_{total} = [S] / (K_s + [S])$$
$$[ES] / [E]_{total} = 5 \text{ mM} / (2.8 \text{ mM} + 5 \text{ mM}) = 0.64$$

Enzima con inhibidor 1 (Competitivo)

$$[ES] / [E]_{total} = [S] / \{K_s (1 + [I]/K_{ic}) + [S]\}$$
$$[ES] / [E]_{total} = 5 \text{ mM} / (7.33 \text{ mM} + 5 \text{ mM}) = 0.40$$

(62.5% de la fracción en ausencia de inhibidor)

Enzima con inhibidor 2 (No competitivo)

$$[ES] / [E]_{total} = [S] / \{K_s (1 + [I]/K_i) + [S] (1 + [I]/K_i)\}$$
$$[ES] / [E]_{total} = 5 \text{ mM} / (2.8 \text{ mM} \times 3.13 + 5 \times 3.13 \text{ mM}) = 0.20$$

(31% de la fracción en ausencia de inhibidor)

(E) ¿Y en forma no productiva?

***La única enzima que tiene sustrato unido en forma no productiva es
Aquella en presencia del inhibidor 2 (No competitivo)***

$$[ESI] / [E]_{\text{total}} = [I] / \{K_i (1 + K_s/[S]) + [I] (1 + K_s/[S])\}$$

$$[ESI] / [E]_{\text{total}} = 10 \text{ mM} / (4.7 \text{ mM} \times 1.57 + 10 \text{ mM} \times 1.57) = 0.44$$

F) ¿Podría calcular la concentración relativa de todas las especies de la enzima en ausencia y en presencia de los inhibidores?

Enzima sin inhibidor

$$\begin{aligned} [E] / [E]_{\text{total}} &= K_s / (K_s + [S]) \\ [E] / [E]_{\text{total}} &= 2.8 \text{ mM} / (2.8 \text{ mM} + 5 \text{ mM}) = 0.36 \end{aligned}$$

Enzima con inhibidor 1 (Competitivo)

$$\begin{aligned} [E] / [E]_{\text{total}} &= K_s / \{K_s (1 + [I]/K_{ic}) + [S]\} \\ [E] / [E]_{\text{total}} &= 2.8 \text{ mM} / (7.33 \text{ mM} + 5 \text{ mM}) = 0.25 \end{aligned}$$

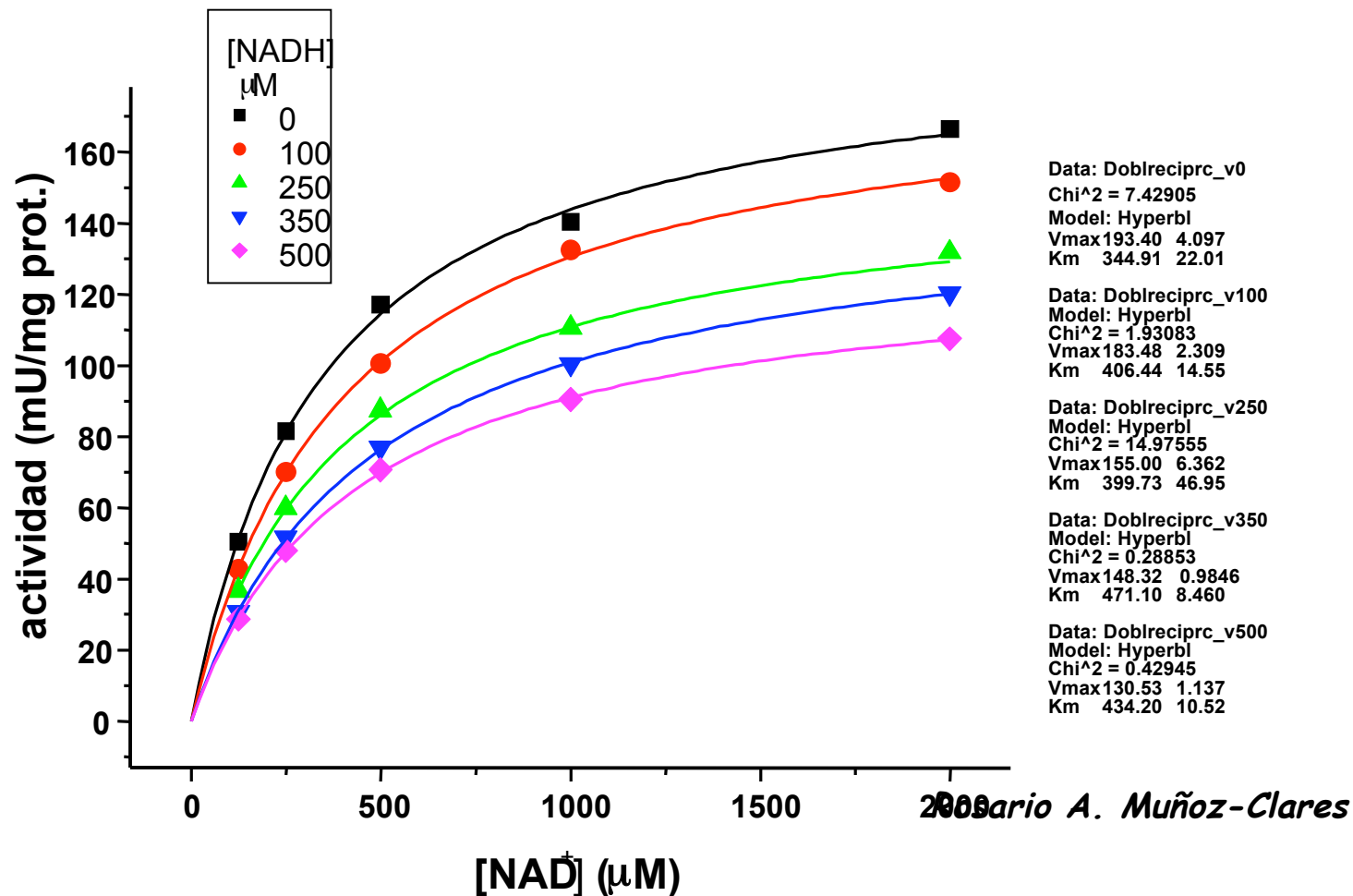
$$\begin{aligned} [EI] / [E]_{\text{total}} &= [I] / \{K_{ic}(1 + [S]/K_s) + [I]\} \\ [EI] / [E]_{\text{total}} &= 10 \text{ mM} / (6.38 \text{ mM} \times 2.77 + 10 \text{ mM}) = 0.35 \end{aligned}$$

Enzima con inhibidor 2 (No competitivo)

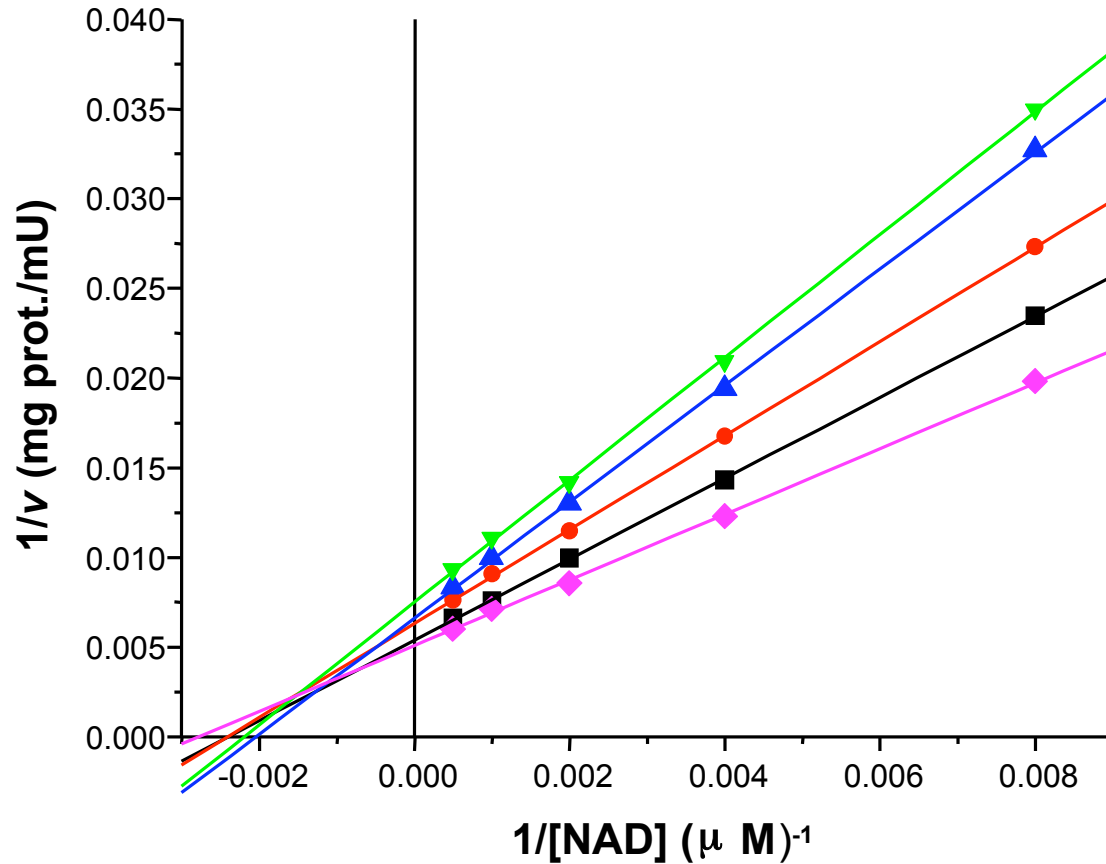
$$\begin{aligned} [E] / [E]_{\text{total}} &= K_s / \{K_s (1 + [I]/K_i) + [S] (1 + [I]/K_i)\} \\ [E] / [E]_{\text{total}} &= 2.8 \text{ mM} / (2.8 \text{ mM} \times 3.13 + 5 \text{ mM} \times 3.13) = 0.12 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [EI] / [E]_{\text{total}} &= [I] / \{K_s (1 + [S]/K_s) + [I] (1 + [S]/K_s)\} \\ [EI] / [E]_{\text{total}} &= 10 \text{ mM} / (4.7 \text{ mM} \times 2.77 + 10 \text{ mM} \times 2.77) = 0.24 \end{aligned}$$

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando NAD^+ como coenzima. Con el fin de conocer el mecanismo cinético que sigue esta enzima se estudió la inhibición de la reacción por el producto NADH , en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de NAD^+ era variable y la de betaína aldehído constante. Los datos de velocidad inicial obtenidos se incluyen en la siguiente tabla. A) Determinar por medio de regresión no lineal el tipo de inhibición.



B) Mostrar los resultados en forma de gráficas de dobles recíprocos.



Linear Regression for Doblreciprc_F:
Y = A + B * X
Param Value sd
A 0.00538 0.00007
B 2.25541 0.01792
R = 0.99991
SD = 0.00011, N = 5
P = 1.1054E-6

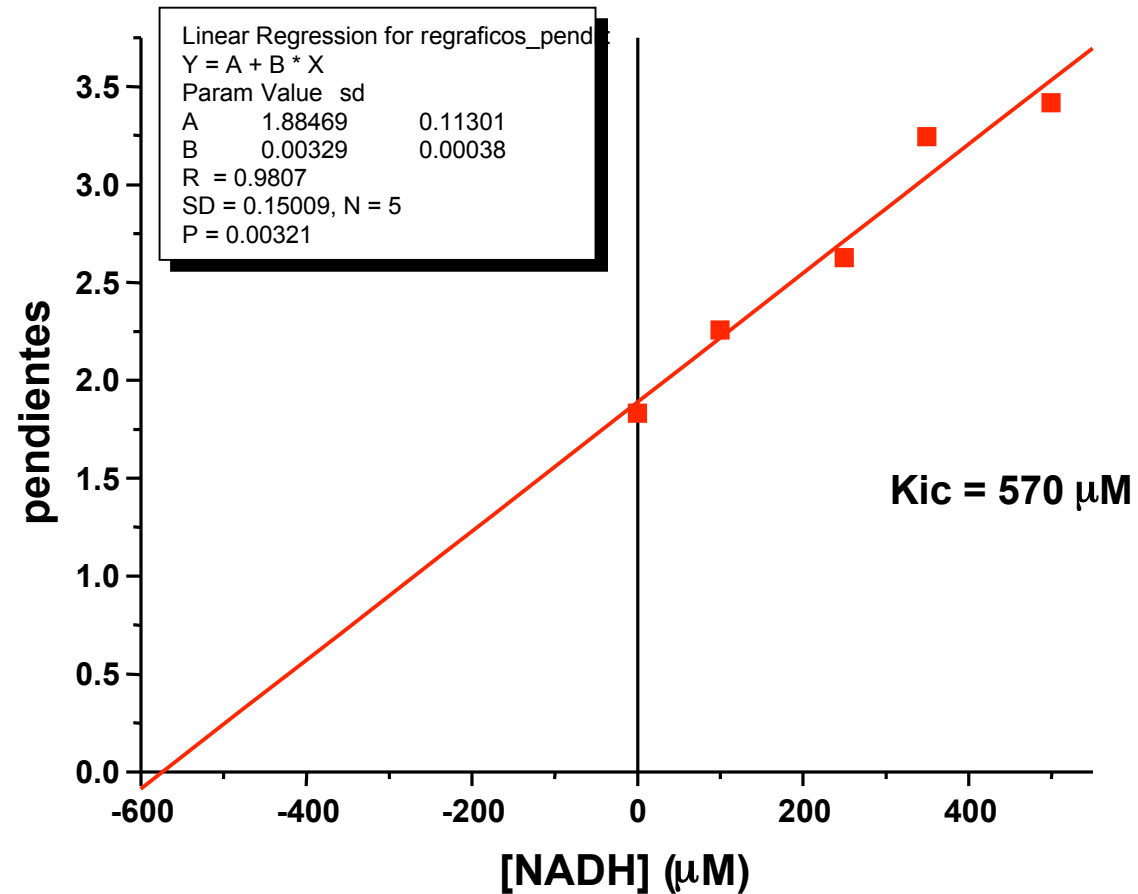
Linear Regression for Doblreciprc_G:
Y = A + B * X
Param Value sd
A 0.00630,00007
B 2.62389 0.0158
R = 0.99935
SD = 0.0001, N = 5
P = 4.8185E-7

Linear Regression for Doblreciprc_H:
Y = A + B * X
Param Value sd
A 0.00661 0.00011
B 3.24464 0.0278
R = 0.99989
SD = 0.00017, N = 5
P = 1.3865E-6

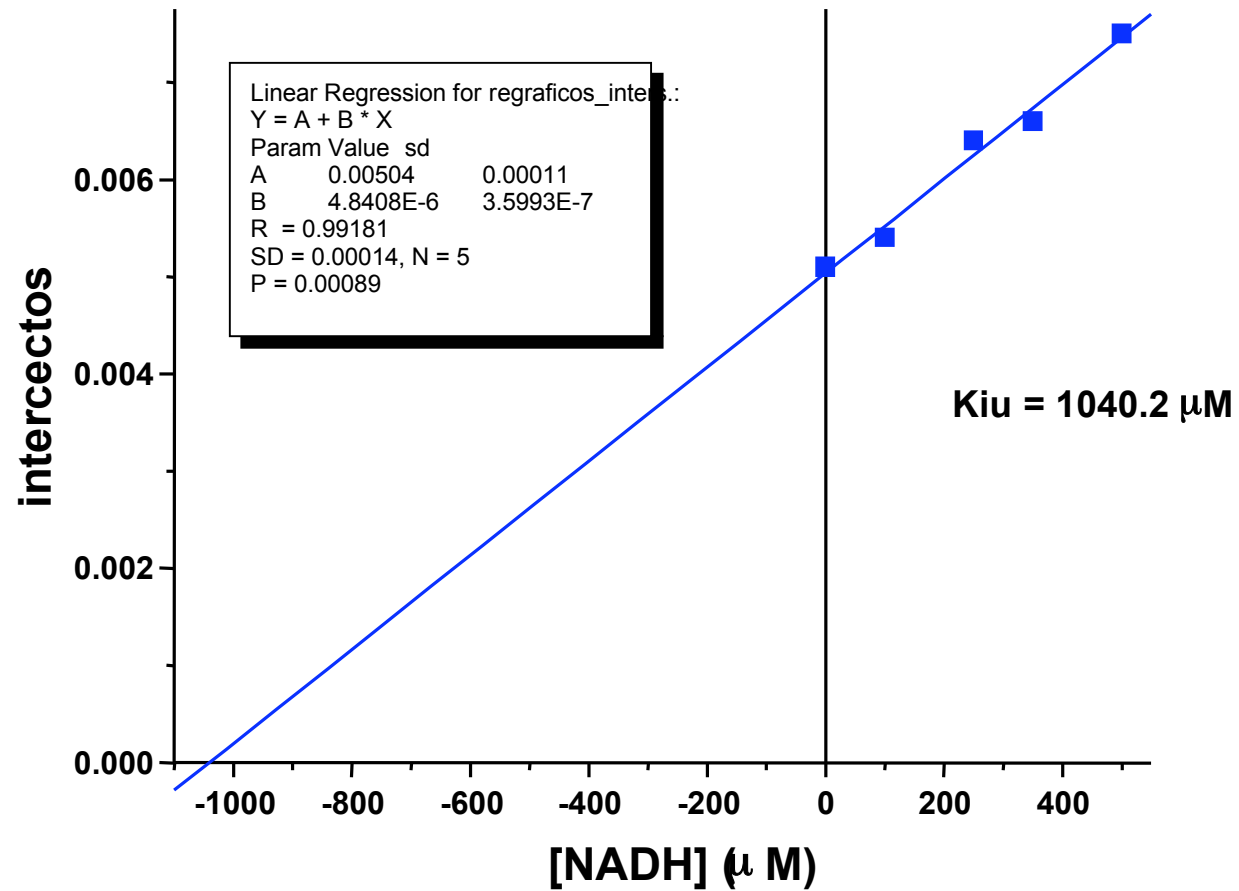
Linear Regression for Doblreciprc_A:
Y = A + B * X
Param Value sd
A 0.00749 0.00015
B 3.41768 0.03515
R = 0.99994
SD = 0.00021, N = 5
P = 2.3977E-6

Linear Regression for Doblreciprc_B:
Y = A + B * X
Param Value sd
A 0.00508 0.00013
B 1.83063 0.03105
R = 0.99957
SD = 0.00019, N = 5
P = 0.00001

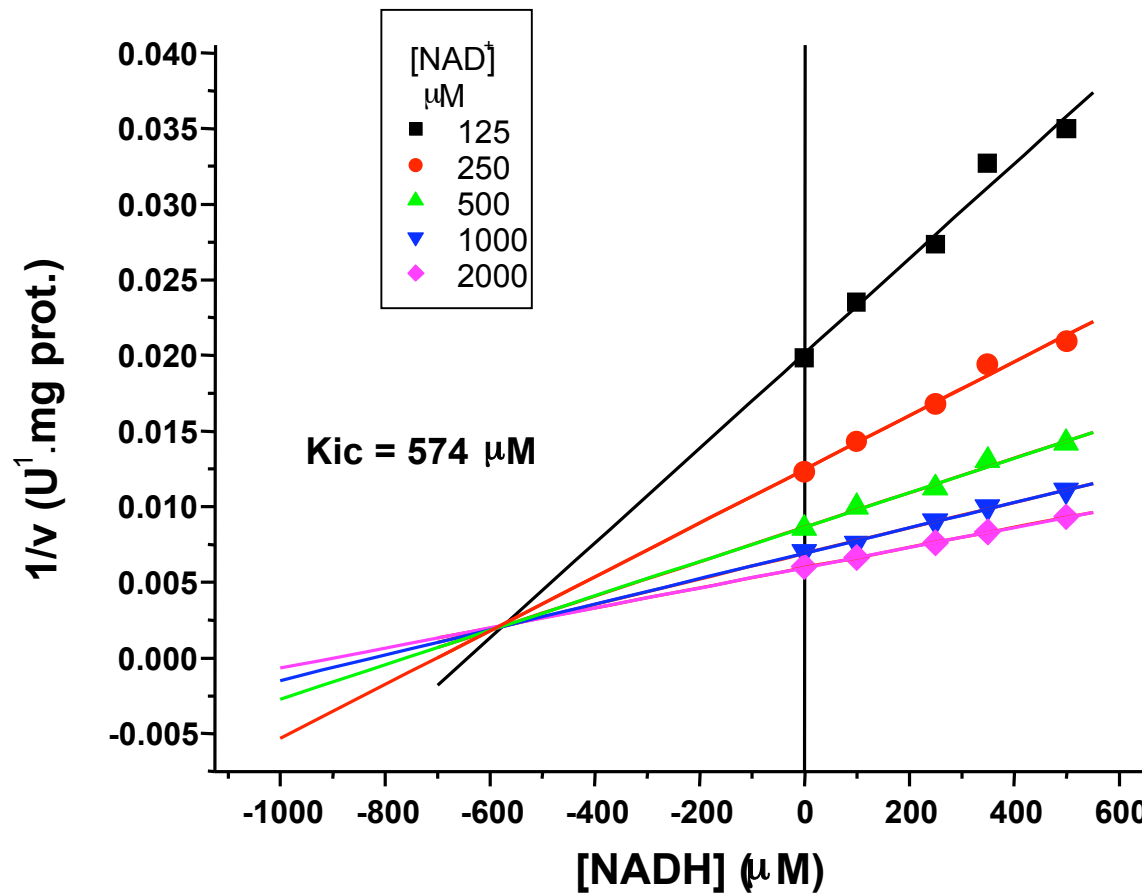
C) Calcular la(s) constante(s) de inhibición del NADH por medio de regráficos de interceptos y/o pendientes de estos últimos.



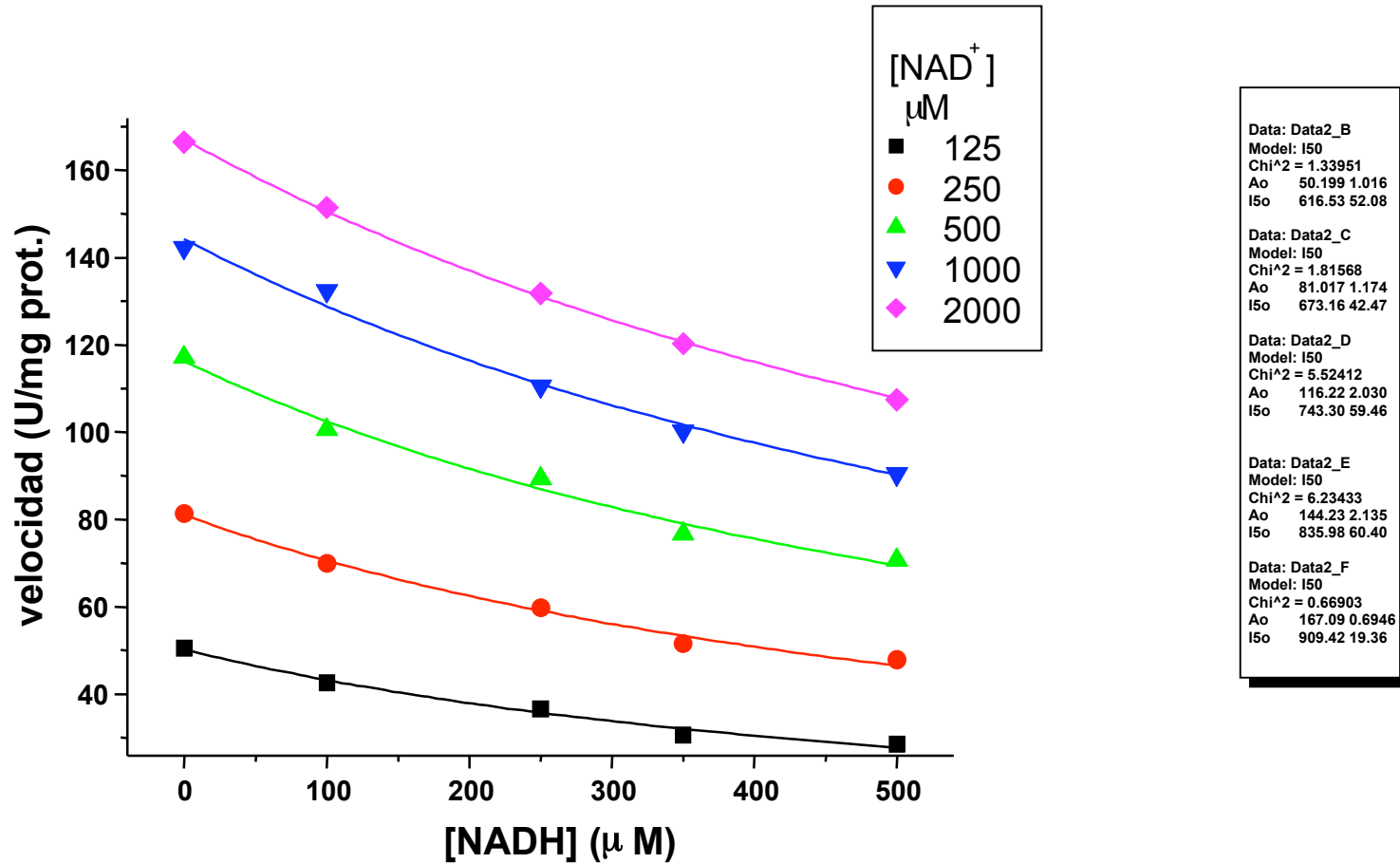
C) Calcular la(s) constante(s) de inhibición del NADH por medio de regráficos de interceptos y/o pendientes de estos últimos.



D) Graficar los datos $1/v$ versus la concentración de inhibidor (gráficas de Dixon) y calcular por este método gráfico la(s) constante(s) de inhibición.



D) Graficar los datos $1/v$ versus la concentración de inhibidor (gráficas de Dixon) y calcular por este método gráfico la(s) constante(s) de inhibición.



A) Deducir la ecuación que relaciona el valor de I_{50} de un inhibidor competitivo con la concentración de sustrato y la K_s para ese sustrato.

$$\frac{v_i}{v_0} = 0.5 = \frac{\frac{V_{max} [S]}{K_s(1 + I_{50}/K_{ic}) + [S]}}{\frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]}} = \frac{K_{ic} (K_s + [S])}{K_s(K_{ic} + I_{50}) + K_{ic} [S]} = \frac{K_{ic} (K_s + [S])}{K_{ic} (K_s + [S]) + I_{50} K_s}$$

$$K_{ic} (K_s + [S]) = I_{50} K_s$$

$$I_{50} = K_{ic} (1 + [S]/K_s)$$

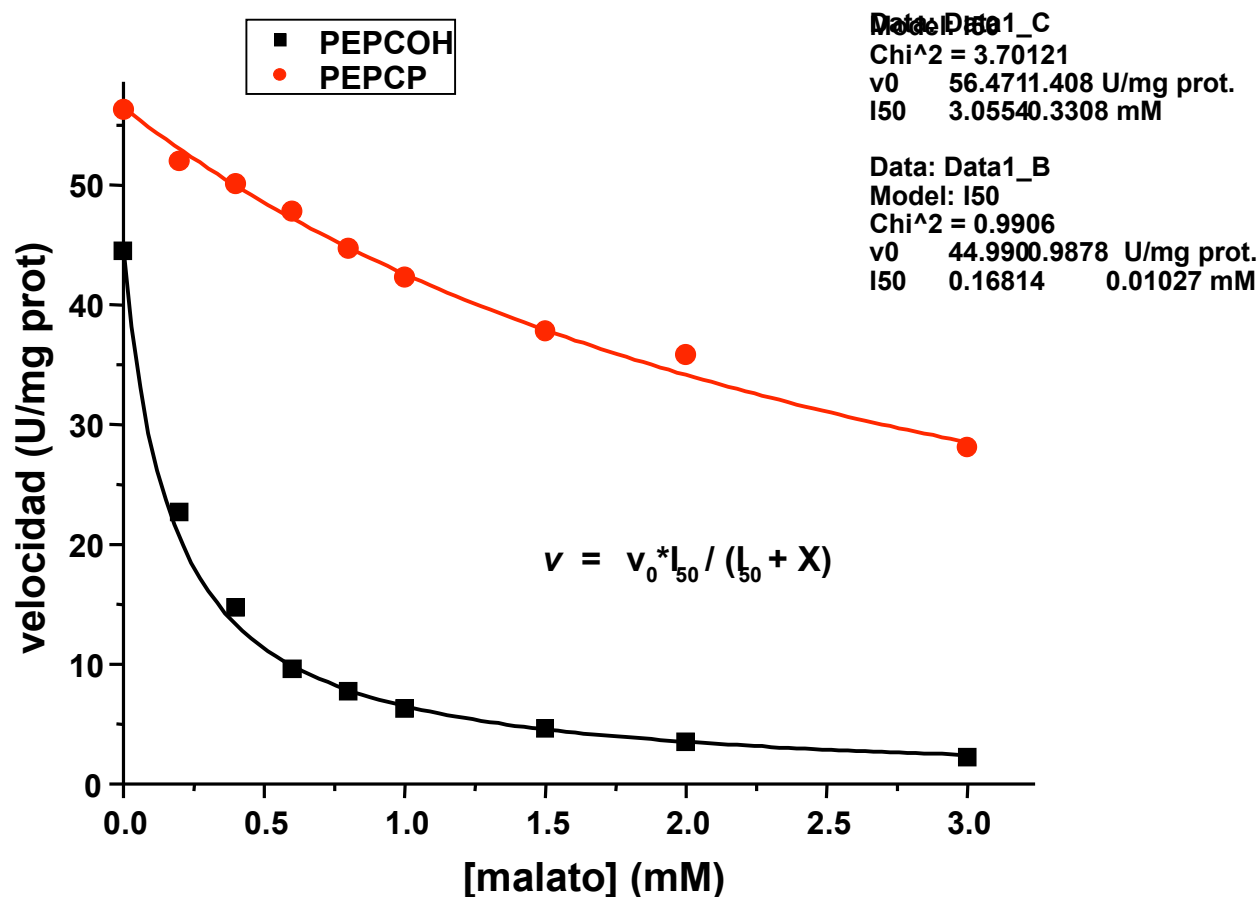
B) Para el mismo tipo de inhibidor, deducir la siguiente ecuación:

$v_i = v_0 I_{50} / (I_{50} + [I])$, en donde v_i es la velocidad obtenida en presencia del inhibidor, v_0 es la velocidad en ausencia de inhibidor, I_{50} es la concentración de inhibidor que reduce la velocidad a la mitad de la velocidad no inhibida e $[I]$ es la concentración de inhibidor.

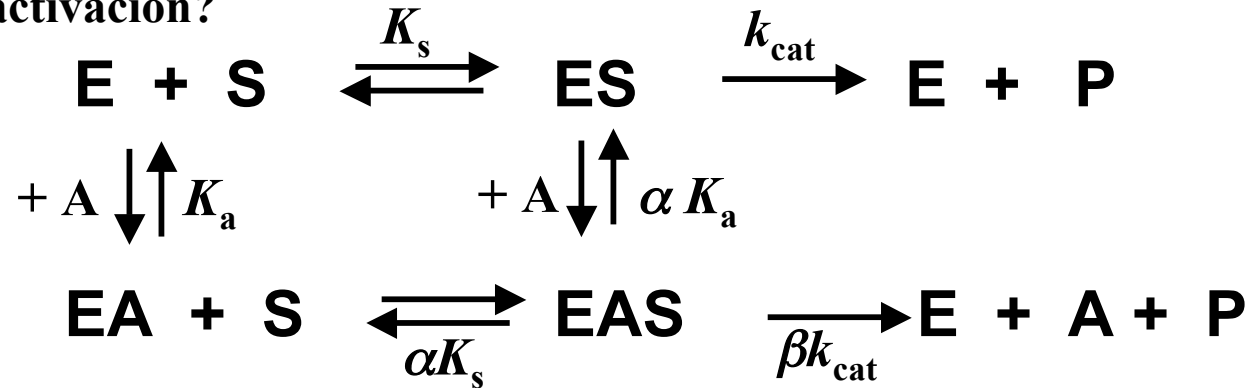
$$v_i = \frac{v_0 I_{50}}{I_{50} + [I]} = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]} \left[\frac{K_{ic} (1 + [S]/K_s)}{K_{ic} (1 + [S]/K_s) + [I]} \right] = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]} \left[\frac{K_s K_{ic} + K_{ic} [S]}{K_s K_{ic} + K_{ic} [S] + K_s [I]} \right]$$

$$v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]} \left[\frac{K_{ic} (K_s + [S])}{K_{ic} (K_s + [S]) + K_s [I]} \right] = \frac{V_{max} [S]}{K_s (1 + [I]/K_{ic}) + [S]}$$

Se estudió la sensibilidad al inhibidor malato de las formas fosforilada (PEPC-P, forma de luz) y desfosforilada (PEPC-OH, forma de oscuridad) de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de hoja de maíz a una concentración fija, subsaturante, de sus sustratos y a pH neutro. Se obtuvieron los datos de velocidad inicial incluidos en la siguiente tabla. Usando la ecuación que relaciona la velocidad de la reacción en presencia del inhibidor con la concentración de inhibidor dada en el ejercicio anterior, calcular los valores de I_{50} para las dos formas de la enzima y discutir los resultados.



(A) Asumiendo que se sigue el supuesto de equilibrio rápido, deduzca la ecuación de velocidad inicial para una reacción monosustrato que es activada por un activador no esencial que puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. (B) ¿Cuál sería el análisis gráfico que debería hacerse en este caso para el diagnóstico del mecanismo de activación?



A)

$$v = \frac{[E]_t k_{\text{cat}} [S]/K_s + [E]_t \beta k_{\text{cat}} [S][A]/K_s \alpha K_a}{1 + [S]/K_s + [A]/K_a + [S][A]/K_s \alpha K_a}$$

$$v = \frac{[E]_t k_{\text{cat}} [S] (1 + \beta[A]/\alpha K_a)}{K_s (1 + [A]/K_a) + [S] (1 + [A]/\alpha K_a)}$$

B) Re gráfico de pendientes y de intersechos de una gráfica de dobles inversos a diferentes concentraciones de activador

$$\begin{aligned}
 V_{\text{max ap}} &= V_{\text{max}} (1 + \beta[A]/\alpha K_a) / (1 + [A]/\alpha K_a) = V_{\text{max}} (\alpha K_a + \beta[A]) / (\alpha K_a + [A]) \\
 (V_{\text{max}}/K_m)_{\text{ap}} &= (V_{\text{max}}/K_m) (1 + \beta[A]/\alpha K_a) / (1 + [A]/K_a) = (V_{\text{max}}/K_m) (\alpha K_a + \beta[A]) / (\alpha K_a + [A])
 \end{aligned}$$

Ambos re gráficos son hipérbolas equiláteras que no pasan por el origen