

Enzimas

- **Las enzimas son catalizadores biológicos que disminuyen la energía de activación de las reacciones que catalizan, pero no modifican la constante de equilibrio.**
- **Por tanto aceleran en igual proporción la velocidad de la reacción en las dos direcciones.**

Necesidad de la biocatálisis

- *¿Por qué la gran mayoría de las reacciones en los seres vivos necesitan ser catalizadas para que ocurran a una velocidad apreciable?*
 - **Porque de lo contrario estarían todas en el equilibrio.**
 - **Porque así la célula puede regular en forma diferencial su velocidad, regulando la actividad de los catalizadores de cada una de ellas.**

Reacción catalizada por enzimas



VENTAJAS DE LAS ENZIMAS SOBRE LOS CATALIZADORES INORGÁNICOS

- *EFICIENCIA*
- *CONDICIONES SUAVES DE REACCIÓN*
- *ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN*
- *CAPACIDAD DE REGULACIÓN*

table 8-5

**Some Rate Enhancements Produced
by Enzymes**

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

¿QUÉ TANTO ACELERAN LAS ENZIMAS LAS VELOCIDADES DE LAS REACCIONES?

La reacción en que una molécula de orotidina monofosfato pierde un CO₂ ocurre 10¹⁷ veces más rápida cuando es catalizada por la enzima *orotidina monofosfato descarboxilasa* que cuando no es catalizada

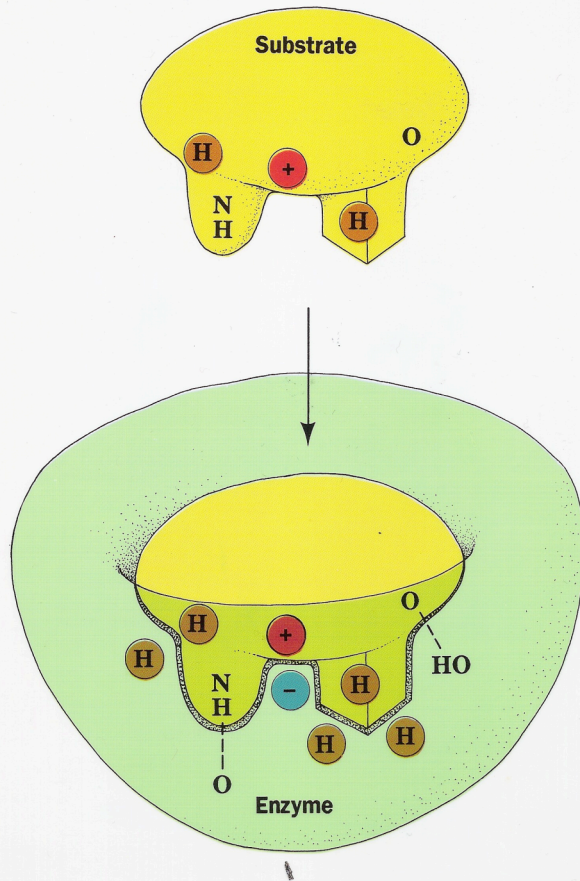
$$10^{17} = 100.000.000.000.000.000$$

CIEN MIL BILLONES DE VECES MÁS RÁPIDA

Especificidad de la catálisis enzimática

- **La catálisis enzimática requiere:**
 - ***Unión específica*** a la proteína de las moléculas de sustrato y de moléculas reguladoras.
 - ***Reactividad específica*** de la proteína con el(los) sustrato(s).

Unión específica

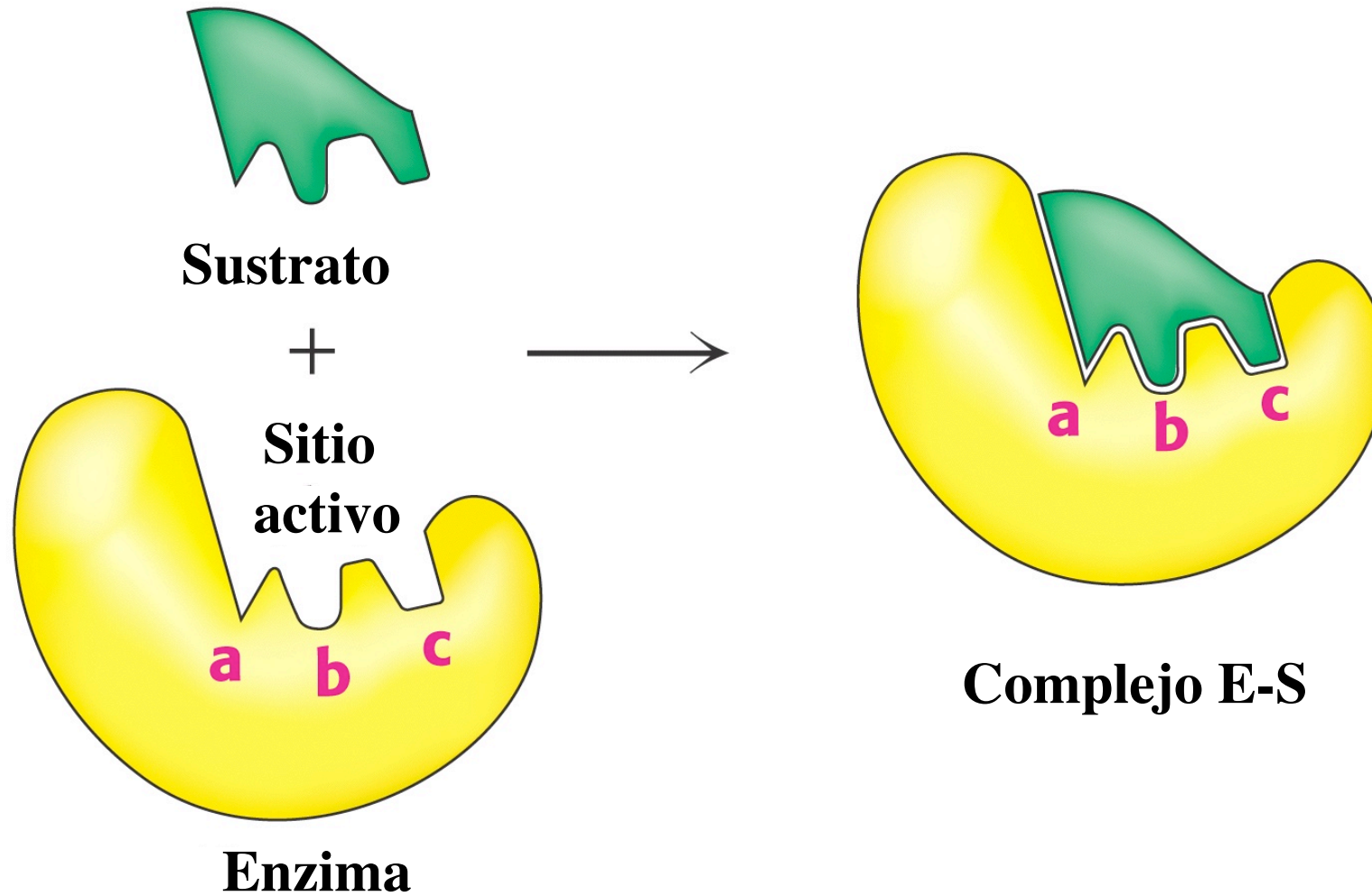


- *La(s) molécula(s) que va(n) a reaccionar, llamadas **sustrato(s)**, se unen a una región en la superficie de la enzima llamada **sitio activo**.*

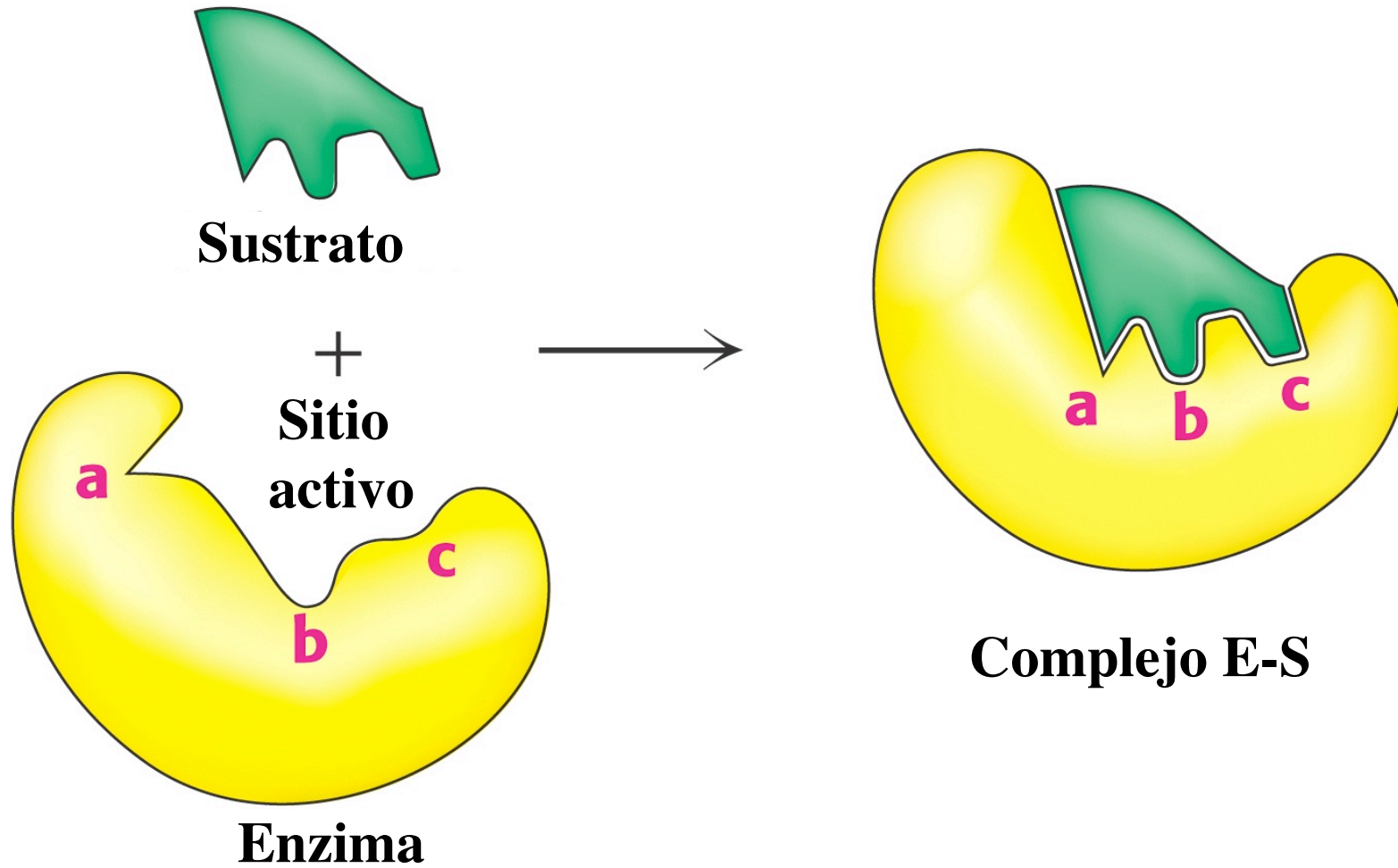
TEORÍAS DE UNIÓN ESPECÍFICA DEL SUSTRATO

- *Existen dos teorías para explicar la unión específica:*
 - *TEORÍA DE LA LLAVE Y LA CERRADURA*
 - *TEORÍA DEL AJUSTE INDUCIDO*

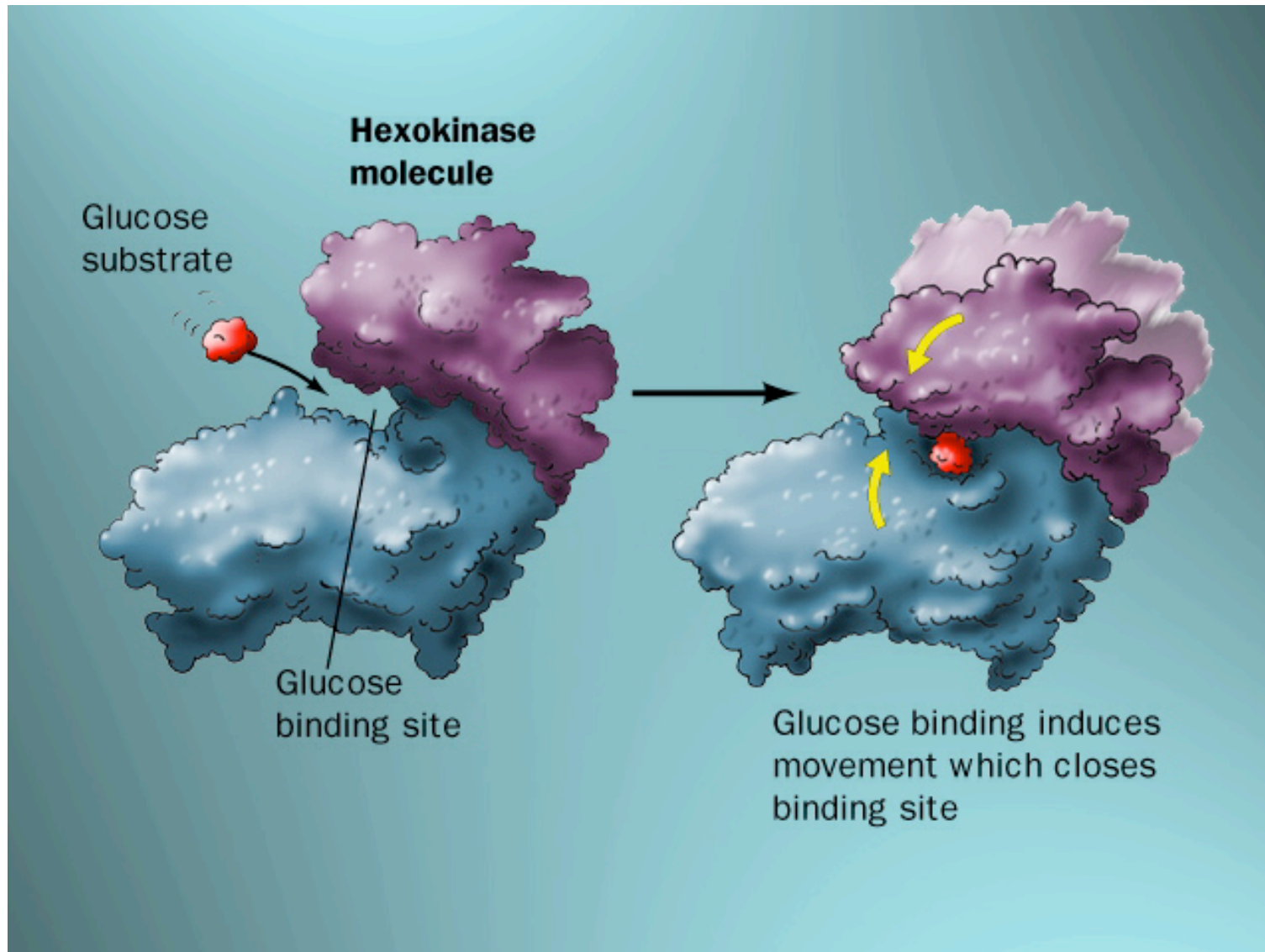
TEORÍA DE LA LLAVE Y LA CERRADURA



TEORÍA DEL AJUSTE INDUCIDO



AJUSTE INDUCIDO



COFACTORES

- **METALES**
- **COENZIMAS**

Ambos pueden ser:

- **SOLUBLES**
- **GRUPOS PROSTÉTICOS**

**{ Apoenzima
Holoenzima**

table 8-1

Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

table 8-2

Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

*The structure and mode of action of these coenzymes are described in Part III of this book.

table 8–3

International Classification of Enzymes*

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

*Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

Clasificación de enzimas

ALCOHOL DESHIDROGENASA

EC 1.1.1.1

- *Clase* : 1 (oxidoreductasa)
- *Subclase* : 1 (actúa sobre un sustrato que posee un grupo CH-OH como donador de electrones)
- *Subsubclase* : 1 (NAD⁺ o NADP⁺ es el coenzima aceptor)
- *Orden dentro de la subsubclase* : 1 (primera enzima de este grupo)

UNIDADES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Actividad

Unidad Internacional (U) = $\mu\text{mol producto/min}$

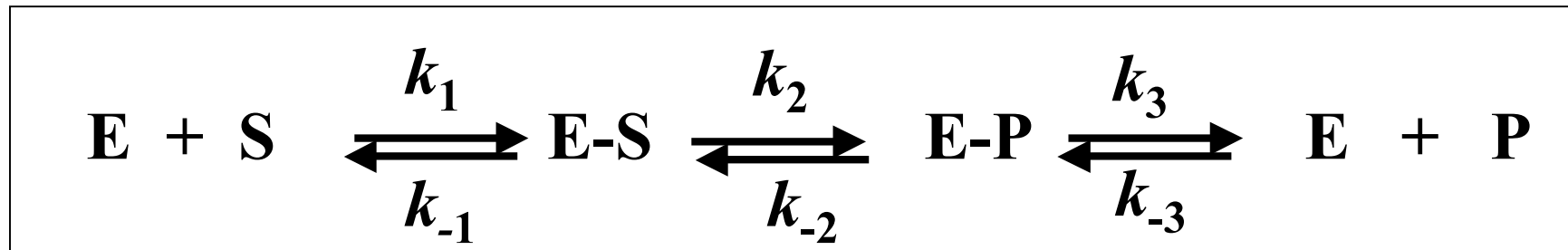
Katal = mol producto/s

Actividad específica

U/mg proteína

Katal/mg proteína

Reacción catalizada por enzimas



- *Las constantes de velocidad de los pasos elementales son de orden 1 y 2*
- *El orden global de la reacción con respecto a [S] va de 1 a 0*
- *Los estudios cinéticos clásicos de estado estacionario no nos permiten determinar el valor de estas constantes*

Valores límites de las constantes de velocidad de una reacción catalizada

A) Primer orden



Limitado por la frecuencia vibracional acoplada de los núcleos en la coordenada de la reacción.



Limitado por las interacciones favorables en el complejo que deben romperse para que se produzca la disociación.

B) Segundo orden



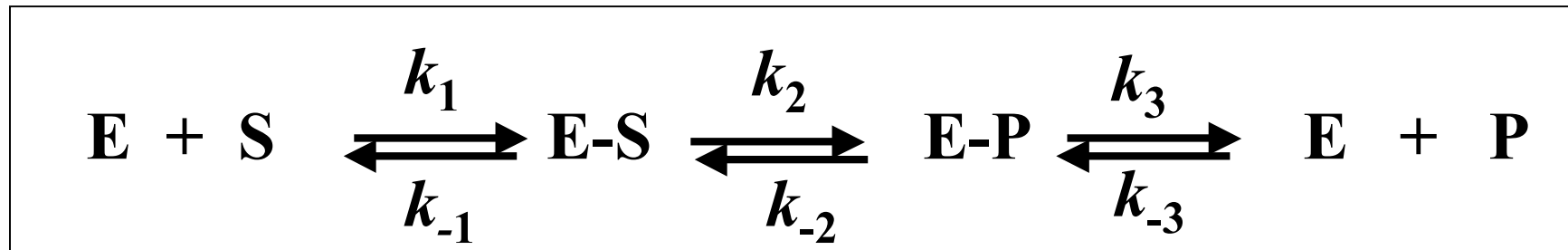
Limitado por la velocidad a la que las moléculas se encuentran para formar el complejo activado (limitado por la difusión).

Caracterización cinética de las enzimas

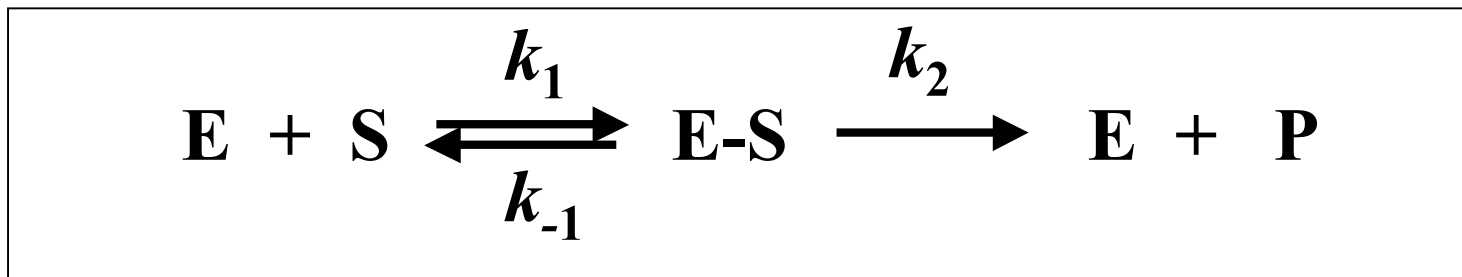
- *Determinar la velocidad inicial de la reacción catalizada*
 - Variando la concentración de sustrato(s) y manteniendo la concentración de enzima constante.
 - Variando la concentración de enzima y manteniendo la concentración de sustrato(s) constante.
- *Determinar los parámetros o constantes cinéticas:*
 - V_{max} , k_{cat} , K_m , V_{max}/K_m , k_{cat}/K_m
- *Determinar el mecanismo cinético:*
 - Equilibrio rápido o estado estacionario.
 - Secuencial o ping pong.
 - Ordenado o al azar.

Reacción catalizada por enzimas

A) Reversible



B) Irreversible simplificada



Determinación de la dependencia de la velocidad de la reacción catalizada de la [S]



- **Para relacionar los cambios en velocidad con la [S] necesitamos una ecuación de velocidad**
 - Si seguimos el curso temporal de la reacción a una sola concentración inicial de sustrato, necesitamos integrar con respecto al tiempo los cambios de concentración de sustrato o de producto (ecuación de Michaelis Menten integrada).
 - Si determinamos las velocidades iniciales a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, utilizamos la ecuación de Michaelis Menten.
- **En ambos casos la concentración de enzima debe ser muy inferior a la de sustrato.**

Condiciones en las que aplica la ecuación de Michaelis-Menten

- **Velocidad inicial**
- **Ausencia de producto**
- **Concentración de sustrato muy superior a la concentración de enzima**

Todo ello para asegurarnos de que la concentración del sustrato permanece “casi” constante durante el periodo de tiempo en que medimos la reacción

Especies de enzima y sustrato

$$[E]_0 = [E]_{\text{total}} = [E] + [ES]$$

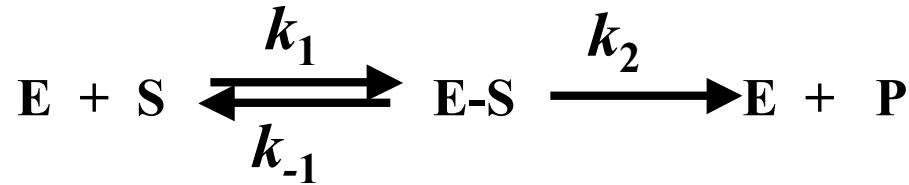
$$[S]_0 = [S]_{\text{total}} = [S] + [ES]$$

Puesto que:

- 1) $[S]_0 \gg [E]_0$
- 2) Se miden velocidades iniciales

$$[S]_{\text{total}} = [S]_0 = [S]$$

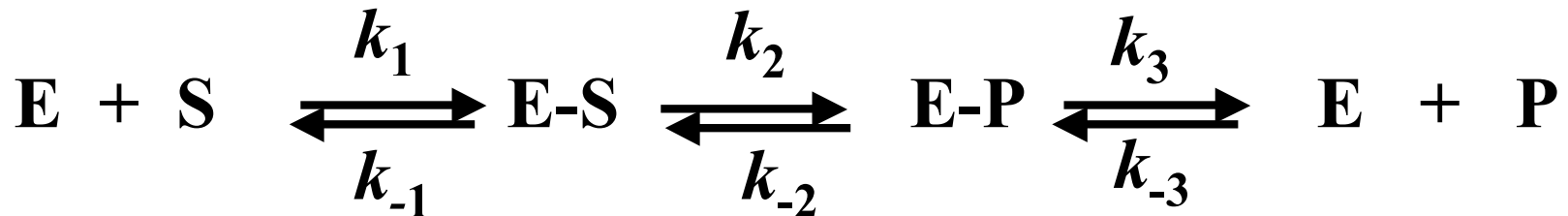
Condiciones de la reacción catalizada



- ***EQUILIBRIO RÁPIDO***

- Se da cuando $k_{-1} > k_{\text{cat}}$
- Aunque parte de ES va hacia formación de P, ésta es pequeña comparada con la parte que se va de regreso a E y S.
- Por ello, se puede asumir que se establece un “cuasi” equilibrio entre E y S por un lado y ES por otro.
- Esto nos va a permitir determinar la [ES].

Condiciones de la reacción catalizada



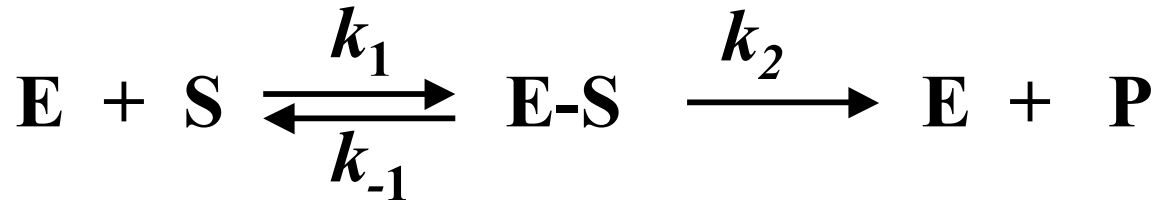
- ***EQUILIBRIO RÁPIDO***

Se da cuando $k_{-1} > k_2$ en la reacción de ida y $k_3 > k_{-2}$ en la reacción de regreso.

La unión de sustratos o la disociación de productos son muy rápidas comparadas con los pasos químicos.

A saturación del sustrato la velocidad será igual a k_2 (reacción de ida) o k_{-2} (reacción de regreso). Es decir el valor de k_{cat} será igual al de k_2 o k_{-2}

Ecuación de velocidad de la reacción catalizada (equilibrio rápido)



$$v = k_{cat}[\text{ES}]$$

$$[\text{E}_{total}] = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

$$\text{¿}[\text{ES}]/[\text{E}_{total}]?$$

$$K_s = [\text{E}][\text{S}]/[\text{ES}], \quad [\text{ES}] = [\text{E}][\text{S}]/K_s,$$

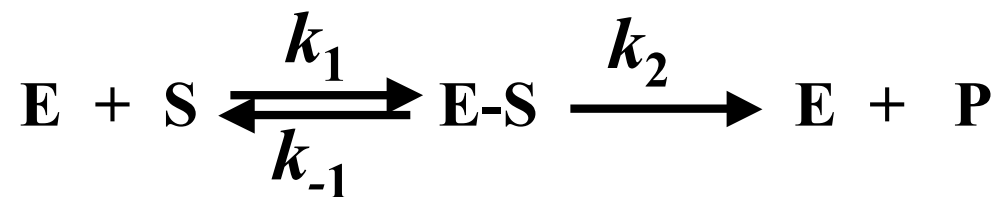
$$[\text{ES}]/[\text{E}_{total}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]/K_s}{[\text{E}] + [\text{E}][\text{S}]/K_s} = [\text{S}]/(K_s + [\text{S}])$$

$$v = k_{cat}[\text{E}_{total}][\text{S}]/(K_s + [\text{S}])$$

ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Condiciones de la reacción catalizada



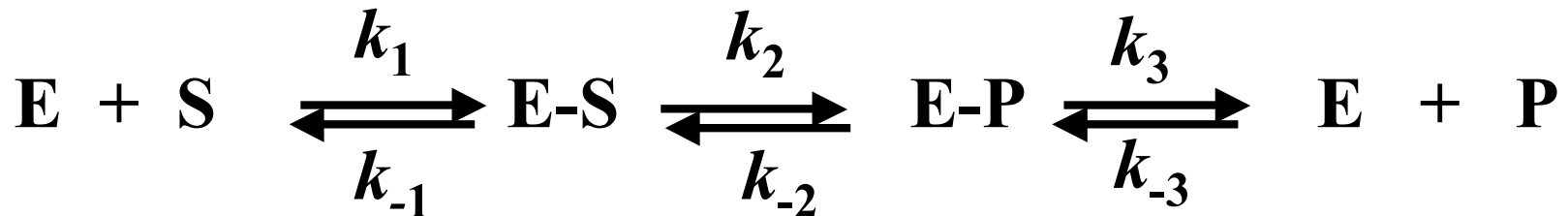
- ***EQUILIBRIO RÁPIDO***

Se da cuando $k_{-1} > k_2$

- ***ESTADO ESTACIONARIO***

Se da cuando $k_{-1} < k_2$

Condiciones de la reacción catalizada



- ***EQUILIBRIO RÁPIDO***

Se da cuando $k_{-1} > k_2$ en la reacción de ida y $k_3 > k_{-2}$ en la reacción de regreso.

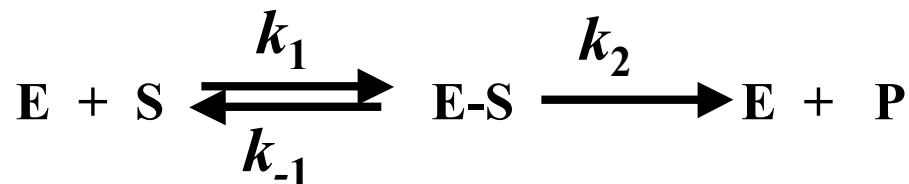
El valor de k_{cat} es k_2 (reacción de ida) o k_{-2} (reacción de regreso).

- ***ESTADO ESTACIONARIO***

Se da cuando $k_{-1} < k_2$ en la reacción de ida y $k_3 < k_{-2}$ en la reacción de regreso.

El valor de k_{cat} puede estar determinado por k_2 o k_3 (reacción de ida) o por k_{-2} o k_{-1} (reacción de regreso).

Condiciones de la reacción catalizada



- ***ESTADO ESTACIONARIO***
 - Se da cuando $k_{-1} < k_2$
 - La mayor parte de ES va hacia formación de producto, por lo que no regresa casi nada a E + S y no se puede establecer el “cuasi” equilibrio entre E, S y ES.
 - Se establece un estado estacionario en el que la concentración de ES no cambia en un periodo de la reacción (llamado por esto de estado estacionario).
 - Esto nos va a permitir determinar la [ES].

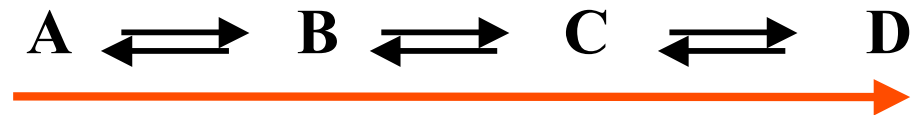
EQUILIBRIO QUÍMICO vs ESTADO ESTACIONARIO (Reacciones no catalizadas por enzimas)

- *Equilibrio químico:*



- Puede involucrar sólo a una reacción reversible.
- Cuando se establece el equilibrio:
 - la velocidad neta de la reacción es cero.
 - la concentración de reactivos y productos es constante.

- *Estado estacionario:*



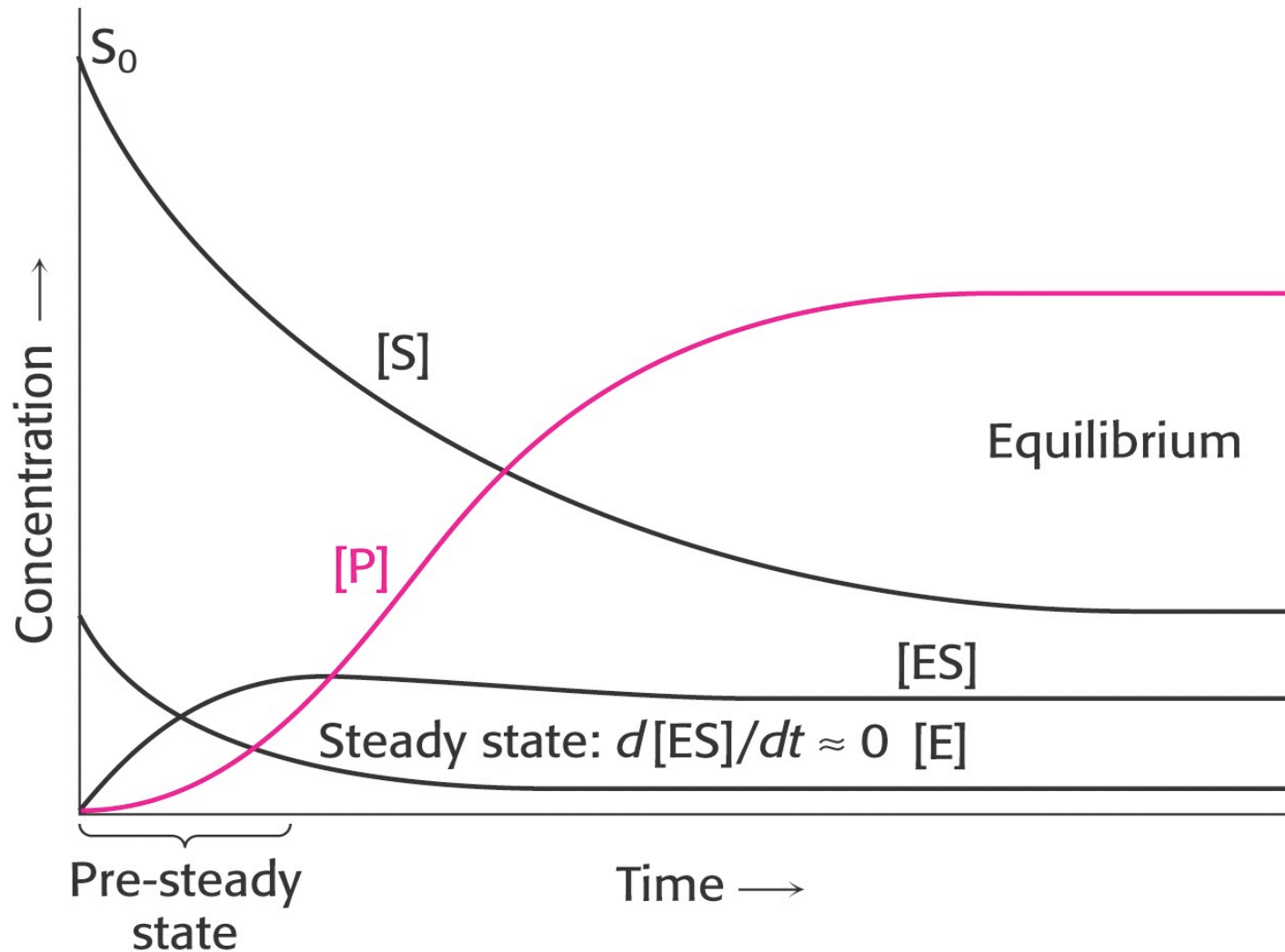
- Involucra varias reacciones reversibles consecutivas, en las que el producto de una es sustrato de la siguiente.
- Cuando se establece el estado estacionario:
 - existe un flujo neto hacia los productos
 - las concentraciones del reactivo inicial y del producto final cambian.
 - las concentraciones de los intermediarios son constantes.
 - las velocidades de todos los pasos son iguales.

Rosario A. Muñoz-Clares

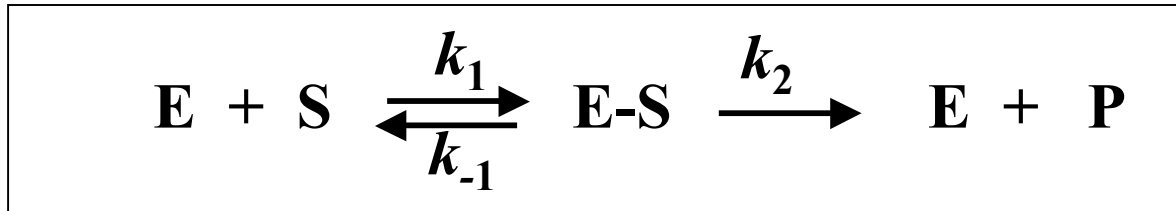
USO DEL TÉRMINO ESTADO ESTACIONARIO

- *Se puede usar para indicar una característica de la reacción catalizada, en contraposición a la de equilibrio rápido.*
- *Se puede usar para indicar el periodo de tiempo en el que se mide una reacción, de segundos a minutos, en contraposición al periodo de pre-estado estacionario que va de milisegundos a segundos.*

CURSO TEMPORAL DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS



Ecuación de velocidad de la reacción catalizada (estado estacionario)



$$v = k_2[\text{ES}]$$

$$[\text{E}]_{\text{total}} = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

$$\text{¿}[\text{ES}] / [\text{E}]_{\text{total}}\text{?}$$

$$d[\text{ES}] / dt = 0, \quad k_1[\text{E}][\text{S}] = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$$

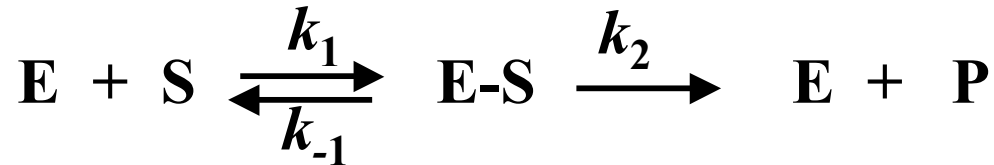
$$[\text{ES}] = k_1[\text{E}][\text{S}] / (k_{-1} + k_2)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$[\text{ES}] / [\text{E}]_{\text{total}} = \frac{[\text{E}][\text{S}] / K_m}{[\text{E}] + [\text{E}][\text{S}] / K_m} = [\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$$

$$v = [\text{E}]_{\text{total}} k_2 [\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$$

Variables de la ecuación de velocidad de la reacción catalizada



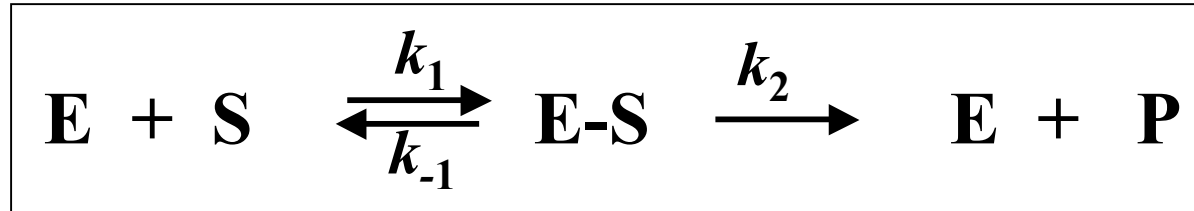
$$v = k_2[\text{E}_{\text{total}}][\text{S}]/(K_m + [\text{S}])$$

Variable dependiente : velocidad inicial

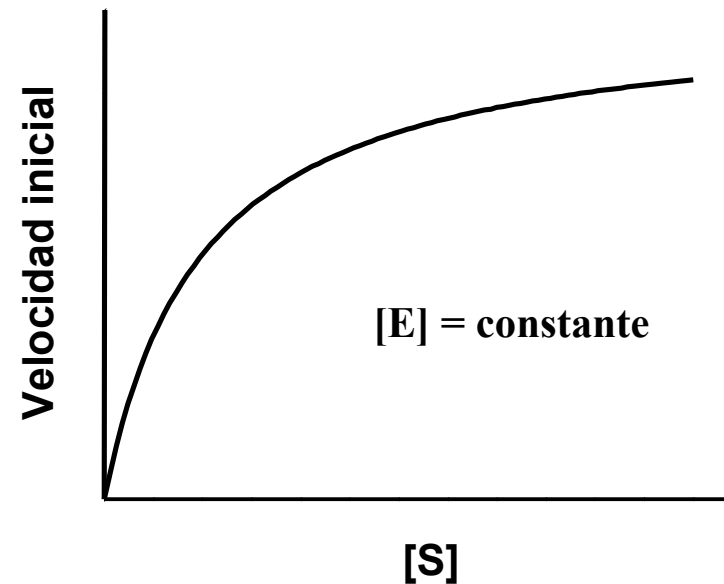
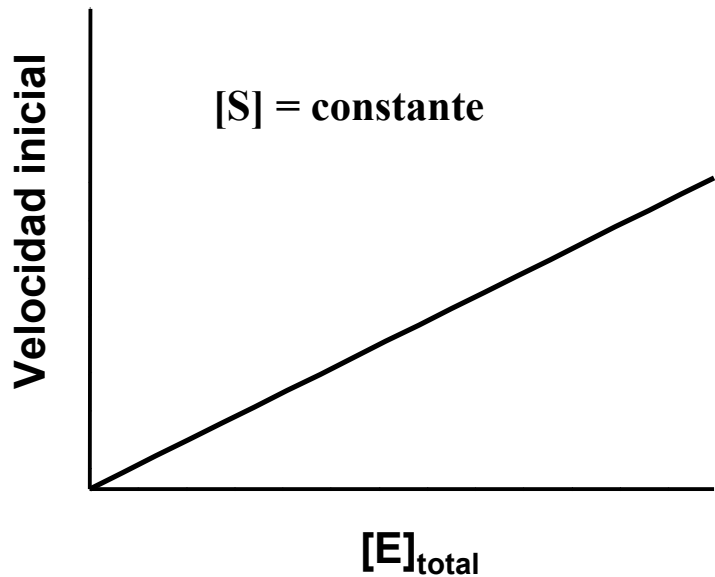
Variables independientes:

- 1) **Concentración de enzima.** La velocidad varía en forma directamente proporcional con la [E] a cualquier [S] constante
- 2) **Concentración de sustrato.** La velocidad varía en forma hiperbólica con la [S] a cualquier [E] constante

Variables de la ecuación de velocidad de la reacción catalizada



$$\mathbf{v = k_2[E]_{total}[S] / (K_m + [S])}$$



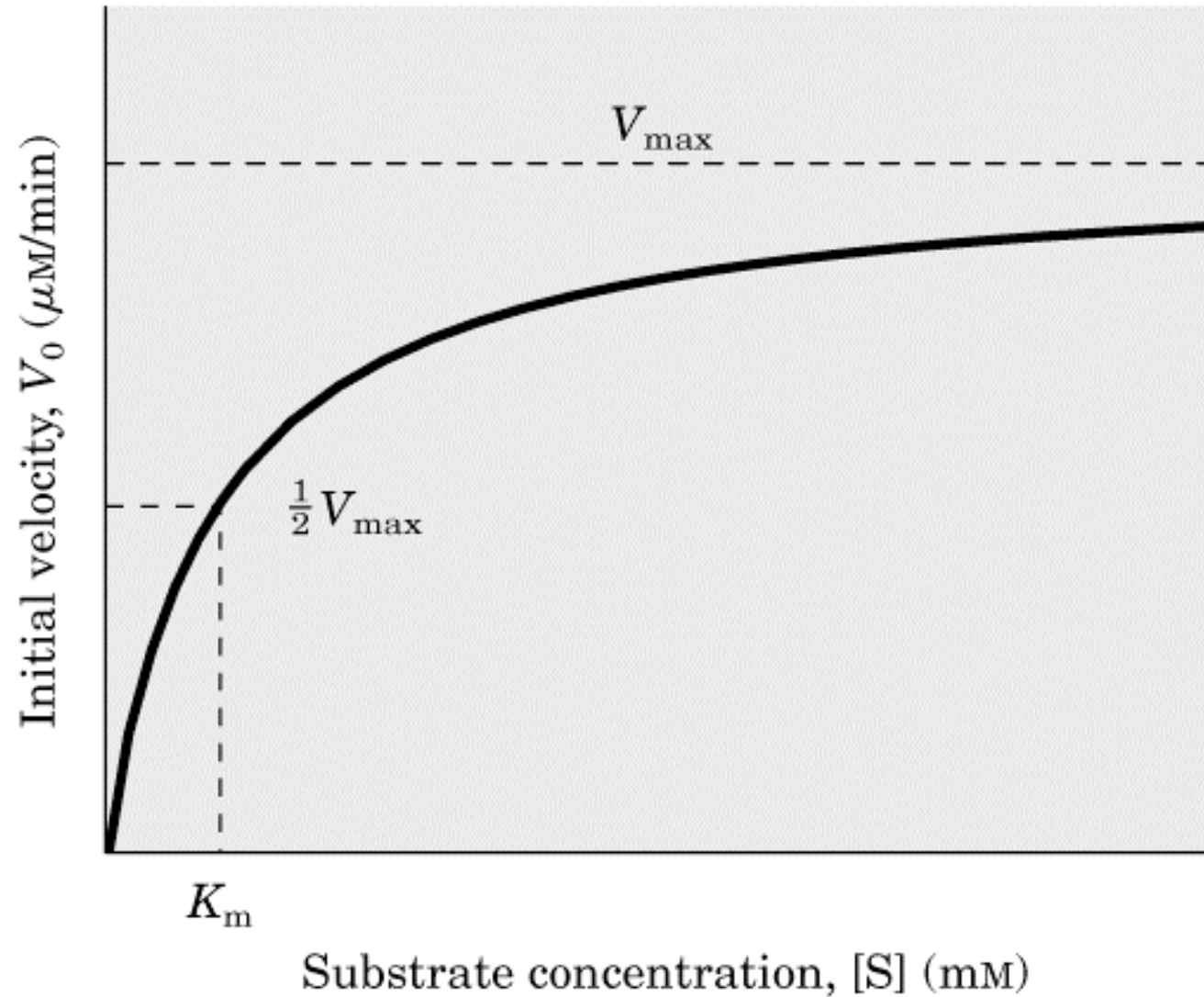
CONSTANTES O PARÁMETROS CINÉTICOS

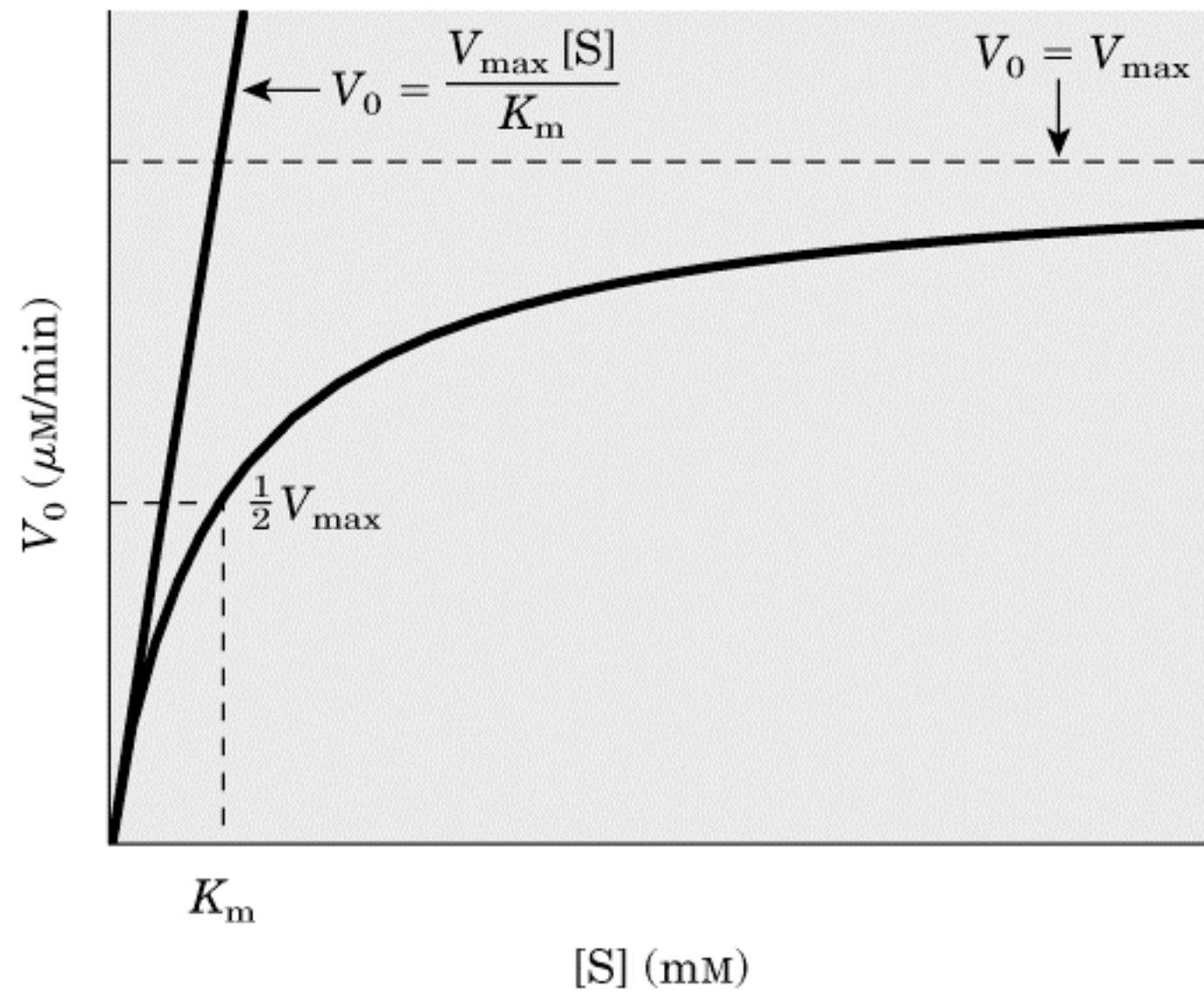
- **Son las constantes que aparecen en las ecuaciones de velocidad.**
- **Están formadas por constantes de velocidad de los pasos que constituyen la reacción catalizada.**

ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN





Parámetros cinéticos



$$V_{\max} = [\mathbf{E}]_{\text{total}} k_2 = [\mathbf{E}]_{\text{total}} k_{\text{cat}}$$

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

$$V_{\max} / K_m = [\mathbf{E}]_{\text{total}} k_2 k_1 / (k_{-1} + k_2)$$

$$k_{\text{cat}} / K_m = k_2 k_1 / (k_{-1} + k_2) \rightarrow k_1$$

UNIDADES DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

V_{\max} concentración \times tiempo⁻¹ ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{min}^{-1}$)

k_{cat} tiempo⁻¹ (min⁻¹, s⁻¹)

K_m concentración (mM, μM)

V_{\max}/K_m tiempo⁻¹ (min⁻¹, s⁻¹)

k_{cat}/K_m concentración⁻¹ \times tiempo⁻¹ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Constante catalítica (k_{cat})

- Sólo puede conocerse cuando se tiene a la enzima pura y por tanto se conoce su concentración

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{E}]_{\text{total}} \quad \text{o} \quad k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{sitios activos}]$$

- En una reacción en equilibrio rápido es la constante de velocidad de primer orden de conversión de ES a EP (k_2).
- En una reacción en estado estacionario es una función de todas las constantes de velocidad de primer orden (de pasos que ocurren tras la unión de los sustratos)
- Si uno de los pasos es limitante de la velocidad, k_{cat} es la constante de velocidad de este paso
- A k_{cat} también se le conoce como *número de recambio*, porque indica el número máximo de ciclos catalíticos por sitio activo y por unidad de tiempo.

TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Constante de Michaelis Menten

(K_m)

- **En condiciones de equilibrio rápido es la constante de disociación del complejo ES.**

$$K_m = k_{-1} / k_1$$

- **En condiciones de estado estacionario es una constante de disociación aparente que puede ser considerada como la constante de disociación global de todos los complejos de la enzima.**

$$K_m = (k_{-1} + k_{cat}) / k_1$$

- **En todos los casos es la concentración de sustrato a la que**

$$v = V_{max} / 2$$

TABLE 8.5 K_M values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa- <i>N</i> -acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO_2	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

Constante de especificidad

$$(V_{\max}/K_m \text{ o } k_{\text{cat}}/K_m)$$

- **Indica cuál es el mejor sustrato de una enzima (aquél que tenga la mayor constante de especificidad).**
- **Indica la eficiencia catalítica de la enzima a concentraciones de sustrato por debajo de los niveles de saturación (la máxima es 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).**
- **Representa el paso de unión de la enzima y el sustrato (cualquier factor que afecte esta constante está afectando el paso de unión).**

Constante de especificidad

$$(V_{\max} / K_m \text{ o } k_{\text{cat}} / K_m)$$

Sustrato

Parámetros cinéticos


A	$V_{\max A}$	$K_m A$	$(V_{\max} / K_m)_A$
B	$V_{\max B}$	$K_m B$	$(V_{\max} / K_m)_B$

¿Cuál de los dos es el mejor sustrato de esta reacción?

Considerando que A y B son inhibidores competitivos en la reacción del otro y que ambos sean equimolares:

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{(V_{\max} / K_m)_A [A]}{(V_{\max} / K_m)_B [B]} = \frac{(V_{\max} / K_m)_A}{(V_{\max} / K_m)_B}$$

TABLE 8.7 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{—CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.6×10^2
Norleucine	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.0×10^3
Phenylalanine	— CH_2 — 	1.0×10^5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

Especificidad versus afinidad

- ***Especificidad*** es la capacidad que tiene una enzima de discriminar entre posibles sustratos (sustratos alternos). Nos indica la velocidad relativa a la que se llevará a cabo la reacción catalizada con estos diferentes sustratos.
 - Se mide por la constante de especificidad para cada sustrato.
 - Los mejores sustratos, es decir aquellos que producen una reacción más rápida, son los que tienen una mayor constante de especificidad.
- ***Afinidad*** es la estabilidad del complejo ES. Nos indica la capacidad que tiene la enzima de formar un complejo con un determinado sustrato.
 - Se mide por la constante de disociación (K_d) del complejo ES, que en ocasiones es igual a la K_m .
 - Los sustratos con mayor afinidad son los que tienen una menor K_d .

Constante de especificidad

$$(V_{\max} / K_m \text{ o } k_{\text{cat}} / K_m)$$

- Bajo condiciones de estado estacionario

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

y

$$k_{-1} \ll k_{\text{cat}}$$

Para una enzima perfecta S nunca va a poder disociarse de ES una vez unido, es decir k_{-1} debe ser mucho menor que k_{cat} , luego

$$k_{\text{cat}} / K_m = k_1$$

Por tanto,

- k_{cat} / K_m representa el paso de unión del sustrato
- el valor máximo que puede alcanzar una enzima perfecta es $\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

TABLE 8.8 Enzymes for which $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ is close to the diffusion-controlled rate of encounter

Enzyme	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose phosphate isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide dismutase	7×10^9

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 4.5.

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

- ***Siguiendo el curso temporal*** de la reacción a una única concentración de sustrato, manteniendo fija la concentración de enzima, y usando para el análisis de los datos la *ecuación de Michaelis-Menten integrada*.
- ***Midiendo velocidades iniciales*** a diferentes concentraciones de sustrato, manteniendo fija la concentración de enzima, y usando para el análisis de los datos la *ecuación de Michaelis-Menten*.

Ecuación de Michaelis Menten integrada

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{(K_s + [S])}$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}([S]_0 - [P])}{(K_s + [S]) - [P]}$$

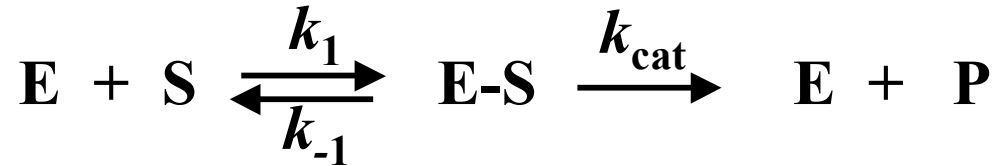
$$V_{\max}t = [P] + K_s \ln \left(\frac{[S]_0}{([S]_0 - [P])} \right)$$

$$V_{\max}t = ([S]_0 - [S]) + K_s \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]} \right)$$

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

- *Diseño del experimento*
 - Usar un intervalo de concentración de, al menos, 0.2 a 5Km.
 - Asegurarse de que se miden velocidades iniciales.
 - Comprobar dependencia lineal de la velocidad inicial de la concentración de enzima.
- *Análisis de los datos experimentales*
 - Regresión no lineal.
 - Regresión lineal.

Transformaciones de la ecuación de velocidad de Michaelis Menten

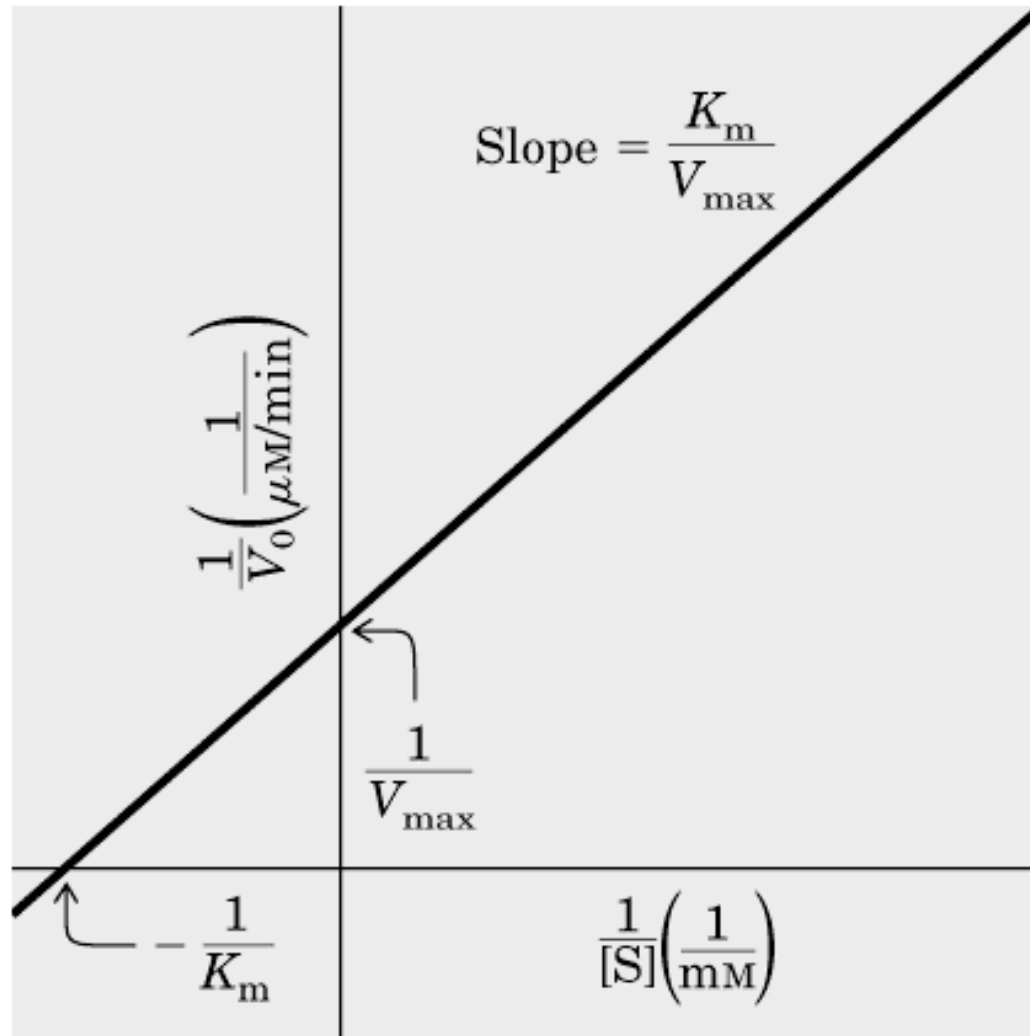


$$v = k_{\text{cat}}[\text{E}_{\text{total}}][\text{S}]/(K_m + [\text{S}])$$

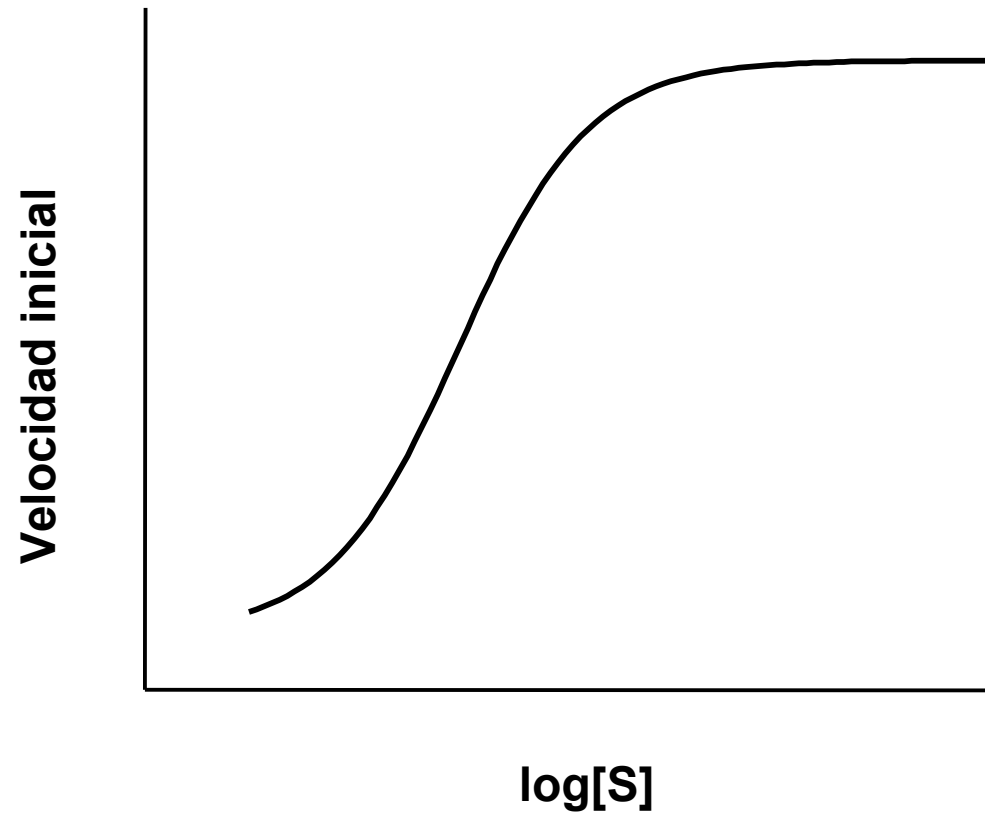
- ***Lineal***
 - $1/v$ *versus* $1/[\text{S}]$ (Dobles recíprocos o Lineweaver-Burk)
 - $[\text{S}]/v$ *versus* $[\text{S}]$ (Hanes)
 - v *versus* $v/[\text{S}]$ (Eadie-Hofstee)
- ***Sigmoidal***
 - v *versus* $\log \text{S}$ (semilogarítmica)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Gráfica de dobles recíprocos o de Lineveawer-Burk



GRÁFICA SIGMOIDAL (velocidad inicial vs $\log[S]$)



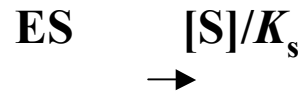
Reglas para deducir ecuaciones de velocidad para sistemas en equilibrio rápido

- *Escribir los equilibrios entre las especies de enzima y ligandos*
- *Escribir la ecuación de conservación de masas de las especies de la enzima*
- *Escribir la ecuación de velocidad considerando k_{cat} y las especies productivas*
- *Dividir ambos lados de la ecuación por $[E]_{total}$, expresada en el lado derecho como la suma de todas las especies de enzima*
- *Expresar la igualdad en términos de $[E]_{libre}$*

Reglas para escribir ecuaciones de velocidad para sistemas en equilibrio rápido

- *Escribir los equilibrios entre las especies de enzima y ligandos*
- *Escribir la ecuación de conservación de masas de las especies de la enzima*
- *Representar cada especie de la enzima por la concentración del ligando dividido entre su constante de disociación, o por el producto de las concentraciones de los ligandos dividido entre el producto de sus respectivas constantes de disociación.*

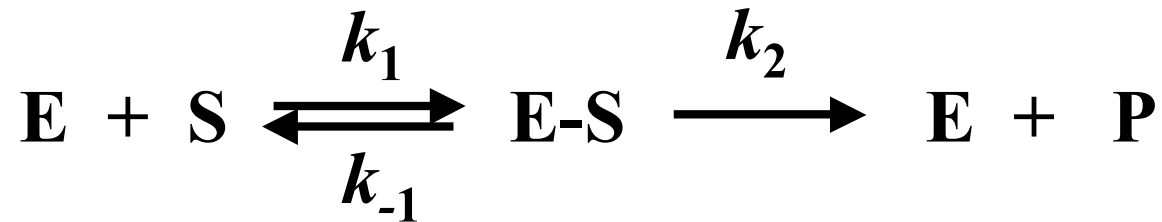
Ejemplos:



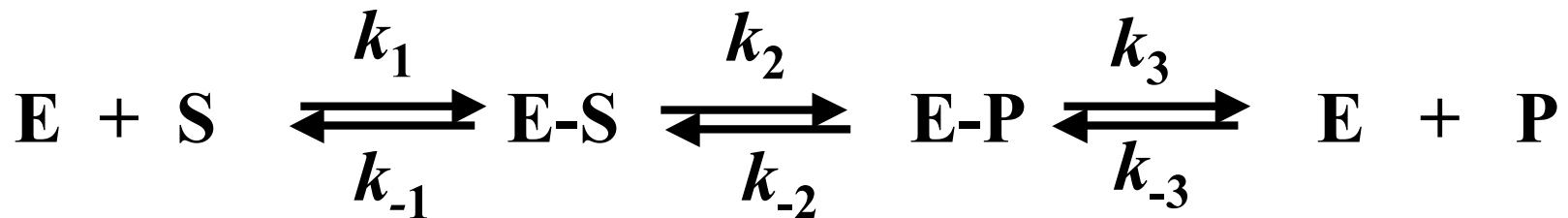
- $[\text{E}]_{\text{libre}}$ *se representa por la unidad (1)*
- *Escribir en el numerador V_{max} multiplicado por la(s) especie(s) productiva(s) de la enzima*
- *Escribir en el denominador todas las especies de la enzima*

Reacción catalizada por enzimas

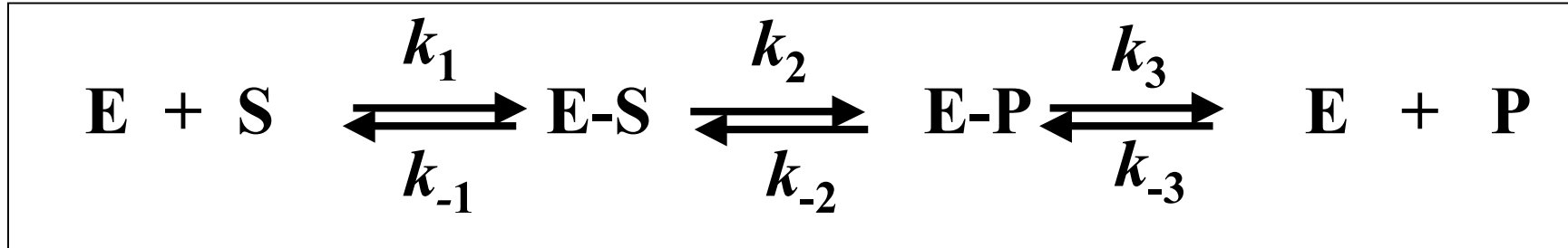
A) Irreversible simplificada



B) Reversible



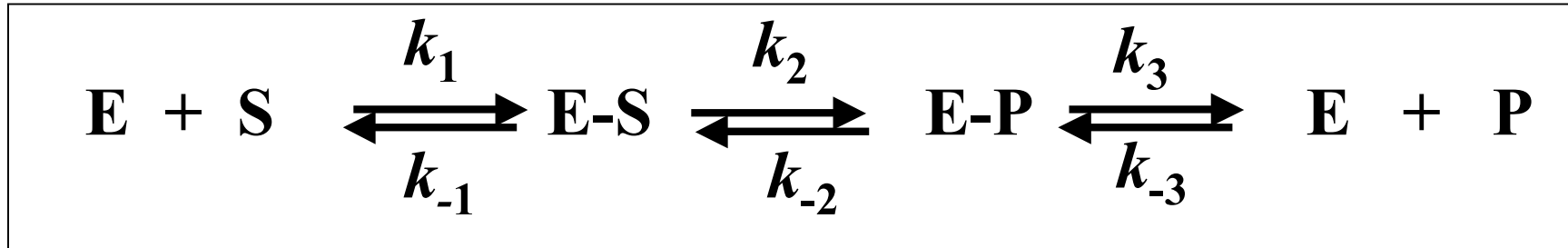
Ecuación de velocidad de una reacción
monosustrato reversible en equilibrio rápido



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

$$V_s = k_2 [\text{E}]_t \quad V_p = k_{-2} [\text{E}]_t \quad K_s = k_{-1}/k_1 \quad K_p = k_3/k_{-3}$$

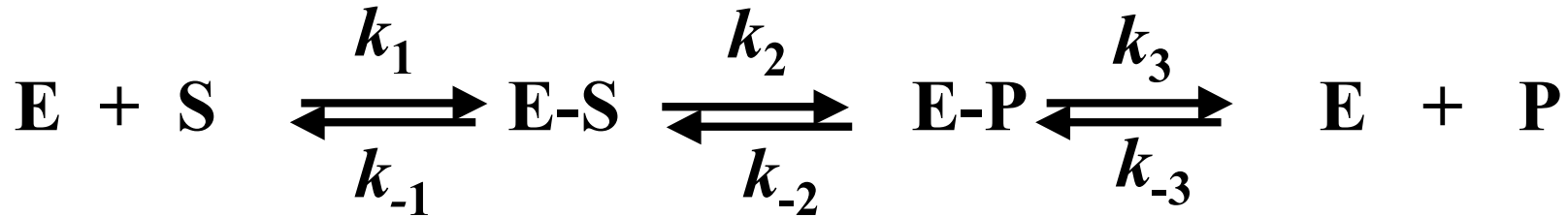
Ecuación de velocidad de una reacción
monosustrato reversible en equilibrio rápido



$$v_{\text{neta}} = \frac{V_1 [\text{S}]/K_s}{1 + [\text{S}]/K_s + [\text{P}]/K_p} - \frac{V_2 [\text{P}]/K_p}{1 + [\text{S}]/K_s + [\text{P}]/K_p}$$

$$v_{\text{neta}} = \frac{V_1 [\text{S}]}{K_s(1 + [\text{P}]/K_p) + [\text{S}]} - \frac{V_2 [\text{P}]}{K_p(1 + [\text{S}]/K_s) + [\text{P}]}$$

Ecuación de Haldane para una reacción monosustrato en equilibrio rápido



En el equilibrio $v_{\text{neta}} = 0$, luego

$$V_1 [S]_{\text{eq}} / K_s = V_2 [P]_{\text{eq}} / K_p$$

$$K_{\text{eq}} = [P]_{\text{eq}} / [S]_{\text{eq}} = \frac{V_1 K_p}{V_2 K_s} = \frac{V_1 / K_s}{V_2 / K_p}$$

Ecuación de Haldane

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{P}]_{\text{eq}}}{[\text{S}]_{\text{eq}}} = \frac{V_1 K_p}{V_2 K_s} = \frac{V_1 / K_s}{V_2 / K_p}$$

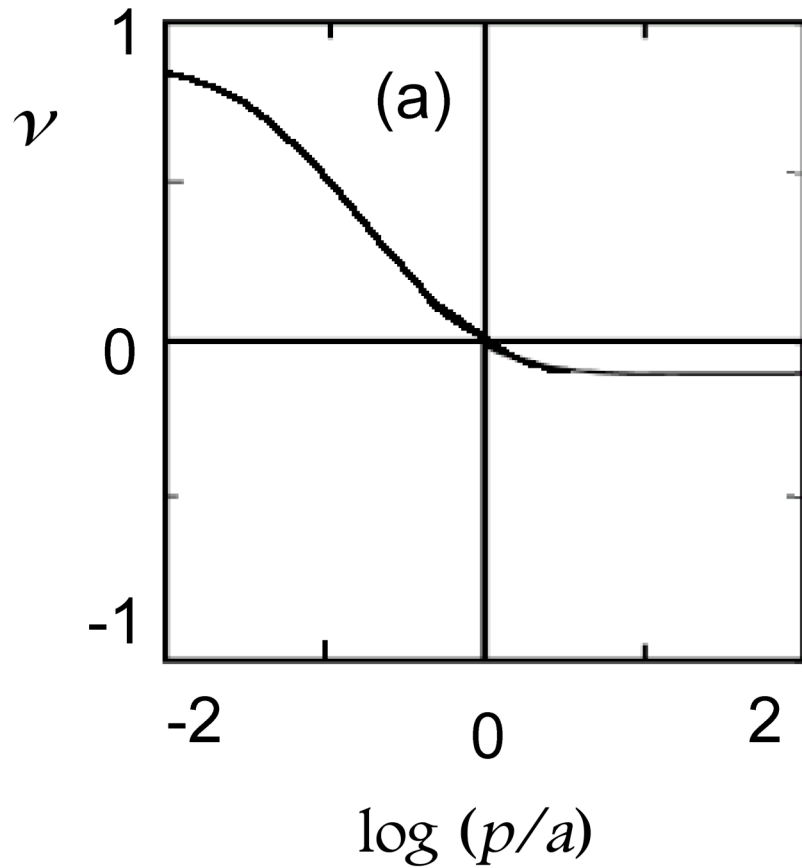
Relaciona la K_{eq} con las constantes cinéticas, demostrando que éstas no son independientes y que los valores que puedan tomar tienen un límite impuesto por la termodinámica de la reacción

“Enzimas de un sentido”

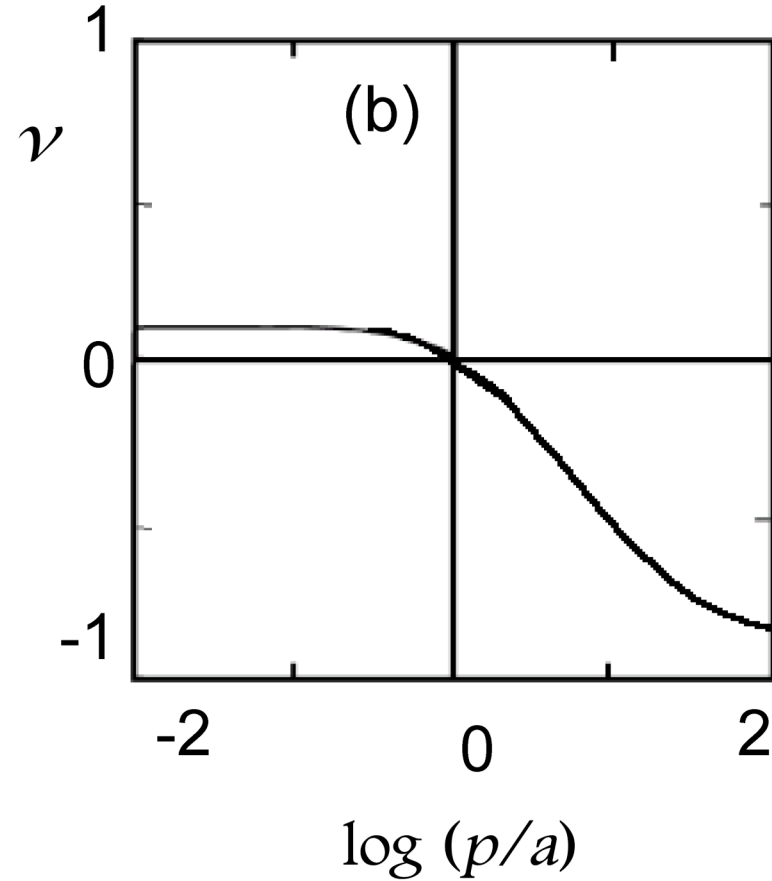
En reacciones reversibles, $K_{eq} = 1$, catalizan preferencialmente un sentido de la reacción

¿Violan la termodinámica?

“Enzimas de un sentido”



$$K_{mP} \ll K_{mA}$$



$$K_{mP} \gg K_{mA}$$

Tomado de A. Cornish-Bowden “Fundamentals of Enzyme Kinetics”, 1999, Portland Press

Rosario A. Muñoz-Clares

Evolución de las enzimas hacia la perfección catalítica

Objetivo:

Conseguir la máxima k_{cat}/K_m posible

- Lo consiguen incrementando ambos parámetros, k_{cat} y K_m , hasta el límite impuesto por la concentración de sustrato *in vivo*.
- Por razones termodinámicas y por seguridad metabólica es ventajoso incrementar K_m de manera que *in vivo* la saturación por el sustrato sea baja.
- En reacciones reversibles no se puede alcanzar la perfección catalítica en las dos direcciones, con la excepción de aquellas en las que la K_{eq} valga 1.

Table 12.3 *Illustration of the importance of the evolution of k_{cat} and K_M at constant values of k_{cat}/K_M and $[S]^a$*

($k_{cat}/K_M = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $[S] = 10^{-3} \text{ M}$)

K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	Rate ^b (s^{-1})
10^{-6}	1	1
10^{-5}	10	9
10^{-4}	10^2	90
10^{-3}	10^3	500
10^{-2}	10^4	909
10^{-1}	10^5	990
1	10^6	999

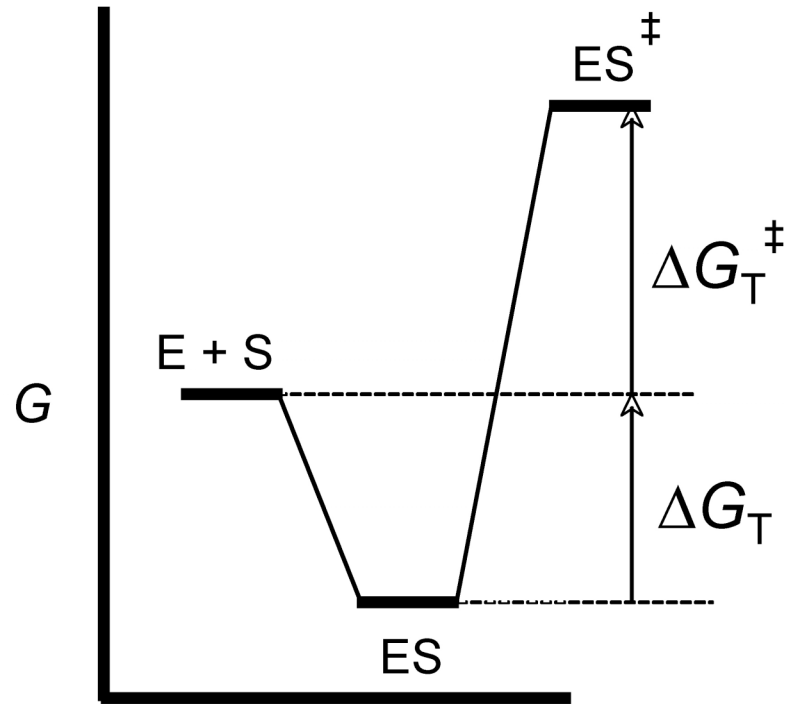
^aThe hypothetical processes are: (1) The enzyme has evolved to be complementary to the transition state of substrate, so that k_{cat}/K_M is maximized. (2) While maintaining k_{cat}/K_M , the enzyme evolves to increase K_M . The values assigned to k_{cat}/K_M and $[S]$ are arbitrary.

^bMoles of product produced per mole of enzyme per second.

Tomado de A. Fersht "Structure and Mechanism in Protein Science", 1998, Freeman

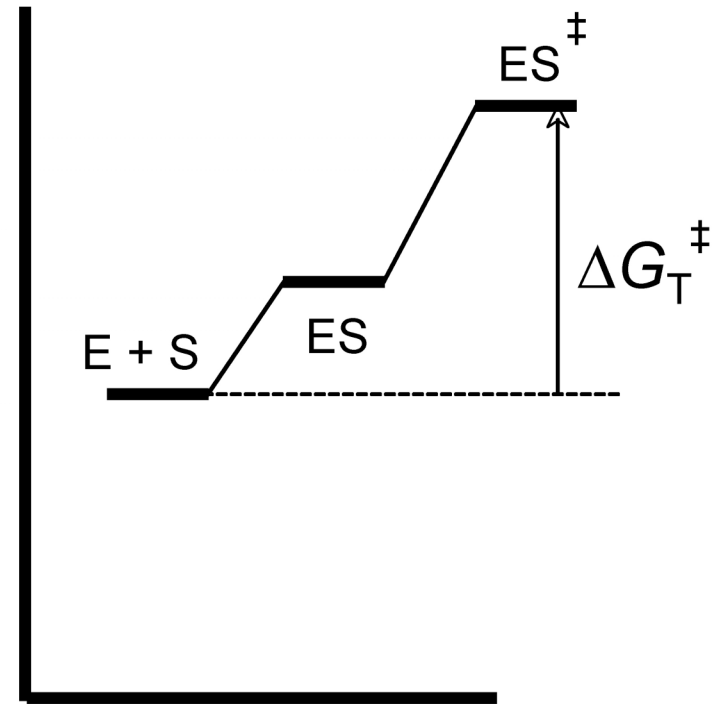
Rosario A. Muñoz-Clares

$$K_M < [S]$$



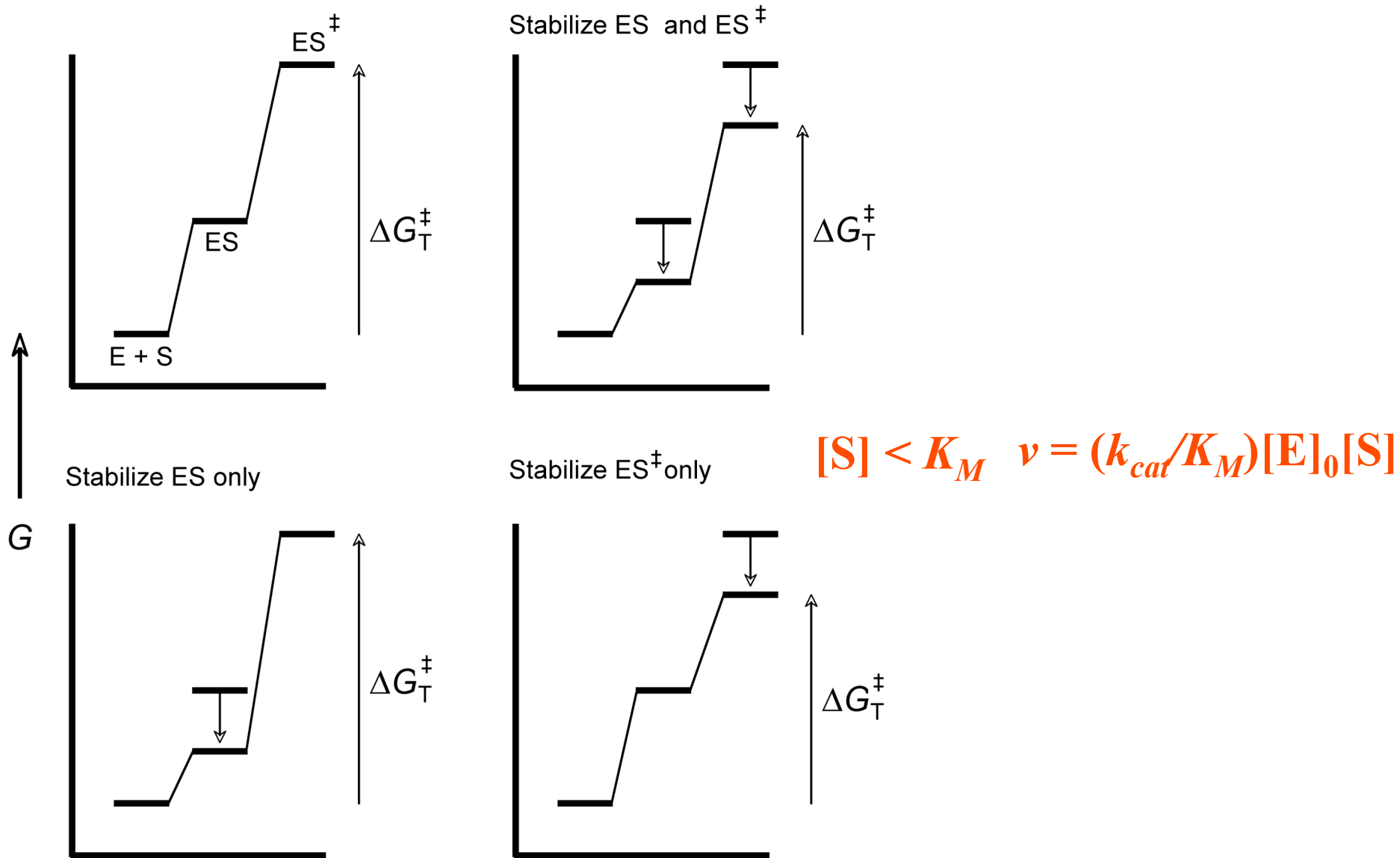
(a)

$$K_M > [S]$$

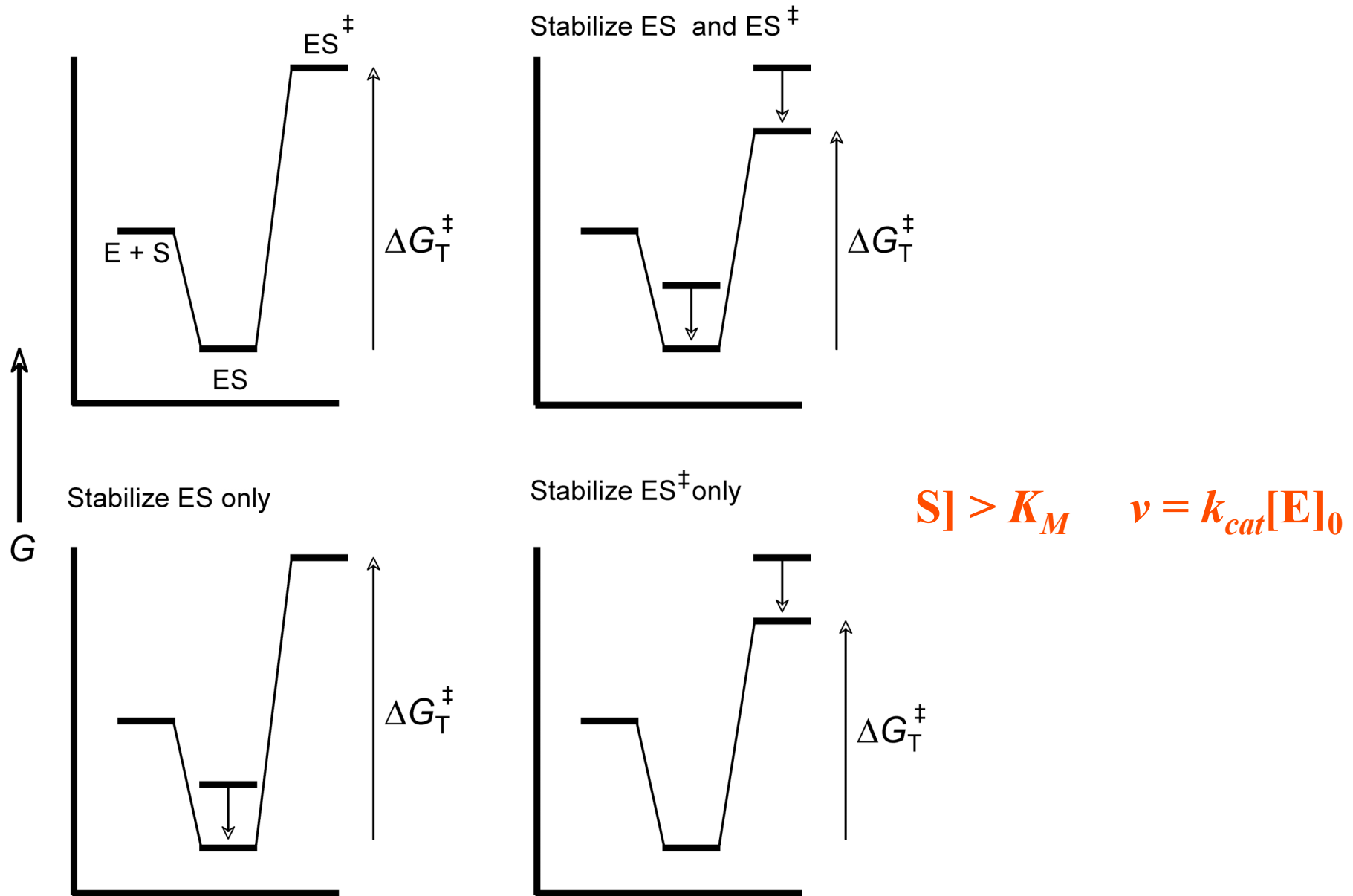


(b)

Tomado de A. Fersht "Structure and Mechanism in Protein Science", 1998, Freeman



Tomado de A. Fersht "Structure and Mechanism in Protein Science", 1998, Freeman



Tomado de A. Fersht "Structure and Mechanism in Protein Science", 1998, Freeman

Rosario A. Muñoz-Clares

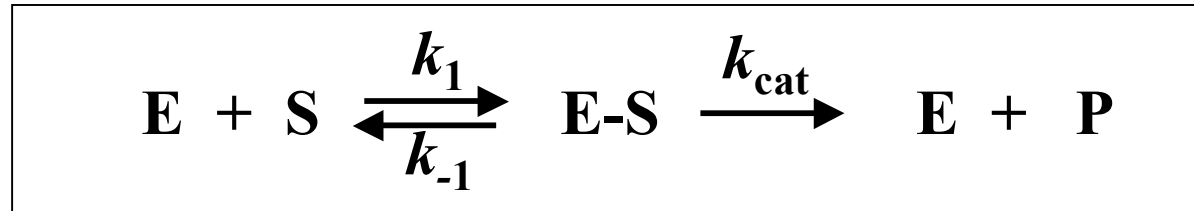
Velocidad de la reacción catalizada bajo condiciones de estado estacionario *in vivo*



- ***In vivo*, dadas las condiciones de estado estacionario, la velocidad de la reacción individual viene impuesta por la de la ruta metabólica.**
- **Las enzimas ajustan la concentración de sustratos a esa velocidad.**

$$[\text{S}] = K_m / \{(V/v) - 1\}$$

Variables de la ecuación de velocidad de la reacción catalizada bajo condiciones de estado estacionario *in vivo*



$$[\text{S}] = K_m / \{(V/v) - 1\} = K_m v / (V - v)$$

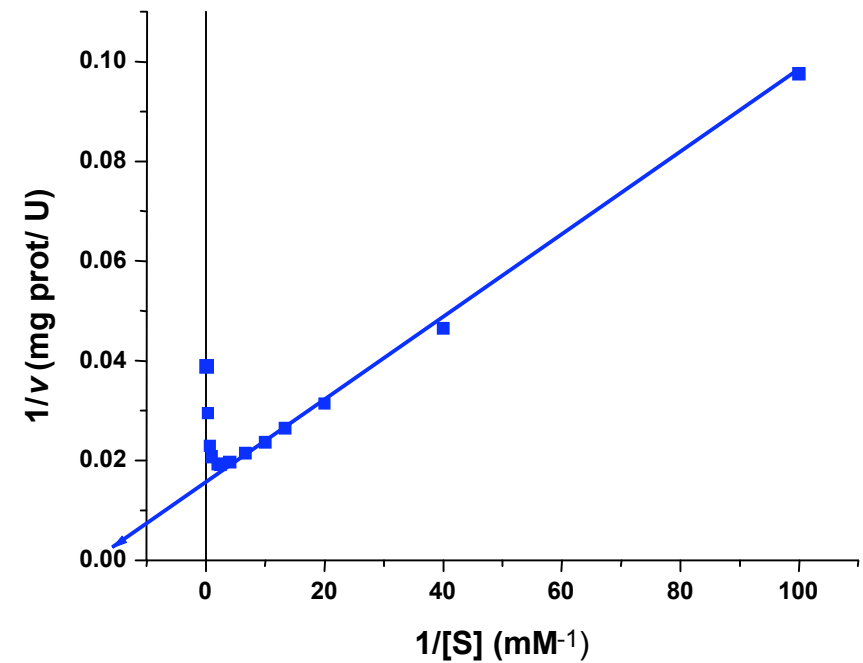
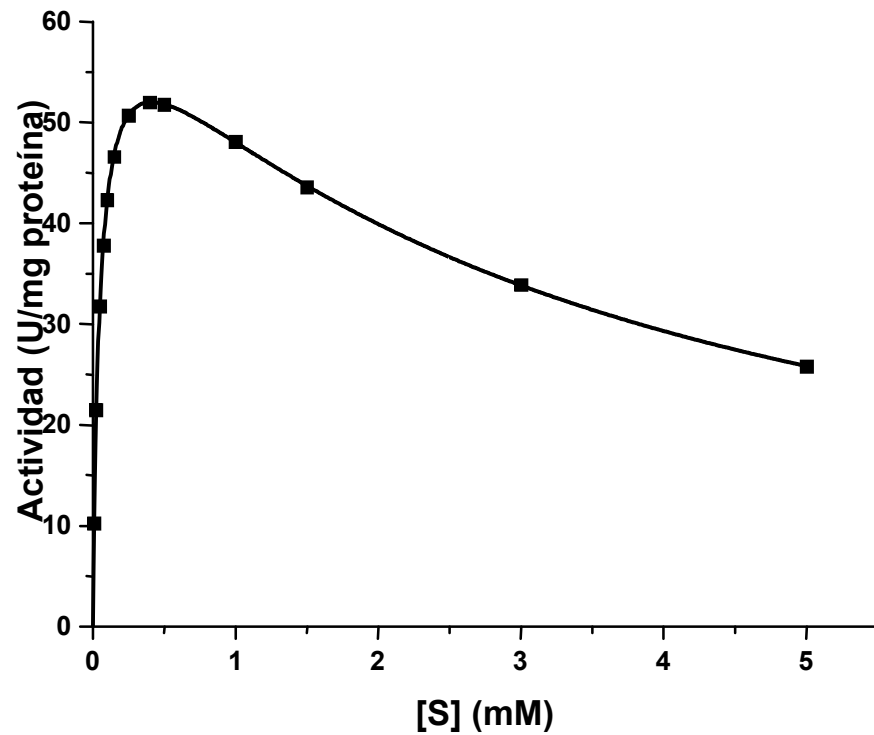
- ***Variable dependiente*** : concentración de sustrato
- ***Variable independiente***: Velocidad de la reacción. La [S] varía en forma hiperbólica con la velocidad a cualquier [E] constante

Causas de cinética no hiperbólica

- **Presencia de isoenzimas en la preparación enzimática**
- **Existencia de asimetría en los sitios activos de una misma molécula enzimática oligomérica**
- **Inhibición por sustrato**
- **Existencia de histéresis**
- **Cambios inducidos por los ligandos en el estado de agregación de la enzima**
- **Cooperatividad entre los sitios activos de una misma molécula enzimática**
- **Unión al azar de los sustratos en mecanismos con más de un sustrato que siguen estado estacionario, siendo una de las rutas de unión más rápida que la otra**
- **Existencia de una ruta alterna de liberación de un producto en mecanismos en estado estacionario en los que la liberación de este producto es el paso limitante de la reacción**

Inhibición por sustrato

$$v = V_{\max} [A] / \{K_{mA} + [A](1 + [A]/K_{siA})\}$$



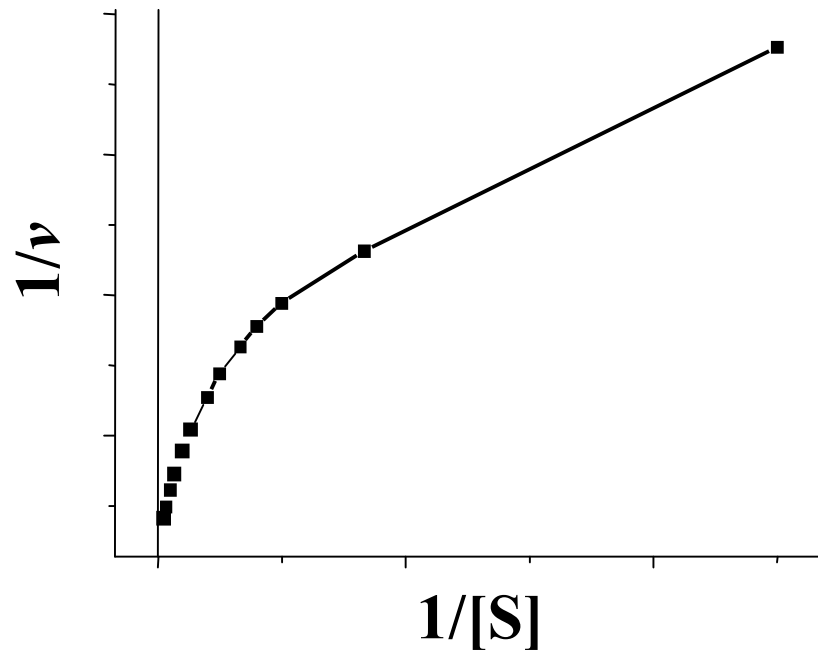
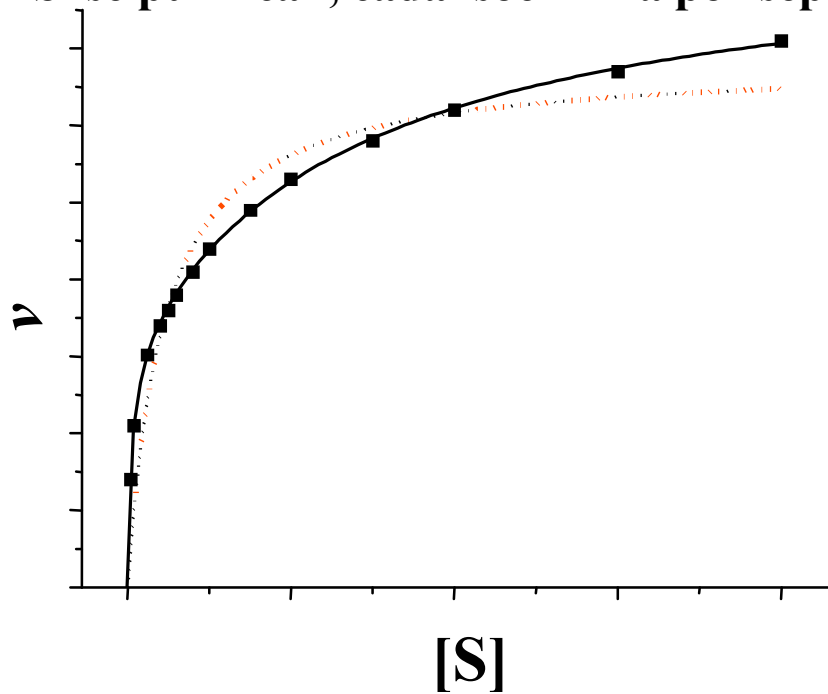
ISOENZIMAS

- **Proteínas que en un organismo catalizan la misma reacción pero están codificadas por genes diferentes.**
- **Difieren en sus propiedades cinéticas.**
- **Se expresan diferencialmente en diferentes tejidos, organelos o estados fisiológicos o patológicos.**

Presencia de isoenzimas en la preparación enzimática

$$v = V_{\max 1} [S]/(K_{m1} + [S]) + V_{\max 2} [S]/(K_{m2} + [S])$$

Si se purifican, cada isoenzima por separado seguirá una cinética de Michelis Menten.



Asimetría en los sitios activos de una misma enzima

$$v = V_{\max 1} [S]/(K_{m1} + [S]) + V_{\max 2} [S]/(K_{m2} + [S])$$

Si se purifican, cada una por separado seguirá una cinética de Michelis Menten.

