

de Michaelis-Menten, propusieron lo que hoy conocemos como “la doble recíproca”: una función lineal de donde se pueden extrapolar los valores de K_M y V_{max} :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.24)$$

Es decir, obtenemos la ecuación de una recta de la forma $y = ax + b$ donde la pendiente es K_M/V_{max} y la ordenada al origen es $1/V_{max}$. Además, si hacemos que $1/v_0 = 0$, nos queda la igualdad

$$\frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{V_{max}} \therefore$$

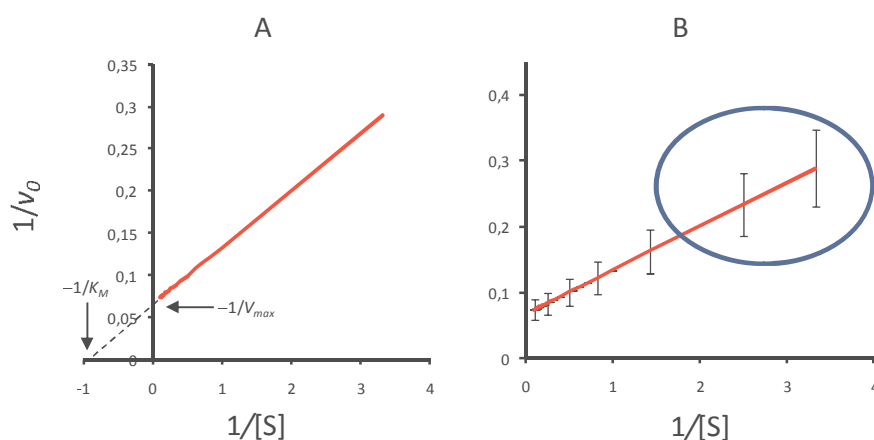


Fig. 3.3. Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk de los datos de la Fig. 3.2. En **A** se muestra la línea que une los puntos experimentales (rojo) y su prolongación sobre los ejes. El corte del eje $1/v_0$ se produce en el valor $1/V_{max}$ y el corte del eje $1/[S]$ se produce en el valor equivalente a $-1/K_M$. En **B** se muestra la misma gráfica (sin proyectar) donde se han incluido barras de error correspondientes a 10% de error en las medidas de las v_0 . El óvalo azul señala los puntos que provienen de valores bajos de v_0 .

$$\frac{V_{max}}{V_{max}[S]} = -\frac{1}{K_M} = \frac{1}{[S]} \quad (3.25)$$

es decir, que la proyección de la recta sobre el eje de las abscisas da $-1/K_M$. En otras palabras, la proyección de la recta sobre los ejes $1/v_0$ y $1/[S]$ da por resultado las inversas de los dos parámetros de la hipérbola: $1/V_{max}$ y $-1/K_M$ (Fig. 3.3).

La representación de la doble recíproca, también conocida como representación de Lineweaver-Burk, si bien ha sido muy utilizada, tiene algunas limitaciones. La más importante es que, dado que en general se usan $[S]$ relativamente bajas, los valores de las inversas $1/[S]$ y $1/v_0$ son grandes y por lo tanto, también lo son los desvíos ocasionados por los valores experimentales. Observando la recta de la Fig. 3.3 vemos que los errores cometidos a valores bajos de $1/[S]$ y $1/v_0$ van a propagarse a la pendiente de la recta con lo cual la extrapolación a los ejes de abscisas y ordenadas puede arrojar estimaciones muy erróneas. Para solucionar este problema se han propuesto modificaciones a la doble recíproca, siempre procurando transformar la ecuación de Michaelis-Menten en una ecuación de una recta. Algunas de las más importantes son la representación de $[S]/v_0$ vs $[S]$, la de v_0 vs $v_0/[S]$ y la lineal directa.

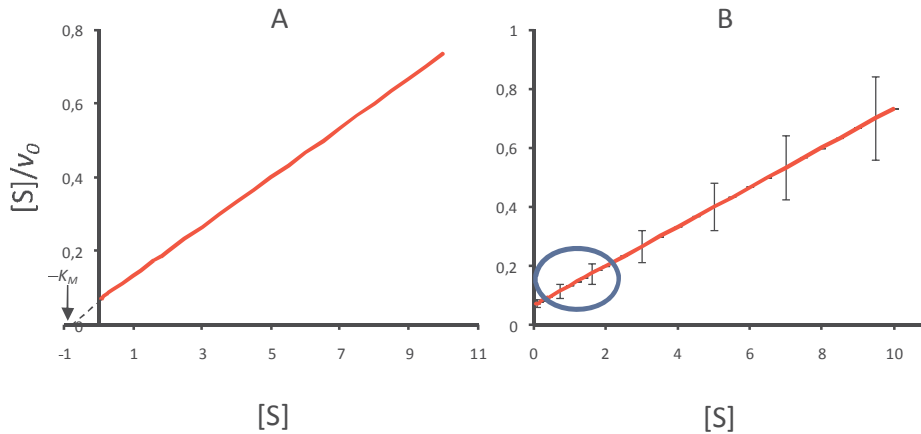


Fig. 3.4. Representación de Hanes-Wolfe de los datos de la Fig. 3.2. En **A** se muestra la línea que une los puntos experimentales (rojo) y su prolongación sobre los ejes. El corte del eje $[S]$ se produce en el valor equivalente a $-K_M$. En **B** se muestra la misma gráfica (sin proyectar) donde se han incluido barras de error correspondientes a 10% de error en las medidas de las v_0 . El óvalo azul señala los puntos que provienen de valores bajos de v_0 .

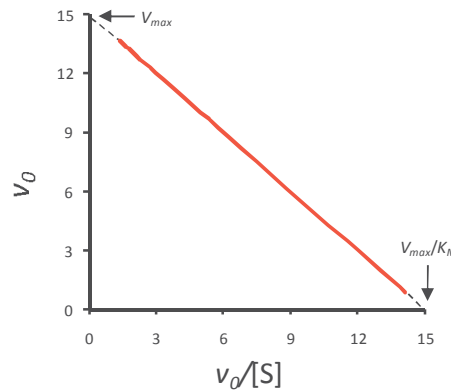


Fig. 3.5. Representación de Eadie-Hofstee de los datos de la Fig. 3.2. En este caso no se pueden trazar barras de error verticales ya que v_0 se encuentra en ambos ejes.

La primera de ellas es también conocida como la representación de Hanes-Woolf y se obtiene multiplicando ambos miembros de la doble recíproca (3.24) por $[S]$:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}[S] \quad (3.26)$$

En un gráfico donde el eje de las ordenadas representa $[S]/v_0$ y el de las abscisas representa $[S]$, la ordenada al origen es K_M/V_{max} , la pendiente es $1/V_{max}$ y el corte en el eje de las abscisas se produce en el valor $-K_M$ (Fig. 3.4).

Calculando V_{max} a partir de esta pendiente, también puede obtenerse K_M despejando del valor de la ordenada al origen.

Similarmente, si multiplicamos ambos miembros de la ecuación de la doble recíproca (3.24) por $(v_0 V_{max})$ y reorganizamos se obtiene la representación de Eadie-Hofstee:

$$\frac{v_0 V_{max}}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{v_0 V_{max}}{[S]} + \frac{v_0 V_{max}}{V_{max}} \quad (3.27)$$

$$V_{max} = \frac{v_0}{[S]} K_M + v_0 \quad (3.28)$$

$$v_0 = V_{max} - \frac{v_0}{[S]} K_M \quad (3.29)$$

En una representación gráfica de 3.29 donde las abscisas representan $v_0/[S]$ y las ordenadas v_0 , se obtiene una recta cuya ordenada al origen es V_{max} y su pendiente es $-K_M$ (Fig. 3.5)

En ambos casos, se evita que o bien $[S]$ o bien v_0 estén expresados como inversas, con lo cual se disminuyen las desviaciones de la pendiente que se originaban por el alto valor de la inversa del error en la doble recíproca. En la representación de Hanes-Woolf (3.26) la magnitud del error en la v_0 queda relativizada por la $[S]$, de modo que las barras de error son menores para valores bajos de v_0 . (Fig. 3.4). Por lo tanto, si el diseño del experimento demanda medir v_0 bajas, es preferible utilizar esta representación antes que la doble recíproca. Por su parte, la representación de Eadie-Hofstee (3.29) permite representar las v_0 en forma directa a lo largo de todo el rango desde 0 hasta V_{max} (Fig. 3.5). Además, en esta representación los datos que más se desvían de la línea de ajuste son fácilmente observables, de modo tal que es preferible utilizar esta representación cuando hay dudas acerca de si la cinética de la enzima en estudio sigue o no el modelo de Michaelis-Menten (más adelante vamos a ver comportamientos que se desvían de esta cinética).

Finalmente, en 1974 Eisenthal y Cornish-Bowden propusieron la representación lineal directa, que tiene la ventaja de que no requiere cálculos y por lo tanto puede ser utilizada en el laboratorio mientras el experimento está en curso. Ello permite ajustar concentraciones y tiempos de incubación en tiempo real para optimizar reactivos y esfuerzo. Esta representación parte de un rearrreglo de la ecuación de Michaelis-Menten (3.17), donde ahora la V_{max} y el K_M son tratados como variables:

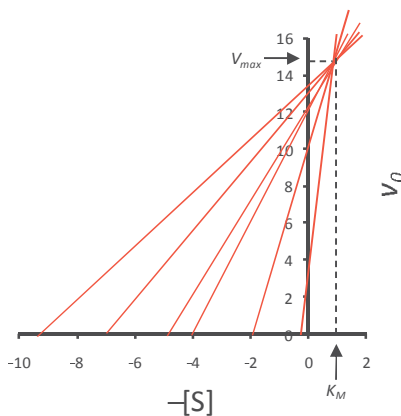


Fig. 3.6. Representación lineal directa de los datos de la Fig. 3.2. Cada recta es un par de datos de $-[S]$ y v_0 , y las coordenadas del punto donde todas las rectas se cortan son K_M y V_{max} .

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \therefore V_{max} = \frac{v_0(K_M + [S])}{[S]} \quad (3.30)$$

$$V_{max} = K_M \frac{v_0}{[S]} + v_0 \quad (3.31)$$

La ecuación 3.31 define una línea recta donde la ordenada al origen es v_0 y la pendiente es $v_0/[S]$, que cortará al eje de las abscisas en valores de $-[S]$ y al eje de las ordenadas en valores de v_0 :

$$V_{max} = 0 \therefore -K_M \frac{v_0}{[S]} = v_0 \quad (3.32)$$

$$\frac{-K_M}{[S]} = \frac{v_0}{v_0} \quad (3.33)$$

$$K_M = -[S] \quad (3.34)$$

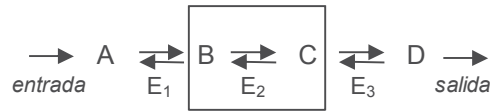
$$K_M = 0 \therefore V_{max} = 0 \frac{v_0}{[S]} + v_0 \quad (3.36)$$

$$V_{max} = v_0 \quad (3.37)$$

Por más que parezca raro usar v_0 y $[S]$ como constantes, en realidad una vez que uno las mide en un experimento puede considerar que lo son, ya que las mismas no deberían modificarse para esa medición en particular. De este modo, puede trazarse una recta para un par de valores de v_0 (en el eje de las ordenadas) y $-[S]$ (en el eje de las abscisas). Dado que para esa enzima y en ese experimento en particular va a haber un único par de valores de V_{max} y K_M que no dependerán de las $[S]$, una segunda recta trazada para un segundo par de valores de v_0 y $-[S]$ se deberá intersectar con la primera en un punto cuyas coordenadas en los ejes v_0 y $[S]$ deberán ser V_{max} y K_M (Fig. 3.6). Lo mismo puede decirse de cualquier par de puntos de v_0 y $-[S]$, de modo tal que se terminará obteniendo una serie de rectas, todas las cuales se deberían cortar en el mismo punto de coordenadas (K_M, V_{max}) y cuya desviación nos dará una medida del error experimental. Por lo tanto, lo único que hay que hacer es medir v_0 a diferentes $[S]$ y graficar las rectas resultantes a ver si todas se cortan en un mismo punto. Si es así, de ese punto pueden extraerse directamente los valores de V_{max} y K_M (Fig. 3.6).

La Forma Reversible de la Ecuación de Michaelis-Menten

Todo lo que vinimos viendo hasta aquí se basa en la idea de que trabajamos en condiciones iniciales, esto es, antes de que se haya acumulado una cantidad significativa de producto. Esto sin dudas sirve de mucho para calcular los parámetros cinéticos V_{max} , k_p , k_A y K_M mediante ensayos *in vitro*, pero no refleja la realidad de la célula. Si consideramos una enzima actuando en el metabolismo celular y no en el tubo de ensayo, inmediatamente veremos que cataliza su reacción específica en presencia **tanto del sustrato como del producto**. Sin embargo, como veremos más adelante, la reacción no llega al equilibrio, sino que se encuentra en un estado estacionario, tal que aún cuando no se den las condiciones iniciales, **la velocidad de reacción sigue siendo constante**. Esto puede entenderse si miramos el siguiente esquema:



que representa parte de una vía metabólica donde hay una entrada de sustancia A, que se transforma en B, luego B se transforma en C, que a su vez se transforma en D, y D sale del sistema. Si este sistema está en estado estacionario, significa que el *flujo* de materia a lo largo de la serie de reacciones es constante. En otras palabras, la velocidad con la que entra materia bajo la forma de A es igual a la velocidad con que sale materia bajo la forma de D. No importa si la molécula A es más grande o más chica que la molécula D, o si es más compleja o está más reducida, etc. Lo que importa es si la **cantidad de materia por unidad de tiempo** que entra al sistema es igual a la que sale. Para que se cumpla la condición de estado estacionario por la cual la cantidad de materia que entra por unidad de tiempo es igual a la que sale, debe cumplirse además que **todas las reacciones dentro del sistema estén ocurriendo a la misma velocidad**³. O sea, el **flujo** de materia dentro del sistema también debe ser constante. Por ende, la reacción catalizada por la enzima E₂ (en el recuadro) debe estar ocurriendo a una velocidad constante e igual a la de las catalizadas por E₁ y E₃ para que la condición de estado estacionario se mantenga. Esto significa que no importa que B (sustrato) y C (producto) estén presentes; la reacción va a ocurrir de todos modos con velocidad constante. Por lo tanto, necesitamos una expresión de la ecuación de Michaelis-Menten que dé cuenta de la presencia del producto para poder aplicarla al análisis de vías metabólicas.

De acuerdo con el esquema que planteamos al principio, la serie de reacciones a considerar en presencia del producto serían:



con lo cual ahora no solo debemos considerar como constante catalítica a k_2 , sino también a k_{-1} , ya que hay que tomar en cuenta la reacción de formación de S a partir de P. Además, la velocidad neta (v_{neta}) va a resultar de la diferencia entre la velocidad de formación de P a partir de S (a la que denominaremos velocidad directa, o v_d) y la de formación de S a partir de P (a la que denominaremos velocidad reversa, o v_r):

$$v_{neta} = v_d - v_r \quad (3.38)$$

Por lo tanto, si hacemos la simplificación de tomar en cuenta al complejo ES como el único capaz de producir P a partir de S o bien S a partir de P, el estado estacionario puede ser expresado como la situación en la cual la [ES] no cambia con el tiempo. Es decir que en este

³ Esto se refiere al ejemplo de una vía lineal muy simple. Normalmente, las vías metabólicas incluyen ramificaciones y ciclos en las cuales no se puede decir que todas las reacciones ocurren a la misma velocidad, sino que el balance neto de las velocidades de entrada y salida se compensa exactamente para dar por resultado el estado estacionario.

estado la diferencia entre las velocidades de formación de ES a partir de S o de P y las velocidades de descomposición del complejo ES para dar S o P es nula:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_T] - [ES])[S] + k_{-2}([E_T] - [ES])[P] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (3.39)$$

Agrupando los términos que contienen [ES] y reordenando, obtenemos la siguiente igualdad para [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.40)$$

Esta ecuación es muy similar a 3.14, la que obtuvimos anteriormente en el tratamiento de la aproximación del estado estacionario para deducir la ecuación de Michaelis-Menten y de hecho, si se considera [P] = 0 se llega a la misma ecuación.

Ahora podríamos expresar la v_{neta} de producción de P como la diferencia entre la velocidad a la cual P es producido en la reacción $ES \rightarrow E + P$ y la velocidad a la cual P es consumido en la reacción $E + P \rightarrow ES$:

$$v_{neta} = k_2[ES] - k_{-2}([E_T] - [ES])[P] \quad (3.41)$$

Reemplazando [ES] en 3.41 por lo obtenido en la igualdad 3.40:

$$v_{neta} = k_2 \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} - k_{-2} [E_T][P] + k_{-2} \frac{k_1 [E_T][S] + k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} [P] \quad (3.42)$$

Esta ecuación da un poquito de miedo, y peor va a ser ahora, que te voy a pedir que saquemos denominador común y distribuyamos el numerador. Pero enseguida vas a ver que para nuestra tranquilidad, la mayoría de los términos del numerador se van a cancelar mutuamente:

$$v_{neta} = \frac{k_1 k_2 [E_T][S] - k_{-1} k_{-2} [E_T][P] + k_2 k_{-2} [E_T][P] - k_2 k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} + \frac{k_1 k_{-2} [E_T][S][P] - k_1 k_{-2} [E_T][S][P] + k_{-2}^2 [E_T][P]^2 - k_{-2}^2 [E_T][P]^2}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.43)$$

la cual, luego de simplificar los términos que se cancelan mutuamente, queda:

$$v_{neta} = \frac{k_1 k_2 [E_T][S] - k_{-1} k_{-2} [E_T][P]}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P])} \quad (3.44)$$

De nuevo, si comparamos con la ecuación 3.15 veremos que se trata de la misma ecuación, con $[P] = 0$. Similarmente, si consideramos $[S] = 0$ obtendremos la ecuación simétrica para la v_0 de producción de S a partir de P. Con estas consideraciones, podemos encontrar los parámetros cinéticos para S y P que quedan definidos por la relación entre las constantes k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} :

$$k_{p,S} = k_2; \quad k_{p,P} = k_{-1} \quad (3.45)$$

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad K_{M,P} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (3.46)$$

$$k_{A,S} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}; \quad k_{A,P} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad (3.47)$$

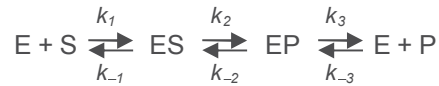
Con estas definiciones, y recordando que $V_{max,d} = k_2 [ET]$ por lo que análogamente $V_{max,r} = k_{-1} [ET]$, podemos ahora dividir el numerador y el denominador de la ecuación de la v_{neta} por $(k_{-1} + k_2)$ y expresarla así en términos de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_{neta} = \frac{\frac{k_1 k_2 [ET][S]}{k_{-1} + k_2} - \frac{k_{-1} k_{-2} [ET][P]}{k_{-1} + k_2}}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_1 [S]}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_{-2} [P]}{k_{-1} + k_2}} \quad (3.48)$$

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{M,S}} + \frac{[P]}{K_{M,P}}} \quad (3.49)$$

La ecuación 3.49 se conoce como la *ecuación de Michaelis-Menten reversible* y puede verse que, como siempre, si hacemos $[P] = 0$ se reduce a la ecuación directa 3.17. Esta ecuación puede aplicarse a vías metabólicas y utilizarse para el modelado matemático del metabolismo, donde los flujos internos van a estar determinados por las v_{neta} de las enzimas participantes.

Sin embargo, esta deducción tiene un problema, originado en una simplificación que se utilizó en el punto de partida. Recordemos que comenzamos diciendo que partiríamos de "la simplificación de tomar en cuenta al complejo ES como el único capaz de producir P a partir de S", lo cual no es estrictamente así. En realidad, el esquema de reacciones debería representarse de la manera siguiente:



Es decir, en la simplificación que hicimos no tomamos en cuenta (deliberadamente) que una vez que se forma el complejo ES ocurre la reacción dentro del mismo, con lo cual dicho complejo se transforma en un complejo EP y solo después el P se disocia de la E. La transformación del complejo ES en EP también tiene su cinética, y en particular, es ahí donde se produce la reacción. Por lo tanto, puede considerarse que la etapa cuyas constantes cinéticas son k_2 y k_{-2} es la etapa limitante de la reacción, ya que las otras dos etapas son simplemente unión y disociación. Por supuesto que si quisiéramos deducir la ecuación de la v_{neta} a partir del sistema de reacciones completo nos las veríamos negras, pero al final llegaríamos a la misma ecuación de Michaelis-Menten reversible, salvo que ahora los parámetros cinéticos van a resultar de relaciones de constantes diferentes ya que debemos incluir las constantes cinéticas de la transformación reversible de ES en EP. No vamos a deducir todos estos parámetros pero sí es importante considerar los dos K_M :

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)}; \quad K_{M,P} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)} \quad (3.50)$$

Si, como dijimos, la transformación reversible de ES en EP es la etapa limitante de la reacción, significa que tanto la reacción $ES \rightarrow EP$ como la reacción $EP \rightarrow ES$ deben ser ambas limitantes. Esto quiere decir que la constante k_2 para la transformación $ES \rightarrow EP$ debe ser mucho menor que la suma de las constantes ($k_{-2} + k_3$), que determinan la reacción reversa $EP \rightarrow ES$ y la disociación $EP \rightarrow E + P$, y simultáneamente, la constante k_{-2} para la reacción $EP \rightarrow ES$ debe ser mucho menor que la suma de las constantes ($k_{-1} + k_2$), que determinan la disociación $ES \rightarrow E + S$ y la reacción $ES \rightarrow EP$:

$$k_2 \ll (k_{-2} + k_3) \quad (3.51)$$

$$k_{-2} \ll (k_{-1} + k_2) \quad (3.52)$$

Por lo tanto, si aproximamos a cero los valores de esas constantes y las reemplazamos en las ecuaciones 3.50:

$$K_{M,S} = \frac{k_{-1}(k_{-2} + k_3) + 0k_3}{k_1(k_{-2} + 0 + k_3)} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_{S,S} \quad (3.53)$$

$$K_{M,P} = \frac{0k_{-1} + k_3(k_{-1} + k_2)}{k_{-3}(k_{-1} + 0 + k_2)} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_{S,P} \quad (3.55)$$

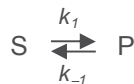
las constantes de Michaelis-Menten K_M se reducen a las constantes de disociación K_S . Por lo tanto, la ecuación 3.49 queda expresada como:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{S,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{S,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{S,S}} + \frac{[P]}{K_{S,P}}} \quad (3.56)$$

donde ahora las constantes de disociación sí representan la verdadera afinidad de la enzima por S o P.

Relación de Haldane

Al principio del capítulo aclaramos que las enzimas son catalizadores, es decir, aceleran la velocidad de las reacciones pero no modifican sus constantes de equilibrio. Ahora podríamos preguntarnos si a partir de los parámetros cinéticos podemos obtener una expresión para la constante de equilibrio. Suponiendo una reacción no catalizada:



en el equilibrio la $v_{neta} = v_d - v_r$ es cero, con lo cual:

$$k_1[S]_{eq} = k_{-1}[P]_{eq} \quad (3.57)$$

donde $[S]_{eq}$ y $[P]_{eq}$ representan las concentraciones de S y P una vez que la reacción alcanzó el equilibrio. Por lo tanto, la constante de equilibrio (K_{eq}) será:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} \quad (3.58)$$

Como dijimos, estas $[S]_{eq}$ y $[P]_{eq}$ serán las mismas si se añade la enzima que cataliza esta reacción; la única diferencia será que se alcanzarán más rápido en presencia de la enzima que en su ausencia. Por lo tanto, si utilizamos $[S]_{eq}$ y $[P]_{eq}$ en la ecuación 3.49, ésta forzosamente tendrá que igualarse a 0:

$$\frac{V_{max,d} \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} + \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}}} = 0 \quad (3.59)$$

Para que esto sea así, es necesario que el numerador de 3.59 valga 0, con lo cual:

$$V_{max,d} \frac{[S]_{eq}}{K_{M,S}} = V_{max,r} \frac{[P]_{eq}}{K_{M,P}} \quad \therefore$$

$$\frac{V_{max,d}}{K_{M,S}} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = K_{eq} \quad (3.60)$$

La ecuación 3.60 se llama *relación de Haldane* entre los parámetros cinéticos y la constante de equilibrio. Como la $[E_T]$ es la misma en ambas V_{max} , la relación de Haldane también puede expresarse usando los otros parámetros cinéticos, lo cual es ilustrativo:

$$\frac{\frac{k_{p,S}}{K_{M,S}}}{\frac{k_{p,P}}{K_{M,P}}} = K_{eq} \quad (3.61)$$

$$\frac{k_{A,S}}{k_{A,P}} = K_{eq} \quad (3.62)$$

es decir que la constante de equilibrio también es la relación entre las constantes de especificidad para S y P. La reacción va a ser termodinámicamente favorable en el sentido $S \rightarrow P$ si la constante de especificidad para S es mayor que para P. No obstante, debe recordarse siempre que estos tratamientos se refieren a tendencias termodinámicas; la reacción puede proceder en el sentido $P \rightarrow S$ si se la inicia en presencia de P y con $[S] = 0$.

La relación de Haldane también puede reemplazarse en la ecuación 3.49, lo cual brinda otro resultado interesante. Comencemos por sacar divisor común en el denominador:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{M,S}} + \frac{[P]}{K_{M,P}}} = \frac{V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}}}{\frac{K_{M,S}K_{M,P} + K_{M,P}[S] + K_{M,S}[P]}{K_{M,S}K_{M,P}}} \quad (3.63)$$

Ahora llevemos $K_{M,S}$ al numerador:

$$v_{neta} = \frac{K_{M,S} \left(V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{\frac{K_{M,S}K_{M,P}}{K_{M,P}} + \frac{K_{M,P}[S]}{K_{M,P}} + \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}} \quad (3.64)$$

Simplificando y reordenando en el denominador:

$$v_{neta} = \frac{K_{M,S} \left(V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} + [S] + \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}} = \frac{K_{M,S} \left(V_{max,d} \frac{[S]}{K_{M,S}} - V_{max,r} \frac{[P]}{K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.65)$$

Distribuyamos $K_{M,S}$ en el numerador y simplifiquemos:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d}[S] - V_{max,r} \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}}}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.66)$$

Seguidamente, multipliquemos y dividamos por $V_{max,d}$ en el numerador y luego simplifiquemos:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d}[S] \frac{V_{max,d}}{V_{max,d}} - V_{max,r} \frac{K_{M,S}[P]}{K_{M,P}} \frac{V_{max,d}}{V_{max,d}}}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} = \frac{V_{max,d} \left([S] - [P] \frac{V_{max,r} K_{M,S}}{V_{max,d} K_{M,P}} \right)}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.67)$$

Si comparamos el segundo miembro del numerador con la relación de Haldane (3.60) vamos a notar que

$$\frac{V_{max,r} K_{M,S}}{V_{max,d} K_{M,P}} = \frac{V_{max,r}}{\frac{K_{M,P}}{K_{M,S}}} = \frac{1}{K_{eq}} \quad (3.68)$$

De este modo, si reemplazamos 3.68 en 3.67, la ecuación que finalmente nos queda es:

$$v_{neta} = \frac{V_{max,d} \left([S] - \frac{[P]}{K_{eq}} \right)}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.69)$$

Esta ecuación es una forma muy útil de escribir la ecuación de Michaelis-Menten reversible ya que destaca, por un lado, el parecido con la ecuación de Michaelis-Menten para la v_0 (3.17) y por otro lado, evidencia dos cosas fundamentales. En el numerador, evidencia que la v_{neta} depende de cuán desplazada del equilibrio esté la reacción. Llamemos a lo que tenemos dentro del paréntesis del numerador de 3.69 como *grado de desplazamiento del equilibrio* y simbolicémoslo como ρ . Si allí reemplazamos K_{eq} por la relación de concentraciones de S y P en el equilibrio (ecuación 3.58), obtenemos lo siguiente:

$$\rho = [S] - \frac{[P]}{K_{eq}} = [S] - \frac{[P]}{\frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}}} \therefore$$

$$\rho = [S] - [S]_{eq} \frac{[P]}{[P]_{eq}} \quad (3.70)$$

Asumiendo que iniciamos la reacción con S y en ausencia de P, la misma se producirá necesariamente en el sentido $S \rightarrow P$, independientemente de su valor de K_{eq} . A medida que transcurre la reacción [S] se aproximará a $[S]_{eq}$, y por lo tanto irá disminuyendo desde su valor inicial. Recíprocamente, a medida que se vaya produciendo P, [P] se irá incrementando y se irá aproximando a $[P]_{eq}$. Es importante notar que ni [S] podrá disminuir más que el valor de $[S]_{eq}$ ni [P] podrá aumentar más allá de $[P]_{eq}$, ya que estos son los límites termodinámicos del sistema. Por lo tanto, a medida que [S] disminuya y [P] aumente, ρ tenderá a cero.

Vale la pena recordar aquí que la condición termodinámica para que una reacción se produzca es que su $\Delta G'$ sea menor que cero. El valor de $\Delta G'$ surge de:

$$\Delta G' = -RT \ln \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} + RT \ln \frac{[P]}{[S]} \quad (3.71)$$

Como puede verse, cuanto más desplazada del equilibrio esté una reacción, más negativo será su $\Delta G'$ y por lo tanto, más favorable será termodinámicamente. Pero esto nada nos dice de su velocidad, ya que, como venimos insistiendo, la relación 3.71 se cumple independientemente de la presencia de la enzima, y además no incluye explícitamente al tiempo. Sin embargo, si reemplazamos 3.70 en 3.69 veremos que el grado de desplazamiento del equilibrio también determina en forma directa la v_{neta} :

$$v_{neta} = V_{max,d} \frac{\rho}{K_{M,S} \left(1 + \frac{[P]}{K_{M,P}} \right) + [S]} \quad (3.72)$$

Por otra parte, si miramos en el denominador de 3.69 y 3.72, notaremos que se parece mucho al denominador de la ecuación de Michaelis-Menten directa (3.17) excepto que $K_{M,S}$ aparece multiplicado por un factor mayor que 1. El valor de este factor depende de [P] y de la afinidad de la enzima por P. Dado que P puede acceder también al sitio activo de la enzima, bloquea en parte los sitios accesibles para S. Por lo tanto, el efecto que se produce por la presencia de P es disminuir el valor de K_M ya que ahora se necesita mayor [S] para alcanzar la misma v_o que si P no estuviera. Sin embargo, la presencia de P no afecta el valor de V_{max} , ya que al ser la unión de P al sitio activo reversible, P puede ser desplazado del sitio activo aumentando suficientemente la [S]. Ya que estrictamente el $K_{M,S}$ no se modifica por la

presencia de P, hablamos de $K_{M,S}$ aparente y lo podemos simbolizar $K_{M(ap),S}$. Reemplazando, 3.72 queda expresada entonces como

$$v_{neta} = V_{max,d} \frac{P}{K_{M(ap),S} + [S]} \quad (3.73)$$

donde ahora vemos claramente cómo la v_{neta} depende del grado de desplazamiento del equilibrio y de la afinidad de P por el sitio activo de la enzima.

Preguntas

- 1) ¿Cuáles son los aspectos característicos de las reacciones enzimáticas?
- 2) ¿Es cierto que todas las enzimas conocidas son de naturaleza proteica?
- 3) ¿Qué propiedades presentan las enzimas que las diferencian de otros catalizadores?
- 4) ¿Qué tipo de interacciones se ejercen entre la enzima y el sustrato para formar el complejo ES?
- 5) ¿A qué es igual la constante de Michaelis, de qué depende?
- 6) Defina K_S y k_{cat} .
- 7) Cuál es la diferencia entre el complejo activado y el complejo enzima-sustrato?
- 8) Para una reacción $A \rightarrow B$ defina las condiciones en que $K_M = K_S$. Describa condiciones bajo las cuales esto no es cierto.
- 9) ¿Cuál es la aproximación del estado estacionario y bajo qué condiciones es válida?
- 10) ¿Cuál es el orden de reacción, con respecto al sustrato, de una reacción enzimática monosustrato?
- 11) ¿Bajo qué condiciones podemos asegurar que medimos velocidades iniciales?
- 12) ¿En cuánto tiempo se alcanza la V_{max} ?
- 13) ¿Cómo varía la velocidad inicial para $[S] \ll K_M$ y para $[S] \gg K_M$? ¿Qué utilidad tiene trabajar en cada una de estas condiciones?
- 14) ¿Cuál estimaría que fuese la concentración del sustrato fisiológica de las enzimas?
- 15) ¿Qué es el número de recambio?

Problemas

Problema 1

Para una reacción catalizada por una enzima michaeliana:

- a- Dibuje un gráfico de velocidad de reacción en función del tiempo.
- b- Haga lo mismo para la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato.
- c- Idem para velocidad inicial vs. concentración de enzima.

Problema 2

La creatina quinasa cataliza la siguiente reacción:



a- De acuerdo al valor de K_{eq} , en una mezcla de creatina, ATP, creatina-P y ADP en equilibrio a pH 8,0 un 87% de la creatina se encuentra como creatina-P. Si a esta mezcla se le agrega la creatina quinasa (sin cambiar las otras condiciones), ¿podría predecir qué porcentaje de creatina-P habrá luego de una hora de reacción?

b- Si luego de alcanzado el equilibrio se agrega creatina-P marcada con ^{32}P , ¿se introducirá ^{32}P en el ATP?

c- El K_M de esta enzima por la creatina es $1,6 \times 10^{-2}$ M. ¿Qué significado físico tiene este valor? ¿Como podría aumentar el K_M (creatina)?

Problema 3

En diez mezclas de reacción conteniendo la misma concentración de enzima y distintas concentraciones de sustrato, se determinaron las velocidades iniciales:

Sustrato (M)	v_o ($\mu\text{moles min}^{-1}$)
$1,0 \cdot 10^{-3}$	65
$5,0 \cdot 10^{-4}$	63
$1,0 \cdot 10^{-4}$	51
$5,0 \cdot 10^{-5}$	42
$3,0 \cdot 10^{-5}$	33
$2,0 \cdot 10^{-5}$	27
$1,0 \cdot 10^{-5}$	17
$5,0 \cdot 10^{-6}$	9,5
$1,0 \cdot 10^{-6}$	2,2
$5,0 \cdot 10^{-7}$	1,1

Utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk, determine gráficamente K_M y $V_{m\acute{a}x}$. Tenga en cuenta que uno de los factores críticos en la seguridad de esta determinación es la escala elegida para ordenada y abscisa. ¿Qué rango de concentración de sustrato es más útil para estas determinaciones?

Problema 4

En un experimento similar al anterior, se obtuvieron los datos de la tabla que se muestra en la página siguiente.

Grafique v_o en función de $v_o/[S]$. Determine K_M y $V_{m\acute{a}x}$. ¿Cuál es la ventaja de este tipo de gráfica con respecto al gráfico de la doble recíproca?

Sustrato (M)	v_o ($\mu\text{moles min}^{-1}$)
$4,0 \cdot 10^{-4}$	130
$2,0 \cdot 10^{-4}$	110
$1,0 \cdot 10^{-4}$	89
$5,0 \cdot 10^{-5}$	62
$4,0 \cdot 10^{-5}$	53
$2,5 \cdot 10^{-5}$	38
$2,0 \cdot 10^{-5}$	32

Problema 5

Se estudió la dependencia de la velocidad de una reacción enzimática con la concentración de sustrato. Se midieron en un volumen de reacción de 10 ml, las velocidades iniciales a distintas concentraciones de sustrato y concentración constante de enzima:

Sustrato (M)	v_o ($\mu\text{moles min}^{-1}$)
$5,0 \cdot 10^{-2}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-3}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,25
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,20
$5,0 \cdot 10^{-6}$	0,071
$5,0 \cdot 10^{-7}$	0,0096

a) ¿Cómo determina los valores de v_o ?

Utilizando cálculos numéricos (no gráficos) conteste lo siguiente:

b) ¿Cuáles son los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M ?

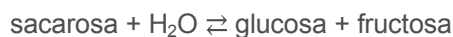
c) ¿Cuáles son las velocidades iniciales a $[S] = 1,0 \cdot 10^{-6}$ M y $1,0 \cdot 10^{-1}$ M?

d) Calcule la cantidad total de producto producido durante los primeros 5 minutos a $[S] 2,0 \cdot 10^{-3}$ M. ¿Puede hacer el mismo cálculo a $[S] 2,0 \cdot 10^{-6}$ M?

e) Suponga que la concentración de enzima en cada mezcla de reacción se incrementa en un factor de 4. ¿Cuál será el valor de K_M ? y de $V_{m\acute{a}x}$? ¿Cuál será el valor de v_o a $[S] 5,0 \cdot 10^{-6}$ M?

Problema 6

Se desea medir parámetros cinéticos de la invertasa en un extracto de levadura comercial. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Para ello se realiza el experimento diagramado a continuación:

	Mezcla de reacción 1	Mezcla de reacción 2	Mezcla de reacción 3
Buffer Ac. acético-acetato Na 0,02 M pH 4,77	2 ml	2 ml	2 ml
Sacarosa 0,5 M	-	-	2 ml
Sacarosa 0,05 M	2 ml	4 ml	-
Extracto enzimático	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Agua	5,6 ml	3,6 ml	5,6 ml

Las tres mezclas de reacción se incubaron a 20 °C tomándose muestras de 1 ml a tiempos 2', 5' 7' y 10' de incubación. Sobre las muestras se midió la actividad de la enzima. Los resultados se expresan como μmoles de sacarosa transformada en 10 ml de mezcla de reacción:

Tiempo	μmoles sacarosa transformada/10 ml mezcla reacción		
	M.R. 1	M.R. 2	M.R. 3
2'	1,6	2,0	3,9
5'	3,7	4,5	9,0
7'	5,5	6,3	12,6
10'	5,5	9,0	18,2

- Calcule, con estos datos, $V_{\text{máx}}$ y K_M a partir de un gráfico $1/v_o$ en función de $1/[\text{S}]$.
- Calcule las unidades de invertasa contenidas en los 0,4 ml de extracto enzimático, de acuerdo a una unidad de actividad enzimática que Ud. debe definir previamente.
- ¿Puede calcular la actividad específica de la invertasa en el extracto enzimático? Explique.

Problema 7

Los siguientes datos se registraron para la reacción $\text{S} \rightleftharpoons \text{P}$ catalizada enzimáticamente:

[S] (M)	v_o (nmoles l ⁻¹ min ⁻¹)
$6,25 \times 10^{-6}$	15,00
$7,50 \times 10^{-5}$	56,25
$1,00 \times 10^{-4}$	60,00
$1,00 \times 10^{-3}$	74,90
$1,00 \times 10^{-2}$	75,00

a- Determinar $V_{m\acute{a}x}$ y K_M

b-¿Cuál sería v_o si $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M?

b1-¿Cuál sería v_o si $[S] = 5,0 \cdot 10^{-5}$ M?

b2-¿Cuál sería v_o si $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M y la concentración de enzima es el doble de la original?

c-¿Cuál es la concentración de enzima libre cuando $[S]$ es $1,00 \cdot 10^{-2}$ M?

d- ¿Cuál es la concentración de enzima libre cuando $[S]$ es $6,25 \cdot 10^{-6}$ M?

e- La v_o dada en la tabla anterior se determinó midiendo la concentración de producto acumulado en un período de 10 min. ¿Es válida la suposición de que estos valores de v_o representan las velocidades iniciales en todo el rango de $[S]$?

f- Defina una unidad enzimática para este sistema y calcule la actividad en la mezcla de incubación.

Bibliografía

Cornish-Bowden A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Londres: Wiley-Blackwell.

Dixon, M., Webb, E.C. (1980) *Enzymes* New York: Academic Press.

Fell D. (1996) *Understanding the Control of Metabolism*. Londres: Portland Press.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons.

Segel I.W. (1982) *Cálculos de Bioquímica*, 2da. edición. Zaragoza: Editorial Acribia.

Voet D., Voet J (2006) *Bioquímica*, 3ra. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.