

Cinética Enzimática

Biofísica 2023

Luis Claro

Presentación basada en las diapositivas del Dr. Andrés Pomi, para el curso de Biofísica 2022

Enzimas

Las enzimas son **catalizadores biológicos**.

En su mayoría se trata de **proteínas** con la capacidad de manipular otras moléculas sin ser alterados por la reacción, esas moléculas son denominadas **sustratos**.

Un sustrato es capaz de unirse al **sitio activo** de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto a lo largo de una serie de pasos denominada mecanismo enzimático.

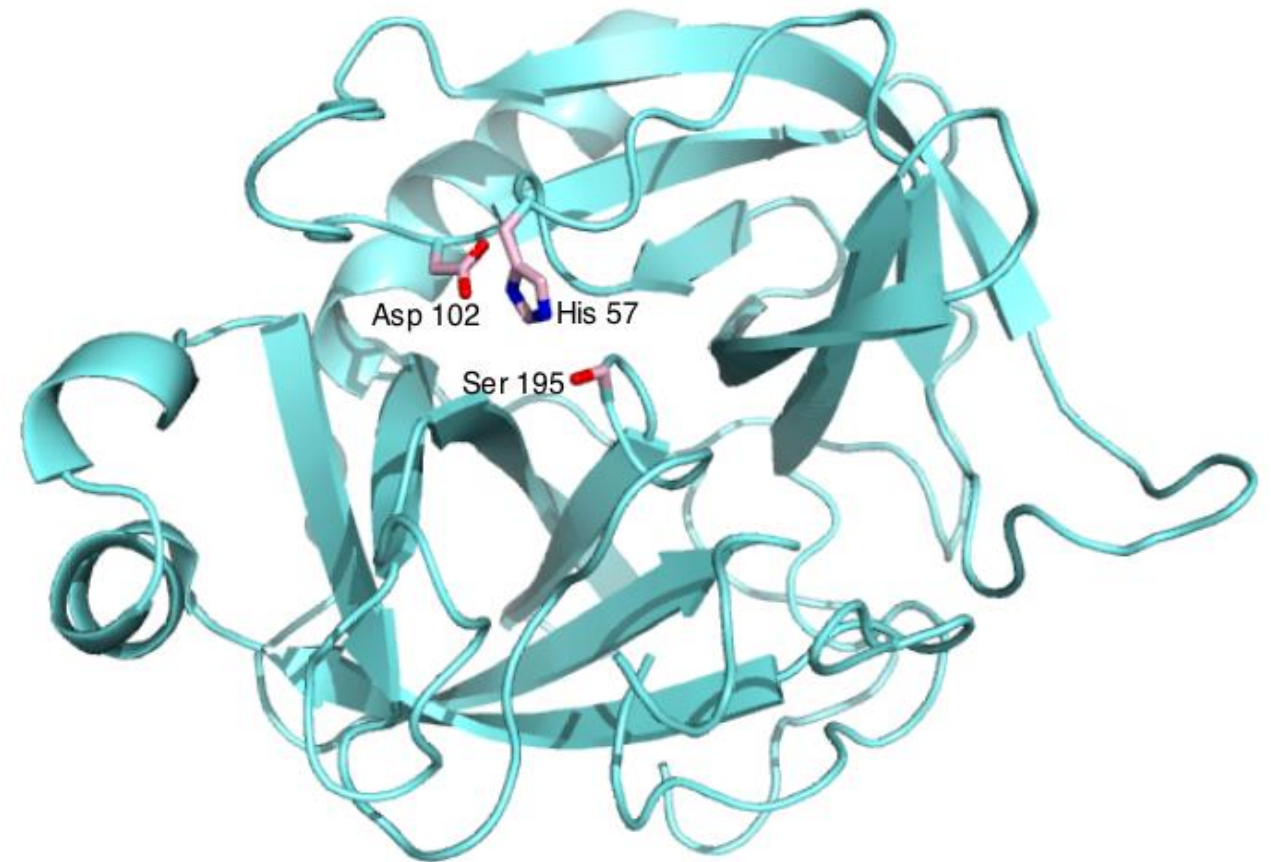
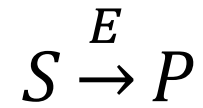


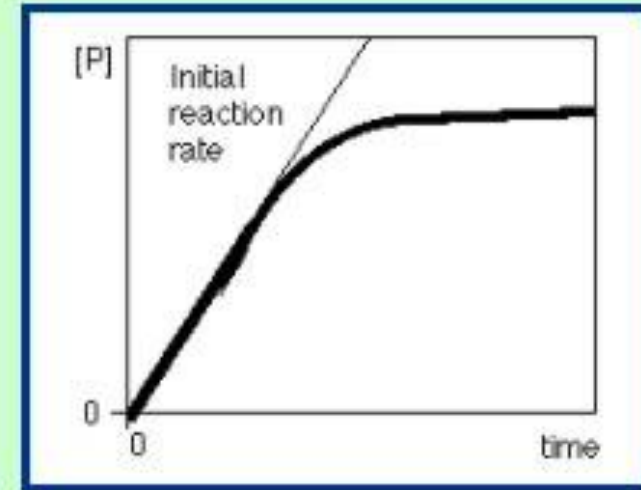
Diagrama de cinta de la quimotripsina. Se identifican los residuos que forman el sitio activo.

Medida de la velocidad de reacción y aproximación a su mecanismo

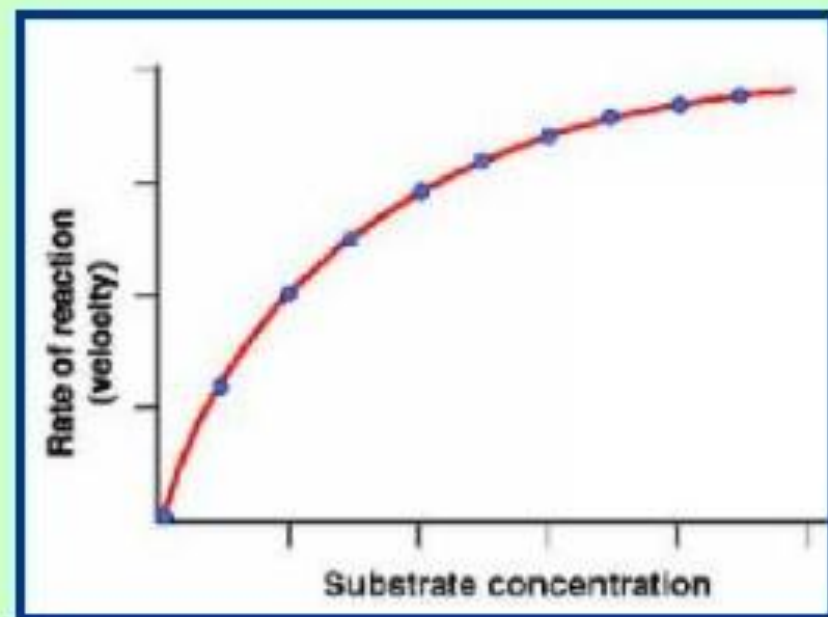
La cinética enzimática **estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas**. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos **no es necesario purificar o aislar el enzima**. La medida se realiza siempre en las **condiciones óptimas** de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{\max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos.



Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada **curva de avance de la reacción**, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción (Figura de la derecha). Para evitar esta complicación se procede a **medir la velocidad inicial de la reacción** (v_0). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero (Figura de la derecha). De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda **considerarse la [S] como esencialmente constante** a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones **no es necesario considerar la reacción inversa**, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.



Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la **concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la Figura de la derecha. **Cuando $[S]_0$ es pequeña**, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, **la reacción es de primer orden**. **A altas $[S]_0$** , el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, **la reacción es de orden cero** y la velocidad es máxima (V_{max}).



Estudio del curso temporal de la acción enzimática

Victor Henri

1902

- Complejo enzima-sustrato



- Hipótesis de equilibrio rápido



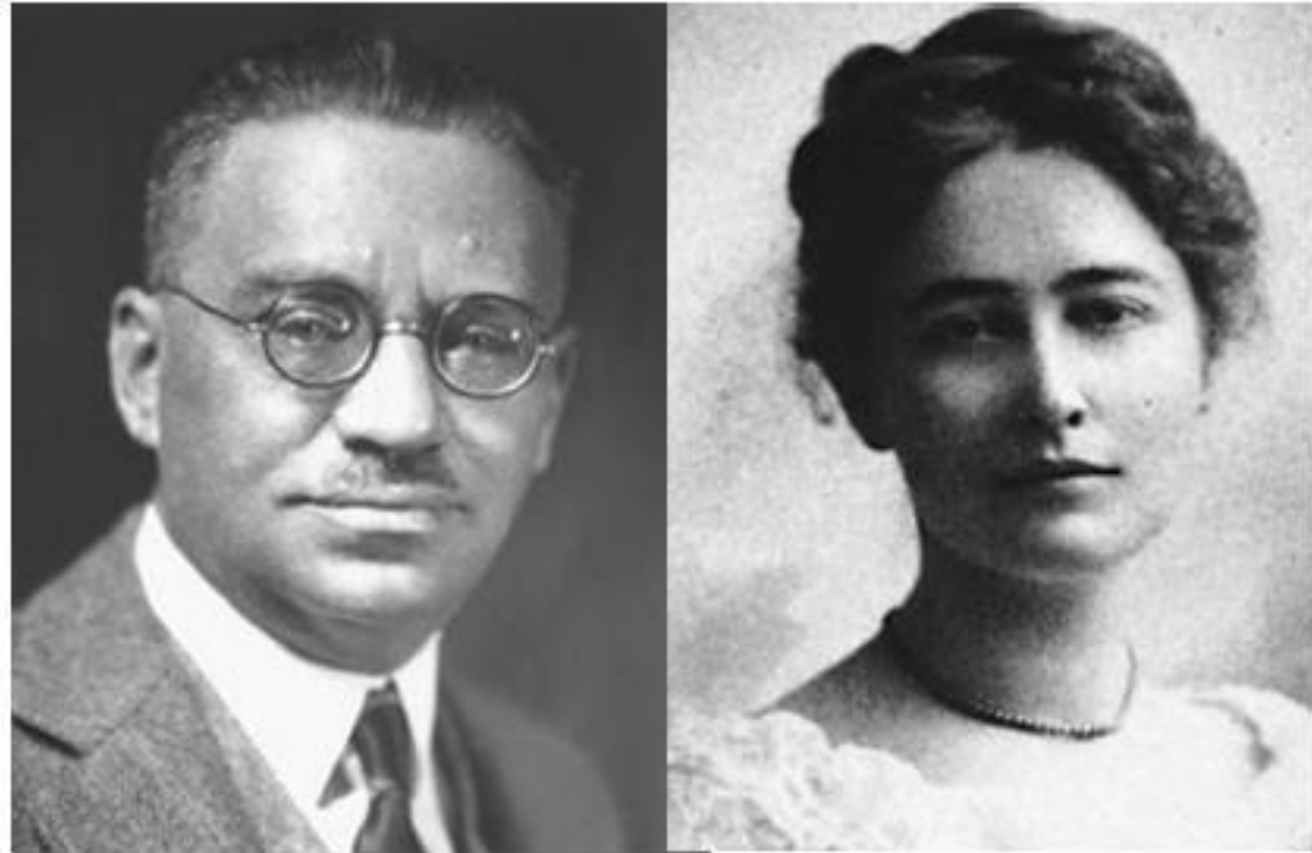
$v_1 = k_1 e \cdot s$ $v_2 = k_{-1} x$ En equilibrio $v_1 = v_2$

cte. de disociación: $K_s = e \cdot s / x = k_{-1} / k_1$



Leonor Michaelis & Maud L. Menten (1913)

- Utilización de buffers para el control del pH en el estudio de reacciones enzimáticas



e_0 : enzima total; e : enzima libre; x : complejo; k_{+2} : cte. cinética del segundo paso irreversible

- Esquema de reacción:



- Hipótesis de equilibrio rápido:

$$K_s = es/x,$$

- Conservación de enzima: $e_0 = e + x$ $x = (e_0 - x)s/K_s$ $\therefore x = \frac{e_0}{(K_s/s) + 1}$

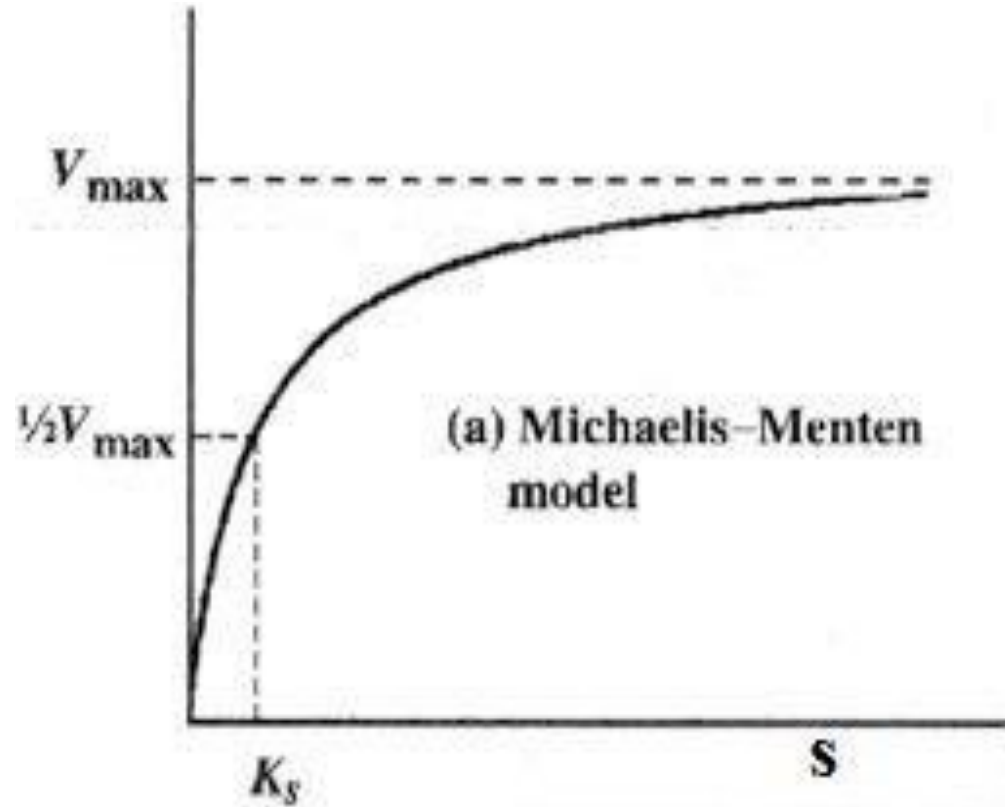
- Ecuación de velocidad:

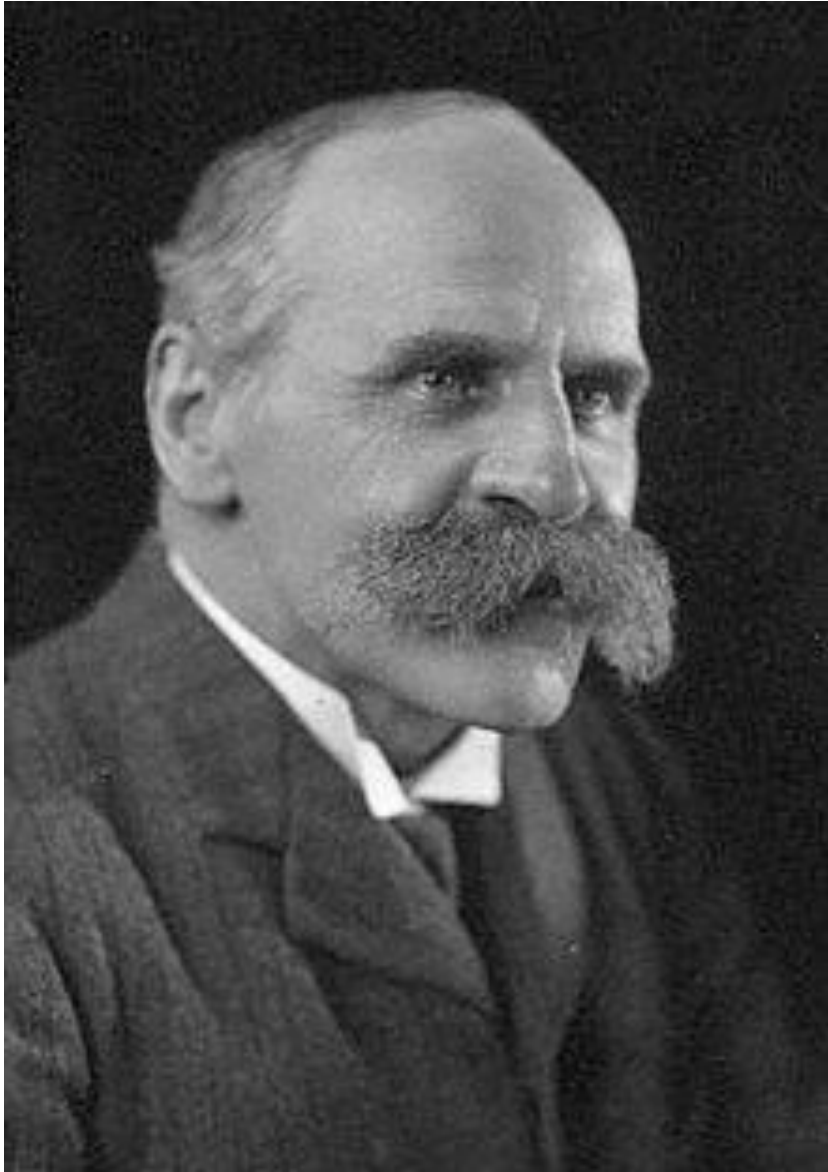
$$v = k_{+2}x = \frac{k_{+2}e_0}{(K_s/s) + 1} = \frac{k_{+2}e_0s}{K_s + s}$$

Cinética hiperbólica

$$v = \frac{V_{max}S}{K_S + S}$$

$$V_{max} = k_2e_0$$
$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$$





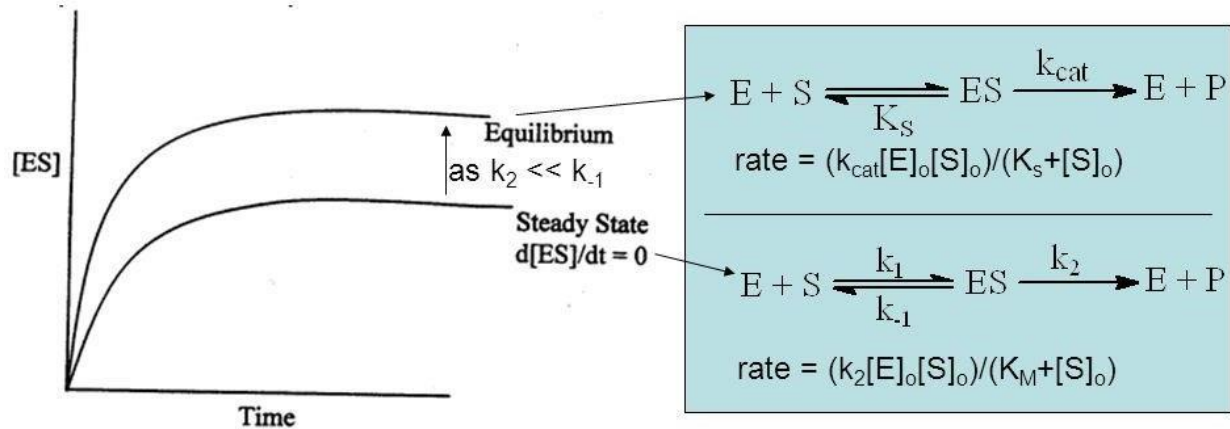
La contribución de Haldane

J. S. Haldane, MD, FRS - 1910

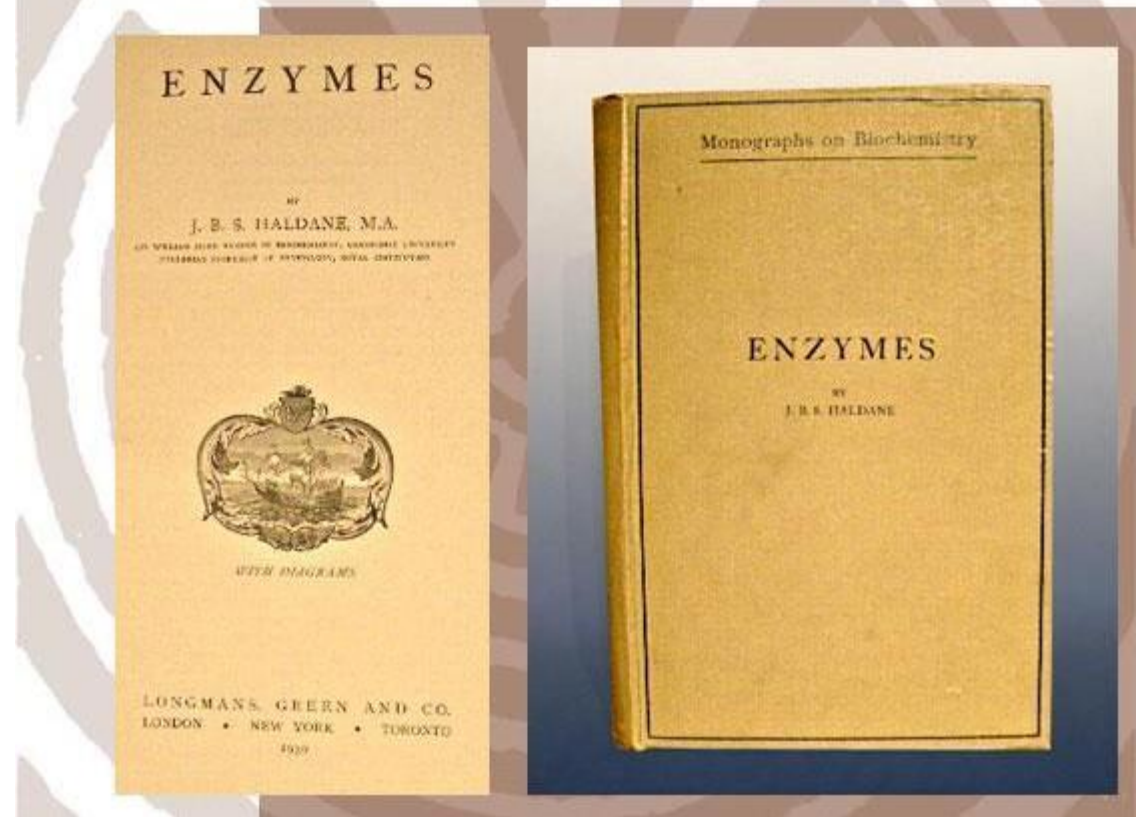
JBS Haldane y la Enzimología

1930

1-Nuevo mecanismo: Hipótesis del Estado Estacionario



- Briggs and Haldane revised the mechanism
 - They assumed that k_2 was significant in comparison to k_{-1} (not an equilibrium, rather a steady-state).
 - They set $d[ES]/dt = 0$ to obtain a rate formula.
 - The “new” M-M equation has the same form as the original! Why? Equilibrium is a special case of the steady state treatment, $k_2 \ll k_{-1}$.
 - How does K_M vary amongst the two models? K_M is either $(k_{-1} + k_2)/k_1$ or $K_M \approx K_S = k_{-1}/k_1$ (in the original M-M model).

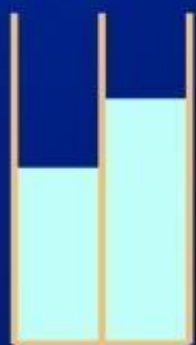


2-Relaciones de Haldane

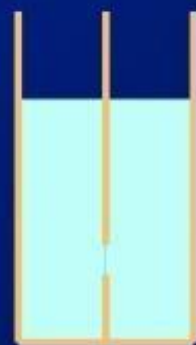
Equilibrio vs Estado Estacionario

¿Equilibrio = Estado Estacionario?

En el equilibrio, al comunicar los compartimientos no hay procesos netos



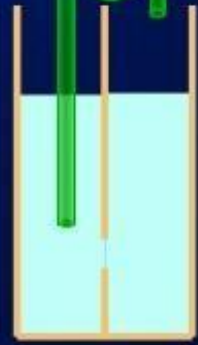
desequilibrio



equilibrio



Estado estacionario...



equilibrio

la entrada es igual a la salida y hay propiedades internas sin cambio mientras se le de energía, pues al parar ese suministro, hay procesos netos que llevan al sistema hacia el equilibrio.

M en C R Govea V.

Estados de no-Equilibrio y estados Estacionarios

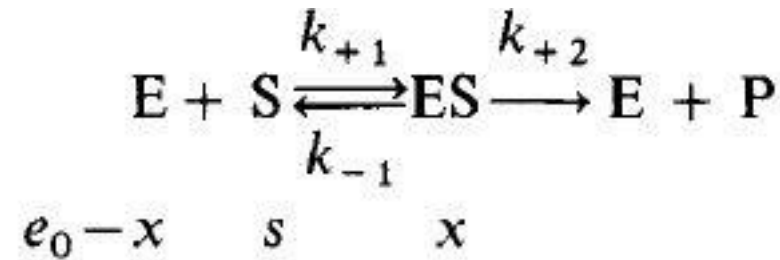
- Al igual que en un equilibrio, los parámetros que nos interesan permanecen constantes en el tiempo.
- A diferencia del equilibrio, hay un flujo directo que parte de una fuente, llega a un reservorio y atraviesa al sistema.
- Sólo los sistemas fuera del equilibrio son capaces de realizar trabajo útil.

Ilya Prigogine



Tratamiento de Briggs & Haldane (1925)

- Hipótesis del Estado Estacionario del complejo enzima-sustrato



$$dx/dt = k_{+1}(e_0 - x)s - k_{-1}x - k_{+2}x$$

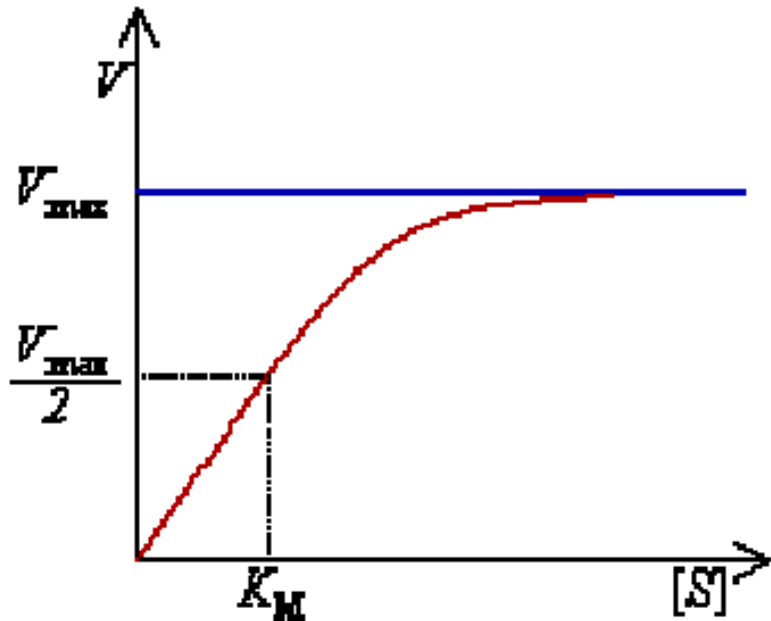
$$v = k_{+2}x = \frac{k_{+1}k_{+2}e_0s}{k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}} = \frac{k_{+2}e_0s}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + s}$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$V_{\max} = k_2 E_T$$

Ecuación de M-M

$$S = K_M \Rightarrow v_P = \frac{V_{\max}}{2}$$



$$v_P = V_{\max} \frac{S}{K_M + S}$$

- Caso 1: $S \ll K_M$

$$v = (V_{\max}/K_M) S$$

$$v = k_{\text{obs}} S$$

- Caso 2: $S \gg K_M$

$$v = V_{\max}$$

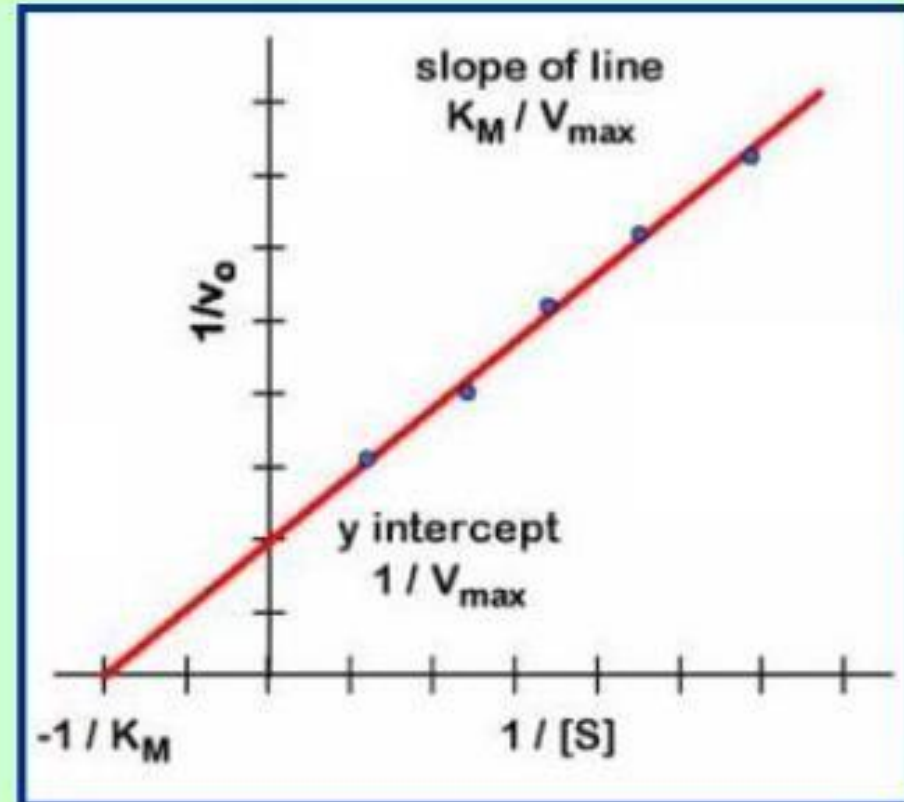
- K_M y afinidad de la enzima por el sustrato

Linealizaciones y estimación de parámetros

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la **representación doble recíproca** ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de **representación de Lineweaver-Burk** (Figura de la derecha). Es una recta en la cual:

- La pendiente es K_M/V_{max}
- La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$
- La ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

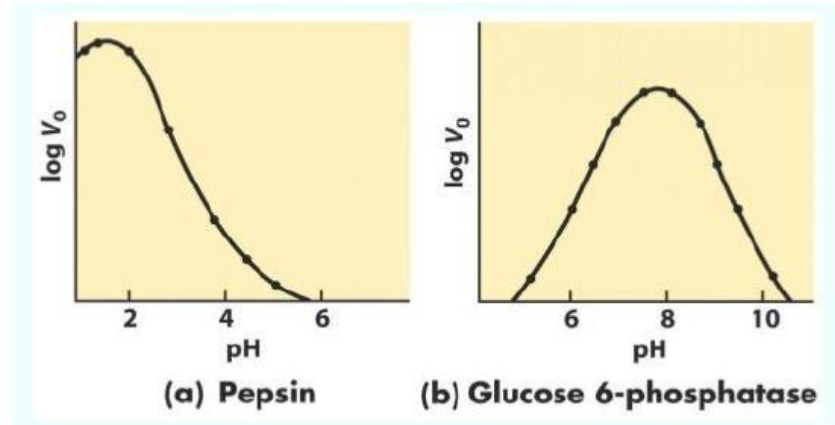
De esta forma, a partir de los datos experimentales se puede calcular gráficamente, los valores de K_M y V_{max} de un enzima para diversos sustratos.



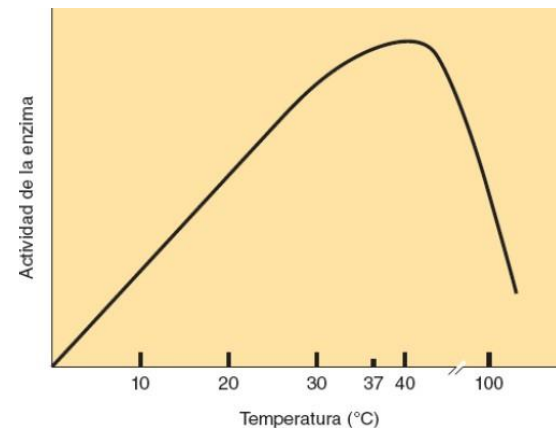
Variaciones

- Inhibición de la acción enzimática:
 - Inhibición por producto
 - Inhibición competitiva

- Efecto del pH



- Efecto de la temperatura



Bibliografía recomendada

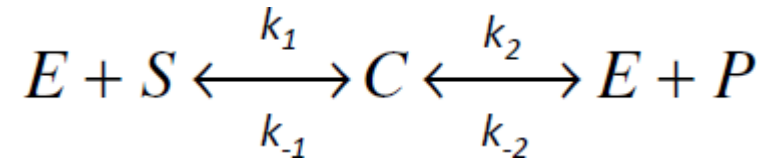
“Principles of Enzyme Kinetics”, de Cornish-Bowden

Capítulo 2: Introduction to Enzyme Kinetics

Capítulo 7 o 9 (Según la versión): Control of Enzyme Activity

Reversibilidad

- El paso irreversible en la cinética Michaeliana es una simplificación fuerte



- Hipótesis de estado estacionario del complejo:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 E S + k_{-2} E P - (k_{-1} + k_2) C = 0$$

$$\frac{dP}{dt} = v_P = k_2 C - k_{-2} E P$$

$$K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_P = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}$$

$$\begin{aligned} V_S &= k_2 E_T \\ V_P &= k_{-1} E_T \end{aligned}$$

Utilizando las ecuaciones de conservación, reorganizando términos y redefiniendo, se llega a la expresión:

$$v_P = \frac{V_S \frac{S}{K_S} - V_P \frac{P}{K_P}}{1 + \frac{S}{K_S} + \frac{P}{K_P}}$$

- Ecuación de Michaelis-Menten reversible

Relación de Haldane

- Vínculo entre la cinética enzimática y la Termodinámica.

En el equilibrio: $v_P = 0 \Rightarrow V_S \frac{S}{K_S} - V_P \frac{P}{K_P} = 0$

$$K_{eq} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}}$$

$$K_{eq} = \frac{V_S K_P}{V_P K_S}$$

- La relación de Haldane nos permite obtener **la constante de equilibrio, K_{eq} , de la reacción a partir de las constantes cinéticas** .

Y por extensión, podemos, también calcular el valor de $\Delta G'^{\circ}$ de la reacción a partir de las constantes cinéticas enzimáticas, ya que:

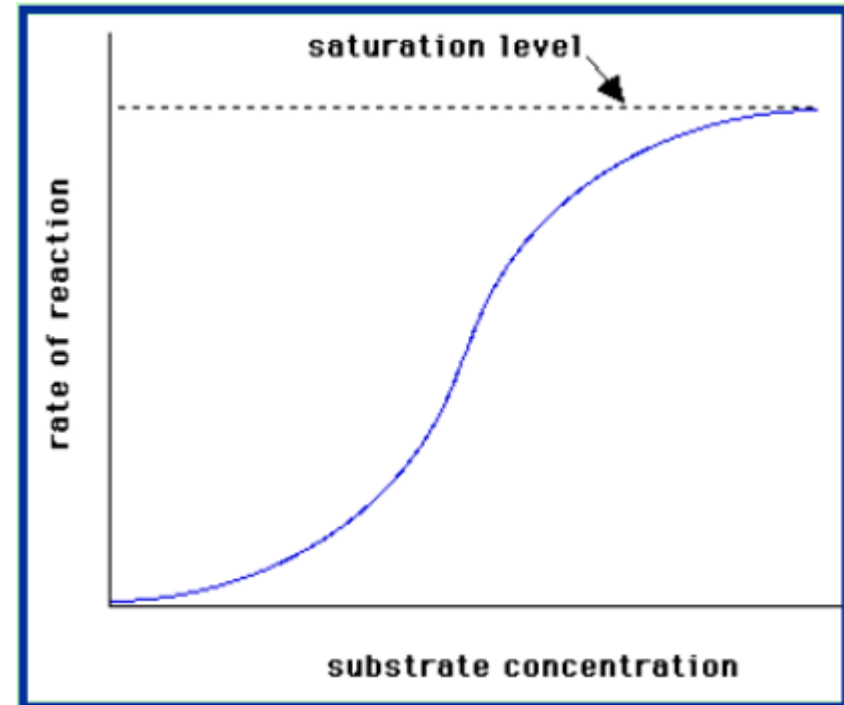
$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln \frac{V_{m_S} K_{m_P}}{V_{m_P} K_{m_S}}$$

Las constantes cinéticas son fáciles de calcular experimentalmente.

Cinéticas no-Michaelianas

- Enzimas alostéricas
- Enzimas con cooperatividad

$$v = \frac{V_{max}S^n}{K_{0,5}^n + S^n}$$



Importancia de la Cooperatividad

“Sin embargo, incluso si hay varios efectores actuando concertadamente, la situación cualitativa es la misma: un cambio drástico en el entorno es necesario en orden de conseguir incluso un modesto cambio de velocidad. Los requerimientos metabólicos son exactamente los opuestos: por un lado, las concentraciones de los metabolitos principales deben ser mantenidos dentro de una pequeña tolerancia, y por otro lado, las velocidades de reacción deben ser capaces de cambiar muy grandemente – probablemente más que el rango 0,1V a 0,9V que hemos considerado en muchos casos – en respuesta a fluctuaciones dentro de esas pequeñas tolerancias.”

Cooperatividad en la catálisis: Enzimas Alostéricas

- Algunas enzimas tienen la capacidad de responder con extrema sensibilidad a pequeños cambios en las concentraciones de metabolitos. Esta propiedad es llamada cooperatividad, debido a que es atribuida a la “cooperación” entre los sitios activos de enzimas oligoméricas (Ej.: la ‘enzima honoraria’: hemoglobina).

Dos enfoques: **Seleccionismo** vs. **Instructivismo**

Modelo alostérico concertado de Monod-Wyman-Changeux vs. Modelo secuencial Koshland-Nemethy-Filmer

1. La proteína es un oligómero
 2. La proteína existe en un equilibrio entre dos estados: T (tenso) y R (relajado)
 3. La forma T tiene la misma constante K_t de unión al sustrato para todos sus sitios
 4. La forma R tiene la misma constante K_r de unión al sustrato para todos sus sitios
 5. $K_t > K_r$
 6. El cooperativismo está dado por la constante de equilibrio entre las formas T y R, la constante alostérica, L.
1. En ausencia de ligando la proteína existe como una única conformación
 2. Cuando el ligando se une, induce un cambio conformacional que es transmitido al resto de la enzima modificando las constantes de afinidad
 3. El modelo de KNF= modelo de ajuste inducido

MWC (1965)

KNF (1966)

