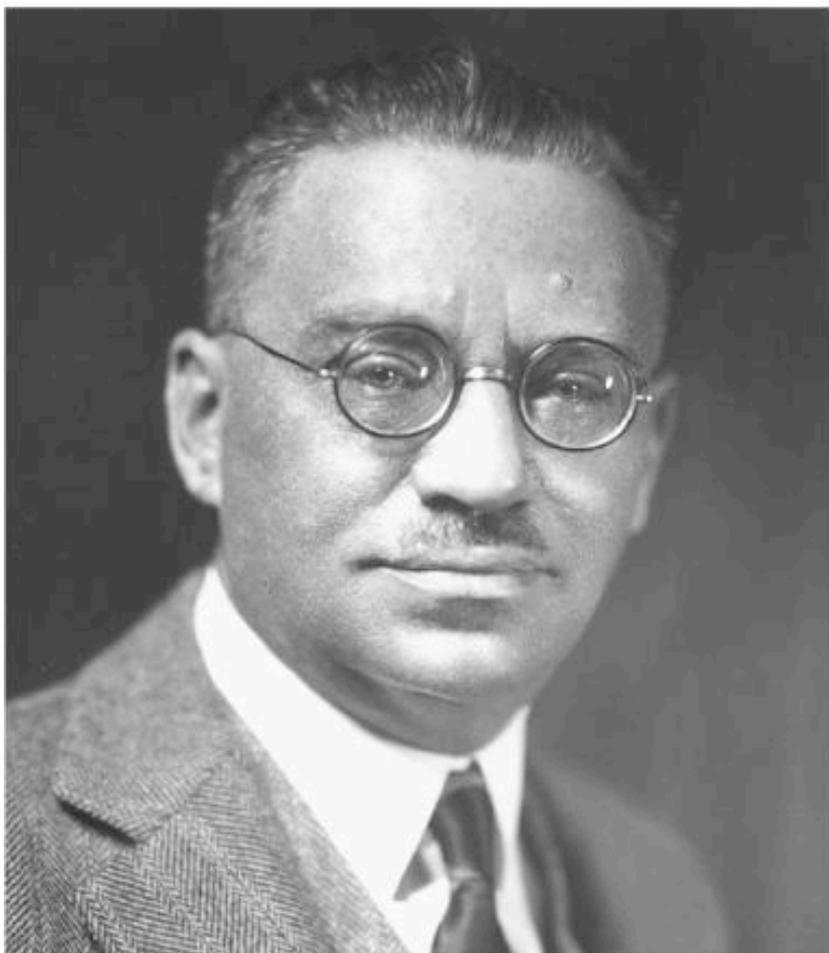


TEMA: Enzimas II

- **Cinética de la reacciones enzimáticas**
- **Ecuación de Michaelis-Menten**
- **Tipos de inhibición enzimática**
- **Métodos de representación gráfica**

Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Menten (1879-1960)



CINÉTICA ENZIMÁTICA



$$v_0 = d[P]/dt = k_2 [E:S]$$

$$v_f = - d[S]/dt = k_1 [E] [S] = k_1 ([E_T] - [E:S]) [S]$$

$$v_d = - d[E:S]/dt = k_{-1} [E:S] + k_2 [E:S]$$

CINÉTICA DEL ESTADO ESTACIONARIO

$$d[E:S]/dt = 0$$

$$v_f = v_d$$

Ecuación de Michaelis- Menten

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

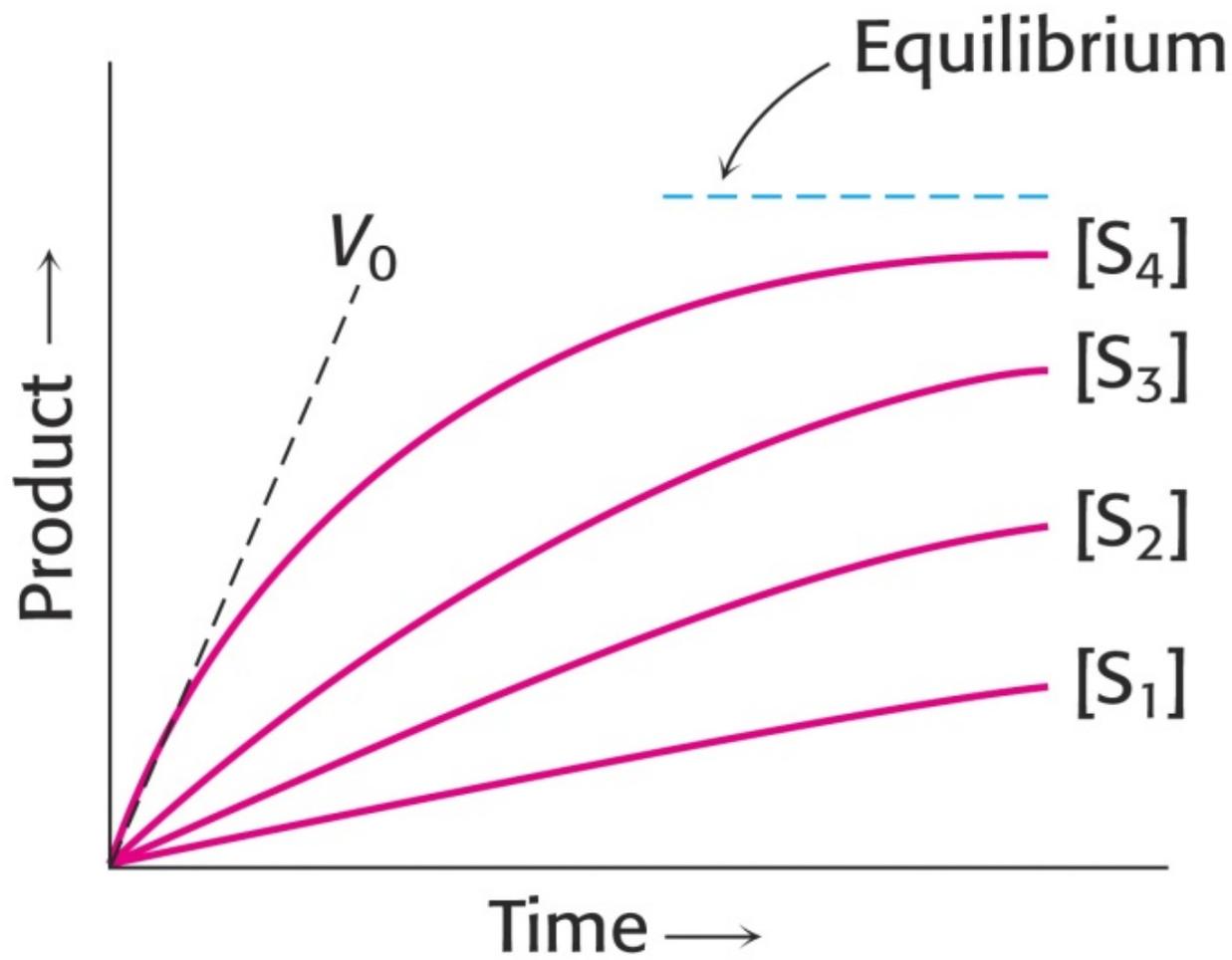
Constante de Michaelis-Menten

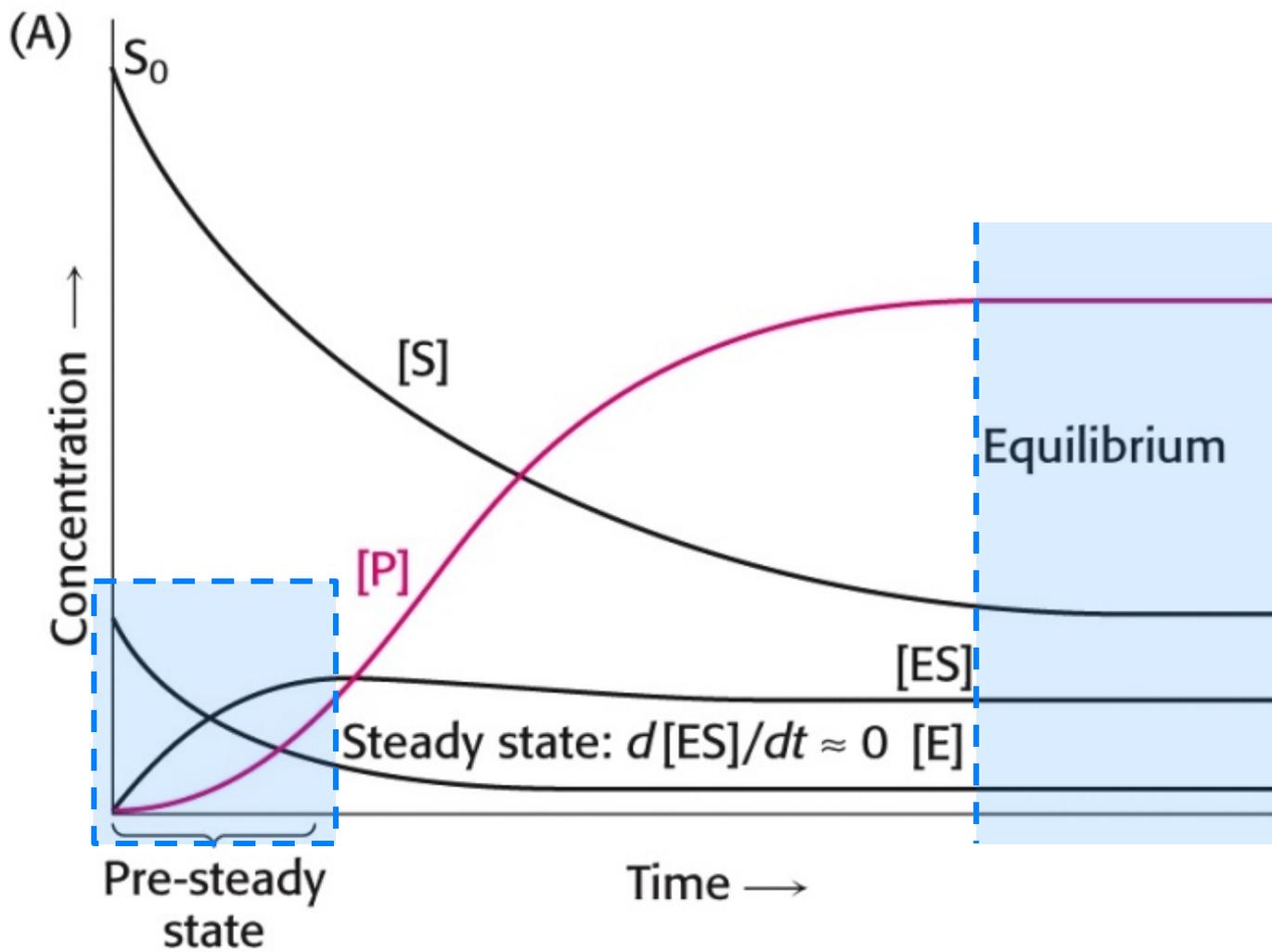
$$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

Da una idea de la afinidad por S

Velocidad máxima

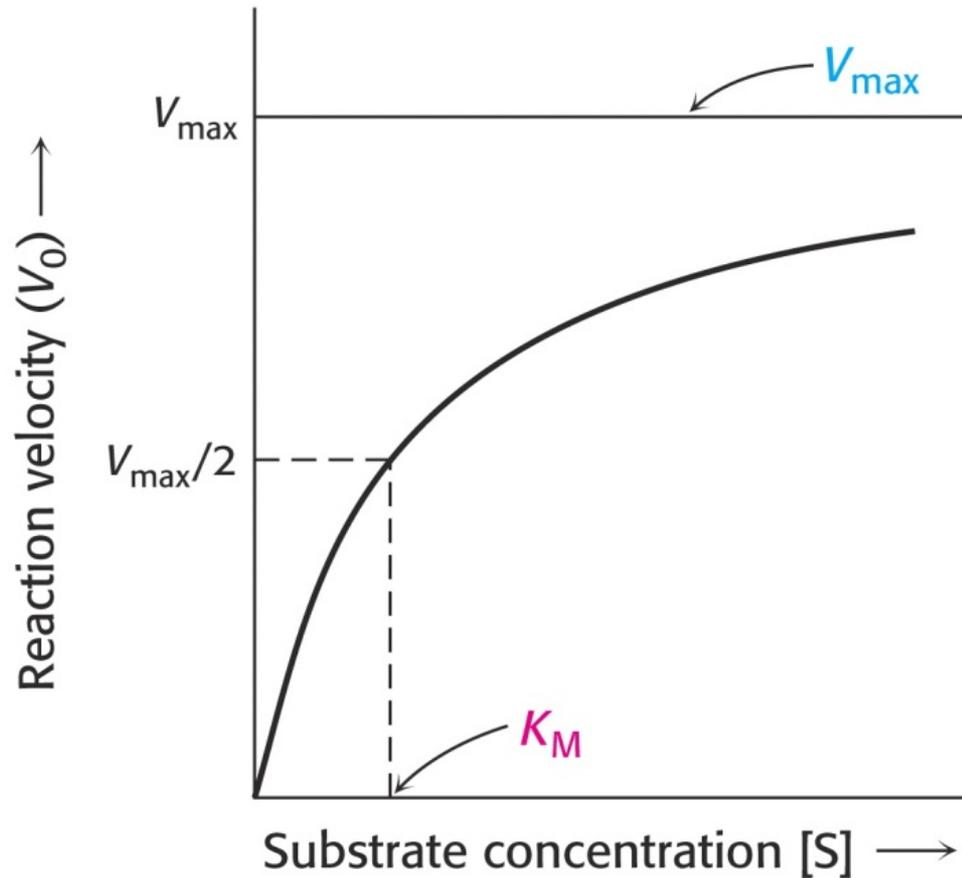
$$V_{\max} = k_2 [E_T]$$





Cinética enzimática

Ecuación de Michaelis-Menten



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

Parámetros cinéticos de una enzima

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-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
Arginine-tRNA synthetase	tRNA	0.4
	ATP	300

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

Enzyme	$k_{\text{cat}} / K_M (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$
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

NÚMERO DE RECAMBIO (k_{cat})

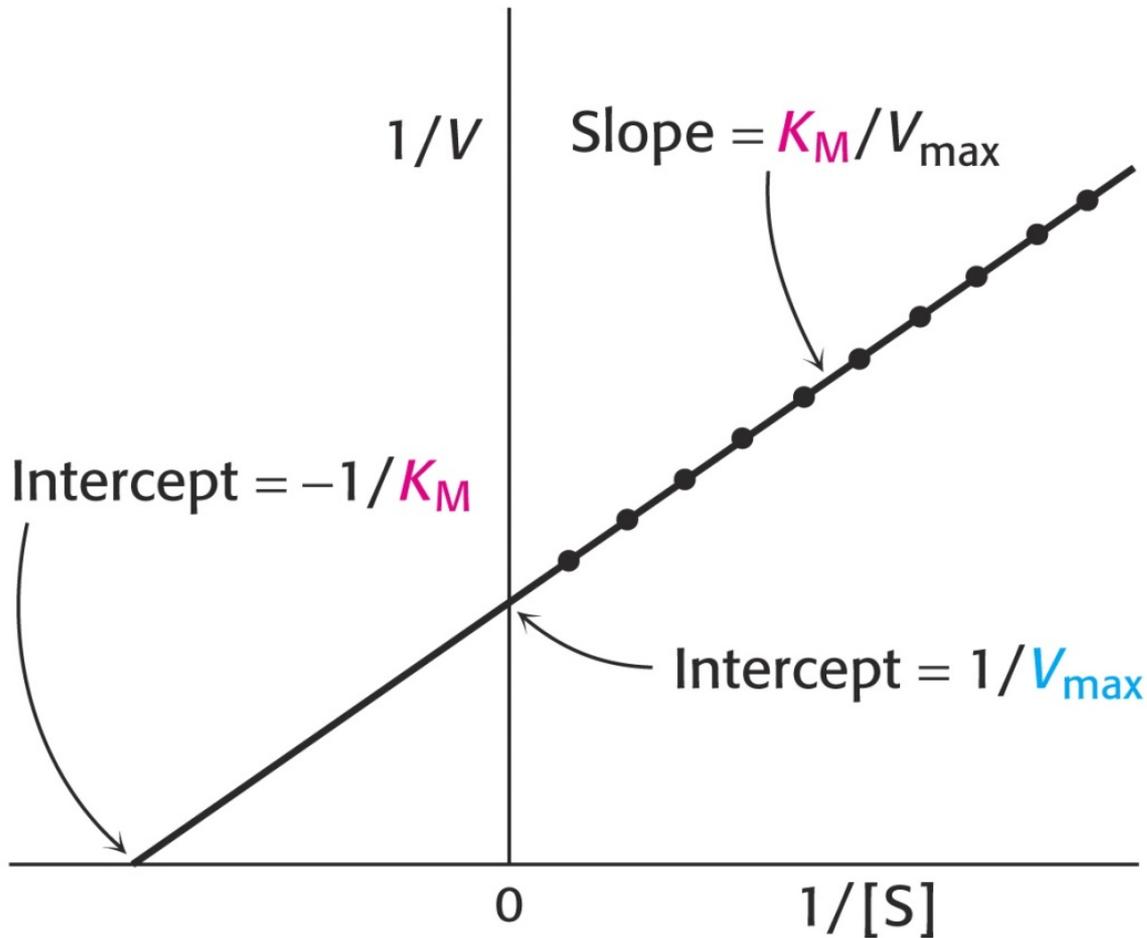
Número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por molécula de enzima y a concentraciones saturantes de sustrato

$k_{\text{cat}}/K_M \longrightarrow$ EFICIENCIA CATALÍTICA

$K_M \longrightarrow$ AFINIDAD
 $V_{\text{max}} \longrightarrow$ POTENCIA CATALÍTICA
 $k_{\text{cat}} \longrightarrow$ NUMERO DE RECAMBIO

Ecuación de dobles inversos o de Lineweaver-Burk

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



Conceptos básicos en Cinética Enzimática:

Constante de Michaelis-Menten (K_M): Informa sobre la concentración de sustrato a la que están ocupados el 50% de los centros activos (mitad de la velocidad máxima). Da una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato. Tiene unidades de concentración.

Velocidad máxima (V_{max}): Velocidad de reacción para una determinada cantidad de enzima saturada por el sustrato. Da una idea de la potencia catalítica de la enzima. Tiene unidades de concentración por unidad de tiempo.

Número de recambio (k_{cat}): Número de moléculas de sustrato procesadas (recambios) por unidad de tiempo por una molécula de enzima, en condiciones saturantes. Tiene unidades de $(\text{tiempo})^{-1}$. Cada molécula de sustrato es procesada por la enzima en un tiempo igual a $1/k_{cat}$.

Eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M): Constante de velocidad aparente para la reacción de segundo orden entre enzima y sustrato, a bajas concentraciones de este último. Da una buena idea de lo eficiente que es la enzima, porque cuantifica tanto la catálisis como la interacción. Tiene unidades de $(\text{concentración} \times \text{tiempo})^{-1}$.

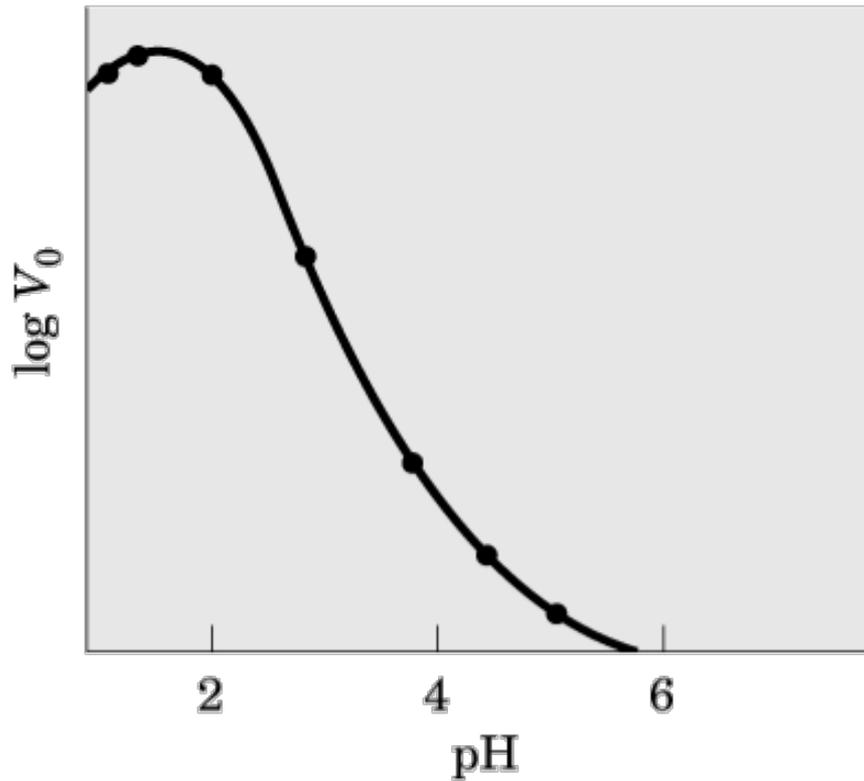
También son útiles...

Unidad de actividad enzimática (U.I.): Cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato por minuto en condiciones óptimas para la enzima. En lugar de U.I. la IUB recomienda el uso del *katal*, o cantidad de enzima capaz de transformar un mol de sustrato por segundo.

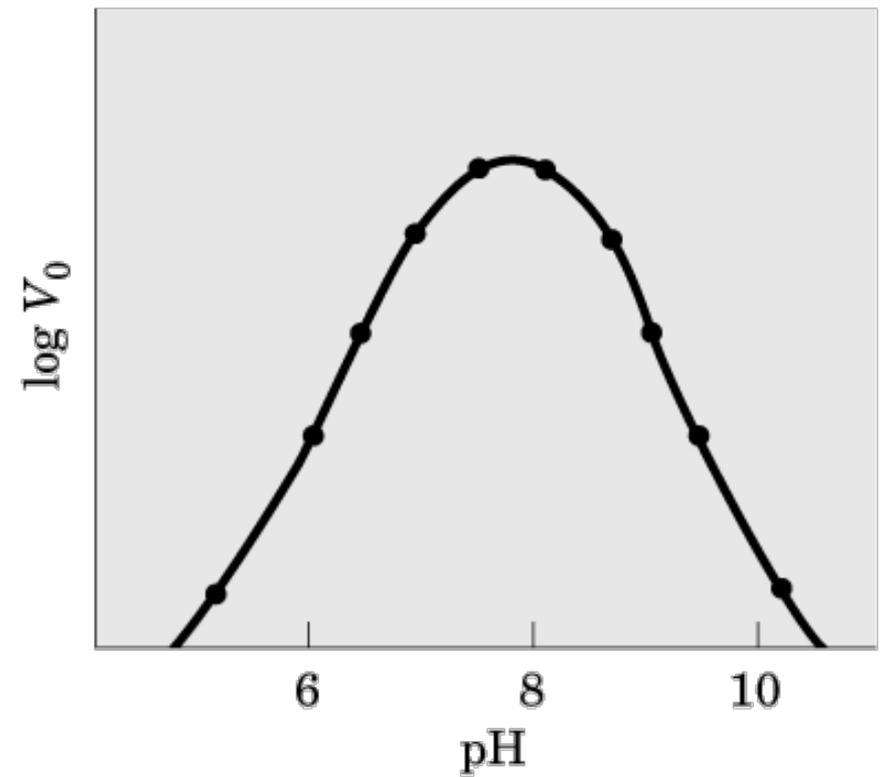
Actividad específica: Unidades de actividad enzimática por mg de enzima. Está relacionada con el número de recambio.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática

pH óptimo



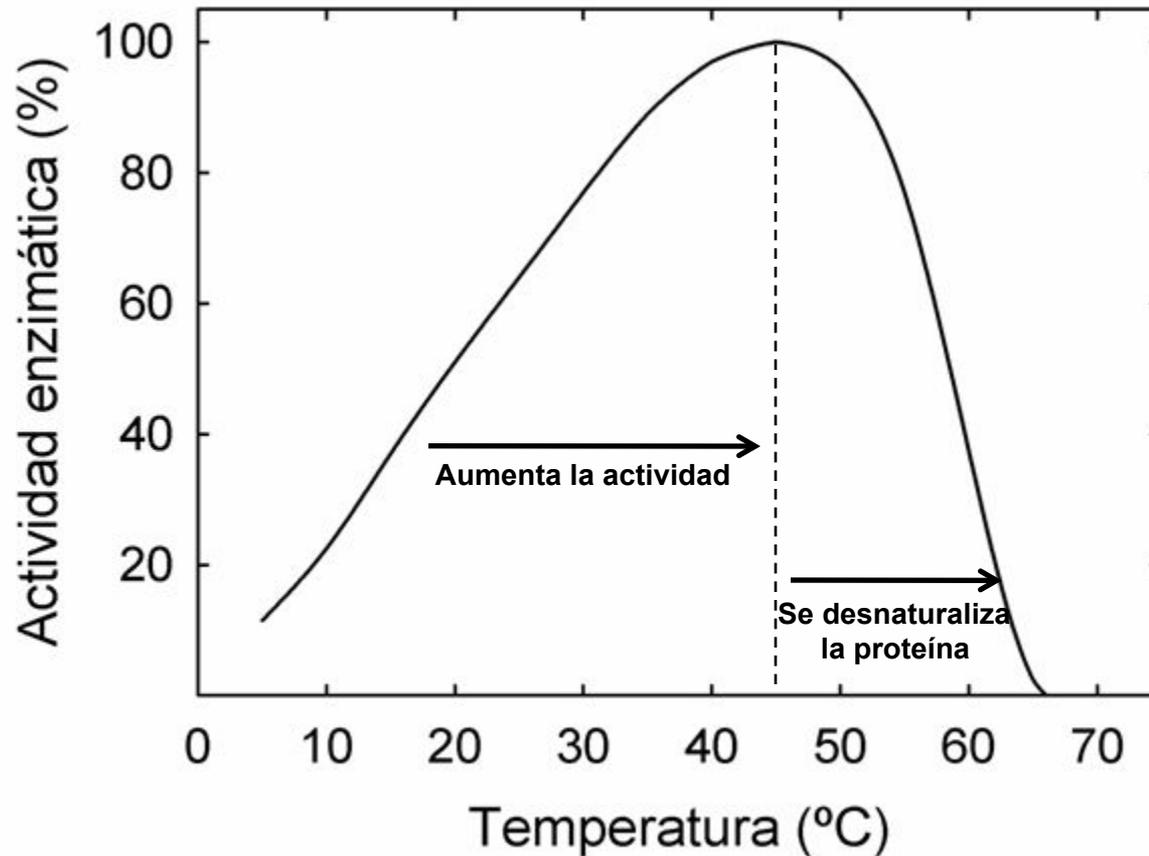
Pepsina
pH óptimo ácido



Glucosa-6-fosfatasa
pH óptimo básico

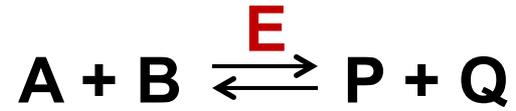
Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Temperatura óptima



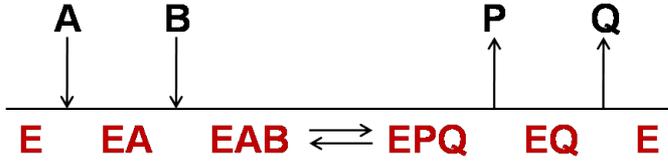
REACCIONES MONOSUSTRATO: $E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow P + E$

REACCIONES BISUSTRATO

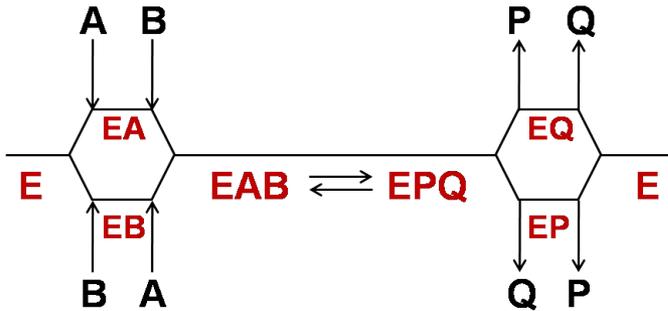


SECUENCIAL

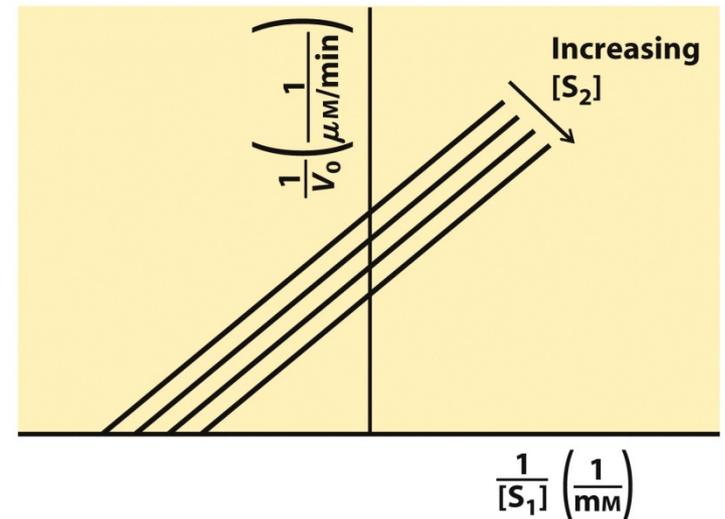
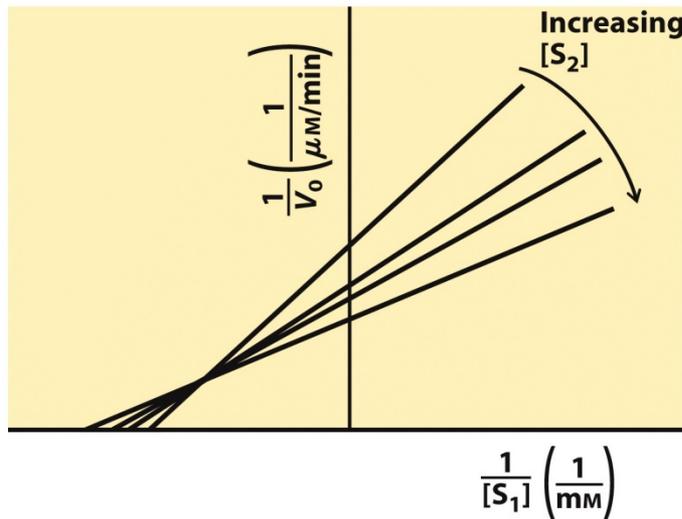
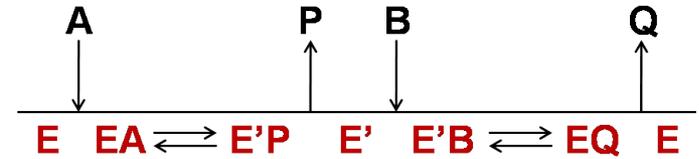
Ordenada



Azar

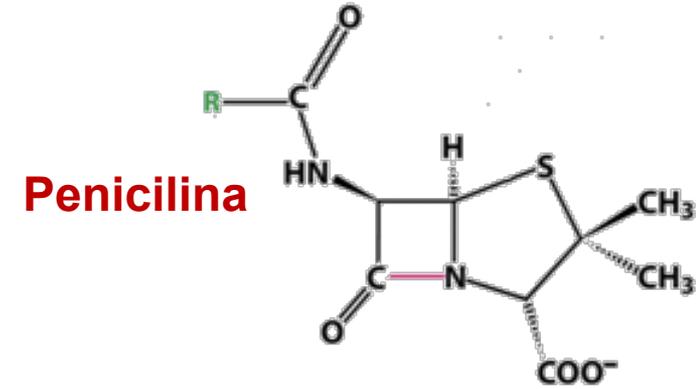
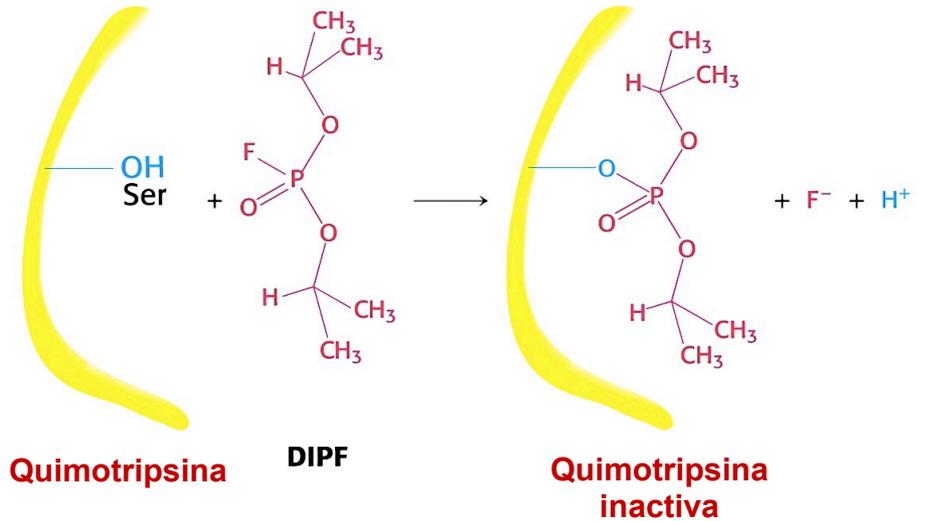


PING-PONG



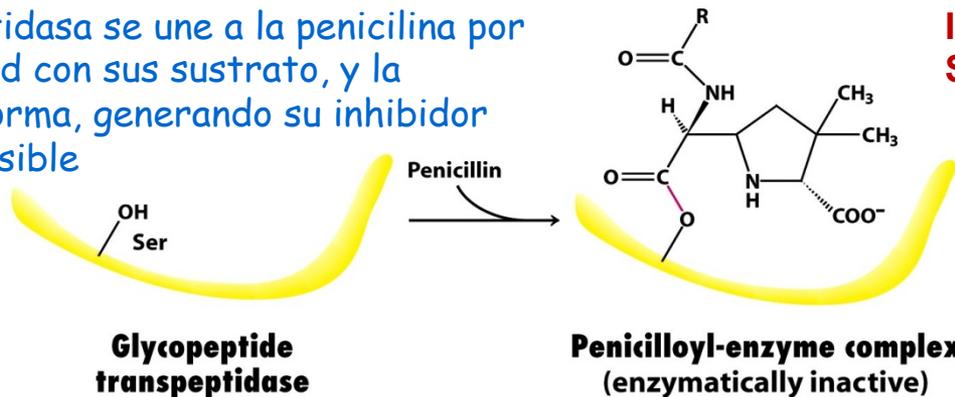
INHIBICIÓN ENZIMÁTICA: Las enzimas se pueden inhibir por la unión de moléculas específicas, llamadas **INHIBIDORES**

Inhibición Irreversible: El inhibidor se une muy fuertemente (normalmente por unión covalente), al centro activo de la enzima, de manera que bloquea su actividad de forma permanente; o bien destruye algún residuo esencial para la actividad catalítica, con las mismas consecuencias de inactivación permanente.

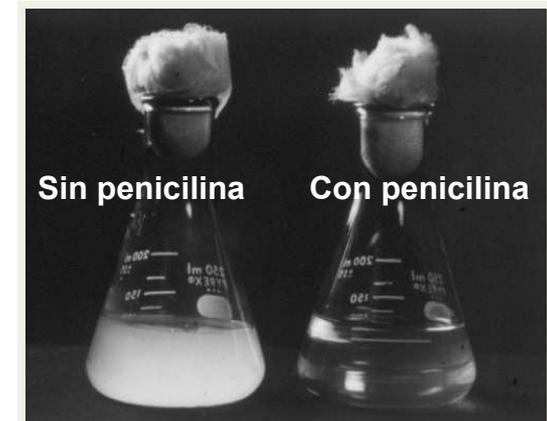


La penicilina se une covalentemente a una transpeptidasa que participa en la biosíntesis de la pared bacteriana, inactivándola

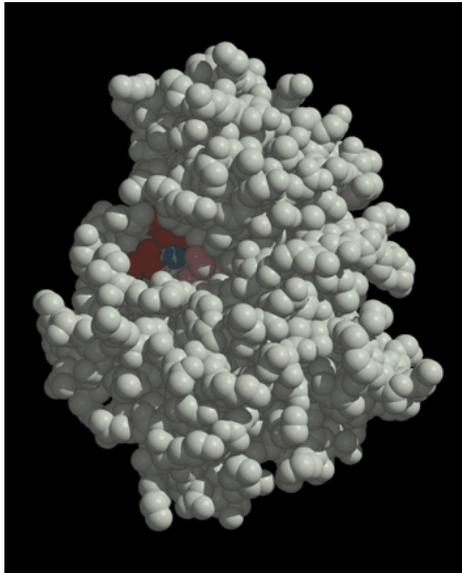
La peptidasa se une a la penicilina por similitud con sus sustrato, y la transforma, generando su inhibidor irreversible



INHIBIDOR SUICIDA



Otro ejemplo de Inhibición irreversible suicida



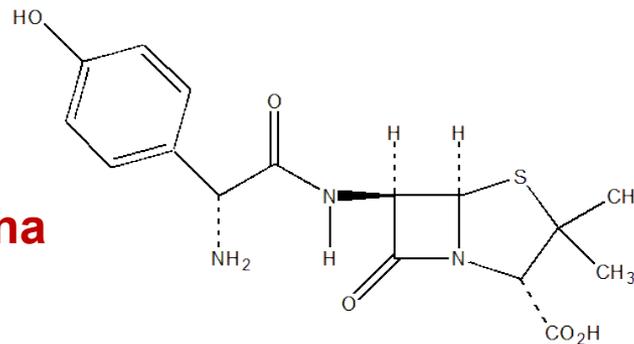
β -lactamasa

Ser-proteína que hidroliza a las penicilinas haciendo que las bacterias se vuelvan resistentes a estos antibióticos β -lactámicos

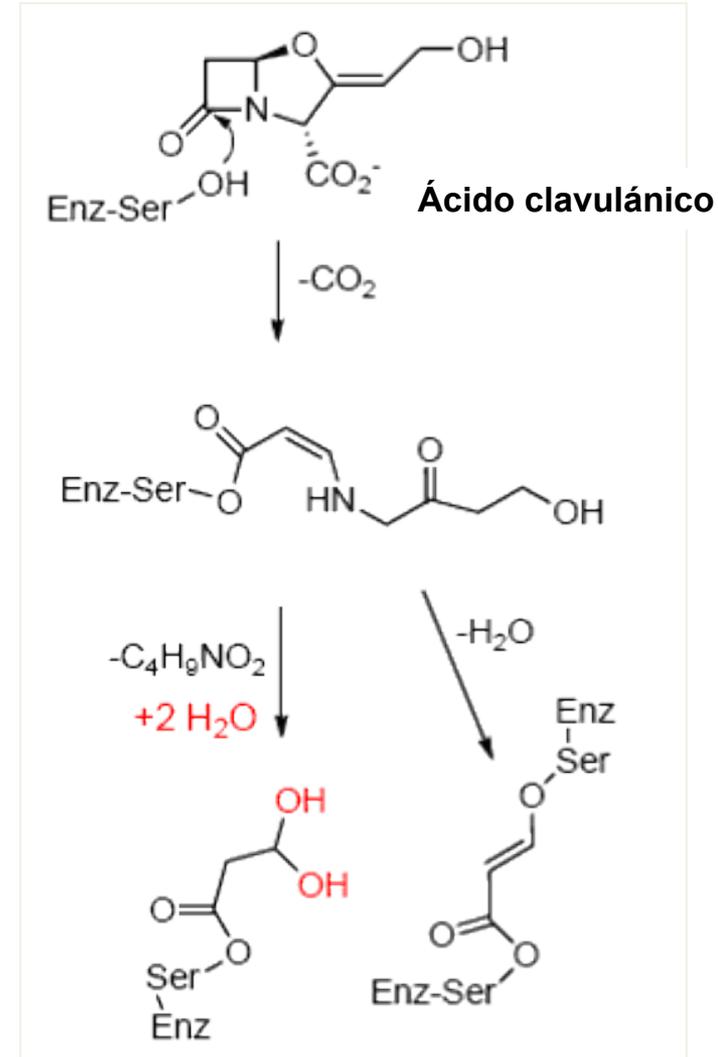
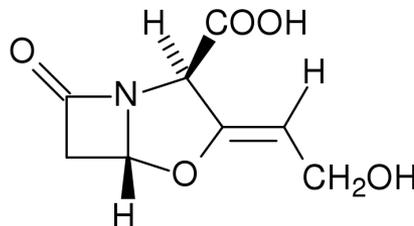


El Augmentine contiene una penicilina y ácido clavulánico, otro inhibidor suicida

Amoxicilina



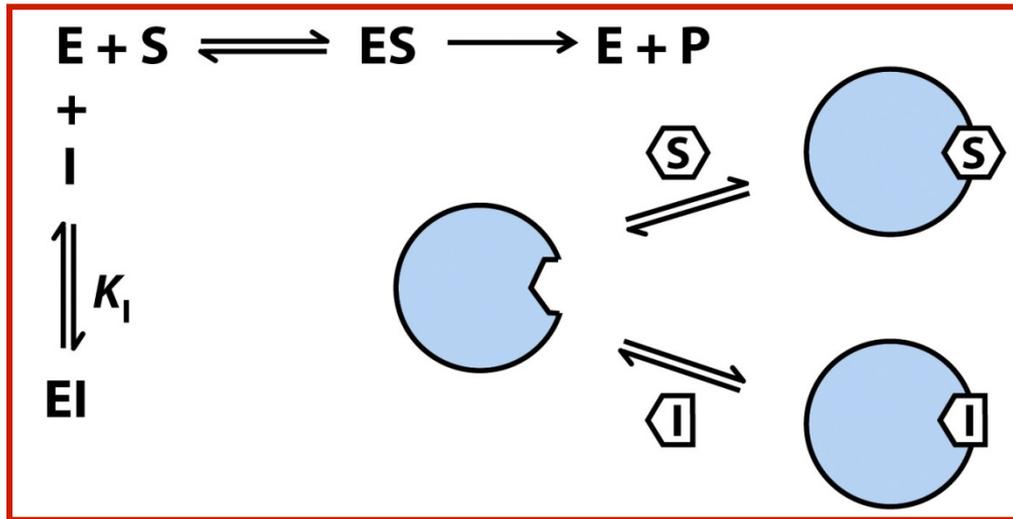
Ácido clavulánico



La industria farmacéutica está en continuo desarrollo de nuevos antibióticos, a fin de contrarrestar la capacidad de las bacterias para desarrollar resistencias
Toda una guerra química declarada!

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA REVERSIBLE: A diferencia de la Inhibición irreversible, el Inhibidor se puede disociar de la enzima.

Inhibición Competitiva: El inhibidor compete con el sustrato por el sitio activo de la enzima.



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

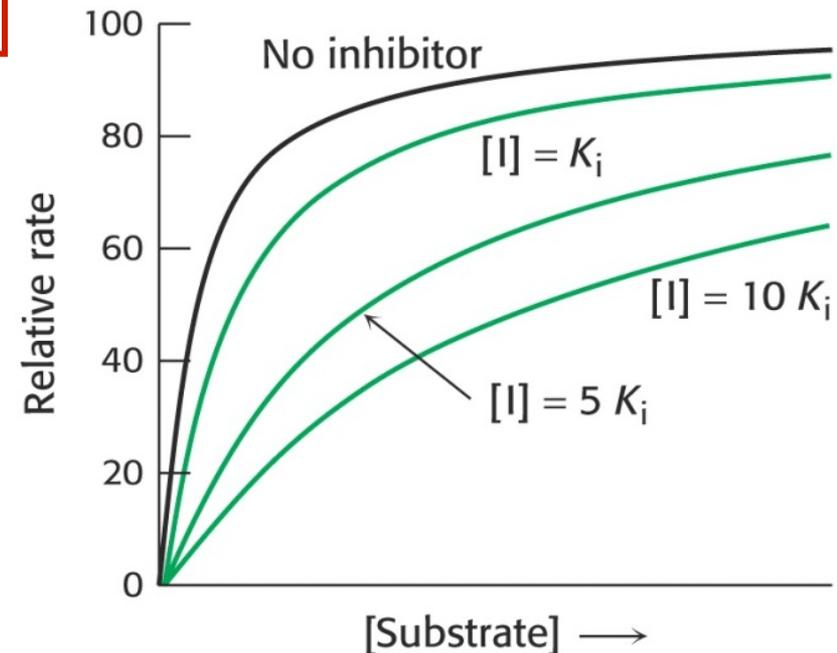
$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

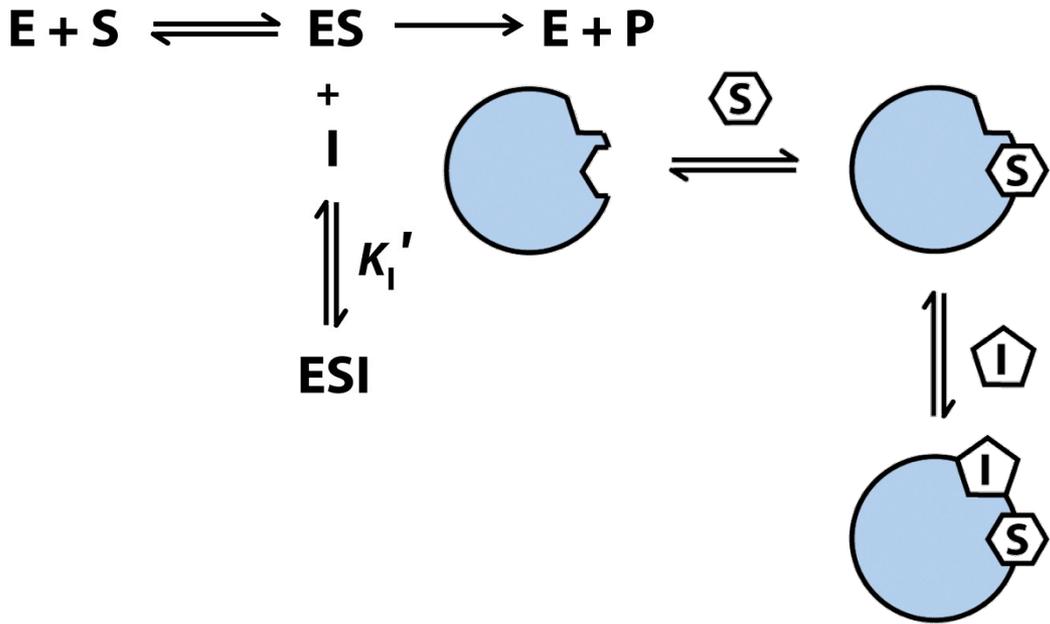
La V_{\max} no varía, pero se requiere mayor concentración de sustrato para alcanzarla.

K_m aparente aumenta con $[I]$

- Los inhibidores competitivos suelen parecerse estructuralmente al sustrato.
- Cuanto más inhibidor se encuentre unido a la enzima, menos centros activos quedarán disponibles para la catálisis.
- La inhibición se puede contrarrestar aumentando la concentración de sustrato, a fin de favorecer a éste en su competición contra el inhibidor por la unión al centro activo.



Inhibición Acompetitiva: El inhibidor se une sólo al complejo enzima-sustrato en un sitio distinto del centro activo.



- El inhibidor afecta a la función catalítica de la enzima (sitio catalítico), pero no a la unión del sustrato (sitio de unión)
- La inhibición no se puede contrarrestar aumentando la concentración de sustrato.
- El equilibrio de E y S se encuentra desplazado hacia la formación del complejo ES; es decir, hay un aumento aparente de la afinidad de E por S

$$K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

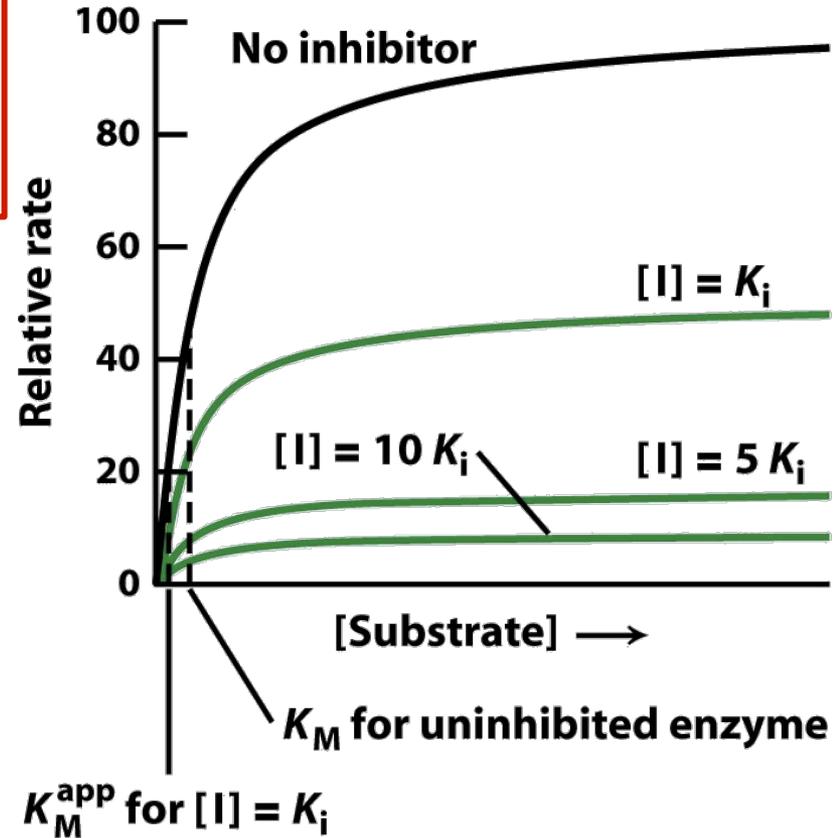
$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

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

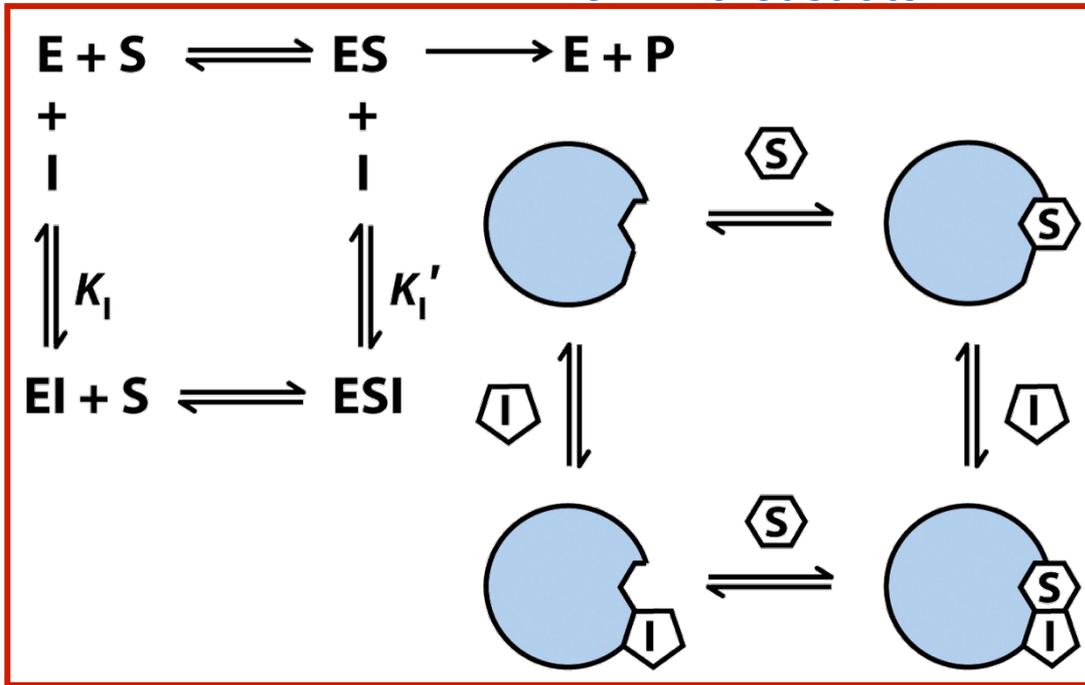
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$

La V_{max} observada disminuye al aumentar la concentración del inhibidor

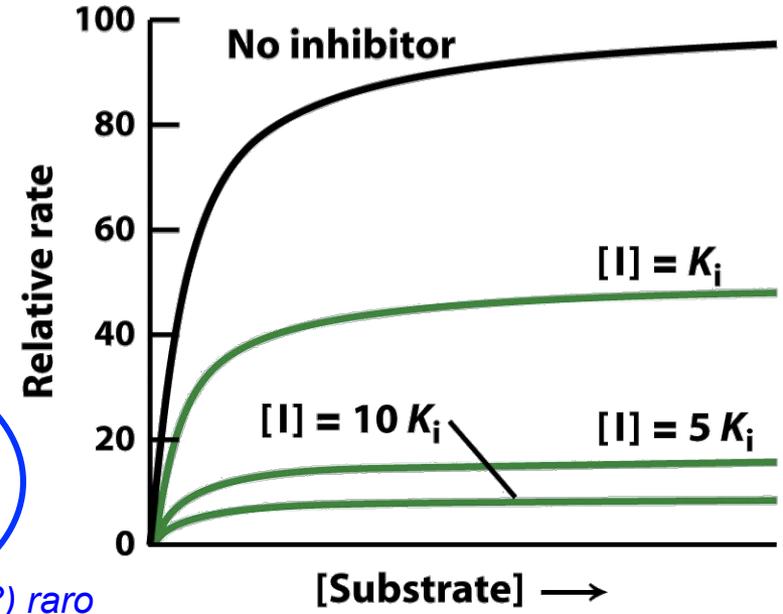
K_m aparente disminuye con $[I]$



Inhibición Mixta: El inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato



- El inhibidor afecta tanto a la unión del sustrato a la enzima, como a la función catalítica de ésta
- La inhibición no se puede contrarrestar aumentando la concentración de sustrato.
- Las dos constantes de afinidad por el inhibidor, la de la enzima y la del complejo enzima-sustrato, pueden ser diferentes



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$

Si $K_i = K_i'$,
INHIBICIÓN NO COMPETITIVA
 (K_m no varía)
 (?) raro

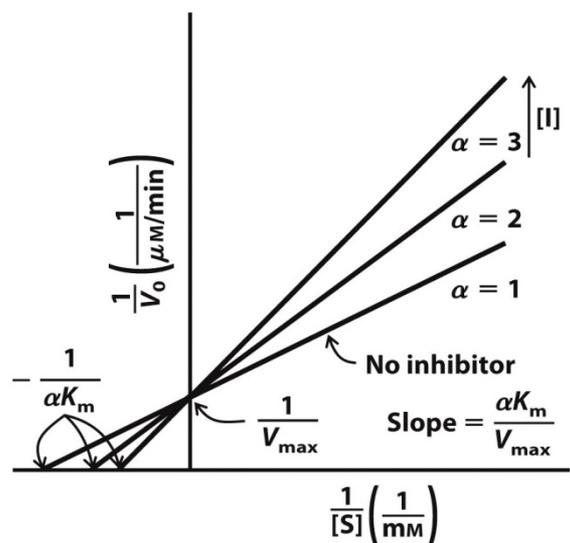
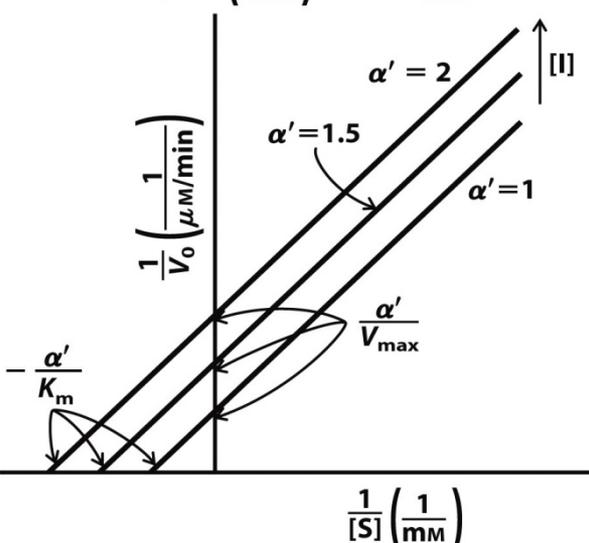
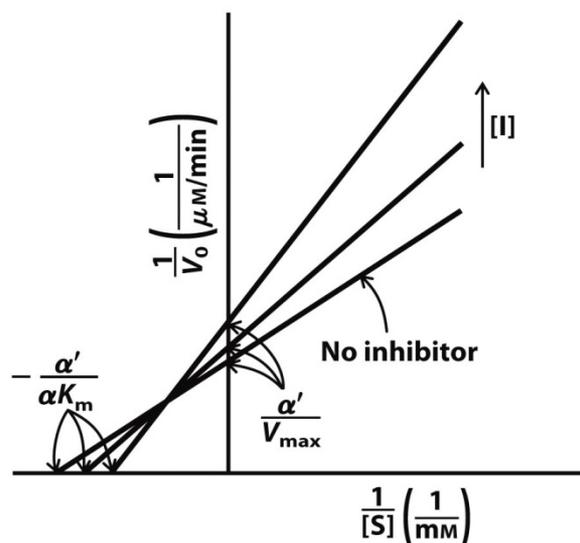
$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

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

La V_{max} observada disminuye al aumentar la concentración del inhibidor

K_m aparente aumenta o disminuye con $[I]$, según sean K_i y K_i'

Efectos de los Inhibidores Reversibles sobre los valores aparentes de V_{\max} y K_m

Competitiva	Acompetitiva	Mixta
<p>$\leftrightarrow V_{\max}^{\text{ap}} = V_{\max}$</p> <p>$\uparrow K_m^{\text{ap}} = \alpha \cdot K_m$</p>	<p>$\downarrow V_{\max}^{\text{ap}} = V_{\max} / \alpha'$</p> <p>$\downarrow K_m^{\text{ap}} = K_m / \alpha'$</p>	<p>$\downarrow V_{\max}^{\text{ap}} = V_{\max} / \alpha'$</p> <p>$\downarrow \text{ ó } \uparrow K_m^{\text{ap}} = \alpha \cdot K_m / \alpha'$</p>
<p>$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$</p> 	<p>$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$</p> 	<p>$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$</p> 

Inhibición No Competitiva

Sólo se daría cuando el inhibidor interfiriera con la catálisis, sin afectar a la afinidad de la enzima por el sustrato. Ej.: ligandos muy pequeños como protones o iones metálicos.

