

Tema 7

Cinética Enzimática

TEMA 7

CINÉTICA ENZIMÁTICA



1. DEFINICIONES

- ¿CÓMO ACTÚAN LOS ENZIMAS?



2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

- MODELO DE MICHAELIS-MENTEN
- REPRESENTACIONES



3. INHIBICIONES EN REACCIONES ENZIMÁTICAS

- INHIBICIÓN COMPETITIVA Y NO COMPETITIVA



4. MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

1 DEFINICIONES

LAS ENZIMAS son proteínas (RNA) que catalizan reacciones químicas en las células.

Cada enzima es altamente **específica** para la reacción que cataliza.

Esta especificidad está determinada por el **centro activo** de la enzima (en donde se hallan los grupos químicos responsables de la catálisis).

Muchas enzimas necesitan **co-factores** (co-reactivos, co-sustratos) para cumplir su función catalítica.



Son Proteínas de **alto peso molecular** (macromoléculas, 10^4 a 10^6 g/mol, 10^2 a 10^4 aminoácidos)

Su actividad depende de la **integridad** de su conformación proteica.

Metales pueden formar parte de su centro activo, o de otra parte de la enzima (co-factor).

Los reactivos de la reacciones catalizadas por enzimas se denominan **sustratos**.

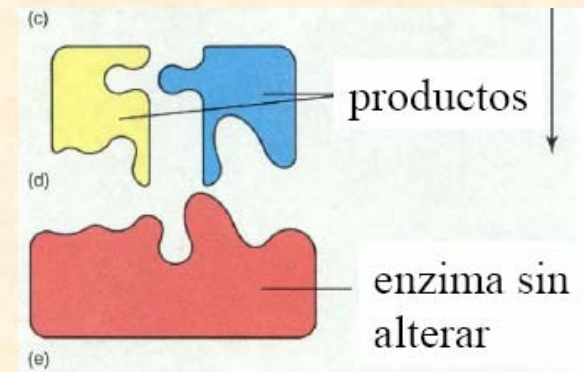
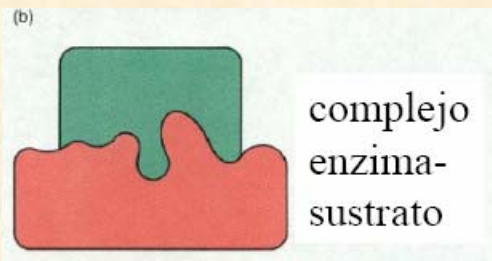
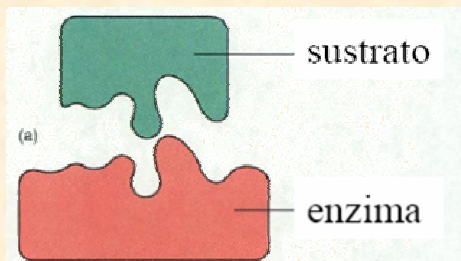
Los enzimas son **catalizadores específicos**: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.



¿Cómo actúan los enzimas?

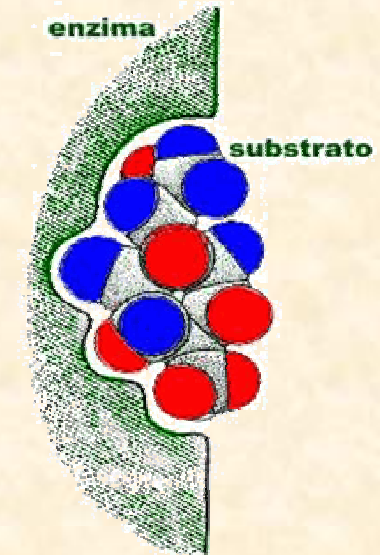
En una reacción catalizada por un enzima:

- La sustancia sobre la que actúa el enzima (**sustrato**).
- El sustrato se une a una región concreta del enzima (**centro activo**).
 - Un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato.
 - Un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.
- Formados los **productos** el enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción



¿Cómo actúan los enzimas?

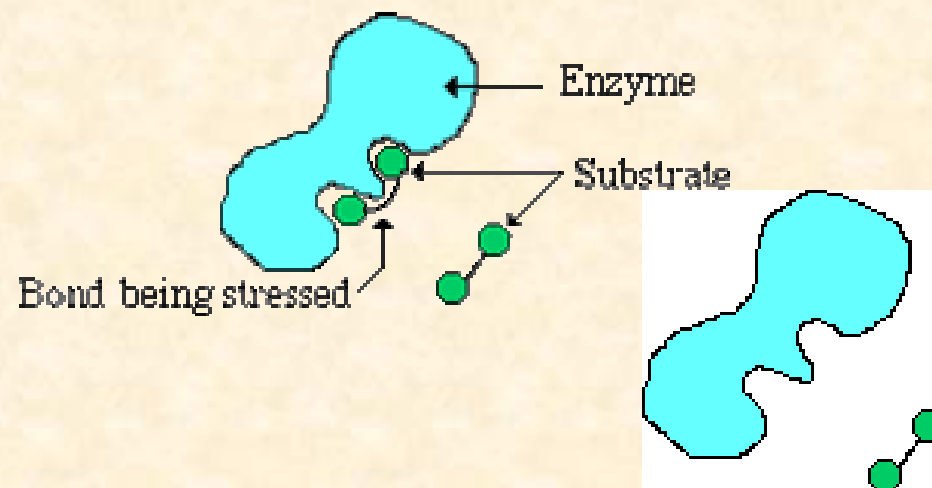
Hipótesis de la Cerradura y la llave (E. Fischer, 1894)



Hipótesis del Ajuste Inducido (Daniel Koshland, 1958)

– E Induce al S a configuración aproximada al Estado de Transición

1. UNE S
2. REDUCE E_a
3. IMPULSA Catalisis
4. LIBERA P
5. SE REGENERA



CINÉTICA ENZIMÁTICA

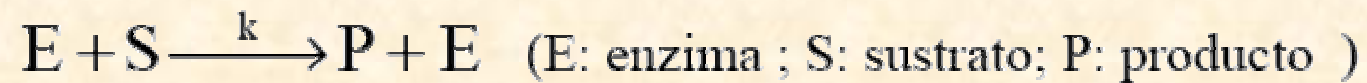
Estudio de la velocidad de reacciones catalizadas enzimáticamente

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima depende de

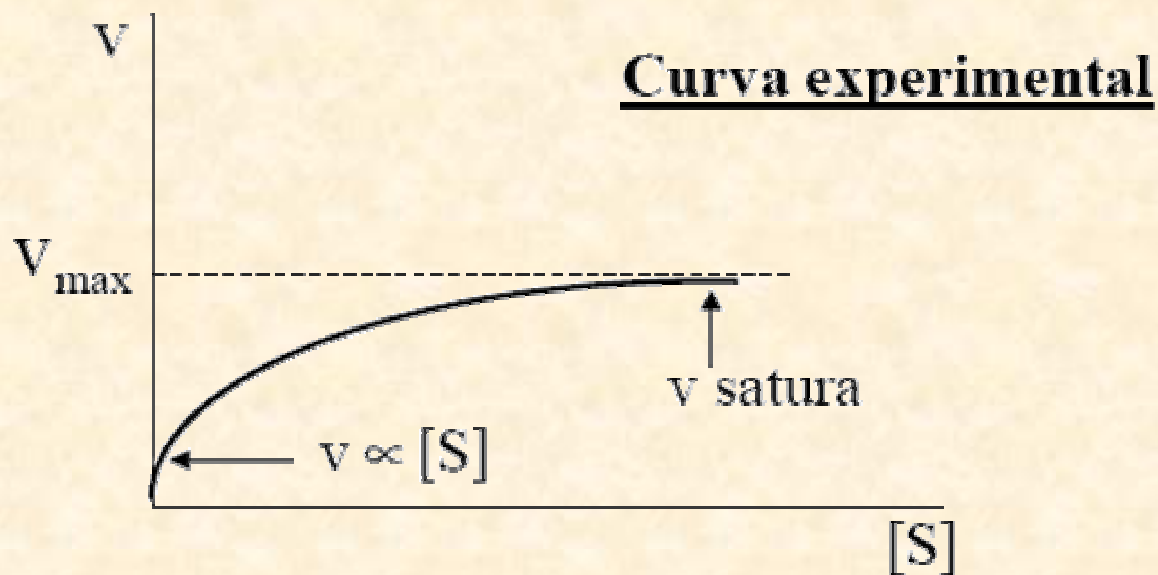
1. la **concentración** de moléculas de sustrato [S]
2. la **temperatura**
3. la presencia de **inhibidores**
4. **pH del medio**, que afecta a la conformación (estructura espacial) de la molécula enzimática

2

CINÉTICA ENZIMÁTICA



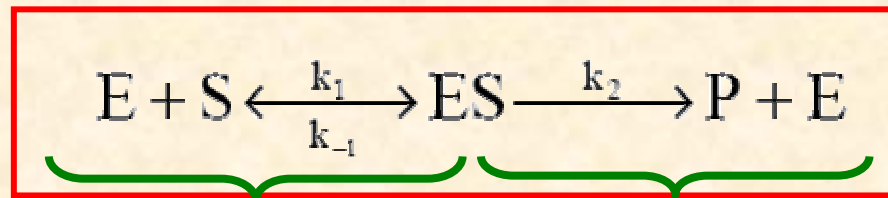
Aparentemente: $v = \frac{d[P]}{dt} = k[E][S] \quad (v \propto [S])$



MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

Hipótesis básicas:

enzima y sustrato forman un complejo intermedio ES



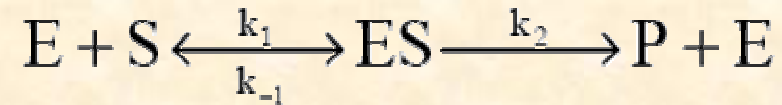
Etapa rápida

Etapa lenta

- $[E_0] = [E] + [ES] \equiv \text{constante}$
- el proceso $ES \longrightarrow P+E$ es irreversible (concentración de producto pequeña)
- **Hipótesis cuasi-estacionaria:** después de una fase inicial transitoria, la concentración de las distintas formas enzimáticas (E,ES) no varía

MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

Modelo matemático:



Definiciones:

$$s \equiv [S]; e \equiv [E]; c \equiv [ES]; p \equiv [P];$$
$$e_0 \equiv [E_0] = [E] + [ES] \equiv e + c$$

- $\frac{ds}{dt} = k_{-1}c - k_1se$
- $\frac{de}{dt} = (k_{-1} + k_2)c - k_1se$
- $\frac{dc}{dt} = k_1se - (k_{-1} + k_2)c$
- $\frac{dp}{dt} = k_2c$

MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

$$\frac{dc}{dt} = k_1 se - (k_{-1} + k_2)c \approx 0 \Rightarrow c = \frac{k_1 se}{k_{-1} + k_2} = \frac{se}{K_m}; \left(K_m \equiv \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right)$$

$$e_0 = e + c = e + \frac{se}{K_m} = e \left(1 + \frac{s}{K_m} \right) \Rightarrow e = \frac{e_0}{1 + \frac{s}{K_m}};$$

Luego: $c = \frac{se}{K_m} = \frac{se_0}{K_m + s},$ y

$$v = \frac{dp}{dt} = k_2 c = \frac{k_2 e_0}{K_m + s} s = \frac{V_{\max} s}{K_m + s}; \quad (V_{\max} \equiv k_2 e_0)$$

$$v = \frac{V_{\max} s}{K_m + s}$$

MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

$$K_m \equiv \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} : \text{constante de Michaelis}$$

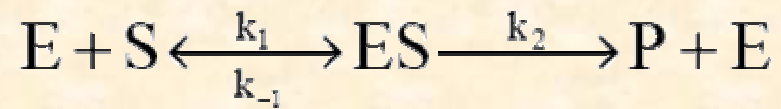
(si $k_2 \ll k_{-1}$: $K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$ es la constante de disociación del complejo

enzima-sustrato: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES$)

$$V_{\max} \equiv k_2 e_0 : \text{velocidad máxima de reacción}$$

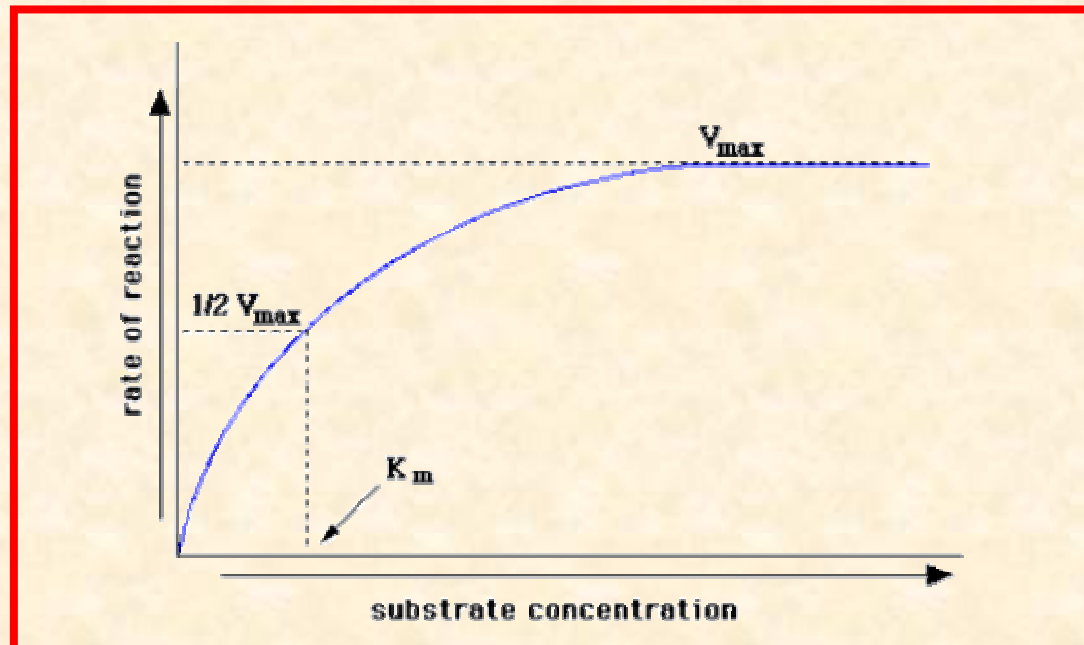
$$\text{para } s = K_m \longrightarrow v = V_{\max} / 2$$

MODELO DE MICHAELIS-MENTEN



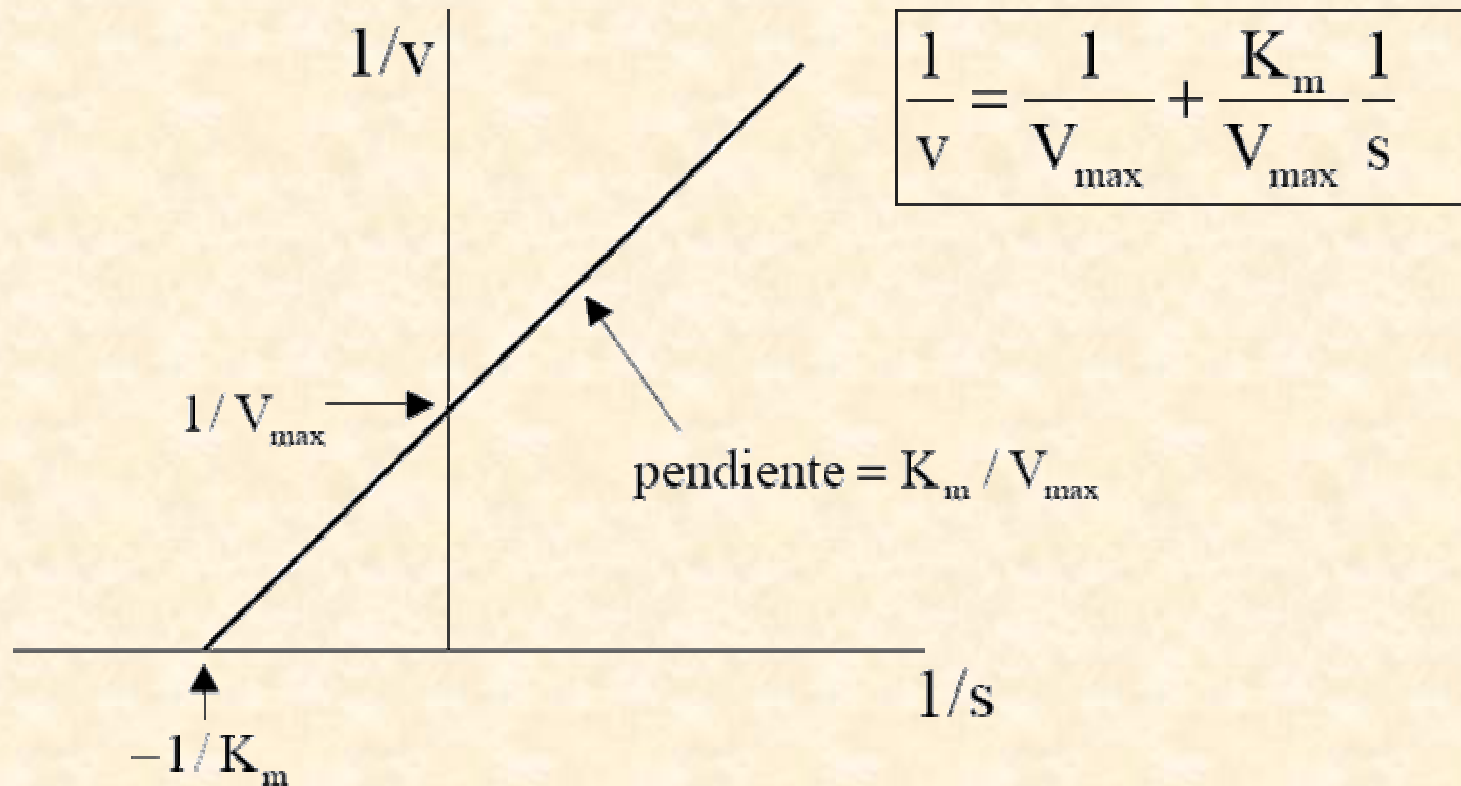
$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

- ✓ para $s \ll K_m$: $v \approx \frac{V_{\max}}{K_m} s$
- ✓ para $s \gg K_m$: $v \approx V_{\max} \equiv k_2 e_0$



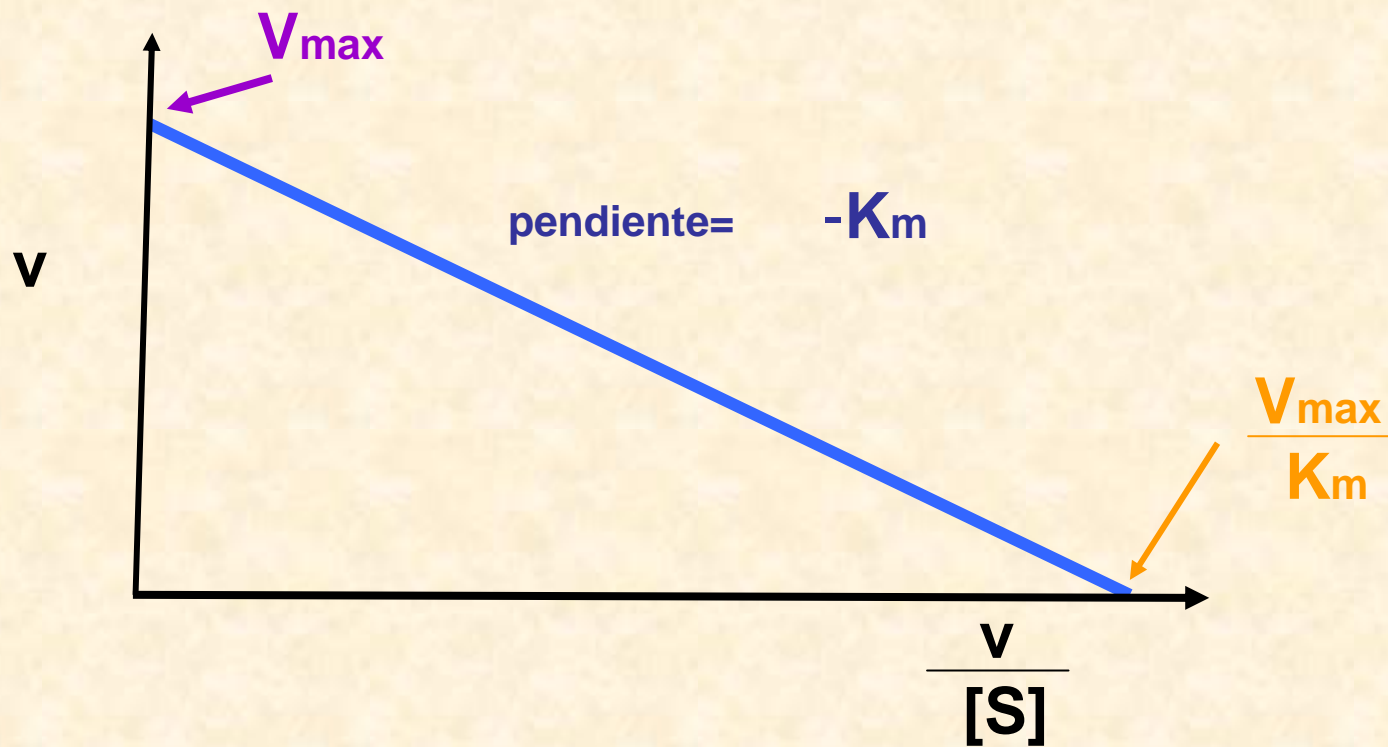
Representación de Lineweaver-Burk

Representa $1/v$ frente a $1/s$ y permite determinar a partir de medidas experimentales parámetros básicos de la cinética enzimática como la **constante de Michaelis** y la **velocidad máxima de reacción**



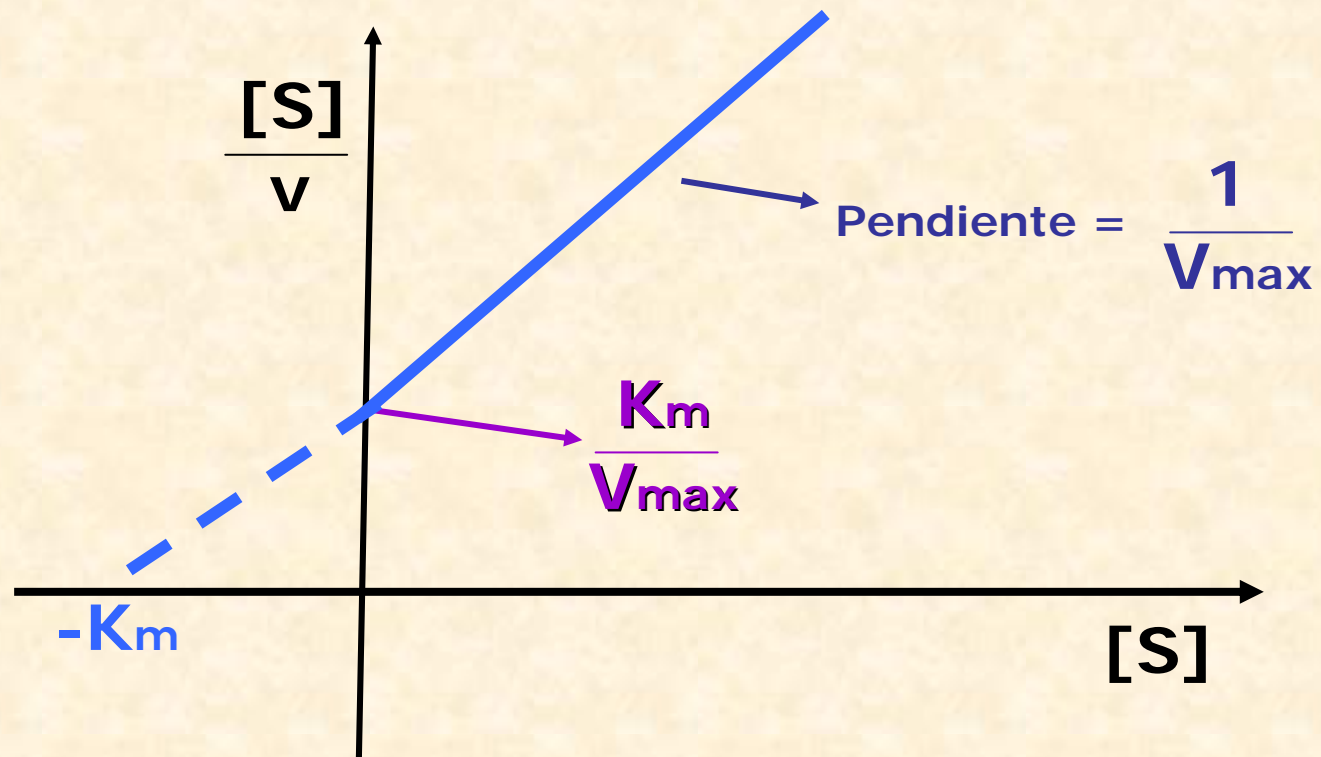
Representación de Eadie-Hofstee

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



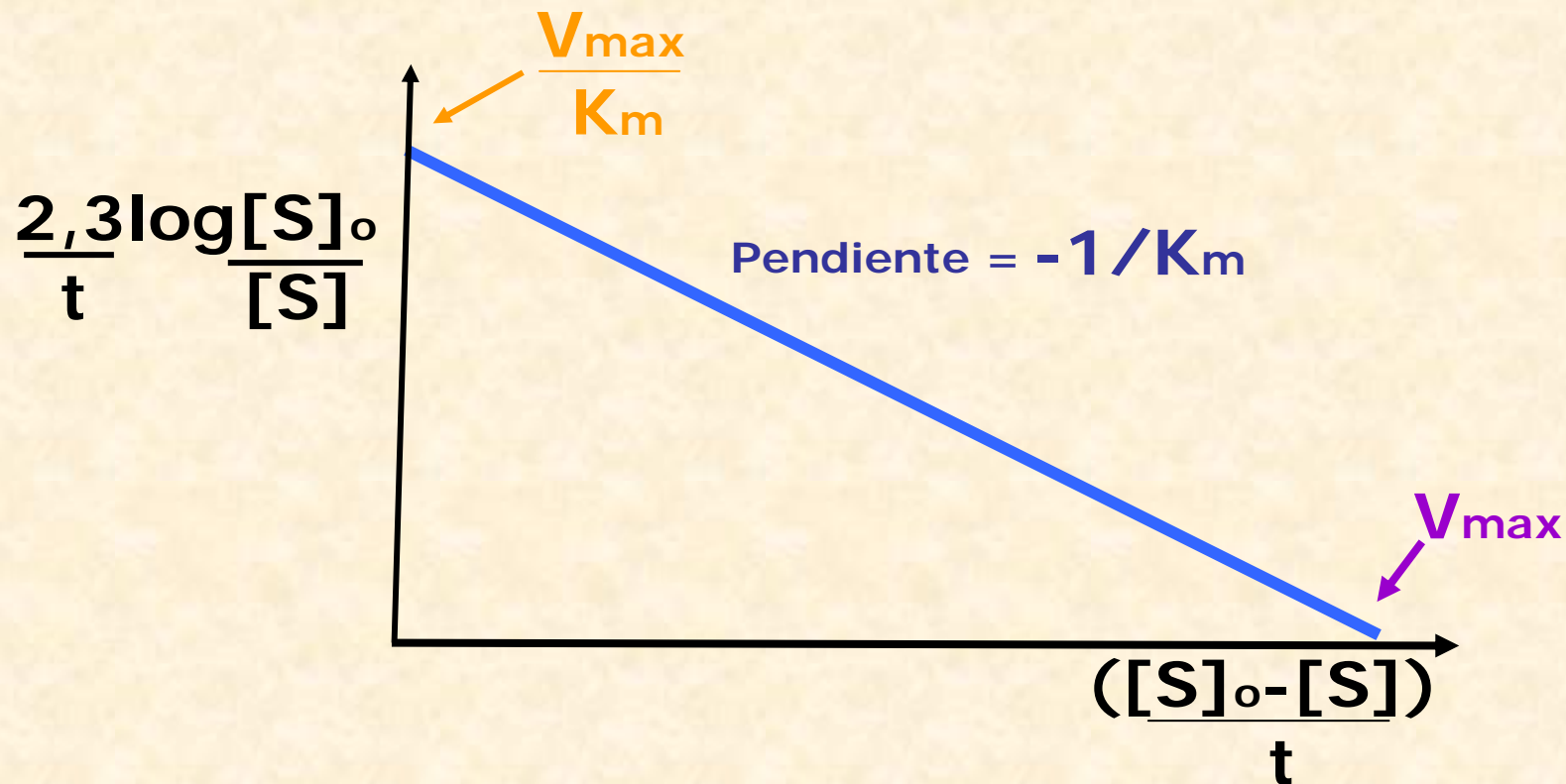
Representación de Hanes-Woolf

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



Representación integrada de Michaelis-Menten

$$\frac{2,3}{t} \log \frac{[S]_o}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{([S]_o - [S])}{t}$$

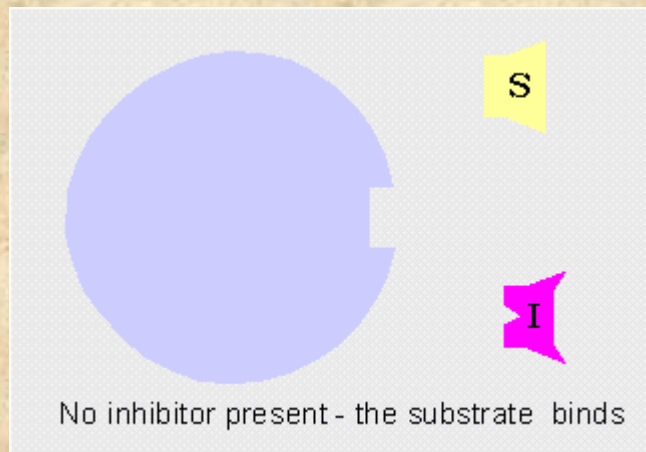


3

INHIBICIÓN EN REACCIONES ENZIMÁTICAS

Inhibición enzimática: moléculas diferentes del sustrato pueden unirse al enzima reduciendo total o parcialmente su actividad catalítica. Estas moléculas reciben el nombre de **inhibidores**

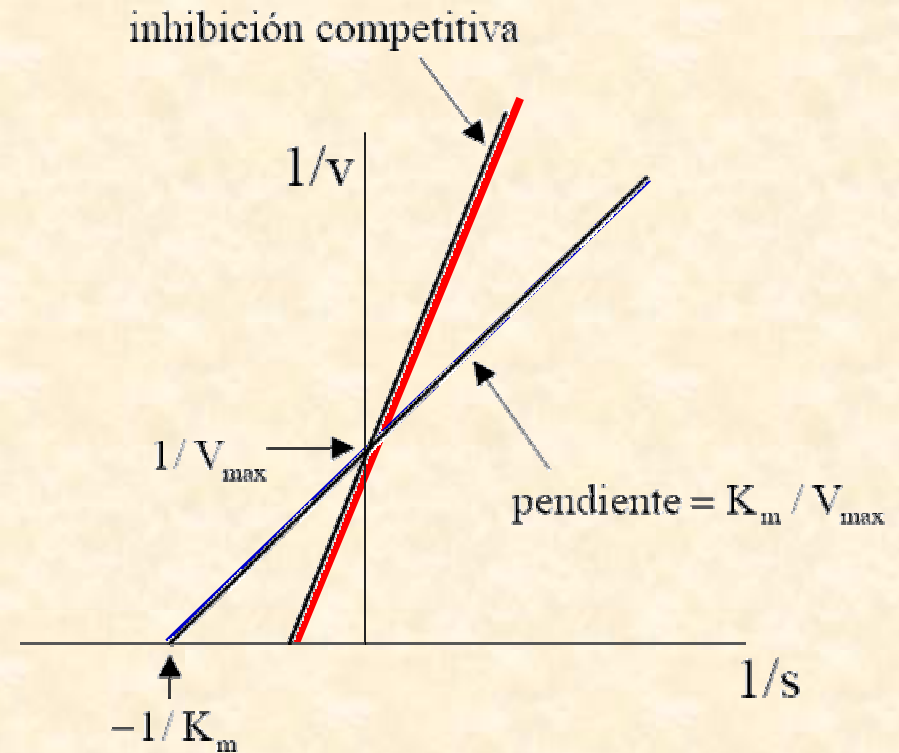
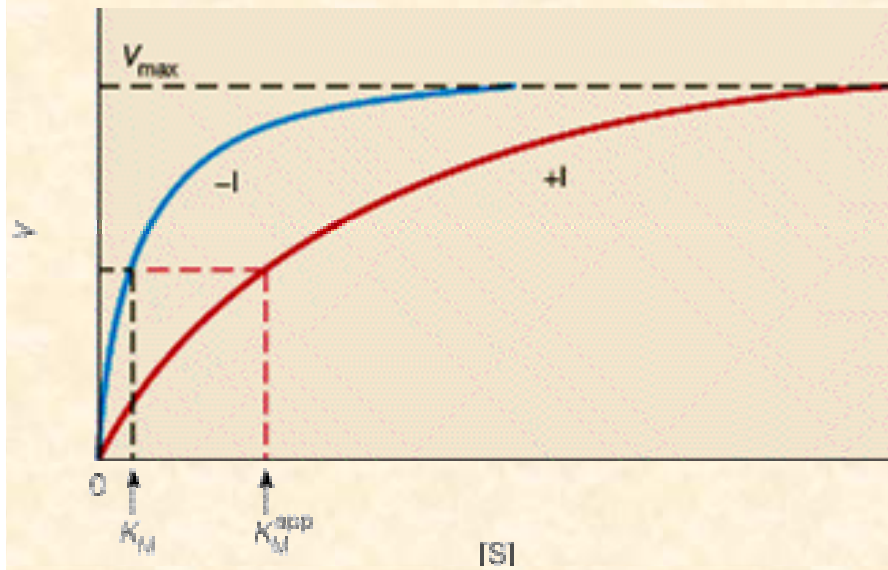
Inhibidor competitivo



Inhibidor no competitivo

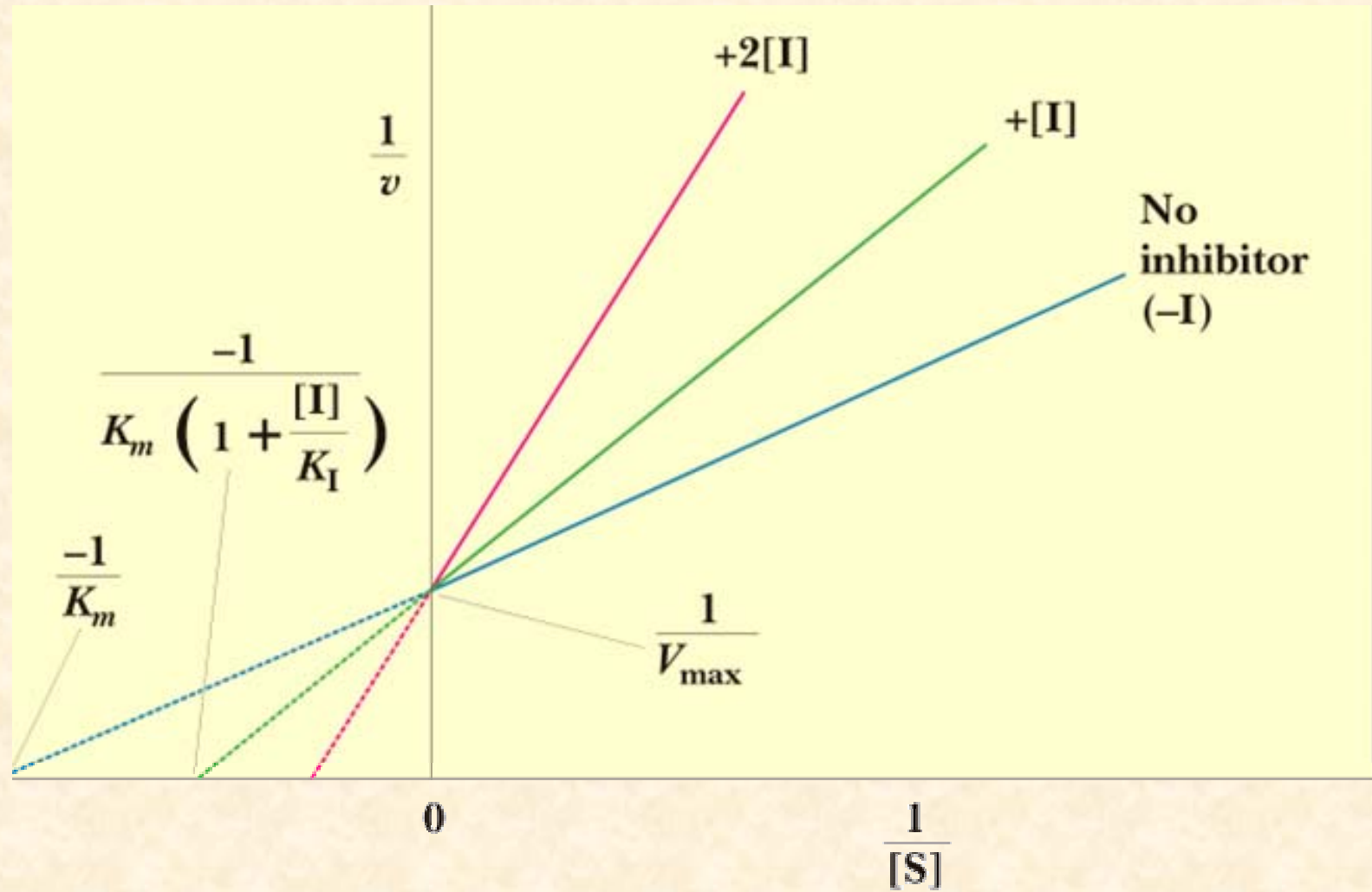


Inhibición competitiva

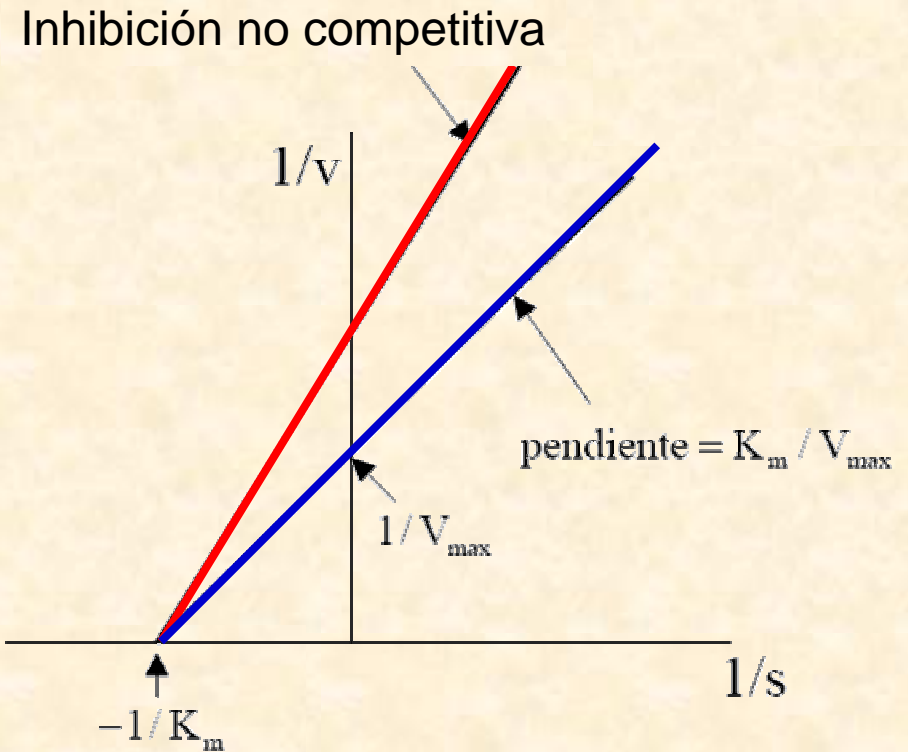
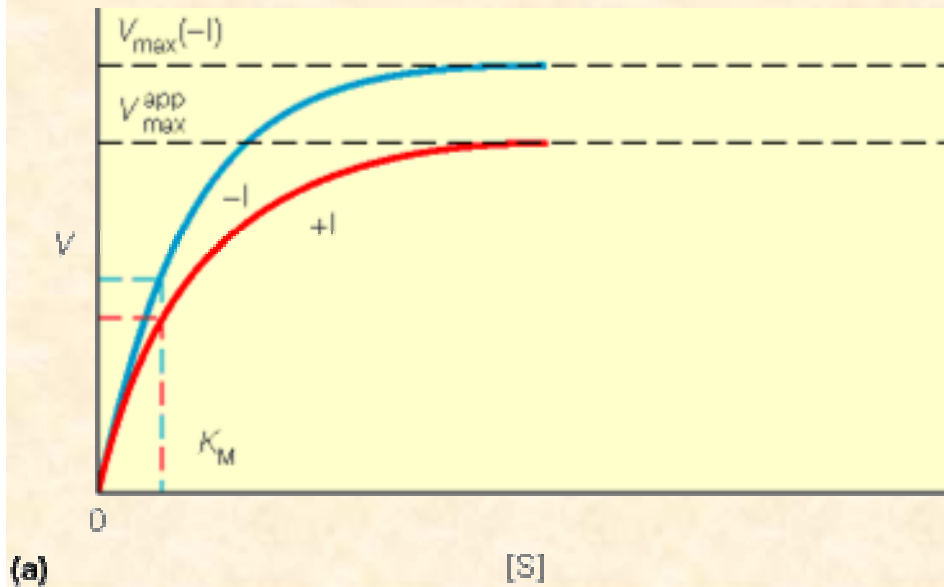


El inhibidor reduce la velocidad de reacción, pero **la velocidad máxima** (concentraciones de sustrato grandes) **sigue siendo la misma**

Inhibición competitiva



Inhibición no competitiva

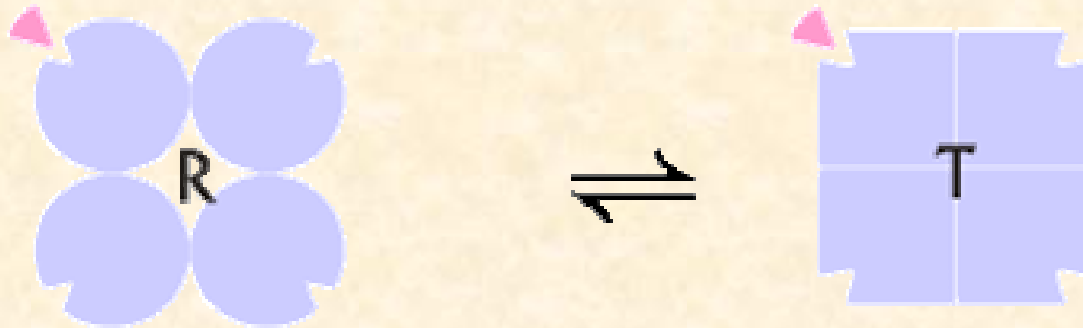


El inhibidor reduce la velocidad máxima pero K_m (la afinidad del enzima por el sustrato) **sigue siendo el mismo**

4

MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Hay enzimas que pueden adoptar 2 conformaciones interconvertibles llamadas R (relajada) y T (tensa). R es la forma más activa porque se une al sustrato con más afinidad. Las formas R y T se encuentran en equilibrio

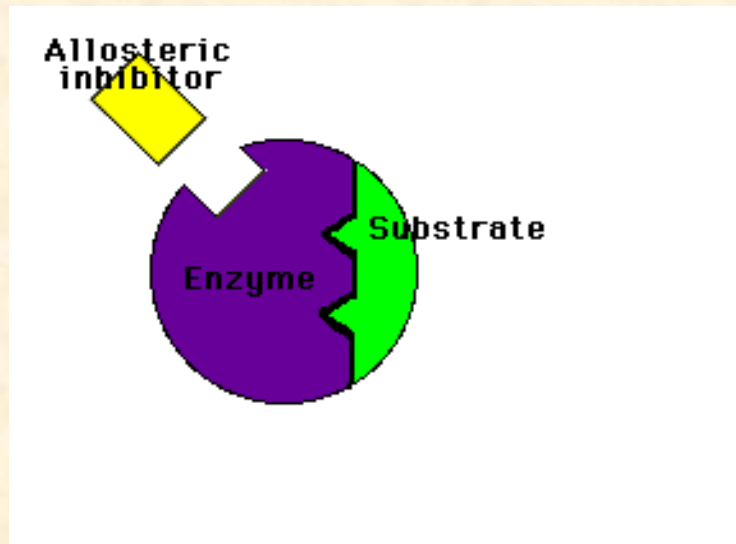
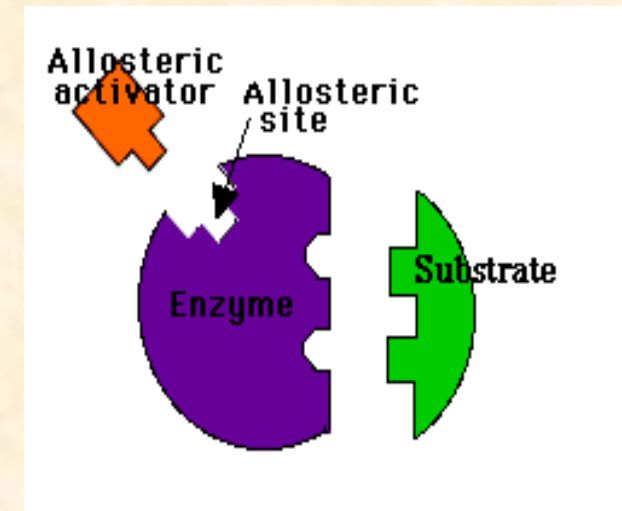


Ciertas sustancias tienden a estabilizar la forma R. Son los llamados **moduladores positivos**. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo.

Las sustancias que favorecen la forma T y disminuyen la actividad enzimática son los **moduladores negativos**.

Modulación alostérica de la actividad enzimática

Las moléculas que favorecen la forma R pero que actúan sobre una región del enzima distinta del centro activo son los **activadores alostéricos**.



Si los moduladores negativos actúan en lugares distintos del centro activo del enzima (inhibición no competitiva) se llaman **inhibidores alostéricos**.