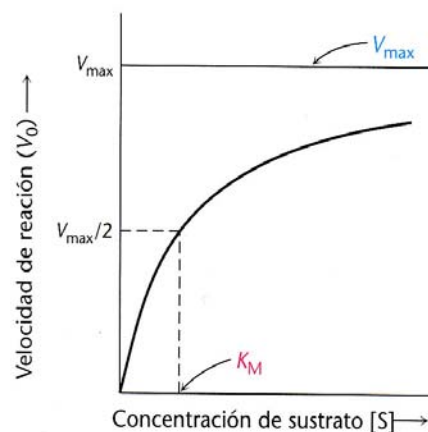
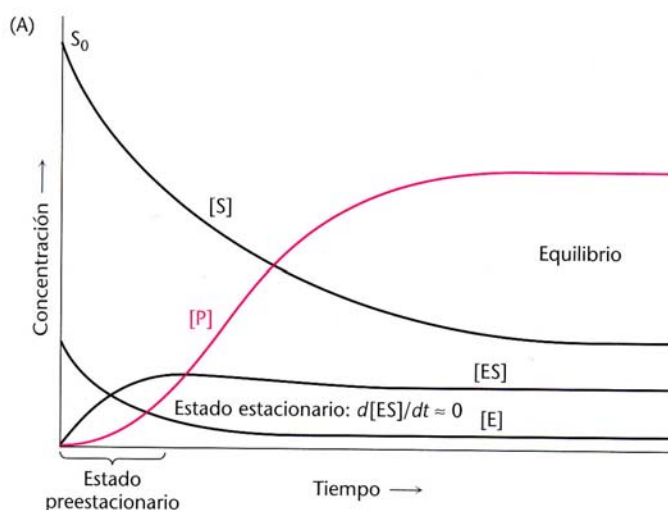


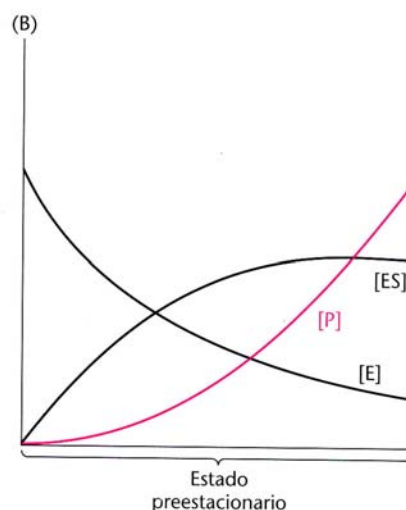
Determinación de la velocidad inicial. Se representa la cantidad de producto formado a distintas concentraciones de sustrato en función del tiempo. La velocidad inicial (V_0) para cada concentración de sustrato se determina a partir de la pendiente de la curva al comienzo de la reacción, cuando la reacción inversa es insignificante.



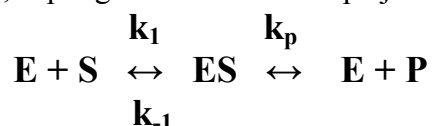
Cinéticas Michaelis –Menten. Representación de la velocidad de reacción (V_0) en función de la concentración de sustrato $[S]$, para un enzima que obedece a la cinética de Michaelis –Menten , donde se muestra que la velocidad máxima (V_{max}) se alcanza de forma aproximadamente asintótica. La constante de Michaelis (K_M) es la concentración de sustrato que produce una velocidad de $V_{max} / 2$



Cambios en la concentración de los participantes en una reacción catalizada por una enzima en función del tiempo. Cambios de concentración en condiciones del estado estacionario (A) y del estado preestacionario (B).



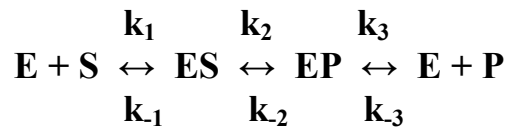
1) ES y EP complejos centrales, supongamos un solo complejo ES



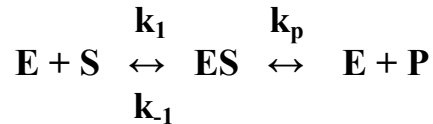
2) La reacción inversa es insignificante, esto se da solamente en condiciones de velocidad inicial

3) E, S y ES se equilibran muy rápidamente en comparación con la velocidad con la que ES se transforma en E + P

**Sistema unireactivo sencillo – Aproximación de equilibrio rápido
(Henri, Michaelis y Menten)**



ES y EP complejos centrales, supongamos un solo complejo y la reacción inversa es insignificante, esto es en condiciones de velocidad inicial. Por tanto:



K_p Es la constante catalítica de velocidad

La velocidad es: $v = k_p [ES]$ (1) ; El enzima total es $[E]_t = [E] + [ES]$ (2)

Dividiendo (1) por (2) $\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]}$; (3)

Debido a la suposición de equilibrio, [ES] se puede poner en función de la cte de disociación k_s

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad [ES] = \frac{[S]}{k_s} [E] \quad \text{Sustituyendo [ES] en (3)}$$

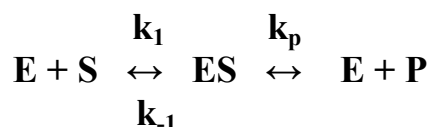
$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p \frac{[S]}{k_s} [E]}{[E] + \frac{[S]}{k_s} [E]}; \quad \text{Eliminando [E] y pasando } k_p \text{ al primer miembro} \quad \frac{v}{k_p [E]_t} = \frac{\frac{[S]}{k_s}}{1 + \frac{[S]}{k_s}}$$

Si $v = k_p [ES]$, entonces $k_p [E]_t = V_{max}$

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{k_s}}{1 + \frac{[S]}{k_s}}; \quad \text{operando} \quad \frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{k_s + [S]}$$

La ecuación de Henri- Michaelis-Menten nos da la velocidad instantánea o velocidad inicial respecto de V_{max} para una concentración de sustrato dada.

La Aproximación del estado estacionario (Briggs y Haldane)



La velocidad es: $v = k_p [ES]$ (1); El enzima total es $[E]_t = [E] + [ES]$ (2)

Dividiendo (1) por (2)
$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]}; \quad (3)$$

Si la concentración de ES es cte. Entonces la velocidad de formación y descomposición de ES son iguales.



Velocidad de formación de $ES = k_1 [E] [S]$

Velocidad de descomposición de $ES = k_{-1} [ES] + k_p [ES] = (k_{-1} + k_p) [ES]$

En el estado estacionario, $d [ES] / dt = 0$ ó $k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_p) [ES]$

Despejando $[ES]$; $[ES] = \frac{k_1 [E] [S]}{(k_{-1} + k_p)}$; $\frac{(k_{-1} + k_p)}{k_1} [ES] = [E] [S]$

$$\frac{(k_{-1} + k_p)}{k_1} = k_m; \text{ entonces } [ES] = \frac{[S]}{k_m} [E] \quad (4)$$

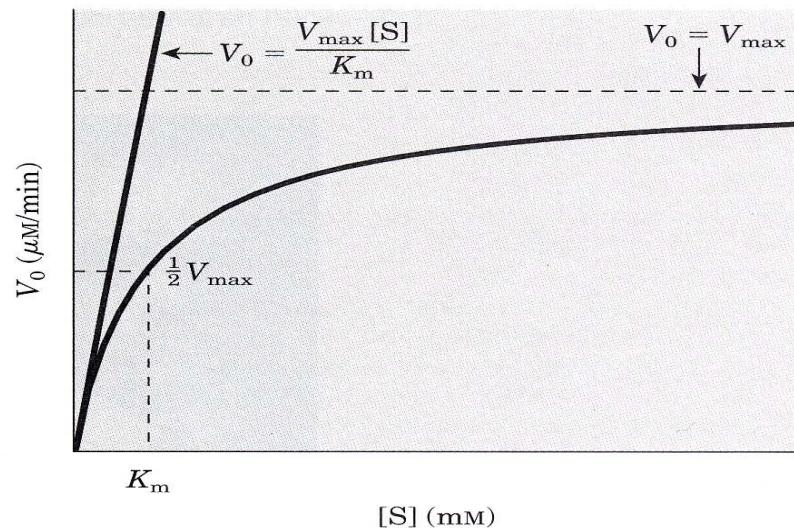
Sustituyendo (4) en (3)

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p \frac{[S]}{k_m} [E]}{[E] + \frac{[S]}{k_m} [E]} \quad \text{eliminando } [E] \text{ y siendo } \frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{k_m}}{1 + \frac{[S]}{k_m}}$$

operando

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

Así, la forma de la ecuación de velocidad es la misma que la que se deduce para las condiciones de equilibrio rápido. Sólo difieren las constantes de velocidad que componen la constante final k .



Dependencia de la velocidad con respecto a la concentración de sustrato. En la gráfica se muestran los parámetros cinéticos que definen los límites de la curva a [S] alta y baja. A baja [S], $K_m \gg [S]$ por lo que el término [S] del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten es insignificante; la ecuación se simplifica a $V_0 = V_{\max} [S] / K_m$ y V_0 tiene una dependencia lineal con respecto a [S] tal como se observa. A alta [S] donde $[S] \gg K_m$, el término K_m del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten es insignificante simplificándose la ecuación a $V_0 = V_{\max}$; esto está de acuerdo con la meseta que se observa a [S] elevada. La ecuación de Michaelis-Menten es, pues, consistente con la dependencia observada de V_0 con respecto a [S] y con la forma de la curva definida por los términos V_{\max} / K_m a baja [S] y V_{\max} a alta [S]

Métodos de representación de los datos de cinética enzimática:
Representación inversa de Lineweaver-Burk: $1/v$ frente a $1/[S]$.

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{k_m + [S]}; \text{ invirtiendola: } \frac{V_{\max}}{v} = \frac{k_m + [S]}{[S]}$$

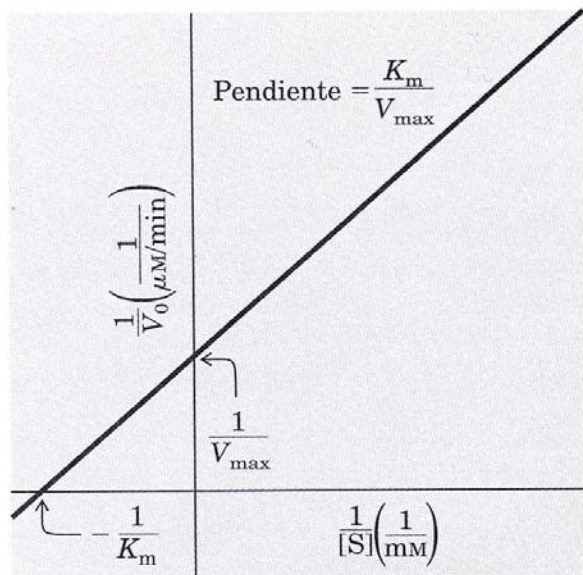
$$\text{operando: } \frac{1}{v} = \frac{k_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad \text{Separando términos: } \frac{1}{v} = \frac{k_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

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

$$\text{Pendiente} = k_m / V_{\max}$$

$$\text{Cuando } 1/[S] = 0 \rightarrow 1/v = 1/V_{\max}$$

$$\text{y si } 1/v = 0 \rightarrow -\frac{1}{V_{\max}} = \frac{k_m}{V_{\max} [S]} - \frac{1}{V_{\max}}; \text{ simplificando } V_{\max} \text{ y pasando } k_m \text{ al primer miembro } -\frac{1}{k_m} = -\frac{1}{[S]}$$



**Gráfica de los dobles recíprocos
o de Lineweaver-Burk.**

¿Porqué determinar k_m ?

a) Da una idea de la concentración de sustrato “in vivo”

Así la fracción de centros llenos f_{ES} .

$$f_{ES} = \frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{k_m + [S]}$$

b) Se relaciona con las constantes de velocidad de las etapas individuales:

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

$$\text{Si } k_{-1} \gg k_2 \rightarrow k_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = k_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

En este caso k_m es indicador de la estabilidad del complejo $[ES]$, de tal manera que:

$\uparrow k_m$ baja afinidad y $\downarrow k_m$ alta afinidad.

TABLA 8.5 Valores de la K_M de algunos enzimas

Enzima	Sustrato	$K_M(\mu\text{M})$
Quimotripsina	Acetil-L-triptofanamida	5000
Lisozima	Hexa- <i>N</i> -acetilglucosamina	6
β -Galactosidasa	Lactosa	4000
Treonina desaminasa	Treonina	5000
Anhidrasa carbónica	CO_2	8000
Penicilinas	Bencilpenicilina	50
Piruvato carboxilasa	Piruvato	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
Arginina-tRNA sintetasa	Arginina	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

Significado de V_{\max}

Número de recambio: La velocidad máxima, revela el número de recambio de un enzima, que es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo y por molécula de enzima cuando éste está totalmente saturado de sustrato. Es igual a la constante cinética k_2 , también llamada k_{cat}


$$V_{\max} = k_2 [E]_t; \quad k_2 = \frac{V_{\max}}{[E]_t} = \text{n}^\circ \text{ de recambio (tiene unidades de s}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Ciclos catalíticos} = 1 / k_2$$

TABLA 8.6 Números de recambio máximos de algunos enzimas

Enzima	Número de recambio (por segundo)
Anhidrasa carbónica	600 000
3-Cetosteroide isomerasa	280 000
Acetilcolinesterasa	25 000
Penicilinas	2 000
Lactato deshidrogenasa	1 000
Quimotripsina	100
DNA polimerasa I	15
Triptófano sintetasa	2
Lisozima	0,5

TABLA 8.7 Preferencias de la quimotripsina por los sustratos

Aminoácido en enlace éster	Cadena lateral de aminoácido	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$
Glicina	—H	$1,3 \times 10^{-1}$
Valina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CH—} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,0
Norvalina	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$3,6 \times 10^2$
Norleucina	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$3,0 \times 10^3$
Fenilalanina	— CH_2 — 	$1,0 \times 10^5$

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

Perfección cinética en la catálisis enzimática: el criterio k_{cat} / k_m

* Cuando la $[S] \gg k_m \rightarrow$ la velocidad $\approx k_{cat}$

* En condiciones fisiológicas $[S] / k_m$ varía entre 0.01 y 1

Si $[S] \ll k_m$ En este caso: $v_0 = \frac{k_{cat}}{k_m} [E] [S]$; pero además $[E]_{libre} \approx [E]_t$;

Entonces tenemos que $v_0 = \frac{k_{cat}}{k_m} [S] [E]_t$;

de aquí que k_{cat} / k_m es la constante de velocidad para la interacción de E y S, y se puede utilizar como una medida de la eficiencia catalítica.

¿Que eficiencia puede tener un enzima?

$$\frac{k_{cat}}{k_m} = \frac{k_{cat}}{\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}}; \quad \frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}} \quad k_1 \text{ el resultado del cociente es } < k_1$$

Ahora si $k_{cat} \gg k_{-1} \rightarrow$ entonces $\frac{k_{cat}}{k_m} \approx k_1$

tabla 8-8

Enzimas para los que k_{cat}/K_m es próximo al límite controlado por difusión (10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)				
Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Carbónico anhidrasa	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalasa	H_2O_2	4×10^7	1,1	4×10^7
Crotonasa	Crotonil-CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarasa	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β -Lactamasa	Bencilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

Fuente: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W.H. Freeman and Company, Nueva York.

Esta velocidad no puede superar la velocidad de encuentro del enzima y el sustrato, controlada por la difusión. La difusión limita el valor de k_1 , de modo que no puede superar cifras de 10^8 y $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Acetilcolinesterasa



Datos: $K_{cat} = 1.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 9 \times 10^{-5} \text{ M}$ Cociente $K_{cat} / K_m = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

$$1.6 \times 10^8 \approx K_1$$

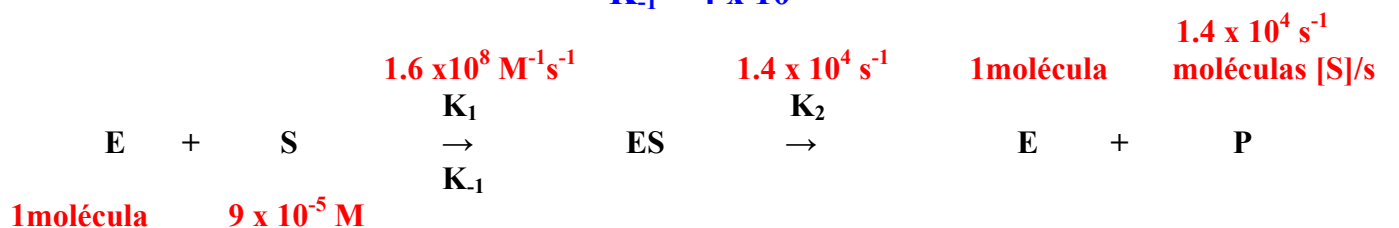
Comprobación: $K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$; $9 \times 10^{-5} = \frac{K_{-1} + 1.4 \times 10^4}{K_1}$; $K_{-1} = 9 \times 10^{-5} K_1 - 1.4 \times 10^4$ (1)

$$\frac{K_{cat}}{K_{-1} + K_{cat}} = \frac{1.4 \times 10^4 \times K_1}{9 \times 10^{-5} K_1 - 1.4 \times 10^4 + 1.4 \times 10^4} \text{ simplificando } \frac{1.4 \times 10^4 \times K_1}{9 \times 10^{-5} \times K_1} = 1.6 \times 10^8 = K_1 \text{ (2)}$$

Sustituyendo el valor obtenido para K_1 en (2) en la ecuación (1)

$$K_{-1} = 9 \times 10^{-5} \times 1.6 \times 10^8 - 1.4 \times 10^4$$

$$K_{-1} = 4 \times 10^2$$



$$1/6.022^{23} \text{ moles/litro} \times 9 \times 10^{-5} \text{ moles/litro} \times 1.6 \times 10^8 \text{ litros/moles s} = 2.3912^{-20} \text{ moles/litro} \times \text{s} = \text{M/s}$$

$[E] [S]$ tiene que ser menor o igual a 1.4945×10^{-28}

$$1.4 \times 10^4 / 6.022^{23} = 2.3248^{-20} \text{ M/s}$$