

QUÍMICA BIOLÓGICA

Enzimas
Cinética Enzimática

2017

INTRODUCCIÓN

❑ **Proteínas** (única excepción: RNAs catalíticos o ribozimas)

❑ **Holoenzima** (complejo catalíticamente activo)

✓ Apoenzima (inactiva)

✓ Cofactor (coenzimas, grupos prostéticos)

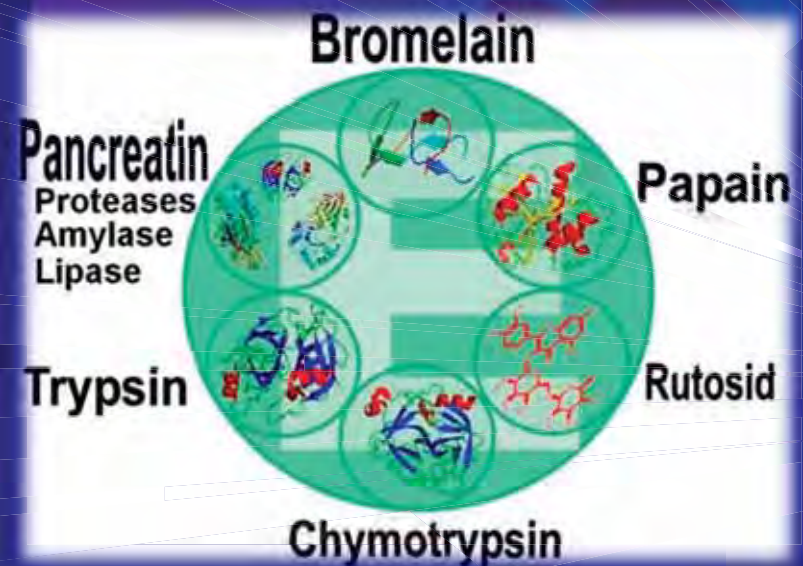
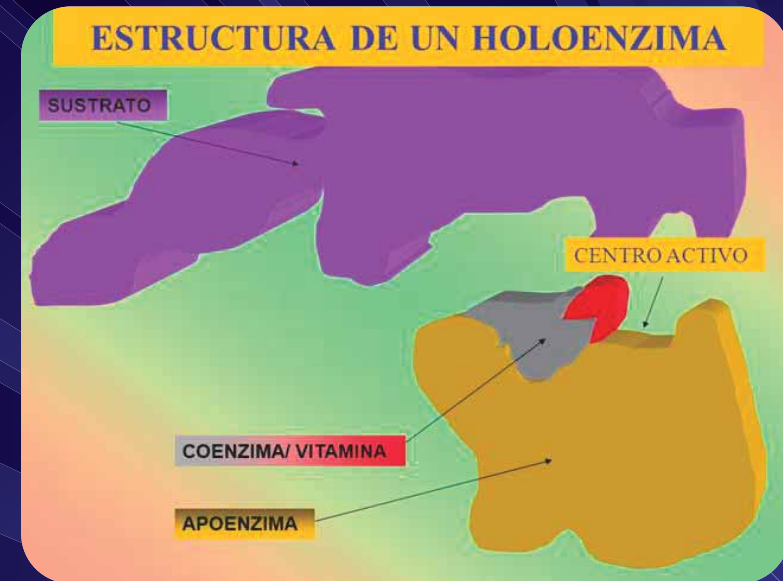
❑ **Ligandos**

✓ Sustratos

✓ Activadores

✓ Inhibidores

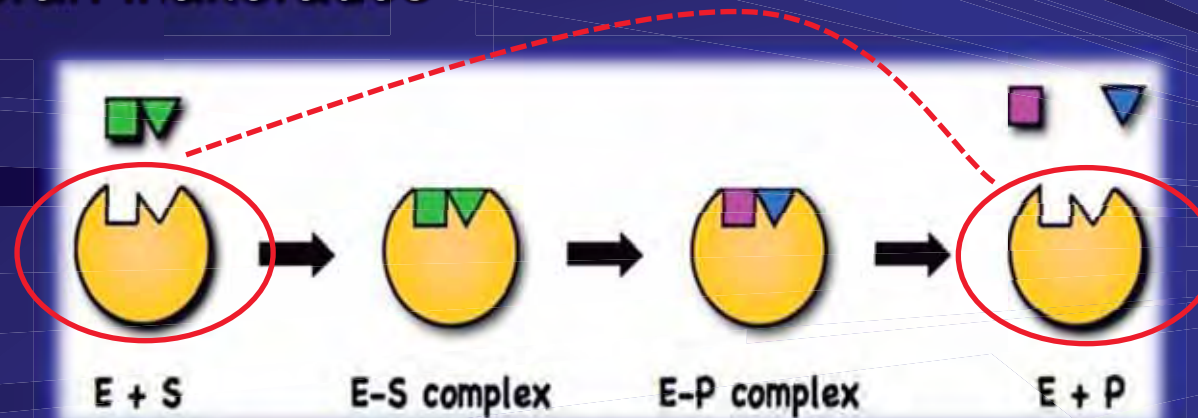
❑ **Efecto de pH y T**



INTRODUCCIÓN (cont.)

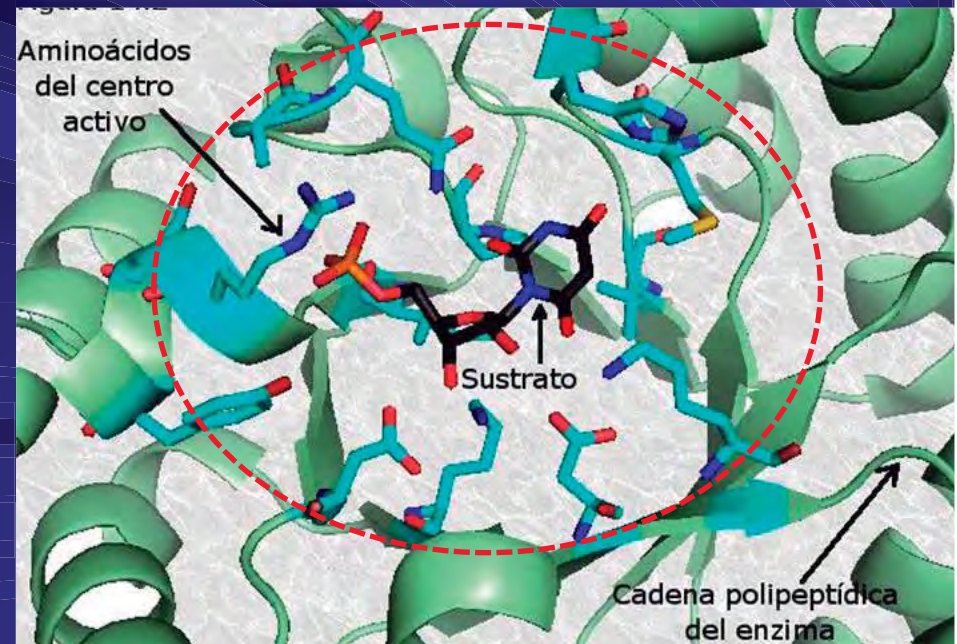
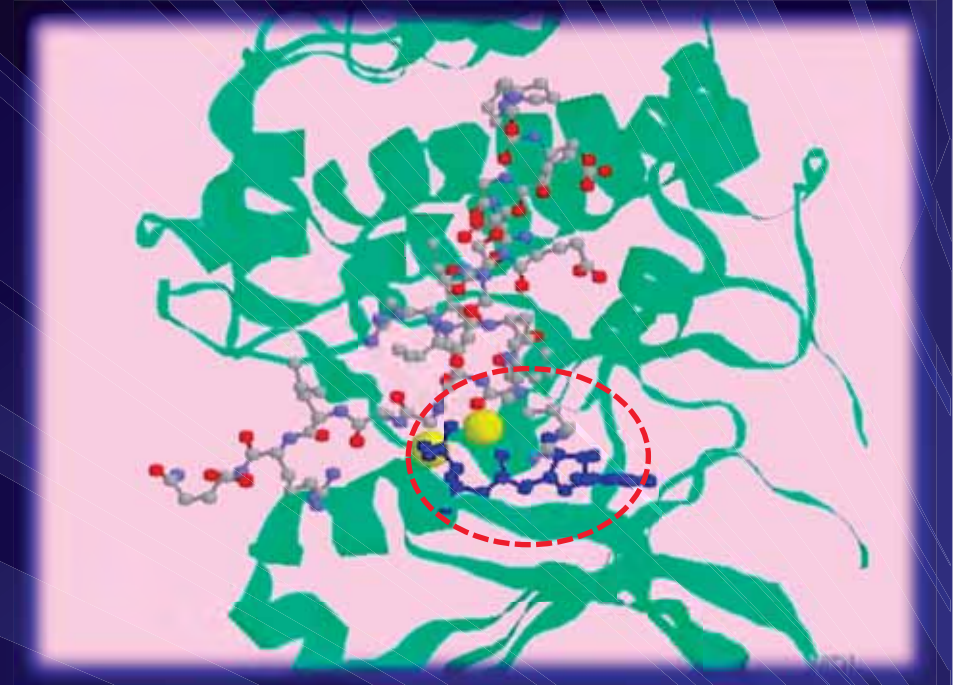
❑ Catalizadores Biológicos

- ✓ Alta Velocidad de Reacción en ambas direcciones (10^6 - 10^{12})
- ✓ Condiciones de reacción intermedias ($T < 100^\circ\text{C}$; PA, pH ~ neutro)
- ✓ Eficaces a concentraciones catalíticas
- ✓ Alta especificidad de Reacción (ambos S y P, poco P secundario)
- ✓ Capacidad de Regulación (actividad catalítica varía en respuesta a [C] de sustancias diferentes de S)
- ✓ Se recuperan inalterados



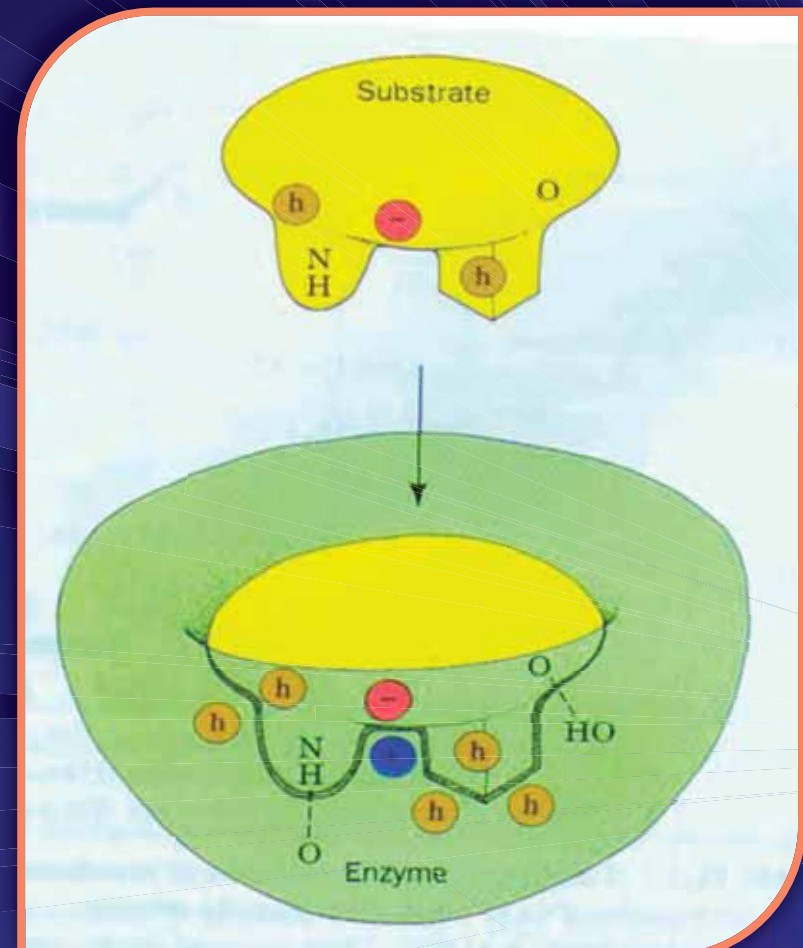
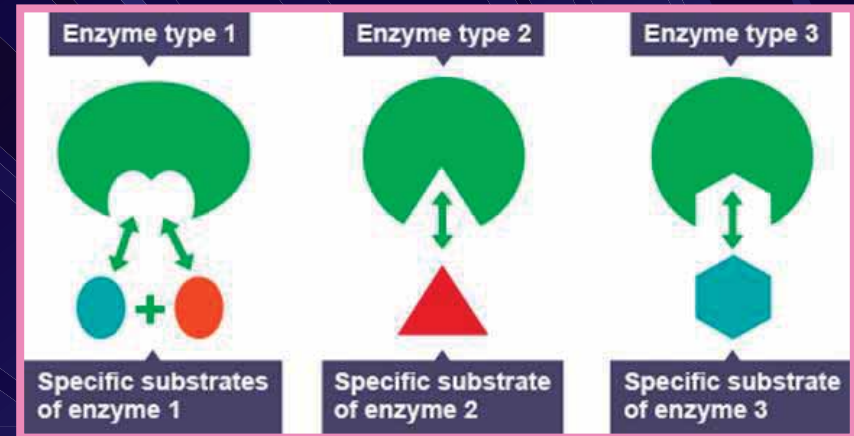
❑ Sitio activo

- ✓ Hendidura en la molécula que involucra una parte pequeña de la E
- ✓ Entidad tridimensional formada por grupos relativamente distantes en la estructura primaria
- ✓ Unión específica del S mediante fuerzas no covalentes: electrostáticas, puente H_2 , Van der Waals, interacciones hidrofóbicas.



■ Sitio activo

- ✓ Alta especificidad
- ✓ Complementaria en forma al S
- ✓ Residuos aa que lo conforman poseen complementariedad electrónica.



❑ Sitio Activo

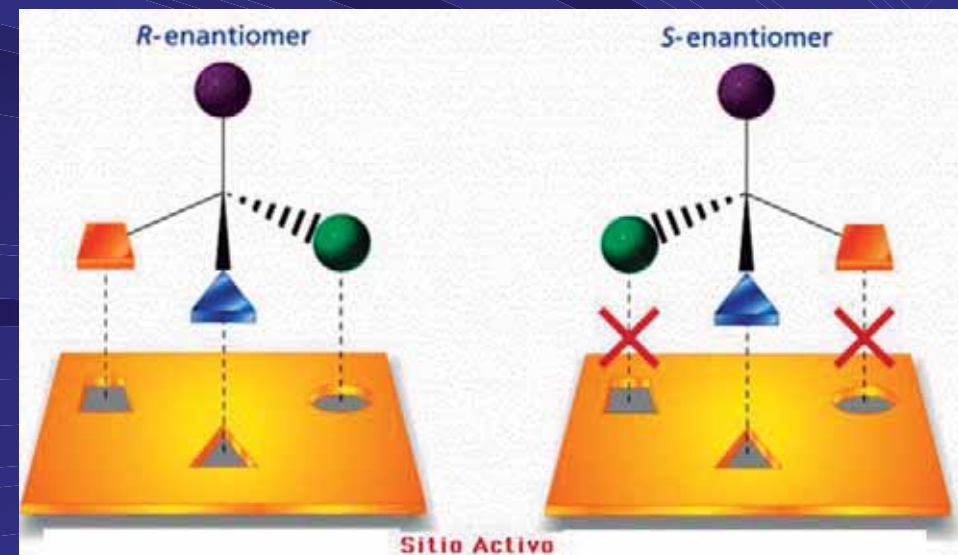
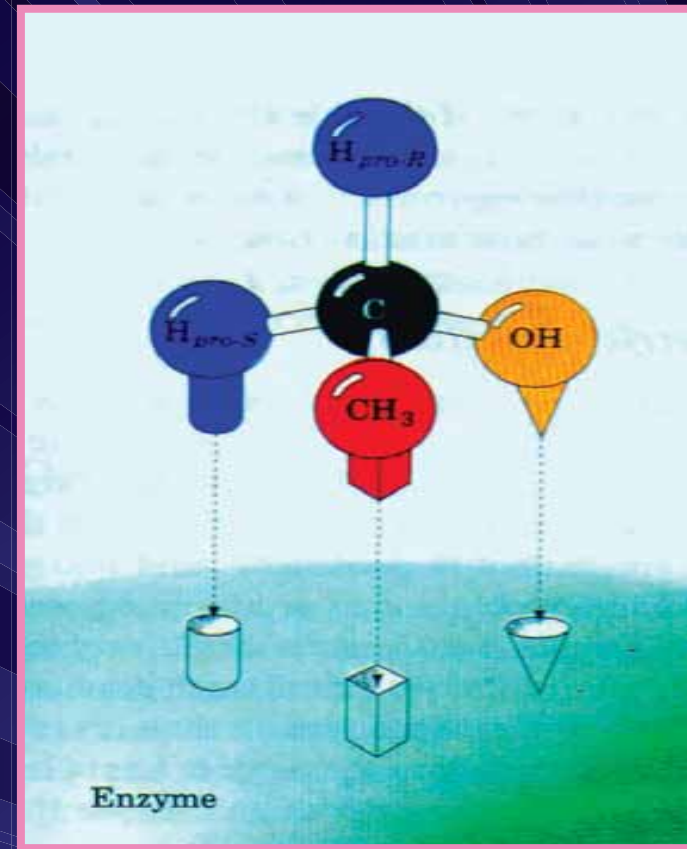
Estereoespecificidad

Alta en ambos:

- ✓ “unión” de S quirales
(sitios activos asimétricos)
- ✓ “catálisis” de la
reacción

Especificidad Geométrica:
más restrictiva.

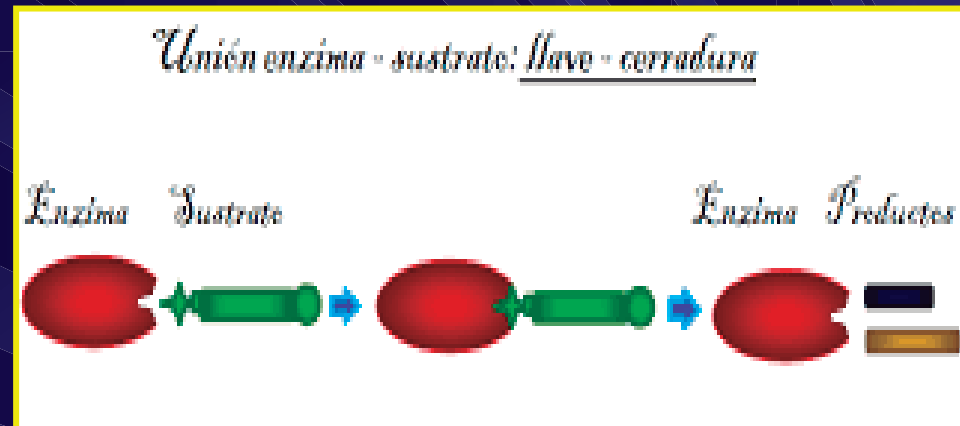
Especificidad absoluta
para un compuesto o
compuestos relacionados



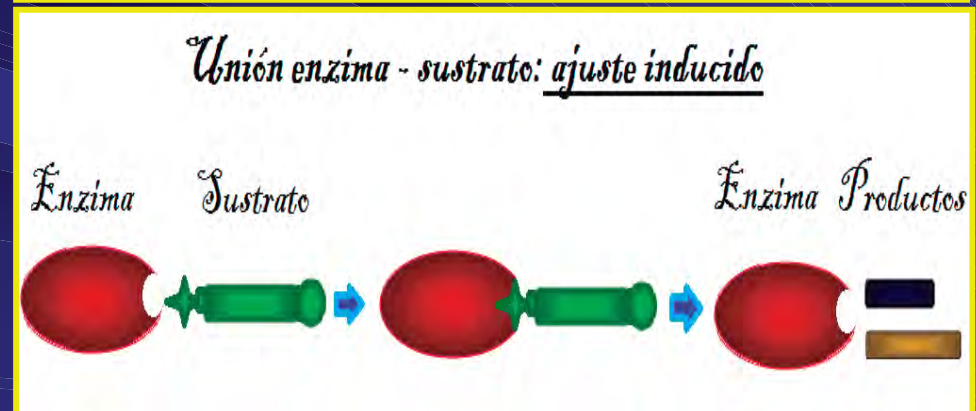
❑ Sitio Activo

Teorías sobre especificidad de la unión

✓ Fisher, E (1894):



✓ Koshland, D (1958):



Rx: sitio de unión de $> E$ esta preformado, pero exhibe algún grado de inducción luego que el S se une.

CINÉTICA ENZIMÁTICA

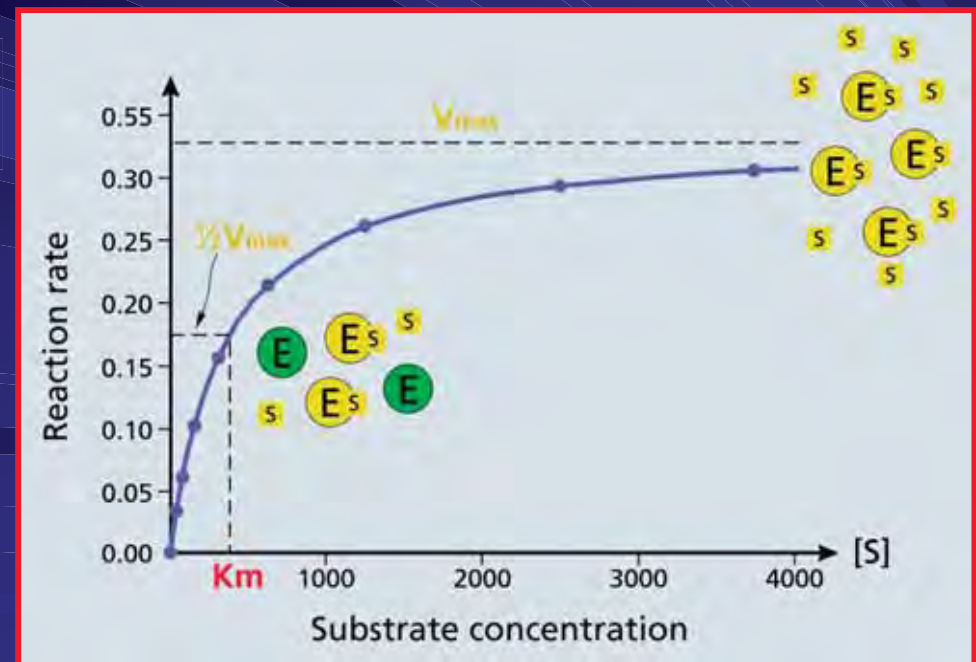
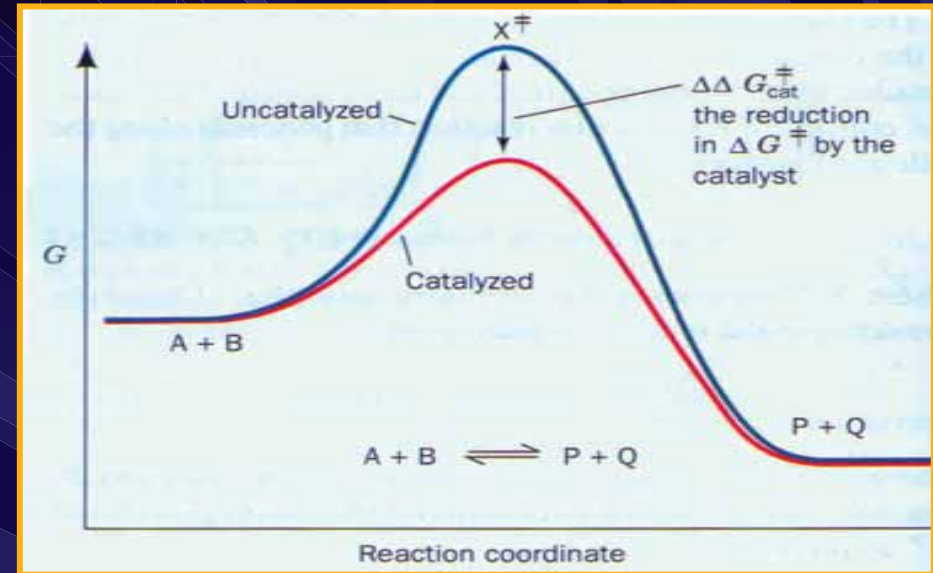
❑ Catalizador: disminuye la barrera de activación para la reacción catalizada, en ambos sentidos.



Si P es despreciable →

$$V = V_o$$

... minimiza efectos de reacción reversible: Inhibición x P, inactivación E, etc.





Cuando la $[S] \uparrow \uparrow$... $E \rightarrow ES$, el 2do paso es independiente de la $[S] \therefore$

$$v_o = dP/dt = k_2 [ES]$$

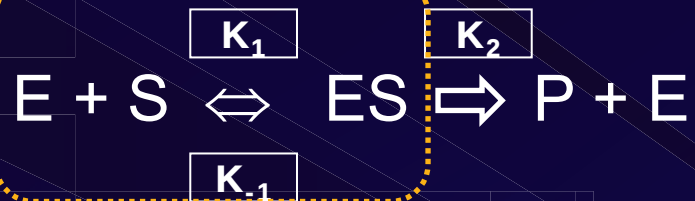
Velocidad total de producción de ES...

$$d[ES]/dt = k_1 [E][S] - k_{-1}[ES] - k_2 [ES]$$

$$[Et] = [ES] + [E] \therefore [E] = [Et] - [ES]$$

Medible experimentalmente

$$d[ES]/dt = k_1 ([Et] - [ES]) [S] - k_{-1}[ES] - k_2 [ES]$$



Aproximaciones...

Si $K_{-1} \gg K_2 \rightarrow K_s = K_{-1} / K_1$
 $= [S][E] / [ES]$

Estado Estacionario $\Rightarrow$
 (Briggs-Haldane 1925)

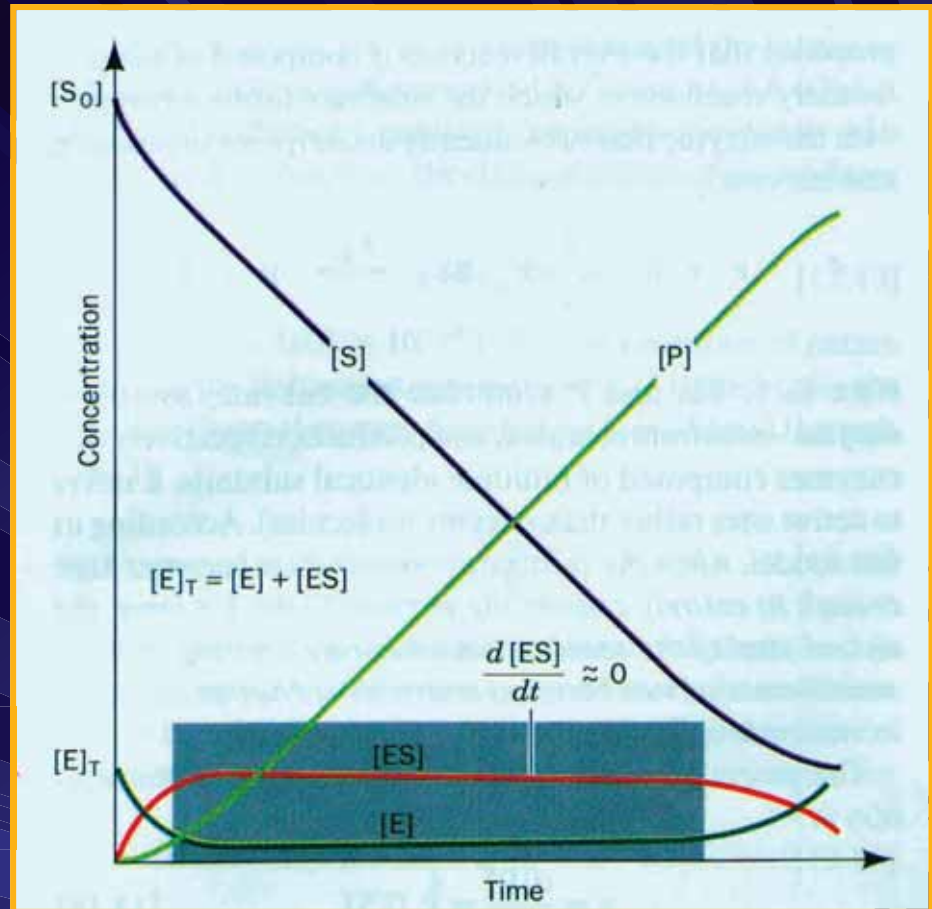
$[ES] \approx \text{cte}$ hasta que S agota $\Rightarrow$

$$d[ES]/dt = 0$$

$$\therefore d[ES]/dt = K_1 ([E]_T - [ES]) [S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] = 0$$

$$K_1 ([E]_T - [ES]) [S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] = 0 \quad \text{distribuyo...}$$

$$K_1 [E]_T[S] - K_1[ES][S] - K_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$



saco factor común ES y redistribuyo $\Rightarrow$

$$(K_1[S] + K_{-1} + k_2) [ES] = K_1 [Et][S]$$

$$[ES] = K_1 [Et][S] / K_1[S] + K_{-1} + k_2 = \frac{[Et][S]}{[S] + K_M} \quad K_M = \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1}$$

$$v_o = K_2 [ES] \text{ (saturación S)} = \frac{K_2 [Et][S]}{[S] + K_M}$$

Si $[S] \gg K_M \Rightarrow v_o = K_2 [Et] = V_M$
(saturación E)

$$v_o = \frac{V_M [S]}{[S] + K_M}$$

$$v_o = \frac{V_M [S]}{[S] + K_M}$$

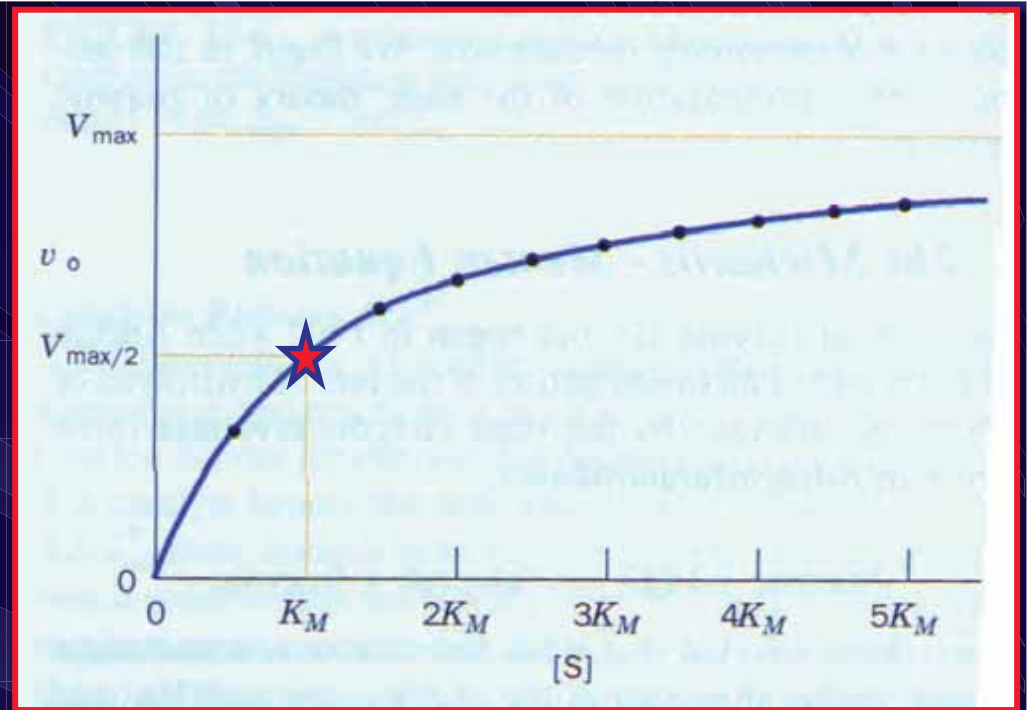
$$\text{Si } [S] = K_M \Rightarrow v_o = V_M / 2$$

$$\text{Si } [S] \ll K_M \Rightarrow v_o = V_M [S] / K_M$$

$$\text{Si } [S] \gg K_M \Rightarrow v_o = V_M$$

$$K_M = 10^{-1} - 10^{-7} \text{ M}$$

depende de S, condiciones ambientales (pH, T, fza. Iónica), y de la identidad de la E.

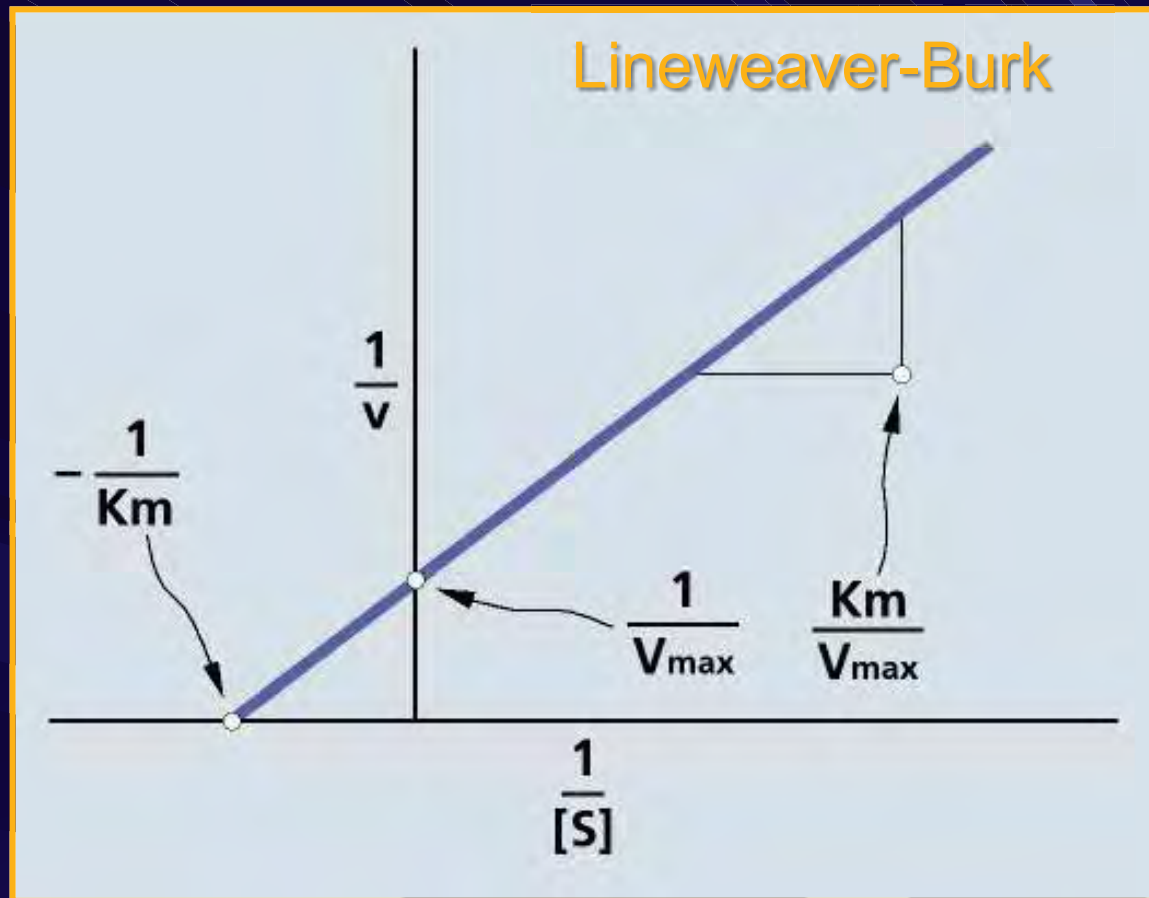


KM $\cong$ medida de la Afinidad de E x S.

$$K_M = (K_{-1} + K_2) / K_1 = (K_{-1} / K_1) + (k_2 / K_1) = K_s + (k_2 / K_1) \Rightarrow$$

$$\text{Si } (k_2 / K_1) \ll K_s \Rightarrow K_M = K_s$$

$$\text{Si } K_s \downarrow = K_M \downarrow \Rightarrow \text{Afinidad } \uparrow$$

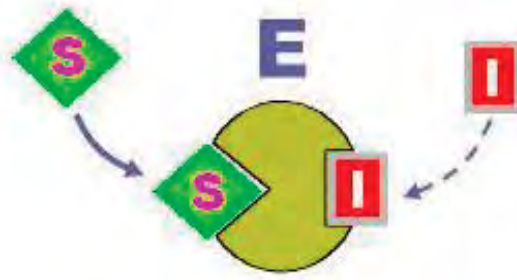
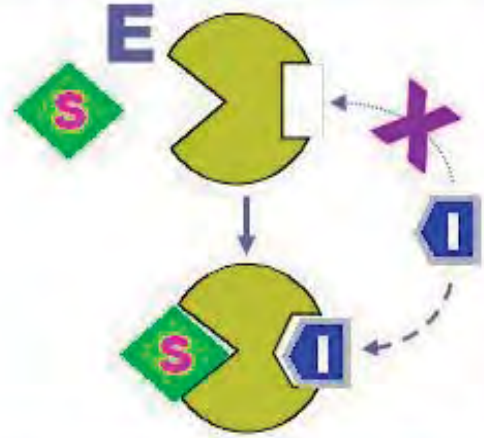


Eadie-Hofstee: en el eje de abscisas se representa v y en el de ordenadas v/S

$$v_o = \frac{V_M [S]}{[S] + K_M} \quad \frac{1}{V} = \frac{S + K_M}{V_M \cdot S} \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} \left(\frac{1}{S} \right)$$

Análisis del Gráfico: Subestima V_M , > datos experimentales a la izquierda ($\uparrow [S]$), pequeños errores en $v_o \Rightarrow$ grandes en $1/v_o$

Mecanismo de Inhibición Enzimática

	▶ Competitive	■ Non-competitive	■ Uncompetitive
Cartoon Guide		PURO 	
Equation and Description	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ EI	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ $EI + S \rightarrow EIS$	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ EIS
	[I] binds to free [E] only, and competes with [S]; increasing [S] overcomes inhibition by [I].	[I] binds to free [E] or [ES] complex; Increasing [S] can not overcome [I] inhibition.	[I] binds to [ES] complex only, increasing [S] favors the inhibition by [I].

Inhibición Enzimática Gráficos

	▶ Competitive	■ Non-competitive	■ Uncompetitive
Direct Plots	v_o, V_{max}, K_m, K_m', $[S], \text{mM}$	v_o, V_{max}, V_{max}', $K_m = K_m'$, $[S], \text{mM}$	V_{max}, V_{max}', K_m', K_m, $[S], \text{mM}$
	V_{max} unchanged K_m increased	V_{max} decreased K_m unchanged	Both V_{max} & K_m decreased
Double Reciprocal	$1/v_o$, $1/V_{max}$, $1/K_m$, $1/[S]$, Intersect at Y axis	$1/v_o$, $1/V_{max}$, $1/K_m$, $1/[S]$, Intersect at X axis	$1/v_o$, $1/V_{max}$, $1/K_m$, $1/[S]$, Two parallel lines

□ *No-competitivo (mixto)*

Inhibidor se une a sitios de E que participan en la "unión" y "catálisis" $\Rightarrow$ afecta $K_M \uparrow$ y $V_M \downarrow$.
Efectiva a $[C] \uparrow$ y $\downarrow$ de S

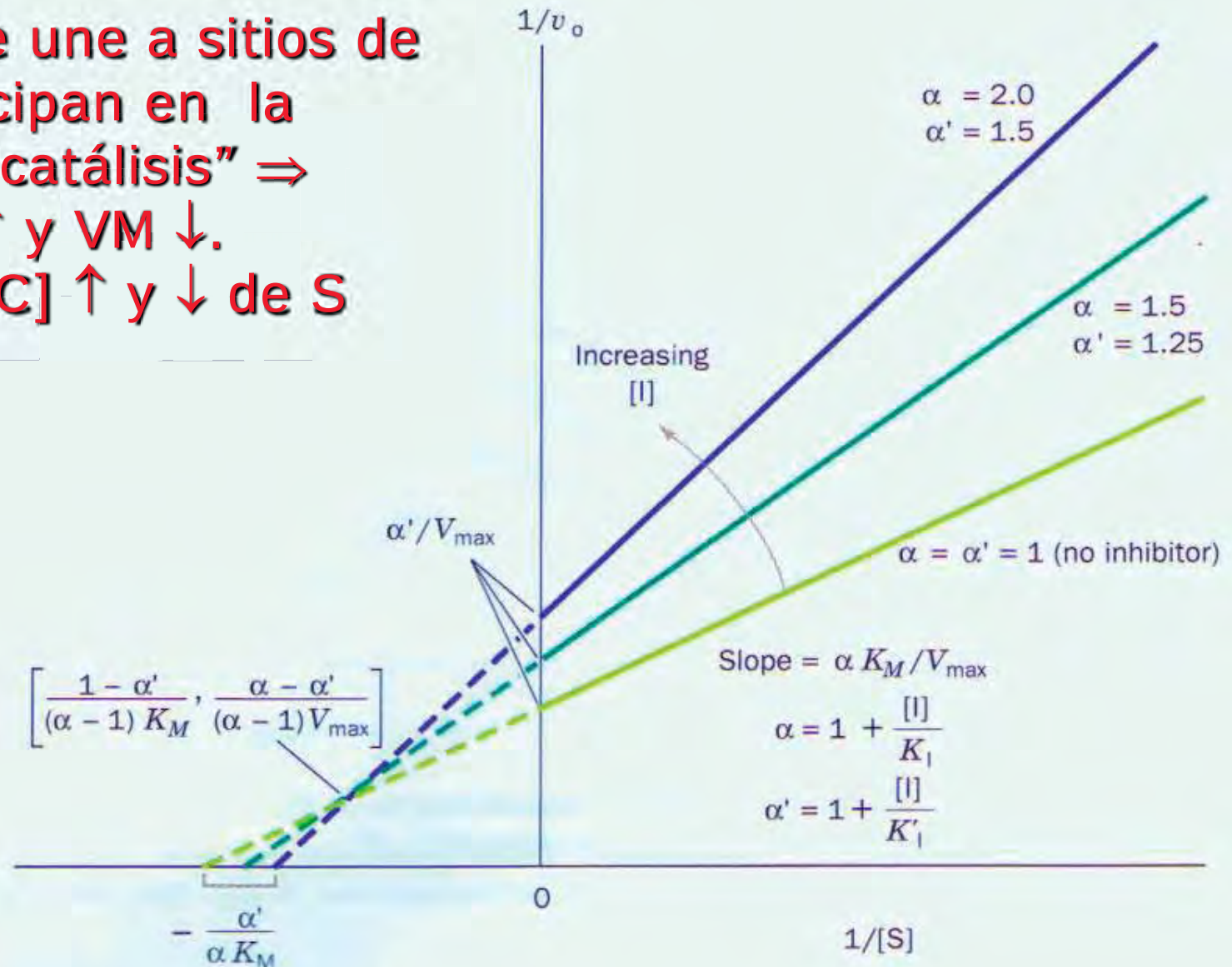


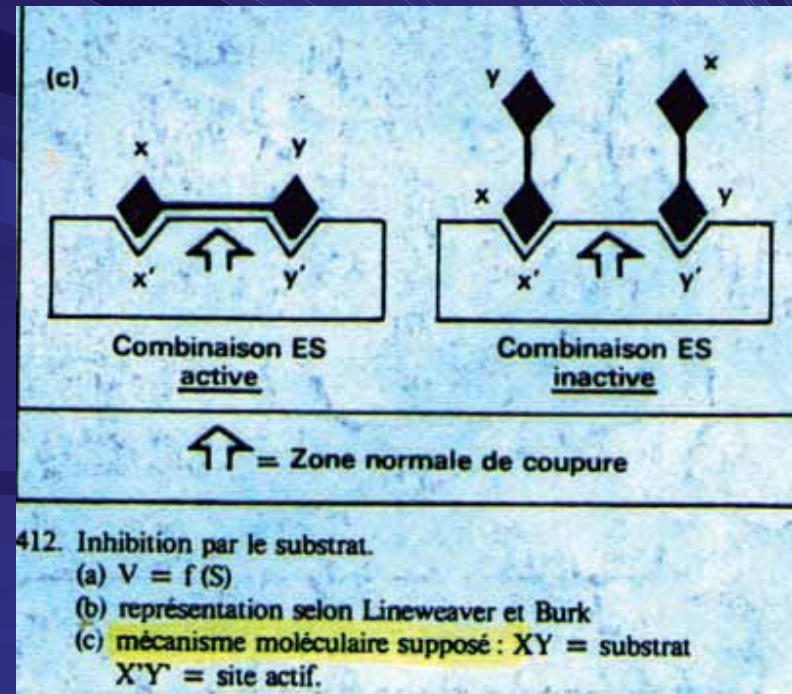
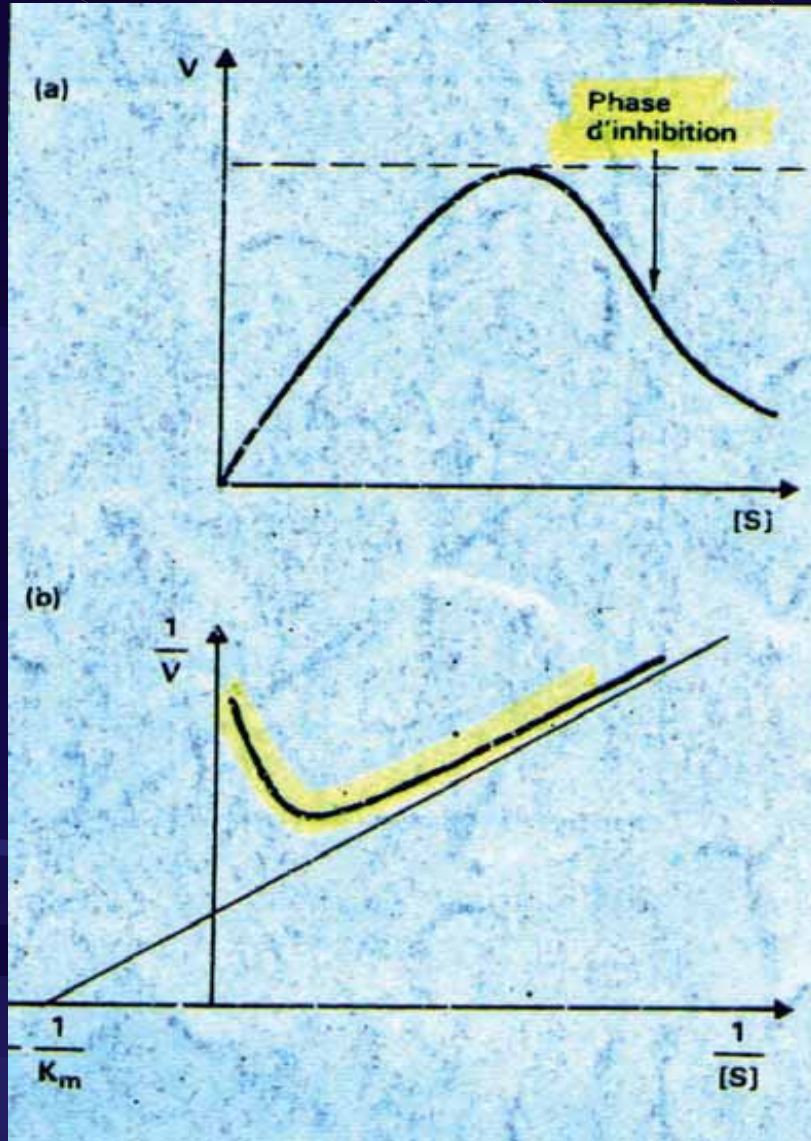
TABLE 13-2. THE EFFECTS OF INHIBITORS ON THE PARAMETERS OF THE MICHAELIS-MENTEN EQUATION^a

Type of Inhibition	$V_{\max}^{\text{app}}$	K_M^{app}
None	$V_{\max}$	K_M
Competitive	$V_{\max}$	αK_M
Uncompetitive	$V_{\max}/\alpha'$	K_M/α'
Mixed	$V_{\max}/\alpha'$	$\alpha K_M/\alpha'$
Puro	$V_{\max}/\alpha'$	K_M

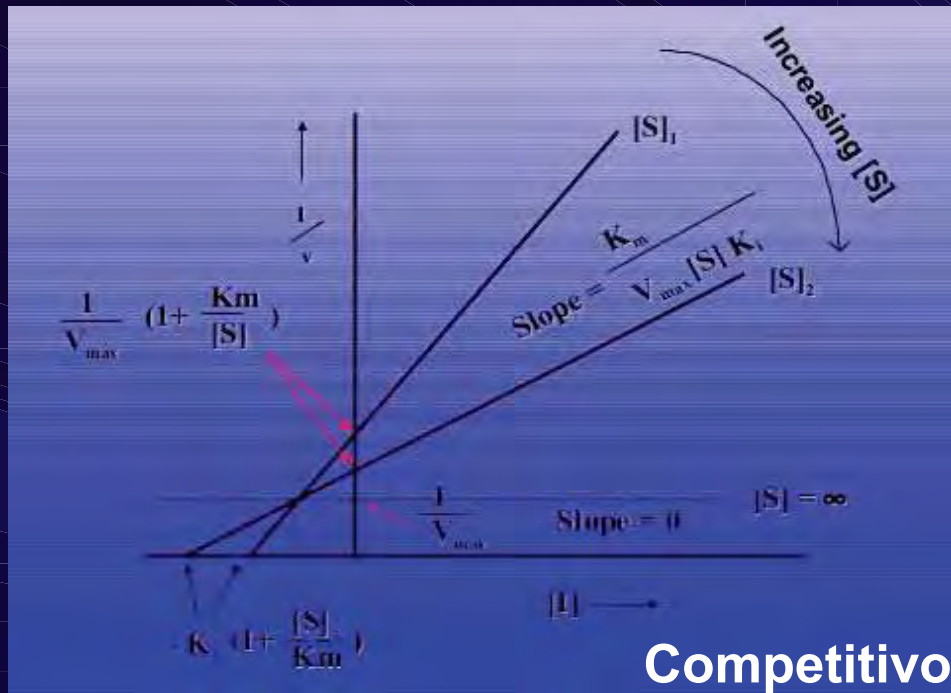
^a $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$ and $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$

Inhibición por exceso de S

- ✓ La unión de S suplementario a un 2^{do} sitio activo en la E produce la modificación de la proteína $\Rightarrow$ inhibe el sitio activo principal.
- ✓ La presencia de un exceso de S $\Rightarrow$ impide la unión correcta del S a su sitio activo



Determinación de K_I (método de Dixon)



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} \frac{[I]}{K_i} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$

No-competitivo



Activadores Enzimáticos

□ Cationes Metálicos

Grupo prostético de una metalo E (Zn^{2+} en metalo-proteinasas), parte de grupo próstético (Fe^{2+} del hemo de catalasa) o activador disociable ($\text{E} + \text{A} \leftrightarrow \text{EA} ; K_A$).

✓ Monovalentes: $\text{Na}, \text{K}, \text{NH}_4, \text{Rb}, \text{Cs} \Rightarrow$ cambio conformacional ($\downarrow \text{KM}$ o $\uparrow \text{VM}$). Participación directa en el mecanismo de reacción $\Rightarrow$ estabiliza S (por tautomería ceto-enol).

✓ Divalentes: $\text{Mg}, \text{Ca}, \text{Zn}, \text{Mn}, \text{Cd}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Fe}, \text{Cu}$

Unión directa a E $\Rightarrow$ algunas veces sirve de nexo entre E y S

Unión a S (verdadero S de la reacción; Quinasas/ATP);

Cu/Fe, en reacciones redox.

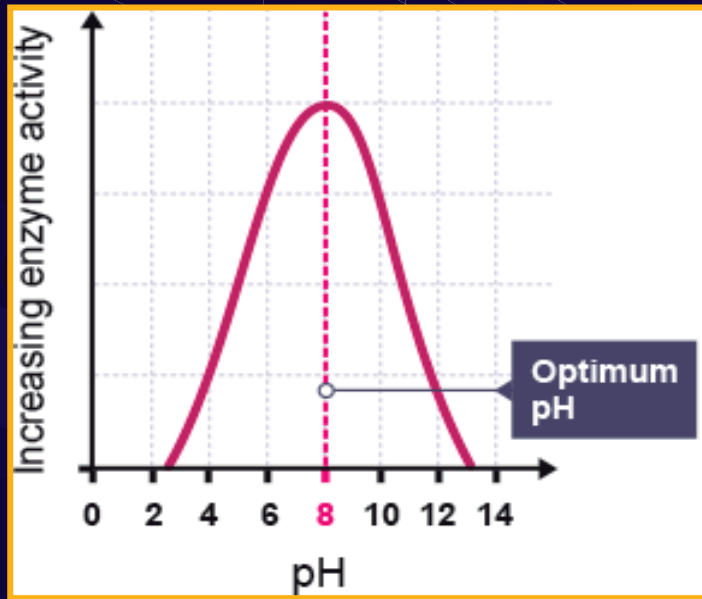
✓ Trivalentes: Al, Cr

Puede haber inhibición por exceso de activador.

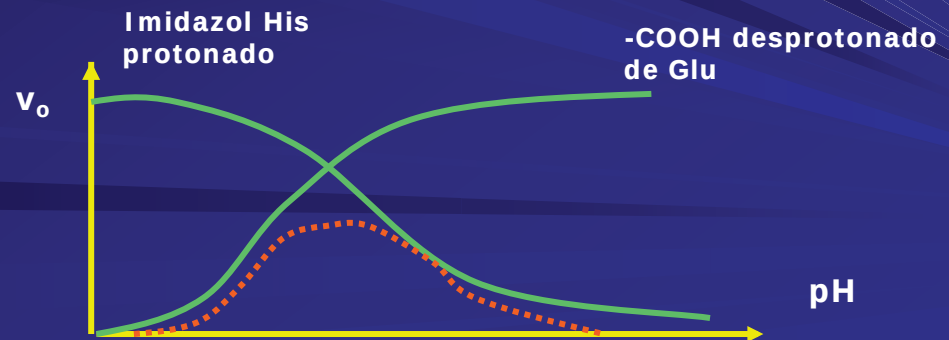
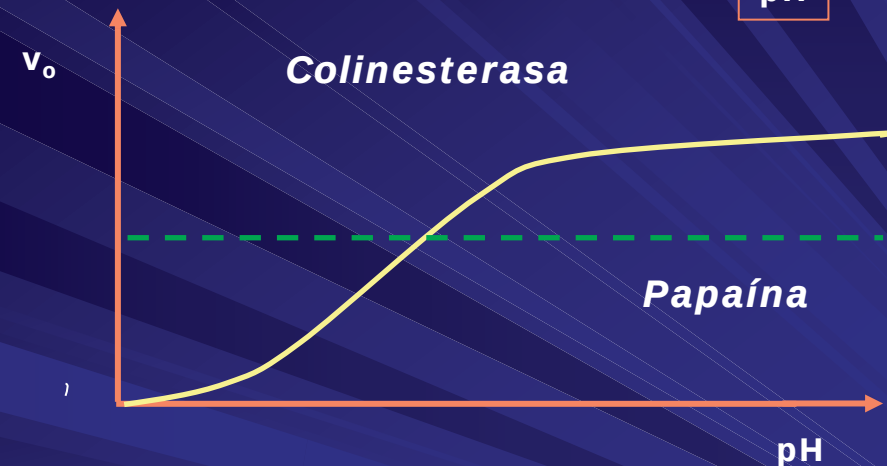
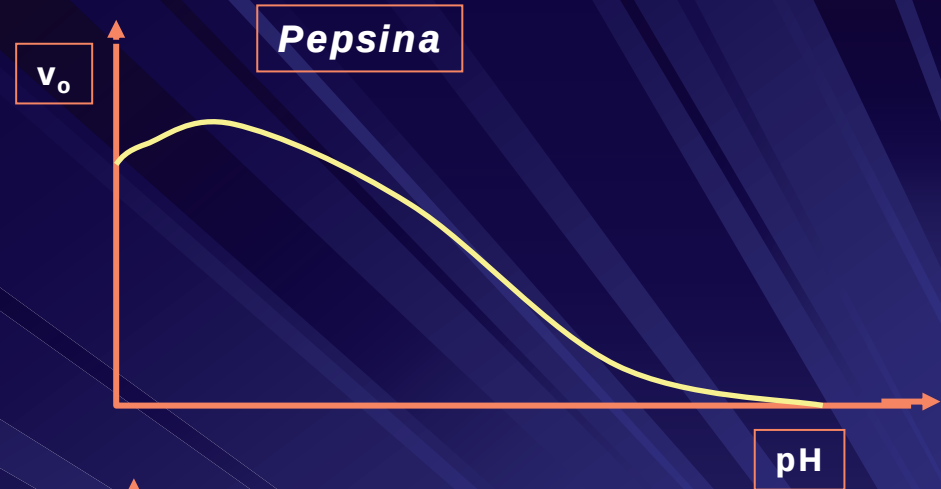
□ **Aniones:** menos frecuente, concentraciones relativamente elevadas, 50-100 nM, (α -amilasas x Cl^-)

Efecto del pH

Quimotripsina



La figura refleja el estado de ionización de los aa involucrados en la catálisis (es la sumatoria de dos curvas de titulación).



Efecto del pH sobre la “estabilidad” de la E (desnaturalización) o sobre la “actividad” (efectos cinéticos genuinos)?

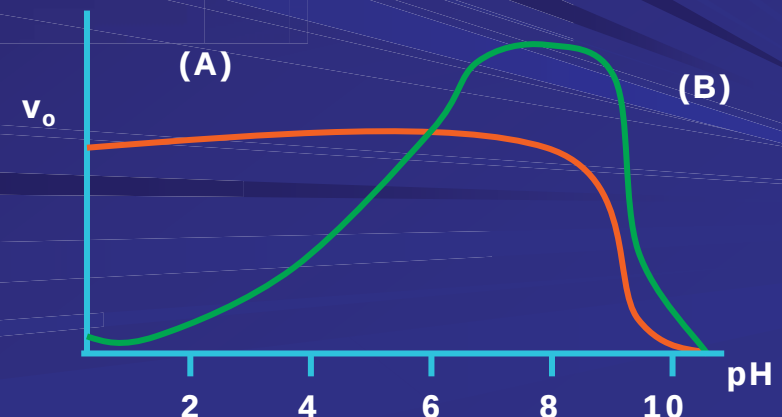
Efectos sobre actividad dependen de: **pKs** grupos **ionizables** del **sitio activo**, **pKs** grupos del **S** que participan en la **unión**, **pKs** grupos **catalíticos** del **sitio activo**, y **pKs** de **otros** grupos de **E** (producen cambios conformacionales que afectan v)

- ✓ Si pH afecta grupos de E y/o S involucrados en la formación de ES $\Rightarrow$ afecta K_M
- ✓ Si afecta grupos que están sólo en ES $\Rightarrow$ afecta V_M

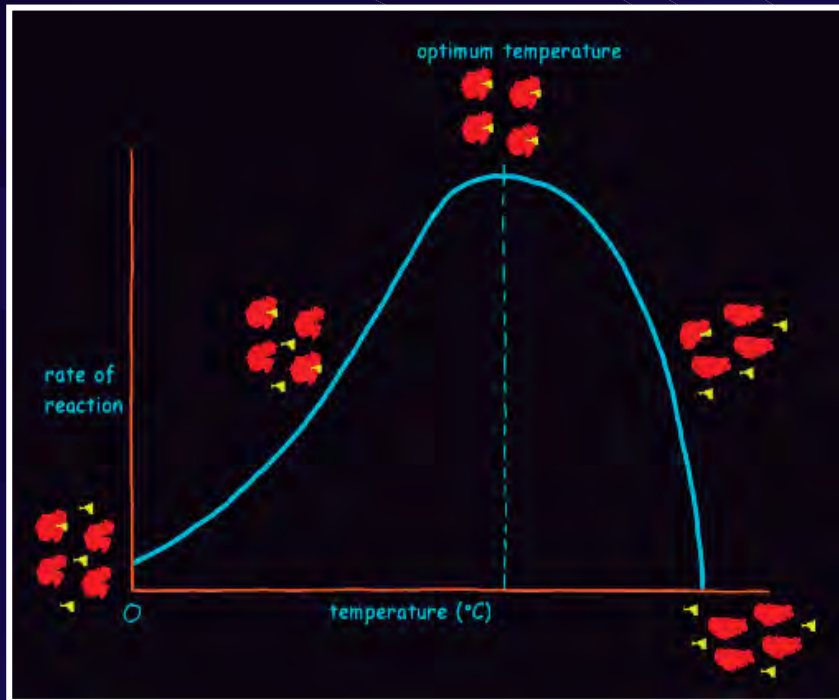
Efecto del pH sobre la actividad o estabilidad?

(A) E preincubada 5-10' a esos pHs, y medida v_o a pH 6.4-6.5

(B) v_o medida a esos pHs

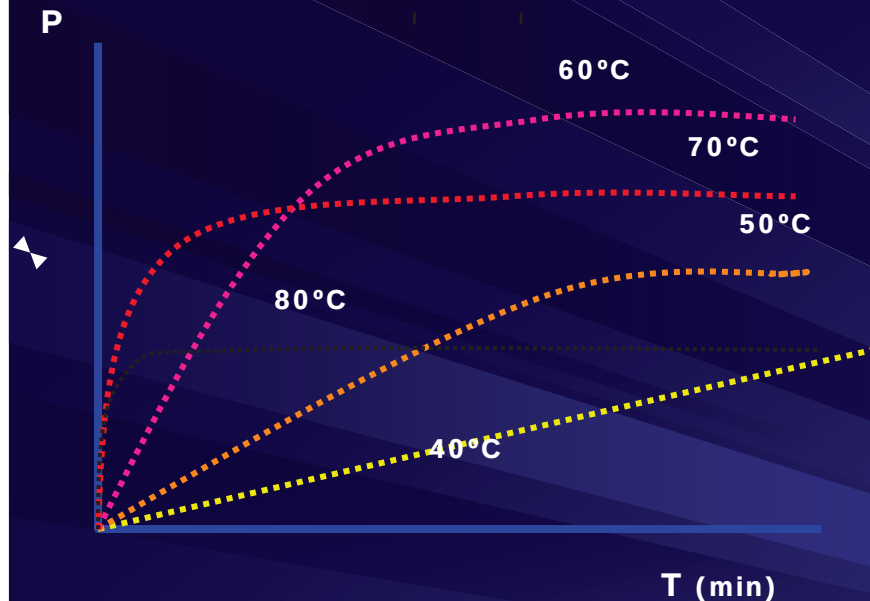


Efecto de la T



Efectos de la T sobre la reacción enzimática: real sobre v_0 (sobre v de ruptura de ES determinada por la E_a reacción); sobre la afinidad de la E x S; sobre pH de E, S y ES (por alteración de los valores de pK_s); sobre la afinidad de E x activadores e inhibidores; o sobre la estabilidad de E o a causas secundarias (cambio de la solubilidad de gases, de pH del buffer, etc.)

Efectos de la T sobre Estabilidad



La mayor parte de E se inactiva debido a desnaturalización por T próximas a 100°C (excepción bacterias termófilas)

Otras se inactivan x frío (disociación debida a inestabilización de uniones hidrofóbicas)

REACCIONES BISUSTRATO

$A + B \xrightleftharpoons{E} P + Q$ (60% reacciones conocidas)
 Reacciones de Transferencia de un grupo específico de un S a otro.

