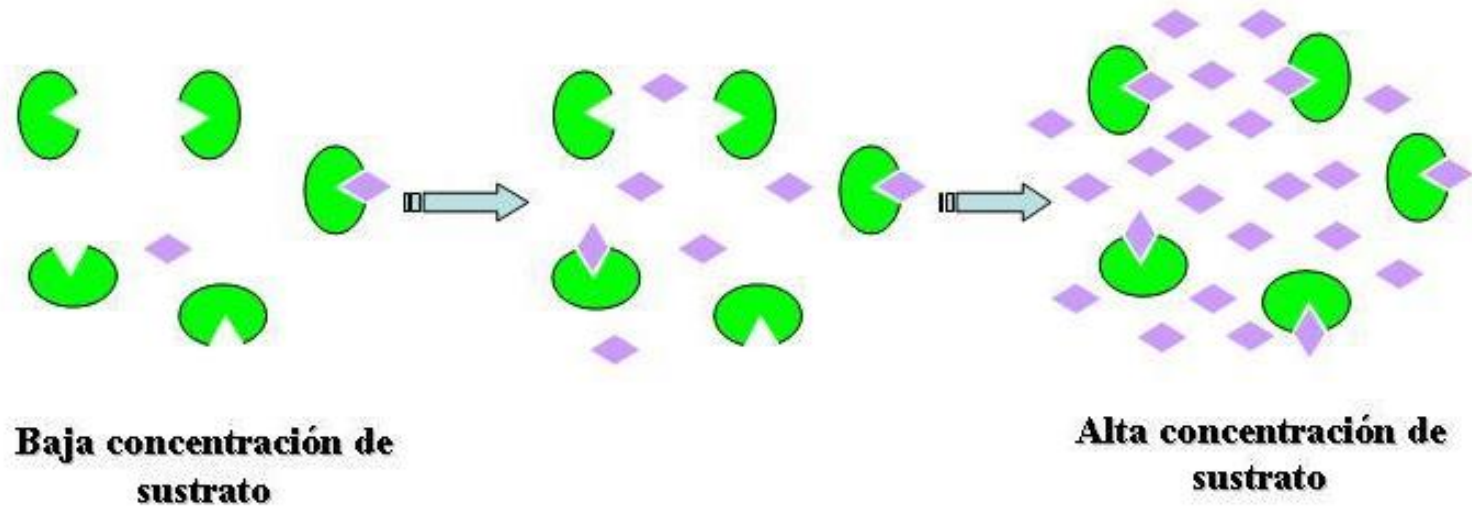


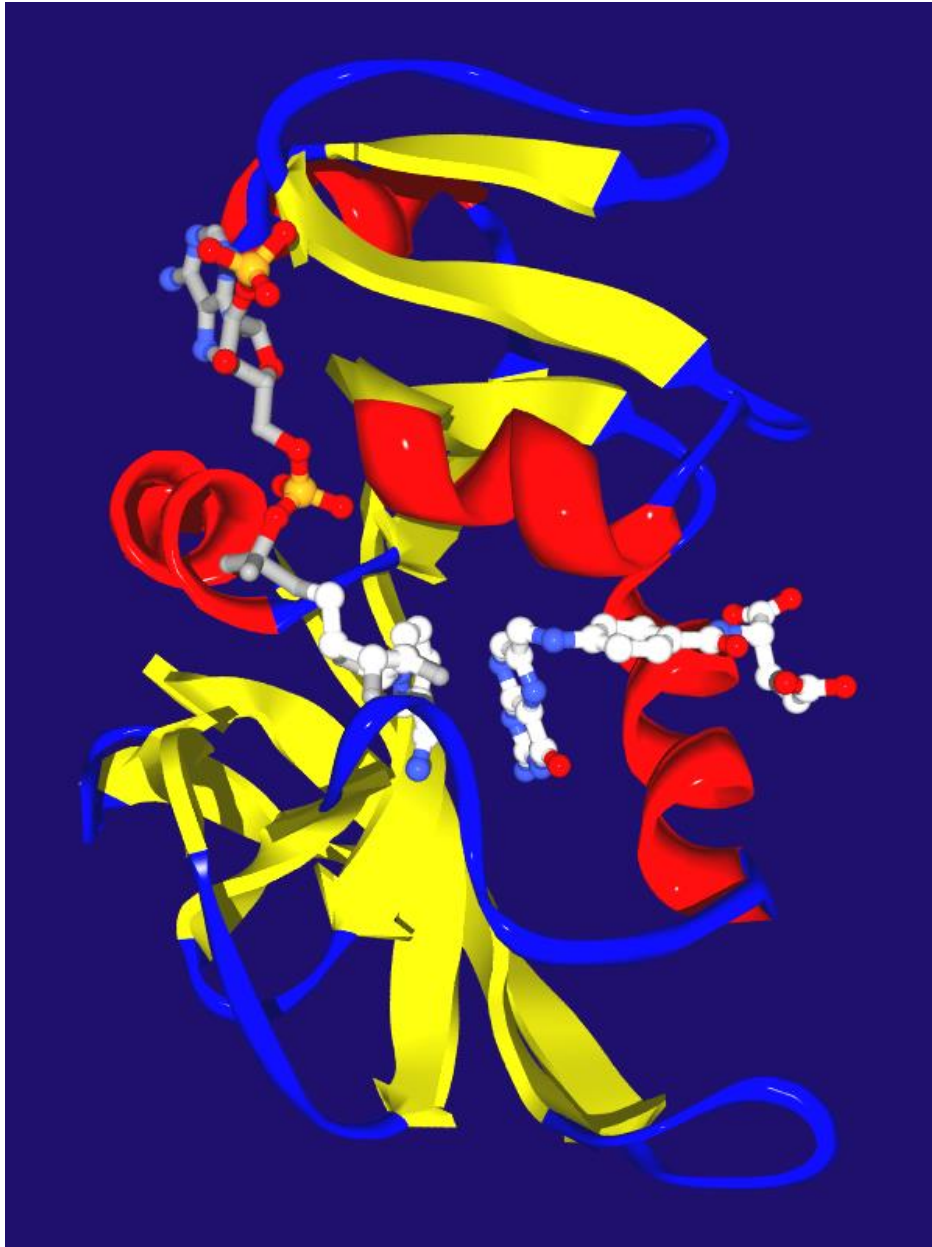
Catálisis Enzimática



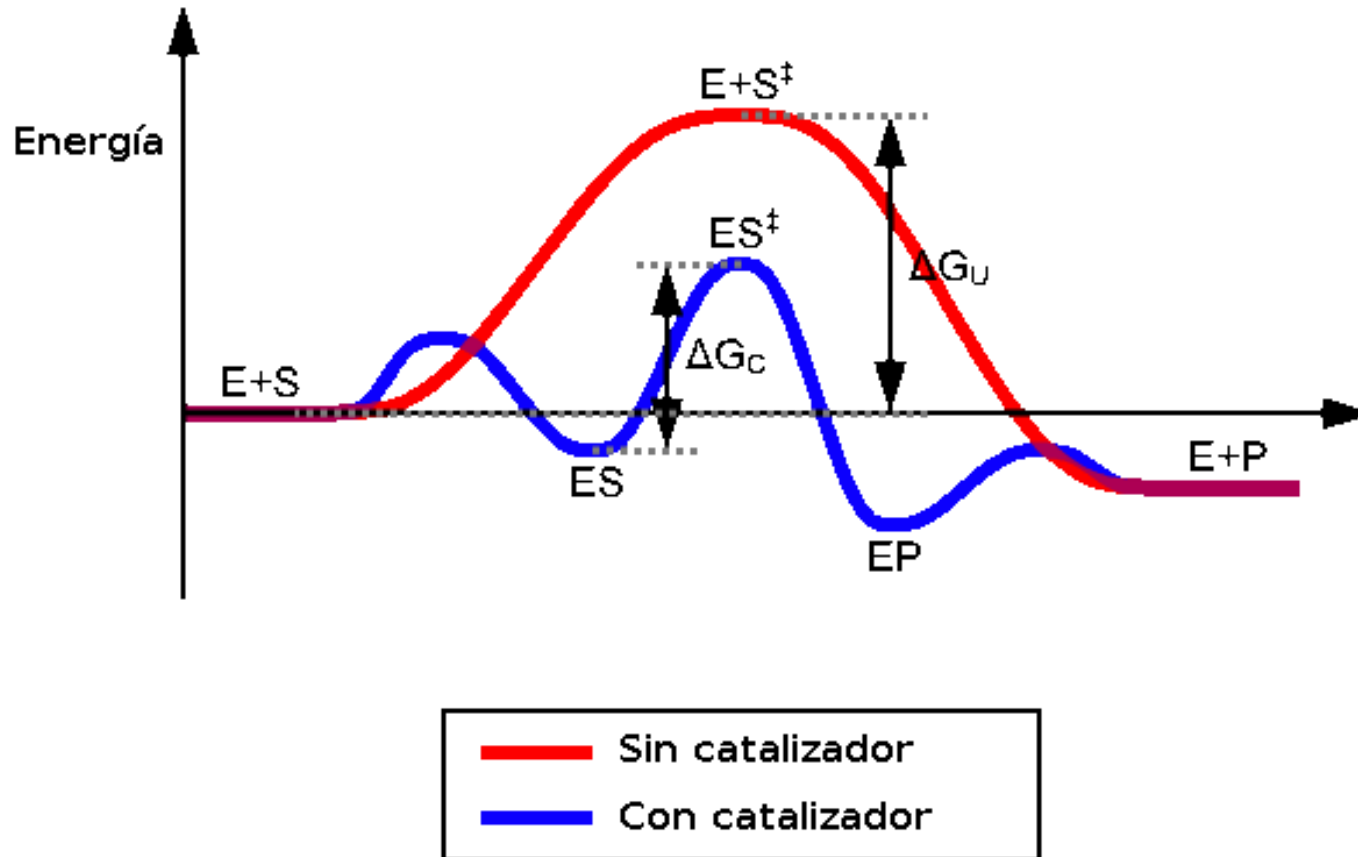
MODELO DE MICHAELIS- MENTEN

Enzima - Sustrato



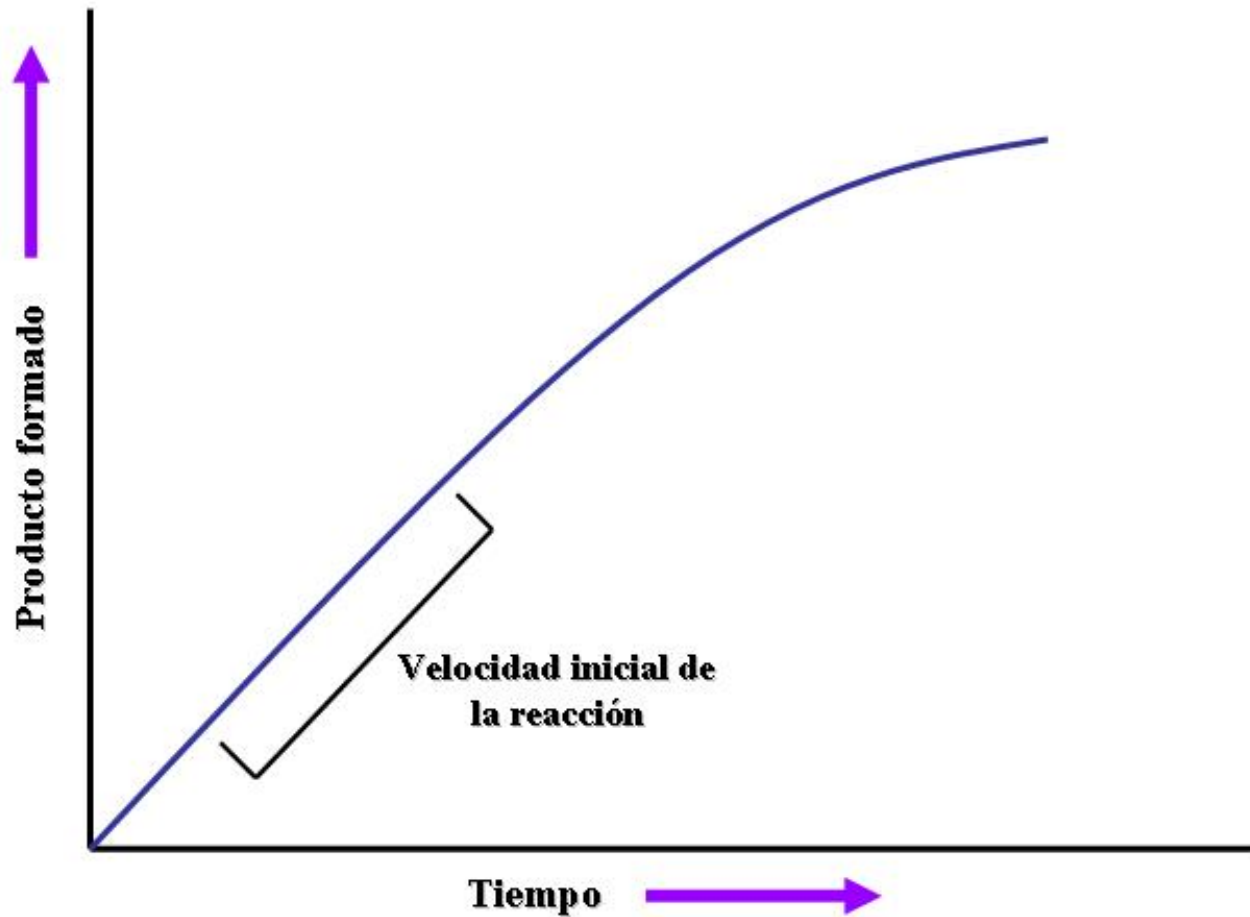


La **enzima dihidrofolato reductasa** de *E. coli* con sus **dos sustratos**, **dihidrofolato** (derecha) y **NADPH** (izquierda), unidos al sitio activo. La proteína se muestra empleando un diagrama de listones con las hélices α en rojo, las hojas β en amarillo. [7DFR](#)



Perfil de la Energía Libre de Gibbs para una reacción no catalizada (rojo) y otra catalizada por una enzima (azul)

Ensayos con Enzimas



Leonor Michaelis (1875-1949)



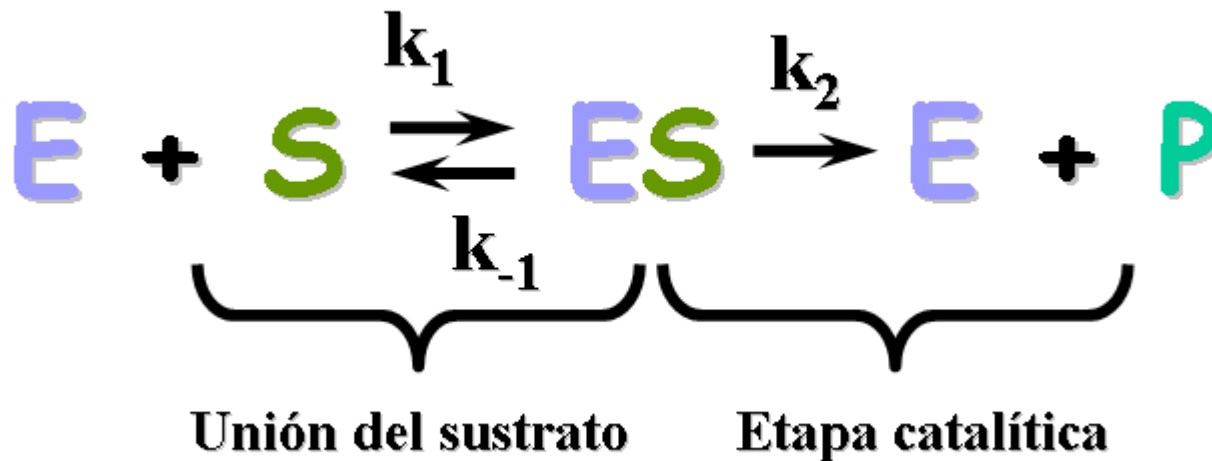
Leonor Michaelis
Berlín, Alemania 1875
Nueva York 1949

Maud Menten (1879-1960)



Maude Leonora Menten
Ontario, Canadá en 1879
Ontario, Canadá 1960
Profesor a los 79 años

Mecanismo de sustrato sencillo para una reacción enzimática (Michaelis - Menten)



Ecuación de Michaelis - Menten

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2}$$

Definimos:

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

De donde:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

La velocidad de formación del producto:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

La concentración total de la enzima es:

$$[E_o] = [E] + [ES]$$

De donde la concentración de enzima libre es:

$$[E] = [E_o] - [ES]$$

Sustituyendo:

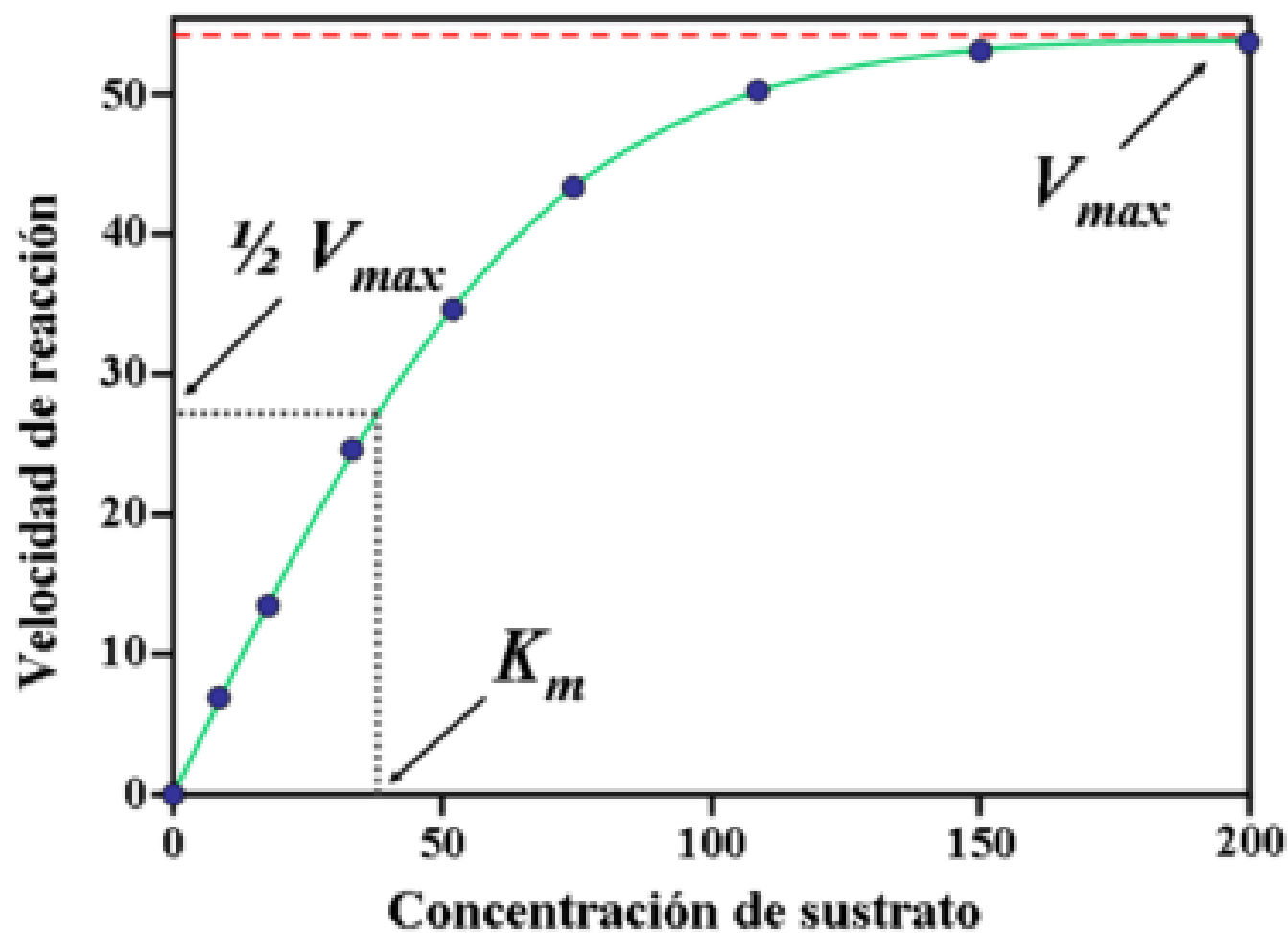
$$[ES] = \frac{([E_o] - [ES])[S]}{K_m}$$

$$K_m[ES] + [S][ES] = [E_o][S]$$

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E_o] \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

- $d[P]/dt$ o V_0 es la velocidad de producción de producto
- $k_2[E_0]$ o $V_{\max}$ es la velocidad máxima.
- k_2 es frecuentemente llamada k_{cat}
- Notar que si $[S]$ es grande comparada con K_m , $[S]/(K_m + [S])$ tiende a 1. La velocidad de formación de producto es igual a $k_2[E_0]$ en ese caso.
- Cuando $[S]$ es igual a K_m , $[S]/(K_m + [S])$ vale 0.5. En ese caso, la velocidad de formación de producto es la mitad de la máxima ($1/2 V_{\max}$).
- De la gráfica de V_0 contra $[S]$ se puede determinar $V_{\max}$ y K_m . Esto requiere una serie de experimentos a E_0 constante y diferentes concentraciones de sustrato $[S]$.



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

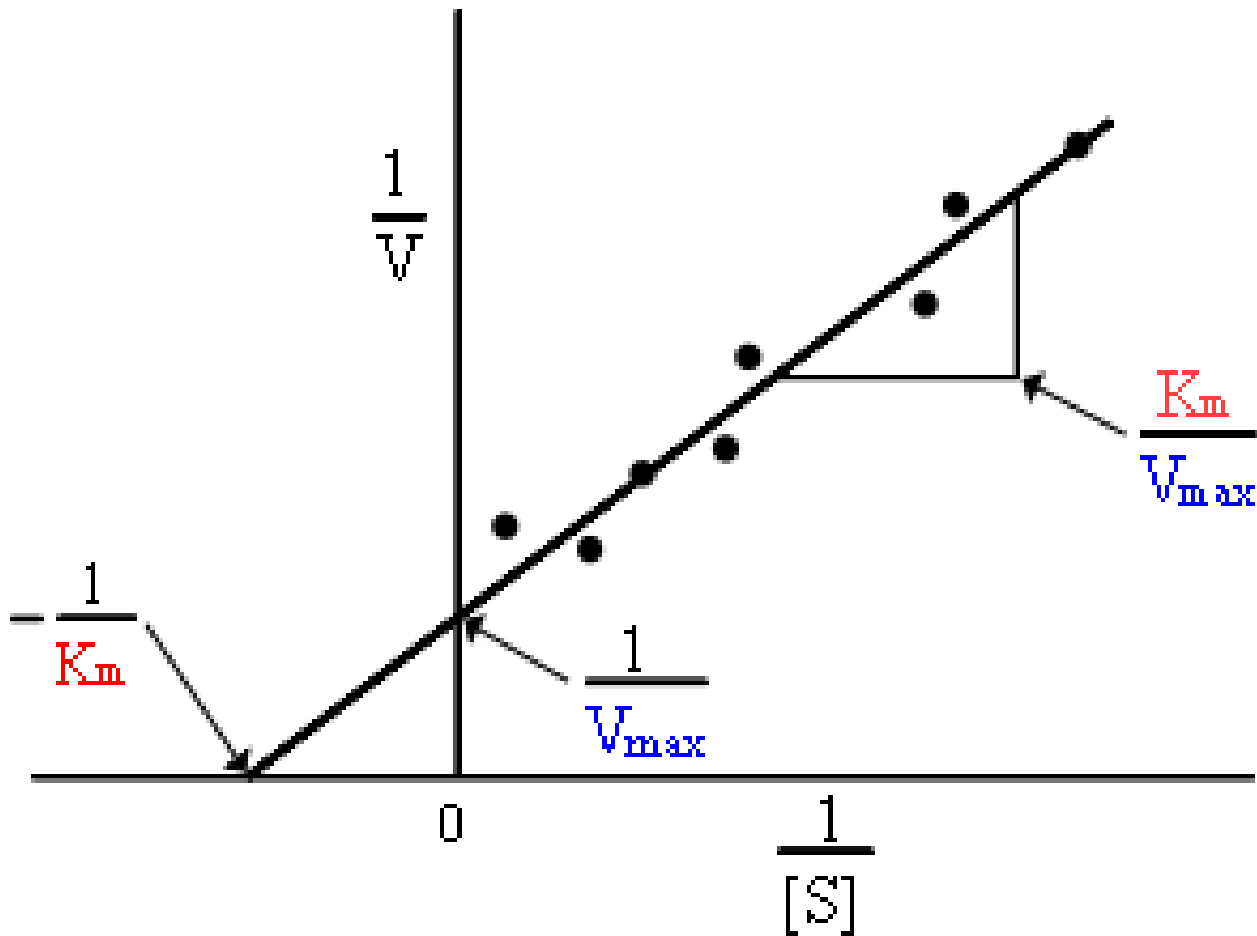
Ecuación de Michaelis - Menten

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

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

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

Diagrama de Lineweaver-Burke



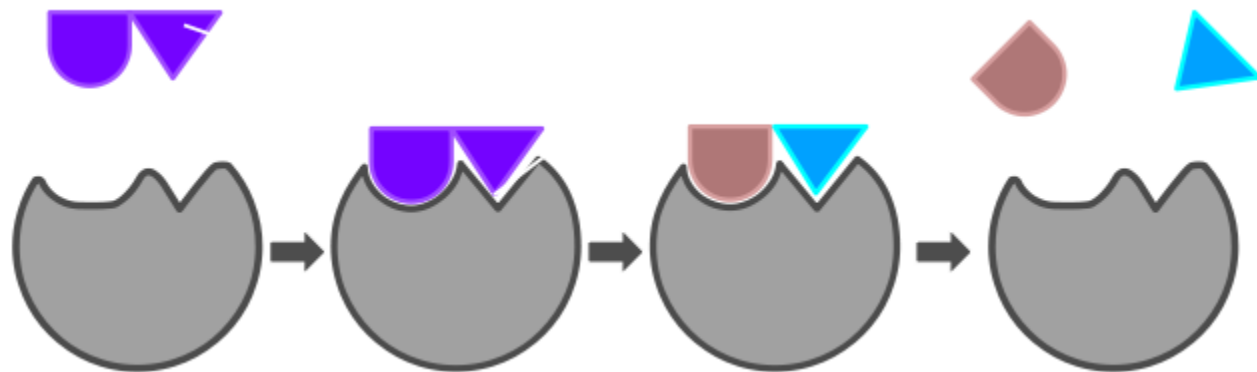


TABLE 6–6 K_m for Some Enzymes and Substrates

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

TABLE 6–7 Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

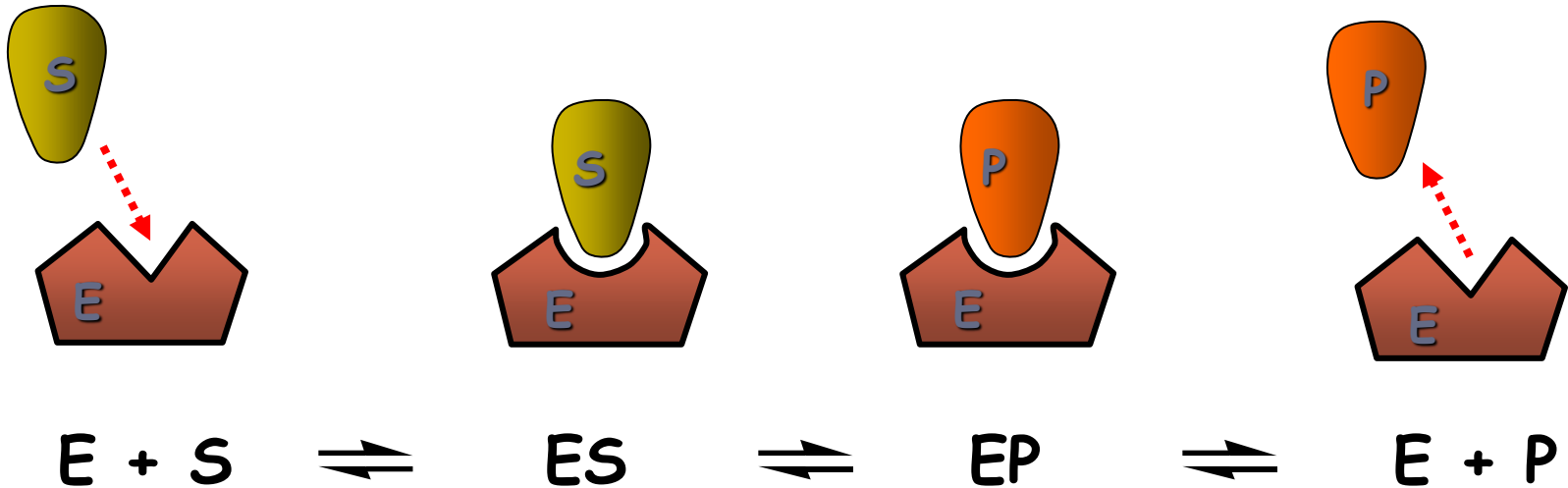
$$k_{\text{cat}} / k_M$$

TABLE 6–8 Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

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

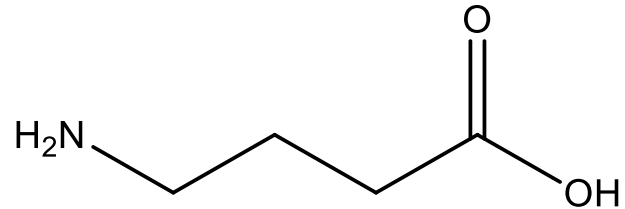
Inhibición Enzimática



- ¿Qué sucede si el sustrato no se desprende del sitio activo?
 - La enzima se bloquea (inhibe) para posteriores acciones con el sustrato
- ¿Por qué inhibir?
 - Para controlar [S] o [P]
 - Aumentar [S] sin reaccionar
 - Disminuir [P] formado

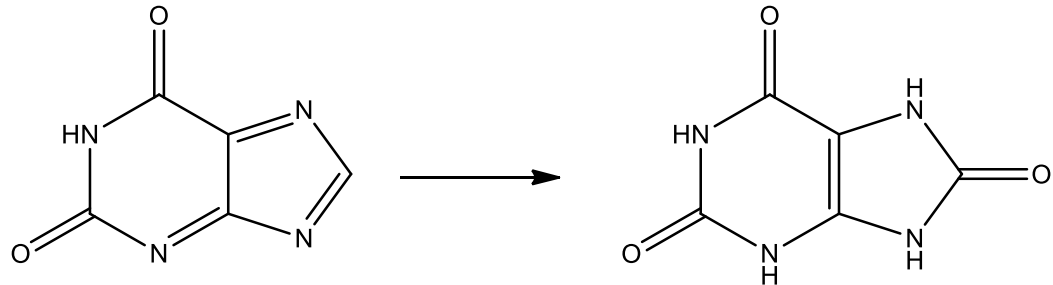
Ejemplos

- Aumento [S]



- Disminución de los niveles de GABA causa convulsiones
- GABA aminotransferasa degrada GABA
- Inhibición de la enzima aumenta los niveles de GABA

- Disminuye [P]

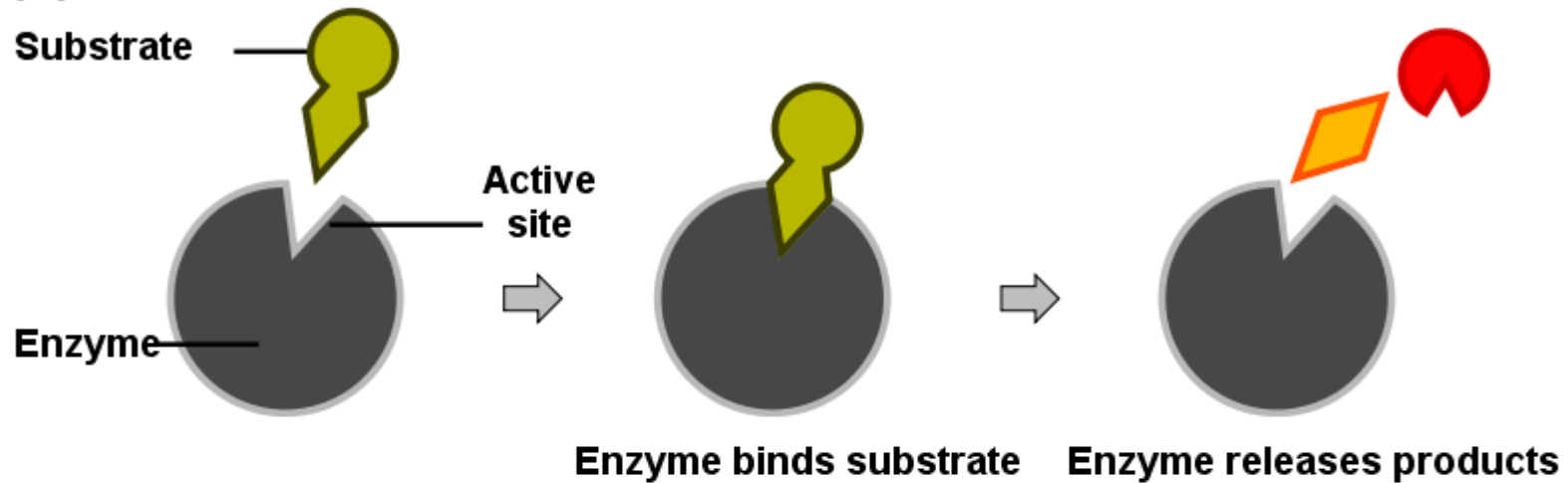


- La Xantina se convierte a ácido úrico mediante la xantina oxidasa
- El exceso de ácido úrico produce gota
- La inhibición de la enzima disminuye la producción de ácido úrico

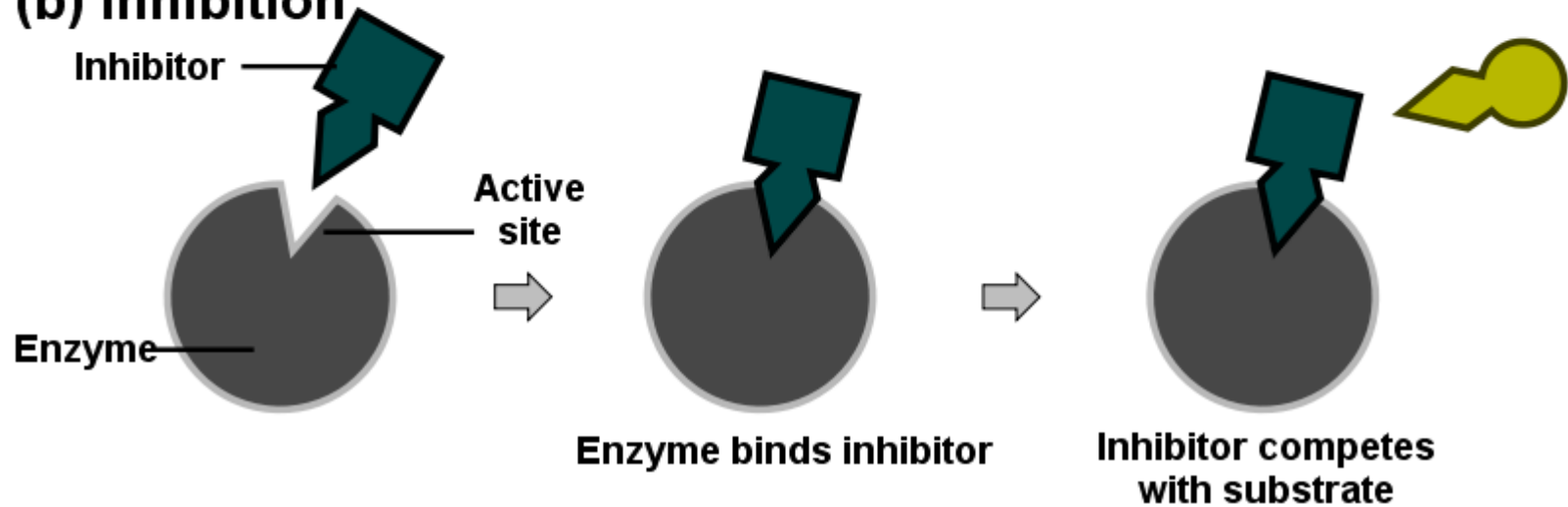
Tipos de Inhibición

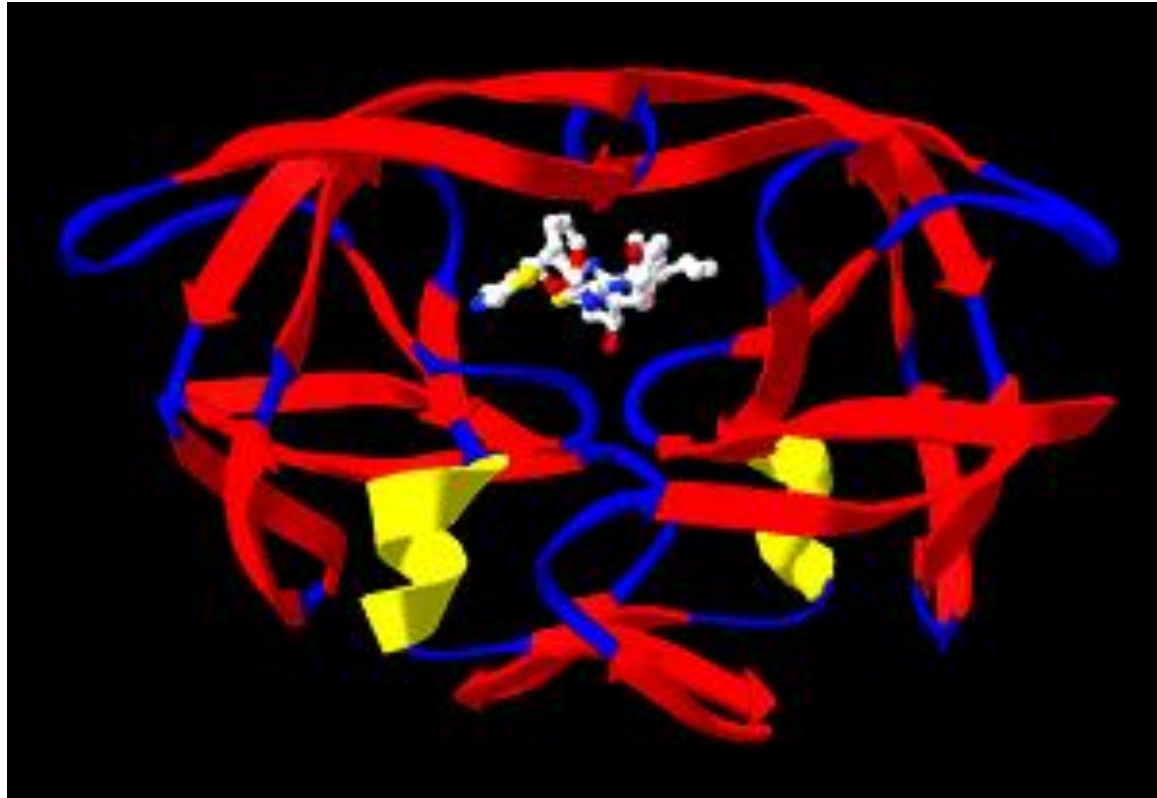
- Reversible
 - Competitivo
 - Acompetitivo
 - Mixto
 - No competitivo
- Irreversible

(a) Reaction



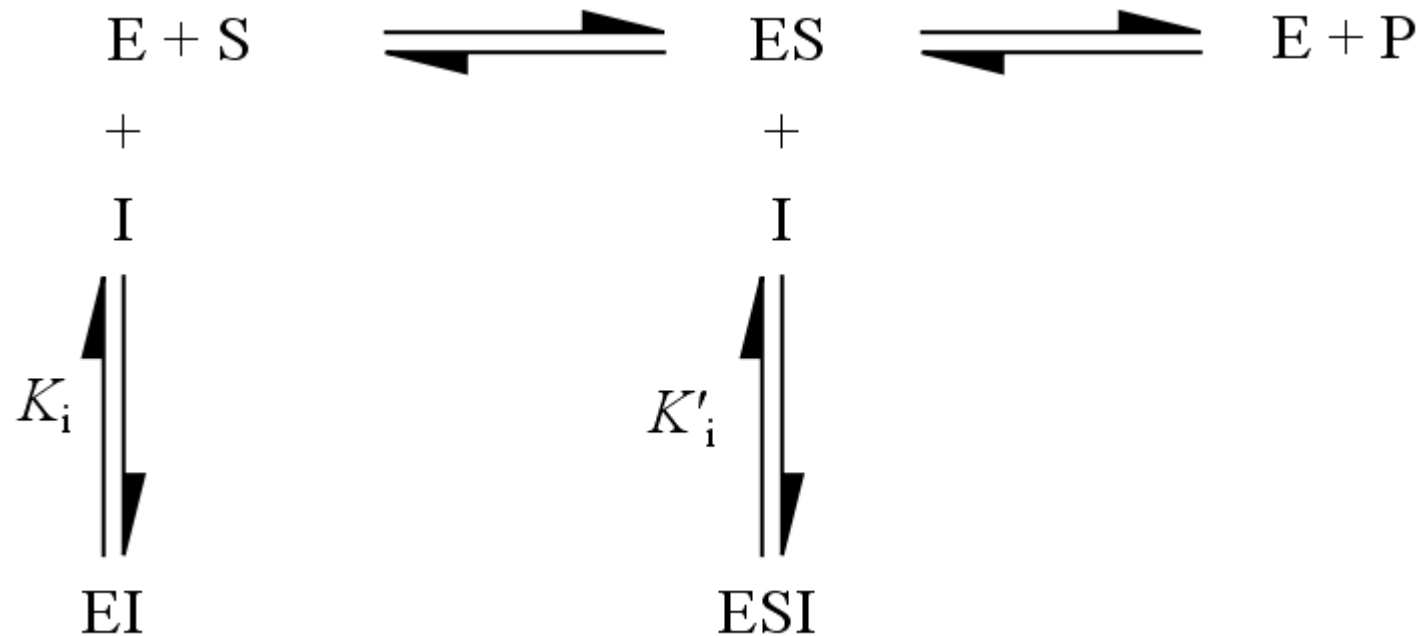
(b) Inhibition





Modelo estructural de la proteasa del virus del VIH unida a un inhibidor de la proteasa, el ritonavir. La estructura de la proteasa se muestra mediante cintas de color rojo, azul y amarillo, mientras que el inhibidor es representado por una estructura de esferas y varillas cerca del centro de la proteasa. Modelos creado a partir del PDB 1HXW

Inhibidores enzimáticos



Inhibidores competitivos

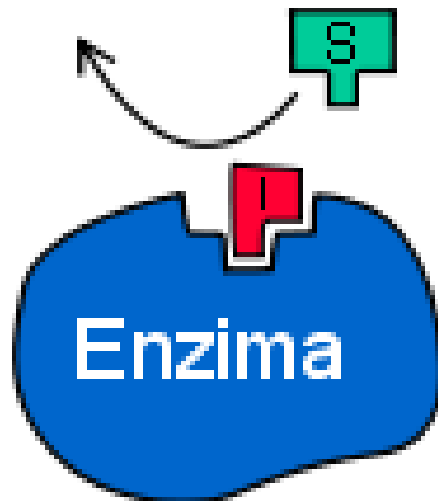
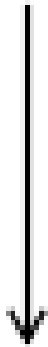
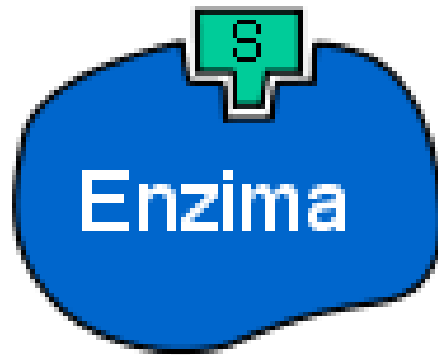
- Se pueden unir a E, pero no a ES
- Aumenta el valor de K_m (es decir, el inhibidor interfiere con la unión del sustrato)
- No afecta a la V_{max} (el inhibidor no obstaculiza la catálisis ya que no se puede unir a ES).

Inhibidores no competitivos

- Tienen afinidades idénticas por E y ES ($K_i = K_i'$)
- No cambia K_m (es decir, no afecta a la unión del sustrato)
- Disminuye V_{max} (es decir, la unión del inhibidor obstaculiza la catálisis)

Inhibidores de tipo mixto

- Se unen tanto a E como a ES,
- Sus afinidades por estas dos formas de enzimas son distintas ($K_i \neq K_i'$)
- Interfieren con la unión del sustrato (incremento de K_m) y dificulta la catálisis en el complejo ES (disminución de la V_{max})



Inhibición competitiva: el sustrato (S) y el inhibidor (I) compiten por el sitio activo.

Inhibición Reversible (IR)

- La IR puede afectar a $V_{\max}$ o K_m o a ambas a la vez
- Si sólo afecta K_m → IR Competitiva
- Si sólo afecta $V_{\max}$ → IR No-Competitiva
- Si afecta tanto a K_m como a $V_{\max}$:
 - IR Acompetitiva
 - IR Mixta

$$V = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} = \frac{(1/\alpha')V_{max}[S]}{(\alpha/\alpha')K_m + [S]}$$

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

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

Inhibición Competitiva

- La más común
- El inhibidor compite con el sustrato natural por el enlace al sitio activo
- El inhibidor tiene una estructura semejante a la del sustrato natural
 - Se enlaza más fuertemente
 - Puede o no reaccionar
 - Si reacciona lo hace lentamente
 - Proporciona información del sitio activo al comparar las estructuras

Inhibición Competitiva

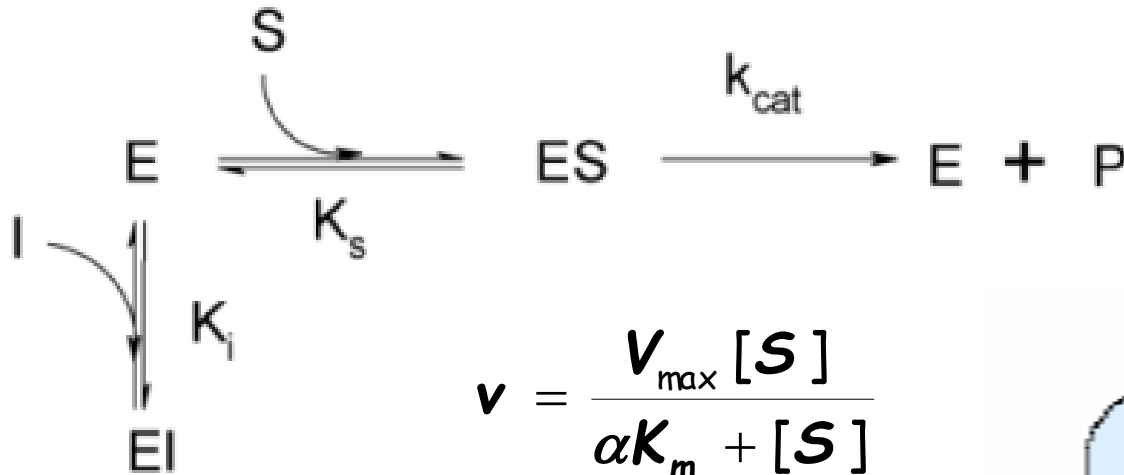
- I y S compiten por E
- Un aumento en [I]
 - Aumenta [EI]
 - Reduce [E] disponible para unirse a S
- Se requiere mantener [I] alta para asegurar la inhibición

Ecuación de Michealis-Menten para la Inhibición Competitiva

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

- Donde $\alpha = 1 + [I]/K_I$
 - Función de la concentración y afinidad del inhibidor por la enzima
 - $\alpha = 1$ cuando $[I] = 0$
- Conforme $[S]$ aumenta, V_0 se aproximará a $V_{\max}$ para cualquier valor de α
 - S supera los efectos del inhibidor; satura
- Conforme $[I]$ aumenta, K_M aumenta por α
 - Se requiere más S para alcanzar $\frac{1}{2} V_{\max}$
 - La velocidad no aumenta rápidamente con $[S]$ dada la inhibición

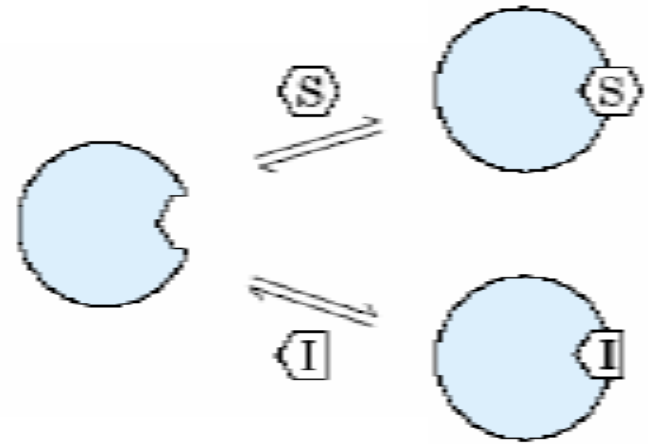
Inhibición Reversible Competitiva



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

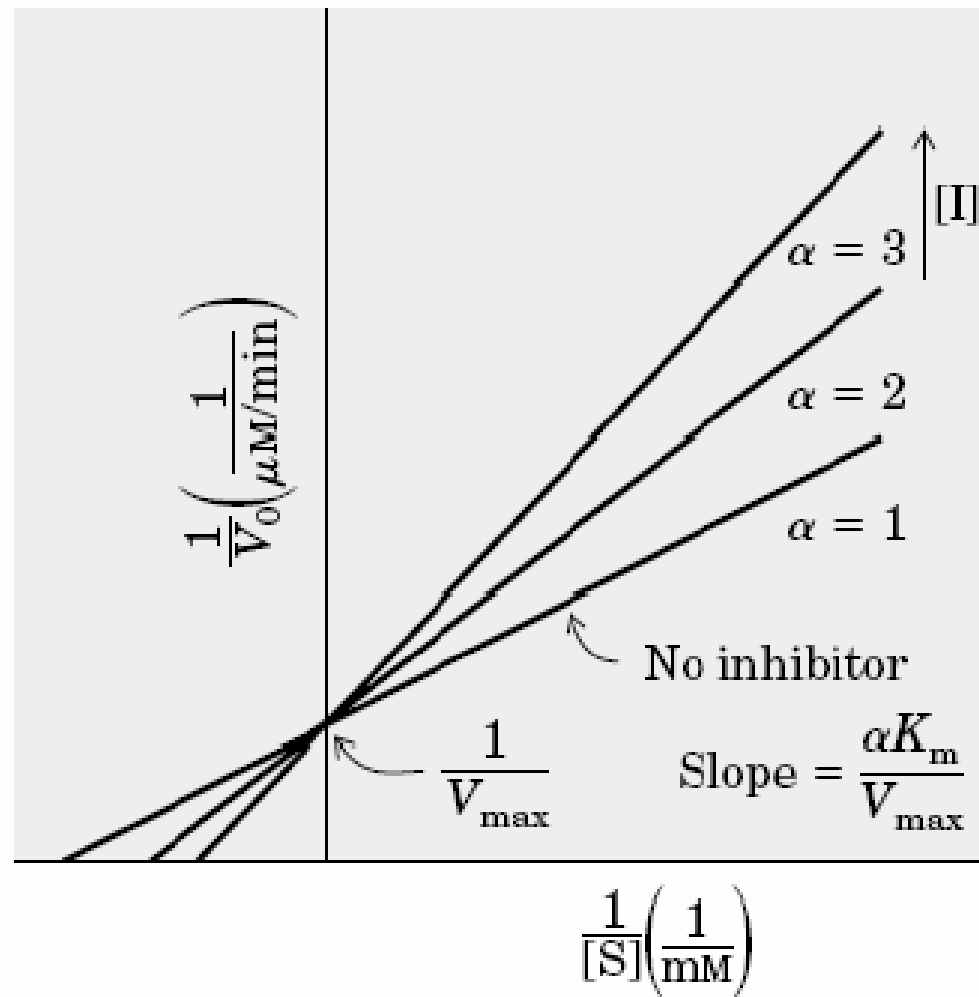
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

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



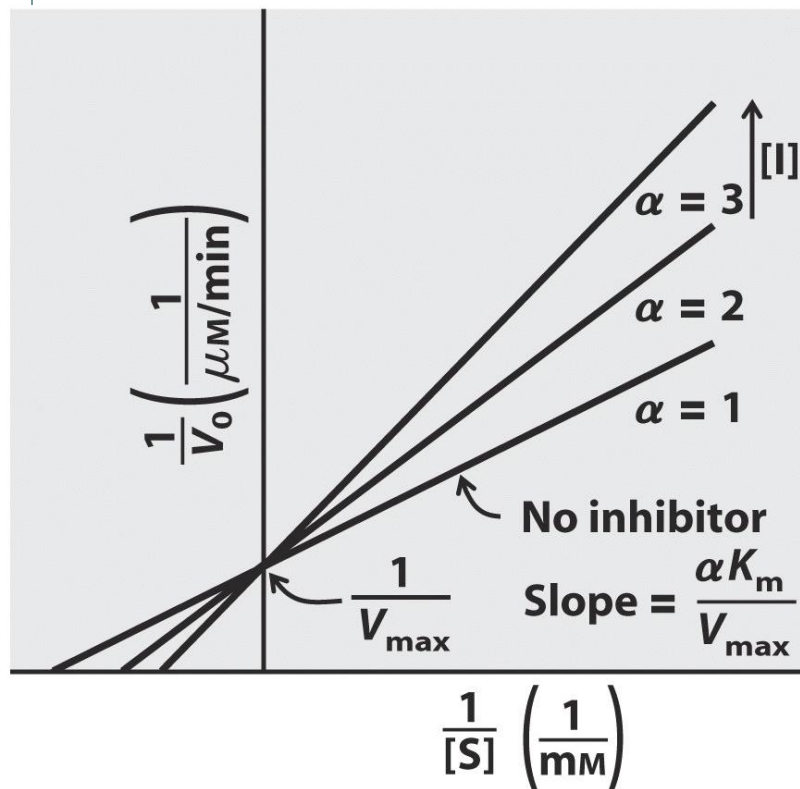
Inhibición Reversible Competitiva

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Ecuación de Lineweaver-Burke para Inhibición Competitiva

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

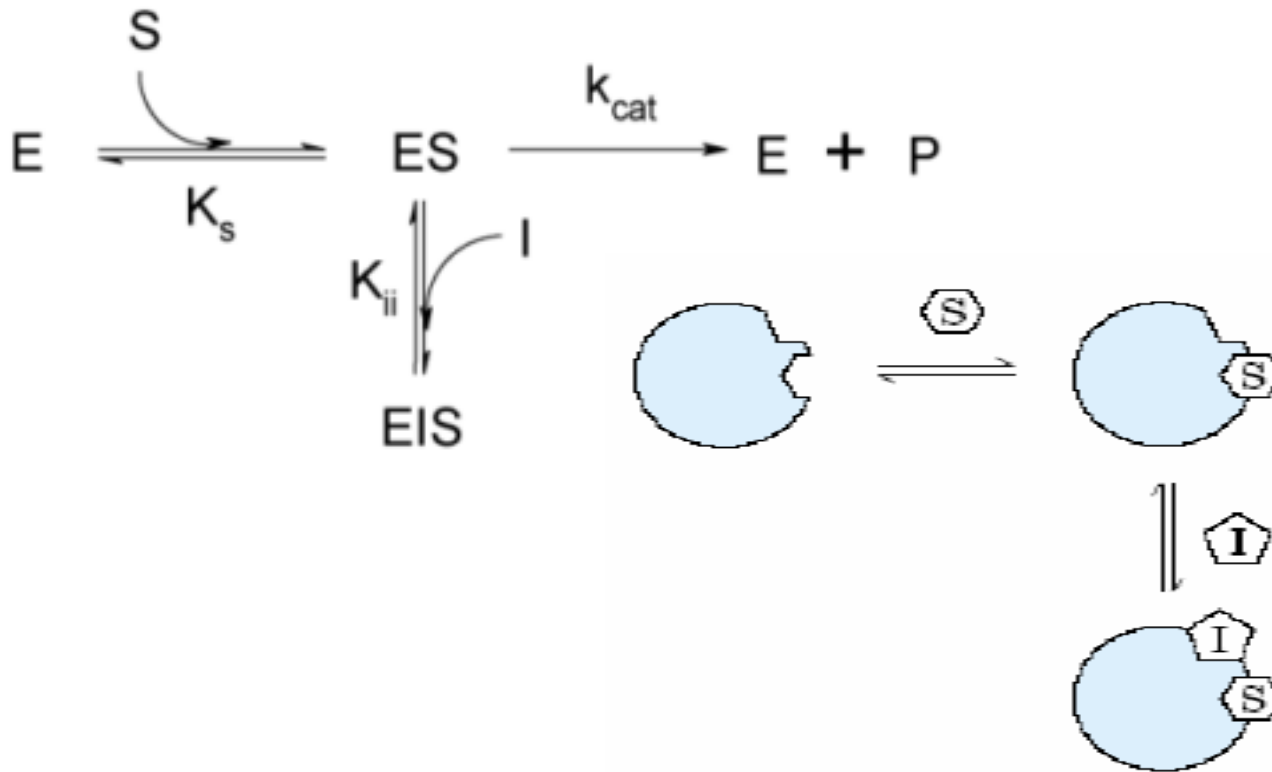


- Mayor pendiente (multiplicada by α)
- Ordenada al origen **no cambia** ($V_{\max}$ el mismo valor)
- K_M es mayor (multiplicada by α)

Inhibición Acompetitiva

- El Inhibidor se une al complejo enzima-sustrato, no a la enzima libre
- El Inhibidor no requiere ser semejante al sustrato
- Sitio activo = multisustrato, o I en el segundo sitio
- Se distorsiona el sitio activo; evita que ocurra la reacción
- Aumento de $[S]$ no cambia el enlace el inhibidor a ES (acompetitiva)
 - $V_{\max}$ es afectada por $[I]$

Inhibición Reversible Acompetitiva



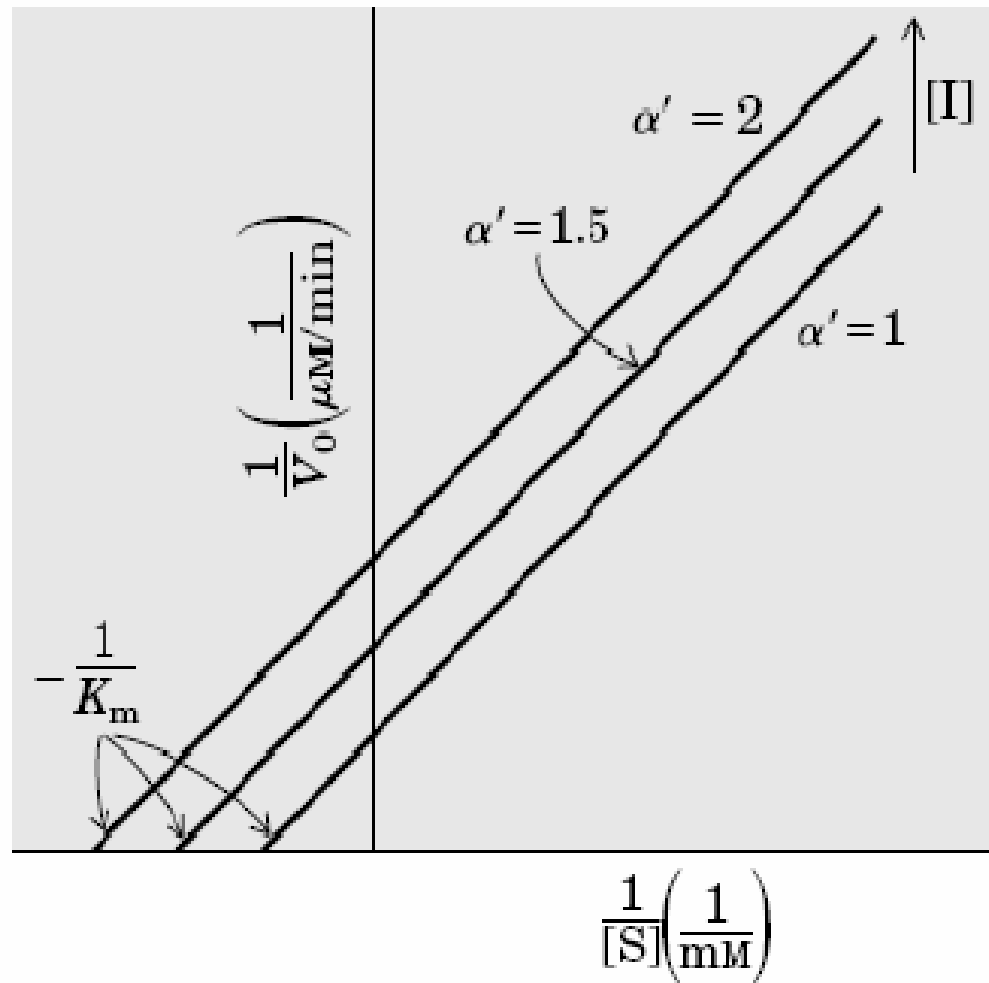
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

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

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

Inhibición Reversible Acompetitiva

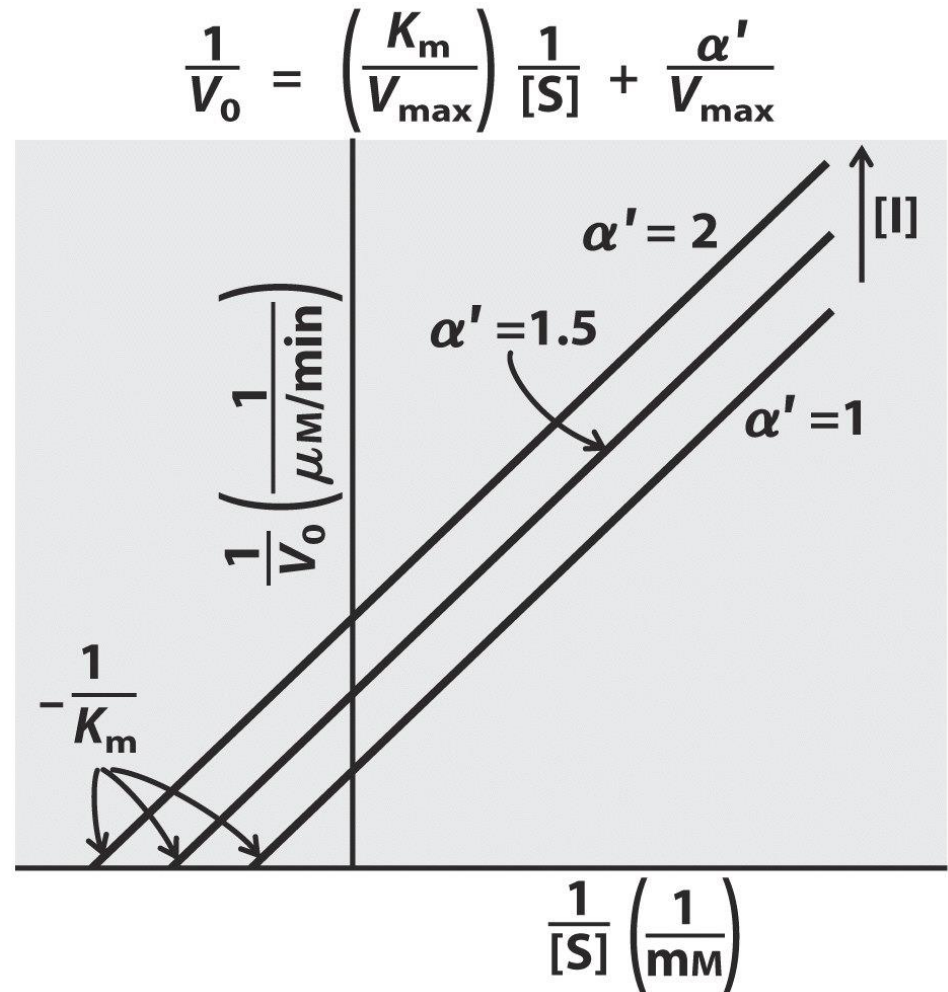
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



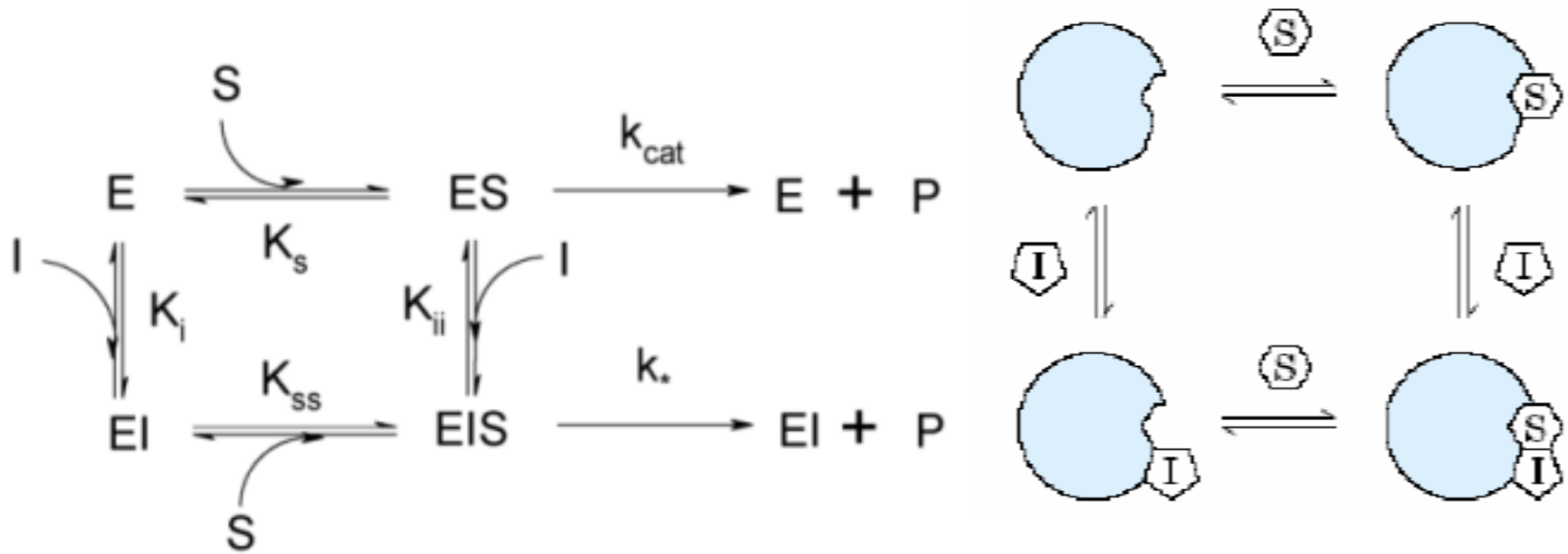
Inhibición Acompetitiva

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]}$$

- Aumento de [I]
 - Disminuye $V_{\max}$ (aumenta ordenada al origen)
 - Disminuye K_M (disminuye valor $y=0$)
 - El cociente $K_M/V_{\max}$ es el mismo (pendiente)



Inhibición Reversible Mixta



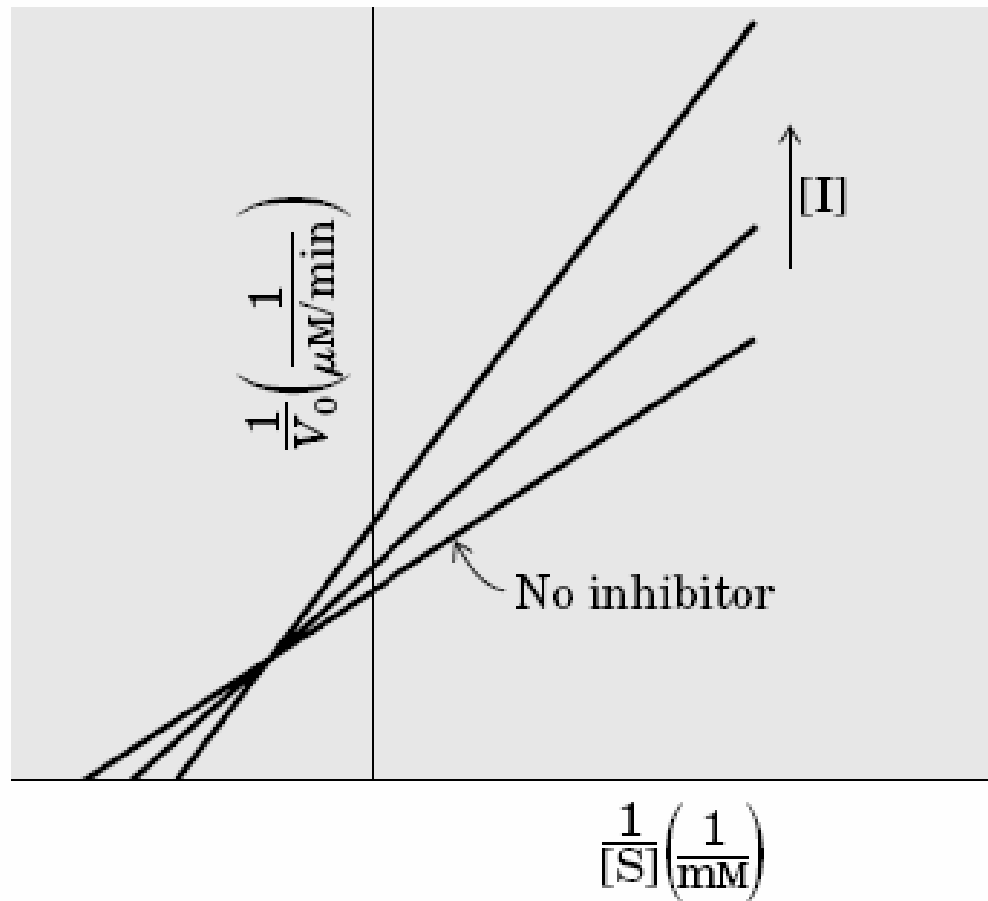
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

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

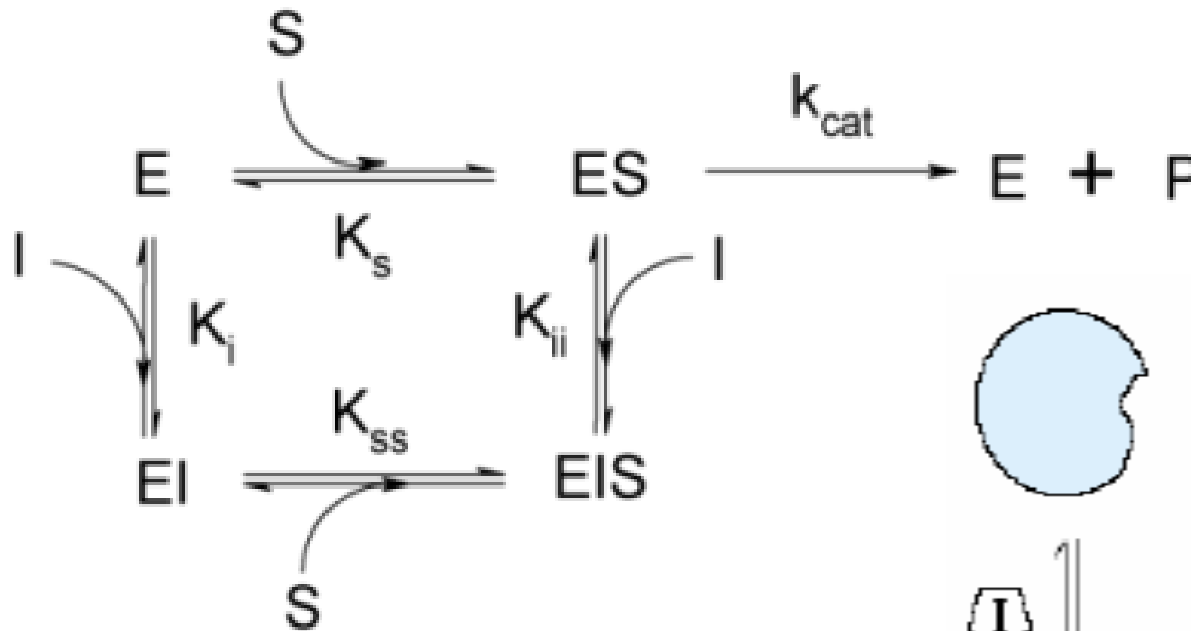
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

Inhibición Reversible Mixta

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

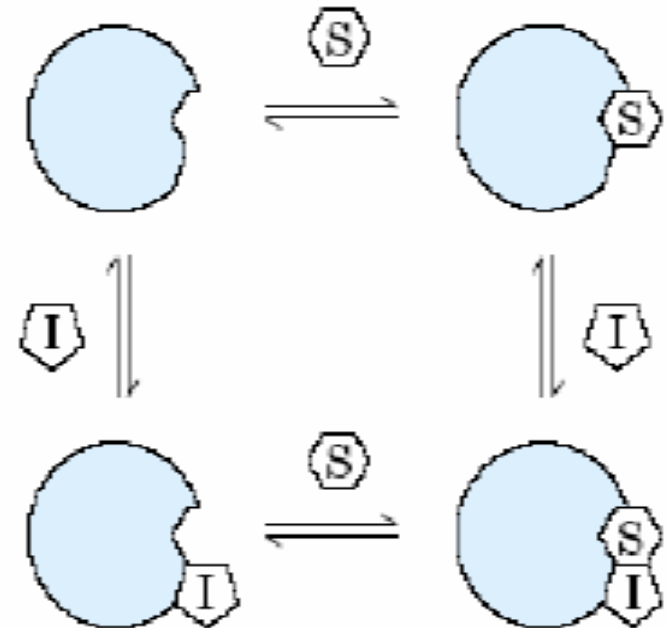


Inhibición Reversible no Competitiva



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

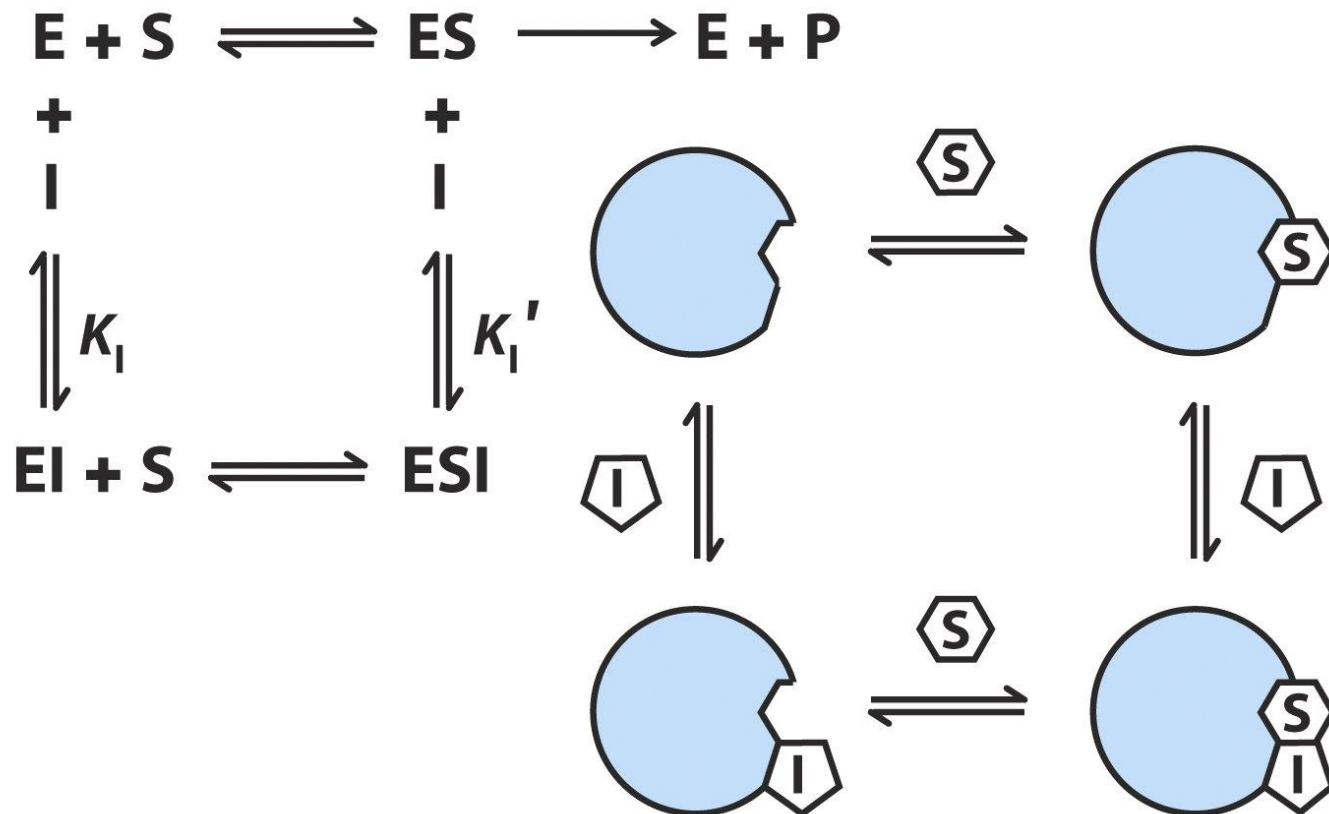
Si $\alpha = \alpha'$



Inhibición Mixta

- El inhibidor se une a E ó a S

(c) Mixed inhibition



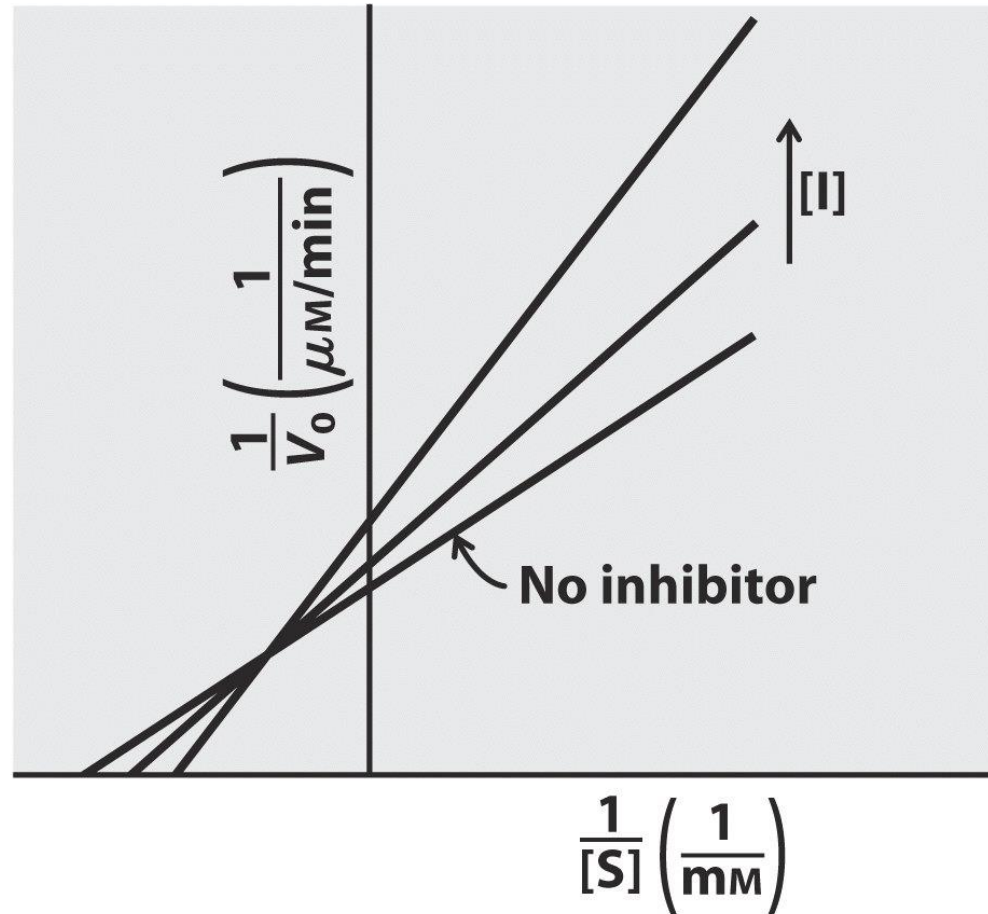
Inhibición Mixta

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

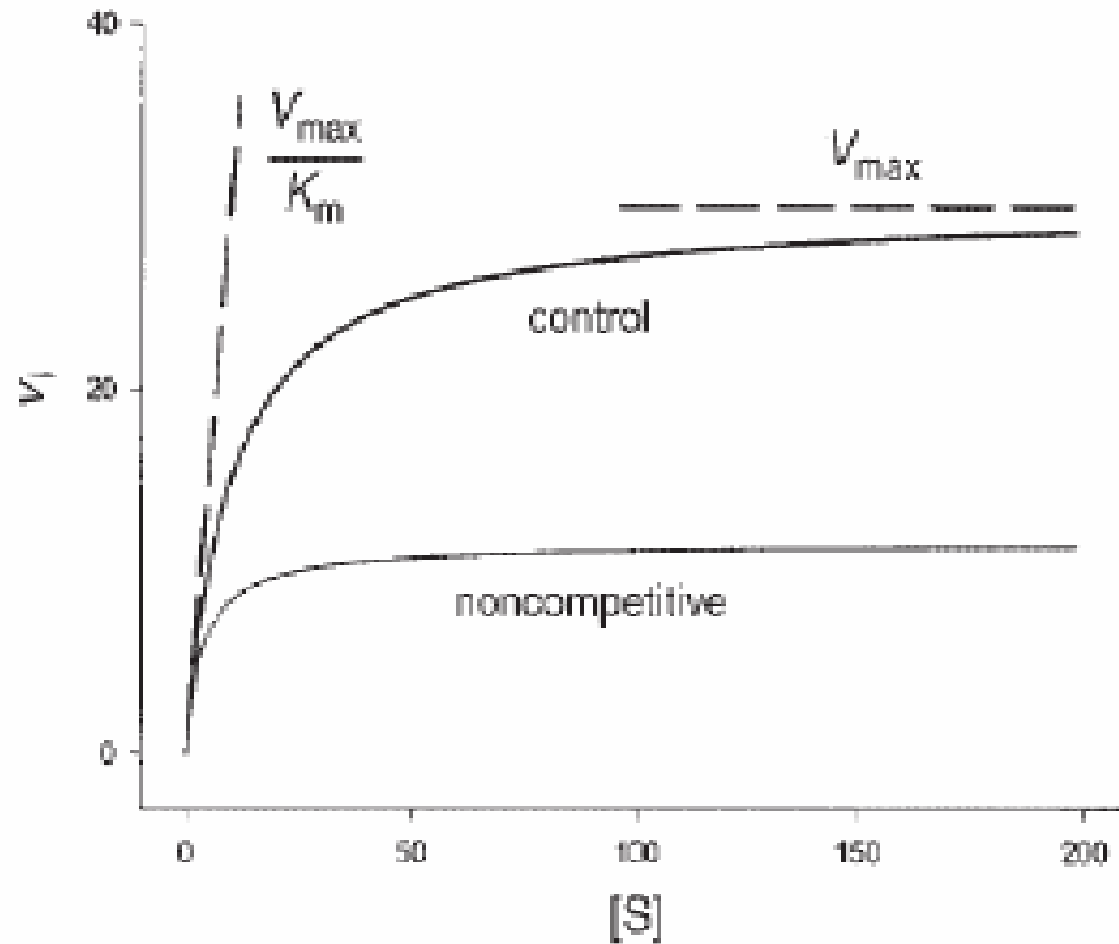
- **Aumento de [I]**

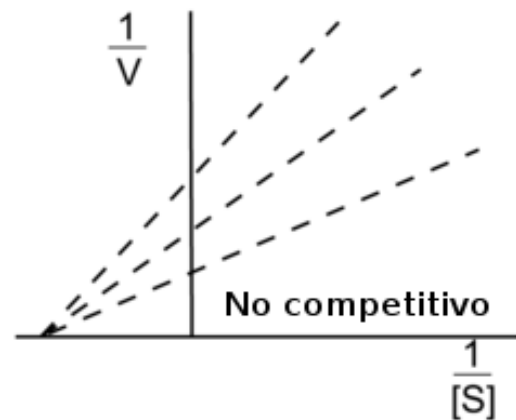
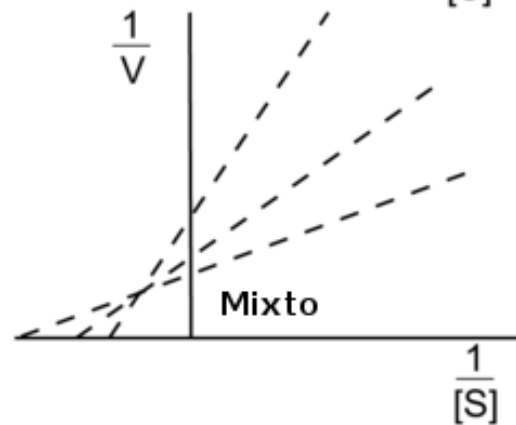
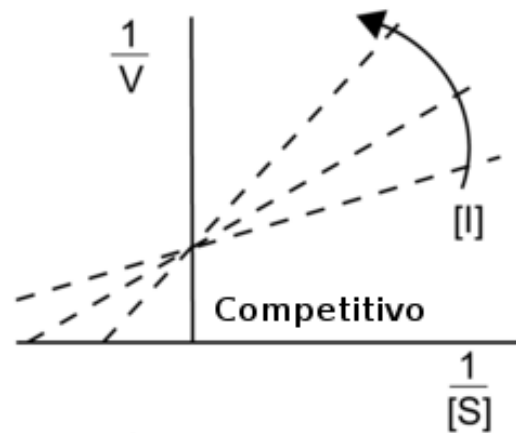
- Baja $V_{\max}$ (aumenta ordenada al origen)
- Aumenta K_M (aumenta el valor de $y=0$)
- Cociente $K_M/V_{\max}$ no es el mismo (cambia pendiente)

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



Inhibición Reversible no Competitiva





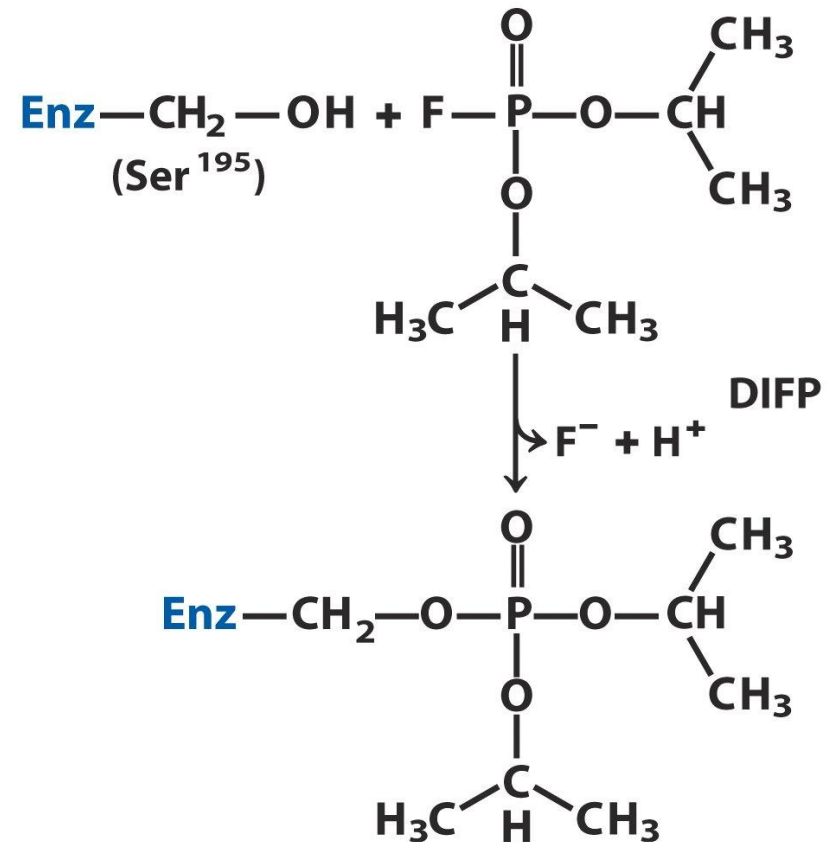
Diagramas de Lineweaver-Burke de los diferentes tipos de inhibidores enzimáticos reversibles.

La flecha muestra el efecto producido por el incremento de las concentraciones de inhibidor.

Inhibición Irreversible

- Inhibidor

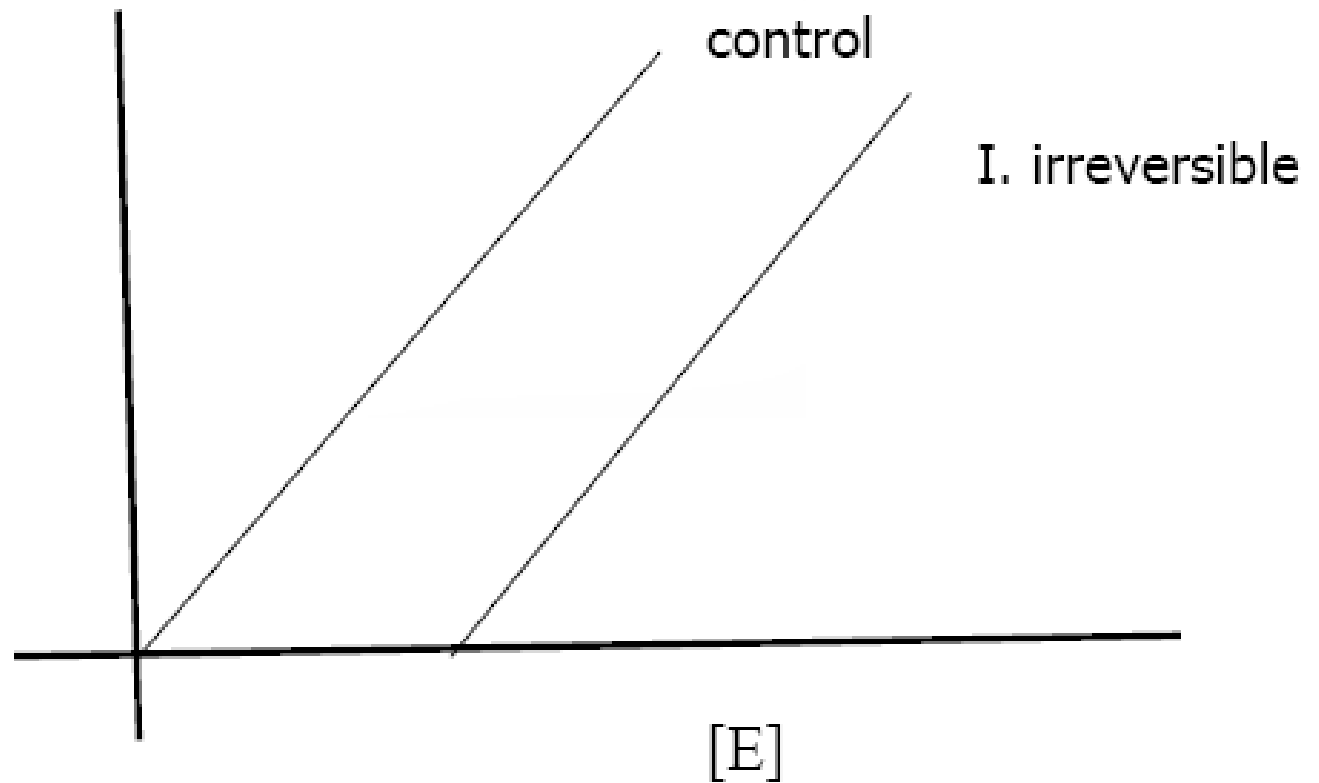
- Se une covalentemente, o
- Destruye el grupo funcional para la actividad enzimática, o
- Enlace no covalente muy estable



Inhibición Irreversible



V_{max}



Catálisis enzimática

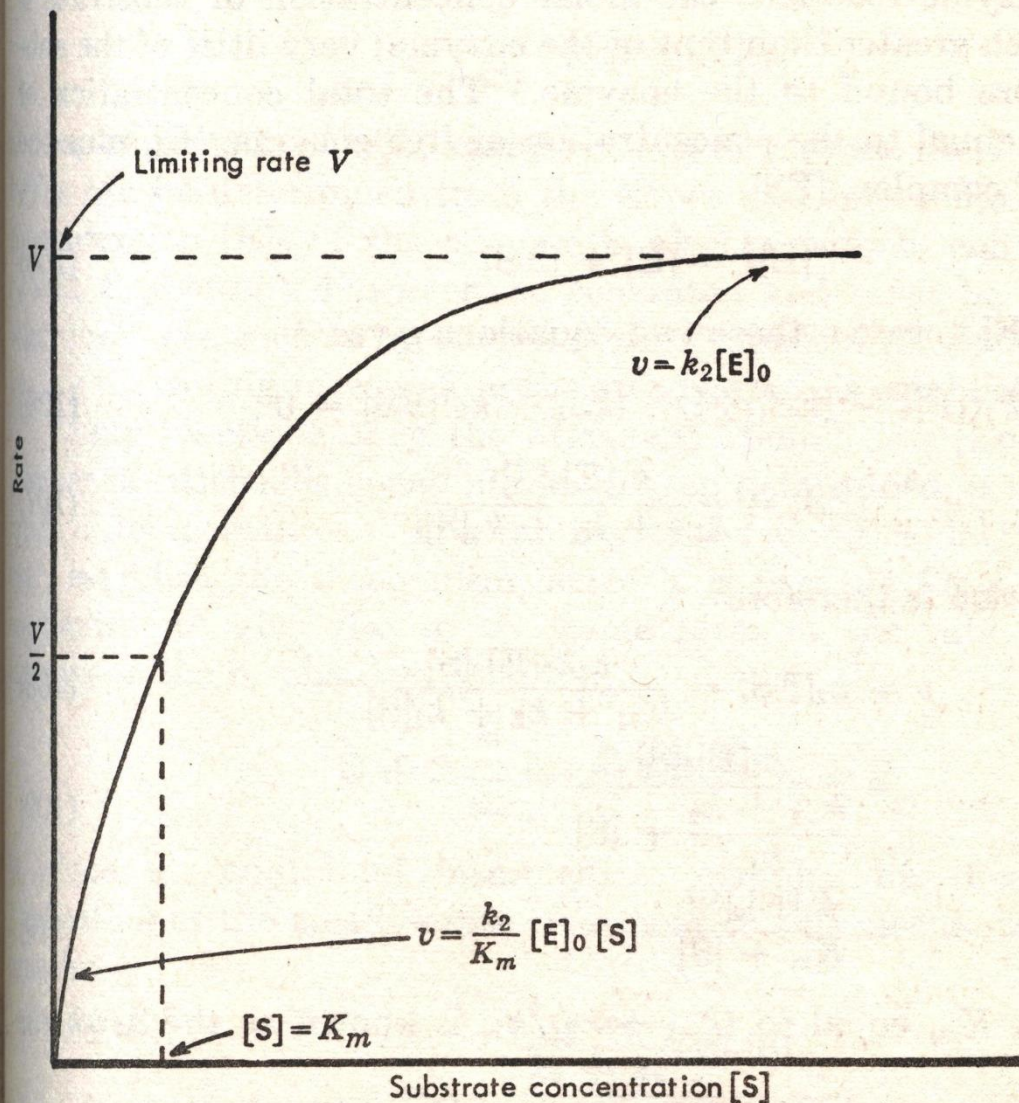


Fig. 84. The variation of rate with substrate concentration for an enzyme-catalyzed reaction obeying the Michaelis-Menten equation.

