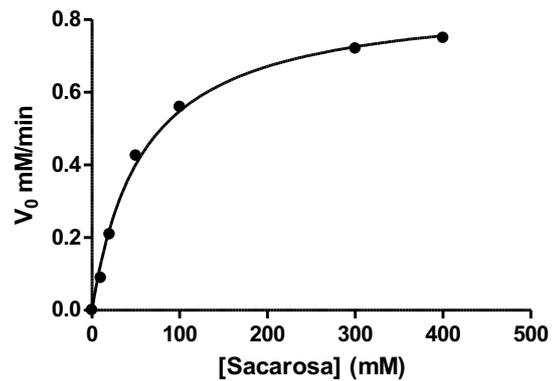


UTI: BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

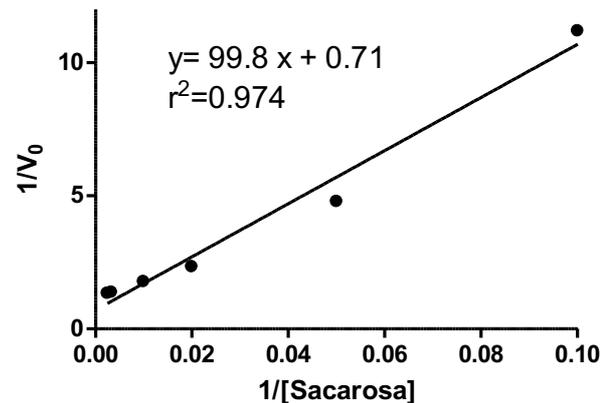
CUESTIONARIO GUÍA Nº4: ENZIMAS

1. Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir del estudio de la actividad de la enzima invertasa de levaduras, la cual cataliza la hidrólisis de la sacarosa:

| [sacarosa] (mM) | V_o (mM/min) |
|-----------------|----------------|
| 0 | 0 |
| 10 | 0.089 |
| 20 | 0.209 |
| 50 | 0.426 |
| 100 | 0.560 |
| 300 | 0.720 |
| 400 | 0.750 |



| $1/[sacarosa]$ (mM) | $1/V_o$ (mM/min) |
|----------------------|------------------|
| 0.1 | 11.2 |
| 0.05 | 4.78 |
| 0.02 | 2.34 |
| 0.01 | 1.78 |
| 3.5×10^{-3} | 1.38 |
| 2.5×10^{-3} | 1.33 |



- a) Determine los valores de los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} para esta enzima.

Respuesta: De la gráfica de dobles recíprocos ($1/V_o$ vs $1/[sacarosa]$) se pueden obtener los parámetros cinéticos de la reacción. La ecuación $y = 99,8x + 0,71$ corresponde a una ecuación de la recta $y = ax + b$, donde **a** es la pendiente del gráfico y **b** es el punto de corte en el eje "y".

Esta gráfica se obtiene por la linealización de la hipérbola rectangular (descrita por la ecuación de Michaelis y Menten) en donde luego de algunas cuentas se obtiene la siguiente expresión:

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

La ecuación de la recta obtenida con estos datos experimentales es:

$$y = 99,8x + 0,71$$

Donde:

$$y = 1/V_o$$

$$a = K_M / V_{\max}$$

$$b = 1/V_{\max}$$

De esta manera:

$$1/V_{\max} = 0,71$$

$$1/0,71 = V_{\max}$$

$$V_{\max} = 1,41 \text{ mM/min}$$

$$K_M / V_{\max} = 99,8$$

$$K_M / 1,41 \text{ (mM/min)} = 99,8$$

$$K_M = 99,8 \times 1,41 = 140,72 \text{ mM}$$

$$K_M = 140,72 \text{ mM}$$

b) Calcule la constante catalítica o número de recambio K_{cat} , teniendo en cuenta que la concentración de enzima utilizada fue 10 nM. ¿qué significado tiene ese valor?

Respuesta:

La constante catalítica o número de recambio se calcula como:

$$V_{\max} = K_{\text{cat}} [\text{Enzima total}]$$

Conociendo la V_{\max} calculada en el ejercicio anterior (1,42 mM/min) y la concentración total de enzima de 10 nM (10×10^{-6} mM) se despeja K_{cat} de la ecuación:

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [\text{ET}]$$

$$K_{\text{cat}} = (1,41 \text{ mM/min}) / 10 \times 10^{-6} \text{ mM} = 141.000 \text{ min}^{-1}$$

$K_{\text{cat}} = 141000/\text{min}$. Lo que significa que la enzima transforma 141.000 moléculas de sustrato en producto en un minuto (cuando se encuentra en condiciones de V_{\max} , o sea, saturada por el sustrato)

2. Explique qué mecanismos existen para regular la actividad de una enzima.

RESPUESTA

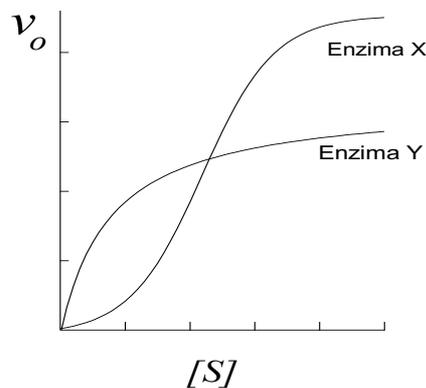
La actividad de una enzima puede ser regulada de diferentes maneras:

1- Regulando la síntesis de la misma ya sea a nivel de la traducción (ARN → proteína) como a nivel de la transcripción (ADN → ARNm). De esta manera podemos regular la cantidad de enzima presente en un determinado momento.

2- Se puede regular la velocidad de degradación de la misma, disminuyendo o aumentando su concentración según lo necesario.

3- Mediante la presencia de inhibidores los cuales pueden actuar de diferente manera. Los inhibidores pueden ser el producto final de la reacción u otros compuestos presentes del metabolismo. Los mismos pueden ser competitivos (estructura similar al sustrato), no-competitivos (estructura no relacionada con el sustrato) o a-competitivos. De acuerdo al modo de inhibición se afectan de forma diferente los parámetros cinéticos de la enzima.

3. Las enzimas X e Y catalizan la misma reacción y presentan las curvas v_o en función de $[S]$ que se muestran en la figura. ¿Qué diferencia presentan ambas enzimas en cuanto a su regulación?

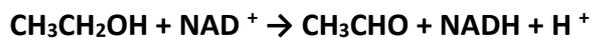


Respuesta:

La enzima Y es una enzima "Michaeliana" ya que sigue la cinética descrita por Michaelis y Menten, con la característica hipérbola rectangular. La enzima X es una enzima **alostérica** y se comporta diferente en relación a la dependencia de la V_o con la concentración de sustrato. La curva descrita por este tipo de enzimas se llama sigmoidea. También se saturan y podemos definir a la concentración a la cual la velocidad es la mitad que la máxima, pero no le llamamos K_M sino $K_{0.5}$. Si observamos las curvas, hay un rango de concentraciones de sustrato en el cual la actividad de la enzima Y no varía mucho con la $[S]$, mientras que pequeños cambios en $[S]$ llevan a un

gran cambio para la V_o de la enzima X. Lo anterior se explica por fenómenos de cooperatividad en las enzimas alostéricas y permite una regulación fina de su velocidad, ya que es común que los cambios de concentración de metabolitos celulares sean pequeños, pero eso es suficiente para modular a la alta, o a la baja la actividad de estas enzimas. Además, las enzimas alostéricas son reguladas por moduladores que se unen a sitios, justamente, "alostéricos" y modifican su actividad, aumentando o disminuyendo los parámetros V_{max} y $K_{0.5}$.

4. Muchas reacciones enzimáticas se inhiben por el producto de la reacción. Se estudia la reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, responsable de la detoxificación de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a nivel hepático, que lo transforma en acetaldehído.



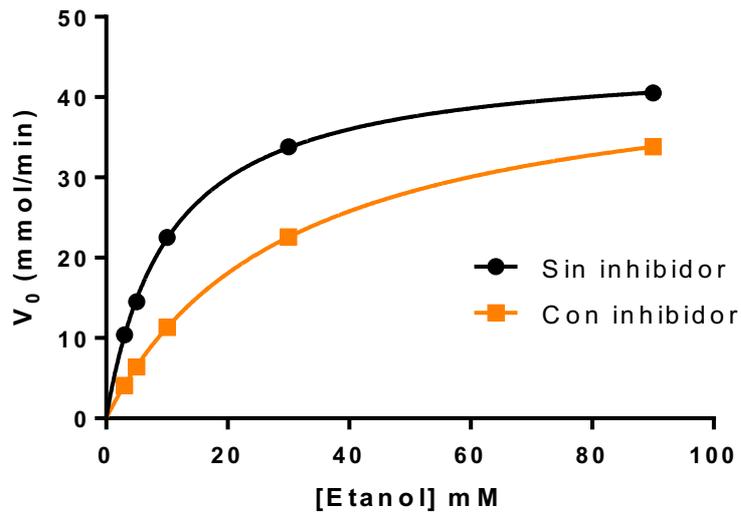
Su producto, el acetaldehído (CH_3CHO), es a su vez, un inhibidor de la enzima por lo que se realizaron ensayos de actividad en ausencia y en presencia de una concentración de 4.0 mM de acetaldehído. Utilizando los datos del estudio expresados en las tablas:

- Grafique los datos de $V_o = f([S])$ en presencia y en ausencia del inhibidor sobre los mismos ejes.
- Determine los valores de K_m , V_{max} en ausencia y en presencia del acetaldehído.
- Determine el tipo de inhibición

| [Etanol](mM) | v (mmol/min) | v (mmol/min) c/inhibidor |
|--------------|--------------|-----------------------------|
| 3,0 | 10,4 | 4,1 |
| 5,0 | 14,5 | 6,4 |
| 10,0 | 22,5 | 11,3 |
| 30,0 | 33,8 | 22,6 |
| 90,0 | 40,5 | 33,8 |

Respuesta:

- Gráfica de $V_o = f([S])$:

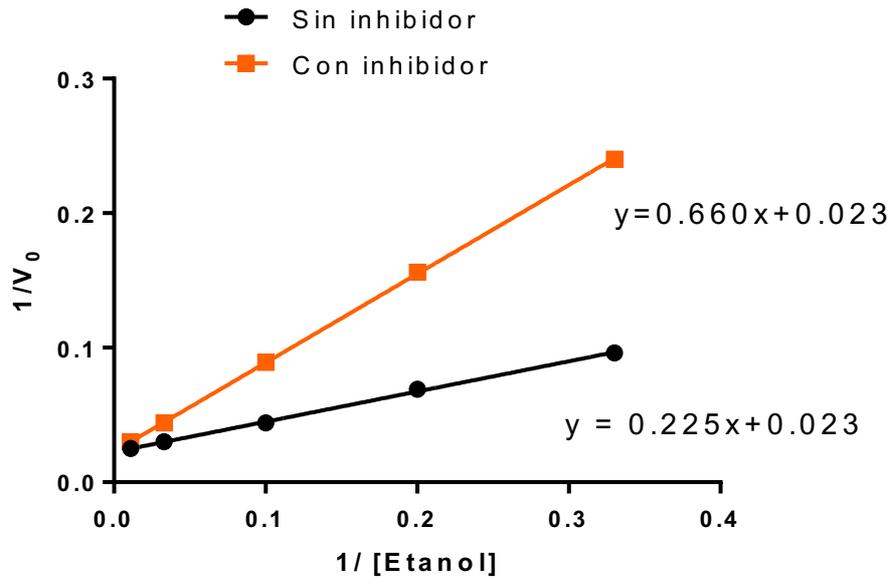


A simple vista podemos ver que en presencia del inhibidor parece haber un aumento del K_M , es decir, necesitamos más concentración de Etanol (Sustrato) para llegar a la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$.

- b) Para determinar los parámetros cinéticos recurrimos al gráfico de dobles recíprocos. Primero calculamos $1/V_0$ y $1/S$ para generar la tabla de datos para el gráfico:

| [Etanol](mM) | v (mmol/min) | v (mmol/min) c/inhibidor | 1/[Etanol] | 1/v | 1/v c/inhibidor |
|--------------|--------------|--------------------------|------------|--------|-----------------|
| 3,0 | 10,4 | 4,1 | 0,330 | 0,0960 | 0,240 |
| 5,0 | 14,5 | 6,4 | 0,200 | 0,0690 | 0,156 |
| 10,0 | 22,5 | 11,3 | 0,100 | 0,0440 | 0,089 |
| 30,0 | 33,8 | 22,6 | 0,033 | 0,0300 | 0,044 |
| 90,0 | 40,5 | 33,8 | 0,011 | 0,0250 | 0,030 |

Luego grafico $1/V_0 = f(1/[S])$:



Al ajustar a la mejor recta, el programa de hojas de cálculo, reporta la ecuación de la recta para ambas series de datos. Al igual que en el ejercicio 2), despejamos los parámetros K_M y V_{max} teniendo en cuenta que:

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

Entonces:

Datos sin inhibidor

$$Y = 0.225x + 0.023$$

- $0.023 = 1/V_{max}$
 $V_{max} = 43 \text{ mmol/min}$
- $0.225 = K_M/V_{max}$
 $0.225 = K_M/43$
 $0.225 \cdot 43 = K_M$
 $K_M = 9.7 \text{ mM}$

Datos con inhibidor

$$Y = 0.660x + 0.023$$

- $0.023 = 1/V_{max}$
 $V_{max} = 43 \text{ mmol/min}$
- $0.660 = K_M/V_{max}$

$$0.660 = K_M/43$$
$$0.660 \times 43 = K_M$$
$$K_M = \mathbf{28.4 \text{ mM}}$$

Si comparamos los parámetros, la $V_{\text{máx}}$ se mantiene igual en presencia del inhibidor, mientras que la K_M aumenta considerablemente. Este es el caso típico de un inhibidor competitivo, que al unirse al sitio activo de la enzima bloquea la entrada del sustrato, haciendo que se requiera más sustrato para obtener la misma velocidad. Como su unión es reversible, si aumenta mucho la concentración de sustrato, se desplaza el inhibidor y se puede alcanzar la velocidad máxima.