

## TEMA 8

### ENZIMAS II

1. Cinética enzimática
2. Inhibición enzimática
3. Reacciones multisustrato
4. Regulación enzimática

#### 1. Cinética enzimática.

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, en los seres vivos. No obstante, éstas muestran (además del fenómeno de la especificidad, antes comentado) un rasgo característico que no se observa en los catalizadores no enzimáticos, se trata de la  **saturación**  por el sustrato, entendida en términos de ocupación de los centros activos de todas las moléculas de enzima.

Estudiar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de una enzima no es sencillo, si pensamos que lógicamente la concentración del sustrato disminuye según avanza la reacción. Una simplificación en los experimentos cinéticos consiste en medir la velocidad inicial ( $V_0$ ). Si el tiempo es suficientemente corto la disminución de sustrato será mínima y ésta podrá considerarse, por tanto, casi constante. La Figura 1 muestra el efecto de distintas concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por un enzima.

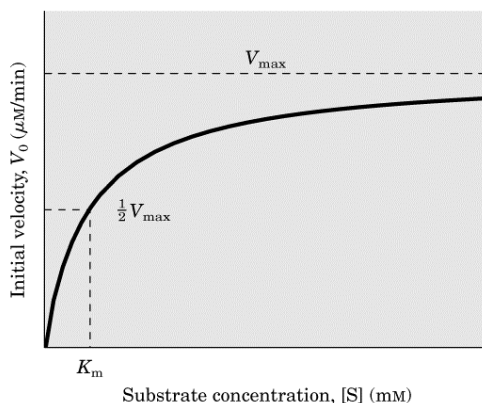


Figura 1.

**Cinética enzimática.** Modelo de Michaelis-Menten.

Este comportamiento es característico de la mayoría de las enzimas y fue estudiado por Michaelis y Menten en 1913. En la cinética enzimática de la Figura 1 se distinguen tres fases:

- Para una concentración baja de sustrato, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración del sustrato (relación lineal), la cinética es de primer orden.
- Para una concentración alta de sustrato, la velocidad de la reacción se hace prácticamente constante e independiente de la concentración de sustrato, la cinética se considera de orden cero.
- Para concentraciones de sustrato intermedias la velocidad del proceso deja de ser lineal, y a esta zona se la denomina de cinética mixta.

La velocidad de una reacción catalizada ( $V$ ) nos indica la cantidad de sustrato consumido, o producto formado, por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional se designa por "U" (unidad de actividad enzimática) y corresponde a los  $\mu$ moles de sustrato consumidos en 1 min, o bien a los  $\mu$ moles de producto formado en 1 min.

$$U \equiv \mu\text{mol S/min} \equiv \mu\text{mol P/min}$$

La curva que expresa la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad inicial tiene la misma forma para la mayoría de las enzimas; se trata de una hipérbola rectangular, cuya expresión algebraica viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten, donde muestra la relación entre la velocidad inicial ( $V_0$ ) y la concentración de sustrato,  $S$ .

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

Los términos  $V_{max}$  (*velocidad máxima*) y  $K_m$  (*constante de Michaelis*) son dos parámetros cinéticos característicos de cada enzima, que pueden determinarse experimentalmente.

La **velocidad máxima** ( $V_{max}$ ) se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, cuando esto ocurre la velocidad alcanza un valor máximo. Este valor depende de la cantidad de enzima que tengamos.

La **constante de Michaelis** ( $K_m$ ) nos indica la concentración de sustrato a la cuál la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es independiente de la concentración de enzima, y es característico de cada enzima según el sustrato utilizado (si tiene varios). La  $K_m$  también indica la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es la  $K_m$ . Cuanto menor sea la  $K_m$  menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad del enzima hacia ese sustrato.

A partir de la ecuación de Michaelis-Mente podemos explicar matemáticamente las tres fases de la curva de la figura 1.

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

Así:

- A baja  $[S]$ , es decir si  $K_m \gg \gg [S]$ , el término  $K_m + [S]$  podemos aproximarlo a la  $K_m$ , quedando un expresión del tipo:

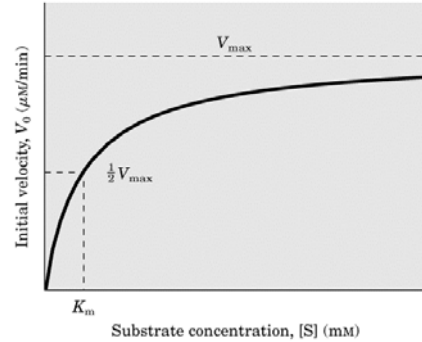
$$V = k' [S]$$

Esta es una cinética de primer orden, que se caracteriza por una variación lineal de la  $V$  respecto al tiempo, como tiene lugar en la primera fase.

- A altas  $[S]$ , es decir,  $K_m \ll \ll [S]$ , despreciaríamos  $K_m$  frente a  $[S]$ , con lo que  $V = V_{max}$  (que sería constante); la cinética es de orden cero y se habría alcanzado la saturación por sustrato, como ocurre en la fase final.

- El tramo intermedio, en el que la  $[S] \approx K_m$  correspondiente a una cinética de orden mixto y se ajusta a la ecuación de Michaelis.

En muchos casos es de vital importancia conocer estos parámetros cinéticos. En principio, podrían obtenerse de forma poco rigurosa a partir de la curva de Michaelis Menten, para lo cual sería preciso primero obtener el valor de la  $V_{max}$  y después, teniendo en cuenta que la  $K_m$  es la concentración a la cual la velocidad es la mitad de la velocidad



máxima, podríamos obtener su valor. Pero existen métodos gráficos más fiables que facilitan el cálculo preciso de la  $K_m$  y la  $V_{max}$ . Los cálculos se hacen en base a transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis; una de las expresiones más utilizadas es la representación de Lineweaver-Burk (Figura 2). En esta forma de cálculo se representa  $1/V$  frente a  $1/S$ , esto es la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración (de ahí que también la representación sea conocida como de dobles inversos), así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es  $-1/K_m$  y con el eje Y es  $1/V_{max}$ , siendo la pendiente  $K_m/V_{max}$ .

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

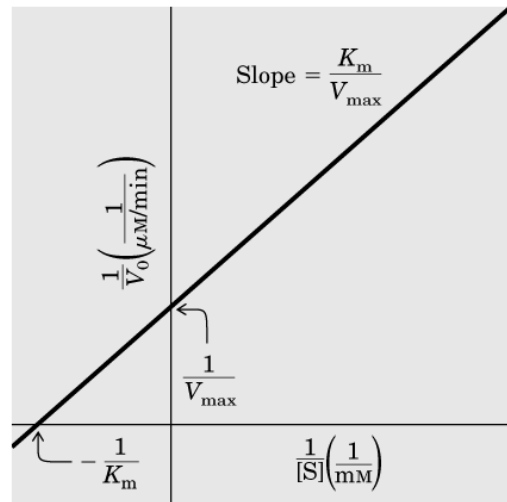
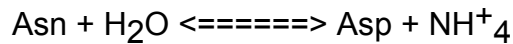


Figura 2.

**Cinética enzimática.** Representación de Lineweaver-Burk.

De esta forma, y una vez hecha la representación, podemos extrapolar el valor de X para  $Y=0$ , o el de Y, cuando  $X=0$ , y obtener haciendo el inverso de los valores (y teniendo en cuenta el signo) el valor de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

La obtención de la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de una enzima, es importante no sólo porque son parámetros que la identifican, sino también por motivos que, en ocasiones, pueden ser de vital importancia. Por ejemplo, algunos tipos de leucemia (enfermedad en la que los glóbulos blancos proliferan anormalmente) pueden evitarse por la administración de una enzima, la Asparraginasa, que cataliza la reacción de hidrólisis de la asparragina (Asn) a ácido aspártico (Asp).



Este descubrimiento condujo a la conclusión de que la Asn presente en la sangre es un principio nutritivo para el crecimiento de los linfocitos malignos; el problema apareció cuando se utilizaron distintas fuentes de asparraginasa, descubriéndose que no todas eran eficientes. Al final se encontró la razón. Estas enzimas, de diferentes fuentes (animal, vegetal o microbiana), tenían diferente  $K_m$  respecto a la Asn. Como la [Asn] en la sangre es muy baja, sólo aquellas enzimas con el valor de  $K_m$  muy bajo (una mayor afinidad por el sustrato) serían capaces de provocar la hidrólisis de la Asn. Así, se comprobó al obtener los parámetros que la enzima que presentaba menor  $K_m$  para la Asn era la de una bacteria (*E. coli*), y fue la que se utilizó para controlar la enfermedad.

## 2. Inhibición enzimática

Existen sustancias que pueden impedir que la enzima desarrolle su actividad catalítica, ralentizando o paralizando la reacción enzimática. A estas sustancias se las denomina ***inhibidores enzimáticos***. Teniendo en cuenta que las reacciones químicas en la célula están catalizadas por enzimas, es fácil intuir el papel de muchos inhibidores enzimáticos que actúan como fármacos, antibióticos o conservantes; otros pueden ser tóxicos, potentes venenos. Por ejemplo, la aspirina (acetilsalicilato) es un analgésico que inhibe la enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de prostaglandinas, implicadas en la producción del dolor.

Se conocen dos tipos principales de inhibición: la reversible y a la irreversible. La primera implica una unión “no covalente” del inhibidor y, por lo tanto, siempre puede revertirse. En la inhibición irreversible, el inhibidor se une al enzima de forma “covalente” y permanente.

**Inhibición reversible:** los distintos modelos de inhibición reversible implican la unión no covalente del inhibidor con la enzima, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad enzimática y en la forma en que afectan a la cinética de la reacción. Entre ellos están la inhibición competitiva, la acompetitiva y la no competitiva.

- El **inhibidor competitivo**, es una sustancia similar en estructura al sustrato, con quien compite por el sitio activo de la enzima.

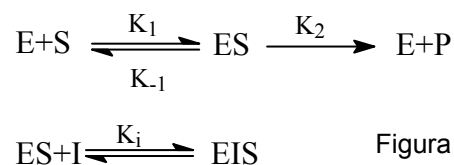
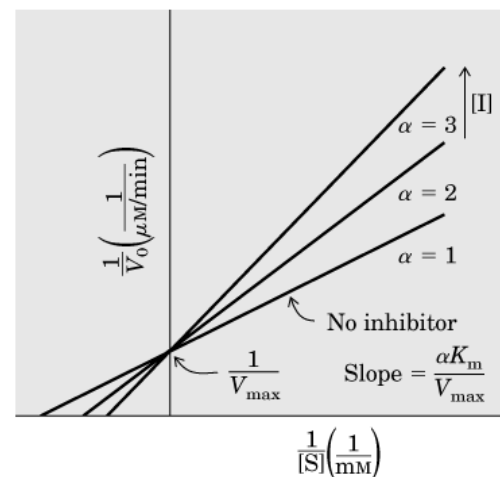


Figura 3.

**Inhibición competitiva.** Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles inversos.

Como consecuencia, aunque la velocidad máxima no se altera, para alcanzarla sería necesario poner más cantidad de sustrato en el medio de reacción, lo que se refleja, en la correspondiente curva de Michaelis, como un aparente aumento de la  $K_m$  (la enzima en presencia del inhibidor perdería afinidad por el sustrato). La representación de dobles inversos (Figura 3) permite observar claramente este tipo de inhibición.

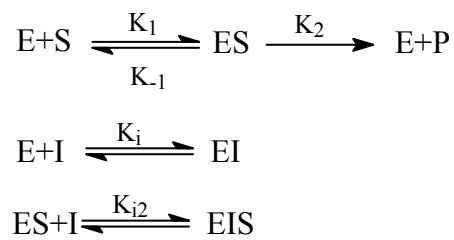
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Así cuando se realizan distintos estudios a varias concentraciones de inhibidor, obtenemos, mediante la representación de dobles inversos, distintas rectas que se cortan en el mismo punto (para  $X=0$ ), indicando que la  $V_{\max}$  no se altera, pero la  $K_m$  (y por lo tanto la afinidad) aparentemente sí, pues existen varios puntos de corte para  $y=0$ , por lo tanto aparentemente varias  $K_m$ , que además van aumentando con la concentración del Inhibidor.

La eficacia de un inhibidor competitivo depende de su concentración respecto a la del sustrato. Si hay un exceso de inhibidor éste bloqueará los centros activos de las moléculas de enzima, resultando una inhibición total. No obstante, el proceso es reversible si se procura exceso de sustrato, que desplazaría totalmente al inhibidor.

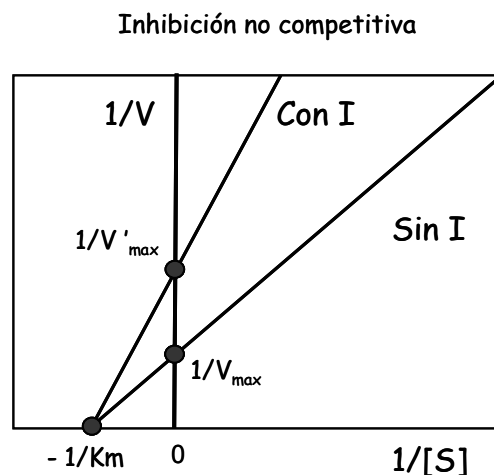
- El **inhibidor no competitivo** puede combinarse tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato, sin afectar al sitio activo de la enzima.



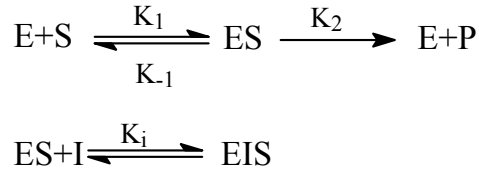
Al no unirse el inhibidor al sitio activo, no se afecta la afinidad de la enzima por el sustrato y en este caso la  $K_m$  no se altera y la  $V_{max}$  disminuye, como puede observarse en la representación de dobles inversos (Figura 4), el punto de corte de las rectas ahora esta sobre el eje X, (cuando  $y=0$ ), mientras que hay distintos punto de corte con el eje Y, como se aprecia la  $V_{max}$  disminuye con el inhibidor.

Figura 4.

**Inhibición no competitiva.** Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles inversos.



- El **inhibidor acompetitivo** reacciona con la enzima en un punto distinto al centro activo, pero sólo en el caso de que ésta esté unida al sustrato formando el complejo ES; de esta forma impide que la enzima desarrolle su actividad catalítica.

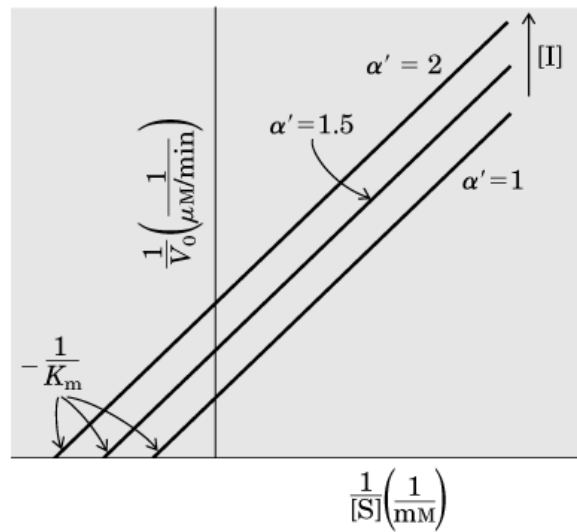


$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

Figura 5.

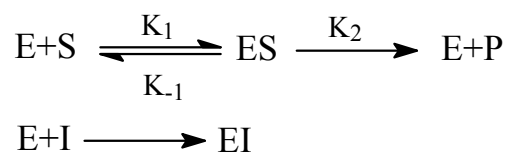
**Inhibición acompetitiva.**

Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles inversos.



Tanto la  $V_{max}$  como la  $K_m$  se alteran en la misma proporción, esto se manifiesta en la representación de dobles inversos como rectas paralelas y por lo tanto con la misma pendiente (Figura 5). Se observa cómo se produce, una disminución de la  $V_{max}$  y curiosamente, también, una disminución aparente de la  $K_m$ .

**En la inhibición irreversible**, el inhibidor se une covalentemente a la enzima y la inactiva de manera irreversible. Casi todos los inhibidores irreversibles son sustancias tóxicas naturales o sintéticas.





Se trata de sustancias que reaccionan con algún grupo funcional importante para la catálisis, bloqueándolo e impidiendo que la enzima desarrolle su actividad. En muchos casos la interacción se produce a través del sitio activo, impidiendo de manera irreversible que el sustrato ocupe su lugar; tal es el caso del gas Sarín, que inhibe irreversiblemente la acetilcolinesterasa, enzimas implicadas en la transmisión del impulso nervioso, al competir con su sustrato, la acetilcolina (un neurotransmisor) y la inhalación del gas causa parálisis rápida de las funciones vitales.

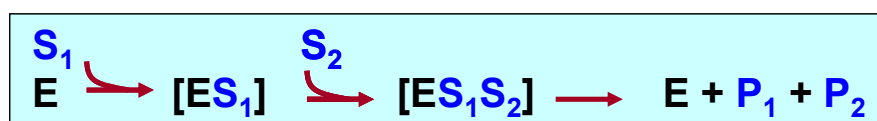
En la inhibición irreversible, cuando el inhibidor afecta al sitio activo se observaría una situación similar a la inhibición competitiva, una disminución de la  $V_{max}$  y un aumento aparente de la  $K_m$ , si bien el proceso sería completamente irreversible por sustrato, incapaz éste de desplazar al inhibidor del sitio activo. La inhibición enzimática por modificación covalente constituye además una importante forma de regulación metabólica, como veremos en próximos apartados.

### 3. Reacciones multisustrato

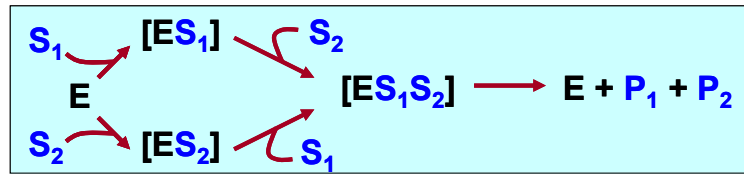
En este capítulo hemos estudiado reacciones catalizadas enzimáticamente en las que interviene un solo sustrato que se transforma en producto, se trata un mecanismo relativamente simple que podría ajustarse a reacciones catalizadas por algunas enzimas (isomerasas, hidrolasas, algunas liasas) pero es importante tener en cuenta que la gran mayoría de las reacciones son multisustrato y suelen dar varios productos.

Cuando una enzima une dos o más sustratos y libera múltiples productos, el orden de los pasos para ser una característica importante del mecanismo de reacción. Hay distintos mecanismos que explican este tipo de reacciones, veamos varios casos en los que se utilicen dos sustratos  $S_1$  y  $S_2$  y se obtengan dos productos  $P_1$  y  $P_2$ .

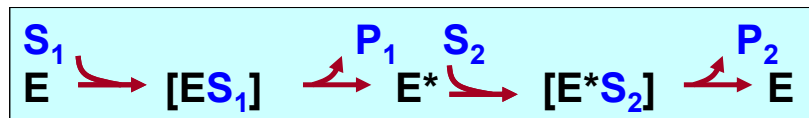
- a) Unión ordenada de los sustratos: en este caso un sustrato debe unirse antes de que el segundo sustrato pueda unirse a la enzima.



- b) Unión aleatoria de los sustratos: en este caso cualquiera de los dos sustratos puede ser el primero en unirse a la enzima.



- c) Mecanismo "ping-pong": en este caso primero se une un sustrato, se libera el primer producto, y a continuación se une el segundo sustrato para así liberar el segundo producto.

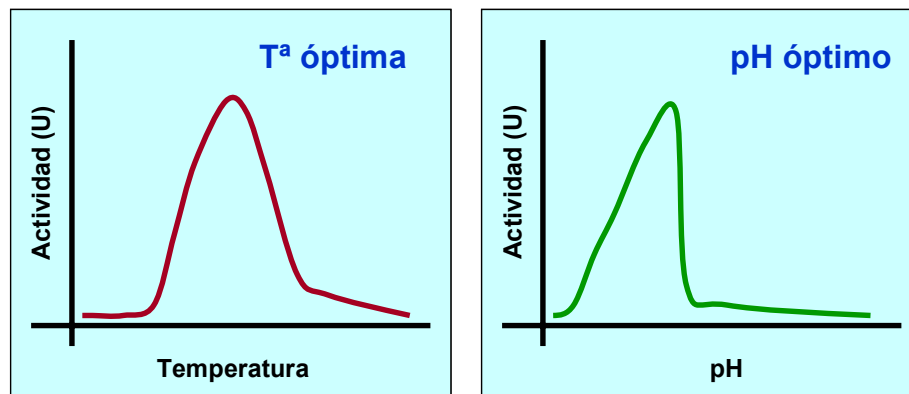


#### 4. Regulación enzimática

Una característica que diferencia las enzimas de los catalizadores químicos convencionales es su capacidad para regular su propia actividad. Una enzima puede ser más o menos activa gracias a la existencia de distintos niveles de regulación:

Nivel de síntesis: implica una regulación genética, en este caso se trata de proteínas inducibles que se sintetizan cuando las requiere el organismo, este tipo de regulación se estudiará en el Tema 11.

Nivel de actividad: que las moléculas de enzima existentes estén más o menos activas. Puede llevarse a cabo por factores extrínsecos a la enzima. Dicha regulación puede venir dada por una variación en la concentración celular del sustrato o de inhibidor, como se ha indicado en apartados anteriores, o bien, por cambios de temperatura o de pH, en este caso se debe a que las enzimas poseen un pH óptimo y una temperatura óptima de trabajo.

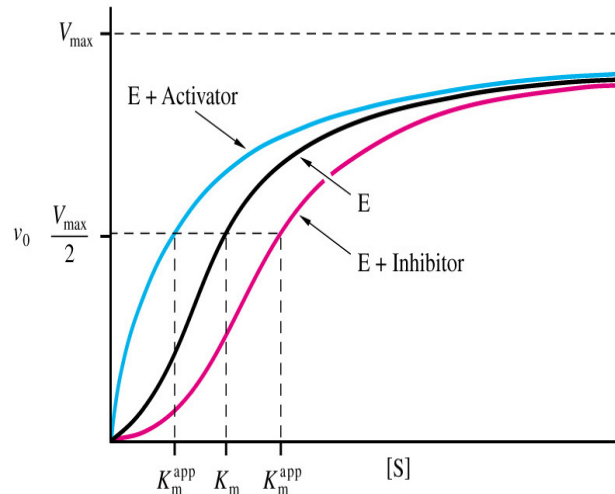


Ejemplo del efecto del pH o la Tª sobre la actividad enzimática

La variación del pH o la Tª afectan a la actividad enzimática, en algunos casos, como los de la figura los efectos pueden ser bastante drásticos, mientras que en otros casos el rango de Tª o pH óptimo puede ser mayor, sin que afecten a la actividad. No obstante, suele ocurrir que una vez superado el óptimo se produzca una desnaturalización irreversible de la enzima

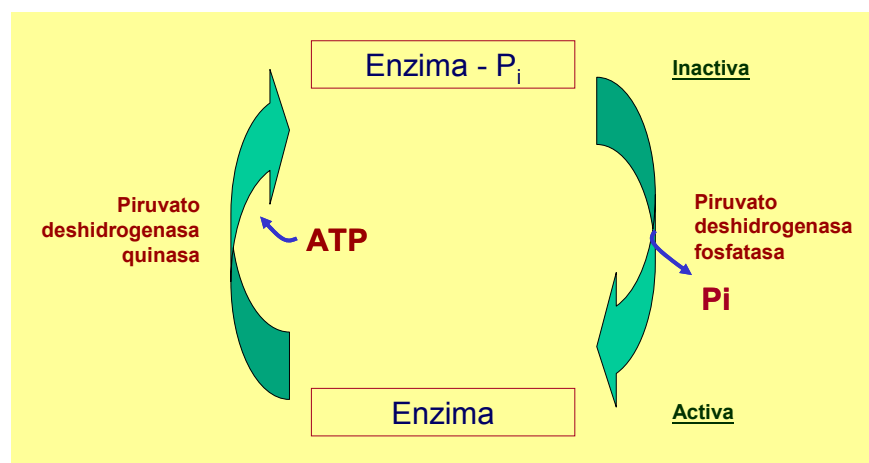
También ocurre que la regulación puede ser provocada por factores intrínsecos a la propia enzima; en este caso se habla de **enzimas reguladoras**, enzimas que por su propia naturaleza tienen mecanismos especiales de regulación. Están especializadas en regularse respondiendo de forma muy sensible a señales externas. En la célula las enzimas operan en grupo, en rutas constituidas por varios pasos enzimáticos. En cada ruta hay al menos una enzima reguladora que determina la velocidad de toda la ruta. La modulación de las enzimas reguladoras ocurre mediante diferentes mecanismos:

- *Enzimas alostéricas*. Funcionan mediante la unión reversible no covalente de compuestos regulatorios llamados moduladores. El modulador puede ser un activador (modulación positiva) que acelere el proceso, o un inhibidor (modulador negativo). Este modulador puede ser el propio sustrato de la reacción (alosterismo homotrópico) o una otra sustancia (alosterismo heterotrópico). Normalmente se trata de enzimas multiméricas, de tal forma que la entrada del primer sustrato facilita (acelera) la entrada del siguiente, y normalmente ocurre que el sitio activo y el regulatorio se encuentran en distintas subunidades. En esos casos la cinética que presenta la enzima es distinta a la clásica de Michaelis-Menten, apareciendo una sigmoide como muestra la siguiente figura:



### Enzima alostérica

- **Enzimas interconvertibles.** Se trata de enzimas reguladoras en las que el proceso de control de la actividad se realiza gracias a una modificación covalente reversible, en el que están implicadas también otras enzimas que se encargan de hacer la modificación, en base a la concentración celular de determinados metabolitos. Un ejemplo, claro es el caso de la enzima piruvato deshidrogenasa, que se estudiará en profundidad en el Tema 14, y que su regulación implica, entre otros factores, la fosforilación /defosforilación de la enzima. De tal forma que cuando la enzima es fosforilada pierde su actividad y cuando se defosforila recupera su actividad.



- También son posibles, la regulación enzimática mediante proteínas reguladoras que se unen a la enzima, o la regulación por eliminación proteolítica de pequeños segmentos peptídicos, aunque en este caso el proceso es irreversible.