

Estudio cinético de la fase de transición del mecanismo de Michaelis-Menten con inhibición por exceso de sustrato

R. Varón Castellanos*, J. Tudela Serrano**, F. García Carmona**, F. García Cánovas**

* Dpto. de Química Física, Facultad de Ciencias Químicas y Matemáticas

** Dpto. interfacultativo de Bioquímica

Recibido: 22-3-85

Aceptado: 30-10-85

Kinetic study of the transient phase of the Michaelis-Menten mechanism with inhibition by substrate excess

Summary: The kinetic behaviour in the transient phase of a Michaelis-Menten mechanism with inhibition by substrate excess has been analyzed. Time dependent equations for all species involved to mechanism are derived. Several procedures for rate constants evaluation are proposed.

Key-words: Transient phase, Michaelis-Menten, Substrate inhibition.

INTRODUCCIÓN

En la literatura científica, desde el año 1965, se han descrito más de 800 enzimas que sufren desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten, basándose en estudios de estado estacionario¹. Estos hechos han animado a distintos autores a intentar explicar los resultados experimentales bajo enfoques más rigurosos que los utilizados previamente², encontrando que a diferencia de la ecuación clásica de Michaelis-Menten, que es de grado 1:1 con respecto al sustrato, podrían darse grados tales como 1:2; 2:2; 2:3; 3:4; etc.

Estos descubrimientos cuestionan fuertemente si debe aceptarse que las enzimas son en su mayoría michaelianas, ya que si esto no es así, los parámetros clásicos tales como K_M y V_{max} perderían su significado físico para tales enzimas.

Es conocida la existencia de posibles causas que pueden dar lugar a desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten³. Algunos ejemplos son: la enzima que contiene una

impureza que reacciona con el sustrato, o bien la enzima que existe en dos formas con diferentes actividades o en la que se producen agregaciones o micelas¹. Algunas de las desviaciones cinéticas encontradas podrían deberse a tales hechos. No obstante, una vez suprimidos tales efectos donde es posible, los hechos experimentales indican que son muchas las enzimas que dan cinéticas anómalas, entre ellas se encuentran acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida, adenosín desaminasa, arilsulfatasa, bencilamina oxidasa, α -quimotripsina, fumarasa, β -galactosidasa, galactosa deshidrogenasa, peroxidasa y xantín oxidasa². Algunas posibles causas cinéticas para explicar estas desviaciones podrían ser: a) inhibición por sustrato, b) activación por sustrato, c) rutas al azar, d) efectos alostéricos.

El grupo más numeroso de desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten corresponde a la inhibición por sustrato (352 ejemplos). En la mayoría de los casos en los que aparece este tipo de efecto, lo que se ha hecho es trabajar a bajas concentraciones de sustrato, de tal manera que se obtenga una ecuación de velocidad 1:1 con respecto al

$$Q = (k_{-1} + k_2)k_{-3} + k_1k_{-3}y_1^0 + k_1k_3y_1^{0^2} \quad (11)$$

y, a su vez,

$$\lambda_1 \lambda_2 = Q \quad (12)$$

$$-(\lambda_1 + \lambda_2) = P \quad (13)$$

λ_1 y λ_2 son siempre reales y negativas.

Por otra parte, y_2 depende de t según

$$y_2 = \beta + \alpha t + \sum_{h=1}^2 \gamma_h e^{\lambda_h t} \quad (14)$$

donde

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_{-3} y_1^0 x_1^0}{(k_{-1} + k_2)k_{-3} + k_1 k_{-3} y_1^0 + k_1 k_3 y_1^{0^2}} \quad (15)$$

$$\beta = \frac{k_1 k_2 y_1^0 x_1^0 - P\alpha}{Q} \quad (16)$$

$$\gamma_1 = -\frac{k_1 k_2 (k_{-3} + \lambda_1) y_1^0 x_1^0}{\lambda_1^2 (\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (17)$$

$$\gamma_2 = -\frac{k_1 k_2 (k_{-3} + \lambda_2) y_1^0 x_1^0}{\lambda_2^2 (\lambda_1 - \lambda_2)} \quad (18)$$

Algunos ejemplos típicos de la variación de α con respecto a y_1^0 y de y_2 con respecto a t se muestran en las figs. 2 y 3, respectivamente.

El período de inducción tiene el valor

$$\tau = -\frac{1}{k_{-3}} + \frac{P}{Q} \quad (19)$$

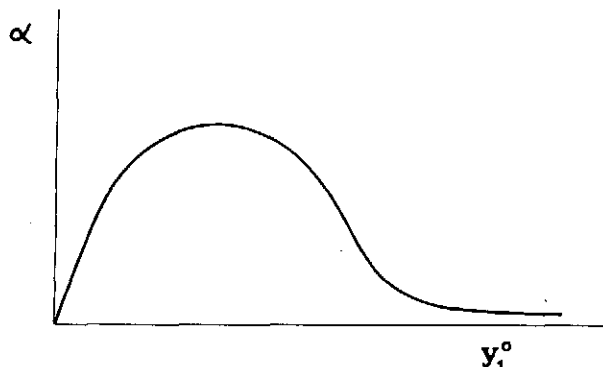


FIGURA 2. Representación esquemática de α vs. y_1^0

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES

El mecanismo bajo estudio se ajusta, en las curvas de acumulación de producto Y_2 frente al tiempo, a la suma de dos exponenciales. La determinación de las λ_h permitirá determinar todas las constantes implicadas en el sistema. Puesto que las λ_h son reales y negativas, el procedimiento a seguir sería⁶:

- 1) Determinación en el estado estacionario de α , β y τ
- 2) Representación, en la fase de transición, de $\ln(y_2 - \beta - \alpha t)$ vs. t , lo que da, supuesto $|\lambda_1| < |\lambda_2|$ y a partir de cierto instante, t_p , una recta de pendiente λ_1 y ordenada en el origen $\ln \gamma_1$.
- 3) La determinación de λ_2 puede hacerse de acuerdo con

$$\lambda_2 = \frac{\gamma_1 \cdot \lambda_1^2}{\lambda_1 \gamma_1 + \alpha} \quad (20)$$

expresión deducida teniendo en cuenta las ecs. (12),

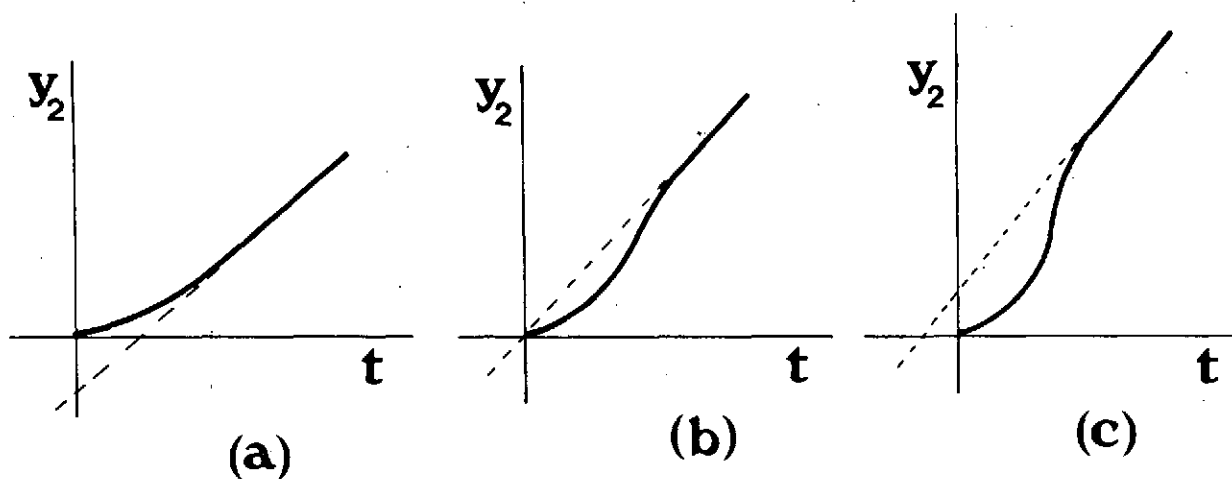


FIGURA 3. Representación esquemática de los perfiles concentración del producto-tiempo. Los casos representados en (a), (b) y (c) corresponden, respectivamente a un valor de τ positivo, nulo o negativo. A su vez, τ es positivo, nulo o negativo según que $k_{-3}(k_{-3} + k_3 y_1^0)$ sea, respectivamente, mayor, igual o menor que $k_1 k_3 y_1^0$.

(13) y (15) - (17). La ec. (20) permite el cálculo de λ_2 de una forma analítica sin necesidad de representar $\ln(y_2 - \beta - \alpha t - \gamma_1 e^{\lambda_1 t})$ vs. t para $0 \leq t \leq t_p$.

Con los valores de λ_1 y λ_2 podemos calcular todas las k_i ($i=1, 2, 3, -1, -3$), puesto que $\lambda_1 + \lambda_2$ según la ec. (13) es lineal respecto de y_1^0 . A partir de la pendiente y ordenada en el origen tenemos dos ecuaciones y aplicando regresión no lineal a λ_1, λ_2 (ec. (12)) obtenemos tres ecuaciones adicionales.

Otra posibilidad sería el ajuste por regresión no lineal a la ec. (19), con lo que se obtendrían cinco ecuaciones. Además se cumplen las siguientes relaciones:

$$\lim_{y_1^0 \rightarrow \infty} \tau = -\frac{1}{k_{-3}} \quad (21)$$

$$\lim_{y_1^0 \rightarrow 0} \tau = \frac{1}{k_{-1} + k_2} \quad (22)$$

$$\lim_{y_1^0 \rightarrow \infty} \frac{\alpha y_1^0}{x_1^0} = \frac{k_2 k_{-3}}{k_3} \quad (23)$$

las cuales nos permiten otras aproximaciones al conocimiento de los valores de las k_i .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales de velocidad en estado estacionario frente a la concentración de sustrato indican que un gran número de enzimas se desvían del comportamiento michaeliano. Los estudios en estado estacionario detectan estas desviaciones a partir de gráficas α vs. y_1^0 o $1/\alpha$ vs. $1/y_1^0$. Se han establecido criterios para poder dilucidar a qué grado con respecto al sustrato está correspondiendo la velocidad. Sin embargo, puesto que según la ec. (15) los factores que multiplican a la concentración de sustrato son expresiones algebraicas de las k_i , la determinación de sus valores nos permite conocer cuál va a ser la influencia de cada término en la ecuación y saber a qué etapa se debe en concreto el que ese término sea significativo o no. En el caso sencillo de un mecanismo 1:2 queda claro cómo a partir de la determinación de las λ_h ($h = 1, 2$) puede obtenerse esta información. En mecanismos más

complejos sería conveniente utilizar la expresión de τ para el cálculo de k_i mediante regresión no lineal.

Desde el punto de vista experimental la determinación de λ_h ($h = 1, 2$) o τ tienen el condicionamiento de necesitar medidas en fase de transición (normalmente en una escala de tiempo de milisegundos), lo cual exige la utilización de técnicas rápidas⁷. Otro requisito experimental viene impuesto por la necesidad de medir pequeños niveles de productos de reacción, lo que obliga a usar sustratos con características apropiadas (alto coeficiente de extinción, alta solubilidad, etc.), y elevadas concentraciones de enzima⁷.

A partir de lo expuesto anteriormente, en el caso de mecanismos 1:2, desaparece el sentido físico de K_M y V_{max} y la descripción de la reacción catalizada por la enzima sería conveniente hacerla, en los casos donde sea posible, por los valores de las k_i .

BIBLIOGRAFÍA

- HILL, M. C., WAIGHT, D. R. y BARDSLEY, G. W. *Molecular Biochemistry* 15, 173 (1977).
- BARDSLEY, G. W., LEFF, P., KAVANAGH, J. y WAIGHT, D. R. *Biochem. J.* 187, 739 (1980).
- LAIDLER, K. J. y BUNTING, P. S. *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford (1973).
- GÁLVEZ, J., VARÓN, R., GARCÍA CÁNOVAS, F. y GARCÍA CARMONA, F. J. *Theor. Biol.* 94, 413 (1982).
- GÁLVEZ, J. y VARÓN, R., *J. Theor. Biol.* 98, 1 (1981).
- GÁLVEZ, J., VARÓN, R., GARCÍA CÁNOVAS, F. y GARCÍA CARMONA, F. *An. Quim.* 79, 5 (1983).
- HIROMI, K., *Kinetics of Fast Enzyme Reactions*, John Wiley & Sons, New York (1979).

APÉNDICE

Valores de las K_i de la ec. (4):

$$\begin{aligned} K_{11} &= -K_{12} \\ K_{12} &= k_1 y_1^0 \\ K_{22} &= -(K_{21} + K_{23}) \\ K_{21} &= K'_{21} + K''_{21} \\ K'_{21} &= k_{-1} \\ K''_{21} &= k_2 \\ K_{23} &= k_3 y_1^0 \\ K_{33} &= -K_{32} \\ K_{32} &= k_{-3} \end{aligned}$$