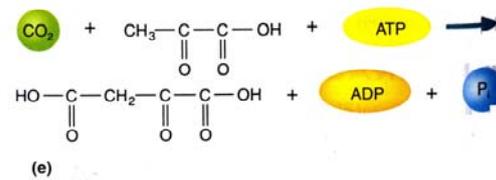
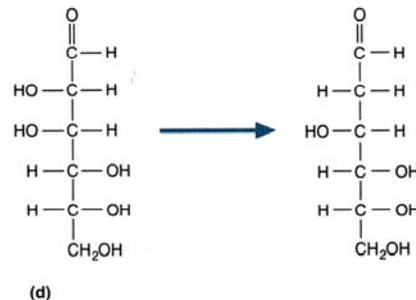
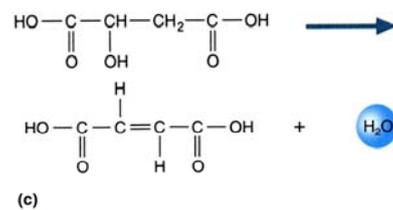
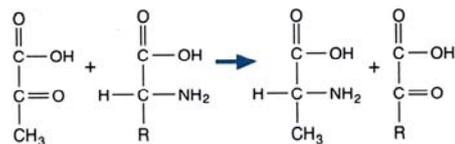
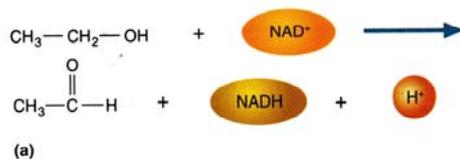


Tema 6. ENZIMAS

1. Determine la clase de enzima que cataliza cada una de las reacciones siguientes:



- ¿Porqué la glucosa es estable en atmósfera de oxígeno durante períodos de tiempo largos?
- En la cinética enzimática, ¿porqué se realizan las medidas al comienzo de la reacción?
- Los datos de abajo indican las velocidades de la reacción catalizada por la hexoquinasa. Calcular la K_m y la V_{max} de la hexoquinasa a partir de la gráfica de Michaelis-Menten:

Conc. Glucosa (mM)

Velocidad (mmoles G-6-P/seg/mg enz)

0,05	30
0,10	43
0,15	52
0,20	57
0,30	58

- Calcular la velocidad inicial de una reacción enzimática cuando $[S] = K_m$ y la enzima sigue una cinética michaeliana.

6. Se prepararon dos series de tubos para determinar la actividad de la fosfatasa alcalina utilizando p-nitrofenil fosfato como sustrato. La velocidad de la reacción se midió por la liberación de p-nitrofenol seguida colorimétricamente.

En cada tubo se añadió igual cantidad de extracto enzimático y se incubaron con dos concentraciones distintas de sustrato: $[S] = 0,25 \text{ mM}$ y $[S] = 2,5 \text{ mM}$. A distintos tiempos de incubación (ver tabla) se detuvo la reacción y se midió la cantidad de p-nitrofenol formado, obteniéndose los siguientes resultados:

Tiempo de incubación	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0 min	
$[S] = 0,25 \text{ mM}$	0,05	0,11	0,15	0,18	0,25	0,28 mmoles p-NF	
$[S] = 2,5 \text{ mM}$		0,19	0,33	0,47	0,51	0,55	0,62 mmoles p-NF

- A partir de estos datos experimentales, hacer una representación gráfica de cantidad de producto formado frente al tiempo.
- calcular el valor de velocidad inicial (V_0) para cada una de las dos concentraciones de sustrato.
- Comentar los valores obtenidos. ¿Por qué la curva deja de ser lineal con el tiempo?

7. Se realizó un experimento similar al del problema anterior esta vez con otras dos concentraciones de sustrato diferentes. Los valores de velocidad inicial obtenidos fueron:

$[S] = 0,45 \text{ mM}$ $V_0 = 0,17 \text{ mmoles/min}$

$[S] = 1 \text{ mM}$ $V_0 = 0,25 \text{ mmoles/min}$

A partir de los datos obtenidos en los dos problemas, hacer las siguientes representaciones gráficas:

- Michaelis-Menten
- Lineweaver-Burk.

Calcular la K_m y la V_{max} de la fosfatasa alcalina para este sustrato. ¿Serán iguales para cualquier otro sustrato de este enzima?

8. Responder si las siguientes cuestiones son verdaderas o falsas.

La K_m de un enzima es:

- dependiente de la concentración de sustrato
- la concentración de sustrato para la cual se obtiene la V_{max}
- la concentración de sustrato para la cual se obtiene la mitad de la V_{max}

La velocidad de la reacción

- disminuye con el tiempo a una concentración dada de sustrato
- depende de la concentración de sustrato
- depende de la concentración de enzima.

En una inhibición no competitiva:

- la V_{max} aumenta
- la K_m aumenta
- la K_m disminuye

9. a) Explicar los cambios en la K_m en los distintos mutantes de la hexoquinasa:

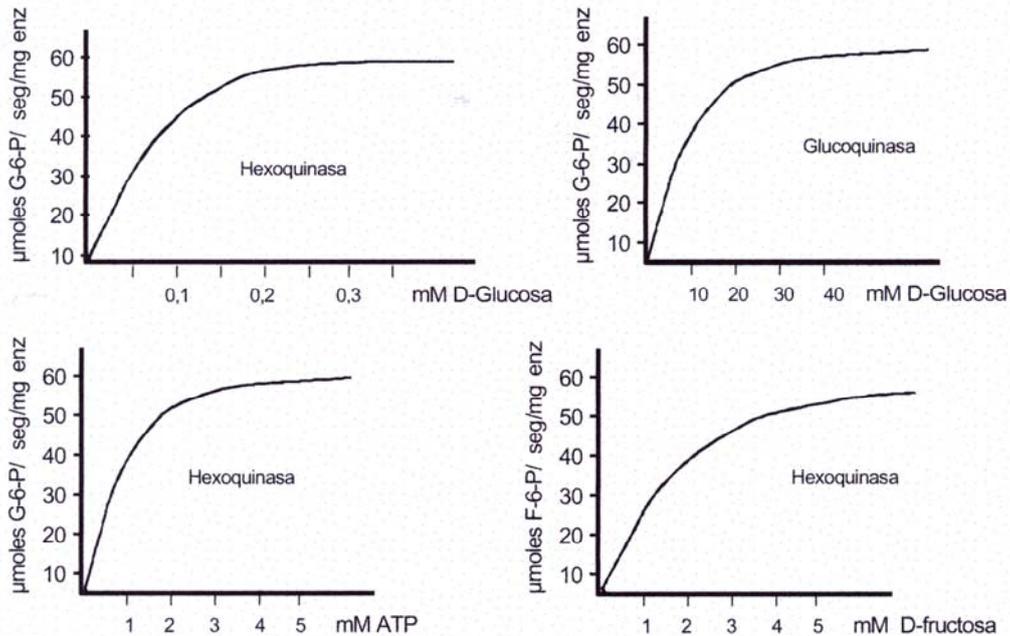
Silvestre (Asn-204) @ $K_m = 0,05 \text{ mM}$ glucosa

Mutante Gln-204 @ $K_m = 12 \text{ mM}$ glucosa

Mutante Val-204 @ $K_m = 300 \text{ mM}$ glucosa

b) ¿Cuánto ha de bajar la concentración de glucosa en sangre para que la velocidad de fosforilación de glucosa en el eritrocito sea un 90% de la V_{max} ?

10. Se representan debajo las gráficas de la velocidad inicial frente a concentración de glucosa, fructosa y de ATP de la hexoquinasa y de su isoenzima hepática la glucoquinasa



- Calcular los valores aproximados de K_m y V_{max} para glucosa de ambas enzimas y para ATP
- ¿La hexoquinasa es específica para la glucosa o la fructosa?
- ¿Qué enzima tiene mayor afinidad por la glucosa?

11. La cinética de un enzima (estudio de la velocidad enzimática utilizando distintas concentraciones de sustrato) se analizó en presencia de dos inhibidores diferentes (I_a e I_b) obteniéndose los siguientes resultados experimentales:

[S] x 10^{-5} M	Velocidad (mmoles/min/mg)		
	<u>Sin inhibidor</u>	<u>Con inhibidor Ia</u>	<u>Con inhibidor Ib</u>
0,3	10,4	4,1	2,1
0,5	14,5	6,4	2,9
1,0	22,5	11,3	4,5
3,0	33,8	22,6	6,8
9,0	40,5	33,8	8,1

- Representar V_o frente a $[S]$ y $1/V_o$ frente a $1/[S]$.
- Calcular K_m y V_{max} en ausencia y presencia de ambos inhibidores
¿De qué tipo de inhibición se trata?

12. El enzima aspartato transcarbamilasa cataliza la primera reacción de la biosíntesis de pirimidinas. Se realizó un estudio cinético de este enzima utilizando aspartato como sustrato, en presencia de CTP y en ausencia del mismo y se obtuvieron los siguientes datos:

Aspartato (mM)	Velocidad (unidades arbitrarias)	
	<u>Sin CTP</u>	<u>con CTP</u>
1	0,45	0,2
2	0,8	0,4
3	1,7	0,7
4	2,9	1,0
5	3,4	1,4
7	4,3	2,4
9	5,1	3,7
10	5,3	4,2
12	5,6	4,8
15	5,8	5,5
16	5,8	5,6
17	5,8	5,6

- sin utilizar ninguna representación, estimar el valor de K_m
- Representar los datos experimentales (V_o frente a $[S]$)
- Utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, calcular la V_o para una $[S] = 3$ mM. ¿Existe alguna discrepancia entre los datos teóricos y experimentales?.
- ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático?

13. ¿Qué concentraciones de sustrato, expresadas como múltiplos de la K_m , son necesarias para obtener velocidades iniciales de $0,5 V_{max}$, $0,9 V_{max}$ y V_{max} ?

14. Las mediciones experimentales realizadas en las células vivas indican que las concentraciones de los metabolitos se encuentran habitualmente alrededor del valor de la K_m de los enzimas de los que son sustratos. ¿Qué significado fisiológico tiene esa observación? ¿Porqué no serían efectivas concentraciones de sustrato mucho más altas o mucho más bajas que la K_m ?

15. La K_m de un enzima es siempre:

- La mitad de la $V_{máx}$.
- Una constante de disociación.
- La concentración de sustrato fisiológicamente normal.
- La concentración de sustrato que da la mitad de la velocidad máxima.
- Idéntica para todos los isozimas que catalizan una reacción determinada.