

Taller de Modelado de Cinética Enzimática

Emplearas el programa de [simulación de cinética enzimática](http://www.kscience.co.uk/-animations/model.swf) que se encuentra en el sitio: (<http://www.kscience.co.uk/-animations/model.swf>) para realiza los ejercicios que se describen a continuación, en los cuales obtendrás los datos para practicar el cálculo de las propiedades cinéticas de las enzimas.

Este es un simulador simple que sirve para demostrar el efecto de los factores que afectan la actividad enzimática. La simulación no es perfecta y puede que los datos no correspondan exactamente al comportamiento de las enzimas reales, sin embargo, son útiles para una introducción al análisis cuantitativo de la actividad enzimática y los factores que la modifican.

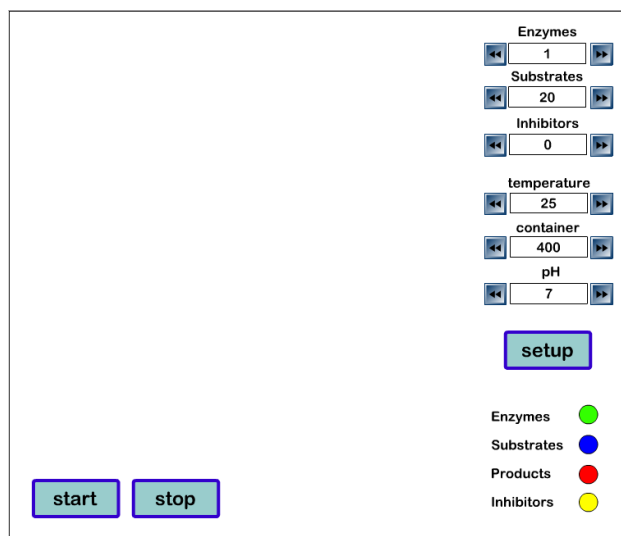
Introducción al manejo del simulador



Al hacer *clic* en el vínculo al simulador, en tu navegador se abre la hoja del programa, con una interface como la de la figura siguiente:

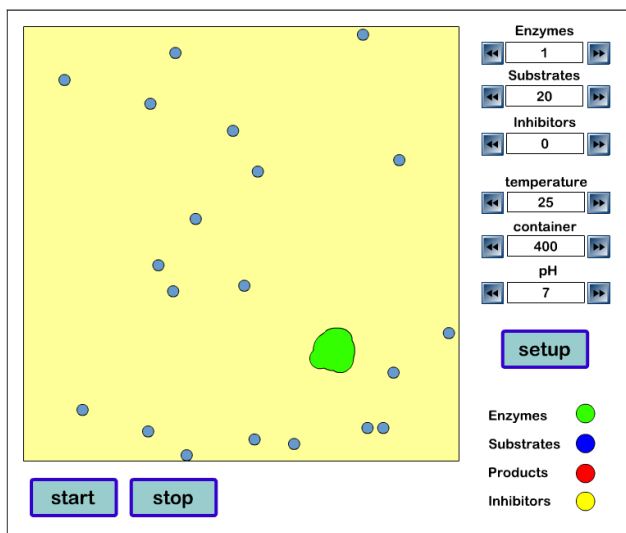
Del lado derecho se encuentran los botones con que se ajustan los parámetros de la simulación, el botón **setup**, para mostrarla y la leyenda con el código de colores empleados en la representación de **enzima**, **sustrato**, **producto** e **inhibidor**.

En el borde inferior están los botones **start** y **stop** que inician y detienen la simulación.

Haz *clic* en el botón **setup** para que puedas ver la simulación del sistema de reacción. La imagen será parecida a la de la figura inferior.



Utiliza los botones de control  y  para cambiar los valores de los parámetros de la simulación. Cada que cambies uno o más valores haz *clic* en **setup** y observa cómo cambia el sistema de reacción.



Ahora, devuelve todos los parámetros a sus valores originales (los que aparecen en la figura superior) y haz *clic* en el botón **start**; observa como los círculos azules, que representan sustratos, cambian a color rojo, de productos, cuando entran en contacto con la enzima. Como puedes ver el simulador es aleatorio, no todos los sustratos que entran en contacto con la enzima se transforman; es importante que identifiques correctamente el cambio porque de ello depende que los resultados de la simulación sean útiles.

Hoja 5

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Efecto de un Inhibidor Enzimático							
2	Sustrato	1	2	3	4	5	Promedio	Velocidad
3	10							
4	13							
5	17							
6	20							
7	50							
8	100							
9								

Al realizar cada uno de las simulaciones anota tus resultados en las celdas apropiadas de la hoja del factor correspondiente.

Efecto de la concentración de sustrato

- Ajusta los parámetros de la simulación a los valores siguientes:
Enzymes: 1; Substrates: 10; Inhibitors: 0; temperature: 5; container: 400; pH: 7.
- Al hacer clic en el botón **Start**, se inicia la simulación. Usando un cronómetro mide, con la mayor precisión posible, el tiempo, en segundos, desde que haces clic en el botón **Start** hasta que 5 moléculas de sustrato se conviertan en producto. Escribe tu resultado, en segundos, en la celda **B3** de la hoja del **Efecto de la Concentración de Sustrato**.
- Repite la simulación 4 veces más, en las mismas condiciones. Escribe tus resultados en las celdas **C3 a F3** de la misma hoja.
- Cambia el número de moléculas de sustrato a 13, corre la simulación 5 veces. Recuerda que debes medir el tiempo, en segundos, en que se transforman 5 moléculas de sustrato con la mayor precisión posible. Escribe los valores obtenidos en las celdas **B4 a F4** de la hoja de cálculo.
- Repite el ejercicio usando 17, 20, 50 y 100 moléculas. Escribe tus resultados en las celdas **B5 a F5, B6 a F6, B7 a F7 y B8 a F8** de la hoja de cálculo, respectivamente.

Efecto de la Temperatura

- Ajusta los parámetros de la simulación a los valores siguientes:
Enzymes: 1; Substrates: 20; Inhibitors: 0; temperature: 5; container: 400; pH: 7.
- Corre la simulación 5 veces con estas condiciones y escribe tus resultados en las celdas **B3 a F3** de la hoja de cálculo del **Efecto de la Temperatura**.
- Repite el experimento usando temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50 y 60. Escribe tus resultados en las celdas **B4 a F4, B5 a F5, B6 a F6, B7 a F7, B8 a F8 y B9 a F9** de la hoja de cálculo, respectivamente.

Efecto del pH

- Ajusta los parámetros de la simulación a los valores siguientes:
Enzymes: 1; Substrates: 20; Inhibitors: 0; temperature: 25; container: 400; pH: 1.
- Corre la simulación 5 veces con estas condiciones y escribe tus resultados en las celdas **B3 a F3** de la hoja de cálculo del **Efecto del pH**.
- Repite el experimento usando pH de 3, 5, 7 y 9. Escribe tus resultados en las celdas **B4 a F4, B5 a F5, B6 a F6 y B7 a F7** de la hoja de cálculo, respectivamente.

Efecto de la Concentración de Enzima

1. Ajusta los parámetros de la simulación a los valores siguientes:
Enzymes: 1; Substrates: 20; Inhibitors: 0; temperature: 25; container: 400; pH: 7.
2. Corre la simulación 5 veces con estas condiciones y escribe tus resultados en las celdas **B3 a F3** de la hoja de cálculo del **Efecto de la Concentración de Enzima**.
3. Repite el experimento usando 4, 7, 10 y 13 enzimas. Escribe tus resultado en las celdas **B4 a F4, B5 a F5, B6 a F6 y B7 a F7** de la hoja de cálculo, respectivamente.

Efecto de un Inhibidor enzimático

1. Ajusta los parámetros de la simulación a los valores siguientes:
Enzymes: 1; Substrates: 10; Inhibitors: 1; temperature: 25; container: 400; pH: 7.
2. Corre la simulación 5 veces con estas condiciones y escribe tus resultados en las celdas **B3 a F3** de la hoja de cálculo del **Efecto de un Inhibidor Enzimático**.
3. Repite el experimento usando 13, 17, 20, 50 y 100 moléculas de **Substrates**. Escribe tus resultado en las celdas **B4 a F4, B5 a F5, B6 a F6, B7 a F7 y B8 a F8** de la hoja de cálculo, respectivamente.

Cálculo de la velocidad de reacción

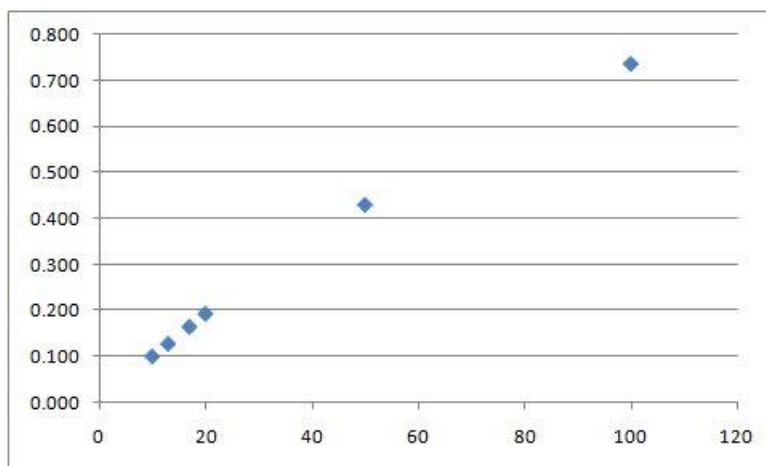
1. Regresa a la hoja de cálculo del **Efecto de la Concentración de Sustrato** y haz clic en la celda **G3**.
2. Escribe el comando **=PROMEDIO(B3:F3)** y presiona **Enter**. Obtendrás el valor promedio del tiempo de reacción.
3. Haz clic en la celda **H3** y escribe el comando **=5/G3**. El resultado es la velocidad promedio de la reacción simulada. Tus resultados pueden ser semejantes a los de la figura siguiente.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Efecto de la Concentración de Sustrato							
2	Sustrato	1	2	3	4	5	Promedio	Velocidad
3	10	50.2	48.8	49.8	51.2	47.5	49.5	0.1010101
4	13							

4. Copia las fórmulas de las celdas **G3** y **H3**, en las celdas **G** y **H** de los renglones **4 a 8**, para calcular la velocidad para cada concentración de sustrato.
5. Para calcular la velocidad de todos tus simulaciones sólo necesitas copiar las mismas fórmulas en las celdas **G** y **H** del resto de las hojas de cálculo.

Análisis del Efecto de la Concentración de Sustrato

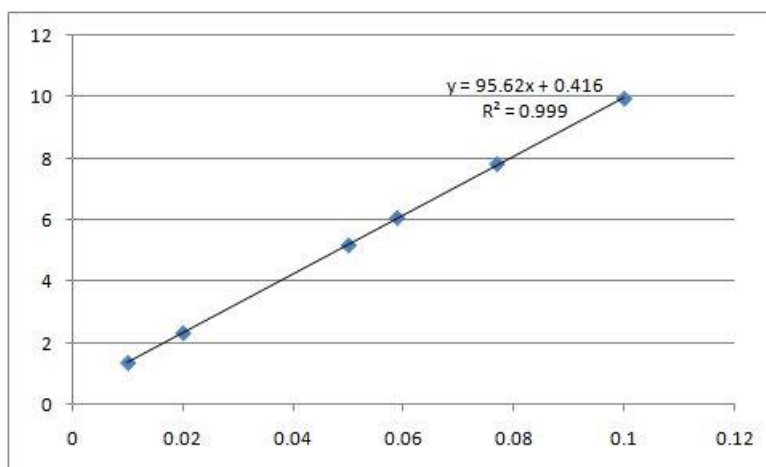
Calculo de K_M y V_{MAX} . Selecciona los bloques de celdas **A3 a A8** y **H3 a H8** que contienen los valores de concentración de sustrato y velocidad de reacción respectivamente. En la sección de *Gráficos* del menú *Insertar* selecciona *Dispersión sólo con marcadores*. Se inserta la grafica de dispersión de velocidad (y) en función de la concentración de sustrato (x).



La gráfica debería tener una forma más claramente hiperbólica que la de la figura, como la que se muestra en las notas del curso, pero estamos trabajando con un programa de simulación simple, que tiene un componente de azar y puede desviarse del comportamiento real.

Para calcular K_M y V_{MAX} hay que aplicar la ecuación de Lineweaver-Burk, para ello se deben transformar los datos calculando la inversa de la concentración (1/moléculas) y de velocidad (1/velocidad) y preparando una nueva tabla con los valores transformados. Para transformar los datos basta escribir en la primera celda de la nueva tabla la fórmula =1/Dirección del dato. Aplicándolo a la tabla de datos de la hoja de Efecto de la Concentración de Sustrato, las fórmulas sería =1/A3 y =1/H3, el resultado sería semejante al de la figura de la derecha. Copiando la fórmula a las celdas vecinas se obtiene la tabla de datos transformados. Utiliza estos datos para preparar la gráfica de la inversa de la velocidad (y) en función de la inversa de la concentración (x) como lo hiciste antes.

	1/sustrato	1/velocidad
10		
11	0.1	9.94
12	0.07692308	7.816
13	0.05882353	6.068
14	0.05	5.18
15	0.02	2.328
16	0.01	1.36



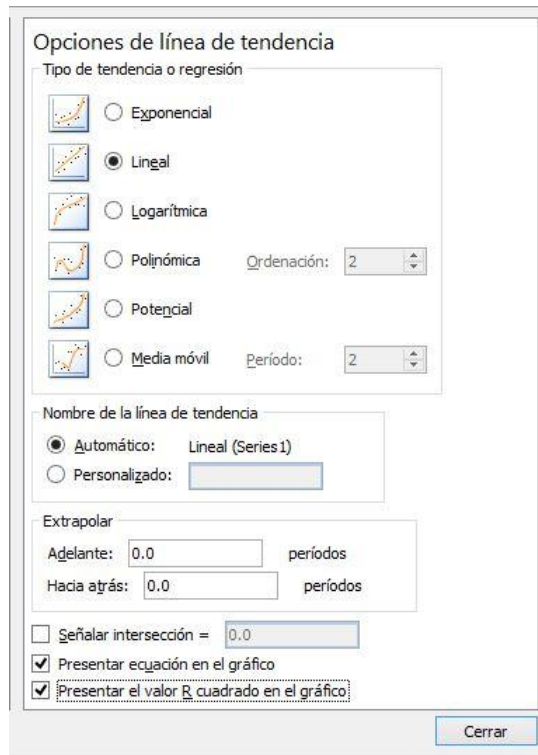
Según la ecuación de Lineweaver-Burk, la ordenada en el origen de la recta de regresión de estos datos, es la inversa de la velocidad máxima de la enzima y la pendiente es el cociente de la constante de Michaelis entre la velocidad máxima. Para obtener los parámetros de la línea de regresión, en la gráfica selecciona la serie de datos, haciendo clic sobre cualquiera de los puntos, en las *Herramientas de gráficos* selecciona la pestaña *Presentación* y en ella

la opción *Línea de tendencia*, al final del menú que se despliega, selecciona *Más opciones de línea de tendencia*.

Se abre un cuadro de opciones en el que debes seleccionar *Lineal* y marcar las casillas *Presentar ecuación en el gráfico* y *Presentar el valor R cuadrado en el gráfico*. cuando haces clic en *Cerrar*, en la gráfica se dibuja la línea de tendencia y se presentan los datos solicitados.

El coeficiente de x es la pendiente de la recta que equivale a K_M/V_{MAX} y el término independiente de la ecuación es la ordenada en el origen que es igual a $1/V_{MAX}$. R cuadrada es el coeficiente de determinación que representa la fracción de la variación entre los datos, que se explica por el modelo de relación empleado, en este caso lineal. Para los 6 punto que tenemos, un buen modelo debe tener una R cuadrada mayor a 0.811.

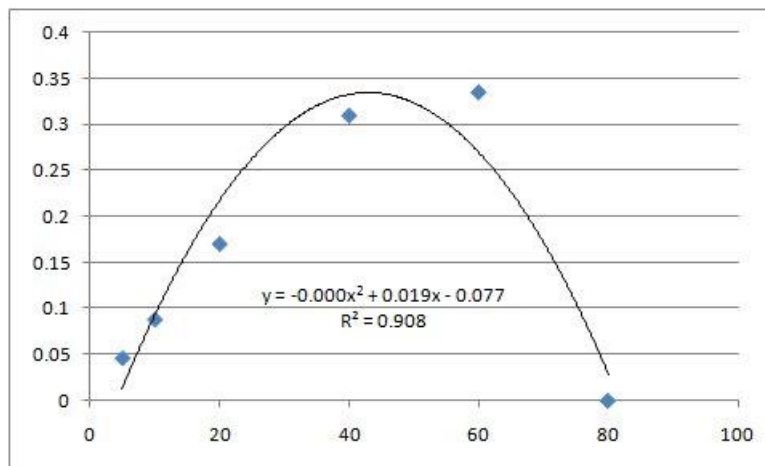
La velocidad máxima es la inversa del término independiente de la ecuación, en el ejemplo 0.416, y la V_{MAX} se obtiene dividiendo $1/0.416 = 2.404$. El valor obtenido representa el número máximo de moléculas que puede transformar la enzima en un segundo. Para calcular la velocidad máxima, el término independiente de la ecuación debe ser positivo, de otra manera el valor calculado no tiene sentido. Multiplicando la pendiente de la ecuación por la velocidad máxima calculada, se obtiene el valor de la constante de Michaelis, el ejemplo sería 95.62 por $2.404 = 229.86$. Como se explica en las notas del curso K_M es la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, que en la simulación representa el número de moléculas que se deben añadir para alcanzar una velocidad de 1.2, que corresponde a la mitad de la velocidad máxima.



Análisis del Efecto de la Temperatura

Cálculo de la Temperatura óptima. Usando el método que aprendiste para el efecto de la concentración de sustrato, prepara la gráfica de velocidad en función de la temperatura. En este ejercicio debes seleccionar los bloques **A3 a A9** y **H3 a H9** de la hoja del **Efecto de la Temperatura**.

En la gráfica, selecciona la serie de datos para añadir la línea de tendencia. En las *Herramientas de gráficos* selecciona la pestaña *Presentación* y en ella la opción *Línea de tendencia*, al final del menú que se despliega, selecciona *Más opciones de línea de tendencia*. Se abre el cuadro de opciones que ya conoces, en esta ocasión debes seleccionar *Polinómica* y asegurarte de que la *Ordenación* es 2. También asegúrate de marcar las casillas *Presentar ecuación en el gráfico* y *Presentar el valor R cuadrado en el gráfico*.

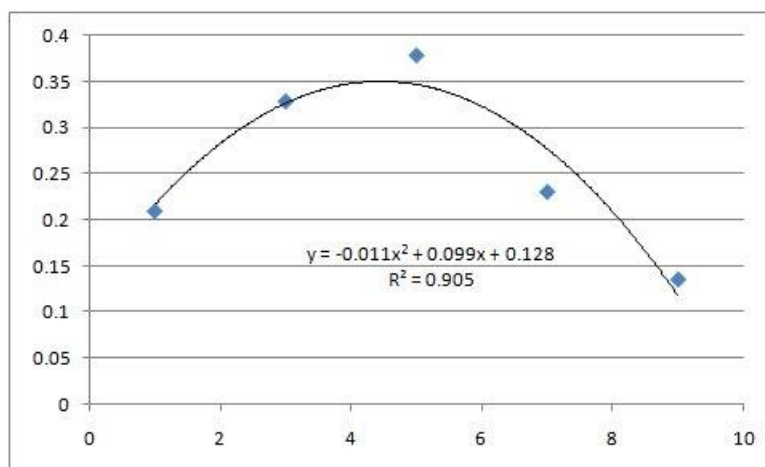


La Temperatura óptima se calcula dividiendo el coeficiente de x (0.019) con signo negativo, entre el doble del coeficiente de x cuadrada (-0.00022) en el ejemplo es $= -0.019/(2 \text{ por } -0.00022) = 43.2 \text{ °C}$.

Análisis del Efecto del pH

Cálculo del pH óptimo. Usando el método que aprendiste para el efecto de la concentración de sustrato, prepara la gráfica de velocidad en función del pH, usando los bloques de celdas **A3 a A7** y **H3 a H7**, de la hoja del Efecto del pH.

En la gráfica elaborada, selecciona la serie de datos para añadir la línea de tendencia. En las *Herramientas de gráficos* selecciona la pestaña *Presentación* y en ella la opción *Línea de tendencia*, al final del menú que se despliega, selecciona *Más opciones de línea de tendencia*. Se abre el cuadro de opciones que ya conoces, nuevamente debes seleccionar *Polinómica* y asegurarte de que la *Ordenación* es 2. También asegúrate de marcar las casillas *Presentar ecuación en el gráfico* y *Presentar el valor R cuadrado en el gráfico*.

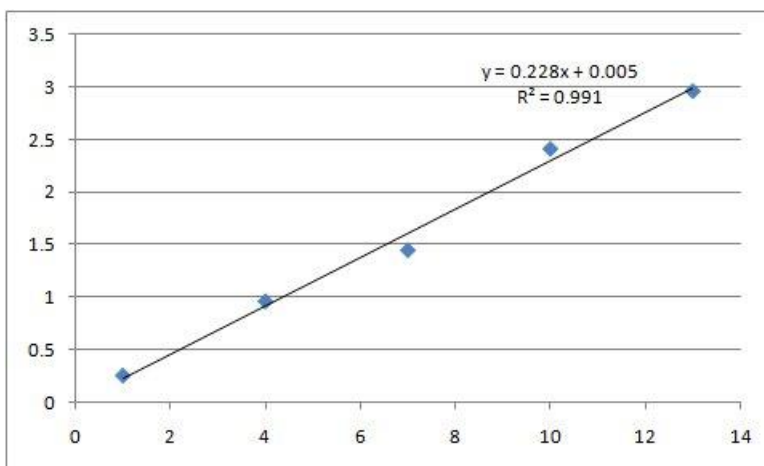


El pH óptimo se calcula dividiendo el coeficiente de x (0.099) con signo negativo, entre el doble del coeficiente de x cuadrada (-0.011) en el ejemplo es $= -0.099/(2 \text{ por } -0.011) = 4.5$.

Análisis del Efecto de la Concentración de Enzima

Cálculo de la constante catalítica. Usando el método que aprendiste para el efecto de la concentración de sustrato, prepara la gráfica de velocidad en función de [E] usando los datos de los bloques **A3** a **A7** y **H3** a **H7** de la Hoja de **Efecto de la Concentración de Enzima**.

En la gráfica elaborada, selecciona la serie de datos para añadir la línea de tendencia. En las *Herramientas de gráficos* selecciona la pestaña *Presentación* y en ella la opción *Línea de tendencia*, al final del menú que se despliega, selecciona *Más opciones de línea de tendencia*. Se abre el cuadro de opciones que ya conoces, en esta ocasión debes seleccionar *Lineal* y asegurarte de que las casillas *Presentar ecuación en el gráfico* y *Presentar el valor R cuadrado en el gráfico* estén marcadas.

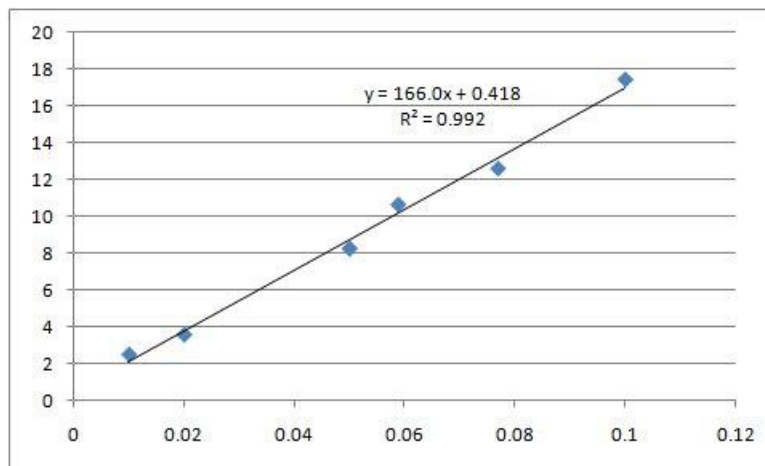


La relación es de primer orden y la constante catalítica de la enzima es la pendiente de la línea (el coeficiente de x). En el ejemplo la pendiente es igual a 0.228 con unidades de segundos⁻¹, y representa el número de moléculas de sustrato que puede transformar la enzima en un segundo. En una cinética real representaría el número de moles de sustrato que transforma un mol de enzima en un segundo.

Análisis del Efecto de un Inhibidor Enzimático

Determinación del tipo de inhibición. Para calcular los parámetros de la enzima en presencia de un inhibidor debes aplicar la transformación de Lineweaver-Burke, calculando las inversas de la concentración de sustrato y la velocidad, de los bloques de celdas **A3** a **A8** y **H3** a **H8** de la hoja del **Efecto de un Inhibidor Enzimático**, de la misma forma que hiciste en el análisis del efecto de la concentración de sustrato.

Usando el método que ya aprendiste, prepara la gráfica de inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de sustrato, en presencia del inhibidor. La gráfica elaborada debería ser aproximadamente una línea recta. Añade la línea de tendencia, la ecuación correspondiente y la R cuadrada.



La velocidad máxima es la inversa del término independiente de la ecuación, en el ejemplo 0.418, y la V_{MAX} se obtiene dividiendo $1/0.418 = 2.392$. El valor obtenido representa el número máximo de moléculas que puede transformar la enzima en un segundo. Multiplicando la pendiente de la ecuación por la velocidad máxima calculada se obtiene el valor de la constante de Michaelis, en el ejemplo son 166.0 por $2.392 = 397.13$.

Para determinar el tipo de inhibición, se debe compara los valores de K_M y V_{MAX} de la enzima con y sin inhibidor. Los valores calculados en este ejemplo para la enzima sin inhibidor son $V_{MAX} = 2.404$ y $K_M = 229.86$. Los valores de V_{MAX} calculados, son casi iguales en los dos casos. Por otra parte, el K_M de la enzima inhibida es mayor que el de la enzima libre. El aumento de K_M sin que cambie V_{MAX} son las características cinéticas de un inhibidor competitivo.

Cuando completes el ejercicio guarda tu libro de Excel. Envíalo al correo del curso en un mensaje que debe tener como asunto **Simulación**, antes de las 24:00 de la fecha indicada.