

Cinética de la fosfatasa alcalina

Francisco A. Ocaña

3 de febrero de 2012

Resumen

Este ejercicio ilustra el ajuste de los parámetros de un modelo de Michaelis–Menten a datos experimentales obtenidos en la cinética de una reacción química con la enzima fosfatasa alcalina. Todos los cálculos y representaciones gráficas aparecen en el fichero `fosfatasa.xls`.

1. Planteamiento

La enzima fosfatasa alcalina actúa como catalizador en reacciones enzimáticas de interés farmacéutico. Su interés radica en el hecho de que, por un lado, está presente en distintos órganos (riñón, hígado, intestino, hueso, etc.), siendo sus niveles plasmáticos muy informativos en el ámbito sanitario, y, por otro lado, se utiliza en el proceso de pasterización de la leche. El lector encontrará más detalles en el documento de los profesores Bárcena Ruiz *et al.*.

Bajo ciertas condiciones, la velocidad de una reacción enzimática suele ser modelada a través de la ecuación propuesta por Michaelis–Menten que, en nuestro caso, establece que

$$\frac{dP}{dt} = V_m \frac{S}{S + K_m}, \quad (1)$$

donde

- S es la concentración de sustrato p-nitrofenil-fosfato presente en el inicio,
- $P = P(t)$ es la concentración de producto p-nitrofenol formado, en el transcurso de la reacción, hasta el instante t y

- V_m y K_m , que se denominan velocidad máxima y constante de Michaelis–Menten, respectivamente, son los parámetros (positivos) de interés farmacocinético.

Para interpretar los parámetros V_m y K_m tan sólo es necesario considerar $\frac{dP}{dt}$ como función de S . Por un lado, obsérvese que, para cualquier concentración S , se cumple que $\frac{dP}{dt} < V_m$ y, además, $\lim_{S \rightarrow \infty} \frac{dP}{dt} = V_m$, es decir, V_m es el valor de la asíntota horizontal de $\frac{dP}{dt}$, considerándola como función de S . Nótese que, a pesar de la denominación de V_m , su valor no es nunca alcanzado. Por otro lado, K_m es la concentración de sustrato que cumple que $\frac{dP}{dt}(S = K_m) = V_m/2$.

Bárcena Ruiz *et al.* realizan el siguiente experimento. Consideran cinco tubos de ensayo variando en ellos la cantidad de sustrato, tal y como aparecen en el fichero `fosfatasa.xls`. Transcurridos 10 minutos, cuantifican la cantidad de producto p-nitrofenol obtenido en la reacción midiendo la absorbancia, que denotaremos con A , de la disolución. De esta forma, los datos obtenidos en el laboratorio vienen dados por $\{(S_i, A_i) : i = 1, \dots, 5\}$.

El objetivo que nos planteamos en este ejercicio es ilustrar cómo estimar los parámetros cinéticos V_m y K_m con la ayuda de una hoja de cálculo.

2. Cálculos

A grandes rasgos, la implementación de los cálculos que realizaremos se estructura como sigue. Comenzaremos por obtener valores aproximados de $\frac{dP}{dt}$ en cada uno de los cinco tubos de ensayo considerados. Una vez obtenidos, presentaremos dos procedimientos de estimación de los parámetros V_m y K_m , consistentes en linealizar la Ecuación (1), que son denominados diagramas de Lineweaver–Burk y de Eadie–Hofstee, respectivamente.

Para aproximar los valores de $\frac{dP}{dt}$ en cada uno de los cinco tubos de ensayo considerados en el experimento, obtendremos las concentraciones de producto formado en cada uno de ellos. En concreto, aplicamos la ley de Lambert–Beer para obtener la concentración de producto formado en la reacción enzimática al cabo de los 10 minutos, es decir,

$$P_{10} = \frac{A}{\varepsilon I},$$

siendo en este caso $I = 1 \text{ cm}$ y $\varepsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. De esta forma, podemos realizar la siguiente aproximación

$$\frac{dP}{dt} \approx \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_{10}}{10} \text{ (mM/min)},$$

pues en el inicio de la reacción no existía producto p-nitrofenol. De esta forma, obtenemos el conjunto de valores $\{(S_i, V_i) : i = 1, \dots, 5\}$, denotando con $V_i = (\Delta P/\Delta t)_i$, a partir de los cuáles obtendremos las estimaciones de los parámetros cinéticos V_m y K_m .

2.1. Diagrama de Lineweaver–Burk

Una forma de linealizar la Ecuación (1) consiste en transformarla como sigue:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + S}{V_m S} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m},$$

siendo $V = dP/dt$. Así, el modelo lineal ajustado de la forma $y = a + bx$, donde $x = 1/S$ e $y = 1/V$, proporcionaría como parámetros a $a = 1/V_m$ y $b = K_m/V_m$, obteniéndose que

$$\begin{aligned}\widehat{V}_m &= 1/\widehat{a} \\ \widehat{K}_m &= \widehat{b}/\widehat{a}\end{aligned}$$

2.2. Diagrama de Eadie–Hofstee

Otra forma de linealizar la Ecuación (1) consiste en transformarla como sigue:

$$\frac{V_m}{V} = \frac{K_m + S}{S} = \frac{K_m}{S} + 1,$$

siendo $V = dP/dt$. De lo anterior, se tiene que

$$V_m = K_m \frac{V}{S} + V$$

y, por tanto, que

$$V_m - K_m \frac{V}{S} = V,$$

Por tanto, el modelo lineal ajustado de la forma $y = a + bx$, con $y = V$ y $x = V/S$, proporcionaría como parámetros a $a = V_m$ y $b = -K_m$, obteniéndose que

$$\begin{aligned}\widehat{V}_m &= \widehat{a} \\ \widehat{K}_m &= -\widehat{b}.\end{aligned}$$

2.3. Representaciones gráficas de las funciones de Michaelis–Menten estimadas

Siguiendo la Ecuación (1) y utilizando las estimaciones proporcionadas con cualesquiera de los dos procedimientos considerados, podemos obtener la representación gráfica de la función estimada de la velocidad $V = dP/dt$ respecto a la cantidad de producto S . Además, estas representaciones gráficas pueden ser comparadas con los valores experimentales $\{(S_i, V_i) : i = 1, \dots, 5\}$.

En las hojas `GMichaelisMenten` y `GMichaelisMenten-2` aparecen las representaciones gráficas de las dos funciones de Michaelis–Menten estimadas, junto con los datos experimentales considerados. En la hoja `GMichaelisMenten-2` se obtienen las funciones de Michaelis–Menten considerando un amplio rango de valores de S , con la idea de visualizar mejor el comportamiento típico de dichas funciones.

Referencias

- [1] Bárcena Ruiz, J.A., García Alfonso, C., Padilla Peña, C.A., Martínez Galisteo, E., y Díez Dapena, J. *Caracterización Cinética de la fosfatasa*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.