

# Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática

José Manuel López Nicolás y Francisco García Carmona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Universidad de Murcia.

josemln@um.es, gcarmona@um.es

## INTRODUCCIÓN

Sin duda alguna una de las partes más importantes de la bioquímica es la enzimología, un área centrada en el estudio y caracterización de las enzimas, biomoléculas de naturaleza proteica o ribonucleica que catalizan reacciones químicas en los sistemas biológicos. Por su naturaleza la enzimología abarca un amplio espectro de estudio que va desde la implicación de las enzimas en el metabolismo hasta su estructura pasando por su cinética, su posible aplicación en la biotecnología, su variabilidad en la filogenia, los adyuvantes enzimáticos, los cofactores y las coenzimas, etc. Pero la cinética enzimática también está llena de curiosidades históricas que deben ser conocidas por todos los amantes de la bioquímica en particular y de la biología en general. En este artículo les contamos algunas de ellas que seguro que les sorprenderá.

## ¿MICHAELIS-MENTEN?

Dentro de las ecuaciones más recordadas por todos los alumnos que han cursado la asignatura de bioquímica se encuentra la de Michaelis-Menten, eje fundamental sobre el que gira la cinética enzimática y que describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Pero a pesar de que la ecuación de Michaelis-Menten de la que posteriormente les hablaremos es de sobra conocida para los alumnos que realizan la carrera de Biología, no lo es tanto el origen de su nombre.

$$V = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Figura 1. Ecuación de Michaelis-Menten.

Todos los años, justo antes de empezar la asignatura de enzimología, hacemos una pregunta trampa en clase: ¿Quién era Michaelis-Menten? Las respuestas suelen ser de todo tipo. A lo largo de los últimos cursos hemos escuchado que el responsable de la famosa ecuación enzimática es un Premio Nobel de Química, un microbiólogo alemán, un bioquímico

francés... pero poca gente en clase sabe que en realidad Michaelis-Menten no era una persona sino dos: Leonor Michaelis y Maud Leonora Menten.

En las siguientes líneas les vamos a hablar de los padres de la cinética enzimática pero antes debes tener ustedes claro que la época en la que se desarrolla esta historia, finales del siglo XIX y principios del siglo XX, no era nada propicia para que una mujer y un hombre de raza negra deslumbrasen al mundo con un modelo científico validado y usado actualmente por todos los bioquímicos.

Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Menten (1879-1960)



Figura 2. Leonor Michaelis (izquierda) y Maud Leonora Menten (derecha).

Maud Leonora Menten nació en Ontario (Canadá) en 1879. Se graduó en Artes en la Universidad de Toronto en 1904, y en Medicina en 1907. Cuatro años después, en 1911, se convirtió en una de las primeras mujeres de la historia, y la primera canadiense, en obtener un título de Doctorado. A pesar de estos brillantes comienzos, la investigación de aquella época era coto privado del género masculino y las mujeres no lo tenían nada fácil. Por esta razón, y para poder progresar en su carrera científica, Maud Menten se vio obligada a emigrar a EEUU como investigadora asociada en el Instituto Rockefeller y en la Western Reserve University. Posteriormente el espíritu investigador de Maud Menten la llevó a cruzar el charco desplazándose a la Universidad de Berlín donde prosiguió sus investigaciones sobre la acción catalítica de las enzimas. Y fue en la capital alemana, y en su famosa universidad, donde en 1912 Maud Menten conoció a uno de los más brillantes profesores de la Universidad de Berlín, Leonor Michaelis.

Michaelis no era ni mucho menos un principiante. De hecho, cuando conoció a Menten ya había ejercido como director del Laboratorio Bacteriológico del Hospital Berlins Charité. Leonor Michaelis, nacido en Berlín en 1875, se educó en Alemania y realizó sus primeras investigaciones en la Universidades de Berlín y de Friburgo. Trabajó en el Hospital Municipal de Berlín desde 1906 hasta 1922, fecha esta última en la que decidió marchar a Japón para trabajar como profesor de Bioquímica en la Escuela Médica de Nagoya. Cuatro años después se trasladó a Estados Unidos, primero a la Universidad John Hopkins y más tarde al Rockefeller Institute (precisamente uno de los primeros centros en los que desarrolló su investigación Maud Menten), donde permaneció hasta su jubilación en 1941.

Pues bien, de aquel encuentro en 1912 entre Leonor Michaelis y Maud Menten, y de su estrecha colaboración investigadora, nació la ecuación de Michaelis-Menten, una expresión matemática tan básica y fundamental en bioquímica que les proporcionó a ambos un reconocimiento internacional y que vamos a resumir en los siguientes párrafos.

La ecuación de Michaelis-Menten es capaz de describir el cambio sufrido por la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al variar la concentración del sustrato. La reacción que se establece entre la enzima y su sustrato va precedida de la formación de un complejo, hipótesis que no pudo comprobarse experimentalmente hasta cincuenta años después del establecimiento de la ecuación gracias a la aplicación de las técnicas espectroscópicas.

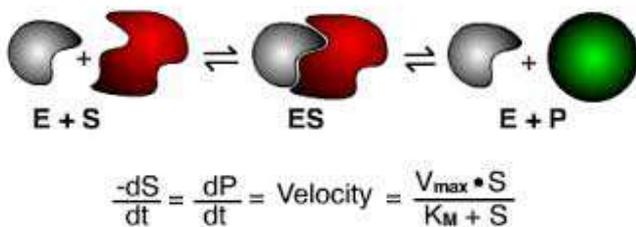
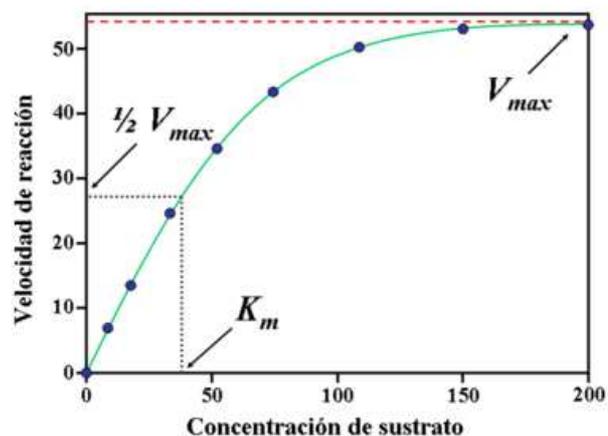


Figura 3. Interacción enzima-sustrato.

Michaelis determinó la denominada constante de Michaelis ( $K_m$ ) que establece la afinidad entre una enzima y su sustrato. Predijo y explicó la velocidad de reacción, es decir la cantidad de sustrato que reacciona con la enzima por unidad de tiempo, así como los factores que estimulan o inhiben dicha velocidad de reacción. Demostró que las sucesivas adiciones de sustrato al medio de la reacción provocan un abrupto incremento de la velocidad de reacción hasta un cierto punto en el que la enzima se satura y la adición posterior de sustrato ya no afecta a la velocidad; es el

momento en el que se alcanza la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ).

En la siguiente imagen observamos como la velocidad  $V$  que indica el número de moléculas del sustrato que se convierten en producto por segundo, responde a la variación de sustrato. Con concentraciones crecientes de sustrato  $[S]$ , la enzima va acercándose asintóticamente a su velocidad máxima  $V_{max}$ , pero nunca la alcanza. Por esta razón, no hay un valor de  $[S]$  determinado para la  $V_{max}$ . De todas formas, se puede definir un parámetro característico de la enzima empleando la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ( $V_{max}/2$ ), en este punto la  $[S]$  es igual a la  $K_m$ . Valores bajos de  $K_m$  indican que el complejo  $ES$  está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto.



Pero la trayectoria científica de Maud Menten no acabó en la ecuación de Michaelis-Menten...ni mucho menos. Ella no era una investigadora al uso. Su afán por investigar no le impedía cambiar de centro de trabajo, ni de país, ni lo que es aun más difícil, de línea de investigación...algo difícil de ver hoy en día donde estamos acostumbrados a no movernos de nuestra área de trabajo arriesgando lo menos posible nuestro currículum investigador. A pesar de que sus más conocidos estudios versan sobre la relación existente en los sistemas biológicos entre el sustrato y la enzima correspondiente que dieron origen al desarrollo de la famosa ecuación y a la determinación de métodos estándares que permitieron aislar y describir el comportamiento de las proteínas, esta investigadora canadiense no se amilanó a la hora de adentrarse en otros campos de la ciencia.

Menten continuó su brillante carrera como patóloga en la Universidad de Pittsburgh a partir de 1918, publicando prolíficamente en temas médicos y bioquímicos. Sus muchos logros incluyeron co-descubrimientos importantes referentes el azúcar de la sangre, la hemoglobina y a las funciones del

riñón. Incluso se atrevió con la microbiología alimentaria y en 1924, con Hellen Manning, descubrió los efectos hiperglucémicos de las toxinas de Salmonella. Además, publicó en 1944 el qué puede ser el primer uso de la electroforesis en la separación de las proteínas. Junto a Andersch y Wilson determinó los coeficientes de sedimentación y las movibilidades electroforéticas de la hemoglobina adulta y fetal, adelantándose al trabajo de Linus Pauling a quien se ha considerado pionero en ese campo. Otros estudios importantes realizados por Menten fueron la distribución que seguía el cloro y los cloruros en relación con las fibras y células nerviosas.

Sin embargo, y a pesar de todos sus logros científicos, Maud Menten no logró que se le concediese la plaza definitiva de profesora titular (antes era profesora numeraria) hasta 1949, cuando tenía la friolera de...¡¡¡69 años!! Este hecho demuestra dos cosas: el poco reconocimiento académico a las mujeres investigadoras de la época y, sobre todo, la tenacidad de esta científica canadiense por conseguir uno de sus objetivos prioritarios en la vida: ser profesora universitaria.



A pesar de que nuestra protagonista se jubiló como profesora en 1950, siguió investigando hasta que su salud se lo permitió. Durante un corto periodo de tiempo, entre 1951 y 1954, Maud Menten formó parte del Medical Institute of British Columbia donde condujo la investigación sobre el cáncer. Seis años antes de su muerte en 1960 se trasladó nuevamente a Ontario.

Pero por si todo lo relatado acerca de la intensa vida de Maud Menten les pareciese poco, no debemos olvidar que esta mujer desarrolló una gran capacidad y afición por los idiomas, la música, y las bellas artes, hasta el punto de realizar un significativo número de exposiciones de pintura con otros artistas de Pittsburgh.

Estamos seguros de que ustedes se han dado cuenta de que en esta historia hemos hecho mucha más incidencia en Maud Leonora Menten que en Leonor Michaelis. ¿Por qué? Porque estamos hablando de una mujer cuya carrera investigadora y docente no fue precisamente un paseo de rosas pero que, durante toda su vida nos dejó un legado mucho más allá de la cinética enzimática que le encumbró a la fama. Es posible que Maud Menten no tenga la fama de

otras investigadoras como Marie Curie, Rosalind Franklin, Jocelyn Bell Burnell, Lise Meitner, Dorothy Crowfoot Hodgkin, o muchas otras...pero a nuestro entender, y en contra de la mayoría de las listas que podemos encontrar en la red, se encuentra entre las 10 mejores científicas de la historia.

Maud Menten nos enseñó a lo largo de su carrera científica que la investigación no entiende de sexos, ni de países, ni de miedos por cambiar de tema de trabajo ni de líneas de investigación que sean propiedad de unos cuantos científicos...pero también mostró, al igual que otras

investigadoras, que aunque a veces nos obcequemos en ellos y creamos que son insalvables, el afán por investigar puede con los obstáculos más infranqueables. En nuestra modesta opinión creemos que seguir el ejemplo de Maud Menten en su forma de abordar la investigación nos debe servir de ejemplo a muchos, entre los cuales nos incluimos.



Pero el hecho de que Leonor Maud Menten fuese un ejemplo a seguir no le quita un ápice de importancia a la labor de Leonor Michaelis, un científico de

gran fama brillantemente reconocido en todo el mundo y cuyo discurrir por el mundo de la investigación y la docencia fue todo un éxito desde el inicio hasta el final de su carrera. Tenemos la manía de desmitificar a todos aquellos que, a pesar de haber obtenido resultados que han quedado para la historia, no han tenido las dificultades de otros. Y eso no es justo.

### ¿LINEWEAVER -BURK?

Leonor Michaelis y Maud Menten, ambos grandes científicos, fueron los padres de la cinética enzimática que tantos quebraderos de cabeza ha dado a los bioquímicos pero también enormes satisfacciones. ¿Quieren saber una de ellas? Ahí va: la famosa ecuación de Michaelis-Menten que es empleada a diario por miles de bioquímicos para el cálculo de constantes cinéticas de todo tipo dio lugar, de forma indirecta, a una joya literaria: uno de los artículos más referenciados de la historia de la ciencia. Veamos.

A la hora de llevar a la práctica la cinética de Michaelis-Menten la mayoría de los bioquímicos recurrimos al famoso

diagrama de Lineweaver-Burk que se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. Su utilidad se basa en que el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten ya que es fácilmente representable y de dicho diagrama emana mucha información de interés en el campo de la bioquímica.

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

Figura 6. Expresión de Lineweaver-Burk.

La representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar la  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $V_{\max}$  (velocidad máxima); el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a la inversa de  $V_{\max}$ , y el de abscisas es el valor de  $-1/K_m$  ... así de fácil. Es cierto que la representación de Lineweaver-Burk presenta algunos inconvenientes ya que, al requerir de dobles inversos, pequeños errores experimentales pueden conducir a grandes errores. Además, el hecho de que a altas concentraciones los puntos se aglutinen al principio de la gráfica puede dar lugar a cálculos erróneos. Sin embargo, si los experimentos se plantean correctamente desde el punto de vista metodológico, los resultados son totalmente fiables.

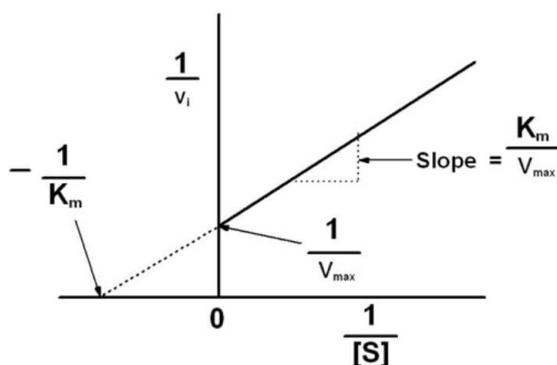


Figura 7. Representación gráfica de Lineweaver-Burk.

¿Y este planteamiento tan sencillo tuvo tanta repercusión en la comunidad bioquímica? Sí. Lo lógico sería pensar que lo que acabamos de contarles es tremendamente simple y realmente lo es, pero a pesar de que la representación del doble recíproco de una hipérbola cuadrangular era conocida por los matemáticos antes de que se publicara el trabajo de Lineweaver-Burk, su aplicación en el campo de la bioquímica era inédito. Sin embargo, desde la publicación del mismo, la doble inversa de Lineweaver-Burk se ha empleado continuamente en miles de trabajos bioquímicos lo que ha provocado que durante mucho tiempo

haya ocupado uno de los primeros puestos dentro de los artículos más referenciados de toda la historia de la ciencia.

¿Y dónde podemos encontrar este famoso artículo? Pues en contra de lo que puedan pensar no se publicó en Nature, ni en Science, ni en Cell, ni en ninguna de las "Top Ten" de las revistas científicas. Además, y como hemos comentado, el objeto del estudio no fue el cáncer, ni el SIDA, ni el Alzheimer, ni nada por el estilo. La revista donde está publicado uno de los trabajos más referenciados de la historia es de sobra conocida en el ámbito científico, Journal of the American Chemical Society, perteneciente a la American Chemical Society, y el tema de estudio nuestra querida cinética enzimática. La referencia completa es: "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". Journal of the American Chemical Society 56: pp.658-666. 1934.

¿Y quién fue Lineweaver-Burk? Pues volvemos al caso de Michaelis-Menten. Lineweaver-Burk, de la misma forma que ocurría con Michaelis-Menten, son dos personas y no una. Hans Lineweaver y Dean Burk... y al igual que nos decantamos por Maud Menten anteriormente ahora lo vamos a hacer por Hans Lineweaver. ¿Por qué? Porque este químico-físico norteamericano llegó a publicar el famoso artículo sobre el que hoy versa esta entrada siendo todavía un estudiante y porque este señor vivió ni más ni menos que ¡101 años!

Hans Lineweaver nació en Pickens (Virginia Oeste) el día de Navidad de 1907. Se licenció en Químicas en la Universidad George Washington en 1930 doctorándose en Química Física en la Universidad Johns Hopkins seis años más tarde. Pero aunque le dedicó gran tiempo de su carrera científica a la bioquímica en general y a la enzimología en particular, Hans Lineweaver destacó en muchos otros campos como la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. De hecho no solo fue el responsable del primer método de pasteurización de la clara de huevo aprobado por el gobierno americano sino que patentó un proceso para convertir las plumas de algunos animales en productos para alimentación.

Durante su carrera, Lineweaver fue el autor o co-autor de cerca de 100 publicaciones técnicas y seis patentes lo que le llevó a recibir decenas de premios y menciones, entre ellos el Premio Nicolás Appert, del Instituto de Tecnólogos de Alimentos (IFT) en 1973.

658

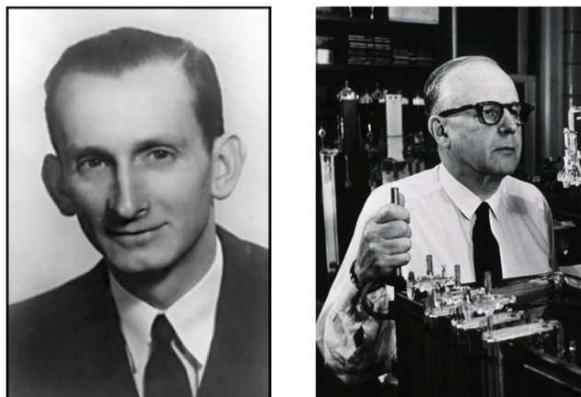
HANS LINEWEAVER AND DEAN BURK

Vol. 56

[CONTRIBUTION FROM THE FERTILIZER INVESTIGATIONS UNIT, BUREAU OF CHEMISTRY AND SOILS, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE]

The Determination of Enzyme Dissociation Constants

BY HANS LINEWEAVER AND DEAN BURK



**Figura 8.** Hans Lineweaver (izquierda) y Dean Burk (derecha).

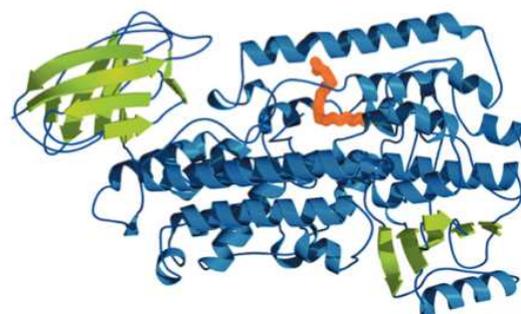
Aunque seamos fieles seguidores de Hans no le quitamos mérito a Dean Burk, el bioquímico americano co-descubridor de la biotina que dirigió el trabajo que les dio la fama a esta pareja que ha quedado unida para la eternidad...y decimos "dirigió" porque Burk fue el mentor de Lineweaver, el que lo acogió en el Departamento de Agricultura estadounidense cuando Hans era un simple alumno y lo catapultó a la fama.

Burk nació en Oakland (California) en 1904 e ingresó en la Universidad de California en Davis cuando solo tenía 15 años. Un año más tarde se trasladó a la Universidad de Berkeley donde se graduó en entomología en 1923 y, cuatro años después, se doctoró en bioquímica. Dean Burk, al igual que Maud Menten, se adentró con éxito en varias disciplinas científicas. En 1929 se unió al Departamento de Agricultura estadounidense donde trabajó en la línea de fijación del nitrógeno y en 1939 ingresó en el Instituto de Cáncer llegando a dirigir el laboratorio de citología hasta que se retiró en 1974 y fue uno de los más prestigiosos investigadores en la lucha contra el cáncer. Además, esta "fuerza de la naturaleza" como le denominaban algunos, también desarrolló el primer prototipo de las actuales resonancias magnéticas y por su trabajo en la fotosíntesis recibió el Premio Hillebrand en 1952. Un genio que falleció en Washington en 1988.

Estimados lectores, si han llegado hasta aquí habrán descubierto quienes son para nosotros los 4 mosqueteros de la cinética enzimática: Leonor Michaelis, Maud Leonora Menten, Hans Lineweaver y Dean Burk. Gracias a su trabajo de hace muchos años los bioquímicos de hoy en día disponemos de herramientas de gran valor para conocer cómo funcionan muchas enzimas.

Habíamos pensado convertir los 4 mosqueteros en el tridente mágico. ¿Cómo? Incluyendo en este artículo a los responsables del "Diagrama de Eadie-Hofstee". Este diagrama permite visualizar rápidamente los parámetros cinéticos

importantes como  $K_m$  y  $V_{max}$  de la ecuación de Michaelis-Menten pero que está menos afectado por el margen de error que el diagrama de Lineweaver-Burk ya que asigna el mismo peso a todos los puntos para cualquier concentración del sustrato o velocidad de reacción.



**Figura 9.** Los cuatro mosqueteros sobre la enzima 15- lipoxigenasa humana de reticulocito.

Sin embargo, y a pesar de que cómo ya se imaginarán G.S. Eadie y B.H.J. Hofstee eran dos personas y no una, preferimos quedarnos con los 4 mosqueteros y que de los dos señores responsables del "Diagrama de Eadie-Hofstee" alguien escriba en el siguiente centenario de la Universidad de Murcia no sea que ustedes se inhiban por exceso de producto, se agoten por acumulación de sustrato o se inactiven por suicidio enzimático...

## REFERENCIAS

- Leonor Michaelis. 1875-1949 (PDF; 2,4MB). A Biographical Memoir by L. Michaelis, D. A. MacInnes, S. Granick J., National Academy of Sciences.
- "Dr. Maud Menten". The Canadian Medical Hall of Fame. Retrieved 14 October 2014.
- Associated Press. (1988). Dean Burk, 84, Chemist for Cancer Institute. New York Times.
- Lineweaver, H y Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3): 658-666.
- Haldane, J.B.S (1957). "Graphical methods in enzyme chemistry". *Nature*, 179: 832. <http://www.mcnbiografias.com/>