

ENZIMOLOGIA, Tercer Curs de Biologia

Objectius de l'assignatura:

Proporcionar amplis coneixements de cinètica enzimàtica. Estudiar les característiques del centre actiu, els principals mecanismes de catàlisi enzimàtica i les metodologies utilitzades. Donar les bases del paper dels enzims en la regulació metabòlica. Principals aplicacions pràctiques dels enzims.

Problemes

Es realitzaran problemes de la majoria dels temes del programa

Pràctiques

- Efecte de la concentració d'enzim sobre l'activitat enzimàtica.
- Cinètica enzimàtica de la lactat deshidrogenasa. Inhibició per excés de substrat.
- Inhibició de la lactat deshidrogenasa per àcid oxàlic i àcid oxàmic. Determinació del mecanisme d'inhibició.
- Determinació del pes molecular i de la puresa de la quimotripsina a partir de la cinètica enzimàtica de "burst".

Avaluació

- Examen de teoria
- Examen de problemes
- Avaluació del treball al laboratori durant les pràctiques i de la memòria corresponent

2º CICLE DE BIOLOGIA

PROGRAMA D'ENZIMOLOGIA

Prof. Dr. Xavier Parés

1. Enzims. Concepte. Introducció històrica. Propietats generals. Proteïnes. Ribozims. Catalitzadors eficients. Especificitat. Complexe enzim-substrat. Disminució de l'energia d'activació. Regulació. Cofactors.
2. Clasificació i nomenclatura dels enzims. Normes de la Comissió Internacional d'Enzims. Nomenclatura i classificació de les sis classes principals d'enzims. Altres característiques necessàries per a determinar un enzim.
3. Cinètica de la reacció enzimàtica. Concepte. Mesura de l'activitat enzimàtica. Velocitat inicial. Unitats d'activitat enzimàtica. Efecte de la concentració d'enzim.
4. Cinètica enzimàtica. Efecte de la concentració de substrat. Ordre de reacció. Ordre de la reacció enzimàtica. Equació de Michaelis-Menten. Modificació de l'equació de Michaelis-Menten per Briggs-Haldane. Significat de l'equació de Michaelis-Menten. Reaccions amb més d'un intermediari enzim-substrat. Significat de k_{cat} . Significat de K_m i K_s . Significat de la constant d'especificitat: k_{cat}/K_m . Reversibilitat de la reacció enzimàtica: equació de Haldane. Determinació de K_m i V_{max} : mètodes de Lineweaver-Burk i d'Eadie-Hofstee. Altres mètodes.
5. Cinètica enzimàtica. Inhibició de la catàlisi enzimàtica. Tipus d'inhibidors. Inhibició reversible. Inhibició competitiva. Anàlisi gràfica. Representació de Dixon. Inhibició no competitiva. Inhibició acompetitiva. Inhibició mixta. Inhibició per excés de substrat. Inhibició irreversible.
6. Cinètica enzimàtica. Reaccions amb més d'un substrat. Reaccions amb dos substrats. Mecanisme seqüencial ordenat. Mecanisme seqüencial estadístic. Mecanisme de doble desplaçament (ping-pong). Mecanisme de Theorell-Chance. Tractament matemàtic i anàlisi gràfica. Estudi del

mecanisme de la reacció utilitzant inhibidors. Estudi del mecanisme per intercanvi isotòpic.

7. Cinètica enzimàtica. Cinètica de l'estadi pre-estacionari. Mètodes de mescla ràpida. Mètodes de relaxació. "Bursts" i "lags". Tractament matemàtic. Significat de les constants de velocitat. Significat de k_1 . La k_1 com a limit de k_{cat}/K_m . Significat de k_{-1} .
8. Cinètica enzimàtica. Acció de la temperatura sobre la cinètica enzimàtica. Efectes del pH sobre la cinètica enzimàtica. Ionització de residus essencials. Influència del pH sobre els paràmetres cinètics. Evaluació de les constants d'ionització. Identificació del grups ionitzables implicats en els processos d'unió i catàlisi.
9. Cinètica enzimàtica. Unió de lligands a proteïnes. Concepte de cooperativitat. Anàlisi de la cooperativitat. Equació de Hill. Unió de l'oxigen a l'hemoglobina.
10. Cinètica enzimàtica. Model de Monod, Wyman i Changeux. Explicació dels efectes cooperatius homotròpics pel model MWC. Enzims al·lostèrics. Model de Koshland, Nemethy i Filmer. Determinació del model de cooperativitat que segueix un determinat enzim. Exemple d'enzim amb regulació al·lostèrica: aspartat transcarbamilasa. Cinètica sigmoïdal en absència de cooperativitat.
11. Especificitat enzimàtica. El centre actiu, especificitat i estructura tridimensional. Definició de centre actiu. Característiques del centre actiu. Teories sobre l'acoblament entre l'enzim i el substrat. Teoria de Fisher (pany i clau). Teoria de Koshland ("induced fit" o acoblament induït). Hipòtesis que impliquen tensió o estabilització de l'estat de transició.
12. El centre actiu. Identificació dels centres d'unió i de catàlisi. Aïllament del complex ES. Utilització d'anàlegs del substrat. Modificació química amb inhibidors irreversibles. Marcadors per afinitat ("affinity labels"). Substrats suïcides. Marcadors per fotoafinitat. Principals aminoàcids implicats en el centre actiu i detectables per modificació química. Mutagènesi dirigida. Modificació enzimàtica per tractament amb enzims proteolítics. Investigació de l'estructura tridimensional del centre actiu: raigs X, RMN, anticossos monoclonals. Invariabilitat evolutiva de residus d'aminoàcids.
13. Mecanisme de la catàlisi. Catàlisi àcido-bàsica. Catàlisi amb ions metàl·lics. Catàlisi covalent. Efectes de proximitat i orientació. Canvis en l'entorn. Aspectes energètics de la catàlisi enzimàtica. Exemple de mecanisme enzimàtic: la carboxipeptidasa A.

14. Regulació de l'activitat enzimàtica. Modificació de la concentració d'enzim. Modificació de les propietats catalítiques: Variació de la velocitat en funció de la concentració de substrat. Isoenzims. Activació per precursor i retroinhibició. Control unit a l'energia. Control hormonal. Complexos multienzimàtics. Compartimentació. Sistemes lligats a membranes. Enzims multifuncionals. Polimerització-despolimerització. Unió d'altres proteïnes. Modificació covalent irreversible. Modificació covalent reversible.
15. Enzims en bioquímica clínica. Enzims plasmàtics. Enzims i errors congènits del metabolisme. Enzims com a reactius en bioquímica clínica.
16. Aplicacions biotecnològiques dels enzims. Enzims com a reactius analítics. Producció en gran escala d'enzims. Enzims immobilitzats: preparació, propietats i aplicacions. Utilització d'enzims en diferents tipus d'indústries.

BIBLIOGRAFIA

Obres específiques:

- BOYER, P.D. (ed.) "The Enzymes" (sèrie de múltiples volums). 3^a edició. A partir de 1970. Academic Press. New York.
- BOYER, P.D. (ed.) "The Enzymes". Vol I i II. Student Edition. 1971 Academic Press. New York.
- CORNISH- BOWDEN, A. "Principles of enzyme kinetics". 1979. Butterworths. London.
- CORNISH- BOWDEN, A. "Fundamentals of enzyme kinetics". 1979. Butterworths. London.
- CORNISH-BOWDEN, A., WHARTON, C.W. "Enzyme Kinetics". 1988. IRL Press. Oxford.
- DIXON, M., WEBB, E.C., THORNE, C.J.R., TIPTON, K.F. "Enzymes". 1979. 3^a edició. Academic Press. New York.
- ENGEL, P.C. "Enzyme Kinetics". 1981. 2^a edició. Chapman and Hall. London.

- FERSHT, A., "Enzyme Structure and Mechanism". 1985. 2ª edició. W.H. Freeman. Versió castellana: "Estructura y Mecanismo de los Enzimas". 1980. Reverté. Barcelona. Correspon a la primera edició anglesa de 1977.
- PALMER, T. "Understanding Enzymes". 1985. 2ª edició. Ellis Horwood. Chichester.
- SEGEL, I.H. "Enzyme Kinetics". 1975. Wiley. New York.
- PRICE, N.C., STEVENS, L. "Fundamentals of Enzymology". 1989. 2ª edició. Oxford University Press. Oxford.
- DRESSLER, D., POTTER, H. "Discovering Enzymes". 1991. Scientific American Library - Freeman. New York.
- MARTIN B.R. "Metabolic Regulation. A Molecular Approach". 1987. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- NEWSHOLME, E. A., START, C. "Regulation in Metabolism". 1973. J. Wiley & Sons. Chichester.
- HAWCROFT, D. "Diagnostic Enzymology". 1987. J. Wiley & Sons. Chichester. U.K.
- TIETZ, N.W. (ed) "Textbook of Clinical Chemistry". 1986. Saunders. Philadelphia.

Obres Generals

- DEVLIN, T.M. (ed.) "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations". 1992. 3ª edició. Wiley. Chichester, UK.
Edició castellana de 1988. 2ª edició. Vol. I y II. Reverté. Barcelona.
- MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K. E. "Biochemistry". 1990. Benjamin/Cummings Publishing Co. Redwood City, CA.
- RAWN, J.D. "Bioquímica". 1989. Vol. I y II. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid.
- STRYER, L. "Bioquímica". 1988. 3ª edició. Ed. Reverté. Barcelona.
- VOET, J.G., VOET, D. "Bioquímica". 1992. Omega. Barcelona.