

PROGRAMA D'ENZIMOLOGIA

Febrer, 1998

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. Estat de transició. Regulació. Cofactors.
2. Classificació 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. Hipòtesi de l'equilibri ràpid: equació de Michaelis-Menten. Hipòtesi de l'estat estacionari: cinètica de Briggs-Haldane. Significat de  $k_{cat}$ . Significat de l'equació de Michaelis-Menten. Reaccions amb més d'un intermediari enzim-substrat. Cinètica amb dos intermediaris. Significat de  $K_m$  i  $K_s$ . Significat de la constant d'especificitat:  $k_{cat}/K_m$ . Reaccions enzimàtiques reversibles e irreversibles. L'equació de Haldane per les reaccions enzimàtiques reversibles. Determinació gràfica de  $K_m$  i  $V_{max}$ : mètodes de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes, i Eisental i Cornish-Bowden. Procesament informàtic de les dades. Comparació entre els diferents mètodes
5. Cinètica enzimàtica. Inhibició de la catàlisi enzimàtica. Tipus d'inhibidors. Inhibició reversible. Inhibició competitiva. Anàlisi gràfica. Representació de Dixon. Aplicacions de la inhibició competitiva. Inhibició no competitiva. Inhibició acompetitiva. Inhibició mixta. Inhibició per excés de substrat. Inhibició irreversible i aplicacions. Activació enzimàtica.
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'estat pre-estacionari. Mètodes de mescla ràpida. Mètodes de relaxació. Tractament matemàtic. "Bursts" i "lags". Significat de les constants de velocitat. Significat de  $k_1$ . La  $k_1$  com a límit de  $k_{cat}/K_m$ . Significat de  $k_{-1}$ .
8. Cinètica enzimàtica. Acció de la temperatura sobre la cinètica enzimàtica. Representació d'Arrhenius. Efectes del pH sobre la cinètica enzimàtica. Variació de la posició d'equilibri de la reacció. Inestabilitat a pHs extrems. Ionització del sustrat. 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. Efectes del microentorn sobre el pK.
9. Cinètica enzimàtica. Unió de lligands a proteïnes. Concepte i tipus de cooperativitat. Anàlisi de la cooperativitat. Equació de Hill. Model d'Adair. Unió de l'oxigen a l'hemoglobina.



10. Cinètica enzimàtica. Models de cooperativitat. Model de Monod, Wyman i Changeux. Explicació dels efectes cooperatius homotròpics pel model MWC. Enzims alostèrics. Sistemes K i sistemes V. Model de Koshland, Nemethy i Filmer. Determinació del model de cooperativitat que segueix un determinat enzim. Exemple d'enzim amb regulació alostèrica: aspartat carbamil transferasa. Cinètica sigmoidal 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). La hexoquinasa com a exemple d'acoblament induït. Hipòtesi que impliquen tensió o estabilització de l'estat de transició. Dades que recolzen la teoria de l'estat de transició. Anàlegs de l'estat de transició. Anticossos catalítics.
12. El centre actiu. Identificació dels centres d'unió i de catàlisi. Aïllament del complexe ES. Utilització de substrats artificials. Modificació química amb inhibidors irreversibles específics. Marcadors per afinitat ("affinity labels"). Inhibidors suïcides, exemples amb interès farmacològic. Marcadors per fotoafinitat. Marcatge amb reactius específics d'aminoàcids. 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 de proteïnes: raigs X, RMN, anticossos monoclonals. Invariabilitat evolutiva de residus d'aminoàcids. L'alcohol deshidrogenasa.
13. Mecanisme de la catàlisi. Introducció als mecanismes de l'acció enzimàtica. Catàlisi àcido-bàsica. La ribonucleasa A. Catàlisi covalent. Catàlisi amb ions metàl·lics. Efectes de proximitat i orientació. Canvis en l'entorn: catàlisi electrostàtica. La superòxid dismutasa. Energètica de la catàlisi enzimàtica. Valors òptims de la Km. La triosa fosfat isomerasa com enzim energèticament eficient. Exemple de mecanisme enzimàtic: la carboxipeptidasa A.
14. Regulació de l'activitat enzimàtica. Modificació de la concentració d'enzim. Regulació de la síntesi i degradació dels enzims. Mecanismes de degradació. Variació de la velocitat enzimàtica en funció de la concentració de substrat, producte i cofactors. Activació per precursor i retroinhibició. Control unit a l'energia. Control hormonal. Complexos multienzimàtics. Sistemes lligats a membranes. Enzims multifuncionals. Polimerització-despolimerització. Unió a altres proteïnes. Modificació covalent irreversible. Modificació covalent reversible. Regulació de les vies metabòliques.
15. Isoenzims. Concepte. Mètodes d'identificació i estudi. Orígen dels isoenzims. Diferències en propietats entre isoenzims. Distribució del isoenzims entre els teixits. Significat fisiològic dels isoenzims. Variació del isoenzims durant el desenvolupament. Isoenzims i enfermetat. Isoenzims i evolució enzimàtica.
16. Enzims en bioquímica clínica. Enzims plasmàtics. Orígen dels enzims plasmàtics. Factors que afecten els nivells dels enzims plasmàtics. Selecció dels anàlisi enzimàtics. Aminotransferases. Creatina quinasa. Lactat deshidrogenasa. Anàlisis enzimàtiques en la determinació de l'infart de miocardi. Enzims i errors congènits del metabolisme. Enzims com a reactius en bioquímica clínica.
17. Aplicacions biotecnològiques dels enzims. Producció en gran escala d'enzims. Enzims immobilitzats: preparació, propietats i aplicacions. Utilització d'enzims en diferents tipus d'indústries. Anàlisis enzimàtics d'interès industrial. Biosensors. Enginyeria d'enzims.

## BIBLIOGRAFIA

### Obres específiques:

- BELL, J.E., BELL, E.T. "Proteins and Enzymes". 1988. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- BOYER, P.D. (ed.) "The Enzymes" (sèrie de múltiples volums). 3<sup>a</sup> edició. A partir de 1970. Academic Press. New York.
- CHAPLIN, M.F., BUCKE, C. "Enzyme Technology". 1990. Cambridge University Press.
- CORNISH-BOWDEN, A. "Principles of enzyme kinetics". 1976. Butterworths. London.
- CORNISH-BOWDEN, A. "Fundamentals of enzyme kinetics". 1995. Portland Press. 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<sup>a</sup> edició. Academic Press. New York.
- DRESSLER, D., POTTER, H. "Discovering Enzymes". 1991. Scientific American Library Freeman. New York.
- ENGEL, P.C. "Enzyme Kinetics". 1981. 2<sup>a</sup> edició. Chapman and Hall. London.
- ENGEL, P.C. (ed.) "Enzymology Labfax". 1996. Academic Press, San Diego, CA.
- FERSHT, A., "Enzyme Structure and Mechanism". 1985. 2<sup>a</sup> edició. W.H. Freeman. Versió castellana: "Estructura y Mecanismo de los Enzimas". 1980. Reverté. Barcelona. Correspon a la primera edició anglesa de 1977.
- Gutfreund, H. "Kinetics for the Life Sciences". 1995. Cambridge University Press.
- HAWCROFT, D. "Diagnostic Enzymology". 1987. J. Wiley & Sons. Chichester. U.K.
- KYTE, J. "Mechanism in Protein Chemistry". 1995. Garland. 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.
- PALMER, T. "Understanding Enzymes". 1985. 2<sup>a</sup> edició. Ellis Horwood. Chichester.
- PELMONT, J. "Enzymes". 1993. 12a edició. Presses Universitaires de Grenoble.
- PRICE, N.C., STEVENS, L. "Fundamentals of Enzymology". 1989. 2<sup>a</sup> edició. Oxford University Press. Oxford.
- PRICE, N.C. (ed.) "Proteins Labfax". 1996. Academic Press, San Diego, CA.
- SCHULZ, A.R. "Enzyme kinetics. From Diastase to Multi-enzyme Systems". 1994. Cambridge University Press. Cambridge.
- SEGEL, I.H. "Enzyme Kinetics". 1975. Wiley. New York.



- TEAL, A.R., WYMER, P.E.O. "Enzymes and Their Role in Biotechnology". 1985. The Biochemical Society, London.
- TIETZ, N.W. (ed) "Textbook of Clinical Chemistry". 1986. Saunders. Philadelphia.
- VIRATELLE, O. "Protéines et Enzymes". 1993. Hermann, París.

### 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.
- HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.D., SCRIMGEOUR, K.G. "Principles of Biochemistry". 1993. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA.
- GARRET, R.H., GRISHAM, C.M. "Biochemistry". Saunders, Fort Worth.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. "Principios de Bioquímica". 1993. 2ª edició. Omega, Barcelona.
- MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K. E. "Biochemistry". 1990. Benjamin/Cummings Publishing Co. Redwood City, CA.
- MORAN, L.A., SCRIMGEOUR, K.G, HORTON, H.R., OCHS, R.S., RAWN, J.D. . "Biochemistry". 1993. 2ª edició Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA.
- RAWN, J.D. "Bioquímica". 1989. Vol. I y II. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid.
- STRYER, L. "Bioquímica". 1995. 4ª edició. Ed. Reverté. Barcelona.
- VOET, J.G., VOET, D. "Biochemistry".1995. Wiley. New York.  
Edició en castellà: "Bioquímica". 1992. Omega. Barcelona.
- ZUBAY, G. "Biochemistry".1993, 3ª edició, Brown, Dubuque, Iowa.