

PROGRAMA D'ENZIMOLOGIA 2004-2005

1. Enzims. Concepte. Història. Significació biològica, química i pràctica. Definicions. Classificació i nomenclatura. Normes de la Comissió Internacional d'Enzims.

2. Cinètica de la reacció enzimàtica. Velocitat inicial: concepte, determinació, representació. Anomalies. Efecte de la concentració de substrat: Cinètica hiperbòlica. Reaccions amb un substrat. Efecte de la concentració de substrat: equació de Michaelis-Menten. Estat pre-estacionari i estat estacionari: conceptes. Equació de Michaelis segons l'estat estacionari. Determinació de la K_m i de la V_{max} . Mètodes de Lineweaver-Burk i d'Eadie-Hofstee. Altres mètodes. Integració de l'equació de Michaelis-Menten. Significat dels paràmetres cinètics. Efecte de la concentració d'enzim.

3. Cinètica enzimàtica. Reaccions reversibles i irreversibles: tractament a l'estat estacionari; relació de Briggs-Haldane. Inhibició per excés de substrat. Reaccions enzimàtiques amb més d'un complex intermedi enzim-substrat: tractament a l'estat estacionari. Compostos químics intermedis enzim-substrat: cas de l'acil-enzim. Cinètica a altes concentracions d'enzim: diferents aproximacions matemàtiques.

4. Cinètica enzimàtica. k_{cat}/K_m : concepte; utilitat a baixes concentracions de substrat. Complexos abortius: fixació no productiva. Discriminació entre substrats competitiu. Relació amb la constant d'equilibri de la reacció.

5. Cinètica enzimàtica. Inhibició de la catàlisi enzimàtica: tipus d'inhibidors. Inhibidors reversibles: inhibició competitiva i no competitiva; inhibició incompetitiva i mixta. Model general. Anàlisi gràfica dels diferents tipus d'inhibició. Determinació de la constant d'inhibició K_i . Inhibidors irreversibles.

6. Cinètica enzimàtica. Reaccions amb més d'un substrat: notació de Cleland. Mecanisme de doble desplaçament (ping-pong); mecanisme seqüencial ordenat; mecanisme seqüencial estadístic; mecanisme de Theorell-Chance. Tractament matemàtic i anàlisi gràfica. Mètodes per a la determinació del tipus de mecanisme.

7. Cinètica enzimàtica. Cinètica dels estats efímers o fugaços (transients). Mètodes de mescla: flux continu (continuous flow), flux detingut (stopped-flow), extinció (quenched-flow). Mètodes de relaxació: salt de temperatura (T-jump), salt de pressió (P-jump). Descripció, conceptes i tractament matemàtic. "Bursts": determinació de la concentració d'enzim. Determinació de k_1 . Magnitud de les constants de velocitat.

8. Cinètica enzimàtica. Efecte del pH sobre la reacció enzimàtica. Tractament cinètic a l'estat estacionari. Funcions del pH de Michaelis. Grups ionitzables. Determinació del pK dels grups ionitzables que intervenen en la fixació del substrat i en el procés catalític. Efecte de la temperatura. Crioenzimologia.

9. El centre actiu dels enzims. Definició i descripció. Identificació dels aminoàcids constituents del centre actiu. a) Mètodes que utilitzen la modificació química: 1) Marcatge amb

una part del substrat. 2) Marcatge amb substrats suïcides. 3) Marcatge amb quasi (o pseudo) substrats. 4) Marcatge per afinitat. 5) Marcatge amb una quantitat limitada de reactiu específic d'aminoàcids. 6) Marcatge en presència d'una substància protectora del seti actiu. 7) Marcatge mitjançant co-catalitzadors. b) Mètodes físico-químics: 1) Estudis en funció del pH. 2) Ressonància magnètica nuclear. 3) Cristal·lografia de raigs X. 4) Espectroscòpia Raman. 5) Difracció de neutrons. c) Altres mètodes: 1) Mutació dirigida. 2) Comparació de seqüències. 3) Mètodes de predicció.

10. El centre actiu dels enzims. Especificitat i estructura tridimensional del centre actiu. Forces que mantenen la configuració estèrica de l'enzim. Energies de fixació. Flexibilitat de la proteïna completa. Flexibilitat del centre actiu. Teories sobre l'acoblament entre enzim i substrat: teories de Fischer (pany i clau); de Koshland (acoblament induït o "induced fit") i de Haldane (tensió). Complemetaritat entre enzim i estat de transició. Anticossos amb activitat catalítica (abzims). Enzims amb diversos subestis de fixació de substrat. L'enzim perfectament evolucionat.

11. Casos notables d'especificitat enzimàtica. Hiperespecificitat enzimàtica: mecanismes "editorials" i de correcció d'errors: aminoacil-tRNA sintetases, DNA polimerases, endonucleases de restricció. Especificitat estèrica dels enzims. Selecció i reconeixement de centres quirals.

12. Mecanismes relacionats amb la catàlisi enzimàtica. Efectes de proximitat i d'orientació: efectes entròpics. Canalització d'intermedis: complexos multienzimàtics, sistemes lligats a membranes, enzims multifuncionals; Catàlisi àcido-bàsica general. Catàlisi àcido-bàsica concertada. Catàlisi covalent. Catàlisi per distorsió.

13. Mecanismes relacionats amb la catàlisi enzimàtica. Coenzims, cofactors i grups prostètics: definicions. Mecanismes d'actuació: piridoxal fosfat, tiamina pirofosfat, coenzim B₁₂, NAD. Ribozims: característiques i formes d'acció. Metalls.

14. Regulació de l'activitat enzimàtica. Descripció general dels diferents mecanismes de regulació. a) Modificació de la concentració d'enzim: inducció i repressió. b) Modificació de les propietats cinètiques: variació de la velocitat en funció de la concentració de substrat; existència de diversos enzims amb diferents propietats cinètiques (isozims); activació per precursor i retroinhibició; control lligat a l'energia; control hormonal; polimerització-despolimerització; unió d'altres proteïnes; modificació covalent irreversible; modificació covalent reversible.

15. Regulació de l'activitat enzimàtica. Enzims amb cinètica sigmoidal. Enzims al·lostèrics: model de Monod, Wyman i Changeux; model de Koshland, Némethy i Filmer; model de Rabin; model de Ricard. Tractament matemàtic.

16. Desenvolupaments especials. Enzims sintètics. Enzims immobilitzats: concepte. Tècniques de preparació. Propietats. Aspectes teòrics i pràctics. Utilització industrial dels enzims.

BIBLIOGRAFIA

- BOYER, P.D. "The Enzymes". Vols. I i II. Student edition. Academic Press. New York. 1971
- CANTOR, C. & SCHIMMEL, P. "Biophysical Chemistry". Part III. Freeman. San Francisco. 1980
- COPELAND, R.A. "Enzymes". VCH, New York, 1996
- CORNISH-BOWDEN, A. "Fundamentals of enzyme kinetics". Portland Press Ltd. London. 1995
- CORNISH-BOWDEN, A. & WHARTON, C.W. "Enzyme kinetics" IRL Press, Oxford. 1988
- DIXON, M. & WEBB, E.C. "Enzymes". 3rd ed. Longmans. London. 1979
- DRESSLER, D. & POTTER, H. "Discovering enzymes". Scientific American Library. New York. 1991
- FERSHT, A. "Estructura y mecanismo de los enzimas". Reverté. Barcelona. 1980
- FERSHT, A. "Structure and mechanism in protein science" 3rd ed. Freeman, New York. 1998
- JURNAK & McPHERSON. "Biological macromolecules and assemblies. Vol. 3: Active sites of enzymes". Wiley. New York. 1987
- KYTE, J. "Mechanism in protein chemistry". Garland, London & New York, 1995
- LIEBMAN, J.F. & GREENBERG, A. "Mechanistic principles of enzyme activity". VCH Publishers, New York & Weinheim, 1988
- NUÑEZ DE CASTRO, I. "Enzimología", Pirámide, Madrid 2001
- PAGE, M.I. "Enzyme mechanisms" Royal Soc. Chem., Cambridge. 1987
- PALMER. "Understanding enzymes". 2nd. ed. Ellis Horwood. Chichester. 1985
- PELMONT, J. "Enzymes". 12^a ed. Presses Universitaires de Grenoble. 1995
- PRICE, N.C. & STEVENS, L. "Fundamentals of enzymology". 2nd ed. Oxford University Press. Oxford. 1989
- PURICH, D.L. "Contemporary enzyme kinetics and mechanism" 2nd ed. Academic Press. San Diego. 1996.
- SIGMAN, D.S. & BOYER, P.D. "The enzymes". Vol. XIX (Mechanisms of catalysis). Academic Press. San Diego. 1990

SUCKLING, C.J. "Enzyme chemistry. Impact and applications". 2nd ed. Chapman & Hall, London. 1990

SUELTER. "A practical guide to enzymology". Wiley. New York. 1985

COL·LECCIONS

The Enzymes, 3^a ed. Diferents volums. BOYER, P.D. ed. Academic Press. New York

Advances in Enzymology

Annual Review of Biochemistry

Essays in Biochemistry

Methods in Enzymology

Trends in Biochemical Sciences