



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Llicenciatura de Bioquímica

Assignatura: Enzimologia

Curs 2007-2008

1. **Enzims.** Concepte. Introducció històrica. Propietats generals. Significació biològica, química i pràctica. Definicions. Complex enzim-substrat. Disminució de l'energia d'activació. Estat de transició. Regulació. Cofactors enzimàtics.
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. Mètodes de determinació de l'activitat enzimàtica. Velocitat inicial: concepte, determinació, representació. Unitats d'activitat enzimàtica. Efecte de la concentració d'enzim. Obtenció i caracterització dels enzims.
4. **Cinètica de la reacció enzimàtica.** Reaccions amb un substrat. Efecte de la concentració de substrat: equació de Michaelis-Menten. Estat pre-estacionari i estat estacionari: conceptes. Hipòtesi d'estat estacionari: tractament de Briggs-Haldane. Reaccions enzimàtiques amb més d'un complex intermedi enzim-substrat. Integració de l'equació de Michaelis-Menten.
5. **Cinètica enzimàtica.** Determinació de la K_M i de la V_{max} . Mètodes de Lineweaver-Burk i d'Eadie-Hofstee. Altres mètodes. Significat dels paràmetres cinètics k_{cat} i K_M . Concepte de k_{cat}/K_M : eficiència catalítica i especificitat enzimàtica. Equació de Michaelis-Menten per a reaccions reversibles: relació de Haldane.
6. **Cinètica enzimàtica.** Inhibició de la catàlisi enzimàtica: tipus d'inhibidors. Inhibidors reversibles: inhibició competitiva i no competitiva; inhibició acompetitiva i mixta. Model general. Anàlisi gràfica dels diferents tipus d'inhibició. Determinació de les constants d'inhibició. Concepte de IC_{50} i la seva relació amb les constants d'inhibició.
7. **Cinètica enzimàtica.** Efectes inhibidors dels substrats. Complexos abortius: fixació no productiva. Inhibició per excés de substrat. Discriminació entre substrats competitius. Inhibidors pseudoirreversibles i inhibidors irreversibles. Utilització d'inhibidors com a fàrmacs.

8. **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. Intercanvi isotòpic i efecte isotòpic.
9. **Cinètica enzimàtica.** Cinètica dels estats efímers o fugaos ("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 i conceptes. "Bursts": determinació de la concentració d'enzim.
10. **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. Enzims en dissolvents orgànics.
11. **Cinètica enzimàtica.** Cooperativitat i al·lostèria. Equacions de Hill, Adair i índex de cooperativitat R_a . Model de Monod, Wyman i Changeux. Model de Koshland, Némethy i Filmer.
12. **Especificitat enzimàtica i centre actiu.** El centre actiu: definició, especificitat i estructura tridimensional. 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). Complementaritat entre enzim i estat de transició. Anticossos amb activitat catalítica (abzims). Enzims amb diversos subestis de fixació de substrat. L'enzim perfectament evolucionat.
13. **El centre actiu.** 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 centre actiu. 7) Marcatge mitjançant co-catalitzadors.
 - b) Mètodes físico-químics: 1) Estudis en funció del pH. 2) Estudi de l'estructura tridimensional.
 - c) Altres mètodes: 1) Mutació dirigida. 2) Comparació de seqüències. 3) Mètodes de predicció.
14. **Mecanismes relacionats amb la catàlisi enzimàtica (1).** 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.

- 15. Mecanismes relacionats amb la catàlisi enzimàtica (2).** Coenzims, cofactors i grups prostètics: definicions. Mecanismes d'actuació: piridoxal fosfat, tiamina pirofosfat, coenzim B₁₂, NAD. Metalls. Ribozims: característiques i formes d'acció.
- 16. 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.
- 17. 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.
- 18. Aplicacions biotecnològiques dels enzims.** Producció d'enzims en gran escala. Aplicacions: fàrmacs, indústria alimentària i detergents.
- 19. Disseny i síntesi de nous catalitzadors.** Evolució dirigida. Generació de mutants i selecció i "screening" de l'activitat enzimàtica desitjada. Redisseny d'enzims per a modificar la seva termoestabilitat i enantioselectivitat.

BIBLIOGRAFIA

- BOMMARIUS, A.S. & RIEBEL, B.R. "Biocatalysis. Fundamentals and applications". Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2004
- 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. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis". VCH, New York, 1996
- COPELAND, R.A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". Wiley Interscience. John Wiley & Sons, Inc. Publication. 2005
- CORNISH-BOWDEN, A. "Fundamentals of enzyme kinetics". 3rd ed. Portland Press Ltd. London. 2004
- 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

EISENTHAL, R. & DANSON, M.J. "Enzyme assays. A practical approach". 2nd ed. Oxford University Press. 2002

ENGEL, P.C. (ed.) "Enzymology Labfax". Academic Press. San Diego CA. 1996

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

LIEBMAN, J.F. & GREENBERG, A. "Mechanistic principles of enzyme activity". VCH Publishers, New York & Weinheim, 1988

NUÑEZ DE CASTRO, I. "Enzimología", Pirámide, Madrid 2001

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

Professors de teoria

Josep Antoni Biosca (despatx C2/323)

M. Victòria Nogués (despatx C2/235)

Professor de problemes

Josep Antoni Biosca

Professors de pràctiques

Susanna Navarro (laboratori C2/239) (coordinadora)

Avaluació de l'assignatura

Teoria: 6,5/10 (examen de preguntes curtes)

Problemes: 2/10

Pràctiques: 1,5/10

Per a aprovar l'assignatura: Nota de teoria + nota de problemes + nota de pràctiques ≥ 5