

Biocatàlisi

2013/2014

Codi: 100956

Crèdits: 6

Titulació	Tipus	Curs	Semestre
2500253 Biotecnologia	OT	4	0

Professor de contacte

Nom: Josep Antoni Biosca Vaqué

Correu electrònic: Josep.Biosca@uab.cat

Utilització d'idiomes

Llengua vehicular majoritària: català (cat)

Algun grup íntegre en anglès: No

Algun grup íntegre en català: Sí

Algun grup íntegre en espanyol: No

Prerequisits

No hi ha prerequisits oficials. De tota manera, part dels continguts d'algunes assignatures de 1r curs i 3r curs són necessaris per a poder seguir correctament l'assignatura. En especial, els de les assignatures següents: Bioquímica, Química i Enginyeria de Proteïnes i Tècniques Instrumentals Bàsiques i Avançades.

Objectius

L'assignatura Biocatàlisi es centra en l'estudi dels enzims, les seves propietats i aplicacions. El coneixement dels enzims és clau en el marc de la Bioquímica, Biologia Molecular i àrees relacionades atès el seu paper com a catalitzadors de les reaccions biològiques i les aplicacions en els processos biotecnològics.

L'assignatura analitza els enzims des de diferents perspectives: activitat, cinètica, mecanismes i aplicacions. L'objectiu general de l'assignatura és proporcionar els fonaments per a l'anàlisi, caracterització i ús dels enzims des de les perspectives de la recerca i de l'aplicació biotecnològica i biomèdica.

Objectius concrets de l'assignatura:

Coneixement de les característiques generals, classificació i mètodes d'assaig de l'activitat enzimàtica.

Anàlisi de la cinètica enzimàtica i determinació i significat dels paràmetres cinètics.

Coneixement de la inhibició enzimàtica i les seves aplicacions, especialment en el camp dels fàrmacs.

Anàlisi del centre actiu i coneixement dels mètodes de caracterització.

Anàlisi dels mecanismes enzimàtics i de regulació.

Aplicacions biomèdiques i biotecnològiques dels enzims.

Competències

- Biotecnologia
- Adquirir nous coneixements i tècniques de forma autònoma.
- Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
- Aplicar les principals tècniques associades a l'ús de sistemes biològics: DNA recombinant i clonació,

cultius cel·lulars, manipulació de virus, bacteris i cèl·lules animals i vegetals, tècniques immunològiques, tècniques de microscòpia, proteïnes recombinants i mètodes de separació i caracterització de biomolècules.

- Buscar i gestionar informació procedent de diverses fonts.
- Buscar, obtenir i interpretar la informació de les principals bases de dades biològiques, bibliogràfiques i de patents i usar les eines bioinformàtiques bàsiques.
- Descriure les bases moleculars, cel·lulars i fisiològiques de l'organització, el funcionament i integració dels organismes vius en el marc de la seva aplicació als processos biotecnològics.
- Dissenyar experiments de continuació per resoldre un problema.
- Dissenyar i executar un protocol complet d'obtenció i purificació d'un producte biotecnològic.
- Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
- Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
- Obtenir informació de bases de dades i utilitzar el programari necessari per a establir correlacions entre estructura, funció i evolució de macromolècules.
- Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
- Raonar de forma crítica.
- Treballar de forma individual i en equip.
- Utilitzar les metodologies analítiques per a l'assaig de l'activitat biològica dels components cel·lulars, en especial enzims, in vivo i in vitro.

Resultats d'aprenentatge

1. Adquirir nous coneixements i tècniques de forma autònoma.
2. Aplicar els recursos informàtics per a la comunicació, la recerca d'informació, el tractament de dades i el càlcul.
3. Avaluar la idoneïtat dels mètodes de determinació d'activitats enzimàtiques i analitzar l'efecte de les condicions experimentals d'assaig.
4. Buscar i gestionar informació procedent de diverses fonts.
5. Calcular i interpretar els paràmetres cinètics de les reaccions enzimàtiques, mitjançant mètodes gràfics i utilitzant programes informàtics.
6. Dissenyar experiments de continuació per resoldre un problema.
7. Dissenyar, executar i avaluar un protocol bàsic d'obtenció i purificació d'un enzim.
8. Explicar els fonaments fisicoquímics de la catàlisi enzimàtica.
9. Explicar les bases estructurals i els principals mecanismes de la catàlisi enzimàtica, i com es regula.
10. Identificar els principals mecanismes d'inhibició enzimàtica, conèixer-ne el significat biològic i calcular i interpretar les constants corresponents.
11. Interpretar resultats experimentals i identificar elements consistents i inconsistents.
12. Llegir textos especialitzats tant a llengua anglesa com a les llengües pròpies.
13. Obtenir informació sobre la base estructural dels enzims i els seus mecanismes en les principals bases de dades.
14. Pensar d'una forma integrada i abordar els problemes des de diferents perspectives.
15. Raonar de forma crítica.
16. Treballar de forma individual i en equip.
17. Utilitzar aquestes tècniques per a identificar, clonar, expressar gens i proteïnes útils en el disseny i obtenció d'enzims.
18. Utilitzar el coneixement dels organismes vius i els seus sistemes enzimàtics per al disseny de processos i l'obtenció de productes biotecnològics.
19. Utilitzar les bases de dades d'enzims en relació amb l'activitat, funcions biològiques i aplicacions.

Continguts

Tema 1

Concepte de biocatàlisi. Perspectiva històrica. Factors a considerar en un procés de biocatàlisi: font del biocatalitzador i optimització del procés. Sistemes cel·lulars i enzimàtics: propietats.

Tema 2

Propietats generals dels enzims. Concepte i significació biològica, química i pràctica. Definicions. Complex enzim-substrat. Disminució de l'energia d'activació. Estat de transició. Regulació. Cofactors enzimàtics. Classificació dels enzims. Bases de dades amb informació d'enzims.

Tema 3

Obtenció i caracterització dels enzims. Fonts d'obtenció. Tècniques per a l'extracció d'enzims. Mètodes de determinació de l'activitat enzimàtica. Velocitat inicial: concepte, determinació, representació. Unitats d'activitat enzimàtica. Efecte de la concentració d'enzim.

Tema 4

Cinètica 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.

Tema 5

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..

Tema 6

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.

Efectes inhibidors dels substrats. Complexos abortius: fixació no productiva. Inhibició per excés de substrat. Discriminació entre substrats competitiu. Inhibidors pseudoirreversibles i inhibidors irreversibles.

Tema 7

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

Tema 8

Acció de la temperatura sobre la cinètica enzimàtica. Representació d'Arrhenius. Enzims d'organismes extremòfils. Efectes del pH sobre la cinètica enzimàtica. Ionització de residus essencials. Influència del pH sobre els paràmetres cinètics. Avaluació de les constants d'ionització. Identificació dels grups ionitzables implicats en els processos d'unió i catàlisi. Efectes del microentorn sobre el pK. Exemples

Tema 9

Unió de lligands a proteïnes. Concepte i tipus de cooperativitat. Anàlisi de la cooperativitat. Unió de l'oxigen a l'hemoglobina. Models de cooperativitat. Model de Monod, Wyman i Changeux. Explicació dels efectes cooperatius homotrópics pel model MWC. Enzims al·lostèrics. 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 al·lostèrica: aspartat carbamil transferasa.

Tema 10

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 de la unió a tres punts. Hipòtesi que impliquen tensió. Estabilització de l'estat de transició. Evidències que recolzen la teoria de l'estat de transició. Anticossos catalítics.

Tema 11

El centre actiu. Identificació dels centres d'unió i de catàlisi. Marcatge amb una part del substrat. Utilització de substrats artificials. Modificació química amb inhibidors irreversibles específics. Marcadors per afinitat. Inhibidors suïcides, exemples amb interès farmacològic. Marcatge inespecífic. Aminoàcids susceptibles de ser modificats químicament. Mutagènesi dirigida. Les serina-proteases: subtilisina. Comparació de la mutagènesi i el marcatge químic. Investigació de l'estructura tridimensional de proteïnes: raigs X, RMN. Comparació de seqüències. L'alcohol deshidrogenasa.

Tema 12

Mecanismes de catàlisi. Introducció als mecanismes de l'acció enzimàtica. Catàlisi àcido-bàsica. Catàlisi covalent. Mecanisme de la subtilisina. Catàlisi amb ions metàl·lics. Mecanismes de l'alcohol deshidrogenasa i l'anhidrasa carbònica. Efecte de l'entorn: catàlisi electrostàtica. El lisozim. La superòxid dismutasa. Efectes de proximitat i orientació. Energètica de la catàlisi enzimàtica. Valors òptims de la K_m . La triosa fosfat isomerasa com enzim energèticament eficient.

Tema 13

Ribozims. Activitat catalítica del RNA. Tipus de ribozims. El ribosoma és un ribozim. Significat biològic dels ribozims.

Tema 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. Significat funcional de la cooperativitat i el al·lostèrisme. Control unit a l'energia. Control hormonal. Isoenzims. Agrupacions multienzimàtiques. Complexos multienzimàtics. Sistemes lligats a membranes. Enzims multifuncionals. Enzims amb funcions addicionals no enzimàtiques "moonlighting enzymes". Polimerització-despolimerització. Unió a altres proteïnes. Modificació covalent irreversible. Modificació covalent reversible. Regulació de les vies metabòliques.

Tema 15

Enzims en bioquímica clínica i biotecnologia. Enzims com agents terapèutics. Enzims indicadors de patologies. Enzims plasmàtics. Origen dels enzims plasmàtics. Factors que afecten els nivells dels enzims plasmàtics. Exemples d'enzims amb interès diagnòstic. Aminotransferases. Creatina quinasa. Lactat deshidrogenasa. Indicadors de l'infart de miocardi. Enzims com a reactius en bioquímica clínica. Enzims i errors congènits del metabolisme, exemples. Producció en gran escala d'enzims. Aplicacions: fàrmacs, indústria alimentària i detergents. Enzims immobilitzats. Enzims en nanotecnologia

Tema 16

Disseny i síntesi de nous catalitzadors. Evolució dirigida. Generació de mutants. Selecció i "screening" de l'activitat enzimàtica desitjada. Redisseny d'enzims per a modificar la seva termoestabilitat i enantioselectivitat.

Problemes.

Els problemes que es proposen fan referència a alguns aspectes del temari, emfatitzant la determinació de paràmetres cinètics en diferents situacions: presència d'inhibidors, reaccions bisubstrat, preparacions no

homogènies, etc. Els enunciats dels problemes es lliuraran a través del Campus Virtual amb antelació a les classes de problemes en les que es resolguin.

Pràctiques.

Aplicar diferents metodologies dirigides a l'obtenció i caracterització d'un biocatalitzador sobreexpressat en llevat (*Saccharomyces cerevisiae*), a l'anàlisi de l'estereoespecificitat de la reacció, així com a la utilització de "software" per a càlculs cinètics.

Metodologia

L'assignatura de Biocatàlisi consta de classes teòriques, classes de problemes i classes de pràctiques.

A continuació es descriu l'organització i la metodologia docent que es seguirà en aquestes activitats.

Classes de teoria:

El contingut del programa de teoria serà impartit principalment pels professors en forma de classes magistrals amb suport audiovisual. Les presentacions utilitzades a classe pels professors estaran a disposició dels alumnes al Campus Virtual de l'assignatura abans de l'inici de cadascun dels temes. Aquestes sessions expositives constituïran la part més important de l'apartat de teoria. És recomanable que els alumnes disposin del material publicat al Campus Virtual en forma impresa per tal de poder seguir les classes amb més comoditat. S'aconsella que els alumnes consultin de forma regular els llibres recomanats a l'apartat de Bibliografia d'aquesta guia docent per tal de consolidar i clarificar, si és necessari, els continguts explicats a classe. També és aconsellable que els alumnes utilitzin els enllaços indicats al Campus Virtual, que contenen vídeos i animacions relacionats amb els processos explicats a classe.

Classes de resolució de problemes:

Hi haurà 5 sessions de problemes que es dedicaran a la resolució dels tipus de problemes més relacionats amb els continguts del programa de teoria. Es pretén que aquestes classes serveixin per consolidar els continguts prèviament treballats a les classes de teoria i també perquè l'alumne es familiaritzi amb algunes de les estratègies experimentals, amb la interpretació de dades científiques i la resolució de problemes basats en situacions experimentals reals.

Els enunciats dels problemes es lliuraran a través del Campus Virtual amb antelació a la classe de problemes en la que s'hagin de tractar.

Classes de pràctiques:

Hi haurà 3 sessions de 4 hores, amb el contingut següent:

- 1.- Determinació de l'activitat de l'enzim Bdh1p en extractes de llevat que estan sobreexpressant aquest enzim. Càlcul de l'activitat en U/mL d'extracte.
- 2.- Determinació dels paràmetres cinètics per l'enzim Bdh1p enfront diferents substrats. Preparar barreges de reacció enfront diferents substrats.
- 3.- Separació de substrats i productes de les barreges de reacció per extracció amb cloroform. Caracterització dels substrats i productes de la reacció de Bdh1p mitjançant la separació dels mateixos en una columna quiral ubicada en un cromatògraf de gasos.
- 4.- Utilització d'un programa informàtic per a la determinació dels paràmetres cinètics de Bdh1p. Anàlisi de diferents patrons d'inhibició.

Tutories

Es realitzarà una sessió de tutoria del grup classe abans de les proves parcials 1 i 2 i, a petició dels alumnes, tutories individuals. En el cas que el nombre de sol·licituds sigui elevat es realitzaran, de manera addicional, tutories d'aula que s'anunciarien oportunament a través del Campus Virtual. L'objectiu d'aquestes sessions serà el de resoldre dubtes, repassar conceptes bàsics i orientar sobre les fonts d'informació consultades.

Material disponible al Campus Virtual de l'assignatura:

Presentacions utilitzades pel professor a classes de teoria.

Enunciats dels problemes.

Protocol de les classes pràctiques.

Calendari de les activitats docents (classes d'aula, tutories i avaluacions).

Activitats formatives

Títol	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Tipus: Dirigides			
Classes de pràctiques	12	0,48	1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 15, 16, 19
Classes de resolució de problemes	5	0,2	2, 3, 5, 7, 10, 15, 16
Classes de teoria	35	1,4	1, 4, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
Tipus: Supervisades			
Tutories en grup	2	0,08	4, 14, 15
Tipus: Autònomes			
Estudi	40	1,6	1, 4, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19
Realització de la memòria de pràctiques	11	0,44	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19
Resolució de problemes	15	0,6	2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 15, 16

Avaluació

Resolució de qüestions de teoria (7/10)

- L'avaluació d'aquesta activitat es realitzarà mitjançant dues proves escrites en les que l'alumne ha de demostrar el seu grau d'assoliment dels conceptes teòrics.
- Cadascuna de les proves tindrà un pes global del 35%. La primera estarà programada a mitjans del semestre i la segona a finals del semestre. Les dues proves inclouran preguntes curtes relacionades amb les classes de teoria.
- El dia de l'examen final, aquells alumnes que no hagin superat alguna de les dues proves parcials o vulguin millorar la seva qualificació podran realitzar la prova corresponent. La realització d'aquesta nova prova suposa la renúncia a la primera qualificació.

Resolució de problemes (1/10)

El dia de la primera prova parcial s'hauran de resoldre tres problemes dels tipus tractats a les classes de problemes. El resultat d'aquesta prova tindrà un pes global del 10%.

Assistència a les classes pràctiques i realització de la memòria (2/10).

S'avaluarà l'actitud de l'alumne al laboratori, puntualitat, portar el material adient com bata, ulleres de protecció i guió de practiques, prèviament treballat a casa, així com el seu treball al laboratori. L'alumne entregará una memòria de pràctiques el dia fixat pel professor en la que haurà respòs les qüestions plantejades. L'avaluació de l'actitud suposará el 25% de la nota i l'avaluació de la memòria presentada l'altre 75% del total de la nota.

És necessari obtenir una qualificació final igual o superior a 5/10 per superar l'assignatura.

Es considera que un estudiant obté la qualificació de No Presentat quan la valoració de totes les activitats d'avaluació realitzades no li permeti assolir la qualificació global de 5 en el supòsit que hagués obtingut la màxima nota en totes elles.

Activitats d'avaluació

Títol	Pes	Hores	ECTS	Resultats d'aprenentatge
Assistència a classes pràctiques i realització de la memòria	20	24	0,96	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19
Prova de problemes	10	2	0,08	3, 5, 7, 10, 15
Proves parcials de teoria	70	4	0,16	4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18

Bibliografia

Obres específiques

-Biocatalysis. Fundamentals and applications (2004). A. S. Bommarius, B. R. Riebel. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

-Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications (2007). Ed. J. Polaina and A.P. MacCabe. Springer.

-Introduction to Biocatalysis using enzymes and microorganisms (1995). S. M. Roberts, N.T. Turner, A.J. Willets i M.K. Tumer. Cambridge University Press.

-Structure and Mechanism in Protein Science. A guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding (1998). A. Fersht. W.H. Freeman & Company.

-Enzyme kinetics. Principles and methods (2008) 3rd. Ed. H. Bisswanger Wiley-VCH. Weinheim.

-Fundamentals of Enzyme Kinetics. A. Cornish-Bowden (2004). 3rd edition. Portland Press Ltd.

-Fundamentals of Enzymology (1999) 3rd ed. Price, N.C., Stevens, L. Oxford University Press. Oxford.

-Enzymes Assays. A Practical Approach. R. Eienthal and M. J. Danson (2002) 2nd ed. Oxford University Press.

-Enzimología. I. Núñez de Castro (2001). Ediciones Pirámide (Anaya).

-Biotransformations in Organic Chemistry. 4th ed. K. Faber (2000). Ed. Springer

-Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. R. A. Copeland (2005). Wiley Interscience. John Wiley & Sons, Inc. Publication.

Obres Generals

- Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry M.D. and Rawn, J.D. "Principios de Bioquímica". 2008. 4ª ed. Prentice-Hall. Pearson Educación. México.

- Mathews, C. K. and van Holde, K. E. "Bioquímica". 2002, 3ª ed. Addison/Wesley. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid.

- Nelson, D.L. and Cox, M.M. "Lehninger Principios de Bioquímica". 2008, 5ª ed. Omega. Barcelona.

- Nelson, D.L. and Cox, M.M. "Lehninger Principles of Biochemistry". 2008, 5ª ed. Freeman, New York

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L "Biochemistry" (2012). 7ª ed. Freeman, New York

- Voet, D., Voet, J.G. "Biochemistry" (2010), 4ª ed. Wiley

- Voet, D., and Voet, J.G. "Bioquímica". 2006, 3ª ed. Ed.Médica Panamericana. Barcelona

Enllaços Web

Estaran actualitzats al campus Virtual de l'assignatura.