

Biocatàlisis

Código: 100997
Créditos ECTS: 6

Titulació	Tipo	Curso	Semestre
2500502 Microbiología	OT	4	0

Contacto

Nombre: Josep Antoni Biosca Vaqué
Correo electrónico: Josep.Biosca@uab.cat

Uso de idiomas

Lengua vehicular mayoritaria: catalán (cat)
Algún grupo íntegramente en inglés: No
Algún grupo íntegramente en catalán: Sí
Algún grupo íntegramente en español: No

Equipo docente

Xavier Parés Casasampera

Prerequisitos

No hay prerequisites oficiales. De todos modos, parte de los contenidos de la asignatura Bioquímica, de 1er curso, son necesarios para poder seguir correctamente la asignatura.

Objetivos y contextualización

La asignatura Biocatàlisis se centra en el estudio de los enzimas, sus propiedades y aplicaciones. El conocimiento de los enzimas es clave en el marco de la Bioquímica, Biología Molecular y ciencias relacionadas, dado su papel como catalizadores de las reacciones biológicas y de sus aplicaciones en los procesos biotecnológicos. La asignatura analiza los enzimas desde diferentes perspectivas: actividad, cinética, mecanismos y aplicaciones. El objetivo general de la asignatura es proporcionar los fundamentos para el análisis, caracterización y uso de las enzimas desde las perspectivas de la investigación y de la aplicación biotecnológica y biomédica.

Objetivos concretos de la asignatura:

- Conocimiento de las características generales, clasificación y métodos de ensayo de la actividad enzimática.
- Análisis de la cinética enzimática y determinación y significado de los parámetros cinéticos.
- Conocimiento de la inhibición enzimática y sus aplicaciones, especialmente en el campo de los fármacos.
- Análisis del centro activo y conocimiento de los métodos de caracterización.
- Análisis de los mecanismos enzimáticos y de regulación.
- Aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de los enzimas.

Contenido

Tema 1

Concepto de biocatàlisis. Perspectiva histórica. Factores a considerar en un proceso de biocatàlisis: fuente del biocatalizador y optimización del proceso. Sistemas celulares y enzimáticos: propiedades.

Tema 2

Propiedades generales de los enzimas: Concepto y significación biológica, química y práctica. Definiciones.

Complejo enzima-sustrato. Disminución de la energía de activación. Estado de transición. Regulación. Cofactores enzimáticos. Clasificación de los enzimas.

Tema 3

Obtención y caracterización de los enzimas. Fuentes de obtención. Técnicas para la extracción de enzimas. Métodos de determinación de la actividad enzimática. Velocidad inicial: concepto, determinación, representación. Unidades de actividad enzimática. Efecto de la concentración de enzima.

Tema 4

Cinética enzimática. Reacciones con un sustrato. Efecto de la concentración de sustrato: ecuación de Michaelis-Menten. Estado pre-estacionario y estado estacionario: conceptos. Hipótesis de estado estacionario: tratamiento de Briggs-Haldane. Estado pre-estacionario. Métodos de estudio. "Bursts" y "lags".

Tema 5

Determinación de la K_M y de la V_{max} . Métodos de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee. Otros métodos de determinación de los parámetros cinéticos. Significado de los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M . Concepto de k_{cat} / K_M : eficiencia catalítica y especificidad enzimática. Ecuación de Michaelis-Menten para reacciones reversibles: relación de Haldane.

Tema 6

Inhibición de la catálisis enzimática: tipos de inhibidores. Inhibidores reversibles: inhibición competitiva y no competitiva; inhibición acompetitiva y mixta. Modelo general. Análisis gráfico de los diferentes tipos de inhibición. Determinación de las constantes de inhibición. Concepto de IC_{50} y su relación con las constantes de inhibición. Inhibición por exceso de sustrato. Discriminación entre sustratos competitivos. Inhibidores pseudoirreversibles e inhibidores irreversibles. Utilización de inhibidores como fármacos. Marcadores por afinidad. Sustratos suicidas como inhibidores irreversibles.

Tema 7

Reacciones con más de un sustrato: notación de Cleland. Mecanismo de doble desplazamiento (ping-pong); mecanismo secuencial ordenado; mecanismo secuencial estadístico. Tratamiento matemático y análisis gráfico. Métodos para la determinación del tipo de mecanismo enzimático. Intercambio isotópico y efecto isotópico, concepto y aplicaciones.

Tema 8

Acción de la temperatura sobre la cinética enzimática. Representación de Arrhenius. Enzimas de organismos extremófilos. Efectos del pH sobre la cinética enzimática. Ionización de residuos esenciales. Influencia del pH sobre los parámetros cinéticos. Evaluación de las constantes de ionización. Identificación de los grupos ionizables implicados en los procesos de unión y catálisis. Efectos del microentorno sobre el pK. Ejemplos.

Tema 9

Unión de ligandos a proteínas. Concepto y tipos de cooperatividad. Análisis de la cooperatividad. Unión del oxígeno a la hemoglobina. Modelos de cooperatividad. Modelo de Monod, Wyman y Changeux. Explicación de los efectos cooperativos homotrópicos por el modelo MWC. Enzimas alostéricas. Sistemas K y sistemas V. Modelo de Koshland, Nemethy y Filmer. Determinación del modelo de cooperatividad que sigue un determinado enzima. Ejemplo de enzima con regulación alostérica: aspartato carbamil transferasa.

Tema 10

Especificidad enzimática. El centro activo, especificidad y estructura tridimensional. Definición de centro activo. Características del centro activo. Teorías sobre el acoplamiento entre el enzima y el sustrato. Teoría de Fisher (llave y cerradura). Teoría de Koshland ("induced fit" o acoplamiento inducido). La hexoquinasa como ejemplo de acoplamiento inducido. Hipótesis de la unión a tres puntos. Hipótesis que implican tensión. Estabilización del estado de transición. Evidencias que apoyan la teoría del estado de transición. Anticuerpos catalíticos. Aplicaciones de los anticuerpos catalíticos

Tema 11

El centro activo. Identificación de los centros de unión y de catálisis. Marcaje con una parte del sustrato. Utilización de sustratos artificiales. Modificación química con inhibidores irreversibles específicos. Marcadores por afinidad. Inhibidores suicidas, ejemplos de interés farmacológico. Mutagénesis dirigida. Las

serina-proteasas: subtilisina. Comparación de la mutagénesis y el marcaje químico. Investigación de la estructura tridimensional de proteínas: rayos X, RMN, modelaje molecular. Invariabilidad evolutiva de residuos de aminoácidos. La alcohol deshidrogenasa.

Tema 12

Mecanismos de catálisis. Introducción a los mecanismos de la acción enzimática. Catálisis ácido-básica. Catálisis covalente. Mecanismo de la subtilisina. Catálisis con iones metálicos. Mecanismos de la alcohol deshidrogenasa y la anhidrasa carbónica. Efecto del entorno: catálisis electrostática. La lisozima. La superóxido dismutasa. Efectos de proximidad y orientación. Energética de la catálisis enzimática. Valores óptimos de la K_m . La triosa fosfato isomerasa como enzima energéticamente eficiente.

Tema 13

Cofactores enzimáticos y ribozimas. Estructura y mecanismo de cofactores. Actividad catalítica del RNA: ribozimas. Tipos de ribozimas. El ribosoma es un ribozima. Significado biológico de los ribozimas. Aplicaciones de los ribozimas.

Tema 14

Regulación de la actividad enzimática. Modificación de la concentración de enzima. Regulación de la síntesis i degradación de los enzimas. Mecanismos de degradación. Variación de la velocidad enzimática en función de la concentración de sustrato, producto i cofactores. Activación por precursor y retroinhibición. Significado funcional de la cooperatividad y el alosterismo. Control unido a la energía. Control hormonal. Isoenzimas. Agrupaciones multienzimáticas. Complejos multienzimáticos. Sistemas ligados a membranas. Enzimas multifuncionales. Polimerización-despolimerización. Unión a otras proteínas. Modificación covalente irreversible. Modificación covalente reversible. Sistemas de cascada enzimática. Regulación de la fotosíntesis. Regulación de las vías metabólicas.

Tema 15

Enzimas en bioquímica clínica y biotecnología. Enzimas como agentes terapéuticos. Enzimas indicadores de patologías. Enzimas plasmáticos. Origen de los enzimas plasmáticos. Factores que afectan los niveles de los enzimas plasmáticos. Ejemplos de enzimas con interés diagnóstico. Aminotransferasas. Creatina quinasa. Lactato deshidrogenasa. Indicadores del infarto de miocardio. Enzimas como a reactivos en bioquímica clínica. Enzimas y errores congénitos del metabolismo, ejemplos. Enzimas en la industria. Producción en gran escala de enzimas. Aplicaciones: fármacos, industria alimentaria, detergentes, industria textil. Enzimas inmovilizados. Enzimas como biosensores

Tema 16

Métodos para mejorar la biocatálisis. Diseño y síntesis de nuevos catalizadores. Evolución dirigida. Generación de mutantes. Selección y "screening" de la actividad enzimática deseada. Rediseño de enzimas para modificar su termoestabilidad y enantioselectividad.

Clases de problemas.

Los problemas que se proponen hacen referencia a algunos aspectos del temario, enfatizando la determinación de parámetros cinéticos en diferentes situaciones: presencia de inhibidores, reacciones bisubstrat, preparaciones no homogéneas, etc. Los enunciados de los problemas se entregarán a través del Campus Virtual con antelación a las clases de problemas en las que se resuelvan.

Clases Prácticas.

En las clases prácticas se aplicarán diferentes metodologías dirigidas a la obtención y caracterización de un biocatalizador sobreexpresado en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se determinará la estereoespecificidad de la reacción y se utilizarán diferentes programas informáticos para determinar los parámetros cinéticos y para estudiar la estructura.