

Tema 6. ENZIMAS. Clasificación. Principios de la catálisis enzimática. Energía de activación. Velocidad de reacción y equilibrio de reacción. Cinética enzimática: ecuación de Michaelis-Menten. Ecuación de los dobles recíprocos. Inhibición enzimática. Tipos de inhibición. Mecanismos de regulación de la actividad enzimática: alosterismo, modificación covalente, proenzimas. Isoenzimas

BIOQUÍMICA-1º de Medicina
Dpto. Biología Molecular
Jesús Navas



ENZIMAS

- Catalizadores de las reacciones biológicas.
- La mayoría son proteínas aunque hay moléculas de RNA con actividad catalítica (ribozimas)
- Gran poder catalítico
- Alto grado de especificidad
- Actúan en soluciones acuosas a 37°C y pH neutro
- Su actividad puede regularse
- El 25% de los genes humanos codifican enzimas que catalizan reacciones metabólicas.

Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

(“Lehninger Principles of Biochemistry” 3th.ed.
Nelson, DL and Cox, M.M. Worth Publishers, 2000.)

IMPORTANCIA DE LOS ENZIMAS

- Cada paso de una vía metabólica está catalizado por un enzima.
- La medida de la **actividad enzimática** en fluidos biológicos o tejidos es importante para el **diagnóstico** de muchas enfermedades.
- Muchos fármacos son **inhibidores** de la actividad enzimática
- Importancia en la industria de alimentación y agricultura.

Enzima	Tejido(s)	Uso diagnóstico
AST	Corazón, músculo esquelético, hígado, cerebro	Hepatopatía
ALT	Hígado	Hepatopatía, p. ej. hepatitis (ALT > AST)
Amilasa	Páncreas, glándulas salivales	Pancreatitis aguda, obstrucción biliar
CK	Músculo esquelético, corazón, cerebro	Distrofia muscular, infarto de miocardio
GGT	Hígado	Hepatitis, exceso de alcohol
LDH	Corazón, hematíes hígado	Linfoma, hepatitis
Lipasa	Páncreas	Pancreatitis aguda, obstrucción biliar
Fosfatasa alcalina	Osteoblasto	Enfermedad ósea, tumores óseos
Fosfatasa ácida	Próstata	Cáncer de próstata

ENZIMAS: RESEÑA HISTORICA

- Primera descripción (finales del siglo XVIII)
- 1850. Estudios de Pasteur
- 1897. Buchner
- 1926. Summer cristaliza la ureasa
- Segunda mitad del siglo XX: se purifican y caracterizan millares de enzimas, lo que ha permitido conocer su mecanismo de acción.

Enzimas. Definiciones:

- Cofactor: necesario para la actividad enzimática. Pueden ser iones metálicos o una molécula orgánica, denominada coenzima. Si el cofactor está unido fuertemente al enzima se denomina grupo prostético.
- Apoenzima: parte proteica del enzima (no activa)
- Holoenzima: apoenzima + cofactor

Nomenclatura de los enzimas:

SUSTRATO + TIPO DE REACCION + ASA



Un tercio de los enzimas requieren algún ión metálico para catalizar

Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B



TABLE 8.2 Enzyme cofactors

Cofactor	Enzyme
Coenzyme	
Thiamine pyrophosphate	Pyruvate dehydrogenase
Flavin adenine nucleotide	Monoamine oxidase
Nicotinamide adenine dinucleotide	Lactate dehydrogenase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (CoA)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Methylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate	Thymidylate synthase
Metal	
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase
Zn ²⁺	Carboxypeptidase
Mg ²⁺	<i>EcoRV</i>
Mg ²⁺	Hexokinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Nitrate reductase
Se	Glutathione peroxidase
Mn ²⁺	Superoxide dismutase
K ⁺	Propionyl CoA carboxylase

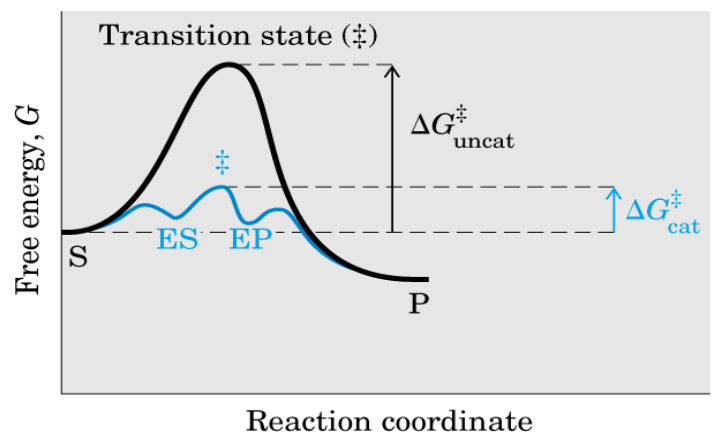
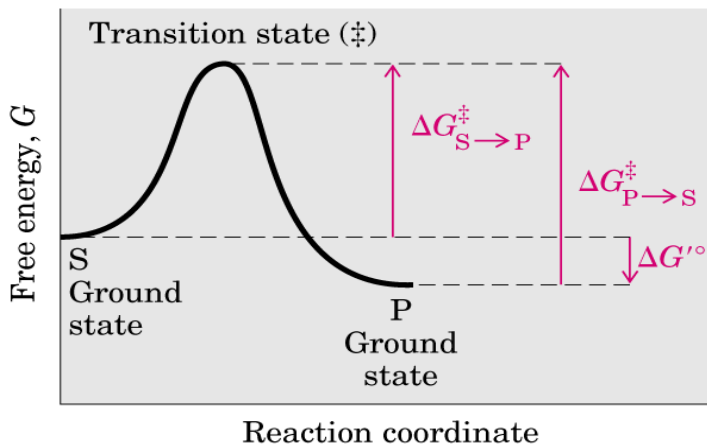
Muchas vitaminas son cofactores o precursores de cofactores de enzimas

Vitamin	Coenzyme	Typical reaction type	Consequences of deficiency
Thiamine (B ₁)	Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfer	Beriberi (weight loss, heart problems, neurological dysfunction)
Riboflavin (B ₂)	Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Oxidation–reduction	Cheliosis and angular stomatitis (lesions of the mouth), dermatitis
Pyridoxine (B ₆)	Pyridoxal phosphate	Group transfer to or from amino acids	Depression, confusion, convulsions
Nicotinic acid (niacin)	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD ⁺)	Oxidation–reduction	Pellagra (dermatitis, depression, diarrhea)
Pantothenic acid	Coenzyme A	Acyl–group transfer	Hypertension
Biotin	Biotin–lysine complexes (biocytin)	ATP-dependent carboxylation and carboxyl–group transfer	Rash about the eyebrows, muscle pain, fatigue (rare)
Folic acid	Tetrahydrofolate	Transfer of one-carbon components; thymine synthesis	Anemia, neural-tube defects in development
B ₁₂	5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Transfer of methyl groups; intramolecular rearrangements	Anemia, pernicious anemia, methylmalonic acidosis
C (ascorbic acid)		Antioxidant	Scurvy (swollen and bleeding gums, subdermal hemorrhages)

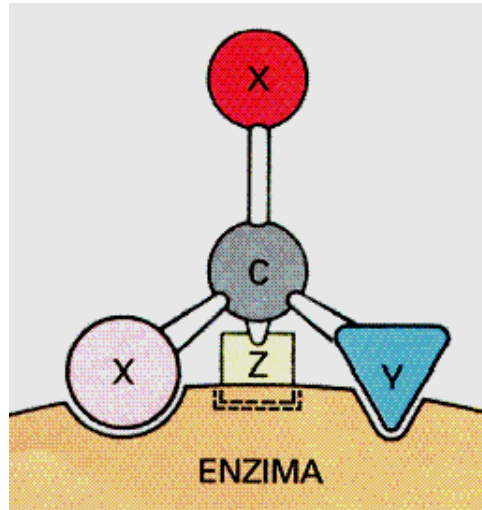
CLASES DE ENZIMAS

Clase	Reacción	Enzimas
1. Oxidorreductasas	$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$	Deshidrogenasa, peroxidasa
2. Transferasas	$A-B + C \rightarrow A + B-C$	Hexocinasa, transaminasa
3. Hidrolasas	$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Fosfatasa alcalina, tripsina
4. Liasas (sintasas)	$A(XH)-B \rightarrow A-X + B-H$	Anhidrasa carbónica, deshidratasas
5. Isomerasas	$A \rightleftharpoons Iso-A$	Triosa-fosfato-isomerasa, fosfoglucomutasa
6. Ligasas (sintetasas)	$A + B + ATP \rightarrow A-B + ADP + Pi$	Piruvato-carboxilasa, DNA-ligasa

Los enzimas aceleran las reacciones disminuyendo la energía de activación

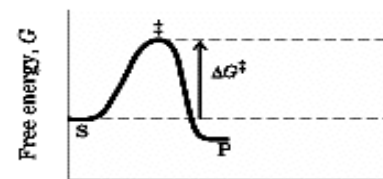


Los enzimas son estereoespecíficos porque forman varias interacciones entre aminoácidos del centro activo y los distintos grupos del sustrato

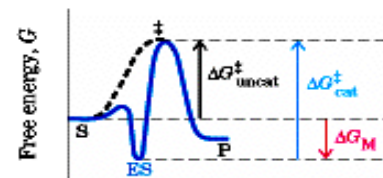
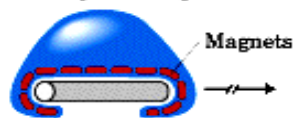


El centro activo de los enzimas es complementario al estado de transición de la reacción catalizada

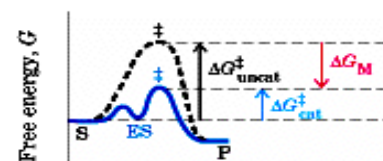
(a) No enzyme



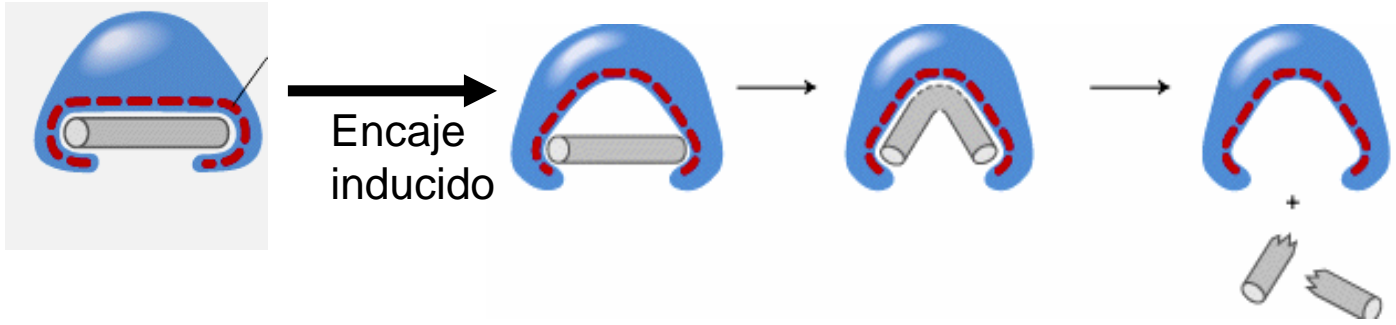
(b) Enzyme complementary to substrate



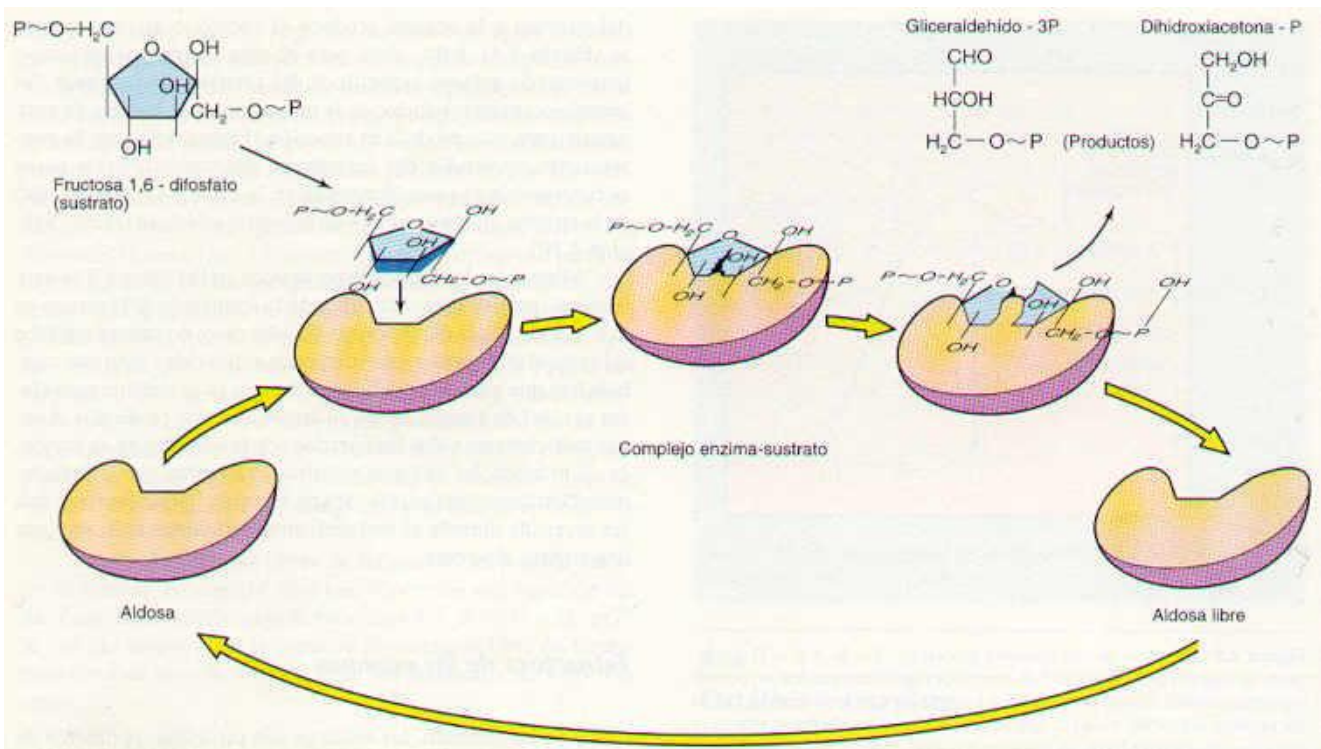
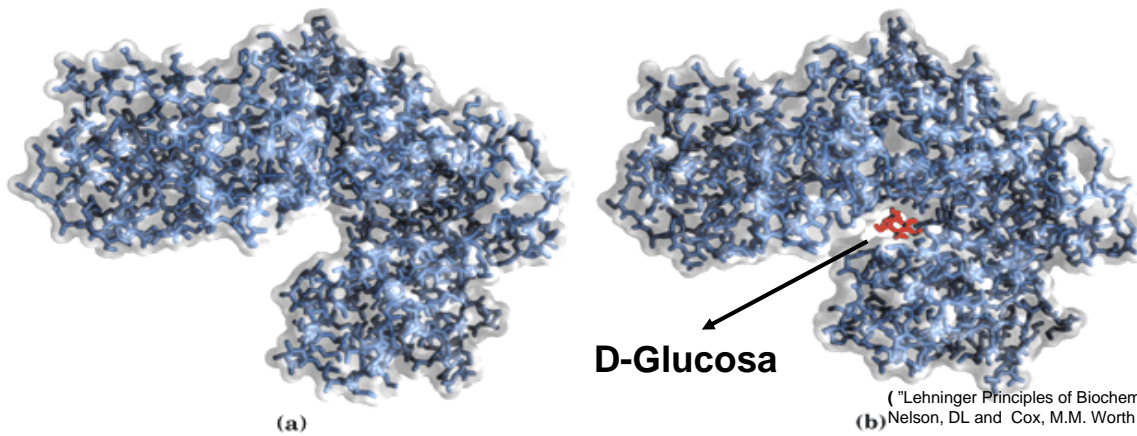
(c) Enzyme complementary to transition state



Progreso de la reacción

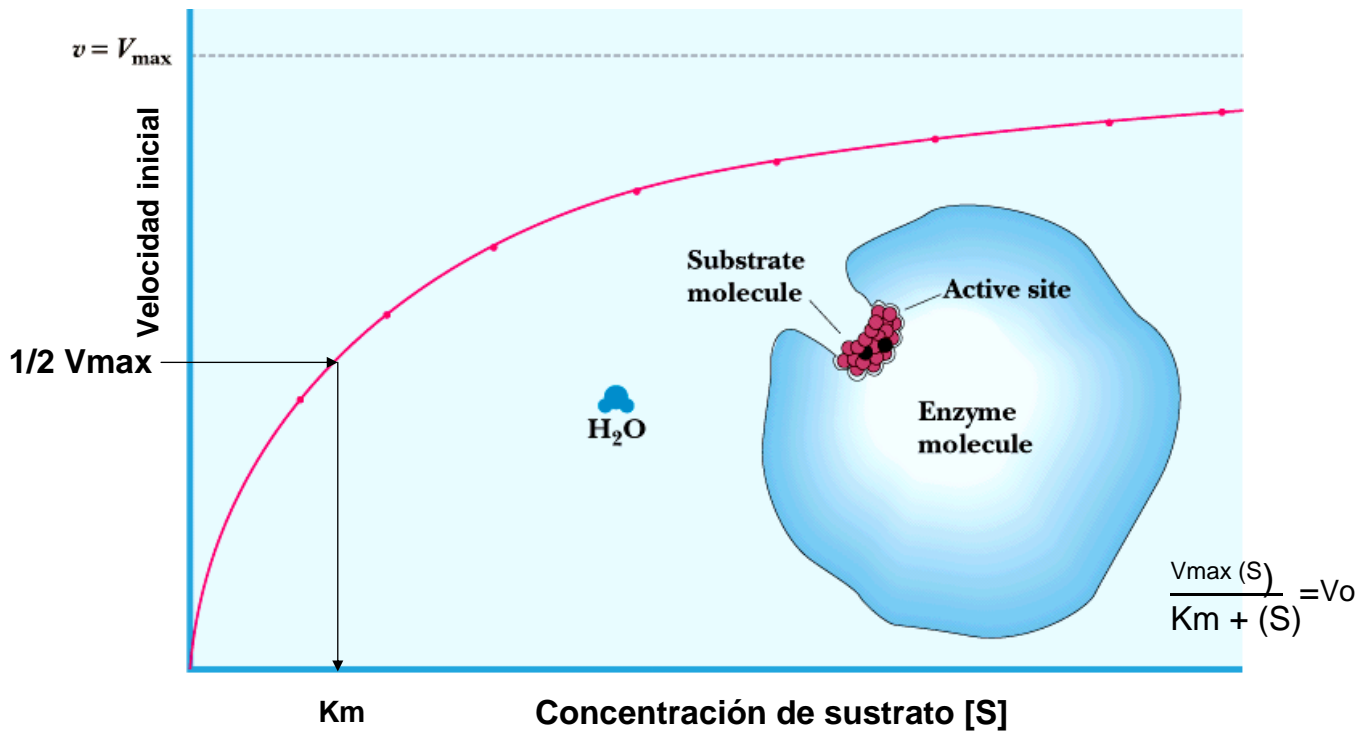


Cambio conformacional inducido por glucosa en la hexoquinasa
(Hexoquinasa = ATP:glucosa fosfotransferasa = 2.7.1.1)

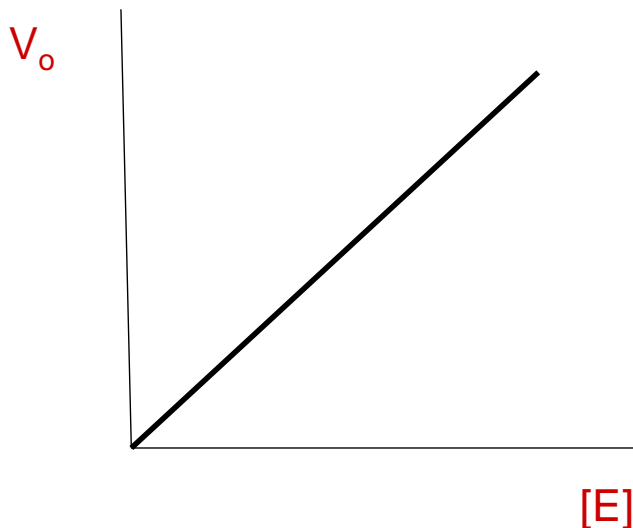


Ciclo catalítico de la enzima fructosa bifosfato aldolasa. Esta enzima cataliza la siguiente reacción: fructosa 1,6-difosfato --> gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato en la glucólisis. Después de la unión de la fructosa 1,6-difosfato y la formación del complejo enzima-sustrato, la conformación de la enzima es alterada, lo que introduce tensión en ciertos enlaces del sustrato, el cual se rompe dando lugar a los dos productos.

La V_{\max} se alcanza cuando todos los centros activos están ocupados con sustrato



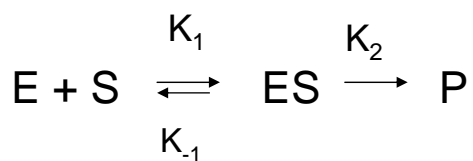
Relación entre V_o y $[E]$



La velocidad inicial es función lineal de la concentración de enzima siempre que la concentración de sustrato sea alta

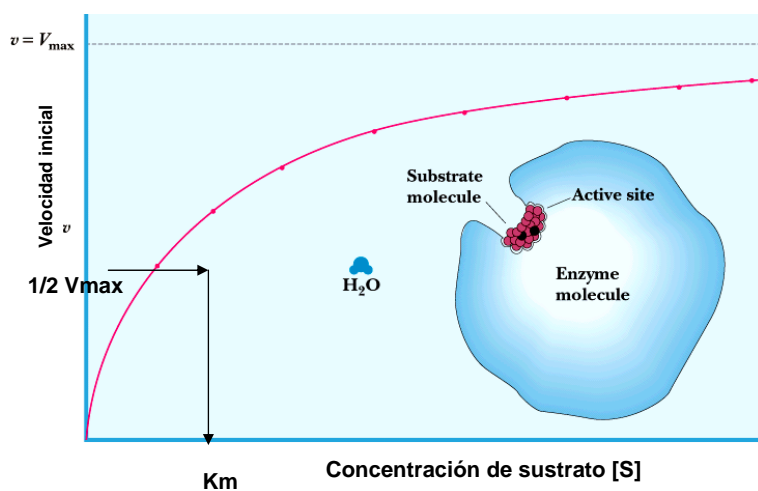
Ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$

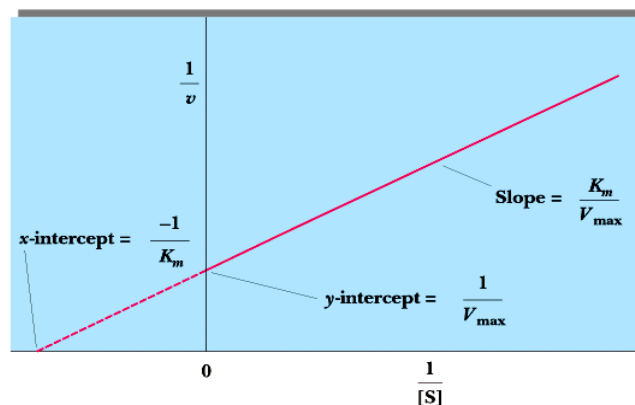


$$K_m = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_1}$$

La Vmax se alcanza cuando todos los centros activos están ocupados con sustrato

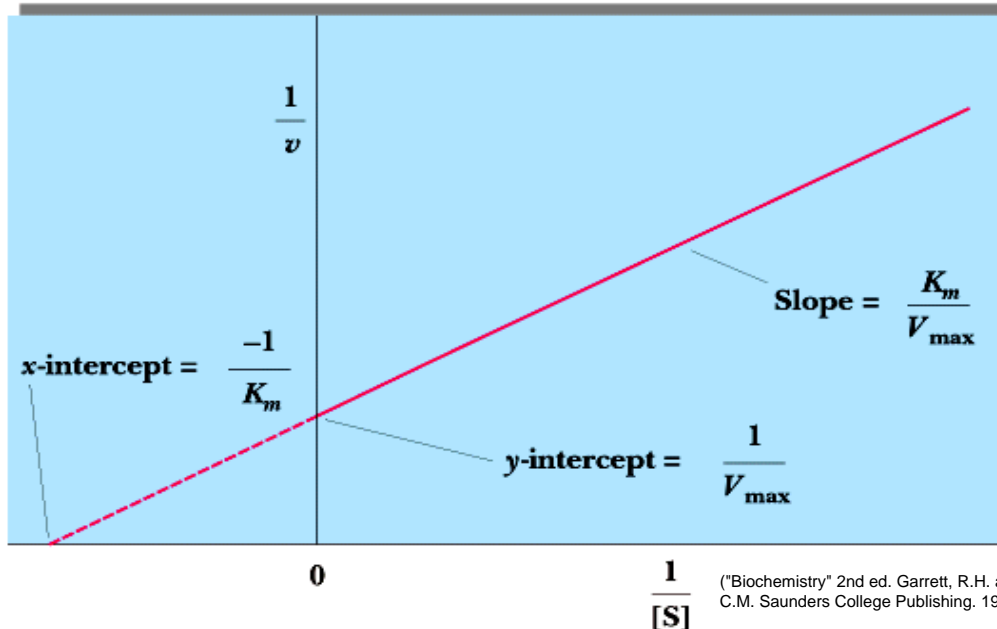


$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



Calculo de Km y Vmax por la representación de Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



("Biochemistry" 2nd ed. Garrett, R.H. and Grisham, C.M. Saunders College Publishing, 1999.)

Parámetros enzimáticos

1. K_m (constante para cada enzima) = concentración de S a la que la V_o es $1/2 V_{\max}$. Es una medida de la afinidad del enzima por S. Cuanto menor es K_m , mayor es la afinidad del enzima por S
2. K_{cat} (constante para cada enzima) = número de recambio = número de moléculas de sustrato convertidas en producto por molécula de enzima y unidad de tiempo, en condiciones de saturación de sustrato.
3. V_{\max} = velocidad máxima teórica = la velocidad cuando todos los centros activos están ocupados con sustrato (nunca alcanzada en la realidad)
4. **Unidad de enzima** = cantidad de enzima que transforma $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por min = una forma común de expresar la velocidad
5. **Actividad específica** = unidades por mg de proteína total de la preparación enzimática. En el caso de enzimas en suero: unidades/L

K_m for Some Enzymes and Substrates

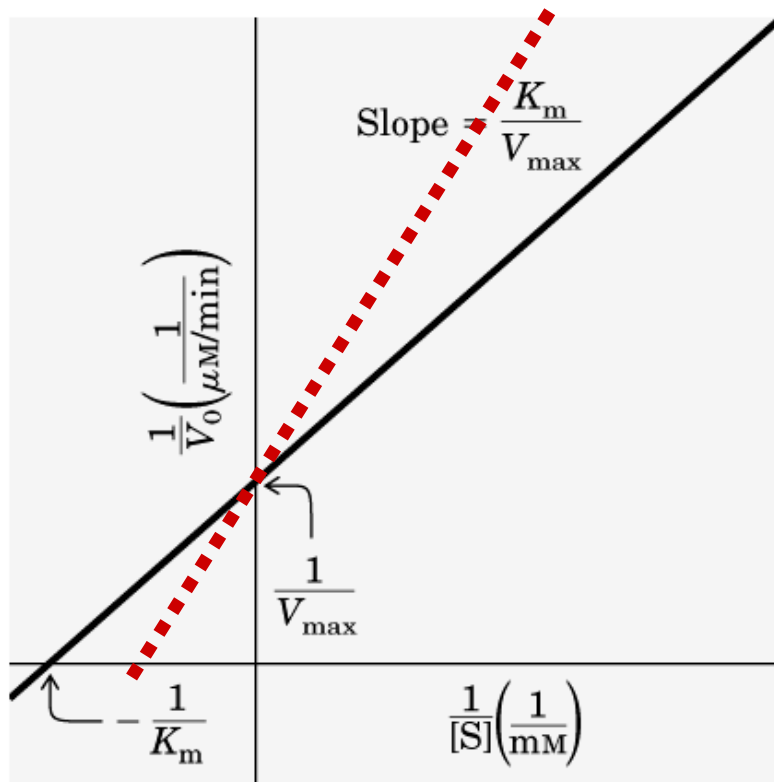
Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	25
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)
Catalase	H ₂ O ₂	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

Inhibición competitiva

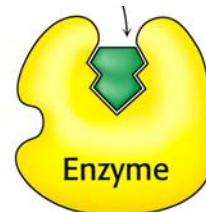
+ Inhibidor



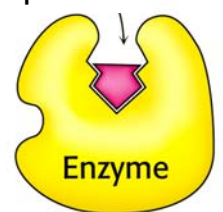
Unión del Inhibidor al centro activo, compitiendo con S

- Aumenta K_m
- No cambia V_{max}

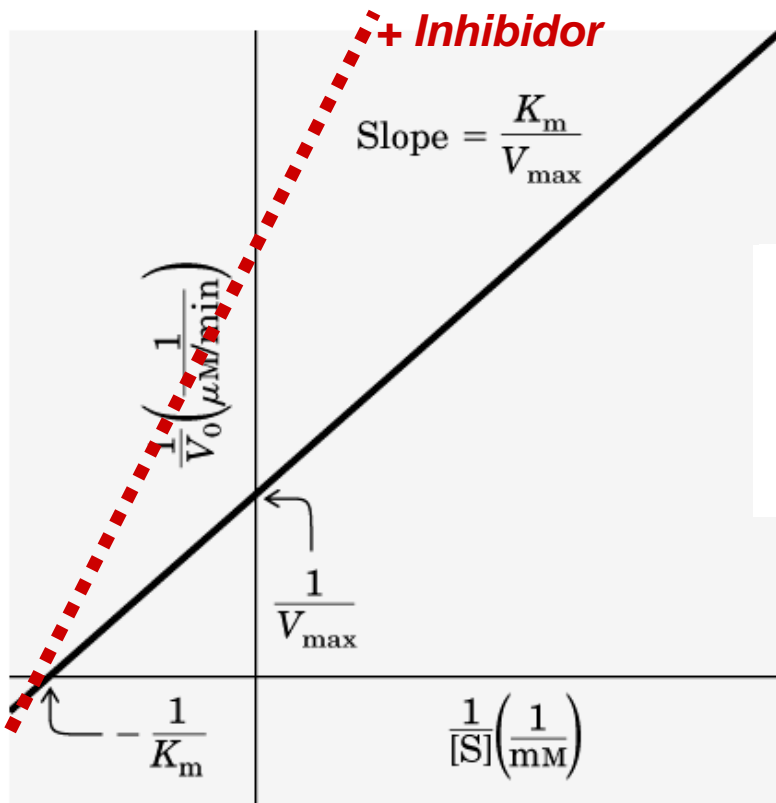
Sustrato



Inhibidor competitivo



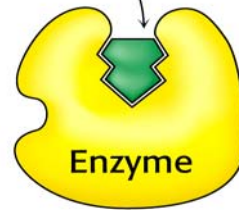
Inhibición no competitiva



Unión del Inhibidor a un sitio del enzima distinto del centro activo: no compite con S

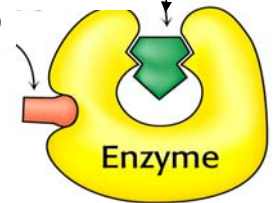
- No cambia K_m
- Disminuye V_{max}

Sustrato

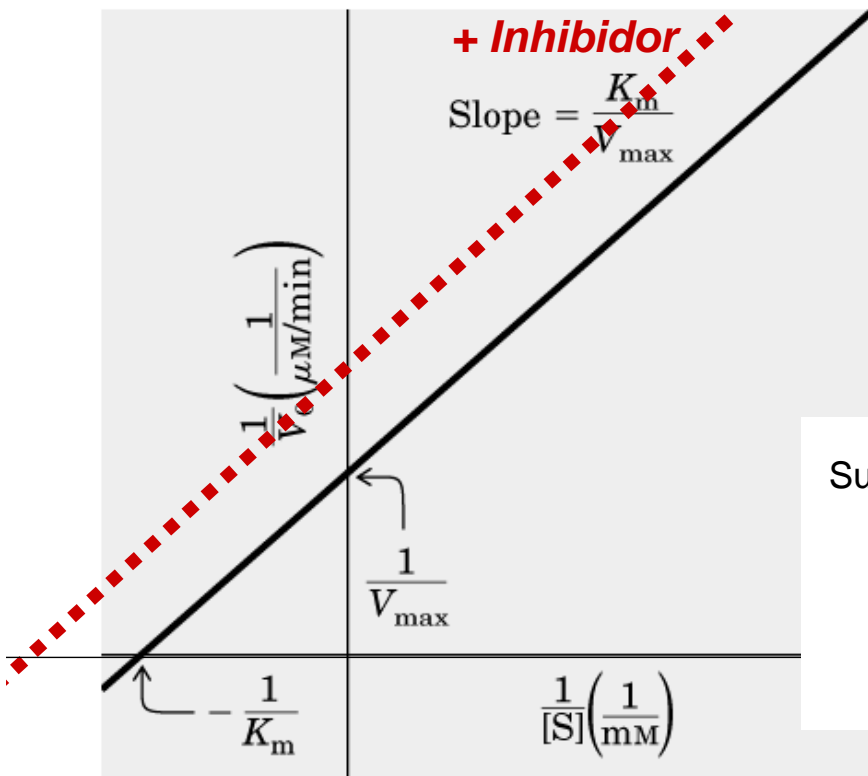


Inhibidor no competitivo

Sustrato



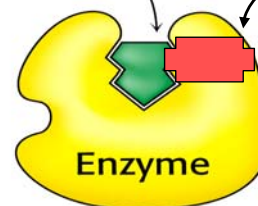
Inhibición acompetitiva



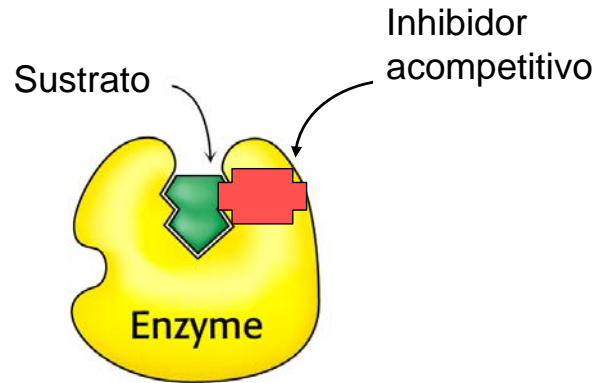
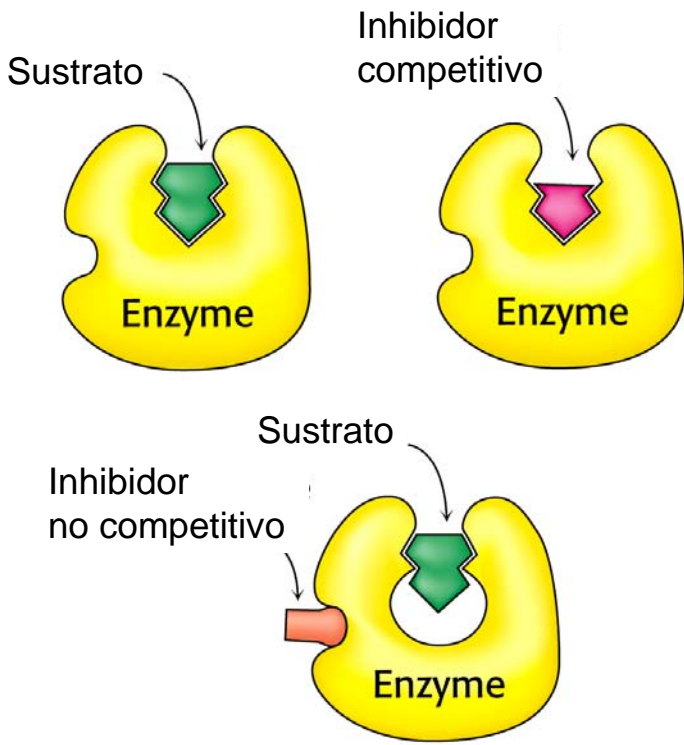
Unión del Inhibidor a enzima-S, estabilizando el complejo enzima-S pero impidiendo la formación de producto:

- Disminuye K_m
- Disminuye V_{max}

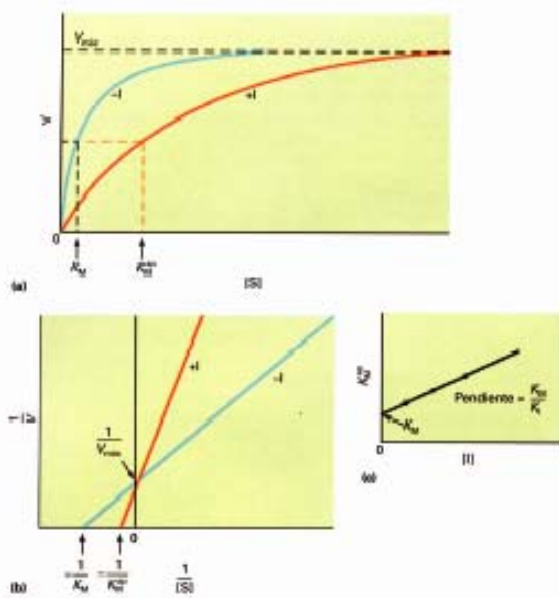
Sustrato



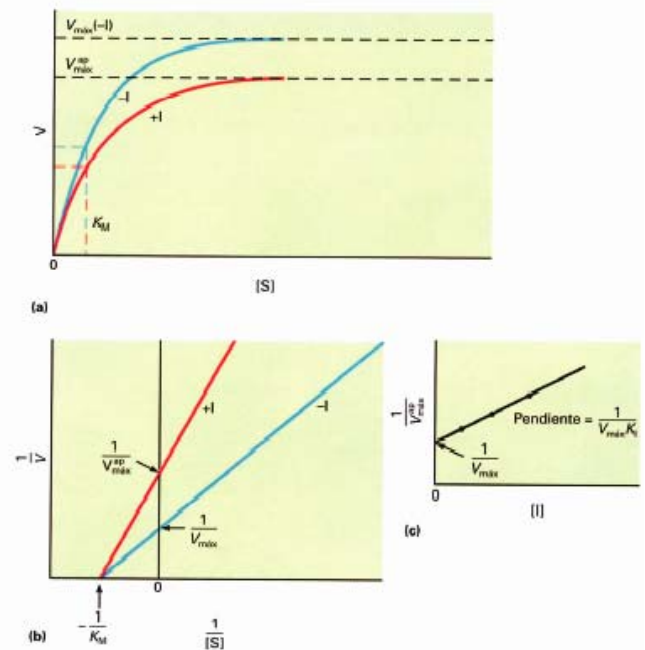
Inhibidor acompetitivo



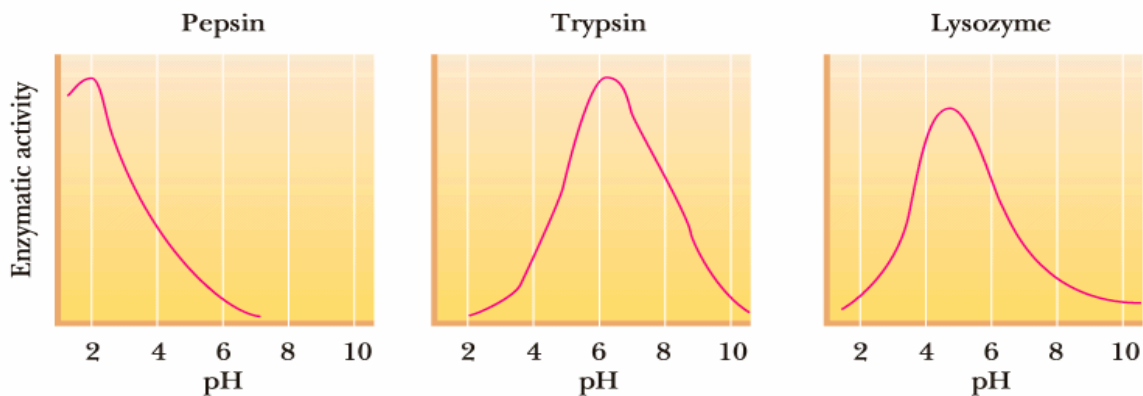
INHIBICION COMPETITIVA



INHIBICION NO COMPETITIVA



Efecto del pH sobre la actividad enzimática

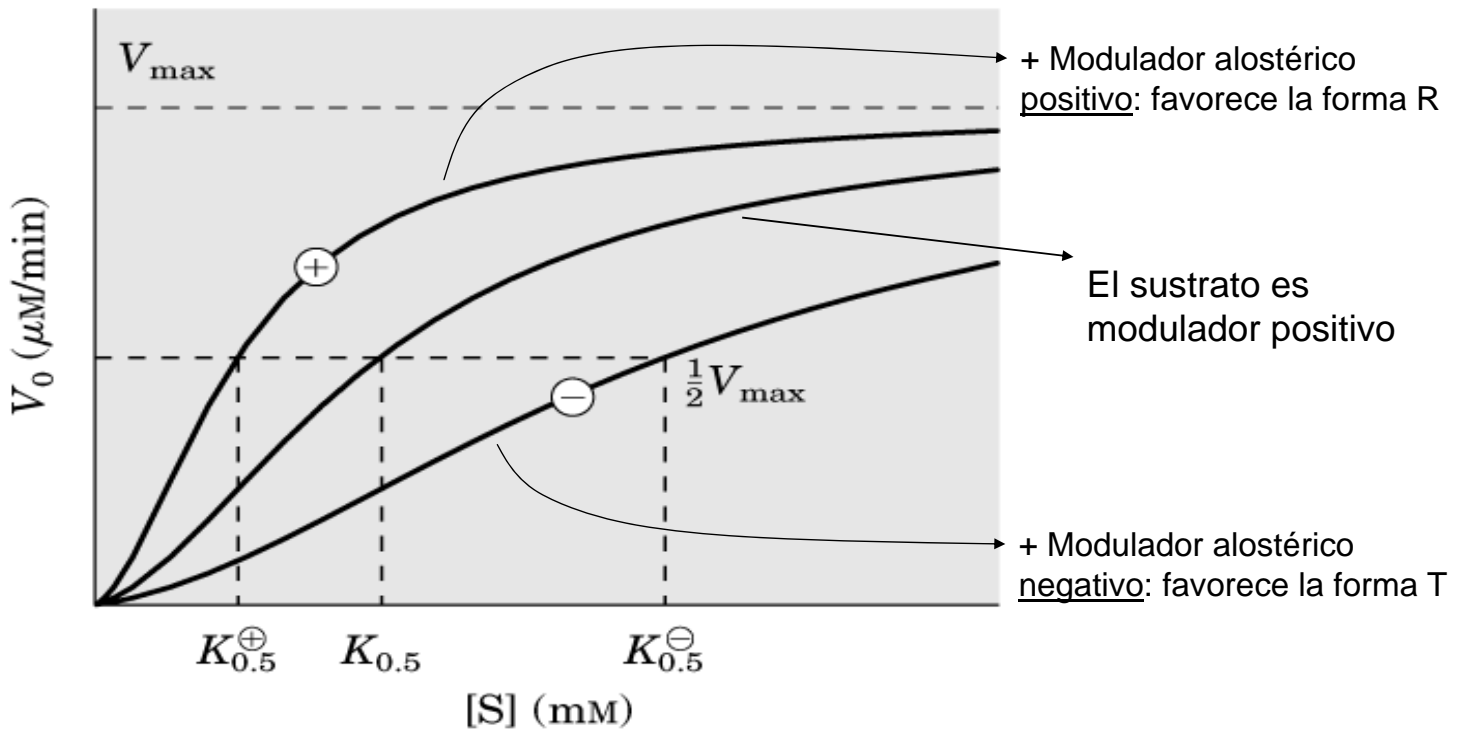


(Garret and Grisham)

MECANISMOS DE REGULACIÓN ENZIMÁTICA

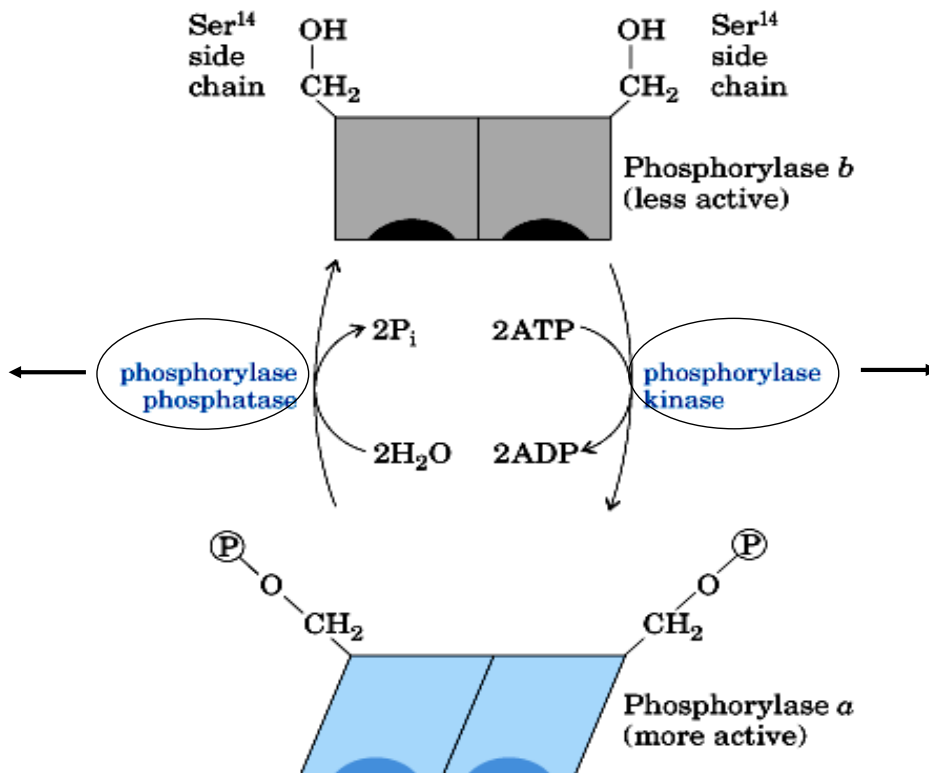
- Regulación de la **cantidad de enzima presente** en las células
- **Inhibición reversible** por productos
- Interacción con **moduladores (proteínas u otros)**
 - **Activación/inhibición alostérica**
 - El modulador alostérico se une a un sitio distinto del centro activo
 - La unión del modulador es reversible e implica cambio conformacional
 - Suelen ser enzimas multiméricas
 - Tienen cinética sigmoidea
 - **Modificación covalente:**
 - fosforilación
 - ADP-ribosilación
 - metilación
- **Activación proteolítica** de pro-enzimas

Efectos alostéricos de moduladores positivo y negativo

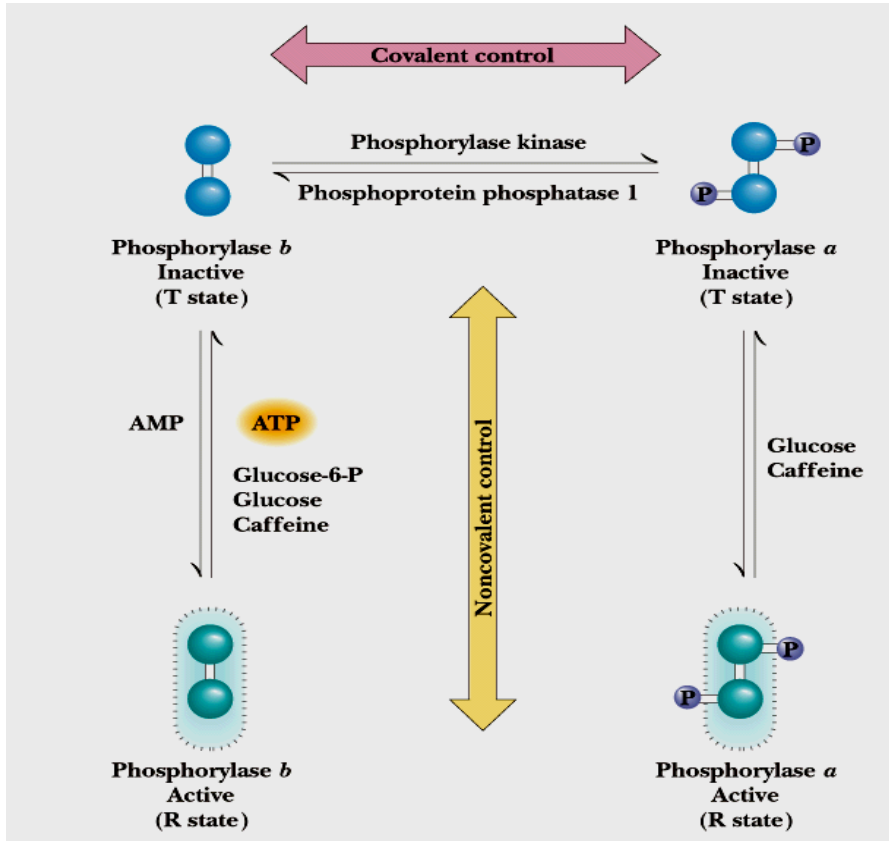


Activación/inactivación de enzimas por fosforilación

Ejemplo: glucógeno fosforilasa



Una enzima puede tener varios mecanismos de regulación



Activación de proenzimas por proteólisis

