

Bioquímica Estructural y Metabólica

TEMA 5. Enzimología



TEMA 5. 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.

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.

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.
- Muchas 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: 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 REACCIÓN + ASA

UN TERCIO DE LOS ENZIMAS REQUIEREN ALGÚN IÓN METÁLICO

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

MUCHAS VITAMINAS SON COFACTORES O PRECURSORES DE COFACTORES DE ENZIMAS

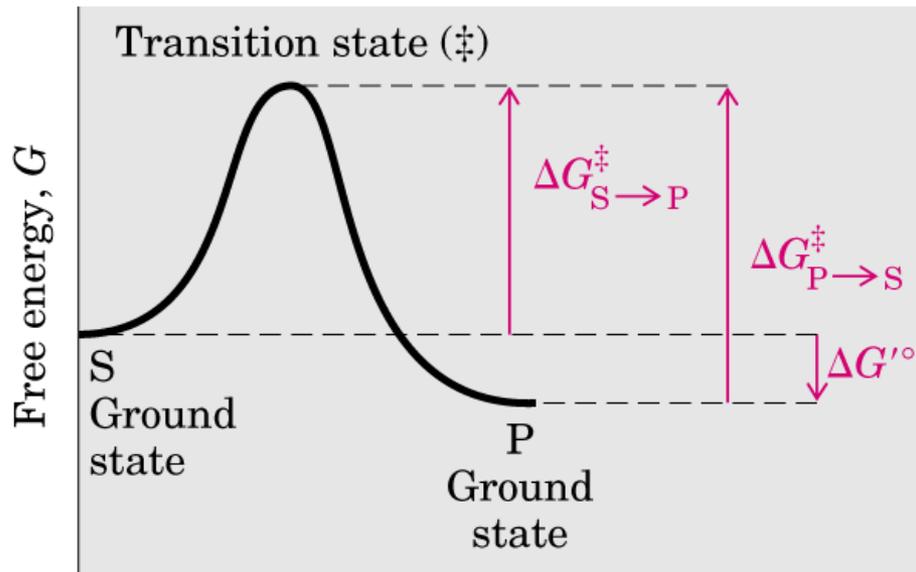
Vitamin	Coenzyme	Typical reaction type	Consequences of deficiency
Thiamine (B ₁)	Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfer	Beriberi (weight loss, heart problems, neurological dysfunction)
Riboflavin (B ₂)	Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Oxidation–reduction	Cheliosis and angular stomatitis (lesions of 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)

Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.

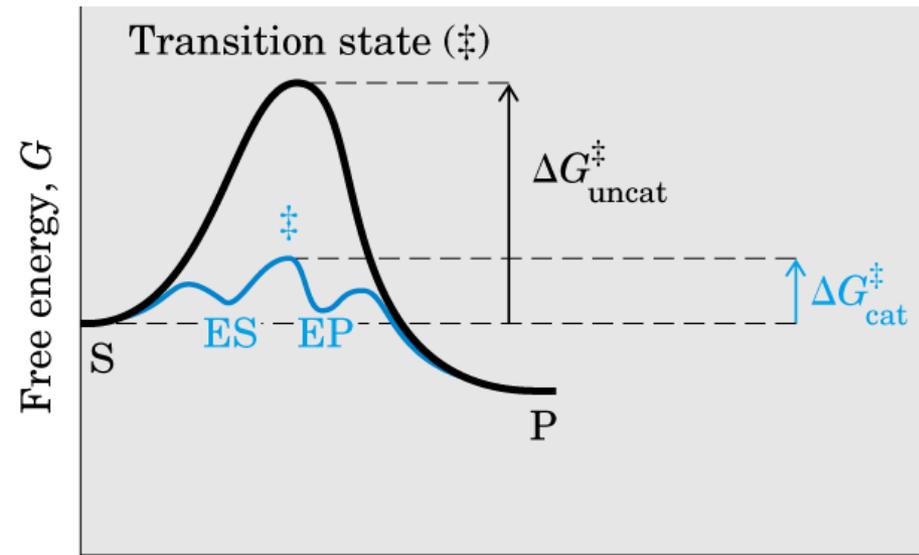
CLASES DE ENZIMAS

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

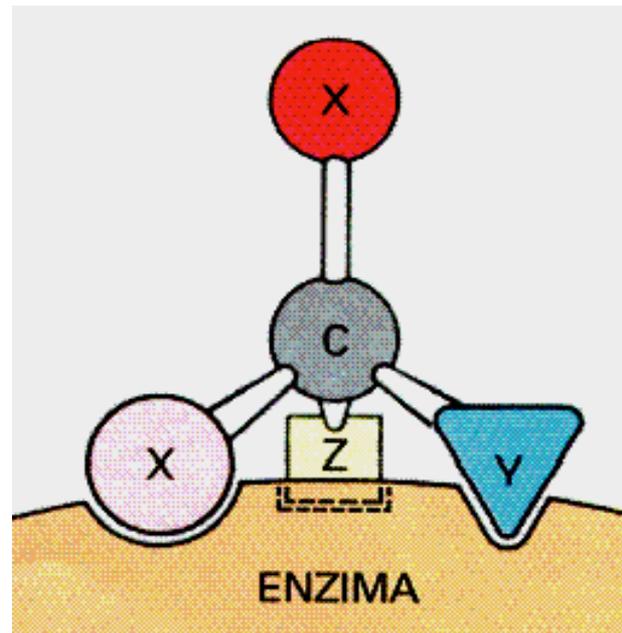


Reaction coordinate



Reaction coordinate

LOS ENZIMAS SON ESTEREOESPECÍFICAS PORQUE FORMAN VARIAS INTERACCIONES ENTRE AMINOÁCIDOS DEL CENTRO ACTIVO Y LOS DISTINTOS GRUPOS DEL SUSTRATO

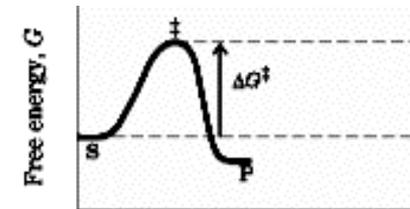


Mathews & Van Holde. Bioquímica. McGraw-Hill, 1998.

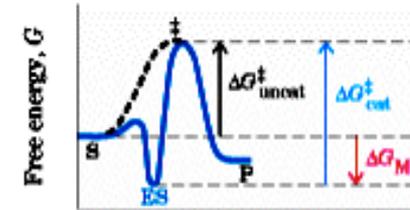
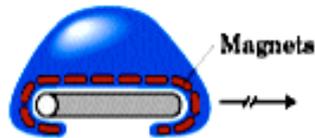
Jesús Navas Méndez

EL CENTRO ACTIVO DE LOS ENZIMAS ES COMPLEMENTARIO AL ESTADO DE TRANSICIÓN DE LA REACCIÓN CATALIZADA

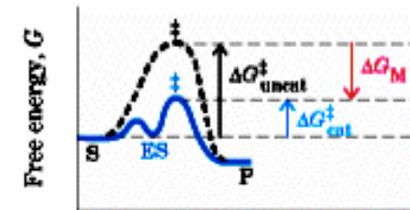
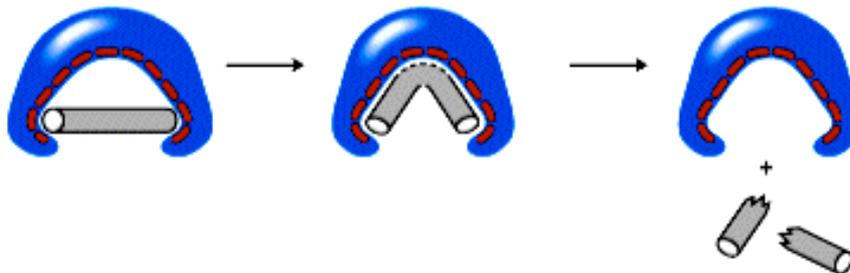
(a) No enzyme



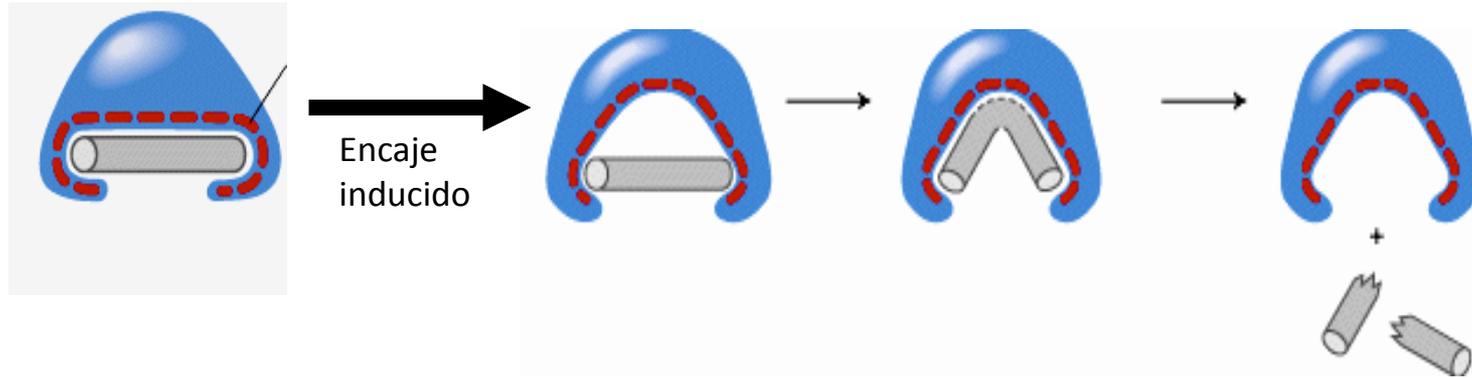
(b) Enzyme complementary to substrate



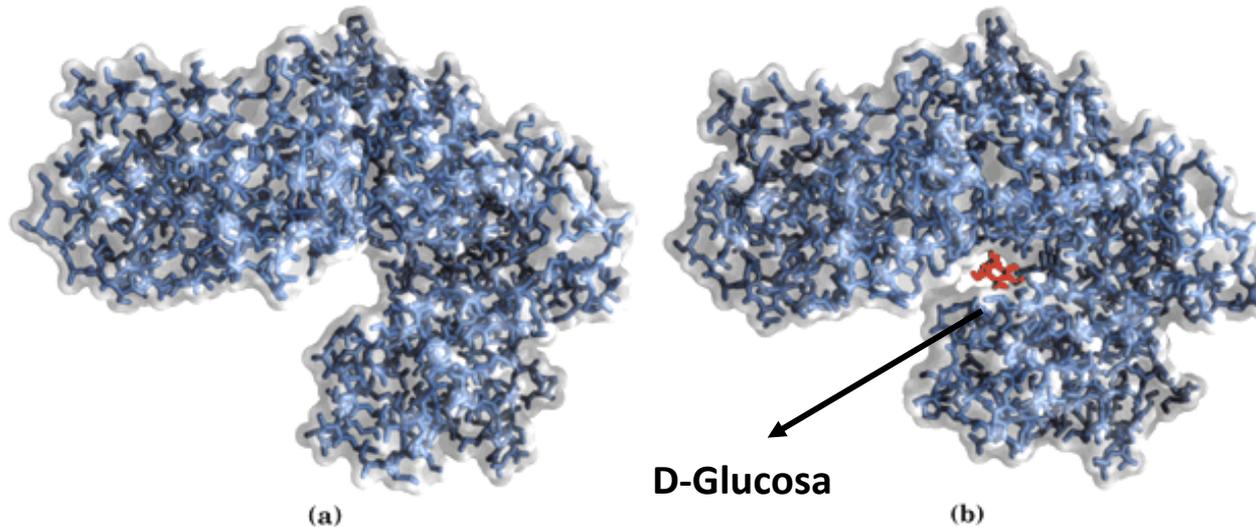
(c) Enzyme complementary to transition state



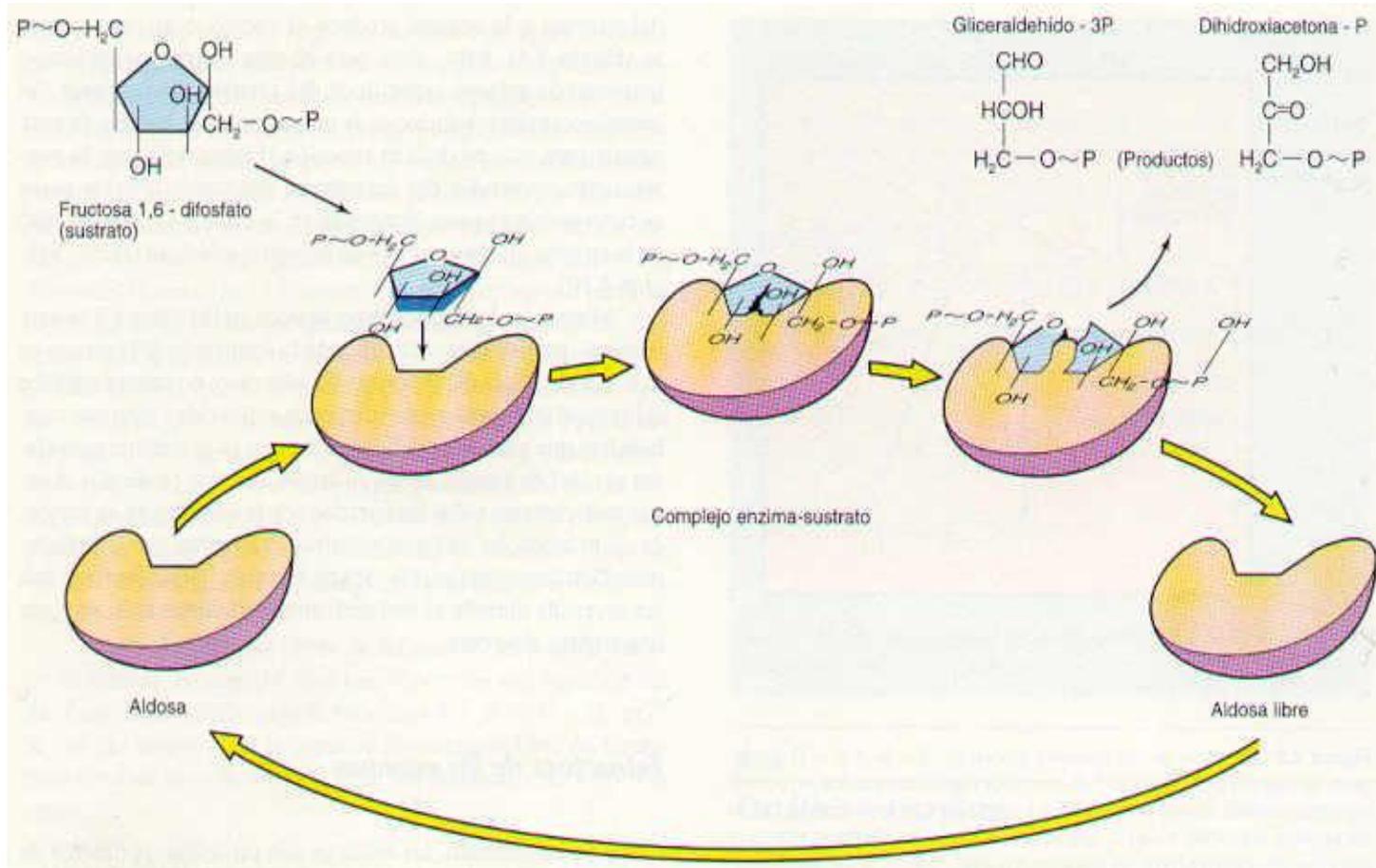
Progreso de la reacción



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

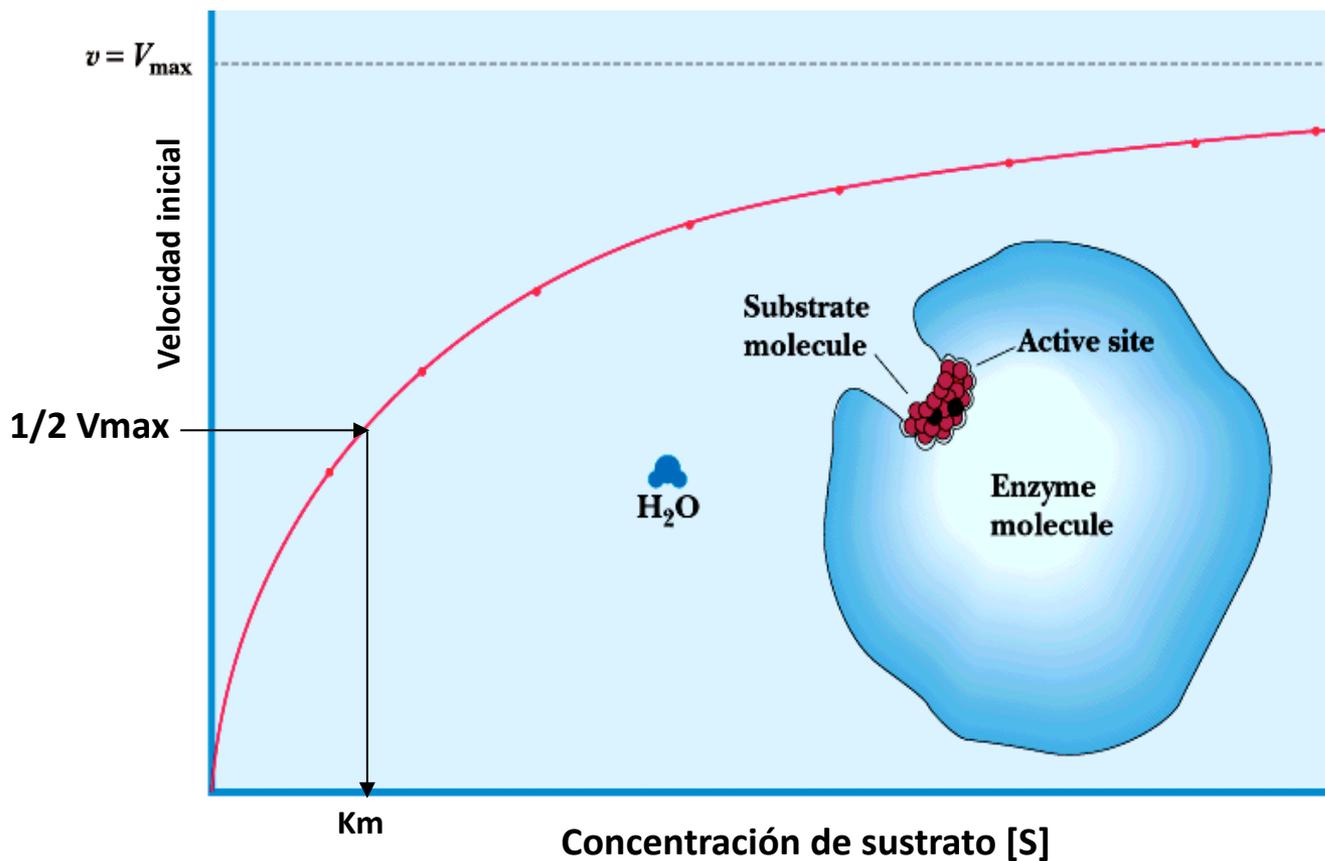


Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.



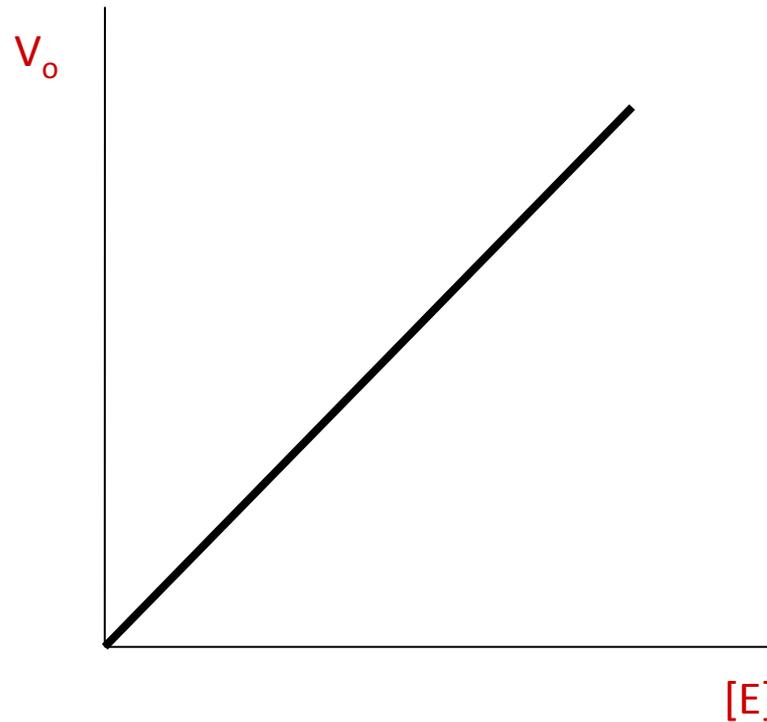
Ciclo catalítico de la enzima fructosa bifosfato aldolasa. Esta enzima cataliza la siguiente reacción: fructosa 1,6-difosfato --> gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato en la glucólisis. Después de la unión de la fructosa 1,6-difosfato y la formación del complejo enzima-sustrato, la conformación 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**



Garrett, R.H. and Grisham, C.M. *Biochemistry*. 2ª ed. Saunders College Publishing. 1999.

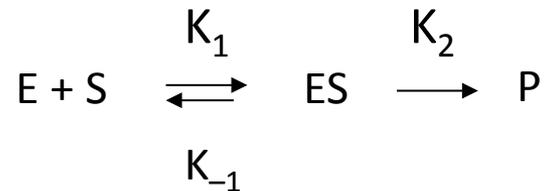
RELACIÓN ENTRE V_o y $[E]$



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

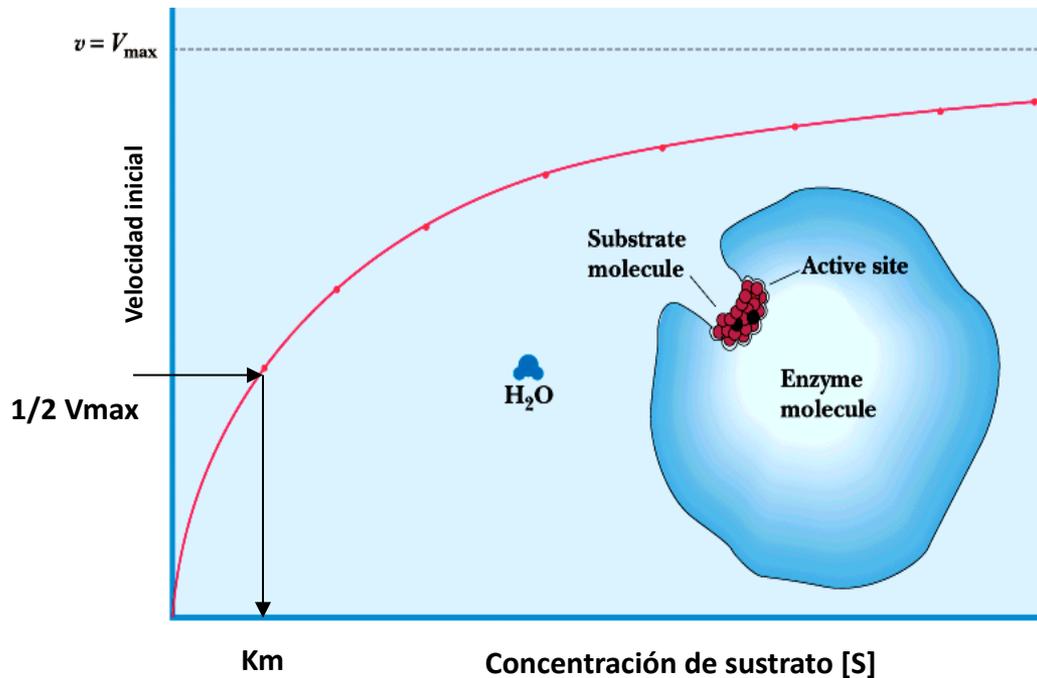
ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

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

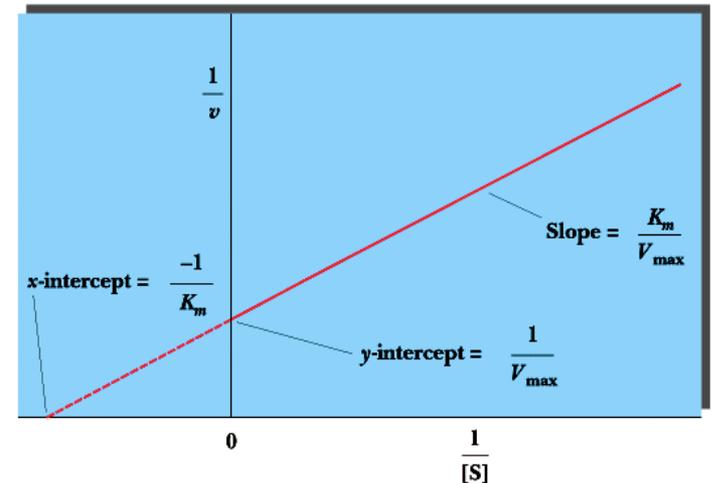


$$K_m = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_1}$$

**LA V_{max} SE ALCANZA CUANDO TODOS LOS CENTROS
ACTIVOS ESTÁN OCUPADOS CON SUSTRATO**

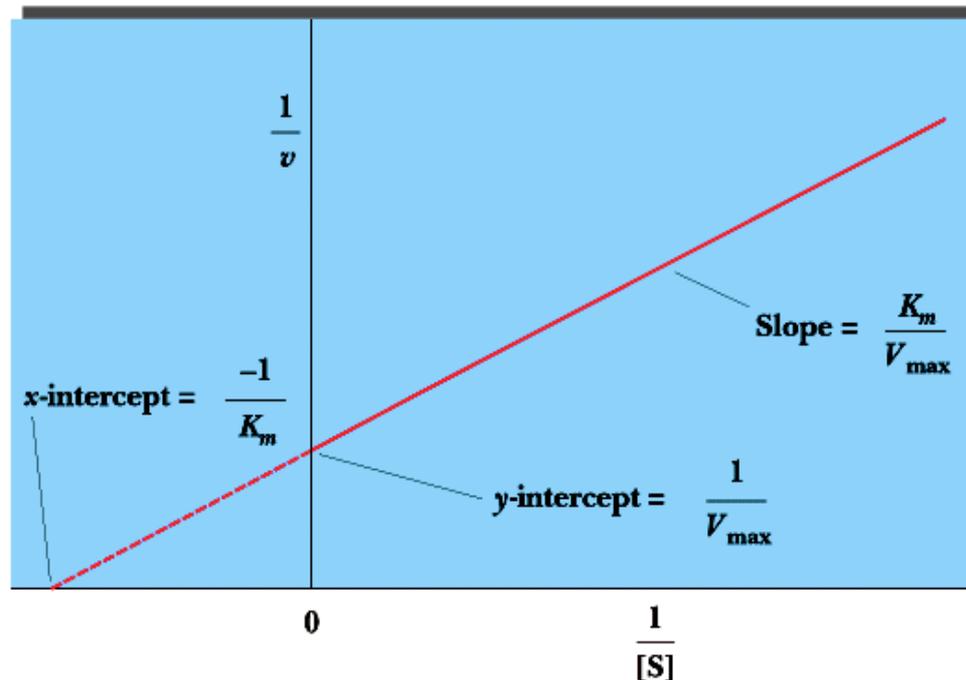


$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$



CALCULO DE K_m Y V_{max} POR LA REPRESENTACIÓN DE LINEWEAVER-BURK

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



Garrett, R.H. and Grisham, C.M. *Biochemistry*. 2ª ed. 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 μmol 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
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3^a ed. Worth Publishers, 2000.

EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

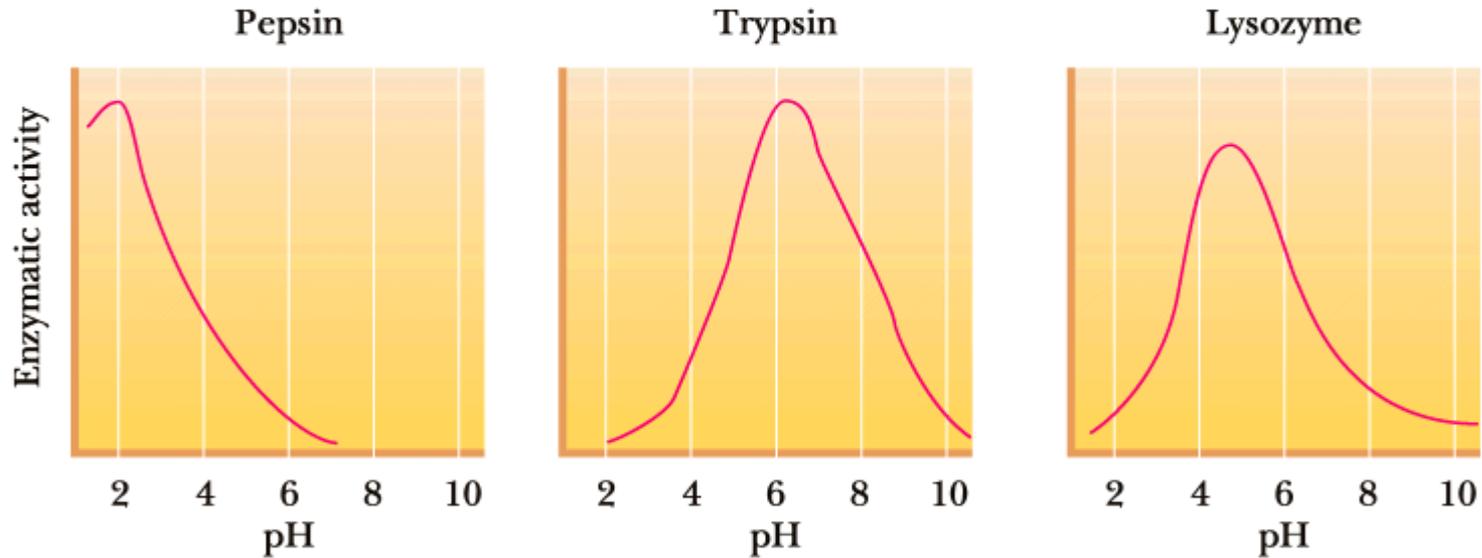
Los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado **pH óptimo**.

EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, y la tripsina lo tiene a pH 6.

Ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular: los [amortiguadores fisiológicos](#).

EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



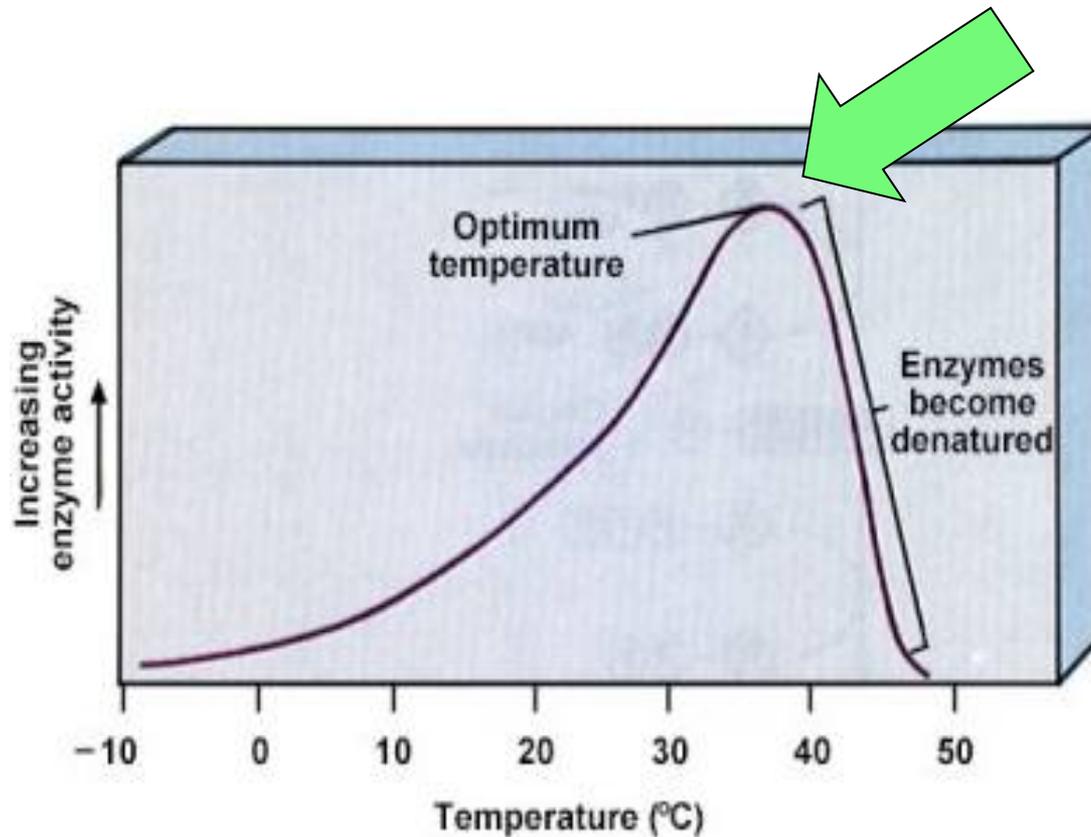
(Garret & Grisham)

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los aumentos de temperatura por lo general aceleran las reacciones químicas. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley, solo que al ser proteínas a partir de cierta temperatura se empiezan a desnaturalizar.

Esa temperatura se llama **temperatura óptima** y es aquella en la que la velocidad enzimática es máxima.

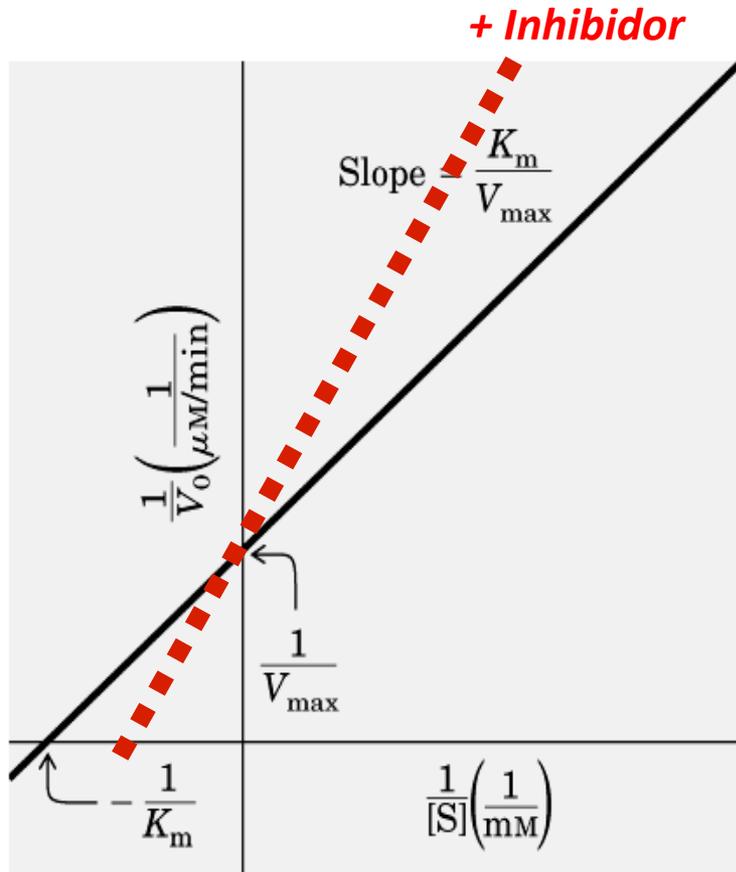
VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA



INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

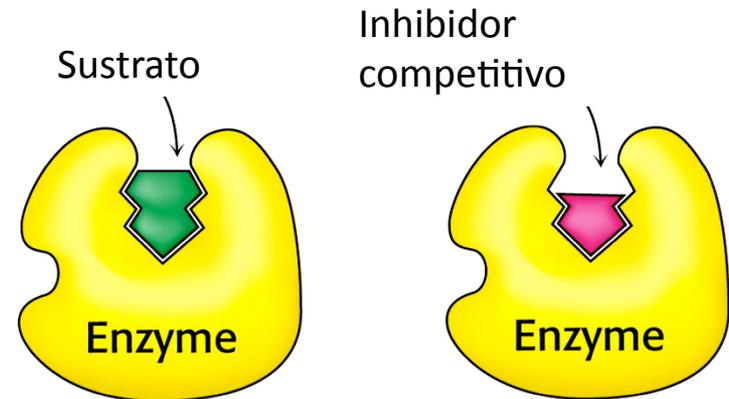
- Inhibición **irreversible** (uniones covalentes entre inhibidor y enzima. Ejemplo: fármacos).
- Inhibición **reversible**.
 - COMPETITIVA.
 - NO COMPETITIVA.

INHIBICIÓN COMPETITIVA



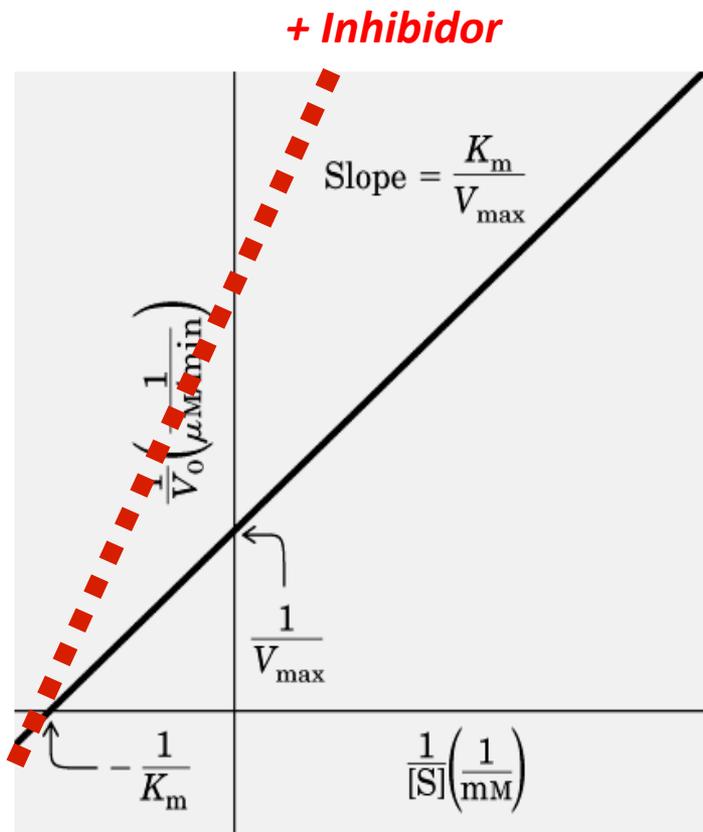
Unión del Inhibidor al centro activo, compitiendo con S:

- Aumenta K_m .
- No cambia V_{max} .



Adaptado de: Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.

INHIBICIÓN NO COMPETITIVA



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

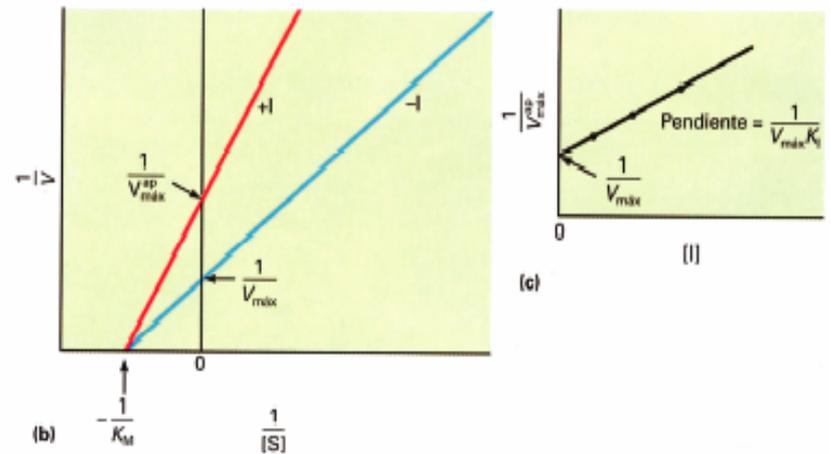
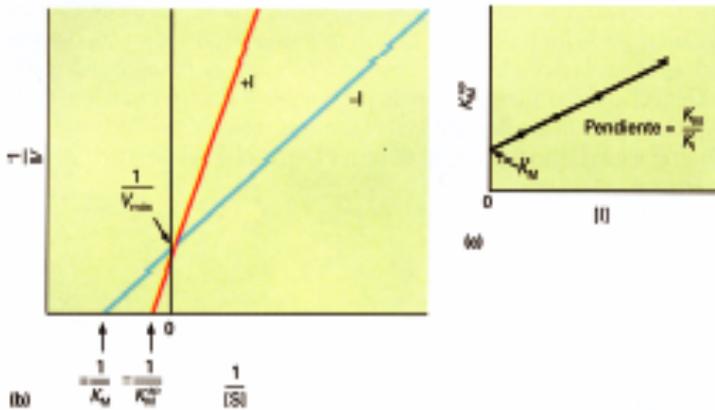
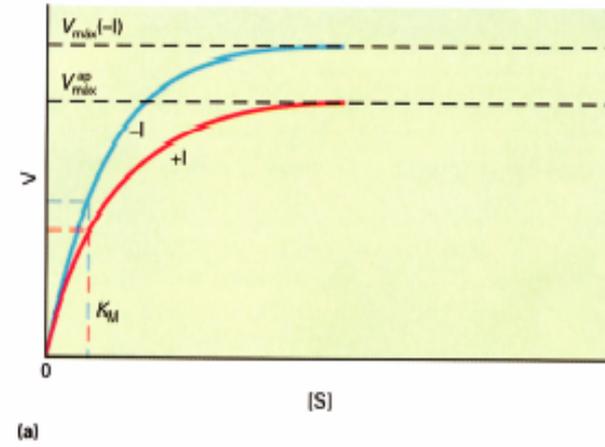
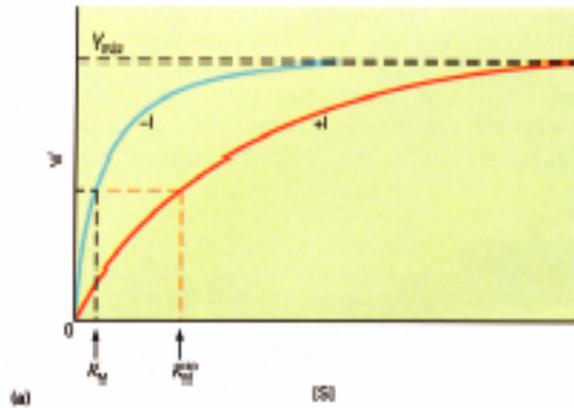
- No cambia K_m .
- Disminuye V_{max} .

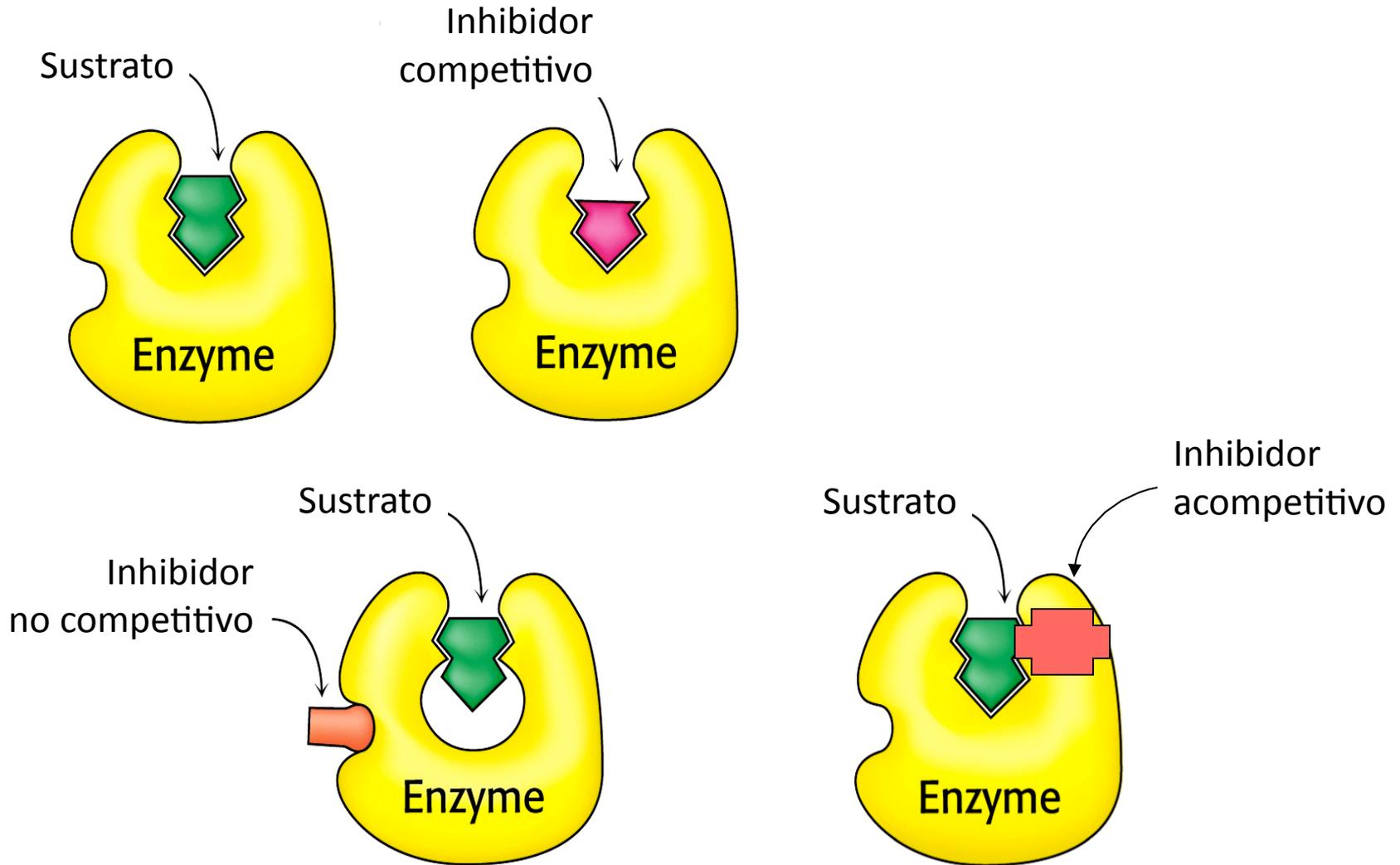


Adaptado de: Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.

INHIBICION COMPETITIVA

INHIBICION NO COMPETITIVA

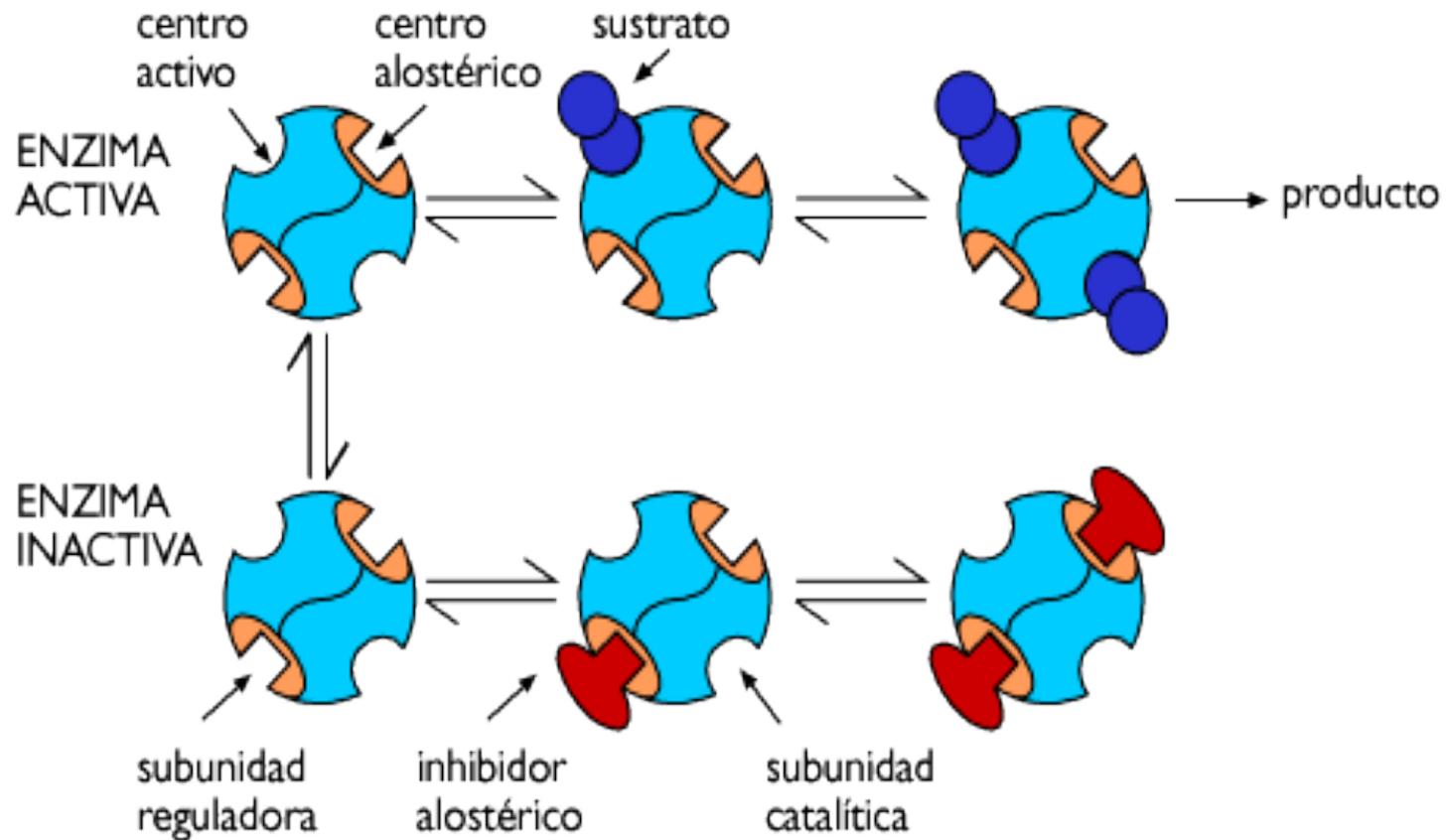




Berg, Tymoczko and Stryer. *Biochemistry*. 5ª ed. Freeman and Co, 2002.

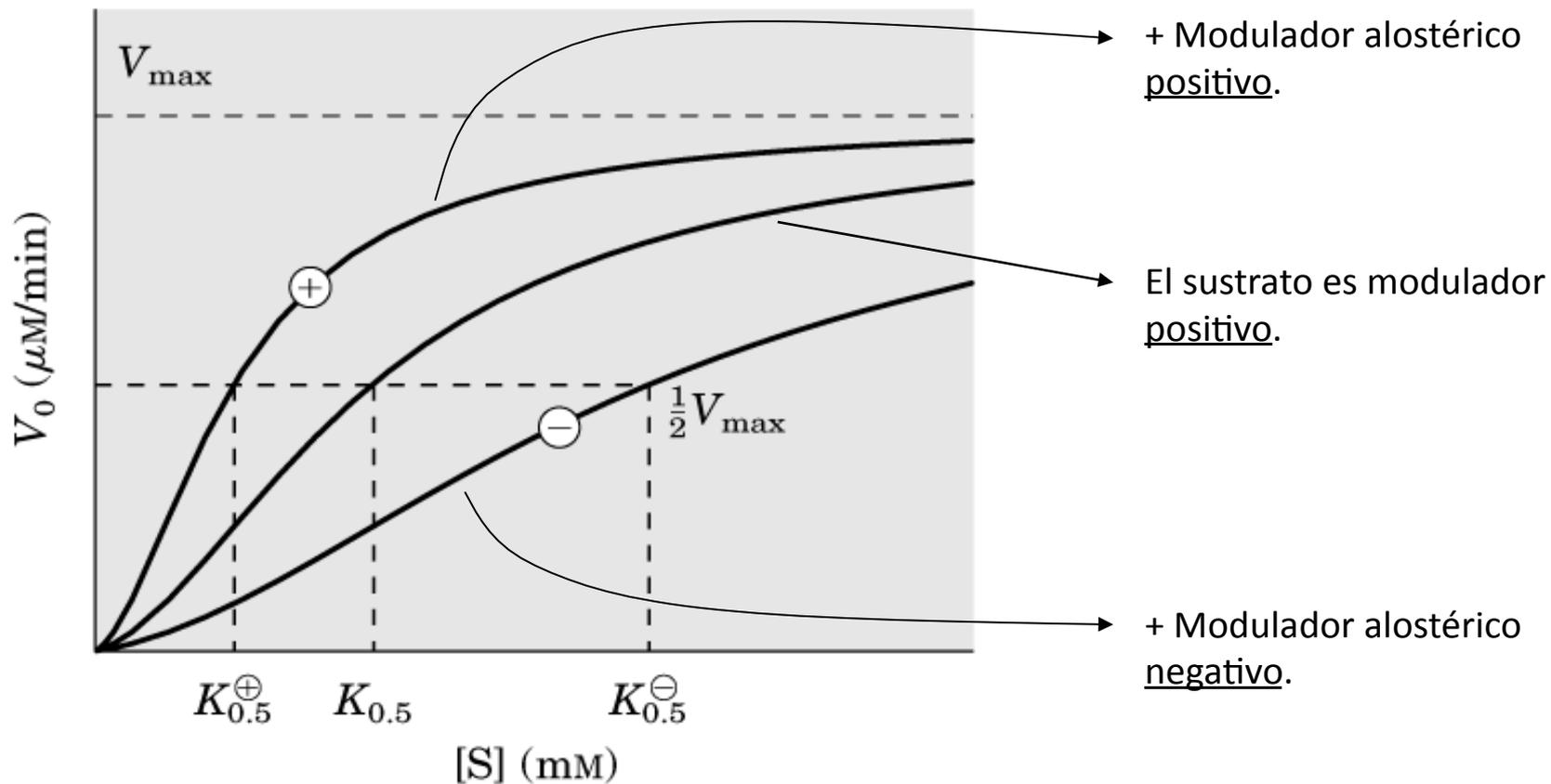
- Regulación de la **cantidad de enzima presente** en las células.
- **Inhibición reversible** por productos.
- Interacción con **moduladores (proteínas u otros)**:
 - **Activación/inhibición alostérica**:
 - El modulador alostérico se une a un sitio distinto del centro activo.
 - La unión del modulador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

ENZIMAS ALOSTÉRICOS



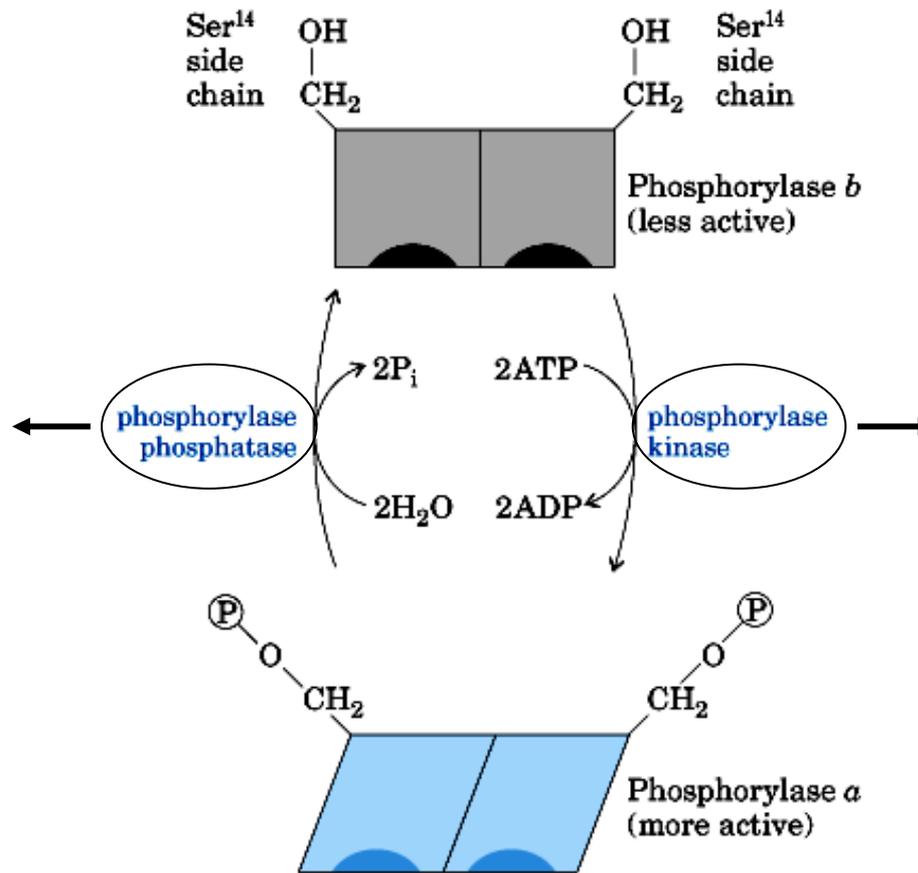
LOS ENZIMAS ALOSTÉRICOS NO PRESENTAN CINÉTICA MICHAELIANA





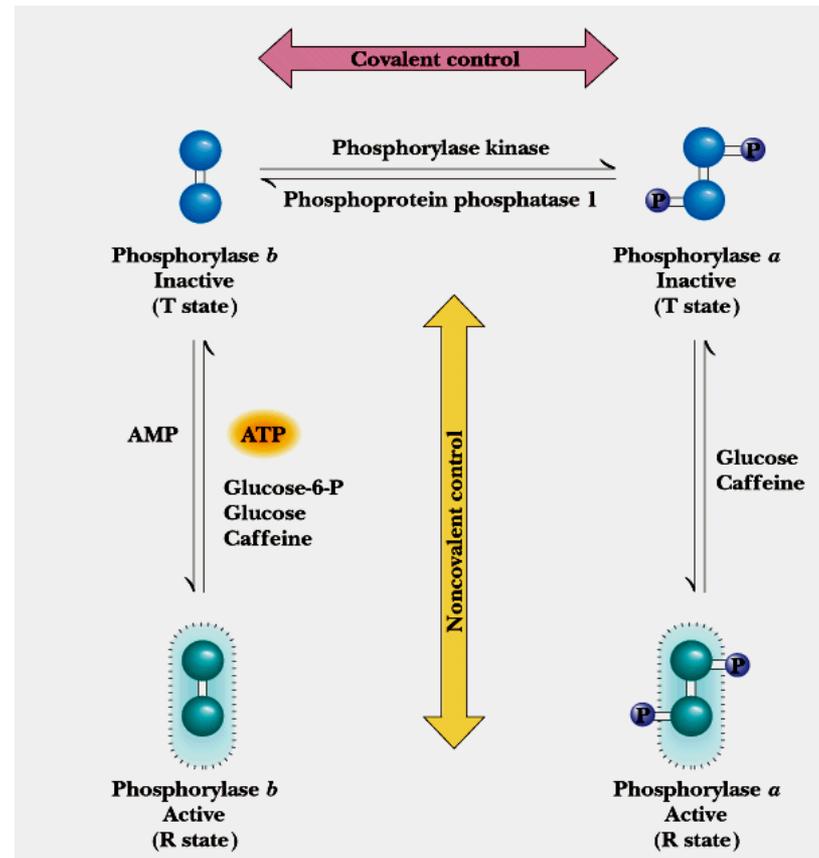
Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.

ACTIVACIÓN/INACTIVACIÓN DE ENZIMAS POR FOSFORILACIÓN EJEMPLO: GLUCÓGENO FOSFORILASA



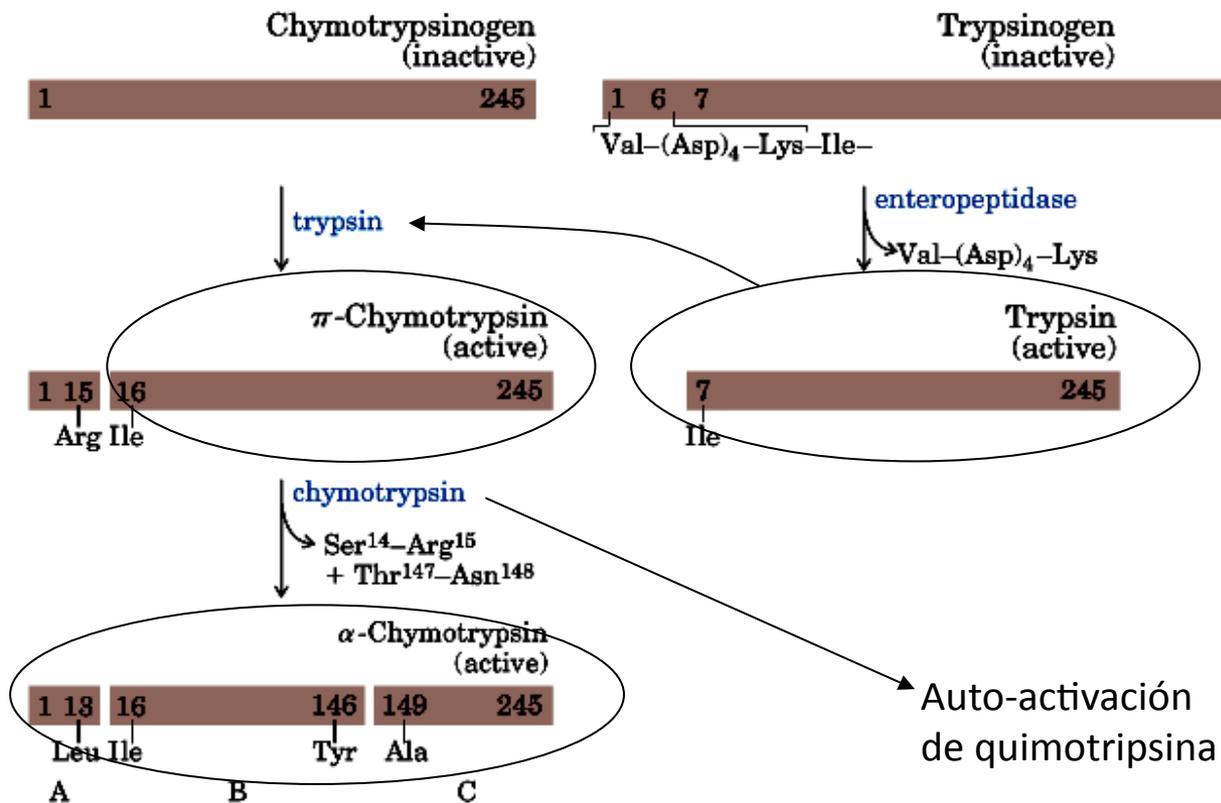
Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3^a ed. Worth Publishers, 2000.

UNA ENZIMA PUEDE TENER VARIOS MECANISMOS DE REGULACIÓN



Garrett, R.H. and Grisham, C.M. *Biochemistry*. 2ª ed. Saunders College Publishing. 1999.

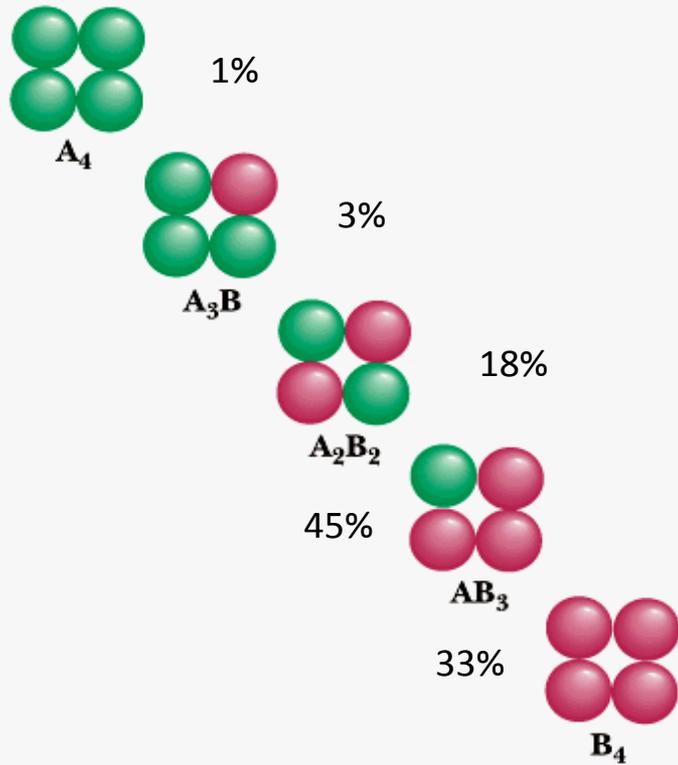
ACTIVACIÓN DE PROENZIMAS POR PROTEÓLISIS



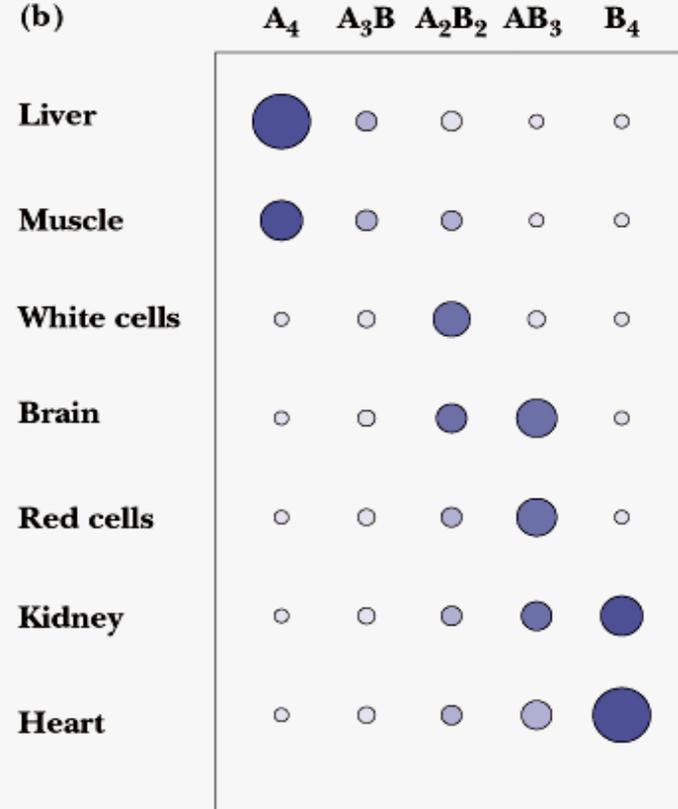
Nelson, DL and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth Publishers, 2000.

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 15.6

(a) The five isomers of lactate dehydrogenase



(b)



Saunders College Publishing

BIBLIOGRAFÍA

- *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5ª ed. Freeman, 2009. Cap 6.
- *Mark's Basic Medical Biochemistry. A clinical approach*. 3ª ed. LWW., 2008. Cap 8.
- Devlin. *Textbook of Biochemistry with Clinical correlations*. 7ª ed. Wiley, 2010. Cap 10.
- Feduchi y cols. *Bioquímica: conceptos esenciales*. Panamericana, 2011. Cap 8.
- Berg, Tymoczko and Stryer. *Biochemistry*. 7ª ed. WH. Freeman, 2011. Caps 8, 9.
- Voet and Voet. *Biochemistry*. 4ª ed. Wiley, 2011. Caps 13, 14, 15.
- Baynes and Dominiczak. *Bioquímica Médica*. 3ª ed. Elsevier, 2011. Cap 6.
- Garrett and Grisham. *Biochemistry*. 4ª ed. 2009. Caps 13, 14, 15.