

BLOQUE TEMATICO II:

TEMA 4: Enzimas y cofactores. Terapia enzimática y marcadores proteicos en clínica

“L'autor/L'autora s'acull a l'article 32 de la Llei de propietat intel·lectual vigent respecte de l'ús parcial d'obres alienes com ara imatges, gràfics o altre material contingudes en les diferents diapositives, donat el caràcter i la finalitat exclusivament docent i eminentment il·lustrativa de les explicacions a classe d'aquesta presentació,”

“El autor/La autora se acoge al artículo 32 de la Ley de Propiedad Intelectual vigente respecto al uso parcial de obras ajenas, como imágenes, gráficos u otro material contenido en las diferentes diapositivas., dado el carácter y la finalidad exclusivamente docente y eminentemente ilustrativa de las explicaciones en clase de esta presentación,”

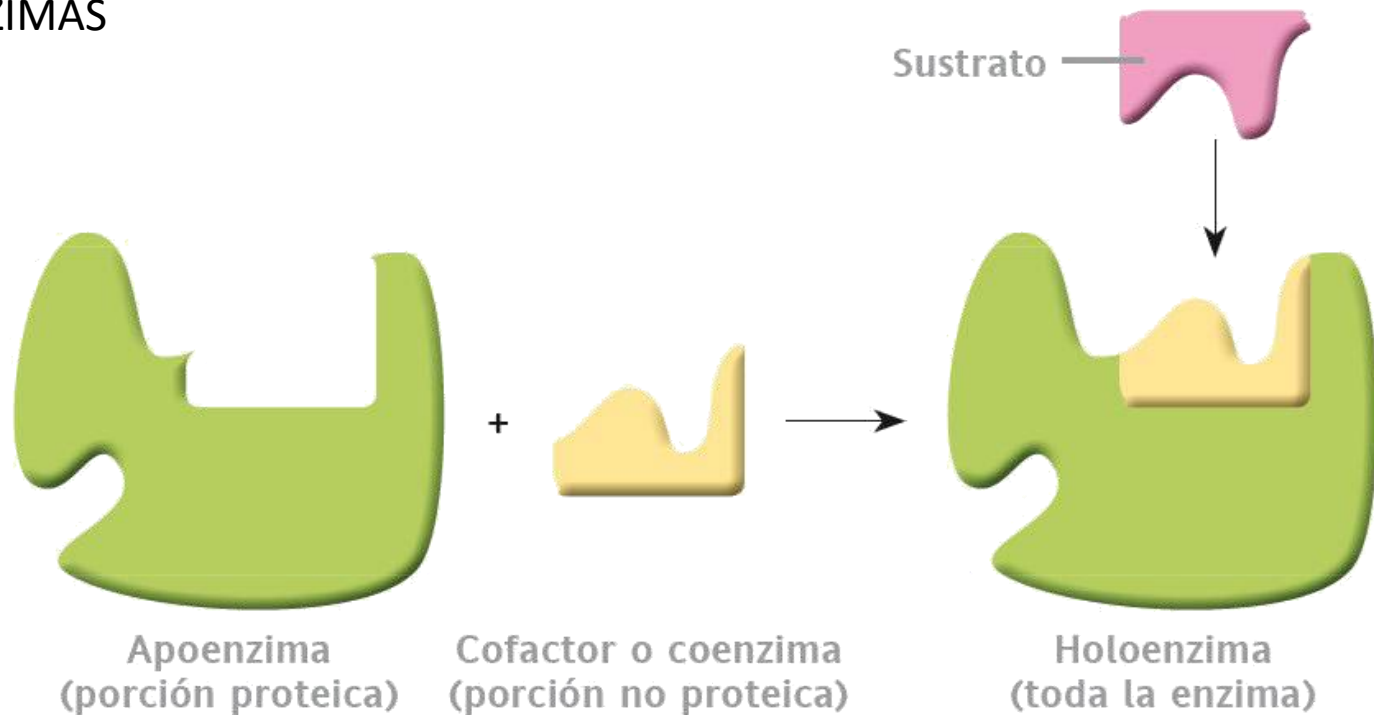
INDICE

- Definiciones y nomenclatura.
- Características generales de las enzimas.
- Centro activo de las enzimas: propiedades e interacciones enzima-sustrato. Factores que intervienen en la catálisis enzimática.
- Cinética enzimática. Ecuación de Michaelis-Menten. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .
- Inhibición enzimática reversible e irreversible
- Alostерismo: regulación homoalostérica y heteroalostérica. Hemoglobina.
- Regulación de la actividad enzimática.
- Aplicaciones clínicas de las enzimas.

DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

- CATALIZADORES BIOLÓGICOS:

- ENZIMAS
- RIBOZIMAS
- ABZIMAS



DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

Algunas coenzimas que actúan como cofactores enzimáticos

Coenzima	Ejemplos de grupos químicos transferidos	Precursor en mamíferos
Biocitina	CO ₂	Biotina
Coenzima A	Grupos acilo	Ácido pantoténico B ₅
Coenzima B ₁₂	Átomos de H y grupos alquilo	Vitamina B ₁₂
Flavina adenina dinucleótido	Electrones	Riboflavina (vitamina B ₂)
Lipoato	Electrones y grupos acilo	No se requiere en la dieta
Nicotinamida adenina dinucleótido	Ion hidruro (:H ⁻)	Ácido Nicotínico (niacina B ₃)
Piridoxal fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B ₆)
Tetrahidrofolato	Grupos monocarbonados	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldehídos	Tiamina (vitamina B ₁)

DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

Iones	Enzima
Cu^{2+}	Citocromo oxidasa
Fe^{2+} o Fe^{3+}	Citocromo oxidasa, catalasa
K^{+}	Piruvato quinasa
Mg^{2+}	Hexoquinasa, glucosa-6-fosfato
Mn^{2+}	Arginasa, ribonucleótido reductasa
Mo	Dinitrogenasa, nitrato reductasa
Ni^{2+}	ureasa
Se	Glutation peroxidasa
Zn^{2+}	Alcohol deshidrogenasa

Iones que actúan como cofactores enzimáticos

DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

Nomenclatura tradicional

Ureasa: hidrólisis de urea

Amilasa: hidrólisis de almidón

DNA polimerasa: polimerización de nucleótidos formando DNA

Tripsina

Número de clasificación

Carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1)

Clase: 3 → Hidrolasas.

Subclase: 4 → Enlace peptídico

17 → metalocarboxipeptidasas.

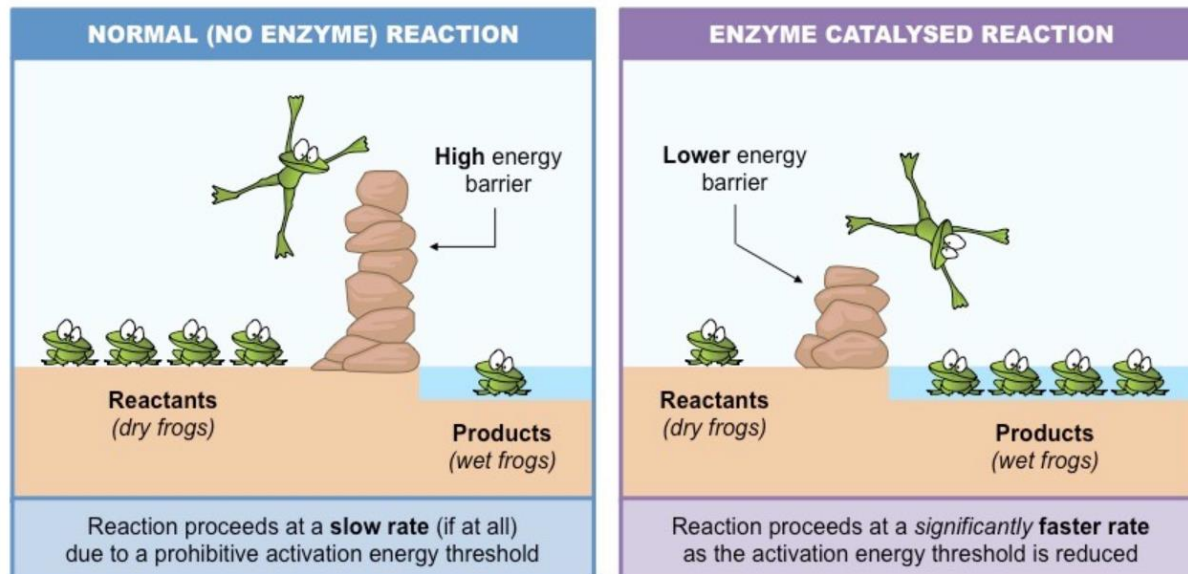
Nº de orden: 1

DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

Nº	Clase	Tipo de reacción	Ejemplos
1	Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción	Glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4)
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra	Hexoquinasa (EC 2.7.1.2)
3	Hidrolasas	Rupturas hidrolíticas	Carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos	Piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1)
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas	Malato isomerasa (EC 5.2.1.1)
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP	Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1)

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS

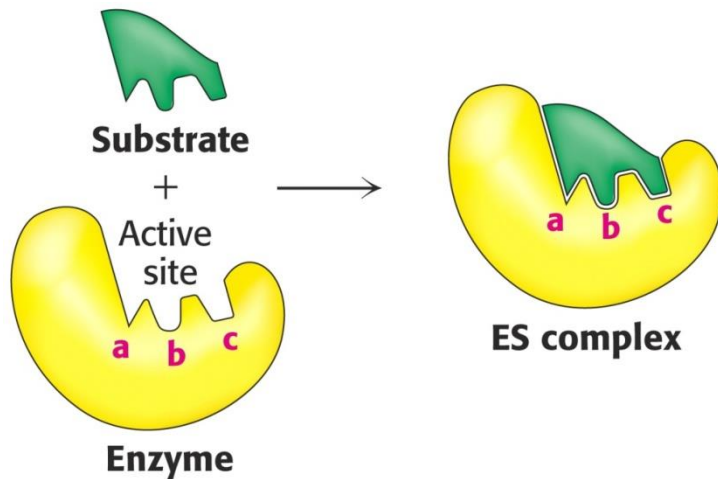
- Elevada eficacia catalítica de las enzimas
- Las enzimas se recuperan en su estado inicial tras cada ciclo catalítico
- Son catalizadores específicos (incluso estereoespecíficos)
- Capacidad para la regulación



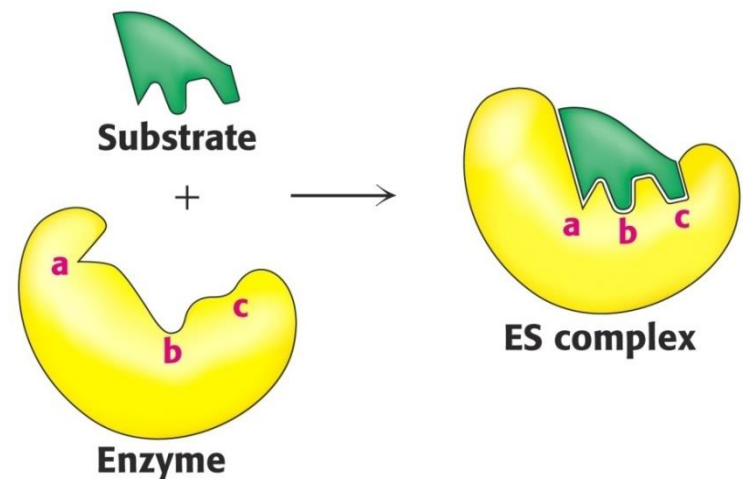
CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

Responsable de la **especificidad** y **capacidad catalítica** de las enzimas

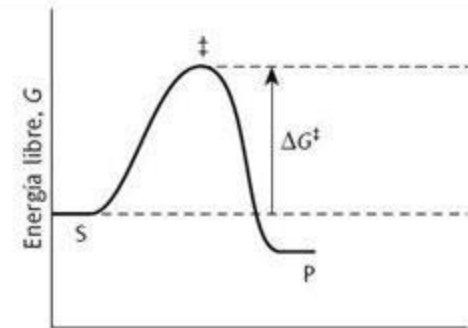
Modelo de la llave y la cerradura
(Fischer, 1890)



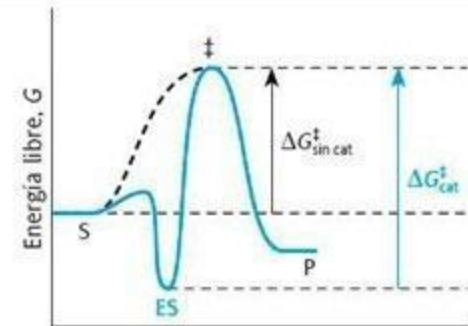
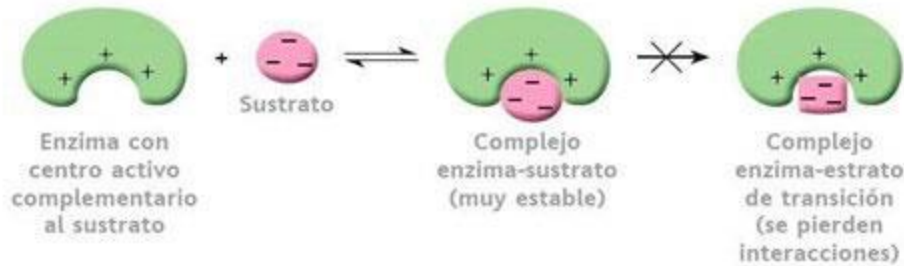
Teoría del ajuste inducido
(Koshland & Neet, 1968)



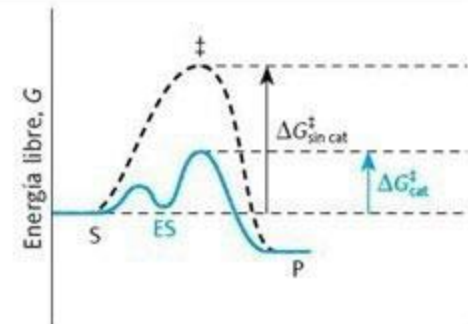
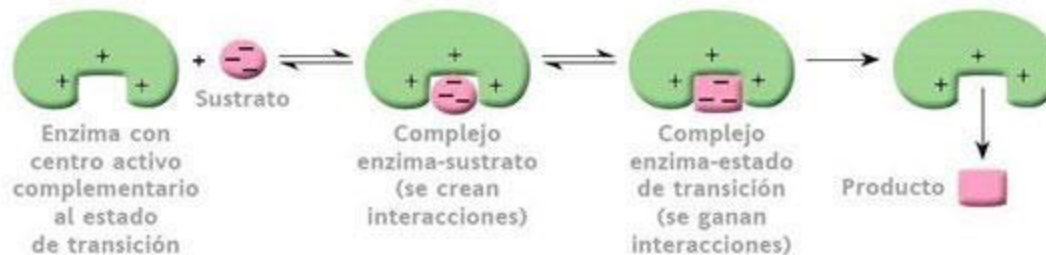
(a) Reacción sin catalizar



(b) Modelo de Fischer (llave y cerradura)

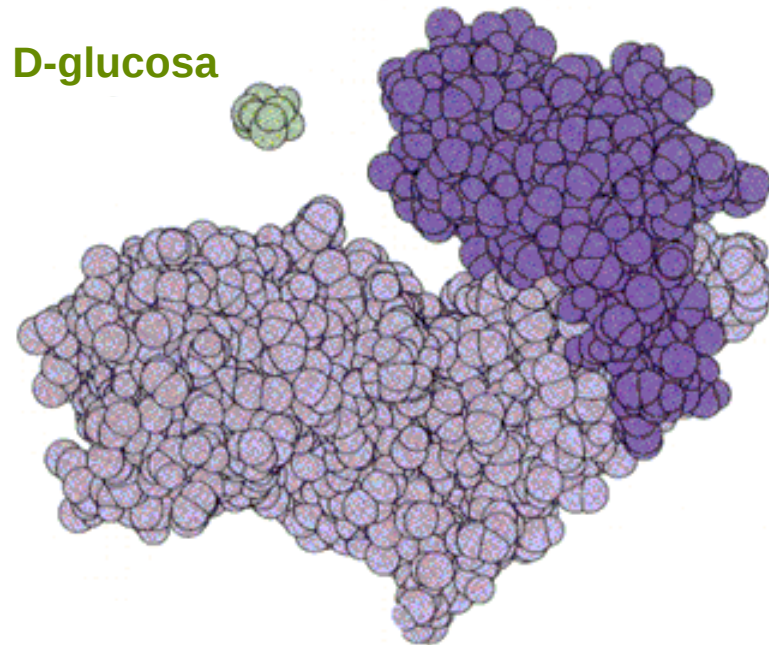


(c) Modelo del estado de transición

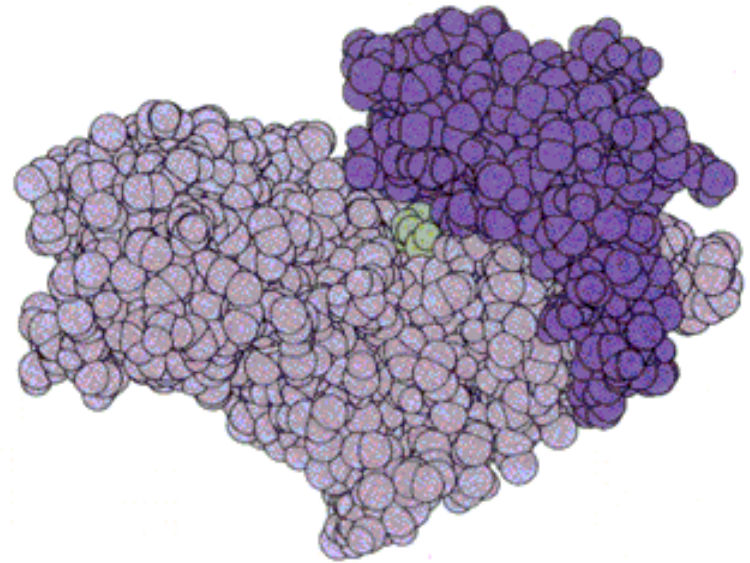


CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

Cambio conformacional inducido en la hexoquinasa



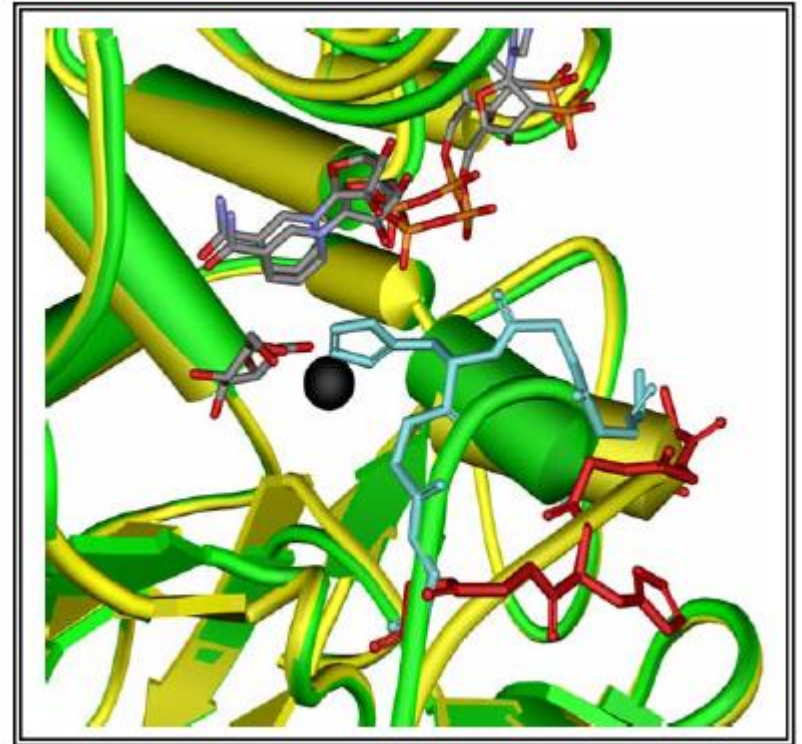
(a) Antes de la unión de glucosa



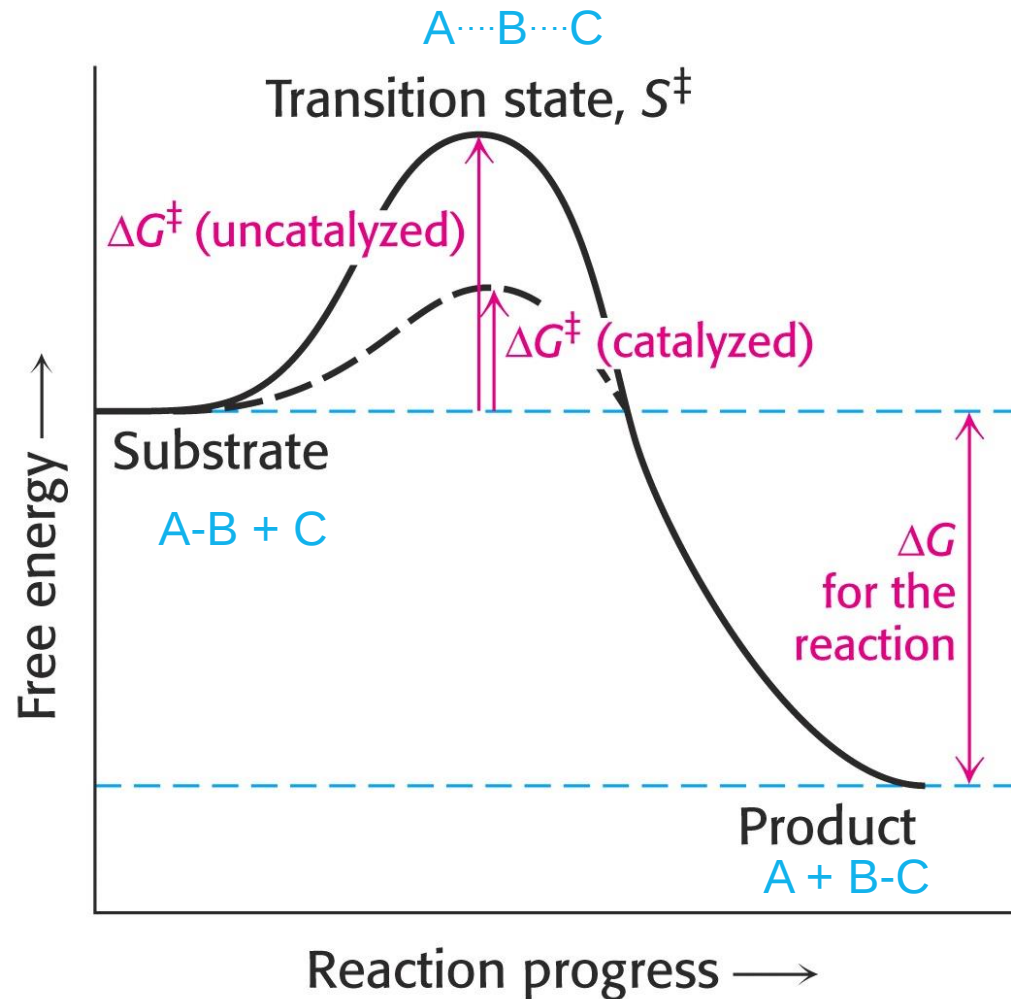
(b) Después de la unión de glucosa

CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

- Relacionadas con su estructura
- aa alejados en la cadena peptídica
- Puntos de unión al S
- Enlaces débiles
- Algunos aa del centro activo participan en la transformación del S
- Cofactores

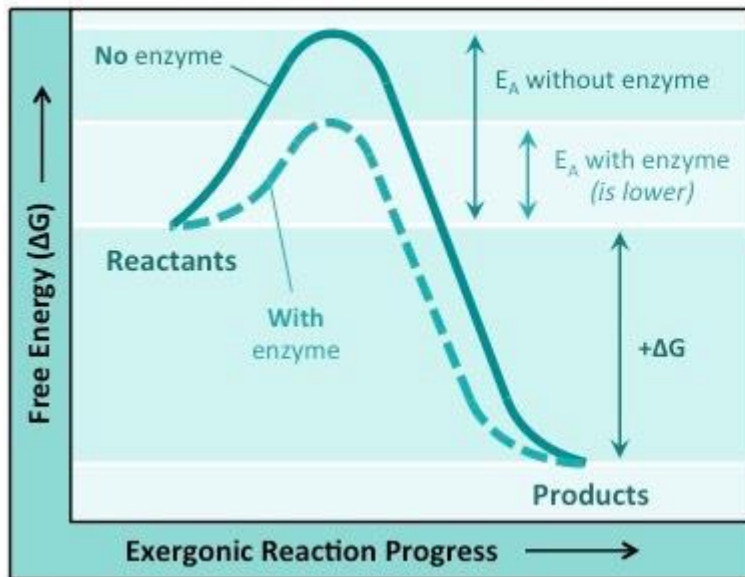


CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

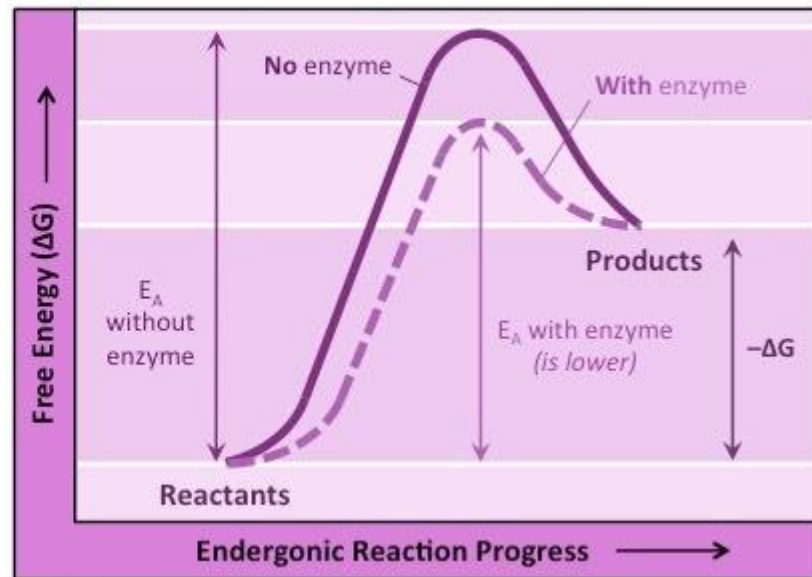


CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

EXERGONIC REACTION



ENDERGONIC REACTION



CENTRO ACTIVO DE LAS ENZIMAS

Factores que intervienen en la catálisis enzimática.

Dependen de la constitución del centro activo:

- 1.- Factores de proximidad y orientación
- 2.- Fenómenos de superficie
- 3.- Factores de distorsión o tensión de enlaces
- 4.- Presencia de grupos catalíticos

Catálisis general ácido-base

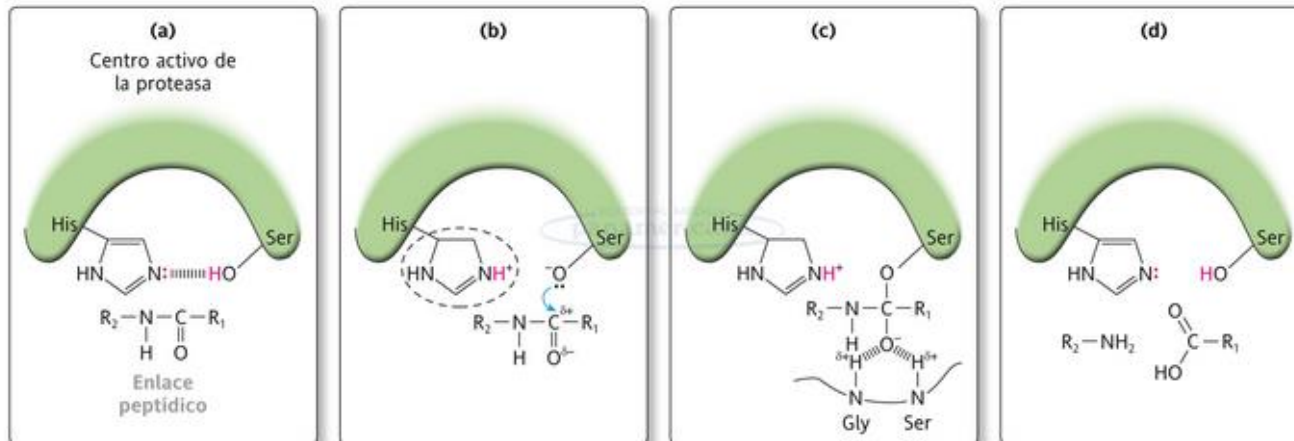
Catálisis covalente

Catálisis por iones metálicos

Aminoácidos implicados en catálisis ácido-base

Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	$\text{R}-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{COO}^-$
Lys, Arg	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}^+}}$	$\text{R}-\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
Cys	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{R}-\text{S}^-$
His	$\text{R}-\text{C}=\text{CH} \begin{array}{c} \text{HN} \quad \text{N}^+ \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{H} \end{array}$	$\text{R}-\text{C}=\text{CH} \begin{array}{c} \text{HN} \quad \text{N} \text{:} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{H} \end{array}$
Ser	$\text{R}-\text{OH}$	$\text{R}-\text{O}^-$
Tyr	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^-$

Figure 6-9



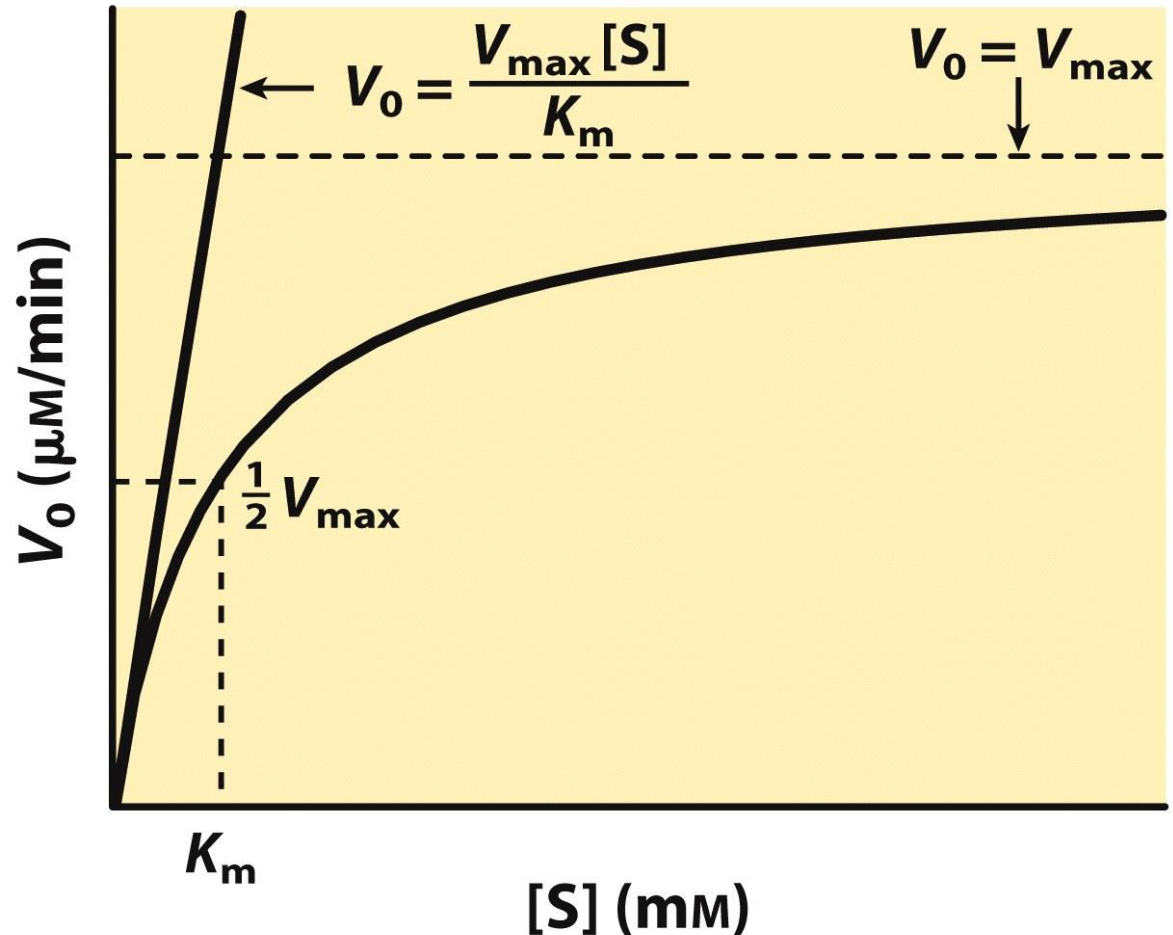
Catálisis ácido-base general y covalente en una proteasa

CINÉTICA ENZIMÁTICA



Ecuación de
Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M}$$



CINÉTICA ENZIMÁTICA



$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M}$$

¿Qué representa K_M ?

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Cuando $[S]=K_M$, $v=V_{\max}/2$

TABLE 6–6

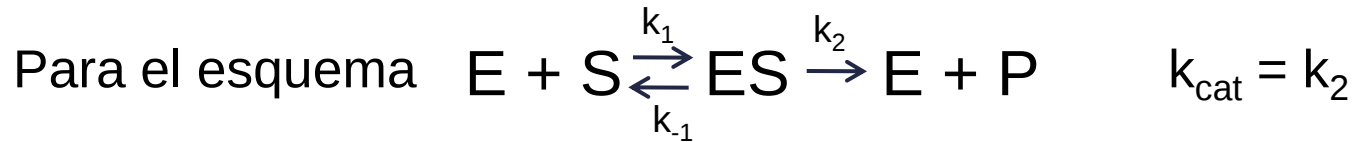
K_m for Some Enzymes and Substrates

Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5

CINÉTICA ENZIMÁTICA

Constante catalítica

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T}$$



K_{cat} : número de recambio: número de moléculas de sustrato convertidas en producto en una unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando el enzima está saturado por el sustrato

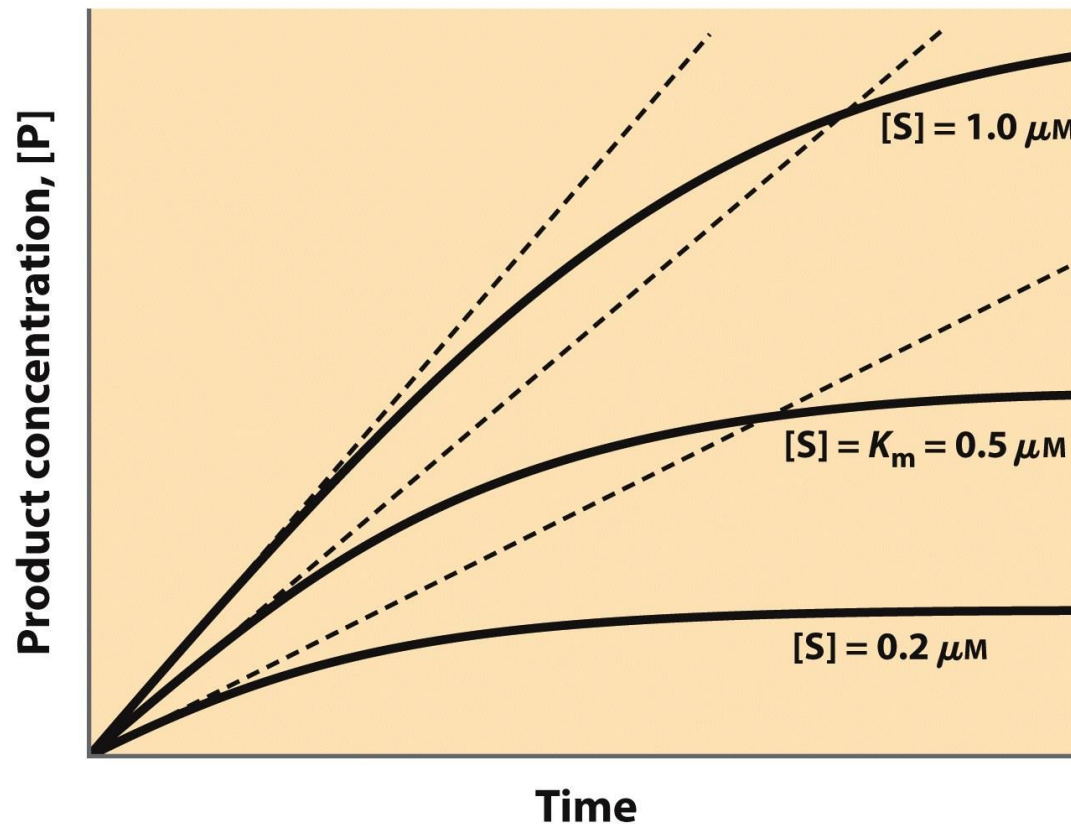
CINÉTICA ENZIMÁTICA

La velocidad se puede cuantificar:

1. Determinando la $[S]$ o de $[P]$ en el tiempo
2. Cantidades catalíticas de enzima muy bajas (10^{-12} - 10^{-18} M) e inferiores a las cantidades de S
3. $[S]$ debe ser saturante
4. Temperatura de reacción $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 7,3-7,5.
5. Unidades (U): cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de producto por minuto
6. Actividad específica: U/mg
7. Normalmente se determinan velocidades iniciales

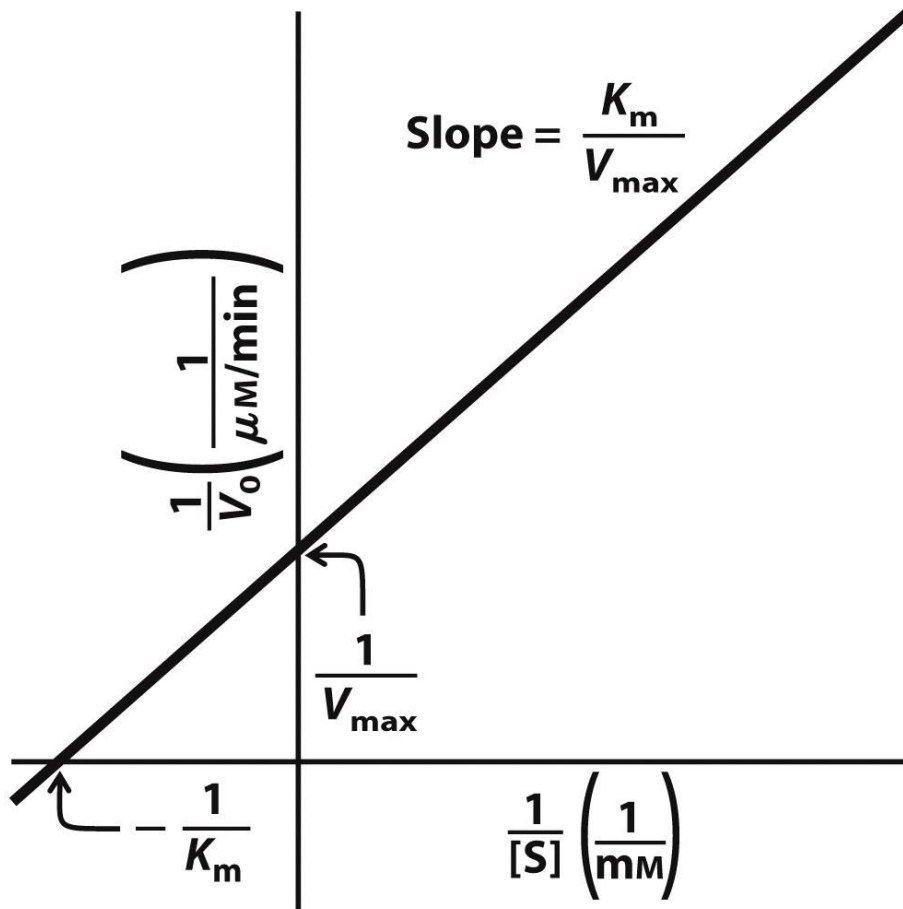
CINÉTICA ENZIMÁTICA

La velocidad de la reacción enzimática
varía con la concentración de sustrato



CINÉTICA ENZIMÁTICA

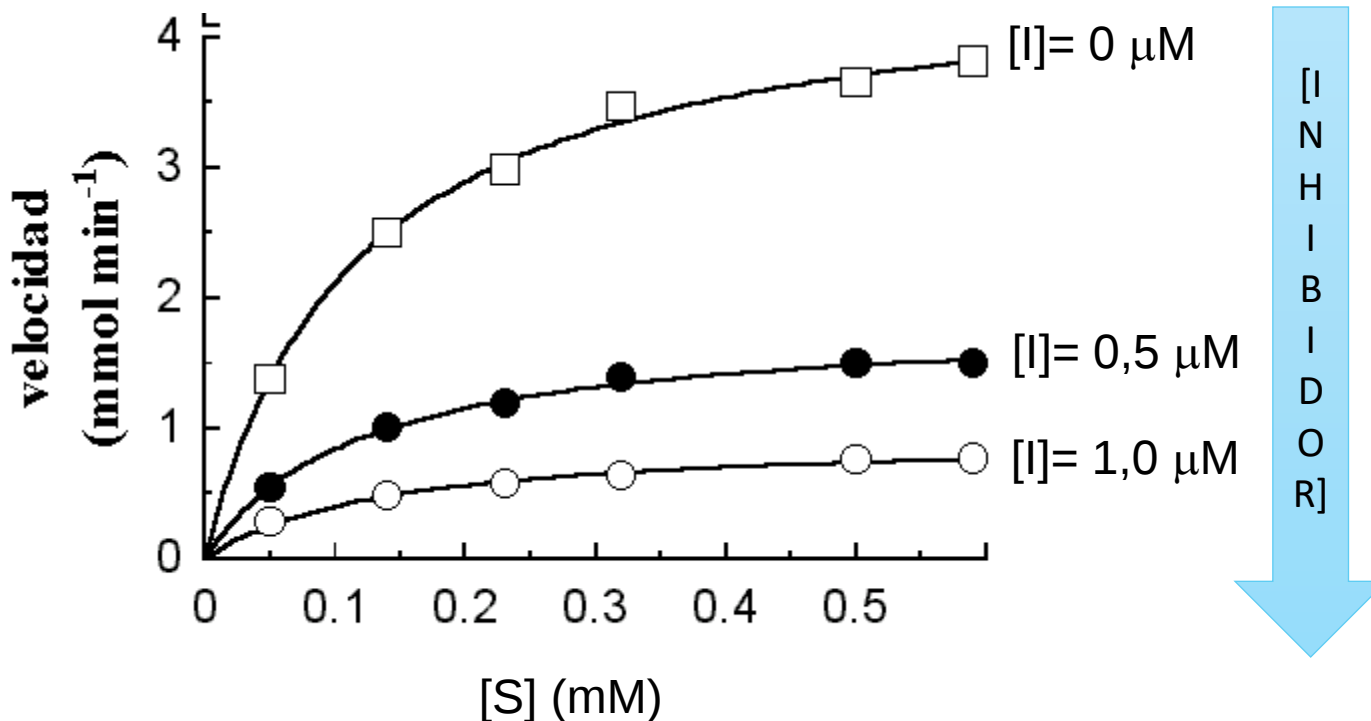
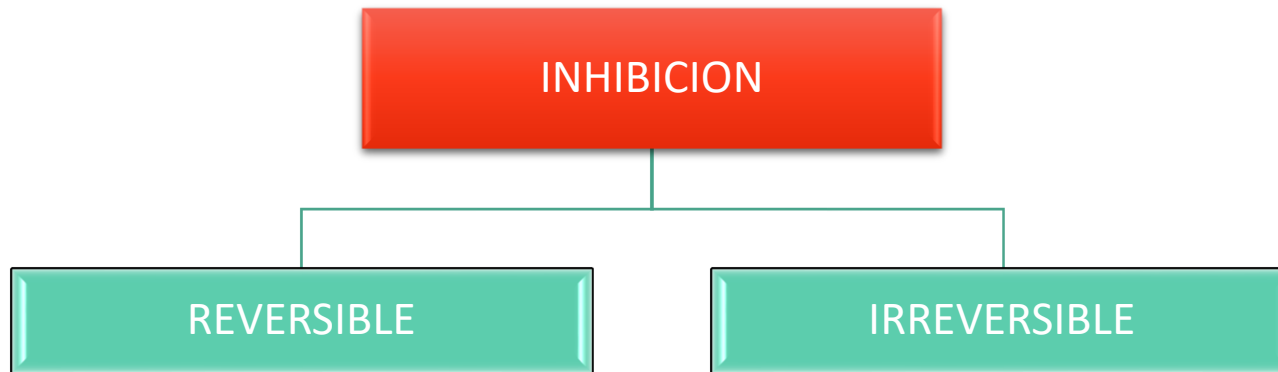
Determinación experimental de K_M y $V_{\max}$

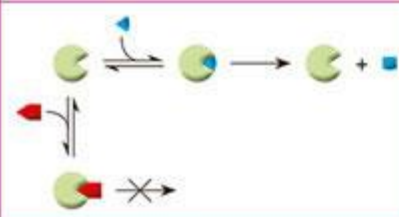
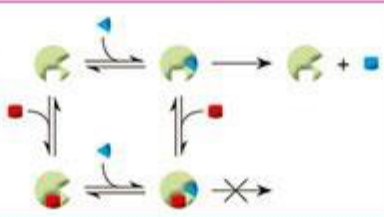
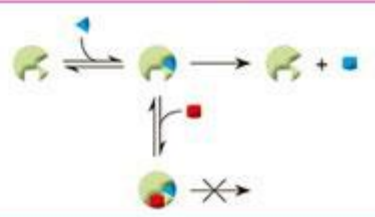
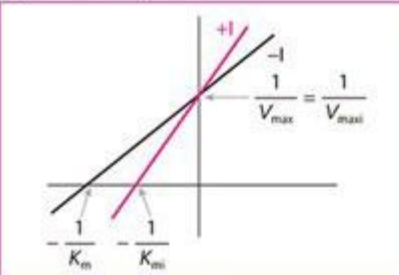
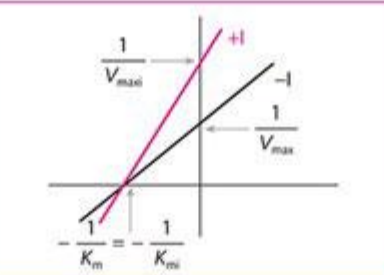
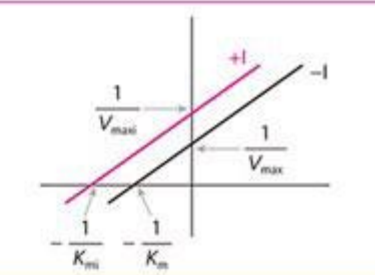


Representación de
Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

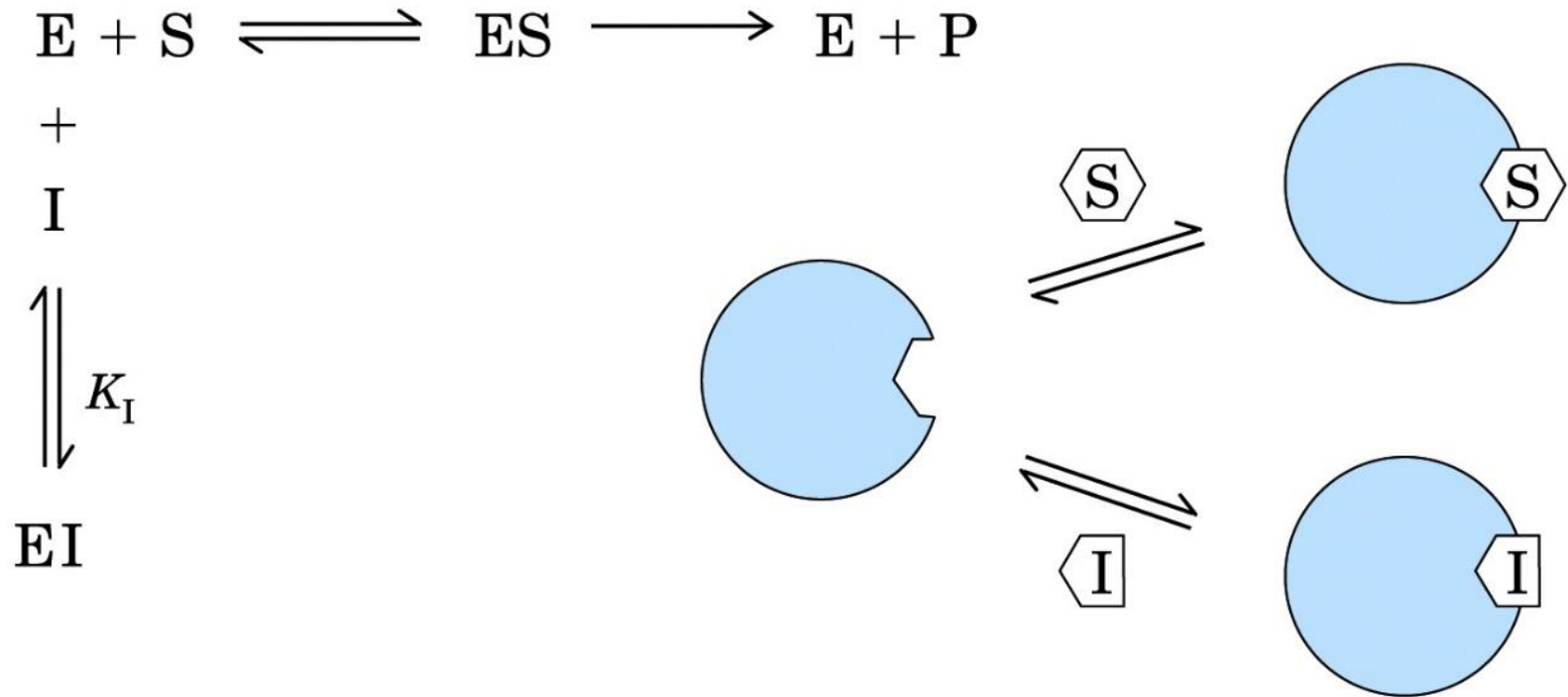
INHIBICIÓN ENZIMÁTICA



(1) INHIBICIÓN COMPETITIVA	(2) INHIBICIÓN NO COMPETITIVA	(3) INHIBICIÓN ACOMPETITIVA
(a) Reacción $E + S \xrightleftharpoons{K_i} ES \xrightarrow{\quad} E + P$ $EI \xrightarrow{\quad} \text{no reacción}$ 	$E + S \xrightleftharpoons{K_i} ES \xrightarrow{\quad} E + P$ $EI + S \xrightleftharpoons{K'_i} ESI \xrightarrow{\quad} \text{no reacción}$ 	$E + S \xrightleftharpoons{K_i} ES \xrightarrow{\quad} E + P$ $ESI \xrightarrow{\quad} \text{no reacción}$ 
(b) Representación gráfica 		
(c) Variación de parámetros cinéticos $V_{maxi} = V_{max}$ $K_{mi} > K_m$ $K_{mi} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ $K_{mi} = K_m \alpha$	$V_{maxi} < V_{max}$ $K_{mi} = K_m$ $V_{maxi} = \frac{V_{max}}{1 + ([I]/K_i)}$ $V_{maxi} = V_{max} / \alpha$	$V_{maxi} < V_{max}$ $K_{mi} < K_m$ $V_{maxi} = \frac{V_{max}}{1 + ([I]/K_i)}$ $V_{maxi} = V_{max} / \alpha$ $K_{mi} = \frac{K_m}{1 + ([I]/K_i)}$ $K_{mi} = K_m / \alpha$
(d) Ecuación de Michaelis-Menten $V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_{mi} + [S]}$	$V_i = \frac{V_{maxi} [S]}{K_m + [S]}$	$V_i = \frac{V_{maxi} [S]}{K_{mi} + [S]}$

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Inhibidores reversibles competitivos



(a) Competitive inhibition

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Inhibidores reversibles competitivos

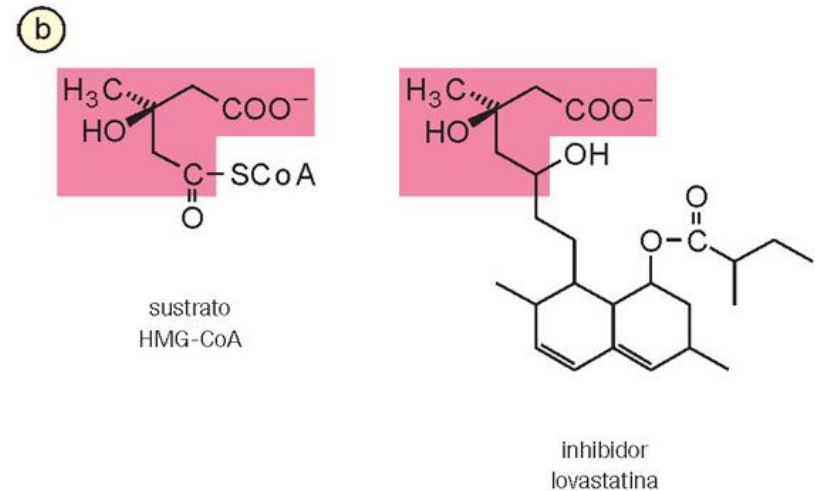
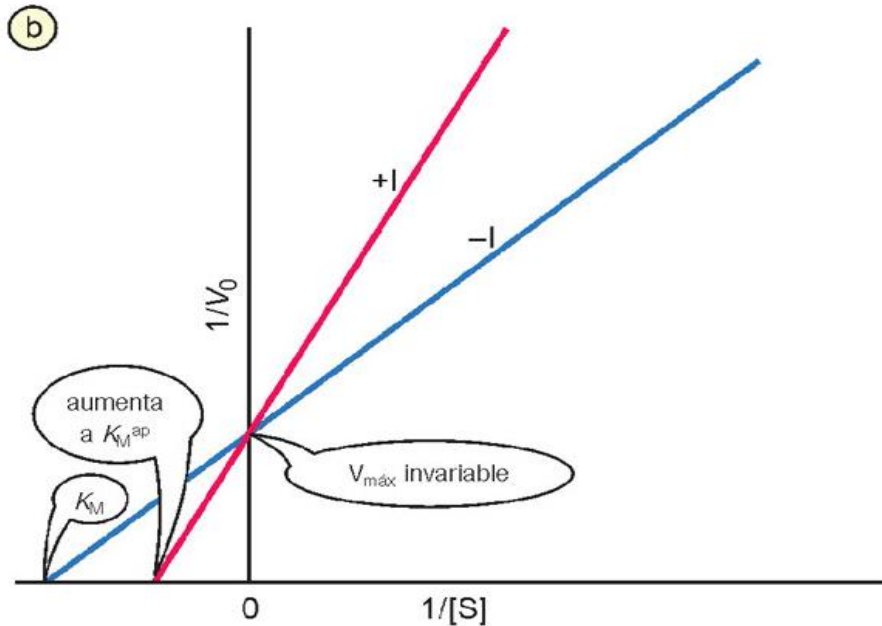
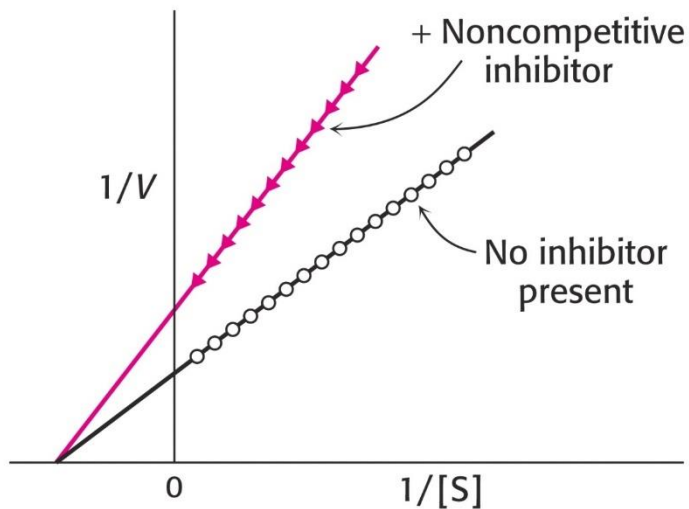
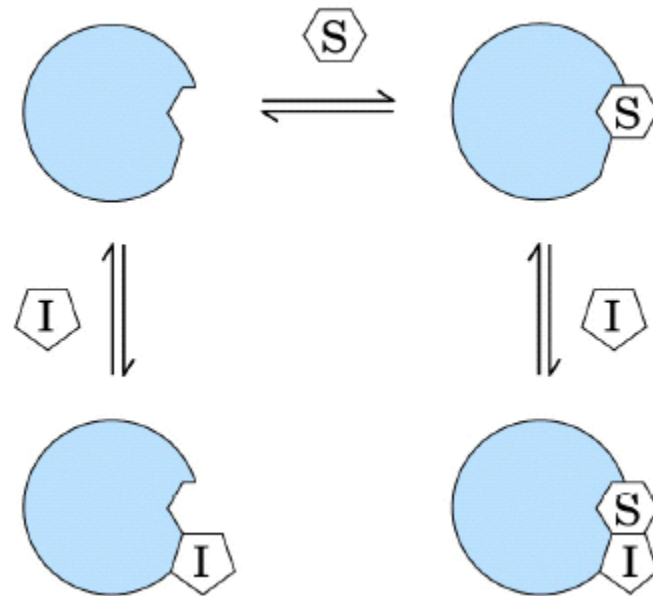
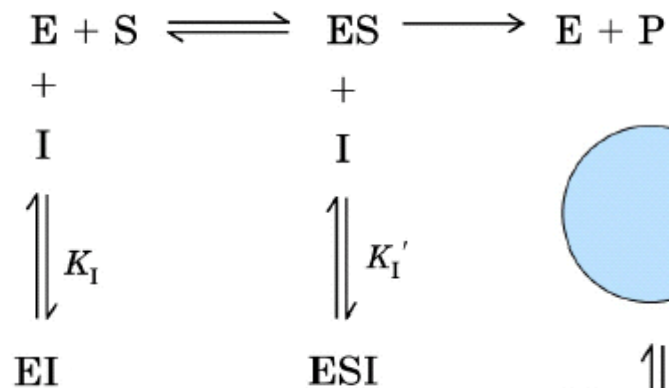


Tabla 13.2 Selección de inhibidores enzimáticos relevantes fisiológicamente.

Fármaco	Enzima inhibida	Usado como
lovastatina	HMG coenzima A reductasa	disminuidor de colesterol

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Inhibidores reversibles NO competitivos



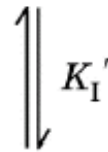
INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Inhibidores reversibles acompetitivos

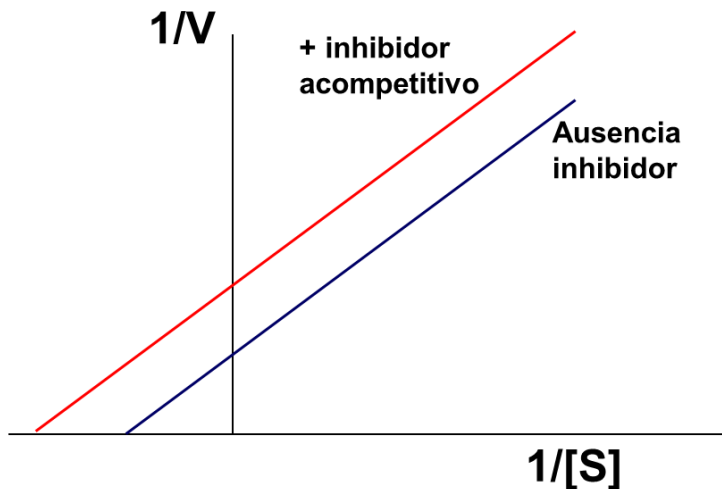
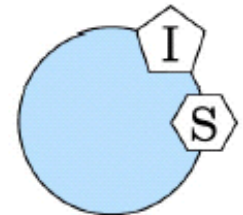
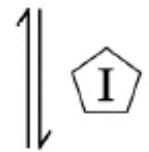
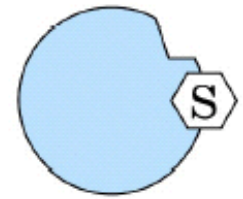
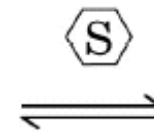
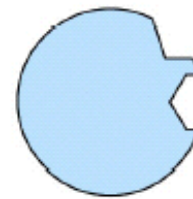


+

I



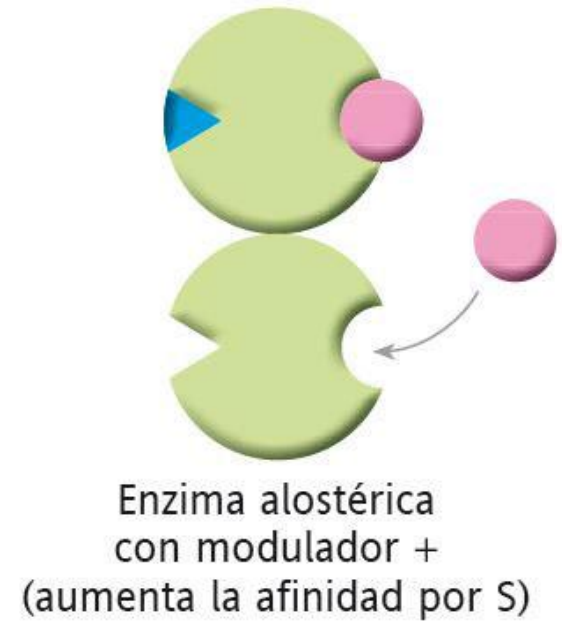
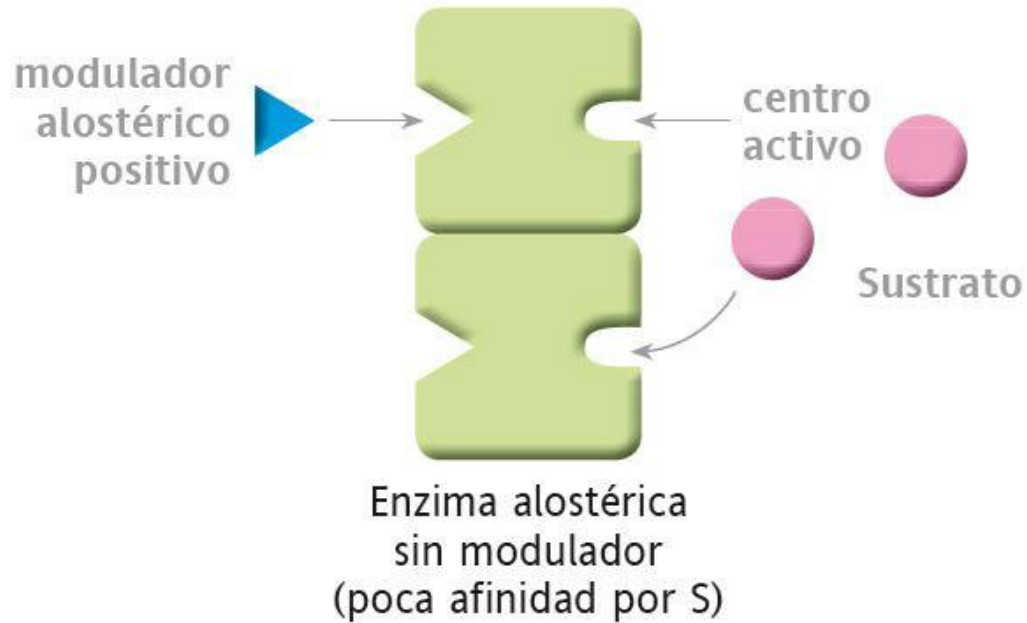
ESI



INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Medicamento	Enzima inhibida	Enfermedad tratada
Amburicin®	Topoisomerasa 2	Cáncer (quimioterapia)
Antabuse®	Aldehído deshidrogenasa	Alcoholismo
Captopril®	Enzima de la síntesis de angiotensina	Hipertensión
Celebrex®	Ciclooxigenasa 2	Artritis
Digoxin®	ATPasa de la bomba de K^+Na^+	Problemas cardíacos
Hycamtin®	Topoisomerasa 1	Cáncer (quimioterapia)
Lipitor®	3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA	Exceso de colesterol
Viagra®	Fosfodiesterasa 5	Disfunción eréctil

ALOSTERISMO



ALOSTERISMO

MWC model

Monod, Wyman and Changeux

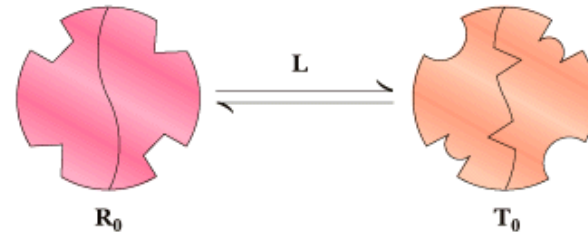
(a) the enzyme consists of two or more identical subunits, each containing a site for the substrate or effector.

(b) at least two different conformational states (usually designated as R and T states)

are in equilibrium and differ in their affinities for substrate or effector.

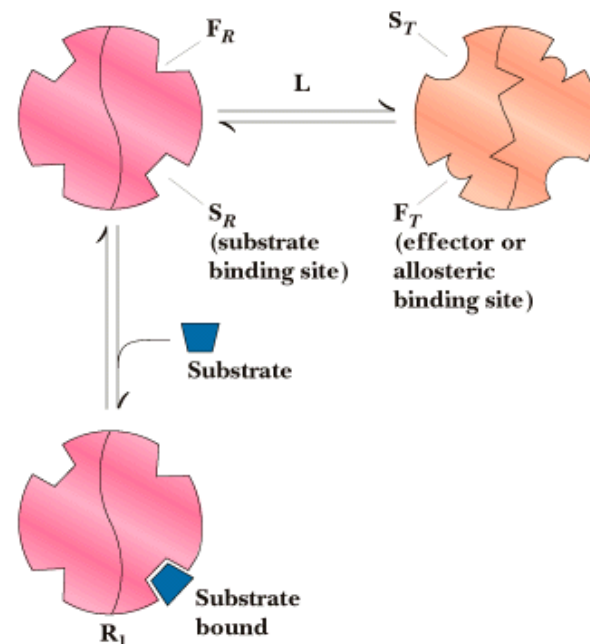
(c) The conformational changes of all subunits occur in a concerted manner (conservation of structural symmetry).

(a) A dimeric protein can exist in either of two conformational states at equilibrium.



$$L = \frac{T_0}{R_0} \quad L \text{ is large. } (T_0 \gg R_0)$$

(b) Substrate binding shifts equilibrium in favor of R.



ALOSTERISMO

MWC model
Monod, Wyman and Changeux

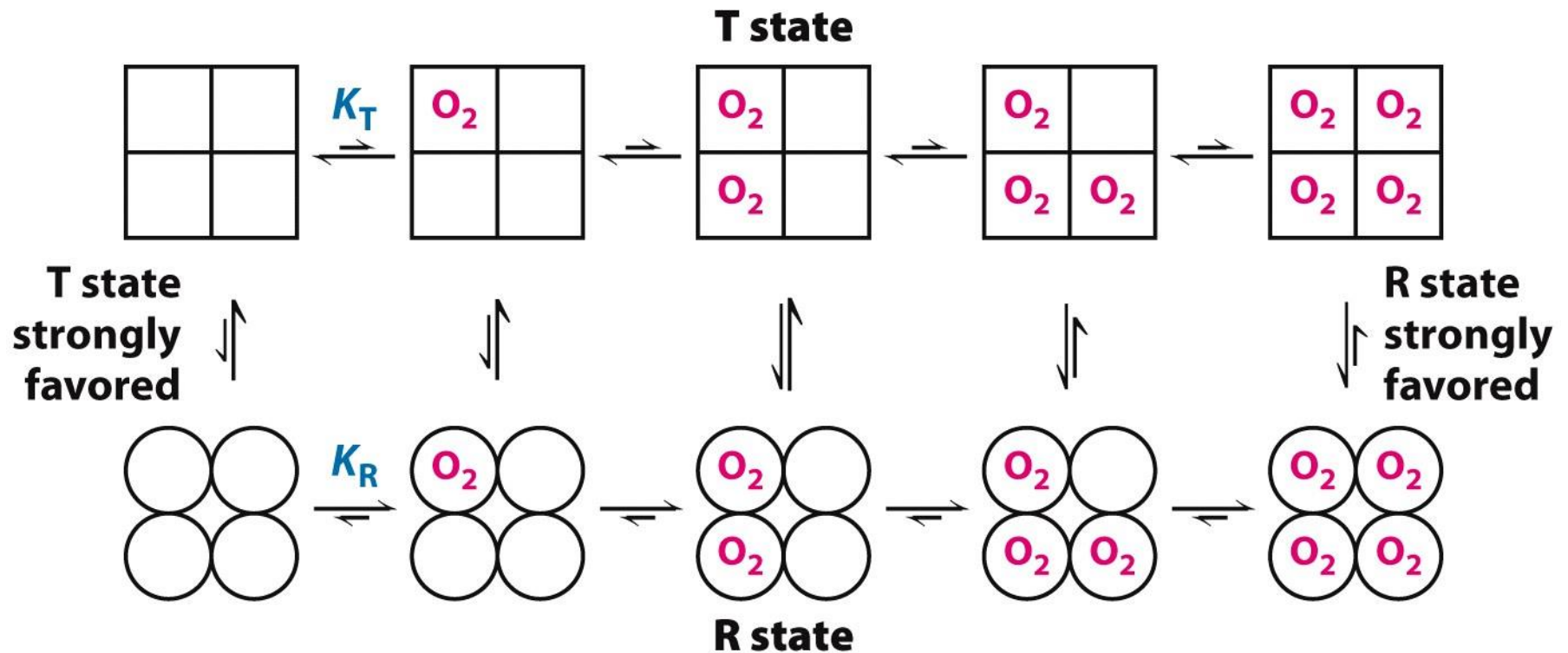


Figure 7.12
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

ALOSTERISMO

MWC model

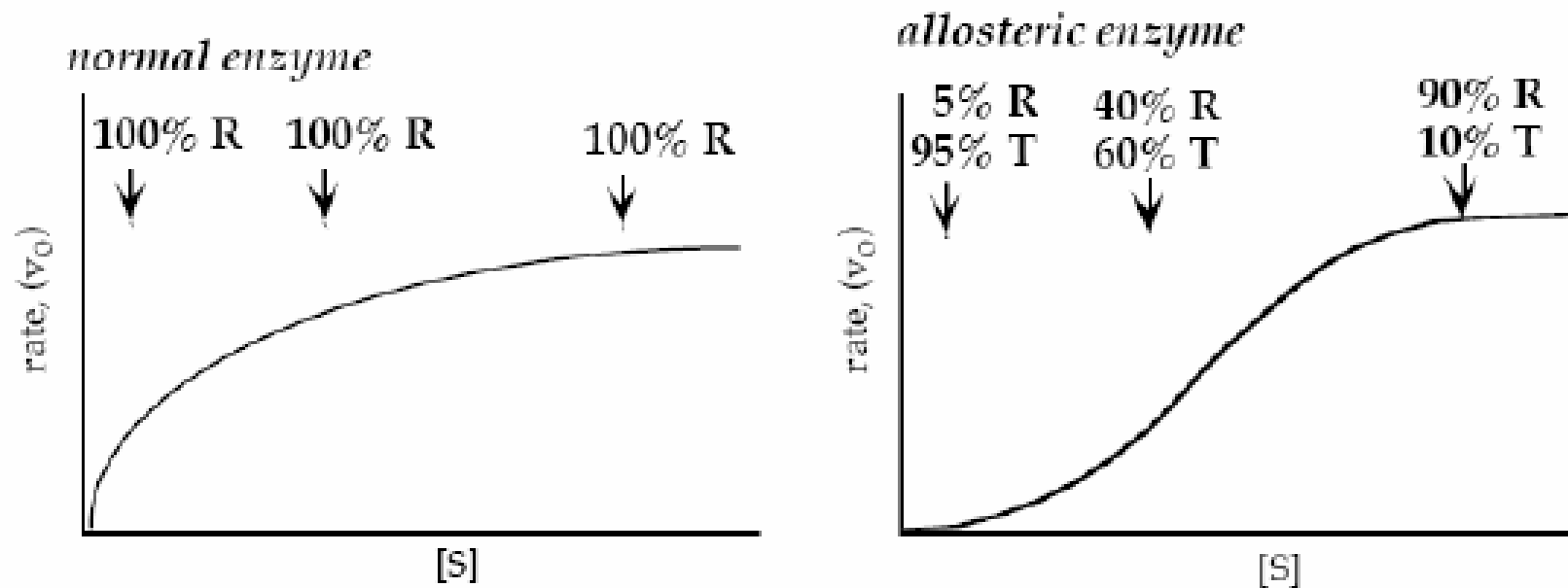
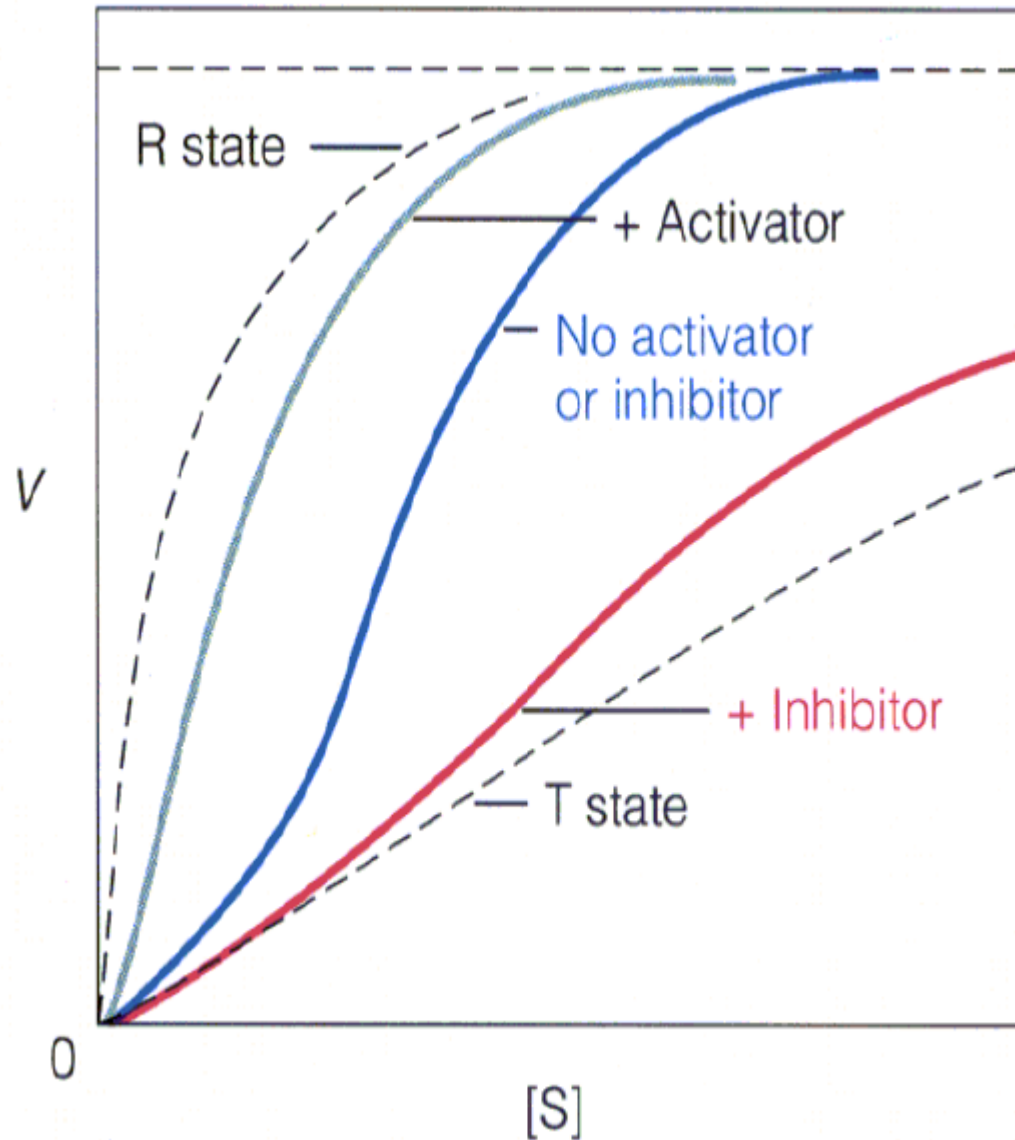


Fig. 18 Per cent of enzyme in the active form.

ALOSTERISMO

MWC model



ALOSTERISMO

AKNF model

Adair, Koshland, Nemethy & Filmer

- (a) Two conformational states A and B are available to each subunit
- (b) only the subunit to which the ligand is bound changes its conformation
- (c) the ligand-induced conformational change in one subunit alters its interactions with neighboring subunits.

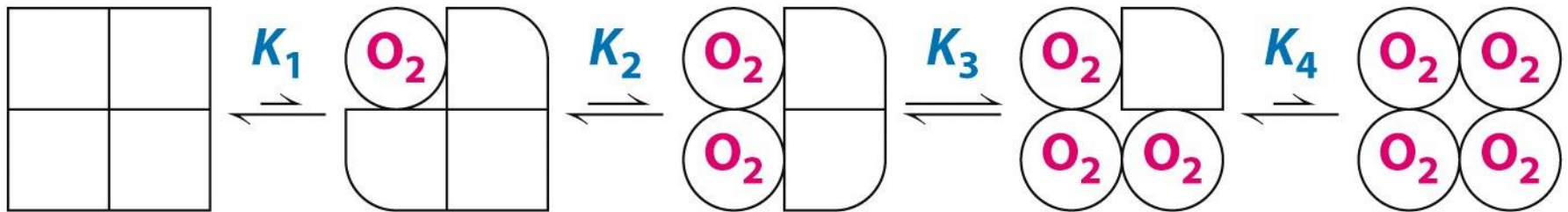
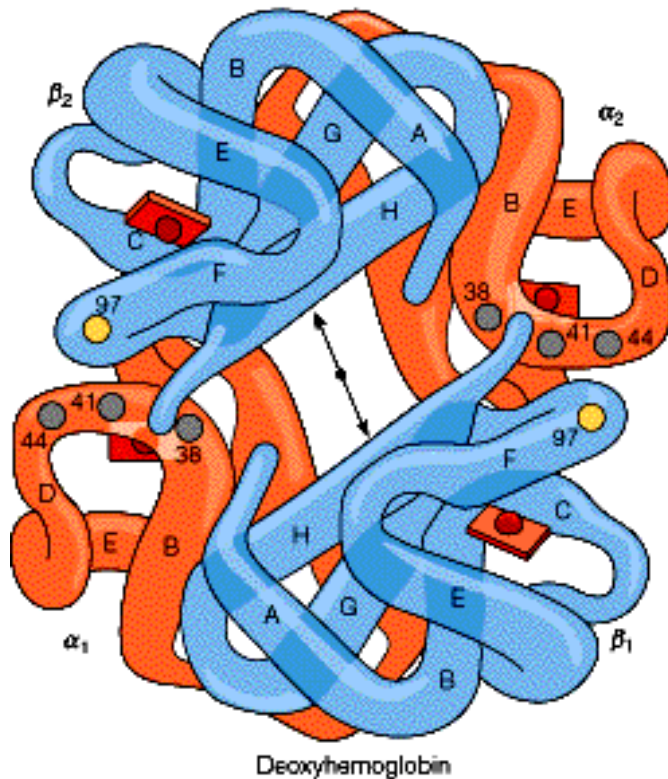


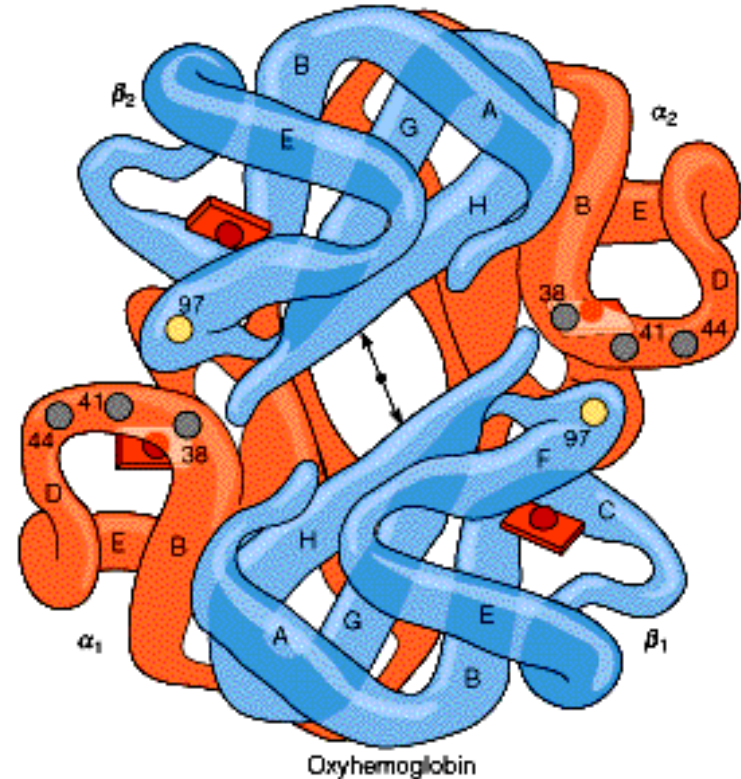
Figure 7.14
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

ALOSTERISMO: HEMOGLOBINA



(b)

Forma T

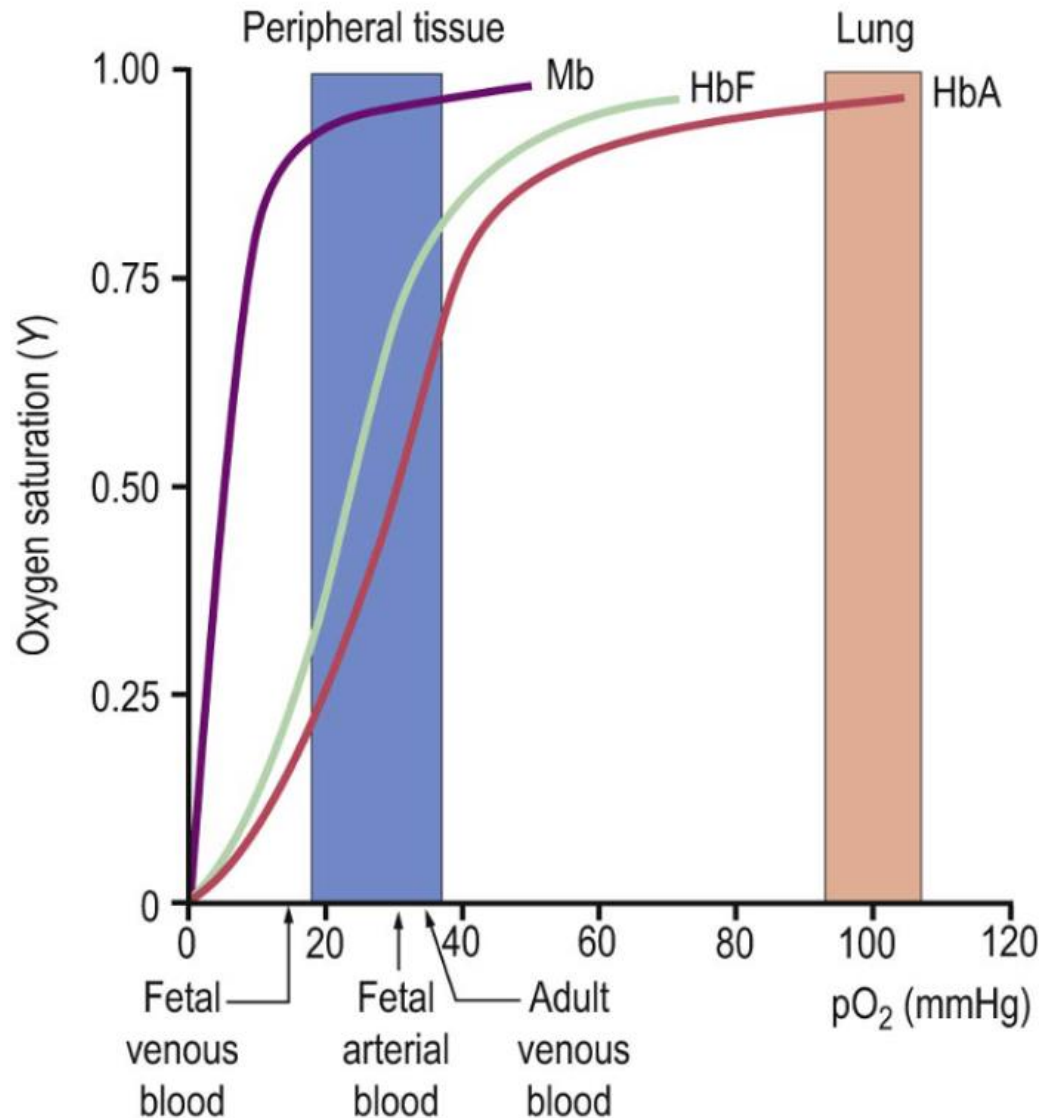


Forma R

ALOSTERISMO: HEMOGLOBINA

- Tipos de hemoglobina
 - Hb A₁:
 - Más abundante en adultos
 - $\alpha_2\beta_2$
 - Hb A₂:
 - 2% en adultos
 - $\alpha_2\delta_2$
 - En el feto:
 - $\zeta \text{ y } \varepsilon \longrightarrow \alpha, \beta, \gamma, \delta$
 - Hb F: $\alpha_2\gamma_2$

ALOSTERISMO: HEMOGLOBINA



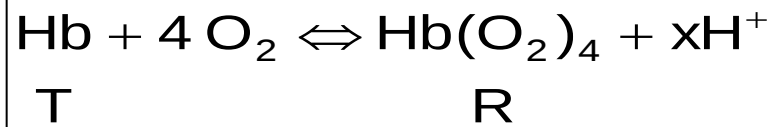
Ecuación de Hill

$$\bar{y} = \frac{[pO_2]^n}{[P_{50}]^n + [pO_2]^n}$$

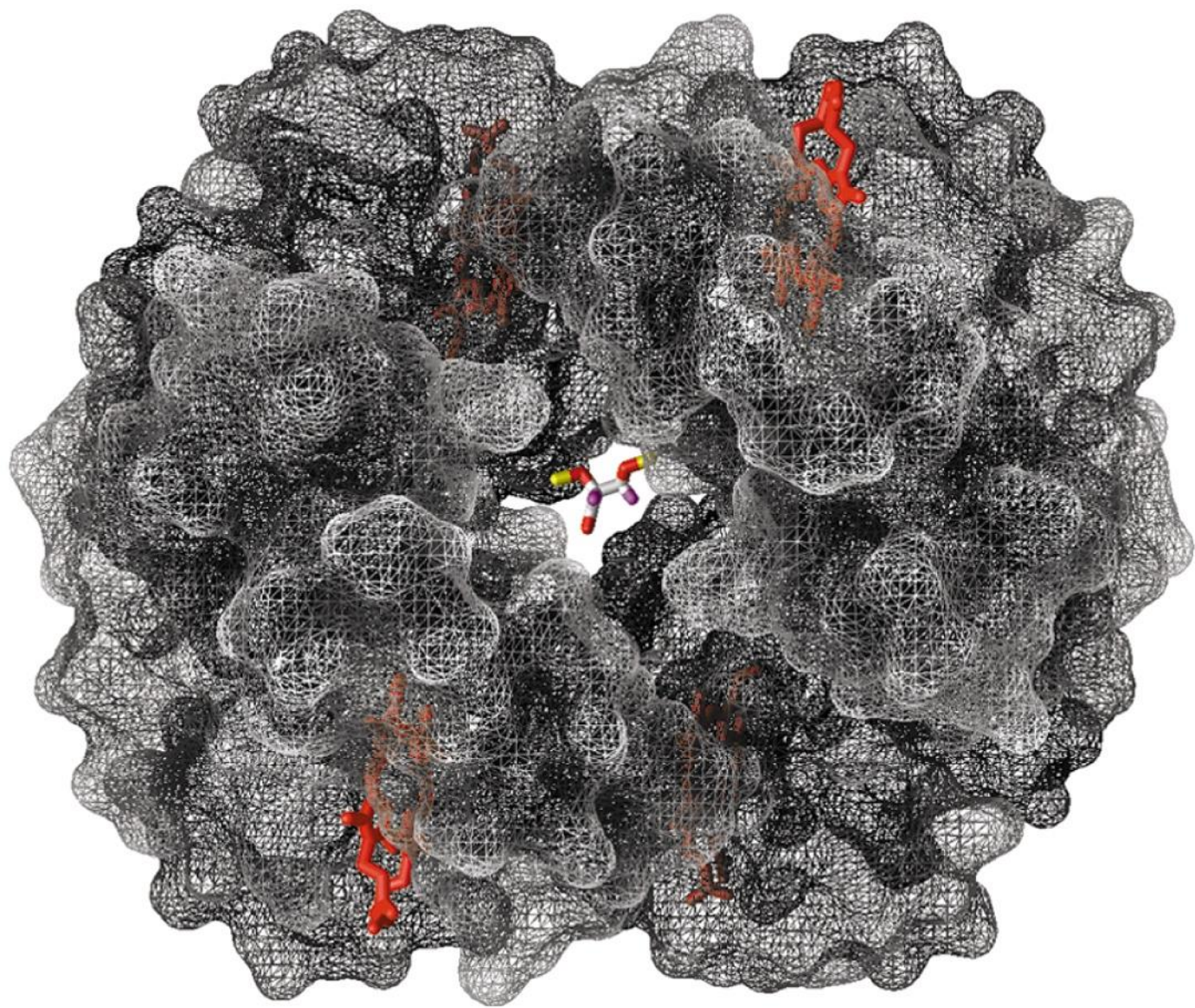
ALOSTERISMO: HEMOGLOBINA

Factores que afectan a la liberación de O₂

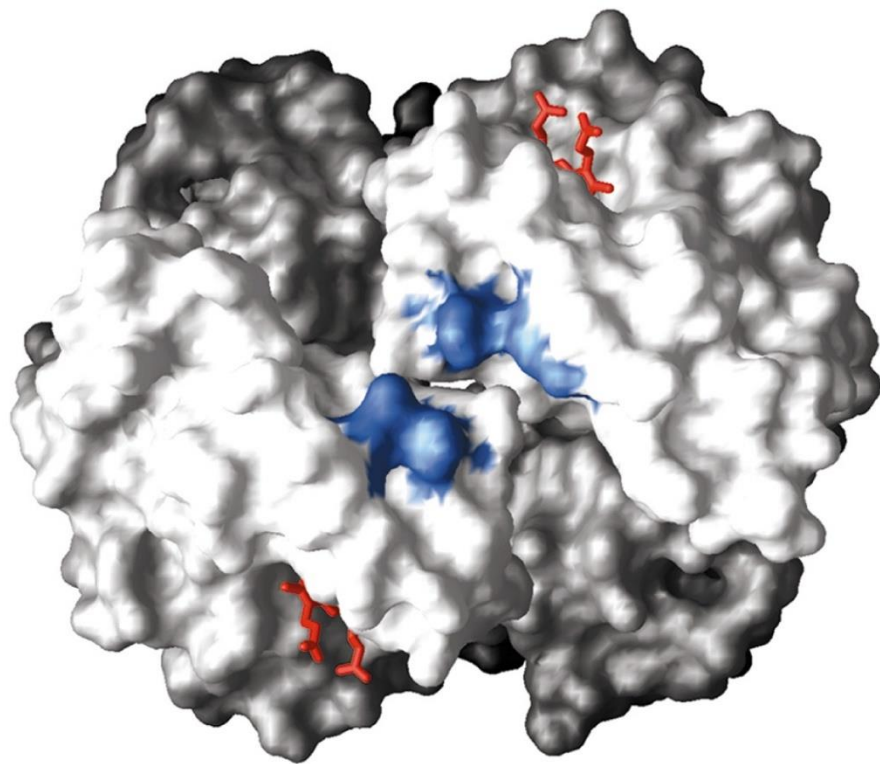
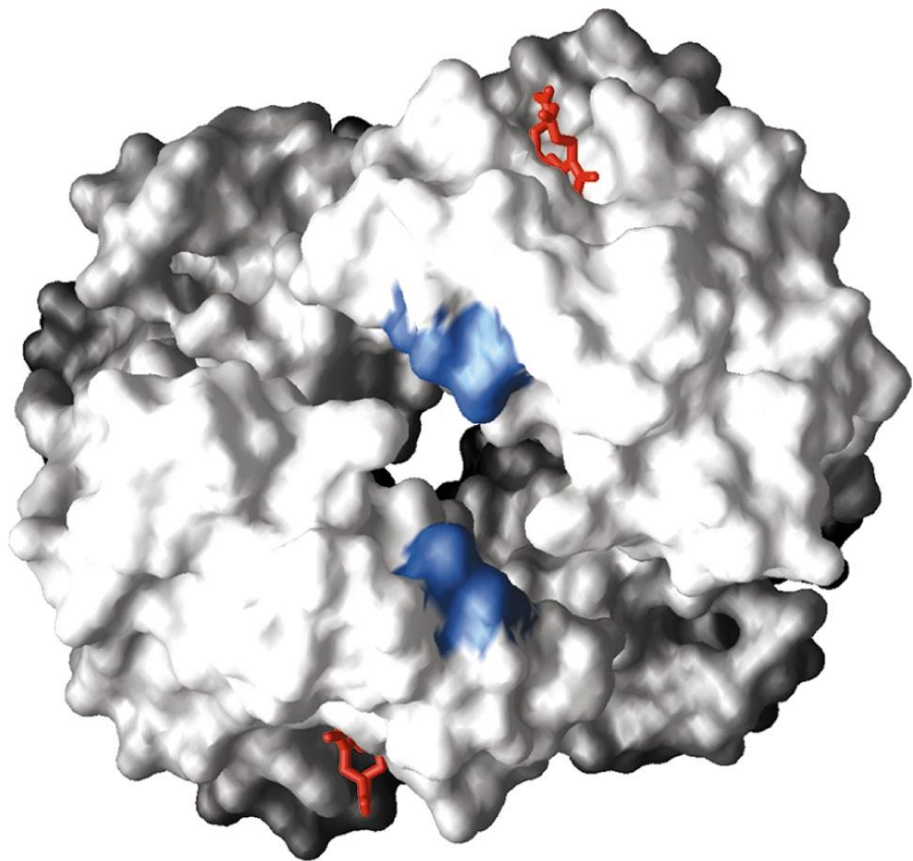
- Presencia de 2,3-bifosfoglicerato (BPG)
 - Dificulta la unión de O₂ de la proteína en forma T
 - Hb F une BPG con menor afinidad que Hb A
- Efecto Bohr
 - ↑ acidez ⇒ ↑ liberación de O₂ (menor unión de O₂)

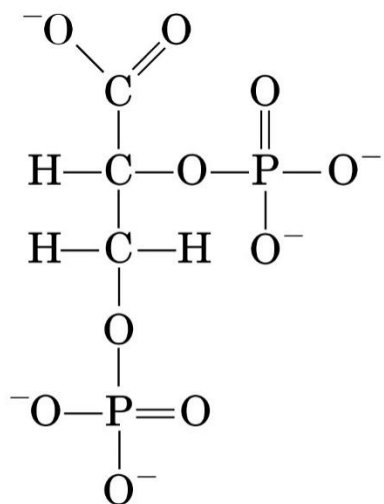


- Temperatura
 - ↑ Temperatura ⇒ ↑ liberación de O₂
- Monóxido de carbono: CO
 - Mayor afinidad (210 veces superior) por el Fe que el O₂

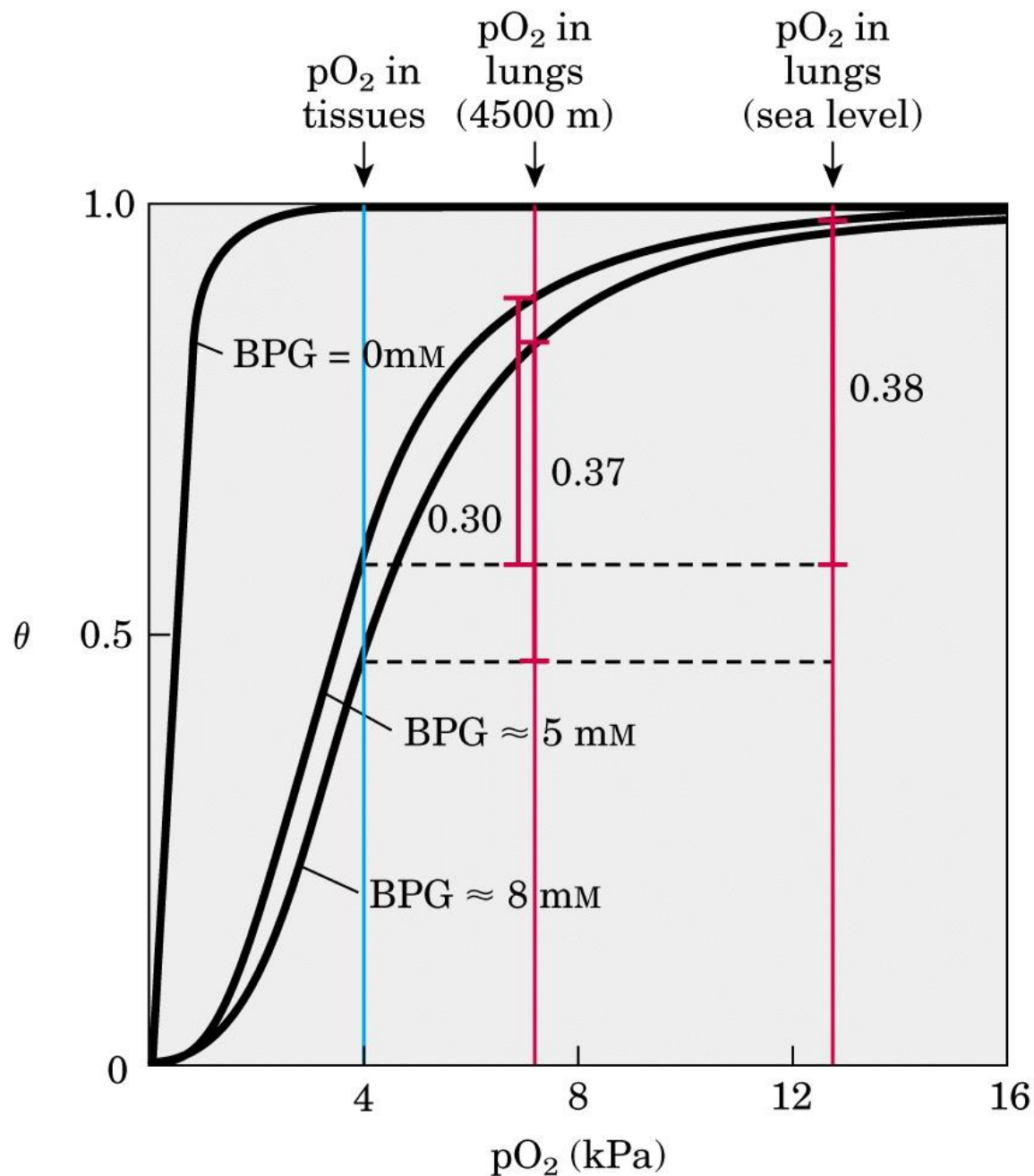


(a)





2,3-Bisphosphoglycerate



ALOSTERISMO: HEMOGLOBINA

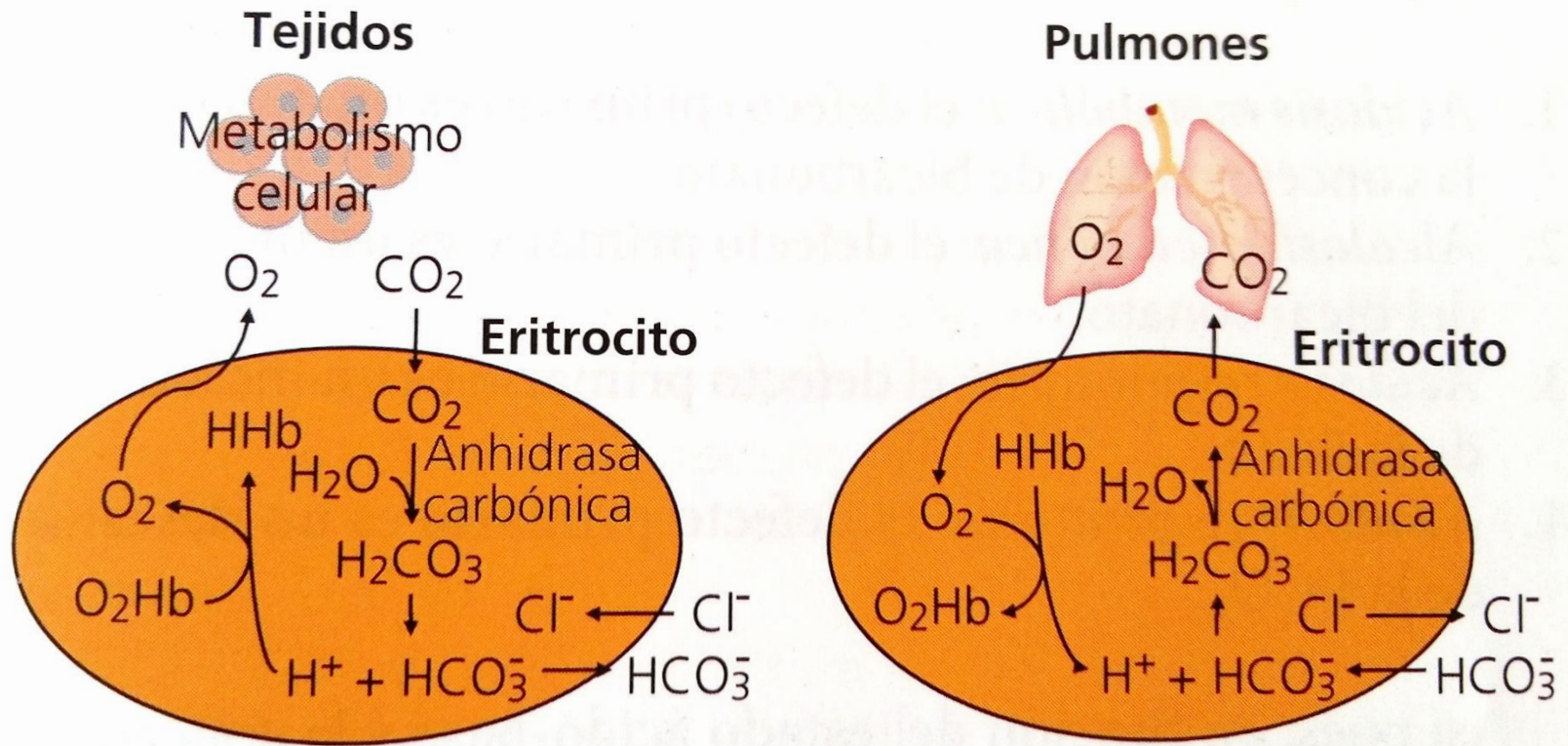
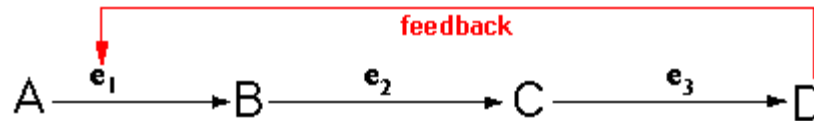


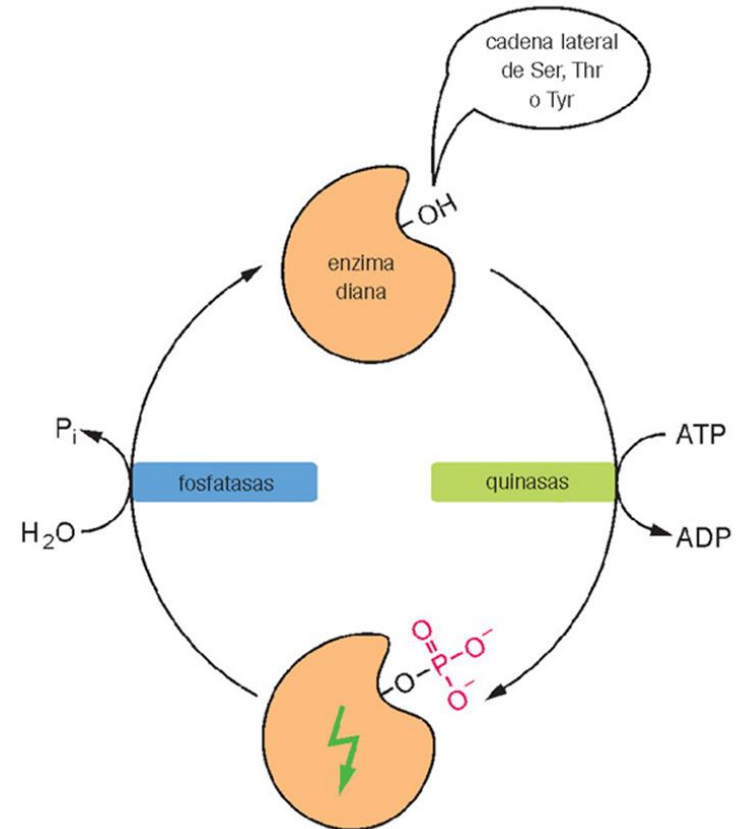
Figura 8-4. Interrelación entre el sistema amortiguador del bicarbonato y la hemoglobina.

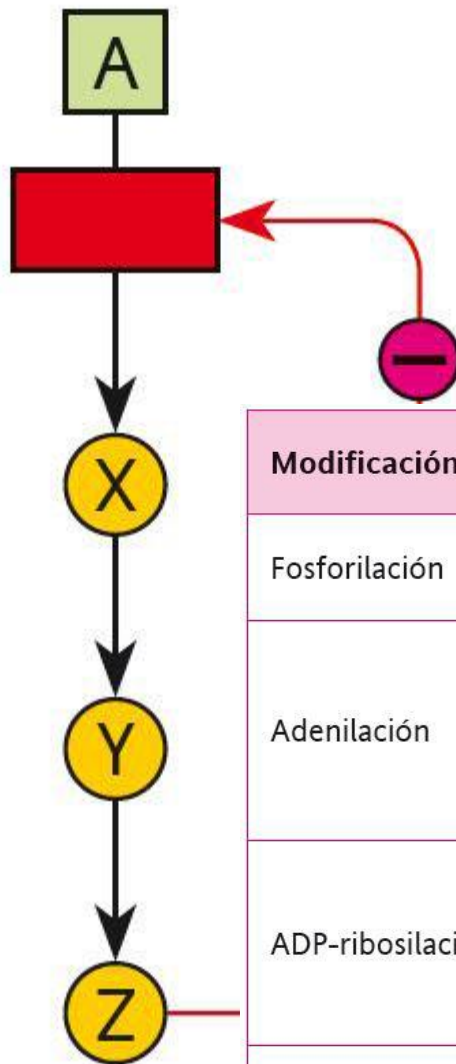
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

- Regulación por feedback o retroalimentación:



- Modificación covalente:





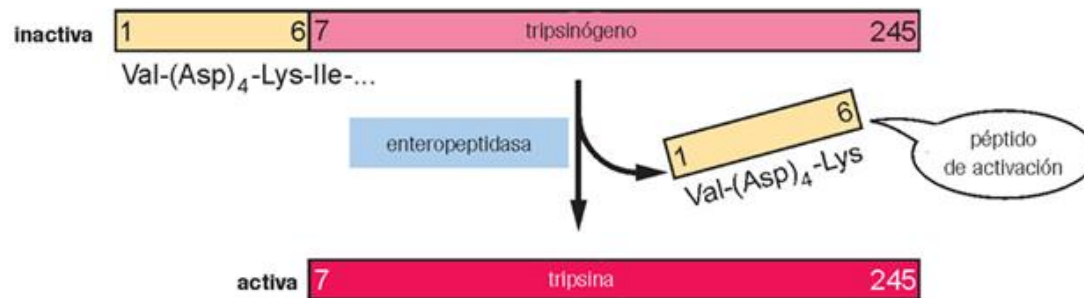
Bioquímica.
Feduchi / Romero
Editorial Médica

Modificación covalente		Residuos que aceptan la modificación covalente
Fosforilación	$\text{Enzima} \xrightarrow[\text{ADP}]{\text{ATP}} \text{Enzima}-\text{P}$	Tyr, Ser, Thr, His
Adenilación	$\text{Enzima} \xrightarrow[\text{PP}_i]{\text{ATP}} \text{Enzima}-\text{P}-\text{O}-\text{ribose}-\text{A}$	Tyr
ADP-ribosilación	$\text{Enzima} \xrightarrow[\text{nicotinamida}]{\text{NAD}} \text{Enzima}-\text{O}-\text{ribose}-\text{P}-\text{P}-\text{O}-\text{ribose}-\text{A}$	Arg, Gln, Cys
Metilación	$\text{Enzima} \xrightarrow[\text{S-adenosil homocisteína}]{\text{S-adenosil metionina}} \text{Enzima}-\text{CH}_3$	Glu

Bioquímica. Conceptos Esenciales
Feduchi / Romero / Yañez / Castiñeira / García-Hoz.
Editorial Médica Panamericana © 2015

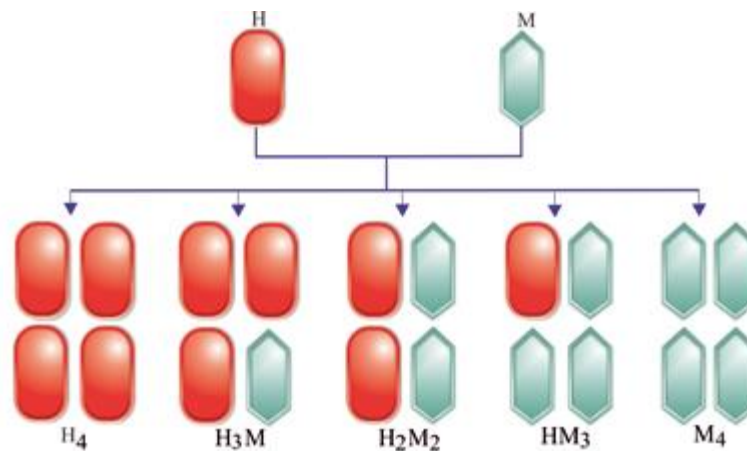
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

- Activación de zimógenos



- Isoenzimas

Lactato
deshidrogenasa



APLICACIONES CLINICAS DE LAS ENZIMAS

Reactivos para la cuantificación de metabolitos

Marcadores moleculares de patologías

ENZIMA	ALTERACIÓN
α -amilasa	↑ En pancreatitis aguda o insuficiencia renal crónica ↓ Casos de pérdida importante de función pancreática (fibrosis quística)
Creatina quinasa (CK)	↑ En el infarto de miocardio (isoenzima MB) y en las afecciones musculares (isoenzima MM)
Lactato deshidrogenasa (LDH)	↑ En patologías musculares, cardíacas, renales, hepáticas y en anemias hemolíticas
Aminotransferasas (Transaminasas)	↑ En enfermedades hepáticas como la hepatitis o la cirrosis
γ -glutamil transferasa (γ -GT)	↑ En enfermedades hepatobiliares y en el alcoholismo
Fosfatasa alcalina	↑ En las hepatopatías

APLICACIONES CLINICAS DE LAS ENZIMAS

Agentes Terapéuticos

Estreptoquinasa: producida por *Streptococcus pyogenes*

- Eficaz en el tratamiento del infarto de miocardio
- Disuelve coágulos:

Estreptocinasa → Plasminógeno → Precursor plasmina
↓
Fibrina

Activador de plasminógeno tisular humano (tPA)