

BIOQUÍMICA.

TEMA I. BIORREGULADORES

F.O.E. Conferencia

Actividad N0:1

Método : expositivo y elaboración conjunta.

Medios: Presentación powerpoint y pizarra

Título: Enzimas.

Aspectos generales.

Nomenclatura. Clasificación.

Modo de acción. Cinética enzimática.

Regulación de su actividad.

OBJETIVOS:

Interpretar la cinética enzimática y relacionarlas con el efecto de diferentes agentes físico-química sobre la actividad.

Justificar el papel regulador de las enzimas en el metabolismo.

OBJETIVOS METODOLÓGICO Y EDUCATIVOS.

Demostrar como se cumple la relación estructura función.

Estimular el desarrollo de la responsabilidad a través del cumplimiento de tareas docentes.

BIBLIOGRAFÍA

Bioquímica para estudiantes de Ciencias Agropecuarias. p. 42-66

Bioquímica A.L. Lehninger p. 189-194, 223-248.

MOTIVACIÓN

Problema.

En la empresa de cítrico uno de los problemas que tienen es el enyerbamiento por lo que el ingeniero agrónomo responsable de los cultivos recomienda utilizar un herbicida cuyo principio activo según las especificaciones técnicas es el 2,4 D (2,4 diclorofenoxiacético), que es una auxina de gran actividad por presentar en su estructura un anillo fenólico sustituido por una cadena lateral ácida y la posición 2 y 4 sustituido por cloro.

Este compuesto como otras auxinas estimula la síntesis de enzimas celulares que su actividad esta relacionada con el crecimiento.

El colectivo de trabajadores agrícolas aplican el herbicida al cultivo y observan al día siguiente un crecimiento apreciable de la hierba pero en días posteriores esta al fin muere.

Planteamiento del problema

- ¿ Qué son los herbicidas?
- ¿ Qué es una enzima?; ¿Qué es lo que hacen?
- ¿ puede ser afectada su actividad, cómo?
- ¿ Qué es una auxina, cual es su función?
- ¿ Qué relación existe entre las enzima y las Auxinas ?
- ¿ Por qué la hierba crece el 1er día después del suministro de 2,4D?
- ¿ Por qué muere por la presencia de 2,4 D?

Argumente el papel regulador de las enzimas y las hormonas en el metabolismo.

* Parte del problema se le dará respuesta en la clase de hoy pero el resto se abordará en la próxima conferencia (hormonas)

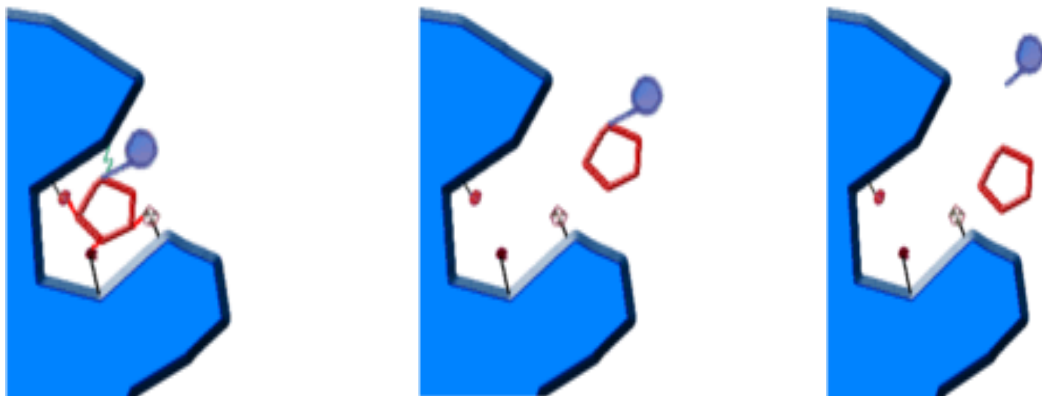
ASPECTOS GENERALES SOBRE LOS ENZIMAS.

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Los enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

Los enzimas, a diferencia de los catalizadores inorgánicos catalizan reacciones específicas. Sin embargo hay distintos grados de especificidad. El enzima sacarasa es muy específico: rompe el enlace β -glucosídico de la sacarosa o de compuestos muy similares. Así, para el enzima sacarasa, la sacarosa es su sustrato natural, mientras que la maltosa y la isomaltosa son sustratos análogos. El enzima actúa con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos. Entre los enzimas poco específicos están las proteasas digestivas como la quimotripsina, que rompe los enlaces amida de proteínas y péptidos de muy diverso tipo.

En una reacción catalizada por un enzima:

- La sustancia sobre la que actúa el enzima se llama sustrato.
- El sustrato se une a una región concreta del enzima, llamada centro activo. El centro activo comprende (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.
- Una vez formados los productos el enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción



PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS.

Las propiedades de los enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, cambios en la conformación suelen ir asociados en cambios en la actividad catalítica.

Las propiedades de las enzimas que las distinguen del resto de los catalizadores no proteicos son:

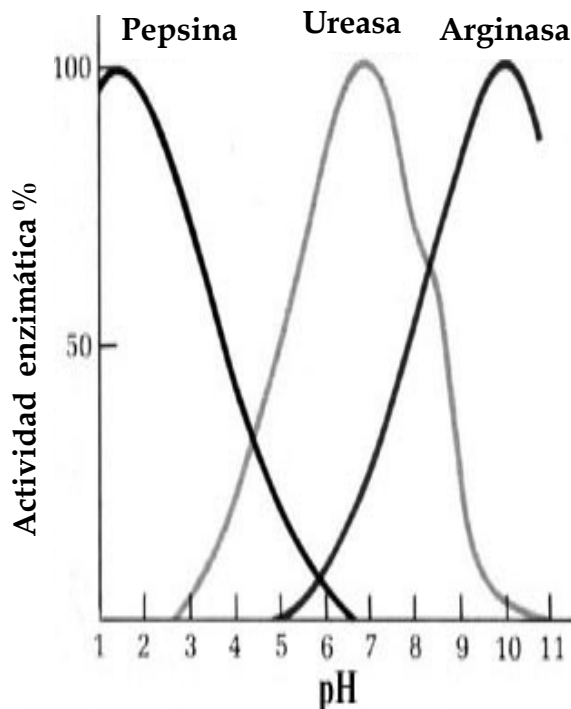
- Eficiencia catalítica
- Reversibilidad
- Especificidad.

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima son:

- pH
- Temperatura
- cofactores

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.



Las 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. Por ejemplo, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a pH 7 y la arginasa lo tiene a pH 10 (Figura de la izquierda)

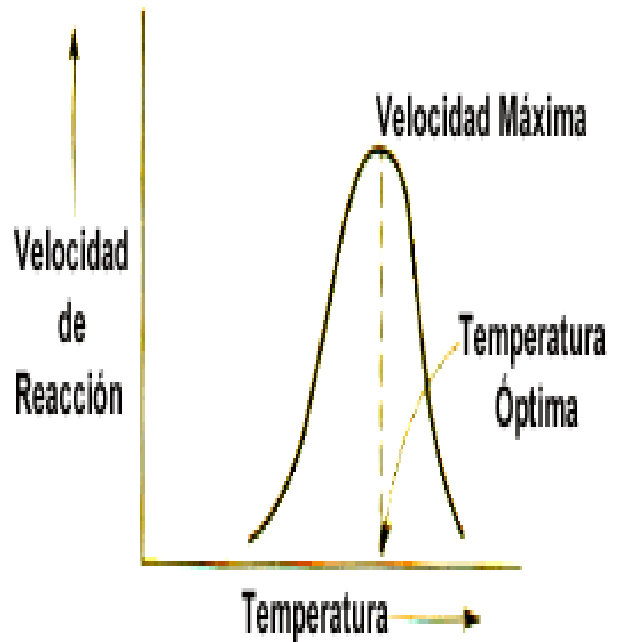
Como ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular (amortiguadores fisiológicos)

El pH puede afectar de varias maneras:

- El centro activo puede contener aminoácidos con grupos ionizados que pueden variar con el pH.
- La ionización de aminoácidos que no están en el centro activo puede provocar modificaciones en la conformación de la enzima.
- El sustrato puede verse afectado por las variaciones del pH.

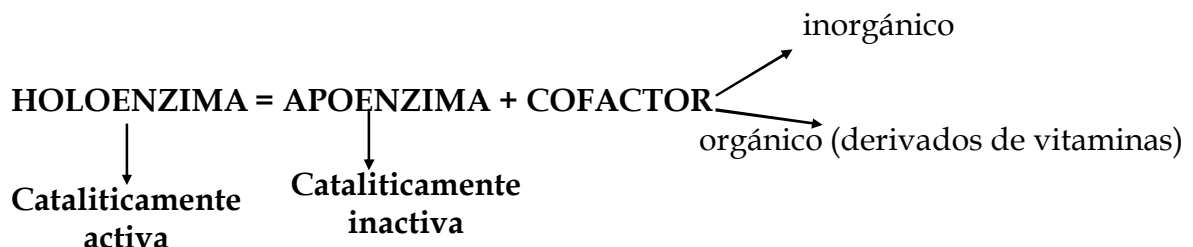
EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima (Figura de la derecha). Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.



EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A veces, un enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis (los cofactores). Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} etc. Casi un tercio de los enzimas conocidos requieren cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama coenzima o grupo prostético. Muchos de estos coenzimas derivan de vitaminas. Cuando los cofactores se encuentran unidos covalentemente al enzima se llaman grupos prostéticos y cuando están débilmente unidos se les llama coenzima. La forma catalíticamente activa del enzima, es decir, el enzima unida a su grupo prostético o coenzima, se llama holoenzima. La parte proteica de un holoenzima (inactiva) se llama apoenzima, de forma que:



NOMENCLATURA DE LOS ENZIMAS

Hay varias formas mediante las cuales se asigna un nombre a un enzima:

- nombres particulares (relacionado con el sustrato y la acción).
- nombre sistemático (consta de tres elementos: el sustrato preferente, el tipo de reacción realizada , terminación "asa") Ej. glucosa fosfato isomerasa.
- Código de la comisión enzimática (enzyme comission). El nombre de cada enzima puede ser identificado por un código numérico, encabezado por las letras EC (enzyme comission), seguidas de cuatro números separados por puntos. El primer número indica a cual de las seis clases pertenece el enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción. Así, la ATP:glucosa fosfotransferasa (glucoquinasa) se define como EC 2.7.1.2. El número 2 indica que es una transferasa, el 7 que es una fosfotransferasa, el 1 indica que el aceptor es un grupo OH, y el último 2 indica que es un OH de la D-glucosa el que acepta el grupo fosfato.

CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

En función de su acción catalítica específica, los enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases:

Clase 1:OXIDORREDUCTASA

Clase 2: TRANSFERASAS

Clase 3: HIDROLASAS

Clase 4: LIASAS

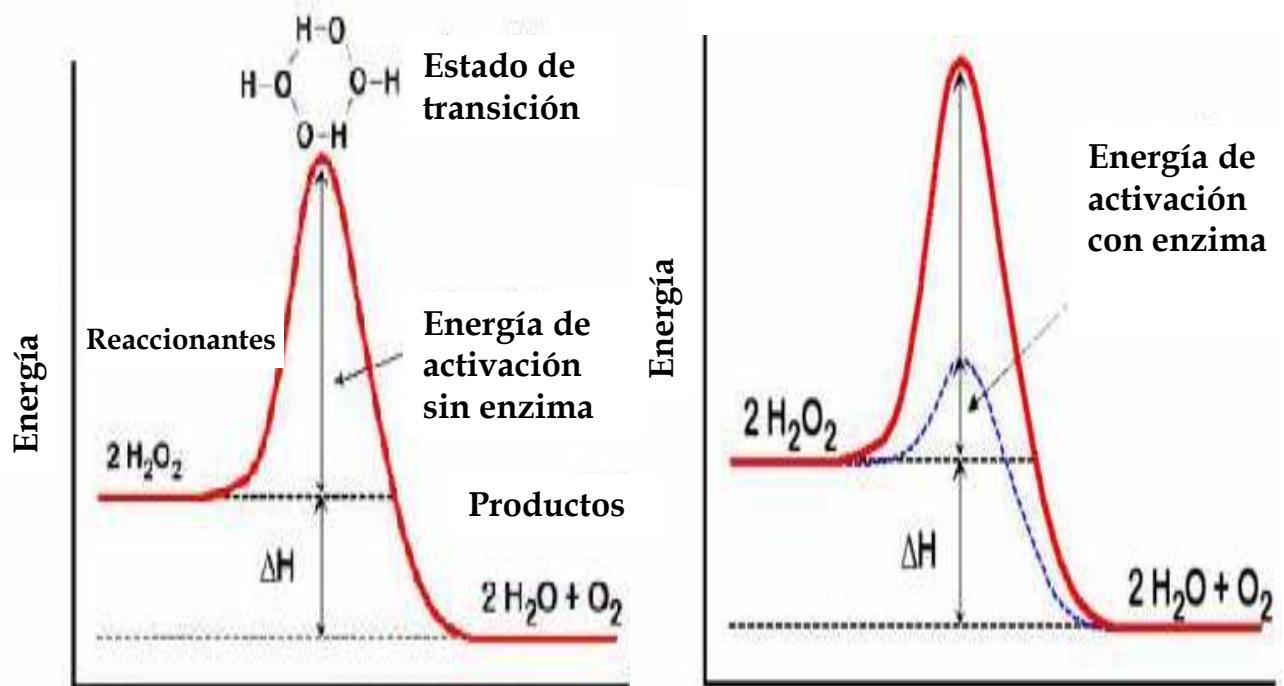
Clase 5: ISOMERASAS

Clase 6: LIGASAS

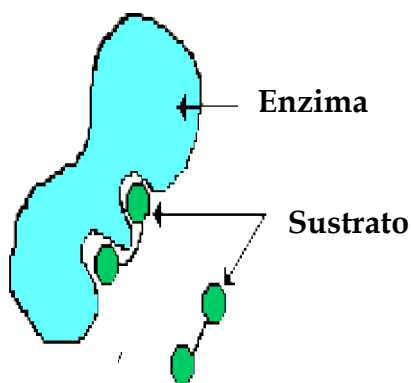
Ver pág. WEB ejemplos de cada grupo de clasificación en la conferencia sobre enzimas.

MODO DE ACCIÓN DE LOS ENZIMAS

Los enzimas son catalizadores especialmente eficaces, ya que disminuyen la energía de activación (E_a) aún más que los catalizadores inorgánicos. Por ejemplo, la descomposición del agua oxigenada (H_2O_2) para dar H_2O y O_2 puede ocurrir sin catalizador, con un catalizador inorgánico (platino), o con un enzima específico (catalasa). Las respectivas E_a para cada proceso son 18, 12 y 6 Kcal/mol. Así, se puede calcular que el platino acelera la reacción 20.000 veces, mientras que la catalasa la acelera 370.000 veces.



Para que una reacción química tenga lugar, las moléculas de los reactantes deben chocar con una energía y una orientación adecuadas. La actuación del enzima (1) permite que los reactantes (sustratos) se unan a su centro activo con una orientación óptima para que la reacción se produzca y (2) modifica las propiedades químicas del sustrato unido a su centro activo, debilitando los enlaces existentes y facilitando la formación de otros nuevos.



Hay dos modelos sobre la forma en que el sustrato se une al centro activo del enzima:

- el modelo llave-cerradura.
- el modelo del ajuste inducido.

Ver página WEB de la asignatura donde se explican dichos modelos

CINETICA ENZIMÁTICA

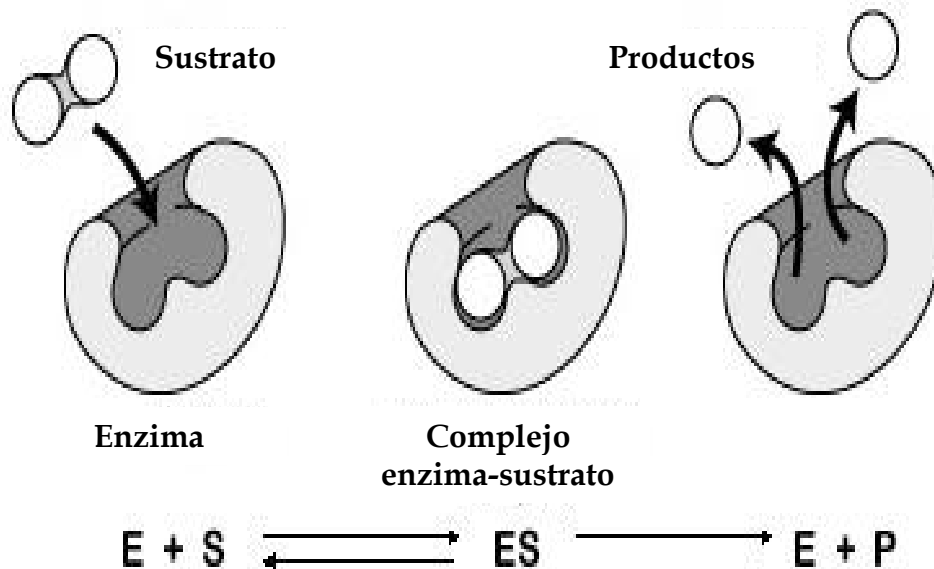
Los principios generales de las reacciones químicas se aplican también a las reacciones enzimáticas. Por este motivo, antes de empezar con la cinética enzimática, es importante recordar algunos conceptos básicos de cinética química.

A continuación, se describirán los siguientes conceptos:

Modelo cinético de Michaelis-Menten

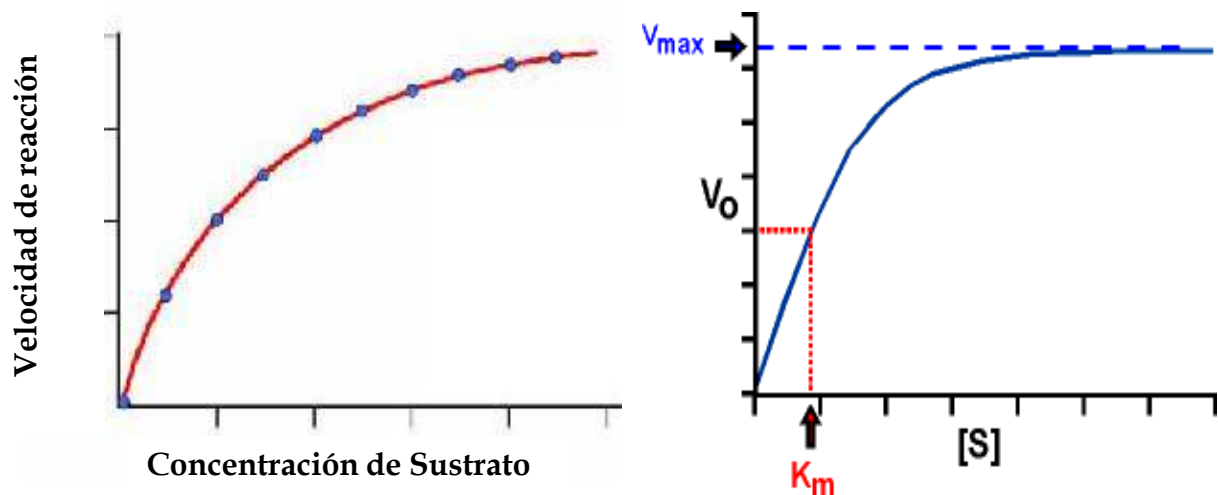
Cálculo de la K_m y la V_{max} de una enzima

Actividad enzimática.

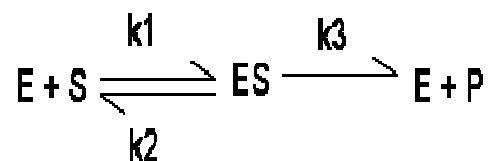


La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar el enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reaccionantes.

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato ($[S_0]$) sobre la velocidad inicial de la reacción (v_0), manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S_0]$ obtenemos la gráfica que aparece a continuación. Cuando $[S_0]$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato ($[S]$), y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{max}).



Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S_0]$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando el enzima libre:



En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso y también reciben el nombre de constantes microscópicas de velocidad. Según esto, podemos afirmar que:

- $v_1 = k_1 [E] [S]$
- $v_2 = k_2 [ES]$
- $v_3 = k_3 [ES]$

Se puede distinguir entre enzima libre (E) y enzima unido al sustrato (ES), de forma que la concentración total de enzima, $[E_T]$, (que es constante a lo largo de la reacción) es:

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [E_T] - [ES]$, resulta que: $v_1 = k_1 [S] [E_T] - k_1 [S] [ES]$

Además, como $[ES]$ es constante, la velocidad de formación de los productos es constante:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante.}$$

Mediante un procesamiento matemático se deduce que:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}$$

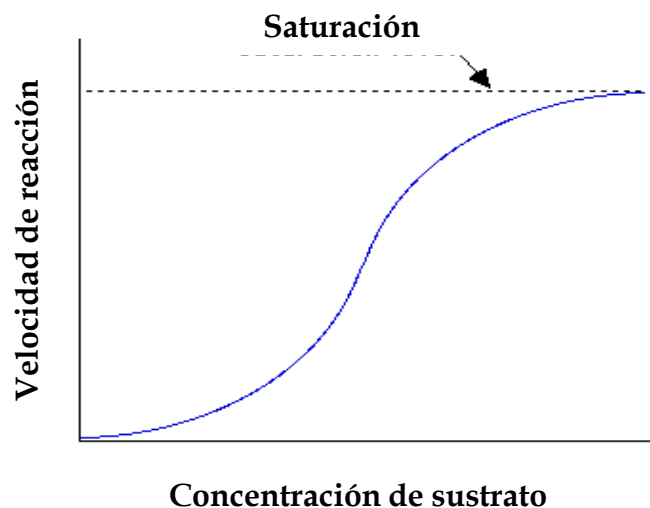
Donde la expresión $(k_2+k_3)/k_1$ se ha sustituido por K_M , o constante de Michaelis-Menten. Este enlace nos aporta una explicación sobre las razones que hacen de la K_m un parámetro cinético importante que expresa la afinidad de la enzima por su sustrato.

La ecuación de Michaelis - Menten relaciona la concentración de sustrato con la velocidad de la reacción.

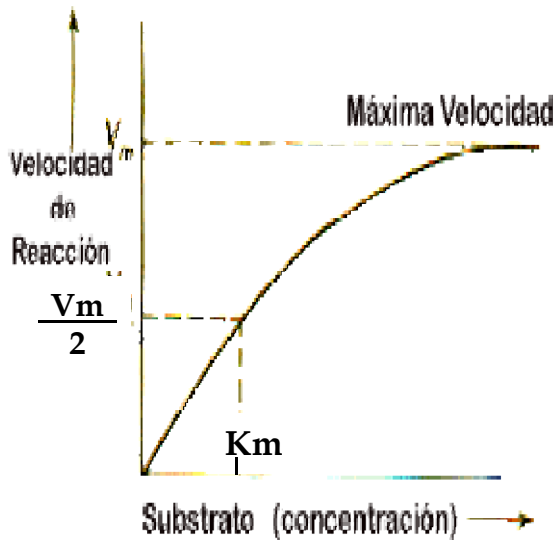
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

(ver texto p55-59 y página WEB en conferencia de enzima la deducción matemática)

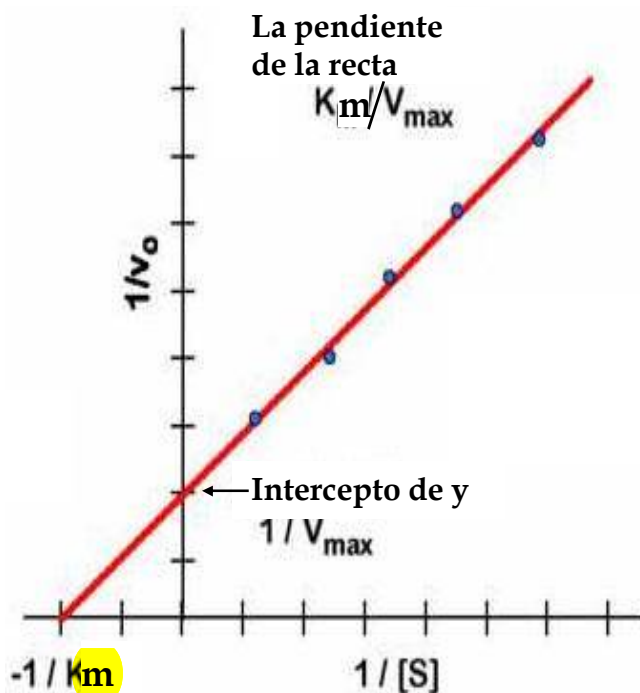
Hay enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten. Se dice que su cinética no es Michaeliana. Esto ocurre con los enzimas alostéricos, cuya gráfica v frente a $[S]$ no es una hipérbola, sino una sigmoide (Figura). En la cinética sigmoidea, pequeñas variaciones en la $[S]$ en una zona crítica (cercana a la K_m) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción.



CÁLCULO DE LA K_m Y DE LA V_{max} DE UN ENZIMA



La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S_0]$) es una hipérbola. La V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .



Para determinar gráficamente los valores de K_m y V_{max} es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S_0]$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk (Figura). Es una recta en la cual:

La pendiente es K_m/V_{max}

La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_m$

La ordenada en el origen ($1/[S_0] = 0$) es $1/V_{max}$

$$1/v = K_m/V_m \cdot 1/S + 1/V_m$$

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Una molécula de enzima no tiene por qué actuar siempre a la misma velocidad. Su actividad puede estar modulada por:

cambios en el **pH**

cambios en la **temperatura**

presencia de **cofactores**

las **concentración de sustratos y de los productos finales**

presencia de **inhibidores**

Modulación alostérica.

Modificación covalente

activación por **proteolisis**

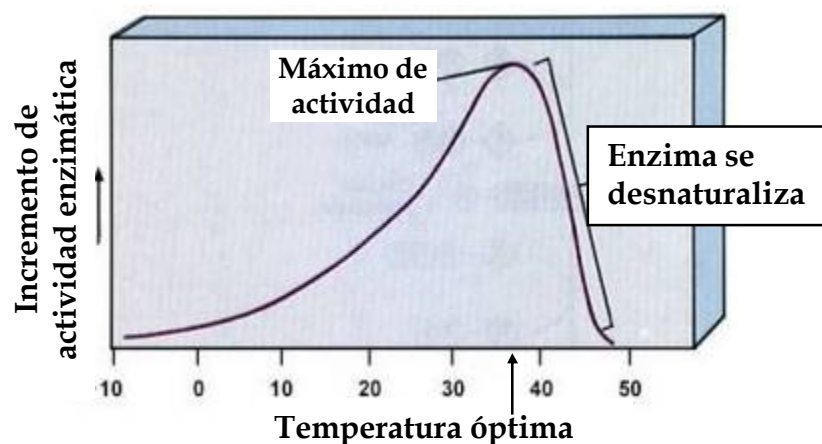
Isoenzimas.

EFFECTO 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. Como 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.

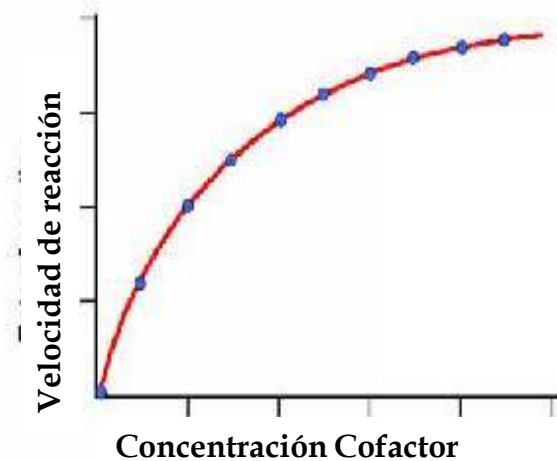
•EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A la temperatura óptima la enzima presenta el máximo de actividad catalítica. Por encima de esta temperatura, la enzima comienza a desnaturalizarse por lo que la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.



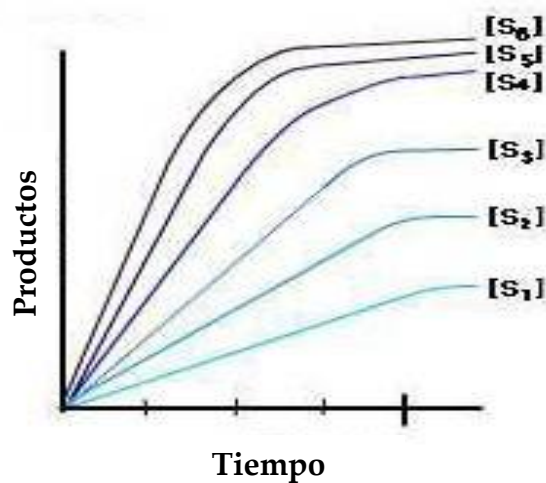
EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El cofactor ejerce sobre la velocidad de reacción un efecto semejante a la concentración de S (figura siguiente). Si la reacción es catalizada por una enzima que requiere un cofactor y este no está presente la reacción no ocurre porque la enzima estará catalíticamente inactiva.



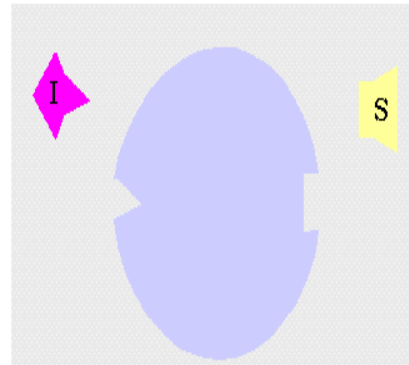
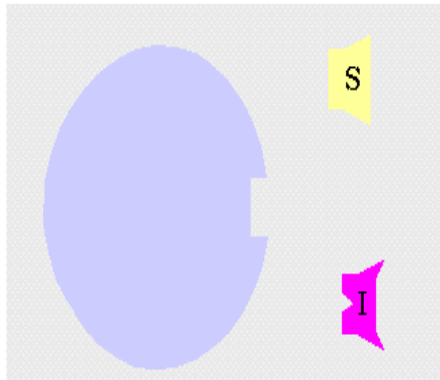
EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de sustrato. La Figura de la derecha muestra la velocidad de una reacción enzimática a 6 concentraciones distintas de sustrato. Además, la presencia de los productos finales puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido



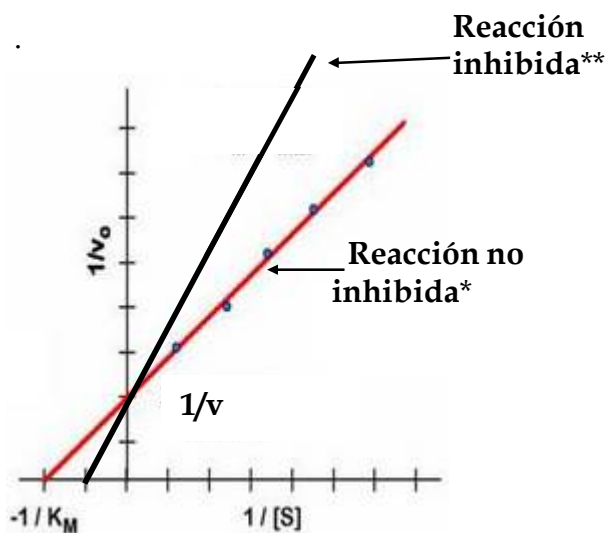
EFFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Ciertas moléculas pueden inhibir la acción catalítica de un enzima: son los inhibidores. Estos inhibidores bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (inhibidor competitivo) o bien alteran la conformación espacial del enzima, impidiendo su unión al sustrato (inhibidor no competitivo) (Figuras inferiores).



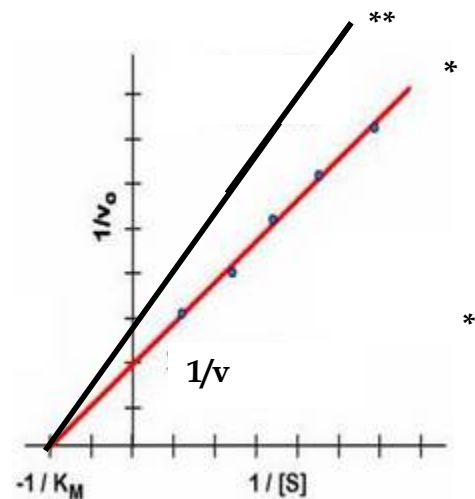
Inhibición competitiva

Inhibidor compite con el S por el CA, porque presenta estructura semejante al S (afecta la K_M , pero la V_{Max} se recupera cuando $[S] \gg [Inh]$)



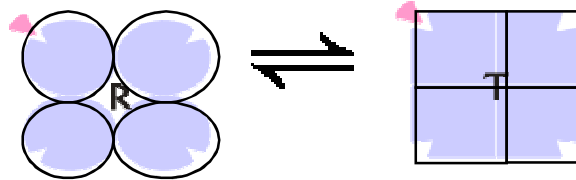
Inhibición no competitiva

El inhibidor no puede unirse al CA, no presenta estructura semejante al S (no afecta la K_M , pero la V_{max} no se recupera aunque la $[S] \gg [Inh]$)



MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

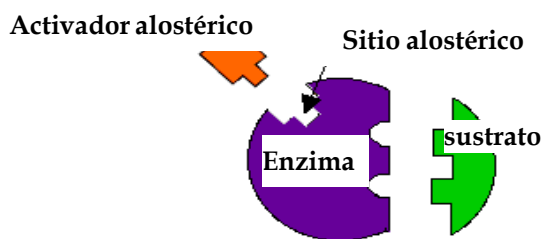
Hay enzimas que pueden adoptar 2 conformaciones interconvertibles llamadas R (relajada) y T (tensa). R es la forma más activa porque se une al sustrato con más afinidad. Las formas R y T se encuentran en equilibrio $R \rightleftharpoons T$



Ciertas sustancias tienden a estabilizar la forma R. Son los llamados moduladores positivos. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo. Las moléculas que favorecen la forma R pero que actúan sobre una región del enzima distinta del centro activo son los activadores alostéricos:

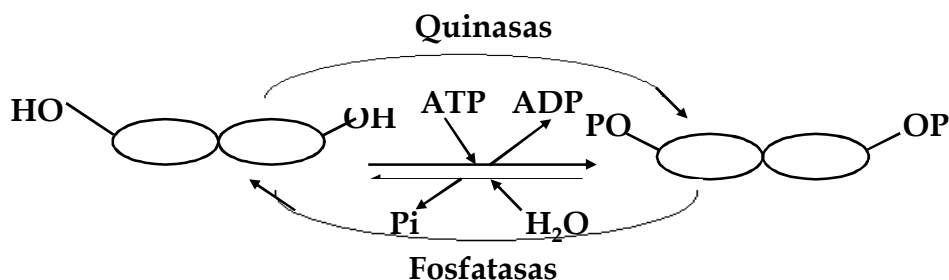
Efactor alostérico \oplus o activador: Favorece la unión con el sustrato, desplaza el equilibrio hacia la formación de estados R.

Efactor alostérico \ominus o inhibidor: inhibe la unión de la enzima con el S, desplaza el equilibrio hacia la formación de estados T.



EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN COVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Otros enzimas pasan de una forma menos activa a otra más activa uniéndose covalentemente a un grupo químico de pequeño tamaño como el Pi o el AMP. También se da el caso inverso, en el que un enzima muy activo se desactiva al liberar algún grupo químico. En las enzimas de las vías degradativas del metabolismo, la forma fosforilada es más activa que la no fosforilada, mientras que en las vías biosintéticas ocurre lo contrario. Son estados interconvertibles por acción de otras enzimas.



Hacer un cuadro comparativo con las principales características de los mecanismos de regulación alostérica y modificación covalente.

OTRAS BIBLIOGRAFÍA ENZIMAS

Bioquímica para estudiantes de Ciencias Agropecuarias. p. 42-66

Bioquímica A.L. Lehninger p. 189-194, 223-248.

Biochemistry. Geoffrey Zubay Cap. 8 y 9 p. 259-345.

[Bioquímica. Voet & Voet. Cap 12,13 y 14](#)

[Bioquímica. Matheus Cap. 11](#)

Bioquímica A.L. Lehninger. Cap.

CONCLUSIONES.

Proteínas celulares \longrightarrow Función como catalizador
Enzimas (justificar)



E: Glucoquinasa

¿Cómo será la especificidad de sustrato y de acción de esta enzima?

Destacar la importancia de las enzimas en la regulación del metabolismo permitiendo que este transcurra cumpliéndose el principio de máxima eficiencia y economía

Trabajo independiente ver activación proteolítica de la actividad enzimática y regulación de la actividad enzimática por medio de isoenzimas (Pág. WEB)

CUESTIONARIO

¿Qué es un enzima y cual es su naturaleza química?

¿Cómo se define el complejo funcional enzimático? Citar sus componentes y describirlos.

Explique qué es el centro activo y cómo está constituido.

Enumere las propiedades de los enzimas que lo diferencian del resto de las proteínas.

Explique, en forma comparativa, las teorías que tratan de explicar el modo en que se lleva a cabo la unión entre la enzima y el sustrato.

Justifique mediante un gráfico el efecto de la concentración de los enzimas sobre la velocidad de la reacción.

¿Qué expresa la ecuación de Michaelis- Menten?

¿Cómo puede definirse la K_M ?

Represente gráficamente la K_M mediante el grafico de Michaelis- Menten y el de Lineweaver y Burk. Explicar su significación practica.

Explique mediante gráficos la inhibición competitiva y la no competitiva.

Explique el efecto de la temperatura y el pH sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas.