



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA



INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS DE LA MEDICINA I

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS COMPONENTES MACROMOLECULARES DE LA CÉLULA

Profesor Coordinador General	:	Héctor Toledo
Profesores Encargados	:	Marcelo Antonelli María Angélica Carrasco Remigio López Héctor Toledo
Profesores Coordinadores de Capítulos	:	Marcelo Antonelli María Angélica Carrasco
Profesores Participantes	:	Carmen Alcayaga Marcelo Antonelli María Isabel Behrens María Angélica Carrasco Milton de la Fuente Paulina Donoso Steffen Härtel Germaine Jacob Eugenia Jedlicki Assaf Katz Juan Luis Lorca Juan Diego Maya Omar Orellana Omar Ramírez Gloria Riquelme Juan C. Salazar Gina Sánchez Héctor Toledo

2007

I N D I C E

1. CALENDARIO DE ACTIVIDADES	3
2. RESÚMENES DE ACTIVIDADES EXPOSITIVAS	5
3. TRABAJOS PRÁCTICOS Y SEMINARIOS	10
- Trabajo Practico N°1: Análisis de Proteínas	11
- Seminario N°1: Estructura y Propiedades de los Aminoácidos y Proteínas	23
- Trabajo Practico N°2: Enzimas	28
- Seminario N°2: Enzimología	39
- Seminario N°3: Discusión de trabajos prácticos de análisis de proteínas y enzimas	44
- Seminario N°4: Membranas Biológicas: Estructura, difusión simple, potencial químico transducción de señales	45
- Seminario N°5: Membranas Biológicas: Transporte mediado pasivo y activo Transporte Activo y Pasivo	47
4. ANEXOS	
1. Trabajo de Computación Análisis y Predicción de la Estructura de las Proteínas	51
2. Cinética Enzimática	57
3. Guía de Laboratorio: uso de columnas de Bio-Gel P60	60

COMPONENTES MACROMOLECULARES DE LA CÉLULA

Semana 23 al 27 de Julio

Lunes 23	Martes 24	Miércoles 25	Jueves 26	Viernes 27
8.30 Bienvenida al curso 9.00 CC Organización en los seres vivos: Remigio López	8.30 CG Estructura y propiedades de aminoácidos 10.30 CG Niveles de organización de proteínas.	8.30 TP Análisis de proteínas Grupo A		8.30 TP Análisis de proteínas grupo B

Semana 30 de Julio al 3 de Agosto

Lunes 30	Martes 31	Miércoles 1	Jueves 2	Viernes 3
8.30 CC Enfermedad de Alzheimer: de las proteínas al paciente. Dra. María Isabel Behrens.	8.30 CG Estructura de proteínas 10.30 CG Cinética enzimática I	8.30 Seminario Estructura y propiedades de aminoácidos y proteínas Grupo A		8.30 Seminario Estructura y propiedades de aminoácidos y proteínas. Grupo B

Semana 6 al 10 de Agosto

Lunes 6	Martes 7	Miércoles 8	Jueves 9	Viernes 10
8.30 Libre	8.30 TP Enzimología Grupo A	8.30 CG Cinética enzimática II 10.30 CG Regulación de la actividad de las enzimas:Modifs. covalentes y alosterismo		8.30 TP Enzimología Grupo B

Semana 13 al 17 de Agosto

Lunes 13	Martes 14	Miércoles 15	Jueves 16	Viernes 17
8.30 CC Inhibición de la síntesis de tioles en T. cruzi como estrategia para aumetnar la actividad de drogas antichagásicas. Dr. Juan Diego Maya.	8.30 Seminario Enzimología Grupo A	Feriado		8.30 Seminario Enzimología Grupo B

Semana 20 al 24 de Agosto 2007

Lunes 20	Martes 21	Miércoles 22	Jueves 23	Viernes 24
8.30 Libre	8.30 CG Estructura y composición molecular de Membranas Biológicas 10.30 CG Transducción de señales	8.30 Seminario Discusión TPs Análisis de Proteínas y Enzimas Grupo A		8.30 Seminario Discusión TPs Análisis de Proteínas y Enzimas Grupo B

Semana 27 al 31 de Agosto

Lunes 27	Martes 28	Miércoles 29	Jueves 30	Viernes 31
8.30 Libre	8.30 CG Difusión simple y potencial químico 10.30 CG Potencial electroquímico y potencial de membrana	8.30 Seminario -Estructura y composición de membranas -Transducción de señales -Difusión y potencial químico Grupo A		8.30 Seminario -Estructura y composición de membranas -Transducción de señales -Difusión y potencial químico Grupo B

Semana 03 al 07 de Septiembre

Lunes 03	Martes 04	Miércoles 05	Jueves 06	Viernes 07
8.30 Drogas relacionadas con el ánimo y su interacción con transportadores. Dr Juan Luis Lorca	8.30 CG Transporte mediado pasivo 10.30 CG Transporte mediado activo	8.30 Seminario -Potencial electroquímico -Transporte mediado pasivo y activo Grupo A		8.30 Seminario -Potencial electroquímico -Transporte mediado pasivo y activo Grupo B

Semana 10 al 14 de Septiembre

Lunes 10	Martes 11	Miércoles 12	Jueves 13	Viernes 14
	8.30 III Certamen			

Simbología utilizada

CC=Clases de Curso Completo (todo el curso)

CG= Clase de grupo pequeño (4 salas en paralelo)

TP= Trabajo Práctico

RESÚMENES DE ACTIVIDADES EXPOSITIVAS

23/07- 8.30-9.00

Bienvenida al curso

9.00-10.00

CC Estructura y Organización en los Seres Vivos.

Profesor: Remigio López

Los seres vivos son entidades complejas cuyo estudio por parte de los biólogos es una materia de activa investigación en la actualidad. Al igual que en muchos otros estudios sobre temas complejos, los científicos (biólogos) se han especializado en estudiar partes (estructura) y relaciones entre las partes (organización) de los seres vivos. Así, es posible reconocer, a manera de ejemplo, a biólogos moleculares, biólogos celulares, histólogos, anatomistas, endocrinólogos, etólogos, genetistas, evolucionistas y ecólogos, entre otros. Todos ellos relacionan estructura con función. Cada uno de estos especialistas dispone de herramientas de análisis propias: la detección de corrientes eléctricas, la detección de moléculas orgánicas o macromoléculas o de las propiedades de las mismas, la separación de estructuras subcelulares en campos gravitacionales artificiales, la observación de las mismas mediante microscopios de diferente poder de resolución, la observación directa a simple vista o mediante técnicas imagenológicas. Un médico es esencialmente un biólogo que al enfrentarse a evaluar a un paciente debe recurrir a fuentes de información que aportan datos desde los iones hasta el individuo que lo consulta, desde las relaciones genealógicas del paciente con su familia hasta el ambiente en que se desenvuelve. A estas secuencias de partes, de relaciones, de complejidades, se conoce con el nombre niveles de organización.

Durante la primera parte del curso, los estudiantes se vieron enfrentados a conocer estructuras generales de la materia, incluyendo sus relaciones y sus propiedades. La segunda parte del curso se inicia con el estudio de algunas moléculas pequeñas (aminoácidos) las que a través de su interacción ordenada en el espacio estructuran macromoléculas (proteínas) cuya función puede ser reconocidamente más específica que lo atribuible a cada uno de los aminoácidos que la constituyen. De la misma manera, otras moléculas pequeñas (nucleótidos) pueden pasar a constituir unidades estructurales básicas de macromoléculas, como el DNA, que constituyen sistemas de información codificada en los seres vivos. Ambos tipos de macromoléculas son sintetizados por estructuras biológicas muy complejas de las que también forman parte proteínas y ácidos nucleicos. Estos sistemas sintetizadores deben ser estructurados, activados y dispuestos en sitios físicos para realizar sus funciones. Tales sitios constituyen ámbitos delimitados en los que existen condiciones apropiadas para las funciones que en ellos se desarrollan. Tales límites están estructurados básicamente por asociaciones de lípidos y proteínas que organizados en bicapas (membranas) no sólo aíslan sino que al mismo tiempo comunican espacios con características distintas. La estructura de macromoléculas, la eficiencia y fidelidad de la maquinarias de síntesis de las mismas, la estructura y funcionamiento de membranas biológicas que intercomunican los compartimientos que delimitan también serán materias de esta parte del curso. A esta altura, nos habremos familiarizado con procesos moleculares propios de una célula. Por convención, una célula es la unidad estructural más simple en la que se dan relaciones propias de lo que llamamos vida. En la etapa final del curso analizaremos el conocimiento actual en procesos propiamente celulares: recepción y respuesta a señales ambientales, proliferación celular, adquisición y expresión de atributos particulares (diferenciación celular) y muerte celular.

CG 24/07-8.30 – 10.00

Estructura y propiedades de aminoácidos

Profesores: Marcelo Antonelli, Germaine Jacob, Eugenia Jedliki, Omar Orellana,

Todas las proteínas, desde las más simples hasta las más complejas, están formadas por la unión covalente de las mismas unidades básicas: los aminoácidos. Todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son α aminoácidos, es decir, tienen un átomo de carbono ($C\alpha$) formando enlaces con un grupo amino, un grupo carboxílico, un H y una cadena lateral y es por lo tanto asimétrico. Todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son L-aminoácidos y se diferencian entre ellos por sus cadenas laterales. A partir de sólo 20 aminoácidos es posible sintetizar cientos de miles de proteínas diferentes y sus propiedades estarán determinadas en último término por las propiedades de los aminoácidos que las forman y la secuencia en que ellos se unen.

En esta clase conocerán las diferentes cadenas laterales que pueden tener los aminoácidos y las características de hidrofiliidad, hidrofobicidad o ácido base que esa cadena le confiere al aminoácido.

CG 25/07-10.30 – 12.30

Niveles de organización en las proteínas

Profesores: Marcelo Antonelli, Germaine Jacob, Eugenia Jedliki, Omar Orellana.

Las proteínas presentan gran diversidad de funciones y esto se explica por la gran variedad de estructuras que ellas pueden adquirir. Las proteínas están constituidas por aminoácidos, los cuales enlazados en número y combinaciones diferentes, dan lugar a una enorme gama de estructuras primarias. A su vez, la secuencia de aminoácidos dirige el plegamiento de la proteína, determinando el segundo nivel de organización: la estructura secundaria. Las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos dan origen a la estructura terciaria de las proteínas obteniéndose una estructura tridimensional única. Algunas proteínas presentan estructura cuaternaria, que es la que se origina por interacciones entre distintas subunidades (cadenas polipeptídicas independientes).

En esta clase estudiaremos las propiedades del enlace peptídico, los tipos de estructura secundaria y los enlaces que la estabilizan, las fuerzas e interacciones que mantienen la estructura terciaria de las proteínas y como pueden asociarse diferentes cadenas polipeptídicas para dar origen a una proteína con estructura cuaternaria.

CC 30/07- 8.30-10.00 hrs.

Enfermedad de Alzheimer: de las proteínas al paciente

Dra. María Isabel Behrens.

A fin de entregar una visión global de la relevancia en salud humana de la estructura de proteínas, en esta clase se analizarán aspectos moleculares y celulares asociados a la enfermedad de Alzheimer así como su correlación con los aspectos clínicos de esta patología.

CG 31/08-8.30-10:00

Estructura de proteínas

Profesores: Marcelo Antonelli, Eugenia Jedliki, Omar Orellana, Germaine Jacob.

Las proteínas son las macromoléculas biológicas que presentan mayor variedad de formas, tamaños y funciones. Están formadas por cadenas lineales de aminoácidos cuya secuencia está determinada por la información genética codificada en el ADN de cada organismo en particular.

En una proteína particular se requiere que la cadena polipeptídica posea una estructura espacial determinada para que pueda cumplir su función. Esta estructura está determinada por la secuencias de aminoácidos que posea. Lo más probable es que si se altera la secuencia se altere también su función. Sin embargo dos proteínas que presentan secuencias similares, pero no idénticas también pueden presentar estructuras y funciones equivalentes (una misma proteína proveniente de organismos diferentes).

Algunas patologías se deben a una alteración en estructura de una proteína particular. Esta alteración puede causar una deficiencia en la función debido a cambios sutiles o a cambios masivos en la estructura de la proteína afectada. En esta clase se analizarán las alteraciones puntuales que ocurren en la hemoglobina que conducen a ciertas anemias, y los cambios masivos en la estructura de la proteína PrP (prión), que provoca la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (una patología neurodegenerativa).

CG 31/08 -10.30-12.30

Cinética Enzimática

Profesores: Marcelo Antonelli, Eugenia Jedliki, Omar Orellana, Germaine Jacob.

En esta clase se estudiarán las propiedades cinéticas de las reacciones catalizadas por las enzimas. Se analizarán las representaciones gráficas de estas reacciones y los parámetros cinéticos más importantes, así como también el efecto de inhibidores. (VER ANEXO 1, Página N° 55).

Curva de progreso

Velocidad inicial (V^0).

Equilibrio.

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial

Complejo [Enzima-Sustrato].

Ecuación de Michaelis Menten. Parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Concepto de saturación de la enzima.

K_m en función de las constantes cinéticas. Etapa limitante de la reacción (k_{cat}).

Representación gráfica de la ecuación de Michaelis Menten. Gráfico doble recíproco.

Determinación de K_m y V_{max} .

Efecto de la concentración de enzima sobre V_{max} y k_{cat}

Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.

Inhibición de la actividad enzimática.

Inhibidores competitivos y no competitivos.

Inactivación enzimática.

CG 08/08-08.30-10.00

Cinética Enzimática

Profesores: Marcelo Antonelli, Eugenia Jedliki, Omar Orellana, Germaine Jacob.

Continuación de la clase del 01/08

CG 08/08-10.30-12.30

Regulación de la actividad de las enzimas: Modificaciones covalentes reversibles y alosterismo.

Profesores: Marcelo Antonelli, Eugenia Jedliki, Omar Orellana, Germaine Jacob.

Algunas enzimas están sometidas a regulación, es decir, su actividad puede aumentar o disminuir en respuesta a ciertas señales celulares, lo cual se logra a través de diferentes mecanismos. En cada ruta metabólica existe al menos una enzima regulada y gracias a su acción, la velocidad global de la vía puede ajustarse constantemente a la circunstancia bioquímica de la célula.

I. Regulación a nivel de la actividad enzimática:

A) Alosterismo y cooperatividad: representación gráfica de la cinética de enzimas alostéricas. Efectores alostéricos.

B) Modificación covalente reversible de las enzimas. Fosforilación y desfosforilación.

II. Regulación a nivel de la cantidad de enzima: Inducción y represión de genes.

CC 13/08- 8.30-10.00

Inhibición de la síntesis de tioles en *T. cruzi* como estrategia para aumentar la actividad de drogas antichagásicas.

Dr. Juan Diego Maya.

El nifurtimox y el benznidazol son nitroderivados que se usan en el tratamiento clínico de la Enfermedad de Chagas. Los productos del metabolismo de estos dos fármacos son radicales libres o agentes electrofílicos que inducen estrés oxidativo en el parásito. El *Trypanosoma cruzi* se defiende de este estrés mediante dos tioles: tripanotión y glutatión. Por tanto, las modificaciones en la síntesis de estos dos tioles podrían aumentar el efecto de los fármacos antichagásicos. En efecto, la molécula butionina sulfoximina inhibe a la gamma glutamilcisteína sintetasa, paso limitante en la síntesis de glutatión y tripanotión. Se aporta evidencia de la eficacia de esta combinación en modelos in vitro de la enfermedad de Chagas.

CG 21/08-8.30-10.00 Estructura y composición molecular de Membranas Biológicas.

Profesores: Carmen Alcayaga, María Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

Es necesario conocer las propiedades básicas de las membranas biológicas para entender los distintos procesos en que estas participan. Las membranas están formadas principalmente por lípidos y proteínas de los que estudiaremos estructura, distribución, movimientos y las interacciones entre ellos. La formación de la bicapa lipídica se entiende utilizando conceptos termodinámicos que se han revisado en la primera parte de FCMI. Analizaremos el modelo de mosaico fluido de la membrana formulado por Singer y Nicolson, incorporando los elementos que se conocen hasta el momento.

CG 21/08-10.30-12.00 Transducción de Señales.

Profesores: Carmen Alcayaga, María Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

Transducción de señales es el campo de la ciencia que busca entender los mecanismos que las células han desarrollado para interpretar los mensajes extra e intracelulares que reciben y realizar las respuestas correspondientes. Proteínas y lípidos de membrana participan como componentes de vías de transducción de señales. Estudiaremos algunos ejemplos de estas vías que nos ayudarán a entender los contenidos de las clases siguientes.

CG 28/08-8.30-10.00 Difusión simple y potencial químico.

Profesores: Carmen Alcayaga, María Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

Solutos de baja polaridad y tamaño pequeño atraviesan la membrana biológica a través de la bicapa lipídica por un mecanismo de *difusión simple*. En esta clase analizaremos como ocurre el movimiento de un soluto en un solvente y a través de la bicapa utilizando la ecuación de Fick. La energía asociada a la difusión de un soluto no cargado puede conocerse determinando la diferencia de *potencial químico* entre el estado final y el inicial, la que es originada por el gradiente de concentración del soluto.

CG 28/08-10.30-12.00 Potencial electroquímico y potencial de membrana.

Profesores: Carmen Alcayaga, María Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

Cuando un soluto tiene carga neta, su transporte es determinado tanto por su diferencia de concentración como por la diferencia de voltaje (*potencial de membrana*) a través de la membrana plasmática. La energía asociada al transporte de un soluto cargado se determina por la diferencia de *potencial electroquímico* del soluto entre los estados inicial y final.

CC 03/07-8.30-10.00 Drogas relacionadas con el ánimo y su interacción con transportadores.

Dr. Juan Luis Lorca

Transportadores de neurotransmisores como dopamina, noradrenalina y serotonina son blanco de varios agentes farmacológicos que afectan funciones cerebrales, incluyendo estimulantes, antidepresivos y neurotoxinas. En esta clase se expondrá una visión clínica de este tema.

CG 04/09 8.30-10.00 Transporte mediado pasivo.

Profesores: Carmen Alcayaga, Maria Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

Para el transporte de moléculas polares a través de la membrana existen proteínas de membrana especializadas, las que pueden ser transportadores o canales iónicos. Se habla de **transporte mediado pasivo** cuando el soluto se mueve a favor de su gradiente electroquímica y por lo tanto, no requiere energía. Estudiaremos las propiedades del transporte mediado por transportadores referente a sus parámetros cinéticos como son flujo máximo y Km. Además compararemos los mecanismos del transporte mediado por transportadores con los involucrados en el funcionamiento de los canales iónicos.

CG 04/09 10.30-12.00 Transporte mediado activo.

Profesores: Carmen Alcayaga, Maria Angélica Carrasco, Gloria Riquelme, Gina Sánchez.

En el **transporte mediado activo** se generan o mantienen gradientes electroquímicos y para esto el transportador se acopla a un proceso espontáneo que recibe el nombre de fuente de energía. Calcularemos la energía necesaria para construir las gradientes iónicas presentes en las células y determinaremos como la energía almacenada en una gradiente iónica puede usarse para transportar activamente un soluto. Conocer estos mecanismos nos permitirá entender el funcionamiento de la bomba sodio-potasio ATPasa y del complejo molecular responsable de sintetizar ATP en la mitocondria, entre otros transportadores.

**TRABAJOS PRÁCTICOS
Y
SEMINARIOS**

TRABAJO PRÁCTICO N°1. Análisis de Proteínas

I. TÉCNICAS DE SEPARACION DE PROTEÍNAS BASADAS EN LA CARGA ELÉCTRICA

1.- Cromatografía de intercambio iónico: con esta técnica las proteínas se pueden separar sobre la base de su carga neta. Si una proteína está a un pH en el cual posee carga neta positiva, se puede unir a partículas que contienen grupos negativos (ácidos ionizados), mientras que una proteína cargada negativamente se une a partículas que contienen grupos con carga positiva (bases protonadas).

Los intercambiadores iónicos son materiales sintéticos que se fabrican en forma de esferas (resinas). Estas resinas pueden funcionar como intercambiadores iónicos debido a la presencia de grupos ionizables en su superficie.

Si sus grupos ionizables son ácidos y se trabaja a un pH tal que ellos estén disociados, la resina tendrá cargas negativas y constituirá un intercambiador catiónico (ejemplo: carboximetilcelulosa). En este caso, los iones positivos (cationes) se intercambian entre la resina y el medio.

Si sus grupos ionizables son básicos y se trabaja a un pH tal que ellos estén protonados, la resina presentará carga positiva y constituirá un intercambiador aniónico (ej: dietil, aminoetil celulosa o DEAE-celulosa), pudiendo intercambiar iones negativos (aniones) con el medio.

De esta forma, una proteína cargada positivamente (a un pH menor que su pI) se puede unir a intercambiadores catiónicos. Por el contrario, una proteína cargada negativamente (a un pH mayor que su pI) se unirá a intercambiadores aniónicos.

Después de seleccionar el intercambiador, se procede a equilibrarlo en un amortiguador adecuado y se preparan columnas que pueden ser de distinta altura y diámetro.

La muestra, que contiene las proteínas disueltas en un volumen pequeño, se aplica en la parte superior del lecho de la resina. Luego se hace pasar un amortiguador al pH apropiado para eluir las proteínas. También éstas se pueden eluir utilizando soluciones salinas en concentraciones adecuadas.

El eluido que sale por la parte inferior de la columna se puede coleccionar en fracciones pequeñas y la presencia de proteínas en éstas se puede determinar por su absorbancia a 280 nm.

2.-Electroforesis: Esta técnica permite separar las moléculas de una mezcla mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Las proteínas presentan propiedades ácido-base que están determinadas por el número y tipo de sus radicales ionizables, junto con los grupos amino y carboxilo terminal. Las proteínas que han sido modificadas post-traduccionalmente, ya sea mediante glicosilación, fosforilación, sulfonación, acetilación etc., poseen cargas adicionales. A un pH diferente al de su punto isoelectrico, las proteínas presentan carga, lo cual les permite migrar al ser sometidas a un campo eléctrico.

Cuando una molécula cualquiera es sometida a un campo eléctrico, la velocidad con que migra depende de dos fuerzas opuestas, una impulsora y otra de resistencia. La primera depende fundamentalmente de la magnitud del campo eléctrico aplicado y de la carga neta de la molécula. En la segunda influyen, entre otros factores, el tamaño y la forma de la molécula y la viscosidad del medio a través del cual se mueve. Al respecto, la velocidad de migración resulta ser directamente proporcional a la carga neta de la molécula y al potencial aplicado e inversamente proporcional al tamaño de la molécula y a la viscosidad del medio. En relación a este último punto, un factor importante en una electroforesis es el soporte o matriz en el cual está migrando la mezcla de proteínas en solución.

La matriz óptima para electroforesis es aquella que es estable, que disminuye o elimina la convección y que no reacciona químicamente con la muestra.

Se ha utilizado una variedad de matrices o soportes para la separación de moléculas mediante electroforesis, entre las cuales se encuentran la agarosa y la poliacrilamida.

Poliacrilamida: es un polímero que proviene de la polimerización de la acrilamida en conjunto con la N,N, metilen-bis-acrilamida, que actúa como reactivo entrecruzador. Mediante variaciones en las concentraciones de ambos reactivos se puede lograr distintos tamaños de poros en los geles. Para iniciar la polimerización se adiciona un catalizador que generalmente es una amina cuaternaria, N,N,N',N'-tetrametil etilen-diamina (TEMED), y el iniciador, persulfato de amonio, que genera radicales libres de oxígeno.

Los poros del gel son de tamaño pequeño, lo cual retarda la migración de las proteínas de gran tamaño, permitiendo separar con gran resolución aquellas que tengan densidad de carga (razón entre la carga y la masa de la proteína) similares.

Como resultado de la electroforesis se obtienen bandas de las proteínas separadas, las cuales se pueden visualizar por tinción u otros medios.

Existen varios sistemas para efectuar electroforesis en geles de poliacrilamida, entre ellos se pueden mencionar:

- i. Electroforesis en condiciones nativas: en estas condiciones las proteínas se separan principalmente de acuerdo a la carga neta que presentan a un pH determinado, a la forma y al tamaño de ellas.
- ii. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS): en este sistema las proteínas se separan según su tamaño. Para realizar una electroforesis en estas condiciones, las proteínas se incuban previamente en presencia de SDS, que es un detergente aniónico. El tratamiento de las proteínas con este detergente y con agentes reductores de grupos sulfhidrilos (generalmente β -mercaptoetanol), cambia su forma tridimensional compacta a una de tipo filamentoso. El SDS se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas confiriéndoles una importante carga negativa, haciendo que la carga intrínseca de la proteína no sea significativa. Así, se eliminan las diferencias en cuanto a forma y a carga eléctrica y las velocidades de migración de las proteínas de la mezcla se correlacionan en forma muy precisa con el peso molecular. Por esto, este método se usa frecuentemente para determinar el peso molecular de las proteínas, por comparación con la movilidad electroforética de proteínas patrones de peso molecular conocido. El tratamiento con SDS permite además la disociación de las subunidades de las proteínas oligoméricas.
- iii. Isoelectroenfoque: en este método, una mezcla de proteínas se somete a la acción de un campo eléctrico en un soporte gelificado, en el que se ha establecido con anterioridad un gradiente de pH. Cada proteína migra y queda "enfocada" en aquella porción del gradiente de pH cuyo valor es igual al de su punto isoelectrónico. Esta técnica brinda una alta resolución para la separación de las proteínas y puede utilizarse como instrumento analítico o preparativo.

Todos los métodos descritos se pueden efectuar en forma mono o bidimensional, en tubos cilíndricos, en placas o en combinaciones de las anteriores.

La resolución de proteínas se puede aumentar extraordinariamente empleando combinaciones de sistemas. Así por ejemplo, la técnica de O'Farrell combina el isoelectroenfoque en una primera dimensión con una electroforesis en presencia de SDS en la segunda dimensión, lográndose una separación de 500 o más proteínas en una sola corrida.

APLICACIONES CLÍNICAS DE LA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Proteinograma del suero humano

Las proteínas del suero se pueden analizar mediante electroforesis, utilizando como soportes papel-agar, acetato de celulosa u otros medios.

Un ejemplo de las técnicas electroforéticas que se emplean en los hospitales es la separación de fracciones del suero. Estas fracciones son: γ globulina, β_2 globulina, β_1 globulina, α_2 globulina, α_1 globulina y albúmina, ordenadas de acuerdo a su movilidad electroforética. Cada una de estas fracciones a su vez, está formada por varias proteínas. Aunque esta técnica es de baja resolución, permite el estudio de estas fracciones en condiciones normales y patológicas.

Existe una serie de enfermedades en las cuales se altera el contenido de las diversas fracciones mencionadas. Estos cambios se detectan luego de separar las proteínas de los sueros de pacientes mediante electroforesis, tinción y densitometría de las bandas:

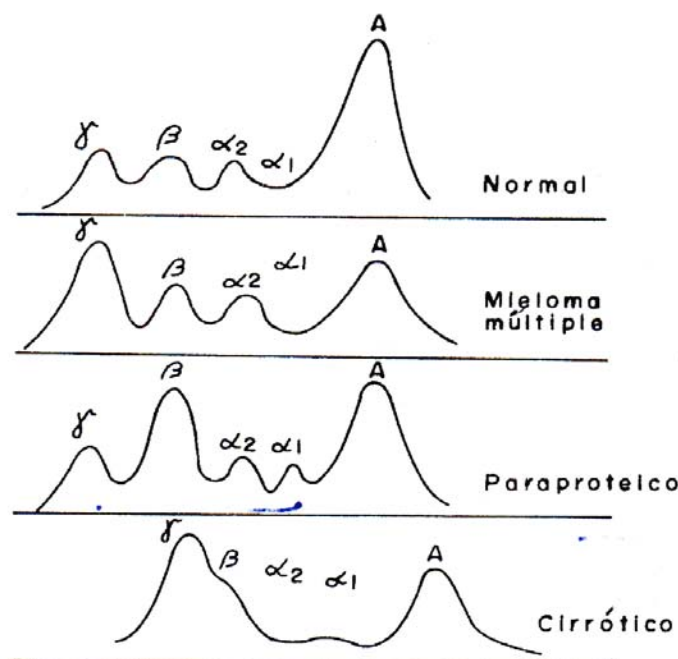


Figura 1 : Algunos ejemplos de cambios en los perfiles electroforéticos normales en ciertas enfermedades.

Estos análisis, en conjunto con otros datos, permiten diagnosticar una serie de enfermedades.

Las técnicas más modernas descritas, especialmente los geles bidimensionales, son de gran utilidad para mejorar el diagnóstico de ciertas enfermedades, ya que los sueros presentan un número superior a las 40 proteínas.

II. **TECNICAS DE SEPARACION DE PROTEÍNAS BASADAS EN EL TAMAÑO MOLECULAR**

1.- Cromatografía de exclusión molecular: mediante esta técnica, una mezcla de proteínas disueltas en un amortiguador adecuado, se deja fluir por gravedad a lo largo de una columna empaquetada con gránulos o perlas de un polímero inerte, el cual tiene un alto grado de hidratación y presenta poros de mayor o menor volumen según el polímero. Este debe ser lavado y equilibrado con la solución amortiguadora apropiada antes de ser usado.

En las columnas, las proteínas de diferentes tamaños van penetrando con diferente facilidad en los poros internos de los gránulos y descienden a lo largo de la columna a distintas velocidades. Las moléculas muy grandes no pueden penetrar en los poros de los gránulos y son excluidas saliendo de la columna en primer lugar. Las proteínas muy pequeñas pueden penetrar libremente en los poros de los gránulos, con lo cual su paso por la columna se obstaculiza y se retarda su salida o elución. Las fracciones del eluido que salen de la columna tienen las proteínas ya separadas de acuerdo a su tamaño molecular.

En el transcurso del tiempo el Sephadex ha sido uno de los polímeros más utilizado en el uso de esta técnica. Esta resina es un dextrano modificado, constituido por cadenas lineales de polisacáridos entrecruzadas. Estos polisacáridos forman una malla tridimensional que contiene poros cuyos tamaños dependen del grado de entrecruzamiento. Sin embargo durante los últimos años se han desarrollado otros polimeros que pueden ser utilizados en cromatografía de exclusión molecular. Uno de estos polimeros lo constituyen los de la familia de los Bio-Gel P (marca registrada por Bio-Rad Inc.). Estos geles o resinas de Bio-Gel P están constituídas por esferas porosas sintetizadas por polimerización de archilamida y N, N'-metilen-bis-acrilamida. El tamaño del poro de las esferas de Bio-Gel P depende del grado de entrecruzamiento entre la acrilamida y la N, N'-metilen-bis-acrilamida. El tamaño de poro de las partículas determina su rango útil de separación. Esto significa en la práctica que es el tamaño de las partículas a separar el que determine el tipo de Bio-Gel P a utilizar. A continuación se muestra una tabla con los distintos tipos de Biol-Gel P comercialmente disponibles, su tamaño de partícula (diámetro de partícula hidratada) y el rango de masa molecular o tamaño de partícula (expresado en Daltons) que permite separar o fraccionar.

Tipo de Bio Gel	Tamaño de partícula del Bio Gel (µm)	Rango de tamaño de fraccionamiento (Daltons)
Bio-Gel P-2 Gel, Fino	45-90	100-1.800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fino	< 45	100-1.800
Bio-Gel P-4 Gel, Medio	90-180	800-4.000
Bio-Gel P-4 Gel, Fino	45-90	800-4.000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fino	< 45	800-4.000
Bio-Gel P-6 Gel, Medio	90-180	1.000-6.000
Bio-Gel P-6 Gel, Fino	45-90	1.000-6.000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fino	< 45	1.000-6.000
Bio-Gel P-6DG Gel	90-180	1.000-6.000
Bio-Gel P-10 Gel, Medio	90-180	1.500-20.000
Bio-Gel P-10 Gel, Fino	45-90	1.500-20.000
Bio-Gel P-30 Gel, Medio	90-180	2.500-40.000
Bio-Gel P-30 Gel, Fino	45-90	2.500-40.000
Bio-Gel P-60 Gel, Medio	90-180	3.000-60.000
Bio-Gel P-60 Gel, Fino	45-90	3.000-60.000
Bio-Gel P-100 Gel, Medio	90-180	5.000-100.000
Bio-Gel P-100 Gel, Fino	45-90	5.000-100.000

Para cada tipo de resina o Bio-Gel se puede estimar el Volumen de exclusión (Vo), que corresponde al volumen total de agua externa (fuera del grano de Bio-Gel). Para ello se debe utilizar un marcador cuyo peso molecular sea mayor que el rango de pesos moleculares excluidos por el Bio-Gel que se está utilizando. En este trabajo práctico utilizaremos Bio-Gel P60 de tamaño medio que permite separar proteínas de entre 3.000 y 60.000 Daltons de masa molecular. Esta resina excluye partículas con una masda molecular mayor a 60.000 Daltons.

III. SEPARACION DE PROTEÍNAS DE SOLUTOS DE BAJO PESO MOLECULAR

Diálisis: Las proteínas en solución pueden separarse fácilmente de los solutos de bajo peso molecular mediante diálisis. En este procedimiento se utiliza una membrana semipermeable que retiene las moléculas de gran tamaño y permite el paso de las moléculas pequeñas y del agua.

Referencias: - Capítulo 2 Explorando las proteínas. L. Stryer Bioquímica 3era Edición 1988 (Inglés)
o cualquiera posterior
- Biochemistry: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

PARTE EXPERIMENTAL

I. DIALISIS.

Procedimiento:

- Sellar el tubo de diálisis en un extremo, mediante un nudo. Probar con agua destilada que no presente filtraciones.
- Colocar en su interior 5 ml de una mezcla que contiene:

20 ml de agua
0,25 ml de seroalbúmina de bovino (BSA) con Azul de Coomassie
4 ml de cromato de sodio al 5%
- Sellar el otro extremo de la bolsa, mediante otro nudo, y colocarla en un vaso de precipitado de 1000 ml, que contenga agua destilada. Agitar durante 1 hora sobre un agitador magnético.

II. PUNTO ISOELECTRICO.

Procedimiento:

- Disponer de una batería de 5 tubos de ensayo, cada uno de ellos con 3 ml de una solución amortiguadora a los siguientes pH:

2,0 - 3,0 - 4,7 - 7,2 - 8,0
- Agregar a cada tubo 0,3 ml de caseína 0,5 g/100 ml.

III. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Se utilizará una columna previamente empacada con la resina de intercambio iónico carboximetilcelulosa A52, (intercambiador catiónico, y equilibrada con una solución amortiguadora de Tris (tris hidroximetil amino metano) 10 mM pH 7.

Muestra de proteína:

Se utilizará citocromo C de corazón de bovino, disuelto en la misma solución amortiguadora utilizada para equilibrar la resina.

Aplicación de la muestra y elución:

- Antes de cargar la muestra, eluir la solución amortiguadora en que está equilibrada la resina hasta una altura de aproximadamente 1 mm sobre ésta.
- Cargar 5 gotas de la solución de citocromo C, utilizando una pipeta Pasteur. Para esto, apoye la punta de la pipeta en el vidrio de la columna y deje escurrir lentamente. La muestra penetrará en la resina y antes que se seque la superficie de ésta, proceda al paso siguiente.
- Lavar con 5 ml de Tris 10 mM a pH 7, agregándolo suavemente para evitar turbulencias en el lecho de la resina. Deje que descienda hasta que quede a 1 mm de la superficie de la resina.
- Eluir el citocromo C, agregando lentamente 8 ml de NaCl 1 M en Tris 10 mM a pH 7,0.

- Colectar el eluido en fracciones de 1 ml en 7 tubos de ensayo previamente numerados. Observar el color rojo en los tubos y el cambio de coloración de la columna.

IV. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

Se utilizará una columna previamente empacada con una suspensión del polímero Bio gel P-60 y equilibrada con una solución amortiguadora que contiene Tris 10 mM, pH 7 y EDTA 1 mM (amortiguador de equilibrio).

Preparación de la muestra:

La mezcla a separar está constituida por hemoglobina y vitamina B-12, que se encuentran disueltos en amortiguador de equilibrio.

Aplicación de la muestra y elución:

- Antes de cargar la muestra, eluir la solución amortiguadora en que está equilibrado el Bio gel hasta una altura de 1 mm sobre el lecho de la resina.
- Colocar lentamente con pipeta una gota de muestra sobre el Bio gel, evitando que éste sea agitado en forma turbulenta. Para esto, apoye la pipeta Pasteur contra el vidrio de la columna.
- Una vez que la muestra ha penetrado en el gel y sin que se seque la superficie de la resina, agregar lentamente 0,250 ml de amortiguador de equilibrio.
- Eluir la muestra agregando 3 ml de buffer de elución. Esto debe hacerse agregando 1 ml del buffer de elución en forma separada hasta completar los 3 ml. (VER ANEXO 3, Página N°60).

V. ELECTROFORESIS

1.- Preparación de las muestras:

Previo a la separación electroforética, las proteínas de la muestra son tratadas con SDS y β -mercaptoetanol para producir la desnaturación descrita en la sección anterior. Ambos reactivos están presentes en el amortiguador de carga cuya composición es:

SDS	2%
Tris	0,065 M
glicerol	10%
β -mercaptoetanol	2,5%
azul de bromofenol	0,1%

2.- Preparación de los geles:

Se utilizarán geles de poliacrilamida y se prepara un gel separador y un gel concentrador.

El polímero se utiliza al 10% para el gel separador y al 5,6% para el gel concentrador. Para ello, estas soluciones se dejan polimerizar entre 2 placas de vidrio separadas por "separadores" hasta formar un gel. Se prepara primero el gel separador y luego, cuando éste ya está gelificado, se agrega encima la poliacrilamida al 5,6% para formar el gel concentrador (Figura 2).

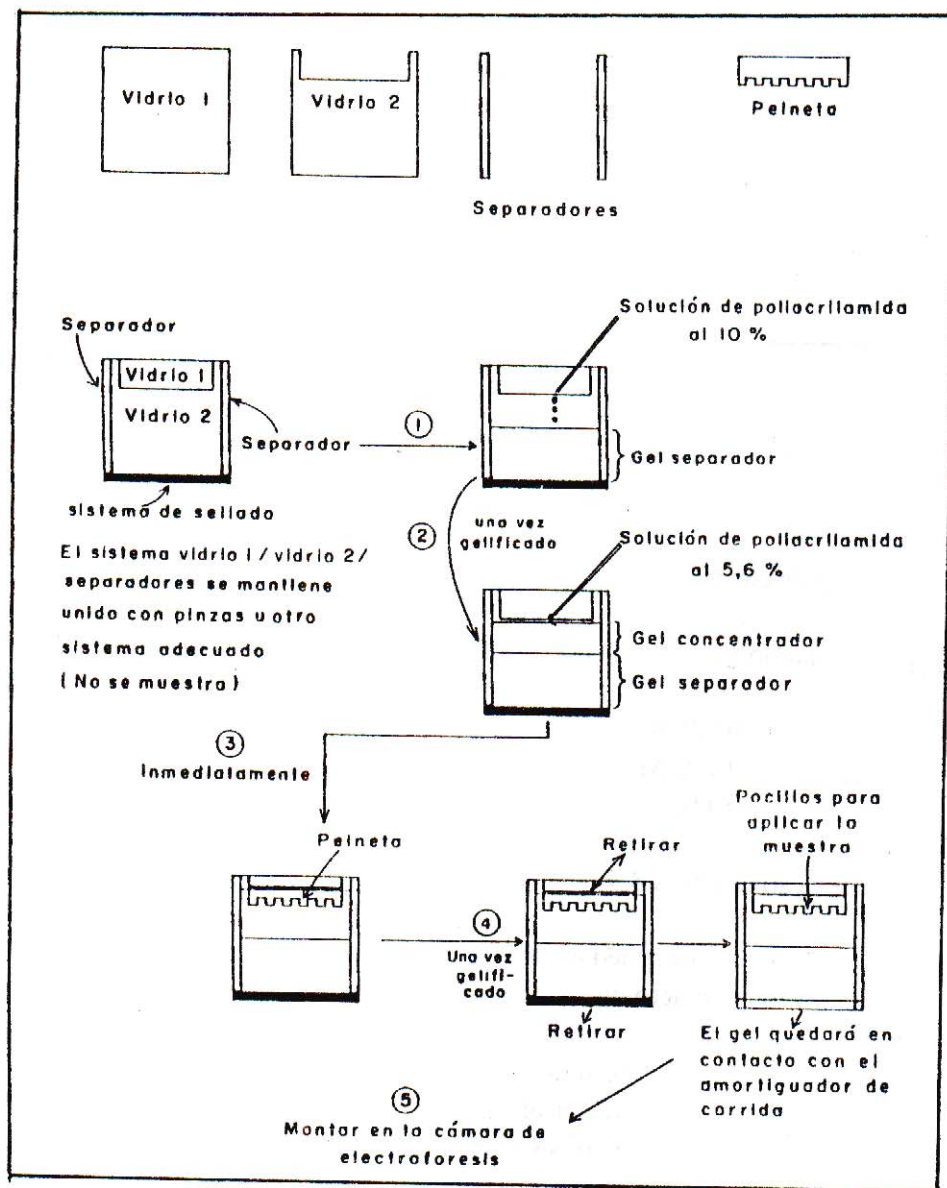


Figura 2: Preparación del gel de poliacrilamida

3.- Procedimiento para realizar una electroforesis:

Los pasos seguidos en el montaje de una electroforesis en gel de poliacrilamida son los siguientes:

- a) Montar las placas de vidrio que contienen el gel en la cámara de electroforesis.

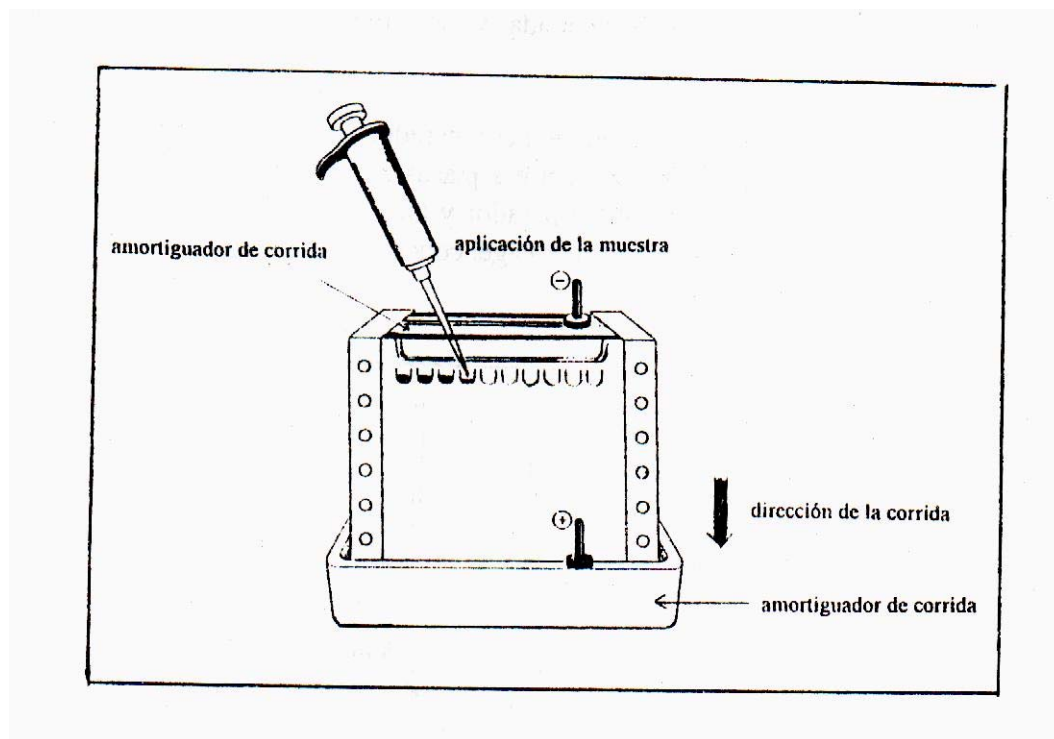


Figura 3 : Cámara de electroforesis

- b) Agregar el amortiguador de corrida. Esta solución está constituida por:

Tris	0,025 M
glicina	0,192 M
SDS	0,1%

El pH de la solución es 8,9.

- c) Sacar las burbujas que puedan haber en la parte inferior de las placas, para permitir que el gel quede en contacto directo con el amortiguador.
- d) Aplicar en cada pocillo 10 μ l de la muestra que se va a separar. El frente de corrida de la muestra estará señalado por el azul de bromofenol presente en ellas. En uno de los pocillos se aplican 10 μ l de una solución que contiene una mezcla de proteínas patrones de pesos moleculares conocidos.
- e) Efectuar la electroforesis, aplicando 150 volts mientras la muestra atraviesa el gel concentrador y 180 volts cuando la muestra alcanza el gel separador. La duración de la corrida es de 1,5 horas, período que corresponde al tiempo que demora el Azul de bromofenol en alcanzar el extremo inferior de las placas.

- f) Una vez concluido el proceso, retirar el gel de las placas y teñirlo durante 0,5 – 1 hora, cubriéndolo completamente con un solución acuosa que contiene:

Metanol	50%
ácido acético	5%
Azul de Coomasie	0,2%

Agitar suavemente durante la tinción.

- g) Desteñir el gel, agitando suavemente y efectuando cambios de la solución de desteñido, la cual contiene:

Metanol	20%
ácido. acético	7%

INFORME

Los alumnos deberán presentar un informe escrito en el que desarrollen los puntos indicados a continuación.

I. DIALISIS

- 1.- Describa el fenómeno observado y explique sus resultados.
- 2.- De ejemplos de situaciones experimentales relacionadas con la purificación de proteínas dónde Ud. deba realizar una diálisis.

II. PUNTO ISOELECTRICO

- 1.- Comente los resultados que obtuvo.
- 2.- Describa brevemente el fundamento teórico del isoelectroenfoque.

III. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

- 1.- Describa brevemente en que se basa este método.
- 2.- Explique el efecto del NaCl 1 M sobre la elución del citocromo c desde la columna de carboximetilcelulosa. ¿Qué otro método podría utilizar para eluir el citocromo C de la columna de carboximetilcelulosa?

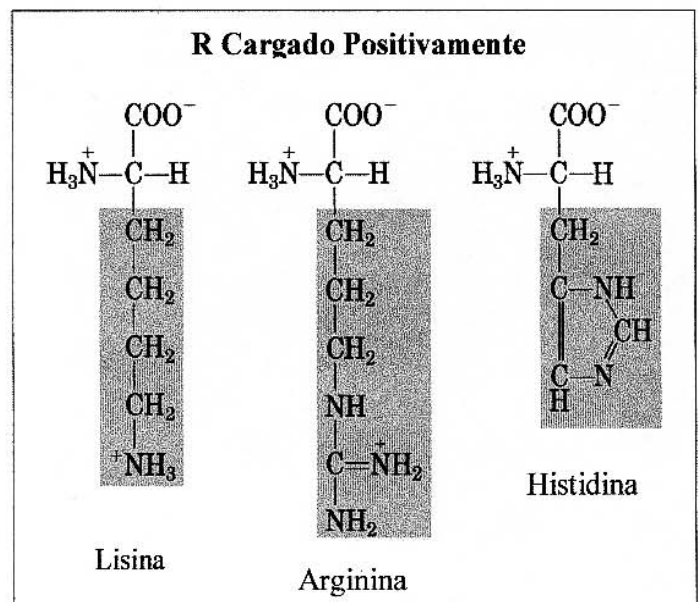
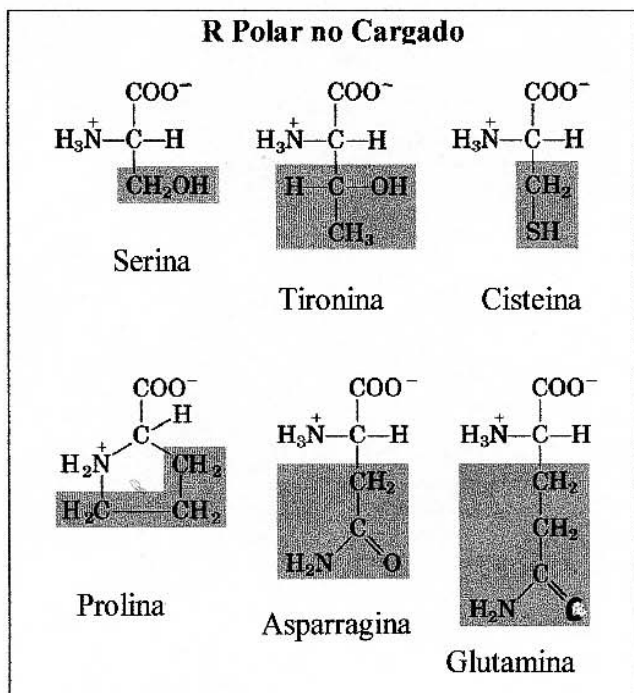
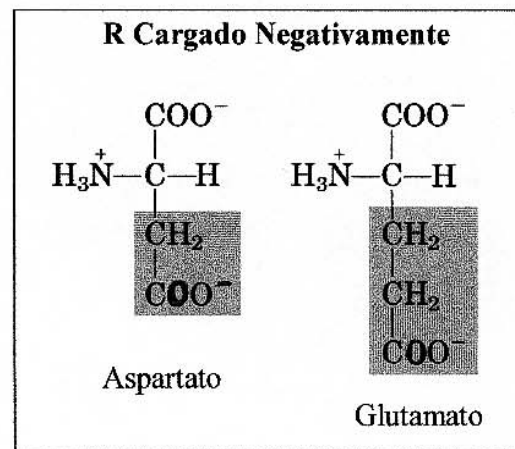
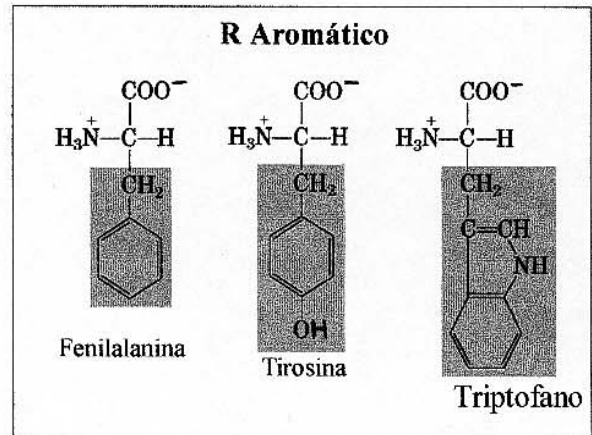
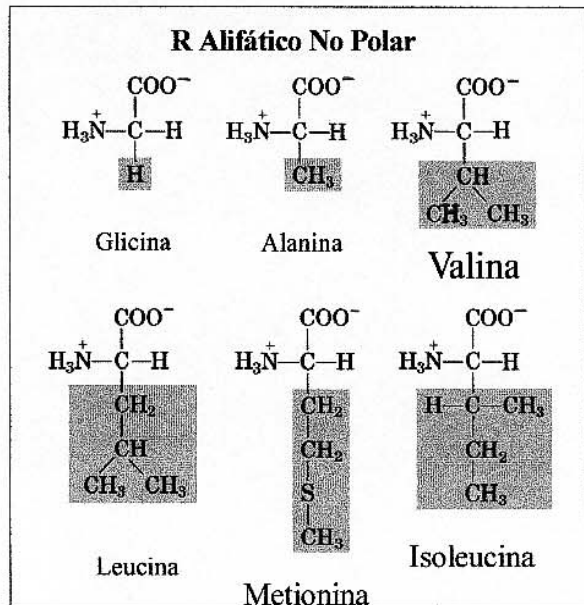
IV. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

- 1.- Explique las bases moleculares de este método.
- 2.- Señale el orden de elución de los compuestos presentes en la mezcla aplicada a la columna de Biogel y el porqué de dicho orden.

V. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURANTES

- 1.- Dibuje una curva de calibración, graficando el log PM de las proteínas patrones vs la migración relativa de ellas.
- 2.- Calcule el PM de la(s) proteína(s) presente(s) en la muestra.

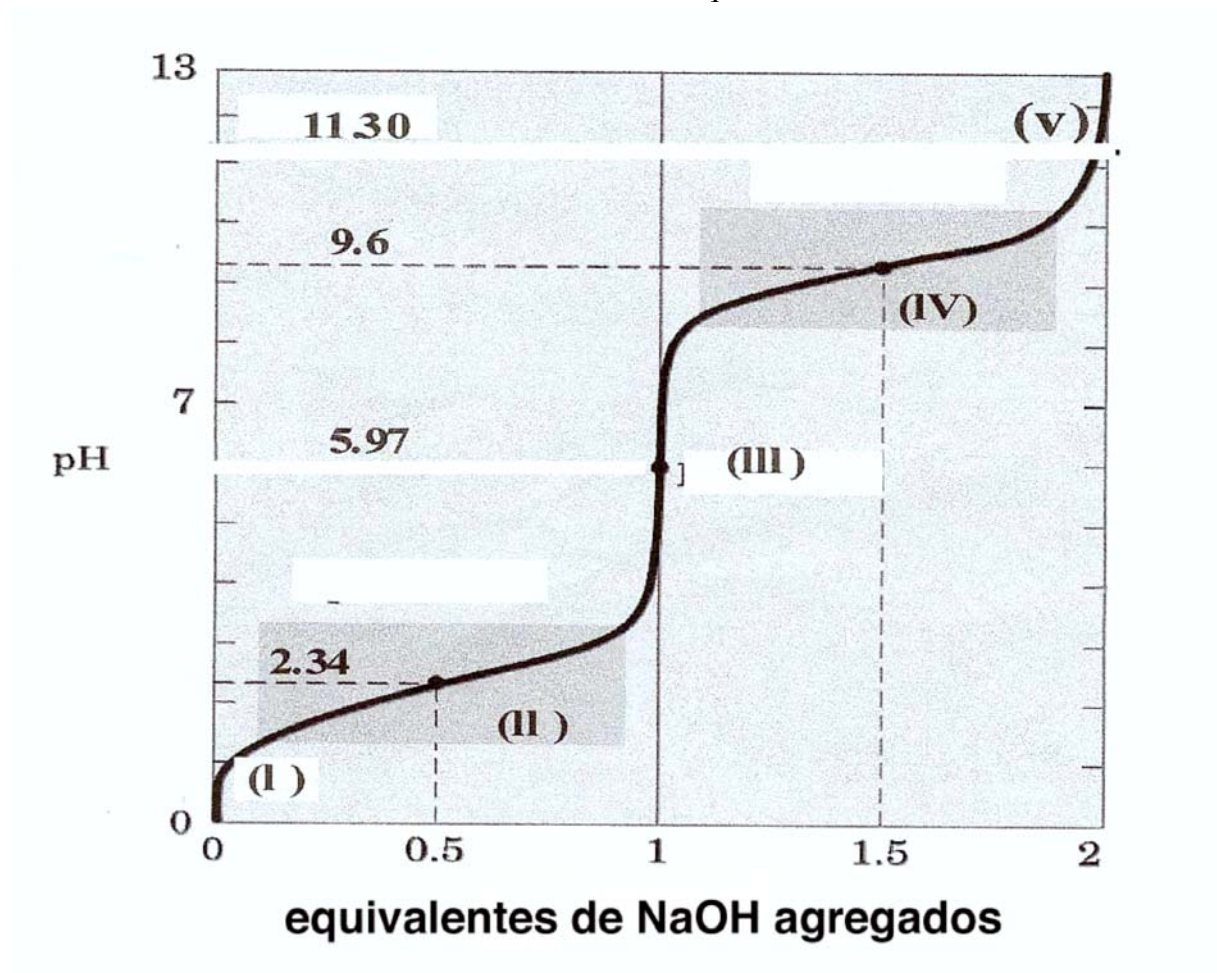
Aminoácidos



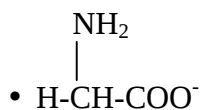
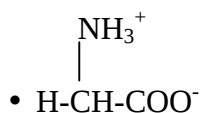
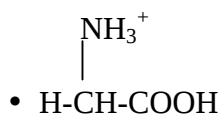
SEMINARIO N° 1

Estructura y Propiedades de los Aminoácidos y Proteínas

1. Se tituló 100 ml de una solución de glicina 0,1 M (pH 1,72) con una solución estándar de NaOH 2 M, obteniéndose la curva de titulación que se muestra a continuación



- a. Indique en qué fase de la curva la especie iónica predominante es

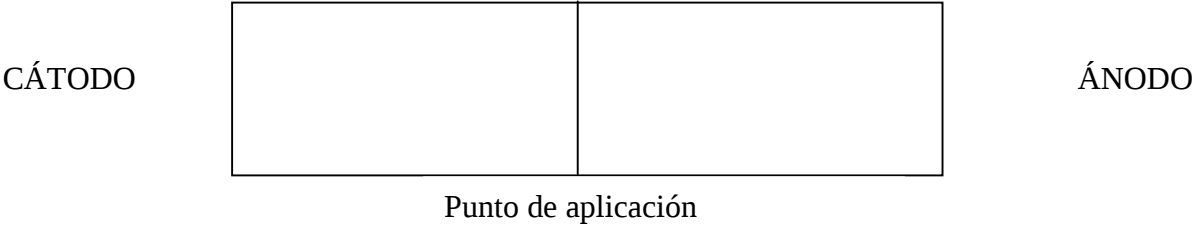


- b. ¿En qué punto de la curva existe una relación 1:1 de 1) catión y zwitterion?
2) anión y zwitterion?
- c. ¿Cuál es el valor del pK_a del grupo carboxilo de la glicina? ¿Cuál es el del grupo amino?
- d. ¿A qué pH existe la máxima concentración de zwitterion?
- e. ¿Cuál es el pI de la glicina?

2. a. Calcule el pI para alanina, ácido glutámico y lisina, a partir de sus pK_a :

	pK α -COOH	pK α -NH ₃ ⁺	pK R
alanina	2,34	9,69	
ácido glutámico	2,19	9,67	4,25
lisina	2,18	8,85	10,53

b. Indique la carga neta de cada uno a pH 6 y 11.
c. Prediga la migración de estos aminoácidos en una electroforesis en papel a pH 6.
Fundamente su respuesta.



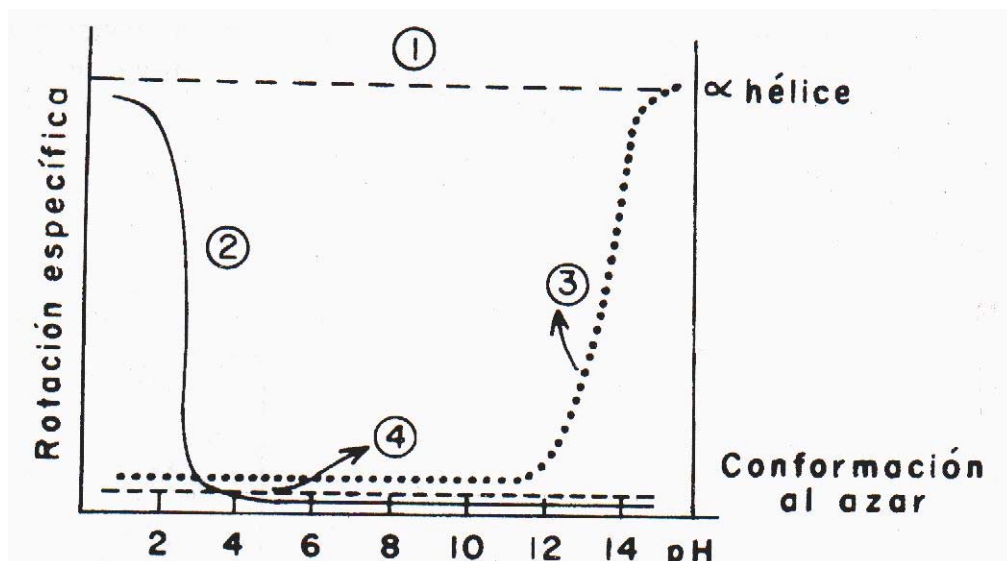
d. Si la mezcla de aminoácidos se aplica sobre una resina de intercambio aniónico a pH ¿cuál será el orden de elución de ellos al tratar la resina con soluciones de pH decrecientes? Fundamente su respuesta.

3. Escriba la reacción de formación de un enlace peptídico a partir de 2 aminoácidos. Describa las características del enlace peptídico.

4. Complete la siguiente tabla:

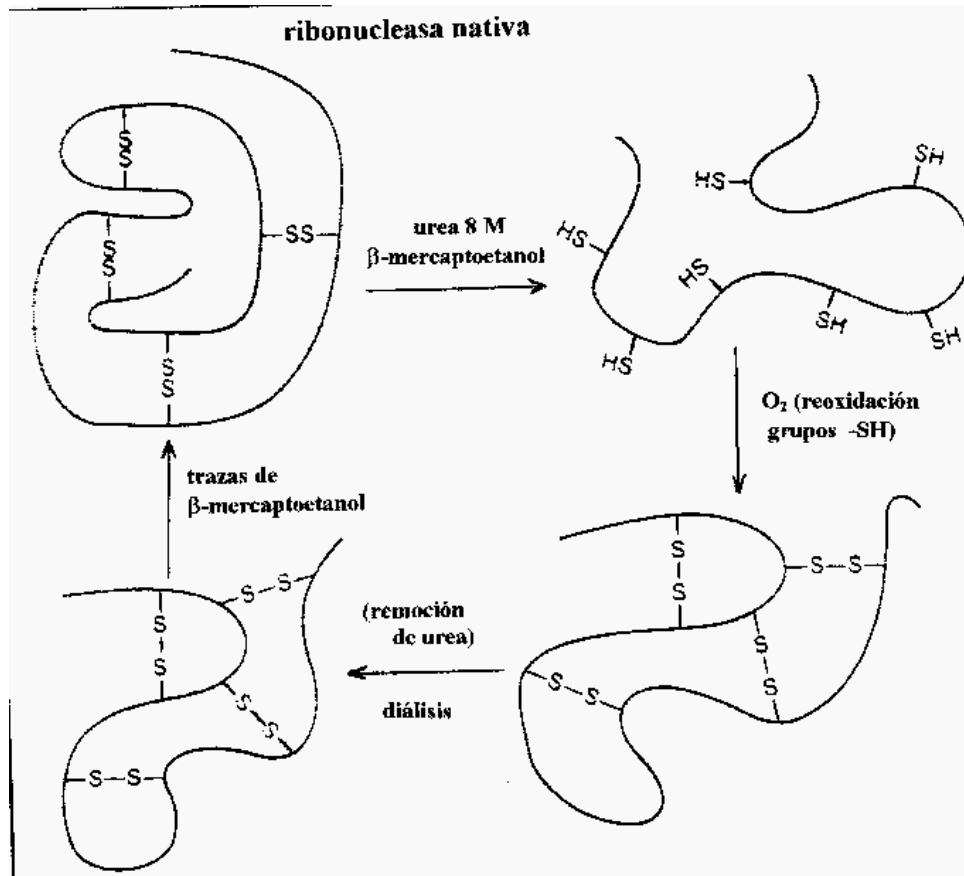
estructura	enlaces o interacciones que la estabilizan	grupos químicos involucrados en su formación
primaria		
secundaria		
• α -hélice		
• conformación β		
terciaria		
cuaternaria		

5. ¿Cuáles son las características de las proteínas fibrilares? ¿Cuáles son las diferencias fundamentales con las proteínas globulares?
6.
 - a. Describa las características estructurales más relevantes de la α -hélice y de la lámina plegada.
 - b. Señale los factores que desestabilizan a cada una de dichas estructuras. Explique.
7. A un laboratorio especializado se le encargó la síntesis de poliaspártico, polilisina, poliprolina y polialanina. Una vez sintetizados, se produjo una confusión con las muestras, de forma tal que no se sabía cuál es cuál. Para resolver este problema se decidió hacer un espectro de dicroísmo circular (que nos da información sobre la estructura secundaria de un polipéptido) determinándose la rotación específica a diferentes pH. Los resultados obtenidos son los siguientes:



- ¿Cuál polipéptido corresponde a cada tubo? Fundamente su respuesta.
8. La polivalina se pliega en forma de α -hélice, mientras que la poliisoleucina no lo hace, manteniendo una conformación al azar. ¿Por qué estos aminoácidos, ambos alifáticos, dan a una cadena polipeptídica propiedades diferentes?
 9. Entre los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas, un número significativo de ellos son de naturaleza alifática o aromática. ¿Qué importancia tiene esto en la estructura tridimensional de las proteínas?
 10. La estructura de triple hélice del colágeno se caracteriza por extensas secuencias de (glicina-X- prolina)_n o (glicina-X-hidroxiprolina)_n en las cuales X es cualquier aminoácido. Al respecto
 - a. ¿Cómo se explica que el colágeno sea rico en glicina?
 - b. ¿Qué tipo de enlaces sostienen a las 3 hélices unidas en esta estructura?
 - c. ¿Por qué la prolina puede ser parte de esta estructura y no de una α -hélice?

11. ¿Por qué se utiliza la absorbancia a 280 nm como un método para determinar la concentración relativa de proteínas en solución? ¿Qué inconveniente tiene?
12. La ribonucleasa es una enzima de 124 aminoácidos con 4 puentes disulfuro. Si esta proteína en solución se trata con urea 8 M y β -mercaptoetanol, la enzima pierde por completo su actividad enzimática. Si luego se reoxida en presencia de O_2 y sin remover la urea, la enzima permanece inactiva. Si se elimina la urea y se agregan trazas de β -mercaptoetanol, se recupera la proteína completamente activa. Una representación esquemática de este experimento se muestra a continuación:



Explique, paso a paso, estos resultados experimentales.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

Enzimas

1. INTRODUCCION GENERAL AL ESTUDIO DE UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA

El estudio de la actividad de una enzima "in vitro" implica aislarla y purificarla, aunque sea en forma parcial, y analizar individualmente las variables que influyen en la actividad. Tomando en consideración los conocimientos generales que se tienen sobre la naturaleza de las enzimas y aquellos conocimientos particulares que nos permiten suponer algunos requerimientos especiales de la enzima en estudio, es indispensable fijar en forma tentativa las condiciones experimentales en que se realizará el ensayo enzimático. De este modo, se debe elegir un pH, una temperatura y un tiempo de incubación compatibles con la naturaleza proteica de la enzima.

2. DETECCION Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Las enzimas son proteínas que se encuentran en la naturaleza mezcladas entre sí y con muchas otras especies moleculares. Sin embargo, es posible detectarlas aunque no estén puras si se conocen el o los sustratos y el o los productos de las reacciones que catalizan y se disponen de los métodos analíticos para medirlos.

En los estudios de actividad enzimática es necesario realizar controles que permitan detectar alteraciones en la medición. Los controles más importantes en enzimología son los siguientes:

- a) Blanco de sustrato: Se entiende por blanco de sustrato una mezcla de reacción igual a la mezcla en que se detecta la actividad enzimática, pero en la cual se reemplaza la solución de sustrato por un volumen equivalente de su solvente. Generalmente el solvente del sustrato es agua o un amortiguador. **Este control es útil de realizar cuando se sospecha que uno o más componentes del sistema, con excepción del sustrato, interfiere(n) con el método de cuantificación del sustrato o los productos.**
- b) Blanco de enzima: Este control es una mezcla de reacción igual a la mezcla donde se detecta la actividad enzimática, pero en la que se reemplaza la solución de enzima por un volumen equivalente de su solvente, que generalmente es un amortiguador. **Este control es importante cuando el sustrato es inestable y da productos en ausencia de la enzima.**
- c) Tiempo cero: Este control contiene todos los componentes necesarios para la detección de la actividad de una enzima y consiste en que la reacción se detiene en el momento mismo en que se mezclan los componentes del sistema.

La utilidad de este control radica en el hecho que, teniendo una composición exactamente igual a la de la mezcla de reacción, acusa las interferencias debidas a cualquier componente, las que deben ser tomadas en cuenta para los efectos de la cuantificación de la actividad enzimática.

En condiciones experimentales bien definidas, es posible hacer que la velocidad de la reacción enzimática dependa exclusivamente de la concentración de enzima. La velocidad de la reacción es así una medida de la cantidad de enzima presente. Como la concentración de sustrato influye sobre la velocidad de una reacción enzimática, para ensayar la actividad de una enzima lo habitual es elegir una concentración de sustrato tal que determine una reacción de orden cero. Esto se

consigue generalmente con una concentración de sustrato 10 a 100 veces más alta que la K_M de la enzima, es decir, con una concentración saturante de sustrato.

La cantidad de sustrato transformado o cantidad de producto formado por unidad de tiempo se denomina velocidad de reacción y puede expresarse en milimoles/hora, mg/min, micromoles/seg, etc.

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica ha definido la unidad internacional de Enzima (U) como la "cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1,0 micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas". Esta unidad es aceptada universalmente.

La velocidad en una reacción enzimática depende de múltiples factores, los que se deben tener presente para la correcta medida de la actividad enzimática. Entre ellos tienen especial importancia la concentración del sustrato, el pH del medio en que ocurre la reacción, la temperatura y la presencia de inhibidores y activadores. Algunos de estos factores serán objeto de estudio en este trabajo práctico.

El pH afecta de modo notable la velocidad de una reacción enzimática, por lo que debe elegirse el pH óptimo para las condiciones de experimentación, el cual deberá mantenerse constante durante todo el tiempo de la reacción. Debe tenerse especial cuidado en aquellos casos en que los productos de la reacción tienen carácter ácido o básico. En enzimología, toda medición de actividad enzimática deberá hacerse en presencia de un sistema amortiguador que garantice, por su concentración, la mantención del pH elegido.

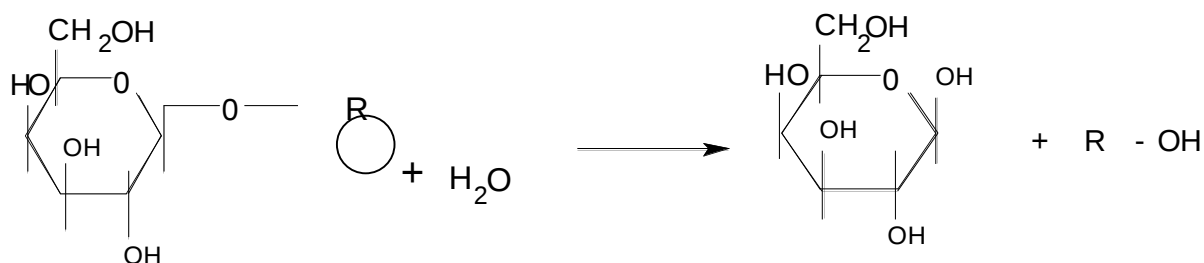
La temperatura modifica la velocidad de la reacción enzimática, por lo que debe mantenerse constante durante el curso de la reacción, lo que se consigue fácilmente con baños regulados con termostatos. La temperatura también influye sobre la estabilidad de la enzima, generalmente mientras más baja sea la temperatura, mayor es la estabilidad de la enzima. No existen reglas definidas para elegir la temperatura a la cual se realizará la determinación de la actividad enzimática, pero lo habitual es que sea la misma temperatura del organismo del cual se obtuvo la enzima. Para evitar desnaturaciones es recomendable mantener la enzima a 0° mientras se prepara el experimento.

Las enzimas son afectadas por diversos compuestos que las activan o las inhiben. Especial referencia debe hacerse a los iones de metales pesados, que en general inhiben a las enzimas. Es por lo tanto imprescindible tomar precauciones con el agua utilizada en las soluciones que debe desionizarse y con la limpieza del material de vidrio y evitar todo contacto de la enzima y soluciones con metales (vasijas de cobre, lata, etc.).

Es importante emplear una cantidad de enzima tal que se obtengan velocidades fácilmente medibles en las condiciones seleccionadas de tiempo, temperatura, pH, etc.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA β -GALACTOSIDASA

La β -galactosidasa hidroliza a la lactosa y otros β -galactósidos rompiendo el enlace o-glicosídico:



Esta enzima es absolutamente específica para los β -galactósidos no sustituidos en el anillo galactósido (lactosa, orto-nitrofenil- β -galactósido, tiogalactósido, etc.). Su actividad y afinidad son influenciadas por la naturaleza del residuo aglicona del sustrato, siendo mayores cuando este radical es relativamente grande.

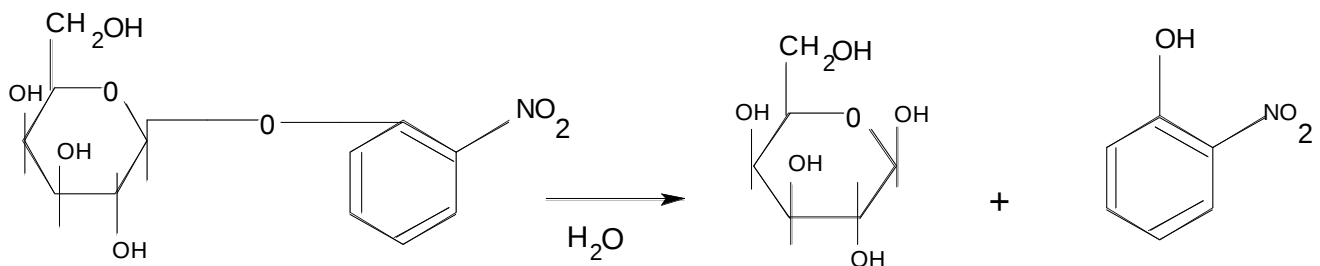
La actividad enzimática depende del medio iónico en que se encuentra la enzima. Por ejemplo el Na^+ es un activador, mientras que los R-NH_4^+ son inhibidores como los son también el Cu^{++} , el Hg^{++} y el Zn^{++} .

Otros azúcares como la melobiosa, galactosa, glucosa y sacarosa son inhibidores débiles de esta enzima.

La K_m de la β -galactosidasa para sus diferentes sustratos es muy variable, siendo de aproximadamente $1 \times 10^{-3}\text{M}$ para la lactosa, su sustrato natural, y hasta diez veces menor para los otros β -galactósidos.

La β -galactosidasa se obtiene de *Escherichia coli* y puede almacenarse diluída en amortiguador fosfato (0,001 M, pH 7.2) que contiene 0,2% de gelatina, que la estabiliza. En estas condiciones la enzima mantiene su actividad durante meses a -20°C y durante varias horas a 25°C .

La actividad enzimática de la β -galactosidasa puede determinarse usando el orto-nitrofenil- β -galactósido como sustrato. Este sustrato sintético presenta una mayor afinidad por la enzima que su sustrato natural y al ser hidrolizado libera orto-nitrofenol:



El uso de este sustrato sintético y de otros sustratos cromógenos hace más fácil la medición de la actividad de la enzima, ya que los productos coloreados de la hidrólisis se miden directamente por colorimetría sin necesidad de realizar una reacción adicional., como sería en el caso de usar su sustrato natural.

El sustrato no absorbe a las longitudes de onda de la luz visible, pero el orto-nitrofenol (ONF) en medio alcalino tiene un color amarillo con un máximo de absorción en 420 nm que es directamente proporcional a la concentración de ONF en un rango entre 0,02 a 0,30 $\mu\text{moles/ml}$. El método permite determinar cantidades de ONF dentro de un rango de 0,1 a 1,5 μmoles totales.

Referencias: - Capítulos 8, 9 y 10; - Introducción a las enzimas; - Mecanismos de acción de las enzimas; - Control de la actividad enzimática. L Stryer Bioquímica, 3era Edición 1988 (Inglés) o cualquiera posterior
- Biochemistry: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos generales:

- i. Amortiguador fosfato de sodio 0,02 M pH 7,0.
- ii. Solución de o-nitrofenil- β -galactósido 0,01 M (ONFG).
Esta solución dura una semana a 4°C. A temperatura ambiente se hidroliza espontáneamente.
- iii. Solución de o-nitrofenol $7,5 \times 10^{-4}$ M (ONF).
- iv. Solución de carbonato de sodio 1,0 M.
- v. Enzima en solución de 0,05 a 0,1 U por ml de amortiguador fosfato 0,001 M pH 7,2, que contiene 0,2% de gelatina.

**EXPERIMENTO 1. CONFECCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN
PARA ORTO-NITROFENOL**

En la medición de la concentración de o-nitrofenol por métodos colorimétricos se requiere determinar la dependencia de la absorbancia con la concentración del compuesto a determinar. Se confeccionará una curva de calibración mediante el uso de soluciones de ONF de concentración conocida.

PROCEDIMIENTO: (sensibilidad del método 0,1 a 1,5 µmoles)

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8 (blanco)
µmoles ONF								
ONF 7,5x10 ⁻⁴ M (ml)	0,2	0,3	0,7	1	1,3	1,7	2	0
Amortiguador fosfato 0,02 M pH 7,0 (ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Na ₂ CO ₃ 1,0 M (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O (ml)	2,6	2,5	2,1	1,8	1,5	1,1	0,8	2,8

Lectura
colorimétrica

Lo ideal es hacer el experimento en duplicado. El espectrofotómetro se ajusta a absorbancia = 0 con H₂O destilada. El valor de absorbancia del tubo blanco se resta de las lecturas de los tubos 1 al 7.

EXPERIMENTO 2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA β-GALACTOSIDASA.

El efecto del pH en la velocidad de la actividad enzimática se produce por cambios en el estado de ionización de los componentes del sistema enzimático (enzima libre, complejo enzima-sustrato, sustrato).

Es posible que la enzima reaccione sólo con una especie iónica de un sustrato ionizable o tenga diferente afinidad con las diferentes especies iónicas del sustrato.

Debido a su naturaleza proteica la enzima posee numerosos grupos ionizables. Si se varía la ionización de residuos aminoácidos del sitio activo o de otros residuos de la proteína, que de alguna manera alteren el sitio activo, se afecta la unión y la estabilidad del complejo enzima-sustrato o la actividad catalítica misma.

Los cambios del pH de incubación pueden producir modificaciones en el valor de la Km, de la velocidad máxima o de ambas.

Las enzimas son activas en un rango limitado de pH y, en la mayoría de los casos, se puede encontrar un pH o una zona de pH en la cual la actividad enzimática es mayor, lo que se denomina pH óptimo. Hay que considerar además que la enzima puede inactivarse por desnaturalación a pH extremos y que la estabilidad de la enzima frente a diversos agentes desnaturalantes puede variar en función del pH. La naturaleza de la solución amortiguadora en que se mide la reacción puede también alterar la actividad enzimática. Por ejemplo los cationes Na⁺ son activadores y los K⁺ son inhibidores de la actividad de la β-galactosidasa, y el amonio sustituido, como en el amortiguador TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) es un inhibidor fuerte.

PROCEDIMIENTO: Influencia del pH en la formación de o-nitrofenol.

- Se usará soluciones amortiguadoras de fosfato de sodio de pH diferente. La concentración de estas soluciones será lo suficientemente alta para que no varíe el pH de la preparación enzimática al pH elegido dentro de las condiciones del ensayo enzimático previamente establecidas.
- a) Disponer una serie de tubos de ensayo en igual número que el de los valores de pH elegidos. Agregar a cada tubo los componentes del sistema enzimático, **excepto el sustrato**, variando en cada tubo la solución amortiguadora de acuerdo con el protocolo preparado. Incluir en la serie un tubo blanco de enzima para cada pH. Mezclar y equilibrar los tubos durante tres minutos a 20⁰ C. Iniciar la reacción con el sustrato (ver protocolo).
- b) Incubar durante 10 minutos a 20⁰ C. Detener la reacción agregando **1 ml** de la solución de carbonato de sodio (concentración que sobrepasa la concentración de la solución amortiguadora usada). Completar volumen a 5 ml con agua y leer la absorbancia de la solución.

Se prepara 1 batería de tubos a distintos pH

	<u>pH</u>									
Amortiguador fosfato 0,1 M	5,7									
Amortiguador fosfato 0,1 M	6,3									
Amortiguador fosfato 0,1 M	7,0									
Amortiguador fosfato 0,1 M	7,5									
Amortiguador fosfato 0,1 M	9,0									
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5,7	6,3	7,0	7,5	9,0	5,7	6,3	7,0	7,5	9,0
Amortiguador Fosfato 0,1 M (ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Enzima (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	--	--	--	--	--
Agua (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Mezclar y equilibrar a 20°C durante 3 minutos y luego agregar:

ONFβG										
1x10 ⁻² M (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Incubar 10´ a 20º y luego agregar:

Na ₂ CO ₃ 1 M (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Mezclar y luego agregar:

Agua destilada (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
---------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Absorbancia a
420 nm.

EXPERIMENTO 3: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA.

La velocidad de una reacción química aumenta al aumentar la temperatura a la que se realiza la determinación, lo cual es extensivo a las reacciones catalizadas por enzimas. Sin embargo, pasado cierto límite de temperatura las enzimas se inactivan por desnaturalización. La velocidad de algunas reacciones enzimáticas es casi nula a 0° y aumenta progresivamente al aumentar la temperatura hasta alrededor de 40°. La razón entre las velocidades de la reacción a dos temperaturas que difieren en 10° se denomina coeficiente de temperatura Q10 y en las reacciones enzimáticas tiene un valor alrededor de 2. Si se aumenta la temperatura por encima de 40° comienza por lo general a disminuir la velocidad hasta hacerse cercana a cero, lo que se debe a que la enzima se desnatura. La magnitud de la desnaturalización de la enzima a una determinada temperatura depende del tiempo de incubación, por lo cual no puede hablarse de "temperatura óptima" como caracterización cinética de una enzima. Otras condiciones que modifican la estabilidad de una enzima pueden influir en el efecto de la temperatura sobre ella, como por ejemplo, pH, fuerza iónica del medio, concentración de la enzima, del sustrato y de cofactores.

PROCEDIMIENTO. Determinación de la formación o-nitrofenol a diferentes temperaturas.

- a) Disponer de baños de incubación, por lo menos a cinco temperaturas diferentes, entre 0° y 100° (0°, 20°, 30°, 50° y 100°).
- b) Disponer una serie de tubos de ensayo de acuerdo al número de temperaturas a ensayar, incluyendo además los tubos blancos de enzima para cada temperatura. Agregar los componentes del sistema enzimático, equilibrar cada tubo a las diferentes temperaturas de incubación elegidas e iniciar la reacción con el sustrato.
- c) Incubar exactamente durante el tiempo previamente establecido. Detener la reacción con solución de carbonato de sodio. Completar volumen a 5 ml con agua y leer la absorbancia de la solución.

TUBO	1	-	2	3	-	4	5	-	6	7	-	8	9	-	10
t°	0°			20°			37°			50°			100°		
Amortiguador fosfato 0,02 M pH 7,0 (ml)	0,7		0,7	0,7		0,7	0,7		0,7	0,7		0,7	0,7		0,7
Agua destilada (ml)	1,0		1,5	1,0		1,5	1,0		1,5	1,0		1,5	1,0		1,5
Enzima (ml)	0,5		--	0,5		--	0,5		--	0,5		--	0,5		--

Mezclar y equilibrar 3 minutos a la temperatura indicada Luego agregar:

ONF β G 0,01 M 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 (ml)

Mezclar e incubar 10 minutos a la temperatura indicada Luego agregar:

Na₂CO₃ 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5
1 M (ml)

Mezclar y luego agregar:

H ₂ O (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
-----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Absorbancia
420 nm

EXPERIMENTO 4: ESTUDIO DE LA FORMACION DE 0-NITROFENOL (ONF) EN FUNCION DEL TIEMPO (CURVA DE PROGRESO)

En este experimento se estudiará la formación de producto por la β galactosidasa en función del tiempo empleando diferentes concentraciones del sustrato. A partir de los datos obtenidos se calcularán las velocidades iniciales de las reacciones a las distintas concentraciones de sustrato hasta alcanzar la velocidad máxima (V_{MAX}), es decir cuando todo la enzima está formando el complejo enzima-sustrato.

PROCEDIMIENTO: Se determinará la cantidad de ONF formado en función del tiempo de incubación, utilizando como sustrato ONFβG a diferentes concentraciones.

Cada pareja de estudiantes realizara el experimento con una sola concentracion de sustrato. Las diferentes parejas usarán concentraciones distintas de sustrato (S1-S6).

Soluciones de ONFβG

S1	0,0008	M
S2	0,00125	M
S3	0,00166	M
S4	0,0025	M
S5	0,005	M
S6	0,01	M

- a) Preparar una batería de 10 tubos que contengan 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M de acuerdo al protocolo de detención de la reacción (Protocolo B).
- b) Elegir la concentración de sustrato que se empleará en la reacción. Preparar los tubos en que se desarrollará la reacción enzimática a distintas concentraciones de sustrato, de acuerdo al siguiente protocolo (A):

A. Protocolo para el desarrollo de la reacción enzimática

TUBOS	A (ml)	B(ml)
Amortiguador fosfato 2x10 ⁻² M pH 7,0	2,8	0,7
Enzima	2,0	--
H ₂ O destilada	4,0	1,5

Mezclar bien y preincubar ambos tubos a 20⁰ C por 3 minutos.

Agregar ONFβG	1,2	0,3
---------------	-----	-----

Incubar los tubos a 20⁰ C, retirar 1 ml del incubado a los tiempos indicados y agregarlo al tubo que contiene el Na₂CO₃ (Protocolo B)

B. Protocolo para la detención de la reacción

Tubo A									Tubo B	
TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tiempo de incubación (min)	0´	5´	10´	15´	25´	35´	45´	55´	10´	40´
Carbonato de sodio 1M (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubado (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O destil.	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Absorbancia 420 nm										

EXPERIMENTO 5: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL O-NITROFENIL β -GALACTOSIDO EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

En la determinación de los parámetros cinéticos de la β -galactosidasa (K_M y V_{MAX}) es necesario estudiar la influencia de la concentración del sustrato (ONF β G) en la velocidad inicial de la reacción enzimática. En una reacción enzimática la velocidad de formación de producto en el tiempo disminuye hasta hacerse cero en el equilibrio. La velocidad inicial de la reacción catalizada por la enzima es dependiente de la concentración de sustrato hasta que la enzima se “satura” con el sustrato. En esta condición la velocidad inicial alcanzada es máxima (V_M). Mediante la ecuación de velocidad de las reacciones enzimáticas (ecuación de Michaelis-Menten) o sus variantes lineales (Lineweaver-Burk, Edie-Hoffstie, etc.), se pueden cuantificar estos parámetros cinéticos.

PROCEDIMIENTO : se determinará la velocidad inicial de las reacciones enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato ONF β G.

Para este propósito se empleará la información obtenida por cada pareja de estudiantes en el experimento 4 de curva de progreso a distintas concentraciones de sustrato. Por lo tanto todos los integrantes de los grupos de laboratorio deben ponerse de acuerdo para aportar sus datos experimentales y determinar los parámetros cinéticos solicitados.

- a) Verificar las concentraciones de ONF β G empleada en el experimento 4 por cada pareja de trabajo. Graficar en un mismo gráfico las curvas de progreso obtenidas por cada pareja. Calcular las velocidades iniciales de cada experimento (curva de progreso a cada concentración de sustrato)
- b) Graficar la velocidad inicial obtenida en cada caso con respecto a la concentración de sustrato empleada. Este gráfico representa la curva de saturación de la enzima.
- c) Graficar el recíproco de la velocidad inicial respecto del recíproco de la concentración de sustrato. Determinar a partir de este gráfico, los valores de K_M y V_M .

INFORME.

Los alumnos deberán presentar un informe escrito en el que desarrollen los puntos indicados a continuación.

INTRODUCCION

Explicar los fundamentos del estudio de una enzima y los objetivos generales de los experimentos que se realizaron en el trabajo práctico. Hacer una breve descripción de la reacción enzimática estudiada.

RESULTADOS

1. Curva de calibración

A. Objetivo del experimento

B. Expresión de los resultados, desarrollando el cálculo que realizó para uno de los tubos.

- i. Calcular los μmoles de ONF en cada uno de los tubos.
- ii. Hacer un gráfico de la Absorbancia vs los μmoles de ONF utilizado.
- iii. Calcular la pendiente de la recta (factor de calibración).

2. Influencia del pH sobre la actividad de la β -galactosidasa.

A. Objetivo del experimento.

B. Expresión de los resultados, desarrollando el cálculo para uno de los tubos.

- i. Tabular los resultados, consignando: número del tubo, pH, lectura colorimétrica, μmoles de ONF producidos, velocidad de la reacción (μmoles de ONF/min).
- ii. Dibujar una gráfica de velocidad de la reacción en función del pH.

3. Influencia de la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa.

A. Objetivo del experimento.

B. Expresión de los resultados, desarrollando el cálculo para uno de los tubos.

- i. Tabular los resultados, consignando: número del tubo, temperatura de incubación, lectura colorimétrica, μmoles de ONF producidos, velocidad de la reacción (μmoles de ONF/min).
- ii. Dibujar una gráfica de velocidad de la reacción en función de la temperatura.

4. Estudio de la formación de o-nitrofenol (ONF) en función del tiempo (curva de progreso).

A. Objetivo del experimento

B. Expresión de los resultados, desarrollando el cálculo para uno de los tubos.

- i. Tabular los resultados, consignando: concentración de sustrato, tiempo de incubación, lectura colorimétrica, μmoles de ONF producidos.
- ii. Hacer una gráfica con los μmoles de ONF producidos en función del tiempo.
Calcular la velocidad inicial de la reacción.

5. Influencia de la concentración de ONF β G sobre la velocidad de la reacción. Cálculo de la Km. (utilizar los datos de la curva de progreso de cada pareja de alumnos)

- A. Objetivo del experimento.
- B. Expresión de los resultados y cálculo de los parámetros cinéticos.
 - i. Empleando los datos obtenidos en la curva de progreso a las distintas concentraciones de sustrato (de cada pareja de alumnos), graficar en un sólo gráfico cada una de las curvas obtenidas. Calcular las velocidades iniciales a cada concentración de sustrato. Tabular los resultados, consignando: concentración molar de **ONF β G (S)** en el medio de incubación, absorbancia, μ moles de ONF producidos.
 - ii. Con los datos de velocidad inicial de cada reacción (μ moles de ONF/min), dibujar una gráfica de velocidad de la reacción en función de la concentración del sustrato (S). Calcular aproximadamente la Km.
 - ii. Dibujar una gráfica de $1/v$ en función de $1/S$ (según la ecuación de Lineweaver-Burk). Calcular la Km y Vmax.

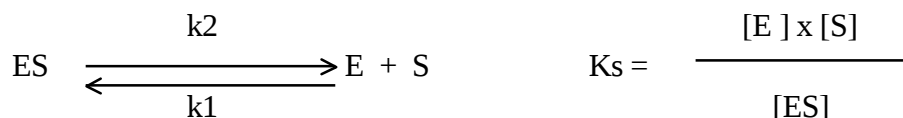
DISCUSION.

Discutir los resultados obtenidos. En caso de observar diferencias con los resultados esperados, analizar las causas posibles.

SEMINARIO N°2
Enzimología

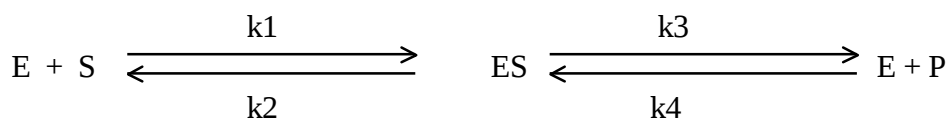
A. Factores que determinan la velocidad de una reacción enzimática. Análisis cinético. Ecuación de Michaelis Menten Representación gráfica y determinación de parámetros cinéticos

1. De acuerdo con la teoría desarrollada por Michaelis-Menten , la constante K_s es el valor de la constante de disociación del complejo enzima-sustrato:



¿Qué relación tiene el valor de K_s con la afinidad de la enzima por el sustrato?

2. Para una reacción enzimática :



A la relación $(k_2 + k_3) / k_1$ se le denomina constante de Michaelis-Menten ó K_m

- Si la constante K_s se define como k_2/k_1 ¿en qué condiciones K_m sería igual a K_s ?
 - ¿Qué significado tiene un valor de K_m alto y un valor de K_m bajo con respecto a la concentración del complejo enzima-sustrato (ES)?
 - Analice el concepto de constante catalítica, k_{cat} .
3. Ud. determina la curva de progreso de una reacción enzimática midiendo la cantidad de producto formado cada 5 minutos y encuentra los siguientes resultados:

Tiempo	µmoles producto/mg enzima
0	4
5	9
10	14
15	19
25	22
35	24

Grafique estos datos e indique en que período de tiempo se puede considerar que la reacción transcurre en velocidad inicial.

Calcule

- velocidad inicial
- velocidad de reacción a los 25 min
- Si ud necesita estudiar efecto de un inhibidor o de un activador sobre la actividad de esa enzima, que tiempo elegiría para estudiarlo.

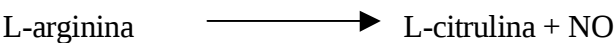
4. La estreptoquinasa es una enzima proteolítica producida por el estreptococo beta hemolitico. Puede ser usada en clínica ya que tiene la capacidad de disolver trombos vasculares.
Al analizar varios cultivos de estreptococo beta hemolítico se encontró que sus extractos presentaban la siguiente actividad:

Tiempo min	Prep 1	Prep 2 μ moles producto/mg proteína	Prep 3	Prep 4
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	2.0	4.8	9.5	18.1
2.0	3.9	9.5	18.1	33.0
5.0	9.5	22.1	39.3	63.2
10.0	18.1	39.3	63.2	86.5
15.0	25.9	52.8	77.7	95.0
20.0	33.0	63.2	86.5	98.2
30.0	45.1	77.7	95.0	99.7

- a) Grafique los datos en un sólo gráfico
b) Calcule la velocidad inicial en cada caso
c) Calcule la velocidad de la reacción a los 30 min
d) Cual es la preparación mas activa?
e) Si la preparación de uso habitual es la # 4, pero Ud dispone sólo de la # 1 como podría compensar la diferencia de actividad?
5. Al estudiar el efecto de diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad de la reacción $S \rightleftharpoons P$, catalizada por la enzima E, se obtienen los siguientes resultados

CONCENTRACION DE SUSTRATO [M]	VELOCIDAD INICIAL (mmoles/ min)
1×10^{-2}	75,0
1×10^{-3}	74,9
1×10^{-4}	60,0
$1,5 \times 10^{-5}$	28,1
$6,25 \times 10^{-6}$	15,00

- a) Determine la Km para la enzima y la Vmáx en las condiciones estudiadas.
b) Represente los valores en un gráfico de Lineweaver Burk y compare los valores de los parámetros cinéticos Km y Vmax con los calculados en a)
c) Calcule la velocidad inicial para una concentración de sustrato de 0,02 M
¿Cuál sería la concentración de producto al cabo de 3 minutos?
d) Calcule la Km y la Vmax de la reacción si se usa el doble de la concentración de Enzima
6. El oxido nitrico es un importante regulador de la presión arterial y su síntesis es catalizada por la enzima oxido nitrico sintetasa que se encuentra presente en el endotelio vascular, de acuerdo a la siguiente reacción:



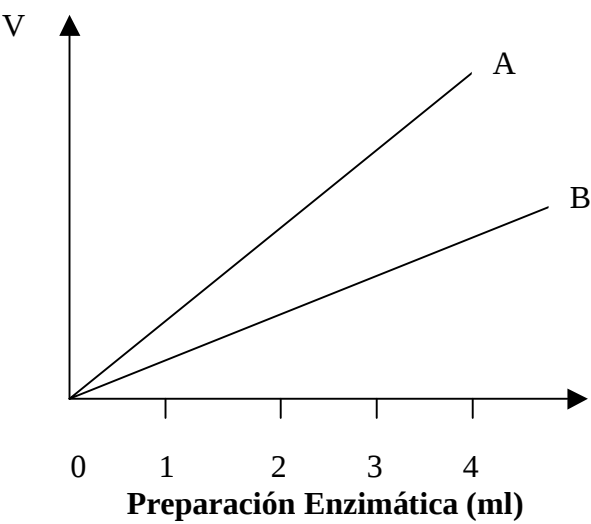
Al estudiar la actividad de esta enzima en un paciente hipertenso y compararlo con un control se encontró el siguiente comportamiento frente a variación de la concentración de L-arginina

Arginina (mmoles/l)	v (μmoles NO /min/mg enzima)	
	Control	Paciente
1	12	1.3
5	35	6.3
10	47	11.6
20	60	20
50	66	35
100	70	46
200	70	56

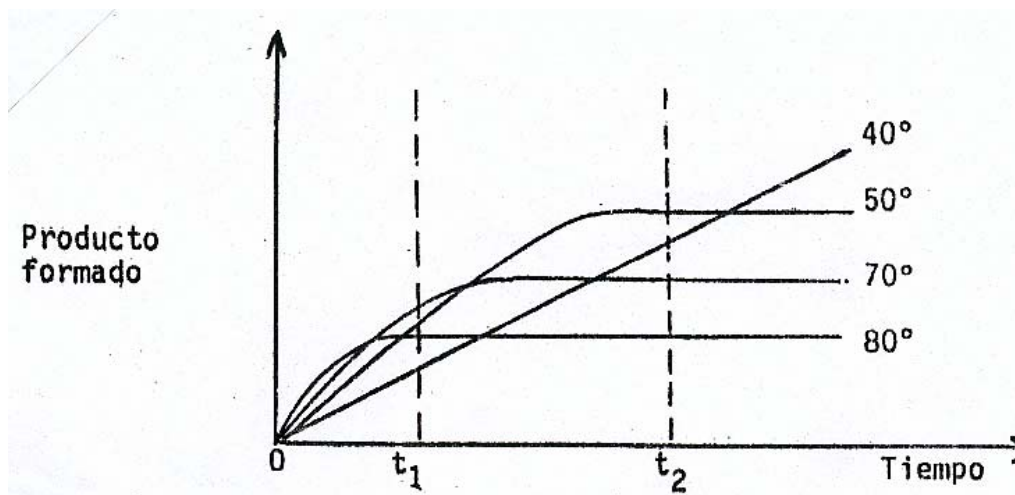
Al analizar con tecnicas moleculares la enzima del paciente hipertenso se encontró que en el sitio activo de la enzima un residuo de tirosina habia sido reemplazado por un triptofano.

De acuerdo a estos resultados explique:

- a) ¿cuál es la consecuencia de la substitución del aminoácido sobre los parámetros cinéticos Km y Vmáx?
 - b) Cómo se puede explicar que el cambio en un solo aminoácido afecte de esa forma la actividad de la enzima?
 - c) Cómo podría mejorar la condición del paciente sin realizar ninguna maniobra invasiva?.
7. El gráfico siguiente representa la velocidad de una reacción enzimática catalizada por dos preparaciones diferentes (A y B) de una misma enzima, usando concentraciones saturantes de sustrato:

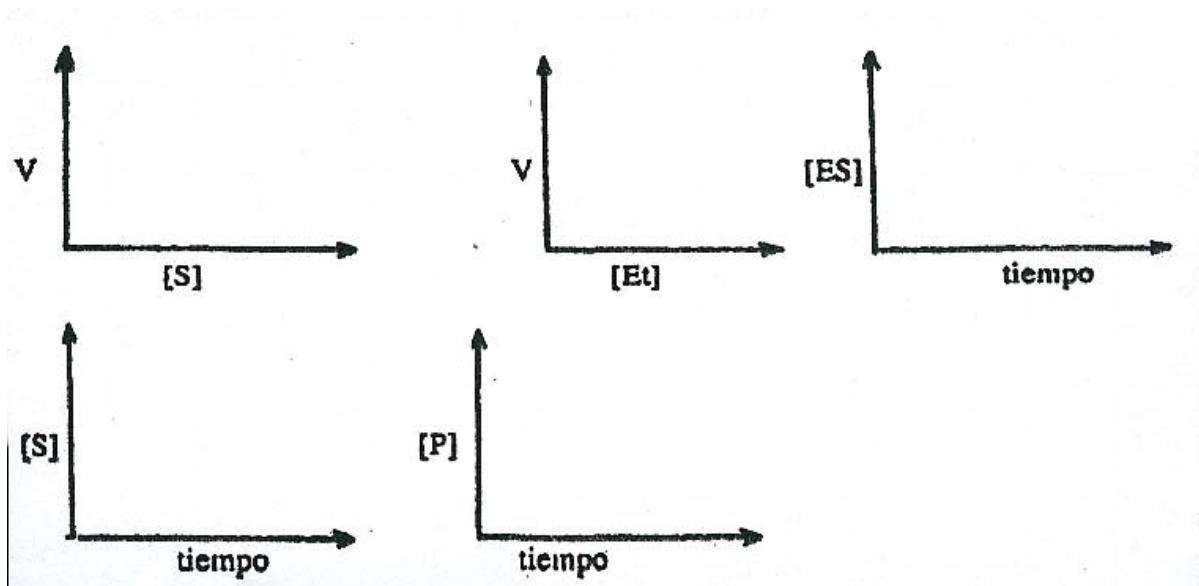


- a) ¿Cuál de las preparaciones es más activa? Aproximadamente ¿cuántas veces más?
 - b) Haga un gráfico de velocidad en función de la concentración de sustrato, que represente el comportamiento de las preparaciones A y B respectivamente, usando igual volumen de cada una de ellas.
 - c) Si ambas preparaciones enzimáticas tienen igual concentración de proteínas, ¿cómo será la actividad específica de la preparación A respecto a la de la preparación B? ¿En cuál preparación la enzima está más pura?
8. Estructura de una enzima. Desnaturalización e inactivación enzimática.
- a. Analice las características estructurales del sitio activo de una enzima. Discuta los modelos de interacción enzima-sustrato denominados de llave-cerradura y de encaje inducido
 - b. En relación a la estructura y función de una enzima, discuta qué se entiende por inhibición, inactivación y desnaturalización.
9. El gráfico muestra la cantidad de producto formado en función del tiempo de una reacción enzimática incubada a diferentes temperaturas:

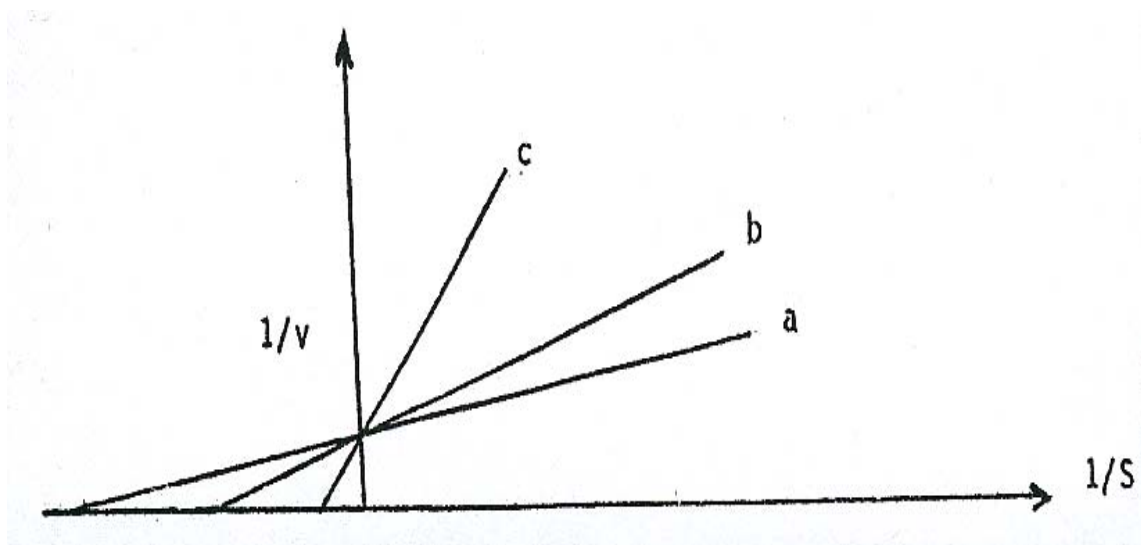


- a) ¿Cómo se puede interpretar la diferencia de resultados obtenidos a diferentes temperaturas en los tiempos t_1 y t_2 ?
 - b) ¿Se puede medir la velocidad de la reacción a 80°? En caso afirmativo ¿cuáles son las condiciones necesarias para hacerlo?
10. De acuerdo con sus conocimientos sobre K_m y $V_{máx}$ ¿cómo interpretaría el hecho de que en presencia de un inhibidor competitivo aumente la K_m sin variar la $V_{máx}$? ¿Cómo interpretaría el hecho de que en presencia de un inhibidor no competitivo disminuya la $V_{máx}$ sin variar la K_m ?

11. Suponiendo que se tiene un sistema enzimático que sigue la cinética de Michaelis-Menten, haga un esquema de las curvas que correspondan en los siguientes ejes y discuta su significado:



12. Se midió la actividad de una enzima en ausencia de inhibidor (a) y en presencia de dos tipos diferentes de inhibidores (b y c), y se graficó según el método de los "dobles recíprocos" (Lineweaver y Burk) :



- ¿Cuál de los dos inhibidores (b y c) es más activo?
 - Explique el mecanismo de acción de ambos inhibidores.
13. En relación a las enzimas, discuta algunos mecanismos que pueden regular la velocidad con que ocurren los procesos metabólicos al interior de la célula
14. ¿Qué tipo de estructura presentan en general las enzimas alostéricas? Dibuje la curva de saturación que presentan estas enzimas. Explique este comportamiento cinético a través de los modelos conocidos.
15. ¿Qué entiende por: a) cooperatividad b) sitio alostérico?

SEMINARIO N° 3

DISCUSIÓN DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y ENZIMAS

Los alumnos deberán realizar una discusión oral de los resultados obtenidos en los trabajos prácticos de Análisis de Proteínas y Enzimas. Mediante la utilización de material gráfico y siguiendo las pautas de los informes escritos, **los alumnos deberán presentar sus resultados al resto de sus compañeros para lo cual deberán traer los calculos y gráficos en papel (poster) de modo que puedan ser vistos desde lejos por el resto de sus compañeros.**

SEMINARIO N° 4

Seminario Membranas Biológicas
“Estructura, difusión simple, potencial químico, transducción de señales”

Objetivos:

- Conocer estructura, formación y propiedades físicas de membranas biológicas.
 - Entender los factores que determinan la velocidad de difusión de un soluto en una membrana.
 - Entender el significado de curva de progreso y discutir el significado de flujo inicial
 - Conocer el concepto de potencial químico.
 - Enfatizar algunos puntos de vías de transducción de señales.
1. Los tres tipos de lípidos que predominan en una membrana biológica son glicerofosfolídeos, esfingolípidos y colesterol. Explique porqué estos lípidos en solución acuosa adoptan la estructura de bicapa y porqué estas se sellan. Aplique sus conocimientos de termodinámica para explicar el efecto hidrofóbico. Indique cuales otras interacciones contribuyen a la estabilidad de las bicapas.
 2. El modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson en 1972, supone que tanto las proteínas como los lípidos difunden libremente en el plano de la membrana y presenta la bicapa lipídica como una entidad homogénea.
 - a) Describa una membrana biológica de acuerdo al conocimiento actual sobre lípidos y proteínas, en relación a composición, movilidad y distribución en la bicapa.
 - b) Discuta el concepto de fluidez analizando la situación de una bicapa lipídica y de una membrana biológica.
 3.
 - a) Especifique los términos de la ley de Fick y sus unidades. Dé un ejemplo de difusión simple de un compuesto en agua atribuyendo valores a estos distintos términos.
 - b) Explique las modificaciones de la ecuación de la ley de Fick necesarias para determinar velocidad de difusión en una membrana biológica.
 - c) Explique en qué consiste el concepto de potencial químico y cómo se utiliza en difusión simple.
 4. El oxígeno es transportado por difusión simple a través de las membranas. En el enfisema pulmonar el área disponible para la difusión disminuye en forma importante, y por lo tanto, la velocidad de difusión del oxígeno también disminuye.
 - a) Especifique la vía que utiliza el oxígeno para alcanzar el torrente sanguíneo.
 - b) Explique sobre la base de la ley de Fick, como se puede compensar la disminución de la difusión del oxígeno en el enfisema.
 5. Al incubar glóbulos rojos con una solución 2 mM de un soluto no polar y de bajo peso molecular, éste entra al glóbulo rojo alcanzando concentraciones internas crecientes en el tiempo como se indica en la tabla:

Tiempo (seg.)	Concentración interna de S (mM)
0	0
0.25	0.09
0.5	0.18
1	0.36
2	0.66
4	1.1
6	1.39
10	1.73
20	2.0
40	2.1
60	2.0

- a) Haga un gráfico de concentración interna de soluto versus tiempo de incubación con los datos de la tabla y explique la forma de la curva resultante.
 - b) ¿Cómo se determina el flujo inicial de entrada de S al glóbulo rojo y cuál es su significado?
 - c) Compare el potencial químico del soluto en el medio intracelular y el extracelular al inicio y al final del experimento.
 - d) ¿Cómo se puede determinar la permeabilidad de la membrana del glóbulo rojo al soluto S?
6. Al estudiar el transporte de glucosa en cultivos de células provenientes de 2 animales (A y B), se encontró que al incubar éstas con glucosa 5 mM (en presencia de un inhibidor de la degradación intracelular de glucosa) la glucosa aumentaba en el interior de las células con el siguiente curso temporal:

Tiempo(s)	Concentración de glucosa (mM)	
	A	<u>B</u>
0.0	0.0	0.0
1.0	0.45	0.041
2.0	0.91	0.082
4.0	1.65	0.16
8.0	2.25	0.32
15.0	3.8	0.59
25.0	4.6	0.94
40.0	5.0	1.42

- a) Grafique los resultados obtenidos
 - b) Compare los flujos iniciales en ambos casos y sugiera cuáles son los mecanismos de transporte para glucosa en ambos casos.
 - c) Indique como debe ser la concentración interna en cada caso al continuar la incubación por varias horas.
 - d) Compare estos resultados con el transporte del soluto del ejercicio anterior
7. a) En las vías que dan cuenta de la formación de los segundos mensajeros AMP cíclico e IP3 con diacilglicerol, identifique: señales, receptores, proteínas G y mecanismos de generación de los segundos mensajeros, efectores y sus blancos.
- b) Desarrolle en relación a la señalización por calcio: procesos en los que participa el calcio, sensores, efectores, concentraciones en reposo y en actividad.

SEMINARIO N°5

Seminario Membranas Biológicas
“Transporte mediado pasivo y activo”

Objetivos:

- Entender los fundamentos del transporte mediado
- Entender el concepto de potencial electroquímico

1. Este ejercicio es continuación del ejercicio del seminario anterior donde se analizó el transporte de glucosa en dos animales. Como se espera, el flujo inicial de glucosa a distintas concentraciones es mayor en las células del animal A. Grafique flujo inicial versus concentración externa de glucosa con los datos que se dan en la siguiente tabla:

[Glucosa] mM	A J inicial (nmoles/cm ² /s)	B J inicial (nmoles/cm ² /s)
0	0	0
1.0	4.2	0.10
2.0	6.0	0.19
3.0	7.5	0.31
4.0	8.8	0.40
5.0	9.1	0.48
7.5	10.6	0.74
10	11	0.98
15	11.1	1.52

- a) ¿Cómo es el mecanismo de entrada de glucosa en ambos tipos de células? Explique estos resultados.
- b) En cada gráfico calcule los parámetros característicos del proceso.
2. Compare **difusión facilitada**, **transporte activo** y **canales iónicos** en términos de mecanismos de transporte y de la relación de potencial electroquímico para los compartimentos intra y extracelular en condición inicial y final.
3. Calcule la diferencia de potencial electroquímico para la entrada y para la salida de sodio en neuronas. Considere que la concentración intracelular de sodio en una célula de mamífero es de 10 mM. En el medio extracelular el sodio alcanza una concentración de 145 mM. Las neuronas tienen una diferencia de potencial eléctrico a través de su membrana (V_i-V_e) de -60 mV. Utilice la temperatura de 37° C.
Sabremos en que dirección se mueve el sodio, y además en cual caso hay energía disponible para realizar trabajo (dé ejemplos de transporte que pueden utilizar la energía disponible de una gradiente electroquímica del sodio).
4. Con valores fisiológicos de concentración intra y extracelular de calcio en una célula cualquiera:
- a) Determine la diferencia de potencial electroquímico para la entrada de calcio al intracelular. Considere una diferencia de potencial (V_m) de -70 mV y temperatura de 37° C.
- b) ¿Cuánta energía se requiere para mantener la gradiente de concentración de calcio?
- c) Explique como funcionan los sistemas de transporte activo primario y secundario de calcio. Indique en que membranas celulares se encuentran localizados.
- d) Indique que ocurre si se activan canales de calcio de la membrana plasmática.

5. Considerando una célula a 37°C con un potencial de membrana en reposo de –70 mV y las siguientes concentraciones intra y extracelulares de sodio y potasio:

	Intracelular mM	Extracelular mM
Na ⁺	10	150
K ⁺	115	4

- a) ¿Se encuentra alguno de estos iones en equilibrio?
b) ¿Qué potencial de membrana debería establecerse para que cada ión se encuentre en equilibrio?
c) ¿Para que la membrana se haga permeable para cada uno de ellos en forma independiente, que debe ocurrir y en que sentido se moverán?
6. El gradiente de H⁺ en la mitocondria se acopla a la síntesis de ATP a través de proteínas llamadas F-ATPasas.
- a) Describa cómo y donde se establece la gradiente de protones en la mitocondria.
b) La síntesis de ATP tiene un ΔG de 13.8 Kcal/mol (57.740 J/mol). Calcule cuántos H⁺ deben ser transportados para sintetizar 1 mol de ATP. Considere:

$$\Delta V (V_i - V_e) = -140 \text{ mV}$$

$$T = 298^\circ \text{ K}$$

$\Delta \text{pH} = 1$. Esto significa una razón de 10 para: concentración de protones espacio intermembranas/conc. protones intracelular.

Ejercicios complementarios

1. En una célula la relación de concentración del Na⁺ externo / interno es de 15 y la temperatura de 37° C. Explique en cual dirección se moverá el ión si el potencial de membrana presenta los siguientes valores:
a) + 72,3 mV
b) – 72,3 mV
c) 0 mV
d) + 100 mV
2. a) La digoxina es un fármaco comúnmente usado en la insuficiencia cardíaca. Este compuesto se une al sitio de K⁺ de la Na⁺K⁺ ATPasa. Explique con un esquema cual será la consecuencia que éste fármaco tendrá sobre la concentración de sodio intracelular.
b) Durante el tratamiento con digoxina se produce un aumento de la concentración de calcio en el interior de las células cardíacas. Proponga un mecanismo que podría ser la causa de ese aumento del calcio.
c) Explique cuales otros procesos de transporte es probable que se afecten en forma indirecta en un paciente en tratamiento con digoxina.
3. La glándula tiroides acumula yoduro (I⁻) para la síntesis de hormonas tiroideas, creando una gradiente de concentración de 1000 entre el intra y el extracelular. Esta acumulación de I⁻ depende de la gradiente de sodio, la que en la tiroides es semejante a la de las otras células del organismo. Proponga un mecanismo que de cuenta de esta acumulación de ioduro.
4. Las células del epitelio intestinal se ven enfrentadas a dos medios de muy diferente composición: por el lado apical enfrentan el lumen intestinal mientras que por el lado baso-lateral enfrentan al plasma sanguíneo. Estas células se encargan de transportar hacia la sangre los nutrientes aportados por la alimentación. Por ejemplo, estas células son muy eficientes para transportar toda la glucosa que llega al lumen intestinal hacia la sangre.

- a) ¿Que sistemas de transporte cumplen con este objetivo en la célula epitelial? ¿Sería eficiente para la célula tener sistemas de transporte idénticos en la membrana apical y en la baso-lateral? Discuta.
- b) Suponiendo que el Na^+ externo es 140 mM y el interno 10 mM, y que el potencial de membrana de estas células es de -60 mV, calcule cuanta glucosa puede acumularse en el intracelular.

(Nota: el transporte de glucosa a través del epitelio intestinal puede analizarlo en la sala de computadores en el programa HYPERCELL).

ANEXOS

ANEXO 1

TRABAJO DE COMPUTACION “ANÁLISIS Y PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS”

Objetivos

Esta actividad esta orientada a analizar, mediante imágenes computacionales, en su mayoría interactivas, aspectos diversos de la estructura de las proteínas, desde las bases moleculares de las interacciones hasta la estructura cuaternaria y la interacción de las proteínas con ligandos pequeños o con otras macromoléculas (DNA). Adicionalmente se ilustra un método de identificación y predicción de la estructura de una proteína específica, basado en el análisis computacional de la información codificada en un gen.

Contenidos y procedimiento computacionales.

1. ASPECTOS BÁSICOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Las siguientes actividades están basadas en la visualización de diversas estructuras proteicas con el apoyo de los programas computacionales de dominio público MAGE y RASMOL, diseñados especialmente para estos propósitos. Los archivos correspondientes (.kin y .pdb respectivamente) contienen imágenes interactivas y en algunos casos animaciones que permiten tener visiones de la distribución en el espacio de los átomos y los grupos químicos y observar como pueden estas interacciones influir sobre la estructura tridimensional de las proteínas.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL USO DEL PROGRAMA MAGE

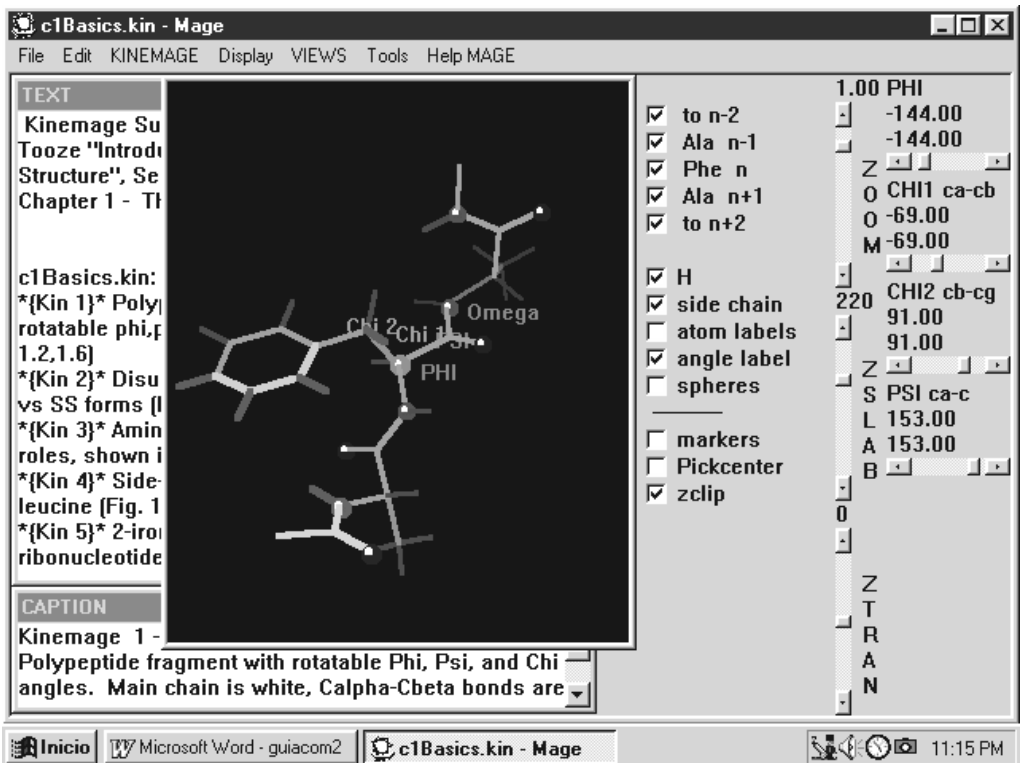


Figura 1. Pantalla típica del programa MAGE

A fin de visualizar la estructura primaria y secundaria de proteínas, se tendrá acceso al programa Mage. Oprimiendo el botón rojo y posteriormente la opción **proceed**, se estará dentro del programa. En la barra de herramientas, con el comando **File** y luego **Open New File**, aparecerán 5 archivos que contienen en su interior distintas imágenes relacionadas con el tema. En cada archivo se indicarán las imágenes y más específicamente los detalles que es recomendable observar. Para cambiar de una imagen a otra, marcar la opción KINEMAGE y dentro de ésta, Next. Para cambiar de un archivo a otro, no es necesario cerrarlo. Basta con abrir el siguiente.

En las imágenes, la flecha sobre la pantalla permite girar la estructura en cualquier dirección. Al lado derecho de la pantalla, con los símbolos se puede observar la imagen correspondiente (por ejemplo **side chain** ilustra las cadenas laterales de los aminoácidos). La barra ZOOM permite agrandar o achicar la estructura.

Actividad

* Abrir el archivo Basic.kin.

- **ENLACE PEPTÍDICO. Imagen 1.** Utilizando las barras y puntas de flecha horizontales, observar la rotación de los enlaces phi, chi y psi en torno al carbono α del enlace peptídico. Visualizar las conformaciones posibles que pueden adquirir los componentes del enlace.
- **PUENTE DISULFURO. Imagen 2.** Se observa el efecto de la formación de un enlace S-S entre dos cisteínas sobre la distancia entre dos segmentos de una proteína. Con el comando **View** se pueden activar las diferentes vistas del puente S-S. Con el comando **animate** se puede observar el efecto de la formación del puente S-S en la conformación de la proteína. Apuntando a **T4lys, SS** se sobreponen las imágenes.
- **ORIENTACIÓN DE LAS CADENAS LATERALES. Imagen 3.** En esta imagen se puede observar la disposición de los residuos hidrofóbicos hacia el interior de la proteína y de los hidrofílicos hacia el exterior. Con el comando **animate** se da un paseo por todas las imágenes.

* Abrir el archivo Alfa.kin.

- **HÉLICES ALFA.** En la **imagen 1** se observa un conjunto de hélices alfa en dos subunidades de una proteína dispuestas en forma paralela. Con el comando **sc Hphobic** o **sc Hphilic** se puede observar la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos en cada subunidad (**Rop sub a, Rop sub b**) en forma independiente.

* Abrir el archivo Módulos.kin.

- **HÉLICES ALFA.** En la **imagen 1** se observa una hélice alfa (**ADH helix**) en la superficie de una proteína (**ADH rest**). Se puede observar la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos (**side chain**) y de los puentes de hidrógeno (**H bond**). Con el **ZOOM** achique la imagen. Apuntando a **ADH rest**, vea la hélice en el contexto de la proteína. Apunte a **side ch** y vea los enlaces peptídicos formando la hélice.
- **ESTRUCTURAS BETA.** En la **imagen 2** se observan estructuras beta conectadas por uniones (**loop**) de distinta naturaleza. En la **imagen 3** se observa una lámina beta con 5 cadenas en diferente orientación, marcadas b1-b5 (**str label**). Los puentes de hidrógeno entre las cadenas paralelas o antiparalelas se visualizan con los comandos **Hbond parallel** o **antipar**.

* Abrir el archivo AlfaBeta.kin.

- **SUPERESTRUCTURAS SECUNDARIAS.** En la **imagen 1**, un dominio compuesto por estructuras alfa y beta en forma consecutiva. Con **ANIMATE** se puede ir construyendo el dominio estructural paso a paso. Con el comando **VIEW** en la barra de herramientas se tienen dos vistas de la hoja beta. En la **imagen 2** se observa un "barril" combinado con ocho estructuras alfa y beta. Con el comando **ANIMATE** se tienen diferentes vistas del barril y de la orientación de las cadenas laterales con sus radios de van der Waals, culminando con una visión del barril en el contexto de la proteína.

*** Abrir el archivo Fibrilar.kin**

- **PROTEÍNAS FIBRILARES. Imagen 1.** Observar la distribución espacial de las cadenas principales en el colágeno , con la disposición de las moléculas de agua, las glicinas y las prolinas. En la **imagen 2** se observa la disposición de las cadenas principales sobreenrolladas de la tropomiosina.

*** Cerrar el programa MAGE**

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL USO DEL PROGRAMA RASMOL.

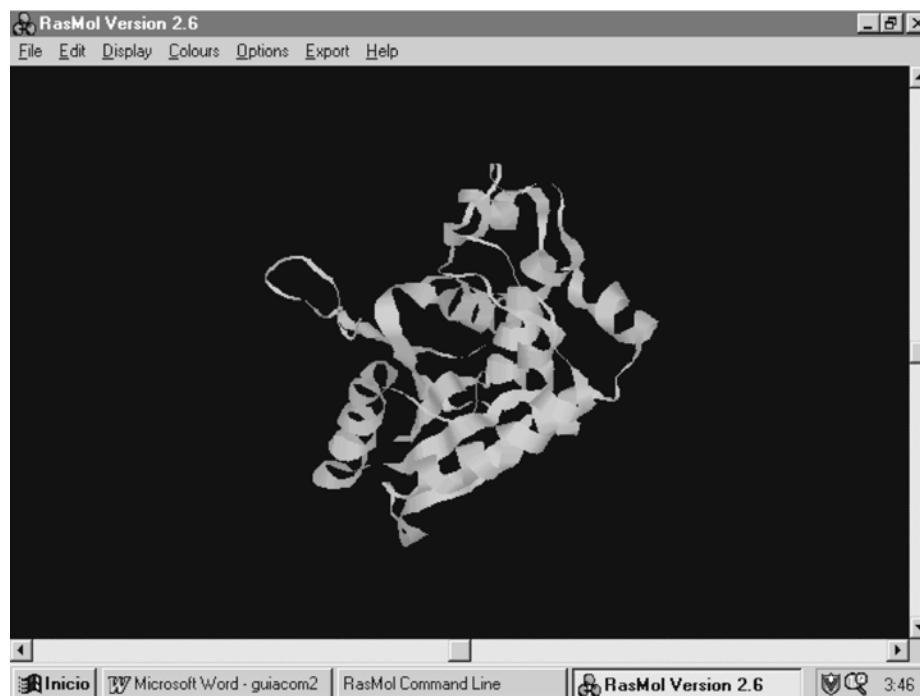


Figura 2. Pantalla típica del programa RASMOL

Con la flecha correspondiente, abrir el programa **RASMOL**. En la barra de herramientas apuntar el comando **file**. Abrir el archivo adecuado. Aparecerá la macromolécula en un formato en que se observan todos los enlaces covalentes. Con el comando **Display** se puede cambiar el estilo de la presentación de la molécula. Por ejemplo, **Backbone** muestra el esqueleto de la cadena polipeptídica (enlaces peptídicos) o de ácido nucleico (enlaces fosfodiéster). El comando **Colours** permite colorear la macromolécula en diferentes estilos, por ejemplo: **Shapely** colorea cada grupo químico de un color diferente, **Chain** colorea cada cadena en forma independiente. Con el cursor en la pantalla o con las puntas de flecha al lado de la pantalla se puede girar la molécula en cualquier dirección.

- **ESTRUCTURA TERCIARIA DE PROTEÍNAS.** Abrir el archivo **g3pdhsimple**, se observa la estructura terciaria de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa. Con el comando **Display**, cambie la forma de representar la proteína.

*** Cerrar el archivo**

- **ESTRUCTURAS CUATERNARIAS DE PROTEÍNAS.** Abrir el archivo. **Hemoglobina**. Cambie con el comando **Display**, la forma de representar la proteína. Con el comando **Colour chain** se colorea cada subunidad por separado. Con los comandos **Display wireframe** y **spacefill** se observan los grupos hem.

*** Cerrar el archivo**

2. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA.

En esta sección de la presentación se analizará la predicción de la estructura de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa a partir de la secuencia del DNA.

La secuenciación del DNA es una técnica de rutina en cualquier laboratorio de biología molecular. Con el empleo del código genético, que asigna un triplete de nucleótidos (codones) a un aminoácido determinado o tripletes sin sentido (que no codifican para aminoácidos), se puede deducir la secuencia (estructura primaria) de posibles proteínas codificadas en segmento de DNA en estudio. A partir esta secuencia utilizando la información archivada en los bancos de datos de secuencias de proteínas se puede identificar la proteína codificada. Con el empleo de programas computacionales es posible predecir la similitud con otras proteínas que cumplen la misma función o funciones similares, la estructura secundaria y finalmente las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína en estudio. La mayoría de estas operaciones se pueden realizar mediante el acceso público a la información y los programas a través de INTERNET.

En esta sección se revisará paso a paso las distintas etapas de este proceso, tal como se realiza en un laboratorio de investigación:

Página 3.

- En primer lugar se observa la secuencia del DNA en estudio. Mediante metódicas de clonamiento molecular, se aisló de *Escherichia coli* un DNA que se presume codifica para la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa. Este DNA se secuenció en el mismo laboratorio.

Página 4.

- En esta página se observa un esquema de los posibles marcos de lectura presentes en el segmento de DNA en estudio. Mediante un programa computacional es posible predecir los segmentos del DNA en que se observan muy pocos codones de término de la traducción, lo que implica que es posible que codifiquen para una proteína real. En cada segmento de DNA existen seis localizaciones posibles para la codificación de una proteína (seis marcos de lectura posibles). En esta página, los posibles marcos de lectura se visualizan en color azul.

Página 5 y 6.

- Se observa la secuencia del DNA y las posibles secuencias de aminoácido (en el código de una letra) de las proteínas en los tres marcos de lectura en un sentido de la hebra. Los codones de término se ilustran con un asterisco. El marco predicho en la página anterior como el más largo (2) se indica en letras azules.

Páginas 7 y 8.

- Se comparó la secuencia obtenida anteriormente con las archivadas en el banco de datos de secuencias de proteínas GeneBank. Se ilustran los resultados obtenidos en este análisis. En la primera parte se observa una lista de las proteínas que tienen mayor similitud de secuencia con la proteína en estudio. Se indica de izquierda a derecha el número del archivo, una breve descripción con el nombre y el organismo del que proviene, un valor de puntaje (score) de similitud y finalmente un valor estadístico (P) que significa la probabilidad que el hallazgo sea al azar (mientras menor sea este número, mayor es la probabilidad que las proteínas comparadas sean similares).

En la segunda parte se muestra un alineamiento de las secuencias de la proteína en estudio (query) con las que tienen los puntajes más altos (subject). Entre las secuencias se indica los aminoácidos idénticos. Las + indican aminoácidos similares funcionalmente.

Páginas 9 y 10.

- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos predicha de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa con la de otros organismos. Se indican en color azul y con asteriscos los aminoácidos conservados entre todas las proteínas. Los aminoácidos conservados funcionalmente (ejemplo: aspártico y glutámico) se ilustran con uno o dos puntos (., :).

Página 11.

- Predicción de la estructura secundaria de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa. Mediante el programa computacional Garnier (disponible en INTERNET), se predijo la estructura secundaria de la enzima. Los cilindros indican regiones de hélice α , las flechas estructuras β y los puntos regiones sin una estructura definida. Estos últimos corresponden posiblemente a las conexiones entre segmentos con estructuras α o β .

Página 12.

- Acceso al programa **RASMOL**. En esta oportunidad se deben abrir los archivos **G3PDHASA** simple y **completa** para observar la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima.

Al abrir el archivo **protDNA** se observará una proteína que interacciona con el DNA. ¿Es esta proteína un monómero o un dímero?. ¿En qué región del DNA interactúa?

Página 13.

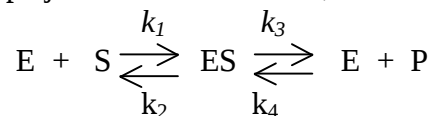
- **FIN SUPERESTRUCTURAS SECUNDARIAS.** En la **imagen 1**, un dominio compuesto por estructuras alfa y beta en forma consecutiva. Con **ANIMATE** se puede ir construyendo el dominio estructural paso a paso. Con el comando **VIEW** en la barra de herramientas se tienen dos vistas de la hoja beta. En la **imagen 2** se observa un "barril" combinado con ocho estructuras alfa y beta. Con el comando **ANIMATE** se tienen diferentes vistas del barril y de la orientación de las cadenas laterales con sus radios de van der Waals, culminando con una visión del barril en el contexto de la proteína.

ANEXO 2

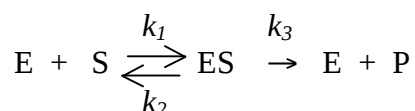
Cinética Enzimática

Derivación de la ecuación de Michaelis y Menten

Dada la reacción $S \rightleftharpoons P$ catalizada por la enzima E. Si la reacción ocurre a través de la formación de un complejo enzima sustrato ES, entonces podemos escribir:



Si la formación de producto P en el tiempo es medida en condiciones de velocidad inicial (V_o), esto es a tiempos muy cortos, la concentración de producto [P] puede ser considerada muy pequeña y por lo que k_3 puede ser despreciada. Por lo tanto la reacción puede ser escrita de la siguiente manera:



Si k_3 es la etapa limitante entonces la velocidad de la reacción es:

$$V_o = k_3[ES] \quad (1)$$

Donde V_o es velocidad inicial.

Si suponemos que la [ES] se mantiene constante durante un cierto tiempo de la reacción, entonces:

velocidad de formación de ES = velocidad de disociación de ES

por tanto

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

por otro lado:

$$[Et] = [E] + [ES]$$

donde Et = enzima total
y E = enzima libre

si $[E] = [Et] - [ES]$

entonces podemos escribir:

$$k_1([Et] - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$k_1[Et][S] - k_1[ES][S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$k_1[Et][S] = k_2[ES] + k_3[ES] + k_1[ES][S]$$

despejando en función de [ES] tenemos:

$$k_1[Et][S] = (k_2 + k_3 + k_1[S])[ES]$$

$$\text{luego } [ES] = \frac{k_1[Et][S]}{(k_2 + k_3 + k_1[S])}$$

dividiendo por k_1 :

$$[ES] = \frac{[Et][S]}{(k_2 + k_3)/k_1 + [S]}$$

Si definimos a $(k_2 + k_3)/k_1 = K_m$ = constante de Michaelis y Menten,

Entonces podemos escribir:

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

Si reemplazamos $[ES]$ en (1), entonces tenemos finalmente que:

$$V_o = \frac{k_3[Et][S]}{K_m + [S]} \quad \text{ó} \quad \text{Ecuacion de Michaelis y Menten}$$

Caso 1: $[S] \rightarrow \infty$

$$V_o = \frac{k_3[Et][S]}{K_m + [S]}$$

dividiendo por $[S]$

$$\text{Entonces: } V_o = \frac{k_3[Et]}{K_m/[S] + 1}$$

Si $[S] \rightarrow \infty$, entonces $V_o \rightarrow k_3[Et]$ (cinética de orden 0)

Se define entonces a $k_3[Et]$ = velocidad máxima = V_{max} .

Escribimos finalmente:

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

Caso 2: $[S] \ll K_m$, entonces $K_m + [S] \approx K_m$

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \quad (\text{cinética de orden 1})$$

dado que: $V_{max} = k_3[Et]$

$$V_o = \frac{k_3[Et][S]}{K_m}$$

k_3 es la etapa limitante de la reacción y se conoce también con el nombre de constante catalítica (k_{cat}) o número de recambio.

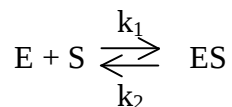
Podemos entonces finalmente escribir:

$$V_o = \frac{k_{cat}[Et][S]}{K_m}$$

El parámetro k_{cat}/K_m se conoce también con el nombre de eficiencia catalítica.

Caso 3: Si $k_2 \gg k_3$, entonces $k_2 + k_3 \approx k_2$

por tanto, si $K_m = (k_2 + k_3)/k_1 = k_2/k_1$



y como la $[ES]$ es constante durante algún tiempo en la reacción, entonces:

velocidad de formación de ES = velocidad de disociación de ES

luego, $k_1[S][E] = k_2[ES]$

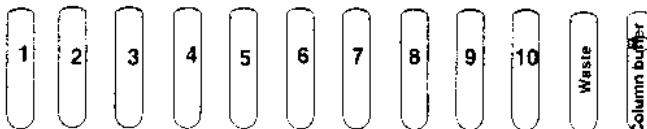
$$\frac{[ES]}{[S][E]} = \frac{k_1}{k_2} = K_s \text{ (constante de formación de } ES\text{)}$$

por tanto $K_m = 1/K_s =$ constante de disociación del complejo ES .

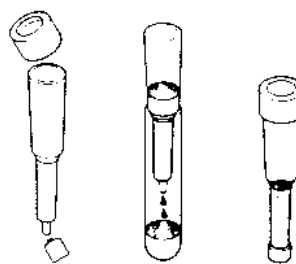
ANEXO 3

Laboratory Quick Guide Size Exclusion Chromatography Kit

1. Obtain 12 collection tubes and label ten sequentially from 1 to 10. Label the tubes with your name and laboratory period. Label the final two tubes “Waste” and “Column Buffer”. Using a clean pipette, transfer 4 ml of column buffer into the tube labeled “Column Buffer”.



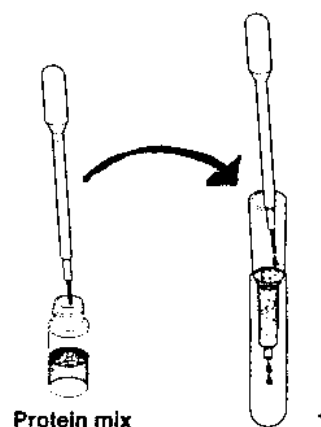
2. Remove the cap and snap off the end of the sizing column. Allow all of the buffer to drain into the waste tube. Observe the upper surface of the matrix and insure that all of the buffer has entered the column. Looking directly over and into the column, you should see the “grainy” appearance of the column matrix. Cap the bottom of the column.



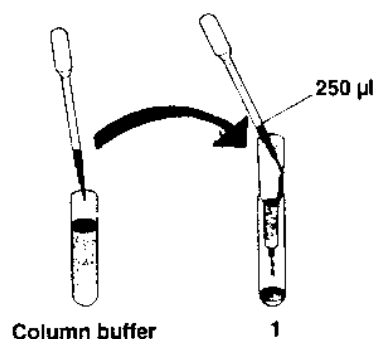
3. Carefully place the column onto tube 1. You are now ready to load (or the teacher may load) the protein sample onto the column.



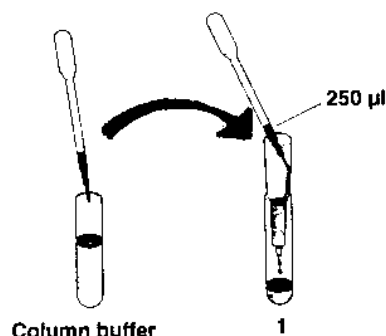
4. When you are ready to load the protein mix, uncap the column. It is important to uncap the column only when you are ready to load your protein—you do not want your column to run dry. Using a pipette, add one drop of protein mix onto the top of the column bed (your teacher may do the loading for you). The pipette should be inserted into the column and the drop should be loaded just above the top of the column so that it minimally disturbs the column bed.



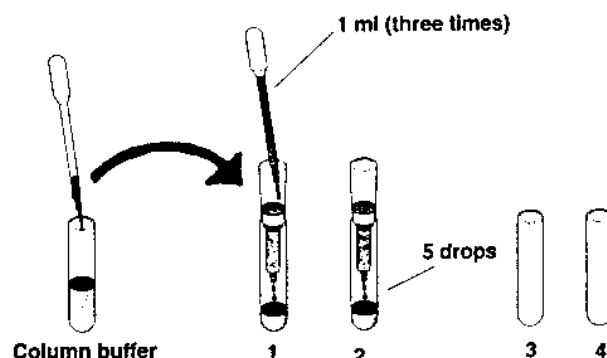
5. As soon as the drop of protein mix enters the column bed, carefully add 250 μ l of column buffer to the top of the column. This is best done by inserting the pipette tip into the column so that it rests just above surface of the column matrix. Carefully let the buffer run down the side of the tube and onto the top of the bed. (Note: The size separation will work best when the column bed is left undisturbed). Begin to collect drops into tube 1.



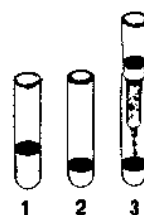
6. Add another 250 μ l of column buffer to the top of the column. Add the buffer as before, by placing the pipette just above the top of the column and letting the buffer run down the side of the tube. Continue to collect drops into tube 1.



7. Add 3 ml of column buffer to the top of the column matrix. This can be done by adding 1 ml three times from the pipette. At this time the protein mix has entered the column far enough so that slight disturbances to the column bed will not affect the separation. Transfer the column to tube 2 and begin to count the drops that enter into each tube. Collect 5 drops of buffer into tube 2.



8. When 5 drops have been collected into tube 2, transfer the column onto tube 3. Collect 5 drops of buffer into each collection tube. When 5 drops have been collected into a tube, lift it off and transfer it to the next tube.



9. Continue collecting 5 drops into each tube. When you reach tube 10, collect a total of 10 drops. Cap the column and if your teacher instructs you to do so, parafilm or cover your fractions until the next laboratory period. Store the fractions in the refrigerator. Sketch your results.

