

ENZIMAS

Catalizadores Biológicos

Marco Galleguillos Caamaño
Bioquímico, Mg. BQ
Universidad de Chile

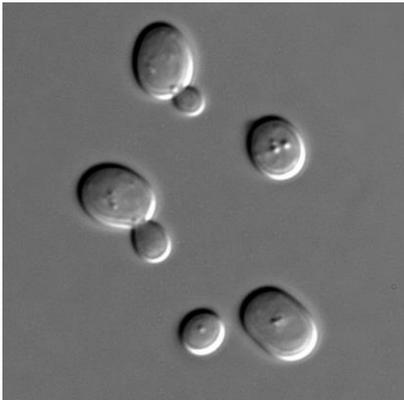
Algunos hitos importantes en el descubrimiento de las enzimas



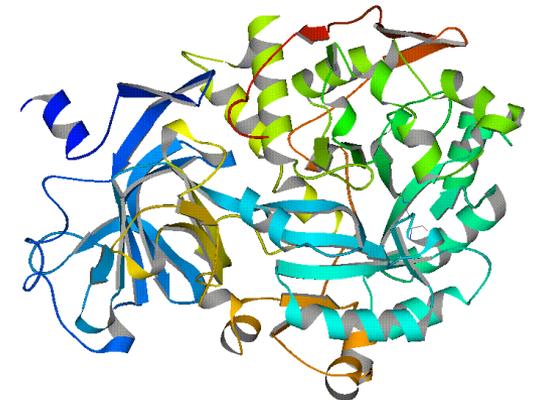
Fermentación de azúcares

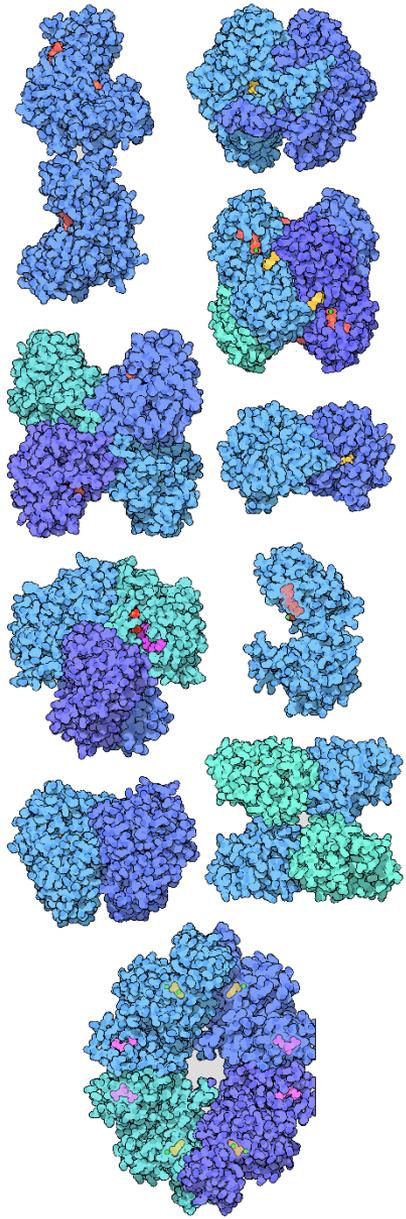
Büchner en 1890 demostró que un extracto libre de células de levadura podía transformar la glucosa en etanol

Summer, en 1926 cristalizó la enzima ureasa y demostró su naturaleza proteica



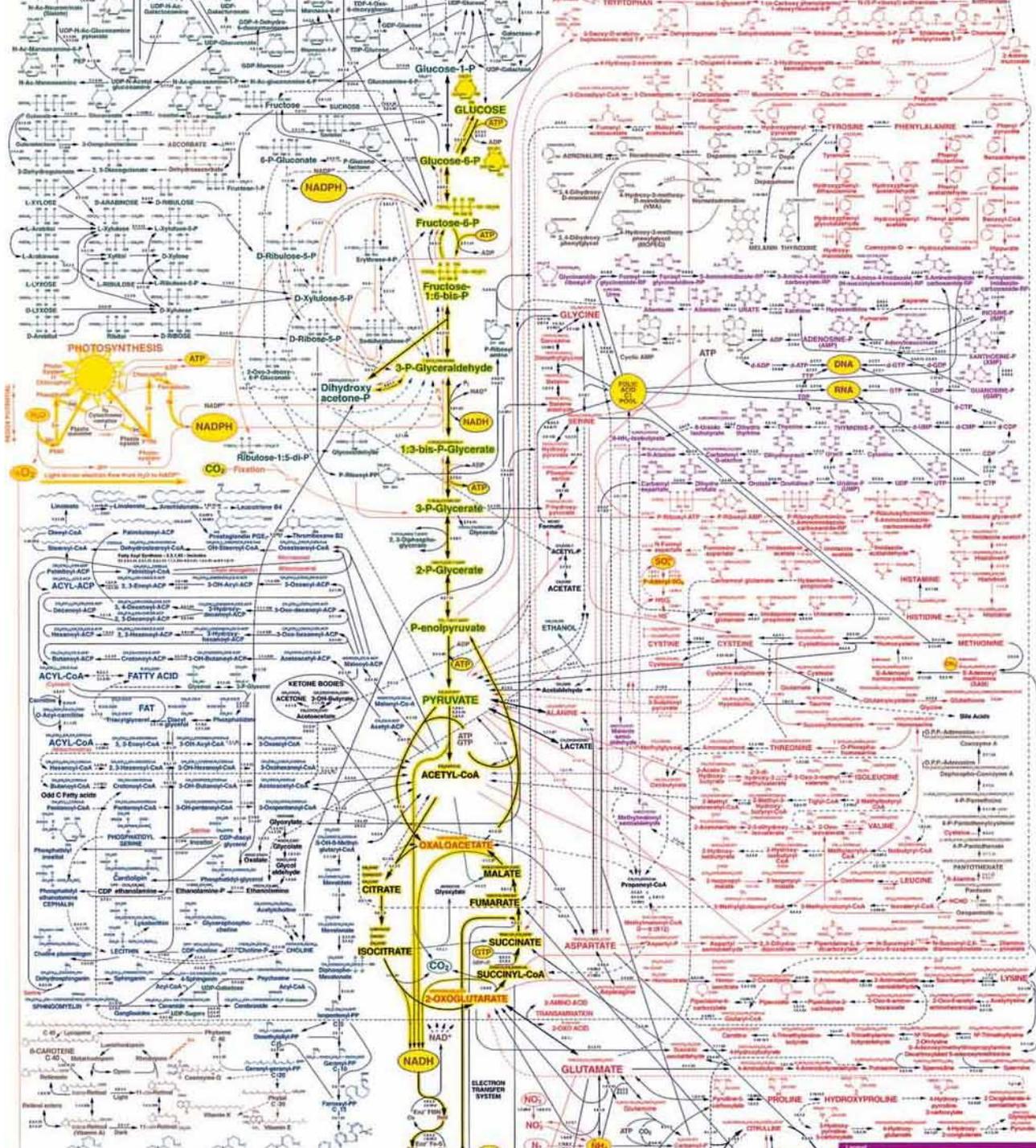
Saccaromyces cerevisiae



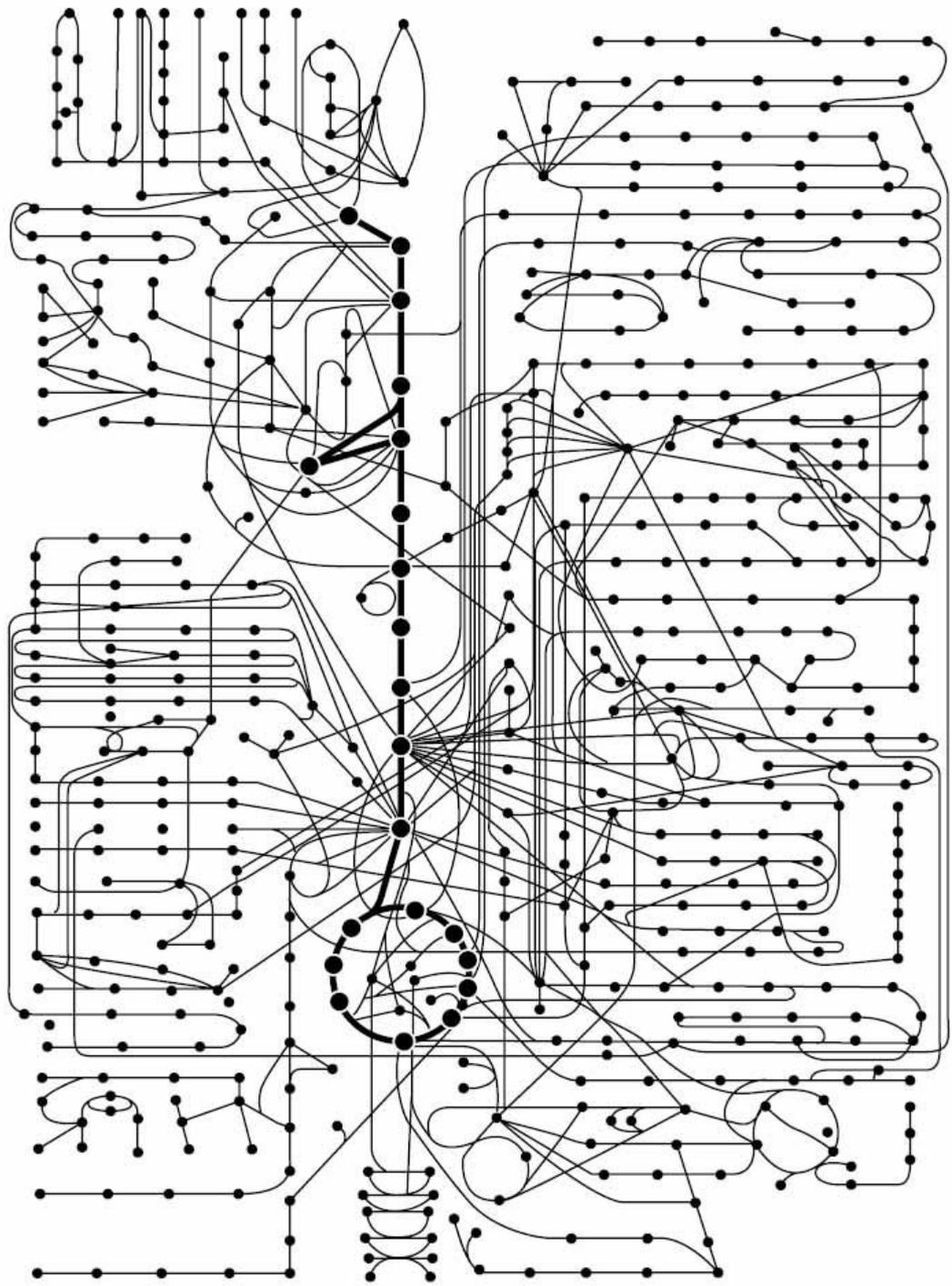


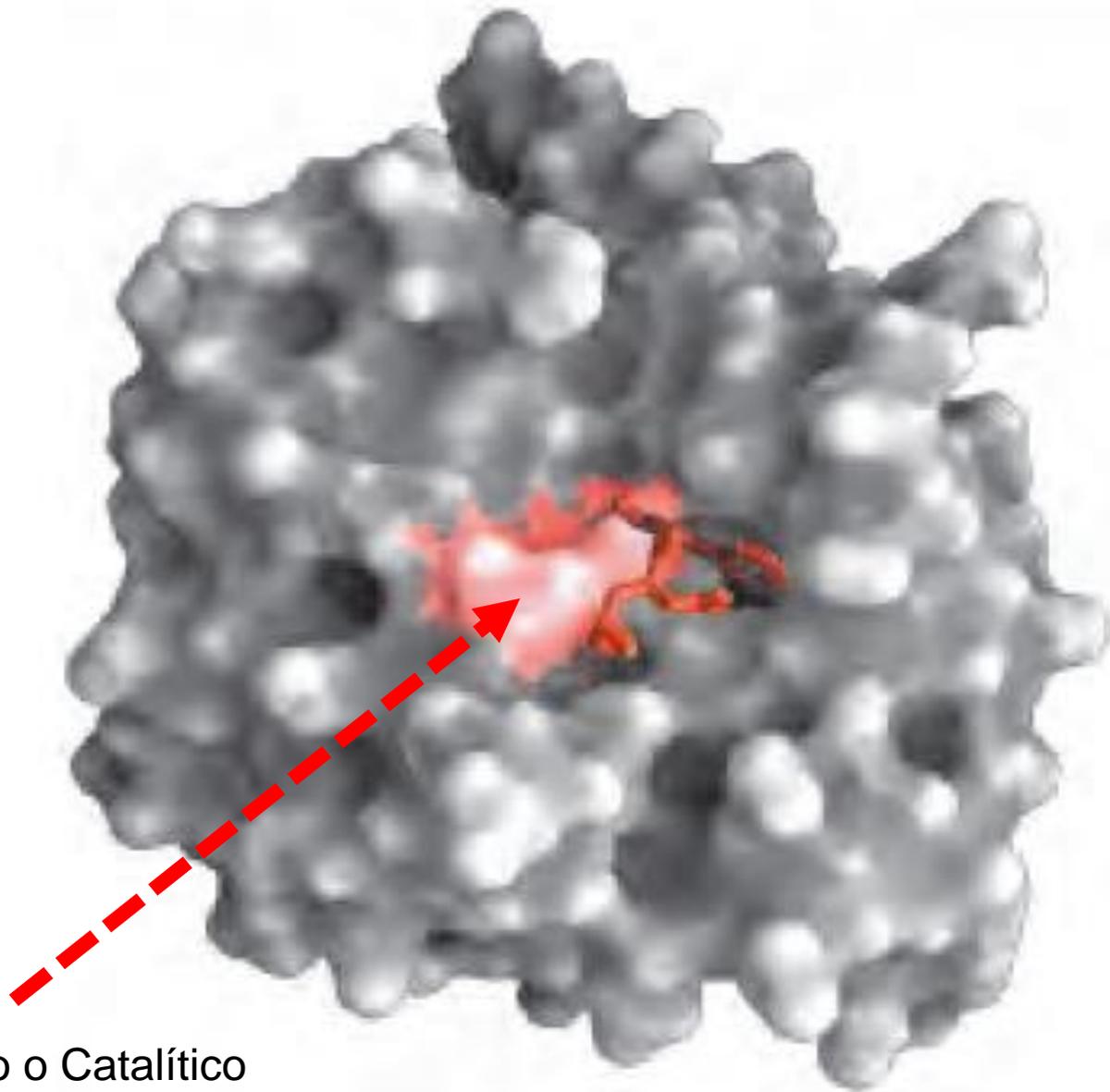
La palabra “**ENZIMA**” viene del griego:

Prefijo “**en**” (en el interior) y “**Zymé**” (levadura)



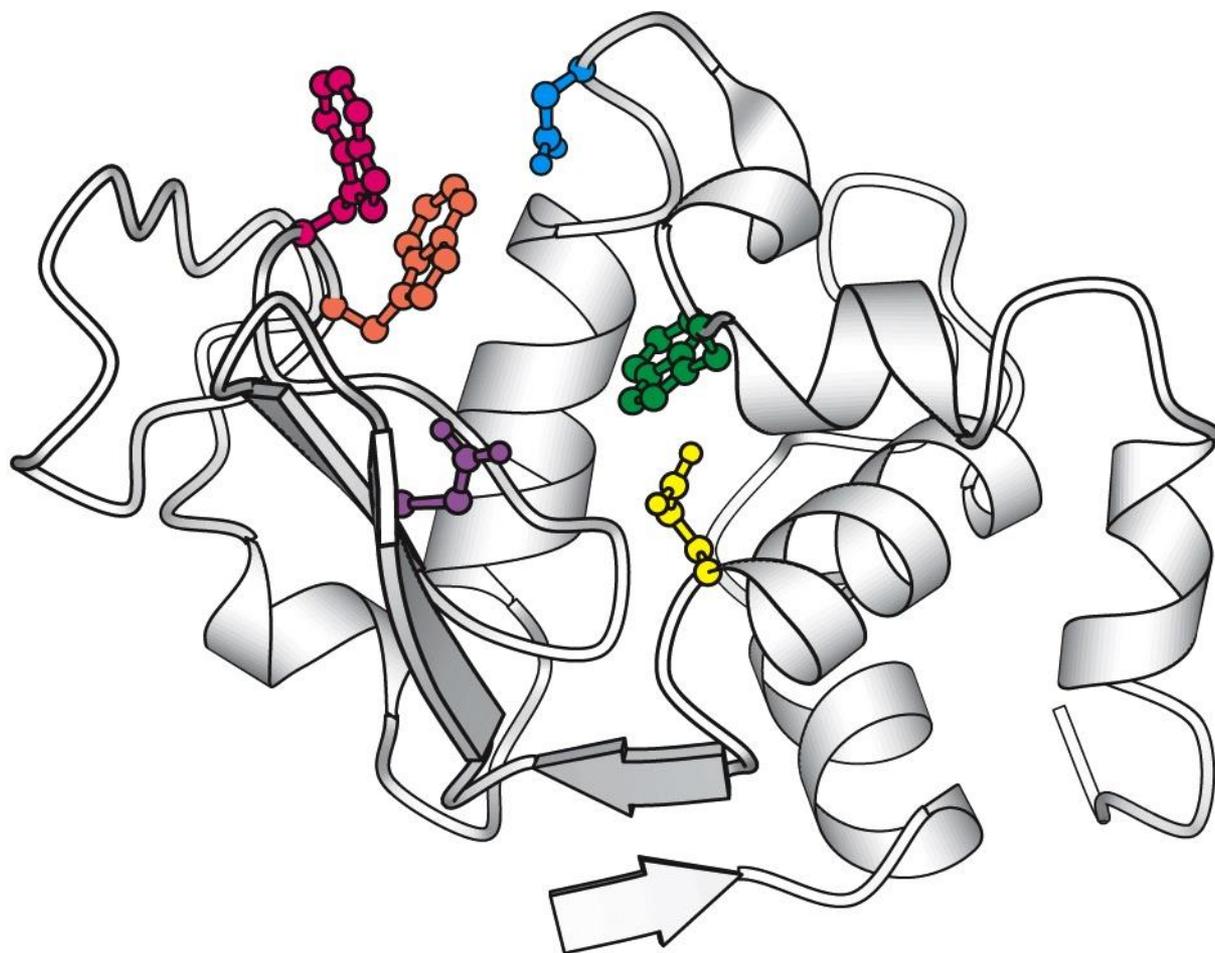
Cada punto representa un **metabolito** dentro de esta red de reacciones que constituyen el **metabolismo intermediario**. Cada reacción es catalizada por una enzima específica



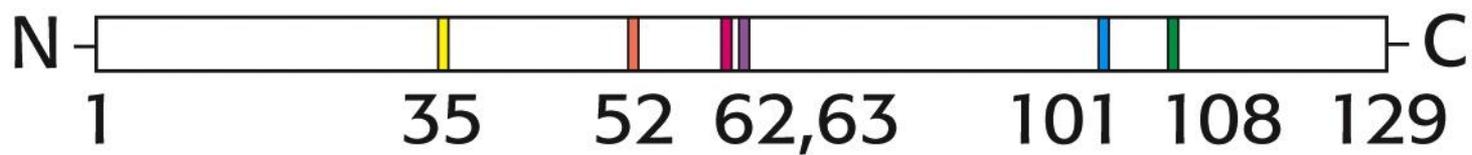


Sitio Activo o Catalítico

(A)

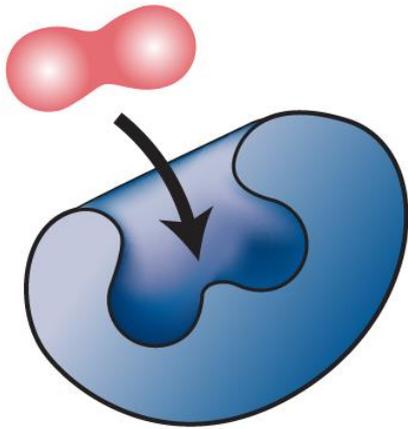


(B)

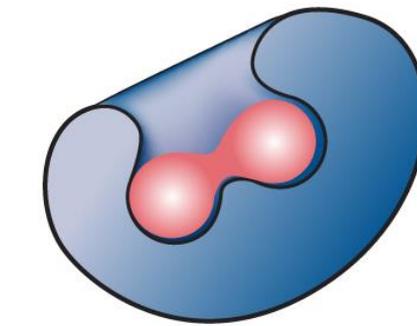


Mecanismo de la actividad de una enzima

Sustrato

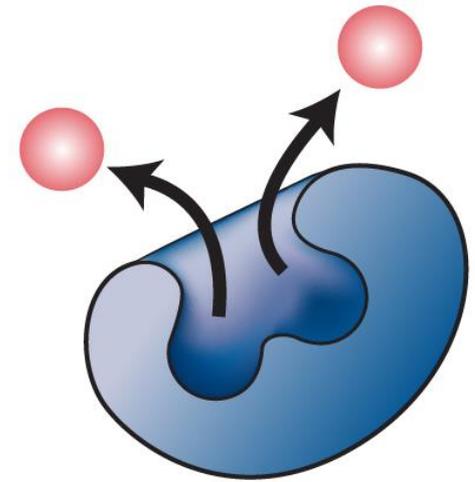


Enzima



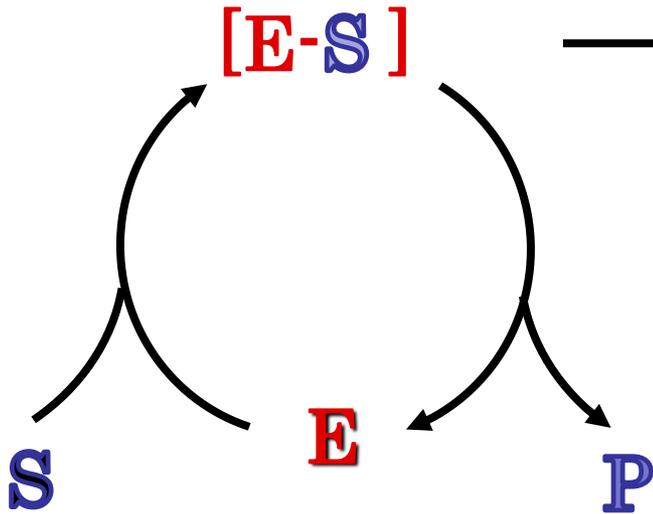
Complejo
Enzima-Sustrato

Productos



Enzima

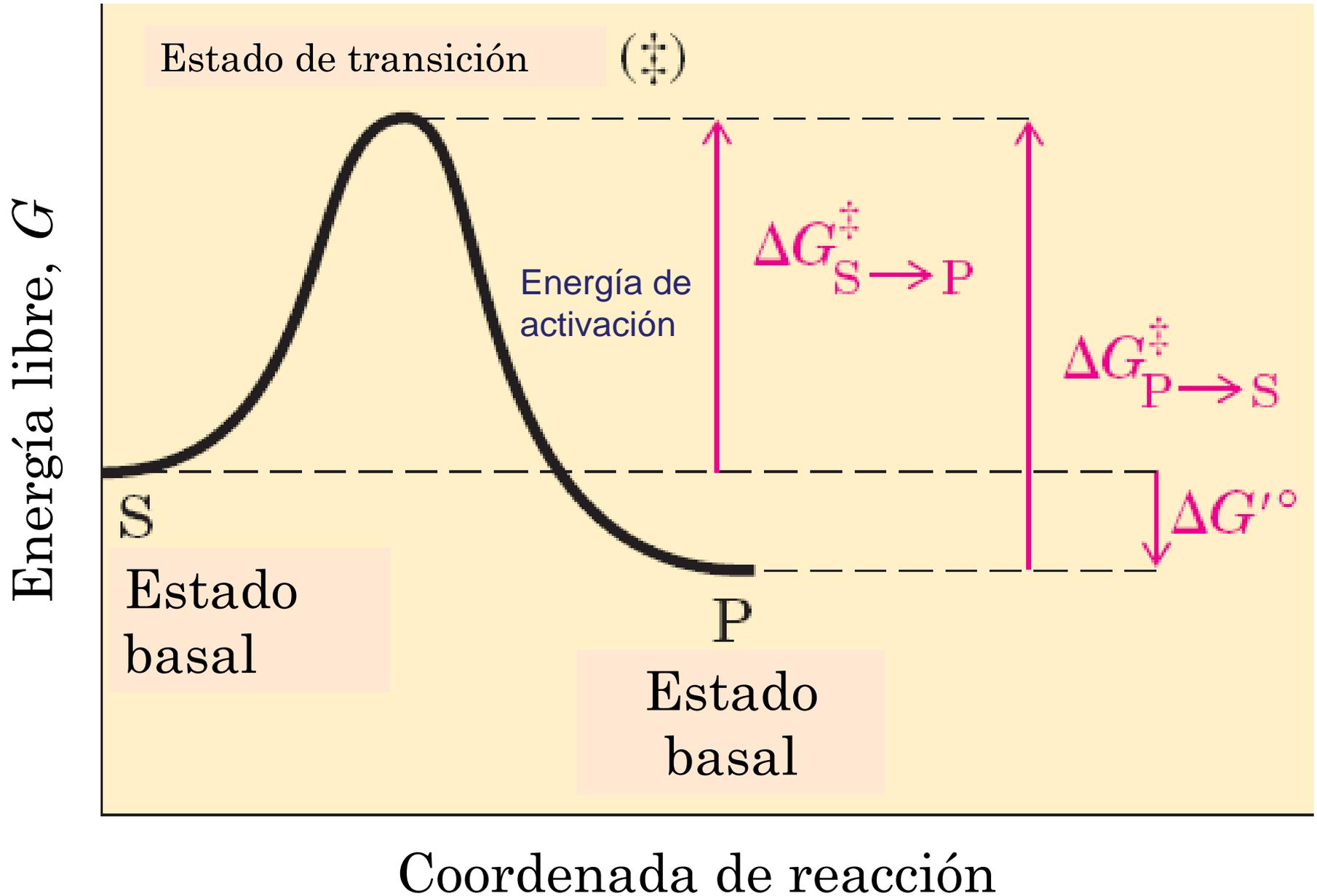
ENZIMAS



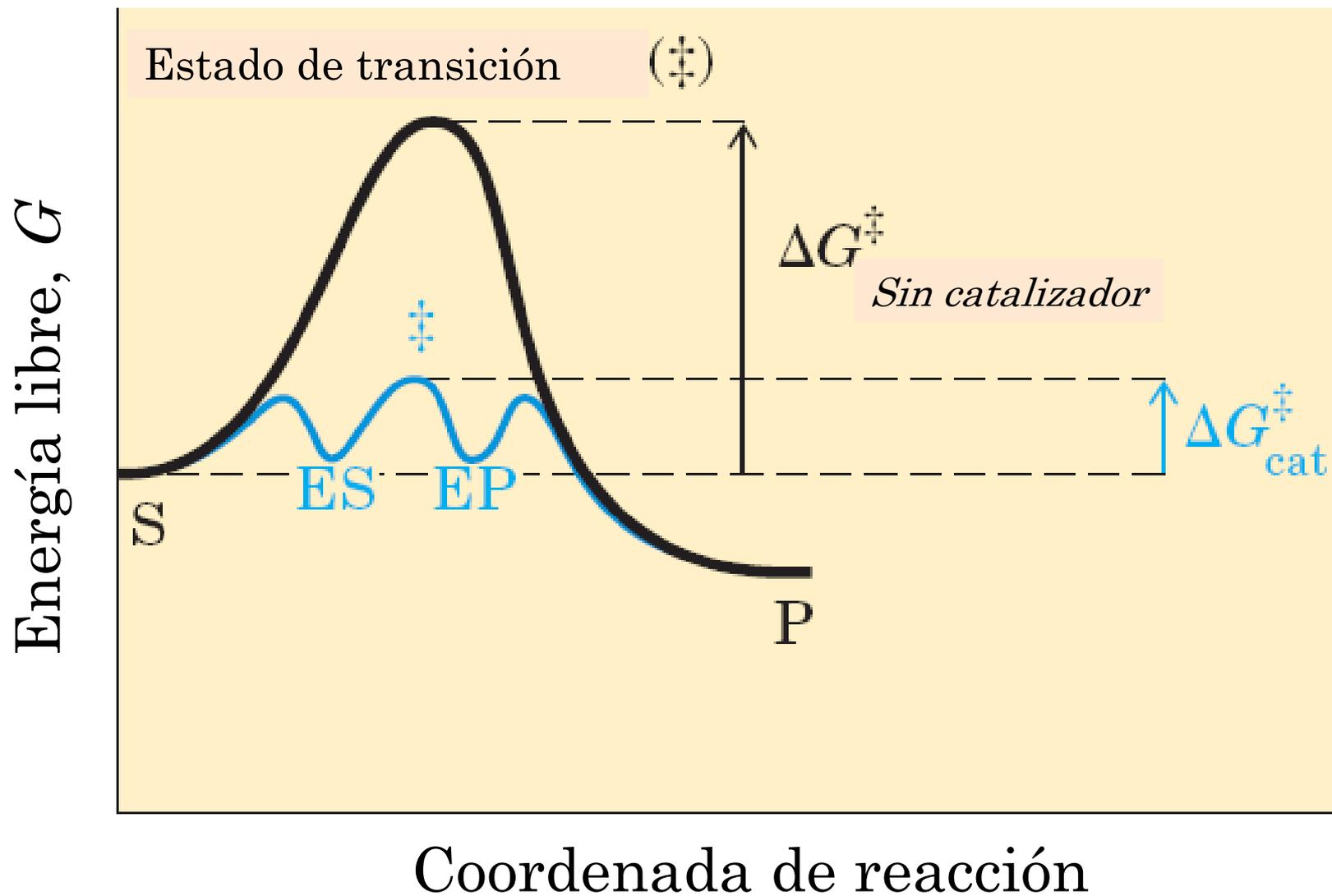
Se forma un Complejo Activado o Estado de transición

La Enzima disminuye la energía necesaria para lograr el estado de transición

Perfil de energía de una reacción química exergónica ($\Delta G < 0$)

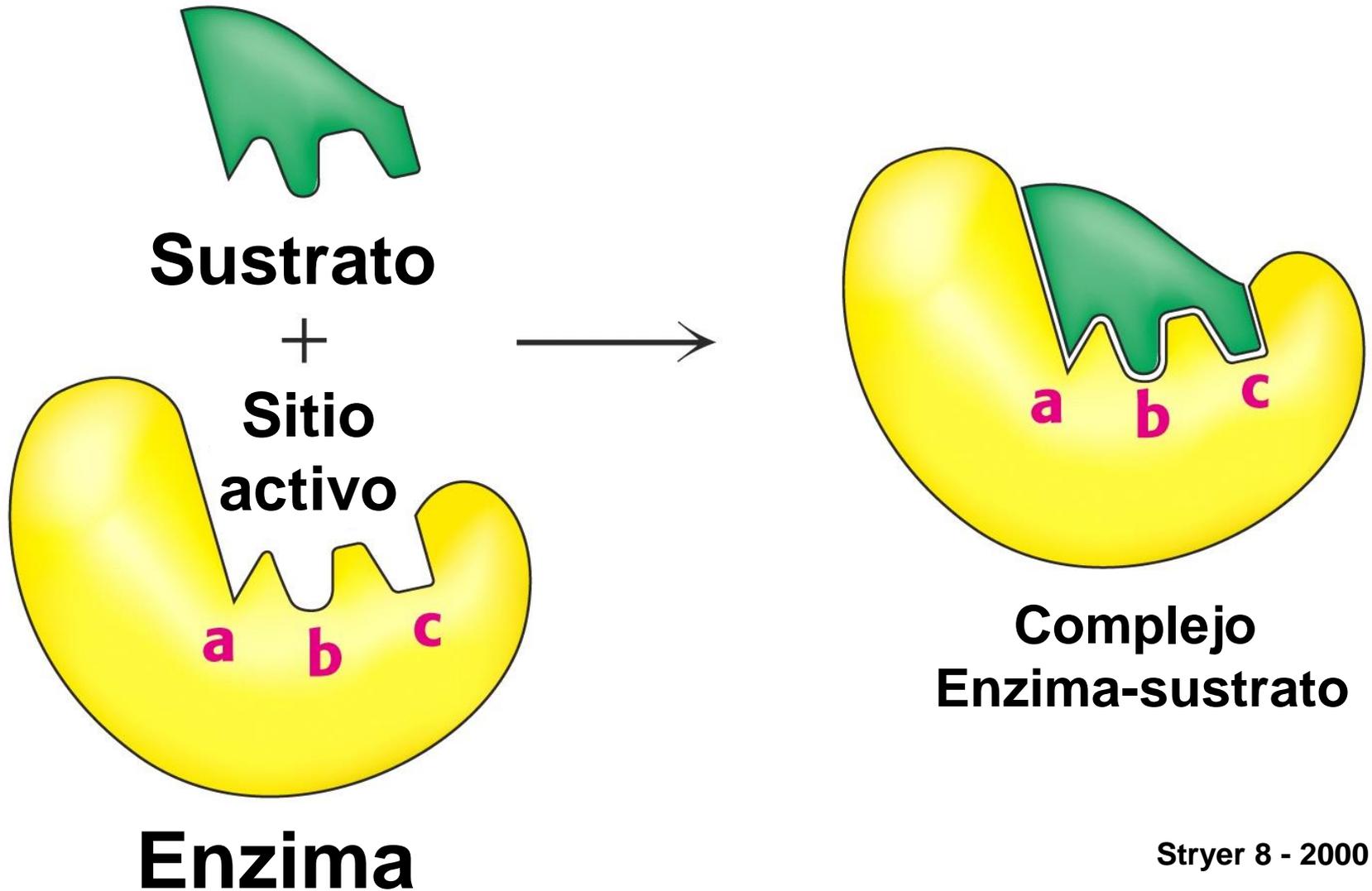


Los catalizadores bajan la Energía de activación facilitando la reacción

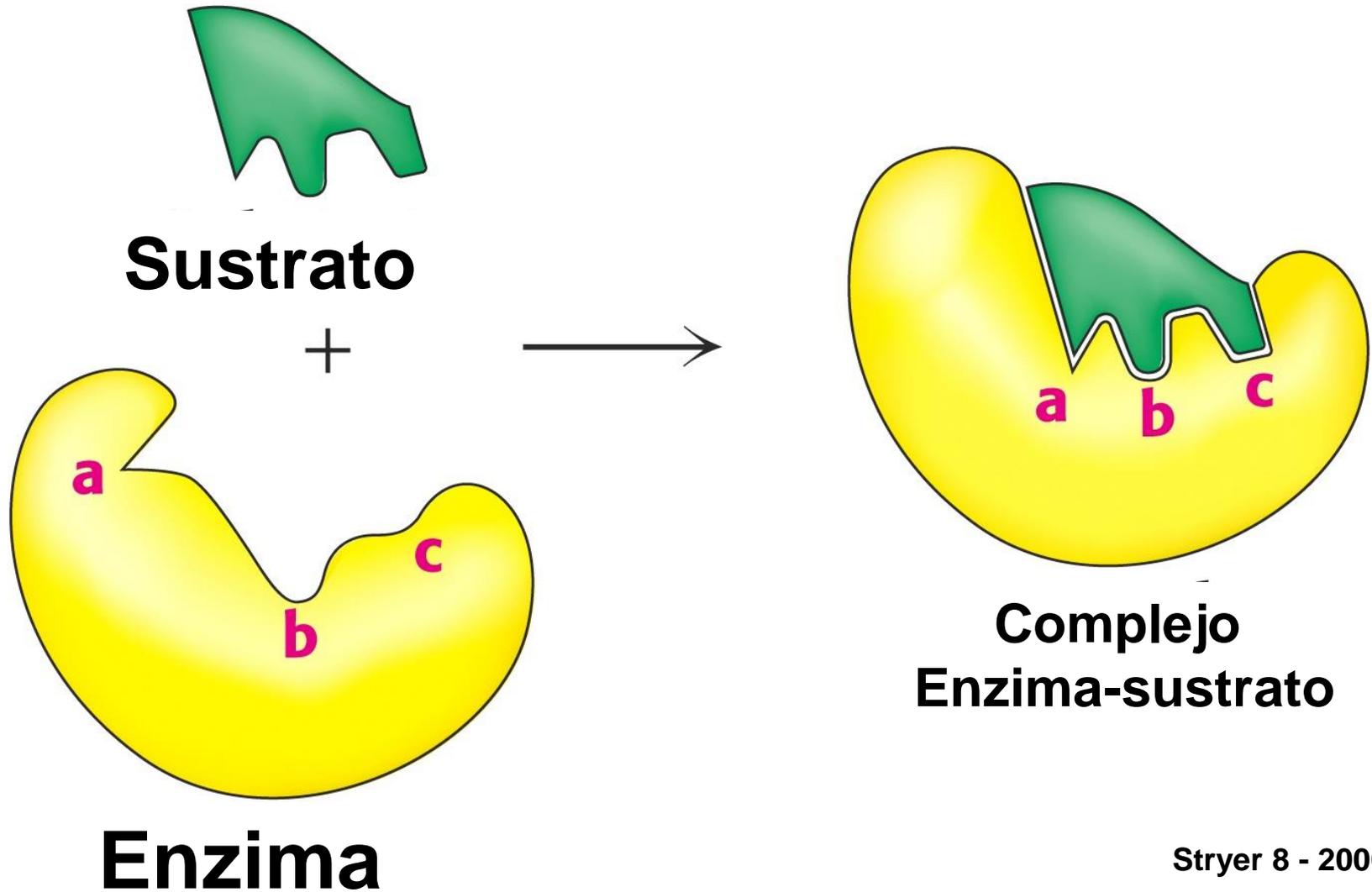


Curso de la reacción

Modelo Llave - Cerradura



Modelo de Ajuste Inducido



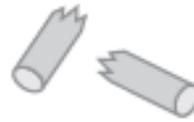
(a) No enzyme



Substrate
(metal stick)

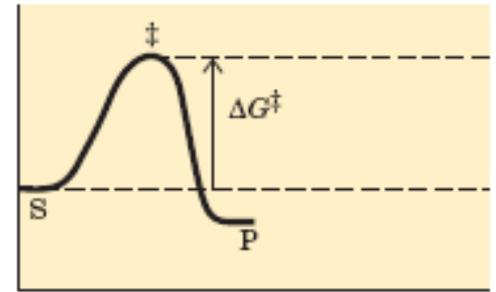


Transition state
(bent stick)

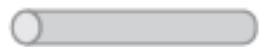


Products
(broken stick)

Free energy, G



(a) No enzyme



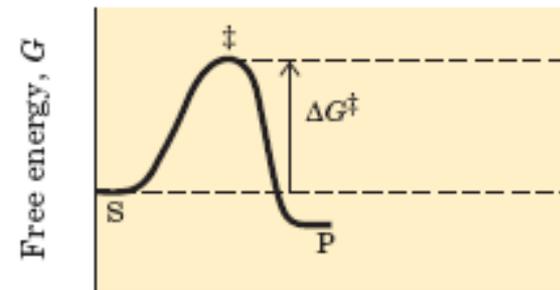
Substrate
(metal stick)



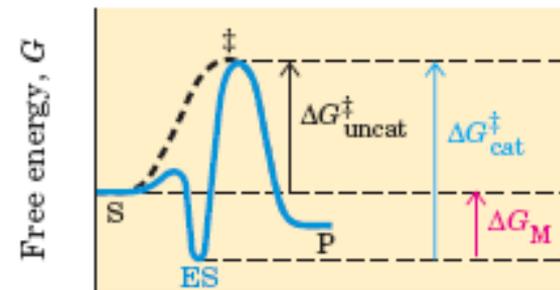
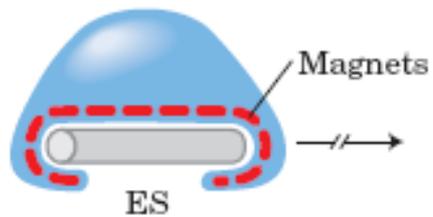
Transition state
(bent stick)



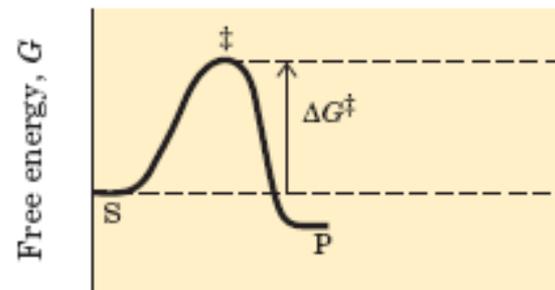
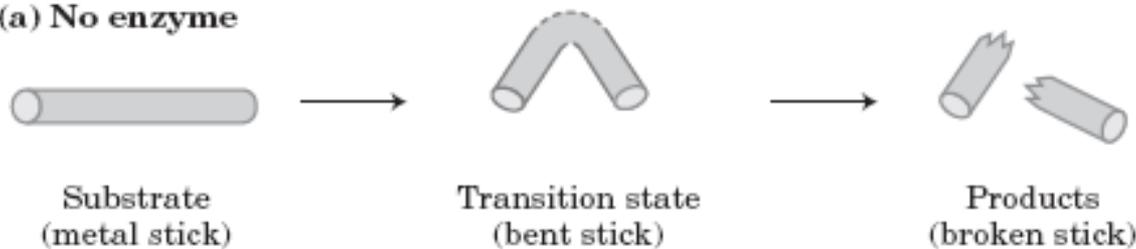
Products
(broken stick)



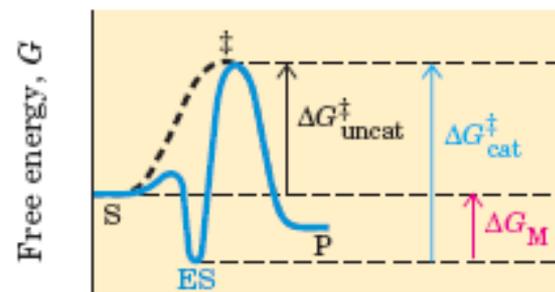
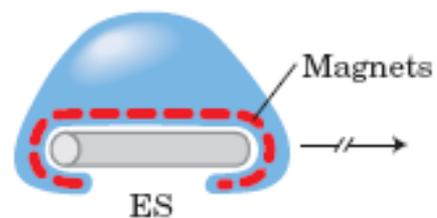
(b) Enzyme complementary to substrate



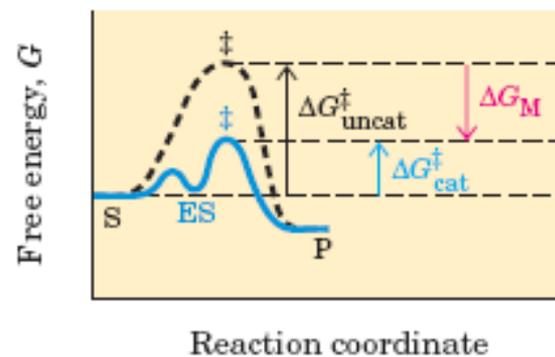
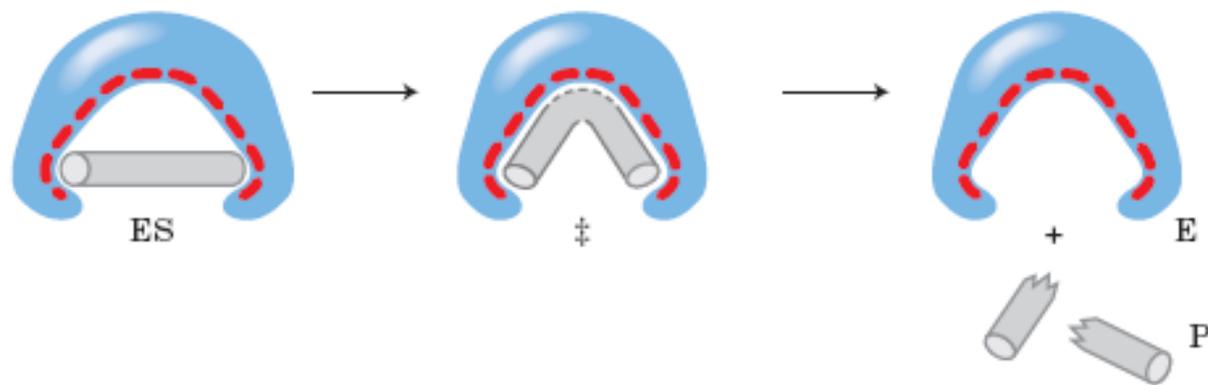
(a) No enzyme



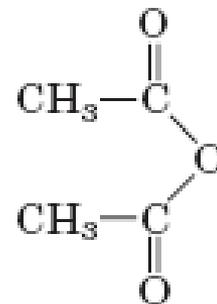
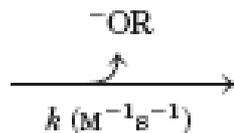
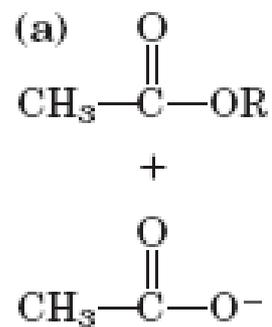
(b) Enzyme complementary to substrate



(c) Enzyme complementary to transition state



Reacción

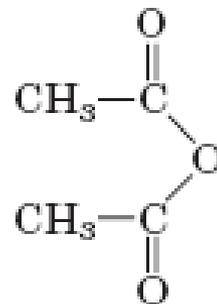
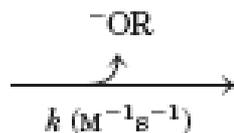
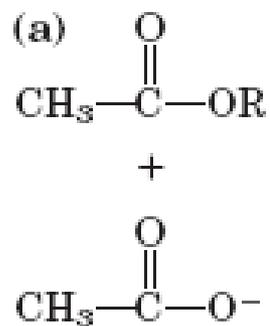


Aumento en la
velocidad de
reacción

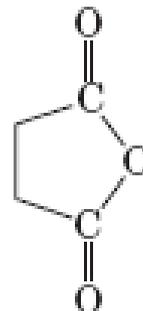
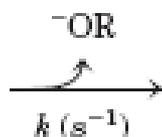
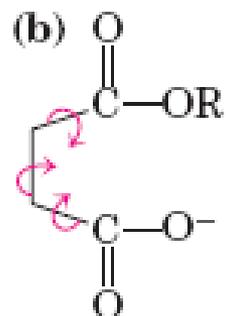
1

Reacción

Aumento en la
velocidad de
reacción



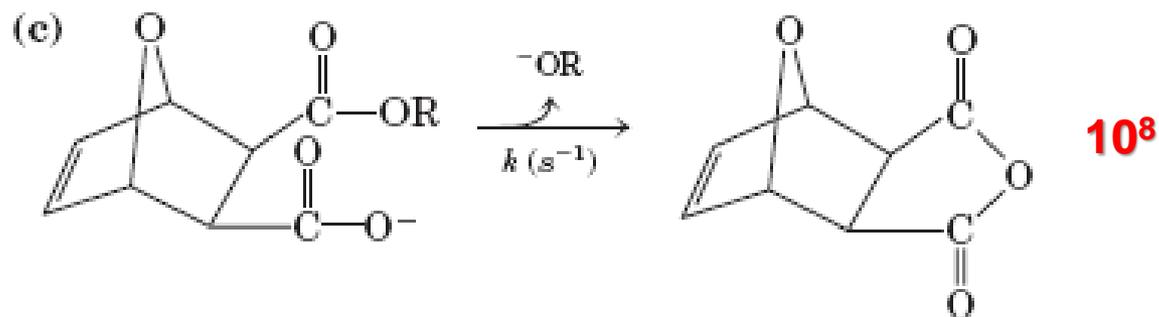
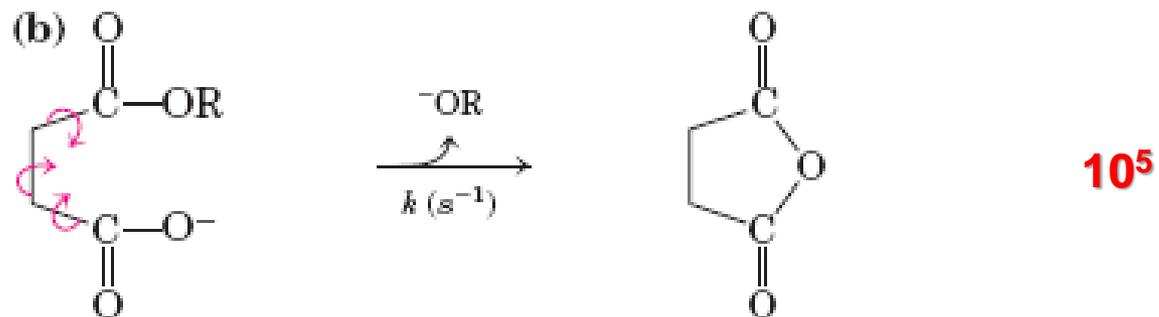
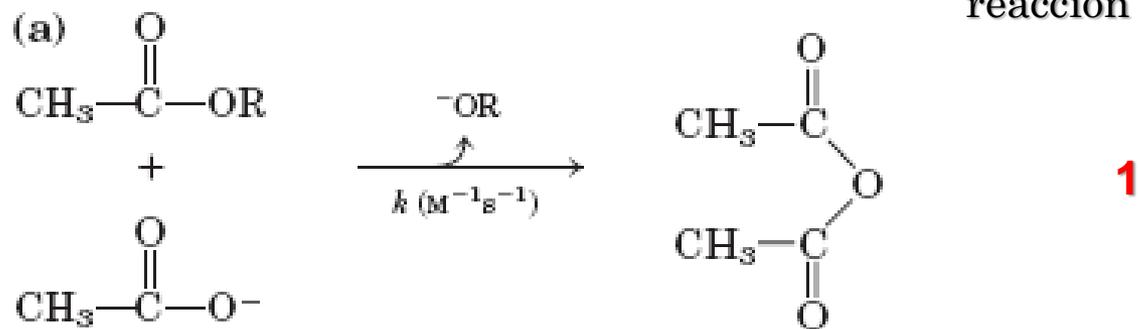
1



10⁵

Reacción

Aumento en la
velocidad de
reacción



Reacción

Aumento en la
velocidad de

La orientación espacial de los grupos químicos reaccionantes afecta a la velocidad de las reacciones.

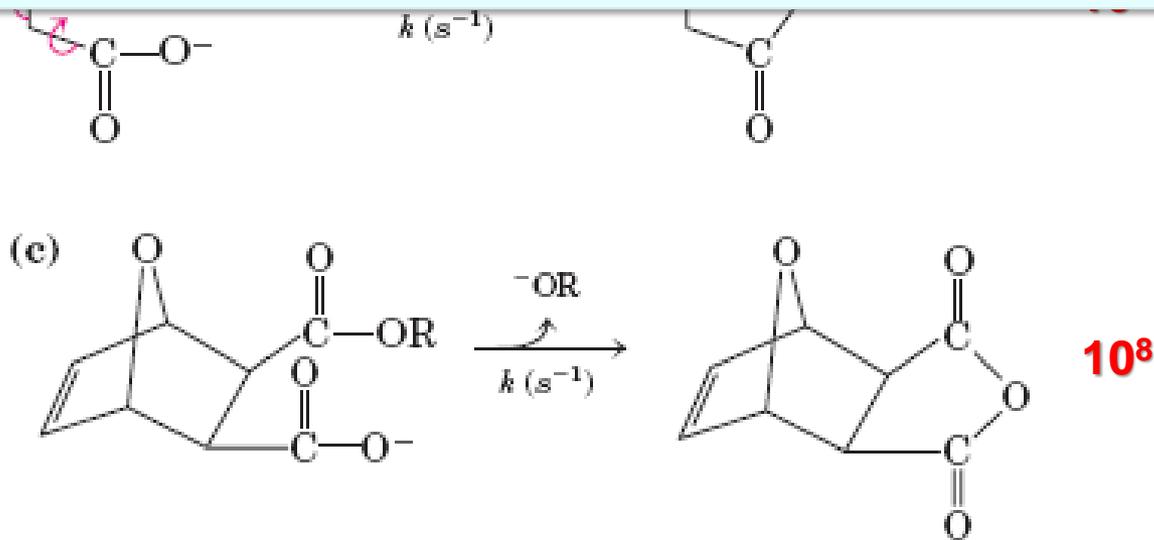
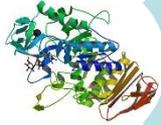


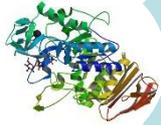
TABLE 6–5 Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

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

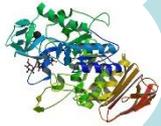
Características generales de las Enzimas :



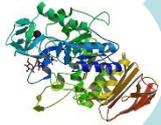
Facilitan una reacción termodinámicamente posible (Disminuyen la E de Activación)



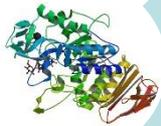
Se recuperan al final de la reacción



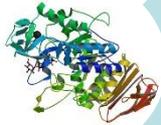
Tienen Sitio Activo Catalítico: en el que se reconoce al sustrato y ocurre la catálisis



Son específicas : Reconocen a su Sustrato y lo modifican siempre igual

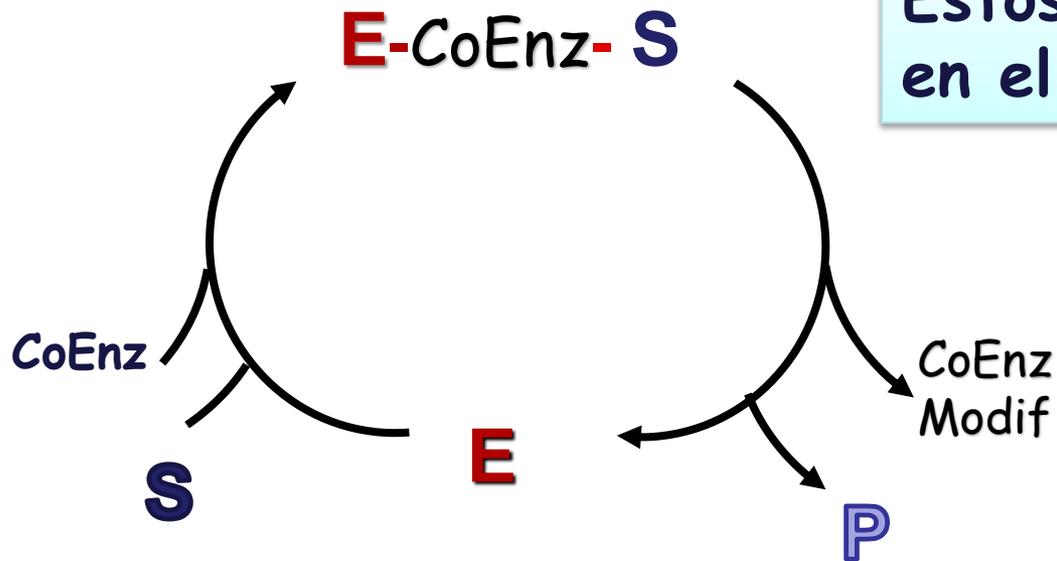


Son altamente eficientes



Su acción puede ser regulada : la velocidad de reacción puede aumentar o disminuir

En algunas Reacciones Enzimáticas se requiere la participación de una Coenzima o de un Cofactor :



Estos componentes participan en el Estado de transición

TABLE 8.2 Enzyme cofactors

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

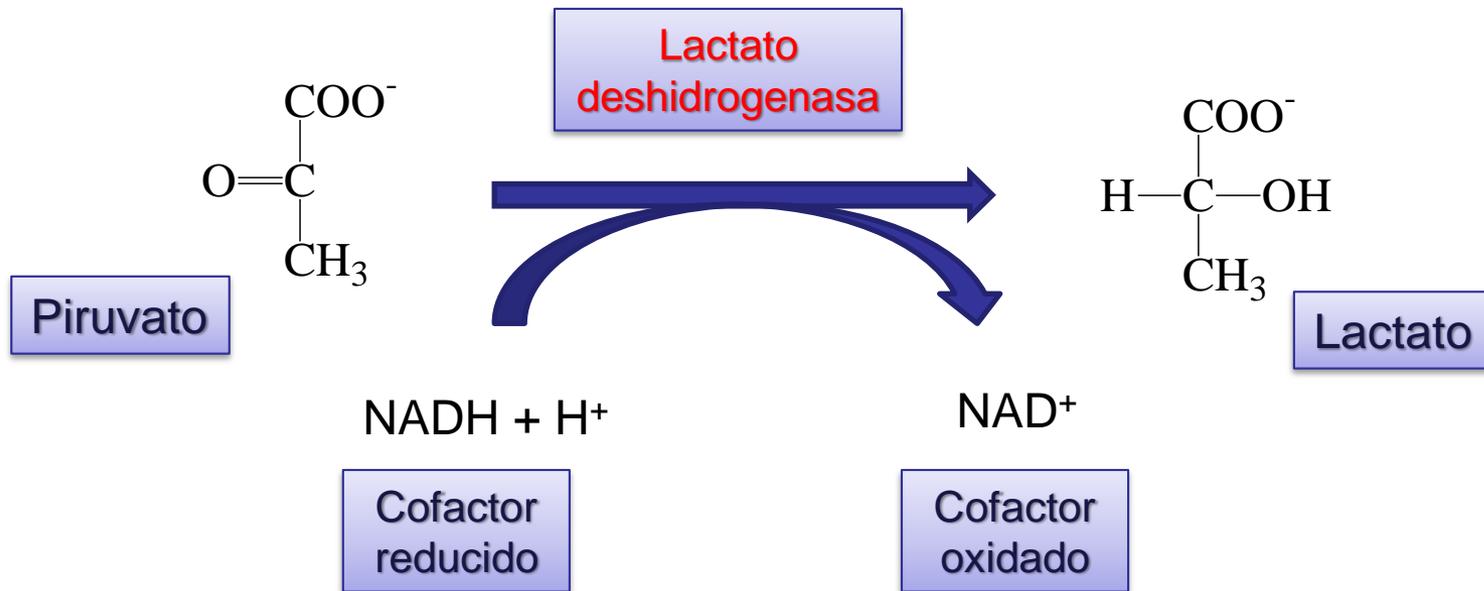
Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan en seis grupos:

1. Óxido-reductasas
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas (sintasas)
5. Isomerasas
6. Ligasas (sintetasas)



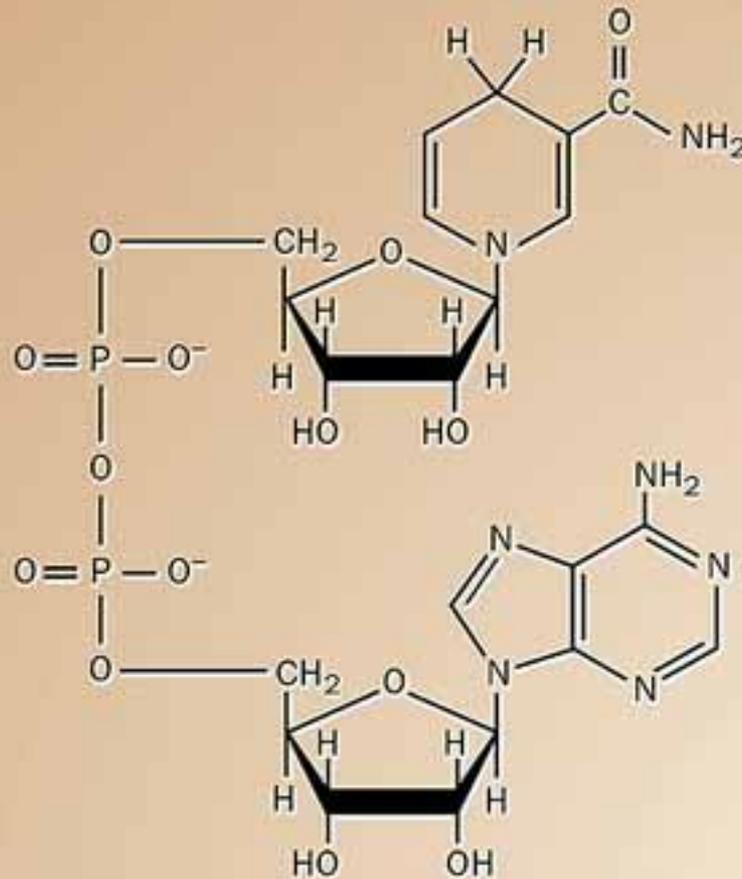
Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + P</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Reacción que ocurre en el citosol de las células animales

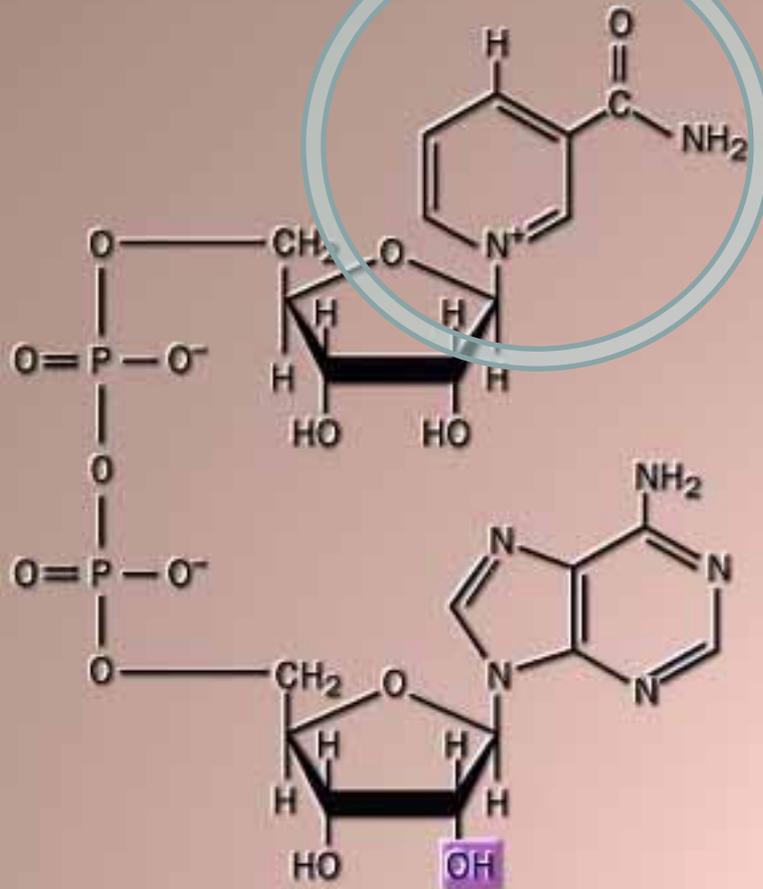


EC 1.1.1.27



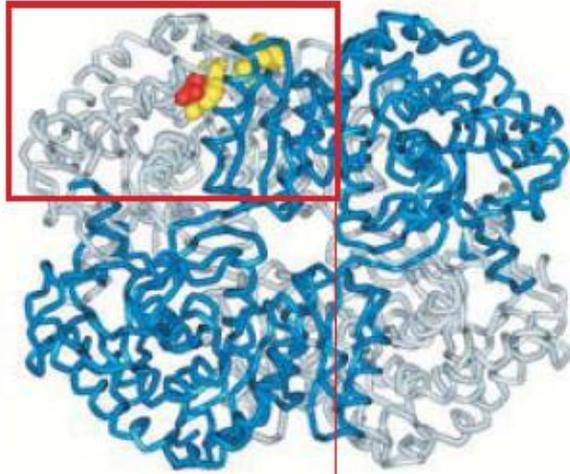


**Nicotinamide adenine dinucleotide
(NADH)**

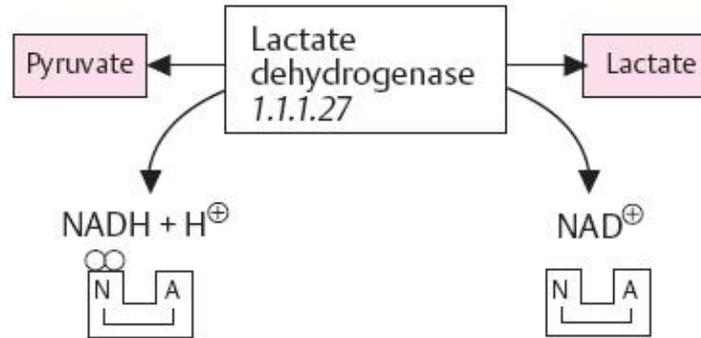


**Nicotinamide adenine dinucleotide
(NAD⁺)**

A. Lactate dehydrogenase: structure

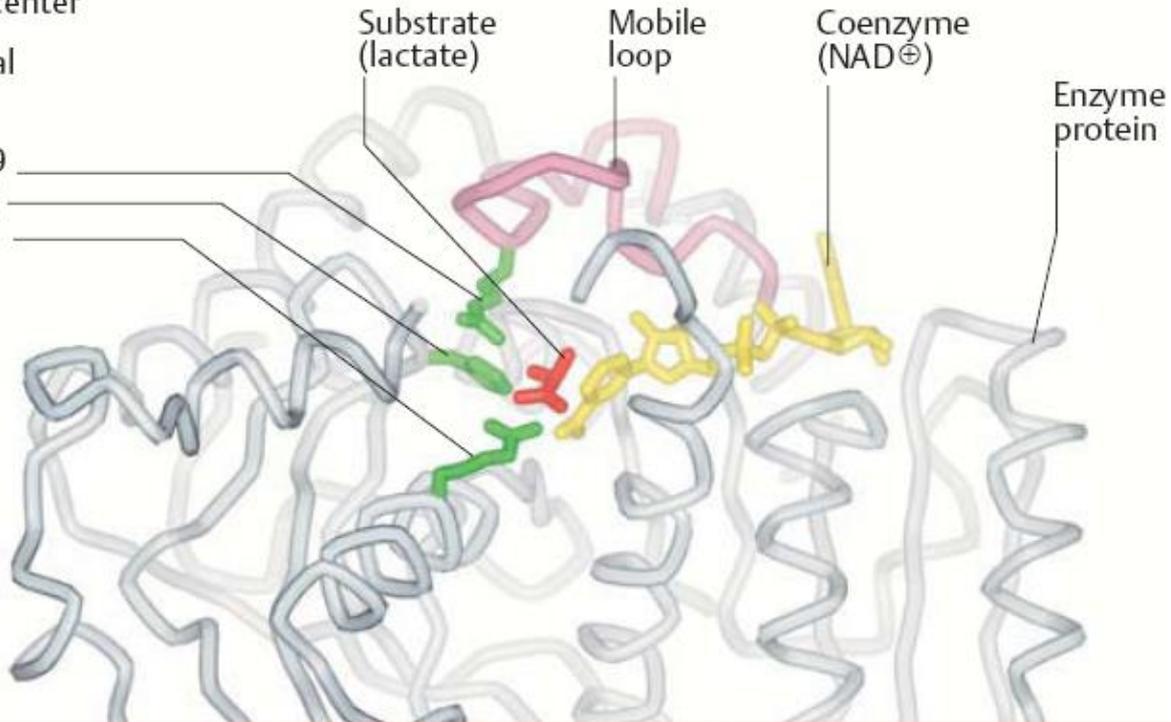


1. Tetramer 144 kDa

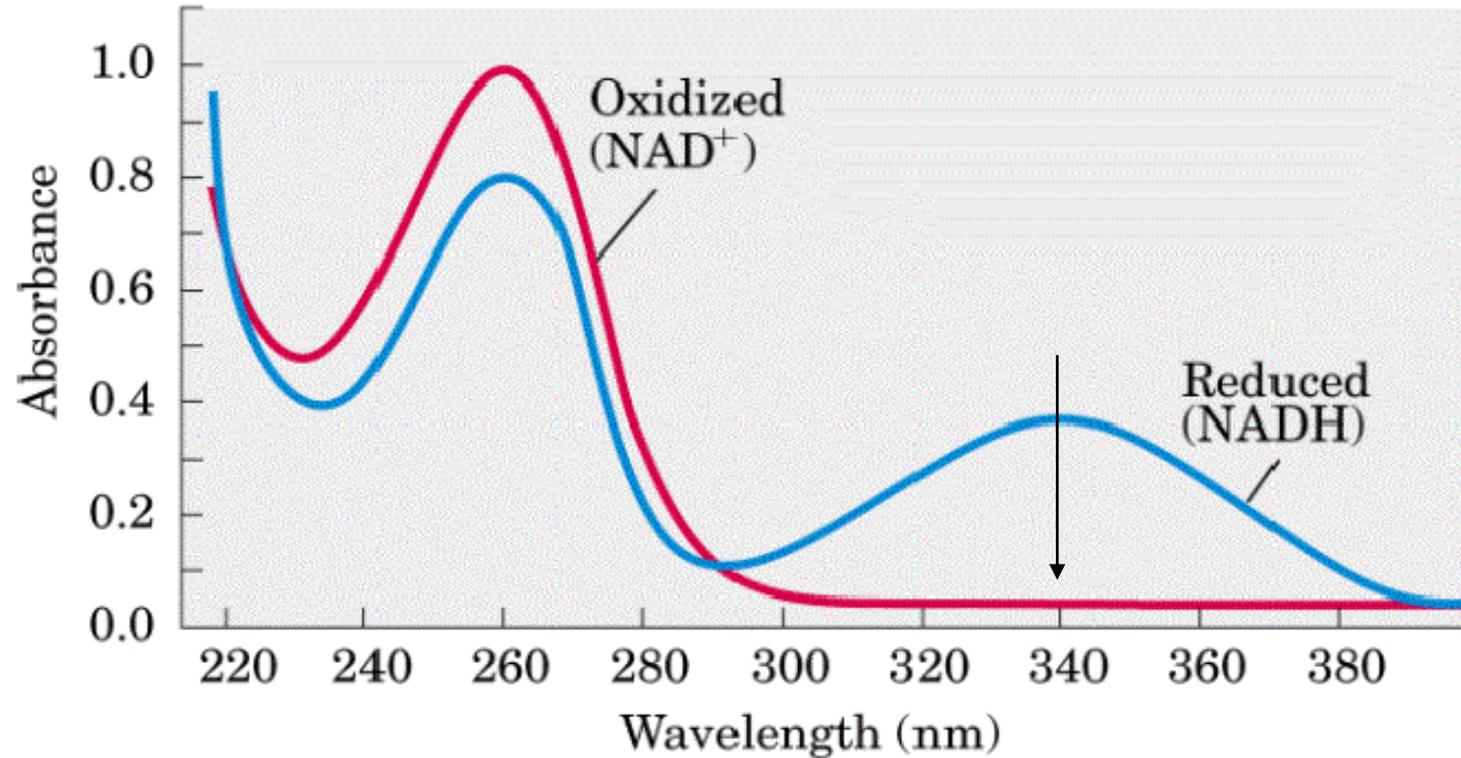


2. Active center

Essential amino acids
Arg-109
His-195
Arg-171



Espectro de absorción del NAD



(b)

Una forma de poder medir la concentración de NADH en un medio acuoso a través de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm

Isoenzimas o Isoformas

B. Isoenzymes

Lactate dehydrogenase M

1. Gene

R Y L M G E R L G V H P L S C H G W V L G E H G D S S V P V W S G M N V A G C S L K T L H P D L G T D . .

Lactate dehydrogenase H

R Y L M A E K L G I H P S S C H G W I L G E H G D S S V A V W S G V N V A G V S L Q E L N P E M G T D . .

LDH1 (H₄)

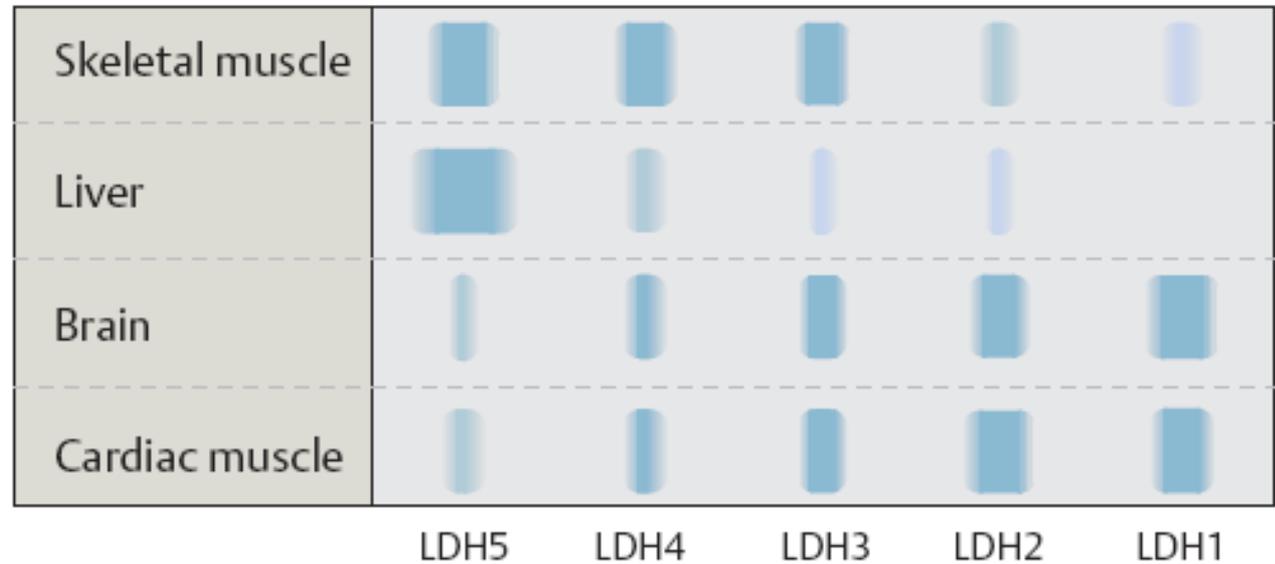
LDH2 (M₁H₃)

LDH3 (M₂H₂)

LDH4 (M₃H₁)

LDH5 (M₄)

2. Forms

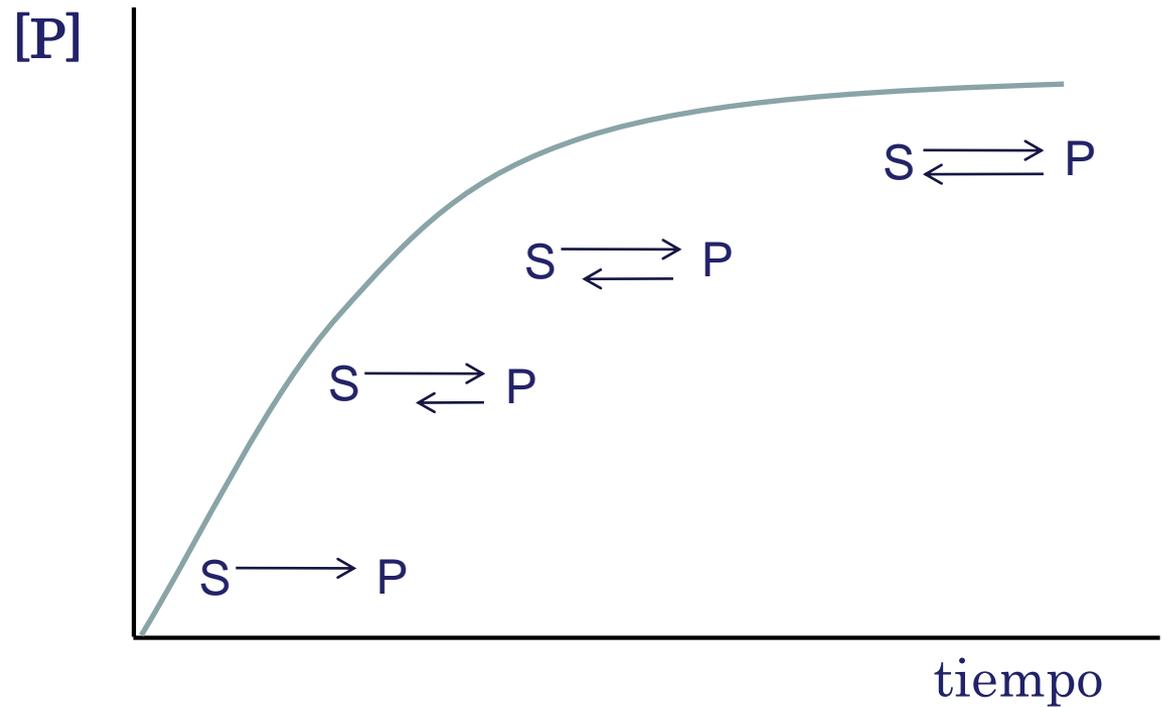


3. Separation by gel electrophoresis

CINÉTICA ENZIMÁTICA

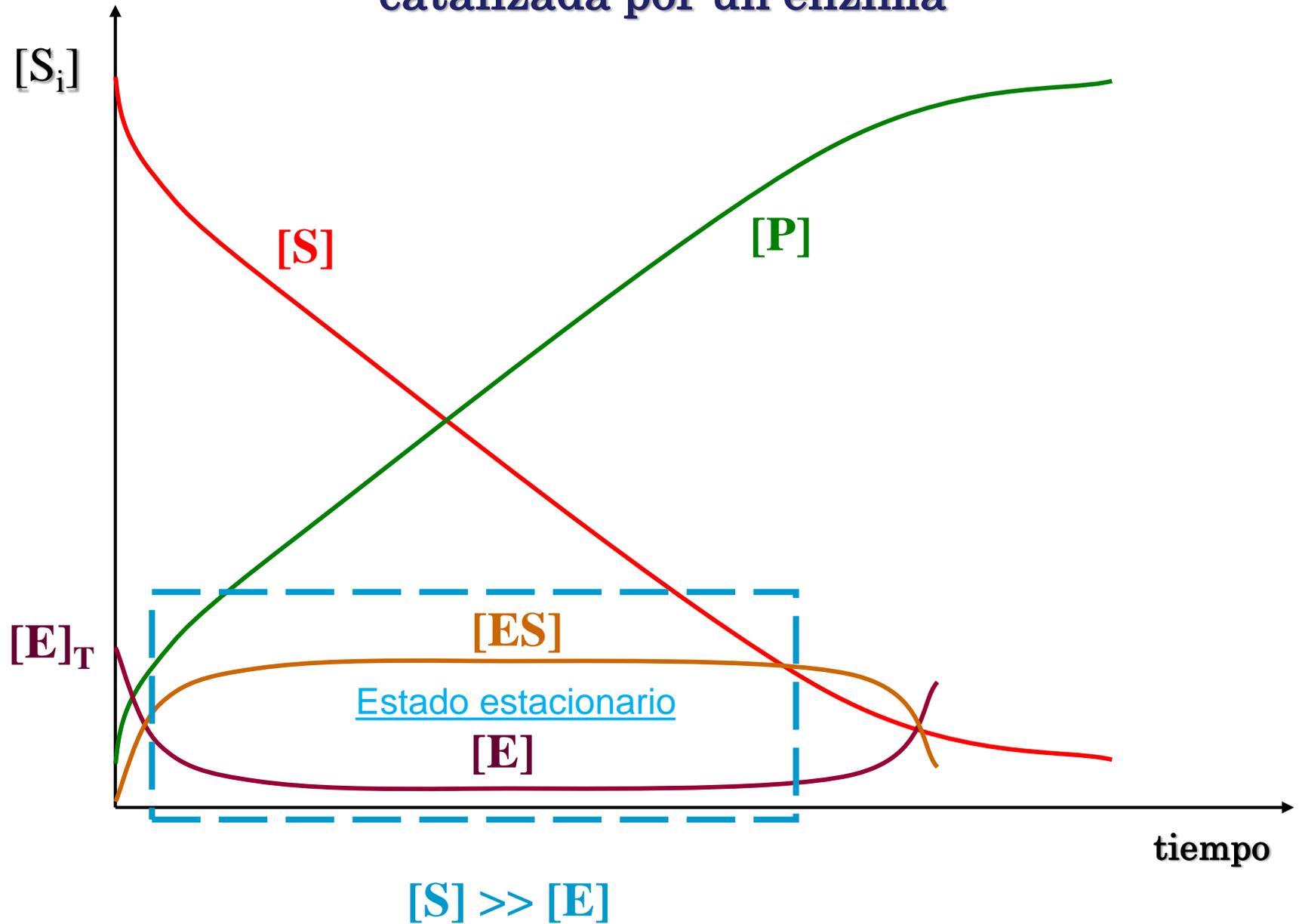
- ¿Cuál es el mecanismo de catálisis de una enzima?
- ¿Qué factores afectan la catálisis?
- ¿Cómo se regula la velocidad de catálisis enzimática?

Curva de Progreso



Indica cómo cambia la concentración de S y P en el tiempo

Curva de progreso para una reacción catalizada por un enzima



Cinética Michaelis - Menten



Leonor Michaelis,
1875–1949

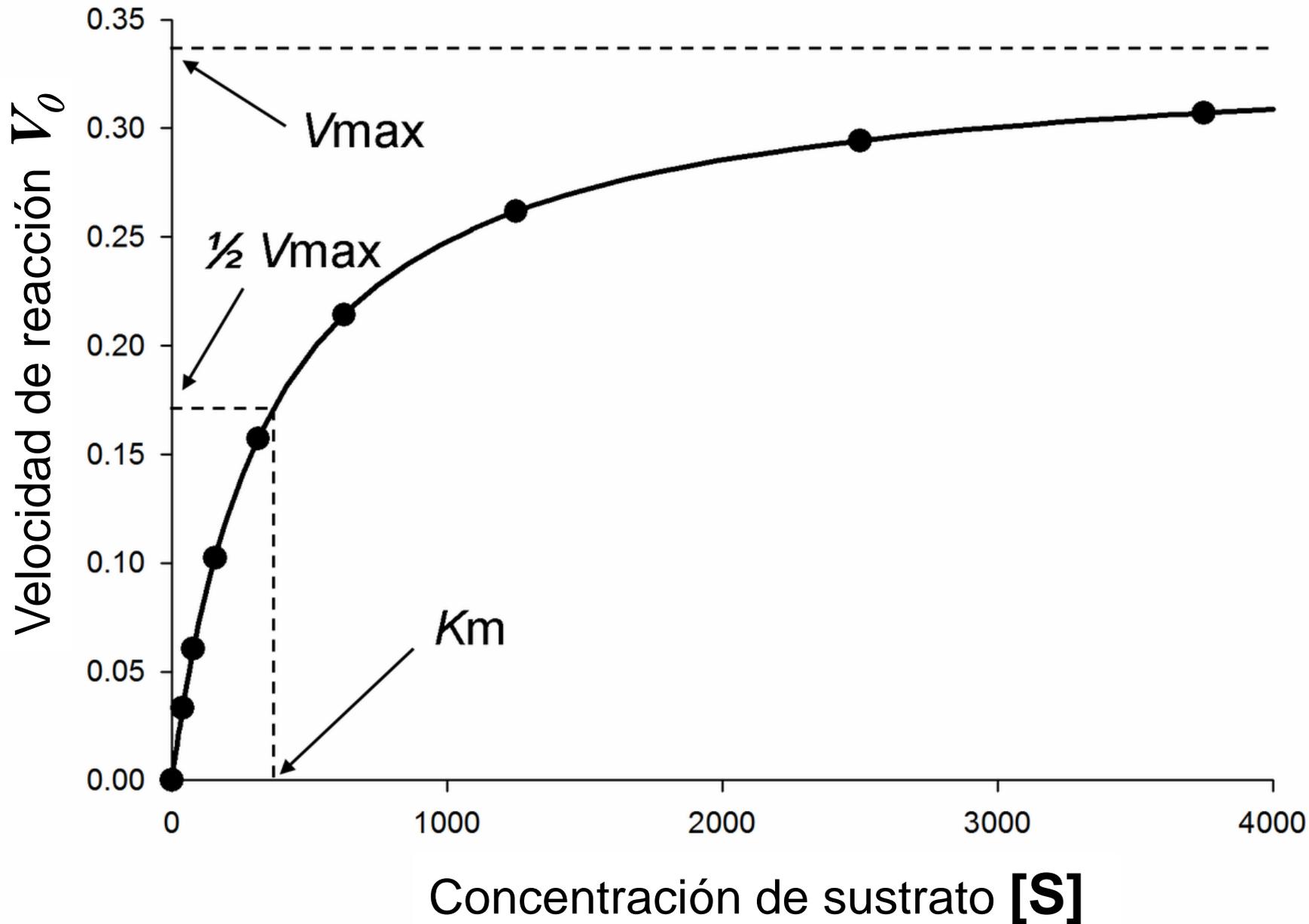


Maud Menten,
1879–1960

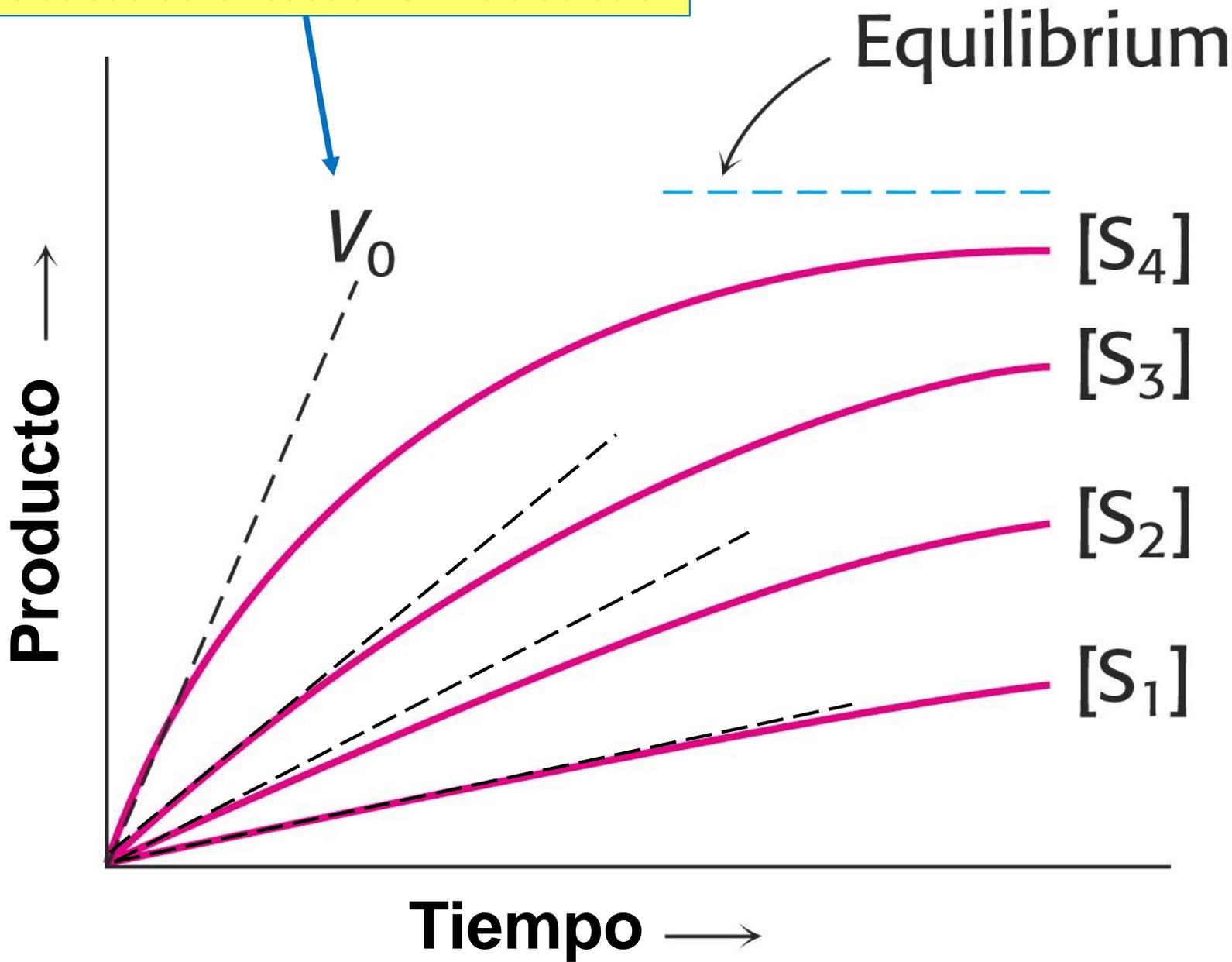
Michaelis y Menten desarrollaron un modelo que intenta explicar las reacciones enzimáticas (1913)

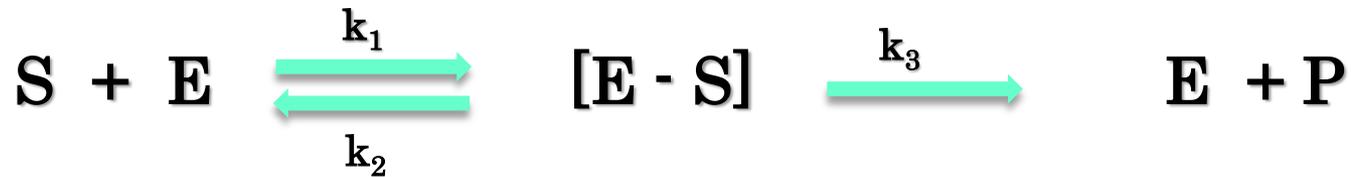
Michaelis L and Menten M L 1913 Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z.* **49**
333–369

Curva de Michaelis - Menten



La velocidad de la reacción al inicio de esta





Consideraciones:

- Sistema en Estado Estacionario : $[ES]$ cte.
- $E_{\text{total}} = E_{\text{libre}} + ES = \text{cte.}$
- Se mide vel. inicial $\therefore v = k_3 [ES]$
- Cuando toda E está como ES : E saturada ; $v = V_{\text{max}}$; S = concentración saturante

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



Velocidad de formación de [ES] = $k_1 [S] [E] = k_1 [S] (E_{\text{total}} - [ES])$

Velocidad de desaparición de [ES] = $k_2 [ES] + k_3 [ES]$

Se asume que el sistema se encuentra en **estado estacionario**, por lo tanto $[ES] = \text{constante}$

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

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



$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

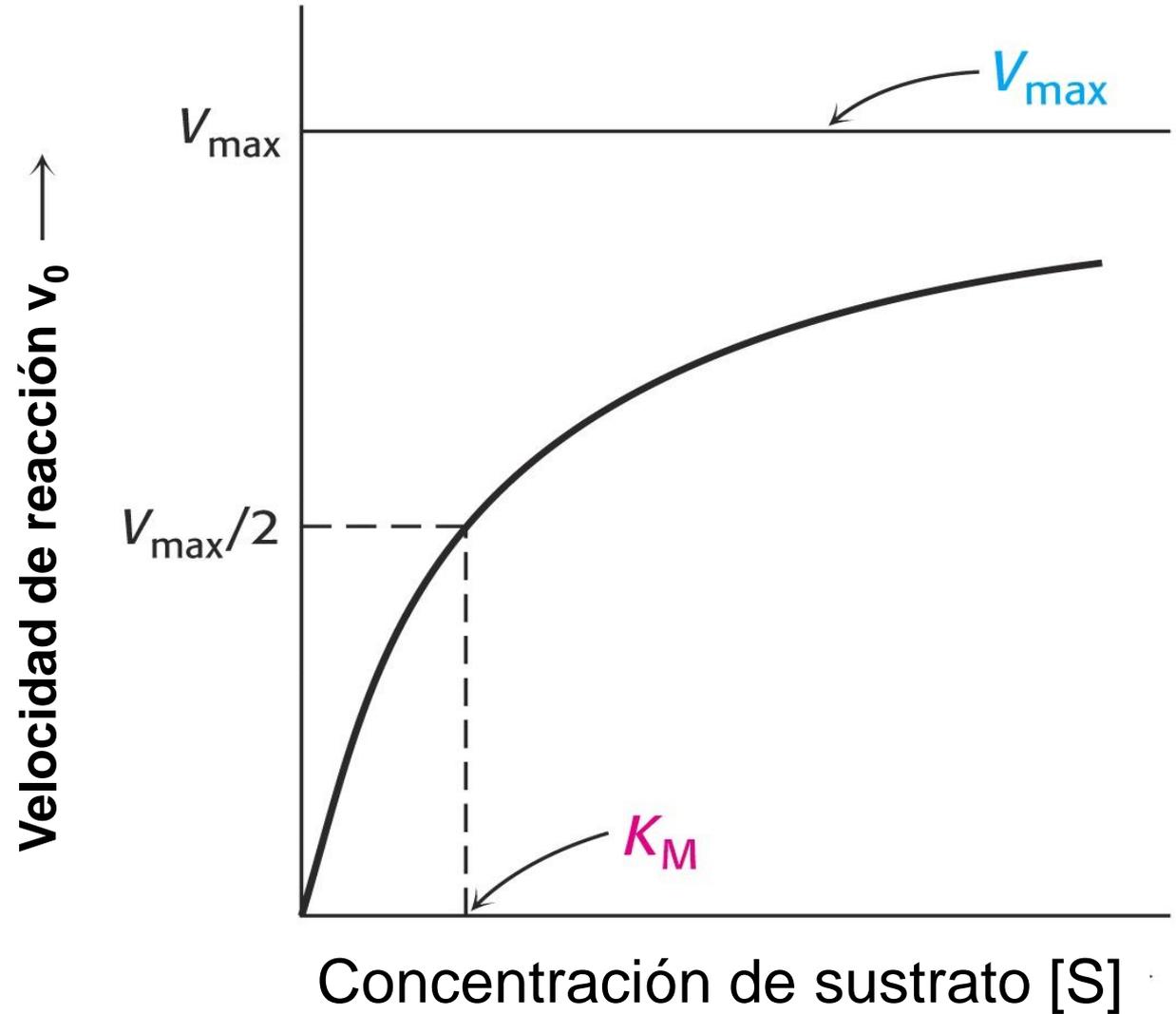
V_0 corresponde a la Velocidad inicial

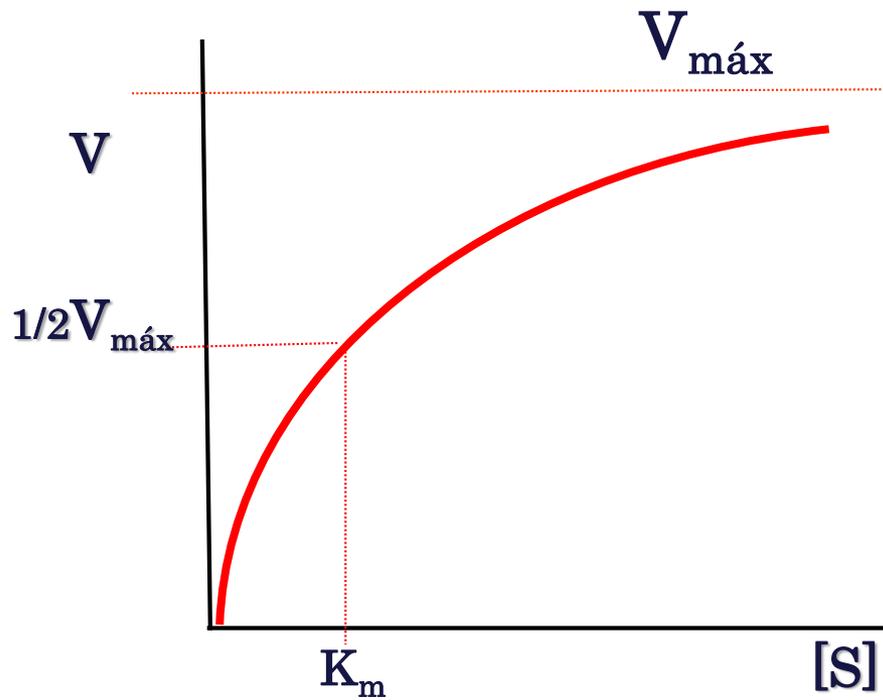
Cuando la enzima está saturada se logra la Velocidad máxima V_{\max}

$K_m =$ Constante de Michaelis $(k_3 + k_2)/k_1$

$V_{\max} = k_3 [E_0]$

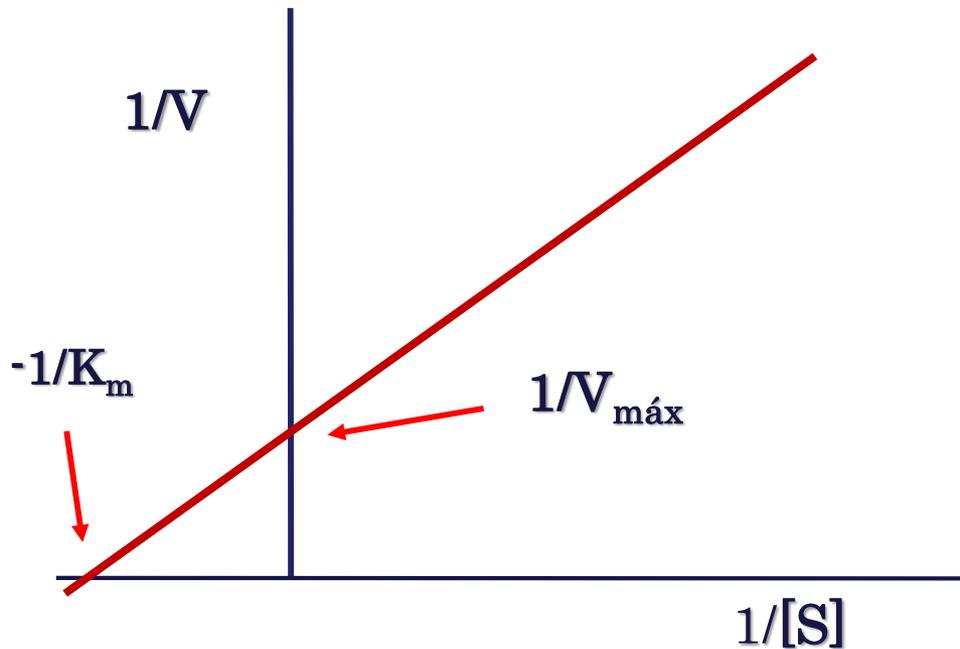
Efecto de [S] sobre la velocidad de una Reacción Enzimática





$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

MICHAELIS - MENTEN



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

LINEWEAVER - BURK

(Gráfico de dobles
recíprocos)

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_{\text{T}}}$$

Número de recambio de una enzima es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto en unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando esta está saturada de sustrato.

Enzima	Sustrato	K_M (M)	k_{cat} (S ⁻¹)	k_{cat} / K_M (M ⁻¹ S ⁻¹)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	$9,5 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^8$
Anhidrasa carbónica	CO ₂	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^6$	$8,3 \times 10^7$
	HCO ₃ ⁻	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$
Catalasa	H ₂ O ₂	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
Quimotripsina	N-acetilglicina etil ester	$4,4 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$
	N-acetiltirosina etil ester	$6,6 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^5$

Número de recambio de algunas enzimas

TABLE 6-7 Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

Definiciones estructurales

HOLOENZIMA

- Estructura proteica y otro componente iónico o molecular

Apoenzima

- Parte proteica

Parte no proteica

- Cofactores
- Coenzimas

Si la parte no proteica está firmemente unida a la proteína:
Grupo PROSTÉTICO

¿Cómo se modifica la actividad de las enzimas?



Componentes

- Sustrato
- Enzimas
- Coenzima

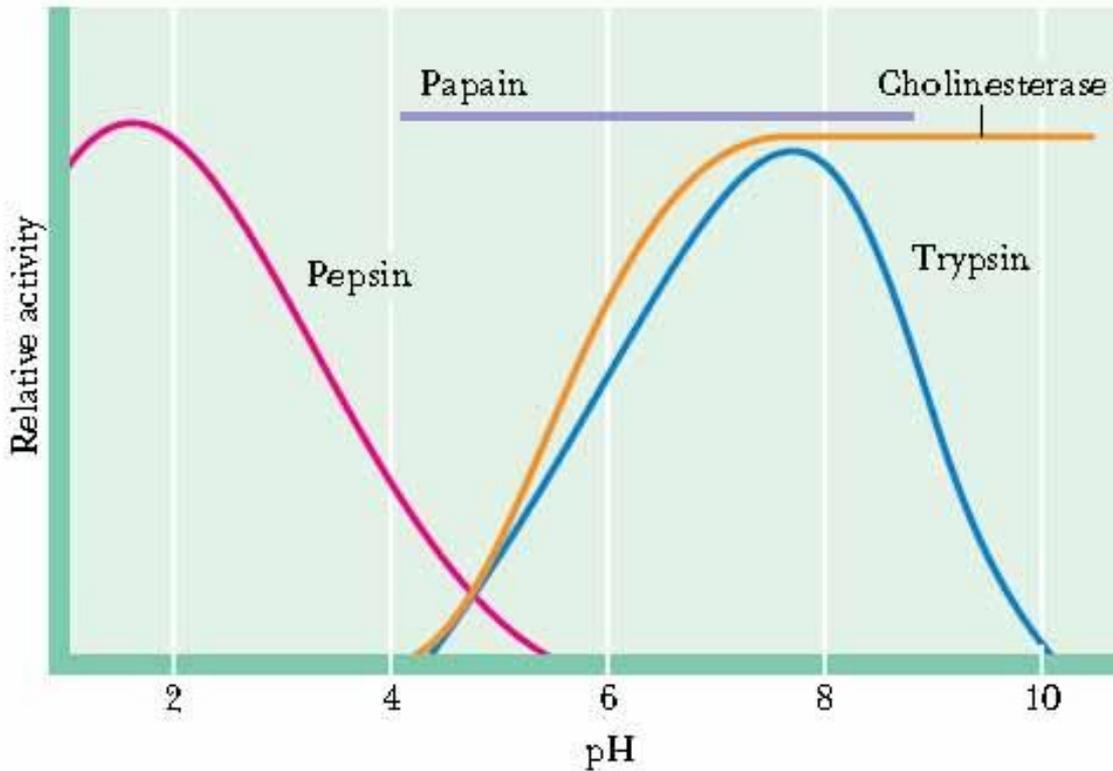
Condiciones ambientales

- Temperatura
- pH
- Fuerza iónica

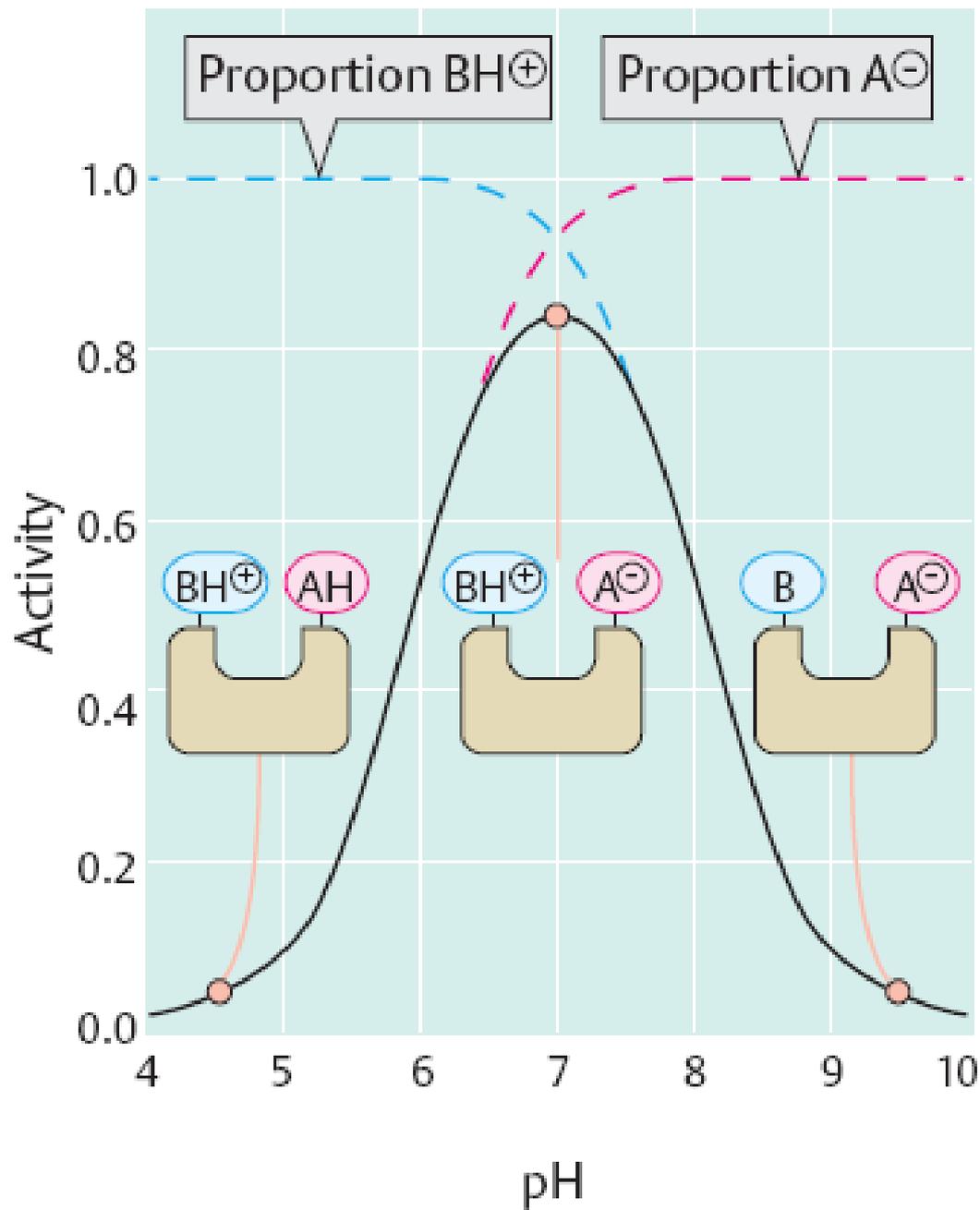
Presencia de moléculas que afectan la interacción E-S

- Metabolitos
- Mensajeros celulares
- Fármacos, toxinas, etc.

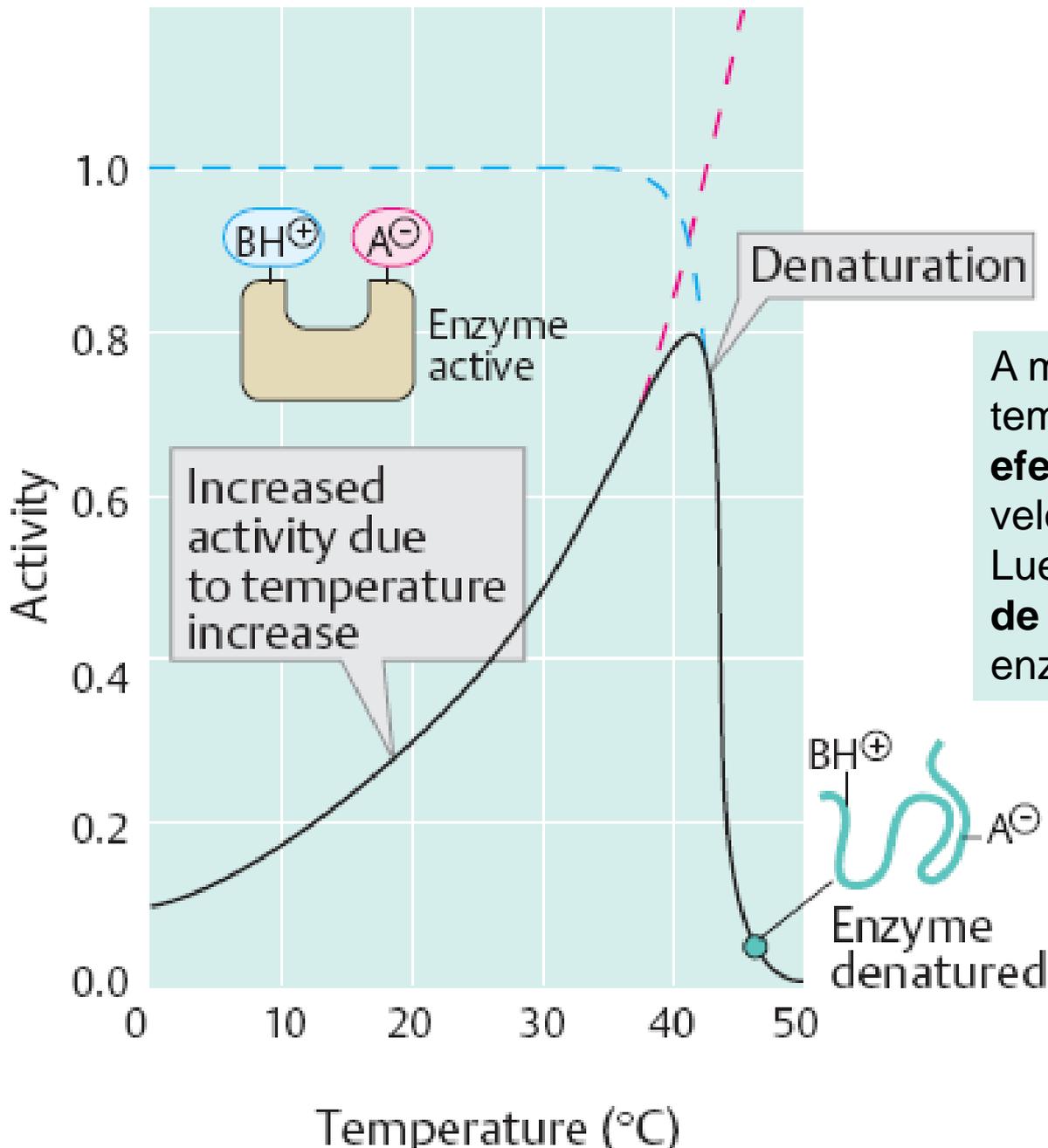
Efecto del pH sobre la actividad enzimática



Optimum pH of Some Enzymes	
Enzyme	Optimum pH
Pepsin	1.5
Catalase	7.6
Trypsin	7.7
Fumarase	7.8
Ribonuclease	7.8
Arginase	9.7



Cuando varía el pH del medio, cambia el estado iónico de los **grupos ionizables**. Si cambian su estado iónico los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima, se altera la catálisis



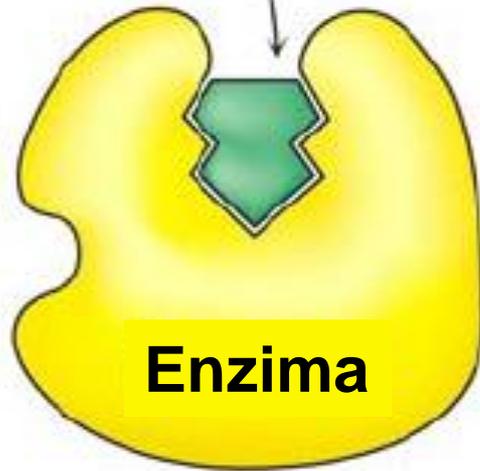
A medida que aumenta la temperatura se produce un **efecto cinético** (mayor velocidad) hasta cierto punto. Luego se manifiesta un **efecto de desnaturalización** de la enzima.

Modificación de la actividad enzimática por la acción de:

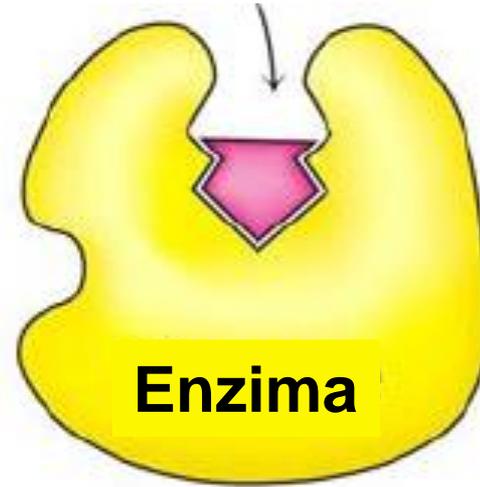


- Inhibidores
- Inactivadores
- Moduladores

Sustrato

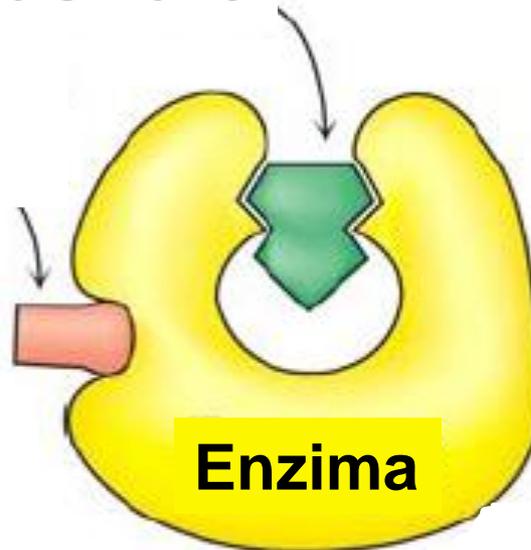


Inhibidor
competitivo

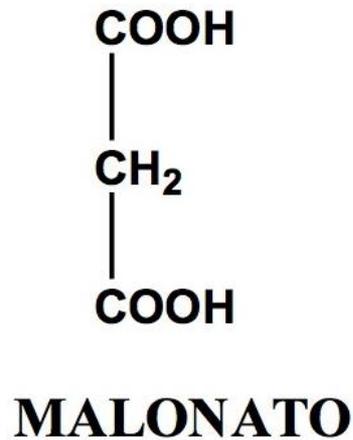
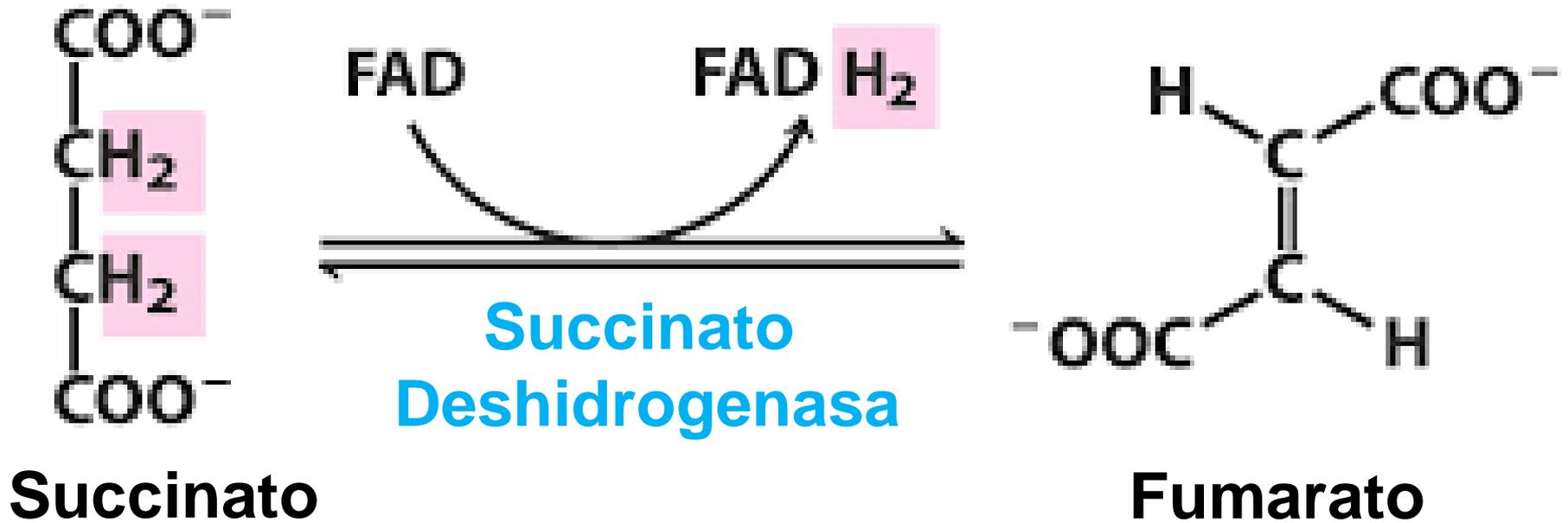


Sustrato

Inhibidor no
competitivo

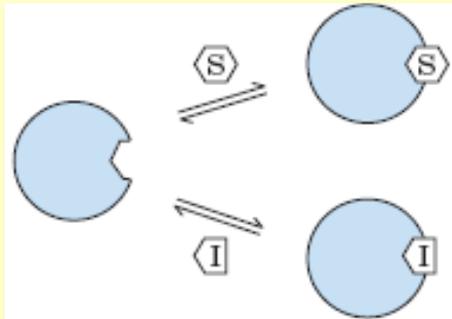


Inhibición Competitiva

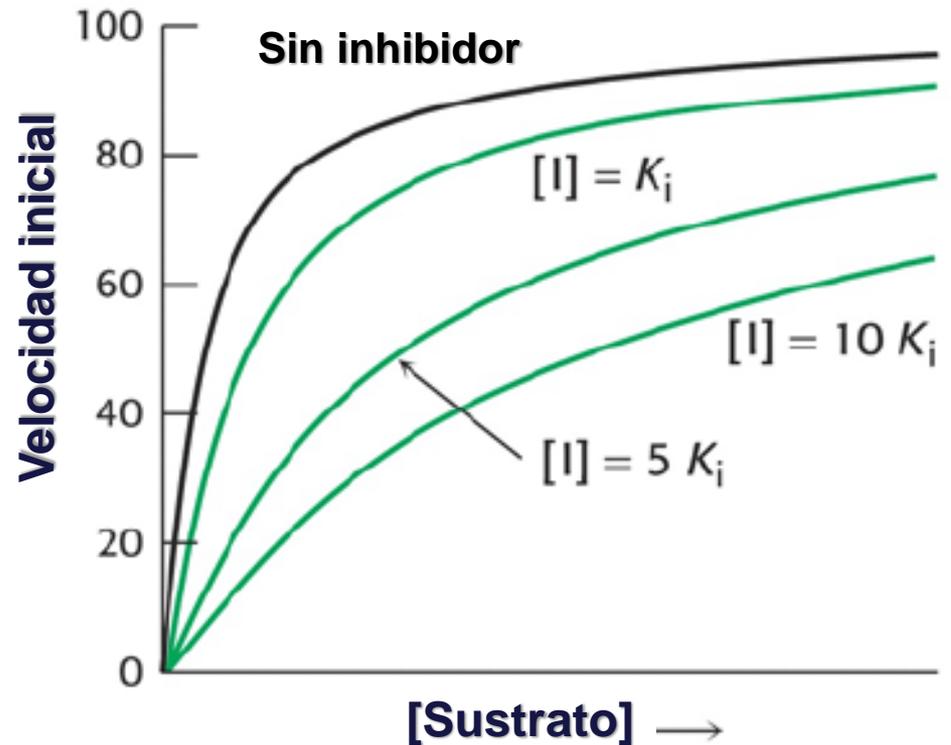
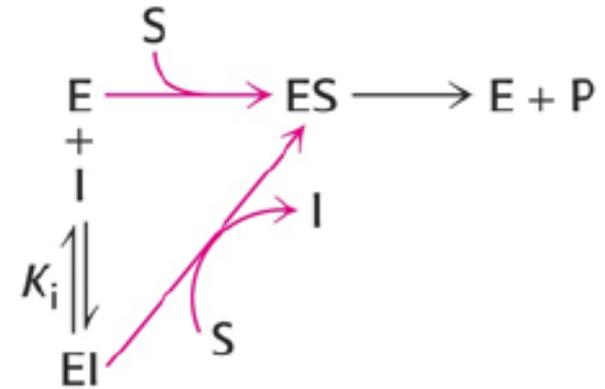


Inhibición Competitiva

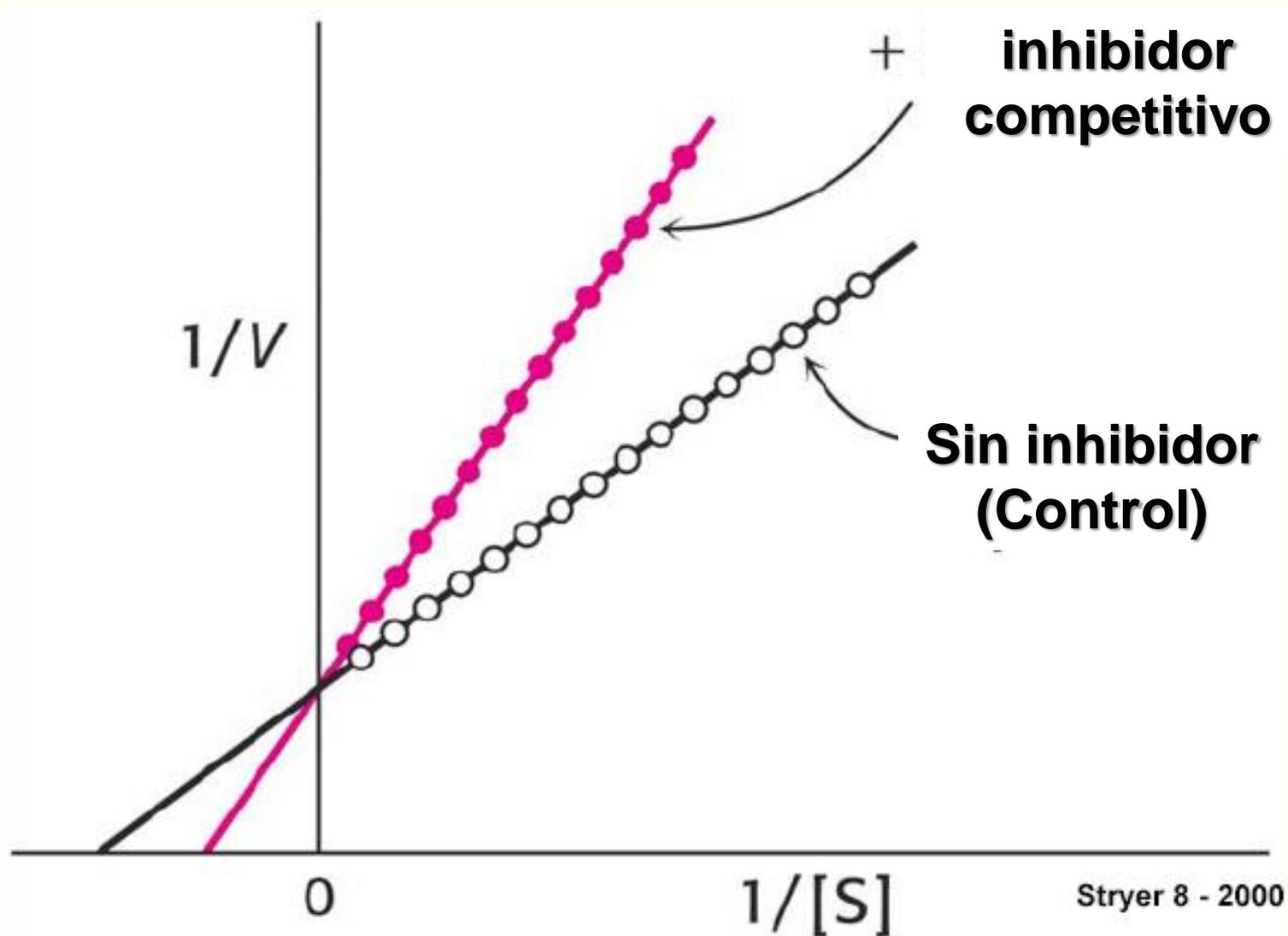
- Reversible
- No se afecta la V máxima



Stryer 8 - 2000

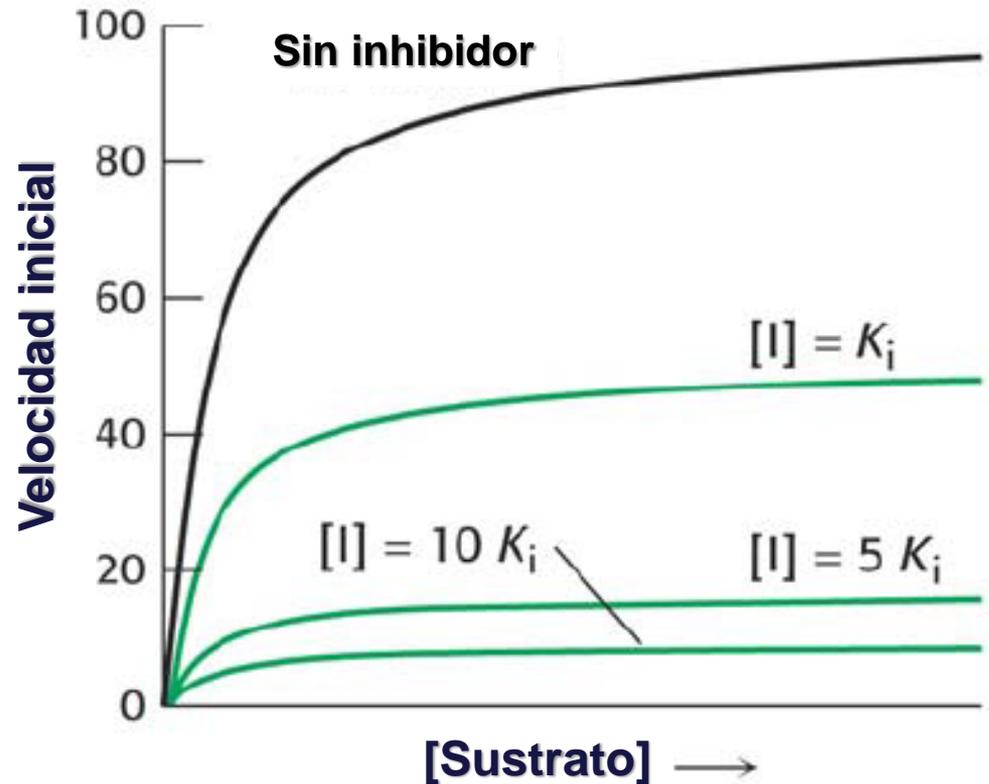
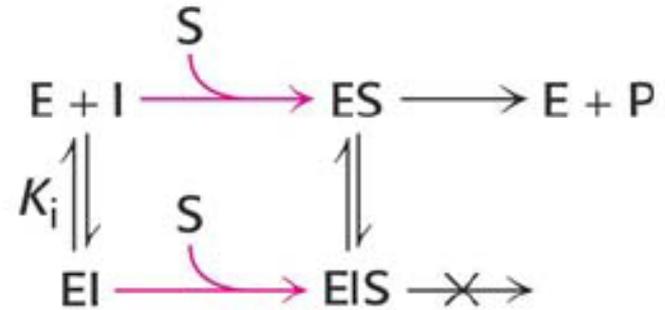
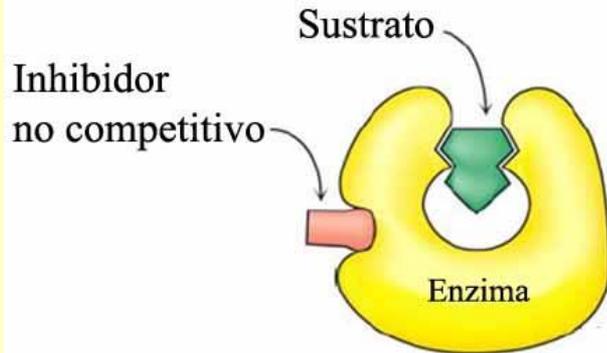


Doble Recíproca- Inhibición Competitiva

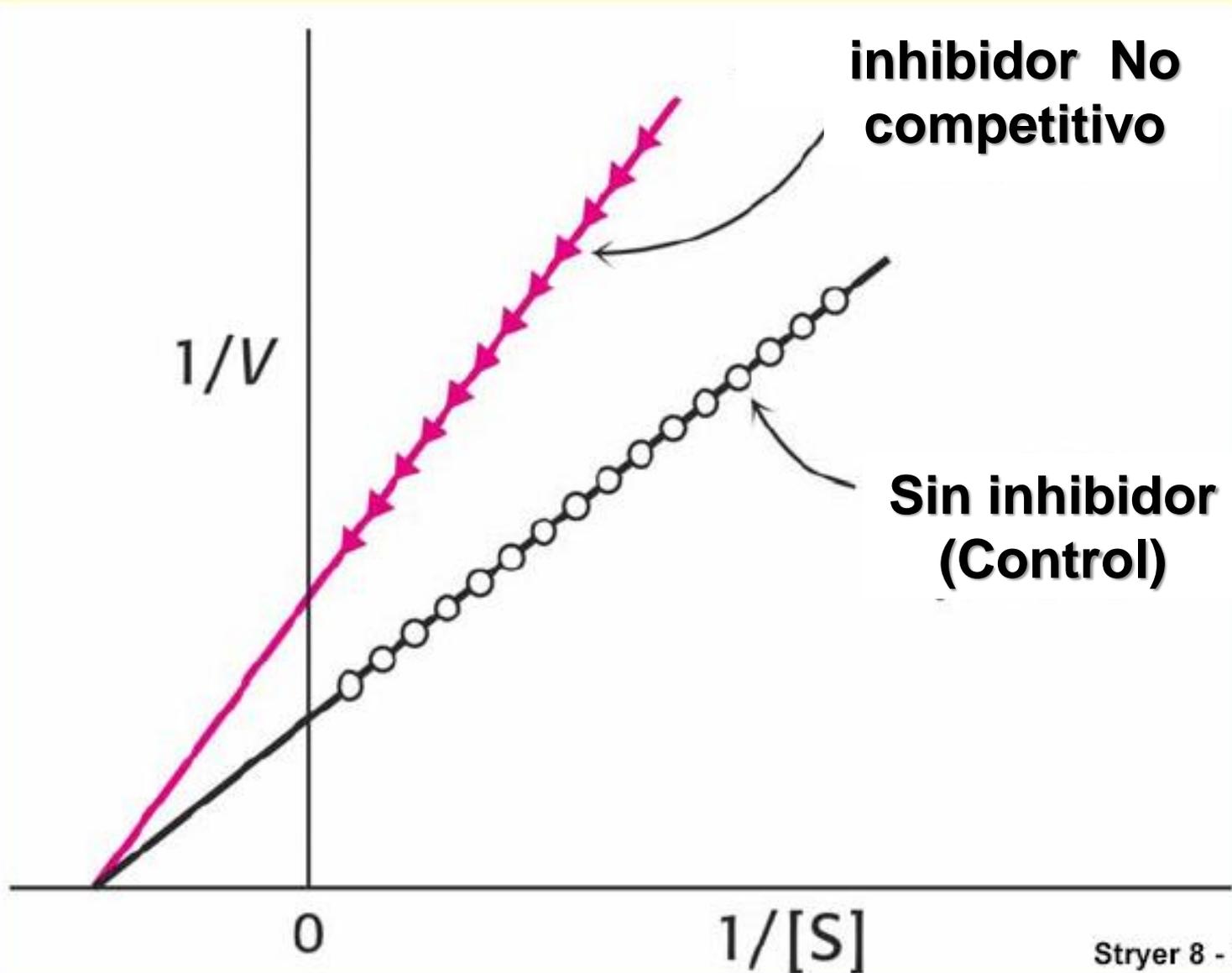


Inhibición NO Competitiva

- Reversible
- No se afecta la K_m
- Disminuye el N° de recambio

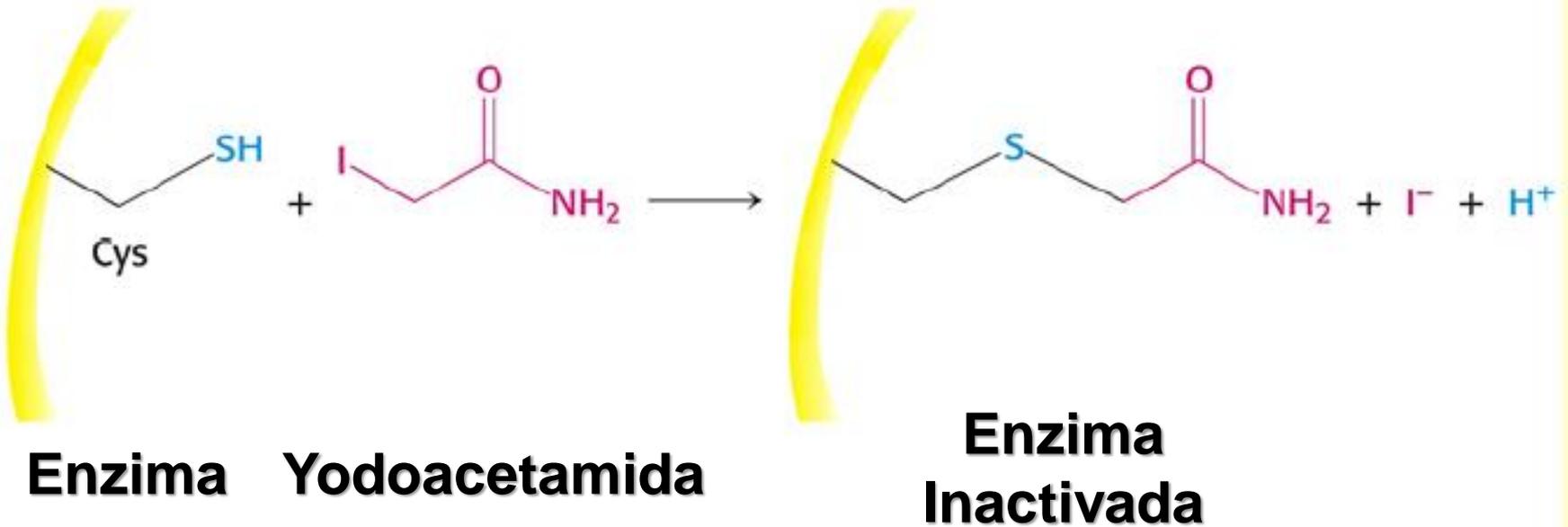


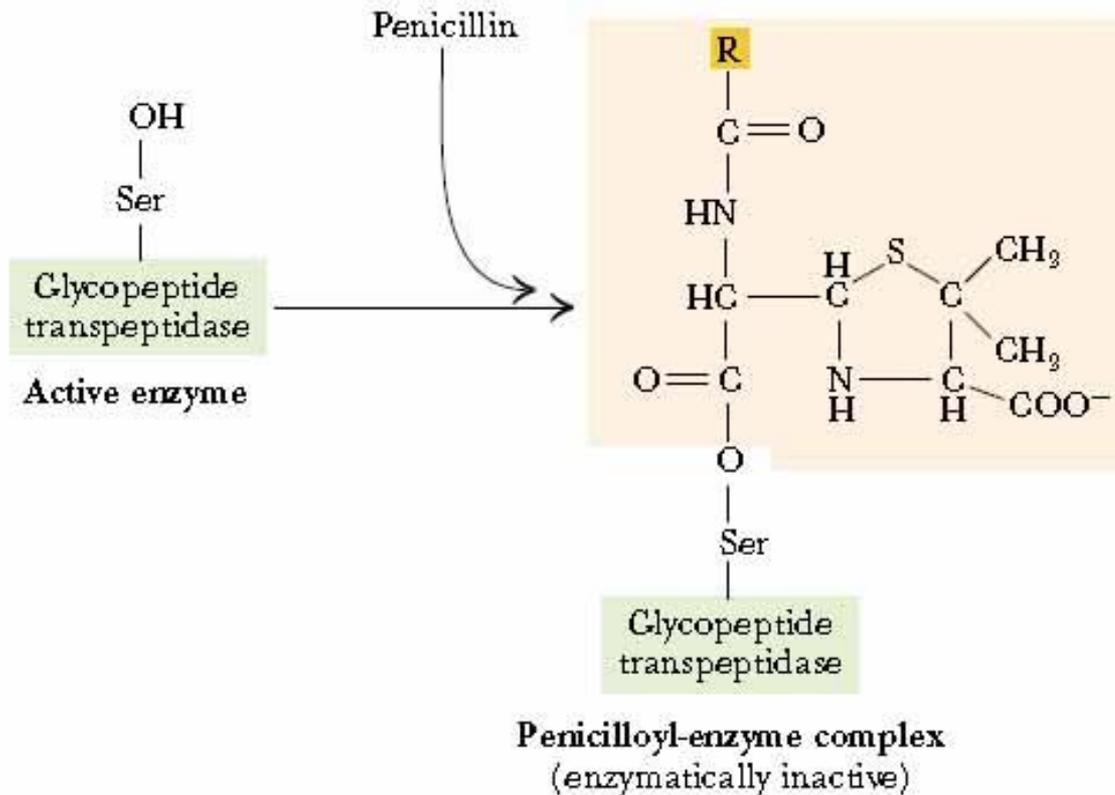
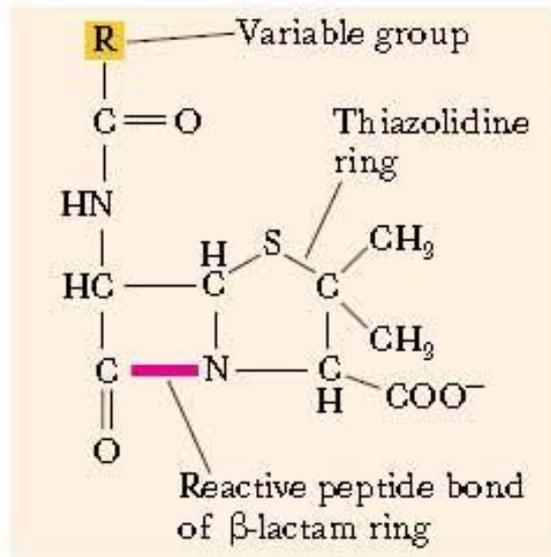
Doble Recíproca- Inhibición NO Competitiva



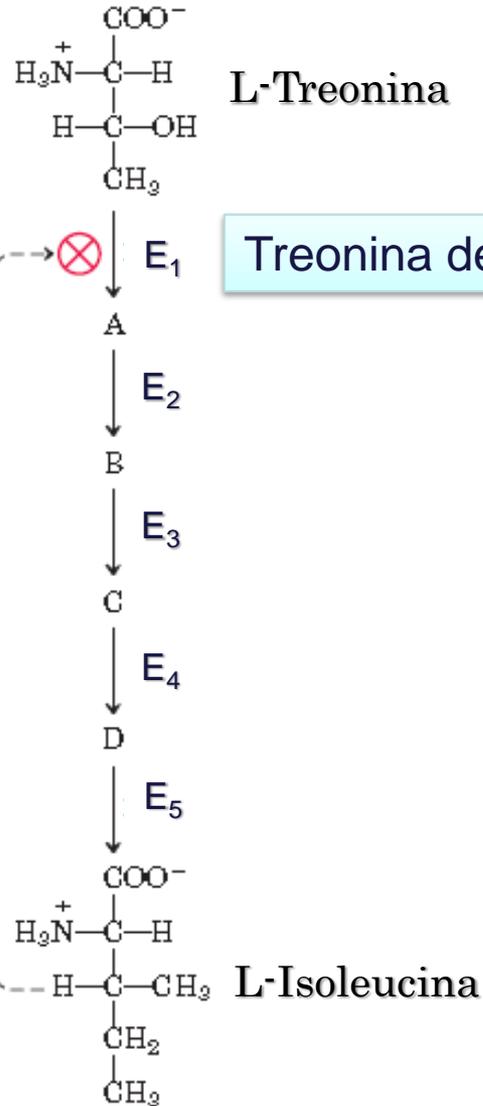
Inactivación de la actividad enzimática

Proceso Irreversible

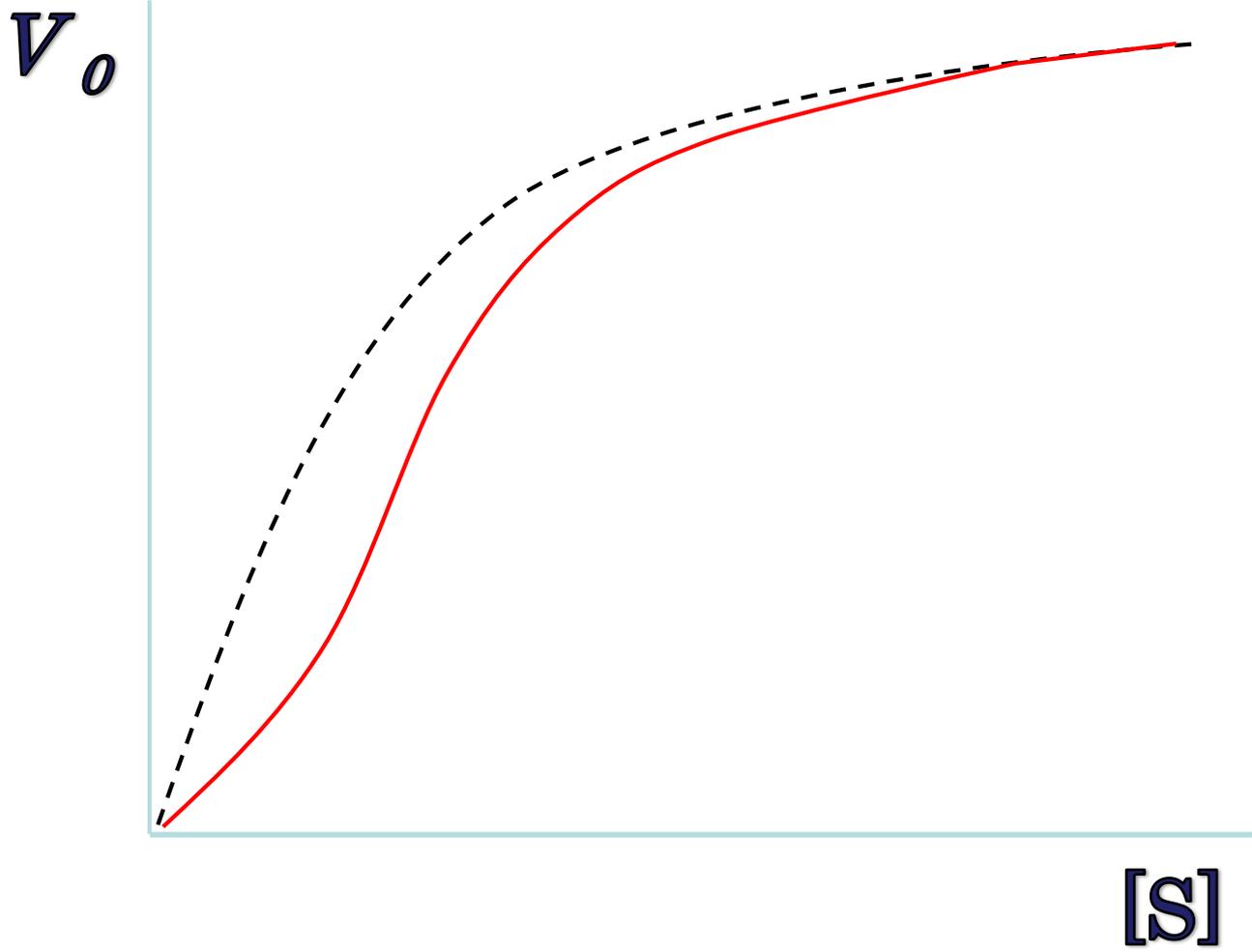




ENZIMAS ALOSTÉRICAS

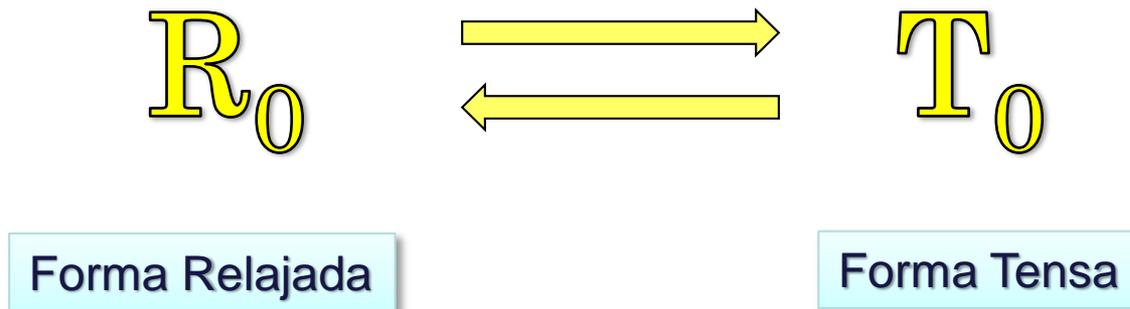


Las enzimas alostéricas están en puntos de regulación clave de una ruta metabólica



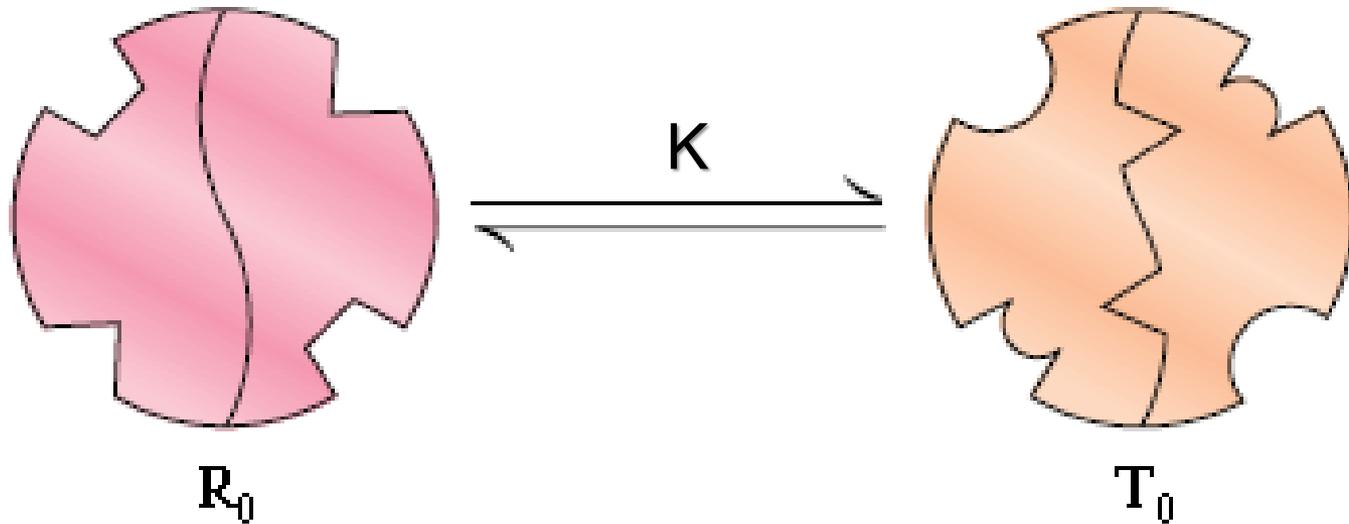
Las **enzimas alostéricas** tienen una curva cinética de tipo sigmoideo

En 1965 Jacques Monod, Jeffrier Wyman y Jean-Pierre Changeux, propusieron un modelo que explicaría el comportamiento de las enzimas alostéricas. (modelo MWC)



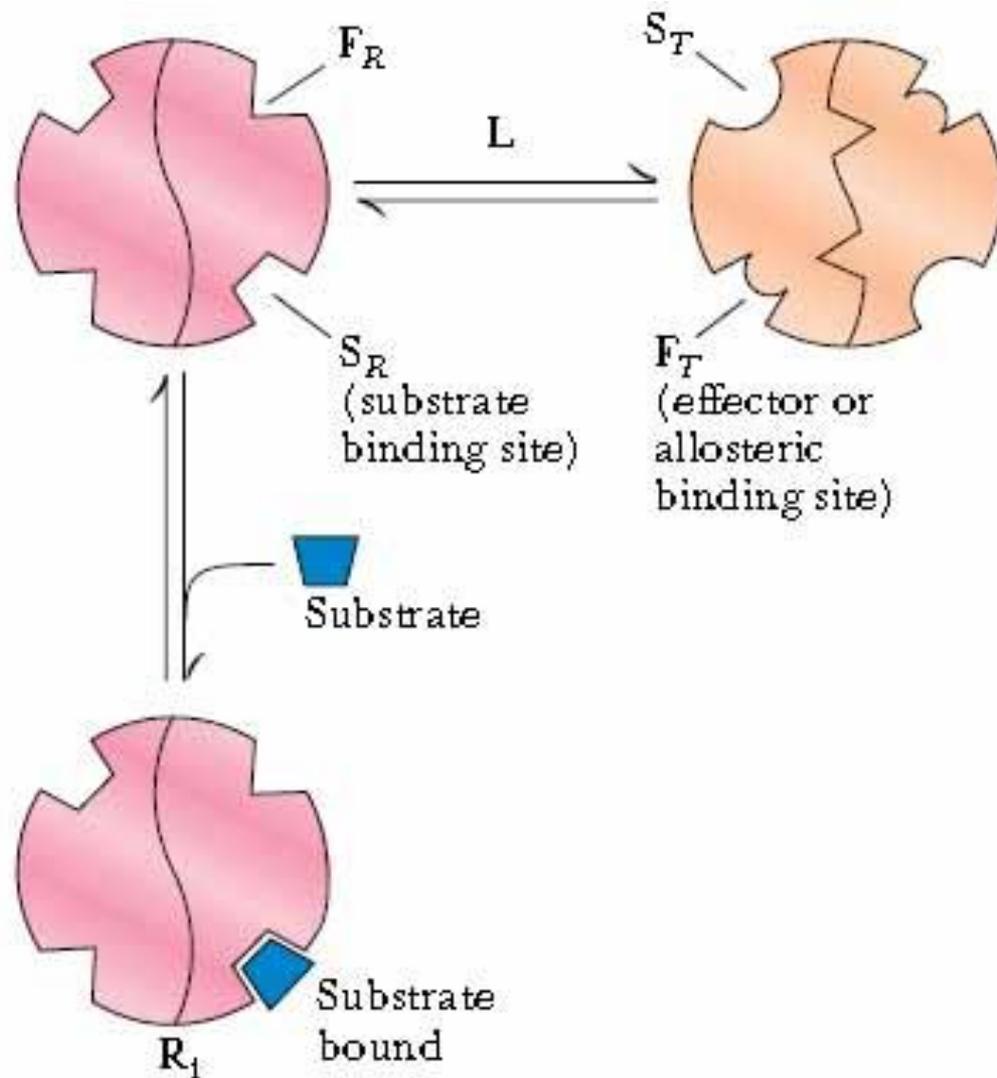
Se plantea un equilibrio entre dos conformaciones de la enzima: la **forma relajada** con mayor actividad y la **forma tensa** con baja actividad.

Proteína dimérica en dos estados conformacionales en equilibrio

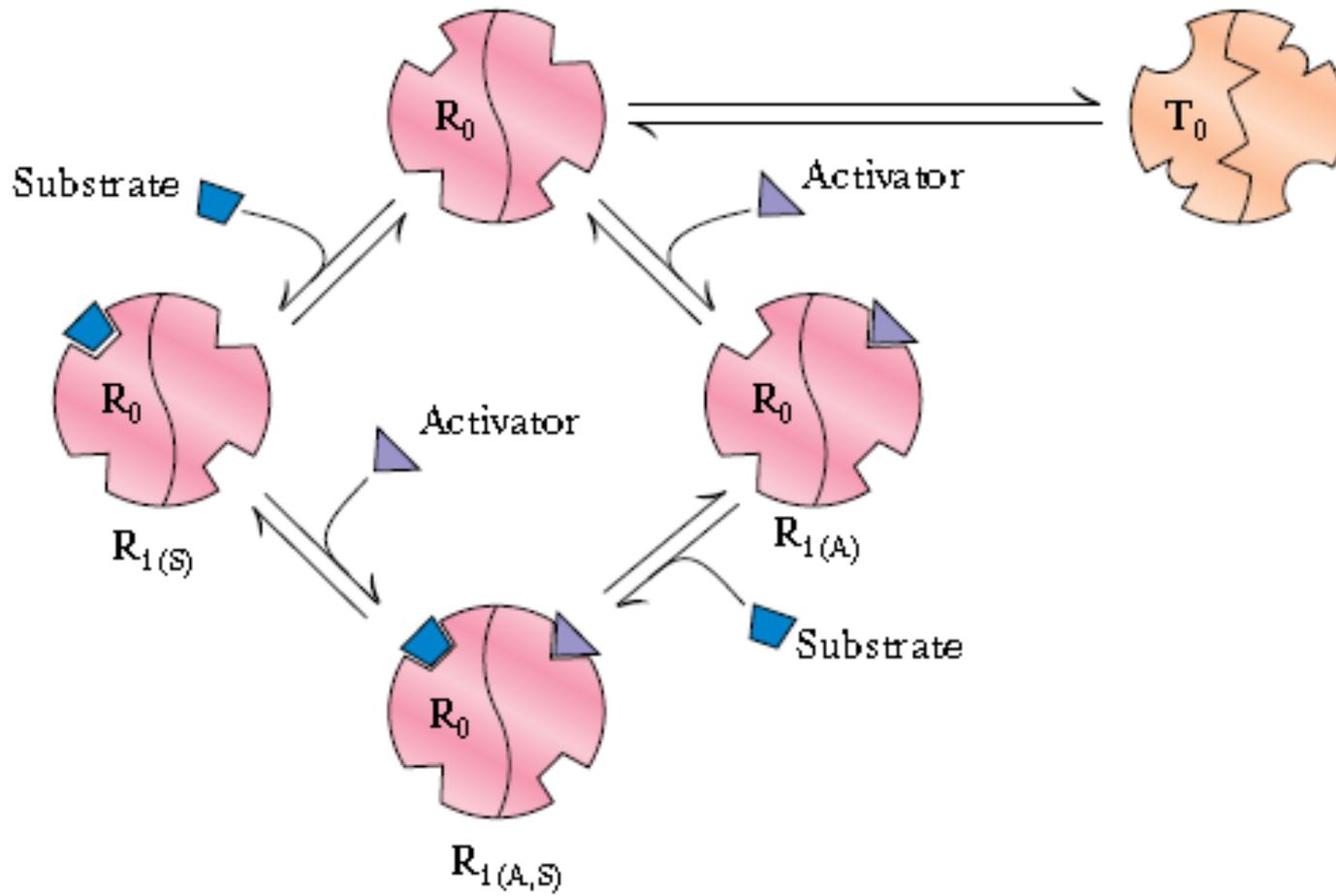


$$K = \frac{T_0}{R_0} \quad K \text{ es grande } (T_0 \gg R_0)$$

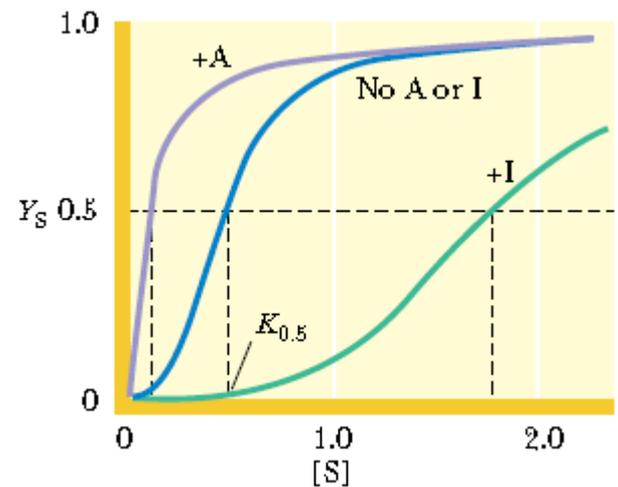
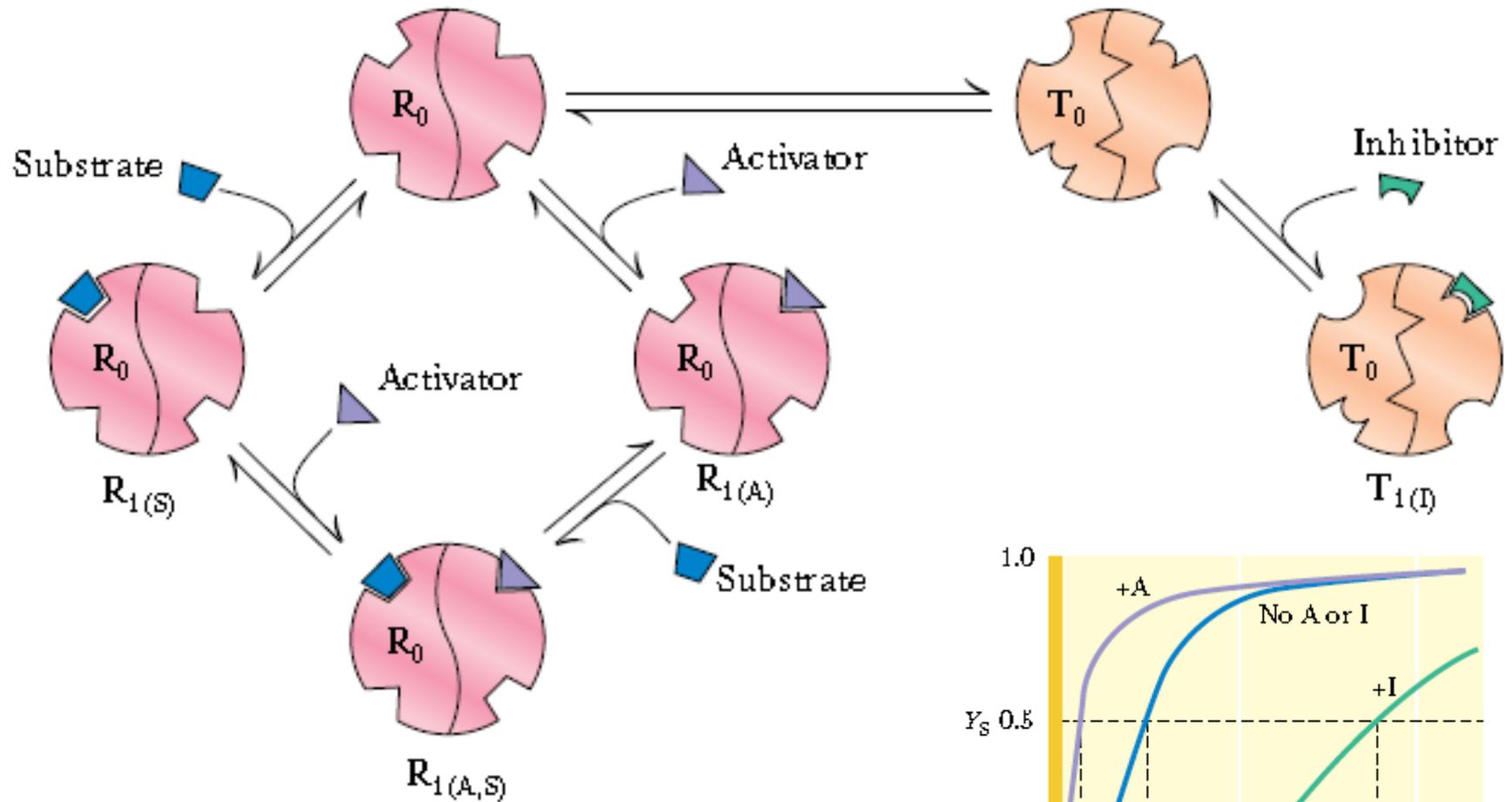
La unión del sustrato desplaza el equilibrio hacia la forma R



En presencia de una efector positivo (activador de la enzima) ▶

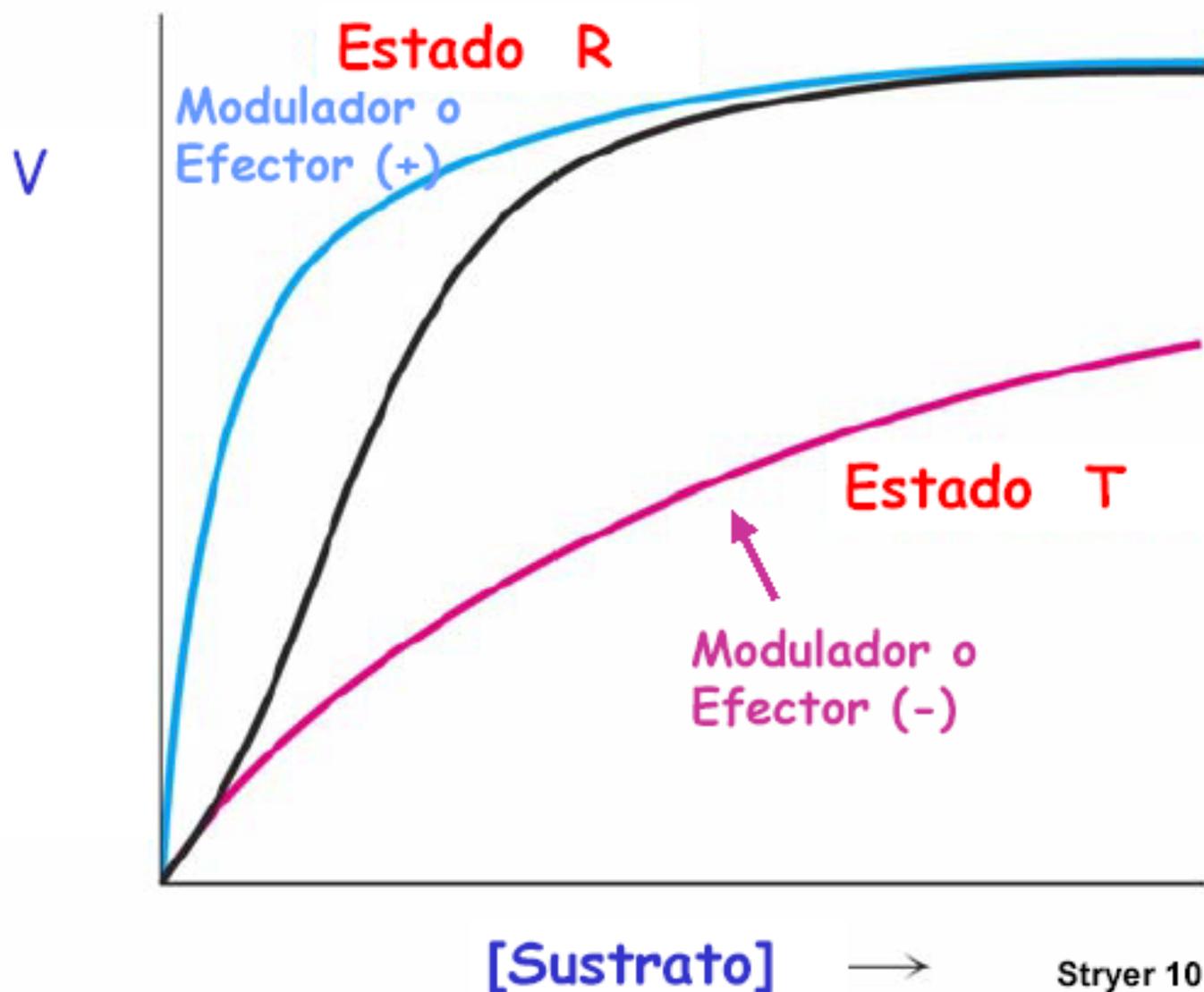


En presencia de un efector negativo (inhibidor de la enzima)

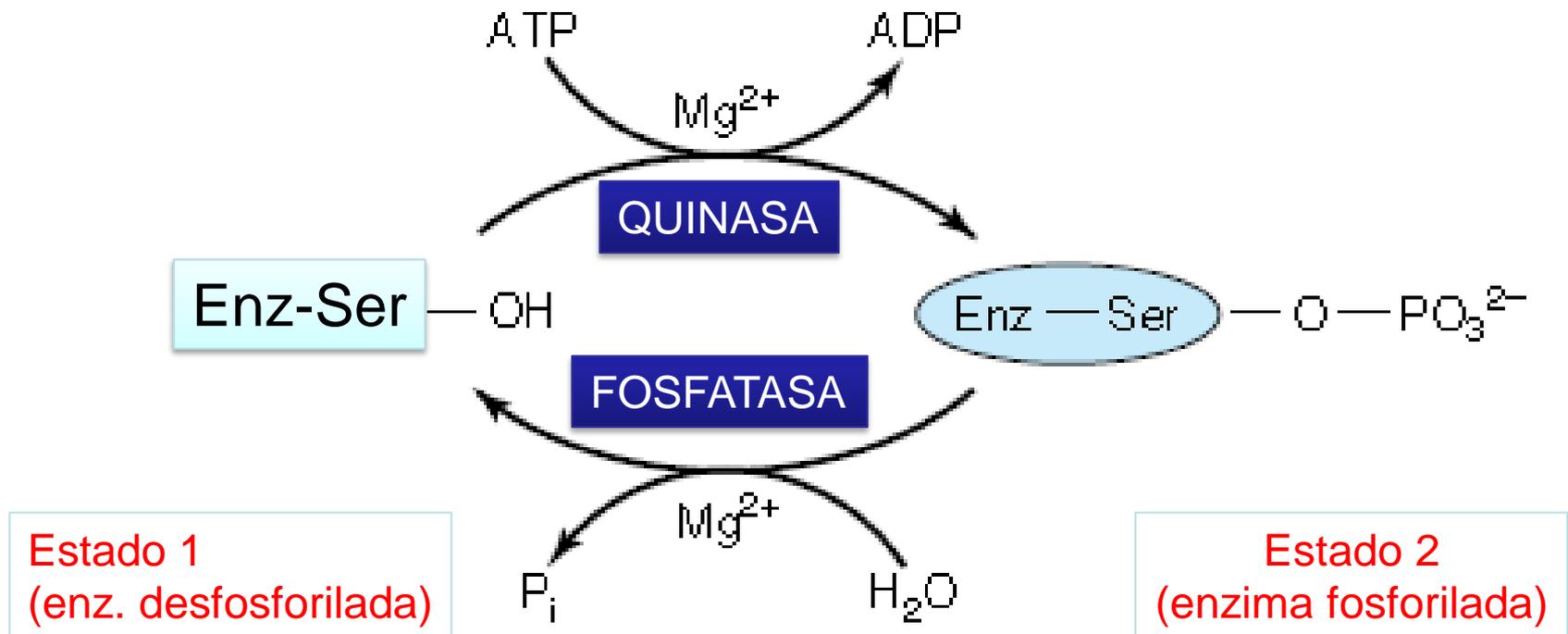


Y = saturación de la enzima

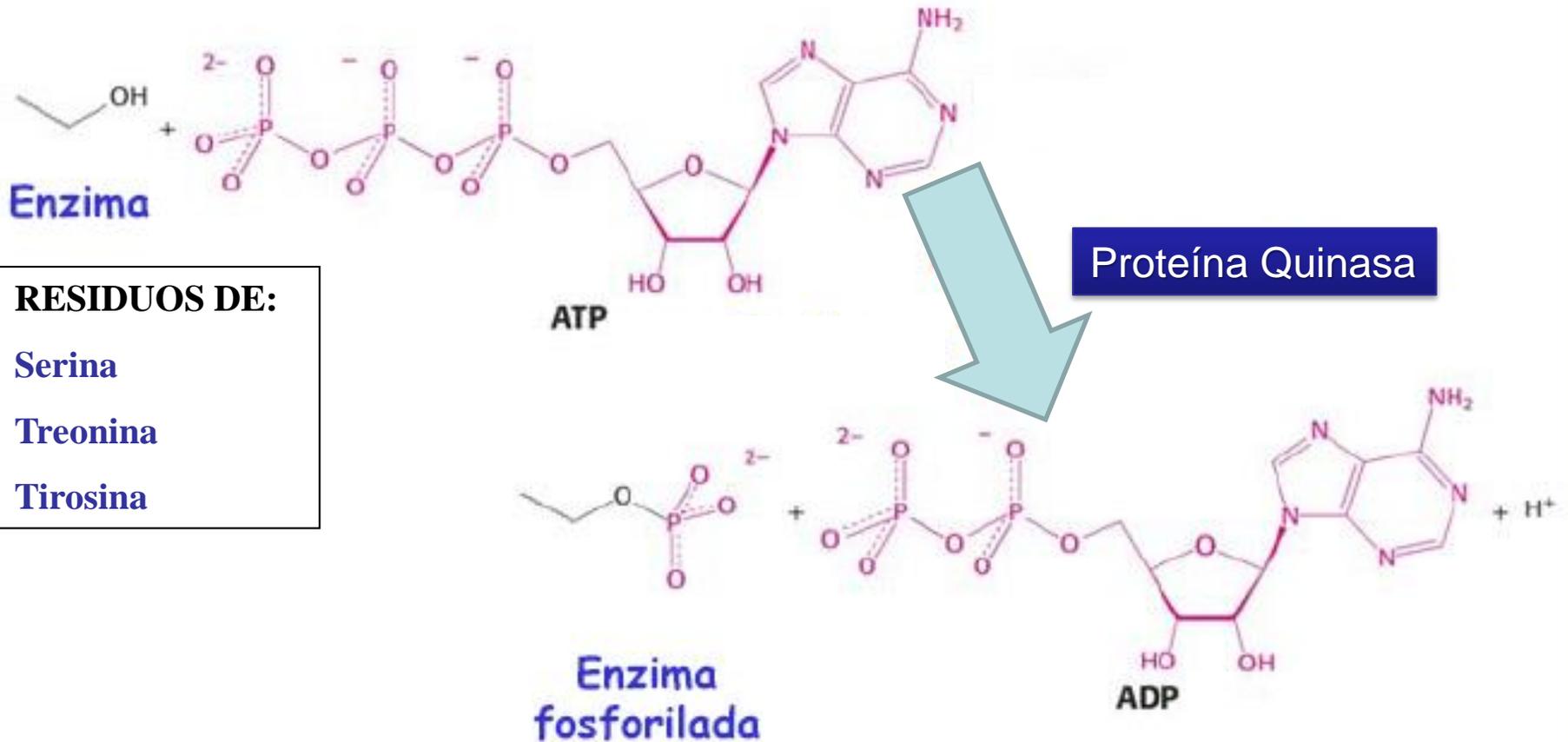
Enzimas Alostéricas Conformación Relajada (R) vs Conformación Tensa (T)



Modificación covalente de proteínas

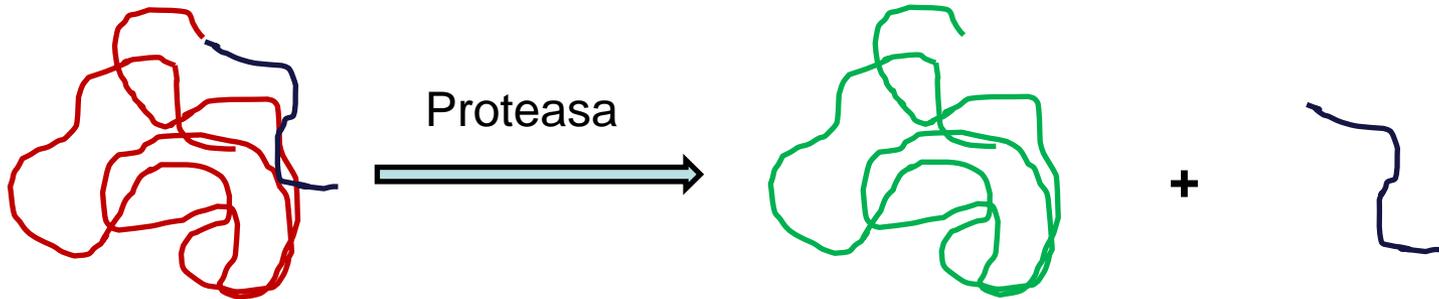


Modificación covalente de proteínas



Las Enzimas pueden activarse o inhibirse por modificación con fosfato

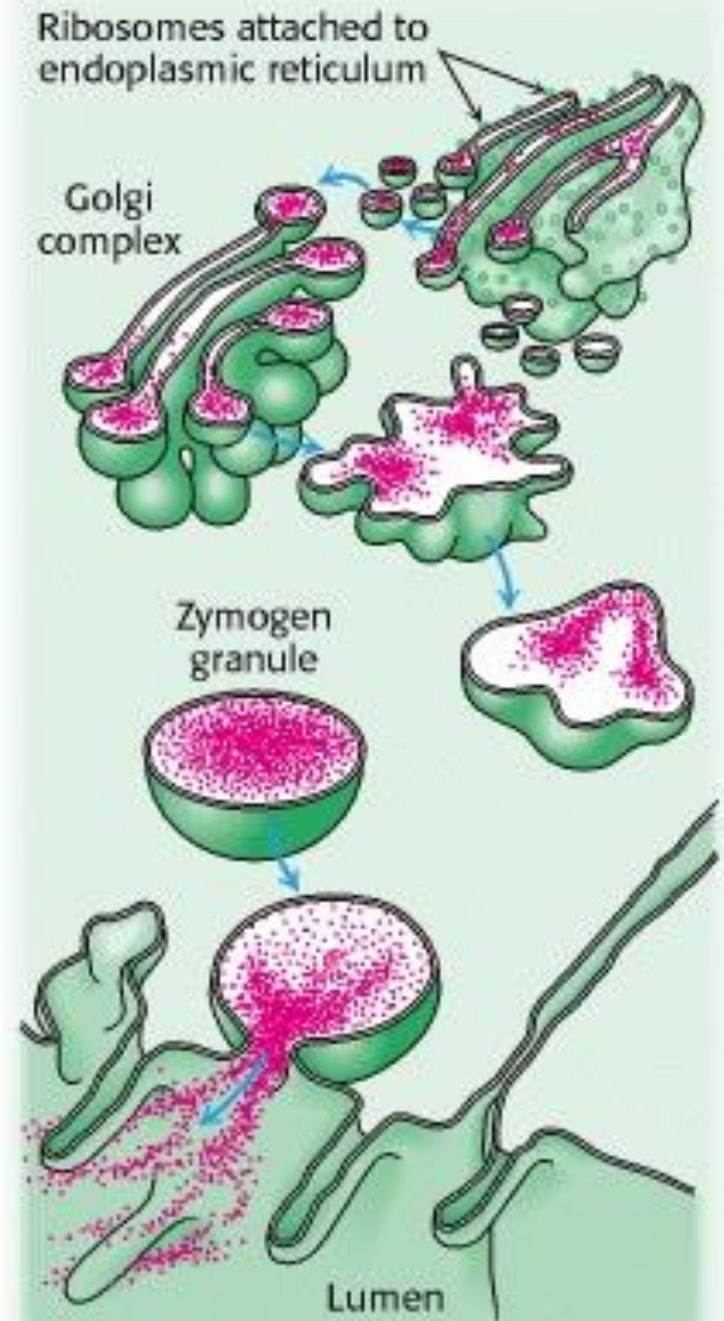
Activación de zimógenos (Proteólisis dirigida)



Proenzima o zimógeno
(conformación inactiva)

Enzima
(conformación activa)

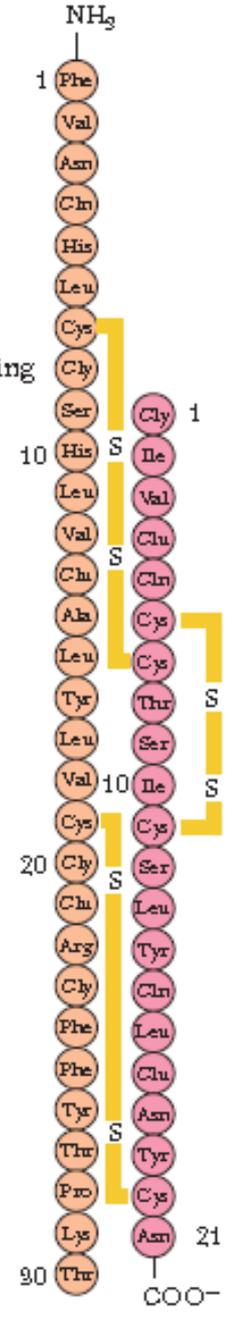
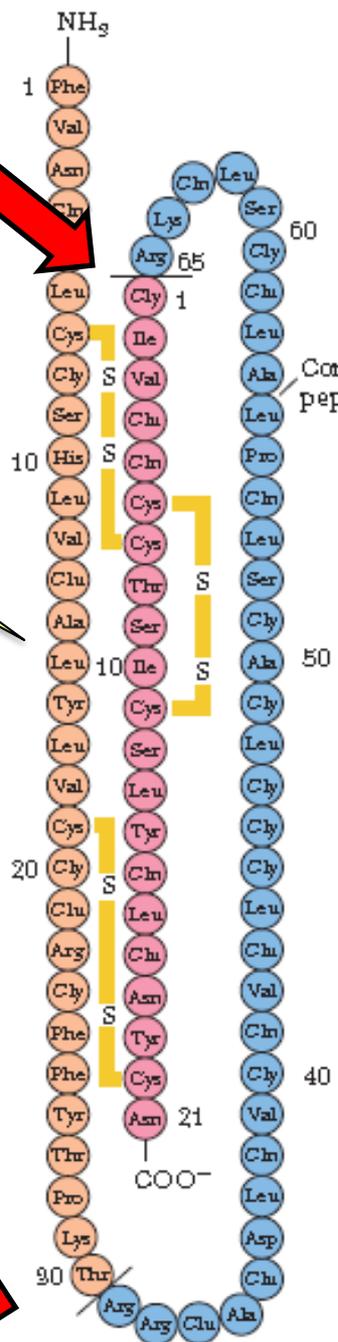
Muchas veces las enzimas se sintetizan en estado de zimógeno, un precursor inactivo.



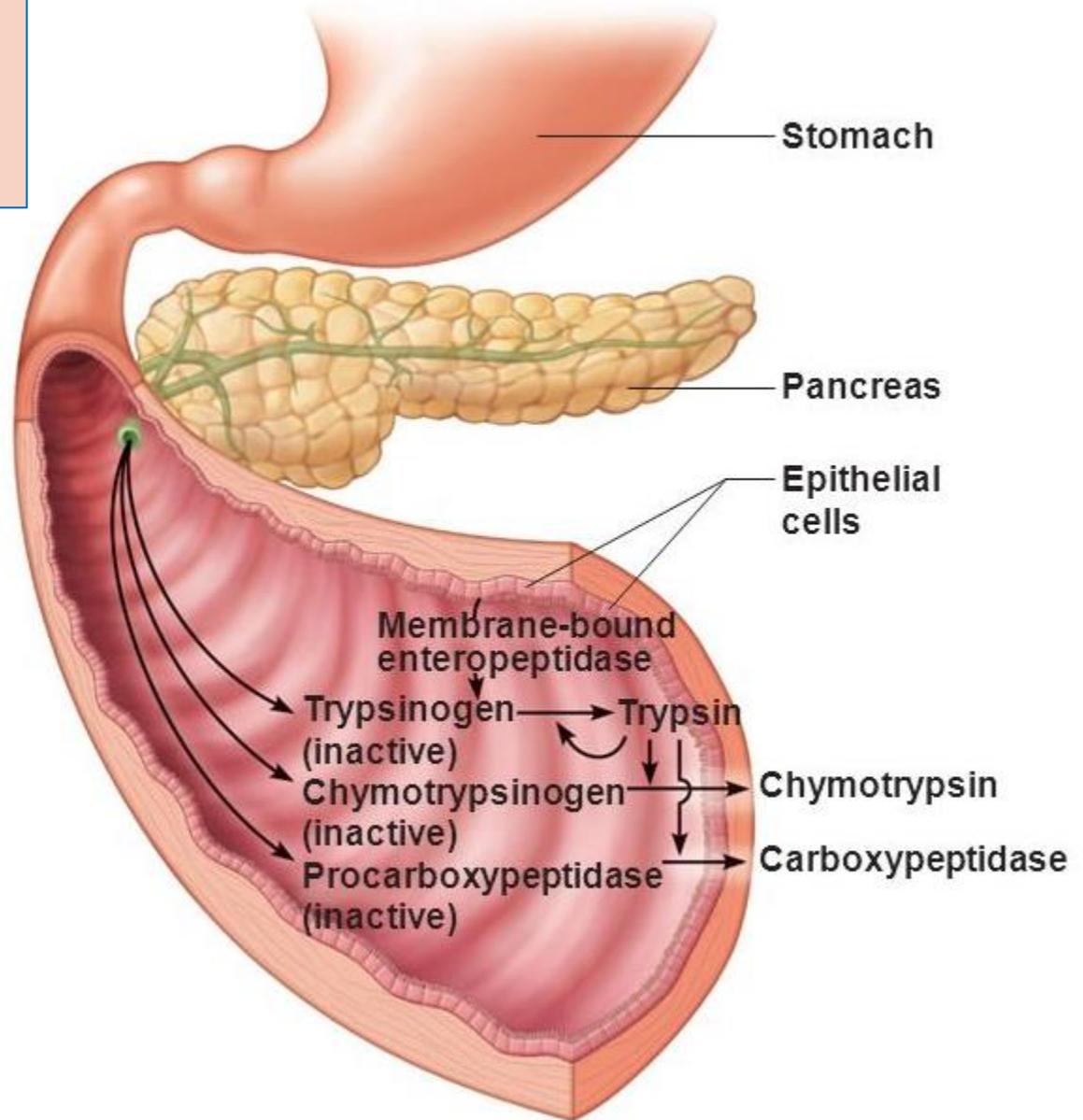
Proinsulina

Insulina

Zimógeno



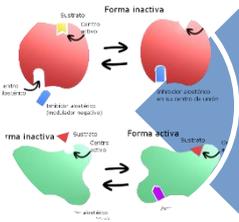
Las enzimas proteolíticas que participan en la digestión de proteínas se secretan en forma de zimógeno



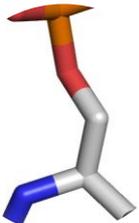
Regulación de la actividad enzimática



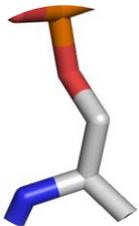
Participan enzimas regulables llamadas enzimas marcapaso o enzimas claves de una vía metabólica



La actividad se puede modificar por efecto de Moduladores o Efectores (**Alosterismo**)

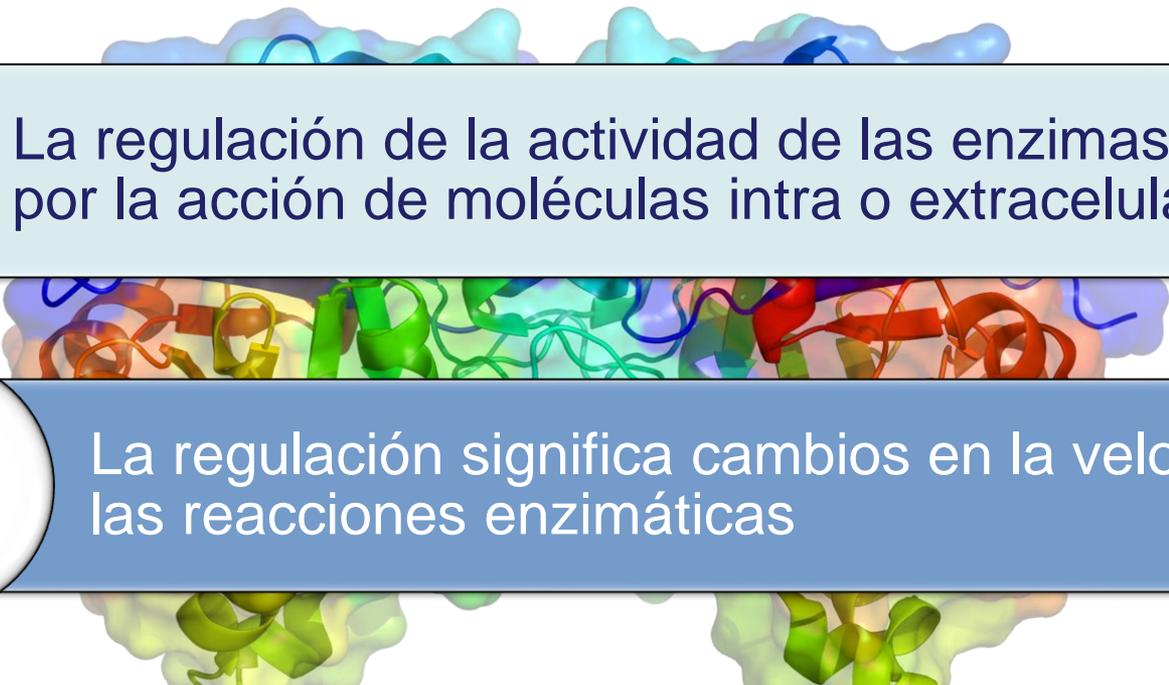


La actividad se puede modificar por unión covalente a un ligando (**Modificación covalente**)



La actividad se puede modificar por ruptura dirigida de la proteína (**Proteólisis dirigida**)

Regulación de la actividad enzimática

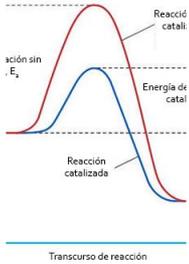


La regulación de la actividad de las enzimas se logra por la acción de moléculas intra o extracelulares

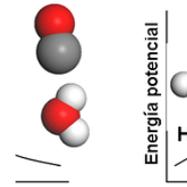
La regulación significa cambios en la velocidad de las reacciones enzimáticas

Generalmente la regulación de la actividad enzimática involucra cambios en la conformación de la proteína (enzima)

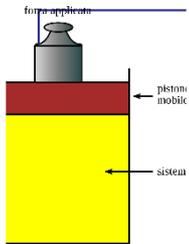
¿Qué diferencia a las enzimas de otros catalizadores?



¿Disminución de la E de activación?



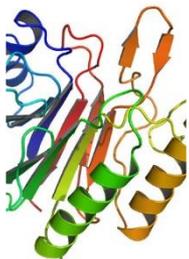
¿Aumento en la velocidad de reacción?



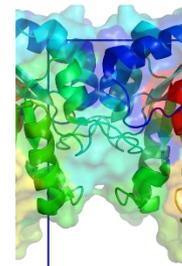
¿Efectos en ΔG o en K_{equil} ?



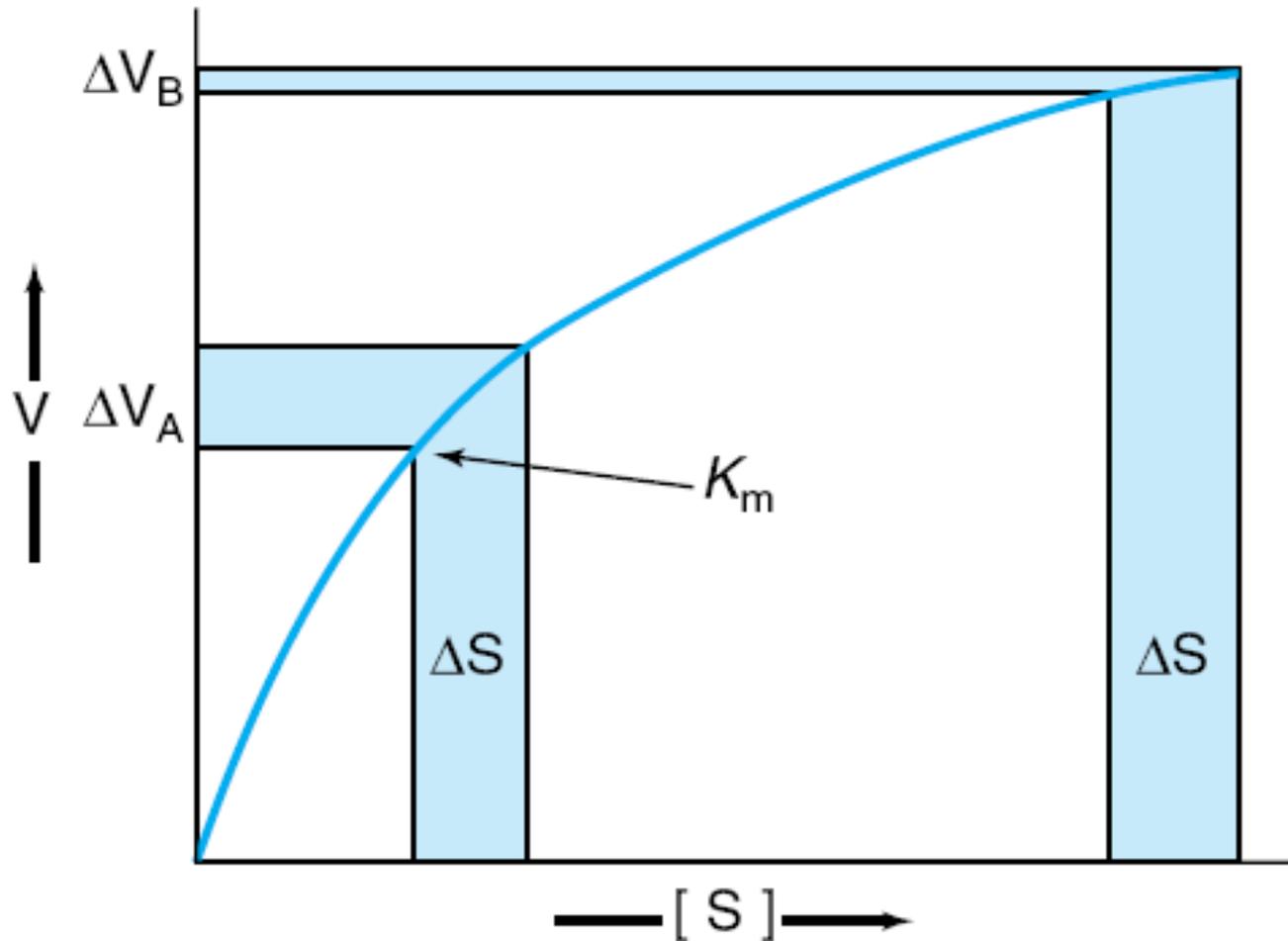
¿Reconocimiento específico de su sustrato?



¿Eficiencia de su acción?



¿Regulación de su actividad?



Respuesta diferencial de la velocidad de una reacción catalizada por enzima, ΔV , al mismo cambio incremental en la concentración de sustrato cercana a la K_m (ΔV_A) o muy por sobre la K_m (ΔV_B).