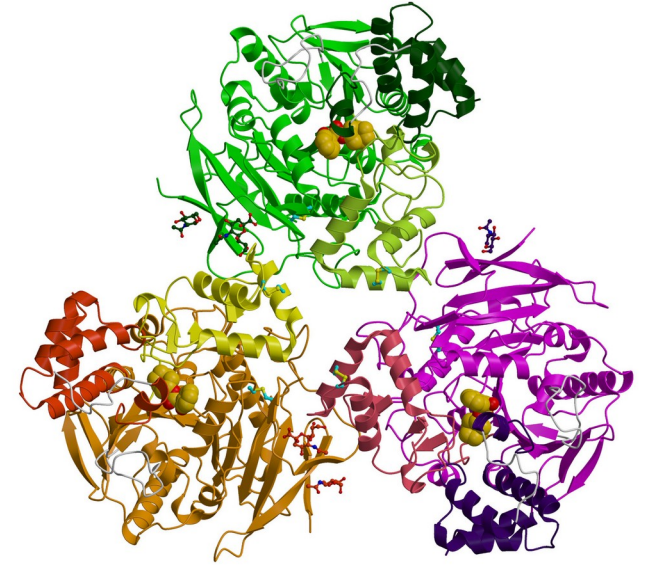
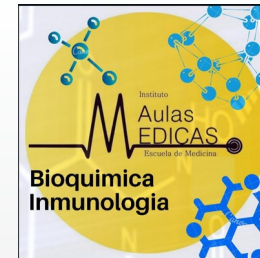


Enzimas (clase 2)



Docente : Juan Ignacio De Palo
Aulas Medicas Curso Virtual de Bioquímica e
Inmunologia 2020.





Enzimas clase 2

- **Regulación Enzimática**
- **Cinética Enzimática (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Alostérica).**
- **Inhibidores Enzimáticos Michaelianos**
- **Acción del pH y Temperatura en las enzimas.**



Regulación Enzimática

- Importancia de la regulación enzimática

*Un organismo debe poder **coordinar** su **metabolismo** a través de la regulación de sus enzimas. De este modo puede **adaptarse** a cambios de **pH**, **temperatura**, disponibilidad de **energía** o ausencia de esta y mantener una condición interna estable a través de mecanismos de compensación y **autorregulación** (homeostasis).*

Regulación → Catálisis → Adaptación celular

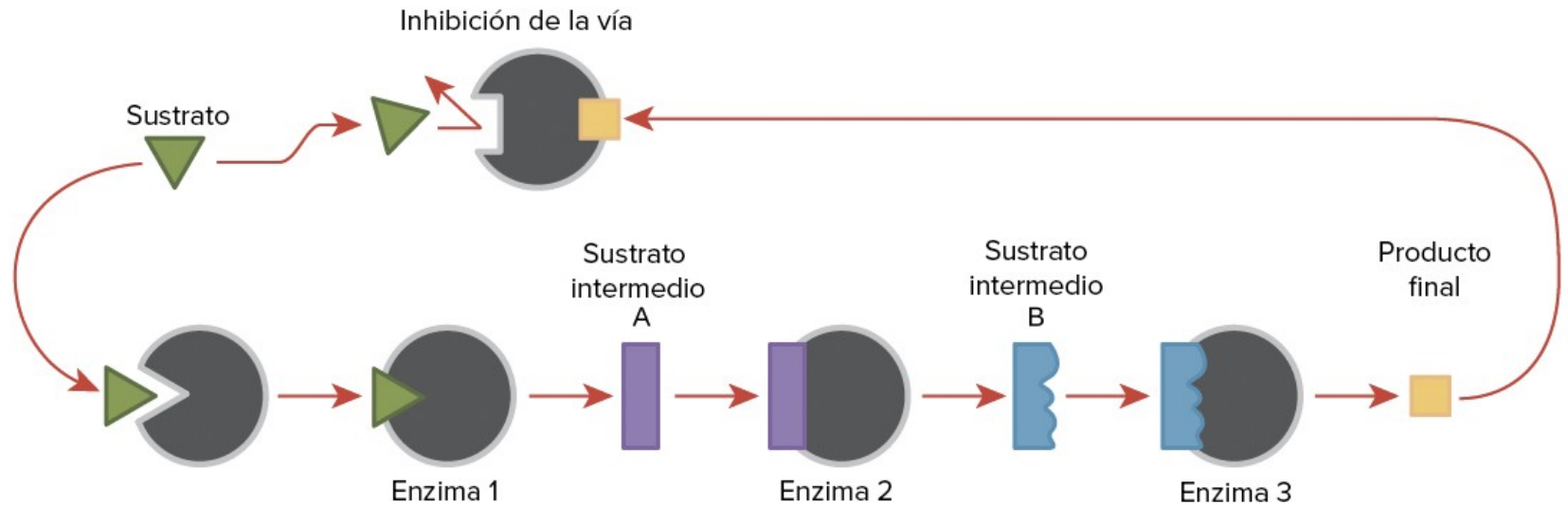


Regulación Enzimática

- El **conjunto de reacciones enzimáticas** organizadas, coordinadas y ordenadas conforma el **metabolismo**.
- Las **vías metabólicas** son conjuntos o colecciones de **reacciones enzimáticas ordenadas**, coordinadas y reguladas que constituyen el metabolismo.
- El **metabolismo** es un **sistema multienzimático**.
- **ENZIMAS → REACCIONES ENZIMÁTICAS → VÍAS METABÓLICAS → METABOLISMO**

Regulación Enzimática

- Esquema de una vía metabólica



La regulación de las vías metabólicas se da a nivel de sus reacciones enzimáticas mediadas por enzimas reguladoras lo que en un ultima instancia regula al metabolismo.



Regulación Enzimática

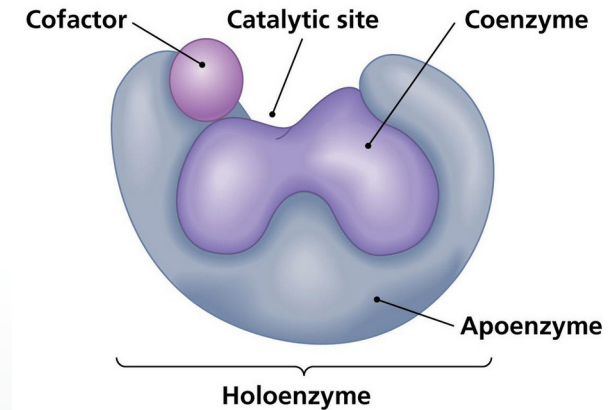
- La **mayor parte** de las **enzimas** de cada ruta metabólica obedecen a **factores cinéticos** enzimáticos generales **Michaelianos** que incluyen cambio de la **V** de la reacción ante incrementos del **S**, una **V_{max}** ante la saturación de los sitios catalíticos, la **K_m** ($\frac{1}{2}$ de la **V_{max}**) y la **inhibición** reversible e irreversible por acción de **inhibidores**.
(Enzimas Michaelianas).
- **Enzimas reguladoras** : Enzimas que tienen mayor efecto sobre la **velocidad global** de una **vía metabólica**, su **catálisis** aumenta o disminuye en respuesta a señales (adaptación celular) bajo **regulaciones** alostericas, covalentes, génicas, etc. **(Enzimas No Michaelianas).**

Regulación Enzimática

La célula controla sus enzimas a dos niveles :

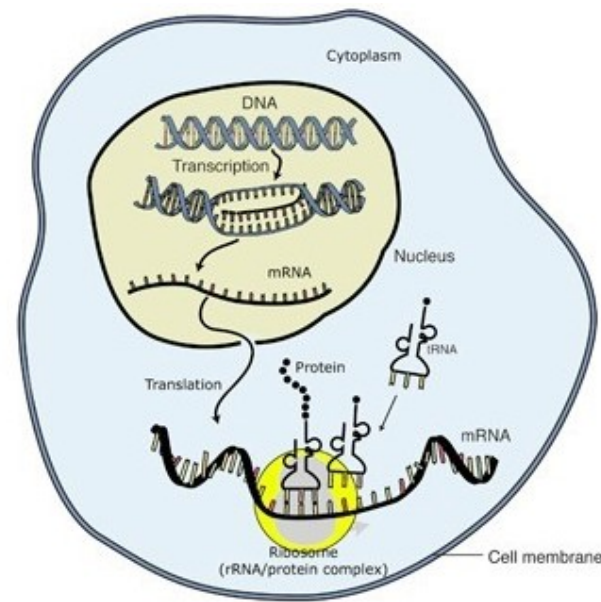
1) **Control de la actividad enzimática** : la **acción enzimática** puede regularse a través de *modificaciones estructurales* que alteran la **afinidad** por el **sustrato** o por *disponibilidad de compuestos necesarios* para la acción enzimática

- **Regulación alosterica**
- **Modificación covalente**
- **Activacion de zimogenos**
- **Regulación por isoenzimas**
- **Otros (disponibilidad de sustrato, cofactor)**



Regulación Enzimática

- 2) Control de la cantidad o disponibilidad enzimática (control génico) :
- La **cantidad** (concentración) de una enzima en una célula depende del equilibrio que se entre su **velocidad** (horas, minutos) de **síntesis** y de su velocidad de **degradación**. Cada una de estas velocidades está **controlada** directamente por la célula a nivel de la transcripción de genes y la síntesis proteica.
- La **regulación génica** modifica la concentración de enzimas disponibles en una célula
 - **ADN → ARNm → Ribosomas → Enzima (Proteína)**



Regulación Alosterica

- 1) Definición :

- allos*, “otro”, y *stereos*, “forma”.

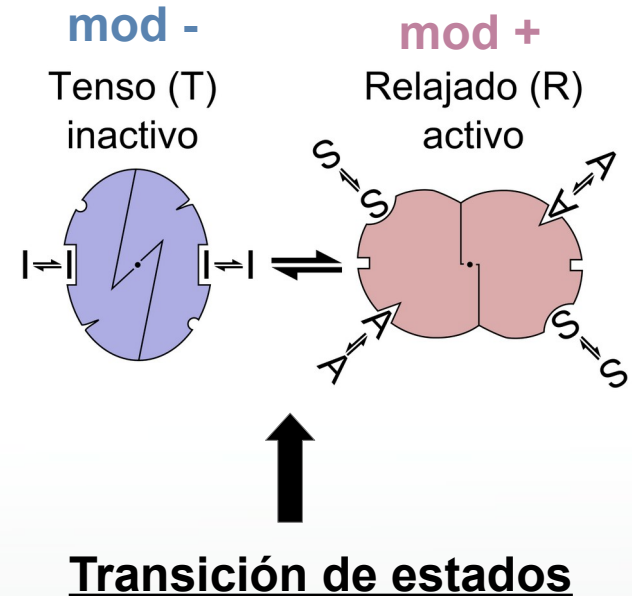
- Las enzimas alostericas sufren **cambios conformacionales** inducidos por la **unión no covalente** de **reguladores** conocidos como **moduladores** o **efectores alostericos**.

- Los cambios de forma **interconvierten** a la enzima en **formas mas activas (R)** o **menos activas (T)**.

- Los moduladores pueden ser **estimuladores (+)** o **inhibidores (-)**

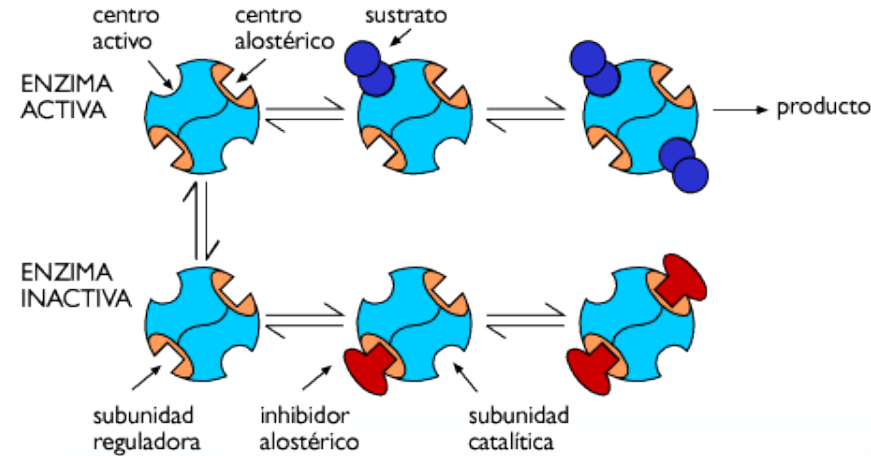
- Si el moduladores es el S (homotropica), si es una molécula diferente (heterotropica)

- Los moduladores afectan la **afinidad por el S**



Regulación Alosterica

- 2) Estructura
- Las **enzimas alostericas** son **oligomericas**. (varias cadenas polipeptidicas)
- Poseen **subunidades R y C**.
- Poseen **sitios reguladores** diferentes al sitio activo que se conocen como **centros alostericos**.
- Los **centros alostericos** son **específicos** para sus moduladores.
- El modelo de **unión cooperativa** en la Hemoglobina es de tipo alosterico.





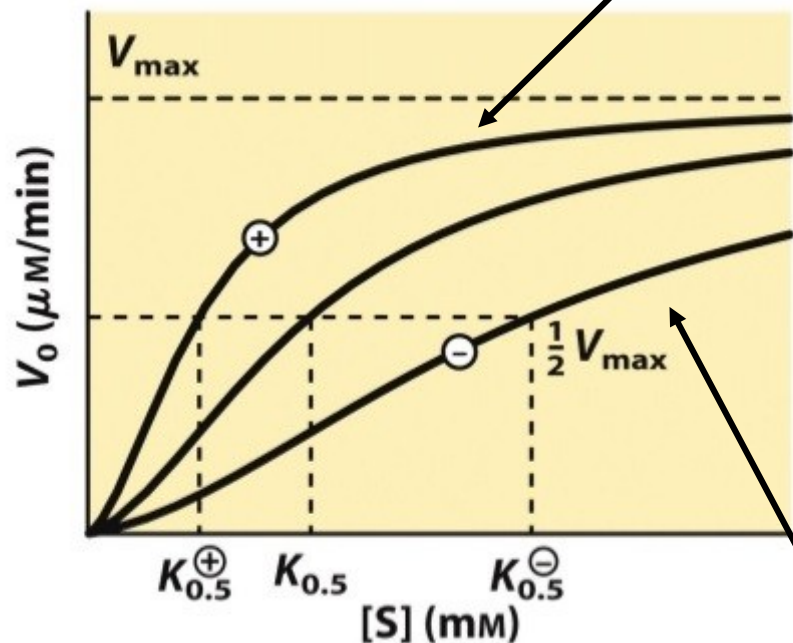
Regulación Alosterica

- 3) Cinética
- La **cinética alosterica** es **sigmoidea** (no Michaeliana o no hiperbólica)
- **Forma de S** (evoluciona en presencia de S y moduladores)
- **Curva sigmoidea** que muestra relación V_0 y $[S]$
- El comportamiento sigmoideo es el reflejo de las **interacciones proteicas cooperativas**
- Los cambios estructurales afectan a todas las **subunidades adyacentes (cooperativismo)**
- El S suele actuar como modulador +

Regulación Alostérica

- 4) Grafico alosterico

Modulador positivo
aumenta la V

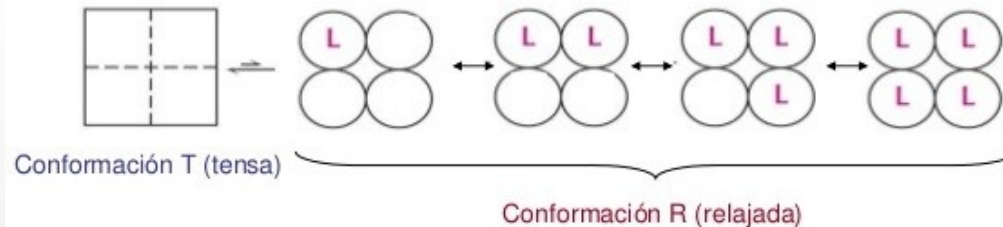
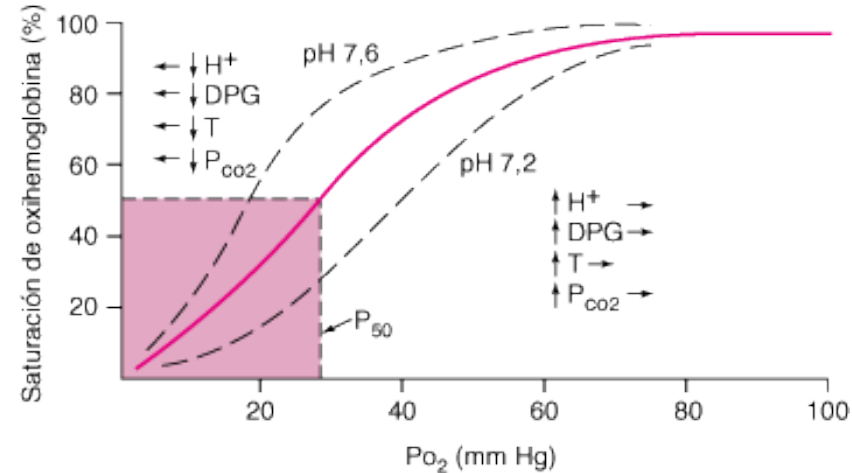
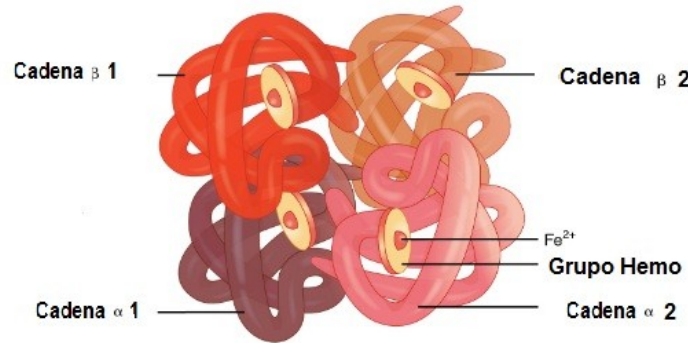


K 0,5 es la [S] para la $\frac{1}{2} V_{\text{max}}$

Modulador negativo
reduce la V

Regulación Allostética

- 5) Cooperativismo (Hemoglobina)



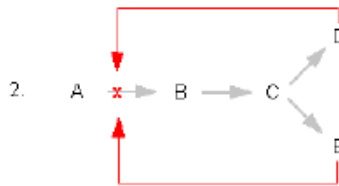
Regulación Alosterica

- **6) Feedback negativo**

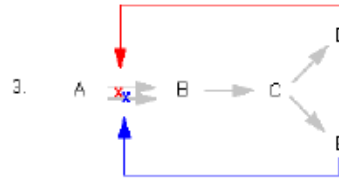
- **Regulación negativa** de una enzima dada por el **producto final** o **productos finales** de la reacción o por el producto de una vía metabólica lineal o ramificada. Este tipo de regulación asegura que la síntesis de un producto sea frenada. Es un tipo de regulación alosterica.



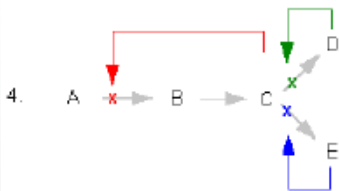
1. Inhibición simple. El producto final (E) inhibe el paso $A \rightarrow B$.



2. Inhibición cooperativa. Ambos productos (D, E) inhiben el primer paso de su propia síntesis.



3. Inhibición multivalente.



4. Inhibición en una ramificación de una vía biosintética (inhibición secuencial)

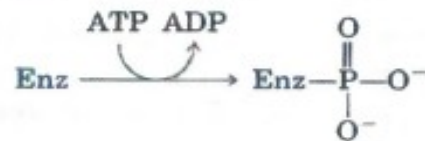
Modificación Covalente

- 1) Definición

- La actividad de la **enzima** como proteína es **modificada** covalentemente a nivel de sus aminoácidos por **unión** o **separación** de **grupos funcionales modificadores** (fosforilo, acetilo, metilo, amida, carboxilo, miristilo, sulfato, adenosina difosfato ribosilo, etc)
- Los **grupos funcionales** se **unen** y se **eliminan** de las enzimas por acción de **otras enzimas**
- Agregar un grupo altera la carga de la enzima y su función
- La fosforilación y la desfosforilación son las modificaciones covalentes mas importantes

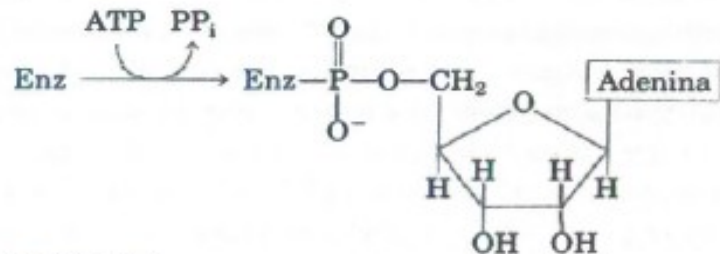
Fosforilación

(Tyr, Ser, Thr, His)



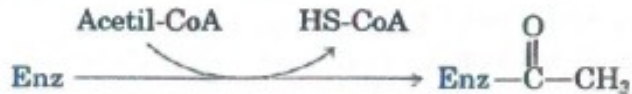
Adenililación

(Tyr)



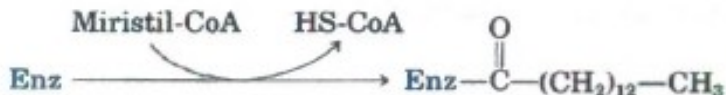
Acetilación

(Lys, α -amino (extremo amino))



Miristilación

(α -amino (extremo amino))





Modificación Covalente

Modificaciones covalentes más comunes			
Modificación	Molécula donadora	Ejemplo de proteína modificada	Función de la proteína
Fosforilación	ATP	Glucógeno fosforilasa	Homeostasis de la glucosa
Acetilación	Acetil-CoA	Histonas	Empaquetamiento del ADN, transcripción
Miristoilación	Miristoil-CoA	Src	Transducción de señales
ADP-ribosilación	NAD	ARN polimerasa	Transcripción
Farnesilación	Farnesil-pirofosfato	Ras	Transducción de señales
γ -Carboxilación	HCO_3^-	Trombina	Coagulación
Sulfatación	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato	Fibrinógeno	Formación del coágulo
Ubiquitinación	Ubiquitina	Ciclinas	Control del ciclo celular
Fosforilación	ATP	Glucógeno fosforilasa	Homeostasis de la glucosa
Acetilación	Acetil-CoA	Histonas	Empaquetamiento del ADN, transcripción

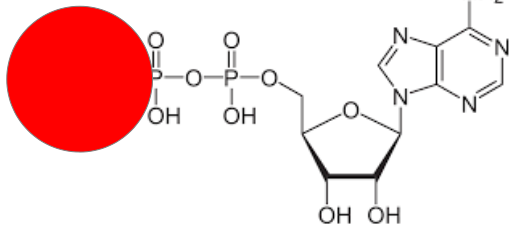


Modificación Covalente

- 2) Fosforilación y Desfosforilación
- Un $\frac{1}{3}$ de las proteínas eucariontes se encuentran fosforiladas.
- Las **proteína quinasas** catalizan la transferencia de un grupo fosfato terminal del ATP hacia un aminoácido
- Los aminoácidos fosforilados son Ser, Tyr o Thr.
- El **grupo fosfato** introduce oxígeno y forma **puentes de H** con los **NH₂⁺** o las **cadenas laterales R** de los aminoácidos catalíticos y de fijación alterando su función
- Las **quinasas** reconocen **secuencias consenso** (Ser, Tyr, Thr)
- Las fosfatasas catalizan
-

Modificación Covalente

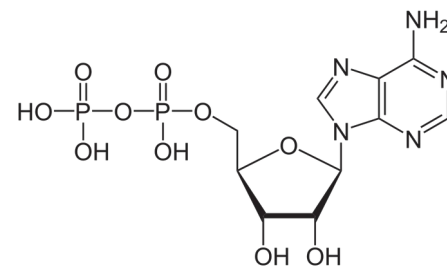
Fosfato
gamma



Tirosina quinasa
Serina quinasa
Treonina quinasa

ATP

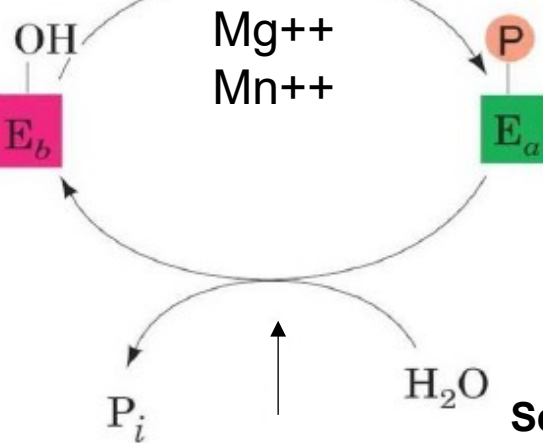
ADP



Aminoácidos
(NH₂+ y R)
desfosforilados
de la enzima

Tyr-OH
Ser-OH
Thr-OH

Enzima desfosforilada



Tyr-P
Ser-P
Thr-P

Aminoácidos
(NH₂+ y R)
fosforilados de la
enzima.

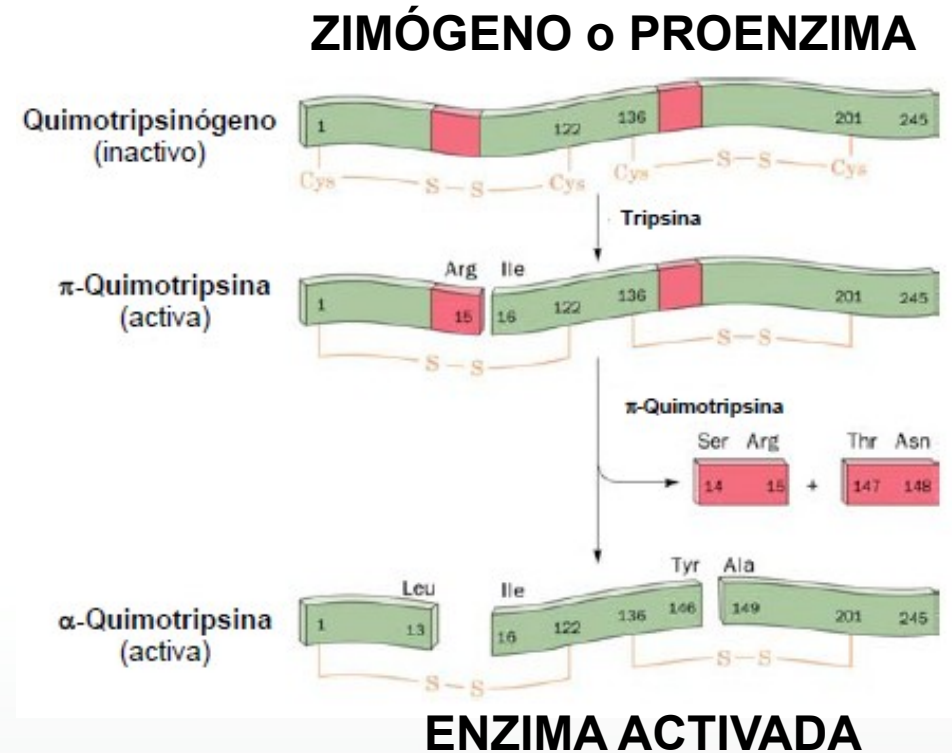
Enzima fosforilada

Ser-Thr fosfatasa
Tyr-fosfatasa
CysAsp-fosfatasa

Fosfatasas

Ruptura proteolítica

- En algunas enzimas la **escisión** de un **precursor inactivo (zimógeno)** es necesaria para formar la enzima activa.
- Muchas enzimas son **liberadas** en su **forma inactiva** y por acción de **peptidasas**, adoptan su forma enzimática activa.
- La **ruptura proteolítica** expone el **sitio activo** de la enzima.
- Ejemplos : **Enzimas digestivas**. (pepsina, tripsina, quimotripsina), coagulación, caspasas, insulina, colágeno, etc.



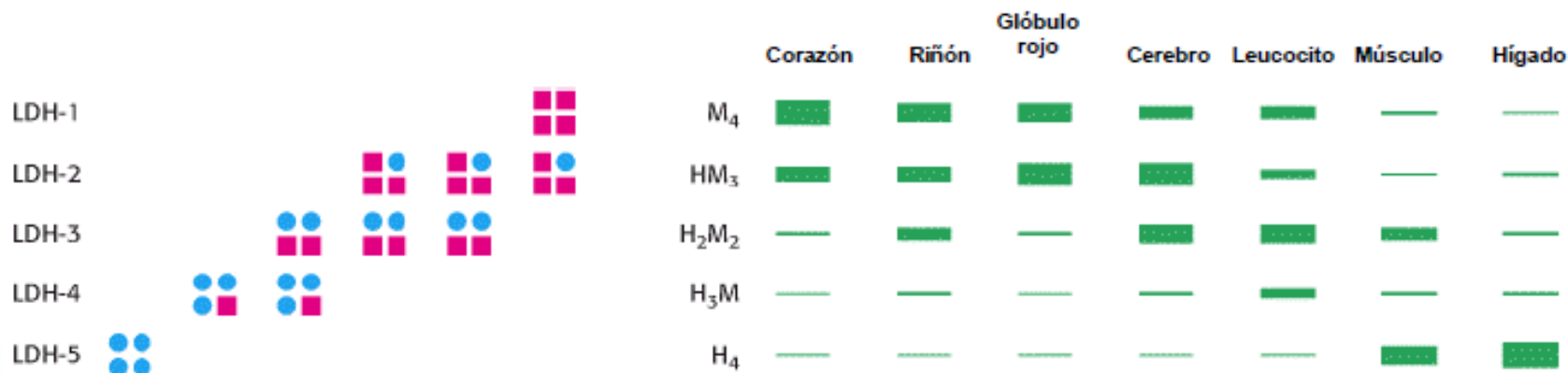


Isoenzimas

- *iso* “igual”
- Las **isozimas** o **isoenzimas**, son enzimas que catalizan la **misma reacción** pero difieren en la secuencia de **aminoácidos**, codificados por **genes diferentes (loci)**, se encuentran en **tejidos** diferentes, **Km** diferente, **regulación diferente**.
- La existencia de las **isoenzimas** permite un control fino del **metabolismo adecuado** para las **necesidades particulares** de un tejido particular o un estadio del desarrollo.
- Ej : **LDH** (Lactato Deshidrogenasa)
- $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Lactato} + \text{NAD}^+$
- La **LDH** es un tetrámero constituido por dos cadenas polipeptídicas: H y M. Existen 5 isoenzimas de LDH con combinación diferentes y en tejidos diferentes. (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5).
- La **presencia** de algunas **isoenzimas** en **plasma** es **indicativa** de daño tisular y puede ser utilizado para el diagnóstico clínico de **patologías**. (enzimas sericas)

Isoenzimas

Isoenzimas de LDH



Otros ejemplos : **Creatinfosfatokinasa** (CPK) (MM, MB, BB),
Hexokinasa (HKI, HKII, HKIII y HKIV).



Compartimentalizacion

- Las **vías metabólicas** tienen lugar en **ubicaciones celulares específicas**.
- La **compartimentalización** del **citoplasma** de la célula permite que las **diferentes vías metabólicas** operen en **diferentes ubicaciones** y en consecuencia, la **disponibilidad de sustratos** esté limitada.
- Ej : **Glucokinasa hepática**. A altos niveles de glucosa opera en citoplasma y a bajos niveles de glucosa es trascolada al núcleo. Esto modula la fosforilación de la glucosa citoplasmática.



Compartimentalización

Vías metabólicas por compartimientos celulares

Funciones metabólicas de los orgánulos de los eucariontes	
Orgánulo	Principales funciones
Mitocondria	Ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos, degradación de aminoácidos
Citosol	Glucólisis, vía de las pentosas, biosíntesis de ácidos grasos, muchas reacciones de gluconeogénesis
Lisosoma	Digestión enzimática de los componentes celulares y de la materia ingerida
Núcleo	Replicación y transcripción del ADN, procesamiento del ARN
Aparato de Golgi	Procesamiento postraduccional de las proteínas de membrana y secretoras; formación de la membrana plasmática y vesículas secretoras
Retículo endoplasmático rugoso	Síntesis de proteínas unidas a la membrana y secretoras
Retículo endoplasmático liso	Biosíntesis de lípidos y esteroides
Peroxisomas	Reacciones oxidativas catalizadas por aminoácido oxidasas y catalasa; reacciones del ciclo del glioxilato en plantas

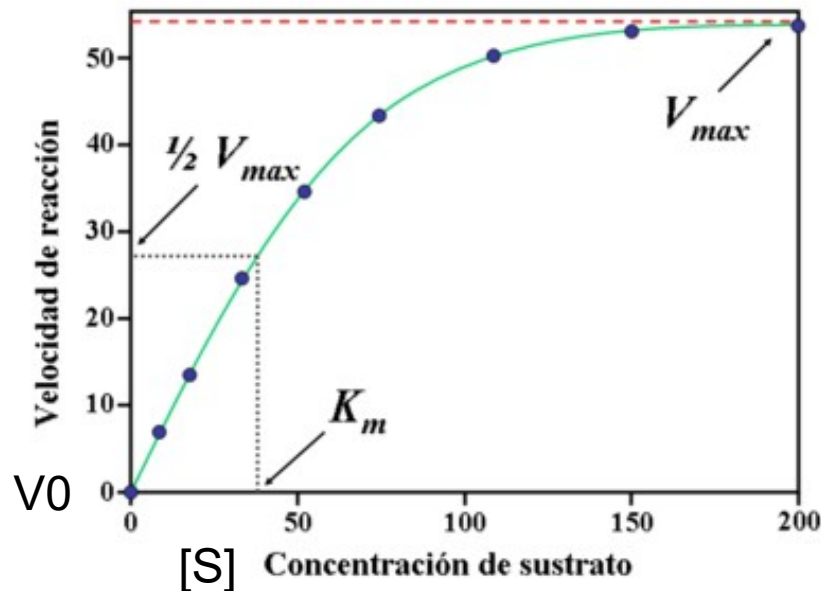


Regulación génica

- Control de la **disponibilidad** y **concentración** enzimática.
- Las **concentraciones** de las **enzimas** y en consecuencia las **actividades enzimáticas**, pueden alterarse por medio de la **síntesis de proteínas** en respuesta a las necesidades metabólicas.
- Los mecanismos de regulación génica son :
 - **1) Inducción genética (aumenta la síntesis de enzimas)** ↑
 - Señal → Receptor → Factor de transcripción → ADN → ARNm → Enzima
 - **2) Represión genética (reduce la síntesis de enzimas)** ↓
 - Señal → Receptor → Factor de transcripción + corepresor → disminución en la transcripción y síntesis de ARNm → Ausencia de Enzima.

Cinética Enzimática de Michaelis-Menten

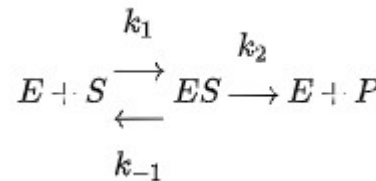
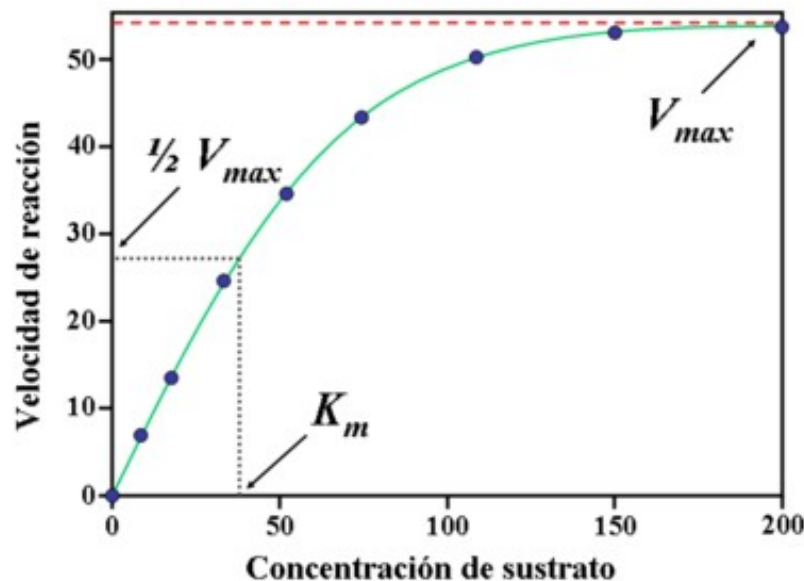
- 1) Concepto :
- **Cinética enzimática** es el estudio de la **acción enzimática** a través de la **determinación** de la **velocidad** de una reacción
- La **[S]** es un factor clave que afecta la **V** de una reacción
- La **V₀** (**velocidad inicial**) se explora en función de la **[S]**.
- La **V₀** aumenta a mayores **[S]** y alcanza una meseta (**V_{max}**).
- Se alcanza la **V_{max}** ante **[S]** cada vez mayores.
- La relación **V₀** y **[S]** se representan en una **curva hiperbólica rectangular** y se expresa algebraicamente por la ecuación de **Michaelis-Menten**.



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

Cinética Enzimática de Michaelis-Menten

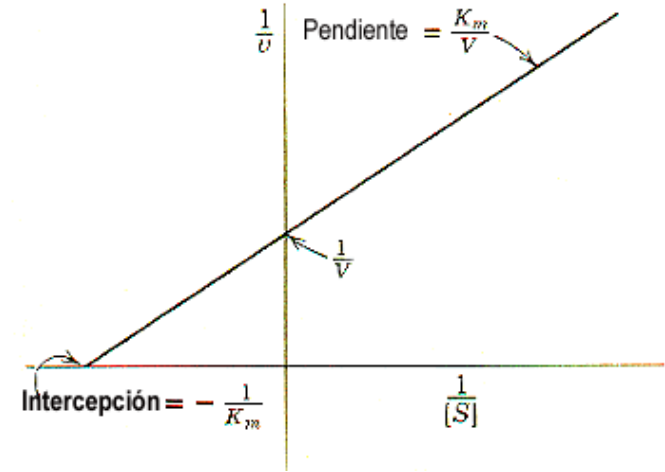
- **Michaelis y Menten** postularon que la E se combina con el S y forma el complejo ES el cual se descompone en P
- Las **velocidades de formación y descomposición** de ES son determinadas por las constantes de velocidad :
- **k1** formación de ES
- **k-1** descomposición E + S
- **k2** descomposición a E + P
- **V0** es determinada por la **descomposición** de ES que viene fijado por k2. ($V_0 = k_2 [ES]$)
- El **Km (Constante de Michaelis)** se define como $(k_2 + k_{-1}) / k_1$
- El **Km** en la practica se expresa como
- **Km = [S] cuando V0 es 1/2 Vmax.**



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

Ecuación de Lineweaver-Burk

- Grafica de los dobles recíprocos
- La **ecuación de Michaelis-Menten** a fines prácticos se simplifica en una ecuación de recíprocos, o sea dividiendo la ecuación de Michaelis-Menten por 1.
- Se obtiene la **ecuación de Lineweaver-Burk**.
- La grafica de los dobles recíprocos permite estudiar mecanismos de acción enzimáticos e inhibidores enzimáticos.



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



Inhibición Enzimática

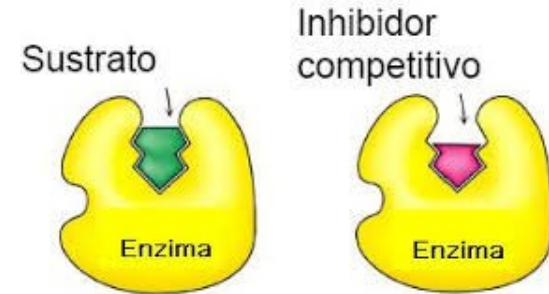
- Los **inhibidores** son **moléculas** que **interfieren** en la **catálisis** pudiendo **enlentecerla** o **detenerla completamente**.
- Muchos fármacos son diseñados como inhibidores enzimáticos (ej : aspirina)
- Los inhibidores se dividen en
- **1) Inhibidores reversibles :**
 - - Desaparece el inhibidor y la actividad de la enzima es restaurada.
 - - Su unión es no covalente.
- Los **inhibidores enzimáticos reversibles** pueden ser clasificados según el efecto que produzcan en las constantes cinéticas **K_m** y **V_{max}**. como
 - **Competitivos,**
 - **No competitivos**
 - **Acompetitivos**
 - **Mixtos**
- **2) Inhibidores irreversibles**
 - - El inhibidor inactiva permanentemente a la enzima.
 - - Su unión es covalente y modifica a los aminoácidos de la enzima

Inhibición Enzimática

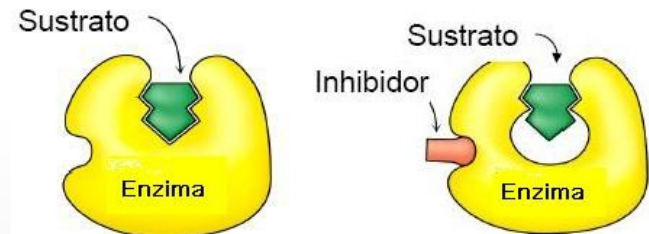
- Inhibición competitiva
- El inhibidor **compite** con el sustrato ya que tiene similitud molecular.
- Se **une** a la E pero **no** al **complejo ES**
- Al interferir con la unión del S modifica el K_m pero no la V_{max} (no obstaculiza la catálisis).
- Inhibición no competitiva

Los **inhibidores** tienen afinidades idénticas por E y ES.

La inhibición no competitiva **no cambia K_m** (es decir, no afecta la unión del sustrato) pero **disminuye V_{max}** (es decir, la unión del inhibidor **obstaculiza la catálisis**).



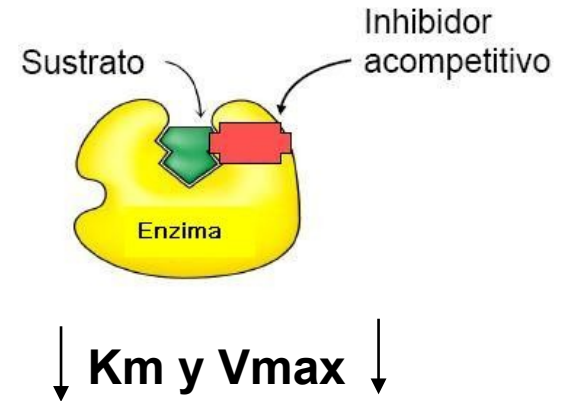
↑ **K_m y no modifica la V_{max}**



No modifica K_m y V_{max} ↓

Inhibición Enzimática

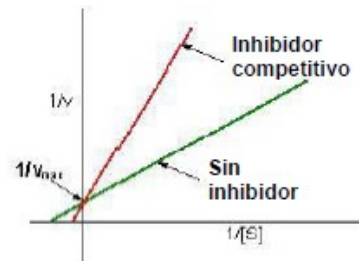
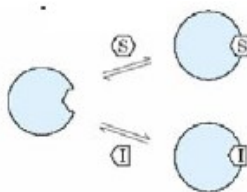
- **Inhibición acompetitiva**
- Los **inhibidores se unen solamente al complejo ES y no a la enzima libre.** Se requiere que primero se une el S y después se fije el inhibidor.
- Se produce una distorsión del sitio activo y por lo tanto, la enzima es catalíticamente inactiva.
- Este tipo de inhibición **disminuye la V_{max}** ya que una fracción del complejo ES formado será desviada hacia la formación del complejo ESI.
- Dado que el inhibidor disminuye la concentración de ES, también **producirá una disminución de K_m .**



Inhibición Enzimática

Competitiva:

Los inhibidores se unen a E, pero no al ES. Interfieren con la unión del sustrato, pero no afectan la catálisis del ES.

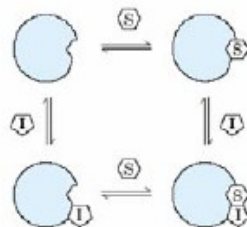


K_m **V_{max}**

↑ No varía

No competitiva:

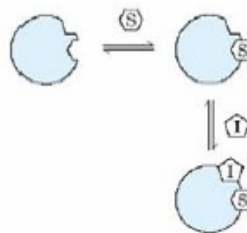
Los inhibidores tienen afinidades idénticas por E y ES. No afecta la unión del sustrato pero impide la formación del producto a partir de ES.



No varía ↓

Acompetitiva:

Los inhibidores se unen solamente al complejo ES pero no a la E. Una fracción del complejo ES será desviada hacia la formación del complejo ESI.



↓ ↓

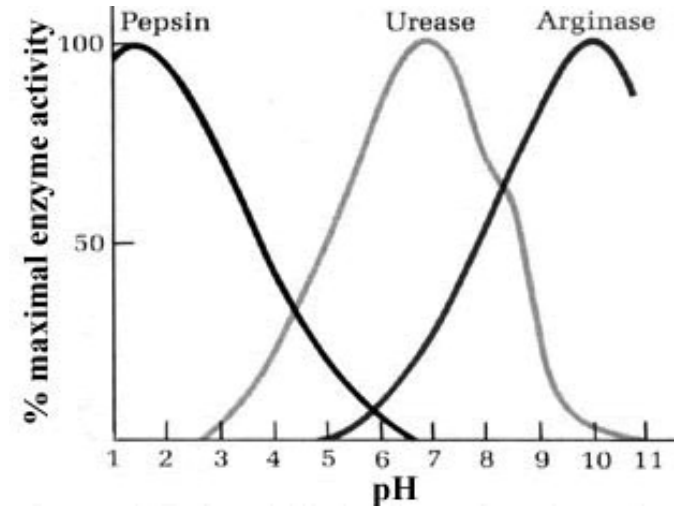


Inhibición Enzimática

- **Inhibidores irreversibles**
- Se unen de **manera covalente**, destruyen un **grupo funcional** del sitio activo enzimático
- La **cinética** de un **inhibidor enzimático irreversible** se asemeja a la de un inhibidor no **competitivo puro**.
- Pueden formar **uniones no covalentes muy estables** que anulan la actividad enzimática conocido como “**complejo del punto muerto**”.
- Los **inhibidores irreversibles** son generalmente **específicos** para un tipo de enzima y no inactiva a todas las proteínas.
- Algunos herbicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa tienen acción irreversible
- **Inactivadores suicidas** son inhibidor que aumentan su reactividad a medida que la enzima actúa y no se transforman en producto.

Enzimas y acción del pH

- **Temperatura y pH**
- **1) pH**
- **Potencial de hidrógeno** o potencial de los hidrogeniones. ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$)
- Las **enzimas** tienen un **pH óptimo** o un **intervalo de pH** donde alcanzan su máxima actividad.
- Las **cadenas laterales de los aminoácidos** de fijación o catalíticos pueden actuar como **ácidos o bases débiles**
- La acción del pH en una enzima depende del pKa (constante de disociación ácida) de los aminoácidos que determinan su función

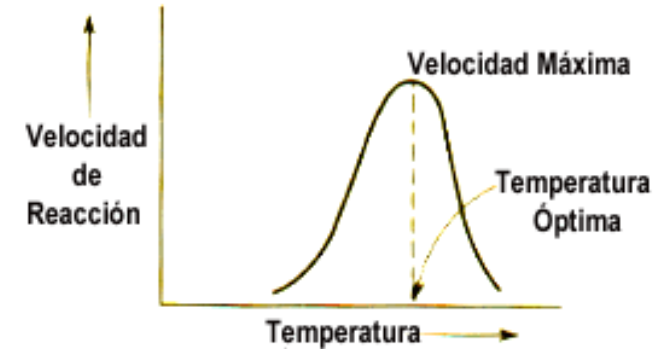


ENZIMA	pH óptimo
Pepsina	1.5
Tripsina	7.7
Catalasa	7.6
Arginasa	9.7
Fumarasa	7.8
Ribonucleasa	7.8

Enzimas y acción de la temperatura

• 2) Temperatura

- Energía interna de un sistema termodinámico o magnitud asociada a la **vibración o colisión de partículas** dentro de un sistema.
- En términos generales la **velocidad de las reacciones aumenta** ante aumentos de temperatura ya que favorece la **colisión entre moléculas** ($E + S \rightarrow ES$)
- La actividad enzimática aumenta y alcanza una temperatura optima.
- Aumentos de temperatura pueden **ocasionar desnaturalización** de los **biocatalizadores** por alteración molecular con **perdida de su función biológica**



Efecto de la Temperatura

↑
↑
Temperatura
Actividad
Enzimática