

**PROGRAMA DE LA ASIGNATURA**  
**ENZIMOLOGÍA**  
**OPCIÓN : BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

SEM.	CÓDIGO	TEORÍA H/S	PRÁCT H/S	LAB. H/S	UNIDAD CRÉDITO	PRELACIÓN
9	13201	3	0	6	6	12301

## **UNIDAD 1.**

**ESTRUCTURA:** Recuerdos sobre comportamiento de las proteínas en solución. Purificación. (5 Semanas).

### **Determinación de la Estructura Primaria de las Proteínas.**

Composición en aminoácidos (teoría y técnicas). Métodos de secuenciamiento. Producción de péptidos por métodos químicos y enzimáticos. Determinación de los aminoácidos terminales. Técnicas de separación de péptidos.

### **Conformación de las Proteínas.**

Métodos Espectrofotométricos utilizados en la determinación de la conformación. Proteínas oligoméricas. Determinación de subunidades. Utilización de la difracción de rayos X.

### **Sitio Activo.**

Estructura del sitio activo. Naturaleza de los aminoácidos implicados. Modificaciones específicas de residuos de aminoácidos. Evidencias de cambios de conformación.

### **Cofactores.**

Estructura de diversos tipos de cofactor. (Flavinas, piridoxal fosfato, vitamina B12, hierro). Fijación de cofactor a la apoproteína. Estructura del sitio de fijación y determinación de la naturaleza de los a.a. implicados en la fijación.

## **UNIDAD II.**

### **CINÉTICA ENZIMÁTICA. (5 Semanas)**

- Recuerdos de cinética química.
- Equilibrio y estado estacionario. Constante de Michaelis, Menten y Henry.
- Reversibilidad e irreversibilidad de las reacciones.
- Inhibición de las reacciones enzimáticas (diversos tipos de inhibición).
- Modelo de reacción con diversos complejos intermediarios.
- Reacciones complejas. Implicación de diversos sustratos.
- Métodos analíticos de Cleland y King-Altman.
- Modelos.
- Regulación de la actividad enzimática. Alostera. Otros modelos.

## **UNIDAD III.**

### **CATÁLISIS ENZIMÁTICA. (6 Semanas)**

#### **Modelos Químicos de Catálisis.**

Catálisis ácida, básica, ácido-básica, nucleófila, electrófila. Catálisis intramolecular y coordinada. Mecanismos modelos involucrando la hidrólisis del enlace ester.

#### **Termodinámica.**

Determinación de los diversos parámetros termodinámicos. Energía de activación.

#### **Funcionamiento de algunas enzimas.**

Técnicas utilizadas para llevar a un modelo de catálisis enzimática.

Ejemplos de :

- Quimotripsina y Ribonuclease.
- Enzimas a Piridoxal Fosfato.
- Enzimas a NAD y a Flavina.
- Lisozoma.
- Piruvato deshidrogenasa.
- Fosfato alcalina (modelo ping-pong).
- Complejos multienzimáticos.

## **PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA II. "ENZIMOLOGÍA" (LABORATORIO)**

## **I. Purificación de Enzimas.**

- Fosforilasa b de músculo de conejo (esquelética).
- Fosforilasa Kinasa de músculo de conejo.
- Galactosidasa de Escherichia coli.

En estas prácticas se utilizan técnicas de precipitación (por pH, por solvente, por sal), resinas de intercambio iónico, tamis molecular, cristalización. La electrofóresis en geles de poliacrilamida se utiliza para control de pureza.

## **II. Estructura de Proteínas.**

- Estudio del equilibrio Fosforilasa a-fosforilasa b (dímero tetrámero) gracias a la fosforilasa Kinasa.
- Determinación de la estructura oligomérica de las fosforilasas a y b por tamiz molecular y gel de poliacrilamida sin y con SDS.
- Determinación de los extremos N y C-terminales y cuantificación por técnicas de los ADP y Dansil sobre las proteínas purificadas.
- Cuantificación de los grupos -SH y de los puentes disulfuro, sobre las proteínas purificadas.
- Producción y purificación de péptidos por la acción del Bromuro de cianógeno (BrCn).

## **III. Actividad Enzimática.**

- Seguimiento de la actividad de la fosforilasa a través de un sistema de enzimas auxiliares acoplados a la reproducción del NADP.
- Determinación de la actividad enzimática de las fosforilasa a y b en presencia de efectores (AMP y ATP).
- Determinación de la  $K_m$  de la -galactosidasa. Utilización de esta enzima para ilustrar el modelo de una acción enzimática con un sustrato y dos complejos intermediarios.
- Estudio cinético de la peroxidasa de rábano (tres sustratos).
- Discriminación entre dos modelos propuestos (escribir las dos ecuaciones de velocidad según el formalismo de Dalziel).

## **BIOLOGÍA II. "ENZIMOLOGÍA". (PRÁCTICA DE PROBLEMAS) (2 horas por Semana)**

1. Carga de aminoácidos y péptidos en función del pH.
2. Estructura de proteínas. Composición en aminoácidos.
3. Estructura de proteínas. Producción de péptidos. Mapas péptidicos.
4. Estructura de proteínas. Determinación de secuencias.
5. Cinética química. Determinación de constantes de velocidad.
6. Determinación de Km. diversas formas de graficar.
7. Determinación de Kd por varias técnicas. Desarrollo matemático y formas de graficar.
8. Determinación de constantes de velocidad en modelos con intermediarios múltiples.
9. Diferenciación de modelos con enzimas a dos sustratos.
10. Utilización de inhibidores y determinación de Ki.
11. Efecto de pH y determinación de pKa.
12. Efecto de la temperatura y determinación de parámetros termodinámicos al equilibrio y de activación.
13. Alostiería.

### **TEXTOS BÁSICOS PARA BIOLOGÍA II.**

- Sidney Bernhand. (Estructura y función de las enzimas).
- A. Light. (Structure of enzymes).
- Paul D. Boyer. (The enzymes - Diversos volúmenes).
- K.M. Plawmen. (Enzyme Kinetics).
- A. Fersht. (Sobre estructura y mecanismos).