

**ENZIMOLOGIA DE PROTEINAS Y ENZIMAS
(BT735)**

Profesor encargado: **Juan Pablo Rodríguez**

Objetivos del Curso: Proporcionar los conocimientos teóricos que entreguen las bases estructurales y de relación estructura-función, para una utilización adecuada de las proteínas en las aplicaciones biotecnológicas presentes y futuras, y las bases teóricas del mecanismo de acción de las enzimas incluyendo modificaciones utilizando técnicas de ingeniería genética de última generación. Esto permitirá comprender no sólo su utilidad sino también el tremendo potencial futuro de las aplicaciones prácticas de las enzimas.

Profesores: Barbara Andrews (F. Ciencias. Físicas y Matemáticas)
 Juan Asenjo (F. Ciencias. Físicas y Matemáticas)
 Miguel Llanos (INTA)
 Juan Pablo Rodríguez (INTA)

Trabajos Prácticos: Javier Guerrero (INTA)
 Alvaro Olivera (F. Ciencias. Físicas y Matemáticas)

Evaluación del Curso:

Controles:	75%
Seminarios y Trabajos Prácticos:	25%

Contenido del Curso:

I. Estructura de Proteínas

a) Aminoácidos

- Configuración D y L
- Zwitterions
- Grupos radicales
- Propiedades ácido - base
- Curvas de titulación

b) Proteínas

* Estructura primaria:

- Secuencia de aminoácidos
- Enlace peptídico
- Estructura - función

* Estructuras superiores:

- Estructura secundaria: α -hélice, conformación β
- Estructura terciaria
- Estructura cuaternaria
- Enlaces que estabilizan estructuras superiores

* Interacciones:

- Proteína - Proteína
- Proteína - Solvente
- Proteína - Ligando

c) Análisis de proteínas

c.1. Espectroscopía de absorción:

- Principios básicos
- UV/Vis
- Infrarrojo
- Fluorescencia molecular
- Análisis espectroscópico de moléculas orgánicas
- Efecto de la estructura sobre la absorción

c.2. Tamaño y carga de proteínas.

- Electroforesis uni y bidireccional
- Isoelectroenfoque
- Métodos cromatográficos
- Cromatografía
 - Exclusión molecular,
 - Intercambio iónico,
 - Afinidad.

d) Cuerpos de Inclusión:

- Formación
- Aislamiento
- Solubilización

- Re-enrollamiento (refolding) de las proteínas

II. Enzimología.

a) Estructura y función de enzimas

* Reacciones Químicas:

Energía Libre.
Energía de Activación
Catalizadores

* Mecanismo de reacción:

Sitio activo
Estado de Transición
Modificación de aminoácidos
Mutagénesis sitio-dirigida
Catálisis ácido-base general
Catálisis covalente
Efecto de orientación y proximidad

* Biomoléculas con actividad catalítica:

Anticuerpos
RNA

* Enzimas Inmovilizadas

b) Cinética Enzimática:

Ecuaciones de velocidad de reacción
Modelo Michaelis-Menten
Teoría de estado estacionario: Briggs-Haldane
Concepto de equilibrio, velocidad inicial y estado estacionario
Evaluación de parámetros cinéticos (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee; métodos computacionales directos)
Activación e inhibición por sustrato
Reacciones de dos sustratos
Reacciones reversas
Efectos de pH y temperatura: denaturación
Sistemas heterogéneos: sustratos insolubles
Número de Damköhler, módulo de Thiele

c) Reactores enzimáticos:

Enzimas inmovilizadas

Difusión y reacción, factor efectividad

Cinética de reactores enzimáticos

Reactores batch, CFSTR y flujo pistón

Aplicaciones de Ingeniería de Enzimas

d) Ingeniería de Proteínas:

Mutagénesis Sitio Dirigida, Principios.

Mutagénesis al Azar; evolución acelerada (“gene shuffling”)

Ejemplos Varios, Aplicaciones, ventajas, desventajas.

Referencias Generales.

- Principles of Biochemistry

Albert L. Lehninger

- Biochemistry

Donald Voet and Judith G. Voet

- Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research

Edited by Jay A. Glasel and Murray P. Deutscher

- Structure and Mechanism in protein science

A Fersht

- Organic Chemistry.

Robert T Morrison and Robert N. Boyd

- Methods in Enzymology, Vol XLIV

Immobilised Enzymes. Edited by Klaus Mosbach

- Techniques for the Analysis and Modelling of Enzyme Kinetic Mechanisms

Chan F. Lam

- Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism

Daniel L. Purich

- Biochemical Engineering Fundamentals

J.E. Bailey and D.F. Ollis

- Protein Structure
T.E. Creighton
- Protein Structure Prediction
Michael J. E. Sternberg
- Protein Engineering and Design
Paul A. Carey
- Proteins. Analysis and Design
Ruth H. Angeletti