

**ENZIMOLOGIA Y ESTRUCTURA DE PROTEINAS
(BT 57B)**

Profesor encargado: Juan Pablo Rodríguez

Horario de Clase: Lunes: 12,00-13,30 hrs.
Viernes: 12,00-13,30 hrs.
Miércoles: 14,30-16,00 hrs. (Clase Auxiliar).
Lugar: Sala .

Trabajos Prácticos: Jueves: 14,30 - 18,00 hrs.
Lugar: INTA/ Fac. Ciencias Físicas y Matemáticas

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%

2003

Contenido del Curso:

Semana 1. (10 - Marzo). M. Llanos

I. Estructura de Proteínas

a) Aminoácidos

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

Semana 2. (17 - Marzo). M. Llanos

b) Proteínas

- * Estructura primaria:
 - Secuencia de aminoácidos
 - Enlace peptídico
 - Estructura - función

Semana 3. (24 - Marzo). M. Llanos

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

- * Interacciones:
 - Proteína - Proteína
 - Proteína - Solvente
 - Proteína - Ligando

Semana 4. (31 - Marzo). J.P. Rodríguez

c) Análisis de proteínas

- c.1. Espectroscopía de absorción:
 - Principios básicos
 - UV/Vis
 - Infrarroja
 - Fluorescencia molecular
 - Análisis espectroscópico de moléculas orgánicas
 - Efecto de la estructura sobre la absorción

CONTROL 1: 9 - Abril

Semanas 5 y 6. (7 - Abril; 14 - Abril). *J.P. Rodríguez*

c.2. Tamaño y carga de proteínas.

Electroforesis uni y bidireccional

Isoelectroenfoque

Métodos cromatográficos

Cromatografía

Exclusión molecular,

Intercambio iónico,

Afinidad.

Semana 7. (21 - Abril). *B. Andrews*

d) Cuerpos de Inclusión: - Formación

- Aislamiento

- Solubilización

- Re-enrollamiento (refolding) de las proteínas

Semana 8 y 9, 10. (28 - Abril; 5 - Mayo; 12 - Mayo). *J.P. Rodríguez*

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

Semana del 19 - 24 de Mayo: Vacaciones

CONTROL 2: 28 - Mayo

Semanas 11 y 12. (26 - mayo, 2 - Junio). J. Asenjo

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

Semana 13. (9 - Junio). J. Asenjo

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

Semana 14 y 15 (16 - Junio; 23 - Junio). J. Asenjo.

d) Ingeniería de Proteínas:

- Mutagénesis Sitio Dirigida, Principios.
- Mutagénesis al Azar; evolución acelerada (“gene shuffling”)
- Ejemplos Varios, Aplicaciones, ventajas, desventajas.

CONTROL 3: 18 - Junio

Ultimo día de clases: 28 Junio

EXAMEN: 1 – 13 Julio.

Trabajos Prácticos

Trabajo Práctico # 1: Javier Guerrero (INTA)

Grupo 1: 17 – Abril

Grupo 2: 24 – Abril

Trabajo Práctico # 2: Javier Guerrero (INTA)

Grupo 1: 8 – Mayo

Grupo 2: 15 - Mayo

Trabajo Práctico # 3: J avier Guerrero (INTA)

Grupo 1: 29 – Mayo

Grupo 2: 5- Junio

Trabajo Práctico # 4: Alvaro Olivera (FCFM)

Grupo 1: 12 – Junio

Grupo 2: 19 – Junio

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. Glaser 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