

TRABAJO PRACTICO DE AULA

TEMA: ENZIMAS

QUIMICA BIOLOGICA FCEN UNCuyo. 2019.

PROF. DRA. MARIA BELEN HAPON

1- Estas colaborando en un proyecto de investigación de tu facultad, en el cual determinas la actividad de una enzima pancreática que degrada almidón en una especie de pájaro en peligro de extinción autóctono. Para caracterizarla tienes que medir la reacción de su muestra con distintas concentraciones de sustrato y obtiene los siguientes valores:

Sustrato (mM)	Velocidad inicial (nmol/min)
0.5	5
1.5	20.8
3.5	48
5	60
10	76
20	79

a-¿Cómo llamarías con un nombre común a la enzima?

b-Diseña una gráfica de concentración de sustrato versus velocidad de reacción.

c- ¿Cuál es la velocidad máxima que puede alcanzar dicha reacción?

d-¿La proteína que usted está describiendo es una proteína alostérica? ¿Porqué?

2-Estas realizando tu trabajo final de tesina en un laboratorio en donde se estudia la actividad de una enzima lipasa pancreática con un posible uso como quitamanchas. Al extraer la enzima en dos tubos distintos, no los rotula adecuadamente y uno de los tubos tiene una dilución mayor que el otro. Para resolver dicho problema y lograr identificar los tubos, tu director de tesina te sugiere que midas la actividad lipasa en ambos tubos y obtienes los siguientes datos:

Sustrato (nM)	Velocidad inicial tubo A (nmol/min)	Velocidad inicial tubo B(nmol/min)
3	10	5
7.5	18	9
15	30	15
30	45	22.5
75	70	35
150	89	44.5
300	97	48.5
750	97	47.5
1500	98	49

a- Luego, tu Director te pide que hagas una curva de Velocidad de reacción vs. Concentración de sustrato.

b- Los datos más importantes que te ha pedido tu Director de Tesina es que encuentres la máxima velocidad que puede alcanzar la reacción y el K_m para tal enzima. ¿Cuáles son los valores que obtienes a partir del gráfico para ambos tubos?

c- Para obtener un valor de K_m mas exacto tu Director te sugiere que hagas un curva de regresión lineal del tipo Lineweaver- Burke.

d- En base a esta última gráfica ahora te pide que identifiques ambos tubos. ¿Cómo puedes identificar a cada tubo?

e- ¿Te sirvió la ayuda de tu Director? Si el no hubiera estado disponible ¿Cómo hubieras solucionado el problema?

3- La acumulación de ácido úrico en sangre y tejidos provoca una enfermedad llamada Gota. La enzima xantina oxidasa es la enzima responsable de la producción de ácido úrico y por lo tanto de esta patología. Suponiendo que en el laboratorio en que estas trabajando tiene como objetivo probar nuevos agentes terapéuticos que inhiban la formación de ácido úrico, decide probar el agente AP. Para tus ensayos utilizas el método de extracción de xantinaoxidasa a partir de leche fresca que es un fuente rica en dicha enzima. La reacción se realiza en un medio que contiene buffer fosfato a pH 7.4 y se utilizas como sustrato xantina. La velocidad de reacción la mides mediante la detección espectrofotométrica de la generación de ácido úrico a 295nm. ¿Podrías indicar si este agente recientemente desarrollado en tu laboratorio tiene capacidad para inhibir la formación de ácido úrico? Si determinas que AP inhibe la formación de ácido úrico ¿Podrías indicar como sería su mecanismo de acción? .

Datos experimentales

Xantina (uM)	Velocidad (uM/min) Control	Velocidad en presencia de AP (uM/min)
0.50	5.20	2.00
1.00	8.33	3.67
2.00	12.61	6.03
6.00	17.00	11.54
8.00	20.20	13.77
9.00	20.30	14.49
20.00	20.83	19.23

a-Con los datos obtenidos realiza dos curvas de concentración de sustrato versus velocidad de reacción en ausencia y presencia de AP. Indica que diferencias observas entre las dos curvas a medida que aumenta la concentración de xantina.

b- Realice un gráfico de Lineweaver-Burke y compare entre las dos rectas, $V_{m\acute{a}x}$ y K_m . Indique a que se debe la diferencia que observa entre ambas rectas.

c-¿Que tipo de interacción produce la AP sobre la enzima?

d-¿Se puede revertir la situación? Indique de que manera lo harías.

4- Botrytis cinérea es un hongo común en nuestro medio que afecta a diversos cultivos entre ellos la vid. Ciertos agroquímicos han sido diseñados para el tratamiento de este tipo de hongos, entre ellos aquellos que afectan la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. Esta enzima está ligada a dos vía metabólicas muy importantes en los eucariotas, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Suponiendo que usted consigue trabajo en un laboratorio de una empresa que desarrolla agroquímicos de última generación y se le asigna la tarea de identificar dos compuestos sintetizados recientemente que podrían actuar como inhibidores de esta enzima. Para medir la actividad de la enzima usted utiliza un kit comercial que permite medir la conversión de succinato a fumarato, dentro de la misma reacción se produce la transferencia de electrones a un aceptor que cambia de color azul a incoloro al reducirse. Este cambio de color lo puede medir espectrofotométricamente.

Como primer paso usted determina la actividad de esta enzima agregando distintas concentraciones de succinato y midiendo la desaparición del color azul en un tubo (1) que solo contiene la enzima y el sustrato, luego realiza el mismo experimento en otro tubo pero agregando también el inhibidor X (tubo 2) y otro en el que agrega el inhibidor Z (tubo 3) y obtiene los siguientes resultados:

[sustrato] M/L	Velocidad (1)	Velocidad (2)	Velocidad (3)
1	0.191	0.153	0.106
5	0.414	0.35	0.221
15	0.484	0.45	0.274
30	0.521	0.521	0.287
45	0.514	0.516	0.296

- a- Realice en el mismo gráfico curvas de concentración de sustrato versus velocidad de las tres reacciones
- b- Determine $V_{\text{máx}}$ y K_m para las 3 reacciones a partir del gráfico de Lineweaver-Burk.
- c- Realice un informe dirigido a su superior detallando como realizó el experimento, los datos mas relevantes que obtuvo y una conclusión donde indique si los compuestos sintéticos desarrollados en el laboratorio se pueden utilizar como inhibidores para la Botrytis cinérea. También incluye si estos actúan en el sitio activo de la enzima o en otro sitio diferente.