

## Niveles de control de la actividad enzimática

Por la concentración de sustrato(s) y producto(s) de la reacción

**Por efectores alostéricos estructuralmente distintos de los reactantes**

Efectores: Activadores o Inhibidores.  
puede haber varios efectores simultáneos

**Por modificación covalente de la enzima**

Reversible

Irreversible (activación de precursor)

**Por la existencias de diferentes Isoenzimas**

En distintos tejidos, o en diferentes situaciones metabólicas en el mismo tejido

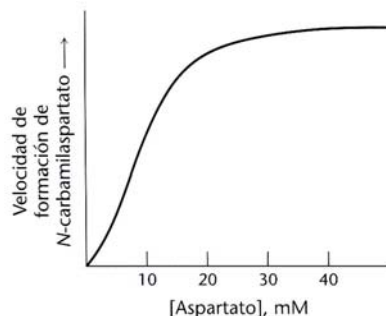
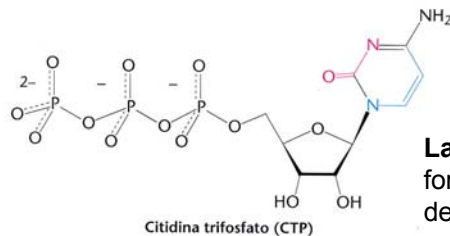
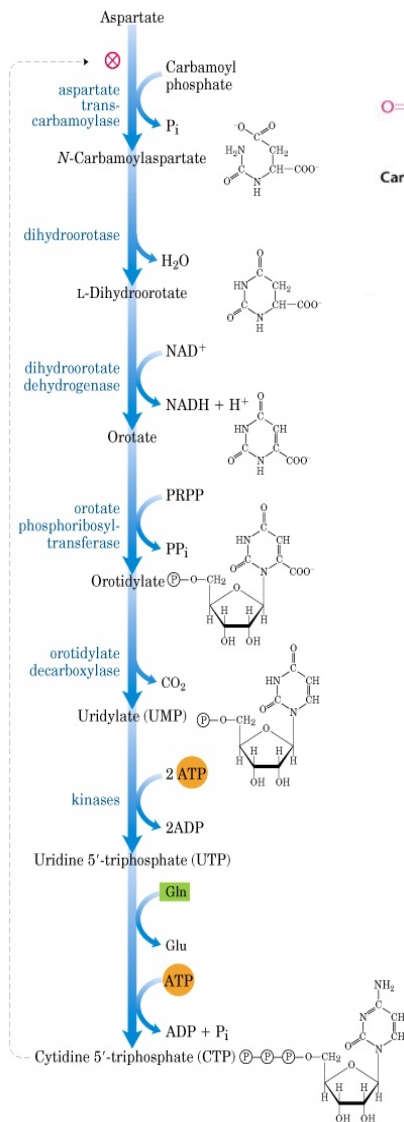
**Por modificación de la cantidad total de la proteína**

Biosíntesis

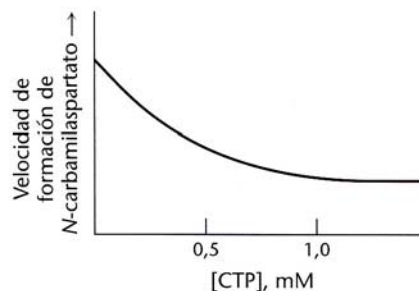
Degradación

## La Aspartato transcarbamilasa se inhibe alostéricamente por el producto final de su propia vía metabólica

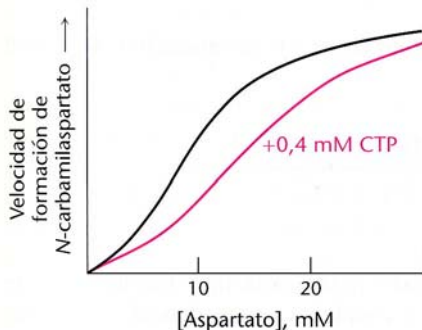
**Reacción ATCasa.** La aspartato transcarbamilasa cataliza la etapa limitante: la condensación de aspartato y carbamilfosfato para formar N-carbamilaspartato, en la síntesis de pirimidinas



**La ATCasa desarrolla una cinética sigmoidea.** La formación de producto en función de la concentración de sustrato genera una curva sigmoidea porque la unión del sustrato a un centro activo favorece la conversión del enzima entero al estado R, de forma que aumenta la actividad de los demás centros activos. Así pues, los centros activos muestran cooperatividad

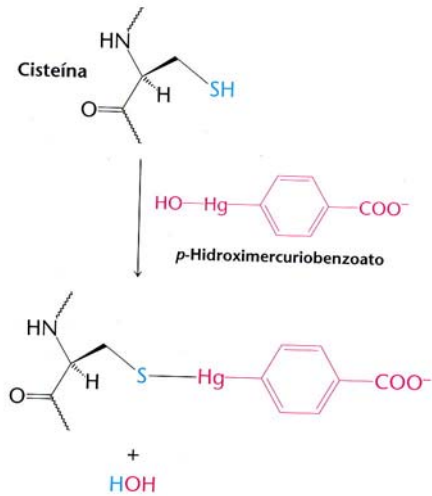


La citidina trifosfato, uno de los productos finales de la vía de síntesis de pirimidinas, inhibe a la aspartato transcarbamilasa, a pesar de tener poca semejanza estructural con los reactantes o los productos

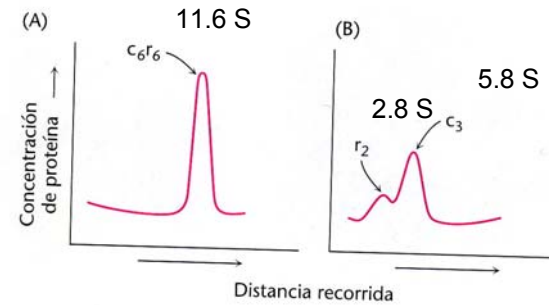


La citidina trifosfato (CTP) estabiliza el estado T de la ATCasa, haciendo más difícil que la unión del sustrato permita al enzima pasar al estado R. El resultado es que la curva se desplaza hacia la derecha.

## ATCasa composición: el complejo consta de subunidades catalíticas y reguladoras

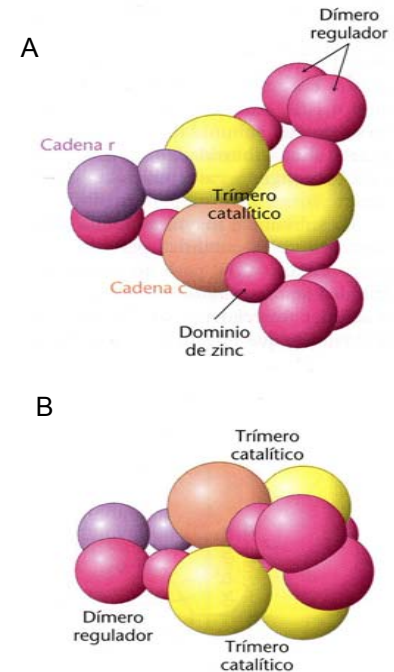


Modificación de los residuos de cisteína. El *p*-hidroximercurio benzoato reacciona con residuos de cisteína cruciales de la aspartato transcarbamilasa.

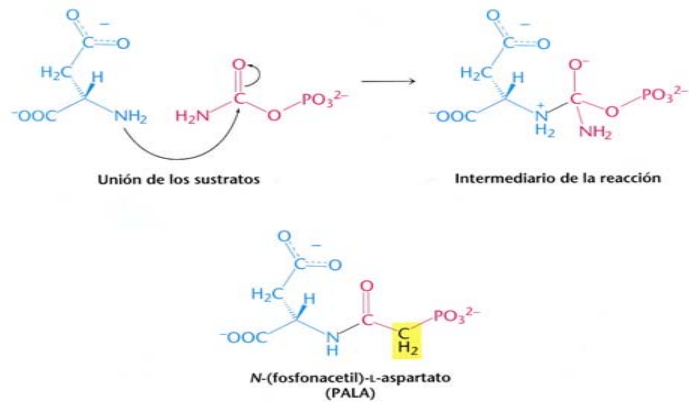


Estudios de ultracentrifugación de la ATCasa nativa (A), y del enzima después del tratamiento con *p*-hidroximercuribenzoato (B) demuestran que el enzima se puede disociar en las subunidades catalíticas y reguladoras.

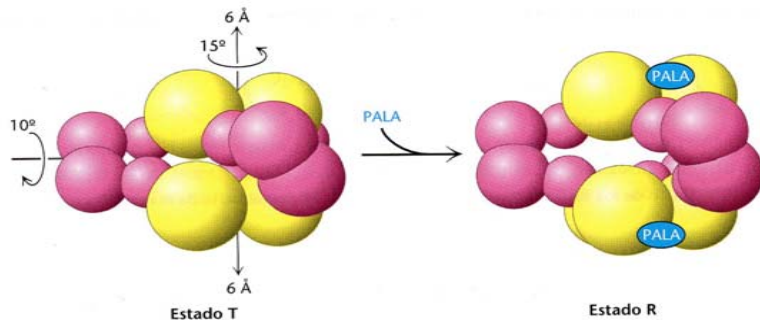
Estructura de la ATCasa. (A) La estructura cuaternaria de la aspartato transcarbamilasa vista desde arriba. El dibujo es una representación simplificada de las relaciones entre las subunidades. Sólo resulta visible uno de los trímeros [cadenas c catalíticas, en naranja y amarillo]. El otro trímero queda oculto detrás de él. (B) visión lateral del complejo.



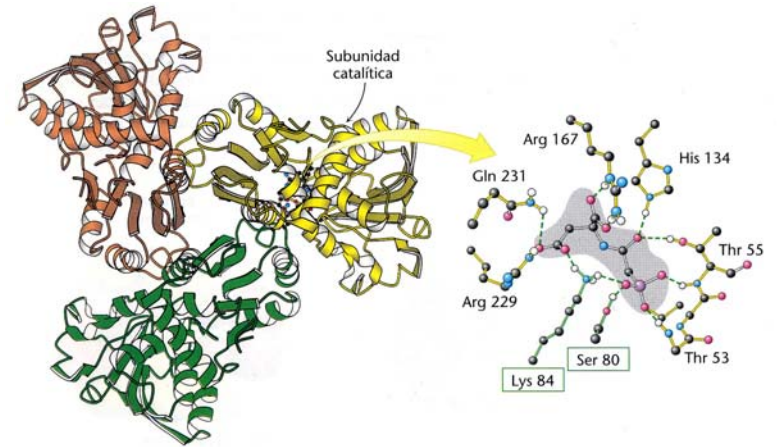
## Identificación de los centros activos



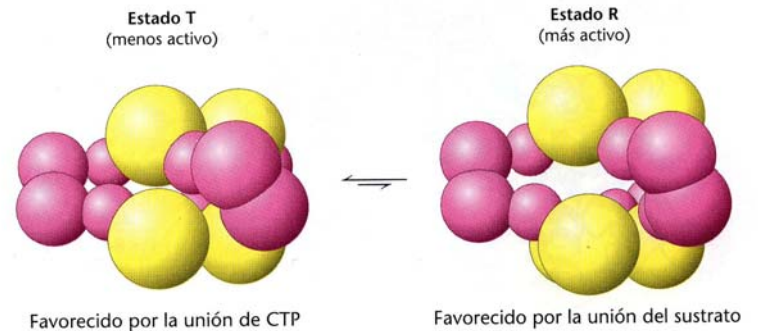
El PALA, un análogo bisustrato. (Arriba) el ataque nucleofílico del grupo amino del aspartato sobre el carbono carbonílico del carbamilfosfato genera un intermediario en el proceso de formación de N-carbamilaspartato. (Abajo) el N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA) es un análogo de este intermediario de la reacción y resulta ser un potente inhibidor competitivo de la aspartato transcarbamilasa.



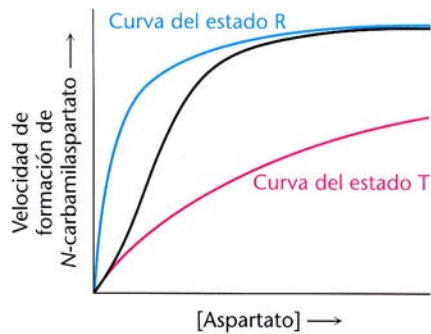
Transición del estado T al R. La aspartato transcarbamilasa presenta dos conformaciones: el estado T (tenso) compacto, relativamente inactivo; y el estado R (relajado), expandido. La unión del PALA estabiliza el estado R.



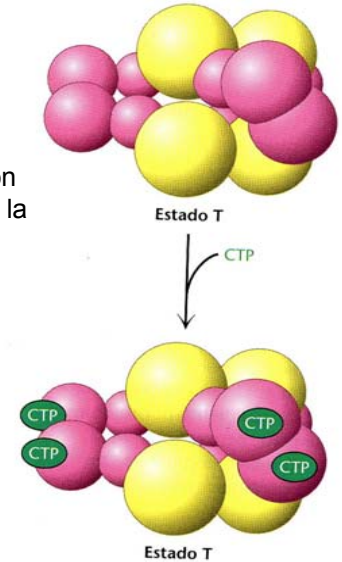
Centro activo de la ATCasa. Se muestran algunos residuos del centro activo, cruciales para unirse al inhibidor PALA. El centro activo está formado principalmente por residuos de una subunidad, pero la subunidad adyacente también contribuye con residuos importantes (en verde)



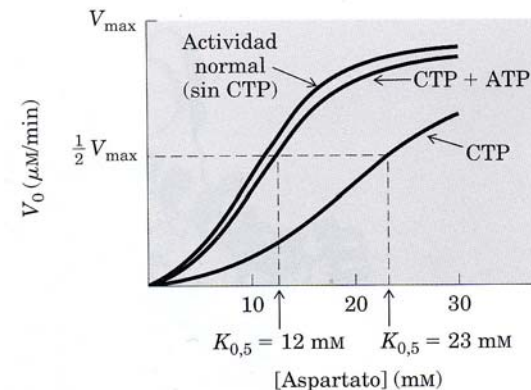
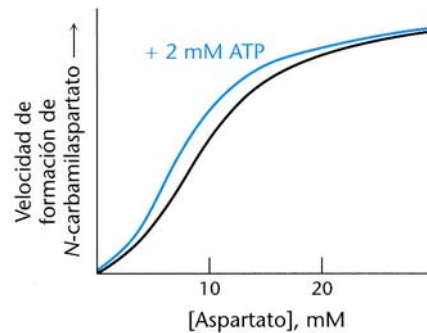
Los estados T y R están en equilibrio. Aún en ausencia de cualquier sustrato o regulador, la aspartato transcarbamilasa presenta un equilibrio entre los estados T y R. En estas condiciones, el estado T está favorecido en un factor de aproximadamente 200.



El CTP estabiliza el estado T. La unión de CTP a la subunidad reguladora de la ATCasa estabiliza el estado T



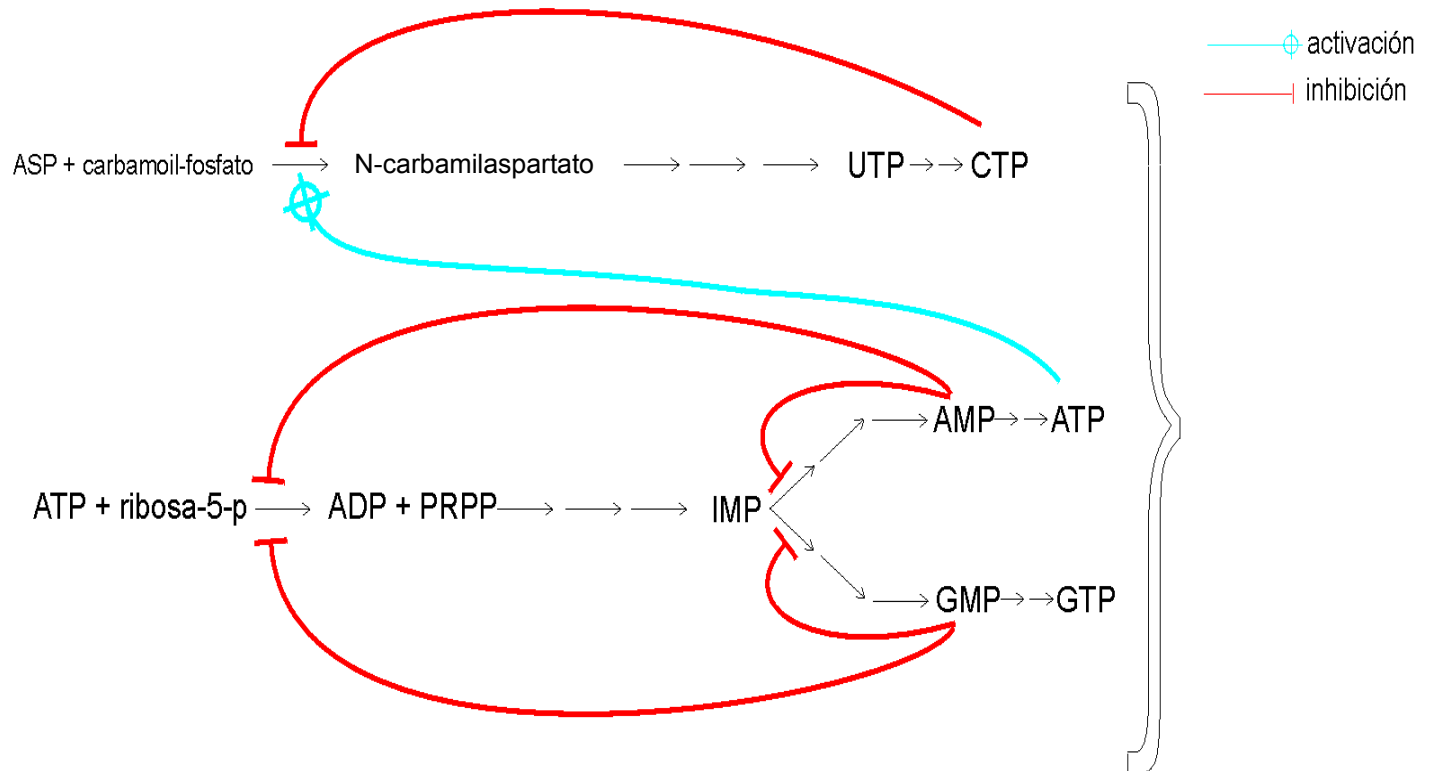
Fundamentos de la curva sigmoidea. La generación de la curva sigmoidea por efecto de la cooperatividad puede entenderse si imaginamos el enzima alostérico como una mezcla de dos enzimas michaelianos, uno con un elevado valor de  $K_m$ , que corresponde al estado T y otro con un bajo valor de  $K_m$ , que corresponde al estado R. Cuando la concentración de sustrato aumenta, el equilibrio se desplaza del estado T al R lo que provoca un brusco aumento de la actividad respecto a la concentración de sustrato.



Efecto del ATP sobre la cinética de la ATCasa. El ATP es un activador alostérico de la ATCasa porque estabiliza el estado R y facilita la unión del sustrato al enzima. El resultado es que la curva se desplaza a la izquierda (en azul).

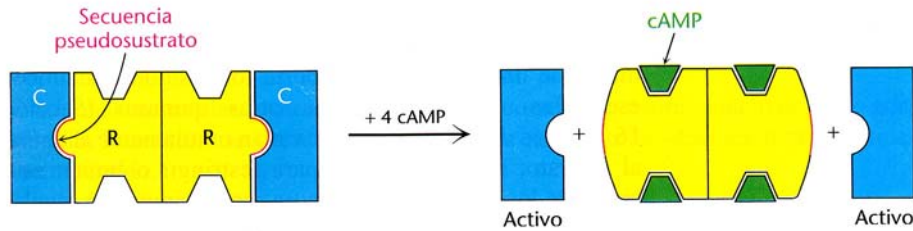
Regulación alostérica de la ATCasa por CTP y ATP. La adición de 0.8 mM de CTP, el inhibidor alostérico, aumenta la  $K_{0,5}$  para el aspartato (curva inferior) y disminuye la velocidad de conversión del aspartato en N-carbamilaspartato. El ATP a una concentración de 0.6 mM revierte completamente este efecto (curva central).

Esquema simplificado de las interacciones alostéricas en la síntesis de bases púricas y pirimidínicas en E.coli



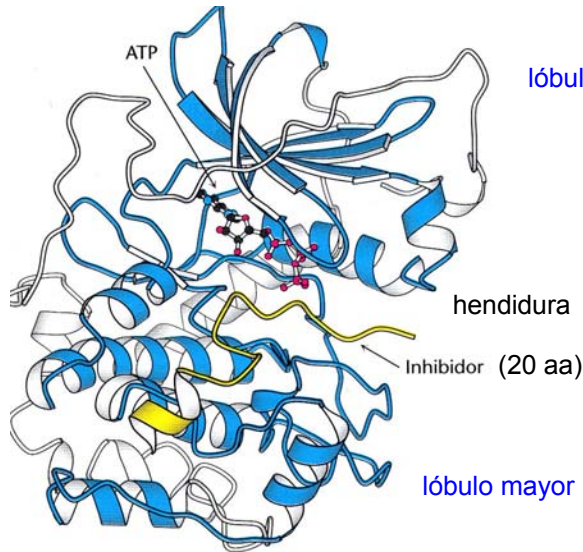


## Proteína Kinasa A (PKA): Un enzima alostérico con subunidades catalíticas (C) y reguladoras (R) disociables



Regulación de la proteína kinasa A. La unión de cuatro moléculas de AMPc activa a la proteína porque disocia el holoenzima (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) en una subunidad reguladora (R<sub>2</sub>) y dos subunidades catalíticamente activas (C).

El AMPc sirve como mensajero intracelular que media en las acciones fisiológicas de las hormonas. El hallazgo más sorprendente es que la mayoría de los efectos del AMPc en las células eucariotas se alcanza a través de la activación de una única proteína kinasa. La proteína kinasa A.



lóbulo menor

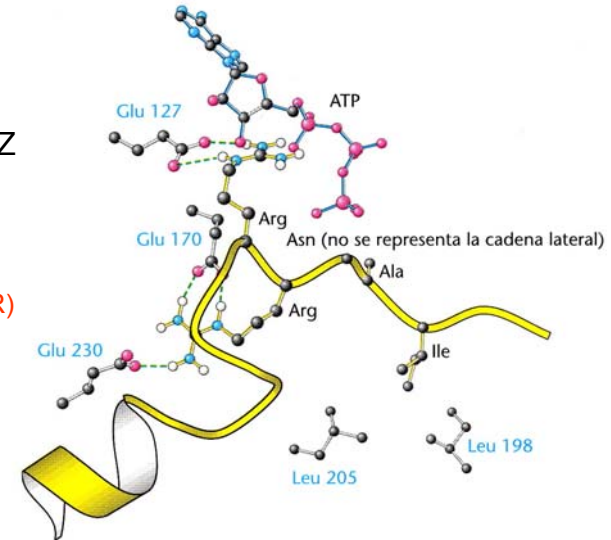
Secuencia consenso (proteína diana)

Arg-Arg-X-SER-Z o Arg-Arg-X-Thr-Z

Secuencia pseudosustrato (subunidad R)

Arg-Arg-Gly-Ala-Ile

X: aa pequeño; Z: aa hidrofóbico



Estructura tridimensional del complejo formado por la subunidad catalítica de la proteína kinasa A (350 residuos) y un inhibidor portador de una secuencia pseudosustrato. El inhibidor (en amarillo) se une a una hendidura situada entre los dominios del enzima. El ATP queda adyacente al centro activo.

Unión de un pseudosustrato a la PKA. Las cadenas laterales de las dos argininas del pseudosustrato forman puentes salinos con tres carboxilatos de sendos glutamatos. En el reconocimiento del sustrato también son importantes las interacciones hidrofóbicas. El residuo de isoleucina del pseudosustrato establece contacto con un par de leucinas del enzima.

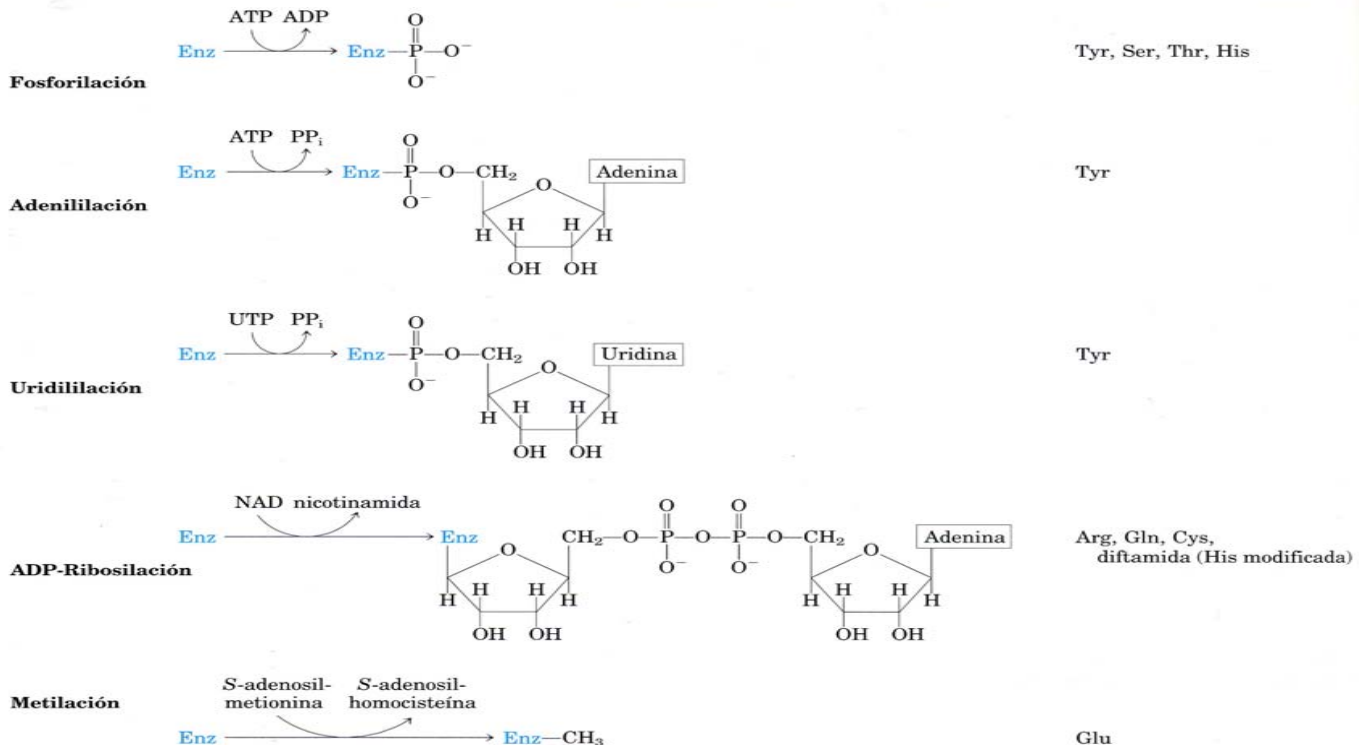
## Modificaciones covalentes comunes de la actividad de proteínas

Modificación	Molécula dadora	Ejemplo de proteína modificada	Función de la proteína
Fosforilación	ATP	Glucógeno fosforilasa	Regulación de la glucosa; transducción de energía
Acetilación	Acetil-CoA	Histonas	Empaquetado del DNA; transcripción
Miristilación	Miristil-CoA	Src	Transducción de señales
ADP-ribosilación	NAD	RNA polimerasa	Transcripción
Farnesilación	Farnesilpirofosfato	Ras	Transducción de señales
$\gamma$ -Carboxilación	$\text{HCO}_3^-$	Trombina	Coagulación de la sangre
Sulfatación	3'-Fosfoadenosina-5'-fosfosulfato	Fibrinógeno	Formación del coágulo sanguíneo
Ubiquitinación	Ubiquitina	Ciclina	Control del ciclo celular

## Ejemplos de reacciones de modificación de enzimas

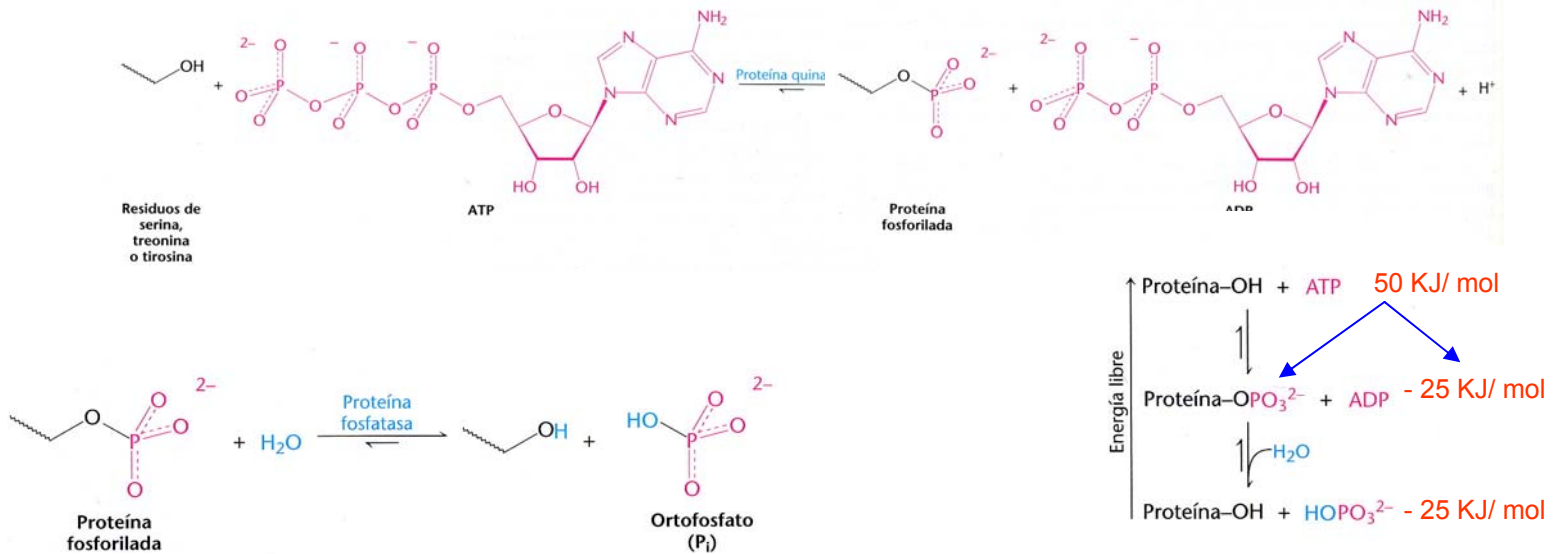
Modificación covalente

Residuos aminoácidos que se sabe aceptan la modificación covalente



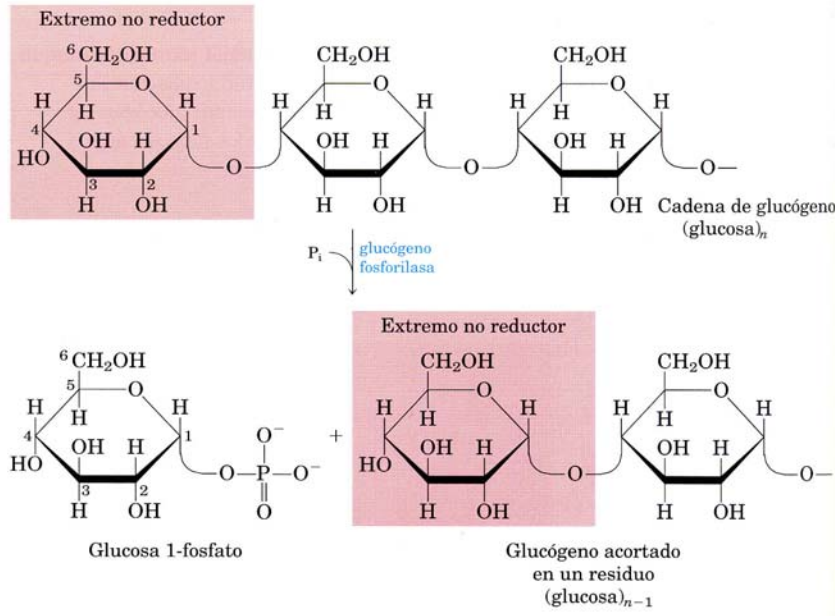


**La fosforilación es un mecanismo muy eficaz para regular la actividad de las proteínas por motivos estructurales, termodinámicos, cinéticos o reguladores**



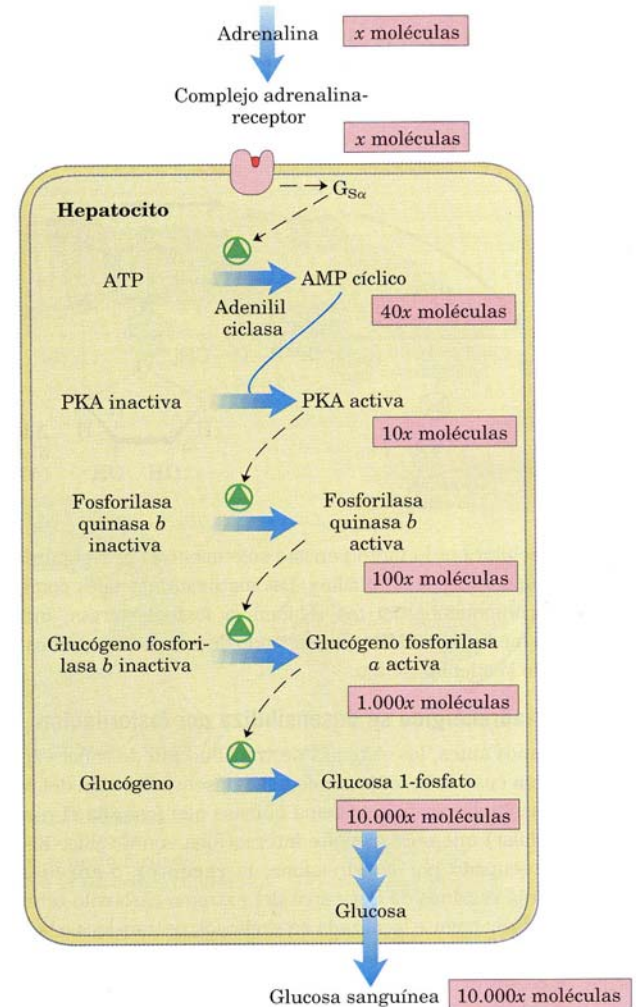
- 1) Un grupo fosforilo añade dos cargas negativas a la proteína que modifica → posibilidad de nuevas interacciones ocasionando cambios estructurales que pueden modificar la unión del sustrato y la actividad catalítica.
- 2) El grupo fosfato puede establecer tres o más enlaces por puentes de hidrógeno.
- 3) La energía libre de fosforilación es grande ( - 50 kJ mol<sup>-1</sup>) aportadas por el ATP, el 50 % se conserva en la proteína fosforilada y la otra mitad en hacer irreversible el proceso. Recuérdese que un cambio de energía libre de 5.69 kJ / mol repercute por un factor de 10 en la constante de equilibrio. Por tanto, la fosforilación puede alterar el equilibrio conformacional entre los diferentes estados funcionales de la proteína por un factor del orden de 10 exp 4.
- 4) La fosforilación y desfosforilación, pueden ser muy rápidas o lentas. Las cinéticas pueden ajustarse a las necesidades de cada proceso fisiológico.
- 5) La fosforilación puede desencadenar efectos amplificados: Una quinasa puede fosforilar centenares de moléculas de una proteína diana, si se trata de una enzima, puede tener lugar una amplificación ulterior, porque cada una de las moléculas puede transformar un gran número de moléculas de sustrato.
- 6) El ATP es la unidad biológica de energía, el uso de este compuesto como dador de fosforilos, conecta el estado energético de la célula con la regulación del metabolismo.

## Regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa por modificación covalente



Eliminación del residuo glucosa terminal del extremo no reductor de una cadena de glucógeno por medio de la glucógeno fosforilasa. Este proceso es repetitivo el enzima elimina sucesivamente residuos de glucosa a partir de un punto de ramificación.

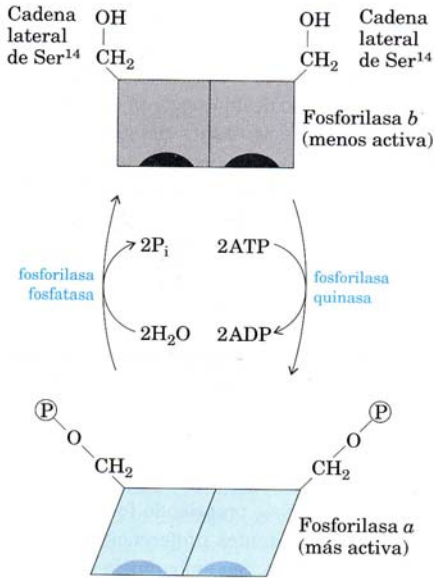
Cascada de la adrenalina. La adrenalina provoca una serie de reacciones en hepatocitos en las que unos catalizadores activan otros catalizadores, dando como resultado una gran amplificación de la señal. La unión de un pequeño número de moléculas de adrenalina a los receptores específicos  $\beta$ -adrenérgicos en la superficie celular activa la adenil ciclasa. Para ilustrar la amplificación, se muestran 40 moléculas de AMPc producidas por cada molécula de adenil ciclasa; las 40 moléculas activan 10 moléculas de PKA, cada molécula de PKA activa 10 moléculas del siguiente enzima, y así sucesivamente. Estas amplificaciones son probablemente mucho menores que la realidad.



### Fosforilasa kinasa



### Músculo



Activadores de la kinasa

- PKA - Adrenalina
- Calcio

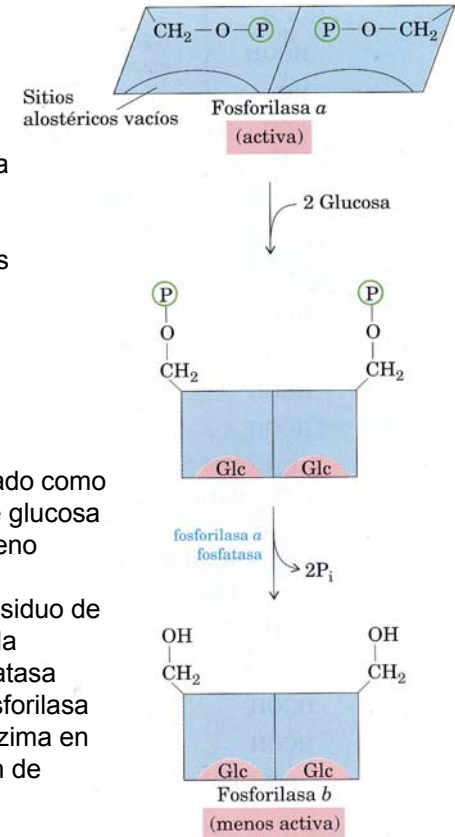
Moduladores alostéricos de la fosforilasa

- AMP activador
- ATP inhibidor

### Fosforilasa fosfatasa



### Hígado



Activadores de la kinasa

- PKA - Glucagón

Moduladores alostéricos de la fosforilasa

- Glucosa inhibidor

La glucogeno fosforilasa del hígado como sensor de glucosa. La fijación de glucosa a un sitio alostérico de la glucógeno fosforilasa a induce un cambio conformacional que expone el residuo de serina fosforilado a la acción de la fosforilasa a fosfatasa. Esta fosfatasa convierte a la fosforilasa a en fosforilasa b, reduciendo la actividad del enzima en respuesta a la alta concentración de glucosa en sangre

En la forma más activa del enzima, la fosforilasa a, residuos de Ser específicos, uno en cada subunidad, se encuentran en estado fosforilado. La fosforilasa a se convierte en fosforilasa b, que es menos activa, por pérdida enzimática de estos grupos fosforilo, promovida por la fosforilasa fosfatasa. La fosforilasa b se puede reconvertir (reactivar) en fosforilasa a por acción de la fosforilasa kinasa.

## Control hormonal

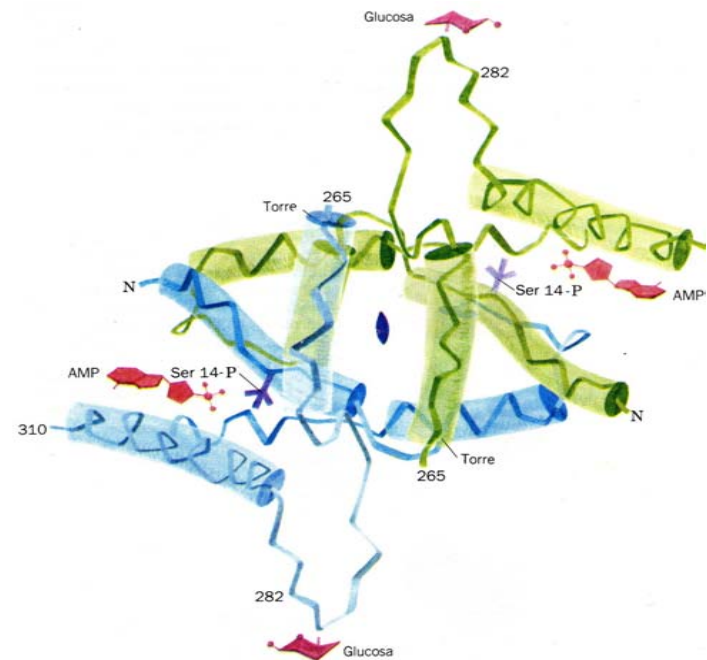
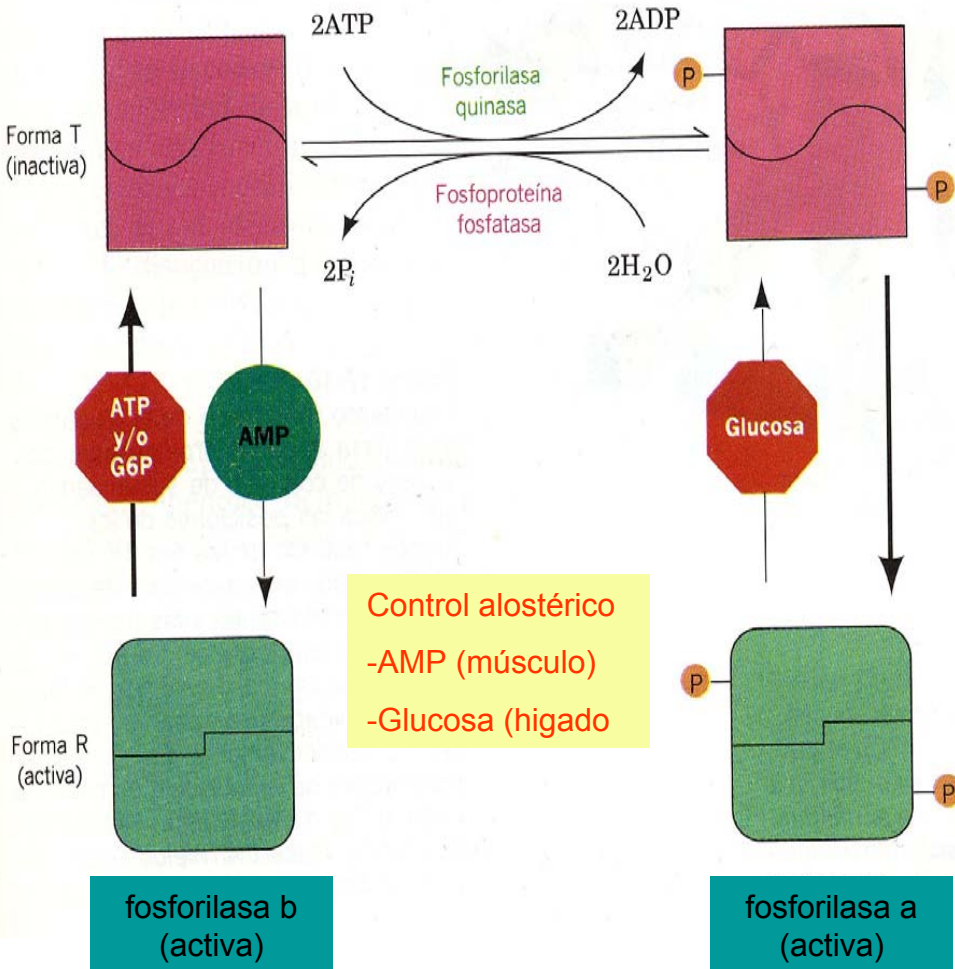
Adrenalina

Glucagón

Control de la actividad glucógeno fosforilasa. El enzima puede adoptar la configuración T, enzimáticamente inactiva (arriba), o la forma R, catalíticamente activa (abajo). La conformación de la fosforilasa b está controlada alostéricamente por efectores como AMP, ATP y Glucosa-6P y, por lo general, en condiciones fisiológicas, se encuentra en el estado T. En cambio. La forma modificada del enzima, la fosforilasa a, no responde a estos efectores y se encuentra principalmente en el estado R, a menos que exista un nivel elevado de glucosa. En condiciones fisiológicas normales, la actividad enzimática de la glucógeno fosforilasa viene determinada esencialmente por sus velocidades de modificación y desmodificación. Observe que solamente la forma T del enzima está sujeta a fosforilación y desfosforilación, con lo que la unión de los efectores afecta las velocidades de modificación/desmodificación

fosforilasa b  
(inactiva)

fosforilasa a  
(inactiva)



Fragmento del dímero de la glucógeno fosforilasa a, en las proximidades de la zona de contacto de subunidades, que indica las posiciones de los grupos fosforilo de la SER 14. Los AMPs unidos en los centros de unión del efector alostérico y las moléculas de glucosa unidas al centro activo.

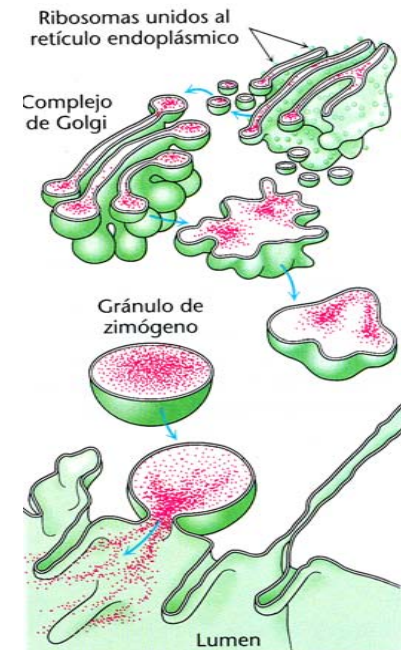
## Modificaciones covalentes irreversibles

### Muchas proteínas se activan por escisiones proteolíticas específicas

- 1) Los enzimas digestivos que hidrolizan a las proteínas son sintetizados como zimógenos en el estómago o en el páncreas.
- 2) La coagulación sanguínea está mediada por una cascada de activaciones proteolíticas.
- 3) Algunas hormonas proteicas se sintetizan como precursores inactivos. Ejemplo, la insulina
- 4) La proteína fibrosa colágeno, principal componente de la piel y del hueso deriva del procolágeno.
- 5) Durante el desarrollo y post-parto se reabsorbe grandes cantidades de colágeno. La conversión de procologenasa en colagenasa.
- 6) La muerte celular programada o apoptosis. La activación de las caspasas a partir de las procaspasas.

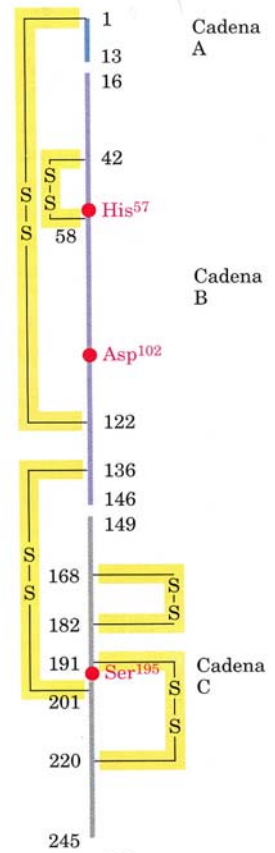
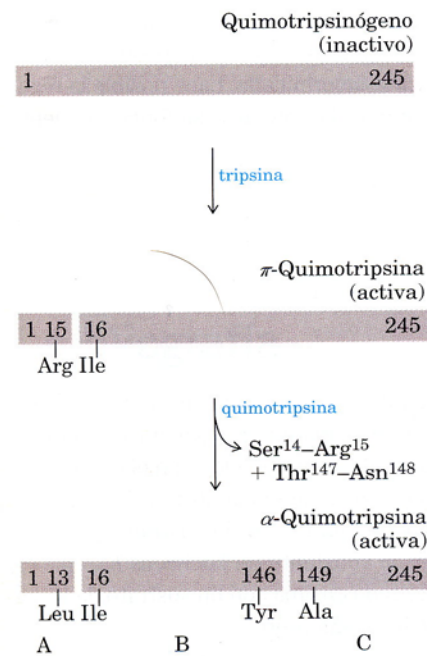
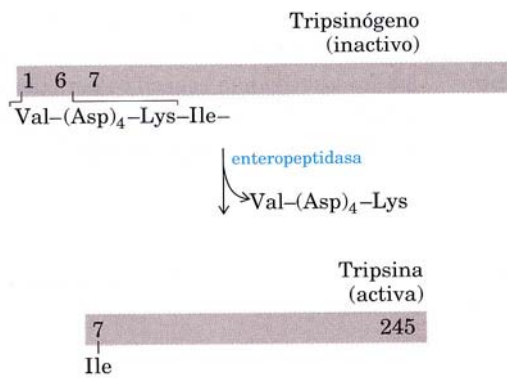
### Zimógenos gástricos y pancreáticos

Lugar de la síntesis	Zimógeno	Enzima activo
Estómago	Pepsinógeno	Pepsina
Páncreas	Quimotripsinógeno	Quimotripsina
Páncreas	Tripsinógeno	Tripsina
Páncreas	Procarboxipeptidasa	Carboxipeptidasa
Páncreas	Proelastasa	Elastasa

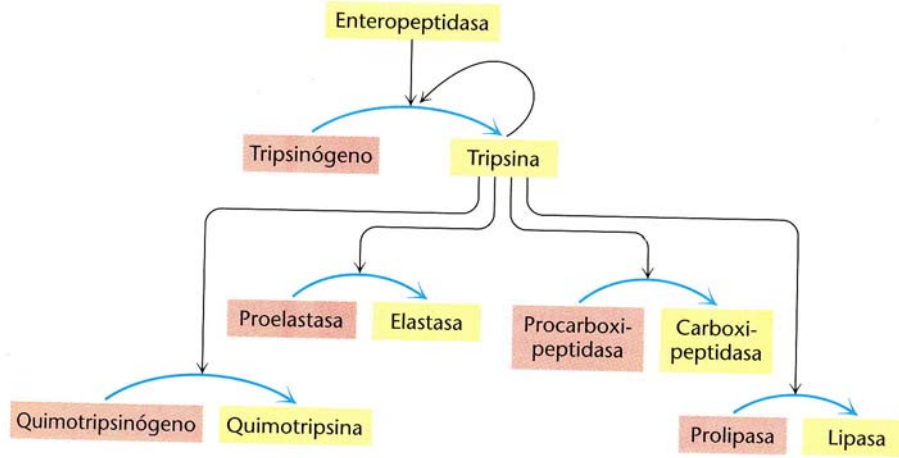


**Secreción de zimógenos por una célula acinar del páncreas**





Activación de zimógenos por rotura proteolítica. Se muestra la formación de quimotripsina y tripsina a partir de sus zimógenos. Las barras representan la secuencia primaria de las cadenas polipeptídicas. Los aminoácidos en los extremos de los fragmentos polipeptídicos generados por la rotura se indican debajo de las barras. Los números representan las posiciones de los aminoácidos en la secuencia primaria de los zimógenos quimotripsinógeno o tripsinógeno (el aminoácido N-terminal es el número 1). Las tres cadenas polipeptídicas (A,B y C) de la quimotripsina están unidas por puentes disulfuro (esquema de la derecha).



La enteropeptidasa (secretada por las células del duodeno) inicia la activación de los zimógenos pancreáticos mediante la activación de la tripsina, la cual activa después a los demás zimógenos. Los enzimas activos se representan en amarillo; los zimógenos en anaranjado

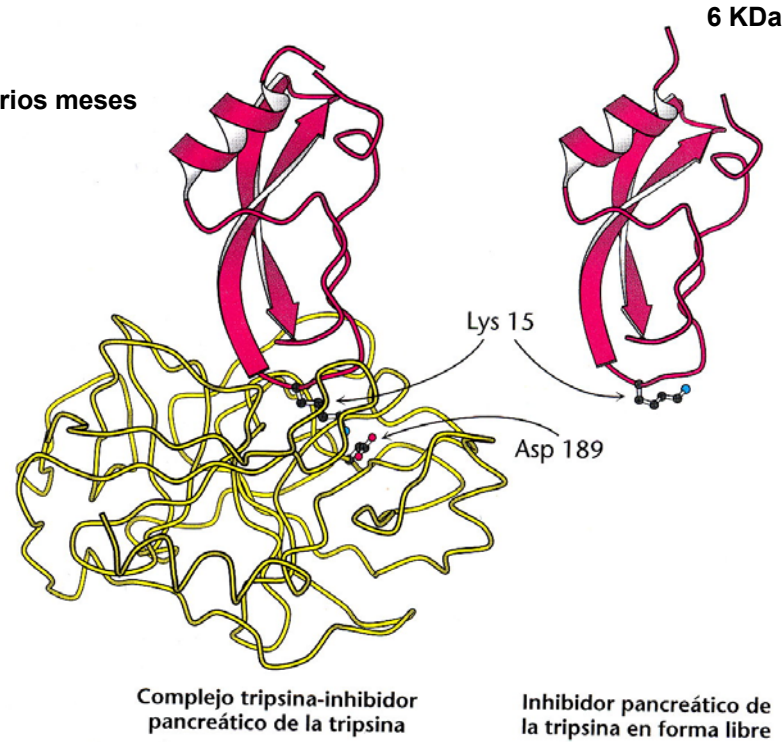


## Propiedades de la unión proteína-ligando

$K_d = 0.1 \text{ pM}$

$\Delta G^\circ = -75 \text{ KJ / mol}$

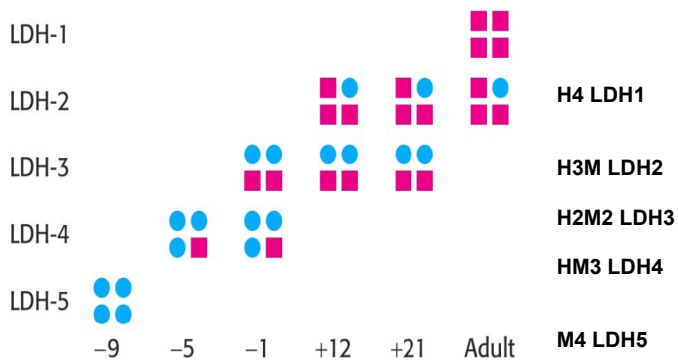
vida media del complejo = varios meses



Interacción de la tripsina con su inhibidor. Estructura del complejo de la tripsina (amarillo) y el inhibidor pancreático de la tripsina (rojo). La lisina 15 del inhibidor penetra en el centro activo del enzima y forma un puente salino con el aspartato 189 de este centro activo. El inhibidor unido al enzima y el inhibidor libre tienen una estructura casi idéntica.

## Isoenzimas: el sistema LDH

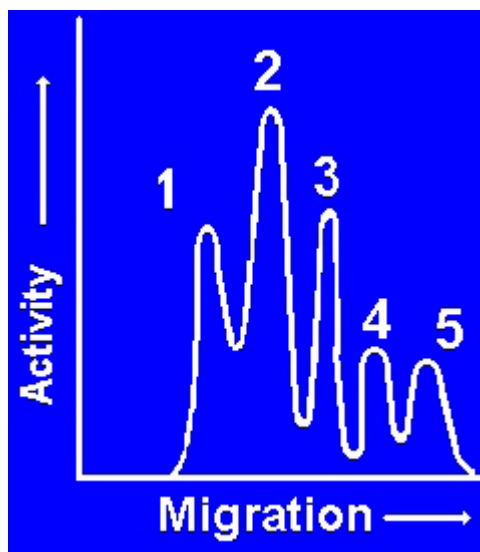
Cambios en la expresión de las formas isoenzimáticas de LDH de corazón de rata a lo largo del desarrollo



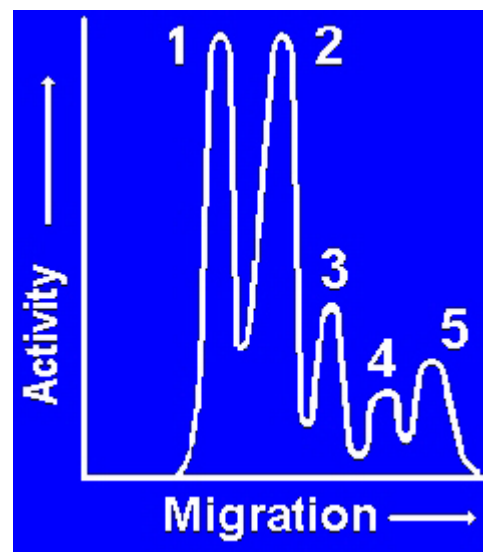
Patrón de distribución de isoenzimas de LDH

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
LDH-1	High	Low	Low	Low	Low	Low	Low
LDH-2	High	Low	Low	Low	Low	Low	Low
LDH-3	Low	High	High	High	Low	Low	Low
LDH-4	Low	High	Low	High	High	High	Low
LDH-5	Low	Low	Low	Low	Low	High	High

normal



paciente



Alteración del perfil electroforético de los isoenzimas de LDH en suero humano como consecuencia de un infarto de miocardio.