

15

CAPÍTULO

Enzimas y centro activo

Todas las funciones que realizan los seres vivos tienen su fundamento en un número extraordinario de reacciones químicas, que se agrupan de manera funcional y dan lugar a los procesos biológicos encargados de mantener, desarrollar y perpetuar a cada individuo.

Todas las reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos dependen de la existencia de un catalizador, bien porque ellas sean catalizadas, bien porque su reactante, su producto o ambos requieran de un catalizador para producirse o consumirse respectivamente. El fenómeno de la catálisis presenta características tan especiales en los seres vivos que hemos asignado el término de biocatálisis para describirlo; su presencia universal en los procesos moleculares hace que la biocatálisis constituya una categoría central en el estudio de la bioquímica.

Los catalizadores que actúan en los seres vivos son los biocatalizadores, que se caracterizan por presentar una estructura molecular compleja y funcionar con eficiencia y especificidad elevadas, como se vio en el capítulo anterior.

El funcionamiento de los biocatalizadores depende no sólo de su estructura y de las propiedades derivadas de ésta, también de sus interacciones con el resto de los componentes celulares, interacciones que en ocasiones son determinantes.

En este capítulo se trata el estudio de la estructura de los biocatalizadores, de su mecanismo general de acción y sus principales propiedades. El conocimiento de estos aspectos es imprescindible para el estudio adecuado, no sólo del metabolismo celular sino de casi todas las funciones del organismo.

Biocatalizadores

Las proteínas realizan múltiples funciones en los seres vivos: contracción, transporte, regulación, sostén, defensa, etcétera. En todos los casos existe en el fundamento de su actividad un mecanismo de reconocimiento molecular, o sea, una interacción específica entre la proteína y una o más sustancias.

Las proteínas especializadas en la función catalítica reciben el nombre de enzimas y las sustancias sobre las cuales actúan se denominan sustratos.

Lo que distingue a las enzimas de las demás proteínas es precisamente que, una vez producido el reconocimiento molecular del sustrato, se realiza la transformación de la sustancia reconocida, o sea, como consecuencia de diferentes interacciones entre la proteína enzimática y su sustrato, éste experimenta un reordenamiento de sus elementos

constituyentes debido a la ruptura y formación de algunos enlaces químicos. La sustancia que resulta de la acción de la enzima sobre el sustrato recibe el nombre de producto.

Las reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos presentan casi siempre una energía de activación tan elevada, que en condiciones compatibles con la vida ocurrirían a velocidades casi nulas, con lo cual la vida (al menos en las condiciones actuales) sería prácticamente imposible.

Como consecuencia, una de las principales adquisiciones evolutivas de los seres vivos fue la aparición de proteínas con actividad catalítica, que al disminuir la energía de activación de las reacciones hacen posible no sólo que éstas se produzcan a gran velocidad, sino que se lleven a cabo en condiciones moderadas de temperatura, pH, etcétera, compatibles con la vida.

Un ejemplo puede ilustrar mucho esta situación, la hidrólisis del enlace peptídico es energéticamente favorable ($\Delta G^{\circ} = -2 \text{ kcal.mol}^{-1}$); sin embargo, la energía de activación para la reacción no catalizada en condiciones normales -solución acuosa neutra y temperatura ambiente- es tan elevada, que la velocidad de reacción puede demorarse algunos meses antes que se puedan detectar los productos. Esto hace que los procedimientos empleados para la hidrólisis de proteínas sean realmente drásticos. Los bioquímicos pueden hidrolizar de forma química las proteínas mediante una solución 6 M de ácido clorhídrico en un ampulita al vacío a 100 °C durante 24 h; sin embargo, algunas enzimas como la quimotripsina o la tripsina catalizan la hidrólisis a 37 °C, en pH neutro y según la proteína utilizada como sustrato cada molécula de enzima puede hidrolizar hasta 100 enlaces peptídicos por segundo. Prueba de ello es el proceso digestivo, pues apenas una hora después de ingerir una comida rica en proteínas, es posible detectar sus aminoácidos en la sangre.

En muchas ocasiones para la realización de estas transformaciones es suficiente con la participación de la proteína enzimática, pero en otros casos se requiere el concurso de otros elementos que reciben el nombre de cofactores, que pueden ser iones inorgánicos o compuestos orgánicos de bajo peso molecular; en este último caso reciben el nombre de coenzimas. Si bien la proteína enzimática vuelve al estado inicial al final de la misma reacción, las coenzimas requieren de una reacción posterior. Las proteínas enzimáticas y sus cofactores correspondientes constituyen los sistemas biocatalíticos.

Las especificidades de acción y de sustrato están determinadas fundamentalmente por la parte proteínica del sistema biocatalítico, como lo demuestra la existencia de cofactores que actúan con enzimas que difieren en el tipo de reacción que catalizan y en el sustrato que transforman; también la sensibilidad a la temperatura, a los cambios de la concentración de H^+ y la solubilidad corresponden a la parte proteínica y no a los cofactores; sin embargo, los cofactores influyen de forma importante en la eficiencia y las propiedades cinéticas de los sistemas biocatalíticos.

Mecanismo básico de acción de las enzimas

Aun cuando cada enzima al catalizar una reacción lo hace de una forma particular, existen algunos hechos que son de tipo general y que se manifiestan en todas las enzimas.

Todas las reacciones enzimáticas se realizan al menos en 2 etapas, una primera en la cual se produce la unión física entre la enzima (E) y el sustrato (S), que da origen al complejo enzima-sustrato (ES) y se forma de manera reversible, o sea, puede descomponerse nuevamente dando origen al sustrato y a la enzima libre. No debe confundirse el complejo enzima-sustrato con el complejo activado que fue estudiado en el capítulo anterior (Fig. 15.1).

Una vez formado el complejo enzima-sustrato éste puede realizar la transformación del sustrato, dando origen al producto (P) y a la enzima libre que está en condiciones de volver a iniciar el proceso.

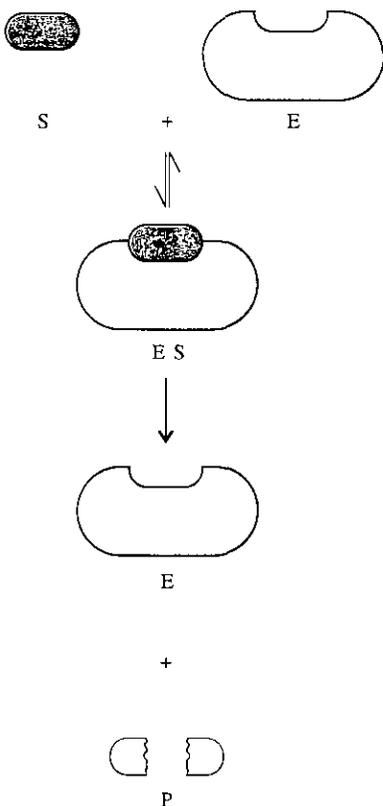


Fig. 15.1. El complejo enzima sustrato. Durante la reacción catalizada por una enzima, ésta forma un complejo intermediario con el sustrato. La unión de la enzima con el sustrato es muy específica y constituye un paso obligado para la formación de los productos.



A la etapa número 1 le llamamos etapa de unión, y a la número 2 de transformación. La actividad de las enzimas puede ser modificada y afectar la etapa 1, la 2 o ambas. Esta es una representación simplificada, pues es posible suponer la existencia de otros complejos intermediarios sobre todo cuando en la reacción intervienen cofactores o más de un sustrato.

El punto crucial de este mecanismo básico es la existencia del complejo enzima-sustrato, que fue propuesta por primera vez por *Henry* en 1905 y a partir de ese momento se han reunido una serie importante de indicios acerca de su presencia:

1. Las propiedades físicas de las enzimas, como su solubilidad y estabilidad al calor, cambian frecuentemente con la formación del complejo enzima-sustrato.
2. Las características espectroscópicas de muchas enzimas y sustratos cambian con la formación del complejo ES, de la misma forma que el espectro de absorción de la hemoglobina cambia al unirse con el oxígeno. Otras técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear y la resonancia magnética electrónica son también muy informativas acerca de las interacciones ES.
3. Los complejos ES algunas veces han podido ser aislados en forma pura. Para una enzima que cataliza la reacción



a veces es posible aislar un complejo EA, si la enzima tiene afinidad suficiente por A y se incuba en ausencia de B.

4. La formación del complejo ES muestra un elevado grado de especificidad, por ejemplo la D-serina no es sustrato de la triptófano sintetasa, que utiliza L-serina; el isómero D ni siquiera se une a la enzima; esto supone que el lugar de unión del sustrato tiene una forma muy definida.
5. Algunos complejos ES se han visualizados directamente por microscopía electrónica y por difracción de rayos X. Los complejos de ácidos nucleicos y sus enzimas polimerasas se observan de manera fácil en microfotografías electrónicas.

La comprobación de la existencia del complejo enzima-sustrato orientó la búsqueda de las características de las enzimas que permiten su formación; los resultados se exponen a continuación.

Centro activo

La existencia del complejo enzima-sustrato y la característica de que la mayoría de los sustratos presentan un tamaño varias veces menor que la estructura de la enzima, implican que la enzima sólo entra en contacto con el sustrato en una pequeña zona específica de su voluminosa estructura; esto se confirma con algunos experimentos en los cuales se eliminaban varios aminoácidos de las enzimas sin alterar su función.

Las proteínas enzimáticas presentan 2 regiones o sitios importantes, uno de ellos reconoce y liga al sustrato (sitio de reconocimiento) y el otro cataliza la reacción (sitio catalítico) toda vez que el sustrato se ha unido. Estos 2 sitios están adyacentes uno al otro en la forma activa de la enzima y, en ocasiones, el sitio catalítico es parte del de reconocimiento, estas 2 regiones en conjunto reciben el nombre de centro activo.

Aunque las enzimas difieren mucho en estructura, especificidad y modo de catálisis, se puede establecer un número de generalizaciones con respecto a la estructura de los centros activos (Fig. 15.2):

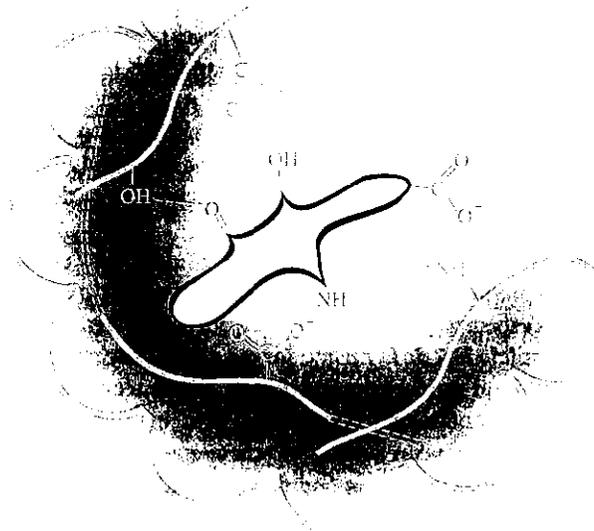


Fig. 15.2. Estructura del centro activo. Gracias al repliegue de la cadena polipeptídica se forma una cavidad que posee una estructura tridimensional complementaria a la del sustrato. El centro activo contiene grupos específicos que sirven, unos para la unión del sustrato y otros para su transformación.

1. El centro activo representa una porción pequeña del volumen total de la enzima; muchos de los residuos de aminoácidos de la enzima no entran en contacto con el sustrato.
2. El centro activo de una enzima tiene un conjunto de grupos químicos ordenados espacialmente de forma precisa, esto hace que el sustrato quede unido al centro activo de forma tan íntima que casi ninguna otra molécula puede unirse.
3. El centro activo es una entidad tridimensional, éste se presenta generalmente como una cavidad constituida según los repliegues que la cadena polipeptídica forma al establecer su estructura terciaria.
4. Los aminoácidos de las 2 regiones del centro activo no necesariamente están adyacentes unos a otros en la cadena polipeptídica lineal; el acercamiento se produce como consecuencia del plegamiento de la cadena.
5. El centro activo está situado superficialmente en la enzima, permite el acceso de las moléculas del sustrato con relativa facilidad.
6. Los grupos que intervienen en la formación del centro activo realizan diferentes funciones.

En la estructura del centro activo se pueden distinguir varios componentes cada uno de los cuales contribuye a la función general pero de forma diferente:

1. Eje peptídico. Formado por la parte monótona de la estructura polipeptídica, cuyos pliegues y repliegues contribuyen de manera importante a dar la forma tridimensional del centro activo.
2. Grupos de ambientación. Son cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en el centro activo y que son de naturaleza apolar, contribuyen a que éste presente características que no permitan la entrada del agua; esta característica provoca cambio en las propiedades catalíticas de otros grupos y además, permite que se refuercen las interacciones débiles entre la enzima y el sustrato.

3. **Grupos de fijación.** También son cadenas laterales de aminoácidos que presentan grupos funcionales capaces de establecer interacciones específicas con el sustrato; estas interacciones suelen ser de 3 tipos fundamentales:

- Puentes de hidrógeno que se establecen entre grupos polares de las cadenas laterales de los aminoácidos serina, treonina, tirosina, etcétera, con grupos polares del sustrato.
- Enlaces salinos o iónicos que pueden formarse entre grupos que presentan cargas eléctricas de la cadena lateral de los aminoácidos aspártico, glutámico, histidina, arginina y lisina, con grupos de carga opuesta en el sustrato.
- Fuerzas de Van der Waals o fuerzas residuales que se establecen entre grupos del centro activo y del sustrato que se localizan muy cerca unos de otros y no tienen características que les permitan otro tipo de interacción.

Debido a que el agua tiene una constante dieléctrica muy elevada, la ausencia de agua en el centro activo hace que estas interacciones, que de por sí son débiles, sean algo más fuertes que en un ambiente polar.

Los puentes de hidrógeno son también un factor importante en la orientación del sustrato en su entrada al centro activo, pues ellos tienen carácter direccional que no poseen las demás interacciones.

Estos 3 componentes (eje peptídico, grupos de ambientación y grupos de unión) son determinantes en la etapa de unión de la enzima con el sustrato. Esta unión está determinada por 2 factores principales, la complementariedad espacial o estérica que se establece entre la conformación del centro activo y la estructura del sustrato; así como la complementariedad química entre los grupos del centro activo y los del sustrato.

4. **Grupos catalíticos.** Al igual que los anteriores son cadenas laterales de aminoácidos que participan en la estructura del centro activo, pero son los que están implicados de forma directa en la transformación del sustrato: los que cumplen con mayor frecuencia esta función son el imidazol de la histidina y el hidroxilo de la serina, también han sido demostrados el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína y el carboxilo del aspártico, o del glutámico.

Estos son los grupos que intervienen en la segunda etapa de la reacción o etapa de transformación; sin embargo, no se puede olvidar que si la primera etapa no se realizó satisfactoriamente, la segunda etapa se verá también afectada, pues no puede haber una adecuada transformación si la unión ha sido deficiente.

El centro activo es una estructura dinámica. Si las fuerzas que mantienen la estructura del centro activo son fundamentalmente interacciones débiles, en un conjunto de moléculas de una misma enzima existirán centros activos que presenten diferentes estados conformacionales interconvertibles, desde aquéllos que facilitan mucho la unión al sustrato hasta los que casi no permiten la entrada del sustrato, pasando por todos los estados intermedios imaginables.

Formación del complejo enzima-sustrato

Se han postulado 2 hipótesis para explicar la formación del complejo enzima-sustrato, las llamadas de la llave y la cerradura, así como la de adaptación inducida.

La unión del sustrato con la enzima puede implicar mantener juntas 2 moléculas que presentan una estructura complementaria desde el punto de vista espacial o químico, o ambos, en un complejo que se estabiliza por un número variado de interacciones débiles. Como este tipo de acoplamiento recuerda al que se produce entre una llave y su cerradura, para describir esta unión se dice que se produce por un mecanismo así llamado *lock and key*. Para que este mecanismo se produzca el centro activo debe poseer una estructura tridimensional complementaria al sustrato aun en ausencia de éste.

Sin embargo, en algunas enzimas la estructura complementaria del centro activo sólo existe cuando está unido el sustrato; la unión de éste induce un cambio conformacional en la enzima, hace que los residuos catalíticos adopten la posición adecuada, lo cual significa que a medida que el sustrato penetra en el centro activo éste adquiere su forma funcional óptima. Las moléculas que se unen al sitio de reconocimiento de la enzima, pero no inducen ese cambio conformacional, no son sustratos de la enzima; de esta forma una enzima puede diferenciar un sustrato de un no sustrato por 2 factores, primero, si la sustancia puede unirse a la enzima y segundo, si puede provocar el cambio conformacional pertinente. Cuando las 2 condiciones se cumplen se dice que el mecanismo de unión es por adaptación inducida.

La glucoquinasa es un ejemplo interesante de este tipo de mecanismo; esta enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la glucosa y algunas otras hexosas. Algunos estudios de cristalografía de rayos X han demostrado que estructuralmente la enzima está formada por 2 lóbulos; la unión de la glucosa induce un cambio conformacional grande que aproxima los 2 lóbulos y crea un sitio catalítico funcional (Fig. 15.3). Sólo la glucosa y otras moléculas de estructura muy similar pueden inducir el cambio conformacional que asegura que la enzima fosforile a sustratos correctos. Algunas sustancias como el glicerol, la ribosa y aun el agua pueden unirse a la enzima en el sitio de reconocimiento, pero ninguna de ellas induce el cambio conformacional requerido y por tanto no son sustratos de la enzima.

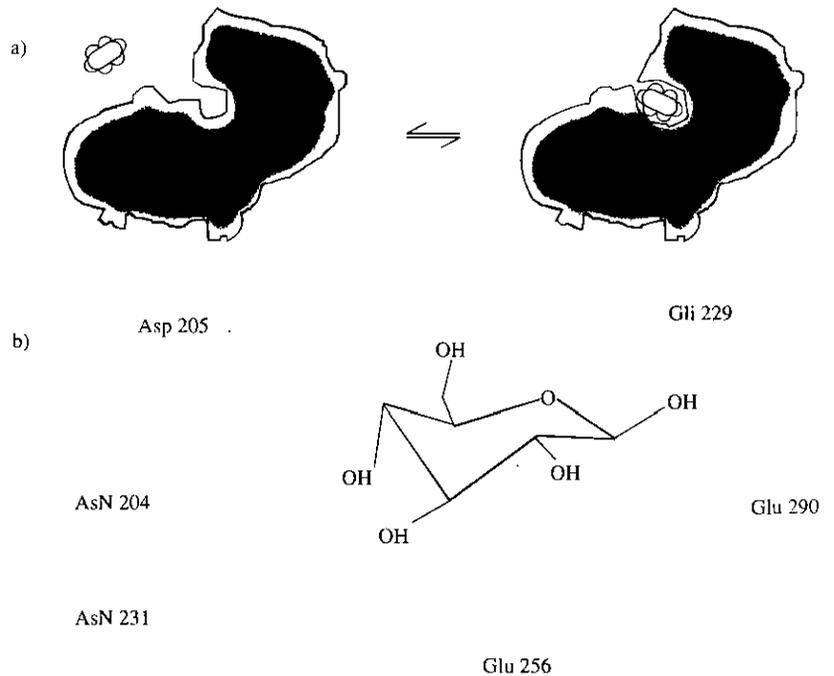


Fig. 15.3. Adaptación inducida en la glucoquinasa. La enzima está formada por una sola cadena polipeptídica que adopta una estructura tridimensional formada por 2 lóbulos que delimitan una profunda depresión donde está localizado el centro activo, al unirse con el sustrato se produce la transconformación de la enzima que provoca un acercamiento entre los 2 lóbulos, por lo que el sustrato queda atrapado como se muestra en a). En b) aparecen los grupos del centro activo que forman puentes de hidrógeno con la glucosa. Obsérvese que estos grupos pertenecen a los aminoácidos que no ocupan posiciones consecutivas en la cadena polipeptídica.

Estudios de la formación del complejo enzima-sustrato en numerosas enzimas han puesto de manifiesto que algunas de ellas funcionan según el mecanismo llave-cerradura, en tanto, otras lo hacen por adaptación inducida.

Mecanismos de la catálisis

El asombroso incremento de la velocidad de las reacciones que logran las enzimas escapa a las explicaciones clásicas de este fenómeno en el mundo inanimado. Ha sido necesario un estudio minucioso de la forma en que actúan enzimas específicas, además de modelaciones experimentales y trabajos de investigación teórica para tener una explicación aproximada de porqué las enzimas tienen la capacidad de incrementar de forma tan notable la velocidad de las reacciones; se han identificado numerosos facto-

res que pueden influir en la acción de los catalizadores, pero en este momento sólo se mencionarán aquéllos que están más relacionados con el funcionamiento de las enzimas, los llamados efectos de aproximación, inmovilidad y orientación.

Cuando el sustrato se aloja en el centro activo, lo hace de una manera forzada con cierto grado de distorsión de la estructura, que puede provocar la aproximación de grupos reactivos del sustrato y favorecer el desarrollo de la reacción; este efecto es aún más evidente en las reacciones con 2 sustratos, los cuales al asociarse sobre la superficie de la enzima quedan muy próximos y de esta forma se facilita la reacción.

Las estructuras químicas son dinámicas; los grupos químicos poseen movimientos de rotación alrededor de los enlaces simples; esta movilidad puede dificultar las reacciones, pues se requiere que los grupos se mantengan fijos en una posición al menos durante un período breve. Al unirse al centro activo, la enzima limita considerablemente la movilidad de los grupos del sustrato, esta inmovilidad momentánea es un factor favorable para el desarrollo de la reacción.

Por último, las sustancias para reaccionar no sólo necesitan aproximarse, también se requiere que ese acercamiento se realice con una determinada orientación para que se favorezca la formación de los enlaces que determinan el desarrollo de la reacción. La íntima relación que se establece entre la enzima y el sustrato asegura que éste quede situado con la orientación más favorable para la reacción; de nuevo este efecto es aún más evidente en las reacciones con 2 sustratos.

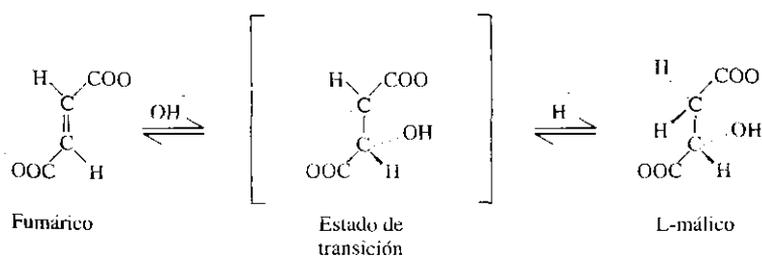
Algunos análisis teóricos y estudios experimentales han demostrado que cada uno de estos efectos por sí no pueden explicar los incrementos de velocidad observados en las reacciones enzimáticas, aun cuando al actuar de manera simultánea se potencializan unos a otros.

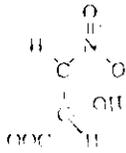
Teniendo en cuenta los efectos estudiados anteriormente los incrementos de la velocidad de la reacción, que logran las enzimas, son mucho mayores que los esperados de acuerdo con los mecanismos anteriores. Una hipótesis para su explicación fue enunciada inicialmente por *Linus Pauling* en 1948 y desarrollada más tarde por otros investigadores; según ellos la enzima en realidad no se une al sustrato propiamente dicho, sino al estado de transición o complejo activado de la reacción, provocando un aumento en la concentración de éste con lo cual, como fue estudiado en el capítulo 14, se incrementa la velocidad de la reacción.

Esta situación puede lograrse al menos de 2 formas, bien la enzima se une directamente al estado de transición con una elevada afinidad, o durante el proceso de unión la enzima obliga al sustrato a adquirir la estructura del estado de transición, al crear en éste tensiones estéricas que lo obligan a adoptar esta estructura; aunque durante un tiempo se pensó que la segunda opción era la correcta, investigaciones posteriores apoyan más la primera alternativa.

Esta hipótesis ha recibido evidencias experimentales con el uso de sustancias, cuyas estructuras semejan la del estado de transición de algunas reacciones a las cuales se les ha denominado análogos del estado de transición. La similitud estructural que estos análogos tienen con el sustrato natural de la enzima hace que puedan unirse rápido y con elevada afinidad a la enzima, pero sus diferencias les impiden ser transformados por la enzima; por tanto, estos análogos del estado de transición actúan como eficientes inhibidores competitivos de la enzima. Para el estudio de los inhibidores enzimáticos debe consultarse el capítulo 16.

Tomando como ejemplo la reacción de la fumarasa pueden ilustrarse los conceptos que se acaban de enunciar; esta enzima cataliza la hidratación reversible del ácido fumárico y forma ácido L-málico, con la participación de un carbanión como estado de transición.





3-nitro-2-L-hidroxipropionato

Un análogo del estado de transición como el 3-nitro-2-L-hidroxipropiónico es un excelente inhibidor de la fumarasa y se une a la enzima con una afinidad que es 11 000 veces mayor que la del L-málico. Experimentos como éste apoyan la idea de que la enzima se une al estado de transición y no al sustrato, lo cual explicaría el incremento notable de la velocidad que se observa en las reacciones catalizadas de manera enzimática; esta teoría ha permitido diseñar compuestos que se unen a enzimas específicas con mucha mayor afinidad que sus sustratos, algunos de estos compuestos se emplean como medicamentos.

Modificaciones del centro activo

La estructura del centro activo es dinámica y constantemente sufre procesos de transconformación, para lo cual como ya se ha estudiado, no precisa la ruptura de enlaces covalentes, sólo de interacciones débiles; sin embargo, debido a estas mismas características estructurales del centro activo existen numerosos agentes que pueden provocar transconformaciones más drásticas, que implicarían alteraciones y, por tanto, afectarían la función de la enzima.

Todos los agentes capaces de modificar la estructura tridimensional de las proteínas al actuar sobre las enzimas provocarían la distorsión del centro activo, que como se ha visto depende de la estructura terciaria de las enzimas; es por ello que todos los agentes desnaturizantes afectan la actividad enzimática. Esta característica ha determinado el amplio uso de agentes desnaturizantes para detener reacciones enzimáticas en el laboratorio.

Por otra parte, los agentes como la concentración de iones hidrógeno (medida como pH), afectan el grado de disociación de los grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos, pueden alterar la distribución de cargas eléctricas del centro activo y por tanto modificar la actividad de las enzimas; también puede alterar el estado de ionización del sustrato y traer consecuencias similares sobre la velocidad de la reacción.

La presencia en la solución de análogos del sustrato -sustancias relacionadas estructuralmente con el sustrato de la enzima, pero que no son susceptibles de ser transformados por ésta- puede ocasionar una pérdida de la actividad enzimática si estas sustancias llegan a unirse al centro activo y lo mantienen ocupado. Por otra parte la existencia de compuestos químicos, capaces de reaccionar específicamente con grupos del centro activo y modificarlo, pudiera afectar la acción de las enzimas. En ocasiones la modificación que determinado grupo produce en la enzima provoca la abolición permanente de la actividad catalítica de la proteína enzimática, lo que ha hecho que este tipo de sustancia se le denomine sustratos suicidas.

De todo lo anterior se puede afirmar que la actividad catalítica presente en una preparación enzimática dependerá de la concentración de centros activos útiles, o sea, el número de centros activos por unidad de volumen unidos al sustrato o que no presentan ninguna alteración que les impida unirse.

Especificidad de las enzimas

Desde el punto de vista estructural las enzimas difieren del resto de las proteínas por la existencia del centro activo, por ello, las propiedades particulares de las enzimas son aquellas que derivan del centro activo.

Teniendo en cuenta las características estructurales y funcionales del centro activo se infiere que a un centro activo determinado sólo podrá unirse un sustrato (o un número muy limitado de ellos que presenten una estructura muy similar), a esta propiedad del centro activo, y por tanto de las enzimas, se le denomina especificidad de sustrato.

La especificidad de sustrato puede ser absoluta, cuando sólo existe un sustrato capaz de ocupar el centro activo de la enzima; o relativo, si se trata de un grupo de sustratos. Aun en este último caso se observa que la unión de sustratos diferentes no se produce con igual fortaleza, lo cual manifiesta que la enzima presenta una afinidad distinta por cada uno de los sustratos, y en la mayoría de los casos se destaca uno de ellos como el más afín. Como ya fue estudiado, las 2 hipótesis de formación del complejo enzima-sustrato permiten explicar de manera adecuada la especificidad de sustrato de las enzimas.

Una vez que se ha producido la unión del sustrato al centro activo, sólo alguno de los enlaces del sustrato quedará al alcance de los grupos catalíticos de la enzima; de esta forma la enzima podrá realizar una transformación de ese sustrato, aunque éste sea susceptible de varias transformaciones. a esta propiedad del centro activo y por tanto de la enzima se le da el nombre de especificidad de acción.

Por ejemplo, el ácido glutámico puede experimentar una reacción de α -descarboxilación y producir ácido γ -amino butírico, también una desaminación o transaminación para originar ácido α -cetoglutarico; para cada reacción hace falta una enzima específica, todas con la misma especificidad de sustrato (ácido glutámico), pero con diferente especificidad de acción. Casi siempre las enzimas que tienen una elevada especificidad de acción y de sustrato resultan ser enzimas claves en el metabolismo celular.

Considerando que la unión enzima-sustrato es muy específica y que una vez formado el complejo es una de las transformaciones posibles la que se lleva a cabo, podemos derivar una característica general del funcionamiento de los biocatalizadores. En todas las reacciones biocatalizadas se obtiene siempre el número máximo de moléculas del producto a partir del sustrato, sin que en las reacciones aparezcan productos secundarios como es frecuente en reacciones no catalizadas por enzimas. esta regularidad de los procesos biológicos moleculares es el contenido esencial del principio de máxima eficiencia.

Centro activo de la quimotripsina y la tripsina

La estructura y mecanismo de acción de la quimotripsina y la tripsina se conocen detalladamente, ambas enzimas se sintetizan en el páncreas en forma de precursores inactivos (zimógenos) llamados quimotripsinógeno y tripsinógeno, respectivamente. La activación del quimotripsinógeno tiene lugar en el intestino delgado donde se forma la quimotripsina que funciona al igual que la tripsina, hidrolizando enlaces peptídicos de las proteínas ingeridas como parte del proceso digestivo. Dos rupturas proteolíticas irreversibles activan la enzima, una elimina la serina 14 y la arginina 15 del quimotripsinógeno y otra, la treonina 147 (Fig. 15.4). Esta activación en el intestino tiene la ventaja de prevenir que la enzima pueda degradar el tejido pancreático que la produce.

La quimotripsina no hidroliza todos los enlaces peptídicos, más bien es selectiva para aquéllos donde participa el grupo carboxilo de fenilalanina, tirosina o triptófano (Fig. 15.5). La tripsina por el contrario es específica para los enlaces, donde el grupo carboxilo lo aportan la lisina o la arginina.

El mecanismo de acción de la quimotripsina fue determinado a partir de su estructura tridimensional estudiada por cristalografía de rayos X; la enzima contiene 3 cadenas polipeptídicas A, B y C con 13, 131 y 97 aminoácidos cada una, unidas por enlaces disulfuros.

En la molécula se destacan 2 aspectos estructurales importantes, el centro activo y una hendidura o "bolsón" creada por las cadenas laterales de varios aminoácidos hidrofóbicos; esta hendidura hidrofóbica sirve de sitio de unión para residuos de aminoácidos específicos del sustrato. La conformación de este "bolsón" permite a los residuos alineados en él participar en interacciones hidrofóbicas con las cadenas late-

Fig. 15.4. Activación del quimotripsinógeno. El páncreas segrega el quimotripsinógeno hacia el duodeno, donde ocurre su transformación en quimotripsina. Esta activación se produce por la separación de los aminoácidos que ocupan las posiciones 14, 15 y 147, de esta manera la molécula queda formada por 3 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuros.

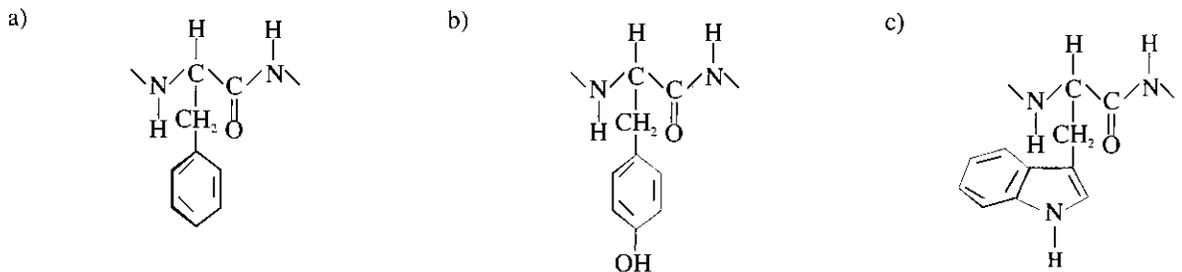
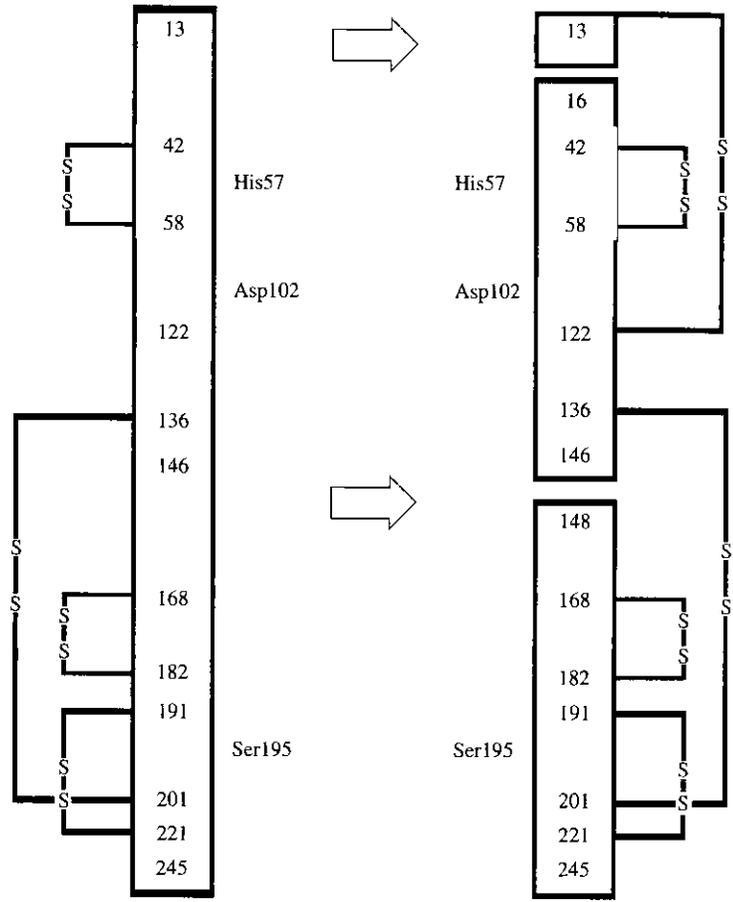


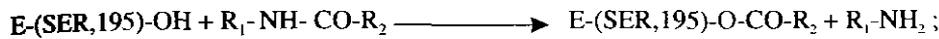
Fig. 15.5. Especificidad de la quimotripsina. La quimotripsina tiene una acción selectiva sobre los enlaces peptídicos donde participa el grupo carboxilo de la fenilalanina a), tirosina b) y triptófano c). La estructura cíclica, presente en la cadena R de estos aminoácidos, se acomoda en un profundo "bolsón" que rodea el centro catalítico de la enzima.

rales de fenilalanina, tirosina y triptófano. En estas interacciones no pueden participar cadenas laterales con cargas eléctricas, ni grupos apolares pequeños.

Los residuos apolares de las proteínas globulares están escondidos hacia el interior; cuando esas proteínas están en su estado nativo los enlaces peptídicos que unen aminoácidos apolares no son accesibles a la hidrólisis por la quimotripsina. En condiciones normales el ácido clorhídrico del estómago desnatura las proteínas ingeridas, y las proteasas de este órgano degradan parcialmente las proteínas antes de quedar expuestas al pH neutro del intestino para su posterior digestión por la quimotripsina.

La actividad catalítica de la quimotripsina depende de 3 residuos de aminoácidos: histidina 57, aspártico 102 y serina 195; estos aminoácidos están distantes unos de otros en la estructura primaria de la proteína, pero en la molécula activa el plegamiento es tal que las 3 cadenas laterales están muy cercas y en posición correcta para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico en la proteína que se une a la enzima. Cuando el quimotripsinógeno se activa, la conformación del polipéptido se altera y distribuye estos 3 residuos en la organización correcta.

La reacción de hidrólisis comprende varias etapas, entre ellas la formación de un complejo covalente entre la enzima y el sustrato. Primero, se produce la ruptura del enlace peptídico y el grupo carboxilo se transfiere al grupo -OH de la serina 195.



segundo, este intermediario acilenzima es hidrolizado



El aspártico 102 y la histidina 57 facilitan la reacción de acilación porque, primero, promueven la separación de un protón de la serina 195 y después lo añaden al grupo amino del péptido producto. De una forma similar el aspártico 102 y la histidina 57 facilitan la hidrólisis del intermediario acilenzima (Fig. 15.6).

Estos pasos catalizados por la enzima -transferencia de un protón desde la enzima al sustrato, formación de un intermediario covalente acil-serina y la hidrólisis del acil-enzima- reducen drásticamente la energía de activación total de la reacción de proteólisis.

Una comparación entre la quimotripsina y la tripsina resulta muy útil para enfatizar en la naturaleza de la especificidad de las reacciones catalizadas por enzimas;

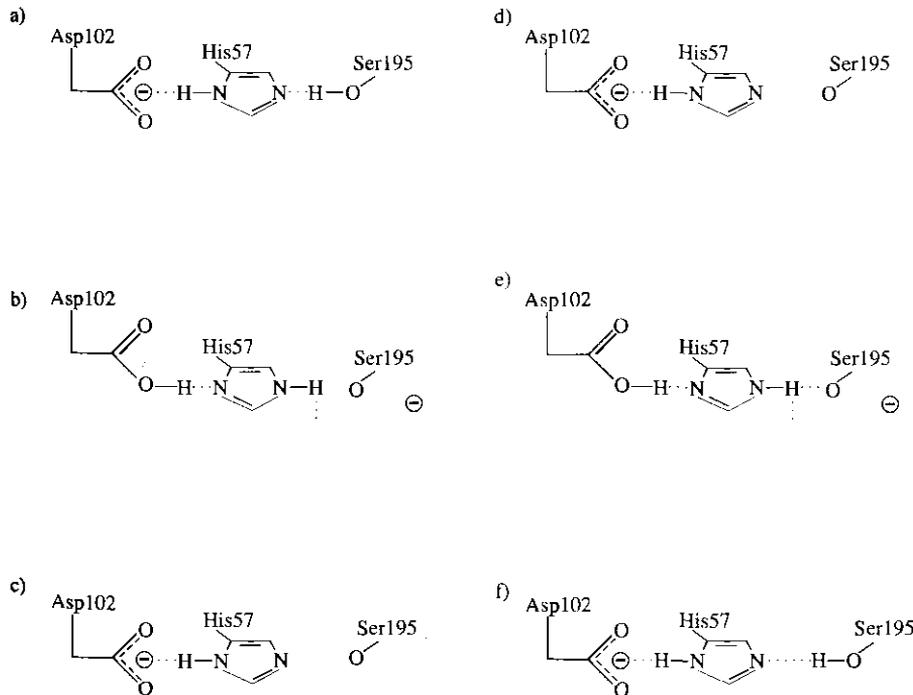


Fig. 15. 6. Mecanismo de acción de la quimotripsina. En el centro activo de la quimotripsina se crea un corrimiento de cargas que promueven la transferencia de un protón entre la enzima y el sustrato, con formación de un intermediario acil-enzima; este movimiento de electrones sucede entre 3 aminoácidos que forman el centro activo y, como en otros casos ya estudiados, no se encuentran localizados de forma consecutiva en la estructura primaria de la enzima. Esta ruta disminuye de manera considerable la energía de activación de la reacción, que puede entonces ocurrir en condiciones moderadas de temperatura y pH.

aproxinadamente el 40 % de los aminoácidos de estas 2 moléculas son los mismos, en particular la secuencia alrededor del residuo clave de serina

gli-asp-ser-gli-gli-pro

La estructura tridimensional y el mecanismo de la catálisis son también muy similares, lo cual sugiere que ambos han surgido de forma evolutiva de un polipéptido ancestral común; la principal diferencia está en las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran en el sitio de unión del sustrato. Los aminoácidos con carga negativa que ocupan esta área en la molécula de tripsina facilitan la unión de cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva (arginina, lisina) en vez de los hidrofóbicos.

Clasificación y nomenclatura de las enzimas

De lo estudiado hasta el momento se deduce que hay 2 propiedades fundamentales de las enzimas y todas ellas derivan de las características del centro activo: gran eficiencia catalítica y elevada especificidad; esta última en sus 2 aspectos es la que sirve de fundamento a la clasificación y nomenclatura de las enzimas.

Clasificación

Se toma como fundamento la especificidad de acción, con lo cual se establecen 6 grupos principales, teniendo en cuenta la reacción global que ellas catalizan; estos grupos o clases principales se dividen en subclases y subsubclases, según otras características del tipo de reacción como son los grupos involucrados, los cofactores necesarios, etcétera.

Los grupos principales y su definición son:

1. Oxidorreductasas. Son aquellas enzimas que catalizan las reacciones de oxidorreducción, o sea, la transferencia de electrones o sus equivalentes entre un donante y un aceptor.
2. Transferasas. Catalizan la transferencia de un grupo químico entre un donante y un aceptor; se excluyen aquellas que transfieren electrones o sus equivalentes, pues pertenecen a la clase anterior, y aquellas en que el aceptor del grupo es el agua, pues pertenecen a la clase siguiente.
3. Hidrolasas. Catalizan la ruptura de enlaces químicos con la participación de las moléculas del agua.
4. Liasas. Catalizan reacciones en las cuales se produce la adición o sustracción de grupos químicos a dobles enlaces.
5. Isomerasas. Catalizan la interconversión de 2 isómeros.
6. Ligasas. Catalizan la unión covalente de 2 sustratos mediante la energía de hidrólisis de nucleósidos trifosfatados, generalmente el ATP.

Nomenclatura

Existen 2 tipos de nomenclatura: la sistemática y la recomendada. La sistemática utiliza los grupos principales, describe la reacción y sólo se utiliza en revistas y textos científicos donde se requiere de un elevado grado de precisión; para su uso existe un código de 4 números donde el primero representa la clase, el segundo la subclase, el tercero la subsubclase y el cuarto el número de orden de la enzima, que aparece en una relación publicada por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de

Bioquímica y Biología Molecular, donde los autores deben consultar cada vez que van a emplearla.

La recomendada viene a ser una forma abreviada de la sistemática, su uso es común sobre todo en textos para estudiantes; en ambos casos se tiene en cuenta tanto la especificidad de acción como la de sustrato y el nombre de la enzima termina en el sufijo *asa*; ejemplo, para la reacción:

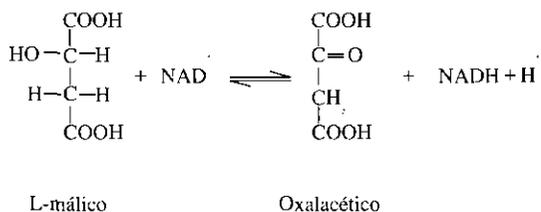
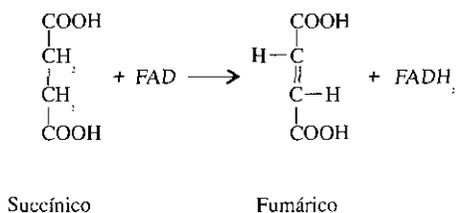


El uso de la nomenclatura sistemática nos llevaría al nombre siguiente **lactato:NAD-oxidoreductasa**, o sea, que prácticamente describe la reacción.

La nomenclatura recomendada tiene en cuenta la especificidad de sustrato, en este caso para el lactato, y la especificidad de acción, se trata de una deshidrogenación, por tanto el nombre de la enzima sería **lactato deshidrogenasa**. Para poder utilizar la nomenclatura recomendada, que se utiliza en este libro, es necesario conocer algunos subgrupos de enzimas como:

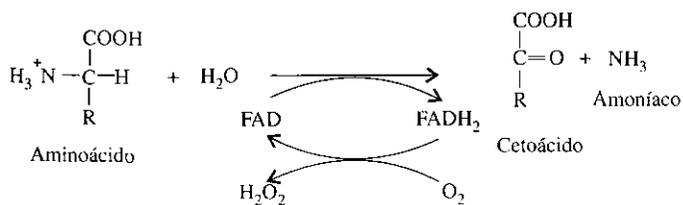
1. Entre las oxidoreductasas.

- **Deshidrogenasas.** Sustraen átomos de hidrógeno (casi siempre 2) de los sustratos y los transfieren a una molécula aceptora que no es el oxígeno.



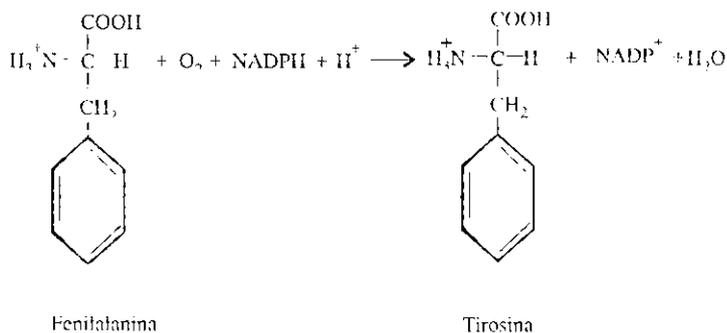
En el primer caso se trata de la **succínico deshidrogenasa**, en el segundo de la **málico deshidrogenasa**.

- **Oxidasa.** Oxidan los sustratos mediante el oxígeno como aceptor de electrones.



Esta reacción la cataliza la **aminoácido oxidasa**.

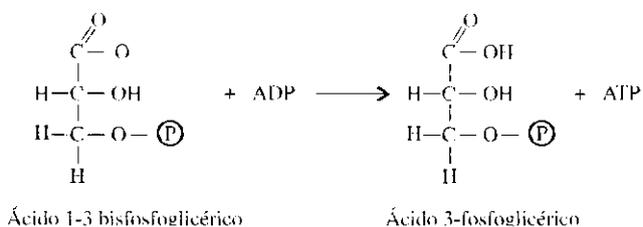
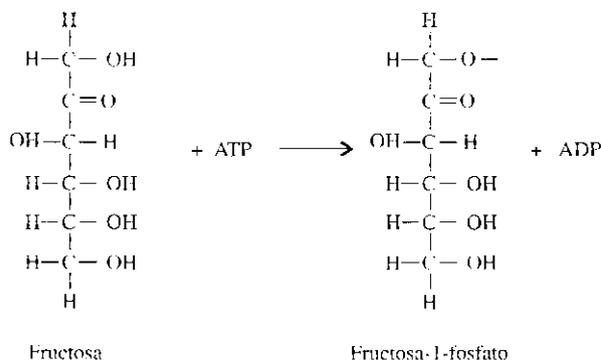
- **Hidroxilasas.** Catalizan la introducción de funciones hidroxilo en sus sustratos utilizando oxígeno molecular como donante.



Esta reacción es catalizada por la fenilalanina hidroxilasa.

2. Entre las transferasas tenemos.

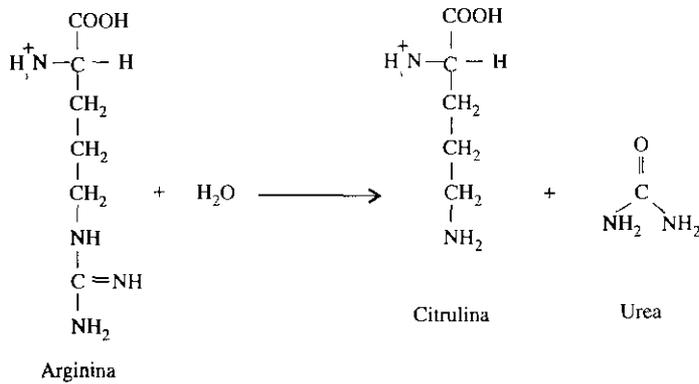
- **Quinasas.** Catalizan reacciones de transferencia de grupos fosfatos donde intervienen nucleósidos di y trifosfatados.



La primera reacción es catalizada por la fructoquinasa y la segunda por la gliceroquinasa.

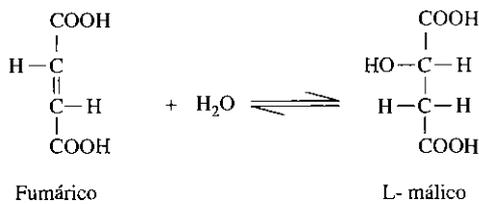
El resto de las transferasas reciben nombres derivados del grupo que transfieren (transaminasas de grupos amino, transmetilasas de metilos, transcarboxilasas de carboxilos, etcétera).

3. El grupo de las hidrolasas es el más simple para nombrar, pues basta con hacer terminar el nombre del sustrato en el sufijo asa.

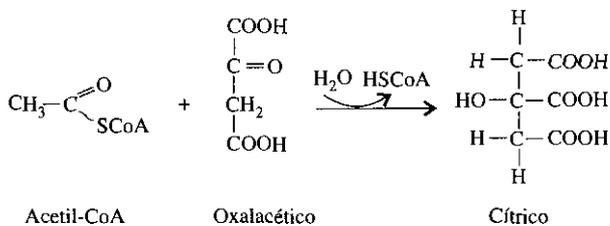


Esta enzima se denomina arginasa.

4. Las liasas son las más difíciles de nombrar, ejemplo las hidratasas, que adicionan agua a los dobles enlaces.

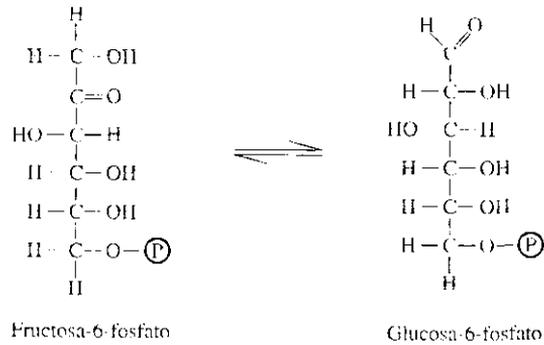


Esta enzima se nombra fumarico hidratasa o simplemente fumarasa, aunque este último nombre no es correcto. Cuando actúan en reacciones biosintéticas reciben el nombre de sintetasa.



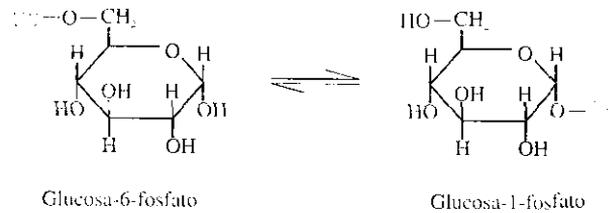
Se nombra como citricosintetasa.

5. Las isomerasas reciben diferentes nombres según los tipos de isómeros que intervienen en la reacción. Como regla se reserva el nombre de isomerasas para las enzimas que interconvierten isómeros de función.



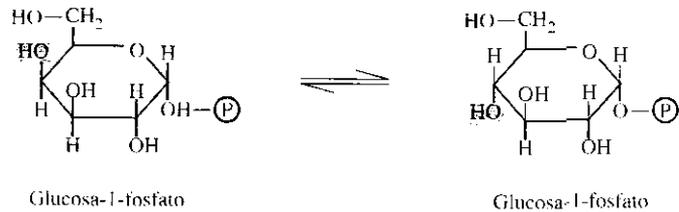
La enzima es la fosfohexosa isomerasa.

Las que interconvierten isómeros de posición se designan mutasas.



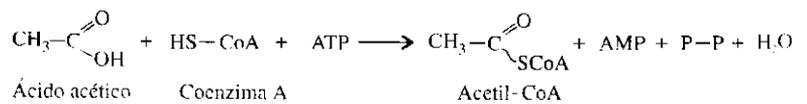
En este caso se llama fosfoglucomutasa.

Las que interconvierten epímeros se denominan epimerasas.



En este caso será la galactosa fosfato epimerasa.

6. A las ligasas se les conoce en general como sintetasas y para nombrarlas generalmente se utiliza el nombre del producto en vez del sustrato, la acetil-CoA sintetasa cataliza la reacción siguiente:



Hace unos años la Comisión de Enzimas recomendó utilizar el término ligasas para estas enzimas y el de sintetetasas para las liasas, pero como esta recomendación aún no se ha generalizado, en este texto se seguirá la denominación anterior.

Siempre se debe recordar que las enzimas son proteínas cuya función es la de catalizar reacciones, por tanto, debe existir una correspondencia entre el nombre de la enzima y la reacción que ellas catalizan, pues conociendo la reacción se puede deducir el nombre, y a partir del nombre puede inferirse la reacción.

No obstante, existen algunas enzimas que recibieron nombres triviales por sus descubridores y que la práctica ha consagrado como el caso de la pepsina, tripsina, quimotripsina, etcétera.

Resumen

Las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos son catalizadas por proteínas específicas denominadas enzimas, éstas se caracterizan por presentar un elevado poder catalítico y una gran especificidad.

Aun cuando cada enzima tiene su forma particular de actuar, en todas ellas se puede distinguir un mecanismo general de acción en 2 etapas: la primera es la unión de la enzima con el sustrato y la segunda la transformación de éste. Este mecanismo supone la existencia de un complejo enzima-sustrato cuya formación ha sido comprobada por numerosos medios.

En todas las enzimas existen 2 sitios importantes que son el de reconocimiento y el catalítico, que juntos constituyen el centro activo de la enzima. La estructura del centro activo está determinada por el eje covalente de la cadena polipeptídica que le da la forma, los grupos de ambientación, los grupos de unión y los grupos catalíticos. En la unión enzima-sustrato intervienen diferentes tipos de interacciones como las hidrofóbicas, salinas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals; el ambiente apolar del centro activo facilita el establecimiento de estas interacciones.

Las características estructurales y funcionales del centro activo son las que confieren la especificidad y eficiencia catalítica a las enzimas. La especificidad de sustrato consiste en la propiedad que tienen las enzimas de actuar sobre un número muy reducido de sustratos, generalmente uno, en tanto la especificidad de acción determina que la enzima cataliza sólo una de las posibles transformaciones del sustrato.

Muchos agentes físicos y químicos pueden alterar la estructura del centro activo y con ello el funcionamiento de la enzima, los agentes desnaturalizantes de proteínas, las elevadas temperaturas, los cambios de pH y sustancias químicas específicas son algunos de estos agentes.

La unión enzima-sustrato puede producirse por 2 mecanismos fundamentales de acuerdo con el tipo de enzima, bien por el tipo llave-cerradura o por ajuste inducido.

La tripsina y la quimotripsina son enzimas cuyos mecanismos de acción ilustran de manera adecuada el funcionamiento de las enzimas.

La especificidad de las enzimas sirve de base a su clasificación y nomenclatura. A partir de la especificidad de acción se distinguen 6 grupos de enzimas: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La nomenclatura incluye tanto la especificidad de sustrato como la de acción. Existen enzimas que tienen nombres triviales como la pepsina, tripsina, etcétera que aunque no están basados en estos criterios se utilizan de manera cotidiana.

Ejercicios

1. ¿Qué función desempeña en la formación del centro activo el plegamiento de la cadena polipeptídica que da lugar a la formación de la estructura terciaria de la proteína enzimática?
2. ¿Qué importancia tiene el hecho de que en el centro activo exista un ambiente apolar?
3. ¿Podría inactivarse una enzima modificando grupos del centro activo que no intervienen de forma directa en la catálisis?
4. ¿Por qué para la catálisis enzimática es necesario la formación del complejo enzima-sustrato? Discuta al menos 2 posibilidades.
5. ¿Por qué podemos afirmar que las enzimas funcionan de acuerdo con el principio de la máxima eficiencia?
6. ¿Qué ventaja representa que el complejo ES se forme por un mecanismo de adaptación inducida y no por el mecanismo de llave y cerradura?
7. En el centro activo de una enzima existen 3 aminoácidos claves que son aspártico, histidina y glutámico. ¿Podría esto explicar por qué esta enzima es tan sensible a los cambios de pH?
8. Clasifique y nombre las enzimas que catalizan las reacciones siguientes:

