

# LOS ENZIMA PROTEICOS

## LOS ENZIMAS: DEFINICIÓN Y ESPECIFICIDAD

Las reacciones químicas en los sistemas biológicos, ocurren rara vez en ausencia de catalizadores. Estos catalizadores son proteínas específicas llamados **ENZIMAS**. Las características sorprendentes de todos los enzimas son su poder catalítico y su especificidad. Además, como veremos más adelante, la actividad de muchos enzimas es regulable.

Se puede considerar que todos los enzimas son proteínas aunque, recientemente, se ha descubierto el poder catalítico que tienen ciertos ARN en el proceso de síntesis de proteínas en los ribosomas.

Los enzimas aceleran las reacciones multiplicando su velocidad por un millón de veces o más. De hecho, la mayoría de las reacciones de los sistemas biológicos no tienen lugar a velocidades perceptibles en ausencia de enzimas. Incluso una reacción tan sencilla como la hidratación del dióxido de carbono, viene catalizada por un enzima:



De otro modo la transferencia del CO<sub>2</sub> desde los tejidos a la sangre y desde ésta al aire alveolar, sería incompleta. La *anhidrasa carbónica*, el enzima que cataliza esta reacción, es uno de los más rápidos que se conocen. Cada molécula enzimática puede hidratar hasta 10<sup>5</sup> moléculas de CO<sub>2</sub> en un segundo. Esta reacción, catalizada, es 10<sup>7</sup> veces más rápida que la misma reacción no catalizada.

Los enzimas son altamente **específicos** tanto en la reacción que catalizan como en su selección de sustancias reaccionantes, denominadas **SUSTRATOS** (=molécula que transforma el enzima). Normalmente, un enzima cataliza una sola reacción química o grupo de reacciones estrechamente relacionadas. El grado de especificidad del sustrato es normalmente elevado y, a veces, prácticamente absoluto. Un ejemplo del alto grado de especificidad de los enzimas es el demostrado por la *ADN-polimerasa I*. Este enzima sintetiza ADN uniendo las cuatro clases de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos en el ADN que se está sintetizando viene determinada por la secuencia de nucleótidos de la otra hebra de ADN que sirve como molde.

Tan sólo se inserta un nucleótido equivocado en el filamento nuevo de ADN menos de una vez en un millón de inserciones.

## COFACTORES

Los cofactores son moléculas que se unen al enzima y realizan, o bien colaboran a realizar, la reacción al sustrato. En un principio se piensa que el enzima es quien reconoce al sustrato y el cofactor quien se encarga de que la reacción se lleve a término. La mayoría de los enzimas requieren la ayuda de cofactores, sin embargo algunos efectúan ellos mismos el reconocimiento del sustrato y la reacción sobre éste.

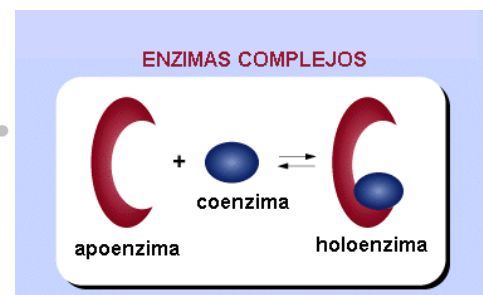
### Tipos

Existen dos tipos de cofactores:

- ▶ *Activadores inorgánicos*, como iones metálicos  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , etc. Cuando se usa el término cofactor se suele referir generalmente a éstos, ya que el otro tipo tiene nombre propio.
- ▶ *Moléculas orgánicas complejas*, llamadas **COENZIMAS**. Los coenzimas son moléculas de tipo orgánico que se unen al enzima dando lugar a la molécula activa. Esta molécula activa es una heteroproteína y se denomina *HOLOENZIMA*, su grupo prostético es el *COENZIMA* y su grupo proteico es el que ahora se denomina *APOENZIMA*.



Los coenzimas no son, en general, específicos de un único tipo de apoenzima; incluso determinados coenzimas pueden unirse a más de 100 tipos de apoenzimas diferentes, cada uno de los cuales con una funcionalidad distinta. A menudo se alteran durante las reacciones enzimáticas, pero una vez éstas han acabado, se regeneran rápidamente para volver a ser funcionales.



## CINÉTICA ENZIMÁTICA

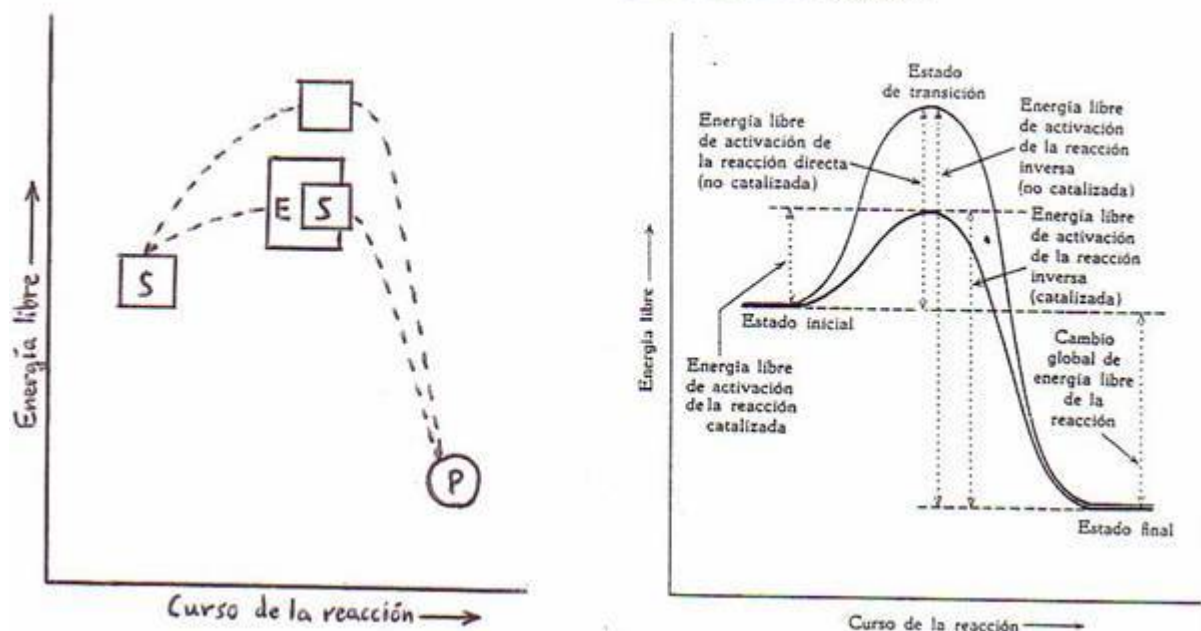
La cinética enzimática trata sobre cómo se producen las reacciones en las que intervienen los enzimas y a qué velocidad.

Parece lógico pensar que un proceso que pasa de un estado de elevada energía a otro de menor nivel energético, se tendría que producir de un modo espontáneo. Por lo tanto un sustrato con una energía mayor que la de sus productos, debería producir éstos espontáneamente. Sin embargo no es así.

Una reacción química  $A \rightleftharpoons B$  transcurre a través de un **ESTADO DE TRANSICIÓN** que tiene una energía mayor que la de A y la de B. La velocidad de una reacción química depende de la temperatura (en general, a mayor temperatura mayor velocidad de reacción) y de la diferencia de energía entre el sustrato (reaccionante - A) y el estado de transición. A esta diferencia de energía se le ha denominado **Energía libre de activación de Gibbs** y se simboliza como  $\Delta G$ . Por lo tanto para que la reacción bioquímica se lleva a cabo, el sustrato deberá alcanzar el estado de transición, por lo que deberá consumir energía.

¿Cómo actúan entonces los enzimas?. Los enzimas aceleran las reacciones químicas porque **disminuyen la energía libre de activación**. La combinación del sustrato con el enzima crea una nueva vía de reacción que tiene un estado de transición de menor energía de la que tendría en ausencia del enzima. Por consiguiente, en presencia del enzima la reacción se realizará más fácilmente.

Diagrama de energía para una reacción química, no catalizada y catalizada.

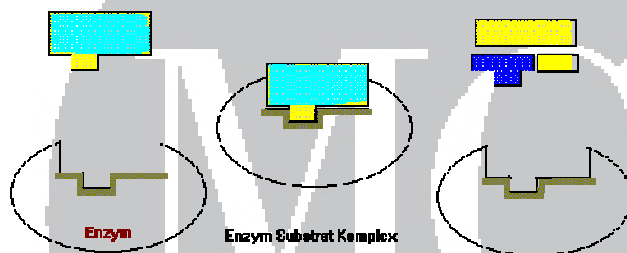


## ETAPAS DE LAS REACCIÓN ENZIMÁTICA

Antes de producir los productos, el enzima debe unirse al sustrato. Por lo tanto, cualquier formación o rotura de un enlace químico por un enzima viene precedida por la formación de un

complejo enzima-sustrato (ES). El sustrato queda ligado a una región específica del enzima que se denomina complejo enzima-sustrato.

El sustrato queda ligado a una región específica del enzima que se denomina **CENTRO ACTIVO**. La mayoría de los enzimas son altamente selectivos en su unión con los sustratos que deben encajar espacialmente con el centro activo del enzima. Y dado que cada enzima tiene una forma diferente para su centro activo esto implica que, por regla general, en el centro activo de un enzima tan sólo pueda encajar un sustrato o alguno similar a él. También en esta etapa de formación del complejo enzima-sustrato, se produce gran parte del control de la actividad catalítica.



El centro activo de un enzima es la región que se une al sustrato. Aunque los enzimas difieren ampliamente en estructura, especificidad y modo de catálisis, se puede establecer un número de generalizaciones respecto a sus centros activos.

El centro activo de un enzima es la región que se une al sustrato. Aunque los enzimas difieren ampliamente en estructura, especificidad y modo de catálisis, se puede establecer un número de generalizaciones respecto a sus centros activos.

- 1º) El centro activo supone una porción relativamente pequeña del volumen total del enzima. Muchos de los residuos aminoácidos de un enzima no están en contacto con el sustrato. Esto plantea la pregunta intrigante de porqué los enzimas son tan grandes. Casi todos los enzimas están constituidos por más de 100 residuos de aminoácidos, lo que les da una masa mayor de 10 kilodaltons y un diámetro mayor de 25  $\text{\AA}$ .
- 2º) El centro activo es una entidad tridimensional. El centro activo de un enzima no es un punto, una línea, ni tan siquiera un plano. Es una forma tridimensional compleja, compuesta de grupos que proceden de diferentes partes de la secuencia lineal de aminoácidos. En el caso de la LISOZIMA, un enzima que ataca la pared celular de las bacterias, los residuos (=aminoácidos) que forman el centro activo tridimensional son los números 35, 52, 62, 63 y 101 de la secuencia lineal de 129 aminoácidos.
- 3º) Los sustratos se unen a los enzimas por fuerzas relativamente débiles.
- 4º) Los centros activos son hoyos o hendiduras.
- 5º) La especificidad del enlace entre el enzima y el sustrato depende de la disposición exactamente definida de los átomos del centro activo.

Un sustrato debe tener una forma adecuada para introducirse en el centro. La metáfora establecida en 1890 por Emil Fischer sobre el encaje del sustrato en el enzima como una llave en su cerrado fue bastante acertado, aunque hoy se acepta más el modelo de conformación inducida. Este modelo describe la unión enzima-sustrato como una mano

cuando se mete en un guante: se necesita una forma previa adecuada, pero la conformación final es fruto de la interacción de la mano (sustrato) y el guante (enzima).

Una vez unido el sustrato al centro activo del enzima, actúa este último y se obtienen los productos quedando el enzima libre e inalterado, listo para actuar de nuevo.

## EL MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

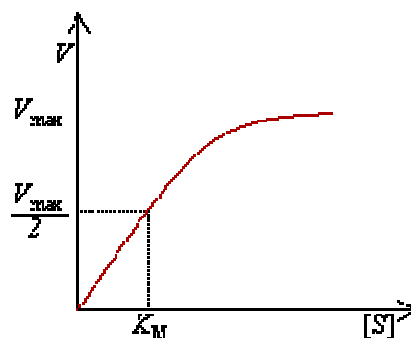
Se observó que a medida que se aumentaba la concentración de sustrato (siempre a concentración de enzima constante) aumentaba la velocidad de reacción.

No obstante se llegaba a una concentración de sustrato para la cual la velocidad ya no aumentaba más. Había llegado a un máximo imposible de superar. A esta velocidad se le denominó **Velocidad máxima (Vm)** para esa reacción enzimática. A este fenómeno se le denomina  saturación por el sustrato , efecto que no aparece en las reacciones no catalizadas.

En 1913, Leonor Michaelis interpretó la velocidad máxima de una reacción catalizada por un enzima en términos de la formación de un complejo ES. A concentraciones de sustrato suficientemente elevadas, los centros catalíticos están ocupados por él y, por lo tanto, la velocidad de reacción alcanza un máximo. Ese mismo año y junto con Maud Menten propusieron un sencillo modelo matemático que da cuenta de estas características cinéticas:

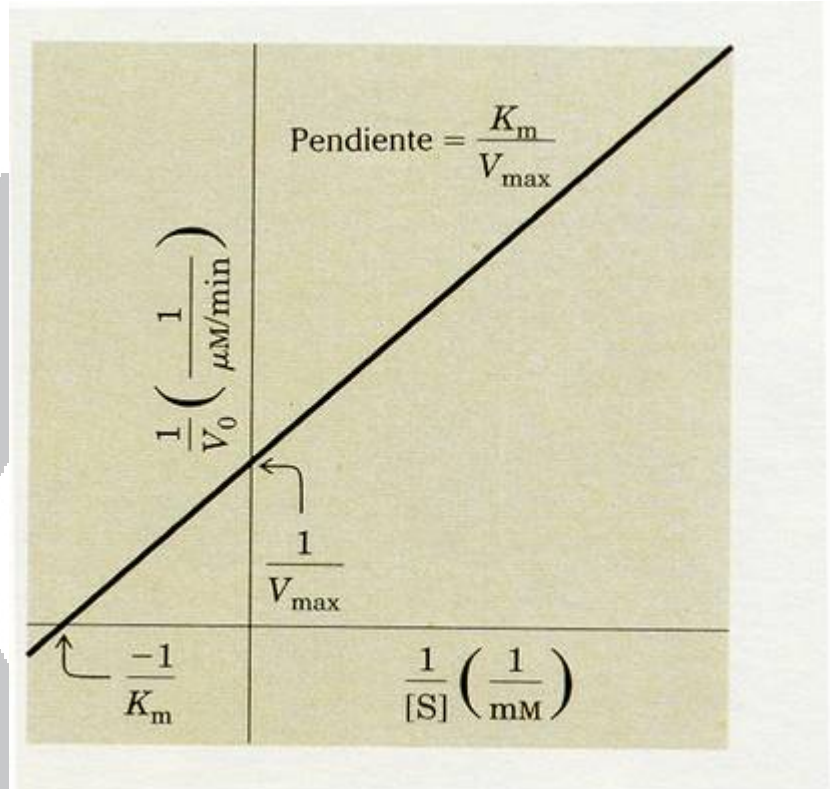
$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

en donde  $K_m$  es una constante que equivale a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción se hace la mitad de su valor máximo. La ecuación de Michaelis-Menten queda reflejada en la siguiente gráfica:



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = b x + c$$



### INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

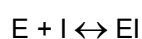
La inhibición de la actividad enzimática por moléculas específicas y por iones es importante porque constituye uno de los principales controles de los sistemas biológicos. También, muchos fármacos y agentes tóxicos actúan inhibiendo enzimas. Es más, la inhibición enzimática puede suministrar una idea acerca del mecanismo de la acción enzimática.

La inhibición irreversible se da cuando el inhibidor queda covalentemente unido al enzima de tal manera que la disociación es prácticamente nula. Por el contrario, la inhibición reversible se caracteriza por un rápido equilibrio entre el inhibidor y el enzima. Existen tres tipos de inhibición reversible:

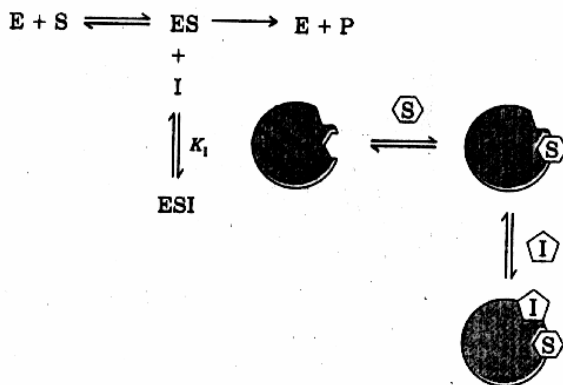
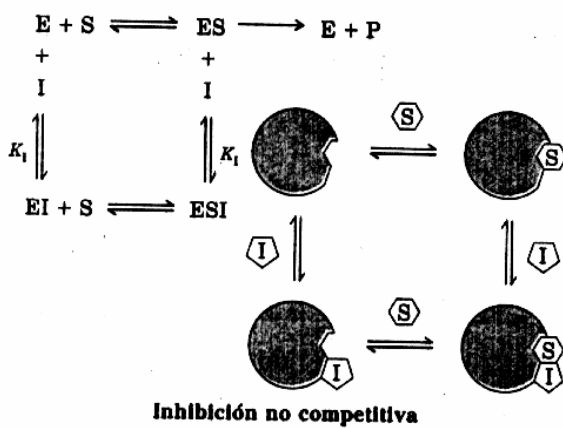
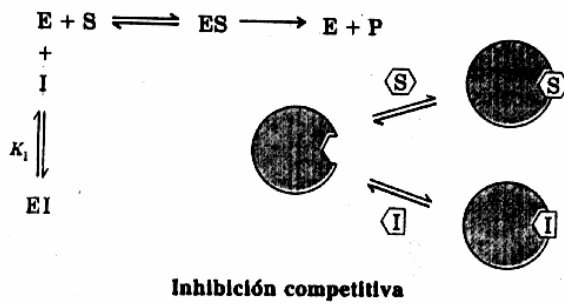
Prof. Víctor M. Vitoria

#### INHIBICIÓN COMPETITIVA

Es el tipo más sencillo de inhibición reversible. En este caso, el inhibidor se parece al sustrato y se une al centro activo del enzima. Así, el sustrato compite con el inhibidor por el enzima libre. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con el enzima para formar un complejo enzima-inhibidor (EI), análogo al complejo enzima-sustrato:



La molécula de inhibidor no resulta químicamente alterada por el enzima.

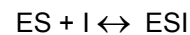
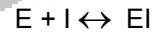


**INHIBICIÓN NO COMPETITIVA**

También es reversible.

El inhibidor y el sustrato pueden unirse simultáneamente a una molécula de enzima, interfiriendo la acción de éste. Los inhibidores no competitivos se unen a un centro del enzima distinto del centro activo, a menudo para deformar al enzima, de modo que no pueda formarse el complejo ES a su velocidad normal y que una vez formado no se descomponga a su velocidad habitual para liberar los productos de la reacción.

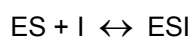
En la inhibición no competitiva la reacción con el inhibidor produce dos formas inactivas: EI y ESI.



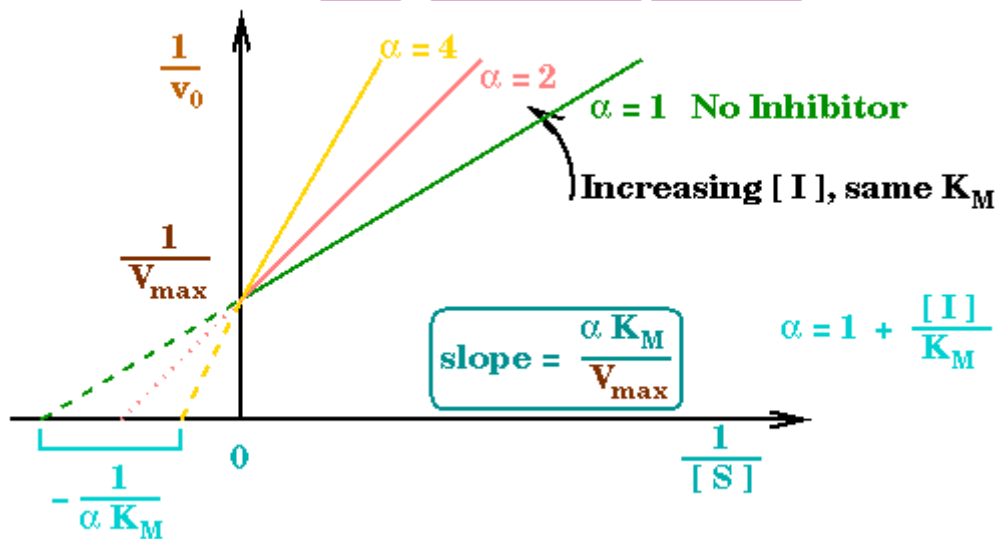
**INHIBICIÓN INCOMPETITIVA (ACOMPETITIVA)**

En este tipo de inhibición, cuya designación no es muy adecuada, el inhibidor no se combina con el enzima libre ni afecta a la reacción con el

sustrato normal; sin embargo, el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar el complejo enzima-sustrato-inhibidor, el cual no experimenta su transformación posterior en el producto habitual de la reacción:



**M-M Competitive Inhibitor**

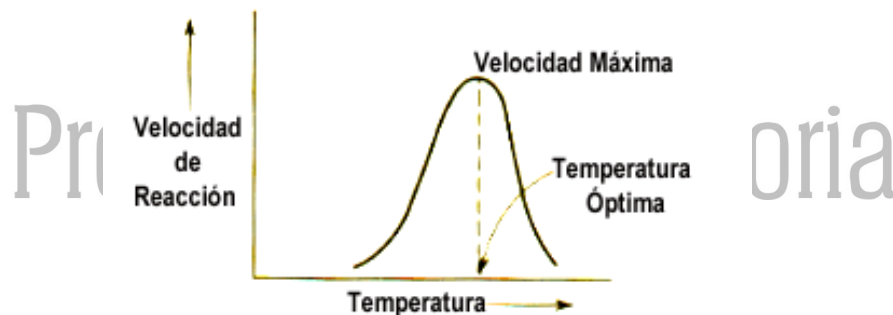


**Lineweaver-Burk Plot**

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA**

I) La temperatura

la actividad enzimática desaparece si se producen cambios notables de temperatura. Elevándola, la actividad disminuye e incluso desaparece por desnaturalización de la proteína enzimática. Por el contrario, al descender la temperatura, disminuye la actividad, pero el enzima no se destruye , y el proceso es reversible.

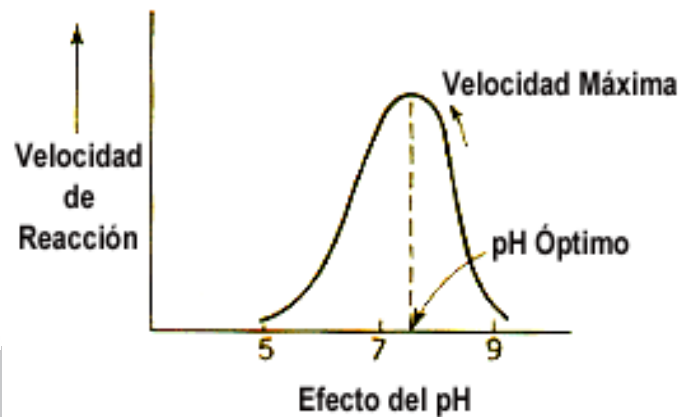


**Efecto de la Temperatura**

II) El pH

Existe un pH óptimo tal que al alejarse de él, disminuye la velocidad. III). La concentración de sustrato

Al aumentar la concentración a Tª y pH constantes aumenta la actividad hasta cierto límite, a partir del cual el enzima se satura.



IV) Activadores

Algunos enzimas necesitan la presencia de determinados iones(cofactores) para que sean activos.

V) Inhibidores

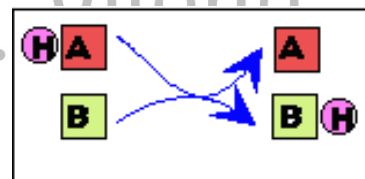
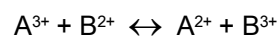
Como acabamos de ver son sustancias que impiden de distintas maneras la actuación del enzima.

**NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS**

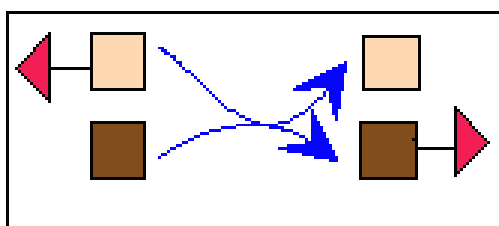
Antiguamente se denominaba fermentos a los enzimas. Para la nomenclatura del enzima, se usa el sufijo -ASA y el nombre del sustrato sobre el cual actúan y el tipo de reacción que catalizan. Se clasifican en los siguientes grupos:

A) OXIDORREDUCTASAS : catalizan reacciones de oxido-reducción, es decir, son capaces de transferir hidrógenos y electrones.

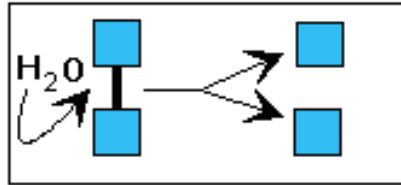
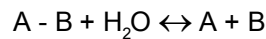
Son los responsables de la producción de energía en los seres vivos:



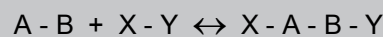
B) TRANSFERASAS: son enzimas que transfieren un radicar desde una molécula a otra, sin que se pierda en el medio.



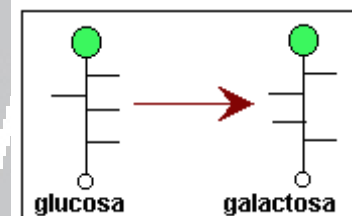
C) HIDROLASAS. son enzimas que rompen enlaces introduciendo una molécula de agua.



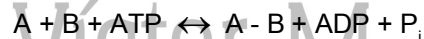
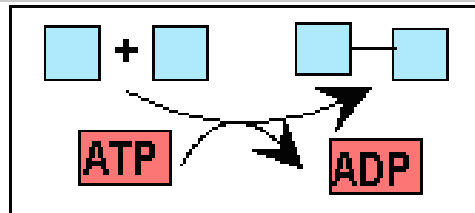
D) LIASAS : son enzimas que rompen enlaces, sin introducir una molécula de agua, pero sí otros radicales:



E) ISOMERASAS : son enzimas que actúan produciendo reordenaciones dentro de la molécula o transfiriendo radicales en la misma molécula. Son responsables de la formación de isómeros:



D) LIGASAS O SINTETASAS : son enzimas que unen moléculas pero en presencia de energía. Esta energía es proporcionada por el ATP que se hidroliza en ADP + P<sub>i</sub>.

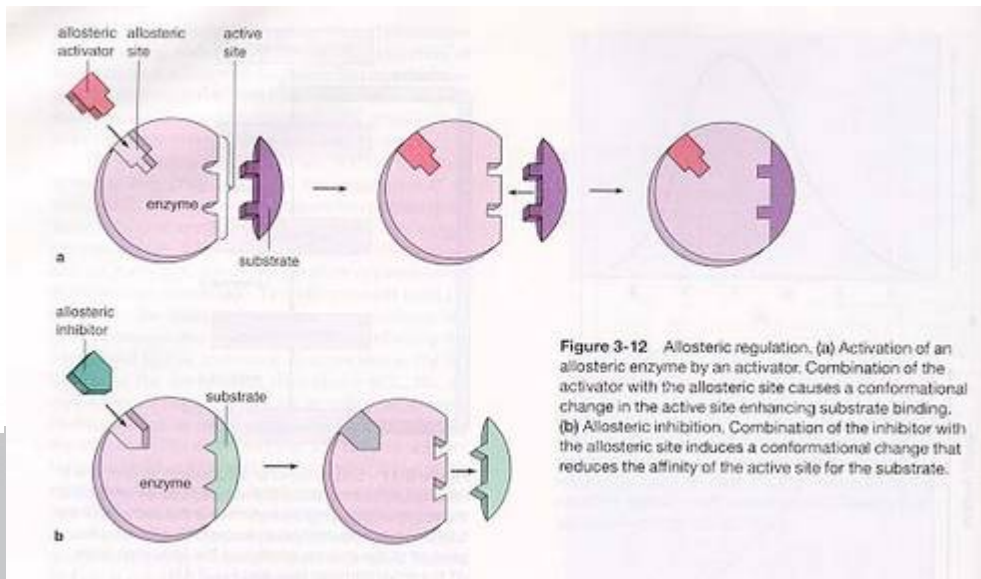


## ENNZIMAS ALOSTÉRICOS

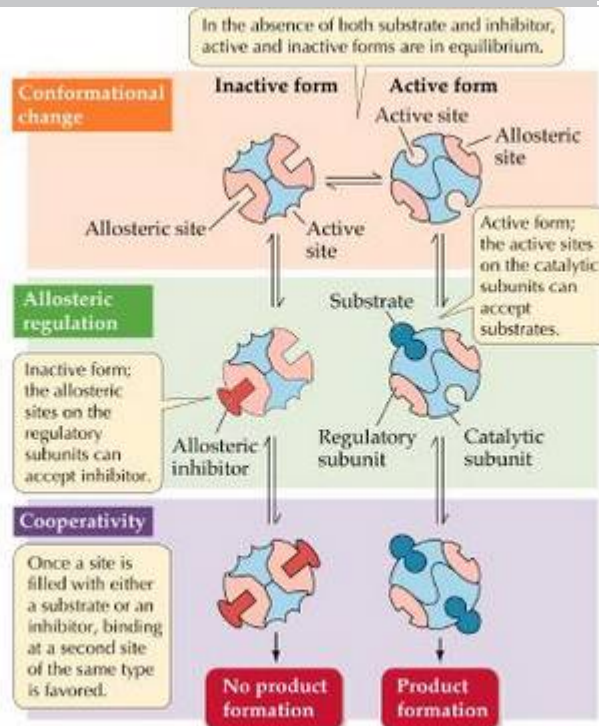
A veces puede resultar útil contemplar a una célula como a una fábrica. Ninguna fábrica operará de manera eficiente si cada máquina está funcionando con su velocidad máxima. Pronto se producirán problemas.

Los **enzimas alostéricos**, son enzimas con una gran susceptibilidad de ser reguladas. Son proteínas oligoméricas, es decir, con varias subunidades cada una con un **centro activo** y con un **centro regulador** o **alostérico**. A este lugar se puede unir otra molécula denominada **efector** o **modulador** (“alostérico” significa “otro lugar”). La interacción del modulador con el centro alostérico es tan específica como lo es la interacción del sustrato con el centro activo y

también está basada en la complementariedad espacial. Estos moduladores pueden ser positivos o **activadores** o negativos o **inhibidores**.

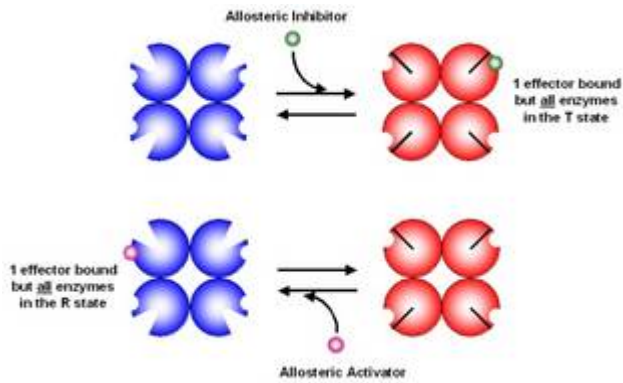


Estos enzimas también presentan un fenómeno que se explicó en la hemoglobina que es el de la **cooperatividad**. Si la cooperatividad se presenta por la unión del sustrato, recibe el nombre de **homoalosterismo**. Si la cooperatividad es producida por activadores o inhibidores diferentes al sustrato, recibe el nombre de **heteroalosterismo**.



© 1998 Sinauer Associates, Inc.

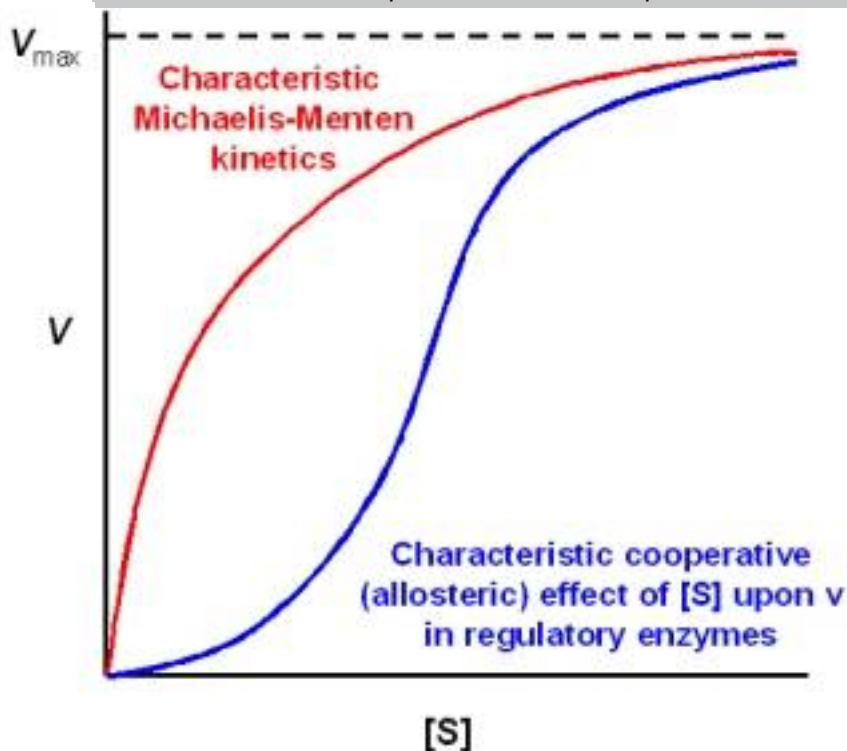
Las unidades de los enzimas alostéricos presentan dos conformaciones: la conformación R, o conformación con mucha afinidad por el sustrato y la conformación T (tenso) con muy poca afinidad por el sustrato.



Cuando un activador (o sustrato en un caso de homaloesterismo) se une al enzima provoca el paso de las subunidades a la conformación R. Así se produce el efecto de cooperatividad ya que las subunidades aumentan la afinidad por el sustrato en la conformación R. Por el contrario, cuando se une el inhibidor, la conformación para a ser T, y el enzima

alostérico se vuelve incapaz de unirse al sustrato por lo que la reacción que cataliza se interrumpe.

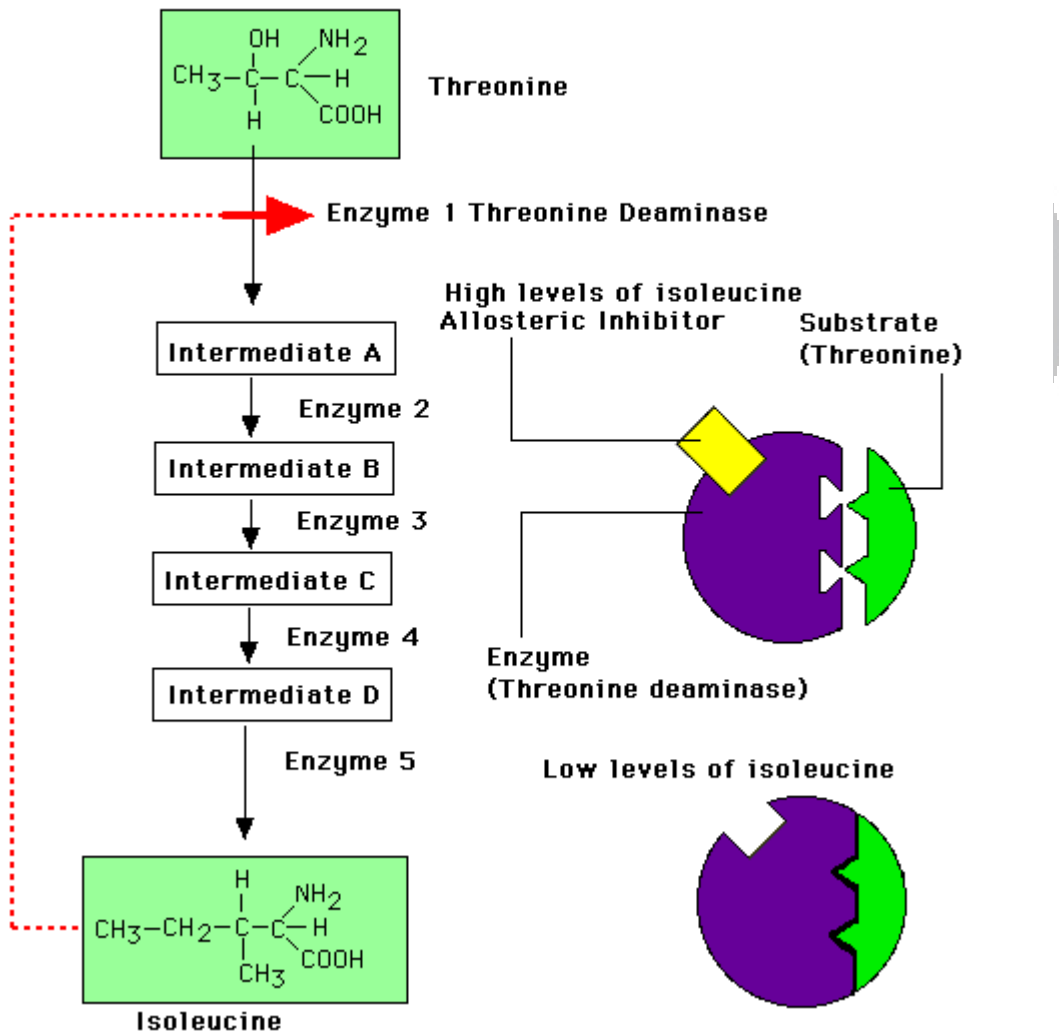
La cinética de las reacciones catalizadas por enzimas alostéricos es diferente a la de los enzimas que siguen la cinética de Michaelis-Menten. Su gráfica presenta una **sigmoide** que indica que en un momento determinado, al ir aumentando la concentración de sustrato, aumenta de repente la velocidad de reacción. Esto es debido al fenómeno de la cooperatividad. Los enzimas alostéricos también presentan saturación por el sustrato.



Muchos enzimas alostéricos se encuentran al principio de vías metabólicas. Estos enzimas suelen tener como inhibidor al producto de final de dicha ruta metabólica. De esta

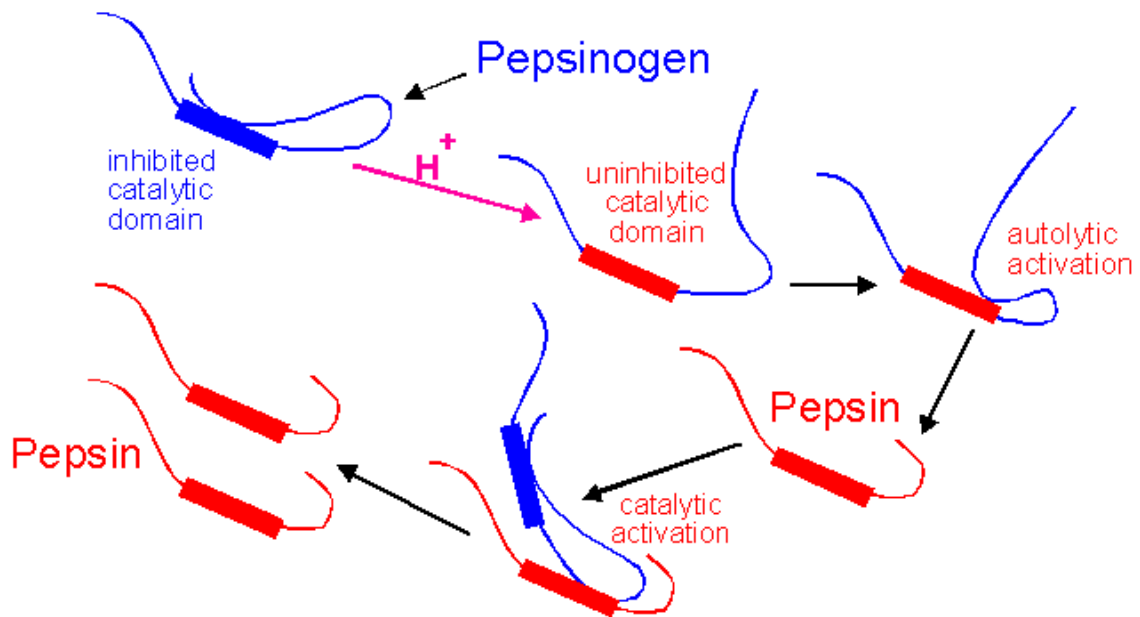
manera cuando la concentración del producto final de la ruta metabólica alcanza un valor determinado, la acción del enzima queda inhibida y se paraliza dicha ruta. De este modo se garantiza que cuando la célula haya conseguido la cantidad de producto suficiente, se paraliza su producción. A este sistema de regulación se le denomina **REGULACIÓN POR PRODUCTO FINAL** o **retroalimentación negativa**.

### Feedback Inhibition



Otro modo en el que la actividad de los enzimas puede regularse es por los **CIMÓGENOS**. Los cimógenos son enzimas que se sintetizan inactivos y que requieren un cambio posterior para ser activos. Si no se produce este cambio o se encuentran los agentes que los producen, el enzima no pasará a su forma activa. Este sistema es muy utilizado por células que fabrican productos que, en su forma activa, podrían dañarlas. Por ejemplo, las células principales de la mucosa gástrica fabrican un enzima que digiere las proteínas (hidroliza los enlaces peptídicos). Si el enzima estuviese activo en el interior de la célula, digeriría las

proteínas de la célula provocando su muerte. Por eso, las células principales fabrican pepsinógeno, un precursor inactivo de la pepsina. El pepsinógeno es un ejemplo de zimógeno. Cuando el pepsinógeno llega al estómago, es atacado por el HCl ( $H^+$ ) y se transforma en pepsina, el enzima activo mediante un sistema autocatalítico.



Otros ejemplos de este mismo fenómeno son el tripsinógeno y el quimiotripsinógeno (para dar tripsina y quimiotripsina en el duodeno) que se fabrican en los acinos pancreáticos. Recuerde también el paso de procolágeno a tropocolágeno.

Los zimógenos se acumulan en el interior de las células antes de su exocitosis en forma de gránulos.

