

DE LA ZIMASA AL RIBOZIM: L'EVOLUCIÓ DEL CONCEPTE D'ENZIM

JULI G. PERETÓ

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València. Burjassot.

Text de la ponència presentada a la Primera Jornada de Biologia «Cap a on va la biologia contemporània», celebrada a Prada dins el marc de la Universitat Catalana d'Estiu, l'agost de 1991.

«Les explicacions en la biologia contemporània continuaran essent químiques.»

J. Lederberg, pròleg a Kornberg (1989)

RESUM

El descobriment dels enzims i de la seva estructura química va jugar un paper molt important en els inicis històrics de la bioquímica com a ciència moderna. A partir de l'experiment seminal de Büchner, va costar més de trenta anys establir la natura proteica dels enzims. En el nostre segle, la majoria de vies metabòliques i enzimàtiques s'han dilucidat. Durant les dècades dels anys setanta i dels vuitanta els bioquímics s'han interessat més pel DNA que per les proteïnes. En els darrers anys certes observacions han canviat radicalment l'eclipsada enzimologia: s'ha descobert la catàlisi per RNA (ribozims) i per anticossos (abzims), i s'ha adquirit un coneixement cada vegada més gran del plegament de proteïnes *in vivo*, a causa dels «acompanyants» (*chaperones*) moleculars. Els avenços en enginyeria metabòlica i de proteïnes, la biologia del desenvolupament, la neurobiologia i el projecte del genoma humà anuncien una època de prosperitat per a l'enzimologia en el llindar del segle XXI.

MOTS CLAU: *enzim, ribozim, abzim, acompanyant molecular, catàlisi.*

SUMMARY

The discovery of the enzymes and their chemical nature played a critical role in the historical beginning of biochemistry as a modern science. It took more than 30 years to establish the proteinaceous nature of enzymes after the seminal experiment of Büchner. During the present century, most metabolic pathways and enzymatic mechanisms have been elucidated. In the 70s and the 80s, biochemists switched their interest from proteins to DNA. Nevertheless several discoveries illuminated the eclipsed enzymology: catalysis by RNA (ribozymes) and by antibodies (abzymes), as well as the progress in the understanding of protein folding *in vivo* (molecular *chaperones*). Current advances in protein and metabolic engineering, developmental biology, neurobiology, and the genome project imply a prosperous time for enzymology on the threshold of the 21st century.

KEY WORDS: *enzyme, ribozyme, abzyme, molecular chaperone, catalysis.*

Segle XIX: el descobriment dels enzims

Les primeres observacions d'activitats promotores de reaccions químiques per part de substàncies derivades de matèria viva foren fetes per Payen i Persoz (1833) amb la diastasa, activitat d'origen vegetal que permet la conversió de midó en sucre, i Schwann (1834-1836) amb la pepsina, derivada del suc gàstric. Amb la descripció d'aquestes activitats, Berzelius introduí el concepte de *catàlisi* (1837), tot comparant-les amb processos similars de natura inorgànica. El 1860 Berthelot va descriure la primera activitat intracel·lular: la invertasa del rent que converteix la sacarosa en glucosa i fructosa. Finalment, el 1878 Kühne proposa el terme *enzim* per fer referència a totes les activitats catalítiques associades amb la matèria vivent.

Va ser, però, la fermentació alcohòlica l'autèntica clau per obrir el pas al l'estudi científic dels enzims. El reconeixement d'aquest procés com un fenomen químic fou establert molt aviat, tant com ho va permetre la ciència química. Amb Lavoisier i Gay-Lussac s'arribà a una equació química del procés de transformació del sucre en alcohol perfectament ajustada. Malgrat això, la causa de la fermentació era tan fosca com en els temps de l'invent de l'escriptura, allà pel 4000 aC, a Mesopotàmia, on ja coneixien les propietats euforitzants del *sikaru*, una beguda fabricada per fermentació de grans, possiblement el precedent més antic de la nostra cervesa.

El 1779 l'Acadèmia Francesa de Ciència oferí un kilogram d'or a qui fos capaç d'explicar la natura de la fermentació alcohòlica. Hi tenien, per cert, un fort interès econòmic i industrial per dominar aquest procés i treure avantatge sobre els alemanys, als quals havien guanyat al camp de batalla. Aquest premi l'hauria pogut aconseguir qualsevol dels grans químics del segle passat, com ara Berzelius, Von Liebig o Wöhler si haguessen gaudit d'una visió biològica més clara i en el cas que haguessin reconegut el paper central del llevat. D'altra banda, Pasteur, que s'havia guanyat el prestigi com a químic, tot i apreciament el paper del llevat, va exagerar el sentit biològic fins a arribar a renunciar als principis químics i caure al parany vitalista. De fet, el 1838 Cagniard de Latour (i després el mateix Pasteur) va comprovar que el creixement cel·lular, la vida, es trobava associat al fenomen de la fermentació. Mentrestant, Liebig aportava una explicació mecanicista, newtoniana, de l'acció catalítica observada en la fermentació, un procés més aviat associat amb la putrefacció que amb la vida, segons ell.

D'aquesta manera, el segle XIX va ser testimoni de la controvèrsia entre Pasteur i Liebig, potser de les polèmiques científiques més àcides que hom coneix. En tractar d'explicar el fenomen de la fermentació alcohòlica, el primer defensava una posició vitalista i el segon, una de materialista. La solució del problema fou donada, d'una manera inesperada i per casualitat, per

l'experiment de Büchner (1897), considerat per molts com l'inici de la bioquímica moderna. Tractant de trobar un mètode per preservar els extractes de llevat obtinguts en premsar les cèl·lules, va provar una tècnica tradicional: afegir-hi una bona quantitat de sucre, com es fa per preparar melmelades i confitures. La sorpresa va ser que aquella mescla començava a bullir violentament. És a dir, l'extracte lliure de cèl·lules era capaç de fermentar el sucre afegit. No calia, doncs, que l'estructura cel·lular fos intacta (com demanava Pasteur) per tal d'observar el fenomen. L'activitat derivada de les cèl·lules fou anomenada *zimasa*.

La fermentació *in vitro*, al tub d'assaig, en absència de cèl·lules, és el paradigma de l'enfocament experimental genuïnament bioquímic. La bioquímica s'uneix així als grans corrents biològics ja encetats o a punt d'aparèixer en escena: la teoria cel·lular (Schleiden i Schwann, 1838-1839; l'*omnis cellula e cellula* de Virchow, 1855), la teoria dels gèrmens com a causants de malalties infeccioses (Koch, 1876, i després, Pasteur), la teoria de l'evolució (Darwin-Wallace, 1859) i la teoria *quàntica* de la transmissió hereditària (Mendel, 1865, redescobert en 1900 per De Vries, Correns i Tschermak). Amb el segle xx comença, doncs, la biologia moderna.

Primera meitat del segle xx: cercant la natura química dels enzims, llur anatomia i fisiologia

Gradualment, la força vital fou substituïda pels enzims. Ara, però, calia establir la natura química d'aquests agents i encara haurien de passar gairebé quaranta anys des de l'experiment de Büchner abans que tothom acceptés que els enzims eren de naturalesa proteica. Les primeres observacions sobre l'acció dels enzims feren suposar que aquests eren una « propietat » de la matèria vivent. Ja al segle xx els enzims tingueren, primer, la categoria de substància química definida, i, després, de proteïna específica. Això va ser demostrat a bastament pels estudis

de Summer, Kunitz i Northrop entre 1926 i 1935. La purificació, la caracterització i, sobretot la cristal·lització dels enzims foren etapes fonamentals per donar pas al seu coneixement molecular. En aquest sentit, el desenvolupament de tècniques com la ultracentrifugació (Svedberg, anys vint), l'anàlisi automàtica d'aminoàcids (Stein, Moore, Anfinsen) i l'electroforesi (Tiselius, anys cinquanta) foren decisives per tal de bastir proves experimentals sòlides en la demostració de la natura proteica dels enzims i l'aleshores gens òbvia correspondència entre una proteïna funcional i una seqüència d'aminoàcids concreta. Amb tot, eminents científics com Willstätter sosteniren fins a la mort que la proteïna devia ésser més aviat un vehicle, un suport, per al veritable catalitzador, possiblement ions inorgànics sovint considerats com a contaminants.

Paral·lelament als esforços en la identificació química dels enzims, hi ha qui s'interessa pels aspectes cinètics. S'avança en els models que puguem explicar quantitativament el comportament enzimàtic, sobretot a partir de la proposta de Brown (1902) de la formació del complex enzim-substrat, del desenvolupament de l'equació de Michaelis-Menten (1913) i de l'aplicació de la hipòtesi de l'estat estacionari (Briggs-Haldane 1925). Un altre aspecte fonamental és la visió dels enzims com a productes dels gens. La primera proposta neix dels estudis de mutacions genètiques que causen « errors congènits del metabolisme », realitzats per Garrod (1908), que va advertir que certes malalties hereditàries humanes rares (tals com l'albinisme i l'alcaptonúria) eren produïdes per l'absència d'enzims específics. Més tard, Beadle i Tatum (1940) formularien la hipòtesi « un gen-un enzim », a partir dels seus estudis de genètica fúngica.

El descobriment de l'anatomia dels enzims fou una tasca engegada a partir de 1950. Els estudis cristal·logràfics (Pauling, 1951; Perutz i Kendrew, 1960) i la possibilitat de seqüenciació (Sanger, 1952) subministren les bases per tal que els enzims prenguen una forma i un disseny

espacials a escala atòmica. Cal advertir que les primeres estructures descobertes foren de proteïnes fibroses i, després, de proteïnes no catalítiques, com la mioglobina i l'hemoglobina, tot i que aquesta és considerada «l'enzim honorari». El primer enzim que es va poder «veure» va ser el lisozim (Phillips, 1966). Pel que fa a la funció, la fisiologia dels enzims, es viu una era daurada de mitjan anys trenta fins a mitjan anys setanta. Es descriuen els principals mecanismes de reacció i es tracen les rutes metabòliques més importants.

Els felços seixanta, o la dècada de les idees genials, i l'inici de l'eclipsi durant els setanta

La dècada dels seixanta fou força fructífera des del punt de vista conceptual. La hipòtesi quimiosmòtica (1961) sobre l'acoblament energètic durant la respiració i la fotosíntesi, acaba per sempre amb la cèl·lula com a *sac d'enzims*. La frontera traçada per Warburg («on l'estructura comença, la bioquímica acaba») és traspasada per Mitchell amb l'ajut d'un simple pHmetre. S'introdueix el concepte de metabolisme vectorial enfront del metabolisme escalar, per tal de distingir aquells processos catalítics en què el transport de substàncies i la compartimentació esdevenen essencials i indistingibles. La generació i el manteniment de gradients iònics ocupen així un lloc central en els fenòmens de transport a través de membrana i de transducció de fonts d'energia primàries (llum, oxidació-reducció) en formes de treball útil per a la cèl·lula (moviment, biosíntesi, comunicació, morfogènesi, calor, llum, etc.).

La hipòtesi al·lostèrica (1963) inicia una nova dimensió de l'enzimologia. Més enllà de l'extraordinària especificitat i del poder catalític, els enzims són també capaços de sentir i integrar informació de l'ambient. La regulació enzimàtica esdevé un ingredient essencial en la comprensió molecular de la cèl·lula.

Finalment, es completa la pedra Rosetta del codi genètic, l'equivalència del llenguatge li-

neal dels nucleòtids al d'aminoàcids i fructifica un dels pensaments més profunds de la biologia moderna, l'anomenat *dogma central* de la biologia molecular (Crick, 1970). Contràriament a allò que solen reflectir els llibres de text, el *dogma* no postula res al voltant de les direccions de flux informatiu entre els àcids nucleics. La proposta de Crick, alhora breu i grandiosa, fou: una vegada la informació genètica ha pres la forma química de proteïna, ja no pot sortir d'aquí. Un tret de gràcia al lamarckisme des de la biologia molecular, que fins ara, malgrat alguns intents, no ha estat contradit.

Els seixanta també ofereixen una observació experimental que ningú no sospitava la revolució que originaria: Arber (1962) descobreix els enzims de restricció, que serien caracteritzats després per Nathans i Smith. La creació de la primera molècula de DNA recombinant (1972) marca l'inici de l'eclipsi dels enzims com a objecte central d'estudi. Per a molts biòlegs i, el que és pitjor, per a molts estudiants de biologia, els enzims passaran a ser els components d'un *kit* d'anàlisi clínica o de manipulació de DNA i, fins i tot, el seu nom acabat en *-asa* serà substituït per un número o un color.

Ribozims, abzims i espelmes moleculars: punts d'inflexió durant els anys vuitanta

L'eclipsi dels enzims durant, com l'anomena Kornberg, l'*era dels caçadors de gens* (1975-), no ha estat total. L'any 1981 fou especialment il·luminat pel descobriment de l'RNA catalític per Cech. Estudiant la maduració del precursor de l'rRNA de *Tetrahymena*, Cech fou capaç de demostrar que l'escissió i la posterior unió de fragments de RNA era un procés autocatalític, és a dir, succeïa en absència de proteïnes. Després es va poder comprovar que l'intró eliminat, per ell mateix, era capaç de catalitzar diversos mecanismes de trencament i formació de l'enllaç fosfodiester. El 1983 Altman demostrava que la subunitat catalítica de la RNasa P, un enzim implicat en la maduració dels precursors de

tRNA, era de naturalesa ribonucleica. D'ençà els primers exemples descrits, la llista de reaccions catalitzades per RNA, tant naturals com artificials, ha anat creixent. Aquestes observacions, tot i significar una revolució conceptual (*tots els enzims ja no són proteïnes*), havien entrat dins del terreny de les possibilitats «raonables» per a biòlegs com Crick i Orgel. En efecte, per pura especulació, a partir del paper fet per l'RNA a les cèl·lules actuals, hom podia imaginar un món primitiu on tant la transferència d'informació com la catàlisi foren protagonitzades per àcids nucleics. Era una manera de resoldre el vell problema de l'ou i la gallina per tal d'explicar qui fou abans si les proteïnes o els àcids nucleics, durant l'evolució més primitiva de la vida. Amb el descobriment de l'RNA catalític, un àcid nucleic és capaç de portar informació genètica i, teòricament, d'executar-la. El concepte equívoc de Schrödinger (*els gens són els plànols i els executors*) troba aquí una materialització real i possible. De fet, el cercle s'ha tancat completament amb la descripció de Noller, el 1992, segons la qual l'activitat peptidil transferasa del ribosoma procariòtic (l'enzim que catalitza la unió d'un aminoàcid amb el següent durant la síntesi proteica) resideix a l'rRNA 23S i no a les proteïnes. Què significa, tot això, per al nostre concepte d'enzim? Tan sols l'extensió de la natura química dels biocatalitzadors a un nou tipus d'espècie química: els enzims poden ser proteïnes o RNA. Fins i tot, potser no hauria fet falta inventar un nom nou (*ribozim*), ja que quan es va proposar el terme *enzim* (Kühne, 1878) encara s'estava ben lluny de conèixer la seua natura. A més, la idea continguda en la denominació *enzim* (etimològicament, «dins del llevat») continua essent vàlida per a l'RNA catalític. Por haver-hi altres biomolècules capaces d'exercir la funció catalítica? Ens hauria de sorprendre la demostració que un polisacàrid accelere una reacció metabòlica?

Tot això encara haurà de venir. El que sí que s'ha pogut fer és convertir en catalítiques proteïnes que originalment no ho són. Tal és el

cas dels anticossos catalítics o *abzims*. Els anys seixanta, Jencks, desenvolupant la teoria de l'estat de transició aplicada al procés de la catàlisi enzimàtica, havia postulat que si hom fos capaç de sintetitzar un anticòs complementari de la geometria de l'estat de transició d'una reacció química (biològica o no!) aquesta proteïna hauria de catalitzar el procés. Els grups de Tramontano i de Schultz van poder demostrar-ho l'any 1986, independentment, emprant anticossos monoclonals contra molècules orgàniques anàlogues dels estats de transició de les reaccions d'hidròlisi d'esters. Avui és possible dissenyar i sintetitzar catalitzadors prou poderosos, amb l'avantatge de l'estereoselectivitat que ofereix la catàlisi enzimàtica.

La dècada dels vuitanta encara ens ha donat un concepte bioquímic més que afecta els enzims. La idea clàssica, derivada dels experiments d'Anfinsen amb la ribonucleasa (1961) i de l'autoassociació de ribosomes i virus *in vitro*, indicava que l'estructura primària de la proteïna (la seqüència lineal d'aminoàcids) és necessària i suficient per tal de determinar l'estructura tridimensional d'un enzim. Tanmateix, el plegament de les proteïnes *in vivo* és força més complicat. L'adquisició de l'estructura tridimensional correcta, i també l'autoassociació de subunitats per donar oligòmers, requereix, gairebé sempre, l'auxili d'altres proteïnes. Són les anomenades *espelmes moleculars* (*molecular chaperones*) que eviten les interaccions incorrectes entre superfícies potencialment complementàries durant la síntesi del polipeptid o durant el transport i muntatge de complexos multimoleculars. Un tipus d'aquestes espelmes moleculars (*chaperonins*) actuen com a autèntics enzims del plegament polipeptídic. Tot i que el mecanisme biofísic no és conegut encara, sembla que, al mateix temps que impedeixen plegaments incorrectes, acceleren la ruta de plegament correcte. Amb el descobriment de les espelmes moleculars cal modificar el concepte clàssic: l'estructura primària és necessària però no suficient per a l'adquisició de l'estructura tridimensional de la proteïna.

El desenvolupament de les tècniques de manipulació de DNA ha permès també avenços molt significatius en l'enzimologia. L'enginyeria proteica fa ús de la mutagènesi dirigida, el canvi d'uns pocs nucleòtids per tal d'introduir la modificació d'un o dos aminoàcids escollits a l'estructura proteica. És possible imitar la natura i fer «evolucionar» un enzim en un temps rècord. Allò que la selecció natural ha dissenyat *cegament* durant els darrers 3.500 milions d'anys al planeta Terra, es pot modificar amb un *propòsit* en un laboratori de biologia molecular en unes hores. Esbrinar els secrets més íntims de la relació estructura-funció d'una proteïna o dissenyar una insulina o un anticòs «millor» entren dins dels resultats aconseguits ja. Un dels objectius prioritaris de molts projectes biotecnològics és la producció de béns biològics valuosos i escassos (hormones, antibiòtics, vitamines, enzims, interferó, factor de coagulació, etc.) a gran escala dins d'un fermentador. La nostra pobra comprensió de la regulació metabòlica fa que moltes vegades no siga possible l'èxit en forma d'un procés econòmicament rendible perquè la sobreexpressió d'un enzim o enzims biosintètics no sempre és suficient. S'estan donant els primers passos cap a una enginyeria metabòlica, un millorament de les activitats cel·lulars manipulant enzims, transportadors i funcions reguladores mitjançant tècniques de DNA recombinant. Això requerirà un gran esforç teòric i experimental en l'estudi del metabolisme intermediari i la seua regulació, una especialitat bioquímica que alguns haurien donat per acabada i moribunda fa uns anys.

Cap on va la química de proteïnes i l'enzimologia contemporànies?

No és difícil preveure que les dècades properes portaran nous punts d'inflexió al pensament biològic. Seqüenciar el genoma dels diferents organismes model (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*)

significarà tenir a l'abast una immensa quantitat d'informació (d'altra banda, un desafiament també per a l'informàtica). Sabrem la seqüència dels gens, però què en sabrem, de llur funció? Caldrà fer un esforç paral·lel en la caracterització dels productes dels gens, caldrà incrementar l'interès dels estudiants per les proteïnes. Fins al juny de 1992, segons dades aportades per Hodgson (1992) hi ha un 76 % del genoma d'*E. coli* seqüenciat i un 27 % del de llevat, enfront de l'1,8 % de *Drosophila* o un 0,6 % de l'humà. I segons Chothia (1992), del DNA ja seqüenciat amb prou feines es poden identificar un 35 % de seqüències similars a proteïnes ja conegudes. Així que, de moment, la bioinformàtica, l'estudi a través de les bases de dades de com una seqüència de DNA pot representar una funció cel·lular concreta, es troba força limitada (Bains, 1992).

D'altra banda, un dels grans problemes dels «caçadors de gens» és que quan es vol expressar el corresponent cDNA en un sistema heteròleg (*E. coli*, *S. cerevisiae*) per obtenir el producte proteic en grans quantitats i caracteritzar-lo, el sistema falla massa sovint. Sabem tan poc dels requeriments per a l'estabilitat i el correcte plegament d'una proteïna dins la cèl·lula!

Dues àrees de la biologia que comportaran, sens dubte, esforços intel·lectuals *qualitatius* sense precedents seran la biologia del desenvolupament (incloent-hi la comprensió global del càncer) i la neurobiologia, les bases químiques de les funcions (i disfuncions) cerebrals. Dels gairebé cent mil gens que codifiquen proteïnes a l'espècie humana, la meitat s'expressen al cervell.

Així doncs, a trenc d'alba del segle XXI coneixerem l'inici d'un renaixement enzimològic.

Agraïments

El primer reconeixement és per al Dr. Ricard Guerrero, que va tenir la idea d'organitzar aquesta Primera Jornada de Biologia a Prada. També vull expressar la meua gratitud a totes les perso-

nes que han escoltat aquesta conferència, tant a Prada de Conflent com a València, pel seu interès i suggeriments. El Dr. J. Moreno i la Dra. M. Pamblanco han enriquit amb els seus comentaris el text original, per bé que les errades i enfocaments més personals són responsabilitat exclusiva de l'autor.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, G. (1975). La ciencia de la vida en el siglo xx. FCE. Mèxic.
- ALTMAN, S. (1990). Enzymatic cleavage of RNA by RNA (Nobel Lecture). **Angew Chem. Int. Ed. Engl.** 29: 749-758.
- BAINS, W. (1992). Sequence-So what? **Bio/Technology**. 10: 751-754.
- BRENNER, S. (1990). The human genome: the nature of the enterprise. **Human genetic information: science, law, and ethics**. Ciba Symp. 149. J. Wiley Chichester. p. 6-17.
- CECH, T. (1990). Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena* (Nobel Lecture). **Angew Chem. Int. Ed. Engl.** 29: 759-768.
- CHOTHIA, C. (1992). One thousand families for the molecular biologist. **Nature**. 357: 543-544.
- DEBRU, C. (1983). **L'esprit des protéines. Histoire et philosophie biochimiques**. Herrman, París.
- DIXON, M. (1970). Historia de las enzimas y de las oxidaciones biológicas. **La química de la vida**. Needham, J. (Ed. FCE) Mèxic. p. 61-93.
- DRESLER, D. i H. POTTER (1991). Discovering enzymes. **Scientific American Library**, Nova York.
- ELLIS, R. J. i S. M. VAN DER VIES. (1991) Molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.** 60: 321-347.
- HODGSON, J. (1992) Sequencing and mapping efforts in «model organisms». **Bio/Technology**. 10: 760-761
- JUDSON, H. F. (1979). **The eighth day of creation. The makers of the revolution in biology**. Jonathan Cape, Londres.
- KORNBERG, A. (1987). The universal language. **Bio/Technology**. 5: 520.
- KORNBERG, A. (1989). **For the love of enzymes. The odyssey of a biochemist**. Harvard University press, Cambridge MA. (Hi ha una traducció a la llengua espanyola a Ed. Pirámide).
- KRAUT, J. (1988). How do enzymes work? **Science**. 242: 533-540.
- LAMARCO, K. Ed. (1991). Frontiers in Biotechnology. **Science**. 252: 1643-1681.
- LEICESTER, H. M. (1974). **Development of biochemical concepts from ancient to modern times**. Harvard University Press, Cambridge MA.
- MOODY, P. C. E. i A. J. WILKINSON. (1990). Protein engineering. In Focus. Rickwood D. (Ed. IRL Press), Oxford.
- PACE, N. R. (1992). New horizons for RNA catalysis. **Science**. 256: 1402-1403.
- PERETÓ, J. G. (1984). Tots els enzims ja no són proteïnes. **Ciència**. 4: 178-179.
- SUCKLING, C. J. (1992). Catalytic antibodies-catalysts from scratch. **Biotechnol. Educ.** 3: 9-20.
- TEICH, M. (1970). **Los fundamentos históricos de la bioquímica moderna**. La química de la vida, Needham, J. (Ed. FCE), Mèxic. p. 284-314.