

Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat. (Esp)

Vól. 101, N° 2, pp 399-417, 2007

VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica

## ENZIMAS: QUÉ SON Y PARA QUE SIRVEN

LUIS FRANCO VERA \*

\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 46100 Burjassot, Valencia. [luis.franco@uv.es](mailto:luis.franco@uv.es)

### INTRODUCCIÓN

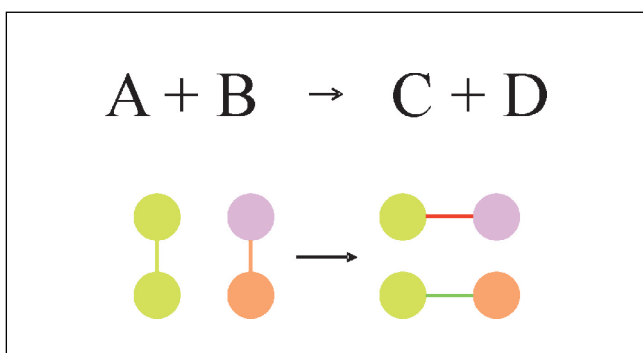
A veces, tendemos a contemplar las realidades naturales con una visión excesivamente antropocéntrica, de modo que cuando nos planteamos preguntas como la que sugiere el encabezamiento de este artículo, “¿para qué sirven las enzimas?”, podemos pensar inmediatamente en dar una respuesta del tipo: “las enzimas sirven para que el hombre pueda desarrollar tal o cual operación”. Además, no es infrecuente que uno seleccione la respuesta entre aquellas operaciones que reportan un beneficio inmediato, de modo que a la perspectiva antropocéntrica se añada otra de corte utilitarista. Es evidente que el hombre tiene pleno derecho a obtener provecho de la naturaleza, siempre, huelga decirlo, que esa actividad no perjudique a los demás ni a la propia naturaleza, lo que sería un modo indirecto de perjudicar al resto de la humanidad presente o futura. Pero también es cierto que una mentalidad pragmática a ultranza puede entorpecer la contemplación de las realidades naturales en sí mismas; puede impedir descubrir múltiples facetas

que, tal vez, podrían redundar en un mayor beneficio para la humanidad. En este sentido, puede ser conveniente aproximarse a la comprensión del mundo biológico con una actitud abierta, contemplativa si se quiere, sin intentar *aprovechar* inmediatamente las posibilidades que nos ofrece. Y muchas veces resultará de esa visión, asombrada y desinteresada, un profundo conocimiento de las realidades más íntimas de la naturaleza que hará posible su aplicación.

Desde este punto de vista, nos acercaremos al conocimiento de las enzimas. En primer lugar, para tratar de comprender su funcionamiento y, ¿por qué no?, para llenarnos de asombro ante su eficacia catalítica y ante el resto de sus propiedades; después, para con esa comprensión, tratar de entender las bases sobre las que se asienta el aprovechamiento de esas propiedades.

### ¿POR QUÉ LAS ENZIMAS SON CATALIZADORES TAN EFICACES

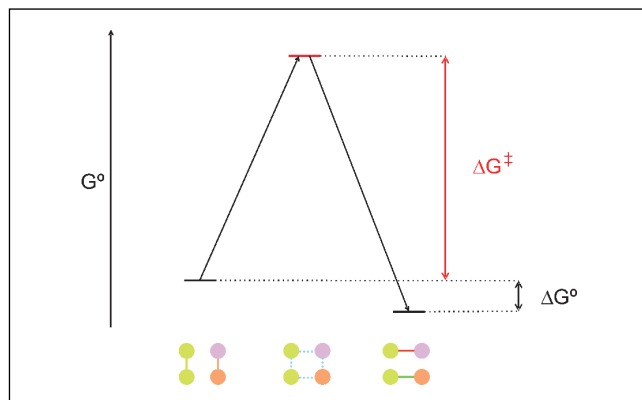
Una reacción química en la que, a partir de unas moléculas se obtienen unos productos diferentes, siempre implica una redistribución de enlaces. La organización de los átomos que componen los reactivos es distinta de la de los productos y en las moléculas, los átomos se unen entre sí mediante enlaces. Cuando, por ejemplo, representamos una reacción como  $A + B \rightarrow C + D$ , estamos indicando implícitamente un balance de materia, es decir, que los átomos presentes en A y B se encuentran también en C y D, aunque, evidentemente, están distribuidos de forma diferente. La figura 1 representa esquemáticamente esa idea.



**Figura 1.** Representación esquemática de una reacción química que pone de manifiesto que en cualquiera de ellas debe producirse una reorganización de enlaces covalentes.

Una reacción química puede considerarse tanto desde una perspectiva termodinámica como desde un punto de vista cinético. En el primer caso, lo más inmediato es indicar el cambio de energía libre que se produce al transcurrir la reacción. Por ejemplo, si la reacción  $A + B \rightarrow C + D$  transcurre en condiciones estándar, la variación de energía libre es  $\Delta G^\circ$ . Evidentemente, el valor de esta magnitud no representa la variación real de energía libre, ya que raras veces se dará la reacción en condiciones estándar, es decir, con todos los reactivos y productos a concentración 1 M. Pero sí aporta un dato valioso: un valor de  $\Delta G^\circ$  negativo, por ejemplo, indica que la reacción *tiende* a producirse de izquierda a derecha, aunque las condiciones actuales puedan obligar a lo contrario<sup>1</sup>.

Para introducir un nuevo concepto, vale la pena citar ahora un ejemplo, del que luego se hará más uso. En las reacciones de hidrólisis  $\Delta G^\circ$  es siempre negativo: el aumento de entropía que implica la escisión hidrolítica de un compuesto químico es responsable de ello. Los aceites comestibles, por concretar, son triésteres de glicerol con ácidos grasos, luego para su hidrólisis  $\Delta G^\circ < 0$ . Si se mezcla el aceite (A) con agua (B), necesariamente se tendrá  $\Delta G < 0$ . La reacción de hidrólisis, en principio, debe producirse con una gran liberación de energía, pero todos tenemos experiencia de que al mezclar aceite con agua, el aceite permanece inalterado durante mucho tiempo. La razón de esta aparente paradoja estriba en que en una reacción química, para que los reactivos se conviertan en productos es preciso pasar por un estado intermedio, el estado de transición. Como se esquematiza en la figura 2, en el estado de transición ni se han terminado de romper los enlaces que hay en A y B, ni se han acabado de formar los que han de aparecer en C y D. El estado de transición representa, pues, una situación inestable, de modo que, para pasar de A + B a C + D, es necesario comunicar a los reactivos la energía necesaria para que alcancen el estado de transición. Esta energía se denomina energía de activación, y se repre-



**Figura 2.** Perfil energético simplificado de una reacción química. Se supone que la reacción esquematizada en la fig. 1 se caracteriza por una variación de energía libre negativa en condiciones estándar. Para que se conviertan los reactivos en productos, es necesario pasar por un estado de transición en el que los nuevos enlaces aún no se han formado totalmente. Este estado, representado en el centro del esquema, es inestable, por lo que para llegar a él es preciso comunicar a los reactivos una energía de activación,  $\Delta G^\ddagger$ .

senta con el símbolo  $\Delta G^\ddagger$  (Fig. 2). Es evidente que la existencia de un estado de transición implica una dificultad al progreso de la reacción y que cuanto mayor sea el valor de  $\Delta G^\ddagger$ , tanto más difícil será que la reacción se produzca.

La consideración de una reacción desde un punto de vista cinético es fácil si se trata de una reacción elemental<sup>2</sup>. Por ejemplo, para una reacción  $A \rightarrow B$ , la velocidad,

$$v = \frac{d[B]}{dt},$$

será proporcional a la concentración de A, es decir,  $v = k[A]$ . La constante de proporcionalidad,  $k$ , recibe el nombre de *constante cinética* y, en primera aproximación, mide la facilidad intrínseca con que los reactivos se convierten en productos. Si la reacción elemental, como la de la figura 1, implica dos moléculas, es evidente que la velocidad dependerá de la concentración de ambas de modo que  $v = k[A][B]$ .

<sup>1</sup> Hay que recordar que

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]},$$

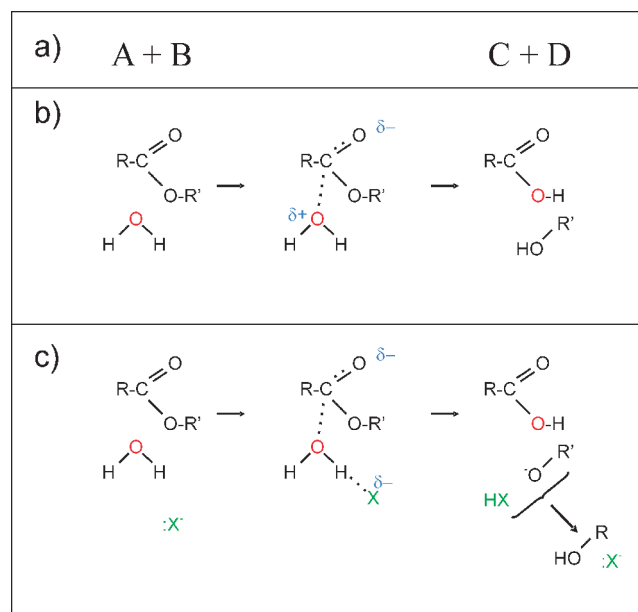
con lo que, aunque  $\Delta G^\circ$  sea negativo, si C y D están mucho más concentrados que A y B, el segundo sumando de la ecuación puede hacer que  $\Delta G$  resulte positivo y la reacción transcurra de derecha a izquierda.

<sup>2</sup> De una forma sencilla, se puede decir que una reacción es elemental cuando transcurre tal como se escribe, sin incorporación ni salida de otras especies químicas.

Las consideraciones elementales anteriores<sup>3</sup>, sobre cinética y termodinámica de reacciones no son independientes. Intuitivamente se ve, por ejemplo, que debe existir una relación entre  $\Delta G^\ddagger$  y  $k$ , de modo que una energía de activación grande, al implicar un mayor obstáculo al avance de la reacción, se correlaciona con una constante cinética pequeña. Por otro lado, es también evidente —y se puede comprobar con un rápido examen de la figura 2— que el valor de la energía de activación no tiene ningún efecto sobre el balance energético de la reacción. Independientemente de cuál sea la magnitud de  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta G^\circ$  permanece invariable. En el transcurso de la reacción, la energía de activación que hay que comunicar a los reactivos para que alcancen el estado de transición, es devuelta al pasar desde éste a los productos.

Un ejemplo concreto puede ayudar a fijar mejor las ideas que se acaban de exponer y, al propio tiempo, a introducir el concepto de catálisis. Por seguir con la línea arriba apuntada, el ejemplo será la hidrólisis de un éster. En este caso, A y B son el éster y el agua, mientras que C y D representan al ácido y al alcohol resultantes. En la figura 3b, el átomo de oxígeno del agua se ha coloreado, para expresar gráficamente cómo este átomo acaba incorporado al ácido. En el estado de transición, que aparece en la parte central de la figura, el desplazamiento parcial de los electrones  $\pi$  del enlace C=O hacia el oxígeno hace posible que un par de electrones libres del agua realice un ataque nucleofílico al carbono del éster. Como consecuencia, aparece un enlace parcial entre el átomo de carbono, que pasa a ser tetraédrico, y el oxígeno del agua. Pero éste queda con una carga parcial positiva y esta es la causa principal de la inestabilidad del estado de transición, ya que el oxígeno es un elemento electronegativo. De hecho, esta inestabilidad puede implicar una energía de activación tan elevada que en muchos casos —como el del aceite antes mencionado— la reacción de hidrólisis de ésteres, pese a ser exérgica, no se produce al mezclarlos con agua.

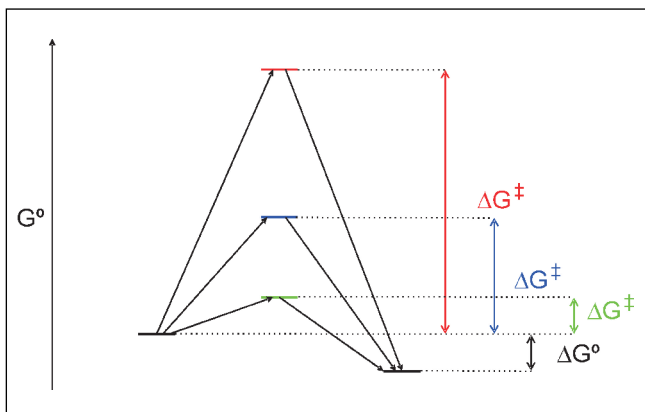
No obstante, la Química Orgánica enseña que en presencia de sosa concentrada sí se produce la hidrólisis de los ésteres. Desde tiempo inmemorial se ha empleado este procedimiento para fabricar jabones



**Figura 3.** Esquema de una reacción química (a), que se presenta en el panel (b) para el caso concreto de la hidrólisis de un éster. Se indica el mecanismo químico y una estructura posible para el estado de transición. En el panel (c) se da el mecanismo de esa misma reacción en presencia de una base,  $:X^-$ , que actúa como catalizador.

sólidos —sales sódicas de los ácidos grasos— a partir de grasas y aceites. Este proceso precisamente ha dado el nombre, saponificación, a la reacción de hidrólisis de ésteres en presencia de una base fuerte como la sosa. ¿Cuál es el motivo por el que una base facilita la reacción de hidrólisis? En la figura 3c la base se ha representado como  $:X^-$ ; hay que advertir que lo esencial de una base es que posea un par de electrones libres capaces de captar un protón. Que posea —como en el caso del ion hidroxilo,  $OH^-$ — carga negativa o no la posea es irrelevante. Pues bien, la base puede ceder parcialmente sus electrones libres a la molécula de agua reactiva, de modo que compense la carga negativa que poseería de otro modo el oxígeno en el estado de transición. En consecuencia, la inestabilidad del estado de transición —y, con ella, la energía de activación— disminuye. Por lo que se ha comentado antes, la reacción se acelera en presencia de la base. Pero el examen de la figura 3c permite añadir otro detalle: al término de la reacción, los productos formados son los mismos que si la base no hubiera estado presente y, lo que es más importante, la base se

<sup>3</sup> Un tratamiento cinético más completo quedaría fuera del alcance de estas líneas. El lector interesado puede acudir a cualquier texto de cinética química.



**Figura 4.** Perfil energético, análogo al de la fig. 2, que muestra como en presencia de un catalizador se estabiliza el estado de transición con la consiguiente disminución de  $\Delta G^\ddagger$ . En el caso de que el catalizador sea una enzima, la disminución de  $\Delta G^\ddagger$  puede ser muy importante (véanse los símbolos representados en verde).

recupera en el mismo estado inicial. De este modo, la base acelera la reacción sin consumirse en ella. Este es el rasgo fundamental de un catalizador químico: facilitar cinéticamente las reacciones sin gastarse. Una única molécula de catalizador puede participar así en la transformación de un número muy elevado —en teoría, indefinido— de moléculas de reactivos. En la figura 4 se puede observar cómo un catalizador, aunque estabiliza el estado de transición y rebaja, por tanto, la energía de activación, no altera el balance termodinámico de la reacción. El valor de  $\Delta G^\circ$  no se afecta y, como  $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$ , el estado final de la reacción, el estado de equilibrio termodinámico, no se afecta por la presencia de un catalizador; simplemente, se alcanza más rápidamente.

Una consideración más a propósito del mecanismo descrito en la figura 3c. No hay que olvidar que la reacción transcurre en disolución, y que las moléculas, por tanto, poseen libertad de movimiento. Teniendo presente esta circunstancia, es razonable pensar que la estabilización del estado estacionario es un suceso sumamente improbable. En efecto, exige la concurrencia de tres moléculas, la del éster, la de agua y la base con una disposición espacial concreta. No basta que la molécula de agua se acerque a la del éster; es preciso que lo haga de modo que uno de los pares de electrones libres del oxígeno quede orientado hacia el carbono para poder realizar el ataque nucleofílico. Y la base debe acercarse a la molécula de agua de forma que sus electrones libres queden en proximidad de uno

de los átomos de hidrógeno del agua. Por este motivo, en las reacciones de saponificación se emplea sosa muy concentrada: la abundancia de iones  $\text{OH}^-$  aumenta la probabilidad de la formación de este complejo.

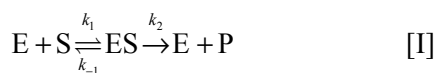
El ejemplo que se ha mencionado corresponde a un tipo particular de catálisis, la catálisis ácido-base. Pero los rasgos fundamentales de la catálisis, es decir, rebajar la energía de activación por estabilizar el estado de transición —y, por ende, facilitar cinéticamente la reacción—, no consumirse en ella y no alterar su balance termodinámico, son comunes a todos los mecanismos catalíticos.

Tras las consideraciones anteriores es ya hora de iniciar el estudio de las enzimas, los catalizadores que emplean los organismos vivos. En primer lugar, llama la atención que las enzimas son catalizadores mucho más eficaces que cualquier catalizador químico. Una experiencia común permite apoyar este aserto. Se acaba de hablar de la saponificación de los ésteres. Pues bien, para completar la reacción de hidrólisis de una grasa en presencia de  $\text{NaOH}$  concentrada (p. ej., 1 M) hacen falta unas 3 h a  $100^\circ$  aproximadamente. Sin embargo, la digestión de las grasas en el organismo, que implica su hidrólisis, se completa en mucho menos tiempo y a  $37^\circ \text{C}$ , gracias a la actuación de unas enzimas, las lipasas. Y, como se ve en la tabla I, hay otras enzimas capaces de acelerar las reacciones por un factor cercano a  $10^{18}$ . Esto es algo absolutamente impensable para un catalizador químico, cuya eficacia no pasa de  $10^6$  o  $10^7$  veces. Además, las enzimas poseen otra propiedad de la que carecen los catalizadores químicos: la especificidad. La catálisis que ejerce la sosa, puede emplearse para la hidrólisis de cualquier éster, pero también para la hidrólisis de amidas, de anhídridos, etc. e incluso para otras reacciones no hidrolíticas. Sin embargo, una hidrolasa —una enzima que cataliza reacciones de hidrólisis— no es capaz de catalizar otro tipo de reacciones. Más aún, las enzimas no sólo poseen especificidad de reacción, sino también de sustrato. Una lipasa no hidroliza —al menos, no lo hace con eficacia— un éster distinto de un triacilglicerol, ni una amida, etc. Y la asparaginasa, enzima que hidroliza el enlace amida de la asparagina, no cataliza apenas la hidrólisis de la glutamina, que sólo difiere de la asparagina en poseer un átomo de carbono más.

¿Cuáles son las bases moleculares de una acción tan eficaz y específica? La clave para contestar esta pregunta la dio el trabajo de Leonor Michaelis (1875-1949) y Maud Menten (1879-1960). El primero era un joven profesor de la Universidad de Berlín; la segunda, una, aún más joven, doctora de origen canadiense. Sus nombres han pasado a la historia de la Bioquímica, hasta el punto que se puede decir que la Enzimología comienza realmente con ellos. No obstante, la mayoría de las veces se malinterpreta el verdadero significado de su trabajo. Todo el que haya estudiado una Bioquímica, por elemental que haya sido, ha oído hablar de la *constante de Michaelis*, o de la *ecuación de Michaelis-Menten*. Pero asociar el nombre de estos investigadores a una ecuación es realmente una injusticia. El verdadero alcance de su trabajo es muy otro. Michaelis y Menten se interesaron por la reacción catalizada por la invertasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa para producir glucosa y fructosa, reacción que se podría abreviar como:



donde E representa a la enzima y P a los productos de la reacción. Como ésta es irreversible, a simple vista, la velocidad de la reacción vendría dada por  $v = k[S]$ , en la que  $k$  sería la constante cinética. Esta ecuación implicaría que, al representar  $v$  en función de  $[S]$ , se debería obtener una línea recta, que pasaría por el origen y cuya pendiente sería  $k$ . No obstante, la representación era muy diferente. Como ya había observado Victor Henri en 1903 (1), se obtenía una curva de pendiente continuamente decreciente, que tendía asintóticamente a un valor de velocidad que no se podía superar por mucho que se elevara la concentración del sustrato<sup>4</sup>. Pero Henri no acertó a comprender la razón de este resultado que, por el contrario, fue el punto de partida del modelo de Michaelis y Menten. Supusieron estos autores que, para que el sustrato se convirtiera en producto, un requisito esencial era que se uniera previamente a la enzima, formando un complejo. La propuesta de de Michaelis y Menten se esquematiza pues:



Hoy en día estamos tan acostumbrados a ver el esquema [I] como prototipo de una reacción enzimática, que puede costar trabajo comprender el verdadero mérito de Michaelis y Menten al proponerlo. Efectivamente, si el sustrato debe formar un complejo con la enzima —lo que, posteriormente, se ha llamado el *complejo de Michaelis*—, la velocidad de la reacción, es decir, la velocidad de aparición del producto, vendrá dada por  $v = k_2[\text{ES}]$ . Y es evidente que la concentración de complejo ES no puede superar el valor de la concentración total de enzima, lo que justifica que la velocidad tienda asintóticamente a un valor máximo al aumentar la concentración de sustrato.

El modelo de Michaelis-Menten implica algo que ahora conviene detallar. La unión de la enzima con el sustrato no se efectúa por una simple adsorción inespecífica, sino que tiene lugar a través de una localización concreta de la enzima, llamada *centro activo*. El sustrato encaja en el centro activo, en primer lugar porque sus estructuras son más o menos complementarias desde un punto de vista estérico. Pero además, y esto es más importante, se establecen múltiples interacciones entre los aminoácidos que forman el centro activo y el sustrato. Se trata de interacciones no covalentes, débiles cada una de ellas, pero fuertes en su conjunto al ser muy numerosas. Tanto la complementariedad estérica del centro activo y el sustrato como el establecimiento de múltiples interacciones explican la especificidad de la interacción enzima-sustrato. Para ilustrar esta cuestión, se puede usar el ejemplo de la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, una de las enzimas cuyas propiedades cinéticas se recogen en la tabla I. La enzima cataliza la descarboxilación de la orotidina-5-fosfato, la última etapa de la biosíntesis de las pirimidinas. La reacción se recoge en la figura 5a. La enzima está formada por dos cadenas polipeptídicas de 239 aminoácidos cada una y posee dos centros activos situados en la interfase entre ambas cadenas. En la figura 5b se presenta un esquema del centro activo, elaborado a partir de los datos cristalográficos de Appleby *et al.* (3). Se puede ver que, de los aminoácidos que posee la enzima, sólo 11 intervienen directamente en la unión del sustrato en el centro activo. Nueve pertenecen a una de las cadenas y los 2 restantes a la otra. Aunque estos aminoácidos están

<sup>4</sup> Desde hace mucho tiempo, se ha hecho costumbre denominar sustratos a los reaccionantes de una reacción enzimática.

Enzima	$k_{\text{cat}}/k^a$
$\beta$ -amilasa	$7,2 \times 10^{17}$
Orotidina-5'-P descarboxilasa	$1,4 \times 10^{17}$
Fumarasa	$3,5 \times 10^{15}$
Ureasa	$1,0 \times 10^{14}$
Carboxipeptidasa B	$1,3 \times 10^{13}$
Adenosina desaminasa	$2,1 \times 10^{12}$
Citidina desaminasa	$1,2 \times 10^{12}$
Glucógeno fosforilasa	$9,0 \times 10^{11}$
Cetoesteroide isomerasa	$3,9 \times 10^{11}$
Hexoquinasa	$8,0 \times 10^{10}$
Alcohol deshidrogenasa	$2,0 \times 10^{10}$
Triosa-fosfato isomerasa	$1,0 \times 10^9$
Anhidrasa carbónica	$1,1 \times 10^8$
Creatin quinasa	$4,0 \times 10^8$
Corismato mutasa	$1,9 \times 10^6$

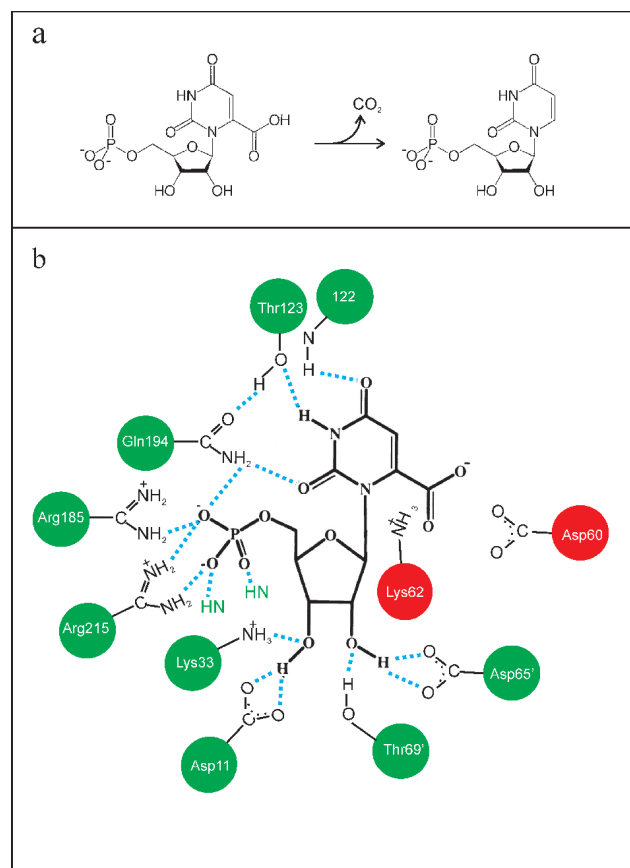
<sup>a</sup> El cociente indica la relación entre la constante cinética de la reacción catalizada por la enzima y la correspondiente a la reacción sin atalizar. El significado de la magnitud  $k_{\text{cat}}$  se explica con detalle en el texto.

**Tabla I.** Efecto de las enzimas sobre la velocidad de reacción.

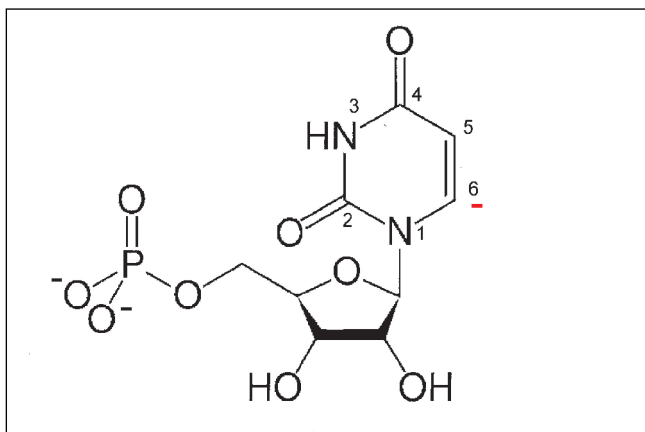
alejados en la secuencia de la proteína, evidentemente se encuentran próximos en la estructura terciaria de la enzima. Se aprecia también en la figura 5b que esos 11 aminoácidos establecen un total de 16 interacciones — mayoritariamente enlaces de hidrógeno — con los átomos del sustrato.

Las propiedades del centro activo que se acaban de mencionar y, especialmente, el ejemplo de la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, justifican la gran especificidad de sustrato de las enzimas. Es muy difícil encontrar una molécula que tenga una forma y tamaño semejantes a los del sustrato orotidina-5'-fosfato y que además posea en la zona adecuada los átomos donadores o aceptores para que se establezcan los enlaces de hidrógeno que retienen al sustrato unido al centro activo. Pero esas propiedades aún son insuficientes para explicar el porqué de su eficacia catalítica. Para ello, hay que añadir un dato: en el centro activo, además de los aminoácidos que se encargan del reconocimiento específico del sustrato hay otros que

desempeñan el auténtico papel catalizador. En la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa esa misión la realizan las cadenas laterales de Lys62 y de Asp60. Como se aprecia en la figura 5b, esos aminoácidos se encuentran próximos al grupo carboxilo del sustrato, que ha de perderse en la reacción, y su función es precisamente la de estabilizar el estado de transición. Tras la pérdida del grupo carboxilo, el carbono 6 queda en la forma inestable de carbanión (4), representada en la figura 6, y la carga positiva de Lys62 estabiliza el estado de transición, a partir del cual, por protonación del carbanión, se obtiene el producto. Por su parte, muchas enzimas hidrolíticas poseen en su centro activo aminoácidos capaces de actuar como bases,



**Figura 5.** Función del centro activo en la catálisis enzimática. Se emplea el ejemplo de la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa. (A) Descarboxilación de la de la orotidina-5'-fosfato, reacción catalizada por la enzima. (B) Esquema del centro activo de la enzima, construido a partir de los datos de Appleby *et al.* (3). En verde se representan los aminoácidos implicados en la formación del complejo de Michaelis, que establecen los enlaces señalados por las líneas de puntos azules. En rojo se señalan los aminoácidos con función directamente catalítica. Véase el texto para más detalles.



**Figura 6.** Estructura del estado de transición propuesto (4) para la reacción catalizada por la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa.

aportando un par de electrones libres, con lo que cumplen el papel de la base en un mecanismo catalítico como el esquematizado en la figura 3c.

La figura 5b pone de manifiesto, finalmente, otra de las propiedades que hacen de las enzimas catalizadores tan eficaces. La gran cantidad de interacciones entre el centro activo y el sustrato no sólo garantiza la especificidad con la que éste se une, sino que asegura que los aminoácidos implicados en la catálisis (en rojo en la figura 5b) queden próximos a la zona reactiva del sustrato. De esta manera, se soluciona el problema apuntado al hablar antes sobre la catálisis homogénea, en disolución, en la que era necesario utilizar una gran concentración del catalizador. Evidentemente, la fijación del sustrato y su colocación con la proximidad y orientación adecuadas a la acción de los residuos catalíticos cumple con creces la misión de una elevada concentración de catalizador. Naturalmente, la fijación del sustrato implica una variación negativa de entropía. A la vista de la conocida relación termodinámica entre entropía y energía libre,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , es obvio que un valor de  $\Delta S < 0$  resulta desfavorable desde un punto de vista energético, pero el elevado número de interacciones favorables enzima-sustrato hace que  $\Delta H$  sea lo suficientemente negativo para hacer termodinámicamente favorable la formación del complejo de Michaelis.

Todas las consideraciones anteriores explican la inigualable eficacia de las enzimas como catalizadores. Su papel estabilizador del estado de transición, con la consiguiente disminución de la energía

de activación, es mucho más pronunciado que el que ejercen los catalizadores químicos. Volviendo al esquema de la figura 4, se comprende que las enzimas aceleren las reacciones químicas mucho más que los catalizadores ordinarios.

Si se admite la existencia del complejo de Michaelis como un intermediario en la conversión del sustrato en producto (esquema [I]), es posible desarrollar la ecuación que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración de sustrato. Se ha comentado antes que  $v = k_2[ES]$  y existen diversos procedimientos para expresar  $[ES]$  en función de la concentración de sustrato. Michaelis y Menten usaron uno aproximado; hoy en día se suele utilizar otro, pero el resultado matemático es similar. Se suele partir de la consideración, apoyada por la integración numérica de las ecuaciones diferenciales cinéticas derivadas del esquema [I], de que la reacción enzimática transcurre mayoritariamente en el *estado estacionario*. Se entiende como tal el periodo de tiempo durante el cual se puede suponer que la concentración de ES permanece constante, ya que se forma a partir de la enzima y el sustrato libres a la misma velocidad que desaparece para disociarse y para formar producto. Como quiera que el estado estacionario, en la inmensa mayoría de los casos, comienza antes de 0,1 s tras la mezcla de la enzima y el sustrato y se prolonga varios minutos, la suposición de estado estacionario es habitualmente válida. En el estado estacionario

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0,$$

e imponiendo esta condición en las ecuaciones cinéticas, se llega a:

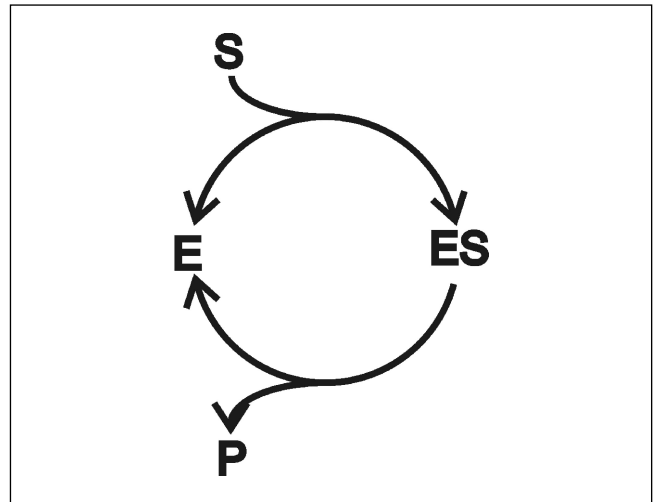
$$v_0 = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad [1]$$

La ecuación [1], ecuación de Michaelis-Menten, es la ecuación de una hipérbola. Su representación gráfica, limitada al primer cuadrante, el único en que tiene sentido físico la ecuación, se puede observar en la figura 7. Como era de esperar, la representación satisface la observación experimental de que la velocidad no aumenta indefinidamente, sino que tiende asintóticamente a  $V_{\max}$ , el valor máximo que puede alcanzar la velocidad en respuesta a un aumento

en la concentración de sustrato. Si la reacción enzimática se describiera adecuadamente por el esquema [I], la velocidad máxima sería el producto de  $k_2$  por  $[E]_0$ , la concentración total de enzima en términos de centros activos<sup>5</sup>. Pero, en general, el esquema [I] es sólo una aproximación, y el mecanismo de la reacción enzimática implica un número superior de etapas entre la formación del complejo de Michaelis y la formación del producto. En general, se puede escribir:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0 \quad [2]$$

donde  $k_{\text{cat}}$ , constante catalítica o número de recambio, es una constante, combinación de todas las constantes cinéticas de las etapas comprendidas entre el complejo de Michaelis y la formación del producto. Sus dimensiones son de  $(\text{tiempo})^{-1}$ . La ecuación [2] permite elaborar una definición de constante catalítica como el número máximo de moléculas de sustrato que cada centro activo es capaz de transformar en producto en una unidad de tiempo. A veces es útil otra manera de expresar esta misma idea. El esquema de reacción [I] se puede representar de forma gráfica como aparece en la figura 8. Esta representación pone de manifiesto el carácter cíclico de la actuación de una enzima, ya que, al no consumirse en la reacción —cosa que ocurre en

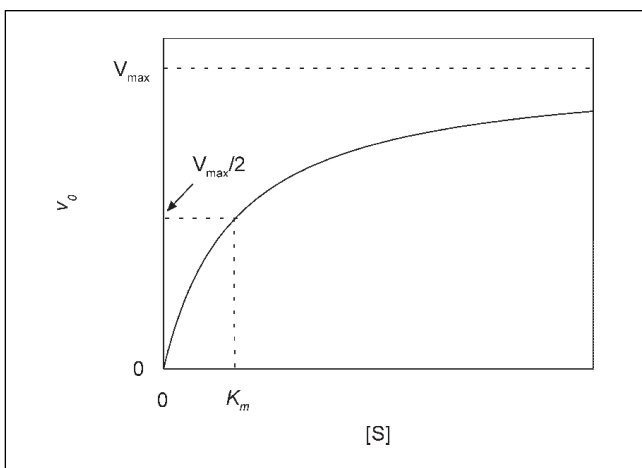


**Figura 8.** Representación esquemática de un ciclo de catálisis.

todos los catalizadores—, una molécula de enzima es capaz de catalizar la transformación de muchas moléculas de sustrato, es decir, de realizar muchos *ciclos de catálisis*. Pues bien, a la vista de estas consideraciones, la constante catalítica se podría definir como el número máximo de ciclos de catálisis que cada centro activo puede realizar en la unidad de tiempo.

En la ecuación [1] aparece un parámetro,  $K_m$ , constante de Michaelis, que algebraicamente resulta de una combinación de las diferentes constantes cinéticas. Su sentido físico, como concentración de sustrato para la que se alcanza una velocidad igual a  $V_{\max}/2$ , se puede obtener fácilmente a partir de la ecuación [1] y se recoge en la figura 7. Es importante, pues, observar que la constante de Michaelis tiene dimensiones de concentración. Aunque no sea tan evidente y tan general, la constante de Michaelis tiene también el significado de constante de disociación aparente de los complejos enzima-sustrato en el estado estacionario<sup>6</sup>.

Finalmente, hay que advertir que la validez de la ecuación [1] no se restringe al caso del simple mecanismo representado por el esquema [I]. Ya se ha



**Figura 7.** Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.

<sup>5</sup> Muchas enzimas tienen más de un centro activo. En ellas,  $[E]_0$  representa el producto de la concentración total de enzima, es decir, la concentración de enzima libre a  $t=0$  por el número de centros activos de la molécula de enzima.

<sup>6</sup> Este significado es exacto si la reacción enzimática puede describirse por el esquema [I]. En caso contrario, no pasa de ser una aproximación, válida para obtener muchas conclusiones. Cuando el mecanismo de reacción incluye otras formas del complejo enzima-sustrato posteriores al complejo de Michaelis, la expresión aparente de  $K_m$  como constante de disociación incluiría  $\Sigma[ES]$  en vez de  $[ES]$  y por eso se habla de constante de disociación *de los complejos enzima-sustrato*.

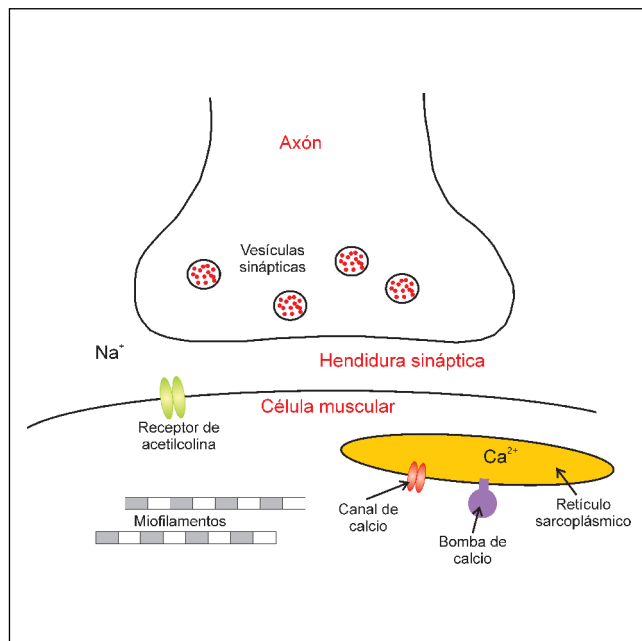


apuntado que puede aplicarse a otros mecanismos más complejos; lo que variará en cada caso es la forma de las expresiones algebraicas que relacionan  $K_m$  y  $k_{cat}$  con las diferentes constantes cinéticas, pero en todos los casos son válidos los significados físicos que se han dado para esos parámetros. También es válida la ecuación de Michaelis-Menten en el caso de que la reacción sea reversible, siempre que las velocidades se determinen en los momentos iniciales del estado estacionario. La notación  $v_0$  que aparece en la ecuación [1] significa precisamente *velocidad inicial*. Incluso es posible aplicar la ecuación [1] a reacciones que impliquen más de un sustrato —que es lo habitual en las reacciones de interés bioquímico—, si se expresa la velocidad de la reacción en función de la concentración de un sustrato, manteniendo constante la concentración de los demás. Naturalmente, en estos casos los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  son valores aparentes, dependientes de la concentración de aquellos sustratos que no se han variado durante la reacción.

### ALGUNAS PROPIEDADES SORPRENDENTES DE LAS ENZIMAS

Un estudio detallado de las propiedades de las enzimas quedaría totalmente fuera del alcance de este capítulo<sup>7</sup>. Aún así, puede bastar la consideración de los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de algunas enzimas para sorprenderse ante las consecuencias de que posean esos valores y no otros. Por ejemplo, la acetilcolinesterasa posee una constante catalítica de  $25\,000\text{ s}^{-1}$ . De acuerdo con la definición dada más arriba, eso significa que un centro activo es capaz de realizar 25 000 ciclos de catálisis por segundo, o lo que es lo mismo, que un ciclo —que implica, no lo olvidemos, captar el sustrato para formar el complejo de Michaelis, pasar por el estado de transición, formar el producto y liberarlo del centro activo— puede llegar a durar tan sólo 0,04 ms. Pero esa extraordinaria rapidez está relacionada con la función que desempeña la enzima. La acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor que actúa, por ejemplo, en las sinapsis neuromusculares. La acetilcolina se almacena en las vesículas sinápticas, situadas en la terminal de un axón (figura 9).

Cuando el sistema nervioso central envía la orden de contracción a un músculo, el cambio de polarización de la membrana presináptica hace que las vesículas sinápticas viertan su contenido a la hendidura sináptica, que separa el axón de la célula muscular. La acetilcolina se difunde así por la hendidura sináptica y llega a interactuar con un receptor que se encuentra en la membrana de las células musculares. Este receptor actúa como un canal de sodio, que permite la entrada de este ion en las células musculares, con la correspondiente despolarización de su membrana. A su vez, ese cambio de potencial abre un canal específico de calcio situado en la membrana del retículo sarcoplásmico, lo que permite que el ion almacenado en su interior difunda hacia el citosol. Y es precisamente la interacción de calcio con los componentes de los miofilamentos lo que provoca la contracción muscular. Así pues, la liberación de acetilcolina se traduce en contracción muscular. Pero si el músculo ha de relajarse de nuevo tiene que existir una forma de revertir todo ese proceso. La acetilcolinesterasa actúa a este nivel. La enzima se encuentra en la hendidura sináptica, con lo que continuamente



**Figura 9.** Esquema de una sinapsis neuromuscular para ilustrar la función del neurotransmisor acetilcolina y de la enzima acetilcolinesterasa. Los detalles se dan en el texto.

<sup>7</sup> El lector interesado puede encontrar excelentes descripciones en algunos libros clásicos, como los recogidos en las referencias 5 y 6.

hidroliza el neurotransmisor y hace descender su concentración. Cuando ésta es suficientemente baja, se libera de su receptor, el canal de sodio se cierra, se restablece la polarización de la membrana de la célula muscular, se cierra el canal de calcio y una bomba específica para este ion lo introduce de nuevo en el retículo sarcoplásmico, con lo que el músculo se relaja. Pero si los episodios de contracción y relajación deben sucederse rápidamente, como ocurre en los dedos de un pianista que está ejecutando una obra de Chopin, o en los músculos de vuelo de un insecto, que puede aletear unas 400 veces por segundo, es menester que todos los procesos implicados en la contracción-relajación ocurran a gran velocidad. La elevada constante catalítica de la acetilcolinesterasa hace que la enzima pueda desempeñar perfectamente su función.

En el extremo contrario, se puede mencionar el ejemplo de la lisozima, enzima cuya constante catalítica es tan sólo de  $0,5 \text{ s}^{-1}$ . A simple vista puede parecer que la lisozima representa un *fracaso biológico*. Pero si se examina con detalle la función de esta enzima, se ve que no es ésa la realidad. La lisozima es una enzima presente en la secreción nasal, en las lágrimas y en la saliva. Cataliza la escisión de los enlaces  $\beta$ -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la 2-acetamido 2-desoxiglucosa en mucopolisacáridos o mucopéptidos. Como éstos polímeros son constituyentes fundamentales de las paredes bacterianas, la lisozima ejerce una acción lítica sobre las bacterias. Su presencia en los fluidos corporales indicados tiene precisamente una función de protección ante la invasión del cuerpo por microorganismos. Pero no hace falta que la lisis bacteriana se produzca a gran velocidad; en todo caso, lo que requiere la protección del organismo es que las bacterias se destruyan antes de que proliferen. Y como el tiempo de generación de una bacteria es, en el caso más rápido, de varios minutos, una constante catalítica del orden de la indicada para la lisozima es más que suficiente para que la enzima pueda desempeñar su función a la perfección.

Ahora es tiempo de contemplar la adaptación de los valores de la constante de Michaelis a las necesidades funcionales de las enzimas. Para ello, tomaremos como ejemplo la utilización de los aminoácidos. Su función primordial e insustituible es la de participar como monómeros en la síntesis de proteínas. Cuando hay exceso de algún aminoácido, el organismo es capaz de degradarlo, con lo que obtiene energía. Es

una forma adecuada de utilizar los aminoácidos sobrantes, pero en esta función no son insustituibles; hay otros muchos componentes celulares capaces de proporcionar energía en su degradación y algunos que, como los triacilgliceroles, sólo juegan ese papel en el organismo. Por tanto, no tendría sentido que una célula degradara aminoácidos cuando hagan falta para sintetizar proteínas. ¿Cómo se asegura esa dedicación de aminoácidos a la síntesis de proteínas y se encamina sólo el sobrante a la degradación? La respuesta se encuentra si se contemplan las propiedades de las enzimas que inician ambos procesos. La primera reacción que sufren los aminoácidos para intervenir en la biosíntesis de proteínas es la unión al tRNA. La reacción está catalizada por las aminoacil-tRNA sintetasas. Existen sintetasas específicas para cada aminoácido, pero todas tienen en común el poseer una  $K_m$  pequeña, que puede llegar a ser tan baja como  $2,2 \mu\text{M}$  (7).

La degradación de los aminoácidos suele empezar por una reacción de transaminación, catalizada por una aminotransferasa o transaminasa. Aunque estas enzimas son también específicas para los diferentes aminoácidos, su  $K_m$  suele ser bastante alta y en algunos casos, el valor absoluto encontrado es superior a 30 mM (8). Teniendo en cuenta que una constante de Michaelis baja implica —con las reservas apuntadas antes— que el complejo de Michaelis se forma con facilidad, un aminoácido puede unirse muy bien a su aminoacil-tRNA sintetasa aunque se encuentre a baja concentración. Por el contrario, sólo cuando se encuentre en exceso se unirá apreciablemente a las enzimas que van a conducir a su degradación.

La conclusión evidente de estos ejemplos es que las enzimas presentan una exquisita adaptación de sus propiedades cinéticas a la función fisiológica que desempeñan. Con la actitud que se mencionaba en la introducción, el asombro que puede producir la constatación de este hecho, debe animar al investigador a profundizar más y más en el mecanismo de actuación de las enzimas.

## EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los años que transcurrieron entre 1940 y 1955 constituyeron, en opinión de algunos autores, una edad

de oro para la Enzimología. Se descubrieron en esos años centenares de enzimas; muchas de ellas se aislaron e incluso se cristalizaron; se caracterizaron sus propiedades cinéticas y se obtuvieron importantes datos sobre sus mecanismos de actuación. A finales de la década de 1950, sin embargo, la Enzimología comenzó a experimentar un cambio notable. Se obtuvieron los primeros datos sobre enzimas cuya actividad dependía de algunos metabolitos diferentes de los sustratos o productos. Una de ellas era la aspartato transcarbamoilasa, que, pasando el tiempo, llegaría a constituir un caso paradigmático. Otra, en la que vamos a detenernos un momento, la treonina desaminasa. Esta enzima cataliza la primera etapa de la biosíntesis de isoleucina y atrajo la atención de François Jacob y Jacques Monod, que propusieron su estudio a Jean Pierre Changeux como tema de su tesis doctoral. La isoleucina actuaba como inhibidor de la treonina desaminasa. Se trataba de un caso de *retroinhibición*, inhibición de una enzima por el producto final de la ruta metabólica, que también ocurría en la aspartato transcarbamoilasa. Changeux obtuvo pronto unos interesantes datos. En primer lugar, la treonina desaminasa, que poseía varias subunidades, no seguía una cinética michaeliana: al representar su velocidad frente a la concentración de sustrato, en vez de la típica curva hiperbólica, se obtenía una sigmoide, lo que sugería que la unión del sustrato, treonina, era cooperativa. Por otro lado, el calentamiento ligero de la enzima la hacía insensible a los efectos del inhibidor, isoleucina, pero no modificaba su capacidad catalítica. Este fenómeno, que el propio Changeux comenzó a llamar desensibilización, parecía indicar que sustrato e inhibidor se unían a sitios diferentes en la enzima. Fue entonces cuando Monod acuñó el término *alosterismo*, palabra de raíz griega que significa precisamente eso: otro lugar.

Monod y Jacob (9) por un lado y Changeux (10) por otro, presentaron sus resultados en la edición de 1961 de los *Cold Spring Harbor Symposia*. Cuando el volumen que recogía sus intervenciones se publicó, la comunidad científica tuvo ocasión de leer por primera vez la palabra alosterismo, que Monod no había llegado a pronunciar en público. En realidad, la posibilidad de que inhibidores y sustratos interaccionaran con las enzimas por localizaciones diferentes había sido sugerida por otros investigadores. La primera vez que aparece escrita esa idea es en un artículo de Crane

y Sols (11) sobre la inhibición de la hexoquinasa de cerebro por su producto, glucosa-6-fosfato, en el que se lee textualmente: «Los datos indican que la hexoquinasa de cerebro posee, además de los sitios de unión para los sustratos y el adenosintrifosfato, un tercer sitio de unión específico para la glucosa-6-fosfato». Y, por otro lado, otros autores habían formulado más tarde afirmaciones parecidas respecto a las enzimas que experimentan retroinhibición. Pero el mérito del grupo del Instituto Pasteur está en que llegaron al fondo de la cuestión. Monod, Changeux y Jacob (12) definen el mecanismo alostérico con una condición negativa y con otra positiva. La primera niega la existencia de interacciones directas de cualquier género entre el sustrato o sustratos de una proteína alostérica y los *efectores*, los metabolitos que controlan su actividad. La segunda establece que el efecto alostérico se debe totalmente a una alteración conformacional reversible inducida en la proteína cuando se une el efector específico.

Cuando Monod, Changeux y Jacob propusieron estos conceptos, se conocían aún pocas enzimas cuyo comportamiento se pudiera definir como alostérico. En su artículo (12) se detienen expresamente en 6, pero, además, añaden otra proteína, la hemoglobina, cuyo comportamiento encaja también dentro del concepto de alosterismo. Es especialmente importante el caso de esta proteína —*enzima honoraria*, la llamarían más tarde— que tanto contribuyó al desarrollo futuro de los modelos alostéricos. Estos modelos intentaban explicar los mecanismos moleculares por los que esos cambios de conformación de las proteínas —la transición alostérica— podían modular la actividad enzimática.

El primer modelo alostérico fue también fruto de la intuición de Monod, que siguió contando con la participación de Changeux e inició una colaboración con Jeffries Wyman. Este último era entonces uno de los mejores conocedores de la hemoglobina, la *enzima alostérica honoraria*. Ya se ha comentado antes que en la treonina desaminasa el sustrato se une de modo cooperativo y otro tanto ocurre en la mayoría de las proteínas alostéricas. Este comportamiento incluye a la hemoglobina, precisamente la primera proteína para la que se demostró la unión cooperativa de un ligando, en este caso el oxígeno. El resultado del esfuerzo coordinado de los tres investigadores, fue una publicación

en la que se proponía “un modelo plausible” para explicar la naturaleza de las transiciones alostéricas (13). El modelo postula que, en las proteínas alostéricas, existen dos estados conformacionales, T y R, que pueden interconvertirse libremente y que presentan distinta afinidad por el ligando, pero no admite la existencia de estados intermedios con propiedades estructurales híbridas entre T y R. Los sitios de unión de ligando a las formas R son equivalentes e independientes entre sí, y otro tanto ocurre con los sitios de las formas T. Es obvio que, si no fuera por la coexistencia de T y R, la unión de ligando transcurriría sin cooperatividad. Pero cuando se tienen en cuenta los presupuestos anteriores, es evidente que, al añadir ligando, éste se unirá *preferentemente* a las formas de afinidad mayor, las formas R. Una simple consideración de las leyes del equilibrio químico indica que la presencia de ligando conlleva un desplazamiento del equilibrio T-R hacia estas últimas formas, lo que da lugar a un incremento global de la afinidad. Naturalmente, si se postula que los inhibidores alostéricos tienen preferencia para unirse a las formas T y que los activadores lo hacen predominantemente a las formas R, las mismas consideraciones sobre el equilibrio químico explican el mecanismo de actuación de los efectores. Hay que señalar, no obstante, que esta misma sencillez ha pasado inadvertida a más de un autor, que se ha limitado a constatar que las ecuaciones derivadas de ese planteamiento conceptual se ajustan cuantitativamente bien al comportamiento experimental de la hemoglobina. A título de ejemplo, se incluye la ecuación para la unión del sustrato:

$$\bar{Y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n} \quad [3]$$

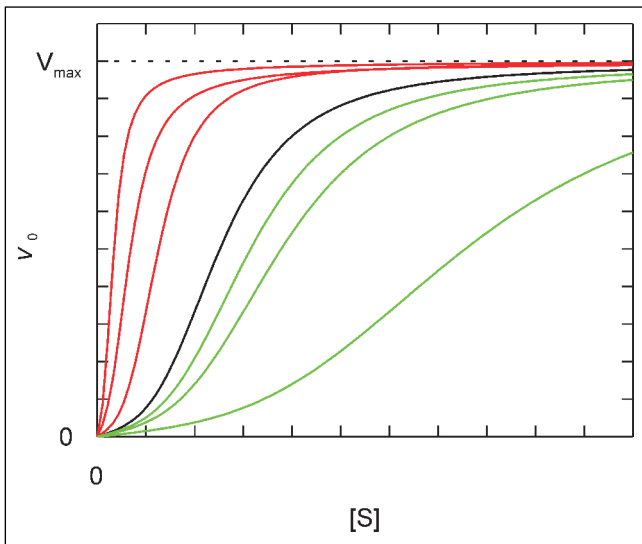
en la que  $\bar{Y}$  es la fracción de saturación<sup>8</sup>,  $L$  la constante alostérica, es decir la constante del equilibrio T-R en ausencia de ligandos,  $c$  es la relación entre las constantes de disociación del sustrato de las formas T y R, y  $\alpha$  es el cociente entre la concentración de sustrato y su constante de disociación de las formas R.

Poco después de la aparición del artículo de Monod, Wyman y Changeux, se publicó otro con el

germen de lo que sería el segundo gran modelo alostérico, concretamente el de Koshland, Némethy y Filmer (14). Para explicar la cooperatividad, Koshland y sus colaboradores proponían que la unión de ligando a una proteína alteraba exclusivamente la conformación de la subunidad ocupada. Esto puede afectar a la estabilidad de la estructura cuaternaria, si cambia el modo de interacción de esa subunidad con las contiguas. Y como la estabilidad puede aumentar o disminuir, puede resultar cooperatividad positiva o negativa. Algo más tarde, Koshland extendió el modelo para explicar el alosterismo.

Los años siguientes fueron fecundos, ya que la publicación del modelo de Koshland inició lo que Changeux llamó una “controversia creativa” entre las dos concepciones de cooperatividad y alosterismo. Al ser simples y generalizadores, como ha de ocurrir con todos los modelos, es ocioso decir que prácticamente ninguna proteína alostérica se puede definir al 100% por uno u otro de los modelos. Como consecuencia, han surgido modelos alternativos, modelos integradores..., pero en definitiva, cuando han transcurrido más de 40 años desde la propuesta del alosterismo como un modo de regulación, todos los modelos se reducen de una forma u otra a uno u otro de los originales. El de Monod, Wyman y Changeux tiene el encanto especial de las ideas geniales, que en su aparente sencillez encierran un profundo significado. Por supuesto, es necesario introducir precisiones matemáticas en las ecuaciones simples del tratamiento inicial, pero el rasgo fundamental del modelo, es decir, el que la transición entre dos estados conformacionales sea concertada, parece resistir los embates del tiempo. Al menos, eso ocurre en el caso de la hemoglobina. En un reciente estudio exhaustivo, se han analizado datos cinéticos muy precisos sobre la disociación de complejos hemoglobina-monóxido de carbono para concluir que el modelo de dos estados sirve para explicar satisfactoriamente la cooperatividad en la unión de ligandos a la hemoglobina (15). Es necesario, eso sí, un sistema de 85 ecuaciones diferenciales acopladas para describir adecuadamente los resultados desde un punto de vista cuantitativo, pero el rasgo fundamental del modelo ha persistido.

<sup>8</sup> La fracción de saturación es la fracción molar de sitios ocupados por ligando.



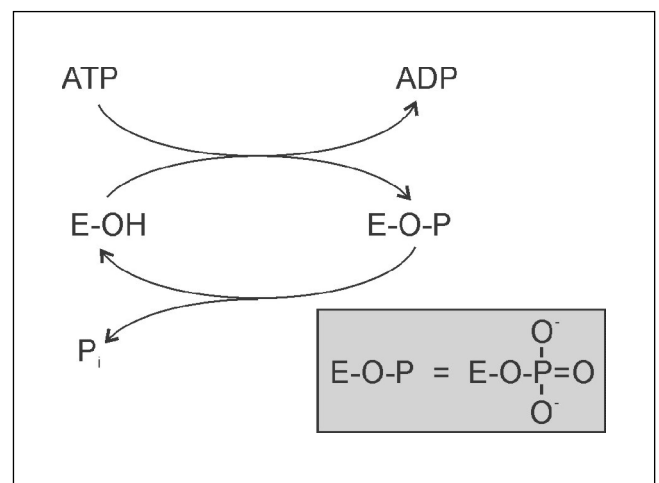
**Figura 10.** Cinética de una enzima alostérica tipo K. La figura muestra la cinética de la reacción en ausencia de efectores (curva negra), en presencia de varias concentraciones de un efector alostérico positivo (curvas rojas) o negativo (curvas verdes).

Hasta ahora, al hablar del alosterismo, realmente nos hemos limitado a uno de sus tipos, el alosterismo *K*, en el que la enzima alostérica presenta cooperatividad en la unión de sustrato y los efectores alteran la afinidad de la enzima por el sustrato, pero no modifican la velocidad máxima (figura 10). Existe otro tipo de alosterismo, menos frecuente, en el que el sustrato se une a la enzima sin cooperatividad y los efectores modifican la constante catalítica —y, por tanto, la velocidad máxima—, pero no alteran la afinidad del sustrato. Se trata del denominado alosterismo *V*.

El alosterismo, a pesar de su importancia, no es el único proceso del que se valen las células para modular su actividad enzimática. Hay también enzimas cuyos cambios de actividad se regulan por modificación covalente. En este mecanismo, la enzima puede encontrarse en dos estados: uno activo y otro inactivo. Pero los dos difieren fundamentalmente en que uno de ellos posee un grupo unido covalentemente, mientras que el otro estado carece de ese grupo. Son numerosos los grupos que modifican las enzimas, pero la modificación más corriente —y la única que se va a considerar en este artículo— es la fosforilación, por la que se añade a la enzima un grupo fosfato, que esterifica un hidroxilo de la cadena lateral de serina, treonina o tirosina. Como se aprecia en la figura 11, la transformación de la forma no fosforilada en la fosfo-

rilada implica una reacción química. En efecto, el grupo hidroxilo (-OH) de la forma no modificada (E-OH) tiene que convertirse en un éster fosfórico (E-O-P), cuya estructura se aprecia en el recuadro de la figura. Pero ello implica la formación de nuevos enlaces, es decir, una reacción química. Concretamente, el grupo fosfato procede de otra molécula, que actúa como donadora, el ATP, que se transforma en ADP. Y la conversión de la enzima fosforilada en la forma desfosforilada también implica una reacción química, es decir, la hidrólisis del éster fosfórico para liberar el anión fosfato. Naturalmente, para que se produzcan estas reacciones de transformación de E-OH en E-O-P y viceversa hacen falta otras enzimas auxiliares, de modo que se da la circunstancia de que cada enzima que se regula por modificación covalente necesita al menos de dos enzimas auxiliares, para que se puedan interconvertir las formas modificadas y las no modificadas. En el caso concreto de la modificación por fosforilación que se esquematiza en la figura 11, las enzimas auxiliares que introducen el grupo fosfato a expensas del ATP se denominan proteína quinasa, mientras que las que catalizan la hidrólisis del éster fosfórico de la proteína reciben el nombre de proteína fosfatasa.

Por otro lado, la regulación por modificación covalente puede afectar tanto a la afinidad con la que se une el sustrato a la enzima regulada, como a su capacidad



**Figura 11.** Reacciones de fosforilación y desfosforilación de una enzima. La enzima desfosforilada se representa como E-OH, para hacer énfasis en el grupo o grupos hidroxilo que se modifican por transferencia de fosfato desde el ATP. La enzima fosforilada se representa como E-O-P y la estructura del éster fosfórico se da en el recuadro.

Propiedad	Mecanismo de regulación enzimática	
	Alosterismo	Modificación covalente
Complejidad	Poca	Variable. Puede llegar a ser mucha
Velocidad de respuesta	Rápida	Lenta
Amplificación	Poca	Mucha
Sensibilidad	Media	Alta. Puede llegar a ser muy grande

**Tabla II.** Comparación de algunas propiedades del alosterismo y de la modificación covalente.

catalítica. Por tanto, la velocidad de la reacción puede resultar alterada tanto por variaciones en  $[ES]$  como en  $k_{cat}$  (ver ecuación [2]).

No se puede generalizar cuál de las dos formas, modificada o sin modificar, es la activa, ya que en la naturaleza existen ejemplos de ambas situaciones. Centrándonos en un caso en el que la forma fosforilada sea la activa en la catálisis de una reacción que convierta un sustrato  $X$  en un producto  $Y$ , para que se pueda catalizar la reacción  $X \rightarrow Y$  se requiere que la actuación de la quinasa supere a la de la fosfatasa. Es decir, el estado de actividad o no de la enzima depende de la actividad de las enzimas auxiliares. Este proceso de regulación por modificación covalente da lugar, pues, a lo que se llama regulación en cascada, puesto que la actividad de una enzima depende a su vez del estado de actividad de otras. Con frecuencia, se da además una complicación adicional: las enzimas auxiliares pueden regularse también por modificación covalente, por lo que cada una de ellas requiere, a su vez, otras enzimas auxiliares. Se habla así de cascadas de regulación de dos o más ciclos. Por supuesto, no puede multiplicarse hasta el infinito el número de ciclos de una cascada de regulación. De hecho, siempre existe una primera enzima auxiliar que se regula por alosterismo, de modo que el efector de esa enzima es el que dispara toda la cascada de regulación.

Llegados a este punto, cabe preguntarse: si la regulación por modificación covalente es tan complicada comparada con la regulación alostérica, ¿qué razones hay para que exista? O, dicho de otro modo, ¿por qué, a lo largo de la evolución, la selección natural no ha eliminado un proceso tan complicado? Para encontrar una respuesta convincente, hay que profundizar en las

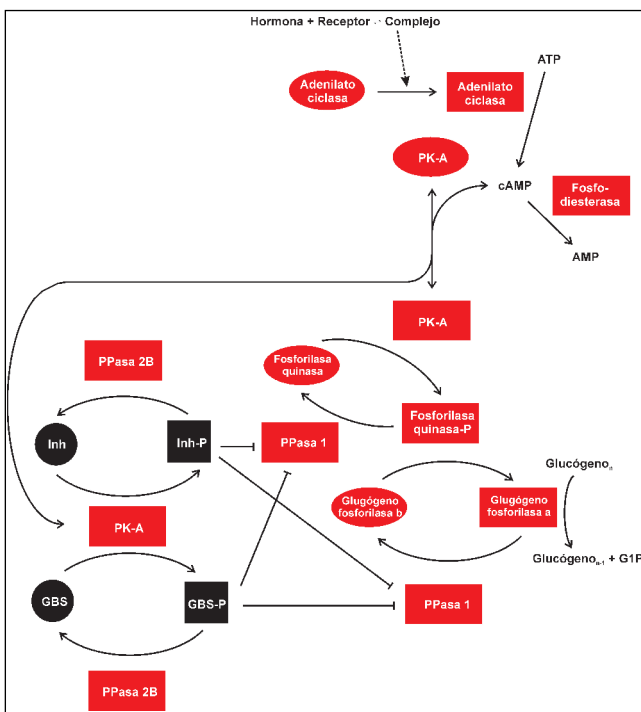
peculiaridades de la regulación por modificación covalente y compararlas con las de la regulación alostérica, como se hace en la tabla II. En ella se hace mención a la complejidad de ambos mecanismos, a la velocidad de respuesta, a la amplificación y a la sensibilidad.

La complejidad se refiere, por ejemplo, al número de enzimas requeridas, una sólo en el caso del alosterismo, y, por lo menos tres en la regulación por modificación covalente. La velocidad de respuesta indica el tiempo que tiene que transcurrir desde que el efector que dispara el proceso aparece o cambia de concentración hasta que se advierte el cambio final en la reacción catalizada por la enzima objeto de regulación. La regulación alostérica es virtualmente instantánea, ya que las interacciones enzima-efector, como todas las interacciones proteína-ligando, son muy rápidas. Por el contrario, en la regulación por modificación covalente desde que se activa la primera enzima auxiliar hasta que lo haga la enzima final puede pasar un tiempo de varios minutos, ya que es preciso que se vayan completando las reacciones de modificación catalizadas por las enzimas auxiliares.

La amplificación hace referencia a la concentración mínima de efector que puede actuar. Hay que tener en cuenta que, de ordinario, las enzimas se encuentran a concentración bastante más baja que la de sus sustratos. Pues bien, las enzimas auxiliares tienen como sustrato a otra enzima, por lo que su concentración puede ser bajísima. Y si la cascada tiene varios ciclos, la primera enzima auxiliar puede tener una concentración, por ejemplo, del orden de  $10^{-14}$ - $10^{-15}$  M. En estas condiciones, no es raro encontrar efectores capaces de actuar a concentración de  $10^{-11}$ - $10^{-12}$  M. Se dice que hay entonces una gran amplificación,

porque una concentración mínima de efector puede tener una consecuencia importante. Esto sería impensable en una regulación alostérica.

El concepto de sensibilidad, aunque parezca a simple vista semejante al de amplificación, es distinto. Se refiere al cambio en la concentración de efector que se requiere para lograr un determinado cambio en la actividad de la enzima final. Casi siempre, se mide la variación de concentración de efector necesaria para aumentar la actividad de la enzima final del 10 al 90% (si se trata de una activación) o del 90 al 10% (si se trata de una inhibición). En la regulación alostérica, en el mejor de los casos, para lograr ese cambio hay que multiplicar por 5 o 6 la concentración de efector, mientras que en la regulación por modificación covalente puede bastar multiplicar la concentración de efector por un factor menor que 1,1.



**Figura 12.** Cascadas de regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa. Se recogen las etapas esenciales de la regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular en respuesta a la descarga de adrenalina. Para mayor sencillez, se han omitido algunos pasos, como la participación de las proteínas G. Las enzimas se representan en rojo, mientras que aparecen en negro las proteínas reguladoras no enzimáticas. Se emplea la convención de representar como rectángulos las formas activas de las enzimas o proteínas reguladoras y como elipses las inactivas. En el caso de enzimas, la forma activa se representa junto a la flecha que indica la reacción catalizada.

Así pues, en los organismos vivos coexisten ambos tipos de regulación. El alosterismo se prefiere cuando se necesita una respuesta rápida y no se requiera gran amplificación ni sensibilidad. Pero en los casos contrarios, se prefiere la regulación por modificación covalente, aunque eso implique una mayor complejidad del sistema. En muchas enzimas, además, se pueden dar simultáneamente ambos tipos de regulación, apareciendo lo que Sols denominó *multimodulación enzimática* (16). Un ejemplo bien documentado en el que interviene la multimodulación es el del metabolismo del glucógeno. La figura 12 muestra el complejo proceso de la regulación de la glucógeno fosforilasa, la enzima que cataliza la degradación del glucógeno. Sin necesidad de entrar en detalles —que se han expuesto en otro lugar (17)—, se puede decir simplemente que la actividad de esta enzima, sujeta a modificación por fosforilación, depende en último término de la actuación de una hormona, que actúa como efector inicial. Se trata, pues, de un proceso en el que una señal hormonal se convierte, en último término, en una señal catalítica. Con toda propiedad, se puede, por tanto hablar de una *transducción* mediante la cual un tipo de señal se convierte en otro distinto. En esa cascada de transducción interviene el receptor hormonal y proteínas G, la proteína quinasa A, la glucógeno fosforilasa quinasa, las correspondientes proteína fosfatasas y, además, inhibidores de las fosfatasas que, a su vez, pueden modificar su actividad por fosforilación. Es evidente que el entramado de la regulación posee una elevada complejidad que permite afinar hasta lo indecible el control de la actividad enzimática.

## ¿CÓMO PODEMOS APROVECHAR LAS PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS?

Ahora estamos en condiciones de plantear el *¿para qué sirven?* del título. Una vez que hemos pasado revista a las propiedades más sobresalientes de las enzimas —aunque por razones de brevedad haya sido necesario pasar como de puntillas por la mayoría de ellas—, estamos en condiciones de comprender las posibilidades de su aprovechamiento práctico.

En primer lugar, nuestra atención se concentra sobre la especificidad de sustrato. Ningún reactivo químico posee una especificidad comparable a la de

las enzimas que, como se ha visto, se basa en una exquisita organización del centro activo. Esta especificidad es un atractivo desde el punto de vista analítico, ya que permite determinar cualitativa y cuantitativamente un analito en mezclas complejas, sin necesidad de separación previa. Hay que tener en cuenta que para seguir fácilmente el curso de la reacción, es conveniente que en la misma se produzca un cambio en las propiedades físicas —ordinariamente absorbancia o fluorescencia— de los sustratos o productos que permita la determinación cuantitativa del progreso de la reacción. Cuando esto no ocurre, de ordinario se recurre a una reacción enzimática acoplada. En este contexto, una reacción acoplada es la que utiliza como sustrato uno de los productos de la primera y que, a su vez, conduce a un producto de fácil detección. Son muy numerosas las posibilidades de empleo de reacciones acopladas, por lo que actualmente es posible la utilización de ensayos enzimáticos para la determinación de una amplísima variedad de analitos de interés químico, clínico o industrial.

Cuando se trata de llevar a cabo determinaciones cuantitativas —la situación más frecuente—, se pueden utilizar dos tipos de métodos: el del punto final y los cinéticos. El primero, posible si la reacción principal y, en su caso, las acopladas, pueden transcurrir de modo prácticamente irreversible, consiste en dejar progresar las reacciones hasta su finalización. La determinación cuantitativa del producto valorable permite —a través del conocimiento de la estequiometría de todas las reacciones— evaluar la concentración del analito problema. El fundamento de los métodos cinéticos requiere una explicación previa. En la ecuación de Michaelis-Menten [1], si se multiplica numerador y denominador por  $[S]/K_m$ , se llega a:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\frac{[S]}{K_m} + 1} \quad [4]$$

Cuando la concentración de sustrato es muy pequeña comparada con la constante de Michaelis, el término  $[S]/K_m$  es despreciable frente a la unidad en el denominador y la ecuación [4] queda entonces como:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{K_m} [S], \quad [5]$$

que corresponde a una ecuación de primer orden. La velocidad en esas condiciones es directamente propor-

cional a la concentración de sustrato, lo que permite, tras la calibración correspondiente con concentraciones conocidas de sustrato, la determinación cuantitativa de ese sustrato en muestras problema. Hay que insistir en que este método implica la validez de la ecuación [5], que sólo ocurre cuando  $[S]/K_m \ll 1$ . Es pues, necesario, conocer previamente no sólo  $K_m$  —cosa que no entraña ninguna dificultad— sino también tener una idea aproximada del intervalo de concentración en que se va a encontrar el analito en el problema. Pero aún en el caso en que esa concentración sea demasiado grande para suponer que  $[S]/K_m \ll 1$ , el método puede seguirse empleando si se trabaja en presencia de un inhibidor competitivo de la reacción, ya que estos inhibidores tienen como efecto la elevación de la constante de Michaelis.

La utilización práctica de las enzimas supera con creces su empleo analítico. Su especificidad y su enorme eficacia catalítica han atraído la atención desde hace mucho tiempo con el fin de emplearlas como catalizadores en reacciones de interés industrial. De hecho, se emplean profusamente en la industria farmacéutica, en la alimentaria, etc. Pero el factor económico puede ser, evidentemente, decisivo a la hora de programar un proceso industrial y, desde esa perspectiva, las enzimas presentan varios inconvenientes. En primer lugar, su costo elevado frente al de los catalizadores convencionales. Por otra parte, las enzimas son inestables a altas temperaturas, a valores extremos de pH, etc., lo que eleva el costo al reducir la vida útil de la enzima. Finalmente, al realizarse la catálisis en disolución acuosa, se presenta la dificultad de recuperar la enzima después de la reacción, lo que puede reducir su uso a una sola operación.

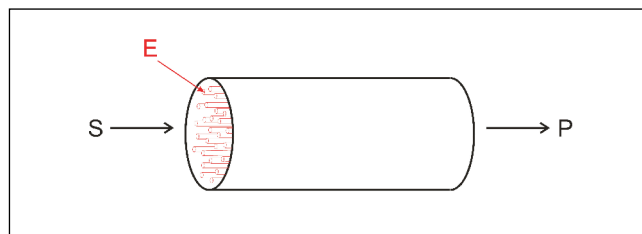
Por otro lado, dejando aparte los problemas económicos, existen muchas reacciones químicas de interés industrial para las que no hay enzimas, ya que parten de sustratos que no son naturales, y hay también reacciones de interés industrial cuyos sustratos son escasamente soluble en agua, el medio en que se llevan a cabo las reacciones enzimáticas en los organismos. La tecnología de enzimas, una rama emergente de la Enzimología, intenta superar todas esas dificultades.

La inmovilización de enzimas es un método bien conocido, que en muchos casos da excelentes resul-



tados<sup>9</sup>. Se trata que la enzima quede retenida por una matriz sólida, lo que permite recuperarla al término de la operación. La enzima se puede así reutilizar. Hay varios tipos de inmovilización: por adsorción sobre soportes adecuados (por ejemplo, perlas de vidrio), por unión covalente a polímeros naturales o artificiales o por encapsulación en una matriz que permita el acceso a sustratos y productos e impida la salida de la enzima. En cualquier caso, hay que evitar que la inmovilización impida la aproximación de los sustratos al centro activo. Cuando se emplea la unión covalente, suelen usarse reactivos bifuncionales, que se unen por un extremo a la enzima y por otro al polímero, de longitud de cadena suficientemente larga, para que la enzima quede a distancia del polímero. La inmovilización tiene la ventaja adicional de que aumenta la estabilidad de la enzima. El dispositivo esquematizado en la figura 13 representa un caso particular de inmovilización por encapsulación, que permite una operación continua. La enzima se sitúa en este caso, en el interior de fibras, ordinariamente capilares para aumentar su superficie total, formadas por membranas permeables a los sustratos y productos pero no a la enzima. Si por el espacio exterior a esos tubos se hace fluir una disolución de los sustratos, éstos pueden penetrar al lugar ocupado por la enzima y, allí, convertirse en los productos, que difundirán hacia el exterior de los tubos. Si la relación entre la velocidad del flujo y la longitud del dispositivo se ajusta convenientemente, se puede conseguir que los que a la entrada era una disolución de sustrato lo sea a la salida de producto. Este es el fundamento de los reactores enzimáticos, que se emplean tanto en procesos industriales como para las finalidades analíticas a las que se ha aludido antes.

La inmovilización de enzimas constituye una metodología clásica para su utilización práctica y, como tal, viene utilizándose desde hace bastante tiempo. Otra posibilidad, si bien menos utilizada en general, es el uso de enzimas en disolventes no acuosos (19). Es posible preparar las enzimas para que al exponerlas a esos disolventes mantengan la estructura nativa y, por tanto, su actividad. El empleo de disolventes orgánicos, además de la obvia ventaja de que pueden emplearse enzimas como catalizadores de reacciones que transcurren en medios no acuosos, presenta otra



**Figura 13.** Esquema de un reactor enzimático. Las fibras semi-permeables que contienen la enzima se representan en rojo. Véase el texto para los detalles de funcionamiento.

peculiaridad. Hay muchas reacciones, como por ejemplo las de hidrólisis a las que se aludía al principio, que en medio acuoso son irreversibles. Realmente, en estas reacciones el agua actúa como reactivo nucleófilo y si la reacción transcurre en medio acuoso, la elevada concentración de agua (55,5 M), junto con el valor de  $\Delta G^\circ < 0$  propio de toda reacción hidrolítica, hace que el valor actual de  $\Delta G$  sea tan negativo que la reacción se dirige indefectiblemente en el sentido de hidrólisis. Pero en medios anhidros, sólo queda el agua estructural de la enzima; la concentración de ese reactivo es ahora muy pequeña y la reacción puede producirse en el sentido de síntesis más que en el de hidrólisis, si existe un nucleófilo adecuado. De esta manera, se han podido utilizar, por ejemplo, lipasas para sintetizar triacilglicérols. La reacción transcurre, pues, justo en el sentido contrario al habitual. Hay que recalcar que este comportamiento no constituye una transgresión a los principios termodinámicos: simplemente es una consecuencia de realizar la reacción en unas condiciones en las que la concentración de agua es varios órdenes de magnitud inferior a la habitual.

Pero, la mayor potencialidad de modificar las enzimas para emplearlas con eficacia en procesos industriales y —al mismo tiempo— las grandes esperanzas cara al futuro vienen proporcionadas por la posibilidad de alterar la secuencia de las enzimas mediante técnicas proporcionadas por la Biología Molecular. La creciente facilidad para provocar mutagénesis dirigida, de modo que se altere a voluntad la secuencia de las enzimas, así como el perfeccionamiento de todas las técnicas requeridas para la producción de proteínas recombinantes a gran escala, ha dado lugar al nacimiento de la denominada *inge-*

<sup>9</sup> El artículo de Cao (18) contiene una útil revisión sobre inmovilización de enzimas.

*nería de enzimas.* La mutagénesis dirigida se puede emplear, por ejemplo, para aumentar la estabilidad térmica de las enzimas. Para realizar la mutagénesis sobre una base racional, es útil el conocimiento de los mecanismos de desnaturalización térmica, la termodinámica y cinética del plegamiento<sup>10</sup>. También ayuda el disponer de datos comparativos con enzimas de organismos termófilos. Pero también se puede emplear mutagénesis con el fin de aumentar la estabilidad de las enzimas frente al pH, o bien para modificar su pH óptimo de acción. Normalmente se lleva a cabo cambiando aminoácidos por otros similares con pK diferente.

En los dos casos que se acaban de mencionar se han obtenido avances interesantes, y las aplicaciones son ya en muchos casos una realidad (ver, por ejemplo, ref. 20). Pero también caben otras opciones, que permiten soñar a los investigadores en posibilidades que hasta hace poco parecerían ciencia ficción y que la ingeniería de enzimas puede convertir en algo alcanzable. Por ejemplo, es posible cambiar la especificidad de una enzima, de modo que pueda aceptar algunos sustratos diferentes del natural. Los resultados obtenidos en esta línea son tangibles a nivel académico desde hace tiempo. Por ejemplo, hace ya dos décadas que se demostró que es posible con una simple mutación, concretamente cambiando la glutamina 102 por una arginina, convertir la lactato deshidrogenasa en malato deshidrogenasa (21). Pero aún no se han obtenido en esta línea resultados utilizables con finalidad aplicada. Lo mismo puede decirse de la posibilidad de mejorar los parámetros cinéticos de una enzima.

Recoger todas las líneas de actuación en el campo de la tecnología de enzimas habría sido una tarea tediosa y de dudosa utilidad en el presente contexto. Sirvan los anteriores ejemplos como muestra de la enorme potencialidad que el conocimiento teórico sobre el funcionamiento de las enzimas tiene sobre sus aplicaciones prácticas.

## CONCLUSIONES

Las líneas precedentes han constituido, aunque de forma sucinta, un recorrido por el mundo de las

enzimas. Desde el primer contacto con ellas, ha surgido posiblemente el asombro ante la perfección catalítica que poseen. Y, posiblemente, sea ese asombro el que ha permitido a tantos científicos adentrarse en un conocimiento más y más profundo de la arquitectura y funcionamiento de esos catalizadores. Sólo desde la base de este profundo conocimiento está siendo posible el inicio de una segunda edad de oro en la Enzimología: una edad en la que el hombre puede soñar con aplicar las reacciones enzimáticas a tantos problemas de la vida ordinaria sin que se le tache de visionario. Pero hay que reconocer honradamente que el haber iniciado un camino no significa que ya se haya recorrido. Aún son necesarios muchos esfuerzos y, posiblemente tenga que pasar bastante tiempo, para que todos esos sueños vayan cristalizando en realidades.

## BIBLIOGRAFÍA

1. HENRI, V. (1903) *Lois générales de l'action des diastases*, Hermann, Paris.
2. MICHAELIS, L. Y MENTEN, M. L. (1913) «Die Kinetic der Invertinwirkung» *Biochem. Z.* **49**, 333–369.
3. APPLEBY, T. C., KINSLEY, C., BEGLEY, T. P. Y EALICK, S. E. (2000) «The crystal structure and mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase» *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2005–2010.
4. MILLER, B. G. (2004) «Insight into the catalytic mechanism of orotidine 5'-phosphate decarboxylase from crystallography to mutagenesis» *Top. Curr. Chem.* **238**, 43–62.
5. FERSHT, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman, New York.
6. CORNISH-BOWDEN, A. (2004) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London, 2nd ed.
7. IBBA, M. MORGAN, S., CURNOW, A. W., PRIDMORE, D. R., VOTHKNECHT, U. C., GARDNER, W., LIN, W., WOESE, C. R. Y SÖLL, D. (1997) «A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: Resemblance to class I synthetases» *Science* **278**, 1119–1122.
8. HOPPER, S. Y SEGAL, H. L. (1962) «Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine transaminase» *J. Biol. Chem.* **237**, 3189–3195.

<sup>10</sup> Lo contrario también es cierto: hasta ahora, la mutagénesis ha servido más para esclarecer esos mecanismos.

9. MONOD, J. Y JACOB, F. (1961) «Teleonomic mechanism in cellular metabolism, growth, and differentiation» *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 389.
10. CHANGEUX, J. P. (1961) «Feedback control mechanism of L-threonine deaminase by L-isoleucine» *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 313–318.
11. CRANE, R. K. Y SOLS, A. (1954) «The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds» *J. Biol. Chem.* **210**, 597–606.
12. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. Y JACOB, F. (1963) «Allosteric proteins and cellular control systems» *J. Mol. Biol.* **6**, 306–329.
13. MONOD, J., WYMAN, J. Y CHANGEUX, J. P. (1965) «On the nature of allosteric transitions: A plausible model» *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.
14. KOSHLAND, D., NÉMETHY, G. Y FILMER, D. (1966) «Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits» *Biochemistry* **5**, 365–385.
15. HENRY, E. R., JONES, C. M., HOFRICHTER, J. Y EATON, W. A. (1997) «Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics?» *Biochemistry* **36**, 6511–6528.
16. SOLS, A. (1981) «Multimodulation of enzyme activity» *Curr. Top. Cell Regul.* **19**, 77–101.
17. FRANCO, L. (2003) *El rostro humano de la Ciencia*. Discurso de ingreso. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid.
18. CAO, L. (2005) «Immobilised enzymes: science or art?» *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 217–226.
19. KLIBANOV, A. M. (2001) «Improving enzymes by using them in organic solvents» *Nature* **409**, 241–246.
20. LÓPEZ-CAMACHO, C., SALGADO, J., LEQUERICA, J. L., MADARRO, A., BALLESTAR, E., FRANCO, L., Y POLAINA, J. (1996) «Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa*  $\beta$ -glucosidase A» *Biochem. J.* **314**, 833–838.
21. WILKS, H. M., HART, K. W., FEENEY, R., DUNN, C. R., MUIRHEAD, H., CHIA, W.N., BARSTOW, D. A., ATKINSON, T., CLARKE, A. R. Y HOLBROOK, J. J. (1988) «A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework» *Science* **242**, 1541–1544.