

Tema 10

Mecanismo de acción de las enzimas

Después de análisis cinéticos y estructurales más o menos combinados, llegamos a conclusiones sobre la identidad y secuencia de los complejos intermedios y las velocidades de interconversión. Con todo esto, nos queda proponer un mecanismo de reacción en términos cinéticos y químicos.

Factores de los que depende el poder catalítico

Antes de que podamos describir el mecanismo, necesitamos saber cuales son los factores que intervienen y de que manera.

- **Efecto entrópico:** Lleva a la formación del complejo. Las fuerzas que intervienen son no covalentes. Para todas las enzimas.
- **Estabilización del estado de transición:** Este salto a un nivel de energía superior, supone un coste energético, el cual disminuye gracias a la estabilización que ejercen la mayoría de las enzimas. Posteriormente se producirá la catálisis, que podrá ser ácido"básica y/o electrostática.
- **Varios estados de transición:** Algunas enzimas continúan con vías de nivel energético inferior a través de varias etapas, mediante catálisis covalente, que puede ser electrófila y/o nucleófila.

Lo más importante es, sin duda, es la capacidad de las enzimas para disminuir la inestabilidad del estado de transición, lo que se traduce en una menor energía de activación (G''), como se observa en el gráfico de las hojas.

La alta energía de este estado depende de la generación de cargas muy inestables (normalmente por estar muy cercanas), además de que en muchos casos, la formación del complejo implica la unión de varios componentes, algo no muy favorable termodinámicamente al disminuir la entropía.

Teoría del estado de transición

Hay que saber que toda reacción debe pasar por un estado estacionario, por muy sencilla que sea. Depende de entidades físicas, sustancias reaccionantes (con un estado basal o inicial) y otras especies más inestables (que formarán parte de estados de transición o activados).

La gráfica de las hojas nos muestra una de las estrategias de la vida, disminuir G'' haciéndolo pasar por varios complejos, en lugar de por uno con una gran G'' .

Podemos entonces relacionar la eficiencia de una enzima frente a dos sustratos, ya que cuanto mejor esté configurada para un determinado sustrato, mejor estabilizará su estado de transición, menor será G'' y mayor será la velocidad. Por el contrario, la velocidad será mayor frente a un sustrato para el cual el C.A. no esté del todo configurado, por lo que no podrá estabilizar bien el estado de transición, aumentando G'' , disminuyendo consiguientemente la velocidad. En definitiva si $S1''$ es menos inestable que $S2''$ (debido a su diferente estructura), querrá decir que la enzima puede estabilizar mejor $S1$, o lo que es lo mismo, que está mejor diseñada para $S1$, tiene mayor eficiencia para este sustrato.

Estas diferencias nos permitirán dilucidar un mecanismo de reacción, pero para ello necesitamos antes definir la velocidad de paso por los estados de transición. Para ello, definimos la velocidad de desaparición de S'' :

$$v = -\frac{d[S'']}{dt} = v [S'']$$

. La constante de proporcionalidad es (ν), que se define como constante de ruptura o transformación de S" en P en el entorno químico y como la frecuencia vibracional del enlace que se va a romper en el entorno físico. Como frecuencia se relaciona con la constante de Planck y con la energía térmica, lo que nos define

$$\nu = \frac{K T}{h}$$

, siendo K la constante de Boltzmann, T la temperatura (°K) y h la constante de Planck.

Tenemos, por tanto, la ecuación de velocidad, pero ¿Cómo definimos $[S']$?

Lo haremos mediante la teoría del estado de transición, teniendo en cuenta que G'' es quien controla el equilibrio. A la conclusión a la que se llega es la siguiente

$$k_1 = \frac{KT}{h} e^{\frac{-\Delta G}{RT}}$$

Lo que nos relaciona de forma clara, la constante de velocidad de formación del complejo con la energía de activación, además de con la temperatura. De este modo, k_1 aumenta si:

- ! T
- ! G''
- ! [especies reaccionantes]

Con todo esto, ya podemos concluir que la catálisis se basa en la estabilización del estado de transición respecto de las sustancias reaccionantes, o lo que es lo mismo, en la disminución de G'' .

Una vez sabiendo que elementos actúan en la catálisis, los definiremos uno a uno.

El efecto de la Temperatura

Sacando logaritmos en la ecuación anterior, llegamos a una recta:

$$\ln k_1 = \ln \frac{KT}{h} - \frac{\Delta G}{R} \frac{1}{T}$$

La representación de la misma (en las hojas), nos muestra como aumenta k_1 al aumentar la temperatura. Pero esta representación no es del todo real, ya que en una reacción enzimática hay que tener en cuenta que una enzima es un ente biológico, con lo que a altas temperaturas pierde su efectividad. Esto se observa si tenemos en cuenta K_{cat} , que llevaría consigo la E_a global ya que engloba todas las constantes y, por tanto, veríamos el efecto producido por la temperatura sobre todas las etapas (de transformación), o sólo sobre k_1 . La gráfica en este caso sería $\ln V_{max}$ Vs $1/T$. En ella se observa claramente la desnaturalización que sufre la encima al pasar del límite, justo después del punto de mayor velocidad, a la que se denominará temperatura óptima. Hay que saber que esa temperatura hay que hallarla en condiciones de saturación, para asegurarnos que la velocidad es realmente V_{max} .

Definimos entonces **Q10** como el *coeficiente de temperatura*. Éste se halla midiendo lo que asciende la velocidad al aumentar la temperatura en 10 °. En las reacciones enzimáticas es 2.

Factores responsables del poder catalítico de las enzimas

Formación del complejo no covalente: ES

Se basa en la interacción no covalente (puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, etc.) entre átomos del sustrato(s) y aminoácidos del centro activo, con el fin de bajar el nivel energético del complejo ES. Eso se empieza a entrever en un ejemplo muy sencillo expuesto en las hojas,. En él se supone la formación de un puente de hidrógeno entre la enzima y el sustrato, el cual, en el estado libre forman respectivos puentes con moléculas de agua. El proceso está controlado por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

, más exactamente por el término $T\Delta S$

. Esto es así porque la entropía del medio aumenta notablemente debido a la reducción de la organización que debe presentar la caja de solvatación, lo que determina irremediablemente un descenso en G, con lo que el proceso es espontáneo. Se observa como no hay una ganancia en el número de puentes de hidrógeno, lo que no quiere decir que la energía asociada a los dos primeros sea la misma que en los dos segundos, pero aunque halla una diferencia a favor de los primeros, (antes de la formación del complejo), esta es sin duda mucho menor que la energía proveniente de la ganancia en entropía del medio.

Resumiendo:

- $\Delta H = H(\pm) - T\Delta S_{\text{medio}}$!! Espontáneo.

En las hojas pone que $H=0$ por la no formación de nuevos puentes de hidrógeno. Si no me equivoco, esto no es exactamente así, ya que como se ha dicho antes todo dependerá de la energía asociada a los mismos, con lo que podrá ser 0, mayor o menor, pero en todo caso se verá sobrepasada por el incremento en la entropía del medio.

Se puede concluir, por tanto, que el proceso de formación del complejo siempre será favorable para todos los sistemas.

Energía de unión

Se define como G_0' asociada a la formación del complejo ES, igual a la energía libre (negativa) asociada a esa formación, siempre en condiciones estándar. Esta energía libre de formación, vendrá determinada por las constantes k_1 y k^{-1} , y se relaciona directamente con la constante de equilibrio (todo en las hojas) e inversamente con la constante de disociación K_s (k^{-1}/k_1). Si decíamos que K_m y K_s tenían unos valores del orden de 10^x ($x= 2, 6, 7$), implica, o mejor dicho corrobora que G es espontánea, ya que la potencia negativa se corresponde con el mayor valor de k_1 sobre k^{-1} ($k_1 > k^{-1}$ formación del complejo favorable). Con esto seguimos demostrando que la formación del complejo está termodinámicamente favorecida.

Consideramos GS como la que engloba a todas las individuales de las diferentes interacciones no covalentes entre la enzima y el sustrato. Por esto, la energía de unión definida es válida para todos los supuestos, ya que, aunque en un principio planteamos la formación de un solo puente de hidrógeno, la G que utilizamos puede ser válida para otros modelos si la consideramos GS.

Efecto entrópico: utilización de la energía de unión en la catálisis

Se trata de ver como afecta esa energía de unión (favorable) a la catálisis. Mediante el modelo más sencillo, el de M&M, en el cual definimos los pasos reversibles como GS y el de transformación lo dejamos regido por K_{cat} , preguntándonos que energías intervendrán en ese proceso y que estará controlándolas. Seguimos recordando que normalmente la transformación se suele producir en varias etapas, pero, por conveniencia hacemos que sea un solo paso de transformación. De este modo podemos definir V como $K_{cat} \cdot [ES]$, teniendo muy en cuenta que esto sólo es cierto en el caso de un solo paso de transformación, ya que si no, la constante que multiplicaría a $[ES]$ sería la del último paso. Si utilizamos lo que obtuvimos para el estado de transición, que nos dice que la energía de la reacción es proporcional a la concentración de especies de sustancias reaccionantes que han alcanzado el estado de transición. Al contrario de lo que sucedía en el

apartado anterior, donde tratábamos de averiguar la energía de la unión de la enzima y el sustrato, ahora ya tenemos el sustrato en el centro activo, y lo que tenemos que hacer es encontrar la expresión de la energía de transformación, o lo que es lo mismo como superar la barrera energética a la que de nuevo se enfrenta la enzima, pasar de ES a ES".

Teniendo en cuenta, por tanto, que el sustrato se encuentra en el centro activo y aplicando la teoría del estado de transición llegamos a la siguiente expresión:

$$K_{CAT} = v \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

Esta nos indica que K_{cat} siempre se relaciona con G^* independientemente de las constantes microscópicas que englobe e independientemente del número de etapas.

La formación del **estado de transición** implica necesariamente la pérdida de entropía a varios niveles, rotacional, (es rígido a todos los niveles); traslacional, (sobre todo en reacciones catalizadas); interna, (rotacional, vibracional). En la formación del complejo ES, disminuimos la rotacional y la traslacional (el sustrato queda fijado al C.A.) y al pasar al ES" disminuimos la que nos quedaba, la entropía interna. Se ve ahora claro como las enzimas lo que hacen es dividir los cargos energéticos en dos para así poder controlarlos mejor, y se aprovechan de la energía favorable debida al aumento de la entropía del medio.

El efecto entrópico se define, por tanto, como las pérdidas en entropía rotacional y traslacional se producen en un proceso termodinámicamente favorable (formación del complejo ES). De este modo, el coste energético para llegar al estado de transición, queda reducido a la disminución de entropía interna (como coste) ya que el resto se ha solventado mediante la ganancia de entropía del medio. Por esto, y como se ve en las imágenes, la GT^* , compuesta por una GS^* y G^* , queda reducida debido al signo negativo de GS^* . Esta es la diferencia sustancial entre los procesos catalizados y los no catalizados, estos últimos deben afrontar el coste energético para pasar al estado de transición de un golpe (siempre hacia arriba), mientras que los procesos catalizados, hacen primero una bajada de energía mediante un proceso espontaneo y después afrontan la subida, que desde abajo es del mismo coste que sin enzima, pero contabilizando la energía desde el sustrato hasta el estado de transición, el escalón es mucho más pequeño que sin enzima.

Olvidándonos de los pasos intermedios, tenemos una energía de activación, la *energía de transición global* (GT^*), y analizando la reactividad (unión + transformación), definida por la constante de especificidad mediante la teoría del estado de transición, tenemos que ésta se relaciona con la energía de transición global, de forma equivalente a como K_{cat} se relacionaba con la energía activación; y K_s con la energía de unión (G^*).

De esta forma, cada una de las constantes a la que llamamos macrométricas se relaciona con las distintas barreras energéticas que aparecen durante la catálisis.

Maximización de la energía de unión

Conseguiremos un mejor efecto entrópico mediante la maximización del número de interacciones estabilizantes entre la enzima y el estado de transición. Será, por tanto, la mejor forma de rebasar la energía de activación, consiguiendo el mayor número de interacciones no covalentes entre la enzima y el estado de transición. Se trata entonces de conseguir que cada grupo potencial del sustrato tenga su equivalente en la enzima, que sean lo más equivalentes posible.

Fischer, intuyó algo parecido, pero se quedo en las puertas, afirmando que existía complementareidad *enzima"sustrato*, algo no del todo cierto, y que más tarde *consiguieron Haldane y Pauling*, diciendo que el mayor número de interacciones se conseguía en el estado de transición, enunciando la complementareidad *enzima"estado de transición*. Con esta teoría, se observa como la energía de unión (GS^* negativa) es la suma

de la energía, también negativa, debida a las interacciones entre la enzima con el sustrato (GS) y la que se produce ($\Delta G < 0$) cuando el sustrato alcanza el estado de transición. Esto contribuye, por tanto, a la maximización de la energía de unión, lo que determina una bajada en la energía de activación, determinante en los procesos biológicos. Esto repercutirá a su vez en K_{cat} y la constante de especificidad, de modo que cuanto más baje la energía de activación más ascenderá K_{cat} (el resultado un aumento en la velocidad). Una bajada en la energía global $\Delta G^\ddagger$, hará que aumente la constante de especificidad.

Evidencias experimentales

Trataremos de evidenciar dos puntos:

- La energía de unión se utiliza para disminuir la energía de activación
- La máxima complementareidad se da en el complejo ES[‡] (*complementareidad E[‡]estado de transición*).

Esto se consigue mediante experimentos con análogos del estado de transición, de manera que se observa como las K_s de estos análogos son menores que los de los sustratos naturales:

Como se observa de esta relación, una K_s menor para los análogos del estado de transición, implica una menor tendencia a la salida del C.A.

También se utilizan diferencias en potenciales sitios de interacción no covalente en sustratos alternativos y análisis del comportamiento cinético (K_m ; K_{cat}) de enzimas (normalmente proteasas) al ponerlas en contacto con distintos sustratos alternativos. En este tipo de análisis, en los que consideramos $K_m = K_s$, se observa un aumento de la constante de especificidad, debidos a cambios superiores en K_{cat} que en K_m .

De esta forma, un descenso en la energía de activación para S2 implicará un aumento de K_{cat} , (ver la fórmula que las relaciona), que unido a una ligera subida en valor absoluto de la energía de unión, hace que aumente la constante de especificidad. Por el contrario, para S1, la energía de activación es mayor y, por tanto, K_{cat} disminuye, que unido a un leve aumento de K_m (seguimos recordando que tenemos la condición $K_m = K_s$) hará que disminuya la constante de especificidad. Esto se resume diciendo que la enzima puede establecer más interacciones con S2 que con S1 ($\Delta G_{S1}^\ddagger < \Delta G_{S2}^\ddagger$) y con S[‡]2 que con S[‡]1 ($\Delta G_1^\ddagger > \Delta G_2^\ddagger$).

Otra forma de comprobarlo es mutando los potenciales sitios de unión con el sustrato en el C.A. y realizar los pertinentes análisis cinéticos. Lo que se observa en las enzimas mutadas es una bajada muy importante en K_{cat} , lo que implica un aumento en la energía de activación debida a la pérdida de interacciones estabilizantes del intermediario de reacción. También aumenta la K_m , aunque de forma más leve, lo que significa que el efecto entrópico es más débil. Esta menor variación en K_m que en K_{cat} parece confirmarnos que si es más importante (como siempre todo es relativo) la estabilización del intermediario de reacción (interacciones enzima"estado de transición) que la unión de la enzima al sustrato, donde casi siempre existirá alguna interacción más o menos específica que derive en un efecto entrópico.

Ya hemos comentado la importancia de los coenzimas, sin ir más lejos, la tirosil t[‡]RNA sintetasa, es capaz de catalizar la unión de la tirosina a AMP en ausencia del t[‡]RNA, que queda unido a la enzima en forma de complejo ES[‡].

Modelos de interacción enzimática

- **Modelo de distorsión de enlaces:** Enunciado por Haldane y Pauling, afirma que la enzima es rígida, y distorsiona al sustrato al estar este en el C.A. para llevarlo a ES[‡]. Se trata de complementareidad enzima"intermedio de reacción.
- **Modelo de ajuste inducido:** Enunciado por Koshland, afirma que la enzima sufre cambios

conformationales. Se trata de complementareidad enzima"intermedio de reacción.

En la actualidad se asumen los dos modelos. Cuando se forma el complejo ES y ES" cambiará de conformación el que esté más favorecido energéticamente o los dos.

La ecuación de la recta se encuentra en las hojas.

En relación con un ejercicio de la hoja 1.

Sinceramente no estoy muy seguro de ello, pero así debe ser, ya que así me lo explicó ella después de ponerme como mal un desarrollo a partir de esa fórmula en el examen, por haberla generalizado.

ENZIMOLOGÍA

1

Mecanismo de acción de las enzimas

GT"

energía global

G"

energía de activación

GS"

energía de unión

E + S

E"S

ES"

Ks

Kcat

Kcat/ Km

G

G

Kcat/ Km

Kcat

Ks

ES1"

E"S

E + S1

GS"

energía de unión

G"

energía de activación

GT"

energía global

Kcat/ Km

Kcat

Ks

ES2"

E"S

E + S2

GS"

energía de unión

G"

energía de activación

GT"

energía global