

Tema 11

Catálisis ácido "básica y catálisis electrostática

Se trata de la estabilización de las cargas generadas en el estado de transición, debida a aminoácidos polares (la posesión o no de carga es función del C.A.). A través de estos aminoácidos, se justifican las estabilizaciones, y aún siendo catálisis electrostática por cation se llama catálisis electrofílica.

En este tema se sentarán las bases de las posibles catálisis mediante ejemplos conocidos, de modo, que en el examen, puedas inventar un método conociendo aminoácidos del C.A. o bien el sustrato. Puede ser que se trate de uno de los ejemplos que veremos a continuación, o puede que no.

Empezaremos haciendo una clasificación bioquímica de las reacciones:

- **De transferencia de grupo:** Hidrolasas, transferasas.
- **Redox**
- **Eliminación de isómeros y reorganizaciones:** Isomerasas.
- **Ruptura y formación de enlaces carbono-carbono:** Ligasas y liasas.

Cada uno de estos tipos requerirá un tipo diferente de enzima con una catálisis característica, por ejemplo, el tipo *transferencia de grupo*, se basa en el paso de un grupo electrofílica desde un nucleófilo a otro, lo que se denomina sustitución nucleofílica.

Catálisis general básica

Utilizando la hidrólisis de un éster como reacción tipo, veremos el trabajo que realiza el grupo básico, en este caso el nitrógeno de una histidina, que para ser básico requiere estar desprotonado, con dos electrones no apareados.

Como se ve en la primera figura, la misión de este grupo básico consiste en abstraer un protón del agua para hacer a esta molécula más polar, o lo que es lo mismo, aumentan " del O lo que favorece el ataque nucleofílico de éste al carbono carboxilo. En el segundo paso, quedará un intermediario tetraédrico (típico en la hidrólisis de dobles enlaces) en el que el carbono está unido a tres oxígenos, uno de ellos con carga negativa, que empezará la excisión del **OR** atacando al carbono para conseguir el doble enlace. También quedará la histidina protonada.

Catálisis general ácida

Seguiremos con el mismo ejemplo, siendo ahora la histidina el grupo ácido al tener tendencia a soltar en protón que abstrajo del agua. Nos quedamos en que el oxígeno con carga negativa ofrecía los electrones para formar un doble enlace, haciendo que se debilite el enlace del oxígeno con el radical. Esto se verá favorecido por la cesión del protón de la histidina a este grupo saliente para formar un alcohol. En definitiva, la transferencia del protón de la histidina al grupo saliente (anion alcóxido, RO⁻) posibilita la salida del grupo en forma estable, la de alcohol.

También puede tener otra función esta catálisis ácida, la de aumentar la reactividad del centro de reacción (aumentar + del centro). Se diferencia de la básica en que esta última hace más reactivo al centro atacante (aumentar "), mientras que la ácida, o bien favorece la salida de un grupo cediéndole un protón, o bien, hace más reactivo el blanco, lo el grupo atacante. Por supuesto, al tratarse de un grupo ácido, lo que hace es provocar la atracción de electrones hacia el O. Al final, el oxígeno se queda con el doble enlace y con el

protón, con la subsiguiente carga positiva. Ésta debilitará el doble enlace al polarizarlo, aumentando el carácter electrofílico del carbono, haciéndolo, por tanto, un mejor centro de reacción.

Catálisis electrostática

Su misión es la de estabilizar las cargas generadas en el estado de transición. Esto se consigue de varias formas:

- Interacción con cargas de signo opuesto de cadenas laterales del C.A.
- Interacción con dipolos orientados, como por ejemplo el NH de los enlaces peptídicos.
- Interacción con iones metálicos del C.A. A esto se le denomina catálisis electrofílica (a pesar de ser electrostática). Es evidente que los iones a utilizar son muchos y variados, dependiendo del número de cargas o de la fuerza del mismo.

Como ejemplo se nos pone la Carboxipeptidasa A. en su C.A. presenta un átomo de Zn cuya misión es la de polarizar el enlace C=O con sus dos cargas positivas, lo que genera una atracción muy significativa de los electrones del oxígeno, que a su vez arrastrará a los del doble enlace, haciendo más electrofílico al carbono para que actúe con más facilidad en agua como nucleófilo. En esta reacción, el glutamato 270 interviene como base general (base conjugada) haciendo posible la aparición del intermediario tetraédrico al abstraer un protón del agua, misión típica de una base general. Todo este proceso se describe con mucho más detalle en las hojas, demasiado para lo que se exige.

Catálisis Covalente

Hasta ahora decíamos que las interacciones entre la enzima y el sustrato eran no covalentes, sin embargo, en este tipo de catálisis se trata de conseguir que una especie poco reactiva se transforme en otra mucho más reactiva. Esto se consigue mediante la unión covalente al catalizador. El efecto hace que disminuya la energía de activación por el paso por diferentes intermedios de reacción.

Hay dos tipos:

- **Nucleofílica:** en ella está implicada una cadena lateral con características nucleofílicas. Se basa en que la unión del catalizador al sustrato facilita el desplazamiento posterior de un grupo saliente relativamente básico.
- **Electrofílica:** se basa en que la unión del catalizador al sustrato hace que el centro de reacción sea más electrofílico por la retirada de electrones. El sumidero de electrones, suele ser un $=N^{+}<$. Hay que tener en cuenta que aunque el efecto es distinto de la nucleofílica, ambas se producen por cadenas laterales nucleofílicas, por ello esta clasificación es un poco ambigua.

No siempre la unión se produce directamente con la enzima, sino también por medio de coenzimas. Hay que decir que no son excluyentes, de hecho suelen darse los dos tipos.

Nucleofílica

Es función de las especies ionizables, de la carga con la que se encuentren, y todo ello producirá un exceso de electrones. A la lista de grupos que pueden actuar como nucleófilos habría que añadir Thr"O" y Tyr"O", sólo en esta forma, al igual les ocurre a los demás. Hay que tener en cuenta que se trata de las bases conjugadas y que todas ellas cursan con uniones covalentes con el sustrato.

Como ejemplo se nos pone la Quimotripsina, una serín proteasa. Se caracteriza por una triada catalítica:

- **Ser195:** que una vez en forma de base conjugada une el sustrato, de modo, que es la cadena

nucleofílica.

- **His57:** En forma de base, abstraerá un protón de la serina para hacerla catalítica.
- **Asp102:** Se encarga de mantener a la histidina en su sitio para que pueda realizar su función, además de ayudar a mantener su estructura.
- **Gly193:** Aunque no forma parte de la triada catalítica, su NH del enlace peptídico forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo atacado por la serina, lo que hace que sea más corto y estable a medida que el oxígeno adquiere carga negativa. En definitiva, contribuye a la estabilización del estado de transición.

La Quimotripsina corta a la derecha de aminoácidos aromáticos Phe, Tyr, Trp, (por eso presenta una cavidad hidrofóbica). Utiliza dos sustituciones nucleofílicas, cada una con su intermediario. Cada una de estas sustituciones presenta las siguientes etapas:

- **Adición del nucleófilo al C carbonilo**
- **Formación del intermediario tetraédrico**
- **Salida del grupo básico**

Describiremos ahora cada uno de los pasos que sigue la enzima para hidrolizar el enlace:

- La histidina abstrae un protón de la serina, que ya empieza a atacar al enlace C=N, debido en parte a la debilitación del mismo al perder electrones por la interacción del =O con la Gly y con el NH de la serina.
- Una vez la serina en forma de nucleófilo, se une al sustrato por medio del oxígeno que sigue interactuando con el protón, ahora de la histidina, el cual a su vez interactúa con el N del enlace a romper. Como ya se ha formado el oxoanión, debido a las interacciones con la glicina mencionadas en el paso anterior, el enlace peptídico deja de ser planar, formándose el **intermediario tetraédrico**.
- La histidina actúa de ácido general cediendo un protón al grupo básico saliente, completándose así la primera sustitución. Pero aún queda la otra parte de la cadena peptídica unida covalentemente a la enzima por medio de la serina, formando la acil"enzima. Entonces empieza la segunda sustitución, que provocará la hidrólisis de la acil"enzima. La ruptura del enlace peptídico, provoca la formación de nuevo del doble enlace, el cual, siguiendo un proceso idéntico al descrito en el paso 1 elimina los electrones del doble enlace recién formado, y que confiere una estructura trigonal. Una vez que ha cedido el protón, la histidina actúa como base general abstrayendo un protón del agua polarizándola aún más, haciendo factible así que esta ataque al carbono, que también será más electrófilo.
- Se forma de nuevo un intermediario tetraédrico con un oxoanión y con el protón abstraído del agua interactuando todavía con el oxígeno ahora unido al carbono y con el oxígeno de la serina que comienza a debilitar su enlace con el sustrato. Se trata, por tanto, de la hidrólisis de un éster.
- El último paso es la salida del grupo básico de la segunda sustitución. Esta se ve favorecida por la ruptura del enlace covalente con la serina que recupera el protón cogiéndolo de la histidina.

Electrofílica

Se trata de conseguir aumentar el $+$ del centro de reacción. Ya hemos visto algunas estrategias como la catálisis general ácida o la catálisis electrofílica, y ahora añadimos la **catálisis covalente electrofílica**. Puede formar intermediarios covalentes entre el sustrato y la enzima o entre sustrato y coenzima, en cualquiera de los casos, se consiguen retirar electrones del centro de reacción. Esto se consigue normalmente mediante un nitrógeno catiónico, al que se le llama un sumidero de electrones.

En este tipo de catálisis utilizaremos como ejemplo la Aldolasa. Ésta es capaz de formar una base de Schiff (imina) mediante la condensación del N de un Lys del C.A. y el grupo aldehído o cetona de los azúcares (Adición nucleofílica del amino al C carbonilo). Si esta imina estable se pone en medio ácido o algún componente del C.A. la cede un protón se convierte en un ion iminio ($+$). Este ion puede perder un protón (el de un carbono) apareciendo una carga negativa generando entonces un carbanión, el cual se estabiliza por

resonancia formando una enamina, una especie más estable.

La enamina presenta un carbono metilénico que se puede activar como nucleófilo. También puede formar un carbanión, que suele ser la base para formar un enlace C-C o para degradarlo, de hecho la aldolasa puede hacer las dos cosas.

El ion iminio polariza el enlace con el carbono.

Al igual que hicimos en el tipo anterior, comentaremos todos los pasos de la catálisis llevada a cabo por la aldolasa:

- La Fructosa 1,6 bis"fosfato llega al C.A. interactuando de forma no covalente con una Lys que medio comparte un protón con una Cys y con un grupo con B. Ambas cadenas intentan neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato. Para poder interactuar mejor, el protón de la cisteína pasa a la lisina, quedando con cargas " y + respectivamente. Hay una lisina que queda orientada justo al lado de la cetona, de modo, que debido a la fuerza del NH₂ se unen soltando una molécula de agua. Esta adición nucleofílica crea un ion iminio muy inestable que favorece los desplazamientos de electrones, que harían que la molécula se rompiera por 3"2 si no fuera por la Cys, que una vez perdido el protón actúa como nucleófilo abstrayendo el protón del grupo alcohol en C4, lo que provoca la aparición de un doble enlace C=O que rompe la molécula.
- La ruptura hace que salga el gliceraldehído 3"fosfato, dejando un carbanión en la enzima, el cual se solventa mediante la cesión de n protón de una histidina.
- La histidina en forma de base actúa como tal polarizando al agua mediante la abstracción de un protón. Esta agua polarizada busca un centro nucleófilo, y lo encuentra en el carbonilo, que ha perdido electrones por el nitrógeno catiónico, ahora formando de nuevo un ion iminio.
- Este paso es la hidrólisis de la imina, dejando el C.A. libre para unir una cetona, DHAP o F1,6BP.

Si tratamos de unir dos triosas, es evidente que en primer lugar debe entrar la DHAP y después de la formación del ion iminio y del posterior carbanión al quitarse una molécula de agua un G3P.

Tema 12

Catálisis electrofílica con participación de coenzimas

La diferencia con la anterior es que en este caso se requiere un coenzima, que será quien se una al sustrato. El ejemplo que utilizaremos es el del fosfato de piridoxal (PLP) en una reacción de transaminación. Hay muchos, por ejemplo el fosfato de tiamina también presenta un nitrógeno catiónico que realiza una función análoga al PLP.

Características del PLP

- Deriva de la vitamina B6.
- Puede actuar en transaminaciones, racemizaciones o cambios en el estado de oxidación.
- Presenta en la posición 4 un grupo aldehído capaz de formar Bases de Schiff o iminas.
- Un grupo alcohol en 3 que estabiliza mediante la formación de un puente de hidrógeno interno la imina. Actúa como catalizador ácido"base.
- Un grupo fosfometileno en 5 que sirve como reconocimiento E"CoE, de forma análoga a como se reconocían los grupos fosfato en la aldolasa.
- Un nitrógeno catiónico que promueve la deslocalización de los electrones dentro del anillo.

Ejemplo, la transaminación

Lo primero que sucede en la condensación del PLP con la transaminasa por medio de la formación de una imina, a la que denominaremos aldimina por provenir de un aldehído, con una amina de la lisina del C.A. Esta deshidrogenación deja un nitrógeno catiónico cuyo protón forma un puente de hidrógeno con el O" (debido a la pérdida del protón en la entrada al centro activo). A partir de esa unión, la aldimina a la que llamaremos interna por producirse entre la CoE y la E, hace susceptible de un ataque nucleofílico de una amina desprotonada de un aminoácido, al carbono carbonilo, empezando la primera sustitución nucleófila.

- Consiste en la unión del aminoácido por su nitrógeno al PLP liberándolo de su unión con la lisina del C.A. Se forma entonces una aldimina externa por formarse entre el CoE y el sustrato. La lisina queda desprotonada, con lo que se convierte en un nucleófilo (base) que ataca al protón del carbono , provocando una reorganización de los electrones por todo el complejo CoE"S.
- Esta reorganización de la aldimina externa se estabiliza por resonancia formando un intermediario quinoideo, que se caracteriza por la formación de un doble enlace entre el carbono y el N y entre el siguiente carbono y el anillo. Este último doble enlace, ataca a la lisina, ahora en forma de ácido debido al exceso de electrones que le llega del nitrógeno del anillo, ahora sin carga.
- La pérdida del protón de la lisina vuelve a dejar a esta en forma de base, mientras que la captura del mismo por parte del doble enlace C"Anillo regenera la carga en el nitrógeno del anillo y mantiene el doble enlace entre el carbono y el nitrógeno, fundamental en el siguiente paso. En este paso, por tanto, se forma una cetimina, ya que proviene de una condensación con una cetona.
- La entrada de una molécula de agua provoca la hidrólisis de la cetimina, debido a la potencialidad electrófila del carbono y a la polarización que realiza la lisina al abstraer un protón del agua, actuando de base general. El resultado de esta hidrólisis es la salida de un "cetoácido y de Piridoxamina fosfato, que ha capturado el grupo amino del aminoácido que entró en el paso 1.

La Piridoxamina servirá como coenzima al segundo sustrato, otro "cetoácido al que se convertirá en aminoácido mediante los pasos antes descritos pero de manera inversa. En este recorrido inverso, para liberar el aminoácido será la amina de la enzima la que atacará.

Se podría pensar que cual es la necesidad de unir el PLP a la enzima, ya que podría saltarse ese paso y formar directamente una aldimina externa. La respuesta es evidente, la formación de la aldimina interna hace mucho más susceptible de un ataque nucleófilo al carbono carbonilo. Esto en definitiva es la base de la catálisis covalente.

La transaminación, como se ve, se trata de una reacción Ping"Pong.

Sinceramente no estoy muy seguro de que sea carboxilo, pero ya que deriva de un ácido creo que será así.

Recordemos que los centros de reacción suelen ser + como **C** o **P**.

ENZIMOLOGÍA

92

Catálisis ácido"básica y electrostática

G

ES"

Unión covalente Ea

E+S

S''

P

S

E+P

ES'''

ES'

Reacción no catalizada

Reacción catalizada