

Organizaciones enzimáticas macromoleculares

POR
JOSÉ A. LOZANO TERUEL

INTRODUCCION

Desde que se conoció el papel catalítico de los enzimas, se desarrolló un intenso trabajo experimental a fin de obtenerlos más puros, cristalizados si era posible, estudiándose las características químico-físicas, sobre todo las relacionadas con la actividad catalítica. Aun cuando, desde luego, no contamos todavía con un conocimiento adecuado de cada una de las etapas individuales catalizadas enzimáticamente, la tendencia actual en la Bioquímica es profundizar en el tratamiento de las asociaciones multienzimáticas, que cada día se nos presentan como más frecuentes y que están enmarcadas dentro del intento general de dar una significación fisiológica a los hallazgos bioquímicos.

En tales asociaciones se pueden distinguir dos posibilidades:

a) Enzimas unidos más o menos fuertemente a orgánulos subcelulares y que producen una asociación multienzima de gran eficiencia aun cuando no se afecten las actividades catalíticas individuales.

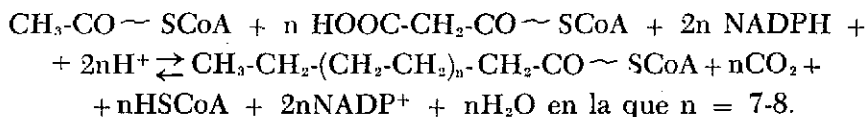
b) Enzimas en fase líquida, "solubles", pero agregados de un modo funcionalmente significativo, con la posibilidad de que unas proteínas puedan afectar a las otras modificando su actividad catalítica.



En este artículo nos vamos a limitar a tratar de dar una pequeña información sobre dos de estos sistemas multienzimáticos, la sintetasa de ácidos grasos en levadura y el complejo α -cetoácido deshidrogenasa en *E. coli*.

Sintetasa de ácidos grasos

La sintetasa de ácidos grasos consiste en una serie de enzimas particulares, obtenidos normalmente del sobrenadante de la centrifugación del citoplasma durante 1 hora a 100.000 g y que catalizan la reacción global de formación de un ácido graso a partir de una molécula de acetil-coenzima A y de n moléculas de malonilcoenzima A, según la reacción:



El acetil CoA es el "iniciador" del proceso y sus dos carbonos corresponden a los dos carbonos finales del ácido graso producido y los demás corresponden a los carbonos del malonil, de cuyos tres carbonos, dos están en el ácido graso y el otro como dióxido de carbono.

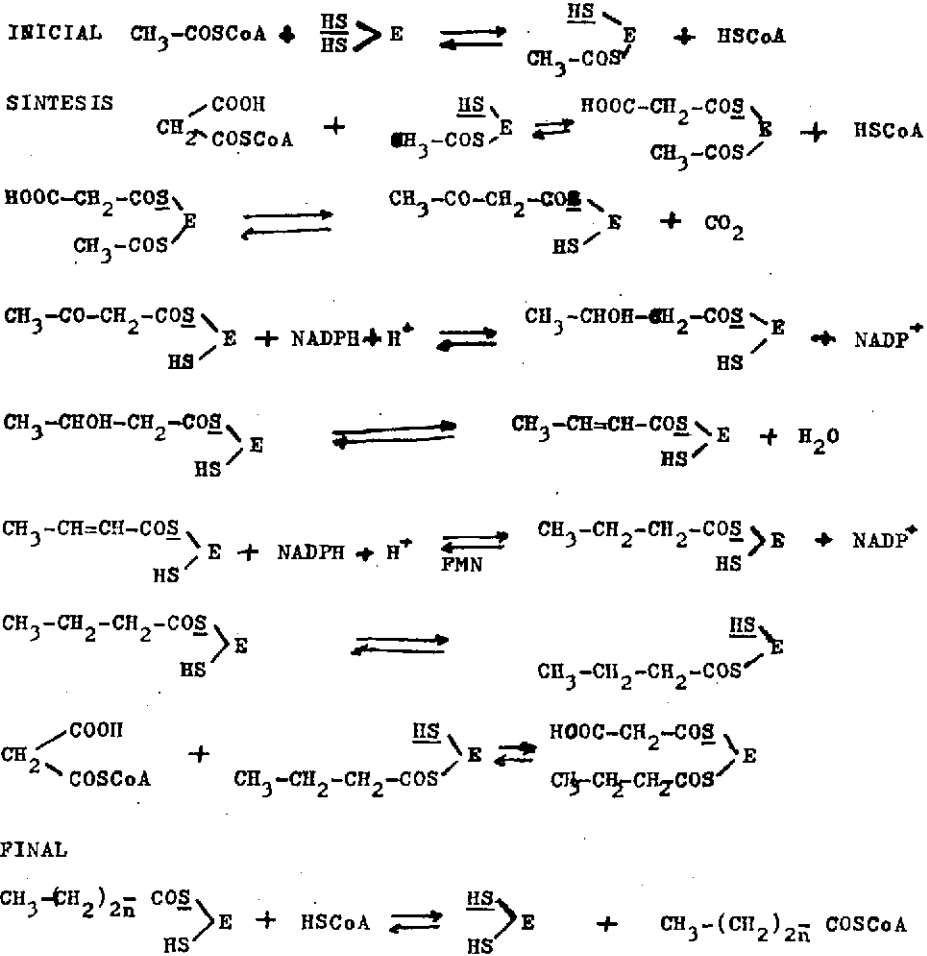
A pesar de ser sistemas "solubles", en el caso especial de levadura o en otras procedencias como hígado de palomo o mamífero, el complejo ha resistido todos los intentos de fraccionamiento en sus componentes enzimáticos activos, al contrario de lo que sucede con bacterias y plantas.

En el caso de la levadura, Lynen expresa la reacción global, considerando que en la sintetasa existen dos grupos tioles diferentes que llamaremos "periférico" y "central" con un esquema de actuación como el representado en la gráfica n.º 1. Todas estas secuencias las lleva a cabo el complejo multienzimático cuya unidad funcional consiste en 7 enzimas diferentes, situados alrededor de un grupo tiol "central" como podemos observar en la gráfica n.º 2 en la que 1 es un enzima de transferencia de palmitilo, 2 el de transferencia de malonilo, 3 el enzima condensante, 4 el enzima que cataliza la primera reducción, 5 el de la deshidratación, 6 el de la segunda reducción y 7 el de la transferencia final.

Desde luego, se han encontrado 7 diferentes aminoácidos terminales y en proporción de 3 moles de cada uno por mol de sintetasa, la cual es homogénea en ultracentrifuga y electroforesis y tiene un peso molecular de 2.300.000. En otros sistemas enzimáticos, el producto de la reacción

Gráfica nº 1

SINTETASA DE ACIDOS GRASOS

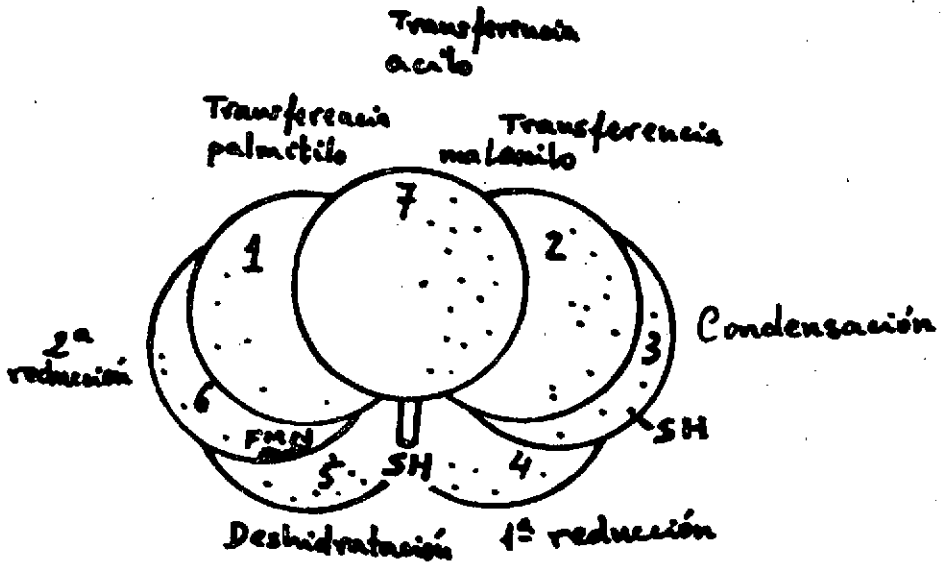


no es ácido palmítico sino una mezcla de palmitil CoA y estearil CoA. El que no se obtenga éxito en aislar grasos intermedios de menor peso molecular producidos biosintéticamente es lógico teniendo en cuenta que la transformación del malonil CoA en el complejo sintetasa se va realizando mediante la formación de intermedios que siempre están unidos covalentemente a la sintetasa.

Con microscopía electrónica, se pueden observar en la sintetasa purificada de levadura la presencia de partículas simples ovaladas rodeadas de un anillo ecuatorial con un diámetro del orden de los 230 Å y se pue-



Sintetasa de ácidos grasos

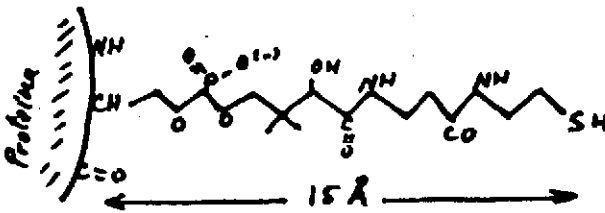
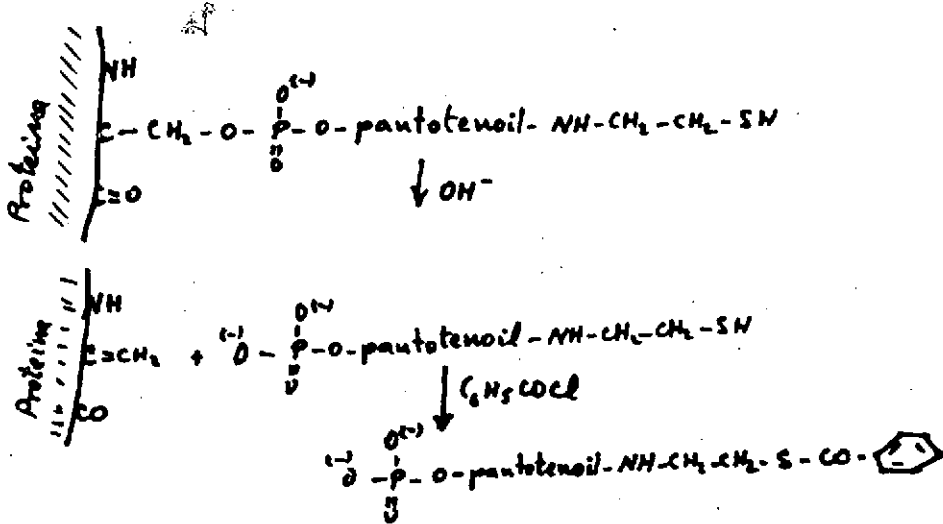


gráfica nº 2

de suponer que la sintetasa es un trimero constituido por tres porciones, de P. M. 700.000, cada una con los 7 enzimas. La idea está de acuerdo con los datos citados de aminoácidos terminales, con la cantidad de acetato que se puede unir al enzima (tres moles por mol) o con el hecho de que un mol de sintetasa de levadura parece poseer tres moles de grupos tioles "periféricos" y tres moles de grupos tioles "centrales".

Respecto a los grupos tioles, el "periférico" pertenece a una cisteína localizada en el enzima condensante de la sintetasa. Respecto al "central" en 1967 se ha identificado como situado sobre un portador 4' fosfopantotéina unida a través de un enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo de una porción serina de un polipéptido. La estructura coincide con la "proteína portadora de ácido" (PPA-SH) aislable de *E. coli* o de plantas y parece también semejante a la del complejo sintetasa de mamíferos.

Grupo tiol "central"



Grafica n° 3

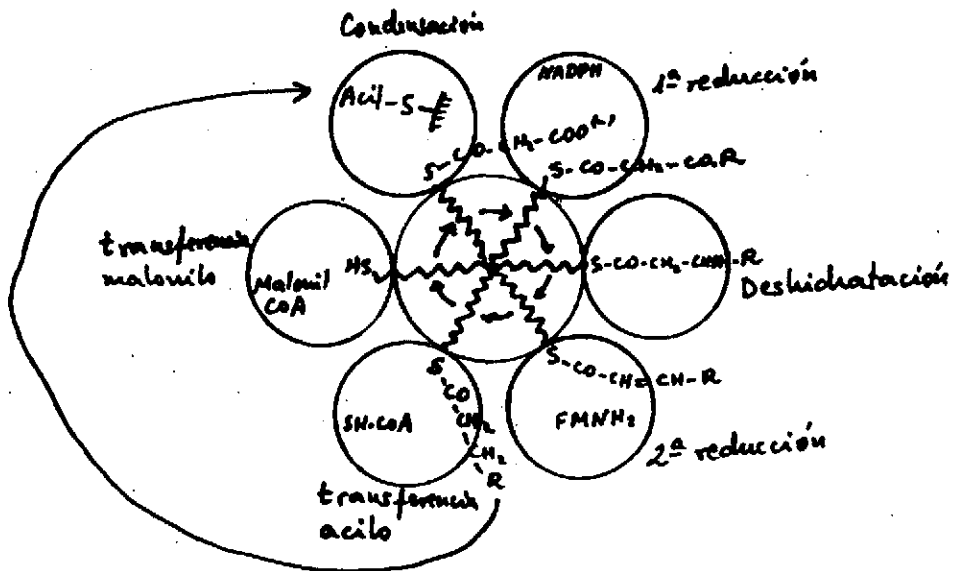
En E.coli las reacciones 2, 3 y 4 del esquema global se sustituyen por:

2. Acetil CoA + PPA - SH \rightarrow Acetil S-PPA + HSCoA
3. Malonil CoA + PPA - SH \rightarrow Malonil S-PPA + HSCoA.
4. Acetil S-PPA + Malonil S-PPA \rightarrow Acetoacetyl S-PPA + PPA-SH + CO₂

y también se han aislado activamente los enzimas que catalizan las demás reacciones individuales.



Por lo que hemos visto, el grupo -SH está condicionado en la sintetasa de levadura, con un brazo flexible de longitud mayor de 15 \AA , lo que le permite la rotación en dirección a los demás enzimas del complejo enzimático, con lo cual es perfectamente factible que los intermediarios unidos covalentemente a este grupo tiol puedan estar en estrecho contacto sucesivamente con el lugar activo de cada componente enzimático, pues éstos tienen la libertad de movimiento limitada por la existencia del complejo, como vemos en la gráfica n.º 4.



Sintetasa ács. grasos
Gráfica n.º 4

Un hecho sin interpretación fácil es que la sintetasa de ácidos grasos produce principalmente ácidos palmítico y esteárico, pero no ácidos de cadena más corta y aunque se puede suponer que se debe a un problema de especificidad hacia el sustrato por parte del enzima que transfiere el radical del ácido graso hasta el coenzima A, los datos experimentales no indican tales diferencias de especificidad. Quizás la clave esté en otros hechos. En experimentos de protección del enzima contra reactivos de grupos tioles tales como la N-etilmaleimida, se preincubó el enzima con

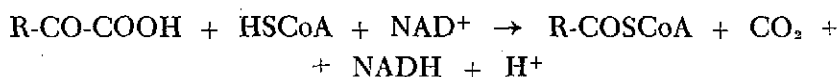
acetil CoA y homólogos superiores, produciéndose acilaciones en los grupos tioles "central" y "periférico" que protegen el enzima contra la inactivación. Sin embargo, con malonil CoA, sólo se acila el -SH central y el efecto protector no existe, lo cual indica que el efecto protector es debido al -SH "periférico" y se ha comprobado que al ir aumentando la longitud del acil CoA, disminuye el efecto de la protección, lo cual puede indicar que los alrededores del grupo "tiol" periférico del complejo enzimático sean de tipo hidrofílico, mientras que los del central sean de tipo lipofílico, lo cual haría que al aumentar la longitud de la cadena del ácido graso, la tendencia a trasladarse desde el grupo tiol central al periférico (para comenzar el ciclo de aumento de dos carbonos), sea menor y en el caso del ác. palmítico y esteárico permanecen preferentemente sobre el grupo tiol "central", bloqueando la llegada de un nuevo radical malonilo hasta que estos ácidos se eliminan del complejo enzimático por transferencia al HSCoA. Si esta interpretación es correcta, significa que la arquitectura del complejo lleva en sí la información específica acerca del producto de la reacción.

En resumen, según Lynen, podemos considerar el sistema sintetasa de ácidos grasos en levaduras ocasionado por una estabilización de sus subunidades por el hecho de participar en el complejo, de tal modo que una vez separadas son muy lábiles. También cabría la posibilidad de que las interacciones alostéricas sean necesarias para producir un sistema catalítico activo.

Respecto a la sintetasa de hígado de ave, de PM 500.000, parece de tipo semejante y al disociarse también pierde la actividad. Por su peso molecular y tamaño podría considerarse análoga a un monómero de la sintetasa de levadura. Aun en los casos de *E. coli* o de plantas; con sintetetas disociables que conservan las actividades individuales, la tendencia es considerar el sistema en las células intactas como una unidad organizada y que en la extracción se vencen las débiles fuerzas de cohesión.

Complejos α -cetoácidos deshidrogenasas

La descarboxilación oxidativa del piruvato o del α -ceto-glutarato tiene lugar según una reacción global:



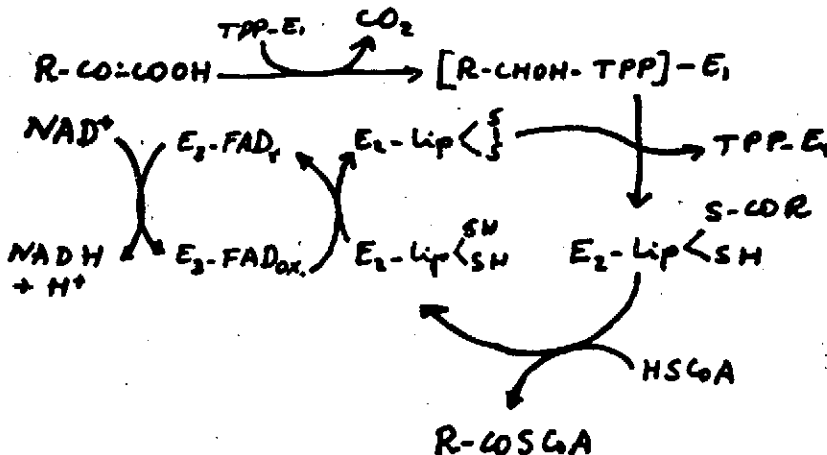
en la que participan varios enzimas. El proceso es importante ya que del pirúvico se obtiene el acetil CoA que es el combustible o materia prima del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, aparte de que constituye el principal camino de la oxidación de α -cetoácidos.

En *E. coli*, el complejo piruvato deshidrogenasa posee un peso molecular de 4,8 millones y se ha fraccionado en tres enzimas distintos:

E_1 = piruvato descarboxilasa de P. M. 183.000.

E_2 = Lipoil reductasa transacetilasa de P. M. $1,6 \times 10^6$ y parece una asociación de unidades de P. M. 35000, cada una con un ácido lipoico.

E_3 = (Flavo proteína) = dihidrolipoildeshidrogenasa de P. M. 112000.



E_1 = piruvato descarboxilasa
 E_2 = lipoil reductasa transacetilasa
 E_3 = dihidrolipoil deshidrogenasa

Complejo pirúvico deshidrogenasa

Gráfica nº 5

En el caso de α -cetoglutarato deshidrogenasa los resultados son similares y E_2 y E_3 son intercambiables.

Aun cuando E_1 , no combine con E_3 , en presencia de E_2 se reconstituye espontáneamente el complejo, que podría estar constituido por

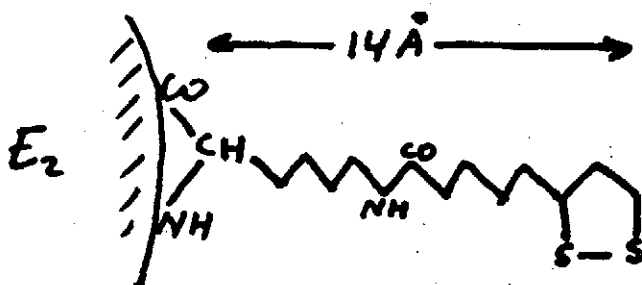
12 unidades E_1 de P. M. 183000.

24-48 unidades E_2 de P. M. 70000-35000.

6 unidades E_3 de P. M. 112000.

con uniones no covalentes y con un esquema del funcionamiento como el de la gráfica n.º 5, en que $R = CH_3$, ó $HOOC - CH_2 - CH_2$.

Respecto a la organización macromolecular, desde 1960 se conoce que el ácido lipoico se une a E_2 a través de un grupo ϵ -amino de un residuo lisina lo cual proporciona un brazo flexible de unos 14 \AA para el anillo ditiolano reactivo. Además, la relación lipoilos enlazados /FAD en el complejo es 4:1 con todos los lipoilos funcionales, y por otra parte se han conseguido micrografías del complejo, todo lo cual señala hacia un esquema de acción, constituido según la gráfica n.º 5 y en total el complejo queda como un agregado poliédrico "abierto", de acuerdo con los datos conocidos de que todas las fracciones lipoilo del complejo pueden liberarse y reincorporarse enzimáticamente sin alterar el estado de agregación del complejo.

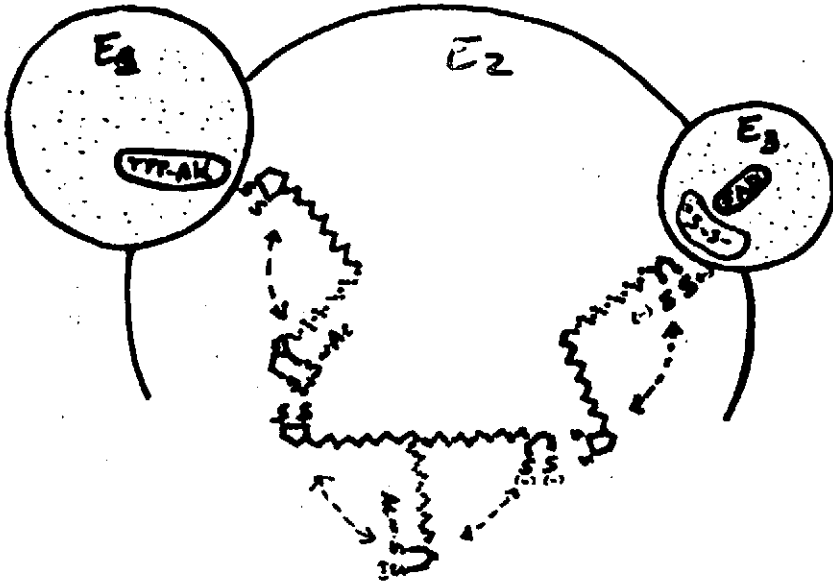


lipoil reductasa transacetilasa
gráfica n.º 6

En el caso de α -cetoglutarato deshidrogenasa de *E. coli* no se han obtenido micrografías porque durante el proceso de preparación (teñido), el complejo parece que se disocia.

De todos modos la similitud entre los dos complejos deshidrogenasas

de *E. coli* es muy grande, aun cuando difieran en detalles, tales como el número de subunidades o en la secuencia de aminoácidos de la lipoil reductasa. Respecto a otros complejos α -cetodeshidrogenasas de otras fuentes, como tejidos de mamífero, la situación parece semejante, pero existen diferencias respecto a disposición de subunidades.



GASH Ac-SLoA

Esquema de acción de piruvato
deshidrogenasa

Gráfica n° 7

Los enzimas componentes del complejo piruvato deshidrogenasa de *E. coli* pueden usar lipoato libre en lugar de la fracción proteina-ácido lipóico, lo cual sugiere que en los organismos primitivos los 3 enzimas ahora juntos formando el complejo, existían como entidades separadas y que el lipoato servía como coenzima móvil trasladándose entre los 3 enzimas. En el curso de la evolución los 3 enzimas adquirieron la capacidad de combinarse unos con otros lo cual les hizo más eficientes y facilitó el control de la reacción. Posteriormente se incorporaría al conjunto la fracción lipóilo localizándose en la lipoil reductasa transacetilasa y así es como está en los organismos modernos.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

Annual Review of Biochemistry; año 1966, 1.^a parte, págs. 57-84.
The Biochemical Journal; febrero 1967, págs. 381-400.

○

