

## ENSAYO\*

# LOS ENZIMAS, AGENTES DE LA VIDA

Por Alberto Sols

Con la investigación de las últimas décadas, la Bioquímica ha tocado fondo al nivel molecular de la vida. Y a nivel molecular, en la vida hay dos elementos fundamentales: la información, contenida en los ácidos nucleicos, y la acción, realizada por los enzimas (1). Los enzimas catalizan las reacciones cuya trama constituye la vida en acción. Por é ello, bien puede decirse que los enzimas son los agentes de la vida.

La vida implica una gran diversidad de reacciones químicas, cada una catalizada por un enzima específico. Y cada célula concreta — los microcosmos que constituyen las unidades básicas de la vida— tiene un millar largo



**ALBERTO SOLS** es Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Director del Instituto de Enzimología del C.S.I.C. Fue Presidente-fundador de la Sociedad Española de Bioquímica y es miembro de honor de la American Society of Biological Chemists. Sus investigaciones sobre enzimología fisiológica han dado lugar a un centenar de publicaciones y unas sesenta conferencias en el extranjero.

\* **BAJO** la rúbrica de «Ensayo» el Boletín Informativo de la Fundación Juan March publica cada mes una colaboración original y exclusiva de un especialista sobre un aspecto de un tema general. Anteriormente fueron objeto de estos ensayos temas relativos a la Ciencia, el Lenguaje, el Arte, la Historia y la Prensa. El tema desarrollado actualmente es la Biología.

En Boletines anteriores se han publicado: *Control electrónico del cerebro*, por José M. Rodríguez Delgado, Director del Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid; *Bioquímica de la nutrición*, por Francisco Grande Covián, Director del Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición «Don Juan Carlos I-Fundación Cuenca Villoro»; *Las fronteras de la Ecología*, por Ramón Margalef, Profesor de Ecología de la Universidad de Barcelona; *Alteraciones del desarrollo cerebral*, por Federico Mayor Zaragoza, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid; *La bioconversión de la energía solar y la crisis energética y alimentaria*, por Manuel Losada, Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Sevilla; *Aspectos biológicos del abuso de drogas*, por Josep Laporte, Catedrático de Terapéutica y Farmacología Clínica de la Universidad Autónoma de Barcelona; *Evolución y Darwinismo*, por Francisco J. Ayala, Profesor de Genética de la Universidad de California en Davis; *La genética del cáncer y los virus*, por María Luisa Durán-Reynals, Profesora de Patología del Albert Einstein College de Nueva York; *El origen de la vida*, por Juan Oró, Profesor de Bioquímica de la Universidad de Houston; y *La genética de poblaciones*, por Antonio Prevosti, Catedrático de Genética de la Universidad de Barcelona.

de enzimas distintos. La mayor parte de los enzimas —incluyendo los más importantes— actúan precisamente dentro de las células, a lo que alude el nombre propuesto en 1876: «enzima», del griego «en la levadura», primera célula de la que se extrajeron hace sólo ochenta años (2).

Los enzimas en los seres vivos son el equivalente a la diversidad de profesionales en una sociedad muy desarrollada. Para completar la analogía diremos que si una ciudad grande, como Madrid, se redujera por arte de magia al tamaño de una célula epitelial, los hombres que dan vida a la ciudad, con su millar de profesiones diversas, pasarían a tener el tamaño de los enzimas. Sólo que el número total de moléculas enzimáticas en una célula es mucho mayor que el de individuos en una ciudad. En las células se ha conseguido un aprovechamiento integral del espacio, no aproximado por ninguna colectividad humana. Y maravillosamente, el apiñamiento de los enzimas en las células no tiene nada de amontonamiento esterilizador sino que es compatible con —y en parte contribuye a— una eficacísima integración funcional.

Se conocen ya unos dos mil enzimas distintos, y se descubre alguno más cada semana. Algunos realizan funciones muy básicas y son comunes a la generalidad de los organismos vivos. Otros, en cambio, están en relación con funciones especiales limitadas a algún tipo de organismo. Lo que todavía no podemos calcular, ni siquiera tentativamente, es como cuántos enzimas distintos habrá en el mundo vivo. Probablemente cientos de miles, quizá millones de enzimas. Por este lado no hay peligro de que se queden sin trabajo los científicos de las próximas generaciones (3).

La naturaleza de los enzimas está perfectamente desentrañada: son proteínas (4), de peso molecular generalmente entre unos 40.000 y 200.000, sin o con un complemento no proteico llamado grupo prostético. Es más, hoy día tenemos conciencia de que la admirable eficacia de los enzimas sólo es posible en las proteínas. Como todas las proteínas, los enzimas se sintetizan por traducción de una secuencia de DNA a una secuencia de aminoácidos, según la clásica regla «un gen - un enzima». El inmenso número de combinaciones estructurales posibles en las proteínas da base no sólo para el gran número de enzimas conocidos y el enorme de los presuntos, sino para el hecho de que cada enzima dado puede tener múltiples variantes químicas según el organismo de procedencia, con nulas o insignificantes diferencias como catalizador. Incluso con

frecuencia hay dos o más variantes de un enzima dentro de un organismo, en cuyo caso se habla de «isozimas» (o isoenzimas). Los isozimas —procedentes de duplicación de un gen con mutaciones posteriores independientes— son cantera propicia para la eventual aparición de enzimas «nuevos» sin pérdida de los antiguos, en el pasado y —con toda probabilidad en potencia— en el futuro. La evolución molecular ha venido perfeccionando y diversificando los biocatalizadores a lo largo de más de mil millones de años.

## LO QUE PUEDEN HACER LOS ENZIMAS

Los enzimas son catalizadores fabulosamente eficaces, muchísimo más eficaces que los catalizadores no biológicos. Esta eficacia de los enzimas tiene dos notas cardinales: una enorme actividad molecular y una exquisita especificidad, características bien individualizables aunque parcialmente relacionadas. Con una tercera nota opcional: la admirable regulabilidad por los efectos alostéricos.

### Actividad molecular

Cada enzima puede acelerar millones o billones de veces la velocidad de una reacción, entre las posibles en un sistema dado; sólo acelerar, pero la aceleración específica es tan grande que en la práctica suele conducir a aparente creación *de novo*. Y, además, los enzimas son infatigables.

Aunque se está progresando rápidamente en el desentrañamiento íntimo de las bases fisicoquímicas de la enorme actividad molecular de los enzimas, éstas tienen todavía bastante de especulativo (Knowles, Koshland). Enzimas y sustratos reaccionan molécula a molécula (o subunidad a una de las regiones atacables) dando lugar a la formación de un complejo enzima-sustrato por ajuste inducido. Y este complejo conduce a un descenso muy grande de la energía de activación normalmente requerida para una reacción dada, sin modificar el equilibrio de la reacción catalizada (5).

La actividad molecular varía bastante de unos enzimas a otros. Ahora bien, una observación sistemática de las medias para cada una de las grandes familias en que se clasifican los enzimas por el tipo de reacción catalizada nos llevó a Carlos Gancedo y a mí a la conclusión de que, en conjunto, tiende a haber un paralelismo entre la actividad

molecular y la simplicidad de la reacción catalizada, desde una media máxima de 36.000 moléculas/subunidad/minuto para las hidrolasas a una mínima de 100 para los enzimas que actúan sobre un sitio determinado de una macromolécula. Parece que la generalidad de los enzimas a lo largo de la evolución molecular se ha acercado mucho a las máximas absolutamente posibles en cuanto a actividad molecular, cosa comprensible en términos de selección natural con tiempo suficiente. Es decir, que los enzimas, en cuanto a actividad, son no solamente muy buenos sino que tienden a ser los mejores posibles.

Para que esta gran capacidad potencial de los enzimas se realice en la práctica hace falta que haya sustrato(s) abundante (cuánto es «abundante» lo describiremos en la sección siguiente) y condiciones ambientales favorables (agua, pH, temperatura, fuerza iónica y a veces algo más). Dando por supuesto que se reúnen estas circunstancias para un enzima, cada molécula de éste trabaja a destajo, generalmente varios cientos de veces por segundo y, al parecer, sin cansarse. Esta presunción está siendo confirmada en mi laboratorio por un experimento crítico; resultados preliminares indican que los enzimas, aunque como proteínas en solución no son inmortales, como catalizadores son realmente infatigables (6).

### **Especificidad... y afinidad**

Si la actividad de la generalidad de los enzimas es impresionante, la selectiva especificidad de muchos de ellos es verdaderamente admirable. Arthur Kornberg, el pionero de la enzimología del DNA, en un reciente ensayo en homenaje a Severo Ochoa titulado «For the love of enzymes» cuenta la revelación que fueron para él «the feats of enzymes... enzymes of astonishing specificity and catalytic potency».

Cada enzima es capaz de realizar una acción elemental de entre un abanico de posibilidades más bien modesto: carboxilar, isomerizar, hidrolizar, deshidrogenar, transferir grupos (amino, fosfato, metilo...) y pocos más. Es decir que, aunque los enzimas son muy eficaces, no tienen nada de polifacéticos. La gran complejidad química de la vida es la consecuencia de la acción de un gran número de enzimas, cada uno actuando sobre el producto de uno anterior. La especificidad de acción de los enzimas es virtualmente absoluta (unas pocas aparentes excepciones han sido recientemente identificadas como enzimas de dos cabe-

zas: algo así como hermanos siameses, sólo que procedentes de fusión de dos genes en vez de separación incompleta de dos gemelos univitelinos).

¿Sobre quién —qué molécula o moléculas concretas— puede materializarse la capacidad de acción de un enzima? Es lo que se llama su *especificidad de sustrato*. El que la selectividad en materia de sustrato sea precisamente grande o pequeña tiene gran valor biológico: los enzimas metabólicos —que son la mayoría— son muy específicos, lo que hace posible la coexistencia funcional sin interferencias de cientos de enzimas en un compartimiento intracelular en el que cada enzima va a lo suyo sin meterse con ninguno de los múltiples prójimos (los metabolitos sustratos de los otros enzimas). En cambio los enzimas digestivos (extra o intracelulares: lisosomas) son convenientemente poco selectivos, con lo que una numéricamente modesta batería de enzimas es capaz de digerir casi todo lo que le echen (7). La especificidad de los enzimas metabólicos es producto de la selección natural que favorece a los que, por estorbar menos, permiten una mejor economía celular. Por ello pueden algunos actuar fácilmente sobre ciertos análogos del sustrato fisiológico que nunca —o raramente— tuvieron ocasión de encontrar *in vivo*. Lo que implica que si la mayoría de los enzimas parecen muy específicos *in vitro*, en la práctica todavía lo son más *in vivo*. En cualquier caso, cuánto de específicos pueden ser o no ser depende en parte del tamaño del sustrato fisiológico, que puede variar tan ampliamente como de 2 daltones ( $H_2$ ) a cientos de millones de daltones (glucógeno); naturalmente, la posibilidad de cambios tolerables es pequeña para los sustratos muy pequeños y grande para los sustratos muy grandes. Es en los metabolitos intermediarios en el rango de cientos de daltones donde la selección biológica sobre la especificidad de los enzimas ha tenido el más amplio margen de operación.

Donde la especificidad de sustrato de los enzimas se hace más llamativa, en contraste con los catalizadores inorgánicos, es en el campo de los estereoisómeros y anómeros de un compuesto dado. Para el mundo tridimensional de los sitios activos de los enzimas, la estereoespecificidad es simplemente natural, ya que cada estereoisómero tiene una configuración en el espacio netamente distinta (8). Y básicamente lo mismo vale para la especificidad anomérica en los casos donde es aplicable, aunque aquí la gran selectividad esté enmascarada por la espontáneamente rápida interconversión entre los anómeros (9).

Un caso muy interesante de especificidad en acción en la vida real, en todas las células, es lo que podría llamarse la «compartimentación química» en oxidorreducción, por especificidad selectiva de los enzimas dependientes de piridinnucleótido precisamente para una de dos opciones: el NAD o el NADP. Esta rigurosa selectividad permite la coexistencia funcional independiente, en un compartimiento físico como es el citoplasma, de vías catabólicas oxidativas con vías anabólicas reductivas. Y no menos interesante es la excepción de la glutamato deshidrogenasa, que capacita a este enzima para jugar un decisivo papel ambivalente en el catabolismo nitrogenado en los animales superiores.

Los enzimas suelen alcanzar sus enormes velocidades máximas a concentraciones moderadas de sustrato, en contraste con los catalizadores inorgánicos. Esto completa la posibilidad de su gran eficacia en las células, donde las concentraciones de los metabolitos sustratos de los enzimas no pueden ser altas por la sencilla razón de que no cabrían todos. La cinética de saturación de los enzimas tiende a ser hiperbólica, aunque hay importantes desviaciones sigmoides de las que se hablará en la sección siguiente, siendo el valor de concentración correspondiente a la mitad de la velocidad máxima (constante de Michaelis,  $K_m$ , o su análogo para las cinéticas sigmoides,  $S_{0.5}$ ) un parámetro fundamental de cada enzima. La  $K_m$  (o  $S_{0.5}$ ) es generalmente un reflejo del inverso de la *afinidad* del enzima por el sustrato. Por los valores de  $K_m$  para el sustrato fisiológico, los enzimas pueden agruparse en tres niveles: de  $K_m$  altas ( $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  M), medianas ( $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  M) y bajas ( $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M), que corresponden respectivamente a afinidades pequeñas, medianas y grandes. Pero no hay enzimas de  $K_m$  «buenas» y «malas»: cuando se examina el contexto biológico en que actúa cada enzima acaba encontrándose que todas las  $K_m$  fisiológicas son buenas ya que concretamente corresponden a las afinidades más convenientes para una buena economía celular. Si en actividad molecular de los enzimas la selección natural tiende a favorecer siempre la mayor, en materia de afinidad por el sustrato tiende a favorecer la mejor, que a veces debe ser precisamente pequeña o justamente mediana (como por ejemplo la glucokinasa del hígado, con  $K_m$  para la glucosa mucho más alta que la hexokinasa, aunque es más específica que ésta). También aquí cabe hablar en cierta manera, de «compartimientos de afinidad», como por ejemplo en el contraste entre los enzimas que movilizan los aminoácidos

para la biosíntesis de proteínas, con afinidades más bien grandes ( $K_m$  alrededor de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M) que les permiten estar saturados a concentraciones fisiológicamente bajas de sus sustratos, y los enzimas que inician el catabolismo de los aminoácidos como fuentes de energía, que típicamente tienen afinidades pequeñas ( $K_m$   $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  M), lo que les mantiene como en reserva para actuar significativamente sólo cuando tiende a sobrar el aminoácido correspondiente, pero sin competir prácticamente con la más vital síntesis de proteínas mientras ese aminoácido escasee.

La afinidad de ciertos enzimas por sus sustratos es tan grande que parece como si fuesen capaces de cazarlos al vuelo. Pues bien, en cierta manera lo hacen. Cuando hay una buena complementariedad estructural entre sitio activo y sustrato, la contribución de múltiples puntos ligantes da lugar a una fuerza de atracción orientada que permite multiplicar el número de encuentros eficaces. Como analogía puede decirse que así como los gatos tienden a caer siempre de pie, también las moléculas de sustrato cuando se acercan a un sitio activo de un enzima tienden a llegar al mismo precisamente en la orientación conveniente. Podría decirse que si para la formación del complejo enzima-sustrato el movimiento térmico de las moléculas es la base, la afinidad del enzima por el sustrato es un complemento, y a veces muy importante.

En las encrucijadas metabólicas de la célula la velocidad máxima (cantidad de enzima  $\times$  actividad molecular a saturación) y la afinidad pueden contribuir por igual al reparto entre las varias opciones, dada la general escasez de los metabolitos. Análogamente, si un enzima se encuentra con una mezcla de sustratos, repartirá su actividad entre ellos por integración de la actividad máxima y la afinidad para cada uno de ellos. Yo he introducido el concepto de coeficiente de eficacia ( $V_{max}/K_m$ ), como se ilustra en la siguiente tabla sobre la hexokinasa de cerebro (Sols y Crane):

	$V_{max}$ relativa	$K_m$ (mM)	Coficiente de eficacia relativo
Glucosa .....	"1"	0,01	"1"
Fructosa .....	1,5	1,6	0,009
Manoheptulosa .....	0,015	0,05	0,003
1,5-Anhidroglucitol .....	1	30	0,0003

Este enfoque muestra que, en caso de competencia o escasez, la glucosa es mejor sustrato que la fructosa y la

manoheptulosa mejor que el 1,5-anhidroglucitol, pese a que las velocidades máximas sugieren lo contrario.

### **La tercera dimensión en enzimología: los efectos alostéricos**

Al final de la década de los cincuenta se descubrió una auténtica tercera dimensión en enzimología: que algunos enzimas son, además de actores, receptores de señales. Hay mecanismos de control de la actividad de los enzimas potencialmente capaces de dar cuenta de la maravillosa regularidad y eficacia global del funcionamiento de los seres vivos a nivel molecular. Volviendo al símil de la ciudad convertida en célula, imagínese una gran ciudad con calles, avenidas, puentes y túneles para un millón de coches, pero sin sistemas de control de tráfico. Si a la gran ciudad se le suprimieran todos los controles de tráfico, desde el circular por la derecha hasta los semáforos, habría un caos circulatorio más que impresionante, ya que sería absolutamente catastrófico. Pues en las células hay muchos millones de moléculas de enzimas de más de mil clases distintas y las células funcionan admirablemente (¡mucho mejor que el tráfico de nuestras grandes ciudades!).

El mecanismo regulador crucial es el llamado alosterismo. Muchos enzimas, virtualmente todos los que son clave o «marcadores de paso» de vías metabólicas, son enzimas «alostéricos» (Monod et al.), capaces de responder con cambios cuantitativos de actividad a señales químicas del medio. Esto puede implicar dos grados distintos de elaboración. El más simple es la cooperatividad positiva entre múltiples sitios iguales en enzimas oligoméricos que da lugar a las cinéticas sigmoides que multiplican la sensibilidad a cambios en la concentración de un sustrato. Más complejo y mucho más trascendental es el hecho de que muchos enzimas tienen sitios ligantes, distintos de los sitios activos, específicos para ciertos metabolitos capaces de complejarse con el enzima cambiando su conformación y modificando con ello su actividad. Estos enzimas, exquisito producto de la evolución, pueden así actuar como transductores químicos; como decíamos antes, son a la vez actores y receptores.

El efecto alostérico inducido por la formación del complejo enzima-efector puede ser activador o inhibidor, y actuar sobre la actividad molecular, la afinidad, o ambas a la vez. Un enzima regulador puede tener uno o varios sitios alostéricos distintos, siendo capaz, en el último caso, de efectuar una auténtica integración de señales de tenden-

cias convergentes o antagónicas. Un ejemplo sencillo es la inhibición no competitiva de la aspartil transcaramilasa —primer enzima de la vía de la biosíntesis de los pirimidin nucleótidos— por el citidintrifosfato, producto final de la vía. Otro ejemplo sencillo y clásico es la activación de la fosforilasa por el ácido adenilico (AMP), que permite regular la movilización rápida de las reservas de glucógeno. Y un caso complejo bien justificado es la fosfofructokina-sa —enzima clave de la glicolisis— que suele tener cinética sigmoide respecto a su sustrato, el fructosa-6-P, es alostéricamente inhibida por el ATP y el citrato, y activada por el AMP, el  $\text{NH}_4^+$  y el fosfato inorgánico.

La dimensión alostérica abre inmensas posibilidades de regulación metabólica. También aquí parece que hemos tocado fondo. El advenimiento evolutivo de una red de mecanismos alostéricos de regulación fue factor decisivo en el establecimiento del imperio del orden en la economía celular: la eficaz integración metabólica que dio lugar a lo que podríamos llamar la vida refinada, que es la que ha prosperado en nuestro planeta.

El metabolismo celular es una gran red de enzimas actuando en series que conviene agrupar en vías metabólicas entre encrucijadas, siendo cada una de estas vías una unidad funcional con uno o varios mecanismos de regulación. Como ilustración de la división de un largo camino metabólico en varias «vías metabólicas» concretas, cada una con regulación propia y el conjunto integrable en secuencia, puede citarse la interpretación actual del mecanismo del efecto Pasteur, gran enigma pendiente durante varias décadas cuya probable solución ha sido posible ahora tras el advenimiento de «la era alostérica», como resumimos a continuación.

Casi todas las células no verdes usan la glucosa como la principal fuente de energía. La degradación anaerobia —a alcohol y  $\text{CO}_2$  en la levadura o a ácido láctico en los animales— se llama fermentación y libera poca energía. La degradación aerobia hasta  $\text{CO}_2$  y agua se llama oxidación y libera mucha energía. Pues bien, cuando —por disponer de  $\text{O}_2$ — las células pueden oxidar la glucosa, consumen menos de ella, lo que se llama el efecto Pasteur. Parece muy natural; pero el cómo ocurre fue un misterio durante largo tiempo, a lo largo del cual se formularon docenas de hipótesis. Pues bien, nosotros hemos llegado a una teoría coherente que da cuenta del fenómeno a nivel molecular: se trata de la integración secuencial de una serie de mecanismos alostéricos «feedback», actuando a nivel de

una etapa clave en cada una de tres vías metabólicas sucesivas, que de abajo arriba son el ciclo de Krebs, la vía glicolítica común y la vía de la fosforilación de la glucosa (Sols, 1977).

Como final de este capítulo es importante hacer constar que las grandes posibilidades de los efectos alostéricos ya encontrados para ciertos enzimas clave tienen dos importantes reservas: la doble incertidumbre, cualitativa y cuantitativa, sobre si «están todos los que son» —o queda alguno importante, quizá más importante, por descubrir— y si «son todos los que están», es decir, si lo encontrado *in vitro* valdrá realmente *in vivo*, problema este último que empieza a estar en vías de solución como comentaremos a continuación.

## **VOLVIENDO DEL TUBO DE ENSAYO A LA CELULA**

Como ya indicamos, la extracción de los enzimas de las células fue un paso decisivo que hizo posible la identificación y estudio de los enzimas metabólicos. Pese a las críticas de fisiólogos chapados a la antigua, la enzimología debía desarrollarse *in vitro*. Ahora bien, el gran progreso de la misma nos ha llevado no sólo al desentrañamiento inequívoco de las bases moleculares del metabolismo sino a las puertas del conocimiento de las bases moleculares de su regulación. Con lo que se ha actualizado una inquietud largo tiempo latente: ¿hasta qué punto se comportarán los enzimas *in vivo* como vemos que pueden hacerlo *in vitro*? Nuestro laboratorio ha aportado dos abordajes complementarios en esta dirección: la competencia entre sitios ligantes en las células y el abordaje *in situ*, que permite una observación directa de la cinética de los enzimas dentro de las células. Lo que se está consiguiendo ya permite decir que en cierta manera estamos volviendo los enzimas del tubo de ensayo a la célula.

### **Competencia entre sitios ligantes en las células**

El citoplasma celular es una sopa muy espesa en la que los enzimas, lejos de ser meras fuerzas catalíticas, son el componente mayoritario. La concentración de muchos enzimas supera el rango micromolar. Además, la mayoría de los enzimas metabólicos son oligómeros con múltiples sitios ligantes, catalíticos o alostéricos. Y frecuentemente varios enzimas distintos tienen sitios ligantes para el mismo metabolito. Si frente a todo ello se tiene en cuenta que la concentración de la mayoría de los metabolitos en las

células es bastante baja, resulta que la concentración de sitios ligantes puede en ocasiones exceder a la de los metabolitos correspondientes (una especie de enzimología «a través del espejo»: ¡mucho enzima para poco sustrato!). Y entonces ya no cuentan las concentraciones absolutas de metabolitos, sino su distribución entre libres y combinados; y ya no cuentan las afinidades absolutas de los sitios ligantes, sino las relativas según la competencia que reina en el complejo mundo intracelular. Nosotros hemos desarrollado un sistema de evaluación de la distribución de metabolitos en libres y combinados que ha resuelto ya varios problemas de regulación metabólica (Sols y Marco) y puede ayudar a resolver muchos más. Como ejemplo, citaré el caso de la piruvato kinasa del hígado, capaz de regulación alostérica por el fructosadifosfato, para el que tiene una afinidad que parecía demasiado grande, hasta que pusimos de manifiesto que era precisamente la que necesitaba para poder operar fisiológicamente en presencia de dos competidores más potentes, uno por su mucha mayor afinidad (la fructosadifosfatasa) y el otro por su mucha mayor normalidad (la aldolasa). Y como caso extremo es interesante el de los sitios ligantes para el oxalacetato en las mitocondrias del hígado: ¡hay unos cien sitios ligantes —entre cinco enzimas distintos— por cada molécula de oxalacetato!

### **El abordaje *in situ***

El micromundo de cada célula está limitado por una membrana que sólo puede ser atravesada por los nutrientes y productos de desecho, en gran parte por la intervención de sistemas específicos de transporte. En la generalidad de los microorganismos esta membrana celular que limita y controla las entradas y salidas está a su vez envuelta por una pared celular porosa, libremente permeable a moléculas pequeñas. Pues bien, se puede desintegrar la membrana celular —atacando su base lipídica— hasta suprimir la barrera de permeabilidad a micromoléculas, tras lo cual los enzimas intracelulares pueden ser estudiados cinéticamente en su propio ambiente macromolecular. Este es el abordaje *in situ* introducido por nuestro laboratorio y utilizado ya para el estudio de una veintena de enzimas en *E. coli* y levadura. Posteriormente hemos extendido el abordaje a células animales, que no tienen pared celular, fijando las proteínas de la membrana con reactivos bifuncionales («grapadores») para dar lugar a una pared artificial, tras lo cual se puede permeabilizar por deslipida-

ción sin que se desintegren las células. Con este método estamos estudiando enzimas en eritrocitos, leucocitos y células de tumor ascítico.

Después de haber estudiado ya una treintena de enzimas *in situ*, está emergiendo una conclusión general: el comportamiento de los enzimas dentro de las células tiende a ser cualitativamente igual al observable *in vitro*, pero tiende a ser cuantitativamente diferente en los enzimas alostéricos. Por consiguiente, para el estudio de la regulación metabólica a nivel enzimático, es muy importante confirmar o modificar por el abordaje *in situ* los parámetros enzimáticos potencialmente reguladores.

### **Enzimas *in vivo***

El abordaje *in situ* es algo así como la mitad del camino hacia el objetivo final de conocer precisamente el comportamiento de los enzimas *in vivo*. Actualmente hay algunos intentos de sondeo por distintos caminos, cada uno con un rango limitado de posibles aplicaciones. El más usado depende de refinamientos en el uso de marcajes isotópicos específicos que, por ejemplo, han permitido a Lardy y colaboradores en Madison evaluar el ciclo «inútil» del par de enzimas antagónicos fosfofructokinasa-fructosadifosfatasa y su regulación como mecanismo termogénico en el abejorro. Otro camino radicalmente distinto se basa en la aplicación a tejidos de equipos muy complejos de resonancia magnética nuclear, en lo que destaca el trabajo pionero de Rada, en Oxford. Los pocos enzimas con un sustrato muy permeable pueden ser estudiados *in vivo* directamente o mediante acoplamiento a un sistema intracelular capaz de asegurar sus requerimientos coenzimáticos. Y cabe prever que en el futuro se idearán otros abordajes específicos para el estudio de enzimas intracelulares *in vivo*.

Por su ubicación fisiológica, los enzimas pueden clasificarse en intracelulares, segregados y enzimas de la superficie celular, siendo estos últimos enzimas de la membrana celular que actúan sobre sustratos externos. Naturalmente, los enzimas de la superficie celular son fáciles de estudiar en su medio ambiente natural en los microorganismos y células sanguíneas. Y con el tiempo podrán ser estudiados *in vivo* estos enzimas aun en tejidos organizados mediante trucos especiales, como es el caso de la valoración de lactasa intestinal por administración de 3-metil-lactosa y valoración de 3-metilglucosa en orina, que ha sido propuesto

y está siendo desarrollado en nuestro laboratorio (Martínez-Pardo et al.).

## **CUANDO FALTA UN AGENTE: ENZIMOPATOLOGIA**

Los genes y su replicación son muy estables pero no inmutables. Mutación espontánea más selección natural son la gran cantera de la evolución. La evolución actúa a nivel de grandes poblaciones, porque la mayoría de las mutaciones son desfavorables y sus productos son barridos por la competencia. Excepto en el hombre civilizado: sociedad y medicina se esfuerzan —y cada vez lo consiguen más— en procurar la supervivencia de todos, incluso los más débiles. Por eso abundan cada vez más las enfermedades específicamente moleculares. No es sólo que se reconocen cada vez más, sino que están aumentando por falta de selección natural.

### **Disenzimias**

Como los enzimas son los agentes de la vida, la mayor parte de las enfermedades moleculares son precisamente alteración en algún enzima, «disenzimias». Veinticinco años después de la identificación de la primera disenzimia (deficiencia en glucosa-6-fosfatasa como base molecular de la tesarismosis glucogénica, C. Gerty y Carl Cori, 1951) se conocen ya más de un centenar de cuadros patológicos cada uno producido por deficiencia de un enzima concreto. Las deficiencias pueden ser cuantitativas, «anenzimias», o cualitativas, principalmente por «disalosterismos». Y como ninguno de los varios miles de enzimas que tenemos es inmune contra la mutación desfavorable de su estructura o síntesis, el número potencial de disenzimias distintas es enorme, salvo la limitación práctica de que algunos enzimas son tan esenciales para la vida que una deficiencia severa de los mismos da lugar a organismos no viables, probablemente la causa de la mayoría de los abortos espontáneos. Pero aun salvada esta limitación, el número de disenzimias posibles —entre cuantitativas y cualitativas— es muy grande.

### **Perspectivas terapéuticas**

La identificación de un número creciente de enfermedades como disenzimias es más satisfactoria intelectual que prácticamente, ya que como la mayoría de los enzimas son intracelulares, en principio no cabe terapéutica sustitutiva.

No obstante, el saber exactamente qué es lo que falla es un gran paso hacia un eventual remedio. Remedios que en principio pueden venir por uno de los siguientes tres caminos: sortear, suplir o reemplazar.

*Sortear* las consecuencias de una disenzimia se ha conseguido ya en varios casos de enzimas dispensables. El primer caso que se resolvió es muy ilustrativo: la galactosemia, una enfermedad congénita severa que depende de la deficiencia en un enzima intermedio en la utilización de la galactosa, azúcar abundante en la leche (en forma de lactosa), dando lugar a una síntesis tóxica si se toma ésta. Suprimiendo la leche de la dieta se evitan completamente los trastornos de la enfermedad, aunque no se «cure». Y como el diagnóstico molecular puede hacerse fácilmente en una gota de sangre del cordón umbilical, el infante deficiente puede ser eficazmente protegido antes de «enfermar» por ingestión de un alimento que para él es tóxico por su disenzimia. Una situación intermedia, también clásica, es la fenilcetonuria, dependiente de la deficiencia congénita en el enzima clave en el catabolismo del aminoácido fenilalanina. Aquí no se puede suprimir la fenilalanina de la dieta porque es un aminoácido esencial —no sintetizable por el hombre—, indispensable para la biosíntesis de proteínas. Pero reduciendo su aporte en la dieta para poder cubrir los requerimientos sin sobrante importante que resulte tóxico, se puede conseguir un desarrollo normal.

*Suplir* un enzima deficiente por enzimoterapia sustitutiva es fácil para enzimas extracelulares, pero parecía virtualmente imposible para los intracelulares. Sin embargo, el emergente complejo mundo de la membranología está imponiendo revisiones drásticas de conceptos. Las membranas celulares son entidades dinámicas que pueden mediar importantes trasiegos incluso de macromoléculas, por «endocitosis» o «exocitosis». Pues bien, muy recientes investigaciones han puesto de manifiesto que algunos enzimas lisosomales administrados parenteralmente son captados por el hígado y algunas otras células en el curso de pocos minutos. Esto quiere decir que las docenas de enzimas lisosomales (cuyas deficiencias individuales son la causa concreta de otras tantas enfermedades moleculares) son ya, en principio, accesibles a terapéutica sustitutiva, lo que de hecho se está ya ensayando con resultados esperanzadores en algunas de las lipidosis más graves. Y más en general, las relaciones dinámicas entre membrana celular y lisosomas abren posibilidades de «terapéu-

ticas lisosomotropas» como capítulo de grandes perspectivas próximas en ingeniería fenotípica.

*Reemplazar* un gen averiado era hace apenas media docena de años un sueño de pura ciencia ficción. Pero ya no lo es. En la década de los setenta, la nueva tecnología del DNA recombinante —basada en la sofisticada enzimología del DNA— ha abierto un camino fabuloso que pasa la ingeniería genética de la ciencia ficción al futuro previsible... ¡Y a no muy largo plazo! El camino práctico de la ingeniería genética en el hombre podrá aún estar erizado de dificultades pero, en principio, ya es abordable. Por consiguiente, es muy interesante investigar en esta dirección puesto que ya sabemos que el problema, aunque puede ser muy difícil, es soluble en principio. Y con la posibilidad de solución radical de muchas enfermedades moleculares, el fantástico progreso de la biología molecular abre esperanzas de neutralizar —al menos en parte— la suspensión de la selección natural en la especie humana, introducida por la Medicina con beneficio del hombre enfermo pero a expensas de la calidad de la especie.

Y aún más fascinante que las perspectivas de posibles reemplazos de genes-enzimas averiados, la introducción aditiva de un gen está abriendo la puerta para una evolución artificial, auténtica revolución teórica que puede tener resultados enormemente provechosos. Un caso ya sobre el tapete es el de los intentos de incorporar los genes *nif*, que codifican los enzimas para la fijación de nitrógeno en ciertas bacterias, a la dotación genética de algunos cereales. Si se consigue, podría resolverse de raíz el problema de los abonos nitrogenados, fundamental en la encrucijada actual de la humanidad, con población creciente y energía menguante. Los enzimas, agentes de la vida conocida, pueden también convertirse en instrumento para una vida mejor (10).

## REFERENCIAS

Hay dos obras fundamentales de consulta sobre los enzimas:

*The Enzymes*, 3.<sup>a</sup> edición, editada por P. D. Boyer, Academic Press, New York. 12 volúmenes, 1970-1975.

*Methods in Enzymology*, serie de volúmenes monográficos editada por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, y publicada por Academic Press. El vol. 1 se publicó en 1955; a fines de 1976 se andaba ya por el vol. 45.

Además cabe recomendar especialmente un excelente compendio, donde se pueden encontrar fácilmente muchos datos (incluso algunos que no se encuentran en las dos grandes obras de consulta citadas):

*Enzyme Handbook*. Th. E. Barman. Springer-Verlag, Berlín. 3 volúmenes (1969-1974).

### Artículos monográficos citados

«Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency». W. J. Albery y J. R. Knowles. *Biochemistry*, 15 (1976), 5631-5640.

- «Role of flexibility in specificity, control and evolution of enzymes». D. E. Koshland, Jr. *FEBS Letters* 62, supplement (1976) E47-E52.
- «In vivo evaluation of intestinal lactase with 3-methylactose». M. Martínez-Pardo, G. M. Montes. M. Martín-Lomas y A. Sols 11th. FEBS Meeting, Copenhagen, 1977.
- «Allosteric proteins and cellular control systems». J. Monod, J. P. Changeux y F. Jacob. *J. Mol. Biol.*, 6 (1963), 306-329.
- «El efecto Pasteur en la era alostérica». A. Sols. En *Avances de la Bioquímica*, ed. por L. Cornudella et al., Salvat Editores, S. A., Barcelona, 1977.
- «Substrate specificity of brain hexokinase». A. Sols y R. K. Crane, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954), 581-595.
- «Primary regulatory enzymes and related proteins». A. Sols y C. Gancedo. En *Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells* (ed. E. Kun y S. Grisolia), págs. 85-114. J. Wiley & Sons, New York, 1972.
- «Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation». A. Sols y R. Marco. En *Current Topics in Cellular Regulation* (ed. B. L. Horecker y E. R. Stadtman), vol. 2, págs. 227-273, Academic Press, New York, 1970.
- «Study of enzyme activity in animal cells in situ». A. Sols, J. E. Feliu y J. J. Aragón. En *Metabolic Interconversions of Enzymes 1975* (ed. S. Shaltiel), págs. 191-197, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1976.

## NOTAS

(1) Los enzimas no tienen sexo en la naturaleza, pero sí un problema gramatical de género en español. Por el origen etimológico quizá debería decirse los enzimos, y cada uno de ellos terminar con el sufijo *-aso*, pero esto último requeriría demasiada marcha atrás para ser viable. Por ello tiene cierto peso el argumento de consistencia en favor de *las* enzimas. En cambio, el uso está más bien a favor de *los* enzimas, sucesores recientes de nuestros tradicionales *los* fermentos. El diccionario de la Academia dice las enzimas y los fermentos (¡y sin referencias cruzadas!).

(2) Este acontecimiento, que abrió las puertas a la bioquímica dinámica, fue conseguido casi por casualidad por un joven químico alemán, Buchner, en una universidad que podríamos llamar de provincias, la de la ciudad de Würzburg. Materiales: levadura de panadería, mortero, arena, filtro y azúcar... y chiripa! («serendipity»?).

(3) Durante uno de los cotidianos e informales «lunchs» en la biblioteca del Departamento de Bioquímica de la Washington University, en San Luis, en los tiempos de los Cori, un becario principiante le preguntó a Carl Cori que dónde podría encontrarse un enzima nuevo (sueño favorito de muchos enzimólogos en ciernes). El profesor Cori se encogió de hombros y contestó: «new enzymes, like oil, are where you find them». Aquello lo presenció yo a comienzos de la década de los cincuenta; veinticinco años más tarde cabe puntualizar que los enzimólogos tenemos ventaja: los enzimas abundan mucho más que el petróleo.

(4) La identificación de los enzimas como proteínas arranca de la observación casual de la cristalización de la ureasa, hecha por el americano Sumner en 1927 cuando en Europa —entonces centro de la ciencia— se daba por seguro que no eran proteínas y quizá ni siquiera entidades materiales reales. El complemento, unos cuarenta años después, fue la elucidación de la estructura primaria de un enzima —la ribonucleasa— y su conformación por síntesis química convencional —muy elaborada, pero convencional— de un enzima química y catalíticamente indistinguible del de origen biológico: un importante golpe de gracia para el vitalismo.

(5) Este hecho, sólidamente establecido, puede visualizarse gráficamente con la analogía de las pulgas en un cajón doble. Imagínese un cajón con dos compartimientos a distinto nivel y separados por un tabique que no llega a la tapa del cajón. Si se pone en uno de los compartimientos un buen número de pulgas, éstas empezarán a saltar y algunas veces caerán en el otro compartimiento, donde a su vez saltarán y a veces volverán al compartimiento de partida. Dando tiempo suficiente se llegará a un equilibrio consistente en un

reparto: muchas pulgas en el compartimiento bajo y pocas —¡pero siempre algunas!— en el alto, con independencia del punto de partida. Y si se repitiese el experimento con una previa bajada del tabique, es intuitivo que se llegaría al mismo equilibrio (que depende sólo del desnivel entre los compartimientos), pero en un tiempo menor. Pues bien, la bajada del tabique en el cajón de las pulgas equivale al descenso de la energía de activación por el que los catalizadores aceleran una reacción sin afectar su equilibrio.

(6) Este experimento, realizado en colaboración con el estudiante de Medicina Alberto Tejedor, consiste en disolver un enzima que cataliza una reacción fácilmente reversible en un medio ambiente próximo al fisiológico y en condiciones asépticas, incubándolo en paralelo sin sustrato, con sustrato saturante y con un análogo estructural complejable pero no transformable, valorando periódicamente el enzima residual. La glucosafosfato isomerasa de levadura, escogida por reunir varias circunstancias que facilitan la realización y el valor crítico del experimento, ha resultado tener en las condiciones adoptadas una vida media a 30° de aproximadamente un mes, con completa independencia de reposo o trabajo, pese a haber transformado en el último caso unos mil millones de moléculas de sustrato por molécula (subunidad) de enzima.

(7) Pero no todo. Aún los enzimas digestivos pueden tener algunos requisitos bastante definidos en materia de especificidad. Este es el caso de las glicosidasas, familia de enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos, en la que en general cada uno reconoce un azúcar glicosídico (el «glicón») y un tipo de enlace: el  $\alpha$  o el  $\beta$ . Pues bien, la generalidad de los animales tienen en el intestino  $\alpha$ -glicosidasas que les permiten aprovechar el almidón y el glucógeno de la dieta, ambos polímeros de la glucosa basados en enlaces  $\alpha$  (con el estadio intermedio de maltosa: O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucosa), y todos los mamíferos tienen  $\beta$ -galactosidasas, que les permite aprovechar la lactosa de la leche (O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucosa). Pero ningún animal tiene una  $\beta$ -glicosidasas (o una  $\beta$ -glicosidasas que fuese indiferente a la orientación del hidróxilo en posición 4 del glicón, que es la única diferencia entre la glucosa y la galactosa), lo que les cierra en principio la puerta para poder aprovechar el producto final mayoritario de la fotosíntesis: la celulosa, polímero de la glucosa basado en enlaces  $\beta$  (con el estadio intermedio de la celobiosa: O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucosa). Es sorprendente que un objetivo tan importante no se haya conseguido por una dificultad al parecer tan pequeña. Sólo algunos animales han sorteado la dificultad albergando en su aparato digestivo microorganismos productores de celulosa.

(8) Ahora bien, el que parezca «natural» que los enzimas sean —cuando ha lugar— estereoespecíficos no quita que el origen de la disimetría molecular de los seres vivos sea una de las incógnitas más difíciles dentro de la gran incógnita global del origen real de la vida: la transición de la presunta «sopa» producto de síntesis prebióticas —que tenía que ser molecularmente racémica— a un mundo vivo en cuyas proteínas intervienen sólo L-aminoácidos y con unos carbohidratos basados en la serie D de los monosacáridos, por citar dos casos sobresalientes y familiares. ¿Llegará algún bioquímico de la generación actual a concebir una hipótesis plausible que pudiera dar la clave del origen de ese mundo de la disimetría molecular en los seres vivos que fue descubierto a mediados del siglo pasado por el gran Pasteur?

(9) Un ejemplo tan obvio como notorio es la especificidad de la glucosa oxidasa que al quitar dos hidrógenos del carbono 1 de la D-glucosa requiere un anómero cíclico, de los que el enzima prefiere la forma piranosa, y una determinada configuración de los sustituyentes del carbono anomérico, de las que el enzima utiliza sólo la  $\beta$ . Por consiguiente, de los diez principales anómeros entre los dos isómeros de una solución de glucosa racémica —el resultado de la síntesis química convencional— la glucosa oxidasa coge sólo uno: la  $\beta$ -D-glucopiranosas. ¡Y eso además de ser completa o virtualmente exclusiva para la glucosa entre la docena larga de azúcares abundantes en la naturaleza!

(10) El manuscrito de este ensayo fue leído críticamente por Gertrudis de la Fuente, Clotilde Estévez, Carlos Asensio y Carlos Gancedo, cuya cordial colaboración agradezco. Sus sugerencias han mejorado este ensayo. Pero como no todas han sido tenidas en cuenta, este testimonio de colaboración no implica responsabilidades con las tesis aquí expuestas.