

## CAPITULO 3. METALOENZIMAS

### 3.1. Introducción.

Hoy en día se conoce que más de la tercera parte de las enzimas estudiadas contienen uno o varios metales con funciones específicas en los procesos metabólicos. De las 4048 estructuras cristalinas de proteínas almacenadas en el "Brookhaven Protein Data Bank" hasta diciembre de 1995, 2123 (el 52 %) contienen metales. Esta cifra no contempla los metales débilmente enlazados a las proteínas /Holm, 1996/. Ya no es posible ignorar la función de los metales al estudiar las enzimas. El papel de los metales en la función enzimática es complejo, donde incide tanto la interacción directa del metal con el sustrato como con el resto de la enzima.

Si se piensa que los catalizadores inorgánicos más eficientes requieren de cientos de grados de temperatura, a veces altas presiones, y ni con ello alcanzan elevadas eficiencias, no cabe la menor duda sobre la perfección de las metaloenzimas. Estos catalizadores naturales realizan su función a 37 °C (310 K) a tal grado de eficiencia que la reacción metabólica ocurre en segundos o fracciones, y donde los reaccionantes (sustratos) pueden ser complejas moléculas de hasta miles de dalton de masa molecular.

Las enzimas pueden estar constituidas solamente por proteínas o, además, requerir de un componente prostético (no-proteico) para poder realizar su función catalítica, denominado **cofactor**. El cofactor puede ser un ion metálico, una molécula orgánica o ambos, esto es, un compuesto de coordinación. La enzima que resulta catalíticamente inactiva sin la asociación del cofactor se denomina **apoenzima**; mientras que en tal caso el cofactor se denomina **coenzima**, si se trata de una molécula orgánica. Ello implica que se utiliza el término coenzima cuando la interacción enzima-cofactor no es fuerte, ocurriendo sólo en el momento del metabolismo.

Cuando el cofactor es un ion metálico pueden presentarse dos situaciones:

- que el metal se encuentre fuertemente retenido por la proteína o coenzima y siempre se encuentren asociados
- que el enlace metálico no sea fuerte, con un alto grado de disociación, sólo formándose el enlace en el momento de cumplir la enzima con su función catalítica

La diferencia entre uno y otro tipo de enzima, por lo tanto, estriba en el orden de estabilidad del enlace metálico. Se ha cuantificado que el límite entre uno y otro tipo de enzima corresponde a un valor de constante de estabilidad de  $10^7 - 10^8$ . En este sentido es necesario aclarar que no existe ninguna correlación entre la estabilidad del enlace metálico y la actividad de la enzima. Al primer tipo se le denomina **metaloenzima**, mientras que al segundo tipo se le denomina **enzima metaloactivada**.

La estabilidad de una metaloenzima puede llegar a ser en extremo elevada. Así, por ejemplo, la RNA polimerasa de la E. coli solamente intercambia el cinc(II) presente en su centro activo cuando se desnaturaliza la proteína. Lo más llamativo de este ejemplo es que se trata de un metal que no se caracteriza precisamente por la alta estabilidad de sus enlaces coordinados al ser nula la EECC.

Los metales divalentes son los que fundamentalmente se asocian a las proteínas para formar una enzima, como es el caso de: Mg(II), Ca(II), Zn(II), Mn(II), Co(II), Fe(II), Cu(II), etc. También se conocen enzimas que contienen a metales monovalentes y trivalentes, como son: Cu(I), Fe(III), Co(III), Mn(III).

De acuerdo con la naturaleza química del grupo prostético, las metaloenzimas pueden clasificarse en /Bowen,1966/:

- metaloproteínas
- metaloporfirinas
- metaloflavinas

Según el tipo de reacción química en que intervienen, las enzimas se pueden clasificar en:

- oxidoreductasas, cuando catalizan procesos redox.
- transferasas, para transferencia de grupos.
- hidrolasas, en reacciones hidrolíticas.
- liasas, cuando ocurre la adición o remoción de grupos en dobles enlaces.
- isomerasas, en isomerizaciones.
- ligasas o sintetasas, en reacciones de condensación entre dos moléculas mediante la ruptura de enlace de fosfato.

El papel determinante del metal en la enzima está relacionado con:

- los efectos estructurales que ejercen los enlaces del metal
- los efectos electrónicos que provoca el metal enlazado

Estos aspectos se encuentran íntimamente relacionados entre sí y dan lugar a una sustancial disminución de la energía de activación y, por ende, es lo que permite la función catalítica de la enzima. Esta condición electrónico - estructural del metal en el centro activo de la enzima, que reduce la energía de activación, se denomina **estado entático** /Vallee, 1968/. Este término proviene del griego “entasis”, que significa “bajo tensión” y de ello precisamente se trata, de que el sustrato fijado en el centro activo de la metaloenzima se encuentre tensionado. Este estado entático no tiene símil directo en los complejos sintéticos considerados modelos de las diferentes metaloenzimas. Por ello, es de suponer que en el estado entático están involucradas también las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas y la influencia mutua con las características químicas del metal.

Los factores electrónico - estructurales de las enzimas se logran gracias a la conjugación de una y otra característica, tanto del metal como de la proteína. Ello permite definir la alta selectividad de cada enzima. Ahora bien, es necesario aclarar que las variaciones estructurales que manifiesta una enzima en su acción catalítica son bien pequeñas, porque sino implicarían un gran consumo de energía. Por esta razón, es que hasta el presente estas variaciones estructurales no han podido ser determinadas experimentalmente.

### **Centro activo.**

Para un análisis, aunque sea somero, de las características electrónico - estructurales de las metaloenzimas es necesario comenzar por el centro activo, donde se encuentra enlazado el metal. El metal se puede encontrar enlazado únicamente a la proteína, como es el caso de las metaloproteínas, o también a otras moléculas, como en las porfirinoenzimas y flavinoenzimas. El metal se enlaza a la proteína a través de los aminoácidos que presentan grupos donantes no comprometidos en el enlace peptídico y que presenten un acentuado carácter básico. Tal es el caso del anillo imidazólico de la histidina, el grupo tiol de la cisteína y de los segundos grupos carboxilatos de los ácidos glutámico y aspártico. Estos cuatro aminoácidos: histidina (His), cisteína (Cys), ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp) resultan fundamentales en la fijación del ion metálico en el centro activo (ver Tabla 3.1). En algunas enzimas, el metal se puede encontrar enlazado también al agua y al grupo tioéter de la metionina.

La His y la Cys son los aminoácidos que forman los complejos más estables con los metales de la primera serie de transición. En las proteínas estos aminoácidos se coordinan de forma

monodentada y de alguna forma retienen fuertemente al ion metálico. La capacidad de coordinación del segundo grupo carboxilato de Glu y Asp resulta significativamente menor y tiene un carácter mucho más electrostático, sobre todo en la interacción con metales duros.

Tabla 3.1. Esferas de coordinación de metales en los centros activos de algunas metaloenzimas.

Enzima	Esfera de coordinación	Referencia
MnSOD	$Mn(His)_3(Asp)(H_2O)$	Norris, 1986
Rubredoxina	$Fe(Cys)_4$	Watenpaugh, 1980
Miohemeritina	$(His)_2(N_3)Fe(\mu-Glu)(Asp)Fe(His)_3$	Sheriff, 1987
CuZnSOD	$(His)_3Cu(\mu-His)Zn(His)_2(Asp)$	Tainer, 1983
Hemocianina	$(His)_3Cu...Cu(His)_3$	Gaykema, 1985
Azurina	$Cu(His)_2(Cys)(Met)(peptido)$	Norris, 1986
Anhidrasa carbónica	$Zn(His)_2(H_2O)$	Kannan, 1975
Carboxipeptidasa A	$Zn(His)_2(Glu)(H_2O)$	Rees, 1983
Carbonato deshidratasa	$Zn(His)_3(H_2O)$	Kannan, 1972

La coordinación a través del grupo tiolato de la Cys tiene la característica de ser  $\pi$ -aceptora y, por ello, favorecer la reducción del metal. Esa es la razón por la cual la presencia de este aminoácido en el centro activo esta asociado a las propiedades redox de la metaloenzima.

Los grupos carboxilatos pueden coordinarse de forma mono- o bidentada, aunque en la mayoría de los casos conocidos se comporta como monodentado. Además de la coordinación directa al metal, el grupo carboxilato en cadena lateral forma interacciones electrostáticas a distancia, tanto con el metal como con otros grupos polares mediante puentes de hidrógeno, los cuales pueden alcanzar una gran fortaleza. Así, por ejemplo, el puente de hidrógeno carboxilato - histidina es tan fuerte que coexiste con la asociación carboxílico - histidinato.

El agua también puede encontrarse coordinada al metal en el centro activo. Ello es relativamente frecuente en el caso de metaloenzimas involucradas en transferencia protónica. La acción polarizante del metal sobre la molécula de agua coordinada acentúa la labilidad de un protón, favoreciendo su transferencia. La formación de puentes de hidrógeno de grupos carboxilato con agua coordinada favorece aun más este proceso de transferencia protónica. El átomo de oxígeno involucrado en el enlace peptídico puede participar en la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con el metal. Esto es lo que explica el que los compuestos de coordinación sintetizados con péptidos, así como las propias proteínas, aumenten su solubilidad en agua al adicionárseles una sal.

La conformación terciaria y cuaternaria de proteína queda definida por la coordinación del metal en el centro activo y por las interacciones a distancia, electrostáticas o por puentes de hidrógeno, tanto metal - proteína como proteína - proteína. Esto le confiere a la proteína una cierta rigidez, aunque con zonas de mayor flexibilidad. En el centro activo esta "rigidez" puede ser más acentuada. Esta característica es la que le confiere a la coordinación del metal una acentuada estabilidad. Esta estabilidad adicional provocada por la **rigidez matricial** de la proteína en el centro activo por la coordinación de un metal a una proteína pudiera resultar similar al efecto macrocíclico visto ya en los anillos porfirínicos.

### **Efecto cooperativo.**

Cuando el sustrato se encuentra coordinado al metal en el centro activo las variaciones electrónico - estructurales que tienen lugar se transmiten al resto de la enzima. Esta transmisión de información tiene lugar a través de interacciones a distancia. Este fenómeno se ha denominado **efecto cooperativo**. De esta forma se regula el acceso del sustrato al centro activo, mediante un flujo constante. Esta transmisión de información tiene lugar fundamentalmente a través de los puentes de hidrógeno que forma la proteína.

El efecto cooperativo es esencial en las metaloenzimas constituidas por varias subunidades ya que permite la acción coordinada o cooperada de las diferentes subunidades entre sí. Lamentablemente este fenómeno ha sido esclarecido en sólo unos pocos casos /Pratt, 1986/. La hemoglobina, constituida por cuatro subunidades, probablemente sea el mejor ejemplo donde se ha podido esclarecer el efecto cooperativo, tal y como se describió en el epígrafe 2.2.

### **Estereoselectividad.**

El entorno del centro activo de la enzima, donde generalmente se encuentra ubicado el metal, permite el acceso y reacción de un sólo sustrato, para el cual ha sido diseñada la enzima. El acceso selectivo del sustrato al centro activo de la enzima es controlado fundamentalmente por las proteínas. Este control es tanto sobre el sustrato específico como sobre la selección del extremo del sustrato que debe acercarse al centro activo. Esta estereoselectividad viene definida por las conformaciones de las proteínas constituyentes de la enzima, que determinan las geometrías de los canales de acercamiento del sustrato al centro activo. Las características estéricas de estos canales constituyen la principal restricción estereoselectiva. A su vez, los puentes de hidrógeno que pueden formarse entre la proteína y el sustrato constituyen otro criterio de estereoselectividad.

La conformación de la proteína define la cavidad a través de la cual el sustrato se acerca al centro activo de la enzima. La geometría y dimensión de esta cavidad definen la especificidad del sustrato, como una llave en su cerradura. La geometría del canal de acceso al centro activo se encuentra en estrecha relación con las características específicas de la metaloenzima. Existen casos en que el canal se va estrechando de afuera hacia adentro como, por ejemplo, en la CuZnSOD /Bertini, 1998/. El por qué de esta característica se verá posteriormente al estudiar esta metaloenzima.

### **Hidrofobicidad.**

La hidrofobicidad, como parámetro importante en la definición estructural de la proteína, es de naturaleza entrópica /Jernigan (1994)/.

La definición de la conformación de la proteína da lugar a cavidades con mayor o menor hidrofobicidad. La geometría e hidrofobicidad de estas cavidades o canales pueden variar producto de la coordinación del sustrato al centro activo. Estas pequeñas variaciones en los canales de acceso del sustrato al centro activo constituyen una especie de "transmisión de información" que regula la secuencia de acceso del sustrato.

El sustrato, coordinado en el centro activo, forma una capa hidrofóbica por el efecto de los átomos de carbono presentes. Esta capa hidrofóbica incrementa la estabilidad del complejo al reducir la constante dieléctrica del entorno. Con ello, el acceso y competitividad del agua como ligando se reduce al mínimo.

El centro activo en las metaloenzimas, por su naturaleza, cumple con la condición de manifestar una alta hidrofiliidad. Mientras mayor sea la carga del metal, mayor será el carácter hidrofílico del centro activo /Gregory (1993)/. Esta región hidrofílica se encuentra recubierta por otra de naturaleza hidrofóbica, dada por los átomos de carbono de la proteína. La hidrofobicidad del canal aumenta con la distancia del centro activo. Las variaciones que experimenta el carácter hidrofílico de la metaloenzima a lo largo de los canales, a través de los cuales se introduce el sustrato, sirven de selectores específicos de esta acción.

### **Factor de distorsión.**

Los factores estéricos no sólo tienen importancia en la definición de la estereoselectividad. Entre los factores estéricos resultan de suma importancia los fenómenos de distorsión. La esfera de coordinación generalmente se encuentra distorsionada en las metaloenzimas /Armstrong, 1988/. En el caso del cobre(II) la distorsión se produce producto del efecto Jahn-Teller. En los casos de otros iones metálicos la distorsión es provocada por la asimetría en la esfera de coordinación. La presencia de ligandos diferentes coordinados a un metal y contrapuestos en un mismo eje interactúan entre sí a través del denominado **efecto trans**. Esta asimetría de la esfera de coordinación ejerce un efecto distorsionante sobre el sustrato, acentuado por las interacciones a distancia. Con la distorsión del sustrato se logra un aumento de la reactividad.

El fenómeno de distorsión tiene especial importancia en los procesos de transferencia electrónica. Ello resulta comprensible si se recuerda el mecanismo de esfera externa o proceso túnel en procesos redox de compuestos de coordinación (epígrafe 1.5).

### **Procesos redox.**

El metal en el centro activo de la enzima incide electrónicamente sobre el sustrato al ocurrir la coordinación. De esta forma el metal puede alterar el estado de oxidación del sustrato o debilitar alguno de los enlaces. En los procesos redox el metal transmite tal alteración electrónica sobre el sustrato que puede modificar el estado de oxidación de uno o varios átomos. El metal igualmente se oxida o reduce pero en forma cíclica. De esta forma, la metaloenzima puede continuar ejerciendo su acción redox sobre otras moléculas del sustrato.

Las variaciones electrónicas que pueda provocar el metal sobre un sustrato se encuentran íntimamente relacionadas con la forma en que el metal se encuentre asociado en la enzima. Así, según cuáles sean los átomos donantes de la enzima se pueden favorecer más o menos los procesos redox del metal. Por ejemplo, si el metal se encuentra enlazado a un átomo que se comporte como  $\pi$ -aceptor se verá favorecida su reducción y de esta forma se comportará en el proceso catalítico.

En el caso de los procesos redox debe tenerse en cuenta que la transferencia electrónica puede tener lugar a través de un puente o a distancia mediante el denominado efecto túnel. En el segundo caso, el más común, la distancia entre el metal y el sustrato puede implicar varios cientos de pm. Lógicamente, la velocidad de transferencia electrónica resulta inversamente proporcional a la distancia, con un carácter exponencial /Beratan, 1992/.

Cuando la transferencia electrónica tiene lugar a grandes distancias los fenómenos de distorsión analizados arriba adquieren particular importancia dado que bajo esas condiciones se favorecen las transformaciones estéricas que tienen lugar entre los estados oxidado y reducido. Cuando la transferencia electrónica se realiza a más de 10 Å de distancia el "túnel" se establece mediante orbitales enlazados covalentemente, incluyendo tanto los de los reaccionantes como los del

solvente. La transferencia también puede favorecerse mediante la formación de puentes de hidrógeno.

La transferencia electrónica a distancia más simple ocurre a través de un mecanismo de esfera externa que involucra cambios geométricos e interacciones con el solvente. Este proceso es gobernado por el Principio de Frank – Condon. En esencia, este principio establece que la transferencia electrónica es tan rápida que no ocurren variaciones geométricas en el donante y el aceptor.

La transferencia electrónica, según la Teoría de Marcus, establece un parámetro de reorganización energético,  $\lambda$ , que contiene componentes tanto de esfera interna o externa.  $\lambda$  corresponde a la energía requerida para distorsionar a los reaccionantes para alcanzar la geometría del producto, sin que ocurra transferencia electrónica. Este parámetro aparece en la ecuación de la constante de velocidad de transferencia electrónica:

$$k_{TE} = \nu_n K \exp[-(\lambda + \Delta G^\circ)^2 / 4\lambda RT]$$

donde:  $\nu_n$  es el factor de frecuencia nuclear; y  $K$  es el coeficiente de transmisión. El término  $\lambda + \Delta G^\circ$  permite explicar el por qué la constante de velocidad  $k_{TE}$  aumenta hasta que  $-\Delta G^\circ = \lambda$  y después comienza a disminuir.

Cuando en el proceso de transferencia se encuentran involucrados varios electrones la situación se complica, afectando generalmente la velocidad del proceso. En este caso, el potencial de la reacción general debe ser muy semejante al de cada uno de los pasos unielectrónicos. Esta condición se favorece en complejos polinucleares que posean enlaces metálicos que sean débiles /Schilov, 1988/. La energía de activación en los procesos de transferencia electrónica es de unos 30 J/mol, o sea, 2 - 3 veces menor que en las reacciones inorgánicas. Ello explica la efectividad de la acción catalítica de las metaloenzimas.

Cuando en una misma enzima participa más de un metal o un mismo metal a diferentes estados de oxidación, generalmente cada uno ejerce una acción diferente, estructural o electrónica. Metales como el magnesio o calcio se limitan a ejercer efectos estructurales en las enzimas, tanto sobre las proteínas como sobre el sustrato. Cuando el sustrato se encuentra en el centro activo de la enzima un metal, como los arriba mencionados, puede coordinar al sustrato, fijándole una posición espacial definida que permita que el otro metal presente ejerza la acción redox.

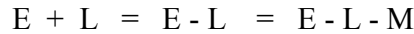
Los metales de transición que se caracterizan por configuraciones electrónicas llenas o semillenas, como por ejemplo el Mn(II)-  $3d^5$  o el Zn(II)-  $3d^{10}$ , forman compuestos de coordinación en que la **energía de estabilización por campo cristalino (EECC)** es nula según la Teoría de Campo Cristalino. Por ello, cualquier transformación configuracional en este tipo de compuestos tiene lugar con un consumo mínimo de energía, con lo cual se favorece cinéticamente la reacción metabólica en la cual participa la metaloenzima.

Mientras mayor sea la covalencia del enlace metal - sustrato, más puede incidir electrónicamente el metal en el reordenamiento electrónico del sustrato. Este reordenamiento electrónico puede llegar a provocar la ruptura de algún enlace específico del sustrato. Por esta razón, aún metales de transición que presenten EECC nulas, pueden jugar un papel electrónico importante en la enzima. Los metales representativos, como el calcio(II) y magnesio(II), por su alta dureza forman enlaces iónicos e inciden poco en la distribución electrónica del sustrato. En tales casos, la naturaleza iónica del enlace metal-sustrato permite un intercambio más rápido, típico de las enzimas metaloactivadas transmisoras de señales.

### **Mecanismos de acción.**

Los mecanismos de acción de las enzimas metálicas pueden clasificarse en tres tipos:

- Interacción del sustrato (ligando) actuando como puente entre la enzima y el metal:



Este tipo de mecanismo presupone un enlace del metal muy débil por lo que corresponde al caso de enzimas metaloactivadas. Así, diferentes quinasas actúan por este mecanismo. Las quinasas realizan la función de liberar un grupo fosfato del ATP, con la consiguiente formación del ADP. Lógicamente, el metal activante en las quinasas es el magnesio(II), calcio(II), o el manganeso(II), que son duros. Los metales alcalino-terreos se enlazan al ATP a través del grupo fosfato, mientras que los metales de transición lo hacen principalmente por las bases nitrogenadas, resultando menos eficientes.

- Interacción a través del metal en puente:



La carboxipeptidasa A se caracteriza por funcionar por un mecanismo de este tipo. Esta enzima presenta en el centro activo al cinc(II) y realiza la función de hidrolizar los péptidos a través del grupo carboxílico terminal. Ello tiene lugar al coordinarse el átomo de oxígeno del grupo carboxílico al cinc(II), con la consiguiente formación del puente E - M - L.

- Interacción a través de la enzima en puente:



Este tipo de mecanismo es característico de enzimas que contienen metales monovalentes. Este mecanismo puede presentar la particularidad de que la enzima forme puente entre L y varios metales, cada uno con una función específica, como es el caso de la acetilCoA sintetasa. Esta enzima requiere de tres metales para su función catalítica.

### **3.2. Enzimas metaloactivadas.**

Dada la relativamente baja estabilidad de las enzimas metaloactivadas respecto a las verdaderas metaloenzimas, las primeras se caracterizan por: una composición variable, la susceptibilidad de su equilibrio de disociación a las condiciones del medio y no cumplir rigurosamente con los criterios cinéticos de Michaelis. Tales características implican que la asociación del metal a la enzima resulta competitiva respecto a otros biometales y bioligandos presentes en el medio. Ahora bien, como los biometales se encuentran asociados en los sistemas biológicos, la coordinación a la enzima implica una previa disociación de otra proteína u otro tipo de bioligando.

El enlace metálico es esencialmente iónico debido a que el metal se caracteriza por ser divalente y altamente electropositivo, como el magnesio(II), calcio(II) y manganeso(II). Esta elevada naturaleza iónica favorece el lábil intercambio metal – proteína mediante un dinámico equilibrio entre la proteína con el metal asociado y su disociación. El magnesio(II) es el ion metálico más común en las enzimas metaloactivadas. El calcio(II), por el contrario, activa a muy pocas enzimas. El manganeso(II), por sus semejanzas con el magnesio(II), actúa muy frecuentemente como activador en el caso de fosfato transferasas y descarboxilasas. El sodio(I) y el potasio(I) también activan algunas enzimas. De este breve análisis resulta lógico esperar que las enzimas metaloactivadas ejerzan su acción mediante procesos no-redox. En la Tabla 3.2 se brindan, a modo de ilustración, algunos ejemplos de enzimas metaloactivadas.

Las enzimas metaloactivadas actúan al asociarse el metal a la proteína, por lo que este proceso constituye el *disparador* de la acción enzimática. Por esta razón, este tipo de enzima se presenta en procesos que no son de carácter permanente. Así, la asociación del metal a la proteína determina el inicio del proceso metabólico, el cual culmina cuando se disocia el metal.

Tabla 3.2. Algunas enzimas metaloactivadas.

Enzima	Fuente	Cofactor
Acetoquinasa	E. coli	Mg(II)
Adenosina fosfoquinasa	Levadura	Mg(II)
ATP asa F	Mitocondria	Mg(II)
Aspartasa	E. coli	Co(II)
Galactoquinasa	Levadura	Mg(II)
Glicilglicin dipeptidasa	Músculo de rata	Co(II)
Fosfatasa alcalina	Leche	Mg(II)
Piruvato quinasa	Músculo	Mg(II)
Oxidasa del ac. pirúvico	Lactobacillus	Mg(II)
Riboquinasa	Hígado	Mg(II)

Debido a sus propias características, las enzimas metaloactivadas son sensibles a ser inhibidas por:

- la presencia de un exceso de otro metal
- la formación de complejos polinucleares, actuando el metal como puente
- la modificación del centro activo por la acción de grupos tioles y otros donantes fuertes y de agentes quelatantes
- la presencia de cationes monovalentes pequeños, tales como:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , etc.
- variaciones del pH del medio.

Para ejemplificar la función de una enzima metaloactivada a continuación se examinará brevemente la ATPasa F, que es la única de las enzimas metaloactivadas, mencionadas en la Tabla 3.1, que ejerce su función catalítica en el organismo humano.

La ATPasa F es una molécula compleja con una alta masa molar de 380 000 Da y tiene la función de catalizar la síntesis del ATP a partir de ADP y fosfato. La forma de esta enzima esta asociada a su complejo mecanismo de acción. El factor F consta de dos dominios:  $F_1$  y  $F_0$  (ver Figura 3.1).  $F_1$  contiene nueve subunidades proteicas unidas entre sí en forma circular como los pétalos de una flor, con 10 nm de ancho y 8 de alto.

Por el dominio  $F_0$  fluyen los protones provocando un torque mecánico que es transmitido a  $F_1$  a través de la subunidad  $\gamma$ , acción en la cual también participa la subunidad  $\epsilon$ . En ésta última subunidad se libera el ATP. La energía libre que provoca el paso de 12 protones por  $F_0$  es suficiente para formar tres moléculas de ATP. Este proceso implica la síntesis de ATP a partir de ADP, por lo que esta enzima se denomina también ATP sintetasa.

En  $F_0$  también se encuentra la subunidad c, consistente de 9 a 12 pares de hélices  $\alpha$  gemelas. La subunidad a consiste de 5 - 7 membranas tipo hélices  $\alpha$  y esta conectada a  $F_1$  mediante las subunidades b y  $\delta$ .



Este proceso es reversible. Así, cuando a esta enzima se asocia el magnesio(II) tiene lugar la reacción inversa, o sea, la hidrólisis del ATP para formar ADP. Cuando ello ocurre, tiene lugar la conversión de energía química en mecánica, y con un 100 % de eficiencia.

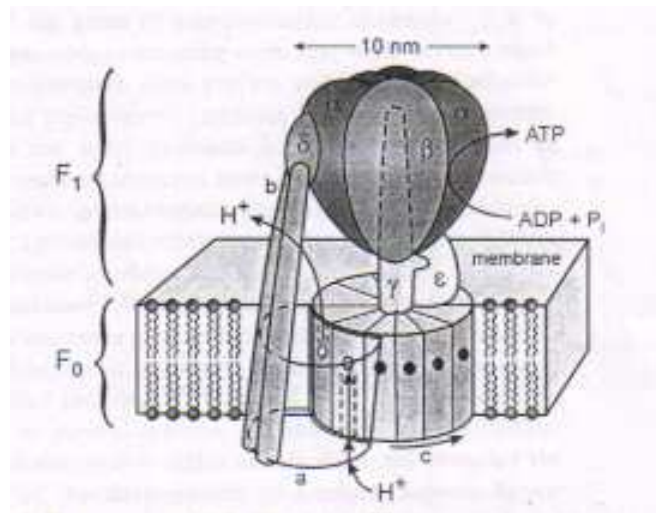


Figura 3.1. Esquema de la ATPasa F

### 3.3. Metaloproteinoenzimas.

En estas enzimas el metal se encuentra enlazado directamente a la proteína. Algunas de las metaloproteínas más importantes son: la superóxido dismutasa, la ribonucleótido reductasa, las proteínas Fe-S, la ceruloplasmina, la tirosina, ácido ascórbico oxidasa, proteasa, pirocatecasa, etc. A modo de ejemplificación, en este epígrafe se describirán las tres primeras enzimas mencionadas.

#### Superóxido dismutasa.

Existen cuatro tipos de superóxido dismutasas (SOD) /Oberley, 1979/:

- CuZnSOD, que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria de las células eucarióticas y el citosol. La eritrocupreina en bovinos es también de este tipo de SOD.
- MnSOD, presente en la matriz de la mitocondria
- MnSOD, presente en la matriz de bacterias, como la E. coli
- FeSOD, presente en el espacio periplasmático de la E. coli

Aquí se prestará atención solamente al primero tipo de SOD. Tanto la CuZnSOD, como la MnSOD, ejercen una función imprescindible para la vida de las células ya que regulan la concentración de los radicales superóxido según:



Se supone que la reacción involucra la reducción de un cobre(II) por un radical superóxido para formar  $\text{O}_2$ , mientras que el segundo radical vuelve a oxidar el cobre(I) a cobre(II) para dar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El peróxido de hidrógeno así formado es posteriormente descompuesto por la catalasa.

La dismutación del radical superóxido se desarrolla muy velozmente, con  $\text{pK} = 9$ . En el intervalo de  $\text{pH} = 4,8 - 9,7$  la velocidad de la reacción es independiente de la concentración hidrogeniónica. Por simple difusión protónica en medio acuoso no se puede alcanzar una concentración hidrogeniónica tal en los entornos del centro activo de la enzima que posibilite que la velocidad de reacción no dependa de este factor. La única forma de interpretar este singular fenómeno es a través de la influencia que pueda ejercer la proteína sobre la difusión protónica a

través de la formación de puentes de hidrógeno. En este mismo sentido también debe influir la Asp-141 (bovina) o Asp-143 (humana), que se encuentra localizada en posiciones muy próximas al cobre(II).

La geometría del canal de acceso al centro activo juega un papel importante en la estereoselectividad del radical superóxido. Se ha podido comprobar que el canal de acceso es de 2400 pm en la superficie de la enzima, estrechándose posteriormente a 1000 pm con una profundidad de 500 pm. Finalmente, en el centro activo el canal se estrecha aun más, hasta menos de 400 pm. Semejante estrechamiento sólo admite el paso de aniones muy pequeños, como el  $\text{CN}^-$  y  $\text{N}_3^-$ .

La Cu,ZnSOD debe cumplir con la condición de favorecer el acceso al centro activo, tanto del sustrato aniónico como de los protones necesarios para la dismutación. Por ello es que en la entrada del canal de acceso del centro activo deben haber residuos de aminoácidos cargados negativa y positivamente. La Arg-141, situada en la medianía del canal de acceso al centro activo y cargada positivamente, atrae al sustrato aniónico hacia el centro activo. Más alejados, se encuentran residuos de Glu, con carga negativa, que orienta el sustrato hacia el canal de acceso y estabiliza dicha abertura.

La CuZnSOD bovina presenta una estructura muy similar a la de otras procedencias y por esta razón ha sido la más ampliamente estudiada. Su estructura se caracteriza porque, tanto el cinc(II) como el cobre(II), se encuentran enlazados a átomos de nitrógeno del imidazol (ver Figura 3.1). En el caso del cobre(II) la coordinación es por los imidazoles de las histidinas 44, 46, 61 y 118. Adicionalmente, este ion metálico se encuentra coordinado a una molécula de agua conformando una estructura de pirámide de base cuadrada. El cinc(II), por su parte, se encuentra coordinado tetraédricamente por los imidazoles de las histidinas 61, 69 y 78, así como por el grupo carboxilato de la asparagina-81. Obsérvese que la histidina-61 participa en la coordinación de ambos iones metálicos y ello es debido a que el grupo imidazol se encuentra desprotonado, formando un puente del tipo:  $\text{Cu(II)-N}^*\text{N-Zn(II)}$ . La His-61 desprotonada puede cumplir la función de suministrar protones ya que al ocurrir la reducción a Cu(I) se rompe dicho enlace, protonándose nuevamente la His-61. Aparentemente, la función del cinc(II) es sólo la de estabilizar la estructura de la proteína /Valentine, 1985; Hart, 1999/.

Unidades de este tipo, en que la proteína se enlaza según la forma descrita al cobre(II) y al cinc(II), existen dos en la enzima. Ambas unidades se atraen lipofílicamente.

Se recomienda la revisión de Bertini (1990) para informaciones sobre las características espectroscópicas de la CuZnSOD, y las de Ellerby (1996) y Bertini (1998) sobre el mecanismo de acción. En los tumores, el contenido de CuZnSOD disminuye y el MnSOD desaparece totalmente, salvo en el caso de la neuroblastoma, en que la variación no es tan drástica /Valentine, 1985/. Esta disminución de la actividad de la SOD favorece la proliferación de radicales libres y, con ello, el desarrollo del tumor.

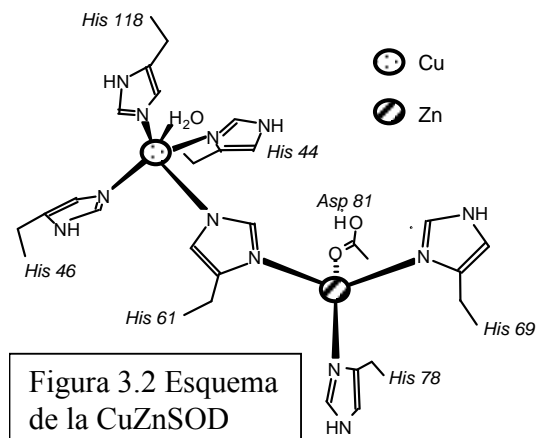


Figura 3.2 Esquema de la CuZnSOD

El radical superóxido, por su alta reactividad, resulta perjudicial para el desarrollo celular ya que puede dar lugar a diferentes tipos de procesos, tales como:

- autooxidación
- peroxidación celular
- envejecimiento celular
- otros procesos patológicos

Cualquiera de estas vías de acción puede producir serias alteraciones metabólicas en las células. De ahí, la importancia de la acción protectora de la SOD.

Se ha podido comprobar que la longevidad de las diferentes especies animales se encuentra en relación directa con el contenido de SOD de cada especie.

### **Ribonucleótido reductasa.**

La ribonucleótido reductasa (RNR) o ribonucleótido difosfato reductasa realiza la función de catalizar la síntesis de los desoxiribonucleótidos precursores del DNA y, como tal, su actividad es esencial en la respiración celular y la síntesis del DNA /Moore, 1984/. La actividad de la RNR es ciclodependiente, siendo mayor en el paso G - S y menor en la mitosis. La RNR esta presente, tanto en animales como en las plantas.

Esta enzima esta constituida por dos unidades proteicas no-idénticas, requeridas ambas para la actividad enzimática. En su centro activo, la RNR presenta al hierro(II). Se ha comprobado que sustancias que se comportan como ligandos quelatos, tales como: hidrourea, pirazoloimidazol, tiosemicarbazonas, etc. inhiben a la RNR al bloquear el centro activo de la enzima, producto de su coordinación al hierro(II) /Moore, 1984/.

### **Proteínas Fe-S.**

Este tipo de proteína puede encontrarse en cualquier forma de vida y se caracteriza por el hecho de que el hierro no se ubica en un anillo porfirínico. Por esta razón, este tipo de enzimas también se denomina proteínas no-hemo. El hierro se encuentra enlazado a átomos de azufre de dos naturalezas diferentes: el azufre lábil o inorgánico de procedencia no totalmente esclarecida, y el azufre sulfhidrilo o tiolato de la cisteína. El azufre lábil toma la denominación de la propiedad que presenta de liberarse en forma de sulfuro de hidrógeno ante la presencia de ácidos. A través del grupo tiol es que el hierro se enlaza a la proteína.

El número de átomos de hierro constituyentes no es superior a ocho. Cuando hay mas de un átomo de hierro se forma un cúmulo (cluster).

Este tipo de enzimas puede realizar dos tipos de funciones:

- procesos redox
- transferencia electrónica en la fotosíntesis, fijación del nitrógeno y respiración mitocondrial.

Las principales proteínas Fe-S son: la rubredoxina, las ferredoxinas y las proteínas de alto potencial. La rubredoxina es la menor proteína Fe-S conocida, con un masa molar de unos 6000 Da y con una composición  $Fe(SR)_4$ , y una coordinación tetraédrica para el hierro. Por su parte, las ferredoxinas de composición  $Fe_4S_4(SR)_4$  presentan una estructura de cúmulo del tipo cubano.

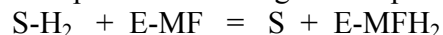
### **3.4. Metalflavoenzimas.**

Las metalflavoenzimas (MF) se caracterizan por contener, como grupo prostético, al flavinmononucleótido o flavinadeninucleótido y un metal. Algunos ejemplos de

metaloflavoenzimas se brindan en la Tabla 3.3. Según el tipo de acción enzimática que ejerzan, las MF pueden ser de dos tipos:

- deshidrogenasas
- oxidasas

Las deshidrogenasas se caracterizan por realizar el siguiente tipo de reacciones:



Las deshidrogenasas presentan muy poca o ninguna tendencia a interactuar, mediante su forma reducida  $-MFH_2$ , con el oxígeno molecular. Las flavinoxidasas reducidas, por el contrario, reaccionan fácilmente con el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno.

Una metaloflavinoenzima interesante lo es la xantin oxidasa. Esta enzima actúa sobre la xantina para generar el ácido úrico y el radical superóxido. Sobre los perjuicios que provoca en la célula la presencia de este reactivísimo radical ya se trató en el epígrafe anterior. El ácido úrico ejerce un efecto positivo debido a su acción antioxidante /Florence, 1983/.

Cada molécula de xantin oxidasa contiene de uno a dos átomos de molibdeno y de cuatro a ocho átomos de hierro, en dependencia de su procedencia. El molibdeno se encuentra presente al estado de oxidación 6+, reduciéndose a 4+ en el proceso enzimático, con la formación de un intermediario al estado de oxidación 5+.

Tabla 3.3. Características de algunas metaloflavinoenzimas

Metaloflavinoenzima	Masa molar (Da)	Metal
Succinato deshidrogenasa	100 000	Fe
Glicerín-3-fosfato deshidrogenasa	---	Fe
Xantin oxidasa	300 000	Fe, Mo
Aldehído oxidasa	280 000	Fe, Mo
Dihidrorotato oxidasa	115 000	Fe

### 3.5. Metaloporfirinoenzimas.

La mayoría de las metaloporfirinoenzimas conocidas presentan grupos prostéticos del tipo de las cobalaminas (transmetilasa del hígado, metilmalonil CoA mutasa), de las cobalamidas (dioldehidrasa, glutámico isomerasa) o del tipo de las protoheminas (citocromo c oxidasa, citocromo c, peroxidasa, catalasa).

Probablemente las metaloporfirinoenzimas sean las más estudiadas estructuralmente y de las de mayor comprensión en cuanto a la naturaleza del enlace metálico.

En la Tabla 3.4 se brinda una relación de algunas metaloporfirinoenzimas. De éstas, quizás la más interesante sea la citocromo c oxidasa, sobre la cual se hará una breve descripción.

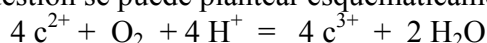
Aunque bastante bien caracterizada estructuralmente, la citocromo c oxidasa ha resultado durante mucho tiempo una enzima enigmática en cuanto a su mecanismo de acción se refiere.

Tabla 3.4. Algunas metaloporfirinoenzimas.

Enzima	Metal	Tipo de porfirina
Transmitilasa del hígado	Co	Cobalamina
Metilmalonil CoA mutasa	Co	Cobalamina

Diolhidrasa	Co	Cobalamina
Glutámico isomerasa	Co	Cobalamina
Citocromo oxidasa	Cu, Fe	Protohemina
Citocromo c	Fe	Hemina c
Peroxidasa	Fe	Protohemina
Catalasa	Fe	Protohemina

La singularidad de la citocromo c oxidasa comienza por el hecho de que en la reacción en que participa, las especies transportadas, el protón y los sustratos, no intercambian masa sino energía solamente. La reacción en cuestión se puede plantear esquemáticamente de la forma siguiente:



donde  $c^{2+}$  y  $c^{3+}$  representan al citocromo c en sus formas reducida y oxidada, respectivamente. Esta constituye la reacción terminal de la cadena respiratoria mitocondrial /Malström, 1990/.

Desde el punto de vista estructural esta enzima también resulta singular. La enzima esta constituida por un máximo de tres unidades, número que varía en dependencia de su procedencia. Las dos primeras subunidades, I y II, resultan las fundamentales en el proceso redox. La subunidad III y las cadenas polipeptídicas cumplen otras funciones no totalmente esclarecidas, probablemente relacionadas con procesos regulatorios.

La enzima presenta cuatro centros redox: los citocromos **a** y **a3**, que contienen moléculas de hemo a, y dos átomos de cobre,  $CuA^{2+}$  y  $CuB^{2+}$ . El  $CuA^{2+}$  se encuentra en la subunidad II, mientras que el  $CuB^{2+}$  aparentemente esta en la subunidad I, junto con los citocromos **a** y **a3**. El  $CuB^{2+}$  presenta características espectroscópicas muy similares a las del cobre en la CuZnSOD. Los grupos hemo no se encuentran enlazados covalentemente a la proteína.

### Bibliografía.

- Amstrong, W. H.(1988) ACS Sym. Ser. 372, 1.  
 Beratan, D. N.; Onuchic, J.N.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. (1992) Science 258, 1740.  
 Bertini, I.; Luchinat, C.; Messori, L. (1988) Pure & Appl. Chem. 60, 1261.  
 Bertini, I; Banci, L.; Piccioli, M. (1990) Coord. Chem. Rev. 100, 67.  
 Bertini, I; Mangani, S.; Viezzoli, M. S. (1998) Adv. Inorg. Chem. 45, 128.  
 Bowen, H. J. M. (1966) "Trace Elements in Biochemistry" Ed. Acad. Press. London.  
 Eichhorn, G. L. (1973) "Inorganic Biochemistry" Ed. Elsevier Sci. Pub. New York  
 Ellerby, L. M.; Cabelli, D. E.; Graden, J. A.; Valentine, J. S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6556.  
 Florence, T. M.(1983) Chem. Aust. 50, 166.  
 Gregory, D. S.; Martin, A. C. R.; Cheetham, J. C.; Rees, A. R. (1993) Protein Eng. 6, 29.  
 Hart, P. J.; Balbirnie, M. M.; Ogihara, N. L.; Nersissian, A. M.; Weiss, M. S.; Valentine, J. S.; Eisenberg, D. (1999) Biochemistry 38, 2167.  
 Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. (1996) Chem. Rev. 96, 2239.  
 Jernigan, R.; Raghunathan, G.; Bahar, I. (1994) Curr. Opinion Struct. Biol. 4, 256.  
 Kannan, K. K.; Nostrand, B.; Fridborg, K.; Lougren,S.; Ohlsson, A.; Petef, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 72, 51

Kannan, K. K.; Liljas, A.; Waara, I.; Bergsten, P. C.; Lövgren, S.; Strandberg, B.; Bengtsson, U.; Carlsson, U.; Fridborg, K.; Järup, L.; Petef, M. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 221.

Linder, M. L. (1983) J. Nutr. Growth Cancer 1, 27.

Malmström, B. G. (1990) Chem. Rev. 90, 1247.

Moore, E. C.; Sartorelli, A. C. (1984) Pharmac. Ther. 24, 439.

Norris, G. E.; Anderson, B. F.; Baker, E. N. (1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 2784.

Oberley, L. W.; Buettner, G. R. (1979) Cancer Res. 39, 1141.

Pratt, J. M. (1986) J. Inorg. Biochem. 28, 145.

Rees, D. C.; Lewis, M.; Lipscomb, W. N. (1983) J. Mol. Biol. 168, 367.

Sheriff, S.; Hendrickson, W. A.; Smith, J. L. (1987) J. Mol. Biol. 197, 273.

Shilov, A. E. (1988) J. Molec. Cat. 47, 351.

Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. (1983) Nature (London) 301, 284.

Valentine, J. S.; Mota de Freitas, D. (1985) J. Chem. Educ. 62, 990.

Vallee, B. L.; Williams, R. J. P. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 498.

Watenpaugh, K. D.; Sieker, L. C.; Jensen, L. H. (1980) J. Mol. Biol. 138, 615.