

LA COMPLEJIDAD DE LAS PROTEÍNAS: RELACIÓN ENTRE ESTABILIDAD, FLEXIBILIDAD Y CATÁLISIS¹

Armando Gómez Puyou.

Introducción

Las proteínas son el producto de la información que está en el genoma de cada individuo. Aunque se ha logrado descifrar el genoma de varios organismos, no deja de impresionar la cantidad de información que se encuentra en una simple secuencia de bases puricas y pirimidicas. En el código está escrito cual debe ser el primer aminoácido de cada proteína, cuáles son los que lo siguen y cual es el final. Esto en si es sorprendente ya que en promedio cada proteína está formada por aproximadamente 200 aminoácidos, y en cada célula existen miles de proteínas diferentes. Además ahora se sabe que cada una de esas proteínas tiene la capacidad para llevar a cabo un trabajo específico. El origen de las proteínas solo se puede explicar por mecanismos evolutivos en los que a través de miles de años de ensayo y error, se formaron y persistieron únicamente aquellas que podían efectuar las reacciones que se requieren para que un organismo sobreviva. Las proteínas que surgieron hace mucho tiempo son las que, con modificaciones relativamente pequeñas, llegaron hasta nuestros días.

A la complejidad del origen de las proteínas se añade el hecho de que en el microcosmos de una célula

constantemente hay destrucción de proteínas, y sin embargo en las células siempre hay una cantidad relativamente constante de proteínas. Esto implica, y de hecho se ha demostrado, que en toda la vida de las células, la síntesis de las proteínas es un proceso constante. En términos muy simples, las células son esencialmente una máquina programada para sintetizar las moléculas que se destruyen. Sin embargo, cuando se quiere entender cómo esos procesos se llevan a cabo, se encuentra que la complejidad del sistema muchas veces rebasa los límites de las imaginaciones más activas. Este capítulo trata sobre las proteínas, que son sólo uno de los muchos tipos de componentes que forman las células del mundo biológico. Principalmente se tratará de describir la complejidad de las proteínas en cuanto a su formación y la de los factores que participan en la expresión de su función.

En esta breve introducción es apropiado señalar que la investigación de las proteínas es uno de los temas de mayor interés en la ciencia contemporánea. Esto se debe principalmente a dos razones. Una, es que en la ciencia no hay nada más atractivo que un campo de importancia en el que existen preguntas que aún no se han podido contestar. La segunda es que se tiene la certeza de que el conocimiento de las fuerzas que operan en la formación y función de las

¹ <http://bq.unam.mx/mensajequimico>. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70243, 04510 México, D. F., México.

proteínas hará posible la fabricación de proteínas con las características que uno desee, o sea que el problema es de importancia económica.

Generalidades

Todas las proteínas del mundo biológico están formadas por los mismos 20 aminoácidos. Esto llama la atención ya que en la evolución las proteínas han adquirido funciones muy diversas. Por ejemplo, algunas han adquirido la capacidad de llevar a cabo procesos contráctiles, otras la de pasar solutos través de una membrana, establecer comunicación entre los distintos componentes de una células, deslizarse o girar una sobre otra, o catalizar reacciones con mecanismos químicos diferentes. La gran diversidad de funciones que las proteínas han adquirido con solo 20 aminoácidos diferentes solo se explica si los aminoácidos que se enlazan a través de uniones peptídicas para formar una proteína determinada, lo hacen en una secuencia u orden específico, la llamada estructura primaria de las proteínas. De hecho, la estructura o el orden en que se colocan los aminoácidos es el fruto de la información que se encuentra en el genoma de cada individuo. Sin embargo, la estructura primaria es solo parte de la historia. Se sabe que la formación de una proteína funcionalmente competente requiere que la cadena polipeptídica se distorsione y así permita la interacción entre dos sitios de la cadena polipeptídica; los sitios pueden estar a distancias de unos cuantos o muchos aminoácidos. Cuando todas las interacciones entre distintos sitios de la proteína se establecen se llega al producto final, una molécula con una estructura tridimensional precisa y funcionalmente competente.

Las interacciones que se establecen entre distintos segmentos de la cadena polipeptídica ocurren principalmente entre

las cadenas laterales de los aminoácidos. Es importante señalar que estas interacciones no son covalentes, aunque en algunas proteínas existen puentes disulfuro que son necesarios para mantener su estructura y función. Las interacciones no covalentes pertenecen a la categoría de uniones débiles - puentes de sal, interacciones tipo van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En términos energéticos todas ellas son órdenes de magnitud menos estables que las uniones covalentes.

En muchas proteínas, la estructura final se forma con una sola cadena de aminoácidos, a este tipo de proteínas se les denomina monoméricas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas existen como oligómeros (1): Estas son el resultado de la interacción entre dos o más cadenas de aminoácidos que tienen alguna estructura tridimensional, y que en un paso posterior a la asociación adquieren la estructura nativa. En la terminología actual, cuando el producto final de la síntesis de proteínas es una proteína formada por dos o más cadenas polipeptídicas, se dice que esa proteína tiene una estructura cuaternaria. Dentro de las proteínas oligoméricas las más comunes son las diméricas, y dentro de éstas las homodiméricas (formadas por dos monómeros idénticos), pero existen proteínas que están formadas por más de 20 monómeros. Independientemente del número de cadenas polipeptídicas que las formen, a las proteínas que llenen una estructura terciaria o cuaternaria definidas y son funcionalmente competentes también se les conoce como proteínas nativas.

Después del genoma

Como se mencionó, la estructura primaria de una proteína es una cadena de aminoácidos enlazados por uniones peptídicas cuya secuencia está determinada por la información que se encuentra en el genoma. Sin embargo, una cadena de aminoácidos que no tiene estructura definida y estable no es una proteína, tal y como existen en todos

los organismos de nuestro mundo. A partir de la formación de la estructura primaria, los pasos que dan lugar a la formación de las estructuras secundarias, terciarias, y cuaternarias son totalmente independientes de la información genética. Esto lo demostró Anfinsen y colaboradores (2) hace ya varias décadas. Los investigadores desnaturalizaron a una enzima (ribonucleasa), o sea que indujeron la pérdida de su estructura terciaria y secundaria. En un segundo paso eliminaron el agente desnaturalizante y observaron que la proteína volvía a adquirir su estructura nativa. El mismo fenómeno se ha visto con muchas otras proteínas. Estas observaciones han llevado a la conclusión de que en la estructura primaria de una proteína existe la información para que las proteínas adquieran una estructura tridimensional precisa y funcional.

El cómo una cadena de aminoácidos adquiere espontáneamente su estructura funcional es uno de los temas de mayor interés actual. Las siguientes observaciones y consideraciones ilustran porque este tema es un verdadero desafío intelectual. Se sabe desde hace muchos años que ciertos agentes como el cloruro de guanidinio o la urea ocasionan desnaturalización de las proteínas. Es decir, cuando las proteínas se exponen a concentraciones altas (molares) de uno de estos agentes, se observa que las proteínas pierden su estructura secundaria, terciaria, o cuaternaria si es que se trata de una enzima oligomérica. Supóngase que la proteína que se desnaturalizó estaba formada por 200 aminoácidos; este número es cercano al promedio de los aminoácidos que forman a las cadenas polipeptídicas de las proteínas. Ahora bien, si el agente desnaturalizante se elimina, es frecuente observar que la proteína adquiere nuevamente su estructura nativa. Lo impresionante y enigmático de la

observación, es que la transición del estado desnaturalizado al nativo muchas veces ocurre en segundos o en fracciones de segundo.

Para entender el fenómeno, algunos investigadores han hecho algunos cálculos. Se ha examinado por ejemplo, si la formación de la estructura nativa a partir de una cadena de aminoácidos es un proceso al azar (3). En esta línea de pensamiento, se supuso que cada uno de los aminoácidos de la cadena polipeptídica visita a todos los otros aminoácidos hasta que finalmente logran establecer las interacciones que se encuentran en la estructura nativa. Bajo estas consideraciones, se calculó que si cada visita tuviera un tiempo de duración de 1 milisegundo, la formación de la proteína nativa tardaría más de 1017 segundos, que es la edad del universo. Ciertamente que la adquisición de la estructura de una proteína no es un proceso al azar. Esto implica que en la secuencia de aminoácidos existe la información para que rápidamente una cadena de aminoácidos se pliegue y se establezcan los cientos de interacciones débiles que se encuentran en la estructura nativa de una proteína. De hecho, muchos investigadores se refieren a los mecanismos que operan en el plegamiento de una proteína como la segunda parte del código genético.

Actualmente se trabaja mucho para entender como es que una cadena de aminoácidos con una secuencia determinada, se pliega rápida y espontáneamente a una estructura tridimensional precisa funcionalmente competente. El trabajo ha empezado a rendir frutos. Ahora gracias al análisis detallado de estructuras cristalográficas de cientos de proteínas y de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos, es posible predecir con relativa seguridad la predisposición de cuando ciertas secuencias de aminoácidos para formar α hélices, hebras β , o asas. De la misma manera existen estudios que señalan cuales porciones de las

proteínas pueden formar arreglos que determinan su capacidad para interactuar con otras proteínas, es decir proteínas oligoméricas (4).

Se espera que lo anterior ilustre que aún hay muchos puntos por entender en el plegamiento de las proteínas. Como se mencionó, el campo en sí es un verdadero desafío. Sin embargo, también es de interés práctico, principalmente para los diseñadores de proteínas. De nada le sirve a esos investigadores conocer cuales son los residuos y en que posición deben estar para que la proteína ejerza determinada función, si la proteína no se pliega a la estructura correcta.

Las proteínas son estructuras dinámicas

La cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear (RMN) en conjunción con la información bioquímica que se ha acumulado a través de muchos años han sido fundamentales en el conocimiento que actualmente se tiene sobre las proteínas. Ahora se conoce la arquitectura atómica del interior y el exterior de muchas de ellas y como ésta se relaciona con su función. Además, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear proporcionan información precisa sobre los átomos que intervienen en la formación del complejo ligando-proteína. Esta información es muy valiosa, y por tanto es muy alentador que en los últimos años el campo de la cristalografía y la resonancia magnética nuclear se hayan desarrollado a un ritmo impresionante. Como resultado, hoy en día en los bancos de datos, se obtiene fácilmente información estructural sobre más de 6.000 proteínas.

Las imágenes cristalográficas y las obtenidas por resonancia magnética nuclear son muy bellas. Además proporcionan datos sobre la posición de cada uno de los átomos de las proteínas

en un espacio tridimensional, y en consecuencia la distancia que hay entre ellos. Esto permite hacer inferencias razonables sobre las interacciones que mantienen la estructura de las proteínas y como los ligandos interactúan con ellas. Lamentablemente, las imágenes pueden dar la idea de que las proteínas son estructuras constantes e invariables. Nada está más lejos de la realidad. En el caso de las enzimas, aún en ausencia de su sustrato, las estructuras vibran y fluctúan constantemente. En algunas de sus regiones, las fluctuaciones son pequeñas, pero en otras, los movimientos pueden ser de varios Å. También se ha documentado que cuando un ligando se une a la proteína, se producen cambios estructurales de la proteína; a veces los cambios son en regiones cercanas al sitio de unión, pero con frecuencia se observa que la unión del ligando ocasiona cambios en lugares distantes. Todo esto indica que las proteínas son estructuras dinámicas. El dinamismo de las proteínas y su contribución a su función se percibe más claramente en las enzimas. Es por esta razón que el resto del capítulo tratará principalmente sobre las enzimas.

Vale la pena señalar que el dinamismo de las enzimas se muestra muy claramente en los trabajos en que se siguió el proceso catalítico en una sola enzima (5). Este y otros datos muestran que el proceso catalítico es una secuencia de reacciones en que cada una se acompaña de movimiento y desplazamiento de distintas partes de la proteína. De hecho, algunos investigadores consideran a la catálisis como una sucesión de microestados que difieren en distintos grados de fluctuaciones locales (6). Los arreglos internos que constantemente ocurren, o aquellos que específicamente se llevan a cabo durante la catálisis solo son posibles si en las proteínas existe cierto grado de flexibilidad. Esto lleva a la consideración de lo que es una enzima funcionalmente competente. Hasta donde se puede ver, para que ejerzan su función, las enzimas deben

poseer cierto grado de flexibilidad, pero al mismo tiempo deben conservar su estructura tridimensional, o sea que las proteínas sean estables.

Una vez que los aminoácidos se han enlazado por medio de uniones peptídicas, la cadena se pliega y adquiere su estructura nativa. Como se mencionó, en el caso de las proteínas oligoméricas, los polipéptidos plegados se asocian unos con otros y forman el oligómero funcionalmente competente. Es necesario señalar que en el plegamiento correcto de las proteínas con frecuencia participan factores externos, como por ejemplo, las chaperonas o chaperoninas, pero en este capítulo este tema no se discutirá. En lo que sí se hace énfasis, es que la transformación de una cadena de aminoácidos desplegada a la estructura nativa, es un proceso termodinámicamente espontáneo. Es decir, una vez que la cadena de aminoácidos se ha formado, su tendencia natural es la adquisición de la estructura nativa, o sea que el cambio de energía libre, ΔG , en la transición de la cadena desplegada a una estructura que es capaz de llevar a cabo una función es negativo.

El valor del ΔG en la reacción proteína desplegada a nativa es de importancia ya que da una idea de la estabilidad de esta última. Se han hecho numerosos estudios para determinar los valores del ΔG del plegamiento de las proteínas (por ejemplo ver ref. 7). Sobre la base de estos estudios, ahora se tiene una idea bastante cercana sobre el ΔG de esta reacción. En general, el cambio de energía libre de la reacción es del orden de unas 10 kcal por mol favorable a la formación de la estructura nativa (8).

¿Que significa un ΔG de 10 kcal por mol? Esto se tiene que evaluar tomando en cuenta la estructura global de las proteínas. A partir de las estructuras

crystalográficas de muchas proteínas en su estado nativo, se ha visto por ejemplo, que una proteína conformada por una cadena polipéptidica de unos 200 aminoácidos, posee varios miles de interacciones débiles, puentes de sal, puentes de hidrógeno, interacciones tipo van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Sobre esta base es tal vez ilustrativo señalar a que pueden ser equivalentes 10 kcal/mol. Por ejemplo, 10 kcal por mol son equivalentes a la energía de formación de unos cuantos puentes de hidrógeno. Estas cifras indican que las proteínas son efectivamente estables, de no ser así, las enzimas catalíticamente competentes no existirían; sin embargo su estabilidad es marginal.

Esta característica de las enzimas muy probablemente está relacionada con su función. De hecho, en este momento es apropiado recordar que en algunas proteínas es muy clara la existencia de factores desestabilizantes. Por ejemplo, algunas proteínas tienen residuos cargados que se localizan en partes hidrofóbicas de las proteínas (9). La presencia de una carga en el interior de un ambiente hidrofóbico es un factor desestabilizante, y sin embargo en varias proteínas se ha demostrado la existencia de tales fuerzas y su conservación a lo largo de la evolución.

A priori, la existencia de factores desestabilizantes en las enzimas parecería una incongruencia. Sin embargo, si se acepta que los procesos catalíticos están íntimamente ligados a la flexibilidad de las enzimas, la existencia de tales factores puede tener sentido. Las enzimas sirven para catalizar, y este proceso se acompaña de muchos arreglos internos. Es decir, en las proteínas se requiere que las interacciones entre sus átomos o residuos no sean muy estables, de otra manera las proteínas no podrían sufrir los arreglos conformacionales que se requieren para su función. Bajo esta línea de pensamiento, algunos investigadores de hecho consideran que para que la enzima

ejerza su función (10) es necesario que exista un balance entre fuerzas estabilizantes y desestabilizantes. Por lo tanto, no es sorprendente que el ΔG de la transición del estado desplegado a nativo sea relativamente pequeño. En este sentido, tal vez vale la pena considerar si así fue como la evolución resolvió el problema de crear una estructura flexible, pero a la vez estable.

Estabilidad, flexibilidad y catálisis

En este momento es conveniente evaluar si las consideraciones anteriores las sustentan observaciones experimentales. Específicamente la pregunta a contestar es si en las enzimas en realidad hay relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. Existen dos líneas de investigación en las que se ha acumulado información pertinente.

Una de éstas versa sobre las propiedades que las enzimas adquieren cuando se colocan en medios de bajo contenido de agua. Como se mencionó, existen muchas pruebas que indican que los procesos catalíticos se acompañan de múltiples cambios conformacionales. Esto obviamente implica que en el curso de la catálisis, muchos de los residuos de la proteína se ocultan o se exponen al solvente. En otras palabras, los arreglos entre el agua y la proteína son parte del proceso catalítico. Esta misma regla se debe aplicar a la flexibilidad proteica; las fluctuaciones o movimientos de las proteínas se acompañan de arreglos entre los residuos de la proteína y el solvente.

Con esta idea, se llevaron a cabo estudios para determinar cómo la cantidad de agua en contacto con una enzima afectaba su capacidad catalítica. Uno de estos estudios lo realizó Garza-Ramos y cols (11). Los investigadores colocaron a la ATPasa mitocondrial dentro de micelas invertidas. Este sistema tiene la ventaja de que la

cantidad de agua en contacto con la enzima se puede ajustar fácilmente. Los investigadores encontraron que entre más bajo era el contenido de agua en contacto con la enzima, menor era su V_{max} . Bajo el concepto de que la catálisis se acompaña de cambios estructurales y ajustes con el solvente, los datos se explican por el hecho de que a bajas cantidades de agua (cerca de una monocapa de moléculas de agua alrededor de la enzimas), los arreglos entre la proteína y el solvente se ven seriamente afectados, y en consecuencia, la velocidad catalítica disminuye.

En el mismo sistema, los autores estudiaron la estabilidad de la enzima. Los resultados fueron dramáticos; se encontró que en ambientes de bajo contenido de agua, la enzima resistía temperaturas de más de 80° C. Los investigadores también observaron que ajustando el contenido de agua del sistema, se podía observar que existe una relación inversa entre la termoestabilidad de la enzima y su capacidad catalítica, vista como V_{max} . Es decir, entre más estable era la enzima, menor era su capacidad catalítica. Estos resultados son los que se esperarían de una estructura en la que su estabilidad está inversamente relacionada con su capacidad para llevar a cabo los cambios conformacionales que son necesarios para la catálisis. Este tipo de estudios también se han hecho en sistemas en los que las enzimas se suspenden directamente en un solvente orgánico apolar (ver revisión en ref 12). También se observó que entre más baja es la cantidad de agua en contacto con la enzima, menor es su capacidad catalítica y mayor es su termoestabilidad.

La relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis también se puede observar cuando se estudia el comportamiento de las enzimas a distintas temperaturas, y en particular cuando se comparan enzimas de organismos mesófilos y termófilos. Los experimentos clásicos en que se mide la actividad enzimática a distintas temperaturas muestran

que el número de recambio de la enzima, la velocidad a la que la enzima convierte a su sustrato en producto K_{cat} , aumenta conforme se eleva la temperatura del sistema. Todas las enzimas muestran este comportamiento, pero además en todas, cuando se llega a una temperatura determinada, la k_{cat} disminuye, y a temperaturas un poco más altas las enzimas dejan de expresar actividad catalítica. En forma gráfica, la curva de temperatura contra la magnitud de la k_{cat} tiene la forma de una campana asimétrica, el ascenso es gradual, mientras que la caída de la actividad es brusca. La temperatura a la que se observa la máxima k_{cat} se conoce como temperatura óptima. Si se considera el dinamismo de las proteínas y su flexibilidad, se puede aceptar que la parte ascendente de la curva refleja un aumento en la flexibilidad de la enzima que es inducido por el aumento gradual de la temperatura.

Cuando se compara la actividad de una enzima que proviene de un organismo mesófilo con la de un termófilo, se obtienen datos interesantes e ilustrativos sobre la relación que existe entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. Como es de esperar, las curvas de actividad enzimática *versus* temperatura de las dos enzimas tienen el mismo perfil, excepto que la curva con la enzima del termófilo se desplaza hacia temperaturas más altas. Es decir, a las temperaturas a las que la enzima mesofílica expresa actividades relativamente altas, la enzima termofílica muestra poca actividad. Sin embargo, en la medida que se incrementa la temperatura del sistema, se llega al punto en que la enzima del mesófilo deja de expresar catálisis, mientras que la del termófilo continúa aumentando hasta que finalmente se llega a una temperatura (aprox. 80o - 85° C en las enzimas termofílicas) en que su actividad catalítica desaparece.

Los trabajos en que se han comparado las k_{cat} a diferentes temperaturas de enzimas que provienen de organismos termofílicos y mesofílicos muestran una característica interesante. A pesar de que las curvas de las enzimas termofílicas están a la derecha de las de los mesófilos, las k_{cat} de las dos enzimas a las temperaturas óptimas son muy similares. En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad catalítica, excepto que se requieren diferentes temperaturas para que las enzimas muestren velocidades catalíticas semejantes. Jaenicke y Bohm (8) se han referido a este comportamiento como un fenómeno de estados equivalentes. En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad para llevar a cabo los arreglos conformacionales que acompañan a la catálisis, excepto que para que éstos ocurran, las termofílicas requieren temperaturas mayores, o sea que la enzima termofílica es relativamente más rígida o menos flexible que la mesofílica.

En el comportamiento de las enzimas de los mesófilos y los termófilos en función de la temperatura hay otro punto que vale la pena meditar. Este se refiere a la temperatura a que las enzimas dejan de expresar catálisis. La temperatura a las que las enzimas mesofílicas dejan de expresar catálisis es alrededor de 60° C, mientras que en las termofílicas no es raro observar que éstas son estables a temperaturas de 85° C. Los estudios de muchos laboratorios muestran que la pérdida de actividad, se debe a que a determinada temperatura, las enzimas pierden la estructura que les permite ser catalíticamente activas. El que las enzimas termofílicas requieran mayor temperatura para perder su estructura tridimensional, obviamente implica que estas enzimas son más estables que las mesofílicas, lo cual es necesario para que los termófilos vivan en las condiciones físicas de sus nichos. Esto obviamente se logró por medio de adaptación Darwiniana. Por lo tanto es válido concluir que el balance entre las fuerzas desestabilizantes y estabilizantes fueron

factores que los procesos evolutivos tuvieron que tomar en cuenta para que los distintos organismos de nuestro mundo fueran exitosos.

Contrapunto

Los datos de las enzimas que provienen de organismos que habitan distintos nichos y los que se han obtenido sobre el comportamiento de las enzimas en sistemas de bajo contenido de agua ilustran una característica general de las enzimas: entre mayor sea la estabilidad de las enzimas, menor es su capacidad catalítica. Ya que la capacidad catalítica está relacionada con la flexibilidad de la proteína, y la flexibilidad con estabilidad es entonces relativamente claro que en las enzimas estas tres características son esenciales e interdependientes. Es decir, la catálisis no es posible sin flexibilidad, pero esta última tiene que ser de una magnitud que sea compatible con el parámetro estabilidad.

Es importante señalar que esta imagen de las enzimas es congruente con muchos datos experimentales. Sin embargo, hay algunas observaciones en las cuales la relación entre estabilidad y función no es evidente. Un ejemplo son los experimentos de Mercado-Besserer y cols con la trifosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* (datos no publicados). Un grupo de investigadores de la UNAM clonaron, expresaron, caracterizaron y obtuvieron la estructura cristalográfica de la enzima (13,14). Mercado-Besserer y cols analizaron los datos y observaron que la enzima tiene un ácido glutámico oculto al solvente. Dada su localización, el ácido glutámico debería ejercer una acción desestabilizante, por tanto se modificó genéticamente por una glutamina y se determinó el efecto de la mutación en algunas características de la enzima. Se encontró que la termoestabilidad de la mutante era cerca de 20° C superior a la

de la enzima silvestre. El resultado era el esperado; la eliminación de un factor desestabilizante aumentó la estabilidad de la proteína. Sin embargo, los investigadores también observaron que la k_{cat} y la K_m de la enzima mutante fueron similares a las de la enzima nativa. Por lo tanto los datos indican que, cuando menos en este caso, los cambios en la estabilidad global de una enzima no se relacionan con la capacidad de la enzima para sufrir los arreglos conformacionales que se requieren en la catálisis.

Conclusiones y perspectivas

Todo lo anterior indica que aún hay mucho que aprender sobre la relación entre la estructura y función de las enzimas. Sin embargo, es importante reconocer que los datos que se han obtenido con organismos de distintos nichos y con enzimas en medios de bajo contenido de agua indican fuertemente que existe una relación muy estrecha entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. De esta manera, la pregunta que surge es ¿se pueden explicar la catálisis enzimática, la flexibilidad y la estabilidad de las enzimas en términos moleculares precisos? En opinión del autor, la respuesta es no... aún. Es cierto que los mecanismos químicos por los cuales se lleva a cabo la transformación de un sustrato en producto son razonablemente claros para muchas enzimas. Sin embargo, aún se desconoce en gran parte como los eventos en el sitio catalítico se relacionan con los cambios conformacionales que ocurren en otros lugares de las enzimas. La flexibilidad de las enzimas aún presenta muchas incógnitas. Esto se debe principalmente a que es difícil medir la flexibilidad global de una proteína o la de determinadas regiones o residuos de las enzimas. Sin embargo, las técnicas en que se mide intercambio de hidrógeno por deuterio se ven prometedoras (15). La estabilidad es otro parámetro difícil de medir. Es cierto que la estabilidad global de una proteína en términos de ΔG es cuantificable, pero la

estabilidad de regiones específicas de las enzimas aún no se puede medir fácilmente. En este punto, sin embargo, existen estudios interesantes en que por medidas de accesibilidad de una sonda que reacciona con residuos específicos de una proteína, se pueden hacer inferencias de la estabilidad de la región en la que encuentra el residuo (16).

Antes de terminar, es tal vez apropiado señalar que el nivel de complejidad de las enzimas es alto y conforme aumenta el conocimiento sobre las mismas, su complejidad es cada vez más evidente. Ahora se sabe que la estructura global de las enzimas no es simplemente un punto de apoyo para los residuos catalíticos; todo indica que el resto de de la proteína también es parte importante de la catálisis. Por tanto, es necesario conocer con certeza como las regiones distantes al sitio catalítico participan en la expresión de la catálisis, y cuales son los factores que controlan la estabilidad y flexibilidad de las enzimas. De igual importancia es definir en forma precisa como es que una proteína adquiere su estructura tridimensional. Ciertamente que únicamente con esta información se podrá pasar a la siguiente etapa de la enzimología: fabricar enzimas que sean diferentes a las que nos heredó la evolución. Por ejemplo, enzimas que catalicen la transformación de los sustratos a los productos que se deseen, o que sean termoestables, o que funcionen en condiciones industriales drásticas, o que trabajen en medios no acuosos. Ciertamente que esta parte de la historia apenas comienza.

Referencias

1. Goodsell, D. S. y Oison, A. J. (2000) Structural symmetry and protein function Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29,105-153.
2. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, Science 181,223-230.
3. Levinthal, C. (1969) How to fok graciously en Mossbauer spectroscopy in biological systems, Proceedings of a Meeting in Allerton House, Monticello, Ill (Ed. P. de Brunner, J. C. M. Tsibris, y E. Munck, University of Illinois Press, Urbana. Citado por Honig, B. (1999) Protein folding: from the Levinthal parados to structure prediction. J. Mol. Biol. 293,283-293.
4. Ofran, Y. Y Rost, B. (2003) Analysing six types pf protein-protein interfaces, J. Mol. Biol. 325, 377-387.
5. Xue, Q. F. y Yeung, E. S. (1995) Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme Nature 373, 681-683.
6. Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, J., y Petsko, G. A. (1998) Adjustments of conformational flexibility is a Rey event in the thermal adaptation of proteins Proc. Nat. Acad, Sic. USA. 95, 7406-7411.
7. Najera, H., Costas, M., y Femández-velasco, D. A. (2003) Thermodynamic cnaracterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the irrterplay between function and stabiirty as reasons for the oligomeric nature of an enzyme Biochem. J. 370, 785-792.
8. Jaenicke, R. y Bohm, G. (1998) The stabiirty of proteins in extreme environments Curr. Op. in Struct. Biol. 8, 738-748.
9. Irun, M. P., Maldonado, S y Sancho, J. (2001) Stabilization of apoflavodoxin by replacing hydrogen-bonded charged Asp or Glu residues by the neutral

isosteric Asn or Gln Prot. Eng
14,173-181.

10. Petsko, G. A. (2001) Structural basis of thermostability in hyperthermophilic bacteria, or "There is more than one way to skin a cat" Meth. Enzymol 469.-478.
11. Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou, A. (1990) Enzyme catalysis in organic solvents with low water content at high temperatures. The adenosinetriphosphatase of submitochondrial particles. Biochemistry 29, 751-758,.
12. Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1998) Enzymes in low water systems Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 33. 53-89.
13. Landa, A., Rojo-Domínguez, A., Jiménez, L. Y Fernández-Velasco, D. A. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem. 247, 348-355.
14. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Komhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica* J. Mol. Biol. 322,669-675.
15. Fields, P. A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility Comp. Biochem. Physiol. Part A. 129,417-431
16. Silvennán, J. A. y Harbury, P. B. (2002) The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha) 8 barrel. J. Mol. Biol. 324,1031-1040.