

**Instituto Boliviano
de Biología
de
Altura**

•••••

No. 12

SEPTIEMBRE Y
OCTUBRE DE 1970

BIOSINTESIS Y REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LAS ENZIMAS

Dr. Alain Freminet

La importancia de las enzimas en el metabolismo y el aspecto fundamental de la regulación de sus actividades y de su biosíntesis en el mundo viviente, son fenómenos bien conocidos.

Las enzimas son catalizadores de la materia constituyendo los seres vivos. Brevemente sabemos que en general las enzimas son constituidas por dos partes:

- la enzima propiamente dicha de naturaleza proteídica.
- la coenzima, cuerpo de poco peso molecular, en general nucleótidos.

El número de las coenzimas es poco, mientras el número de las enzimas es mayor.

Si en la mayoría de los casos la reacción química catalizada por la enzima se realiza a nivel de la coenzima, la especificidad de la reacción es debida a la proteína. Entonces, estudiar la biosíntesis de las enzimas y la regulación de esta biosíntesis, viene a estudiar la biosíntesis de las proteínas y la regulación de esta biosíntesis.

El conocimiento de este problema ha evolucionado muy rápidamente en estos últimos años: es lo que llamamos actualmente la biología molecular que se refiere tanto a los datos de la bioquímica como a los de la genética. Vamos a ver rápidamente la estructura de los ácidos nucleicos y de las proteínas; veremos después el determinismo genético de la estructura de las proteínas, el código, la biosíntesis propiamente dicha y por fin la regulación de esta biosíntesis.

Por último hablaremos de lo que se puede pensar de la influencia de la altura sobre estos mecanismos.

//////

I.- Algunos datos sobre la estructura de los ácidos nucleicos y la estructura de las proteínas.-

- Ácidos nucleicos

Se distinguen dos tipos de ácidos nucleicos:

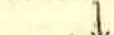
El ARN (o RNA), ácido ribonucleico liberando ribosa a la hidrólisis encontrándose en el citoplasma y en el núcleo de la célula.

- El ADN (o DNA), ácido desoxiribonucleico liberando desoxiribosa a la hidrólisis, encontrándose únicamente en el núcleo (cromosomas).

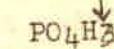
Son asociados a proteínas por enlaces salinos y forman las nucleoproteínas. El peso molecular puede variar de 30.000 a 2 millones y de 6 a 12 millones (o más) en el ADN.

Si hacemos hidrólisis por nucleasas, fosfatasa o fosforilasas y nucleosidasas, se puede determinar la degradación y la constitución: siguiente:

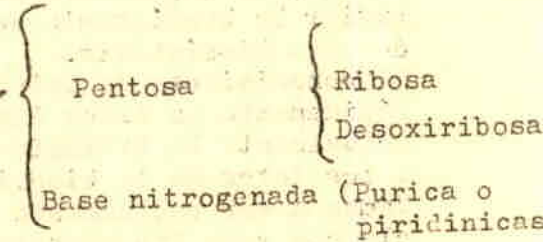
Acido nucleico



Nucleotidos



+ Nucleosidos →



AN → polinucleotido.

Polinucleotido= base nitrogenada-pentosa-fosfato.

Las bases nitrogenadas derivan :

- sea de la piridina { Citosina (C)
Timina (T)
Uracil (U) Bases piridinicas
- o sea de la purina { Adenina (A)
Guanina (G) Bases puricas

La unión entre los nucleótidos es realizada por enlaces fosfo-diésteres entre C3' y C5' o C2' y C5' de 2 azúcares de 2 nucleótidos vecinos.

- Estructura del ADN

(Fué determinada sobre todo por:

- Los datos del análisis químico
- El estudio de la difracción de los rayos X
- El estudio de los modelos atómicos y moleculares

Rápidamente se sabe: (Chargaff)

- Hay A.T.C.G-

- En todos los ADN analizados: $A=T$ $\frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$
C=G

$$\frac{A+G}{T+C} = 1 \quad \frac{\text{bases púricas}}{\text{bases pirimídicas}}$$

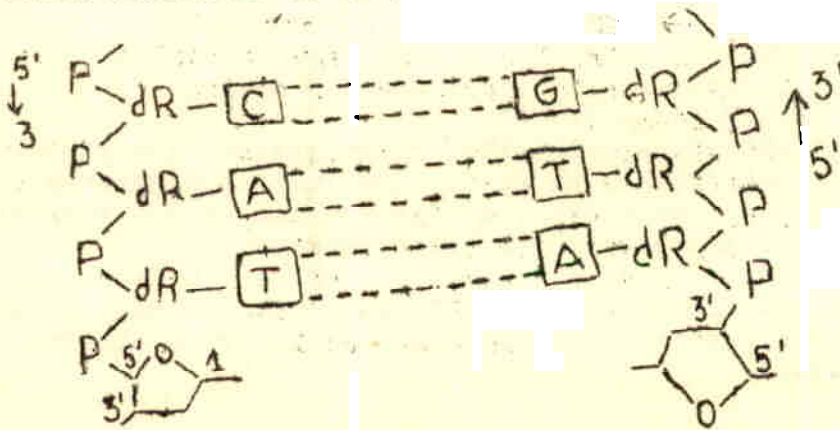
Pero hay una gran diversidad del ADN porque $\frac{A+T}{G+C}$

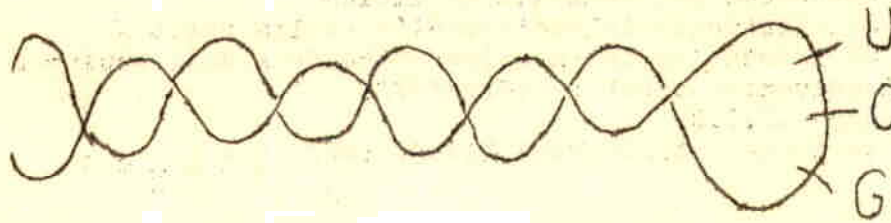
puede variar mucho (0,4 a 2,6).

En 1953 hipótesis de Watson y Crick del doble hélice:

El ADN es constituido por la asociación de 2 cadenas de nucleótidos enrolladas en hélice alrededor de un mismo eje. Hay enlaces hidrógeno entre los carbonilos y las funciones aminadas de las bases que se encuentran una frente a otra.

Las bases están al centro de la hélice, los azúcares y los fosfatos constituyen la parte periférica (solo enlaces fosfo diésteres C3'C5')





Amino Acido específico de U C G.

Las cadenas están en polaridad opuesta. Las 2 secuencias de nucleotidos son complementarias. Esto es constante en todos los ADN, lo que es variable es la composición en pares AT,GC... y la manera como se suceden (secuencia)

Estructura del ARN

Hay el mismo número de bases pero el Uracil toma el campo de la Timina.

ADN → ATGC

ARN → AUGC

no hay igualdad entre las bases, algunas partes de la molécula pueden tener la estructura en hélice.

Hay 3 tipos de ARN:

- 1) - El ARN ribosomal (ARNr) constituyendo los ribosomas cadenas ramificadas es decir, con fuertes diésteres C3'C5' y C2'C5', de estructura, no intervienen en la transmisión directa de los caracteres hereditarios.
- 2) - El ARN mensajero (ARNm), cadena no ramificada es la imagen complementaria del ADN. En efecto transporta la información genética del ADN hasta un lugar de biosíntesis, (Ribosoma)

3) - El ARN soluble o de transferencia ARNa o ARNt, de peso molecular leve y constante (PM 25.000 a 30.000: 80 nucleótidos) Es una cadena única con una gran parte en hélice (estructura en orquídea). Tiene 2 polos activos: 1 fosfóilo a un lado de la cadena y en la cadena 1 triplete de nucleótidos con las bases dirigidas al exterior. Estos 3 nucleótidos forman lo que llamamos el anticodón que puede asociarse al codón del ARNm complementario de 1 triplete del ADN. Por ejm si tenemos:

ADN	ARNm	ARNt
T-----	A	U-----
C-----	G	C-----
G-----	C	G-----
A-----	U	A-----

Codón anticodón

PROTEINAS ESTRUCTURA I:

Cadena peptídica (es decir encadenamiento de los amino-ácidos por un enlace amido) única y específica por cada proteína.

(Hay 20 amino-ácidos corrientes.

ESTRUCTURA SECUNDARIA II:

Las cadenas principales peptídicas se enrollan de una manera helicoidal (hélice de Pauling y Corey). Enlaces hidrógenos entre los carbonilos y las funciones aminadas de la cadena peptídica aseguran la cohesión. Fue probado directamente (rayos X: trabajo de Kendrew sobre la mioglobina -80% Hélice).

ESTRUCTURA III:

Resultado de los repliques del hélice, intervención de enlaces disulfuros, salinos, hidrófobos, fuerzas electrostáticas y de Van der Waals.

ESTRUCTURA IV:

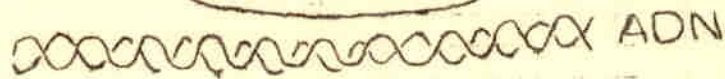
Las proteínas activas biológicamente son muy a menudo polímeros.

La estructura I determina las otras y estudiaremos su biosíntesis.

II Biosíntesis de las proteínas

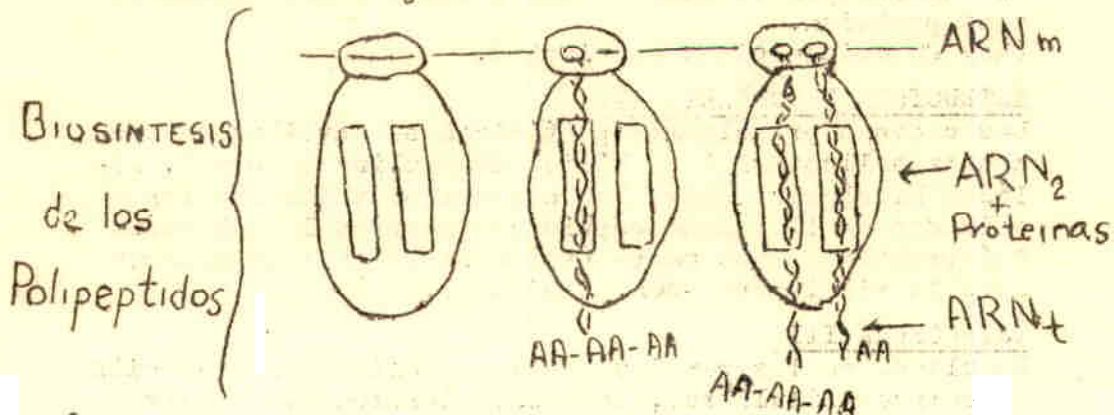
Vamos a seguir el esquema general siguiente resumiendo todas las posibilidades de transferencia de la información del ADN y de ahí el esquema de la biosíntesis de las proteínas.

dXTP $\xrightarrow{\text{Replicasa}}$ ADN \leftarrow REPLICACION

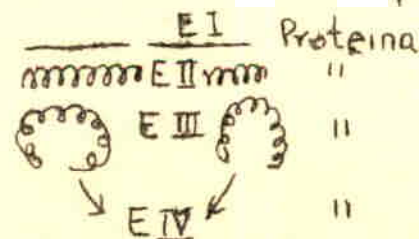
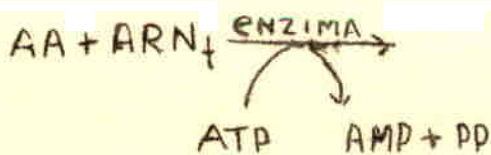


XTP $\xrightarrow{\text{Transcriptasa}}$ ARN_m \leftarrow TRANSCRIPCION

Polisoma: Conjunto de Ribosomas



ACTIVACION DE LOS AA



En este esquema:

- La secuencia de los amino ácidos es determinada por la secuencia de los nucleótidos del ADN (hipótesis del código genético)
- La síntesis de las proteínas tienen lugar al nivel del polisoma: conjunto de ribosomas en asociación con el ARNm y el ARNt ligado a los aminoácidos.
- Los amino-ácidos vienen en este complejo bajo la forma de un aminoacil-ARNt específico. Su posición depende de la concordancia codón-anticodón del ARNm y ARNt, correspondiendo a los triplete del ADN.

a) Determinismo genético de la estructura de las proteínas. El DNA o ADN tiene 2 funciones:

- Una función autocatalítica utilizada durante la división celular.
- Una función heterocatalítica utilizada para la biosíntesis de las proteínas.

Al momento de la mitosis o de la meiosis el ADN cataliza su propia biosíntesis. Es una replicación semi-conservativa: es decir que las 2 cadenas de nucleótidos se dividen (los enlaces hidrógenos desaparecen) y dos otras cadenas se forman por la propiedad de complementariedad que hemos visto antes.

El ADN dirige la biosíntesis de las proteínas necesarias al crecimiento y a la vida de la célula.

Estos puntos son probados por las experiencias siguientes: Experiencias de Meselson y Stahl (replicación semi-conservativa).

- Estudio de la transformación del Pneumococo (Griffith-1928 y después Avery, McCleod, Mc. Carthy - 1944).
- Estudio del ciclo del bacteriofago T2 de E.Coli (Hershey y Chase, utilizando isótopos P32 y S35)

De estas experiencias se sabe que el ADN tiene todas las propiedades esenciales del material genético:

- Dirige su propia biosíntesis (replicación)
- " la biosíntesis de una o muchas características bioquímicas.

Se admite (Beadle y Tatum 1941):

- La estructura de cada proteína es determinada por un gene de estructura particular (segmento de ADN)-(1 gene-1 enzima) " " "

- Cada gene de estructura determina unicamente la estructura de una proteina " 1 enzima - 1 gene".
- Existe una correspondencia univoca entre la estructura molecular del ADN y la estructura molecular de la proteina confiere estudios, mutaciones y mutagenesis.

b) El Código: El análisis genético fino ha demostrado la co-linealidad de las secuencias polinucleótidas y polipeptídicas.

Tenemos el problema siguiente: como se puede hacer la traducción de una información escrita con un alfabeto compuesto de 4 nucleótidos (ATGC) en una proteina escrita con un alfabeto compuesto de 20 amino-ácidos (confiere el problema del morse que puede traducir nuestro alfabeto con el punto, la raya y el silencio.)

El código es entonces a "triplete" (Gamow 1956)

En efecto si buscamos el número de nucleótidos necesarios para codificar 20 amino-ácidos podemos ver que:

con un código

con un código a 1 nucleótido se puede codificar 4 AA

con un " " 2 " " " " " " 4² = 16 AA

con un " " 3 " " " " " " " 4³ = 64 AA (triple)

Este código es degenerado, puntuado, no se puede trasladar, y es universal.

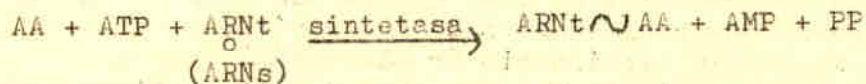
El código es conocido ahora ejm.: Phe → UUU ó UUC

c)

c) Activación de los amino-ácidos, formación del complejo ARNt-Amino-ácidos.-

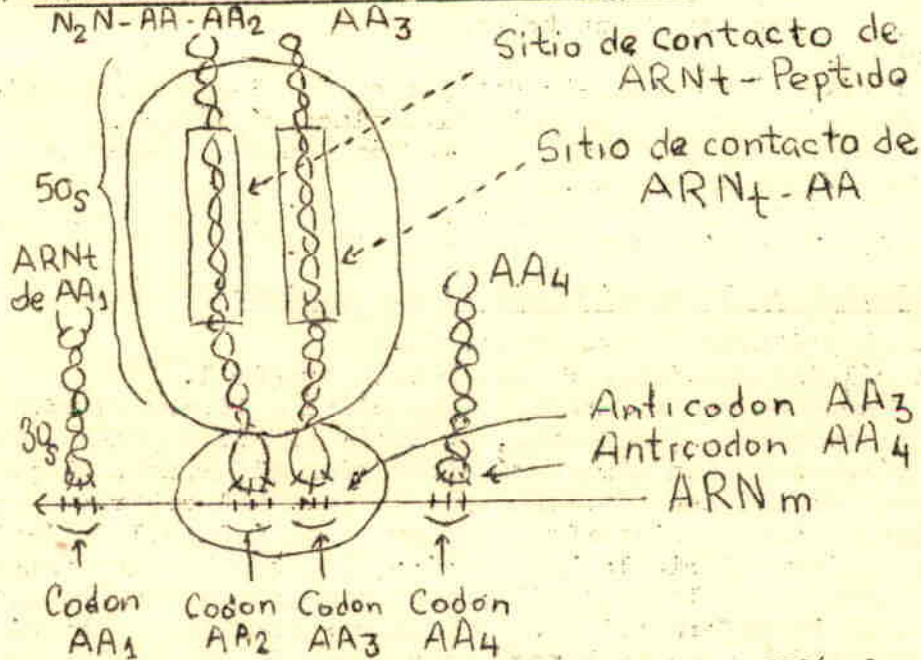
La hidrólisis de un enlace peptídico libera una energía de 2 a 3.000 calorías, entonces es necesario activar los amino-ácidos de tal modo que pueden formar el enlace peptídico.

- Tenemos la reacción:



Esta reacción es compleja, tiene como intermediario la formación de un amino-acil-adenilato ligado a la enzima. Las sintetetas que intervienen en estas reacciones son universalmente difundidas y son específicas por los amino-ácidos (hay 20 sintetetas diferentes por lo menos) y de los AARNt aceptadores (62 AARNt aceptadores diferentes).

d) Funcionamiento del complejo ribosomal



El ribosoma es formado de 2 partes: 30S y 50S (valores provenientes del estudio de las velocidades de ultra-centrifugación)

El mensajero se pone con la parte 30 S.

Hay dos sitios sobre la parte 50 S. para la fijación de los ARN de transferencia: uno por AARNt - AA y uno por AARN - péptido.

El AARNt-amino-ácido se pone con las partes 50 S. en función del codón (AARN_m) y del anticodón (AARNt) ligados por enlaces hidrógenos.

El conjunto de los ribosomas forma el polisoma (5 a 20 ribosomas) visto a la microscopía electrónica en el reticulocito del conejo (amplificación 350.000). Una mole de GTP es hidrolizada por cada enlace peptídico formado, permitiendo el pasaje del ARN-péptido de un sitio a otro. Dos enzimas intervienen: Son los factores de transferencia, cuando el enlace peptídico es hecho, el primero ARNt es liberado del sitio del ribosoma, el ARNt-péptido cambia de sitio, y otro ARNt - AA puede venir sobre el sitio libre mientras el ARN mensajero progresa de un triplete.

En conclusión:

- Los ARNt sitúan los amino-ácidos y aportan el potencial químico necesario a la realización del enlace peptídico.
- Los ribosomas son "la mesa de operación" donde se hace la biosíntesis de las proteínas.
- El ARNm es el transcriptor del mensaje genético contenido en el ADN y dirige la síntesis de las proteínas.

III. Regulación de la biosíntesis de las enzimas

Rendremos el problema muy generalmente. Todas las células provienen de una célula original, el huevo fecundado y cada una de estas células tienen el mismo conjunto de cromosomas, de genes, es decir el mismo genoma. Pero estas células tienen características bien diferentes al punto de vista morfológico y funcional y de ahí, molecular. Por ejm. las células hepáticas sintetizan las suero-albúminas, las células del linaje eritrocitario la hemoglobina, las células del páncreas numerosas enzimas de la digestión; sin embargo cada una de estas células tiene la información genética necesaria tanto a la síntesis de la albúmina de la hemoglobina, como de las enzimas de la digestión. Para un tipo celular dado, algunas potencialidades son expresadas, otras no. Es el problema de la diferenciación. De otra parte, la vida de una célula depende del funcionamiento coordinado de un gran número de enzimas. La naturaleza, la cantidad y actividad de las enzimas presentes deben estar reveladas de una manera tal que las células y el organismo tengan un crecimiento armonioso. Las hormonas, el sistema nervioso intervienen para regular la actividad de las

- La naturaleza de los mecanismos moleculares de diferenciación y de regulación por mucho tiempo misteriosa fue más conocida hace poco.

Tenemos que dar homenaje a los 3 premios Nobel franceses de 1965 (Woff, Jacob y Monod). Es poco decir la influencia que han tenido estos maestros sobre los que han seguido sus cursos.

Lo que vamos a explicar ahora es un resumen de sus trabajos.

a) Regulación de la biosíntesis de las enzimas por los genes mismos.

Estudiaremos el sistema de la β galactosidasa de E. Coli (trabajo de Monod). La β galactosidasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de los β galactosidos. Estudiaremos el crecimiento de una colonia salvaje de E. Coli en un medio nutritivo conteniendo solamente lactosa (β galactosido) como fuente de carbono. Podemos observar que la biosíntesis y la producción de galactosidasa se produce solamente cuando hay β galactosidos en el medio. Si cambiamos la fuente de carbono y que no haya β galactosidos, vemos que no hay biosíntesis de β galactosidasa (colonias inductibles). Entonces los galactosidos son inductores de la biosíntesis de la β galactosidasa.

Se han aislado colonias mutantes que producen siempre la β galactosidasa que haya o no β galactosidos en el medio (colonias constitutivas).

Las enzimas producidas en los dos casos son las mismas y tienen las mismas propiedades. Entonces no son los genes que dirigen la biosíntesis que cambian en este caso, pero otros genes del cromosoma bacteriano.

Hay dos tipos de genes:

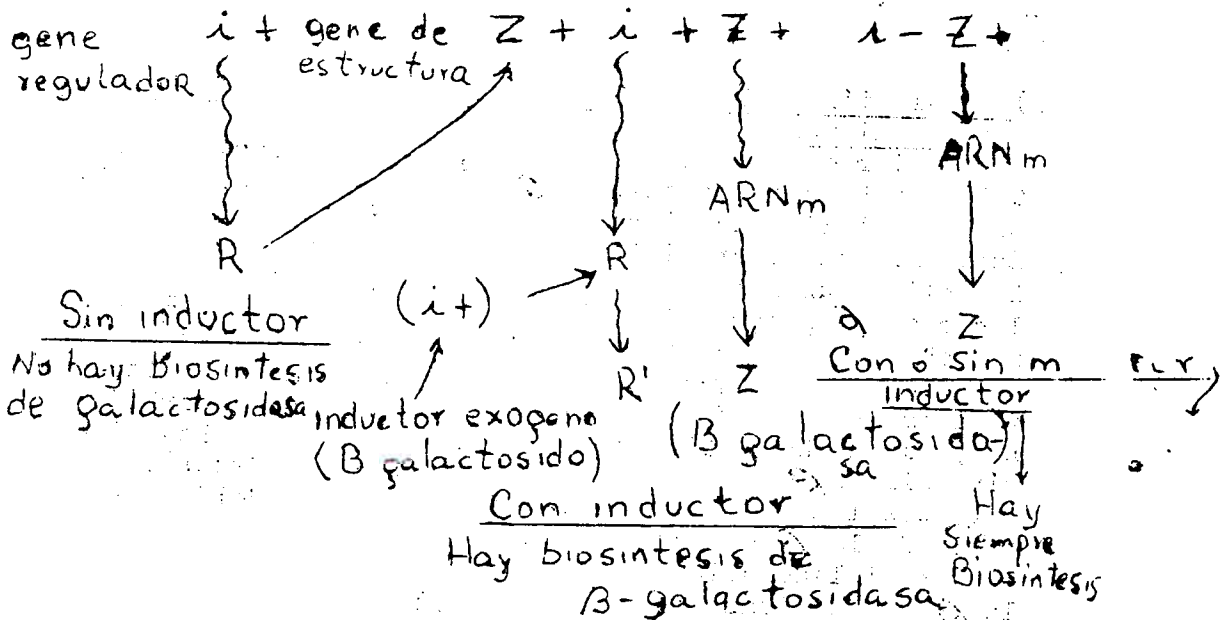
- los genes de estructura

- los genes de regulación.

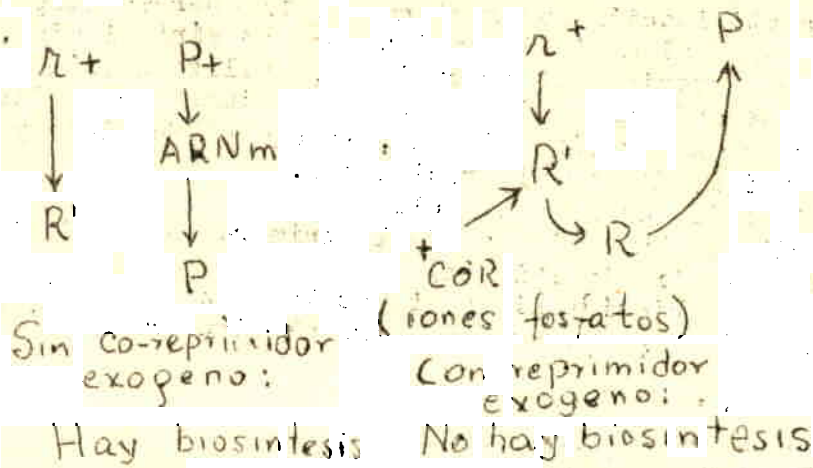
La hipótesis del "reprimidor" fue demostrada por los trabajos de Pardee, Monod, Jacob (1958). Algunos reprimidores fueron aislados más tarde (1967)

Los "inductibles" sintetizan un reprimidor (R) que en la ausencia de inductor exógeno, prohíbe la síntesis de las enzimas (aquí galactosidasa)

El inductor inactiva el reprimidor, producto del gene regulador. Si este gene regulador es inhibido por mutación (colonia constitutiva) no hay producción del reprimidor y la formación de la de la enzima tiene lugar aún con inductor. Se explica as , la adaptación por inducción.



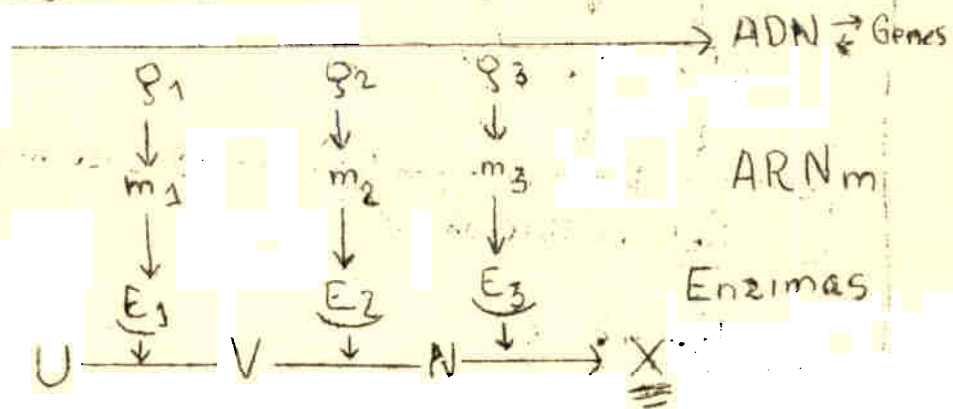
Un otro tipo de regulación es el de las fosfatasas por ejm.: En este caso: adaptación por derepresión, la enzima es sintetizada cuando no hay el producto de la reacción enzimática disponible en el medio (aquí iones-fosfatos). Se admite que el gene de regulación produce un reprimidor inactivo (R') pero que puede estar activado por el producto de la reacción enzimática: coreprimidor exógeno (aquí iones-fosfatos).



En conclusión se ve que los genes mismos actúan sobre la regulación de la biosíntesis de las proteínas.

b) Regulación de las cadenas en biosíntesis.

- Sea una cadena de reacciones teniendo el metabolito X como producto final. Cada una de las reacciones conduciendo a X son capitalizadas por una enzima especial dependiendo de un gene de estructura.

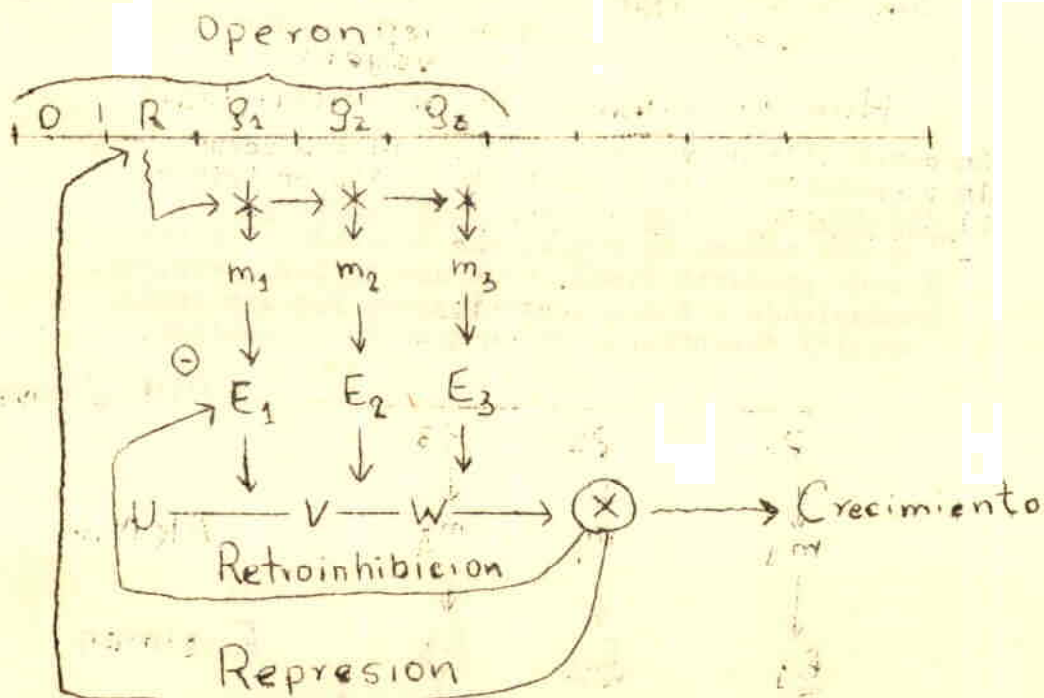


Se ve una utilización muy racional de la energía disponible:

- Si X es dado al medio las enzimas no son sintetizadas, la biosíntesis de X detiene el crecimiento, utiliza X exógeno.
- Si X no es dado al medio todas las enzimas necesarias a la vía metabólica de X son sintetizadas, la cadena funciona y produce X endógeno utilizado por el crecimiento.

El mecanismo de control es doble:

- Inhibición de la actividad de la primera enzima de la cadena por X mismo (retro-inhibición)
- Parada de la biosíntesis de todas las enzimas de la cadena, por el mecanismo de los genes de regulación (represión)



La retroinhibición es un mecanismo actuando por el fenómeno que llamamos allosteria : el inhibidor cambia la estructura del sitio activo de la enzima y prohíbe la asociación enzima sustrato (ES).

Los genes de estructura, dirigiendo la síntesis de las enzimas cooperando a una misma cadena de biosíntesis obedecen simultáneamente a un mismo sistema de regulación lo más a menudo genéticamente ligados constituyendo una unidad estructural y funcional a la cual fué dada el nombre de "operon".

Vamos a tomar un ejemplo en el caso de la hemoglobina. Se sabe que hay 4 operones actuando sobre la biosíntesis de las diferentes cadenas proteínicas posibles en la molécula de hemoglobina ().

La regulación se hace por depresión, es decir, que hay un reprimidor que debe estar activado para poder actuar. Al momento del nacimiento debemos tener una regulación tal que sea a hacer bajar y parar la biosíntesis de la hemoglobina fetal y al mismo tiempo hacer aumentar la biosíntesis de la hemoglobina normal.

En la aclimatación a la hipoxia (altura) hay una regulación permitiendo aumentar la cantidad de hemoglobina sintetizada. En La Paz por ejm. hay de 17 a 18 grms. de hemoglobina y si bajamos a nivel del mar encontramos los valores normales aún si los que bajan han nacido en la altura (indios).

Es muy probable que los mecanismos de regulación bioquímicos son los que dan la verdadera adaptación a la altura. Conocemos muchos datos sobre los cambios enzimáticos causados por la altura (citocroma, deshidrogenasas) El problema es que no tenemos casi nunca un STRESS debido únicamente a la hipoxia. Aquí un esquema inspirado de los peruanos y de Barbachova (Leningrado).

Lucha por el oxígeno

Adaptación a la hipoxia

SISTEMAS FUNCIONALES

NIVEL CELULAR

Hiperventilación
Aumento de flujo sanguíneo
Cambio del equilibrio ácido
básico.
Cambio de actividad enzimática

-Disminución del consumo de O₂
-Intensificación de la glicolisis
anaeróbica
-Aumento de la resistencia de los
tejidos.

A NIVEL CELULAR

NIVEL MOLECULAR

Aumento de mioglobina
Cambio de actividad enzimática
Incremento de la utilización
del O₂ cuando pO₂ baja.

- Estímulos clínicos
- Regulación
- Permeabilidad.

Pensamos que en el futuro, el I.B.B. A., debe estudiar estos mecanismos íntimos que podrán aclarar un poco el fenómeno de la adaptación.

Podemos pensar también que estos mecanismos podrían darnos una idea de la manera por la cual ha aparecido y crecido la vida antes que se establezca la fotosíntesis sobre la tierra.