

IDEAS GENERALES SOBRE ACTIVACIÓN DE ZIMÓGENOS

Ana Vázquez

Ramón Varón

Francisco García-Cánovas

Ana Vázquez. Escuela Universitaria de Formación del Profesorado de E.G.B. de Albacete. Departamento de Química-Física.

Ramón Varón. Escuela Universitaria Politécnica de Albacete. Departamento de Química-Física.

Francisco García-Cánovas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Murcia.

ZIMÓGENOS FISIOLÓGICOS

EL término “activación de zimógenos” se aplicó inicialmente a la activación de los precursores de enzimas proteolíticas como el tripsinógeno, quimotripsinógeno o procarboxipeptidasas (Neurath, 1957). Este mismo tipo de reacción ocurre en una gran variedad de procesos biológicos, como la coagulación de la sangre (Tankersley y Finlayson, 1984; Fisher, 1988), reacciones del sistema del complemento (Müller-Eberhard, 1988), activación de proinsulina a insulina (Holzer y Heinrich, 1980), así como en la de protirosinasa (Galindo y col. 1983; King y Flurkey, 1987). La activación de zimógenos presenta también aplicaciones en la terapia farmacológica, así por ejemplo, la administración de activador tisular del plasminógeno (TPA) a un enfermo después de la formación de un trombo sanguíneo en una arteria coronaria, aumenta la probabilidad de sobrevivir a un ataque cardíaco (Van de Werf y col., 1984).

La reacción de activación de zimógenos requiere la rotura catalítica de uno o más enlaces peptídicos por proteólisis limitada. Este proceso es una reacción exérgica en condiciones fisiológicas normales y tiene carácter irreversible, no existiendo reacciones opuestas que regeneren el mismo enlace peptídico hidrolizado o que reinserten el péptido liberado correspondiente. En este sentido, la activación de zimógenos es un mecanismo de control del

organismo que difiere, esencialmente, de las transiciones alostéricas y de modificaciones covalentes reversibles (Stadtman, 1970). La activación de zimógenos afecta unidireccionalmente a cambios en la célula y puede inducir nuevas funciones fisiológicas.

En algunos casos el proceso de activación de zimógenos consta de una sola reacción, mientras que en otros el proceso implica una cascada de reacciones, que sirve para amplificar un estímulo y obtener una mayor respuesta fisiológica (Neurath, 1975).

En la Figura 1 se esquematiza un proceso de activación de zimógenos, siendo X, Y y Z los zimógenos que pueden ser convertidos en su forma activa. La conversión del zimógeno X a la enzima X_a se inicia por un estímulo fisiológico específico. En la cascada de activación el producto de una reacción actúa como catalizador de la siguiente. La secuencia de los acontecimientos viene determinada por la especificidad de cada enzima y el grado de amplificación del estímulo inicial por la eficacia de cada proceso de activación. Por ejemplo, suponiendo que una molécula de X_a puede producir 10^3 moléculas de Y_a , y que ésta, a su vez produce 10^3 moléculas de proteína activa, cada molécula de X_a originaría 10^6 moléculas de proteína activa.

La activación de los zimógenos pancreáticos es un proceso en cascada que consta de dos etapas. La enteropeptidasa activa inicialmente el tripsinógeno a tripsina y éste activa, a su vez, a los otros zimógenos: quimotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasa y profosfolipasa. En la Figura 2 se esquematiza este proce-

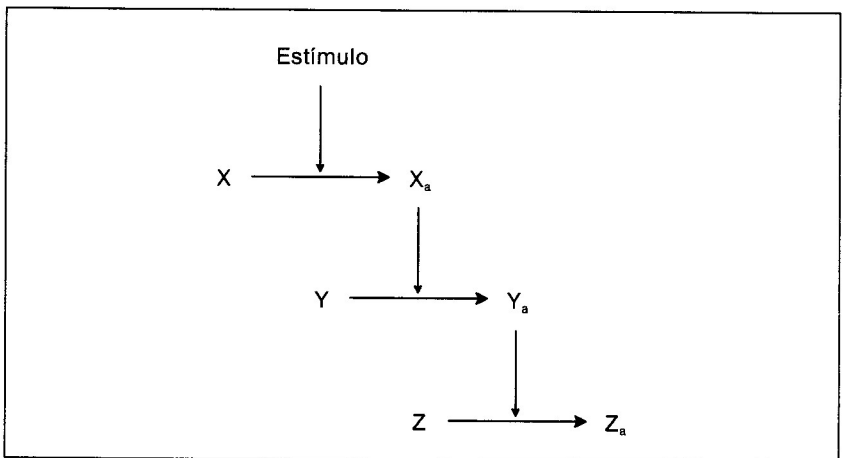


FIGURA 1
Representación esquemática de una reacción de activación de zimógenos en cascada.

X, Y, Z: Zimógenos, X_a , Y_a , Z_a : Enzimas activas.

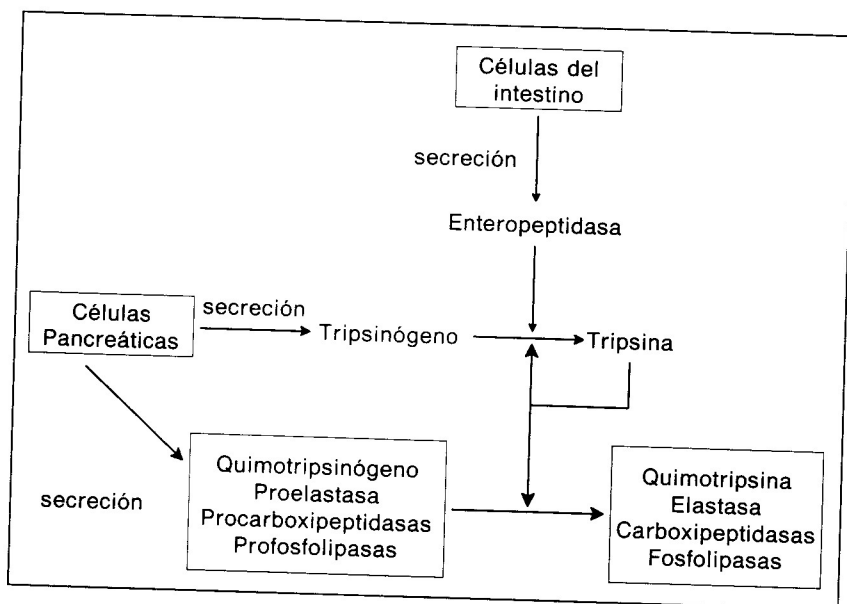


FIGURA 2
Activación de zimógenos en el duodeno.

so de activación. Otros ejemplos más complejos de activación de zimógenos en cascada se presentan en la coagulación de la sangre (Mann y col., 1988) y en la activación del sistema del complemento, que provoca la citólisis de células bacterianas y tumorales (Müller-Eberhard, 1988).

REACCIONES DE ACTIVACIÓN DE ZIMÓGENOS

La activación de zimógenos por rotura proteolítica de uno o varios enlaces peptídicos es un proceso enzimático que requiere la presencia de una enzima activante. Este proceso favorece la constitución y/o exposición del sitio activo, relacionado con el dominio funcional correspondiente que ya se encuentra en el zimógeno. Así, por ejemplo, la tripsina convierte el quimotripsinógeno en quimotripsina y la enteropeptidasa cataliza la formación de tripsina a partir del tripsinógeno.

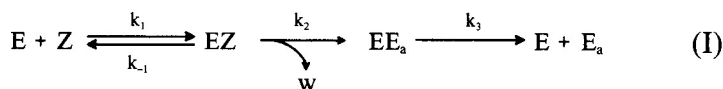
Generalmente, la enzima activante es distinta de la enzima activa resultante de la activación, dando lugar a un proceso de activación intermolecular sobre el zimógeno o proenzima. Se pueden dar casos de activación recíproca, como ocurre, por ejemplo, cuando la enzima calicreina activa el factor XII, acoplado a la activación de precalicreina por el factor XIIa (Fisher, 1988). Sin

embargo, a veces la propia enzima activa puede actuar en una reacción de autocatálisis sobre su precursor o zimógeno, como ocurre en el caso del tripsinógeno que también puede ser activado por tripsina (Varón y col., 1990). En otros casos, los zimógenos muestran bajos niveles de capacidad proteolítica que pueden contribuir a la activación de otras moléculas del propio zimógeno (Gertler y col., 1974; Kerr y col., 1975). Ambos procesos de autoactivación tienen carácter intermolecular (Silverber y col., 1980). Aunque la eficacia catalítica de la autoactivación es baja, la naturaleza exponencial de la autocatálisis favorece que pueda llegar a representar un factor importante en el proceso global de activación de zimógenos.

Algunos zimógenos, como el pepsinógeno, sufren autoactivación intramolecular. La activación del pepsinógeno sucede de forma espontánea a pH inferior a 5. La etapa clave es la rotura del enlace peptídico entre la leucina 16 y la isoleucina 17 (James y Sieliecki, 1986).

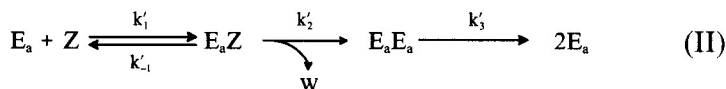
MECANISMO DE LAS REACCIONES DE ACTIVACIÓN DE ZIMÓGENOS

Muchos de los procesos de activación de zimógenos se producen mediante un mecanismo Uni-Bi (Varón et al., 1987) según el esquema:

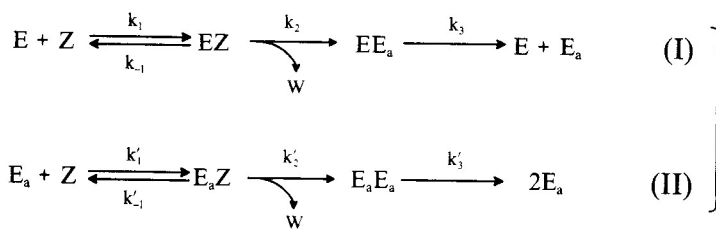


donde E es la proteasa activante, Z el zimógeno precursor, E_a la enzima activada y k_i (i = 1, 2, 3 y -1) las constantes de velocidad correspondientes a cada una de las etapas del mecanismo de reacción.

La proteasa activante, E, puede coincidir en algunos casos con la propia enzima activa E_a, siendo entonces un proceso autocatalítico de acuerdo con el esquema:



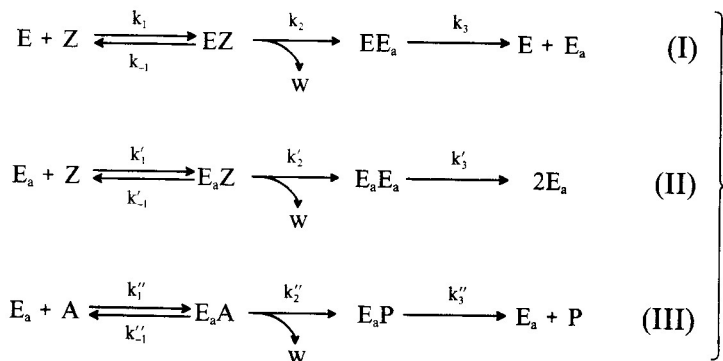
En muchos casos, se producen dos o más reacciones en cascada, tal es el caso de la activación del tripsinógeno. La cascada de activación puede ser representada por el siguiente esquema:



Esquema I

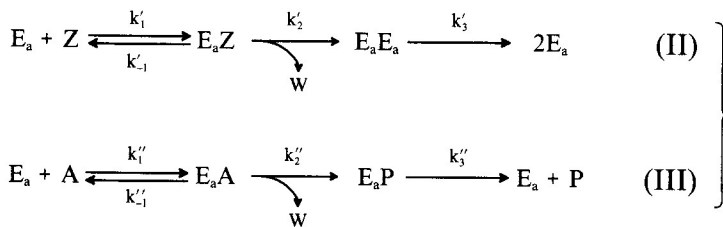
El estudio de este tipo de mecanismos presenta la dificultad de que, generalmente, ni la concentración de la enzima activada, E_a , ni la del péptido liberado, W , pueden ser seguidas experimentalmente con facilidad. El procedimiento usado normalmente es la eliminación periódica de alícuotas del medio de reacción seguido de un ensayo de actividad de la enzima activada en la alícuota (Colom y Figarella, 1979; García Moreno y col. 1991). La actividad de E_a se determina midiendo la velocidad inicial de la reacción de E_a con un sustrato apropiado. Este procedimiento, además de ser laborioso está expuesto a una gran diversidad de errores, por ejemplo la reacción de activación continúa dándose en la alícuota eliminada del medio de reacción.

Estas reacciones pueden ser medidas indirectamente acoplándolas a otra reacción enzimática en la que la enzima activa, E_a , actúa sobre un sustrato cromogénico para dar un producto cromofórico que puede ser detectado espectrofotométricamente. Generalmente, la reacción de la enzima, E_a , sobre su sustrato A , sigue también un mecanismo Uni-Bi, de forma que el mecanismo global es:



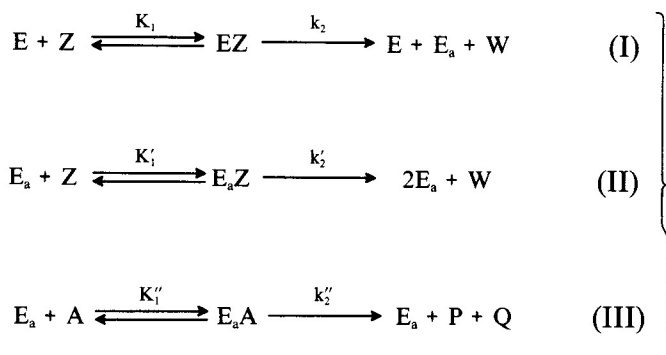
Esquema II

donde P y Q son los productos de la reacción. La activación del zimógeno por su propia enzima activada, junto con la reacción de seguimiento, viene representado por el esquema:



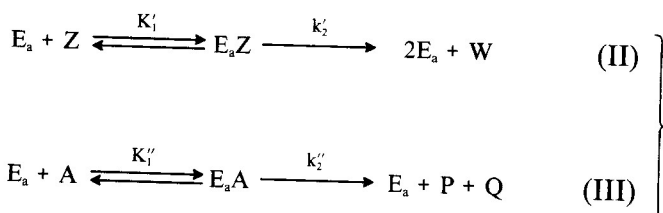
Esquema III

El estudio de estos mecanismos de reacción es complejo, y la determinación de todas las constantes cinéticas del mismo presenta numerosas dificultades. Sin embargo, en muchas ocasiones la situación se simplifica cuando una o más de las constantes de velocidad toma valores muy superiores a los de las demás. Puesto que el paso $EZ \rightarrow E_a E_a + W$ requiere la rotura de un enlace peptídico y el paso $E_a E_a \rightarrow E_a + E_a$ es una simple desacilación, se cumple generalmente la relación $k_2 \ll k_3$ (Dixon, 1979; Cornish-Bowden, 1988) y también $k_2'' \ll k_3'$ debido a que el sustrato de estas enzimas suele ser una amida. Si, además, se cumplen las condiciones de equilibrio rápido el mecanismo del Esquema II queda reducido a:



Esquema IV

En estas mismas condiciones el mecanismo del Esquema III quedaría reducido a:



Esquema V

El estudio cinético de un proceso de activación de zimógenos debe constar de varias etapas:

1. Análisis cinético del mecanismo, es decir, obtención de las ecuaciones analíticas que nos dan la evolución de la concentración de productos y especies enzimáticas con el tiempo.
2. Planteamiento de un diseño experimental para cada caso, de acuerdo con las expresiones analíticas obtenidas. El diseño experimental consta de varias etapas. En una primera etapa se realizan una serie de ensayos enzimáticos en los que se comprueba el número de términos exponenciales significativos de la ecuación de acumulación de los productos. A continuación se comprueba la respuesta del sistema respecto a diversas magnitudes experimentales, y por último, se calculan las constantes cinéticas implicadas en el mecanismo.

Como ejemplo, planteamos el estudio cinético del mecanismo del Esquema V:

1. Análisis cinético

En condiciones iniciales $[Z]_0 \gg [E]_0$ y $[A]_0 \gg [Z]_0$ se obtiene que la acumulación de los productos viene dada por

$$[Y] = \beta (1 - e^{\lambda t}) \quad (1)$$

donde

$$\beta = - \frac{(k'_2/K') [E_a]_0 [A]_0}{(k'_2/K') [Z]_0} \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{k'_2 [Z]_0}{K' (1 + [A]_0/K') + [E_a]_0} \quad (3)$$

2. Diseño experimental:

Ensayos de actividad enzimática

En primer lugar, se realizan una serie de ensayos de actividad enzimática con diversos valores de $[E_a]_0$, $[Z]_0$ y $[A]_0$. De acuerdo con el análisis cinético, el sistema evoluciona según una ecuación uniexponencial. Los ajustes, mediante regresión no lineal de las curvas de progreso a la Eqn. 1, están caracterizados por el parámetro χ^2 y pueden compararse mediante el test F, para comprobar que la introducción de más términos exponenciales en la ecuación correspondiente no mejora significativamente. Así se obtienen los parámetros β y λ .

Efecto de la concentración de zimógeno

Esta etapa consiste en la realización de una serie de ensayos a distintos valores de $[Z]_0$, permaneciendo constantes $[E_a]_0$ y $[A]_0$. Se puede comprobar la dependencia lineal de los parámetros $-1/\beta$ y λ respecto a $[Z]_0$ (Eqn. 2 y 3).

Efecto de la concentración de sustrato auxiliar

La realización de una serie de ensayos con diversos valores de $[A]_0$, manteniendo constante $[E_a]_0$ y $[Z]_0$, proporciona los parámetros cinéticos β y λ para cada valor de $[A]_0$. Se puede comprobar la dependencia lineal de los parámetros $-\beta$ y $1/\lambda$ respecto a $[A]_0$ (Eqn. 2 y 3).

Efecto de la concentración de enzima activante

En esta etapa se realizan una serie de ensayos a $[Z]_0$ y $[A]_0$ constantes, variando el valor de $[E_a]_0$. Se obtienen los valores de los parámetros β y λ para cada valor de $[E_a]_0$. El análisis por regresión no lineal de los valores de λ vs. $[E_a]_0$, según la Eqn. 3, permite calcular los valores de K' y k'_2 . En una etapa previa se pueden determinar los valores de K'' y k''_2 , a partir de una serie de ensayos experimentales en los que las únicas especies presentes al comienzo de la reacción sean la enzima activa y el sustrato auxiliar.

BIBLIOGRAFÍA

- COLOMB, E. y FIGARELLA, C. (1979): *Biochim. Biophys. Acta*, 571, 343.
- CORNISH-BOWDEN, A. (1979): en "Fundamentals of enzyme kinetics". Butterworth & Co. Londo. pp. 40-47 y 85-89.
- DIXON, M.; WEBB, E. C.; THORNE, C. J. D. y TIPTON, K. F. (1979): *J. Am. Chem. Soc.*, 99(20), 6506.
- FISHER, B. I. (1988): *A. Med. laboratoriums Diagn.*, 29(6), 327.
- GALINDO, J. D.; PEÑAFIEL, R.; VARÓN, R.; PEDREÑO, E.; GARCÍA-CARMONA, F. y GARCÍA CÁNOVAS, F. (1983): *Internat. J. Biochem.*, 15, 633.
- GARCÍA-MORENO, M.; HAVSTEEN, H.; VARÓN, R. y H. RIX-MATZEN (1991): *Biochim. Biophys. Acta*, 1080, 143.
- GERTEL, A.; WALSH, K. A. y NEURATH, H. (1974): *Biochemistry*, 13, 1302.
- HOLZER, H. y HEINRICH, P. C. (1980): *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 63.
- JAMES, M. N. G. y SIELECKI, A. R. (1986): *Nature*, 35, 319.
- KERR, M. A.; WALSH, K. A. y NEURATH, H. (1975): *Biochemistry*, 14, 5088.
- KING, R. S. y FLURKEY, W. H. (1987): *J. Sci. Food. Agric.*, 41, 231.
- MÜLLER-EBERHARD, H. J. (1988): *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 321.
- NEURATH, H. (1957): *Adv. Protein. Chem.*, 12, 320.
- NEURATH, H. (1975): *Proteasas and Biological Control*. Ed. Reich, E. Rifkins, D. B. & Shaw, E. Vol. 2, pp. 51-64.
- MANN, K. G.; JENY, R. J.; KRISHNASWAMY, S. (1988): *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 915.
- STADTMAN, E. R. (1970): *The Enzymes*. Ed. Boyer, P. D. Academic press. New York, 3rd. Vol. 1, pp. 397-459.
- SILVERBER, M.; THOMPSON, R.; MILLER, G. y KAPLAN, A. P. (1980): *The Regulation of coagulation*. Elsevier/North Holland. New York, pp. 531-541.
- TANKERSLEY, D. L. y FINLAYSON, J. S. (1984): *Biochem. J.*, 24, 273.
- VAN DE WERF, F.; LUDBROOK, P. A.; BERGMAN, S. R.; TIEFENBRUNN, A. J.; FOXX, A. A. K.; DE GEEST, H.; VERSTRAETE, M.; COLLEN, D. y SOBEL, B. E. (1984): *New Engl. J. Med.*, 310, 609.
- VARÓN, R.; HAVSTEEN, B.; VÁZQUEZ, A.; GARCÍA-MORENO, M.; VALERO, E. y GARCÍA-CÁNOVAS, F. (1990): *J. theor. Biol.*, 145, 123.
- VARÓN, R.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; TUDELA, J.; GARCÍA-MORENO, M.; VÁZQUEZ, A. y VALERO, E. (1987): *Math. Biosc.*, 87, 31.