

1. LOS ORÍGENES DE LA QUÍMICA MODERNA: QUÍMICA Y ALQUIMIA. LAS PROTEÍNAS EN LOS ALBORES DE LA QUÍMICA

La química arranca, históricamente, de la fascinación del hombre por la transformación de una sustancia en otra. A nadie se le escapa la ventajas de dominar y dirigir a voluntad estas transformaciones, algo que, en una cultura animista, no está en nuestras manos, pero si en las de los genios y poderes sobrenaturales que controlan el mundo. El control del fenómeno químico pasaba consecuentemente por la connivencia, la sumisión o el control, de una forma u otra, de estos poderes sobrenaturales. Esto y no otra cosa es la magia en su versión cultural y religiosa. La alquimia conservó mucho de esta carga mágica durante muchos siglos, en contextos en que ésta ya no tenía cabida. De ahí el inevitable aire de charlatanería huera que acabó adquiriendo, tan agudamente caricaturizado por Quevedo (1580-1626) en *Las zahúrdas de Plutón*. La deformidad de la sátira subraya con trazos gruesos el carácter esperpéntico de estas prácticas ya en esa época:

Y yo bajé otra grada por ver lo que Judas me dijo que eran peores que él y topé en una alcoba muy grande una gente desatinada, que los diablos confesaban que ni los entendían ni se podían averiguar con ellos. Eran astrólogos y alquimistas. Estos andaban llenos de hornos y crisoles, de lodos minerales, de escorias, de cuernos, de estiércol, de sangre humana, de polvos y alambiques. Cual estaba fijando el mercurio al martillo y habiendo resuelto la materia viscosa y ahuyentado la parte sutil, lo corruptivo del fuego, en llegándose a la copela, se le iba en humo. Otros disputaban si se había de dar fuego de mecha o si el fuego o no fuego de Raimundo había de entenderse de la cal o si de luz efectiva del calor y no de calor efectivo del fuego. Cuales con el signo de Hermete daban principio a la obra magna y en otra parte miraban ya el negro blanco y le aguardaban colorado y ajuntando a esto la *proporción de la*

naturaleza, con naturalezas se contenta la naturaleza y con ella misma se ayuda y demás oráculos ciegos suyos, esperaban la reducción de la primera materia, y al cabo reducían su sangre a la postrera podre; y en lugar de hacer del estiércol, cabellos, sangre humana, cuernos y escoria, oro; hacían del oro estiércol, gastándolo neciamente. ¡Oh qué de voces que oí..... Y qué bravas las daban sobre entender aquellas palabras tan referidas de todos los autores químicos: ¡Oh! ¡Gracias sean dadas a Dios, que de la cosa más vil del mundo permite hacer una cosa tan rica! Sobre cuál era la cosa más vil se ardían. Uno decía que ya la había hallado; y si la piedra filosofal se había de hacer de la cosa más vil, era fuerza hacerse de corchetes.... Y cerraran con ellos si no dijera un diablo: —¿Queréis saber cuál es la cosa más vil?— Los alquimistas; y así porque se haga la piedra es menester quemaros a todos. Diéronles fuego y ardían casi de buena gana sólo por ver la piedra filosofal.¹

A comienzos del siglo XVII, cuando escribe Quevedo estas líneas que acabamos de leer, Sir Francis Bacon (1561-1626), en su *Novum Organum* (Lib. I, LXXXV),² en un contexto ya no de chanza y sátira sino de reflexión científica, reconoce efectivamente también que la alquimia era cosa más curiosa que sensata. No obstante, el propio Bacon reconoce en esta misma obra, que a pesar de tanta charlatanería, no puede negarse que la alquimia ha conseguido un buen número de hallazgos e inventos útiles al hombre. Sin embargo, con este revestimiento de cosa más curiosa que sensata, o el retratado a trazos gruesos por Quevedo, era imposible que la química pudiera participar del movimiento científico, al lado de la física o las matemáticas que por aquellas fechas ya contaban o habían contado con genios de la altura de Copernico (1473-1543), Galileo (1564-1642) o Kepler (1571-1630). La química, pues, necesitaba ser despojada de la charlatanería, tarea en la que jugó un papel fundamental, todavía en el siglo XVII, Robert Boyle (1627-1691). Su obra *The Sceptical Chemist* marca un hito decisivo en la historia de la ciencia. Esta obra marcó la separación definitiva entre quienes profesaban una filosofía de carácter hermético y los que deseaban avanzar por la senda operativa de la experimentación. La obra de Boyle al diferenciar con claridad la experimentación de laboratorio propiamente dicha de la especulación enmascarada en las prácticas del horno abrió a la química las puertas de la ciencia. A Boyle le debemos también la formulación del moderno concepto de elemento químico. El fruto de esta depuración lo ve ya enseguida el siglo XVIII (Boyle muere en la última década del siglo XVII) en que encontramos ya consolidada la química basada exclusivamente en la experimentación y, así, asiste al nacimiento de ésta como nueva disciplina científica que, aunque escasa todavía de conocimientos procede ya con el rigor y la metodología de la ciencia moderna. Al siglo XVIII pertenecen químicos tan sobresalientes como Lavoisier (1743-1794) y Fourcroy (1755-1809) uno de los

primeros, si no el primero de los nuevos químicos en interesarse por las albúminas, nombre que recibían y continuaron recibiendo hasta comienzos del siglo XX las proteínas. El «Compendio de Bioquímica» del Prof. Pietro Rondoni, uno de los primeros tratados de Bioquímica que probablemente circularon por España traducidos a nuestra lengua, al hablar de las proteínas, en su cuarta edición (1935), todavía denomina a las proteínas albúminas, aunque ocasionalmente y aconsejando que el término caiga en desuso. Pronto, pues, en sus albores, las proteínas ya habían captado el interés de la Química.

2. LA QUÍMICA DE LA MATERIA VIVA: LA IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

El siglo XVIII ve la consolidación del concepto de elemento y de compuesto químico propuesto por Boyle así como el desarrollo de los primeros métodos fiables de análisis elemental. A partir de ese momento, a finales ya del siglo XVIII y comienzos del XIX, con estos elementos instrumentales y conceptuales en la mano, los químicos de la época se lanzaron con empeño y obstinación a aplicar el análisis elemental a todo lo que tenían a mano. Consecuentemente la literatura química de la época aparece inundada de tablas porcentuales de contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y, a veces, azufre y fósforo de las sustancias más inverosímiles. Aunque estas listas se utilizaban para calcular masas moleculares basadas en escalas relativas de pesos atómicos, el significado de estos cálculos no quedaba del todo claro, pues el concepto de enlace químico aun no estaba formulado por esta época. Objeto de estos análisis fueron también las sustancias vivas y los alimentos, que acabaría llevando con el tiempo a la revolución conceptual que supuso borrar la distinción desde el punto de vista químico entre los reinos mineral, vegetal y animal, una de las bases de los espectaculares avances de la medicina, la farmacia y la agricultura de las últimas décadas.

La albúmina era una sustancia que sabía preparar ya desde tiempo inmemorial a partir del huevo, un alimento de valor nutritivo excepcional. Cuando los nuevos químicos se decidieron a hacer análisis elemental de los alimentos, la reconocida importancia nutritiva de la albúmina la hacía candidato obvio para estos estudios. Por estos años de la fiebre del análisis elemental había además otras sustancias purificadas de otros alimentos que al poseer propiedades quimicofísicas groseras análogas a las de la albúmina de huevo fueron agrupadas, junto con esta última, en una nueva categoría de compuestos químicos: las albúminas. Para Fourcroy las sustancias que debían ser clasificadas como albúminas eran tres (la albúmina de huevo, la fibrina y la gelatina); Posteriormente al grupo se unieron la albúmina del suero y alguna otra de origen vegetal como la albúmina de trigo.

Gerardus Johannes Mulder (1802-1880) fue el pionero del análisis elemental de las albúminas y responsable, junto con el químico Berzelius, de que a partir de entonces pasaran a llamarse proteínas. Mulder estudió medicina, pero hacia el año 1830 decidió abandonar la práctica clínica y dedicarse a la química. Enseguida fue nombrado «lector» de botánica, química, matemáticas y farmacia en Rotterdam. Hacia 1840 lo vemos ya con el nombramiento de Profesor en la Universidad de Utrech. Mulder fue uno de esos analíticos dedicado a determinar la composición de todo producto natural que le caía a mano, trabajo para el que frecuentemente se aconsejó de Berzelius (1779-1848), uno de los patriarcas de la química de la época con el que mantuvo una intensa correspondencia. Hacia 1837 Mulder decidió concentrarse en el análisis elemental de esas sustancias que cincuenta años antes Fourcroy había denominado albúminas, y de las que ya se sabía que eran abundantes en nitrógeno. Los resultados de estos análisis fueron sorprendentes. Mulder descubrió que todas estas albúminas compartían una composición elemental altamente similar, si se exceptuaba el azufre,^{3,4} como se ilustra en la Tabla I. Ello le llevó a al convencimiento de que las albúminas compartían todas una especie de núcleo químico idéntico que el denominó, traducido al español, algo así como «Materia Prima» (Grundstoff), al que se unirían cantidades diferentes y características de azufre para dar lugar a su vez a las diferentes albúminas. Esta materia prima constituiría la base de la materia viva y se sintetizaría en las plantas (el trigo y otras plantas que sirven de alimento). A través de la cadena trófica entraría en el reino animal donde le serían añadidos los átomos de azufre específicos de las diferentes albúminas. Es obvio que la teoría propuesta por Mulder daba cuenta de la importancia nutritiva de determinados alimentos como el trigo, los huevos y la carne que eran ricos en albúminas.

TABLA I

Análisis elemental porcentual de las Albúminas (Mulder⁴)

	<i>Fibrina</i>	<i>Albúmina de huevo</i>	<i>Albúmina del suero</i>
Carbono	54,56	54,48	54,84
Hidrógeno	6,90	7,01	7,09
Nitrógeno	15,72	15,70	15,83
Oxígeno	22,13	22,00	21,23
Fósforo	0,33	0,43	0,33
Azufre	0,36	0,38	0,68

Mulder comunicó los resultados del análisis elemental de las albúminas y las conclusiones que extraía de ellos a Berzelius que quedó entusiasmado con los resultados y la teoría de Mulder y le propuso en su carta de respuesta de 10 de Julio de 1838,⁵ que las albúminas pasaran a denominarse proteínas, del griego πρωτεϊοζ que podríamos traducir como primigenio, de acuerdo con el papel que jugaban en la nutrición y en la constitución de la materia viva animal:

Le nom protéine que je vous propose pour l'oxyde organique de la fibrine et de l'albumine, je voulais le dériver de πρωτεϊοζ, parce qu'il paraît être la substance primitive ou principale de la nutrition animale que les plantes préparent pour les herbivores et qui ensuite ils passent aux carnivores.

Mulder comunicó por carta también sus hallazgos y teorías a Justus Liebig⁶ una de las grandes estrellas de la química de la época, que los acogió con entusiasmo. El artículo con los primeros resultados de Mulder en *Annalen de Pharmacie*,³ revista de la que Liebig era editor, no era realidad otra cosa que un resumen recogiendo lo sustancial de esta carta, preparado por el propio Liebig. En un artículo publicado en 1841 Liebig hace patente su entusiasmo y admiración por Mulder y confirma que todo lo que este ha publicado ha sido confirmado en su laboratorio. Es más en su libro *Animal chemistry*⁷ extrapola al máximo las teorías de Mulder hasta el punto de afirmar:

Tanto el albumen como la fibrina, en el proceso de la nutrición, son capaces de ser convertidos en fibra muscular, y la fibra muscular es capaz de ser convertida en sangre.

Los resultados de Mulder fueron puestos en cuestión pronto. Por una parte se vio que el azufre no podía separarse de las proteínas para obtener la «materia prima» tan fácilmente; siempre quedaba algo de azufre si uno no quería destruir del todo las albúminas.^{8,9} Por otra, empezaron a detectarse variaciones consistentes en composición relativa de una proteína a otra. Así, por ejemplo, se encontró un mayor contenido relativo en nitrógeno en la fibrina que en la albúmina de huevo.¹⁰ Por otra parte empezaron a identificarse enseguida nuevas proteínas cuya composición elemental relativa no cabía duda que era diferente de la propuesta por Mulder para la «materia prima». Liebig que tan fuertemente había apostado por Mulder viendo en entredicho su autoridad científica, que el estaba dispuesto a mantener como fuera, convirtió a este último en cabeza de turco y la emprendió con él.¹¹ Ello dio lugar a una agria polémica que mantuvo a las proteínas en el primer plano de las discusiones científicas el tiempo suficiente para despertar un interés general sobre ellas y crear conciencia de que se trataba de compuestos muy importantes a la hora de desvelar los secretos químicos de la vida. La polémica acabó también consagrando el nombre de proteínas.

3. LAS PROTEÍNAS VERDADERAS MACROMOLÉCULAS

Dejando aparte errores y teorías extravagantes, a lo que sí apuntaban los experimentos de Mulder y confirmaron los análisis elementales subsiguientes es que las proteínas eran compuestos de un peso molecular sorprendentemente elevado. De acuerdo con los cálculos de Mulder⁴ la fórmula de ese núcleo químico capaz de aceptar sucesivos átomos de azufre para convertirse en una u otra proteína, la denominada «materia prima», sería: $C_{400}H_{620}N_{100}O_{120}$, una composición que con una moderna escala de pesos atómicos daría una fórmula peso de 8600, un valor claramente de macromolécula incluso para las escalas de pesos moleculares manejadas hoy día. Mulder, de hecho, calculó un peso molecular de 54000 pues usó una escala de pesos atómicos en que al oxígeno se le adjudicaba el valor de cien. Sin embargo los valores relativos de la escala eran correctos como lo demuestra el hecho de que basta multiplicar por dieciséis y dividir por cien el valor calculado por Mulder para obtener el peso atómico correcto de acuerdo con la escala actual de pesos atómicos.

Clasificar a las proteínas como macromoléculas implicaba concederles de antemano la categoría de compuesto químico, algo no fácil de defender en una época en que la cristalización y pureza química se asumía que iban indisolublemente unidas. El carácter pegajoso, de sirope y mucilaginoso de las proteínas y su tendencia a formar coágulos y precipitados amorfos hacía muy difícil pensar que pudieran llegar a cristalizarse, y algo que no cabe esperar que cristalice no podía entrar de lleno conceptualmente en la química. Este carácter peculiar de las soluciones de proteínas más bien parecía apuntar a que las soluciones de proteínas no eran tales sino sólo suspensiones coloidales. El final del siglo XIX asistió a un pujante desarrollo de la química de los coloides y muchos de los especialistas en esta disciplina defendieron sin dudar el carácter coloidal de las proteínas. Fue precisamente tratando de aportar pruebas incontrovertibles de que las disoluciones de proteínas eran en realidad suspensiones coloidales como Svedberg, el pionero del desarrollo de la ultracentrifugación

analítica, puso fin a la controversia, ya bien entrado el siglo XX, al demostrar que las proteínas no eran agregados sino verdaderas macromoléculas.¹² La verdad es que se trataba de una discusión a la que solo prestaban ya atención los expertos en coloides, pues los químicos de proteínas ya habían acumulado datos suficientes para que desde su punto de vista no cupiera duda de que las proteínas eran verdaderos compuestos químicos, eso sí, de un peso molecular inusualmente alto para aquella época.

Argumentos a favor de que las proteínas fueran macromoléculas no faltaron, en realidad, desde los años en que Mulder publicó los resultados de su análisis elemental. Ya hemos mencionado líneas más arriba que la capacidad de cristalizar se asumía como prueba incontrovertible del carácter químico de una sustancia. Pues bien, hacia el año 1840 ya se había observado que de vez en cuando la hemoglobina cristalizaba, pronto se aprendió a hacerlo sistemáticamente, y en 1871 el fisiólogo Wilhem Preyer (1841-1898) publicó ya la cristalización de la hemoglobina de casi cincuenta especies, desde mamíferos a pájaros reptiles y peces.¹³ Elevada ya a nivel de compuesto químico puro al ser cristalizable, la hemoglobina atrajo hacia sí, enseguida, la atención de numerosos químicos. Los estudios sobre la hemoglobina sirvieron para desarrollar muy pronto conceptos muy importantes en química de proteínas como el de grupo prostético. En efecto, la hemoglobina pudo demostrarse que constaba de una fracción propiamente proteica que fue denominada globina y un grupo prostético, en este caso un derivado porfirínico, responsable del color rojo, que era fácilmente separable y cristalizable aparte. Este grupo se vio que contenía hierro por lo que fue denominado hemina.¹⁴ En consecuencia, Hoppe-Seyler propuso denominar al complejo de la hemina y la globina como hemoglobina.¹⁵

La hemoglobina, una vez revestida de la aureola de compuesto químico puro se convirtió en objetivo preferido de los especialistas en análisis elemental. Los resultados de todos estos análisis eran notablemente reproducibles y todos ellos ponían de manifiesto, independientemente de la especie de la que proviniese la hemoglobina utilizada en el análisis, que se trataba de una proteína con un contenido extremadamente bajo en hierro, aproximadamente un 0,4%.¹⁶ En base al contenido de hierro podía calcularse para la hemoglobina un peso molecular mínimo de aproximadamente 16000. Zinoffsky obtuvo resultados equivalentes en base a la determinación del contenido en azufre, asumiendo que la molécula de hemoglobina contiene dos átomos de este elemento.¹⁷ Finalmente, por aquellos años (1894), logró cuantificarse la ya de sobra conocida capacidad de unir oxígeno de la hemoglobina.¹⁸ Estos estudios pusieron de manifiesto que para unir un mol de ligando se necesitaban dieciséis mil gramos de hemoglobina un valor que de nuevo apunta a una unidad quí-

mica funcional mínima de aproximadamente 16000 de peso molecular. Hacia finales del siglo XIX, había quedado claramente establecido, por tanto, el carácter macromolecular de las proteínas por los químicos y fisiólogos. A medida que se fueron caracterizando más proteínas fue quedando claro también que su tamaño podía variar considerablemente.

4. LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS

Es obvio a primera vista, que cualquier intento de establecer algún tipo de fórmula estructural de un compuesto con la composición elemental de la «materia prima» de Mulder ($C_{400}H_{620}N_{100}O_{120}$) puede acabar no siendo otra cosa que aventurarse a poner orden en el caos. Sin embargo, los químicos aprendieron a llevar a cabo hidrólisis menos drásticas de las proteínas que las que se llevan a cabo en los análisis elementales. Estos procedimientos ofrecieron nuevas alternativas de formulación estructural, específicas para las proteínas. Estas hidrólisis llevadas a cabo en presencia de altas concentraciones de ácidos y bases fuertes a elevadas temperaturas, no reducían las proteínas a mezclas informes de compuestos orgánicos sino que permitían aislar unos pocos compuestos químicos bien definidos, caracterizados por poseer funciones amino y carboxilo al mismo tiempo, denominados aminoácidos. La química había caracterizado ya un par de estos, la glicina y la leucina, allá por el año 1820,¹⁹ mucho antes de que Mulder llevara a cabo sus experimentos de análisis elemental con proteínas. La asparagina había sido identificada como sustancia química, e incluso cristalizada, en 1806. A lo largo del siglo XIX a partir de los materiales biológicos más variados siguieron identificándose muchos otros, pues la naturaleza ha sido muy generosa a la hora de engendrar este tipo de compuestos, sobre todo en el mundo microbiano y el de las plantas. Como afirma en una revisión de 1972 sobre aminoácidos Hubert Bradford Vickery, un especialista clásico en esta materia:¹⁹

In recent years, scores of new aminoacids have been found in various plant and animal tissues; Greenstein and Winitz (1961) list 90, and Meister (1965) 183, and some of them have been found as components of antibiotic substances synthesized by lower organisms. Fowden (1964, 1970) has also reviewed the field. Few months have gone by since these publications that have not seen the description of still another new amino acid.

Sin embargo muy pocos de estos aminoácidos aparecen al hidrolizar las proteínas. En realidad en las proteínas sólo encontramos veinte aminoácidos fundamentales distintos. El resto hasta completar un número de sesenta o setenta que pueden aislarse de los hidrolizados proteicos, no son sino modificaciones de los anteriores que en una mayoría abrumadora de los casos tiene lugar una vez que estos aminoácidos fundamentales se han incorporado ya a las proteínas.¹⁹ El descubrimiento de los veinte aminoácidos fundamentales de las proteínas llevó mucho tiempo. La Tabla II recoge su enumeración junto con el año de su descubrimiento. La mayor parte de estos aminoácidos fundamentales se descubrieron a partir de hidrolizados de proteínas. Algunos sin, embargo, como la treonina se descubrieron al tratar de elaborar dietas sintéticas para la nutrición animal y observarse que, a pesar de añadirse todos los aminoácidos conocidos, todavía era necesario añadir una pequeña proporción de proteína de alta calidad nutritiva.¹⁹ Los veinte aminoácidos fundamentales que se obtienen de las proteínas pertenecen a la serie de los α -aminoácidos. Esto es, sus grupos carboxilo y amino van unidos a un mismo carbono de acuerdo con la fórmula (escrita a la manera de 1900): $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$, en que R puede ser H u otras 19 funciones químicas diferentes recogidas en la Figura 1.

TABLA II
Aminoácidos fundamentales que intervienen en la formación
de las proteínas y fecha de su descubrimiento¹⁹

1820	Glicina	1896	Histidina
1820	Leucina	1901	Valina
1849	Tirosina	1901	Prolina
1865	Serina	1901	Triptófano
1866	Ácido Glutámico	1904	Isoleucina
1868	Ácido Aspártico	1922	Metionina
1881	Fenilalanina	1932	Asparagina
1888	Alanina	1932	Glutamina
1889	Lisina	1935	Cisteína
1895	Arginina	1936	Treonina

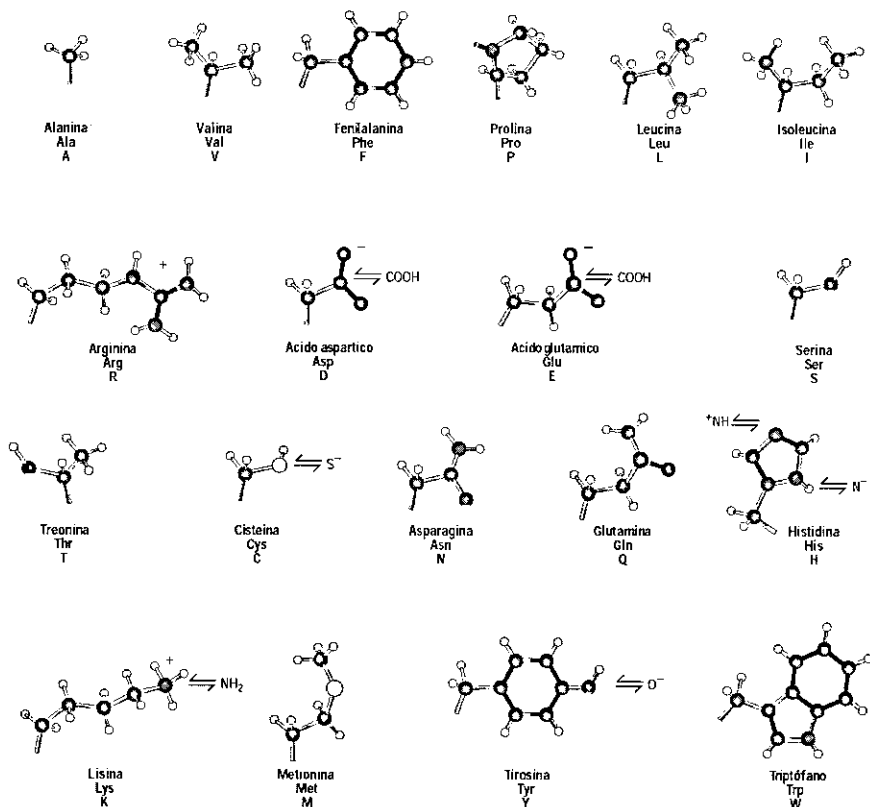


Figura 1. Los veinte residuos que se unen a los C para dar lugar a los veinte aminoácidos fundamentales de las proteínas. Los códigos de una y tres letras son los propuestos por M. Dayhoff y E. Brand, respectivamente.^{21, 22}

4.1. El enlace peptídico

Hacia 1900, existía ya una convicción generalizada de que las proteínas estaban constituidas por aminoácidos. Por estos años, como puede verse en la Tabla II, se habían caracterizado ya quince de estos componentes. El descubrimiento progresivo de los aminoácidos que forman parte de las proteínas a lo largo de la segunda mitad del siglo XIX corrió paralelo al desarrollo del concepto de enlace químico como responsable de la formación de las moléculas. Ello llevaba inmediatamente a preguntarse cómo se enlazaban químicamente los aminoácidos en las macromoléculas proteínicas. Fue en 1902, en Karlsbad, en la 74 reunión de la Sociedad alemana de investigadores de la naturaleza y médicos (Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte) donde se propuso por

Emil Fisher y Franz Hofmeister, de forma independiente y siguiendo dos aproximaciones totalmente distintas, la que resultó ser la respuesta definitiva a esta cuestión.

En los años en que llevaron a cabo sus trabajos Emil Fisher y Franz Hofmeister se conocían diversos procedimientos que hacían que las proteínas dieran lugar a soluciones coloreadas. Uno de estos procedimientos era la denominada reacción del biuret, un compuesto de fórmula $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ (dos grupos amidas unidos secuencialmente) que en condiciones alcalinas y en presencia de sulfato de cobre daba una intensa coloración azul. Al contrario de lo que ocurre con las proteínas, los aminoácidos no dan lugar a esta reacción, un fenómeno que jugó un papel clave en la dilucidación del tipo de enlace mediante el que se unían los aminoácidos para formar las proteínas.

Emil Fisher fue el prototipo del químico orgánico de la Alemania triunfante de su época, convertida en primera potencia mundial. Llegó a dirigir en Berlín un instituto de doscientas cincuenta personas. Tocó muchos temas en química orgánica aunque sus mejores trabajos fueron sobre purinas y carbohidratos, trabajos por los que recibió el premio Nobel en 1902. Estudiando los carbohidratos se interesó por los fermentos que los degradaban, que para él eran indiscutiblemente proteínas. A partir de estos estudios, observando la especificidad de estas reacciones, formuló la interacción llave cerradura como modelo visual de la interacción de los fermentos (enzimas) con sus sustratos del que tanto han echado mano los bioquímicos. Interesado por las proteínas decidió poner todos sus conocimientos de química orgánica en obtener proteínas artificiales. Basó su modelo de construcción de éstas en la polimerización de α -aminoácidos mediante enlaces amídicos sucesivos, y acuñó para describir estos compuestos los términos de «péptido» y «polipéptido». Su primer péptido fue una glicilglicina. Para el año del congreso de Karlsbad había conseguido sintetizar un tetrapéptido. Este compuesto daba la reacción del «biuret» característica de los polipéptidos y su hidrólisis mediante los procedimientos que descomponían las proteínas en aminoácidos permitía obtener en forma libre de nuevo, los aminoácidos que integraban el tetrapéptido, como debía esperarse si la hipótesis de Fisher era correcta. Estos resultados presentados en Karlsbad fueron publicados como resumen de su conferencia en el mismo año²⁰ y mucho más extensamente cuatro años después.²¹

Franz Hofmeister no era químico sino un fisiólogo que, con frecuencia, buscaba entender la fisiología desde la química. Fue discípulo de Carl Lehman un experto de renombre en la degradación de las proteínas en el intestino, degradación que generalmente se admitía que ocurría en dos etapas merced a la acción de los fermentos intestinales. La primera etapa llevaba a la acumulación de unos fragmentos comúnmente conocidos como albumosas y peptonas que eran degradados

en una segunda etapa a aminoácidos, por acción de otros fermentos. Curiosamente en aquella época se pensaba que las albumosas y peptonas, desde el punto de vista de la nutrición eran más importantes que los aminoácidos como tales. Se pensaba que estos bloques atravesaban la pared intestinal y eran ensamblados otra vez en nuevas proteínas en los tejidos. La comunicación de Hofmeister en el Congreso de Karlsbad fue recogida en un artículo publicado simultáneamente.²² La aproximación de Hofmeister en este artículo al problema de cómo se unen los aminoácidos para dar lugar a las proteínas no estaba basada en experimentos llevados a cabo por su laboratorio con vistas a resolver el problema, sino que era enteramente deductiva. Hofmeister en su estudio considera los diversos enlaces posibles entre los aminoácidos y los va descartando uno a uno. Considera en primer lugar los enlaces eter, ester o carbono-carbono y los descarta pues era ya de sobra conocido que el fermento intestinal conocido como tripsina no degradaba este tipo de enlaces. Descarta también las uniones del tipo $=C-N-C=$, del tipo de las del biuret, pues ello daría lugar a que las proteínas tuvieran numerosos grupos carboxilo libres y que, consecuentemente, tuvieran un carácter fuertemente ácido, en contra de lo que dictaba la experiencia. Sin embargo, dado que las proteínas dan una reacción de biuret positiva, al contrario de lo que les ocurre a los aminoácidos, cabría pensar que la condensación de estos debía llevar a la formación de algún tipo de enlace parecido al del biuret, esto es, a la formación de una cadena conjugada de enlaces amida. La formación de cadenas de α -aminoácidos en las que cada uno de ellos está unido a los que lo flanquean por sus grupos NH_2 y carboxilo, respectivos, por enlaces amida, daría lugar a la aparición de una estructura de este tipo. En base a todas estas consideraciones Hofmeister propone que las proteínas se forman básicamente a partir de este mecanismo de condensación entre aminoácidos que daría lugar al enlace (destacado en negrita) $-NH-C_{\alpha}-CO-NH-C_{\alpha}-CO-$ que se repetiría regularmente. Para no complicar demasiado la fórmula se ha omitido que el carbono- α lleva unido bien dos átomos de H (en el caso del aminoácido glicina) o bien un átomo de H y uno de los 19 residuos recogidos en la Figura 1 en el caso de los restantes aminoácidos. De esta forma en el polipéptido es posible identificar dos regiones: una lineal definida por la cadena que forman los carbonos- α unidos entre sí por enlaces amida, normalmente denominada esqueleto peptídico o, también cadena peptídica; otra formada por el conjunto de los 19 residuos de la Figura 1 que de alguna forma cuelga de esta.

4.2. El análisis de aminoácidos

Una vez que ganó aceptación la idea de que las proteínas eran polímeros de aminoácidos, era obvio que la determinación de su composición en aminoácidos delineaba una imagen química del compuesto mucho más informativa que la que suministraba su mera composición elemental. Fue entonces cuando se impuso

crear un sistema de símbolos equivalente al de los elementos químicos para poder condensar en unos pocos caracteres lo que podríamos llamar la fórmula aminoacídica de las proteínas. En una amplia revisión que recogía todos los resultados disponibles de análisis de aminoácidos de las proteínas Edwin Brand propuso el código de tres letras para designar los aminoácidos que todavía usamos hoy (Figura 1).²³ En la actualidad normalmente uno presenta la composición de aminoácidos en tablas, pero en aquella época no era extraño publicar fórmulas empíricas de las proteínas del tipo de Gly₂₇Val₃₄Leu₄₆...., remedando las usadas para reflejar la composición química elemental. Hoy día los símbolos de tres letras cada vez se usan menos, habiendo sido reemplazados por los de una letra (Figura 1). Esta nueva representación de los aminoácidos fue propuesta en 1966 en los comienzos de la bioinformática con objeto de facilitar los cálculos, dada la limitación de memoria y la lentitud de los procesadores de los computadores de la época.²⁴

Aunque existían algunos procedimientos químicos para determinar el contenido de las proteínas en algunos aminoácidos como la lisina o la arginina, basados en el análisis de los diferentes estados del nitrógeno,^{25, 26} el método de uso más general para determinar la composición de aminoácidos de una proteína era el método microbiológico.²⁷ Este procedimiento estaba basado en el uso de microorganismos mutantes del tipo de *Neurospora* o *Lactobacillus*, que carecían específicamente de la capacidad de sintetizar cada uno de los veinte diferentes aminoácidos de las proteínas. La composición cuantitativa de aminoácidos se determinaba a partir del crecimiento del cultivo de cada uno de estos mutantes, estrictamente dependiente de la cantidad en el medio del aminoácido que específicamente no puede sintetizar, tras las calibraciones apropiadas. La aparatosis del proceso y la lentitud explica que se impusiera buscar otras alternativas. No obstante el método gozó de partidarios entusiastas entre los bioquímicos de amplio reconocimiento de la época. Así J. T. Edsall, hablando de los progresos en la caracterización de proteínas, no dudaba en incluir entre las técnicas que más decisivamente habían contribuido a ello:

the introduction of the microbiological methods, which have furnished such rapid and astonishingly accurate estimations of small amounts of many amino acids, including several that were previously inaccessible to accurate estimation.²⁸

4.3. La cromatografía: una nueva solución

La determinación de la composición de aminoácidos de las proteínas va a cambiar, sin embargo, radicalmente gracias a la cromatografía. William Stein y Stanford Moore desarrollaron en base a esta última técnica un procedimiento de

alguna forma definitivo para resolver este problema que, en esencia, es el que usamos todavía hoy día en los laboratorios de química de proteínas.

La cromatografía fue inventada muy al comienzo del siglo XIX por el botánico ruso Michael S. Tswett. A él se debe también el nombre de la técnica. La desarrolló para demostrar que en la coloración de las hojas de las plantas intervienen varios pigmentos. Específicamente, él demostró que cuando una gota de un extracto del color de una hoja se depositaba en un papel ésta se extendía en círculos de amplitud progresiva cada uno de un color. También observó que se podían rellenar tubos con el adsorbente, introducir por un extremo el extracto coloreado de las hojas y después ir eluyendo, con los solventes apropiados, en forma de discos de color, los distintos pigmentos presentes en este.^{29, 30} Es lo que hoy denominamos cromatografía en columna. Aunque por diversas razones no se prestó atención a los trabajos de Tswett a lo largo de casi veinte años, hacia 1930 la potencia de la técnica comenzó a ser reconocida. La potencia de la cromatografía para el aislamiento de sustancias tal como hoy la conocemos debe mucho a los trabajos teóricos y desarrollos prácticos llevados a cabo a partir de esa década por J. P. Martin and R. L. M. Synge, trabajos que les hicieron merecedores el premio Nobel en 1948.³¹ Sin embargo, aunque lo intentaron muy pronto, el desarrollo de un método que permitiera aplicar la cromatografía a la separación y cuantificación de las mezclas de aminoácidos provenientes de la hidrólisis de las proteínas se les resistió y despertó un cierto escepticismo en muchos, como reflejan las palabras del propio Edsall en el artículo antes citado:

The future significance of partition chromatography and allied techniques may be very great indeed, but, at present, the figures derived from these methods appear to be subject to somewhat greater error than those derived from some of the other methods (microbiological methods, N.A.).²⁸

El éxito de la cromatografía en el análisis de aminoácidos vino de la mano de William Stein y Stanford Moore. La clave estuvo en usar sin más los aminoácidos tal como se obtienen de la hidrólisis clorhídrica en lugar de sus derivados *N*-acilo como hacían Martin y Synge. Ello permitía utilizar además solventes acuosos para la cromatografía lo que abarataba y simplificaba muy considerablemente el proceso cromatográfico y el manejo de reactivos. Para cuantificar los aminoácidos eluidos echaron mano de un viejo reactivo, la ninhidrina. En 1949, el método, que había comenzado a desarrollarse sólo en 1946, permitió ya ofrecer el análisis aminoacídico completo de la α -lactoglobulina y se la seroalbúmina bovina.^{32, 33} Para 1958 el método pudo ser ya totalmente automatizado y los analizadores de aminoácidos comenzaron a comercializarse. Como se ha apuntado unas líneas más arriba, los analizadores

automáticos de aminoácidos actuales no son sustancialmente diferentes de estos primeros. Obviamente han mejorado considerablemente las fases sólidas de las columnas cromatográficas empleadas, lo que se ha traducido en un aumento considerable de la sensibilidad y en un acortamiento también considerable del tiempo de análisis.

A pesar de la antigüedad de la técnica, el análisis de aminoácidos sigue siendo en la actualidad uno de los recursos más potentes que los laboratorios de química de proteínas ponen al servicio de las ciencias biológicas y disciplinas afines. La composición de aminoácidos es una auténtica huella dactilar de la proteína y los actuales analizadores ponen a nuestra disposición imágenes muy fidedignas de éstas a partir de cantidades mínimas. El análisis de aminoácidos se ha convertido, así, en un instrumento imprescindible de control de calidad de la síntesis de proteínas. Además, el desarrollo de algoritmos capaces de comparar una composición de aminoácidos con las predichas a partir de los datos depositados en las bases de secuencias, ya sean de DNA o de proteínas, hace del análisis de aminoácidos un procedimiento de identificación de proteínas extremadamente eficaz, dado el volumen que estas bases de datos tienen hoy día.³⁴

5. LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS

La unión de aminoácidos mediante la formación de enlaces amida entre sus grupos amino y carboxilo permitía concebir a las proteínas como polímeros lineales. Los veinte aminoácidos fundamentales de las proteínas se distribuirían a lo largo de estos polímeros de acuerdo con una secuencia específica de cada una de ellas. Esta composición secuencial, a la que los textos se refieren en la actualidad con expresiones como «secuencia de una proteína» o «estructura primaria de una proteína», daría cuenta de su composición de aminoácidos característica. Sin embargo hasta bien avanzada la primera mitad del siglo XX no todos los especialistas estaban convencidos de que éste fuera un modelo suficiente sólido. Svedbberg, por ejemplo, proponía que todas las proteínas se formaban a base de la combinación de una o varias subunidades peptídicas comunes a todas ellas unidas no necesariamente por enlaces covalentes. Se basaba para ello en las notables similitudes que en peso molecular y forma había encontrado entre la albúmina de huevo y la proteína de Bence-Jones ya en sus primeros trabajos de centrifugación analítica.³⁵ El descubrimiento de la disociación de la hemoglobina por él mismo e independientemente por Adair,^{36,37} al estudiar las proteínas como osmolitos se consideró un argumento más en apoyo de esta propuesta. Svedbberg llegó incluso a proponer el peso molecular de estas unidades fundamentales.³⁸⁻⁴⁰ Una variante de esta propuesta, basada en los mismos datos experimentales y en los datos conocidos por entonces de composición aminoacídica de las proteínas, a la que también se le prestó bastante atención dado todo el aparato matemático en que aparentemente se sustentaba fue la formulada por Bergman y Niemann.⁴¹ Entre los que prestaban atención a esta teoría de que las proteínas se ensamblaban mediante mecanismos químicos todavía desconocidos a partir de subunidades polipeptídicas de secuencias aminoacídicas repetitivas encontramos al mismo J. Monod.⁴² Algunos consideraban incluso que dado que las proteínas se ensamblaban de esta forma, era una inutilidad tratar de buscar un código genético. Sydney Brenner se hace eco de esta disputa en su biografía:⁴³

He's (Fred Sanger) actually shown this remarkable fact that this things (the proteins) have a chemical structure in the form of sequence of amino acids. Until that time no one actually believed this. They all thought that proteins were polymers of amino acids just joined together according to their abundance. There's something called the Bergman-Niemann hypothesis, which said that things occurred with a frequency according to their abundance.

Otros expertos en proteínas, aunque admitían que los aminoácidos podían formar en las proteínas una única cadena lineal, dudaban de que este hecho tuviera mucha importancia. Este escepticismo derivaba de la observación de que muchas proteínas presentaban diferencias de comportamiento claramente detectables aun dentro de la misma especie, a la luz de las técnicas químico-físicas de análisis del momento. Las diferencias más aparentes eran las de carga, que obviamente se atribuían a diferencias en la composición de aminoácidos. Puesto que podían darse también cambios entre aminoácidos con carga de igual signo, o sin carga, se sospechaba que estas diferencias de composición podían estar pasando desapercibidas la mayor parte de las veces y ser un fenómeno bastante extendido. En una amplia revisión sobre este tema, publicada en fecha tan tardía como 1954, se concluía:

All protein preparations prepared so far represent populations of closely related members of a family, not collections of identical molecules.⁴⁴

Teoría que parecía, pues, hacer bastante irrelevante la composición de aminoácidos y, por ende, el posible orden de estos en las proteínas, a la hora de dar razón de las propiedades biológicas de estas.

Las investigaciones de Fred Sanger se encargaron de demostrar, sin embargo, que las proteínas estaban constituidas por unas pocas cadenas polipeptídicas lineales en las que los aminoácidos definían una secuencia de composición característica. Con ello, Sanger, introdujo a las proteínas plenamente en la Química.

Los trabajos de investigación mediante los que Fred Sanger demostró que los aminoácidos se ordenan en una proteína en secuencias perfectamente definibles tienen su origen en los de Edwin Brand, investigador ya mencionado, uno de los especialistas en determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas que gozaba de mayor reconocimiento a mediados del siglo XX. Era partidario decidido del análisis microbiológico como técnica para determinar la composición de aminoácidos de una proteína. Como un elemento adicional de caracterización

de la composición aminoacídica de las proteínas, sus trabajos incluían siempre la determinación del número de aminoácidos que presentaban libre el grupo α -amino. Este valor obviamente indicaba el número de cadenas polipeptídicas de que constaba la proteína. En general se trataba de números bastante elevados así tanto para la seroalbúmina, como para la α -globulina y la insulina Brand, proponía un número de aminoácidos con extremo α -amino libre de diez. El método utilizado por Brand para estas determinaciones se prestaba, sin embargo, a grandes errores. El procedimiento consistía en restar el número de lisinas calculado a partir del análisis de aminoácidos microbiológico del número de grupos amino libres de la proteína calculados de forma independiente. La fuente de error del método derivaba de que había que restar dos números grandes de magnitudes parecidas obtenidos experimentalmente, lo que llevaba a que los errores porcentuales de la determinación fueran necesariamente muy elevados. Con objeto de aumentar la precisión de estas determinaciones se le encomendó a Sanger, nada más entrar a trabajar en la Universidad de Cambridge, que pusiera a punto un método basado en el dinitrofluorobenceno para determinar directamente el número de aminoácidos de una proteína que presentaban libre su grupo α -amino.⁴⁵ Este compuesto reacciona con los grupos amino libre de las proteínas formando un derivado dinitrofenilado de color amarillo intenso que no se destruye cuando se procede a hidrolizar la proteína mediante tratamiento con ácidos concentrados. La identificación de los aminoácidos dinitrofenilados obtenidos tras la hidrólisis permite conocer el número y la identidad de los aminoácidos con grupo α -amino libre de una proteína. El método tenía dos limitaciones importantes que daban lugar a ambigüedades. La primera de ellas era que el grupo amino en posición α de la lisina también daba derivados dinitrofenilados. La identificación de derivados coloreados de la lisina en el hidrolizado de una proteína no era, por tanto, indicación unívoca de que este aminoácido tuviera, efectivamente, su grupo α -amino en estado libre. La otra fuente de ambigüedad provenía del hecho de que durante la hidrólisis de la proteína mediante tratamiento con ácidos concentrados los derivados dinitrofenilados de la glicina se hidrolizan en mayor o menor extensión también. Con objeto de obviar esta última ambigüedad, Sanger se vio obligado a reducir el tiempo de hidrólisis al mínimo necesario. Al hacer esto, observó que obtenía productos dinitrofenilados adicionales. Al analizarlos, vio que se trataba de productos surgidos de una hidrólisis parcial de la proteína en los que el aminoácido dinitrofenilado (inicialmente con su α -aminoácido libre), aparecía formando parte de dipéptidos y a veces también de tri y tetrapéptidos. La composición de estos péptidos delataba que estos no eran otra cosa que fragmentos en los que el aminoácido dinitrofenilado iba acompañado de aquellos otros que constituían los eslabones siguientes de la cadena polipeptídica. Obviamente, estos resultados suponían un argumento importante a favor de que los aminoácidos en las proteínas polimerizaban ordenadamente, teoría que ya hemos visto que científicos muy importantes ponían en duda. Aprovechando la posibilidad de engendrar

nuevos aminoácidos con extremos α -amino libres mediante hidrólisis parciales de las proteínas, Sanger se propuso demostrar que el hecho de que los aminoácidos aparecieran polimerizados ordenadamente en el extremo α -amino de las proteínas no era un fenómeno exclusivo de esta región sino que se extendía a toda la cadena polipeptídica. Para llevar a cabo esta investigación, Sanger escogió la insulina, una proteína fácil de obtener en cantidades razonables y a la vez una de las proteínas más pequeñas de entre las que ya habían sido bien caracterizadas en aquella época. Tras diez años de trabajos casi en solitario, durante los que realizó una cantidad de determinaciones que todavía hoy impresionan cuando se releen los artículos en que publicó sus resultados, Sanger determinó sin ambigüedades lo que él llamó el orden de polimerización de los aminoácidos en la insulina y hoy denominamos, la secuencia de la insulina.⁴⁶⁻⁵³

Sydney Brenner recuerda en sus memorias el impacto de los resultados de Sanger:

There is a club in Oxford called the Alembic Club, which was for the discussion of chemistry. And I can remember—I think it must have been either late 1953 or early 1954, but certainly while I was at Oxford—going to a lecture that was given by Fred Sanger on the structure [the amino acid sequence] of insulin. He showed how he deduced the structure. I remember that he had a wonderful set of little blocks [representing amino acids] which he turned over to face the audience as he related the structure. And the thing that struck me, because protein structure was totally impossible thing then, was that at the end of the lecture Sir Robert Robinson stood up and said, «Doctor Sanger has made proteins part of chemistry. He's actually shown this remarkable fact that these things have a chemical structure in the form of the sequence of amino acids». Until that time no one actually believed this.⁴³

Las investigaciones de estos diez años de trabajo fueron recogidas en seis artículos publicados todos ellos en una misma revista, ciertamente no de alto impacto. Por las publicaciones recogidas en estos seis artículos publicados desde 1945 a 1955 Fred Sanger recibió tres años más tarde, en 1958 su primer Premio Nobel.

El valor científico de los trabajos de Sanger es incuestionable. Los párrafos precedentes han tratado de dar cuenta de ello. Sin embargo, si bien los estudios de Sanger constituyeron un hito en el desarrollo del concepto bioquímico de las proteínas, y junto con el establecimiento por los mismos años de la estructura del ácido desoxiribonucleico, en el del concepto químico de la vida, no puede decirse lo mismo de la metodología desarrollada por Sanger para determinar la

secuencia de aminoácidos de la insulina. Justo al contrario de la técnica desarrollada por él años más tarde para la secuenciación de los ácidos desoxiribonucleicos, que le hizo merecedor de un segundo premio Nobel en 1980 y abrió las puertas a los proyectos genoma e indirectamente a la secuenciación masiva de proteínas, procesos clave de la revolución biomédica moderna. En la actualidad se conocería la secuencia de aminoácidos de muy pocas proteínas si el único instrumento de que hubiéramos dispuesto para acceder a esta información fuera la extremadamente laboriosa técnica que utilizó Sanger en sus trabajos con la insulina. De igual forma, la biología moderna no hubiera podido desarrollarse en numerosas de sus facetas, a la velocidad que lo ha hecho si no se hubiera determinado la secuencia de cientos de proteínas a partir del final de la década de 1960. El mérito del desarrollo de una técnica eficaz para la secuenciación de proteínas es sin lugar a duda de Pehr Edman, un científico que de no haber sido por una muerte relativamente temprana, a los 60 años, hubiera visto probablemente recompensada su contribución a la ciencia con el Premio Nobel.

El punto de partida de la contribución de Edman fueron las investigaciones llevadas a cabo por Abderhalen y Bockmann hacia 1930, que consiguieron hidrolizar secuencialmente el tripéptido alanil-glicil-leucina e identificar en cada caso el aminoácido desprendido, tras separarlo del resto del péptido mediante cristalización, regenerarlo, pues se desprende en forma de hidantoina, y volverlo a cristalizar de nuevo.⁵⁴ Estos trabajos se basaban a su vez en los de Bergman y colaboradores que pusieron de manifiesto que el fenilisocianato cuando reaccionaba con el grupo α -amino libre de un polipéptido debilitaba el enlace peptídico mediante el que este aminoácido se unía al resto del polipéptido. Ello permitía desprenderlo en condiciones en las que el resto de los enlaces peptídicos no resultaban afectados.⁵⁵ Abderhalen y Bockmann cayeron en la cuenta de que la eliminación selectiva de este residuo, dejaba un nuevo grupo α -amino libre, susceptible de ser tratado en una etapa subsiguiente de nuevo con fenilisocianato y ser también desprendido. La identificación de los productos desprendidos en cada etapa, permitirían establecer directamente por tanto, el orden de los aminoácidos del péptido a partir de aquel que inicialmente tenía su α -amino libre. En el método propuesto por Abderhalen y Bockmann el péptido era tratado con metanol-HCl por media hora a 60 °C, con objeto de desprender el aminoácido que había reaccionado con el fenilisocianato. Edman al analizar las limitaciones del método, se percató, de que en estas condiciones un bajo porcentaje de los enlaces peptídicos del péptido se hidrolizaban también al azar, generando grupos α -amino adicionales libres, lo que hacía que al llevar a cabo un segundo tratamiento con fenilisocianato se desprendieran otros aminoácidos, aparte del que ocupaba la segunda posición. La situación se iba agravando a medida que avanzaba el número de ciclos, de ahí que los resultados se volvieran ambiguos enseguida. Edman observó también que a esta pérdida de calidad con-

tribuía también el hecho de que era muy difícil conseguir que todos los aminoácidos que habían reaccionado con el fenilisocianato se desprendiesen de una vez. En consecuencia, parte de ellos se desprendían en los tratamientos subsiguientes, lo que hacía que tras cada uno de estos obtuviéramos una mezcla en que junto con el aminoácido que le correspondía desprenderse en ese ciclo estuvieran también presentes en proporciones diversas los que se habían desprendido en ciclos anteriores. Finalmente Edman vio también claro que era necesario simplificar el engorroso proceso de identificación de los aminoácidos desprendidos, que como hemos detallado más arriba implicaba dos cristalizaciones y la obtención del aminoácido original en forma libre a partir de su derivado hidantoínico.

El desprendimiento del aminoácido que ha reaccionado con el fenilisocianato es debido a que el oxígeno del isocianato lleva acabo un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico que une el primer aminoácido con el segundo. Tomando en consideración este mecanismo de reacción, Edman decidió sustituir el fenilisocianato por el fenilisotiocianato, pues el azufre resultaba ser un nucleófilo mucho mejor que el oxígeno en esta reacción debido a un menor solapamiento de los orbitales p que compensaba con creces la mayor electronegatividad del oxígeno. Con ello consiguió disminuir considerablemente el arrastre de los productos de una reacción en la siguiente.⁵³ La siguiente mejora del método vino de la mano de un estudio cuidadoso de cómo tras el ataque nucleofílico del enlace peptídico se acaba sintetizando el derivado hidantoínico. Edman pudo establecer que el aminoácido con el α -amino libre se desprende del resto del péptido como una 5-tioazolinona, un compuesto que es inestable y que acaba convirtiéndose bien por calor o bien en solución acuosa ácida en el isómero 2-tiohidantoina (Figura 2). La reacción I no es hidrolítica y puede llevarse a cabo, por tanto, en presencia de ácidos anhídros con relativa rapidez, mientras las reacciones III y IV son lentas y requieren soluciones acuosas. El establecimiento de este mecanismo de reacción, le permitió a Edman diseñar un ciclo de degradación que podía llevarse a cabo en los cuatro pasos siguientes: (1) formación del feniltiocarbamil-péptido; (2) formación de la feniltioazolinona-aminoácido por un breve tratamiento con ácido en condiciones anhidras del péptido modificado; (3) extracción de este último compuesto; (4) conversión del aminoácido extraído tras ser transferido a una solución acuosa ácida a la forma de derivado de feniltiohidantoina. La brevedad y las condiciones anhidras del paso segundo evitaban de forma muy considerable la hidrólisis al azar del péptido y, consecuentemente, la aparición en ciclos sucesivos de grupos α -amino libres adicionales que como señalamos anteriormente eran una segunda causa de ambigüedad de los resultados una vez que se habían llevado a cabo unos pocos ciclos. Finalmente, aprovechando los avances de la cromatografía que hemos reseñado con anterioridad, Edman puso a punto un método de identificación

en 1960, en un artículo en los *Annals of the New York Academy of Sciences*.⁵⁶ En este mismo artículo Edman presentó la secuencia de aminoácidos correspondientes a los dieciocho residuos contiguos al aminoácido con el grupo α -amino libre de la lisozima. También se afirma en él, que podía llevarse a cabo fácilmente un ciclo por día, con lo que el establecimiento de la secuencia de la lisozima requeriría sólo meses, en lugar años como necesitó Sanger con la insulina. El método de Edman, a pesar de todo, no obviaba de modo absoluto la aparición de ambigüedades cuando se llevaban ya realizados muchos ciclos debido a la imposibilidad de eliminar del todo el arrastre de aminoácidos de ciclos anteriores, y a que no es posible tampoco evitar un cierto porcentaje de hidrólisis del péptido al azar a medida que avanza el proceso. También llegaba un momento en que la cantidad de aminoácido hidantoinilado que se formaba era muy pequeña, debido a las inevitables pérdidas de polipéptido a lo largo del proceso a causa de las manipulaciones que requiere cada ciclo. Por ello la secuenciación de una proteína completa requería previamente su fragmentación en unos cuantos trozos. Obviamente un proceso repetitivo como el de Edman se prestaba a la automatización. Para 1963, Edman ya había diseñado una máquina automática de secuenciar proteínas. Con ella logró identificar sin ambigüedades los productos de los primeros treinta y cinco ciclos de degradación a los que sometió a la globina.⁵⁵ Cuatro años más tarde la máquina de Edman había alcanzado su diseño definitivo que fue publicado en las primeras páginas del primer número del *European Journal of Biochemistry*.⁵⁷ Una foto de la máquina, su diagrama general, y el de la cámara de reacción aparecen recogidos en la Figura 3. Las reacciones se llevaban a cabo en la copa marcada con A en el diagrama inferior de la figura. Al objeto de conseguir que la proteína fuera expuesta en una superficie muy grande para aumentar al máximo le eficiencia de las reacciones químicas y al mismo tiempo utilizar la menor cantidad posible de reactivo, esta copa giraba a alta velocidad. Por ello esta máquina recibió el nombre de *spinning cup*, nombre con el que aparece citada infinitas veces en la literatura. Con aquella máquina Edman conseguía, finalmente, identificar sin ambigüedades los productos de los primeros sesenta ciclos de degradación secuencial de la mioglobina.⁵⁵

A lo largo de los años la máquina diseñada por Edman ha ido sufriendo numerosas modificaciones en su diseño. Se abandonó el *spinning cup*, y se sustituyó por un cartucho de reacción que permitía llevar a cabo la mayor parte de las reacciones en fase gaseosa. La máquina pasó entonces a llamarse *gas phase sequenator*. Este cartucho de reacción se abandonó después por otro sistema que permitía aun mayor precisión a la hora de añadir los diferentes reactivos y, por consiguiente, miniaturizar el proceso considerablemente. La máquina pasó entonces a llamarse *pulsed liquid sequenator*. Por supuesto, hubo otros muchos diseños, pero ninguno de ellos consiguió con-

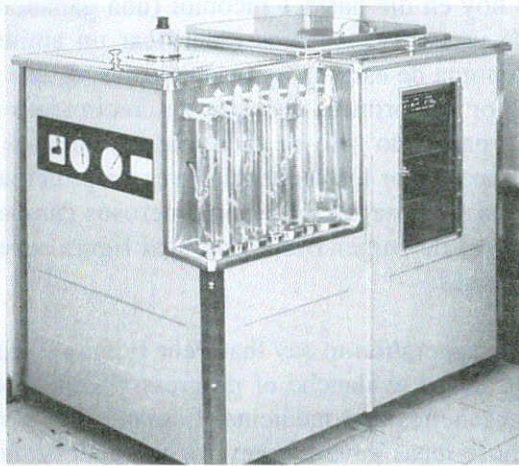
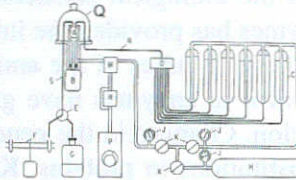
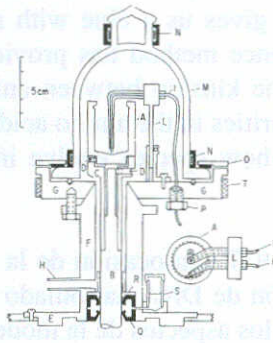
A**B****C**

Figura 3. Secuenciador de Edman. **A**, Aspecto general del aparato; **B**, diagrama del equipo; **C**, cámara de reacción (etiquetada con Q en B) en la que aparece en esquema el *spinning cup* (etiquetada como A).⁵⁵

solidarse en el mercado, excepto estos últimos mencionados expresamente. Todas estas máquinas, no obstante, no son sino mejoras, con mayor o menor fortuna de la de Edman. En sus primeros estudios, antes de desarrollar la máquina automática, Edman venía a necesitar para sus secuenciaciones de 1 a 2 milimoles de proteína. Con su máquina de 1967 necesitaba sólo 300 nano-

moles. Con las de hoy en día basta 1 picomol (una ganancia en sensibilidad de mil millones de veces), y podemos identificar un aminoácido cada cincuenta minutos. Con una de estas máquinas actuales, el que les habla fue capaz de secuenciar por vez primera el factor de crecimiento para fibroblastos humano en un mes partiendo sólo de cien microgramos de proteína. La información proporcionada por los secuenciadores de proteína desde que estuvieron disponibles ha sido inapreciable en numerosos campos de las ciencias de la vida. En palabras de Birger Blombäck, una figura señera también de la química de las proteínas:

It is no exaggeration to say that Pehr Edman's sequence method is instrumental in the avalanche of progress which followed in molecular biology, genetics and medicine. Edman will be remembered as a scientist whose ideas gave the key for the understanding of the inner core of the mysterious protein molecules. His work therefore marks the beginning of a new era in the biological sciences. Structural elucidation of hormones and enzymes has provided the information which is a prerequisite for their synthesis. Studies of the amino acid sequence of substrates and *active centra* in enzymes have given us clues as to the mechanisms of their action. Changes in the genes have been demonstrated as amino acid substitutions in proteins. Knowledge about the nature of these substitutions helps us to understand the pathogenesis of different diseases and gives us a clue with regard to adequate therapy. Pehr Edman's sequence method has provided us with a new *Systema Naturae* in which the kinship between animal species is registered on the basis of similarities in the amino acid sequences of their proteins. We can appreciate how species evolve in a natural selection process.⁵⁸

Estas palabras están escritas en 1977 con ocasión de la muerte de Edman. Es obvio que hoy día la secuenciación de DNA ha tomado el relevo de la secuenciación de Edman en muchos de los aspectos de la moderna biología apuntados por Blombäck, como es el caso de la genómica evolutiva, disciplina que dio sus primeros pasos gracias a la secuenciación de proteínas por el método de Edman. Sin embargo, hay que evitar que este desplazamiento se traduzca en olvido de lo mucho que los comienzos de esta moderna biología debe a los trabajos de Edman. Por otra parte, aunque desplazada de este papel protagonista, la secuenciación de Edman sigue siendo todavía un instrumento inapreciable de los laboratorios de los servicios centrales de nuestros centros de investigación. La trascendencia de los resultados derivados de la metodología desarrollada por Edman lo sitúan, por tanto, a la altura de otros grandes científicos que revolucionaron la Biología con sus desarrollos metodológicos y por

ello recibieron el premio Nobel. Por citar a algunos: Svedberg por centrifugación analítica; Tiselius por la electroforésis; Martin and Synge por la cromatografía; Merrifield por la síntesis de macromoléculas en fase sólida; Mullis por el PCR. Como dije más arriba, es bastante difícil de imaginar que este reconocimiento no le hubiera llegado también a Edman de no haberse interpuesto una muerte prematura.

6. EL ESTADO PLEGADO DE LAS PROTEÍNAS

Los estudios de Fischer, Hofmeister, Sanger y Edman, llevan inexorablemente a la conclusión de que las proteínas son unos largos polímeros lineales. De acuerdo con ello, es posible imaginar a las proteínas en solución como largas cadenas de aminoácidos serpenteando entre las moléculas de agua. Curiosamente, sin embargo, no era común hablar de las proteínas en estos términos, a pesar de que las evidencias para rechazar este modelo de comportamiento en solución tardan mucho en acumularse y en formularse con nitidez. Es más, aún no estaba firmemente establecido que las proteínas eran el tipo de polímero que Sanger demostró definitivamente que eran, cuando ya Hsien Wu, a la sazón profesor en la Facultad de Medicina de Peiping,⁵⁹ propuso en 1931 que las proteínas en solución (fueran polímeros lineales o no), debían adoptar una configuración tridimensional compacta y además definida.⁶⁰ El punto de partida lo constituyeron sus estudios sobre la desnaturalización de las proteínas.

La desnaturalización de las proteínas es un proceso típico y exclusivo de este tipo de compuesto químico. Se trata de un proceso distinto del de precipitación, tan frecuente en química, que no lleva consigo cambio químico alguno en las propiedades del compuesto, que vuelve al estado soluble inicial tan pronto como se retira el agente precipitante. La desnaturalización, por el contrario hace que la proteína cambie de propiedades de forma que deja de ser ya soluble en las condiciones en que previamente lo era. Aparte de ser un fenómeno específico de las proteínas, la desnaturalización se caracteriza también por ser inducida por un conjunto extremadamente variado de agentes (Tabla III); por el orden monomolecular del proceso de desnaturalización; por no ir acompañada de cambio en el peso molecular u otra característica química o física de la proteína, aparte de la alteración de la solubilidad; por el aumento de la digestibilidad de la proteína desnaturalizada; por el cambio en las propiedades antigénicas; y, finalmente, por la pérdida de la capacidad de cristalizar.

TABLA III

Agentes que inducen la desnaturalización de las proteínas⁶⁰

Ácidos y Alcalis
Sales de metales pesados
Alcoholes, Éter, Fenol y numerosos otros compuestos orgánicos
Urea concentrada
Sales de guanidinio concentradas
Calor
Congelación
Luz ultravioleta
Altas presiones
Agitación
Ultrasonido
Deshidratación

Ya hemos hablado con anterioridad de la capacidad de las proteínas de cristalizar y de lo que supuso este descubrimiento para atraer la atención de los químicos. Cuando Hsien Wu llevaba a cabo sus estudios sobre la desnaturalización de las proteínas, la resolución de la estructura atómica de las moléculas pequeñas a partir de la difracción de los rayos X de sus cristales era una técnica bien desarrollada que había dado lugar también a desarrollos teóricos importantes. Estaba sólidamente establecido el principio de que la clave de la cristalización consistía en la capacidad de las moléculas de precipitar ordenada y regularmente en el espacio de forma que sus átomos adoptaran también una disposición tridimensional regular a lo ancho y largo del cristal. Al aplicar estos principios a las proteínas, la conclusión de que las moléculas de éstas tienen que ser bastante rígidas y que sus átomos tienen que ocupar una posición relativa fija se impone necesariamente, lo que es obviamente incompatible con el estado desplegado fluctuante del que hablamos al comenzar este apartado. De alguna forma, según Wu, la propia molécula de proteína nativa pueden ser considerada ella misma como un microcristal, con la salvedad de que no tiene que haber necesariamente una regularidad interna en la disposición de sus átomos. Hsien Wu postuló, en consecuencia, que el tipo de fuerzas responsables de la formación

de los cristales «valencias secundarias» las llamaba él, para distinguirlas de las valencias primarias, los enlaces químicos covalentes que diríamos hoy, debían ser las responsables también de la estructura interna de las proteínas, y que los agentes desnaturalizantes no harían otra cosa que debilitar estas fuerzas. La desnaturalización de las proteínas equivaldría, por tanto, a la disolución de un cristal, una equiparación que necesariamente obliga a postular un proceso inverso, la renaturalización, para que el modelo sea termodinámicamente correcto. Aunque por mucho tiempo la irreversibilidad del proceso había sido considerada uno de los atributos de la desnaturalización, en base a las observaciones de los efectos del calor sobre la albúmina de huevo, en 1925 Anson y Mirsky, y un par de años más tarde el propio Wu, ya habían demostrado utilizando hemoglobina y metahemoglobina que las proteínas desnaturalizadas pueden ser llevadas de nuevo a su estado nativo, de forma que recuperaban su actividad biológica y su capacidad de cristalizar. La observación de que muchas otras proteínas se comportaban de forma equivalente demostró que la renaturalización era un proceso suficientemente general en las proteínas y que la excepción era más bien el que su desnaturalización fuera irreversible.⁶⁰⁻⁶³

7. NATURALEZA DE LAS VALENCIAS SECUNDARIAS QUE MANTIENEN A LAS PROTEÍNAS EN SU ESTADO PLEGADO NATIVO

Seguimos en este momento la terminología que utiliza Hsien Wu cuando propone que las proteínas en su estado nativo están plegadas sobre sí mismas de un modo definido. Obviamente hay que postular algún tipo de enlace intramolecular para explicar que las proteínas mantengan esta estructura plegada, que obviamente no puede ser de naturaleza covalente, dado el carácter de los agentes que inducen la desnaturalización de las proteínas y de las condiciones en que se produce su renaturalización. En su artículo Wu, propone que la atracción entre los residuos con carga eléctrica de distinto signo es la responsable de que las proteínas adopten una conformación compacta definida.⁶⁰ Obviamente esta explicación carece en absoluto de sentido pues las fuerzas de tipo salino no existen en el agua. Por esta razón se desestabilizan y acaban disolviéndose los cristales de sal y les correspondería hacer lo mismo a las estructuras cristalinas intramoleculares de las proteínas, propuesta por Wu. La propuesta de Wu, sin embargo, gozó de mucho predicamento y aunque John D. Bernal en 1939 descartaba ya sin el menor género de duda que los enlaces iónicos pudieran tener algo que ver con el mantenimiento de las proteínas en estado plegado, pues estos pasarían inmediatamente al estado hidratado,⁶⁴ hasta 1949 este mecanismo todavía siguió siendo invocado de vez en cuando.⁶⁵

7.1. Los puentes de hidrógeno

Los puentes de hidrógeno, puestos de moda a partir del año 1933, cuando John D. Bernal y Ralph Fowler utilizaron este concepto para proponer un modelo que explicara las sorprendentes propiedades del agua líquida⁶⁶ tomaron el relevo a los enlaces iónicos como responsables de que las cadenas polipeptídicas adopten una configuración compacta bien definida en solución. El concepto de los enlaces de

puentes de hidrógeno había sido propuesto más de diez años antes por Wendell Latimer y Worth Rodebush,⁶⁷ algo que Bernal y Fowler aparentemente ignoraban, al poco de que Lewis formulara el concepto de enlace covalente como la unión que se forma entre dos átomos cuando comparten electrones.⁶⁸ En el puente de hidrógeno, por el contrario, los que intervienen, además de este elemento, son átomos con gran afinidad por los electrones, como pueden ser el oxígeno y nitrógeno, que atraen hacia sí los electrones de los átomos de hidrógeno covalentemente unidos a ellos. Como consecuencia de este desplazamiento de electrones el átomo de hidrógeno adquiere una carga parcial positiva que es compensada mediante la interacción con las cargas parciales negativas que necesariamente aparecen alrededor de los elementos electrófilos que han secuestrado los electrones de los hidrógenos unidos covalentemente a ellos. Latimer y Rodebush reconocieron desde el comienzo el carácter electrostático del enlace por puentes de hidrógeno, su carácter de enlace débil, y que este tipo de enlace no se limita necesariamente a la formación de moléculas dobles o triples sino que puede dar lugar, como sería el caso de algunos líquidos, a la formación de grandes agregados de moléculas que están formándose y deshaciéndose continuamente a causa de la agitación térmica. La magnitud que puede llegar a alcanzar este fenómeno en el agua líquida no pasó tampoco desapercibida a Latimer y Rodebush.⁶⁷

Las investigaciones de John. D. Bernal a propósito de los puentes de hidrógeno en el agua dieron lugar a desarrollos cuantitativos muy extensos de este concepto. Bernal y Fowler calcularon que entre el hidrógeno y el oxígeno de la molécula de agua hay una distancia de 0.96 \AA y que este enlace, con el hidrógeno como punta de flecha, apunta directamente hacia el átomo de oxígeno de una molécula adyacente en el caso del agua líquida, quedando los dos átomos de oxígeno a una distancia de 2.76 \AA . De acuerdo con estos cálculos, el hidrógeno no ocupa, consecuentemente una posición equidistante entre los oxígenos de dos moléculas de agua ligadas por puentes de hidrógeno. En un modelo todavía más elaborado publicado posteriormente John Bernal y su estudiante Helen Megaw introdujeron la noción de que, en la masa de agua líquida, la naturaleza de los enlaces electrostáticos y covalentes que, respectivamente, unen el átomo de hidrógeno a los dos átomos de oxígeno implicados en un puente de hidrógeno alterna continuamente de forma concertada, de tal manera que, en realidad, no puede afirmarse que un átomo determinado, de oxígeno o de hidrógeno, forme parte de una molécula concreta de agua. Este efecto unido al deslizamiento recíproco de las moléculas del agua en estado líquido hace que los átomos de hidrógeno y oxígeno pasen continuamente de unas moléculas a otras y que, por tanto, deban verse más como pertenecientes a la masa total del agua que a moléculas determinadas. Obviamente ello implica que, desde un punto de vista termodinámico, el agua líquida posea un elevado nivel de entropía, una situación de la que tendremos que hablar más adelante con cierta extensión al ex-

plicar las fuerzas que hoy día se acepta unánimemente que son responsables de que las proteínas adopten configuraciones tridimensionales compactas y definidas. Este salto continuo de los átomos de hidrógeno de un oxígeno a otro explica también que la fluidez del agua sea compatible con la ordenación tetraédrica (tipo cuarzo) de las moléculas del agua.⁶⁹

El principal responsable de que los puentes de hidrógeno ocuparan el papel atribuido con anterioridad a los enlaces salinos en el plegamiento de las cadenas polipeptídicas fue Linus Pauling un autor que vio reconocida muy pronto su autoridad en el campo de los enlaces químicos a partir de la publicación de su libro *The nature of chemical bond*.⁷⁰ Interesado inicialmente por la determinación de la estructura de compuestos inorgánicos mediante difracción de rayos-X, Pauling se interesó pronto en la mecánica cuántica, disciplina que aplicó al problema del enlace entre átomos mediante electrones compartidos. Aunque este no es el caso de los puentes de hidrógeno, Pauling no dejó de ocuparse de ellos, reconociendo su naturaleza electrostática tanto en el libro que acabamos de citar como en artículos previos.⁷¹ El interés de Pauling por las proteínas vino determinado por puras necesidades financieras cuando estaba interesado en la determinación de la estructura de los sulfuros y por la decisión de la Fundación Rockefeller, que financiaba los estudios de Pauling, de cambiar sus objetivos científicos. En palabras del propio Pauling:

One day, when I was visiting the Rockefeller Foundation headquarters in New York City, Warren Weaver, who was in charge of research grants in chemistry said to me that the Rockefeller Foundation in fact had no interest whatever in the structure of the disulfide minerals; instead, at that time their interest was largely in biochemistry. I thought about this for some time, and then submit an application for a larger grant to permit me to investigate hemoglobin....⁷²

Aunque el éxito acompañó a Pauling desde sus comienzos en sus investigaciones sobre la hemoglobina, pronto se dio cuenta de que las proteínas eran un tipo de compuesto químico muy especial de los que sabía muy poco. Con buen sentido decidió incorporar entonces a su grupo a Alfred Mirsky, un bioquímico con experiencia en hemoglobina del que ya hemos hablado a propósito de la desnaturalización de las proteínas.⁶¹⁻⁶³ La interacción de Pauling con Mirsky hizo que el primero se interesara por la desnaturalización de las proteínas y que ambos publicaran enseguida, en 1936, una teoría sobre la estructura de las proteínas en estado nativo y desnaturalizado.^{72, 73} De acuerdo con esta teoría:

The polypeptide chain is folded into a uniquely defined configuration, in which it is held by hydrogen bonds.⁷³

Según Mirsky y Pauling en las proteínas se darían dos clases de puentes de hidrógeno, unos que implican al oxígeno y al nitrógeno de los enlaces peptídicos, y otros debido a los átomos de oxígeno y nitrógeno de los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos, aunque en el caso de estos últimos, no todos los grupos amino y carboxilo van a estar implicados en puentes de hidrógeno, pues muchos de ellos deben de estar en la superficie de la molécula. El trabajo incluye también las características geométricas del puente de hidrógeno, un cálculo de la energía de este enlace en las proteínas (5 kcal/mol) y la aplicación del modelo al caso de la estabilidad del plegamiento de la tripsina.⁷³ En el caso de esta proteína, Mirsky y Pauling proponen que han de romperse unos treinta puentes de hidrógeno, para dar cuenta de la energía de activación de esta ruptura, de los cuales se regenerarán unos veinticinco en el estado desnaturalizado. En conclusión, por tanto en el caso de la tripsina habría cinco puentes de hidrógeno clave que serían los realmente responsables de mantener su estado plegado nativo.⁷³

Es obvio que los cálculos termodinámicos que se proponen para explicar la estabilidad y regularidad del plegamiento de las proteínas tampoco son correctos en este caso por razones similares a las que se adujeron anteriormente para descartar que lo fueran las fuerzas electrostáticas. No es correcto decir que la desnaturalización de las proteínas en solución es debido a la ruptura de una serie de puentes de hidrógeno, pues, aunque es verdad que se rompen, son reemplazados inmediatamente por otros con el agua o con los agentes que han inducido la desnaturalización, cuando ésta ha sido inducida mediante tratamientos químicos. Mirsky y Pauling lo reconocen expresamente al hablar de la desnaturalización química, pero inexplicablemente no extienden sus observaciones al caso de las proteínas en soluciones acuosas:

The reagents which cause denaturation are all substances which affect hydrogen-bond formation. Alcohol, urea and salicylate are well-known hydrogen-bond forming substances; they form hydrogen bonds with the protein side chains, which are thus prevented from combining with each other and holding the protein in its native configuration.⁷³

En presencia de agentes desnaturalizantes, por tanto, la diferencia neta de energía entre el estado nativo y desnaturalizado de la proteína es prácticamente cero y tal debe ser en la mera presencia de agua dado su alta capacidad de formar también puentes de hidrógeno y la alta concentración de agua en la soluciones de proteína. Inexplicablemente parece que nadie cayó en la cuenta de esta inconsistencia en el trabajo de Mirsky y Pauling de forma que la idea de que los puentes de hidrógeno eran los responsables de la estabilización del plegamiento nativo de las proteínas persistió muchos años. Sorprendentemente na-

die prestó atención tampoco a las dudas expresadas por químicos tan conspicuos como Hans Neurath⁷⁴ ni a otras explicaciones que flotaban ya en el ambiente y que acabaron imponiéndose casi veinte años más tarde.⁷⁵⁻⁷⁸ Exactamente a partir de los años 1954-59 en que Kauzman las formuló explícitamente.^{79, 80}

7.2. El efecto hidrofóbico y la disparatada teoría de los cicloles

El efecto hidrofóbico está considerado hoy día el principal responsable de que las proteínas en solución acuosa adopten un estado plegado compacto regular. Esta teoría se formula, sin embargo, en el contexto de un modelo de plegamiento de las proteínas totalmente descabellado, conocido como teoría de los cicloles. Quizá haya que atribuir al hecho de que surgiera mezclada con las extravagancias de ésta, la falta de atención que a los comienzos se prestó a la teoría que explica la estabilización del estado plegado regular de las proteínas a partir del efecto hidrofóbico.

La teoría de los cicloles, un modelo bastante global de estructura química de las proteínas, fue propuesta Dorothy Wrinch una matemático inglesa sin nociones de química. Entre otras cosas, la teoría negaba el carácter polipeptídico de las proteínas. En su lugar se proponía que los aminoácidos adoptaban en las proteínas, mediante un cambio químico análogo al tautomerismo lactama-lactima de otros compuestos orgánicos, una estructura de seis anillos que acababan, a su vez, formando una especie de colmenas poliédricas que ella denominaba cicloles, nombre con el que pasó a ser conocida la teoría.⁸¹⁻⁸⁴ La propuesta de Dorothy Wrinch denotaba, sin embargo, un desconocimiento de la química más que notable. Así, los radios atómicos no eran tenidos en cuenta y se trabajaba sólo con enlaces, de forma que las estructuras que proponía resultaban estéricamente imposibles, cuando se tenían en cuenta los volúmenes de los átomos. Es más, las cadenas laterales de los aminoácidos (Figura 1) se representaban sin más todas ellas con la letra «R» sin tenerse en cuenta que esta letra podía estar representando un volumen variable y desde luego considerablemente mayor que el que delimitaba el propio tamaño de la letra en el modelo. Para 1938 ya se habían publicado críticas demolidoras de la teoría.^{85, 86} Sin embargo, las buenas relaciones y el carácter de Dorothy Wrinch hicieron que se ignoraran estas críticas y se prestara a su teoría una atención extremadamente superior a la que merecía. Así, consiguió implicar en la demostración de su teoría a personajes de la categoría científica de Irving Langmuir que por aquellos años (1932) acababa de recibir el premio Nobel por sus descubrimientos e investigaciones en química de superficies.

Desde los primeros tratados sobre los puentes de hidrógeno⁶⁷ y su relación con las propiedades del agua⁶⁶ se propuso que la repulsión característica de la

hidrofobicidad era debida a la fuerte interacción que, a través de numerosos puentes de hidrógeno, se establece entre las moléculas de agua. Las moléculas apolares no son expulsadas del agua porque haya una repulsión, sino porque esta interacción agua-agua es mucho más fuerte que la que existe entre las moléculas de agua y las apolares. Conviene distinguir claramente este efecto, del de atracción recíproca por similitud entre las moléculas apolares debida a las fuerzas de van der Waals.⁸⁷ El primero en echar mano del concepto de hidrofobicidad fue Isidor Traube que lo utilizó para explicar por qué muchas sustancias orgánicas en la interfase aire-agua orientan sus regiones más polares hacia el agua y las menos polares hacia el aire.⁸⁸ No obstante, el que realmente explotó casi hasta la saciedad el efecto hidrofóbico fue Irving Langmuir, en sus estudios sobre la tensión superficial, estudios que llevó a cabo en su mayoría con un instrumento de la simplicidad del que ha pasado a la historia con el nombre de balanza de Langmuir.⁸⁹ La formación de micelas de detergente en agua fue otro de los campos de aplicación del efecto hidrofóbico.⁹⁰

Langmuir era totalmente ajeno a la quimicofísica de proteínas, pero Dorothy Wrinch logró captar su interés al proponerle una serie de nuevos experimentos con su balanza para probar la teoría de los cicloles. El éxito de los primeros experimentos entusiasmó a Langmuir que vio como se abrían nuevas perspectivas de aplicación para su balanza que juzgó llenos de promesas.

This should have great value as a biological tool: very likely it will find a place in the diagnosis of disease.⁸⁷

lo convirtió en un defensor acérrimo de la teoría de los cicloles

Tratando de buscar un soporte teórico para ésta, Langmuir echó mano de sus conocimientos sobre el comportamiento de las sustancias apolares en la interfase aire-agua. Inmediatamente se dio cuenta de que una fracción sustancial de las cadenas laterales de los aminoácidos de una proteína es apolar, por lo que el efecto hidrofóbico en una solución de proteínas en agua debe ser considerable, e inducir que estas adopten formas compactas del tipo de las micelas de detergente. Dado, por tanto, la necesidad de colapsar la proteína en un volumen lo menor posible, esta puede llegar a adoptar conformaciones como la de los cicloles que en otras circunstancias parecerían imposibles. Langmuir expuso estas ideas primero en un simposio en Cold Spring Harbor y posteriormente en dos conferencias impartidas en Inglaterra en la *Royal Institution* (1938) y en la *Royal Society* (1939)⁹¹⁻⁹³ cuando ya la mayor parte de los químicos de proteínas ingleses de renombre empezaba a estar más que cansados de que a un disparate como la teoría de los cicloles se le siguiera dando tanta audiencia. Especialmente molesto estaba J. D. Bernal al que ya nos hemos referido en diversas oca-

siones, pues Dorothy Wrinch se había permitido afirmar que los datos preliminares de difracción de rayos-X por la insulina, publicados por Dorothy Crowfoot, estudiante de doctorado con Bernal, estaban a favor de la teoría de los cicloles.^{94, 95} Sin embargo, a pesar de que de hecho capitaneaba a los opositores a la teoría de Wrinch, fue lo suficientemente inteligente para darse cuenta de la importancia de la aportación de Langmuir y de la necesidad de separarla de la ganga de los cicloles. En una conferencia dictada en la *Royal Institution* en el mismo año de 1939 sale decididamente en defensa del efecto hidrofóbico.⁶⁴

The behaviour of the hydrophobe groups of the proteins must be such as to hold together.....In this way a force of association is provided which is not so much of attraction between hydrophobe groups, which is always weak, but that of repulsion of the groups out of the water medium.

a la vez que reconoce:

Langmuir has used this picture as a justification of the cyclol cage hypothesis, but it is strictly quite independent of it.

En este momento del debate estalló la segunda guerra mundial. Todos los implicados en la discusión se vieron implicados de una forma u otra en ella. Para cuando terminó, todos parecían haber olvidado, junto con la teoría de los cicloles, el efecto hidrofóbico, incluso Bernal. En una conferencia que dicta en la *Faraday Society* en 1958 al hablar de las fuerzas que pueden intervenir en la estructura e interacciones de las macromoléculas enumera los enlaces covalentes, los enlaces iónicos y los puentes de hidrógeno. El efecto hidrofóbico del que tan lúcidamente había hablado en 1939 es pasado por alto.⁹⁶ Hubo que esperar a Kauzmann para que el efecto hidrofóbico saliera a la luz de nuevo y ocupara definitivamente el lugar que le corresponde en la quimicafísica de las proteínas.^{79, 80}

En párrafos inmediatamente anteriores hemos visto cómo el efecto hidrofóbico era conocido desde el comienzo del siglo XX y que al final de la década de los años 30 de ese siglo ya se había aplicado a las proteínas. Evidentemente, el contexto histórico rocambolesco en el que se generó la teoría del efecto hidrofóbico como factor estabilizador de la estructura de las proteínas, no fue una circunstancia que facilitase su fácil aceptación por la comunidad científica. El que la reelaboración de ésta por Kauzmann tuviese lugar cuando la polémica de los cicloles ya estaba más que olvidada contribuyó, sin duda, a que la acogida de la teoría fuera bien distinta esta vez. Sin embargo, más que el cambio de contexto histórico, el verdadero factor clave de la rápida aceptación de la te-

oría esta vez, lo constituyeron los estudios de Henry Frank sobre la termodinámica de la interacción de las sustancias apolares con el agua, estudios que desvelaron los verdaderos fundamentos físicos del efecto hidrofóbico. La aplicación de las conclusiones de estos estudios al caso de las soluciones de proteínas en agua constituye el núcleo esencial de la reformulación que lleva a cabo Kauzmann de la teoría de la estabilización de la estructura plegada compacta de las proteínas por el efecto hidrofóbico, como él mismo reconoce expresamente.⁸⁰

Henry Frank era ya doctor en química física por los años en que se hallaba de misionero en China, donde le sorprendió la segunda guerra mundial. Hecho prisionero por los japoneses, fue después objeto de un intercambio de prisioneros. La escasez de profesores, debido a la movilización, hizo que fuera contratado por la Universidad de California. Allí reanudó sus estudios sobre termodinámica de los líquidos. En el tercero de los artículos elaborados como fruto de estas investigaciones se describe el estudio del proceso de mezcla del agua con sustancias apolares.⁷⁹ De acuerdo con el modelo que parecía más obvio, el efecto hidrofóbico se debía a que introducir una molécula apolar en agua supone romper puentes de hidrógeno para como mucho sustituirlos por otras interacciones considerablemente más débiles. A temperatura y presiones normales, y sin otras interacciones que perturben el equilibrio, la solución tenderá, tarde o temprano, a alcanzar de nuevo el estado en que el número de puentes de hidrógeno sea el mayor posible, lo que obviamente acabará expulsando al componente apolar de la masa de agua. Sin embargo Frank observó que la mezcla de una sustancia apolar con el agua era un proceso cuya principal característica termodinámica era la de tener una entropía negativa y un calor de reacción nulo, algo, esto último, incompatible con la ruptura de puentes de hidrógeno. Estas observaciones le llevaron por tanto a la conclusión de que la mezcla de sustancia apolares con agua no induce ruptura neta de puentes de hidrógeno sino una reordenación de estos que debe hacer que en la masa del agua aparezcan zonas de estructura más ordenada que en el resto. Lewis, con quien Frank discutió a fondo sus conclusiones, propuso el nombre de *icebergs* para estas regiones, no porque la estructura del agua en ellas fuera en modo alguno la del hielo, sino para indicar el tipo de fenómeno (aparición de islotes de estructura ordenada en medio de la masa de agua) que sugerían los datos termodinámicos. Según Kauzmann, la estructura de los hidratos cristalinos que se forman a temperatura ambiente a elevadas presiones en las mezclas de agua con metano, etano o propano puede dar una idea más aproximada de la naturaleza de estos *icebergs* que la estructura del propio hielo.⁸⁰ En estas estructuras, conocidas con el nombre de clatratos, las moléculas de agua forman grandes estructuras poliédricas mediante uniones de puentes de hidrógeno, estructuras que a su vez se unen con otras para formar una especie de esponja de celdillas altamente geométricas que albergan en su interior las moléculas apolares que inducen la for-

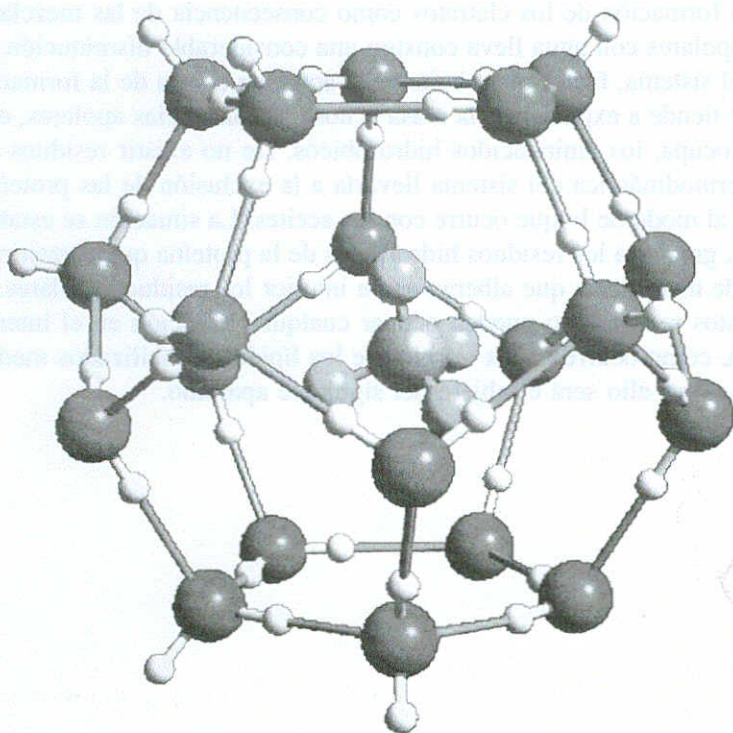


Figura 4. Modelo de la celdilla fundamental de los clatratos. Los clatratos son un tipo de sólido en el que las moléculas de agua forman una especie de jaula en la que queda atrapada una molécula de gas (estructura en gris claro). Muchos gases excepto el hidrógeno y el helio forman clatratos, incluidos los hidrocarburos de menos de cinco átomos de carbono. Las esferas grises oscuras representan los átomos de oxígeno y las blancas las de hidrógeno. Las barras grises oscuras representan los puentes de hidrógeno.

mación del clatrato y lo estabilizan. La estructura propuesta para la celdilla fundamental del clatrato, estabilizado por la ocupación del núcleo de la celdilla por un gas hipotético, aparece recogida en la Figura 4. Cuando hablamos páginas más atrás de la estructura del agua hicimos notar que se trataba de una estructura de alta entropía debido a que los átomos de hidrógeno y, recíprocamente, de oxígeno estaban pasando continuamente de una molécula de agua a otra, de forma que no podían asignarse a ninguna molécula concreta sino que debían ser considerados como patrimonio común de toda la masa de agua. Este profuso intercambio queda severamente limitado en el clatrato al quedar las moléculas de agua insertas en una estructura que limita de forma importante el volumen en que pueden moverse libremente, una condición básica para que tenga lugar el profuso intercambio de los átomos de hidrógeno típico del agua líquida. Por esta

razón, la formación de los clatratos como consecuencia de las mezclas de sustancias apolares con agua lleva consigo una considerable disminución de la entropía del sistema, factor que obviamente actúa en contra de la formación de la mezcla y tiende a expulsar de la masa acuosa las sustancias apolares, en el caso que nos ocupa, los aminoácidos hidrofóbicos. De no existir residuos hidrofílicos, la termodinámica del sistema llevaría a la exclusión de las proteínas de la solución al modo de lo que ocurre con los aceites. La situación se estabiliza, sin embargo, gracias a los residuos hidrofílicos de la proteína que permitirán la formación de una micela que alberga en su interior los residuos apolares. Sin embargo, estos residuos no pueden ocupar cualquier posición en el interior de la molécula, como ocurre en las micelas de los lípidos solubilizados mediante detergentes. Pero ello será el objeto del siguiente apartado.

8. LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Terminamos el apartado anterior afirmando que una micela de lípido mantenida en solución acuosa por efecto de un detergente no era un modelo adecuado de lo que era el carácter micelar de una proteína. Al contrario de lo que ocurre con los lípidos, los aminoácidos de las proteínas no deben estar en estado líquido dentro de la micela sino ordenados en el espacio con la suficiente rigidez como para permitir a las proteínas cristalizar. Éste fue uno de los principales argumentos en que apoyó Wu su propuesta de que los polipéptidos no desnaturalizados adoptaban en solución conformaciones compactas, regulares y rígidas. En sus propias palabras:

In a crystal the atoms are arranged regularly, and the process of crystallization consists in the laying-on of molecules in regular orientation... To explain the crystallizability of natural proteins we have to assume that these proteins molecules are more or less rigid, that is, the atoms in each molecule occupy fixed positions with respect to one another. If this is the case, it will be necessary only to orientate the molecule as a whole... in order to form the crystal.⁶⁰

El interés de Pauling por las proteínas no acabó con la elaboración junto con Mirsky de su teoría sobre la estructura compacta de las proteínas en estado nativo y del papel de los puentes de hidrógeno en la estabilización de esta estructura,⁷³ sino que intrigado por la difracción de los rayos-X por determinadas proteínas como las α -queratinas, trató de buscar una explicación a la regularidad de plegamiento del polipéptido que sugerían estos datos. De nuevo vemos aquí implicada tangencialmente a Dorothy Wrinch. En efecto, Pauling se interesó en la estructura a nivel atómico del plegamiento de las proteínas cuando la Fundación Rockefeller le pidió su opinión sobre las teorías de Dorothy Wrinch sobre la naturaleza de las proteínas. Como ya mencionamos en el apartado anterior Langmuir y Wrinch pretendían que el análisis de la difracción de los rayos-X por los

cristales de insulina claramente demostraban la teoría de los ciclos.^{94, 95} Estos datos llevaron a Pauling, tras rechazar la teoría de Dorothy Wrinch,⁹⁸ a interesarse por la difracción de los rayos-X por las proteínas, persuadido de que él ya sabía lo suficiente sobre cadenas polipeptídicas, su plegamiento y, por supuesto, sobre difracción de rayos-X como para poder proponer un modelo de plegamiento de las proteínas a partir de las fotografías de la difracción de los rayos-X por las queratinas obtenidas por Astbury.^{99, 100} El intento resultó fallido, por el prejuicio de considerar que las unidades repetitivas que revelaban las fotografías a una distancia de 5.1 Å correspondían a los aminoácidos consecutivos del polipéptido. Sin embargo, el estudio aportó uno de los conceptos clave en el plegamiento de las proteínas, el de la estructura del enlace peptídico (Figura 5A):

From the theory of resonance I could predict that the carbon-nitrogen bond in the main chain of the proteins would have some double bond character stolen from the carbonyl groups, and that as a result the polypeptide chain would consist of planar groups joined to one another at the alpha-carbon atoms.⁷²

El fracaso, no obstante, no indujo a Pauling a desistir del tema, sino a buscar datos adicionales en que apoyarse, como las estructuras de los aminoácidos y de péptidos pequeños determinadas a partir de la difracción de los rayos-X, para lo que contó con la colaboración de Robert P. Corey. Basados en estos datos que permitieron calcular la distancia correcta de los distintos enlaces implicados, en la estructura plana de del enlace peptídico (Figura 5A) y en el principio de que cada grupo carbonilo e imino de éste (excepto en el caso de la prolina e hidroxiprolina) está implicado en la formación de un puente de hidrógeno con una distancia entre nitrógeno y oxígeno aproximada de 2.8 Å. Pauling y Corey propusieron en 1951 tres configuraciones básicas de plegamiento de la cadena peptídica de los polipéptidos, las denominadas hélice- α (Figura 5B) y láminas- β antiparalela y paralela (Figura 5C y D).^{101, 102} La belleza estructural de estos plegamientos les hizo adquirir enseguida gran popularidad. Sin embargo, la explicación de la relación que podían tener con el carácter compacto y globular de las proteínas estos plegamientos que de por sí parecían destinados a dar lugar a la formación de largas fibras y extensas láminas, hubo de esperar a que tuvieran lugar desarrollos importantes de las técnicas de análisis de la difracción de los rayos-X por los cristales de proteínas.

Para cuando Mirsky y Pauling publicaron su teoría sobre los estados nativos y desnaturalizados de las proteínas (1936) John D. Bernal y D. Crowfoot ya habían dado a conocer un par de años antes los datos correspondientes a la difracción de rayos-X por cristales de pepsina.¹⁰³ La regularidad en la distribución de átomos en el espacio que revelan estos datos se convirtió para ellos en

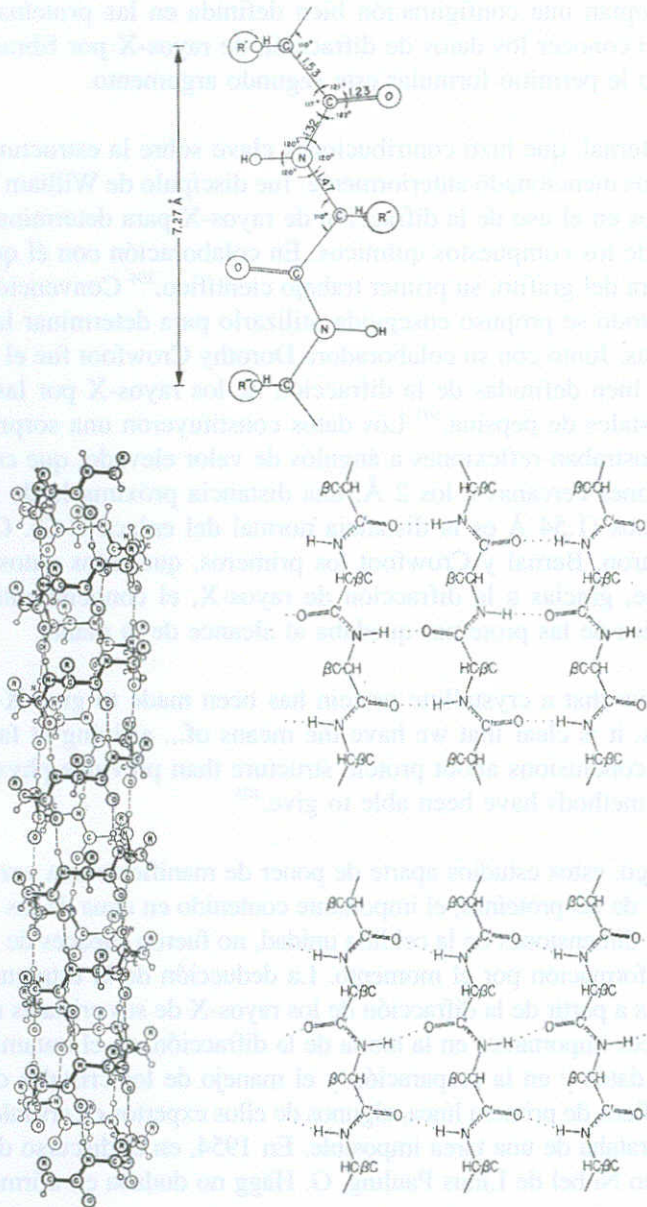


Figura 5. Dimensiones del enlace peptídico (A), y esquemas del plegamiento de la cadena peptídica en hélice α (B) lámina β antiparalela (C) y lámina β paralela (D), según Pauling y colaboradores.^{99, 100}

un poderoso nuevo argumento a favor de su propuesta de que las cadenas polipeptídicas adoptan una configuración bien definida en las proteínas nativas.⁷³ Wu solo pudo conocer los datos de difracción de rayos-X por fibras de proteínas, lo que no le permitió formular este segundo argumento.

John D. Bernal, que hizo contribuciones clave sobre la estructura del agua, como ya hemos mencionado anteriormente, fue discípulo de William Bragg, uno de los pioneros en el uso de la difracción de rayos-X para determinar la estructura atómica de los compuestos químicos. En colaboración con él que determinó la estructura del grafito, su primer trabajo científico.¹⁰⁴ Convencido de la potencia del método se propuso enseguida utilizarlo para determinar la estructura de las proteínas. Junto con su colaboradora Dorothy Crowfoot fue el primero en obtener fotos bien definidas de la difracción de los rayos-X por las proteínas, utilizando cristales de pepsina.¹⁰³ Los datos constituyeron una sorpresa memorable, pues mostraban reflexiones a ángulos de valor elevado, que correspondían a separaciones cercanas a los 2 Å, una distancia próxima la de los enlaces entre los átomos (1.54 Å es la distancia normal del enlace C-C). Obviamente muchos pensaron, Bernal y Crowfoot los primeros, que estos datos ponían de manifiesto que, gracias a la difracción de rayos-X, el conocimiento de la estructura atómica de las proteínas quedaba al alcance de la mano:

Now that a crystalline protein has been made to give X-ray photographs, it is clear that we have the means of... arriving at far more detailed conclusions about protein structure than previous physical or chemical methods have been able to give.¹⁰³

Sin embargo, estos estudios aparte de poner de manifiesto una vez más el carácter globular de las proteínas, el importante contenido en agua de los cristales de proteínas y las dimensiones de la celdilla unidad, no fueron capaces de suministrar mucha más información por el momento. La deducción de la estructura atómica de las proteínas a partir de la difracción de los rayos-X de sus cristales necesitó todavía de avances importantes en la teoría de la difracción, en el tratamiento matemático de los datos y en la preparación y el manejo de los cristales de proteína. Muchos científicos de primera línea, algunos de ellos expertos en cristalografía creyeron que se trataba de una tarea imposible. En 1954, en el discurso de presentación del Premio Nobel de Linus Pauling, G. Hägg no dudaba en afirmar:

To make a direct determination of the structure of a protein by X-ray methods is out of question for the present, owing to the enormous number of atoms in the molecule. A molecule of the coloured blood constituent hemoglobin, which is a protein, contain for example more than 8000 atoms.¹⁰⁵

Sin embargo, por aquellas fechas, estábamos ya a sólo cuatro años de la publicación de la estructura atómica de una proteína muy cercana a la hemoglobina, la mioglobina, y a seis de la publicación de la estructura atómica de la misma hemoglobina, por John C. Kendrew y Max Perutz, respectivamente.^{106, 107}

8.1. La determinación de la estructura de las proteínas por cristalografía

Si a mediados de los años 1950 muchos consideraban algo rayano en la insensatez el tratar de establecer la estructura atómica de la hemoglobina a partir de la difracción de los rayos-X de sus cristales, mucho más lo era, obviamente en 1936 cuando Max Perutz se trasladó de Viena a Cambridge para incorporarse al laboratorio de John D. Bernal adonde seguían obteniéndose espectros de difracción de rayos-X de proteínas de los que no era posible sacar más información que las dimensiones de la unidad de celdilla y las distancias entre planos con gran densidad de electrones internos a esta, como hemos dicho ya unas líneas más arriba.^{95, 108, 109} El gran problema que se interponía entre los espectros de difracción de los rayos-X por los cristales de proteína y la determinación de la estructura atómica concreta que daba lugar a esos espectros era el conocido como el problema de las fases. A solucionar este problema tanto de una forma teórica como práctica dedicó Perutz la mayor parte de los años que median entre su llegada a Inglaterra y la publicación de las primeras estructuras atómicas a finales de los años 1950. A partir de 1946 pudo contar para el abordaje del problema de las fases con la colaboración de John Kendrew que acababa de obtener su título de graduado en químicafísica a los 19 años en el *Trinity College* de Cambridge. Ambos compartirían el Premio Nobel en 1962 por haber conseguido establecer por primera vez la estructura atómica de una proteína y por haber desarrollado la metodología necesaria para ello. Obviamente, un esfuerzo de tantos años es inconcebible que hubiera podido mantenerse si tanto Perutz como Kendrew, miembros únicos, a los comienzos, del grupo de Biología Molecular del *Medical Research Council*, no hubieran contado con el respaldo entusiasta de un hombre con la visión científica de Lawrence Bragg, verdadero inspirador del *Cavendish Laboratory* de Cambridge, al que tanto debe la biología moderna.

El problema de las fases es el siguiente. Es posible describir la distribución de átomos de una proteína y sus electrones mediante una función periódica de la que es posible obtener, por tanto, su transformada de Fourier. Cuando esta molécula en un cristal es sometida a una radiación de rayos-X, esta luz es difractada por estas nubes de electrones a determinados ángulos del rayo incidente con intensidades y fases características. Si reuniéramos en una placa fotográfica el conjunto de estas difracciones y conociéramos la intensidad y fase de la radiación que ha dado lugar a las impresiones que observamos en ella, tendríamos

mos todos los datos que habríamos obtenido al calcular la transformada de Fourier de la distribución periódica de los electrones del cristal que ha dado lugar a la difracción. Como una de las propiedades de las transformadas de Fourier es su reversibilidad, esto es que la síntesis de Fourier del resultado de una transformada de Fourier nos da como resultado la función periódica original que se transformó, es obvio que llevando a cabo la síntesis de Fourier de la distribución de impresiones recogidas en la placa fotográfica en cuestión, obtendríamos la distribución periódica de las nubes de electrones en el cristal de proteína que difractó los rayos-X. Conocida la distribución de las nubes de electrones con el suficiente detalle podemos determinar inmediatamente la posición de los átomos de la proteína que es obviamente en lo que consiste la determinación de la estructura de esta a nivel atómico. Sin embargo existe una dificultad insalvable para llevar a cabo la síntesis de Fourier, que es que al registrar la difracción de los rayos-X por el método que sea perdemos la información de la fase del rayo que da lugar al registro. De ahí la denominación del problema, el problema de las fases. A desarrollar una teoría y una metodología para resolver el problema de la determinación de las fases, dedicaron Perutz y Kendrew muchos años. Gracias a estos esfuerzos, emprendidos cuando muchos estaban persuadidos de que no les llevarían a ninguna parte, pudieron determinar la estructura atómica de la mioglobina y de la hemoglobina.

Para la solución del problema de las fases Perutz y Kendrew recurrieron al fenómeno, de sobra conocido por aquel entonces, de que los átomos pesados dispersan la luz con muchísima mayor intensidad que los átomos ligeros como el carbono y el oxígeno, por poseer muchos más electrones que esos últimos, debido a que la diferencia de la capacidad de dispersión de la luz entre dos átomos es función directa del cuadrado del cociente entre el número de electrones que tiene cada uno de ellos. Así, un átomo de uranio que tiene quince veces más electrones que el carbono tendrá una capacidad de dispersión de los rayos-X es doscientas cincuenta y cinco veces mayor.

La introducción de un átomo pesado en una proteína cristalizada puede llevarse a cabo sin distorsión de su estructura, pues éste puede acabar encajando en el sitio que normalmente ocupan en el cristal el solvente o determinados iones de la solución de cristalización. De ahí el nombre que recibió el método: reemplazamiento isomórfico. Al no alterar la estructura de la proteína, lógicamente no se alterará la distribución característica de su difracción de los rayos-X. Sin embargo, sí causará alteraciones importantes en la intensidad de alguna de las difracciones, al sumar su elevada capacidad de dispersar los rayos-X a la de determinados átomos de la proteína. Una representación de Patterson calculada a partir de estas difracciones que se han vuelto especialmente intensas nos va a permitir calcular la proyección en un plano de la distancia entre los distintos pun-

tos del cristal en los que se han fijado los átomos pesados. Hecho esto, es entonces posible calcular las fases de estas difracciones en base al cambio de intensidad que ha causado en estas la introducción del metal. En general la solución es bastante ambigua. Por ello con frecuencia hay que proceder a obtener cristales de la proteína con elementos pesados diferentes y proceder a una comparación múltiple entre las difracciones de la proteína sin modificar y tratada. Por ello al método, con más precisión, se le denomina reemplazamiento isomórfico múltiple. La tarea es obviamente enorme por el número intensidades a comparar. Por otra parte, fácilmente, al introducir un elemento pesado, la estructura de la proteína sufre ligeras modificaciones que hacen que el cristal no sea isomórfico y que, por tanto, no se pueda utilizar. Ello implica que después de cada tratamiento el cristal deba ser medido para determinar si es isomórfico o no. Finalmente la especificidad de la localización del átomo pesado en el interior de la proteína tampoco suele ser absoluta. Por ello, ordinariamente, la elección del tiempo durante el que la proteína ha de ser tratada con éste suele ser también un factor muy crítico. Si es demasiado corto, el elemento pesado no se distribuirá homogéneamente por todos los sitios que puede ocupar, lo que producirá difracciones de dudosa interpretación. Si el tratamiento es demasiado largo empezarán a ocuparse sitios inespecíficos al azar que harán también inviable el análisis de las difracciones de estos cristales. Obviamente ello no se sabe hasta que los datos se han adquirido. Lo desmesurado de la tarea explica que Kendrew y Perutz tuvieran que emplear años en acumular los datos necesarios para proceder al cálculo de las estructuras de la mioglobina y de la hemoglobina.

La proteína que inicialmente decidió estudiar Perutz fue la hemoglobina. Era una proteína fácil de obtener y de la que era posible obtener fácilmente cristales de calidad. Con el tiempo se vio que era una proteína complicada para los objetivos que Perutz se había propuesto. Era muy grande por ser un tetrámero, como ya hemos mencionado repetidamente a lo largo de este trabajo, y las preparaciones no presentaban frecuentemente la homogeneidad necesaria para los estudios cristalográficos. Esta heterogeneidad derivaba de que la hemoglobina tiene dos estados oxidado y reducido con estructura ligeramente diferente, y de que lentamente sus átomos de hierro acababan pasando del estado ferroso nativo al férrico, con cambio también de la estructura de la proteína. Por esta razón Kendrew comenzó un proyecto independiente centrado en la mioglobina, una proteína que es cuatro veces más pequeña y sin la mayor parte de los problemas de homogeneidad de la hemoglobina. Debido a ello la estructura de esta proteína pudo resolverse dos años antes que la de la hemoglobina en estado oxidado. Se trata de un modelo calculado a partir de sólo cuatrocientas difracciones que requirió de la obtención de nada menos que ocho derivados de la proteína con átomos pesados. Todo ello además contando sólo unos computadores todavía en estado embrionario y sin capacidad gráfica ninguna. El modelo pre-

sentado por Kendrew aparece recogido en la Figura 6A. Se trata de un modelo a una resolución de sólo 6 Å en que uno solo ve aquellas regiones en que los átomos están más empaquetados, pero que permite trazar en su totalidad el esqueleto peptídico de la proteína. Fue un modelo sorprendente por el hito que representaba, pero también decepcionante para muchos que esperando encontrar grandes simetrías internas y espectaculares empaquetamientos de láminas- α y hélices- β y se encontraron solo con una especie de salchicha plegada muy irregularmente. En palabras del propio Kendrew:

Perhaps the most remarkable features of the molecule are its complexity and lack of symmetry. The arrangement seems to be almost totally lacking in the kind of regularities which one instinctively anticipates, and it is more complicated than has been predicted by any theory of protein structure.¹⁰⁵

Dos años más tarde Kendrew pudo publicar un modelo calculado utilizando 9600 difracciones, lo que le permitió llegar a una resolución de 2 Å. En esta estructura ya se podía apreciar claramente que la especie de salchicha del modelo a 6 Å era en realidad:

... hollow cylindrical tubes of high density; projecting at intervals from the cylindrical core are dense regions of various shapes and sizes, which are clearly the amino-acid side-chains. More detailed examination shows that, in fact, the cylindrical tubes are helices, consisting of a single strand of high density with axial repeat about 5.4 Å.¹¹⁰

El modelo a 2 Å (Figura 6B), por tanto, confirmaba que los plegamientos propuestos por Pauling y Corey para la cadena peptídica no eran meras especulaciones sino que efectivamente constituían un primer nivel de empaquetamiento de las proteínas. Pone de manifiesto también cómo estas hélices- α pueden acodarse para dar lugar a formas globulares de empaquetamiento (Figura 6C), una cuestión que dejaba abierta la mera propuesta de Pauling, como hemos hecho notar en páginas anteriores. Sin embargo, la estructura de la mioglobina invalida, a la vez, la hipótesis de Pauling de que los puentes de hidrógeno eran los responsables de mantener plegada a las proteínas. La propuesta de Pauling es verdad a nivel de las hélices- α . No obstante todavía queda mantener empaquetadas a las hélices entre si. El plegamiento de la mioglobina pone de manifiesto que la interacción entre las hélices- α en el interior de la proteína es casi exclusivamente a través de aminoácidos apolares y que aquellos que podrían participar en la formación de puentes de hidrógeno o interacciones iónicas se encuentran en la superficie, donde, por razones obvias, no forman este tipo de enlaces intramoleculares. La estructura de la mioglobina confirma por

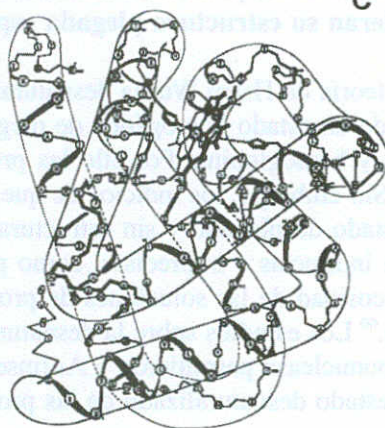
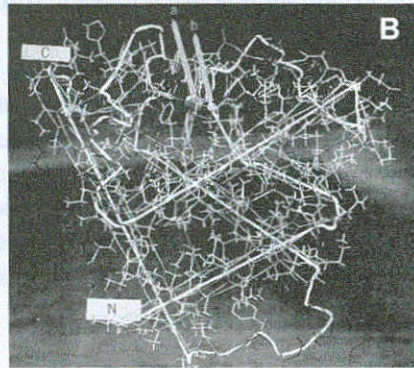
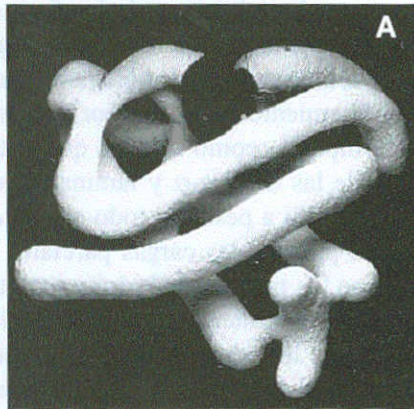


Figura 6. Estructura tridimensional de la hemoglobina obtenida a partir de una síntesis de Fourier a 6 Å (A), a 2 Å (B) y esquema del plegamiento de la cadena peptídica de la proteína en un cilindro plegado sobre si mismo (C) que se observa en la estructura representada en (B). Este cilindro tiene las dimensiones y el plegamiento del tubo retorcido de la estructura recogida en (A).^{104, 108}

tanto la teoría de Kauzmann sobre el origen de las fuerzas que mantienen una proteína plegada.⁸⁰ Sin embargo, la misma estructura sugiere también la razón de por qué la proteína adopta internamente los plegamientos propuestos por Pauling. Es obvio que el confinamiento en el interior apolar de la proteína de un número tan importante de dipolos, como son los que entran a formar parte de los puentes de hidrógenos de las hélices- α y láminas- β , es un proceso energéticamente muy poco favorable. Si a pesar de todo ello la estructura de la proteína no salta por los aires es por que las cargas parciales de estos dipolos quedan neutralizadas al formarse los puentes de hidrógeno internos de las hélices- α y láminas- β , plegamientos que permiten que, a pesar de las limitaciones estéricas que impone la geometría de la cadena polipeptídica, se forme un número de puentes de hidrógeno cercano al máximo posible de ellos. Es obvio que el balance energético entre un estado en que estos dipolos formen puentes de hidrógeno y otro en que estén hidratados en la superficie de la proteína es aproximadamente neutro. En este sentido, como apuntamos páginas atrás, los puentes de hidrógeno no estabilizan el plegamiento de las proteínas. Sin embargo, es obvio que romper los puentes de hidrógeno en el interior de la proteína para proceder a desplegarla es un proceso que requiere una cantidad de energía importante. En consecuencia, la formación de las estructuras propuestas por Pauling es la responsable de las importantes barreras energéticas de activación que normalmente separa el estado nativo de las proteínas del estado desnaturalizado.

8.2. La renaturalización de las proteínas: factores responsables de que las proteínas adquieran su estructura plegada específica

De acuerdo con la teoría de Hsien Wu, la desnaturalización de las proteínas consiste en la pérdida de un estado homogéneo de plegamiento como el observado en la mioglobina y hemoglobina. Por ello las proteínas desnaturalizadas no podrían cristalizar. Sin embargo, los indicios de que, efectivamente, las proteínas adoptaban un estado desplegado y sin estructura definida se basaban en observaciones bastante indirectas e imprecisas, como podían ser, por ejemplo, las del aumento de viscosidad de las soluciones de proteínas a medida que estas se desnaturalizaban.⁶⁰ Los estudios sobre la desnaturalización y posterior renaturalización de la ribonucleasa permitieron a Anfinsen caracterizar de forma mucho más directa el estado desnaturalizado de las proteínas.

La ribonucleasa pancreática bovina contiene ocho cisteínas cuyo grupo sulfhidrilo está oxidado en la proteína nativa formando cuatro enlaces disulfuro (enlaces comúnmente denominados puentes disulfuro en el caso de las proteínas). Si todas las cisteínas de una molécula de ribonucleasa se encontraran formando puentes disulfuro, y estos se formarían al azar, un mero cálculo combi-

natorio nos dice que la ribonucleasa adoptaría ciento cinco configuraciones isoméricas de puentes disulfuro, lo que no es el caso de la molécula nativa en la que se detecta un único patrón (cisteínas 26-84, 40-96, 58-110, 65-72).¹¹¹ Anfinsen redujo estos puentes disulfuro en presencia de urea 8 M, permitió que se formaran de nuevo en presencia de aire añadiendo trazas de iones cobre y, finalmente eliminó la urea. Observó que la preparación carecía totalmente de actividad biológica, y que en ella estaban representadas la mayor parte de las ciento cinco formas isoméricas de la ribonucleasa que podían obtenerse por formación de puentes disulfuro al azar. De no haberse procedido a oxidar previamente de nuevo los grupos sulfhidrilo, la proteína habría vuelto al estado nativo al retirar la urea, de acuerdo con el carácter reversible de la desnaturalización de proteínas que hemos mencionado repetidamente. Al permitir, sin embargo que se formaran puentes disulfuro de nuevo cuando la proteína estaba todavía en estado desnaturalizado Anfinsen pudo sacar una especie de «foto fija» del conjunto de estructuras en equilibrio que coexisten en el estado desnaturalizado de la ribonucleasa. Observó también que esta proteína fijada en su estado plegado al azar recobraba su actividad biológica casi al cien por cien, como cabía esperar de la reversibilidad característica de un estado desnaturalizado de proteínas, cuando era incubada con pequeñas cantidades de reactivos con grupos sulfhidrilo de potencial redox suficientemente bajo como el α -mercaptoetanol o el tioglicolato.¹¹²⁻¹¹⁶ Estos experimentos por tanto le permitieron demostrar a Anfinsen que efectivamente la desnaturalización de una preparación de proteína consistía en que se perdía el plegamiento homogéneo compacto de su cadena polipeptídica para pasar a ser substituido por toda una panoplia bastante heterogénea de plegamientos. Estos mismos experimentos demostraban también, de forma ya directa, la correlación inmediata que existe entre pérdida de estructura y pérdida de actividad biológica.

Los experimentos que apoyan las conclusiones recogidas en el párrafo anterior parecían también demostrar que existía una relación biunívoca estructura función. Expresamente hemos evitado esta formulación en el párrafo anterior, pues los experimentos resumidos en el, aunque sugieren este tipo de relación biunívoca, no la demuestran estrictamente. Obviamente la pérdida de plegamiento nativo va asociado a pérdida reversible de actividad biológica. Sin embargo quedaba por demostrar que la reversibilidad iba asociada estrictamente a la adquisición del estado nativo inicial. Lógicamente admitir que la forma regenerada totalmente activa no tenía por qué no tener la estructura nativa inicial suponía admitir que diversos plegamientos de la ribonucleasa eran también activos. Con los datos disponibles en ese momento, esta opción no podía descartarse, a pesar de que la recuperación de la capacidad de cristalizar de las proteínas renaturalizadas parecía constituir un argumento en su contra bastante contundente.⁶⁰⁻⁶³ Por otra parte, admitir que la forma renaturalizada recuperaba

la estructura tridimensional de la forma nativa suponía admitir que la información necesaria para que una proteína adquiriera su plegamiento nativo está codificada en su propia secuencia, un principio básico de la biología molecular en modo alguno evidente por sí mismo. La demostración de todos estos principios, hoy día ya clásicos, la llevó a cabo Frederick H. White, un antiguo colaborador de Anfinsen trabajando conjuntamente con los cristalógrafos J. Bello, D. Harper y E. De Jarnette. Estos autores llevaron a cabo una investigación extremadamente exhaustiva, con pruebas bioquímicas y quimiofísicas de todo tipo que se extendían, incluso, al análisis de la difracción de los rayos-X de las formas nativa y renaturalizada de la molécula, respectivamente, que demostraba que ésta última recobraba efectivamente la estructura nativa original y que del patrón altamente heterogéneo de puentes disulfuro que presentaba la proteína desnaturalizada, la preparación pasaba a tener un patrón único, el de la proteína nativa.¹¹⁷ Este estudio demostraba además que la proteína era capaz de adquirir su estructura tridimensional nativa por sí misma en base a información contenida exclusivamente en su estructura química primaria, sin intervención de ningún otro elemento celular.

Las conclusiones de White y sus colaboradores hicieron aflorar inmediatamente la pregunta de cómo en la estructura primaria de una proteína puede estar contenida la información necesaria para plegar de forma tan precisa y compacta la cadena polipeptídica. De dominar estas claves, podríamos diseñar proteínas con las estructuras que consideráramos conveniente. Es algo de lo que aun estamos muy lejos. Lo que hoy sabemos arranca, sin lugar a duda, de las investigaciones que Anfinsen llevó a cabo con la ribonucleasa de *Staphylococcus aureus* una proteína que al contrario de la procedente de páncreas bovino no posee puentes disulfuro, lo que permitía observar directamente el fenómeno de plegamiento sin potenciales interferencias derivadas de la concomitancia de otros procesos, como podría ser el de la formación de puentes disulfuro. La ribonucleasa de *S. aureus* tiene además la particularidad de que puede ser tratada con la proteasa tripsina, en condiciones que ocasionan sólo una hidrólisis muy limitada (tras el residuo 5 de su secuencia y tras los residuos 48 o 49), para dar lugar a una forma, conocida como ribonucleasa T, que continúa siendo activa, en la que los dos fragmentos mayores (residuos 5-48/49 y 49/50-149) continúan asociados.¹¹⁸ Los dos fragmentos de la ribonucleasa T pueden separarse fácilmente. Anfinsen observó que cada uno de ellos, por separado, carecía de estructura y, por supuesto, de actividad enzimática.¹¹⁹ Sin embargo, cuando estos dos péptidos se mezclaban, estos se asociaban de nuevo regenerándose la actividad específica de la proteína antes de la disociación y la estructura original de la ribonucleasa T, como se encargaban de poner de manifiesto tanto las medidas de cromatografía, dicroísmo circular, estabilidad térmica y velocidad de sedimentación, como la comparación entre la difracción de los rayos-X de

los cristales de la ribonucleasa T original y reconstruida.^{120, 121} Este conjunto de observaciones aparte de constituir una forma especialmente llamativa de poner de manifiesto la adquisición de un plegamiento definido en base exclusivamente de la información contenida en la secuencia, ponen de manifiesto que esta información está contenida en el conjunto y no en los componentes por separado. Así, cada uno de los componentes sólo adquiere su estructura tridimensional específica cuando se asocia con el otro componente. A este fenómeno se le conoce como el principio de cooperatividad de la estructura de las proteínas y es responsable de las características cinéticas de tipo cooperativo que se observan en muchas propiedades de las proteínas.¹¹⁵

Años antes de que Anfinsen iniciara sus estudios con la ribonucleasa T, ya había sido descrito que la digestión de la ribonucleasa pancreática bovina con subtilisina en condiciones adecuadas hidrolizaba sólo tras el residuo 20 o tras el 21 para dar lugar a una forma de la proteína conocida como ribonucleasa S que conserva asociados los dos fragmentos generados por la hidrólisis y mantiene la actividad específica de la proteína sin digerir.¹²² Por no estar unidos estos dos fragmentos por puentes disulfuro pueden ser separados fácilmente. Los péptidos por separado carecen de actividad ribonucleasa, pero como en el caso de la ribonucleasa T es posible recobrar la actividad enzimática cuando los dos fragmentos se mezclan de nuevo. Sin embargo, cuando el fragmento mayor ha estado incubado en condiciones en que puede tener lugar un intercambio en su patrón de puentes disulfuro, éste pierde su patrón nativo de puentes disulfuro y la mezcla de los dos fragmentos no lleva a la recuperación inmediata de la actividad enzimática, lo que no es el caso cuando se incuba en las mismas condiciones la proteína completa o los dos fragmentos juntos antes de ser separados.^{117, 123} No obstante, es posible hacer que el fragmento que ha perdido el patrón nativo lo recupere incubándolo en presencia del fragmento de 20 aminoácidos en condiciones que posibilitan el intercambio entre puentes disulfuro. Este proceso lleva también a la recuperación de la actividad enzimática de la preparación.¹²³ Este conjunto de datos llevó a Anfinsen a la conclusión de que en fragmentos bastante pequeños de la secuencia de una proteína hay a veces también información muy importante para que toda ella adopte la estructura tridimensional adecuada. En sus estudios con la ribonucleasa S, Anfinsen llegó a delimitar que los primeros quince residuos de la proteína contados desde su extremo amino eran imprescindibles y suficientes para que ésta adoptara su conformación tridimensional nativa.¹²³ Con posterioridad pero sin alcanzar gran precisión, pues los métodos de la época no lo permitían, Anfinsen llegó a la conclusión de que probablemente eran sólo unos pocos residuos de este fragmento de quince aminoácidos los que eran críticos para inducir el plegamiento nativo de la ribonucleasa S.¹²⁴ Hoy día gracias a las poderosas herramientas que la ingeniería genética ha puesto en nuestras manos, todos los que hacemos ingenie-

ría de proteínas sabemos que basta a veces con cambiar un aminoácido para que una proteína sea incapaz de adoptar su plegamiento tridimensional nativo, y permanezca permanentemente en un estado desnaturalizado.

Un principio recíproco al de la importancia de determinados residuos para que las proteínas adquieran su estructura tridimensional nativa es el de que numerosos aminoácidos de una proteína pueden ser alterados sin que ello altere su estructura ni su actividad. Una vez más fueron los estudios de Anfinsen con la ribonucleasa los que permitieron establecer este principio.¹²⁵ Estas investigaciones se basaron en la modificación del grupo α -amino de las lisinas con el anhídrido *N*-carboxi- α -alanina. La reacción de este último compuesto con las lisinas convierte a estos aminoácidos en iniciadores de una reacción de polimerización que permite añadir largas cadenas de polialanina a las proteínas. En el caso de la ribonucleasa pancreática se observó que siete de los grupos α -amino de sus diez lisinas se modificaban y que a cada uno de ellos podían añadirse cadenas de polialanina de hasta setenta residuos sin que se viera alterada la actividad enzimática de la proteína. Es más, esta ribonucleasa desnaturalizada mediante el tratamiento clásico con urea 8 M y reductores de los puentes disulfuro, era capaz de nuevo de recobrar su actividad y el patrón de puentes disulfuro característico de la proteína nativa cuando se retiraban los agentes desnaturalizantes y se la incubaba en las condiciones adecuadas, descritas anteriormente, para que estos puentes se formen de nuevo. Por tanto, así como existen aminoácidos que juegan un papel clave en el plegamiento correcto de la proteína, muchos otros pueden ser modificados y presumiblemente sustituidos sin que ello lleve a alteraciones importantes de la estructura tridimensional de la proteína. Consecuentemente, la función biológica de las proteínas parece que, a grandes rasgos, se correlaciona más con su geometría a nivel macromolecular que con los detalles químicos. La popularización de la secuenciación de proteínas, gracias a la máquina diseñada por Edman,⁵⁷ y de la determinación de la estructura tridimensional de proteínas aportó enseguida numerosos argumentos a favor de esta conclusión. La caracterización de hemoglobinas y citocromos de un amplio abanico de especies y de numerosas proteínas bacterianas codificadas por genes con mutaciones diversas ha demostrado contundentemente que la secuencia de las proteínas puede ser modificada ampliamente sin que ello lleve necesariamente consigo pérdida de estructura y alteración de función.¹²⁶⁻¹²⁹ En consecuencia, la naturaleza ha resuelto de formas muy diversas a lo largo de la evolución el mantenimiento de una estructura geométrica apta para la función encomendada a la proteína. En estas funciones, como por ejemplo en la catálisis enzimática solo intervienen un número limitado de residuos químicos que han de ocupar posiciones relativas muy precisas en el espacio, con capacidad de desplazamientos recíprocos también extremadamente precisos. El resto de la estructura de la proteína solo tiene como función garantizar estas posiciones y desplazamientos relativos y ello lo consigue gracias a una geometría global que ob-

tiene con secuencias de aminoácidos muy diversas. Este fenómeno pensamos que queda bien ilustrado en la Figura 7. En ella aparecen las secuencias de aminoácidos de las veintitrés formas que se conocen del factor de crecimiento para fibroblastos.^{130, 131} Todas estas proteínas tienen una estructura tridimensional equivalente (Figura 7) y son reconocidas, dentro de un estrecho margen de afinidad,

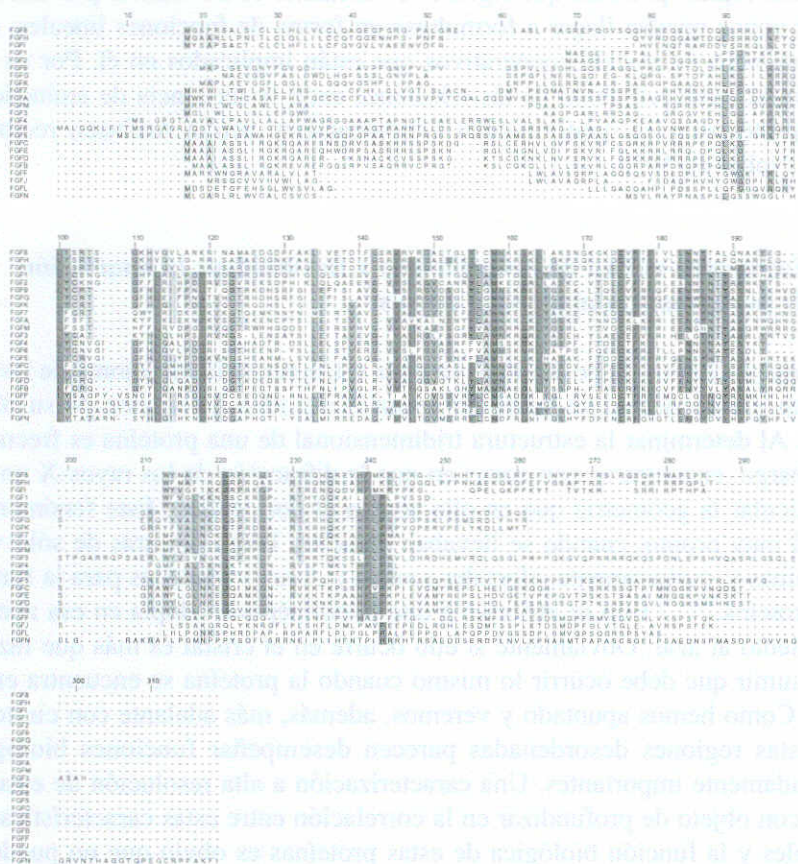


Figura 7. Secuencia de los veintitrés miembros de la familia de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos identificados hasta el momento en vertebrados. Las secuencias se han superpuesto de forma que los aminoácidos conservados aparezcan en la misma columna introduciendo huecos que representan deleciones o adiciones aceptadas a lo largo de la evolución por no afectar apreciablemente a la arquitectura tridimensional de la proteína ni a su función. La numeración de los aminoácidos se estableció en función de la superposición de secuencias, exclusivamente. El grado de conservación de los aminoácidos está representado por intensidad del color gris con que se resaltan. El tono oscuro indica el grado más alto y el claro el menor. El bajo número de aminoácidos en gris oscuro indica que muy pocos de ellos son imprescindibles para la función biológica de estas proteínas y/o para el mantenimiento de su arquitectura tridimensional.^{128, 129}

por las mismas proteínas de la membrana celular, a través de unos pocos aminoácidos concretos de su superficie. Las veintitrés formas se han superpuesto haciendo coincidir verticalmente los aminoácidos conservados que van destacados utilizando diversos tonos de gris (más intenso cuanto más conservados están), como se detalla en el pie de la figura. En la figura se aprecia claramente como la naturaleza ha conseguido el mismo efecto tridimensional de forma muy diversa. Las reglas químicas que rigen este fenómeno están todavía por dilucidar. Tal vez nunca puedan llegar a formularse en forma de funciones lineales, dado el alto número de efectos cooperativos que están implicados en él. Por su contribución al establecimiento de las relaciones entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas y su conformación biológicamente activa Anfinsen recibió el Premio Nobel en 1972.

8.3. Estructura nativa de las proteínas y flexibilidad: la aportación de la resonancia magnética nuclear

Lo que llevamos dicho a propósito de la estructura tridimensional de las proteínas en estado nativo va asociado a una cierta idea de rigidez de su plegamiento. Al determinar la estructura tridimensional de una proteína es frecuente, sin embargo, encontrarse con zonas en que la difracción de los rayos-X no permite calcular la geometría que en ella adopta el polipéptido. Este fenómeno se observó muy pronto, cuando se llevaban resueltas las estructuras de sólo veinte proteínas y, curiosamente, afectaba a veces a zonas esenciales para la función de la proteína.¹³²⁻¹³⁶ Ello se atribuyó a que el polipéptido adopta en esa zona un plegamiento al azar. Obviamente si ello ocurre en el cristal es más que razonable presumir que debe ocurrir lo mismo cuando la proteína se encuentra en solución. Como hemos apuntado y veremos, además, más adelante con cierto detalle, estas regiones desordenadas parecen desempeñar funciones biológicas extremadamente importantes. Una caracterización a alta resolución de estas regiones con objeto de profundizar en la correlación entre estas características estructurales y la función biológica de estas proteínas es obvio que no puede ser abordado utilizando la difracción de rayos-X, casi por definición. No obstante es perfectamente abordable en la actualidad mediante la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, una técnica que permite determinar la estructura tridimensional de las proteínas en solución y estudiar en estas mismas condiciones la dinámica de esta estructura.

Felix Bloch y Edward Purcell fueron los primeros en estudiar sistemáticamente los fenómenos de resonancia magnética nuclear. Sus investigaciones les hicieron merecedores del Premio Nobel en 1952. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear deriva del hecho de que los núcleos de determinados

átomos como los del H, el ^{13}C y el ^{15}N , tienen un cierto carácter dipolar. Estos núcleos al girar, generan un campo magnético cuyo momento coincide con el eje de giro. Como consecuencia de ello, se comportan como verdaderos imanes. Al introducir estos átomos en un campo magnético, sus núcleos se orientan de tal forma que la dirección y el sentido de su momento magnético sean los mismos que el del vector del campo en que se han introducido. Una vez creada esta situación, los átomos pueden ser desviados de esta posición aplicando energía electromagnética de la frecuencia adecuada. Una vez que hemos dejado de aplicar esta radiación, los átomos volverán a su posición inicial mediante un movimiento de precesión alrededor del eje definido por el vector campo magnético. Como consecuencia de ello se convertirán ellos mismos en emisores de radiación electromagnética cuya frecuencia corresponderá a la de su precesión. A comienzos de la década de 1950 se descubrió que la frecuencia de absorción y emisión de energía de los átomos en los que se observaban los fenómenos de resonancia magnética nuclear era modificada por el ambiente químico en que se encontraban estos átomos, fenómeno al que se denominó desplazamiento químico. El descubrimiento de este fenómeno abrió a la resonancia magnética nuclear unas perspectivas importantes como técnica analítica, pues al estar cada átomo de una molécula en un ambiente químico distinto cada uno de ellos tendrá un desplazamiento químico característico que lo identifica. El problema con que tropezó la técnica para imponerse como instrumento analítico en esos años fue su baja sensibilidad. Sin embargo, la sensibilidad de ésta aumentó dramáticamente al descubrirse que el análisis de Fourier permitía determinar los desplazamientos químicos de los diferentes átomos de una molécula a partir de la señal electromagnética que emite el conjunto de ellos al volver a su estado de reposo, tras haber sido desviados previamente todos ellos a la vez de éste mediante un pulso de energía adecuado. La aplicación de los métodos de Fourier permitió también acortar sustancialmente la duración de los experimentos y desarrollar la resonancia magnética nuclear multidimensional. Esta última técnica se basa en que cuando se excitan las moléculas con trenes limitados de pulsos cuya frecuencia se va variando progresivamente, es posible determinar mediante el análisis de Fourier de la radiación electromagnética emitida al volver el sistema al estado de reposo y de los cambios de esta emisión en función del intervalo de tiempo entre pulsos, junto con la frecuencia característica de los átomos resonantes (datos que es posible obtener de los experimentos monodimensionales), la distancia recíproca relativa que separa a los átomos que están próximos. Con estos datos en la mano es posible identificar la naturaleza de los diferentes grupos químicos de una molécula, la distancia a que se encuentran y calcular la estructura global del compuesto. Richard R. Ernst recibió el premio Nobel de Química en 1991 por su contribución al desarrollo de estas técnicas desde el punto de vista teórico y de la ingeniería extremadamente sofisticada que requiere.¹³⁷

Al final de la década de 1970 Wüthrich llevó a cabo, en colaboración con Ernst, al menos en parte, una serie de modificaciones de la técnica para poder aplicarla a la determinación de la estructura de las proteínas. Es fácil de imaginar la complejidad de la tarea dado el elevadísimo número de átomos de las moléculas en juego. Inicialmente Wüthrich tuvo en cuenta sólo la resonancia de los átomos de hidrógeno. Para identificar la frecuencia de cada uno de ellos desarrolló la técnica de la asignación secuencial, a base de combinar los resultados de dos tipos de medidas bidimensionales la denominada *correlated spectroscopy* conocida por las siglas COSY y los de la *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy* (NOESY).¹³⁸⁻¹⁴³ Una vez identificados la mayor parte posible de los protones de la cadena polipeptídica de la proteína por su frecuencia característica, demostró que es posible establecer también a partir de los experimentos NOESY una matriz de distancias recíprocas entre ellos. A partir de aquí, puedo pasar a calcular la estructura de la proteína mediante un método matemático que busca el plegamiento tridimensional de ésta que mejor satisface el conjunto de distancias recíprocas recogidas en la matriz,¹⁴⁴ teniendo en cuenta, por supuesto, las restricciones estéricas que impone la geometría de los distintos enlaces y grupos químicos del polipéptido. En 1985 Wüthrich consiguió determinar, mediante este conjunto de técnicas la estructura tridimensional del inhibidor IIA de proteinasas del plasma seminal de toro.¹⁴⁵ La fiabilidad del método fue comprobada resolviendo simultáneamente y de forma independiente la estructura tridimensional del Tendamistat, un inhibidor de la α -amilasa, utilizando resonancia magnética nuclear y difracción de rayos-x. Ambas técnicas llegaron a soluciones prácticamente idénticas.^{146, 147}

Los algoritmos para calcular la estructura de las proteínas a partir de una matriz de distancias no llevan a una solución única. Es frecuente presentar estas soluciones superpuestas como se ha hecho en la Figura 8 que corresponde a un estudio en el que se determinó la estructura de una variante del factor de crecimiento para fibroblastos que posee propiedades biológicas especialmente interesantes que no viene al caso detallar ahora.¹⁴⁸ En este tipo de gráficas suele representarse solamente la traza de la cadena peptídica de la proteína, pues resultarían demasiado complicadas si se añadieran más detalles. En la Figura puede apreciarse un fenómeno que se observa con frecuencia en estas representaciones y es el de las características diferentes de la superposición de trazas en las distintas regiones de la proteína. Así, observamos, cómo hay zonas (superior derecha) en que las diferentes soluciones a que llega el cálculo de la estructura son muy parecidas, lo que da lugar a que las trazas aparezcan muy empaquetadas. Sin embargo en otras regiones (inferior izquierda) la superposición de la trazas es muy laxa, lo que suele atribuirse a que en estas zonas la proteína es especialmente móvil. Esta conclusión, no deja de ser una suposición, o a lo más una inferencia indirecta, del tipo de la que se hace en el caso de las estructuras



Figura 8. Superposición de las 24 estructuras de la cadena peptídica del factor de crecimiento para fibroblastos FGF²⁷¹⁵⁴ que mejor se ajustan a la matriz de distancias (aproximadamente 1500) utilizada en el cálculo de su plegamiento tridimensional.¹⁴⁶

calculadas mediante difracción de rayos-X cuando resulta imposible determinar la estructura de una determinada zona de la proteína. No obstante los últimos avances de la resonancia magnética nuclear permiten tener una información directa bastante exhaustiva sobre la dinámica de estas zonas.

Un factor decisivo en el desarrollo de estas nuevas técnicas de resonancia ha sido la posibilidad de preparar proteína marcada uniformemente con los isótopos ¹⁵N y ¹³C, cuyos núcleos son también apropiados para la resonancia magnética nuclear. La posibilidad de llevar a cabo un marcaje de las proteínas de este tipo ha permitido desarrollar a cabo experimentos heteronucleares tri y tetradimensionales.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Este tipo de experimentos permite, en primer lugar, una asignación de resonancias mucho más rápida y una determinación de distancias mucho más eficiente y exhaustiva, que, por consiguiente, hace posible calcular estructuras mucho más precisas en un tiempo mucho menor. Pero sobretodo, el marcaje con ¹⁵N y ¹³C lo que permite es llevar a cabo experimentos de relajación heteronuclear y, con ello, tener acceso al estudio de la dinámica de la estructura de la proteína en solución.¹⁵² Esta técnica una vez puesta a punto encontró aplicación inmediata. Gracias a ella, se puso enseguida de manifiesto que un elevado número de proteínas, muchas de ellas fisiológicamente muy importantes, poseen regiones muy móviles y se pudieron calcular los parámetros característicos de la flexibilidad de estas regiones.^{153, 154} Igualmente permitió demostrar cómo, efectivamente, la falta de densidad electrónica observada en determinadas zonas de las

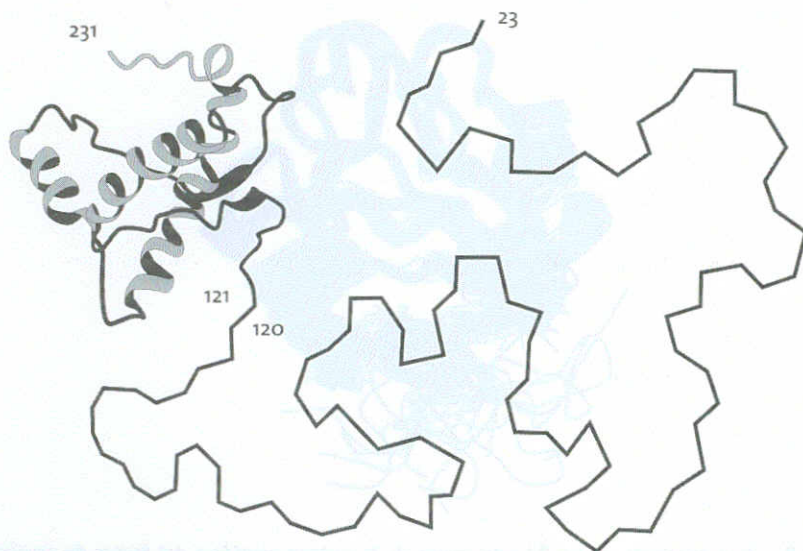


Figura 9. Estructura tridimensional de la cadena peptídica de la proteína priónica (aminoácidos 23 a 231) recombinante en el estado presumiblemente de la forma nativa celular (Pr^C). Aproximadamente la mitad de la cadena (residuos 23 a 120) carece de plegamiento tridimensional estable y es representada en la figura, de forma simbólica, en una de las infinitas configuraciones que puede adoptar.^{154, 155}

estructuras cristalográficas de las proteínas era debido a su intensa movilidad.¹⁵⁵ Quizá uno de los casos más espectaculares de movilidad de una zona determinada de una proteína es el de la forma presuntamente nativa de la proteína priónica.^{156, 157} Como se observa en la Figura 9, la mitad de la proteína es globular, compacta y rica en hélices- α (residuos 121-231) y la otra mitad (residuos 23-120) totalmente flexible, como ponen de manifiesto los tiempos de correlación rotacionales de los grupos ^{15}N - ^1H ($\tau_c < 1$ ns). Obviamente la estructura de esta última región que se recoge en la figura es puramente simbólica y no representa sino una de las infinitas configuraciones que puede adoptar. Una información como esta no hubiera podido obtenerse mediante difracción de rayos-X. Es más una proteína como la *mPrP*(23-231) nunca hubiera cristalizado pues como hemos repetido varias veces a lo largo de este discurso la capacidad de cristalizar de las proteínas fue uno de los argumentos más importantes que usó Hsien Wu a la hora de defender que las proteínas tenían una estructura compacta regular, internamente ordenada y de una cierta rigidez.⁶⁰

En el año 1971 se estableció en los *Brookhaven National Laboratories* una base de datos que fue denominada *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Se trataba de un archivo que ponía a disposición de la comunidad científica las co-

ordenadas de las estructuras de las macromoléculas biológicas que los estudios de difracción de rayos-X habían permitido ir calculando. A los comienzos el archivo contenía datos de sólo siete estructuras. A fecha de 5 de agosto de 2003 el número de estructuras de proteínas cuyas coordenadas están depositadas en esta base de datos es de veinte mil setecientos sesenta y ocho. A partir de finales de la década de 1980, la base de datos tuvo que crear un apartado especial para recoger las estructuras calculadas mediante una nueva técnica, la resonancia magnética nuclear. En la fecha de agosto que acabamos de mencionar el 13.5 % de las estructuras de proteínas depositadas habían sido ya obtenidas mediante resonancia magnética nuclear. Kurt Wüthrich recibió el premio Nobel de química en el 2002 por sus contribuciones en resonancia magnética nuclear para determinar la estructura tridimensional de las macromoléculas biológicas en solución.

9. PROTEÍNAS NATIVAS DESORDENADAS

Hemos dedicado una gran parte de este discurso a la estructura homogénea regular y compacta de las proteínas. Dilucidar estos aspectos ha necesitado grandes esfuerzos, mercedamente premiados con el Nobel en muchos casos. Hemos afirmado muchas veces a lo largo de este discurso, de una forma u otra, que «Hsien Wu estableció que las proteínas tienen una estructura tridimensional compacta regular internamente ordenada y relativamente rígida». Sin embargo, a estas alturas del discurso no tenemos más remedio que afirmar, como ocurre muchas veces en Ciencia, que la afirmación de Wu es verdad, pero que no contiene toda la verdad. Es verdad para una mayoría aplastante de las proteínas conocidas hasta hace algo más de una década. Sin embargo, quedaban todavía nuevos tipos de proteínas por descubrir. Los expertos en proteínas, al necesitar en sus estudios que éstas puedan purificarse con una relativa eficacia, acabaron dejando de lado inadvertidamente a toda una subpoblación que carecía de estructura compacta y homogénea, dado que sin ésta es prácticamente imposible diseñar un procedimiento eficaz para la purificar una proteína en estado nativo. Como consecuencia de ello acabó introduciéndose inadvertidamente un sesgo muy importante, origen del error, en la muestra que sirvió de base para ir estableciendo las propiedades generales de las proteínas. Sería inexacto históricamente afirmar que fue la resonancia magnética nuclear la técnica que hizo caer en la cuenta de que las proteínas sin estructura no eran una excepción, sino que se trataba de algo más común de lo que hacía pensar el selecto conjunto de proteínas que era objeto de estudio por los especialistas. Existen otras técnicas que apuntaban también hacia esto. Sin embargo, fue la potencia de la resonancia magnética nuclear la que dio argumentos totalmente contundentes. Estos datos unidos a los de la genómica suministran razones muy sólidas para pensar que las proteínas desordenadas en estado nativo son muchas más de lo que se creía y que a este grupo pertenecen proteínas con funciones biológicas muy importantes. Así como para la catálisis enzimática es muy importante una relativa rigidez que oriente adecuadamente en el espacio los grupos que intervienen en el

proceso, para otras funciones biológicas, lo decisivo sería precisamente lo contrario: la flexibilidad.

En 1950, F. Karush puso de manifiesto que la seroalbúmina podía unir una amplísima variedad de compuestos hidrofóbicos aniónicos con una afinidad muy alta, al contrario de lo que ocurría con las otras proteínas conocidas por aquella época que manifestaban una especificidad asombrosamente estricta.¹⁵⁸ Utilizando la misma lógica que Fisher a la hora de formular su modelo de la llave y la cerradura para visualizar la especificidad de los enzimas por sus sustratos, Karush propuso que el sitio de unión de la albúmina era capaz de adoptar un número de configuraciones muy elevado todas ellas termodinámicamente equivalentes y en equilibrio dinámico en la proteína libre. El ligando se uniría con aquella de estas configuraciones que mejor se le adaptara desplazando, consiguiendo el equilibrio hacia esta conformación. Karush denominó a este fenómeno adaptabilidad configuracional. Una serie de estudios llevados a cabo a continuación confirmaron el modelo de Karush y pusieron de manifiesto además que la velocidad de transición de una conformación a otra podía llegar a ser muy lenta (del orden de segundos).¹⁵⁹ Con objeto de explicar cómo las proteínas iban adoptando su conformación característica en base al creciente número de interacciones intramoleculares que se iban estableciendo a medida que se avanzaba su síntesis en el ribosoma, Koshland propuso el modelo que denominó de adaptación inducida (*induced fit*) sin prejuzgar si la interacción desplazaba el equilibrio entre diversas configuraciones preexistentes o sin más inducía la nueva conformación.¹⁶⁰ Al final el término que se acabó imponiendo para designar el fenómeno inicialmente descrito por Karush fue el de adaptación inducida. Esta adaptación inducida se utilizó para explicar el cambio de estructura de la hexokinasa al unir glucosa que ponía de manifiesto la dispersión de rayos-X a pequeño ángulo, y la sorprendentemente capacidad de la aspartato aminotransferasa de unir una amplia diversidad de ligandos hidrofóbicos de diferente geometría.¹⁶¹⁻¹⁶³ Obviamente este fenómeno, con los datos que se tenía a mano, podía implicar solamente un cambio de estructura. Sin embargo, muy pronto, los cristalógrafos sugirieron la posibilidad de que zonas muy importantes para la actividad biológica de determinadas proteínas, como podían ser las de unión a ligandos, estuvieran desordenadas en las proteínas nativas, pues con frecuencia no observaban densidad electrónica en la zona del polipéptido que se correspondía con estas regiones, algo que la resonancia magnética nuclear se encargó de demostrar.^{132-136, 155} Más sorprendente todavía resultó el descubrimiento mediante esta última técnica de proteínas en que la zona sin estructura se extendía a todo lo largo de la cadena polipeptídica.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Se empezó, así, a caer en la cuenta de que junto a las proteínas con estructura tridimensional perfectamente definidas existían otras que carecían de ella, bien a lo largo de toda su estructura primaria bien sólo en determinadas regiones bien definidas de ésta.

Actualmente, la lista de proteínas sin estructura tiene ya más de cien entradas.^{167, 168} A partir de 1994 en que se apuntó la posibilidad de que la proteína Tau careciera también de estructura tridimensional definida, a este grupo se le conoce como el de las proteínas nativas no plegadas (*natively unfolded proteins*).¹⁶⁹ En lista que acabamos de mencionar no están incluidos los polipéptidos de menos de cincuenta aminoácidos, pues desde mucho tiempo atrás se considera que definen una clase polipeptídica aparte, separada de la que sería la de las verdaderas proteínas, precisamente porque, en general, carecen de estructura. A la luz del descubrimiento de las proteínas nativas no plegadas y de que el número de estas no deja de aumentar (véanse los estudios genómicos, mas adelante) no es obvio que se deba seguir considerando a los polipéptidos de menos de cincuenta aminoácidos como un grupo aparte. Más bien parece que habría que integrarlos en el grupo de las proteínas nativas no plegadas en el que representarían una solución minimalista: a lo largo de la evolución, se habría prescindido de todas aquellas regiones que contribuyen a la adquisición de un plegamiento tridimensional homogéneo que ya no resultan necesarias. Aunque la resonancia magnética nuclear sigue aportando los datos definitivos para clasificar a un polipéptido dentro de este grupo, otra serie de experimentos más sencillos pueden aportar indicios fehacientes de que nos encontramos ante una proteína nativa no plegada: la dispersión de rayos-X a bajo ángulo, el dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, la digestión por proteasas y el comportamiento hidrodinámico.^{168, 170, 171}

Los experimentos de desnaturalización/renaturalización de la ribonucleasa llevados a cabo por Anfinsen que hemos resumido con cierto detalle en apartados anteriores, demostraron que la secuencia de aminoácidos de una proteína encierra la información necesaria y suficiente para que ésta adopte su plegamiento tridimensional característico. De acuerdo con este principio cabría esperar que fuera la secuencia de aminoácidos la responsable también de las características estructurales específicas de las proteínas nativas no plegadas. Obviamente carece de sentido intentar demostrarlo con experimentos del tipo de los llevados a cabo por Anfinsen y por White.^{112, 113, 117} La demostración ha requerido de una cierta sofisticación computacional como es el uso de redes neuronales artificiales de cálculo. Así, asumiendo que efectivamente era verdad que la secuencia de aminoácidos contenía la información para que una proteína mantenga en estado nativo una estructura no plegada, Dunker y sus colaboradores entrenaron a una red neuronal artificial con un conjunto de proteínas bien caracterizadas como pertenecientes a este grupo. Los predictores obtenidos de estos cálculos mostraron una capacidad sorprendente de identificación de proteínas o regiones no plegadas en estado nativo. Cuando se les hacía analizar conjuntos que contenían un número equivalente de regiones no plegadas y con estructura compacta y ordenada, estos predictores eran capaces de distinguir con

TABLA IV

Aminoácidos en las proteínas y dominios nativos no plegados^{168, 170}

<i>Escasamente Representados</i>	<i>Altamente representados</i>
Isoleucina	Ácido Glutámico
Leucina	Lisina
Valina	Arginina
Triptófano	Glicina
Fenilalanina	Glutamina
Tirosina	Serina
Cisteína	Prolina
Asparagina	Alanina

una precisión superior al 80% los elementos del conjunto que en estado nativo mantienen una estructura compacta y ordenada, de los que se mantienen desplegados. Esta precisión está tan lejos de la que puede esperarse de una mera predicción al azar, que no hay más remedio que concluir que la secuencia de aminoácidos contiene la información determinante del estado nativo no plegado de las proteínas, dado que el predictor se construyó exclusivamente en base a datos de secuencia.^{168, 172-177} En general las secuencias que el predictor identifica como correspondientes a un estado nativo no plegado se caracterizan por su baja complejidad y por un importante sesgo en los aminoácidos que aparecen en ellas (Tabla IV). Este sesgo explica su baja hidrofobicidad. Los aminoácidos enumerados en la Tabla IV (columna derecha) no están tampoco representados todos ellos al mismo nivel en las proteínas nativas no plegadas de forma que, por lo general, estas proteínas tienden a poseer puntos isoeléctricos muy extremos, frecuentemente ácidos.^{168, 170}

Una vez que se puso de manifiesto la solidez del predictor, Dunker y sus colaboradores lo aplicaron a diversas familias de proteínas y descubrieron que las regiones sin plegamiento estaban altamente conservadas en aquellas familias en que se detectaban, a pesar de que a veces pudieran existir grandes diferencias en secuencia de aminoácidos entre estas regiones.¹⁷⁷ El elevado índice de conservación de estas regiones a lo largo de la evolución claramente apunta a que esta característica debe ser biológicamente muy importante. Dunker aplicó también el predictor a treinta y cuatro genomas. Veintidós de bacterias, sie-

te de arqueobacterias y cinco de organismos eucariotas. Los resultados no dejaron de ser sorprendentes e inesperados. En las bacterias y las arqueobacterias estudiadas, el porcentaje de proteínas en las que el predictor reconocía secuencias polipeptídicas sin plegamiento era muy semejante en los dos casos (del 7% al 33% en las primeras; del 9% al 37% en las segundas). Por el contrario, en los cinco genomas de eucariotas analizados el porcentaje ascendía a un valor de entre el 36% y el 63%. La diferencia espectacular en el número de polipéptidos de estado nativo no plegado codificados por estas dos clases de genomas, sugiere que este tipo de polipéptidos debe jugar un papel clave en el salto en sofisticación biológica que supone el paso de organismo procariótico a eucariótico. Sobre cuál pueda ser este papel, solo pueden ofrecerse en este momento indicios. La señalización intra y extracelular parece ser la más obvia de ellos, pues es evidente que los organismos eucarióticos están dotados de sistemas de señalización de mayor sofisticación que los procarióticos, que les van a permitir evolucionar hacia la pluricelularidad y dar lugar a organismos con los sofisticadísimos sistemas de correlación funcional de los animales. Está repetidamente descrito cómo en numerosos casos estos sistemas de control, como en el caso de muchos elementos del sistema endocrino, corren a cargo de polipéptidos de bajo peso molecular, generalmente sin estructura. Muchas de las proteínas que los predictores desarrollados por Dunker clasifican como proteínas nativas no plegadas forman parte también de sistemas de control.¹⁷⁷

A lo largo de este discurso hemos aludido varias veces a que ciertas funciones biológicas, como la catálisis enzimática exigen que las proteínas tengan una estructura tridimensional altamente precisa. Por el contrario, nada se opone *a priori* a que funciones como las de señalización puedan ser desempeñadas por secuencias polipeptídicas lineales o por proteínas que sólo posean estructura secundaria (hélices- α y láminas- β). Por otra parte, las proteínas no plegadas poseen características que pueden ser muy interesantes a la hora de desempeñar este último tipo de funciones. Por ejemplo, la plasticidad estructural inherente de las proteínas nativas no plegadas las hace muy aptas para reconocer un amplio abanico de blancos biológicos y llevar a cabo regulaciones múltiples de alta especificidad. Es el caso del polipéptido de aproximadamente ciento sesenta aminoácidos p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} que inhibe un elevado número de quinasas dependientes de ciclina a las que reconoce no en base a la complementariedad de dos superficies preformadas de la proteína, sino de la capacidad del p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} de adoptar un elevado número de conformaciones muy precisas.¹⁶⁴ Se ha propuesto también que desde el punto de vista de la participación en sistemas de control la falta de estructura de un ligando que transmite una señal puede suponer una ventaja, pues ello contribuiría a que el proceso de reconocimiento por el detector sea independiente de la temperatura, lo que obviamente da estabilidad al sistema.¹⁷⁸ Desde un punto de vista cinético, Shoemaker ha puesto de manifiesto, además, que

las proteínas sin estructura pueden reconocer sus ligandos más rápidamente que aquellas con estructura pues su radio de captura es mayor.¹⁷⁹ Este efecto es muy pequeño, no depende de la concentración del ligando, y a altas concentraciones puede no ser tenido en cuenta. Sin embargo, a bajas concentraciones, en procesos regidos por cinéticas de segundo orden para arriba, como son los procesos de señalización y regulación a través de mensajeros bioquímicos, su contribución puede ser muy importante. De esta forma, la falta de estructura puede compensar una excesiva lentitud en estos procesos a causa de la baja concentración de los componentes químicos del sistema que impone la necesidad de optimizar su sensibilidad y precisión. Por otra parte, la afinidad global puede resultar también relativamente fácil de regular a través de la complementariedad en el caso de polipéptidos sin plegamiento definido. Así, por ejemplo, la unión del activador transcripcional CBP (*CREB binding protein*) a sus dominios de activación es inducido por la fosforilación de estos que aumenta dramáticamente la afinidad al aumentar considerablemente la capacidad de complementariedad.^{180, 181} En esta línea, es fácil imaginar que dado el balance termodinámico exquisito que rige la unión entre una proteína no plegada y su receptor y dada su elevada capacidad para verse afectadas por numerosos otros factores tanto químicos como físicos debido a su flexibilidad, este tipo de proteínas constituyen unos sensores excelentes para cualquier proceso de regulación y transmisión de señales. Finalmente, hay que enumerar como propiedad interesante desde el punto de vista de la eficiencia también de estos procesos de regulación, la alta sensibilidad de las proteínas y regiones nativas no plegadas a las proteasas. Una fácil eliminación del elemento regulador o que trasmite la señal puede contribuir de forma también muy apreciable a que estos procesos funcionen con precisión.^{168, 171, 177}

Podría objetarse que una regulación precisa requiere especificidad y que esto es algo que como ocurre en los enzimas parece que debería exigir que las proteínas que intervienen en procesos de regulación y control tuvieran una estructura tridimensional bien precisa. Sin embargo, aunque a primera vista parezca paradójico, el requerimiento de los polipéptidos no plegados de que tenga lugar una transición característica en su plegamiento para poder unirse a su blanco es un factor muy importante a la hora de elevar su especificidad. Como se han encargado de analizar R. S. Spolar y T. Record,¹⁸² la consecuencia termodinámica de que plegamiento y unión vayan acoplados es que hay que consumir energía en el proceso para inducir el plegamiento a costa de la energía libre total del proceso. Por ello, esta unión sólo podrá tener lugar cuando la complementariedad entre el señalizador y su blanco sea muy elevada y en consecuencia tendrá una especificidad muy alta. Es obvio que la termodinámica general del proceso actúa contra la afinidad, pero ello no es necesariamente no deseable a efectos de regulación y señalización mientras se mantenga una especificidad alta. Una afinidad moderada permite que el ligando señalizador se separe con facilidad, algo que puede resultar muy conve-

niente cuando hay que disparar y suprimir procesos con rapidez, siempre que haya mecanismos que prevengan la inestabilidad del sistema. En este sentido, es frecuente detectar fenómenos importantes de cooperatividad en las uniones en que intervienen proteínas o regiones nativas no plegadas, sobre todo cuando uno de los elementos del complejo es DNA. Es paradigmático el caso del dominio del grupo de alta movilidad (*high mobility group*; HMG) del factor potenciador linfóide de unión-1 (*lymphoid enhancer-binding factor*; LEF). Este factor regula el potenciador del gen del receptor- α de las células T mediante la inducción de una curvatura importante en el DNA.¹⁸³ A la vez el dominio HMG que tiene un plegamiento escasamente definido en ausencia de su ligando, adquiere una estructura tridimensional regular y ordenada al unirse a su ligando.¹⁷¹ Esta doble inducción recíproca hace que el reconocimiento entre estos dos ligandos sea altamente cooperativa, efecto que crea una energía de activación entre los estados ligados y libres del equilibrio que puede impedir que una afinidad moderada se traduzca en inestabilidad del sistema por la facilidad del complejo señalizador de disociarse.

Finalmente, sólo señalar antes de terminar este apartado que el análisis en levaduras de la letalidad causada por la eliminación selectiva de proteínas pone de manifiesto que aquellas cuya pérdida es menos tolerada ocupan, en una elevada proporción, los nodos más densos en el mapa de su interactoma.¹⁸⁴ Obviamente, por su alta capacidad de interactuar con ligandos muy diversos, se trata de proteínas con muchas opciones a pertenecer al grupo de las nativas no plegadas. De ser esto así, resultaría que es esta clase de proteínas la que resulta más imprescindible para la célula.

Hemos llegado al final de nuestro discurso. Nuestro discurrir ha sido como el de uno de esos pequeños animales trepadores que partiendo de la base de un árbol hubiera llegado a los extremos de una de sus ramas tras haber dejado de lado muchas otras. Nuestro camino ha dejado también muchas encrucijadas sin explorar para ocuparnos exclusivamente de la evolución del concepto de proteína como compuesto químico y de aquellos estudios y técnicas que han resultado clave en este proceso. No nos hemos asomado mucho a contemplarlas funcionando, aunque, eso sí, hemos intentado subrayar aquellas características químicas que ayudan a entender sus propiedades biológicas más notables. Hemos dejado de lado mucha investigación extremadamente valiosa en proteínas, conscientemente unas veces y, en otras, por ignorancia. Mis disculpas, en este último caso, son mis limitaciones. Espero, de todas formas, haber sido capaz de delinear ante esta docta audiencia la historia de cómo se ha ido entendiendo qué eran las proteínas desde que se creó el término hasta el momento actual.

Comenzamos este discurso citando a Francisco de Quevedo. Lo haremos de nuevo al llegar al final. Escribía en el *Libro de todas las cosas y otras muchas más*:¹⁸⁵

Si quieres ser autor de libros de alquimia, haz lo que han hecho todos que es fácil, escribiendo jerigonza

Y como ejemplo, una fórmula para la obtención de oro: sátira quevedesca extremadamente maliciosa, llena de dobles sentidos, en un estilo perfectamente imitado, de las recetas que ofrecían los textos de alquimia de la época.

Recibe el rubio y mátale y resucítale el negro. Item, tras el rubio toma lo de abajo y súbelo y baja lo de arriba y júntalos y tendrás lo de arriba.

Espero, no sin una cierta ansiedad, que mi discurso no haya sonado así a esta docta audiencia y que las limitaciones de mi saber no le hagan pensar de la ciencia de las proteínas lo que los diablos a cargo de los alquimistas de la alquimia: algo que ni se entiende ni puede uno averiguarse con ella. Muchas gracias.