Lehninger

PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA

cuarta edición

DAVID L. NELSON
MICHAEL M. COX

Índice general

Prólogo v
1 Fundamentos de bioquímica 1

I ESTRUCTURA Y CATÁLISIS 45

2 El agua 47
3 Aminoácidos, péptidos y proteínas 75
4 Estructura tridimensional de las proteínas 116
5 Función de las proteínas 157
6 Enzimas 190
7 Glúcidos y glucobiología 238
8 Nucleótidos y ácidos nucleicos 273
9 Tecnologías de la información basadas en el DNA 306
10 Lípidos 343
11 Membranas biológicas y transporte 369
12 Bioseñalización 421

II BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO 481

13 Principios de bioenergética 489
14 Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato 521
15 Principios de regulación metabólica: glucosa y glucógeno 560
16 El ciclo del ácido cítrico 601
17 Catabolismo de los ácidos grasos 631
18 Oxidación de aminoácidos y producción de urea 656
19 Fosforilación oxidativa y fotofosforilación 690
20 Biosíntesis de glúcidos en plantas y bacterias 751
21 Biosíntesis de lípidos 787
22 Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas 833
23 Integración y regulación hormonal del metabolismo de los mamíferos 881

III LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN 921

24 Genes y cromosomas 923
25 Metabolismo del DNA 948
26 Metabolismo del RNA 995
27 Metabolismo de las proteínas 1034
28 Regulación de la expresión génica 1081

Apéndice A Abreviaturas comunes en la literatura científica bioquímica A-1
Apéndice B Soluciones abreviadas de los problemas SA-1
Glosario G-1
Procedencia de las ilustraciones PI-1
Índice alfabético I-1

ÍNDICE DE MATERIAS

1 Fundamentos de bioquímica 1

1.1 Fundamentos celulares 3
Las células son las unidades estructurales y funcionales de todos los organismos vivos 3
Las dimensiones celulares están limitadas por la capacidad de difusión del oxígeno 4
Los seres vivos se clasifican en tres dominios 4
Escherichia coli es la célula procariótica mejor estudiada 5
Las células eucarióticas poseen diversos orgánulos membranosos que pueden aislarse para su estudio 6
El citoplasma se organiza gracias al citoesqueleto y es altamente dinámico 9
Las células construyen estructuras supramoleculares 10
Los estudios in vitro podrían no detectar interacciones importantes entre moléculas 11

1.2 Fundamentos químicos 12
Las biomoléculas son compuestos de carbono con una diversidad de grupos funcionales 13
Las macromoléculas son los principales constituyentes de las células 15
Recuadro 1-1 Peso molecular, masa molecular y las unidades que deben utilizarse 15
La estructura tridimensional se describe en términos de configuración y conformación 16
Recuadro 1-2 Louis Pasteur y la actividad óptica: *in vino, veritas* 19
Las interacciones entre las biomoléculas son estereoespecíficas 20

1.3 Fundamentos físicos 21
Los organismos vivos existen en un estado estacionario dinámico y no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno 21
Los organismos transforman energía y materia 22
El flujo de electrones proporciona energía para los organismos 22
Crear y mantener el orden requiere trabajo y energía 23
El acoplamiento energético conecta las reacciones biológicas 23
Recuadro 1-3 Entropía: las ventajas de estar desorganizado 24
K_{eq} y $\Delta G°$ miden la tendencia de una reacción para transcurrir espontáneamente 26
Los enzimas facilitan las secuencias de reacciones químicas 26
El metabolismo está regulado para conseguir equilibrio y economía 27

1.4 Fundamentos genéticos 28
La continuidad genética reside en las moléculas de DNA 29
La estructura del DNA hace posible su replicación y reparación con fidelidad casi perfecta 29
La secuencia lineal del DNA codifica proteínas con estructuras tridimensionales 29

1.5 Fundamentos evolutivos 31
Los cambios en las instrucciones hereditarias hacen posible la evolución 31
Las primeras biomoléculas aparecieron por evolución química 32
La evolución química puede simularse en el laboratorio 32
Los primeros genes y catalizadores podrían haber sido moléculas de RNA o precursores relacionados 32
La evolución biológica empezó hace más de tres mil quinientos millones de años 34

La primera célula fue probablemente quimioheterótrofa 34
Las células eucarióticas evolucionaron a partir de las procarióticas a través de diversas fases 35
La anatomía molecular revela relaciones evolutivas 36
La genómica funcional permite deducir la correspondencia entre genes y procesos celulares específicos 38
La comparación de genomas tendrá una importancia cada vez mayor en la biología y medicina humanas 38

I ESTRUCTURA Y CATÁLISIS 45

2 El agua 47

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos 47
Los puentes de hidrógeno confieren al agua sus propiedades extraordinarias 47
El agua forma puentes de hidrógeno con los solutos polares 49
El agua interacciona electrostáticamente con los solutos cargados 50
La entropía aumenta cuando se disuelve una sustancia cristalina 51
Los gases apolares se disuelven mal en el agua 52
Los compuestos apolares fuerzan cambios desfavorables energéticamente en la estructura del agua 52
Las interacciones de van der Waals son atracciones interatómicas débiles 54
Las interacciones débiles son cruciales para la estructura y función de las macromoléculas 54
Los solutos afectan a las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas 56
Recuadro 2-1 Respuesta táctil en plantas: un fenómeno osmótico 59

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles 60
El agua pura está ligeramente ionizada 60
La ionización del agua se expresa mediante una constante de equilibrio 61
La escala de pH representa las concentraciones de H^+ y OH^- 61
Recuadro 2-2 El producto iónico del agua: dos problemas ilustrativos 62
Los ácidos y bases débiles tienen constantes de disociación características 63
Las curvas de titulación proporcionan el pK_a de los ácidos débiles 64

2.3 Tamponamientos contra cambios de pH en los sistemas biológicos 65
Los tampones son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas 66
Una expresión sencilla relaciona pH, pK_a y concentración de tampón 66
Los ácidos o bases débiles tamponan células y tejidos contra cambios de pH 67
Recuadro 2-3 Resolución de problemas con la ecuación de Henderson-Hasselbalch 67
Recuadro 2-4 Sangre, pulmones y tampón: el sistema tampón del bicarbonato 69

2.4 El agua como reactivo 69

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos 70

3 Aminoácidos, péptidos y proteínas 75

3.1 Aminoácidos 75
Los aminoácidos tienen características estructurales comunes 76
Los residuos aminoácidos de las proteínas son estereoisómeros L 77
Los aminoácidos se pueden clasificar según su grupo R 78
Los aminoácidos no estándar tienen también importantes funciones 80
Los aminoácidos pueden actuar como ácidos y bases 81
Recuadro 3-1 Absorción de la luz por las moléculas: ley de Lambert-Beer 82
Los aminoácidos tienen curvas de titulación características 82
La curva de titulación predice la carga eléctrica de los aminoácidos 84
Los aminoácidos difieren en sus propiedades ácido-base 84

3.2 Péptidos y proteínas 85
Los péptidos son cadenas de aminoácidos 85
Los péptidos pueden distinguirse por su comportamiento de ionización 86
Existen péptidos y polipéptidos biológicamente activos de una gran variedad de tamaños 86
Los polipéptidos tienen una composición de aminoácidos característica 87
Algunas proteínas contienen grupos químicos diferentes a los aminoácidos 88
Existen varios niveles de estructura de las proteínas 88

3.3 Trabajar con proteínas 89
Las proteínas se pueden separar y purificar 89
Las proteínas pueden separarse y caracterizarse por electroforesis 92
Es posible cuantificar las proteínas no aisladas 94

3.4 Estructura covalente de las proteínas 96
La función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos 96
Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de millones de proteínas 96
Los polipéptidos cortos se secuencian utilizando procedimientos automáticos 97
Las proteínas grandes deben secuenciarse a partir de fragmentos más pequeños 99
Las secuencias de aminoácidos se pueden deducir también mediante otros métodos 100
Recuadro 3-2 Investigación de las proteínas mediante la espectrometría de masas 102
Pueden sintetizarse químicamente péptidos y proteínas pequeñas 104
La secuencia de aminoácidos proporciona información bioquímica importante 106

3.5 Secuencias de proteínas y evolución 106
Las secuencias de proteína permiten deducir la historia de la vida en la Tierra 107

4 Estructura tridimensional de las proteínas 116

4.1 Visión general sobre la estructura proteica 116
La conformación de una proteína está estabilizada principalmente por interacciones débiles 117
El enlace peptídico es plano y rígido 118

4.2 Estructura secundaria de las proteínas 120
La hélice α es una estructura secundaria habitual en proteínas 120
La secuencia de aminoácidos afecta a la estabilidad de la hélice α 121
Recuadro 4-1 Cómo distinguir dextrógiro de levógiro 122
La conformación β organiza las cadenas polipeptídicas en forma de hoja 123
Los giros β son frecuentes en las proteínas 123
Las estructuras secundarias comunes tienen ángulos de enlace y un contenido de aminoácidos característico 124

4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas 125
Las proteínas fibrosas están adaptadas a una función estructural 126
Recuadro 4-2 La ondulación permanente es un ejemplo de ingeniería bioquímica 127
En las proteínas globulares la diversidad estructural refleja la diversidad funcional 129
Recuadro 4-3 Razones para que los marineros, exploradores y estudiantes universitarios consuman fruta y verduras frescas 130
La mioglobina proporcionó las primeras claves acerca de la complejidad de las estructuras proteicas globulares 132
Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias diversas 134
Recuadro 4-4 Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína 136
El análisis de numerosas proteínas globulares revela patrones estructurales comunes 139
Los motivos proteicos constituyen la base de la clasificación estructural de las proteínas 141
Las estructuras cuaternarias de las proteínas comprenden desde dímeros sencillos hasta grandes complejos 144
Existen límites al tamaño de las proteínas 146

4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas 147
La pérdida de la estructura conduce a la pérdida de función 147
La secuencia de aminoácidos determina la estructura terciaria 148
Los polipéptidos se pliegan rápidamente y según un proceso de varias etapas 148
Recuadro 4-5 Muerte por un plegamiento incorrecto: las enfermedades priónicas 150
Algunas proteínas sufren un plegamiento asistido 151

5 Función de las proteínas 157

5.1 Unión reversible proteína-ligando: proteínas de unión a oxígeno 158
El oxígeno puede estar unido a un grupo prostético hemo 158
La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno 159
Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente 160
La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando 162
El oxígeno es transportado en la sangre por la mioglobina 162
Las subunidades de la hemoglobina son similares estructuralmente a la mioglobina 163
La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno 164
La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa 164
La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente 167
Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa 167
Recuadro 5-1 Monóxido de carbono: un asesino silencioso 168
La hemoglobina también transporta H^+ y CO_2 170
La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato 171
La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina 172

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmunitario y las inmunoglobulinas 174
La respuesta inmunitaria es el resultado de la acción de una serie de células y proteínas especializadas 175
Las células distinguen lo propio de lo ajeno exponiendo péptidos en su superficie 176
Los anticuerpos poseen dos sitios idénticos de unión a antígeno 178
Los anticuerpos se unen fuertemente al antígeno de una manera específica 180
Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes 180

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares 182
Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina 182
Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso en estructuras ordenadas 184
Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina 185

6 Enzimas 190

6.1 Introducción a los enzimas 191
La mayoría de enzimas son proteínas 191
Los enzimas se clasifican según las reacciones que catalizan 192

6.2 ¿Cómo funcionan los enzimas? 193
Los enzimas alteran las velocidades de reacción pero no los equilibrios 193
Las velocidades de reacción y lo equilibrios tienen definiciones termodinámicas precisas 195
Unos pocos principios explican el poder catalítico y la especificidad de los enzimas 196
Las interacciones débiles entre enzima y sustrato son óptimas en el estado de transición 197
Los enzimas utilizan la energía de fijación para proporcionar especificidad de reacción y catálisis 198
Grupos catalíticos específicos contribuyen a la catálisis 200

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo 202
La concentración del sustrato afecta a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas 202
La relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción se puede expresar de manera cuantitativa 204
Para comparar las actividades enzimáticas se utilizan los parámetros cinéticos 205
Recuadro 6-1 Transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten: gráfica de dobles recíprocos 206
Muchos enzimas catalizan reacciones en las que intervienen dos o más sustratos 207
La cinética en el estado pre-estacionario puede aportar pruebas sobre pasos específicos de la reacción 208

Los enzimas están sujetos a inhibición reversible o irreversible 209
Recuadro 6-2 Pruebas cinéticas para determinar los mecanismos de inhibición 210
El pH afecta a la actividad enzimática 212

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas 213
En el mecanismo de la quimotripsina se produce la acilación y desacilación de un residuo de Ser 213
En la hexoquinasa se produce un encaje inducido durante la unión del sustrato 218
El mecanismo de reacción de la enolasa requiere la presencia de iones metálicos 219
Recuadro 6-3 Pruebas de la complementariedad entre el enzima y el estado de transición 220
El lisozima utiliza dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas 222

6.5 Enzimas reguladores 225
Los enzimas alostéricos experimentan cambios conformacionales en respuesta a la unión del modulador 225
En muchas rutas las etapas reguladoras están catalizadas por enzimas alostéricos 226
Las propiedades cinéticas de los enzimas alostéricos difieren del comportamiento de Michaelis-Menten 227
Algunos enzimas reguladores experimentan modificaciones covalentes reversibles 228
Los grupos fosforilo afectan a la estructura y la actividad catalítica de las proteínas 228
Las fosforilaciones múltiples permiten un exquisito control de la regulación 230
Algunos enzimas y otras proteínas son regulados mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático 231
Algunos enzimas reguladores utilizan varios mecanismos de regulación 232

7 Glúcidos y glucobiología 238

7.1 Monosacáridos y disacáridos 238
Las dos familias de monosacáridos: aldosas y cetosas 239
Los monosacáridos tienen centros asimétricos 239
Los monosacáridos comunes tienen estructura cíclica 240
Los organismos contienen numerosos derivados de las hexosas 243
Los monosacáridos son agentes reductores 244
Los disacáridos contienen un enlace glucosídico 245

7.2 Polisacáridos 247
Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de combustible 247
Algunos polisacáridos tienen función estructural 248
Factores estéricos y los puentes de hidrógeno contribuyen al plegamiento de los homopolisacáridos 250
Las paredes celulares de algas y bacterias contienen heteropolisacáridos estructurales 252
Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos de la matriz extracelular 253

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos 255
Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular que contienen glucosaminoglucanos 256
Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente 258
Los glucolípidos y los lipopolisacáridos son componentes de la membrana 260

7.4 Los glúcidos como moléculas portadoras de información: el código de los azúcares 261
Las lectinas son proteínas que leen el código de los azúcares e intervienen en muchos procesos biológicos 262
Las interacciones lectina-glúcido son muy fuertes y muy específicas 264

7.5 Análisis de glúcidos 267

8 Nucleótidos y ácidos nucleicos 273

8.1 Algunos conceptos básicos 273
Los nucleótidos y ácidos nucleicos están formados por bases y pentosas características 273
Los nucleótidos sucesivos de los ácidos nucleicos están unidos por enlaces fosfodiéster 276
Las propiedades de las bases de los nucleótidos influyen en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos 278

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos 279
El DNA almacena información genética 280
Las moléculas de DNA tienen diferente composición de bases 281
El DNA es una doble hélice 282
El DNA adopta diferentes formas tridimensionales 283
Algunas secuencias de DNA adoptan estructuras no habituales 285
Los RNA mensajeros codifican las cadenas polipeptídicas 287
Muchos RNA tienen estructuras tridimensionales complejas 288

8.3 Química de los ácidos nucleicos 291
El DNA y el RNA de doble hélice pueden desnaturalizarse 291
Los ácidos nucleicos de especies diferentes pueden formar híbridos 292
Los nucleótidos y los ácidos nucleicos experimentan transformaciones no enzimáticas 293
Algunas bases del DNA están melladas 296
Es posible determinar la secuencia de largas cadenas de DNA 296
La síntesis química de DNA ha sido automatizada 298

8.4 Otras funciones de los nucleótidos 300
Los nucleótidos transportan energía química en las células 300
Los nucleótidos de adenina forman parte de muchos cofactores enzimáticos 301
Algunos nucleótidos son moléculas reguladoras 302

9 Tecnologías de la información basadas en el DNA 306

9.1 Clonación del DNA: fundamentos 306
El DNA recombinante se produce con endonucleasas de restricción y DNA ligasa 307
Los vectores de clonación permiten la amplificación de fragmentos de DNA insertados 311
La hibridación permite la detección de secuencias específicas de DNA 314
La expresión de genes clonados produce grandes cantidades de proteína 315
La alteración de los genes clonados produce proteínas modificadas 316

9.2 De los genes a los genomas 317
Las genotecas suministran catálogos especializados de información genética 318

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica secuencias de DNA específicas 319
Secuenciación de genomas enteros 321
Recuadro 9-1 Un arma poderosa para la medicina forense 322

9.3 De los genomas a los proteosomas 325
Las relaciones entre las secuencias o las estructuras dan información sobre la función de las proteínas 326
Los patrones de expresión celular pueden revelar la función celular de un gen 326
La detección de las interacciones proteína-proteína es útil en el estudio de las funciones celulares y moleculares 327

9.4 Modificaciones de los genomas y nuevos productos biotecnológicos 330
Un parásito bacteriano facilita la clonación en plantas 330
La manipulación de los genomas animales suministra información sobre la estructura de los cromosomas y la expresión génica 332
Las nuevas tecnologías pueden facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos 335
Recuadro 9-2 El genoma humano y la terapia génica humana 336
La tecnología del DNA recombinante ofrece nuevos productos y nuevas posibilidades 338

10 Lípidos 343

10.1 Lípidos de almacenamiento 343
Los ácidos grasos son derivados de hidrocarburos 343
Los triacilgliceroles son ésteres de ácidos grasos y glicerol 345
Los triacilgliceroles aportan energía almacenada y aislamiento 346
Muchos alimentos contienen triacilgliceroles 346
Recuadro 10-1 Cachalotes: cabezones de las profundidades 347
Las ceras sirven como almacenes de energía y como cubiertas impermeables al agua 348

10.2 Lípidos estructurales de las membranas 348
Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico 349
Algunos fosfolípidos tienen ácidos grasos unidos por enlace éter 349
Los cloroplastos contienen galactolípidos y sulfolípidos 351
Las arquebacterias contienen lípidos de membrana particulares 352
Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina 352
Los esfingolípidos de la superficie celular son sitios de reconocimiento biológico 353
Los fosfolípidos y los esfingolípidos se degradan en lisosomas 354
Los esteroles tienen cuatro anillos hidrocarbonados fusionados 354
Recuadro 10-2 Algunas enfermedades genéticas humanas son consecuencia de una acumulación anormal de lípidos de membrana 356

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos 357
Los fosfatidilinositoles son derivados de esfingosina que actúan como señales intracelulares 357
Los icosanoides son portadores de mensajes a las células vecinas 358
Las hormonas esteroideas transportan mensajes entre tejidos 359
Las plantas utilizan fosfatidilinositoles esteroides y compuestos tipo icosanoide para enviar señales 360
Las vitaminas A y D son precursores hormonales 360
Las vitaminas E y K y las quinonas lipídicas son cofactores de oxidación-reducción 362
Los dolicoles activan precursores glucídicos para la biosíntesis 363

10.4 Trabajar con lípidos 363
La extracción de lípidos requiere la utilización de disolventes orgánicos 364
La cromatografía de adsorción separa los lípidos de polaridad diferente 365
La cromatografía gas-líquido separa las mezclas de derivados lipídicos volátiles 365
La hidrólisis específica ayuda a determinar la estructura lipídica 365
La espectrometría de masas revela la estructura lipídica completamente 365

11 Membranas biológicas y transporte 369

11.1 Composición y arquitectura de las membranas 370
Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica 370
Todas las membranas biológicas comparten ciertas propiedades fundamentales 371
El elemento básico estructural de las membranas es una bicapa lipídica 371
Las proteínas periféricas de membrana se solubilizan fácilmente 373
Muchas proteínas abarcan la bicapa lipídica 373
Las proteínas integrales son sostenidas en la membrana por interacciones hidrofóbicas con lípidos 375
Puede predecirse la topología de una proteína integral de membrana a partir de su secuencia 376
Lípidos unidos covalentemente anclan algunas proteínas de membrana 378

11.2 Dinámica de membranas 380
Los grupos acilo del interior de la bicapa están ordenados en grados diferentes 380
El movimiento de lípidos transbicapa requiere catálisis 381
Lípidos y proteínas difunden lateralmente en la bicapa 382
Los esfingolípidos y el colesterol se agrupan conjuntamente en balsas de membrana 383
Recuadro 11-1 Microscopia de fuerza atómica para visualizar proteínas de membrana 384
Las caveolinas definen una clase especial de balsas de membrana 385
Ciertas proteínas integrales favorecen las interacciones intercelulares y la adhesión 386
La fusión de las membranas es crucial en muchos procesos biológicos 387

11.3 Transporte de solutos a través de membranas 389
Proteínas de membrana facilitan el transporte pasivo 389
Los transportadores pueden agruparse en superfamilias según sus estructuras 391
El transportador de glucosa de los eritrocitos facilita el transporte pasivo 393
El intercambiador de cloruro-bicarbonato cataliza el cotransporte electroneutro de aniones a través de la membrana eritrocitaria 395
Recuadro 11-2 Transporte defectuoso de glucosa y de agua en dos formas de diabetes 396
El transporte activo da lugar al movimiento de soluto contra un gradiente de concentración o gradiente electroquímico 397
Las ATPasas experimentan fosforilación durante sus ciclos catalíticos 398

Las bombas de Ca^{2+} tipo P mantienen una baja concentración de calcio en el citosol 400
Las ATPasas tipo F son bombas de protones reversibles impulsadas por el ATP 401
Los transportadores ABC utilizan ATP para impulsar el transporte activo de una amplia gama de sustratos 402
Los gradientes de iones proporcionan la energía para el transporte activo secundario 402
Recuadro 11-3 Un canal iónico defectuoso en la fibrosis quística 403
Las acuaporinas forman canales transmembrana hidrofílicos para el paso de agua 406
Los canales selectivos de iones permiten el movimiento rápido de iones a través de las membranas 408
La función del canal iónico se mide eléctricamente 409
La estructura de un canal de K^+ muestra las bases de su especificidad 409
El canal de Na^+ neuronal es un canal iónico de compuerta regulada por voltaje 410
El receptor de acetilcolina es un canal iónico de compuerta regulada por ligando 411
Canales iónicos defectuosos pueden tener consecuencias fisiológicas adversas 415

12 Bioseñalización 421

12.1 Mecanismos moleculares de transducción de señal 422
Recuadro 12-1 El análisis de Scatchard cuantifica la interacción receptor-ligando 423

12.2 Canales iónicos de compuerta regulada 425
Los canales iónicos son el fundamento de la señalización eléctrica en células excitables 425
El receptor nicotínico de acetilcolina es un canal iónico de compuerta regulada por ligando 426
Los canales iónicos de compuerta regulada por voltaje producen potenciales de acción neuronales 427
Las neuronas tienen canales receptores que responden a una variedad de neurotransmisores 428

12.3 Enzimas receptores 429
El receptor de insulina es una proteína quinasa específica de tirosina 429
Las guanilil ciclasas de receptores generan el segundo mensajero cGMP 433

12.4 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros 435
El sistema receptor β-adrenérgico actúa a través del segundo mensajero cAMP 435
El receptor β-adrenérgico se desensibiliza por fosforilación 439
El AMP cíclico actúa como segundo mensajero para un conjunto de moléculas reguladoras 441
Dos segundos mensajeros proceden de fosfatidilinositoles 442
El calcio es un segundo mensajero en muchas transducciones de señal 442
Recuadro 12-2 FRET: bioquímica visualizada en una célula viva 446

12.5 Proteínas de armazón polivalentes y balsas de membrana 448
Módulos proteicos unen residuos de Tyr, Ser o Thr fosforilados de proteínas asociadas 448
Las balsas de membrana y las caveolas pueden segregar proteínas de señalización 451

12.6 Señalización en microorganismos y plantas 452
La señalización bacteriana impone la fosforilación en un sistema de dos componentes 452
Los sistemas de señalización en plantas tienen algunos de los componentes utilizados por microbios y mamíferos 452
Las plantas detectan etileno a través de un sistema de dos componentes y una cascada MAPK 454
Proteínas quinasa tipo receptor transducen señales de péptidos y brasinosteroides 455

12.7 Transducción sensorial en la vista, el olfato y el gusto 456
La luz hiperpolariza los conos y bastones del ojo de vertebrados 456
La luz desencadena cambios de conformación en el receptor de la rodopsina 457
La rodopsina excitada actúa a través de la proteína G transducina reduciendo la concentración de cGMP 457
La amplificación de la señal visual tiene lugar en los bastones y conos 458
La señal visual termina rápidamente 458
La rodopsina se desensibiliza por fosforilación 459
Los conos están especializados en la visión en color 460
El olfato y el gusto en vertebrados utilizan mecanismos similares al sistema visual 460
Recuadro 12-3 Daltonismo: experimento de John Dalton desde la tumba 461
Los sistemas de receptores serpentina acoplados a proteína G presentan características comunes 462
La interrupción en la señalización por proteínas G provoca enfermedades 464

12.8 Regulación de la transcripción por hormonas esteroideas 465

12.9 Regulación del ciclo celular por proteínas quinasa 466
El ciclo celular tiene cuatro etapas 466
Los niveles de las proteínas quinasa dependientes de ciclina experimentan oscilaciones 467
Las CDK regulan la división celular por fosforilación de proteínas clave 470

12.10 Oncogenes, genes supresores de tumores y muerte celular programada 471
Los oncogenes son formas mutadas de genes de proteínas que regulan el ciclo celular 471
Defectos en los genes supresores de tumores eliminan restricciones normales de la división celular 472
La apoptosis es el suicidio celular programado 473

II BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO 481

13 Principios de bioenergética 489

13.1 Bioenergética y termodinámica 490
Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica 490
Las células precisan fuentes de energía libre 491
La variación de energía libre estándar está directamente relacionada con la constante de equilibrio 491
La variación de energía libre real depende de las concentraciones de reactivos y productos 493
Las variaciones de energía libre estándar son aditivas 494

13.2 Transferencia de grupos fosforilo y ATP 496
La variación de energía libre en la hidrólisis del ATP es grande y negativa 496
Otros compuestos fosforilados y tioésteres también tienen energías libres de hidrólisis elevadas 497
Recuadro 13-1 Energía libre de hidrólisis del ATP dentro de las células: el coste real de los procesos metabólicos 498

El ATP proporciona energía por transferencia de grupo y no por simple hidrólisis 500
El ATP dona grupos fosforilo, pirofosforilo y adenililo 502
Recuadro 13-2 Los destellos de la luciérnaga: informes resplandecientes del ATP 503
La formación de macromoléculas informativas requiere energía 504
El ATP aporta energía para el transporte activo y la contracción muscular 504
Las transfosforilaciones entre nucleótidos se dan en todos los tipos celulares 505
El polifosfato inorgánico es un dador potencial de grupos fosforilo 506
Las ecuaciones bioquímicas y químicas no son idénticas 506

13.3 Reacciones de oxidación-reducción 507
El flujo de electrones puede realizar trabajo biológico 507
Las reacciones de oxidación-reducción se pueden describir en forma de semirreacciones 508
En las oxidaciones biológicas interviene con frecuencia la deshidrogenación 508
Los potenciales de reducción son una medida de la afinidad por los electrones 509
Los potenciales de reducción estándar permiten el cálculo de la variación de energía libre 510
La oxidación celular de glucosa a dióxido de carbono requiere transportadores de electrones especializados 512
Unos cuantos tipos de coenzimas y proteínas actúan como transportadores universales de electrones 512
El NADH y el NADPH actúan con las deshidrogenasas como transportadores solubles de electrones 512
La deficiencia en la dieta de niacina, forma vitamínica del NAD y del NADP, produce pelagra 514
Los nucleótidos de flavina están fuertemente unidos en las flavoproteínas 515

14 Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato 521

14.1 Glucólisis 522
Una visión global: la glucólisis tiene dos fases 523
La fase preparatoria de la glucólisis precisa ATP 525
La fase de beneficios de la glucólisis produce ATP y NADH 529
El balance global muestra una ganancia neta de ATP 533
La glucólisis está sometida a una regulación estricta 533
El catabolismo de la glucosa está alterado en el tejido canceroso 533

14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis 534
El glucógeno y el almidón se degradan mediante fosforólisis 534
Los polisacáridos y disacáridos de la dieta se hidrolizan a monosacáridos 535
Otros monosacáridos pueden entrar en diferentes puntos de la ruta glucolítica 536

14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación 538
El piruvato es el aceptor electrónico terminal en la fermentación láctica 538
El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica 538
Recuadro 14-1 Atletas, caimanes y celacantos: la glucólisis en condiciones limitantes de oxígeno 539
La tiamina pirofosfato transporta grupos "aldehído activos" 540
Algunas fermentaciones microbianas dan lugar a otros productos finales con valor comercial 541
Recuadro 14-2 Elaboración de la cerveza 542

14.4 Gluconeogénesis 543
La conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato requiere dos reacciones exergónicas 544
La conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato constituye el segundo rodeo 547
La conversión de la glucosa 6-fosfato en glucosa libre constituye el tercer rodeo 547
La gluconeogénesis es energéticamente cara, pero es esencial 548
Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y muchos aminoácidos son glucogénicos 548
La gluconeogénesis y la glucólisis están reguladas de forma recíproca 548

14.5 Ruta de las pentosas fosfato de oxidación de la glucosa 549
La fase oxidativa produce pentosas fosfato y NADPH 550
Recuadro 14-3 ¿Por qué no comía falafel Pitágoras?: deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 551
La fase no oxidativa recicla las pentosas fosfato a glucosa 6-fosfato 552
El síndrome de Wernicke-Korsakoff está exacerbado por un defecto en la transcetolasa 554
La glucosa 6-fosfato se reparte entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato 554

15 Principios de regulación metabólica: glucosa y glucógeno 560

15.1 Metabolismo del glucógeno en animales 562
La degradación del glucógeno está catalizada por la glucógeno fosforilasa 562
La glucosa 1-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, reponer la glucosa sanguínea 563
El nucleótido-azúcar UDP-glucosa aporta glucosa para la síntesis de glucógeno 565
Recuadro 15-1 Carl y Gerty Cori: pioneros del metabolismo y las enfermedades del glucógeno 566
La glucogenina incorpora los residuos iniciales de azúcar del glucógeno 569

15.2 Regulación de las rutas metabólicas 571
Las células vivas mantienen un estado estacionario dinámico 571
Los mecanismos reguladores se desarrollaron bajo fuertes presiones selectivas 571
Los enzimas reguladores responden a cambios en la concentración de metabolitos 572
La actividad enzimática se puede alterar de diversas maneras 574

15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis 575
Los isozimas de la hexoquinasa de músculo y de hígado están afectados de forma diferente por su producto, la glucosa 6-fosfato 576
Recuadro 15-2 Isozimas: proteínas diferentes que catalizan la misma reacción 577
La fosfofructoquinasa-1 se halla sometida a una compleja regulación alostérica 578
La piruvato quinasa es inhibida alostéricamente por el ATP 579

Existen diversos puntos de control de la gluconeogénesis 580
La fructosa 2,6-bisfosfato es un regulador potente de la glucólisis y de la gluconeogénesis 581
¿Son inútiles los ciclos de sustrato? 583
La xilulosa 5-fosfato es un regulador clave de los metabolismos glucídico y lipídico 583

15.4 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno 583
La glucógeno fosforilasa está sujeta a control alostérico y hormonal 584
La glucógeno sintasa también está regulada por fosforilación y desfosforilación 586
La glucógeno sintasa quinasa 3 interviene en las acciones de la insulina 586
La fosfoproteína fosfatasa 1 es clave para el metabolismo del glucógeno 588
El transporte al interior de la célula limita la utilización de glucosa 588
El metabolismo glucídico está coordinado por señales alostéricas y hormonales 588
La insulina modifica la expresión de muchos genes implicados en el metabolismo de glúcidos y de lípidos 590
El metabolismo de glúcidos y de lípidos está integrado mediante mecanismos hormonales y alostéricos 591

15.5 Análisis del control metabólico 591
Se puede medir experimentalmente la contribución de cada enzima al flujo a través de una ruta 592
El coeficiente de control cuantifica el efecto de un cambio en una actividad enzimática sobre el flujo metabólico a través de una ruta 592
El coeficiente de elasticidad está relacionado con la sensibilidad de un enzima a cambios en la concentración de metabolito o de regulador 593
El coeficiente de respuesta expresa el efecto de un controlador externo sobre el flujo a través de la ruta 593
El análisis del control metabólico se ha aplicado al metabolismo glucídico con resultados sorprendentes 593
Recuadro 15-3 Análisis del control metabólico: aspectos cuantitativos 594
El análisis del control metabólico sugiere un método general para incrementar el flujo a través de una ruta 596

16 El ciclo del ácido cítrico 601

16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado) 602
El piruvato se oxida a acetil-CoA y CO_2 602
El complejo de la piruvato deshidrogenasa necesita cinco coenzimas 603
El complejo de la piruvato deshidrogenasa está formado por tres enzimas diferentes 604
En la canalización de sustratos, los intermediarios nunca abandonan la superficie enzimática 605

16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico 606
El ciclo del ácido cítrico tiene ocho pasos 608
Recuadro 16-1 Sintasas y sintetasas; ligasas y liasas; quinasas, fosfatasas y fosforilasas: ¡sí, una nomenclatura confusa! 613
La energía de las oxidaciones del ciclo se conserva eficientemente 614
Recuadro 16-2 Citrato: una molécula simétrica que reacciona asimétricamente 614
¿Por qué es tan complicada la oxidación del acetato? 616
Los componentes del ciclo del ácido cítrico son importantes intermediarios biosintéticos 616
Las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios del ciclo del ácido cítrico 616
Recuadro 16-3 Citrato sintasa, limonada y suministro mundial de alimentos 618
La biotina de la piruvato carboxilasa transporta grupos CO_2 618

16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico 621
La producción de acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa está regulada por mecanismos alostéricos y covalentes 621
El ciclo del ácido cítrico está regulado en sus tres etapas exergónicas 622
En el ciclo del ácido cítrico puede darse la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos 622

16.4 El ciclo del glioxilato 623
El ciclo del glioxilato produce compuestos de cuatro carbonos a partir de acetato 623
Los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato tienen una regulación coordinada 624

17 Catabolismo de los ácidos grasos 631

17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas 632
Las grasas de la dieta se absorben en el intestino delgado 632
Las hormonas activan la movilización de triacilgliceroles almacenados 634
Los ácidos grasos son activados y transportados al interior de las mitocondrias 635

17.2 Oxidación de los ácidos grasos 637
La β-oxidación de ácidos grasos saturados se produce en cuatro pasos básicos 638
Los cuatro pasos de la β-oxidación se repiten para generar acetil-CoA y ATP 639
El acetil CoA puede continuar oxidándose a través del ciclo del ácido cítrico 639
Recuadro 17-1 Los osos llevan a cabo la β-oxidación durante la hibernación 640
La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos reacciones adicionales 641
La oxidación de ácidos grasos de cadena impar requiere tres reacciones adicionales 642
La oxidación de ácidos grasos está regulada 642
Defectos genéticos de las acil graso-CoA deshidrogenasas producen enfermedades graves 643
Recuadro 17-2 El coenzima B_{12}: una solución radical a un problema desconcertante 644
Los peroxisomas también llevan a cabo la β-oxidación 646
Los peroxisomas y glioxisomas de las plantas utilizan acetil-CoA procedente de la β-oxidación como precursor biosintético 647
Los enzimas de la β-oxidación de diferentes orgánulos han tenido una evolución divergente 647
En el retículo endoplasmático tiene lugar la ω-oxidación de los ácidos grasos 648
El ácido fitánico experimenta α-oxidación en los peroxisomas 649

17.3 Cuerpos cetónicos 650
Los cuerpos cetónicos formados en el hígado se exportan a otros órganos como combustible 650
Durante la diabetes y en situaciones de inanición se da una sobreproducción de cuerpos cetónicos 652

18 Oxidación de aminoácidos y producción de urea 656

18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino 657
Las proteínas de la dieta se degradan enzimáticamente a aminoácidos 658
El piridoxal fosfato participa en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato 660
El glutamato libera su grupo amino en forma de amoníaco en el hígado 661
La glutamina transporta amoníaco al hígado 662
Recuadro 18-1 Determinación de lesiones tisulares 664
La alanina transporta amoníaco desde los músculos esqueléticos al hígado 664
El amoníaco es tóxico para los animales 665

18.2 Excreción de nitrógeno y ciclo de la urea 665
La urea se produce a partir de amoníaco en cinco pasos enzimáticos 667
Los ciclos del ácido cítrico y de la urea pueden conectarse 668
La actividad del ciclo de la urea está regulada a dos niveles 669
Las interconexiones entre rutas reducen el coste energético del ciclo de la urea 669
Defectos genéticos en el ciclo de la urea pueden ser letales 669

18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos 671
Algunos aminoácidos se convierten en glucosa, otros en cuerpos cetónicos 671
Varios cofactores enzimáticos juegan papeles importantes en el catabolismo de los aminoácidos 672
Seis aminoácidos se degradan a piruvato 674
Siete aminoácidos se degradan a acetil Co-A 677
En algunas personas el catabolismo de la fenilalanina es genéticamente defectuoso 679
Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato 681
Cuatro aminoácidos se convierten en succinil-CoA 682
Los aminoácidos de cadena ramificada no se degradan en el hígado 683
Recuadro 18-2 Detectives científicos resuelven un crimen misterioso 684
La asparagina y el aspartato se degradan a oxalacetato 685

19 Fosforilación oxidativa y fotofosforilación 690

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA 691

19.1 Reacciones de transferencia de electrones en las mitocondrias 691
Los electrones son canalizados hacia transportadores universales de electrones 692
Los electrones pasan a través de una serie de transportadores unidos a membrana 693
Los transportadores de electrones actúan en complejos multienzimáticos 696
La energía de la transferencia de electrones se conserva eficientemente en un gradiente de protones 701
Las mitocondrias de plantas tienen mecanismos alternativos para oxidar el NADH 704

19.2 Síntesis de ATP 704
Recuadro 19-1 Calor, plantas malolientes y rutas respiratorias alternativas 706
La ATP sintasa está compuesta por dos dominios funcionales, F_o y F_1 708
En la superficie de F_1 el ATP está estabilizado frente al ADP 708
El gradiente de protones impulsa la liberación del ATP de la superficie del enzima 709
Cada subunidad β de la ATP sintasa puede adoptar tres conformaciones diferentes 709
La catálisis rotacional es la clave en el mecanismo de unión y cambio de la síntesis de ATP 711
El acoplamiento quimiosmótico permite que las estequiometrías del consumo de O_2 y de la síntesis de ATP no se correspondan con números enteros 712
La fuerza protón-motriz suministra energía para el transporte activo 713
Sistemas de lanzadera envían indirectamente NADH citosólico a las mitocondrias para su oxidación 714

19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa 716
La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades energéticas celulares 716
Una proteína inhibidora impide la hidrólisis de ATP durante la isquemia 717
Las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón producen calor 717
Las rutas de formación de ATP están reguladas de forma coordinada 718

19.4 Genes mitocondriales: su origen y los efectos de mutaciones 719
Mutaciones en genes mitocondriales producen enfermedades humanas 719
Las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas 721

19.5 Función de las mitocondrias en la apoptosis y en el estrés oxidativo 721

FOTOSÍNTESIS: CAPTACIÓN DE LA ENERGÍA LUMINOSA 723

19.6 Características generales de la fotofosforilación 723
La fotosíntesis en plantas tiene lugar en los cloroplastos 724
La luz produce un flujo de electrones en los cloroplastos 724

19.7 Absorción de la luz 725
Las clorofilas absorben energía luminosa para la fotosíntesis 725
Los pigmentos accesorios aumentan la gama de absorción de la luz 728
La clorofila canaliza la energía absorbida a centros de reacción mediante transferencia de excitones 728

19.8 El acontecimiento fotoquímico central: el flujo electrónico impulsado por la luz 730
Las bacterias tienen uno de los dos tipos de centros de reacción fotoquímicos individuales 730
Factores cinéticos y termodinámicos evitan la disipación de energía por conversión interna 732
Dos centros de reacción actúan en tándem en plantas superiores 733
Las clorofilas antena están íntimamente asociadas a los transportadores electrónicos 734
La separación espacial de los fotosistemas I y II evita el latrocinio de excitones 736
El complejo del citocromo b_6f une los fotosistemas II y I 737
Las cianobacterias utilizan el complejo del citocromo b_6f y el citocromo c_6 tanto en la fosforilación oxidativa como en la fotofosforilación 738
El agua es escindida por el complejo que desprende oxígeno 738

19.9 Síntesis de ATP por fotofosforilación 740
Un gradiente de protones acopla el flujo electrónico con la fosforilación 740
Se ha establecido la estequiometría aproximada de la fotofosforilación 741
El flujo cíclico de electrones produce ATP, pero no NADPH ni O_2 741
La ATP sintasa de los cloroplastos es como la de las mitocondrias 742
Los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas 742
Diversos organismos fotosintéticos utilizan dadores de hidrógeno diferentes del agua 743
En las bacterias halófilas una única proteína absorbe luz y bombea protones para impulsar la síntesis de ATP 743

20 Biosíntesis de glúcidos en plantas y bacterias 751

20.1 Síntesis fotosintética de glúcidos 751
Los plastidios son orgánulos propios de las células vegetales y de las algas 752
La asimilación del dióxido de carbono tienen lugar en tres fases 753
Cada triosa fosfato sintetizada a partir de CO_2 cuesta seis NADPH y nueve ATP 762
Un sistema de transporte exporta triosas fosfato desde el cloroplasto e importa fosfato 763
Cuatro enzimas del ciclo de Calvin son activados indirectamente por la luz 764

20.2 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM 766
La fotorrespiración es el resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco 766
La ruta de recuperación del fosfoglicolato es costosa 767
En las plantas C_4, la fijación del CO_2 y la actividad rubisco están separadas espacialmente 769
En las plantas CAM, la captación de CO_2 y la acción de la rubisco están separadas en el tiempo 770

20.3 Biosíntesis de almidón y sacarosa 771
La ADP-glucosa es el sustrato de la síntesis de almidón en los plastidios de las plantas y de la síntesis de glucógeno en las bacterias 771
La UDP-glucosa es el sustrato de la síntesis de sacarosa en el citosol de las células de hojas 771
La conversión de triosas fosfato en sacarosa y almidón está estrechamente regulada 772

20.4 Síntesis de polisacáridos de la pared celular: celulosa vegetal y peptidoglucano bacteriano 774
La celulosa es sintetizada por estructuras supramoleculares en la membrana plasmática 775
Oligosacáridos unidos a lípidos son precursores en la síntesis de la pared celular bacteriana 777
Recuadro 20-1 El proyectil contra el chaleco antibalas: penicilina y β-lactamasa 779

20.5 Integración del metabolismo glucídico en la célula vegetal 780
La gluconeogénesis convierte las grasas y proteínas en glucosa en las semillas en germinación 780
Fondos o reservas de intermediarios comunes unen rutas en diferentes orgánulos 781

21 Biosíntesis de lípidos 787

21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides 787
El malonil-CoA se forma a partir del acetil-CoA y del bicarbonato 788
La síntesis de ácidos grasos transcurre mediante una secuencia de reacciones repetidas 788
El complejo de la ácido graso sintasa tiene siete sitios activos diferentes 789
La ácido graso sintasa recibe los grupos acetilo y malonilo 790
Las reacciones de la ácido graso sintasa se repiten hasta formar palmitato 791
La ácido graso sintasa de algunos organismos está compuesta por proteínas multifuncionales 794
La síntesis de ácidos grasos se produce en el citosol de muchos organismos pero en las plantas tienen lugar en los cloroplastos 794
El acetato sale de la mitocondria en forma de citrato 794
La biosíntesis de ácidos grasos está estrechamente regulada 795
Los ácidos grasos de cadena larga se sintetizan a partir del palmitato 797
La desaturación de los ácidos grasos necesita una oxidasa de función mixta 798
Recuadro 21-1 Oxidasas de función mixta, oxigenasas y citocromo P-450 798
Los icosanoides se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos 800
Recuadro 21-2 El remedio está en el sitio (activo): isozimas de la ciclooxigenasa y la búsqueda de una aspirina mejor 802

21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles 804
Los triacilgliceroles y glicerofosfolípidos se sintetizan a partir de los mismos precursores 804
La biosíntesis de triacilgliceroles en los animales está regulada por hormonas 804
El tejido adiposo genera glicerol 3-fosfato mediante gliceroneogénesis 806

21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana 808
Las células tienen dos estrategias para unir grupos de cabeza de los fosfolípidos 809
La síntesis de fosfolípidos en *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol 811
Los eucariotas sintetizan fosfolípidos aniónicos a partir del CDP-diacilglicerol 811
Las rutas eucarióticas hasta la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina están interrelacionadas 812
La síntesis de plasmalógeno requiere la formación de un alcohol graso unido por enlace éter 813
Las síntesis de esfingolípidos y glicerofosfolípidos comparten precursores y algunos mecanismos 813
Los lípidos polares están destinados a membranas celulares específicas 814

21.4 Biosíntesis de colesterol, esteroides e isoprenoides 816
El colesterol se forma del acetil CoA en cuatro fases 816
El colesterol tiene varios destinos 820
El colesterol y otros lípidos son transportados por lipoproteínas plasmáticas 820
Recuadro 21-3 Los alelos de la apoE predicen la incidencia de la enfermedad de Alzheimer 824
Los ésteres de colesterol entran en las células por endocitosis facilitada por receptor 824
La biosíntesis del colesterol está regulada a diversos niveles 825
Las hormonas esteroideas se forman por rotura de la cadena lateral y oxidación del colesterol 827
Los intermediarios de la síntesis del colesterol tienen muchos destinos alternativos 828

22 Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas 833

22.1 Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno 834
El ciclo del nitrógeno mantiene una reserva de nitrógeno disponible biológicamente 834
El nitrógeno es fijado por enzimas del complejo de la nitrogenasa 834
El amoníaco se incorpora a las biomoléculas a través del glutamato y las glutamina 837
La glutamina sintetasa es un punto de regulación principal en el metabolismo del nitrógeno 838
Varios tipos de reacciones tienen un papel especial en la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos 840

22.2 Biosíntesis de los aminoácidos 841
El α-cetoglutarato es precursor del glutamato, la glutamina, la prolina y la arginina 842
La serina, la glicina y la cisteína proceden del 3-fosfoglicerato 842
Tres aminoácidos no esenciales y seis aminoácidos esenciales se sintetizan a partir de oxalacetato y piruvato 845
El corismato es un intermediario clave en la síntesis de triptófano, fenilalanina y tirosina 849
La biosíntesis de la histidina utiliza precursores de la biosíntesis de purinas 851
La biosíntesis de los aminoácidos se halla bajo control alostérico 851

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos 854
La glicina es un precursor de las porfirinas 854
El hemo es la fuente de los pigmentos biliares 854
Recuadro 22-1 Bioquímica de reyes y vampiros 857
La biosíntesis de la creatina y del glutatión se realiza a partir de aminoácidos 857
Los D-aminoácidos se hallan básicamente en las bacterias 858
Los aminoácidos aromáticos son precursores de muchos compuestos presentes en los vegetales 859
Los aminoácidos se convierten en aminas biógenas por descarboxilación 859
La arginina es el precursor de la síntesis biológica del óxido nítrico 860
Recuadro 22-2 Un caballo de Troya bioquímico para la curación de la enfermedad del sueño africana 862

22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos 862
La síntesis de novo de los nucleótidos de purina empieza con el PRPP 864
La biosíntesis de los nucleótidos de purina está regulada por retroinhibición 866
Los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a partir de aspartato, PRPP y carbamil fosfato 867
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina está regulada por retroinhibición 868
Los nucleósidos monofosfato se convierten en nucleósidos trifosfato 868
Los ribonucleótidos son los precursores de los desoxirribonucleótidos 869
El timidilato se forma a partir de dCDP y dUMP 872
La degradación de las purinas y las pirimidinas produce ácido úrico y urea, respectivamente 873
Las bases purínicas y pirimidínicas se reciclan a través de rutas de recuperación 875
Una sobreproducción de ácido úrico es la causa de la gota 875
Muchos agentes quimioterapéuticos actúan sobre enzimas de las rutas de biosíntesis de nucleótidos 876

23 Integración y regulación hormonal del metabolismo de los mamíferos 881

23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas 881
El descubrimiento y la purificación de las hormonas requieren un bioensayo 882
Recuadro 23-1 ¿Cómo se descubre una hormona? El arduo camino hasta la insulina purificada 883
Las hormonas actúan a través de receptores celulares de elevada afinidad 884
Las hormonas son químicamente diversas 886
La liberación de hormonas está regulada por señales neuronales y hormonales jerarquizadas 889

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo 892
El hígado transforma y distribuye los nutrientes 893
El tejido adiposo almacena y suministra ácidos grasos 897
El músculo utiliza ATP para realizar trabajo mecánico 898
El cerebro emplea energía para la transmisión de los impulsos eléctricos 900
La sangre transporta oxígeno, metabolitos y hormonas 900

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético 902
El páncreas secreta insulina o glucagón en respuesta a cambios en la glucosa en sangre 902
La insulina contrarresta la glucosa sanguínea elevada 904
El glucagón contrarresta los niveles bajos de glucosa en sangre 904
Durante el ayuno y la inanición el metabolismo se modifica para proporcionar combustible para el cerebro 906
La adrenalina es la señal de una actividad inminente 908
El cortisol indica estrés, incluyendo los bajos niveles de glucosa en sangre 909
La diabetes es un defecto en la producción o en la acción de la insulina 909

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal 910
La teoría lipostática predice la regulación por retroalimentación del tejido adiposo 910
La leptina estimula la producción de hormonas peptídicas anorexigénicas 912
La leptina desencadena una cascada de señalización que regula la expresión génica 913
El sistema de la leptina puede haber evolucionado para regular la respuesta a la inanición 913
La insulina actúa en el núcleo arcuato para regular la ingesta y la conservación de energía 914
La adiponectina actúa a través de la AMPK 914
La dieta regula la expresión de genes cruciales para el mantenimiento de la masa corporal 915
La grelina y la PYY_{3-36} establecen los hábitos de ingesta a corto plazo 916

III LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN 921

24 Genes y cromosomas 923

24.1 Elementos cromosómicos 924
Los genes son segmentos de DNA que codifican cadenas polipeptídicas y RNA 924
Las moléculas de DNA son mucho más largas que las células que las contienen 925
Los genes y los cromosomas eucarióticos son muy complejos 928

24.2 DNA superenrollado 930
La mayor parte del DNA celular está subenrollado 932
El subenrollamiento del DNA se define por el número de enlace topológico 933
Las topoisomerasas catalizan cambios en el número de enlace del DNA 935
La compactación del DNA requiere una forma especial de superenrollamiento 937

24.3 La estructura de los cromosomas 938
La cromatina está compuesta por DNA y proteínas 938
Las histonas son pequeñas proteínas básicas 939
Los nucleosomas son las unidades fundamentales de organización de la cromatina 940
Los nucleosomas se empaquetan en sucesivos órdenes superiores de organización 942
Las estructuras de los cromosomas condensados se mantienen mediante proteínas SMC 943
El DNA bacteriano también se encuentra altamente organizado 943

25 Metabolismo del DNA 948

25.1 Replicación del DNA 950
La replicación del DNA está gobernada por un conjunto de reglas fundamentales 950
El DNA es degradado por nucleasas 952
El DNA es sintetizado por DNA polimerasas 952
La replicación es muy precisa 954
E. coli posee al menos cinco DNA polimerasas 955
La replicación del DNA requiere muchos enzimas y factores proteicos 957
La replicación del cromosoma de *E. coli* procede por etapas 958
La replicación bacteriana corre a cargo de factorías replicativas ancladas en la membrana 963
La replicación en las células eucarióticas es más compleja 964

25.2 Reparación del DNA 966
Las mutaciones están relacionadas con el cáncer 966
Todas las células tienen múltiples sistemas de reparación del DNA 967
Recuadro 25-1 Reparación del DNA y cáncer 970
La interacción de las horquillas de replicación con lesiones del DNA puede inducir síntesis de DNA propensa al error a través de la lesión 976

25.3 Recombinación del DNA 978
La recombinación genética homóloga tienen múltiples funciones 979
La recombinación durante la meiosis se inicia en roturas de doble cadena 980
La recombinación requiere una multitud de enzimas y otras proteínas 982
Todos los aspectos del metabolismo del DNA participan en la reparación de las horquillas de replicación bloqueadas 984
La recombinación específica de sitio produce reordenamientos precisos del DNA 985
La recombinación específica de sitio puede ser necesaria para completar la replicación del cromosoma 988
Los elementos genéticos transponibles se mueven de un lugar a otro 988
Los genes de las inmunoglobulinas se forman por recombinación 990

26 Metabolismo del RNA 995

26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA 996
El RNA es sintetizado por RNA polimerasas 996
La síntesis del RNA empieza en los promotores 998
La transcripción está regulada a diferentes niveles 1001
La terminación de la síntesis del RNA está indicada por secuencias específicas 1001
Recuadro 26-1 La RNA polimerasa deja su huella en un promotor 1002
Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares 1003
La RNA polimerasa II requiere otros muchos factores proteicos para su actividad 1003
La RNA polimerasa dependiente de DNA es inhibida selectivamente 1006

26.2 Maduración del RNA 1007
Los mRNA eucarióticos llevan un casquete en el extremo 5′ 1008
Tanto los intrones como los exones son transcritos del DNA al RNA 1008
El RNA cataliza el corte y empalme de los intrones 1009
Los mRNA eucarióticos tienen una estructura característica en el extremo 3′ 1011
La maduración diferencial del RNA da lugar a múltiples productos a partir de un gen 1014
Los RNA ribosómicos y los tRNA también son modificados 1014
Algunas etapas del metabolismo del RNA están catalizadas por enzimas de RNA 1017
Los mRNA celulares se degradan a velocidades diferentes 1020
La polinucleótido fosforilasa forma polímeros de tipo RNA de secuencia aleatoria 1020

26.3 Síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA 1021
La transcriptasa inversa produce DNA a partir de RNA vírico 1021
Algunos retrovirus provocan cáncer y sida 1023
Muchos transposones, retrovirus e intrones pueden tener un origen evolutivo común 1023
Recuadro 26-2 Tratamiento del sida con inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH 1024
La telomerasa es una transcriptasa inversa especializada 1025
Algunos RNA víricos se replican por medio de una RNA polimerasa dependiente de RNA 1027
La síntesis de RNA ofrece pistas importantes sobre la evolución bioquímica 1027
Recuadro 26-3 El método SELEX para generar polímeros de RNA con nuevas funciones 1030

27 Metabolismo de las proteínas 1034

27.1 El código genético 1034
El código genético fue descifrado mediante moldes de mRNA artificiales 1035
El balanceo permite que algunos tRNA reconozcan más de un codón 1039
Recuadro 27-1 Cambio de montura a medio camino: desplazamiento del marco de traducción y edición del mRNA 1040
Recuadro 27-2 Excepciones que confirman la regla: variaciones naturales del código genético 1042

27.2 Síntesis de proteínas 1044
La biosíntesis de las proteínas tienen lugar en cinco etapas 1044
El ribosoma es una compleja máquina supramolecular 1045

Recuadro 27-3 De un mundo de RNA a un mundo de proteína 1048
Los RNA de transferencia tienen rasgos estructurales característicos 1049
Fase 1: las aminoacil-tRNA sintetasas unen los aminoácidos correctos a sus tRNA 1051
Fase 2: la síntesis de proteínas empieza con un aminoácido específico 1054
Fase 3: los enlaces peptídicos se forman durante la fase de elongación 1058
Fase 4: la terminación de la síntesis de polipéptidos requiere una señal específica 1061
Fase 5: plegamiento y modificación de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas 1062
Recuadro 27-4 Variación inducida en el código genético: supresión de mutaciones sin sentido 1065
La síntesis de proteínas es inhibida por muchos antibióticos y toxinas 1065

27.3 Destino y degradación de las proteínas 1068
La modificación postraducción de muchas proteínas eucarióticas empieza en el retículo endoplasmático 1068
La glucosilación juega un papel clave en el destino de las proteínas 1069
Las secuencias señal para el transporte nuclear no son cortadas 1071
Las bacterias también utilizan secuencias señal para el destino de las proteínas 1072
Las células importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptores 1074
Todas las células disponen de sistemas especializados de degradación de proteínas 1075

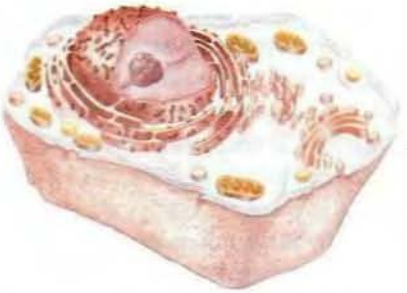
28 Regulación de la expresión génica 1081

28.1 Principios de regulación génica 1082
La RNA polimerasa se une al DNA en los promotores 1082
El inicio de la transcripción está regulada por proteínas que se unen a los promotores o cerca de ellos 1083
La mayoría de los genes procarióticos están agrupados y se regulan en operones 1085
El operón *lac* está sujeto a regulación negativa 1085
Las proteínas reguladoras tienen dominios independientes de unión al DNA 1087
Las proteínas reguladoras también tienen dominios de interacción proteína-proteína 1090

28.2 Regulación de la expresión génica en los procariotas 1092
El operón *lac* está sujeto a regulación positiva 1093
Muchos genes de los enzimas de la biosíntesis de aminoácidos se regulan por atenuación de la transcripción 1094
La inducción de la respuesta SOS requiere la destrucción de proteínas represoras 1097
La síntesis de proteínas ribosómicas está coordinada con la síntesis de rRNA 1098
Algunos genes se regulan por recombinación genética 1100

28.3 Regulación de la expresión génica en los eucariotas 1102
La cromatina transcripcionalmente activa es estructuralmente diferente de la cromatina inactiva 1102
La cromatina se remodela por acetilación y desplazamiento de los nucleosomas 1103
Muchos promotores eucarióticos se regulan positivamente 1103
Transactivadores y coactivadores que se unen al DNA facilitan el ensamblaje de los factores de transcripción generales 1104
Los genes del metabolismo de la galactosa en las levaduras están sujetos tanto a regulación positiva como negativa 1106
Los transactivadores de unión al DNA tienen una estructura modular 1106
La expresión génica eucariótica puede ser regulada por señales intercelulares e intracelulares 1108
La fosforilación de los factores de transcripción nucleares puede contribuir a su regulación 1109
Muchos mRNA eucarióticos están sometidos a represión traduccional 1109
El silenciamiento postranscripcional de los genes se produce por interferencia del RNA 1110
El desarrollo está controlado por cascadas de proteínas reguladoras 1111

***Apéndice A* Abreviaturas comunes en la literatura científica bioquímica A-1**
***Apéndice B* Soluciones abreviadas de los problemas SA-1**
***Glosario* G-1**
***Procedencia de las ilustraciones* PI-1**
***Índice alfabético* I-1**



capítulo 1

FUNDAMENTOS DE BIOQUÍMICA

1.1 Fundamentos celulares 3
1.2 Fundamentos químicos 12
1.3 Fundamentos físicos 21
1.4 Fundamentos genéticos 28
1.5 Fundamentos evolutivos 31

Con el descubrimiento de la célula, la biología había descubierto su átomo... A partir de entonces el estudio de la célula y el análisis de su estructura resultó esencial para la caracterización de la vida con el objeto de identificar aquellas propiedades comunes y necesarias para la vida de cada una de las células y también, alternativamente, para identificar diferencias asociadas con el desarrollo de funciones específicas.

—*François Jacob,* La logique du vivant: une histoire de l'hérédité, *1970*

Debemos reconocer, y así me lo parece, que el hombre, con todas sus nobles cualidades... acarrea todavía en su estructura física el sello indeleble de su humilde origen.

—*Charles Darwin,* The Descent of Man, *1871*

Hace aproximadamente unos quince o veinte mil millones de años, el universo nació de un cataclismo explosivo que esparció partículas subatómicas extremadamente calientes y ricas en energía. En cuestión de segundos se formaron los elementos más simples. Al tiempo que el universo se expandía y enfriaba, se condensaba la materia bajo la influencia de la gravedad y se formaban las estrellas. Algunas de ellas se hicieron enormes, explotaron en supernovas y liberaron la energía necesaria para producir elementos más complejos a partir de la fusión de los núcleos atómicos más simples. De este modo aparecieron la Tierra y los elementos químicos que hoy se encuentran en ella. La vida apareció hace unos cuatro mil millones de años en forma de microorganismos sencillos dotados de la capacidad de extraer energía de los compuestos orgánicos o de la luz solar. Esta energía sirvió para sintetizar una amplia variedad de **biomoléculas** a partir de los elementos y compuestos más simples presentes en la superficie de la Tierra.

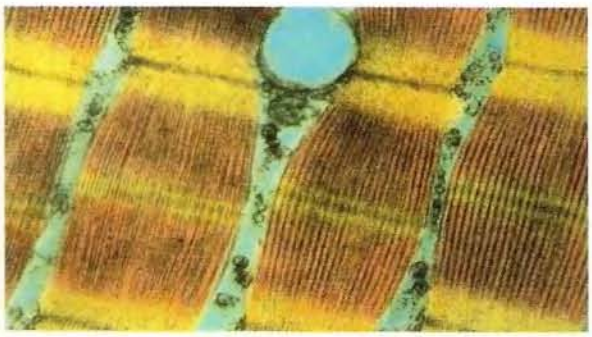
La bioquímica se pregunta acerca del modo en que miles de diferentes moléculas inanimadas dieron lugar a las complejas propiedades de los organismos vivos. Cuando estas moléculas se aíslan y examinan individualmente cumplen todas las leyes físicas y químicas que describen el comportamiento de la materia inanimada, del mismo modo que ocurre con todos los procesos que tienen lugar en organismos vivos. El estudio de la bioquímica muestra el modo en que las moléculas inanimadas que constituyen los organismos vivos interaccionan para mantener y perpetuar la vida, rigiéndose por las mismas leyes físicas y químicas que gobiernan todo el universo.

A pesar de ello, los organismos poseen cualidades que los distinguen de otras agrupaciones de materia. ¿Cuáles son las características distintivas de los organismos vivos?

Un elevado grado de complejidad química y de organización microscópica. Las intrincadas estructuras internas celulares están formadas por miles de moléculas diferentes (Fig. 1-1a). Cada una posee su propia secuencia de subunidades característica, una estructura tridimensional única e interacciona con una selección altamente específica de moléculas de la célula.

Sistemas para la extracción, transformación y uso de energía del entorno (Fig. 1-1b), que permiten a los organismos construir y mantener sus complejas estructuras y llevar a cabo trabajo mecánico, químico, osmótico y eléctrico. Contrariamente, la materia inanimada tiende a degradarse hacia un estado más desordenado, equilibrándose con su entorno.

La capacidad para autorreplicarse y autoensamblarse (Fig. 1-1c). Una única célula bacteriana colocada en un medio nutriente estéril puede generar mil millones de células "hijas" idénticas a ella en 24 horas. Cada célula contiene miles de moléculas diferentes, algunas de ellas de una gran complejidad; a pesar de ello, cada bacteria



(a)

(b)

(c)

FIGURA 1-1 Algunas características de la materia viva. **(a)** En esta sección fina de tejido muscular de vertebrado, vista por el microscopio electrónico, se aprecia su organización y complejidad microscópica. **(b)** Un halcón de las praderas se nutre mediante el consumo de un pequeño pájaro. **(c)** La reproducción biológica tiene lugar con fidelidad casi perfecta.

es una copia fiel del original y toda la información para su construcción está contenida en el material genético de la célula original.

Mecanismos para detectar y responder a las alteraciones en su entorno, mediante un ajuste constante a estos cambios gracias a la adaptación de sus procesos químicos internos.

La existencia de funciones definidas para cada uno de sus componentes y la regulación de las interacciones entre ellos. Esto es cierto no únicamente para estructuras macroscópicas como hojas y tallos o el corazón y los pulmones, sino también para estructuras microscópicas intracelulares y para compuestos químicos individuales. Existe una relación dinámica entre los componentes químicos de un organismo vivo; los cambios en uno de los componentes producen cambios compensatorios en otro, de modo que el conjunto posee un carácter propio, más allá del de cada una de sus partes individuales. El conjunto de moléculas lleva a cabo un programa que tiene como resultado final la reproducción del mismo y la perpetuación de este conjunto de moléculas; en definitiva, el resultado final es la vida.

Una historia de cambio evolutivo. Los organismos varían sus estrategias vitales heredadas para sobrevivir en situaciones nuevas. El resultado de eones de años de evolución es una enorme diversidad de formas de vida, superficialmente muy diferentes (Fig. 1-2) pero relacionadas a través de sus ancestros comunes.

A pesar de estas propiedades comunes de las que se deduce que existe una uniformidad fundamental en todas las manifestaciones de la vida, existen muy pocas generalizaciones que sean absolutamente correctas para todos los organismos vivos y bajo todas las condiciones. La diversidad es enorme. La gama de hábitats en que viven los organismos tiene su reflejo en la gama igualmente amplia de adaptaciones bioquímicas específicas que tienen lugar en un entorno químico compartido. Con el objeto de primar la claridad de exposición, en este libro usaremos algunas generalizaciones que, aunque no perfectas, resultan útiles; con frecuencia también comentaremos algunas excepciones que pueden ayudar a aclarar aquellas generalizaciones científicas.

FIGURA 1-2 Organismos vivos diferentes comparten características químicas comunes. Pájaros, bestias, plantas y microorganismos del suelo comparten con el hombre las mismas unidades estructurales básicas (células) y los mismos tipos de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) compuestas por los mismos tipos de subunidades monoméricas (nucleótidos, aminoácidos). Utilizan los mismos mecanismos de síntesis de los componentes celulares, comparten el mismo código genético y descienden de los mismos ancestros evolutivos. Detalle del "Jardín del Edén", obra de Jan van Kessel el Joven (1626-1679).

La bioquímica pretende describir en términos moleculares aquellas estructuras, mecanismos y procesos químicos compartidos por todos los organismos y proporciona los principios de organización que subyacen en todas las diversas formas de vida, principios a los que nos referiremos colectivamente como *la lógica molecular de la vida*. Aunque la bioquímica proporciona conocimientos y aplicaciones prácticas, su preocupación última es el prodigio de la vida misma.

Por tanto, en este capítulo introductorio describiremos los fundamentos celulares, químicos, físicos (termodinámicos) y genéticos de la bioquímica y el principio general de la evolución: el desarrollo de las propiedades de las células vivas a lo largo de las generaciones. Durante la lectura de este libro puede resultar útil referirse a este capítulo de vez en cuando con el objeto de refrescar la memoria sobre estos temas básicos.

1.1 Fundamentos celulares

La unidad y diversidad de los organismos es evidente incluso a nivel celular. Los organismos más pequeños son unicelulares y microscópicos. Los organismos mayores contienen muchos tipos de células de tamaño, forma y funciones diferentes. A pesar de estas diferencias obvias, todas las células comparten ciertas propiedades fundamentales, observables a nivel bioquímico.

Las células son las unidades estructurales y funcionales de todos los organismos vivos

Todas las células comparten ciertas características estructurales (Fig. 1-3). La **membrana plasmática** define la periferia de la célula, separando su contenido del medio externo. Está compuesta por moléculas de lípidos y de proteínas que forman una barrera hidrofóbica fina y flexible. Actúa como una barrera a la libre circulación de iones inorgánicos y de la mayor parte de compuestos cargados o polares. Las proteínas de transporte de la membrana plasmática permiten el paso de ciertos iones y moléculas; las receptoras transmiten señales hacia el interior de la célula; por su parte, los enzimas de membrana participan en algunas reacciones. Gracias a la interacción no covalente entre las subunidades individuales de lípidos y proteínas de la membrana plasmática, la estructura global tiene un elevado grado de flexibilidad que permite que se produzcan cambios en la forma y el tamaño de la célula. Al crecer la célula se insertan en la membrana nuevas moléculas de lípido y proteína recién sintetizadas; la división celular produce dos células, cada una con su propia membrana. El crecimiento y la división (fisión) celular se producen sin pérdida de la integridad de la membrana.

El volumen interno limitado por la membrana celular, el **citoplasma** (Fig. 1-3), está compuesto por una disolución acuosa, el **citosol,** y una variedad de partículas en suspensión con funciones específicas. El citosol es una solución muy concentrada que contiene: enzimas y las moléculas de RNA que los codifican; las subunidades monoméricas (aminoácidos y nucleótidos) a partir de las cuales se forman estas macromoléculas; centenares de pequeñas moléculas orgánicas denominadas **metabolitos,** intermediarios de las rutas biosintéticas y

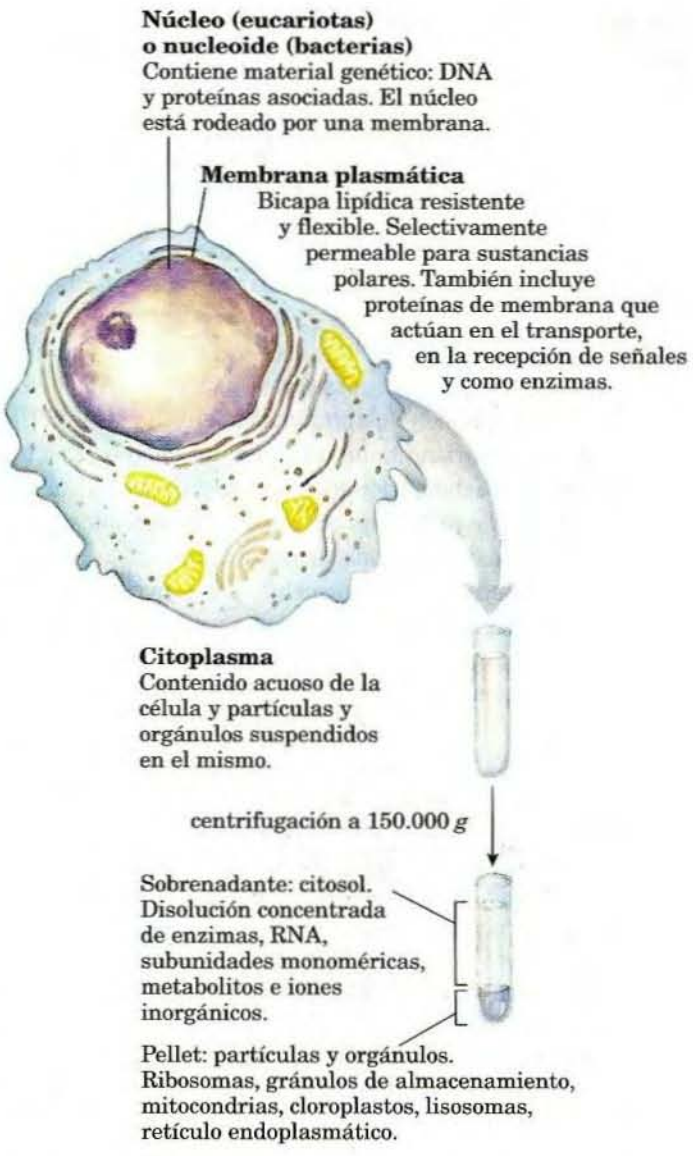


FIGURA 1-3 Características universales de las células vivas. Todas las células tienen un núcleo o nucleoide, una membrana plasmática y citoplasma. El citosol es la parte del citoplasma que permanece en el sobrenadante después de una centrifugación del extracto celular a 150.000 g durante 1 hora.

degradativas; **coenzimas,** compuestos esenciales en muchas reacciones catalizadas enzimáticamente; iones inorgánicos; y **ribosomas,** pequeñas partículas compuestas por proteínas y RNA en las que tiene lugar la síntesis de proteínas.

Todas las células tienen, al menos durante una parte de su ciclo vital, un **núcleo** o un **nucleoide,** en el que se almacena y replica el **genoma** (el conjunto de genes, compuestos de DNA). El nucleoide bacteriano no se encuentra separado del citoplasma por una membrana, pero en los organismos superiores el núcleo contiene el material nuclear que se halla englobado en el interior de una membrana doble, la envoltura nuclear. Las células que poseen envoltura nuclear se denominan **eucariotas** (del griego *eu*, "verdadero", y *karyon*, "núcleo"); las que no poseen envoltura nuclear –las células bacterianas– se denominan **procariotas** (del griego *pro*, "antes").

Las dimensiones celulares están limitadas por la capacidad de difusión del oxígeno

La mayor parte de células son de tamaño microscópico. El diámetro típico de las células animales y vegetales es de unos 5 a 100 μm, y muchas bacterias tienen una longitud de tan sólo 1 a 2 μm (véase la contracubierta posterior para encontrar información sobre las unidades y sus abreviaturas). ¿Qué es lo que limita las dimensiones de una célula? El límite inferior viene probablemente marcado por el número mínimo de cada una de las diferentes biomoléculas necesarias. Las células completas más pequeñas, los micoplasmas, tienen un diámetro de 300 nm y un volumen de aproximadamente 10^{-14} mL. Un solo ribosoma bacteriano tiene una longitud de aproximadamente 20 nm en su dimensión más alargada, de modo que un pequeño número de ribosomas ocupan ya una fracción significativa del volumen de una célula de micoplasma.

El límite superior del tamaño celular viene marcado por la velocidad de difusión de las moléculas disueltas en sistemas acuosos. Por ejemplo, una célula bacteriana que depende de reacciones que consumen oxígeno para la producción de su energía debe obtener el oxígeno molecular del medio en el que se encuentra mediante difusión a través de su membrana plasmática. La célula es tan pequeña y la relación entre el área de su superficie y su volumen tan grande, que el O_2 alcanza con facilidad todas las partes de su citoplasma por difusión. Sin embargo, al aumentar el tamaño de la célula, desciende la relación superficie/volumen hasta llegar al punto en que su metabolismo consume O_2 a una velocidad superior a la del suministro mediante difusión. En esta situación, el metabolismo que requiere O_2 se hará imposible cuando el tamaño celular crezca por encima de un determinado punto, que representará el teórico límite superior del tamaño de la célula.

Los seres vivos se clasifican en tres dominios

Todos los organismos vivos pertenecen a uno de los tres grandes grupos (reinos o dominios) que representan las tres ramas de la evolución a partir de un progenitor común (Fig. 1-4). Desde un punto de vista bioquímico se puede distinguir entre dos grandes grupos de procariotas: las **arquebacterias** (del griego *arche*, "origen") y las **eubacterias** (del griego *eu*, "verdadero"). Las eubacterias habitan en el suelo, en las aguas superficiales y en los tejidos de otros organismos vivos o en descomposición. La mayor parte de las bacterias mejor estudiadas, incluyendo a *Escherichia coli*, son eubacterias. Las arquebacterias se han descubierto más recientemente y están mucho menos caracterizadas bioquímicamente. La mayor parte de ellas habitan en medios muy extremos. Las pruebas de que se dispone sugieren que las arquebacterias y las eubacterias divergieron pronto y constituyen dos dominios distintos, llamados también Archaea y Bacteria. Todos los organismos eucarióticos, que constituyen el tercer dominio, Eucarya, evolucionaron a partir de la misma rama que dio origen a los Archaea; las arquebacterias están, por tanto, más estrechamente relacionadas con los eucariotas que con las eubacterias.

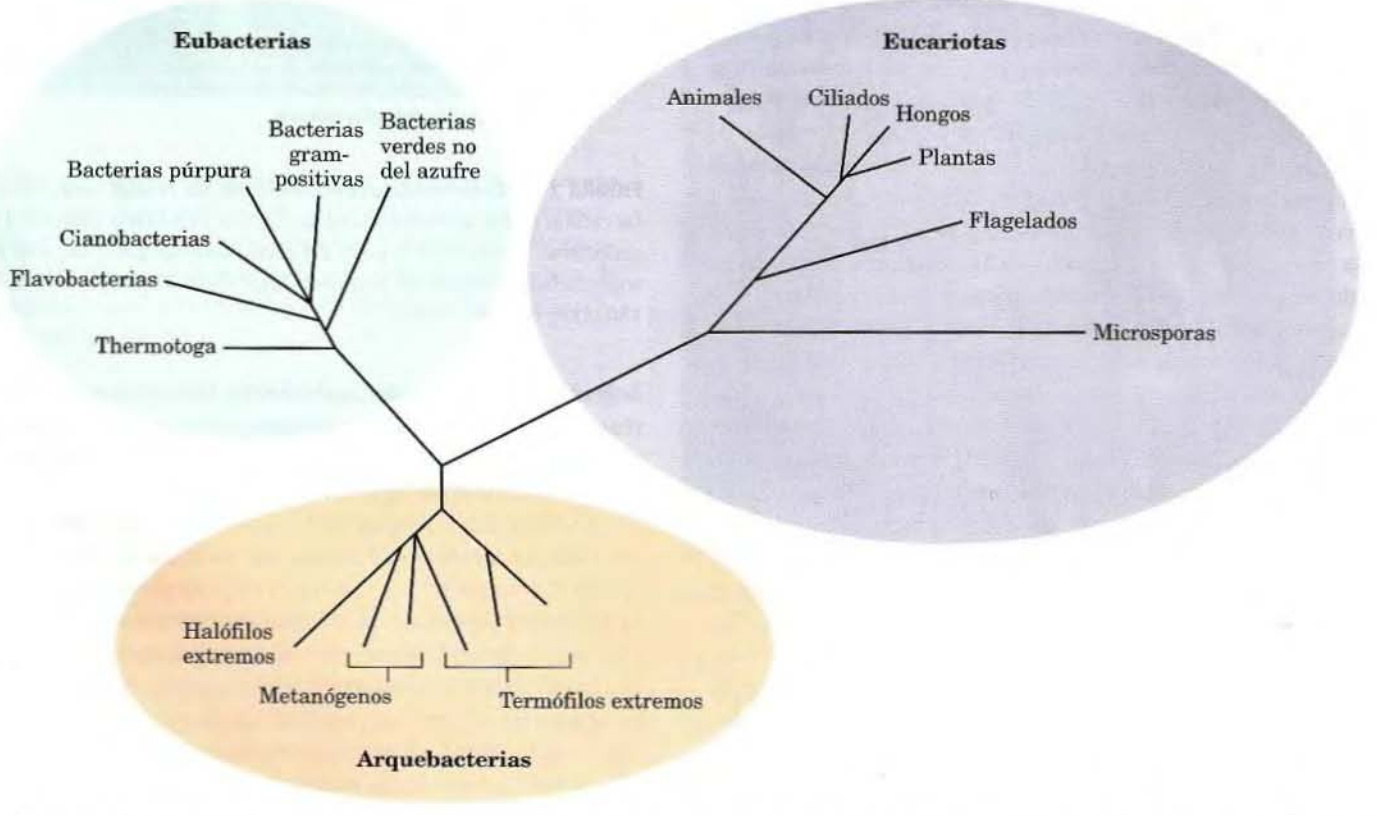


FIGURA 1-4 Filogenia de los tres dominios de la vida. Las relaciones filogenéticas se ilustran a menudo mediante un "árbol genealógico" de este tipo. La relación evolutiva entre dos organismos será tanto más estrecha cuanto menores sean los puntos de ramificación entre ellos.

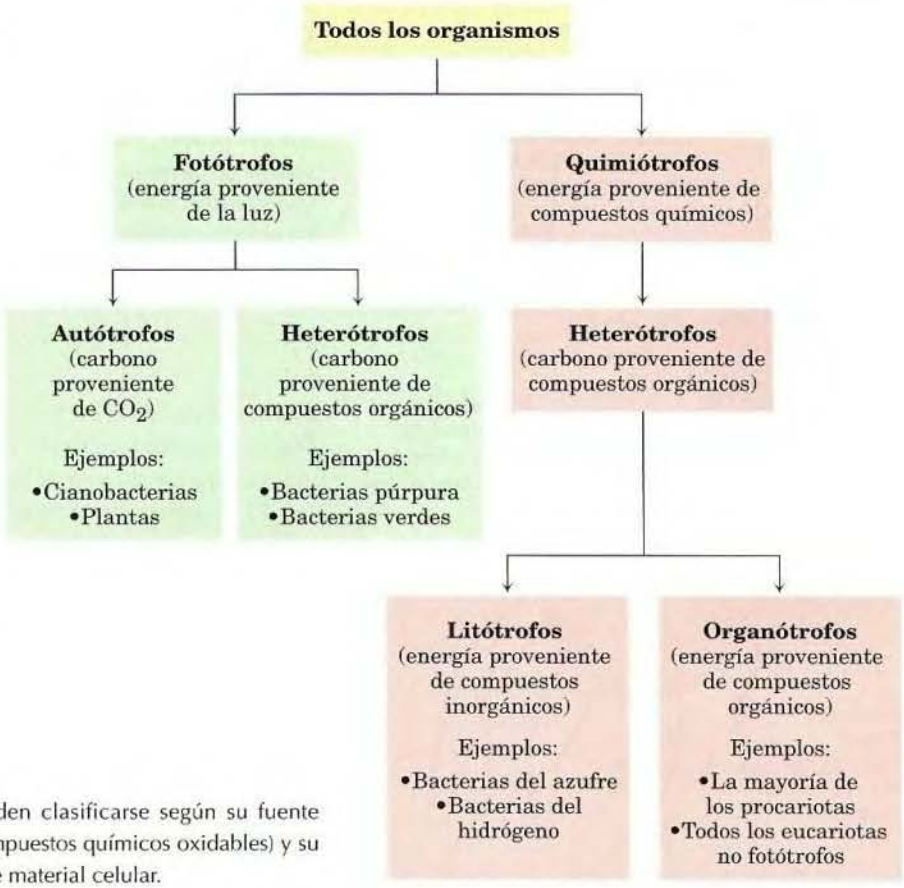


FIGURA 1-5 Los organismos pueden clasificarse según su fuente principal de energía (luz solar o compuestos químicos oxidables) y su fuente de carbono para la síntesis de material celular.

Dentro de los dominios de Bacteria y Archaea existen subgrupos que se distinguen por sus hábitats. En los hábitats **aeróbicos,** con abundante oxígeno, muchos organismos residentes obtienen su energía mediante la transferencia de electrones desde las moléculas de combustible al oxígeno. Otros ambientes son **anaeróbicos,** privados de oxígeno, lo que obliga a que los microorganismos adaptados a ellos obtengan su energía mediante la transferencia de electrones hacia el nitrato (generando N_2), sulfato (generando H_2S) o CO_2 (generando CH_4). Muchos de los organismos que han evolucionado en estos ambientes son *anaerobios obligados* que morirían por exposición al oxígeno.

Los organismos pueden clasificarse a partir de su forma de obtener la energía y el carbono que necesitan para la síntesis de material celular (Fig. 1-5). Se pueden establecer dos amplias categorías a partir de las fuentes de energía: los **fotótrofos** (del griego *trophe*, "nutrición") recolectan y utilizan la luz solar, mientras que los **quimiótrofos** obtienen su energía a partir de la oxidación de combustibles químicos. Todos los quimiótrofos necesitan una fuente de nutrientes orgánicos puesto que no pueden fijar CO_2 en forma de compuestos orgánicos. Los fotótrofos pueden dividirse, a su vez, entre los que pueden obtener todo el carbono necesario a partir de CO_2 **(autótrofos)** y los que requieren nutrientes orgánicos **(heterótrofos).** Ningún quimiótrofo puede obtener sus átomos de carbono exclusivamente del CO_2 (es decir, no existen autótrofos en esta categoría) pero los quimiótrofos pueden ser clasificados según un criterio diferente: si el combustible que oxidan es inorgánico **(litótrofos)** u orgánico **(organótrofos).**

La mayoría de los organismos conocidos se encuentran dentro de una de estas cuatro amplias categorías –autótrofos o heterótrofos entre los organismos fotosintéticos; litótrofos u organótrofos entre aquellos que oxidan compuestos químicos–. Los procariotas disponen de diversas alternativas generales para la obtención de carbono y energía. Por ejemplo, *Escherichia coli* es un quimioorganoheterótrofo; necesita compuestos orgánicos del medio ambiente como combustible y como fuente de carbono. Las cianobacterias son fotolitoautótrofas; utilizan la luz solar como fuente de energía y convierten el CO_2 en biomoléculas. Los individuos de la especie humana somos quimioorganoheterótrofos, como *E. coli.*

Escherichia coli es la célula procariótica mejor estudiada

Las células bacterianas comparten ciertas características estructurales comunes, pero también presentan especializaciones específicas de grupo (Fig. 1-6). La célula de *E. coli* tiene aproximadamente 2 μm de longitud y un poco menos de 1 μm de diámetro. Posee una membrana externa protectora y una membrana plasmática interna que engloba el citoplasma y el nucleoide. Entre las membranas interna y externa se sitúa una capa fina pero resistente de peptidoglucanos que proporciona a la célula su forma y rigidez características. La membrana plasmática y las capas que la rodean constituyen la **envoltura celular.** En el dominio Archaea, la rigidez es conferida por una polímero diferente (pseudopeptidoglucano). Las membranas plasmáticas de eubacterias consisten en una fina bicapa de

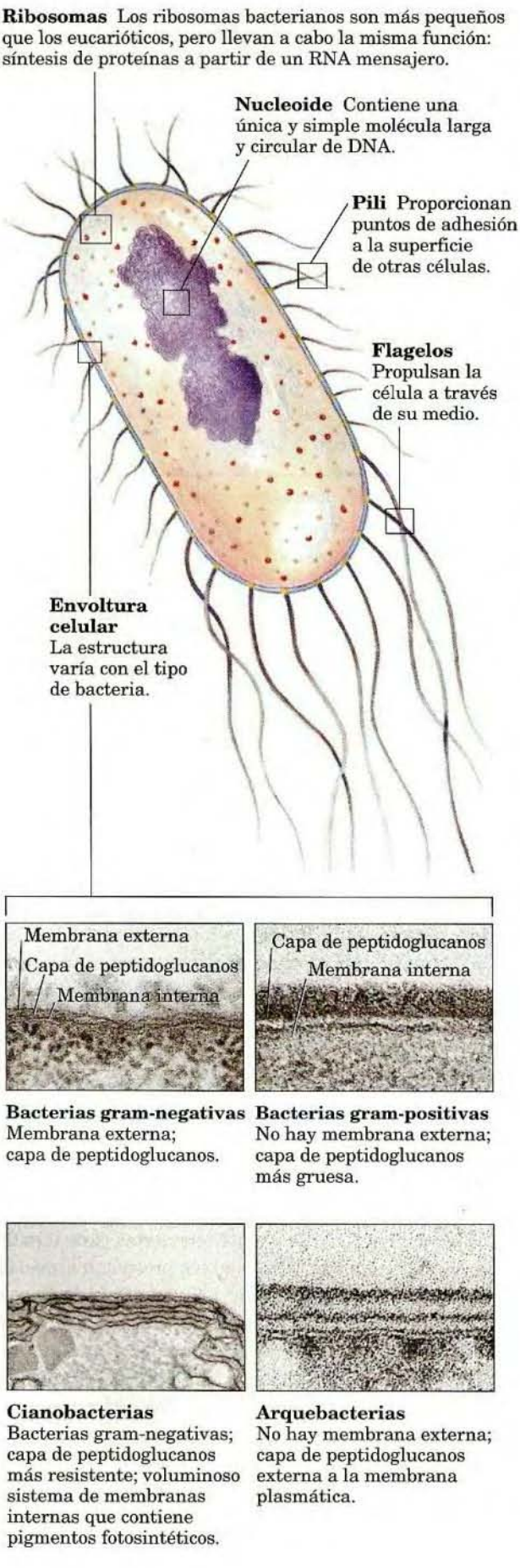


FIGURA 1-6 Características estructurales comunes de las células bacterianas. A causa de diferencias en la estructura de la envoltura celular, algunas eubacterias retienen la tinción de Gram (gram-positivas) y otras no (gram-negativas). *E. coli* es gram-negativa. Las cianobacterias son también eubacterias, pero se distinguen por su voluminoso sistema de membranas internas, en el que se localizan los pigmentos fotosintéticos. Pese a que las envolturas celular de las arquebacterias y las eubacterias gram-positivas parecen similares al microscopio electrónico, la estructura de los lípidos de membrana y de los polisacáridos de la envoltura celular son muy diferentes en estos organismos.

moléculas de lípido en la que se insertan proteínas. Las membranas arquebacterianas tienen una arquitectura similar, aunque sus lípidos difieren de los presentes en eubacterias.

El citoplasma de *E. coli* contiene unos 15.000 ribosomas, miles de copias de cada uno de los miles de enzimas diferentes, numerosos metabolitos y cofactores y una variedad de iones inorgánicos. El nucleoide contiene una única molécula circular de DNA y el citoplasma contiene uno o más segmentos circulares de DNA de tamaño mucho menor que reciben el nombre de **plásmidos.** En la naturaleza, algunos plásmidos confieren resistencia a toxinas y antibióticos presentes en el medio. En el laboratorio, estos segmentos de DNA son muy adecuados para la manipulación experimental y resultan de extrema utilidad para el genético molecular.

La mayor parte de bacterias existen como células individuales, aunque en algunas especies bacterianas tienden a asociarse en racimos o filamentos e incluso algunas (las mixobacterias) muestran un primitivo comportamiento social.

Las células eucarióticas poseen diversos orgánulos membranosos que pueden aislarse para su estudio

Las células eucarióticas típicas (Fig. 1-7) son mucho mayores que las células procarióticas –tienen normalmente un diámetro de 5 a 100 μm y un volumen celular que es entre mil y un millón de veces superior al de las bacterias–. Las características distintivas de los eucariotas son el núcleo y los orgánulos rodeados de membrana que llevan a cabo funciones específicas: mitocondrias, retículo endoplasmático, complejos de Golgi y lisosomas. Las células vegetales contienen además vacuolas y cloroplastos (Fig. 1-7) En el citoplasma de muchas células también se observan gránulos o gotículas que contienen nutrientes de reserva como almidón o grasas.

En lo que constituyó un importante avance bioquímico, Albert Claude, Christian de Duve y George Palade desarrollaron métodos para la separación de orgánulos citosólicos –un paso esencial para el aislamiento de biomoléculas y otros componentes celulares y para la investigación de su estructura y función–. En un procedimiento de fraccionamiento celular típico (Fig. 1-8) se disgregan células o tejidos en solución mediante una homogeneización suave, que rompe la membrana celular pero respeta la integridad de la mayoría de los orgánulos. A continuación se centrifuga el homogenado, proceso en el que orgánulos como el núcleo, las mitocondrias y los liso-

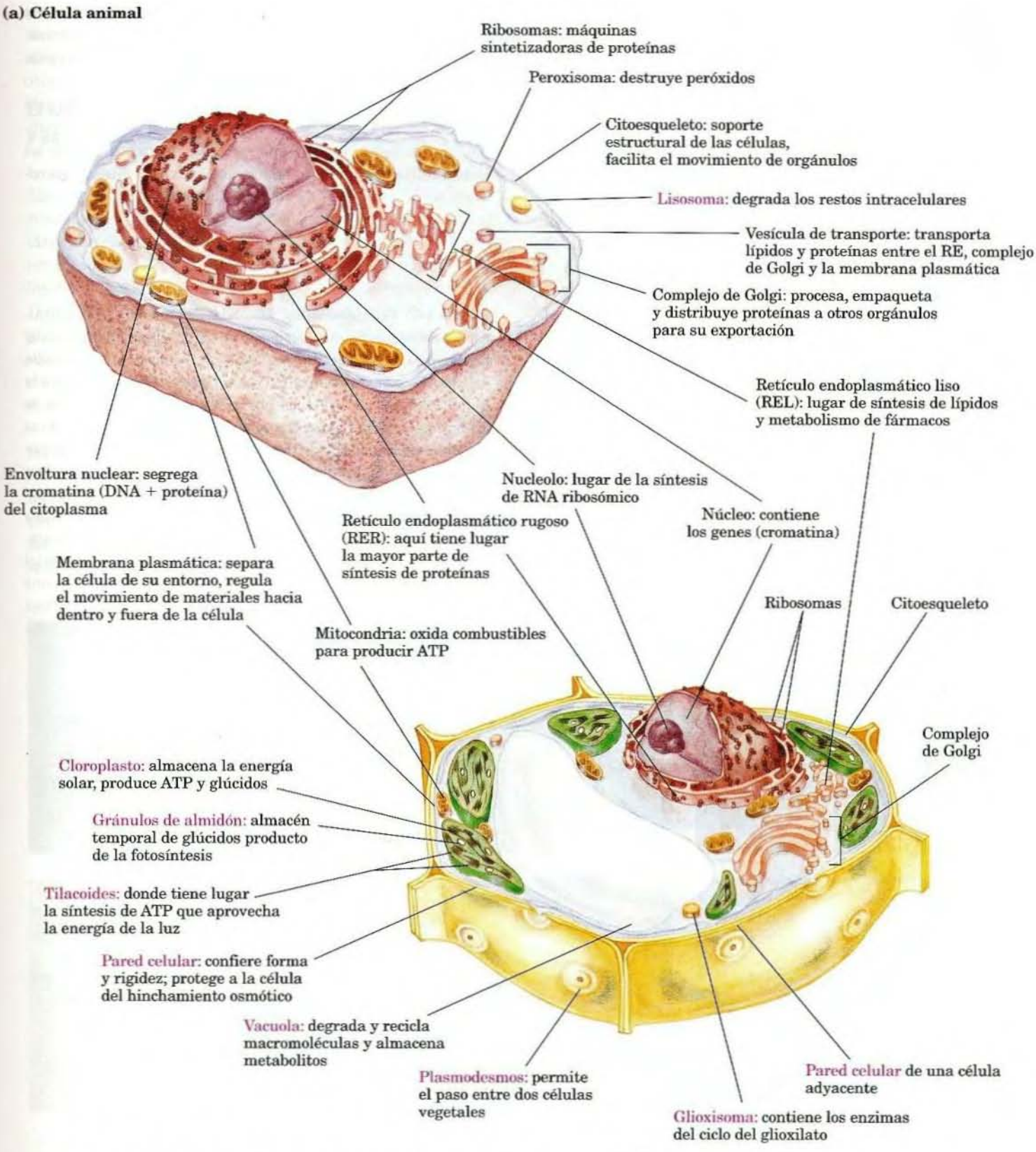
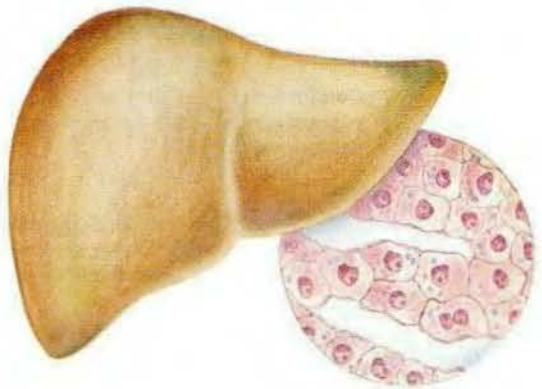


FIGURA 1-7 Estructura de la célula eucariótica. Ilustración esquemática de los dos principales tipos de célula eucariótica: **(a)** una célula animal representativa y **(b)** una célula vegetal representativa. Las células vegetales tienen aproximadamente entre 10 y 100 μm de diámetro –son más grandes que las células animales, que presentan típicamente un intervalo de 5 a 30 μm–. Las estructuras rotuladas en rojo son exclusivas de células animales o de células vegetales.

somas sedimentan a velocidades diferentes a causa de su diferente tamaño. Al tener diferente densidad específica "flotan" a niveles distintos en un gradiente de densidad.

La centrifugación diferencial permite obtener un fraccionamiento grosero inicial del contenido citoplasmático, que puede purificarse con más precisión mediante una centrifugación isopícnica ("misma densidad"). Mediante esta metodología, los orgánulos de densidad diferente (resultado de las diferentes relaciones entre cantidad de lípidos y proteínas en cada clase de orgánulo) se separan en un gradiente de densidad. Recogiendo cuidadosamente el material de cada región del gradiente y observándolo al microscopio, el bioquímico puede establecer la posición de cada orgánulo y purificarlo para su estudio posterior. De esta manera se supo, por ejemplo, que los lisosomas contienen enzimas degradativos, que las mitocondrias contienen enzimas oxidativos y que los cloro-



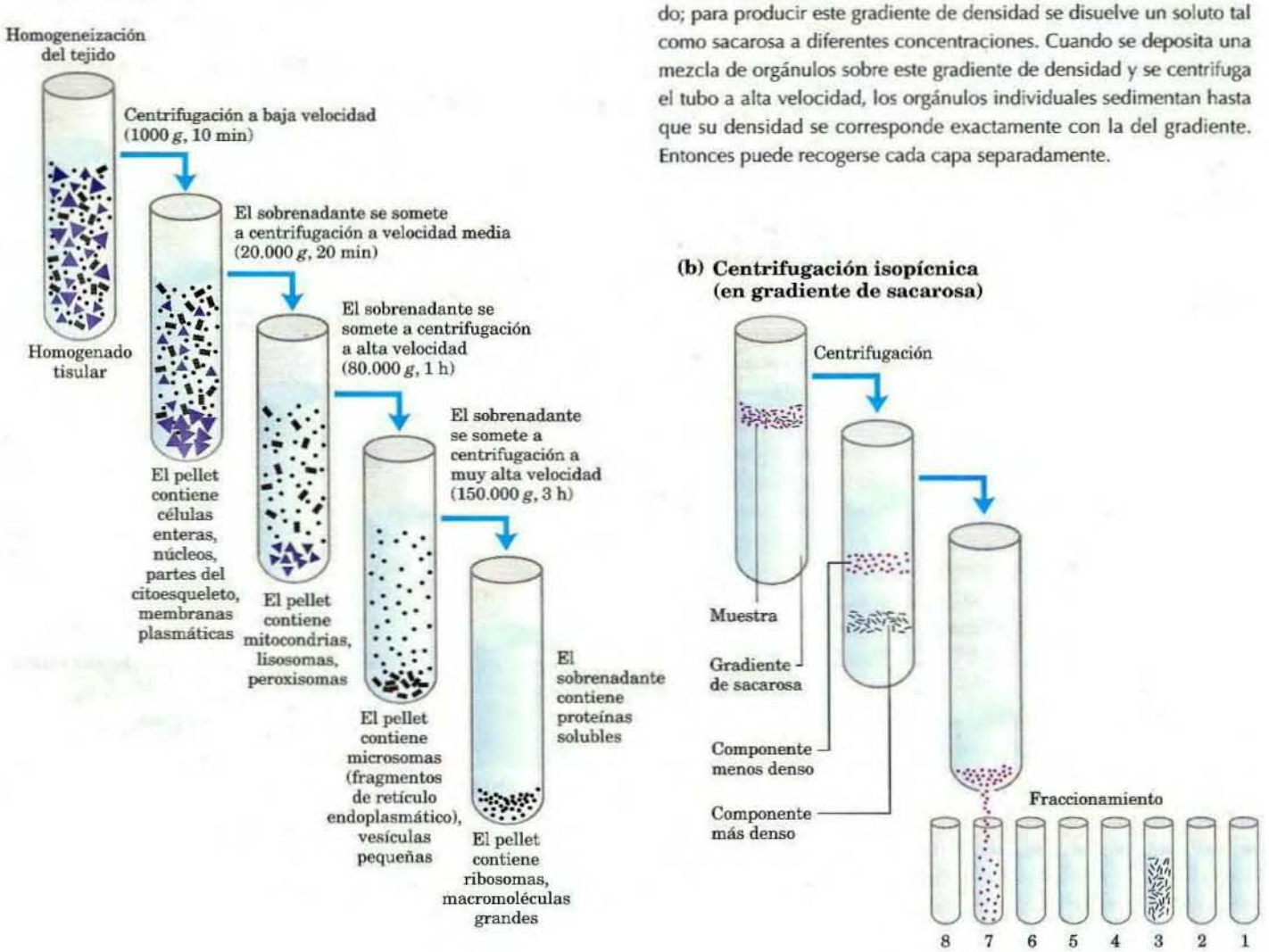


FIGURA 1-8 Fraccionamiento subcelular de un tejido. En primer lugar se homogeneiza mecánicamente un tejido, como por ejemplo el hígado, para romper las células y dispersar su contenido en un medio acuoso. El medio de sacarosa tiene una presión osmótica similar a la de los orgánulos; con eso evita la difusión de agua hacia el interior de los orgánulos, lo que provocaría su hinchamiento y explosión. **(a)** Las partículas en suspensión de diferente tamaño se pueden separar por centrifugación a diferentes velocidades o bien **(b)** es posible separar partículas con diferente densidad mediante centrifugación isopícnica. En la centrifugación isopícnica se llena un tubo de centrífuga con una disolución, cuya densidad aumenta desde la superficie hasta el fondo; para producir este gradiente de densidad se disuelve un soluto tal como sacarosa a diferentes concentraciones. Cuando se deposita una mezcla de orgánulos sobre este gradiente de densidad y se centrifuga el tubo a alta velocidad, los orgánulos individuales sedimentan hasta que su densidad se corresponde exactamente con la del gradiente. Entonces puede recogerse cada capa separadamente.

plastos contienen pigmentos fotosintéticos. El aislamiento de un orgánulo enriquecido en un cierto enzima suele ser el primer paso en la purificación de dicho enzima.

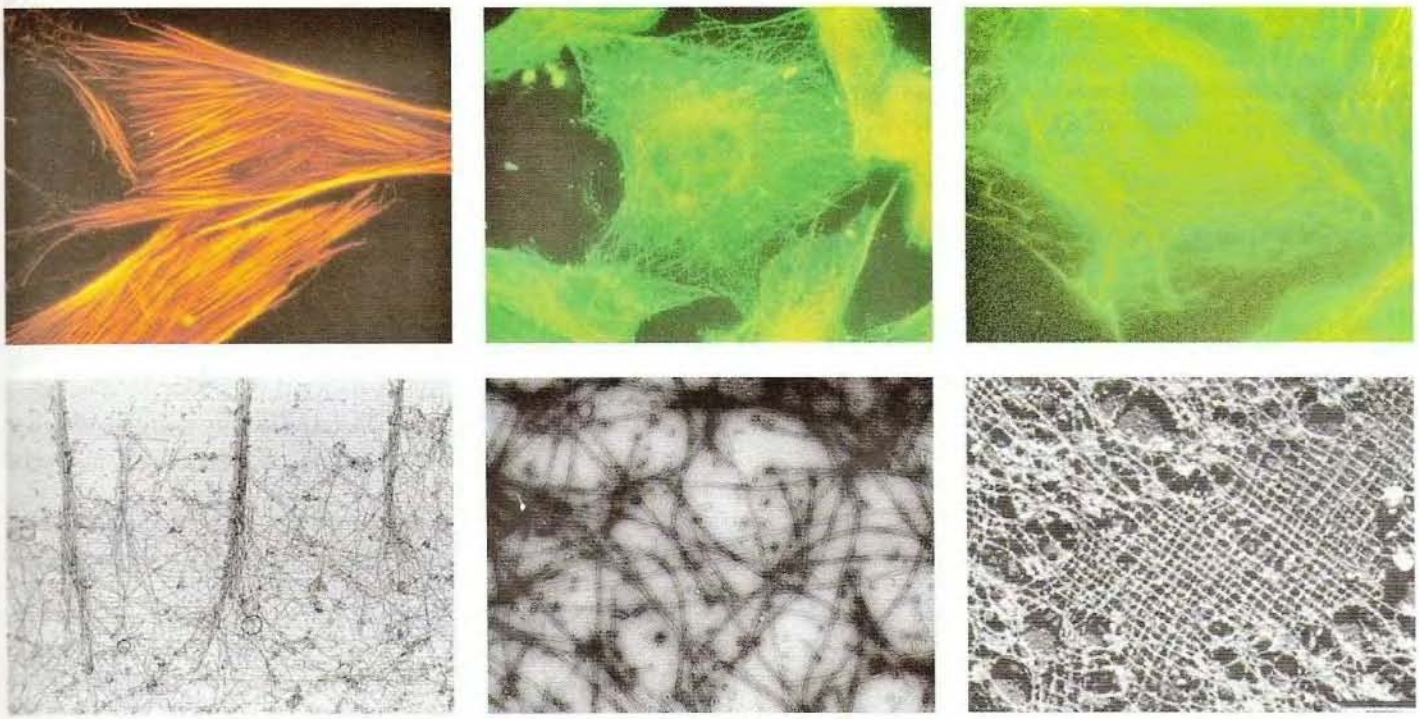
El citoplasma se organiza gracias al citoesqueleto y es altamente dinámico

La microscopia electrónica permite observar distintos tipos de filamentos de proteína que se entrecruzan en la célula eucariótica y forman una trama tridimensional e interconectada, el **citoesqueleto.** Existen tres clases principales de filamentos citoplasmáticos –los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios (Fig.1-9)– que difieren en anchura (entre 6 y 22 nm), composición y función específica. Todos ellos proporcionan estructura y organización al citoplasma y mantienen la forma de la célula. Los filamentos de actina y los microtúbulos colaboran también en el movimiento de los orgánulos o en el movimiento celular global.

Cada tipo de componente citoesquelético está compuesto por subunidades simples de proteína que polimerizan para formar filamentos de grosor uniforme. Estos filamentos no son estructuras permanentes, sino que están en constante fluctuación entre su forma monomérica y su forma estructurada en filamentos. Su localización celular no está fijada rígidamente, sino que varía en gran medida durante la mitosis, la citoquinesis, el desplazamiento ameboide o a causa de los cambios en la forma de la célula. La regulación de la formación, disgregación y localización de los diversos tipos de filamentos corre a cargo de otras proteínas encargadas de unir o entrelazar los filamentos o de desplazar orgánulos citoplasmáticos.

De este breve repaso de la estructura celular podemos extraer la idea general de que la célula eucariótica está formada por una trama de fibras estructurales y un complejo sistema de compartimientos limitados por membranas (Fig. 1-7). Los filamentos se desagregan para reestructurarse en otro lugar distinto. Las vesículas membranosas brotan de un orgánulo y se fusionan con otro. Los orgánulos se mueven por el citoplasma a lo largo de filamentos de proteína gracias a la energía de motores proteicos. El **sistema endomembranoso** segrega procesos metabólicos específicos y aporta las superficies en las que tienen lugar ciertas reacciones enzimáticas. La **exocitosis** y la **endocitosis,** mecanismos de transporte (hacia el exterior y el interior de las células, respectivamente) que implican fusión y fisión de membranas, permiten la comunicación entre el citoplasma y su medio externo mediante la secreción de sustancias producidas en la célula y la captación de materiales extracelulares.

A pesar de su complejidad, la organización del citoplasma está lejos de ser un producto del azar. El movimiento y la posición de los orgánulos y de los elementos del citoesqueleto es-



Actina formando "fibras de estrés" **(a)** | Microtúbulos **(b)** | Filamentos intermedios **(c)**

FIGURA 1-9 Los tres tipos de filamentos citoplasmáticos. Los paneles superiores muestran células epiteliales fotografiadas después de un tratamiento con anticuerpos que se unen a y tiñen específicamente **(a)** filamentos de actina que dan lugar a "fibras de estrés", **(b)** microtúbulos que irradian desde el centro de la célula y **(c)** filamentos intermedios que se extienden por todo el citoplasma. Los anticuerpos que reconocen específicamente actina, tubulina o proteínas de filamento intermedio se fijan covalentemente a un compuesto fluorescente. Cuando se visualiza la célula al microscopio de fluorescencia, sólo son visibles las estructuras teñidas. Los paneles inferiores muestran cada tipo de filamento al microscopio electrónico de transmisión **(a, b)** o de barrido **(c)**.

tán sometidos a una estrecha regulación y en el transcurso de la vida de la célula eucariótica se producen importantes reorganizaciones finamente orquestadas, como la mitosis. Las interacciones entre citoesqueleto y orgánulos son reversibles, de tipo no covalente y están sujetas a regulación en respuesta a diversas señales intra- y extracelulares.

Las células construyen estructuras supramoleculares

Las macromoléculas y sus subunidades monoméricas son de tamaño muy diferente (Fig. 1-10). Una molécula de alanina mide menos de 0,5 nm. La hemoglobina, proteína transportadora de oxígeno en los eritrocitos (glóbulos rojos), contiene cerca de 600 subunidades de aminoácido formando cuatro largas cadenas que se pliegan de forma globular y se asocian en estructuras de 5,5 nm de diámetro. Las proteínas son, a su vez, mucho menores que los ribosomas (cuyo diámetro es de aproximadamente 20 nm), orgánulos de tamaño muy inferior al de las mitocondrias, que miden aproximadamente 1000 nm de diámetro. Existe, pues, una gran diferencia entre las biomoléculas simples y las estructuras celulares que pueden observarse al microscopio óptico. La Figura 1-11 ilustra la jerarquía estructural en la organización celular.

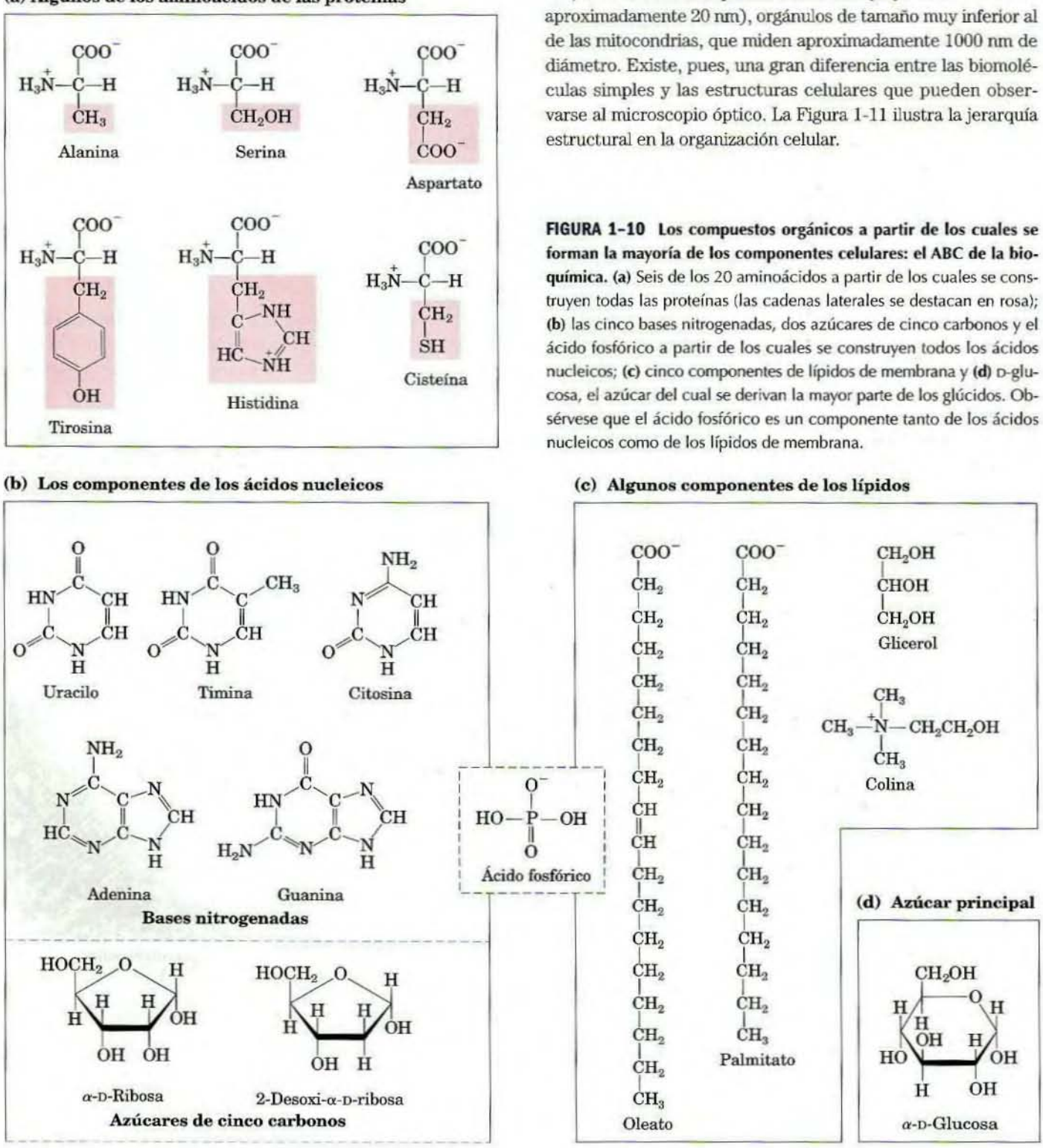


FIGURA 1-10 Los compuestos orgánicos a partir de los cuales se forman la mayoría de los componentes celulares: el ABC de la bioquímica. **(a)** Seis de los 20 aminoácidos a partir de los cuales se construyen todas las proteínas (las cadenas laterales se destacan en rosa); **(b)** las cinco bases nitrogenadas, dos azúcares de cinco carbonos y el ácido fosfórico a partir de los cuales se construyen todos los ácidos nucleicos; **(c)** cinco componentes de lípidos de membrana y **(d)** D-glucosa, el azúcar del cual se derivan la mayor parte de los glúcidos. Obsérvese que el ácido fosfórico es un componente tanto de los ácidos nucleicos como de los lípidos de membrana.

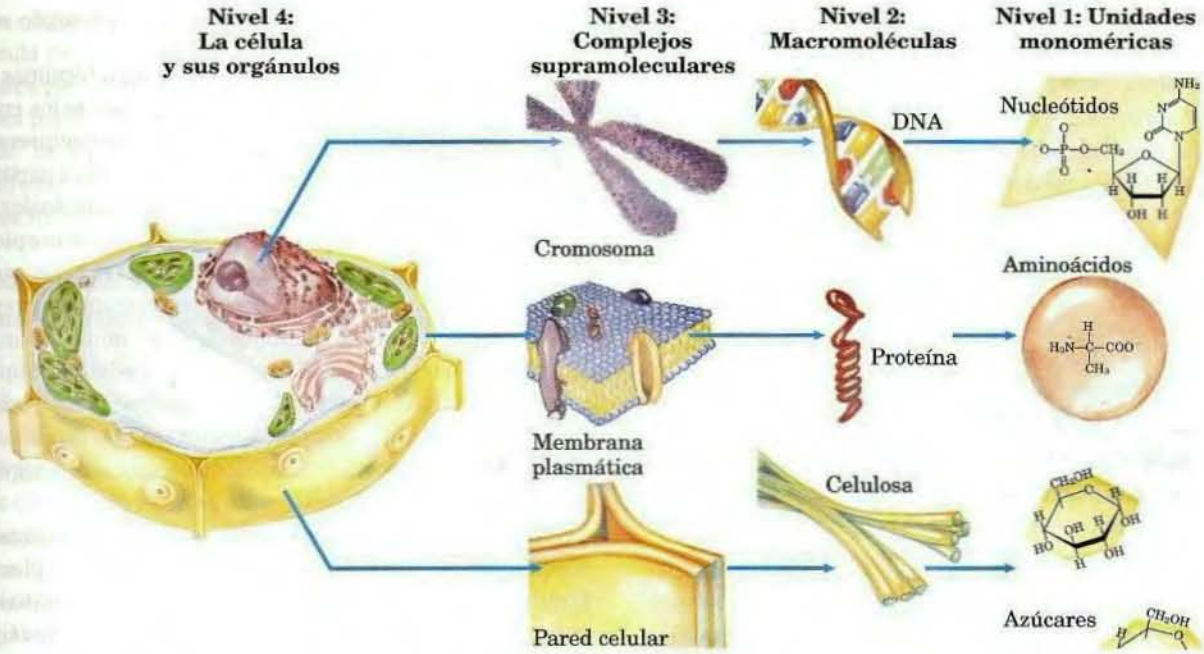


FIGURA 1-11 Jerarquía estructural en la organización molecular de las células. En esta célula vegetal, el núcleo es un orgánulo que contiene diversos tipos de complejos supramoleculares, entre ellos los cromosomas. Los cromosomas están formados por macromoléculas de DNA y muchas proteínas diferentes. Cada tipo de macromolécula se construye a partir de subunidades simples, como por ejemplo el DNA, que está formado por nucleótidos (desoxirribonucleótidos en realidad).

Las subunidades monoméricas de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos se unen mediante enlaces covalentes. Sin embargo, en complejos supramoleculares, las macromoléculas se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes –mucho más débiles, individualmente, que los enlaces covalentes–. Entre las interacciones no covalentes se cuentan los enlaces de hidrógeno (entre grupos polares), las interacciones iónicas (entre grupos cargados), las interacciones hidrofóbicas (entre grupos no polares en solución acuosa) y las interacciones de van der Waals, todas ellas de energía bastante menor que la de los enlaces covalentes (Tabla 1-1). En el Capítulo 2 se describe la naturaleza de estas interacciones no covalentes. Los complejos supramoleculares se estabilizan gracias al gran número de interacciones no covalentes que se establecen en ellos y que son las responsables de sus estructuras únicas.

Los estudios in vitro podrían no detectar interacciones importantes entre moléculas

Uno de los métodos para entender un proceso biológico consiste en el estudio de las moléculas purificadas in vitro (en el interior del tubo de ensayo), evitando la interferencia con otras moléculas presentes en la célula intacta –es decir, in vivo–. A pesar de que esta metodología ha resultado muy útil, debemos recordar que el interior de una célula es muy diferente del entorno que pueda haber en un tubo de ensayo. Los componentes "interferentes" que se eliminan mediante purificación pueden resultar críticos para la función biológica o para la regulación de la actividad de la molécula purificada. Por ejemplo, los estudios in vitro de enzimas puros se llevan a cabo normalmente a concentraciones muy bajas y en soluciones acuosas en agitación constante. En la célula, el enzima se encuentra disuelto o suspendido en un citosol de textura parecida a un gel y acompañado de miles de proteínas diferentes, algunas de las cuales se unen al enzima y varían su actividad. Algunos enzimas forman parte de complejos multienzimáticos en los que los

TABLA 1-1 Energías de enlace en biomoléculas comunes

Tipo de enlace	*Energía de disociación del enlace* (kJ/mol)*	*Tipo de enlace*	*Energía de disociación del enlace* (kJ/mol)*
Enlaces simples		**Enlaces dobles**	
O—H	470	C=O	712
H—H	435	C=N	615
P—O	419	C=C	611
C—H	414	P=O	502
N—H	389		
C—O	352	**Enlaces triples**	
C—C	348	C≡C	816
S—H	339	N≡N	930
C—N	293		
C—S	260		
N—O	222		
S—S	214		

*Cuanto mayor sea la energía necesaria para la disociación (rotura) del enlace, más fuerte es el mismo.

reactivos son canalizados de un enzima a otro sin que lleguen a tener contacto con el disolvente. La difusión se halla disminuida en el denso citosol y la composición del mismo varía en sus distintas regiones. Resumiendo, una molécula determinada puede actuar de modo muy diferente en la célula que in vitro. Uno de los retos de la bioquímica es comprender la influencia de la organización celular y las asociaciones supramoleculares en la función de enzimas y otras biomoléculas –comprender la función tanto in vivo como in vitro.

RESUMEN 1.1 Fundamentos celulares

- Todas las células están rodeadas por una membrana plasmática, poseen un citosol que contiene metabolitos, coenzimas, iones inorgánicos y enzimas y poseen un conjunto de genes contenidos en un nucleoide (procariotas) o un núcleo (eucariotas).
- Los fotótrofos utilizan la luz del sol para realizar trabajo; los quimiótrofos oxidan combustibles mediante la transferencia de electrones a buenos aceptores electrónicos: compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos u oxígeno molecular.
- Las células bacterianas contienen un citosol, un nucleoide y plásmidos. Las células eucarióticas tienen un núcleo y están multicompartimentadas, con ciertos procesos confinados en orgánulos específicos, los cuales pueden ser separados y estudiados de modo aislado.
- Las proteínas del citoesqueleto se asocian formando largos filamentos que confieren forma y rigidez a las células y son el soporte para el movimiento de los orgánulos a través de la célula.
- Los complejos supramoleculares se mantienen estables mediante interacciones no covalentes y dan lugar a estructuras de diversos tamaños, algunas de ellas visibles al microscopio óptico. Interacciones importantes en el medio celular pueden perderse a causa de la eliminación de moléculas individuales de estos complejos para su estudio in vitro.

1.2 Fundamentos químicos

La bioquímica tiene como objetivo explicar en términos químicos las estructuras y funciones biológicas. Uno de los enfoques que se han mostrado más productivos para la comprensión de los fenómenos biológicos parte de la purificación, a partir de organismos vivos, de componentes químicos individuales, como pueden ser las proteínas, para caracterizar sus propiedades estructurales y químicas. A finales del siglo XVIII los químicos llegaron a la conclusión de que la composición de la materia viva era sorprendentemente diferente de la del mundo inanimado. Antoine Lavoisier (1743-1794) observó la relativa simplicidad química del "mundo mineral" en contraste con la complejidad de los "mundos animal y vegetal"; se sabía que estos últimos estaban formados por compuestos ricos en carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Durante la primera mitad del siglo XX, investigaciones bioquímicas paralelas acerca de la degradación de glucosa en levaduras y en células musculares de animales permitieron observar grandes similitudes químicas entre estos dos tipos de células, aparentemente muy diferentes: la degradación de la glucosa en levadura y en células musculares tiene lugar a través de los mismos diez intermediarios químicos. Exhaustivos estudios posteriores confirmaron la universalidad de esta observación, resumida por Jacques Monod: "Lo que es cierto para *E. coli* es cierto para el elefante". La noción actual de que los todos organismos tienen un origen evolutivo común se basa en parte en esta universalidad de los intermediarios y las transformaciones químicas.

Tan sólo alrededor de 30 de los más de 90 elementos químicos presentes en la naturaleza son esenciales para los seres vivos. La mayoría de los elementos de la materia viva tienen un número atómico relativamente bajo; sólo cinco de ellos tienen un número atómico superior al del selenio, 34 (Fig. 1-12). Los cuatro elementos más abundantes en los organismos vivos, en términos de porcentaje sobre el número total de átomos, son el hidrógeno, el oxígeno, el nitrógeno y el carbono, que en conjunto representan más del 99% de la masa de la mayoría de las células. Son los elementos más ligeros capaces de formar uno, dos, tres y cuatro enlaces covalentes, respectivamente; en general, los elementos más ligeros forman los enlaces más fuer-

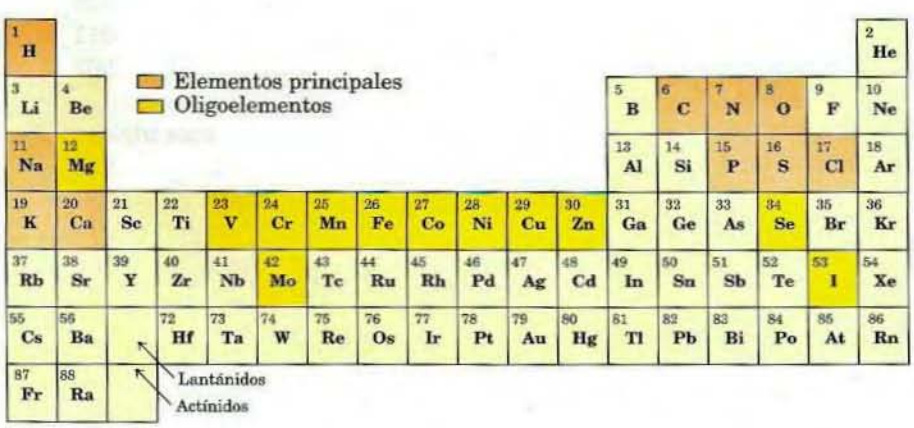


FIGURA 1-12 Los elementos esenciales para la vida y la salud de los animales. Los elementos principales (en naranja) son componentes estructurales de células y tejidos y deben estar presentes en la dieta en cantidad de gramos diarios. Las necesidades de oligoelementos (en amarillo) son mucho menores: en el caso del hombre son suficientes unos pocos miligramos al día de Fe, Cu y Zn, e incluso menos de los demás elementos. Las necesidades elementales de las plantas y los microorganismos son muy similares a las aquí presentadas.

tes. Los oligoelementos (Fig. 1-12) representan una fracción minúscula del peso del cuerpo humano, pero todos ellos son esenciales para la vida, generalmente porque resultan imprescindibles para la función de proteínas específicas, incluidos los enzimas. La capacidad transportadora de oxígeno de la molécula de hemoglobina, por ejemplo, depende totalmente de cuatro iones hierro que constituyen sólo el 0,3% de su masa.

Las biomoléculas son compuestos de carbono con una diversidad de grupos funcionales

La química de los organismos vivos se organiza alrededor del carbono, que representa más de la mitad del peso seco de las células. El carbono puede formar enlaces simples con átomos de hidrógeno y tanto enlaces simples como dobles con los átomos de oxígeno y de nitrógeno (Fig. 1-13). La capacidad de los átomos de carbono para formar enlaces simples carbono-carbono de gran estabilidad es crucial en la biología. Cada átomo de carbono puede formar enlaces simples con hasta cuatro átomos de carbono diferentes. Dos átomos de carbono pueden compartir también dos (o tres) pares de electrones, dando lugar a enlaces carbono-carbono dobles (o triples).

Los cuatro enlaces simples que puede formar un átomo de carbono se distribuyen tetraédricamente, con un ángulo de 109,5°

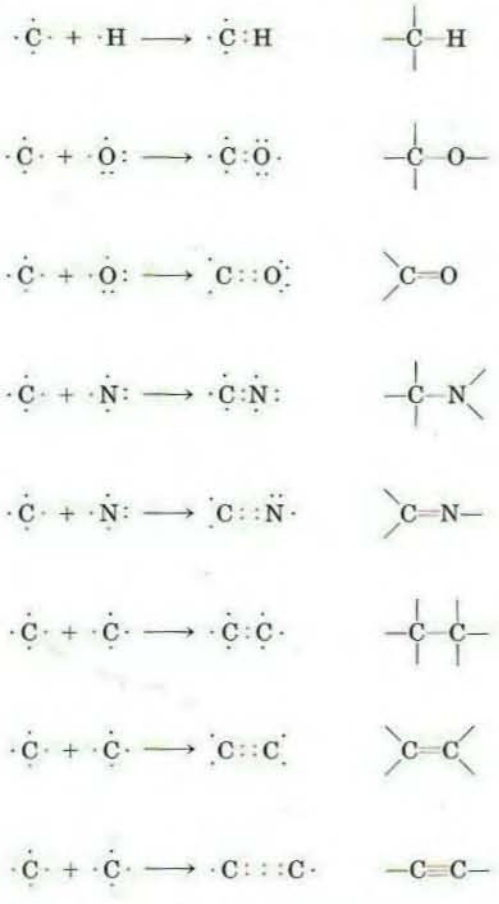


FIGURA 1-13 Versatilidad de enlace del carbono. El carbono puede formar enlaces covalentes simples, dobles y triples (en rojo), en particular con otros átomos de carbono. Los enlaces triples son muy poco frecuentes en biomoléculas.

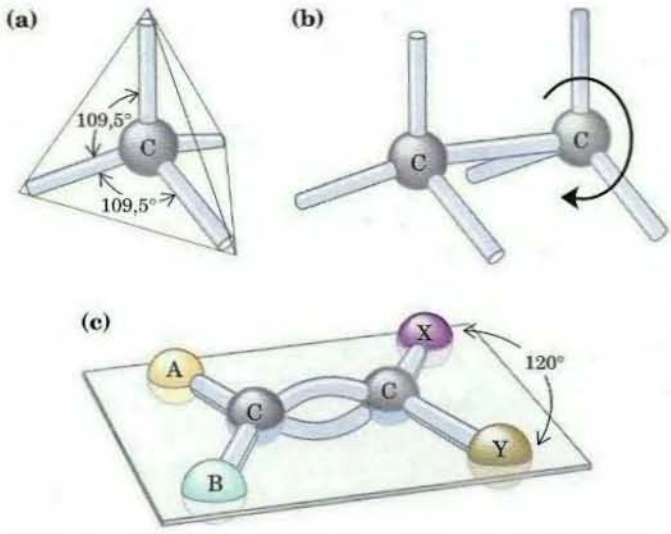


FIGURA 1-14 Geometría de los enlaces del carbono. (a) Los átomos de carbono presentan la distribución tetraédrica característica de sus cuatro enlaces simples. **(b)** Los enlaces simples carbono-carbono presentan libertad de rotación, que aquí se muestra para el etano (CH_3—CH_3). **(c)** Los enlaces dobles son más cortos y no permiten la libre rotación. Los dos carbonos unidos por el enlace doble y los átomos denominados A, B, X e Y están situados en el mismo plano rígido.

entre ellos (Fig. 1-14) y una longitud media de 0,154 nm. Existe libertad de rotación alrededor de cada enlace simple carbono-carbono a no ser que ambos átomos de carbono estén unidos a grupos muy voluminosos o cargados, en cuyo caso la rotación puede estar restringida. Un enlace doble carbono-carbono es más corto (mide aproximadamente 0,134 nm) y rígido, y permite una rotación casi nula alrededor de su eje.

Los átomos de carbono enlazados covalentemente en las biomoléculas pueden formar cadenas lineales, ramificadas y estructuras circulares. A esos esqueletos de carbono se les añaden grupos de otros átomos, llamados **grupos funcionales,** que confieren propiedades químicas específicas a la molécula. Es probable que la versatilidad de enlace del carbono fuera una de las causas principales de la selección de los compuestos de carbono para formar parte de la maquinaria molecular de las células durante el origen y la evolución de los seres vivos. Ningún otro elemento químico puede formar moléculas con formas y tamaños tan diferentes o con tanta variedad de grupos funcionales.

Puede considerarse que la mayor parte de las biomoléculas son derivados de los hidrocarburos, con átomos de hidrógeno reemplazados por grupos funcionales para dar lugar a las diferentes familias de compuestos orgánicos. Las más comunes son los alcoholes, con uno o más grupos hidroxilo, las aminas, con grupos amino, los aldehídos y las cetonas, con grupos carbonilo, y los ácidos carboxílicos, con grupos carboxilo unidos (Fig. 1-15). Muchas biomoléculas son polifuncionales y contienen dos o más tipos de grupos funcionales (Fig. 1-16), cada uno con propiedades químicas y reactividad propias. La "personalidad" química de cada compuesto viene determinada por la química de sus grupos funcionales y su disposición tridimensional.

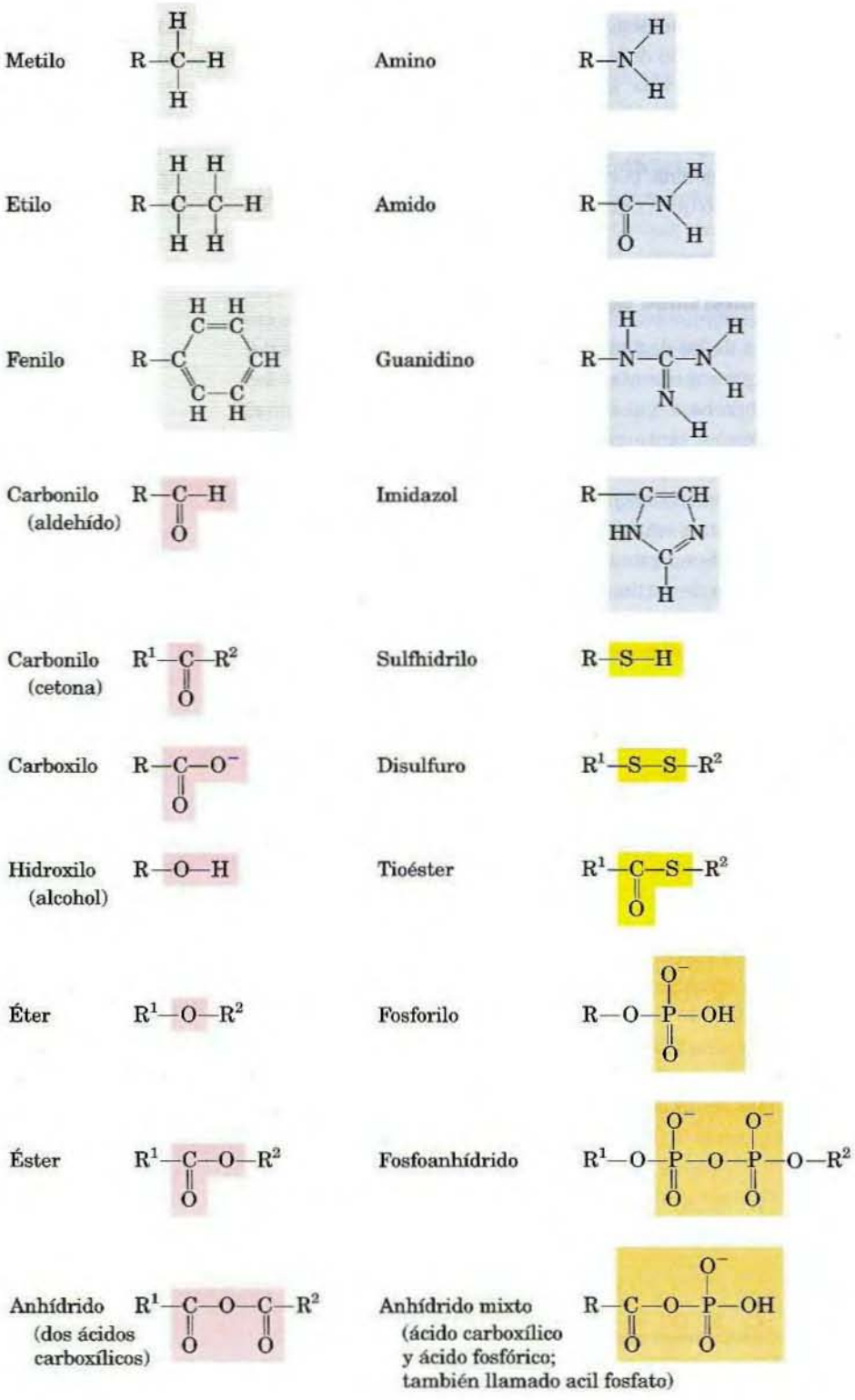


FIGURA 1-15 Algunos grupos funcionales comunes de las biomoléculas. En esta figura, así como en otras a lo largo de todo el libro, se utiliza la R para representar un sustituyente cualquiera. Puede ser tan simple como un átomo de hidrógeno, pero normalmente es un grupo carbonado. Cuando se representan dos o más sustituyentes en una molécula, se emplea el superíndice R^1, R^2, etc.

Las células contienen un conjunto universal de moléculas pequeñas

En la fase acuosa de una célula (citosol) se encuentran disueltas de 100 a 200 pequeñas moléculas orgánicas diferentes (M_r ~100 a ~500), que son los metabolitos centrales de las rutas principales presentes en la práctica totalidad de las células –los metabolitos y rutas que se han conservado a lo largo de la evolución–. (En el Recuadro 1-1 se encuentra una explicación de las diversas maneras de referirse al peso molecular de una sustancia.) En este conjunto de moléculas se incluyen los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y sus derivados fosforilados y ciertos ácidos mono- di- y tricarboxílicos. Las moléculas son polares o cargadas, solubles en agua y se encuentran en concentraciones que van desde micromolar a milimolar. Se mantienen dentro de la célula porque la membrana plasmática es impermeable a ellas –aunque algunos transportadores específicos de membrana pueden catalizar el movimiento de ciertas moléculas hacia el interior o el exterior de la célula o entre compartimientos de las células eucarióticas–. La presen-

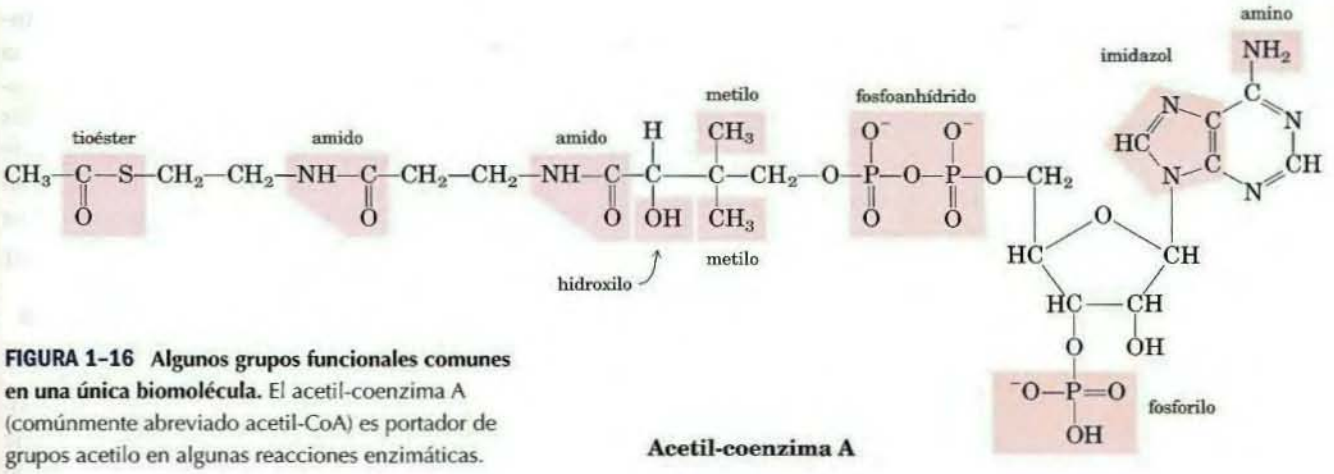


FIGURA 1-16 Algunos grupos funcionales comunes en una única biomolécula. El acetil-coenzima A (comúnmente abreviado acetil-CoA) es portador de grupos acetilo en algunas reacciones enzimáticas.

cia universal del mismo conjunto de compuestos en las células vivas es una manifestación de la universalidad del diseño metabólico y refleja la conservación evolutiva de las rutas metabólicas que se desarrollaron en las células primitivas.

Existen otras biomoléculas de pequeña masa molecular que son específicas para ciertos tipos de células u organismos. Por ejemplo, las plantas vasculares contienen, además de los metabolitos ya comentados de carácter universal, otras moléculas denominadas **metabolitos secundarios,** que juegan un papel específico en la vida de la planta. Entre estos metabolitos se incluyen compuestos que proporcionan a las plantas su aroma característico y otros como la morfina, quinina, nicotina y cafeína. El conjunto de pequeñas moléculas de una célula determinada ha recibido el nombre de **metaboloma** de la célula, sugiriendo un paralelismo con el término "genoma" (definido anteriormente y que se comentará más ampliamente en la Sección 1.4). Si supiéramos la composición del metaboloma de una célula, seríamos capaces de predecir qué enzimas y rutas metabólicas son activos en su interior.

Las macromoléculas son los principales constituyentes de las células

Gran parte de las moléculas biológicas son macromoléculas, polímeros de alta masa molecular construidos a partir de precursores relativamente simples. Las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos son el resultado de la polimerización de subunidades relativamente pequeñas de masa molecular relativa igual o inferior a 500. El número de unidades polimerizadas puede variar entre decenas y millones. La síntesis de macromoléculas es una de las actividades celulares que más energía consume. Las macromoléculas pueden formar luego es-

RECUADRO 1-1 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Peso molecular, masa molecular y las unidades que deben utilizarse

Existen dos maneras comunes y equivalentes de definir la masa molecular y ambas se utilizan en este texto. La primera es el *peso molecular*, o *masa molecular relativa*, representados por el símbolo M_r. El peso molecular de una sustancia se define como la relación entre la masa de una molécula de esta sustancia y la duodécima parte de la masa del carbono-12 (^{12}C). Al definirse como una relación entre dos valores con las mismas unidades, M_r no tiene dimensiones –no tiene unidades asociadas–. La segunda es la *masa molecular*, representada por m. Ésta es simplemente la masa de una molécula, o la masa molecular dividida por el número de Avogadro. La masa molecular, m, se expresa en daltons (abreviado Da). Un dalton equivale a una duodécima parte de la masa del carbono-12; un kilodalton (kDa) equivale a 1000 daltons y un megadalton (MDa) a un millón de daltons.

Considérese, por ejemplo, una molécula de masa 1000 veces la del agua. De esta molécula podemos decir lo siguiente: M_r = 18.000 o m = 18.000 daltons. También la podemos describir como "una molécula de 18 kDa". Sin embargo, la expresión M_r = 18.000 daltons es incorrecta.

Otra unidad que sirve para describir la masa de un único átomo o una única molécula es la unidad de masa atómica (anteriormente denominada uma, abreviatura que ahora ha sido cambiada por u). Una unidad de masa atómica (1 u) se define como la duodécima parte de la masa de un átomo de carbono-12. Puesto que la masa de un átomo de carbono-12 medida experimentalmente es de $1{,}9926 \times 10^{-23}$ g, 1 u = $1{,}6606 \times 10^{-24}$ g. La unidad de masa atómica resulta adecuada para describir, por ejemplo, la masa de un pico observado por espectrometría de masas (véase Recuadro 3-2).

TABLA 1-2 Componentes moleculares de una célula de *E. coli*

	Porcentaje de peso total de la célula	*Número aproximado de especies moleculares diferentes*
Agua	70	1
Proteínas	15	3000
Ácidos nucleicos		
DNA	1	1
RNA	6	>3000
Polisacáridos	3	5
Lípidos	2	20
Subunidades monoméricas e intermediarios	2	500
Iones inorgánicos	1	20

tructuras supramoleculares, dando lugar a unidades funcionales tales como los ribosomas. En la Tabla 1-2 se muestran las principales clases de biomoléculas de la bacteria *E. coli*.

Las **proteínas,** largos polímeros de aminoácidos, constituyen, excluyendo el agua, la fracción celular más importante. Algunas proteínas tienen propiedades catalíticas y actúan como enzimas, otras sirven como elementos estructurales, receptores de señales o transportadores que acarrean sustancias específicas hacia o desde el interior de las células. Las proteínas son quizá las biomoléculas más versátiles. Los **ácidos nucleicos,** DNA y RNA, son polímeros de nucleótidos. Almacenan y transmiten la información genética y algunas moléculas de RNA desempeñan papeles estructurales y catalíticos en complejos supramoleculares. Los **polisacáridos,** polímeros de azúcares simples como la glucosa, tienen dos funciones: sirven como almacén de combustibles energéticos y como elementos estructurales extracelulares que proporcionan sitios de fijación específicos para determinadas proteínas. Los polímeros más cortos de azúcares (oligosacáridos) actúan como señales específicas cuando se presentan unidos a proteínas o lípidos de la superficie celular. Los **lípidos,** derivados grasos o aceitosos de hidrocarburos, sirven como componentes estructurales de las membranas, reserva de combustible rico en energía, pigmentos y señales intracelulares. En proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos el número de subunidades monoméricas es muy grande: la masa molecular relativa de las proteínas oscila entre 5000 y más de 1 millón, es de hasta varios miles de millones en ácidos nucleicos y del orden de millones en polisacáridos como el almidón. Las moléculas individuales de lípido son mucho más pequeñas (M_r 750 a 1500) y no se consideran macromoléculas. Pero la asociación no covalente de un gran número de moléculas de lípido produce la formación de estructuras de gran tamaño. Las membranas celulares se construyen a partir de enormes agregados no covalentes de moléculas de lípidos y de proteínas.

Las proteínas y los ácidos nucleicos son **moléculas informativas:** cada proteína y cada ácido nucleico posee una secuencia característica rica en información. Algunos oligosacáridos de estructura ramificada y formados por seis o más azúcares diferentes son también moléculas portadoras de información y actúan en la superficie celular externa como puntos altamente específicos de reconocimiento en muchos procesos celulares (como se describirá en el Capítulo 7).

La estructura tridimensional se describe en términos de configuración y conformación

Los enlaces covalentes y los grupos funcionales de las biomoléculas son de importancia central para su función, al igual que la distribución de los átomos de una biomolécula en el espacio tridimensional (su estereoquímica). Los compuestos de carbono existen normalmente como **estereoisómeros,** moléculas que contienen los mismos enlaces químicos pero con una estereoquímica diferente, es decir, con diferente **configuración** o relación espacial entre sus átomos constituyentes. Las interacciones entre las biomoléculas son invariablemente **estereoespecíficas,** lo que implica que las moléculas que interactúan deben tener una estereoquímica concreta.

La Figura 1-17 muestra tres formas de ilustrar la estructura estereoquímica de moléculas simples. El diagrama en

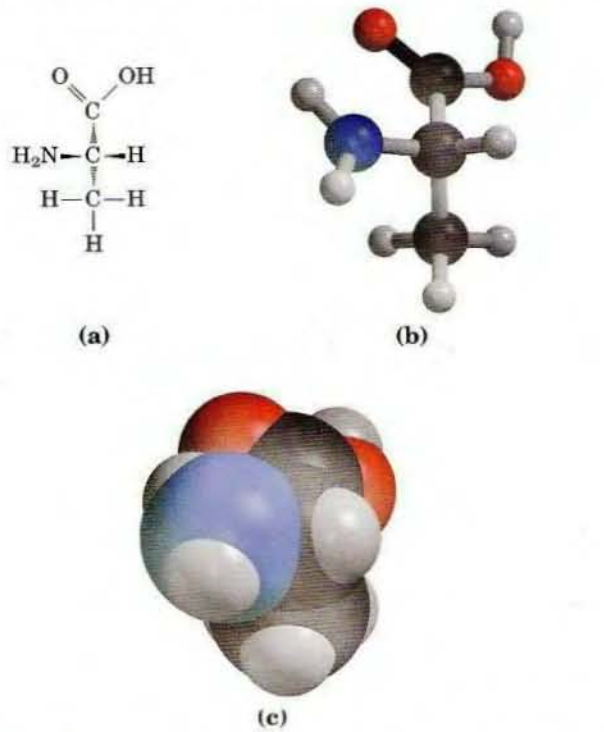
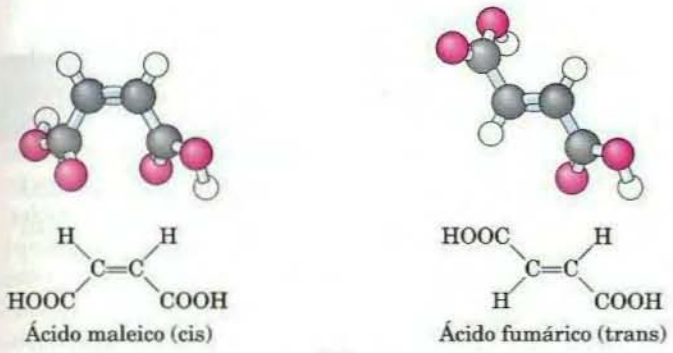


FIGURA 1-17 Representación de moléculas. Tres maneras de representar la estructura del aminoácido alanina. **(a)** Fórmula estructural en perspectiva: el símbolo (—) representa un enlace en el que el átomo del extremo más ancho se proyecta hacia el exterior del plano del papel y hacia el lector; el símbolo (⋯) representa enlaces que están dirigidos hacia la parte posterior del plano del papel. **(b)** Modelo de bolas y varillas, donde se observan las longitudes relativas de los enlaces y los ángulos de enlace. **(c)** Modelo espacial lleno, en el que cada átomo se presenta con su radio de van der Waals.



(a)

11-*cis*-Retinal

Todo-*trans*-Retinal

(b)

FIGURA 1-18 Configuraciones de isómeros geométricos. (a) Los isómeros como el ácido maleico y el ácido fumárico no pueden interconvertirse sin la rotura de enlaces covalentes, proceso que consume mucha energía. **(b)** En la retina de los vertebrados, el paso inicial del proceso de detección de la luz es la absorción de la luz visible por parte del 11-*cis*-retinal. La energía de la luz absorbida (aproximadamente 250 kJ/mol) convierte el 11-*cis*-retinal en todo-*trans*-retinal, lo que produce variaciones eléctricas en las células de la retina que dan lugar al impulso nervioso. (Obsérvese que en los modelos de bolas y varillas de los retinales se omiten los átomos de hidrógeno.)

perspectiva especifica la estereoquímica de forma no ambigua, pero los ángulos y las distancias de enlace se representan mejor con modelos de bolas y varillas. En los modelos espacialmente llenos el radio de cada átomo es proporcional a su radio de van der Waals y los contornos del modelo definen el espacio ocupado por la molécula.

La configuración es el resultado de la presencia de (1) enlaces dobles, alrededor de los cuales no existe libertad de rotación, o (2) centros quirales, alrededor de los cuales los grupos sustituyentes se disponen según una secuencia específica. La característica que identifica a los isómeros configuracionales es que no pueden ser interconvertidos sin romper temporalmente uno o más enlaces covalentes. La Figura 1-18a muestra las configuraciones del ácido maleico y de su isómero, el ácido fumárico. Estos compuestos son **isómeros geométricos** o **cis-trans;** difieren en la disposición de sus grupos sustituyentes con respecto al doble enlace que no posee capacidad de rotación (del latín *cis*, "a este lado" –los grupos se encuentran en el mismo lado del enlace doble; *trans*, "al otro lado"– los grupos se hallan en lados opuestos). El ácido maleico es el isómero cis y el ácido fumárico es el trans; cada uno de ellos es un compuesto bien definido que puede ser aislado y purificado, teniendo cada uno de ellos sus propias características químicas. Un sitio de unión (por ejemplo, en un enzima) que sea complementario para una de estas moléculas no lo será para la otra, lo cual explica por qué estos dos compuestos tienen papeles biológicos diferentes a pesar de ser químicamente muy parecidos.

En el segundo tipo de isomería configuracional, los cuatro sustituyentes diferentes unidos a un átomo de carbono tetraédrico pueden ordenarse en el espacio de dos maneras diferentes (tener dos configuraciones, Fig. 1-19), dando lugar a dos estereoisómeros con propiedades químicas similares o idénticas, pero que difieren en algunas propiedades físicas y biológicas. Se dice que un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes es asimétrico y los carbonos asimétricos se denominan **centros quirales** (del griego *chiros*, "mano"). Una molécula con un solo carbono quiral puede tener dos estereoisómeros, mientras que puede haber 2^n estereoisómeros cuando los carbonos quirales son dos o más (n). Algunos estereoisómeros son imágenes especulares uno del otro; son los llamados **enantiómeros** (Fig. 1-19). Las parejas de estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan **diastereómeros** (Fig. 1-20).

Tal como observó Louis Pasteur (Recuadro 1-2), los enantiómeros tienen propiedades químicas casi idénticas pero se diferencian en una propiedad física característica, su interacción con la luz polarizada. En soluciones separadas, los dos enantiómeros rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, pero soluciones equimolares de los dos enantiómeros **(mezclas racémicas)** no provocan rotación óptica. Los compuestos sin centros quirales no rotan la luz polarizada.

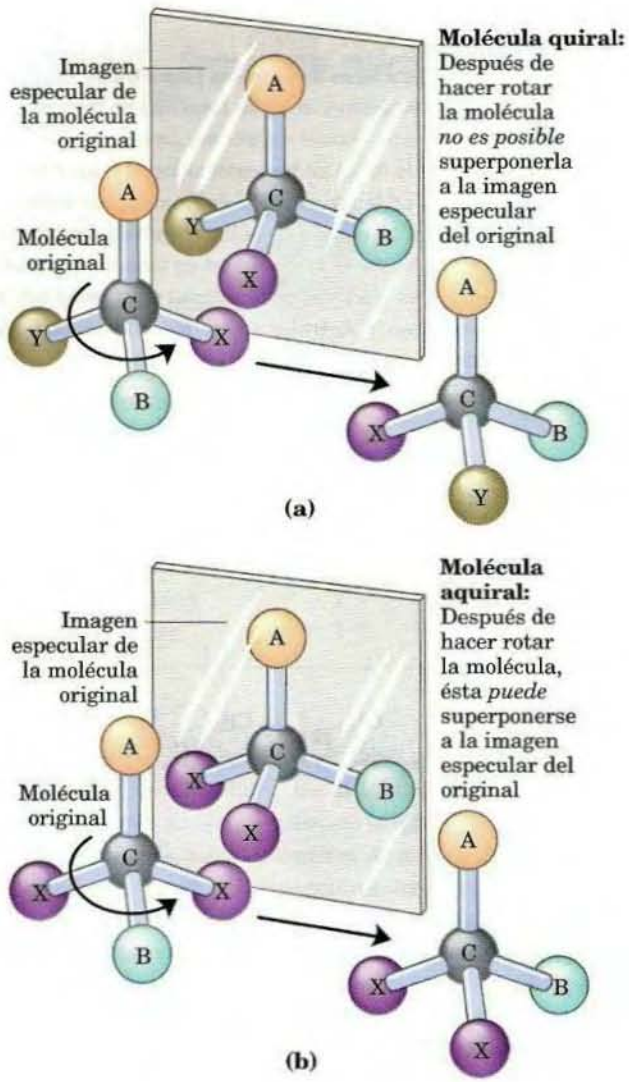


FIGURA 1-19 Asimetría molecular: moléculas quirales y aquirales. **(a)** Cuando un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes (A, B, X, Y), éstos pueden disponerse de dos maneras diferentes, que dan lugar a dos moléculas no superponibles, siendo cada una de ellas la imagen especular de la otra (enantiómeros). Estos átomos de carbono asimétricos se denominan átomos quirales o centros quirales. **(b)** Cuando alrededor del átomo de carbono tetraédrico se disponen únicamente tres sustituyentes diferentes (es decir, hay dos sustituyentes iguales), solamente es posible una configuración espacial y la molécula es simétrica o aquiral. En este caso la molécula puede superponerse a su imagen especular: la molécula de la izquierda, rotando en sentido contrario a las agujas del reloj (cuando se mira hacia abajo por el eje vertical que une A y C), da lugar a la molécula del espejo.

Dada la importancia de la estereoquímica en las reacciones entre biomoléculas (como se verá más adelante), el bioquímico debe poder denominar y representar la estructura de las biomoléculas de modo que su estereoquímica quede definida sin ambigüedad. El sistema de nomenclatura RS es el más útil para compuestos con más de un centro quiral. En este sistema se asigna una *prioridad* a cada uno de los grupos unidos a un carbono quiral. La prioridad para algunos sustituyentes comunes es la siguiente.

$$-OCH_2 > -OH > -NH_2 > -COOH > -CHO > -CH_2OH > -CH_3 > -H$$

Según el sistema RS, el átomo quiral ha de mirarse de modo que el grupo de prioridad más baja (4 en el diagrama de la página siguiente) quede situado en dirección opuesta al observador. Si la prioridad de los otros tres grupos (1 a 3) disminuye según el sentido de las agujas del reloj, la configuración será (*R*) (del latín *rectus*, "derecha") y si va en contra del sen-

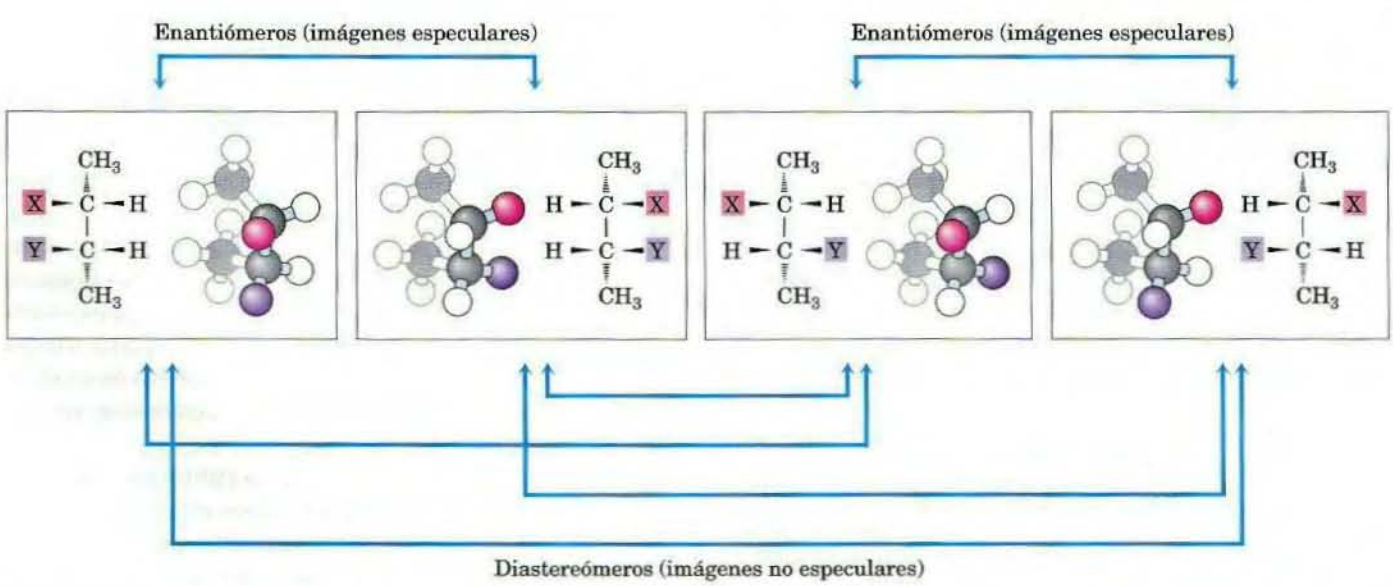


FIGURA 1-20 Dos tipos de estereoisómeros. Hay cuatro butanos diferentes 2,3-bisustituidos ($n=2$ carbonos asimétricos, por consiguiente $2^n = 4$ estereoisómeros). Cada uno de ellos se muestra en un recuadro como una fórmula en perspectiva y como un modelo de bolas y varillas, el cual se ha rotado para permitir que el lector vea todos los grupos. Algunos pares de estereoisómeros son imágenes especulares uno del otro, siendo por tanto enantiómeros. Otros pares no son imágenes especulares y reciben el nombre de diastereómeros.

RECUADRO 1–2 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

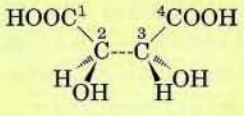
Louis Pasteur y la actividad óptica: *in vino, veritas*

Louis Pasteur fue, en 1843, el primero en encontrar una explicación correcta para el fenómeno de la **actividad óptica.** Investigando sobre el sedimento cristalino que se acumulaba en los barriles de vino (una forma del ácido tartárico denominada ácido paratartárico, también conocido como ácido racémico, del latín *racemus* "racimo de uva"). Utilizó unas pinzas muy finas para separar dos tipos de cristales cuya forma era idéntica pero de los que cada uno de ellos era la imagen especular del otro. Ambos poseían todas las propiedades químicas del ácido tartárico pero, al disolverlos, uno de ellos hacía rotar la luz polarizada hacia la izquierda (levógiro) y el otro hacia la derecha (dextrógiro). Pasteur describió e interpretó el experimento de este modo:

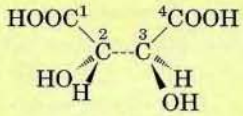
Louis Pasteur
1822–1895

> En los cuerpos isoméricos, los elementos y las proporciones en las que están combinados son los mismos, tan sólo la disposición de los átomos es diferente... Sabemos, por un lado, que las disposiciones moleculares de los dos ácidos tartáricos son asimétricas y, por el otro, que estas disposiciones son absolutamente idénticas, a excepción de que exhiben asimetría en direcciones opuestas. ¿Se encuentran los átomos del ácido dextro agrupados en forma de una espiral dextrógira, situados en el ápice de un tetraedro irregular, o bien ordenados según ésta o aquella disposición asimétrica? No lo sabemos.*

Ahora podemos dar una respuesta. Los estudios cristalográficos con rayos X confirmaron en 1951 que las formas levógira y dextrógira del ácido tartárico son entre ellas imágenes especulares y permitieron establecer la configuración absoluta de cada una de ellas (Fig. 1). Se ha utilizado la misma metodología para demostrar que, aunque el aminoácido alanina existe en dos formas enantioméricas (denominadas D y L), en las proteínas la alanina se presenta sólo en una de las formas (el isómero L; véase Capítulo 3).



Ácido (2*R*,3*R*)-tartárico
(dextrógiro)

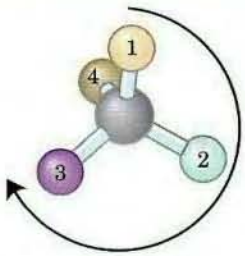


Ácido (2*S*,3*S*)-tartárico
(levógiro)

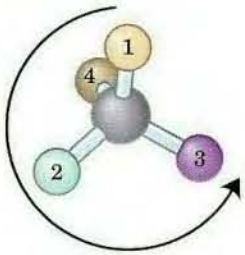
FIGURA 1 Pasteur separó cristales de dos estereoisómeros del ácido tartárico y demostró que las disoluciones de los dos compuestos por separado daban lugar al mismo grado de rotación de luz polarizada pero en direcciones opuestas. Más tarde se demostró que las formas dextrógira y levógira de Pasteur correspondían a las formas isoméricas (*R,R*) y (*S,S*) aquí mostradas. En el texto se describe el sistema de nomenclatura RS.

*Extraído de la conferencia de Pasteur en la Société Chimique de Paris en 1887, citada en DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science,* p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

tido de las agujas del reloj la configuración será (*S*) (del latín *sinister*, "izquierda"). De esta manera cada carbono quiral es llamado (*R*) o (*S*) y la presencia de esas designaciones en el nombre del compuesto proporciona una descripción inequívoca de la estereoquímica de cada centro quiral.

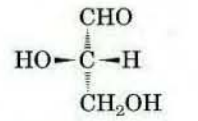


Dextrógiro
(*R*)



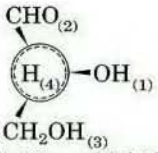
Levógiro
(*S*)

En el Capítulo 3 se describe otro sistema de nomenclatura, el sistema D y L. Una molécula con un solo centro quiral (como el gliceraldehído) recibe un nombre no ambiguo con cualquiera de los dos sistemas.



L-Gliceraldehído

≡



(*S*)-Gliceraldehído

El concepto de **conformación** molecular describe la disposición espacial de los grupos sustituyentes que tienen libertad para adoptar diferentes posiciones en el espacio sin necesidad de romper enlaces, gracias a su libertad de rotación. Así, en el etano, un hidrocarburo sencillo, existe libertad casi total de rotación alrededor del enlace simple carbono-carbono. Por lo tanto, son posibles muchas conformaciones diferentes e interconvertibles de la molécula de etano, según el grado de rotación del enlace (Fig. 1-21). Dos conformaciones son de especial interés: la extendida, más estable que las demás y por tanto la predominante, y la forma eclipsada, la menos estable. No es posible aislar ninguna de estas dos formas conformacionales puesto que se hallan en equilibrio y son interconverti-

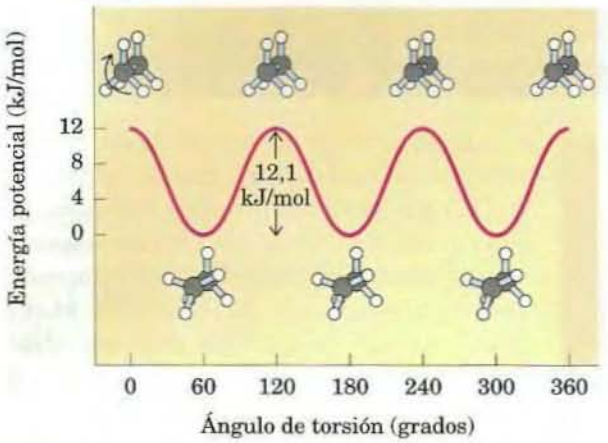


FIGURA 1-21 Conformaciones. El etano tiene muchas conformaciones posibles al existir libertad de rotación alrededor del enlace simple carbono-carbono. En el modelo de bolas y varillas, cuando el átomo de carbono anterior (desde el punto de vista del lector) y sus tres átomos de hidrógeno rotan con relación al átomo de carbono posterior, la energía potencial de la molécula aumenta hasta un máximo en la conformación completamente eclipsada (ángulos de torsión de 0°, 120°, etc.) y disminuye hasta el mínimo en la conformación completamente extendida (ángulos de torsión de 60°, 180°, etc.). Las diferencias de energía son lo suficientemente pequeñas como para permitir la rápida interconversión de las dos formas, por lo que resulta imposible aislar las formas eclipsada y extendida.

FIGURA 1-22 Encaje complementario de una macromolécula y una molécula pequeña. La figura muestra un segmento de RNA de la región reguladora TAR del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (en gris) unido a una molécula de argininamida (en color), representando un residuo de una proteína que se une a esta región. La argininamida se ajusta a una cavidad de la superficie del RNA y se mantiene en esta orientación mediante varias interacciones no covalentes con éste. Esta representación de la molécula de RNA esta generada con el programa informático GRASP, que puede calcular la forma de la superficie externa de una macromolécula, definida por los radios de van der Waals de todos los átomos de la molécula o por el "volumen de exclusión del solvente", más allá del cual no puede penetrar una molécula de agua.

bles. Sin embargo, cuando se reemplazan uno o más átomos de hidrógeno de cada uno de los carbonos con grupos funcionales voluminosos o cargados eléctricamente, la libertad de rotación alrededor del enlace carbono-carbono queda restringida. Ello limita el número de conformaciones estables de los derivados del etano.

Las interacciones entre las biomoléculas son estereoespecíficas

Las interacciones biológicas entre moléculas son estereoespecíficas: su "encaje" debe ser correcto estereoquímicamente. La estructura tridimensional de las biomoléculas grandes y pequeñas es de importancia primordial en sus interacciones biológicas: un reactivo con su enzima, una hormona con su receptor de membrana celular, un antígeno con su anticuerpo específico son ejemplos de ello (Fig. 1-22). El estudio de la estereoquímica biomolecular mediante métodos físicos precisos constituye una parte importante de la moderna investigación sobre estructura celular y función bioquímica.

Las moléculas quirales de los organismos vivos se encuentran generalmente presentes en sólo una de sus formas quirales. Por ejemplo, los aminoácidos están presentes en las proteínas sólo como isómeros L; la glucosa, tan sólo en forma de su isómero D. (En el Capítulo 3 se describen las convenciones para denominar los estereoisómeros de los aminoácidos; las correspondientes a los glúcidos se describen en el Capítulo 7; el sistema RS, descrito anteriormente, es el más útil para algunas biomoléculas.) En cambio, cuando un compuesto que posee un átomo de carbono asimétrico se sintetiza químicamente en el laboratorio, la reacción suele producir todas las formas quirales posibles, formando, por ejemplo, una mezcla de formas D y L. En las células vivas se produce una sola forma quiral gracias a que los enzimas que sintetizan los compuestos quirales son también, a su vez, moléculas quirales.

La estereoespecificidad, o capacidad de distinguir entre estereoisómeros, es una propiedad de los enzimas y otras proteínas y un rasgo característico de la lógica molecular de las células vivas. Si el sitio de unión en una proteína es complementario para un isómero de un compuesto quiral, no será complementario para el otro isómero. En la Figura 1-23 se muestran dos notables ejemplos de la capacidad de los sistemas biológicos para distinguir estereoisómeros.

RESUMEN 1.2 Fundamentos químicos

- Gracias a su versatilidad de enlace, el átomo de carbono puede producir una amplia variedad de esqueletos carbono-carbono con diversidad de grupos funcionales; estos grupos son los que confieren su personalidad biológica y química a las biomoléculas.
- Las células vivas contienen un conjunto casi universal compuesto por unos centenares de moléculas de baja masa molecular; las interconversiones de estas moléculas en las rutas metabólicas centrales se han conservado a lo largo de la evolución.
- Las proteínas y los ácidos nucleicos son polímeros lineales de subunidades monoméricas simples; sus

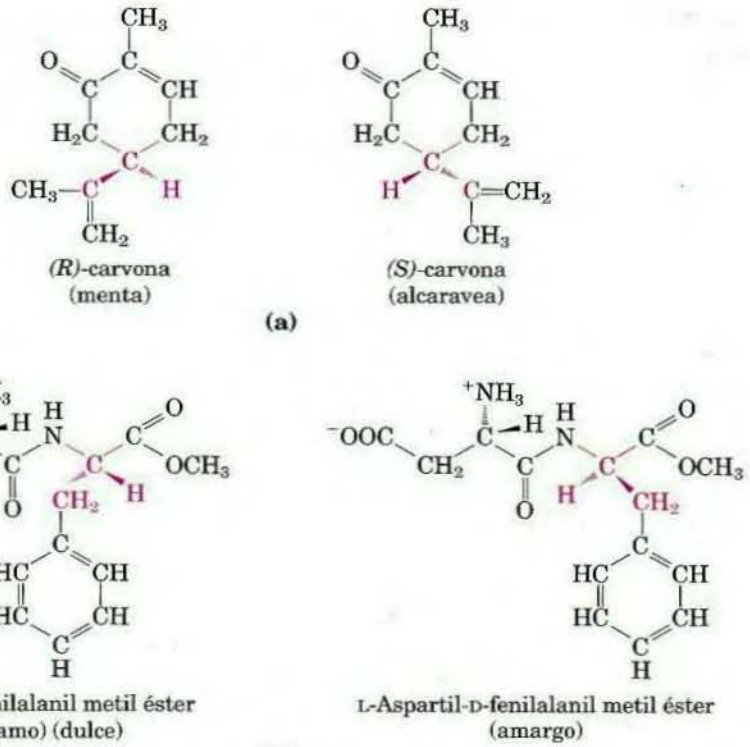


FIGURA 1-23 Estereoisómeros distinguibles por receptores sensoriales del gusto y olfato humanos. **(a)** Dos estereoisómeros de la carvona: la (*R*)-carvona (aislada del aceite de menta) posee la fragancia característica de la menta; la (*S*)-carvona (de aceite de semillas de alcaravea) huele a alcaravea. **(b)** El aspartamo, el edulcorante comercializado con el nombre de NutraSweet, se distingue fácilmente de su estereoisómero amargo, a pesar de que sus conformaciones difieren tan sólo en uno de los dos átomos de carbono quirales.

secuencias contienen la información para definir su estructura tridimensional y sus funciones biológicas.

- La única manera de cambiar la configuración molecular es mediante la rotura de enlaces covalentes. Si un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes (un carbono quiral), éstos pueden ordenarse de dos modos diferentes, generando estereoisómeros con propiedades diferentes. Sólo uno de los estereoisómeros es biológicamente activo. La conformación molecular es la posición de los átomos en el espacio resultante de la rotación alrededor de enlaces simples y sin que implique la rotura de enlaces covalentes.
- De modo prácticamente invariable, las interacciones entre moléculas biológicas son estereoespecíficas: requieren el encaje complementario entre las moléculas que interactúan.

1.3 Fundamentos físicos

Las células y organismos deben realizar trabajo para mantenerse vivas y reproducirse. Las reacciones sintéticas celulares requieren aporte de energía del mismo modo que los procesos sintéticos industriales. También se consume energía en el movimiento de una bacteria, en el destello de una luciérnaga o en la descarga eléctrica de una anguila. Además, el almacenaje y la expresión de la información tienen un coste energético, sin el cual las estructuras ricas en información perderían inevitablemente su orden y, por ende, su significado.

Las células han desarrollado, a lo largo de la evolución, mecanismos muy eficientes para el acoplamiento de la energía obtenida de la luz solar o de los combustibles con muchos procesos celulares que consumen energía. Uno de los objetivos de la bioquímica es la comprensión, en términos químicos y cuantitativos, de los mecanismos de extracción, canalización y consumo de la energía en las células vivas. Podemos considerar las conversiones de la energía celular en el contexto de las leyes de la termodinámica.

Los organismos vivos existen en un estado estacionario dinámico y no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno

Las moléculas y los iones contenidos en un organismo vivo difieren en cuanto a tipo y concentración de los que se encuentran en su entorno. Un *Paramecium* en una charca, un eritrocito en el torrente sanguíneo humano o un manzano en un jardín son ejemplos de organismos que tienen una composición diferente a la de su entorno y que, una vez maduros, mantienen (en una primera aproximación) una composición constante a pesar de que su entorno cambie constantemente.

A pesar de que la composición química característica de un organismo varía poco a lo largo del tiempo, la población de moléculas de una célula u organismo se encuentra bien lejos de ser estática. Continuamente se sintetizan y se degradan pequeñas moléculas, macromoléculas y complejos supramoleculares mediante reacciones químicas que necesitan de un flujo constante de masa y energía a través del sistema. Las moléculas de hemoglobina que están transportando en este momento oxígeno desde nuestros pulmones a nuestro cerebro se sintetizaron el mes pasado; dentro de un mes se habrán degradado y habrán sido reemplazadas por nuevas moléculas de hemoglobina. La glucosa que ingerimos en la última comida se encuentra ahora

circulando por nuestro torrente sanguíneo; antes de que termine el día estas mismas moléculas de glucosa se habrán convertido en dióxido de carbono o grasa y habrán sido reemplazadas por un suministro fresco de glucosa, de modo que nuestra concentración de glucosa en sangre se mantenga más o menos constante a lo largo del día. La cantidad de hemoglobina y glucosa en sangre permanece prácticamente constante porque la velocidad de síntesis o ingestión de cada una de ellas compensa con exactitud la velocidad de su degradación, consumo o conversión en algún otro producto. La constancia en la concentración es el resultado de un *estado estacionario dinámico*, un estado estacionario que se encuentra lejos del equilibrio. El mantenimiento de este estado estacionario requiere el aporte constante de energía; cuando la célula ya no es capaz de generar energía, muere e inicia su degradación hacia el equilibrio con su entorno. A continuación veremos qué es lo que se conoce exactamente como "estado estacionario" y "equilibrio".

Los organismos transforman energía y materia de su entorno

Para las reacciones químicas que tienen lugar en solución, podemos definir un **sistema** como el conjunto de los reactivos y productos presentes, el disolvente que los contiene y la atmósfera circundante o, dicho de otro modo, todo aquello que está incluido en una región definida del espacio. El conjunto del sistema y su entorno configura el **universo.** Si el sistema no intercambia materia ni energía con su entorno, se denomina **aislado.** Si el sistema intercambia energía pero no materia con su entorno es un sistema **cerrado;** si intercambia materia y energía, es un sistema **abierto.**

Un organismo vivo es un sistema abierto que intercambia materia y energía con su entorno. Los organismos vivos extraen energía de su entorno de dos maneras: (1) captan combustibles químicos (como por ejemplo glucosa) del entorno y extraen energía de su oxidación (véase Recuadro 1-3, Caso 2); o (2) absorben energía de la luz solar.

La primera ley de la termodinámica, desarrollada a partir de la física y de la química pero plenamente válida para sistemas biológicos, describe el principio de conservación de la energía: *en cualquier proceso físico o químico la cantidad de energía total del universo permanece constante, aunque su forma puede variar.* Las células son consumados transductores de energía, capaces de interconvertir energía química, electromagnética, mecánica y osmótica con gran eficiencia (Fig 1-24).

El flujo de electrones proporciona energía para los organismos

Prácticamente todos los organismos vivos derivan su energía, directa o indirectamente, de la energía radiante de la luz solar que proviene de las reacciones de fusión termonuclear que se producen en el sol. Las células fotosintéticas absorben la energía luminosa del sol y la utilizan para dirigir los electrones desde el agua al dióxido de carbono, dando lugar a compuestos ricos en energía tales como glucosa ($C_6H_{12}O_6$), almidón y sacarosa, y liberando O_2 a la atmósfera:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

(reducción del CO_2 por acción de la energía luminosa)

La células y los organismos no fotosintéticos obtienen energía para sus necesidades mediante la oxidación de los productos ricos en energía de la fotosíntesis, transportando electrones hacia

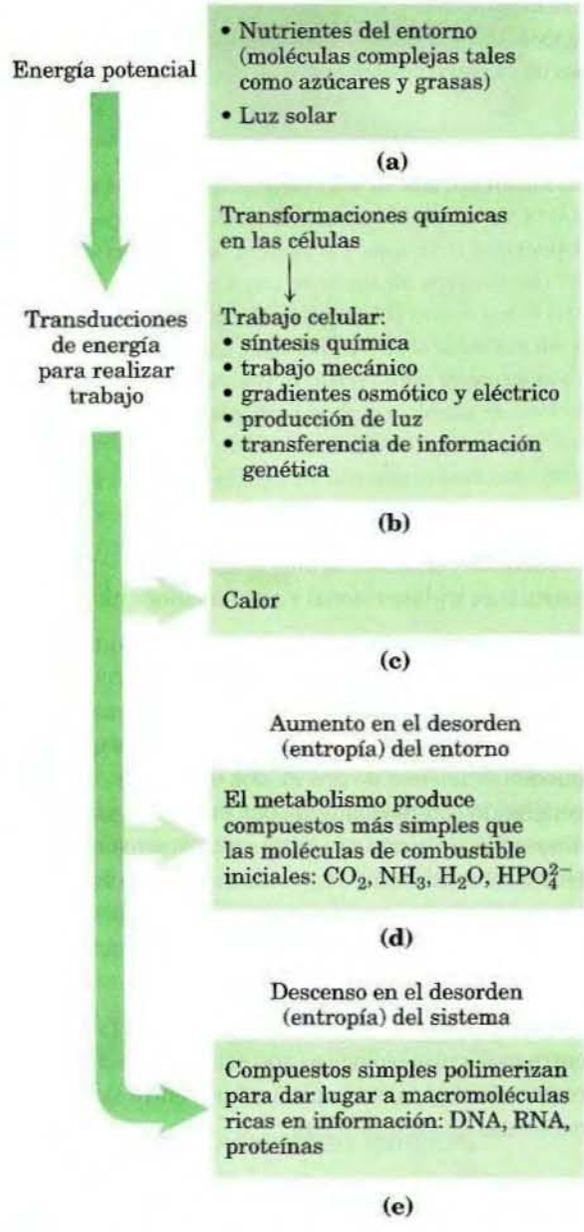


FIGURA 1-24 Algunas interconversiones de energía en los organismos vivos. Durante las transducciones metabólicas de energía, el desorden del sistema y de su entorno (entropía) aumenta a la vez que la energía potencial de las moléculas nutrientes complejas disminuye. **(a)** Los organismos vivos extraen energía de su entorno, **(b)** convierten una parte de ella en formas útiles para producir trabajo; **(c)** devuelven una parte al entorno en forma de calor y **(d)** liberan moléculas como productos finales menos organizadas que el combustible original, aumentando la entropía del universo. Como consecuencia de todas estas transformaciones **(e)** aumenta el orden (disminuye el desorden) en el sistema mediante la formación de macromoléculas complejas. El Capítulo 13 hace un tratamiento cuantitativo de la entropía.

el O_2 atmosférico para formar agua, dióxido de carbono y otros productos finales, que son reciclados en el medio ambiente:

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía}$$

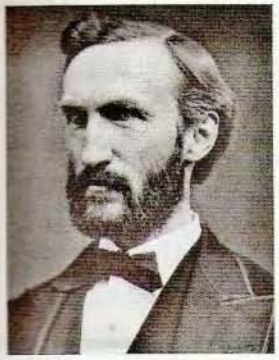
(reacción de oxidación de la glucosa que produce energía)

Prácticamente todas las transducciones energéticas de las células pueden entenderse como un flujo de electrones desde una molécula a otra, en un proceso "cuesta abajo" desde potenciales electroquímicos superiores a inferiores; siendo así, esto es formalmente análogo al flujo de electrones en un circuito eléctrico alimentado por una batería eléctrica. Todas las reacciones que implican un flujo de electrones son **reacciones de oxidación-reducción:** un reactivo se oxida (pierde electrones) y otro se reduce (gana electrones).

Crear y mantener el orden requiere trabajo y energía

El DNA, el RNA y las proteínas son macromoléculas informativas. Además de usar energía química para formar los enlaces covalentes entre las subunidades de estos polímeros, las células deben invertir energía para ordenar las subunidades en su secuencia correcta. Es extremadamente improbable que los aminoácidos de una mezcla se condensen espontáneamente para formar una proteína de secuencia única. Ello implicaría un aumento del orden en una población de moléculas, lo que contrastaría con la segunda ley de la termodinámica según la cual la tendencia de cualquier proceso natural es la de incrementar el desorden del universo: *la entropía total del universo está en constante crecimiento*. Para dar lugar a la síntesis de macromoléculas a partir de sus subunidades monoméricas debe suministrarse energía libre al sistema, en este caso, la célula.

El desorden de los componentes de un sistema químico se expresa como **entropía, *S*** (Recuadro 1-3). Cualquier variación en el grado de desorden de un sistema equivale a una variación de entropía, ΔS, que, convencionalmente, adopta valores positivos cuando aumenta el desorden. J. Willard Gibbs, que desarrolló la teoría de las variaciones energéticas durante las reacciones químicas, demostró que el **contenido en energía libre, *G***, de cualquier sistema cerrado puede definirse a partir de tres magnitudes: **entalpía, *H***, que refleja el número y el tipo de enlaces; entropía, S; y la temperatura absoluta, T (en grados Kelvin). La definición de energía libre es: $G = H - TS$. Si una reacción química tiene lugar a temperatura constante, la **variación de energía libre, ΔG,** viene determinada por la variación de entalpía, ΔH, que refleja el tipo y la cantidad de enlaces químicos e interacciones no covalentes que se rompen y forman, y la variación de entropía, ΔS, que describe el cambio en el grado de desorden del sistema:



J. Willard Gibbs, 1839–1903

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$$

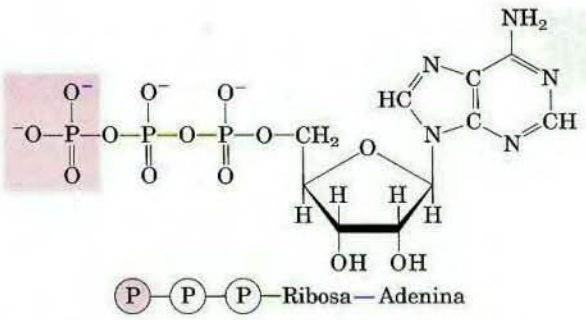


FIGURA 1-25 Adenosina trifosfato (ATP). La eliminación del fosfato terminal de ATP (en rosa) mediante rotura de un enlace fosfoanhídrido es altamente exergónica y se acopla a muchas reacciones endergónicas en la célula (como en el ejemplo de la Figura 1-26b).

Un proceso tiende a ocurrir espontáneamente sólo si ΔG es negativa. No obstante, la función celular depende principalmente de moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, para las que la energía libre de formación es positiva: son menos estables y más ordenadas que una mezcla de sus componentes monoméricos. Para llevar a cabo estas reacciones que requieren energía **(endergónicas),** la célula las acopla a otras que desprenden energía libre (reacciones **exergónicas**), de modo que el proceso sea globalmente exergónico: la *suma* de las variaciones de energía libre es negativa. La fuente habitual de energía libre en las reacciones biológicas acopladas es la energía liberada por la hidrólisis de enlaces fosfoanhídrido tales como los que se encuentran en la molécula de adenosina trifosfato (ATP; Fig. 1-25, véase también Fig. 1-15). Aquí, cada Ⓟ representa un grupo fosforilo:

Aminoácidos ⟶ polímero $\quad \Delta G_1$ es positiva (endergónica)

—Ⓟ—Ⓟ ⟶ —Ⓟ + Ⓟ $\quad \Delta G_2$ es negativa (exergónica)

Cuando estas reacciones están acopladas, la suma de ΔG_1 y ΔG_2 es negativa (el proceso global es exergónico). Mediante esta estrategia, la célula puede sintetizar y mantener los polímeros ricos en información esenciales para la vida.

El acoplamiento energético conecta las reacciones biológicas

La cuestión central de la *bioenergética* es el modo mediante el cual la energía obtenida de la luz o del metabolismo de los combustibles se acopla a la energía requerida por las reacciones celulares. Para comprender el acoplamiento de la energía es instructivo considerar un ejemplo mecánico simple como el mostrado en la Figura 1-26a. Un objeto situado en la parte superior de un plano inclinado posee una cierta cantidad de energía potencial como resultado de su elevación. Tiende a deslizarse por el plano, perdiendo su energía potencial al acercarse al suelo. Si al objeto deslizante se le acopla, mediante un mecanismo de cuerda y polea, un objeto más pequeño, el movimiento espontáneo hacia abajo del más grande puede hacer elevar al mas pequeño, realizándose trabajo. La cantidad de energía transformable en trabajo es la **variación en energía libre, ΔG**; este

RECUADRO 1-3 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Entropía: las ventajas de estar desorganizado

El término entropía, que literalmente significa "cambio en el interior", fue utilizado por primera vez en 1851 por Rudolf Clausius, uno de los autores que formularon la segunda ley de la termodinámica. La definición cuantitativa rigurosa de la entropía implica consideraciones estadísticas y probabilísticas. No obstante, se puede ilustrar su naturaleza de forma cualitativa con tres ejemplos sencillos, cada uno de los cuales muestra un aspecto de la entropía. Los rasgos clave que describen la entropía son *azar* y *desorden*, que se manifiestan en formas diversas.

Caso 1: La tetera y la distribución aleatoria del calor

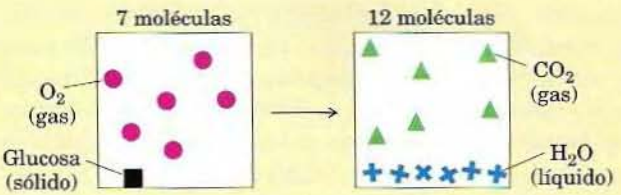
Sabemos que el vapor que se genera a partir del agua en ebullición puede realizar trabajo útil. Pero supongamos que apagamos el fogón debajo de una tetera llena de agua a 100 °C (el "sistema") en la cocina (el "entorno") y la dejamos enfriar. A medida que se enfría, no se produce trabajo, pero el calor pasará de la tetera al entorno, elevando la temperatura del entorno (la cocina) en una cantidad infinitesimalmente pequeña hasta alcanzar el equilibrio completo. En este momento todas las partes de la tetera y de la cocina estarán exactamente a la misma temperatura. La energía libre que en un momento estaba concentrada en la tetera de agua caliente a 100 °C, *potencialmente* capaz de realizar trabajo, ha desaparecido. Su equivalente en energía calórica está aún presente en la tetera + cocina, es decir, el "universo", pero se ha distribuido por completo aleatoriamente en todo el mismo. Esta energía ya no sirve para realizar trabajo porque no hay diferencial de temperatura dentro de la cocina. Además, el aumento de entropía de la cocina (el entorno) es irreversible. Sabemos por experiencia que el calor nunca vuelve atrás espontáneamente desde la cocina a la tetera para volver a elevar la temperatura del agua a 100 °C.

Caso 2: Oxidación de la glucosa

La entropía es un estado no sólo de la energía sino también de la materia. Los organismos aeróbicos (heterótrofos) extraen energía libre de la glucosa obtenida de su entorno a través de la oxidación de la glucosa con O_2, también obtenido del entorno. Los productos finales de este metabolismo oxidativo, CO_2 y H_2O, son devueltos al entorno. En este proceso el entorno experimenta un incremento de entropía, mientras que el propio organismo permanece en estado estacionario y no experimenta ningún cambio en su orden interno. Aunque parte de la entropía surge de la disipación de calor, la entropía también proviene de otro tipo de desorden, ilustrado por la ecuación de la oxidación de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

que podemos representar de manera esquemática como



Los átomos contenidos en una molécula de glucosa más 6 moléculas de oxígeno, un total de 7 moléculas, se dispersan más al azar por la reacción de oxidación y están ahora presentes en un total de 12 moléculas ($6CO_2 + 6H_2O$).

Siempre que una reacción química transcurre de modo que hay un aumento en el número de moléculas, o cuando una sustancia sólida se convierte en productos líquidos o gaseosos, que permiten más libertad para el movimiento molecular que un sólido, hay un incremento en el desorden molecular y, por tanto, de entropía.

Caso 3: Información y entropía

El siguiente fragmento de *Julio César*, Acto IV, Escena 3, es declamado por Bruto cuando se da cuenta de que se ha de enfrentar al ejército de Marco Antonio. Es un ordenamiento no al azar y rico en información de 125 letras del alfabeto inglés:

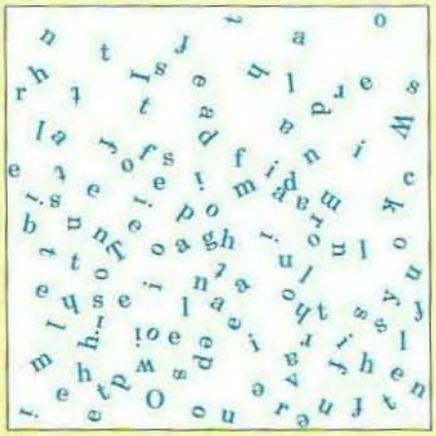
valor será siempre ligeramente inferior a la cantidad teórica de energía liberada, habida cuenta de que una parte de la energía se disipa en forma de calor de fricción. Cuanto mayor sea la elevación del objeto grande, mayor será el cambio energético al deslizarse hacia abajo (ΔG) y mayor será la cantidad de trabajo que puede realizar.

¿Cuál es el equivalente de este proceso en reacciones químicas? En sistemas cerrados, las reacciones químicas se producen espontáneamente hasta que se alcanza el **equilibrio.** Cuando el sistema está en equilibrio, la velocidad de formación de producto es exactamente igual a la velocidad en que el producto se convierte en reactivo. Aquí no hay un cambio neto en la concentración de reactivos y productos y se alcanza un *estado estacionario*. La variación de energía que se produce cuando el sistema evoluciona desde su estado inicial al de equilibrio, sin variaciones en la presión y la temperatura, viene dada por la variación de energía libre, ΔG. La magnitud de ΔG depende de la reacción química en particular y de lo lejos que el sistema se encuentre inicialmente del equilibrio. Cada uno de los compuestos implicados en una reacción química contiene una cierta cantidad de energía potencial, que guarda relación con el número y el tipo de enlaces. En las

There is a tide in the affairs of men,
Which, taken at the flood, leads on to fortune;
Omitted, all the voyage of their life
Is bound in shallows and in miseries.*

Tiene muchos significados escondidos además de lo que expresa abiertamente. Refleja unos hechos, pero también se hace eco de las ideas desarrolladas en el drama sobre el conflicto, la ambición y las exigencias del liderazgo. Es muy rica en información.

Pero si las 125 letras que forman esta cita se distribuyeran totalmente al azar, de modo caótico, como se muestra en el cuadro siguiente, no tendrían ningún significado.

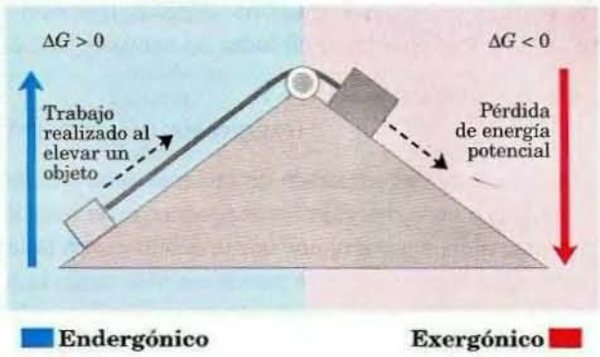


Así, las 125 letras no aportarían ninguna información, o muy poca, pero serían muy ricas en entropía. Tales consideraciones confirman que la información es una forma de energía y se la ha denominado "entropía negativa". De hecho, la rama de las matemáticas denominada teoría de la información, que es básica para la lógica de programación de los ordenadores, está muy relacionada con la teoría termodinámica. Los organismos vivos son estructuras muy ordenadas, no al azar, inmensamente ricas en información pero pobres en entropía.

*En los negocios humanos hay una manera que, aprovechada en la pleamar, conduce a la fortuna; pero si no se aprovecha, todo el viaje de la vida va en medio de bajíos y naufragios. SHAKESPEARE, *Dramas*, Editorial Iberia, S.A., Barcelona.

reacciones que ocurren espontáneamente, los productos tienen menos energía libre que los reactivos, de manera que la reacción libera una cantidad de energía libre que está disponible para realizar trabajo. Estas reacciones se denominan exergónicas y la disminución de energía libre de reactivos a productos se expresa con un valor negativo. Las reacciones endergónicas requieren una aportación de energía y sus valores de ΔG son positivos. Sólo una parte de la energía liberada en las reacciones bioquímicas exergónicas se puede utilizar para producir trabajo. En los sistemas vivos parte de la energía se disipa en forma de calor o se pierde incrementando la entropía.

(a) Ejemplo mecánico



(b) Ejemplo químico

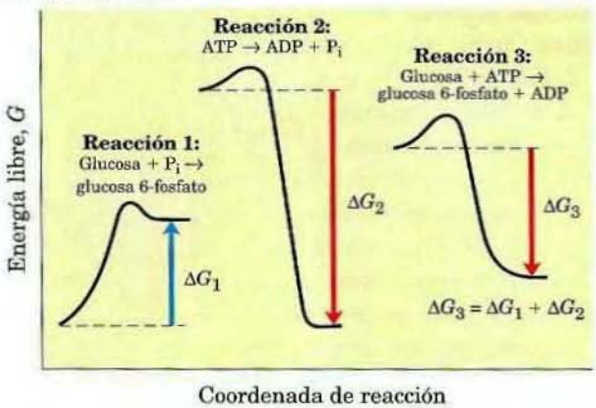


FIGURA 1-26 Acoplamiento energético en procesos químicos y mecánicos. (a) El movimiento descendente de un objeto libera energía potencial capaz de producir trabajo mecánico. La energía potencial liberada por el movimiento descendente espontáneo, un proceso exergónico (rosa), puede acoplarse al movimiento endergónico ascendente de otro objeto (azul). **(b)** En la reacción 1 la formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa y fosfato inorgánico (P_i) da lugar a un producto con una energía superior a la de los reactivos. La ΔG es positiva para esta reacción endergónica. En la reacción 2, la rotura exergónica de adenosina trifosfato (ATP) puede hacer posible una reacción endergónica cuando ambas estén acopladas. La reacción exergónica tiene una variación de energía libre (ΔG_2) grande y negativa, mientras que en la reacción endergónica la variación de energía libre (ΔG_1) es más pequeña y de valor positivo. La tercera reacción representa la suma de las reacciones 1 y 2, y la variación en su energía libre ΔG_3 es la suma aritmética de ΔG_1 y ΔG_2. Dado que el valor de ΔG_3 es negativo, la reacción global es exergónica y espontánea.

En los organismos vivos una reacción exergónica se puede acoplar a una endergónica para hacer posibles ciertas reacciones que de otro modo serían desfavorables. La Figura 1-26b ilustra este principio para la conversión de glucosa en glucosa 6-fosfato, el primer paso de la oxidación de glucosa. El camino más simple para producir glucosa 6-fosfato es:

Reacción 1: **Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato**
(endergónica; ΔG_1 es positiva)

(P_i es la abreviatura para el fosfato inorgánico HPO_4^{2-}. No describiremos ahora en detalle, sino más adelante, la estructura

de estos compuestos.) Esta reacción no ocurre espontáneamente porque ΔG es positiva. Una segunda reacción muy exergónica puede tener lugar en todas las células:

Reacción 2: $ATP \longrightarrow ADP + P_i$

(exergónica; ΔG_2 es negativa)

Estas dos reacciones comparten un intermediario común, P_i, que se consume en la reacción 1 y se produce en la reacción 2. Las dos reacciones pueden, por tanto, acoplarse en la forma de una tercera reacción que se puede escribir como la suma de las reacciones 1 y 2, omitiendo el intermediario común, P_i, de los dos lados de la ecuación:

Reacción 3: **Glucosa + ATP $\longrightarrow$ glucosa 6-fosfato + ADP**

Puesto que se libera más energía en la reacción 2 que la consumida en la reacción 1, la variación de energía libre en la reacción 3, ΔG_3, es negativa, lo que hace posible que la síntesis de glucosa 6-fosfato transcurra a través de la reacción 3.

El acoplamiento de reacciones exergónicas con otras endergónicas a través de un intermediario compartido es básico para los intercambios energéticos en los sistemas vivos. La hidrólisis del ATP (reacción 2 en la Fig. 1-26b) es la reacción exergónica que proporciona la energía para la mayoría de procesos endergónicos en las células. De hecho, el ATP es el principal transportador de energía química en la célula.

K_{eq} y $\Delta G°$ miden la tendencia de una reacción para transcurrir espontáneamente

La tendencia de una reacción química para llegar a su final puede expresarse en forma de una constante de equilibrio. Para la reacción

$$aA + bB \longrightarrow cC + dD$$

la constante de equilibrio, K_{eq}, viene dada por

$$K_{eq} = \frac{[C_{eq}]^c[D_{eq}]^d}{[A_{eq}]^a[B_{eq}]^b}$$

donde $[A_{eq}]$ es la concentración de A, $[B_{eq}]$ es la concentración de B, etc., *cuando el sistema ha llegado al equilibrio*. Un valor elevado de K_{eq} indica que la reacción tiene lugar hasta que los reactivos se han convertido casi en productos.

Gibbs demostró que la ΔG de una reacción química cualquiera es función de la **variación de energía libre estándar, $\Delta G°$** (una constante característica de cada reacción específica) y de un término que expresa la concentración inicial de reactivos y productos:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[C_i]^c[D_i]^d}{[A_i]^a[B_i]^b} \qquad (1\text{–}1)$$

donde $[A_i]$ es la concentración inicial de A y así sucesivamente, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

Cuando una reacción ha alcanzado el equilibrio no persiste ninguna fuerza que la induzca a ir en una dirección u otra y no puede realizar trabajo: $\Delta G = 0$. En esta situación concreta, $[A_i] = [A_{eq}]$, etc. para todos los reactivos y productos, y

$$\frac{[C_i]^c[D_i]^d}{[A_i]^a[B_i]^b} = \frac{[C_{eq}]^c[D_{eq}]^d}{[A_{eq}]^a[B_{eq}]^b} = K_{eq}$$

Sustituyendo ΔG por 0 y $[C_i]^c[D_i]^d/[A_i]^a[B_i]^b$ por K_{eq} en la Ecuación 1-1, obtenemos la relación

$$\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$$

de la que deducimos que $\Delta G°$ es tan sólo una manera alternativa a K_{eq} para expresar la dirección de una reacción. Gracias a poder medir K_{eq} experimentalmente disponemos de un modo de determinar $\Delta G°$, la constante termodinámica característica de cada reacción.

$\Delta G°$ y ΔG se expresan ambas en joules por mol (o calorías por mol). Cuando $K_{eq} >> 1$, $\Delta G°$ es grande y negativa; cuando $K_{eq} << 1$, $\Delta G°$ es grande y positiva. Es posible deducir con un simple vistazo a una tabla de valores de K_{eq} o de $\Delta G°$ cuáles son las reacciones que tenderán a producirse y cuáles no.

Hay que decir que las constantes *termodinámicas* como $\Delta G°$ muestran dónde se halla el punto de equilibrio final de la reacción, pero nada nos dicen acerca de la velocidad con que se alcanza (véase Capítulo 6).

Los enzimas facilitan las secuencias de reacciones químicas

Todas las macromoléculas biológicas son mucho más inestables termodinámicamente que sus subunidades monoméricas, aunque sean, no obstante, *estables cinéticamente:* su degradación *no catalizada* ocurre tan lentamente que, en la escala de tiempo aplicable a los organismos, estas moléculas son estables. Si prácticamente todas las reacciones químicas celulares tienen lugar a una velocidad significativa es gracias a la presencia de **enzimas** –biocatalizadores que provocan un gran incremento en la velocidad de reacciones químicas específicas sin consumirse en el proceso.

La trayectoria de una reacción entre reactivo(s) y producto(s) transcurre de manera prácticamente invariable a través de una barrera energética, denominada barrera de activación (Fig 1-27), que debe ser superada para que tenga lugar la reacción. La rotura y formación de enlaces implica generalmente y de manera previa la distorsión de los enlaces existentes, lo que genera un **estado de transición** de mayor energía libre que reactivos o productos. El punto más alto en un diagrama de coordenadas de reacción representa el estado de transición y la diferencia de energía entre un reactivo en su estado fundamental y en su estado de transición se denomina **energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$.** Los enzimas catalizan reacciones proporcionando un entorno más confortable para el estado de transición: una superficie complementaria a su estereoquímica, polaridad o carga. La unión de un enzima al estado de transición es exergónica y la energía liberada por esa unión reduce la energía de activación de la reacción, incrementando de modo muy importante su velocidad.

Una contribución adicional a la catálisis ocurre cuando dos o más reactivos se unen a la superficie del enzima en sitios cercanos y en una orientación estereospecífica que favorece la reacción. Gracias a esta disposición se incrementa en varios órdenes de magnitud la probabilidad de que se produzcan coli-

siones productivas entre los reactivos. Como resultado de estos y otros factores que se tratan en el Capítulo 6, las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar generalmente a velocidades mayores que 10^{12} veces las de las no catalizadas.

Salvo algunas excepciones, los catalizadores celulares son proteínas. (Como se tratará en los Capítulos 26 y 27, las moléculas de RNA desempeñan en ocasiones papeles catalíticos.) También de modo casi universal, cada enzima cataliza una reacción específica y cada reacción en la célula está catalizada por un enzima diferente. Es por tanto evidente que en cada célula son necesarios miles de enzimas diferentes. La multiplicidad de los enzimas, su especificidad (la capacidad de discriminar entre diferentes reactivos) y su susceptibilidad a la regulación confieren a las células la capacidad de disminuir selectivamente las barreras de activación. Esta selectividad resulta crucial para la regulación efectiva de los procesos celulares. Haciendo que las reacciones específicas procedan a velocidades significativas en momentos determinados, los enzimas determinan de qué modo se canalizan la materia y la energía en las actividades celulares.

Los miles de reacciones químicas catalizadas por enzimas en el interior de las células se encuentran organizadas funcionalmente en muchas secuencias diferentes de reacciones consecutivas denominadas **rutas** o **vías,** en las que el producto de una reacción pasa a ser el reactivo de la siguiente. Algunas de estas rutas degradan nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales simples, con el fin de extraer de ellos energía química y convertirla en una forma útil para la célula; en conjunto, estas reacciones degradativas productoras de energía libre reciben el nombre de **catabolismo.** Otras rutas catalizadas por enzimas parten de pequeñas moléculas precursoras convirtiéndolas en moléculas progresivamente mayores y más complejas. Estas rutas sintéticas requieren invariablemente un aporte de energía y en conjunto se denominan **anabolismo.** La compleja red de reacciones catalizadas por enzimas constituye el **metabolismo** celular. El ATP es el principal nexo de unión (el intermediario compartido) entre los componentes anabólicos y catabólicos de esta red (Fig. 1-28). Las rutas de reacciones catalizadas enzimáticamente que actúan sobre los principales constituyentes de las células –proteínas, grasas, azúcares y ácidos nucleicos– son casi idénticas en todos los organismos vivos.

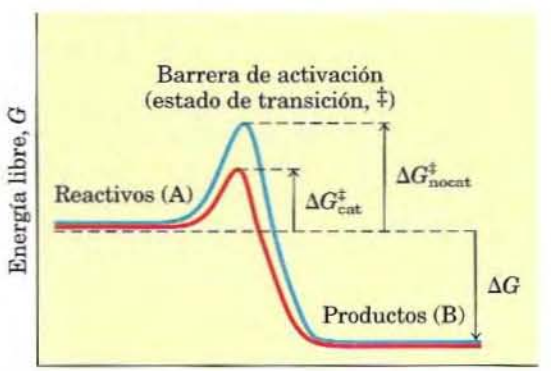


FIGURA 1-27 Variaciones energéticas durante una reacción química. En la conversión de los reactivos (A) en productos (B) debe salvarse una elevada barrera de activación, que representa el estado de transición a pesar de que los productos son más estables que los reactivos, tal como indica la gran variación negativa de energía libre (ΔG). La energía necesaria para superar la barrera de activación es la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) . Los enzimas catalizan las reacciones disminuyendo la barrera de activación. Se unen fuertemente a los intermediarios del estado de transición y la energía de enlace de esta interacción reduce la energía de activación desde $\Delta G^{\ddagger}_{nocat}$ hasta $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$. (Obsérvese que la energía de activación *no* está relacionada con la variación de la energía libre de la reacción, ΔG.)

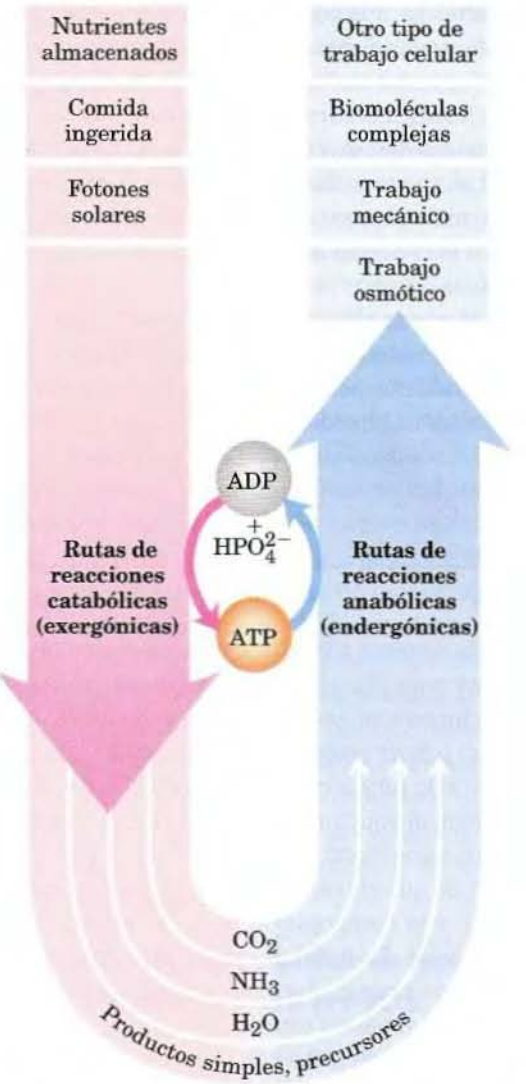


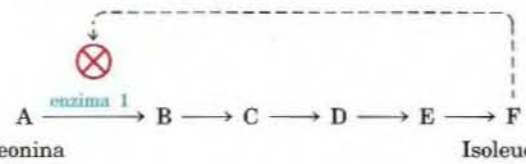
FIGURA 1-28 Papel central del ATP en el metabolismo. El ATP es el intermediario químico común que conecta los procesos que liberan energía con aquellos que la requieren. Su papel en la célula es análogo al del dinero en las relaciones comerciales: se "gana/produce" en reacciones exergónicas y se "gasta/consume" en las endergónicas.

El metabolismo está regulado para conseguir equilibrio y economía

Las células vivas no son sólo capaces de sintetizar simultáneamente miles de clases diferentes de moléculas sino que además son capaces de hacerlo en las proporciones precisas que

son necesarias para la célula en cualquier situación. Cuando, por ejemplo, se produce un crecimiento celular rápido, deben sintetizarse grandes cantidades de precursores de proteínas y ácidos nucleicos, mientras que en condiciones de no crecimiento la necesidad de estos precursores se encuentra muy reducida. Los enzimas clave de cada ruta metabólica están regulados de manera que cada tipo de molécula precursora se sintetiza en la cantidad adecuada a las necesidades circunstanciales de la célula.

Considérese la ruta de *E. coli* que conduce a la síntesis del aminoácido isoleucina. La ruta consta de cinco reacciones, catalizadas cada una por un enzima diferente (las letras A a F representan los intermediarios de la ruta):



Si una célula empieza a producir más isoleucina de la necesaria para la síntesis proteica, la isoleucina no utilizada se acumula y este incremento en la concentración inhibe la actividad catalítica del primer enzima de la ruta, con lo que se frena inmediatamente la producción de isoleucina. Esta **retroinhibición** mantiene el equilibrio entre producción y utilización de cada intermediario metabólico.

A pesar de que el concepto de ruta discreta es útil para la organización y la comprensión del metabolismo, constituye una simplificación. En la célula existen miles de intermediarios metabólicos, muchos de los cuales forman parte de más de una ruta. El metabolismo estaría mejor representado por una red de rutas interconectadas e interdependientes. La variación en la concentración de cualquier metabolito afectaría a otras rutas, dando inicio a un efecto en cadena que influiría en el flujo de materiales a través de otros sectores de la economía de la célula. La comprensión de estas complejas interacciones entre intermediarios y rutas en términos cuantitativos es una tarea ingente, pero hoy existen nuevas aproximaciones experimentales (véase Capítulo 15) que han empezado a ofrecer nuevos puntos de vista sobre la regulación del metabolismo.

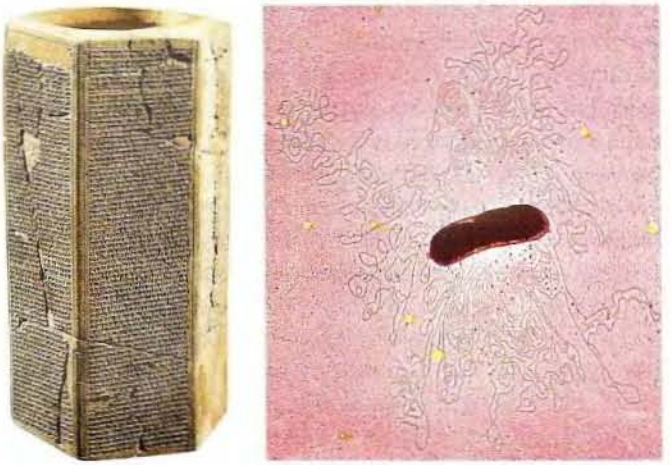
Las células regulan también la síntesis de sus propios catalizadores, los enzimas, en respuesta a la variación en las necesidades de un producto metabólico (véase Capítulo 28). La expresión de los genes (la traducción de la información del DNA en proteínas celulares activas) y la síntesis de los enzimas son otros niveles de control metabólico. Todos ellos deben incluirse al describir el control global del metabolismo. Ofrecer una visión completa del modo en que la célula regula su actividad es una tarea ingente que no ha hecho más que empezar.

RESUMEN 1.3 Fundamentos físicos

- Las células vivas son sistemas abiertos que intercambian materia y energía con su entorno, extrayendo y canalizando energía para mantenerse en un estado estacionario dinámico distante del equilibrio. La energía se obtiene de la luz solar o de los combustibles, convirtiendo la energía de un flujo electrónico en energía de los enlaces químicos del ATP.
- La tendencia de una reacción química para llegar al equilibrio puede expresarse como la variación en su energía libre, ΔG, que tiene dos componentes: variación de entalpía, ΔH, y variación de entropía, ΔS. Estas variables se relacionan entre ellas por la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$.
- Cuando la ΔG de una reacción es negativa, la reacción es exergónica y tiende a llegar a su fin; cuando ΔG es positiva, la reacción es endergónica y tiende a avanzar en la dirección opuesta. Cuando dos reacciones se suman para dar lugar a una tercera reacción, la ΔG de la reacción global es la suma de las ΔG de las reacciones individuales. De esta forma se produce el acoplamiento de reacciones.
- La conversión de ATP en P_i y ADP es altamente exergónica (ΔG negativa y de valor elevado) y muchas reacciones celulares endergónicas son posibles gracias al acoplamiento a esta reacción a través de intermediarios comunes.
- La variación de energía libre estándar de una reacción, ΔG°, es una constante física relacionada con la constante de equilibrio mediante la ecuación $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$.
- La mayor parte de las reacciones celulares tiene lugar a velocidades útiles porque existen enzimas que las catalizan. Los enzimas actúan en parte estabilizando el estado de transición, reduciendo la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, e incrementando la velocidad de reacción en muchos órdenes de magnitud. La actividad catalítica de los enzimas en las células está regulada.
- El metabolismo es la suma de muchas secuencias de reacciones interconectadas en las que se interconvierten metabolitos celulares. Cada secuencia está regulada de manera que produzca lo que la célula necesita en cada momento y consuma sólo la energía necesaria.

1.4 Fundamentos genéticos

Posiblemente, la propiedad más notable de las células y organismos vivos es su capacidad para reproducirse con fidelidad casi perfecta a lo largo de incontables generaciones. Esta continuidad de rasgos heredados implica que, a lo largo de millones de años, la estructura de las moléculas que contienen la información genética ha debido permanecer constante. Muy pocas huellas históricas de la civilización (Fig. 1-29) han logrado sobrevivir un millar de años. Pero existen pruebas convincentes de que las instrucciones genéticas de los organismos vivos han permanecido prácticamente inalteradas durante períodos mucho más largos; muchas bacterias tienen aproximadamente el mismo tamaño, forma y estructura interna, y contienen el



(a) (b)

FIGURA 1-29 Dos escrituras antiguas. (a) El prisma de Senaquerib, grabado aproximadamente en 700 a. C., describe algunos hechos históricos acaecidos durante el reinado del rey Senaquerib en caracteres de la lengua asiria. El prisma contiene aproximadamente 20.000 caracteres, pesa 50 kg y ha sobrevivido prácticamente intacto durante 2700 años. **(b)** La molécula única de DNA de la bacteria *E. coli*, observada durante el proceso de filtrado hacia el exterior de la célula lisada, es centenares de veces más larga que la célula misma y contiene codificada toda la información necesaria para especificar la estructura y las funciones de la célula. El DNA bacteriano contiene aproximadamente 10 millones de caracteres (nucleótidos), pesa menos de 10^{-10} g y sólo ha sufrido cambios menores durante los últimos millones de años. (Los puntos amarillos y las manchas oscuras de la micrografía electrónica colorizada son artefactos de la preparación.)

mismo tipo de moléculas precursoras y enzimas, que las que vivieron hace cuatro mil millones de años.

El descubrimiento de la naturaleza química y la estructura tridimensional del material genético, el **ácido desoxirribonucleico** o **DNA,** se cuenta entre los hitos fundamentales de la biología del siglo XX. La secuencia de sus subunidades monoméricas, los nucleótidos (o más exactamente, los desoxirribonucleótidos) de este polímero lineal, lleva codificadas las instrucciones para formar todos los demás componentes celulares y actúa además como molde para la producción de moléculas idénticas de DNA que serán distribuidas a la progenie al dividirse la célula. La continuidad en la existencia de una especie biológica exige que su información genética se mantenga estable, se exprese correctamente en forma de productos génicos y se reproduzca con un mínimo de errores. La corrección y efectividad en el almacenamiento, la expresión y la reproducción del mensaje genético define a las especies, las distingue de las demás y asegura su continuidad.

La continuidad genética reside en las moléculas de DNA

El DNA es un polímero orgánico largo y delgado que tiene la rara propiedad de estar construido a escala atómica en una dimensión (anchura) y a escala humana en la otra (longitud). Un espermatozoide o un óvulo humanos, que transportan la información hereditaria acumulada a lo largo de miles de millones de años de evolución, transmiten esta herencia en forma de moléculas de DNA en las que el mensaje genético está codificado en la secuencia lineal de las subunidades de nucleótido unidas covalentemente.

Cuando hablamos de las propiedades de una especie química solemos describir el comportamiento medio de un número muy grande de moléculas idénticas. La predicción del comportamiento de una molécula individual en una cantidad de, por ejemplo, un picomol de un compuesto (en torno a 6×10^{11} moléculas) resulta difícil, pero es más sencillo predecir el comportamiento *medio* de las moléculas gracias al gran número de ellas que es posible analizar al mismo tiempo. En este aspecto, el DNA celular es una excepción notable. El DNA de una célula de *E. coli* es una *única molécula* que contiene 4,64 millones de pares de nucleótidos y constituye todo su material genético. Esta molécula única debe replicarse perfectamente en todos sus detalles para que *E. coli* genere una progenie idéntica mediante la división celular; en este caso no es, por tanto, posible pensar en un comportamiento medio, o estadístico. Lo mismo ocurre en todas las demás células. Un espermatozoide humano aporta al óvulo que fecunda una sola molécula de DNA en cada uno de los 23 cromosomas diferentes, que se combinan con una sola molécula de DNA en cada uno de los cromosomas correspondientes del óvulo. El resultado de esta unión es fácilmente predecible: un embrión que contiene la totalidad de sus 35.000 genes, formado por 3 mil millones de pares de nucleótidos, e intacto: ¡una hazaña química increíble!

La estructura del DNA hace posible su replicación y reparación con fidelidad casi perfecta

La capacidad de las células vivas de preservar su material genético y duplicarlo para su transmisión a la generación siguiente es el resultado de la complementariedad estructural entre las dos mitades de la molécula de DNA (Fig. 1-30). La unidad básica del DNA es un polímero lineal formado por cuatro subunidades monoméricas diferentes, los **desoxirribonucleótidos,** ordenados en una secuencia lineal precisa. En esta secuencia lineal se encuentra codificada la información genética. Dos de estas cadenas poliméricas se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice de DNA, en la que cada subunidad monomérica de una cadena queda específicamente apareada con una subunidad complementaria de la cadena opuesta. Antes de producirse la división celular, las dos cadenas de DNA se separan y actúan como molde para la síntesis de otra cadena complementaria nueva, con lo que se generan dos moléculas de doble hélice idénticas, una para cada célula hija. Si una cadena resultase dañada, la continuidad de la información queda asegurada por la información presente en la cadena complementaria, que actuará como molde para la reparación de la lesión.

La secuencia lineal del DNA codifica proteínas con estructuras tridimensionales

La información está codificada en el DNA en su secuencia lineal (monodimensional) de unidades desoxirribonucleotídicas, pero la expresión de esta información da como resultado una célula tridimensional. La transición entre una y tres dimensiones ocu-

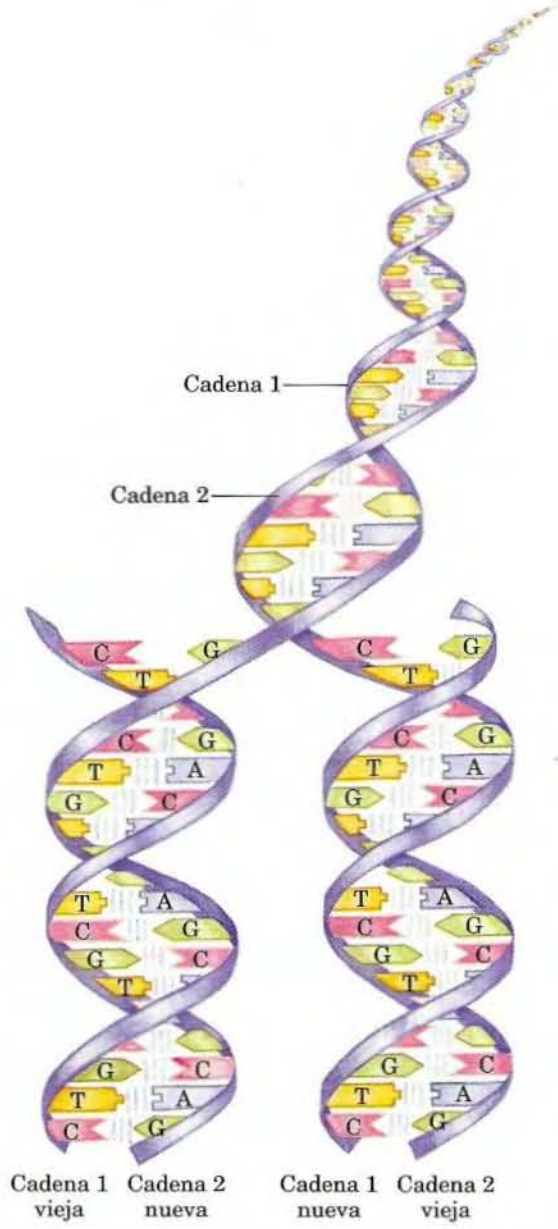


FIGURA 1-30 Complementariedad entre las dos cadenas del DNA. El DNA es un polímero lineal de cuatro subunidades, los desoxirribonucleótidos desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C) y desoxitimidilato (T), unidos covalentemente. Cada uno de los nucleótidos, gracias a su precisa estructura tridimensional, posee la capacidad intrínseca de asociarse muy específicamente, pero no de modo covalente, con otro de los nucleótidos: A se asocia siempre con su complementario T y G siempre con C. En la molécula de DNA de doble cadena, la secuencia completa de nucleótidos de una hebra es *complementaria* a la secuencia de la otra hebra. Las dos cadenas del DNA, unidas por muchos puentes de hidrógeno (líneas verticales azules) entre los pares de nucleótidos complementarios, se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice del DNA. En la replicación del DNA, las dos cadenas se separan y se sintetizan dos cadenas nuevas, cada una con una secuencia complementaria a la de una de las cadenas originales. El resultado son dos moléculas de DNA en doble hélice, cada una de ellas idéntica al DNA original.

rre en dos fases. Una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos del DNA codifica (a través de un intermediario, el RNA) la producción de una proteína con otra secuencia lineal, en este caso de aminoácidos (Fig. 1-31). La proteína se pliega adoptando una estructura tridimensional particular, determinada por su secuencia de aminoácidos y estabilizada principalmente por interacciones no covalentes. Aunque la forma final de la proteína plegada viene dictada por su secuencia de aminoácidos, el proceso de plegamiento recibe la asistencia de "chaperonas moleculares", que catalizan el proceso impidiendo vías incorrectas de plegamiento. La adopción de una estructura tridimensional precisa, o **conformación nativa,** es crucial para la función de la proteína.

Una vez la proteína ha adoptando su conformación nativa, puede asociarse de modo no covalente con otras proteínas, o bien con ácidos nucleicos o lípidos, para formar complejos supramoleculares como cromosomas, ribosomas y membranas.

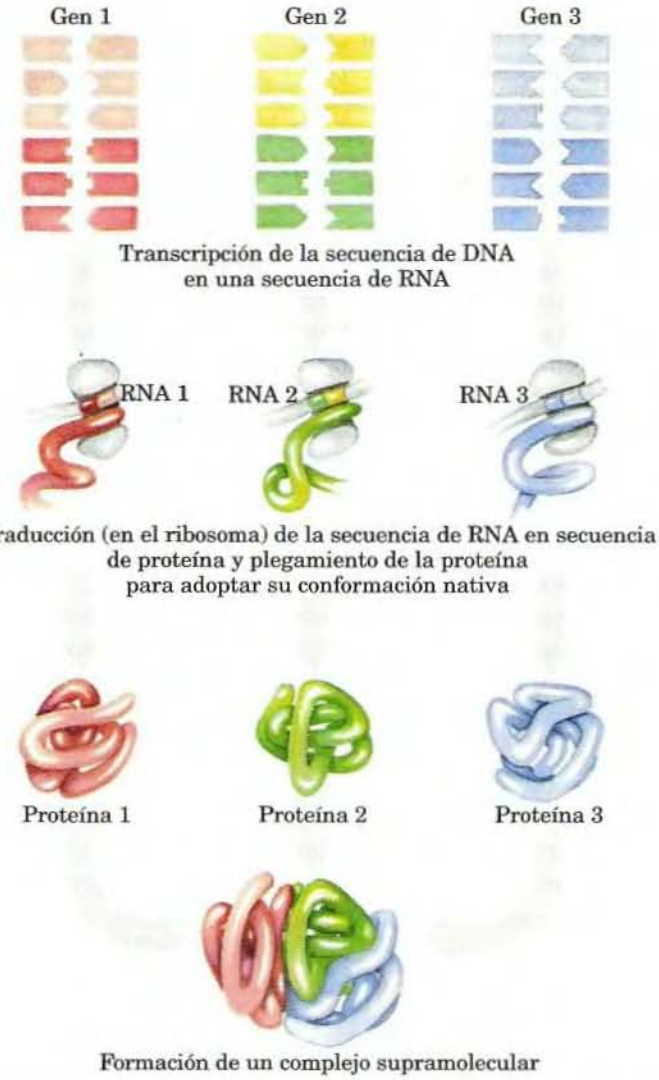


FIGURA 1-31 Del DNA al RNA y a las proteínas. Las secuencias lineales de desoxirribonucleótidos en el DNA, distribuidas en genes, se transcriben en moléculas de ácido ribonucleico (RNA) cuyas secuencias de ribonucleótidos le son complementarias. Las secuencias de RNA se traducen en cadenas lineales de proteína, que se pliegan para adoptar sus conformaciones tridimensionales nativas, a menudo con la ayuda de las chaperonas moleculares. Las proteínas se asocian a veces con otras proteínas para formar complejos supramoleculares, estabilizados por interacciones débiles.

Cada molécula de estos complejos posee sitios de unión específicos y de alta afinidad para las demás y puede formar espontáneamente complejos funcionales en el medio celular.

A pesar de que las secuencias proteicas contienen toda la información necesaria para el plegamiento en el estado nativo, este plegamiento sólo puede producirse en el entorno adecuado. El automontaje requiere, pues, una información correcta (proporcionada por la secuencia del DNA) y un entorno adecuado (el interior celular), por lo que la secuencia de DNA no es capaz por sí sola de dictar la formación de una célula. Como dijo Rudolph Virchow, el patólogo e investigador prusiano del siglo XIX, "Omnis cellula e cellula": toda célula proviene de otra célula.

RESUMEN 1.4 Fundamentos genéticos

- La información genética está codificada en la secuencia lineal de cuatro desoxirribonucleótidos en el DNA.
- La molécula de DNA en doble hélice contiene un molde interno que permite su propia replicación y reparación.
- La secuencia lineal de aminoácidos de una proteína, codificada en el DNA del gen de esa proteína, da lugar a una estructura tridimensional proteica que es exclusiva para esa proteína.
- Ciertas macromoléculas individuales con afinidad específica para con otras macromoléculas forman complejos supramoleculares.

1.5 Fundamentos evolutivos

Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución

—Theodosius Dobzhansky, The American Biology Teacher, *marzo 1973*

Los grandes progresos de la bioquímica y la biología molecular desde que Dobzhansky hizo esta contundente generalización han confirmado su validez. El alto grado de similitud entre las vías metabólicas y las secuencias génicas de organismos de todos los *phyla* es un robusto argumento a favor de la hipótesis de que todos los organismos modernos comparten un progenitor evolutivo común y derivaron a partir de él a través de una larga serie de pequeños cambios (mutaciones) que conferían, en cada caso, una ventaja selectiva a un organismo dado en un nicho ecológico concreto.

Los cambios en las instrucciones hereditarias hacen posible la evolución

A pesar de la fidelidad casi perfecta de la replicación genética, ciertos errores muy poco frecuentes que no han sido reparados durante la replicación del DNA producen variaciones en la secuencia nucleotídica del DNA, dando lugar a una **mutación** (Fig. 1-32) que cambia las instrucciones para alguno de los componentes celulares. Una reparación incorrecta de una lesión en una de las cadenas de DNA tiene el mismo efecto. Las mutaciones en el DNA que se transmite a los descendientes

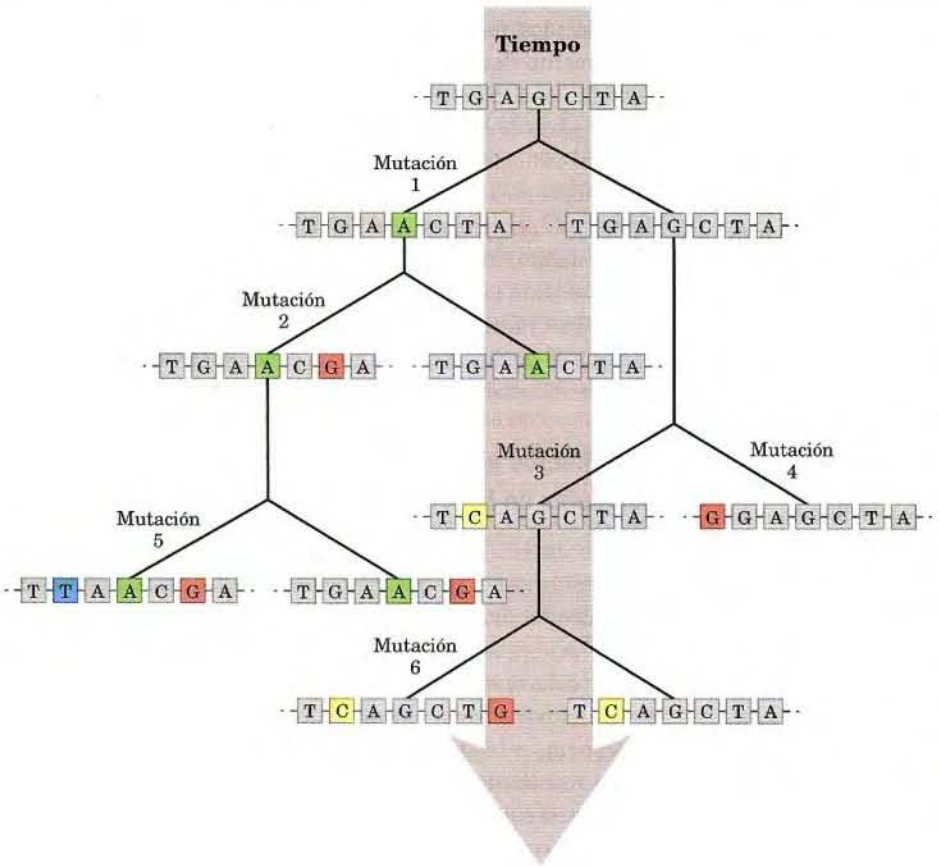


FIGURA 1-32 Papel de las mutaciones en la evolución. La acumulación gradual de mutaciones a lo largo de un período prolongado de tiempo da como resultado nuevas especies biológicas, cada una de ellas con una secuencia de DNA única. En la parte superior se muestra un segmento corto de un gen de un hipotético organismo progenitor. Con el paso del tiempo, los cambios en la secuencia nucleotídica (mutaciones, indicadas por cajas coloreadas), *que afectan a un solo nucleótido en cada ocasión,* generan una progenie con secuencias de DNA diferentes. Esta progenie mutante también sufre mutaciones ocasionalmente y da lugar a unos descendientes que tienen uno o más nucleótidos diferentes en relación con la secuencia progenitora. Una nueva especie aparece cuando dos líneas han divergido tanto en su acervo genético que ya no pueden aparearse.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

pueden ser dañinas o incluso letales para el organismo; pueden, por ejemplo, provocar la síntesis de un enzima defectuoso incapaz de catalizar una reacción metabólica esencial. Sin embargo, una mutación da lugar ocasionalmente a un organismo mejor preparado para sobrevivir en su entorno natural. El enzima mutante podría, en este caso, haber adquirido una especificidad ligeramente diferente que lo convierte en capaz de utilizar cierto compuesto que la célula era incapaz de metabolizar antes de producirse la mutación. Si una población de células se encontrase en un entorno en el que este compuesto fuera el único o el más abundante de los nutrientes disponibles, la célula mutante tendría ventajas selectivas sobre las otras células no mutantes (de **tipo silvestre** –**wild type**–) de la población. La célula mutante y su progenie sobrevivirían y prosperarían en el nuevo entorno mientras que las células del tipo silvestre no dispondrían de nutrientes y perecerían.

A veces, se produce la duplicación de un gen entero. La segunda copia es superflua, con lo que las mutaciones que se produzcan en este segundo gen no serán nocivas; ésta constituye otra forma de evolución celular, puesto que implica la producción de un nuevo gen con una nueva función al tiempo que se retienen el gen y la función originales. Así, las moléculas de DNA de los organismos modernos son como documentos históricos llenos de datos que hablan del largo viaje desde las primeras células a los organismos actuales. Sin embargo, los datos históricos contenidos en el DNA no son completos; a lo largo de la evolución se han borrado muchas de las mutaciones, o se ha escrito sobre ellas. A pesar de ello, las moléculas de DNA son la mejor fuente de historia biológica disponible.

Varios miles de millones de años de selección adaptativa han conducido al refinamiento de los sistemas celulares, haciéndolos capaces de obtener el máximo provecho de las propiedades físicas y químicas de las materias primas moleculares para llevar a cabo las actividades básicas de transformación de la energía y de autorreplicación de las células vivas. Las variaciones genéticas producidas al azar entre individuos de una población, combinadas con la selección natural (supervivencia y reproducción de los individuos mejor adaptados en un ambiente selectivo y cambiante), han dado como resultado la evolución de una enorme variedad de organismos.

Las primeras biomoléculas aparecieron por evolución química

Hasta aquí hemos pasado por alto el primer capítulo de la historia de la evolución: la aparición de la primera célula viva. Los compuestos orgánicos, entre los que se incluyen biomoléculas básicas tales como aminoácidos y glúcidos, se encuentran presentes únicamente en muy pequeñas cantidades en la corteza terrestre, el mar y la atmósfera. ¿Cómo adquirieron los primeros organismos vivos sus sillares estructurales orgánicos característicos? En 1922, el bioquímico Aleksandr. I. Oparin propuso una teoría para el origen de la vida en la Tierra, postulando que la atmósfera fue en un principio muy diferente de la actual. Rica en metano, amoníaco y agua, prácticamente exenta de oxígeno, se trataba de una atmósfera reductora. Según la teoría de Oparin, la energía eléctrica de las descargas de los relámpagos o la energía calorífica desprendida durante la actividad volcánica hicieron que el amoníaco, el metano, el vapor de agua y otros componentes de la atmósfera primigenia reaccionaran, dando lugar a compuestos orgánicos simples. Estos compuestos se habrían disuelto en los mares primitivos, que así se fueron enriqueciendo a lo largo de muchos milenios con una gran variedad de compuestos orgánicos simples. En esta disolución caliente (la "sopa primordial") algunas moléculas orgánicas habrían mostrado una tendencia superior a la de las demás a asociarse en complejos superiores. A lo largo de millones de años, éstos llegaron a asociarse espontáneamente para formar membranas y catalizadores (enzimas) que se reunieron para dar lugar a los precursores de las primeras células. Durante muchos años, los puntos de vista de Oparin se consideraron especulativos e indemostrables, hasta que se llevó a cabo un experimento sorprendente empleando un utillaje muy simple.

La evolución química puede simularse en el laboratorio

El experimento clásico acerca del origen abiótico de las biomoléculas orgánicas fue realizado en 1953 por Stanley Miller en el laboratorio de Harold Urey. Miller sometió mezclas gaseosas de NH_3, CH_4, vapor de agua y H_2 a descargas eléctricas producidas entre un par de electrodos durante períodos iguales o superiores a una semana y a continuación analizó el contenido del recipiente de reacción cerrado (Fig. 1-33). La fase gaseosa de la mezcla resultante contenía CO y CO_2 además de los gases iniciales. La fase acuosa contenía una mezcla de compuestos orgánicos entre los que se incluían algunos aminoácidos, hidroxiácidos, aldehídos y cianuro de hidrógeno (HCN). Este experimento demostró la posibilidad de producción abiótica de biomoléculas en tiempos relativamente cortos y en condiciones relativamente suaves.

Experimentos más refinados han probado que muchos de los componentes químicos de las células vivas se pueden formar bajo estas condiciones. Los polímeros de RNA pueden actuar como catalizadores en ciertas reacciones biológicas importadas (como se trata en los Capítulos 26 y 27), por lo que es posible que el RNA jugara un papel crucial en la evolución prebiótica gracias a su doble capacidad como catalizador y como depositario de la información.

Los primeros genes y catalizadores podrían haber sido moléculas de RNA o precursores relacionados

En los organismos modernos, los ácidos nucleicos codifican la información genética que especifica la estructura de los enzimas, mientras que los enzimas poseen la capacidad de catalizar los procesos de replicación y reparación de los ácidos nucleicos. La mutua dependencia de estas dos clases de biomoléculas hace que surja una duda desconcertante ¿Quién apareció primero, el DNA o las proteínas?

La respuesta podría bien ser: ninguno de ellos. El descubrimiento de que las moléculas de RNA o una molécula similar pueden actuar como catalizadores de su propio proceso de

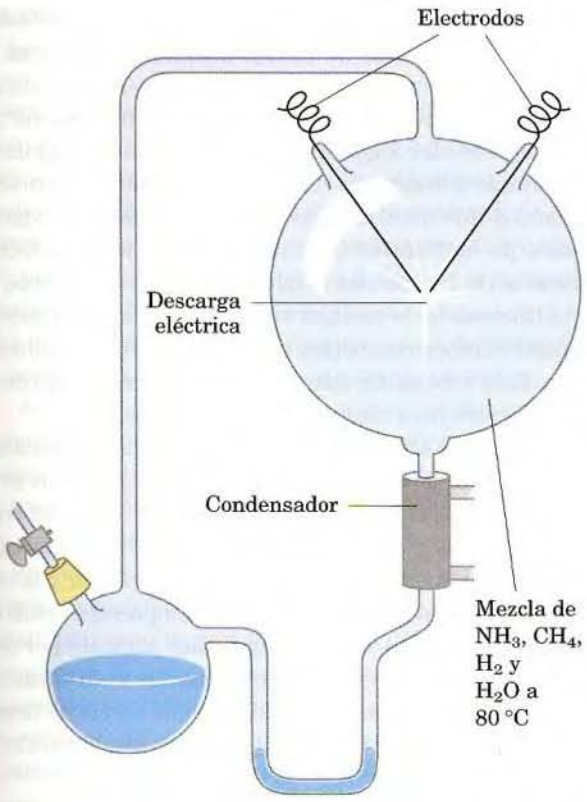


FIGURA 1-33 Producción abiótica de biomoléculas. Aparato de descargas eléctricas del tipo utilizado por Miller y Urey en los experimentos en que demostraron la formación abiótica de compuestos orgánicos en condiciones atmosféricas primitivas. Después de someter el contenido gaseoso del sistema a descargas eléctricas se recogieron los productos por condensación. Entre esos productos se encontraron biomoléculas tales como los aminoácidos.

formación sugiere que el RNA pudo haber sido a la vez el primer gen *y* el primer catalizador biológico. Así (Fig. 1-34), una de las primeras etapas de la evolución biológica habría sido la formación al azar, en la sopa primordial, de una molécula de RNA capacitada para catalizar la formación de otras moléculas de RNA con la misma secuencia –una molécula de RNA autorreplicante y autoperpetuante–. La concentración de moléculas de RNA autorreplicantes se incrementaría exponencialmente al formarse dos moléculas a partir de una, cuatro a partir de dos, etc. Es de presumir que la fidelidad de la reproducción distaba mucho de ser perfecta, de modo que el proceso permitiría la generación de variantes de la molécula de RNA, algunas de las cuales serían probablemente más eficaces en su autorreplicación. En la competencia por la utilización de los nucleótidos, las secuencias autorreplicantes más eficientes saldrían más beneficiadas y las menos desaparecerían del medio.

De acuerdo con la hipótesis del "mundo de RNA", la división de funciones entre el DNA (almacenamiento de la información genética) y las proteínas (catálisis) se produjo en una etapa más tardía. Con anterioridad se desarrollaron nuevas variantes de moléculas de RNA autorreplicantes que poseían la capacidad adicional de catalizar la condensación de aminoácidos en forma de péptidos. Ocasionalmente los péptidos así formados habrían sido capaces de potenciar la capacidad autorreplicativa del RNA y el conjunto RNA-péptido podría haber sufrido variaciones secuenciales que generarían moléculas aún más eficientes. El reciente e importante descubrimiento de que en la maquinaria de las células modernas encargada de la síntesis de proteínas (ribosomas) son moléculas de RNA, y no de proteína, las que catalizan la formación del enlace peptídico casa con la hipótesis del mundo de RNA.

Cierto tiempo después de la evolución de este primitivo sistema de síntesis de proteínas, aparecieron moléculas de DNA con secuencias complementarias a las de RNA autorreplicante, que reemplazaron a estas últimas en la función de conservar la información "genética", mientras que las moléculas de RNA evolucionaron para actuar en la síntesis de proteínas. (En el Capítulo 8 se explica por qué es el DNA una molécula más estable que el RNA y, por tanto, un mejor depositario de la información hereditaria.) Las proteínas demostraron ser catalizadores versátiles y asumieron con el tiempo esta función. Los compuestos lipídicos de esta sopa primordial pudieron formar capas relativamente impermeables capaces de envolver a grupos de moléculas autorreplicantes. La concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el interior de estos compartimientos lipídicos favoreció las interacciones moleculares necesarias para los procesos de autorreplicación.

FIGURA 1-34 Posible situación en un "mundo de RNA".

La evolución biológica empezó hace más de tres mil quinientos millones de años

La Tierra se formó hace aproximadamente 4500 millones de años y la primera prueba concluyente de la existencia de vida data de hace unos 3500 millones de años. En 1996, varios científicos que trabajaban en Groenlandia no encontraron fósiles pero sí pruebas químicas de formas de vida de una antigüedad de unos 3850 millones de años, formas de carbono incrustadas en rocas que parecen tener un origen biológico claro. En algún lugar de la Tierra y durante los primeros mil millones de años, apareció el primer organismo simple, capaz de replicar su propia estructura a partir de un molde (¿RNA?) que fue el primer material genético. Dado que en los tiempos del amanecer de la vida la atmósfera terrestre carecía prácticamente de oxígeno y además existían pocos organismos que pudieran consumir los compuestos orgánicos formados mediante procesos naturales, éstos eran relativamente estables. Sumada esta estabilidad a eones de tiempo, lo improbable acaba volviéndose inevitable: los compuestos orgánicos se incorporaron a las células en evolución para producir catalizadores autorreplicativos cada vez más efectivos. La evolución biológica había empezado.

La primera célula fue probablemente quimioheterótrofa

Las primeras células que aparecieron en la compleja mezcla de compuestos orgánicos que era la sopa primordial de los tiempos prebióticos fueron quimioheterótrofas con casi total seguridad (Fig. 1-5). Los compuestos orgánicos que necesitaban se sintetizaron originalmente a partir de componentes de la atmósfera primitiva de la Tierra como el CO, el CO_2, el N_2 y el CH_4, gracias a la acción no biológica de la actividad volcánica y de las tormentas eléctricas. Los heterótrofos primitivos adquirieron gradualmente la capacidad de obtener energía a partir de ciertos compuestos presentes en su medio ambiente y de usar esta energía para la síntesis de un número gradualmente creciente de sus propias moléculas precursoras, gracias a lo que fueron convirtiéndose en menos dependientes del suministro externo de estas moléculas. Un acontecimiento evolutivo muy significativo fue el desarrollo de pigmentos capaces de captar la luz visible del sol y usar su energía en la reducción o "fijación" del CO_2 para producir compuestos orgánicos más complejos. Es probable que el dador de electrones original para estos procesos **fotosintéticos** fuera el H_2S, que genera azufre elemental o sulfato (SO_4^{2-}) como productos secundarios, aunque en algún momento las células desarrollaron la capacidad enzimática de utilizar H_2O como dador de electrones en las reacciones fotosintéticas, lo que implicaba la eliminación de O_2 como producto de desecho. Las cianobacterias son los modernos descendientes de estos primitivos productores fotosintéticos de oxígeno.

Dado que la atmósfera de la Tierra prácticamente no contenía oxígeno en las primeras fases de la evolución biológica, las células primitivas eran anaeróbicas. Los quimioheterótrofos podían oxidar compuestos orgánicos a CO_2 sin transferir electrones al O_2 sino a aceptores tales como el SO_4^{2-}, dando H_2S como producto. Con la aparición de las bacterias fotosintéticas productoras de O_2, la atmósfera fue enriqueciéndose progresivamente en oxígeno –un poderoso oxidante y un veneno mortal para los organismos anaeróbicos–. Respondiendo a la presión evolutiva del llamado "holocausto del oxígeno", algunos linajes de microorganismos dieron lugar a los organismos aeróbicos que obtenían su energía mediante el transporte de electrones desde moléculas de combustible hacia el oxígeno. Gracias a que las transferencias de electrones desde moléculas orgánicas al O_2 desprenden mucha energía, los organismos aeróbicos disfrutaron de ventajas energéticas sobre los anaeróbicos cuando ambos competían en un ambiente que contenía oxígeno. Esta ventaja dio como resultado el predominio de los organismos aeróbicos en ambientes ricos en O_2.

Las bacterias actuales habitan en la práctica totalidad de nichos ecológicos de la biosfera y el conjunto de bacterias es capaz de usar casi todos los tipos de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Las bacterias fotosintéticas tanto de aguas dulces como saladas captan la energía solar y la utilizan en la formación de glúcidos y otros compuestos celulares, los cuales, por su parte, son utilizados como alimento por otras formas de vida. El proceso evolutivo continúa y, en el caso de las bacterias de reproducción rápida, en una escala de tiempo que prácticamente nos permite observarlo en el laboratorio.

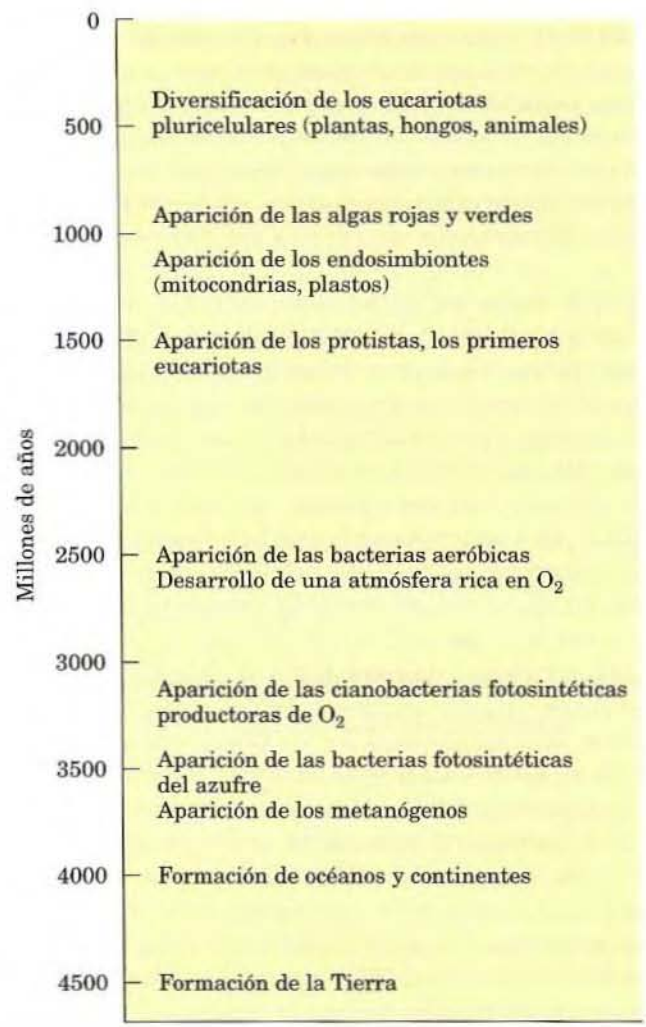


FIGURA 1-35 Hitos principales en la evolución de la vida en la Tierra.

Las células eucarióticas evolucionaron a partir de las procarióticas a través de diversas fases

A partir de hace aproximadamente 1500 millones de años, el registro fósil empieza a mostrar pruebas de la existencia de organismos mayores y más complejos, probablemente las primeras células eucarióticas (Fig. 1-35). No es posible deducir detalles acerca de los pasos evolutivos entre procariotas y eucariotas únicamente a partir del registro fósil, pero de la comparación morfológica y bioquímica de los organismos modernos se deduce la probable existencia de una secuencia de acontecimientos congruente con los datos aportados por los fósiles.

A lo largo del proceso que dio lugar a los eucariotas a partir de los procariotas debieron de producirse tres cambios principales. En primer lugar, al ir adquiriendo las células mayor cantidad de DNA, se perfeccionaron los mecanismos necesarios para su plegamiento en complejos discretos con proteínas específicas y para su división equitativa entre células hijas durante la división celular. Fueron necesarias proteínas especializadas para la estabilización del DNA plegado y para la segregación de los complejos proteína-DNA resultantes (*cromosomas*) durante la división celular. En segundo lugar, al aumentar el tamaño de las células, se desarrolló un sistema de membranas intracelulares que incluye una membrana doble que rodea al DNA. Esta membrana segrega el proceso nuclear de síntesis de RNA a partir de un molde de DNA del proceso citoplasmático de la síntesis de proteínas en los ribosomas. Finalmente, las células eucarióticas primitivas, incapaces de llevar a cabo la fotosíntesis o de usar metabolismo aeróbico, conjugaron sus ventajas con las de las bacterias aeróbicas o fotosintéticas para formar asociaciones **endosimbióticas** que se convirtieron en permanentes (Fig. 1-36). Algunas bacterias aeróbicas evolucionaron para dar lugar a las mitocondrias de los eucariotas modernos y algunas cianobacterias fotosintéticas se convirtieron en plástidos, como por ejemplo los cloroplastos de las algas verdes, probables ancestros de las modernas células vegetales. En la Tabla 1-3 se comparan las células procarióticas y eucarióticas.

En alguna fase posterior de la evolución, los organismos unicelulares descubrieron las ventajas de la asociación, que les permitió adquirir mayor movilidad, eficiencia y éxito reproductivo que sus competidores unicelulares. El proceso de evolución de estos organismos organizados en grupos dio lugar a asociaciones permanentes entre células individuales y, finalmente, a la especialización en el seno de la colonia, es decir, a la diferenciación celular.

Las ventajas de la especialización celular impulsaron la evolución de organismos cada vez más complejos y altamente diferenciados, en los que ciertas células llevaban a cabo las funciones sensoriales, otras las funciones digestivas, fotosintéticas o reproductoras y así sucesivamente. Muchos de los organismos multicelulares modernos contienen centenares de

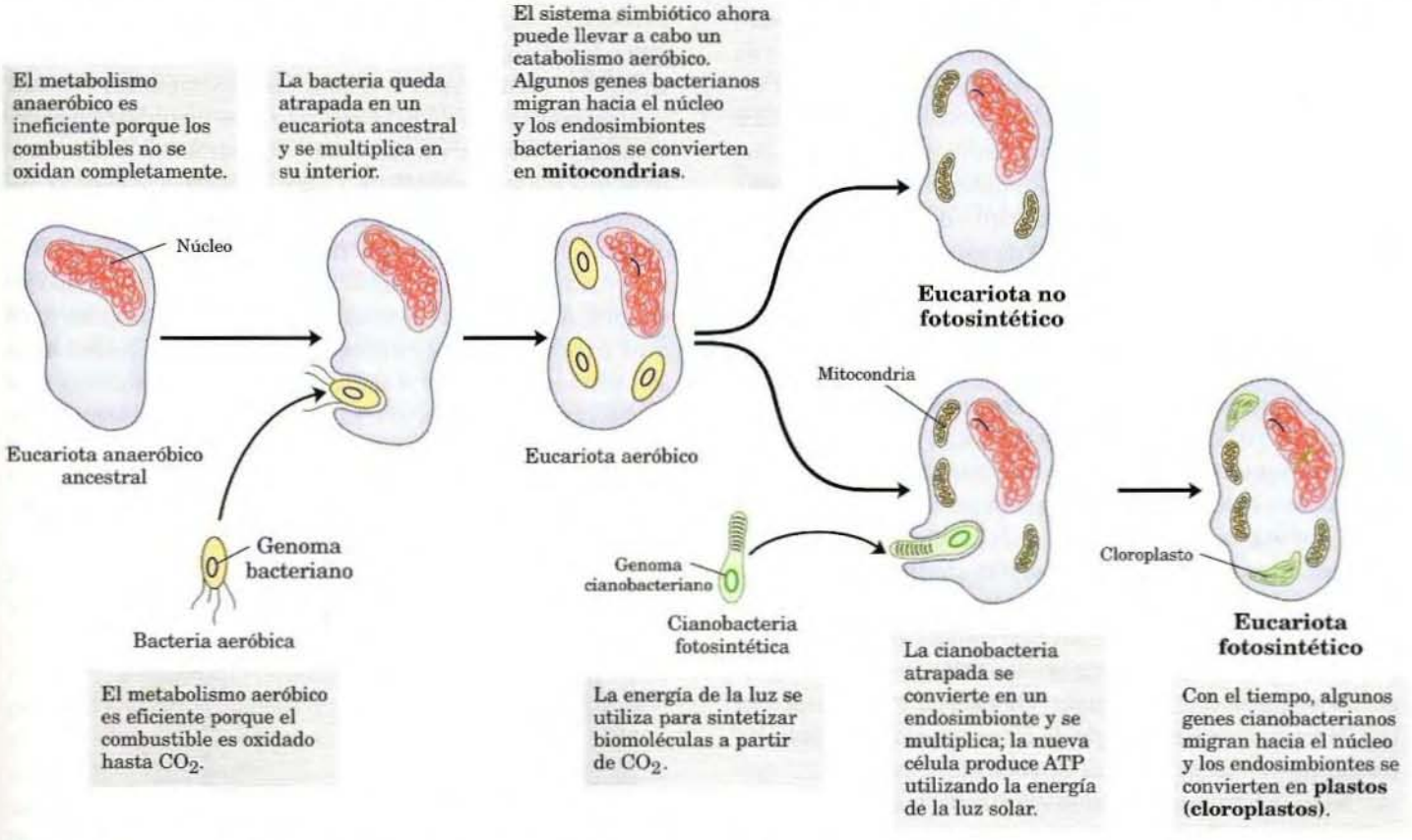


FIGURA 1-36 Evolución de los eucariotas mediante endosimbiosis. La célula eucariótica original, un anaerobio, asimiló bacterias púrpura endosimbióticas (amarillo) que poseían la capacidad de llevar a cabo catabolismo aeróbico y se convirtieron, con el paso del tiempo, en mitocondrias. Cuando las cianobacterias fotosintéticas (verde) se convirtieron también en endosimbióticas de algunos eucariotas aeróbicos, estas células se convirtieron en los precursores fotosintéticos de las algas verdes y plantas modernas.

TABLA 1-3 Comparación de las células eucarióticas y procarióticas

Característica	*Célula procariótica*	*Célula eucariótica*
Tamaño	Generalmente pequeña (1–10 μm)	Generalmente grande (5–100 μm)
Genoma	DNA con proteínas no histonas; genoma en el nucleoide, no rodeado de membrana	DNA complejado con proteínas histonas y no histonas en los cromosomas; cromosomas en el núcleo con envoltura nuclear
División celular	Fisión o gemación; no hay mitosis	Mitosis con huso mitótico; centriolos en muchos casos
Orgánulos unidos a membrana	Ausentes	Mitocondrias, cloroplastos (en plantas y algunas algas), retículo endoplasmático, complejo de Golgi, lisosomas (en animales), etc.
Nutrición	Absorción; algo de fotosíntesis	Absorción, ingestión; fotosíntesis en algunas especies
Metabolismo energético	Sin mitocondrias; enzimas oxidativos unidos a la membrana plasmática; gran variación de modelos metabólicos	Enzimas oxidativos empaquetados en mitocondrias; modelo más unificado de metabolismo oxidativo
Citoesqueleto	No hay	Complejo, con microtúbulos, filamentos intermedios, filamentos de actina
Movimiento intracelular	No hay	Corriente citoplasmática, endocitosis, fagocitosis, mitosis, transporte de vesículas

Fuente: modificado de Hickman, C.P., Roberts, L.S. & Hickman, F.M. (1990) *Biology of Animals*, 5.ª ed. p. 30, Mosby-Yearbook, Inc., St. Louis, MO.

tipos celulares distintos, estando cada uno de ellos especializado en alguna función necesaria para el organismo en su conjunto. Los mecanismos fundamentales que aparecieron inicialmente han seguido un proceso de refinamiento y mejora a lo largo de la evolución. En el movimiento de los cilios de *Paramecium* y de los flagelos de *Chlamydomonas* subyacen las mismas estructuras y mecanismos empleados en las altamente diferenciadas células espermáticas de los vertebrados.

La anatomía molecular revela relaciones evolutivas

Carolus Linnaeus, naturalista del siglo XVIII, observó las similitudes y diferencias anatómicas entre organismos vivos y diseñó un marco de referencia para valorar el grado de relación entre especies diferentes. Charles Darwin, en el siglo XIX, nos proporcionó una hipótesis unificadora para explicar la filogenia de los organismos modernos –el origen de las diferentes especies a partir de un ancestro común–. La investigación bioquímica del siglo XX reveló la anatomía molecular de las células de especies diferentes –las secuencias de subunidades monoméricas y las estructuras tridimensionales de moléculas de ácidos nucleicos y proteínas–. Los bioquímicos disponen hoy de un creciente repertorio de datos con el que analizar las relaciones evolutivas y refinar la teoría de la evolución.

Se ha determinado la secuencia completa del **genoma** (la información genética completa de un organismo) de numerosas eubacterias y de varias arquebacterias; de los microorganismos eucarióticos *Saccharomyces cerevisiae* y *Plasmodium* sp.; de las plantas *Arabidopsis thaliana* y arroz; y también de los animales multicelulares *Caenorhabditis elegans* (un gusano), *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre), el ratón, la rata y *Homo sapiens* (nosotros) (Tabla 1-4). Constantemente se añaden secuencias a esta lista. La disponibilidad de estas secuencias y la posibilidad de llevar a cabo comparaciones detalladas y cuantitativas entre especies permitirá profundizar en el proceso evolutivo. Hasta ahora, la filogenia molecular derivada de las secuencias génicas es congruente con la filogenia clásica basada en estructuras macroscópicas y en muchos casos es más precisa. La unidad de la vida a nivel molecular es evidente a pesar de la continua divergencia de los organismos a nivel anatómico; las estructuras y los mecanismos moleculares son extraordinariamente similares entre los organismos más simples y los más complejos. Es a nivel de las secuencias donde

Carolus Linnaeus, 1701–1778

Charles Darwin, 1809–1882

TABLA 1-4 Algunos organismos con genomas secuenciados por completo

Organismo	*Tamaño del genoma (en millones de pares de nucleótidos)*	*Interés biológico*
Mycoplasma pneumoniae	0,8	Produce neumonía
Treponema pallidum	1,1	Produce la sífilis
Borrelia burgdorferi	1,3	Produce la enfermedad de Lyme
Helicobacter pylori	1,7	Produce úlceras gástricas
Methanococcus jannaschii	1,7	¡Crece a 85 °C!
Haemophilus influenzae	1,8	Causa la gripe bacteriana
Methanobacterium thermoautotrophicum	1,8	Miembro de los Archaea
Archaeoglobus fulgidus	2,2	Metanógeno a alta temperatura
Synechocystis sp.	3,6	Cianobacteria
Bacillus subtilis	4,2	Bacteria común del suelo
Escherichia coli	4,6	Algunas cepas producen síndrome de choque tóxico
Saccharomyces cerevisiae	12,1	Eucariota unicelular
Plasmodium falciparum	23	Produce la malaria humana
Caenorhabditis elegans	97,1	Gusano multicelular
Anopheles gambiae	278	Vector de la malaria
Mus musculus domesticus	$2,5 \times 10^3$	Ratón de laboratorio
Homo sapiens	$2,9 \times 10^3$	Ser humano

estas similitudes se aprecian mejor, ya sea en las del DNA que codifica las proteínas o en las de las proteínas mismas.

Cuando dos genes comparten secuencias muy similares (en su DNA o en las proteínas codificadas), se dice que sus secuencias son homólogas y que las proteínas que codifican son **homólogos.** Si una *misma* especie contiene dos genes homólogos, estos dos genes y sus productos proteicos se denominan **parálogos.** Se piensa que los genes parálogos han aparecido por duplicación génica seguida de cambios graduales en las secuencias de cada una de las dos copias (Fig. 1-37). Generalmente, las proteínas parálogas son similares no únicamente en secuencia sino también en estructura tridimensional, aunque es habitual que hayan adquirido funciones diferentes a lo largo de su evolución.

Dos genes (o proteínas) homólogos de especies diferentes se denominan **ortólogos.** Es frecuente observar que los ortólogos tienen la misma función en ambos organismos, por lo que cuando se encuentra que una secuencia génica recién secuenciada es altamente ortóloga con un gen de otra especie se presume que el gen codifica una proteína con la misma función en las dos especies. De este modo resulta posible deducir la función de los productos génicos a partir de la secuencia genómica, sin necesidad de caracterización bioquímica alguna de la proteína codificada. Un **genoma anotado** contiene, además de la secuencia del DNA, una descripción de la probable función de cada producto génico deducida a partir de las comparaciones con otras secuencias genómicas con funciones proteicas establecidas. En principio, la identificación de las rutas (conjuntos de enzimas) codificadas en un genoma permite deducir directamente las capacidades metabólicas de un organismo.

Las diferencias secuenciales entre genes homólogos pueden utilizarse como una primera aproximación para medir el grado de divergencia evolutiva entre dos especies, es decir, el tiempo transcurrido desde que su precursor evolutivo común dio lugar a dos líneas con diferente destino evolutivo. A mayor número de diferencias secuenciales, mayor será el tiempo transcurrido desde la divergencia. Es posible construir una filogenia (o árbol evolutivo) donde la distancia evolutiva entre dos especies cualquiera se represente por su proximidad en el árbol (se muestra un ejemplo en la Fig. 1-4).

Al progresar la evolución van apareciendo nuevas estructuras, procesos o mecanismos reguladores que reflejan los cambios en los genomas de los organismos en evolución. El genoma de un eucariota simple tal como la levadura debería poseer genes relacionados con la formación de la membrana nuclear, no presentes en los procariotas. El de un insecto contendrá genes que codifiquen proteínas implicadas en la especificación de los segmentos corporales característicos de los insectos, unos genes que no se esperan en el genoma de levadura. El genoma de todos los vertebrados debe contener genes que especifiquen el desarrollo de la columna vertebral y los mamíferos deben poseer en exclusiva aquellos genes necesarios para el desarrollo de la placenta. Y así sucesivamente. La comparación de genomas completos de diferentes especies de cada *phylum* puede permitir la identificación de genes críticos para los cambios evolutivos en el plan corporal y el desarrollo.

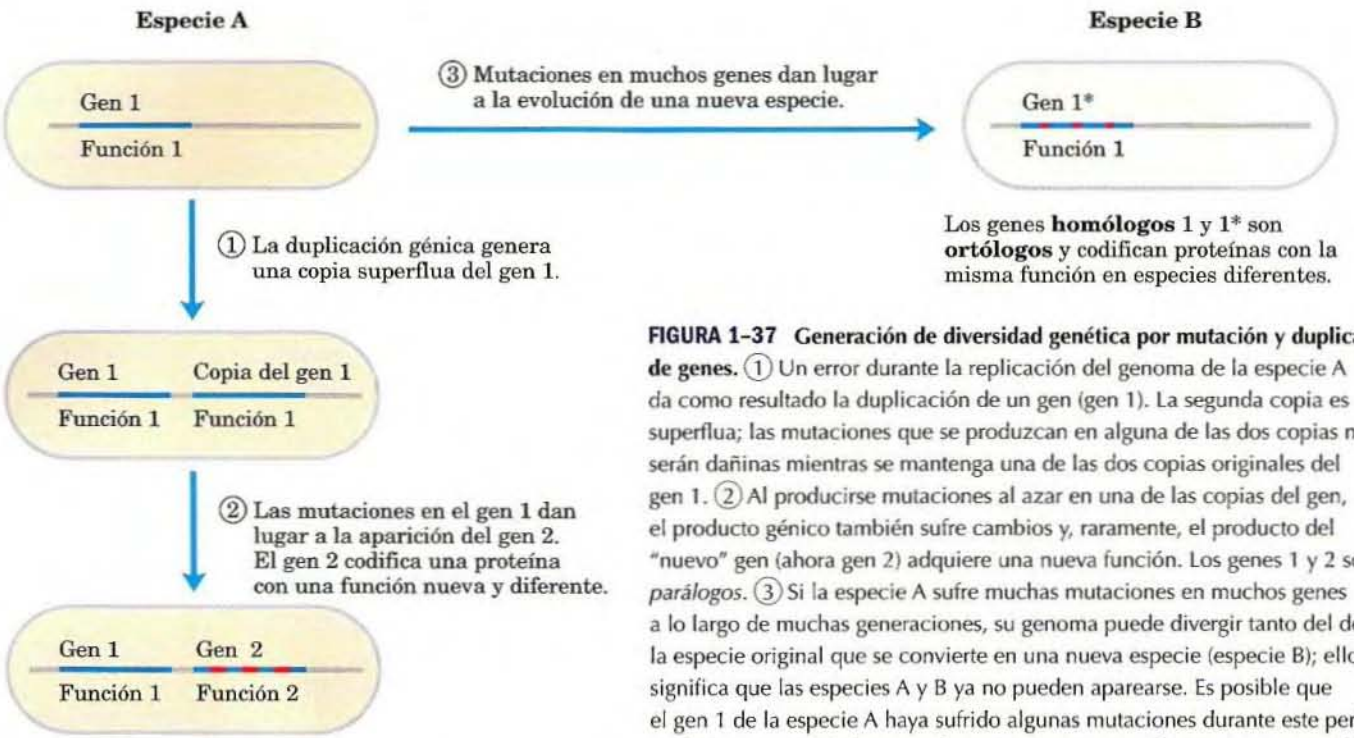


FIGURA 1-37 Generación de diversidad genética por mutación y duplicación de genes. ① Un error durante la replicación del genoma de la especie A da como resultado la duplicación de un gen (gen 1). La segunda copia es superflua; las mutaciones que se produzcan en alguna de las dos copias no serán dañinas mientras se mantenga una de las dos copias originales del gen 1. ② Al producirse mutaciones al azar en una de las copias del gen, el producto génico también sufre cambios y, raramente, el producto del "nuevo" gen (ahora gen 2) adquiere una nueva función. Los genes 1 y 2 son *parálogos*. ③ Si la especie A sufre muchas mutaciones en muchos genes a lo largo de muchas generaciones, su genoma puede divergir tanto del de la especie original que se convierte en una nueva especie (especie B); ello significa que las especies A y B ya no pueden aparearse. Es posible que el gen 1 de la especie A haya sufrido algunas mutaciones durante este período evolutivo (convirtiéndose en el gen 1*), aunque puede retener una porción suficiente del gen original como para ser reconocido como un *homólogo* de él y para que su producto tenga la misma función (o una función similar) que el producto del gen 1. El gen 1* es un *ortólogo* del gen 1.

La genómica funcional permite deducir la correspondencia entre genes y procesos celulares específicos

Cuando la tarea de la secuenciación del genoma y de la anotación de cada uno de los genes ha concluido, los investigadores en genética molecular pueden agrupar genes de acuerdo con los procesos en los que intervienen (síntesis del DNA, síntesis proteica, generación de ATP, etc.) y deducir qué fracción del genoma está dedicada a cada una de las actividades celulares. El conjunto más numeroso de genes de *E. coli*, *A. thaliana* y *H. sapiens* es el de los genes de función todavía desconocida y representa más del 40% en cada una de esas especies. Los transportadores de iones y pequeñas moléculas a través de las membranas plasmáticas suponen una importante proporción de genes en las tres especies, mayor en la bacteria y la planta que en el mamífero (10% de los 4269 genes de *E. coli*, ~8% de los 25.706 genes de *A. thaliana* y ~4% de los ~35.000 genes de *H. sapiens*). Los genes que codifican las proteínas y el RNA necesarios para la síntesis proteica representan entre el 3% y el 4% del genoma de *E. coli*, pero en las células más complejas de *A. thaliana* son necesarios más genes para dirigir las proteínas a su localización celular final que para la propia síntesis proteica (aproximadamente el 6% y el 2% de los genes, respectivamente). En general, cuanto más complejo es el organismo, mayor es la proporción de su genoma que codifica genes implicados en la *regulación* de procesos celulares y menor la proporción de los dedicados a los procesos básicos, como por ejemplo la generación de ATP y la síntesis de proteínas.

La comparación de genomas tendrá una importancia cada vez mayor en la biología y medicina humanas

Los genomas del chimpancé y del ser humano son idénticos en un 99,9% y, a pesar de ello, las diferencias entre las dos especies son enormes. Las relativamente pocas diferencias en la dotación genética deben explicar la posesión del lenguaje por parte de los humanos, las extraordinarias cualidades atléticas de los chimpancés, etc. La comparación de los genomas permitirá la identificación de genes que podrían estar relacionados con los programas de desarrollo de los seres humanos y de otros primates y con la aparición de funciones complejas. La imagen resultante será tanto más clara cuanto mayor sea el número de genomas de primates secuenciados para su comparación con el genoma humano.

De manera parecida, las diferencias en la dotación genética entre humanos son ínfimas en comparación con las diferencias entre humanos y chimpancés pero, a pesar de ello, estas diferencias dan cuenta de la variedad entre individuos. Todavía debemos aprender mucho acerca de la variabilidad secuencial entre humanos; durante la próxima década el aumento en la información genómica transformará los conceptos en el diagnóstico y tratamiento médicos. Podemos esperar que los tratamientos paliativos den paso a remedios curativos en algunas enfermedades genéticas y que se propongan medidas preventivas cada vez más efectivas relacionadas con la susceptibilidad a enfermedades asociada con ciertos marcadores genéticos. La "historia clínica" de hoy podría ser pronto reemplazada por un "pronóstico clínico". ■

RESUMEN 1.5 Fundamentos evolutivos

- Ciertas mutaciones en la herencia genética dan lugar a organismos mejor adaptados a la supervivencia en un nicho ecológico determinado y a la selección preferente de su progenie. Este proceso de mutación y selección conforma la base de la evolución darwiniana que ha dado como resultado los organismos actualmente existentes a partir de la primera célula y explica la similitud fundamental entre todos los organismos vivos.
- La vida apareció hace aproximadamente 3500 millones de años, probablemente gracias a la formación de compartimientos rodeados de membrana que contenían moléculas de RNA capaces de autorreplicarse. Los componentes de la primera célula surgieron probablemente como producto de la acción de las descargas eléctricas y las elevadas temperaturas sobre moléculas atmosféricas simples tales como CO_2 y NH_3.
- Las funciones catalítica y genética del genoma de RNA primigenio se separaron en el curso del tiempo, convirtiéndose el DNA en el material genómico y las proteínas en las moléculas catalíticas principales.
- Las células eucarióticas adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa de bacterias endosimbióticas. En los organismos multicelulares, líneas celulares diferenciadas se especializan en una o más funciones esenciales para la supervivencia del organismo.
- El conocimiento de las secuencias nucleotídicas completas de organismos de diferentes ramas del árbol filogenético proporciona datos sobre la evolución y la función de los organismos existentes y ofrece enormes oportunidades a la medicina humana.

Palabras clave

Todos los términos están definidos en el glosario.

metabolito 3
núcleo 3
genoma 3
eucariota 4
procariota 4
arquebacteria 4
eubacteria 4
citoesqueleto 9
estereoisómeros 16
configuración 16
centro quiral 17
conformación 19
entropía, *S* 23
entalpía, *H* 23
variación de energía libre, ΔG 23
reacción endergónica 23
reacción exergónica 23
equilibrio 24
variación de energía libre estándar, ΔG° 26
energía de activación, $\Delta G^\ddagger$ 26
catabolismo 27
anabolismo 27
metabolismo 27
mutación 31

Bibliografía

General

Fruton, J.S. (1999) *Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biochemistry,* Yale University Press, New Haven.
Un distinguido historiador de la bioquímica describe el desarrollo de esta ciencia y discute acerca de su impacto en la medicina, la farmacia y la agricultura.

Harold, F.M. (2001) *The Way of the Cell: Molecules, Organisms, and the Order of Life,* Oxford University Press, Oxford.

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology,* edición ampliada. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Un relato de gran autoridad y muy interesante sobre la aparición de la bioquímica y la biología molecular en el siglo xx.

Kornberg, A. (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* **26,** 6888–6891.
La importancia de aplicar técnicas químicas a problemas biológicos descrita por un eminente investigador.

Monod, J. (1971) *Chance and Necessity,* Alfred A. Knopf, Inc., New York. [Edición rústica Vintage Books, 1972.] Edición original en francés (1970) *Le hasard et la nécessité*, Editions du Seuil, Paris.
Una exploración de las implicaciones filosóficas de la biología.

Pace, N.R. (2001) The universal nature of biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98,** 805–808.
Una breve discusión sobre la definición mínima de vida, en la Tierra o en otro lugar.

Schrödinger, E. (1944) *What is Life?* Cambridge University Press, New York. [Reimpreso (1956) en *What is life? and Other Scientific Essays,* Doubleday Anchor Books, Garden City, NY.]
Una profunda y provocadora visión sobre la vida.

Fundamentos celulares

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004) *Biología molecular de la célula,* 4.ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
Un soberbio libro de texto sobre estructura y función celulares, que cubre todos los temas considerados en este capítulo y una referencia útil para muchos de los posteriores.

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J. & Hardin, J. (2000) *The World of the Cell,* 5.ª ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.
Un excelente libro de texto introductorio a la biología celular.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.R., Zipursky, S.L. & Darnell, J. (2003) *Molecular Cell Biology,* 5.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Al igual que el libro de Alberts y coautores, un texto soberbio, útil para éste y posteriores capítulos.

Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. & Heller, H.C. (2001) *Life: The Science of Biology,* 6.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Fundamentos químicos

Barta, N.S. & Stille, J.R. (1994) Grasping the concepts of stereochemistry. *J. Chem. Educ.* **71,** 20–23.

Una clara descripción del sistema RS de nomenclatura de los estereoisómeros, con consejos prácticos para determinar y recordar la quiralidad de los isómeros.

Brewster, J.H. (1986) Stereochemistry and the origins of life. *J. Chem. Educ.* **63,** 667–670.

Una interesante y lúcida discusión sobre el modo en que la evolución pudo haber seleccionado tan sólo uno de los dos estereoisómeros para la construcción de proteínas y otras moléculas.

Kotz, J.C. & Treichel, P., Jr. (1998) *Chemistry and Chemical Reactivity,* Saunders College Publishing, Fort Worth, TX.

Una completa y excelente introducción a la química.

Vollhardt, K.P.C. & Shore, N.E. (2005) *Química orgánica: estructura y función,* Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Estereoquímica, grupos funcionales, reactividad y la química de las principales clases de biomoléculas.

Fundamentos físicos

Atkins, P. W. (1999) *Química física,* 6.ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Atkins, P.W. & Jones, L. (1998) *Química: moléculas, materia, cambio,* Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Blum, H.F. (1968) *Time's Arrow and Evolution,* 3.ª ed., Princeton University Press, Princeton.

Una excelente discusión sobre la influencia de la segunda ley de la termodinámica en la evolución biológica

Fundamentos genéticos

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287,** 2185–2195.

Secuencia completa del genoma de la mosca del vinagre.

***Arabidopsis* Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408,** 796–815.

***C. elegans* Sequencing Consortium.** (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282,** 2012–2018.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewinton, R.C. & Miller, J.H. (2002) *Modern Genetic Analysis: Integrating Genes and Genomes,* W. H. Freeman and Company, New York.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409,** 860–921.

Jacob, F. (1973) *The Logic of Life: A History of Heredity,* Pantheon Books, Inc., New York. Traducción del original (1970) *La logique du vivant: une historie de l'hérédité*, Editions Gallimard, Paris

Una descripción histórica y filosófica del camino por el que hemos llegado al actual grado de comprensión de la vida a nivel molecular.

Pierce, B. (2002) *Genetics: A Conceptual Approach,* W. H. Freeman and Company, New York.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291,** 1304–1351.

Fundamentos evolutivos

Brow, J.R. & Doolittle, W.F. (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61,** 456–502.

Una completa discusión sobre los argumentos que permiten situar los Archaea en el árbol filogenético que conduce a los organismos multicelulares.

Darwin, C. (1964) *On the Origin of Species: A Facsimile of the First Edition (published in 1859),* Harvard University Press, Cambridge.

Uno de los trabajos científicos más influyentes de la historia.

de Duve, C. (1995) The beginnings of life on earth. *Am. Sci.* **83,** 428–437.

Una explicación de la sucesión de pasos químicos que condujo a los primeros organismos vivos.

de Duve, C. (1996) The birth of complex cells. *Sci. Am.* **274** (abril), 50–57.

Dyer, B.D. & Obar, R.A. (1994) *Tracing the History of Eukaryotic Cells: The Enigmatic Smile,* Columbia University Press, New York.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52.**

Una colección de casi 100 artículos sobre todos los aspectos de la evolución prebiótica y de la evolución biológica temprana; probablemente la mejor referencia sobre evolución molecular.

Fenchel, T. & Finlay, B.J. (1994) The evolution of life without oxygen. *Am. Sci.* **82,** 22–29.

Discusión sobre la hipótesis endosimbiótica a la luz de los actuales organismos anaeróbicos endosimbióticos.

Gesteland, R.F. & Atkins, J.F. (eds.) (1993) *The RNA World,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Una colección de interesantes revisiones sobre un amplio número de temas relacionados con el mundo de RNA.

Hall, B.G. (1982) Evolution on a Petri dish: the evolved β-galactosidase system as a model for studying acquisitive evolution in the laboratory. *Evolutionary Biol.* **15,** 85–150.

Knoll, A.H. (1991) End of the Proterozoic eon. *Sci. Am.* **265** (octubre), 64–73.

Discusión sobre el hecho de que un aumento en el oxígeno atmosférico dio lugar al desarrollo de organismos multicelulares.

Lazcano, A. & Miller, S.L. (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* **85,** 793–798.

Los últimos estudios sobre el origen de la vida: atmósferas primitivas, surgencias submarinas, origen autótrofo frente a origen heterótrofo, los mundos de RNA y pre-RNA y el tiempo requerido para que se originase la vida.

Margulis, L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93,** 1071–1076.

Describe los argumentos que justifican la división de los seres vivos en cinco reinos: Monera, Protoctista, Fungi, Animalia, Plantae. (Compárese con el artículo de Woese et al.)

Margulis, L., Gould, S.J., Schwartz, K.V. & Margulis, A.R. (1998) *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 3.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Descripción de los principales grupos de organismos, bellamente ilustrada con micrografías electrónicas y dibujos.

Mayr, E. (1997) *This Is Biology: The Science of the Living World*, Belknap Press, Cambridge, MA.

Una historia del desarrollo de la ciencia, con énfasis especial en la evolución darwiniana y a cargo de un eminente darwinista.

Miller, S.L. (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52,** 17–27.

Resumen de los experimentos de laboratorio sobre evolución química, a cargo de la persona que llevó a cabo el experimento de Miller-Urey original.

Morowitz, H.J. (1992) *Beginnings of Cellular Life: Metabolism Recapitulates Biogenesis*, Yale University Press, New Haven.

Schopf, J.W. (1992) *Major Events in the History of Life*, Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Smith, J.M. & Szathmáry, E. (1995) *The Major Transitions in Evolution*, W. H. Freeman and Company, New York.

Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87,** 4576–4579.

Describe los argumentos que justifican la división de los seres vivos en tres reinos. [Compárese con el artículo de Margulis (1996) citado antes.]

Problemas

A continuación se proponen algunos problemas relacionados con el contenido del capítulo. (Al resolver los problemas del final del capítulo puede ser conveniente referirse a las tablas que se encuentran en la contracubierta posterior.) Cada problema recibe un título para facilitar su referencia y discusión.

1. El tamaño de las células y sus componentes

(a) Si se pudiera aumentar una célula 10.000 veces (que es el típico aumento que se consigue con un microscopio electrónico), ¿qué tamaño tendría? Se supone que se observa una "típica" célula eucariótica con un diámetro celular de 50 μm.

(b) Si esta célula fuera una célula muscular (miocito), ¿cuántas moléculas de actina podría albergar? (Se considera que la célula muscular es esférica y que no hay otros componentes presentes; las moléculas de actina son esféricas con un diámetro de 3,6 nm. El volumen de una esfera es de $4/3\pi r^3$).

(c) Si la célula fuera una célula hepática (hepatocito) de las mismas dimensiones, ¿cuántas mitocondrias podría contener? (Se considera que la célula es esférica, que no hay otros componentes presentes y que la mitocondria es esférica con un diámetro de 1,5 μm.)

(d) La glucosa es el principal nutriente energético para la mayoría de las células. Suponiendo que está presente en concentraciones de 1 mM, calcular cuántas moléculas de glucosa estarían presentes en la hipotética (y esférica) célula eucariótica. (El número de Avogadro, el número de moléculas en un mol de una sustancia no ionizada, es de $6{,}02 \times 10^{23}$.)

(e) La hexoquinasa es un enzima importante en el metabolismo de la glucosa. Si la concentración de hexoquinasa en nuestra célula eucariótica es de 20 μM, ¿cuántas moléculas de glucosa estarán disponibles para ser metabolizadas por cada molécula de hexoquinasa?

2. Componentes de *E. coli* Las células de *E. coli* tienen forma de varilla, con aproximadamente 2 μm de longitud y 0,8 μm de diámetro. El volumen de un cilindro es de $\pi r^2 h$, donde h es la altura del cilindro.

(a) Si la densidad media de *E. coli* es de $1{,}1 \times 10^3$ g/L, ¿cuál es la masa de una sola célula?

(b) La pared celular protectora de *E. coli* tiene un grosor de 10 nm. ¿Cuál es el porcentaje del volumen total de la bacteria ocupado por la pared?

(c) *E. coli* es capaz de crecer y multiplicarse rápidamente gracias a la presencia de unos 15.000 ribosomas esféricos (diámetro 18 nm) en cada célula, que llevan a cabo la síntesis de proteínas. ¿Cuál es el porcentaje del volumen celular total ocupado por los ribosomas?

3. Información genética en el DNA de *E. coli* La información genética contenida en el DNA consiste en una secuencia lineal de unidades codificantes sucesivas, denominadas codones. Cada codón es una secuencia específica de tres desoxirribonucleótidos (tres pares de desoxirribonucleótidos en el DNA de doble cadena) y cada codón codifica un único aminoácido en una proteína. La masa molecular de una molécula de DNA de *E. coli* es de $3{,}1 \times 10^9$ g/mol. La masa molecular media de un par de nucleótidos es de 660 g/mol y cada nucleótido contribuye con 0,34 nm a la longitud del DNA.

(a) Calcular la longitud de una molécula de DNA de *E. coli*. Comparar la longitud de la molécula de DNA con las dimensiones reales de la célula (véase Problema 2). ¿Cómo puede caber la molécula de DNA en el interior de la célula?

(b) Considérese que la proteína promedio de *E. coli* tiene una cadena de 400 aminoácidos. ¿Cuál es el número máximo de proteínas que pueden ser codificadas por una molécula de DNA de *E. coli*?

4. El elevado régimen del metabolismo bacteriano Las células bacterianas tienen un metabolismo mucho más rápido que las células animales. En condiciones ideales, algunas bacterias multiplican su tamaño por dos y se dividen en 20 min, mientras que la mayoría de células animales requieren 24 h en condiciones de crecimiento rápido. La elevada tasa del metabolismo bacteriano exige que la relación entre la superficie celular y su volumen sea grande.

(a) ¿Cuál es la razón de que la relación superficie-volumen tenga efecto sobre la velocidad del metabolismo?

(b) Calcular la relación superficie-volumen para la bacteria esférica *Neisseria gonorrhoeae* (diámetro 0,5 μm), responsable de la enfermedad denominada gonorrea. Compararla con la relación superficie-volumen de una ameba globular, una célula eucariótica de gran tamaño (150 μm de diámetro). El área de una esfera es $4\pi r^2$.

5. Transporte axonal rápido Las neuronas poseen extensiones largas y finas denominadas axones, que son estructuras especializadas que conducen señales a través del sistema nervioso de un organismo. Algunas extensiones axonales pueden tener hasta 2 m –por ejemplo, los axones que se originan

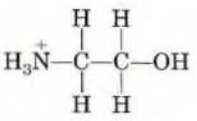
en la médula espinal y terminan en los músculos de los dedos de los pies–. Pequeñas vesículas membranosas que transportan materiales esenciales para la función axonal se mueven a lo largo de microtúbulos del citoesqueleto, desde el cuerpo de la célula hasta la punta de los axones.

(a) Si la velocidad media de una vesícula es de 1 μm/s, ¿cuánto tiempo tarda una vesícula en moverse desde el cuerpo celular en la médula espinal hasta la punta del axón en los dedos de los pies?

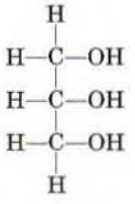
(b) El movimiento de moléculas grandes en las células mediante difusión es relativamente lento. (Por ejemplo, la hemoglobina difunde aproximadamente a una velocidad de 5 μm/s.) Sin embargo, la difusión de la sacarosa en disolución acuosa sucede a una velocidad que se aproxima a la de los mecanismos de transporte celular rápido (aproximadamente 4 μm/s). ¿Cuáles son las ventajas, para la célula o para un organismo, de los mecanismos de transporte rápido dirigido comparados con la simple difusión?

6. Vitamina C: ¿Es tan buena la vitamina sintética como la natural? Los productores de alimentos "sanos" insisten en que las vitaminas obtenidas de fuentes naturales son más saludables que las obtenidas por métodos sintéticos. Se dice, por ejemplo, que el ácido L-ascórbico puro (vitamina C) obtenido de escaramujos es mejor que el ácido L-ascórbico puro obtenido en una planta química. ¿Son diferentes las dos vitaminas? ¿Puede el organismo distinguir la fuente de una vitamina?

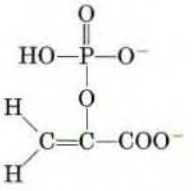
7. Identificación de grupos funcionales En las Figuras 1-15 y 1-16 se muestran algunos de los grupos funcionales más comunes de las biomoléculas. Es importante saberlos identificar, puesto que las actividades y las propiedades biológicas de las biomoléculas están determinadas en gran parte por sus grupos funcionales. Identificar y nombre cada uno de los grupos funcionales que forman parte de las siguiente moléculas.



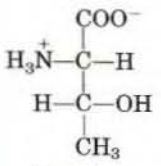
Etanolamina
(a)



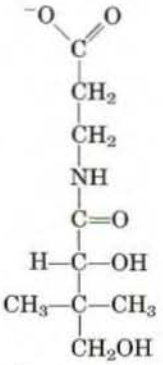
Glicerol
(b)



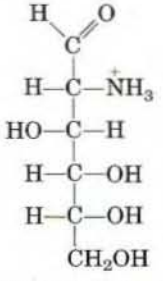
Fosfoenolpiruvato, un intermediario del metabolismo de la glucosa
(c)



Treonina, un aminoácido
(d)

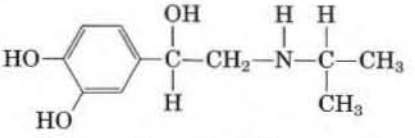


Pantotenato, una vitamina
(e)



D-Glucosamina
(f)

8. Actividad de fármacos y estereoquímica En ocasiones, las diferencias cuantitativas en la actividad biológica de dos enantiómeros de un compuesto son bastante grandes. Por ejemplo, el isómero D del fármaco isoprotenerol, utilizado en el tratamiento del asma, es entre 50 y 80 veces más efectivo como broncodilatador que el isómero L. Identificar el centro quiral del isoprotenerol. ¿Cuál puede ser la causa de que dos enantiómeros posean actividades biológicas tan radicalmente diferentes?

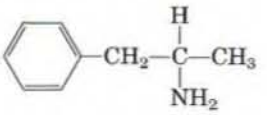


Isoproterenol

9. Separación de biomoléculas Al estudiar una biomolécula determinada (una proteína, ácido nucleico, glúcido o lípido) en el laboratorio, el bioquímico necesita en primer lugar separarla del resto de biomoléculas de la muestra –es decir, *purificarla*–. Más adelante se considerarán las técnicas específicas de purificación. Sin embargo, considerando simplemente las unidades monoméricas que constituyen las biomoléculas más complejas, deberíamos tener algunas ideas sobre qué características de esas biomoléculas nos permitirían separar unas de otras. Por ejemplo, ¿cómo se podrían separar (a) aminoácidos de ácidos grasos y (b) nucleótidos de glucosa?

10. ¿Una vida basada en el silicio? El silicio pertenece al mismo grupo de la tabla periódica que el carbono y, como éste, puede formar hasta cuatro enlaces simples. Se han escrito muchas historias de ciencia ficción sobre la posibilidad de una vida basada en el silicio. ¿Sería esto posible? ¿Que características del silicio lo hacen *menos* apto para actuar como el elemento central organizador de la vida? Para responder a esta pregunta se puede utilizar lo aprendido acerca de la versatilidad de enlace del carbono, además de referirse a un libro de química inorgánica para averiguar las propiedades de enlace del silicio.

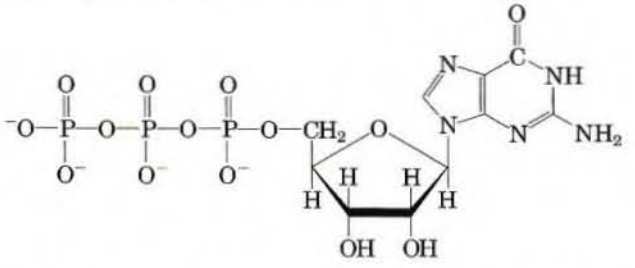
11. Acción farmacológica y estructura molecular Hace algunos años dos compañías farmacéuticas comercializaron un fármaco bajo los nombres comerciales de Dexedrina y Benzedrina. La estructura del compuesto es:



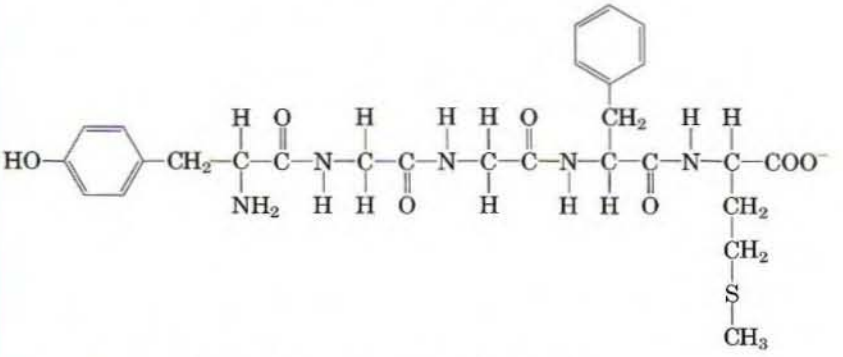
Las propiedades físicas (análisis elemental de C, H y N, punto de fusión, solubilidad, etc.) de la Dexedrina y de la Benzedrina eran idénticas. La dosis oral recomendada de Dexedrina (que todavía se encuentra a la venta) era de 5 mg/día, pero la dosis recomendada de Benzedrina (retirada del mercado) era el doble. Aparentemente hacía falta mucha más Benzedrina que Dexedrina para conseguir la misma respuesta fisiológica. Explicar esta contradicción aparente.

12. Componentes de biomoléculas complejas En la Figura 1-10 se muestran las estructuras de los principales componentes de biomoléculas complejas. Identificar los constituyentes de cada una de las tres biomoléculas que se muestran a continuación (en sus formas ionizadas a pH fisiológico).

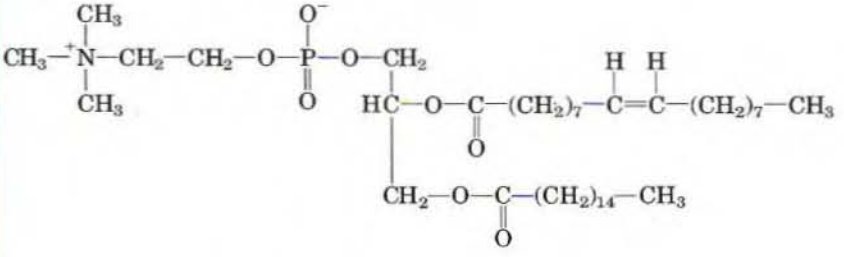
(a) Guanosina trifosfato (GTP), un nucleótido rico en energía que sirve de precursor del RNA:



(b) Metionina-encefalina, el opiáceo endógeno del cerebro:



(c) Fosfatidilcolina, un componente habitual de las membranas:



13. Determinación de la estructura de una biomolécula Se aisló una sustancia desconocida, X, a partir del músculo de conejo. La estructura de X se determinó a partir de los siguiente experimentos y observaciones. El análisis cuantitativo demostró que X se componía exclusivamente de C, H y O. Se oxidó completamente una muestra de X de peso conocido y se midieron las cantidades de H_2O y CO_2 producidas. A partir de este análisis cuantitativo, se llegó a la conclusión de que contenía un 40,00% de C, un 6,71% de H y un 53,29% de O en peso. Se determinó la masa molecular de X con un espectrómetro de masas y resultó ser de 90,00 u (unidades de masa atómica; véase Recuadro 1-1). Un espectro infrarrojo de X demostró que contenía un enlace doble. X se disolvía rápidamente en agua para dar una disolución ácida. Se ensayó una disolución de X en un polarímetro, observándose que poseía actividad óptica.

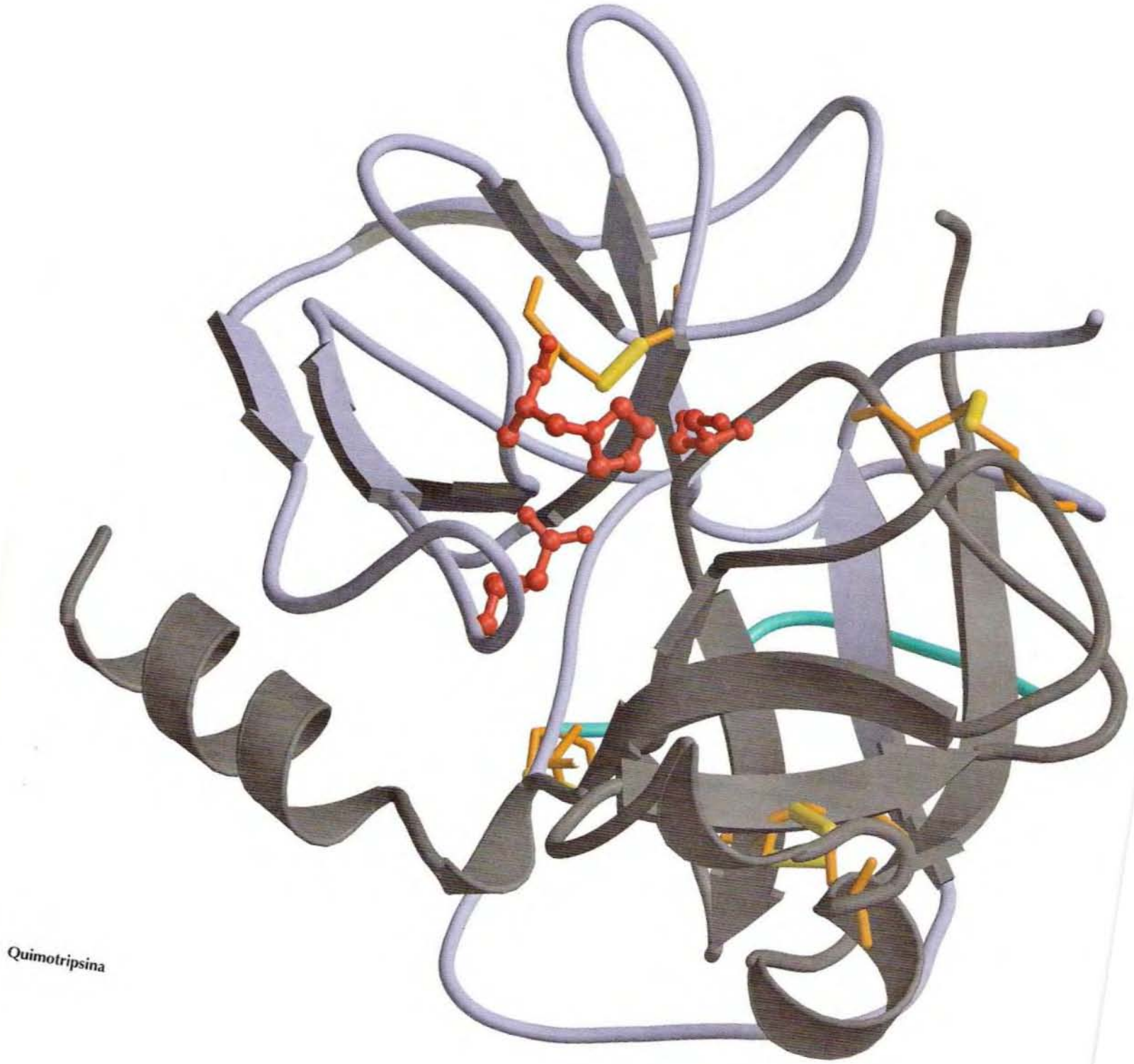
(a) Determinar la fórmula empírica y molecular de X.

(b) Dibujar las posibles estructuras de X que sean congruentes con la fórmula molecular y contengan un doble enlace. Considérense *tan sólo* estructuras lineales o ramificadas y no estructuras cíclicas. Recuérdese que los enlaces del oxígeno consigo mismo son poco estables.

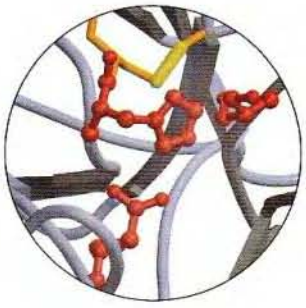
(c) ¿Cuál es el significado estructural de la actividad óptica observada? ¿Que estructuras de (b) son congruentes con esta observación?

(d) ¿Cuál es el significado estructural de la observación acerca del carácter acídico de una disolución de X? ¿Qué estructuras de (b) son congruentes con esta observación?

(e) ¿Cuál es la estructura de X? ¿Existe más de una estructura congruente con todos los datos aportados?



Quimotripsina



PARTE

ESTRUCTURA Y CATÁLISIS

2 El agua *47*
3 Aminoácidos, péptidos y proteínas *75*
4 Estructura tridimensional de las proteínas *116*
5 Función de las proteínas *157*
6 Enzimas *190*
7 Glúcidos y glucobiología *238*
8 Nucleótidos y ácidos nucleicos *273*
9 Tecnologías de la información basadas en el DNA *306*
10 Lípidos *343*
11 Membranas biológicas y transporte *369*
12 Bioseñalización *421*

El investigador alemán Eduard Buchner descubrió en 1897 que era posible fermentar azúcar, no sólo con levadura ordinaria, sino también con la ayuda de extractos de levadura que no contenían ninguna de las células de Saccharomyces... ¿Por qué se consideró que este experimento, aparentemente trivial, tenía tanta importancia? La respuesta es evidente si se considera el desarrollo de las investigaciones dedicadas a la elucidación de la naturaleza química (de la vida)... en ellas, y de modo más insistente que en la mayoría de campos de investigación, ha habido una tendencia a considerar lo inexplicado como inexplicable... De este modo, la levadura está formada por células vivas y la fermentación era considerada por la mayoría de investigadores –Pasteur entre ellos– como una manifestación de la vida, es decir, debería estar inextricablemente asociada con los procesos vitales en esas células. El descubrimiento de Buchner demostró que ello no era así. Se puede decir que, a partir de entonces y de repente, una parte importante de los procesos vitales pasó de las células a los laboratorios de los químicos para ser estudiados mediante metodologías químicas. También permitió demostrar que, además de la fermentación, la combustión y la respiración, la rotura de proteínas, grasas y glúcidos y muchas otras reacciones similares que caracterizan a la célula viva podían ser imitadas en el tubo de ensayo sin que hiciera falta ninguna colaboración por parte de las células y que, en general, estas reacciones y los procesos químicos ordinarios están gobernados por las mismas leyes.

—A. Tiselius, en la conferencia de presentación del Premio Nobel de Química otorgado a James B. Sumner, John H. Northrop y Wendell M. Stanley, 1946

El descubrimiento pionero de Buchner supuso el nacimiento de la ciencia bioquímica. Su hallazgo abrió las puertas a un mundo químico que ha inspirado a generaciones de investigadores durante más de un siglo. La bioquímica es precisamente la química de la vida: sí, resulta posible investigar, analizar y comprender la vida. Para empezar con ello, todo estudiante de bioquímica necesita un lenguaje y algunos fundamentos básicos; son los que se tratan en la Parte I.

Los capítulos de la Parte I se dedican a la estructura y función de las principales clases de componentes celulares: el agua (Capítulo 2), los aminoácidos y las proteínas (Capítulos 3 a 6), los azúcares y los polisacáridos (Capítulo 7), los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8), los ácidos grasos y los lípidos (Capítulo 10) y, finalmente, las membranas y las proteínas señalizadoras de membrana (Capítulos 11 y 12). Los temas dedicados a las moléculas contienen información suplementa-

ria acerca de las tecnologías usadas para estudiarlas. Algunas de las secciones técnicas se hallan integradas en las descripciones moleculares, aunque se dedica un capítulo entero (Capítulo 9) a una descripción integrada de los modernos avances de la biotecnología que han permitido acelerar el ritmo de la investigación y los descubrimientos.

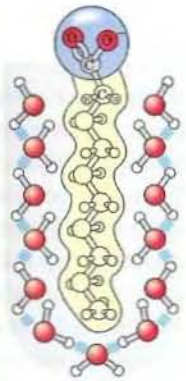
Las moléculas que se encuentran en la célula son una parte principal del lenguaje de la bioquímica; es necesario estar familiarizado con ellas para comprender los temas más avanzados que se discuten en este libro y para apreciar la interesante y cada vez más voluminosa literatura sobre bioquímica. Empezaremos con el agua porque sus propiedades afectan a la estructura y la función de todos los demás constituyentes celulares. Para cada clase de molécula orgánica estudiaremos en primer lugar la estructura covalente de sus unidades monoméricas (aminoácidos, monosacáridos, nucleótidos y ácidos grasos) para pasar luego a describir las estructuras de las macromoléculas y complejos supramoleculares derivados de ellas. Un aspecto constantemente presente es que las macromoléculas poliméricas de los sistemas vivos, aunque de gran tamaño, son entidades químicas muy ordenadas con secuencias específicas de las subunidades monoméricas, lo que da lugar a estructuras y funciones concretas. Este aspecto fundamental se puede descomponer en tres principios interrelacionados: (1) la estructura única de cada macromolécula determina su función; (2) las interacciones no covalentes juegan un papel crítico en la estructura y por tanto en la función de las macromoléculas; y (3) las subunidades monoméricas en las macromoléculas poliméricas están dispuestas según secuencias específicas, lo que representa una forma de información de la que depende el estado vivo ordenado.

La relación entre estructura y función es especialmente evidente en las proteínas, ya que muestran una extraordinaria diversidad de funciones. Una secuencia polimérica concreta de aminoácidos produce una estructura fibrosa resistente tal como la que se encuentra en el cabello y en la lana; otra secuencia da lugar a una proteína que transporta oxígeno en la sangre; una tercera se une a otras proteínas y cataliza la rotura de los enlaces entre sus aminoácidos. De modo parecido se pueden entender las funciones especiales de los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos como una manifestación directa de su estructura química, con sus subunidades monoméricas características unidas en precisos polímeros funcionales. Los azúcares enlazados entre sí se transforman en almacenes de energía, en fibras estructurales y en puntos de reconocimiento molecular específico; los nucleótidos encadenados en el DNA o RNA contienen las instrucciones para la construcción de un organismo completo; y los lípidos agregados forman las membranas. En el Capítulo 12 se unifica la discusión de las funciones de las biomoléculas, describiendo de qué modo sistemas de señalización específicos regulan las actividades de las biomoléculas dentro de una célula, dentro de un órgano y entre órganos para mantener un organismo en homeostasis.

A medida que pasamos de unidades monoméricas a polímeros cada vez mayores, el enfoque químico se desplaza desde los enlaces covalentes a las interacciones no covalentes. Las propiedades de los enlaces covalentes, tanto de las unidades monoméricas como de los enlaces que las conectan en los polímeros, imponen restricciones sobre las formas adoptadas por las moléculas grandes. Son, sin embargo, las numerosas interacciones no covalentes las que dictan la conformación nativa estable de las moléculas grandes a la vez que permiten la flexibilidad necesaria para su función biológica. Como veremos, las interacciones no covalentes son esenciales para que los enzimas manifiesten su poder catalítico así como para la interacción específica de los pares de bases complementarias en los ácidos nucleicos, el ordenamiento y propiedades de los lípidos en las membranas y la interacción de una hormona o factor de crecimiento con su receptor de membrana.

El principio de que las secuencias de unidades monoméricas son ricas en información aparece de manera clara en la discusión de los ácidos nucleicos en el Capítulo 8. No obstante, las proteínas y algunos polímeros cortos de azúcares (oligosacáridos) también son moléculas ricas en información. La secuencia de aminoácidos es una forma de información que dirige el plegamiento de la proteína hacia su estructura tridimensional única y, en último término, determina la función de la misma. Algunos oligosacáridos también tienen secuencias y estructuras tridimensionales únicas que pueden ser reconocidas por otras macromoléculas.

Para cada clase de moléculas encontramos una jerarquía estructural similar en la que subunidades de estructura determinada se conectan mediante enlaces de flexibilidad limitada formando macromoléculas de estructura tridimensional determinada por interacciones no covalentes. Estas macromoléculas interaccionan a su vez para formar las estructuras supramoleculares y los orgánulos que permiten a una célula llevar a cabo sus numerosas funciones metabólicas. En su conjunto las moléculas descritas en la Parte I son el material de la vida. Empezaremos por el agua.



capítulo 2

EL AGUA

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos *47*

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles *60*

2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos *65*

2.4 El agua como reactivo *69*

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos *70*

Creo que con la progresiva aplicación de los métodos de la química estructural a los problemas fisiológicos, observaremos que la importancia del enlace de hidrógeno en fisiología es mayor que la de cualquier otra característica estructural

—*Linus Pauling*, The Nature of the Chemical Bond, *1939*

¿Qué es lo que Bloom, amante del agua, extractor de agua y de agua acarreador admiró en el agua al volver? Su universalidad, su virtud democrática.

—*James Joyce*, Ulises, *1922*

El agua es la sustancia más abundante en los sistemas vivos, constituyendo el 70% o más del peso de la mayoría de organismos. Los primeros organismos vivos aparecieron en un entorno acuoso y el curso de la evolución ha sido moldeado por las propiedades del medio acuoso en que se inició la vida.

Este capítulo se inicia con la descripción de las propiedades físicas y químicas del agua, a las que se adaptan todas las características de la estructura y función celulares. Las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua y la débil tendencia del agua a ionizarse tienen una importancia crucial para la estructura y función de las biomoléculas. Trataremos el tema de la ionización en términos de constantes de equilibrio, pH y curvas de titulación y consideraremos la forma en la que las soluciones acuosas de ácidos o bases débiles y de sus sales actúan como tampones contra los cambios de pH en los sistemas biológicos. La molécula de agua y sus productos de ionización, H^+ y OH^-, influyen de manera profunda sobre la estructura, autoformación y propiedades de los componentes celulares. Las interacciones no covalentes responsables de la fuerza y de la especificidad de "reconocimiento" entre las biomoléculas están influidas de manera decisiva por las propiedades disolventes del agua, entre las que se incluye su capacidad para formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con los solutos.

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

Los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua proporcionan las fuerzas de cohesión que hacen que el agua sea líquida a temperatura ambiente y favorecen el extremo ordenamiento de las moléculas, típico del agua cristalina (hielo). Las biomoléculas polares se disuelven fácilmente en el agua porque pueden reemplazar las interacciones agua-agua por interacciones agua-soluto energéticamente más favorables. Por el contrario, las biomoléculas apolares interfieren en las interacciones agua-agua pero no son capaces de formar interacciones agua-soluto –en consecuencia, las moléculas apolares son muy poco solubles en agua–. En soluciones acuosas, las moléculas apolares tienden a agruparse entre sí.

Los puentes de hidrógeno y los enlaces iónicos, las interacciones hidrofóbicas (del griego, "temor al agua") y de van der Waals son individualmente débiles, pero colectivamente tienen una influencia muy significativa sobre la estructura tridimensional de las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos de membrana.

Los puentes de hidrógeno confieren al agua sus propiedades extraordinarias

El agua tiene un punto de fusión, un punto de ebullición y un calor de vaporización más elevados que la mayoría de disolventes comunes (Tabla 2-1). Estas propiedades del agua se

TABLA 2-1 Punto de fusión, punto de ebullición y calor de vaporización de algunos disolventes comunes

	Punto de fusión (°C)	*Punto de ebullición (°C)*	*Calor de vaporización (J/g)**
Agua	0	100	2260
Metanol (CH_3OH)	−98	65	1100
Etanol (CH_3CH_2OH)	−117	78	854
Propanol ($CH_3CH_2CH_2OH$)	−127	97	687
Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$)	−90	117	590
Acetona (CH_3COCH_3)	−95	56	523
Hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$)	−98	69	423
Benceno (C_6H_6)	6	80	394
Butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$)	−135	−0,5	381
Cloroformo ($CHCl_3$)	−63	61	247

*La energía calórica necesaria para convertir 1,0 g de un líquido en su punto de ebullición, a presión atmosférica, en su estado gaseoso a la misma temperatura. Es una medida directa de la energía requerida para superar las fuerzas de atracción entre las moléculas en la fase líquida.

deben a la atracción entre moléculas de agua adyacentes, lo que confiere al agua líquida una gran cohesión interna. Un vistazo a la estructura electrónica de la molécula de H_2O permite deducir la causa de estas fuerzas de atracción intermolecular.

Cada átomo de hidrógeno de una molécula de agua comparte un par electrónico con el átomo de oxígeno central. La geometría de la molécula de agua sigue las formas de los orbitales electrónicos externos del átomo de oxígeno, que son similares a los orbitales de enlace del carbono sp^3 (véase Fig. 1-14). Estos orbitales describen un tetraedro, con un átomo de hidrógeno en dos vértices y electrones sin compartir en los otros dos (Fig. 2-1a). El ángulo del enlace H—O—H es de 104,5°, menor que los 109,5° de un tetraedro perfecto por la compresión por los orbitales no enlazantes del átomo de oxígeno.

El núcleo del oxígeno atrae electrones más fuertemente que el núcleo del hidrógeno (un protón); es decir, el oxígeno es más electronegativo. Por tanto el H y el O comparten los electrones de forma desigual; los electrones se sitúan con mayor frecuencia cerca del átomo del oxígeno que del de hidrógeno. El resultado de esto es la formación de dos dipolos eléctricos en la molécula de agua, a lo largo de cada uno de los enlaces H—O; cada hidrógeno es portador de una carga positiva parcial (δ^+) y el átomo de oxígeno es portador de una carga negativa parcial igual a la suma de las dos cargas positivas parciales ($2\delta^-$) (Fig. 2-1b). Como resultado de ello, existe una atracción electrostática entre el átomo de oxígeno de una molécula de agua y el hidrógeno de otra (Fig. 2-1c), que se denomina **puente de hidrógeno.** A lo largo de este libro, representaremos los puentes de hidrógeno mediante tres líneas paralelas de color azul, como en la Figura 2-1c.

Los puentes de hidrógeno son relativamente débiles. Los puentes de hidrógeno en el agua líquida tienen una **energía de disociación de enlace** (la energía requerida para romper un enlace) de aproximadamente 23 kJ/mol, en comparación con los 470 kJ/mol del enlace covalente O—H en el agua o de los 348 kJ/mol del enlace covalente C—C. El enlace de hidró-

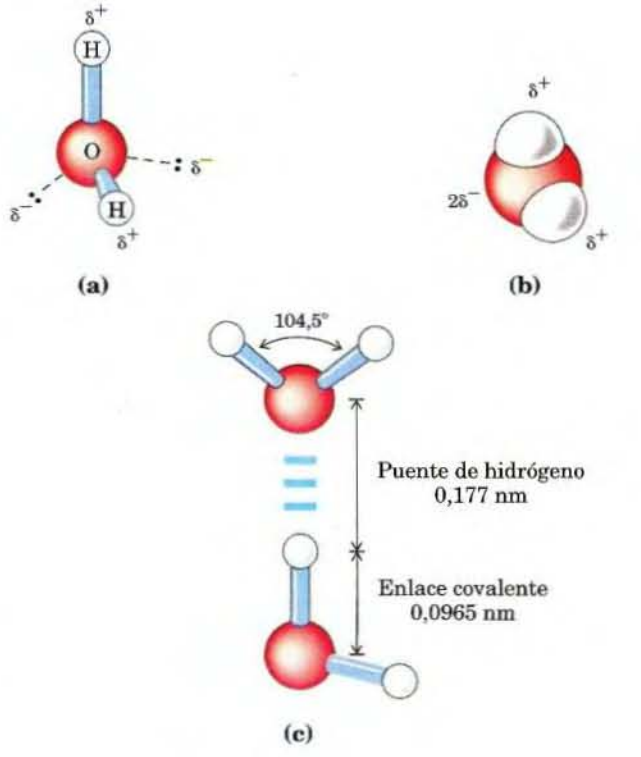


FIGURA 2-1 ***Estructura de la molécula de agua.*** *La naturaleza dipolar de la molécula de H_2O se muestra en modelos de* **(a)** *bolas y varillas y* **(b)** *esferas. Las líneas a trazos en* **(a)** *representan los orbitales no* enlazantes. Existe un ordenamiento casi tetraédrico de los pares de electrones de la capa externa alrededor del átomo de oxígeno; los dos átomos de hidrógeno tienen cargas parciales positivas localizadas (δ^+) y el átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa ($2\delta^-$). **(c)** Dos moléculas de H_2O unidas por un puente de hidrógeno (simbolizado aquí y a lo largo de este libro mediante tres líneas azules) entre el átomo de oxígeno de la molécula superior y un átomo de hidrógeno de la inferior. Los puentes de hidrógeno son más largos y más débiles que los enlaces O—H covalentes.

geno tiene un 10% de carácter covalente, debido al solapamiento de los orbitales de enlace, y un 90% de carácter electrostático. A temperatura ambiente, la energía térmica de una solución acuosa (la energía cinética del movimiento de los átomos y moléculas individuales) es del mismo orden de magnitud que la necesaria para romper los enlaces de hidrógeno. Cuando se caliente el agua, el incremento de temperatura es un reflejo del movimiento más rápido de las moléculas individuales del agua. Aunque en cualquier momento dado la mayoría de moléculas en el agua líquida están unidas por puentes de hidrógeno, el tiempo de vida de cada uno de ellos es tan sólo de entre 1 y 20 picosegundos (1 ps = 10^{-12} s); al romperse un puente de hidrógeno se forma otro, con la misma o con otra molécula, en el lapso de 0,1 ps. Se ha aplicado el término de "agrupamientos fluctuantes" (*flickering clusters*) a las agrupaciones de corta duración de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno en fase líquida. La suma de todos los puentes de hidrógeno entre moléculas de H_2O confiere gran cohesión interna al agua líquida. Las extensas redes de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno forman también puentes de conexión entre solutos (proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo) que permiten que las moléculas más grandes interaccionen entre ellas a través de distancias de varios nanómetros sin necesidad de entrar en contacto físico.

El ordenamiento casi tetraédrico de los orbitales alrededor del átomo de oxígeno (Fig. 2-1a) permite que cada molécula de agua forme enlaces de hidrógeno con hasta cuatro moléculas de agua vecinas. Sin embargo, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica, las moléculas de agua están desorganizadas y en movimiento continuo, de forma que cada molécula forma puentes de hidrógeno con un promedio de otras 3,4 moléculas solamente. Por el contrario, en el hielo, cada molécula está fija en el espacio y forma puentes de hidrógeno con otras 4 moléculas de agua (Fig. 2-2). La rotura de un número de puentes de hidrógeno suficiente para desestabilizar la retícula cristalina del hielo requiere mucha energía térmica, lo que explica el punto de fusión relativamente elevado del agua (Tabla 2-1). Cuando se funde el hielo o se evapora el agua, se absorbe calor por parte del sistema:

$$H_2O(\text{sólido}) \longrightarrow H_2O(\text{líquido}) \qquad \Delta H = +5{,}9 \text{ kJ/mol}$$

$$H_2O(\text{líquido}) \longrightarrow H_2O(\text{gas}) \qquad \Delta H = +44{,}0 \text{ kJ/mol}$$

Durante la fusión o la evaporación aumenta la entropía del sistema acuoso a medida que conjuntos altamente ordenados de moléculas de agua se relajan para dar paso a los conjuntos de puentes de hidrógeno menos ordenados del agua líquida o a las moléculas totalmente desordenadas de agua en el estado gaseoso. A temperatura ambiente, tanto la fusión del hielo como la evaporación del agua se dan espontáneamente; la tendencia de las moléculas de agua a asociarse mediante puentes de hidrógeno queda contrarrestada por el empuje energético hacia el desorden. Recuérdese que la variación de energía libre (ΔG) ha de ser negativa para que un proceso se produzca de forma espontánea: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, en donde ΔG representa la fuerza motriz, ΔH la variación de entalpía relacionada con la rotura y formación de enlaces y ΔS la variación en el grado de desorden. Dado que ΔH es positiva para la fusión y para la evaporación, es el aumento de entropía (ΔS) el que hace que ΔG sea negativa e impulse estas transformaciones.

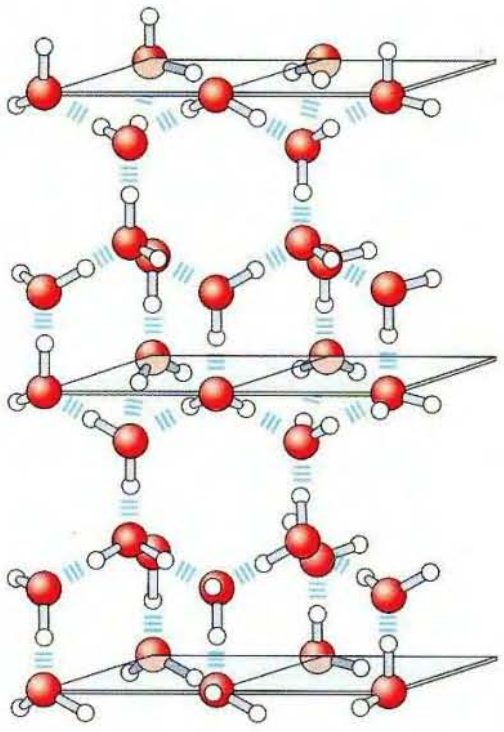


FIGURA 2-2 Puentes de hidrógeno en el hielo. Cada molécula de agua forma un máximo de cuatro puentes de hidrógeno, creando una red cristalina regular. Por el contrario, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica cada molécula de agua forma puentes de hidrógeno con otras 3,4 moléculas de agua en promedio. La red cristalina del hielo es menos densa que el agua líquida y por eso flota en el agua líquida.

El agua forma puentes de hidrógeno con los solutos polares

Los puentes de hidrógeno no son exclusivos del agua. Se forman fácilmente entre un átomo electronegativo (el aceptor de hidrógeno, normalmente oxígeno o nitrógeno con un par de electrones no enlazantes) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo (el dador de hidrógeno) en la misma o en otra molécula (Fig. 2-3). Los átomos de hidrógeno unidos covalentemente a átomos de carbono

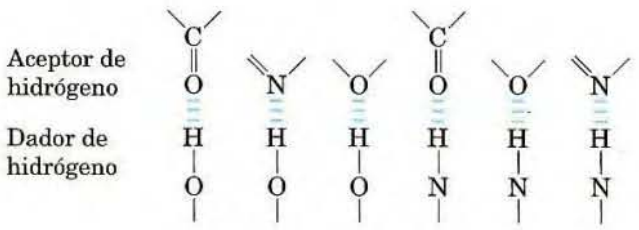


FIGURA 2-3 Tipos comunes de puentes de hidrógeno en los sistemas biológicos. El aceptor de hidrógeno es habitualmente el oxígeno o el nitrógeno; el dador es otro átomo electronegativo.

no participan en la formación de puentes de hidrógeno, puesto que el carbono es tan sólo ligeramente más electronegativo que el hidrógeno y, por tanto, el enlace C—H es sólo muy débilmente polar. Esta diferencia explica por qué el butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$) tiene un punto de ebullición relativamente alto de 117 °C, mientras que el butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$) tiene un punto de ebullición de solamente −0,5 °C. El butanol tiene un grupo hidroxilo polar, por lo que puede formar puentes de hidrógeno intermoleculares. Las biomoléculas no cargadas pero polares tales como los azúcares se disuelven fácilmente en el agua debido al efecto estabilizador de los puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos hidroxilo o el oxígeno carbonílico del azúcar y las moléculas polares de agua. Los alcoholes, aldehídos, cetonas y los compuestos que contienen enlaces N—H forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua (Fig. 2-4) y tienden a ser solubles en agua.

Los puentes de hidrógeno alcanzan una fuerza máxima cuando las moléculas unidas están orientadas de forma que la interacción electrostática sea lo mayor posible, lo que tiene lugar cuando el átomo de hidrógeno y los dos átomos que lo comparten se encuentran en línea recta –esto es, cuando el átomo aceptor está alineado con el enlace covalente entre el átomo dador y el H (Fig. 2-5)–. Los puentes de hidrógeno tienen pues un carácter altamente direccional y son capaces de mantener dos moléculas o grupos unidos por puente de hidrógeno con un ordenamiento geométrico específico. Veremos más adelante que esta propiedad de los puentes de hidrógeno confiere estructuras tridimensionales muy precisas a moléculas de proteínas y ácidos nucleicos en las que existen muchos puentes de hidrógeno intramoleculares.

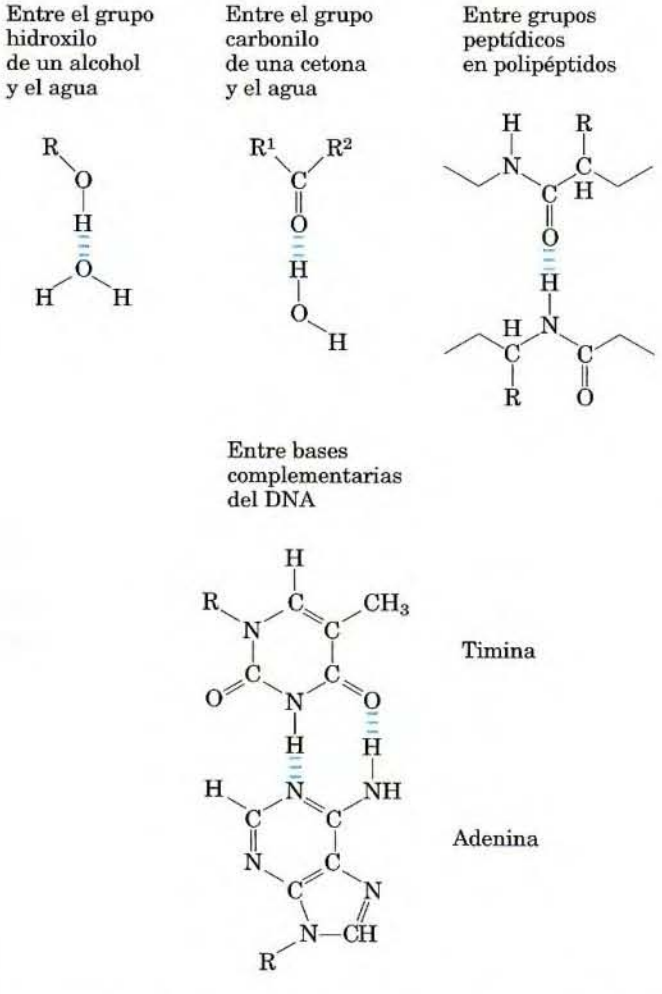


FIGURA 2-4 Algunos puentes de hidrógeno que tienen importancia biológica.

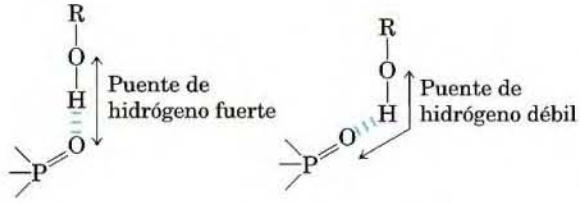


FIGURA 2-5 Direccionalidad del puente de hidrógeno. La atracción entre las cargas eléctricas parciales (véase Fig. 2-1) es máxima cuando los tres átomos implicados (en este caso O, H y O) se hallan en línea recta. Cuando los grupos unidos por puente de hidrógeno sufren restricciones estructurales (como por ejemplo cuando forman parte de una única molécula de proteína), esta geometría ideal puede no ser posible y el puente de hidrógeno resultante es más débil.

El agua interacciona electrostáticamente con los solutos cargados

El agua es un disolvente polar. Disuelve fácilmente la mayoría de biomoléculas, que generalmente son compuestos cargados o polares (Tabla 2-2); los compuestos que se disuelven fácilmente en el agua son **hidrofílicos** (del griego, "amantes del agua"). Por el contrario, los disolventes apolares tales como el cloroformo y el benceno son malos disolventes de las biomoléculas polares, pero disuelven fácilmente las que son **hidrofóbicas** –moléculas apolares tales como los lípidos y las ceras.

El agua disuelve sales tales como el NaCl mediante la hidratación y estabilización de los iones Na^+ y Cl^-, debilitando las interacciones electrostáticas entre ellos y contrarrestando así su tendencia a asociarse en una red cristalina (Fig. 2-6). Lo mismo ocurre con las biomoléculas cargadas, compuestos con grupos funcionales tales como los ácidos carboxílicos ionizados ($—COO^-$), las aminas protonadas ($—NH_3^+$) y los ésteres o anhídridos fosfóricos. El agua disuelve fácilmente este tipo de compuestos reemplazando puentes de hidrógeno soluto-soluto por puentes de hidrógeno soluto-agua, apantallando así las interacciones electrostáticas entre moléculas del soluto.

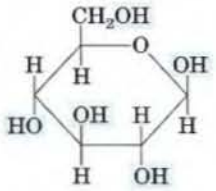
El agua es especialmente efectiva en apantallar las interacciones electrostáticas entre iones disueltos a causa de su elevada constante dieléctrica, una propiedad física que refleja el número de dipolos en un disolvente. La intensidad, o fuerza (F), de las interacciones iónicas en una disolución depende de la magnitud de las cargas (Q), la distancia entre los grupos cargados (r) y la constante dieléctrica (ε) del disolvente en el que tienen lugar las interacciones:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\varepsilon r^2}$$

TABLA 2-2 Algunos ejemplos de biomoléculas polares, apolares y anfipáticas (mostradas en forma iónica a pH 7)

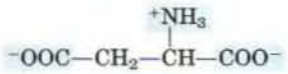
Polares

Glucosa

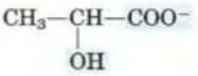


Glicina

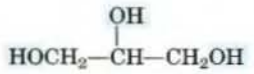
Aspartato



Lactato

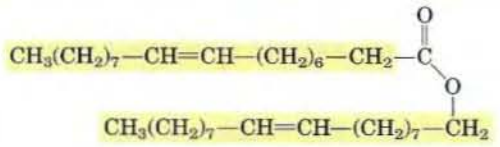


Glicerol



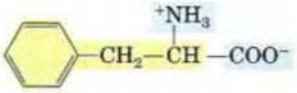
Apolares

Cera típica

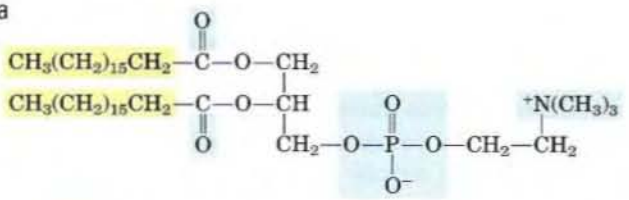


Anfipáticas

Fenilalanina



Fosfatidilcolina



Grupos polares Grupos apolares

Para el agua a 25 °C, ε (que es adimensional) tiene un valor de 78,5 mientras que para el benceno, que es un disolvente muy apolar, ε vale 4,6. Así, las interacciones iónicas son mucho más fuertes en los ambientes menos polares. La dependencia respecto a r^2 hace que las atracciones o repulsiones iónicas operen sólo a distancias muy cortas, del orden de 10 a 40 nm (dependiendo de la concentración de electrolito) cuando el disolvente es el agua.

La entropía aumenta cuando se disuelve una sustancia cristalina

A medida que se disuelve una sal tal como el NaCl, los iones Na^+ y Cl^- que abandonan la red cristalina adquieren más libertad de movimiento (Fig. 2-6). El incremento de entropía (desorden) que se produce en el sistema es el principal responsable de la facilidad con la que se disuelven en agua sales

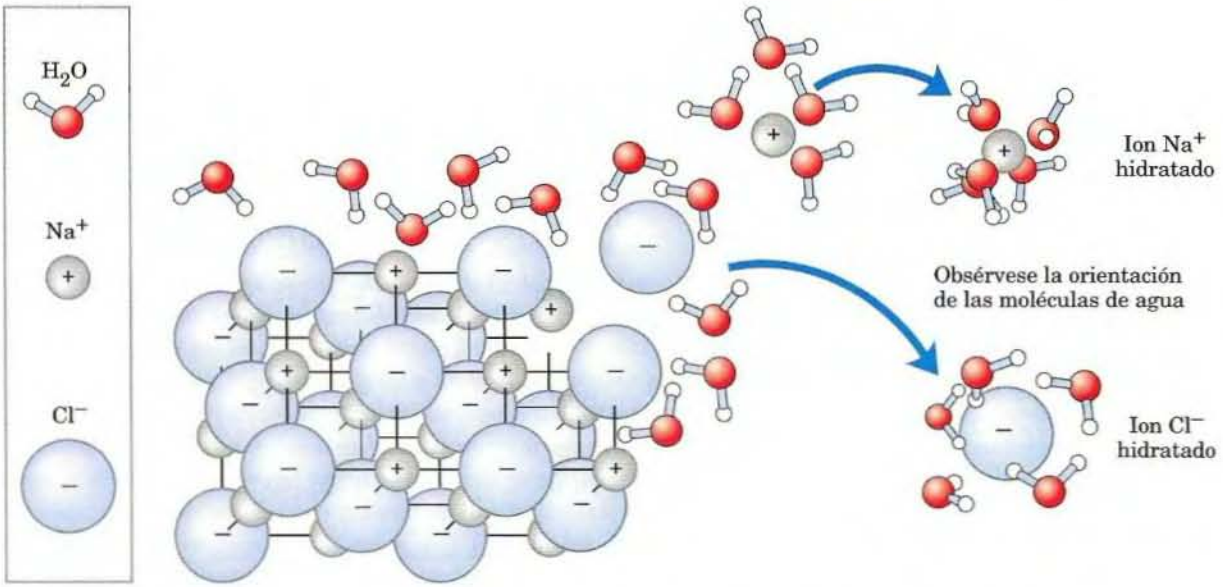


FIGURA 2-6 El agua como disolvente. El agua disuelve muchas sales cristalinas hidratando los iones que las componen. La red cristalina del NaCl se destruye a medida que moléculas de agua se agrupan alrededor de los iones Cl^- y Na^+. Las cargas iónicas son así parcialmente neutralizadas y se debilitan las atracciones electrostáticas necesarias para la formación de la red.

tales como el NaCl. En términos termodinámicos, la disolución tiene lugar con una variación favorable en la energía libre: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, en donde ΔH tiene un valor positivo pequeño y $T\Delta S$ un valor positivo alto, de forma que ΔG es negativa.

Los gases apolares se disuelven mal en el agua

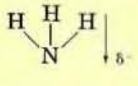
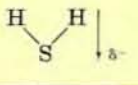
Los gases biológicamente importantes tales como el CO_2, O_2 y N_2, son apolares. En el O_2 y N_2 ambos átomos comparten los electrones de igual manera. En el CO_2, cada enlace C=O es polar, pero los dos dipolos están dirigidos de manera opuesta, con lo que se anulan entre sí (Tabla 2-3). El movimiento de estas moléculas desde la fase gaseosa desordenada a la fase acuosa restringe su movimiento y el movimiento de las moléculas de agua y representa, por tanto, un descenso de entropía. La naturaleza apolar de estos gases y la disminución de entropía cuando se introducen en la disolución hacen que sean muy poco solubles en agua (Tabla 2-3). Algunos organismos contienen proteínas transportadoras hidrosolubles (hemoglobina y mioglobina, por ejemplo) que facilitan el transporte del O_2. El dióxido de carbono forma ácido carbónico (H_2CO_3) en disolución acuosa y es transportado en forma de ion bicarbonato (HCO_3^-), ya sea en forma libre –el bicarbonato es muy soluble en agua (~100g/L a 25 °C)– o unido a hemoglobina. Otros dos gases, el NH_3 y el H_2S, también tienen papeles biológicos en algunos organismos; éstos son gases polares que se disuelven fácilmente en el agua.

Los compuestos apolares fuerzan cambios desfavorables energéticamente en la estructura del agua

Cuando se mezcla el agua con benceno o hexano, se forman dos fases; ninguno de los dos líquidos es soluble en el otro. Los compuestos apolares tales como el benceno y el hexano son hidrofóbicos –son incapaces de experimentar interacciones energéticamente favorables con las moléculas de agua y, de hecho, interfieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua–. Todas las moléculas o iones en disolución acuosa interfieren en los puentes de hidrógeno de algunas moléculas de agua en su proximidad inmediata, pero los solutos cargados o polares (tales como el NaCl) compensan esta pérdida de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua mediante la formación de nuevas interacciones entre el soluto y el agua. La variación neta de entalpía (ΔH) en la disolución de estas sustancias es, generalmente, pequeña. Los solutos hidrofóbicos no ofrecen esta compensación, por lo que su adición al agua puede resultar, por tanto, en una pequeña ganancia de entalpía; la rotura de puentes de hidrógeno requiere la adición de energía al sistema. Además, la disolución de compuestos hidrofóbicos en el agua da lugar a un descenso significativo de entropía. Las moléculas de agua en la vecindad inmediata del soluto apolar están restringidas en sus orientaciones posibles ya que forman una capa en forma de jaula de moléculas de agua muy ordenada alrededor de cada molécula de soluto. Estas moléculas de agua no están tan altamente orientadas como las de los **clatratos,** compuestos cristalinos de un soluto apolar y agua, pero el efecto es el mismo en ambos casos: el orden en las moléculas de agua reduce la entropía. El número de moléculas de agua ordenadas, y por tanto la magnitud del descenso de entropía, es proporcional al área superficial del soluto hidrofóbico incluido en la jaula de moléculas de agua. La variación de energía libre que conlleva la disolución de un soluto apolar en agua es, por tanto, desfavorable: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, en donde ΔH tiene un valor positivo, ΔS un valor negativo y ΔG es positiva.

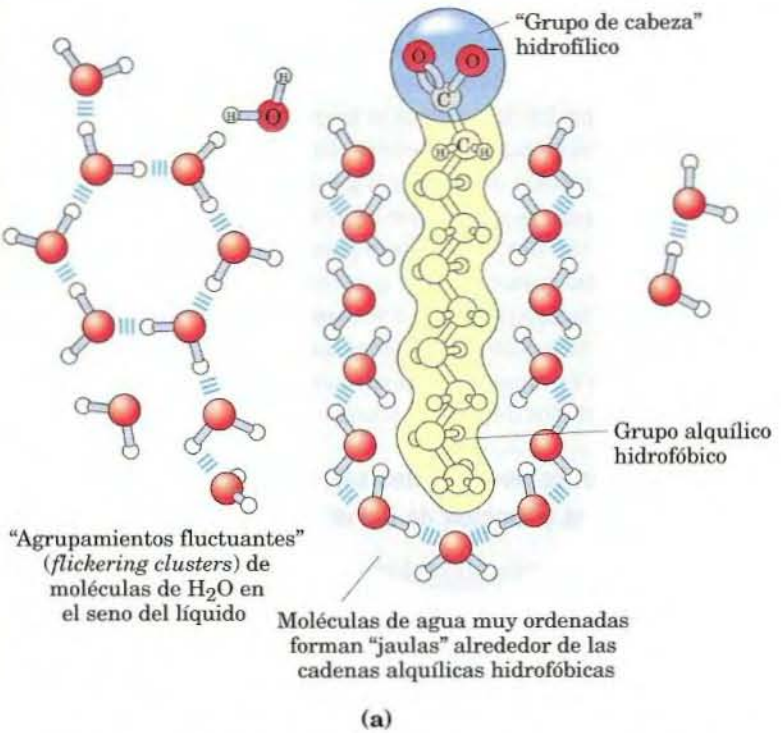
Los compuestos **anfipáticos** contienen regiones que son polares (o cargadas) y regiones que son apolares (Tabla 2-2).

TABLA 2-3 Solubilidad de algunos gases en agua

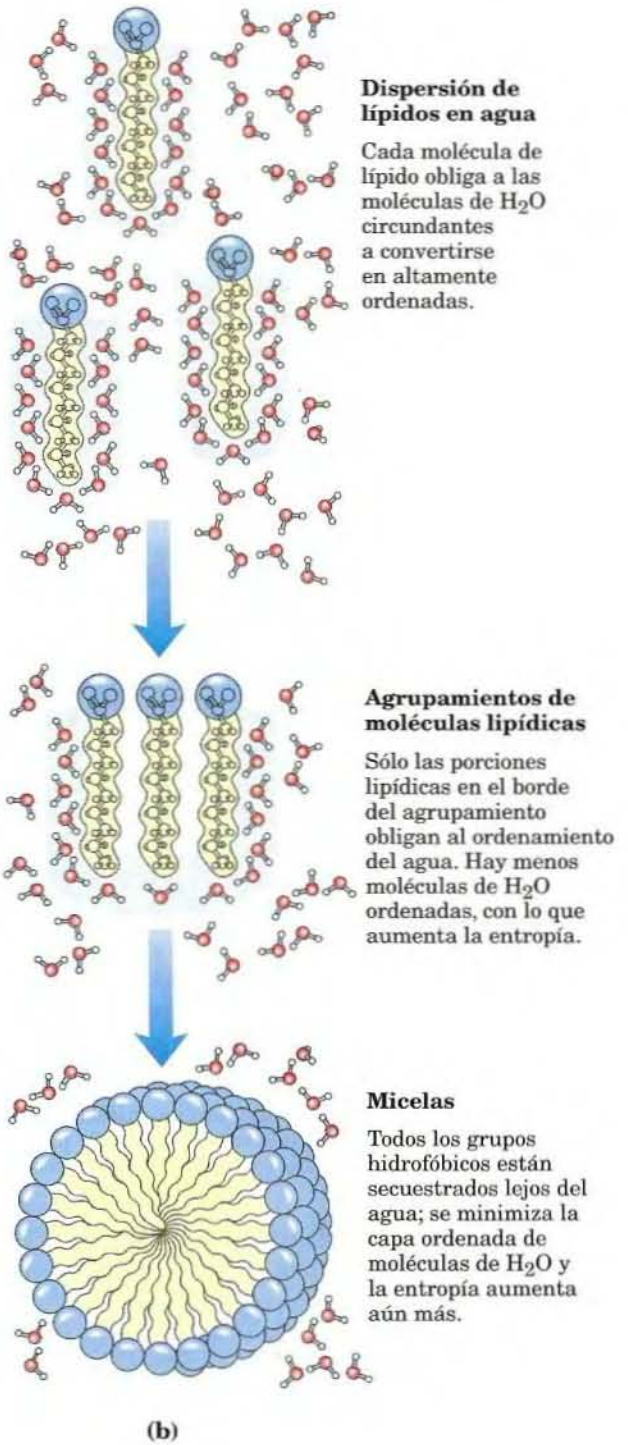
Gas	*Estructura**	*Polaridad*	*Solubilidad en agua (g/L)†*
Nitrógeno	N≡N	Apolar	0,018 (40 °C)
Oxígeno	O=O	Apolar	0,035 (50 °C)
Dióxido de carbono	$\overset{\delta^-}{\leftarrow}\quad\overset{\delta^-}{\rightarrow}$ O=C=O	Apolar	0,97 (45 °C)
Amoníaco		Polar	900 (10 °C)
Sulfuro de hidrógeno		Polar	1860 (40 °C)

*Las flechas representan dipolos eléctricos; existe una carga negativa parcial (δ^-) en la punta de la flecha y una carga parcial positiva (δ^+; no mostrada aquí) en la cola.

†Obsérvese que las moléculas polares se disuelven mucho mejor incluso a temperaturas bajas que las moléculas apolares a temperaturas relativamente elevadas.



(a)



(b)

FIGURA 2-7 Compuestos anfipáticos en solución acuosa. **(a)** Los ácidos grasos de cadena larga tienen cadenas alquílicas muy hidrofóbicas, cada una de las cuales está rodeada por una capa de moléculas de agua altamente ordenadas. **(b)** Agrupándose en micelas, las moléculas de ácido graso exponen al agua la mínima superficie hidrofóbica posible y se necesitan menos moléculas de agua en la capa de agua ordenada. La micela se estabiliza gracias a la energía ganada en la liberación de moléculas de agua inmovilizadas.

Cuando se mezcla un compuesto anfipático con agua, la región polar hidrofílica interacciona favorablemente con el disolvente y tiende a disolverse, pero la región apolar hidrofóbica tiende a evitar el contacto con el agua (Fig. 2-7a). Las regiones apolares de las moléculas se agrupan para presentar la menor área hidrofóbica posible al disolvente mientras que las regiones polares se disponen de forma que se maximice su interacción con el disolvente acuoso (Fig. 2-7b). Estas estructuras estables de compuestos anfipáticos en agua, denominadas **micelas,** pueden contener cientos o miles de moléculas. Las fuerzas que mantienen juntas las regiones apolares de las moléculas se denominan **interacciones hidrofóbicas.** La fuerza de estas interacciones no se debe a ninguna atracción intrínseca entre las partes apolares. Proviene más bien de la obtención de la máxima estabilidad termodinámica del sistema al minimizar el número de moléculas de agua ordenadas necesarias para rodear porciones hidrofóbicas de las molécula de soluto.

Muchas biomoléculas son anfipáticas; las proteínas, pigmentos, ciertas vitaminas y los esteroles y fosfolípidos de las membranas tienen regiones con superficies polares y apolares. Las estructuras formadas por estas moléculas se estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares. Las interacciones hidrofóbicas entre lípidos y entre lípidos y proteínas son los determinantes más importantes de la estructura de las membranas biológicas. Las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos apolares estabilizan también las estructuras tridimensionales de las proteínas.

La formación de puentes de hidrógeno entre el agua y los solutos polares también produce un cierto ordenamiento de las moléculas de agua, pero el efecto es menos significativo que con los solutos apolares. Parte de la fuerza impulsora de la unión de un sustrato polar (reactivo) a la superficie polar complementaria de un enzima es el aumento de entropía que

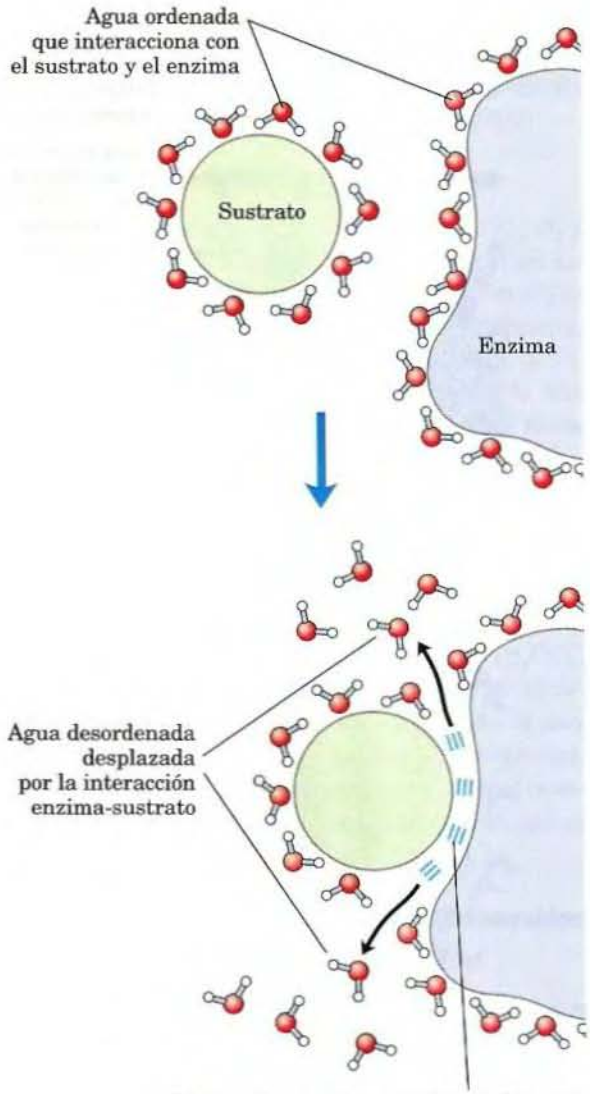


FIGURA 2-8 La liberación de agua ordenada favorece la formación de un complejo enzima-sustrato. Cuando están separados, tanto el enzima como el sustrato fuerzan a las moléculas de agua cercanas a formar una capa ordenada. La unión del sustrato al enzima libera parte del agua ordenada y el aumento de entropía resultante proporciona un "empujón" termodinámico para la formación del complejo enzima-sustrato.

tiene lugar al desplazar el enzima moléculas de agua ordenadas del sustrato (Fig. 2-8).

Las interacciones de van der Waals son atracciones interatómicas débiles

Cuando dos átomos no cargados se encuentran muy cerca, las nubes electrónicas que los rodean se influyen mutuamente. Variaciones al azar en las posiciones de los electrones alrededor del núcleo pueden crear un dipolo eléctrico transitorio, que induce un dipolo eléctrico opuesto también transitorio en el átomo cercano. Los dos dipolos se atraen débilmente entre sí con lo que los núcleos se acercan más. Estas atracciones débiles se denominan **interacciones de van der Waals.** A medida que los dos núcleos se acercan entre sí sus nubes electrónicas empiezan a repelerse. En el punto determinado en que la atracción de van der Waals equilibra exactamente esta fuerza repulsiva, se dice que los núcleos se encuentran en contacto de van der Waals. Cada átomo posee un **radio de van der Waals** característico, que constituye una medida de lo que este átomo permitirá acercarse a otro (Tabla 2-4). En los modelos moleculares espaciales que se muestran a lo largo de este libro los átomos se representan con tamaños proporcionales a sus radios de van der Waals.

Las interacciones débiles son cruciales para la estructura y función de las macromoléculas

Las interacciones no covalentes que hemos descrito (puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals) (Tabla 2-5) son mucho más débiles que los enlaces covalentes. Se requiere un aporte de energía de 350 kJ para romper un mol (6×10^{23}) de enlaces C—C simples y de unos 410 kJ para romper un mol de enlaces C—H, pero se requieren solamente entre 4 y 8 kJ para destruir un mol de interacciones de van der Waals típicas. Las interacciones hidrofóbicas son también mucho más débiles que los enlaces covalentes, aunque son sustancialmente reforzadas por un disolvente de polaridad elevada (una disolución salina concentrada, por ejemplo). Las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno son de fuerza variable, que depende de la polaridad del disolvente y del grado de alineamiento de los átomos unidos por enlace de hidrógeno, pero son siempre significativamente más

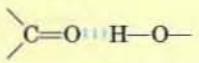
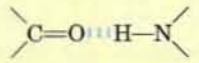
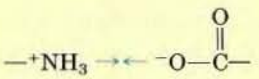
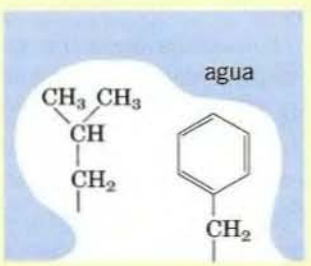
TABLA 2-4 Radios de van der Waals y radios de enlace covalente (enlace simple) de algunos elementos

Elemento	*Radio de van der Waals(nm)*	*Radio covalente del enlace simple (nm)*
H	0,11	0,030
O	0,15	0,066
N	0,15	0,070
C	0,17	0,077
S	0,18	0,104
P	0,19	0,110
I	0,21	0,133

Fuentes: radios de van der Waals: Chauvin, R. (1992) Explicit periodic trend of van der Waals radii. *J. Phys. Chem.* **96,** 9194-9197. Radios covalentes: Pauling, L. (1960) *Nature of the Chemical Bond,* 3.ª ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Nota: los radios de van der Waals describen las dimensiones espaciales de los átomos. Cuando dos átomos se unen covalentemente, los radios atómicos en el punto de enlace son menores que los radios de van der Waals porque el par de electrones compartido acerca los dos átomos. La distancia entre núcleos en una interacción de van der Waals o en un enlace covalente es aproximadamente igual a la suma de los radios de van der Waals o de los radios covalentes de los dos átomos, respectivamente. De este modo, la longitud de un enlace simple carbono-carbono es de aproximadamente 0,077 nm + 0,077 nm = 0,154 nm.

TABLA 2-5 Cuatro tipos de interacciones no covalentes ("débiles") entre biomoléculas en disolución acuosa

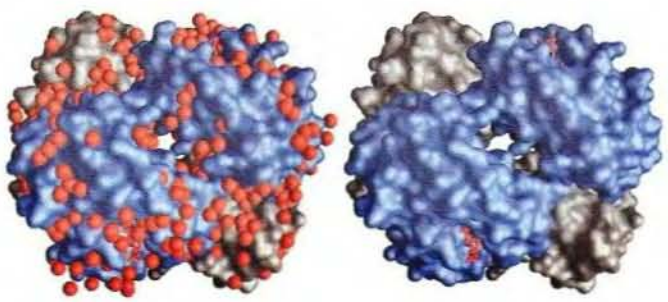
Enlaces de hidrógeno	
Entre grupos neutros	
Entre enlaces peptídicos	
Interacciones iónicas	
Atracción	
Repulsión	
Interacciones hidrofóbicas	
Interacciones de van der Waals	Dos átomos cualesquiera muy próximos

débiles que los enlaces covalentes. En un disolvente acuoso a 25 °C, la energía térmica disponible puede ser del mismo orden de magnitud que la fuerza de estas interacciones débiles y la interacción entre las moléculas de soluto y de disolvente (agua) es casi tan favorable como las interacciones soluto-soluto. En consecuencia, los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals se forman y rompen continuamente.

Aunque cada uno de estos cuatro tipos de interacciones es débil en comparación con un enlace covalente, el efecto acumulativo de muchas interacciones de este tipo puede ser muy significativo. Por ejemplo, la unión no covalente de un enzima a su sustrato puede implicar varios puentes de hidrógeno y una o más interacciones iónicas así como interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. La formación de cada uno de estos enlaces débiles contribuye a un descenso neto de la energía libre del sistema. Podemos calcular la estabilidad de una interacción no covalente, tal como la de una molécula pequeña unida por puentes de hidrógeno a su pareja macromolecular, a partir de la energía de unión. La estabilidad, medida por la constante de equilibrio (véase más adelante) de la reacción de unión, varía de forma *exponencial* con la energía de unión. La disociación de dos biomoléculas (tales como un enzima y su sustrato unido) asociadas de forma no covalente mediante múltiples interacciones débiles requiere que todas estas interacciones se destruyan al mismo tiempo. Dado que las interacciones fluctúan al azar, tal destrucción simultánea es muy poco probable. La estabilidad molecular conferida por dos, cinco o 20 interacciones débiles es, por tanto, mucho mayor de lo que podría esperarse de una simple adición de las pequeñas energías de unión.

Las macromoléculas tales como las proteínas, el DNA y el RNA contienen tantos sitios potenciales para la formación de puentes de hidrógeno o interacciones iónicas, de van der Waals o hidrofóbicas que el efecto acumulativo del gran número de pequeñas fuerzas de unión es enorme. La estructura más estable (nativa) de la mayoría de macromoléculas es aquella en la que se maximizan las posibilidades de uniones débiles. El plegamiento de una cadena polipeptídica o polinucleotídica en su forma tridimensional viene determinado por este principio. La unión de un antígeno a un anticuerpo específico depende de los efectos acumulativos de muchas interacciones débiles. Como se ha resaltado anteriormente, la energía liberada cuando un enzima se une de manera no covalente a su sustrato es la fuente principal del poder catalítico del enzima. La unión de una hormona o un neurotransmisor a su receptor celular proteico es el resultado de interacciones débiles. Una consecuencia del gran tamaño de los enzimas y de los receptores es que sus grandes superficies proporcionan muchas oportunidades para el establecimiento de interacciones débiles. A nivel molecular, la complementariedad entre biomoléculas que interaccionan entre sí refleja la complementariedad y las interacciones débiles entre grupos polares, cargados e hidrofóbicos en la superficie de las moléculas.

Al determinar la estructura de una proteína tal como la hemoglobina (Fig. 2-9) por cristalografía de rayos X (véase Recuadro 4-4, p. 136), es frecuente encontrar moléculas de agua unidas tan fuertemente que forman parte de la estructura cris-



(a) (b)

FIGURA 2-9 Unión del agua a la hemoglobina. La estructura cristalina de la hemoglobina se muestra en **(a)** con sus moléculas de agua unidas (esferas rojas) y en **(b)** sin las moléculas de agua. Estas moléculas de agua se hallan tan firmemente unidas a la proteína que afectan al patrón de difracción de rayos X como si formaran parte del cristal. Las dos subunidades α de la hemoglobian se muestran en color gris y las dos subunidades β en azul. Cada subunidad tiene unido un grupo hemo (estructura de varillas roja), que sólo es visible en las subunidades β en esta figura. La estructura y función de la hemoglobina se tratan en detalle en el Capítulo 5.

talina; lo mismo ocurre en cristales de RNA o DNA. Estas moléculas de agua, detectables también en disolución mediante resonancia magnética nuclear, poseen propiedades que las distinguen del resto de agua del disolvente. Son, por ejemplo, osmóticamente inactivas (véase más adelante). El agua fuertemente unida es esencial para la función de muchas proteínas. Por ejemplo, en una de las reacciones clave del proceso de la fotosíntesis, la energía de la luz se usa para bombear protones a través de una membrana biológica al tiempo que se produce un flujo de electrones a través de una serie de proteínas transportadoras (véase Fig. 19-54). Una de estas proteínas, el citocromo *f*, tiene unida una cadena de cinco moléculas de agua (Fig. 2-10) que puede proporcionar una vía para el movimiento de los protones a través de la membrana según un proceso conocido como "salto de protones" (que se describe más adelante). Casi con toda seguridad, otra bomba de protones que utiliza la energía de la luz, la bacteriorrodopsina, usa una cadena de moléculas de agua unidas y orientadas de una forma precisa para el movimiento transmembrana de los protones (véase Fig. 19-59).

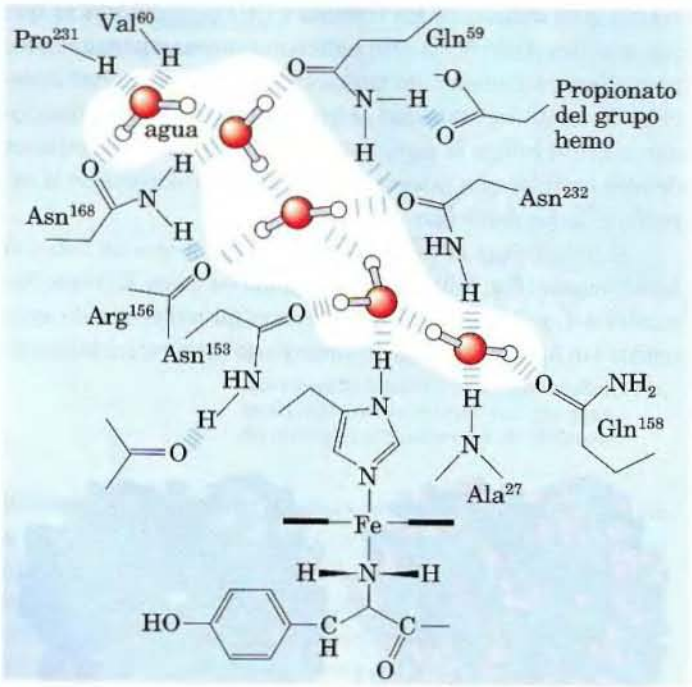


FIGURA 2-10 Cadena de agua en el citocromo *f*. Hay agua unida en el canal de protones de la proteína de membrana citocromo *f*, que forma parte de la maquinaria recolectora de energía de la fotosíntesis en cloroplastos (véase Fig. 19-57). Cinco moléculas de agua están unidas mediante enlaces de hidrógeno entre ellas y con grupos funcionales de la proteína: los átomos de la cadena principal de residuos de valina, prolina, arginina y alanina y las cadenas laterales de tres residuos de asparagina y dos residuos de glutamina. La proteína tiene un grupo hemo unido (véase Fig. 5-1) que, mediante su átomo de hierro, facilita el flujo de electrones durante la fotosíntesis. El flujo electrónico está acoplado al movimiento de protones a través de la membrana, lo que probablemente produce un "salto de protones" (véase Fig. 2-14) a lo largo de esta cadena de moléculas de agua unidas.

Los solutos afectan a las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas

Los solutos de cualquier tipo alteran ciertas propiedades físicas del agua disolvente: su presión de vapor, punto de ebullición, punto de fusión (punto de congelación) y presión osmótica. Éstas se denominan **propiedades coligativas** ("ligadas") puesto que el efecto de los solutos sobre las cuatro tiene la misma base: la concentración de agua es menor en las disoluciones que en el agua pura. El efecto de la concentración de soluto sobre las propiedades coligativas del agua es independiente de las propiedades químicas del soluto; depende únicamente del *número* de partículas de soluto (moléculas, iones) en una determinada cantidad de agua. Un compuesto tal como el NaCl, que se disocia en disolución, tiene un efecto dos veces mayor sobre la presión osmótica, por ejemplo, que un número idéntico de moles de un soluto que no se disocie como por ejemplo la glucosa.

Los solutos alteran las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas al disminuir la concentración efectiva de agua. Por ejemplo, cuando una fracción significativa de las moléculas de la superficie de una disolución acuosa no son de agua sino de soluto, la tendencia de las moléculas de agua a escapar a la fase vapor –es decir, la presión de vapor– disminuye (Fig. 2-11). De modo similar, la tendencia de las moléculas de agua a trasladarse desde la fase acuosa a la superficie de un cristal de hielo en formación se reduce cuando algunas de las moléculas que chocan con el cristal son de soluto, no de agua. En este caso, la disolución se congelará más lentamente que el agua pura, y a una temperatura inferior. Para una disolución acuosa 1,00 molal (1,00 mol de soluto por 1000 g de agua) de un soluto ideal, no volátil y no disociable, a 101 kPa (1 atm) de presión, el punto de congelación es 1,86 °C menor y el punto de ebullición es 0,543 °C mayor que el del agua pura. Para disoluciones 0,100 molal del mismo soluto, los cambios son de la décima parte.

Las moléculas de agua tienden a trasladarse de una región de elevada concentración de agua a una de concentración inferior. Cuando dos disoluciones acuosas diferentes están separadas por una membrana semipermeable (que deja pasar moléculas de agua pero no del soluto), las moléculas de agua que difunden de la región de alta concentración de agua hacia la de concentración de agua menor producen presión osmótica (Fig. 2-12). El valor aproximado de esta presión, **Π**, medida como la fuerza necesaria para oponerse al movimiento del agua (Fig. 2-12c), viene dado por la ecuación de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

en la que R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. El término ic es la **osmolaridad** de la disolución, el producto de la concentración molar de soluto c y el factor de van't Hoff i, que es una medida del grado de disociación del soluto en dos o más especies iónicas. En disoluciones diluidas de NaCl, el soluto se disocia completamente en iones Na^+ y Cl^-, doblando el número de partículas de soluto, y en este caso $i = 2$. Para solutos no ionizables, i es siempre 1. Para di-

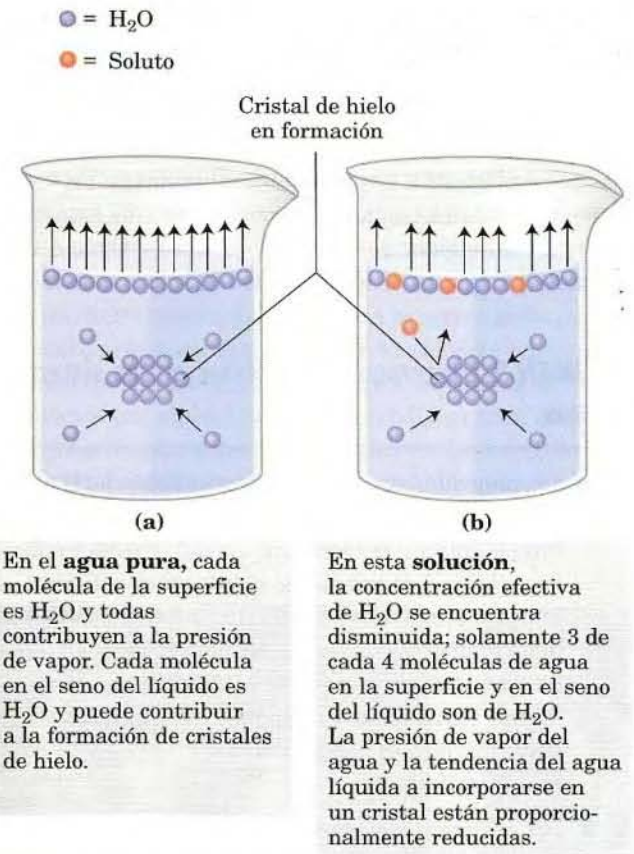


FIGURA 2-11 Los solutos alteran las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas. (a) A una presión de 101 kPa (1 atm), el agua pura hierve a 100 °C y se congela a 0 °C. **(b)** La presencia de moléculas de soluto reduce la probabilidad de que las moléculas de agua abandonen la disolución y entren en la fase gas, reduciendo de esta forma la presión de vapor de la disolución e incrementando el punto de ebullición. De modo similar, la probabilidad de que una molécula de agua choque con un cristal de hielo en formación y se una al mismo es menor cuando algunas de las moléculas que chocan con el cristal son de soluto en vez de agua. El efecto es la disminución del punto de congelación.

soluciones de varios (n) solutos, Π es la suma de las contribuciones de cada especie:

$$\Pi = RT(i_1c_1 + i_2c_2 + \cdots + i_nc_n)$$

La **ósmosis,** el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable impulsado por diferencias en la presión osmótica, es un factor importante en la vida de la mayoría de las células. Las membranas plasmáticas son más permeables al agua que a la mayor parte del resto de moléculas pequeñas, iones y macromoléculas. Esta permeabilidad es debida en parte a la simple difusión de agua a través de la bicapa lipídica y en parte a canales proteicos (acuaporinas; véase Fig. 11-46) en la membrana que permiten el paso selectivo de agua. Las disoluciones de igual osmolaridad se denominan **isotónicas.** Una célula rodeada por una disolución isotónica no gana ni pierde agua (Fig. 2-13). En una disolución **hipertónica,** aquélla con una osmolaridad mayor que el citosol, la célula se encoge al salir agua hacia fuera. En una disolución **hipotónica** (de osmolaridad menor), las células se hinchan al penetrar el agua en ellas. En su medio habitual, las células contienen generalmente concentraciones más elevadas de biomoléculas y de iones que sus alrededores, de forma que la presión osmótica tiende a impulsar agua hacia el interior de las células. Si no se equilibrara de alguna forma, este movimiento de agua hacia dentro distendería la membrana plasmática y llegaría a causar la explosión de la célula (lisis osmótica).

A lo largo de la evolución han surgido varios mecanismos para evitar esta catástrofe. En las bacterias y los vegetales, la membrana plasmática está rodeada de una pared celular no expandible de rigidez y fuerza suficientes para resistir la presión osmótica y evitar la lisis osmótica. Algunos protozoos de agua dulce, que viven en un medio altamente hipotónico, poseen un orgánulo (vacuola contráctil) que bombea agua al exterior de la célula. En animales multicelulares, el plasma sanguíneo y el fluido intersticial (el fluido extracelular de los tejidos) se mantienen a una osmolaridad cercana a la del citosol. La elevada concentración de albúmina y otras proteínas en el plasma sanguíneo contribuye a su osmolaridad. Las células también bombean activamente iones tales como el Na^+ hacia el fluido intersticial para permanecer en equilibrio osmótico con su entorno.

Puesto que el efecto de los solutos en la osmolaridad depende del *número* de partículas disueltas, no de su *masa*, las

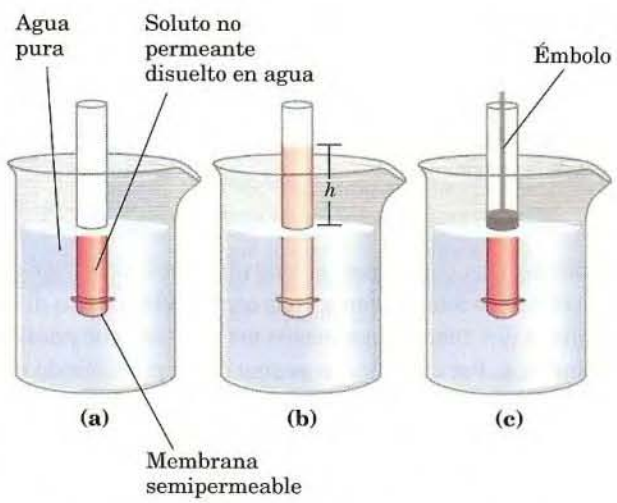


FIGURA 2-12 Ósmosis y medida de la presión osmótica. (a) Estado inicial. El tubo contiene una solución acuosa, el vaso contiene agua pura y la membrana semipermeable permite el paso de agua pero no de soluto. El agua fluye desde el vaso hacia el tubo para igualar su concentración a un lado y a otro de la membrana. **(b)** Estado final. Se ha movido agua hacia la solución del compuesto no permeante, diluyéndola y elevando la columna de agua dentro del tubo. En el equilibrio, la fuerza de gravedad que actúa sobre la solución que hay en el tubo equilibra exactamente la tendencia del agua a moverse hacia el interior del tubo, donde su concentración es menor. **(c)** La presión osmótica (Π) se mide como la fuerza que es necesario aplicar para devolver la solución del tubo al nivel de la del vaso. Esta fuerza es proporcional a la altura, h, de la columna en **(b)**.

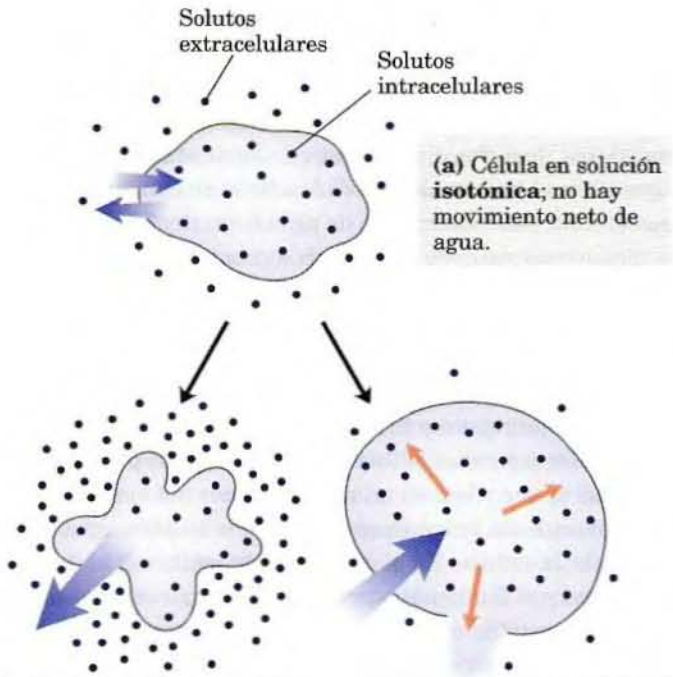


FIGURA 2-13 Efecto de la osmolaridad extracelular en el movimiento del agua a través de una membrana plasmática. Cuando una célula en equilibrio osmótico con el entorno que la rodea (esto es, en un medio isotónico) **(a)** se transfiere a una solución hipertónica **(b)** o a una solución hipotónica **(c)**, el agua fluye a través de la membrana plasmática en la dirección que tiende a igualar la osmolaridad dentro y fuera de la célula.

macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos) tienen un efecto mucho menor en la osmolaridad de una disolución que la que tendría una misma masa de sus componentes monoméricos. Por ejemplo, un *gramo* de un polisacárido compuesto por 1000 unidades de glucosa tiene el mismo efecto en la osmolaridad que un *miligramo* de glucosa. Un efecto del almacenamiento de combustible en forma de polisacáridos (almidón o glucógeno) en vez de como glucosa u otros azúcares simples es el de evitar un aumento enorme de la presión osmótica en la célula de depósito

Las plantas utilizan la presión osmótica para conseguir rigidez mecánica. La concentración muy elevada de soluto en las vacuolas impulsa agua hacia el interior de la célula (Fig. 2-13). La presión osmótica resultante contra la pared celular (presión de turgencia) proporciona rigidez a la célula, al tejido y al organismo vegetal. Cuando la lechuga de su ensalada se marchita es debido a que la pérdida de agua ha reducido la presión de turgencia. Alteraciones repentinas en la presión de turgencia producen el movimiento de partes de la planta que se observa en plantas sensibles al tacto como la Venus atrapamoscas y la mimosa (Recuadro 2-1).

La ósmosis también tiene consecuencias en los protocolos de laboratorio. Las mitocondrias, cloroplastos y lisosomas, por ejemplo, están rodeados de membranas semipermeables. Para aislar estos orgánulos a partir de células rotas, los bioquímicos deben llevar a cabo los fraccionamientos en disoluciones isotónicas (véase Fig. 1-8). Los tampones utilizados en los fraccionamientos celulares contienen normalmente concentraciones suficientes (alrededor de 0,2 M) de sacarosa o algún otro soluto inerte para proteger los orgánulos de la lisis osmótica.

RESUMEN 2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

- Las muy diferentes electronegatividades del H y del O hacen del agua una molécula muy polar, capaz de formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con sus solutos. Los enlaces de hidrógeno son de vida efímera, principalmente electrostáticos y más débiles que los enlaces covalentes. El agua es un buen disolvente de solutos polares (hidrofílicos), con los que forma enlaces de hidrógeno, y de solutos cargados, con los que interacciona electrostáticamente.
- Los compuestos no polares (hidrofóbicos) no se disuelven bien en el agua; no pueden formar enlaces de hidrógeno con el disolvente y su presencia induce un ordenamiento energéticamente desfavorable de moléculas de agua alrededor de sus superficies hidrofóbicas. Para minimizar la superficie expuesta al agua, los compuestos no polares como por ejemplo los lípidos forman agregados (micelas) en los que sus partes hidrofóbicas se hallan secuestradas en el interior, asociándose a través de interacciones hidrofóbicas, y sólo las partes más polares interaccionan con el agua.
- Numerosas interacciones débiles no covalentes influyen decisivamente sobre el plegamiento de macromoléculas tales como las proteínas o los ácidos nucleicos. Las conformaciones macromoleculares más estables son aquellas en las que se maximiza el número de enlaces de hidrógeno en el interior de la molécula y entre la molécula y el disolvente, y en las que las zonas hidrofóbicas se agrupan en el interior de la molécula, lejos del disolvente acuoso.
- La concentración de los solutos tiene una gran influencia sobre las propiedades físicas de las disoluciones acuosas. Cuando se separan dos compartimientos acuosos mediante una membrana semipermeable (tal como la membrana plasmática que separa la célula de su entorno), el agua fluye a través de esta membrana hasta igualar la osmolaridad de los dos compartimientos. Esta tendencia del agua a fluir a través de la membrana semipermeable recibe el nombre de presión osmótica.

RECUADRO 2-1 EL MUNDO DE LA BIOQUÍMICA

Respuesta táctil en plantas: un fenómeno osmótico

Las hojas altamente especializadas de la Venus atrapamoscas (*Dionaea muscipula*) se cierran rápidamente en respuesta a un ligero toque de un insecto desprevenido, atrapando al insecto para su posterior digestión. Atraído por el néctar de la superficie de las hojas, el insecto toca tres pelos mecánicamente sensibles, desencadenando el cierre en forma de trampa de la hoja (Fig. 1). Este movimiento de la hoja es producido por rápidas variaciones (en 0,5 s) en la presión de turgencia de las células mesófilas (las células interiores de la hoja), probablemente producidas por la liberación de iones K^+ de las células y el consiguiente flujo resultante de agua hacia fuera por ósmosis. Glándulas digestivas en la superficie de la hoja liberan enzimas que extraen nutrientes del insecto.

La planta sensible (*Mimosa pudica*) también experimenta un cambio destacable en la forma de las hojas desencadenado por un toque mecánico (Fig. 2). Un ligero toque o vibración produce un repentino decaimiento de las hojas, resultado de una súbita reducción de la presión de turgencia en las células de la base de cada folíolo y hoja. Al igual que en la Venus atrapamoscas, la caída de presión de turgencia es el resultado de la liberación de iones K^+ seguida del flujo hacia fuera de agua.

(a)

(b)

FIGURA 1 Respuesta táctil en la Venus atrapamoscas. Una mosca que se acerca a una hoja abierta **(a)** es atrapada para su digestión por la planta **(b)**.

(a)

(b)

FIGURA 2 Las hojas en forma de pluma de la planta sensible **(a)** se cierran y caen **(b)** para proteger a la planta de daños estructurales por el viento.

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

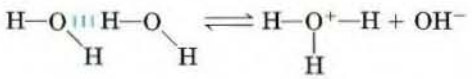
Aunque gran parte de las propiedades del agua como disolvente se pueden explicar en función de la molécula H_2O sin carga, debe tenerse también en cuenta el pequeño grado de ionización del agua en iones hidrógeno (H^+) y en iones hidroxilo (OH^-). Al igual que todas las reacciones reversibles, se puede describir la ionización del agua mediante una constante de equilibrio. Cuando se disuelven ácidos débiles en agua, su ionización aporta H^+; las bases consumen H^+ al protonarse. Estos procesos están también gobernados por constantes de equilibrio. La concentración total de ion hidrógeno se puede medir experimentalmente y se expresa como el pH de la solución. Para predecir el estado de ionización de los solutos en agua, hemos de tener en cuenta las constantes de equilibrio pertinentes para cada reacción de ionización. Haremos por tanto ahora una breve discusión sobre la ionización del agua y de los ácidos y bases débiles disueltos en la misma.

El agua pura está ligeramente ionizada

Las moléculas de agua tienen una ligera tendencia a ionizarse reversiblemente para proporcionar un ion hidrógeno (protón) y un ion hidroxilo, dando el equilibrio

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (2\text{–}1)$$

Aunque normalmente se muestra el producto de disociación del agua como H^+, los protones libres no existen en disolución; los iones hidrógeno formados en el agua son inmediatamente hidratados a **iones hidronio** (H_3O^+). La formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua hace que la hidratación de los protones disociados sea virtualmente instantánea:



La ionización del agua puede medirse a través de su conductividad eléctrica; el agua pura conduce la corriente eléctrica al migrar H^+ hacia el cátodo y OH^- hacia el ánodo. El movimiento de los iones hidronio e hidroxilo en el campo eléctrico se produce con una rapidez anómala en comparación con el de otros iones tales como el Na^+, K^+ y Cl^-. Esta elevada movilidad iónica es el resultado del "salto de protones" que se muestra en la Figura 2-14. Ningún protón individual se mueve muy lejos a través del volumen de la disolución, pero una serie de saltos de protones entre moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno produce el movimiento neto de un protón a una gran distancia en un tiempo notablemente corto. Como resultado de la elevada movilidad del H^+ (y del OH^-, que también se mueve rápidamente mediante salto de protones, pero en la dirección opuesta), las reacciones ácido-base en disolución acuosa son en general excepcionalmente rápidas. Como ya se ha visto anteriormente, el salto de protones también desempeña probablemente un papel en las reacciones biológicas de transferencia de protones (Fig. 2-10; véase también Fig. 19-59).

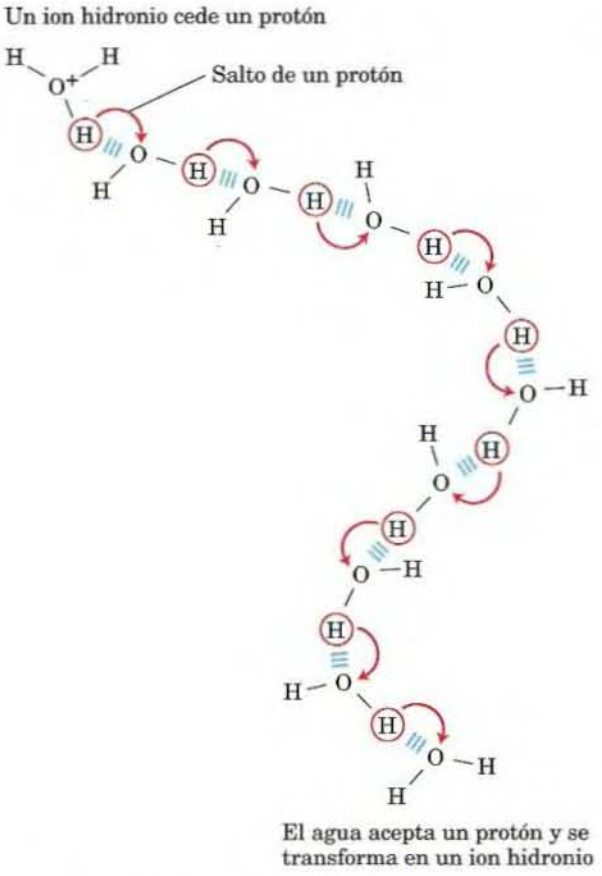


FIGURA 2-14 Salto de protones. "Saltos" de protones a corta distancia a través de una serie de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno tienen como resultado el movimiento neto extremadamente rápido de un protón a una gran distancia. Cuando un ion hidronio (arriba a la izquierda) cede un protón, una molécula de agua a una cierta distancia (abajo a la derecha) adquiere uno, convirtiéndose en un ion hidronio. El salto de protones es mucho más rápido que la auténtica difusión y explica la extraordinariamente elevada movilidad iónica de los iones H^+ comparada con otros cationes monovalentes como el Na^+ o K^+.

Puesto que la ionización reversible es crucial para el papel del agua en la función celular, hemos de tener una manera de expresar el grado de ionización del agua en términos cuantitativos. Un breve repaso de algunas propiedades de las reacciones químicas reversibles nos mostrará cómo podemos hacerlo.

La posición del equilibrio de cualquier reacción química viene dada por su **constante de equilibrio, K_{eq}** (a veces expresada simplemente como K). Para la reacción general

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad (2\text{–}2)$$

se puede definir una constante de equilibrio en función de la concentración de los reactivos (A y B) y de los productos (C y D) presentes en el equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

En rigor, los términos de concentración deberían ser las *actividades*, o concentraciones efectivas en soluciones no ideales, de cada especie. Excepto en los trabajos muy precisos, se

puede llegar a una aproximación de la constante de equilibrio midiendo las *concentraciones* en el equilibrio. Por razones que escapan a esta discusión, las constantes de equilibrio son adimensionales. Sin embargo, en las expresiones de equilibrio utilizadas en este libro hemos mantenido en general las unidades de concentración (M) para recordar que la molaridad es la unidad de concentración que se utiliza en el cálculo de K_{eq}.

La constante de equilibrio es fija y característica para cada reacción química a una temperatura dada. Define la composición de la mezcla final en el equilibrio, independientemente de las cantidades iniciales de reactivos y productos. De modo inverso, podemos calcular la constante de equilibrio de una reacción dada a una temperatura determinada si se conocen las concentraciones en el equilibrio de todos los reactivos y productos. Como hemos visto en el Capítulo 1 (p. 26), la variación estándar de energía libre ($\Delta G°$) está relacionada directamente con la K_{eq}.

La ionización del agua se expresa mediante una constante de equilibrio

El grado de ionización del agua en el equilibrio (Ec. 2-1) es pequeño; a 25 °C aproximadamente tan sólo dos de cada 10^9 moléculas en el agua pura están ionizadas en un momento dado. La constante de equilibrio para la ionización reversible del agua (Ec. 2-1) es

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (2\text{–}3)$$

En agua pura a 25 °C, la concentración del agua es de 55,5 M (gramos de H_2O en 1 L divididos por el peso molecular en gramos, o sea [1000 g/L)/(18,015 g/mol)] y es esencialmente constante en relación a las bajísimas concentraciones de H^+ y OH^-, es decir, 1×10^{-7} M. De acuerdo con ello podemos sustituir por 55,5 M el denominador de la expresión de la constante de equilibrio (Ec. 2-3) para dar

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{55{,}5\ \text{M}},$$

la cual, reordenando, se convierte en

$$(55{,}5\ \text{M})(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \qquad (2\text{–}4)$$

donde K_w designa el producto $(55{,}5\ \text{M})(K_{eq})$, denominado **producto iónico del agua** a 25 °C.

El valor de K_{eq}, determinado mediante medidas de conductividad eléctrica del agua pura, es $1{,}8 \times 10^{-16}$ M a 25 °C. La sustitución de este valor de K_{eq} en la Ecuación 2-4 da el producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ \text{M})(1{,}8 \times 10^{-16}\ \text{M}) = 1{,}0 \times 10^{-14}\ \text{M}^2$$

Así, el producto $[H^+][OH^-]$ en disoluciones acuosas a 25 °C es siempre igual a 1×10^{-14} M^2. Cuando existen concentraciones exactamente iguales de H^+ y OH^-, tal como sucede en el agua pura, se dice que la solución está a **pH neutro.** A este pH, se puede calcular la concentración de H^+ y OH^- a partir del producto iónico del agua de la manera siguiente:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2$$

Despejando $[H^+]$ da

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}$$

$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}\ \text{M}$$

Dado que el producto iónico del agua es constante, siempre que $[H^+]$ sea superior a 1×10^{-7} M, $[OH^-]$ será inferior a 1×10^{-7} M, y viceversa. Cuando la $[H^+]$ es muy alta, tal como sucede en una solución de ácido clorhídrico, $[OH^-]$ será muy pequeña. A partir del producto iónico del agua podemos calcular $[H^+]$ si conocemos $[OH^-]$ y viceversa (Recuadro 2-2).

La escala de pH representa las concentraciones de H^+ y OH^-

El producto iónico del agua, K_w, constituye la base de la **escala de pH** (Tabla 2-6). El pH constituye una forma conveniente de designar la concentración de H^+ (y por consiguiente de OH^-) en cualquier solución acuosa entre 1,0 M de H^+ y 1,0 M de OH^-. El término **pH** se define mediante la expresión

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

El símbolo p denota el "logaritmo negativo de". Para una solución exactamente neutra a 25 °C, en la que la concentración de los iones hidrógeno es $1{,}0 \times 10^{-7}$ M, se puede calcular el pH de la manera siguiente:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{1{,}0 \times 10^{-7}} = \log (1{,}0 \times 10^7)$$
$$= \log 1{,}0 + \log 10^7 = 0 + 7 = 7$$

TABLA 2-6 La escala de pH

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH*
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

*A veces se utiliza la expresión pOH para describir la basicidad, o concentración de OH^-, de una solución; el pOH se define por la expresión pOH = $-\log [OH^-]$, que es análoga a la expresión para el pH. Obsérvese que en todos los casos, pH + pOH = 14.

RECUADRO 2-2 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

El producto iónico del agua: dos problemas ilustrativos

El producto iónico del agua permite calcular la concentración de H^+ dada la concentración de OH^- y viceversa; los siguientes problemas lo demuestran.

1. ¿Cuál es la concentración de H^+ en una disolución de NaOH 0,1 M?

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Despejando $[H^+]$ da

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 1^{-14}\,M^2}{0{,}1\,M} = \frac{10^{-14}\,M^2}{10^{-1}\,M}$$
$$= 10^{-13}\,M \quad (\textit{respuesta})$$

2. ¿Cuál es la concentración de OH^- en una disolución en la que la concentración de H^+ es $1{,}3 \times 10^{-4}$ M?

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Despejando $[OH^-]$ da

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{1.0 \times 10^{-14}\,M^2}{1{,}3 \times 10^{-4}\,M}$$
$$= 7{,}7 \times 10^{-11}\,M \quad (\textit{respuesta})$$

Al realizar estos u otros cálculos, hay que asegurarse de utilizar el número correcto de cifras significativas en las respuestas.

El valor de 7 para el pH de una solución exactamente neutra no es una cifra escogida de manera arbitraria; proviene del valor absoluto del producto iónico del agua a 25 °C, que por una feliz coincidencia es un número entero. Las soluciones que tienen un pH superior a 7 son alcalinas o básicas; la concentración de OH^- es mayor que la de H^+. Inversamente, las soluciones con un pH inferior a 7 son ácidas.

Obsérvese que la escala de pH es logarítmica, no aritmética. Decir que el pH de dos soluciones difiere en 1 unidad de pH significa que una solución tiene una concentración de H^+ diez veces superior al de la otra, pero no nos dice cuál es el valor absoluto de la diferencia. La Figura 2-15 indica el pH de algunos fluidos acuosos comunes. Una bebida de cola (pH 3,0) o un vino tinto (pH 3,7) tiene una concentración de H^+ aproximadamente 10.000 veces superior a la de la sangre (pH 7,4).

Se puede medir aproximadamente el pH de una solución acuosa utilizando diversos colorantes indicadores, entre ellos el tornasol, la fenolftaleína y el rojo fenol, que experimentan cambios de color cuando se disocia un protón de la molécula de colorante. Las determinaciones precisas del pH en el laboratorio químico o clínico se hacen con un electrodo de vidrio que es selectivamente sensible a la concentración de H^+ pero que es insensible al Na^+, K^+ y otros cationes. En un pHmetro se amplifica la señal de un electrodo de este tipo y se compara con la señal generada por una disolución cuyo pH se conoce con exactitud.

La medición del pH es una de las operaciones más importantes y frecuentemente utilizadas en bioquímica. El pH afecta a la estructura y actividad de macromoléculas biológicas; por ejemplo la actividad catalítica de los enzimas tiene una gran dependencia del pH (véase Fig. 2-21). La medida del pH de la sangre y de la orina se utiliza normalmente para diagnosticar enfermedades. El pH del plasma sanguíneo de las personas

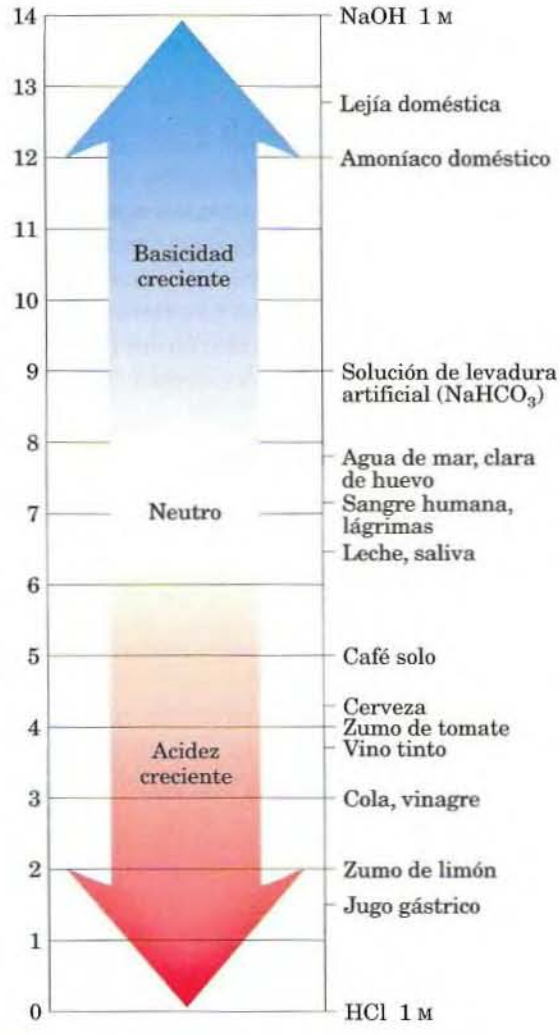


FIGURA 2-15 pH de algunos fluidos acuosos.

con diabetes grave no controlada, por ejemplo, es con frecuencia inferior al valor normal de 7,4; este estado se conoce como acidosis. En otros estados patológicos el pH de la sangre es superior al normal, estado que se denomina alcalosis.

Los ácidos y bases débiles tienen constantes de disociación características

Los ácidos clorhídrico, sulfúrico y nítrico, denominados comúnmente ácidos fuertes, están completamente ionizados en soluciones acuosas diluidas; las bases fuertes NaOH y KOH también están ionizadas completamente. De mayor interés para los bioquímicos es el comportamiento de los ácidos y bases débiles –los que no están completamente ionizados al disolverse en el agua–. Éstos son frecuentes en los sistemas biológicos y juegan papeles importantes en el metabolismo y su regulación. Se comprenderá mejor el comportamiento de las soluciones acuosas de los ácidos y bases débiles si definimos primero algunos términos.

Se pueden definir los ácidos como dadores de protones y las bases como aceptores de protones. Un dador de protones y su correspondiente aceptor forman un **par ácido-base conjugados** (Fig. 2-16). El ácido acético (CH_3COOH), un dador de protones, y el anión acetato (CH_3COO^-), el correspondiente aceptor de protones, constituyen un par ácido-base conjugados, relacionado por la reacción reversible

$$CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$$

Cada ácido tiene una tendencia característica a perder su protón en disolución acuosa. Cuanto más fuerte sea el ácido mayor será la tendencia a perder su protón. La tendencia de cualquier ácido (HA) a perder un protón y formar su base conjugada (A^-) se define mediante la constante de equilibrio (K_{eq}) para la reacción reversible

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-,$$

que es

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

Las constantes de equilibrio de las reacciones de ionización se suelen denominar **constantes de disociación** o de ionización, a menudo designadas como K_a. En la Figura 2-16 se dan las constantes de disociación de algunos ácidos. Los ácidos más fuertes, tales como el fosfórico y el carbónico, tienen constantes de disociación más altas; los ácidos más débiles, tales como el monohidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}), tienen constantes de disociación más bajas.

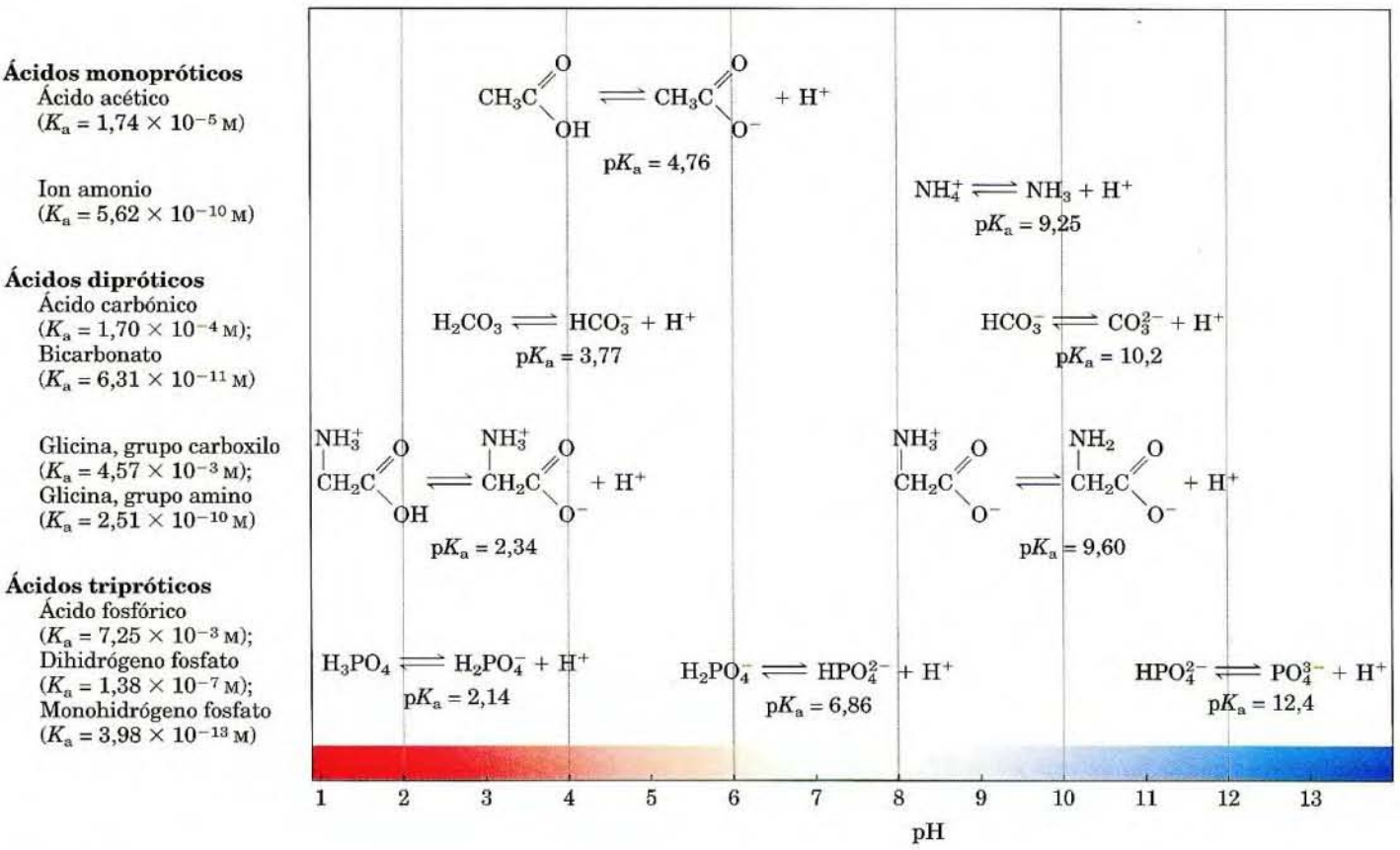


FIGURA 2-16 Un par ácido-base conjugado consiste en un dador de protones y un aceptor de protones. Algunos compuestos, tales como el ácido acético y el ion amonio, son monopróticos; pueden ceder solamente un protón. Otros son dipróticos [H_2CO_3 (ácido carbónico) y glicina] o tripróticos [H_3PO_4 (ácido fosfórico)]. Se muestran las reacciones de disociación para cada par en donde tienen lugar a lo largo de un gradiente de pH. Para cada reacción se muestra la constante de equilibrio o disociación (K_a) y su logaritmo negativo, el pK_a.

En la Figura 2-16 también se incluyen los valores de **pK_a**, una expresión análoga a la del pH y que se define mediante la ecuación

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Cuanto más fuerte sea la tendencia a disociar un protón, más fuerte es el ácido y menor es su pK_a. Como veremos a continuación, se puede determinar fácilmente el pK_a de cualquier ácido débil.

Las curvas de titulación proporcionan el pKa de los ácidos débiles

La titulación se utiliza para determinar la cantidad de un ácido en una solución dada. En este procedimiento, se titula un volumen determinado de ácido con una solución de una base fuerte, normalmente hidróxido sódico (NaOH), de concentración conocida. El NaOH se añade en pequeñas porciones hasta que se ha consumido (neutralizado) el ácido según se determina mediante un colorante indicador o con un pHmetro. Se puede calcular la concentración de ácido en la solución original a partir del volumen y la concentración de NaOH añadido.

Una gráfica del pH frente a la cantidad de NaOH añadido **(curva de titulación)** muestra el pK_a del ácido débil. Consideremos la titulación de una disolución 0,1 M de ácido acético (que denominaremos HAc para simplificar) con NaOH 0,1 M a 25 °C (Fig. 2-17). En el proceso están implicados dos equilibrios reversibles:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (2\text{–}5)$$

$$HAc \rightleftharpoons H^+ + Ac^- \qquad (2\text{–}6)$$

Los equilibrios deben cumplir simultáneamente sus constantes de equilibrio características que son, respectivamente,

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}\ M^2 \qquad (2\text{–}7)$$

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \times 10^{5}\ M \qquad (2\text{–}8)$$

Al principio de la titulación, antes de añadir nada de NaOH, el ácido acético ya está ligeramente ionizado, en un grado que se puede calcular a partir de su constante de disociación (Ec. 2-8)

A medida que se va incorporando gradualmente el NaOH, el OH^- adicionado se combina con el H^+ libre en la disolución para formar H_2O, en un grado que satisfaga la relación de equilibrio de la Ecuación 2-7. A medida que se elimina H^+ libre, el HAc se disocia más para satisfacer su propia constante de equilibrio (Ec. 2-8). El resultado neto a medida que progresa la titulación es que se ioniza más y más HAc, formando Ac^-, según se va añadiendo NaOH. En el punto medio de la titulación, en el que se han añadido exactamente 0,5 equivalentes de NaOH, se ha disociado la mitad del ácido acético original, de modo que la concentración del dador de protones, [HAc], es igual a la del aceptor de protones, [Ac^-]. En este punto medio tiene validez una relación muy importante: el pH de la solución equimolar de ácido acético y acetato es exactamente igual al

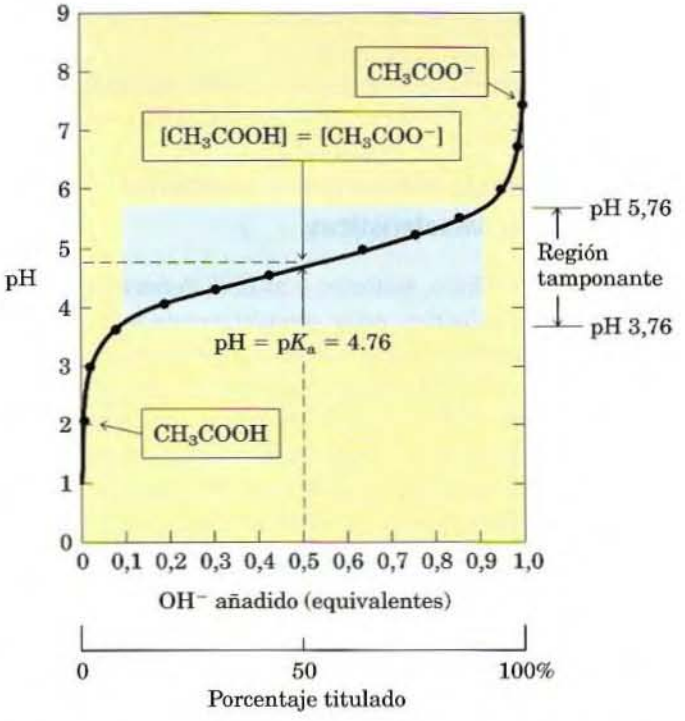


FIGURA 2-17 Curva de titulación del ácido acético. El pH de la mezcla se mide después de cada adición consecutiva de NaOH a la solución de ácido acético. Este valor se representa frente a la fracción de la cantidad total de NaOH requerida para convertir todo el ácido acético en su forma desprotonada, el acetato. Los puntos obtenidos de esta manera dan la curva de titulación. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos indicados. En el punto medio de la titulación las concentraciones del dador de protones y del aceptor de protones son iguales y el pH es numéricamente igual al pK_a del ácido acético. La zona sombreada es la región útil de capacidad tamponante, generalmente entre el 10% y el 90% de la titulación del ácido débil.

pK_a del ácido acético (pK_a = 4,76; Figs. 2-16 y 2-17). Pronto quedará clara la base de esta relación, que es válida para todos los ácidos débiles.

A medida que la titulación continúa mediante la adición de mayores cantidades de NaOH, el ácido acético todavía sin disociar se convierte gradualmente en acetato. El punto final de la titulación tiene lugar a aproximadamente pH 7,0: todo el ácido acético ha perdido sus protones, dándolos al OH^-, para formar H_2O y acetato. A todo lo largo de la titulación coexisten los dos equilibrios (Ecs. 2-5 y 2-6), cumpliendo cada uno de ellos con su constante de equilibrio.

En la Figura 2-18 se comparan las curvas de titulación de tres ácidos débiles con constantes de disociación muy diferentes: el ácido acético (pKa = 4,76); el dihidrógeno fosfato, $H_2PO_4^-$ (pK_a = 6,86), y el ion amonio, NH_4^+ (pK_a = 9,25). Aunque las curvas de titulación de estos ácidos tienen la misma forma, están desplazadas a lo largo del eje de pH debido a que estos ácidos tienen diferente fuerza. El ácido acético, que tiene la mayor K_a (el menor pK_a) de los tres es el más fuerte (pierde su protón con más facilidad); a pH 4,76 se encuentra

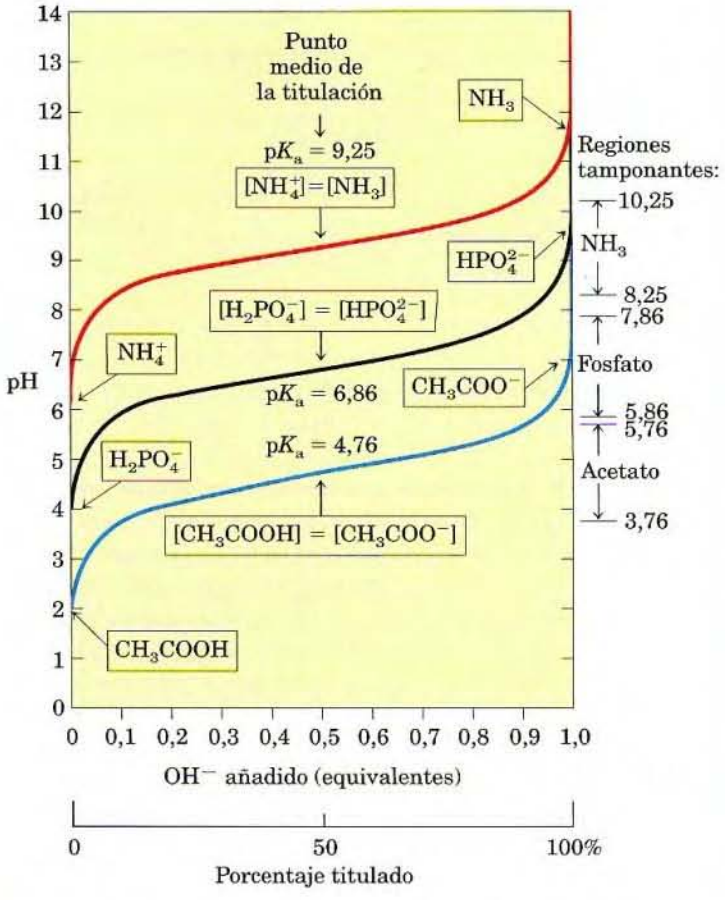


FIGURA 2-18 Comparación de las curvas de titulación de tres ácidos débiles. Se muestran las curvas de titulación de CH_3COOH, $H_2PO_4^-$ y NH_4^+. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos señalados de la titulación. Las regiones con capacidad tamponante están indicadas a la derecha. Los pares ácido-base conjugados son tampones efectivos entre aproximadamente el 10 y el 90% de la neutralización de la especie dadora de protones.

ya semidisociado. El dihidrógeno fosfato pierde un protón con menor facilidad y está semidisociado a pH 6,86. El ion amonio es el ácido más débil de los tres y no está semidisociado hasta pH 9,25.

El rasgo más importante de la curva de titulación de un ácido débil es que muestra gráficamente que un ácido débil y su anión, un par ácido-base conjugado, pueden actuar como tampones.

RESUMEN 2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

- El agua pura está ligeramente ionizada y contiene la misma cantidad de iones hidrógeno (iones hidronio, H_3O^+) que de iones hidroxilo. El grado de ionización se describe mediante una constante de equilibrio, $K_{eq} = \dfrac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$, de la que se deduce el producto iónico del agua, K_w. A 25 °C, $K_w = [H^+][OH^-] = (55,5\ M)(K_{eq}) = 10^{-14}\ M^2$.
- El pH de una solución acuosa refleja, en escala logarítmica, la concentración de iones hidrógeno: $pH = \log \dfrac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$.
- A mayor acidez de una disolución, menor será su pH. Los ácidos débiles se ionizan parcialmente y liberan un ion hidrógeno, lo que hace disminuir el pH de la solución acuosa. Las bases débiles aceptan un ion hidrógeno y aumentan el pH. El grado en que se producen estos procesos es característico de cada ácido o base débil concreto y se expresa como la constante de disociación, K_a: $K_{eq} = \dfrac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$.
- El pK_a expresa la fuerza relativa de un ácido o base débiles en escala logarítmica: $pK_a = \log \dfrac{1}{K_a} = -\log K_a$.
- Cuanto más fuerte sea un ácido, menor será su pK_a; cuanto más fuerte sea una base, mayor será su pK_a. El pK_a se puede determinar experimentalmente; es el pH del punto medio de la curva de titulación del ácido o de la base.

2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

Casi todos los procesos biológicos son dependientes del pH; un pequeño cambio en el pH produce un gran cambio en la velocidad del proceso. Esto no sólo es cierto para las muchas reacciones en las que el ion H^+ es un participante directo, sino también para aquellas en las que no existe un papel aparente para los iones H^+. Los enzimas que catalizan las reacciones celulares, y muchas de las moléculas sobre las que actúan, contienen grupos ionizables con valores de pK_a característicos. Los grupos amino y carboxilo protonados de los aminoácidos y el grupo fosfato de los nucleótidos, por ejemplo, funcionan como ácidos débiles; su estado iónico depende del pH del medio que los rodea. Tal como hemos señalado anteriormente, las interacciones iónicas se cuentan entre las fuerzas que estabilizan una molécula proteica y permiten que un enzima reconozca y se fije a su sustrato.

Las células y los organismos mantienen un pH citosólico específico y constante, que mantiene las biomoléculas en su estado iónico óptimo, normalmente cerca de pH 7. En los organismos multicelulares, el pH de los fluidos extracelulares también se mantiene estrechamente regulado. El pH se mantiene constante principalmente gracias a los tampones biológicos, que son mezclas de ácidos débiles y de sus bases conjugadas.

Describiremos aquí los equilibrios de ionización implicados en el tamponamiento y mostraremos la relación cuantitativa entre el pH de una solución tamponada y el pK_a del tampón. El tamponamiento biológico se ilustra mediante los sistemas tampón del fosfato y el carbonato en el hombre.

Los tampones son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas

Los **tampones** son sistemas acuosos que tienden a resistir cambios en su pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido (H^+) o base (OH^-). Un sistema tampón consiste en un ácido débil (dador de protones) y su base conjugada (aceptor de protones). Por ejemplo, una mezcla de igual concentración de ácido acético y de ion acetato, tal como la que se encuentra en el punto medio de la curva de titulación de la Figura 2-17, es un sistema tampón. La curva de titulación del ácido acético tiene una zona relativamente plana que se extiende alrededor de 1 unidad de pH a cada lado de su pH de punto medio 4,76. En esta zona una cantidad de H^+ o OH^- añadida al sistema tiene un efecto mucho menor sobre el pH que la misma cantidad añadida fuera del margen de tamponamiento. Esta zona relativamente plana es la región tamponante del par del tampón ácido acético-acetato. En el punto medio de la región tamponante, en donde la concentración de dador de protones (ácido acético) es exactamente igual a la del aceptor de protones (acetato), el poder tamponante del sistema es máximo; esto es, se produce el cambio mínimo de pH cuando se adiciona OH^+ o H^+. El pH en este punto de la curva de titulación del ácido acético es igual a su pK_a. El pH del sistema tampón del acetato cambia ligeramente cuando se adiciona una pequeña cantidad de OH^- o de H^+, pero este cambio es muy pequeño si lo comparamos con el cambio de pH que se produciría si se añadiese la misma cantidad de OH^- o H^+ al agua pura o a una disolución de la sal de un ácido fuerte y una base fuerte, tal como el NaCl, que no tiene capacidad tamponante.

El tamponamiento es el resultado de dos equilibrios de reacciones reversibles que tienen lugar en una disolución de concentraciones casi iguales de dador de protones y de su aceptor de protones conjugado. La Figura 2-19 explica de qué modo funciona el sistema tampón. Siempre que se añade H^+ u OH^- a un tampón, el resultado es un pequeño cambio en el cociente de las concentraciones relativas del ácido débil y de su anión y, por tanto, un pequeño cambio de pH. El descenso en la concentración de un componente del sistema se equilibra exactamente por un incremento del otro. La suma de los componentes del sistema no varía, sólo varía su proporción.

Cada par conjugado ácido-base tiene una zona característica de pH en la que es un tampón eficaz (Fig. 2-18). El par $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tiene un pK_a de 6,86 y por tanto puede servir como sistema tampón eficiente entre aproximadamente pH 5,9 y pH 7,9; el par NH_4^+/NH_3, con un pK_a de 9,25, puede actuar como tampón entre aproximadamente pH 8,3 y pH 10,3.

Una expresión sencilla relaciona pH, pK y concentración de tampón

Las curvas de titulación del ácido acético, $H_2PO_4^{2-}$ y NH_4^+ (Fig. 2-18) tienen formas casi idénticas, lo que sugiere que son reflejo de una ley o relación fundamental. Éste es, efectivamente, el caso. La forma de la curva de titulación de cualquier ácido débil está expresada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que es importante para comprender la acción de los tampones y el equilibrio ácido-base en la sangre y tejidos de los vertebrados. Esta ecuación es simplemente una forma útil de reenunciar la expresión de la constante de disociación de un ácido. En el caso de la disociación de un ácido débil HA en H^+ y A^-, la ecuación de Henderson-Hasselbalch puede deducirse de la forma siguiente:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Despejando primero $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Tomando el logaritmo negativo en ambos miembros:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Sustituyendo $-\log[H^+]$ por pH y $-\log K_a$ por pK_a:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

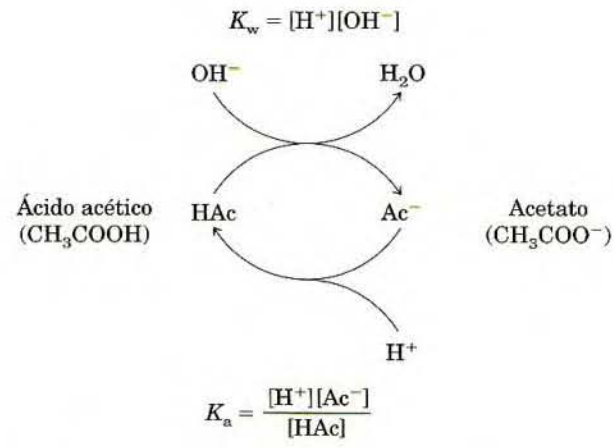


FIGURA 2-19 El par ácido acético-acetato como sistema tampón. El sistema es capaz de absorber H^+ u OH^- a través de la reversibilidad de la disociación del ácido acético. El dador de protones, el ácido acético (HAc), contiene una reserva de H^+ ligado, que puede liberarse para neutralizar una adición de OH^- al sistema formando H_2O. Esto sucede porque el producto $[H^+][OH^-]$ excede transitoriamente K_w (1×10^{-14} M^2). El equilibrio se ajusta rápidamente de modo que este producto sea igual a 1×10^{-14} M^2 (a 25 °C), reduciendo así transitoriamente la concentración de H^+. No obstante, ahora el cociente $[H^+][Ac]/[HAc]$ es menor que K_a, por lo que se disocia más HAc para restaurar el equilibrio. De modo semejante, la base conjugada, Ac^-, puede reaccionar con iones H^+ adicionados al sistema; de nuevo las dos reacciones de ionización vuelven simultáneamente al equilibrio. Así, un par ácido-base conjugado, tal como el ácido acético y el ion acetato, tienden a resistir un cambio en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o base. La acción tamponante es simplemente la consecuencia de dos reacciones reversibles que tienen lugar simultáneamente y que alcanzan sus puntos de equilibrio según sus constantes de equilibrio, K_w y K_a.

Invirtiendo ahora $-\log[HA]/[A^-]$, lo que implica cambiar su signo, se obtiene la **ecuación de Henderson-Hasselbalch:**

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2\text{–}9)$$

que se enuncia de forma más general:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{aceptor de protones}]}{[\text{dador de protones}]}$$

Esta ecuación se ajusta a la curva de titulación de todos los ácidos débiles y nos permite deducir una serie de relaciones cuantitativas importantes. Por ejemplo, muestra por qué el pK_a de un ácido débil es igual al pH de la solución en el punto medio de su titulación. En este punto $[HA] = [A^-]$ y de ahí

$$pH = pK_a + \log 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

Como se muestra en el Recuadro 2-3 la ecuación de Henderson-Hasselbalch también permite (1) calcular el pK_a a partir del pH y la relación molar entre dador y aceptor de protones; (2) calcular el pH a partir del pK_a y la relación molar entre dador y aceptor de protones; y (3) calcular la relación molar entre dador y aceptor de protones, conocidos el pH y el pK_a.

Los ácidos o bases débiles tamponan células y tejidos contra cambios de pH

Los fluidos intracelular y extracelular de los organismos multicelulares poseen un pH característico y prácticamente constante. Los sistemas tampón proporcionan la primera línea de defensa del organismo contra los cambios del pH interno. El citoplasma de la mayoría de células contiene elevadas concentraciones de proteínas, las cuales contienen muchos aminoácidos con grupos funcionales que son ácidos débiles o bases débiles. Por ejemplo, la cadena lateral de la histidina (Fig. 2-20) tiene un pK_a de 6,0; las proteínas que contienen residuos de histidina pueden por tanto tamponar de manera eficiente a pH cercano a la neutralidad. Nucleótidos tales como el ATP, así como muchos metabolitos de baja masa molecular, contienen grupos ionizables que pueden contribuir al poder tamponante del citopolasma. Algunos orgánulos altamente especializados y compartimientos extracelulares contienen elevadas concentraciones de compuestos que contribuyen a la capacidad tamponante: los ácidos orgánicos tamponan las vacuolas de las células vegetales; el amoníaco tampona la orina.

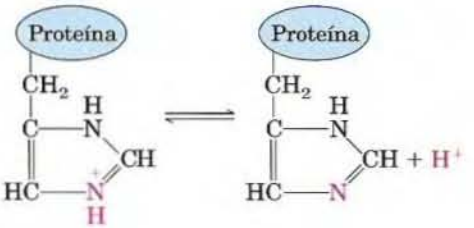


FIGURA 2-20 El aminoácido histidina, componente de las proteínas, es un ácido débil. El pK_a del nitrógeno protonado de la cadena lateral es 6,0.

RECUADRO 2-3 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Resolución de problemas con la ecuación de Henderson-Hasselbalch

1. Calcular el pK_a del ácido láctico, sabiendo que cuando la concentración de ácido láctico es 0,010 M y la concentración de lactato es 0,087 M, el pH es 4,80.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{lactato}]}{[\text{ácido láctico}]}$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[\text{lactato}]}{[\text{ácido láctico}]}$$

$$= 4{,}80 - \log \frac{0{,}087}{0{,}010} = 4{,}80 - \log 8{,}7$$

$$= 4{,}80 - 0{,}94 = 3{,}9 \quad (\textit{respuesta})$$

2. Calcular el pH de una mezcla de ácido acético 0,10 M y de acetato sódico 0,20 M. El pK_a del ácido acético es 4,76.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$= 4{,}76 + \log \frac{0{,}20}{0{,}10} = 4{,}76 + 0{,}30$$

$$= 5{,}1 \quad (\textit{respuesta})$$

3. Calcular el cociente de la concentración de acetato y de ácido acético requerida en un sistema tampón a pH 5,30.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$\log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = pH - pK_a$$

$$= 5{,}30 - 4{,}76 = 0{,}54$$

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = \text{antilog } 0{,}54 = 3{,}5 \quad (\textit{respuesta})$$

Para observar el efecto del pH sobre el grado de ionización de un ácido débil, consulte el gráfico animado de la Ecuación 2-9.

Dos tampones biológicos especialmente importantes son los sistemas del fosfato y del bicarbonato. El sistema tampón del fosfato, que actúa en el citoplasma de todas las células, consiste en el $H_2PO_4^-$ como dador de protones y el HPO_4^{2-} como aceptor de protones:

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

El sistema tampón del fosfato presenta su efectividad máxima a un pH próximo a su pK_a de 6,86 (Figs. 2-16, 2-18) y tiende pues a resistir los cambios de pH en el intervalo entre 5,9 y 7,9. Es, por tanto, un tampón efectivo en los fluidos biológicos; en los mamíferos, por ejemplo, los fluidos extracelulares y la mayoría de compartimientos citoplasmáticos tienen un pH en el intervalo de 6,9 a 7,4.

El plasma sanguíneo está tamponado en parte por el sistema del bicarbonato, que consiste en ácido carbónico (H_2CO_3) como dador de protones y bicarbonato (HCO_3^-) como aceptor de protones:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Este sistema tampón es más complejo que otros pares ácido-base conjugados, ya que uno de sus componentes, el ácido carbónico (H_2CO_3), se forma a partir de dióxido de carbono disuelto (d) y agua, según la reacción reversible:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)][H_2O]}$$

El dióxido de carbono es un gas en condiciones normales y la concentración de CO_2 disuelto es el resultado de su equilibrio con el CO_2 de la fase gaseosa (g):

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$

$$K_3 = \frac{[CO_2(d)]}{[CO_2(g)]}$$

El pH de un sistema tampón de bicarbonato depende de la concentración de H_2CO_3 y de HCO_3^-, dador y aceptor de protones, respectivamente. A su vez, la concentración de H_2CO_3 depende de la concentración de CO_2 disuelto, que a su vez depende de la concentración del CO_2 en la fase gaseosa, denominada **presión parcial** de CO_2. Por consiguiente, el pH de un tampón bicarbonato expuesto a una fase gaseosa viene determinado en último término por la concentración de HCO_3^- en la fase acuosa y la presión parcial de CO_2 en la fase gaseosa (Recuadro 2-4).

El plasma sanguíneo humano tiene normalmente un pH cercano a 7,4. Si fallasen los mecanismos de regulación del pH o estuvieran desbordados, tal como puede suceder en la diabetes grave no controlada, en la que una sobreproducción de ácidos metabólicos produce acidosis, el pH de la sangre puede descender a 6,8 o menos, lo que conduce a lesiones celulares irreparables y a la muerte celular. En otras enfermedades el pH puede ascender a niveles letales.

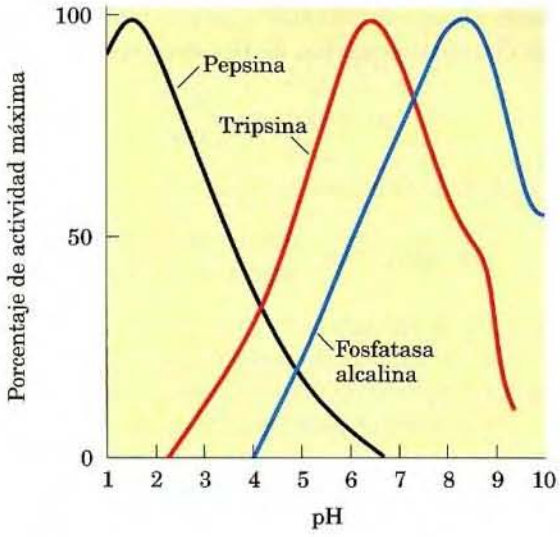


FIGURA 2-21 pH óptimo de algunos enzimas. La pepsina es un enzima digestivo secretado en el jugo gástrico; la tripsina, un enzima digestivo que actúa en el intestino delgado; la fosfatasa alcalina del tejido óseo es un enzima hidrolítico que se cree que participa en la mineralización del hueso.

Aunque son muchos los aspectos de la estructura y función celulares influidos por el pH, es la actividad catalítica de los enzimas la que es especialmente sensible. Los enzimas tienen un máximo de actividad catalítica a un pH característico denominado **pH óptimo** (Fig. 2-21). A ambos lados del pH óptimo su actividad catalítica desciende a menudo de forma abrupta. Así, un pequeño cambio en el pH puede provocar una gran diferencia en la velocidad de alguna reacción crucial catalizada enzimáticamente. El control biológico del pH de las células y fluidos corporales es, por consiguiente, de importancia crucial en todos los aspectos del metabolismo y de las actividades celulares.

RESUMEN 2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

- Una mezcla de un ácido (o base) débil y su sal resiste los cambios de pH provocados por la adición de H^+ o OH^-. Esta mezcla actúa como un tampón.
- El pH de una disolución de ácido débil (o base débil) y su sal se deduce de la ecuación de Henderson-Hasselbalch: $pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$.
- En las células y los tejidos, los sistemas tampón de fosfato y bicarbonato mantienen los fluidos intracelulares y extracelulares en su pH óptimo (fisiológico), que es normalmente cercano a 7. Los enzimas suelen actuar de manera óptima a este pH.

RECUADRO 2-4 BIOQUÍMICA EN MEDICINA

Sangre, pulmones y tampón: el sistema tampón del bicarbonato

En los animales pulmonados el sistema tampón del bicarbonato es un tampón fisiológico eficiente cerca de pH 7,4 ya que el H_2CO_3 del plasma sanguíneo está en equilibrio con una gran capacidad de reserva de CO_2(g) en el espacio aéreo de los pulmones. Este sistema tampón implica tres equilibrios reversibles entre CO_2 gaseoso en los pulmones y bicarbonato (HCO_3^-) en el plasma sanguíneo (Fig. 1).

Cuando se añade H^+ (por ejemplo, a partir de ácido láctico producido en el tejido muscular durante el ejercicio vigoroso) a la sangre, a medida que ésta pasa por los tejidos, la reacción 1 transcurre hacia un nuevo equilibrio en el que se incrementa la concentración de H_2CO_3. Esto incrementa la concentración de CO_2(d) en el plasma sanguíneo (reacción 2) y así aumenta la presión de CO_2(g) en el espacio aéreo de los pulmones (reacción 3); el CO_2 sobrante se exhala.

De manera inversa, cuando se aumenta el pH del plasma sanguíneo (por ejemplo, por la producción de NH_3 durante el catabolismo de las proteínas), se producen los hechos opuestos: disminuye la concentración de H^+ en el plasma sanguíneo, lo que hace que se disocie más H_2CO_3 en H^+ y HCO_3^-. A su vez esto hace que se disuelva más CO_2(g) de los pulmones en el plasma sanguíneo. La velocidad de la respiración, esto es, la velocidad de inhalación y exhalación de CO_2, puede ajustar rápidamente estos equilibrios y mantener casi constante el pH de la sangre.

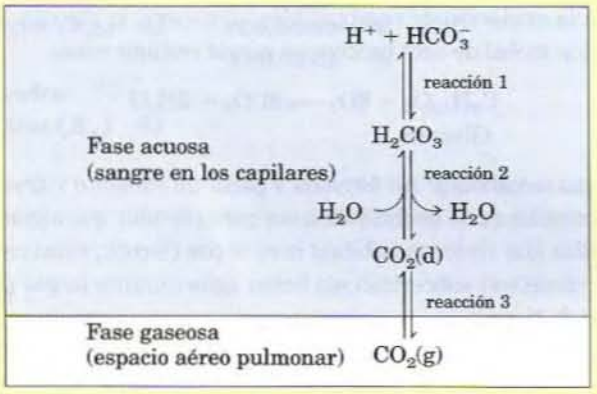
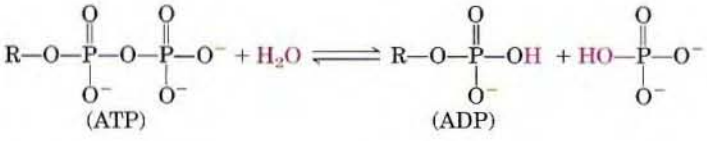


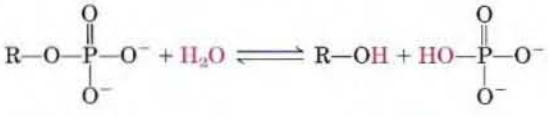
FIGURA 1 El CO_2 del espacio aéreo de los pulmones está en equilibrio con el tampón bicarbonato en el plasma sanguíneo que pasa a través de los capilares pulmonares. Puesto que se puede ajustar rápidamente la concentración de CO_2 disuelto mediante cambios en la velocidad de respiración, el sistema tampón del bicarbonato de la sangre está en un cuasi-equilibrio con una gran reserva potencial de CO_2.

2.4 El agua como reactivo

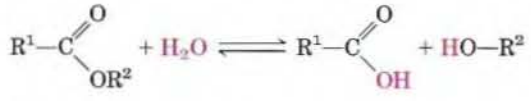
El agua no es tan sólo el disolvente en el que tienen lugar las reacciones químicas de las células vivas; a menudo, participa directamente en estas reacciones. La formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico constituye un ejemplo de una **reacción de condensación** en la que se eliminan los elementos del agua (véase Fig. 2-22a). La reacción inversa a ésta –rotura acompañada de la adición de los elementos del agua– es una **reacción de hidrólisis.** Las reacciones de hidrólisis son también responsables de la despolimerización enzimática de proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos. Las reacciones de hidrólisis, catalizadas por enzimas denominados **hidrolasas,** son casi siempre exergónicas. La formación de polímeros celulares a



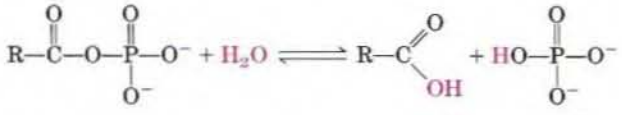
Anhídrido fosfato **(a)**



Éster fosfato **(b)**



Éster carboxilato **(c)**



Acil fosfato **(d)**

FIGURA 2-22 Participación del agua en reacciones biológicas. (a) El ATP es un anhídrido fosfato formado mediante una reacción de condensación (pérdida de los elementos del agua) entre ADP y fosfato. R representa la adenosina monofosfato (AMP). Esta reacción de condensación requiere energía. La hidrólisis (adición de los elementos del agua) del ATP libera una cantidad equivalente de energía. **(b), (c),** y **(d)** representan reacciones similares de condensación y de hidrólisis comunes en los sistemas biológicos.

partir de sus subunidades por simple inversión de la hidrólisis (es decir, mediante reacciones de condensación) sería endergónica, por lo que no tiene lugar. Como veremos, las células salvan este obstáculo termodinámico mediante el acoplamiento de reacciones de condensación endergónicas con procesos exergónicos, tales como la rotura del enlace anhídrido del ATP.

Al leer esto, el lector está (¡esperemos!) consumiendo oxígeno. El agua y el dióxido de carbono son los productos finales de la oxidación de combustibles tales como la glucosa. La reacción global de este proceso se puede resumir como

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

El "agua metabólica" así formada a partir de alimento y grasas almacenadas es de hecho suficiente para permitir que algunos animales que viven en hábitats muy secos (jerbos, ratas canguro, camellos) sobrevivan sin beber agua durante largos períodos de tiempo.

El CO_2 producido por la oxidación de glucosa se convierte en los eritrocitos en la forma más soluble HCO_3^-, mediante una reacción catalizada por el enzima carbónico anhidrasa:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

En esta reacción, el agua no es tan sólo un sustrato sino que actúa en un proceso de transferencia de protones formando una red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno a través de las que se produce un salto de protones (Fig. 2-14).

Las plantas y algas verdes utilizan la energía de la luz solar para romper el agua en el proceso de la fotosíntesis:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 2AH_2$$

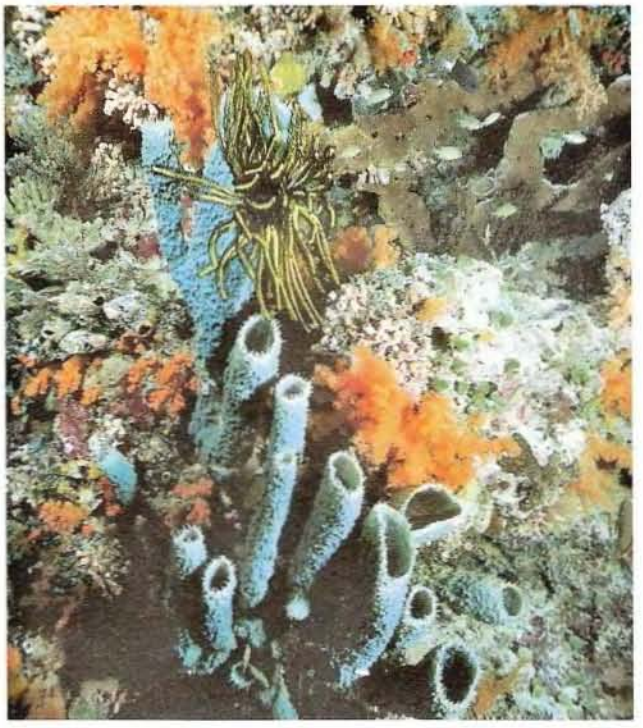
En esta reacción, A es una especie aceptora de electrones que varía según el tipo de organismo fotosintético y el agua actúa como dador de electrones en una secuencia de oxidación-reducción (véase Fig. 19-49) que es fundamental para el desarrollo de toda forma de vida.

RESUMEN 2.4 El agua como reactivo

- El agua es a la vez el disolvente en el que tienen lugar las reacciones metabólicas y un reactivo que interviene en muchos procesos bioquímicos, entre los que se incluyen reacciones de hidrólisis, de condensación y de oxidación-reducción.

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos

Los organismos se han adaptado de manera efectiva a su ambiente acuoso e incluso han desarrollado medios para aprovechar las propiedades únicas del agua. El alto calor específico del agua (la energía calórica necesaria para elevar en 1 °C la temperatura de 1 g de agua) es útil para las células y organismos porque permite que el agua actúe como un "tampón térmico", permitiendo que la temperatura de un organismo permanezca relativamente constante cuando varía la temperatura del aire o se genera calor como subproducto del metabolismo. Además, algunos vertebrados aprovechan el elevado calor de vaporización del agua (Tabla 2-1) utilizando (es decir, perdiendo) exceso de calor corporal al evaporar el sudor. El alto grado de cohesión interna del agua líquida, debido a los puentes de hidrógeno, es aprovechado por las plantas como medio para transportar nutrientes disueltos desde las raíces a las hojas durante el proceso de la transpiración. Incluso la densidad del hielo, menor que la del agua líquida, tiene consecuencias biológicas importantes en los ciclos vitales de los organismos acuáticos. Los estanques se congelan desde arriba hacia abajo y la capa de hielo superior aísla el agua de debajo del aire frígido, impidiendo que el estanque (y los organismo que hay en él) se congelen. De gran importancia para todos los organismos vivos es el hecho de que muchas propiedades físicas y biológicas de las macromoléculas celulares, especialmente las proteínas y los ácidos nucleicos, provienen de sus interacciones con moléculas de agua del medio circundante. La influencia del agua en el curso de la evolución biológica ha sido profunda y determinante. Si han aparecido formas de vida en otras partes del universo, es improbable que se parezcan a las de la Tierra, a menos que su origen extraterrestre sea también un lugar en el que haya grandes cantidades de agua líquida disponibles.



Los medios acuosos dan cobijo a multitud de especies. Los corales blandos, esponjas, briozoos y algas se disputan el espacio en este arrecife de las islas Filipinas.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

enlace de hidrógeno 48
energía de enlace 48
hidrofílico 50
hidrofóbico 50
anfipático 52
micela 53
interacciones hidrofóbicas 53
interacciones de van der Waals 54
osmolaridad 56
ósmosis 57
isotónico 57
hipertónico 57
hipotónico 57
constante de equilibrio (K_{eq}) 60
producto iónico del agua (K_w) 61
pH 61
par ácido-base conjugados 63
constante de disociación (K_a) 63
pK_a 64
curva de titulación 64
tampón 66
ecuación de Henderson-Hasselbalch 67
condensación 69
hidrólisis 69

Bibliografía

General

Belton, P.S. (2000) Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. *Cell. Mol. Life Sci.* **57,** 993–998.

Denny, M.W. (1993) *Air and Water: The Biology and Physics of Life's Media,* Princeton University Press, Princeton, NJ.
Una excelente investigación sobre la importancia biológica de las propiedades del agua.

Eisenberg, D. & Kauzmann, W. (1969) *The Structure and Properties of Water,* Oxford University Press, New York.
Clásico tratado avanzado de la química física del agua y las interacciones hidrofóbicas.

Franks, F. & Mathias, S.F. (eds) (1982) *Biophysics of Water,* John Wiley & Sons, Inc., New York.
Extensa colección de artículos sobre la estructura del agua pura y del citoplasma.

Gerstein, M. & Levitt, M. (1998) Simulating water and the molecules of life. *Sci. Am.* **279** (noviembre), 100–105.
Una descripción bien ilustrada del uso de la simulación por ordenador para estudiar la biológicamente importante asociación del agua con las proteínas y ácidos nucleicos.

Gronenborn, A. & Clore, M. (1997) Water in and around proteins. *The Biochemist* **19** (3), 18–21.
Una breve discusión sobre el agua unida a las proteínas detectada mediante cristalografía y RMN.

Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1460,** 177–191.
Una revisión sobre el papel de una cadena interna de moléculas de agua en el movimiento de protones a través de esta proteína.

Kornblatt, J. & Kornblatt, J. (1997) The role of water in recognition and catalysis by enzymes. *The Biochemist* **19** (3), 14–17.
Un breve y útil resumen de las formas en que el agua unida influye en la estructura y actividad de las proteínas.

Kuntz, I.D. & Zipp, A. (1977) Water in biological systems. *N. Engl. J. Med.* **297,** 262–266.
Breve revisión del estado físico del agua citosólica y sus interacciones con las biomoléculas disueltas.

Ladbury, J. (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **3,** 973–980.

Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460,** 133–156.
Una revisión de carácter avanzado sobre una bomba de protones que utiliza una cadena interna de moléculas de agua.

Nicolls, P. (2000) Introduction: the biology of the water molecule. *Cell. Mol. Life Sci.* **57,** 987–992.
Una revisión corta sobre las propiedades del agua, que sirve de introducción a otras excelentes revisiones avanzadas publicadas en el mismo número de la revista (véanse en especial las de Pocker y Rand et al., referidas más adelante).

Pocker, Y. (2000) Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydration-dehydration processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **57,** 1008–1017.
Revisión sobre el papel del agua en la catálisis enzimática, tomando la carbónico anhidrasa como ejemplo.

Rand, R.P., Parsegian, V.A. & Rau, D.C. (2000) Intracellular osmotic action. *Cell. Mol. Life Sci.* **57,** 1018–1032.
Revisión sobre el papel del agua en la catálisis enzimática a partir de estudios sobre disolventes pobres en agua.

Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S. & Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.* **23,** 143–148.
Revisión acerca del modo en que la célula bacteriana contrarresta los cambios en la osmolaridad de su entorno.

Stillinger, F.H. (1980) Water revisited. *Science* **209,** 451–457.
Breve revisión sobre la estructura física del agua, incluyendo la importancia de los puentes de hidrógeno y la naturaleza de las interacciones hidrofóbicas.

Symons, M.C. (2000) Spectroscopy of aqueous solutions: protein and DNA interactions with water. *Cell. Mol. Life Sci.* **57,** 999–1007.

Westhof, E. (ed.) (1993) *Water and Biological Macromolecules,* CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
Catorce capítulos, cada uno de ellos de un autor diferente, que cubren (a un nivel avanzado) la estructura del agua y sus interacciones con las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos.

Wiggins, P.M. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54,** 432–449.
Una revisión sobre el agua en biología, incluyendo una discusión sobre la estructura física del agua líquida, sus interacciones con las biomoléculas y el estado del agua en las células vivas.

Interacciones débiles en los sistemas acuosos

Fersht, A.R. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12,** 301–304.
Una discusión cuantitativa, clara y concisa sobre la contribución de los puentes de hidrógeno al reconocimiento molecular y la catálisis enzimática.

Frieden, E. (1975) Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity. *J. Chem. Educ.* **52,** 754–761.
Revisión de las cuatro clases de interacciones débiles que estabilizan las macromoléculas y les confieren especificidad biológica. Contiene ejemplos claros.

Jeffrey, G.A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding,* Oxford University Press, New York.
Una discusión avanzada y detallada de la estructura y propiedades de los puentes de hidrógeno, incluyendo los presentes en el agua y en las biomoléculas.

Martin, T.W. & Derewenda, Z.S. (1999) The name is bond—H bond. *Nat. Struct. Biol.* **6,** 403–406.
Breve revisión acerca del carácter parcialmente covalente de los enlaces de hidrógeno.

Schwabe, J.W.R. (1997) The role of water in protein-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 126–134.
Examina el importante papel del agua tanto en la especificidad como en la afinidad de las interacciones proteína-DNA.

Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200,** 1012–1018.
Revisión de las bases químicas y energéticas de las interacciones hidrofóbicas entre biomoléculas en solución acuosa.

Ácidos débiles, bases débiles y tampones: problemas para practicar

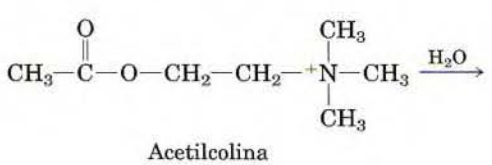
Segel, I.H. (1976) *Biochemical Calculations,* 2.ª ed, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Problemas

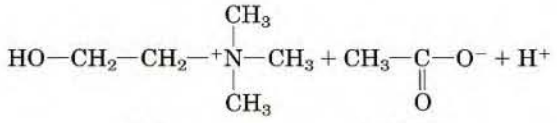
1. Vinagre artificial Una forma de preparar vinagre (*no* la más recomendable) consiste en hacer una disolución de ácido acético, único componente ácido del vinagre, al pH adecuado (véase Fig. 2-15), y añadir agentes saborizantes adecuados. El ácido acético (M_r 60) es líquido a 25 °C con una densidad de 1,049 g/mL. Calcular el volumen que se debe añadir a agua destilada para hacer 1 L de vinagre artificial (véase Fig. 2-16).

2. Acidez del HCl gástrico En un laboratorio hospitalario se tituló hasta neutralidad con NaOH 0,1 M una muestra de 10,0 mL de jugo gástrico obtenido varias horas después de una comida; se necesitaron 7,2 mL de NaOH. El estómago del paciente no contenía comida ni bebida ingerida por lo que se puede suponer que no había tampones presentes. ¿Cuál era el pH del jugo gástrico?

3. Medida de los niveles de acetilcolina por cambios del pH La concentración de la acetilcolina (un neurotransmisor) en una muestra se puede determinar a partir de los cambios de pH que acompañan a su hidrólisis. Cuando se incuba la muestra con el enzima acetilcolinesterasa, la acetilcolina se convierte cuantitativamente en colina y ácido acético, el cual se disocia produciendo acetato y un ion hidrógeno:



Acetilcolina



Colina Acetato

En un análisis típico, una muestra de 15 mL de una solución acuosa que contenía una cantidad desconocida de acetilcolina tenía un pH de 7,65. Cuando se incubó con acetilcolinesterasa, el pH de la solución descendió hasta 6,87. Suponiendo que no había tampón en la mezcla de ensayo, determinar el número de moles de acetilcolina en los 15 mL de la muestra.

4. Equilibrio osmótico en una rana marina La rana devoradora de cangrejos del Sudeste asiático, *Rana cancrivora*, nace y madura en agua dulce, pero busca su alimento en las ciénagas costeras (con una riqueza en agua marina de entre el 80% y el 100%). En consecuencia, cuando la rana se traslada desde el agua dulce al agua marina experimenta un gran cambio en la osmolaridad de su ambiente (de hipotónico a hipertónico).

(a) El agua marina al 80% contiene NaCl 460 mM, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM y $MgCl_2$ 50 mM. ¿Cuáles son las concentraciones de las diferentes especies iónicas en este agua de mar? Considerando que estas sales constituyen prácticamente todos los solutos del agua de mar, calcular su osmolaridad.

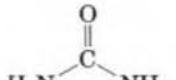
(b) La siguiente tabla muestra las concentraciones citoplasmáticas de iones en *Rana cancrivora*. Ignorando las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y otros metabolitos pequeños disueltos, calcular la osmolaridad de las células de la rana sobre la base de únicamente las concentraciones iónicas dadas a continuación.

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Cl^- (mM)	Ca^{2+} (mM)	Mg^{2+} (mM)
R. cancrivora	122	10	100	2	1

(c) Como todas las ranas, la rana devoradora de cangrejos puede intercambiar gases a través de su piel permeable, lo que le permite estar bajo el agua durante largos períodos de tiempo sin respirar. ¿Cómo afecta la elevada permeabili-

dad de la piel de la rana a sus células cuando se traslada del agua dulce al agua marina?

(d) Esta rana utiliza dos mecanismos para mantener sus células en equilibrio osmótico con su entorno: (1) permite que las concentraciones de Na^+ y Cl^- en sus células aumenten lentamente a medida que los iones difunden en la dirección de sus gradientes de concentración; (2) como muchos elasmobranquios (tiburones), retiene la urea, producto de desecho, en sus células. La adición tanto de NaCl como de urea aumenta la osmolaridad del citoplasma hasta un valor que es casi igual al del ambiente circundante.



Urea (CH_4N_2O)

Suponiendo que el volumen de agua en una rana típica sea de 100 mL, ¿cuántos gramos de NaCl [peso fórmula (FW) 58,44] necesita incorporar la rana para mantener sus tejidos isotónicos con el agua de mar?

(e) ¿Cuántos gramos de urea (FW 60) debe retener para conseguir lo mismo?

5. Propiedades de un tampón El aminoácido glicina se utiliza a menudo como principal ingrediente de un tampón en experimentos bioquímicos. El grupo amino de la glicina, que tiene un pK_a de 9,6, puede existir en la forma protonada ($—NH_3^+$) o como base libre ($—NH_2$) debido al equilibrio reversible

$$R—NH_3^+ \rightleftharpoons R—NH_2 + H^+$$

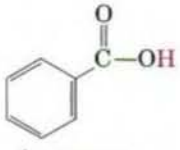
(a) ¿En qué intervalo de pH puede utilizarse la glicina como tampón eficiente gracias a su grupo amino?

(b) En una disolución 0,1 M de glicina a pH 9,0, ¿qué fracción de la glicina tiene su grupo amino en la forma $—NH_3^+$?

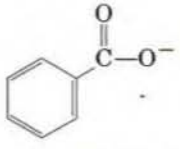
(c) ¿Qué cantidad de KOH 5 M debe añadirse a 1,0 L de glicina 0,1 M a pH 9,0 para llevar su pH exactamente a 10,0?

(d) Cuando el 99% de la glicina está en su forma $—NH_3^+$, ¿cuál es la relación numérica entre el pH de la solución y el pK_a del grupo amino?

6. Efecto del pH sobre la solubilidad La naturaleza fuertemente polar y formadora de puentes de hidrógeno del agua hace que sea un disolvente excelente para las especies iónicas (cargadas). Por el contrario, las moléculas orgánicas apolares no ionizadas, tales como el benceno, son relativamente insolubles en agua. En principio, la solubilidad en agua de cualquier ácido o base orgánicos se puede incrementar mediante la conversión de las moléculas en especies cargadas. Por ejemplo, la solubilidad del ácido benzoico en agua es baja. La adición de bicarbonato sódico a una mezcla de agua y ácido benzoico aumenta el pH y desprotona el ácido benzoico formando el ion benzoato, que es bastante soluble en agua.

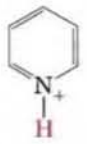


Ácido benzoico
$pK_a \approx 5$



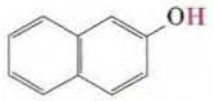
Ion benzoato

¿Son los siguientes compuestos más solubles en una solución acuosa de NaOH 0,1 M o de HCl 0,1 M? (Los protones disociables se señalan en rojo.)



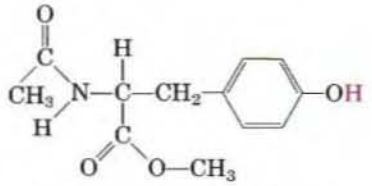
Ion piridina
$pK_a \approx 5$

(a)



β-Naftol
$pK_a \approx 10$

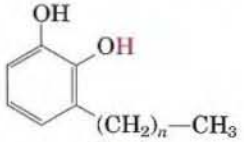
(b)



N-Acetiltirosina metil éster
$pK_a \approx 10$

(c)

7. Tratamiento de la urticaria por hiedra venenosa Los componentes de la hiedra y el roble venenosos que producen la urticaria característica son catecoles sustituidos con grupos alquilo de cadena larga.

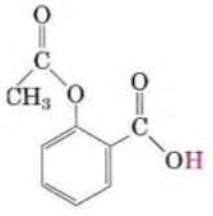


$pK_a \approx 8$

Si el lector hubiera estado expuesto a la acción de la hiedra venenosa, ¿cuál de los tratamientos siguientes aplicaría al área afectada? Justifique su elección.

(a) Lavar el área con agua fría.
(b) Lavar el área con vinagre diluido o zumo de limón.
(c) Lavar el área con agua y jabón.
(d) Lavar el área con jabón, agua y bicarbonato sódico.

8. pH y absorción de fármacos La aspirina es un ácido débil con un pK_a de 3,5.



Se absorbe a la sangre a través de la células que cubren el estómago y el intestino delgado. La absorción requiere el paso a través de la membrana plasmática, la velocidad del cual viene determinada por la polaridad de la molécula: las moléculas cargadas y muy polares pasan lentamente, mientras que las que son hidrofóbicas y neutras pasan rápidamente. El pH del contenido del estómago es de alrededor de 1,5 y el pH del con-

tenido del intestino delgado de alrededor de 6. ¿Se absorbe más aspirina hacia el torrente sanguíneo en el estómago o en el intestino delgado? Justificar claramente la elección.

9. Preparación de un tampón estándar para la calibración de un pHmetro El electrodo de vidrio utilizado en los pHmetros comerciales da una respuesta eléctrica proporcional a la concentración de ion hidrógeno. Para convertir estas respuestas en pH, deben calibrarse los electrodos de vidrio frente a disoluciones estándar de concentración de H^+ conocida. Determinar el peso en gramos de dihidrógeno fosfato sódico [$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; peso fórmula (FW) 138,01] y de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4; FW 141,98) necesarios para preparar 1 L de un tampón estándar a pH 7,00 con una concentración total de fosfato de 0,100 M (véase Figura 2-16).

10. Cálculo del pH a partir de la concentración de ion hidrógeno ¿Cuál es el pH de una disolución que tiene una concentración de H^+ de (a) $1{,}75 \times 10^{-5}$ mol/L; (b) $6{,}50 \times 10^{-10}$ mol/L; (c) $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol/L; (d) $1{,}50 \times 10^{-5}$ mol/L?

11. Cálculo de la concentración de ion hidrógeno a partir del pH ¿Cuál es la concentración de H^+ de una disolución de pH (a) 3,82; (b) 6,52; (c) 11,11?

12. Cálculo del pH a partir de relaciones molares Calcular el pH de una solución diluida que contiene una relación molar acetato potásico:ácido acético ($pK_a = 4{,}76$) de (a) 2:1; (b) 1:3; (c) 5:1; (d) 1:1; (e) 1:10.

13. Trabajo con tampones Un tampón contiene 0,010 moles de ácido láctico ($pK_a = 3{,}86$) y 0,050 moles de lactato sódico por litro. (a) Calcular el pH del tampón. (b) Calcular la variación del pH cuando se añaden 5 mL de HCl 0,5 M a 1 L del tampón. (c) ¿Cuál es la variación de pH esperable si se añadiera la misma cantidad de HCl a 1 L de agua pura?

14. Cálculo del pH a partir de concentraciones ¿Cuál es el pH de una solución que contiene 0,12 mol/L de NH_4Cl y 0,03 mol/L de NaOH (el pK_a de NH_4^+/NH_3 es 9,25)?

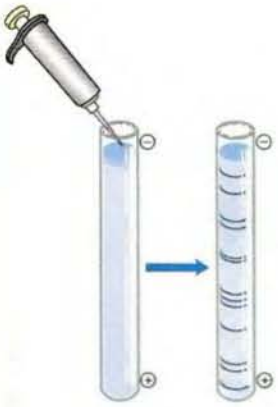
15. Cálculo del pK_a Se cree que un compuesto X desconocido tiene un grupo carboxílico con un pK_a de 2,0 y otro grupo ionizable con un pK_a comprendido entre 5 y 8. Cuando se añaden 75 mL de NaOH 0,1 M a 100 mL de una solución 0,1 M de X a pH 2,0, el pH aumenta hasta 6,72. Calcular el pK_a del segundo grupo ionizable de X.

16. Control del pH sanguíneo por la frecuencia respiratoria

(a) La presión parcial de CO_2 en los pulmones puede variar rápidamente con la velocidad y profundidad de la respiración. Por ejemplo, un remedio común para aliviar el hipo es incrementar la concentración de CO_2 en los pulmones. Esto se puede conseguir conteniendo la respiración, respirando escasamente y de forma lenta (hipoventilación) o respirando dentro de una bolsa de papel. En tales condiciones, la presión parcial de CO_2 en el espacio de aire de los pulmones aumenta por encima de la normal. Explicar cualitativamente el efecto de este proceder sobre el pH sanguíneo.

(b) Una práctica común de los corredores de distancias cortas es respirar rápida y profundamente (hiperventilación) durante aproximadamente medio minuto para eliminar el CO_2 de los pulmones justo antes de correr, por ejemplo, un sprint de 100 m. El pH de su sangre puede aumentar a 7,60. Explicar por qué aumenta el pH de la sangre.

(c) En una carrera de corta distancia los músculos producen mucho ácido láctico [$CH_3CH(OH)COOH$, $K_a = 1{,}38 \times 10^{-4}$] a partir de sus depósitos de glucosa. En vista de ello, ¿por qué puede ser útil una hiperventilación antes de realizar un sprint?



capítulo 3

AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

3.1 Aminoácidos *75*
3.2 Péptidos y proteínas *85*
3.3 Trabajar con proteínas *89*
3.4 Estructura covalente de las proteínas *96*
3.5 Secuencias de proteínas y evolución *106*

Quisiera que la palabra que le propongo, proteína... se entendiera como derivada de *proteios,* porque describe la sustancia primitiva o principal de la nutrición animal que las plantas elaboran para los herbívoros y que éstos proporcionan a los carnívoros.

—*J. J. Berzelius,* carta a G. J. Mulder, 1838

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y están presentes en todas las células y en todas las partes de las mismas. Las proteínas también presentan una gran variedad; en una sola célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes, que varían en tamaño desde péptidos relativamente pequeños hasta polímeros enormes de masas moleculares del orden de millones. Además, las proteínas muestran una gran diversidad en cuanto a su función biológica y son los productos finales más importantes de las rutas de información que se discuten en la Parte III de este libro. Las proteínas son los instrumentos moleculares mediante los que se expresa la información genética.

La clave de la estructura de los miles de proteínas diferentes se encuentra en unas subunidades monoméricas relativamente simples. Todas las proteínas, tanto si provienen de los linajes bacterianos más antiguos como de las formas de vida más complejas, están construidas a partir del mismo conjunto ubicuo de 20 aminoácidos, unidos de forma covalente en secuencias lineales características. Debido a que cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral propia que determina sus propiedades químicas, se puede considerar este grupo de 20 moléculas precursoras como el alfabeto en el que está escrito el lenguaje de la estructura proteica.

El hecho más notable es que las células puedan producir proteínas con propiedades y actividades muy diferentes uniendo los mismos 20 aminoácidos en multitud de combinaciones y secuencias diferentes. A partir de estos bloques estructurales los diferentes organismos pueden fabricar productos tan diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, fibras musculares, la proteína del cristalino del ojo, plumas, telarañas, cuernos de rinoceronte, proteínas de la leche, antibióticos, venenos de hongos y un sinfín de otras sustancias con actividades biológicas distintas (Fig. 3-1). Entre estos productos proteicos, los enzimas son los más variados y especializados. Prácticamente todas las reacciones celulares están catalizadas por enzimas.

La estructura y función de las proteínas constituyen el tema de este capítulo y de los tres siguientes. Empezamos con una descripción de las propiedades químicas fundamentales de los aminoácidos, péptidos y proteínas.

3.1 Aminoácidos

Arquitectura de proteínas – Aminoácidos

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, en los que cada **residuo aminoácido** está unido al siguiente a través de un tipo específico de enlace covalente. (El término "residuo" refleja la pérdida de los elementos del agua cuando un aminoácido se une a otro.) Las proteínas se pueden degradar (hidrolizar) hasta sus aminoácidos constituyentes mediante diversos métodos y los estudios iniciales sobre las proteínas se centraron, naturalmente, en los aminoácidos libres procedentes de las mismas. Veinte son los aminoácidos comúnmente encontrados en

FIGURA 3-1 Algunas funciones de las proteínas. (a) La luz producida por las luciérnagas es el resultado de una reacción en que intervienen la proteína luciferina y el ATP, catalizada por el enzima luciferasa (véase Recuadro 13-2). **(b)** Los eritrocitos contienen grandes cantidades de la proteína transportadora de oxígeno hemoglobina. **(c)** La proteína queratina, producida por todos los vertebrados, es el componente estructural principal del pelo, escamas, cuernos, lana, uñas y plumas. El rinoceronte negro está casi extinguido en estado salvaje debido a los mitos prevalentes en algunas partes del mundo de que un polvo derivado de su cuerno tiene propiedades afrodisíacas. En realidad, las propiedades químicas del polvo de cuerno de rinoceronte no son diferentes del de las pezuñas de bóvidos o de las uñas humanas.

proteínas. El primer aminoácido descubierto fue la asparagina en 1806. El último de los 20 que se encontró fue la treonina, que no fue identificada hasta 1938. Todos los aminoácidos tienen nombres comunes o triviales que, en algunos casos, provienen de la fuente de la cual se aislaron inicialmente. La asparagina se encontró por primera vez en el espárrago y el ácido glutámico se encontró en el gluten de trigo; la tirosina se aisló por primera vez del queso (su nombre proviene del griego *tyros*, "queso") y la glicina (del griego *glykos*, "dulce") se denominó de esta manera debido a su sabor dulce.

Los aminoácidos tienen características estructurales comunes

Los 20 aminoácidos estándar encontrados en las proteínas son α-aminoácidos. Tienen todos un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α) (Fig. 3-2). Difieren unos de otros en sus cadenas laterales, o **grupos R,** que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en la solubilidad en agua de los aminoácidos. Además de estos 20 aminoácidos existen muchos más que se encuentran con menor frecuencia. Algunos de ellos son residuos que han sido modificados después de la síntesis de una proteína; otros se hallan presentes en organismos vivos pero no como unidades constituyentes de las proteínas. A los aminoácidos estándar se les han asignado abreviaturas de tres letras y símbolos de una sola letra (Tabla 3-1) que se utilizan para indicar de manera abreviada la composición y secuencia de aminoácidos polimerizados en las proteínas.

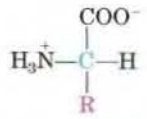
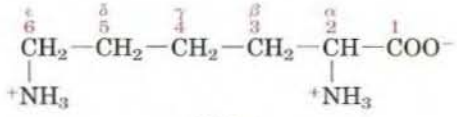


FIGURA 3-2 Estructura general de un aminoácido. Esta estructura es común a todos los α-aminoácidos, con una única excepción. (La excepción es la prolina, un aminoácido cíclico.) El grupo R o cadena lateral (en rojo) unido al carbono α (azul) es diferente para cada aminoácido.

En una práctica que puede resultar confusa, se utilizan dos convenciones para identificar los carbonos dentro de un aminoácido. Los carbonos adicionales de un grupo R se designan comúnmente β, γ, δ, ε, etc., empezando a partir del carbono α. Para la mayoría de las demás moléculas orgánicas, los átomos de carbono se numeran simplemente a partir de un extremo, dando la máxima prioridad (C-1) al carbono cuyos sustituyentes contengan átomos de mayor número atómico. Siguiendo esta última convención, el grupo carboxilo de un aminoácido sería el C-1 y el carbono α sería el C-2. En algunos casos, como en aminoácidos con grupos R heterocíclicos, el sistema de letras griegas es ambiguo y se utiliza por ello la convención numérica.



Lisina

En todos los aminoácidos estándar excepto la glicina, el carbono α está unido a cuatro grupos diferentes: un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno (Fig. 3-2; en la glicina el grupo R es otro átomo de hidrógeno). El átomo de carbono α es, por tanto, un **centro quiral** (p. 17). Debido al ordenamiento tetraédrico de los orbitales de enlace alrededor del átomo de carbono α, los cuatro grupos diferentes pueden ocupar dos ordenamientos distintos en el espacio, por lo que los aminoácidos pueden aparecer en forma de dos estereoisómeros. Al ser imágenes especulares no superponibles entre sí (Fig. 3-3), las dos formas constituyen un tipo de estereoisómeros denominados **enantiómeros** (véase Fig. 1-19). Todas las moléculas con un centro quiral son también **ópticamente activas,** es decir, hacen girar el plano de la luz polarizada (véase Recuadro 1-2).

Para especificar la **configuración absoluta** de los cuatro sustituyentes de los átomos de carbono asimétricos se ha desarrollado una nomenclatura especial. Las configuraciones absolutas de los azúcares sencillos y los aminoácidos se especifican mediante el **sistema D, L** (Fig. 3-4), basado en la configuración absoluta del azúcar de tres carbonos gliceraldehído, una convención propuesta por Emil Fischer en 1891. (Fischer conocía los grupos que rodean el átomo de carbono asimétrico del gliceraldehído pero tuvo que adivinar su configuración absoluta; su predicción se confirmó posteriormente por análisis de difracción de rayos X.) Para todos los compuestos quirales, los estereoisómeros que tienen una configuración relacionada con la del L-gliceraldehído se designan L y los estereoisómeros relacionados con el D-gliceraldehído se designan D. Los grupos funcionales de la L-alanina se hacen coincidir con los del L-gliceraldehído alineando aquellos que pueden interconvertirse mediante reacciones químicas simples en un solo paso. Así, el grupo carboxilo de la L-alanina ocupa la misma posición respecto al carbono quiral que el grupo aldehído del L-gliceraldehído, puesto que un aldehído puede convertirse fácilmente en un grupo carboxilo en un solo paso mediante una oxidación. Históricamente, las denominaciones similares *l* y *d* se utilizaron para levógiro (que gira la luz a la izquierda) y dextrógiro (que gira la luz a la derecha). Sin embargo, no todos los L-aminoácidos son levógiros y se hizo necesaria la convención que se muestra en la Figura 3-4 para evitar posibles ambigüedades sobre la configuración absoluta. Según la convención de Fischer, L y D hacen referencia *solamente* a la configuración absoluta de los cuatro sustituyentes alrededor del carbono quiral.

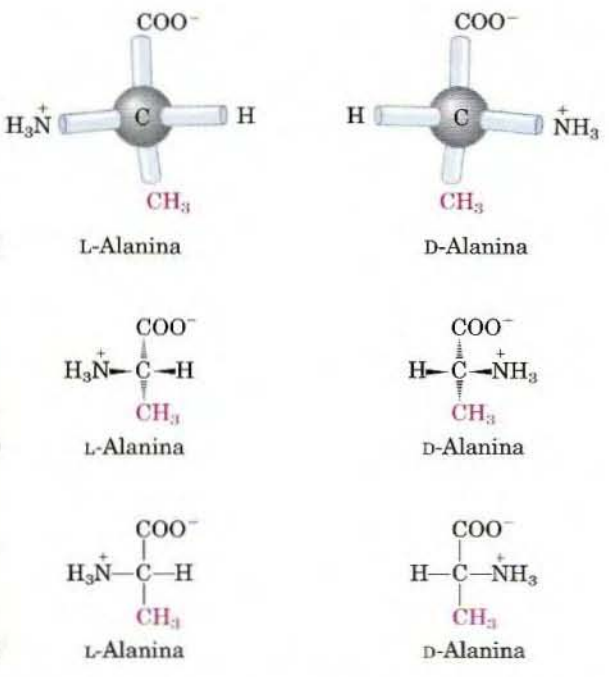


FIGURA 3-3 Estereoisomería en los α-aminoácidos. (a) Los dos estereoisómeros de la alanina, la L- y la D-alanina, son imágenes especulares no superponibles entre sí (enantiómeros). **(b, c)** Dos convenciones diferentes para mostrar la configuración en el espacio de los estereoisómeros. En las fórmulas de perspectiva **(b)** los enlaces con forma de cuña se proyectan fuera del plano del papel; los enlaces a trazos lo hacen hacia atrás. En las fórmulas de proyección **(c)** se supone que los enlaces horizontales se proyectan fuera del plano del papel, los enlaces verticales hacia atrás. No obstante, se utilizan a menudo las fórmulas de proyección de modo no sistemático, sin pretender representar una configuración estereoquímica específica.

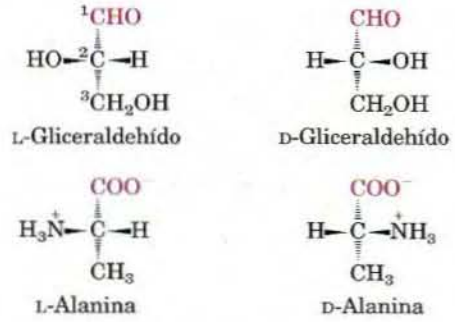


FIGURA 3-4 Relación estérica de los estereoisómeros de la alanina con la configuración absoluta del L- y D-gliceraldehído. En estas fórmulas de perspectiva los carbonos están alineados verticalmente con el átomo quiral en el centro. Los carbonos de estas moléculas están numerados empezando por los carbonos aldehído- o carboxilo-terminales (en rojo) de 1 a 3 y de arriba abajo tal como se muestra. Cuando se presentan de esta forma, el grupo R del aminoácido (en este caso el grupo metilo de la alanina) está siempre debajo del carbono α. Los L-aminoácidos son los que tienen el grupo α-amino a la izquierda y los D-aminoácidos los que tienen el grupo α-amino a la derecha.

Otro sistema para especificar la configuración alrededor de un centro quiral es el **sistema RS,** que se utiliza en la nomenclatura sistemática de la química orgánica y describe con mayor precisión la configuración de las moléculas con más de un centro quiral (véase p. 18).

Los residuos aminoácidos de las proteínas son estereoisómeros L

Casi todos los compuestos biológicos con un centro quiral se presentan en la naturaleza en una sola de sus formas estereoisómeras, la D o la L. Los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente L-estereoisómeros. Sólo se han encontrado D-aminoácidos en unos pocos péptidos, generalmente pequeños, que incluyen algunos péptidos de las paredes celulares bacterianas y algunos antibióticos peptídicos.

Es un hecho notable que casi todos los aminoácidos de las proteínas sean L-estereoisómeros. Cuando se forman compuestos quirales en reacciones químicas ordinarias, el resultado es una mezcla racémica de isómeros D y L, que son difíciles de distinguir y aislar por el químico. Sin embargo, para los sistemas vivos, los isómeros D y L son tan diferentes como la mano derecha y la izquierda. La formación de subestructuras estables y repetidas en las proteínas (Capítulo 4) requiere en general que sus aminoácidos sean de una misma serie estereoquímica. Las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos gracias a que los centros activos de los enzimas son asimétricos, lo que implica que las reacciones que catalizan sean estereoespecíficas.

TABLA 3-1 Propiedades y convenciones asociadas con los aminoácidos estándar

Aminoácido	Abreviatura/ símbolo	M_r	Valores de pK_a pK_1 (—COOH)	pK_2 ($—NH_3^+$)	pK_R (grupo R)	pI	Índice hidropático*	Presencia en las proteínas (%)†
Grupos R apolares alifáticos								
Glicina	Gly G	75	2,34	9,60		5,97	−0,4	7,2
Alanina	Ala A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro P	115	1,99	10,96		6,48	1,6	5,2
Valina	Val V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos								
Fenilalanina	Phe F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	−1,3	3,2
Triptófano	Trp W	204	2,38	9,39		5,89	−0,9	1,4
Grupos R polares sin carga								
Serina	Ser S	105	2,21	9,15		5,68	−0,8	6,8
Treonina	Thr T	119	2,11	9,62		5,87	−0,7	5,9
Cisteína	Cys C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn N	132	2,02	8,80		5,41	−3,5	4,3
Glutamina	Gln Q	146	2,17	9,13		5,65	−3,5	4,2
Grupos R cargados positivamente								
Lisina	Lys K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	−3,9	5,9
Histidina	His H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	−3,2	2,3
Arginina	Arg R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	−4,5	5,1
Grupos R cargados negativamente								
Aspartato	Asp D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	−3,5	5,3
Glutamato	Glu E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	−3,5	6,3

*Escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofilicidad de los grupos R; puede utilizarse para predecir la tendencia de los aminoácidos a buscar un ambiente acuoso (valores negativos) o un ambiente hidrofóbico (valores positivos). Véase Capítulo 11. De Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157,** 105–132.

†Presencia media en más de 1150 proteínas. De Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. En *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599–623, Plenum Press, New York.

Los aminoácidos se pueden clasificar según su grupo R

El conocimiento de las propiedades químicas de los aminoácidos estándar es de vital importancia para la comprensión de la bioquímica. El tema se puede simplificar agrupando los aminoácidos en cinco clases principales basadas en las propiedades de sus grupos R (Tabla 3-1), en especial su **polaridad,** o tendencia a interaccionar con el agua a pH biológico (cerca de pH 7,0). La polaridad de los grupos R varía enormemente desde totalmente apolar o hidrofóbico (insoluble en agua) hasta altamente polar o hidrofílico (soluble en agua).

En la Figura 3-5 se muestran las estructuras de los 20 aminoácidos estándar y algunas de sus propiedades se muestran en la Tabla 3-1. Dentro de cada clase existen gradaciones de polaridad, tamaño y forma de los grupos R.

Grupos R apolares alifáticos Los grupos R de esta clase de aminoácidos son apolares e hidrofóbicos. Las cadenas laterales de la **alanina, valina, leucina** e **isoleucina** tienden a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras proteicas a través de interacciones hidrofóbicas. La **glicina** tiene la estructura más simple. Aunque formalmente es apolar, su muy pequeña cadena lateral no tiene una contribución real en las interacciones hidrofóbicas. La **metionina,** uno de los dos aminoácidos que contienen azufre, tiene un grupo tioéter apolar en su cadena lateral. La **prolina** tiene una cadena lateral alifática

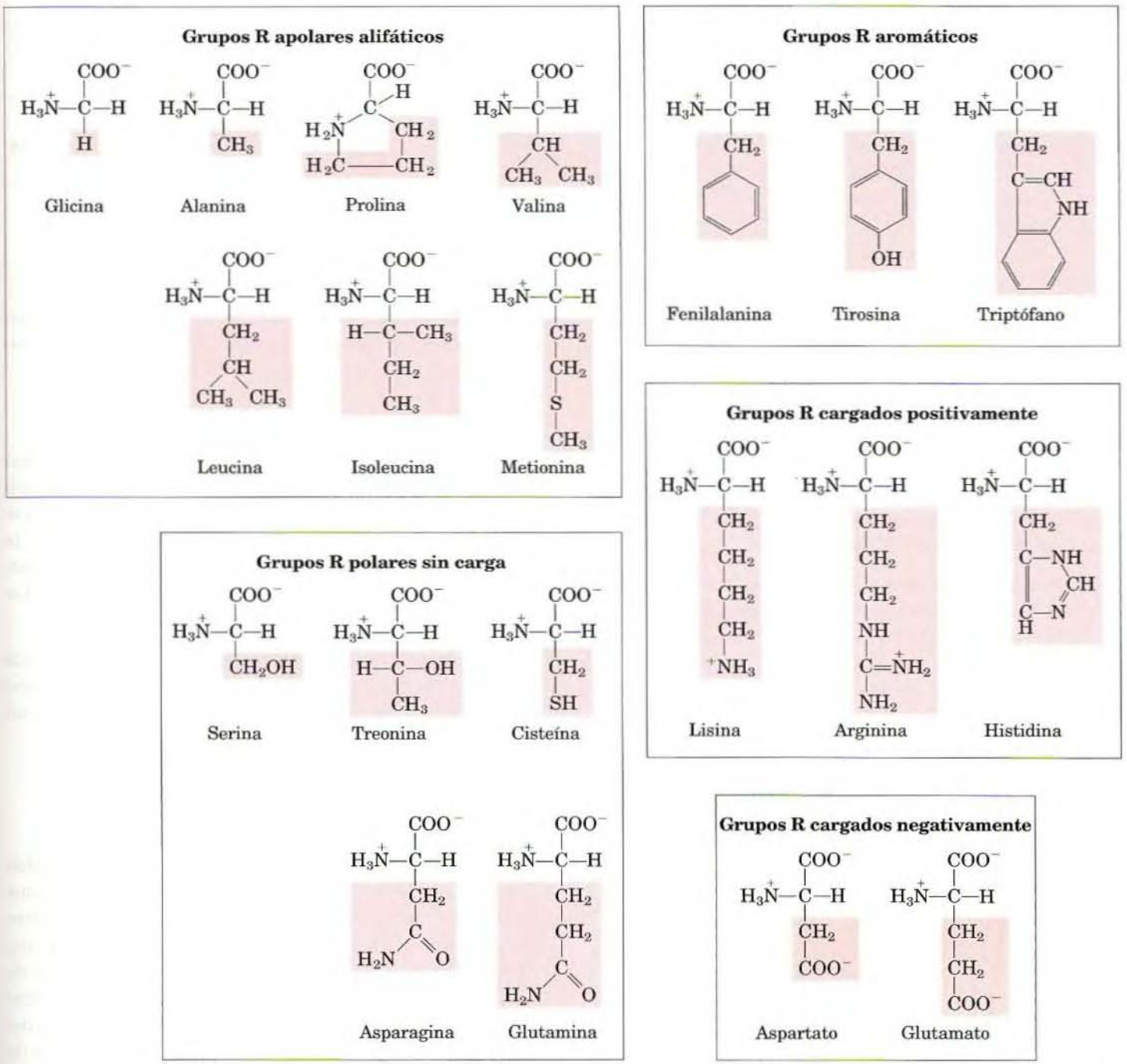


FIGURA 3-5 Los 20 aminoácidos estándar de las proteínas. Las fórmulas estructurales muestran el estado de ionización que predomina a pH 7,0. Las partes no sombreadas son comunes a todos los aminoácidos; las partes sombreadas en rojo son los grupos R. Aunque el grupo R de la histidina se muestra sin carga, su pK_a (véase Tabla 3-1) es tal que una fracción pequeña pero significativa de estos grupos está cargada positivamente a pH 7,0.

con una estructura cíclica distintiva. El grupo amino secundario (imino) de los residuos de prolina tiene una conformación rígida que reduce la flexibilidad estructural de las regiones polipeptídicas que contienen este aminoácido.

Grupos R aromáticos La **fenilalanina,** la **tirosina** y el **triptófano,** con sus cadenas laterales aromáticas, son relativamente apolares (hidrofóbicos). Todos ellos pueden participar en interacciones hidrofóbicas. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno y constituye un grupo funcional importante en algunos enzimas. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico del triptófano.

El triptófano y la tirosina, y en mucho menor grado la fenilalanina, absorben la luz ultravioleta (Fig. 3-6; Recuadro 3-1). Esto explica la fuerte absorbancia de la luz característica de la mayoría de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, propiedad aprovechada por los investigadores en la caracterización de las proteínas.

Grupos R polares sin carga Los grupos R de estos aminoácidos son más solubles en agua, o hidrofílicos, que los de los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman puentes de hidrógeno con el agua. En esta clase de aminoácidos se incluyen la **serina, treonina, cisteína, asparagina** y **glutamina.** La polaridad de la serina y la treonina proviene de sus grupos hidroxilo; la polaridad de la cisteína de su grupo sulfhidrilo; y la polaridad de la asparagina y glutamina de sus grupos amida.

La asparagina y la glutamina son las amidas de otros dos aminoácidos que también se encuentran en las proteínas, aspartato y glutamato, respectivamente, a los que se hidrolizan fácilmente por ácido o base. La cisteína se oxida fácilmente formando un aminoácido dimérico unido covalentemente llamado **cistina,** en el que dos moléculas de cisteína o sus residuos están unidos a través de un enlace disulfuro (Fig. 3-7). Los residuos unidos por un puente disulfuro son fuertemente hidrofóbicos (apolares). Los puentes disulfuro desempeñan un papel especial en la estructura de muchas proteínas al formar uniones covalentes entre partes de una molécula de proteína o entre dos cadenas polipeptídicas diferentes.

Grupos R cargados positivamente (básicos) Los grupos R más hidrofílicos son los que están cargados, sea positiva o negativamente. Los aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga neta positiva significativa a pH 7,0 son la **lisina,** que tiene un grupo amino primario adicional en la posición ε de su cadena alifática; la **arginina,** que tiene un grupo guanidino cargado positivamente; y la **histidina,** que contiene un grupo imidazol. La histidina es el único aminoácido estándar que tiene una cadena lateral ionizable con un pK_a próximo a la neutralidad. En muchas reacciones catalizadas por enzimas, un residuo de His facilita la reacción al servir de dador/aceptor de protones.

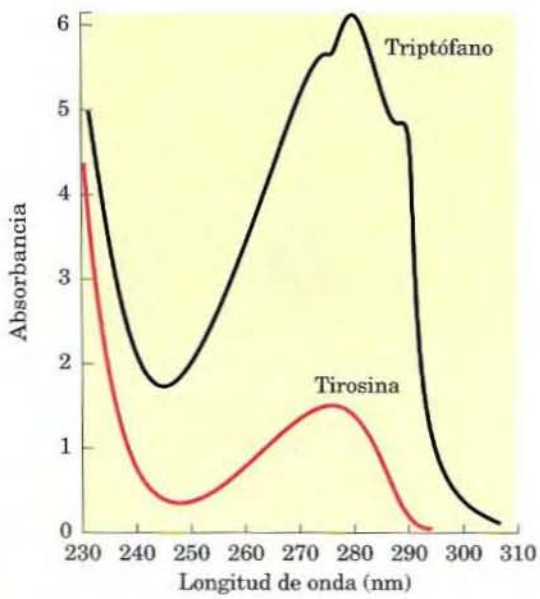


FIGURA 3-6 Absorbción de la luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos. Comparación de los espectros de absorción de luz de los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina a pH 6,0. Los aminoácidos están presentes en cantidades equimolares (10^{-3} M) en idénticas condiciones. La absorción de la luz por el triptófano es cuatro veces mayor que la de la tirosina. Obsérvese que el máximo de absorción tanto para el triptófano como para la tirosina está cercano a una longitud de onda de 280 nm. La absorción de luz por el tercer aminoácido aromático, la fenilalanina (no mostrado), generalmente contribuye poco a las propiedades espectroscópicas de las proteínas.

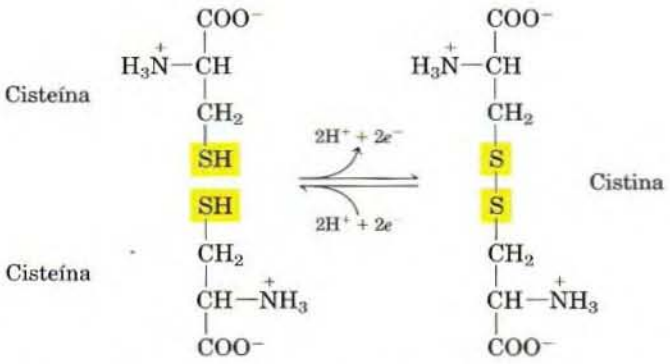


FIGURA 3-7 Formación reversible de un puente disulfuro por oxidación de dos moléculas de cisteína. Los puentes disulfuro entre residuos de Cys estabilizan las estructuras de muchas proteínas.

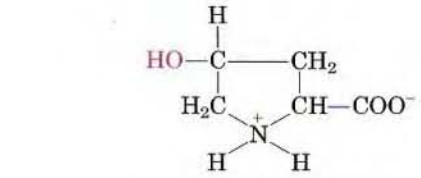
Grupos R cargados negativamente (ácidos) Los dos aminoácidos que tienen grupos R con una carga neta negativa a pH 7,0 son el **aspartato** y **glutamato,** cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo.

Los aminoácidos no estándar tienen también importantes funciones

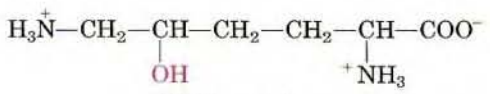
Además de los 20 aminoácidos estándar, las proteínas pueden contener residuos creados por modificación de los residuos estándar ya incorporados a un polipéptido (Fig. 3-8a). Entre los aminoácidos no estándar están la **4-hidroxiprolina,** que es un derivado de la prolina, y la **5-hidroxilisina,** derivada de la lisina. La primera se encuentra en la pared celular de plantas y ambas se encuentran en el colágeno, una proteína fibrosa del tejido conjuntivo. La **6-*N*-metil-lisina** es un constituyente de la miosina, una proteína contráctil del músculo. Otro aminoácido no estándar importante es el **γ-carboxiglutamato,** que se encuentra en la proteína protrombina que interviene en la coagulación de la sangre, así como en ciertas otras proteínas que unen Ca^{2+} como parte de su función biológica. Más compleja es la **desmosina,** que es un derivado de cuatro residuos diferentes de Lys y que se encuentra en la proteína fibrosa elastina.

La **selenocisteína** es un caso especial. Este residuo poco frecuente es introducido durante la síntesis de proteínas en lugar de ser creado a través de una modificación postsintética. Contiene selenio en lugar del azufre de la cisteína. La selenocisteína, que de hecho proviene de la serina, se encuentra en sólo unas pocas proteínas conocidas.

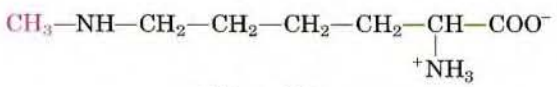
Se han encontrado alrededor de otros 300 aminoácidos en las células. Éstos tienen funciones diversas pero no forman



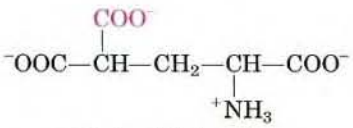
4-Hidroxiprolina



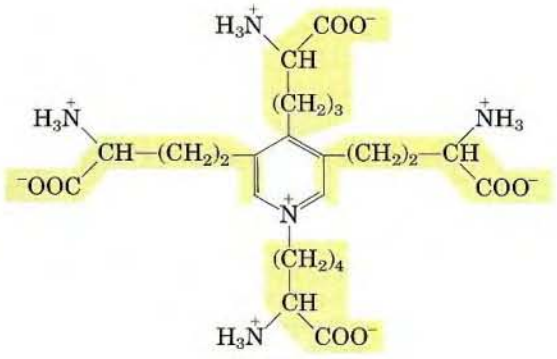
5-Hidroxilisina



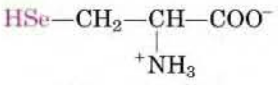
6-*N*-metil-lisina



γ-Carboxiglutamato

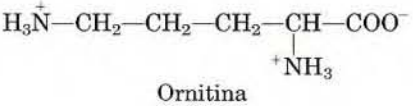


Desmosina

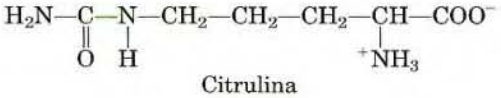


Selenocisteína

(a)



Ornitina



Citrulina

(b)

parte de proteínas. La **ornitina** y la **citrulina** (Fig. 3-8b) merecen una mención especial porque son intermediarios clave (metabolitos) en la biosíntesis de la arginina (Capítulo 22) y en el ciclo de la urea (Capítulo 18).

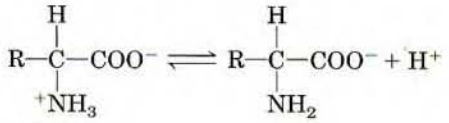
FIGURA 3-8 Aminoácidos no estándar. (a) Algunos aminoácidos no estándar encontrados en proteínas. Todos ellos provienen de aminoácidos estándar. Los grupos funcionales extra añadidos a través de reacciones de modificación se muestran en rojo. La desmosina se forma a partir de cuatro residuos de Lys (los cuatro esqueletos carbonados están sombreados en amarillo). Obsérvese que se utilizan tanto números como letras griegas para identificar los átomos de carbono de estas estructuras. **(b)** La ornitina y la citrulina, que no se encuentran en proteínas, son intermediarios en la biosíntesis de arginina y en el ciclo de la urea.

Forma no iónica — Forma zwitteriónica

FIGURA 3-9 Formas no iónica y zwitteriónica de los aminoácidos. La forma no iónica no se encuentra en cantidades significativas en disoluciones acuosas. El zwitterión predomina a pH neutro.

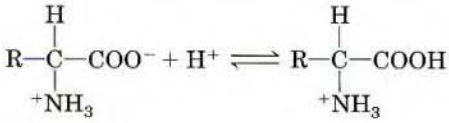
Los aminoácidos pueden actuar como ácidos y como bases

Cuando un aminoácido se disuelve en agua, se encuentra en solución en forma del ion dipolar, o **zwitterion** (en alemán "ion híbrido"), mostrado en la Figura 3-9. Un zwitterion puede actuar bien como ácido (dador de protones):



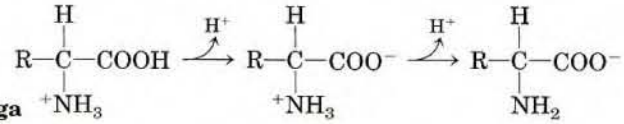
Zwitterion

o como base (aceptor de protones):



Zwitterion

Las sustancias con esta naturaleza dual son **anfóteras** y a menudo se denominan **anfolitos** (de "electrolitos anfóteros"). Un α-aminoácido sencillo monoamínico y monocarboxílico, tal como la alanina, es un ácido diprótico cuando está totalmente protonado –esto es, tiene dos grupos, el grupo —COOH y el grupo $—NH_3^+$, que pueden dar protones:



Carga neta: **+1** **0** **−1**

RECUADRO 3-1 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Absorción de la luz por las moléculas: ley de Lambert-Beer

Una gran variedad de biomoléculas absorben luz a longitudes de onda características, de la misma forma que el triptófano absorbe luz a 280 nm (Fig. 3-6). La medida de la absorción de la luz mediante un espectrofotómetro se utiliza para detectar e identificar moléculas y para medir su concentración en solución. La fracción de la luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente (paso óptico) y con la concentración de la especie absorbente (Fig. 1). Estas dos relaciones se combinan en la ley de Lambert-Beer,

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

en donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, ε es el coeficiente de absorción (o extinción) molar (en unidades de litros por mol-centímetro), c es la concentración de la especie absorbente (en moles por litro) y l el paso óptico de la muestra que absorbe la luz (en centímetros). La ley de Lambert-Beer supone que la luz incidente es paralela y monocromática (de una sola longitud de onda) y que las moléculas de disolvente y de soluto están orientadas al azar. La expresión $\log(I_0/I)$ se denomina **absorbancia** y se designa como A.

Es importante resaltar que cada milímetro sucesivo de paso óptico de la solución absorbente en una cubeta de 1,0 cm no absorbe una cantidad constante sino una fracción constante de la luz que incide en él. No obstante, con una capa absorbente de paso óptico fijo, *la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.*

El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente y la longitud de onda, y también con el pH si la especie absorbente de luz está en equilibrio con un estado de ionización que tiene diferentes propiedades de absorbancia.

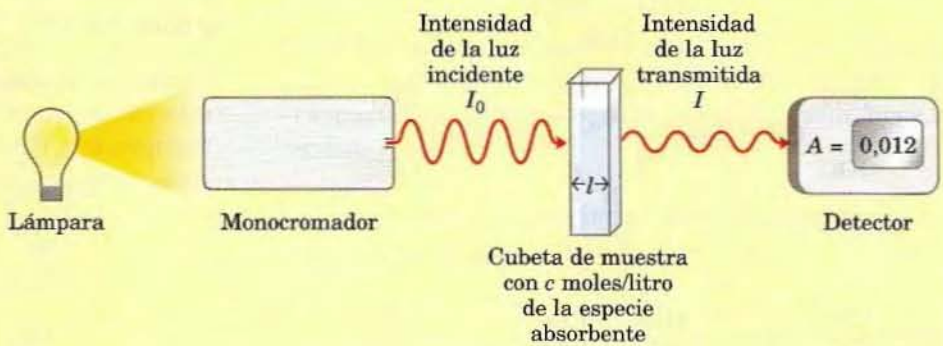


FIGURA 1 Componentes principales de un espectrofotómetro. Una fuente de luz emite luz en un amplio espectro. A continuación, el monocromador selecciona y transmite luz de una longitud de onda determinada. La luz del monocromador pasa a través de la muestra situada en una cubeta de paso óptico l y es absorbida por la muestra en proporción a la concentración de la especie absorbente. La luz transmitida se mide mediante un detector.

Los aminoácidos tienen curvas de titulación características

La titulación ácido-base implica la adición o eliminación gradual de protones (Capítulo 2). La Figura 3-10 muestra la curva de titulación de la forma diprótica de la glicina. La gráfica tiene dos etapas distintas, que corresponden a la desprotonación de dos grupos diferentes de la glicina. Cada una de las etapas se asemeja en su forma a la curva de titulación de un ácido monoprótico tal como el ácido acético (véase Fig. 2-17) y puede analizarse de la misma manera. A pH muy bajo, la especie iónica predominante de la glicina es $^+H_3N—CH_2—COOH$, la forma totalmente protonada. En el punto medio de la primera etapa de la titulación, en el que el grupo —COOH de la glicina pierde su protón, se encuentran presentes concentraciones equimolares del dador de protones ($^+H_3N—CH_2—COOH$) y del aceptor de protones ($^+H_3N—CH_2—COO^-$). En el punto medio de cualquier titulación se alcanza un punto de inflexión en que el pH es igual al pK_a del grupo protonado que se está titulando (véase Fig. 2-18). Para la glicina el pH en el punto medio es 2,34 y por lo tanto su grupo —COOH tiene un pK_a (rotulado como pK_1 en la Fig. 3-10) de 2,34. (Recuérdese del Capítulo 2 que pH y pK_a son simplemente notaciones útiles de la concentración de protones y de la constante de equilibrio de la ionización, respectivamente. El pK_a es una medida de la tendencia de un grupo a ceder un protón, tendencia que disminuye en un factor de 10 cada vez que el pK_a se incrementa en una unidad.) A medida que avanza la titulación se alcanza otro punto importante a pH 5,97. Aquí hay otro punto de inflexión en el que la eliminación del primer protón es prácticamente completa mientras que tan sólo se ha iniciado la eliminación del segundo. A este pH la glicina se encuentra mayoritariamente en forma del ion dipolar $^+H_3N—CH_2—COO^-$. Pronto volveremos a hablar sobre el significado de este punto de inflexión en la curva de titulación (pI en la Fig. 3-10).

La segunda etapa de la titulación corresponde a la eliminación de un protón del grupo $—NH_3^+$ de la glicina. El pH en el punto medio de esta etapa tiene un valor de 9,60, igual al valor del pK_a (rotulado pK_2 en la Fig. 3-10) del grupo $—NH_3^+$. La titulación es prácticamente completa a un pH de aproximadamente 12, en donde la forma predominante de la glicina es $H_2N—CH_2—COO^-$.

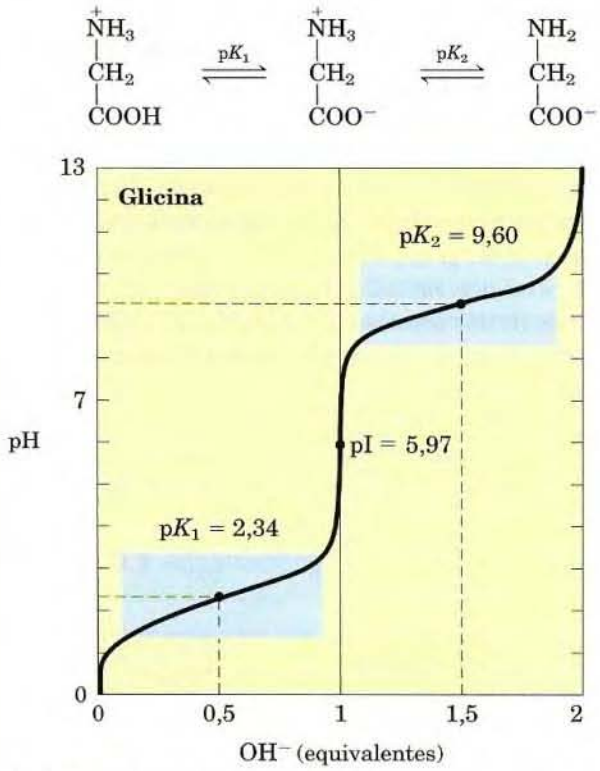


FIGURA 3-10 Titulación de un aminoácido. Se muestra aquí la curva de titulación de glicina 0,1 M a 25 °C. Las especies iónicas predominantes en puntos clave de la titulación se muestran encima de la gráfica. Los recuadros sombreados, centrados alrededor de $pK_1 = 2,34$ y $pK_2 = 9,60$, indican las regiones de máximo poder tamponante.

A partir de la curva de titulación de la glicina se pueden deducir diversas informaciones interesantes. En primer lugar, da una medida cuantitativa del pK_a de cada uno de los dos grupos ionizables: 2,34 para el —COOH y 9,60 para el grupo $—NH_3^+$. Obsérvese que el grupo carboxilo de la glicina es más de 100 veces más ácido (se ioniza más fácilmente) que el grupo carboxilo del ácido acético que, como hemos visto en el Capítulo 2, tiene un pK_a de 4,76, cercano al promedio para un grupo carboxilo unido a un hidrocarburo alifático sin más sustituyentes. La modificación del pK_a de la glicina está causada por la repulsión entre el protón saliente y el grupo amino cargado positivamente cercano situado en el átomo de carbono α tal como se describe en la Figura 3-11. Las cargas opuestas en el zwitterion resultante tienen un efecto estabilizante, desplazando el equilibrio aún más hacia la derecha. De modo similar, el pK_a del grupo amino de la glicina es menor que el pK_a medio de un grupo amino. Este efecto es debido en parte a los átomos de oxígeno electronegativos del grupo carboxilo, que tienden a atraer electrones hacia ellos, aumentando así la tendencia del grupo amino a ceder un protón. Por tanto, el grupo α-amino tiene un pK_a menor que el de una amina alifática tal como la metilamina (Fig. 3-11). En resumen, el pK_a de cualquier grupo funcional se ve fuertemente afectado por su entorno químico, un fenómeno que a veces es utilizado en los centros activos de los enzimas para promover mecanismos de reacción exquisitamente adaptados que dependen de los valores modificados de los pK_a de grupos dadores/aceptores de protones de residuos específicos.

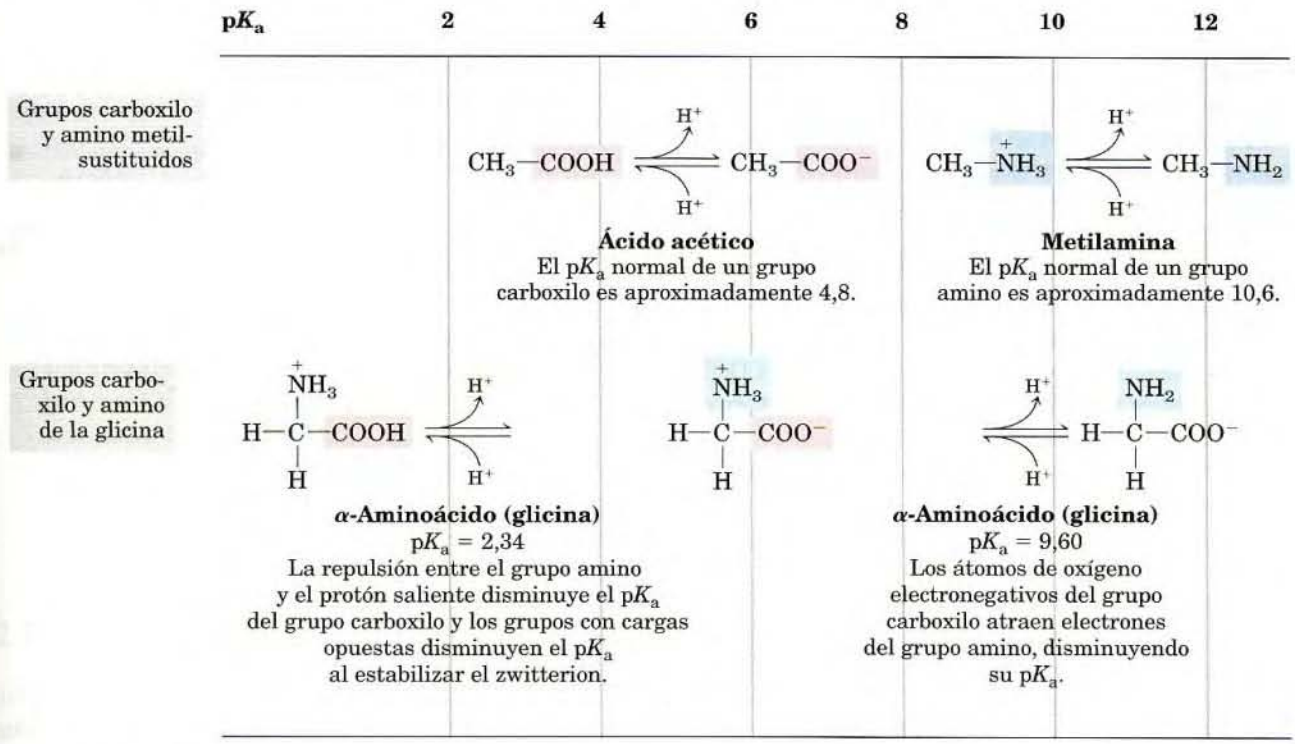


FIGURA 3-11 Efecto del entorno químico en el pK_a. Los valores de pK_a para los grupos ionizables de la glicina son menores que los de los grupos amino y carboxilo sustituidos simplemente por un metilo. Estas modificaciones que disminuyen el pK_a son debidas a interacciones intramoleculares. Efectos similares pueden ser causados por grupos químicos que están posicionados en las cercanías de un grupo ionizable –por ejemplo, en el centro activo de un enzima.

La segunda información que proporciona la curva de titulación de la glicina es que este aminoácido tiene *dos* regiones de capacidad tamponante. Una de éstas es la porción relativamente plana de la curva que abarca alrededor de una unidad de pH a cada lado del primer pK_a de 2,34, lo que indica que la glicina es un buen tampón cerca de este pH. La otra zona de tamponamiento está centrada alrededor de pH 9,60. (Obsérvese que la glicina no es un buen tampón al pH del fluido intracelular o de la sangre, que es de alrededor de 7,4.) Dentro de los márgenes de tamponamiento de la glicina, se puede utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch (véase Recuadro 2-3) para calcular las proporciones de especies dadora y aceptora de protones de la glicina que se requieren para preparar un tampón a un pH determinado.

La curva de titulación predice la carga eléctrica de los aminoácidos

Otra información importante deducida de la curva de titulación de un aminoácido es la relación entre su carga eléctrica neta y el pH de la disolución. A pH 5,97, punto de inflexión entre las dos etapas de su curva de titulación, la glicina está presente de manera predominante en su forma dipolar, totalmente ionizada pero sin carga eléctrica *neta* (Fig. 3-10). El pH característico en que la carga eléctrica neta es cero se denomina **punto isoeléctrico** o **pH isoeléctrico,** designado **pI.** En el caso de la glicina, que no tiene grupo ionizable en su cadena lateral, el punto isoeléctrico es simplemente la media aritmética de los dos valores de pK_a:

$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2}(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$$

Como resulta evidente de la Figura 3-10, la glicina tiene una carga neta negativa a cualquier pH por encima de su pI, por lo que se desplazará hacia el electrodo positivo (ánodo) cuando se coloque en un campo eléctrico. A cualquier pH por debajo de su pI, la glicina tiene una carga neta positiva y se desplazará hacia el electrodo negativo (el cátodo). Cuanto más alejado esté el pH de una disolución de glicina de su punto isoeléctrico, mayor será la carga eléctrica neta de la población de moléculas de glicina. Por ejemplo, a pH 1,0 la glicina se encuentra casi enteramente en su forma $^+H_3N{-}CH_2{-}COOH$ con una carga positiva neta que equivale a 1,0. A pH 2,34, en el que existe una mezcla paritaria de $^+H_3N{-}CH_2{-}COOH$ y $^+H_3N{-}CH_2{-}COO^-$, la carga positiva neta o promedio es de 0,5. De la misma manera se puede predecir el signo y la magnitud de la carga neta de cualquier aminoácido a cualquier pH.

Los aminoácidos difieren en sus propiedades ácido-base

Las propiedades compartidas por muchos aminoácidos permiten algunas simplificaciones generales acerca de su comportamiento ácido-base. En primer lugar, todos los aminoácidos con un solo grupo α-amino, un solo grupo α-carboxilo y un grupo R no ionizable tienen curvas de titulación parecidas a la de la glicina (Fig. 3-10). Estos aminoácidos tienen valores de pK_a muy similares, aunque no idénticos: el pK_a del grupo —COOH en el intervalo de 1,8 a 2,4 y el pK_a del grupo $-NH_3^+$ en el intervalo de 8,8 a 11,0 (Tabla 3-1).

En segundo lugar, los aminoácidos con un grupo R ionizable tienen curvas de titulación más complejas, con *tres* etapas correspondientes a los tres pasos de ionización posibles; tienen por tanto tres valores de pK_a. La etapa adicional debida a la titulación del grupo R ionizable se fusiona en cierto grado con las otras dos. En la Figura 3-12 se muestran las curvas de titulación de dos aminoácidos de este tipo, el glutamato y la histidina. Los puntos isoeléctricos reflejan la naturaleza de los

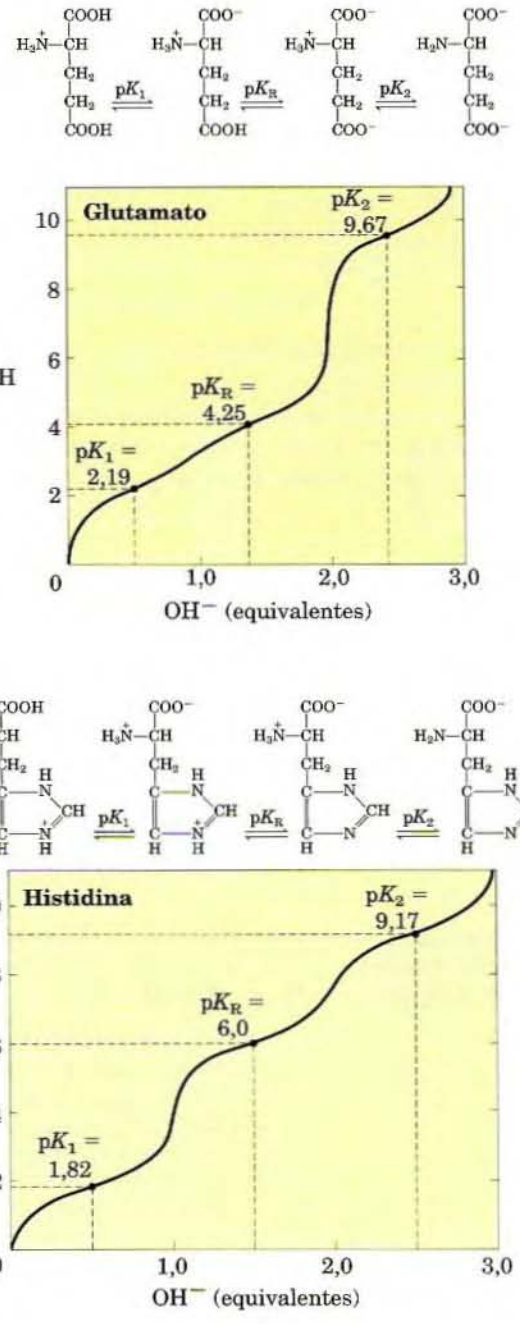


FIGURA 3-12 Curvas de titulación de **(a)** glutamato y **(b)** histidina. El pK_a del grupo R se designa como pK_R.

grupos R ionizables presentes. Por ejemplo, el glutamato tiene un pI de 3,22, considerablemente inferior al de la glicina. Esto es el resultado de la presencia de dos grupos carboxilo que, en el promedio de sus valores de pK_a (3,22), contribuyen con una carga negativa neta de −1 que equilibra la de +1 debida al grupo amino. De modo semejante, el pI de la histidina, con dos grupos cargados positivamente cuando están protonados, es de 7,59 (el promedio de los valores de pK_a de los grupos amino e imidazol), mucho mayor que el de la glicina.

Finalmente, y como se ha indicado anteriormente, en las condiciones generales de exposición libre y abierta al entorno acuoso, sólo la histidina tiene un grupo R (pK_a = 6,0) que proporciona poder tamponante significativo al pH cercano a la neutralidad presente normalmente en los fluidos intra- y extracelulares de la mayoría de animales y bacterias (Tabla 3-1).

RESUMEN 3.1 Aminoácidos

- Los 20 aminoácidos que se encuentran normalmente como residuos en las proteínas contienen un grupo α-carboxilo, un grupo α-amino y un grupo R característico unido al carbono α. El átomo de carbono α de todos los aminoácidos excepto la glicina es asimétrico, por lo que los aminoácidos pueden existir en al menos dos formas estereoisoméricas. En proteínas tan sólo se encuentran los estereoisómeros L, cuya configuración está relacionada con la de la molécula de referencia, L-gliceraldehído.
- También existen otros aminoácidos menos comunes, ya sea como constituyentes de las proteínas (mediante la modificación de los aminoácidos estándar después de la síntesis de proteínas) o como metabolitos libres.
- Los aminoácidos se clasifican en cinco tipos en virtud de la polaridad y carga de sus grupos R (a pH 7).
- Los aminoácidos se diferencian en sus propiedades ácido-base y tienen curvas de titulación características. Los aminoácidos monoamino-monocarboxílicos (con grupos R no ionizables) son ácidos dipróticos [$^+H_3NCH(R)COOH$] a pH bajo y existen en diversas formas diferentes al ir aumentando el pH. Los aminoácidos con grupos R ionizables poseen especies iónicas adicionales, dependiendo del pH del medio y del pK_a del grupo R.

3.2 Péptidos y proteínas

Ahora nos ocuparemos de los polímeros de los aminoácidos, los **péptidos** y las **proteínas.** Los péptidos que se encuentran en la naturaleza varían en tamaño desde pequeñas moléculas que contienen dos o tres aminoácidos hasta moléculas muy grandes que contienen miles de ellos. Aquí nos centraremos en las propiedades químicas fundamentales de estos polímeros.

Los péptidos son cadenas de aminoácidos

Dos moléculas de aminoácidos pueden unirse de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, denominado **enlace peptídico,** formando un dipéptido. Este enlace se forma por eliminación de los elementos del agua (deshidratación) del grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino de otro (Fig. 3-13). La formación del enlace peptídico es un ejemplo de una reacción de condensación, que es un tipo de reacción frecuente en las células vivas. En condiciones bioquímicas normales, el equilibrio de la reacción que se muestra en la Figura 3-13 favorece a los aminoácidos por encima del dipéptido. Para conseguir que la reacción sea termodinámicamente más favorable, es necesario modificar o activar químicamente el grupo carboxilo de modo que su grupo hidroxilo pueda ser eliminado más fácilmente. Al final de este capítulo se esquematiza una aproximación química a este problema. La aproximación biológica a la formación del enlace peptídico es un tema importante del Capítulo 27.

Se pueden unir tres aminoácidos mediante dos enlaces peptídicos para formar un tripéptido; de manera similar se pueden unir aminoácidos para dar tetrapéptidos, pentapéptidos y así sucesivamente. Cuando se unen unos pocos aminoácidos de este modo, la estructura resultante se denomina **oligopéptido.** Cuando se unen muchos aminoácidos el producto se denomina **polipéptido.** Las proteínas pueden tener miles de residuos aminoácidos. Aunque a veces los términos "polipéptido" y "proteína" son intercambiables, las moléculas denominadas polipéptidos tienen generalmente masas moleculares inferiores a 10.000 y las que se denominan proteínas tienen masas moleculares superiores.

La Figura 3-14 muestra la estructura de un pentapéptido. Como ya se ha indicado, las unidades de aminoácido de un péptido se denominan frecuentemente residuos (la parte que queda tras perder un átomo de hidrógeno de su grupo amino y una porción hidroxilo de su grupo carboxilo). El residuo ami-

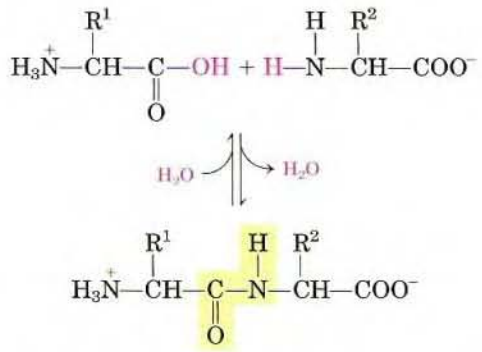


FIGURA 3-13 Formación de un enlace peptídico por condensación. El grupo α-amino de un aminoácido (con el grupo R^2) actúa como nucleófilo desplazando el grupo hidroxilo de otro aminoácido (con el grupo R^1) para formar un enlace peptídico (sombreado en amarillo). Los grupos amino son buenos nucleófilos, pero el grupo hidroxilo es un mal grupo saliente, por lo que no es desplazado fácilmente. A pH fisiológico, la reacción, tal como se muestra, no tiene lugar de forma apreciable.

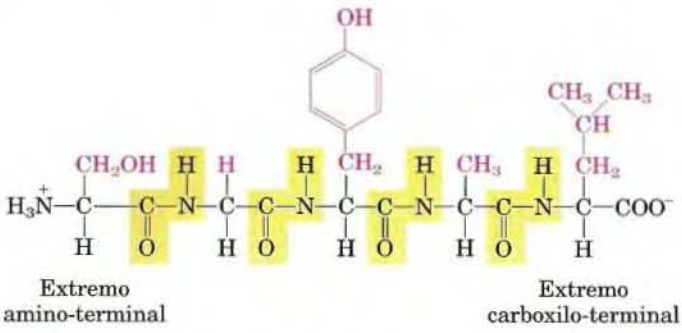


FIGURA 3-14 El pentapéptido serilgliciltirosinilalanil-leucina, o Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu. Los péptidos se nombran empezando por el residuo amino-terminal que, por convención, se sitúa a la izquierda. Los enlaces peptídicos están sombreados en amarillo y los grupos R en rojo.

noácido del extremo de un péptido que tiene un grupo α-amino libre es el residuo **amino-terminal** (o *N*-terminal); el residuo del otro extremo, que tiene un grupo carboxilo libre, es el residuo **carboxilo-terminal** (*C*-terminal).

Aunque la hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción exergónica, tiene lugar lentamente debido a su alta energía de activación. En consecuencia, los enlaces peptídicos de las proteínas son bastante estables, con una vida media ($t_{1/2}$) de alrededor de 7 años en la mayoría de condiciones intracelulares.

Los péptidos pueden distinguirse por su comportamiento de ionización

Los péptidos contienen un único grupo α-amino y un único grupo α-carboxilo libres, uno en cada extremo de la cadena (Fig. 3-15). Estos grupos se ionizan de la misma manera que lo hacen en los aminoácidos libres, aunque las constantes de ionización son diferentes debido a que el grupo con carga opuesta está ausente del carbono α. Los grupos α-amino y α-carboxilo de todos los aminoácidos no terminales están unidos covalentemente en forma de enlaces peptídicos, que no se ionizan y, por tanto, no contribuyen al comportamiento total ácido-base de los péptidos. No obstante, los grupos R de algunos aminoácidos pueden ionizarse (Tabla 3-1) y contribuyen en un péptido a las propiedades ácido-base globales de la molécula (Fig. 3-15). Por tanto, puede predecirse el comportamiento ácido-base de un péptido a partir de sus grupos α-amino y α-carboxilo libres y de la naturaleza y número de sus grupos R ionizables.

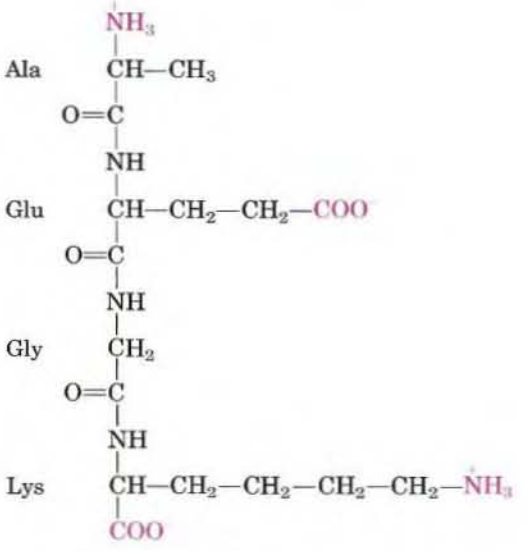
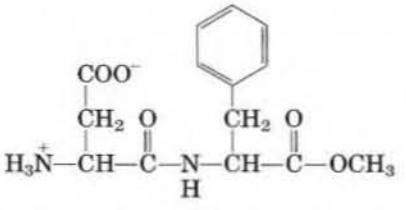


FIGURA 3-15 **Alanilglutamilglicil-lisina**. Este tetrapéptido tiene un grupo α-amino libre, un grupo α-carboxilo libre y dos grupos R ionizables. Los grupos ionizados a pH 7,0 se muestran en rojo.

Al igual que los aminoácidos libres, los péptidos tienen curvas de titulación características y pH isoeléctricos (pI) característicos a los que no sufren desplazamiento en un campo eléctrico. Estas propiedades se aprovechan en algunas de las técnicas utilizadas para separar péptidos y proteínas, como veremos posteriormente en este capítulo. Debe resaltarse que el valor del pK_a de un grupo R ionizable puede cambiar ligeramente cuando un aminoácido se convierte en un residuo de un péptido. La pérdida de carga en los grupos α-carboxilo y α-amino, las interacciones con otros grupos R del péptido y otras condiciones del entorno pueden afectar al pK_a. Los valores de pK_a para los grupos R que se muestran en la Tabla 3-1 pueden ser una guía útil para deducir el intervalo de pH en que se ionizará un grupo determinado, pero no pueden aplicarse a los péptidos de modo estricto.

Existen péptidos y polipéptidos biológicamente activos de una gran variedad de tamaños

No puede hacerse ninguna generalización acerca de las masas moleculares de los péptidos y proteínas biológicamente activos en relación con su función. La longitud de los péptidos naturales varía entre dos y muchos miles de residuos aminoácidos. Incluso los péptidos más pequeños pueden tener efectos biológicamente importantes. Considérese por ejemplo el dipéptido sintetizado comercialmente L-aspartil-L-fenilalanil metil éster, el edulcorante artificial más conocido como aspartamo o NutraSweet.



L-Aspartil-L-fenilalanil metil éster (aspartamo)

Muchos péptidos pequeños naturales producen sus efectos a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, diversas hormonas de vertebrados (Capítulo 23) son péptidos pequeños. Entre éstas se incluyen la oxitocina (nueve residuos aminoácidos), que es secretada por la hipófisis posterior y estimula las contracciones uterinas; la bradiquinina (nueve residuos), que inhibe la inflamación de los tejidos; y el factor liberador de la tirotropina (tres residuos), que se forma en el hipotálamo y estimula la liberación de la hipófisis anterior de otra hormona, la tirotropina. Algunos venenos de setas extremadamente tóxicos, tales como la amanitina, son también péptidos pequeños, lo mismo que muchos antibióticos.

Algo mayores son los polipéptidos pequeños y oligopéptidos tales como la hormona pancreática insulina, que contiene dos cadenas polipeptídicas, una de ellas con 30 residuos aminoácidos y la otra con 21. El glucagón, otra hormona pancreática que se opone a la acción de la insulina, tiene 29 residuos. La corticotropina es una hormona de 39 residuos de la hipófisis anterior y estimula la corteza adrenal.

¿Qué longitud tienen las cadenas polipeptídicas de las proteínas? Como muestra la Tabla 3-2, la longitud varía considerablemente. El citocromo *c* humano tiene 104 residuos aminoácidos unidos en una única cadena; el quimotripsinógeno bovino tiene 245 residuos. En el extremo se encuentra la titina, que tiene cerca de 27.000 residuos aminoácidos y una masa molecular de alrededor de 3.000.000. La inmensa mayoría de los polipéptidos naturales son mucho menores y contienen menos de 2000 residuos aminoácidos.

Algunas proteínas están constituidas por una sola cadena peptídica, pero otras, denominadas proteínas con **subunidades múltiples,** tienen dos o más polipéptidos asociados de forma no covalente (Tabla 3-2). Las cadenas polipeptídicas individuales de una proteína con diversas subunidades pueden ser idénticas o diferentes. Si como mínimo dos son idénticas, la proteína se denomina **oligomérica** y las subunidades idénticas (constituidas por una o más cadenas polipeptídicas) se denominan **protómeros.** La hemoglobina, por ejemplo, tiene cuatro subunidades polipeptídicas: dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas, unidas todas ellas entre sí por interacciones no covalentes. Cada subunidad α está unida de forma idéntica con una subunidad β dentro de la estructura de esta proteína con subunidades múltiples, de forma que la hemoglobina puede considerarse como un tetrámero de cuatro subunidades polipeptídicas o como un dímero de protómeros $\alpha\beta$.

Unas pocas proteínas contienen una o más cadenas polipeptídicas unidas covalentemente. Por ejemplo, las dos cadenas polipeptídicas de la insulina están unidas entre sí a través de puentes disulfuro. En estos casos, los polipéptidos individuales no se consideran subunidades, sino que se suelen denominar simplemente cadenas.

Se puede calcular el número aproximado de residuos aminoácidos de una proteína sencilla, que no contenga ningún otro grupo químico, dividiendo su masa molecular por 110. Aunque la masa molecular media de los 20 aminoácidos estándar es de alrededor de 138, en la mayoría de proteínas predominan los aminoácidos más pequeños; cuando se tienen en cuenta las proporciones en que se presentan los distintos aminoácidos en las proteínas (Tabla 3-1), la masa molecular media está próxima a 128. Dado que se elimina una molécula de agua (M_r 18) para crear cada enlace peptídico, la masa molecular media de un residuo aminoácido de una proteína es de alrededor de $128 - 18 = 110$.

Los polipéptidos tienen una composición de aminoácidos característica

La hidrólisis de péptidos o proteínas con ácido produce una mezcla de α-aminoácidos libres. Cuando se ha hidrolizado completamente, cada tipo de proteína da una proporción o mezcla característica de los diferentes aminoácidos. Los 20 aminoácidos estándar casi nunca se presentan en cantidades iguales en una proteína. Algunos aminoácidos pueden aparecer solamente una vez, o ninguna, por molécula en un tipo determinado de proteína; otros pueden presentarse en números elevados. La Tabla 3-3 muestra la composición de las mezclas de aminoácidos que se obtienen en la hidrólisis completa del citocromo *c* y del quimotripsinógeno bovinos, este último el precursor inactivo del enzima digestivo quimotripsina. Estas dos proteínas, con funciones muy diferentes, también difieren de manera significativa en el número relativo de cada clase de aminoácido que contienen.

Sin embargo, una hidrólisis completa no es suficiente para obtener un análisis exacto de la composición de aminoácidos, a causa de ciertas reacciones laterales que se dan durante el

TABLA 3-2 Datos moleculares de algunas proteínas

	Masa molecular	*Número de residuos*	*Número de cadenas polipeptídicas*
Citocromo c (humano)	13.000	104	1
Ribonucleasa A (páncreas bovino)	13.700	124	1
Lisozima (clara de huevo de pollo)	13.930	129	1
Mioglobina (corazón de caballo)	16.890	153	1
Quimotripsina (páncreas bovino)	21.600	241	3
Quimotripsinógeno (bovino)	22.000	245	1
Hemoglobina (humana)	64.500	574	4
Albúmina sérica (humana)	68.500	609	1
Hexoquinasa (levadura)	102.000	972	2
RNA polimerasa (*E. coli*)	450.000	4158	5
Apolipoproteína B (humana)	513.000	4536	1
Glutamina sintetasa (*E. coli*)	619.000	5628	12
Titina (humana)	2.993.000	26.926	1

TABLA 3-3 Composición de aminoácidos de dos proteínas

	*Número de residuos por molécula de proteína**	
Aminoácido	*Citocromo c bovino*	*Quimotripsinógeno bovino*
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

*En algún tipo de análisis, como sucede en la hidrólisis ácida, Asp y Asn no se distinguen y se designan Asx (o B). De manera similar no es posible distinguir Glu y Gln, que se designan Glx (o Z). Además, el Trp es destruido. Deben emplearse procedimientos adicionales para determinar correctamente el contenido total en aminoácidos.

proceso. Por ejemplo, los enlaces amida de las cadenas laterales de la asparagina y la glutamina se rompen por tratamiento ácido, dando respectivamente aspartato y glutamato. La cadena lateral del triptófano es degradada casi completamente por la hidrólisis ácida y también se pierden pequeñas cantidades de serina, treonina y tirosina. Los bioquímicos utilizan procedimientos adicionales para resolver las ambigüedades resultantes de la hidrólisis ácida cuando es necesario conocer la composición de aminoácidos de una forma precisa.

Algunas proteínas contienen grupos químicos diferentes a los aminoácidos

Muchas proteínas, tales como los enzimas ribonucleasa A y quimotripsinógeno, contienen sólo residuos aminoácidos y ningún otro grupo químico adicional; a este tipo de proteínas se las considera proteínas simples. Sin embargo, algunas proteínas contienen componentes químicos diferentes a los aminoácidos asociados permanentemente; estas proteínas se denominan **proteínas conjugadas.** La parte no aminoácida de una proteína conjugada se denomina habitualmente **grupo prostético.** Las proteínas conjugadas se clasifican según la naturaleza química de su grupo prostético (Tabla 3-4); por ejemplo, las **lipoproteínas** contienen lípidos, las **glucoproteínas** contienen grupos glucídicos y las **metaloproteínas** contienen un metal específico. Algunas proteínas contienen más de un grupo prostético. Normalmente el grupo prostético juega un papel importante en la función biológica de la proteína.

TABLA 3-4 Proteínas conjugadas

Clase	*Grupo prostético*	*Ejemplo*
Lipoproteínas	Lípidos	Lipoproteína β_1 de la sangre
Glucoproteínas	Glúcidos	Inmunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína de la leche
Hemoproteínas	Hemo (ferroporfirina)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleótidos de flavina	Succinato deshidrogenasa
Metaloproteínas	Hierro	Ferritina
	Zinc	Alcohol deshidrogenasa
	Calcio	Calmodulina
	Molibdeno	Dinitrogenasa
	Cobre	Plastocianina

Existen varios niveles de estructura de las proteínas

Para macromoléculas grandes tales como las proteínas, la tarea de describir y comprender la estructura se aborda a varios niveles de complejidad, ordenados en una especie de jerarquía conceptual. Se definen normalmente cuatro niveles de estructura de las proteínas (Fig. 3-16). La **estructura primaria** es una descripción de todos los enlaces covalentes (principalmente enlaces peptídicos y puentes disulfuro) que unen los residuos aminoácidos de una cadena polipeptídica. El elemento más importante de la estructura primaria es la *secuencia* de los residuos aminoácidos. La **estructura secundaria** se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales repetitivos. La **estructura terciaria** describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina **estructura cuaternaria.** En la Sección 3.4 se describe la estructura primaria; los niveles superiores de estructura se tratan en el Capítulo 4.

RESUMEN 3.2 Péptidos y proteínas

- Los aminoácidos pueden unirse covalentemente mediante enlaces peptídicos para formar péptidos y proteínas. Las células contienen generalmente miles de proteínas diferentes, cada una de ellas con una actividad biológica distinta.

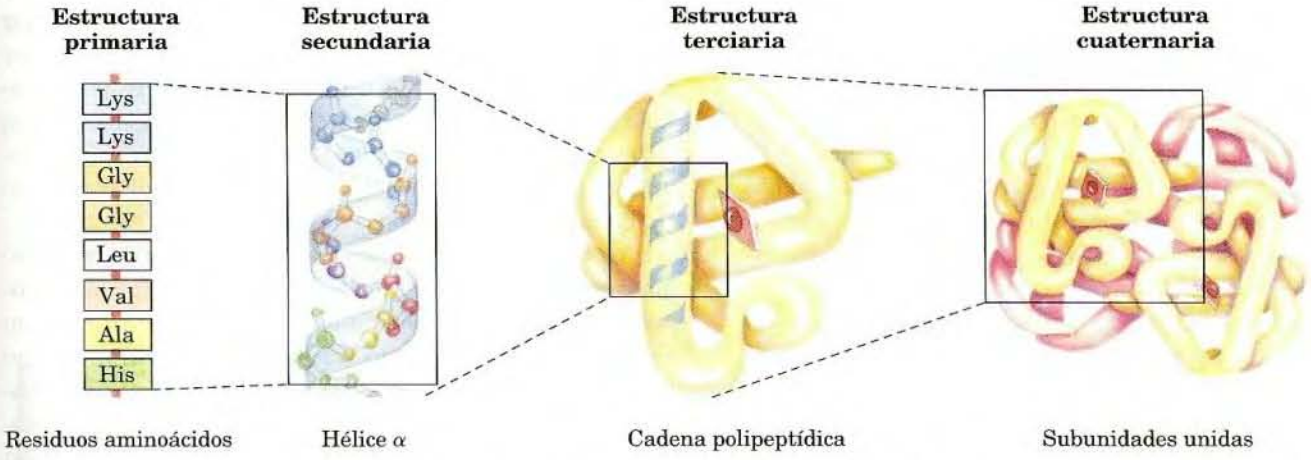


FIGURA 3-16 Niveles de estructura de las proteínas. La *estructura primaria* consiste en una secuencia de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos e incluye los puentes disulfuro que existan. El polipéptido resultante puede estar enrollado en unidades de *estructura secundaria*, tales como una hélice α. La hélice es una parte de la *estructura terciaria* del polipéptido plegado, el cual es en sí mismo una de las subunidades que constituyen la *estructura cuaternaria* de una proteína multisubunidad, en este caso la hemoglobina.

- Las proteínas pueden ser cadenas polipeptídicas muy largas de 100 a varios miles de residuos aminoácidos. Sin embargo, algunos péptidos naturales tienen sólo unos pocos aminoácidos. Algunas proteínas están compuestas por varias cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente que reciben el nombre de subunidades. Las proteínas simples generan tan sólo aminoácidos después de la hidrólisis; las proteínas conjugadas contienen algún otro componente adicional, como por ejemplo un grupo prostético metálico u orgánico.
- La secuencia de aminoácidos de una proteína es una característica propia de esa proteína que se denomina estructura primaria. Éste es uno de los cuatro niveles con que generalmente se describe la estructura de las proteínas.

3.3 Trabajar con proteínas

Nuestro conocimiento de la estructura y función de las proteínas proviene del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína con cierto detalle es necesario separarla del resto de proteínas y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades. Los métodos necesarios provienen de la química de proteínas, disciplina tan antigua como la bioquímica que mantiene una posición central en la investigación bioquímica.

Las proteínas se pueden separar y purificar

Una preparación pura de una proteína es esencial para poder determinar sus propiedades y su actividad. Puesto que las células contienen miles de tipos diferentes de proteínas, ¿cómo puede purificarse una proteína? Los métodos de separación de proteínas aprovechan propiedades que varían de una proteína a otra, entre las que se incluyen el tamaño, la carga y las propiedades de unión.

La fuente de una proteína son generalmente las células de un tejido o células microbianas. El primer paso en cualquier purificación de proteínas es la rotura de estas células, para liberar sus proteínas en una solución denominada **extracto crudo.** En caso necesario puede utilizarse la centrifugación diferencial para preparar fracciones subcelulares o aislar determinados orgánulos (véase Fig. 1-8).

Una vez está a punto el extracto o la preparación de orgánulo, se dispone de diversos métodos para purificar una o más de las proteínas que contienen. Normalmente, el extracto se somete a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones en virtud de alguna propiedad tal como el tamaño o la carga, un proceso que se denomina **fraccionamiento.** Los pasos iniciales de fraccionamiento de una purificación utilizan diferencias en la solubilidad de las proteínas, que es una función compleja del pH, temperatura, concentración de sal y otros factores. La solubilidad de las proteínas disminuye generalmente a concentraciones elevadas de sal, un efecto denominado "*salting out*" (salado). La adición de algunas sales en cantidades apropiadas puede precipitar selectivamente algunas proteínas, permaneciendo las restantes en solución. El sulfato amónico [$(NH_4)_2SO_4$] es particularmente efectivo y se utiliza a menudo para "salar" proteínas.

La solución que contiene la proteína de interés debe a menudo sufrir otros cambios antes de que sean posibles pasos de purificación posteriores. La **diálisis,** por ejemplo, es un procedimiento que separa las proteínas de los disolventes aprovechando el mayor tamaño de las proteínas. El extracto parcialmente purificado se coloca en un saco o tubo de membrana semipermeable. Cuando éste se suspende en un volumen mayor de solución tamponada de fuerza iónica apropiada, la membrana permite el intercambio de sal y tampón, pero no de proteínas. De esta forma, la diálisis retiene las proteínas grandes dentro del saco o tubo de membrana, mientras que permite que la concentración de los demás solutos en la preparación de proteína cambie hasta llegar al equilibrio con la solución del exterior de la membrana. La diálisis puede utili-

zarse, por ejemplo, para eliminar el sulfato amónico de una preparación de proteína.

Los métodos más potentes para el fraccionamiento de proteínas utilizan la **cromatografía en columna,** que aprovecha las diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión y otras propiedades de las proteínas (Fig. 3-17). Se introduce en una columna un material sólido poroso de propiedades químicas adecuadas (la fase estacionaria) y se hace pasar a través del mismo una solución tamponada (la fase móvil). La solución que contiene las proteínas se introduce en la cabeza de la columna y a continuación se filtra a través de la matriz sólida, en forma de una banda que va expandiéndose continuamente dentro de la fase móvil (Fig. 3-17). Las proteínas individuales migran más rápido o más lentamente a través de la columna en función de sus propiedades. Por ejemplo, en la **cromatografía de intercambio catiónico** (Fig. 3-18a), la matriz sólida tiene grupos cargados negativamente. En la fase móvil, las proteínas con carga positiva neta migran más lentamente a través de la matriz que aquéllas con carga negativa neta, puesto que la migración de las primeras se ve más retardada por la interacción con la fase estacionaria. Los dos tipos de proteínas pueden separarse en dos bandas definidas. La expansión de la banda de proteínas en la fase móvil (la solución de proteínas) se debe tanto a la separación de las proteínas de diferentes propiedades como a la difusión. La resolución entre dos tipos de proteínas con diferente carga neta suele mejorar a medida que se aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, la velocidad a la que la solución de proteínas puede pasar a través de la columna suele disminuir con la longitud de la misma. A medida que aumenta el tiempo de residencia en la columna, la resolución puede disminuir debido a la difusión dentro de cada una de las bandas de proteína.

La Figura 3-18 muestra otras dos variantes de cromatografía en columna además de la de intercambio iónico. La **cromatografía de exclusión molecular** separa proteínas según su tamaño. En este método, las proteínas de mayor tamaño emergen de la columna antes que las pequeñas –una observación que contradice la intuición en cierto modo–. La fase sólida consiste en pequeñas perlas, partículas que contienen unos poros o cavidades de tamaño calibrado. Las proteínas de mayor tamaño no pueden entrar en las cavidades, por lo que toman el camino más corto (y más rápido) a través de la columna, rodeando las partículas por el exterior. Las proteínas más pequeñas penetran en las cavidades y, por tanto, migran más lentamente a través de la columna (Fig. 3-18b). La **cromatografía de afinidad** se basa en la afinidad de unión de las proteínas. Las partículas de la columna tienen en este caso un grupo químico unido covalentemente. Una proteína afín a este grupo químico particular se unirá a las partículas de la columna, lo que retardará su migración (Fig. 3-18c).

Un refinamiento moderno de los métodos cromatográficos es la **HPLC,** o **cromatografía líquida de alta resolución.** La HPLC utiliza bombas de alta presión que aceleran el movimiento de las moléculas de proteína en la columna, así como materiales cromatográficos de calidad superior que pueden soportar la fuerza de compresión del flujo presurizado. Al reducir el tiempo de tránsito en la columna, la HPLC puede limitar

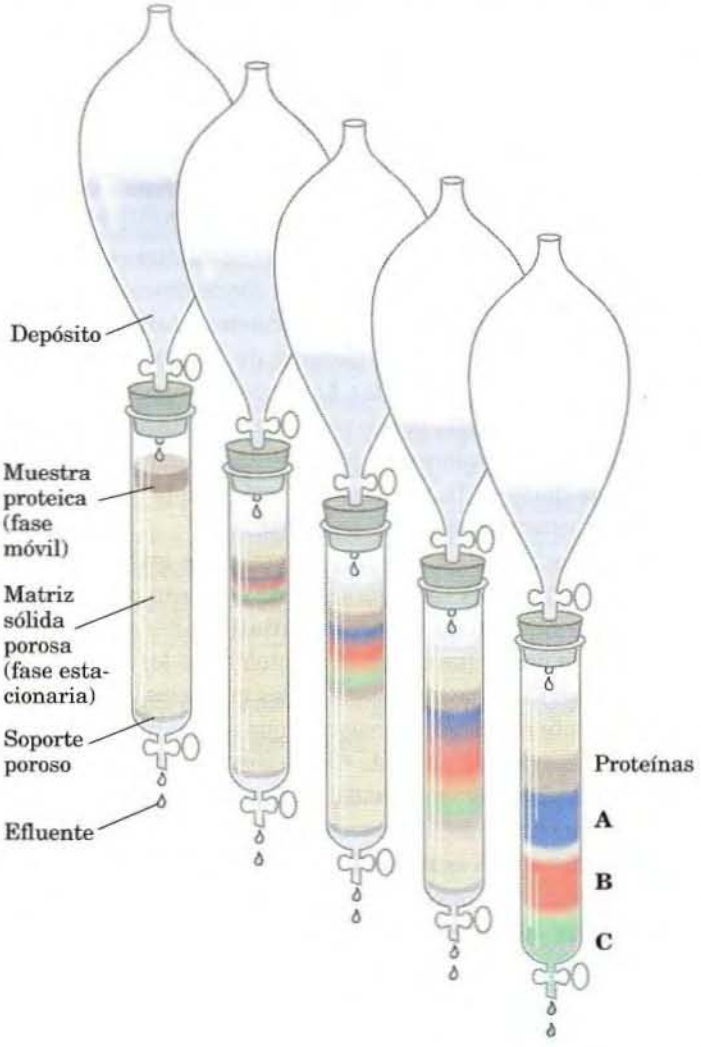
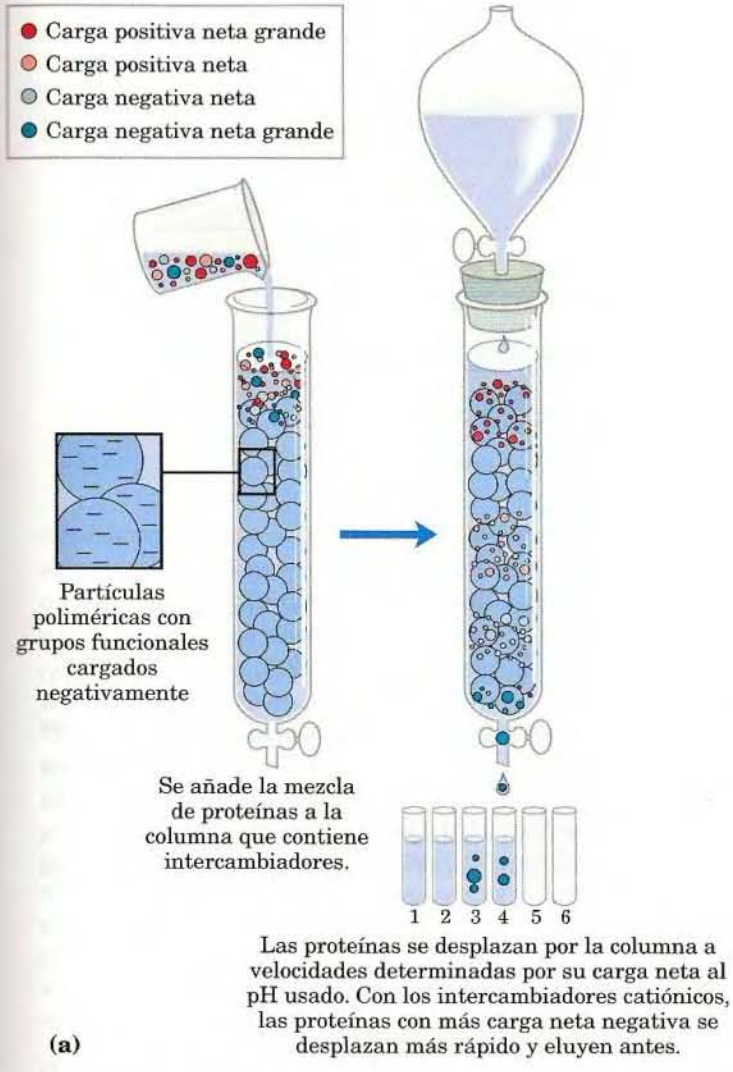
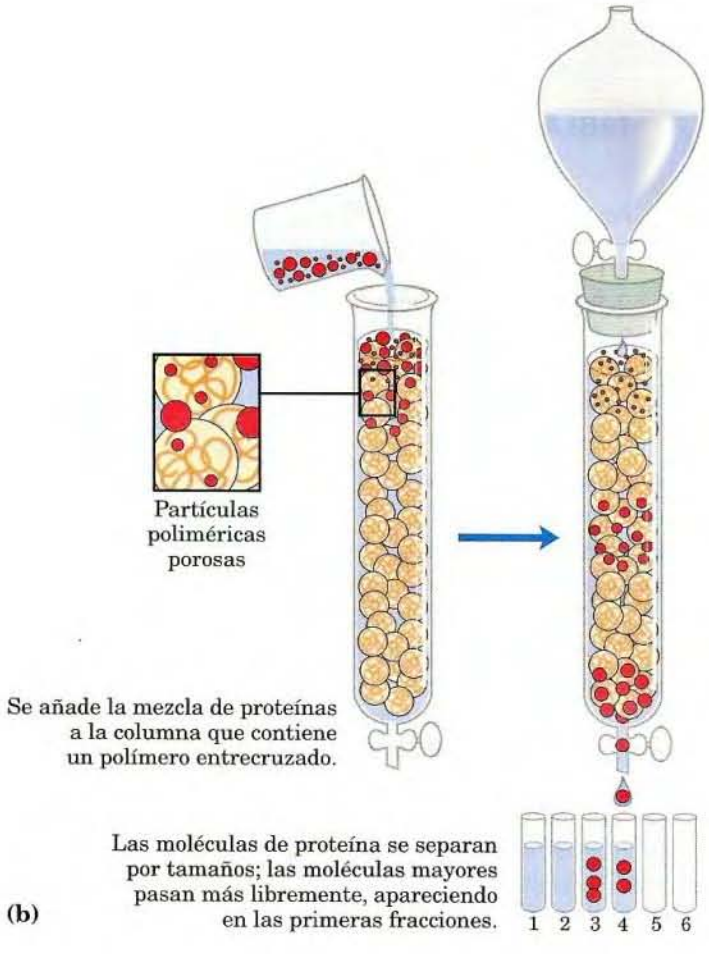


FIGURA 3-17 Cromatografía en columna. Elementos estándar de una columna cromatográfica. Un material sólido poroso se deposita en el interior de una columna hecha generalmente de plástico o vidrio. El material sólido (matriz) constituye la fase estacionaria, a través de la cual fluye una solución, la fase móvil. La solución que sale de la columna por la parte inferior (el efluente) es reemplazada constantemente por solución suministrada por un depósito en la parte superior. La solución de proteína que debe separarse se deposita sobre la cabeza de la columna y se deja percolar hacia el interior de la matriz sólida. Se añade más solución sobre ella. La solución de proteína forma una banda dentro de la fase móvil que tiene inicialmente la anchura de la solución de proteína aplicada a la columna. A medida que las proteínas se desplazan a través de la columna, se retardan en diferentes grados según sus diferentes interacciones con el material de la matriz. La banda de proteína se ensancha así a medida que se desplaza a través de la columna. Los tipos individuales de proteínas (tales como A, B, C, mostradas en azul, rojo y verde) se separan gradualmente entre sí, formando bandas dentro de la banda más ancha de proteínas. La separación mejora (aumenta la resolución) a medida que aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, cada banda de proteína individual también se ensancha con el tiempo debido a la difusión, un proceso que disminuye la resolución. En este ejemplo, la proteína A está bien separada de B y C, pero el ensanchamiento por difusión impide la separación completa de B y C en estas condiciones.





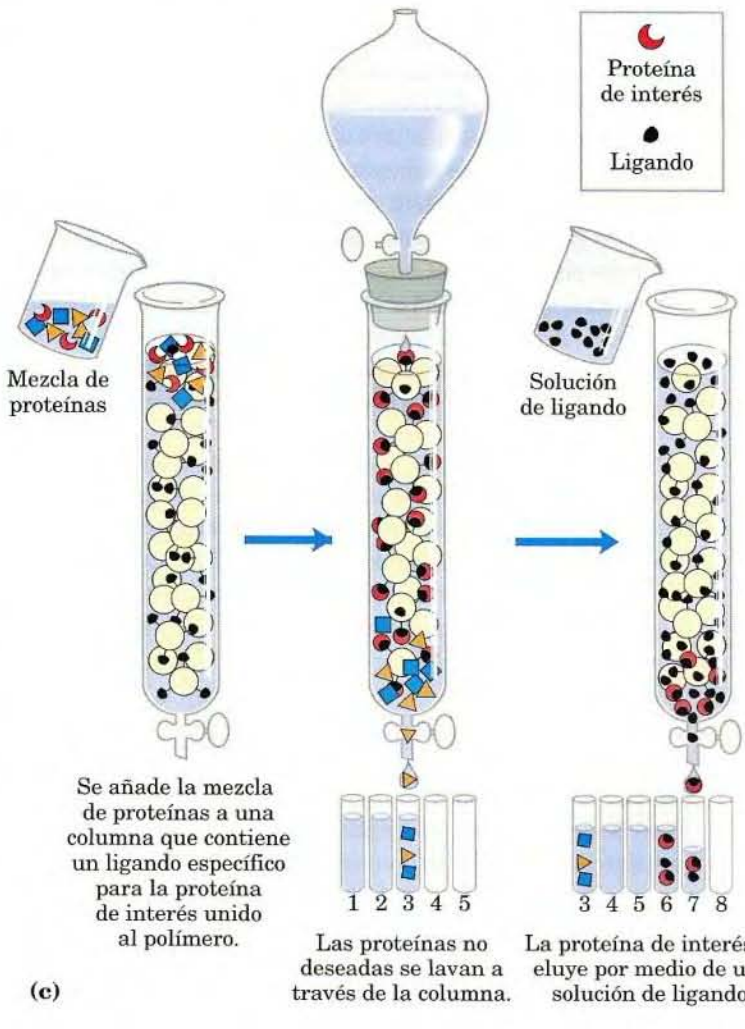


FIGURA 3-18 Tres métodos cromatográficos para la purificación de proteínas. **(a)** La **cromatografía de intercambio iónico** aprovecha las diferencias en el signo y la magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado. La matriz de la columna es un polímero sintético que tiene unidos grupos cargados; los que tienen unidos grupos aniónicos son **intercambiadores catiónicos** y los que tienen unidos grupos catiónicos, **intercambiadores aniónicos.** Se muestra aquí una cromatografía de intercambio iónico sobre un intercambiador catiónico. La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la columna está afectada por el pH y la concentración de iones salinos libres en competencia en la solución que les rodea. La separación puede optimizarse cambiando gradualmente el pH y/o la concentración de sal de la fase móvil de forma que se cree un gradiente de pH o sal. **(b)** La **cromatografía de exclusión por tamaño** separa las proteínas según su tamaño. La matriz de la columna es un polímero entrecruzado con poros de un tamaño seleccionado. Las proteínas mayores se desplazan más rápidamente que las menores, ya que son muy grandes para penetrar en los poros de las partículas y siguen una ruta más directa. Las más pequeñas penetran en los poros y son retardadas por la ruta más laberíntica que describen a través de la columna. **(c)** La **cromatografía de afinidad** separa las proteínas según su especificidad de unión. Las proteínas retenidas en la columna son las que se unen específicamente a un ligando unido covalentemente a las partículas. (En bioquímica, "ligando" se refiere a una molécula o grupo que se une a una macromolécula tal como una proteína.) Una vez se han lavado las proteínas que no se unen a través de la columna, la proteína unida de interés se eluye por medio de una solución que contiene ligando libre.

TABLA 3-5 Tabla de purificación para un enzima hipotético

Procedimiento o paso	*Volumen de la fracción (ml)*	*Proteína total (mg)*	*Actividad (unidades)*	*Actividad específica (unidades/mg)*
1. Extracto celular crudo	1400	10.000	100.000	10
2. Precipitación con sulfato amónico	280	3000	96.000	32
3. Cromatografía de intercambio iónico	90	400	80.000	200
4. Cromatografía de exclusión por tamaño	80	100	60.000	600
5. Cromatografía de afinidad	6	3	45.000	15.000

Nota: todos los datos representan el estado de la muestra después de haber efectuado el procedimiento indicado. La actividad y la actividad específica se definen en la página 94.

la expansión de las bandas de proteína por difusión y por tanto mejorar notablemente la resolución.

La estrategia de purificación de una proteína que no ha sido previamente aislada se guía tanto por los precedentes establecidos como por el sentido común. En la mayoría de casos deben utilizarse varios métodos diferentes de modo secuencial para purificar completamente una proteína. La elección de método es en cierto modo empírica y puede ser necesario probar muchos protocolos antes de encontrar el más efectivo. El proceso de ensayo y error puede a menudo reducirse al mínimo basando el procedimiento en técnicas de purificación desarrolladas para proteínas similares. Se pueden encontrar publicados protocolos de purificación para muchos millares de proteínas. El sentido común indica que se han de utilizar procedimientos baratos, tales como el *salting out*, al principio, cuando el volumen total y el número de contaminantes es máximo. A menudo los métodos cromatográficos no son prácticos en las primeras fases debido a que la cantidad de medio cromatográfico necesario aumenta con el tamaño de la muestra. A medida que se completa cada paso de purificación, el tamaño de la muestra es generalmente menor (Tabla 3-5), lo que hace posible utilizar procedimientos cromatográficos más sofisticados (y caros) en las etapas posteriores.

Las proteínas pueden separarse y caracterizarse por electroforesis

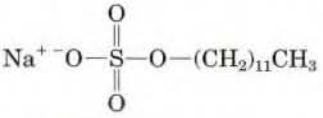
Otra técnica importante para la separación de proteínas se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, proceso denominado **electroforesis.** Estos procedimientos no son utilizados generalmente para purificar proteínas en grandes cantidades, dado que existen normalmente métodos alternativos más sencillos y los métodos electroforéticos frecuentemente afectan a la estructura y por tanto a la función de las proteínas. No obstante, la electroforesis es muy útil como método analítico. Su ventaja es que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite al investigador hacer una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla o del grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada.

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida (Fig. 3-19). El gel de poliacrilamida retrasa el desplazamiento de la proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su cociente carga/masa. El desplazamiento también puede estar afectado por la forma de la proteína. En la electroforesis, la fuerza que mueve la macromolécula es el potencial eléctrico, E. La movilidad electroforética de la molécula, μ, es el cociente entre la velocidad de la partícula, V, y el potencial eléctrico. La movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula, Z, dividida por el coeficiente friccional, f, que refleja en parte la forma de la proteína. Así

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

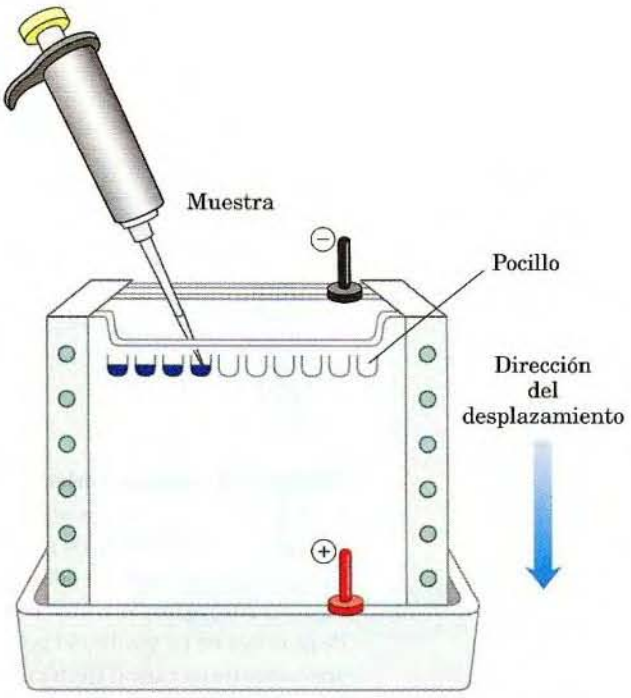
El desplazamiento de una proteína en un gel durante una electroforesis es por tanto función de su tamaño y de su forma.

Un método electroforético frecuentemente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular emplea el detergente **dodecil sulfato sódico (SDS).**



Dodecil sulfato sódico (SDS)

El SDS se une a la mayoría de proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos aminoácidos. El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa similar. Además, la conformación nativa de la proteína se altera cuando se fija el SDS y la mayoría de las proteínas adoptan una forma similar. La electroforesis en presencia de SDS separa, por tanto, las proteínas casi exclusivamente en función de la masa molecular, de forma que los polipéptidos pequeños se desplazan más rápidamente. Después de la electroforesis las proteínas se visualizan añadiendo un colorante tal como el azul de Coomassie, que se fija a las proteínas pero no al gel (Fig. 3-19b). De esta forma puede seguirse el progreso de un procedimiento de purificación de una proteína, ya que el número de bandas proteicas visibles en el gel debe disminuir tras cada nuevo



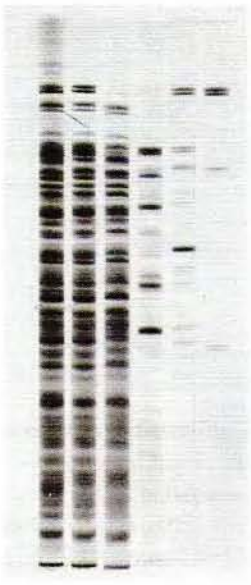


FIGURA 3-19 Electroforesis. **(a)** Se cargan diferentes muestras en los pocillos o depresiones en la parte superior de un gel de poliacrilamida. Las proteínas se trasladan a través del gel cuando se aplica un campo eléctrico. El gel mantiene al mínimo las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura y también minimiza los movimientos de proteínas que no sean los producidos por el campo eléctrico. **(b)** Después de la electroforesis se pueden visualizar las proteínas tratando el gel con un colorante tal como el azul de Coomassie, que se fija a las proteínas pero no al gel. Cada banda del gel representa una proteína diferente (o subunidad proteica); las proteínas más pequeñas se desplazan más rápidamente y, por tanto, se encuentran cerca del extremo inferior del gel. Este gel ilustra la purificación del enzima RNA polimerasa de la bacteria *E. coli*. El primer carril muestra las proteínas presentes en el extracto celular crudo. Los carriles siguientes (de izquierda a derecha) muestran las proteínas presentes después de cada paso de purificación. La proteína purificada contiene cuatro subunidades, tal como se ve en el último carril de la derecha.

paso de purificación. Cuando se compara con las posiciones a las que se desplazan en el gel proteínas de masa molecular conocida, la posición de una proteína desconocida puede proporcionar una medida excelente de su masa molecular (Fig. 3-20). Si la proteína tiene dos o más subunidades diferentes, las subunidades se separarán generalmente a consecuencia del tratamiento con SDS y aparecerá una banda individual para cada una. Electroforesis en gel con SDS

El **enfoque isoeléctrico** es un procedimiento utilizado para determinar el punto isoeléctrico (pI) de una proteína

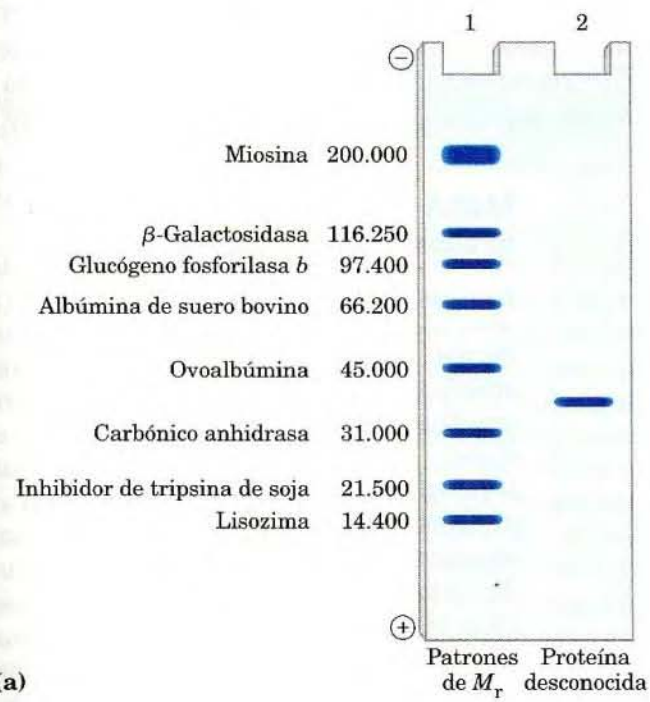


FIGURA 3-20 Estimación de la masa molecular de una proteína. La movilidad electroforética de una proteína en un gel de poliacrilamida con SDS es proporcional a su masa molecular, M_r. **(a)** Proteínas patrón de masa molecular conocida se someten a electroforesis (carril 1). Estas proteínas marcadoras sirven para estimar la masa molecular de una proteína desconocida (carril 2). **(b)** Una gráfica del log M_r de las proteínas marcadoras frente al desplazamiento relativo durante la electroforesis es lineal, lo que permite leer la masa molecular de la proteína desconocida a partir de ella.

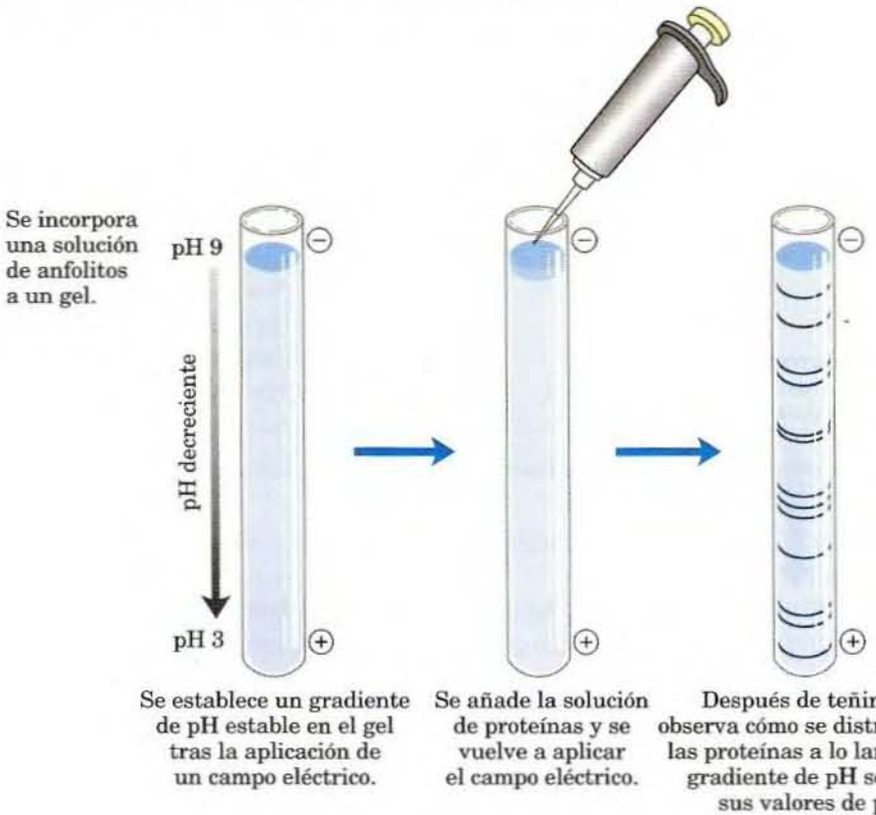


FIGURA 3-21 Enfoque isoeléctrico. Esta técnica separa las proteínas según sus puntos isoeléctricos. Se establece un gradiente estable de pH en el gel por adición de anfolitos adecuados. Se coloca una mezcla de proteínas en un pocillo del gel. Con la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas entran en el gel y se desplazan hasta alcanzar un pH equivalente a su pI. Recuérdese que la carga neta de una proteína es cero cuando pH = pI.

(Fig. 3-21). Se establece un gradiente de pH dejando que una mezcla de ácidos y bases orgánicos de baja masa molecular (anfolitos; p. 81) se distribuya espontáneamente en un campo eléctrico generado a través del gel. Cuando se aplica una mezcla de proteínas, cada una de ellas se desplaza hasta que alcanza el pH que iguala su pI (Tabla 3-6). De este modo las proteínas con puntos isoeléctricos distintos se distribuyen de manera diferente a lo largo del gel.

La combinación secuencial del enfoque isoeléctrico y la electroforesis en gel con SDS en un proceso denominado **electroforesis bidimensional** permite la resolución de mezclas complejas de proteínas (Fig. 3-22). Éste es un método analítico más sensible que cualquier método electroforético individual. La electroforesis bidimensional separa proteínas de masa molecular idéntica que difieren en el pI o proteínas con valores de pI similares pero con diferentes masas moleculares.

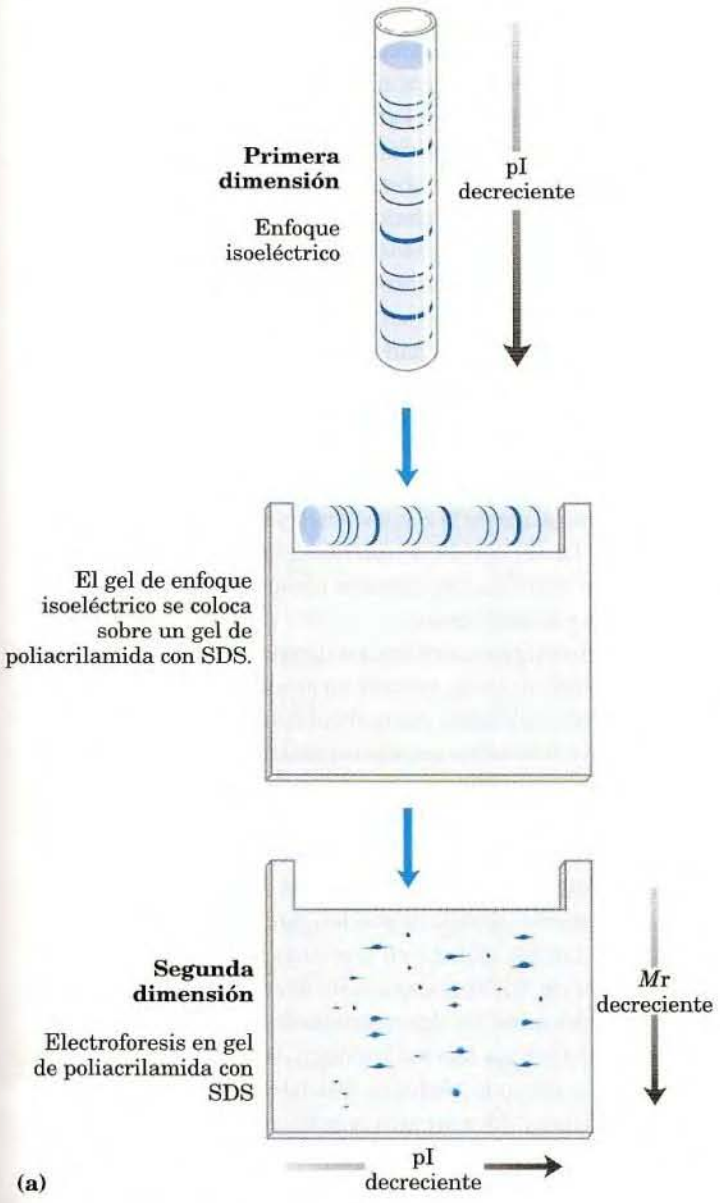
Es posible cuantificar las proteínas no aisladas

A fin de purificar una proteína es esencial disponer de un método para detectar y cuantificar dicha proteína en presencia de muchas proteínas más en cada etapa del proceso. A menudo, la purificación debe realizarse en ausencia de toda información sobre el tamaño y las propiedades físicas de la proteína, o sobre la fracción que representa sobre la masa total de proteína en el extracto. En el caso de proteínas enzimáticas, se puede determinar la cantidad de enzima en una solución o extracto de tejido determinados en función del efecto catalítico que produce el enzima, es decir, el *incremento* de la velocidad a la cual su sustrato se convierte en productos de la reacción cuando está presente el enzima. Con este fin hay que conocer (1) la ecuación global de la reacción catalizada, (2) un procedimiento analítico para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de un producto de la reacción, (3) si el enzima requiere cofactores tales como iones metálicos o coenzimas, (4) la dependencia de la actividad enzimática, respecto de la concentración de sustrato, (5) el pH óptimo y (6) una zona de temperatura en la que el enzima sea estable y tenga una actividad elevada. Los enzimas se ensayan normalmente a su pH óptimo y a una temperatura conveniente dentro del intervalo de 25 a 38 °C. También se requieren generalmente elevadas concentraciones de sustrato de modo que la velocidad inicial de reacción, que se mide experimentalmente, sea proporcional a la concentración de enzima (Capítulo 6).

Por acuerdo internacional, se define 1,0 unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1,0 μmol de sustrato por minuto a 25 °C en condiciones óptimas de medida. El término **actividad** se refiere a las unidades totales de enzima en una solución. La **actividad específica** es el número de unidades enzimáticas por

TABLA 3-6 Punto isoeléctrico de algunas proteínas

Proteína	*pI*
Pepsina	<1,0
Albúmina de huevo	4,6
Albúmina sérica	4,9
Ureasa	5,0
β-Lactoglobulina	5,2
Hemoglobina	6,8
Mioglobina	7,0
Quimotripsinógeno	9,5
Citocromo *c*	10,7
Lisozima	11,0



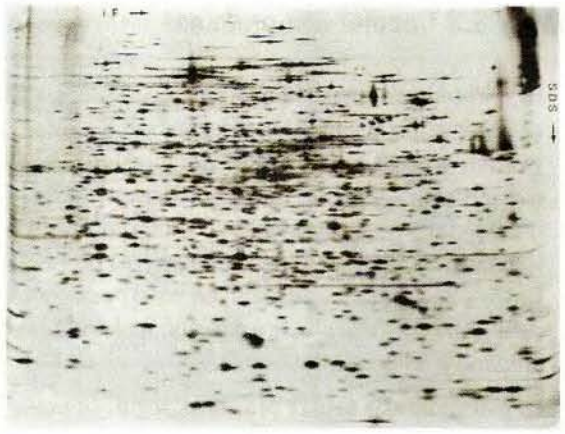


FIGURA 3-22 Electroforesis bidimensional. (a) Las proteínas se separan primero mediante enfoque isoeléctrico en un gel cilíndrico. A continuación se extiende el gel horizontalmente sobre un segundo gel, en forma de plancha, y las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La separación horizontal refleja las diferencias de pI; la vertical refleja las diferencias en masa molecular. **(b)** Utilizando esta técnica se pueden separar más de 1000 proteínas diferentes de *E. coli*.

miligramo de proteína (Fig. 3-23). La actividad específica constituye una medida de la pureza enzimática: aumenta durante la purificación de un enzima y llega a ser máxima y constante cuando el enzima es puro (Tabla 3-5).

Después de cada paso de purificación, se determina la actividad de la preparación (en unidades de especifidad enzimática), se determina independientemente la cantidad total de proteína y su cociente da la actividad específica. La actividad y la proteína total generalmente disminuyen en cada paso. La actividad disminuye porque siempre se produce alguna pérdida debido a inactivación o a interacciones no óptimas con los materiales cromatográficos o con otras moléculas de la solución. La proteína total disminuye porque el objetivo es eliminar tanta proteína no deseada o no específica como sea posible. En un paso de purificación exitoso, la pérdida de proteína no específica es mucho mayor que la pérdida de actividad; por tanto, aun cuando la actividad total disminuye, la actividad específica aumenta. Los datos se recogen finalmente en una tabla de purificación similar a la Tabla 3-5. Generalmente se considera que una proteína es pura cuando pasos adicionales de purificación no consiguen aumentar su actividad específica y cuando sólo se puede detectar una especie proteica (mediante electroforesis, por ejemplo).

En el caso de proteínas que no sean enzimas, se requieren otros métodos de cuantificación. Las proteínas de transporte pueden determinarse por su unión a la molécula que transportan, y las hormonas y las toxinas por los efectos biológicos que producen; por ejemplo, las hormonas de crecimiento estimulan el crecimiento de ciertas células cultivadas. Algunas proteínas estructurales representan una fracción tan grande de la masa tisular que pueden extraerse y purificarse fácilmente sin necesidad de un ensayo funcional. Los métodos son tan variados como las propias proteínas.

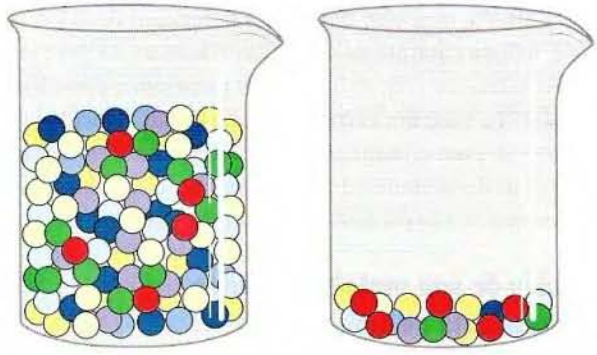


FIGURA 3-23 Actividad frente a actividad específica. Se puede ilustrar la diferencia entre estos dos términos considerando dos recipientes con canicas. Ambos contienen el mismo número de canicas rojas, pero cantidades diferentes de canicas de otros colores. Si se considera que las canicas representan proteínas, ambos recipientes contienen la misma *actividad* de la proteína representada por las canicas rojas. No obstante, el segundo recipiente tiene una *actividad específica* mayor debido a que las canicas rojas son una fracción mucho mayor del total.

RESUMEN 3.3 Trabajar con proteínas

- Las proteínas se separan y purifican en función de diferencias en sus propiedades. Las proteínas se pueden precipitar selectivamente mediante la adición de ciertas sales. Existe una amplia gama de métodos cromatográficos que explotan las diferencias de tamaño, afinidad de unión, carga y otras propiedades. Entre estos métodos se incluyen las cromatografías de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad y líquida de alta resolución.
- La electroforesis separa proteínas según su masa y su carga. La electroforesis en gel con SDS y el enfoque isoeléctrico se pueden utilizar por separado o combinados para obtener una mejor resolución.
- Todos los procedimientos de purificación requieren un método para cuantificar o distinguir la proteína de interés en presencia de otras proteínas. La purificación puede seguirse mediante la determinación de la actividad específica.

3.4 Estructura covalente de las proteínas

La purificación de una proteína es generalmente tan sólo el preludio de una disección detallada de su estructura y función. ¿Qué es lo que hace que una proteína sea un enzima, otra una hormona, otra una proteína estructural y otra un anticuerpo? ¿Cómo se diferencian químicamente? Las diferencias más obvias son estructurales y pueden abordarse en cada nivel estructural definido en la Figura 3-16.

Las diferencias en la estructura primaria pueden ser especialmente informativas. Cada proteína tiene un número y secuencia distintivos de residuos aminoácidos. Como veremos en el Capítulo 4, la estructura primaria de una proteína determina la forma en que se pliega en una estructura tridimensional única y ésta, a su vez, determina la función de la proteína. El resto de este capítulo se centrará en la estructura primaria. Consideraremos en primer lugar las indicaciones empíricas sobre la estrecha relación entre secuencia de aminoácidos y función proteica, para continuar describiendo cómo se determina la secuencia de aminoácidos; finalmente, describiremos los usos a los que se puede destinar esta información.

La función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos

La bacteria *Escherichia coli* produce más de 3000 proteínas diferentes; un ser humano produce de 25.000 a 35.000 proteínas distintas. En ambos casos cada tipo de proteína tiene una estructura tridimensional única que le confiere una función única. Cada tipo de proteína también tiene una secuencia de aminoácidos única. La intuición sugiere que la secuencia de aminoácidos debe desempeñar un papel fundamental en la determinación de la estructura tridimensiorial de la proteína y en último término en su función, pero ¿es correcta esta suposición? Un examen general de las proteínas y de sus variaciones en la secuencia de aminoácidos proporciona una serie de pistas empíricas que ayudan a sustanciar la importante relación entre secuencia de aminoácidos y función biológica.

Primero, tal como ya hemos visto, proteínas con funciones diferentes siempre tienen secuencias de aminoácidos diferentes. Segundo, se han correlacionado miles de enfermedades genéticas humanas con la producción de proteínas defectuosas. Quizás un tercio de estas proteínas son defectuosas debido a un único cambio en la secuencia de aminoácidos; por tanto, si se altera la estructura primaria, puede cambiar también la función de la proteína. Finalmente, al comparar proteínas con funciones similares de diferentes especies encontramos que estas proteínas tienen a menudo secuencias de aminoácidos similares. Un caso extremo es la ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos implicada en la regulación de la degradación de otras proteínas. La secuencia de aminoácidos de la ubiquitina es idéntica en especies tan dispares como pueden ser la mosca del vinagre y el ser humano.

La secuencia de aminoácidos de una proteína ¿está fijada absolutamente, es decir, no varía en absoluto para una proteína concreta? No; es posible cierta flexibilidad. Se calcula que entre el 20 y el 30% de las proteínas humanas son **polimórficas,** teniendo secuencias de aminoácidos que varían dentro de la población humana. La mayoría de estas variaciones de secuencia no tienen ningún efecto, o muy poco, sobre la función de la proteína. Además, proteínas que llevan a cabo una función similar en especies distantes pueden diferir de manera importante en el tamaño global y en la secuencia de aminoácidos.

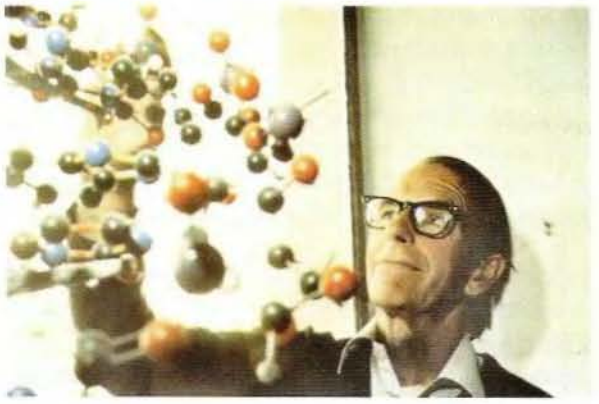
A pesar de que la secuencia de aminoácidos puede variar considerablemente en algunas regiones de la estructura primaria sin afectar a la función biológica, la mayoría de proteínas contienen a menudo regiones cruciales que son esenciales para su función y cuya secuencia se encuentra, por tanto, conservada. La fracción de secuencia global que es crítica varía de proteína a proteína, lo que complica la tarea de relacionar secuencia con estructura tridimensional y estructura con función. No obstante, antes de poder profundizar en este problema, hemos de examinar de qué forma se obtiene la información sobre la secuencia.

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de millones de proteínas

Dos importantes descubrimientos que tuvieron lugar en 1953 fueron de importancia crucial en la historia de la bioquímica. En aquel año James D. Watson y Francis Crick dedujeron la estructura en doble hélice del DNA y propusieron una base estructural que explicaba su precisa replicación (Capítulo 8). Su propuesta aclaró la realidad molecular que estaba implícita en la idea de gen. En aquel mismo año, Frederick Sanger resolvió la secuencia de aminoácidos de las cadenas peptídicas de la hormona insulina (Fig. 3-24), sorprendiendo a muchos investigadores que habían creído durante mucho tiempo que la deducción de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido sería una tarea imposible. Rápidamente se hizo evidente que la secuencia de nucleótidos del DNA y la secuencia de aminoácidos de las

proteínas estaban relacionadas de algún modo. Apenas una década después de estos descubrimientos se reveló el papel de la secuencia de nucleótidos del DNA en la determinación de la secuencia de aminoácidos de las moléculas proteicas (Capítulo 27). Actualmente se puede deducir un número enorme de secuencias proteicas de forma indirecta a partir de las secuencias de DNA que se recogen en los bancos de datos genómicos que crecen rápidamente. No obstante, aún se deducen muchas secuencias utilizando los métodos tradicionales de secuenciación de proteínas.

Se han determinado las secuencias de aminoácidos de millares de proteínas de muchas especies utilizando los princi-



Frederick Sanger

pios desarrollados inicialmente por Sanger. Estos métodos aún están en uso, aunque con muchas variaciones y mejoras en sus detalles. Actualmente, la secuenciación química de proteínas complementa una serie creciente de métodos nuevos, lo cual proporciona múltiples vías para obtener datos de secuencia de aminoácidos. Estos datos son de importancia crítica para cualquier área de la investigación bioquímica.

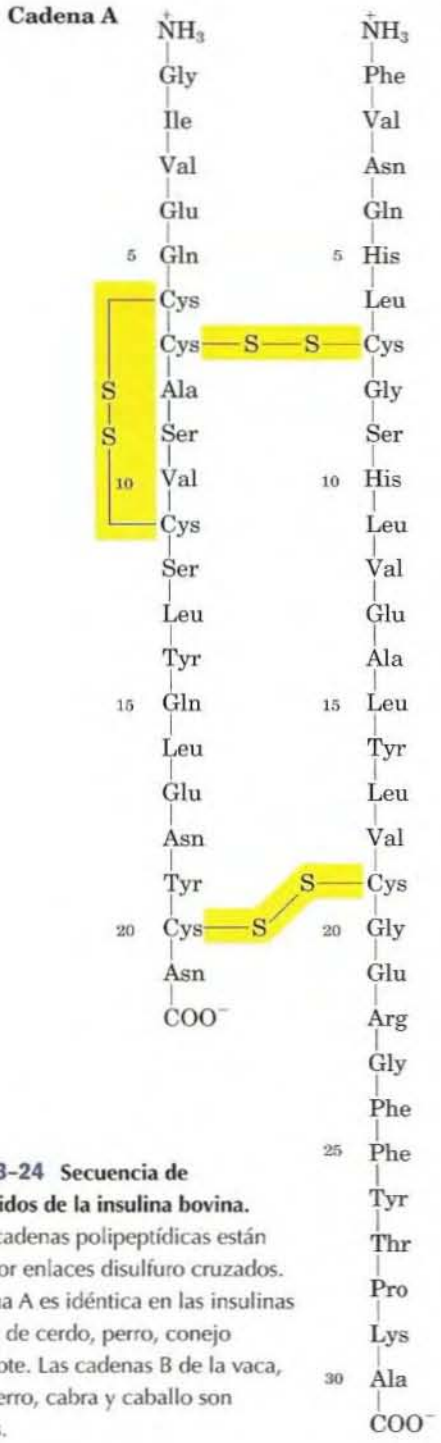
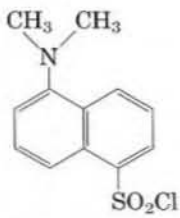


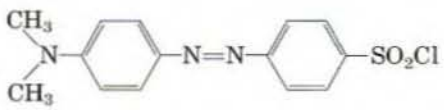
FIGURA 3-24 Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. Las dos cadenas polipeptídicas están unidas por enlaces disulfuro cruzados. La cadena A es idéntica en las insulinas humana, de cerdo, perro, conejo y cachalote. Las cadenas B de la vaca, cerdo, perro, cabra y caballo son idénticas.

Los polipéptidos cortos se secuencian utilizando procedimientos automáticos

Para analizar la estructura primaria de una proteína se utilizan diversos procedimientos. Se dispone de diversos protocolos para marcar e identificar el residuo amino-terminal (Fig. 3-25a). Sanger introdujo el reactivo 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) con este fin; otros reactivos utilizados para marcar el residuo amino-terminal, el cloruro de dansilo y el cloruro de dabsilo, dan derivados que se pueden detectar más fácilmente que los derivados dinitrofenilados. Una vez que se ha marcado el residuo amino-terminal con uno de estos reactivos, se hidroliza el polipéptido a sus aminoácidos constituyentes y se identifica el aminoácido marcado. Dado que la etapa de hidrólisis destruye el polipéptido, este procedimiento no puede utilizarse para secuenciar un polipéptido más allá de su residuo amino-terminal. Sin embargo, puede ayudar a determinar el número de polipéptidos químicamente diferentes en



Cloruro de dansilo



Cloruro de dabsilo

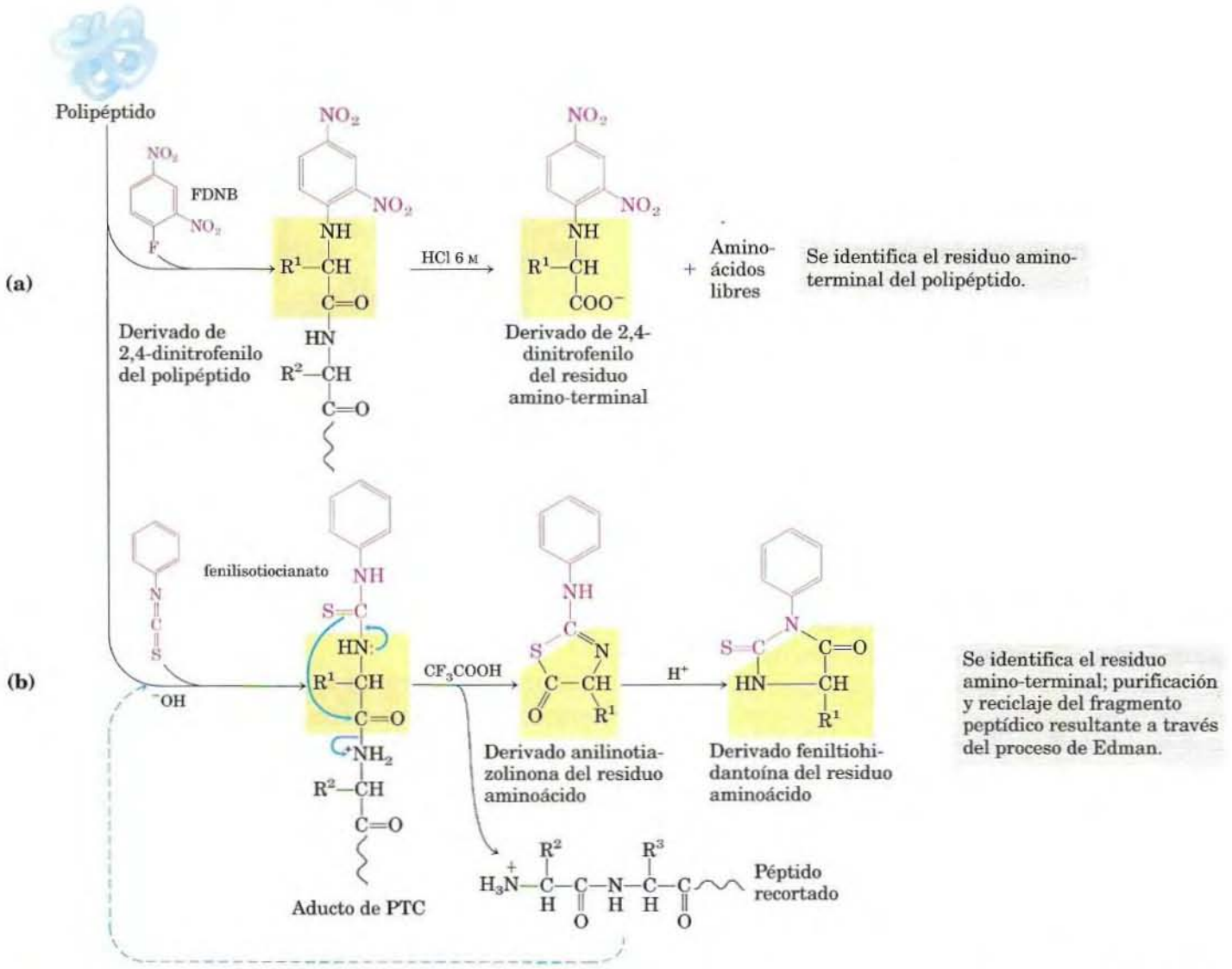


FIGURA 3-25 Pasos en la secuenciación de un polipéptido. **(a)** La identificación del residuo amino-terminal puede ser el primer paso de la secuenciación de un polipéptido. Aquí se muestra el método de Sanger para identificar el residuo amino-terminal. **(b)** El procedimiento de la degradación de Edman permite obtener la secuencia completa de un péptido. En el caso de péptidos cortos este método por sí solo da la secuencia completa, por lo que frecuentemente se omite el paso **(a)**. El paso **(a)** resulta útil en el caso de polipéptidos de gran tamaño que a menudo se fragmentan en péptidos más pequeños para su secuenciación (véase Fig. 3-27).

una proteína, siempre que cada uno tenga un residuo amino-terminal diferente. Por ejemplo, si la insulina se somete a este procedimiento se marcarían dos residuos, Phe y Gly (Fig. 3-24).

Para secuenciar un polipéptido completo se utiliza normalmente un método químico diseñado por Pehr Edman. El procedimiento de la **degradación de Edman** marca y elimina sólo el residuo amino-terminal de un péptido, dejando el resto de enlaces peptídicos intactos (Fig. 3-25b). Se hace reaccionar el péptido con fenilisotiocianato en condiciones alcalinas suaves, lo que convierte el aminoácido amino-terminal en un aducto de feniltiocarbamilo (PTC). El enlace peptídico contiguo al aducto de PTC se rompe a continuación en una reacción llevada a cabo por el ácido trifluoroacético anhidro, con la consiguiente eliminación del aminoácido amino-terminal en forma de anilinotiazolinona. El aminoácido modificado se extrae con disolventes orgánicos, se convierte en un derivado feniltiohidantoína más estable, mediante tratamiento con ácido en solución acuosa, y finalmente se identifica. El uso de reacciones secuenciales llevadas a cabo primero en condiciones básicas y a continuación ácidas proporciona un control adecuado sobre todo el proceso. Cada una de las reacciones del aminoácido amino-terminal puede completarse prácticamente en su totalidad sin afectar a ninguno de los demás enlaces del péptido. Después de la eliminación e identificación del residuo amino-terminal, el *nuevo* residuo amino-terminal puede ser marcado, eliminado e identificado a través de la misma serie de reacciones. Este procedimiento se repite hasta que se ha determinado toda la secuencia. La degradación de Edman se realiza en un instrumento, denominado **secuenciador,** que mezcla los reactivos en las proporciones adecuadas, separa los productos, los identifica y registra los resultados. Estos métodos son extraordinariamente sensibles. A menudo puede determinarse la secuencia aminoácida completa a partir de unos pocos microgramos de proteína.

La longitud de polipéptido que puede secuenciarse correctamente mediante la degradación de Edman depende de la eficiencia de los pasos químicos individuales. Consideremos un péptido que empiece con la secuencia Gly-Pro-Lys- en su extremo amino. Si la glicina se eliminara con una eficiencia del 97%, el 3% de las moléculas del polipéptido en la solución mantendrían un residuo de Gly en su extremo amino. En el segundo ciclo de Edman, el 97% de los aminoácidos liberados sería prolina y el 3% glicina, mientras que un 3% de moléculas del polipéptido mantendrían residuos de Gly (0,1%) o Pro (2,9%) en su extremo amino. En cada ciclo, los péptidos que no han reaccionado en los ciclos anteriores aportarán aminoácidos a un fondo que crece continuamente, haciendo finalmente imposible determinar cuál es el siguiente aminoácido en la secuencia peptídica original. Los secuenciadores modernos alcanzan eficiencias superiores al 99% por ciclo, permitiendo secuenciar más de 50 residuos aminoácidos contiguos de un polipéptido. La estructura primaria de la insulina, resuelta por Sanger y colaboradores a lo largo de un período de 10 años, podría ser ahora determinada por completo en un día o dos.

Las proteínas grandes deben secuenciarse a partir de fragmentos más pequeños

La precisión global en la determinación de una secuencia de aminoácidos disminuye generalmente a medida que aumenta la longitud del polipéptido. Los polipéptidos enormemente grandes que se encuentran en las proteínas han de romperse en trozos más pequeños para poder secuenciarlos de manera eficiente. Este proceso consta de varios pasos. En primer lugar se rompe la proteína en un conjunto de fragmentos específicos mediante métodos químicos o enzimáticos. Si existen puentes disulfuro, es necesario romperlos. A continuación se purifica cada fragmento y se secuencia mediante el procedimiento de Edman. Finalmente se determina el orden en que los fragmentos aparecen en la proteína original y se determina dónde están localizados, si es que los hay, los enlaces disulfuro.

Rotura de los enlaces disulfuro Los puentes disulfuro interfieren en el procedimiento de secuenciación. Un residuo de cistina (Fig. 3-7) al que se cortara uno de sus enlaces peptídicos mediante el procedimiento de Edman podría permanecer unido a otra cadena polipeptídica a través de su puente disulfuro. Los puentes disulfuro también interfieren en la rotura enzimática o química del polipéptido. En la Figura 3-26 se esquematizan dos métodos utilizados para romper enlaces disulfuro de manera irreversible.

Rotura de la cadena polipeptídica Pueden utilizarse varios métodos para fragmentar la cadena polipeptídica. Los enzimas denominados **proteasas** catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Algunas proteasas cortan solamente los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos específicos (Tabla 3-7) y por tanto fragmentan una cadena polipeptídica de forma predecible y reproducible. Varios reactivos químicos cortan también los enlaces peptídicos adyacentes a residuos específicos.

Entre las proteasas, el enzima digestivo tripsina cataliza la hidrólisis de tan sólo aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo está proporcionado por un residuo de Lys o

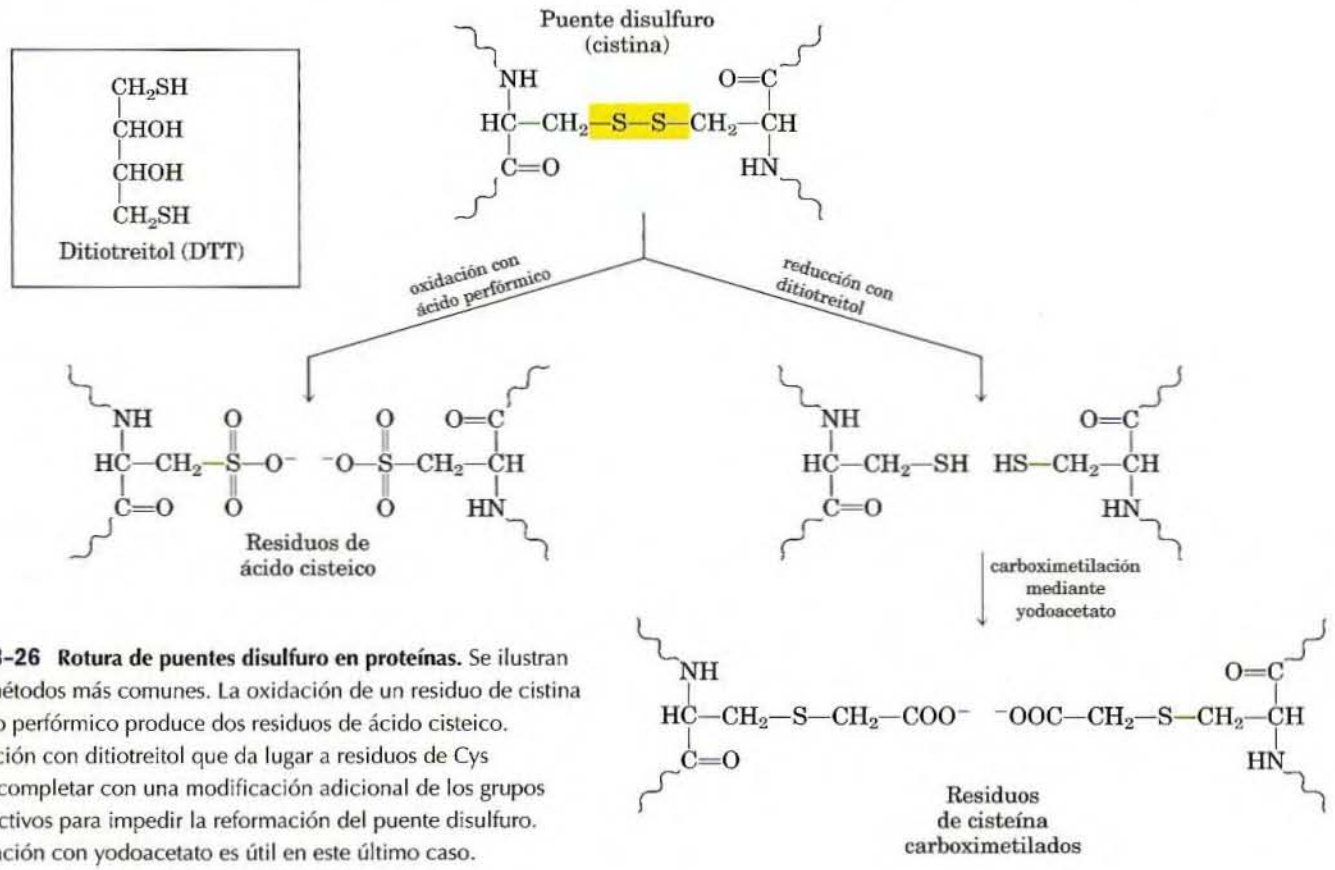


FIGURA 3-26 Rotura de puentes disulfuro en proteínas. Se ilustran los dos métodos más comunes. La oxidación de un residuo de cistina con ácido perfórmico produce dos residuos de ácido cisteico. La reducción con ditiotreitol que da lugar a residuos de Cys se ha de completar con una modificación adicional de los grupos —SH reactivos para impedir la reformación del puente disulfuro. La acetilación con yodoacetato es útil en este último caso.

TABLA 3-7 Especificidad de algunos métodos usuales de fragmentación de cadenas polipeptídicas

*Tratamiento (origen biológico)**	*Puntos de corte*†
Tripsina (páncreas bovino)	Lys, Arg (C)
Proteasa de *Submaxillarus* (glándula submaxilar de ratón)	Arg (C)
Quimotripsina (páncreas bovino)	Phe, Trp, Tyr (C)
Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (bacteria *S. aureus*)	Asp, Glu (C)
Proteasa Asp-*N* (bacteria *Pseudomonas fragi*)	Asp, Glu (N)
Pepsina (estómago porcino)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinasa Lys C (bacteria *Lysobacter enzymogenes*)	Lys (C)
Bromuro de cianógeno	Met (C)

*A excepción del bromuro de cianógeno, todos los reactivos proteasas. Todos pueden obtenerse comercialmente.

†Residuos que aportan el punto de reconocimiento primario para la proteasa o el reactivo; la rotura del enlace peptídico tiene lugar en el lado carbonilo (C) o amino (N) del residuo aminoácido indicado.

Arg, independientemente de la longitud o secuencia de aminoácidos de la cadena. De este modo puede predecirse el número de péptidos de menor tamaño producidos por rotura con tripsina a partir del número total de residuos de Lys o Arg del polipéptido original, determinado a partir de la hidrólisis de una muestra intacta (Fig. 3-27). Un polipéptido con cinco residuos de Lys y/o Arg dará lugar normalmente a seis péptidos más pequeños al ser cortado por la tripsina. Además, todos excepto uno tendrán una Lys o Arg carboxilo-terminal. Los fragmentos producidos por acción de la tripsina (u otro enzima o reactivo químico) se separan a continuación mediante métodos cromatográficos o electroforéticos.

Secuenciación de los péptidos Todos los fragmentos peptídicos resultantes de la acción de la tripsina se secuencian separadamente por el procedimiento de Edman.

Ordenación de los fragmentos peptídicos Ahora debe determinarse el orden de estos "fragmentos de tripsina" en la cadena polipeptídica original. Se corta otra muestra del polipéptido intacto en fragmentos utilizando un enzima o reactivo diferente, que corte enlaces peptídicos en puntos diferentes a los cortados por la tripsina. Por ejemplo, el bromuro de cianógeno sólo rompe aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es aportado por Met. Los fragmentos resultantes de este segundo procedimiento se separan y secuencian igual que los anteriores.

Se examinan las secuencias de aminoácidos de cada fragmento obtenido con los dos procedimientos de rotura con el fin de encontrar péptidos producto del segundo procedimiento cuyas secuencias establezcan una continuidad, debido al solapamiento, entre los fragmentos obtenidos por el primer procedimiento de rotura (Fig. 3-27). Los péptidos solapantes obtenidos a partir de la segunda fragmentación dan el orden correcto de los fragmentos peptídicos obtenidos en la primera. Si se ha identificado el aminoácido amino-terminal previamente a la rotura original de la proteína, se puede utilizar esta información para establecer cuál es el fragmento que proviene del extremo amino. Se pueden comparar los dos conjuntos de fragmentos para detectar posibles errores al determinar la secuencia de aminoácidos de cada fragmento. Si el segundo procedimiento de rotura no consigue establecer continuidad entre todos los péptidos de la primera rotura, deberá utilizarse un tercero o incluso un cuarto, método de rotura para obtener un conjunto de péptidos que pueda proporcionar los solapamientos necesarios.

Localización de los puentes disulfuro Si la estructura primaria incluye puentes disulfuro, su localización se determina en un paso adicional una vez completada la secuenciación. De nuevo se corta una muestra de la proteína con un reactivo como la tripsina, pero esta vez sin romper los puentes disulfuro. Los péptidos resultantes se separan por electroforesis y se comparan con el conjunto original de péptidos generados por la tripsina. Por cada puente disulfuro faltarán dos de los péptidos originales, al tiempo que aparecerá un nuevo péptido más grande. Los dos péptidos que han desaparecido representan las regiones del polipéptido intacto que están unidas por el puente disulfuro.

Las secuencias de aminoácidos se pueden deducir también mediante otros métodos

El método esquematizado anteriormente no es la única forma de determinar secuencias de aminoácidos. Nuevos métodos basados en la espectrometría de masas permiten la secuenciación de polipéptidos cortos (20 a 30 residuos aminoácidos) en sólo unos pocos minutos (Recuadro 3-2). Además, el desarrollo de métodos rápidos para la secuenciación de DNA (Capítulo 8), el descifrado del código genético (Capítulo 27) y el desarrollo de técnicas para el aislamiento de genes (Capítulo 9) permiten deducir la secuencia de un polipéptido mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del gen que lo codifica (Fig. 3-28). Las técnicas utilizadas para determinar secuencias de proteínas y DNA son complementarias. Cuando se dispone del gen, la secuenciación del DNA puede ser más rápida y más precisa que la secuenciación de la proteína. La mayoría de proteínas se secuencian actualmente por esta vía indirecta. Si no se ha aislado el gen es necesaria la secuenciación directa de los péptidos y ésta puede proporcionar información (por ejemplo, localización de los puentes disulfuro) que no puede ser aportada por la secuencia de DNA. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos, o incluso de una parte de un polipéptido, puede facilitar mucho el aislamiento del gen correspondiente (Capítulo 9).

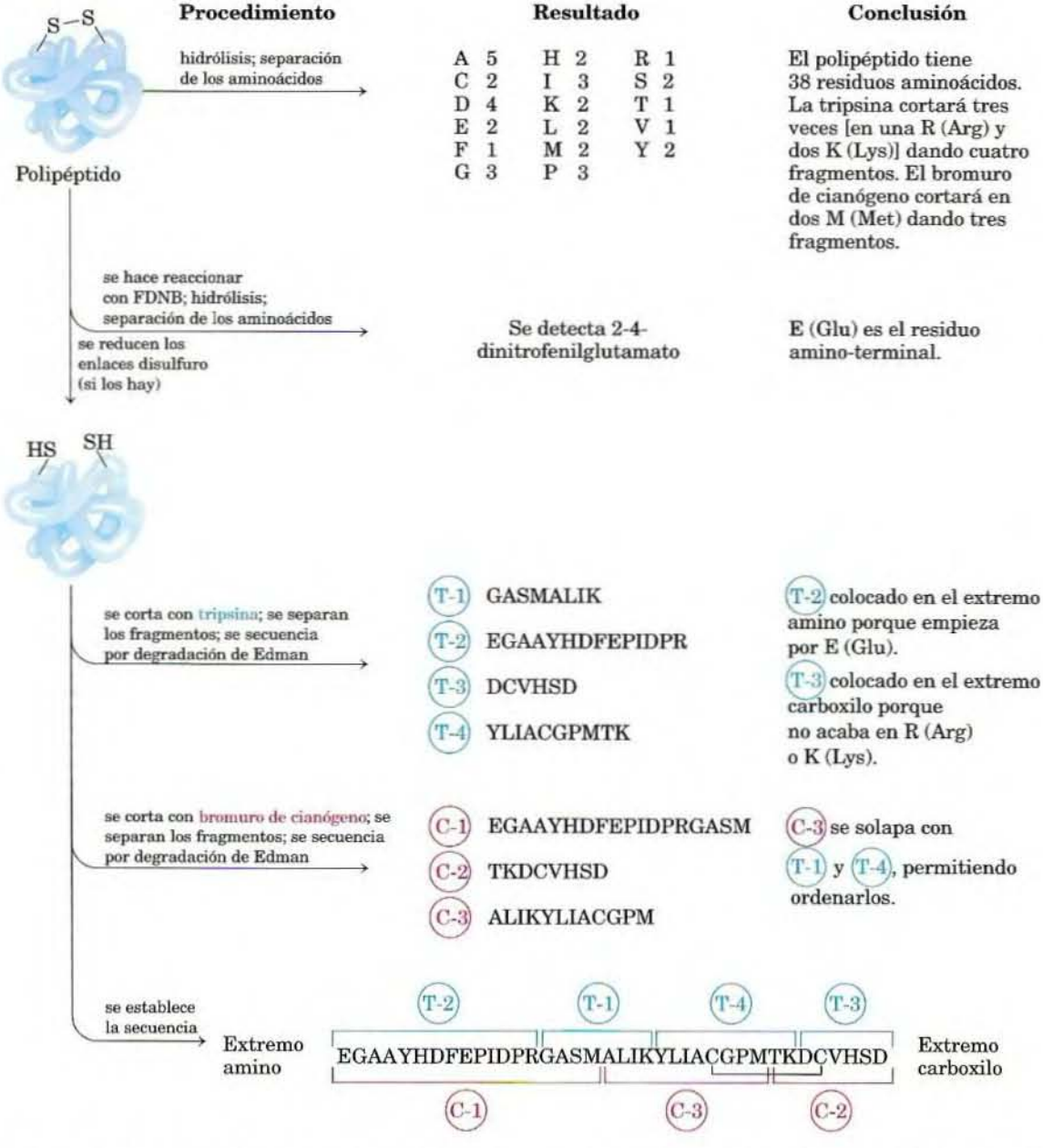


FIGURA 3-27 Fragmentación de las proteínas, secuenciación y ordenamiento de los fragmentos peptídicos. Se determina en primer lugar la composición de aminoácidos y el residuo N-terminal de una muestra intacta. A continuación se rompen los puentes disulfuro presentes antes de la fragmentación de forma que la secuenciación pueda transcurrir con eficiencia. En este ejemplo, sólo hay dos residuos de Cys (C) por lo que sólo hay una posibilidad de localización del puente disulfuro. En los polipéptidos con tres o más residuos de Cys, la posición de los puentes disulfuro puede determinarse tal como se describe en el texto. (Los símbolos de una letra para los aminoácidos aparecen en la Tabla 3-1.)

El conjunto de métodos disponible actualmente para analizar tanto las proteínas como los ácidos nucleicos está dando origen a una nueva disciplina: la "bioquímica de la célula completa". La secuencia completa del DNA de un organismo, su genoma, está actualmente disponible para organismos que abarcan desde virus o bacterias a eucariotas multicelulares (véase Tabla 1-4). Se están descubriendo millones de genes, incluyendo muchos que codifican proteínas sin ninguna función conocida. Para describir el complemento proteico entero codificado por el DNA de un organismo, los investigadores han acuñado el término **proteoma.** Tal como se comenta en el Capítulo 9, las nuevas disciplinas de la genómica y la proteómica complementan las investigaciones realizadas sobre el metabolismo celular intermediario y el metabolismo de ácidos nucleicos, generando una visión nueva y más completa de la bioquímica, a nivel celular e incluso a nivel de organismos enteros.

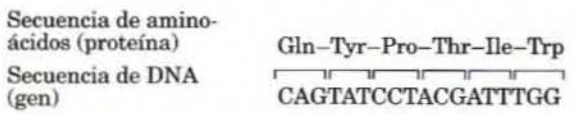


FIGURA 3-28 Correspondencia entre las secuencias de DNA y de aminoácidos. Cada aminoácido está codificado por una secuencia específica de tres nucleótidos en el DNA. El código genético se describe con detalle en el Capítulo 27.

RECUADRO 3-2 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

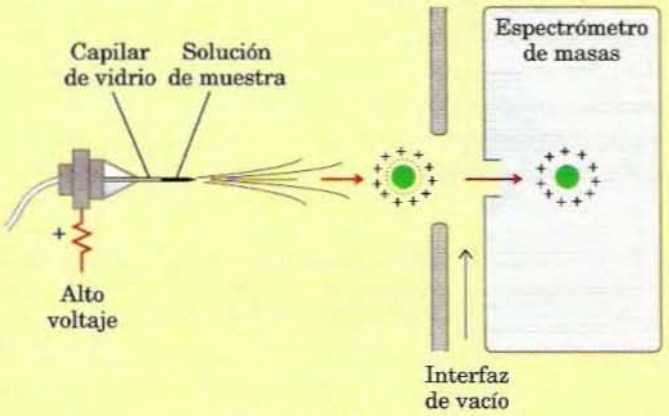
Investigación de las proteínas mediante la espectrometría de masas

El espectrómetro de masas ha sido desde hace tiempo una herramienta indispensable en química. Las moléculas que se deben analizar, a las que se hace referencia como **analitos,** se ionizan en primer lugar en el vacío. Cuando las nuevas moléculas cargadas se introducen en un campo eléctrico y/o magnético, sus trayectorias a través del campo son función de su relación masa-carga, m/z. La medición de esta propiedad de las especies ionizadas puede utilizarse para deducir la masa (M) del analito con una precisión muy elevada.

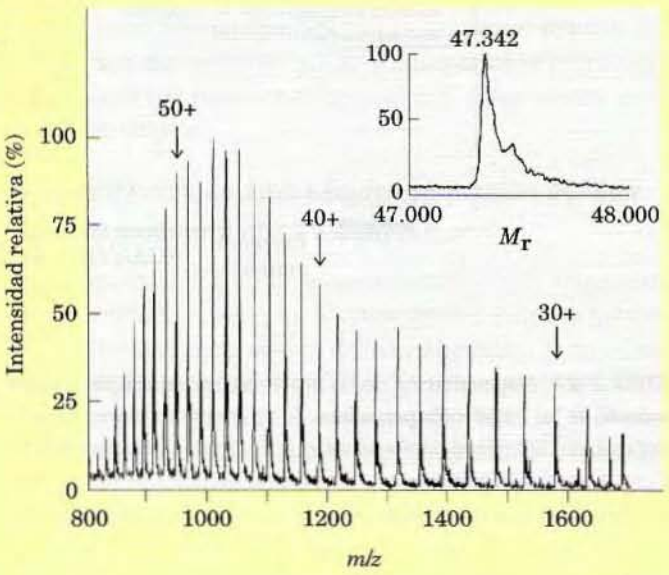
Aunque la espectrometría de masas (MS) se ha utilizado durante muchos años, no podía aplicarse a macromoléculas tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Las medidas de m/z se realizan sobre moléculas en fase gaseosa y la calefacción u otros tratamientos necesarios para llevar una macromolécula a la fase gaseosa causaban normalmente su rápida descomposición. En 1988, se desarrollaron dos técnicas diferentes para superar este problema. En una de ellas, las proteínas se colocan dentro de una matriz que puede absorber luz. Con un pulso corto de luz de láser, las proteínas se ionizan y a continuación se desorben de la matriz hacia el sistema de vacío. Este proceso, conocido como **espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz** o **MALDI MS,** se ha utilizado con éxito para medir la masa de una gran variedad de macromoléculas. En un segundo proceso, que da los mismos buenos resultados, las macromoléculas en disolución son forzadas a pasar de la fase líquida a la fase gas directamente. Una solución de analitos se hace pasar a través de una aguja cargada que se mantiene a un elevado potencial eléctrico, dispersando la solución en una fina niebla de microgotas cargadas. El disolvente que rodea las macromoléculas se evapora rápidamente y los iones con múltiples cargas resultantes se introducen de esta forma en la fase gas de manera no destructiva. Esta técnica se denomina **espectrometría de masas de ionización por electrospray,** o **ESI MS.** Los protones añadidos durante el paso a través de la aguja proporcionan carga adicional a la macromolécula. La m/z de la molécula puede analizarse en la cámara de vacío.

La MS proporciona una gran cantidad de información para la investigación en proteómica, enzimología y química de las proteínas en general. Las técnicas requieren solamente cantidades minúsculas de muestra, de forma que pueden aplicarse fácilmente a las pequeñas cantidades de proteína que pueden extraerse de un gel electroforético bidimensional. La precisa determinación de la masa molecular de una proteína es uno de los parámetros críticos para su identificación. Una vez que se conoce con precisión la masa de una proteína, la MS es un método conveniente y preciso para detectar cambios de masa debidos a la presencia de cofactores unidos, iones metálicos unidos, modificaciones covalentes, etc.

El proceso para determinar la masa molecular de una proteína mediante ESI MS se ilustra en la Figura 1. Al ser inyectada en la fase gas, una proteína adquiere un número variable de protones, y por tanto de cargas positivas, del disolvente. Esto crea un espectro de especies con diferentes relaciones masa-carga. Cada pico sucesivo corresponde a una especie que se diferencia del pico contiguo por una dife-



(a)



(b)

FIGURA 1 Espectro de masas por electrospray de una proteína. **(a)** Una solución de proteína se dispersa en microgotas fuertemente cargadas mediante el paso a través de una aguja bajo la influencia de un campo eléctrico de alto voltaje. Las microgotas se evaporan y los iones (en este caso con protones adicionados) entran en el espectrómetro de masas para medir m/z. El espectro generado **(b)** es una familia de picos, en la que cada pico sucesivo (de derecha a izquierda) corresponde a una especie cargada aumentada en 1 tanto en masa como en carga. En el inserto se muestra una transformación de este espectro generada por ordenador.

rencia de carga de 1 y una diferencia de masa de 1 (1 protón). La masa de la proteína puede determinarse a partir de cualquier par de picos contiguos. La m/z medida para un pico es

$$(m/z)_2 = \frac{M + n_{2X}}{n_2}$$

donde M es la masa de la proteína, n_2 es el número de cargas y X es la masa de los grupos añadidos (en este caso protones). De modo similar, para el pico contiguo,

$$(m/z)_1 = \frac{M + (n_2 + 1)X}{n_2 + 1}$$

Tenemos ahora dos incógnitas (M y n_2) y dos ecuaciones. Podemos resolverlas primero para n_2 y después para M:

$$n_2 = \frac{(m/z)_2 - X}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

$$M = n_2\,[(m/z)_2 - X]$$

Este cálculo que utiliza los valores de m/z para cualquier par de picos de un espectro como el que se muestra en la Figura 1b proporcionará normalmente la masa de la proteína (en este caso, aerolisina k; 47.342 Da) con un error de solamente ±0,01%. Generando varios conjuntos de picos, repitiendo el cálculo y promediando los resultados, se obtiene generalmente un valor de M incluso más preciso. Existen algoritmos de ordenador que transforman el espectro de m/z en un pico único que proporciona también una medida de la masa muy precisa (Fig. 1b, inserto).

La espectrometría de masas puede utilizarse también para secuenciar segmentos cortos de un polipéptido, una aplicación que se ha establecido como una herramienta muy valiosa para la identificación rápida de proteínas desconocidas. La información secuencial se extrae utilizando una técnica denominada **MS en tándem,** o **MS/MS.** Una disolución que contiene la proteína que se está investigando se trata en primer lugar con una proteasa o un reactivo químico para reducirla por rotura hidrolítica a una mezcla de péptidos más cortos. La mezcla se inyecta entonces en un dispositivo que consiste esencialmente en dos espectrómetros de masas en tándem (Fig. 2a, arriba). En el primero de ellos se separa la mezcla de péptidos y los fragmentos ionizados se manipulan

(continúa en la página siguiente)

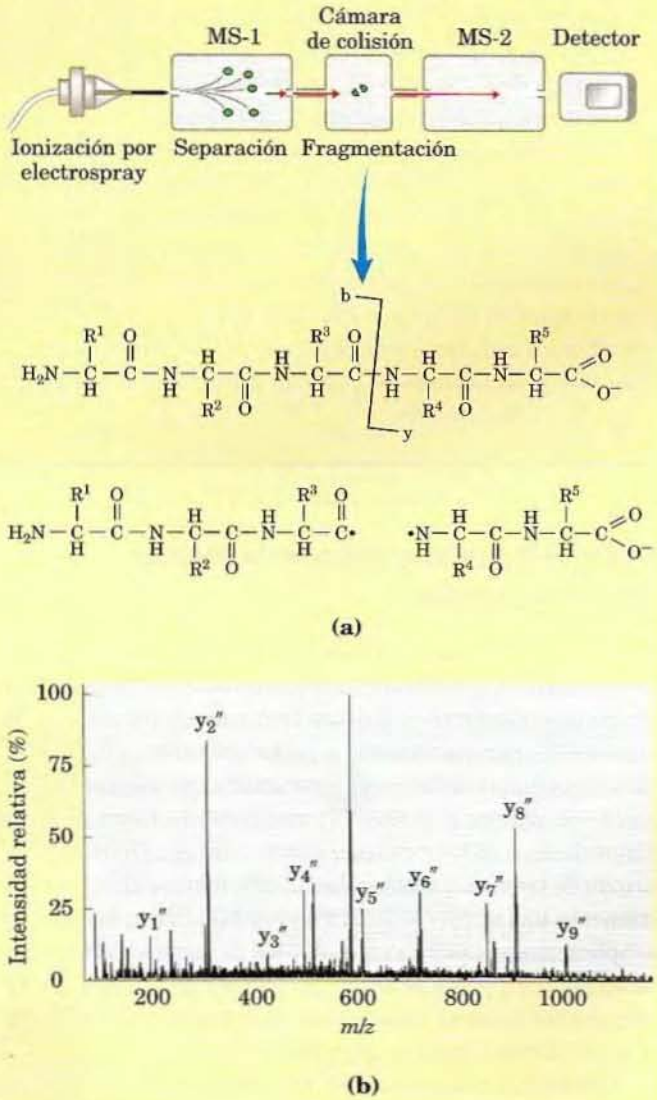


FIGURA 2 Obtención de información secuencial de una proteína por espectrometría de masas en tándem. (a) Tras hidrólisis proteolítica, una solución de proteína se inyecta en un espectrómetro de masas (MS-1). Los diferentes péptidos se separan de manera que sólo se selecciona uno para su análisis posterior. El péptido seleccionado se fragmenta de nuevo en una cámara entre los dos espectrómetros de masas y se mide m/z para cada fragmento en el segundo espectrómetro de masas (MS-2). Muchos de los iones generados durante esta segunda fragmentación resultan de la rotura del enlace peptídico, en la forma mostrada. Estos iones se denominan iones tipo b o tipo y, dependiendo de si la carga se mantiene en el lado amino- o carboxilo-terminal, respectivamente. **(b)** Un espectro típico con picos que representan los fragmentos peptídicos generados a partir de una muestra de un péptido pequeño (10 residuos). Los picos marcados son iones tipo y. El pico alto cercano a y50 es un ion con carga doble y no es parte del conjunto y. Los picos sucesivos difieren en la masa de un determinado aminoácido del péptido original. En este caso, la secuencia deducida fue Phe-Pro-Gly-Gln-(Ile/Leu)-Asn-Ala-Asp-(Ile/Leu)-Arg. Obsérvese la ambigüedad entre los residuos de Ile y Leu, puesto que tienen la misma masa molecular. En este ejemplo, el conjunto de picos procedente de iones de tipo y predomina y como resultado el espectro queda muy simplificado. Esto es debido a que existe un residuo de Arg en el extremo carboxilo-terminal del péptido y la mayoría de las cargas positivas quedan retenidas en este residuo.

RECUADRO 3-2 BIOQUÍMICA PRÁCTICA *(continuación de la página anterior)*

de forma que sólo uno de los diversos tipos de péptidos producidos por la fragmentación sale por el otro extremo. La muestra del péptido seleccionado, cuyas moléculas tienen todas carga en algún punto de su longitud, viaja entonces a través de una cámara de vacío entre los dos espectrómetros de masas. En esta cámara de colisión, el péptido vuelve a fragmentarse por impacto de elevada energía con un "gas de colisión", una pequeña cantidad de un gas noble tal como el helio o el argón que se deja entrar en la cámara de vacío. Este procedimiento está diseñado para fragmentar muchas de las moléculas de péptido de la muestra, siendo en promedio cada péptido individual fragmentado sólo en un sitio. La mayor parte de las fragmentaciones se dan en los enlaces peptídicos. Esta fragmentación no implica la adición de agua (se lleva a cabo casi en el vacío) de forma que los productos pueden incluir iones radicales moleculares tales como radicales carbonilo (Fig. 2a, abajo). La carga del péptido original es retenida por uno de los fragmentos generados a partir de éste.

El segundo espectrómetro de masas mide entonces las relaciones *m/z* de todos los fragmentos cargados (los fragmentos sin carga no se detectan). Esto genera uno o más conjuntos de picos. Uno de los conjuntos de picos (Fig. 2b) consiste en todos los fragmentos cargados que se han generado mediante la rotura del mismo tipo de enlace (pero en puntos diferentes del péptido) y proceden de la rotura del enlace en el mismo lado, sea el carboxilo-terminal o el amino-terminal. Cada pico sucesivo en un conjunto determinado tiene un aminoácido menos que el pico anterior. La diferencia de masa de pico a pico identifica el aminoácido que se ha perdido en cada caso, revelando así la secuencia del péptido. Las únicas ambigüedades implican la leucina y la isoleucina, que tienen la misma masa.

La carga del péptido puede permanecer en el fragmento carboxilo-terminal o en el amino-terminal, y pueden romperse otros enlaces además de los peptídicos en el proceso de fragmentación, lo que da como resultado que se generen múltiples conjuntos de picos. Los dos conjuntos predominantes consisten generalmente en los fragmentos cargados que proceden de la rotura de los enlaces peptídicos. El conjunto formado por los fragmentos carboxilo-terminales puede distinguirse sin ambigüedad del formado por los fragmentos amino-terminales. Dado que las roturas de enlace generadas entre los espectrómetros (en la cámara de colisión) no producen grupos carboxilo y amino completos en los puntos de rotura, los únicos grupos α-amino y α-carboxilo intactos en los fragmentos peptídicos son los de los extremos (Fig. 2a). Los dos conjuntos de fragmentos pueden así identificarse gracias a sus pequeñas diferencias de masa resultantes. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un conjunto puede confirmarse a partir del otro, mejorando así la confianza en la información secuencial obtenida.

Incluso una secuencia corta es a menudo suficiente para permitir la asociación de una proteína con su gen sin ambigüedades, si la secuencia del gen es conocida. La secuenciación mediante espectrometría de masas no puede reemplazar el procedimiento de degradación de Edman para la secuenciación de polipéptidos largos, pero es ideal para la investigación proteómica dirigida a catalogar los cientos de proteínas celulares que pueden separarse en un gel bidimensional. En las próximas décadas, se dispondrá de datos de secuencia genómica detallada de cientos, y en último término miles, de organismos. La capacidad de asociar rápidamente proteínas con genes utilizando la espectrometría de masas facilitará enormemente la explotación de esta extraordinaria fuente de información.

Pueden sintetizarse químicamente péptidos y proteínas pequeñas

Muchos péptidos son potencialmente útiles como agentes farmacológicos, por lo que su producción es de importancia comercial considerable. Existen tres manera de obtener un péptido: (1) por purificación a partir del tejido, tarea a menudo dificultada por las concentraciones extremadamente pequeñas de algunos péptidos; (2) mediante ingeniería genética (Capítulo 9); o (3) por síntesis química directa. Gracias al desarrollo de técnicas potentes, la síntesis química directa es actualmente una opción atractiva en muchos casos. Además de las aplicaciones comerciales, la síntesis de secuencias específicas de péptidos procedentes de proteínas más grandes constituye una herramienta cada vez más importante para el estudio de la estructura y función de proteínas.

Debido a la complejidad de las proteínas, las estrategias sintéticas tradicionales de la química orgánica no son prácticas para péptidos de más de 4 o 5 aminoácidos. Un problema reside en la dificultad de purificar el producto después de cada paso.

El principal avance en esta tecnología fue protagonizado por R. Bruce Merrifield en 1962. Su innovación implicaba la síntesis de un péptido que se mantenía unido por un extremo a un soporte sólido. El soporte es un polímero insoluble (resina) contenido dentro de una columna, similar a las utilizadas en los procedimientos cromatográficos. El péptido se construye sobre este soporte, adicionando aminoácido a aminoácido y utilizando un conjunto estándar de reacciones que siguen un ciclo repetitivo (Fig. 3-29). En cada paso sucesivo del ciclo, grupos químicos protectores bloquean las reacciones no deseadas.

En la actualidad, la tecnología para la síntesis química de péptidos se ha automatizado. Al igual que en las reacciones de secuenciación ya consideradas, la limitación más importante del proceso estriba en la eficiencia de cada ciclo químico, tal como puede verse al calcular los rendimientos globales de pép-

tidos de diferentes longitudes cuando el rendimiento por adición de cada nuevo aminoácido es de 96,0% en lugar de 99,8 % (Tabla 3-8). La reacción incompleta en un paso puede llevar a la formación de una impureza (en forma de un péptido más corto) en el siguiente. Los procedimientos químicos se han optimizado hasta permitir la síntesis de proteínas de una longitud de 100 residuos aminoácidos en unos pocos días con un rendimiento razonable. Se utiliza un enfoque muy similar en la síntesis de ácidos nucleicos (véase Fig. 8-38). Vale la pena resaltar que esta tecnología, aún siendo impresionante, empali-

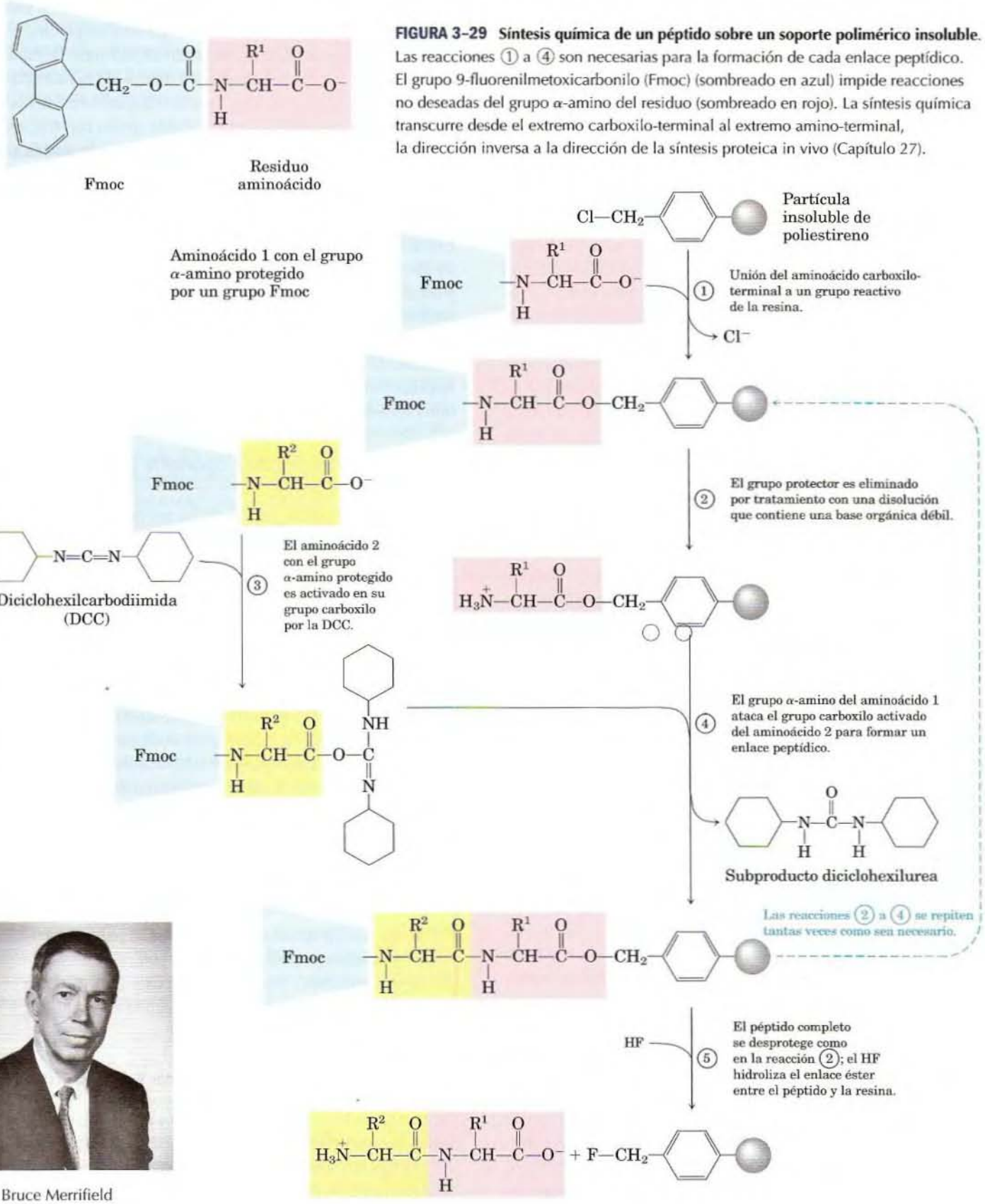


FIGURA 3-29 Síntesis química de un péptido sobre un soporte polimérico insoluble. Las reacciones ① a ④ son necesarias para la formación de cada enlace peptídico. El grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (sombreado en azul) impide reacciones no deseadas del grupo α-amino del residuo (sombreado en rojo). La síntesis química transcurre desde el extremo carboxilo-terminal al extremo amino-terminal, la dirección inversa a la dirección de la síntesis proteica in vivo (Capítulo 27).

R. Bruce Merrifield

TABLA 3-8 Efecto del rendimiento de cada paso sobre el rendimiento global en la síntesis de péptidos

Número de residuos en el polipéptido final	*Rendimiento global del péptido final (%) cuando el rendimiento de cada paso es:*	
	96,0%	*99,8%*
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,7	82

dece al compararla con los procesos biológicos. La misma proteína de 100 aminoácidos sería sintetizada con una fidelidad exquisita en unos 5 segundos por una célula bacteriana.

Diversos métodos nuevos para la ligación eficiente de péptidos han hecho posible la combinación de péptidos sintéticos para formar proteínas mayores. Con estos métodos pueden crearse nuevas formas de proteínas con grupos químicos situados de manera precisa, incluyendo aquellas que pueden no encontrarse fácilmente en las proteínas celulares. Estas nuevas formas proporcionan nuevas maneras de ensayar teorías sobre catálisis enzimática, de crear proteínas con nuevas propiedades químicas y de diseñar secuencias proteicas que se plieguen en determinadas estructuras. Esta última aplicación proporciona la prueba definitiva para nuestra creciente capacidad de relacionar la estructura primaria de un péptido con la estructura tridimensional que adopta en disolución.

La secuencia de aminoácidos proporciona información bioquímica importante

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de una proteína puede proporcionar datos acerca de su estructura tridimensional y función, su localización celular y su evolución. Gran parte de estas deducciones provienen de la búsqueda de similitudes con otras secuencias conocidas. Se conocen actualmente miles de secuencias que están disponibles en bancos de datos accesibles a través de internet. La comparación de una secuencia recién obtenida con este gran banco de secuencias almacenadas revela a menudo relaciones que pueden ser a la vez sorprendentes e iluminadoras.

No se conoce con detalle el modo en que la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional, ni puede predecirse siempre la función a partir de la secuencia. Sin embargo, existen familias de proteínas que tienen algunas características estructurales y funcionales compartidas que pueden identificarse rápidamente sobre la base de la similitud de las secuencias de aminoácidos. Las proteínas individuales se asignan a familias en función del grado de similitud de su secuencia de aminoácidos. Los miembros de una familia son generalmente idénticos en un 25% o más de sus secuencias y las proteínas de estas familias suelen compartir, al menos, algunas características estructurales y funcionales. No obstante, algunas familias se definen por identidades que implican solamente a un pequeño número de residuos aminoácidos que son críticos para alguna función. Diversas subestructuras similares (que se definirán como "dominios" en el Capítulo 4) se hallan presentes en muchas proteínas no relacionadas funcionalmente. Estos dominios se pliegan a menudo dando configuraciones estructurales que tienen un grado de estabilidad excepcional o que están especializadas para un determinado entorno. De las similitudes estructurales y funcionales dentro de las familias de proteínas es posible deducir también relaciones evolutivas.

Ciertas secuencias de aminoácidos sirven con frecuencia de señal que determina la localización celular, la modificación química y la vida media de una proteína. Secuencias señal especiales, normalmente situadas en el extremo amino, son utilizadas para dirigir ciertas proteínas hacia la exportación extracelular, mientras que otras proteínas son dirigidas para su distribución hacia el núcleo, la superficie celular, el citosol y otras localizaciones celulares. Otras secuencias actúan como sitio de anclaje para grupos prostéticos, tales como los grupos azúcar en las glucoproteínas y los lípidos en las lipoproteínas. Algunas de estas señales están bien caracterizadas y son reconocidas fácilmente si se presentan en la secuencia de una proteína recién descubierta (Capítulo 27).

RESUMEN 3.4 Estructura covalente de proteínas

- Las diferencias en la función proteica son el resultado de diferencias en la secuencia y en la composición de aminoácidos. Para una determinada proteína se permiten algunas variaciones en la secuencia sin que la función se vea afectada.
- Las secuencias de aminoácidos se deducen a partir de la fragmentación de los polipéptidos en péptidos más pequeños mediante el uso de reactivos específicos para cierto tipo de enlaces peptídicos, seguida por la determinación de la secuencia de cada fragmento mediante degradación automática de Edman y por la ordenación de la secuencia final mediante la localización de zonas de solapamiento entre fragmentos generados por reactivos diferentes. También es posible deducir la secuencia de las proteína a partir de la secuencia de nucleótidos de su gen correspondiente en el DNA.
- Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas (de hasta 100 residuos aminoácidos). El péptido se construye, residuo a residuo, mientras permanece unido a un soporte sólido.

3.5 Secuencias de proteínas y evolución

La sencilla cadena de letras que denota la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada no refleja la gran cantidad de información contenida en dicha secuencia. Uno de los principales empeños de los bioquímicos ha sido el desarrollo de

métodos cada vez más potentes para la extracción de información a partir del cada vez mayor número de secuencias disponibles. La función de todas las proteínas reside en su estructura tridimensional que, por su parte, viene determinada en gran medida por su estructura primaria. De este modo, la información deducible de una secuencia proteica sólo está limitada por nuestro grado de comprensión de los principios estructurales y funcionales. Desde otra perspectiva, las secuencias de proteínas están empezando a aportar datos acerca de la evolución de las propias proteínas y, en último término, de la evolución de la vida en el planeta.

Las secuencias de proteínas permiten deducir la historia de la vida en la Tierra

La paternidad del campo de la evolución molecular se suele adjudicar a Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, cuyos trabajos de mediados de la década de 1960 fueron pioneros en el uso de secuencias de nucleótidos y proteínas para el estudio de la evolución. El punto de partida es engañosamente simple: si dos organismos están estrechamente emparentados, las secuencias de sus genes y proteínas deberían ser muy similares; las secuencias son cada vez más divergentes al aumentar la distancia evolutiva entre dos organismos. Este punto de vista empezó a dar sus frutos en los años setenta, cuando Carl Woese utilizó secuencias de RNA ribosómico para definir las arquebacterias como un grupo de organismos distintos de otras bacterias y de los eucariotas (véase Fig. 1-4). Las secuencias de proteínas ofrecen la oportunidad de refinar muchísimo la información disponible. Gracias a los proyectos genoma que investigan organismos que abarcan de bacterias a humanos, el número de secuencias disponibles crece a una velocidad enorme. Esta información sirve para trazar la historia biológica; el reto consiste en aprender a leer el jeroglífico genético.

La evolución no ha tomado un camino lineal simple. En cualquier intento de extraer la información evolutiva contenida en secuencias de proteínas abundan las complejidades. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad de una determinada proteína se conservan a lo largo del tiempo evolutivo. Aquellos residuos menos importantes para la función pueden sufrir ciertas variaciones –es decir, puede haber sustituciones de aminoácidos– y estas variaciones pueden proporcionar la información necesaria para trazar el camino evolutivo. Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos no se producen siempre de forma aleatoria. En ciertas posiciones de la estructura primaria, la necesidad de mantener la función puede implicar que tan sólo sean tolerables algunas sustituciones particulares de aminoácidos. Algunas proteínas tienen mayor número de residuos aminoácidos variables que otras. Por ésta y otras razones, las proteínas pueden evolucionar a velocidades distintas.

Otro factor que complica la deducción de la historia evolutiva es la poco frecuente transferencia de un gen o grupo de genes de un organismo a otro, según un proceso que se denomina **transferencia génica lateral.** Los genes transferidos pueden ser bastante similares a los genes de los que procedían en los organismos de partida, mientras que la mayor parte de los demás genes de los mismos dos organismos pueden tener relaciones evolutivas muy distantes. Un ejemplo de transferencia génica lateral se encuentra en la reciente rápida extensión de genes de resistencia a los antibióticos entre las poblaciones bacterianas. Las proteínas procedentes de estos genes transferidos no serían buenos candidatos para el estudio de la evolución bacteriana porque comparten tan sólo una historia evolutiva muy limitada con sus organismos "huésped".

El estudio de la evolución molecular suele centrarse generalmente en familias de proteínas estrechamente relacionadas. En la mayoría de los casos, las familias escogidas tienen funciones esenciales en el metabolismo celular que debieron de estar presentes en la células viables más primitivas, reduciendo de este modo la posibilidad de que hubieran sido introducidas recientemente por transferencia génica lateral. Por ejemplo, una proteína denominada EF-1α está implicada en la síntesis de proteínas en todos los eucariotas. En bacterias se encuentra otra proteína similar, EF-Tu, con la misma función. Las similitudes en secuencia y función indican que EF-1α y EF-Tu son miembros de una familia de proteínas que comparten un ancestro común. Los miembros de las familias de proteínas son **proteínas homólogas** u **homólogos.** Se puede refinar más el concepto de homólogo. Si dos proteínas de una misma familia se encuentran en la misma especie, nos referimos a ellos como **parálogos.** Los homólogos de especies diferentes se denominan **ortólogos** (véase Fig. 1-37). El proceso de reconstrucción de la evolución implica la previa identificación de familias adecuadas de proteínas homólogas para usarlas a continuación en la reconstrucción de los caminos evolutivos.

Los homólogos se identifican utilizando programas de ordenador cada vez más potentes que son capaces de comparar directamente dos o más secuencias seleccionadas o de buscar en voluminosas bases de datos para encontrar parientes evolutivos de una secuencia seleccionada. El proceso de búsqueda electrónica puede imaginarse como el deslizamiento de una secuencia sobre otra hasta que se encuentra el mejor apareamiento. En el alineamiento secuencial se asigna un valor positivo a cada posición en la que los residuos aminoácidos son idénticos –estos valores varían de un programa a otro–, lo que proporciona una medida de la calidad del alineamiento. El procedimiento no está exento de complicaciones. En algunos ca-

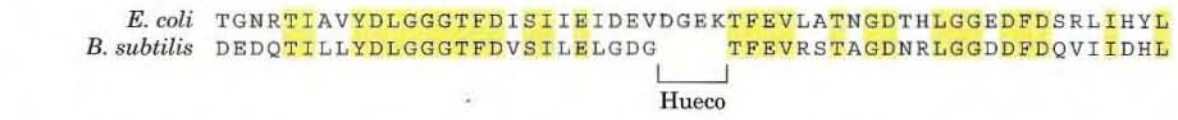


FIGURA 3-30 Alineamiento de secuencias proteicas con el uso de huecos. Se muestra aquí el alineamiento de secuencias de una corta sección de la proteína EF-Tu de dos especies bacterianas, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. La introducción de un hueco en la secuencia de *B. subtilis* permite un mejor alineamiento de los residuos aminoácidos a ambos lados del hueco. Los aminoácidos idénticos están sombreados.

sos las proteínas comparadas se aparean bien, por ejemplo, en dos segmentos secuenciales, mientras que estos segmentos están conectados por secuencias menos relacionadas y de longitudes diferentes. Por tanto, los dos segmentos coincidentes no pueden ser alineados al mismo tiempo. Para salvar este obstáculo, el programa informático introduce "huecos" en una de las secuencias para volver a colocar los segmentos apareables en registro (Fig. 3-30). Como es natural, prácticamente todos los posibles pares de secuencias podrían ser alineados de alguna forma si se introdujera un número de huecos suficiente. Para evitar alineamientos no informativos, los programas incluyen penalizaciones para cada hueco introducido, lo que disminuye el valor o la puntuación del alineamiento global. A través de un proceso de ensayo y error electrónico el programa selecciona el alineamiento con la puntuación óptima que maximiza el número de residuos aminoácidos idénticos, al tiempo que minimiza la introducción de huecos.

Los aminoácidos idénticos resultan a menudo inadecuados para la identificación de proteínas relacionadas o, más importante todavía, para determinar cuán cercanas son las proteínas en una escala de tiempo evolutiva. La consideración de las propiedades químicas de los aminoácidos sustituidos permite establecer un análisis más útil. Muchas de las sustituciones de aminoácidos observadas en una familia de proteínas pueden ser de tipo conservador –es decir, aquellas en las que un residuo aminoácido está reemplazado por otro con propiedades químicas similares–. Por ejemplo, un residuo de Glu puede sustituir en una proteína uno de Asp encontrado en otra proteína de la misma familia; ambos aminoácidos están cargados negativamente. Esta sustitución conservadora debe obtener lógicamente una mayor puntuación en el alineamiento final que otra de tipo no conservador, tal como la sustitución de un residuo de Asp por un residuo hidrofóbico de Phe.

Para determinar qué puntuaciones asignar a todas las posibles sustituciones de aminoácidos, Steven Henikoff y Jorja Henikoff examinaron los alineamientos de un amplio número de proteínas diferentes. No analizaron secuencias enteras sino que se concentraron en miles de bloques cortos conservados en los que la fracción de aminoácidos idénticos era alta y los alineamientos eran por tanto fiables. Observando los bloques secuenciales alineados, los Henikoff analizaron aquellos aminoácidos no idénticos. Adjudicaron mayores puntuaciones a las sustituciones no idénticas que aparecían con mayor frecuencia que a las que lo hacían más raramente. Incluso los residuos idénticos recibieron valores diferentes en virtud de su frecuencia de sustitución, de modo que aquéllos con propiedades químicas únicas (Cys y Trp) recibían puntuaciones mayores que los que eran sustituidos de manera más conservadora (como por ejemplo en el caso de Asp y Glu). El resultado de este sistema de puntuación es una tabla Blosum (*blo*cks *su*bstitution *m*atrix

	A Ala	C Cys	D Asp	E Glu	F Phe	G Gly	H His	I Ile	K Lys	L Leu	M Met	N Asn	P Pro	Q Gln	R Arg	S Ser	T Thr	V Val	W Trp	Y Tyr
A	4	0	−2	−1	−2	0	−2	−1	−1	−1	−1	−2	−1	−1	−1	1	0	0	−3	−2
	C	9	−3	−4	−2	−3	−3	−1	−3	−1	−1	−3	−3	−3	−3	−1	−1	−1	−2	−2
		D	6	2	−3	−1	−1	−3	−1	−4	−3	1	−1	0	−2	0	−1	−3	−4	−3
			E	5	−3	−2	0	−3	1	−3	−2	0	−1	2	0	0	−1	−2	−3	−2
				F	6	−3	−1	0	−3	0	0	−3	−4	−3	−3	−2	−2	−1	1	3
					G	6	−2	−4	−2	−4	−3	0	−2	−2	−2	0	−2	−3	−2	−3
						H	8	−3	−1	−3	−2	1	−2	0	0	−1	−2	−3	−2	2
							I	4	−3	2	1	−3	−3	−3	−3	−2	−1	3	−3	−1
								K	5	−2	−1	0	−1	1	2	0	−1	−2	−3	−2
									L	4	2	−3	−3	−2	−2	−2	−1	1	−2	−1
										M	5	−2	−2	0	−1	−1	−1	1	−1	−1
											N	6	−2	0	0	1	0	−3	−4	−2
												P	7	−1	−2	−1	−1	−2	−4	−3
													Q	5	1	0	−1	−2	−2	−1
														R	5	−1	−1	−3	−3	−2
															S	4	1	−2	−3	−2
																T	5	0	−2	−2
																	V	4	−3	−1
																		W	11	2
																			Y	7

FIGURA 3-31 La tabla Blosum62. Esta tabla de sustitución de bloques se creó comparando miles de bloques cortos de secuencias alineadas que eran idénticas en al menos el 62% de sus residuos aminoácidos. A los residuos no idénticos se les asignaron valores basados en la frecuencia con que eran reemplazados por cada uno de los otros aminoácidos. Cada sustitución contribuye al valor que se da a un alineamiento particular. Los números positivos (sombreados en amarillo) se suman al valor de un alineamiento dado; los números negativos se restan del valor. Los residuos idénticos en las secuencias que se comparan (la diagonal sombreada desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior derecha de la matriz) reciben valores basados en la frecuencia con que son reemplazados, de tal manera que los aminoácidos con propiedades químicas únicas (p. ej., Cys y Trp) reciben valores superiores (9 y 11, respectivamente) que los que son reemplazados más fácilmente por sustituciones conservadoras [p. ej., Asp (6) y Glu (5)]. Muchos programas informáticos utilizan Blosum62 para asignar valores a nuevos alineamientos de secuencias.

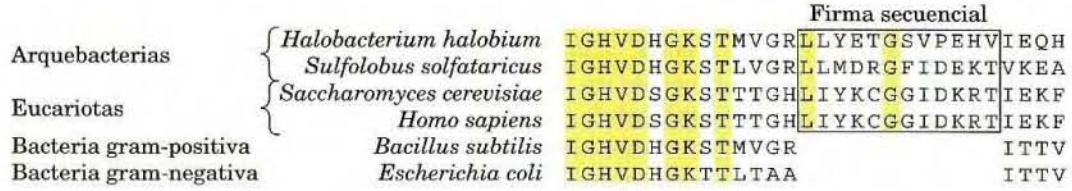


FIGURA 3-32 Una firma secuencial en la familia de las proteínas EF-1a/EF-Tu. La firma secuencial (enmarcada) es una inserción de 12 aminoácidos cerca del extremo amino de la secuencia. Los residuos que se alinean en todas las especies aparecen sombreados en amarillo. Tanto las arquebacterias como los eucariotas tienen la firma, aunque las secuencias de las inserciones son muy distintas para los dos grupos. La variación en la firma secuencial refleja la divergencia evolutiva significativa que ha tenido lugar en este sitio desde que apareció por primera vez en un ancestro común de ambos grupos.

–tabla de sustitución de bloques–). La tabla de la Figura 3-31 se generó a partir de secuencias idénticas en al menos un 62% de los residuos, por lo que se conoce como Blosum62. Se han generado tablas similares para bloques de secuencias homólogas que son idénticas en un 50% o en un 80%. Si se requieren niveles mayores de identidad, es posible sobrerrepresentar las sustituciones más conservadoras, pero ello limita la utilidad de la matriz en la identificación de homólogos cuya relación sea algo distante. Se ha comprobado que la tabla Blosum62 proporciona los alineamientos más fiables en una amplia gama de familias de proteínas y es la tabla rutinariamente más utilizada en muchos programas de alineamiento secuencial.

En la mayoría de los métodos de búsqueda de homologías y exploración de relaciones evolutivas, las secuencias de proteínas (obtenidas por secuenciación directa de la proteína o por secuenciación del DNA que la codifica) son superiores a las secuencias no génicas de ácidos nucleicos (las que no codifican una proteína o un RNA funcional). Para un ácido nucleico, compuesto por cuatro tipos de residuos, un alineamiento al azar de secuencias no homólogas dará generalmente coincidencias en al menos un 25% de las posiciones. La introducción de un limitado número de huecos puede aumentar fácilmente la fracción de residuos coincidentes hasta el 40% o más, con lo que la probabilidad de obtener alineamientos de secuencias no relacionadas aumenta mucho. Los 20 aminoácidos diferentes de las proteínas reducen considerablemente la probabilidad de obtener alineamientos no informativos de este tipo.

Los programas usados para la generación de alineamientos secuenciales se complementan con métodos que comprueban la fiabilidad de esos alineamientos. Un ensayo computerizado habitual consiste en desordenar la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas comparadas con el fin de obtener una secuencia al azar para hacer que a continuación el programa alinee la secuencia así "revuelta" con la otra secuencia no modificada. Se asignan puntuaciones al nuevo alineamiento y se repite el proceso muchas veces. El alineamiento original obtenido antes del desordenamiento de una de las secuencias debería tener una puntuación significativamente mayor que la de cualquiera de los alineamientos hechos con secuencias al azar; con ello, aumenta la confianza de que el alineamiento secuencial haya identificado una pareja de homólogos. Obsérvese que la *ausencia* de una puntuación significativa para un determinado alineamiento no significa necesariamente que no exista una relación evolutiva entre dos proteínas. Tal como veremos en el Capítulo 4, las similitudes en estructura tridimensional ponen a veces de manifiesto relaciones evolutivas en casos en los que la homología secuencial ha sido borrada con el paso del tiempo.

Para realizar estudios evolutivos a partir de una familia de proteínas es necesaria la identificación de miembros de esta familia con funciones similares en la gama más amplia posible de organismos. La información extraída de la familia de proteínas puede usarse para trazar la evolución de esos organismos. A partir del análisis de la divergencia secuencial en familias de proteínas seleccionadas es posible segregar los organismos en clases basadas en su relación evolutiva. Esta información debe ser comparable a la obtenida a partir de los exámenes clásicos sobre la fisiología y la bioquímica de estos organismos.

Es posible encontrar ciertos segmentos de la secuencia de una proteína en organismos de un grupo taxonómico y no en otros grupos; estos segmentos pueden usarse como **firmas secuenciales** del grupo en el que se hallen. Un ejemplo de firma secuencial es la inserción de 12 aminoácidos cerca del extremo N-terminal en las proteínas EF-1α /EF-Tu en todas las arquebacterias y en los eucariotas pero no en otros tipos de bacterias (Fig. 3-32). La firma secuencial es una de las muchas pruebas bioquímicas que pueden ayudar en el establecimiento de las relaciones evolutivas de eucariotas y arquebacterias. Por ejemplo, los principales taxones bacterianos pueden distinguirse mediante firmas secuenciales en varias proteínas diferentes. Las proteobacterias β y γ tienen firmas secuenciales en las familias de las proteínas Hsp70 y DNA girasa (implicadas, respectivamente, en el plegamiento de proteínas y en la replicación del DNA) que no se hallan presentes en ninguna otra bacteria, incluidas otras proteobacterias. Los otros tipos de proteobacterias (α, δ, ε), junto con las proteobacterias β y δ, poseen una firma secuencial distinta en las Hsp70 y otra en la alanil-tRNA sintetasa (un enzima de la síntesis de proteínas) que no se encuentran en otras bacterias. La presencia de firmas secuenciales únicas en las proteobacterias β y γ sugiere que las proteobacterias α, δ y ε aparecieron antes que sus primas β y γ.

Tomando en consideración la totalidad de la secuencia de una proteína, los investigadores pueden ahora construir árboles evolutivos más elaborados que incluyan muchas especies en cada grupo taxonómico. La Figura 3-33 presenta un árbol de este tipo para bacterias, basado en la divergencia secuencial de la proteína GroEL (presente en todas las bacterias y que interviene en el proceso de plegamiento proteico). El árbol puede refinarse en virtud de las secuencias de múltiples proteínas y mediante la adición de datos sobre propiedades

bioquímicas y fisiológicas únicas de cada especie. Existe un gran número de métodos para la generación de árboles, cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes, y muchas maneras de representar las relaciones evolutivas resultantes. En la Figura 3-33 los puntos finales libres de las líneas reciben el nombre de "nodos externos"; cada uno de ellos representa una especie existente, escrita a continuación. Los puntos de intersección de dos líneas, los "nodos internos", representan especies ancestrales extintas. En la mayor parte de representaciones (incluida la Fig. 3-33), las longitudes de las líneas que conectan los nodos son proporcionales al número de sustituciones de aminoácidos que separan una especie de otra. Si podemos asimilar dos especies existentes a un nodo interno común (que representa el ancestro común de las dos especies), la longitud de la rama que conecta el nodo externo con el interno representa el número de sustituciones de aminoácidos que separa cada una de las especies existentes de su ancestro. La suma de las longitudes de todos los segmentos que conectan una especie existente con otra a través de un ancestro común refleja el número de sustituciones que separa las dos especies. El árbol debe calibrarse a través de la comparación con informaciones sobre el registro fósil y otras fuentes con el fin de determinar el tiempo necesario para la divergencia de las diferentes especies.

Al ir disponiendo progresivamente de mayor información secuencial en las bases de datos podemos generar árboles evolutivos basados en una variedad de proteínas diferentes. Algunas proteínas evolucionan más rápido que otras o cambian más rápido en un grupo de especies que en otro. Una proteína de gran tamaño, con muchos residuos variables, puede presentar algunas diferencias incluso entre dos especies estrechamente relacionadas. Otra proteína más pequeña puede ser idéntica al comparar las mismas dos especies. Existen muchas razones para que algunos de los detalles de un árbol evolutivo basado en las secuencias de una proteína difieran de los de un árbol basado en las secuencias de otra proteína. El perfeccionamiento de los análisis mediante el uso de secuencias de muchas proteínas diferentes puede proporcionar una imagen muy detallada y exacta de las relaciones evolutivas. Éste es un proceso en marcha en el que las preguntas que se formulan son fundamentales para definir la forma en que los seres humanos se contemplan a sí mismos y contemplan el mundo que les rodea. El campo de la evolución molecular promete convertirse en una de las fronteras científicas más excitantes del siglo XXI.

RESUMEN 3.5 Secuencias de proteínas y evolución

- Las secuencias de proteínas constituyen una rica fuente de información sobre la estructura y función de las proteínas, así como sobre la evolución de la vida en el planeta. Se están desarrollando métodos refinados para trazar la evolución mediante el análisis de los lentos cambios que se producen en la secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas.

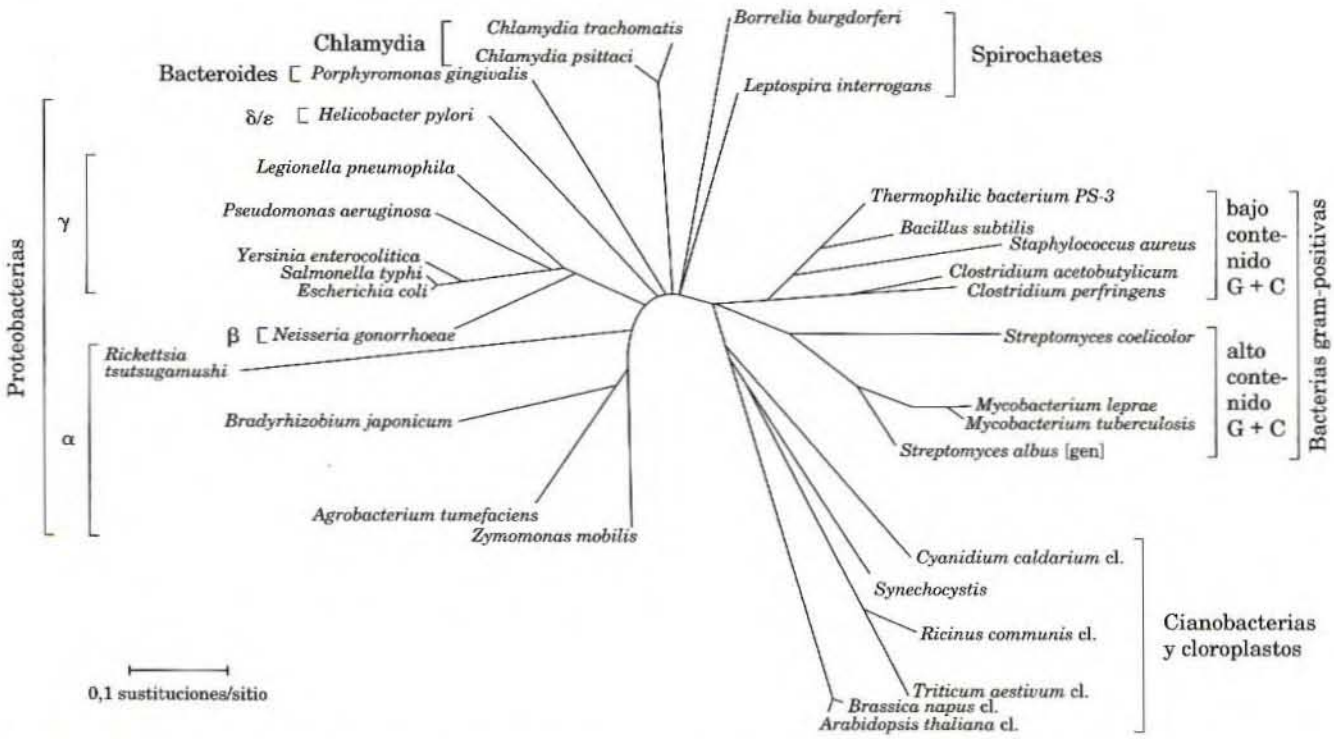


FIGURA 3-33 Árbol evolutivo generado a partir de la comparación de secuencias aminoácidas. Árbol evolutivo bacteriano basado en la divergencia de secuencias observada en la familia de proteínas GroEL. También se incluyen en este árbol (parte inferior derecha) los cloroplastos (cl) de algunas especies no bacterianas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

aminoácidos 75
grupo R 76
centro quiral 76
enantiómeros 76
configuración absoluta 77
sistema D, L 77
polaridad 78
zwitterion 81
absorbancia, *A* 82
pH isoeléctrico (punto isoeléctrico, pI) 84
péptido 85
proteína 85
enlace peptídico 85
oligopéptido 85
polipéptido 85
proteína oligomérica 87
protómero 87
proteína conjugada 88
grupo prostético 88
estructura primaria 88
estructura secundaria 88
estructura terciaria 88
estructura cuaternaria 88
extracto crudo 89
fraccionamiento 89
diálisis 89
cromatografía en columna 89
cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 90
electroforesis 92
dodecil sulfato sódico (SDS) 92
enfoque isoeléctrico 93
degradación de Edman 98
proteasas 99
proteoma 101
transferencia génica lateral 107
proteínas homólogas 107
homólogo 107
parálogo 107
ortólogo 107
firma secuencial 109

Bibliografía

Aminoácidos

Dougherty, D.A. (2000) Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4,** 645–652.

Greenstein, J.P. & Winitz, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids,* 3 vols., John Wiley & Sons, New York.

Kreil, G. (1997) D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 337–345.
Una revisión sobre la presencia de estos estereoisómeros poco corrientes de los aminoácidos.

Meister, A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids,* 2.ª ed., vols. 1 y 2, Academic Press, Inc., New York.
Tratado enciclopédico de las propiedades, presencia natural y metabolismo de los aminoácidos.

Péptidos y proteínas

Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties,* 2.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.
Una fuente de uso general muy útil.

Trabajar con proteínas

Dunn, M.J. & Corbett, J.M. (1996) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **271,** 177–203.
Una descripción detallada de la tecnología.

Kornberg, A. (1990) Why purify enzymes? *Methods Enzymol.* **182,** 1–5.
El papel crítico de los métodos bioquímicos clásicos en una nueva era.

Scopes, R.K. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice,* 3.ª ed., Springer-Verlag, New York.
Una buena fuente para descripciones más completas de los principios que subyacen a los métodos cromatográficos y otros métodos.

Estructura covalente de las proteínas

Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B. & Verlander, M. (2000) Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* **55,** 227–250.
Discusión sobre los métodos usados para la fabricación de péptidos con propiedades farmacéuticas.

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* **291,** 2351–2356.
Las glucoproteínas pueden ser complejas; la espectrometría de masas es el método más adecuado para analizarlas.

Dongre, A.R., Eng, J.K. & Yates, J.R. III (1997) Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends Biotechnol.* **15,** 418–425.
Una descripción detallada de los métodos de espectrometría de masas.

Gygi, S.P. & Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4,** 489–494.
El uso de la espectrometría de masas para la identificación y el estudio de proteínas celulares.

Koonin, E.V., Tatusov, R.L. & Galperin, M.Y. (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8,** 355–363.
Una buena discusión sobre los posibles usos de la enorme cantidad de información de secuencias proteicas que se está acumulando.

Mann, M. & Wilm, M. (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20,** 219–224.
Un resumen de esta técnica abordable para principiantes.

Mayo, K.H. (2000) Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* **18,** 212–217.

Miranda, L.P. & Alewood, P.F. (2000) Challenges for protein chemical synthesis in the 21st century: bridging genomics and proteomics. *Biopolymers* **55,** 217–226.

Este artículo y el de Mayo describen cómo sintetizar péptidos y combinarlos con el fin de disponer de herramientas para estudiar un gran número de problemas bioquímicos.

Sanger, F. (1988) Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* **57,** 1–28.

Un ameno relato histórico sobre el desarrollo de los métodos de secuenciación.

Secuencias de proteínas y evolución

Gupta, R.S. (1998) Protein phylogenies and signal sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among Archaebacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62,** 1435–1491.

Una descripción casi enciclopédica, aunque de agradable lectura, del uso de las secuencias de proteínas en la investigación de la evolución, con la introducción de muchas ideas interesantes y basada en detalladas comparaciones secuenciales.

Li, W.-H. & Graur, D. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution,* 2.ª ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Un texto de fácil lectura en el que se describen las metodologías usadas en el análisis de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos. El Capítulo 5 proporciona una de las mejores descripciones existentes sobre la construcción de árboles evolutivos a partir de datos secuenciales.

Rokas, A., Williams, B.L., King, N. & Carroll, S.B. (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425,** 798–804.

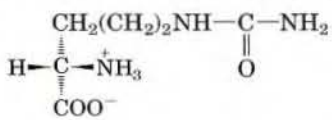
La manera en que la comparación de secuencias de múltiples proteínas puede generar información evolutiva precisa.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8,** 357–366.

Considerado por muchos el artículo fundacional en el campo de la evolución molecular.

Problemas

1. Configuración absoluta de la citrulina La citrulina aislada de la sandía tiene la estructura que se muestra a continuación. ¿Es un aminoácido D o L? Explique por qué.



2. Relación entre la curva de titulación y las propiedades ácido-base de la glicina Una solución de 100 mL de glicina 0,1 M a pH 1,72 se tituló con una solución de NaOH 2 M. Se registró el pH y los resultados se representaron en una gráfica, tal como se muestra a la derecha. Los puntos clave de la titulación se señalan como I a V. Para cada una de las afirmaciones siguientes, (a) a (o), *identifique* el punto clave adecuado de la titulación y *justifique* su elección.

(a) La glicina está presente predominantemente en la forma $^{+}H_3N{-}CH_2{-}COOH$.

(b) La carga neta *media* de la glicina es $+\frac{1}{2}$.

(c) La mitad de los grupos amino están ionizados.

(d) El pH es igual al pK_a del grupo carboxilo.

(e) El pH es igual al pK_a del grupo amino protonado.

(f) La glicina tiene su máxima capacidad tamponante.

(g) La carga neta *media* de la glicina es igual a cero.

(h) El grupo carboxilo ha sido completamente titulado (primer punto de equivalencia).

(i) La glicina está totalmente titulada (segundo punto de equivalencia).

(j) La especie predominante es $^{+}H_3N{-}CH_2{-}COO^{-}$.

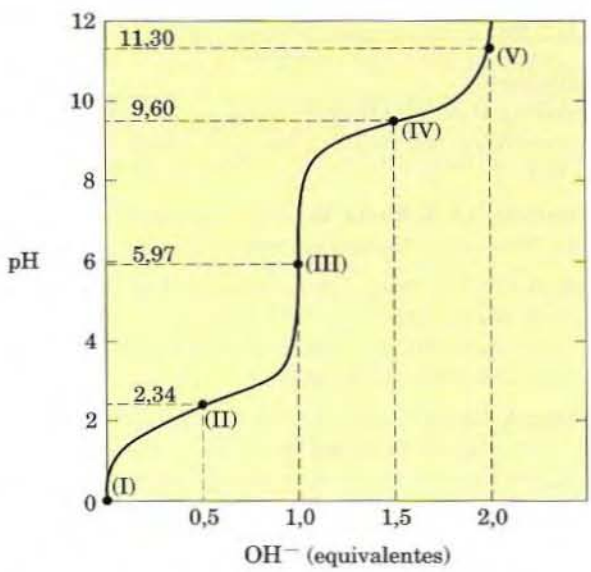
(k) La carga neta *media* de la glicina es −1.

(l) La glicina está presente predominantemente como una mezcla 50:50 de $^{+}H_3N{-}CH_2{-}COOH$ y $^{+}H_3N{-}CH_2{-}COO^{-}$.

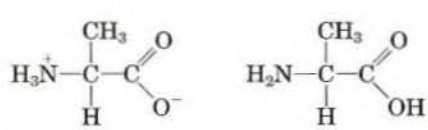
(m) Corresponde al punto isoeléctrico.

(n) Corresponde al final de la titulación.

(o) Representan las *peores* regiones de pH en cuanto al poder tamponante.



3. ¿Cuanta alanina está presente como especie completamente sin carga? A un pH igual a su punto isoeléctrico, la carga neta de la alanina es cero. Se pueden dibujar dos estructuras con una carga neta de cero, pero la forma predominante de la alanina a su pI es zwitteriónica.



Zwitteriónica Sin carga

(a) ¿Por qué es la alanina predominantemente zwitteriónica y no completamente sin carga en su pI?

(b) ¿Qué fracción de alanina está presente en su pI como forma completamente sin carga? Justifique sus suposiciones.

4. Estado de ionización de los aminoácidos Cada grupo ionizable de un aminoácido puede existir en uno de dos estados posibles, cargado o neutro. La carga eléctrica del grupo funcional viene determinada por la relación entre su pK_a y el pH de la solución. Esta relación viene descrita por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

(a) La histidina tiene tres grupos funcionales ionizables. Escriba las ecuaciones de equilibrio pertinentes para sus tres ionizaciones y asigne el pK_a adecuado de cada ionización. Dibuje las estructuras de la histidina en cada estado de ionización. ¿Cuál es la carga neta de la molécula de histidina en cada estado de ionización?

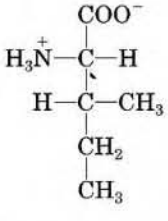
(b) Dibuje las estructuras de los estados de ionización de la histidina predominantes a pH 1, 4, 8 y 12. Observe que el estado de ionización puede obtenerse de forma aproximada tratando independientemente cada grupo ionizable.

(c) ¿Cuál es la carga neta de la histidina a pH 1, 4, 8 y 12? Cuando se coloca en un campo eléctrico a cada uno de estos valores de pH, ¿se desplazará la histidina hacia el ánodo (+) o hacia el cátodo (−)?

5. Separación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico El análisis de mezclas de aminoácidos empieza separando la mezcla en sus componentes mediante cromatografía de intercambio iónico. En una columna con una resina de intercambio catiónico que contiene grupos sulfonados (véase Fig. 3-18a) los aminoácidos fluyen a través de la columna a diferente velocidad debido a dos factores que influyen sobre su movimiento: (1) la atracción iónica entre los residuos $—SO_3^-$ de la columna y grupos funcionales cargados positivamente en los aminoácidos y (2) las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos y el esqueleto fuertemente hidrofóbico de la resina de poliestireno. Para cada par de aminoácidos señalados, determine cuál eluirá antes en una columna de intercambio iónico con un tampón a pH 7,0.

(a) Asp y Lys
(b) Arg y Met
(c) Glu y Val
(d) Gly y Leu
(e) Ser y Ala

6. Nomenclatura de los estereoisómeros de la isoleucina La estructura del aminoácido isoleucina es:



(a) ¿Cuántos centros quirales tiene?
(b) ¿Cuántos isómeros ópticos?
(c) Dibuje fórmulas de perspectiva de todos los isómeros ópticos de la isoleucina.

7. Comparación de los valores de pK_a de la alanina y polialanina La curva de titulación de la alanina muestra la ionización de dos grupos funcionales con valores de pK_a de 2,34 y 9,69, correspondientes a la ionización de los grupos carboxilo y amino protonado, respectivamente. La titulación de di-, tri- y oligopéptidos mayores de la alanina también muestra la ionización de sólo dos grupos funcionales, aunque los valores experimentales de pK_a son diferentes. La tendencia de los valores de pK_a se resume en la tabla.

Aminoácido o péptido	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala-Ala	3,12	8,30
Ala-Ala-Ala	3,39	8,03
Ala-$(Ala)_n$-Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

(a) Dibuje la estructura de Ala-Ala-Ala. Identifique los grupos funcionales asociados con pK_1 y pK_2.

(b) ¿Por qué *aumenta* el valor de pK_1 en cada adición de un residuo de Ala al oligopéptido de Ala?

(c) ¿Por qué *disminuye* el valor de pK_2 en cada adición de un residuo de Ala al oligopéptido de Ala?

8. Tamaño de las proteínas ¿Cuál es la masa molecular aproximada de una proteína de 682 residuos aminoácidos en una única cadena polipeptídica?

9. Número de residuos de triptófano en la albúmina de suero bovino Un análisis cuantitativo de aminoácidos indica que la albúmina de suero bovino (BSA) contiene 0,58% en peso de triptófano (M_r 204).

(a) Calcule la masa molecular *mínima* de la BSA (es decir, suponiendo que haya un solo residuo de triptófano por molécula de proteína).

(b) La filtración en gel de la BSA da una estimación de masa molecular de unos 70.000. ¿Cuántos residuos de triptófano hay en una molécula de albúmina de suero?

10. Carga eléctrica neta de los péptidos Un péptido tiene la secuencia

Glu–His–Trp–Ser–Gly–Leu–Arg–Pro–Gly

(a) ¿Cuál es la carga neta de la molécula a pH 3, 8 y 11? (Utilize los valores de pK_a para las cadenas laterales y grupos amino- y carboxilo-terminales dados en la Tabla 3-1.)

(b) Estime el pI de este péptido.

11. Punto isoeléctrico de la pepsina Se da el nombre de pepsina a varios enzimas digestivos secretados (en forma de proteínas precursoras mayores) por las glándulas que recubren el estómago. Estas glándulas secretan también ácido clorhídrico, que disuelve la materia en forma de partículas de la comida, permitiendo a la pepsina cortar enzimáticamente moléculas de proteína individuales. La mezcla resultante de comida, HCl y enzimas digestivos se denomina quimo y tiene un pH cercano a 1,5. ¿Qué pI predeciría para las proteínas de tipo pepsina? ¿Qué grupos funcionales han de estar presentes para proporcionar este pI a la pepsina? ¿Qué aminoácidos pueden aportar tales grupos a las proteínas?

12. Punto isoeléctrico de las histonas Las histonas son proteínas que se encuentran en el núcleo de las células eucarióticas, fuertemente unidas al DNA, el cual tiene muchos grupos fosfato. El pI de las histonas es muy elevado, de alrededor de 10,8. ¿Qué residuos aminoácidos deben estar presentes en número relativamente elevado en las histonas? ¿En qué forma contribuyen estos residuos a la fuerte unión entre las histonas y el DNA?

13. Solubilidad de los polipéptidos Un método utilizado en la separación de polipéptidos se basa en sus solubilidades diferenciales. La solubilidad en agua de los polipéptidos grandes depende de la polaridad relativa de sus grupos R, especialmente del número de grupos ionizados: cuantos más grupos ionizados haya, más soluble será el polipéptido. De los pares de polipéptidos siguientes, ¿cuál es más soluble al pH indicado?

(a) $(Gly)_{20}$ o $(Glu)_{20}$ a pH 7,0
(b) $(Lys\text{-}Ala)_3$ o $(Phe\text{-}Met)_3$ a pH 7,0
(c) $(Ala\text{-}Ser\text{-}Gly)_5$ o $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ a pH 6,0
(d) $(Ala\text{-}Asp\text{-}Gly)_5$ o $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ a pH 3,0

14. Purificación de un enzima Un bioquímico descubre y purifica un enzima nuevo generando la siguiente tabla de purificación:

Procedimiento	*Proteína total (mg)*	*Actividad (unidades)*
1. Extracto crudo	20.000	4.000.000
2. Precipitación (sal)	5.000	3.000.000
3. Precipitación (pH)	4.000	1.000.000
4. Cromatografía de intercambio iónico	200	800.000
5. Cromatografía de afinidad	50	750.000
6. Cromatografía de exclusión molecular	45	675.000

(a) A partir de la información dada en la tabla, calcule la actividad específica de la solución enzimática después de cada procedimiento de purificación.

(b) ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con este enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento en pureza)?

(c) ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?

(d) ¿Hay alguna indicación en los resultados de esta tabla de que el enzima sea ya puro tras el paso 6? ¿Qué más se podría hacer para estimar la pureza de la preparación enzimática?

15. Determinación de la secuencia del péptido cerebral leucina-encefalina A partir de tejido cerebral normal se ha aislado un grupo de péptidos que influyen sobre la transmisión nerviosa en ciertas partes del cerebro. Estos péptidos se conocen como opioides debido a que se fijan a receptores que se unen también a drogas opiáceas, tales como la morfina o la naloxona. De este modo los opioides imitan algunas de las propiedades de los opiáceos. Algunos investigadores consideran que estos péptidos son los inhibidores del dolor propios del cerebro. Utilizando la información que se da a continuación, determine la secuencia de aminoácidos del opioide leucina-encefalina. Explique por qué su estructura está de acuerdo con todos los datos aportados.

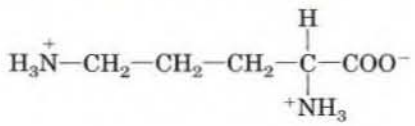
(a) La hidrólisis completa por HCl 6M a 110 °C seguida de análisis de aminoácidos indica la presencia de Gly, Leu, Phe y Tyr en una proporción molar 2:1:1:1.

(b) El tratamiento del péptido con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno seguido de hidrólisis completa y cromatografía indicó la presencia del 2,4-dinitrofenil derivado de la tirosina. No se encontró tirosina libre.

(c) La digestión completa del péptido con pepsina seguida de cromatografía dio lugar a un dipéptido que contenía Phe y Leu, más un tripéptido que contenía Tyr y Gly en una proporción 1:2.

16. Estructura de un antibiótico peptídico de *Bacillus brevis* Los extractos de la bacteria *Bacillus brevis* contienen un péptido con propiedades antibióticas. Este péptido forma complejos con iones metálicos y, aparentemente, interfiere en el transporte iónico a través de las membranas celulares de ciertas especies bacterianas matándolas. La estructura del péptido se ha determinado a partir de las siguientes observaciones.

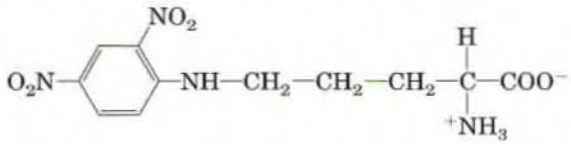
(a) La hidrólisis ácida completa del péptido seguida de análisis de aminoácidos produce cantidades equimoleculares de Leu, Orn, Phe, Pro y Val. Orn es ornitina, un aminoácido que no se halla presente en las proteínas pero que se encuentra en algunos péptidos. Tiene la estructura



(b) La masa molecular del péptido se calculó en alrededor de 1200.

(c) Cuando se trató con el enzima carboxipeptidasa, el péptido no experimentó hidrólisis alguna. Este enzima cataliza la hidrólisis del residuo carboxilo-terminal de un polipéptido a menos que el residuo sea Pro o por alguna razón no contenga un grupo carboxilo libre.

(d) El tratamiento del péptido intacto con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, seguido de hidrólisis completa y cromatografía, dio sólo aminoácidos libres y el siguiente derivado:



(Sugerencia: observe que el 2,4-dinitrofenil derivado implica el grupo amino de una cadena lateral y no el grupo α-amino.)

(e) La hidrólisis parcial del péptido seguida de separación cromatográfica y análisis de secuencia dio lugar a los di- y tripéptidos siguientes (el aminoácido amino-terminal siempre se encuentra a la izquierda):

Leu–Phe Phe–Pro Orn–Leu Val–Orn
Val–Orn–Leu Phe–Pro–Val Pro–Val–Orn

Dada la información anterior, deduzca la secuencia de aminoácidos del antibiótico peptídico. Exponga sus razonamientos. Cuando haya llegado a una estructura, demuestre que es coherente con *cada una* de las observaciones experimentales.

17. Eficiencia en la secuenciación de péptidos Un péptido con la estructura primaria Lys-Arg-Pro-Leu-Ile-Asp-Gly-Ala se secuencia por el procedimiento de Edman. Si cada ciclo de Edman tuviera una eficiencia del 96%, ¿qué porcentaje de los aminoácidos liberados en el cuarto ciclo sería leucina? Haga el cálculo de nuevo, suponiendo en esta ocasión una eficiencia del 99% para cada ciclo.

18. Protocolos de bioquímica: su primera purificación de proteína Siendo el estudiante más nuevo y menos experimentado de un laboratorio de investigación bioquímica,

usted pasa sus primeras semanas lavando material de vidrio y etiquetando tubos de ensayo. A continuación se gradúa para preparar tampones y soluciones madre para su utilización en diversos procedimientos de laboratorio. Finalmente, le dan la responsabilidad de purificar una proteína. Se trata de un enzima del ciclo del ácido cítrico, la citrato sintasa, localizado en la matriz mitocondrial. Siguiendo un protocolo de purificación, lleva a cabo los pasos que se explican a continuación. A lo largo del trabajo, un estudiante con más experiencia le pregunta acerca de la base de cada procedimiento. Dele las respuestas. (Sugerencia: lea en el Capítulo 2 información sobre la osmolaridad; consulte en la p. 6 información sobre la separación de orgánulos de células.)

(a) Recoge 20 kg de corazón de buey en un matadero cercano. Transporta los corazones en hielo y realiza todos los pasos de la purificación en una cámara fría o sobre hielo. Homogeneiza el tejido de los corazones de buey en un medio que contiene sacarosa 0,2 M, tamponado a pH 7,2. *¿Por qué utiliza tejido de corazón de buey y en tan gran cantidad? ¿Cuál es el propósito de mantener el tejido frío y suspenderlo en sacarosa 0,2 M, a pH 7,2? ¿Qué le pasa al tejido al homogenarlo?*

(b) Somete el homogenado de corazón resultante, que es denso y opaco, a una serie de pasos de centrifugación diferencial. *¿Qué consigue con esto?*

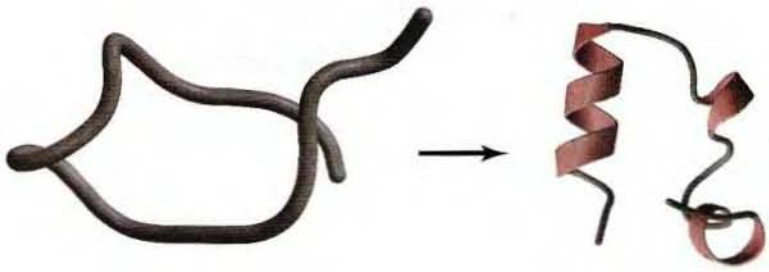
(c) Prosigue con la purificación utilizando la fracción del sobrenadante que contiene mayoritariamente mitocondrias intactas. A continuación lisa osmóticamente las mitocondrias. El lisado, que es menos denso que el homogenado, pero aún opaco, consiste principalmente en membranas mitocondriales y el contenido interno de las mitocondrias. Añade sulfato amónico al lisado, una sal muy soluble, a una concentración determinada. Centrifuga la solución, decanta el sobrenadante y descarta el sedimento. Añade *más* sulfato amónico al sobrenadante, que es más transparente que el lisado. Centrifuga una vez más la muestra, pero esta vez se queda con el sedimento, puesto que contiene la proteína de interés. *¿Cuál es la lógica que aconseja la adición de sal en dos pasos?*

(d) Solubiliza el sedimento de sulfato amónico que contiene las proteínas mitocondriales y lo dializa a lo largo de una noche frente a volúmenes grandes de una solución tamponada (pH 7,2). *¿Por qué no incluye sulfato amónico en el tampón de diálisis? ¿Por qué utiliza solución tamponada en lugar de agua?*

(e) Pasa la solución dializada a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular. Siguiendo el protocolo, recoge la *primera* fracción de proteína que sale de la columna y descarta el resto de fracciones que eluyen de la columna posteriormente. Detecta la proteína midiendo la absorción en el UV (a 280 nm) de las fracciones. *¿Qué le dice sobre la proteína el hecho de recoger la primera fracción? ¿Por qué es la absorción en el UV a 280 nm una buena forma de seguir la presencia de proteína en las fracciones eluidas?*

(f) Coloca la fracción recogida en (e) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico. Después de descartar la fracción inicial que sale de la columna, añade una solución de lavado de pH mayor a la columna y recoge la fracción proteica que eluye inmediatamente. *Explique lo que está haciendo.*

(g) Analiza una pequeña muestra de su fracción, que ahora tiene un volumen muy reducido y es bastante transparente (aunque teñida de rosa), en un gel de enfoque isoeléctrico. Cuando se tiñe, el gel muestra tres bandas finas. De acuerdo con el protocolo, la proteína de interés es la que tiene un pI de 5,6, pero decide realizar otro ensayo de la pureza de la proteína. Corta la banda de pI 5,6 y la somete a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La proteína se resuelve como una única banda. *¿Por qué no estaba seguro de la pureza de la banda de proteína "única" en su gel de enfoque isoeléctrico? ¿Qué le dicen los resultados del gel con SDS? ¿Por qué es importante realizar la electroforesis en gel con SDS* después *del enfoque isoeléctrico?*



capítulo 4

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS

4.1 Visión general sobre la estructura proteica *116*
4.2 Estructura secundaria de las proteínas *120*
4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas *125*
4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas *147*

Posiblemente, las características más notables de [la mioglobina] sean su complejidad y su ausencia de simetría. Su disposición en el espacio parece carecer casi completamente de cualquiera de las regularidades que uno podría anticipar instintivamente y resulta más complicada de lo predicho por cualquiera de las teorías sobre estructura de proteínas.

—*John Kendrew*, artículo en Nature, 1958

El esqueleto covalente de una proteína típica se compone de centenares de enlaces individuales. Dado que es posible la rotación libre alrededor de muchos de estos enlaces, las proteínas pueden adoptar un número ilimitado de conformaciones. Sin embargo, cada proteína tiene una función química o estructural específica, lo que sugiere que cada proteína posee una estructura tridimensional única (Fig. 4-1). A finales de los años veinte se habían cristalizado varias proteínas, entre ellas la hemoglobina (M_r 64.500) y el enzima ureasa (M_r 483.000). Dado que las series ordenadas de moléculas en un cristal sólo se pueden formar cuando las unidades moleculares que componen el cristal son idénticas, el simple hecho de que muchas proteínas puedan cristalizar es una prueba muy importante de que incluso las proteínas muy grandes son entidades químicas discretas con una estructura única. Esta conclusión revolucionó el pensamiento vigente acerca de las proteínas y sus funciones.

En este capítulo exploraremos la estructura tridimensional de las proteínas poniendo énfasis en cinco temas. En primer lugar, la estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos. En segundo lugar, la función de una proteína depende de su estructura. En tercer lugar, una proteína aislada adopta generalmente una única forma estructural o un pequeño número de ellas. En cuarto lugar, las fuerzas más importantes que estabilizan la estructura específica de una proteína son interacciones no covalentes. Por último, dentro del gran número de estructuras proteicas únicas, es posible reconocer algunos patrones estructurales comunes que nos ayudan a organizar nuestro conocimiento sobre la arquitectura de las proteínas.

Estos temas no deben entenderse en el sentido de que las proteínas tengan estructuras tridimensionales estáticas e invariables. La función de una proteína a menudo impone una interconversión entre dos o más formas estructurales. En los Capítulos 5 y 6 se abordarán los aspectos dinámicos de la estructura de las proteínas.

La relación existente entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de una proteína constituye un intrincado rompecabezas que se va solucionando gradualmente mediante el uso de la técnicas de la bioquímica moderna. La comprensión de la estructura es, a su vez, esencial para la discusión de la función en los próximos capítulos. Podemos encontrar y entender los patrones dentro del laberinto bioquímico de la estructura de las proteínas aplicando los principios fundamentales de la química y la física.

4.1 Visión general sobre la estructura proteica

Se denomina **conformación** a la disposición espacial de los átomos de una proteína. La posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. Un cambio de conformación puede ser, por ejemplo, el resultado de la rotación alrededor de enlaces sencillos. De entre las numerosas conformaciones teóricamente posibles para una proteína que con-

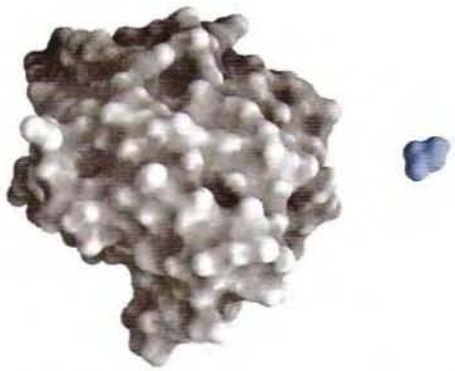


FIGURA 4-1 Estructura del enzima quimotripsina, una proteína globular. Las proteínas son moléculas grandes y, tal como veremos, cada una tiene una estructura única. Se muestra también una molécula de glicina (azul) para la comparación de tamaños. Las estructuras tridimensionales conocidas de proteínas se almacenan en el Protein Data Bank o PDB (www.rcsb.org/pdb). Cada estructura tiene asignado un identificador de cuatro dígitos único, denominado ID del PDB. Allí donde sea necesario, proporcionaremos los ID del PDB para obtener imágenes moleculares de las figuras. La imagen que se muestra aquí se elaboró utilizando el archivo 6GCH del PDB. Los datos de los archivos PDB contienen una serie de coordenadas que detallan la localización de los átomos y su conectividad. Para la visualización de las imágenes son necesarios programas gráficos de uso fácil tales como RasMol o Chime, que convierten las coordenadas en una imagen y permiten que el usuario manipule la estructura en tres dimensiones. Encontrará instrucciones para instalar Chime en las tutorías sobre estructura en el sitio web del libro de texto (www.whfreeman.com/lehninger). El sitio web del PDB contiene instrucciones para la descarga de otros visualizadores. Animamos a todos los estudiantes a que aprovechen los medios puestos a su disposición por el PDB y por los programas gratuitos de gráficos moleculares.

tiene cientos de enlaces sencillos, hay una o, más generalmente, unas pocas, que predominan en condiciones biológicas. La necesidad de la existencia de múltiples conformaciones estables refleja los cambios que deben producirse en la mayor parte de proteínas cuando se unen a otras moléculas o catalizan reacciones. Las conformaciones existentes en unas condiciones determinadas son generalmente las más estables termodinámicamente y las que poseen la menor energía libre de Gibbs (G). Las proteínas que se encuentran en cualquiera de sus conformaciones funcionales y plegadas se denominan proteínas **nativas.**

¿Qué principios determinan cuáles son las conformaciones más estables de una proteína? El conocimiento de la conformación de una proteína puede construirse paso a paso a partir de la discusión sobre la estructura primaria del Capítulo 3 y mediante la consideración de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. A este enfoque tradicional se debe añadir un nuevo énfasis sobre las estructuras supersecundarias, un conjunto creciente de patrones conocidos y clasificables de plegamiento de proteínas que proporciona un importante contexto de organización a este complejo esfuerzo. Empezaremos por establecer algunos principios indicadores.

La conformación de una proteína está estabilizada principalmente por interacciones débiles

En el contexto de la estructura de proteínas, el término **estabilidad** se puede definir como la tendencia a mantener la conformación nativa. Las proteínas nativas sólo son marginalmente estables. La ΔG entre los estados plegado y desplegado de proteínas típicas en condiciones fisiológicas se encuentra en el intervalo de tan sólo 20 a 65 kJ/mol. Una cadena polipeptídica determinada puede adoptar teóricamente incontables conformaciones diferentes, lo que hace que su estado desplegado se caracterice por un alto valor de la entropía conformacional. Este valor de la entropía, junto con las interacciones por enlace de hidrógeno de muchos grupos de la cadena polipeptídica con el disolvente (agua), tiende a favorecer el mantenimiento del estado desplegado. Entre las interacciones químicas que contrarrestan estos efectos y estabilizan la conformación nativa se incluyen los enlaces disulfuro y las interacciones débiles (no covalentes) descritas en el Capítulo 2: enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas. La consideración del papel de estas interacciones débiles es especialmente importante para comprender de qué modo son capaces de plegarse las cadenas polipeptídicas adoptando estructuras secundarias y terciarias específicas y de combinarse con otros polipéptidos para formar estructuras cuaternarias.

La rotura de un solo enlace covalente requiere cerca de 200 a 460 kJ/mol, mientras que las interacciones débiles pueden romperse con simplemente 4 a 30 kJ/mol. Los enlaces covalentes individuales que contribuyen a las conformaciones nativas de proteínas, tales como los enlaces disulfuro que unen partes separadas de una única cadena polipeptídica, son claramente mucho más fuertes que las interacciones débiles individuales. Sin embargo, al ser tan numerosas, las interacciones débiles son las que predominan como fuerza estabilizadora de la estructura de las proteínas. En general, la conformación proteica de menor energía libre (es decir, la más estable) es aquella que posee el mayor número de interacciones débiles.

La estabilidad de una proteína no es únicamente el resultado de la suma de las energías libres de formación de las muchas interacciones débiles de su interior. Cada uno de los grupos que forman los enlaces de hidrógeno en una cadena polipeptídica plegada se encontraba unido por puente de hidrógeno con el agua antes del plegamiento y para cada enlace de hidrógeno formado en una proteína ha debido romperse otro enlace de hidrógeno (de fuerza similar) entre el mismo grupo y el agua. La contribución en estabilidad neta de una interacción débil, o la *diferencia* en energía libre entre el estado plegado y el desplegado, puede ser cercana a cero. Debemos buscar, pues, otras explicaciones para saber por qué la conformación nativa de una proteína se encuentra favorecida.

La contribución de las interacciones débiles a la estabilidad de las proteínas puede entenderse a partir de la consideración de las propiedades del agua (Capítulo 2). El agua pura contiene una red de moléculas de H_2O unidas por puentes de hidrógeno. Ninguna otra molécula tiene el potencial de forma-

ción de enlaces de hidrógeno que tiene agua y otras moléculas presentes en una solución acuosa rompen los enlaces de hidrógeno del agua. La optimización de los enlaces de hidrógeno alrededor de una molécula hidrofóbica en medio acuoso forma una **capa de solvatación** de agua altamente estructurada en su inmediata proximidad. El incremento del orden de las moléculas de agua en la capa de solvatación tiene como consecuencia un descenso desfavorable en la entropía del agua. Sin embargo, cuando los grupos hidrofóbicos se agrupan se reduce esta capa de solvatación al no ofrecer cada uno de los grupos su entera superficie a la disolución. Como resultado de ello se produce un aumento favorable de la entropía. Como se decía en el Capítulo 2, el término entrópico es la principal fuerza motora termodinámica de la asociación de grupos hidrofóbicos en solución acuosa. Por esta razón, las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos tienden a empaquetarse en el interior de la proteína, evitando su interacción con el agua.

En condiciones fisiológicas la formación de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas en una proteína son también procesos dirigidos en gran medida por el mismo efecto entrópico. Los grupos polares pueden formar normalmente enlaces de hidrógeno con el agua y son solubles en ella. Sin embargo, el número de puentes de hidrógeno por unidad de masa es generalmente mayor en el agua pura que en cualquier otro líquido o disolución, por lo que existen límites a la solubilidad de incluso las moléculas más polares, a causa de la disminución neta de enlaces de hidrógeno por unidad de masa que se produce cuando están presentes. En consecuencia, y hasta cierto punto, también alrededor de las moléculas polares se formará una capa de solvatación de agua estructurada. A pesar de que la energía de formación de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas intramoleculares entre dos grupos polares de una macromolécula se compensa en gran parte por la eliminación de las interacciones entre estos mismos grupos y el agua, la desestructuración del agua al producirse la interacción intramolecular proporciona una fuerza entrópica impulsora del plegamiento. La variación neta de energía libre que se produce al formarse interacciones débiles en el interior de las proteínas es mayoritariamente una consecuencia del aumento de entropía en la solución acuosa circundante debido a la interiorización de superficies hidrofóbicas. Esto contrarresta con creces la gran pérdida de entropía conformacional cuando el polipéptido queda limitado a una única conformación plegada.

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel especialmente importante en la estabilización de la conformación de las proteínas; el interior de una proteína es generalmente un núcleo densamente empaquetado de cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos. También es importante que cualquier grupo polar o cargado situado en el interior de la proteína tenga cerca otros grupos adecuados para el establecimiento de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas. La contribución de un enlace de hidrógeno a la estabilidad de la estructura nativa parece pequeña, pero la presencia de grupos con potencial de formación de puente de hidrógeno o de grupos cargados sin la pareja adecuada en el interior hidrofóbico de la proteína puede ser tan *desestabilizante* que las conformaciones que los contienen son a menudo imposibles de adoptar termodinámicamente. La variación favorable de energía libre debida a la combinación de este grupo con otro de la solución externa puede ser mayor que la diferencia de energía libre entre los estados plegado y desplegado. Además, los enlaces de hidrógeno entre grupos de la proteína actúan cooperativamente. La formación de un enlace de hidrógeno facilita la formación de otros enlaces de hidrógeno. Aún se está evaluando cuál es la contribución global de los enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes a la estabilización de la conformación de una proteína. La interacción entre grupos de carga opuesta que forman un par iónico (puente salino) también tiene efectos estabilizantes sobre una o más conformaciones nativas de algunas proteínas.

La mayor parte de los modelos estructurales esbozados a lo largo de este capítulo son reflejo de dos reglas simples: (1) los residuos hidrofóbicos se encuentran mayoritariamente sepultados en el interior de la proteína, lejos del contacto con el agua, y (2) se forma el mayor número posible de enlaces de hidrógeno dentro de la proteína. Las proteínas insolubles y las que se localizan en membranas (analizadas en el Capítulo 11) siguen reglas ligeramente diferentes a causa de la función que realizan o del entorno en el que se encuentran, pero las interacciones débiles son también en estos casos elementos estructurales de importancia crítica.

El enlace peptídico es plano y rígido

Arquitectura de proteínas – Estructura primaria Los enlace covalentes también imponen límites importantes a las posibles conformaciones de un polipéptido. A finales de la década de 1930, Linus Pauling y Robert Corey iniciaron una serie de estudios que sentaron las bases de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura proteica. Empezaron con un análisis cuidadoso del enlace peptídico. Los carbonos α de aminoácidos adyacentes se encuentran separados por tres enlaces covalentes, ordenados así; C_α—C—N—C_α. Los estudios de difracción de rayos X de cristales de aminoácidos y de dipéptidos y tripéptidos sencillos demostraron que el enlace peptídico C—N es algo más corto que el enlace C—N de una amina simple y que los átomos asociados con el enlace son coplanos. Esto indicaba la existencia de una resonancia, es decir, el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amida compartían parcialmente dos pares de electrones (Fig. 4-2a). El oxígeno tiene una carga negativa parcial y el nitrógeno una positiva parcial, formando un pequeño dipolo eléctrico. Los seis átomos del **grupo peptídico** se hallan en el mismo plano, de modo que el átomo de oxígeno del grupo carbonílico y el átomo de hidrógeno del nitrógeno amídico se hallan entre ellos en posición trans. Pauling y Corey concluyeron que los enlaces peptídicos C—N no pueden girar libremente a causa de su carácter parcial de doble enlace. La rotación es posible alrededor de los enlaces N—C_α y C_α—C. El esqueleto polipeptídico de una proteína puede visualizarse por tanto como una serie de planos rígidos en la que los planos consecutivos comparten un punto común de giro alrededor de C_α (Fig. 4-2b). La rigidez de los enlaces peptídicos limita el número de conformaciones que puede adoptar una cadena polipeptídica.

El oxígeno carbonílico tiene carga parcial negativa y el nitrógeno amida carga parcial positiva, lo que da lugar a un pequeño dipolo eléctrico. Prácticamente todos los enlaces peptídicos de proteínas se encuentran en configuración trans, aunque hay excepciones como la representada en la Figura 4-8b.

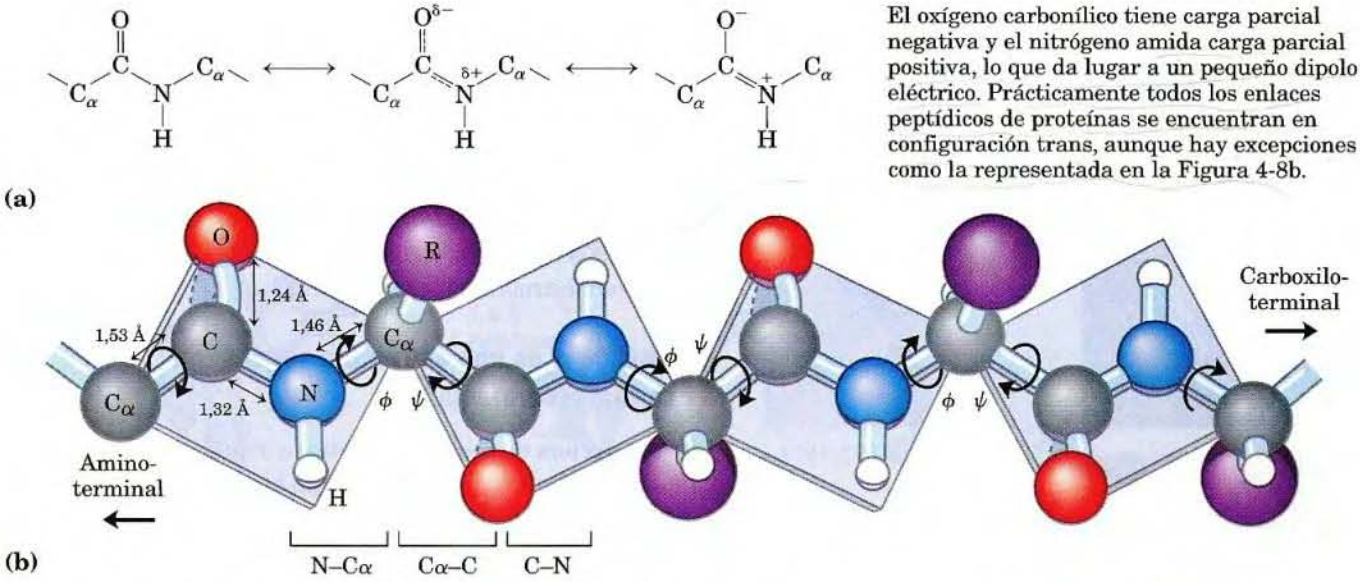


FIGURA 4-2 El grupo peptídico plano. **(a)** Cada enlace peptídico tiene carácter parcial de doble enlace debido a la resonancia y no puede girar. **(b)** Tres enlaces separan los carbonos α secuencialmente consecutivos en una cadena polipeptídica. Los enlaces N—C_α y C_α—C pueden rotar y sus ángulos de enlace se denominan ϕ y ψ, respectivamente. El enlace peptídico C—N no puede rotar libremente. Otros enlaces sencillos de la cadena principal pueden tener también impedida la rotación, según el tamaño y carga de los grupos R. En la conformación que se muestra, φ y ψ tienen un valor de 180° (o de −180°). Al mirar desde un carbono α, los ángulos ϕ y ψ aumentan cuando el grupo carbonilo o los nitrógenos amida, respectivamente, rotan en sentido de las agujas del reloj. **(c)** Por convención, se considera que los ángulos ϕ y ψ tienen un valor de 0° cuando los dos enlaces peptídicos que flanquean un carbono α se encuentran en el mismo plano y se colocan según se muestra. Esta conformación no es accesible en una proteína, puesto que se produciría un solapamiento estérico entre el oxígeno de un grupo α-carbonílico y un átomo de hidrógeno del grupo α-amino. Para ilustrar los enlaces entre átomos, las bolas que representan cada átomo son más pequeñas que el radio de van der Waals para esta escala. 1 Å = 0,1 nm.

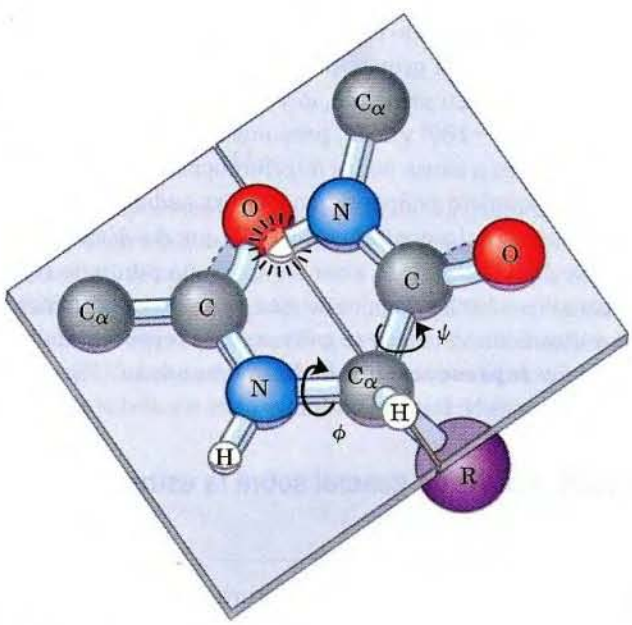
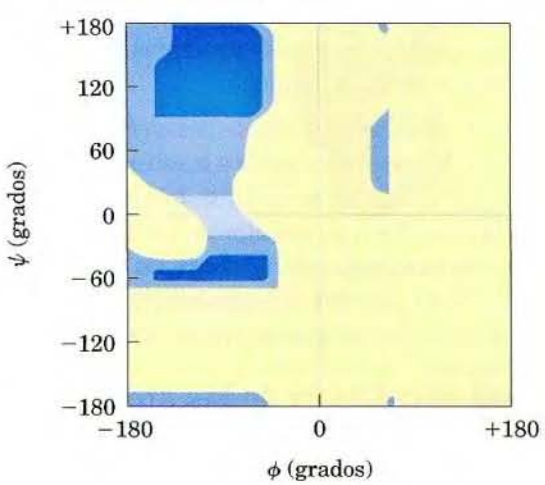


FIGURA 4-3 Representación de Ramachandran para los residuos de L-Ala. Las conformaciones de los péptidos se definen por los valores de ϕ y ψ. Basándose en cálculos en los que se utilizan radios de van der Waals y ángulos de enlace conocidos, las conformaciones consideradas posibles son las que entrañan poca o ninguna interferencia estérica. Las áreas sombreadas de azul oscuro reflejan conformaciones sin solapamiento estérico y por tanto están totalmente permitidas; el azul de intensidad media indica conformaciones permitidas en los límites extremos de contactos atómicos desfavorables; el área azul claro indica conformaciones que están permitidas si se permite cierta flexibilidad en los ángulos de enlace. La estereoquímica de los residuos L-aminoácidos origina la asimetría de la representación. Las representaciones para otros residuos aminoácidos de la serie L sin ramificaciones en sus cadenas laterales son prácticamente idénticas. Los márgenes permitidos para los residuos aminoácidos ramificados tales como Val, Ile y Thr son algo más pequeños que para Ala. El residuo de Gly, el que tiene menos impedimentos estéricos, presenta un margen mucho más amplio de conformaciones permitidas. El margen para los residuos de Pro está muy restringido debido a que el valor de ϕ está limitado a un margen entre −35° a −85° debido a su cadena lateral cíclica.



Linus Pauling, 1901–1994

Robert Corey, 1897–1971

Los ángulos de giro de los enlaces se denominan por convención ϕ (fi) para el enlace N—C_α y ψ (psi) para el enlace C_α—C. También por convención, ϕ y ψ adquieren un valor de 180° cuando el polipéptido está en la conformación totalmente extendida y todos los grupos peptídicos están en el mismo plano (Fig. 4-2b). En principio, ϕ y ψ pueden adoptar cualquier valor entre −180° y 180°, pero muchos de estos valores no son accesibles a causa de las interferencias estéricas entre átomos del esqueleto polipéptídico y de las cadenas laterales de los aminoácidos. La conformación en la que ϕ y ψ valen 0 es inaccesible (Fig. 4-2c); este valor se usa como punto de referencia para describir los ángulos de giro. Los valores permitidos para ϕ y ψ pueden visualizarse gráficamente representando ψ frente a ϕ, en **representación de Ramachandran** (Fig. 4-3), introducida por G.N. Ramachandran.

RESUMEN 4.1 Visión general sobre la estructura proteica

- Cada proteína posee un estructura tridimensional, que es un reflejo de su función
- La estructura proteica está estabilizada por múltiples interacciones débiles. Las interacciones hidrofóbicas son las que más contribuyen a la estabilización de la forma globular de la mayoría de proteínas solubles; los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas se encuentran optimizados en las estructuras específicas más estables termodinámicamente
- La naturaleza de los enlaces covalentes en el esqueleto polipeptídico impone limitaciones a la estructura. El enlace peptídico tiene un carácter de doble enlace parcial que mantiene a los seis átomos del grupo peptídico en una configuración plana rígida. Los enlaces N—C_α y C_α—C pueden girar adoptando, respectivamente, diversos valores en los ángulos ϕ y ψ.

4.2 Estructura secundaria de las proteínas

El término **estructura secundaria** se refiere a la conformación local de algunas partes del polipéptido. Normalmente la discusión de la estructura secundaria se centra en los patrones de plegamiento regulares comunes de las cadenas polipeptídicas. Sólo unas cuantas estructuras secundarias son muy estables y están ampliamente distribuidas en las proteínas. Las más destacables son las conformaciones en hélice α y en β que se describen a continuación. Utilizando los principios químicos fundamentales y unas cuantas observaciones experimentales Pauling y Corey predijeron, en 1951, la existencia de estas estructuras secundarias, algunos años antes de que se resolviera la primera estructura proteica entera.

La hélice α es una estructura secundaria habitual en proteínas

Arquitectura de proteínas – Hélice α Pauling y Corey sabían de la importancia de los enlaces de hidrógeno en la orientación de grupos químicos polares como el C=O y el N—H del enlace peptídico. También conocían los resultados experimentales de William Astbury quien, en la década de 1930, había llevado a cabo un trabajo pionero sobre las proteínas con rayos X. Astbury demostró que la proteína que constituye las púas del puercoespín y el cabello (la proteína fibrosa α-queratina) posee una estructura regular que se repite cada 5,15 a 5,2 Å. (El ángstrom, Å, nombre debido al físico Anders J. Ångström, es igual a 0,1 nm). Con esta información y sus datos acerca del enlace peptídico, y con la ayuda de modelos moleculares precisos, Pauling y Corey se propusieron determinar cuáles eran las conformaciones más probables de las moléculas de proteína.

La disposición más sencilla que podría asumir una cadena polipeptídica es una estructura en hélice, a la que Pauling y Corey denominaron **hélice α** (Fig. 4-4). En esta estructura el esqueleto polipeptídico se encuentra compactamente enrollado alrededor del eje longitudinal imaginario de la molécula y los grupos R de los residuos aminoácidos sobresalen del esqueleto helicoidal. La unidad repetitiva es el giro de hélice, que ocupa alrededor de 5,4 Å a lo largo del eje longitudinal, ligeramente superior a la periodicidad observada por Astbury en su análisis de la queratina del cabello por rayos X. Los residuos aminoácidos de una hélice α adoptan las conformaciones que corresponden a unos ángulos $\psi = -45°$ a $-50°$ y $\phi = -60°$, y cada giro de la hélice incluye 3,6 residuos aminoácidos. El giro de la hélice α en todas las proteínas es dextrógiro (Recuadro 4-1). La estructura predominante en α-queratinas es la hélice α. De modo más general, en las proteínas globulares se observa que aproximadamente una cuarta parte de los residuos aminoácidos se encuentra formando hélices α, aunque la proporción exacta varía mucho de una proteína a otra.

¿Por qué se forma la hélice α con más facilidad que otras conformaciones posibles? En parte, la hélice α hace un uso óptimo de los puentes de hidrógeno internos. La estructura está estabilizada por un enlace de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno electronegativo de un enlace peptídico y el átomo de oxígeno carbonílico electronegativo del cuarto aminoácido del lado amino-terminal de ese polipéptido (Fig. 4-4b). Cada uno de los enlaces peptídicos (salvo los próximos a cada extremo) de la hélice α participa en esta trama de enlaces de hidrógeno. Cada vuelta sucesiva de la

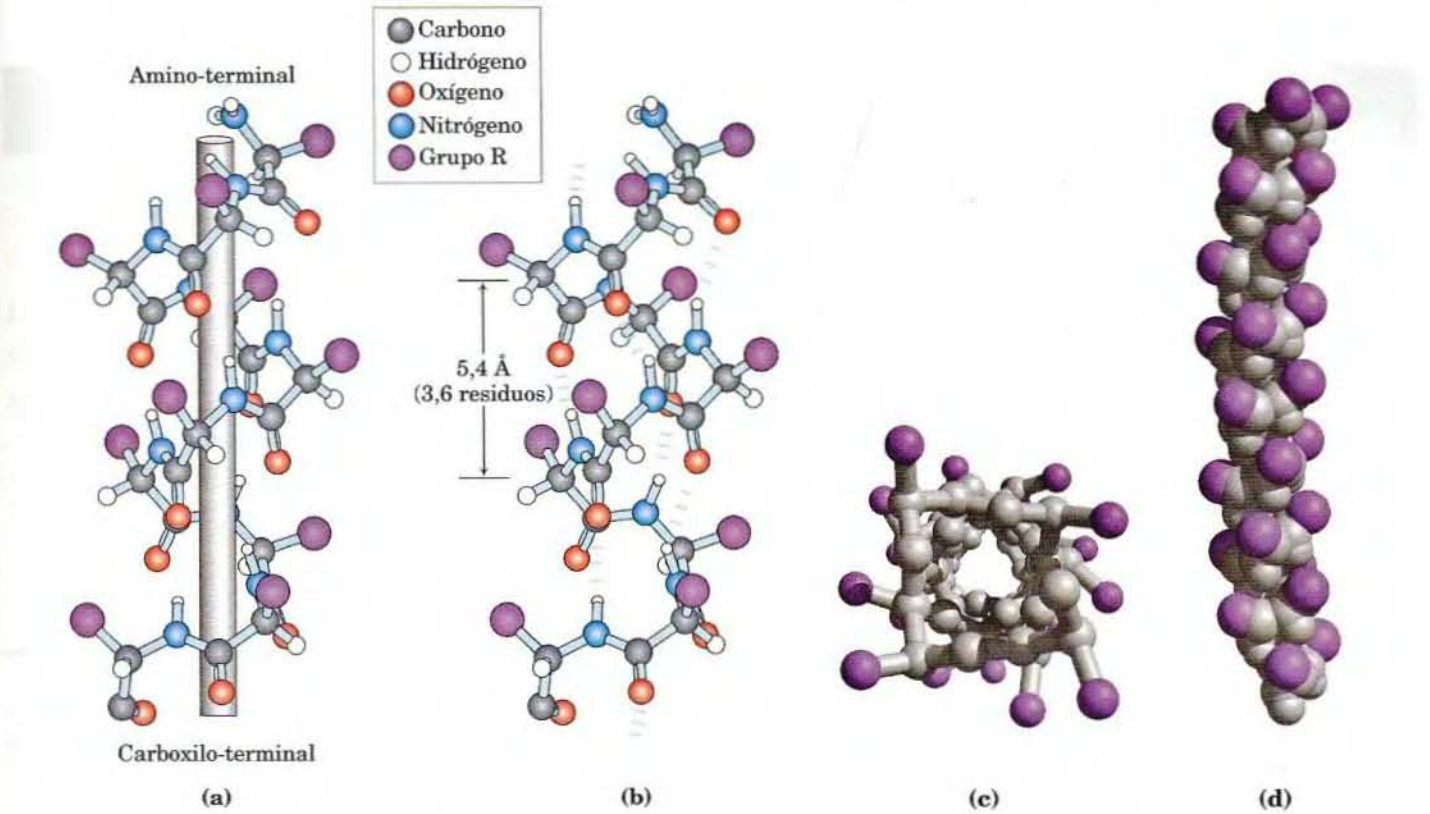


FIGURA 4-4 Cuatro modelos de hélice α, mostrando aspectos diferentes de su estructura. **(a)** Formación de una hélice α dextrógira. Los planos de los enlaces peptídicos rígidos son paralelos al eje longitudinal de la hélice, representado aquí como una barra vertical **(b)** Modelo de bolas y varillas de la hélice α dextrógira en la que se muestran los enlaces de hidrógeno intracatenarios. La unidad repetitiva es una vuelta de hélice sencilla, de 3,6 residuos. **(c)** La hélice α vista desde un extremo a lo largo del eje longitudinal (de PDB ID 4TNC). Obsérvense las posiciones de los grupos R (esferas púrpura). Este modelo de bolas y varillas, utilizado para resaltar la disposición helicoidal, da la falsa impresión de que la hélice está hueca ya que las bolas no representan los radios de van der Waals de los átomos individuales. Como muestra el modelo de esferas **(d)**, los átomos en el centro de la hélice α están en contacto muy cercano.

hélice se mantiene unida a las vueltas adyacentes mediante tres o cuatro enlaces de hidrógeno que, sumados, proporcionan a la estructura una estabilidad considerable.

Experimentos posteriores con modelos moleculares han demostrado que una hélice α se puede formar en polipéptidos tanto con L- como con D-aminoácidos. Sin embargo, todos los residuos deben pertenecer a la misma serie de estereoisómeros; un D-aminoácido rompería una estructura regular constituida por L-aminoácidos y viceversa. Los L-aminoácidos naturales pueden formar hélices α dextrógiras o levógiras, pero no se han hallado hélices levógiras extensas en proteínas.

La secuencia de aminoácidos afecta a la estabilidad de la hélice α

No todos los polipéptidos pueden formar una hélice α estable. Las interacciones que se producen entre las cadenas laterales de los aminoácidos pueden estabilizar o desestabilizar esta estructura. Por ejemplo, si una cadena polipeptídica posee muchos residuos de Glu consecutivos, este segmento no podrá formar una hélice a pH 7,0. Los grupos carboxílicos cargados negativamente de los residuos de Glu adyacentes se repelen con una intensidad que sobrepasa la influencia estabilizadora de los enlaces de hidrógeno de la hélice α. Por la misma razón, si muchos residuos de Lys y/o Arg, con grupos polares carga-

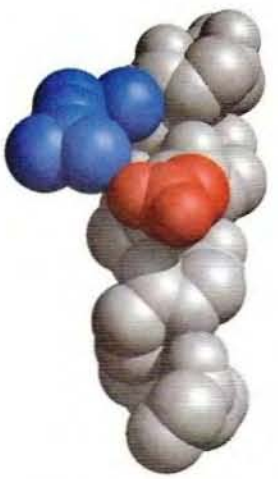


FIGURA 4-5 Interacciones entre los grupos R de aminoácidos separados por tres residuos de una hélice α. En este modelo espacial se muestra una interacción iónica entre el Asp^{100} y la Arg^{103} en una región de hélice α de la troponina C, una proteína fijadora de calcio asociada al músculo (de PDB ID 4TNC). El esqueleto polipeptídico (carbonos, nitrógenos α-amino y oxígenos α-carbonilo) se presenta en color gris para un segmento helicoidal de 13 residuos. Solamente se muestran las cadenas laterales de los residuos de Asp (rojo) y Arg (azul) que interactúan.

RECUADRO 4–1 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Cómo distinguir dextrógiro de levógiro

Existe un método sencillo para determinar el sentido de giro de una estructura helicoidal. Cierre los puños dejando el pulgar estirado y dirigido hacia arriba. Observando su mano derecha, imagine una hélice que se prolonga en la dirección indicada por el pulgar y con su espiral girando en el sentido en que se pliegan los otros cuatro dedos (el contrario a las agujas del reloj). La hélice resultante es dextrógira. La repetición del proceso con la mano izquierda proporcionará la imagen de la hélice levógira, que gira en el sentido de las agujas del reloj si la hélice se prolonga en la dirección del dedo pulgar.

dos positivamente a pH 7,0, están situados consecutivamente, se repelerán e impedirán la formación de la hélice α. El tamaño y la forma de los residuos de Asn, Ser, Thr y Cys pueden desestabilizar la hélice α si se hallan muy cercanos en la cadena.

El giro de la hélice α asegura que se produzcan interacciones críticas entre la cadena lateral de un aminoácido y la que se halla a 3 (o 4) aminoácidos de ella (Fig. 4-5). Los aminoácidos cargados positivamente están a menudo a tres residuos de los cargados negativamente, lo que permite la formación de interacciones iónicas. A menudo hay también un espaciamiento similar en el caso de dos aminoácidos aromáticos, lo que da lugar a una interacción hidrofóbica.

Una de las restricciones a la formación de la hélice α es la presencia de residuos de Pro o Gly. En la prolina, el átomo de nitrógeno forma parte de un anillo rígido (véase Fig. 4-8b) y la rotación alrededor del enlace N—C_α no es posible. Así, un residuo de Pro introduce una curvatura desestabilizante en la hélice α. Además, el átomo de nitrógeno de un residuo de Pro en un enlace peptídico no contiene ningún átomo de hidrógeno que pueda formar enlaces de hidrógeno con otros residuos. Por ello, es rara la presencia de prolina en las hélices α. Por otra razón con frecuencia no hay glicina en las hélices α: tiene más flexibilidad conformacional que otros residuos aminoácidos.

Finalmente, otro factor que afecta a la estabilidad de una hélice α en un polipéptido es la identidad de los residuos aminoácidos localizados cerca de los extremos del fragmento α-helicoidal. En cada enlace peptídico hay un pequeño dipolo eléctrico (Fig. 4-2a). Estos dipolos están conectados por los enlaces de hidrógeno de la hélice, de modo que el dipolo neto aumenta con la longitud de la hélice (Fig. 4-6). Los cuatro aminoácidos de cada extremo de la hélice no participan plenamente en la formación de enlaces de hidrógeno. Las cargas parciales positivas y negativas del dipolo de la hélice residen en realidad en los grupos amino y carbonilo peptídicos situados cerca de los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal de la hélice. Por esta razón a menudo hay aminoácidos cargados negativamente cerca del extremo amino-terminal del segmento helicoidal, donde ejercen una interacción estabilizadora con la carga positiva del dipolo de la hélice; un aminoácido cargado positivamente situado en el extremo amino-terminal es desestabilizante. Lo contrario es también cierto para el extremo carboxilo-terminal del segmento helicoidal.

Hay 5 tipos de restricciones que afectan a la estabilidad de una hélice α: (1) la repulsión (o atracción) electrostática entre residuos aminoácidos sucesivos con grupos R cargados, (2) el volumen de los grupos R adyacentes, (3) las interacciones en-

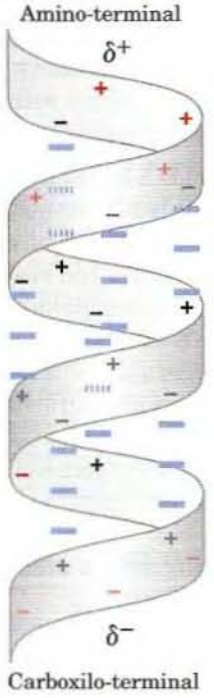


FIGURA 4–6 Dipolo de la hélice. El dipolo eléctrico de un enlace peptídico (véase Fig. 4-2a) se transmite a lo largo de un segmento en hélice α a través de enlaces de hidrógeno intracatenarios, dando como resultado un dipolo global en la hélice. En esta ilustración los constituyentes amino y carbonilo de cada enlace peptídico se indican por símbolos + y −, respectivamente. Los grupos amino y carbonilo no enlazados por enlace de hidrógeno y situados cerca de los extremos de la región en hélice α se muestran en rojo.

tre cadenas laterales de aminoácidos separadas 3 (o 4) residuos, (4) la presencia de residuos de Pro y Gly y (5) la interacción entre residuos aminoácidos en los extremos de la hélice α y el dipolo eléctrico. Así, la tendencia de un segmento de una cadena polipeptídica a plegarse en hélice α depende de la identidad y de la secuencia de sus residuos de aminoácidos.

La conformación β organiza las cadenas polipeptídicas en forma de hoja

Arquitectura de proteínas – Hoja β Pauling y Corey predijeron un segundo tipo de estructura repetitiva, la **conformación β.** Ésta es una conformación más extendida de las cadenas polipeptídicas y su estructura se ha confirmado mediante análisis de rayos X. En ella el esqueleto de la cadena polipeptídica está extendido en zigzag (Fig. 4-7). Las cadenas polipeptídicas en zigzag pueden disponerse de manera adyacente formando una estructura que semeja la de una serie de pliegues. En esta disposición, denominada **hoja β,** se forman enlaces de hidrógeno entre segmentos adyacentes de cadena polipeptídica. Los segmentos individuales que forman una hoja β están normalmente cercanos en la cadena polipeptídica, pero también pueden estar muy distantes uno de otro dentro de la secuencia lineal del polipéptido; incluso pueden pertenecer a segmentos de diferentes cadenas polipeptídicas. Los grupos R de aminoácidos adyacentes sobresalen de la estructura en zigzag en direcciones opuestas, dando lugar a un patrón alternante, tal como se observa en las vistas laterales de la Figura 4-7.

Las cadenas polipeptídicas adyacentes de una hoja β pueden ser paralelas (con la misma orientación amino-carboxilo en el polipéptido) o antiparalelas (con orientaciones opuestas). Las estructuras tienen cierta similitud, aunque el período de repetición es más corto en la conformación paralela (6,5 Å, en comparación con los 7 Å de la antiparalela) y los patrones de formación de puentes de hidrógeno son diferentes.

Algunas estructuras proteicas limitan los tipos de aminoácidos de las estructuras β. Cuando dos o más hojas β están densamente empaquetadas en una proteína, los grupos R de los residuos aminoácidos de las superficies de contacto deben ser relativamente pequeños. Las β-queratinas tienen muchos residuos de Gly y Ala, los dos aminoácidos con los grupos R más pequeños. De hecho, en la fibroína de la seda, Gly y Ala se alternan a lo largo de grandes porciones de la secuencia.

Los giros β son frecuentes en las proteínas

Arquitectura de proteínas – Giros β En las proteínas globulares, con una estructura de plegamiento compacta, en torno a un tercio de los residuos de aminoácidos están en giros o bucles donde la cadena polipeptídica cambia de dirección (Fig. 4-8). Éstos son elementos de conexión que unen tramos sucesivos de hélices β o conformaciones β. Los **giros β** que conectan los extremos adyacentes de dos segmentos de hojas β antiparalelas son muy frecuentes. Esta estructura forma un giro cerrado de 180° en el que están implicados cuatro residuos aminoácidos, con el oxígeno del carbonilo del primer residuo aminoácido formando un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino del cuarto. Los grupos peptídicos de los dos residuos centrales no participan en ningún enlace de hidrógeno interresidual. A menudo se encuentran residuos de Gly y Pro en los giros β, en la glicina porque es un residuo pequeño y flexible y en la Pro por la facilidad con que los enlaces peptídicos en los que participa el nitrógeno imino de la prolina adoptan la configuración cis (Fig. 4-8b), particularmente adecuada para la formación de un giro cerrado. Los dos tipos de giro β que se muestran en la Figura 4-8a son los más comunes. Los giros β se encuentran a menudo en la superficie de las proteínas, donde los grupos peptídicos de los dos residuos aminoácidos centrales en el giro pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. Menos frecuentes son los giros β, con tres residuos por giro con un enlace de hidrógeno entre los residuos primero y tercero.

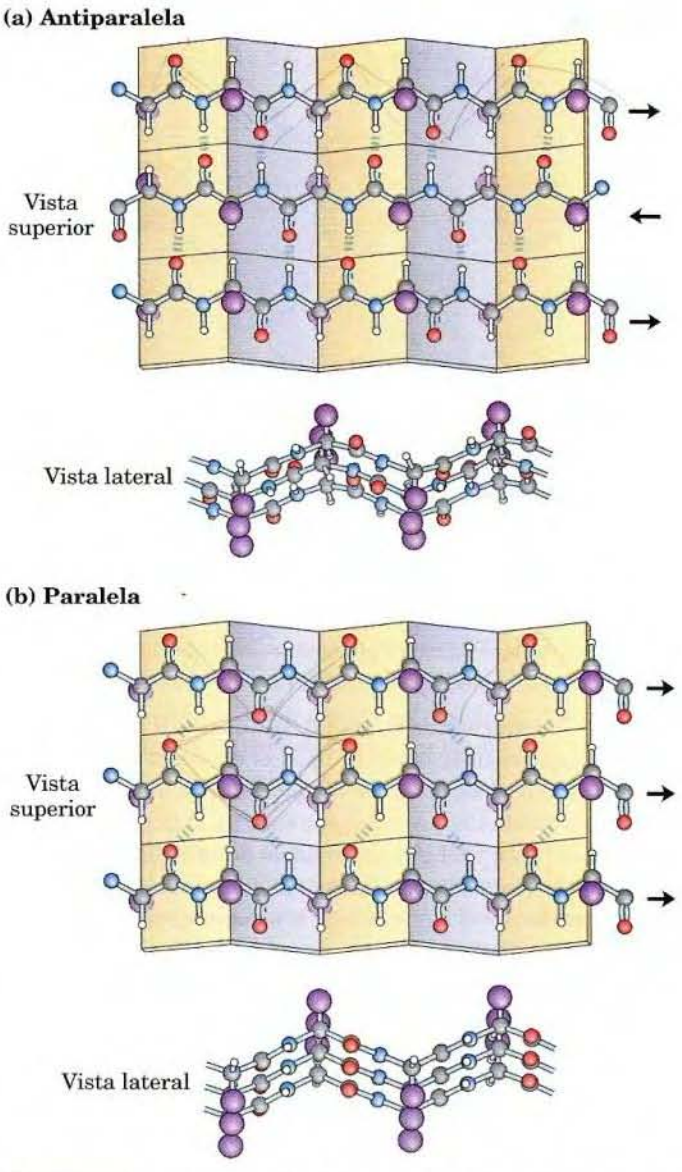
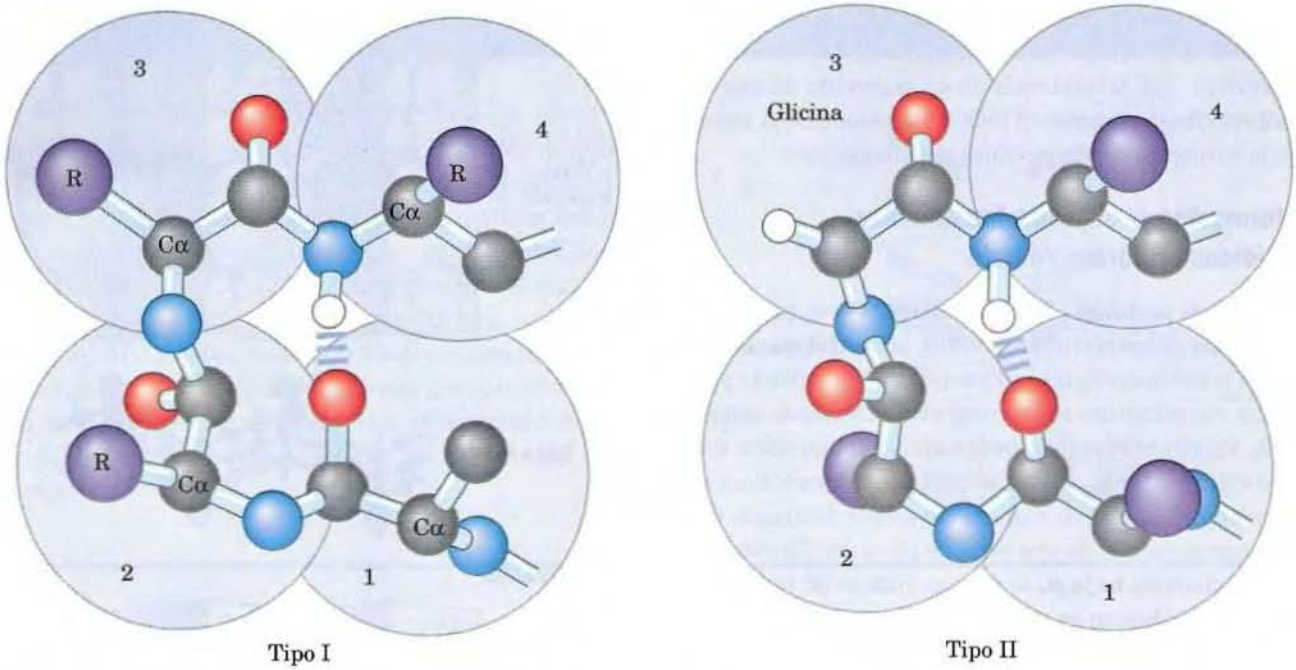


FIGURA 4-7 La conformación β en cadenas polipeptídicas. En estas vistas superior y lateral pueden verse los grupos R dirigidos hacia el exterior de la hoja β y se enfatiza el plegamiento de la hoja descrito por los planos de los enlaces peptídicos. (Un nombre alternativo para esta estructura es hoja β plegada.) También se muestran los enlaces por puente de hidrógeno entre cadenas adyacentes. (**a**) Hoja β antiparalela, en la que la orientación amino-terminal a carboxilo-terminal de cadenas adyacentes es inversa (véanse flechas). (**b**) Hoja β paralela.

(a) Giros β



(b) Isómeros de prolina

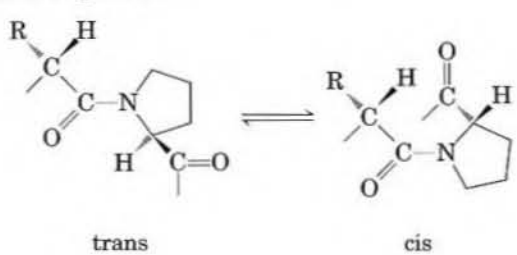


FIGURA 4-8 Estructura de los giros β. **(a)** Los giros β de tipo I y tipo II son los más comunes; el giro de tipo I es dos veces más frecuente que el de tipo II. El tercer residuo del giro β de tipo II siempre es una Gly. Obsérvese el enlace de hidrógeno entre los grupos peptídicos de los residuos 1.° y 4.° del giro. (Los residuos de aminoácidos están enmarcados por grandes círculos azules.) **(b)** Isómeros trans y cis de un enlace peptídico en el que interviene el nitrógeno imino de una prolina. Más del 99,95% de los enlaces peptídicos entre aminoácidos que no sean la prolina se hallan en la configuración trans. Sin embargo, en torno a un 6% de los enlaces peptídicos en los que interviene el nitrógeno imino de la prolina se hallan en la configuración cis y muchos de éstos se dan en los giros β.

Las estructuras secundarias comunes tienen ángulos de enlace y un contenido de aminoácidos característico

La hélice α y la conformación β son las estructuras secundarias repetitivas más importantes en muchas proteínas, aunque hay otras estructuras repetitivas en algunas proteínas especializadas (p. ej., colágeno: véase Fig. 4-13 en p. 128).

Cada tipo de estructura secundaria puede ser completamente descrita por los ángulos de enlace ϕ y ψ de cada residuo. Como puede observarse en la representación de Ramachandran, la hélice α y la conformación β se encuentran dentro de la gama, relativamente restringida, de estructuras permitidas estéricamente (Fig. 4-9a). La mayor parte de los valores de ϕ y ψ obtenidos de estructuras proteicas conocidas se encuentran dentro de las regiones esperadas, observándose altas concentraciones cerca de los valores correspondientes a la hélice α y la conformación β, tal como era de esperar (Fig. 4-9b). El único aminoácido que se encuentra a menudo en una conformación que se halla fuera de las regiones mencionadas es la glicina. Gracias al pequeño tamaño de su cadena lateral de hidrógeno, un residuo de glicina puede adoptar muchas conformaciones estéricamente prohibidas para otros aminoácidos.

Algunos aminoácidos se acomodan mejor que otros a los diferentes tipos de estructuras secundarias (Fig. 4-10). Algunas tendencias se explican fácilmente por las restricciones conocidas de las diferentes estructuras secundarias. Otras tendencias evidentes pueden explicarse teniendo en cuenta el tamaño o las cargas de las cadenas laterales, pero no todas las tendencias de la Figura 4-10 se comprenden bien.

RESUMEN 4.2 Estructura secundaria de las proteínas

- La estructura secundaria es una disposición regular de los aminoácidos en un segmento de la cadena polipeptídica, en la que cada residuo se relaciona espacialmente con sus vecinos de la misma manera.
- Las estructuras secundarias más comunes son la hélice α, la conformación β y los giros β.
- Las estructuras secundarias de un segmente polipeptídico pueden definirse completamente si se conocen los valores de los ángulos ϕ y ψ para todos los aminoácidos del segmento.

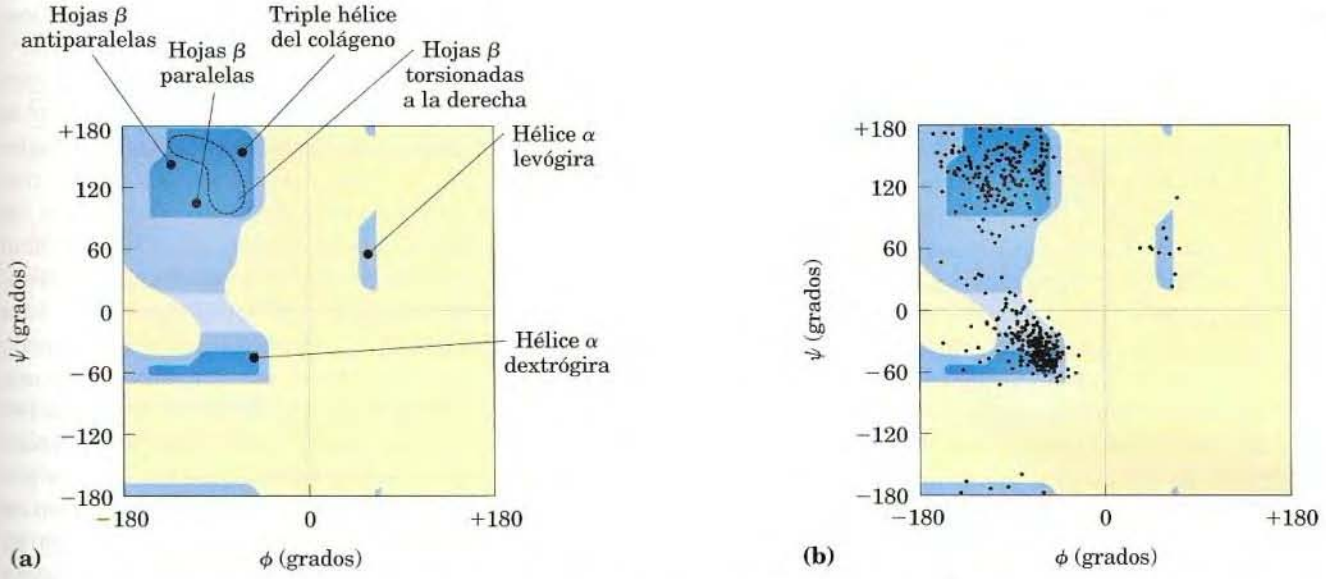


FIGURA 4-9 Representaciones de Ramachandran de diferentes estructuras. (a) Superposición de los valores de ϕ y ψ para diversas estructuras secundarias permitidas sobre la gráfica de la Figura 4-3. Aunque teóricamente son posibles las hélices α levógiras de varios residuos aminoácidos, no se han observado en proteínas. **(b)** Los valores de ϕ y ψ de todos los residuos aminoácidos con excepción de Gly del enzima piruvato quinasa (aislado de conejo) se superponen en la representación teórica de las conformaciones permitidas (Fig. 4-3). Se excluyeron los residuos de Gly pequeños y flexibles ya que frecuentemente caen fuera de los intervalos esperados (azul).

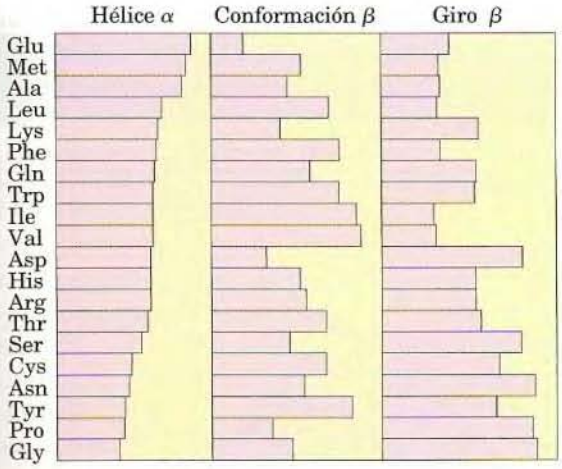


FIGURA 4-10 Probabilidades relativas de que un aminoácido concreto se halle en los tres tipos de estructura secundaria más comunes.

4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas

Arquitectura de proteínas – Introducción a la estructura terciaria La disposición tridimensional global de todos los átomos de una proteína se conoce como **estructura terciaria.** Mientras que el término "estructura secundaria" se refiere al ordenamiento espacial de residuos aminoácidos adyacentes en la estructura primaria, la estructura terciaria incluye aspectos de *largo alcance* en la secuencia de aminoácidos. Aminoácidos que están alejados en la secuencia polipeptídica y que se encuentran en tipos de estructura secundaria diferentes pueden interaccionar dentro de la estructura totalmente plegada de la proteína. La localización de giros (incluidos lo giros β) en la cadena polipeptídica y la dirección y el ángulo de estos giros están determinados por el número y la localización de aminoácidos específicos promotores de su formación, tales como Pro, Thr, Ser y Gly. Los segmentos que interaccionan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición terciaria característica gracias a diferentes tipos de interacciones enlazantes débiles (y a veces mediante enlaces covalentes tales como puentes disulfuro).

Algunas proteínas están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas o subunidades, las cuales pueden ser idénticas o diferentes. La disposición de estas subunidades proteicas en complejos tridimensionales constituye la **estructura cuaternaria.**

Al considerar estos niveles superiores de estructura, es de utilidad clasificar las proteínas en dos grupos principales: **proteínas fibrosas,** que presentan cadenas polipeptídicas dispuestas en largas hebras u hojas, y **proteínas globulares,** con las cadenas polipeptídicas plegadas en formas globulares o esféricas. Los dos grupos son estructuralmente diferentes: las proteínas fibrosas constan mayoritariamente de un único tipo de estructura secundaria; las proteínas globulares contienen a menudo varios tipos de estructura secundaria. Estos grupos difieren en su función en cuanto que las estructuras que dan soporte, forma y protección externa a los vertebrados están formadas por proteínas fibrosas mientras que la mayoría de enzimas y proteínas reguladoras son globulares. Ciertas proteínas fibrosas desempeñan un papel crucial en el desarrollo de nuestra actual comprensión de la estructura de las proteínas y aportan claros ejemplos de la relación entre estructura y función. Empezaremos nuestra discusión con las proteínas fibrosas antes de pasar a los patrones de plegamiento más complejos observados en las proteínas globulares.

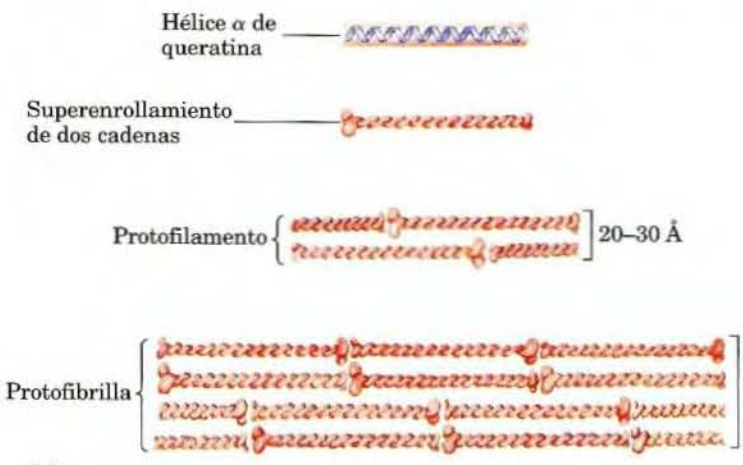
Las proteínas fibrosas están adaptadas a una función estructural

Arquitectura de proteínas – Estructura terciaria de las proteínas fibrosas La α-queratina, el colágeno y la fibroína de la seda son ejemplos claros de la relación entre estructura proteica y función biológica (Tabla 4-1). Estas proteínas comparten propiedades que confieren fuerza, elasticidad, o las dos cosas, a las estructuras en las que se encuentran. En cada caso, la unidad estructural fundamental es la repetición de un elemento simple de estructura secundaria. Todas las proteínas fibrosas son insolubles en agua, una propiedad debida a la elevada concentración de residuos aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto en el interior de estas proteínas como en su superficie. Estas superficies hidrofóbicas se encuentran sepultadas en gran parte en el interior debido al empaquetamiento de muchas cadenas polipeptídicas similares para formar elaborados complejos supramoleculares. La simplicidad estructural subyacente en las proteínas fibrosas las hace especialmente útiles para ilustrar algunos de los principios fundamentales de la estructura de proteínas tratados anteriormente.

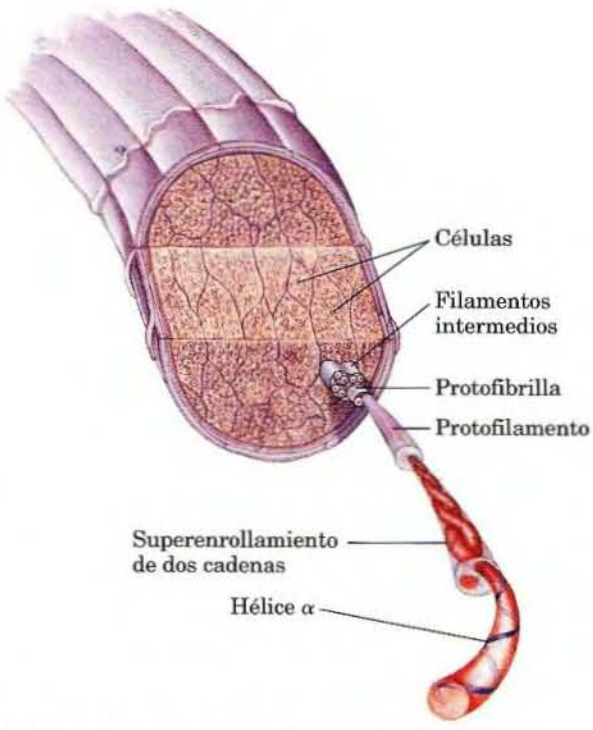
α-Queratina Las α-queratinas son proteínas que han evolucionado para poder soportar esfuerzos mecánicos. En los vertebrados, estas proteínas constituyen la práctica totalidad del peso seco de cabellos, lana, uñas, garras, cañones de las plumas, cuernos, pezuñas y gran parte de la capa externa de la piel. Las α-queratinas pertenecen a una familia más amplia de proteínas denominadas proteínas de los filamentos intermedios (FI). Otras proteínas de esta familia están localizadas en el citoesqueleto de las células animales. Todas las proteínas FI tienen una función estructural y comparten las características estructurales ejemplificadas por la α-queratinas.

La hélice de la α-queratina es la misma hélice dextrógira que se observa en muchas otras proteínas. A principios de la década de 1950 Francis Crick y Linus Pauling sugirieron independientemente que la hélices α de la queratina estaban dispuestas formando un superenrollamiento. Dos hebras de α-queratina orientadas en paralelo (con los extremos amino en el mismo lado) se enrollan una sobre otra formando un enrollamiento superhelicoidal. La resistencia de la estructura está amplificada por el enrollamiento en superhélice, de modo muy similar a como las cuerdas se enrollan para formar una soga más resistente (Fig. 4-11). La torsión del eje de una hélice α para formar el superenrollamiento explica la discrepancia entre los 5,4 Å por vuelta predichos para una hélice α por Pauling y Corey y los 5,15 a 5,2 Å observados por difracción de rayos X en la estructura repetitiva de un cabello (p. 120). El enrollamiento superhelicoidal es levógiro, en sentido opuesto al de la hélice α. La superficie donde las dos hélices α entran en contacto consta de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y sus grupos R se engarzan entre ellos formando un patrón de entrecruzamiento regular. Esto permite un empaquetamiento compacto de las cadenas polipeptídicas en la superhélice levógira. No es sorprendente que la α-queratina sea rica en los residuos hidrofóbicos Ala, Val, Leu, Ile, Met y Phe.

Un polipéptido de α-queratina superenrollada tiene una estructura terciaria relativamente simple, dominada por la estructura secundaria de la hélice α con su eje helicoidal girado en una superhélice levógira. El enrollamiento de los dos polipéptidos en hélice α es un ejemplo de estructura cuaternaria. Los superenrollamientos de este tipo se presentan con frecuencia



(a)



(b) Sección transversal de un cabello

FIGURA 4-11 Estructura del cabello. **(a)** La α-queratina del cabello es una hélice α alargada que presenta elementos ligeramente más gruesos cerca de los extremos amino y carboxilo. Las hélices se enrollan entre ellas por parejas en sentido levógiro, formando superenrollamientos de dos cadenas. Éstas forman a su vez unas estructuras de orden superior denominadas protofilamentos y protofibrillas. Cerca de cuatro protofibrillas –32 hebras de α-queratina en total– se combinan para formar un filamento intermedio. Las hélices superenrolladas de dos en dos cadenas presentes en las diversas estructuras están entrelazadas, pero se desconoce el sentido de este enrollamiento superior así como otros detalles estructurales. **(b)** Un cabello es una disposición de muchos filamentos de α-queratina, formados por subestructuras como las que se muestran en **(a)**.

TABLA 4-1 Estructuras secundarias y propiedades de las proteínas fibrosas

Estructura	*Características*	*Ejemplos*
Hélice α, entrecruzada mediante enlaces disulfuro	Estructuras protectoras insolubles y resistentes, de dureza y flexibilidad variables	α-Queratina de cabello, plumas y uñas
Conformación β	Filamentos suaves y flexibles	Fibroína de la seda
Triple hélice del colágeno	Elevada resistencia a la tensión, sin capacidad de estiramiento	Colágeno de los tendones, matriz ósea

en los elementos estructurales de las proteínas filamentosas y en la proteína muscular miosina (véase Fig. 5-29). La estructura cuaternaria de la α-queratina puede ser muy compleja. Muchas estructuras superenrolladas pueden ensamblarse en grandes complejos supramoleculares del mismo modo en que la α-queratina forma los filamentos intermedios del cabello (Fig. 4-11b).

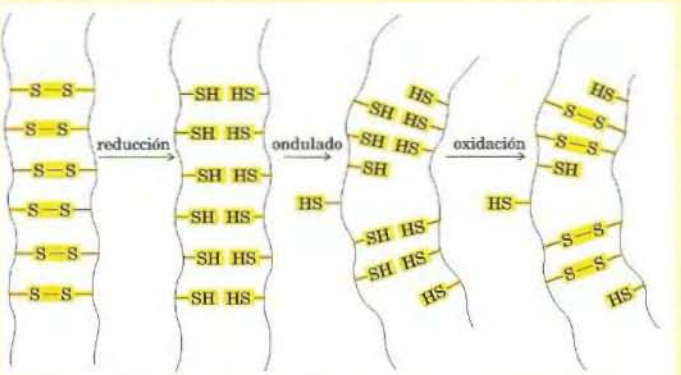
La resistencia de las proteínas fibrosas se refuerza también gracias a entrecruzamientos covalentes entre las cadenas polipeptídicas que forman las "cuerdas" de hélices múltiples y entre cadenas adyacentes de una superestructura molecular. En las α-queratinas los entrecruzamientos que estabilizan la estructura cuaternaria son enlaces disulfuro (Recuadro 4-2). En las α-queratinas más duras y resistentes, tales como las de los cuernos de rinoceronte, se observa que hasta un 18% de los residuos son cisteínas que forman puentes disulfuro.

Colágeno El colágeno ha evolucionado para proporcionar fuerza. Se encuentra en el tejido conjuntivo de, por ejemplo, tendones, cartílagos, matriz orgánica de los huesos y córnea del ojo. La hélice del colágeno es una estructura secundaria única distinta de la hélice α. Es levógira y tiene tres residuos aminoácidos por vuelta (Fig. 4-12). El colágeno también es una estructura superenrollada, pero con estructuras terciaria y cuaternaria distintas: tres cadenas polipeptídicas separadas, denominadas cadenas α (no deben confundirse con hélices α), están superenrolladas una alrededor de la otra (Fig. 4-12c).

RECUADRO 4-2 EL MUNDO DE LA BIOQUÍMICA

La ondulación permanente es un ejemplo de ingeniería bioquímica

Cuando se expone el cabello al calor húmedo, se puede estirar. A nivel molecular, las hélices α de la α-queratina del cabello se estiran hasta que llegan a adoptar una conformación β totalmente extendida. Al enfriarse revierten espontáneamente a la conformación de hélice α. Esta característica "estirabilidad" de las α-queratinas y su elevado contenido en enlaces disulfuro constituyen la base de la ondulación permanente. El cabello que se quiere ondular se arrolla primero de la manera deseada. A continuación se aplica en caliente una solución de agente reductor, generalmente un compuesto que contiene un grupo tiol o sulfhidrilo (—SH). El agente reductor rompe los entrecruzamientos mediante la reducción de cada enlace disulfuro a dos residuos de Cys. El calor húmedo rompe los enlaces de hidrógeno y hace que la estructura helicoidal de las cadenas polipeptídicas se desenrolle. Después de transcurrido un cierto tiempo, se elimina la solución de agente reductor y se añade un agente oxidante que estabiliza los enlaces disulfuro *nuevos* formados entre pares de Cys de cadenas polipeptídicas adyacentes, que no se corresponden ya con las anteriormente presentes. Al lavar y enfriar el cabello, la cadena polipeptídica revierte a su conformación en hélice α. Así el cabello queda ondulado del modo deseado, puesto que los nuevos enlaces disulfuro formados ejercerán algún tipo de torsión y giro sobre los haces de hélices α de las fibras del cabello. La ondulación permanente no es realmente permanente debido a que el cabello crece; en el cabello nuevo que reemplaza al antiguo, la α-queratina presenta el patrón natural de enlaces disulfuro, no ondulado.



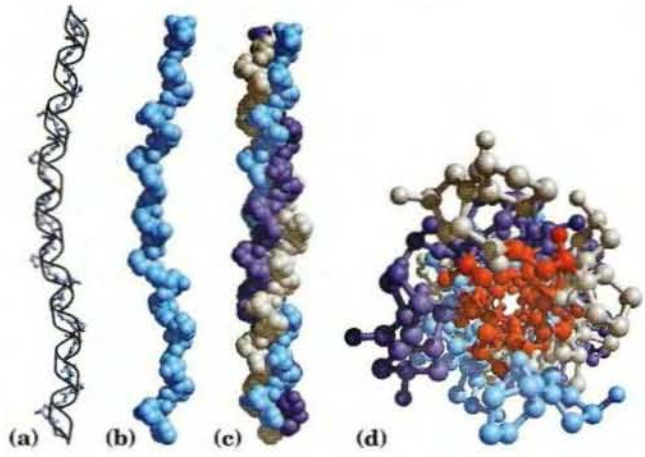


FIGURA 4-12 Estructura del colágeno. (De PDB ID 1CGD.) **(a)** La cadena α del colágeno tiene una estructura secundaria repetitiva que sólo se encuentra en esta proteína. La secuencia repetitiva tripeptídica Gly–X–Pro o Gly–X–4-Hyp adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. La secuencia repetitiva empleada para generar este modelo es Gly–Pro–4-Hyp. **(b)** Modelo de esferas de la misma cadena α. **(c)** Tres de estas hélices (mostradas aquí en gris, azul claro y azul oscuro) se enrollan entre sí de forma dextrógira. **(d)** La superhélice de tres cadenas del colágeno vista desde un extremo, en una representación de bolas y varillas. Los residuos de glicina se representan en rojo. La glicina es necesaria en el lugar en que las tres cadenas entran en contacto a causa de su pequeño tamaño. En esta ilustración las bolas no representan el radio de van der Waals de los átomos individuales. El centro de la superhélice de tres cadenas no está hueco como aquí aparece, sino que está densamente empaquetado.

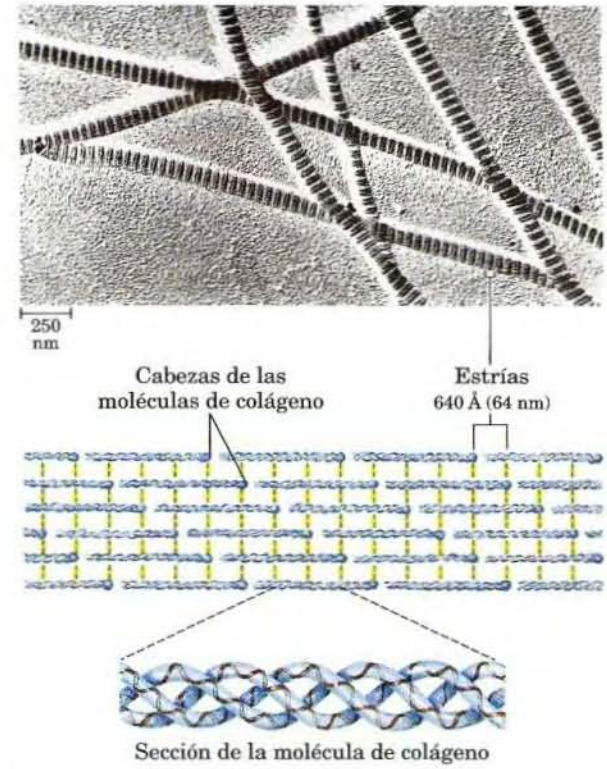
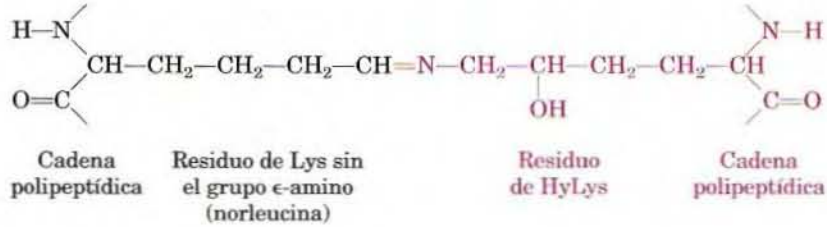


FIGURA 4-13 Estructura de las fibrillas del colágeno. El colágeno (M_r 300.000) es una molécula en forma de vara, de aproximadamente 3000 Å de longitud y solamente 15 Å de grosor. Sus tres cadenas α enrolladas pueden tener secuencias diferentes pero cada una de ellas tiene aproximadamente 1000 residuos aminoácidos. Las fibrillas de colágeno se forman a partir de moléculas de colágeno alineadas de manera escalonada y entrecruzadas para tener fuerza. El alineamiento específico y el grado de entrecruzamiento varían con el tejido y originan las estrías características en las micrografías electrónicas. En el ejemplo aquí mostrado, el alineamiento de los grupos de cabeza de cada cuarta molécula produce estrías distantes 640 Å entre ellas.

En el colágeno el enrollamiento superhelicoidal es dextrógiro, en sentido opuesto a la hélice levógira de las cadenas α.

Existen muchos tipos de colágeno en vertebrados. Normalmente contienen en torno a un 35% de Gly, un 11% de Ala y un 21 % de Pro y de 4-Hyp (4-hidroxiprolina, un aminoácido no estándar; véase Fig. 3-8a). El producto alimentario gelatina deriva del colágeno; a pesar de su naturaleza proteica, tiene poco valor alimenticio porque el colágeno carece de cantidades significativas de muchos aminoácidos esenciales en la dieta humana. El contenido de aminoácidos no habituales en el colágeno está relacionado con limitaciones estructurales características de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos del colágeno suele corresponder a la repetición de un tripéptido del tipo Gly-X-Y, donde X es a menudo Pro e Y es a menudo 4-Hyp. Sólo los residuos de Gly pueden acomodarse en las estrechas uniones entre las cadenas α (Fig. 4-12d). Los residuos de Pro permiten el marcado enrollamiento de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos y la estructura cuaternaria superhelicoidal del colágeno permiten un estrecho empaquetamiento de las tres cadenas polipeptídicas. La 4-hidroxiprolina juega un papel especial en la estructura del colágeno –y en la historia humana (Recuadro 4-3).

El estrecho empaquetamiento de las cadenas α en la triple hélice del colágeno proporciona más fuerza de tensión que un cable de acero de idéntica sección. Las fibrillas de colágeno (Fig. 4-13) son entramados supramoleculares constituidos por una triple hélice de moléculas de colágeno (denominadas a veces moléculas de tropocolágeno) asociadas en una variedad de formas que proporcionan diferentes grados de fuerza de tensión. Las cadenas α de las moléculas de colágeno y las moléculas de colágeno de las fibrillas están entrecruzadas por tipos



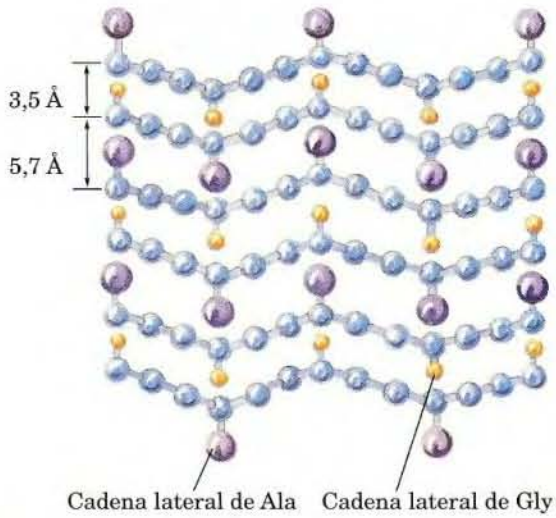


FIGURA 4-14 Estructura de la seda. Las fibras utilizadas para fabricar un tejido de seda o una tela de araña están constituidas por la proteína fibroína. (**a**) La fibroína consiste en capas de hojas β antiparalelas ricas en residuos de Ala (púrpura) y Gly (amarillo). Como se muestra en esta vista lateral, las cadenas laterales pequeñas se interpenetran permitiendo un empaquetamiento compacto en cada capa. **(b)** En la micrografía electrónica coloreada las hebras de fibroína (azul) salen de las fúsulas de las arañas.

no habituales de enlace covalente que implican a residuos de Lys, HyLys (5-hidroxilisina; véase Fig. 3-8a) o His presentes en algunas de las posiciones X o Y de los colágenos. Estas uniones dan lugar a residuos aminoácidos no estándar como la deshidrohidroxilisina-norleucina. La rigidez y la fragilidad cada vez mayores del tejido conjuntivo en las personas de mayor edad se deben a la acumulación de entrecruzamientos covalentes en las fibrillas de colágeno conforme envejecemos.

Un mamífero típico posee al menos unas 30 variedades estructurales diferentes de colágeno localizadas en diferentes tejidos y cada una de ellas difiere ligeramente en secuencia y función. Algunos defectos genéticos en la estructura del colágeno ilustran la íntima relación existente entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional. La osteogénesis imperfecta da como resultado la formación anormal de los huesos en bebés. El síndrome de Ehlers-Danlos debilita las articulaciones. Ambas enfermedades pueden ser letales y ambas son el resultado de la sustitución de un residuo aminoácido por un grupo R grande (como Cys o Ser) en lugar de una Gly en cada cadena α (un residuo de Gly diferente en cada caso). Estas sustituciones de un solo residuo tienen un efecto catastrófico sobre la función del colágeno, pues destruyen la estructura repetitiva Gly-X-Y que le confiere su estructura helicoidal única. La glicina, debido a su papel en la triple hélice del colágeno (Fig. 4-12d), no puede ser sustituida por ningún otro residuo aminoácido sin un efecto perjudicial en la estructura. ■

Fibroína de la seda La fibroína de la seda es producida por los insectos y las arañas. Sus cadenas polipeptídicas están predominantemente en conformación β. La fibroína es rica en residuos de Ala y Gly, lo que permite un empaquetamiento compacto de las hojas β y una disposición entrelazada de los grupos R (Fig. 4-14). La abundancia de enlaces de hidrógeno entre todas las uniones peptídicas en los polipéptidos de cada hoja β y la optimización de las interacciones de van der Waals entre las hojas estabilizan la estructura global. La seda no se estira ya que la conformación β ya está altamente extendida (Fig. 4-7; véase también Fig. 4-15). Sin embargo, la estructura es flexible debido a que las hojas se mantienen unidas mediante numerosas interacciones débiles más que por enlaces covalentes tales como los puentes disulfuro de las α-queratinas.

En las proteínas globulares la diversidad estructural refleja la diversidad funcional

En las proteínas globulares los diferentes segmentos de una cadena polipeptídica (o de múltiples cadenas polipeptídicas) se pliegan unos sobre otros. Esto crea una forma más compacta en relación con los polipéptidos en la conformación totalmente extendida, como puede apreciarse en la Figura 4-15.

FIGURA 4-15 Las estructuras de las proteínas globulares son compactas y variadas. La albúmina sérica humana (M_r 64.500) tiene 585 residuos en una sola cadena. En esta figura se muestran las dimensiones aproximadas de esta cadena polipeptídica sencilla, en el caso de que toda ella se hallara en la conformación extendida β o en hélice α. También se muestra el tamaño real de la proteína en su forma globular nativa, deducida a partir de cristalografía de rayos X; la cadena polipeptídica debe encontrarse compactamente plegada para poder adoptar estas dimensiones.

RECUADRO 4–3 BIOQUÍMICA EN MEDICINA

Razones para que los marineros, exploradores y estudiantes universitarios consuman fruta y verduras frescas

... con la mala fortuna de que, además de la insalubridad del país en el que no cae nunca una gota de agua, fuéramos atacados por una "enfermedad de campo" que hacía que la carne de nuestras extremidades se arrugara y que la piel de nuestras piernas quedara cubierta de manchas negras de aspecto mohoso, como una bota vieja, que las encías de los enfermos quedaran en carne viva; y ninguno escapó de la enfermedad si no era para caer en las garras de la muerte. La señal era ésta: cuando la nariz empezaba a sangrar, la muerte estaba próxima...

—*de* The Memoirs of the Lord of Joinville, *ca. 1300*

Este extracto describe la inquietante situación del ejército de Luis IX hacia el final de la Séptima Cruzada (1248-1254), inmediatamente antes de la batalla de Fariskur, en la que el ejército, debilitado por el escorbuto, fue destruido por los egipcios. ¿Cuál era la naturaleza de la enfermedad que afectaba a los soldados del siglo XIII?

El escorbuto está causado por una deficiencia en vitamina C o ácido ascórbico (ascorbato). La vitamina C es necesaria para, entre otras cosas, la hidroxilación de prolinas y lisinas del colágeno; el escorbuto es una enfermedad caracterizada por la degeneración general del tejido conjuntivo. Entre las manifestaciones del escorbuto en estado avanzado se incluyen numerosas pequeñas hemorragias debidas a la fragilidad de los vasos sanguíneos, pérdida de dientes, cicatrización deficiente de las heridas y reabertura de heridas antiguas, dolor y degeneración de huesos y, finalmente, paro cardíaco. También se observan decaimiento e hipersensibilidad a muchos tipos de estímulos. Los casos más leves de deficiencia de vitamina C se acompañan de fatiga, irritabilidad y un aumento de la gravedad de las infecciones del tracto respiratorio. Muchos animales son capaces de sintetizar grandes cantidades de vitamina C mediante la conversión de glucosa en ascorbato a través de cuatro reacciones enzimáticas. Pero los seres humanos y algunos otros animales como gorilas, cobayas y murciélagos han perdido el último enzima de la serie a lo largo de la evolución y deben obtener su ascorbato de la dieta. La vitamina C se encuentra en muchas frutas y verduras. No obstante, y hasta 1800, a menudo se encontraba ausente de los alimentos desecados o de otro tipo almacenados durante el invierno y durante viajes de larga duración.

FIGURA 1 *Los indios hurones enseñan a Jacques Cartier a elaborar té de cedro como remedio para el escorbuto.*

El escorbuto fue observado por los egipcios en 1500 a. C. y se encuentra descrito en los documentos de Hipócrates del siglo V a. C. A pesar de sus críticos efectos en las guerras medievales y de su aparición repetida en los inviernos de los climas nórdicos, su existencia no fue conocida popularmente hasta la época de las navegaciones de los descubridores europeos entre 1500 y 1800. La primera circumnavegación del globo, comandada por Fernando de Magallanes (1520), supuso la pérdida del 80% de la tripulación a causa del escorbuto. Vasco de Gama perdió a dos tercios de su tripulación durante la primera exploración de las rutas comerciales de la India (1499). Durante el segundo viaje de Jacques Cartier para explorar el río San Lorenzo (1535-1536), su expedición sufrió numerosas bajas y estuvo a punto de fracasar hasta que los nativos americanos les enseñaron a elaborar el té de cedro que curaba y prevenía el escorbuto (puesto que contenía vitamina C) (Fig. 1). Se estima que un millón de marineros perdieron la vida a causa del escorbuto entre 1600 y 1800. Los brotes de escorbuto invernales fueron desapareciendo paulatinamente en Europa a lo largo del siglo XIX al irse extendiendo el cultivo de la patata, introducida desde América del Sur.

En 1747, James Lind, un médico escocés de la Armada Real (Fig. 2), llevó a cabo el primer estudio clínico controlado de la historia. Durante un largo viaje en el buque de guerra de 50 cañones *Salisbury*, Lind seleccionó doce marineros afectados de escorbuto y los separó en grupos de dos. Los doce recibieron la misma dieta, con la excepción de que cada grupo recibió un remedio distinto para el escorbuto de entre los que se hallaban entonces descritos. Aquellos que recibieron limones y naranjas se recuperaron y volvieron al trabajo. Los que recibieron zumo de manzana hervido mejoraron ligeramente, mientras que el resto conti-

FIGURA 2 James Lind, 1716-1794; cirujano naval, 1739-1748.

nuó su deterioro. El *Tratado sobre el escorbuto* de Lind se publicó en 1753, pero la flota real siguió ignorando la enfermedad durante otros 40 años.

En 1795 el almirantazgo británico ordenó proporcionar una ración de zumo de lima o limón concentrado a todos los marineros británicos. El escorbuto continuó siendo un problema en algunas otras partes del mundo hasta 1932, cuando el científico húngaro Albert Szent-Györyi junto con W. A. Waugh y C.G. King de la Universidad de Pittsburg aislaron y sintetizaron el ácido ascórbico.

El ácido L-ascórbico o vitamina C es un polvo cristalino blanco e inodoro. Es muy soluble en agua y relativamente insoluble en disolventes orgánicos. En estado seco y protegido de la luz es estable durante prolongados períodos de tiempo. La cantidad diaria de vitamina C recomendada es de 60 mg en Estados Unidos (Australia y el Reino Unido recomiendan de 30 a 40 mg; Rusia recomienda 100 mg). En ocasiones se recomiendan dosis mayores, pero su efecto no está claro. Es notable que los animales que sintetizan su propia vitamina C únicamente alcanzan los niveles observados en humanos si toman dosis diarias cientos de veces superiores a las recomendadas. Además de los cítricos y de prácticamente todas las frutas frescas, los pimientos, tomates, patatas y brécol son buenas fuentes de vitamina C. La vitamina se destruye con la excesiva cocción o un almacenamiento muy prolongado.

¿Cual es la razón de que el ascorbato sea necesario para la salud? Aquí nos interesa específicamente su papel en la formación del colágeno. El derivado de la prolina 4(R)-L-hidroxiprolina (4-Hyp) juega un papel esencial en el plegamiento del colágeno y en el mantenimiento de su estructura. Como se ha comentado en el texto, el colágeno se construye a partir de un tripéptido repetido de Gly-X-Y, donde X e Y son generalmente Pro o 4-Hyp. Un péptido formado por diez repeticiones de Gly-Pro-Pro se plegará formando una hélice de colágeno, pero tal estructura se desvanece a los 41 °C. Si las diez repeticiones se cambian por Gly-Pro-4-Hyp, la temperatura de fusión aumenta hasta los 69 °C. La estabilidad del colágeno es la consecuencia de la particular estructura de la hélice que forma, determinada experimentalmente y de forma independiente por Helen Berman y Adriana Zagari y sus colaboradores. El anillo de prolina se encuentra normalmente como una mezcla de dos conformaciones no planas denominadas C_γ-endo y C_γ-exo (Fig. 3). La estructura de la hélice del colágeno exige que los residuos Pro en las posiciones Y estén en la conformación C_γ-exo y ésta es la conformación forzada por la hidroxilación en C-4 de la 4-hidroxiprolina. Sin embargo, la misma estructura exige que los residuos de Pro en la posición X estén en la conformación C_γ-endo y la introducción de 4-Hyp en esta posición podría desestabilizar la hélice. La incapacidad de hidroxilar Pro en posición Y en ausencia de vitamina C provoca la inestabilidad del colágeno y los problemas de tejido conjuntivo observados en el escorbuto.

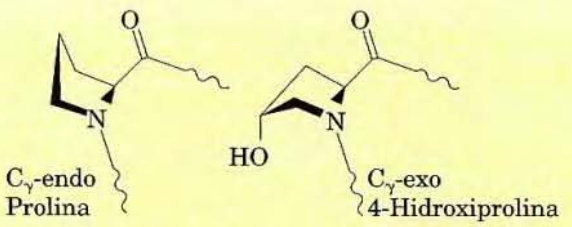


FIGURA 3 La conformación C_γ-endo de la prolina y la conformación C_γ-exo de la 4-hidroxiprolina.

La hidroxilación de residuos de Pro específicos en el procolágeno, el precursor del colágeno, requiere la participación del enzima prolil 4-hidroxilasa. Este enzima (M_r 240.000) se encuentra como un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ en todos los vertebrados. La actividad hidroxilante de prolinas reside en la subunidad α. [Los investigadores se sorprendieron al observar que las subunidades β son idénticas al enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI; p. 152); estas subunidades no participan en la actividad de hidroxilación de prolinas.] Cada subunidad α contiene un átomo de hierro no hemo (Fe^{2+}) y el enzima pertenece a una clase de hidrolasas que requieren α-cetoglutarato en su reacción.

En la reacción normal de la prolil 4-hidroxilasa (Fig. 4a), una molécula de α-cetoglutarato y una de O_2 se unen al enzima. El α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente formando CO_2 y succinato. El átomo de oxígeno restante se utiliza para hidroxilar un residuo específico del procolágeno. En esta reacción no es necesario el ascorbato. Sin embargo, la prolil 4-hidroxilasa también cataliza una reacción de descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato que no está acoplada a la hidroxilación de prolina, siendo ésta la reacción que requiere ascorbato (Fig. 4b). Durante esta reacción, el Fe^{2+} se oxida y la forma oxidada del enzima es inactiva e incapaz de hidroxilar prolina. El ascorbato consumido en la reacción tiene probablemente la misión de reducir el átomo de hierro, permitiendo recuperar la actividad catalítica.

La vitamina C juega otros papeles además de la hidroxilación de la prolina. Reacciones muy similares generan 3-hidroxiprolina y 5-hidroxiprolina, mucho menos abundantes en el colágeno. Los enzimas que catalizan estas reacciones pertenecen a la misma familia de dioxigenasas dependientes de α-cetoglutarato y la función del ascorbato es la misma en todos los casos. Estas dioxigenasas son tan sólo algunas de las docenas de enzimas relacionados que desempeñan diversas tareas metabólicas en diferentes clases de organismos. El ascorbato también desempeña otras tareas. Es un antioxidante que reacciona enzimática y no enzimáticamente con especies reactivas de oxígeno, las cuales tienen un papel importante en el envejecimiento y en el cáncer.

(continúa en la página siguiente)

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

RECUADRO 4–3 BIOQUÍMICA EN MEDICINA (*continuación de la página anterior*)

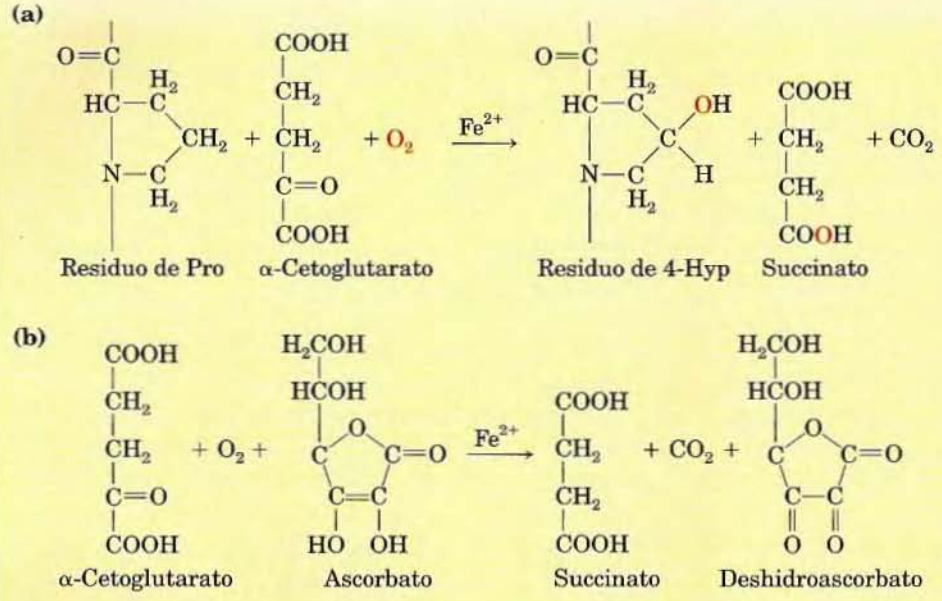


FIGURA 4 Reacciones catalizadas por la prolil 4-hidroxilasa. **(a)** La reacción normal, acoplada a la hidroxilación de prolina y que no requiere ascorbato. En rojo se muestra el destino de los dos átomos de oxígeno del O_2. **(b)** La reacción desacoplada, en la que el α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente sin la hidroxilación de prolina. El ascorbato se consume estequiométricamente en esta reacción al convertirse en deshidroascorbato.

En las plantas el ascorbato es necesario como sustrato de la ascorbato peroxidasa, que convierte H_2O_2 en agua. El peróxido se genera a partir del O_2 producido en la fotosíntesis, una consecuencia inevitable de la generación de O_2 en un compartimiento cargado de poderosos sistemas de oxidación-reducción (Capítulo 19). El ascorbato es también el precursor del oxalacetato y el tartrato en plantas e interviene en la hidroxilación de residuos de Pro de las proteínas de la pared celular denominadas extensinas. El ascorbato está presente en todos los compartimientos celulares de plantas a concentraciones de entre 2 a 25 mM –ésta es la razón de que sean tan buenas fuentes de vitamina C.

El escorbuto aún es un problema hoy. Se encuentra no sólo en lugares remotos con problemas de nutrición, sino también en los campus universitarios norteamericanos. Las únicas verduras consumidas por algunos estudiantes son las de alguna esporádica ensalada y pasan días sin que estos jóvenes consuman fruta. Un estudio de 1998 de 230 estudiantes de la Universidad de Arizona reveló que el 10% sufría una seria deficiencia de vitamina C y 2 de ellos presentaban un nivel tan bajo que probablemente padecían escorbuto. Tan sólo la mitad de los estudiantes del estudio consumían la cantidad diaria recomendada de vitamina C.

¡Consuma verduras y fruta frescas!

El plegamiento proporciona también la diversidad estructural necesaria para que las proteínas puedan llevar a cabo una amplia variedad de funciones biológicas. Entre las proteínas globulares se incluyen enzimas, proteínas de transporte, proteínas motoras, proteínas reguladoras, inmunoglobulinas y proteínas con muchas otras funciones.

Con el inicio del nuevo milenio, el número de estructuras tridimensionales conocidas de proteínas es del orden de varios millares y esta cantidad se duplica cada dos años. Esta riqueza de información estructural esta revolucionando nuestro conocimiento de la estructura de las proteínas, de la relación entre estructura y función e incluso de las rutas evolutivas a través de las cuales las proteínas han alcanzado el estado actual, lo que se puede vislumbrar en las semejanzas entre familias de proteínas a medida que los bancos de datos de proteínas son tamizados y ordenados. La enorme variedad de estructuras podría parecer abrumadora, aunque a medida que se conoce una nueva estructura proteica parece cada vez más claro que es una manifestación de un conjunto finito de patrones de plegamiento estables y reconocibles.

Nuestra discusión acerca de la estructura de las proteínas globulares comienza con los principios extraídos de las primeras estructuras proteicas descritas. A esto le seguirán una descripción detallada de las subestructuras proteicas y una categorización comparativa. Este tipo de discusión sólo es posible gracias a la gran cantidad de información disponible a través de internet de recursos tales como el Protein Data Bank (PDB; www.rcsb.org/pdb), donde están depositadas las estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente de macromoléculas biológicas.

La mioglobina proporcionó las primeras claves acerca de la complejidad de las estructuras proteicas globulares

Arquitectura de proteínas – Estructura terciaria de proteínas globulares pequeñas, II. Mioglobina El primer avance decisivo en la comprensión de la estructura tridimensional de las proteínas globulares se produjo gracias a los estudios de difracción de rayos X con la mioglobina, llevados a cabo por John

Kendrew y colaboradores en los años cincuenta. La mioglobina es una proteína fijadora de oxígeno relativamente pequeña (M_r 16.700) de las células musculares. Su función es almacenar y facilitar la difusión del oxígeno en el músculo en rápida contracción. La mioglobina está formada por una única cadena polipeptídica de 153 residuos aminoácidos de secuencia conocida y por un solo grupo ferroprotoporfirina o hemo. Un grupo hemo idéntico se halla en la hemoglobina, la proteína fijadora de oxígeno de los eritrocitos, y es el responsable del color rojo amarronado oscuro de la mioglobina y de la hemoglobina. La mioglobina es muy abundante en los músculos de los mamíferos buceadores tales como la ballena, la foca y la marsopa, cuyos músculos son tan ricos en esta proteína que tienen un color marrón. El almacenamiento y distribución de oxígeno por la mioglobina muscular les permite permanecer sumergidos durante largos períodos de tiempo. La actividad de la mioglobina se investiga en el Capítulo 5.

En la Figura 4-16 se muestran varias representaciones estructurales de la mioglobina que ilustran la manera en que se pliega la cadena polipeptídica en tres dimensiones –su estructura terciaria–. El grupo en rojo rodeado por la proteína es el hemo. El esqueleto polipeptídico de la molécula de mioglobina está formado por ocho segmentos rectos de hélice α, conectados por giros, algunos de los cuales son giros β. La hélice α de mayor longitud tiene 23 residuos aminoácidos y la más corta solamente siete; todas son dextrógiras. En las regiones helicoidales se hallan más del 70% de los aminoácidos de la molécula de mioglobina. El análisis por rayos X reveló la posición precisa de cada uno de los grupos R, que ocupan todo el espacio contenido dentro de los límites de la cadena plegada.

A partir de la estructura de la mioglobina se dedujeron muchas conclusiones importantes. La posición de las cadenas laterales de los aminoácidos indica que la estructura debe gran parte de su estabilidad a las interacciones hidrofóbicas. La mayor parte de los grupos R hidrofóbicos se hallan situados en el interior de la molécula de mioglobina, lejos del contacto con el agua. Todos los grupos R polares, excepto dos, están en la superficie externa de la molécula, y todos ellos están hidratados. La molécula de mioglobina es tan compacta que en su interior sólo hay espacio para cuatro moléculas de agua. Este denso

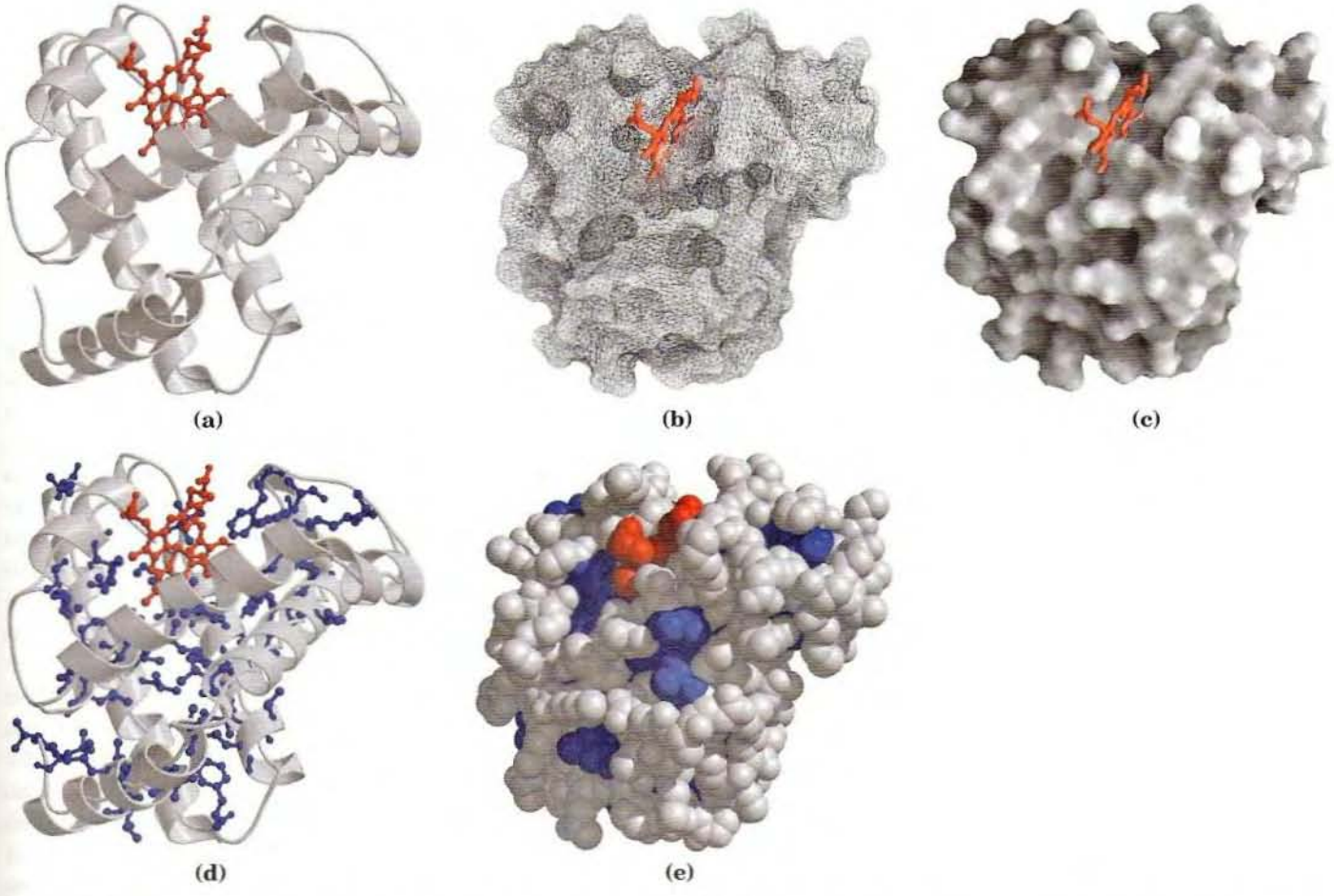


FIGURA 4-16 Estructura terciaria de la mioglobina de cachalote. (PDB ID 1MBO) La orientación de la proteína es la misma en todas las figuras; el grupo hemo se muestra en rojo. Esta figura proporciona ejemplos sobre las diferentes representaciones de la estructura de una proteína. **(a)** El esqueleto polipeptídico se muestra como cintas del tipo introducido por Jane Richardson, que destaca las regiones de estructura secundaria. Las regiones en hélice α se observan con claridad. **(b)** Una imagen de "malla" resalta la superficie de la proteína. **(c)** Una imagen del contorno de superficie de la proteína resulta útil para visualizar las bolsas donde pueden unirse otras moléculas. **(d)** Una representación de cintas que incluye las cadenas laterales (en azul) de los residuos hidrofóbicos de Leu, Ile, Val y Phe. **(e)** Un modelo espacial con todas las cadenas laterales de los aminoácidos. Cada átomo está representado por una esfera que comprende su radio de van der Waals. La mayor parte de los residuos hidrofóbicos (en azul) no son visibles, ya que están sepultados en el interior de la proteína.

núcleo hidrofóbico es típico de las proteínas globulares. La fracción de espacio ocupada por los átomos en un líquido orgánico oscila entre 0,4 y 0,6; en un cristal típico la fracción está entre 0,70 y 0,78, cercana al máximo teórico. En una proteína globular este valor es de alrededor de 0,75, comparable al de un cristal. En un entorno tan empaquetado, las interacciones débiles se potencian mutuamente. Así las cadenas laterales no polares del núcleo están tan cercanas que las interacciones de corto alcance del tipo de van der Waals contribuyen a las interacciones hidrofóbicas estabilizantes.

La deducción de la estructura de la mioglobina confirmó algunas expectativas y a la vez introdujo algunos nuevos elementos de estructura secundaria. Como predijeron Pauling y Corey, todos los enlaces peptídicos se hallan en la configuración plano trans. Las hélices α de la mioglobina proporcionaron la primera prueba experimental directa de la existencia de este tipo de estructura secundaria. Tres de los cuatro residuos de Pro de la mioglobina se encuentran en un giro de la cadena (recuérdese que la prolina, con su ángulo de enlace ϕ fijo y su falta de un grupo N—H en el enlace peptídico para participar en puentes de hidrógeno, es en gran medida incompatible con la estructura en hélice α). El cuarto residuo de Pro se encuentra en una hélice α donde origina la curvatura necesaria para un empaquetamiento compacto de la hélice. Otros giros contienen residuos de Ser, Thr y Asn, que se cuentan entre los aminoácidos que por su tamaño y forma tienden a ser incompatibles con la estructura en hélice α si se encuentran muy próximos en la secuencia de aminoácidos (p. 121).

El grupo hemo plano está situado en una hendidura o bolsa de la molécula de mioglobina. El átomo de hierro del centro del grupo hemo tiene dos posiciones de enlace (de coordinación) perpendiculares al plano del hemo (Fig. 4-17). Una de estas posiciones se une al grupo R de un residuo de His en la posición 93; la otra posición es el sitio donde se une una molécula de O_2. La accesibilidad del grupo hemo al disolvente está muy restringida dentro de esta bolsa. Este hecho es muy importante para la función, puesto que los grupos hemo libres en una solución oxigenada se oxidan rápidamente, pasando de la forma ferrosa (Fe^{2+}), activa en la unión reversible de O_2, a la forma férrica (Fe^{3+}), que no es capaz de fijar O_2.

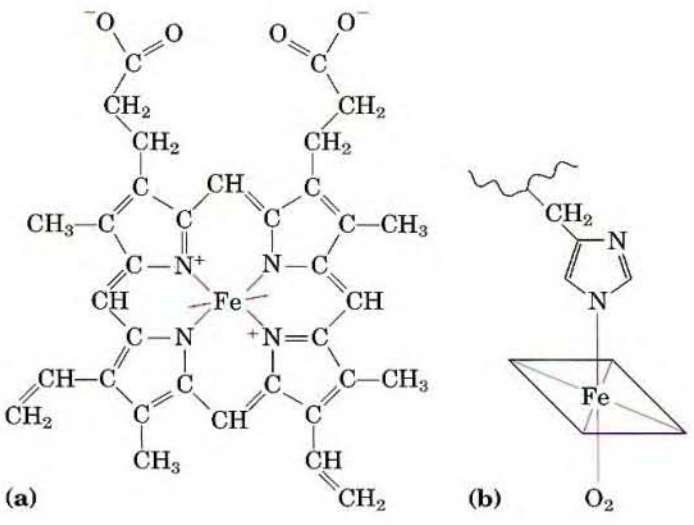


FIGURA 4-17 El grupo hemo. Este grupo se halla en la mioglobina, hemoglobina, citocromos y otras hemoproteínas. **(a)** Está formado por un anillo orgánico complejo, la protoporfirina, a la que se une un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{+}). El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro en el plano de la molécula plana de porfirina y unidos a ella, y dos perpendiculares. **(b)** En la mioglobina y en la hemoglobina, uno de los enlaces de coordinación perpendiculares está unido a un nitrógeno de un residuo de His. El otro está "abierto" y sirve como sitio de unión para una molécula de O_2.

El conocimiento de la estructura de la mioglobina permitió comprender en detalle la correlación entre estructura y función de una proteína. Se ha determinado la estructura de muchas mioglobinas, lo que ha permitido observar los cambios producidos en la estructura a causa de la unión de oxígeno o de otras moléculas. Desde entonces cientos de proteínas han sido sometidas a un análisis similar. Hoy en día, técnicas tales como la espectroscopia de RMN complementan los datos de difracción por rayos X, proporcionando más información sobre la estructura de una proteína (Recuadro 4-4). La secuenciación del DNA genómico de muchos organismos (Capítulo 9) ha permitido identificar miles de genes que codifican proteínas de secuencia conocida pero función desconocida. Nuestra idea inicial sobre la función de estas proteínas a menudo proviene de nuestra aún limitada comprensión de cómo determina la estructura primaria la estructura terciaria y de cómo determina la estructura terciaria la función.

Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias diversas

Como consecuencia de la elucidación de las estructuras terciarias de cientos de proteínas globulares mediante análisis por rayos X, se hizo evidente que la mioglobina representa solamente una de las muchas posibilidades de plegamiento de una cadena polipeptídica. En la Figura 4-18 se comparan las estructuras del citocromo *c*, lisozima y ribonucleasa. Los tres poseen secuencias de aminoácidos propias y estructuras tridimensionales diferentes, lo que se refleja en diferencias en su función. Todos son relativamente pequeños y es fácil trabajar con ellos, lo cual facilita el análisis estructural. El citocromo *c* actúa como un componente de la cadena respiratoria en las mitocondrias (Capítulo 19). Al igual que la mioglobina, el citocromo *c* es una hemoproteína (M_r 12.400) formada por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 100 residuos y un único grupo hemo. En este caso la protoporfirina del grupo hemo se halla unida covalentemente al polipéptido. Tan sólo un 40% del polipéptido se encuentra estructurado en forma de hélice α, en comparación con el 70% observado en el caso de la cadena de mioglobina. El resto de la cadena de citocromo *c* contiene giros β y segmentos extendidos o plegados irregularmente.

El lisozima (M_r 14.600) es un enzima que abunda en la clara de huevo y en las lágrimas humanas y cataliza la rotura hidrolítica de los polisacáridos de las paredes celulares protectoras de algunas familias de bacterias. El lisozima recibe este nombre porque puede lisar, o degradar, las paredes celulares bacterianas y actuar por tanto como agente bactericida. Al

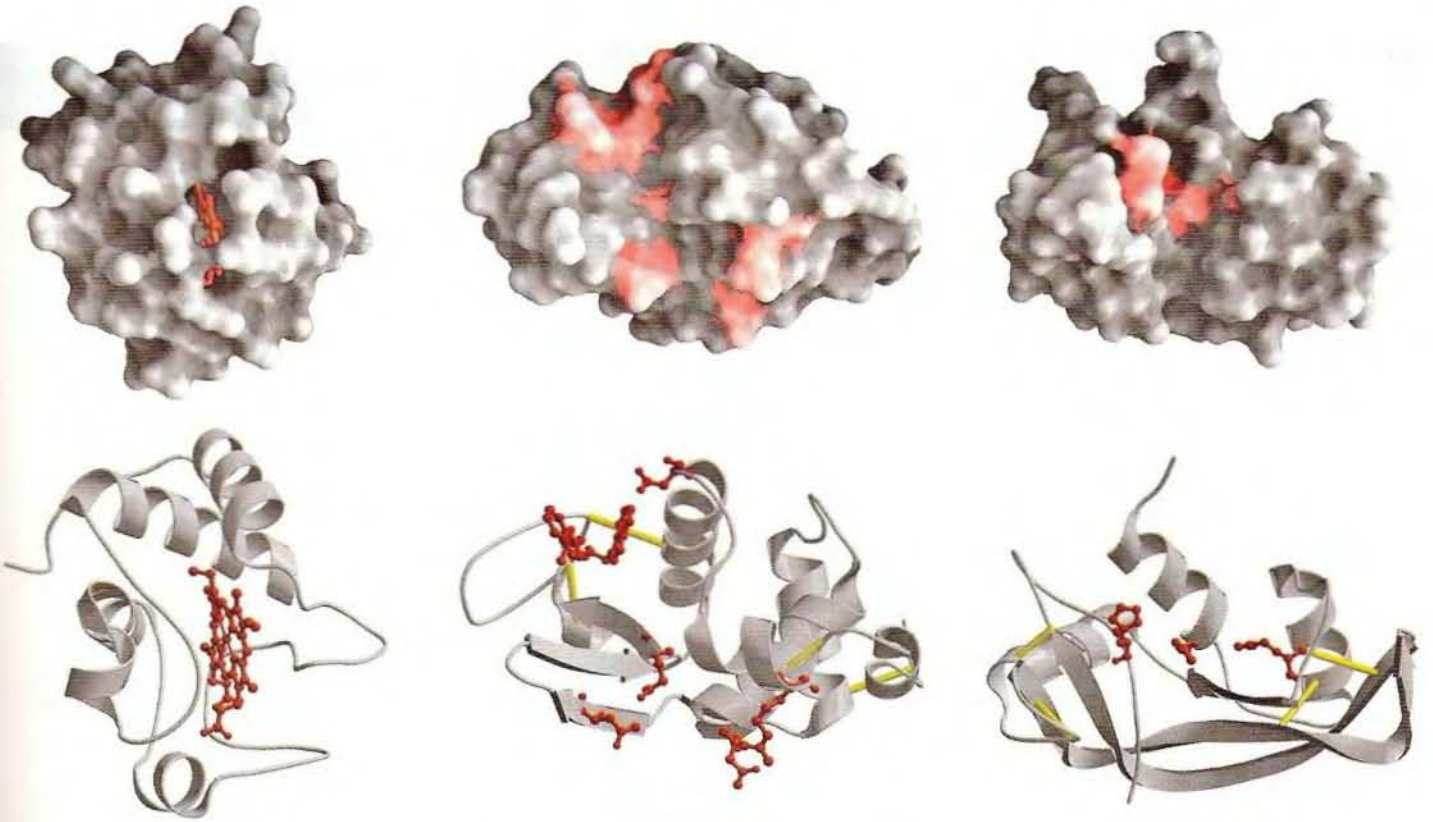


FIGURA 4-18 Estructuras tridimensionales de algunas proteínas pequeñas. Se muestran aquí el citocromo *c* (PDB ID 1CCR), el lisozima (PDB ID 3LYM) y la ribonucleasa (PDB ID 3RN3), todos en representaciones de contorno de superficie y de cintas, las dos en la misma orientación. En la representación de cintas, las regiones en conformación β se representan mediante flechas planas y las hélices α mediante cintas helicoidales. Los grupos funcionales clave (el grupo hemo en el citocromo *c* y cadenas laterales de aminoácidos en los centros activos del lisozima y la ribonucleasa) se muestran en rojo. Los enlaces disulfuro de las representaciones en cintas se muestran en amarillo.

igual que en el caso del citocromo *c*, aproximadamente un 40% de sus 129 aminoácidos se encuentran en segmentos de hélice α pero su distribución es diferente y también posee una cierta cantidad de estructura en hoja β (Fig. 4-18) Cuatro puentes disulfuro contribuyen a la estabilidad de esta estructura. Las hélices α revisten una larga hendidura en la parte lateral de la molécula denominada sitio activo, donde tienen lugar la fijación del sustrato y la catálisis. El polisacárido bacteriano que actúa como sustrato del lisozima encaja en esta hendidura. **Estructura de proteínas – Estructura terciaria de proteínas globulares pequeñas, III. Lisozima**

La ribonucleasa, otra proteína globular pequeña (M_r 13.700), es un enzima secretado por el páncreas al intestino delgado, donde cataliza la hidrólisis de ciertos enlaces de ácidos ribonucleicos presentes en la ingesta. Su estructura terciaria, determinada mediante análisis por difracción de rayos X, presenta muy pocos de los 124 aminoácidos de su cadena polipeptídica en conformación de hélice α y contiene en cambio muchos segmentos plegados en conformación β (Fig. 4-18). Al igual que el lisozima, la ribonucleasa tiene cuatro puentes disulfuro entre diferentes lazos de la cadena polipeptídica.

En las proteínas pequeñas, los residuos hidrofóbicos estarán probablemente menos protegidos en el interior hidrofóbico –la geometría simple dicta que cuanto más pequeña sea la proteína menor será la relación entre el volumen y el área de la superficie–. Las proteínas pequeñas también poseen menos interacciones débiles potenciales disponibles para estabilizarlas. Esto explica por qué la mayoría de las proteínas pequeñas tales como las de la Figura 4-18 están estabilizadas por enlaces covalentes. El lisozima y la ribonucleasa, por ejemplo, presentan puentes disulfuro y el grupo hemo del citocromo *c* está

TABLA 4-2 Cantidades aproximadas de hélice α y conformación β en algunas proteínas monocadena

	*Residuos (%)**	
Proteína (residuos totales)	*Hélice α*	*Conformación β*
Quimotripsina (247)	14	45
Ribonucleasa (124)	26	35
Carboxipeptidasa (307)	38	17
Citocromo c (104)	39	0
Lisozima (129)	40	12
Mioglobina (153)	78	0

Fuente: datos extraídos de Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, Parte I: *The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

*Las partes de las cadenas polipeptídicas no plegadas en hélice α o conformación β consisten en bucles y fragmentos extendidos o plegados irregularmente. Los segmentos en hélice α o conformación β se desvían a veces de sus dimensiones y geometría normales.

RECUADRO 4-4 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína

Difracción de rayos X

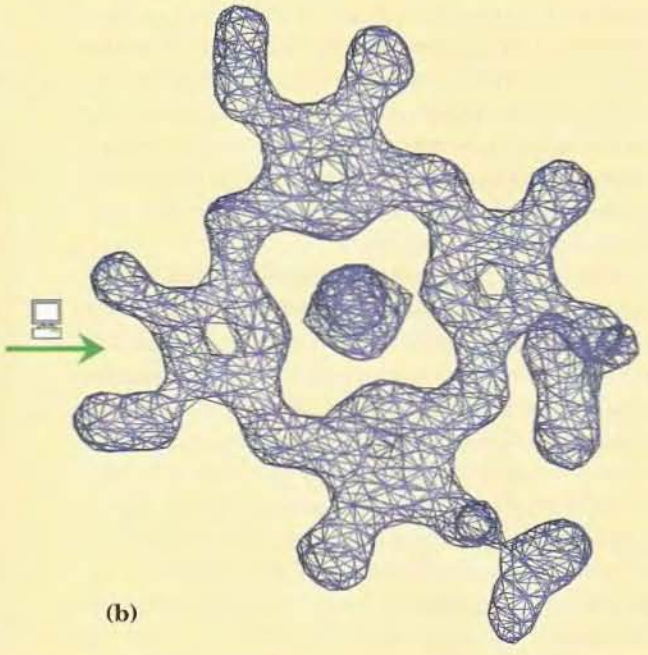
El espaciado entre átomos de una red cristalina puede determinarse midiendo la localización y la intensidad de las manchas producidas en una película fotográfica por un haz de rayos X de longitud de onda conocida al ser difractado por los electrones de los átomos. Por ejemplo, el análisis por rayos X de cristales de NaCl demuestra que los iones Na^+ y Cl^- están distribuidos en una red cúbica sencilla. Los métodos de difracción de rayos X también permiten estudiar el espaciado de diferentes tipos de átomos en moléculas orgánicas complejas, incluso tan grandes como las proteínas. Sin embargo, la técnica para analizar cristales de moléculas complejas es mucho más difícil que para la sal. Cuando el patrón repetitivo del cristal es una molécula tan grande como, por ejemplo, una proteína, el gran número de átomos de una molécula da lugar a millares de señales de difracción que deben analizarse por ordenador.

El proceso se entiende a un nivel elemental si se considera cómo se generan las imágenes en un microscopio óptico. La luz emitida desde una fuente puntual se enfoca sobre un objeto. Las ondas luminosas son dispersadas por el objeto y recombinadas por unas lentes que generan una imagen aumentada del objeto. El tamaño menor de un objeto cuya estructura puede determinarse mediante este sistema (el poder resolutivo del microscopio) viene determinado por la longitud de onda de la luz –en este caso luz visible con longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm–. Los objetos inferiores a la mitad de la longitud de onda de la luz incidente no pueden ser resueltos. Para resolver objetos tan pequeños como las proteínas, son necesarios los rayos X, cuyas longitudes de onda se encuentran en el intervalo de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). No existen, sin embargo, lentes que puedan recombinar los rayos X para formar una imagen; en su lugar el patrón de difracción de los rayos X se recoge directamente y a continuación se convierte en una imagen mediante técnicas matemáticas.

La cantidad de información obtenida mediante cristalografía de rayos X depende del grado de orden estructural de la muestra. A partir de los primeros estudios de los patrones de difracción de proteínas fibrosas que presentan una ordenación regular en cabellos y lana se obtuvieron algunos parámetros estructurales importantes. Sin embargo, los haces ordenadamente formados por proteínas fibrosas no son cristales –las moléculas se disponen una al lado de otra pero no todas están orientadas en la misma dirección–. La obtención de información estructural tridimensional más detallada hace necesario partir de cristales de proteína altamente ordenados. La cristalización de proteínas es una ciencia algo empírica y las estructuras de muchas proteínas importantes no se conocen aún, simplemente por la dificultad para cristalizarlas. Los que trabajan en ello han comparado la dificultad para obtener cristales de proteína con la de conseguir mantener pelotas del juego de bolos unidas con cinta adhesiva.

Operativamente, se pueden distinguir diferentes etapas en el análisis estructural por rayos X (Fig. 1). Una vez se ha obtenido un cristal, se coloca en un haz de rayos X, entre la fuente de rayos X y el detector, y se genera un modelo regular de señales de difracción denominadas reflexiones. Las señales o puntos se generan por el haz de rayos X difractado

(a)



(b)

y cada uno de los átomos de la molécula contribuye en cada uno de los puntos. El patrón global de puntos da lugar a la construcción de un mapa de densidad electrónica de la proteína mediante una herramienta matemática llamada transformada de Fourier. A efectos prácticos es como si el ordenador actuara como una "lente computacional". A continuación se construye un modelo para la estructura coherente con el mapa de densidad electrónica.

John Kendrew observó que el patrón de difracción de rayos X de la mioglobina cristalina (aislada de músculo de cachalote) es muy complejo, presentando unas 25.000 reflexiones. El estudio de éstas por ordenador se hizo en varias etapas. En cada una de ellas se mejoró la resolución, hasta que en 1959 pudieron determinarse las posiciones de casi todos los átomos. La secuencia de aminoácidos obtenida por análisis químico coincidía con el modelo molecular. Desde entonces se han determinado las estructuras de centenares de proteínas con una resolución similar.

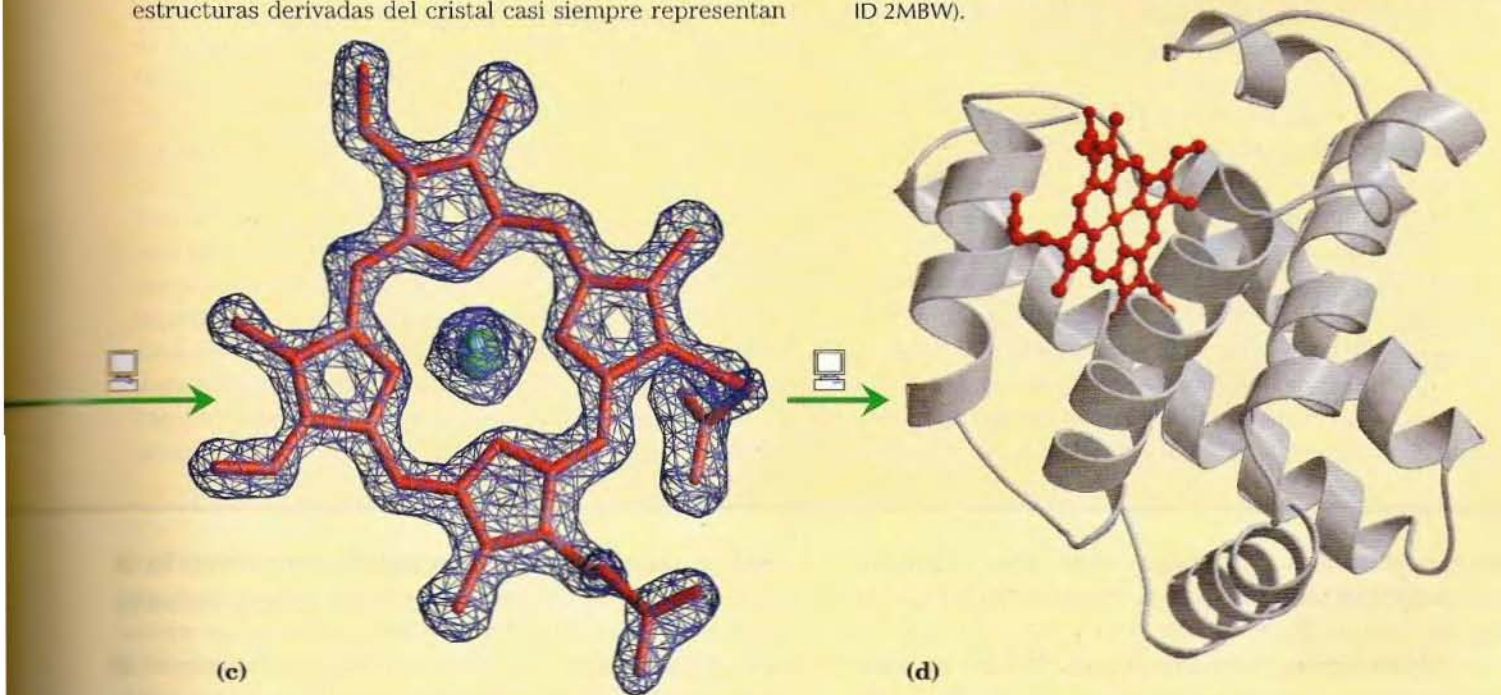
El entorno físico en el interior del cristal no es idéntico al de una solución o de una célula viva. Un cristal impone un espacio y un tiempo promedio en la estructura deducida de su análisis y los estudios de difracción de rayos X aportan escasa información acerca de los movimientos moleculares en el interior de la proteína. La conformación de las proteínas en un cristal podría, en principio, verse también afectada por factores no fisiológicos tales como contactos proteína-proteína casuales en el interior del cristal. Sin embargo, cuando se comparan las estructuras derivadas de los análisis cristalográficos con la información estructural obtenida de otras formas (como la RMN, que se describe a continuación), las estructuras derivadas del cristal casi siempre representan una conformación funcional de la proteína. La cristalografía de rayos X puede aplicarse de forma satisfactoria a proteínas demasiado grandes para ser analizadas estructuralmente por RMN.

Resonancia magnética nuclear

Un método complementario importante para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas es la resonancia magnética nuclear (RMN). Las técnicas modernas de RMN están siendo utilizadas para determinar estructuras de macromoléculas cada vez mayores, incluidos glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas entre pequeñas y de tamaño promedio. Una de las ventajas de los estudios de RMN es que se realizan con las macromoléculas en solución, mientras que la cristalografía de rayos X está limitada a moléculas que pueden ser cristalizadas. La RMN puede incluso penetrar en la parte dinámica de la estructura de las proteínas, lo que in-

(continúa en la página siguiente)

FIGURA 1 Etapas en la determinación de la estructura de la mioglobina de cachalote mediante cristalografía de rayos X. **(a)** Patrones de difracción de rayos X generados a partir de un cristal de proteína. **(b)** Los datos extraídos de los patrones de difracción se utilizan para calcular el mapa de densidad electrónica de la proteína. Se muestra la densidad electrónica de sólo una parte de la estructura, el hemo. **(c)** Las regiones con mayor densidad electrónica indican la localización de núcleos atómicos y esta información se utiliza para recomponer la estructura final. Aquí se modeló la estructura del grupo hemo en el mapa de densidad electrónica. **(d)** Estructura completa de la mioglobina de cachalote, incluyendo el hemo (PDB ID 2MBW).



RECUADRO 4-4 BIOQUÍMICA PRÁCTICA (*continuación de la página anterior*)

cluye los cambios conformacionales, el plegamiento de la proteína y las interacciones con otras moléculas.

La RMN es una manifestación del momento angular de spin nuclear, una propiedad mecánicocuántica del núcleo atómico. Sólo ciertos átomos poseen el tipo de spin nuclear que origina la señal de RMN, entre los que se incluyen ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F y ^{31}P, que poseen el tipo de spin nuclear que da lugar a la señal de RMN. El spin nuclear genera un dipolo magnético. Cuando a una solución que contiene un solo tipo de macromolécula se le aplica un campo magnético intenso y estático, los dipolos magnéticos se alinean en el campo en una de dos orientaciones, paralela (energía baja) o antiparalela (energía alta). Se aplica un pulso breve (~10 μs) de energía electromagnética de una frecuencia adecuada (frecuencia de resonancia, dentro de la zona de radiofrecuencia) y en ángulo recto con los núcleos alineados en el campo magnético. Parte de la energía es absorbida debido al paso del núcleo al estado de energía elevada y el espectro de absorción resultante contiene información acerca de la identidad del núcleo y de su entorno químico inmediato. Para generar un espectro de RMN como el que muestra la Figura 2, se recogen los datos de muchos experimentos llevados a cabo sobre una muestra y se promedian, aumentando así la relación señal-ruido.

El ^{1}H es especialmente importante en los experimentos de RMN debido a sus elevadas sensibilidad y abundancia natural. El espectro de RMN ^{1}H puede llegar a ser muy complicado en el caso de las macromoléculas. Incluso una proteína pequeña tiene cientos de átomos ^{1}H, dando lugar a un espectro de RMN monodimensional demasiado complejo para ser analizado. El análisis estructural de proteínas fue posible con la llegada de las técnicas de RMN bidimensional (Fig. 3). Estos métodos permiten medir los acoplamientos de los espines nucleares dependientes de la distancia en átomos cercanos en el espacio [el efecto nuclear Overhauser (NOE), un método apodado NOESY] o el acoplamiento de espines nucleares de átomos conectados por enlaces covalentes (espectroscopia de correlación total, o TOCSY).

La traducción de un espectro bidimensional de RMN en una estructura tridimensional completa puede ser un proceso laborioso. Las señales NOE aportan cierta información sobre las distancias entre átomos individuales, pero para que estas restricciones en las distancias puedan ser útiles, se han de identificar los átomos que originan estas señales.

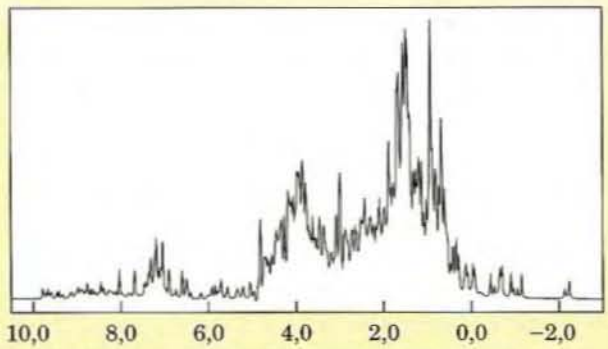


FIGURA 2 Espectro monodimensional de RMN de una globina de un gusano marino. Esta proteína y la mioglobina de cachalote son análogos estructurales muy cercanos, pertenecientes a la misma familia estructural de proteínas, y comparten la función de transporte de oxígeno.

Los experimentos complentarios de TOCSY pueden ayudar a identificar qué señales NOE corresponden a átomos que están unidos por enlaces covalentes. Ciertos patrones de señales NOE se han asociado con estructuras secundarias tales como la hélice α. Con la moderna ingeniería genética (Capítulo 9) se pueden producir proteínas que contengan los isótopos raros ^{13}C o ^{15}N. Las nuevas señales de RMN producidas por estos átomos y el acoplamiento con las señales de ^{1}H producidas por estas sustituciones son de ayuda en la asignación de las señales individuales de NOE ^{1}H. Este proceso también está favorecido por el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Para generar una estructura tridimensional, se introducen las restricciones de distancia en un ordenador junto con restricciones geométricas conocidas como la quiralidad, los radios de van der Waals y las distancias de unión y los ángulos. El ordenador genera una familia de estructuras estrechamente relacionadas que representan una gama de conformaciones coherente con las restricciones de distancia NOE (Fig. 3c). La incertidumbre en las estructuras generadas por RMN es en parte un reflejo de las vibraciones moleculares (respiración) de la estructura de la proteína en disolución, que se tratará en más detalle en el Capítulo 5. La incertidumbre experimental normal también juega su papel.

Cuando se ha determinado una estructura proteica tanto por cristalografía de rayos X como por RMN, ambas estructu-

unido covalentemente a la proteína por dos lados, originando una estabilización significativa de la estructura de la proteína completa.

La Tabla 4-2 muestra las proporciones de hélice α y conformación β (como porcentaje de residuos en cada estructura secundaria) en una serie de proteínas. Cada una de ellas posee una estructura distinta, adaptada a su función biológica. Sin embargo, comparten algunas propiedades importantes. Todas están plegadas de manera compacta y en todos los casos las cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos están orientadas hacia el interior y las cadenas laterales hidrofílicas están en la superficie. Estas estructuras específicas se encuentran también estabilizadas por muchos enlaces de hidrógeno y algunas interacciones iónicas.

ras presentan por lo general una buena correlación. En algunos casos, las localizaciones precisas de determinadas cadenas laterales de aminoácidos en el exterior de la proteína son diferentes, a menudo a causa de efectos relacionados con el empaquetamiento de moléculas de proteína adyacentes en el cristal. Las dos técnicas juntas son el núcleo generador de un rápido incremento en la disponibilidad de información estructural sobre las macromoléculas de las células vivas.

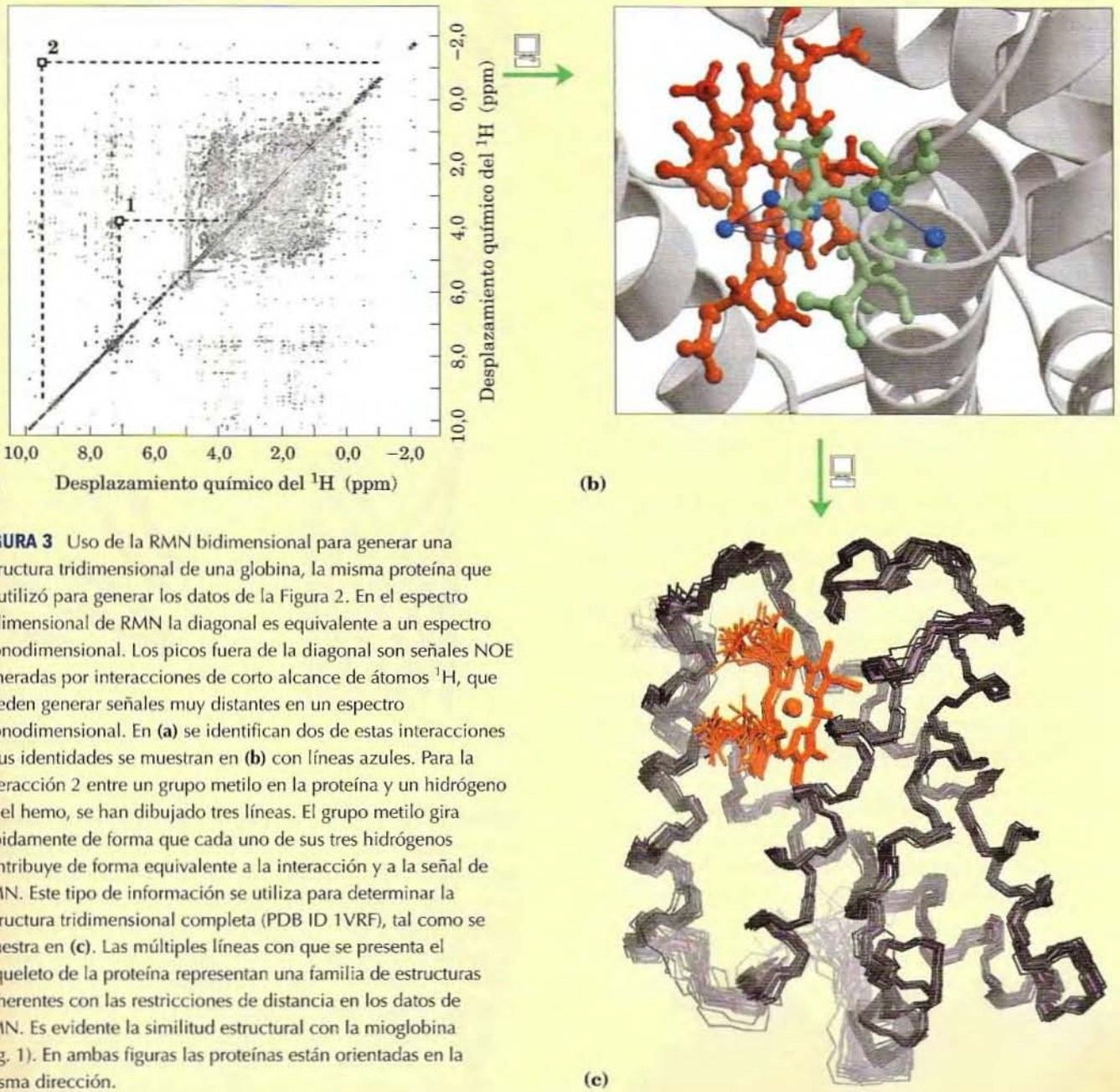


FIGURA 3 Uso de la RMN bidimensional para generar una estructura tridimensional de una globina, la misma proteína que se utilizó para generar los datos de la Figura 2. En el espectro bidimensional de RMN la diagonal es equivalente a un espectro monodimensional. Los picos fuera de la diagonal son señales NOE generadas por interacciones de corto alcance de átomos ^{1}H, que pueden generar señales muy distantes en un espectro monodimensional. En **(a)** se identifican dos de estas interacciones y sus identidades se muestran en **(b)** con líneas azules. Para la interacción 2 entre un grupo metilo en la proteína y un hidrógeno en el hemo, se han dibujado tres líneas. El grupo metilo gira rápidamente de forma que cada uno de sus tres hidrógenos contribuye de forma equivalente a la interacción y a la señal de RMN. Este tipo de información se utiliza para determinar la estructura tridimensional completa (PDB ID 1VRF), tal como se muestra en **(c)**. Las múltiples líneas con que se presenta el esqueleto de la proteína representan una familia de estructuras coherentes con las restricciones de distancia en los datos de RMN. Es evidente la similitud estructural con la mioglobina (Fig. 1). En ambas figuras las proteínas están orientadas en la misma dirección.

El análisis de numerosas proteínas globulares revela patrones estructurales comunes

Arquitectura de proteínas – Estructura terciaria de proteínas globulares grandes Para el principiante, las muy complejas estructuras terciarias de proteínas globulares más grandes que las de la Figura 4-18 se describen mejor en virtud de los patrones estructurales que se repiten en proteínas diferentes y a menudo no relacionadas. La estructura tridimensional de una proteína globular típica se puede considerar un conjunto de segmentos polipeptídicos en conformaciones de hélice α y hoja β unidas por segmentos de conexión. La estructura se puede describir definiendo cómo se apilan estos segmentos uno con el otro y cómo se disponen los segmentos de cone-

xión. Este formalismo ha llevado al desarrollo de bases de datos que permiten comparaciones informativas entre estructuras de proteínas.

La comprensión de una estructura tridimensional entera se realiza a partir del análisis de sus partes. Empezaremos por definir los términos utilizados para describir las subestructuras de las proteínas y pasaremos a las reglas de plegamiento elucidadas del análisis de numerosas estructuras proteicas.

Las **estructuras supersecundarias,** también denominadas **motivos** o **plegamientos,** son disposiciones muy estables de varios elementos de estructura secundaria y las conexiones entre ellos. No hay un acuerdo universal sobre la aplicación de estos tres términos y a menudo se utilizan indistintamente. También se aplican a un amplia serie de estructuras. Los motivos reconocidos van de simples a complejos y aparecen a menudo como unidades repetitivas o combinaciones. Un solo motivo grande puede englobar a la proteína entera. Ya hemos descrito un motivo bien estudiado, el superenrollamiento de la α-queratina, también hallado en otras muchas proteínas.

Los polipéptidos con más de unos pocos cientos de residuos aminoácidos a menudo se pliegan en dos o más unidades globulares estables denominadas **dominios.** En muchos casos un dominio de una proteína grande mantendrá su estructura tridimensional correcta incluso cuando se separa del resto de la cadena polipeptídica. Una proteína con múltiples dominios puede aparecer como formada por distintos lóbulos globulares para cada dominio (Fig. 4-19), pero es más habitual que los extensos contactos entre dominios hagan difícil discernir los dominios individuales. A menudo los diferentes dominios tienen funciones distintas, como la unión de pequeñas moléculas o la interacción con otras proteínas. Las proteínas pequeñas suelen tener un solo dominio (el dominio *es* la proteína).

El plegamiento de los polipéptidos está sujeto a una serie de restricciones físicas y químicas. Una muestra de las principales reglas del plegamiento que se han ido acumulando permite definir algunos motivos sencillos.

1. Las interacciones hidrofóbicas aportan una gran contribución a la estabilidad de las estructuras de las proteínas. La interiorización de los grupos R de los aminoácidos hidrofóbicos que permite la exclusión de las

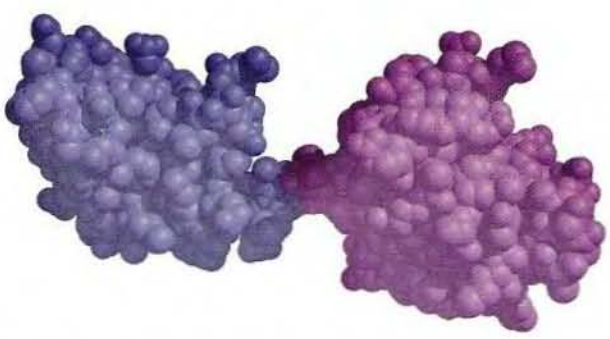


FIGURA 4-19 Dominios estructurales en el polipéptido troponina C. (PDB ID 4TNC) Esta proteína de fijación de calcio asociada con el músculo presenta dominios de fijación de calcio separados, indicados en azul y púrpura.

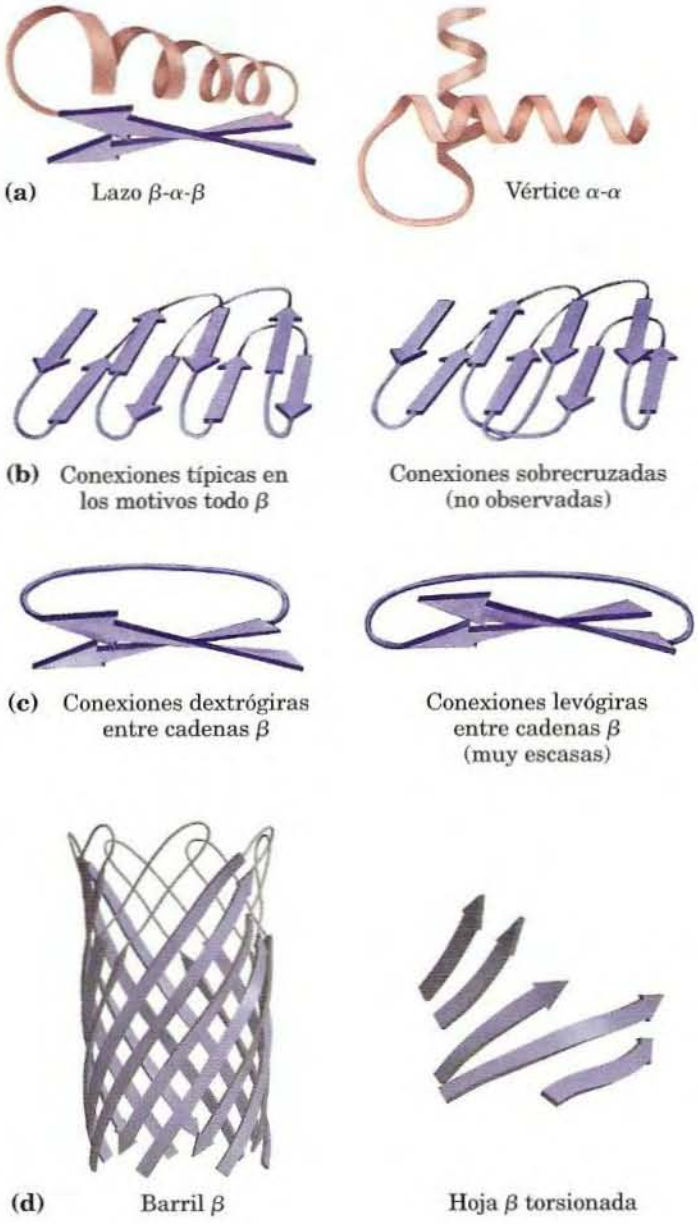


FIGURA 4-20 Patrones de plegamiento estables en proteínas. **(a)** Dos motivos simples y abundantes que proporcionan dos capas de estructura secundaria. Las cadenas laterales de los aminoácidos en la interfase entre elementos de estructura secundaria están protegidas del agua. Obsérvese que las cadenas β en el lazo β-α-β tienden a girar dextrógiramente. **(b)** Conexiones entre cadenas β en hojas β superpuestas. Se muestran las hojas desde un extremo; en el esquema no se incluyen las torsiones. Los conectores más gruesos son los que se encuentran en los extremos más cercanos al observador; los conectores finos están en los extremos más lejanos de las cadenas β. Los conectores de un extremo determinado (por ejemplo, cerca del observador) no se cruzan entre sí. **(c)** Debido a la torsión de las cadenas β, las conexiones entre cadenas son generalmente dextrógiras. Las conexiones levógiras deben formar ángulos más agudos y son difíciles de formar. **(d)** Dos disposiciones de cadenas β estabilizadas por la tendencia de las cadenas a girar. Este barril β es un solo dominio de la α-hemolisina de la bacteria *Staphylococcus aureus* (PDB ID 7AHL). Las hojas β torsionadas son de un dominio de la fotoliasa (una proteína que repara ciertos tipos de lesiones en el DNA) de *E. coli* (PDB ID 1DNP).

moléculas de agua requiere un mínimo de dos capas de estructura secundaria. Dos motivos sencillos, el **lazo β-α-β** y el **vértice α-α** (Fig. 4-20a), generan dos capas.

2. Generalmente, cuando coinciden simultáneamente en las proteínas, las hélices α y las hojas β se localizan en diferentes capas estructurales. Esto es debido a que el esqueleto de un segmento polipeptídico en conformación β no puede formar fácilmente enlaces de hidrógeno con la hélice α alineada con el mismo (Fig. 4-7).
3. Los segmentos polipeptídicos adyacentes en la secuencia primaria están normalmente apilados uno junto al otro en la estructura plegada. Aunque segmentos distantes en el polipéptido pueden estar juntos en la estructura terciaria, ésta no es la norma.
4. Las conexiones entre elementos de estructura secundaria no pueden cruzarse o formar nudos (Fig. 4-20b).
5. La conformación β es más estable cuando los segmentos individuales están ligeramente torsionados en sentido dextrógiro. Esto influye tanto en la disposición relativa de las hojas β como en el camino de conexión del polipéptido entre ellas. Por ejemplo, dos hebras β paralelas deben conectarse mediante una hebra que cruce por encima (Fig. 4-20c). En principio, este cruzamiento por encima puede tener una conformación levógira o dextrógira, pero en las proteínas casi siempre es dextrógira. Las conexiones dextrógiras tienden a ser más cortas que las levógiras y a doblarse a través de ángulos menores, siendo más fáciles de formar. La torsión de las hojas β también conduce a una torsión característica de la estructura formada cuando están juntos muchos segmentos. El barril β y la hoja β torsionada son dos ejemplos de las estructuras resultantes (Fig. 4-20d) y el núcleo de muchas estructuras mayores.

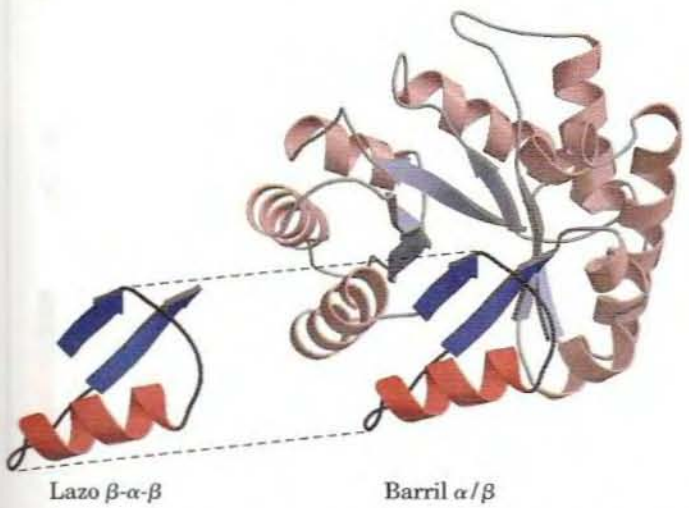


FIGURA 4-21 Construcción de dominios grandes a partir de otros más pequeños. El barril α/β es un motivo común construido a partir de repeticiones del motivo de lazo β-α-β más sencillo. Este barril α/β es un dominio del enzima piruvato quinasa de conejo (PDB ID 1PKN).

Siguiendo estas reglas pueden construirse motivos complejos a partir de otros más sencillos. Por ejemplo, una serie de lazos β-α-β, dispuestos de forma que las hebras β formen un barril, originan un motivo común muy estable denominado barril α/β (Fig. 4-21). En esta estructura cada segmento β paralelo está unido a su vecino por un segmento de hélice α. Todas las conexiones son dextrógiras. El barril α/β se encuentra en muchos enzimas, a menudo con un sitio de unión para un cofactor o sustrato en forma de bolsa cerca de uno de los extremos del barril. Obsérvese que los dominios que presentan patrones de plegamiento similares se dice que tienen el mismo motivo incluso si sus hélices α y hojas β difieren en longitud.

Los motivos proteicos constituyen la base de la clasificación estructural de las proteínas

Arquitectura de proteínas – Estructura terciaria de proteínas globulares grandes, IV. Clasificación estructural de las proteínas

Como hemos visto, la complejidad de la estructura terciaria disminuye al considerar las subestructuras. Los investigadores han organizado el contenido completo de unos bancos de datos en virtud del nivel jerárquico de la estructura, como en el banco de datos de la Structural Classification of Proteins (SCOP). En el nivel de clasificación más elevado, el banco de datos SCOP (http://scop.mrc-lmb.cam-ac.uk/scop) se apropia de un esquema ya utilizado comúnmente, en el que las estructuras de las proteínas se dividen en cuatro clases: todo α, todo β, α/β (en las cuales los segmentos α y β están alternados o entremezclados) y $\alpha + \beta$ (en las cuales las regiones α y β están algo segregadas) (Fig. 4-22). Dentro de cada clase existen de decenas a centenares de disposiciones de plegamiento diferentes, construidas a partir de subestructuras cada vez más fácilmente identificables. Algunas de las subestructuras ordenadas son muy comunes, otras se han encontrado sólo en una proteína. La Figura 4-22 muestra una variedad de motivos ordenados de cada una de las cuatro clases de estructuras de proteínas. Los que se ilustran son sólo una pequeña muestra de los cientos de motivos conocidos. Sin embargo, el número de patrones de plegamiento no es infinito. A medida que la velocidad con que se describe una nueva estructura proteica aumenta, la fracción de estas estructuras que contienen un motivo nuevo disminuye. Es posible que existan menos de 1000 plegamientos diferentes o motivos en todas las proteínas. La Figura 4-22 también muestra cómo las proteínas pueden organizarse basándose en la presencia de los motivos que acabamos de tratar. Los dos niveles de organización más altos, **clase** y **plegamiento,** son puramente estructurales. Por debajo de este nivel, la categorización está basada en relaciones evolutivas.

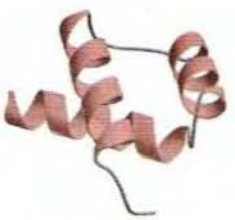
Existen muchos ejemplos de estructuras de dominios o de motivos que se observan repetidamente, revelando que la estructura terciaria de las proteínas se conserva mucho más que la secuencia primaria. La comparación de estructuras de proteínas puede proporcionar, por tanto, mucha información acerca de la evolución. Se dice que pertenecen a la misma **familia de proteínas** aquellas que presentan similitudes significativas de secuencia primaria, que poseen una estructura y función demostrablemente similares o que reúnen las dos ca-

Todo α

1AO6
Albúmina sérica
Albúmina sérica
Albúmina sérica
Albúmina sérica
Humano (*Homo sapiens*)

1BCF
Tipo ferritina
Tipo ferritina
Ferritina
Bacterioferritina (citocromo b_1)
Escherichia coli

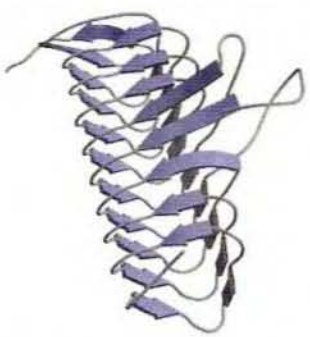
1GAI
α/α Toroidal
Glucosiltransferasa de 6 horquillas
Glucoamilasa
Glucoamilasa
Aspergillus awamori, variante × 100



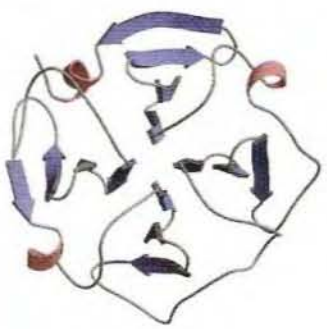
1ENH
Haz de 3 hélices de unión a DNA/RNA
Tipo homeodominio
Homeodominio
engrailed Homeodominio
Drosophila melanogaster

Todo β

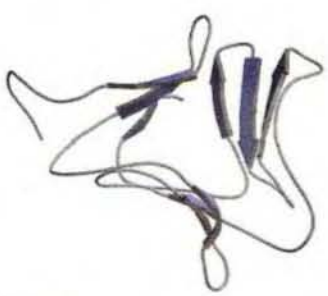
1HOE
Inhibidor de α-amilasa tendamistat
Inhibidor de α-amilasa tendamistat
Inhibidor de α-amilasa tendamistat
Inhibidor de α-amilasa tendamistat
Streptomyces tendae



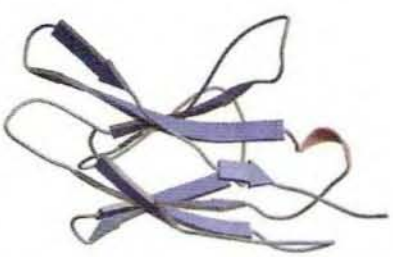
1LXA
Hélice β monohebra levógira
Enzimas tipo LpxA trimérica
UDP *N*-acetilglucosamina aciltransferasa
UDP *N*-acetilglucosamina aciltransferasa
Escherichia coli



1PEX
Propulsor β de cuatro palas
Dominio tipo hemopexina
Dominio tipo hemopexina
Dominio carboxilo-terminal de colagenasa-3 (MMP-13)
Humano (*Homo sapiens*)



1JPC
β-Prisma II
Lectina de plantas esp. para α-D-manosa
Lectina de plantas esp. para α-D-manosa
Lectina (aglutinina)
Anémona (*Galanthus nivalis*)



1CD8
β-Sándwich tipo inmunoglobulina
Inmunoglobulina
Dominio V (tipo dominio variable de anticuerpo)
CD8
Humano (*Homo sapiens*)

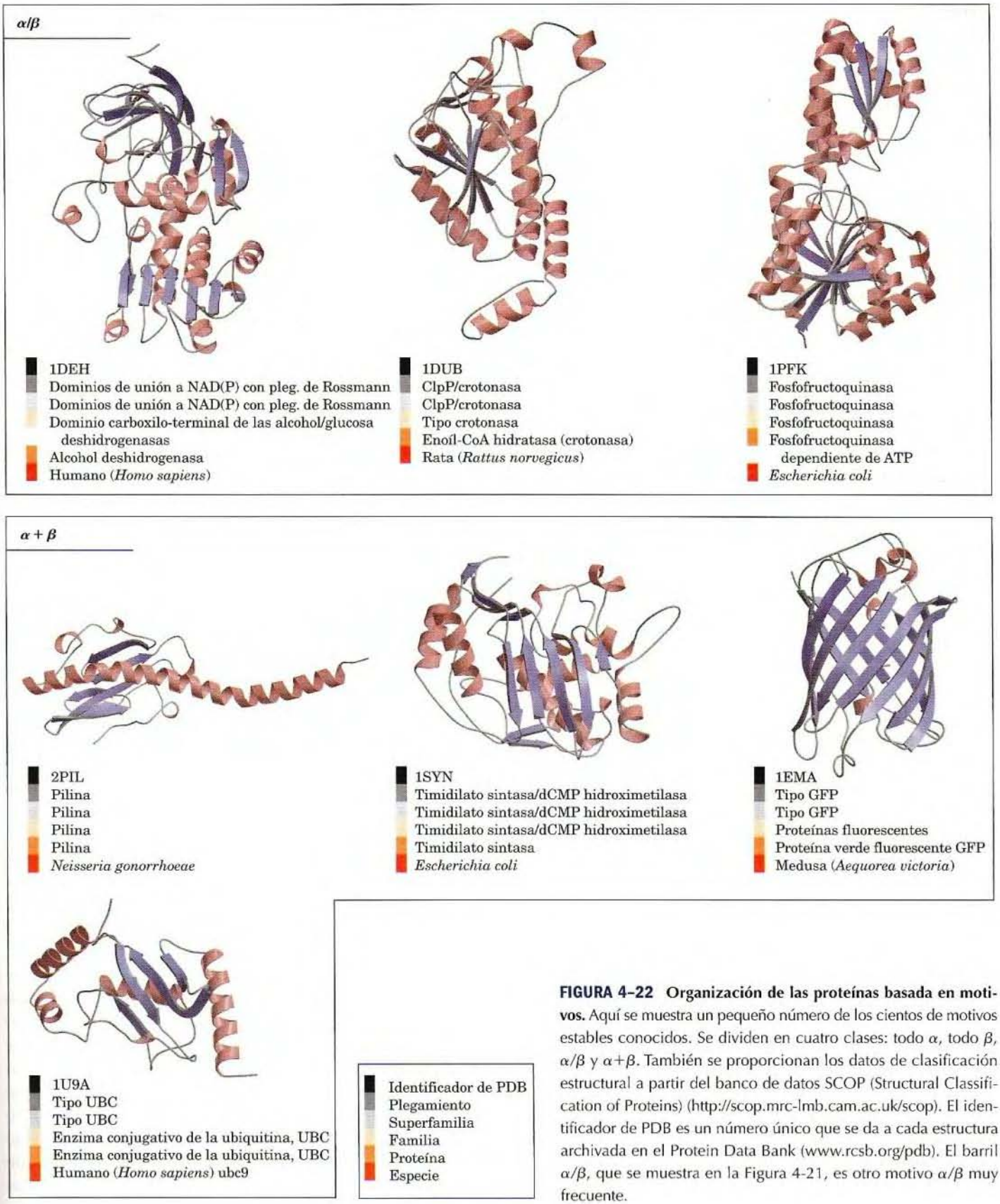


FIGURA 4-22 Organización de las proteínas basada en motivos. Aquí se muestra un pequeño número de los cientos de motivos estables conocidos. Se dividen en cuatro clases: todo α, todo β, α/β y $\alpha+\beta$. También se proporcionan los datos de clasificación estructural a partir del banco de datos SCOP (Structural Classification of Proteins) (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop). El identificador de PDB es un número único que se da a cada estructura archivada en el Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). El barril α/β, que se muestra en la Figura 4-21, es otro motivo α/β muy frecuente.

racterísticas. Dentro de una misma familia de proteínas suele resultar evidente la existencia de una relación evolutiva intensa. Por ejemplo la familia de las globinas está formada por muchas proteínas diferentes con similitudes tanto estructurales como secuenciales con la mioglobina. Dos o más familias con poca similitud en la secuencia primaria utilizan algunas veces el mismo motivo estructural principal y tienen funciones similares; estas familias se agrupan en **superfamilias.** Se considera probable una relación evolutiva entre las familias de una superfamilia, incluso aunque el tiempo y las diferencias funcionales debidas a presiones de adaptación diferentes puedan haber borrado muchas relaciones secuenciales reveladoras. Una familia de proteínas puede encontrarse repartida en los tres dominios de vida celular: Bacterias, Arquea y Eucaria, lo que sugeriría un origen muy antiguo. Otras familias pueden estar presentes en tan sólo un número pequeño de organismos, lo que indicaría que su estructura apareció más recientemente. La reconstrucción de la historia natural de los motivos estructurales basada en las clasificaciones de bases de datos estructurales como SCOP aporta un poderoso complemento a los análisis de secuencias y permite definir muchas relaciones evolutivas.

La base de datos SCOP se actualiza de forma manual con el objetivo de ubicar las proteínas en su lugar adecuado en el esquema evolutivo a partir de características estructurales conservadas. Otras dos iniciativas, las bases de datos CATH (*c*lase, *a*rquitectura, *t*opología y superfamilia *h*omóloga) y FSSP (*f*old classification based on *s*tructure-*s*tructure alignment of *p*roteins) utilizan métodos más automatizados y pueden aportar información adicional

En la definición de las familias y superfamilias de proteínas, los motivos estructurales son muy importantes. Una clasificación y sistemas de comparación mejorados de las proteínas llevan inevitablemente a la elucidación de nuevas relaciones funcionales. Dado el papel central de las proteínas en los sistemas vivos, estas comparaciones estructurales pueden ayudar a esclarecer todos los aspectos bioquímicos, desde la evolución de las proteínas individuales hasta la historia evolutiva de la ruta metabólica entera.

Las estructuras cuaternarias de las proteínas comprenden desde dímeros sencillos hasta grandes complejos

Arquitectura de proteínas – Estructura cuaternaria Muchas proteínas presentan múltiples subunidades polipeptídicas. La asociación de cadenas polipeptídicas puede servir para muchas funciones. Muchas proteínas multisubunidad tienen funciones reguladoras; la unión de pequeñas moléculas puede alterar la interacción entre subunidades produciendo grandes cambios en la actividad de la proteína en respuesta a pequeños cambios en la concentración de sustrato o moléculas reguladoras (Capítulo 6). En otros casos, subunidades diferentes pueden llevar a cabo funciones distintas aunque relacionadas, como la catálisis y la regulación. Algunas asociaciones, como las proteínas fibrosas descritas al inicio de este capítulo y las proteínas de la cápside, tienen principalmente una función estructural. Algunas estructuras grandes son el sitio de reacciones complejas con diversos pasos. Un ejemplo es el ribosoma, donde tiene lugar la síntesis de proteínas.

Una proteína multisubunidad es un **multímero.** Las proteínas multiméricas pueden tener de dos a cientos de subunidades. Un multímero con sólo unas pocas subunidades se denomina a menudo **oligómero.** Si un multímero está constituido por varias subunidades diferentes, la estructura global de la proteína puede ser asimétrica y bastante complicada. Sin embargo, la mayoría de los multímeros tienen subunidades idénticas o grupos repetidos de subunidades no idénticas a menudo dispuestos simétricamente. Como se ha dicho en el Capítulo 3, la unidad de repetición estructural en este tipo de proteína multimérica, sea una sola subunidad o un grupo de subunidades, se denomina **protómero.**

La hemoglobina (M_r 64.500) fue la primera proteína oligomérica cuya estructura tridimensional se determinó. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos prostéticos hemo, en los que los átomos de hierro se encuentran en el estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 4-17). La parte proteica, denominada globina, está constituida por dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). Obsérvese que α y β no se refieren en este caso a estructuras secundarias. Puesto que la hemoglobina es cuatro veces más grande que la mioglobina, costó más resolver su estructura tridimensional por análisis de rayos X, lo que consiguieron Max Perutz, John Kendrew y sus colaboradores en 1959. Las subunidades de hemoglobina están dispuestas en pares simétricos (Fig. 4-23) con una subunidad α y una subunidad β cada uno. Así, la hemoglobina se puede describir como un tetrámero o como un dímero de protómeros $\alpha\beta$.

Las subunidades idénticas de las proteínas multiméricas se ordenan generalmente en uno o en un número limitado de patrones de simetría. Los oligómeros pueden tener **simetría rotacional** o **simetría helicoidal;** esto es, se pueden superponer (haciéndolas coincidir) unas subunidades individuales sobre las otras mediante la rotación a lo largo de uno o más ejes de rotación o mediante una rotación helicoidal. En las proteí-

Max Perutz, 1914–2002 (izquierda)
John Kendrew, 1917–1997 (derecha)

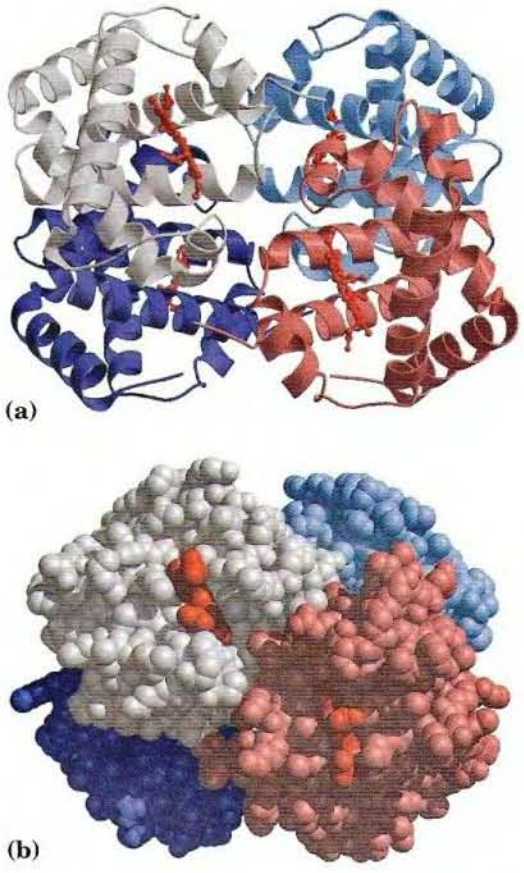


FIGURA 4-23 Estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. (PDB ID 2HHB) El análisis de difracción de rayos X de la desoxihemoglobina (hemoglobina sin moléculas de oxígeno unidas a los grupos hemo) muestra cómo se empaquetan juntas las cuatro subunidades polipeptídicas. **(a)** Representación de cintas. **(b)** Modelo espacial. Las subunidades α se muestran en gris y azul claro; las subunidades β en rosa y azul oscuro. Obsérvese que los grupos hemo (rojo) están relativamente alejados.

nas con simetría rotacional, las subunidades se empaquetan a lo largo de los ejes de rotación para formar estructuras cerradas. Las proteínas con simetría helicoidal tienden a formar estructuras que están más abiertas por los extremos, con las subunidades añadidas según una ordenación en espiral.

Existen diferentes tipos de simetría rotacional. El más sencillo es la **simetría cíclica,** que implica la rotación alrededor de un eje único (Fig. 4-24a). Por convención, una proteína tiene simetría C_n (C de cíclico y n por el número de subunidades relacionadas por el eje) si las subunidades se pueden superponer mediante rotación alrededor de un único eje. El eje se define como un eje rotacional de orden n. Los protómeros $\alpha\beta$ de la hemoglobina están relacionados por un eje de simetría C_2 (Fig. 4-23). Un poco más complicada es la **simetría diédrica,** en la que un eje binario rotacional interseccIona en ángulo recto con un eje de orden n. Una proteína con simetría diédrica –D_n (Fig. 4-24b)– tiene $2n$ protómeros.

Las proteínas con simetría cíclica o diédrica son muy abundantes. Son posibles simetrías rotacionales más complejas, pero sólo unas pocas se encuentran con regularidad. Un ejemplo es la **simetría icosaédrica.** Un icosaedro es un poliedro regular con 12 vértices y 20 caras triangulares equilate-

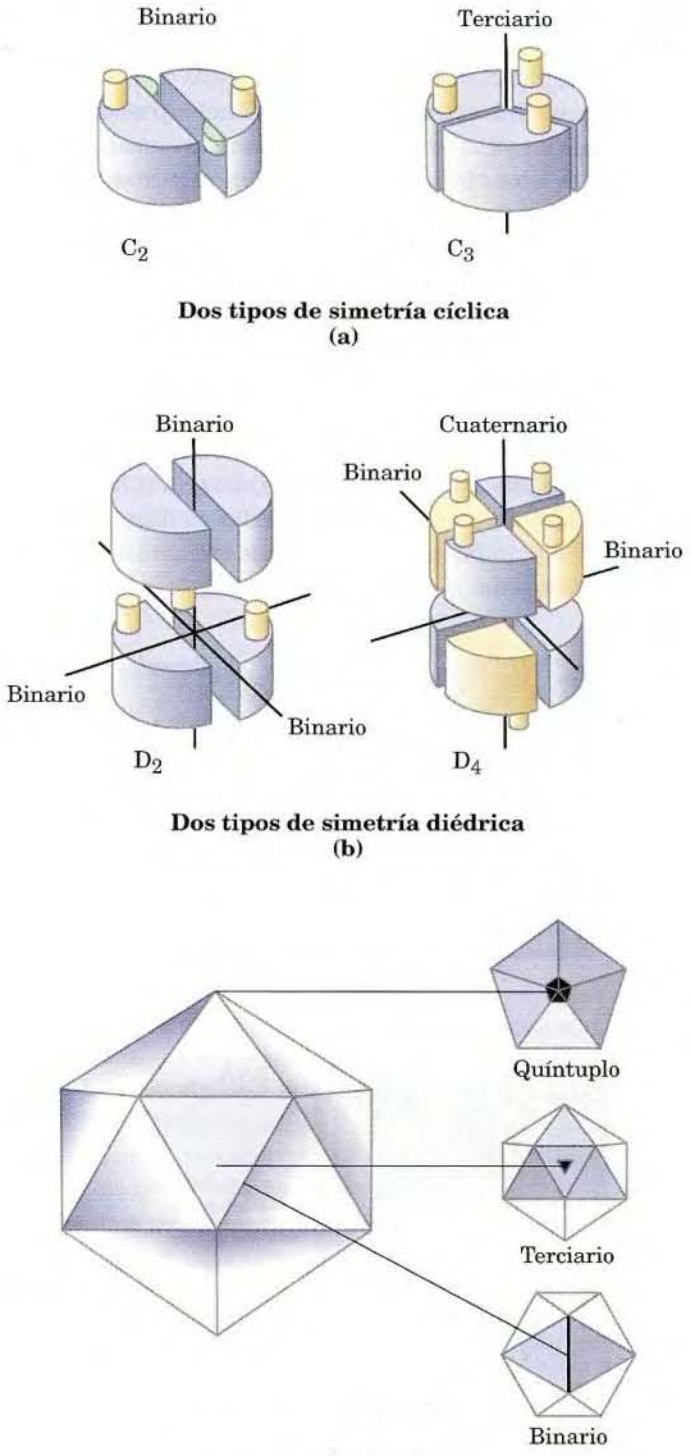
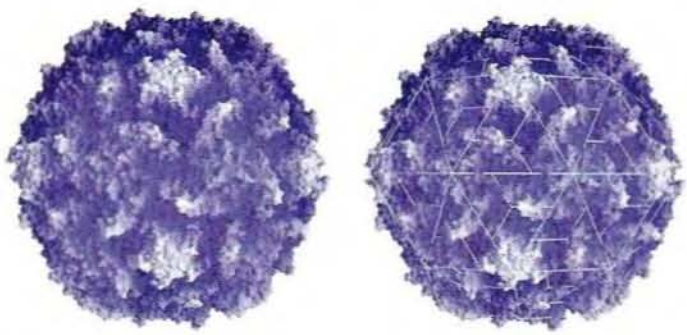


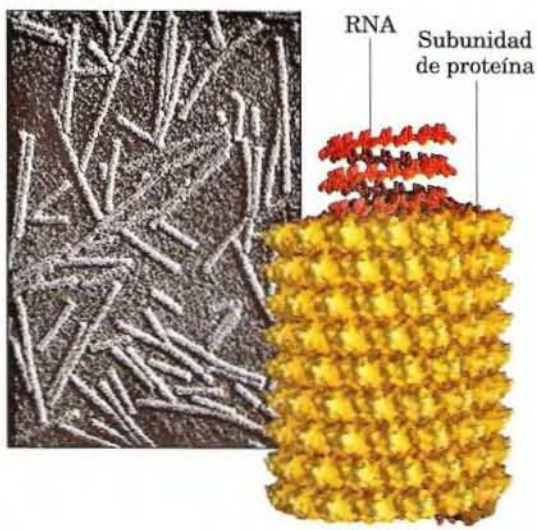
FIGURA 4-24 Simetría rotacional en proteínas. (a) En la simetría cíclica, las subunidades están relacionadas por rotación alrededor de un único eje de orden n, donde n es el número de subunidades relacionadas. Los ejes se muestran como líneas negras; los números son valores de n. De las múltiples disposiciones posibles C_n sólo se muestran dos. **(b)** En la simetría diédrica, todas las subunidades se pueden relacionar mediante la rotación alrededor de uno, o ambos, de los dos ejes, uno de los cuales es un eje binario. La simetría D_2 es la más común. **(c)** Simetría icosaédrica. Para relacionar las 20 caras triangulares de un icosaedro se necesita rotar alrededor de uno o más ejes rotacionales separados: binario, terciario y quíntuplo. En la figura de la derecha se muestra una vista desde el extremo de cada uno de estos ejes.

rales (Fig. 4-24c). Puede hacerse coincidir cada cara con otra mediante la rotación alrededor de uno o más de sus tres ejes rotacionales. Esta estructura es común en las proteínas de la cubierta de los virus o cápside. Los poliovirus humanos tienen una cápside icosaédrica (Fig. 4-25a). Cada cara triangular está constituida por tres protómeros y cada protómero contiene una única copia de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes, tres de las cuales son accesibles a la superficie externa. Las 20 caras de la cubierta icosaédrica que encierra el material genético (RNA) están formadas por sesenta protómeros.

La simetría helicoidal también se da en las cápsides. El virus del mosaico del tabaco está formado por un filamento helicoidal dextrógiro constituido por 2130 subunidades idénticas (Fig. 4-25b). Esta estructura cilíndrica encierra el RNA vírico. Las proteínas con subunidades dispuestas en filamentos helicoidales también pueden formar largas estructuras fibrosas como los filamentos de actina del músculo (véase Fig. 5-30).



(a)



(b)

FIGURA 4-25 Cápsides de virus. **(a)** Virus de la polio (PDB ID 2PLV). Las proteínas de la cubierta del virus de la polio se unen formando un icosaedro de 300 Å de diámetro. La simetría icosaédrica es un tipo de simetría de rotación (véase Fig. 4-24c). A la izquierda se presenta una imagen de un contorno de superficie de la cápside del virus de la polio. En la imagen de la derecha, se han dibujado las líneas para mostrar los ejes de simetría. **(b)** Virus del mosaico del tabaco (PDB ID 1VTM). Este virus en forma de bastón (tal como se muestra en la micrografía electrónica) tiene 3000 Å de longitud y 180 Å de diámetro; presenta simetría helicoidal.

Existen límites al tamaño de las proteínas

El tamaño relativamente grande de las proteínas es un reflejo de sus funciones. La función llevada a cabo por un enzima, por ejemplo, requiere una estructura estable que contenga una bolsa suficientemente grande para unirse a su sustrato y catalizar la reacción. Sin embargo, el tamaño de las proteínas tiene límites, impuestos por dos factores: la capacidad de codificación genética de los ácidos nucleicos y la exactitud del proceso biosintético de proteínas. El empleo de un número grande de copias de una o varias proteínas para formar una estructura envolvente grande (cápside) es de importancia en el caso de los virus, puesto que gracias a esta estrategia se conserva el material genético. Recuérdese que existe una correspondencia lineal entre la secuencia de ácidos nucleicos de un gen y la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica (véase Fig. 1-31). Los ácidos nucleicos de un virus son demasiado pequeños para codificar la información necesaria para una envoltura proteica formada por un solo polipéptido. Gracias al empleo de muchas copias de polipéptidos de tamaño mucho menor, es suficiente disponer de un ácido nucleico mucho menor que codifique las subunidades de la cápside y que además pueda usarse eficientemente repetidas veces. Las células también utilizan grandes complejos de polipéptidos en músculos, cilios, citoesqueleto y otras estructuras. Resulta más eficiente sintetizar muchas copias de un polipéptido pequeño que una copia de una proteína muy grande. De hecho, la mayoría de las proteínas con una masa molecular superior a 100.000 tienen múltiples subunidades, idénticas o diferentes.

El segundo factor limitante del tamaño de las proteínas es la frecuencia de error durante su biosíntesis. Ésta es baja (1 error por cada 10.000 residuos aminoácidos añadidos), pero puede ser significativa para proteínas. Simplificando, se puede decir que la posibilidad de incorporar un aminoácido "equivocado" a una proteína es mayor para una proteína grande que para una pequeña.

RESUMEN 4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de proteínas

- La estructura terciaria es la estructura tridimensional completa de una cadena polipeptídica. Existen dos clases generales de proteínas a partir de la estructura terciaria: fibrosas y globulares
- Las proteínas fibrosas, que desempeñan muchos papeles estructurales, están formadas por elementos repetitivos simples de estructura secundaria.
- Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias más complicadas que a menudo contienen varios tipos de estructura secundaria en la misma cadena polipeptídica. La primera proteína globular cuya estructura se determinó mediante métodos de difracción de rayos X fue la mioglobina.
- Las complejas estructuras de las proteínas globulares pueden analizarse examinando las subestructuras estables denominadas estructuras supersecundarias,

motivos o plegamientos. Los miles de estructuras proteicas conocidas suelen estar construidas a partir de tan sólo unos pocos centenares de motivos. Los dominios son regiones de la cadena polipeptídica que pueden plegarse estable e independientemente.

- La estructura cuaternaria se debe a interacciones entre las subunidades de proteínas multisubunidad (multiméricas) o de grandes complejos proteicos. Algunas proteínas multiméricas posen una unidad repetitiva consistente en una única subunidad o en un grupo de subunidades que se denomina protómero. Los protómeros suelen estar relacionados por simetría rotacional o helicoidal.

4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

Todas las proteínas empiezan su existencia en un ribosoma como una secuencia lineal de residuos de aminoácidos (Capítulo 27). Para alcanzar su conformación nativa, este polipéptido debe plegarse durante y después de la síntesis. Hemos visto que la conformación de una proteína nativa es sólo marginalmente estable. Cambios modestos en el entorno de la proteína pueden acarrear cambios estructurales. A continuación exploramos la transición entre los estados plegado y desplegado.

La pérdida de la estructura conduce a la pérdida de función

Las estructuras proteicas han evolucionado para funcionar en entornos celulares concretos. Condiciones diferentes a las de la célula pueden provocar cambios en la estructura de la proteína. La pérdida de estructura tridimensional suficiente para originar la pérdida de la función se denomina **desnaturalización.** El estado desnaturalizado no se equipara necesariamente con el desplegamiento completo de la proteína y la pérdida total de la conformación. En la mayoría de condiciones, las proteínas desnaturalizadas existen en un conjunto de estados parcialmente plegados de los que se sabe muy poco. La mayoría de las proteínas se pueden desnaturalizar mediante calor, el cual afecta de una manera compleja a las interacciones débiles de una proteína (los enlaces de hidrógeno principalmente). Si se aumenta lentamente la temperatura, la conformación de la proteína permanece generalmente intacta hasta que tiene lugar una pérdida brusca de la estructura (y de la función) dentro de un estrecho margen de temperaturas (Fig. 4-26). La brusquedad del cambio sugiere que el desplegamiento es un proceso cooperativo: la pérdida de estructura en una parte de la proteína desestabiliza otras partes. El efecto del calor sobre las proteínas aún no es un efecto fácilmente predecible. Las proteínas muy estables al calor de las bacterias termófilas han evolucionado para poder funcionar a la temperatura de las fuentes termales (~100 °C). No obstante, la estructura de estas proteínas a menudo difiere muy poco de la de sus proteínas homólogas de bacterias tales como *Escherichia coli*. Aún no se comprende cómo estas pequeñas diferencias promueven estabilidad estructural a temperaturas elevadas.

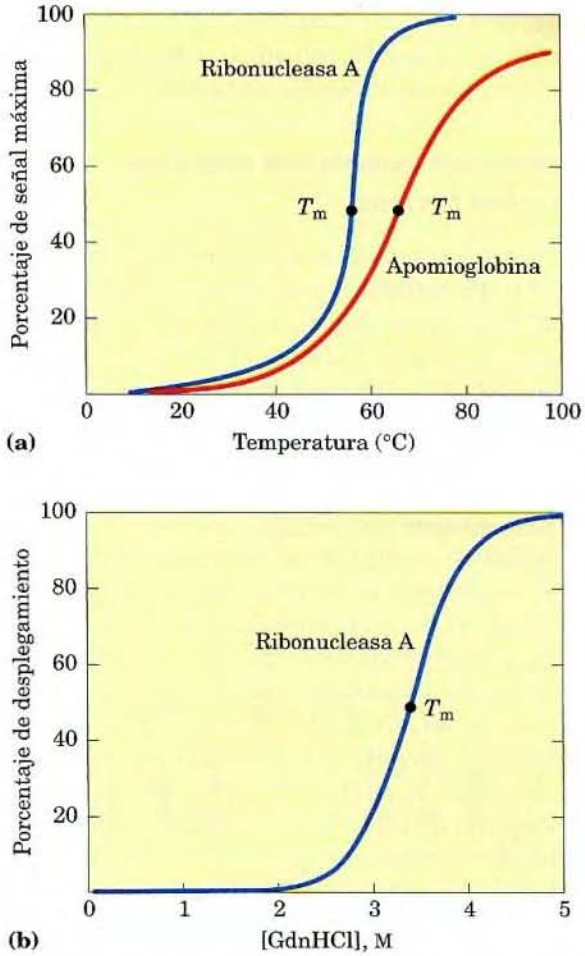


FIGURA 4-26 Desnaturalización de proteínas. Se muestran los resultados para proteínas desnaturalizadas mediante dos tipos de cambios del entorno. En cada caso, la transición del estado plegado al desplegado es muy abrupta, sugiriendo cooperatividad en el proceso de desplegamiento. **(a)** Desnaturalización térmica de la apomioglobina de caballo (mioglobina sin el grupo prostético hemo) y ribonucleasa A (con los enlaces disulfuro intactos; véase Fig. 4-27). El punto medio en el intervalo de temperaturas en el que tiene lugar la desnaturalización se denomina temperatura de fusión o T_m. La desnaturalización de la apomioglobina se siguió mediante dicroísmo circular, una técnica que mide la cantidad de estructura helicoidal en una macromolécula. Se siguió la desnaturalización de la ribonucleasa A midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína, la cual se ve afectada por los cambios de entorno de los residuos de Tyr. **(b)** Desnaturalización de la ribonucleasa A con los disulfuros intactos mediante cloruro de guanidinio (GdnHCl), seguida mediante dicroísmo circular.

La desnaturalización de proteínas puede llevarse a cabo por acción no sólo del calor sino también de extremos de pH, ciertos disolventes orgánicos miscibles en agua como el alcohol o la acetona, ciertos solutos tales como la urea o el cloruro de guanidinio o mediante detergentes. El tratamiento con cada uno de estos agentes desnaturalizantes no rompe enlaces covalentes de la cadena polipeptídica. Los disolventes orgánicos, la urea y los detergentes actúan principalmente rompiendo las interacciones hidrofóbicas que forman el núcleo estable de las proteínas globulares; los extremos de pH alteran la carga neta de la proteína, dando lugar a la aparición de re-

pulsiones electrostáticas y a la destrucción de algunos enlaces de hidrógeno. Los estados desnaturalizados obtenidos con estos diversos tratamientos no son necesariamente equivalentes.

La secuencia de aminoácidos determina la estructura terciaria

La prueba más importante de este hecho la aportaron experimentos que demostraron que la desnaturalización de algunas proteínas es reversible. Algunas proteínas globulares desnaturalizadas por el calor, extremos de pH o reactivos desnaturalizantes pueden recuperar su estructura nativa y su actividad biológica si son devueltas a condiciones en las que la conformación nativa es estable, lo cual se denomina **renaturalización.**

Un ejemplo clásico es la desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa. La ribonucleasa purificada puede desnaturalizarse completamente mediante exposición a una solución concentrada de urea en presencia de un agente reductor. El agente reductor rompe los cuatro puentes disulfuro dando lugar a ocho residuos libres de Cys y la urea elimina las interacciones hidrofóbicas estabilizantes, con lo que el polipéptido pierde completamente su conformación plegada. También hay una pérdida completa de la actividad catalítica. Cuando se eliminan la urea y el agente reductor, la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada se vuelve a plegar espontáneamente adoptando su estructura terciaria correcta y recuperando su actividad catalítica (Fig. 4-27). El replegamiento de la ribonucleasa es tan exacto que los cuatro puentes disulfuro intracatenarios se forman en las mismas posiciones originales de la ribonucleasa nativa. Cálculos matemáticos demuestran que las ocho Cys podrían haberse recombinado al azar para formar cuatro puentes disulfuro de 105 maneras diferentes. De hecho, una distribución de enlaces disulfuro esencialmente al azar es la que se obtiene cuando se permite que los disulfuros se vuelvan a formar en presencia del desnaturalizante, lo que indica que las interacciones por uniones débiles son necesarias para el posicionamiento correcto de los enlaces disulfuro y la adopción de la conformación nativa.

Este experimento clásico, realizado por Christian Anfinsen en los años cincuenta, demostró que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica contiene toda la información necesaria para el plegamiento de la cadena en su estructura tridimensional nativa. Más tarde, se obtuvieron resultados similares utilizando ribonucleasa sintetizada químicamente y catalíticamente activa. Esto eliminó la posibilidad de que algún pequeño contaminante en la preparación de la ribonucleasa purificada por Anfinsen contribuyera a la renaturalización del enzima, disipando así cualquier duda que pudiese quedar acerca del plegamiento espontáneo de este enzima.

Los polipéptidos se pliegan rápidamente y según un proceso de varias etapas

En las células vivas, las proteínas se forman a partir de los aminoácidos a una gran velocidad. Por ejemplo, las células de *Escherichia coli* pueden producir una molécula de proteína entera y biológicamente activa de 100 residuos aminoácidos

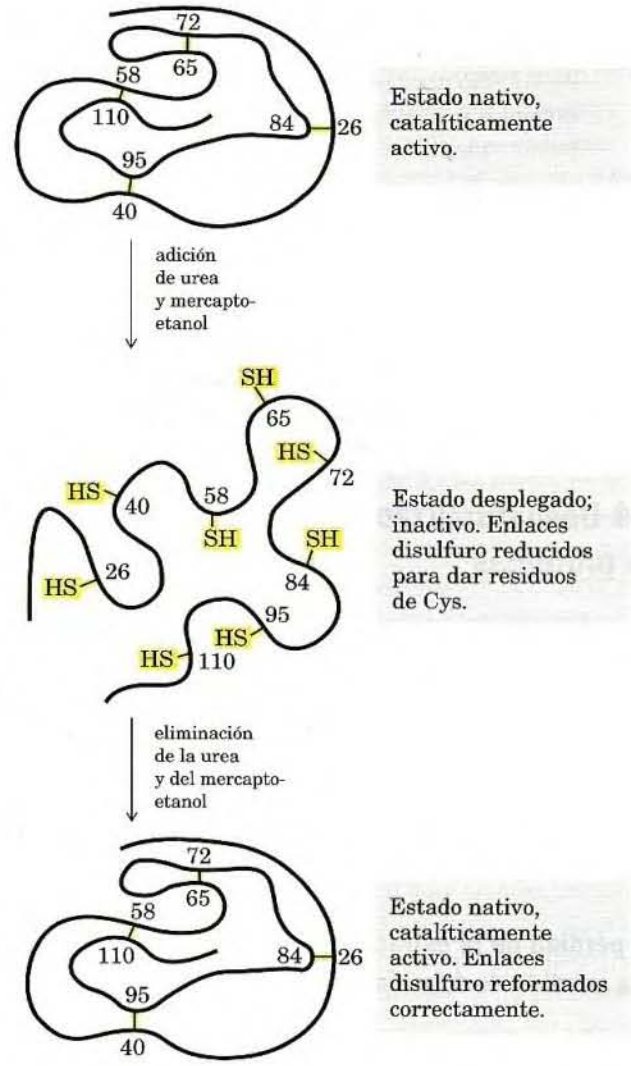


FIGURA 4-27 Renaturalización de la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada. Se añade urea para desnaturalizar la ribonucleasa y mercaptoetanol ($HOCH_2CH_2SH$) para reducirla y romper así los enlaces disulfuro, lo que da lugar a ocho residuos de cisteína. La renaturalización implica la restauración de los enlaces disulfuro correctos.

en unos 5 segundos a 37 °C. ¿Cómo llega a su conformación nativa esta cadena polipeptídica? Vamos a suponer, conservadoramente, que cada residuo de aminoácido puede adoptar una media de 10 conformaciones, lo que origina 10^{100} conformaciones del polipéptido. También vamos a suponer que la proteína se pliega espontáneamente mediante un proceso al azar en el que ensaya todas las conformaciones posibles en torno de cada enlace sencillo de su esqueleto peptídico hasta encontrar su forma nativa biológicamente activa. Si cada conformación se ensaya en el tiempo más corto posible ($\sim 10^{-13}$ s, o sea el tiempo de una sola vibración molecular), probar todas las conformaciones posibles requeriría unos 10^{77} años. Por tanto, el plegamiento de proteínas no puede ser un proceso completamente al azar en el que se siga el método de ensayo y error. Deben existir atajos para el plegamiento. Este problema fue apuntado en 1968 por Cyrus Levinthal y a menudo se denomina la paradoja de Levinthal.

La ruta de plegamiento de una cadena polipeptídica grande es muy complicada y aún no se conocen en detalle los princi-

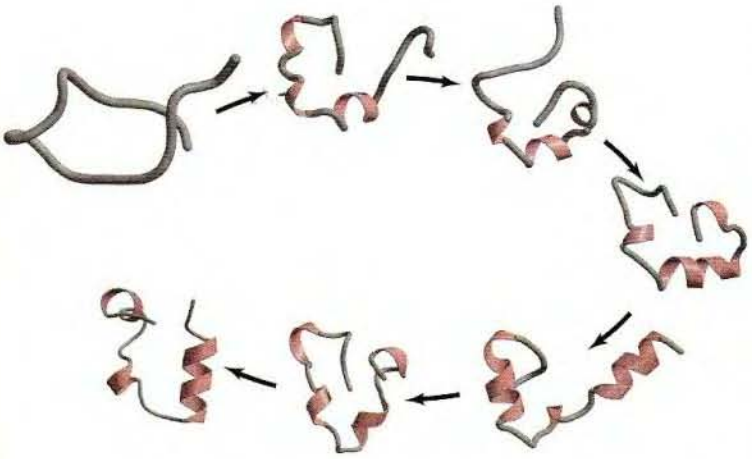


FIGURA 4-28 Una ruta de plegamiento simulada. Se ha simulado informáticamente la ruta de plegamiento de un subdominio de 36 residuos de la proteína villina (una proteína que se une a actina y que se encuentra principalmente en las microvellosidades del intestino). El proceso comienza con el péptido en ovillo estadístico y 3000 moléculas de agua circundantes en una "caja de agua" virtual. Al hacer un mapa de las rutas más probables para llegar a la estructura final entre las incontables alternativas, se tuvieron en consideración los movimientos moleculares del péptido y los efectos de las moléculas de agua. El plegamiento simulado tuvo lugar en un período de tiempo teórico de 1 ms; sin embargo, los cálculos necesitaron quinientos millones de etapas de integración en dos superordenadores Cray, cada uno funcionando durante dos meses.

pios que guían el proceso. Sin embargo, extensos estudios han desarrollado varios modelos plausibles. En uno de los modelos, se considera que el proceso está jerarquizado. Las estructuras secundarias locales se formarían primero. Ciertas secuencias de aminoácidos se plegarían fácilmente en hélices α u hojas β guiadas por las restricciones que ya hemos revisado. A esto le seguiría el establecimiento de interacciones de largo alcance entre, por ejemplo, dos hélices α que se juntarían para formar una estructura supersecundaria estable. El proceso continuaría hasta la completa formación de dominios y el plegamiento del polipéptido entero (Fig. 4-28). En un modelo alternativo, el plegamiento se iniciaría por un colapso espontáneo de la cadena polipeptídica que daría lugar a un estado compacto en el que intervendrían interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares. El estado resultante de este "colapso hidrofóbico" podría ser rico en estructura secundaria, aunque muchas de las cadenas laterales de los aminoácidos no estarían completamente definidas conformacionalmente. El estado colapsado se llama a menudo **glóbulo fundido.** Es probable que la mayoría de las proteínas se plieguen mediante un proceso que incorpora características de ambos modelos. Una población de moléculas peptídicas, en lugar de seguir un camino único, pueden tomar diversos caminos hacia el mismo punto final con una disminución del número de diferentes especies conformacionales parcialmente plegadas a medida que el plegamiento se va completando.

El proceso de plegamiento se puede ver, termodinámicamente, como una especie de embudo de energía libre (Fig. 4-29). Los estados no plegados se caracterizan por un elevado grado de entropía conformacional y una energía libre relativamente elevada. A medida que el plegamiento avanza, el estrechamiento del embudo representa una disminución en el número de especies conformacionales presentes. Las pequeñas depresiones a lo largo de las caras del embudo de energía libre representan intermediarios semiestables que pueden aminorar momentáneamente el ritmo del proceso de plegamiento. El conjunto de intermediarios del plegamiento se reduce, en el fondo del embudo, a una única conformación nativa (o una dentro de un pequeño conjunto de conformaciones nativas).

Defectos en el plegamiento de las proteínas pueden ser la base molecular de muchas enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, la fibrosis quística se origina por defectos en una proteína unida a membrana denominada regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), la cual actúa como canal de los iones cloruro. La mutación más común que origina la fibrosis quística es la elimina-

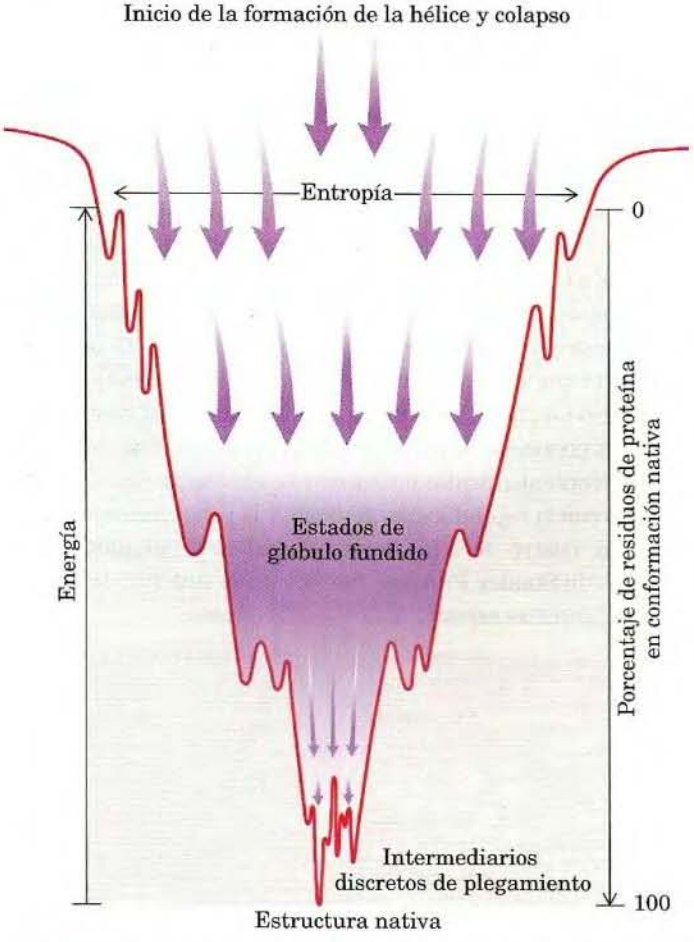


FIGURA 4-29 Termodinámica del plegamiento de una proteína representada como un embudo de energía libre. En la parte superior, el número de conformaciones y, por tanto, la entropía conformacional, es grande. Sólo está presente una pequeña fracción de las interacciones intramoleculares que existirán en la conformación nativa. A medida que el plegamiento avanza, la ruta termodinámica hacia el interior del embudo reduce el número de estados presentes (disminuye la entropía), aumenta la cantidad de proteína en la conformación nativa y disminuye la energía libre. Los escalones en los laterales del embudo representan intermediarios de plegamiento semiestables, los cuales, en algunos casos, pueden hacer que el proceso de plegamiento sea más lento.

ción del residuo de fenilalanina en la posición 508 en la CFTR, lo que produce un plegamiento incorrecto de la proteína (véase Recuadro 11-3). Muchas de las mutaciones relacionadas con enfermedades en el colágeno también producen un plegamiento defectuoso (p. 129). Conocer mejor el plegamiento de las proteínas puede conducir a nuevas terapias para éstas y otras muchas enfermedades (Recuadro 4-5). ■

La estructura de una proteína no presenta una distribución constante de estabilidad termodinámica. Una proteína puede, por ejemplo, poseer dos dominios estables unidos por

RECUADRO 4-5 BIOQUÍMICA EN MEDICINA

Muerte por un plegamiento incorrecto: las enfermedades priónicas

El agente causante de muchas enfermedades cerebrales degenerativas raras en mamíferos parece ser un plegamiento incorrecto de una proteína. Quizá la que mejor se conoce es la enfermedad de las vacas locas (encefalopatía espongiforme bovina, BSE), un brote de la cual ocupó los titulares internacionales de prensa en la primavera de 1996. Entre las enfermedades relacionadas se cuentan el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos y el "scrapie" en ovejas. Estas enfermedades mortales se conocen a veces como encefalopatías espongiformes a causa de la frecuencia con que el cerebro enfermo esta lleno de agujeros (Fig. 1). Entre los síntomas típicos se incluyen demencia y pérdida de coordinación.

En los años sesenta, los investigadores observaron la ausencia de ácidos nucleicos en las preparaciones de los agentes causantes de la enfermedad. Por aquel entonces, Tikvah Alper sugirió que el agente era una proteína. Inicialmente, la idea pareció una herejía. Todos los agentes causantes de enfermedades conocidas hasta el momento –virus, bacterias, hongos, etc.– contenían ácidos nucleicos y su virulencia estaba relacionada con la reproducción genética y la propagación. Sin embargo, cuatro décadas de investigaciones, notablemente a cargo de Stanley Prusiner, han aportado pruebas de que las encefalopatías espongiformes son diferentes.

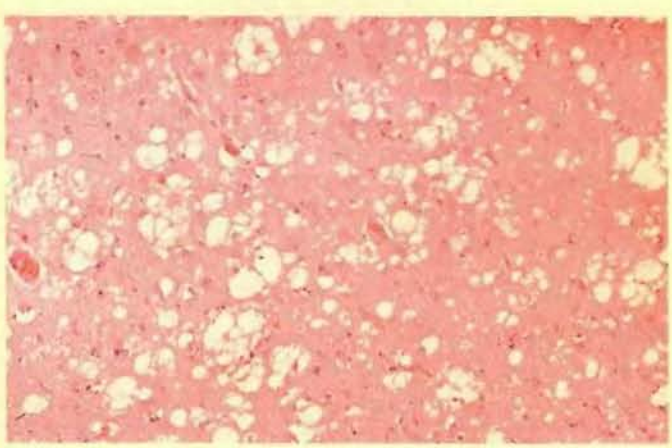


FIGURA 1 Sección teñida del córtex cerebral de un paciente con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob donde se muestra la degeneración espongiforme (vacuolar), la propiedad neurohistológica más característica. Las vacuolas (manchas blancas) son intracelulares y tienen lugar en los procesos pre- y postsinápticos de las neuronas. Aquí las vacuolas tienen de 20 a 100 μm de diámetro.

Se ha identificado el agente infeccioso como una única proteína (M_r 28.000), a la cual Prusiner apodó proteína **prión** (de *pro*teinaceous *i*nfectious *o*nly o PrP). La proteína prión es un constituyente normal del tejido cerebral en todos los mamíferos. No se conoce con detalle su función en el cerebro de mamíferos, aunque podría tratarse de una función señalizadora. Los linajes de ratones a los que les falta el gen de PrP (y por consiguiente la propia proteína) parecen no sufrir los efectos de ninguna enfermedad. La enfermedad aparece sólo cuando la PrP celular normal o PrPC se pliega en una conformación alterada denominada PrPSc (Sc indica "scrapie"). La interacción de PrPSc con PrPC convierte a esta última en PrPSc, iniciándose un efecto dominó, por el que más y más proteína celular se convierte en la forma causante de la enfermedad. No se conoce el mecanismo por el que la presencia de PrPSc conduce a la encefalopatía espongiforme.

En las formas hereditarias de las enfermedades priónicas, una mutación en el gen que codifica PrP origina un cambio en un residuo aminoácido que, según se cree, hace más probable la conversión de PrPC en PrPSc. Una comprensión completa de las enfermedades priónicas se conseguirá a partir de nueva información acerca de cómo afecta la proteína prión a la función cerebral. La información estructural sobre la PrP está empezando a desvelar el proceso molecular que permite que las proteínas priónicas interaccionen para alterar su conformación (Fig. 2).

FIGURA 2 Estructura del dominio globular de la PrP humana en las formas monomérica (izquierda) y dimérica (derecha). La segunda subunidad se muestra en gris para destacar el importante cambio conformacional en la hélice α verde al formarse el dímero.

un segmento con menor estabilidad conformacional, o una pequeña parte de un dominio puede tener menos estabilidad que el resto. Las regiones de baja estabilidad permiten que la proteína alterne su conformación entre dos o más estados. Como veremos en los dos próximos capítulos, las variaciones en la estabilidad de ciertas regiones de una proteína determinada resultan a menudo esenciales para su función.

Algunas proteínas sufren un plegamiento asistido

No todas las proteínas se pliegan espontáneamente a medida que se sintetizan en la célula. Para muchas proteínas el plegamiento está facilitado por la acción de proteínas especializadas. Las **chaperonas moleculares** son proteínas que interaccionan con polipéptidos parcial o incorrectamente plegados, facilitando rutas de plegamiento correctas o aportando microentornos en los que pueda tener lugar el plegamiento. Se conocen bien dos clase de chaperonas moleculares. Ambas se localizan en organismos que van de bacterias a humanos. La primera clase, una familia de proteínas denominada **Hsp70,** presentan generalmente una masa molecular cercana a 70.000 y son más abundantes en células sometidas a estrés por temperaturas elevadas (de ahí, proteínas de choque térmico –por *h*eat *s*hock *p*roteins– de M_r 70.000 o Hsp70). Las Hsp70 se unen a regiones ricas en residuos hidrofóbicos de polipéptidos no plegados, evitando la agregación inapropiada. Por tanto estas chaperonas "protegen" a las proteínas que se han desnaturalizado por calor y a los péptidos que se están sintetizando (y que aún no están plegados). Las proteínas Hsp70 también bloquean el plegamiento de determinadas proteínas que deben permanecer desplegadas hasta que hayan sido traslocadas a través de la membrana (descritas en el Capítulo 27). Algunas chaperonas también ayudan en el empaquetamiento cuaternario de proteínas oligoméricas. Las proteínas Hsp70 se unen a polipéptidos y los liberan en un ciclo en el que también intervienen otras muchas proteínas (incluidas las Hsp40) y la hidrólisis de ATP. En la Figura 4-30 se muestra el plegamiento asistido por chaperonas tal como se ha elucidado para las chaperonas DnaK y DnaJ de *E. coli*, homólogas a las Hsp70 y Hsp40 de eucariotas. Las proteínas DnaK y DnaJ se identificaron en un principio como proteínas necesarias para la replicación in vitro de ciertas moléculas de DNA vírico (de ahí la designación de "Dna").

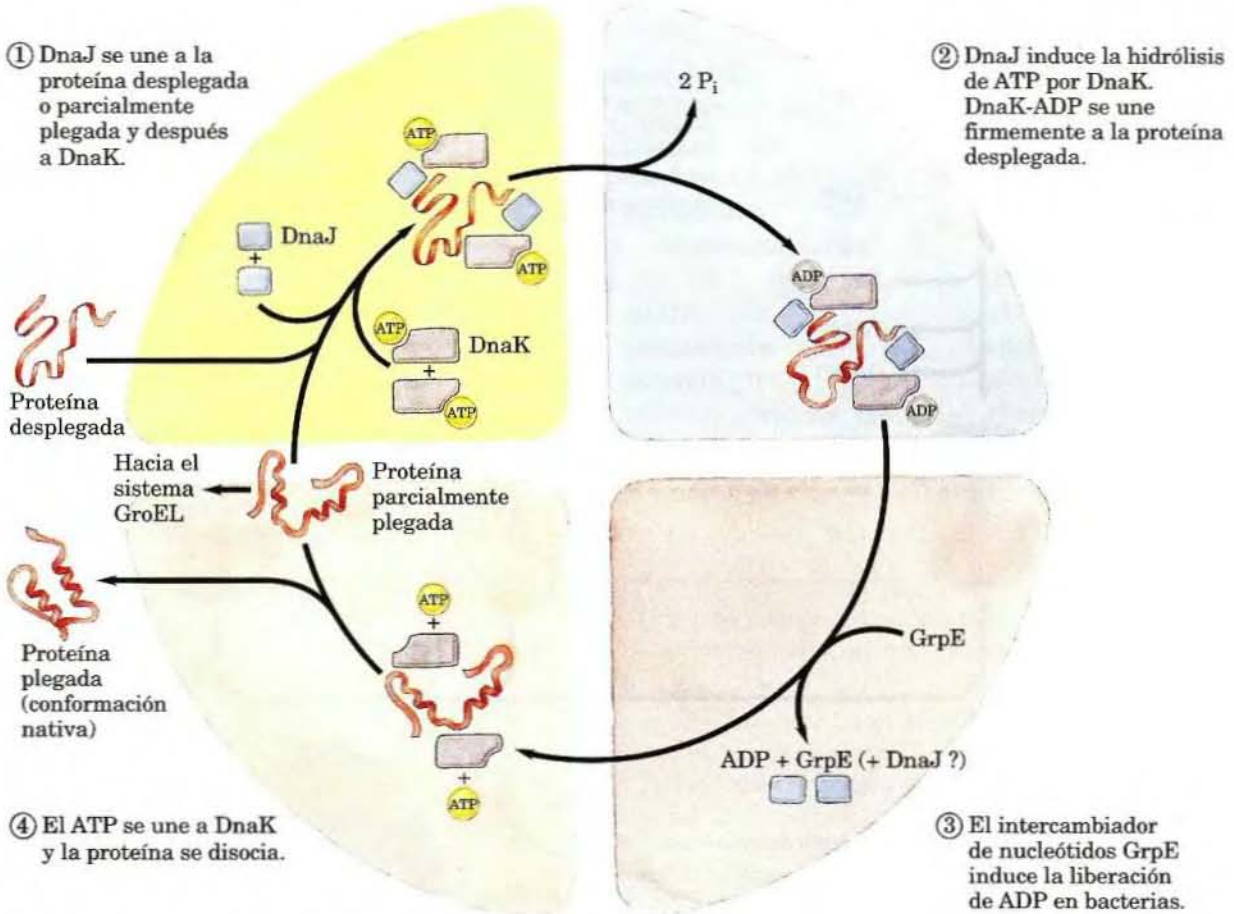


FIGURA 4-30 Las chaperonas en el plegamiento de proteínas. La ruta cíclica por la cual las chaperonas se unen y se liberan de los polipéptidos se ilustra para las proteínas chaperonas de *E. coli* DnaK y DnaJ, homólogas a las chaperonas eucarióticas Hsp70 y Hsp40. Las chaperonas no promocionan activamente el plegamiento de la proteína sustrato, sino que impiden la agregación de los péptidos no plegados. Para una población de polipéptidos, una cierta fracción de los polipéptidos que se liberan al final del ciclo están en la conformación nativa. El resto se vuelven a unir a DnaK o se desvían hacia el sistema de chaperoninas (GroEL; véase Fig. 4-31). En las bacterias una proteína denominada GrpE interacciona transitoriamente con DnaK al final del ciclo (paso ③), promocionado la disociación de ADP y, posiblemente, DnaJ. No se conoce un análogo a GrpE en eucariotas.

La segunda clase de chaperonas se denominan **chaperoninas.** Éstas constituyen elaborados complejos proteicos necesarios para el plegamiento de muchas proteínas celulares que no se pliegan espontáneamente. En condiciones normales, se estima que entre un 10 y un 15% de proteínas celulares de *E. coli* necesitan el sistema propio de chaperonina, denominado GroEL/GroES, para plegarse (cuando las células se someten a estrés por calor hasta un 30% necesitan esta asistencia). Estas proteínas se descubrieron cuando se observó que eran necesarias para el crecimiento de ciertos virus bacterianos (de ahí la designación "Gro" *-gro*wth-). Las proteínas desplegadas se unen en el interior de cavidades del complejo GroEL, el cual se encuentra tapado transitoriamente por la "tapa" de GroES (Fig. 4-31). GroEL experimenta cambios conformacionales sustanciales acoplados a la hidrólisis de ATP y a la unión y liberación de GroES, la cual promueve el plegamiento del péptido unido. Aunque se conoce la estructura de la chaperonina GroEL/GroES, la mayoría de los detalles de este mecanismo de actuación permanecen sin resolver.

Finalmente, la ruta de plegamiento de muchas proteínas necesita dos enzimas que catalizan reacciones de isomerización. La **proteína disulfuro isomerasa (PDI)** es un enzima ampliamente distribuido que cataliza el intercambio o la mezcla de enlaces disulfuro hasta que se forman los enlaces de la conformación nativa. Entre sus funciones, la PDI cataliza la eliminación de los intermediarios de plegamiento con entrecruzamientos

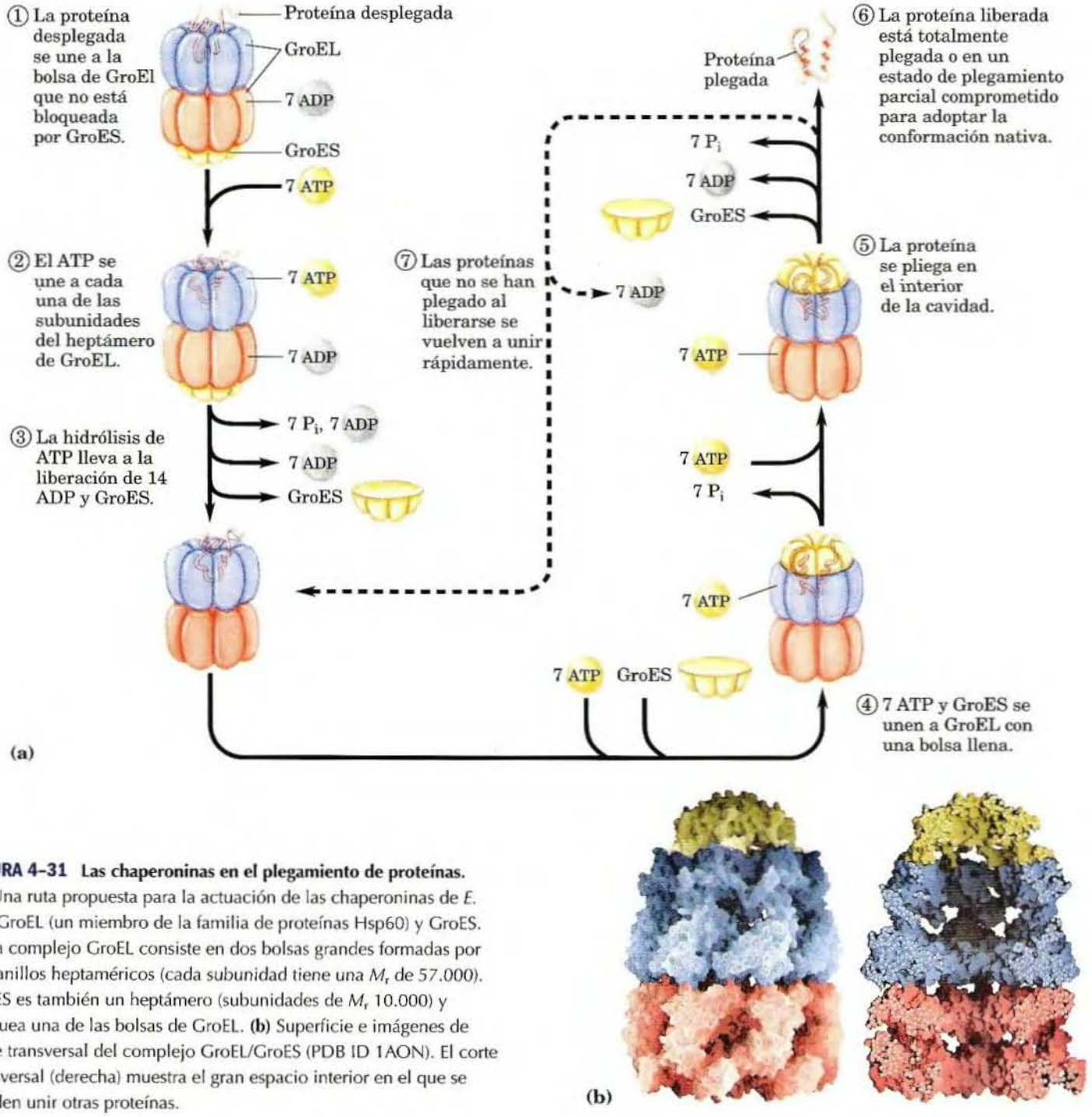


FIGURA 4-31 Las chaperoninas en el plegamiento de proteínas. **(a)** Una ruta propuesta para la actuación de las chaperoninas de *E. coli* GroEL (un miembro de la familia de proteínas Hsp60) y GroES. Cada complejo GroEL consiste en dos bolsas grandes formadas por dos anillos heptaméricos (cada subunidad tiene una M_r de 57.000). GroES es también un heptámero (subunidades de M_r 10.000) y bloquea una de las bolsas de GroEL. **(b)** Superficie e imágenes de corte transversal del complejo GroEL/GroES (PDB ID 1AON). El corte transversal (derecha) muestra el gran espacio interior en el que se pueden unir otras proteínas.

de disulfuros inapropiados. La **péptido prolil cis-trans isomerasa (PPI)** cataliza la interconversión de los isómeros cis-trans de los enlaces peptídicos de prolina (Fig. 4-8b), la cual puede ser una etapa lenta en el proceso de plegamiento de proteínas que contienen algunos enlaces peptídicos de la prolina en la conformación cis.

El plegamiento de proteínas es probablemente un proceso más complejo en el entorno celular densamente empaquetado que en el tubo de ensayo. Es posible que se descubran muchas clases de proteínas que facilitan el plegamiento a medida que continúa la disección bioquímica del proceso de plegamiento.

RESUMEN 4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

- La estructura tridimensional y la función de las proteínas pueden destruirse por desnaturalización, lo que demuestra la relación entre estructura y función. Algunas proteínas desnaturalizadas pueden renaturalizarse espontáneamente para formar proteínas biológicamente activas, demostrando que la estructura terciaria de las proteínas está determinada en la secuencia de aminoácidos
- Es probable que el plegamiento de proteínas en la célula implique la existencia de múltiples caminos. En un principio pueden formarse elementos de estructura secundaria, seguidos por la formación de estructuras supersecundarias. Los numerosos intermediarios de plegamiento evolucionan rápidamente hacia una única conformación nativa.
- Muchas proteínas reciben la asistencia de chaperonas Hsp70 y de chaperoninas en su plegamiento. Enzimas específicos catalizan la formación de enlaces disulfuro y la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos de Pro.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

conformación 116
conformación nativa 117
capa de solvatación 117
grupo peptídico 118
representación de Ramachandran 118
estructura secundaria 120
hélice α 120
conformación β 123
hoja β 123
giro β 123
estructura terciaria 125
estructura cuaternaria 125
proteínas fibrosas 125
proteínas globulares 125
α-queratina 126
colágeno 127
fibroína de la seda 129
estructuras supersecundarias 139
motivo 139
plegamiento 139
dominio 140
familia de proteínas 141
multímero 144
oligómero 144
protómero 144
simetría 144
desnaturalización 147
glóbulo fundido 149
prión 150
chaperona molecular 151
Hsp70 151
chaperonina 152

Bibliografía

General

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181,** 223–230.
El autor revisa su clásico trabajo sobre la ribonucleasa.

Branden, C. & Tooze, J. (1991) *Introduction to Protein Structure,* Garland Publishing, Inc., New York.

Creighton, T.E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties,* 2.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.
Una fuente bien fundamentada y completa.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52.**
Una colección de excelentes artículos sobre muchos temas, entre los que se incluyen la estructura, el plegamiento y la función de proteínas

Kendrew, J.C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* **205** (diciembre), 96–111.
Describe cómo se determinó la estructura de la mioglobina y las enseñanzas que de ella se extrajeron.

Richardson, J.S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* **34,** 167–339.
Un resumen excelente sobre modelos y principios estructurales de proteínas; la autora creó las tan útiles representaciones "en cinta" de las estructuras de proteínas.

Estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria

Berman, H.M. (1999) The past and future of structure databases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10,** 76–80.
Un amplio resumen de los diferentes métodos utilizados en la catalogación de estructuras de proteínas.

Brenner, S.E., Chothia, C., & Hubbard, T.J.P. (1997) Population statistics of protein structures: lessons from structural classifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 369–376.

Fuchs, E. & Cleveland, D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279,** 514–519.

McPherson, A. (1989) Macromolecular crystals. *Sci. Am.* **260** (marzo), 62–69.

Describe cómo se cristalizan macromoléculas como las proteínas.

Ponting, C.P. & Russell, R.R. (2002) The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31,** 45–71.

Una explicación de cómo usar las bases de datos para explorar la evolución.

Prockop, D.J. & Kivirikko, K.I. (1995) Collagens, molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 403–434.

Desnaturalización y plegamiento de proteínas

Baldwin, R.L. (1994) Matching speed and stability. *Nature* **369,** 183–184.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101,** 119–122.

Un buen resumen sobre los mecanismos de las chaperonas.

Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24,** 519–550.

Creighton, T.E., Darby, N.J. & Kemmink, J. (1996) The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* **10,** 110–118.

Daggett, V., & Fersht, A.R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28,** 18–25.

Dill, K.A. & Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4,** 10–19.

Luque, I., Leavitt, S.A. & Freire, E. (2002) The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31,** 235–256.

Revisión acerca cómo contribuyen las variaciones en la estabilidad estructural de una proteína a su función.

Nicotera, P. (2001) A route for prion neuroinvasion. *Neuron* **31,** 345–348.

Prusiner, S.B. (1995) The prion diseases. *Sci. Am.* **272** (enero), 48–57.

Un buen resumen acerca de las pruebas experimentales que condujeron a la hipótesis del prión.

Richardson, A., Landry, S.J. & Georgopolous, C. (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23,** 138–143.

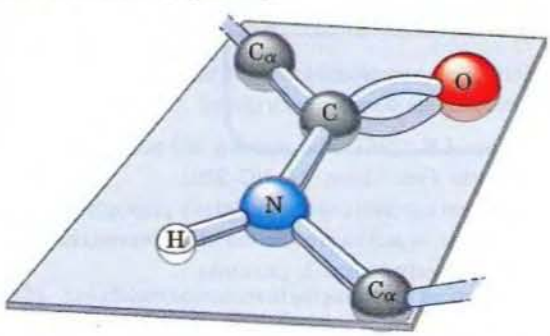
Thomas, P.J., Qu, B.-H. & Pederson, P.L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20,** 456–459.

Westaway, D. & Carlson, G.A. (2002) Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem. Sci.* **27,** 301–307.

Una correcta actualización.

Problemas

1. Propiedades del enlace peptídico En los estudios por rayos X de péptidos cristalinos, Linus Pauling y Robert Corey encontraron que el enlace C—N del enlace peptídico tiene una longitud intermedia (1,32 Å) entre un enlace sencillo C—N típico (1,49 Å) y un doble enlace C=N (1,27 Å). También observaron que el enlace peptídico es plano (los cuatro átomos unidos al grupo C—N se encuentran localizados en el mismo plano) y que los dos carbonos α unidos al C—N se encuentran siempre en posición trans (en lados opuestos del enlace peptídico):



(a) ¿Qué es lo que indica la longitud del enlace C—N sobre su fortaleza y su orden de enlace, es decir acerca de si es un enlace sencillo, doble o triple?

(b) ¿Qué nos dicen estas observaciones acerca de la facilidad de rotación alrededor del enlace peptídico?

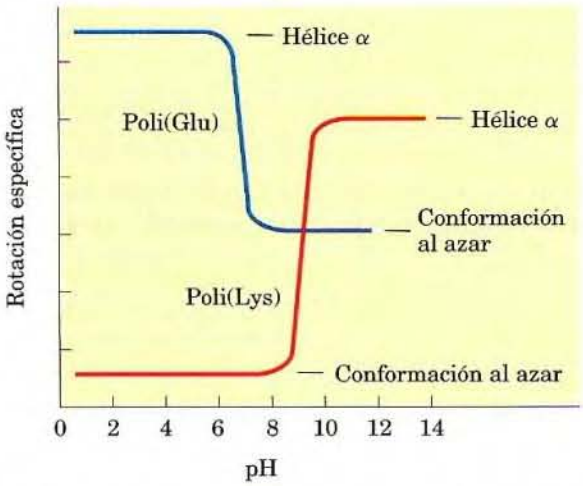
2. Relaciones estructurales y funcionales en las proteínas fibrosas William Astbury descubrió que el patrón de difracción de rayos X de la lana indica la presencia de unidades estructurales repetitivas separadas por una distancia de 5,2 Å en la dirección de la fibra de lana. Cuando se sometía la lana a la acción del vapor y al estiramiento, el patrón de difracción mostraba una nueva unidad estructural repetitiva cada 7,0 Å. Si después de someter la lana a la acción del vapor y estirarla se la dejaba encoger de nuevo, el patrón obtenido se correspondía con el original, con una separación de aproximadamente 5,2 Å. A pesar de que estas observaciones dieron claves importantes acerca de la estructura molecular de la lana, Astbury no pudo interpretarlas en aquel momento.

(a) Interprete las observaciones de Astbury a la luz de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura de la lana.

(b) Cuando se lavan jerséis o calcetines de lana en agua caliente o se calientan en una secadora, se encogen. Por otro lado, y en iguales condiciones, la seda no encoge. Explíquelo.

3. Velocidad de síntesis de la α-queratina del cabello El cabello crece a una velocidad de 15 o 20 cm/año. Todo este crecimiento se concentra en la base de la fibra de cabello, donde los filamentos de α-queratina se sintetizan en el interior de las células epidérmicas vivas, para ser posteriormente ensamblados y formar estructuras en forma de soga (véase Fig. 4-11). El elemento estructural fundamental de la α-queratina es la hélice α, que tiene 3,6 residuos aminoácidos por vuelta y un desplazamiento de 5,4 Å por vuelta (véase Fig. 4-4b). Considerando que la biosíntesis de las cadenas α-helicoidales de la queratina es el factor limitante de velocidad en el crecimiento del cabello, calcule la velocidad a la que deben formarse los enlaces peptídicos (enlaces peptídicos por segundo) para justificar el crecimiento anual observado.

4. Efecto del pH sobre la conformación de las estructuras secundarias α-helicoidales El desplegamiento de la hélice α de un polipéptido para dar lugar a una conformación desordenada viene acompañado por un gran descenso de una propiedad que se denomina rotación específica, una medida de la capacidad de una solución para hacer girar el plano de la luz polarizada. El poliglutamato, un polipéptido formado únicamente por residuos de L-Glu, tiene una conformación helicoidal a pH 3. Sin embargo, al aumentar el pH a 7 se observa un gran descenso en la rotación específica de la disolución. De manera similar, la polilisina (residuos de L-Lys) es una hélice α a pH 10, pero su rotación específica también desciende al cambiar a pH 7, tal como se muestra en el gráfico siguiente.



¿Cuál es la explicación del efecto de los cambios de pH sobre las conformaciones de poli(Glu) y poli(Lys)? ¿Por qué se produce la transición en un margen tan estrecho de pH?

5. Los enlaces disulfuro determinan las propiedades de muchas proteínas Una cierta cantidad de proteínas naturales son muy ricas en enlaces disulfuro y sus propiedades mecánicas (resistencia a la tensión, viscosidad, dureza, etc.) se correlacionan con el grado de formación de enlaces disulfuro. Por ejemplo, la glutenina, una proteína del trigo rica en enlaces disulfuro, es la responsable del carácter cohesivo y elástico de la masa elaborada con harina de trigo. También la dureza y resistencia de los caparazones de tortuga son debidas a la presencia de enlaces disulfuro en su α-queratina.

(a) ¿Cuál es la base molecular de la correlación existente entre contenido en enlaces disulfuro y propiedades mecánicas de la proteína?

(b) La mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan y pierden su actividad cuando se calientan brevemente a 65 °C. Sin embargo, a menudo se observa que las proteínas globulares que contienen muchos enlaces disulfuro deben ser calentadas durante más tiempo y a mayor temperatura para desnaturalizarlas. Una de estas proteínas es el inhibidor pancreático bovino de la tripsina (BPTI), que tiene 58 residuos aminoácidos en una sola cadena y contiene tres enlaces disulfuro. Al enfriar una solución de BPTI desnaturalizado, se recupera la actividad de la proteína. ¿Cuál es la base molecular de esta propiedad?

6. Secuencia de aminoácidos y estructura proteica La creciente comprensión de cómo se pliegan las proteínas ha permitido a los investigadores establecer predicciones acerca de la estructura proteica basándose en los datos de la secuencia primaria de aminoácidos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ile–	Ala–	His–	Thr–	Tyr–	Gly–	Pro–	Phe–	Glu–	Ala–

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala–	Met–	Cys–	Lys–	Trp–	Glu–	Ala–	Gln–	Pro–	Asp–

21	22	23	24	25	26	27	28
Gly–	Met–	Glu–	Cys–	Ala–	Phe–	His–	Arg

(a) Basándose en la secuencia de aminoácidos anterior; ¿dónde puede predecir que se producirán giros β?

(b) ¿En qué posiciones se podrían formar enlaces disulfuro intracatenarios?

(c) Teniendo en cuenta que esta secuencia es parte de una proteína globular más grande, indique la posible localización, ya sea en el interior de la proteína o en su superficie externa, de los siguientes residuos aminoácidos: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique su razonamiento. (Sugerencia: véase el índice de hidropatía en la Tabla 3-1.)

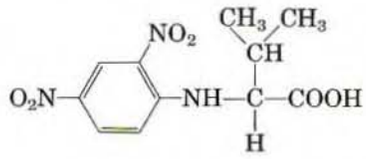
7. La bacteriorrodopsina en las proteínas de membrana púrpura En condiciones ambientales apropiadas, la bacteria halófila denominada *Halobacterium halobium* sintetiza una proteína de membrana (M_r 26.000) conocida como bacteriorrodopsina, que es de color púrpura porque contiene retinal (véase Fig. 10-21). Las moléculas de esta proteína se agregan formando "manchas púrpura" en la membrana celular. La bacteriorrodopsina actúa como una bomba de protones activada por la luz que proporciona energía para las funciones celulares. El análisis de esta proteína por rayos X indica que está formada por siete segmentos de hélice α paralelos, cada uno de los cuales atraviesa la membrana de la célula bacteriana (de un grosor de 45 Å). Calcule el número mínimo de aminoácidos necesario para que un segmento de hélice α atraviese completamente la membrana. Estime cuál es la fracción de proteína bacteriorrodopsina que está implicada en las hélices que abarcan la membrana. (Utilice un peso medio por residuo aminoácido de 110.)

8. Efecto patogénico de la bacteria que provoca la gangrena gaseosa La bacteria anaeróbica *Clostridium perfringens* es altamente patogénica, siendo responsable de la gangrena gaseosa, un estado que destruye el tejido animal. Esta bacteria secreta un enzima que cataliza con eficiencia la hidrólisis del enlace peptídico indicado en rojo en la secuencia:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow{H_2O} \text{—X—}COO^- + H_3\overset{+}{N}\text{—Gly—Pro—Y—}$$

donde X e Y son cualquiera de los 20 aminoácidos estándar. ¿De qué modo contribuye la secreción de este enzima a la invasividad de esta bacteria en los tejidos humanos? ¿Por qué no afecta este enzima a la propia bacteria?

9. Número de cadenas polipeptídicas en una proteína multisubunidad Una muestra (660 mg) de una proteína oligomérica de M_r 132.000 se trató con un exceso de 1-flúor-2,4-dinitrobenceno (reactivo de Sanger) en condiciones ligeramente alcalinas hasta que se completó la reacción. Los enlaces peptídicos de la proteína se hidrolizaron completamente por ebullición en HCl concentrado. Se encontró que el hidrolizado contenía 5,5 mg del compuesto siguiente:



Sin embargo, no se encontraron derivados 2,4-dinitrofenílicos de los grupos α-amino de otros aminoácidos.

(a) Explique de qué modo puede usarse esta información para determinar el número de cadenas polipeptídicas en una proteína oligomérica.

(b Calcule el número de cadenas polipeptídicas de esta proteína.

(c) ¿Qué otra técnica de análisis se puede utilizar para determinar si las cadenas polipeptídicas de esta proteína son iguales o diferentes?

Bioquímica en internet

10. Modelado de proteínas en internet En un intento de identificar el agente causante de la enfermedad de Crohn (una inflamación del intestino), se practicaron biopsias de mucosa intestinal a un grupo de pacientes. Se identificó una proteína que se expresaba a niveles más elevados en los pacientes con enfermedad de Crohn que en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino no relacionadas o en controles no afectados. Se purificó la proteína y se obtuvo la siguiente secuencia *parcial* de aminoácidos (léase de izquierda a derecha):

EAELCPDRCI HSFQNLGIQC VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP FQVPIEEQRG DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG RPLRLPPVLP HPIFDNRAPN
TAELKICRVN RNSGSCLGGD EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG PGWEARGSFS QADVHRQVAI
VFRTPPYADP SLQAPVRVSM QLRRPSDREL
SEPMEFQYLP DTDDRHRIEE KRKRTYETFK
SIMKKSPFSG PTDPRPPPRR IAVPSRSSAS
VPKPAPQPYP

(a) Puede identificar esta proteína utilizando una base de datos de proteínas de internet. Algunos sitios recomendables para empezar son Protein Information Resource (PIR; pir.georgetown.edu/pirwww), Structural Classification of Proteins (SCOP; http://scop.berkeley.edu) y Prosite (http://us.expasy.org/prosite).

En la base de datos seleccionada, siga los enlaces para localizar el programa de comparación de secuencias. Introduzca unos 30 residuos de la secuencia de la proteína en el campo de búsqueda apropiado y envíelos para su análisis. ¿Qué información le proporciona este análisis acerca de la identidad de la proteína?

(b) Repita el procedimiento utilizando diferentes partes de la secuencia de aminoácidos de la proteína. ¿Obtiene siempre el mismo resultado?

(c) Diversas webs proporcionan información sobre la estructura tridimensional de las proteínas. Encuentre información acerca de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, utilizando sitios de bases de datos tales como el Protein Data Bank (PDB) o SCOP.

(d) Durante sus búsquedas en la Web trate de encontrar información acerca de la función celular de la proteína.

capítulo **5**

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

5.1 **Unión reversible proteína-ligando: proteínas de unión a oxígeno** *158*

5.2 **Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmunitario y las inmunoglobulinas** *174*

5.3 **Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares** *182*

En alguna ocasión observando por el microscopio he visto, en sangre casi seca colocada entre placas de vidrio en un desecador, estructuras rectangulares cristalinas con extremos puntiagudos y de color rojo.

—*Friedrich Ludwig Hünefeld,* Der Chemismus in der thierischen Organisation, *1840*
(una de las primeras observaciones de la hemoglobina)

Puesto que las proteínas participan de un modo u otro en todos los procesos químicos de un organismo vivo, se podría esperar que la elucidación de sus estructuras y de sus transformaciones permitiera obtener información altamente significativa para el ámbito de la química biológica.

—*Emil Fischer, artículo en* Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin, *1906*

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína es un paso importante para poder entender cómo funciona. Sin embargo, la estructura estática bidimensional que se muestra sobre una página tiene poco que ver con la realidad. Las proteínas son moléculas dinámicas cuyas funciones dependen, de modo casi invariable, de las interacciones con otras moléculas. Estas interacciones se ven afectadas por cambios, a veces espectaculares y otras sutiles, de la conformación proteica que pueden desencadenar importantes efectos fisiológicos. En este capítulo estudiaremos cómo interaccionan las proteínas con otras moléculas y cómo se relacionan estas interacciones con la estructura dinámica de las proteínas. Es casi imposible exagerar la importancia de las interacciones moleculares para la función proteica. Como hemos visto en el Capítulo 4, la función de las proteínas fibrosas como elementos estructurales de las células y los tejidos se basa en interacciones cuaternarias estables entre cadenas polipeptídicas idénticas. En este capítulo veremos que las funciones de muchas otras proteínas implican interacciones con una variedad de moléculas diferentes. La mayoría de estas interacciones son transitorias, a pesar de que pueden constituir la base de complejos procesos fisiológicos, tales como el transporte de oxígeno, la función inmunitaria y la contracción muscular, los temas que examinamos con detalle en este capítulo. Las proteínas que llevan a cabo estos procesos ilustran los principios fundamentales de la función proteica que se explican a continuación, algunos de los cuales resultarán familiares del capítulo anterior:

Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas. Una molécula unida de manera reversible por una proteína se conoce con el nombre de **ligando.** Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, incluidas otras proteínas. La naturaleza transitoria de las interacciones proteína-ligando es crítica para la vida, permitiendo al organismo responder de manera rápida y reversible al medio ambiente cambiante y a las circunstancias metabólicas.

El ligando se une a un lugar de la proteína llamado **sitio de fijación,** que es complementario al ligando en tamaño, forma, carga y carácter hidrofóbico o hidrofílico. Además, la interacción es específica: la proteína puede diferenciar entre las miles de moléculas diferentes de su entorno y unir selectivamente sólo una o unas pocas. Una proteína determinada puede tener diferentes sitios de fijación para diferentes ligandos. Estas interacciones moleculares específicas son cruciales para mantener el alto grado de orden de un sistema vivo. (Esta discusión excluye la unión

de agua, que puede interaccionar débilmente y de manera no específica con diferentes partes de una proteína. En el Capítulo 6 consideraremos el agua como un ligando específico para diversos enzimas).

Las proteínas son flexibles. Los cambios en su conformación pueden ser sutiles, reflejando vibraciones moleculares y pequeños movimientos de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína. De una proteína que se flexiona de este modo se dice a veces que "respira". Los cambios en la conformación pueden ser también muy grandes, con segmentos importantes de la estructura de la proteína moviéndose incluso varios nanómetros. Los cambios en la conformación específica acostumbran a ser esenciales para la función proteica.

La unión de una proteína con un ligando está asociada con un cambio conformacional que hace que el sitio de fijación sea más complementario al ligando, permitiendo una unión más fuerte. La adaptación estructural que se produce entre la proteína y el ligando se llama **encaje inducido.**

En una proteína multisubunidad, un cambio conformacional en una subunidad afecta a menudo a la conformación de las otras subunidades.

Las interacciones entre ligandos y proteínas pueden ser reguladas habitualmente mediante interacciones específicas con uno o más ligandos adicionales. Estos otros ligandos pueden provocar cambios conformacionales que afecten a la unión del primer ligando.

Los enzimas representan un caso especial en la función proteica. Los enzimas unen y transforman químicamente otras moléculas: catalizan reacciones. Las moléculas sobre las cuales actúan los enzimas se llaman **sustratos** de la reacción en lugar de ligandos y el sitio de fijación a ligando se llama **sitio catalítico** o **sitio activo.** En este capítulo insistiremos sobre las funciones no catalíticas de las proteínas. En el Capítulo 6 trataremos la catálisis enzimática, un tema central en bioquímica. Veremos cómo los temas de este capítulo (unión, especificidad y cambios conformacionales) son tratados también en el próximo capítulo, con el elemento añadido de que las proteínas actuarán como agentes activos de transformaciones químicas.

5.1 Unión reversible proteína-ligando: proteínas de unión a oxígeno

La mioglobina y la hemoglobina son posiblemente las dos proteínas más estudiadas y cuyo mecanismo se conoce con mayor detalle. Fueron las primeras proteínas de las que se determinó su estructura tridimensional y nuestro conocimiento actual de la mioglobina y hemoglobina procede del trabajo de miles de bioquímicos durante diversas décadas. Lo que es más importante, ilustran casi cada aspecto de los procesos bioquímicos más importantes: la unión reversible de un ligando a una proteína. Este modelo clásico de la función proteica nos dará una gran cantidad de información sobre cómo trabajan las proteínas. **Proteínas de unión a oxígeno – Mioglobina: almacenamiento de oxígeno**

El oxígeno puede estar unido a un grupo prostético hemo

El oxígeno no es muy soluble en el agua (véase Tabla 2-3) y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo. La difusión del oxígeno a través de los tejidos es también insuficiente a lo largo de distancias superiores a unos pocos milímetros. La evolución de animales multicelulares grandes dependió de la evolución de proteínas que pudiesen transportar y almacenar oxígeno. Sin embargo, ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos proteicos está preparada para la unión reversible de moléculas de oxígeno. Este papel es desempeñado por ciertos metales de transición, entre ellos el hierro y el cobre, que tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno. Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales, normalmente del hierro, para el transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro libre provoca la formación de especies altamente reactivas del oxígeno tales como los radicales hidroxilo que pueden dañar el DNA y otras macromoléculas. Por lo tanto, el hierro utilizado en las células está presente en formas que lo secuestran y/o lo hacen menos reactivo. En los organismos multicelulares –especialmente en aquellos en los que el hierro, en su calidad de transportador de oxígeno, debe ser transportado a lo largo de grandes distancias– el hierro suele estar incorporado a un grupo prostético unido a una proteína llamada grupo **hemo.** (En el Capítulo 3 hemos visto que un grupo prostético es un compuesto asociado permanentemente a una proteína y que contribuye a su función.)

El grupo hemo tiene una estructura de anillo orgánico complejo, la **protoporfirina,** al cual está unido un único átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 5-1). El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro con átomos de nitrógeno que forman parte del sistema del **anillo de porfirina,** que es plano, y dos perpendiculares a la porfirina. Los átomos de nitrógeno coordinados (dadores de electrones) ayudan a evitar la conversión del hierro hemo al estado férrico (Fe^{3+}). El hierro en estado Fe^{2+} une oxígeno de manera reversible, mientras que en el estado Fe^{3+} no une oxígeno. El grupo hemo se encuentra en una serie de proteínas transportadoras de oxígeno, así como en algunas proteínas, como por ejemplo los citocromos, que participan en las reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones) (Capítulo 19).

En las moléculas hemo libres (grupo hemo no unido a proteínas), el Fe^{2+} tiene dos enlaces de coordinación "abiertos". La reacción simultánea de una molécula de O_2 con dos moléculas de hemo libres (o con dos Fe^{2+} libres) puede dar lugar a la conversión irreversible del Fe^{2+} a Fe^{3+}. En las proteínas que contienen el grupo hemo, esta reacción se evita secuestrando el grupo hemo dentro de la estructura proteica, en un lugar suficientemente profundo donde el acceso a los dos enlaces de coordinación abiertos está restringido. Uno de esos dos enlaces de coordinación está ocupado por el nitrógeno de

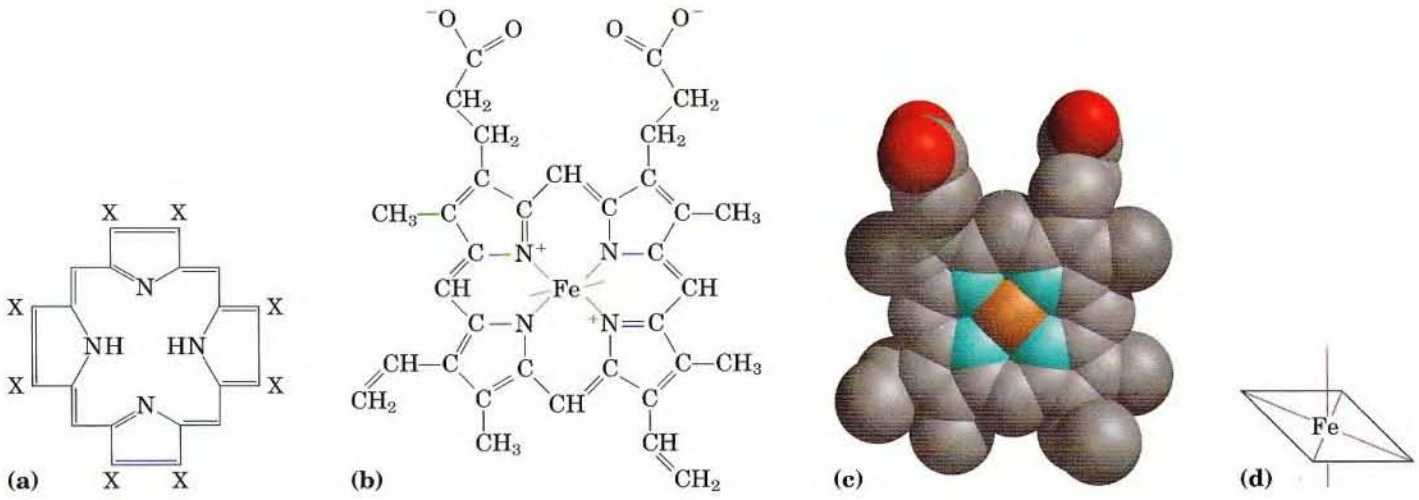


FIGURA 5–1 El grupo hemo. El grupo hemo se encuentra en la mioglobina, hemoglobina y en muchas otras proteínas llamadas proteínas hemo. El grupo hemo consiste en un anillo orgánico complejo, la protoporfirina IX, al cual se une un átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}). **(a)** Las porfirinas, de las cuales la protoporfirina IX es sólo un ejemplo, consisten en cuatro anillos pirrol unidos por puentes meteno, con sustituciones en una o más de las posiciones marcadas como X. **(b, c)** Se muestran dos representaciones del grupo hemo. (De PDB ID 1CCR.) El átomo de hierro del grupo hemo posee seis enlaces de coordinación: cuatro de ellos unidos al anillo de porfirina y en su mismo plano y **(d)** otros dos perpendiculares a este plano.

la cadena lateral de un residuo de His. El otro es el sitio de fijación para el oxígeno molecular (O_2) (Fig. 5-2). Las propiedades electrónicas del hierro del grupo hemo cambian cuando se une el oxígeno, provocando el cambio de color de la sangre desde el púrpura oscuro de la sangre venosa sin oxígeno al rojo brillante de la sangre arterial rica en oxígeno. Algunas moléculas pequeñas, tales como el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO), pueden coordinarse con el hierro del grupo hemo con mayor afinidad que el O_2. Cuando una molécula de CO se une al grupo hemo el O_2 queda excluido, siendo ésta la razón de que el CO sea altamente tóxico para los organismos aeróbicos (un tema tratado en el Recuadro 5-1). Las proteínas de unión a oxígeno regulan el acceso del CO y otras moléculas pequeñas al hierro del grupo hemo mediante el secuestro e inclusión del grupo hemo en su estructura.

FIGURA 5–2 Vista lateral del grupo hemo. Esta perspectiva muestra los dos enlaces de coordinación del Fe^{2+} perpendiculares al sistema del anillo porfirina. Uno de estos dos enlaces está ocupado por un residuo de His, a veces llamada His proximal. El otro es el sitio de fijación del oxígeno. Los cuatro enlaces de coordinación restantes están unidos al sistema del anillo de porfirina y se encuentran en el mismo plano.

La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno

La mioglobina (M_r 16.700; abreviada Mb) es una proteína de unión a oxígeno relativamente simple que está presente en casi todos los mamíferos, principalmente en el tejido muscular. Al ser una proteína de transporte, facilita la difusión del oxígeno en el músculo. Es particularmente abundante en el músculo de los animales que se sumergen, tales como focas y ballenas, que deben almacenar suficiente oxígeno para estancias prolongadas bajo el mar. Hay proteínas muy similares a la mioglobina que están ampliamente distribuidas, estando presentes incluso en algunos organismos unicelulares.

La mioglobina consta de un único polipéptido de 153 aminoácidos con un grupo hemo. Es un ejemplo típico de la familia de proteínas llamadas **globinas,** que poseen estructuras primarias y terciarias similares. El polipéptido está formado por ocho segmentos α-helicoidales conectados por giros (Fig. 5-3). Alrededor de un 78% de los residuos aminoácidos presentes en la proteína se encuentran en estas hélices α.

Cualquier discusión detallada de la función de una proteína implica inevitablemente su estructura. La introducción de algunas convenciones estructurales propias de las globinas facilitará nuestro tratamiento de la mioglobina. Tal como se ve en la Figura 5-3, los segmentos helicoidales se nombran de la A a la H. Un residuo aminoácido individual puede designarse ya sea por su posición en la secuencia de aminoácidos o por su localización dentro de la secuencia de un segmento concreto α-helicoidal. Por ejemplo, el residuo de His coordinado con el grupo hemo en la mioglobina, His^{93} (el aminoácido 93.° desde el extremo N-terminal de la mioglobina), se llama también His F8 (el 8.° residuo de la hélice F). Los giros en la estructura se denominan AB, CD, EF, FG, etc., indicando los segmentos helicoidales que conectan.

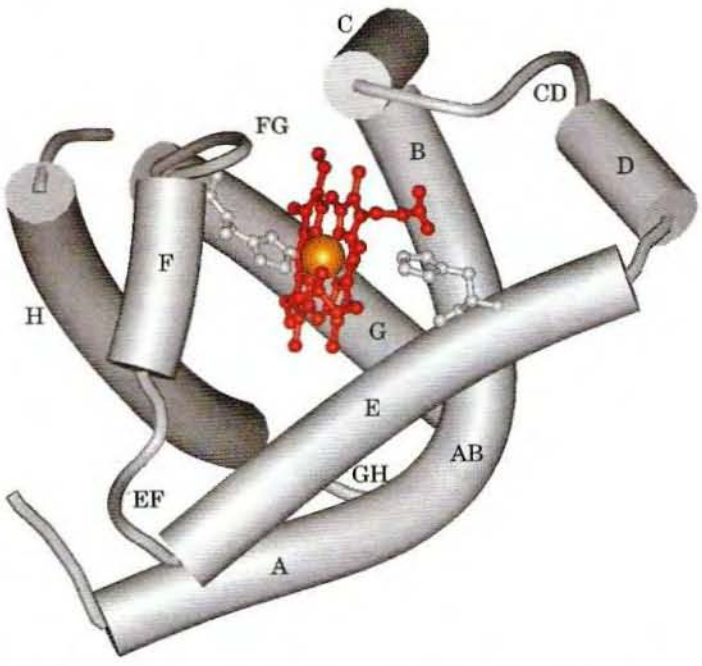


FIGURA 5-3 Estructura de la mioglobina. (PDB ID 1MBO) Los ocho segmentos α-helicoidales (mostrados aquí como cilindros) están marcados de la A a la H. Los residuos de conexión, que no forman parte de las hélices, se nombran como AB, CD, EF, etc., indicando los segmentos que interconectan. Algunos giros, tales como BC y DE, son abruptos y no contienen residuos; no hay nombre específico para ellos. (El corto segmento visible entre D y E es un artefacto de la representación por ordenador.) El grupo hemo está unido a una bolsa formada principalmente por las hélices E y F, aunque también participan algunos residuos aminoácidos de otros segmentos.

Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente

La función de la mioglobina depende no sólo de la capacidad de la proteína para unir oxígeno, sino también de liberarlo cuándo y dónde sea necesario. La función bioquímica depende a menudo de una interacción reversible proteína-ligando de este tipo. Una descripción cuantitativa de esta interacción es por lo tanto un aspecto clave en muchas investigaciones bioquímicas.

En general, la unión reversible de una proteína (P) a un ligando (L) puede describirse por una simple **ecuación de equilibrio:**

$$P + L \rightleftharpoons PL \qquad (5\text{–}1)$$

La reacción se caracteriza por una constante de equilibrio, K_a:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \qquad (5\text{–}2)$$

El término $\boldsymbol{K_a}$ es una **constante de asociación** (no hay que confundirla con la K_a que representa la constante de disociación de una ácido: véase página 63). La constante de asociación proporciona una medida de la afinidad del ligando L por la proteína. La K_a tiene unidades de M^{-1}; un valor más alto de K_a corresponde a una mayor afinidad del ligando por la proteína. Una reorganización de la Ecuación 5-2 muestra que el cociente entre proteína unida y proteína libre es directamente proporcional a la concentración de ligando libre:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \qquad (5\text{–}3)$$

Cuando la concentración de ligando es mucho mayor que la concentración de sitios de fijación a ligando, la unión de ligando por parte de la proteína no afecta de manera significativa a la concentración de ligando libre (no unido), con lo que [L] permanece constante. Esta situación es aplicable en general a la mayoría de ligandos que se unen a las proteínas en las células y simplifica nuestra descripción del equilibrio de unión.

Por lo tanto podemos considerar el equilibrio de unión en función de la fracción, θ (zeta), de sitios de fijación a ligando de la proteína que están ocupados por el ligando:

$$\theta = \frac{\text{sitios de fijación ocupados}}{\text{sitios de fijación totales}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \qquad (5\text{–}4)$$

Sustituyendo [PL] por $K_a[L][P]$ (véase Ec. 5-3) y reorganizando los términos tenemos:

$$\theta = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \dfrac{1}{K_a}} \qquad (5\text{–}5)$$

El término K_a puede ser determinado a partir de una representación de θ frente a la concentración de ligando libre, [L] (Fig. 5-4a). Cualquier ecuación de la forma $x=y/(y+z)$ describe una hipérbola, por lo que θ resulta ser una función hiperbólica de [L]. La fracción de sitios de fijación a ligando ocupados tiende a la saturación de manera asintótica a medida que [L] aumenta. La [L] a la que la mitad de los sitios de fijación a ligando disponibles están ocupados ($\theta = 0{,}5$) corresponde a $1/K_a$.

A veces es más fácil considerar intuitivamente la **constante de disociación, $\boldsymbol{K_d}$,** que es el recíproco de K_a ($K_d = 1/K_a$) y que se expresa en unidades de molaridad (M). K_d es la constante de equilibrio para la liberación del ligando. Las ecuaciones cambian a:

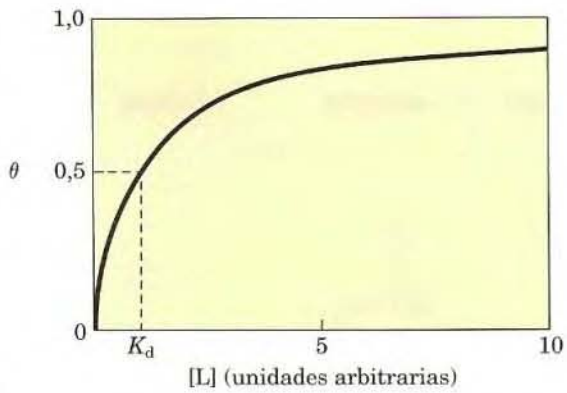
$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \qquad (5\text{–}6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \qquad (5\text{–}7)$$

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \qquad (5\text{–}8)$$

Cuando [L] es igual a K_d la mitad de los sitios de fijación a ligando están ocupados. Cuando [L] desciende por debajo de K_d, cada vez hay menos proteína con ligando unido. Para que un 90% de los sitios de fijación a ligando disponibles estén ocupados, [L] debe ser nueve veces mayor que K_d.

En la práctica, K_d se utiliza mucho más a menudo que K_a para expresar la afinidad de una proteína por su ligando. Obsérvese que un valor más bajo de K_d corresponde a una mayor afinidad del ligando por la proteína. Las matemáticas pueden



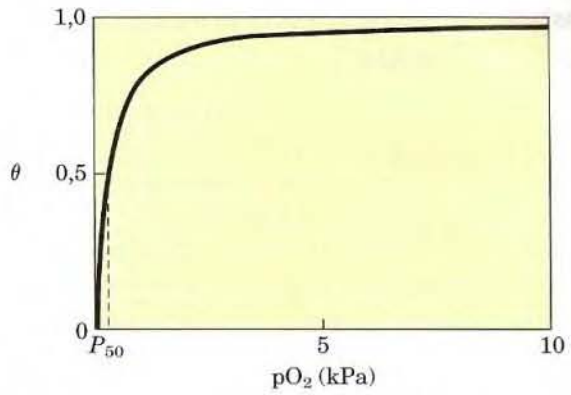


FIGURA 5-4 Representaciones gráficas de la unión de ligando. Se representa la proporción de sitios de unión a ligando ocupados, θ, frente a la concentración de ligando libre. Ambas curvas son hipérbolas rectangulares. **(a)** Curva hipotética de unión a un ligando L. La [L] necesaria para ocupar la mitad de los sitios de unión a ligando disponibles es equivalente a $1/K_a$ o K_d. La curva tiene una asíntota horizontal en $\theta = 1$ y una asíntota vertical (no mostrada) en $[L] = -1/K_a$. **(b)** Curva representativa de la unión de oxígeno a la mioglobina. La presión parcial de O_2 en el aire sobre la solución está expresada en kilopascales (kPa). El oxígeno se une fuertemente a la mioglobina con una P_{50} de sólo 0,26 kPa.

reducirse a frases simples: K_d equivale a la concentración molar de ligando a la cual la mitad de los sitios de fijación a ligando disponibles están ocupados. En este punto, se dice que la proteína ha alcanzado su punto medio de saturación con respecto a la unión de ligando. Cuanto más fuerte es la unión de una proteína a su ligando, menor será la concentración de ligando requerida para que estén ocupados la mitad de los sitios de fijación y por tanto menor será el valor de K_d. En la Tabla 5-1 se proporcionan algunas constantes de disociación significativas.

La unión de oxígeno a la mioglobina sigue los patrones descritos anteriormente. Sin embargo, al ser el oxígeno un gas, debemos hacer algunos ajustes mínimos en las ecuaciones para poder proceder con más facilidad a los experimentos necesarios. En primer lugar sustituimos [L] por la concentración de oxígeno disuelto en la Ecuación 5-8 para tener

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \qquad (5\text{–}9)$$

Como en cualquier ligando, K_d es igual a la $[O_2]$ a la que están ocupados la mitad de los sitios de fijación a ligando disponibles, o $[O_2]_{0,5}$. La Ecuación 5-9 pasa a ser

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \qquad (5\text{–}10)$$

El parámetro que se varía en los experimentos que utilizan el oxígeno como ligando es la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa que se encuentra sobre la disolución, pO_2, debido a que es más fácil de medir que la concentración de oxígeno disuelto. La concentración de una sustancia volátil en disolución es siempre proporcional a la presión parcial local en la fase gaseosa. Si definimos la presión parcial de oxígeno a $[O_2]_{0,5}$ como P_{50} la sustitución en la Ecuación 5-10 da

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \qquad (5\text{–}11)$$

En la Figura 5-4b se muestra una curva de unión para la mioglobina que relaciona θ con pO_2.

TABLA 5-1 Constantes de disociación para algunas proteínas

Proteína	*Ligando*	K_d (M)*
Avidina (clara de huevo)†	Biotina	1×10^{-15}
Receptor de la insulina (humano)	Insulina	1×10^{-10}
Inmunoglobulina anti-VIH (humana)‡	gp41 (proteína de superficie del VIH-1)	4×10^{-10}
Proteína de unión a níquel (*E. coli*)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulina (rata)§	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}

*La constante de disociación citada es válida tan sólo para las condiciones de disolución en las cuales fue determinada. Los valores de K_d para una interacción proteína-ligando pueden ser alterados, en ocasiones en varios órdenes de magnitud, por cambios en variables de la disolución, tales como la concentración de sales o el pH.

†La interacción de la avidina con el cofactor enzimático biotina se halla entre las interacciones bioquímicas no covalentes más fuertes conocidas.

‡Esta inmunoglobulina fue aislada como parte de los esfuerzos para desarrollar una vacuna contra el VIH. Las inmunoglobulinas (descritas más adelante en este capítulo) son altamente variables y la K_d citada aquí no debe considerarse característica de todas las inmunoglobulinas.

§La calmodulina tiene cuatro sitios de fijación para el calcio. Los valores mostrados reflejan los sitios de fijación de menor y mayor afinidad observados en una serie de medidas.

La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando

La unión de un ligando a una proteína no acostumbra a ser tan sencilla como podrían hacer pensar las ecuaciones vistas anteriormente. La interacción se ve afectada en gran medida por la estructura proteica y suele ir acompañada de cambios conformacionales. Por ejemplo, la especificidad con la que el grupo hemo se une a sus diversos ligandos se ve alterada cuando el grupo hemo es un componente de la mioglobina. El monóxido de carbono se une unas 20.000 veces mejor que el O_2 a las moléculas libres de grupo hemo (es decir, la K_d o P_{50} para la unión del CO es más de 20.000 veces menor que la del O_2) pero se une tan sólo unas 200 veces mejor cuando el grupo hemo está unido a la mioglobina. La diferencia se explica en parte por un impedimento estérico. Cuando el O_2 se une al grupo hemo libre, el eje de la molécula de oxígeno forma un ángulo respecto al enlace Fe—O (Fig. 5-5a). Por el contrario, cuando el CO se une al grupo hemo libre, los átomos de Fe, C y O se sitúan en línea recta (Fig. 5-5b). En ambos casos, la unión refleja la geometría de orbitales híbridos de cada ligando. En la mioglobina la His^{64} (His E7) del sitio de fijación al O_2 del grupo hemo está demasiado lejos para coordinarse con el hierro hemo, pero interacciona con el ligando unido al grupo hemo. Este residuo, llamado la *His distal*, forma un enlace de hidrógeno con el O_2 (Fig. 5-5c) pero puede evitar la formación del enlace lineal del CO, dando así una explicación para la disminución selectiva de la unión del CO al grupo hemo en la mioglobina (y en la hemoglobina). La reducción en la unión del CO es importante fisiológicamente, debido a que el CO es un subproducto de bajo nivel del metabolismo celular. Otros factores, no bien definidos aún, parecen intervenir en la modulación de la interacción del grupo hemo con el CO en esas proteínas.

La unión del O_2 al grupo hemo en la mioglobina también depende de movimientos moleculares, o "respiración", en la estructura proteica. La molécula de hemo está profundamente enterrada en el polipéptido plegado, sin que haya un camino directo para el oxígeno desde la disolución hasta el sitio de fijación a ligando. Si la proteína fuese rígida, el O_2 no podría entrar o salir de la bolsa del hemo a una velocidad significativa. Sin embargo, la rápida flexión molecular de las cadenas laterales de los aminoácidos provoca la formación de cavidades transitorias en la estructura de la proteína, de manera que el O_2 puede encontrar su camino moviéndose a través de esas cavidades. Las simulaciones por ordenador de las rápidas fluctuaciones estructurales de la mioglobina sugieren que hay diversos caminos para el oxígeno. Una de las rutas principales viene proporcionada por la rotación de la cadena lateral de la His distal (His^{64}), que tiene lugar en un nanosegundo (10^{-9} s). Incluso cambios conformacionales sutiles pueden ser clave para la actividad proteica.

El oxígeno es transportado en la sangre por la mioglobina

Proteínas de unión a oxígeno – Hemoglobina: transporte de oxígeno

Prácticamente todo el oxígeno transportado por la sangre en los animales es unido y transportado por la hemoglobina de los

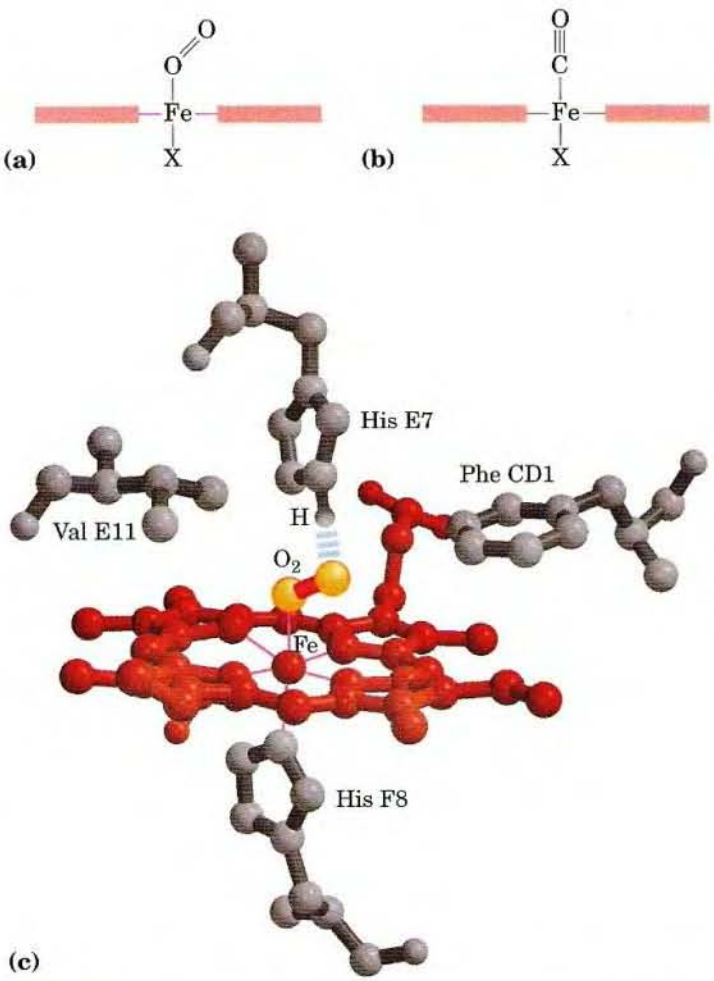


FIGURA 5-5 Efectos estéricos de la unión de ligandos al grupo hemo de la mioglobina. **(a)** El oxígeno se une al grupo hemo con el eje del O_2 en ángulo, una conformación del enlace facilitada por la mioglobina. **(b)** El monóxido de carbono se une al grupo hemo libre con el eje del CO perpendicular al plano del anillo de porfirina. Cuando se une al grupo hemo en la mioglobina, el CO se ve forzado a adoptar un ligero ángulo debido a que la disposición perpendicular está bloqueada estéricamente por la His E7, la His distal. Este efecto debilita la unión del CO a la mioglobina. **(c)** Otra perspectiva (PDB ID 1MBO) muestra la disposición de los residuos aminoácidos clave alrededor del grupo hemo de la mioglobina. El O_2 unido tiene un enlace de hidrógeno con la His distal, la His E7 (His^{64}), facilitando más aún la unión del O_2.

eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos). Los eritrocitos humanos normales son discos bicóncavos pequeños (de 6 a 9 μm de diámetro). Se forman a partir de células madre precursoras llamadas **hemocitoblastos.** En el proceso de maduración, las células madre generan células hijas que producen grandes cantidades de hemoglobina y a continuación pierden sus orgánulos intracelulares (núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático). Los eritrocitos son por lo tanto células vestigiales incompletas, incapaces de reproducirse y, en los humanos, destinadas a sobrevivir durante tan sólo unos 120 días. Su principal función es transportar hemoglobina, la cual está disuelta en su citosol a una concentración muy alta (aproximadamente un 34% de su peso).

En la sangre arterial que pasa de los pulmones a través del corazón para ir a los tejidos periféricos, la hemoglobina está

saturada con oxígeno en un 96%. En la sangre venosa que vuelve al corazón la hemoglobina está saturada sólo en un 64%. Por lo tanto, cada 100 mL de la sangre que pasa a través de los tejidos libera aproximadamente un tercio del oxígeno que transporta, o 6,5 mL de O_2 gaseoso a presión atmosférica y temperatura fisiológica.

La mioglobina, con su curva hiperbólica de unión al oxígeno (Fig. 5-4b), es relativamente insensible a pequeños cambios en la concentración del oxígeno disuelto y por lo tanto funciona bien como una proteína de almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina, con sus múltiples subunidades y sitios de fijación a O_2, está mejor preparada para el transporte de oxígeno. Tal como veremos, las interacciones entre las subunidades de una proteína multimérica pueden permitir una respuesta altamente sensible a pequeños cambios en la concentración de ligando. Las interacciones entre las subunidades de la hemoglobina provocan cambios conformacionales que alteran la afinidad de la proteína por el oxígeno. La modulación de la unión del oxígeno permite a la proteína transportadora de O_2 responder a los cambios en la demanda de oxígeno por parte de los tejidos.

Las subunidades de la hemoglobina son similares estructuralmente a la mioglobina

La hemoglobina (M_r 64.500; abreviada como Hb) es más o menos esférica, con un diámetro de casi 5,5 nm. Es una proteína tetramérica que contiene cuatro grupos prostéticos hemo, uno asociado a cada una de las cadenas polipeptídicas. La hemoglobina de un adulto contiene dos tipos de globina, dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). A pesar de que menos de la mitad de los residuos de aminoácidos de las secuencias polipeptídicas de las subunidades α y β son idénticos, las estructuras tridimensionales de los dos tipos de subunidades son muy similares. Además, sus estructuras son muy similares a la de la mioglobina (Fig. 5-6), a pesar de que las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos son idénticas en tan sólo 27 posiciones (Fig. 5-7). Los tres polipéptidos son miembros de la familia proteica de las globinas. La convención para nombrar las hélices descrita en

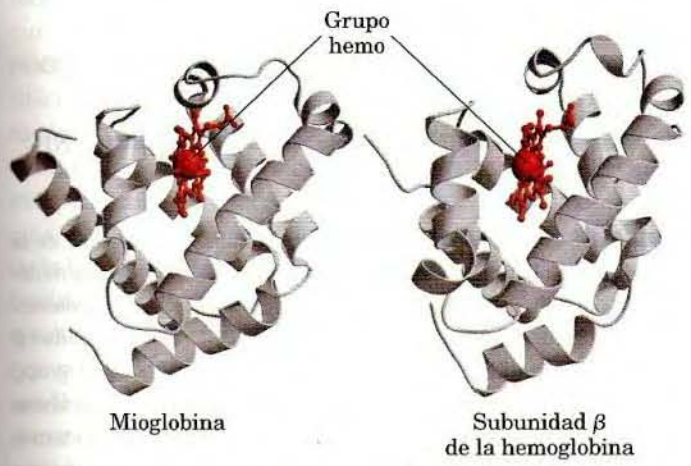


FIGURA 5-6 Comparación de las estructuras de la mioglobina (PDB ID 1MBO) y la subunidad β de la hemoglobina (PDB ID 1HGA).

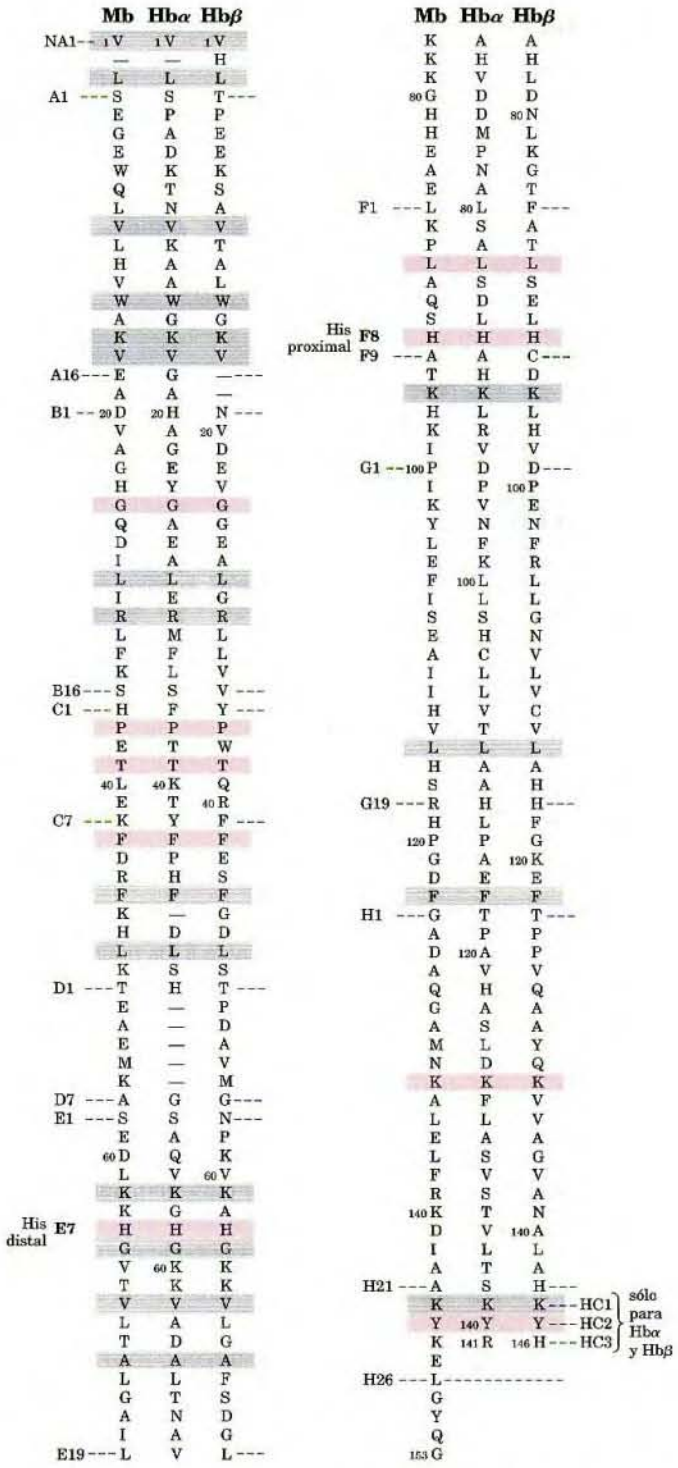


FIGURA 5-7 Secuencias de aminoácidos de la mioglobina de cachalote y de las cadenas α y β de la hemoglobina humana. Las líneas discontinuas señalan los límites entre hélices. Para alinear las secuencias hay huecos en las dos secuencias de hemoglobina en los lugares en donde hay unos cuantos aminoácidos en las secuencias comparadas. Con la excepción de la hélice D, ausente en la Hbα, este alineamiento permite la designación por letras de las hélices que ayuda a destacar los aminoácidos idénticos en las tres estructuras (sombreados). Los residuos destacados en rosa están conservados en todas las globinas. Pero una misma designación de letra y número, para aminoácidos en dos o tres estructuras diferentes, no corresponde a una posición común en la secuencia lineal de las cadenas polipeptídicas. Así, el residuo de His distal es His E7 en las tres estructuras pero corresponde a His^{64}, His^{58} y His^{63} en las secuencias lineales. Los residuos amino- y carboxilo-terminales, situados más allá del primero (A) y último (H) de los fragmentos α-helicoidales, se designan como NA y HC respectivamente.

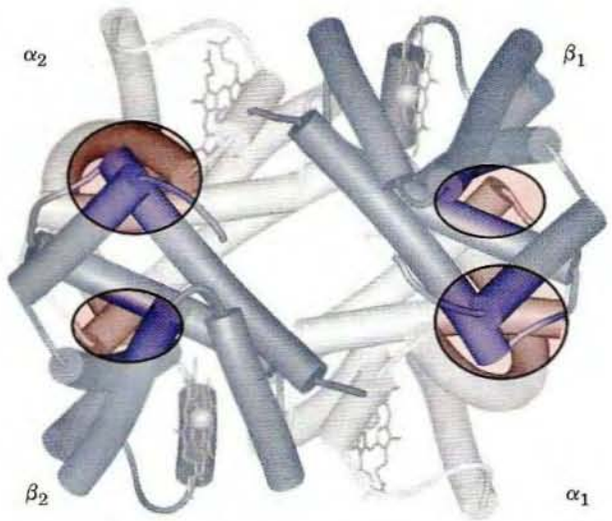


FIGURA 5-8 Interacciones dominantes entre las subunidades de hemoglobina. En esta representación, las subunidades α están en tono claro y las subunidades β en oscuro. Las interacciones más fuertes entre subunidades (destacadas) se producen entre subunidades desiguales. Cuando se une el oxígeno, la unión $\alpha_1\beta_1$ cambia ligeramente, pero se produce un cambio sustancial en la unión $\alpha_1\beta_2$, donde se rompen varios pares iónicos (PDB ID 1HGA).

el caso de la mioglobina es también aplicable a los polipéptidos de la hemoglobina, excepto en que la subunidad α carece de la corta hélice D. La bolsa de unión del grupo hemo está formada principalmente por las hélices E y F.

La estructura cuaternaria de la hemoglobina muestra fuertes interacciones entre subunidades diferentes. La interfase $\alpha_1\beta_1$ (y su correspondiente $\alpha_2\beta_2$) implica a más de 30 residuos y es suficientemente fuerte como para que, aunque un tratamiento suave con urea provoque una disociación del tetrámero en dímeros $\alpha\beta$, éstos permanezcan intactos. La interfase $\alpha_1\beta_2$ (y la $\alpha_2\beta_1$) implica a unos 19 residuos (Fig. 5-8). Las interacciones hidrofóbicas predominan en estas interfases, pero también hay muchos enlaces de hidrógeno y unos pocos pares iónicos (conocidos, a veces, como puentes salinos) cuya importancia se describe más abajo.

La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno

El análisis por rayos X ha revelado que existen dos conformaciones principales de la hemoglobina: el **estado R** y el **estado T.** A pesar de que el oxígeno se une a la hemoglobina en cualquiera de estos dos estados tiene una afinidad considerablemente mayor por la hemoglobina en estado R. La unión del oxígeno estabiliza el estado R. Cuando el oxígeno está ausente experimentalmente, el estado T es más estable y es entonces la conformación predominante de la **desoxihemoglobina.** Los estados T y R fueron denominados originalmente "tenso" y "relajado", debido a que el estado T está estabilizado por un mayor número de pares iónicos, muchos de los cuales pertenecen a la interfase $\alpha_1\beta_2$ (y a la $\alpha_2\beta_1$) (Fig. 5-9). La unión del O_2 a una subunidad de hemoglobina en el estado T promueve un cambio conformacional hacia el estado R. Cuando toda la proteína sufre esta transición, las estructuras de las subunidades individuales cambian poco, pero los pares de subunidades $\alpha\beta$ se deslizan uno sobre otro y rotan, estrechando la bolsa entre las subunidades β (Fig. 5-10). En este proceso, algunos de los pares iónicos que estabilizan el estado T se rompen y se forman otros nuevos.

Max Perutz propuso que la transición T → R está provocada por cambios en las posiciones de cadenas laterales de aminoácidos clave que rodean al grupo hemo. En el estado T la porfirina está ligeramente curvada, provocando que el hierro hemo sobresalga ligeramente hacia la His proximal (His F8). La unión del O_2 hace que el grupo hemo adquiera una conformación más plana, cambiando la posición de la His proximal y de la hélice F unida (Fig. 5-11). Estos cambios conducen a ajustes en los pares iónicos de la interfase $\alpha_1\beta_2$.

La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa

La hemoglobina debe unir oxígeno eficientemente en los pulmones, donde la pO_2 es aproximadamente de 13,3 kPa, y liberar oxígeno en los tejidos, donde la pO_2 es de unos 4 kPa. La

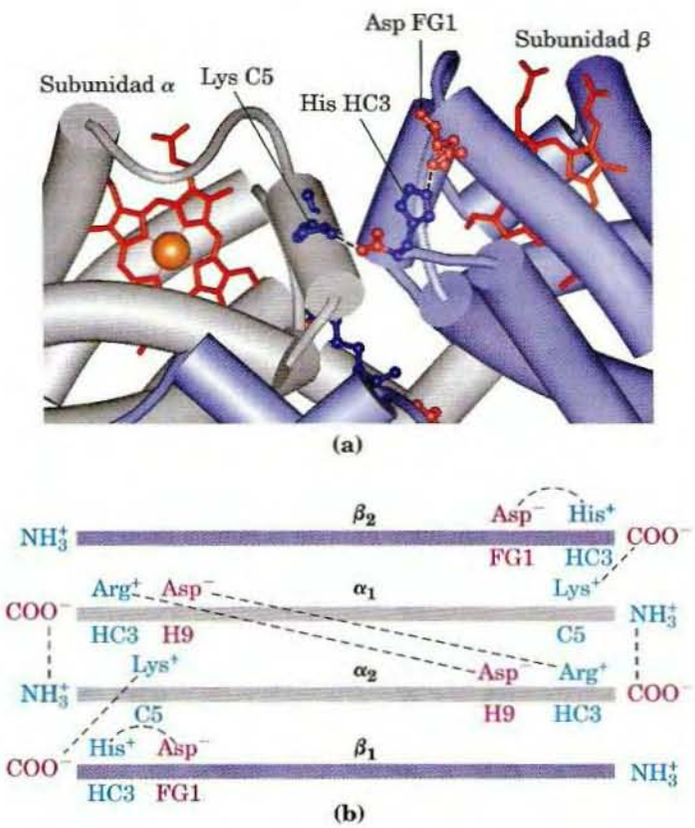


FIGURA 5-9 Algunos pares iónicos que estabilizan el estado T de la desoxihemoglobina (a) Visión en detalle de una porción de una molécula de desoxihemoglobina en estado T (PDB ID 1HGA). Las interacciones entre los pares iónicos His HC3 y Asp FG1 de la subunidad β (en azul) y entre la Lys C5 de la subunidad α (en gris) y el grupo α-carboxilo de la His HC3 de la subunidad β se muestran con líneas discontinuas. (Recuérdese que el HC3 es el residuo carboxilo-terminal de la subunidad β.) **(b)** Las interacciones entre estos pares iónicos y otros no mostrados en **(a)** se esquematizan en esta representación de las cadenas de polipéptido extendido de la hemoglobina.

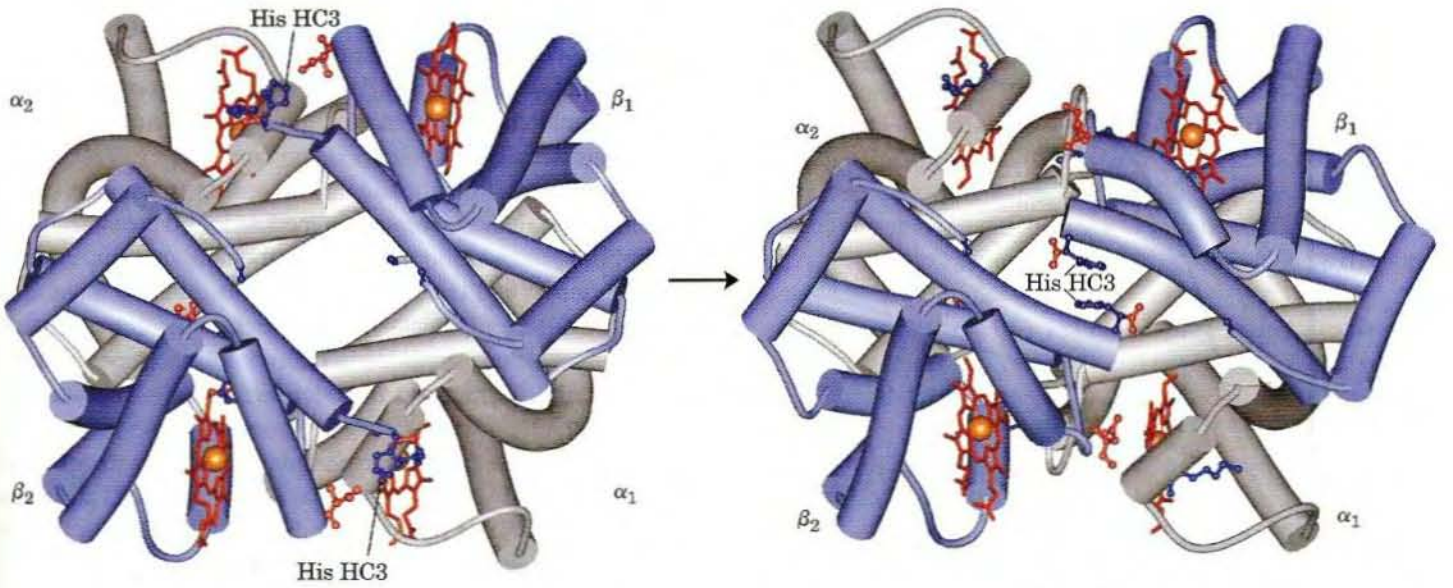


FIGURA 5-10 La transición T → R. (PDB ID 1HGA y 1BBB) En estas descripciones de la desoxihemoglobina, igual que en la Figura 5-9, las subunidades β se muestran en azul y las subunidades α en gris. Las cadenas laterales cargadas positivamente y los extremos de la cadena implicados en la formación de pares iónicos se muestran en azul y sus correspondientes parejas cargadas negativamente se muestran en rojo. La Lys C5 de cada subunidad α y el Asp FG1 de cada subunidad β son visibles aunque no están marcados (compárese con la Fig. 5-9a). Hay que destacar que la molécula tiene una orientación ligeramente diferente que en la Figura 5-9. La transición del estado T al R desplaza de manera sustancial las parejas de subunidades, afectando a algunos de sus pares iónicos. Es destacable el caso de los residuos de His HC3 del extremo carboxilo de las subunidades β, implicados en pares iónicos en el estado T, que rotan hacia el centro de la molécula cuando se pasa al estado R, dejando de formar pares iónicos. Otro resultado destacable de la transición T → R es un estrechamiento de la bolsa entre las subunidades β.

mioglobina, o cualquier proteína que uniera oxígeno siguiendo una curva hiperbólica de unión, estaría poco preparada para esta función, por los motivos que se ilustran en la Figura 5-12. Una proteína que una O_2 con una alta afinidad lo uniría eficientemente en los pulmones pero no liberaría gran parte de él en los tejidos. Si la proteína uniese oxígeno con una afinidad suficientemente baja para liberarlo en los tejidos, no recogería demasiado oxígeno en los pulmones.

La hemoglobina resuelve este problema mediante una transición de un estado de baja afinidad (el estado T) a un estado de alta afinidad (el estado R) a medida que se le unen más moléculas de O_2. Como resultado, la hemoglobina tiene una curva de unión a oxígeno híbrida, en forma de S o curva sigmoidea (Fig. 5-12). Una proteína de una sola subunidad con un único sitio de fijación a sustrato no puede tener una curva de unión sigmoidea (ni siquiera si la unión provocase un cambio conformacional) debido a que cada molécula de ligando se une independientemente y no podría afectar a la unión de otra molécula. En cambio, la unión del O_2 a las subunidades individuales de la hemoglobina puede alterar la afinidad para el O_2 de las subunidades adyacentes. La primera molécula de O_2 que interacciona con la desoxihemoglobina se une débilmente, debido a que se une a una subunidad en el estado T. Sin embargo, esta unión conduce a unos cambios conformacionales que son comunicados a las subunidades adyacentes, haciendo más fácil la unión de moléculas de O_2 adicionales. En efecto, la transición T → R se produce más rápidamente en la segunda subunidad una vez que el O_2 se ha unido a la primera subunidad. La última molécula de O_2 (la cuarta) que se une al hemo lo hace a una subunidad que ya está en el estado R y por tanto se une con una afinidad mucho mayor que la de la primera molécula.

Una **proteína alostérica** es aquella en la que la unión de un ligando a un sitio afecta a las propiedades de unión de otro sitio de la misma proteína. El término alostérico deriva del griego *allos*, "otro", y *stereos*, "sólido" o "forma". Las proteínas alostéricas son aquellas que tienen "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de ligandos conocidos como moduladores. Los cambios conformacionales inducidos por el/los modulador(es) interconvierten formas más activas y menos ac-

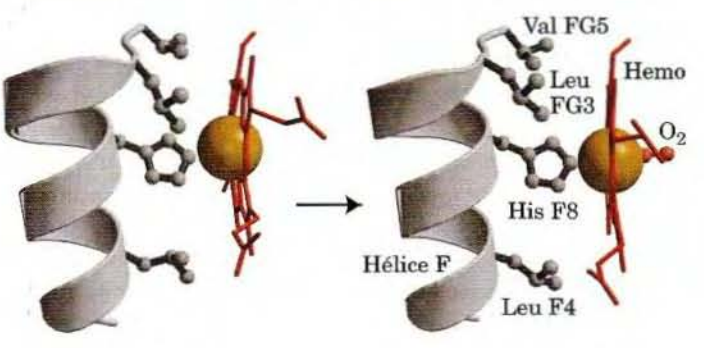


FIGURA 5-11 Cambios conformacionales en el entorno del grupo hemo por la unión del O_2 a la desoxihemoglobina. (PDB ID 1HGA y 1BBB) El cambio de posición de la hélice F cuando el grupo hemo une O_2 es uno de los ajustes que se cree que desencadenan la transición T → R.

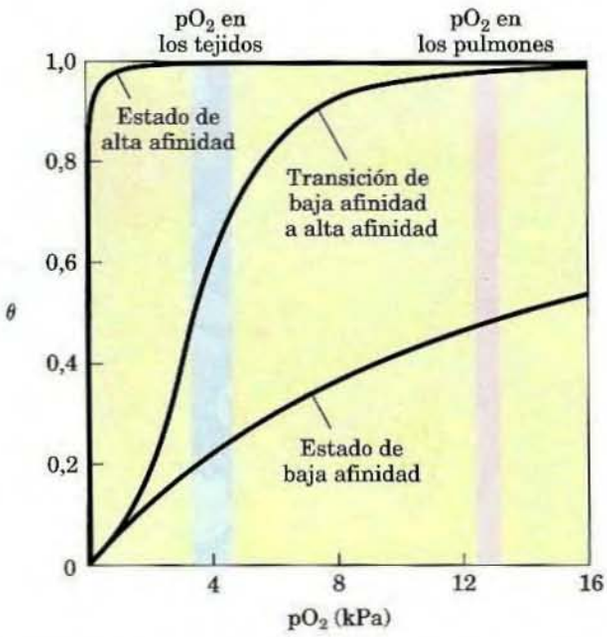


FIGURA 5-12 Curva de unión sigmoidea (cooperativa). Una curva de unión sigmoidea puede contemplarse como una curva híbrida que refleja la transición de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad. La unión cooperativa, tal como se manifiesta por la curva de unión sigmoidea, hace que la hemoglobina sea más sensible a pequeñas diferencias en la concentración de O_2 entre los tejidos y los pulmones, permitiendo que la hemoglobina una oxígeno en los pulmones (donde la pO_2 es alta) y lo libere en los tejidos (donde la pO_2 es baja).

tivas de la proteína. Los moduladores de las proteínas alostéricas pueden ser activadores o inhibidores. Cuando el ligando normal y el modulador son idénticos la interacción se denomina **homotrópica.** Cuando el modulador es una molécula diferente del ligando normal la interacción es **heterotrópica.** Algunas proteínas tienen dos o más moduladores y por lo tanto pueden tener interacciones homotrópicas y heterotrópicas.

La unión cooperativa de un ligando a una proteína multimérica, tal como la que se produce con la unión del O_2 a la hemoglobina, es una forma de unión alostérica observada frecuentemente en las proteínas multiméricas. La unión de un ligando afecta a las afinidades de cualquiera de los restantes sitios de fijación no ocupados y el O_2 puede ser considerado tanto un ligando normal como un modulador homotrópico activador. Hay sólo un sitio de fijación para el O_2 en cada subunidad, de modo que los efectos alostéricos que dan lugar a la cooperatividad están facilitados por cambios conformacionales transmitidos de una subunidad a otra por interacciones subunidad-subunidad. Una curva de unión sigmoidea es un diagnóstico de una unión cooperativa. Permite una respuesta mucho más sensible a las concentraciones de ligando y es importante para la función de muchas proteínas multiméricas. El principio del efecto alostérico puede extenderse fácilmente al caso de los enzimas reguladores, tal como veremos en el Capítulo 6.

Los cambios conformacionales cooperativos dependen de variaciones en la estabilidad estructural de partes diferentes de la proteína, como hemos visto en el Capítulo 4. Los sitios de fijación de una proteína alostérica suelen consistir en segmentos estables próximos a segmentos relativamente inestables,

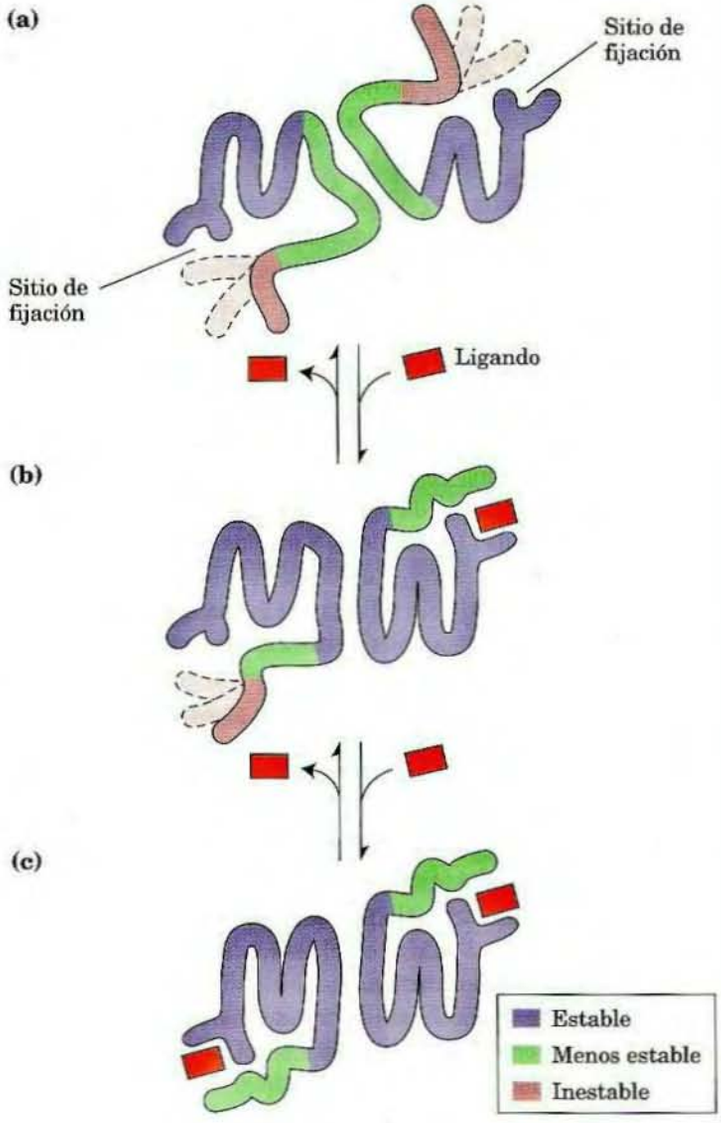


FIGURA 5-13 Cambios estructurales en una proteína multisubunidad que se une cooperativamente a un ligando. La estabilidad estructural no es uniforme en una molécula de proteína. Aquí se muestra una proteína dimérica hipotética formada por regiones de estabilidad alta (azul), media (verde) y baja (rojo). Los sitios de fijación de ligando están compuestos por segmentos de alta y baja estabilidad, por lo que la afinidad por el ligando es relativamente baja. **(a)** En ausencia de ligando, los segmentos rojos son bastante flexibles y adoptan diversas conformaciones, de las que tan sólo unas pocas facilitan la unión del ligando. Los segmentos verdes son más estables en el estado de baja afinidad. **(b)** La unión de ligando a una subunidad estabiliza una conformación de alta afinidad en el segmento rojo cercano (ahora de color verde), lo que induce un cambio conformacional en el resto del polipéptido. Ésta es una forma de encaje inducido. El cambio conformacional se transmite a la otra subunidad mediante interacciones proteína-proteína, de modo que en la otra subunidad se estabiliza una conformación de alta afinidad en el sitio de fijación. **(c)** Una segunda molécula de ligando puede unirse ahora a la segunda subunidad, haciéndolo con mayor afinidad que la primera y dando lugar a la cooperatividad positiva observada.

siendo estos últimos capaces de sufrir cambios frecuentes en su confromación o de llevar a cabo movimientos desorganizados (Fig. 5-13). Cuando se produce la unión de un ligando, las partes móviles del sitio de fijación de una proteína pueden quedar estabilizadas en una conformación particular, afectando a la conformación de las subunidades polipeptídicas adyacentes. Si la totalidad del sitio de fijación tuviera una gran estabilidad, al unirse en él un ligando tan sólo serían posibles cambios estructurales limitados propagables a otras partes de la proteína.

Al igual que ocurre con la mioglobina, la hemoglobina puede unir ligandos diferentes al oxígeno. Un ejemplo importante es el monóxido de carbono, que se une a la hemoglobina con una eficiencia equivalente a unas 250 veces la del oxígeno. La exposición de humanos al CO puede tener consecuencias trágicas (Recuadro 5-1).

La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente

La unión cooperativa del oxígeno por la hemoglobina fue analizada por primera vez por Archibald Hill en 1910. A partir de su trabajo se enunció un método general para el estudio de la unión cooperativa de ligandos a proteínas multisubunidad.

Para una proteína con n sitios de fijación el equilibrio de la Ecuación 5-1 se convierte en

$$\mathrm{P} + n\mathrm{L} \rightleftharpoons \mathrm{PL}_n \qquad (5\text{–}12)$$

y la expresión para la constante de asociación pasa a ser

$$K_a = \frac{[\mathrm{PL}_n]}{[\mathrm{P}][\mathrm{L}]^n} \qquad (5\text{–}13)$$

La ecuación para θ (véase Ec. 5-8) es

$$\theta = \frac{[\mathrm{L}]^n}{[\mathrm{L}]^n + K_d} \qquad (5\text{–}14)$$

Reorganizando y calculando el logaritmo de ambos miembros, obtenemos

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[\mathrm{L}]^n}{K_d} \qquad (5\text{–}15)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log [\mathrm{L}] - \log K_d \qquad (5\text{–}16)$$

en donde $K_d = [\mathrm{L}]^n_{0,5}$.

La Ecuación 5-16 es la **ecuación de Hill** y una representación del $\log [\theta/(1-\theta)]$ frente al $\log [\mathrm{L}]$ se denomina **representación de Hill.** Basándose en la ecuación, la representación de Hill debería tener una pendiente igual a n. Sin embargo, la pendiente determinada experimentalmente no refleja el número de sitios de fijación sino el grado de interacción entre ellos. La pendiente para una curva de Hill se indica por tanto como n_H, el **coeficiente de Hill,** que es una medida del grado de cooperatividad. Si n_H es igual a 1, la unión al ligando no es cooperativa, una situación que puede producirse incluso en una proteína multimérica si las subunidades no se comunican. Un n_H mayor que 1 indica que hay una cooperatividad positiva en la unión a ligando. Ésta es la situación que se observa en la hemoglobina, en la que la unión de una molécula de ligando facilita la unión de las otras. El límite superior teórico para n_H se alcanza cuando $n_H = n$. En este caso la unión sería completamente cooperativa: todos los sitios de fijación en una proteína unirían el ligando simultáneamente y no habría moléculas de proteína parcialmente saturadas de ligando en ningún caso. Este límite nunca se alcanza en la práctica y el valor medido de n_H es siempre menor que el número de sitios de fijación a ligando de la proteína.

Un n_H menor que 1 indica cooperatividad negativa, en donde la unión de una molécula de ligando *dificulta* la unión de otras. Es difícil encontrar casos bien documentados de cooperatividad negativa.

Para adaptar la ecuación de Hill a la unión de oxígeno por parte de la hemoglobina debemos sustituir de nuevo [L] por pO_2 y K_d por P^n_{50}:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log pO_2 - n \log P^n_{50} \qquad (5\text{–}17)$$

Las representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina se presentan en la Figura 5-14.

Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa

Los bioquímicos tienen actualmente una gran cantidad de información sobre los estados T y R de la hemoglobina, pero queda mucho por aprender sobre cómo se produce la transición T → R. Existen dos modelos para la unión cooperativa de ligandos a las proteínas con múltiples sitios de fijación que han influido en gran medida en el planteamiento de este problema.

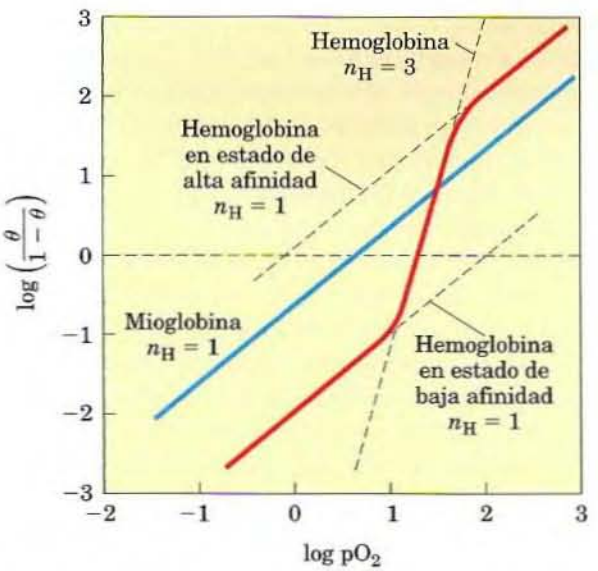


FIGURA 5-14 Representación de Hill para la unión del oxígeno a la mioglobina y a la hemoglobina. Cuando $n_H = 1$ no existe cooperatividad evidente. El máximo grado de cooperatividad observado para la hemoglobina corresponde aproximadamente a $n_H = 3$. Obsérvese que mientras que esto indica un alto nivel de cooperatividad n_H es menor que n, siendo n el número de sitios de fijación a O_2 de la hemoglobina. Esto es lo normal para una proteína que presenta unión alostérica.

RECUADRO 5-1 BIOQUÍMICA EN MEDICINA

Monóxido de carbono: un asesino silencioso

Powell, Arizona, agosto de 2000. Una familia estaba de vacaciones en una casa flotante. Pusieron en marcha el generador de electricidad para poder conectar un aparato de aire acondicionado y un televisor. Unos 15 minutos después, dos hermanos, de 8 y 11 años, saltaron desde la cubierta de popa. Justo debajo de la cubierta estaba situado el tubo de escape del generador. En el lapso de dos minutos, los dos hermanos quedaron exhaustos a causa de la inhalación del monóxido de carbono del tubo de escape, que había quedado concentrado debajo de la cubierta. Ambos se ahogaron. Estas muertes, junto con otras más que ocurrieron en la década de 1990 y que estaban relacionadas con casas flotantes similares, hicieron que se reconsiderara y rediseñara el montaje de los tubos de escape de los generadores.

El monóxido de carbono, un gas incoloro e inodoro, es responsable de más de la mitad de muertes anuales por intoxicación en el mundo. El CO tiene una afinidad por la hemoglobina unas 250 veces mayor que la del oxígeno. En consecuencia, niveles relativamente bajos de CO pueden tener importantes y trágicos efectos. Cuando el CO se combina con la hemoglobina, el complejo resultante se denomina carboxihemoglobina o COHb.

Algunos procesos naturales generan cierta cantidad de CO, pero sus niveles localmente elevados se deben a la actividad humana. Los tubos de escape de motores y estufas son fuentes importantes de CO, al ser éste un producto secundario de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Tan sólo en Estados Unidos, casi 4000 personas mueren cada año a causa de intoxicación por CO, ya sea accidental o intencionadamente. Muchas de las muertes accidentales se producen por un aumento no detectado de CO en espacios cerrados, como el que se produce cuando una estufa tiene pérdidas, vertiendo CO dentro de la casa. Sin embargo, también es posible la intoxicación por CO en espacios abiertos, en los que personas desprevenidas pueden inhalar los gases de escape de generadores, motores fuera borda, motores de tractor, vehículos recreativos o cortadoras de césped.

Es poco frecuente que los niveles de monóxido de carbono en la atmósfera sean peligrosos, oscilando entre menos de 0,05 partes por millón (ppm) en áreas remotas e inhabitadas y 3 a 4 ppm en algunas ciudades del hemisferio norte. En Estados Unidos el límite impuesto por el gobierno para las cantidades de CO en los lugares de trabajo es de 50 ppm para personas que trabajen en turnos de ocho horas. La fuerte unión del CO a la hemoglobina implica que la COHb se puede acumular a lo largo del tiempo si las personas se exponen a una fuente constante y de bajo nivel de CO.

En un individuo sano, el 1% o menos de la hemoglobina total se halla acomplejada en forma de COHb. Al ser el CO un producto del humo del tabaco, muchos fumadores tienen niveles de COHb del orden del 3% al 8% de su hemoglobina total, pudiendo aumentar hasta el 15% en fumadores compulsivos. Los niveles de COHb se equilibran al 50% en las personas que aspiran aire que contiene 570 ppm de CO durante varias horas. Se han desarrollado métodos fiables para relacionar el contenido de CO en la atmósfera con los niveles de COHb en sangre (Fig. 1). En pruebas efectuadas con generadores de casas flotantes como el responsable de las muertes del lago Powell, los niveles de CO alcanzaron de 6000 o 30.000 ppm bajo cubierta, y los niveles de O_2 atmosférico disminuyeron de un 21% a un 12%. Incluso por encima de la cubierta se detectaron niveles de CO de hasta 7200 ppm, suficientes para provocar la muerte en pocos minutos.

¿De qué manera afecta al organismo humano la COHb? Raramente se observan síntomas a niveles de menos del 10% de la hemoglobina total. Al 15% se empiezan a experimentar ligeros dolores de cabeza. Entre el 20% y el 30%, el

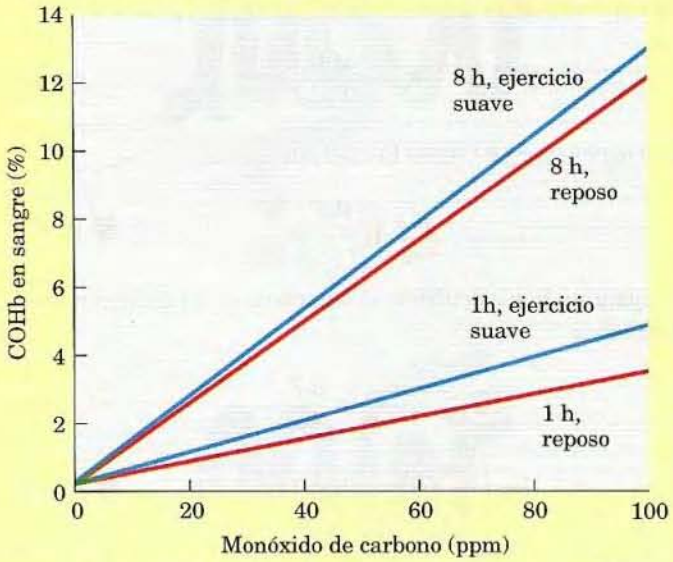


FIGURA 1 Relación entre los niveles de COHb en sangre y la concentración de CO en el aire circundante. Se muestran cuatro condiciones de exposición diferentes, comparando los efectos de una exposición corta con los de otra más prolongada y una exposición en reposo con una exposición durante el ejercicio.

El primer modelo fue el propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965, el llamado **modelo MWC** o **modelo concertado** (Fig. 5-15a). El modelo concertado supone que las subunidades de una proteína con unión cooperativa son funcionalmente idénticas, que cada subunidad puede existir en (como mínimo) dos conformaciones y que todas las subunidades experimentan la transición de una conformación a otra de manera simultánea. En este modelo ninguna proteína tiene subunidades con conformaciones diferentes. Las dos conformaciones están en equilibrio. El ligando puede unirse a cualquiera de ellas aunque con diferente afinidad. La unión sucesiva de moléculas de ligando a la conforma-

dolor de cabeza es muy agudo y suele ir acompañado de náuseas, vértigo, confusión, desorientación y algunas molestias visuales; estos síntomas suelen desaparecer si se trata al individuo con oxígeno. A niveles de COHb del 30% al 50%, los síntomas neurológicos se hacen más graves y a niveles superiores al 50% se pierde la conciencia y se corre el peligro de caer en coma. Seguidamente puede producirse un fallo respiratorio. Si la exposición ha sido prolongada pueden producirse daños permanentes. Niveles superiores al 60% suelen ser mortales. La autopsia de los niños que murieron en el lago Powell reveló que sus niveles eran del 59% y del 52%.

La unión de CO a la hemoglobina está afectada por muchos factores, entre ellos el ejercicio (Fig. 1) y los cambios en la presión del aire relacionados con la altitud. Al tener los fumadores niveles basales más elevados de COHb, aquellos que se exponen a una fuente de CO suelen desarrollar síntomas antes que los no fumadores. Las personas afectadas de enfermedades cardíacas, pulmonares o sanguíneas que reducen la disponibilidad del oxígeno a los tejidos también tienen síntomas a niveles más bajos de exposición. Los fetos corren un riesgo elevado de intoxicación por CO porque la hemoglobina fetal tiene una afinidad algo más elevada por el CO que la adulta. Se han registrado casos en los que el feto ha muerto pero la madre ha sobrevivido.

Puede parecer chocante que la pérdida de la mitad de la hemoglobina en forma de COHb resulte fatal, puesto que sabemos que personas con diversos tipos de anemia suelen vivir razonablemente bien con la mitad de la cantidad total de hemoglobina. Sin embargo, la unión de CO a la hemoglobina tiene efectos más allá del de eliminar proteína del total disponible para la unión del oxígeno. También afecta a la afinidad del resto de subunidades de la hemoglobina con el oxígeno. Al unirse CO a una o dos subunidades de un tetrámero de hemoglobina, la afinidad por el O_2 se incrementa sustancialmente en las restantes subunidades (Fig. 2). De este modo, un tetrámero de hemoglobina con dos moléculas de CO unidas puede fijar O_2 de modo eficiente en los pulmones pero liberarlo con poca eficiencia en los tejidos. Con ello, los tejidos sufren pronto una privación de oxígeno. El problema se acentúa porque los efectos del CO no se limitan a su interferencia con la función de la hemoglobina. El CO se une a otras proteínas con grupos hemo y diversas metaloproteínas. Todavía no se conocen bien los efectos de estas interacciones, pero pueden ser responsables de algunos de los efectos a largo plazo de la intoxicación aguda aunque no mortal por CO.

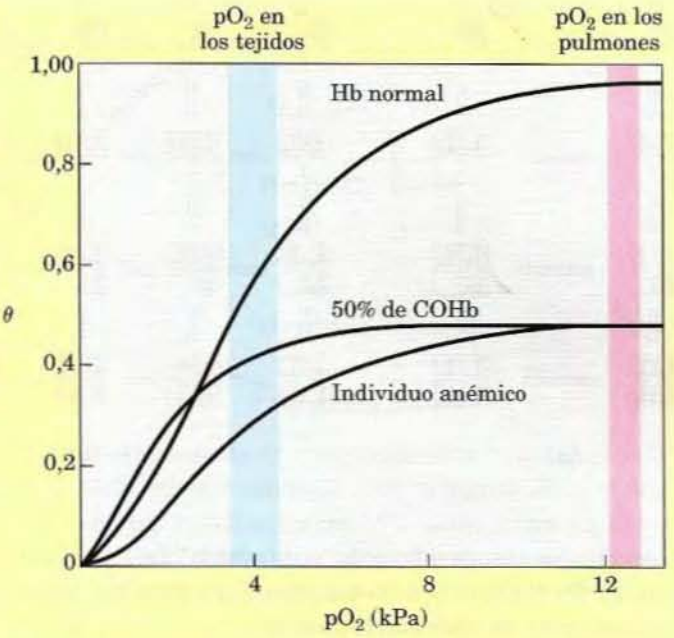


FIGURA 2 Diversas curvas de unión a oxígeno: de hemoglobina normal, hemoglobina de un individuo anémico con el 50% de su hemoglobina funcional y hemoglobina de un individuo con el 50% de sus subunidades de hemoglobina acomplejadas con CO. Se indica la pO_2 en pulmones y tejidos humanos.

Cuando se sospecha de una intoxicación por CO resulta esencial una rápida evacuación de la persona afectada de la fuente de CO, pero ello no garantiza una recuperación rápida. Cuando se produce el traslado desde un lugar contaminado con CO a una atmósfera exterior normal, el O_2 empieza a sustituir el CO de la hemoglobina. Sin embargo, los niveles de COHb descienden bastante lentamente; la vida media es de 2 a 6,5 horas, dependiendo del individuo y de factores ambientales. Si se administra oxígeno al 100% a través de una mascarilla, la velocidad de recambio puede aumentar hasta cuatro veces; el tiempo medio del intercambio O_2-CO puede reducirse a decenas de minutos si se administra oxígeno al 100% a una presión de 3 atm (303 kPa). De este modo, resulta crítico el tratamiento a cargo de un equipo médico competente y bien equipado.

Está muy recomendada la instalación de detectores de monóxido de carbono en las casas. Es una medida sencilla y barata que puede evitar una posible tragedia. Al terminar de recopilar los datos para este recuadro, adquirimos inmediatamente detectores de CO nuevos para nuestras casas.

ción de baja afinidad (la cual sería más estable en ausencia de ligando) hace más probable la transición a la conformación de alta afinidad.

En el segundo modelo, el **modelo secuencial** (Fig. 5-15b) propuesto en 1966 por Daniel Koshland y colaboradores, la unión del ligando puede inducir un cambio de conformación en una subunidad individual. Un cambio conformacional en una subunidad provoca un cambio similar en la subunidad adyacente y también hace más probable la unión de una segunda molécula de ligando. Hay más estados intermedios potenciales en este modelo que en el modelo concertado. Los dos modelos no son mutuamente excluyentes: el modelo concertado puede

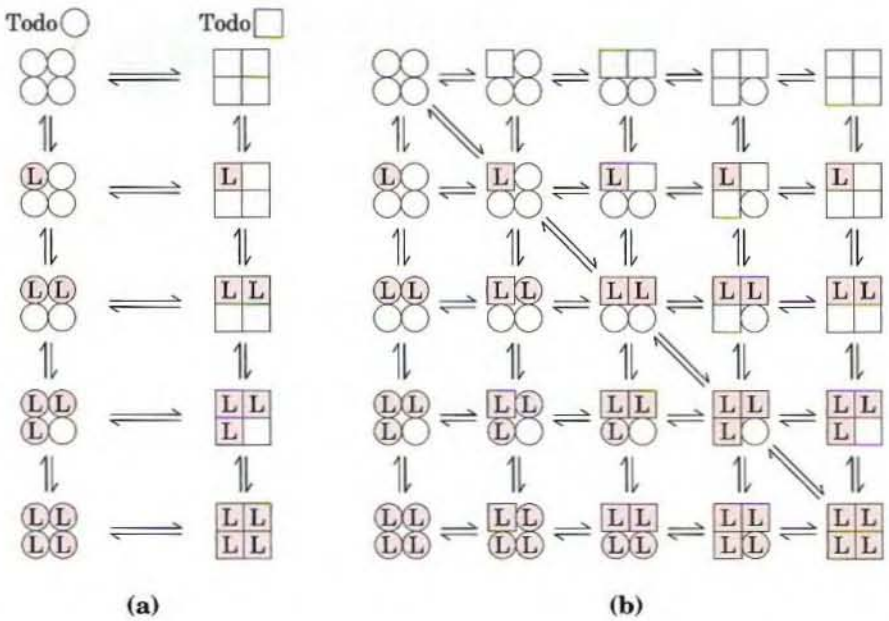


FIGURA 5-15 Dos modelos generales para la interconversión de las formas inactiva y activa de proteínas con unión cooperativa a ligando. A pesar de que los modelos pueden aplicarse a cualquier proteína (incluyendo cualquier enzima, Capítulo 6) que presente unión cooperativa, se muestran cuatro subunidades debido a que el modelo fue propuesto originalmente para la hemoglobina. En el modelo concertado o de todo o nada (modelo MWC) **(a)** se postula que todas las subunidades están en la misma conformación, ya sea como ○ (baja afinidad o inactiva) o como □ (alta afinidad o activa). Dependiendo del equilibrio, K_1, entre las formas ○ y □, la unión de una o más moléculas de ligando (L) desplazará el equilibrio hacia la forma □. Las subunidades con un L unido están sombreadas. En el modelo secuencial **(b)** cada subunidad individual puede estar en la forma ○ o en la forma □, siendo posible un gran número de conformaciones.

verse como un caso limitante de "todo o nada" del modelo secuencial. En el Capítulo 6 utilizaremos estos modelos para la discusión sobre los enzimas alostéricos.

La hemoglobina también transporta H^+ y CO_2

Además de transportar casi todo el oxígeno necesario para las células de los pulmones a los tejidos, la hemoglobina transporta dos productos finales de la respiración celular (H^+ y CO_2) de los tejidos a los pulmones y los riñones, donde son excretados. El CO_2 producido por la oxidación de combustibles orgánicos en la mitocondria se hidrata para formar bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reacción está catalizada por la **carbónico anhidrasa,** un enzima particularmente abundante en los eritrocitos. El dióxido de carbono no es demasiado soluble en solución acuosa y, de no ser convertido en bicarbonato, se formarían burbujas de CO_2 en los tejidos y en la sangre. Tal como puede verse a partir de la ecuación, la hidratación del CO_2 provoca un aumento de la concentración de H^+ (un descenso del pH) en los tejidos. La unión de oxígeno a la hemoglobina se ve muy afectada por el pH y la concentración de CO_2, por lo que la interconversión de CO_2 y bicarbonato es de gran importancia para la regulación de la unión de oxígeno y su liberación en la sangre.

La hemoglobina transporta alrededor del 40% del total de H^+ y del 15% al 20% del CO_2 formado en los tejidos hacia los pulmones y los riñones. (El resto de H^+ es absorbido por el tampón bicarbonato del plasma; el resto del CO_2 se transporta en forma de HCO_3^- y CO_2 disueltos.) La unión del H^+ y CO_2 está inversamente relacionada con la unión de oxígeno. Con un pH relativamente bajo y altas concentraciones de CO_2 en los tejidos periféricos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye a medida que se unen H^+ y CO_2 y se libera oxígeno a los tejidos. A su vez, a medida que se excreta CO_2 en los capilares pulmonares y aumenta consecuentemente el pH de la sangre, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta y la proteína une más O_2 para su transporte a los tejidos periféricos. Este efecto del pH y de la concentración de CO_2 sobre la unión y liberación de oxígeno por la hemoglobina es el llamado **efecto Bohr,** en honor de Christian Bohr, el fisiólogo danés (y padre del físico Niels Bohr) que lo descubrió en 1904.

El equilibrio de unión de la hemoglobina y una molécula de oxígeno puede describirse por la reacción

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

que no es una expresión completa. Para tener en cuenta el efecto de la concentración de H^+ sobre este equilibrio de unión, debemos reescribir la reacción como

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

donde HHb^+ designa la forma protonada de la hemoglobina. Esta ecuación nos dice que la curva de saturación de O_2 de la hemoglobina está influida por la concentración de H^+ (Fig. 5-16). Tanto el O_2 como el H^+ son unidos por la hemoglobina, aunque con afinidades inversas. Cuando la concentración de oxígeno es alta, como ocurre en los pulmones, la hemoglobina une O_2 y libera protones. Cuando la concentración de oxígeno es baja, situación que se da en los tejidos periféricos, el O_2 es liberado y se une H^+.

El oxígeno y el H^+ no se unen a los mismos sitios de la hemoglobina. El oxígeno se une a los átomos de hierro de los grupos hemo, mientras que el H^+ se puede unir a diversos residuos de aminoácido de la proteína. La His^{146} (His HC3) de las subunidades β realiza un aporte fundamental al efecto Bohr. Este residuo forma al protonarse uno de los pares iónicos (con el Asp^{94}, Asp FG1) que ayudan a estabilizar la desoxihemoglobina en el estado T (Fig. 5-9). El par iónico estabiliza la forma protonada de la His HC3, dando a este residuo un pK_a anormalmente alto en el estado T. El pK_a cae a su valor normal de 6,0 en el estado R debido a que el par iónico no puede formarse y este residuo está básicamente desprotonado en la oxihemoglobina a pH 7,6, el pH de la sangre en los pulmones. A medida que aumenta la concentración de H^+, se produce la

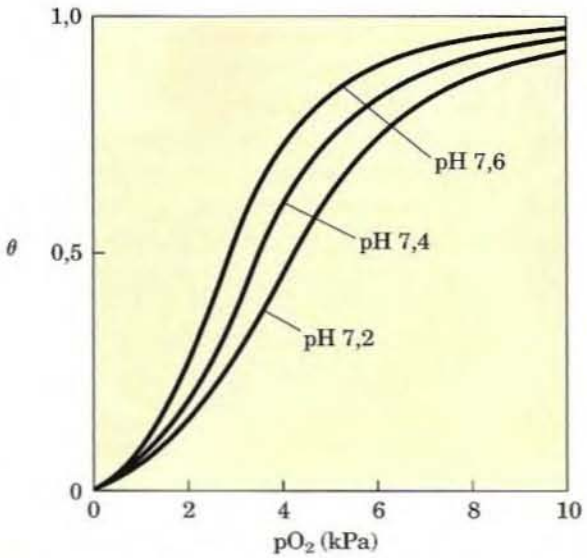
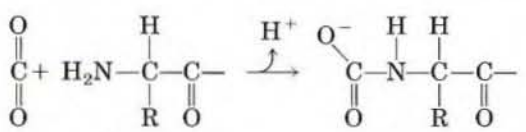


FIGURA 5-16 Efecto del pH sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina. El pH de la sangre en los pulmones es 7,6 y en los tejidos 7,2. Las medidas experimentales sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina se suelen tomar a pH 7,4.

protonación de la His HC3, lo que favorece la transición al estado T provocando la liberación de oxígeno. Un efecto similar se produce con la protonación de los residuos amino-terminales de las subunidades α, de otros residuos de His y quizá de otros grupos.

Así vemos que las cuatro cadenas polipeptídicas de la hemoglobina se comunican unas con otras no sólo por la unión de O_2 a sus grupos hemo sino también por la unión de H^+ a residuos aminoácidos específicos. Y aún hay otros elementos que añadir al entramado. La hemoglobina también une CO_2, una vez más de modo inversamente proporcional a la unión de oxígeno. El dióxido de carbono se une en forma de grupo carbamato al grupo α-amino del extremo amino-terminal de cada cadena de globina, formando carbaminohemoblogina:

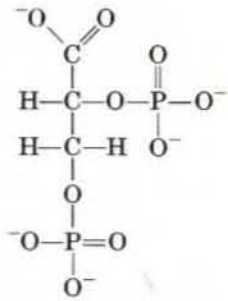


Esta reacción produce H^+ y contribuye al efecto Bohr. Los carbamatos unidos también forman puentes salinos adicionales (no mostrados en la Figura 5-9) que ayudan a estabilizar el estado T y favorecen la liberación de oxígeno.

Cuando la concentración de dióxido de carbono es alta, tal como ocurre en los tejidos periféricos, se une algo de CO_2 a la hemoglobina y la afinidad por el O_2 disminuye, haciendo que éste se libere. Por el contrario, cuando la hemoglobina llega a los pulmones, la alta concentración de oxígeno favorece la unión de O_2 y la liberación de CO_2. Es la capacidad de comunicar información de unión a ligando de una subunidad polipeptídica a las otras lo que convierte la hemoglobina en una molécula tan bellamente adaptada a la integración del transporte de O_2, CO_2 y H^+ por parte de los eritrocitos.

La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato

La interacción del **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** con la hemoglobina proporciona un ejemplo de modulación alostérica heterotrópica.



2,3-Bisfosfoglicerato

El BPG está presente en concentraciones relativamente altas en los eritrocitos. Cuando se aísla, la hemoglobina contiene una cantidad significativa de BPG unido, cuya eliminación completa resulta difícil. De hecho, las curvas de unión a O_2 para la hemoglobina que hemos examinado hasta ahora se habían obtenido en presencia de BPG unido. Se sabe que el 2,3-bisfosfoglicerato reduce de manera considerable la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno: hay una relación inversa entre la unión de O_2 y la unión de BPG. Por tanto podemos describir otro proceso de unión para la hemoglobina:

$$HbBPG + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + BPG$$

El BPG se une a un lugar alejado del sitio de fijación para el O_2 y regula la afinidad de unión de la hemoglobina para el O_2 en relación a la pO_2 en los pulmones. El BPG juega un importante papel en las adaptaciones fisiológicas a la menor pO_2 disponible a grandes alturas. Para un ser humano sano que se pasee a nivel del mar, la unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada de manera que la cantidad de O_2 liberada a los tejidos equivale aproximadamente al 40 % del máximo que podría ser transportado por la sangre (Fig. 5-17). Imaginemos que la misma persona se traslada rápidamente a un lugar montañoso a 4500 m de altitud, donde la pO_2 es considerablemente menor. La liberación de O_2 a los tejidos se ve ahora reducida. Sin embargo, después de unas pocas horas de permanencia a gran altitud, la concentración de BPG en sangre ha empezado a aumentar, conduciendo a una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este ajuste del nivel de BPG tiene sólo un efecto pequeño sobre la unión de O_2 en los pulmones pero afecta de manera importante a la liberación de O_2 en los tejidos. Como resultado, la liberación de oxígeno en los tejidos vuelve a ser de casi el 40% del que puede ser transportado por la sangre. La situación se invierte cuando la persona vuelve al nivel del mar. La concentración de BPG en los eritrocitos también aumenta en las personas que sufren **hipoxia,** una disminución en la oxigenación en los tejidos periféricos debida a un funcionamiento inadecuado de los pulmones o del sistema circulatorio.

El BPG se une a la hemoglobina en la cavidad existente entre las subunidades β en el estado T (Fig. 5-18). Esta cavidad

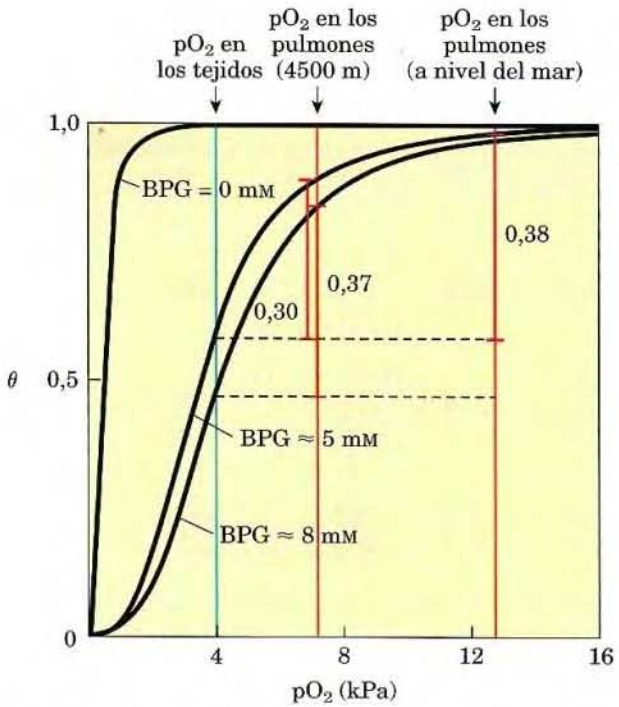


FIGURA 5-17 Efecto del BPG sobre la unión de oxígeno a la hemoglobina. La concentración de BPG en la sangre humana normal es de 5 mM a nivel del mar y 8 mM a grandes altitudes. Obsérvese que la hemoglobina une oxígeno muy fuertemente en ausencia de BPG, presentando una curva de unión hiperbólica. En realidad, el coeficiente de Hill observado para la unión cooperativa de O_2 disminuye sólo (de 3 a 2,5) cuando se extrae el BPG de la hemoglobina, pero la parte creciente de la curva sigmoidea está confinada a una región muy pequeña cercana al origen. A nivel del mar, la hemoglobina está casi saturada con O_2 en los pulmones, pero su nivel de saturación es sólo de un 60% en los tejidos, de manera que la cantidad de oxígeno liberado en los tejidos es cercana al 40% del máximo del que puede ser transportado por la sangre. A grandes altitudes la liberación de O_2 disminuye en una cuarta parte, alcanzando como máximo el 30%. Un aumento en la concentración de BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el O_2 haciendo que se libere a los tejidos cerca de un 40% del que se transporta.

está tapizada con residuos aminoácidos cargados positivamente que interaccionan con los grupos cargados negativamente del 2,3-bisfosfoglicerato. A diferencia del O_2, solamente se une una molécula de BPG a cada tetrámero de hemoglobina. El BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno al estabilizar el estado T. La transición al estado R provoca un estrechamiento de la bolsa de unión a BPG, impidiendo la unión del BPG. En ausencia de BPG, la hemoglobina pasa más fácilmente al estado R.

La regulación de la unión de oxígeno a la hemoglobina por el BPG juega un papel importante en el desarrollo fetal. La hemoglobina fetal debe tener una mayor afinidad por el O_2 que la hemoglobina materna debido a que el feto debe extraer el oxígeno de la sangre de su madre. El feto sintetiza subunidades γ en lugar de las β, formándose la hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Este tetrámero tiene una afinidad por el BPG mucho menor que la de la hemoglobina adulta normal y por lo tanto una mayor afinidad por el oxígeno. **Proteínas de unión a oxígeno – La hemoglobina puede estar regulada alostéricamente**

La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina

La gran importancia de la secuencia de aminoácidos para determinar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas globulares y por lo tanto sus funciones biológicas se demuestra muy claramente en el caso de la anemia falciforme, una enfermedad hereditaria humana. Se conocen más de 500 variantes genéticas de la hemoglobina en la población humana; con pocas excepciones, se trata de variantes muy raras. La mayoría de estas variantes se deben a diferencias en un único aminoácido. Los efectos sobre la estructura y función de la hemoglobina suelen ser muy pequeños, aunque a veces pueden llegar a ser extraordinarios. Cada variante de hemoglobina es el producto de una alteración genética. A cada variante de un gen se le llama alelo. Debido a que los humanos poseen en general dos copias de cada gen, un individuo puede tener dos copias de un alelo (siendo en-

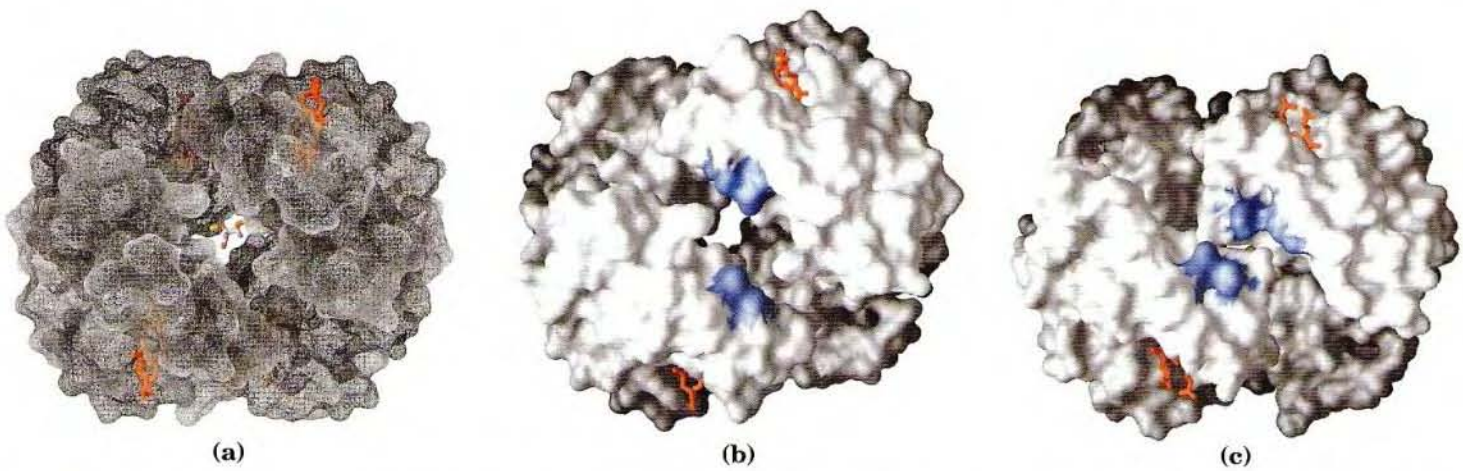


FIGURA 5-18 Unión del BPG a la desoxihemoglobina. **(a)** La unión del BPG estabiliza el estado T de la desoxihemoglobina (PDB ID 1HGA), representada aquí por una imagen de superficie de malla. **(b)** Las cargas negativas del BPG interaccionan con varios grupos cargados positivamente (mostrados en azul en este modelo de contorno de la superficie) que rodean la bolsa entre las subunidades β en el estado T. **(c)** La bolsa de unión para el BPG desaparece con la oxigenación, produciéndose la transición al estado R (PDB ID 1BBB). [Compárense **(b)** y **(c)** con Fig. 5-10.]

(a)

(b)

FIGURA 5-19 Comparación de eritrocitos cóncavos normales y uniformes **(a)** con los eritrocitos de formas diversas presentes en la anemia falciforme **(b)**, los cuales pueden ser normales, falciformes o estrellados.

tonces homozigoto para ese gen) o una copia de cada uno de los dos alelos diferentes (heterozigoto).

La anemia falciforme es una enfermedad genética en la cual un individuo ha heredado el alelo para esta enfermedad de ambos progenitores. Los eritrocitos de estos individuos son anormales y menos numerosos. Además de haber un número extraordinariamente elevado de células inmaduras, la sangre contiene muchos eritrocitos alargados, delgados y con forma de media luna que asemejan la hoja de una hoz (Fig. 5-19). Cuando se desoxigena la hemoglobina de las células falciformes (llamada hemoglobina S), ésta pasa a ser insoluble y forma polímeros que se agregan en fibras tubulares (Fig. 5-20). La hemoglobina normal (hemoglobina A) sigue siendo soluble cuando se desoxigena. Las fibras insolubles de la hemoglobina S desoxigenada son las responsables de la deformación en forma de hoz de los eritrocitos y la proporción de células falciformes aumenta en gran medida cuando se desoxigena la sangre.

Las propiedades alteradas de la hemoglobina S son el resultado de la sustitución de un único aminoácido, una Val en lugar de un Glu en la posición 6 de las dos cadenas β. El grupo R de la valina no posee carga eléctrica, mientras que el glutamato tiene una carga negativa a pH 7,4. Por lo tanto la hemoglobina S tiene dos cargas negativas menos que la hemoglobina A, una por cada una de las cadenas β. La sustitución del Glu por la Val crea un punto de contacto hidrofóbico "pegajoso" en la posición 6 de la cadena β, que se sitúa en la superficie exterior de la molécula. Estos puntos hidrofóbicos hacen

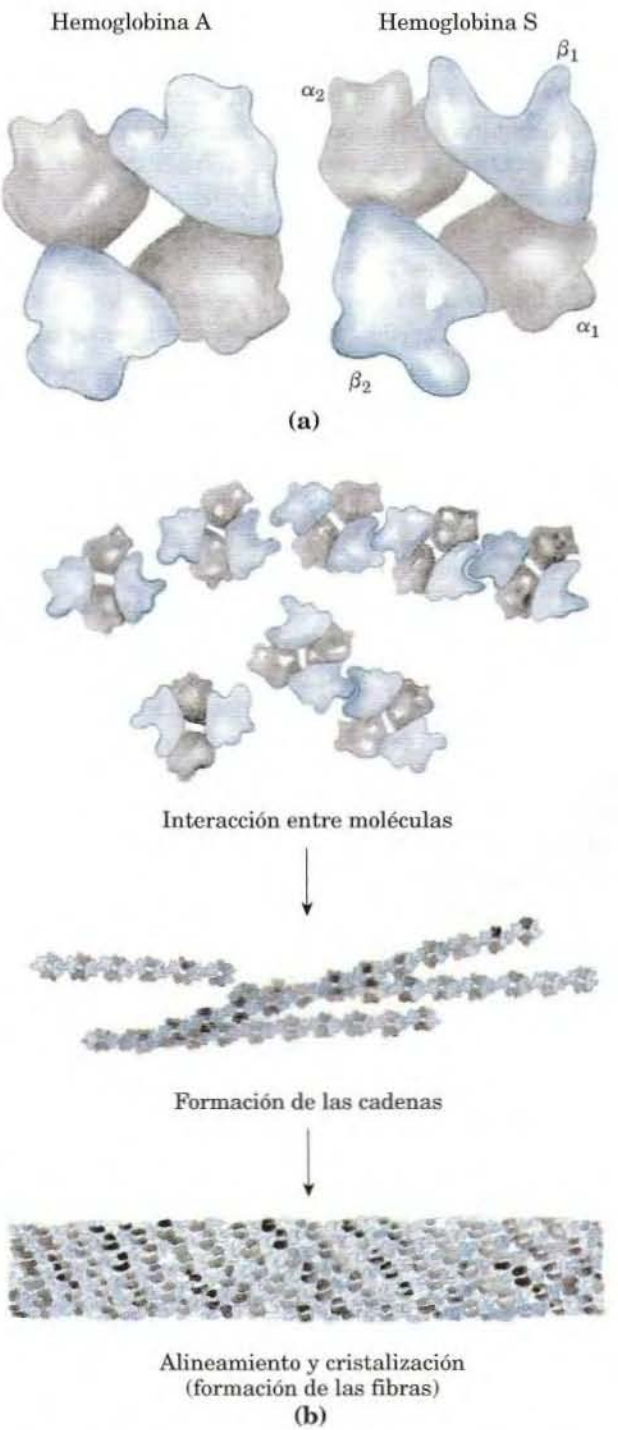


FIGURA 5-20 Hemoglobina normal y de la anemia falciforme. **(a)** Como resultado de un único cambio de aminoácido en las cadenas β se producen diferencias sutiles de conformación entre la hemoglobina A y la hemoglobina S. **(b)** Como resultado de este cambio la desoxihemoglobina S presenta una zona hidrofóbica en su superficie, que provoca la agregación de las moléculas en cadenas que se alinean en forma de fibras insolubles.

que las moléculas de desoxihemoglobina S se asocien anormalmente entre ellas, formando los largos agregados fibrosos característicos de esta enfermedad. Proteínas de unión a oxígeno – Defectos en la Hb dan lugar a graves enfermedades genéticas

Como ya hemos visto, la anemia falciforme se presenta en individuos homozigotos para el aleto falciforme del gen codificante de la subunidad β de la hemoglobina. Los individuos que reciben el alelo de uno solo de sus progenitores y que por tanto son heterozigotos sufren una enfermedad más leve llamada rasgo de la anemia falciforme; en estos casos sólo un 1% de sus eritrocitos son falciformes en estado de desoxigenación. Estos individuos pueden tener una vida completamente normal si evitan el ejercicio vigoroso u otros esfuerzos sobre el sistema circulatorio.

La anemia falciforme es una enfermedad dolorosa y que puede ser mortal. Las personas con anemia falciforme sufren crisis recurrentes provocadas por el ejercicio físico. Se sienten débiles, tienen vértigo y les falta el aire, además de sufrir un aumento del pulso y soplos cardíacos. El contenido en hemoglobina de su sangre es sólo la mitad del normal, de 15 a 16 g/100mL, debido a que los eritrocitos falciformes son muy frágiles y se rompen con facilidad, lo que provoca una anemia ("falta de sangre"). Una consecuencia aún más grave es que los capilares quedan obturados por los eritrocitos alargados y con formas anormales, provocando un intenso dolor e interfiriendo en las funciones normales de los órganos, siendo ésta una de las causas principales que provocan la muerte temprana de muchas de las personas que padecen esta enfermedad.

Las personas con anemia falciforme suelen morir durante la infancia si no reciben tratamiento médico. Sin embargo, el alelo de la anemia falciforme es sorprendentemente común en algunas partes de África. La investigación sobre la persistencia de un alelo con efectos negativos tan evidentes en los individuos homozigotos llevó al descubrimiento de que este alelo aporta una pequeña pero importante resistencia, en individuos heterozigotos, a formas letales de la malaria. La selección natural ha dado como resultado una población de alelos que compensan los efectos negativos del estado homozigoto frente a la resistencia a la malaria que aporta el estado heterozigoto. ■

RESUMEN 5.1 Unión reversible proteína-ligando: proteínas de unión a oxígeno

- La función proteica suele implicar interacciones con otras moléculas. Una molécula que se une a una proteína se denomina ligando y el sitio al que se une sitio de fijación de ligando. Las proteínas pueden sufrir cambios conformacionales a causa de la unión de ligandos y según un proceso que se llama encaje inducido. En una proteína multisubunidad la unión de un ligando a una subunidad puede afectar a la unión a otras subunidades. La unión de ligandos puede estar regulada.
- La mioglobina contiene un grupo prostético hemo que une oxígeno. El hemo consiste en un único átomo de Fe^{2+} coordinado en un anillo de porfirina. El oxígeno se une reversiblemente a la mioglobina, en un proceso que se puede describir mediante una constante de asociación K_a o una constante de disociación K_d. Para una proteína monomérica como la mioglobina, la fracción de sitios de fijación ocupados por ligandos es una función hiperbólica de la concentración de ligando.
- La hemoglobina adulta normal tiene cuatro subunidades que contienen grupos hemo, dos α y dos β, similares en estructura entre ellas y con la mioglobina. La hemoglobina existe en dos estados estructurales interconvertibles, T y R. El estado T es el más estable en ausencia de oxígeno. La unión de oxígeno promueve la transición hacia el estado R.
- La unión de oxígeno a la hemoglobina es al mismo tiempo alostérica y cooperativa. Al unirse O_2 a un sitio de fijación, la hemoglobina sufre cambios conformacionales que afectan a los otros sitios de fijación, lo que constituye un ejemplo de comportamiento alostérico. Las cambios conformacionales entre los estados T y R, a través de interacciones subunidad-subunidad, dan como resultado una unión cooperativa; este comportamiento se describe mediante una curva sigmoidea y se analiza mediante la representación de Hill.
- Se han propuesto dos modelos principales para explicar la unión cooperativa de ligandos a proteínas multisubunidad: el concertado y el secuencial.
- La hemoglobina también se une a H^+ y CO_2, lo que resulta en la formación de pares iónicos que estabilizan el estado T y disminuyen la afinidad de la hemoglobina por el O_2 (el efecto Bohr). La unión del oxígeno a la hemoglobina está también modulada por el 2,3-bisfosfoglicerato, que se une y estabiliza el estado T.
- La anemia falciforme es una enfermedad genética causada por la sustitución de un único aminoácido (Glu^6 por Val^6) en cada una de las cadenas β de la hemoglobina. El cambio genera la aparición de una zona hidrofóbica en la superficie de la hemoglobina que hace que las moléculas se agreguen en haces de fibras. En condiciones de homozigosis, esta enfermedad tiene graves complicaciones médicas.

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmunitario y las inmunoglobulinas

La discusión sobre las proteínas que unen oxígeno ha mostrado de qué modo las conformaciones de esas proteínas afectan y son afectadas por la unión de pequeños ligandos (O_2 o CO_2) al grupo hemo. Sin embargo, en la mayoría de las interacciones proteína-ligando no interviene un grupo prostético. En vez de esto, el sitio de fijación a ligando suele ser más a menudo como el de la hemoglobina para el BPG: una hendi-

dura en la proteína recubierta por residuos de aminoácidos dispuestos de tal manera que hacen que la interacción sea altamente específica. Una discriminación efectiva de los ligandos es la norma para los sitios de fijación, incluso cuando los ligandos tienes diferencias estructurales muy pequeñas.

Todos los vertebrados poseen un sistema inmunitario capaz de distinguir las moléculas "propias" de las "foráneas" y destruir a continuación aquéllas consideradas como ajenas. De esta manera, el sistema inmunitario elimina virus, bacterias y otros patógenos, así como moléculas que puedan representar una amenaza para el organismo. Fisiológicamente, la respuesta del sistema inmunitario frente a un invasor es un entramado complejo y coordinado de interacciones entre diferentes tipos de proteínas, moléculas y tipos celulares. Sin embargo, cuando se trata de proteínas individuales, el sistema inmunitario demuestra cómo un sistema bioquímico específico y extremadamente sensible puede basarse en la unión reversible entre ligandos y proteínas.

La respuesta inmunitaria es el resultado de la acción de una serie de células y proteínas especializadas

La acción inmunitaria es llevada a cabo por una amplia gama de **leucocitos** (glóbulos blancos de la sangre) que incluyen los **macrófagos** y los **linfocitos,** originados todos ellos a partir de células madre no diferenciadas de la médula ósea. Los leucocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo y recorrer los tejidos. Cada una de las células sintetiza una o más proteínas capaces de reconocer y unirse a moléculas que podrían ser señal de una infección.

La respuesta inmunitaria es el resultado de la acción de dos sistemas complementarios, el sistema inmunitario humoral y el celular. El **sistema inmunitario humoral** (del latín *humor*, "fluido") está dirigido contra infecciones bacterianas y virus extracelulares (aquellos que se encuentran en los fluidos corporales), pero también puede responder a proteínas individuales introducidas en el organismo. El **sistema inmunitario celular** destruye las células propias infectadas por virus, encargándose también de destruir algunos parásitos y tejidos foráneos.

La base proteica de la respuesta inmunitaria humoral está formada por unas proteínas solubles llamadas **anticuerpos** o **inmunoglobulinas,** normalmente abreviadas como **Ig.** Las inmunoglobulinas se unen a las bacterias, a los virus o a moléculas grandes identificados como foráneos, marcándolos para su destrucción. Las inmunoglobulinas constituyen hasta un 20% de las proteínas sanguíneas y son producidas por los **linfocitos B** o **células B,** llamados así debido a que completan su desarrollo en la médula ósea (en inglés *bone marrow*).

Los agentes que conforman la base de la respuesta inmunitaria celular son una clase de **linfocitos T** o **células T** (llamados así porque las últimas fases de su desarrollo tienen lugar en el *t*imo) llamadas **células T citotóxicas** (**células T_C,** también llamadas células T asesinas). El reconocimiento de las células infectadas o de los parásitos implica a unas proteínas llamadas **receptores de las células T** que se encuentran en la superficie de las células T_C. Los receptores son proteínas que habitualmente se disponen en la superficie exterior de las células y se extienden a través de la membrana plasmática; reconocen y unen ligandos extracelulares, desencadenando una serie de cambios en el interior celular.

Además de las células T citotóxicas también encontramos las **células T cooperadoras** (**células T_H,** de *helper cells*), cuya función es producir unas proteínas señalizadoras solubles llamadas citoquinas, entre las que se incluyen las interleuquinas. Las células T_H interaccionan con los macrófagos. En la Tabla 5-2 se resumen las funciones de los diversos leucocitos del sistema inmunitario.

Cada proteína de reconocimiento del sistema inmunitario, ya sea un anticuerpo producido por una célula B o un receptor en la superficie de una célula T, une de manera específica alguna estructura química concreta, distinguiéndola en la práctica de cualquier otra. El ser humano es capaz de producir más de 10^8 anticuerpos diferentes con especificidad de unión propia. Esta extrordinaria diversidad hace posible que cualquier estructura química de la superficie de un virus o de una célula invasora sea reconocida y unida por uno o más anticuerpos. La diversidad de los anticuerpos se deriva de la reorganización al azar de una serie de segmentos de los genes de las inmunoglobulinas mediante mecanismos de recombinación genética que se describirán en el Capítulo 25 (véase Fig. 25-44).

Algunas propiedades de las interacciones entre anticuerpos o receptores de las células T y las moléculas a las que se unen son únicas del sistema inmunitario, por lo que se utiliza un léxico especializado para describirlas. Se conoce como **antígeno** cualquier molécula o patógeno capaz de generar una respuesta inmunitaria. Un antígeno puede ser un virus, una pared celular bacteriana, una proteína individual u otras macromoléculas. A un antígeno complejo se le pueden unir una serie de anticuerpos diferentes. Un anticuerpo o un receptor de las células T concreto se unirá solamente a una estructura mole-

TABLA 5-2 Algunos tipos de leucocitos asociados con el sistema inmunitario

Tipo celular	*Función*
Macrófagos	Ingestión de grandes partículas y células por fagocitosis
Linfocitos B (células B)	Producción y secreción de anticuerpos
Linfocitos T (células T)	
Células T citotóxicas (T_C) (asesinas)	Interaccionan con células infectadas a través de receptores de superficie de las células T
Células T cooperadoras (T_H)	Interaccionan con macrófagos y secretan citoquinas (interleuquinas) que estimulan la proliferación de células T_C, T_H y B

cular determinada dentro del antígeno denominada **determinante antigénico** o **epítopo.**

Reaccionar a moléculas pequeñas que son intermediarios comunes y productos del metabolismo celular no sería productivo para el sistema inmunitario. Las moléculas con una $M_r < 5000$ generalmente no actúan como antígenos. No obstante, estas moléculas pequeñas pueden unirse covalentemente a grandes proteínas en el laboratorio de forma que pueden originar una respuesta inmunitaria. Estas moléculas pequeñas se llaman **haptenos.** Los anticuerpos producidos como respuesta a los haptenos unidos a proteínas se unirán entonces a las mismas moléculas pequeñas cuando estén libres. Este tipo de anticuerpos se emplea algunas veces en el desarrollo de pruebas analíticas que describimos más adelante en este capítulo o también como anticuerpos catalíticos (véase Recuadro 6-3).

Las interacciones de un anticuerpo y un antígeno se conocen mucho mejor que las propiedades de unión de los receptores de las células T. Sin embargo, antes de centrarnos en los anticuerpos, estudiaremos con más detalle los sistemas inmunitarios humoral y celular para poder contextualizar las interacciones bioquímicas básicas.

Las células distinguen lo propio de lo ajeno exponiendo péptidos en su superficie

El sistema inmunitario debe identificar y destruir los patógenos, pero también debe reconocer y *no* destruir las proteínas y células normales del propio organismo, lo "propio". La detección de antígenos proteicos es llevada a cabo por las **proteínas MHC (complejo de histocompatibilidad principal).** Las proteínas MHC unen fragmentos peptídicos de proteínas digeridas dentro de la célula y los presentan en la superficie externa de la misma. Normalmente, estos péptidos proceden de la digestión de proteínas celulares típicas, pero durante una infección vírica las proteínas del virus también son digeridas y presentadas por las proteínas MHC en la superficie celular. Los fragmentos peptídicos procedentes de las proteínas foráneas que son expuestos por las proteínas MHC son los antígenos reconocidos por el sistema inmunitario como no propios. Los receptores de las células T unen esos fragmentos y desencadenan los pasos siguientes de la respuesta inmunitaria. Hay dos clases de proteínas MHC (Fig. 5-21), que se diferencian por su distribución en diversos tipos celulares y por el origen de las proteínas digeridas de las que exponen los péptidos.

Las proteínas **MHC de clase I** (Fig. 5-22) se encuentran en la superficie de la inmensa mayoría de las células de los vertebrados. Dentro de la población humana hay innumerables variantes, convirtiéndolas en unas de las proteínas más polimórficas. Debido a que cada individuo produce hasta seis variantes de las proteínas MHC de clase I es muy difícil que dos individuos tengan la misma serie de proteínas. Las proteínas MHC de clase I unen y muestran péptidos derivados de la degradación y recambio proteolíticos de proteínas que se produce normalmente dentro de la célula. Estos complejos de péptidos y proteínas MHC de clase I son las dianas que reconocen los receptores de las células T del sistema inmunitario celular. El esquema general del reconocimiento en el sistema inmunitario fue descrito por primera vez por Rolf Zinkernagel y Peter Doherty en 1974.

Cada célula T_C tiene múltiples copias de un único receptor de célula T que es específico para una clase particular de complejo de proteína MHC de clase I-péptido. Para evitar la creación de un número exagerado de células T_C que reconocerían y destruirían las células normales, la maduración de las células T_C en el timo incluye un proceso de selección estricto

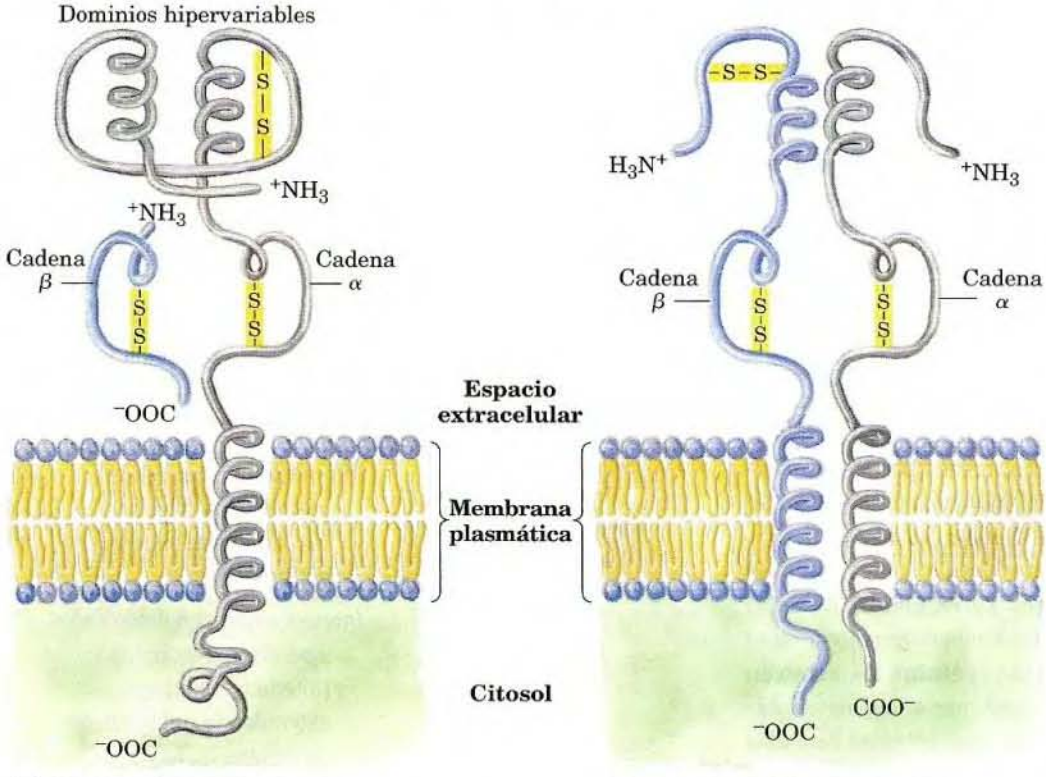
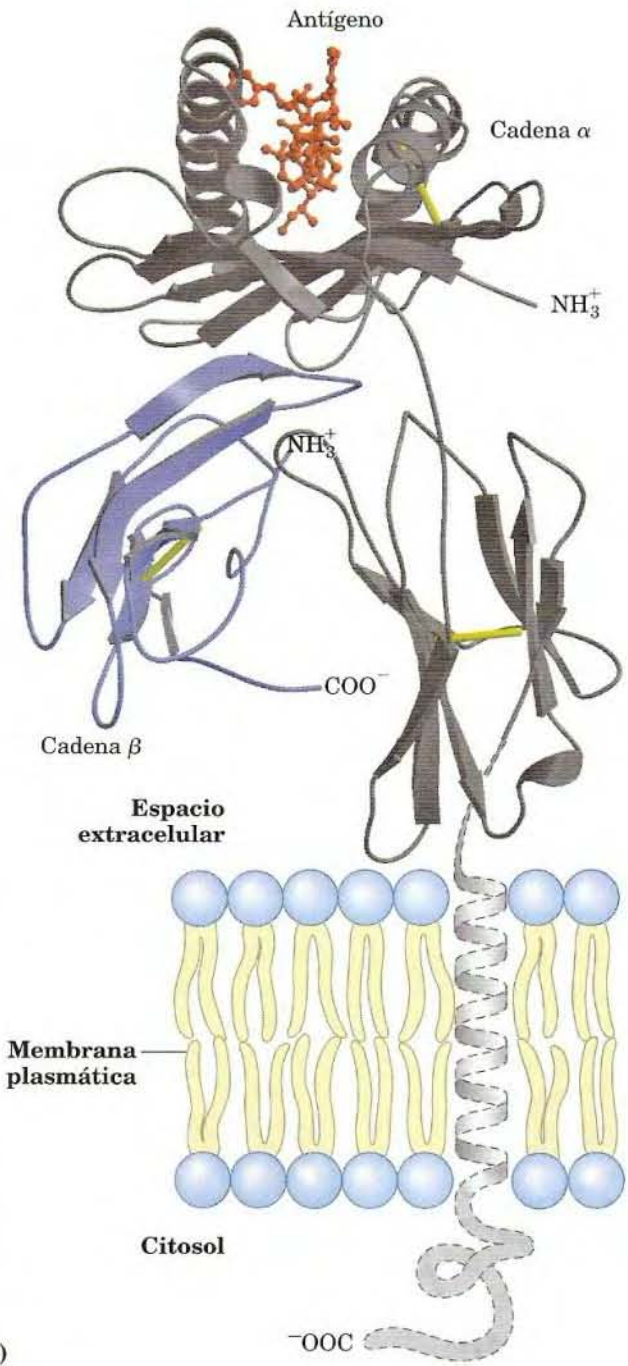
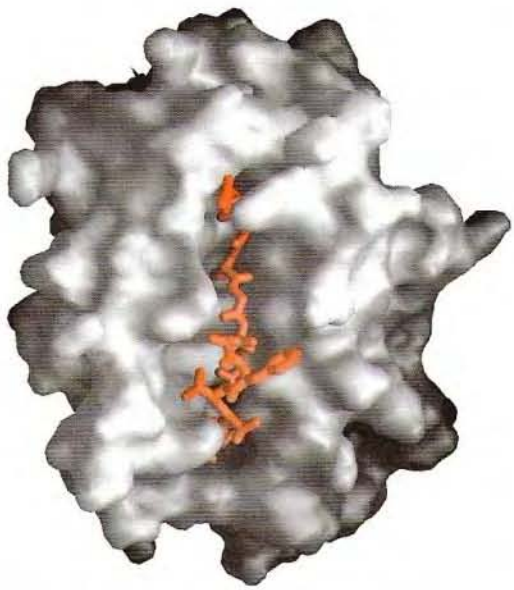


FIGURA 5-21 Proteínas MHC. Estas proteínas constan de una cadena α y una β. **(a)** En las proteínas MHC de clase I, la pequeña cadena β es invariable pero la secuencia de aminoácidos de la cadena α muestra un grado alto de variabilidad, localizada en dominios específicos de la proteína que aparecen en el exterior de la célula. Cada ser humano produce hasta seis cadenas α diferentes para las proteínas MHC de clase I. **(b)** En las proteínas MHC de clase II, ambas cadenas α y β poseen regiones cercanas a sus extremos N-terminales con variabilidad relativamente alta.



(a)



(b)

FIGURA 5-22 Estructura de una proteína MHC humana de clase I. **(a)** Esta imagen procede parcialmente de la determinación de la estructura de la porción extracelular de la proteína (PDB ID 1DDH). La cadena α del MHC se muestra en gris, la pequeña cadena β está en azul, en amarillo se marcan los enlaces disulfuro. En rojo se muestra un ligando unido, un péptido derivado del VIH. **(b)** Una perspectiva superior donde se observa el contorno de la superficie que une y muestra el péptido. El péptido del VIH (en rojo) ocupa este sitio. Ésta es la parte de la proteína MHC de clase I que interacciona con los receptores de células T.

que elimina más del 95% de las células T_C en desarrollo, incluyendo las que podrían reconocer y unirse a proteínas MHC de clase I que mostrasen péptidos de las proteínas celulares propias del organismo. Las células T_C que sobreviven y maduran son aquéllas con receptores que no se unen a las proteínas propias del organismo. El resultado es una población de células que se unen a péptidos foráneos unidos por proteínas MHC de clase I. Estas interacciones conducen a la destrucción de las células infectadas por virus o parásitos. Cuando un órgano es trasplantado, las proteínas MHC de clase I del donante, reconocidas como foráneas, se unen a las células T_C del receptor ocasionando el rechazo.

Las proteínas **MHC de clase II** están presentes en la superficie de unos pocos tipos de células especializadas que incorporan antígenos foráneos y entre las que se incluyen los macrófagos y los linfocitos B. Al igual que las proteínas MHC de clase I, las proteínas de clase II son altamente polimórficas, con muchas variantes en la población humana. Cada individuo es capaz de producir hasta doce variantes, siendo por lo tanto muy improbable que dos individuos tengan la misma serie de variantes. Las proteínas MHC de clase II fijan y muestran péptidos no derivados de proteínas celulares sino de proteínas externas ingeridas por la célula. Los complejos resultantes proteína MHC de clase II-péptido son las dianas de unión de los receptores T de diversas células T cooperadoras. Las células T_H, al igual que las células T_C, sufren un estricto proceso de selección en el timo, eliminándose aquellas que reconocen las proteínas celulares propias. Moléculas MHC

A pesar de la eliminación de la mayoría de las células T_C y T_H durante su proceso de selección en el timo hay un gran número de ellas que sobreviven, siendo éstas las que proporcionan la respuesta inmunitaria. Cada célula superviviente tiene un único tipo de receptor T que puede unirse a una estructura química concreta. Las células T que patrullan por el torrente sanguíneo y los tejidos tienen millones de especificidades de unión diferentes en sus receptores T. Dentro de la inmensa variedad de células T hay siempre un contingente de células que pueden unir específicamente cualquier antígeno que pueda aparecer. La inmensa mayoría de estas células nunca encuentran un antígeno foráneo al cual puedan unirse y normalmente mueren al cabo de pocos días, siendo sustituidas por nuevas generaciones de células T que patrullan de manera ininterrumpida en busca de la interacción que desencadene la respuesta inmunitaria completa.

Las células T_H participan tan sólo de forma indirecta en la destrucción de células infectadas y patógenos, estimulando la proliferación selectiva de las células T_C y B que se unan a un antígeno particular. Este proceso, llamado **selección clonal,** aumenta el número de células del sistema inmunitario que pueden responder a un patógeno particular. La importancia de las células T_H se aprecia claramente en el caso de la epidemia producida por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el virus causante del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Las células T_H son la diana primaria de la infección por VIH. La eliminación de estas células incapacita progresivamente a la totalidad del sistema inmunitario.

Los anticuerpos poseen dos sitios idénticos de unión a antígeno

La **inmunoglobulina G (IgG)** es la principal clase de molécula de anticuerpo y una de las proteínas más abundantes en el suero sanguíneo. Tiene cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas largas, llamadas cadenas pesadas, y dos cadenas ligeras, unidas por enlaces no covalentes y puentes disulfuro en un complejo de M_r 150.000. Las cadenas pesadas de una molécula de IgG interaccionan en un extremo y luego se abren para interaccionar por separado con las cadenas ligeras, formando una molécula en forma de Y (Fig 5-23). En las "bisagras" que separan la base de la IgG de sus ramas, la inmunoglobulina puede ser cortada por proteasas. La rotura con la proteasa papaína libera el fragmento basal, llamado **Fc,** y las dos ramas, llamadas **Fab.** Cada rama tiene un único sitio de fijación a antígeno.

La estructura fundamental de las inmunoglobulinas fue establecida por primera vez por Gerald Edelman y Rodney Porter. Cada cadena está compuesta por dominios identificables: algunos son constantes en secuencia y estructura de una IgG a otra, otros son variables. Los dominios constantes tienen una estructura característica conocida como **plegamiento de la inmunoglobulina,** un motivo estructural muy conservado en todas las proteínas de la clase β (Capítulo 4). Hay tres de estos dominios constantes en cada cadena pesada y uno en cada cadena ligera. Las cadenas pesada y ligera poseen además un dominio variable cada una, en el cual se encuentra la mayor parte de la variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Los dominios variables se asocian para crear el sitio de fijación al antígeno (Fig. 5-24).

En muchos vertebrados la IgG es solamente una de las cinco clases de inmunoglobulinas. Cada clase tiene un tipo característico de cadena pesada, llamadas α, δ, ε, γ y μ, que corresponden a las IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Hay dos tipos de cadena ligera, κ y λ, presentes en cualquiera de las clases de inmunoglobulinas. Las estructuras globales de las **IgD** y las **IgE** son similares a la de la IgG. Las **IgM** pueden presentarse en forma monomérica, unidas a membrana, o en forma de pentámero formado por el entrecruzamiento de la estructura

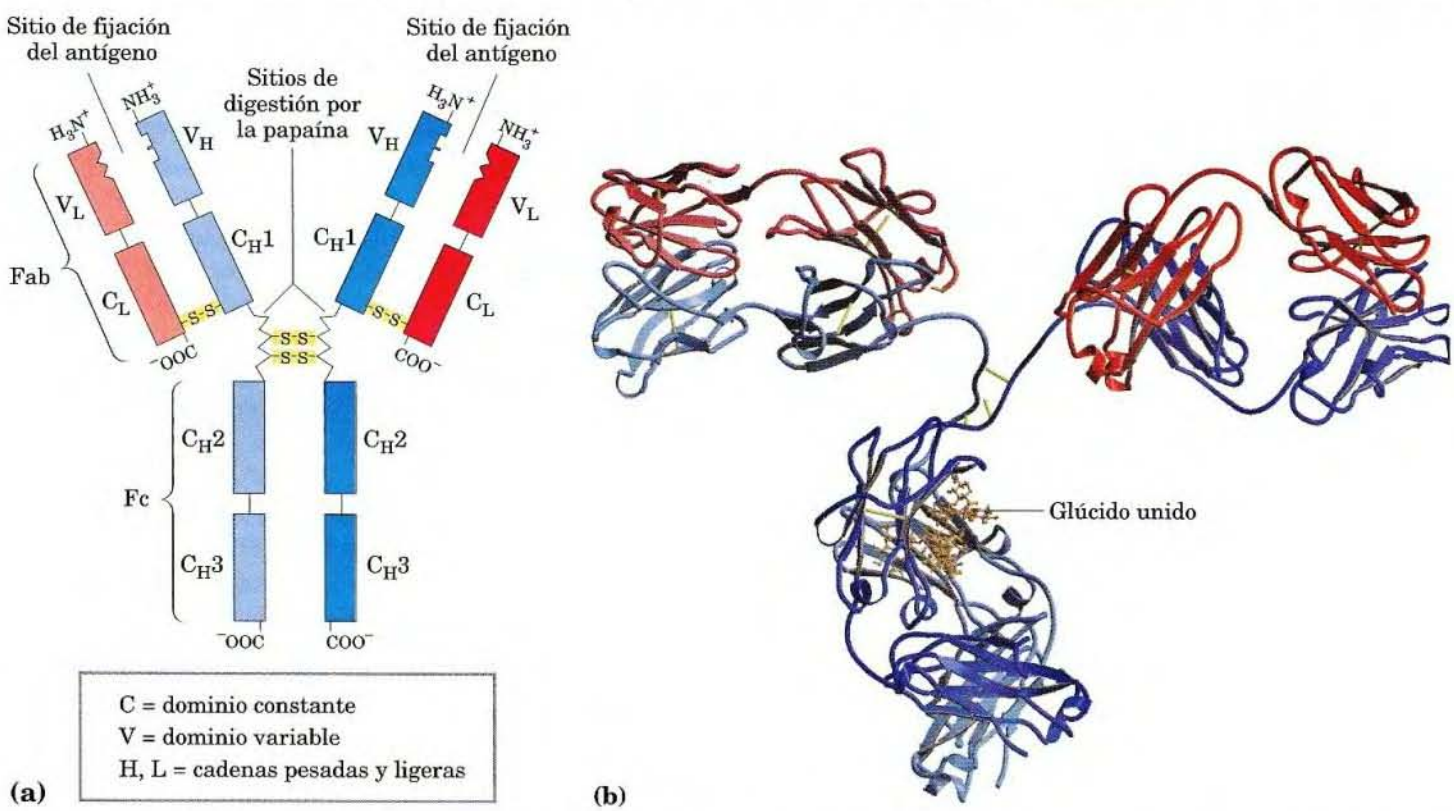


FIGURA 5-23 Estructura de la inmunoglobulina G. (a) Un par de cadenas pesadas se combina con otro de cadenas ligeras para formar una molécula con forma de Y. Se crean dos sitios de fijación a antígeno por la combinación de los dominios variables de una cadena ligera (V_L) y de una pesada (V_H). La digestión con papaína separa las porciones Fab y Fc de la proteína por la región bisagra. La porción F_c contiene también glúcido unido. **(b)** Modelo de cintas de la primera molécula de IgG completamente cristalizada y analizada estructuralmente (PDB ID 1IGT). A pesar de que la molécula contiene dos cadenas pesadas idénticas (en dos tonos de azul), cristaliza según la conformación asimétrica mostrada. La flexibilidad conformacional puede ser importante para la función de las inmunoglobulinas.

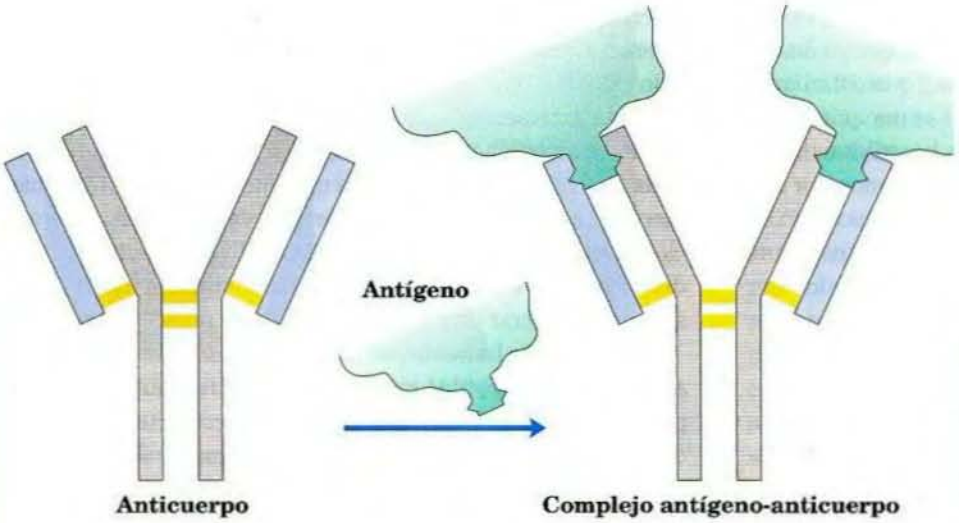


FIGURA 5-24 Unión de la IgG a un antígeno. Para generar un ajuste óptimo para el antígeno, los sitios de fijación de la IgG suelen sufrir ligeros cambios conformacionales. Un ajuste inducido de este tipo es típico de muchas interacciones entre proteína y ligando.

básica cuando son secretadas (Fig. 5-25). Las **IgA** se encuentran principalmente en secreciones tales como la saliva, las lágrimas y la leche, pudiendo encontrarse como monómeros, dímeros o trímeros. La IgM es el primer anticuerpo producido por los linfocitos B y el principal anticuerpo en las primeras fases de la respuesta inmunitaria primaria. Algunas células B empiezan también pronto a producir IgD (con el mismo sitio de fijación a antígeno que la IgM producida por la misma célula) pero la función específica de las IgD no está bien definida.

La IgG descrita anteriormente es el principal anticuerpo en la respuesta inmunitaria secundaria, la respuesta iniciada por las células B de memoria. Como parte de la inmunidad frente a antígenos ya conocidos, la IgG es la inmunoglobulina más abundante en la sangre. Cuando la IgG se une a una bacteria invasora o a un virus, activa ciertos leucocitos, tales como los macrófagos, para que engullan y destruyan al invasor y también activa otros componentes de la respuesta inmunitaria. Hay otra clase de receptores en la superficie celular de los macrófagos que reconocen y unen la región Fc de las IgG. Cuando estos receptores de Fc se unen a un complejo anticuerpo-patógeno el macrófago lo rodea y lo incorpora por fagocitosis (Fig. 5-26).

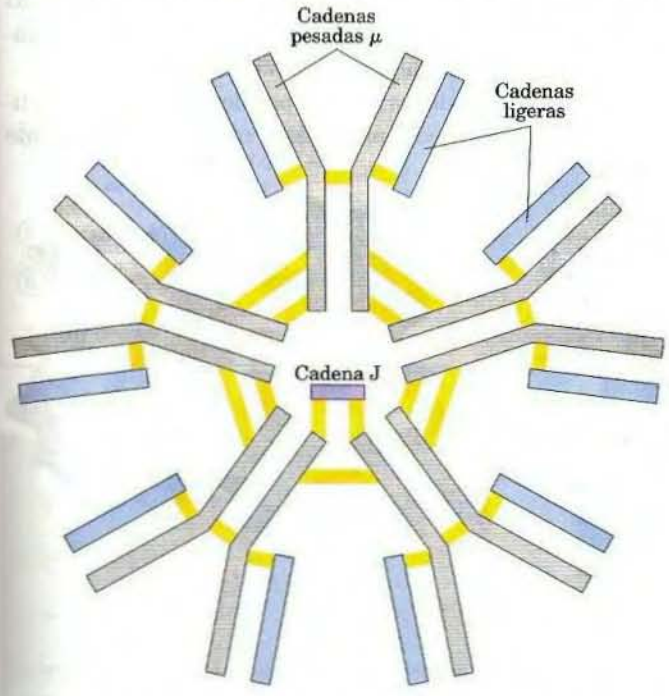


FIGURA 5-25 Pentámero IgM de unidades de inmunoglobulina. El pentámero está entrelazado con enlaces disulfuro (en amarillo). La cadena J es un polipéptido de M_r 20.000 encontrado tanto en la IgA como en la IgM.

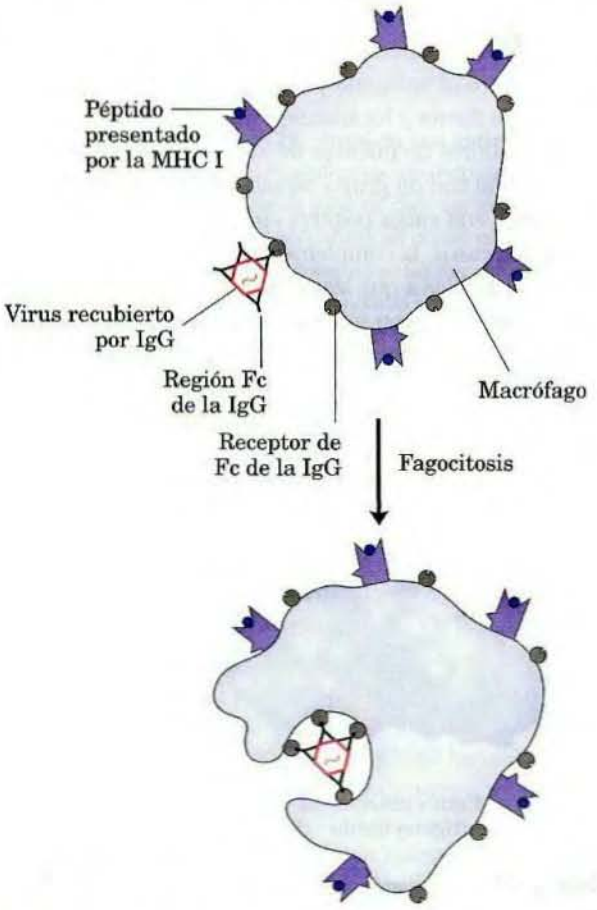


FIGURA 5-26 Fagocitosis por un macrófago de un virus unido a anticuerpo. Las regiones Fc de los anticuerpos se unen a receptores de Fc situados en la superficie del macrófago, haciendo que el macrófago fagocite al virus y lo destruya.

La IgE juega un papel muy importante en la respuesta alérgica, interactuando con los basófilos en la sangre y con las células secretoras de histamina (mastocitos) que están ampliamente distribuidas por los tejidos. La IgE se une por su región Fc a receptores de Fc específicos de los basófilos o de los mastocitos. Así, la IgE actúa como una especie de receptor del antígeno. Si se une el antígeno las células son inducidas a secretar histamina y otras aminas biológicamente activas que provocan dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Se cree que estos efectos sobre los vasos sanguíneos sirven para facilitar el desplazamiento de las células y proteínas del sistema inmunitario hacia los lugares de inflamación. También provocan los síntomas que suelen asociarse con las alergias. El polen y otros alergenos son reconocidos como foráneos, desencadenando una respuesta del sistema inmunitario que normalmente se reserva para los patógenos.

Los anticuerpos se unen fuertemente al antígeno de una manera específica

La especificidad de unión de un anticuerpo viene determinada por la composición de residuos aminoácidos de los dominios variables de sus cadenas pesada y ligera. Muchos residuos de estos dominios son variables, aunque no en la misma medida. Algunos, principalmente aquellos que recubren el sitio de fijación al antígeno, son hipervariables (especialmente proclives a la variación). La especificidad se debe a la complementariedad química entre el antígeno y su sitio de fijación específico, en términos de forma y localización de grupos cargados, no polares y formadores de puentes de hidrógeno. Por ejemplo, un sitio de fijación con un grupo cargado negativamente puede unir un antígeno con carga positiva en la posición complementaria. En muchos casos, la complementariedad se consigue de modo interactivo gracias a que las estructuras del antígeno y del sitio de fijación se influyen mutuamente durante la aproximación del ligando. Se producen entonces cambios conformacionales en el anticuerpo y/o en el antígeno que permiten una completa interacción de los grupos. Éste es un ejemplo de encaje inducido (Fig. 5-27).

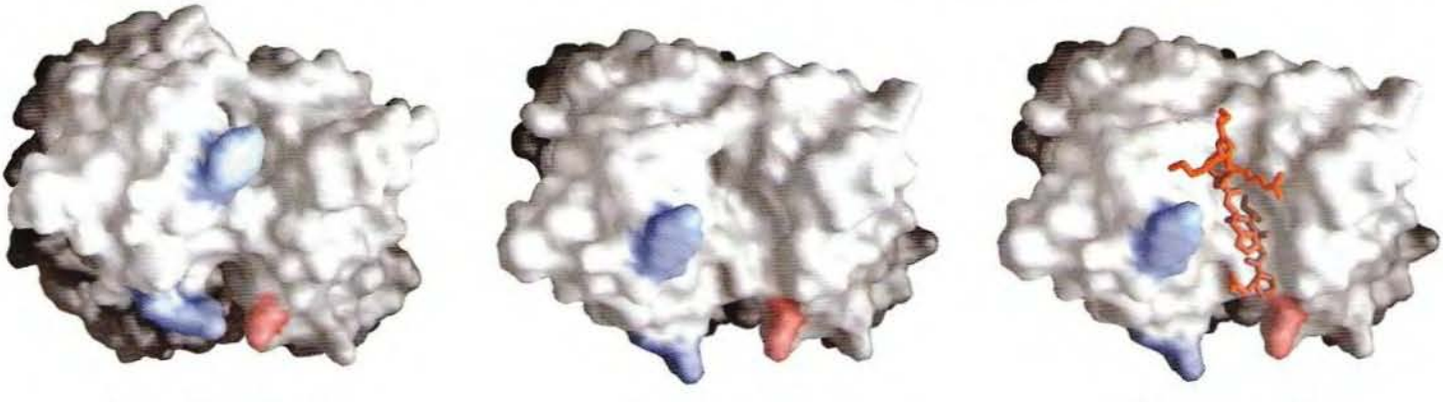
Una interacción antígeno-anticuerpo típica es bastante fuerte, caracterizándose por valores de K_d tan bajos como 10^{-10} M (una K_d más baja corresponde a una interacción de unión más fuerte). La K_d refleja la energía derivada de las diversas interacciones iónicas, de enlace de hidrógeno, hidrofóbicas y de van der Waals que estabilizan la unión. La energía de unión necesaria para generar una K_d de 10^{-10} M es de unos 65 kJ/mol.

El complejo formado por un péptido derivado del VIH (un antígeno modelo) y una molécula Fab ilustra algunas de estas propiedades (Fig. 5-27). Los cambios de estructura observados tras la unión del antígeno son especialmente ilustrativos.

Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes

La extraordinaria afinidad y especificidad de unión de los anticuerpos los convierten en valiosos reactivos para análisis. Se emplean dos tipos de anticuerpos: los policlonales y los monoclonales. Los **anticuerpos policlonales** son los producidos por diferentes poblaciones de linfocitos B en respuesta a un antígeno, tal como podría ser el caso de una proteína inyectada a un animal. Las células de la población de linfocitos B producen anticuerpos que unen específicamente diferentes epítopos dentro del antígeno. Por lo tanto, una preparación policlonal contiene una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes partes de una proteína. Los **anticuerpos monoclonales** son sintetizados por una población de células B idénticas (un **clon**) crecidas en cultivo celular. Estos anticuerpos son homogéneos, reconociendo todos el mismo epítopo. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales fueron desarrolladas por George Köhler y Cesar Milstein.

La especificidad de los anticuerpos tiene utilidades prácticas. Un anticuerpo seleccionado puede unirse covalentemente



(a) Conformación sin antígeno unido

(b) Antígeno unido (no mostrado)

(c) Antígeno unido (mostrado)

FIGURA 5-27 Ajuste inducido en la unión de un antígeno a la IgG. La molécula, mostrada en un contorno de superficie, es el fragmento Fab de una IgG. El antígeno que une esta IgG es un pequeño péptido procedente del VIH. Hay dos residuos de la cadena pesada (en azul) y uno de la ligera (en rosa) que están coloreados para proporcionar puntos visuales de referencia. **(a)** Perspectiva del fragmento Fab visto con el sitio de fijación al antígeno orientado hacia abajo (PDB ID 1GGC). **(b)** La misma perspectiva, pero aquí el fragmento Fab está en la conformación de "unión" (PDB ID 1GGI); el antígeno no está representado para no obstruir la visión del sitio de fijación alterado. Obsérvese cómo se ha agrandado la cavidad de unión y varios grupos han cambiado de posición. **(c)** La misma perspectiva que en **(b)**, pero con el antígeno representado en el sitio de fijación como una estructura roja de varillas.

Georges Köhler, 1946–1995

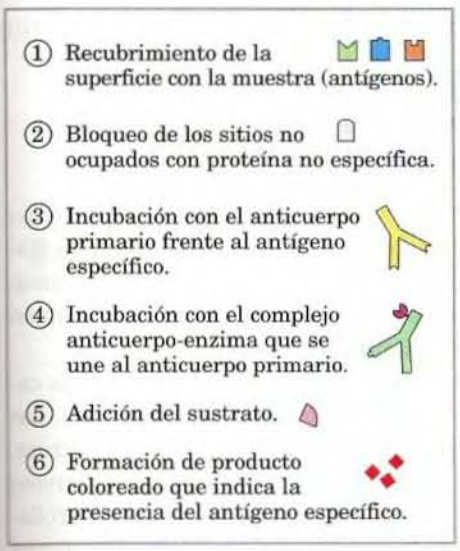
Cesar Milstein, 1927–2002

a una resina y utilizarse en una columna de cromatografía del tipo que se muestra en la Figura 3-18c. Cuando se añade una mezcla de proteínas a la columna, el anticuerpo unirá específicamente su proteína diana y la retendrá en la columna mientras que las otras proteínas escaparán de ella. La proteína diana puede ser eluida de la resina utilizando una solución salina o algún otro agente. Ésta es una herramienta muy poderosa para la purificación de proteínas.

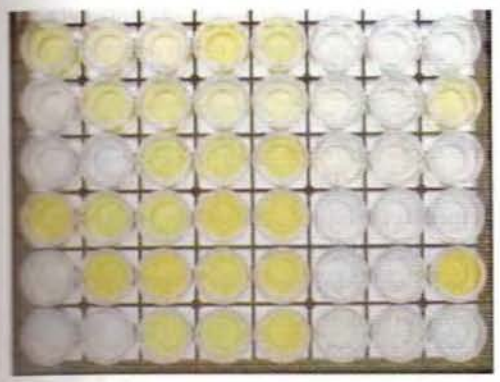
En otra técnica analítica muy versátil, un anticuerpo puede marcarse radiactivamente o con algún otro reactivo que lo haga fácil de detectar. Cuando el anticuerpo se une a la proteína diana, la marca revela la presencia de la proteína en una solución o su localización en un gel o incluso en una célula viva. En la Figura 5-28 se ilustran algunas variantes de este procedimiento.

Un **ELISA** (análisis del inmunoadsorbente unido a enzima) permite un rastreo rápido y una cuantificación de la presencia de un antígeno en una muestra (Fig. 5-28b). Las proteínas de una muestra se adsorben sobre una superficie inerte, normalmente una placa de poliestireno de 96 pocillos. La superficie se lava con una disolución de una proteína no específica y barata (normalmente caseína de leche descremada en polvo) para bloquear la superficie evitando que otras proteínas se unan a ella en los pasos posteriores. A continuación la superficie se trata con una solución que contenga el anticuerpo primario (un anticuerpo frente a la proteína de interés). Se lava el anticuerpo no unido y la superficie se trata con una disolución que contiene anticuerpos frente al anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios han sido conjugados a un enzima que cataliza una reacción con un producto final coloreado. Después de la eliminación del anticuerpo secundario no unido se añade el sustrato del enzima conjugado. La formación de producto (medida colorimétricamente) es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra.

En un **ensayo de inmunoblot** (inmunotransferencia) (Fig. 5-28c), las proteínas que han sido resueltas en gel de electroforesis son transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea (de la misma

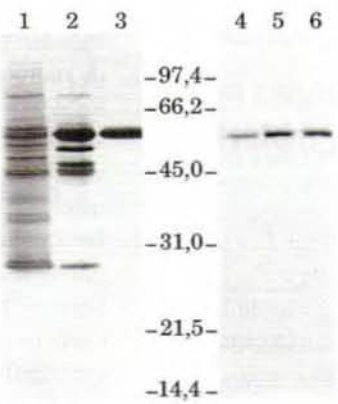


(a)



ELISA

(b)



Gel de SDS Inmunoblot

(c)

FIGURA 5-28 Técnicas con anticuerpos. La reacción específica de un anticuerpo con su antígeno es la base de diversas técnicas que identifican y cuantifican proteínas específicas en muestras complejas. **(a)** Representación esquemática del método general. **(b)** Un ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos frente al virus herpes simplex (VHS) en muestras de sangre. Los pocillos se recubrieron con el VHS como antígeno, al cual se le unirán los anticuerpos frente al VHS. El segundo anticuerpo es una anti IgG humana unida a la peroxidasa de rábano. Las muestras de sangre con mayor cantidad de anticuerpos frente al VHS dan un color amarillo más intenso. **(c)** Un inmunoblot (inmunotransferencia). Los carriles del 1 al 3 pertenecen a un gel de SDS; muestras pertenecientes a pasos consecutivos de la purificación de una quinasa han sido resueltas electroforéticamente y teñidas con azul de Coomasie. Los carriles del 4 al 6 presentan las mismas muestras después de haber sido transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, tras separación en un gel de SDS. A continuación, la membrana se "analizó" con un anticuerpo frente a la proteína quinasa. Los números entre el gel y el inmunoblot indican la M_r ($\times 10^{-3}$).

manera que se hace en un ELISA) y a continuación se trata sucesivamente con el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario unido al enzima y el sustrato. Se forma un precipitado coloreado únicamente sobre la banda que contiene la proteína de interés. El inmunoblot permite la detección de componentes minoritarios de una muestra y proporciona una medida de su masa molecular aproximada. Inmunoblot

Encontraremos otros aspectos de los anticuerpos en capítulos posteriores. Son extremadamente importantes en medicina y nos pueden enseñar muchas cosas sobre la estructura de las proteínas y la acción de los genes.

RESUMEN 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmunitario y las inmunoglobinas

- La respuesta inmunitaria se produce mediante interacciones entre un conjunto de leucocitos especializados y sus proteínas asociadas. Los linfocitos T producen receptores de células T. Los linfocitos B producen inmunoglobulinas. Todas las células producen proteínas MHC, que exponen péptidos del mismo organismo (propios) o antigénicos (foráneos) en la superficie celular. Mediante un proceso denominado selección clonal, las células T cooperadoras inducen la proliferación de células B y de células T citotóxicas que producen inmunoglobulinas o de receptores de células T que se unen a un antígeno específico.
- El ser humano posee cinco clases de inmunoglobulinas, con diferentes funciones biológicas para todas ellas. La clase más abundante es la de las IgG, proteínas en forma de Y con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los dominios cercanos a los extremos superiores de la Y son hipervariables dentro de la amplia población de IgG y forman dos sitios de fijación a antígeno.
- Una inmunoglobulina determinada se une generalmente a una única parte, denominada epítopo, de un antígeno grande. La unión suele implicar un cambio conformacional de la IgG a través de un encaje inducido con el antígeno.

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

Los organismos se mueven. Las células se mueven. Los orgánulos y las macromoléculas se mueven dentro de las células. La mayoría de estos movimientos se originan a partir de la actividad de unos fascinantes motores moleculares basados en proteínas. Grandes agregados de proteínas motoras llevan a cabo cambios conformacionales cíclicos que se acumulan en fuerzas direccionales unificadas, para lo que utilizan energía química, normalmente derivada del ATP. La fuerza resultante puede ser pequeña, como la responsable de la separación de los cromosomas en la división celular, o inmensa, como la que eleva en el aire a un tigre de un cuarto de tonelada de peso.

Tal como se puede suponer, las interacciones entre las proteínas motoras presentan disposiciones complementarias de interacciones iónicas, de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicas y de Van der Waals en los sitios de fijación de las proteínas. Estas interacciones alcanzan niveles extraordinariamente altos de organización espacial y temporal en el caso de las proteínas motoras.

Las proteínas motoras son la base de la contracción muscular, la migración de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, la rotación de los flagelos bacterianos y el movimiento de algunas proteínas a lo largo del DNA. Las proteínas llamadas quinesinas y dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos en las células, transportando orgánulos o reorganizando los cromosomas durante la división celular. Es una interacción de la dineína con los microtúbulos la que origina el movimiento de los flagelos y cilios de los eucariotas. El movimiento flagelar de las bacterias implica un complicado motor de rotación situado en la base del flagelo (véase Fig. 19-34). Las helicasas, las polimerasas y otras proteínas se mueven a lo largo del DNA al tiempo que llevan a cabo sus funciones metabólicas sobre él (Capítulo 25). Aquí nos centramos en el bien estudiado ejemplo de las proteínas contráctiles del músculo esquelético de los vertebrados, utilizándolo como paradigma de la transformación que hacen las proteínas de la energía química en movimiento.

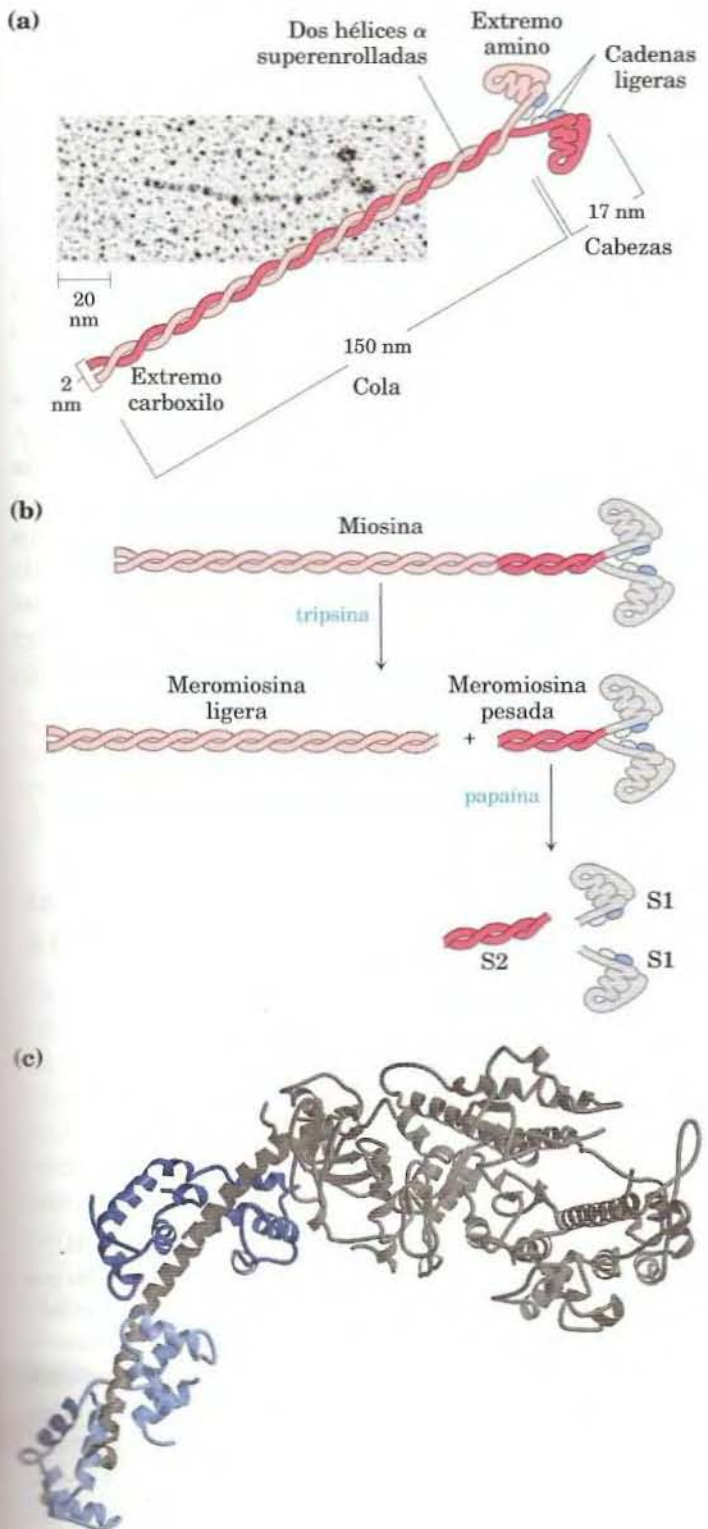
Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina

La fuerza para la contracción muscular se genera por la interacción de dos proteínas, la miosina y la actina, dispuestas en filamentos que llevan a cabo interacciones transitorias y se deslizan unos sobre otros para realizar la contracción. Ambas conforman el 80% de la masa proteica muscular.

La **miosina** (M_r 540.000) tiene seis subunidades: dos cadenas pesadas (M_r 220.000) y cuatro ligeras (M_r 20.000). Las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la estructura. Se hallan dispuestas como hélices α extendidas en su extremo carboxilo-terminal, unas sobre las otras con un superenrollamiento levógiro formando una fibra del tipo de la α-queratina (Fig. 5-29a). En su extremo amino-terminal cada cadena pesada tiene un gran dominio globular donde se encuentra el sitio de hidrólisis del ATP. Las cadenas ligeras están asociadas con los dominios globulares. Tras un breve tratamiento de la miosina con la proteasa tripsina, la mayor parte de la cola fibrosa se libera por proteolisis, dividiéndola en dos componentes, las meromiosinas ligera y pesada (Fig. 5-29b). El dominio globular, llamado subfragmento 1 o S1, o "cabeza" de la miosina, se puede liberar de la meromiosina pesada por tratamiento con papaína. El fragmento S1 así obtenido es el dominio motor que permite la contracción muscular. Los fragmentos S1 pueden cristalizarse, habiéndose determinado su estructura. La estructura global del fragmento S1 se muestra en la Figura 5-29c tal como fue determinada por Ivan Rayment y Hazel Holden.

En las células musculares, las moléculas de miosina se agregan para formar las estructuras llamadas **filamentos gruesos** (Fig. 5-30a). Estas estructuras en forma de barra actúan como núcleo de la unidad contráctil. Varios centenares de moléculas de miosina se disponen en un filamento grueso con sus "colas" fibrosas asociadas para formar una larga estructura bipolar. Los dominios globulares se proyectan a partir de los dos extremos de esta estructura a modo de grupos dispuestos regularmente.

La segunda de las proteínas principales del músculo, la **actina,** abunda en prácticamente todas las células eucarióticas. En el músculo, las moléculas de actina monomérica, llamada



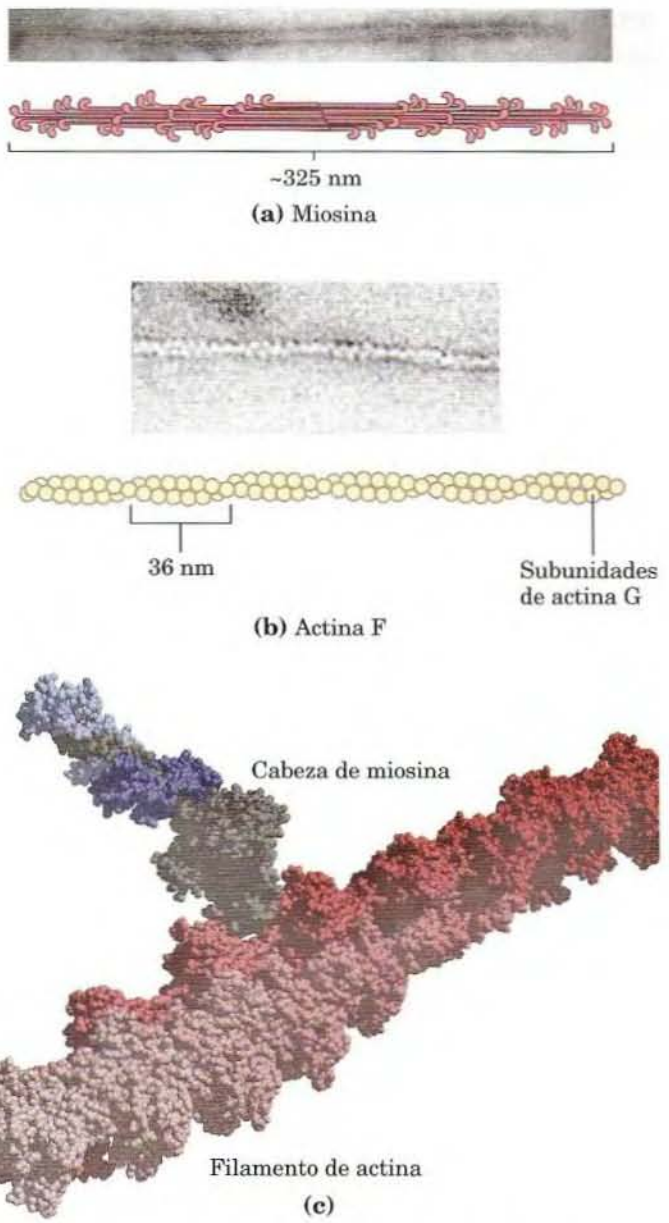


FIGURA 5-30 Principales componentes del músculo. (a) Los agregados de miosina forman una estructura bipolar conocida como filamento grueso. **(b)** La actina F resulta del ensamblaje filamentoso de los monómeros de actina G, que polimerizan en parejas adquiriendo el aspecto de dos filamentos que se enrollan en espiral uno sobre otro con una orientación dextrógira. **(c)** Modelo espacial de bolas de un filamento de actina (diferentes tonos de rojo) con una cabeza de miosina (en gris y dos intensidades de azul) unida a un monómero de actina dentro del filamento. (A partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment.)

◀ **FIGURA 5-29 (a la izquierda) Miosina. (a)** La miosina tiene dos cadenas pesadas (coloreadas en dos tonos de rosa), en las que el extremo carboxilo forma un superenrollamiento extendido (cola) y el extremo amino-terminal tiene unos dominios globulares (cabezas). Con cada cabeza de miosina hay dos cadenas ligeras asociadas (en azul). **(b)** La digestión con tripsina y papaína separa las cabezas de miosina (fragmentos S1) de las colas. **(c)** Representación de cintas del fragmento S1 de la miosina. La cadena pesada se muestra en gris, las dos cadenas ligeras se muestran en dos tonos azules. (A partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment.)

actina G (actina *g*lobular: M_r 42.000), se asocian para formar largos polímeros llamados actina F (actina *f*ilamentosa). Los **filamentos delgados** (Fig. 5-30b) están formados por actina F junto con las proteínas troponina y tropomiosina. La parte filamentosa de los filamentos delgados se asocia al añadirse sucesivas moléculas de actina monomérica a un extremo. Además, cada monómero une ATP y a continuación lo hidroliza a ADP, de manera que todas las moléculas de actina del filamento forman complejo con el ADP. Sin embargo, esta hidrólisis de ATP por la actina se produce sólo en el ensamblaje de los filamentos; no contribuye directamente a la energía gastada en la contracción muscular. Cada monómero de actina del filamento delgado puede unirse fuertemente y de manera específica a una cabeza de miosina (Fig. 5-30c).

Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso en estructuras ordenadas

El músculo esquelético consiste en haces paralelos de **fibras musculares,** siendo cada fibra una única célula multinucleada de gran tamaño, de 20 a 100 μm de diámetro, formada a partir de la fusión de muchas células y con una longitud a veces igual a la del propio músculo. Cada fibra contiene a su vez unas 1000 **miofibrillas,** de unos 2 μm de diámetro, consistiendo cada una en un gran número de filamentos delgados y gruesos que forman complejo con otras proteínas en ordenamientos regulares (Fig. 5-31). Un sistema de vesículas membranosas planas llamado **retículo sarcoplasmático** rodea cada miofibrilla. Al microscopio electrónico, las fibras musculares muestran regiones alternas de alta y baja densidad electrónica, llamadas **bandas A** e **I** (Fig. 5-31b, c), que se deben a la disposición de los filamentos gruesos y delgados, los cuales están alineados y se solapan parcialmente. La banda I es la región del haz cuyo corte transversal sólo contendría filamentos delgados. La banda A, más oscura, es igual de larga que los filamentos gruesos e incluye la región de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados paralelos. En la bisección de la banda I hay una fina estrutura llamada **disco Z,** que es perpendicular a los filamentos delgados y actúa como un ancla a la cual se unen estos filamentos. La banda A también posee una estructura similar en su bisectriz, la **línea M** o disco M, que es una región de alta densidad electrónica en el centro de los filamentos gruesos. El conjunto de la unidad contráctil, los haces de filamentos gruesos solapados en cada uno de sus extremos con haces de filamentos delgados, se denomina **sarcómero.** La disposición de los haces yuxtapuestos permite que los filamentos gruesos y delgados se deslicen unos sobre otros (véase más adelante), provocando un acortamiento progresivo de cada sarcómero (Fig. 5-32).

Los filamentos delgados de actina están unidos en un extremo al disco Z siguiendo un patrón regular. La unión incluye las proteínas musculares minoritarias ***α*-actinina, desmina** y **vimentina.** Los filamentos delgados también contienen una gran proteína llamada **nebulina** (de unos 7000 aminoácidos), la cual podría disponerse en forma de una hélice α suficientemente larga como para abarcar toda la longitud del filamento. La línea M organiza los filamentos gruesos de una manera similar. Contiene las proteínas **paramiosina, proteína C** y **proteína M.** El disco Z está unido a los filamentos gruesos mediante otra clase de proteínas llamadas **titinas,** las cadenas de polipéptidos más largas que se conocen hasta la fecha (la titina del músculo cardíaco humano tiene 26.926 residuos aminoácidos), lo que proporciona un nivel adicional de organización a la estructura global. Se cree que tanto la nebulina como la titina actúan como

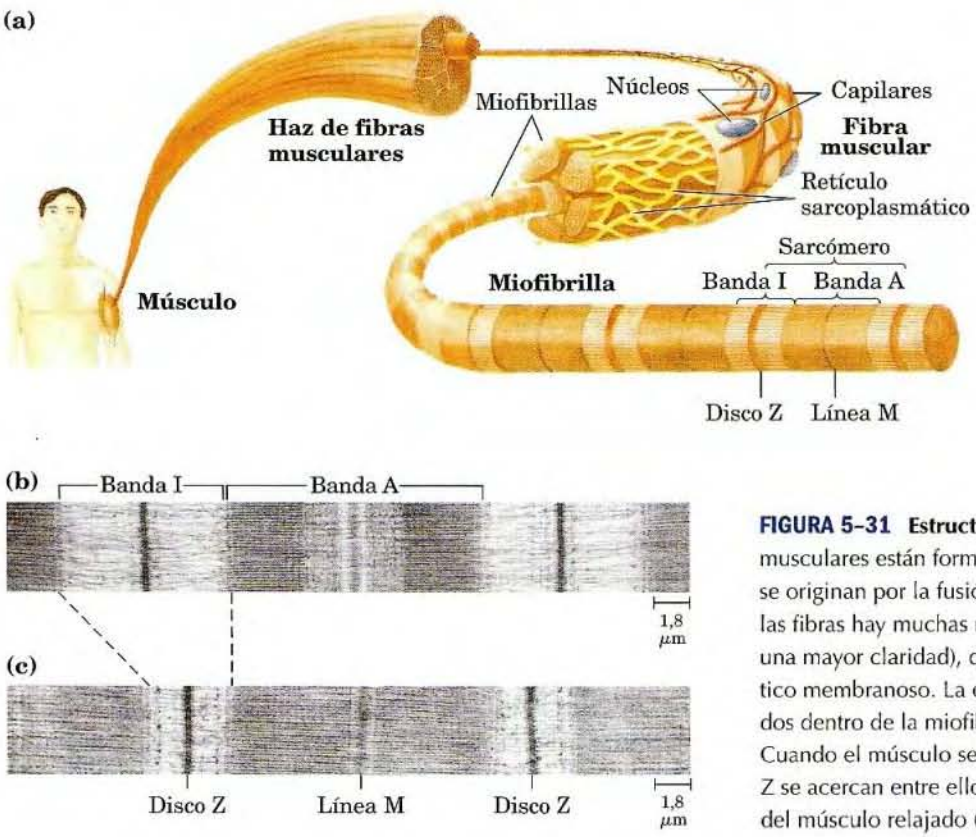


FIGURA 5-31 Estructura del músculo esquelético. (a) Las fibras musculares están formadas por células multinucleadas alargadas que se originan por la fusión de muchas células precursoras. Dentro de las fibras hay muchas miofibrillas (aquí se muestran sólo seis para una mayor claridad), que están rodeadas por el retículo sarcoplasmático membranoso. La organización de los filamentos gruesos y delgados dentro de la miofibrilla le confiere una apariencia estriada. Cuando el músculo se contrae las bandas I se estrechan y los discos Z se acercan entre ellos, como puede observarse en las micrografías del músculo relajado **(b)** y contraído **(c)**.

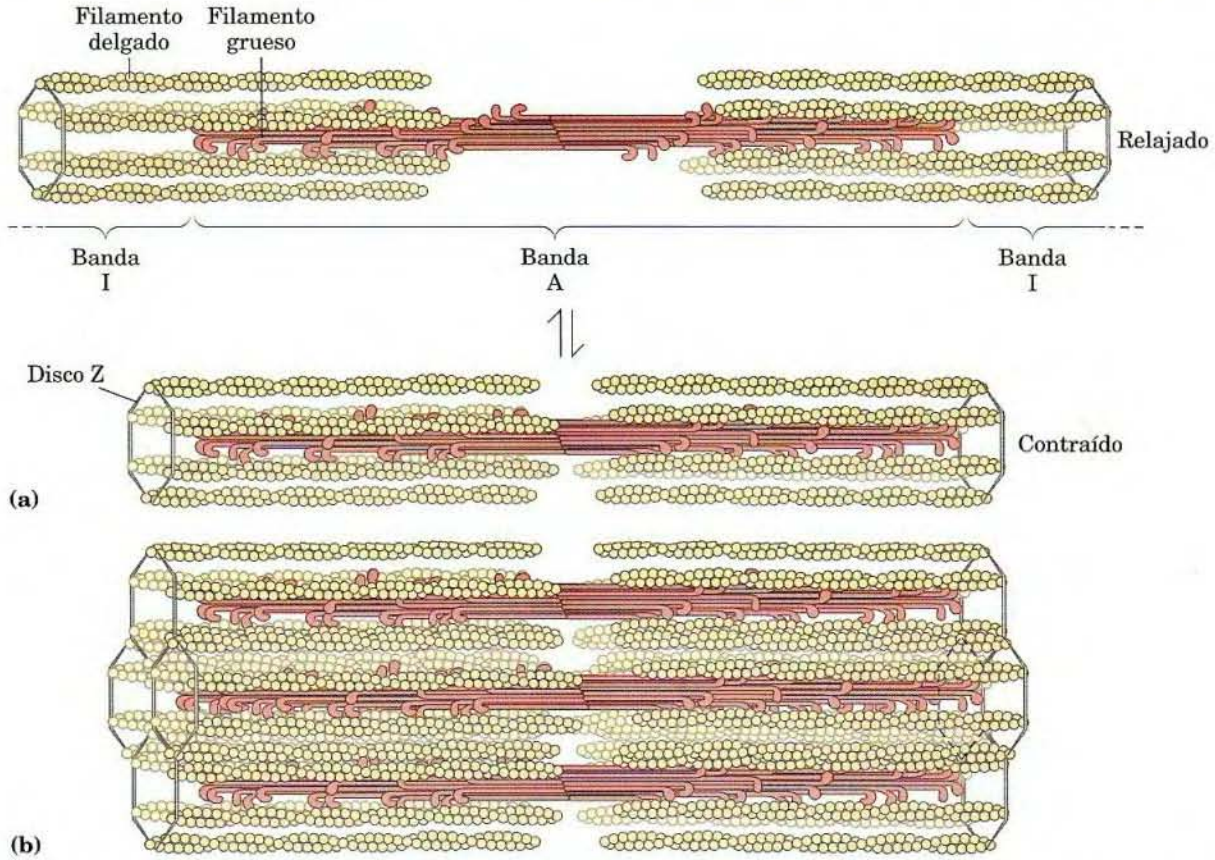


FIGURA 5-32 Contracción muscular. Los filamentos gruesos son estructuras bipolares creadas por la asociación de muchas moléculas de miosina. **(a)** La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos gruesos y delgados entre ellos de manera que los discos Z de bandas I vecinas se aproximan unos a otros. **(b)** Los filamentos gruesos y delgados se disponen de manera que cada filamento grueso está rodeado por seis filamentos delgados.

"pautas moleculares", regulando la longitud de los filamentos gruesos y delgados, respectivamente. La titina se extiende del disco Z a la línea M, regulando la longitud del sarcómero y evitando una hiperextensión del músculo. En los vertebrados la longitud característica de un sarcómero varía de un tejido muscular a otro, un fenómeno debido probablemente en gran medida a la expresión de diferentes variantes de la titina.

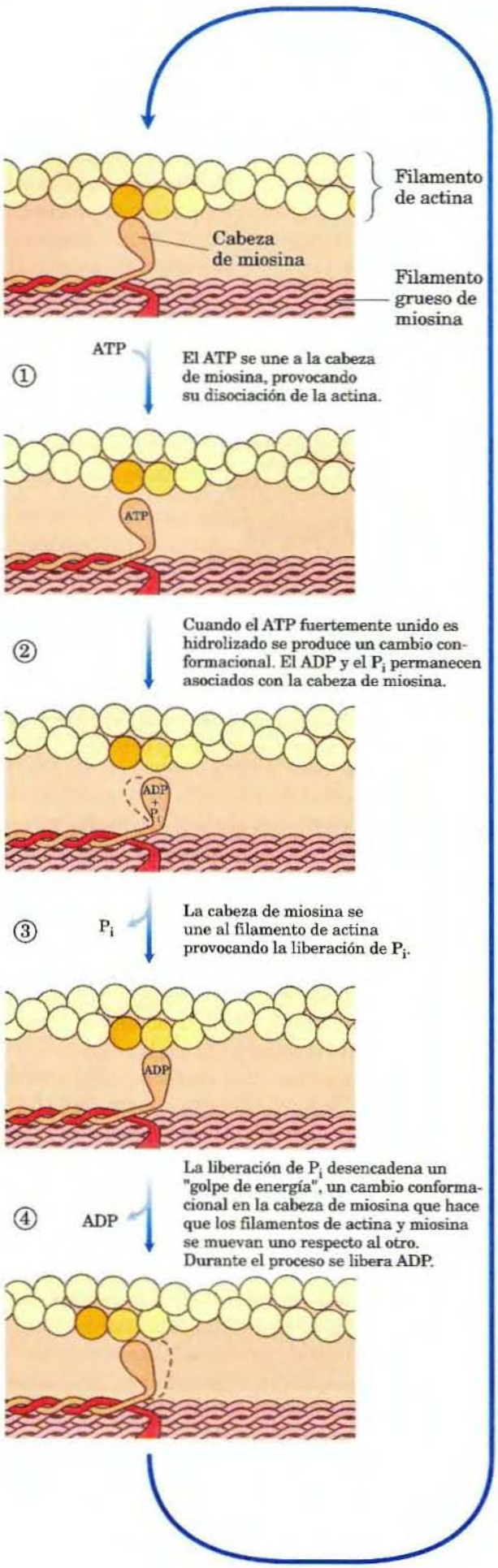
Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina

La interacción entre la actina y la miosina está basada en enlaces débiles. Cuando el ATP no está unido a la miosina, una cara de la cabeza de ésta se une fuertemente a la actina (Fig. 5-33). Cuando el ATP se une a la miosina y es hidrolizado a ADP y fosfato, se producen una serie de cambios conformacionales cíclicos coordinados mediante los cuales la miosina libera la subunidad F de la actina y se une otra subunidad más allá dentro del filamento delgado.

El ciclo consta de cuatro pasos principales (Fig. 5-33). En el paso ①, el ATP se une a la miosina produciendo la abertura de una hendidura en la miosina. Como consecuencia se deshace la interacción actina-miosina, liberándose la actina. A continuación el ATP se hidroliza en el paso ②, provocando un cambio conformacional en la proteína, que pasa a un estado de "alta energía" que hace que la cabeza de miosina se mueva y cambie su orientación con respecto al filamento delgado de actina. La miosina se une entonces débilmente a una subunidad de actina F más cercana al disco Z que la que acaba de liberar. En el paso ③ se produce otro cambio conformacional cuando el fosfato, producto de la hidrólisis del ATP, es liberado de la cabeza de la miosina. Este cambio consiste en el cierre de la hendidura de la miosina, fortaleciendo la unión actina-miosina. Justo a continuación se produce el paso final ④, un "golpe de energía" durante el cual la conformación de la cabeza de miosina vuelve a su estado de reposo original, con un cambio en su orientación relativa con respecto a la actina unida que hace que la cola de la miosina se aproxime al disco Z. A continuación se libera ADP para completar el ciclo. Cada ciclo genera entre 3 y 4 pN (piconewtons) de fuerza y mueve el filamento grueso de 5 a 10 nm con respecto al filamento delgado.

Debido al gran número de cabezas de miosina en un filamento grueso, en cualquier momento habrá algunas de ellas (probablemente entre el 1% y el 3%) unidas a filamentos delgados. Esto evita que los filamentos gruesos puedan deslizarse hacia atrás cuando una cabeza individual de miosina libera la subunidad de actina a la cual estaba unida. De este modo, el filamento grueso se desliza activamente hacia delante sobre los filamentos delgados adyacentes. Este proceso, coordinado entre los diferentes sarcómeros de una fibra muscular, lleva a cabo la contracción muscular.

La interacción entre la actina y la miosina debe ser regulada de manera que la contracción muscular se produzca sólo como respuesta a las señales adecuadas con origen en el sistema nervioso. De esta regulación se encarga un complejo formado por dos proteínas, la **tropomiosina** y la **troponina.** La



tropomiosina se une al filamento delgado, bloqueando los sitios de fijación para la cabeza de miosina. La troponina es una proteína que une Ca^{2+}. El impulso nervioso provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. El Ca^{2+} liberado se une a la troponina (otra interacción proteína-ligando) y provoca un cambio conformacional en los complejos de tropomiosina-troponina, exponiendo los sitios de fijación para miosina de los filamentos delgados. A continuación se produce la contracción.

El músculo esquelético en funcionamiento requiere dos tipos de funciones moleculares que son comunes entre las proteínas: unión y catálisis. La interacción entre la actina y la miosina, una interacción de tipo proteína-ligando igual que la que se da entre las inmunoglobulinas y los antígenos, es reversible y no modifica las moléculas que participan en ella. Sin embargo el ATP se hidroliza a ADP y P_i cuando se une a la miosina. La miosina no es sólo una proteína de unión a actina; es también una ATPasa, un enzima (véase Capítulo 6).

RESUMEN 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

- Las interacciones proteína-ligando adquieren un grado especial de organización espacial y temporal en las proteínas motoras. La contracción muscular se debe a un conjunto de interacciones coreografiadas entre miosina y actina, acopladas a la hidrólisis del ATP a cargo de la miosina.
- La miosina consiste en dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras que forman un dominio enrollado superhelicoidal (cola) y un dominio globular (cabeza). Las moléculas de miosina se organizan en filamentos gruesos que se deslizan sobre filamentos delgados compuestos principalmente por actina. La hidrólisis de ATP en la miosina se acopla a una serie de cambios conformacionales en la cabeza de la miosina que conducen a la disociación de la miosina de una subunidad de actina F y su posterior reasociación con otra subunidad, en una posición más lejana en el filamento delgado. De este modo, la miosina de desliza a lo largo de los filamentos de actina.
- La contracción muscular es estimulada por la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. El Ca^{2+} se une a la proteína troponina, provocando un cambio conformacional en el complejo troponina-tropomiosina que da lugar al inicio del ciclo de interacciones actina-miosina.

FIGURA 5-33 Mecanismo molecular de la contracción muscular. Una serie de cambios conformacionales en la cabeza de miosina, acoplados al ciclo hidrolítico del ATP, hacen que la miosina se separe de una unidad de actina y se asocie a la siguiente unidad de actina del filamento de manera sucesiva. De esta manera las cabezas de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados, arrastrando a los filamentos gruesos dentro del entramado de filamentos delgados (véase Fig. 5-32).

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

ligando 157
sitio de fijación 157
encaje inducido 158
hemo 158
porfirina 158
globinas 159
expresión de equilibrio 160
constante de asociación, K_a 160
constante de disociación, K_d 160
proteína alostérica 165
ecuación de Hill 167
efecto Bohr 170
linfocitos 175
anticuerpo 175
inmunoglobulina 175
linfocitos B o **células B** 175
linfocitos T o **células T** 175
antígeno 175
epítopo 175
hapteno 176
plegamiento de la inmunoglobulina 178
anticuerpos policlonales 180
anticuerpos monoclonales 180
ELISA 181
miosina 182
actina 183
sarcómero 184

Bibliografía

Proteínas de unión a oxígeno

Ackers, G.K. & Hazzard, J.H. (1993) Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* **18,** 385–390.

Changeux, J.-P. (1993) Allosteric proteins: from regulatory enzymes to receptors—personal recollections. *Bioessays* **15,** 625–634.

Una perspectiva interesante de un experto en la materia.

Dickerson, R.E. & Geis, I. (1982) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology,* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.

di Prisco, G., Condò, S.G., Tamburrini, M. & Giardina, B. (1991) Oxygen transport in extreme environments. *Trends Biochem. Sci.* **16,** 471–474.

Una comparación reveladora de las propiedades de unión a oxígeno de las hemoglobinas de las especies polares.

Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. & Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6,** 365–385.

La publicación en la cual se propuso el modelo secuencial.

Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12,** 88–118.

El modelo concertado fue propuesto por primera vez en esta publicación de referencia.

Olson, J.S. & Phillips, G.N., Jr. (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* **271,** 17,593–17,596.

Perutz, M.F. (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem. Sci.* **14,** 42–44.

Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M. & Dodson, G.G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27,** 1–34.

Proteínas del sistema inmunitario

Blom, B., Res, P.C. & Spits, H. (1998) T cell precursors in man and mice. *Crit. Rev. Immunol.* **18,** 371–388.

Davies, D.R. & Chacko, S. (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **26,** 421–427.

Davies, D.R., Padlan, E.A. & Sheriff, S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59,** 439–473.

Davis, M.M. (1990) T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* **59,** 475–496.

Dutton, R.W., Bradley, L.M. & Swain, S.L. (1998) T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* **16,** 201–223.

Life, Death and the Immune System. (1993) *Sci. Am.* **269** (septiembre).

Un número especial sobre el sistema inmunitario.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. & Kuby, J. (2003) *Immunology,* 5.ª ed. W. H. Freeman and Company, New York.

Marrack, P. & Kappler, J. (1987) The T cell receptor. *Science* **238,** 1073–1079.

Parham, P. & Ohta, T. (1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* **272,** 67–74.

Ploegh, H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280,** 248–253.

Thomsen, A.R., Nansen, A. & Christensen, J.P. (1998) Virus-induced T cell activation and the inflammatory response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231,** 99–123.

Van Parjis, L. & Abbas, A.K. (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280,** 243–248.

York, I.A. & Rock, K.L. (1996) Antigen processing and presentation by the class-I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* **14,** 369–396.

Motores moleculares

Finer, J.T., Simmons, R.M. & Spudich, J.A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368,** 113–119.

La tecnología moderna revela las fuerzas que afectan a las proteínas motoras individuales.

Geeves, M.A. & Holmes, K.C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68,** 687–728.

Goldman, Y.E. (1998) Wag the tail: structural dynamics of actomyosin. *Cell* **93,** 1–4.

Huxley, H.E. (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23,** 84–87.

Una interesante perspectiva histórica sobre el esclarecimiento del mecanismo de la contracción muscular.

Labeit, S. & Kolmerer, B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270,** 293–296.
Una descripción estructural y funcional de algunas de las mayores proteínas conocidas.

Molloy, J.E. & Veigel, C. (2003) Myosin motors walk the walk. *Science* **300,** 2045–2046.

Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271,** 15,850–15,853.
Examina los mecanismos de la contracción muscular desde una perspectiva estructural.

Rayment, I. & Holden, H.M. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19,** 129–134.

Spudich, J.A. (1994) How molecular motors work. *Nature* **372,** 515–518.

Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112,** 467–480.

Problemas

1. Relación entre las constantes de afinidad y de disociación La proteína A tiene un sitio de fijación para el ligando X con una K_d de 10^{-6} M. La proteína B tiene un sitio de fijación para el ligando X con una K_d de 10^{-9} M. ¿Qué proteína tiene mayor afinidad para el ligando X? Explíque el razonamiento. Convierta la K_d en K_a para ambas proteínas.

2. Cooperatividad negativa ¿Cúal de las siguientes situaciones daría lugar a una curva de Hill con $n_H<1,0$?

(a) La proteína tiene múltiples subunidades, cada una con un único sitio de fijación a ligando. La unión del ligando a un sitio disminuye la afinidad de unión de los otros sitios.

(b) La proteína es un único polipéptido con dos sitios de fijación a ligando, cada uno con una afinidad diferente.

(c) La proteína es un único polipéptido con un único sitio de fijación a ligando. Una vez purificado, el preparado proteico es heterogéneo, conteniendo algunas moléculas de proteína que están parcialmente desnaturalizadas y por lo tanto poseen una menor afinidad de unión para el ligando.

3. Afinidad por el oxígeno en la mioglobina y en la hemoglobina ¿Cuál es el efecto de los siguientes cambios sobre la afinidad de la hemoglobina y la mioglobina por el O_2? (a) Un descenso del pH del plasma sanguíneo de 7,4 a 7,2. (b) Un descenso de la presión parcial de CO_2 en los pulmones de 6 kPa (aguantando la respiración) a 2 kPa (normal). (c) Un aumento del nivel de BPG de 5 mM (altitud normal) a 8 mM (grandes altitudes).

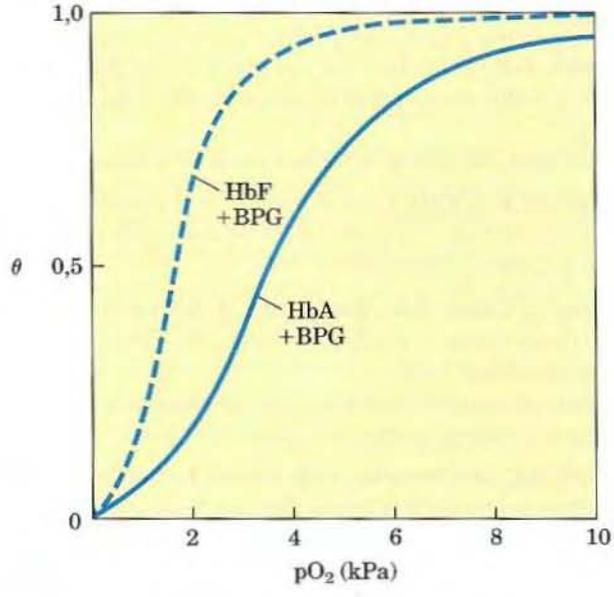
4. Cooperatividad en la hemoglobina En circunstancias apropiadas, la hemoglobina se disocia en sus cuatro subunidades. La unidad α aislada une oxígeno, pero la curva de saturación de O_2 es hiperbólica en lugar de sigmoidea. Además, la unión de oxígeno a la subunidad α aislada no se ve afectada por la presencia de H^+, CO_2 o BPG. ¿Qué indica esto sobre el origen de la cooperatividad en la hemoglobina?

5. Comparación de las hemoglobinas fetal y materna Los estudios sobre transporte de oxígeno en mamíferos en estado de gestación han demostrado que las curvas de saturación por O_2 de las sangres materna y fetal son claramente diferentes. Los eritrocitos fetales contienen una variante estructural de la hemoglobina, la HbF, que consiste en dos subunidades α y dos subunidades γ ($\alpha_2\gamma_2$), mientras que los eritrocitos maternos contienen la HbA normal ($\alpha_2\beta_2$).

(a) ¿Qué hemoglobina tiene una mayor afinidad por el oxígeno en condiciones fisiológicas, la A o la F? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el significado fisiológico de la diferente afinidad por el oxígeno?

(c) Cuando se retira todo el BPG presente en muestras de HbA y HbF las curvas de saturación de O_2 (y las afinidades por O_2) se desplazan hacia la izquierda. No obstante, en esta situación la HbA tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbF. Cuando se reintroduce el BPG las curvas de saturación de O_2 vuelven a la normalidad. ¿Cuál es el efecto del BPG sobre la afinidad por el O_2 de la hemoglobina? ¿Cómo puede utilizarse esto para explicar las diferentes afinidades por el O_2 de las hemoglobinas fetal y materna?



6. Variantes de la hemoglobina Hay casi quinientas variantes de la hemoglobina. La mayoría se deben a un único cambio de aminoácido en una cadena polipeptídica de globina. Algunas provocan enfermedades. A continuación presentamos una breve muestra:

HbS (Hb de la célula falciforme): sustitución de un Glu por una Val en la superficie.
Hb Cowtown: elimina un par iónico implicado en la estabilización del estado T.
Hb Memphis: sustitución de un residuo polar no cargado en la superficie por otro de tamaño similar.
Hb Bibba: sustitución de una Pro por una Leu implicada en un hélice α.
Hb Milwaukee: sustitución de una Val por un Glu.
Hb Providence: sustitución de una Lys por una Asn que se proyecta normalmente hacia la cavidad central del tetrámero.
Hb Philly: sustitución de una Tyr por una Phe, rompiendo el enlace de hidrógeno en la interfase $\alpha_1\beta_1$.

Explique su elección en las siguientes situaciones:

(a) La variante de Hb que tendrá *menor* probabilidad de provocar síntomas patológicos.

(b) La variante o variantes que tengan más probabilidad de mostrar valores de pI diferentes a los de la HbA al analizarlas en un gel de enfoque isoeléctrico.

(c) La variante o variantes que tendrán más probabilidad de mostrar una disminución en la unión de BPG y un aumento de la afinidad global de la hemoglobina por el oxígeno.

7. Unión reversible (aunque fuerte) a un anticuerpo Un anticuerpo se une a un antígeno con una K_d de 5×10^{-8} M. ¿A qué concentración de antígeno será θ igual a: (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

8. Uso de los anticuerpos para demostrar las relaciones entre estructura y función proteicas Un anticuerpo monoclonal se une a la actina G pero no a la F. ¿Qué nos dice esto sobre el epítopo reconocido por el anticuerpo?

9. El sistema inmunitario y las vacunas El organismo huésped necesita tiempo, a menudo días, para presentar una respuesta inmunitaria frente a un nuevo antígeno, pero las células memoria permiten presentar una respuesta rápida frente a los patógenos con los que se ha tenido una exposición previa. A menudo, una vacuna para proteger de una determinada infección vírica suele consistir en un virus muerto o inactivado o en proteínas aisladas a partir de la envoltura vírica. Normalmente la vacuna no provoca infección ni enfermedad cuando se inyecta en un paciente humano, aunque "enseña" de manera efectiva al sistema inmunitario cómo son esas partículas víricas, estimulando la producción de células memoria. Cuando hay una infección posterior, estas células pueden unirse al virus y provocar una rápida respuesta inmunitaria. Algunos patógenos, entre ellos el VIH, han desarrollado mecanismos para eludir la acción del sistema inmunitario, haciendo que sea muy difícil o incluso imposible el desarrollo de vacunas efectivas contra a ellos. ¿Qué estrategia podría utilizar un patógeno para eludir el sistema inmunitario? Suponga que los anticuerpos, los receptores T o ambos están disponibles para unirse a cualquier estructura que pueda aparecer en la superficie de un patógeno y que, una vez unidos, el patógeno es destruido.

10. El modo en que nos quedamos "tiesos" Cuando un vertebrado superior muere, sus músculos se quedan rígidos al ser privados de ATP, un estado llamado *rigor mortis*. Explique la base molecular de este fenómeno.

11. Los sarcómeros desde otro punto de vista La simetría de los filamentos gruesos y delgados dentro de un sarcómero es tal que cada filamento grueso suele estar rodeado por seis filamentos delgados dispuestos en forma hexagonal. Dibuje un corte transversal de una miofibrilla en los siguientes lugares: (a) en la línea M, (b) a través de la banda I, (c) a través de la región densa de la banda A, (d) a través de la región menos densa de la banda A, adyacente a la línea M (véase Fig. 5-31b, c).

Bioquímica en internet

12. Lisozima y anticuerpos Para poder apreciar en detalle cómo funcionan las proteínas en una célula es útil tener una visión tridimensional de cómo interaccionan las proteínas con otros componentes celulares. Afortunadamente, esto es posible consultando en la red las bases de datos de proteínas y los programas de visualización molecular tridimensional RasMol y Protein Explorer. Si no se ha instalado todavía estos programas, vaya a la página web http://www.umass.edu/microbio/rasmol y siga las instrucciones de su sistema operativo y su navegador. Después, vaya a la página del Protein Data Bank (www.rscb.org/pdb).

En este ejercicio examinará las interacciones entre el enzima lisozima (Capítulo 4) y el fragmento Fab del anticuerpo antilisozima. Utilice el identificador del PDB 1FDL para explorar la estructura del complejo entre el fragmento Fab IgG1 y el lisozima (complejo antígeno-anticuerpo). Visualize la estructura utilizando Protein Explorer y emplee la información de la página de resumen de la estructura del PDB (haciendo "clic" en "explore") para contestar estas preguntas:

(a) ¿Qué cadenas del modelo tridimensional corresponden al fragmento de anticuerpo y cuáles al antígeno (lisozima)?

(b) ¿Qué estructura secundaria predomina en el fragmento Fab?

(c) ¿Cuántos residuos de aminoácidos hay en las cadenas pesadas y ligeras del fragmento Fab y en el lisozima? Estime el porcentaje de la molécula de lisozima que interacciona con el sitio de fijación de antígeno del fragmento de anticuerpo.

(d) Identifique los residuos de aminoácido específicos del lisozima y de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de Fab que están situados en la interfase antígeno-anticuerpo. ¿Son estos residuos contiguos en la secuencia primaria de la cadena polipeptídica?

13. Exploración de las interacciones revesibles de proteínas y ligandos con gráficos animados **Utilice los gráficos animados para las Ecuaciones 5-8, 5-11, 5-14 y 5-16 para realizar los ejercicios siguientes.**

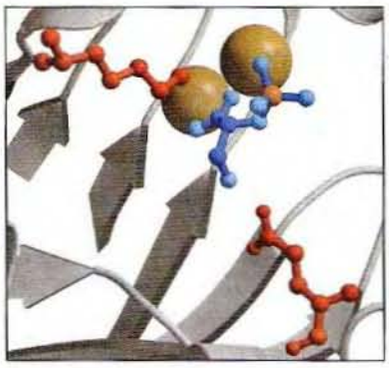
(a) Unión reversible de un ligando a una proteína simple, sin cooperatividad. Para la Ecuación 5-8, genere una gráfica de θ frente a [L] (ejes vertical y horizontal, respectivamente). Examine las gráficas generadas cuando K_d se ajusta a 5 μM, 10 μM, 20 μM y 100 μM. Una mayor afinidad de la proteína por el ligando significa mayor fijación a menores concentraciones de ligando. Suponga que cuatro proteínas diferentes presentan estos cuatro valores diferentes de K_d para el ligando L. ¿Qué proteína tendría mayor afinidad por L?

Examine la gráfica generada cuando K_d = 10 μM. ¿Cuál es el incremento de θ cuando [L] aumenta de 0,2 μM a 0,4 μM? ¿Cuál es el incremento de θ cuando [L] aumenta de 40 μM a 80 μM?

Puede realizar el mismo ejercicio para la Ecuación 5-11. Convierta [L] a pO_2 y K_d a P_{50}. Examine las curvas generadas cuando P_{50} se ajusta a 0,5 kPa, 1 kPa, 2 kPa y 10 kPa. Para la curva generada a P_{50} = 1 kPa, ¿cuál es la variación de θ cuando la pO_2 aumenta de 0,02 kPa a 0,04 kPa? ¿Y de 4 kPa a 8 kPa?

(b) Unión cooperativa de un ligando a una proteína multisubunidad. Utilizando la Ecuación 5-14, genere una curva de fijación de una proteína y un ligando con una K_d = 10 μM y n = 3. Observe el cambio en la definición de K_d en la Ecuación 5-16. En la misma gráfica, añada una curva para una proteína con K_d = 20 μM y n = 3. Observe ahora cómo cambian ambas curvas cuando se pasa a n = 4. Genere las representaciones de Hill (Ec. 5-16) para cada uno de estos casos. Para valores de K_d = 10 μM y n = 3, ¿cuál es el valor de θ cuando [L] = 20 μM?

(c) Siga explorando estas ecuaciones variando todos los parámetros utilizados hasta ahora.



capítulo 6

ENZIMAS

6.1 Introducción a los enzimas *191*

6.2 ¿Cómo funcionan los enzimas? *193*

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo *202*

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas *213*

6.5 Enzimas reguladores *225*

Esta condición podría cumplirse si, cuando las moléculas se combinaran con un enzima, se encontraran a una distancia un poco mayor (que aquella a la que se encuentran cuando están unidas covalentemente), pero más cerca que su distancia de equilibrio cuando se encuentran libres... Usando el símil de Fisher de la llave y la cerradura, la llave no encaja perfectamente en la cerradura sino que ejerce una cierta tensión sobre ella.

—*J. B. S. Haldane,* Enzymes, *1930*

La catálisis de puede describir formalmente como la estabilización del estado de transición mediante la unión fuerte del catalizador.

—*William P. Jencks, artículo en* Advances in Enzymology, *1975*

Existen dos condiciones fundamentales para la vida. Una, la entidad viva ha de poder autorreplicarse (un tema considerado en la Parte III de este libro); dos, el organismo ha de poder catalizar reacciones químicas eficiente y selectivamente. La importancia central de la catálisis puede sorprender a algunos estudiantes principiantes en el estudio de la bioquímica, pero es fácil de ilustrar. Como se ha descrito en el Capítulo 1, los sistemas vivos utilizan la energía de su entorno. Muchos de nosotros, por ejemplo, consumimos cantidades sustanciales de sacarosa –azúcar de mesa común– como un tipo de combustible, ya sea en forma de alimentos y bebidas dulces o como azúcar propiamente dicho. La conversión de la sacarosa en CO_2 y H_2O en presencia de oxígeno es un proceso altamente exergónico, que libera energía libre que podemos utilizar para pensar, movernos, saborear y ver. Sin embargo, se puede almacenar una bolsa de azúcar durante años sin que sufra ninguna transformación obvia a CO_2 y H_2O. Siendo este proceso químico termodinámicamente favorable, es, sin embargo, ¡muy lento! Aun así, cuando un ser humano (o casi cualquier otro organismo) consume sacarosa, la energía química se libera en segundos. La diferencia está en la catálisis. Sin catálisis, las reacciones químicas que, como la de la oxidación de la sacarosa, son necesarias para mantener la vida, no podrían darse en una escala de tiempo conveniente.

En este capítulo dirigimos nuestra atención hacia los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos: los enzimas, las proteínas más extraordinarias y de mayor especialización. Los enzimas tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran espectacularmente las reacciones químicas específicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Hay pocos catalizadores no biológicos que tengan todas estas propiedades.

Los enzimas están en el centro de todos los proceso bioquímicos. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas en las que se degradan moléculas de nutrientes, se conserva y transforma la energía química y se fabrican las macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos. A través de la acción de los enzimas reguladores los sistemas enzimáticos se coordinan de un modo muy eficaz, permitiendo una integración armoniosa de la multitud de actividades metabólicas diferentes que son necesarias para la vida.

El estudio de los enzimas también tiene una importancia práctica inmensa. En algunas enfermedades, especialmente en las que son genéticamente heredables, puede haber una deficiencia, o incluso una ausencia total, de uno o más enzimas. También se pueden producir situaciones anormales por la actividad excesiva de un enzima específico. La medición de la actividad enzimática en el plasma sanguíneo, eritrocitos o muestras de tejido son importantes en el diagnóstico de enfermedades. Muchos fármacos ejercen sus efectos biológicos a

través de la interacción con enzimas. Los enzimas se han convertido en herramientas prácticas importantes, no sólo en medicina sino también en la industria química, en el tratamiento de los alimentos y en la agricultura.

El capítulo empieza con la descripción de las propiedades de los enzimas y los principios fundamentales de su poder catalítico. Sigue una introducción a la cinética enzimática, disciplina que proporciona gran parte del marco necesario para cualquier discusión sobre los enzimas. Se dan seguidamente algunos ejemplos de mecanismos enzimáticos que ilustran los principios introducidos previamente en el capítulo. Acabamos con una discusión sobre los enzimas reguladores.

6.1 Introducción a los enzimas

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación sobre los enzimas. Los catalizadores biológicos se reconocieron y fueron descritos por primera vez a finales del siglo XVIII, en estudios sobre la digestión de la carne por secreciones del estómago; la investigación continuó a principios del siglo XIX examinando la conversión del almidón en azúcar por la saliva y diversos extractos vegetales. Hacia 1850 Louis Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación del azúcar a alcohol por la levadura estaba catalizada por "fermentos". Postuló que tales fermentos son inseparables de la estructura de las células de levadura vivas; este punto de vista, denominado vitalismo, se mantuvo durante décadas. El descubrimiento de Eduard Buchner en 1897 de que los extractos de levadura pueden fermentar el azúcar a alcohol demostró que las moléculas que intervienen en la fermentación pueden continuar funcionando cuando se separan de la estructura de las células vivas. Frederick W. Kühne denominó estas moléculas **enzimas.** Al rechazarse las nociones vitalistas de la vida, el aislamiento de nuevos enzimas y la investigación de sus propiedades permitió el avance de la ciencia bioquímica.

El aislamiento y cristalización de la ureasa por James Sumner en 1926 proporcionó un gran impulso a los primeros estudios sobre los enzimas. Sumner halló que los cristales de ureasa consistían exclusivamente en proteína y postuló que todos los enzimas son proteínas. A falta de otros ejemplos esta idea fue discutida durante algún tiempo. La conclusión de Sumner sólo se aceptó ampliamente cuando más tarde, en la década de 1930, John Northrop y Moses Kunitz cristalizaron la pepsina, la tripsina y otros enzimas digestivos y hallaron que también eran proteínas. Durante este período, J. B. S. Haldane escribió un tratado denominado "Enzimas". Aunque aún no estaba clara la naturaleza molecular de los enzimas, este libro contenía la notable sugerencia de que las interacciones por enlaces débiles entre el enzima y su sustrato podrían ser utilizadas para catalizar la reacción. Esta brillante idea está en el centro de nuestro conocimiento actual sobre la catálisis enzimática.

La investigación sobre los enzimas ha sido muy intensa desde la última parte del siglo XX. Esto ha conducido a la purificación de millares de enzimas, a la elucidación de la estructura y mecanismo químico de muchos de ellos y a un conocimiento general sobre su modo de acción.

La mayoría de enzimas son proteínas

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico (Capítulo 26), todos los enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia un enzima en sus subunidades, se suele perder la actividad catalítica. Si se descompone un enzima en sus aminoácidos constituyentes, siempre se destruye su actividad catalítica. Así, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas son esenciales para su actividad catalítica.

Los enzimas, al igual que otras proteínas, tienen masas moleculares relativas que van desde unos 12.000 hasta más de 1 millón. Algunos enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos aminoácidos. Otros requieren un componente químico adicional llamado **cofactor.** El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 6-1) o una molécula orgánica

TABLA 6–1 Algunos elementos inorgánicos que actúan como cofactores por enzimáticos

Cu^{2+}	Citocromo oxidasa
Fe^{2+} o Fe^{3+}	Citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa
K^{+}	Piruvato quinasa
Mg^{2+}	Hexoquinasa, glucosa 6-fosfatasa, piruvato quinasa
Mn^{2+}	Arginasa, ribonucleótido reductasa
Mo	Dinitrogenasa
Ni^{2+}	Ureasa
Se	Glutatión peroxidasa
Zn^{2+}	Carbónico anhidrasa, alcohol deshidrogenasa, carboxipeptidasas A y B

Eduard Buchner, 1860–1917

James Sumner, 1887–1955

J. B. S. Haldane, 1892–1964

TABLA 6–2 Algunos coenzimas que actúan como portadores transitorios de átomos o grupos funcionales

Coenzima	*Ejemplos de grupos químicos transferidos*	*Precursor en la dieta para los mamíferos*
Biocitina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acilo	Ácido pantoténico y otras moléculas
5′-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B_{12})	Átomo de H y grupos alquilo	Vitamin B_{12}
Flavina adenina dinucleótido	Electrones	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Eectrones y grupos acilo	No se requiere en la dieta
Nicotinamida adenina dinucleótido	Ion hidruro ($:H^-$)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetrahidrofolato	Grupos monocarbonados	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldehídos	Tiamina (vitamina B_1)

Nota: la estructura y modo de acción de estos coenzimas se describe en la Parte II de este libro.

o metaloorgánica compleja denominada **coenzima** (Tabla 6-2). Algunos enzimas requieren *tanto* un coenzima *como* uno o más iones metálicos para su actividad. Un coenzima o ion metálico unido covalentemente o de manera muy fuerte a la proteína enzimática se denomina **grupo prostético.** Un enzima completo catalíticamente activo junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina **holoenzima.** La parte proteica de tal enzima se denomina **apoenzima** o **apoproteína.** Los coenzimas actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos. La mayoría de ellos son derivados de las vitaminas, nutrientes orgánicos requeridos en pequeñas cantidades en la dieta. Los coenzimas se considerarán más detalladamente a medida que se encuentren en la discusión de las rutas metabólicas en la Parte II de este libro. Finalmente, algunos enzimas son modificados covalentemente por fosforilación, glucosilación y otros procesos. Gran parte de estas alteraciones intervienen en la regulación de la actividad enzimática.

Los enzimas se clasifican según las reacciones que catalizan

Muchos enzimas se han bautizado añadiendo el sufijo "-asa" al nombre de su sustrato o a una palabra o frase que describe su actividad. Así, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la polimerización de nucleótidos en la síntesis del DNA. Otros enzimas recibieron nombres muy generales, antes de que se supiera cuál era su reacción específica. Por ejemplo, un enzima que actuaba en la digestión de la comida se llamó pepsina, del griego *pepsis*, "digestión", y el lisozima recibió su nombre por su capacidad de lisar las paredes celulares bacterianas. Otros recibieron el nombre en virtud de su origen o el modo como se obtuvieron: la tripsina, que recibió su nombre del griego *tryein*, "desgastar", se obtuvo frotando tejido pancreático con glicerina. A veces el mismo enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a tales ambigüedades y al número constantemente creciente de enzimas descubiertos, se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de los enzimas. Este sistema distribuye los enzimas en seis clases principales, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada (Tabla 6-3). A cada enzima se le asigna un número clasificatorio de cuatro apartados y un nombre sistemático que identifica la reacción catalizada. Por ejemplo, el nombre sistemático formal del enzima que cataliza la reacción

$$\text{ATP} + \text{D-glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-glucosa 6-fosfato}$$

es la ATP:glucosa fosfotransferasa, lo que indica que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la glucosa. El número de clasificación de este enzima (número E.C., por *E*nzyme

TABLA 6–3 Clasificación internacional de los enzimas

N.º	*Clase*	*Tipo de reacción catalizada*
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C—C, C—S, C—O y C—N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP

Nota: la mayoría de enzimas catalizan la transferencia de electrones, átomos o grupos funcionales. Por tanto, se clasifican y se les asigna número de código y nombre según el tipo de reacción de transferencia, el grupo dador y el grupo aceptor.

Commission) es 2.7.1.1. El primer dígito (2) denota el nombre de la clase (transferasa); el segundo dígito (7), la subclase (fosfotransferasa); el tercer dígito (1), una fosfotransferasa con un grupo hidroxilo como aceptor; y el cuarto dígito (1), D-glucosa como aceptor del grupo fosfato. En muchos casos se utiliza un nombre sencillo de uso más común (en este caso hexoquinasa). La lista y la descripción completa de los miles de enzimas conocidos se mantienen actualizadas por el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). Este capítulo se dedica mayoritariamente a los principios y propiedades comunes a todos los enzimas.

RESUMEN 6.1 Introducción a los enzimas

- La vida depende de la existencia de catalizadores poderosos y específicos: los enzimas. Prácticamente todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por un enzima.
- Con la excepción de una pocas moléculas de RNA catalítico, todos los enzimas conocidos son proteínas. Muchos necesitan coenzimas no proteicos o cofactores para desempeñar su acción catalítica.
- Los enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan. Todos los enzimas tienen números y nombres formales del sistema E.C. y la mayoría tienen también nombres sencillos.

6.2 ¿Cómo funcionan los enzimas?

La catálisis enzimática de las reacciones es esencial para los sistemas vivos. En condiciones biológicas, las reacciones no catalizadas tienden a ser lentas. La mayoría de moléculas biológicas son muy estables al pH neutro, la temperatura suave y el ambiente acuoso presente en el interior de las células. Además, muchas reacciones bioquímicas comunes implican procesos químicos que son desfavorables o poco probables en el ambiente celular, tales como la formación transitoria de intermediarios cargados inestables o la colisión de dos o más moléculas con la orientación precisa requerida para la reacción. Las reacciones necesarias para digerir los alimentos, enviar señales nerviosas o contraer el músculo no se dan a una velocidad útil sin catálisis.

Un enzima soluciona estos problemas al proporcionar un ambiente específico dentro del cual una reacción determinada puede transcurrir a mayor velocidad. El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar dentro de los confines de una bolsa del enzima denominada **sitio activo** (Fig. 6-1). La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima se denomina **sustrato.** La superficie del sitio activo del enzima está revestida con residuos aminoácidos cuyos grupos sustituyentes se unen al sustrato y catalizan la transformación química. A menudo, el sitio activo cubre al sustrato y lo secuestra completamente de la solución. El complejo enzima-sustrato, cuya existencia fue propuesta por primera vez por Charles-Adolphe Wurtz en 1880, es de importancia central en la acción de los enzimas. Es también el punto de partida de los tratamientos matemáticos que definen el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas por enzimas, así como de las descripciones teóricas de los mecanismos enzimáticos.

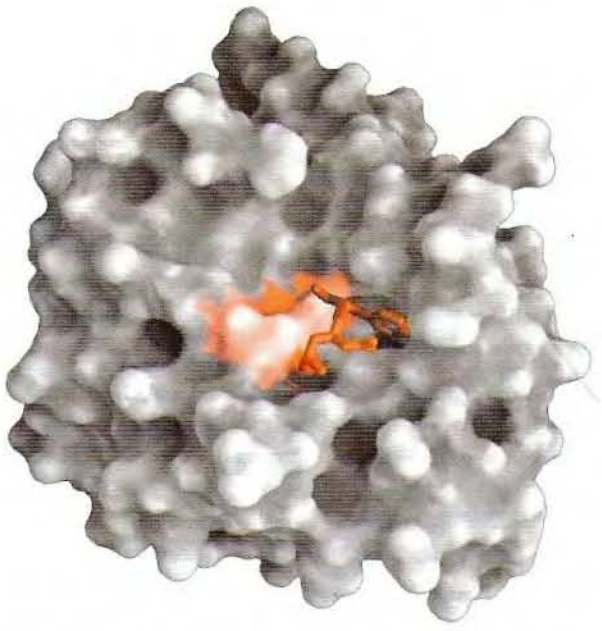


FIGURA 6-1 Fijación de un sustrato al sitio activo de un enzima. Se muestra el enzima quimotripsina unido a un sustrato en rojo (PDB ID 7GCH). Algunos aminoácidos clave del sitio activo se muestran como una mancha roja en la superficie del enzima.

Los enzimas alteran las velocidades de reacción pero no los equilibrios

Se puede escribir una reacción enzimática sencilla como

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \qquad (6\text{–}1)$$

en donde E, S y P representan el enzima, el sustrato y el producto, respectivamente. ES y EP son complejos transitorios del enzima con el sustrato y con el producto, respectivamente.

Para entender la catálisis, hemos de apreciar en primer lugar la importante distinción entre equilibrios de reacción y velocidades de reacción. La función de un catalizador es aumentar la *velocidad* de una reacción. Los catalizadores no modifican los *equilibrios* de reacción. Cualquier reacción, por ejemplo $S \rightleftharpoons P$, se puede describir mediante un diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6-2), una descripción de los cambios energéticos durante la reacción. Tal como se ha explicado en el Capítulo 1, la energía de los sistemas biológicos se describe en función de la energía libre, G. En el diagrama de la coordenada, se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción (coordenada de la reacción). El punto de partida tanto para la reacción hacia la derecha como hacia la izquierda se denomina **estado basal,** que es la contribución a la energía libre del sistema de una molécula promedio (S o P) bajo un conjunto de condiciones dadas. Para describir las variaciones de energía libre de las reacciones, los químicos defi-

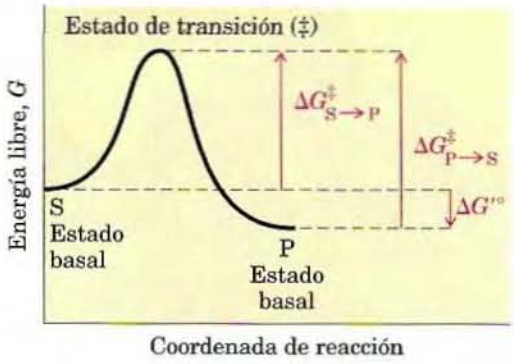


FIGURA 6-2 Diagrama de la coordenada de reacción de una reacción química. Se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción S → P. Un diagrama de este tipo constituye una descripción de los cambios energéticos durante la reacción y el eje horizontal (coordenada de reacción) refleja los cambios químicos progresivos (p. ej., rotura o formación de enlaces) a medida que S se convierte en P. Se indican las energías de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, para las reacciones S → P y P → S. $\Delta G'^{\circ}$ es la variación de energía libre estándar global en la dirección S → P.

nen un conjunto estándar de condiciones (temperatura 298 K; presión parcial de cada gas 1 atm o 101,3 kPa; concentración de todos los solutos igual a 1 M) y expresan la variación de energía libre de este sistema reaccionante como ΔG°, la **variación de energía libre estándar.** Dado que en los sistemas bioquímicos participa normalmente el H^+ en concentraciones muy lejanas de 1 M, los bioquímicos definen la **variación de la energía libre estándard bioquímica, $\Delta G'^{\circ}$,** como la variación de energía libre estándar *a pH 7,0;* emplearemos esta definición a lo largo de todo el libro. En el Capítulo 13 se dará una definición más completa de $\Delta G'^{\circ}$.

El equilibrio entre S y P refleja la diferencia en energía libre de sus estados basales. En el ejemplo que se muestra en la Figura 6-2, la energía libre del estado basal de P es inferior a la del de S, por lo que la $\Delta G'^{\circ}$ de la reacción es negativa y el equilibrio favorece a P. La posición y la dirección de este equilibrio *no* se ven afectadas por ningún catalizador.

Un equilibrio favorable no indica que la conversión S → P sea rápida. La *velocidad* de reacción es dependiente de un parámetro totalmente diferente. Existe una barrera energética entre S y P que representa la energía requerida para el alineamiento de los grupos reactivos, la formación de cargas inestables transitorias, los reordenamientos de enlaces y otras transformaciones que se requieren para que la reacción tenga lugar en cualquiera de las dos direcciones. Esto viene representado por la "colina" energética de las Figuras 6-2 y 6-3. Para que haya reacción las moléculas han de superar esta barrera, por lo que se deben llevar a un nivel energético superior. En la cumbre de la colina energética existe un punto en el que la caída hacia el estado S o P es igualmente probable (en cualquier caso, el camino es de bajada). Es lo que se denomina **estado de transición.** El estado de transición no es una especie química con estabilidad significativa, por lo que no se ha de confundir con un intermediario de reacción. Es, simplemente, un momento molecular fugaz en el que acontecimientos tales como rotura de enlaces, formación de enlaces y desarrollo de cargas han llegado al instante preciso en el que el colapso hacia sustrato o hacia producto es igualmente probable. La diferencia entre los niveles de energía del estado basal y del estado de transición se denomina **energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$.** La velocidad de una reacción refleja esta energía de activación: a una energía de activación más elevada corresponde una reacción más lenta. Las velocidades de reacción pueden aumentarse incrementando la temperatura, mediante lo que se aumenta el número de moléculas con energía suficiente para superar la barrera energética. De modo alternativo, es posible disminuir la energía de activación añadiendo un catalizador (Fig. 6-3). *La catálisis aumenta las velocidades de reacción disminuyendo las energías de activación.*

Los enzimas no constituyen una excepción a la regla de que los catalizadores no modifican el equilibrio de reacción. Las flechas bidireccionales de la Ecuación 6-1 ilustran este punto: cualquier enzima que catalice la reacción S → P también cataliza la reacción P → S. Su única misión es *acelerar* la interconversión de S y P. No se gasta enzima en el proceso y el punto de equilibrio no queda afectado. No obstante, la reacción alcanza el equilibrio de una manera mucho más rápida cuando se halla presente el enzima adecuado ya que se incrementa la velocidad de la reacción.

Se puede ilustrar este principio general considerando la reacción de la sacarosa con el oxígeno para formar dióxido de carbono y agua:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \longrightarrow 12CO_2 + 11H_2O$$

Esta transformación, que se realiza a través de una serie de reacciones separadas, tiene una $\Delta G'^{\circ}$ muy grande y negativa por lo que la cantidad de sacarosa presente en el equilibrio es despreciable. No obstante, la sacarosa es un compuesto estable ya que la barrera de activación energética que debe superar antes de reaccionar con el oxígeno es muy alta. La sacarosa puede almacenarse en un recipiente en presencia de oxígeno de ma-

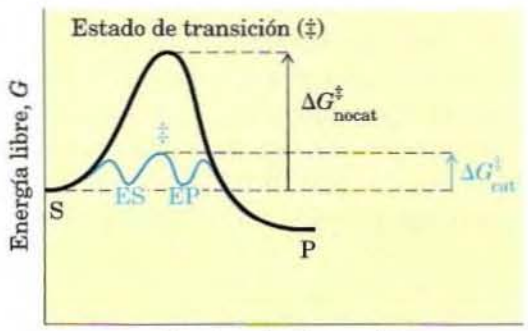


FIGURA 6-3 Diagrama de la coordenada de reacción donde se comparan las reacciones catalizada por enzima y sin catalizar. En la reacción S → P, los intermediarios ES y EP ocupan mínimos en la curva de progreso energético de la reacción catalizada enzimáticamente. Los términos $\Delta G^{\ddagger}_{nocat}$ y $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ corresponden a las energías de activación de las reacciones sin catalizar y catalizada, respectivamente. La energía de activación del proceso global es menor cuando el enzima cataliza la reacción.

nera casi indefinida sin reaccionar. Sin embargo, en las células, la sacarosa es degradada a CO_2 y H_2O a través de una serie de reacciones catalizada por enzimas. Estos enzimas no sólo aceleran las reacciones sino que las organizan y controlan de tal manera que gran parte de la energía liberada en este proceso se recupera en otras formas asequibles a la célula para que realice sus funciones. La ruta de reacciones mediante las que la sacarosa (y otros azúcares) se degradan es la ruta primaria de formación de energía para las células y los enzimas de esta ruta permiten que la secuencia de reacciones tenga lugar en una escala de tiempo útil para las células.

Cualquier reacción puede consistir en varias etapas que suponen la formación y desintegración de especies químicas transitorias denominadas **intermediarios de reacción.*** Un intermediario de reacción es cualquier especie producida en el transcurso de la reacción que tenga un tiempo de vida químico finito (y mayor que el de una vibración molecular, equivalente a 10^{-13} segundos). Cuando la reacción S ⇌ P está catalizada por un enzima, los complejos ES y EP pueden ser considerados intermediarios a pesar de que S y P sean especies químicas estables (Ec. 6-1); los complejos ES y EP ocupan valles en el diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6-3). En el curso de una reacción catalizada enzimáticamente suelen existir otros intermediarios químicos adicionales y menos estables. La interconversión de dos intermediarios de reacción secuenciales constituye por tanto un paso de la reacción. Cuando en una reacción existen varios pasos, la velocidad global viene determinada por el paso (o pasos) cuya energía de activación es la más elevada; este paso se denomina **paso limitante de velocidad.** En un caso sencillo, el paso limitante de velocidad es el punto de energía más elevado en el diagrama de interconversión de S y P. En la práctica, el paso limitante de velocidad puede cambiar con las condiciones de reacción y en el caso de muchos enzimas puede haber varios pasos con energías de activación similares, lo que significa que todos ellos son parcialmente limitantes de la velocidad.

Las energías de activación son barreras energéticas para las reacciones químicas. Estas barreras son cruciales para la propia vida. La velocidad a la que una molécula se transforma en una reacción química determinada desciende al aumentar la barrera de activación de esta reacción. Sin estas barreras energéticas, las macromoléculas complejas revertirían espontáneamente a formas moleculares mucho más sencillas y no podrían existir ni las estructuras complejas y altamente ordenadas ni los procesos metabólicos que tienen lugar en las células. Los enzimas han evolucionado para disminuir *selectivamente* las energías de activación de las reacciones necesarias para la supervivencia celular.

*Adviértase que en este capítulo los términos *paso* e *intermediario* se refieren a especies químicas que se originan en una única reacción catalizada enzimáticamente. En el contexto de las rutas metabólicas en las que participan muchos enzimas (Parte II de este libro), estos términos se utilizan de manera algo diferente. Una reacción enzimática completa recibe a menudo el nombre de "paso" de una ruta y al producto de la reacción de un enzima (que es el sustrato para el siguiente enzima de la ruta) se lo suele denominar "intermediario".

Las velocidades de reacción y los equilibrios tienen definiciones termodinámicas precisas

Los *equilibrios* de reacción están asociados inextricablemente a la variación de energía libre estándar de la reacción, $\Delta G'^\circ$, mientras que las *velocidades* de reacción están asociadas a la energía de activación, $\Delta G^\ddagger$. Una introducción básica a estas relaciones termodinámicas constituye el próximo paso para saber cómo funcionan los enzimas.

Un equilibrio tal como S ⇌ P viene descrito por una **constante de equilibrio, K_{eq},** o K (p. 26). En las condiciones estándar utilizadas para comparar los procesos bioquímicos, una constante de equilibrio se denota por K'_{eq} (o K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \qquad (6\text{–}2)$$

De la termodinámica, puede describirse la relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^\circ$ mediante la expresión

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq} \qquad (6\text{–}3)$$

donde R es la constante de los gases (8,315 J/mol · K) y T es la temperatura absoluta, 298 K (25 °C). La Ecuación 6-3 se desarrollará y tratará detalladamente en el Capítulo 13. Aquí el punto importante es que la constante de equilibrio es un reflejo directo de la variación de energía libre estándar global de la reacción (Tabla 6-4). Un valor negativo grande de $\Delta G'^\circ$ refleja un equilibrio de reacción favorable aunque, tal como se ha comentado antes, no signifique que la reacción transcurra con una velocidad elevada.

La velocidad de una reacción cualquiera viene determinada por la concentración de reactivo (o reactivos) y por una **constante de velocidad** usualmente representada por el símbolo k. Para la reacción unimolecular S → P, la velocidad de la reacción, V, que representa la cantidad de S que ha reaccionado por unidad de tiempo, viene expresada por una **ecuación de la velocidad:**

$$V = k[S] \qquad (6\text{–}4)$$

En esta reacción, la velocidad sólo depende de la concentración de S. Es lo que se denomina una reacción de primer orden.

TABLA 6–4 Relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^\circ$

K'_{eq}	$\Delta G'^\circ$ (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^{1}	−5,7
10^{2}	−11,4
10^{3}	−17,1

Nota: la relación se calcula a partir de $\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq}$ (Ec. 6-3).

El factor k es una constante de proporcionalidad que refleja la probabilidad de reacción bajo un conjunto de condiciones (pH, temperatura, etc.). Aquí, k es una constante de velocidad de primer orden y sus unidades son tiempos inversos, como por ejemplo s^{-1}. Si una reacción de primer orden tiene una constante de velocidad k de 0,03 s^{-1} se puede interpretar (cualitativamente) que el 3% de sustrato asequible será convertido en P en 1 s. Una reacción con una constante de velocidad de 2000 s^{-1} estará lista en una pequeña fracción de segundo. Si la velocidad de reacción depende de la concentración de dos compuestos diferentes, o si reaccionan dos moléculas del mismo compuesto, la reacción es de segundo orden y k es una constante de velocidad de segundo orden (con unidades $M^{-1}s^{-1}$). La ecuación de la velocidad tiene entonces la forma

$$V = k[S_1][S_2] \qquad (6\text{–}5)$$

Aplicando la teoría del estado de transición se puede deducir una expresión que relaciona la magnitud de la constante de velocidad con la energía de activación:

$$k = \frac{\mathbf{k}T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \qquad (6\text{–}6)$$

en donde **k** es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck. El punto importante es que esta relación entre la constante de velocidad k y la energía de activación $\Delta G^{\ddagger}$ es inversa y exponencial. En forma simplificada ésta es la base de la afirmación de que una energía de activación menor significa una velocidad de reacción mayor.

A continuación pasamos de lo *que* hacen los enzimas a *cómo* lo hacen.

Unos pocos principios explican el poder catalítico y la especificidad de los enzimas

Los enzimas son catalizadores extraordinarios. Los aumentos de velocidad conseguidos por los enzimas son de 5 a 17 órdenes de magnitud (Tabla 6-5). Los enzimas son también muy específicos, discriminando fácilmente entre sustratos con estructuras muy similares. ¿Cómo se pueden explicar estos incrementos enormes y altamente selectivos en su velocidad? ¿De dónde viene la energía que proporciona un descenso espectacular de las energías de activación de reacciones específicas?

TABLA 6–5 Algunos incrementos de velocidad producidos por los enzimas

Ciclofilina	10^5
Carbónico anhidrasa	10^7
Triosa fosfato isomerasa	10^9
Carboxipeptidasa A	10^{11}
Fosfoglucomutasa	10^{12}
Succinil-CoA transferasa	10^{13}
Ureasa	10^{14}
Orotidina monofosfato descarboxilasa	10^{17}

La respuesta a estas preguntas tiene dos partes distintas pero relacionadas. La primera se basa en las reordenaciones de los enlaces covalentes durante la reacción catalizada por el enzima. Entre sustratos y grupos funcionales de los enzimas (cadenas laterales específicas de aminoácidos, iones metálicos y coenzimas) tienen lugar reacciones químicas de muchos tipos. Los grupos funcionales catalíticos de los enzimas pueden formar enlaces covalentes transitorios con un sustrato, activándolo para la reacción, o bien puede transferirse transitoriamente un grupo funcional del sustrato al enzima. En muchos casos, estas reacciones sólo tienen lugar en el sitio activo del enzima. Las interacciones covalentes entre enzimas y sustratos reducen la energía de activación (acelerando, por tanto, la reacción), proporcionando una vía de reacción alternativa y de menor energía. En la Sección 6.4 se describen diversos tipos específicos de reestructuraciones en reacciones enzimáticas.

La segunda parte de la explicación se basa en las interacciones *no covalentes* entre el enzima y el sustrato. Gran parte de la energía requerida para disminuir la energía de activación proviene generalmente de interacciones débiles no covalentes entre el sustrato y el enzima. El factor que diferencia realmente a los enzimas de la mayoría de catalizadores no enzimáticos es la formación de un complejo ES específico. La interacción entre enzima y sustrato en este complejo está canalizada por las mismas fuerzas que estabilizan la estructura proteica, incluyendo puentes de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas (Capítulo 4). El establecimiento de cada interacción débil en el complejo ES viene acompañado por la liberación de una pequeña cantidad de energía libre que proporciona un cierto grado de estabilidad a la interacción. La energía proveniente de la interacción enzima-sustrato se denomina **energía de fijación, ΔG_B.** Su significado se extiende más allá del de una simple estabilización de la interacción enzima-sustrato. *La energía de fijación es la principal fuente de energía libre utilizada por los enzimas para disminuir la energía de activación de las reacciones.* Hay dos principios fundamentales que están interrelacionados y que proporcionan una explicación general de cómo aprovechan los enzimas la energía de unión no covalente.

1. La mayor parte del poder catalítico de los enzimas proviene en último término de la energía libre emitida al formarse los múltiples enlaces débiles e interacciones entre el enzima y su sustrato. Esta energía de fijación contribuye tanto a la especificidad como a la catálisis.
2. Las interacciones débiles están optimizadas en el estado de transición de la reacción; los sitios activos de los enzimas son complementarios no a los sustratos per se, sino a los estados de transición a través de los que pasan los sustratos al ser convertidos en productos durante una reacción enzimática.

Estos temas son vitales para el conocimientos de los enzimas y pasan a ser ahora el foco principal de interés de este capítulo.

Las interacciones débiles entre enzima y sustrato son óptimas en el estado de transición

¿Cómo utiliza un enzima la energía de fijación para disminuir la energía de activación de la reacción? La formación del complejo ES no es por sí misma la explicación, aunque algunas de las primeras consideraciones sobre los mecanismos de reacción empezaron con esta idea. Estudios sobre la especificidad enzimática llevados a cabo por Emil Fischer le condujeron a proponer, en 1894, que los enzimas eran estructuralmente complementarios a sus sustratos, de forma que se acoplaban del mismo modo que una llave y una cerradura (Fig. 6-4). Esta elegante idea de que una interacción específica (y exclusiva) entre dos moléculas biológicas está facilitada por superficies moleculares con formas complementarias ha influido profundamente en el desarrollo de la bioquímica y se halla en el centro de muchos procesos bioquímicos. No obstante, la hipótesis de la "llave y la cerradura" puede ser engañosa cuando se aplica a la catálisis enzimática. Un enzima totalmente complementario a su sustrato sería un enzima muy deficiente, como podremos demostrar.

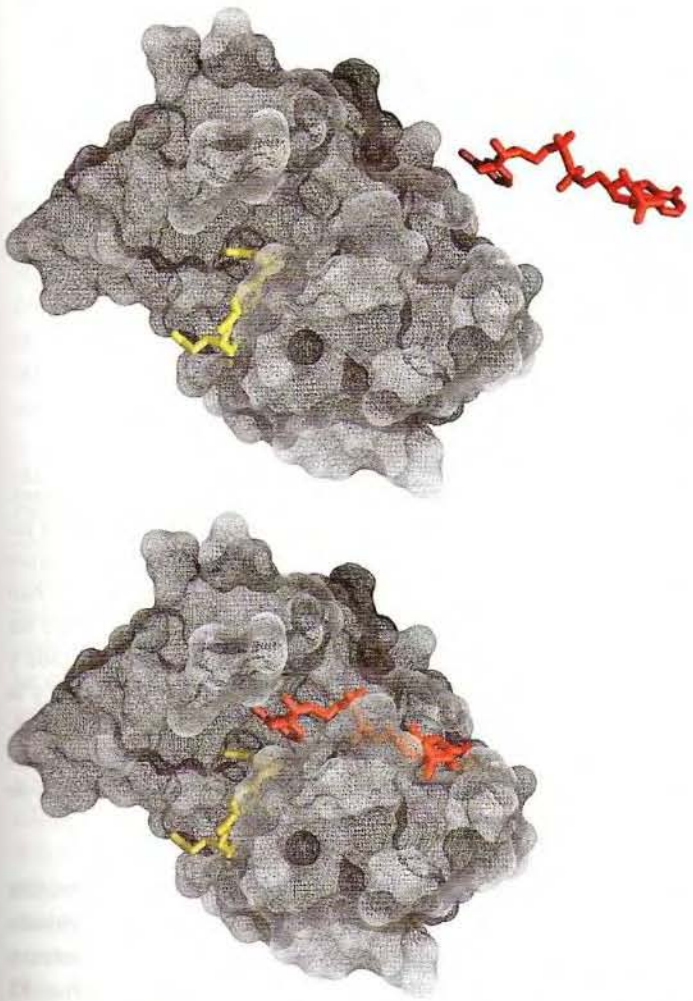


FIGURA 6-4 Formas complementarias de un sustrato y su sitio de fijación sobre un enzima. Se muestra el enzima dihidrofolato reductasa con su sustrato $NADP^+$ (rojo), sin fijar (arriba) y fijado (abajo). También es visible otro sustrato, el tetrahidrofolato (amarillo) (PDB ID 1RA2). El $NADP^+$ se fija a una bolsa que es complementaria en forma y propiedades iónicas. En realidad, la complementariedad entre la proteína y el ligando (en este caso el sustrato) raras veces es perfecta, tal como hemos visto en el Capítulo 5. La interacción de una proteína con un ligando da lugar a menudo a cambios de conformación en una o en ambas moléculas, un proceso denominado encaje inducido. Esta *falta* de complementariedad perfecta entre el enzima y su sustrato (que no es evidente en la figura) es importante para la catálisis enzimática.

Consideremos una reacción imaginaria, la rotura de una vara metálica magnética. La reacción no catalizada se muestra en la Figura 6-5a. Examinaremos ahora dos enzimas imaginarios (dos "varasas") que pudieran catalizar esta reacción, utilizando fuerzas magnéticas como ejemplo de la energía de fijación real utilizada por los enzimas. Diseñaremos en primer lugar un enzima perfectamente complementario al sustrato (Fig. 6-5b). El sitio activo de esta varasa es una bolsa forrada con imanes. Para que se dé la reacción (rotura), la vara debe alcanzar el estado de transición de la reacción, pero se fija de una manera tan fuerte al sitio activo que no puede doblarse, ya que la curvatura de la vara eliminaría algunas de las interacciones magnéticas entre la vara y el enzima. Un enzima así *impide* la reacción ya que estabiliza el sustrato. En un diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6-5b), este tipo de complejo ES correspondería a un pozo energético del que le sería muy difícil salir al sustrato. Tal enzima no sería útil.

La noción moderna de la catálisis enzimática, propuesta por primera vez por Michael Polanyi (1921) y por Haldane en 1930 y después elaborada por Linus Pauling en 1946 dice: para que un enzima catalice una reacción ha de ser complementario al *estado de transición de la reacción*. Ello significa que las interacciones óptimas entre sustrato y enzima sólo pueden tener lugar en el estado de transición. La Figura 6-5c demuestra de qué modo puede actuar un enzima de este tipo. La vara de metal se fija a la varasa, pero sólo se utilizan unas cuantas interacciones para formar el complejo ES. El sustrato ligado aún ha de experimentar el aumento de energía libre necesario para alcanzar el estado de transición. Ahora, sin embargo, el incremento de energía libre requerido para llevar la vara a una conformación curva y parcialmente partida queda nivelado, o es "pagado", por las interacciones magnéticas (energía de fijación) que se forman entre el enzima y el sustrato en el estado de transición. Muchas de estas interacciones se dan en partes de la vara distantes del punto de rotura; así, las interacciones entre el enzima y partes no reactivas del sustrato proporcionan una cierta cantidad de la energía necesaria para catalizar su rotura. Esta "factura energética" se traduce en una energía de activación neta inferior y una mayor velocidad de reacción.

Los enzimas reales funcionan según un principio análogo. En el complejo ES se forman algunas interacciones débiles, pero el complemento total de las interacciones débiles posibles entre sustrato y enzima sólo se forma cuando el sustrato alcanza el estado de transición. La energía libre (energía de fijación) liberada por la formación de esas interacciones equilibra parcialmente la energía requerida para llegar a la cima de la colina energética. La suma de la energía de activación desfavorable (positiva) $\Delta G^{\ddagger}$ y la energía de fijación ΔG_B favorable (negativa) da como resultado una energía de activación *neta*

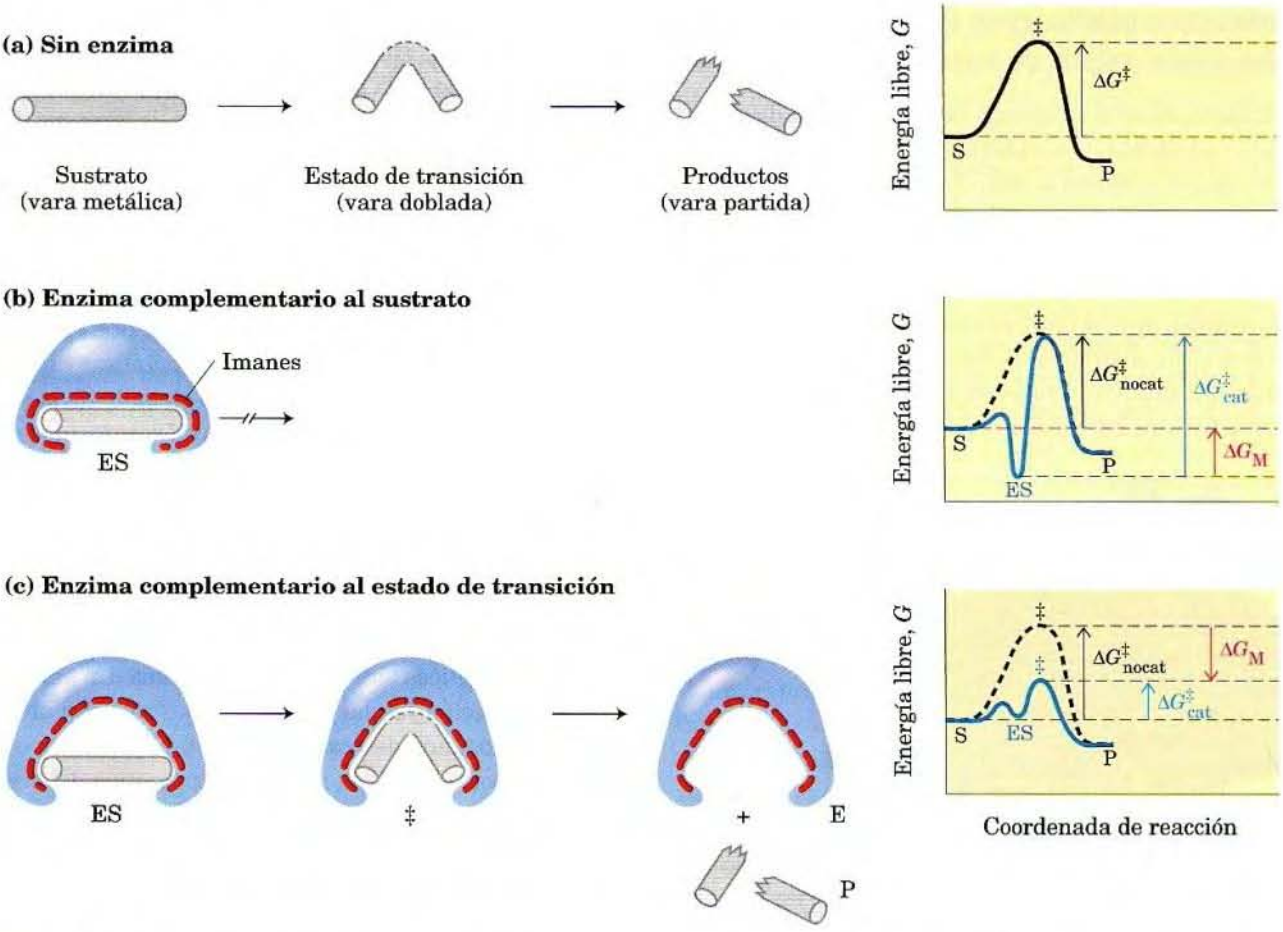


FIGURA 6-5 Enzima imaginario (varasa) diseñado para catalizar la rotura de una vara metálica. **(a)** Para que se rompa la vara en preciso doblarla en primer lugar (estado de transición). En ambos ejemplo de "varasa", las interacciones magnéticas ocupan el lugar de las interacciones por enlaces débiles entre enzima y sustrato. **(b)** Una varasa con una bolsa forrada con imanes complementaria en su estructura a la vara (sustrato) la estabiliza. El doblamiento estará impedido por la atracción magnética entre la vara y la varasa. **(c)** Un enzima con una bolsa complementaria al estado de transición de la reacción ayudará a desestabilizar la vara dando lugar a la catálisis de la reacción. Las interacciones magnéticas proporcionan energía de fijación que compensa el incremento de energía libre requerido para doblar la vara. Los diagramas de la coordenada de reacción (derecha) muestran las consecuencias energéticas de la complementariedad con el sustrato frente a la complementaridad con el estado de transición (se han omitido los complejos EP). El término ΔG_M, la diferencia entre las energías del estado de transición de las reacciones no catalizada y catalizada, procede de las interacciones magnéticas entre la vara y la varasa. Cuando el enzima es complementario al sustrato **(b)**, el complejo ES es más estable y tiene menos energía libre en el estado basal que el sustrato solo. El resultado es un *incremento* de la energía de activación.

menor (Fig. 6-6). El estado de transición tampoco es una especie estable en el enzima, sino que representa un punto breve en el tiempo que pasa un sustrato en la cima de la colina energética. Sin embargo, la reacción catalizada por el enzima es mucho más rápida que el proceso sin catalizar, porque la colina es mucho más baja. El principio importante subyacente es que *las interacciones de fijación débiles entre el enzima y el sustrato proporcionan la fuerza impulsora principal de la catálisis enzimática*. Los grupos del sustrato que intervienen en estas interacciones débiles pueden estar situados a cierta distancia de los enlaces que se rompen o modifican. Las interacciones débiles formadas únicamente en el estado de transición son las que contribuyen primordialmente a la catálisis.

La necesidad de múltiples interacciones débiles para impulsar la catálisis es una de las razones de que los enzimas sean tan grandes. El enzima ha de aportar grupos funcionales para interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno y otras interacciones y ha de posicionar estos grupos de forma precisa para que se pueda optimizar la energía de fijación en el estado de transición. Se obtendrá una correcta fijación si el sustrato se ubica en una cavidad (el sitio activo) alejada del agua. El tamaño de las proteínas refleja la necesidad de superestructuras que permitan mantener la interacción de grupos correctamente posicionados y mantengan inalterable la cavidad del sitio activo.

Los enzimas utilizan la energía de fijación para proporcionar especificidad de reacción y catálisis

¿Pueden explicarse cuantitativamente las enormes aceleraciones de velocidad conseguidas por los enzimas sólo por la energía de fijación? Sí. La Ecuación 6-6 nos permite calcular que $\Delta G^{\ddagger}$ debe disminuir unos 5,7 kJ/mol para acelerar una reacción de primer orden en un factor de diez, en las condiciones que

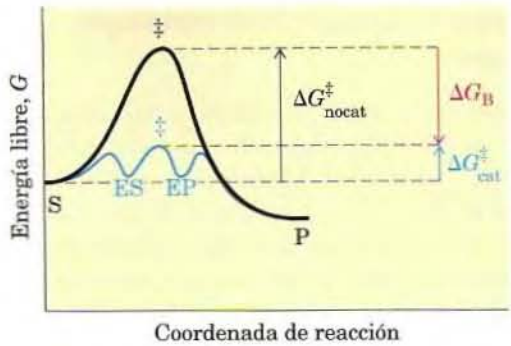
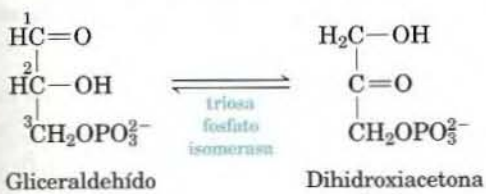


FIGURA 6-6 Papel de la energía de fijación en la catálisis. Para disminuir la energía de activación de una reacción el sistema ha de adquirir una cantidad de energía equivalente a la cantidad en que disminuye $\Delta G^{\ddagger}$. Gran parte de esta energía proviene de la energía de fijación (ΔG_B) conseguida en la formación de interacciones no covalentes débiles entre sustrato y enzima en el estado de transición. El papel de ΔG_B es análogo al de ΔG_M en la Figura 6-5.

se encuentran normalmente en las células. La energía disponible a partir de la formación de una sola interacción débil suele calcularse entre 4 y 30 kJ/mol. La energía global disponible a partir de varias interacciones de este tipo es, por tanto, suficiente para disminuir las energías de activación los 60 a 100 kJ/mol requeridos para explicar los grandes aumentos de velocidad observados en muchos enzimas.

La misma energía de fijación que aporta energía para la catálisis también hace que el enzima sea específico. La **especificidad** se refiere a la capacidad de un enzima de discriminar entre un sustrato y una molécula competitiva. La catálisis y la especificidad son fáciles de distinguir conceptualmente, pero mucho más difíciles de diferenciar experimentalmente porque surgen del mismo fenómeno. Si el sitio activo de un enzima tiene grupos funcionales ordenados de manera óptima para formar interacciones débiles con un sustrato determinado en el estado de transición, el enzima no podrá interaccionar tan bien con ninguna otra molécula. Así, si el sustrato tiene un grupo hidroxilo que forma un puente de hidrógeno específico con un residuo de Glu del enzima, cualquier molécula que carezca de este grupo hidroxilo será un peor sustrato para el enzima. Además, cualquier molécula con un grupo funcional extra para el que el enzima no contiene una bolsa o sitio de fijación será muy probablemente excluido del enzima. En general, la *especificidad* proviene de la formación de múltiples interacciones débiles entre el enzima y su molécula de sustrato específica.

Es posible demostrar la importancia de la energía de fijación en la catálisis. Por ejemplo, el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato:



Gliceraldehído 3-fosfato — Dihidroxiacetona fosfato

En esta reacción se reordenan los grupos carbonilo e hidroxilo de los carbonos 1 y 2. Sin embargo, se ha observado que más del 80% de la aceleración de la velocidad de reacción que tiene lugar procede de las interacciones enzima-sustrato en las que interviene el carbono 3 del sustrato. Se llegó a esta conclusión mediante una cuidadosa comparación de las reacciones catalizadas enzimáticamente sobre gliceraldehído 3-fosfato y sobre gliceraldehído (sin grupo fosfato en la posición 3) como sustratos.

Los principios generales antes esbozados se pueden ilustrar mediante diversos mecanismos catalíticos reconocidos. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por lo que un enzima determinado puede incorporar varios en su mecanismo de acción completo. Es a menudo difícil cuantificar la contribución de cada mecanismo catalítico a la velocidad y/o especificidad de una reacción catalizada por un enzima.

Como hemos visto, la energía de fijación contribuye de modo importante, y a veces dominante, a la catálisis. Consideremos lo que se necesita para que una reacción tenga lugar. Entre los factores físicos y termodinámicos que contribuyen de forma prominente al valor de $\Delta G^{\ddagger}$, la barrera de una reacción, se podría incluir (1) una reducción de la entropía, en forma de reducción en la libertad de movimiento de dos moléculas en solución; (2) la capa de solvatación del agua unida por puentes de hidrógeno que rodea y estabiliza muchas biomoléculas en disolución acuosa; (3) la distorsión de los sustratos que ha de tener lugar en muchas reacciones y (4) la necesidad de conseguir un alineamiento adecuado de los grupos funcionales catalíticos en el enzima. Se puede utilizar la energía de fijación para superar todas estas barreras.

En primer lugar, una gran disminución en los movimientos relativos de los dos sustratos que han de reaccionar, o **reducción de entropía,** es uno de los beneficios obvios de su fijación al enzima. La energía de fijación mantiene los sustratos en la orientación correcta para reaccionar, lo que es una contribución muy importante a la catálisis, ya que las colisiones productivas entre moléculas en solución pueden ser extremadamente raras. Los sustratos se pueden alinear sobre el enzima de forma precisa, generando un gran número de interacciones débiles entre ellos y grupos localizados de manera estratégica en el enzima, lo que mantiene las moléculas de sustrato en las posiciones adecuadas. Algunos estudios han demostrado que la restricción del movimiento de dos reactivos puede producir incrementos de velocidad de muchos órdenes de magnitud (Fig. 6-7).

En segundo lugar, la formación de enlaces débiles entre enzima y sustrato también da lugar a la **desolvatación** del sustrato. Interacciones enzima-sustrato reemplazan la mayoría de, o todos, los enlaces de hidrógeno que puedan existir en disolución entre el sustrato y el agua. En tercer lugar, la energía de fijación de las interacciones débiles formadas únicamente durante el estado de transición de la reacción ayuda a compensar termodinámicamente cualquier distorsión, principalmente en forma de redistribución electrónica, que deba experimentar el sustrato para reaccionar.

Finalmente, el propio enzima puede sufrir un cambio de conformación cuando se fija el sustrato, el cual también se en-

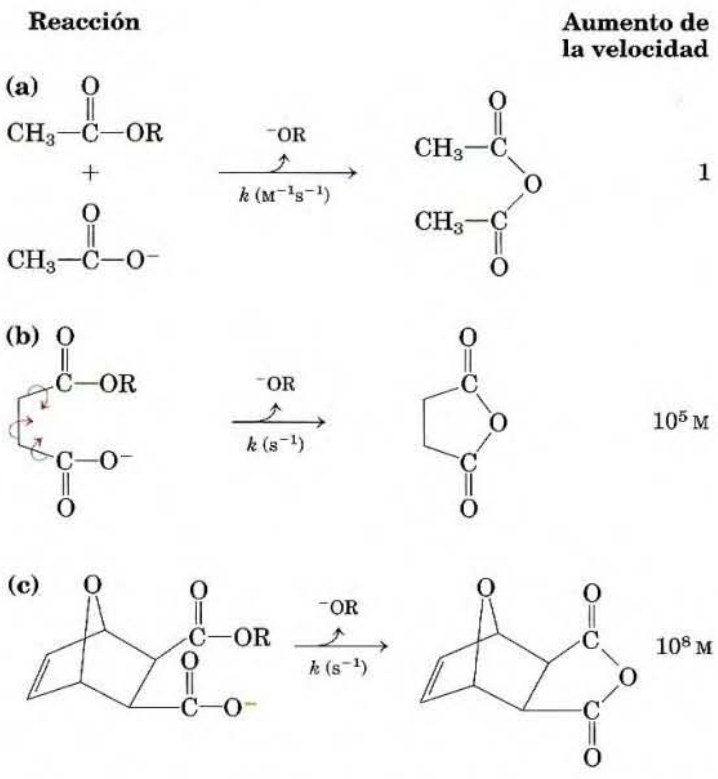


FIGURA 6-7 Aumento de la velocidad por reducción de la entropía. Se muestran las reacciones de un éster con un grupo carboxilato para formar un anhídrido. El grupo R es el mismo en todos los casos. **(a)** Para esta reacción bimolecular la constante de reacción k es de segundo orden y tiene como unidades $M^{-1}\ s^{-1}$. **(b)** Cuando los dos grupos reaccionantes forman parte de la misma molécula, la reacción es mucho más rápida. Para esta reacción unimolecular k tiene como unidades s^{-1}. Dividiendo la constante de velocidad de **(b)** por la constante de velocidad de **(a)** se obtiene un incremento de velocidad de aproximadamente 10^5 M. (El incremento tiene unidades de molaridad debido a que estamos comparando una reacción unimolecular con una bimolecular.) En otras palabras, si el reactivo en **(b)** estuviera presente a una concentración 1 M, los grupos reactivos *se comportarían* como si estuvieran presentes a una concentracion 10^5 M. Obsérvese que el reactivo en **(b)** tiene libertad de rotación alrededor de tres enlaces (mostrados con flechas curvadas), pero esto todavía representa una reducción sustancial de la entropía en relación con **(a)**. Si los enlaces que rotan en **(b)** están restringidos como en **(c)**, la entropía disminuye todavía más y la reacción muestra un incremento de velocidad de 10^8 M en relación con **(a)**.

cuentra inducido por múltiples interacciones débiles con el sustrato. Esta situación se conoce como **encaje inducido,** mecanismo postulado por Daniel Koshland en el año 1958. El encaje inducido puede servir para disponer grupos específicos funcionales del enzima en la orientación adecuada para catalizar la reacción. El cambio conformacional también permite la formación de interacciones débiles adicionales en el estado de transición. En cualquier caso, la nueva conformación del enzima ha incrementado sus propiedades catalíticas. Como ya se ha tratado con anterioridad (véase Capítulo 5), el encaje inducido es una característica habitual en la unión reversible de los ligandos a las proteínas. El encaje inducido también desempeña un papel importante en la interacción de prácticamente todos los enzimas con sus sustratos.

Grupos catalíticos específicos contribuyen a la catálisis

En la mayoría de enzimas, la energía de fijación utilizada para formar el complejo ES es tan sólo una de las diversas contribuciones al mecanismo catalítico general. Una vez unido el sustrato al enzima, grupos funcionales catalíticos situados adecuadamente colaboran en la rotura o formación de enlaces mediante una variedad de mecanismos, entre los que se encuentran la catálisis ácido-base general, la catálisis covalente y la catálisis por iones métalicos. Estos mecanismos son diferentes a los basados en la energía de fijación porque generalmente suponen una interacción *covalente* transitoria con un sustrato o la transferencia de grupos desde o hacia un sustrato.

Catálisis ácido-base general Muchas reacciones bioquímicas suponen la formación de intermediarios cargados inestables que tienden a descomponerse rápidamente en sus especies reactivas constituyentes no pudiendo, de este modo, reaccionar (Fig. 6-8). Los intermediarios cargados a menudo se pueden estabilizar transfiriendo protones a o desde el sustrato o intermediario para formar una especie que se descompone en productos más fácilmente que en reactivos. En las reacciones no enzimáticas, las transferencias de protones pueden utilizar sólo los constituyentes del agua u otros dadores o aceptores débiles de protones. La catálisis que sólo utiliza los iones H^+ (H_3O^+) u OH^- presentes en el agua se denomina **catálisis ácida** o **básica específica.** Si la transferencia de protones entre el intermediario y el agua es más rápida que la descomposición del intermediario en reactivos, el intermediario se estabilizará de manera efectiva cada vez que se forme. En este caso no se producirá catálisis adicional facilitada por otros aceptores o dadores de protones. No obstante, en muchos casos el agua no es suficiente. El término **catálisis ácido-base general** se refiere a transferencias de protones facilitadas por otras clases de moléculas. En reacciones no enzimáticas en solución acuosa, esto se observa solamente cuando la velocidad de descomposición del intermediario inestable en reactivos es mayor que la de transferencia de protones a o desde el agua. Muchos ácidos orgánicos débiles pueden suplementar al agua como dadores de protones en esta situación, al igual que bases orgánicas débiles pueden servir como aceptores de protones.

Varias cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar de modo similar como dadores y aceptores de protones en el sitio activo de un enzima (Fig. 6-9). Estos grupos se pueden posicionar de forma precisa en el sitio activo de un enzima para permitir la transferencia de protones, generando incrementos de velocidad del orden de 10^2 a 10^5. Este tipo de catálisis tiene lugar en la gran mayoría de enzimas. De hecho, las transferencias de protones son las reacciones bioquímicas más habituales.

Catálisis covalente En la catálisis covalente se forma un enlace covalente transitorio entre el enzima y el sustrato. Consideremos la hidrólisis de un enlace entre los grupos A y B:

$$A{-}B \xrightarrow{H_2O} A + B$$

En presencia de un catalizador covalente (un enzima con un grupo nucleofílico X:) la reacción se transforma en

$$A{-}B + X: \longrightarrow A{-}X + B \xrightarrow{H_2O} A + X: + B$$

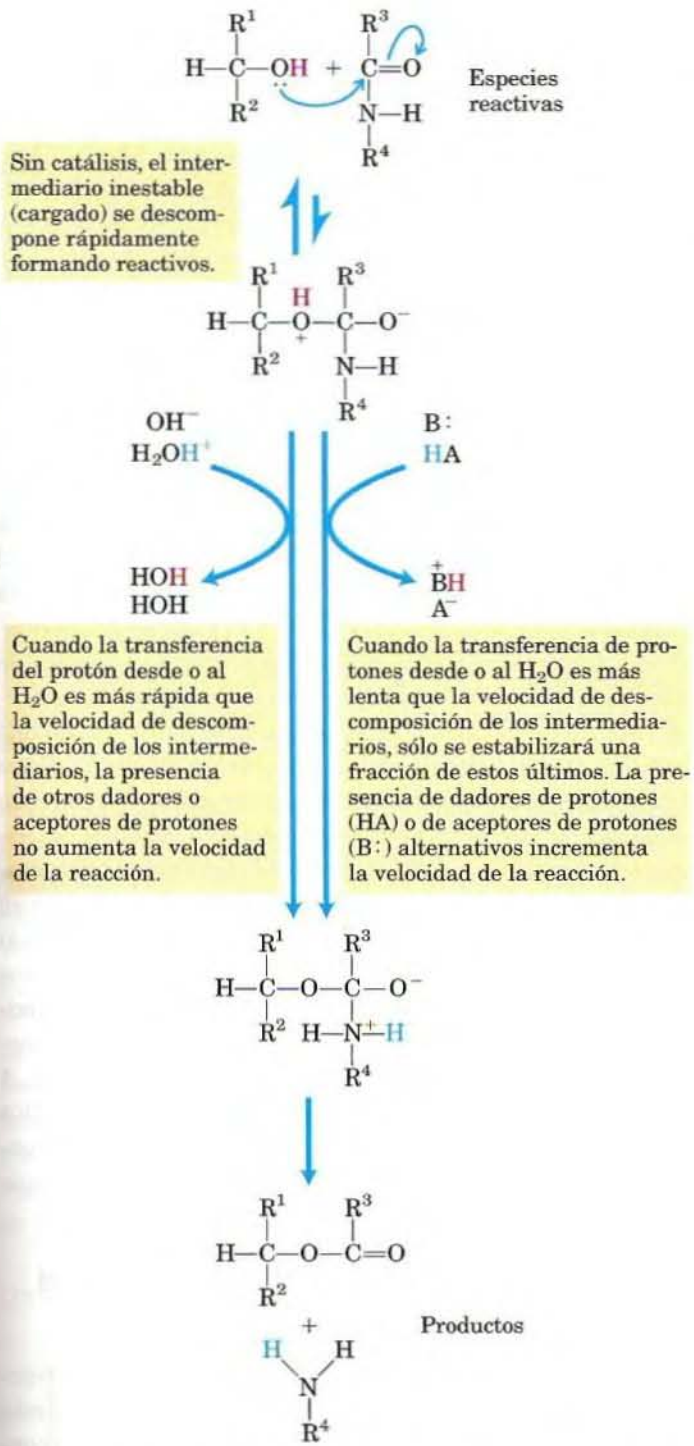


FIGURA 6-8 Modo en que un catalizador supera la formación desfavorable de carga durante la rotura de una amida. Hidrólisis de un enlace amida, la misma reacción que catalizan la quimotripsina y otras proteasas. La formación de carga resulta desfavorable y se puede evitar por la donación de un protón por parte de H_3O^+ (catálisis ácida específica) o HA (catálisis ácida general), donde HA es cualquier ácido. De modo parecido se puede neutralizar la carga por captación del protón por parte de OH^- (catálisis básica específica) o B: (catálisis básica general), donde B: es cualquier base.

Esto altera la ruta de la reacción y sólo produce catálisis si la nueva ruta tiene una energía de activación inferior a la de la ruta no catalizada. Los dos nuevos pasos han de ser más rápidos que la reacción no catalizada. Diversas cadenas laterales de aminoácidos (entre ellas todas las de la Fig. 6-9), así como los grupos funcionales de algunos cofactores enzimáticos, sirven como nucleófilos en algunos enzimas para la formación de enlaces covalentes con los sustratos. Estos complejos covalentes siempre experimentan una reacción adicional con el fin de regenerar el enzima libre. El enlace covalente formado entre el enzima y el sustrato puede activar un sustrato para una nueva reacción de una forma que es normalmente específica para el grupo o coenzima implicado.

Catálisis por iones metálicos Los metales, tanto si están fuertemente unidos al enzima como si son captados de la solución junto con el sustrato, pueden participar de diferentes maneras en la catálisis. Interacciones iónicas entre un metal fijado al enzima y el sustrato pueden ayudar a orientar un sustrato para que reaccione o estabilizar estados de transición de la reacción que estén cargados. Esta utilización de interacciones de fijación débiles entre el metal y el sustrato es similar a algunos de los usos de la energía de fijación enzima-sustrato descrita anteriormente. Los metales también pueden facilitar reacciones de oxidación-reducción mediante cambios reversibles en el estado de oxidación del ion metálico. Casi una tercera parte de los enzimas conocidos requieren uno o más iones metálicos para su actividad catalítica.

La mayoría de enzimas utilizan una combinación de varias estrategias catalíticas para conseguir un incremento de velocidad. Un buen ejemplo de la utilización de la catálisis covalente

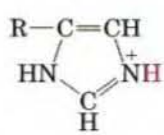
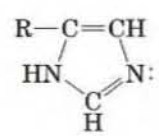
Residuos aminoácidos	Forma ácida general (dador de protones)	Forma básica general (aceptor de protones)
Glu, Asp	R—COOH	R—COO⁻
Lys, Arg	R—NH₂⁺—H	R—NH₂
Cys	R—SH	R—S⁻
His		
Ser	R—OH	R—O⁻
Tyr		

FIGURA 6-9 Aminoácidos implicados en la catálisis ácido-base general. Muchas reacciones orgánicas están favorecidas por dadores (ácidos generales) o aceptores de protones (bases generales). Los sitios activos de algunos enzimas contienen grupos funcionales de aminoácidos, tales como los que aquí se muestran, que pueden participar en el proceso catalítico como dadores o aceptores de protones.

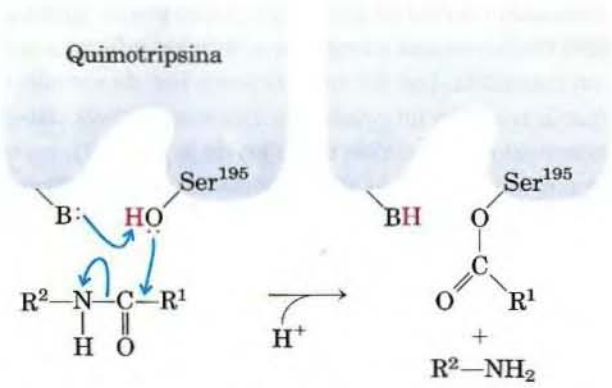


FIGURA 6-10 Catálisis ácido-base general y covalente. El primer paso de la reacción catalizada por la quimotripsina es el paso de acilación. El grupo hidroxilo de la Ser^{195} es el nucleófilo en una reacción en la que colabora la catálisis básica general (la base es la cadena lateral de la His^{57}). Ello proporciona una nueva vía para la hidrólisis del enlace peptídico. La catálisis solamente se produce si cada etapa de la nueva vía es más rápida que la reacción no catalizada. La reacción de la quimotripsina se describe con mayor detalle en la Figura 6-21.

junto con la catálisis ácido-base general se da en la reacción catalizada por la quimotripsina. El primer paso es la rotura de un enlace peptídico, acompañada por la formación de una unión covalente entre un residuo de Ser en el enzima y una parte del sustrato; esta reacción es facilitada por catálisis básica general a cargo de otros grupos catalíticos del enzima (Fig. 6-10). La reacción de la quimotripsina se describe con mayor detalle en la Sección 6.4.

RESUMEN 6.2 ¿Cómo funcionan los enzimas?

- Los enzimas son catalizadores muy eficientes, capaces de aumentar las velocidades de reacción en un factor de entre 10^5 y 10^{17}.
- Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan por la formación de un complejo entre el sustrato y el enzima (complejo ES). La fijación del sustrato se produce en una bolsa del enzima llamada sitio activo.
- La función de los enzimas y de otros catalizadores consiste en disminuir la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, de una reacción con el fin de incrementar su velocidad. El equilibrio de una reacción no es afectado por el enzima.
- Una parte significativa de la energía utilizada para el incremento de la velocidad de las reacciones enzimáticas procede de interacciones débiles (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas) entre enzima y sustrato. El sitio activo del enzima tiene una estructura tal que hace que algunas de estas interacciones débiles tengan lugar de modo preferente en el estado de transición de la reacción, con lo que lo estabilizan. Una de las razones del gran tamaño de los enzimas es la necesidad de que existan múltiples interacciones. La energía de fijación, ΔG_B, puede utilizarse para disminuir la entropía del sustrato o para producir un cambio conformacional en el enzima (encaje inducido). La energía de fijación es también la responsable de la exquisita especificidad de los enzimas por sus sustratos.
- Entre los mecanismos catalíticos adicionales empleados por los enzimas se cuentan la catálisis ácido-base general, la catálisis covalente y la catálisis por iones metálicos. La catálisis suele implicar la existencia de interacciones covalentes transitorias entre el sustrato y el enzima o transferencias de grupos desde o al enzima, con el fin de adoptar una ruta de reacción nueva y de menor energía.

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

Los bioquímicos utilizan normalmente diversos métodos para estudiar el mecanismo de acción de enzimas purificados. El conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína proporciona información importante y el valor de la información estructural aumenta en gran manera con la química de proteínas clásica y con los modernos métodos de la mutagénesis dirigida (el cambio de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante ingeniería genética; véase Fig. 9-12). Estas tecnologías permiten a los enzimólogos examinar el papel de aminoácidos concretos en la estructura y en la acción del enzima. No obstante, el método principal para estudiar el mecanismo de una reacción catalizada enzimáticamente consiste en la determinación de la *velocidad* de la reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales, una disciplina conocida como **cinética enzimática.** Éste es el método más antiguo para conocer el mecanismo enzimático y continúa siendo el más importante. A continuación se expone una introducción básica a la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas. Se pueden encontrar tratamientos más avanzados en los textos y artículos que se citan al final de este capítulo.

La concentración del sustrato afecta a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas

Uno de los factores clave que afectan a la velocidad de una reacción catalizada por un enzima es la concentración de sustrato presente, [S]. Sin embargo, el estudio de los efectos de la concentración de sustrato es complicado debido al hecho de que [S] cambia durante el transcurso de una reacción a medida que el sustrato se convierte en producto. Una aproximación simplificadora en los experimentos cinéticos consiste en medir la **velocidad inicial,** llamada V_0, cuando [S] es mucho mayor que la concentración de enzima, [E]. En una reacción típica, el enzima puede estar presente en concentraciones del orden nanomolar, mientras que [S] puede ser cinco o seis órdenes de magnitud mayor. Si sólo se toman datos del inicio de la reac-

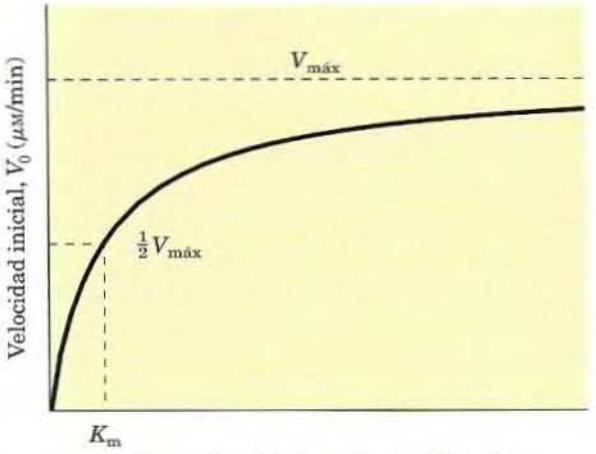


FIGURA 6-11 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por un enzima. En una gráfica de este tipo sólo se puede obtener una aproximación de $V_{máx}$ por extrapolación debido a que V_0 se acercará pero nunca alcanzará $V_{máx}$. La concentración de sustrato a la que V_0 es la mitad de la máxima es K_m, la constante de Michaelis. En un experimento de este tipo la concentración de enzima E es generalmente tan baja que [S] >> [E] incluso cuando [S] se describe como baja o relativamente baja. Las unidades reseñadas son típicas de las reacciones catalizadas por enzimas y sólo se muestran aquí para ayudar a ilustrar el significado de V_0 y [S]. (Obsérvese que la curva describe *parte* de una hipérbola rectangular con una asíntota en $V_{máx}$. Si se continuase la curva por debajo de [S] = 0 se aproximaría a una asíntota vertical a [S] = $-K_m$.)

ción (a menudo 60 segundos o menos), los cambios en [S] se limitan a un pequeño porcentaje y puede considerarse que la concentración permanece constante. En esta situación puede explorarse el valor de V_0 en función de [S], valor que es ajustado por el investigador. El efecto de la variación de [S] sobre V_0 cuando se mantiene constante la concentración de enzima se muestra en la Figura 6-11. A concentraciones de sustrato relativamente bajas, V_0 aumenta casi linealmente con el incremento de [S]. A mayores concentraciones de sustrato, V_0 aumenta a incrementos cada vez menores en respuesta a incrementos de [S]. Finalmente, se alcanza un punto más allá del cual se dan incrementos pequeñísimos de V_0 con el incremento de [S]. Esta meseta se denomina **velocidad máxima, $V_{máx}$**.

El complejo ES constituye la clave para entender este comportamiento cinético, del mismo modo que representó un punto de partida para la discusión de la catálisis. El patrón cinético de la Figura 6-11 hizo que Victor Henri, siguiendo una sugerencia de Wurtz, propusiese en 1903 que la combinación de un enzima con su molécula de sustrato para formar el complejo ES es un paso necesario en la catálisis enzimática. Esta idea fue ampliada para dar lugar a una teoría general de la acción enzimática, en particular a cargo de Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913, quienes postularon que el enzima se combina en primer lugar de forma reversible con su sustrato formando un complejo enzima-sustrato en un paso reversible relativamente rápido:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (6\text{–}7)$$

El complejo ES se descompone seguidamente en un segundo paso más lento dando el enzima libre y el producto de la reacción P:

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (6\text{–}8)$$

La segunda reacción (Ec. 6-8) es más lenta y limita, por tanto, la velocidad de la reacción global. De ahí se desprende que la velocidad global de la reacción catalizada enzimáticamente ha de ser proporcional a la concentración de la especie que reacciona en el segundo paso, es decir, ES.

En cualquier momento de una reacción catalizada por un enzima, éste existe en dos formas, la forma libre o sin combinar E y la forma combinada ES. A baja [S], la mayor parte del enzima estará en la forma sin combinar E. Aquí la velocidad será proporcional a [S] porque el equilibrio de la Ecuación 6-7 será empujado hacia la formación de más ES a medida que [S] aumenta. La velocidad inicial máxima de la reacción catalizada ($V_{máx}$) se observará cuando virtualmente todo el enzima esté en forma de complejo ES y la concentración de E sea extremadamente pequeña. En estas condiciones, el enzima está "saturado" con su sustrato de modo que el aumento adicional de [S] no tendrá efecto sobre la velocidad. Esta condición se producirá cuando [S] sea lo suficientemente alta como para que todo el enzima libre se haya convertido en la forma ES. Cuando el complejo ES se descompone dando el producto P, el enzima queda libre para catalizar la otra reacción de otra molécula de sustrato. El efecto de saturación es una característica distintiva de la catálisis enzimática y es el responsable de la meseta observada en la Figura 6-11. El modelo seguido en la Figura 6-11 recibe en ocasiones el nombre de cinética de saturación.

Cuando el enzima se mezcla inicialmente con un gran exceso de sustrato, existe un período inicial, denominado **estado pre-estacionario,** durante el cual aumenta la concentración del complejo ES. Normalmente el estado pre-estacionario es demasiado corto para que sea observado fácilmente y dura tan sólo unos microsegundos. La reacción alcanza rápidamente un **estado estacionario** en el que [ES] (y la concentración de otros intermediarios) permanece aproximadamente constante con el tiempo. El concepto de estado estacionario fue presentado por G.E. Briggs y Haldane en 1925. La V_0 medida refleja generalmente el estado estacionario, aun cuando V_0 se limite a los primeros instantes de la reacción, y el análisis de

Leonor Michaelis, 1875–1949

Maud Menten, 1879–1960

las velocidades iniciales se conoce como **cinética del estado estacionario.**

La relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción se puede expresar de manera cuantitativa

La curva que representa la relación entre [S] y V_0 (Fig. 6-11) tiene la misma forma general para la mayoría de enzimas (se acerca a una hipérbola rectangular) y se puede expresar algebraicamente mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Estos investigadores dedujeron esta ecuación a partir de su hipótesis básica de que el paso limitante de velocidad en las reacciones enzimáticas es la descomposición del complejo ES para formar el producto y el enzima libre. La ecuación es

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}9)$$

Los términos importantes son [S], V_0, $V_{máx}$ y una constante llamada constante de Michaelis o K_m. Todos estos términos se pueden medir fácilmente de manera experimental.

Aquí desarrollaremos la lógica básica y los pasos algebraicos en una deducción moderna de la ecuación de Michaelis-Menten, la cual incluye la suposición del estado estacionario introducida por Briggs y Haldane. La deducción se inicia con las dos reacciones básicas que intervienen en la formación y descomposición de ES (Ecs. 6-7 y 6-8). En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto [P] es despreciable y se hace la suposición simplificadora de que puede ignorarse la reacción inversa P → S (descrita por k_{-2}). Esta suposición no es crítica y simplifica nuestra tarea. La reacción global se reduce a

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (6\text{–}10)$$

V_0 se determina por la descomposición de ES para dar producto, la que viene fijada por [ES]:

$$V_0 = k_2[ES] \qquad (6\text{–}11)$$

Dado que [ES] de la Ecuación 6-11 no se puede medir experimentalmente con facilidad, hemos de empezar por encontrar una expresión alternativa para este término. En primer lugar introduciremos el término $[E_t]$, que representa la concentración total de enzima (la suma de enzima libre y enzima unido al sustrato). El enzima libre, o no fijado, se puede representar, por tanto, como $[E_t] - [ES]$. Además, debido a que [S] es normalmente mucho mayor que $[E_t]$, la cantidad de sustrato fijada por el enzima en cualquier momento de la reacción es despreciable comparada con la [S] total. Con estas consideraciones, los pasos siguientes nos conducirán a una expresión de V_0 en función de parámetros que se miden fácilmente.

Paso 1 Las velocidades de formación y descomposición de ES vienen determinadas por las constantes de velocidad k_1 (formación) y $k_{-1} + k_2$ (descomposición), según las expresiones siguientes:

$$\text{Velocidad de formación de ES} = k_1([E_t] - [ES])[S] \qquad (6\text{–}12)$$

$$\text{Velocidad de descomposición de ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (6\text{–}13)$$

Paso 2 Suponemos ahora una importante consideración: que la velocidad inicial de reacción refleja un estado estacionario en el que [ES] es constante, es decir, la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de descomposición. A esto se lo denomina **hipótesis del estado estacionario.** Las expresiones de las Ecuaciones 6-12 y 6-13 pueden igualarse en el estado estacionario dando:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (6\text{–}14)$$

Paso 3 Se realiza una serie de pasos algebraicos para resolver la Ecuación 6-14 en función de [ES]. Se resuelve el primer miembro y se saca factor común en el segundo

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (6\text{–}15)$$

Sumando el término $k_1[ES][S]$ a ambos lados de la ecuación y simplificando da

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (6\text{–}16)$$

Despejando [ES] se obtiene:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \qquad (6\text{–}17)$$

Esta expresión aún se puede simplificar más, combinando todas las constantes de velocidad en una expresión:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \qquad (6\text{–}18)$$

El término $(k_2 + k_{-1})/k_1$ se define como la **constante de Michaelis-Menten, K_m.** Sustituyéndola ahora en la Ecuación 6-18 la expresión se simplifica a

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}19)$$

Paso 4 Ahora podemos expresar V_0 en función de [ES]. Sustituyendo [ES] por el segundo miembro de la Ecuación 6-19 en la Ecuación 6-11, obtenemos

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}20)$$

Esta ecuación aún se puede simplificar más. Dado que la velocidad máxima se obtendrá cuando el enzima está saturado (es decir, cuando $[ES] = [E_t]$), $V_{máx}$ se puede definir como $k_2[E_t]$. Sustituyendo esto en la Ecuación 6-20 da la Ecuación 6-9:

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Ésta es la **ecuación de Michaelis-Menten,** la **ecuación de velocidad** de una reacción catalizada enzimáticamente con un sustrato. Es una definición de la relación cuantitativa entre la velocidad inicial V_0, la velocidad máxima $V_{máx}$ y la concentración inicial de sustrato [S], todos ellos relacionados a través

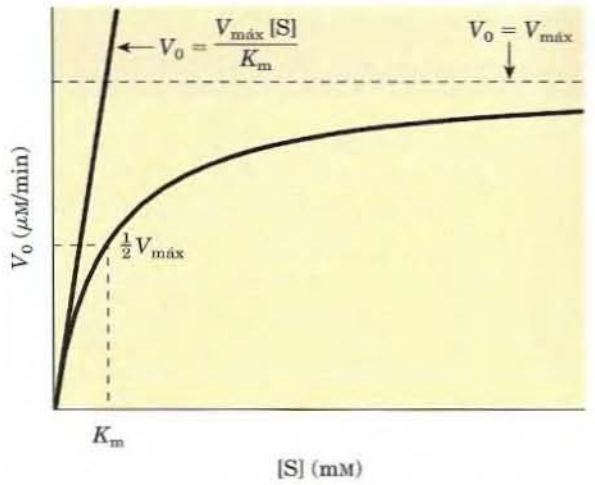


FIGURA 6-12 Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración de sustrato. En el gráfico se muestran los parámetros cinéticos que definen los límites de la curva a [S] alta y baja. A baja [S], $K_m >>$ [S], por lo que el término [S] del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 6-9) es insignificante; la ecuación se simplifica a $V_0 = V_{máx}$ [S]/K_m por lo que V_0 tiene una dependencia lineal con respecto a [S] tal como se observa. A [S] alta, en donde [S] $>> K_m$, el término K_m del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten es insignificante, simplificándose la reacción a $V_0 = V_{máx}$; esto coincide con la meseta que se observa a [S] elevada. La ecuación de Michaelis-Menten es, pues, congruente con la dependencia observada de V_0 con respecto a [S] y la forma de la curva está definida por los términos $V_{máx}/K_m$ a baja [S] y $V_{máx}$ a alta [S].

de la constante de Michaelis, K_m. Obsérvese que K_m tiene unidades de concentración. ¿Se ajusta esta ecuación a los hechos? Sí, podemos confirmar esto considerando las situaciones límite donde [S] es muy alta o muy baja (Fig. 6-12).

De la ecuación de Michaelis-Menten emerge una relación numérica importante en el caso especial en que V_0 sea exactamente la mitad de $V_{máx}$ (Fig. 6-12). En ese caso

$$\frac{V_{máx}}{2} = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}21)$$

Al dividir por $V_{máx}$ obtenemos

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}22)$$

Despejando K_m, obtenemos $K_m + [S] = 2[S]$, o

$$K_m = [S], \text{ cuando } V_0 = \frac{1}{2}V_{máx} \qquad (6\text{–}23)$$

Se trata de una definición práctica de K_m que resulta muy útil: K_m es equivalente a la concentración de sustrato a la cual V_0 es la mitad de $V_{máx}$.

La ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 6-9) puede transformarse algebraicamente en formas que son útiles para la determinación práctica de K_m y $V_{máx}$ (Recuadro 6-1) y, tal como describiremos más adelante, en el análisis de la acción de los inhibidores (véase Recuadro 6-2 en p. 210).

Para comparar las actividades enzimáticas se utilizan los parámetros cinéticos

Es importante distinguir entre la ecuación de Michaelis-Menten y el mecanismo cinético específico sobre el que se basó originalmente. La ecuación describe el comportamiento cinético de muchos enzimas, diciéndose de todos los enzimas que muestran una dependencia hiperbólica de V_0 frente a [S] que siguen una **cinética de Michaelis-Menten.** La regla práctica de que K_m = [S] cuando $V_0 = {}^1/_2 V_{máx}$ (Ec. 6-23) es válida para todos los enzimas que siguen una cinética de Michaelis-Menten. (Las principales excepciones a la cinética de Michaelis-Menten son los enzimas reguladores, que se tratan en la Sección 6.5.) Sin embargo, la ecuación de Michaelis-Menten no depende del mecanismo relativamente sencillo de dos pasos propuesto por Michaelis y Menten (Ec. 6-10). Muchos enzimas que siguen cinética de Michaelis-Menten tienen mecanismos de reacción muy diferentes y enzimas que catalizan reacciones con seis u ocho pasos identificables muestran, a menudo, el mismo comportamiento cinético en el estado estacionario. Aunque la Ecuación 6-23 es válida para muchos enzimas, tanto la magnitud como el significado real de $V_{máx}$ y de K_m pueden cambiar de un enzima a otro. Ésta es una limitación importante de la aproximación del estado estacionario a la cinética enzimática. $V_{máx}$ y K_m son parámetros que se pueden obtener experimentalmente para cualquier enzima, pero que por sí mismos proporcionan muy poca información acerca del número, velocidad o naturaleza química de cada uno de los pasos discretos de la reacción. La cinética del estado estacionario representa, no obstante, el lenguaje estándar mediante el cual se caracterizan y comparan las eficacias catalíticas de los enzimas.

Interpretación de $V_{máx}$ y de K_m En la Figura 6-12 se muestra un método gráfico sencillo para obtener un valor aproximado de K_m. Un procedimiento más práctico, utilizando una **gráfica de dobles recíprocos,** se presenta en el Recuadro 6-1. La K_m puede variar considerablemente de enzima a enzima e incluso para diferentes sustratos del mismo enzima (Tabla 6-6). A veces el término se utiliza (inadecuadamente) como una indicación de la afinidad de un enzima por su sustrato. El significado

TABLA 6-6 K_m de algunos enzimas y sustratos

Enzima	*Sustrato*	K_m (mM)
Hexoquinasa (cerebro)	ATP	0,4
	D-Glucosa	0,05
	D-Fructosa	1,5
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-Benzoiltirosinamida	2,5
β-Galactosidasa	D-Lactosa	4,0
Treonina deshidratasa	L-Treonina	5,0

RECUADRO 6-1 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten: gráfica de dobles recíprocos

La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + [S]}$$

se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales. Una transformación común se deduce simplemente tomando los inversos en ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten, obteniéndose:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx}\,[S]}$$

Separando los componentes del numerador en el segundo miembro de la ecuación da

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}\,[S]} + \frac{[S]}{V_{máx}\,[S]}$$

que se simplifica a

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}\,[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Esta ecuación es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten denominada **ecuación de Lineweaver-Burk.** Para los enzimas que obedecen a la relación de Michaelis-Menten la gráfica de $1/V_0$ frente a 1/[S] (el "doble recíproco" de la gráfica V_0 frente a [S] que hemos utilizado hasta este momento) da una línea recta (Fig. 1). Esta línea tiene una pendiente igual a $K_m/V_{máx}$, la intersección sobre el eje $1/V_0$ es $1/V_{máx}$ y la intersección sobre el eje 1/[S] es igual a $-1/K_m$. La gráfica de dobles recíprocos, también denominada de Lineweaver-Burk, tiene la gran ventaja de permitir una determinación mucho más precisa de $V_{máx}$, la cual sólo puede ser obtenida *aproximadamente* a partir de una gráfica simple de V_0 frente a [S] (véase Fig. 6-12).

Se han deducido y utilizado otras transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten. Cada una de ellas tiene alguna ventaja para analizar los datos cinéticos enzimáticos. (Véase Problema 11 al final del capítulo.)

La gráfica de los dobles recíprocos de las velocidades de reacción es muy útil para distinguir entre ciertos tipos de mecanismos de reacción enzimáticos (véase Fig. 6-14) y para analizar la inhibición enzimática (véase Recuadro 6-2).

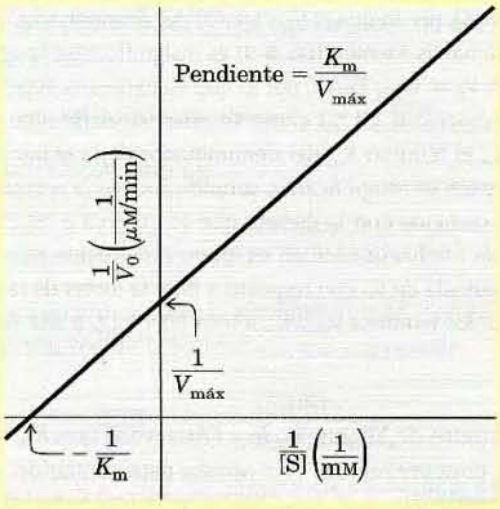


FIGURA 1 Gráfica de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk.

real de K_m depende de aspectos específicos del mecanismo de reacción tales como el número y las velocidades relativas de cada paso de la reacción. Para reacciones con dos pasos,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \qquad (6\text{–}24)$$

Cuando k_2 es limitante de velocidad, $k_2 << k_{-1}$, por lo que K_m se simplifica a k_{-1}/k_1, lo que se define como **constante de disociación, K_d,** del complejo ES. Cuando se dan estas condiciones, K_m representa una medida de la afinidad del enzima por su sustrato en el complejo ES. Sin embargo, esta situación no es válida para la mayoría de enzimas. A veces, $k_2 >> k_{-1}$, por lo que $K_m = k_2/k_1$. En otros casos, k_2 y k_{-1} son comparables, por lo que K_m es una función más compleja de las tres constantes de velocidad (Ec. 6-24). La ecuación de Michaelis-Menten y el comportamiento de saturación característico del enzima continúan siendo válidos, pero K_m no se puede considerar como una medida sencilla de la afinidad por el sustrato. Aún son más comunes los casos en los que la reacción transcurre a través de múltiples pasos después de la formación del complejo ES; en estas condiciones K_m es una función muy compleja de muchas constantes de velocidad.

$V_{máx}$ también varía considerablemente de un enzima a otro. Si un enzima reacciona según el mecanismo de Michaelis-Menten de dos pasos, $V_{máx} = k_2[E_t]$, en donde k_2 es el paso limitante de velocidad. No obstante, el número de pasos en la reacción y la identidad del paso (o pasos) limitante de velocidad puede variar de un enzima a otro. Por ejemplo, consideremos la situación en la que la liberación del producto, EP → E + P, es el paso limitante de velocidad. Al inicio de la reacción (cuando la [P] es baja), la reacción es

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \overset{k_3}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (6\text{–}25)$$

En este caso, la mayor parte del enzima se encuentra en la forma EP en condiciones de saturación, con lo que $V_{máx} = k_3[E_t]$. Es útil definir una constante de velocidad más general, k_{cat}, para describir la velocidad limitante de cualquier reacción enzimática en condiciones de saturación. Si hay varios pasos en la reacción y uno de ellos es claramente limitante, k_{cat} es equivalente a la constante de velocidad del paso limitante. Para la sencilla reacción de la Ecuación 6-10, $k_{cat} = k_2$. Para la reacción de la Ecuación 6-25, $k_{cat} = k_3$. Cuando hay varios pasos

que son parcialmente limitantes de velocidad, k_{cat} es una función compleja de varias constantes de velocidad que definen cada paso individual de la reacción. En la ecuación de Michaelis-Menten, $k_{cat} = V_{máx}/[E_t]$, con lo que la Ecuación 6-9 se transforma en

$$V_0 = \frac{k_{cat}\,[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}26)$$

La constante k_{cat} es una constante de velocidad de primer orden con unidades de tiempos inversos y recibe también el nombre de **número de recambio.** Es equivalente al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo en una sola molécula de enzima cuando el enzima está saturado con el sustrato. En la Tabla 6-7 se indican los números de recambio de varios enzimas.

TABLA 6–7 Números de recambio, k_{cat}, de algunos enzimas

Enzima	*Sustrato*	k_{cat} (s^{-1})
Catalasa	H_2O_2	40.000.000
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	14.000
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	2000
Fumarasa	Fumarato	800
Proteína RecA (una ATPasa)	ATP	0,4

Comparación de mecanismos y eficiencias catalíticas Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m son generalmente útiles para el estudio y comparación de diversos enzimas tanto si sus mecanismos de reacción son sencillos como si son complejos. Cada enzima tiene valores de k_{cat} y de K_m que reflejan el ambiente celular, la concentración de sustrato encontrada normalmente in vivo por el enzima y la química de la reacción catalizada.

Los parámetros k_{cat} y K_m nos permiten también evaluar la eficiencia cinética de los enzimas, pero para este fin no es suficiente uno solo de los parámetros aislados. Dos enzimas que catalizan reacciones diferentes pueden tener la misma k_{cat} (número de recambio) y, no obstante, las velocidades de las reacciones sin catalizar pueden ser diferentes, con lo que los incrementos de velocidad producidos por los enzimas pueden variar mucho. Experimentalmente, la K_m para un enzima tiende a ser igual a la concentración celular de su sustrato. Un enzima que actúa sobre un sustrato presente a muy baja concentración en la célula tenderá a tener una K_m inferior a la de un enzima que actúa sobre un sustrato normalmente abundante.

La mejor manera de comparar las eficiencias catalíticas de diferentes enzimas o el recambio de diferentes sustratos por el mismo enzima es comparando la relación k_{cat}/K_m para las dos reacciones. Este parámetro, conocido a veces como **constante de especificidad,** es la constante de velocidad para la conversión de E+S a E+P. Cuando $[S] << K_m$, la Ecuación 6-26 se simplifica a

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S] \qquad (6\text{–}27)$$

En este caso V_0 depende de la concentración de dos reactivos, $[E_t]$ y [S]; por tanto, ésta es una ecuación de velocidad de segundo orden y la constante k_{cat}/K_m es una constante de velocidad de segundo orden con unidades $M^{-1}s^{-1}$. Existe un límite superior de k_{cat}/K_m, impuesto por la velocidad a la que E y S pueden difundir conjuntamente en una solución. Este límite controlado por difusión está entre 10^8 y 10^9 $M^{-1}s^{-1}$. Hay muchos enzimas que tienen un valor de k_{cat}/K_m cercano a este límite (Tabla 6-8). Se dice que estos enzimas han alcanzado la perfección catálitica. Obsérvese que la relación máxima puede obtenerse con valores diferentes de k_{cat} y K_m.

Muchos enzimas catalizan reacciones en las que intervienen dos o más sustratos

Hemos visto de qué modo afecta la [S] a la velocidad de una reacción enzimática sencilla (S → P) en la que hay una sola molécula de sustrato. No obstante, en muchas reacciones enzimáticas, se fijan al enzima dos (o incluso más) moléculas de sustrato diferentes que participan en la reacción. Por ejemplo, en la reacción catalizada por la hexoquinasa, el ATP y la glucosa son las moléculas de sustrato y el ADP y la glucosa 6-fosfato los productos:

ATP + glucosa ⟶ ADP + glucosa 6-fosfato

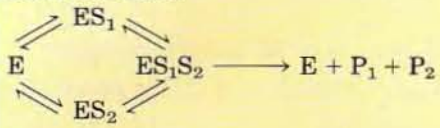
TABLA 6–8 Enzimas para los que k_{cat}/K_m está próxima al límite controlado por difusión (10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$)

Enzima	*Sustrato*	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	$1{,}4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1{,}6 \times 10^8$
Carbónico anhidrasa	CO_2	1×10^6	$1{,}2 \times 10^{-2}$	$8{,}3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2{,}6 \times 10^{-2}$	$1{,}5 \times 10^7$
Catalasa	H_2O_2	4×10^7	$1{,}1 \times 10^0$	4×10^7
Crotonasa	Crotonil-CoA	$5{,}7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2{,}8 \times 10^8$
Fumarasa	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1{,}6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2{,}5 \times 10^{-5}$	$3{,}6 \times 10^7$
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	$2{,}0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

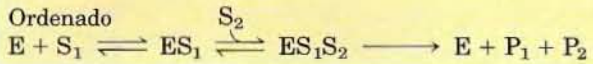
Fuente: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

(a) Reacción enzimática con formación de un complejo ternario

Orden estadístico



Ordenado



(b) Reacción enzimática en la que no se forma un complejo ternario

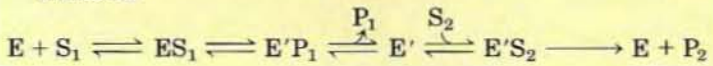


FIGURA 6-13 Mecanismos frecuentes para las reacciones bisustrato catalizadas enzimáticamente. **(a)** El enzima y ambos sustratos se unen formando un complejo ternario. En la fijación ordenada, el sustrato 1 debe unirse antes de que el sustrato 2 se pueda unir de manera productiva. En la unión estadística o al azar, la unión de los sustratos se puede dar en cualquier orden. En **(b)** se forma un complejo enzima-sustrato, un producto abandona el complejo, el enzima modificado forma un segundo complejo con otra molécula de sustrato y sale el segundo producto, regenerando el enzima. El sustrato 1 puede transferir un grupo funcional al enzima (formando E′ modificado covalentemente) que es posteriormente transferido al sustrato 2. Éste es un mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento.

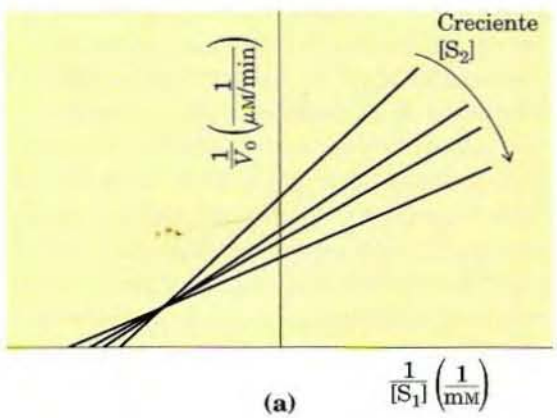
Las velocidades de tales reacciones bisustrato se pueden analizar según el método de Michaelis-Menten. La hexoquinasa tiene una K_m característica para cada uno de sus sustratos (Tabla 6-6).

Las reacciones enzimáticas en las que hay dos sustratos implican normalmente la transferencia de un átomo o un grupo funcional de un sustrato al otro. Tales reacciones transcurren por una o varias rutas diferentes. En algunos casos, ambos sustratos están fijados al enzima al mismo tiempo, formando en algún momento de la reacción un complejo ternario no covalente (Fig. 6-13a); los sustratos pueden fijarse en una secuencia al azar o en un orden específico. En otros casos no se forma complejo ternario cuando el primer sustrato se convierte en producto y se disocia antes de que se una el segundo sustrato. Un ejemplo de esto es el mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento (Fig. 6-13b). La cinética del estado estacionario puede ayudar a menudo a distinguir entre estas posibilidades (Fig. 6-14).

La cinética en el estado pre-estacionario puede aportar pruebas sobre pasos específicos de la reacción

Hemos considerado la cinética como el método principal para el estudio de los pasos de una reacción enzimática y hemos subrayado también las limitaciones de los parámetros cinéticos más comunes para poder proporcionar esta información. Los dos parámetros experimentales más importantes aportados por la cinética en el estado estacionario son k_{cat} y k_{cat}/K_m. La variación de estos parámetros con los cambios de pH o temperatura puede proporcionar en ocasiones información adicional sobre las etapas de una ruta de reacción. En el caso de las reacciones bisustrato, la cinética del estado estacionario puede ayudar a determinar si se forma o no un complejo ternario durante la reacción (Fig. 6-14). Una visión más completa requiere generalmente métodos cinéticos más sofisticados que están fuera del alcance de un texto introductorio. Aquí, introduciremos de manera breve uno de los métodos cinéticos más importantes para estudiar los mecanismos de reacción: la cinética en el estado pre-estacionario.

La descripción completa de una reacción catalizada por un enzima requiere la medida directa de las velocidades de los pasos de reacción individuales, por ejemplo la medición de la asociación de enzima y sustrato para formar el complejo ES. Es durante el estado pre-estacionario cuando se pueden medir de manera independiente las velocidades de muchos pasos de la reacción. Las condiciones de la reacción se ajustan para facilitar la medida de los acontecimientos que tienen lugar du-



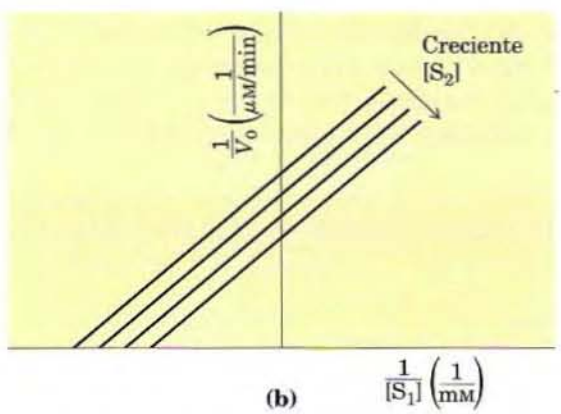


FIGURA 6-14 Análisis cinético en el estado estacionario de las reacciones bisustrato. En estas gráficas de dobles recíprocos (véase Recuadro 6-1) se varía la concentración del sustrato 1 mientras que se mantiene constante la concentración del sustrato 2. Esto se repite para diversos valores de $[S_2]$, con lo que se generan varias líneas separadas. **(a)** Si las líneas se cortan se ha formado un complejo ternario en la reacción; **(b)** si son paralelas, la reacción transcurre a través de una ruta ping-pong o de doble desplazamiento.

rante la reacción de una sola molécula de sustrato. Dado que la fase del estado pre-estacionario de una reacción es generalmente muy corta, se requieren técnicas especializadas para la mezcla y obtención muy rápida de muestras y datos. Uno de los objetivos es disponer de una visión completa y cuantitativa del transcurso energético de la reacción. Tal como ya hemos observado, las velocidades de reacción y los equilibrios están relacionados con las variaciones de energía libre que se producen durante la reacción. La medición de los pasos individuales de la reacción define de qué modo utiliza la energía un enzima dado, lo que representa un componente importante del mecanismo de reacción global. En algunos casos ha sido posible medir las velocidades de cada paso en una reacción con diversos pasos. En las descripciones de enzimas específicos que se dan más adelante en la Sección 6.4 se incluyen algunos ejemplos de la aplicación de la cinética en el estado pre-estacionario.

Los enzimas están sujetos a inhibición reversible o irreversible

Los inhibidores enzimáticos son agentes moleculares que interfieren en la catálisis, haciendo más lentas o deteniendo las reacciones. Los enzimas catalizan virtualmente todos los procesos celulares, por lo que no es sorprendente que los inhibidores enzimáticos se encuentren entre los agentes farmacéuticos más importantes. Por ejemplo, la aspirina (acetilsalicilato) inhibe el enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de prostaglandinas, compuestos que intervienen en muchos procesos, algunos de los cuales producen dolor. El estudio de los inhibidores enzimáticos también ha proporcionado información valiosa sobre mecanismos enzimáticos y ha ayudado a definir algunas rutas metabólicas. Hay dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles.

Inhibición reversible Un tipo de **inhibición reversible** frecuente se denomina competitiva (Fig. 6-15a). Un **inhibidor competitivo** compite con el sustrato por el sitio activo del enzima. Mientras el inhibidor (I) ocupa el sitio activo, impide la fijación del sustrato. Muchos inhibidores competitivos son compuestos que se parecen al sustrato y que se combinan con el enzima formando el complejo EI, pero sin llevarlo a la catálisis. Incluso combinaciones transitorias de este tipo afectarán negativamente a la eficiencia del enzima. Al considerar la geometría molecular de los inhibidores que se parecen al sustrato podemos llegar a menudo a conclusiones sobre qué regiones de un sustrato normal interaccionan con el enzima. La inhibición competitiva se puede analizar cuantitativamente mediante cinética del estado estacionario. En presencia de un inhibidor competitivo, la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 6-9) pasa a ser

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{\alpha K_m + [S]} \qquad (6\text{–}28)$$

donde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{y} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

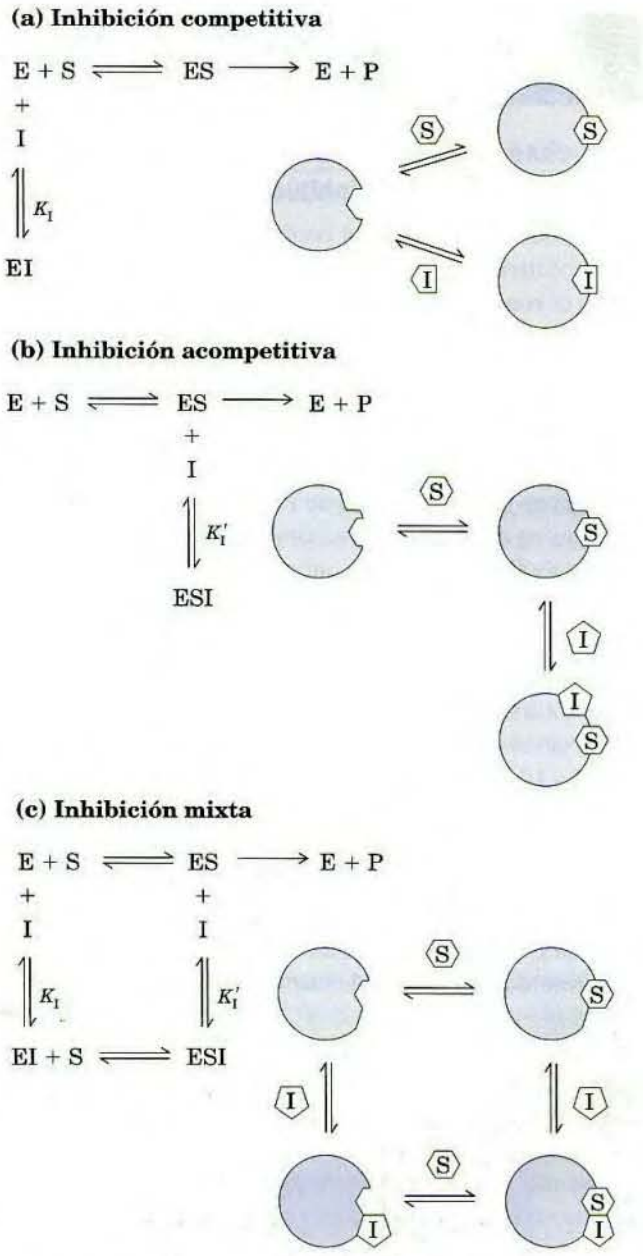


FIGURA 6-15 Tres tipos de inhibición reversible. (a) Los inhibidores competitivos se unen al sitio activo del enzima. **(b)** Los inhibidores acompetitivos se unen en un sitio distinto, pero sólo se unen al complejo ES. K_I es la constante de equilibrio de fijación del inhibidor a E, mientras que K_I' es la constante de equilibrio de fijación del inhibidor a ES. **(c)** Los inhibidores mixtos se unen a sitios separados, pero pueden unirse tanto a E como ES.

La Ecuación 6-28 describe las características importantes de la inhibición competitiva. El término αK_m determinado experimentalmente, la K_m observada en presencia de inhibidor, a menudo se denomina K_m "aparente".

Debido a que el inhibidor se une de manera reversible al enzima, se puede cambiar el sentido de la competición en favor del sustrato simplemente con la adición de más sustrato. Cuando [S] excede sobradamente a [I] se minimiza la probabilidad de que se fije una molécula de inhibidor, motivo por el cual la reacción muestra una $V_{máx}$ normal. No obstante, la [S] a la cual $V_0 = \frac{1}{2} V_{máx}$, la K_m aparente, aumentará en presencia

RECUADRO 6-2 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Pruebas cinéticas para determinar los mecanismos de inhibición

La gráfica de los dobles recíprocos (véase Recuadro 6-1) ofrece una forma fácil de determinar si un inhibidor enzimático es competitivo, acompetitivo o mixto. Se llevan a cabo dos grupos de experimentos de velocidad en los que la concentración de enzima se mantiene constante. En el primer grupo [S] también se mantiene constante, lo que permite medir el efecto del incremento de la concentración de inhibidor [I] sobre la velocidad inicial V_0 (no se muestra en la figura). En el segundo grupo [I] se mantiene constante y se varía [S]. En la gráfica de dobles recíprocos se representa $1/V_0$ frente a 1/[S].

La Figura 1 muestra un conjunto de gráficas de dobles recíprocos, una en ausencia de inhibidor y dos a concentraciones diferentes de un inhibidor competitivo. El incremento de [I] da lugar a la producción de una familia de líneas con una intersección común en el eje $1/V_0$ pero con pendientes diferentes. Debido a que la intersección sobre el eje $1/V_0$ es igual a $1/V_{máx}$, podemos ver que $V_{máx}$ no cambia en presencia del inhibidor competitivo. Es decir, independientemente de la concentración de un inhibidor competitivo, hay siempre una concentración de sustrato suficientemente elevada para desplazar al inhibidor del sitio activo del enzima. Sobre la gráfica está la reordenación de la Ecuación 6-28 en la que se basa la representación. Se puede calcular el valor de α a partir del cambio de pendiente para cualquier valor de [I]. Conociendo [I] y α, se puede calcular K_I a partir de la expresión

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

En la inhibición acompetitiva y mixta, representaciones similares de los datos de velocidad dan las familias de líneas que se ven en las Figuras 2 y 3. Los cambios en los puntos de intersección con los ejes indican cambios en $V_{máx}$ y K_m.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

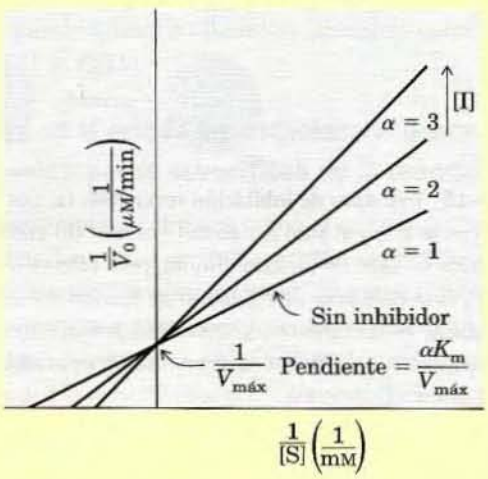


FIGURA 1 Inhibición competitiva.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{máx}}$$

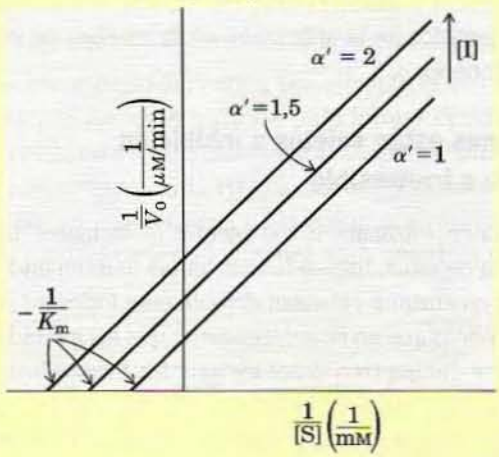


FIGURA 2 Inhibición acompetitiva.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{máx}}$$

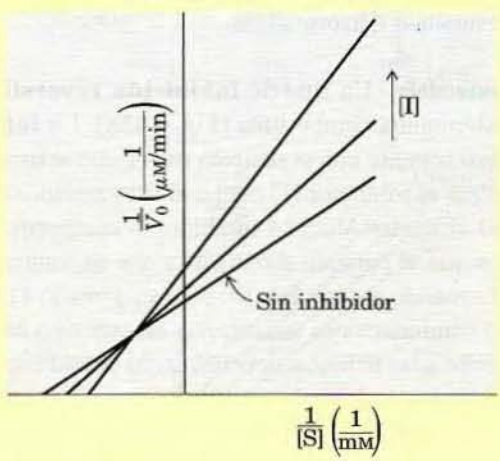


FIGURA 3 Inhibición mixta.

del inhibidor en un factor α. Este efecto sobre la K_m aparente y la ausencia de efecto sobre $V_{máx}$ es diagnóstico de un tipo de inhibición competitiva y se pone de manifiesto fácilmente en una gráfica de dobles recíprocos (Recuadro 6-2). La constante de equilibrio para la fijación del inhibidor, K_I, puede obtenerse a partir de la misma gráfica.

La inhibición competitiva se utiliza en terapia médica para tratar a pacientes que han ingerido metanol, disolvente que se utiliza como anticongelante. El metanol se convierte en formaldehído por acción del enzima del hígado alcohol deshidrogenasa. El formaldehído lesiona muchos tejidos, siendo la ceguera un resultado frecuente de la ingestión de metanol de-

bido a que los ojos son especialmente sensibles al formaldehído. El etanol compite de manera efectiva con el metanol como sustrato de la alcohol deshidrogenasa. El efecto del etanol es muy parecido al de un inhibidor competitivo, con la distinción de que el etanol también es un sustrato y su concentración disminuirá con el tiempo a medida que el enzima lo convierta en acetaldehído. El tratamiento por intoxicación por metanol es la infusión intravenosa lenta de etanol a una velocidad que mantiene una concentración controlada en el torrente sanguíneo durante varias horas. Esto disminuye la formación de formaldehído, reduciendo el peligro mientras los riñones filtran el metanol que se excretará inocuamente por la orina. ■

Hay otros dos tipos de inhibición reversible, acompetitiva y mixta, que a menudo se definen aplicados a enzimas con un solo sustrato pero que en la práctica sólo se observan con enzimas que actúan con dos o más sustratos. Un **inhibidor acompetitivo** (Fig. 6-15b) es el que se fija a un sitio distinto al que se fija el sustrato en el sitio activo y que, a diferencia del inhibidor competitivo, sólo se une al complejo ES. En presencia de un inhibidor acompetitivo, la ecuación de Michaelis-Menten cambia a

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + \alpha'[S]} \qquad \text{(6–29)}$$

donde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \qquad \text{y} \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Como se describe en la Ecuación 6-29, a elevadas concentraciones de sustrato, V_0 se aproxima a $V_{máx}/\alpha'$. Así, un inhibidor acompetitivo disminuye la $V_{máx}$ medida. La K_m aparente también disminuye, debido a que la [S] necesaria para alcanzar la mitad de la $V_{máx}$ disminuye en un factor α'.

Un **inhibidor mixto** (Fig. 6-15c) también se fija a un sitio distinto al del sustrato, pero se fija tanto a E como a ES. La ecuación de velocidad que describe la inhibición mixta es

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \qquad \text{(6–30)}$$

donde α y α' se definen igual que anteriormente. Normalmente, un inhibidor mixto afecta tanto a K_m como a $V_{máx}$. El caso especial en que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado en la práctica, se define clásicamente como **inhibición no competitiva.** Examínese la Ecuación 6-30 para ver por qué un inhibidor no competitivo afectaría a $V_{máx}$ pero no a K_m.

La Ecuación 6-30 se utiliza como una expresión general de los efectos de los inhibidores reversibles, quedando simplificada a las expresiones para la inhibición competitiva y acompetitiva cuando, respectivamente, $\alpha' = 1{,}0$ o $\alpha = 1{,}0$. A partir de esta expresión podemos resumir los efectos de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos individuales. Para todos los inhibidores reversibles se cumple que la $V_{máx}$ aparente es igual a $V_{máx}/\alpha'$, porque el segundo miembro de la Ecuación 6-30 siempre se simplifica a $V_{máx}/\alpha'$ a concentraciones de sustrato suficientemente grandes. En el caso de los inhibidores competitivos, $\alpha' = 1{,}0$ y podemos ignorar este parámetro. A partir de esta expresión para la $V_{máx}$ aparente podemos deducir una expresión para la K_m aparente y demostrar el cambio que se produce en este parámetro en presencia de inhibidores reversibles. La K_m aparente es, como siempre, igual a la [S] a la que V_0 es la mitad de la $V_{máx}$ aparente o, de modo más general, aquella a la que $V_0 = V_{máx}/2\alpha'$. Se llega a esta situación cuando [S] = $\alpha K_m/\alpha'$. De este modo, la K_m aparente es igual a $\alpha K_m/\alpha'$. Esta expresión es más sencilla cuando α o α' es igual a 1,0 (para inhibidores acompetitivos o competitivos), como se resume en la Tabla 6-9.

TABLA 6–9 Efectos de inhibidores revesibles sobre los valores aparentes de $V_{máx}$ y K_m

Tipo de inhibidor	*$V_{máx}$ aparente*	*K_m aparente*
Ninguno	$V_{máx}$	K_m
Competitivo	$V_{máx}$	αK_m
Acompetitivo	$V_{máx}/\alpha'$	K_m/α'
Mixto	$V_{máx}/\alpha'$	$\alpha K_m/\alpha'$

En la práctica, las inhibiciones mixta y acompetitiva sólo se observan en enzimas con dos o más sustratos (p. ej., S_1 y S_2) y son muy importantes en el análisis experimental de estos enzimas. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_1, puede actuar como un inhibidor competitivo en los experimentos en los cuales varía la [S_1]. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_2, puede actuar como un inhibidor mixto o acompetitivo de S_1. Los patrones reales de inhibición observados dependen de si los acontecimientos de fijación de S_1 y S_2 son ordenados o se producen al azar y por consiguiente se puede determinar el orden en que los sustratos se fijan y los productos se liberan del sitio activo. A menudo el uso de uno de los productos de reacción como inhibidor puede ser especialmente informativo. Si sólo está presente uno de los dos productos de reacción, no se puede dar la reacción inversa. Sin embargo, un producto se fijará generalmente en alguna parte del sitio activo para así funcionar como un inhibidor. Los enzimólogos llevan a cabo elaborados estudios cinéticos con diversas combinaciones y cantidades de productos e inhibidores con el fin de obtener una imagen detallada del mecanismo de las reacciones bisustrato.

Inhibición irreversible Los **inhibidores irreversibles** son los que se combinan con o destruyen un grupo del enzima que es esencial para su actividad, o aquellos que forman una asociación no covalente muy estable. Es frecuente la formación de un enlace covalente entre un inhibidor irreversible y un enzima. Los inhibidores irreversibles son también muy útiles para estudiar los mecanismos de reacción. Los aminoácidos con funciones catalíticas clave en el sitio activo pueden ser identificados, en ocasiones, determinando qué aminoácido se ha unido covalentemente a un inhibidor después de la inactivación del enzima. En la Figura 6-16 se muestra un ejemplo.

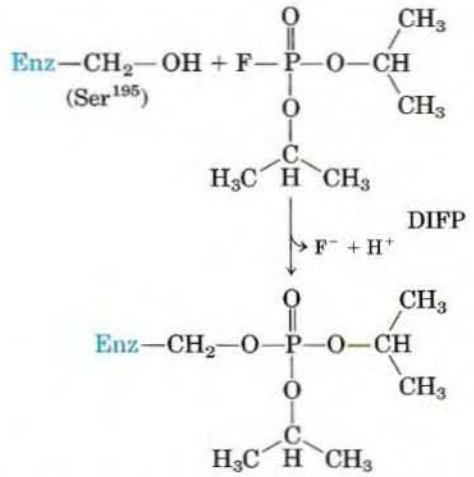


FIGURA 6-16 Inhibición irreversible. La reacción de la quimotripsina con el diisopropilfluorofosfato (DIFP) inhibe el enzima irreversiblemente. Esta reacción condujo al descubrimiento de que la Ser^{195} es la serina clave del sitio activo de la quimotripsina.

Un caso muy especial de inhibidores irreversibles son los **inactivadores suicidas.** Estos compuestos son relativamente poco reactivos hasta que se unen al sitio activo de un enzima específico. Un inactivador suicida pasa a través de los primeros pasos de una reacción enzimática normal, pero a continuación se convierte en un compuesto muy reactivo que se combina irreversiblemente con el enzima en lugar de ser transformado en el producto normal. A estos compuestos también se los llama **inactivadores basados en el mecanismo,** ya que utilizan el mecanismo de reacción enzimático normal para inactivar el enzima. Estos inhibidores juegan un papel central en el *diseño racional de fármacos*, un método moderno para la obtención de nuevos agentes farmacéuticos mediante el que se sintetizan nuevos sustratos sobre la base del conocimiento adquirido sobre sustratos y mecanismos de reacción. Debido a que el inactivador suicida se ha diseñado para un enzima específico y no es reactivo hasta que se halla en el sitio activo del mismo, los fármacos basados en este método son con frecuencia muy efectivos y tienen pocos efectos secundarios (véase Recuadro 22-2).

El pH afecta a la actividad enzimática

Los enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima (Fig. 6-17); a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye. Esto no es sorprendente, dado que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima que dependen del mantenimiento de un cierto estado de ionización, mientras que en otras zonas de la proteína algunas cadenas laterales ionizadas pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantienen la estructura de la proteína. La eliminación de un protón de un residuo de His podría, por ejemplo, eliminar una interacción iónica esencial para la estabilización de la conformación activa del enzima. Menos frecuentes son los casos en los que la sensibilidad al pH tenga relación con la titulación de un grupo del sustrato.

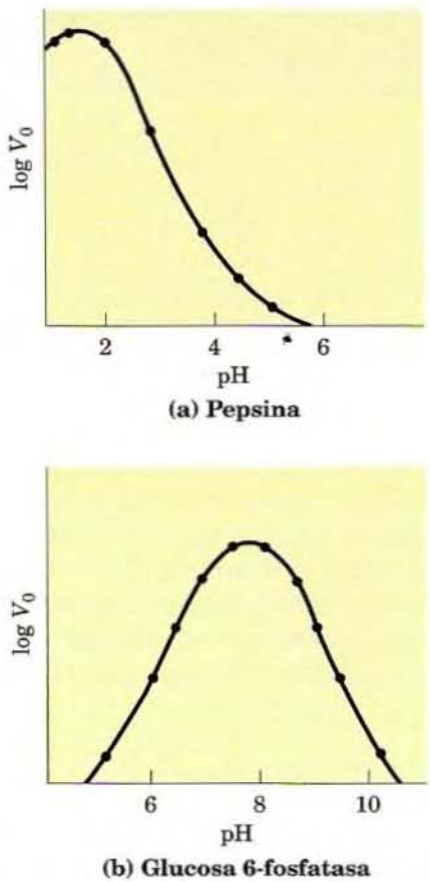


FIGURA 6-17 Perfiles de actividad frente al pH de dos enzimas. Estas curvas se construyen a partir de medidas de las velocidades iniciales cuando la reacción se lleva a cabo en tampones de pH diferentes. Debido a que el pH es una escala logarítmica que expresa cambios de diez veces en la $[H^+]$, los cambios en V_0 también están representados en escala logarítmica. El pH óptimo de actividad de un enzima es generalmente un reflejo del ambiente celular en el que normalmente se encuentra. **(a)** La pepsina, que hidroliza ciertos enlaces peptídicos de proteínas durante la digestión en el estómago, tiene un pH óptimo alrededor de 1,6. El pH del jugo gástrico se encuentra entre 1 y 2. **(b)** La glucosa 6-fosfatasa de los hepatocitos (células del hígado), con un pH óptimo alrededor de 7,8, es responsable de la liberación de glucosa a la sangre. El pH normal del citosol de los hepatocitos está alrededor de 7,2.

El intervalo de pH en el que cambia la actividad puede proporcionar alguna pista sobre qué aminoácido está implicado (véase Tabla 3-1). Por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática cerca de pH 7,0 refleja frecuentemente la titulación de un residuo de His. No obstante, el efecto del pH ha de interpretarse con cautela. En el ambiente compacto de una proteína, el pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos puede cambiar significativamente. Por ejemplo, una carga positiva próxima puede disminuir el pK_a de un residuo de Lys mientras que la proximidad de una carga negativa puede aumentarlo. Estos efectos dan lugar, en ocasiones, a valores de pK_a que varían en varias unidades en comparación con los de los aminoácidos libres. Por ejemplo, en el enzima acetoacetato descarboxilasa hay un residuo de Lys que tiene un pK_a de 6,6 (el normal de la lisina libre es 10,5) debido a efectos electrostáticos de cargas positivas cercanas.

RESUMEN 6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

- Muchos enzimas comparten algunas propiedades cinéticas. Cuando se añade sustrato a un enzima, la reacción enseguida llega a un estado estacionario en el que la velocidad a la que se forma el complejo ES se equilibra con la velocidad a la que reacciona. Al aumentar [S] la actividad de un enzima a concentración fija en el estado estacionario aumenta siguiendo una curva hiperbólica que tiende a su máximo valor de velocidad, $V_{máx}$, en el cual casi todo el enzima ha formado complejo con su sustrato.
- La concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de $V_{máx}$ es la constante de Michaelis, K_m, que es característica de cada enzima que actúa sobre un sustrato determinado. La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

  relaciona la velocidad inicial con [S] y $V_{máx}$ a través de la constante K_m. La cinética de Michaelis-Menten se denomina también cinética del estado estacionario.
- K_m y $V_{máx}$ tienen significados diferentes para diferentes enzimas. La velocidad limitante de una reacción catalizada por un enzima en condiciones de saturación se describe mediante la constante k_{cat}, o número de recambio. La relación k_{cat}/K_m proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica. La ecuación de Michaelis-Menten también es aplicable a reacciones bisustrato, que tienen lugar a través de la formación de complejos ternarios o mediante mecanismos ping-pong (de doble desplazamiento).
- La inhibición reversible de un enzima puede ser competitiva, acompetitiva o mixta. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por su unión reversible al sitio activo, pero no son transformados por el enzima. Los inhibidores acompetitivos se unen tan sólo al complejo ES y en un sitio distinto del sitio activo. Los inhibidores mixtos se unen a E o a ES y también en un sitio distinto del sitio activo. Un inhibidor irreversible se une permanentemente a un sitio activo, ya sea formando un enlace covalente o una interacción no covalente muy estable.
- Todos los enzimas tienen un pH óptimo (o un margen de pH óptimo) en el que presentan la máxima actividad.

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

Este capítulo se ha centrado hasta ahora en los principios generales de la catálisis y en una introducción a algunos de los parámetros cinéticos utilizados para describir la acción enzimática. Nos dedicaremos ahora a algunos ejemplos específicos de mecanismos de reacción enzimáticos.

La comprensión del mecanismo de acción completo de un enzima purificado requiere la identificación de todos los sustratos, cofactores, productos y reguladores. Además requiere un conocimiento de (1) la secuencia temporal en la que se producen los intermediarios de reacción unidos al enzima, (2) la estructura de cada intermediario y de cada estado de transición, (3) las velocidades de interconversión entre los intermediarios, (4) la relación estructural del enzima con cada intermediario y (5) las contribuciones energéticas de todos los grupos reactivos e interaccionantes con respecto a los complejos intermedios y a los estados de transición. Probablemente no existe de momento ningún enzima del que conozcamos todos estos datos. No obstante, la investigación durante muchas décadas ha generado información mecanística sobre centenares de enzimas, siendo ésta en algunos casos muy detallada.

A continuación se presentan los mecanismos de cuatro enzimas: quimotripsina, hexoquinasa, enolasa y lisozima. Con ellos no se pretende cubrir todo el espectro de la química enzimática. Su elección se debe en parte a que se cuentan entre los enzimas mejor conocidos y en parte a que ilustran claramente algunos principios generales esbozados en este capítulo. La discusión se concentra en principios seleccionados junto con algunos experimentos clave que han ayudado a su demostración. El ejemplo de la quimotripsina se utiliza para revisar algunas de las convenciones utilizadas para describir mecanismos enzimáticos. No se incluye gran parte de los detalles mecanísticos y de las pruebas experimentales. Tampoco se habla sobre la especial contribución de los coenzimas a la actividad catalítica de muchos enzimas. La química coenzimática es muy variada y describiremos cada uno de los casos a medida que nos vayamos encontrando con ellos en la Parte II.

En el mecanismo de la quimotripsina se produce la acilación y desacilación de un residuo de Ser

La quimotripsina pancreática bovina (M_r 25.191) es una proteasa, un enzima que cataliza la rotura hidrolítica de enlaces peptídicos. Esta proteasa es específica para la rotura de los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr). En la Figura 6-18 se muestra la estructura tridimensional de la quimotripsina, realzándose los grupos funcionales del sitio activo. La reacción catalizada por este enzima ilustra el principio de la estabilización del estado de transición a la par que proporciona un ejemplo clásico de la utilización de la catálisis ácido-base general y de la catálisis covalente.

La quimotripsina aumenta la velocidad de hidrólisis del enlace peptídico en un factor de al menos 10^9. El enzima no cataliza el ataque directo del agua sobre el enlace peptídico sino que, en su lugar, se forma un intermediario acil-enzima transitorio covalente. Así, la reacción tiene dos fases principales. En la fase de acilación se rompe el enlace peptídico formándose un enlace éster entre el carbono carbonílico del péptido y el enzima. En la fase de desacilación se hidroliza el enlace éster, regenerándose el enzima no acilado.

La primera prueba sobre la formación de un intermedio acil-enzima covalente se dedujo a partir de una aplicación clá-

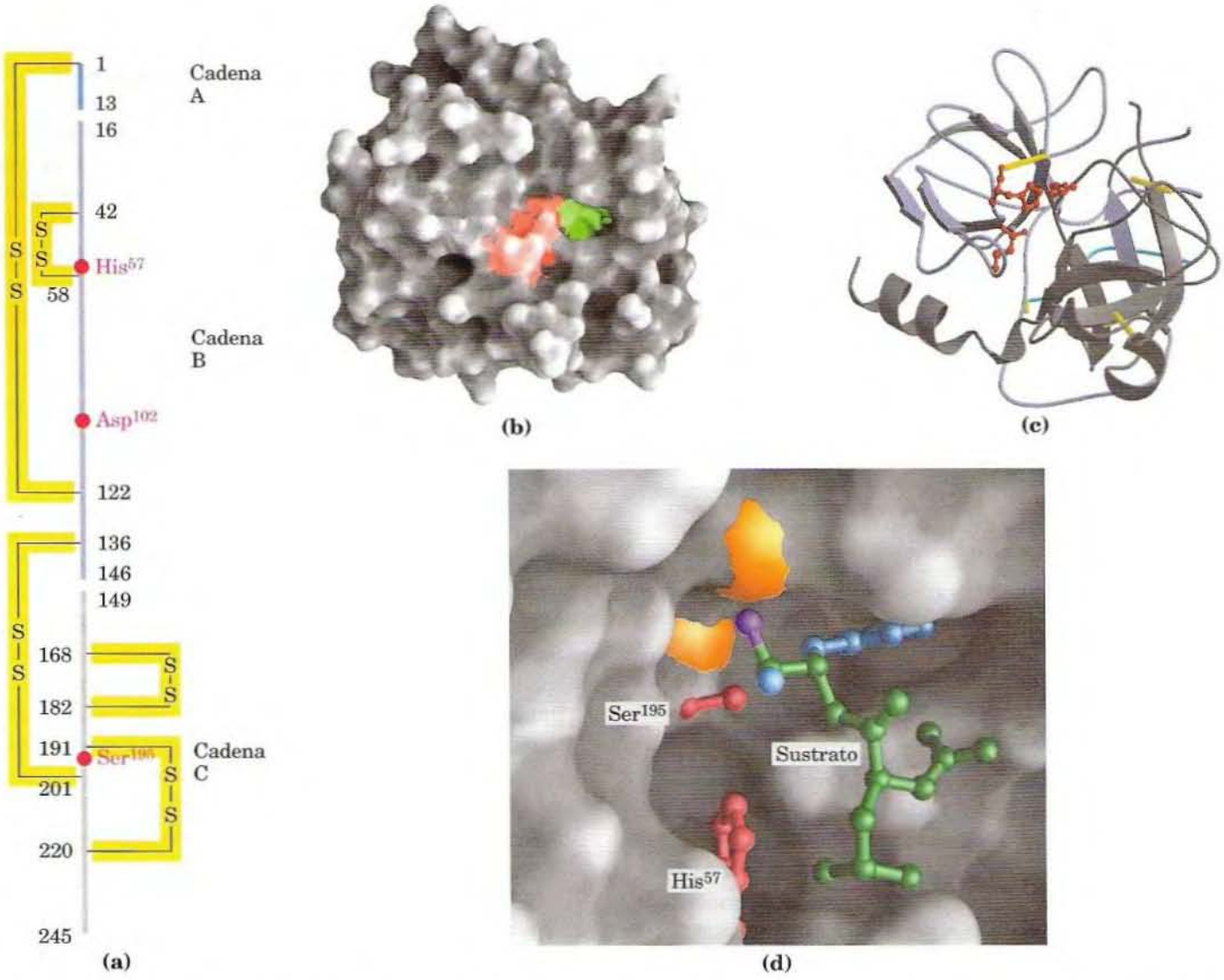


FIGURA 6-18 Estructura de la quimotripsina. (PDB ID 7GCH) **(a)** Representación de la estructura primaria en la que se muestran los enlaces disulfuro y la localización de aminoácidos clave en la catálisis. La proteína consta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas mediante enlaces disulfuro. (La numeración de los residuos de la quimotripsina, con los 14, 15, 147 y 148 "ausentes", se describe en la Figura 6-33.) Los aminoácidos del sitio activo están agrupados en la estructura tridimensional. **(b)** Representación del enzima resaltando su superficie. La bolsa en la que se une la cadena lateral aromática del aminoácido del sustrato se muestra en verde. Los residuos clave del sitio activo, entre ellos Ser^{195}, His^{57} y Asp^{102}, se muestran en rojo y su papel catalítico se explica en la Figura 6-21. **(c)** Esqueleto polipeptídico en representación de cintas; los puentes disulfuro se muestran en amarillo; las cadenas A, B y C tienen el mismo color que en **(a). (d)** Ampliación del sitio activo de la quimotripsina con un sustrato (en verde) unido. Dos residuos del sitio activo, Ser^{195} e His^{57} (ambos en rojo), son parcialmente visibles. El hidroxilo de la Ser^{195} ataca al grupo carbonilo del sustrato (el oxígeno está en púrpura); la carga negativa que se forma sobre el oxígeno es estabilizada por el hueco del oxianión (los nitrógenos amídicos, incluido el de la Ser^{195}, en naranja) (Figura 6-21). En el sustrato, la cadena lateral del aminoácido aromático y el nitrógeno amídico del enlace peptídico que se ha de romper (que se proyecta hacia el observador e indica el camino del resto de la cadena polipeptídica) se muestran en azul claro.

sica de la cinética en el estado pre-estacionario. Además de su actuación sobre polipéptidos, la quimotripsina cataliza la hidrólisis de pequeños compuestos éster y amida. Estas reacciones son mucho más lentas que la hidrólisis de péptidos debido a que la energía de fijación disponible es menor con estos sustratos pequeños pero, en cambio, son mucho más fáciles de estudiar. Los experimentos de B.S. Hartley y B.A. Kilby en 1954 mostraron que la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina, medida por la liberación de *p*-nitrofenol, tenía lugar a través de una rápida explosión inicial (burst) antes de estabilizarse a una velocidad menor (Fig. 6-19). Por extrapolación a tiempo cero, concluyeron que la fase de "burst" correspondía prácticamente a una molécula de *p*-nitrofenol liberada por cada molécula de enzima presente. Hartley y Kilby sugirieron que ello representaba una acilación rápida de todas las moléculas de enzima (con liberación de *p*-nitrofenol) pero que la velocidad del posterior recambio del enzima estaba limitada por un paso de desacilación lento. Desde entonces se han obtenido resultados parecidos con muchos enzimas. Esta observación de la fase de "burst" proporciona otro ejemplo del uso de la cinética en el desglose de una reacción en sus etapas constituyentes.

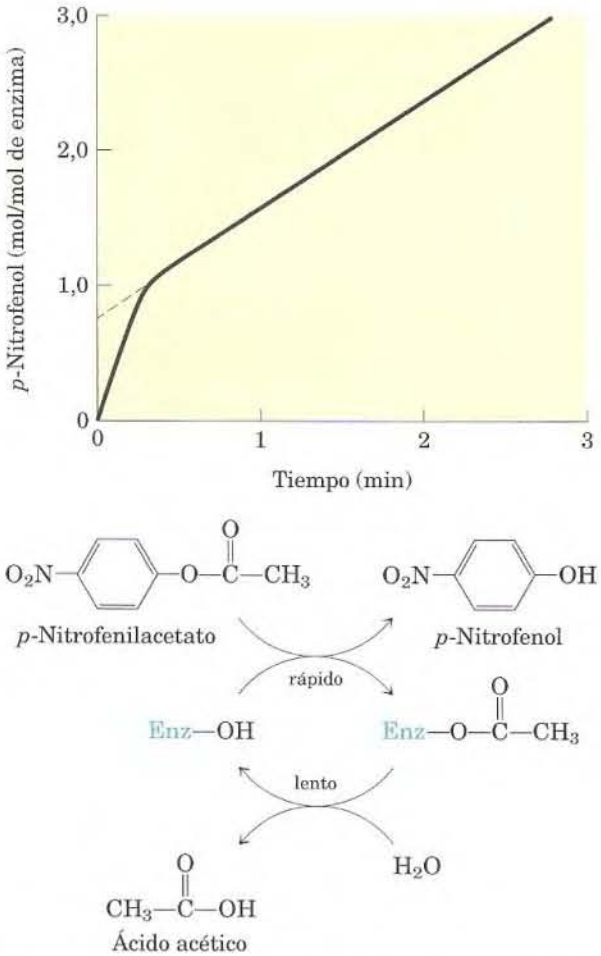


FIGURA 6-19 Pruebas cinéticas en el estado pre-estacionario de la existencia de un intermediario acil-enzima. La hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina se mide por la liberación del *p*-nitrofenol (producto coloreado). Inicialmente, se observa una liberación rápida (burst) de una cantidad de *p*-nitrofenol que es casi estequiométrica con la cantidad de enzima presente. Esto es consecuencia de la fase rápida de acilación de la reacción. La velocidad posterior es menor porque el recambio del enzima viene limitado por la velocidad de la fase más lenta de desacilación.

Se han deducido otras características del mecanismo de la quimotripsina mediante el análisis de la dependencia de la reacción del pH. La velocidad de la hidrólisis catalizada por la quimotripsina representada frente al pH suele tener forma de campana (Fig. 6-20). Las velocidades representadas en la Figura 6-20a se obtuvieron a concentraciones de sustrato bajas (por debajo de la saturación) y son indicativas por tanto del valor de k_{cat}/K_m. La gráfica se puede diseccionar mediante la obtención en primer lugar de las velocidades máximas a cada pH para representar a continuación los valores de k_{cat} sola con respecto al pH (Fig. 6-20b); después de obtener la K_m a cada pH es posible representar los valores de $1/K_m$ (Fig. 6-20c). Estudios cinéticos y enzimáticos han demostrado que los cambios en k_{cat} reflejan el estado de ionización de la His^{57}. El descenso de k_{cat} a pH bajo es el resultado de la protonación de la His^{57} (que no puede en esta situación extraer un protón de la Ser^{195} en el paso ① de la reacción; véase Fig. 6-21). Esta reducción en la velocidad ilustra la importancia de la catálisis ácido-base general en el mecanismo de la quimotripsina. Los cambios en $1/K_m$ reflejan la ionización del grupo α-amino de la Ile^{16} (en el extremo amino-terminal de una de las tres cadenas polipeptídicas de la quimotripsina). Este grupo forma un puente salino con el Asp^{194}, estabilizando la conformación activa del enzima. Cuando este grupo pierde su protón a pH elevado, desaparece el puente salino y se produce un cambio conformacional que

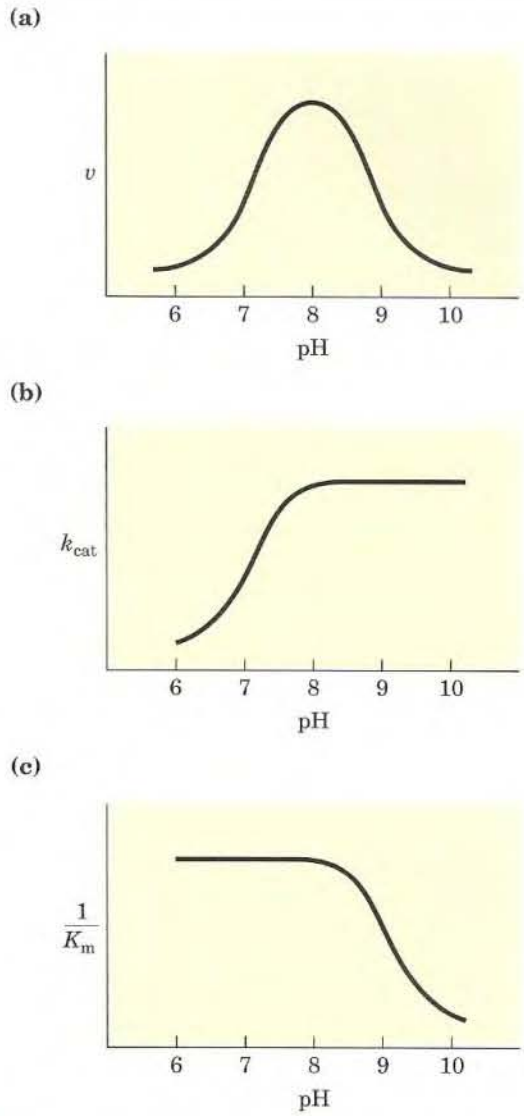


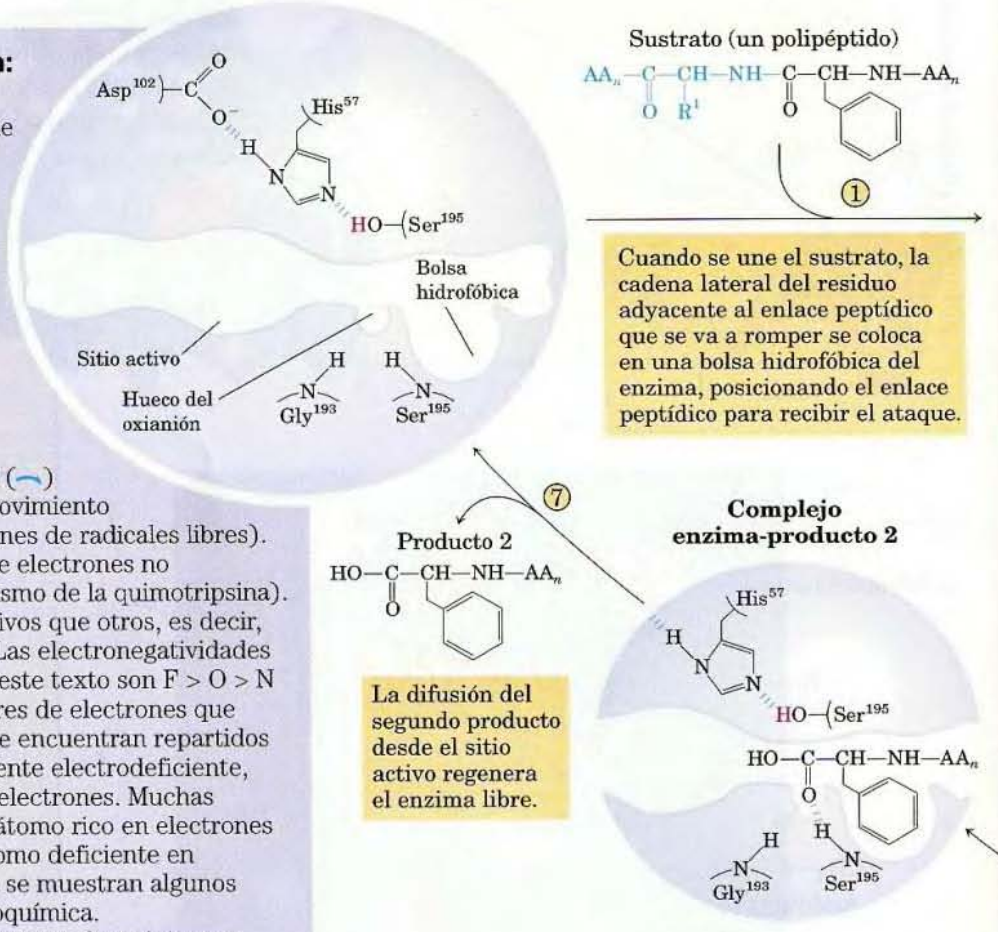
FIGURA 6-20 Dependencia del pH de la reacción catalizada por la quimotripsina. (a) La velocidad de la reacción catalizada por la quimotripsina representada frente al pH genera una curva en forma de campana con un pH óptimo a 8,0. La velocidad (v) que se representa se ha obtenido a bajas concentraciones de sustrato, por lo que refleja el término k_{cat}/K_m. La gráfica se puede descomponer usando métodos cinéticos para determinar separadamente los términos k_{cat} y K_m a cada pH. Cuando se hace esta descomposición (**b** y **c**), queda claro que la transición que se produce justo por encima de pH7 es debida a cambios en k_{cat}, mientras que la que se produce por encima de pH 8,5 es debida a cambios en $1/K_m$. Estudios cinéticos y estructurales han demostrado que las transiciones ilustradas en **(b)** y **(c)** reflejan los estados de ionización de la cadena lateral de la His^{57} (cuando no hay sustrato unido) y del grupo α-amino de la Ile^{16} (en el extremo amino de la cadena B), respectivamente. La His^{57} debe estar desprotonada mientras que la Ile^{16} debe estar protonada para alcanzar la actividad óptima.

Cómo leer mecanismos de reacción: un repaso

Los mecanismos de reacción química, que describen la formación y rotura de enlaces covalentes, se representan con puntos y con flechas curvadas, una convención conocida informalmente como "empuje electrónico". Un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido. Los electrones no enlazados que son importantes para la reacción se designan con puntos (—ÖH). Las flechas curvadas (↷) representan el movimiento de pares de electrones. Las flechas de cabeza simple (↼) (en forma de anzuelo) se usan para el movimiento de un solo electrón (como en las reacciones de radicales libres). La mayoría de pasos implican a un par de electrones no compartido (como en el caso del mecanismo de la quimotripsina).

Algunos átomos son más electronegativos que otros, es decir, atraen más fuertemente los electrones. Las electronegatividades relativas de los átomos que se tratan en este texto son F > O > N > C ≈ S > P ≈ H. Por ejemplo, los dos pares de electrones que forman un enlace C=O (carbonilo) no se encuentran repartidos uniformemente; el carbono es relativamente electrodeficiente, mientras que el oxígeno atrae más a los electrones. Muchas reacciones entrañan la actuación de un átomo rico en electrones (un nucleófilo) que reacciona con un átomo deficiente en electrones (un electrófilo). A la derecha se muestran algunos nucleófilos y electrófilos comunes en bioquímica.

En general, una reacción se inicia en un par electrónico no compartido de un nucleófilo. En los diagramas de mecanismos, la base de la flecha de empuje electrónico está situada cerca de los puntos del par de electrones y la cabeza apunta directamente al centro electrofílico que está siendo atacado. Allí donde un par de electrones no compartido confiera una carga negativa formal al nucleófilo, el mismo signo negativo puede representar al par de electrones no compartido y servir de base de la flecha. En el mecanismo de la quimotripsina, el par de electrones nucleofílico del complejo ES entre los pasos ① y ② es aportado por el oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser^{195}. Este par de electrones (2 de los 8 electrones de valencia del oxígeno hidroxílico) constituye la base de la flecha curvada. El centro electrofílico que está siendo atacado es el carbono carbonílico del enlace peptídico que se va a hidrolizar. Los átomos de C, O y N tienen un máximo de 8 electrones de valencia, mientras que el H tiene un máximo de 2. Estos átomos se encuentran ocasionalmente en estados inestables con una dotación electrónica inferior, pero C, O y N no pueden tener nunca más de 8 electrones. De este modo, cuando el par de electrones de la Ser^{195} de la quimotripsina ataca al carbono carbonílico del sustrato, se produce el desplazamiento de un par de electrones de la capa de valencia del carbono (¡no es posible tener cinco enlaces en un carbono!). Estos electrones se desplazan hacia el oxígeno carbonílico más electronegativo. El oxígeno tiene 8 electrones de valencia tanto antes como después de este proceso químico, pero el número de los compartidos con el carbono se reduce de 4 a 2, con lo que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa. En el paso siguiente, el par de electrones que confiere la carga negativa al oxígeno vuelve atrás para reformar el enlace con el carbono, restableciendo la unión carbonílica. También en este caso se debe desplazar un par de electrones del carbono, concretamente el compartido con el grupo amino del enlace peptídico. Este último paso rompe el enlace peptídico. Los pasos siguientes siguen procesos similares.



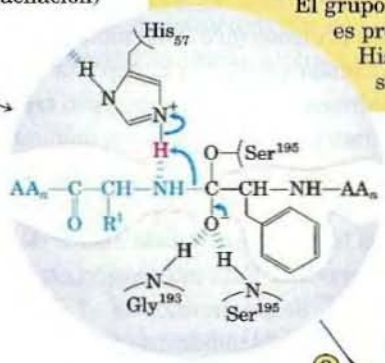
Nucleófilos	Electrófilos
—O⁻ Oxígeno cargado negativamente (como en el grupo hidroxilo no protonado o en un ácido carboxílico ionizado)	:R, —C(=O)— Átomo de carbono de un grupo carbonilo (el oxígeno del grupo carbonilo que es más electronegativo atrae los electrones del carbono)
—S⁻ Sulfhidrilo cargado negativamente	:R, —C=N⁺(H)— Grupo imino protonado (activado para el ataque nucleofílico sobre el carbono por protonación de la imina)
—C⁻ Carbanión	O, :R, O—P(=O)—O Fósforo de un grupo fosfato
—N: Grupo amino no cargado	:R, H⁺ Protón
Imidazol	
H—O⁻ Ion hidróxido	

La interacción de la Ser^{195} y la His^{57} genera un ion alcóxido fuertemente nucleofílico en la Ser^{195}; el ion ataca al grupo carbonilo del enlace peptídico, formando un intermediario tetraédrico acil-enzima. Esto va acompañado por la formación de una carga negativa de corta vida sobre el oxígeno carbonílico del sustrato, que es estabilizada por enlace de hidrógeno en el hueco del oxianión.

Complejo ES

②

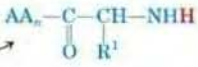
Intermediario de vida corta* (acilación)

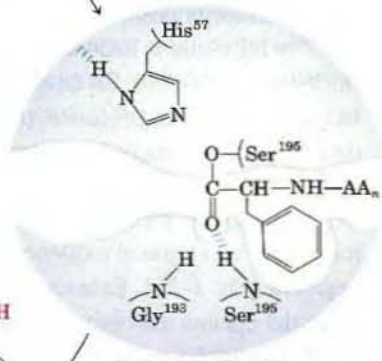


La inestabilidad de la carga negativa sobre el oxígeno carbonílico del sustrato conduce al colapso del intermediario tetraédrico; la reformación de un enlace doble con el carbono desplaza el enlace entre el carbono y el grupo amino del enlace peptídico, rompiéndola. El grupo amino saliente es protonado por la His^{57}, lo que facilita su desplazamiento.

③

Producto 1

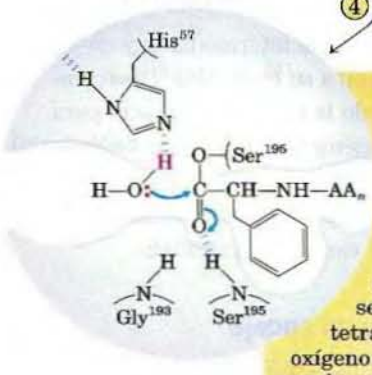




Intermediario acil-enzima

Intermediario acil-enzima

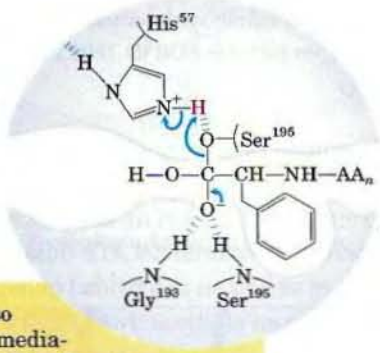
④



Una molécula de agua se desprotona por catálisis básica general, generando un ion hidróxido fuertemente nucleofílico. El ataque del ion hidróxido sobre el enlace éster del acil-enzima genera un segundo intermediario tetraédrico, mientras que el oxígeno del hueco del oxianión vuelve a tomar una carga negativa.

⑤

Intermediario de vida corta* (desacilación)



El colapso del intermediario tetraédrico forma el segundo producto, un anión carboxilato, y desplaza la Ser^{195}.

⑥

MECANISMO FIGURA 6-21 Rotura hidrolítica de un enlace peptídico por la quimotripsina. La reacción tiene dos fases. En la fase de acilación (pasos ① a ③), la formación de un intermediario covalente acil-enzima está acoplada a la rotura de un enlace peptídico. En la fase de desacilación (pasos ④ a ⑦), se regenera el enzima libre; esto es esencialmente el inverso de la fase de acilación, en la que el agua hace la misma función, en sentido inverso, que el componente amino del sustrato. Mecanismo de la quimotripsina

* El intermediario tetraédrico en la ruta de reacción de la quimotripsina y el segundo intermediario tetraédrico que se forma más adelante se conocen a veces como estados de transición, lo que puede llevar a confusión. Un *intermediario* es cualquier especie química con un tiempo de vida finito en donde "finito" se define como más largo que el tiempo requerido para una vibración molecular ($\sim 10^{-13}$ segundos). Un *estado de transición* es simplemente la especie con el máximo de energía que se forma en la coordenada de reacción y no tiene un tiempo de vida finito. Los intermediarios tetraédricos formados en la reacción de la quimotripsina se parecen mucho, tanto energética como estructuralmente, a los estados de transición que conducen a su formación y rotura. Sin embargo, los intermediarios representan una fase comprometida en la que se ha completado la formación de un enlace, mientras que el estado de transición forma parte del proceso de reacción. En el caso de la quimotripsina, dada la estrecha relación entre el intermediario y el estado de transición real, la distinción entre ellos queda difuminada. Además, la interacción del oxígeno cargado negativamente con los nitrógenos amida en el hueco del oxianión, a menudo conocida como estabilización del estado de transición, también sirve en este caso para estabilizar el intermediario. No todos los intermediarios tienen un tiempo de vida tan corto para que puedan parecer estados de transición. El intermediario acil-enzima de la quimotripsina es mucho más estable y más fácilmente detectado y estudiado y no se confunde con un estado de transición.

cierra la bolsa hidrofóbica donde se inserta la cadena lateral aromática del sustrato (Fig. 6-18). En esta situación los sustratos ya no pueden unirse adecuadamente, lo que se refleja cinéticamente en forma de un aumento en K_m.

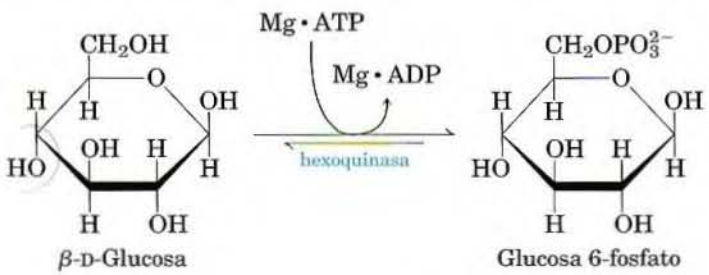
El nucleófilo que interviene en la fase de acilación es el oxígeno de la Ser^{195}. (Las proteasas con un residuo de Ser implicado en el mecanismo catalítico se denominan serinas proteasa.) El pK_a del grupo hidroxilo de una Ser suele se demasiado alto para que la forma no protonada se halle presente en concentraciones significativas a pH fisiológico. Sin embargo, en la quimotripsina la Ser^{195} está unida a la His^{57} y al Asp^{102} a través de una red de enlaces de hidrógeno que se conoce como **tríada catalítica.** Cuando un sustrato peptídico se une a la quimotripsina se produce un ligero cambio de conformación que comprime el enlace de hidrógeno entre la His^{57} y el Asp^{102}, lo que genera una interacción más fuerte, denominada enlace de hidrógeno de baja barrera energética. Esta interacción estabilizada aumenta el pK_a de la His^{57} desde un valor de ~7 (para la histidina libre) a uno superior a 12, haciendo que el residuo de His actúe como una base general capaz de extraer un protón del grupo hidroxilo de la Ser^{195}. La desprotonación evita el desarrollo de una carga positiva muy inestable sobre el hidroxilo de la Ser^{195} y hace que la cadena lateral de la Ser se convierta en un nucleófilo más fuerte. En fases posteriores, la His^{57} también actúa como dador de protones, protonando el grupo amino libre de la parte desplazada del sustrato (el grupo saliente).

Cuando el oxígeno de la Ser^{195} ataca al grupo carbonilo del sustrato, se forma un intermediario tetraédrico de vida muy corta en el que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa (Fig. 6-21). Esta carga se forma en el interior de una bolsa del enzima denominada hueco del oxianión y está estabilizada mediante enlaces de hidrógeno a cargo de los grupos amida de dos enlaces peptídicos del esqueleto de la proteína. Uno de estos enlaces de hidrógeno (el que corre a cargo de la Gly^{193}) está presente solamente en este intermediario y en los estados de transición que conducen a su formación y descomposición, reduciendo de este modo la energía necesaria para llegar a ellos. Esto constituye un ejemplo de la utilización de la energía de fijación en la catálisis.

En el Recuadro 6-3 explica el papel de la complementariedad del estado de transición en la catálisis enzimática.

En la hexoquinasa se produce un encaje inducido durante la unión del sustrato

La hexoquinasa de levadura (M_r 107.862) es un enzima bisustrato que cataliza la reacción reversible



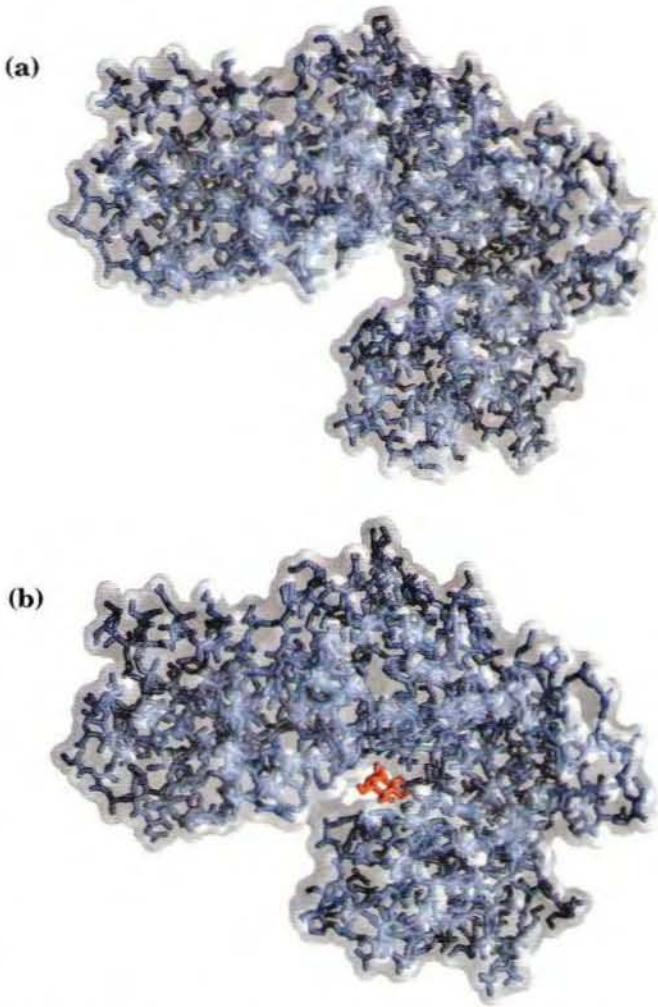


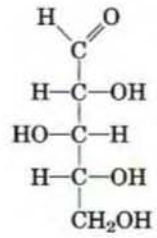
FIGURA 6-22 Encaje inducido en la hexoquinasa. **(a)** La hexoquinasa tiene una estructura en forma de U (PDB ID 2YHX). **(b)** Los extremos se acercan en un cambio conformacional inducido por la unión de la D-glucosa (en rojo) (de PDB ID 1HKG y PDB ID 1GLK).

El ATP y el ADP se unen siempre al enzima formando un complejo con el ion metálico de Mg^{2+}.

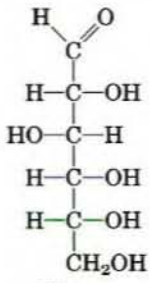
El hidroxilo en la posición C-6 de la molécula de glucosa (al cual se transfiere el γ-fosforilo del ATP durante la reacción de la hexoquinasa) es similar en reactividad química al agua, la cual penetra libremente en el sitio activo de la glucosa. No obstante, la hexoquinasa discrimina de forma favorable a la glucosa en un factor de 10^6. El enzima puede discriminar entre la glucosa y el agua gracias a un cambio conformacional que se produce en el enzima cuando se une el sustrato correcto (Fig. 6-22). El enzima constituye, por tanto, un buen ejemplo de encaje inducido. Cuando no hay glucosa, el enzima se encuentra en una conformación inactiva con las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo fuera de posición para la reacción. Cuando se fijan la glucosa (pero no el agua) y Mg · ATP, la energía de fijación que se produce en esta interacción induce un cambio hacia la conformación catalíticamente activa del enzima.

Los estudios cinéticos han reforzado esta conclusión. El azúcar de cinco carbonos xilosa, similar estereoquímicamente a la glucosa pero con un carbono menos, se une a la hexoquinasa, pero lo hace en una posición donde no puede ser fosforilada. Sin embargo, la adición de xilosa a la mezcla de reacción

aumenta la velocidad de hidrólisis de ATP. Evidentemente, la fijación de xilosa es suficiente para inducir un cambio en la hexoquinasa a su conformación activa, por lo que el enzima resulta "engañado" para que fosforile agua. La reacción de la hexoquinasa también ilustra que la especificidad del enzima no siempre es un simple problema de fijación de un compuesto en lugar de otro. En el caso de la hexoquinasa, se observa especificidad, no en la formación del complejo ES, sino en las velocidades relativas de las etapas catalíticas posteriores. El agua no se excluye del sitio activo, pero las velocidades de reacción aumentan considerablemente en presencia de grupos aceptores de fosforilo funcionales (glucosa).



Xilosa

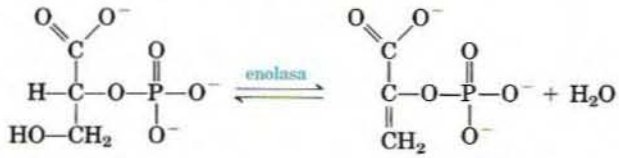


Glucosa

El encaje inducido sólo es un aspecto del mecanismo catalítico de la hexoquinasa: al igual que la quimotripsina, la hexoquinasa utiliza diversas estrategias catalíticas. Por ejemplo, los residuos aminoácidos del sitio activo (los que se posicionan mediante el cambio conformacional que sigue a la fijación del sustrato) participan en la catálisis ácido-base general y estabilizan el estado de transición.

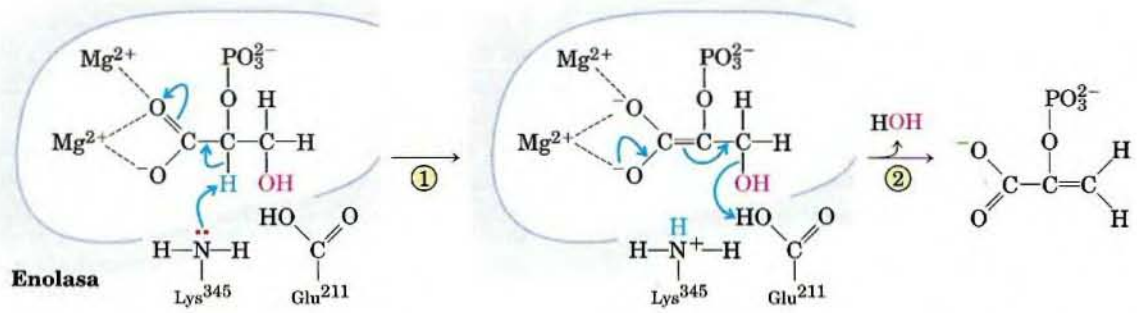
El mecanismo de reacción de la enolasa requiere la presencia de iones metálicos

Otro enzima glucolítico, la enolasa, cataliza la deshidratación reversible del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:

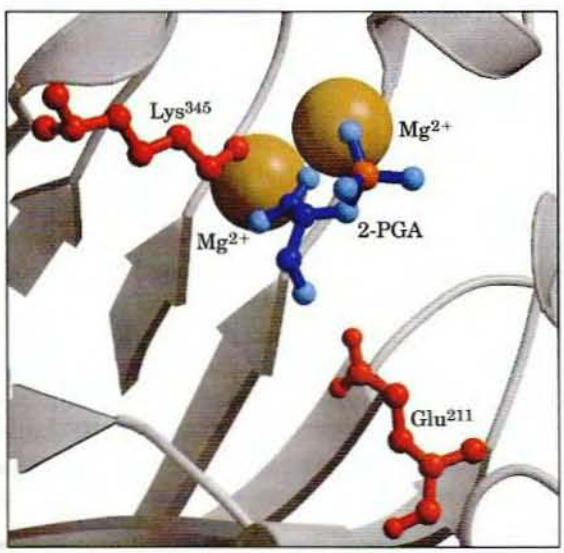


2-Fosfoglicerato Fosfoenolpiruvato

La enolasa de levadura (M_r 93.316) es un dímero con 436 residuos por subunidad. La reacción de la enolasa ilustra un tipo de catálisis por ion metálico y proporciona un ejemplo adicional de catálisis ácido-base general y de estabilización del estado de transición. La reacción tiene lugar en dos etapas (Fig. 6-23a). El residuo de Lys^{345} actúa como un catalizador básico general, sustrayendo un protón en C-2 del 2-fosfoglicerato; el



(a) 2-Fosfoglicerato unido al enzima Intermediario enólico Fosfoenolpiruvato



(b)

MECANISMO FIGURA 6-23 Reacción en dos pasos catalizada por la enolasa. **(a)** Mecanismo mediante el que la enolasa convierte el 2-fosfoglicerato (2-PGA) en fosfoenolpiruvato. El grupo carboxilo del 2-PGA está coordinado por dos iones magnesio en el sitio activo. En el paso ① se extrae un protón mediante catálisis básica general (Lys^{345}) y el intermediario enólico resultante se estabiliza gracias a los dos iones Mg^{2+}. La eliminación del —OH en el paso ② viene favorecida por catálisis ácida general (Glu^{211}). **(b)** El sustrato, 2-PGA, en relación a los iones Mg^{2+}, Lys^{345} y Glu^{211} en el sitio activo de la enolasa. No se muestran los átomos de hidrógeno. Todos los átomos de oxígeno del 2-PGA se muestran en azul claro; el fósforo es naranja (PDB ID 1ONE).

Pruebas de la complementariedad entre el enzima y el estado de transición

Es difícil estudiar el estado de transición de una reacción ya que, por definición, tiene una vida muy corta. No obstante, para entender la catálisis enzimática hemos de estudiar a fondo la interacción entre el enzima y este momento efímero en el transcurso de una reacción. La idea de que un enzima es complementario al estado de transición es virtualmente un requisito para la catálisis, ya que la colina energética sobre la que se asienta el estado de transición es lo que ha de rebajar el enzima para que se produzca la catálisis. ¿De qué modo podemos obtener pruebas de la complementariedad entre enzima y estado de transición? Afortunadamente, existen diversos métodos, viejos y nuevos, para afrontar este problema. Cada uno ha proporcionado pruebas convincentes a favor de este principio general de la acción enzimática.

Correlaciones estructura-actividad

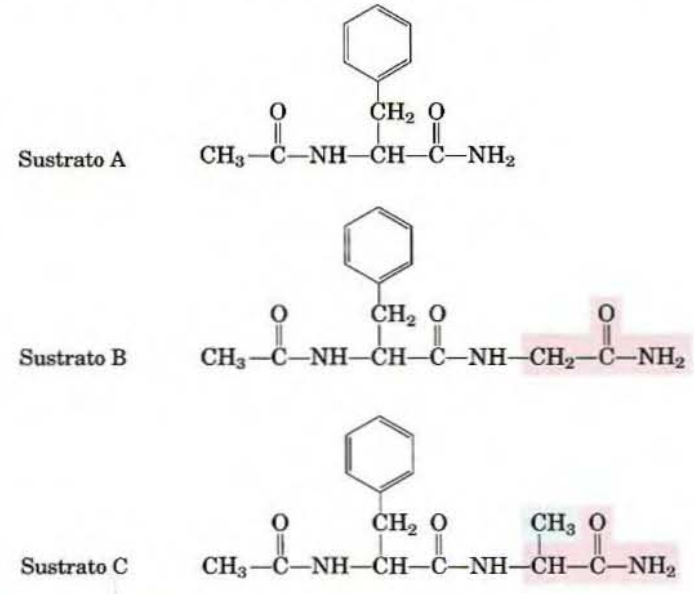
Si los enzimas son complementarios al estado de transición de la reacción habrá algunos grupos funcionales en el sustrato y en el enzima que interaccionarán preferentemente en el estado de transición y no en el complejo ES. La alteración de estos grupos debería tener poco efecto sobre la formación del complejo ES y, por tanto, no debería afectar a los parámetros cinéticos (K_d; o a veces K_m, si $K_d = K_m$) que son reflejo del equilibrio $E + S \rightleftharpoons ES$. El cambio de estos mismos grupos habría de tener, sin embargo, un gran efecto sobre la velocidad global (k_{cat} o k_{cat}/K_m) de la reacción, ya que el sustrato ligado carece de las interacciones potenciales de fijación necesarias para rebajar la energía de activación.

Un ejemplo excelente de este efecto se observa en las cinéticas asociadas con una serie de sustratos relacionados en el enzima quimotripsina (Fig. 1). La quimotripsina cataliza normalmente la hidrólisis de enlaces peptídicos próximos a aminoácidos aromáticos, siendo los sustratos que se muestran en la Figura 1 modelos más pequeños y convenientes que los sustratos naturales (polipéptidos largos y proteínas). Los grupos químicos adicionales añadidos al pasar de A a B y a C están sombreados. Como muestra la tabla, la interacción entre el enzima y estos grupos funcionales añadidos tiene un efecto mínimo sobre K_m (que se considera aquí como un reflejo de K_d) pero un gran efecto positivo sobre k_{cat} y k_{cat}/K_m. Esto es lo que cabría esperar si la interacción contribuyese en gran modo a la estabilización del estado de transición. Los resultados demuestran también que la velocidad de una reacción puede estar muy afectada por interacciones entre enzima y sustrato que se producen en un sitio físicamente remoto a los enlaces covalentes que se alteran durante la reacción catalizada por el enzima.

Un método experimental complementario consiste en la modificación del enzima eliminando ciertas interacciones enzima-sustrato mediante el reemplazo de residuos aminoácidos específicos por mutagénesis dirigida (véase Fig. 9-12). Los resultados que se derivan de estos experimentos demuestran otra vez la importancia de la energía de fijación en la estabilización del estado de transición.

Análogos del estado de transición

A pesar de que los estados de transición no se pueden observar directamente, los químicos pueden predecir a menudo la estructura aproximada de un estado de transición basándose en conocimientos acumulados sobre los mecanismos de reacción. Por definición, el estado de transición es efímero y tan inestable que la medición directa de la interacción de fijación entre esta especie y el enzima es imposible. En algunos ca-



Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
A	0,06	31	2
B	0,14	15	10
C	2,8	25	114

FIGURA 1 Efectos de pequeños cambios estructurales en el sustrato sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis de amidas catalizada por la quimotripsina.

sos, no obstante, se pueden diseñar moléculas estables que se parezcan al estado de transición, los **análogos del estado de transición.** Deberían unirse a un enzima más fuertemente de lo que se une el sustrato en el complejo ES, ya que deberían encajar mejor en el sitio activo que el sustrato. Esta idea fue sugerida por Pauling en la década de 1940 y se ha utilizado para diversos enzimas. Estos experimentos están limitados ya que un análogo del estado de transición nunca puede reproducir perfectamente un estado de transición. Pero se han hallado análogos que se fijan al enzima de 10^2 a 10^6 veces más fuertemente que el sustrato normal, lo que constituye una buena prueba de que los sitios activos de los enzimas son realmente complementarios a sus estados de transición. El mismo principio se utiliza actualmente en la industria farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos. Los potentes fármacos anti-VIH denominados inhibidores de proteasas se diseñaron en parte como análogos del estado de transición de unión fuerte dirigidos al sitio activo de la proteasa del VIH.

Anticuerpos catalíticos

Si se puede diseñar un análogo del estado de transición de la reacción S → P, un anticuerpo que se una fuertemente al análogo del estado de transición debería catalizar S → P. Los anticuerpos (inmunoglobulinas; véase Fig. 5-23) son componentes clave de la respuesta inmunitaria. Cuando se utiliza un análogo del estado de transición como un epítopo unido a una proteína para estimular la producción de anticuerpos, los anticuerpos que lo fijen serán catalizadores potenciales de la reacción correspondiente. El uso de los "anticuerpos catalíticos", sugerido por William P. Jencks en 1969, se ha podido llevar a la práctica gracias al desarrollo de técnicas de laboratorio para la producción de cantidades suficientes de anticuerpos idénticos que se fijan a un antígeno específico (anticuerpos monoclonales; véase Capítulo 5).

Los trabajos pioneros en los laboratorios de Richard Lerner y Peter Schultz han llevado al aislamiento de anticuerpos monoclonales que catalizan la hidrólisis de ésteres o carbonatos (Fig. 2). En estas reacciones, el ataque del agua (OH^-) sobre el carbono carbonílico produce un estado de transición tetraédrico en el que se ha desarrollado una carga negativa parcial sobre el oxígeno carbonílico. Los compuestos éster fosfonato mimetizan la estructura y la distribución de carga de este estado de transición en la hidrólisis de ésteres, por lo que son buenos análogos; en las reacciones de hidrólisis de carbonatos se utilizan compuestos de éster fosfato. Se ha hallado que los anticuerpos que se unen fuertemente a compuestos de tipo fosfonato o fosfato aceleran las correspondientes reacciones de hidrólisis de ésteres o carbonatos con factores de incremento de velocidad de 10^3 a 10^4. El análisis estructural de algunos de estos anticuerpos catalíticos ha demostrado que algunas cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos están dispuestas de tal forma que pueden interaccionar con el sustrato en el estado de transición.

Los anticuerpos catalíticos no se acercan generalmente a la eficacia catalítica de los enzimas, pero a pesar de eso están emergiendo aplicaciones médicas e industriales para ellos. Por ejemplo, se está investigando si los anticuerpos catalíticos diseñados para degradar cocaína podrían ser útiles en el tratamiento de la adición a la cocaína.

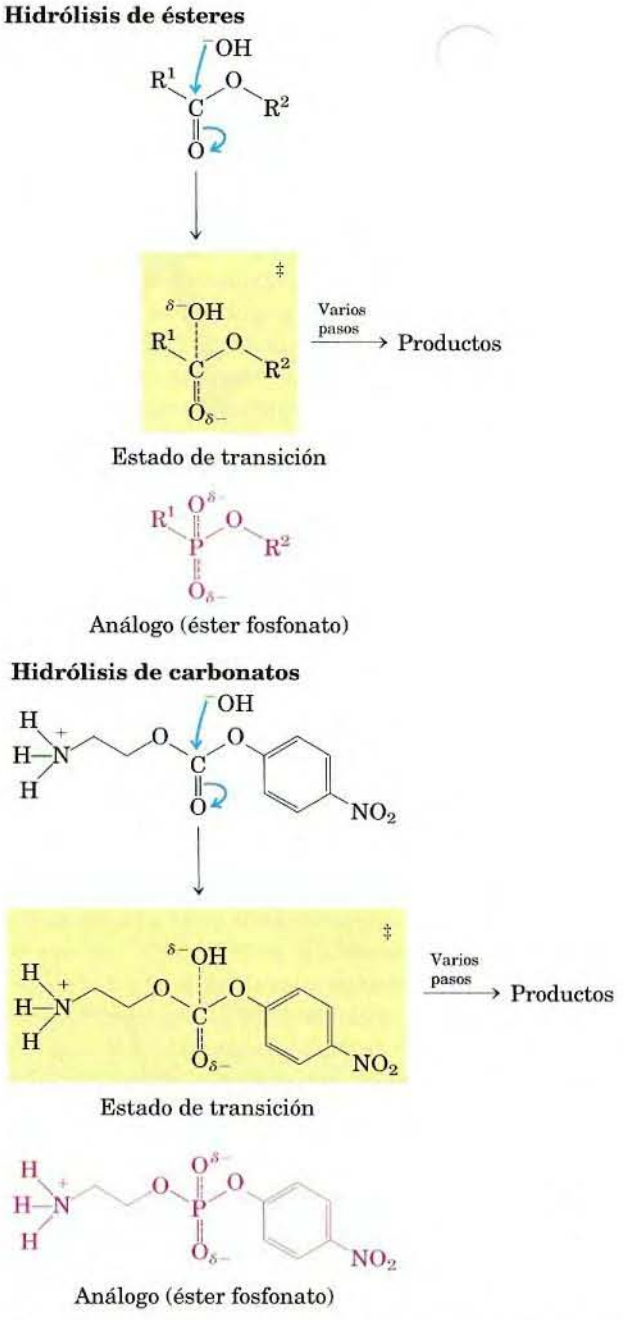


FIGURA 2 Estados de transición esperados para las reacciones de hidrólisis de ésteres y de carbonatos. Los compuestos éster fosfonato y éster fosfato constituyen, respectivamente, buenos análogos del estado de transición de estas reacciones.

Glu^{211} actúa como un catalizador ácido general, cediendo un protón al grupo —OH saliente.

El protón en C-2 del 2-fosfoglicerato no es muy acídico por lo que no se extrae fácilmente. Sin embargo, en el sitio activo del enzima, el 2-fosfoglicerato está sometido a interacciones iónicas fuertes con dos iones Mg^{2+} unidos (Fig. 6-23b), que convierten al protón C-2 en más acídico (disminuyendo su pK_a), haciendo más fácil su extracción. Enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoácidos del sitio activo también contribuyen al mecanismo global. Las diversas interacciones estabilizan efectivamente tanto el intermediario enolato como el estado de transición que precede a su formación.

El lisozima utiliza dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas

El lisozima es un agente antibacteriano natural que se encuentra en las lágrimas y en la clara del huevo. El lisozima de clara de huevo de gallina (M_r 14.296) es un monómero de 129 aminoácidos. Fue el primer enzima para el que se determinó la estructura tridimensional, a cargo de David Phillips y colaboradores en 1965. En la estructura se observan cuatro enlaces disulfuro estabilizadores y una hendidura que contiene el sitio activo (Fig. 6-24a; véase también Fig. 4-18). Más de cinco décadas de investigación sobre el lisozima han permitido obtener una imagen detallada sobre la estructura y la actividad del enzima, además de una interesante historia sobre las vías de progreso de la ciencia bioquímica.

El sustrato del lisozima es una molécula de peptidoglucano, un polisacárido que se encuentra en muchas paredes bacterianas (véase Fig. 7-22). El lisozima rompe el enlace glucosídico C—O ($\beta 1 \rightarrow 4$) entre dos tipos de azúcares de la molécula, el ácido *N*-acetilmurámico (Mur2Ac) y la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), frecuentemente denominados NAM y NAG, respectivamente, en la bibliografía científica sobre enzimología (Fig. 6-24b). Seis residuos alternos de Mur2Ac y GlcNAc del peptidoglucano se unen al sitio activo en los sitios de unión marcados con las letras A a F. La construcción de modelos moleculares ha mostrado que la cadena lateral lactilo de Mur2Ac no puede acomodarse en los sitios C y E, por lo que su ubicación se restringe a los sitios B, D y F. Sólo se rompe uno de los enlaces glucosídicos unidos, el que se encuentra entre un residuo de Mur2Ac en el sitio D y un residuo de GlcNAc en el sitio E. Los aminoácidos catalíticos clave del sitio activo son Glu^{35} y Asp^{52} (Fig. 6-25a). La reacción es una sustitución nucleofílica en la que un —OH del agua reemplaza a GlcNAc en la posición C-1 de Mur2Ac.

Después de la identificación de los residuos del sitio activo y de la obtención de la estructura detallada del enzima, en la década de 1960 parecía que el camino hacia la comprensión del mecanismo de reacción quedaba expedito. Sin embargo, durante décadas no fue posible obtener pruebas definitivas a favor de ningún mecanismo determinado. Existen dos mecanismos químicamente razonables que podrían dar lugar a los productos observados en la rotura de enlaces glucosídicos facilitada por el lisozima. Phillips y colaboradores propusieron un mecanismo disociativo (de tipo S_N1) (Fig. 6-25a, izquierda), mediante el cual se produce en primer lugar la disociación de GlcNAc en el paso ①, dejando un intermediario de catión glucosilo (un carbocatión). En este mecanismo, la GlcNAc saliente es protonada mediante catálisis ácida general por el Glu^{35}, localizado en una bolsa hidrofóbica que confiere un pK_a excepcionalmente elevado a su grupo carboxilo. El carbocatión se estabiliza por resonancia con el oxígeno adyacente en el anillo y mediante interacción electrostática con la carga negativa del Asp^{52} cercano. En el paso ②, una molécula de agua ataca el C-1 de Mur2Ac para dar el producto. El mecanismo alternativo (Fig. 6-25a, derecha) supone dos pasos de desplazamiento directo (de tipo S_N2) consecutivos. En el paso ①, el Asp^{52} ataca el C-1 de Mur2Ac y desplaza la GlcNAc. Al igual que en el primer mecanismo, el Glu^{35} actúa como un ácido general y protona la GlcNAc saliente. En el paso ②, una molécula de agua ataca el C-1 de Mur2Ac, desplazando el Asp^{52} y generando el producto.

El mecanismo de Phillips (S_N1), basado en consideraciones estructurales y apoyado por una variedad de estudios de fijación con sustratos artificiales, fue aceptado durante más de tres décadas. Sin embargo, siguió existiendo cierta controversia y continuaron los experimentos. A veces, el avance del método científico es lento en algunos temas y puede ser difícil diseñar un experimento realmente esclarecedor. Algunos de los primeros argumentos desfavorables al mecanismo de Phillips eran sugerentes pero no totalmente persuasivos. Por ejemplo, se estimaba que la vida media del carbocatión propuesto en el mecanismo era de 10^{-12} segundos, justo un poco mayor que una vibración molecular y no lo suficientemente larga como para permitir la necesaria difusión de otras moléculas. Más importante todavía, el lisozima es un miembro de la familia de enzimas que actúan con "retención de la configuración" y catalizan reacciones en las que el producto tiene la misma configuración anomérica que el sustrato (las configuraciones anoméricas de los glúcidos se examinarán en el Capítulo 7); se sabe que estos enzimas presentan intermediarios covalentes reactivos como el propuesto en el mecanismo S_{N2} alternativo. Por todo ello, el mecanismo de Phillips contradecía los datos experimentales de enzimas estrechamente relacionados con él.

Un experimento a cargo de Stephen Withers y colaboradores en 2001 inclinó la discusión decididamente a favor de la ruta S_N2. Utilizando un enzima mutante (con el residuo 35 cambiado de Glu a Gln) y sustratos artificiales para que, combinados, dieran lugar a un descenso en la velocidad de los pasos clave de la reacción, estos investigadores fueron capaces de estabilizar el elusivo intermediario covalente. Ello les permitió a su vez observar el intermediario directamente mediante espectrometría de masas y cristalografía de rayos X (Fig. 6-25b).

¿Puede considerarse que el mecanismo del lisozima está ya demostrado? No. Un aspecto clave del método científico, como argumentó Albert Einstein en una ocasión, es "No puede haber experimentos suficientes para demostrar que estoy en lo cierto; en cambio, un solo experimento puede demostrar que estoy equivocado". En el caso del mecanismo del lisozima

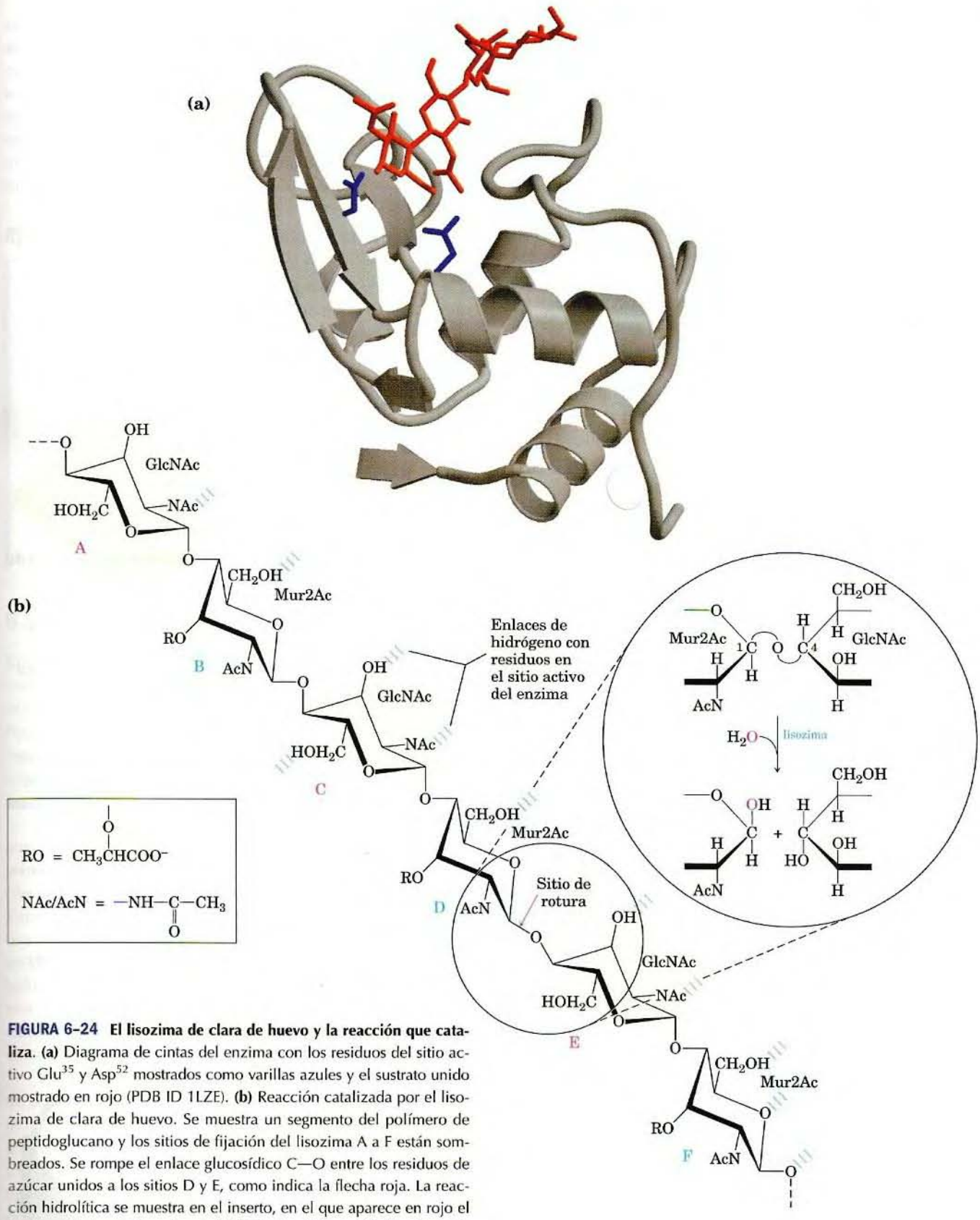
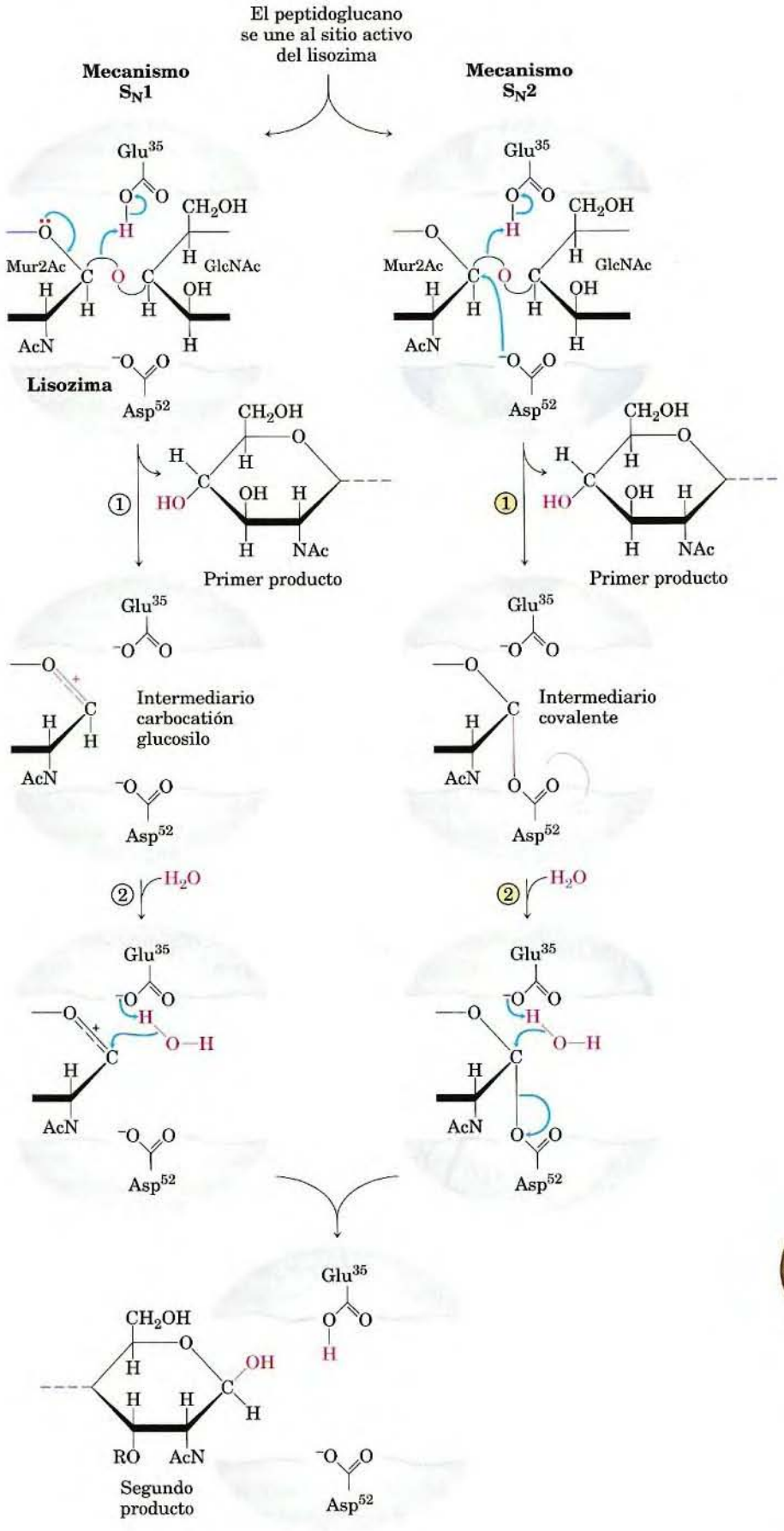


FIGURA 6-24 El lisozima de clara de huevo y la reacción que cataliza. **(a)** Diagrama de cintas del enzima con los residuos del sitio activo Glu^{35} y Asp^{52} mostrados como varillas azules y el sustrato unido mostrado en rojo (PDB ID 1LZE). **(b)** Reacción catalizada por el lisozima de clara de huevo. Se muestra un segmento del polímero de peptidoglucano y los sitios de fijación del lisozima A a F están sombreados. Se rompe el enlace glucosídico C—O entre los residuos de azúcar unidos a los sitios D y E, como indica la flecha roja. La reacción hidrolítica se muestra en el inserto, en el que aparece en rojo el destino del átomo de oxígeno del H_2O. Mur2Ac es el ácido *N*-acetilmurámico; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. RO— representa un grupo lactilo (ácido láctico); —NAc y AcN—, un grupo *N*-acetilo (véase clave en el recuadro).



MECANISMO FIGURA 6-25 Reacción del lisozima. En esta reacción (descrita en la p. 222), el agua introducida en el producto en C-1 de Mur2Ac está en la misma configuración que el enlace glucosídico original. La reacción es, por tanto, una sustitución molecular con retención de configuración. **(a)** Dos mecanismos propuestos explican potencialmente la reacción global y sus propiedades. La ruta S_N1 (izquierda) es el mecanismo original de Phillips. La ruta S_N2 (derecha) es el mecanismo más congruente con los datos actuales. **(b)** Diagrama de cintas del intermediario covalente enzima-sustrato con los residuos del sitio activo (azul) y el sustrato unido (rojo) mostrados en estructuras de varillas (PDB ID 1H6M).

se podría argumentar, como ya se ha hecho, que los sustratos artificiales con los carbonos C-1 y C-2 sustituidos con flúor que fueron utilizados para estabilizar el intermediario covalente podrían haber alterado la ruta de la reacción. La elevada electronegatividad del flúor podría desestabilizar un ion oxicarbenio ya electrodeficiente en el intermediario carbocatión que podría aparecer en el mecanismo S_N1. Sin embargo, la ruta S_N2 es, por ahora, el mecanismo más acorde.

RESUMEN 6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

- La quimotripsina es una serina proteasa con un mecanismo bien conocido que comprende catálisis ácido-base general, catálisis covalente y estabilización del estado de transición.
- La hexoquinasa proporciona un ejemplo excelente del encaje inducido como medio para explotar la energía de fijación del sustrato.
- La reacción de la enolasa tiene lugar mediante catálisis por ion metálico.
- El lisozima utiliza catálisis covalente y catálisis ácida general al promover dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas.

6.5 Enzimas reguladores

En el metabolismo celular hay grupos de enzimas que funcionan conjuntamente en rutas secuenciales para llevar a cabo un proceso metabólico determinado, tal como la conversión, en varias reacciones, de la glucosa en lactato o la síntesis a través de diversas reacciones de un aminoácido a partir de precursores sencillos. En tales sistemas enzimáticos, el producto de la reacción del primer enzima se convierte en el sustrato del siguiente.

La mayor parte de los enzimas de cada ruta metabólica siguen los comportamientos cinéticos ya descritos. Sin embargo, en cada ruta hay uno o más enzimas que tienen un mayor efecto sobre la velocidad global de la secuencia de reacciones. Estos **enzimas reguladores** muestran una actividad catalítica mayor o menor en respuesta a ciertas señales. Los ajustes en la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas reguladores y, por ende, en la velocidad de la secuencia entera de reacciones, permiten que la célula se adapte a las necesidades cambiantes de energía y biomoléculas requeridas para su crecimiento y la reparación de sus componentes.

En muchos sistemas multienzimáticos el primer enzima de la secuencia es un enzima regulador. Éste es un lugar excelente para regular una ruta metabólica, puesto que la catálisis incluso de las primeras reacciones de una ruta que conduce a un producto innecesario despilfarra energía y metabolitos requeridos en procesos más importantes. Los restantes enzimas de la secuencia se encuentran normalmente en cantidades que proporcionan un exceso considerable de actividad catalítica, lo que hace que sus reaccionen tengan lugar tan rápidamente como lo permita la asequibilidad de sustrato proporcionado por las reacciones precedentes.

La actividad de los enzimas reguladores se modula de diversas maneras. Los **enzimas alostéricos** funcionan a través de la unión reversible, no covalente, de compuestos reguladores denominados **moduladores alostéricos** o **efectores alostéricos,** los cuales son generalmente pequeños metabolitos o cofactores. Otros enzimas están regulados por **modificación covalente** reversible. Ambas clases de enzimas reguladores tienden a tener varias subunidades y, en algunos casos, el sitio o sitios reguladores y el sitio activo se encuentran en subunidades separadas. En los sistemas metabólicos existen al menos otros dos mecanismos mediante los que se regula la actividad de los enzimas. Algunos enzimas son estimulados o inhibidos por proteínas de control a las que se fijan. Otros se activan cuando se eliminan segmentos peptídicos mediante escisión proteolítica, la cual, a diferencia de la regulación mediada por efectores, es irreversible. En procesos fisiológicos tales como la digestión, la coagulación de la sangre, la acción hormonal y la visión se encuentran importantes ejemplos de estos dos tipos de mecanismos.

El crecimiento y la supervivencia celulares dependen del uso eficaz de los recursos que hacen posible los enzimas reguladores. No hay una regla única que gobierne la existencia de diferentes tipos de regulación en sistemas diferentes. Hasta cierto punto, la regulación alostérica (no covalente) puede permitir el control afinado de las rutas metabólicas que se requieren de modo continuado pero a diferentes niveles de actividad cuando cambian las condiciones celulares. La regulación por modificación covalente puede ser del tipo todo o nada (el caso más común en las roturas proteolíticas) o dar lugar a ligeros cambios de actividad. En un mismo enzima regulador pueden darse varios tipos de regulación. El resto de este capítulo se dedica a tratar estos procesos de regulación enzimática

Los enzimas alostéricos experimentan cambios conformacionales en respuesta a la unión del modulador

Como hemos visto en el Capítulo 5, las proteínas alostéricas son las que presentan "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de moduladores. El mismo concepto se aplica a ciertos enzimas reguladores, en los que cambios conformacionales inducidos por uno o más moduladores interconvierten formas más activas y menos activas del enzima. Los moduladores de enzimas alostéricos pueden ser inhibidores o estimuladores. El mismo sustrato es a menudo el modulador; los enzimas reguladores en los cuales el sustrato y el modulador son idénticos se denominan homotrópicos. El efecto es similar al de la unión de O_2 a la hemoglobina (Capítulo 5): la unión del ligando (o del sustrato en el caso de los enzimas) origina cambios conformacionales que afectan a la actividad posterior de otros sitios en la proteína. Cuando el modulador es otra molécula diferente del sustrato, se dice que el enzima es heterotrópico. Obsérvese que los moduladores alostéricos no se deben confundir con los inhibidores acompetitivos y mixtos. Aunque estos últimos se unen en un segundo sitio del enzima, no provocan necesariamente cambios conformacionales entre las for-

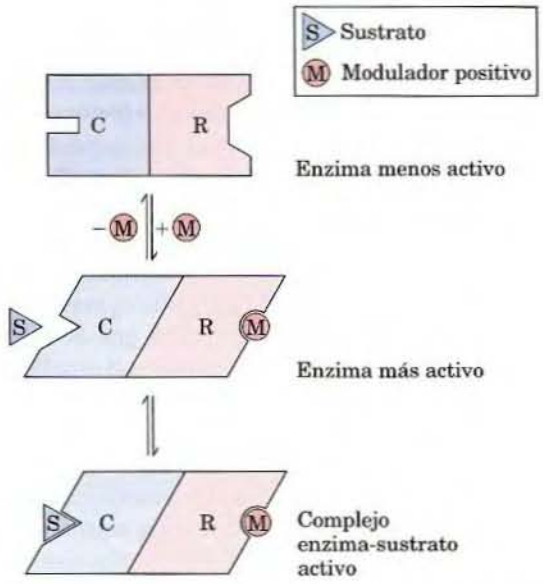


FIGURA 6-26 Interacciones entre subunidades en un enzima alostérico e interacciones con inhibidores y activadores. En muchos enzimas alostéricos el sitio de fijación del sustrato y el sitio, o sitios, de fijación del modulador se encuentran en subunidades diferentes, las subunidades catalítica (C) y la reguladora (R), respectivamente. La fijación del modulador positivo (estimulador, M) a su sitio específico en la subunidad reguladora se comunica a la subunidad catalítica mediante un cambio conformacional. Este cambio hace que la subunidad catalítica sea activa y capaz de fijar el sustrato (S) con mayor afinidad. Al separarse el modulador de la subunidad reguladora, el enzima vuelve a su forma inactiva, o menos activa.

mas activas e inactivas, por lo que los efectos cinéticos son de índole distintas.

Las propiedades de los enzimas alostéricos son significativamente diferentes a la de los enzimas no reguladores sencillos. Algunas de las diferencias son estructurales. Además de sitios activos, los enzimas alostéricos tienen generalmente uno o más sitios reguladores o alostéricos para la fijación del modulador (Fig. 6-26). Del mismo modo que el sitio activo de un enzima es específico para su sustrato, cada sitio regulador es específico para su modulador. Los enzimas con varios moduladores tienen generalmente diferentes sitios de fijación específicos para cada uno de ellos. En los enzimas homotrópicos el sitio activo y el sitio regulador son el mismo.

Generalmente los enzimas alostéricos también son mayores y más complejos que los enzimas sencillos. La mayoría tienen dos o más cadenas polipeptídicas o subunidades. La aspartato transcarbamilasa, que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos (véase Fig. 22-36), tiene 12 cadenas polipeptídicas organizadas en subunidades catalíticas y reguladoras. La Figura 6-27 muestra la estructura cuaternaria de este enzima deducida a partir de análisis de rayos X.

En muchas rutas las etapas reguladoras están catalizadas por enzimas alostéricos

En algunos sistemas multienzimáticos el enzima regulador es inhibido de forma específica por el producto final de la ruta siempre que el producto final se acumule en exceso a las necesidades de la célula. Cuando la reacción del enzima regulador se hace más lenta, todos los enzimas posteriores operan a velocidad reducida, ya que sus sustratos se encuentran en me-

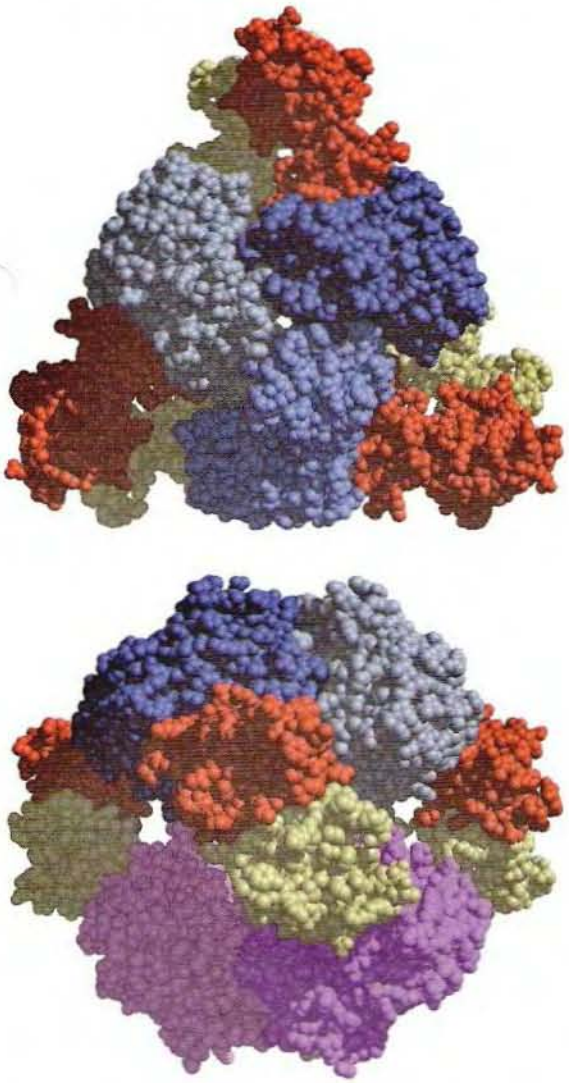


FIGURA 6-27 Dos perspectivas del enzima regulador aspartato transcarbamilasa. (De PDB ID 2AT2.) Este enzima regulador alostérico tiene dos agrupaciones catalíticas apiladas, cada una de las cuales contiene tres cadenas polipeptídicas catalíticas (en tonos de azul y púrpura) y tres agrupaciones reguladoras, cada una con dos cadenas polipeptídicas reguladoras (en rojo y amarillo). Los agrupamientos reguladores forman los vértices de un triángulo que rodea las subunidades catalíticas. Los sitios de fijación de los moduladores alostéricos se encuentran en las subunidades reguladoras. La fijación del modulador produce grandes cambios en la conformación y actividad del enzima. En el Capítulo 22 se tratan el papel de este enzima en la síntesis de nucleótidos y los detalles de su regulación.

nor concentración. De este modo se equilibra la velocidad de formación del producto final con las necesidades de la célula. Este tipo de regulación se denomina **retroinhibición.** La acumulación del producto final de la ruta hace que, en último término, toda la ruta funcione más lentamente.

Uno de los primeros ejemplos descubiertos de retroinhibición alostérica fue el sistema enzimático bacteriano que cataliza la conversión en cinco pasos de L-treonina en L-isoleucina (Fig. 6-28). El primer enzima de este sistema, la treonina deshidratasa, es inhibido por la isoleucina, que es el producto de la última reacción de la serie. Éste es un ejemplo de inhibición alostérica heterotrópica. La isoleucina es muy específica como inhibidor. Ningún otro intermediario de esta secuencia de reacciones inhibe la treonina deshidratasa, ni ningún otro enzima de la secuencia es inhibido por la isoleucina. La isoleucina no se fija al sitio activo, sino a otro sitio específico de la molécula enzimática denominado sitio regulador. Esta fijación es de tipo no covalente, por lo que es fácilmente reversible; si disminuye la concentración de isoleucina, aumenta la actividad de deshidratación de la treonina. De este modo la actividad de la treonina deshidratasa responde rápida y reversiblemente a las fluctuaciones en la concentración celular de isoleucina.

Las propiedades cinéticas de los enzimas alostéricos difieren del comportamiento de Michaelis-Menten

Los enzimas alostéricos muestran una relación entre V_0 y [S] que difiere del comportamiento cinético de Michaelis-Menten. Aunque se saturan con el sustrato cuando [S] es suficientemente elevada, la mayoría de enzimas alostéricos dan lugar a una curva de saturación sigmoidea cuando se representa V_0 frente a [S] (Fig. 6-29), en lugar de la curva hiperbólica típica de los enzimas no reguladores. En la curva de saturación sigmoidea podemos encontrar un valor de [S] a la que V_0 es la mitad de la máxima, pero no nos podemos referir al mismo con la designación K_m, ya que el enzima no sigue la relación hiperbólica de Michaelis-Menten. En su lugar se utilizan a menudo los símbolos $[S]_{0,5}$ o $K_{0,5}$ para representar la concentración de sustrato que da la mitad de la velocidad máxima de la reacción catalizada por un enzima alostérico (Fig. 6-29).

El comportamiento cinético sigmoideo es generalmente el reflejo de interacciones cooperativas entre las subunidades proteicas. Dicho de otro modo, los cambios en la estructura de una subunidad se traducen en cambios estructurales en las subunidades adyacentes, efecto que es facilitado por interacciones no covalentes en la interfase entre subunidades. Los principios son similares a los discutidos para la cooperatividad en la fijación de O_2 a la hemoglobina. El comportamiento cinético sigmoidal se explica mediante los modelos concertado y secuencial de interacción de subunidades (véase Fig. 5-15).

Los enzimas alostéricos homotrópicos suelen ser proteínas multisubunidad y, como se ha visto antes, el mismo sitio de fijación de cada subunidad funciona a la vez como sitio activo y como sitio regulador. Normalmente, el sustrato puede funcionar como modulador positivo (activador) porque las subunidades actúan de forma cooperativa: la fijación de una molécula de sustrato a un sitio de fijación altera la conformación del enzima, facilitando la fijación de otras moléculas de sustrato. Esto explica el incremento sigmoideo en lugar de hiperbólico de V_0 al aumentar [S]. Una característica de las cinéticas sigmoideas consiste en que pequeños cambios en la concentración de un modulador se pueden asociar con grandes cambios en la actividad. Como es evidente en la Figura 6-29a, un incremento relativamente pequeño en [S] en la parte de mayor pendiente de la curva provoca un incremento comparativamente grande en V_0.

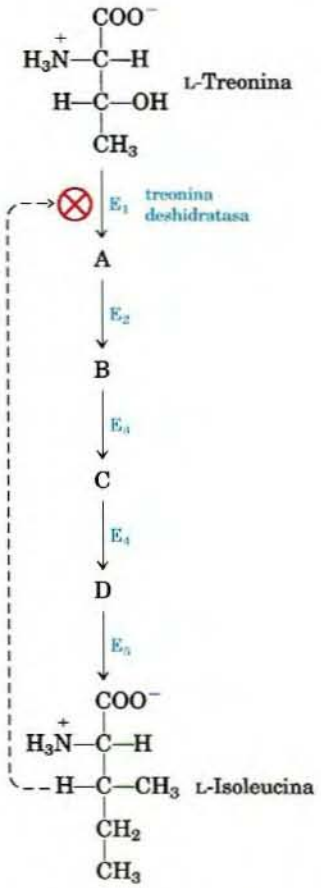


FIGURA 6-28 Retroinhibición. La conversión de la L-treonina en L-isoleucina está catalizada por una secuencia de cinco enzimas (E_1 a E_5). La treonina deshidratasa (E_1) es inhibida alostéricamente de manera específica por la L-isoleucina, producto final de la secuencia, pero no por ninguno de los cuatro intermediarios (A a D). La retroinhibición se indica por la línea a trazos y por el símbolo ⊗ en la flecha de la reacción de la treonina deshidratasa, un recurso que se utiliza en todo este libro.

En el caso de los enzimas heterotrópicos, en los que el modulador es un metabolito diferente del sustrato, es difícil generalizar acerca de la forma de la curva de saturación con el sustrato. Un activador puede hacer que la curva de saturación con el sustrato sea más próxima a la hiperbólica, con un descenso de $K_{0,5}$ pero sin cambios en $V_{máx}$, lo que se traduce en un incremento de la velocidad de reacción a una concentración de sustrato fija (V_0 es superior para cualquier valor de [S];

Fig. 6-29b, curva superior). Otros enzimas alostéricos heterotrópicos responden a la presencia de un activador con un incremento de $V_{máx}$ pero con poco cambio en $K_{0,5}$ (Fig. 6-29c). Un modulador negativo (inhibidor) puede producir una curva de saturación de sustrato *más* sigmoidea, con un incremento de $K_{0,5}$ (Fig. 6-29b, curva inferior). Los enzimas alostéricos heterotrópicos muestran, por consiguiente, diferentes clases de respuesta en sus curvas de actividad frente a sustrato debido a que algunos tienen moduladores inhibidores, otros tienen moduladores activadores y otros tienen moduladores de ambas clases.

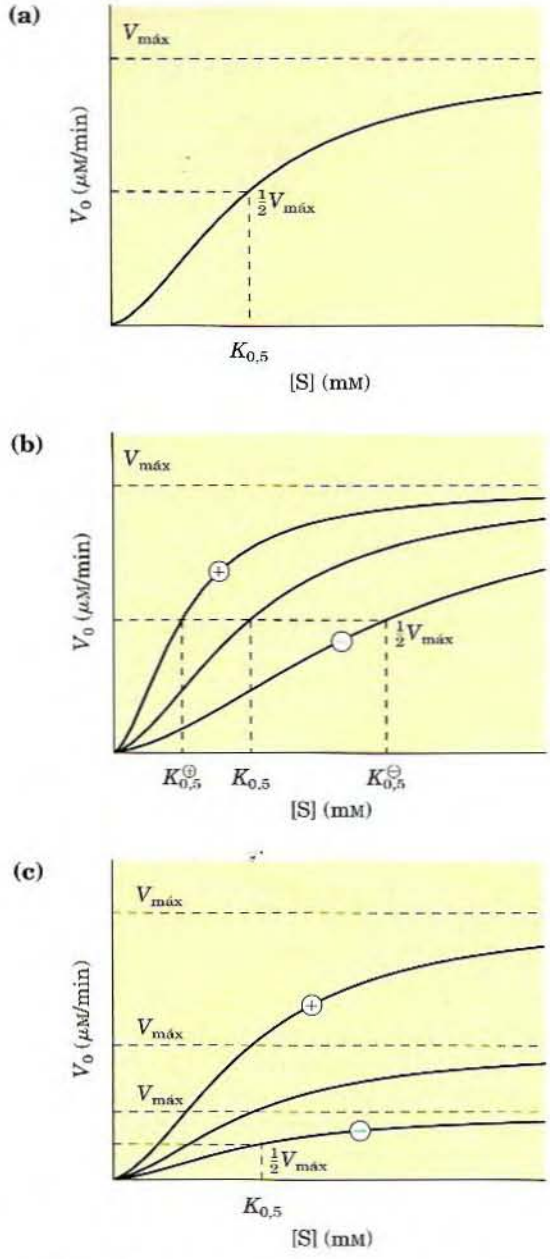


FIGURA 6-29 Curvas de actividad en función de la concentración de sustrato de enzimas alostéricos representativos. Tres ejemplos de respuestas complejas de enzimas alostéricos a sus moduladores. **(a)** Curva sigmoidea producida por un enzima homotrópico en el que el sustrato también actúa como modulador positivo (estimulador) o activador. Obsérvese el parecido con la curva de saturación por oxígeno de la hemoglobina (Fig. 5-12). **(b)** Efectos de un modulador positivo (+) y un modulador negativo (−) sobre un enzima alostérico en el que $K_{0,5}$ se altera sin cambio en $V_{máx}$. La curva central muestra la relación sustrato-actividad sin modulador. **(c)** Un caso de modulación menos común en el que se altera $V_{máx}$ mientras $K_{0,5}$ se mantiene constante.

Algunos enzimas reguladores experimentan modificaciones covalentes reversibles

En otra clase importante de enzimas reguladores se modula la actividad por modificación covalente de la molécula enzimática. Entre los grupos modificadores se cuentan el fosforilo, adenililo, uridililo, metilo y adenosina difosfato ribosilo (Fig. 6-30). Generalmente estos grupos se unen y se eliminan del enzima regulador por la acción de otros enzimas.

Un ejemplo de enzima regulado por metilación es el de la proteína aceptora de metilos de la quimiotaxis de las bacterias. Esta proteína forma parte de un sistema que permite a una bacteria nadar hacia una sustancia atrayente en solución (por ejemplo un azúcar) y alejarse de las sustancias químicas repelentes. El agente metilante es la *S*-adenosilmetionina (adoMet) (véase Fig. 18-18b). La ADP-ribosilación es una reacción especialmente interesante, observada sólo en unas pocas proteínas; la ADP-ribosa proviene del nicotinamida adenina dinucleótido (véase Fig. 8-41). Este tipo de modificación se da en la dinitrogenasa reductasa bacteriana, que regula el importante proceso de la fijación biológica del nitrógeno. Las toxinas diftérica y del cólera son enzimas que catalizan la ADP-ribosilación (e inactivación) de enzimas o proteínas celulares clave. La toxina diftérica actúa sobre el factor 2 de elongación, que es la proteína implicada en la biosíntesis de proteínas, produciendo su inhibición. La toxina del cólera actúa sobre una proteína G que forma parte de una ruta de señalización (véase Fig. 12-39), que conduce a varias respuestas fisiológicas, como la pérdida masiva de fluidos corporales y, a veces, la muerte.

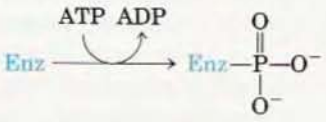
La fosforilación es la modificación reguladora más frecuente; entre un tercio y la mitad de todas las proteínas de la célula eucariótica se fosforilan. Algunas proteínas tiene sólo un residuo fosforilable, otras presentan varios y unas pocas tienen docenas de sitios fosforilables. Este tipo de modificación covalente juega un papel central en un gran número de rutas reguladoras, por lo que se trata detalladamente.

Los grupos fosforilo afectan a la estructura y la actividad catalítica de las proteínas

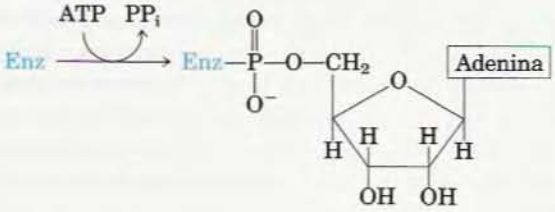
Las **proteínas quinasa** catalizan la unión de grupos fosforilo a residuos aminoácidos específicos de una proteína; la eliminación de los grupos fosforilo está catalizada por las **proteínas fosfatasa.** La unión de un grupo fosforilo a un residuo de Ser, Thr, o Tyr introduce un grupo cargado y voluminoso en una región que era sólo moderadamente polar. Los átomos de oxígeno de un grupo fosforilo pueden formar enlaces de hidró-

Modificación covalente
(residuos diana)

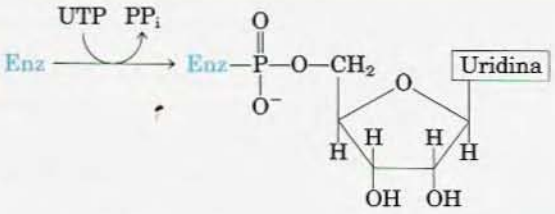
Fosforilación
(Tyr, Ser, Thr, His)



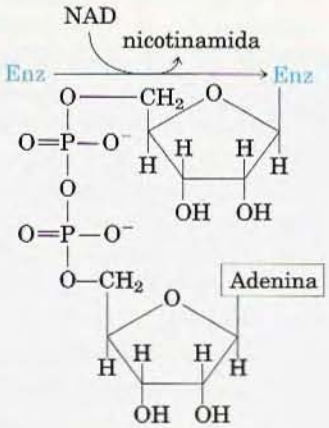
Adenililación
(Tyr)



Uridililación
(Tyr)



ADP-ribosilación
(Arg, Gln, Cys, diftamida–una His modificada)



Metilación
(Glu)

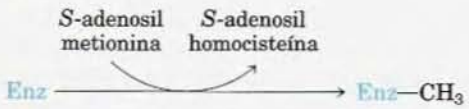


FIGURA 6-30 Algunas reacciones de modificación de enzimas.

geno con uno o varios grupos de la proteína, generalmente los grupos amida de la cadena peptídica al inicio de una hélice α o los grupos guanidinio cargados de la cadena lateral de la Arg. La carga negativa doble de la cadena lateral fosforilada también puede repeler y alejar los residuos cargados negativamente (Asp o Glu). Cuando la cadena lateral modificada se sitúa en una región de la proteína crítica para su estructura tridimensional, se puede esperar que la fosforilación tenga efectos muy importantes en la conformación de la proteína y, por tanto, en la fijación del sustrato y la catálisis.

Un ejemplo importante de regulación por fosforilación se encuentra en la glucógeno fosforilasa (M_r 94.500) de músculo e hígado (Capítulo 15), que cataliza la reacción

$$\underset{\text{Glucógeno}}{(\text{Glucosa})_n} + P_i \longrightarrow \underset{\text{Cadena de glucógeno acortada}}{(\text{glucosa})_{n-1}} + \text{glucosa 1-fosfato}$$

La glucosa 1-fosfato así formada puede utilizarse para la síntesis de ATP en el músculo o ser convertida en glucosa libre en el hígado. La glucógeno fosforilasa se presenta en dos formas: la forma más activa fosforilasa *a* y la forma menos activa fosforilasa *b* (Fig. 6-31). La fosforilasa *a* consta de dos subunidades, cada una de las cuales contiene un residuo de Ser específico que se fosforila en su grupo hidroxilo. Estos residuos de serina

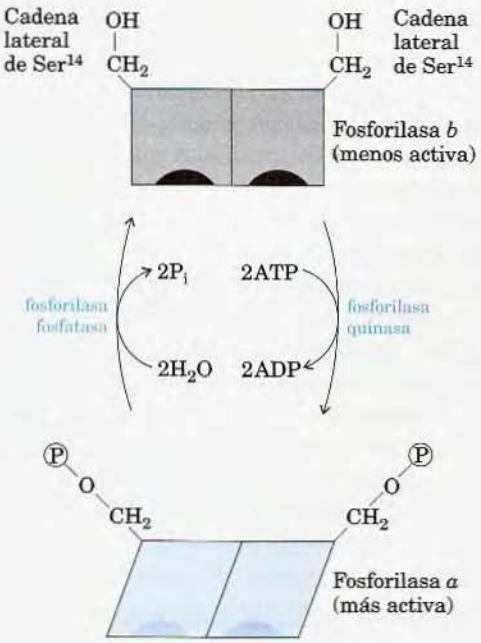


FIGURA 6-31 Regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa por modificación covalente. En la forma más activa del enzima, la fosforilasa *a*, residuos de Ser específicos, uno en cada subunidad, se encuentran en estado fosforilado. La fosforilasa *a* se convierte en fosforilasa *b*, que es menos activa, por pérdida enzimática de estos grupos fosforilo, promovida por la fosforilasa fosfatasa. La fosforilasa *b* se puede reconvertir (reactivar) en fosforilasa *a* por la acción de la fosforilasa quinasa.

fosfato son necesarios para que se pueda alcanzar la actividad máxima del enzima. Los grupos fosfato se pueden eliminar hidrolíticamente mediante un enzima diferente denominado fosforilasa fosfatasa:

$$\underset{\text{(más activa)}}{\text{Fosforilasa } a} + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} + 2P_i$$

En esta reacción la fosforilasa *a* se convierte en fosforilasa *b* mediante la rotura de dos enlaces serina fosfato covalentes, uno en cada subunidad de la glucógeno fosforilasa.

La fosforilasa *b* puede, a su vez, reactivarse (volverse a convertir covalentemente en fosforilasa *a* activa) por mediación de otro enzima, la fosforilasa quinasa, que cataliza la transferencia de grupos fosforilo desde el ATP a los grupos hidroxilo de los dos residuos específicos de Ser en la fosforilasa *b*:

$$2ATP + \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} \longrightarrow 2ADP + \underset{\text{(más activa)}}{\text{fosforilasa } a}$$

La degradación del glucógeno en el músculo esquelético y en el hígado está regulada por variaciones en las proporciones de las dos formas del enzima. Las formas *a* y *b* de la fosforilasa difieren en su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria; cuando se interconvierten las dos formas, el sitio activo experimenta cambios de estructura y, en consecuencia, cambios en la actividad catalítica.

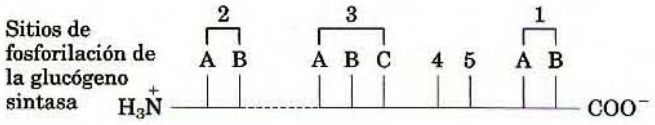
La regulación de la glucógeno fosforilasa mediante fosforilación muestra las consecuencias de la adición de un grupo fosforilo tanto en la estructura como en la actividad catalítica. En el estado no fosforilado, cada subunidad de la proteína se pliega de manera que acerca 20 residuos de su extremo N-terminal, entre los que se incluyen muchos residuos básicos, hacia una región que contiene multiples aminoácidos acídicos; esto origina interacciones electrostáticas que estabilizan la conformación. La fosforilación de la Ser^{14} interfiere en esta interacción, forzando al dominio N-terminal a moverse hacia fuera del entorno acídico y a adoptar una conformación que permite la interacción entre Ⓟ-Ser y varias cadenas laterales de Arg. En esta conformación el enzima es mucho más activo.

La fosforilación de un enzima puede afectar a la catálisis por otra vía: mediante la modificación de la afinidad de fijación del sustrato. Por ejemplo, cuando se fosforila la isocitrato deshidrogenasa (un enzima del ciclo del ácido cítrico; Capítulo 16), la repulsión electrostática del grupo fosforilo inhibe la fijación de citrato (un ácido tricarboxílico) en el sitio activo.

Las fosforilaciones múltiples permiten un exquisito control de la regulación

Los residuos de Ser, Thr o Tyr fosforilados en las proteínas reguladoras se presentan dentro de motivos estructurales comunes, en las denominadas secuencias consenso, que son reconocidas por proteínas quinasa específicas (Tabla 6-10). Algunas quinasas son basidófilas, prefiriendo fosforilar un residuo que tenga vecinos básicos; otras presentan diferentes preferencias de sustrato, tales como por un residuo cercano a una prolina. Sin embargo, la secuencia primaria no es el único factor importante en la determinacion de si un residuo será fosforilado. El plegamiento proteico acerca residuos distantes en la secuencia primaria y la estructura tridimensional resultante puede determinar si una proteína quinasa tiene acceso a un determinado residuo y puede reconocerlo como sustrato. Otro factor que influye en la especificidad de sustrato de ciertas proteínas quinasa es la proximidad a la que se encuentran otros residuos fosforilados.

La regulación por fosforilación es a menudo muy complicada. Algunas proteínas tienen secuencias consenso reconocidas por varias proteínas quinasa, cada una de las cuales puede fosforilar la proteína y variar su actividad enzimática. En algunos casos la fosforilación es jerárquica: un determinado residuo sólo se puede fosforilar si su residuo vecino ya está fosforilado. Por ejemplo, la glucógeno sintasa, el enzima que cataliza la condensación de monómeros de glucosa para formar glucógeno (Capítulo 15), es inactivada por fosforilación de residuos de Ser específicos y su actividad está también modulada por al menos otras cuatro proteínas quinasa que fosforilan otros tantos sitios de fosforilación de la proteína (Fig. 6-32). La proteína no es, por ejemplo, un sustrato de la glucógeno sintasa quinasa 3 hasta que un sitio ha sido fosforilado por la caseína quinasa II. Algunas fosforilaciones inhiben más que otras la glucógeno sintasa y algunas combinaciones de fosforilaciones son acumu-



Quinasa	Sitios de fosforilación	Grado de inactivación de la sintasa
Proteína quinasa A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína quinasa G	1A, 1B, 2	+
Proteína quinasa C	1A	+
Ca^{2+}/calmodulina quinasa	1B, 2	+
Fosforilasa *b* quinasa	2	+
Caseína quinasa I	Al menos nueve	+ + + +
Caseína quinasa II	5	0
Glucógeno sintasa quinasa 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glucógeno sintasa quinasa 4	2	+

FIGURA 6-32 Fosforilaciones reguladoras múltiples. El enzima glucógeno sintasa contiene al menos nueve sitios distintos en cinco regiones que son susceptibles de fosforilación por una de las proteínas quinasa celulares. De este modo, la regulación de este enzima no es cuestión de una conmutación (on/off) binaria, sino que resulta de una modulación finamente ajustada de la actividad con un margen de respuesta amplio a una diversidad de señales.

TABLA 6–10 Secuencias consenso para las proteínas quinasa

Proteína quinasa	*Secuencias consenso y residuo fosforilado**
Proteína quinasa A	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-B-
Proteína quinasa G	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
Proteína quinasa C	-(R/K)-(R/K)-X-(S/T)-B-(R/K)-(R/K)-
Proteína quinasa B	-X-R-X-(S/T)-X-K-
Ca^{2+}/calmodulina quinasa I	-B-X-R-X-X-(S/T)-X-X-X-B-
Ca^{2+}/calmodulina quinasa II	-B-X-(R/K)-X-X-(S/T)-X-X-
Cadena ligera de la miosina quinasa (músculo liso)	-K-K-R-X-X-S-X-B-B-
Fosforilasa *b* quinasa	*-K-R-K-Q-I-S-V-R-*
Quinasa extracelular regulada por señal (ERK)	-P-X-(S/T)-P-P-
Proteína quinasa dependiente de ciclina (cdc2)	-X-(S/T)-P-X-(K/R)-
Caseína quinasa I	-(Sp/Tp)-X-X-(X)-(S/T)-B
Caseína quinasa II	-X-(S/T)-X-X-(E/D/Sp/Yp)-X-
Receptor β-adrenérgico quinasa	$-(D/E)_n$-(S/T)-X-X-X-
Rodopsina quinasa	$-X-X-(S/T)-(E)_n-$
Receptor de insulina quinasa	*-X-E-E-E-Y-M-M-M-M-K-K-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K-K-K-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-*
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) quinasa	*-E-E-E-E-Y-F-E-L-V-*

Fuentes: Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314,** 191-225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15,** 342-346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266,** 15,555-15,558.

*Se muestran aquí las secuencias consenso deducidas (en tipo redonda) y las secuencias reales de sustratos conocidos (en cursiva). Los residuos de Ser (S), Thr (T) o Tyr (Y) que se fosforilan están en rojo; todos los residuos aminoácidos se presentan en abreviaturas de una letra (véase Tabla 3-1). X representa cualquier aminoácido; B, cualquier aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp e Yp, residuos de Ser, Thr y Tyr ya fosforilados.

lativas. Estas fosforilaciones reguladoras múltiples proporcionan el potencial para una regulación extremadamente sutil de la actividad enzimática.

Para servir como un mecanismo regulador efectivo, la fosforilación ha de ser reversible. En general, los grupos fosforilo se añaden y eliminan mediante enzimas diferentes y por consiguiente los procesos se pueden regular independientemente. Las células contienen una familia de fosfoproteínas fosfatasa que hidrolizan ésteres Ⓟ-Ser, Ⓟ-Thr y Ⓟ-Tyr específicos liberando P_i. Las fosfoproteínas fosfatasa conocidas actúan sólo sobre un conjunto de fosfoproteínas, pero presentan una especificidad de sustrato menor que las proteínas quinasa.

Algunos enzimas y otras proteínas son regulados mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático

En algunos enzimas, la escisión de un precursor inactivo denominado **zimógeno** es necesaria para formar el enzima activo. Muchos enzimas proteolíticos (proteasas) del estómago y del páncreas se regulan de esta manera. La quimotripsina y la tripsina se sintetizan inicialmente en forma de quimotripsinógeno y tripsinógeno, respectivamente (Fig. 6-33). La rotura específica produce cambios conformacionales que hacen asequible el sitio activo del enzima. Dado que este tipo de activación es irreversible, se necesitan otros mecanismos para inactivar estos enzimas. Los enzimas proteolíticos son inactivados por proteínas inhibidoras que se fijan muy fuertemente al sitio activo del enzima. Por ejemplo el inhibidor pancreático de tripsina (M_r 6000) se fija a la tripsina inhibiéndola; la α_1-antiproteinasa (M_r 53.000) inhibe principalmente la elastasa de neutrófilos (los neutrófilos son un tipo de leucocitos, o glóbulos blancos; la elastasa es una proteasa que actúa sobre la elastina, un componente de algunos tejidos conjuntivos). La insuficiencia de α_1-antiproteinasa, que puede ser debida a la exposición al humo del tabaco, se ha asociado con lesiones pulmonares, entre ellas el enfisema.

Las proteasas no son las únicas proteínas activadas por proteolisis. Sin embargo, en otros casos, los precursores no reciben el nombre de zimógenos, sino el más general de **proproteínas** o **proenzimas.** Por ejemplo, el colágeno del tejido conjuntivo se sintetiza inicialmente en forma de un precursor soluble denominado procolágeno. El sistema de coagulación de la sangre aporta muchos ejemplos de activación proteolítica de proteínas. La fibrina, la proteína de los coágulos sanguíneos, se origina por proteolisis de su proproteína inactiva, el fibrinógeno. La proteasa responsable de esta activación es la trombina (similar en muchos aspectos a la quimotripsina), la cual a su vez se origina por proteolisis de una proproteína (en este caso un zimógeno), la protrombina. La coagulación de la sangre trancurre a través de una compleja cascada de activaciones proteolíticas.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

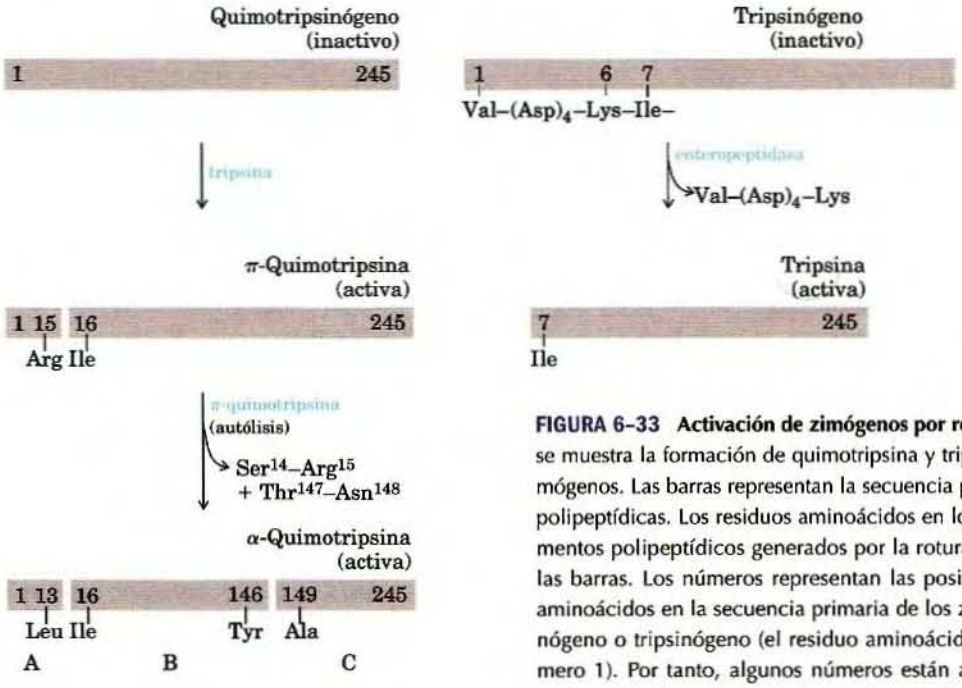


FIGURA 6-33 Activación de zimógenos por rotura proteolítica. Aquí se muestra la formación de quimotripsina y tripsina a partir de sus zimógenos. Las barras representan la secuencia primaria de las cadenas polipeptídicas. Los residuos aminoácidos en los extremos de los fragmentos polipeptídicos generados por la rotura se indican debajo de las barras. Los números representan las posiciones de los residuos aminoácidos en la secuencia primaria de los zimógenos quimotripsinógeno o tripsinógeno (el residuo aminoácido N-terminal es el número 1). Por tanto, algunos números están ausentes en las formas activas. Recuérdese que las tres cadenas polipeptídicas (A, B y C) de la quimotripsina están unidas por puentes disulfuro (véase Fig. 6-18).

Algunos enzimas reguladores utilizan varios mecanismos de regulación

La glucógeno fosforilasa cataliza la primera reacción de una ruta que alimenta el metabolismo energético de los glúcidos a partir de glucosa almacenada (Capítulos 14 y 15). Ésta es una etapa metabólica importante y su correspondiente regulación es compleja. Aunque su regulación primaria es a través de una modificación covalente, como se ha descrito en la Figura 6-31, la glucógeno fosforilasa también es modulada de forma alostérica no covalente por AMP, un activador de la fosforilasa *b*, y por diversas moléculas inhibidoras.

Se han encontrado otros enzimas reguladores complejos en entrecruzamientos metabólicos clave. Uno de los enzimas reguladores más complejos conocidos es la glutamina sintetasa bacteriana, que cataliza una de las etapas que introduce nitrógeno reducido en el metabolismo celular (Capítulo 22). Está regulada alostéricamente (con ocho moduladores alostéricos diferentes, como mínimo), por modificación covalente reversible y mediante la asociación con otras proteínas reguladoras, un mecanismo que se examinará en detalle cuando consideremos la regulación de rutas metabólicas específicas.

¿Cuál es la ventaja de semejante complejidad en la regulación de la actividad enzimática? Hemos empezado este capítulo señalando la importancia central de la catálisis en la existencia de la vida. El *control* de la catálisis también es crítico para la vida. Si todas las reacciones posibles en una célula se catalizaran simultáneamente, las macromoléculas y los metabolitos se degradarían rápidamente a formas químicas más sencillas. Por el contrario, en las células sólo se catalizan las reacciones necesarias en un momento dado. Cuando los recursos químicos son abundantes, se sintetizan y almacenan glucosa y otros metabolitos. Cuando son escasos, las células utilizan estos depósitos para hacer funcionar el metabolismo celular. La energía química se utiliza económicamente, repartiéndose entre las diversas rutas metabólicas según dicten las necesidades celulares. La disponibilidad de poderosos catalizadores, cada uno específico para una reacción determinada, hace posible la regulación de estas reacciones. Éstas a su vez originan la compleja y precisamente regulada sinfonía que denominamos vida.

RESUMEN 6.5 Enzimas reguladores

- La actividad de las rutas metabólicas en las células está regulada mediante el control de las actividades de ciertos enzimas.
- En la retroinhibición, el producto final de una ruta inhibe al primer enzima de la misma.
- La actividad de los enzimas alostéricos se ajusta mediante unión reversible de un modulador específico a un sitio regulador. Los moduladores pueden ser el propio sustrato o algún otro metabolito y el efecto del modulador puede ser activador o inhibidor. El comportamiento cinético de los enzimas alostéricos es un reflejo de las interacciones cooperativas entre subunidades del enzima.

- Otros enzimas reguladores son modulados mediante modificación covalente de un grupo funcional específico necesario para la actividad. La fosforilación de residuos aminoácidos específicos es un método particularmente común de regulación de la actividad enzimática.
- Muchos enzimas proteolíticos se sintetizan como precursores inactivos denominados zimógenos, que se activan por rotura de fragmentos peptídicos pequeños.
- Los enzimas que actúan en importantes intersecciones metabólicas pueden estar regulados a través de combinaciones complejas de efectores, lo que permite la coordinación de las actividades en rutas interconectadas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

enzima 191
cofactor 191
coenzima 191
grupo prostético 192
holoenzima 192
apoenzima 192
apoproteína 192
sitio activo 193
sustrato 193
estado basal 193
variación de energía libre estándar ($\Delta G°$) 194
estado de transición 194
energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) 194
intermediario de reacción 195
paso limitante de velocidad 195
constante de equilibrio (K_{eq}) 195
constante de velocidad 195
energía de fijación (ΔG_B) 196
especificidad 199
encaje inducido 200
catálisis ácido-base específica 200
catálisis ácido-base general 200
catálisis covalente 200
cinética enzimática 202
velocidad inicial, V_0 202
$V_{máx}$ 203
estado pre-estacionario 203
estado estacionario 203
cinética del estado estacionario 203
constante de Michaelis (K_m) 204
ecuación de Michaelis-Menten 204
constante de disociación (K_d) 205
ecuación de Lineweaver-Burk 206
k_{cat} 206
número de recambio 207
inhibición reversible 209
inhibición competitiva 209
inhibición acompetitiva 211
inhibición mixta 211
inhibición no competitiva 211
inhibidores irreversibles 211
inactivador suicida 211
análogos del estado de transición 221
enzima regulador 225
enzima alostérico 225
modulador alostérico 225
retroinhibición 227
proteínas quinasa 228
zimógeno 231

Bibliografía

General

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52.**

Una colección de artículos excelentes sobre temas fundamentales. Continúa siendo muy útil.

Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding,* W. H. Freeman and Company, New York.

Introducción concisa escrita con mucha claridad. Grado avanzado.

Friedmann, H. (ed.) (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry,* vol. 1: *Enzymes,* Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, PA.

Colección de artículos clásicos sobre la química de los enzimas con comentarios históricos a cargo del editor. Sumamente interesante.

Jencks, W.P. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology,* Dover Publications, Inc., New York.

Un libro excepcional y muy avanzado sobre el tema.

Kornberg, A. (1989) *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist,* Harvard University Press, Cambridge.

Principios de la catálisis

Amyes, T.L., O'Donoghue, A.C. & Richard, J.P. (2001) Contribution of phosphate intrinsic binding energy to the enzymatic rate acceleration for triosephosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 11,325–11,326.

Hansen, D.E. & Raines, R.T. (1990) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* **67,** 483–489.

Buen libro para que el estudiante principiante adquiera un mejor conocimiento de los principios de la catálisis.

Harris, T.K. & Turner, G.J. (2002) Structural basis of perturbed pK_a values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* **53,** 85–98.

Kraut, J. (1988) How do enzymes work? *Science* **242,** 533–540.

Landry, D.W., Zhao, K., Yang, G.X.-Q., Glickman, M. & Georgiadis, T.M. (1993) Antibody degradation of cocaine. *Science* **259,** 1899–1901.

Una aplicación interesante de los anticuerpos catalíticos.

Lerner, R.A., Benkovic, S.J. & Schulz, P.G. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* **252,** 659–667.

Miller, B.G. & Wolfenden, R. (2002) Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* **71,** 847–885.

La orotidina monofosfato decarboxilasa parece ser el campeón reinante en la categoría de aumento de la velocidad a cargo de un enzima.

Schramm, V.L. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* **67,** 693–720.

Muchas ilustraciones buenas de los principios presentados en este capítulo.

Cinética

Cleland, W.W. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* **45,** 273–387.

Cleland, W.W. (2002) Enzyme kinetics: steady state. En *Nature Encyclopedia of Life Sciences,* vol. 6, pp. 421–425, Nature Publishing Group, London. Artículo originalmente publicado en 1998. *Encyclopedia* disponible en la red (2001), por suscripción en www.els.net.

Una presentación clara y concisa de los principios básicos.

Raines, R.T. & Hansen, D.E. (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* **65,** 757–759.

Segel, I.H. (1975) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems,* John Wiley & Sons, Inc., New York.

Tratado más avanzado.

Ejemplos de enzimas

Babbitt, P.C. & Gerlt, J.A. (1997) Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **27,** 30,591–30,594.

Una descripción interesante de la evolución de los enzimas con diferentes especificidades catalíticas, haciendo uso de un repertorio limitado de motivos estructurales de proteínas.

Babbitt, P.C., Hasson, M.S., Wedekind, J.E., Palmer, D.R.J., Barrett, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L. & Gerlt, J.A. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α-protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35,** 16,489–16,501.

Kirby, A.J.(2001) The lysozyme mechanism sorted—after 50 years. *Nat. Struct. Biol.* **8,** 737–739.

Una interesante discusión acerca del poder catalítico de los enzimas y los principios en que se sustenta.

Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., & Hwang, J.-K. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry* **28,** 3629–3637.

Enzimas reguladores

Barford, D., Das, A.K. & Egloff, M.-P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27,** 133–164.

Dische, Z. (1976) The discovery of feedback inhibition. *Trends Biochem. Sci.* **1,** 269–270.

Hunter, T. & Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22,** 18–22.

Detalles sobre la variedad de estos importantes enzimas en un eucariota modelo.

Johnson, L.N. & Barford, D. (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22,** 199–232.

Koshland, D.E., Jr. & Neet, K.E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **37,** 359–410.

Monod, J., Changeux, J.-P., & Jacob, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6,** 306–329.

Artículo clásico que introduce el concepto de la regulación alostérica.

Problemas

1. Mantenimiento del sabor dulce del maíz El sabor dulce del maíz recién cosechado es debido a la gran cantidad de azúcar de los granos. El maíz comprado en la tienda (varios días después de la cosecha) no es tan dulce debido a que el 50% del azúcar libre del maíz se convierte en almidón durante el primer día después de la cosecha. Para mantener el sabor dulce del maíz fresco, se sumergen las espigas en agua hirviendo durante unos minutos, enfriándose después en agua fría. El maíz procesado de esta manera y mantenido en un congelador mantiene su dulzor perfectamente. ¿Cuál es la base bioquímica de este proceso?

2. Concentración intracelular de enzimas Para calcular aproximadamente la concentración real de enzimas en una célula bacteriana, suponga que la célula contiene 1000 enzimas diferentes en solución en el citosol y que cada proteína tiene una masa molecular relativa de 100.000. Suponga también que la célula bacteriana es un cilindro (diámetro 1 μm, altura 2 μm). Si el citosol (densidad 1,20) contiene un 20% de proteína soluble en peso y si la proteína soluble consiste únicamente en enzimas, calcule la concentración molar *media* de cada enzima en esta célula hipotética.

3. Incremento de velocidad por la ureasa El enzima ureasa aumenta la velocidad de hidrólisis de la urea a pH 8,0 y 20 °C en un factor de 10^{14}. Si una cantidad dada de ureasa puede hidrolizar completamente una cantidad determinada de urea en 5 min a 20 °C y pH 8,0, ¿cuánto tardará en hidrolizarse esta cantidad de urea en las mismas condiciones pero en ausencia de ureasa? Suponga que ambas reacciones tienen lugar en sistemas estériles, de modo que las bacterias no pueden atacar la urea.

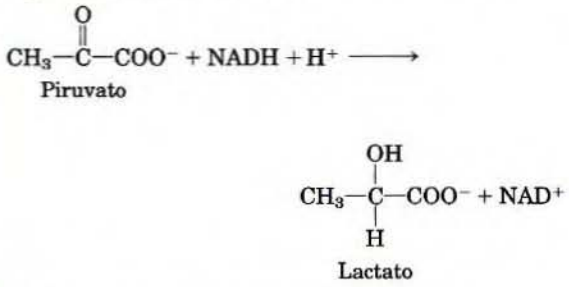
4. Protección de un enzima contra la desnaturalización por el calor Cuando se calientan las soluciones de enzima, se produce una pérdida progresiva de la actividad catalítica con el tiempo debida a la desnaturalización del enzima. Una disolución del enzima hexoquinasa incubada a 45 °C perdió el 50% de su actividad en 12 min, pero, cuando se incubó la hexoquinasa a 45 °C en presencia de una gran concentración de uno de sus sustratos, sólo perdió el 3% de su actividad en 12 min. Explique por qué la desnaturalización térmica de la hexoquinasa se retardó en presencia de uno de sus sustratos.

5. Requerimientos del sitio activo de los enzimas La carboxipeptidasa, que elimina secuencialmente los residuos aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de sus sustratos peptídicos, está formada por una cadena sencilla de 307 aminoácidos. Los dos grupos catalíticos esenciales del sitio activo son proporcionados por Arg^{145} y Glu^{270}.

(a) Si la cadena de carboxipeptidasa fuese una hélice α perfecta, ¿qué distancia existiría (en Å) entre Arg^{145} y Glu^{270}? (Sugerencia: véase Fig. 4-4b.)

(b) Explique por qué estos dos residuos aminoácidos tan lejanos en la secuencia pueden catalizar una reacción que tiene lugar en un espacio de unos pocos angstroms.

6. Determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa El enzima muscular lactato deshidrogenasa cataliza la reacción



NADH y NAD^+ son las formas reducida y oxidada, respectivamente, del coenzima NAD. Las disoluciones de NADH, pero *no* las de NAD^+, absorben luz a 340 nm. Esta propiedad se utiliza para determinar la concentración de NADH en disolución midiendo espectrofotométricamente la cantidad de luz absorbida a 340 nm. Explique cómo se pueden utilizar estas propiedades del NADH para diseñar una determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa.

7. Relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato: ecuación de Michaelis-Menten (a) ¿A qué concentración de sustrato mostrará un enzima cuya k_{cat} es 30,0 s^{-1} y cuya K_m es 0,0050 M una cuarta parte de su velocidad máxima? (b) Determine la fracción de $V_{máx}$ que se encontrará a las siguientes [S]: $\frac{1}{2}K_m$, 2 K_m y 10 K_m.

8. Cálculo de $V_{máx}$ y K_m por observación Aunque existen métodos gráficos para la determinación precisa de los valores de $V_{máx}$ y K_m de una reacción catalizada enzimáticamente (véase Recuadro 6-1), es posible calcular rápidamente estos valores mediante inspección de los valores de V_0 a [S] crecientes. Calcule el valor aproximado de $V_{máx}$ y K_m de la reacción catalizada enzimáticamente para la que se obtuvieron los datos siguientes:

[S] (M)	V_0 (μM/min)
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

9. Propiedades de un enzima de la síntesis de prostaglandinas Las prostaglandinas son un tipo de icosanoides, derivados de ácidos grasos con una variedad de acciones extremadamente potentes en los tejidos de los vertebrados. Las prostaglandinas son las responsables de la aparición de fiebre e inflamación y el dolor asociado. Proceden del ácido araquidónico, ácido graso de 20 carbonos, en una reacción catalizada por el enzima prostaglandina endoperóxido sintasa. Este enzima, una ciclooxigenasa, utiliza oxígeno para convertir el ácido araquidónico en PGG_2, el precursor inmediato de muchas prostaglandinas diferentes (la síntesis de prostaglandinas se describe en el Capítulo 21).

(a) Los siguientes datos cinéticos son para la reacción catalizada por la prostaglandina endoperóxido sintasa. Prestando atención a las dos primeras columnas, determine $V_{máx}$ y K_m del enzima.

[Ácido araquidónico] (mM)	Velocidad de formación de PGG_2 (mM/min)	Velocidad de formación de PGG_2 con 10 mg/mL de ibuprofeno (mM/min)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

(b) El ibuprofeno es un inhibidor de la prostaglandina endoperóxido sintasa. El ibuprofeno reduce la inflamación y el dolor mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Utilizando los datos de la primera y la tercera columna de la tabla, determine el tipo de inhibición que el ibuprofeno ejerce sobre la prostaglandina endoperóxido sintasa.

10. Análisis gráfico de los valores de $V_{máx}$ y K_m Los siguientes datos experimentales se recogieron durante un estudio de la actividad catalítica de una peptidasa intestinal con el sustrato glicilglicina:

$$\text{Glicilglicina} + H_2O \longrightarrow 2 \text{ glicina}$$

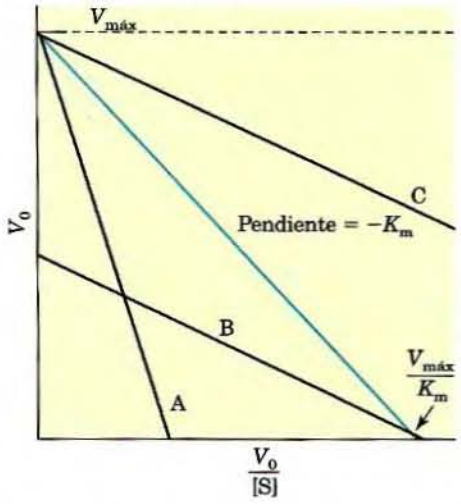
[S] (mM)	Producto formado (μmol/min)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

A partir de estos datos, determine por análisis gráfico (véanse Recuadro 6-1 y su gráfico animado asociado) los valores de $V_{máx}$ y K_m para esta preparación enzimática y su sustrato.

11. Ecuación de Eadie-Hofstee La ecuación de Lineweaver-Burk, o de dobles recíprocos, es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten. Multiplicando ambos miembros de la ecuación de Lineweaver-Burk por $V_{máx}$ y reordenando, se obtiene la ecuación de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m)\frac{V_0}{[S]} + V_{máx}$$

En la gráfica siguiente se nuestra una representación de V_0 frente a $V_0/[S]$ para una reacción catalizada por un enzima. La curva azul se obtuvo en ausencia de inhibidor. ¿Cuál de las otras curvas (A, B o C) muestran la actividad enzimática obtenida cuando se añade un inhibidor competitivo a la mezcla de reacción? Sugerencia: véase Ecuación 6-30.



12. Número de recambio de la carbónico anhidrasa La carbónico anhidrasa de los eritrocitos (M_r 30.000) tiene uno de los mayores números de recambio conocidos. Cataliza la hidratación reversible del CO_2:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Éste es un importante proceso en el transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones. Si 10,0 μg de carbónico anhidrasa pura catalizan la hidratación de 0,30 g de CO_2 en 1 min a 37 °C y $V_{máx}$, ¿cuál es el número de recambio (k_{cat}) de la carbónico anhidrasa (en unidades de min^{-1})?

13. Deducción de la ecuación de velocidad de un inhibidor competitivo La ecuación de velocidad de un enzima sujeto a inhibición competitiva es

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Empezando con una definición nueva del enzima total como

$$[E]_t = [E] + [EI] + [ES]$$

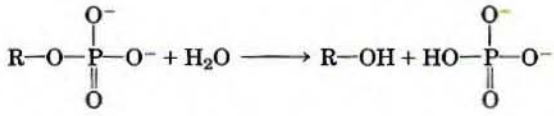
y las definiciones de α y K_I que se proporcionan en el texto, obtenga la anterior ecuación. Utilize como guía la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten.

14. Inhibición irreversible de un enzima Muchos enzimas son inhibidos de manera irreversible por iones de metales pesados tales como Hg^{2+}, Cu^{2+} o Ag^+, los cuales pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo esenciales formando mercapturos:

$$Enz\text{–}SH + Ag^+ \longrightarrow Enz\text{–}S\text{–}Ag + H^+$$

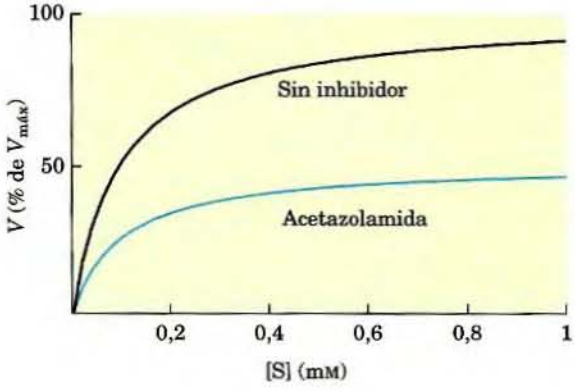
La afinidad de Ag^+ por los grupos sulfhidrilo es tan grande que se puede utilizar para titular grupos —SH de manera cuantitativa. A 10,0 mL de una solución que contenía 1,0 mg/mL de un enzima puro se añadió cantidad suficiente de $AgNO_3$ para inactivar completamente el enzima. Se requirió un total de 0,342 μmol de $AgNO_3$. Calcule la masa molecular mínima del enzima. ¿Por qué el valor obtenido de esta forma sólo da la masa molecular *mínima*?

15. Aplicación clínica de la inhibición enzimática diferencial El suero sanguíneo humano contiene una clase de enzimas denominados fosfatasas ácidas que hidrolizan ésteres fosfato biológicos en condiciones ligeramente ácidas (pH 5,0):



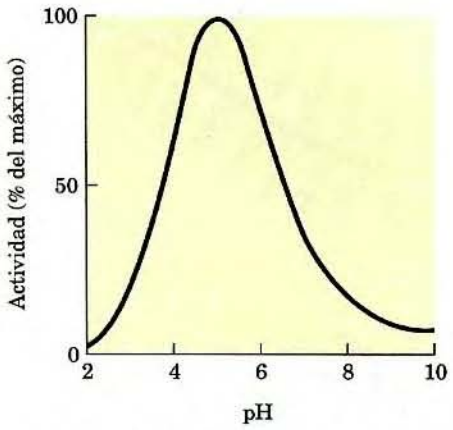
Las fosfatasas ácidas son producidas por los eritrocitos, hígado, bazo, riñón y glándula prostática. El enzima de la glándula prostática es importante en clínica porque un incremento de su actividad en la sangre es con frecuencia un indicador de cáncer de la glándula prostática. La fosfatasa de la próstata es fuertemente inhibida por el ion tartrato mientras que las fosfatasas de los otros tejidos son insensibles al mismo. ¿Cómo se puede utilizar esta información para desarrollar un procedimiento específico para medir la actividad fosfatasa ácida de la glándula prostática en el suero sanguíneo humano?

16. Inhibición de la carbónico anhidrasa por la acetazolamida La carbónico anhidrasa es fuertemente inhibida por el fármaco acetazolamida que se utiliza como diurético (incrementa la producción de orina) y para reducir la presión intraocular del glaucoma (producida por exceso de líquido intraocular). La carbónico anhidrasa juega un papel importante en estos y en otros procesos secretores debido a que participa en la regulación del pH y del contenido de bicarbonato en una serie de fluidos corporales. La curva experimental de la velocidad de reacción (dada aquí en forma de porcentaje de la $V_{máx}$) frente a [S] para la reacción de la carbónico anhidrasa se ilustra en la figura (curva superior). Cuando se repite el experimento en presencia de acetazolamida se obtiene la curva inferior. A partir de la inspección de las curvas y de sus conocimientos de las propiedades cinéticas de los inhibidores enzimáticos competitivos y mixtos, determine la naturaleza de la inhibición por la acetazolamida. Explíquelo.



17. Efectos de los inhibidores reversibles Obtenga la expresión que describe el efecto de un inhibidor reversible sobre la K_m observada (K_m aparente = $\alpha K_m/\alpha'$). Empiece con la Ecuación 6-30 y con la definición de K_m como la [S] a la que $V_0 = V_{máx}/2\alpha'$.

18. pH óptimo del lisozima El sitio activo del lisozima contiene dos residuos aminoácidos esenciales para la catálisis: Glu^{35} y Asp^{52}. Los valores de pK_a de los carboxilos de las cadenas laterales de estos aminoácidos son 5,9 y 4,5, respectivamente. ¿Cuál es el estado de ionización (protonado o desprotonado) de cada residuo a pH 5,2, el pH óptimo del lisozima? ¿De qué modo puede el estado de ionización de estos dos residuos aminoácidos explicar el perfil de actividad frente al pH del lisozima que se muestra en la figura?

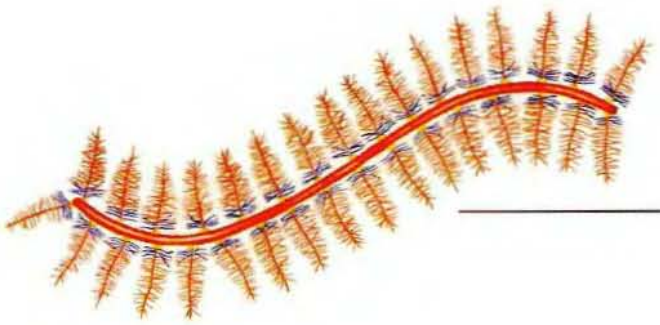


19. Trabajar con la cinética Consulte los gráficos animados del Capítulo 6.

(a) Utilizando el gráfico animado de la Ecuación 6-9, elabore una gráfica de V frente a [S]. Use $V_{máx}$ = 100 μM s^{-1} y K_m = 10 μM. ¿Cuánto se incrementa V_0 cuando [S] aumenta al doble, de 0,2 a 0,4 μM? ¿Cuánto se incrementa V_0 cuando [S] aumenta desde 100 a 200 μM? Observe el cambio en el gráfico cuando se doblan los valores de $V_{máx}$ o de K_m.

(b) Utilizando el gráfico animado de la Ecuación 6-30 y los parámetros cinéticos de (a), elabore una gráfica en la que tanto α como α' sean 1,0. Observe ahora el cambio que se produce cuando α = 2,0; cuando α' = 3,0 y cuando α = 2,0 y α' = 3,0.

(c) Utilizando el gráfico animado de la Ecuación 6-30 y la ecuación de Lineweaver-Burk del Recuadro 6-1, elabore una gráfica de Lineweaver-Burk (de dobles recíprocos) para todos los casos de (a) y (b). Cuando α = 2,0, la intersección en el eje de las x ¿se desplaza hacia la derecha o hacia la izquierda? Si α = 2,0 y α' = 3,0, la intersección en el eje de las x ¿se desplaza hacia la derecha o hacia la izquierda?



capítulo 7

GLÚCIDOS Y GLUCOBIOLOGÍA

7.1 Monosacáridos y disacáridos *238*

7.2 Polisacáridos *247*

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos *255*

7.4 Los glúcidos como moléculas portadoras de información: el código de los azúcares *261*

7.5 Análisis de glúcidos *267*

Ah! Dulce misterio de la vida...

—Rida Johnson Young (letra) y Victor Herbert (música), "Ah! Sweet Mistery of Life", 1910

Sería más optimista acerca de un brillante futuro para el hombre si éste dedicara menos tiempo a intentar dominar la naturaleza y más tiempo a disfrutar de sus dones y respectar su dignidad.

—E.B. White, "Coon Tree", 1977

Los glúcidos son las biomoléculas más abundantes de la Tierra. Cada año, la fotosíntesis convierte más de 100.000 millones de toneladas métricas de CO_2 y H_2O en celulosa y otros productos vegetales. Ciertos glúcidos (como el azúcar y el almidón) son fundamentales en la dieta humana en la mayor parte del mundo y la oxidación de glúcidos es la principal ruta de obtención de energía en la mayoría de las células no fotosintéticas. Los polímeros glucídicos insolubles actúan como elementos estructurales y de protección en las paredes celulares de las bacterias y las plantas y en los tejidos conjuntivos de los animales. Otros polímeros glucídicos lubrican las articulaciones óseas y participan en el reconocimiento y la adhesión intercelulares. Polímeros glucídicos más complejos, unidos covalentemente a proteínas o lípidos, actúan como señal de localización intracelular o de destino metabólico de estas moléculas híbridas denominadas **glucoconjugados.** En este capítulo se introducen las principales clases de glúcidos y glucoconjugados y se dan algunos ejemplos de los muchos papeles estructurales y funcionales que desempeñan.

Los glúcidos son polihidroxialdehídos o cetonas, o bien sustancias cuya hidrólisis da lugar a estos compuestos. Muchos glúcidos comunes, aunque no todos, poseen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$; algunos glúcidos también contienen nitrógeno, fósforo o azufre.

Existen tres clases principales de glúcidos: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (la palabra "sacárido" proviene del griego *sakcharon*, que significa "azúcar"). Los **monosacáridos,** o azúcares simples, consisten en una sola unidad de polihidroxialdehído o cetona. El monosacárido más abundante en la naturaleza es la D-glucosa de seis átomos de carbono, a veces llamada dextrosa. Los monosacáridos de más de cuatro átomos de carbono suelen poseer estructuras cíclicas.

Los **oligosacáridos** consisten en cadenas cortas de unidades de monosacárido, o residuos, unidas por los característicos enlaces glucosídicos. Los más abundantes son los **disacáridos,** formados por dos unidades de monosacárido. El más conocido es la sacarosa, o azúcar de caña, formado por los azúcares de seis carbonos D-glucosa y D-fructosa. Todos los monosacáridos y disacáridos comunes tienen nombres que terminan con el sufijo "-osa". La mayor parte de oligosacáridos con tres o más unidades de monosacárido no se encuentran libres en la célula sino unidos a otro tipo de moléculas (lípidos o proteínas) formando glucoconjugados.

Los **polisacáridos** son polímeros que contienen más de 20 unidades de monosacárido. Algunos polisacáridos constan de centenares o millares de unidades de monosacárido. Algunos polisacáridos, como la celulosa, son cadenas lineales; otros, como el glucógeno, están ramificados. El almidón y la celulosa consisten en unidades repetitivas de D-glucosa, pero difieren en el tipo de enlace glucosídico y tienen propiedades y funciones biológicas notablemente diferentes.

7.1 Monosacáridos y disacáridos

Los glúcidos más simples, los monosacáridos, son aldehídos o cetonas, con uno a más grupos hidroxilo; los monosacáridos

de seis carbonos glucosa y fructosa tienen cinco grupos hidroxilo. Los átomos de carbono a los que se unen los grupos hidroxilo son a menudo centros quirales que dan lugar a muchos estereoisómeros de los azúcares que se encuentran en la naturaleza. Empezaremos este capítulo describiendo las familias de monosacáridos que tienen entre tres y siete átomos de carbono, su estructura y formas estereoisoméricas, y cómo se representan sobre el papel sus estructuras tridimensionales. A continuación, discutiremos algunas reacciones químicas de los grupos carbonilo de monosacáridos. Una de estas reacciones, la adición de un grupo hidroxilo de la misma molécula, genera las formas cíclicas de los azúcares de cinco y seis carbonos (que predominan en disolución acuosa) y da lugar a la aparición de un nuevo centro quiral, que incrementa la complejidad estereoquímica de estos compuestos. Por tanto, también se describirán con cierto detalle la nomenclatura que se utiliza para especificar sin ambigüedad la configuración adoptada por los sustituyentes alrededor de cada átomo de carbono en la forma cíclica y la manera de representar estas estructuras sobre el papel; esta información será de utilidad para la discusión del metabolismo de los monosacáridos en la Parte II. También presentamos en este capítulo algunos derivados de los monosacáridos que encontraremos en capítulos posteriores.

Las dos familias de monosacáridos son las aldosas y las cetosas

Los monosacáridos son sólidos incoloros y cristalinos, solubles en agua e insolubles en disolventes no polares. La mayoría tienen sabor dulce. El esqueleto de los monosacáridos comunes consiste en una cadena de carbonos no ramificada en la que todos los átomos de carbono están unidos por enlaces simples. En todas las formas de cadena abierta, uno de los átomos de carbono está unido a un átomo de oxígeno por un doble enlace, formando un grupo carbonilo; cada uno de los demás átomos de carbono tiene un grupo hidroxilo. Si el grupo carbonilo se halla en un extremo de la cadena carbonada, el monosacárido es un aldehído y recibe el nombre de **aldosa;** si el grupo carbonilo se encuentra en cualquier otra posición, el monosacárido es una cetona y se denomina **cetosa.** Los monosacáridos más simples son las dos triosas de tres átomos de carbono: el gliceraldehído, una aldotriosa, y la dihidroxiacetona, una cetosa (Fig. 7-1a).

Los monosacáridos que poseen cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono en su cadena carbonada se denominan, respectivamente, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas. Existen aldosas y cetosas para cada una de estas longitudes de cadena: aldotetrosas y cetotetrosas, aldopentosas y cetopentosas, y así sucesivamente. Las hexosas, entre las que se cuentan la aldohexosa D-glucosa y la cetohexosa D-fructosa (Fig. 7-1b), son los monosacáridos más comunes en la naturaleza. Las aldopentosas D-ribosa y 2-desoxi-D-ribosa (Fig. 7-1c) son componentes de los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8).

Los monosacáridos tienen centros asimétricos

Todos los monosacáridos excepto la dihidroxiacetona contienen uno o más átomos de carbono asimétricos (quirales) y, por lo tanto, se encuentran en formas isoméricas ópticamente activas (pp. 17-19). La aldosa más sencilla, el gliceraldehído, contiene un centro quiral (el átomo de carbono central) y tiene, por tanto, dos isómeros ópticos, o enantiómeros, diferentes (Fig. 7-2). Por convención, una de estas dos formas se denomina isómero D, la otra isómero L. Como ocurre con otras biomoléculas con centros quirales, la configuración absoluta de los azúcares se ha determinado por cristalografía de rayos X. Para representar sobre el papel la estructura tridimensional de los azúcares se suelen emplear las **fórmulas de proyección de Fisher** (Fig. 7-2).

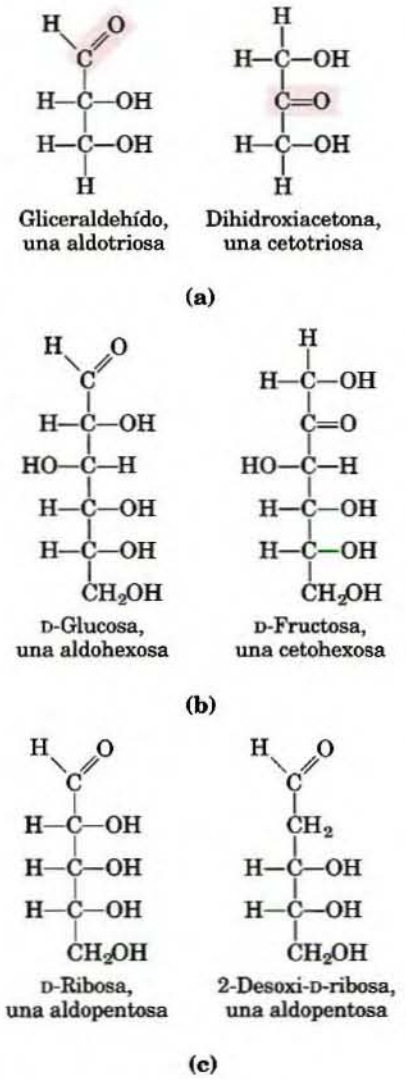
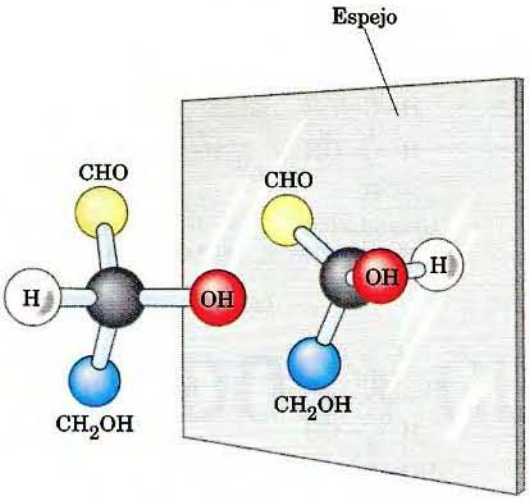
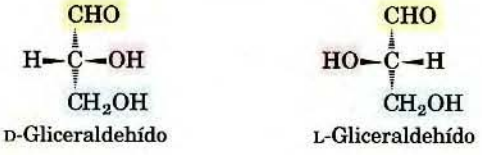


FIGURA 7-1 Monosacáridos representativos. (a) Dos triosas, una aldosa y una cetosa. El grupo carbonilo de cada una está sombreado. **(b)** Dos hexosas comunes. **(c)** Las pentosas que forman parte de los ácidos nucleicos. La D-ribosa es un componente del ácido ribonucleico (RNA) y la 2-desoxi-D-ribosa es un componente del ácido desoxirribonucleico (DNA).



Modelo de bolas y varillas

Fórmulas de proyección de Fisher



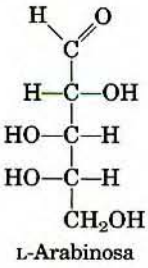
Fórmulas en perspectiva

FIGURA 7-2 Tres modos de representar los dos estereoisómeros del gliceraldehído. Cada esteroisómero es la imagen especular del otro. Los modelos de bolas y varillas muestran la configuración real de las moléculas. Por convención, en las fórmulas de proyección de Fisher, los enlaces horizontales se proyectan hacia fuera del plano del papel, hacia el lector; los enlaces verticales se proyectan por detrás del plano del papel, se alejan del lector. Recuérdese (Fig. 1-17) que en las fórmulas en perspectiva, los enlaces representados con una cuña sólida se proyectan hacia el lector, mientras que las cuñas discontinuas apuntan en sentido opuesto.

En general, una molécula con n centros quirales puede tener 2^n estereoisómeros. El gliceraldehído tiene $2^1 = 2$; las aldohexosas, con cuatro centros quirales, tienen $2^4 = 16$ estereoisómeros. Los estereoisómeros de los monosacáridos de cada una de las longitudes de cadena de átomos de carbono pueden dividirse en dos grupos, que difieren entre ellos en la configuración alrededor del centro quiral *más distante* del grupo carbonilo; aquellos cuya configuración en este carbono de referencia sea la misma que en el D-gliceraldehído se denominan isómeros D, mientras que aquellos que tengan la misma configuración que el L-gliceraldehído son los isómeros L. Cuando el grupo hidroxilo del átomo de carbono de referencia se halla en el lado derecho en la fórmula de proyección, el azúcar es un isómero D; cuando está a la izquierda es un isómero L. De las 16 aldohexosas posibles, 8 son D y 8 L. La mayor parte de las hexosas presentes en los seres vivos son isómeros D.

La Figura 7-3 muestra las estructuras de los estereoisómeros D de todas las aldosas y cetosas que tienen de tres a seis átomos de carbono. Los átomos de carbono de un azúcar se numeran empezando por el extremo de la cadena más próximo al grupo carbonilo. Cada una de las ocho D-aldohexosas, que se diferencian por su estereoquímica en los carbonos C-2, C-3 o C-4, posee su propio nombre: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, etc. (Fig. 7-3a). Las cetosas de cuatro y cinco átomos de carbono se denominan insertando la sílaba "ul" en el nombre de la aldosa correspondiente; por ejemplo, la D-ribulosa es la cetopentosa que corresponde a la aldopentosa D-ribosa. Las cetohexosas se nombran de otra forma; por ejemplo, la fructosa (del latín *fructus*, que significa "fruta"; la fruta contiene importantes cantidades de este azúcar) y la sorbosa (de *Sorbus*, un género de arbusto de montaña, con los frutos ricos en el azúcar relacionado con el alcohol sorbitol). Cuando dos azúcares difieren tan sólo en la configuración alrededor de un átomo de carbono, se denominan **epímeros;** la D-glucosa y la D-manosa, que únicamente difieren en la estereoquímica en C-2, son epímeros, como la D-glucosa y la D-galactosa (que difieren en C-4) (Fig. 7-4).

Algunos azúcares se encuentran en la naturaleza en forma L; como ejemplos tenemos la L-arabinosa y los isómeros L de algunos derivados de azúcares que son componentes habituales de las glucoproteínas (Sección 7.3).



L-Arabinosa

Los monosacáridos comunes tienen estructura cíclica

Hasta ahora, hemos representado las estructuras de aldosas y cetosas en forma de cadenas lineales en aras de la simplicidad (Figs. 7-3, 7-4). No obstante, las aldotetrosas y todos los monosacáridos con cinco o más átomos de carbono en su cadena suelen encontrarse en disolución acuosa en forma de estructuras cíclicas (en anillo), en las que el grupo carbonilo ha formado un enlace covalente con el oxígeno de un grupo hidroxilo perteneciente a la misma cadena. La formación de estas estructuras en anillo es el resultado de una reacción general entre los alcoholes y los aldehídos o las cetonas para formar los derivados denominados **hemiacetales** o **hemicetales** (Fig. 7-5), que contienen un átomo de carbono asimétrico adicional y pueden, por tanto, existir en dos formas estereoisoméricas. Por

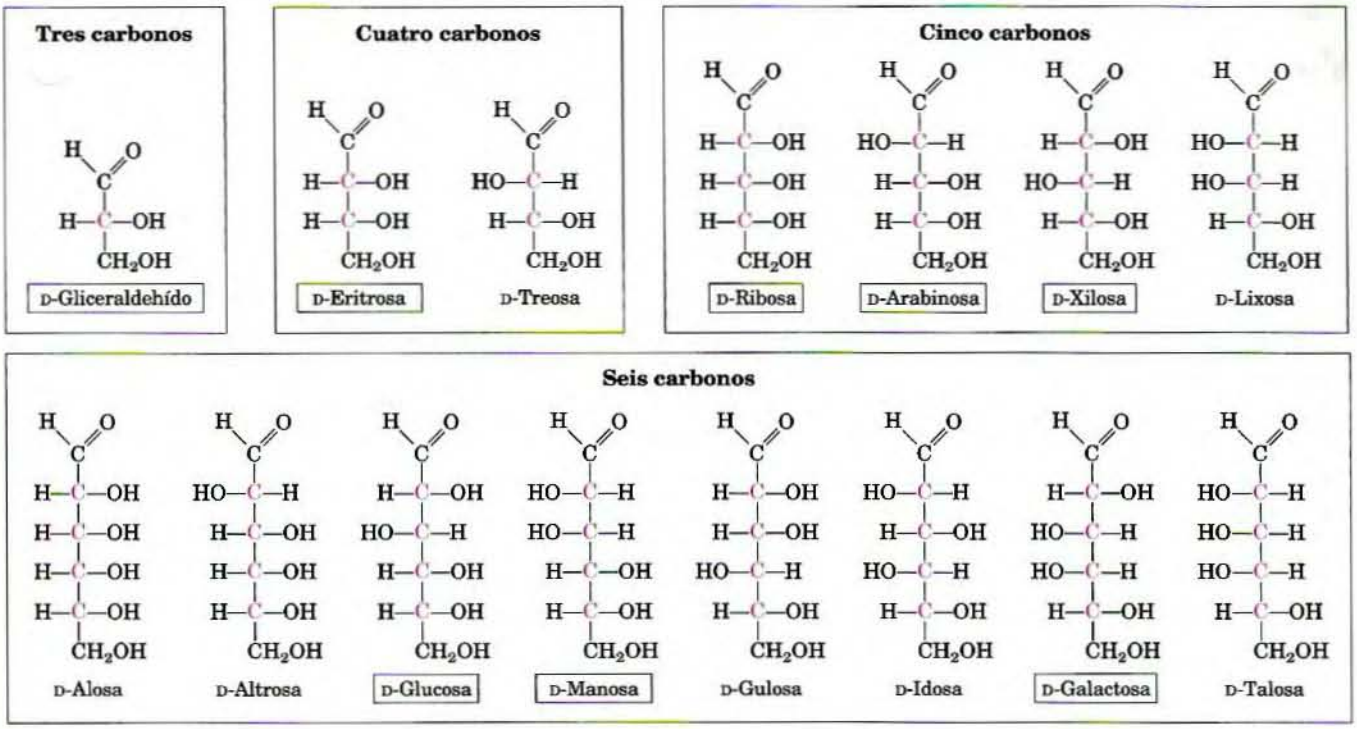


FIGURA 7-3 Aldosas y cetosas. Las series de **(a)** D-aldosas y **(b)** D-cetosas que tienen entre tres y seis átomos de carbono se presentan como fórmulas de proyección. Los átomos de carbono marcados en rojo son centros quirales. En todos estos isómeros D, el carbono quiral *más distante del carbono carbonílico* tiene la misma configuración que el carbono quiral del D-gliceraldehído. Los azúcares cuyos nombres están encuadrados son los más abundantes en la naturaleza; los encontraremos más tarde en éste y en posteriores capítulos.

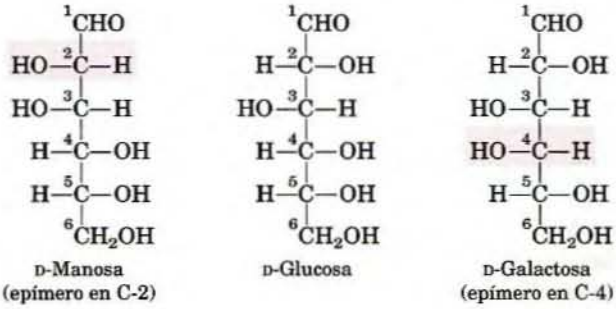


FIGURA 7-4 Epímeros. La D-glucosa y sus dos epímeros se muestran con fórmulas de proyección. Cada epímero difiere de la D-glucosa en la configuración de un solo centro quiral (sombreado en rojo).

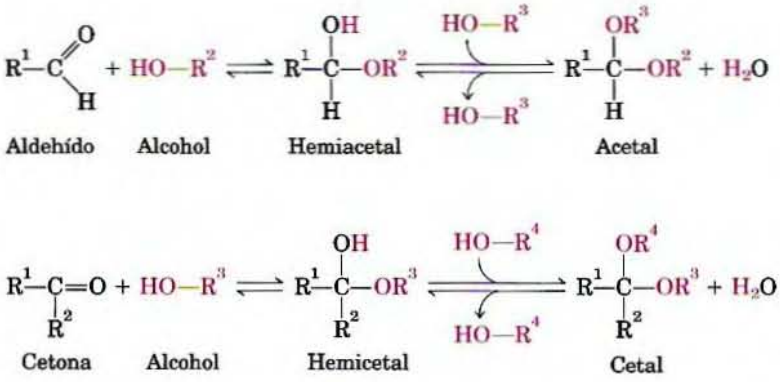


FIGURA 7-5 Formación de hemiacetales y hemicetales. Un aldehído o una cetona pueden reaccionar con un alcohol en relación 1:1 para dar lugar respectivamente a un hemiacetal o un hemicetal, lo que origina un nuevo centro quiral en el carbono carbonílico. La adición de una segunda molécula de alcohol da lugar a la formación de un acetal o un cetal. Cuando el segundo alcohol forma parte de otra molécula de azúcar, el enlace formado es un enlace glucosídico (p. 245).

ejemplo, la D-glucosa se presenta en disolución como un hemiacetal intramolecular en el cual el grupo hidroxilo libre en C-5 ha reaccionado con el C-1 aldehídico, que se convierte en asimétrico y da lugar a dos estereoisómeros designados como α y β (Fig. 7-6). Estos compuestos cíclicos de seis átomos se denominan **piranosas** porque son similares al compuesto cíclico con un anillo de seis átomos denominado pirano (Fig. 7-7). Los nombres sistemáticos de las dos formas cíclicas de la D-glucosa son α-D-glucopiranosa y β-D-glucopiranosa.

Las aldohexosas también presentan formas cíclicas con anillos de cinco átomos que por su similitud con el compuesto cíclico furano, formado por un anillo de cinco átomos, se denominan **furanosas.** Sin embargo, el anillo de seis átomos de aldopiranosa es mucho más estable que el anillo de aldofuranosa y es predominante en las disoluciones de aldohexosas. Únicamente las aldosas que tienen cinco o más átomos de carbono pueden formar anillos de piranosa.

Las formas isoméricas de los monosacáridos que difieren entre sí únicamente en la configuración alrededor del átomo de carbono hemiacetálico o hemicetálico se denominan **anómeros.** El átomo de carbono hemiacetálico o carbonílico se denomina **carbono anomérico.** Los anómeros α y β de la D-glucosa se interconvierten en disolución acuosa mediante un proceso denominado **mutarrotación** (Fig. 7-6). De este modo, una disolución de α-D-glucosa y una disolución de β-D-glucosa dan lugar finalmente a mezclas idénticas en el equilibrio que tienen las mismas propiedades ópticas. Esta mezcla está formada por aproximadamente un tercio de α-D-glucosa, dos tercios de β-D-glucosa y una proporción muy pequeña de las formas lineal y cíclica de cinco átomos (glucofuranosa).

Las cetohexosas se encuentran también en sus formas anoméricas α y β. En estos compuestos el grupo hidroxilo en C-5 (o C-6) reacciona con el grupo cetona en C-2, formando un anillo de furanosa (o de piranosa) que contiene un enlace de tipo hemicetal (Fig. 7-5). La D-fructosa forma fácilmente el anillo de furanosa (Fig. 7-7); la forma anómerica más común de este azúcar tanto combinada como en derivados es la β-D-fructofuranosa.

Las **fórmulas de perspectiva de Haworth** como las mostradas en la Figura 7-7 se emplean normalmente para representar la estereoquímica de las estructuras cíclicas de los monosacáridos. No obstante, el anillo de piranosa de seis miembros no es en realidad plano, como podrían sugerir las perspectivas de Haworth, sino que tiende a asumir una de dos conformaciones en "silla" (Fig. 7-8). Recuérdese del Capítulo 1 (p. 19) que dos *conformaciones* de una molécula son interconvertibles sin necesidad de proceder a la rotura de ningún enlace covalente, mientras que dos *configuraciones* sólo pueden interconvertirse después de la rotura de un enlace covalente, por

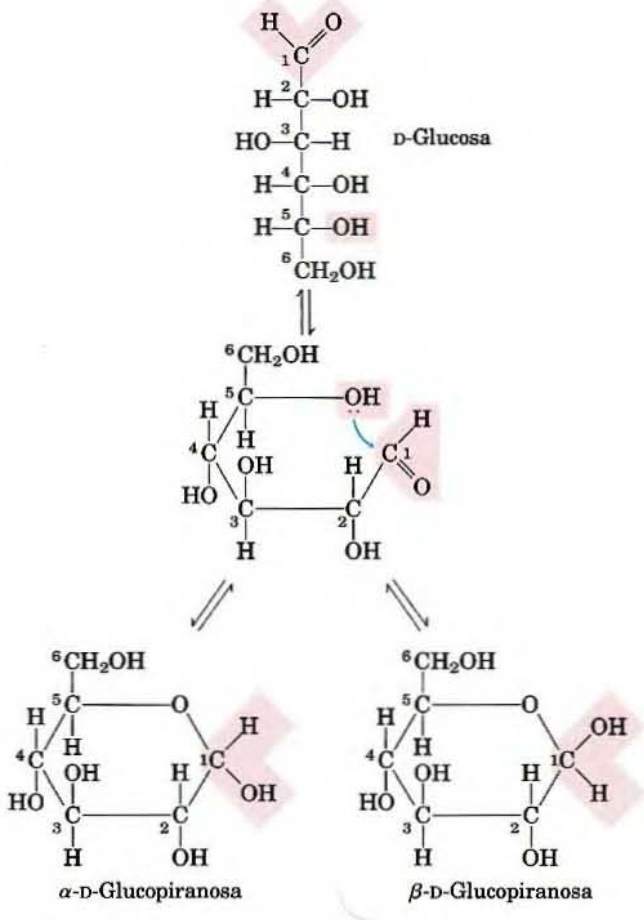


FIGURA 7-6 Formación de las dos formas cíclicas de la D-glucosa. Cuando el grupo aldehído en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 reaccionan para formar un enlace hemiacetálico, se pueden producir dos estereoisómeros, los anómeros α y β, que difieren únicamente en la estereoquímica del carbono hemiacetálico. La interconversión de los anómeros α y β se denomina mutarrotación.

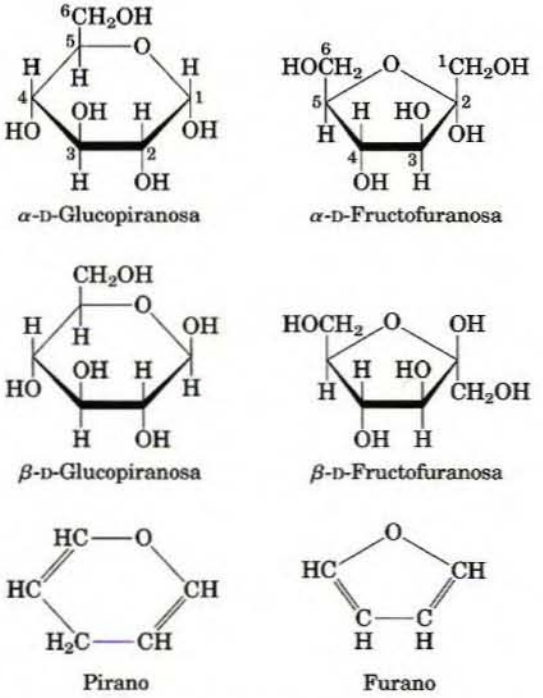


FIGURA 7-7 Piranosas y furanosas. Fórmulas de perspectiva de Haworth de las formas piranosa de la D-glucosa y de las formas furanosa de la D-fructosa. Los lados (enlaces) del anillo más cercanos al lector se representan con trazos gruesos. Los grupos hidroxilo por debajo del plano del anillo en las perspectivas de Haworth se encuentran a la derecha en las proyecciones de Fisher (compárese con Fig. 7-6). Como referencia se muestran las estructuras del pirano y el furano.

ejemplo en el caso de las configuraciones α y β, el enlace en el que participa el átomo de oxígeno del anillo. Veremos más adelante que la conformación tridimensional específica de las unidades de monosacárido es importante en la determinación de las propiedades biológicas y la función de algunos polisacáridos.

Los organismos contienen numerosos derivados de las hexosas

Además de las hexosas sencillas tales como la glucosa, la galactosa y la manosa, existen una serie de derivados en los que un grupo hidroxilo del compuesto original está reemplazado por otros sustituyentes o bien uno de los átomos de carbono se encuentra oxidado en forma de ácido carboxílico (Fig. 7-9). En la glucosamina, la galactosamina y la manosamina, el grupo hidroxilo en C-2 del compuesto original se halla reemplazado por un grupo amino. El grupo amino casi siempre está condensado con ácido acético, como en el caso de la *N*-acetilglucosamina. Este derivado de la glucosamina forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se encuentran los de la pared de la célula bacteriana. Las paredes de las células bacterianas también contienen otro derivado de la glucosamina, el ácido *N*-acetilmurámico, en el cual el ácido láctico (un ácido carboxílico de tres átomos de carbono) está unido mediante un enlace éter con el oxígeno en C-3 de la *N*-acetilglucosamina. La sustitución del grupo hidroxilo en C-6 de la L-galactosa o la L-manosa por un hidrógeno da lugar a L-fucosa y L-ramnosa, respectivamente; estos azúcares en forma desoxi se encuentran en los polisacáridos de las plantas y en los complejos oligosacáridos de glucoproteínas y glucolípidos.

Cuando el carbono carbonílico (aldehídico) de la glucosa se oxida para formar un ácido carboxílico se produce ácido glucónico; otras aldosas dan lugar a otros **ácidos aldónicos.** La oxidación del carbono del otro extremo de la cadena –el C-6 de glucosa, galactosa o manosa– da lugar al correspondiente **ácido urónico:** glucurónico, galacturónico o manurónico. Tanto los ácidos aldónicos como los urónicos forman ésteres intramoleculares estables denominados lactonas (Fig. 7-9, abajo a la izquierda). Además de estos derivados de las hexosas, merece destacarse un azúcar acídico de nueve átomos de carbono: el ácido *N*-acetilneuramínico (un ácido siálico pero que a menudo se lo denomina simplemente "ácido siálico"), un derivado de la *N*-acetilmanosamina, es un componente de muchas glucoproteínas y glucolípidos de animales. Los grupos carboxilos de estos derivados de azúcares acídicos se ionizan a pH 7 y, por tanto, estos compuestos se pueden denominar correctamente carboxilatos –glucuronato, galacturonato, etc.

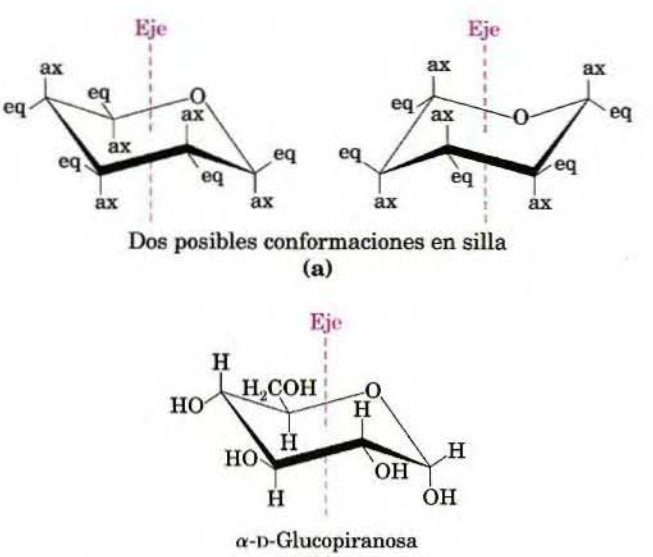


FIGURA 7-8 Fórmulas conformacionales de las piranosas. **(a)** Dos formas conformacionales en silla del anillo de piranosa. Los sustituyentes de los carbonos del anillo pueden ser axiales (ax), que se proyectan casi paralelamente al eje vertical del anillo, o ecuatoriales (eq), que se proyectan de modo aproximadamente perpendicular con respecto al mismo eje. Dos confórmeros de este tipo se interconvierten fácilmente sin romper el anillo. Sin embargo, cuando la molécula se "estira" (por microscopia de fuerza atómica; véase Recuadro 11-1), el suministro de unos 46 kJ de energía por mol de azúcar puede forzar la interconversión de las formas en silla. Normalmente, los sustituyentes en posición ecuatorial sufren menores impedimentos estéricos por parte de los sustituyentes cercanos y las conformaciones en las que los sustituyentes voluminosos se hallan en posición ecuatorial están favorecidas. La conformación de nave es poco habitual, excepto en derivados con sustituyentes muy voluminosos (no se muestra en la figura). **(b)** Conformación en forma de silla de la α-D-glucopiranosa.

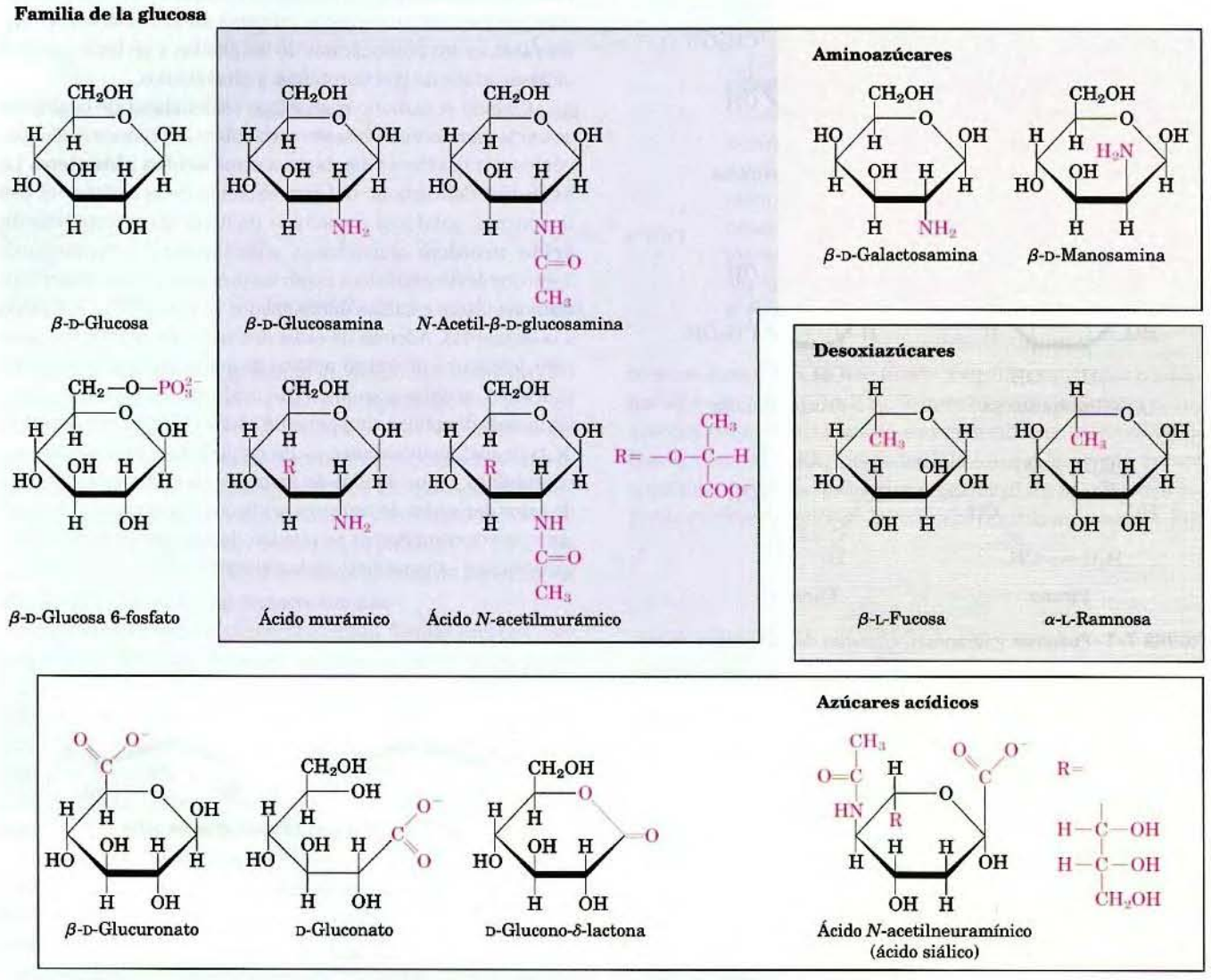


FIGURA 7-9 Algunos derivados de las hexosas de importancia en biología. En los aminoazúcares, un grupo $—NH_2$ reemplaza a uno de los grupos —OH de la hexosa original. La sustitución de un —OH por un —H da lugar a un desoxiazúcar. Obsérvese que los desoxiazúcares mostrados aquí se encuentran en la naturaleza en forma de isómeros L. Los azúcares acídicos contienen un grupo carboxilato, que les confiere una carga negativa a pH neutro. La D-glucono-δ-lactona se forma a partir de ácido glucónico por formación de un enlace éster entre el grupo carboxilato en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 (también denominado carbono δ) del D-gluconato.

En la síntesis y metabolismo de glúcidos los intermediarios no suelen ser los mismos azúcares, sino sus derivados fosforilados. La condensación del ácido fosfórico con uno de los grupos hidroxilo de un azúcar da lugar a un éster fosfato tal como la glucosa 6-fosfato (Fig. 7-9). Los fosfatos de azúcares son relativamente estables a pH neutro y tienen carga negativa. Uno de los efectos de la fosforilación de los azúcares es su retención en el interior de las células; en general, las células no poseen transportadores en la membrana plasmática que permitan el paso de los azúcares fosforilados. La fosforilación también activa a los azúcares para su transformación química. Algunos derivados importantes de los azúcares por fosforilación forman parte de los nucleótidos (véase capítulo siguiente).

Los monosacáridos son agentes reductores

Los monosacáridos pueden ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves como los iones férrico (Fe^{3+}) y cúprico (Cu^{2+}) (Fig. 7-10a). En estas reacciones el carbono carbonílico se oxida a ácido carboxílico. La glucosa y otros azúcares capaces de reducir iones férricos o cúpricos son **azúcares reductores.** Esta propiedad es la base de la reacción de Fehling, un ensayo cualitativo que indica la presencia de azúcares reductores. También se puede estimar la concentración del azúcar midiendo la cantidad de agente oxidante que se reduce por la acción de una disolución de azúcar. Durante muchos años se utilizó este procedimiento para determi-

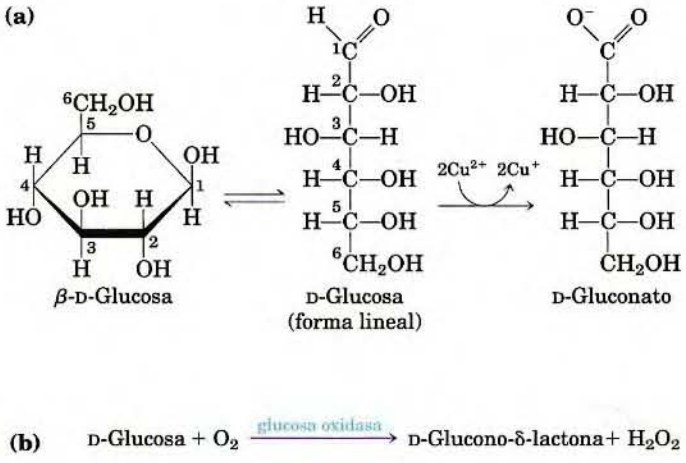


FIGURA 7-10 Azúcares como agentes reductores. (a) La oxidación del carbono anomérico de la glucosa y otros azúcares es la base de la reacción de Fehling. El ion cuproso (Cu^+) producido en condiciones alcalinas forma un precipitado rojizo de óxido cuproso. En forma de hemiacetal (cíclica), el C-1 de la glucosa no puede ser oxidado por el Cu^{2+}. Pero, al encontrarse la forma cíclica en equilibrio con la forma de cadena abierta, la reacción de oxidación puede completarse. La reacción con el Cu^{2+} no es tan simple como la ecuación podría sugerir; además del D-gluconato, se producen varios ácidos de cadena corta por fragmentación de la glucosa. **(b)** La concentración de glucosa en sangre suele determinarse midiendo la cantidad de H_2O_2 producida en la reacción catalizada por la glucosa oxidasa. En la mezcla de reacción, un segundo enzima, la peroxidasa, cataliza la reacción que, a partir del H_2O_2 con un compuesto incoloro, produce un compuesto coloreado, cuya cantidad se mide espectrofotométricamente.

nar el contenido de glucosa en sangre y orina en el diagnóstico de la diabetes mellitus. Hoy hay métodos más sensibles para determinar de glucosa en sangre que emplean el enzima glucosa oxidasa (Fig. 7-10b). ■

Los disacáridos contienen un enlace glucosídico

Los disacáridos (tales como la maltosa, la lactosa y la sacarosa) están formados por dos monosacáridos unidos covalentemente mediante un **enlace *O*-glucosídico,** que se forma cuando un grupo hidroxilo de un azúcar reacciona con el carbono anomérico del otro (Fig. 7-11). Esta reacción da lugar a la formación de un acetal a partir de un hemiacetal (tal como la glucopiranosa) y un alcohol (un grupo hidroxilo de una segunda molécula de azúcar) (Fig. 7-5). Los enlaces glucosídicos se hidrolizan con facilidad por acción de ácidos pero son resistentes a la hidrólisis básica. Por lo tanto, los disacáridos pueden hidrolizarse para dar lugar a sus componentes monosacáridos libres por ebullición en un medio que contenga ácido diluido. Enlaces *N*-glucosídicos unen el carbono anomérico de un azúcar y un átomo de nitrógeno en las glucoproteínas (véase Fig. 7-31) y los nucleótidos (véase Fig. 8-1).

La oxidación del carbono anomérico de un azúcar por iones férricos o cúpricos (la reacción que define a los azúcares reductores) ocurre solamente con la forma lineal, que está en equilibrio con la forma cíclica. Cuando el carbono anomérico participa en un enlace glucosídico, el residuo de azúcar que lo contiene no puede adoptar la forma lineal y, por tanto, se convierte en un azúcar no reductor. Al describir disacáridos o polisacáridos, el extremo de la cadena que contiene el carbono anomérico libre (es decir, aquel que no establece un enlace glucosídico) se suele conocer como **extremo reductor.**

El disacárido maltosa (Fig. 7-11) contiene dos residuos de D-glucosa unidos por un enlace glucosídico entre el C-1 (el carbono anomérico) de un residuo de glucosa y el C-4 de la otra. La maltosa es un disacárido reductor porque mantiene un carbono anomérico libre (el C-1 del residuo de glucosa situado a la derecha en la Fig. 7-11). La configuración del átomo de carbono anomérico del enlace glucosídico es α. La glucosa con un carbono anomérico libre puede existir en las formas α- y β-piranosa.

Deben seguirse algunas reglas con el fin de poder denominar sin ambigüedades disacáridos como la maltosa y en especial otros oligosacáridos más complejos. Por convención, el compuesto se escribe con su extremo no reductor a la izquierda y el nombre "se construye" siguiendo el siguiente orden. (1) Se da la configuración (α o β) del átomo de carbono anomérico que une la primera unidad de monosacárido (izquierda) con la segunda. (2) Se nombra el residuo no reduc-

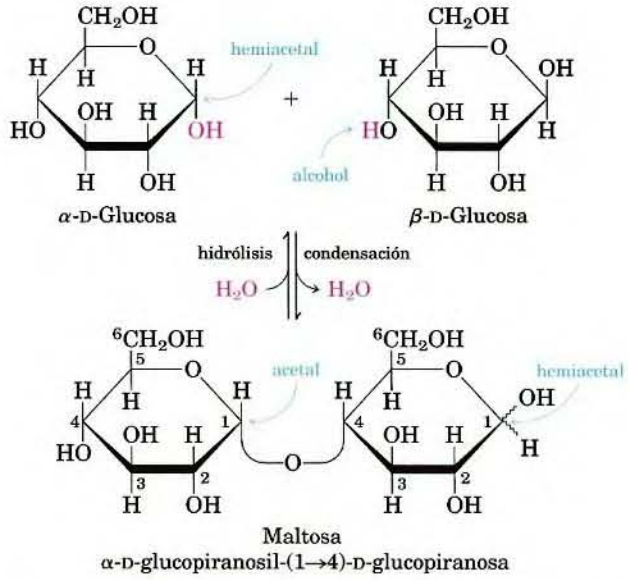
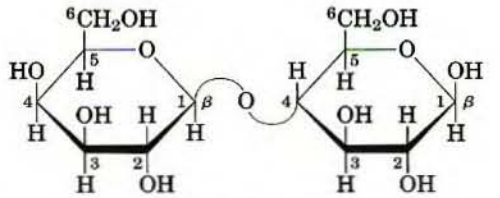


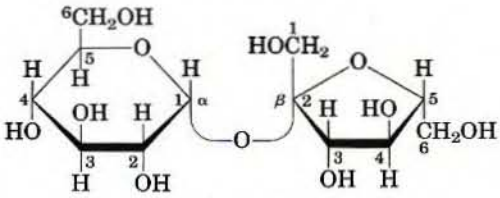
FIGURA 7-11 Formación de maltosa. Un disacárido se forma a partir de dos monosacáridos (aquí, dos moléculas de D-glucosa) cuando un —OH (de un grupo alcohol) de una molécula de glucosa (derecha) se condensa con el hemiacetal intramolecular de otra molécula (izquierda), con eliminación de H_2O y formación de un enlace *O*-glucosídico. La reacción inversa es la de hidrólisis: ataque del enlace glucosídico por una molécula de agua. La molécula de maltosa contiene un hemiacetal reductor en el C-1 no implicado en el enlace glucosídico. Como la mutarrotación interconvierte las formas α y β del hemiacetal, los enlaces en esta posición se representan a veces con líneas onduladas para indicar que la estructura puede ser α y β.

tor. Para distinguir entre estructuras con anillos de cinco o seis átomos, se inserta el vocablo "furano" o "pirano" en el nombre. (3) Los dos átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico se indican entre paréntesis, con una flecha que conecta los dos números; por ejemplo, (1→4) indica que el C-1 del primer residuo de azúcar se une al C-4 del segundo. (4) Se nombra el segundo residuo. Si existe un tercer residuo, se describe a continuación el segundo enlace glucosídico siguiendo las mismas convenciones. Para hacer más corta la descripción de un polisacárido complejo se utilizan a menudo abreviaturas de tres letras para cada monosacárido (Tabla 7-1). Siguiendo esta convención, la maltosa debe denominarse α-D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucopiranosa. Puesto que la mayor parte de los azúcares que encontraremos en este libro son enantiómeros de la serie D y la forma piranosa es predominante entre las hexosas, en general emplearemos una versión reducida del nombre formal de este tipo de compuestos, en la que se especifican la configuración del carbono anomérico y cuáles son los dos átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico. En esta nomenclatura abreviada, la maltosa es Glc(α1→4)Glc.

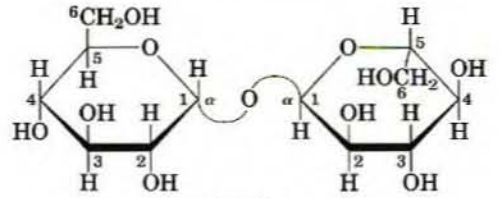
El disacárido lactosa (Fig. 7-12), que da lugar a D-galactosa y D-glucosa por hidrólisis, se encuentra únicamente en la leche. El carbono anomérico del residuo de glucosa puede reducirse y la lactosa es por tanto un disacárido reductor. Su nombre abreviado es Gal(β1→4)Glc. La sacarosa (azúcar de mesa) es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales. Al contrario que la maltosa y la lactosa, la sacarosa no contiene ningún carbono anomérico libre; los dos carbonos anoméricos se encuentran formando el enlace glucosídico (Fig. 7-12). Por tanto, la sacarosa es un azúcar no reductor. Los disacáridos no reductores se nombran como los glucósidos; en este caso, las posiciones unidas son los carbonos anoméricos. En la nomenclatura abreviada, una doble flecha conecta los símbolos que especifican los carbonos anoméricos y sus configuraciones. Por ejemplo, el nombre abreviado de la glucosa es indistintamente Glc(α1↔2β)Fru o Fru(2β↔α1)Glc. La sacarosa en un producto intermedio principal de la fotosíntesis; en muchas plantas es la forma principal para el transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. La trehalosa, Glc(α1↔1α)Glc (Fig. 7-12), es un disacárido de D-glucosa y es un azúcar no reductor. La trehalosa es un constituyente principal del fluido circulante (hemolinfa) de los insectos, con papel de reserva energética.



Lactosa (forma β)
β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosa
Gal(β1→4)Glc



Sacarosa
α-D-glucopiranosil β-D-fructofuranosa
Glc(α1→2β)Fru



Trehalosa
α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranósido
Glc(α1→1α)Glc

FIGURA 7-12 Algunos disacáridos comunes. Como en el caso de la maltosa de la Figura 7-11, se representan en perspectivas de Haworth. Se muestran los nombres comunes, los nombres sistemáticos completos y sus abreviaturas para cada disacárido.

TABLA 7-1 Abreviaturas de los monosacáridos más comunes y de algunos de sus derivados

Abecuosa	Abe	Ácido glucurónico	GlcA
Arabinosa	Ara	Galactosamina	GalN
Fructosa	Fru	Glucosamina	GlcN
Fucosa	Fuc	*N*-Acetilgalactosamina	GalNAc
Galactosa	Gal	*N*-Acetilglucosamina	GlcNAc
Glucosa	Glc	Ácido idurónico	IdoA
Manosa	Man	Ácido murámico	Mur
Ramnosa	Rha	Ácido *N*-acetilmurámico	Mur2Ac
Ribosa	Rib	Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)	Neu5Ac
Xilosa	Xyl		

RESUMEN 7.1 Monosacáridos y disacáridos

- Los azúcares (también llamados sacáridos) son compuestos que contienen un grupo aldehído o cetona y dos o más grupos hidroxilo.
- Los monosacáridos contienen generalmente varios carbonos quirales y, por tanto, existen en una diversidad de formas estereoquímicas que pueden representarse sobre el papel en forma de proyecciones de Fischer. Los epímeros son azúcares que difieren en la configuración de un solo átomo de carbono.
- Los monosacáridos forman normalmente hemiacetales o hemicetales internos en los que el grupo aldehído o cetona se une con un grupo hidroxilo de la misma molécula, creando una estructura cíclica; esto se puede representar mediante las fórmulas de perspectiva de Haworth. El átomo de carbono que se encontraba originalmente en el grupo aldehído o cetona (el carbono anomérico) puede adoptar una de dos configuraciones posibles; α y β, que son interconvertibles por mutarrotación. En la forma lineal, que está en equilibrio con las formas cicladas, el carbono anomérico se oxida fácilmente.
- Un grupo hidroxilo de un monosacárido puede adicionarse al carbono anomérico de un segundo monosacárido formando un acetal. En este disacárido el enlace glucosídico protege el carbono anomérico de la oxidación.
- Los oligosacáridos son polímeros cortos de varios monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. En un extremo de la cadena, el extremo reductor, hay un monosacárido cuyo carbono anomérico no forma parte de un enlace glucosídico.
- La nomenclatura común para los di- u oligosacáridos especifica el orden de las unidades monosacáridas, la configuración en cada carbono anomérico y los átomos de carbono que intervienen en el enlace(s) glucosídico(s).

7.2 Polisacáridos

La mayoría de glúcidos naturales se encuentran en forma de polisacáridos, polímeros de media y elevada masa molecular. Los polisacáridos, denominados también **glucanos,** difieren entre sí en la naturaleza de sus unidades monoméricas repetitivas, en la longitud de sus cadenas, en los tipos de enlace que se forman entre las unidades y en su grado de ramificación. Los **homopolisacáridos** contienen un único tipo de monómero; los **heteropolisacáridos** contienen dos o más tipos diferentes (Fig. 7-13). Algunos homopolisacáridos sirven para el almacenamiento de monosacáridos que se usan como combustible biológico; el almidón y el glucógeno son homopolisacáridos de este tipo. Otros homopolisacáridos (como por ejemplo la celulosa y la quitina) actúan como elementos estructurales en las paredes celulares de plantas y en el exoesqueleto de animales.

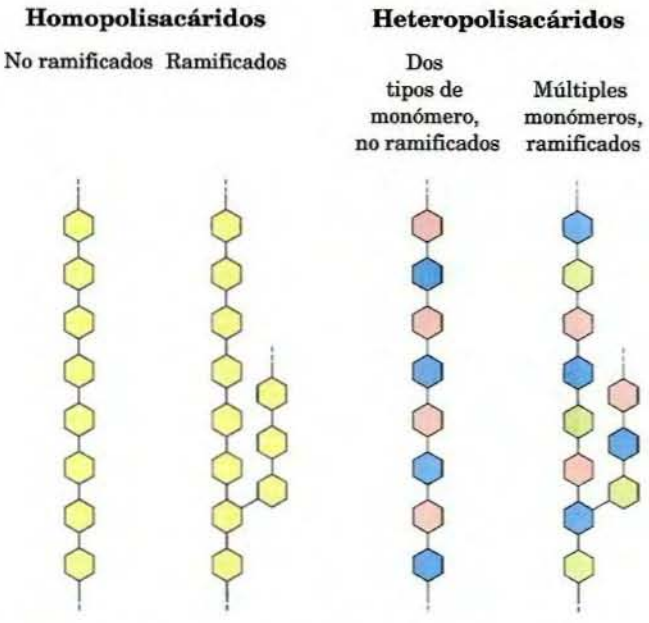


FIGURA 7-13 Homo- y heteropolisacáridos. Los polisacáridos pueden estar compuestos por uno, dos o varios monosacáridos diferentes y formar cadenas lineales o ramificadas de longitudes diversas.

Los heteropolisacáridos proporcionan soporte extracelular a todos los organismos. La capa rígida de la envoltura de la célula bacteriana (el peptidoglucano) es un heteropolisacárido formado por dos unidades de monosacárido alternadas. En los tejidos animales, el espacio extracelular se encuentra ocupado por diversos tipos de heteropolisacáridos, que forman una matriz que mantiene unidas a las células individuales y proporciona protección, forma y sostén a células, tejidos y órganos.

A diferencia de las proteínas, los polisacáridos no suelen tener masas moleculares definidas. Ello se debe a los diferentes mecanismos de formación de los dos tipos de polímeros. Como se verá en el Capítulo 27, las proteínas se sintetizan a partir de un molde (RNA mensajero) de secuencia y longitud definidas por acción de enzimas que copian el molde con fidelidad. No hay molde para la síntesis de polisacáridos; en lugar de ello, el programa para la síntesis de polisacáridos depende tan sólo de los enzimas que catalizan la polimerización de las unidades monoméricas, y no hay un punto específico para la finalización del proceso de síntesis.

Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de combustible

Los polisacáridos de reserva más importantes son el almidón de las células vegetales y el glucógeno de las células animales. Ambos polisacáridos se encuentran en el interior de la célula formando agregados o gránulos de gran tamaño (Fig. 7-14). Las moléculas de almidón y glucógeno están muy hidratadas porque tienen muchos grupos hidroxilo expuestos que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. La mayor parte de las células vegetales tienen capacidad para sintetizar almidón, pero este compuesto es especialmente abundante en tubérculos, tales como la patata, y en las semillas.

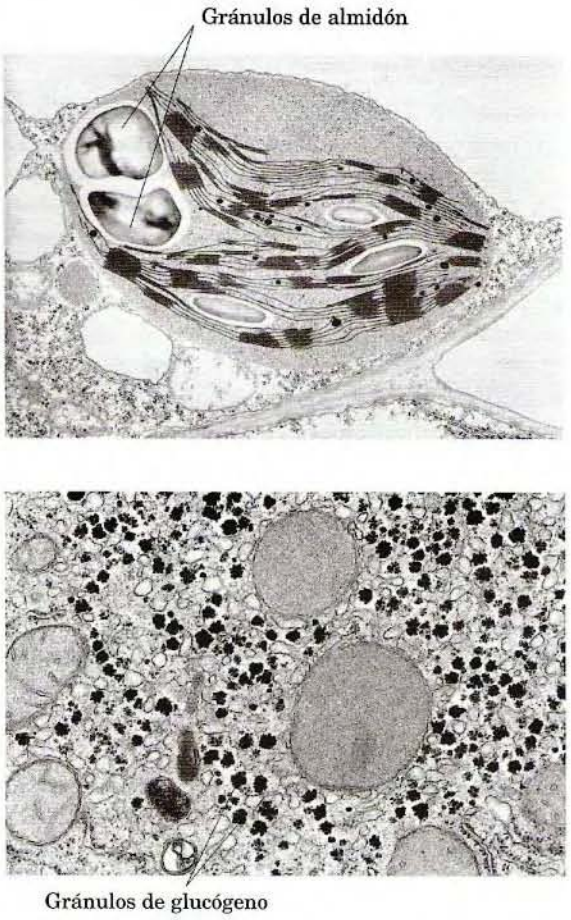


FIGURA 7-14 Micrografías electrónicas de gránulos de almidón y de glucógeno. **(a)** Gránulos de almidón de gran tamaño en un cloroplasto. El almidón se sintetiza en el cloroplasto a partir de D-glucosa formada fotosintéticamente. **(b)** Gránulos de glucógeno en un hepatocito. Estos gránulos se forman en el citosol y son mucho más pequeños (~0,1 μm) que los gránulos de almidón (~1,0 μm).

El **almidón** contiene dos tipos de polímero de glucosa, la amilosa y la amilopectina (Fig. 7-15). El primero consiste en cadenas largas y no ramificadas de unidades de D-glucosa conectadas por enlaces (α1→4). Éstas tienen una masa molecular de unos pocos miles a más de un millón. La amilopectina también posee una elevada masa molecular (hasta 100 millones), pero está muy ramificada. Los enlaces glucosídicos que unen residuos sucesivos de glucosa en las cadenas de amilopectina son (α1→4); los puntos de ramificación (cada 24 a 30 residuos) son enlaces (α1→6).

El **glucógeno** es el polisacárido de reserva más importante en las células animales. Al igual que la amilopectina, el glucógeno es un polímero con subunidades de glucosa unidas por enlaces (α1→4) y con ramificaciones del tipo (α1→6), pero el glucógeno está más ramificado (en promedio, cada 8 a 12 residuos) y es más compacto que el almidón. El glucógeno es especialmente abundante en el hígado, donde puede llegar a representar el 7% de su peso húmedo; también se encuentra en el músculo esquelético. En los hepatocitos el glucógeno está en forma de gránulos de gran tamaño (Fig. 7-14b), que son a su vez agrupaciones de gránulos más pequeños, compuestos por moléculas individuales y altamente ramificadas de glucógeno con una masa molecular de varios millones. Los gránulos de glucógeno también contienen, íntimamente unidos, los enzimas responsables de su síntesis y degradación.

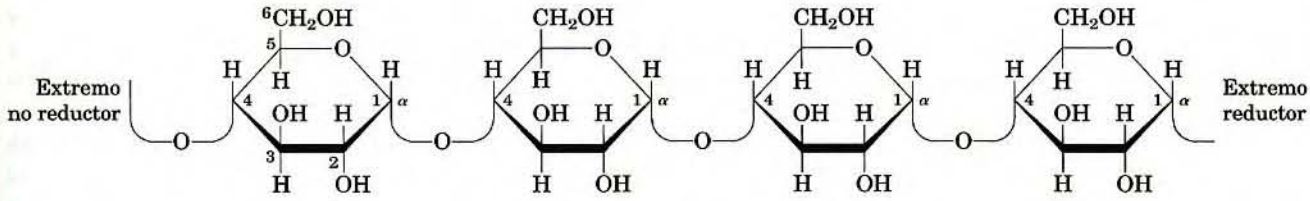
Puesto que cada rama de glucógeno termina con un azúcar no reductor, una molécula de glucógeno tiene tantos extremos no reductores como ramas, pero sólo un extremo reductor. Cuando el glucógeno se emplea como fuente de energía, las unidades de glucosa son eliminadas de una en una desde los extremos no reductores. Dada la naturaleza ramificada de la amilopectina y el glucógeno, los enzimas degradativos que actúan solamente sobre los extremos no reductores pueden trabajar simultáneamente en muchas ramas, aumentando la velocidad de conversión del polímero en monosacáridos.

¿Por qué razón la glucosa no se almacena en forma monomérica? Se ha calculado que el glucógeno almacenado en los hepatocitos equivale a una concentración de glucosa de 0,4 M. En cambio, la concentración real de glucógeno, que es insoluble y contribuye poco a la osmolaridad del citosol, es de aproximadamente 0,01 μM. Si el citosol contuviera una disolución de glucosa 0,4 M, la osmolaridad de la célula sería peligrosamente elevada, lo que provocaría la entrada osmótica de agua que podría ocasionar la ruptura de la célula (véase Fig. 2-13). Además, con una concentración intracelular de glucosa de 0,4 M y una concentración externa de aproximadamente 5 mM (concentración en sangre en los mamíferos), la variación de energía libre para la captación celular de glucosa contra este gradiente de concentración tan alto sería excesivamente elevada.

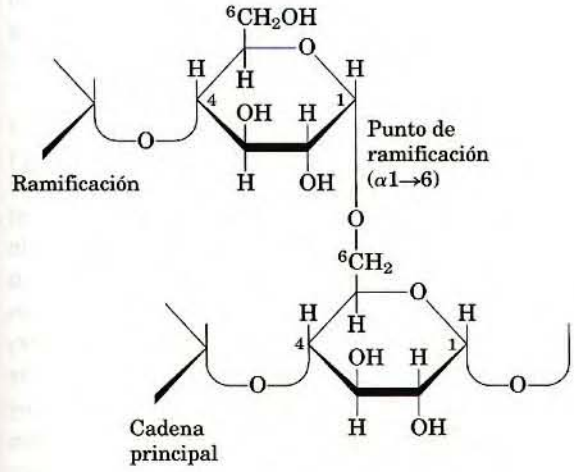
Los **dextranos** son polisacáridos de D-glucosa unida por enlaces (α1→6), presentes en bacterias y levaduras; todos tienen ramificaciones (α1→3) y algunos también (α1→2) o (α1→4). La placa dental, producida por las bacterias que crecen en la superficie de los dientes, es rica en dextranos. Los dextranos sintéticos se usan en diversos productos comerciales (por ejemplo, el Sephadex) utilizados en el fraccionamiento de proteínas por filtración molecular (véase Fig. 3-18b). En estos productos los dextranos están entrecruzados para formar materiales insolubles de diferente porosidad, que dejan pasar macromoléculas de diferente tamaño.

Algunos polisacáridos tienen función estructural

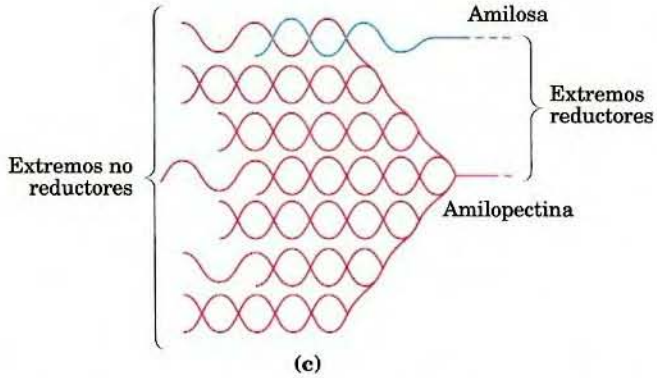
La celulosa se encuentra en las paredes celulares de plantas, en particular en cañas, tallos, troncos y en todos los tejidos vegetales leñosos. Constituye una gran parte de la masa de la madera, y el algodón es casi celulosa pura. Como la amilosa y las cadenas principales de la amilopectina y el glucógeno, la celulosa es un polímero lineal no ramificado formado por unas 10.000 a 15.000 unidades de D-glucosa. No obstante, hay una diferencia muy importante: los residuos de glucosa de la celulosa tienen configuración β (Fig. 7-16), mientras que en la amilosa, la amilopectina y el glucógeno, la glucosa se encuentra en configuración α. Los residuos de glucosa de la celulosa están unidos por enlaces glucosídicos (β1→4), a diferencia de los



(a) Amilosa



(b)

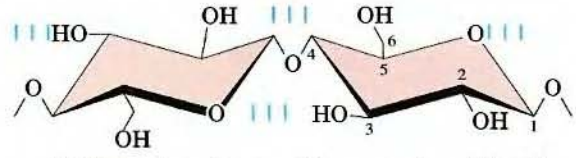


(c)

FIGURA 7-15 Amilosa y amilopectina, los polisacáridos del almidón. **(a)** Un pequeño fragmento de amilosa, un polímero lineal de unidades de D-glucosa unidas por enlaces (α1→4). Cada cadena de polímero puede contener varios miles de residuos de D-glucosa. La amilopectina presenta segmentos de residuos unidos de forma similar a la amilosa entre los puntos de ramificación. **(b)** Un punto de ramificación (α1→6) de la amilopectina. **(c)** Un acúmulo de amilosa y amilopectina del tipo que podría encontrarse en los gránulos de almidón. Los filamentos de amilopectina (en rojo) forman una estructura de doble hélice entre sí o con los filamentos de amilosa (en azul). Los residuos de glucosa en los extremos no reductores de las ramificaciones externas se eliminan enzimáticamente durante la movilización intracelular del almidón para producir de energía. El glucógeno tiene una estructura similar, pero está más ramificado y es más compacto.

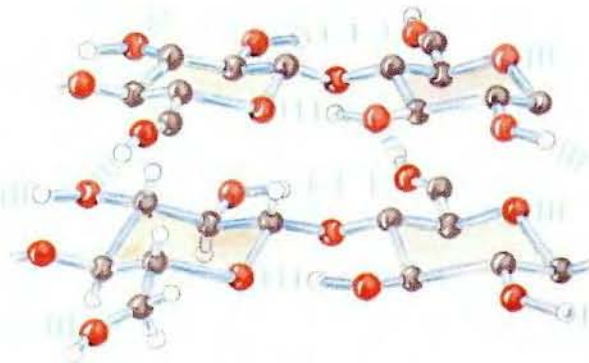
enlaces (α1→4) de la amilosa, el almidón y el glucógeno. Esta diferencia hace que la estructura tridimensional y las propiedades físicas de la celulosa y la amilosa sean muy diferentes.

El glucógeno y el almidón que se ingieren con la dieta son hidrolizados por α-amilasas, enzimas contenidos en la saliva y en el jugo intestinal y capaces de romper enlaces glucosídicos (α1→4) entre unidades de glucosa. La mayoría de animales no pueden utilizar la celulosa como fuente de energía, pues no poseen un enzima capaz de hidrolizar los enlaces (β1→4).



Unidades de D-glucosa unidas por enlaces (β1→4)

(a)



(b)

FIGURA 7-16 Estructura de la celulosa. **(a)** Dos unidades de una cadena de celulosa; las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces (β1→4). Las estructuras de silla rígida pueden presentar movimiento de rotación entre ellas. **(b)** Dibujo a escala de los segmentos de dos cadenas paralelas de celulosa, donde se muestra la conformación de los residuos de D-glucosa y los enlaces de hidrógeno entrelazantes. En la unidad de hexosa de la parte inferior izquierda se muestran todos los átomos de hidrógeno; en las otras tres unidades de hexosa se han omitido los hidrógenos unidos a átomos de carbono para mayor claridad en la representación, puesto que no participan en enlaces de hidrógeno.

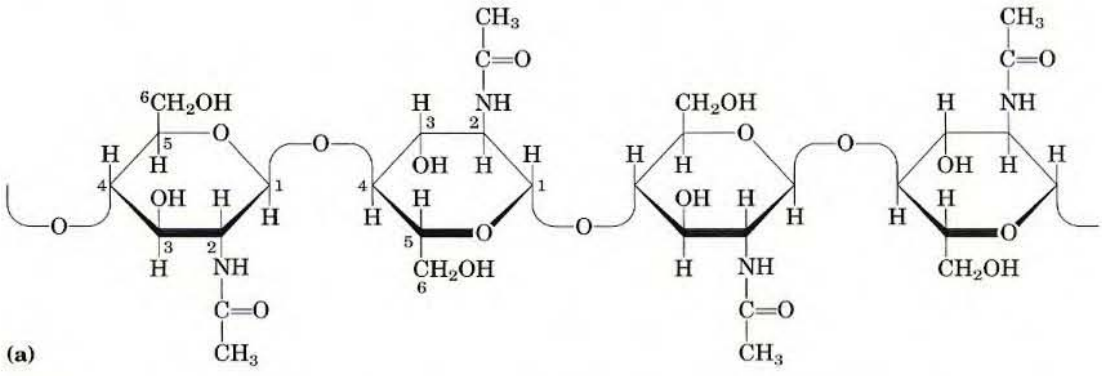
FIGURA 7-17 Degradación de la celulosa por los hongos de la madera. Un hongo de la madera creciendo en un tocón de roble. Todos los hongos de la madera tienen el enzima celulasa, que rompe los enlaces glucosídicos (β1→4) de la celulosa y hace posible el uso de la madera como fuente de azúcar metabolizable (glucosa) por los hongos. Los únicos vertebrados capaces de utilizar la celulosa como nutriente son el ganado vacuno y otros rumiantes (ovejas, cabras, camellos, jirafas). El compartimiento estomacal adicional (rumen) aloja bacterias y protozoos que secretan celulasa.

Las termitas pueden digerir celulosa gracias a que en su tracto intestinal se aloja un microorganismo simbiótico, *Trichonympha*, la cual secreta celulasa, que hidroliza los enlaces (β1→4). Los hongos que crecen en la madera en putrefacción y las bacterias también producen celulasa (Fig. 7-17).

La **quitina** es un homopolisacárido lineal compuesto por residuos de *N*-acetilglucosamina que se encuentran unidos por enlaces β (Fig. 7-18). La única diferencia química con respecto a la celulosa es el cambio del grupo hidroxilo en C-2 por un grupo amino acetilado. La quitina forma fibras extendidas similares a las de la celulosa y no es digerible por los vertebrados. Es el componente principal de los duros exoesqueletos de casi el millón de especies de artrópodos –insectos, langostas y cangrejos, por ejemplo– y es, probablemente, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa.

Factores estéricos y los puentes de hidrógeno contribuyen al plegamiento de los homopolisacáridos

El plegamiento de los polisacáridos en tres dimensiones responde a los mismos principios que gobiernan la estructura de los polipéptidos: subunidades con estructura covalente más o menos rígida forman estructuras macromoleculares tridimensionales estabilizadas por interacciones débiles intra- o intermoleculares: puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y, en polímeros con subunidades cargadas, interacciones electrostáticas. Al tener los polisacáridos tantos grupos hidroxilo, los puentes de hidrógeno tienen una especial importancia en su estructura. El glucógeno, el almidón y la celulosa están formados de subunidades de piranosa (con anillos de seis átomos) al igual que los oligosacáridos de las glucoproteínas y los glucolípidos que se estudiarán más adelante. Estas moléculas pueden representarse como una serie de anillos rígidos de piranosa conectados por un átomo de oxígeno que une dos átomos de carbono (el enlace glucosídico). En principio, hay libertad de rotación en torno a los enlaces C—O que



(a)

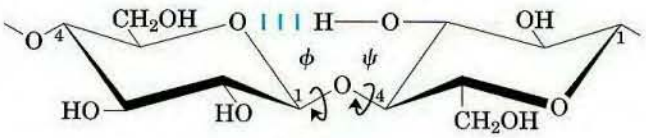
FIGURA 7-18 Quitina. (a) Segmento corto de quitina, un homopolímero de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina con enlaces (β1→4). **(b)** Un coleóptero (*Pelidnota punctata*) con su exosqueleto de quitina.

(b)

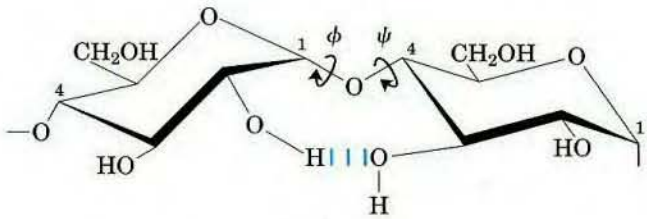
unen los residuos (Fig. 7-16a), pero, como en los polipéptidos (véanse Figs. 4-2, 4-9), la rotación alrededor de cada enlace está limitada por los impedimentos estéricos de los sustituyentes. La estructura tridimensional de estas moléculas puede ser descrita en términos de los ángulos diedro, ϕ y ψ, del enlace glucosídico (Fig. 7-19), análogos a los ángulos ϕ y ψ del enlace peptídico (véase Fig. 4-2). El volumen del anillo de piranosa y de sus sustituyentes provoca que su tamaño y forma impongan restricciones a los ángulos ϕ y ψ; algunas conformaciones son mucho más estables que otras, como puede verse en un mapa de energía en función de ϕ y ψ (Fig. 7-20).

La estructura tridimensional más estable del almidón y el glucógeno es una espiral compacta (Fig. 7-21), estabilizada por puentes de hidrógeno intercatenarios. En la amilosa (sin ramificar) esta estructura es lo suficientemente regular como para hacer posible su cristalización y, por lo tanto, la determinación de su estructura por difracción de rayos X. A lo largo de la cadena de amilosa, cada residuo forma un ángulo de 60° con el residuo precedente, de manera que la hélice tiene seis residuos por vuelta. En la amilosa el orificio de la hélice tiene las dimensiones justas para acomodar yodo en forma de I^{3-} o I^{5-} (iones yoduro) y esta interacción con el yodo constituye el fundamento de la determinación cualitativa habitual de la amilosa.

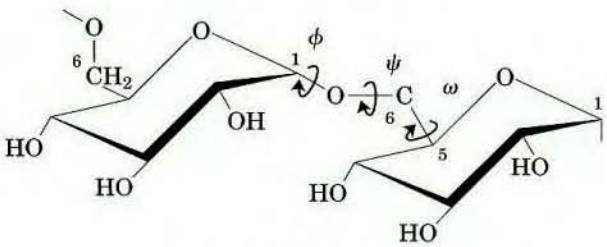
La conformación más estable de la celulosa es aquella en que cada silla experimenta una rotación de 180° en relación con sus vecinas, lo cual genera una cadena extendida. Todos los grupos —OH están disponibles para formar puentes de hidrógeno con cadenas vecinas. Una red estable de puentes de hidrógeno inter- e intracatenarios entre varias cadenas dispuestas paralelamente produce fibras supramoleculares estables con gran resistencia a la tracción (Fig. 7-16b). Esta propiedad de la celulosa la ha hecho útil durante milenios.



Celulosa
Repeticiones de (β1→4)Glc

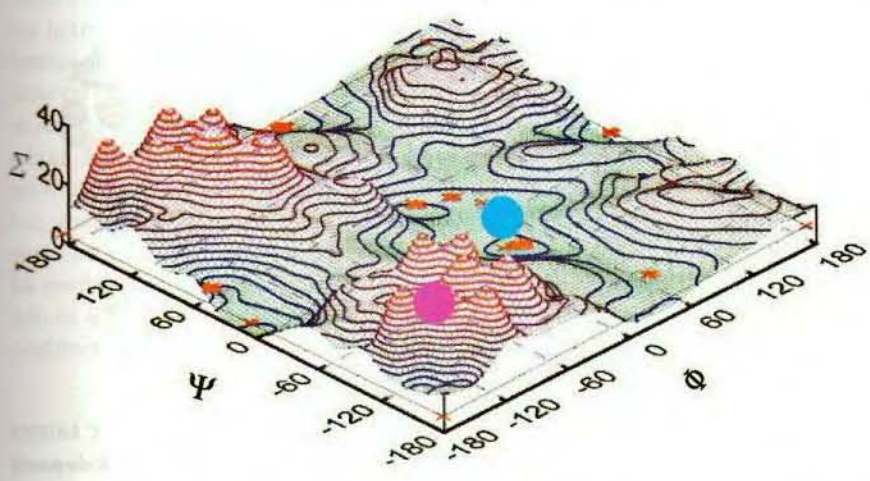


Amilosa
Repeticiones de (α1→4)Glc



Dextrano
Repeticiones (α1→6)Glc, con ramificaciones (α1→3)

FIGURA 7-19 Conformación de los enlaces glucosídicos de la celulosa, la amilosa y el dextrano. Los polímeros se representan como anillos rígidos de piranosa unidos por enlaces glucosídicos con rotación libre en torno a estos enlaces. Obsérvese que en el dextrano hay rotación libre en torno del enlace entre C-5 y C-6 (ángulo de torsión ω).



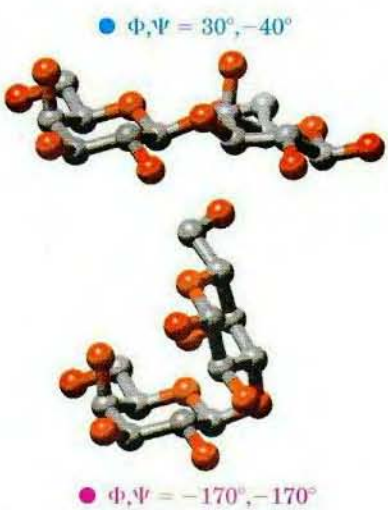


FIGURA 7-20 Mapa de las conformaciones más favorables de oligosacáridos y polisacáridos. Los ángulos de torsión ψ y ϕ (véase Fig. 7-19) pueden en principio tener cualquier valor entre 0° y 360°. De hecho, algunos ángulos de torsión dan lugar a conformaciones estéricamente prohibidas, mientras que otras dan conformaciones que maximizan los puentes de hidrógeno. Cuando la energía relativa se representa para cada valor de ϕ y ψ, con los contornos de isoenergía ("misma energía") dibujados a intervalos de 1 kcal/mol por encima del estado de mínima energía, se obtiene un mapa de las conformaciones más favorables, análogo a la representación de Ramachandran para péptidos (véanse Figs. 4-3, 4-9). Dos conformaciones extremas energéticamente para el disacárido gal(β1→3)gal se sitúan en el diagrama de energía en las posiciones indicadas por los círculos coloreados. Las conformaciones conocidas de los tres polisacáridos mostrados en la Figura 7-19 se han determinado por cristalografía de rayos X y se encuentran en las regiones de menor energía del mapa.

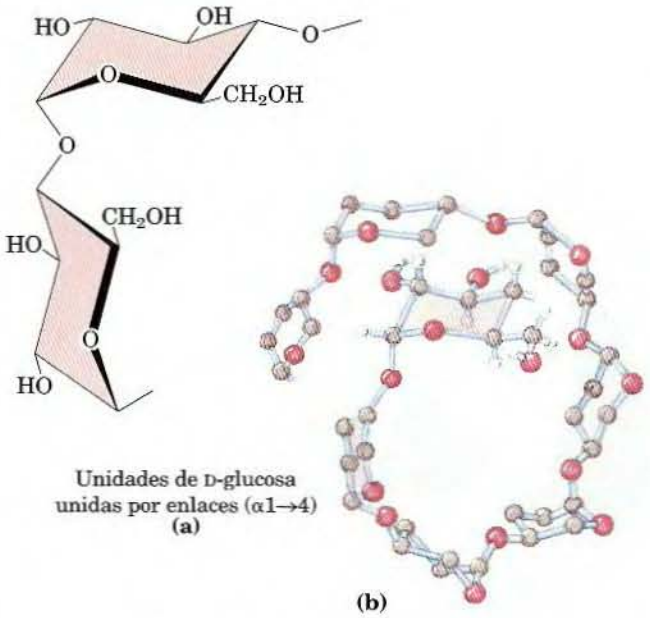


FIGURA 7-21 Estructura del almidón (amilosa). (a) En su conformación más estable de sillas rígidas adyacentes, la cadena de polisacárido se encuentra curvada en lugar de encontrarse estirada como en la celulosa (véase Fig. 7-16). **(b)** Dibujo a escala de un segmento de amilosa. La conformación de los enlaces (α1→4) de la amilosa, la amilopectina y el glucógeno hace que estos polímeros adopten una estructura helicoidal compacta. Esta estructura compacta es la responsable de la densidad de los gránulos de almidón o glucógeno almacenados, visibles en muchas células (véase Fig. 7-14).

Muchos productos manufacturados son derivados de la celulosa. Su contenido de agua es bajo porque la gran abundancia de puentes de hidrógeno intercatenarios satisface su capacidad de formación de puentes de hidrógeno.

Las paredes celulares de algas y bacterias contienen heteropolisacáridos estructurales

El componente rígido de las paredes celulares bacterianas es un heteropolímero de unidades de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico alternadas unidas por enlaces (β1→4) (Fig. 7-22). En la pared celular las cadenas poliméricas lineales están dispuestas paralelamente unas a otras y entrecruzadas mediante péptidos cortos, cuya estructura exacta depende de la especie bacteriana. Los entrecruzamientos peptídicos sueldan entre sí las cadenas de polisacárido y forman una envoltura resistente que rodea toda la célula, evitando que ésta se hinche y se lise a causa de la entrada de agua por ósmosis. El enzima lisozima destruye las bacterias mediante la hidrólisis del enlace glucosídico (β1→4) entre la *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico (véase Fig. 6-24). El lisozima se encuentra en las lágrimas del ojo, donde posiblemente protege de infecciones bacterianas. También es producido por ciertos virus bacterianos, con el fin de garantizar su liberación de la bacteria huésped, paso esencial del ciclo de la infección vírica. La penicilina y otros antibióticos relacionados destruyen las bacterias al impedir la síntesis de los entrecruzamientos, lo que deja la pared celular demasiado débil para resistir la lisis osmótica (véase Recuadro 20-1).

Algunas algas rojas marinas tienen paredes celulares que contienen **agar,** una mezcla de heteropolisacáridos sulfatados, formados por D-galactosa y un derivado de L-galactosa con un enlace éter entre el C-3 y el C-6 (Fig. 7-23). Los dos principales componentes del agar son el polímero no ramificado **agarosa** (M_r ~120.000) y un componente ramificado, la agaropectina. La notable capacidad de la agarosa para formar geles es aprovechada en los laboratorios de bioquímica. Cuando se calienta una suspensión de agarosa en agua y a continuación se enfría, la agarosa forma una doble hélice: dos moléculas en orientación paralela se enrollan una en torno a la otra con una periodicidad helicoidal de tres residuos; la cavidad central retiene moléculas de agua. Estas estructuras se asocian entre sí para formar un gel, una matriz tridimensional que atrapa grandes cantidades de agua. Los geles de agarosa se usan como soporte

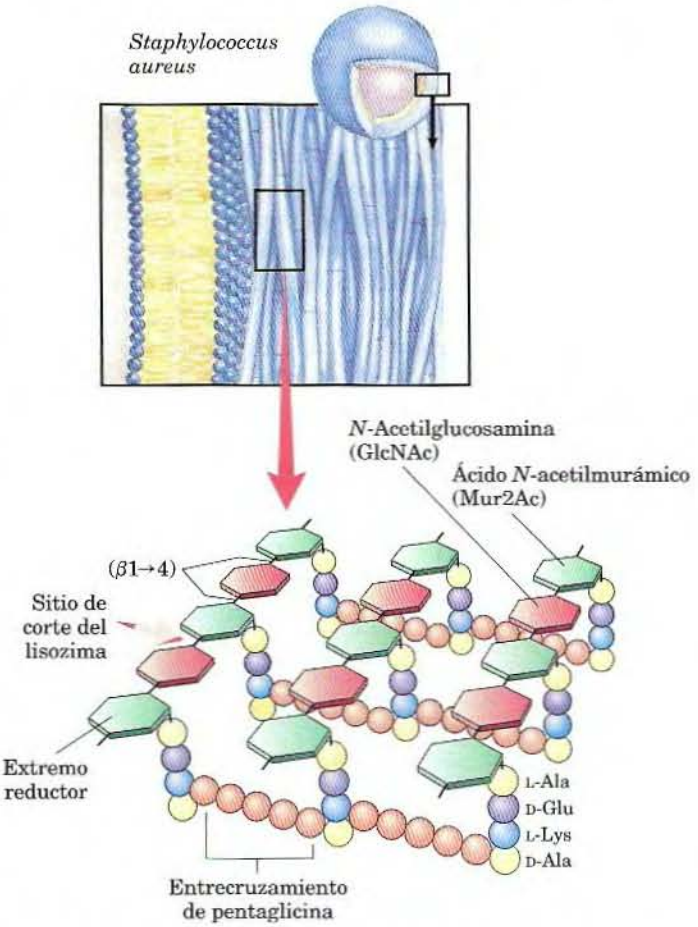
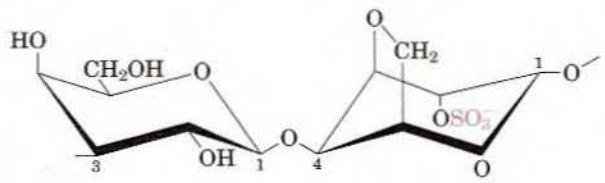


FIGURA 7-22 Peptidoglucano. Éste es el peptidoglucano de la pared celular de la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Los péptidos (ristras de esferas coloreadas) están unidos covalentemente a las unidades de ácido *N*-acetilmurámico de las cadenas de polisacáridos vecinas. Obsérvese la mezcla de aminoácidos L y D en los péptidos. Las bacterias gram-positivas tienen una cadena de pentaglicina en el entrecruzamiento. Las bacterias gram-negativas carecen de pentaglicina; en cambio, el residuo terminal de D-Ala de un tetrapéptido está directamente unido al tetrapéptido vecino a través de una L-Lys o de un aminoácido semejante a la lisina, el ácido diaminopimélico.



Agarosa
Repeticiones de 3)D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal2S(α1

FIGURA 7-23 Estructura de la agarosa. La unidad repetitiva consiste en D-galactosa (β1→4) unida a 3,6-anhidro-L-galactosa (en la cual el anillo éter conecta C-3 y C-6). Estas unidades están unidas por enlaces glucosídicos (α1→3) para formar un polímero de 600 a 700 residuos de longitud. Una pequeña fracción de los residuos de 3,6-anhidrogalactosa tienen un éster sulfato en C-2 (como aquí).

inerte para la separación electroforética de ácidos nucleicos, un paso esencial en el proceso de secuenciación del DNA (p. 296). El agar también se usa para formar una superficie adecuada para el crecimiento de colonias bacterianas. Otro uso del agar es la fabricación de cápsulas para empaquetar vitaminas u otros fármacos; el material seco se disuelve fácilmente en el estómago y es metabólicamente inerte.

Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos de la matriz extracelular

El espacio extracelular de los tejidos animales multicelulares está ocupado por un material gelatinoso, la **matriz extracelular,** también denominada sustancia basal, que mantiene unidas las células y forma un medio poroso para la difusión de nutrientes y oxígeno hacia las células individuales. La matriz extracelular está compuesta por una compleja red de moléculas interconectadas de heteropolisacáridos y proteínas fibrosas como el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina. Estos heteropolisacáridos, los **glucosaminoglucanos,** son una familia de polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacárido (Fig. 7-24). Uno de los dos monosacáridos es siempre la *N*-acetilglucosamina o bien la *N*-acetilgalactosamina; el otro es en la mayor parte de casos un ácido urónico, generalmente el ácido D-glucurónico o el L-idurónico. En algunos glucosaminoglucanos, uno o más de los hidroxilos del aminoazúcar se encuentra esterificado con un grupo sulfato. La combinación de estos grupos sulfato y los grupos carboxilato de los residuos de ácido urónico hace que los glucosaminoglucanos tengan una elevada densidad de carga negativa.

Para minimizar las fuerzas repulsivas entre los grupos cargados próximos entre sí, estas moléculas adoptan una conformación extendida en disolución. Los patrones específicos de los residuos de azúcares sulfatados y no sulfatados en los glucosaminoglucanos hacen posible el reconocimiento específico por una amplia variedad de ligandos proteicos que se unen electrostáticamente a estas moléculas. Los glucosaminoglucanos

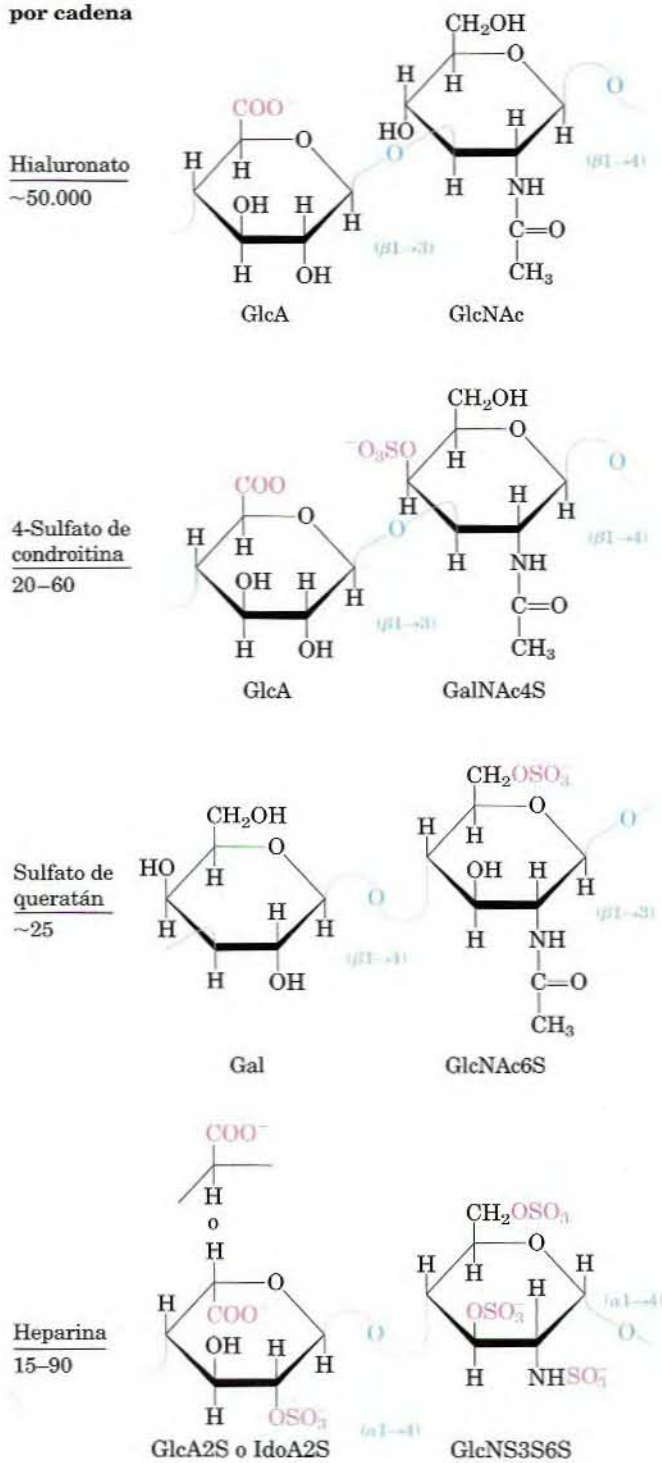
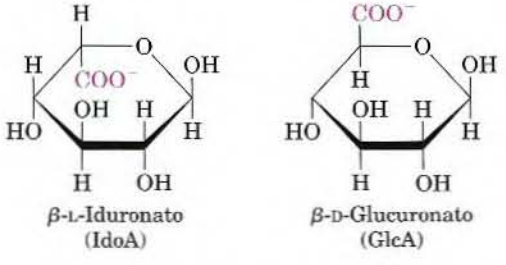


FIGURA 7-24 Unidades repetidas de algunos de los glucosaminoglucanos más comunes de la matriz extracelular. Las moléculas son copolímeros formados por unidades alternadas de ácido urónico y residuos de aminoazúcares, con ésteres de sulfato situados en distintas posiciones. Los grupos carboxilato y sulfato ionizados (en rojo) confieren a estos polímeros su característica carga negativa elevada. La heparina contiene principalmente ácido idurónico (IdoA) y una pequeña proporción de ácido glucurónico (GlcA), suele estar muy sulfatada y es de longitud variable. El sulfato de heparán (no mostrado) es parecido a la heparina, pero con una proporción mayor de GlcA y menos grupos sulfato, dispuestos de forma menos regular.

se unen a proteínas extracelulares para formar proteoglucanos (Sección 7.3).

El glucosaminoglucano **ácido hialurónico** (hialuronato a pH fisiológico) contiene unidades alternadas de ácido D-glucurónico y *N*-acetilglucosamina (Fig. 7-24). Con hasta 50.000 repeticiones de la unidad disacárida básica, los hialuronatos tienen masas moleculares superiores a un millón; forman disoluciones transparentes y viscosas que sirven de lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones y confieren consistencia gelatinosa al humor vítreo del ojo de los vertebrados (en griego, *hyalos* significa "vidrio"; los hialuronatos pueden tener un aspecto vítreo o translúcido). El hialuronato es también un componente esencial de la matriz extracelular de cartílagos y tendones, a los que dota de resistencia a la tensión y elasticidad. La hialuronidasa, un enzima secretado por algunas bacterias patógenas, puede hidrolizar los enlaces glucosídicos del hialuronato, haciendo que los tejidos sean más susceptibles a las invasiones bacterianas. Un enzima similar presente en el esperma hidroliza la capa externa de glucosaminoglucano que protege los óvulos de muchos organismos, permitiendo la penetración de los espermatozoides.

Otros glucosaminoglucanos se diferencian del hialuronato en dos aspectos: generalmente son polímeros mucho más cortos y están unidos covalentemente a proteínas específicas (proteoglucanos). El sulfato de condroitina (en griego *chondros* significa "cartílago") contribuye a la resistencia a la tensión de los cartílagos, tendones, ligamentos y paredes de la aorta. El sulfato de dermatán (en griego *derma* significa "piel") contribuye a la flexibilidad de la piel y también está presente en los vasos sanguíneos y en las válvulas cardíacas. En este polímero, muchos de los residuos de glucuronato (GlcA) presentes en el sulfato de condroitina están reemplazados por su epímero, el iduronato (IdoA).



β-L-Iduronato (IdoA) β-D-Glucuronato (GlcA)

Los sulfatos de queratán (en griego *keras* significa "cuerno") no tienen ácido urónico y su contenido en sulfato es variable. Están presentes en la córnea, los cartílagos, los huesos y en diversas estructuras córneas formadas por células muertas: cuernos, pelos, pezuñas, uñas y garras. La heparina (en griego *hepar* significa "hígado") es un anticoagulante natural producido en los mastocitos (un tipo de leucocito) y liberado en la sangre, donde inhibe la coagulación uniéndose a la proteína antitrombina. La unión de la heparina hace que la antitrombina se una e inhiba a la trombina, una proteasa esencial para la coagulación de la sangre. La interacción es fuertemente electrostática; la heparina tiene la densidad de carga negativa más elevada entre todas las macromoléculas biológicas conocidas (Fig. 7-25). La heparina purificada se añade rutinariamente a las muestras de sangre para análisis clínicos y a la sangre donada para transfusiones con objeto de impedir su coagulación.

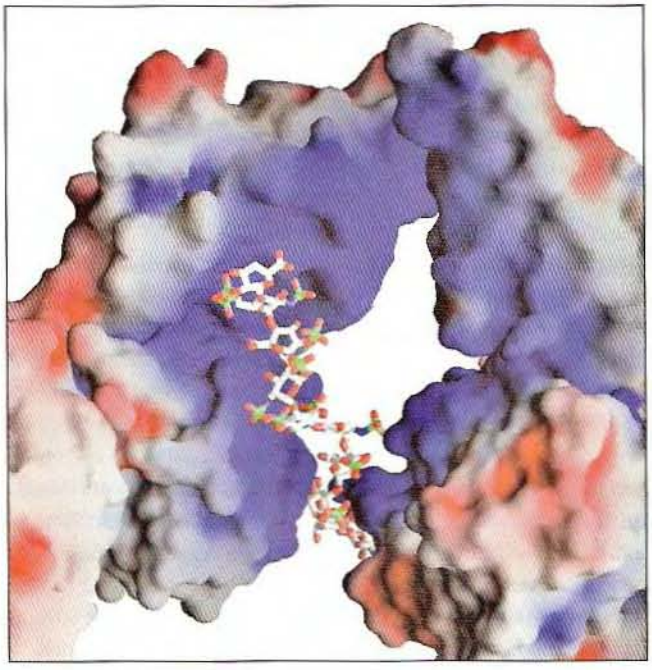


FIGURA 7-25 Interacción de un glucosaminoglucano y su proteína de unión. El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF1), su receptor de superficie celular (FGFR) y un corto segmento de glucosaminoglucano (heparina) fueron co-cristalizados para dar la estructura que aquí se muestra (PDB ID 1E0O). El color de la superficie de la proteína representa el potencial electrostático de superficie: rojo, carga predominantemente negativa; azul, carga predominantemente positiva. La heparina se muestra con la modalidad de bolas y varillas con las cargas negativas ($-SO_3^-$ y $-COO^-$) unidas a la superficie positiva (azul) de la proteína FGF. En este experimento se utilizó heparina, pero in vivo el glucosaminoglucano que se une al FGF en la superficie celular es el sulfato de heparán.

La Tabla 7-2 resume la composición, propiedades, funciones y localización de los polisacáridos descritos aquí.

RESUMEN 7.2 Polisacáridos

- Los polisacáridos (glucanos) sirven de reserva energética y de componentes estructurales en las paredes celulares y en la matriz extracelular.
- Los homopolisacáridos almidón y glucógeno son combustibles de reserva en las células vegetales, animales y bacterianas. Consisten en D-glucosa con enlaces (α1→4) y los tres están ramificados.
- Los homopolisacáridos celulosa, quitina y dextrano tienen papeles estructurales. La celulosa está formada por residuos de D-glucosa unidos por enlaces (β1→4) y confiere resistencia y rigidez a las paredes celulares de las plantas. La quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina unida por enlaces (β1→4), confiere resistencia a los exoesqueletos de los artrópodos.

TABLA 7-2 Estructura y función de algunos polisacáridos

Polímero	*Tipo**	*Unidad repetitiva*†	*Tamaño (número de unidades de monosacárido)*	*Funciones*
Almidón				Reserva energética: en plantas
Amilosa	Homo-	(α1→4)Glc, lineal	50-5000	
Amilopectina	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 24-30 residuos	Hasta 10^6	
Glucógeno	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 8-12 residuos	Hasta 50.000	Reserva energética: en bacterias y células animales
Celulosa	Homo-	(β1→4)Glc	Hasta 15.000	Estructural: confiere rigidez y resistencia a las paredes de células vegetales
Quitina	Homo-	(β1→4)GlcNAc	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a los exoesqueletos de insectos y crustáceos
Dextrano	Homo-	(α1→6)Glc, con ramificaciones(α1→3)	Muy variable	Estructural: en bacterias, adhesivo extracelular
Peptidoglucano	Hetero-; con péptidos unidos	4)Mur2Ac(β1→4) GlcNAc(β1)	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a la envoltura celular bacteriana
Agarosa	Hetero-	3)D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal(α1	1000	Estructural: componente de la pared celular de las algas
Hialuronato (un glucosaminoglucano)	Hetero-; acídico	4)GlcA(β1→3) GlcNAc(β1	Hasta 100.000	Estructural: en vertebrados forma parte de la matriz extracelular de la piel y tejido conjuntivo; viscosidad y lubricación en articulaciones

*Cada polímero se clasifica como un homopolisacárido (homo-) o como un heteropolisacárido (hetero-).

†Las abreviaturas utilizadas para las unidades repetitivas de peptidoglucano, agarosa e hialuronato indican que el polímero contiene repeticiones de esta unidad de disacárido. Por ejemplo, en el peptidoglucano, la GlcNAc de un disacárido está unida por un enlace (β1→4) al primer residuo de la siguiente unidad de disacárido.

El dextrano forma la envoltura adhesiva de algunas bacterias.

- Los homopolisacáridos se pliegan en tres dimensiones. La forma de silla del anillo de la piranosa es esencialmente rígida; por tanto, la conformación de los polímeros está determinada por la rotación en torno al enlace entre el oxígeno y el carbono anomérico. El almidón y el glucógeno forman estructuras helicoidales con puentes de hidrógeno intracatenarios; la celulosa y la quitina forman cadenas largas y estiradas que interaccionan con cadenas vecinas.
- Las paredes celulares de las bacterias y las algas están reforzadas por heteropolisacáridos: peptidoglucano en las bacterias, agar en las algas rojas. El disacárido repetido en los peptidoglucanos es GlcNAc(β1→4)Mur2Ac; en la agarosa es D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal.
- Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos extracelulares en los cuales una de las unidades de monosacárido es el ácido urónico y la otra un aminoazúcar *N*-acetilado. Los ésteres sulfato de algunos de los grupos hidroxilo confieren a estos polímeros una elevada densidad de carga negativa, que fuerza la adopción de estructuras extendidas. Estos polímeros (hialuronato, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán y heparina) son responsables de la viscosidad, adhesividad y resistencia a la tensión de la matriz extracelular.

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos

Además de sus importantes funciones como combustibles de reserva (almidón, glucógeno, dextrano) y como materiales estructurales (celulosa, quitina, peptidoglucanos), los polisacáridos y los oligosacáridos son transportadores de información:

sirven como etiquetas de destino de algunas proteínas y como mediadores de las interacciones específicas intercelulares y entre las células y la matriz extracelular. Las moléculas que contienen glúcidos específicos actúan en el reconocimiento y la adhesión intercelular, en la migración celular durante el desarrollo, en la coagulación sanguínea, en la respuesta inmunitaria y en la cicatrización de las heridas, por sólo mencionar algunas de sus muchas funciones. En la mayor parte de estos casos, el glúcido portador de la información está unido covalentemente a una proteína o a un lípido para formar un **glucoconjugado,** que es la molécula biológicamente activa.

Los **proteoglucanos** son macromoléculas de la superficie celular o de la matriz extracelular con una o más cadenas de glucosaminoglucanos unidas covalentemente a una proteína de membrana o a una de secreción. Habitualmente, la fracción glucosaminoglucano representa la mayor parte (en masa) de la molécula de proteoglucano, domina la estructura y, a menudo, es el principal sitio de actividad biológica. En muchos casos, la actividad biológica consiste en la provisión de múltiples sitios de unión, disponibles para la formación de puentes de hidrógeno y para las interacciones electrostáticas con otras proteínas de la superficie celular o de la matriz extracelular. Los proteoglucanos son uno de los principales componentes del tejido conjuntivo como el cartílago, en el cual sus muchas interacciones no covalentes con otros proteoglucanos, proteínas y glucosaminoglucanos proporcionan resistencia y elasticidad.

Las **glucoproteínas** tienen uno o varios oligosacáridos de diversa complejidad unidos covalentemente a una proteína. Se encuentran en el lado externo de la membrana plasmática, en la matriz extracelular y en la sangre. Dentro de las células, se encuentran en orgánulos específicos tales como los complejos de Golgi, los gránulos de secreción y los lisosomas. Las porciones oligosacáridas de las glucoproteínas son menos repetitivas que las cadenas de glucosaminoglucanos de los proteoglucanos; son ricas en información, formando sitios muy específicos para el reconocimiento y la unión de elevada afinidad a otras proteínas.

Los **glucolípidos** son lípidos de membrana en los que los grupos hidrofílicos de cabeza son oligosacáridos que, como en las glucoproteínas, actúan como sitios específicos para el reconocimiento por proteínas de unión a glúcidos.

Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular que contienen glucosaminoglucanos

Las células de mamífero pueden sintetizar al menos 30 tipos de moléculas pertenecientes a la superfamilia de los proteoglucanos. Estas moléculas actúan como organizadores tisulares, influyen en el desarrollo de tejidos especializados, intervienen en la actividad de varios factores de crecimiento y regulan la formación extracelular de las fibrillas de colágeno. La unidad básica de los proteoglucanos consiste en una "proteína núcleo" a la que se unen covalentemente uno o varios glucosaminoglucanos. Por ejemplo, la matriz laminar extracelular (lámina basal), que separa grupos organizados de células, contiene una familia de proteínas núcleo (M_r 20.000 a 40.000), cada una con

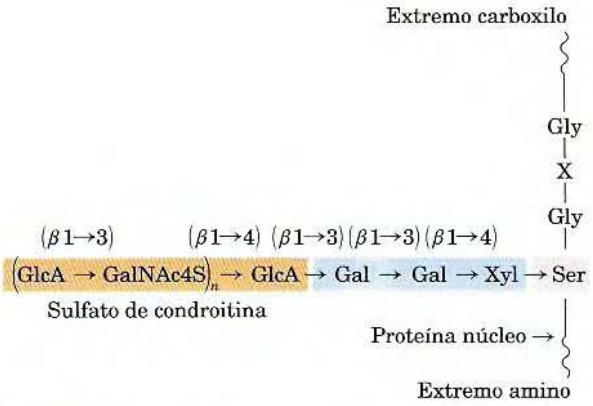


FIGURA 7-26 Estructura de un proteoglucano, mostrando el puente trisacárido. Una típica conexión (en azul) mediante un trisacárido une el glucosaminoglucano –aquí sulfato de condroitina (en naranja)– con un residuo de Ser (en rojo) situado en la proteína núcleo. El residuo de xilosa situado en el extremo reductor del conector está unido por su carbono anomérico al grupo hidroxilo del residuo de Ser.

varias cadenas de sulfato de heparán unidas covalentemente. (El sulfato de heparán tiene una estructura similar a la heparina pero una menor densidad de ésteres de sulfato.) La unión suele realizarse a través de un residuo de Ser, al que se une el glucosaminoglucano mediante un puente trisacárido (Fig. 7-26). El residuo de Ser forma generalmente parte de la secuencia –Ser–Gly–X–Gly– (donde X es cualquier aminoácido); sin embargo, no todas las proteínas con esta secuencia tienen un glucosaminoglucano unido. Muchos proteoglucanos se secretan a la matriz extracelular, pero algunos son proteínas integrales de membrana (véase Fig. 11-6). Por ejemplo, la proteína núcleo sindecán (M_r 56.000) tiene un único dominio transmembrana y un dominio extracelular con tres cadenas de sulfato de heparán y dos de sulfato de condroitina, cada una unida a un residuo de Ser (Fig. 7-27a). En los mamíferos, la familia de los sindecanes tiene al menos cuatro miembros. Otra familia de proteínas núcleo son los glupicanos, con seis miembros. Están unidos a la membrana por un anclaje lipídico, un derivado del lípido de membrana fosfatidil inositol (Capítulo 11).

El componente de sulfato de heparán de los proteoglucanos se une a una gran variedad de ligandos extracelulares y de esta manera modula la interacción de los ligandos con sus receptores específicos de la superficie celular. El examen detallado de la parte glucídica de los proteoglucanos ha mostrado que la variabilidad de la secuencia no es al azar; algunos dominios (normalmente de una longitud de 3 a 8 disacáridos) difieren de los dominios vecinos en secuencia y en capacidad para interaccionar con proteínas específicas. El sulfato de heparán, por ejemplo, se sintetiza inicialmente como un largo polímero (de 50 a 200 unidades de disacárido) de residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y de ácido glucurónico (GlcA) alternados. Esta sencilla cadena es modificada por una serie de enzimas que introducen cambios en regiones específicas. Primero, una *N*-desacetilasa: la *N*-sulfotransferasa reemplaza algunos grupos acetilo de los residuos de GlcNAc por sulfatos, creando acumulaciones de residuos de glucosamina *N*-sulfa-

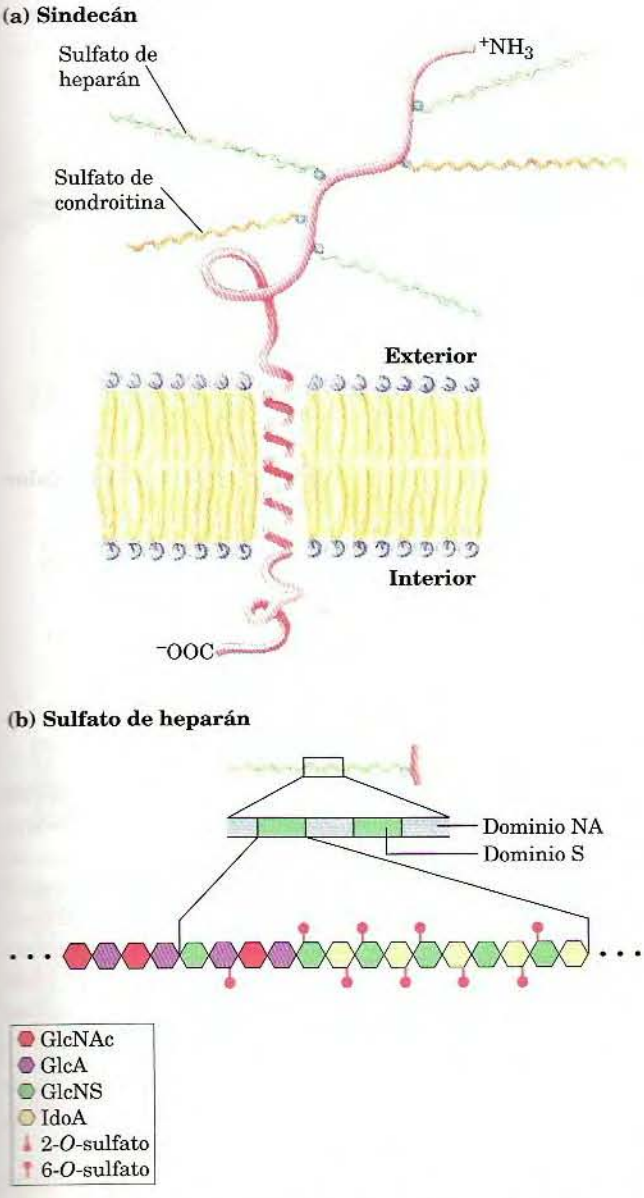


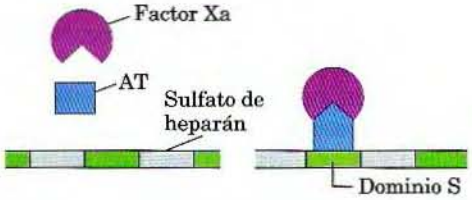
FIGURA 7-27 Estructura del proteoglucano de una proteína integral de membrana. (a) Este esquema muestra un sindecán, una proteína núcleo de la membrana plasmática. El dominio amino-terminal del lado extracelular de la membrana se une covalentemente (por trisacáridos conectores como los de la Fig. 7-26) a tres cadenas de sulfato de heparán y dos cadenas de sulfato de condroitina. Algunas proteínas núcleo están ancladas por una única hélice transmembrana; otras (glupicanos), por un glúcido de membrana unido covalentemente. En un tercer tipo de proteínas núcleo, la proteína es liberada en el espacio extracelular y entra a formar parte de la membrana basal. **(b)** A lo largo de la cadena de sulfato de heparán, las regiones ricas en azúcares sulfatados, los dominios S (verde), alternan con regiones de residuos de GlcNAc y GlcA no modificados, los dominios NA (gris). Uno de los dominios S se muestra con más detalle, para poner de manifiesto la alta densidad de residuos modificados: GlcA, con un éster sulfato en C-6, e IdoA, con un éster sulfato en C-2. El patrón exacto de sulfatación del dominio S difiere en los proteoglucanos. Teniendo en cuenta todas las posibles modificaciones del dímero GlcNAc-IdoA, al menos 32 disacáridos distintos son posibles.

tada (GlcN). Estas acumulaciones atraen enzimas que causan nuevas modificaciones: una epimerasa convierte el GlcA en IdoA; a continuación, sulfotransferasas crean ésteres sulfato en el hidroxilo C-2 del IdoA y en el C-6 del GlcN *N*-sulfatado, pero sólo en regiones que posean residuos de GlcN *N*-sulfatados. En el polímero resultante, los dominios altamente sulfatados (dominios S) están alternados con dominios con residuos de GlcNAc y GlcA no modificados (dominios *N*-acetilados o NA) (Fig. 7-27b). El patrón de sulfatación en los dominios S es diferente en los distintos proteoglucanos; dado el número de posibles modificaciones del dímero GlcNAc-IdoA, son posibles al menos 32 unidades distintas de disacárido. A ello hay que añadir que la misma proteína núcleo puede estar asociada a diferentes estructuras de heparán sulfato según el tipo celular.

Las propiedades de las proteínas extracelulares y moléculas de señalización se modifican a consecuencia de la unión específica a los dominios S. El cambio en la actividad puede ser debido a un cambio conformacional en la proteína inducido por la unión (Fig. 7-28a) o a las interacciones proteína-proteína favorecidas por la unión a dominios vecinos de sulfato de heparán (Fig. 7-28b). Un tercer mecanismo general de acción consiste en la unión de moléculas de señalización extracelulares al sulfato de heparán, lo que tiene como consecuencia el aumento de la concentración local y una interacción más fácil con los receptores de factores de crecimiento en la superficie celular; en estos casos el sulfato de heparán actúa como correceptor (Fig. 7-28c). Por ejemplo, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), una señal proteica extracelular que estimula la división celular, inicialmente se une a la porción de sulfato de heparán de moléculas de sindecán de la membrana plasmática de las células diana. El sindecán presenta el FGF a los receptores de FGF de la membrana plasmática y sólo entonces puede el FGF interaccionar eficazmente con su receptor y estimular la división celular. Finalmente, los dominios S interaccionan –electrostáticamente y de otros modos– con una amplia variedad de moléculas solubles del exterior de la célula, manteniendo una elevada concentración local en la superficie celular (Fig. 7-28d). La importancia de los dominios correctamente sulfatados en el sulfato de heparán se pone de manifiesto en ratones "genosuprimidos" que carecen del enzima que introduce sulfato en el hidroxilo C-2 del IdoA. Estos animales nacen sin riñones y con graves anomalías en el desarrollo del esqueleto y los ojos.

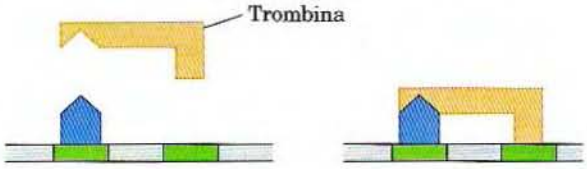
Algunos proteoglucanos pueden formar **agregados de proteoglucanos,** enormes agrupaciones supramoleculares de muchas proteínas núcleo unidas a una única molécula de hialuronato. La proteína núcleo del agrecán (M_r ~250.000) tiene múltiples cadenas de sulfato de condroitina y de sulfato de queratán unidas a residuos de Ser de la proteína núcleo a través de trisacáridos de unión, para dar un monómero de agrecán de M_r ~2×10^6. Cuando un centenar o más de estas proteínas núcleo "decoradas" se unen a una única molécula de hialuronato extendida (Fig. 7-29), el agregado de proteoglucano resultante (M_r >2×10^8) y su agua de hidratación asociada ocupan un volumen semejante ¡al de una célula bacteriana! El agrecán interacciona fuertemente con el colágeno

(a) Activación conformacional



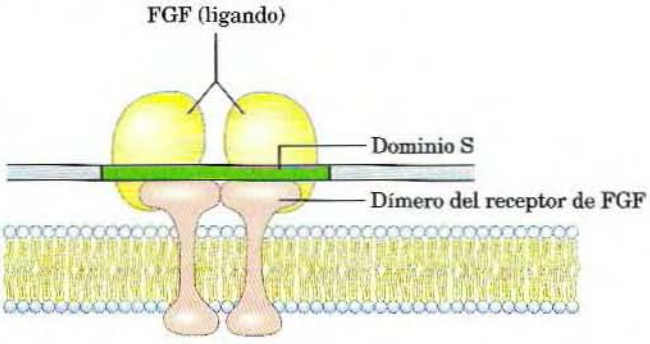
Un cambio conformacional inducido en la proteína antitrombina (AT) al unirse al dominio S de un pentasacárido específico permite su interacción con el Factor Xa, un factor de coagulación de la sangre, impidiendo la coagulación.

(b) Potenciación de la interacción proteína-proteína



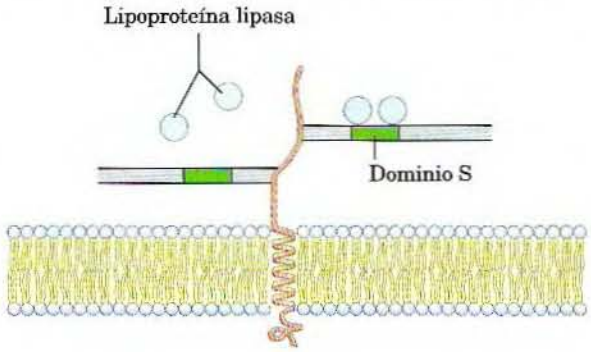
La unión de la AT y de la trombina a dos dominios S adyacentes coloca las proteínas próximas una a otra, favoreciendo su interacción, que inhibe la coagulación sanguínea.

(c) Correceptor para ligandos extracelulares



Los dominios S interaccionan a la vez con el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y con su receptor, favoreciendo la formación del complejo oligomérico y aumentando la efectividad del FGF a baja concentración.

(d) Localización/concentración en la superficie celular



La elevada densidad de cargas negativas en el sulfato de heparán aproxima las moléculas cargadas positivamente de lipoproteína lipasa y las mantiene así mediante interacciones electrostáticas y por interacciones específicas de secuencia con los dominios S. Tales interacciones también son esenciales en el primer paso de la entrada de ciertos virus (p. ej., virus herpes simplex HSV-1 y HSV-2) dentro de las células.

FIGURA 7-28 Cuatro tipos de interacciones proteicas con los dominios S del sulfato de heparán.

del cartílago de la matriz extracelular, contribuyendo a la formación y a la resistencia a la tensión de este tejido conjuntivo.

Las proteínas fibrosas de la matriz como el colágeno, la elastina y la fibronectina están entrelazadas con estos enormes proteoglucanos extracelulares, formando una malla entrecruzada que da resistencia y elasticidad al conjunto de la matriz extracelular. Algunas de ellas son multiadhesivas, al tener una única proteína varios sitios de unión para diferentes moléculas de la matriz. La fibronectina, por ejemplo, tiene dominios distintos que unen la fibrina, el sulfato de heparán, el colágeno y una familia de proteínas de la membrana plasmática denominadas integrinas, que facilitan la señalización entre el interior de la célula y la matriz extracelular (véase Fig. 11-22). Las integrinas, a su vez, tienen sitios de unión para muchas otras macromoléculas extracelulares. La imagen que emerge de las interacciones célula-matriz (Fig. 7-30) son una serie de interacciones entre moléculas celulares y extracelulares. Estas interacciones no sólo sirven para anclar las células a la matriz extracelular sino también para proporcionar vías que dirigen la migración de las células en el tejido en desarrollo y, a través de las integrinas, para transmitir información en ambas direcciones a través de la membrana plasmática.

Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente

Las glucoproteínas son conjugados de proteína y glúcidos en los que la parte del glúcido es menor y estructuralmente más diversa que en los glucosaminoglucanos de los proteoglucanos. El glúcido se une por su carbono anomérico mediante un enlace glucosídico con el —OH de un residuo de Ser o Thr (*O*-unidos) o mediante un enlace *N*-glucosilo con el nitrógeno amídico de un residuo de Asn (*N*-unidos) (Fig. 7-31). Algunas glucoproteínas tienen una sola cadena de oligosacárido, pero muchas tienen más de una; el glúcido puede representar del 1% al 70% o más de la masa de la glucoproteína. Se conoce la estructura

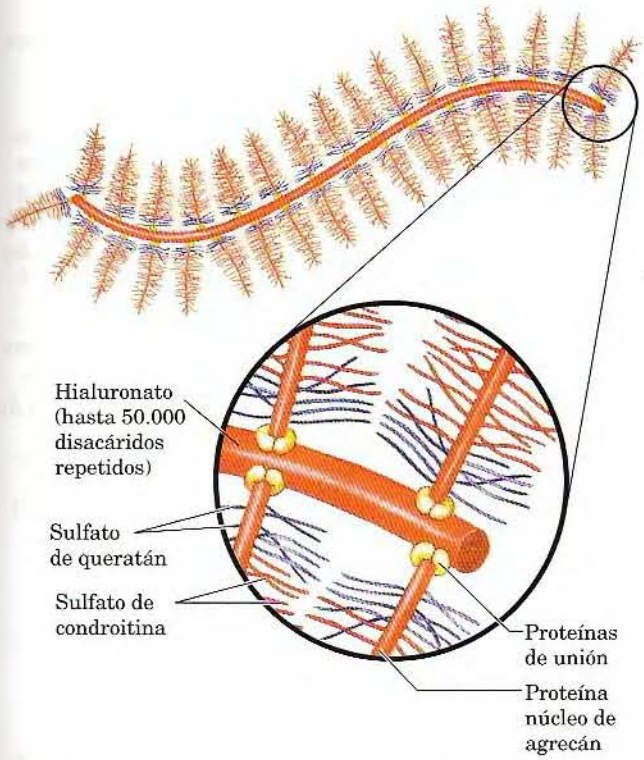


FIGURA 7-29 Agregado de proteoglucano de la matriz extracelular. Una molécula de hialuronato de gran longitud se asocia de manera no covalente con unas 100 moléculas de la proteína núcleo agrecán. Cada molécula de agrecán contiene muchas moléculas de sulfato de condroitina y sulfato de queratán unidas covalentemente. Las proteínas de unión situadas en el punto de unión entre cada proteína núcleo y la espina central de hialuronato intervienen en la interacción proteína núcleo-hialuronato.

de un gran número de oligosacáridos *O*- y *N*-unidos a diversas glucoproteínas; la Figura 7-31 muestra algunos ejemplos típicos.

Como veremos en el Capítulo 11, la superficie externa de la membrana plasmática tiene muchas glucoproteínas de membrana con una serie de oligosacáridos de complejidad variable unidos covalentemente. Una de las glucoproteínas de membrana mejor caracterizadas es la glucoforina A de la membrana de los eritrocitos (véase Fig. 11-7). Contiene un 60% (en masa) de glúcidos en 16 cadenas de oligosacáridos (con un total de 60 o 70 unidades de monosacárido), unidas covalentemente a residuos aminoácidos cercanos al extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica. Quince cadenas de oligosacárido están *O*-unidas a residuos de Ser o de Thr y una está *N*-unida a un residuo de Asn.

Muchas de las proteínas secretadas por las células eucarióticas son glucoproteínas. Por ejemplo, las inmunoglobulinas (anticuerpos) y ciertas hormonas, tales como la hormona estimuladora del folículo, la hormona luteinizante y la hormona estimuladora del tiroides, son glucoproteínas. Muchas proteínas de la leche, entre ellas la lactalbúmina, y algunas proteínas secretadas por el páncreas (como la ribonucleasa) están glucosiladas, como también lo están la mayoría de las proteínas contenidas en los lisosomas.

Se conocen algunos casos en los que la misma proteína producida en dos tejidos diferentes tiene distintos patrones de glucosilación. Por ejemplo, la proteína humana interferón IFN-β1 producida en las células de los ovarios tiene un conjunto de cadenas de oligosacárido diferente de la producida en las células epiteliales de los senos. No se conoce el significado biológico de estas **glucoformas tisulares** pero las cadenas de oligosacárido representan un marcador específico de tejido.

Las ventajas biológicas derivadas de añadir oligosacáridos a las proteínas no se conocen totalmente. Las agrupaciones de glúcidos muy hidrofílicos modifican la polaridad y la solubilidad de las proteínas con las que están conjugados. Las cadenas de oligosacáridos, unidas a las proteínas recién sintetizadas en el complejo de Golgi, pueden también influir en la secuencia de sucesos del plegamiento polipeptídico que determina la estructura terciaria de la proteína (véase Fig. 27-34). Las interacciones estéricas entre los péptidos y los oligosacáridos pueden imposibilitar una ruta de plegamiento y favorecer otra. Cuando numerosas cadenas de oligosacáridos cargados negativamente están agrupadas en una región de la proteína, la repulsión entre las cargas favorece la formación de estructuras en varilla rígida en esta región. El volumen y las cargas negativas de las cadenas de oligosacárido también protegen a algu-

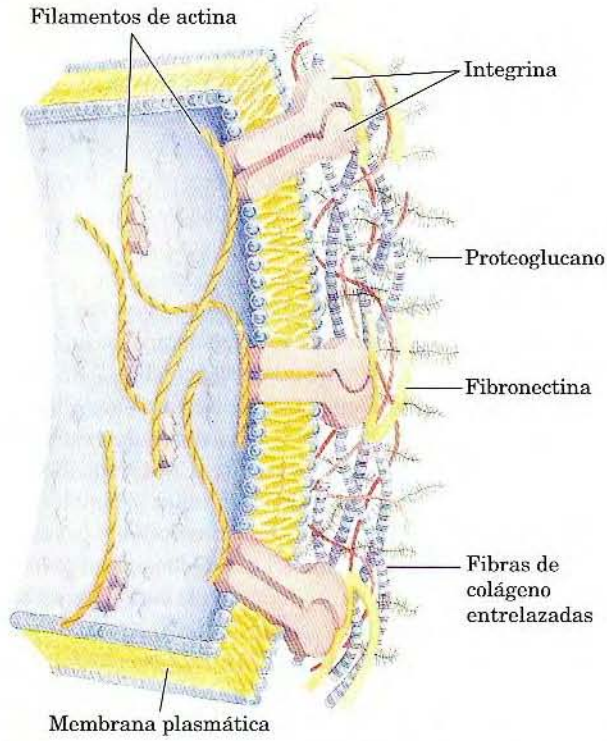


FIGURA 7-30 Interacciones entre las células y la matriz extracelular. En la asociación entre las células y los proteoglucanos de la matriz extracelular participan una proteína de membrana (integrina) y una proteína extracelular (fibronectina en este ejemplo), que posee sitios de unión tanto para las integrinas como para los proteoglucanos. Obsérvese la estrecha asociación de las fibras de colágeno con la fibronectina y el proteoglucano.

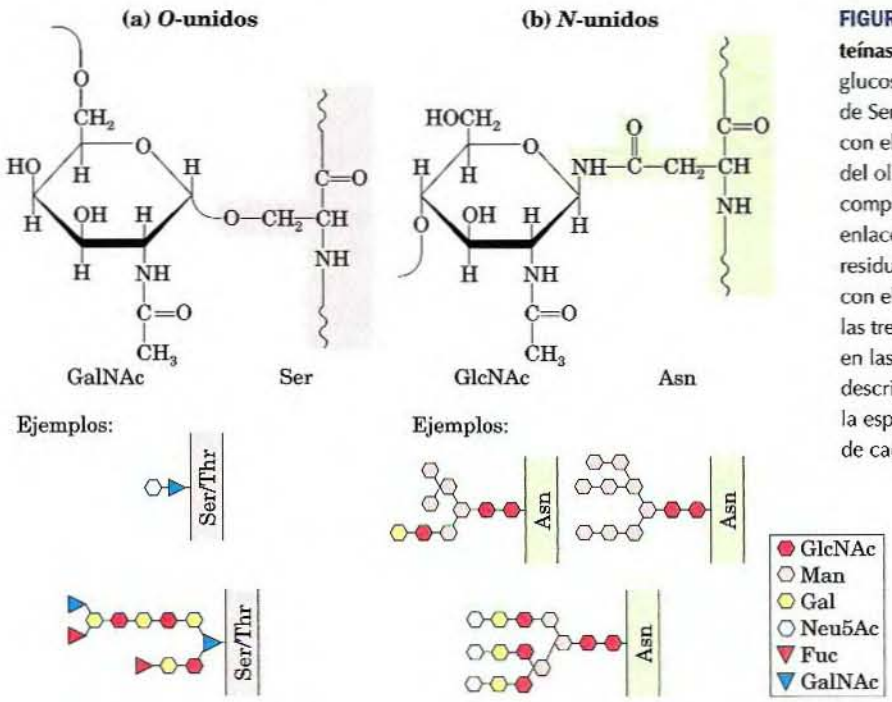


FIGURA 7-31 Unión de oligosacáridos a glucoproteínas. **(a)** Los oligosacáridos *O*-unidos tienen un enlace glucosídico con el grupo hidroxilo de los residuos de Ser o Thr (sombreado en rosa), que aquí se ilustra con el GalNAc como azúcar en el extremo reductor del oligosacárido. Se muestra una cadena simple y una compleja. **(b)** Los oligosacáridos *N*-unidos tienen un enlace *N*-glucosídico con el nitrógeno de la amida del residuo de Asn (sombreado en verde), que aquí se ilustra con el GlcNAc como azúcar terminal. Se muestran las tres cadenas de oligosacáridos más habituales en las glucoproteínas que están *N*-unidas. Una completa descripción de la estructura del oligosacárido requiere la especificación de la posición y estereoquímica (α o β) de cada enlace glucosídico.

nas proteínas de los ataques de enzimas proteolíticos. Además de estos efectos físicos globales en la estructura de las proteínas, las cadenas de oligosacárido producen efectos biológicos más específicos en las glucoproteínas (Sección 7.4).

Los glucolípidos y los lipopolisáridos son componentes de la membrana

Las glucoproteínas no son los únicos componentes celulares que contienen cadenas complejas de oligosacáridos; también algunos lípidos contienen cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Los **gangliósidos** son lípidos de membrana de las células eucarióticas cuya cabeza polar, la parte del lípido que forma la superficie externa de la membrana, es un oligosacárido complejo que contiene ácido siálico (Fig. 7-9) y otros residuos de monosacárido. Algunas de las porciones oligosacáridas de los gangliósidos, tales como las que determinan los grupos sanguíneos humanos (véase Fig. 10-14), son idénticas a las encontradas en ciertas glucoproteínas y también contribuyen a determinar el grupo sanguíneo. Como la porción oligosacárida de las glucoproteínas, la de los lípidos de membrana suele hallarse, tal vez siempre, en la cara externa de la membrana plasmática.

Los **lipopolisacáridos** son los componentes principales de la membrana externa de bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas moléculas son las dianas principales de los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a la infección bacteriana y son, por tanto, determinantes importantes del serotipo de las cepas bacterianas (los serotipos son cepas que se distinguen por sus propiedades antigénicas). Los lipopolisacáridos de *S. typhimurium* contienen seis ácidos grasos unidos a dos residuos de glucosamina, uno de los cuales es el punto de unión de un oligosacárido complejo (Fig. 7-32). *E. coli* posee lipopolisacáridos similares, pero característicos. Los lipopolisacáridos de algunas bacterias son tóxicos para los humanos y otros animales; por ejemplo, son responsables del peligroso descenso de la presión sanguínea que se produce en el síndrome del shock tóxico que resulta de la infección por bacterias gram-negativas. ■

RESUMEN 7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos

- Los proteoglucanos son glucoconjugados en los que una proteína núcleo está unida covalentemente a uno o más glucanos de gran tamaño, tales como el sulfato de heparán, el sulfato de condroitina o el sulfato de queratán. El glucano es la porción mayor (en masa) de la molécula. Unidos al exterior de la membrana plasmática por un péptido transmembrana o un lípido unido covalentemente, los proteoglucanos están implicados en la adhesión, el reconocimiento y la transferencia de información entre células o entre la célula y la matriz extracelular.
- Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente que son menores, pero estructuralmente más complejos y, por tanto, más ricos en información que los glucosaminoglucanos. Muchas proteínas de la superficie celular o extracelulares son glucoproteínas, como es el caso de la mayoría de las proteínas secretadas. Los oligosacáridos unidos covalentemente influyen en el plegamiento y en la estabilidad de las proteínas, suministran información esencial para el destino de las proteínas recién sintetizadas y permiten el reconocimiento específico por otras proteínas.

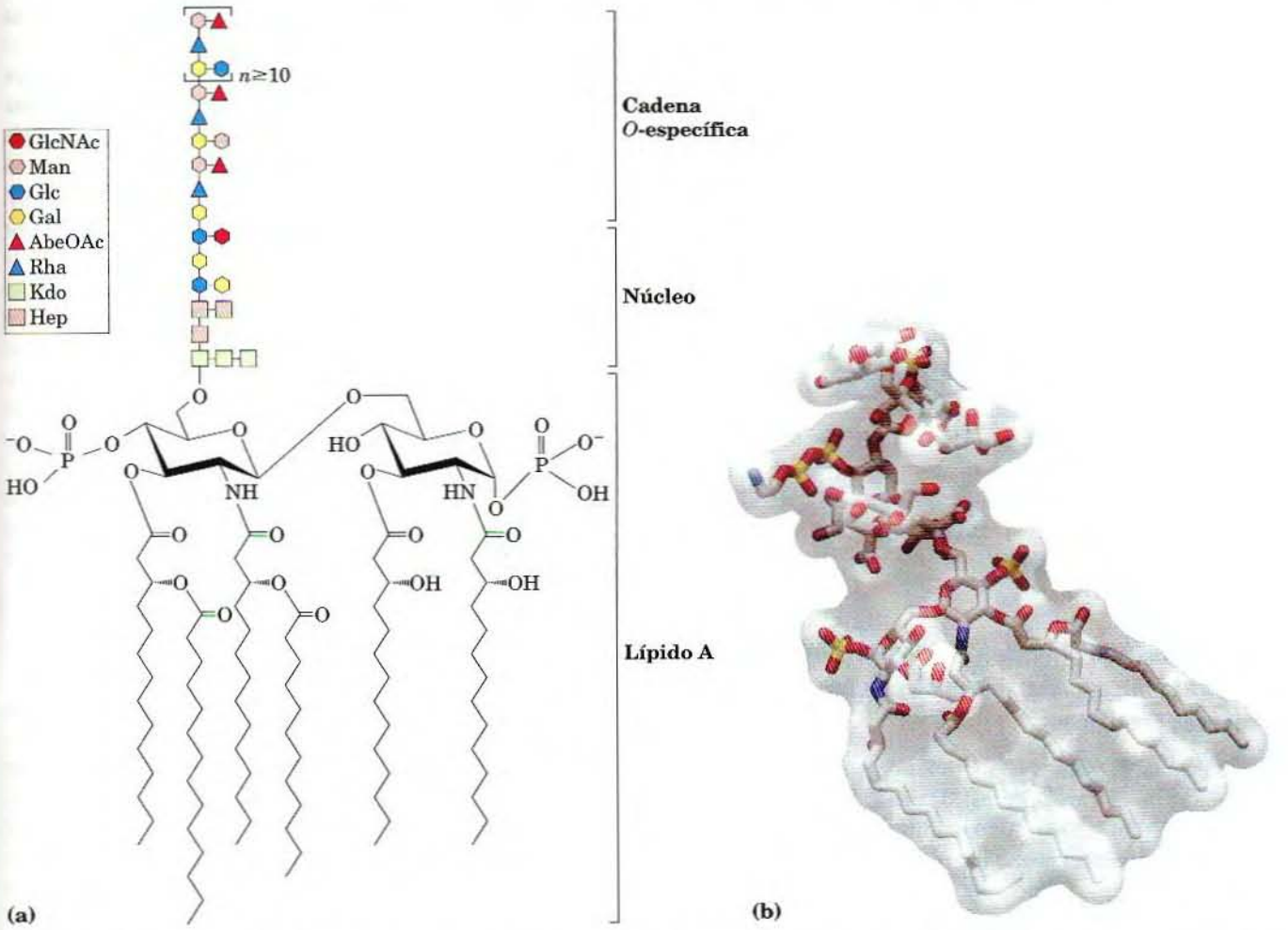


FIGURA 7-32 Lipopolisacáridos bacterianos. **(a)** Esquema del lipopolisacárido de la membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo es el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico, llamado anteriormente ácido cetodesoxioctónico; Hep es L-glicero-D-manoheptosa; AbeOAc es abecuosa (una 3,6-didesoxihexosa), acetilada en uno de sus hidroxilos. Hay seis ácidos grasos en la porción lipídica A de la molécula. Diversas especies bacterianas tienen estructuras de lipopolisacáridos ligeramente diferentes, pero tienen en común una región lipídica (lípido A), un núcleo oligosacárido y una cadena "*O*-específica", que es el determinante principal del serotipo (reactividad inmunológica) de la bacteria. La membrana externa de las bacterias gram-negativas *S. typhimurium* y *Escherichia coli* contiene tantas moléculas de lipopolisacáridos que la superficie celular está prácticamente recubierta por cadenas *O*-específicas. **(b)** La representación de la estructura con varillas es visible a través del modelo molecular espacial del lipopolisacárido de *E. coli*. La posición del la sexta cadena de ácido graso no se muestra en esta figura porque no era visible en la estructura cristalográfica.

- Los glucolípidos y los lipopolisacáridos son componentes de la membrana plasmática con cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente, expuestas en la superficie exterior de la célula.

7.4 Los glúcidos como moléculas portadoras de información: el código de los azúcares

La glucobiología, el estudio de la estructura y la función de los gluconjugados, es una de las más activas y estimulantes áreas de la bioquímica y la biología celular. Cada vez está más claro que las células usan oligosacáridos específicos para codificar información importante acerca del destino intracelular de las proteínas, las interacciones intercelulares, el desarrollo de los tejidos y las señales extracelulares. Discutiremos unos pocos ejemplos para ilustrar la diversidad de la estructura y la variedad de actividades biológicas de los glucoconjugados. En el Capítulo 20 estudiaremos la biosíntesis de los polisacáridos, incluyendo los proteoglucanos, y en el Capítulo 27 la formación de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas.

La mejora de los métodos de determinación de la estructura de los oligosacáridos y polisacáridos ha puesto de manifiesto la sorprendente complejidad y diversidad de los oligosacáridos de las glucoproteínas y los glucolípidos. Considérense las cadenas de oligosacárido de la Figura 7-31, representativas de las encontradas en muchas glucoproteínas. Las más complejas contienen 14 residuos de monosacárido de cuatro tipos, unidos por enlaces diversos como (1→2), (1→3),

(1→4), (1→6), (2→3) y (2→6), algunos en configuración α y otros en configuración β. Las estructuras ramificadas, ausentes en los ácidos nucleicos o en las proteínas, son frecuentes en los oligosacáridos. Partiendo de la suposición razonable de que para la síntesis de los oligosacáridos disponemos de 20 monosacáridos distintos, podemos calcular que son posibles $1{,}44 \times 10^{15}$ oligosacáridos hexaméricos distintos, en comparación con los $6{,}4 \times 10^{7}$ (20^6) hexapéptidos posibles con los 20 aminoácidos comunes y los 4096 (4^6) hexanucleótidos con los cuatro nucleótidos. Si además tenemos en cuenta las variaciones en los oligosacáridos que resultan de la sulfatación de uno o más residuos, el número de oligosacáridos posibles aumenta en dos órdenes de magnitud. Los oligosacáridos poseen mucha información estructural; no sólo compiten, sino que también superan ampliamente a los ácidos nucleicos en densidad de información contenida en una molécula de tamaño modesto. Cada uno de los oligosacáridos de la Figura 7-31 presenta un aspecto tridimensional único –una palabra del código de los azúcares– reconocible por proteínas que interaccionan con él.

Las lectinas son proteínas que leen el código de los azúcares e intervienen en muchos procesos biológicos

Las **lectinas,** presentes en todos los organismos, son proteínas que se unen a los glúcidos con una elevada afinidad y especificidad (Tabla 7-3). Actúan en una amplia variedad de procesos de reconocimiento intercelular, señalización y adhesión y en el destino intracelular de proteínas recién sintetizadas. En el laboratorio, se usan purificadas como reactivos para la detección y separación de glucoproteínas con porciones oligosacáridas diferentes. Aquí discutiremos sólo unos pocos ejemplos de las funciones de las lectinas en las células.

Algunas hormonas peptídicas que circulan en la sangre tienen porciones de oligosacárido que influyen decisivamente en su vida media en circulación. La hormona luteinizante y la tirotropina (hormonas polipeptídicas producidas en la corteza adrenal) tienen oligosacáridos *N*-unidos que terminan con el disacárido GalNAc4S(α1→4)GlcNAc, que es reconocido por una lectina (receptor) de los hepatocitos. (La GalNAc4S es la *N*-acetilgalactosamina sulfatada en el grupo —OH del C-4.) La interacción hormona-receptor interviene en la captación y la degradación de la hormona luteinizante y la tirotropina, reduciendo su concentración en sangre. De este modo, los niveles en sangre de estas hormonas experimentan un aumento (debido a la secreción por la corteza adrenal) y una disminución periódicos (debido a la destrucción por los hepatocitos).

La importancia de la porción oligosacárida de estas hormonas se ha puesto claramente de manifiesto en estudios de individuos con un enzima defectuoso en la ruta de síntesis del oligosacárido. Las hembras con esta anomalía congénita a menudo no presentan los cambios sexuales de la pubertad (sin embargo, los machos con este mismo defecto se desarrollan normalmente). ■

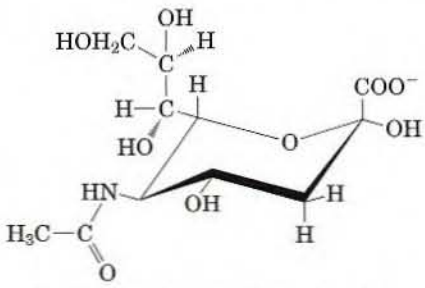
Los residuos de Neu5Ac (un ácido siálico) situados en los extremos de las cadenas de oligosacáridos de muchas glucoproteínas plasmáticas (Fig. 7-31) protegen a la proteína de la captación y degradación por el hígado. Por ejemplo, la ceruloplasmina es una glucoproteína sérica que contiene cobre y que posee varias cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. La eliminación de los residuos de ácido siálico por el enzima sialasa (o neuraminidasa) es una de las maneras mediante las que el organismo marca las proteínas "viejas" para

TABLA 7-3 Ligandos oligosacáridos que se unen a las lectinas

Lectina y su procedencia	*Abreviatura*	*Ligando(s)*
Vegetal		
Concanavalina A	ConA	Manα1—OCH_3
Griffonia simplicifolia lectina 4	GS4	Tetrasacárido Lewis b (Le^b)
Aglutinina de germen de trigo	WGA	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc GlcNAc(β1→4)GlcNAc
Ricina		Gal(β1→4)Glc
Animal		
Galectina-1		Gal(β1→4)Glc
Proteína A de unión a manosa	MBP-A	Octasacárido rico en manosa
Vírica		
Hemaglutinina del virus de la gripe	HA	Neu5Ac(α2→6)Gal(β1→4)Glc
Proteína 1 del virus Polioma	VP1	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc
Bacteriana		
Enterotoxina	LT	Gal
Toxina del cólera	CT	Pentasacárido GM1

Fuente: Weiss, W.I. & Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 441–473.

que sean destruidas y reemplazadas. La membrana plasmática de los hepatocitos tiene moléculas de lectina (receptores de asialoglucoproteínas; "asialo-" indica "sin ácido siálico") que se unen específicamente a las cadenas de oligosacáridos con residuos de galactosa que ya no están "protegidos" por un residuo terminal de Neu5Ac. La interacción receptor-ceruloplasmina provoca la endocitosis y la destrucción de la ceruloplasmina.



Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac)
(ácido siálico)

Parece ser que un mecanismo similar es responsable de la eliminación de los eritrocitos viejos de la sangre de mamíferos. Los eritrocitos recién sintetizados tienen varias glucoproteínas de membrana con cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. Cuando se eliminan experimentalmente los residuos de ácido siálico de una muestra de sangre por tratamiento con sialidasa in vitro y posteriormente se reintroduce la muestra en el torrente sanguíneo, los eritrocitos tratados desaparecen en el plazo de pocas horas; en cambio, los eritrocitos con los oligosacáridos intactos (extraídos y reintroducidos sin tratamiento con sialidasa) continúan circulando durante días.

Varios virus animales se unen a sus células huésped mediante interacciones con oligosacáridos que están expuestos en la superficie celular del huésped. La lectina del virus de la gripe, la proteína HA, es esencial para la entrada del virus y la infección (véase Fig. 11-24). Después de la unión inicial del virus a un oligosacárido de la superficie del huésped que contiene ácido siálico, una sialidasa vírica elimina el residuo terminal de ácido siálico, provocando la entrada del virus a la célula. En el tratamiento de la gripe se utilizan clínicamente inhibidores de este enzima. Las lectinas de la superficie de los virus herpes simplex HS-1 y HS-2 (los agentes causales de los herpes oral y genital, respectivamente) se unen específicamente al sulfato de heparán de la superficie celular como primer paso en su ciclo de infección; la infección requiere de forma precisa el patrón correcto de sulfatación de este polímero.

Las **selectinas** son una familia de lectinas que se encuentran en la membrana plasmática y que intervienen en el reconocimiento intercelular y la adhesión en una amplia variedad de procesos celulares. Uno de estos procesos es el movimiento de las células del sistema inmunitario (linfocitos T) a través de las paredes de los capilares, desde la sangre hacia los tejidos en los lugares de infección o inflamación (Fig. 7-33). En una zona infectada, la P-selectina de la superficie de los capilares de las células endoteliales interacciona con un oligosacárido específico de las glucoproteínas de los linfocitos T circulantes. Esta interacción frena el movimiento de las células T cuando

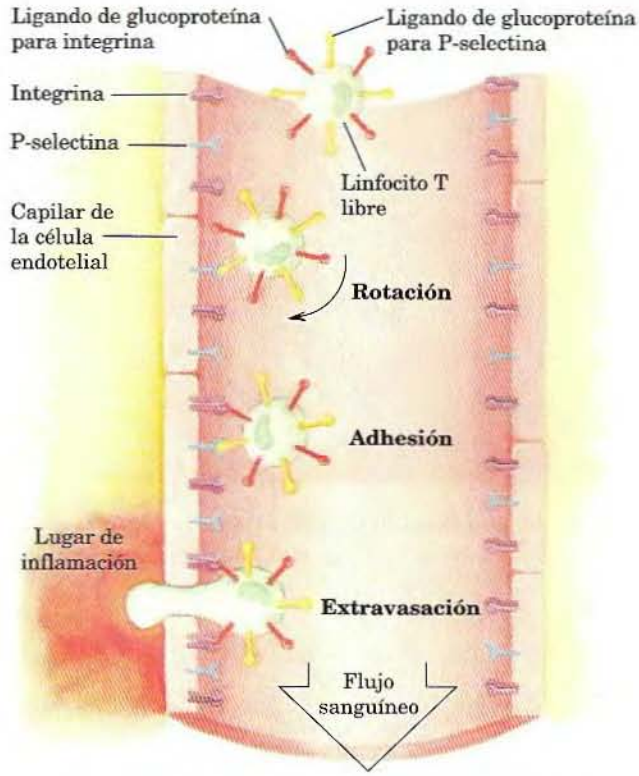


FIGURA 7-33 Papel de las interacciones lectina-ligando en el movimiento de los linfocitos hacia el lugar de una infección o una lesión. Un linfocito T que circula por un capilar se retrasa debido a interacciones transitorias entre las moléculas de P-selectina de la membrana plasmática de las células endoteliales del capilar y los ligandos glucoproteicos de la P-selectina situados en la superficie de la célula T. Dado que los linfocitos interaccionan con sucesivas moléculas de P-selectina, las células T ruedan a lo largo de la superficie del capilar. En las proximidades de la zona de la inflamación, interacciones más fuertes entre la integrina de la superficie del capilar y sus ligandos en la superficie de las células T permiten una fuerte adhesión. La célula T se detiene y, bajo la influencia de señales procedentes de la zona de inflamación, comienza la extravasación –paso a través de la pared del capilar– para alcanzar el lugar de la inflamación.

se adhieren y rotan a lo largo del revestimiento endotelial de los capilares. Una segunda interacción, entre las moléculas de integrina (véase p. 385) de la membrana plasmática de las células T y una proteína de adhesión de la superficie de las células endoteliales, detiene las células T y hace posible su paso a través de la pared del capilar hacia los tejidos infectados para iniciar el ataque inmunológico. Otras dos selectinas participan en este proceso: la E-selectina en las células endoteliales y la L-selectina en las células T, que se unen a sus correspondientes oligosacáridos de la célula T y de la célula endotelial.

Algunos patógenos microbianos tienen lectinas que intervienen en la adhesión bacteriana a las células huésped o en la entrada de toxinas en las células. La bacteria supuestamente responsable de la mayoría de las úlceras gástricas, *Helicobacter pylori*, se adhiere a la superficie interior del estómago mediante interacciones entre las lectinas de la mem-

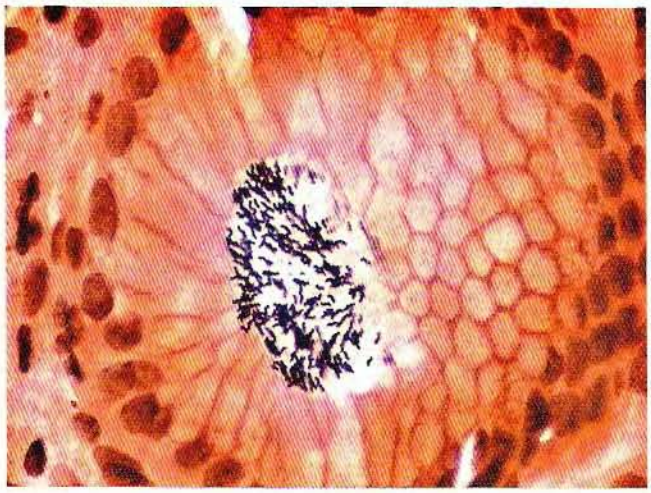


FIGURA 7-34 Una úlcera en desarrollo. Las células de *Helicobacter pylori* se adhieren a la superficie gástrica. Esta bacteria produce úlceras debidas a las interacciones entre una lectina de la superficie bacteriana y el oligosacárido Le^b (un antígeno de grupo sanguíneo) del epitelio gástrico.

brana bacteriana y oligosacáridos específicos de las glucoproteínas de la membrana de las células epiteliales gástricas (Fig. 7-34). Entre los sitios de unión que reconoce *H. pylori* se encuentra el oligosacárido Le^b cuando éste forma parte del determinante del grupo sanguíneo de tipo O. Esta observación ayuda a explicar la mayor incidencia de úlceras gástricas en las personas del grupo sanguíneo O respecto a las de tipo A o B. Los análogos del oligosacárido Le^b sintetizados químicamente podrían ser de utilidad en el tratamiento de este tipo de úlceras. Administrados oralmente, podrían impedir la adhesión bacteriana (y, por tanto, la infección) al competir con las glucoproteínas gástricas por la unión a las lectinas bacterianas.

La molécula de la toxina del cólera (producida por *Vibrio cholerae*) provoca diarrea tras su entrada en las células intestinales responsables de la absorción de agua en el intestino. La toxina se une a la célula diana a través del oligosacárido del ganglíosido GM1, un fosfolípido de membrana (para la estructura de GM1, véase Recuadro 10-2, Fig. 1), en la superficie de las células epiteliales intestinales. De igual manera, la toxina pertusis, producida por *Bordetella pertussis*, la bacteria que causa la tos ferina, penetra en las células diana sólo después de interaccionar con un oligosacárido (o quizá varios oligosacáridos) que posea un residuo terminal de ácido siálico. El conocimiento de los detalles de los sitios de unión de los oligosacáridos a estas toxinas (lectinas) puede permitir el diseño por ingeniería genética de análogos de las toxinas para su uso como vacunas. Análogos de toxinas, carentes del sitio de unión de glúcidos, serían inocuos, pues no podrían unirse ni entrar en las células, pero podrían provocar una respuesta inmunitaria que protegería al receptor de la exposición a la toxina natural. También es posible imaginar fármacos análogos de los oligosacáridos de la superficie celular, que actuarían uniéndose a las lectinas bacterianas o a las toxinas, impidiendo así la unión a las superficies celulares. ■

Las lectinas también actúan en el interior de la célula. Las proteínas destinadas a los lisosomas se marcan en el complejo de Golgi con un oligosacárido que contiene manosa (véase Fig. 27-36). Un motivo estructural común de la superficie de estas glucoproteínas, la región señal, las hace reconocibles por un enzima que fosforila un residuo de manosa en el extremo de la cadena de un oligosacárido. Este residuo de manosa fosforilado es reconocido por el receptor de manosa 6-fosfato dependiente de cationes, una lectina asociada a la membrana con el sitio de unión de manosa fosfato en el lado de la luz del complejo de Golgi. Cuando una sección del complejo de Golgi que contiene el receptor se evagina para formar una vesícula de transporte, las proteínas que contienen residuos de manosa fosfato son arrastradas hacia el interior de la evaginación en formación, debido a la interacción de las manosas fosfato con el receptor; a continuación la vesícula se desplaza y se fusiona con un lisosoma, donde deposita su carga. Muchos enzimas degradativos (hidrolasas) de los lisosomas, tal vez todos, son destinados y entregados mediante este mecanismo.

Las interacciones lectina-glúcido son muy fuertes y muy específicas

En todas las funciones de las lectinas que se han descrito, y en muchas otras en las cuales intervienen las interacciones lectina-oligosacárido, es esencial que el oligosacárido posea una estructura singular, con el fin de que el reconocimiento por la lectina sea altamente específico. La gran densidad de información de los oligosacáridos confiere al código de los azúcares un número virtualmente ilimitado de "palabras" diferentes suficientemente pequeñas para ser leídas por una única proteína. En sus sitios de unión de glúcidos, las lectinas poseen la complementariedad molecular necesaria para permitir la interacción solamente con los glúcidos afines. Ello explica la extraordinaria especificidad de estas interacciones.

Los estudios de difracción de rayos X de la estructura de varios complejos lectina-glúcido han suministrado muchos detalles de la interacción lectina-azúcar. La sialoadhesina (también denominada siglec-1) es una lectina unida a membrana de la superficie de los macrófagos de ratón que reconoce ciertos oligosacáridos que contienen ácido siálico. Esta proteína tiene un dominio en β-sándwich (véase este motivo en la proteína CD8 de la Fig. 4-22) que contiene el sitio de unión del ácido siálico (Figura 7-35a). Todos los sustituyentes del anillo característicos de Neu5Ac están implicados en la interacción entre el azúcar y la lectina; el grupo acetilo en C-5 establece a la vez un puente de hidrógeno e interacciones de van der Waals con la proteína; el grupo carboxilo establece un puente salino con la Arg^{97}; y los hidroxilos del glicerol forman puentes de hidrógeno con la proteína (Fig. 7-35b).

La estructura cristalográfica del receptor/lectina de la manosa 6-fosfato ha revelado detalles de su interacción con la manosa 6-fosfato que explican la especificidad de la unión y el requerimiento de un catión divalente en la interacción lectina-azúcar (Fig. 7-35c). La Arg^{111} del receptor forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo en C-2 de la manosa y se coor-

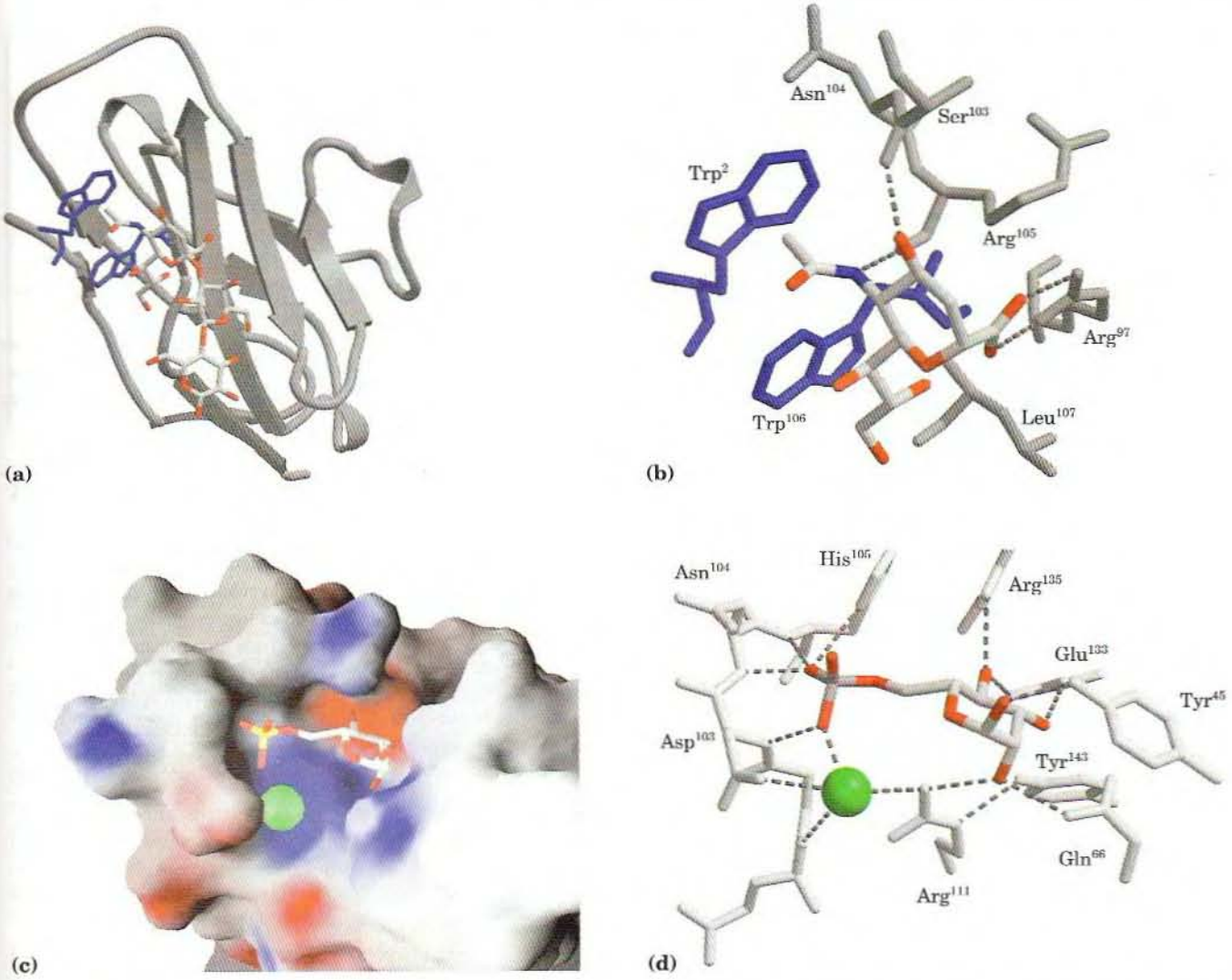


FIGURA 7-35 La interacción lectina-glúcido en detalle. **(a)** Los estudios de cristalografía de rayos X de la lectina (de PDB ID 1QFO) específica de ácido siálico muestran cómo una proteína puede reconocer y unirse a un residuo de ácido siálico (Neu5Ac). La sialoadhesina (también denominada siglec-1), una lectina unida a membrana de la superficie de los macrófagos de ratón, tiene un dominio en β-sándwich (gris) que contiene el sitio de unión de Neu5Ac (azul oscuro). El Neu5Ac se representa como estructura de varillas. **(b)** Todos los sustituyentes del anillo propios de Neu5Ac están implicados en la interacción entre el azúcar y la lectina: el grupo acetilo en C-5 establece a la vez puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals con la proteína; el grupo carboxilo forma un puente salino con la Arg^{97} y los hidroxilos del glicerol forman puentes de hidrógeno con la proteína. **(c)** Estructura del receptor bovino de manosa 6-fosfato en el complejo con manosa 6-fosfato (PDB ID 1M6P). Se muestra el modelo espacial de la proteína, coloreado para representar el potencial electrostático: rojo, carga predominantemente negativa; azul, carga predominantemente positiva. La manosa 6-fosfato se representa como estructura de varillas, un ion manganeso se muestra en verde. **(d)** En este complejo, la manosa 6-fosfato forma un puente de hidrógeno con la Arg^{111} y está coordinada con el ion manganeso (verde). La His^{105}, que forma un puente de hidrógeno con un oxígeno del fosfato de la manosa 6-fosfato, puede ser el residuo que cuando se protona a pH bajo provoca la liberación de la manosa 6-fosfato por el receptor en el lisosoma.

dina con Mn^{2+}. La His^{105} forma un puente de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno del fosfato (Fig. 7-35d). Cuando la proteína marcada con manosa 6-fosfato alcanza el lisosoma (con un pH interno inferior al del complejo de Golgi), el receptor parece perder afinidad por la manosa 6-fosfato. La protonación de la His^{105} puede causar cambio de afinidad.

Además de estas interacciones tan específicas, hay interacciones más generales que contribuyen a la unión de muchos glúcidos a sus lectinas. Por ejemplo, muchos azúcares tienen un lado más polar y otro menos polar (Fig. 7-36); el lado más polar forma puentes de hidrógeno con la lectina y el menos polar interacciones hidrofóbicas con residuos aminoácidos apolares. La suma de todas estas interacciones hace que la unión entre las lectinas y los glúcidos sea de gran afinidad (K_d de 10^{-8} o menor) y especificidad. Ello permite un tipo de transferencia de información esencial en muchos procesos inter- e intracelulares. La Figura 7-37 resume algunas de las interacciones biológicas en las que interviene el código de los azúcares.

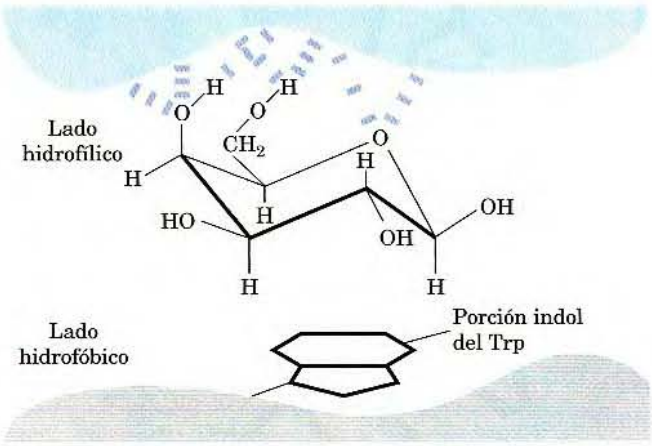


FIGURA 7-36 Interacciones hidrofóbicas de los residuos de azúcar. Los azúcares como la galactosa tienen un lado más polar (la parte superior de la silla, con el anillo de oxígeno y varios hidroxilos), capaz de formar puentes de hidrógeno con la lectina, y un lado menos polar que puede establecer interacciones hidrofóbicas con cadenas laterales apolares de la proteína, tales como el anillo indol del triptófano.

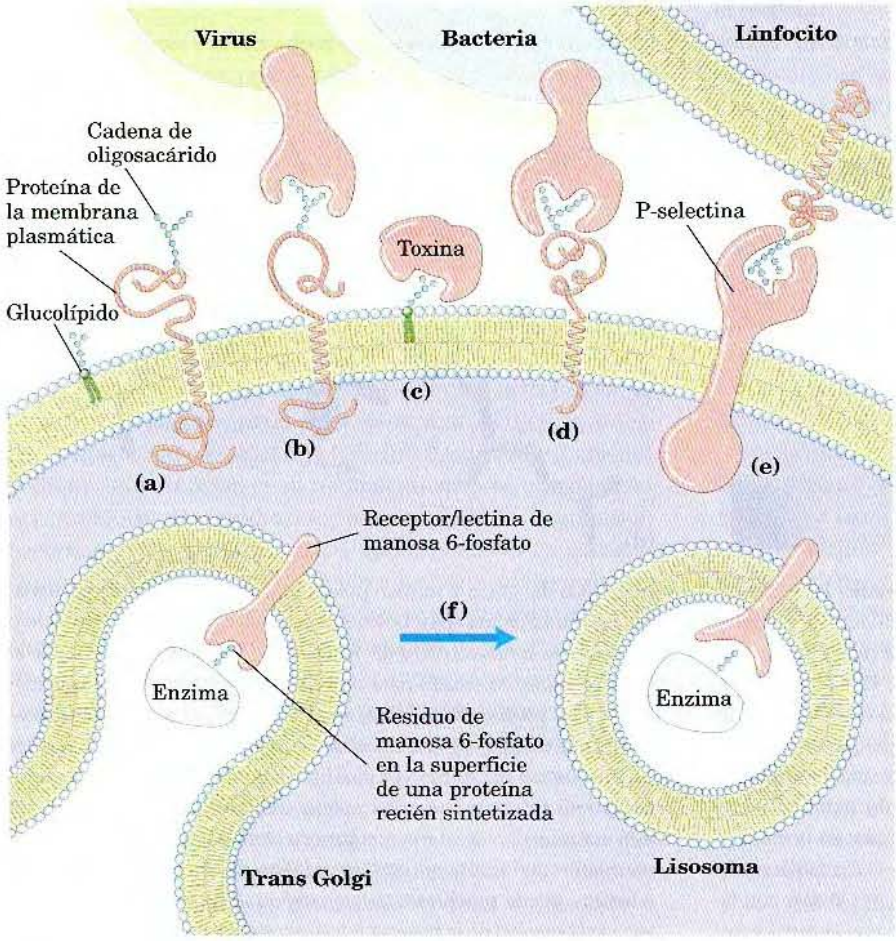


FIGURA 7-37 Papel de los oligosacáridos en el reconocimiento y la adhesión a la superficie de la célula. **(a)** Oligosacáridos con estructura única (representados como ristras de hexágonos) que forman parte de una gran variedad de glucoproteínas o glucolípidos, localizados en la superficie externa de la membrana plasmática, interaccionan con elevada especificidad y afinidad con lectinas del medio extracelular. **(b)** Los virus que infectan células animales, tales como el virus de la gripe, se unen a glucoproteínas de la superficie de la célula en los primeros pasos de la infección. **(c)** Las toxinas bacterianas, tales como las toxinas del cólera y del pertussis, se unen a glucolípidos de la superficie de la célula en los primeros pasos de la infección. **(d)** Algunas bacterias, tales como *Helicobacter pylori*, se adhieren a las células animales para después colonizarlas o infectarlas. **(e)** Las selectinas (lectinas) de la membrana plasmática de ciertas células intervienen en las interacciones intercelulares, como ocurre con los linfocitos T y las células endoteliales de la pared capilar en un lugar de infección. **(f)** El receptor/lectina de la manosa 6-fosfato del complejo del trans Golgi se une a los oligosacáridos de los enzimas lisosómicos, destinándolos a los lisosomas.

RESUMEN 7.4 Los glúcidos como moléculas portadoras de información: el código de los azúcares

- Los monosacáridos pueden formar una variedad prácticamente ilimitada de oligosacáridos, que difieren en estereoquímica y posición de los enlaces glucosídicos, tipo y orientación de los grupos sustituyentes y número y tipo de ramificaciones. Los oligosacáridos contienen una densidad de información mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas.
- Las lectinas, proteínas con dominios de unión de glúcidos de gran especificidad, se encuentran normalmente en la superficie de las células, donde inician la interacción con otras células. En los vertebrados, los oligosacáridos, interpretados como señales por las lectinas, gobiernan la tasa de degradación de ciertas hormonas peptídicas, proteínas circulantes y células sanguíneas.
- La adhesión de patógenos víricos y bacterianos a las células animales diana resulta de la interacción de

lectinas del patógeno con oligosacáridos de la superficie de las células diana. Las lectinas también se encuentran en el interior de las células, donde participan en el destino intracelular de las proteínas.

- La cristalografía de rayos X de complejos lectina-azúcar muestra la detallada complementariedad de las dos moléculas, que explica la fuerza y especificidad de sus interacciones.
- Las selectinas son lectinas de la membrana plasmática que interaccionan con cadenas de glúcidos de la matriz extracelular o de la superficie de otras células, influyendo de este modo en el flujo de información entre la célula y la matriz o entre células.

7.5 Análisis de glúcidos

La aceptación creciente de la importancia de la estructura de los oligosacáridos en el reconocimiento biológico ha sido el estímulo que ha impulsado el desarrollo de métodos de análisis de la estructura y la estereoquímica de los oligosacáridos complejos. El análisis de oligosacáridos es complicado, pues pueden estar ramificados y unirse con una variedad de enlaces. Los oligosacáridos se separan generalmente de su proteína o lípido conjugado antes del análisis; posteriormente, se someten a procesos de degradación con reactivos específicos que revelan la posición o la estereoquímica de los enlaces. La espectrometría de masas y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) también han sido muy valiosas para descifrar la estructura de los oligosacáridos.

La porción oligosacárida de las glucoproteínas o glucolípidos se puede separar mediante enzimas purificados –las glucosidasas que rompen específicamente enlaces *O* o *N* de oligosacáridos o las lipasas que separan lo grupos lipídicos de cabeza–. Las mezclas de glúcidos se resuelven en sus componentes individuales (Fig. 7-38) por alguna de las mismas técnicas utilizadas en la separación de proteínas y aminoácidos: precipitación fraccionada mediante disolventes, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por exclusión de tamaño (véase Fig. 3-18). Las lectinas altamente purificadas, unidas covalentemente a un soporte insoluble, se utilizan habitualmente en la cromatografía de afinidad de glúcidos (véase Fig. 3-18c). La hidrólisis de oligosacáridos y polisacáridos en ácidos fuertes proporciona una mezcla de monosacáridos que, tras su conversión en derivados volátiles adecuados, se pueden separar, identificar y cuantificar por cromatografía gas-líquido (p. 365) para obtener la composición global del polímero.

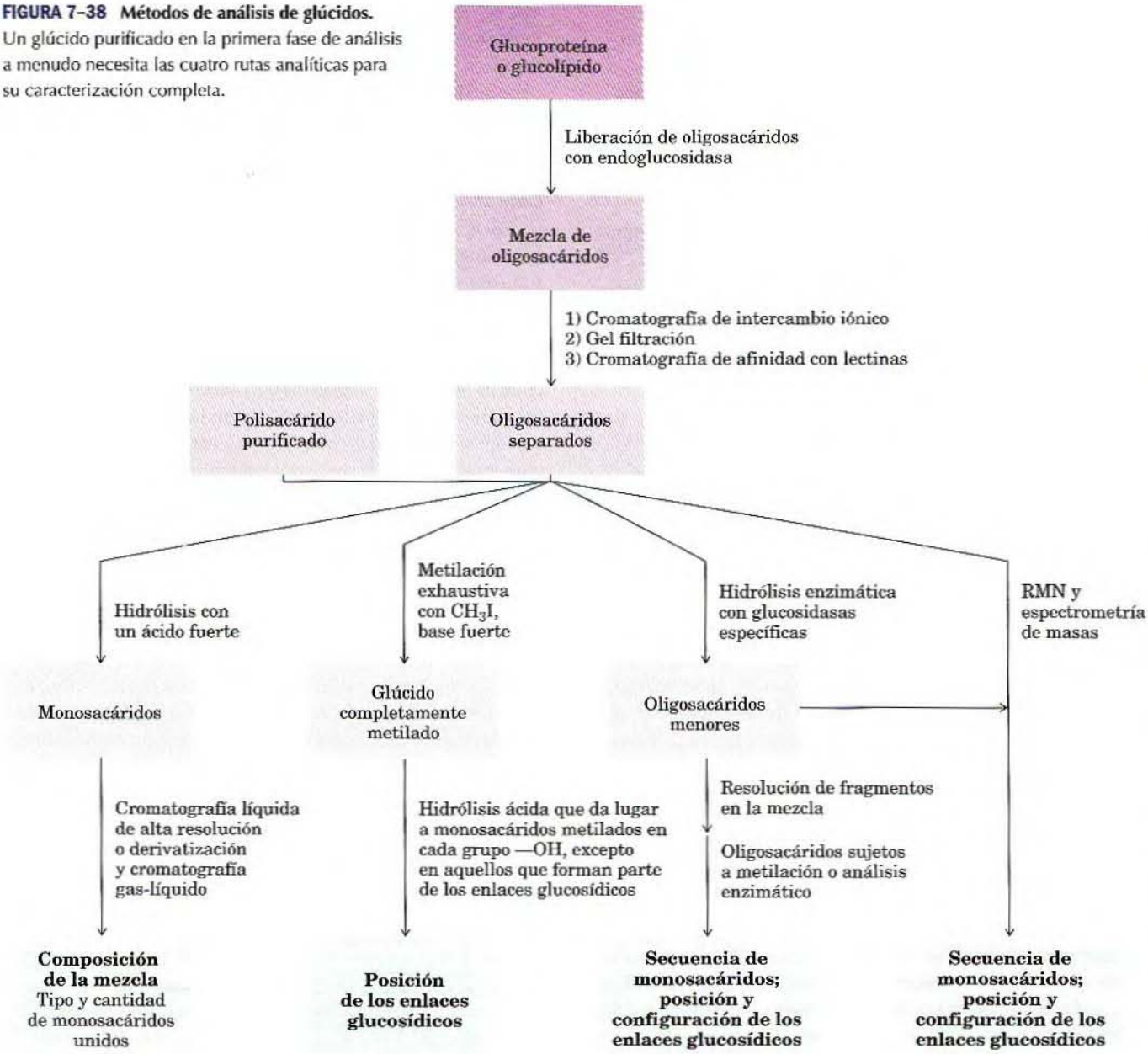
Para polímeros sencillos y lineales como la amilosa, las posiciones de los enlaces glucosídicos se determinan tratando el polisacárido intacto con yoduro de metilo en medio fuertemente básico para convertir todos los hidroxilos libres en éteres metílicos estables en medio ácido. Luego el polisacárido metilado se hidroliza en medio ácido. Los únicos grupos hidroxilo libres presentes en los derivados monosacáridos producidos son los que estaban implicados en enlaces glucosídicos. Para determinar la secuencia de los residuos de monosacáridos, incluyendo las ramas en caso de estar presentes, se utilizan las exoglucosidasas de especificidad conocida para eliminar los residuos uno a uno del extremo o extremos no reductores. La especificidad de estas exoglucosidasas a menudo permite deducir la posición y la estereoquímica de los enlaces. Los polisacáridos y los oligosacáridos de gran tamaño pueden tratarse químicamente o con endoglucosidasas para cortar enlaces glucosídicos internos específicos y así obtener varios oligosacáridos menores y más fácilmente analizables.

El análisis de oligosacáridos se basa cada vez más en la espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución (véase Recuadro 4-4). La espectrometría de masas por desadsorción/ionización por láser facilitada por matriz (MALDI MS) y la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (descritas en el Recuadro 3-2) son fácilmente aplicables a compuestos polares tales como los oligosacáridos. La MALDI MS es un método muy sensible para determinar la masa de un ion molecular (la cadena completa de oligosacárido). La MS en tándem suministra la masa del ion molecular y de muchos de sus fragmentos, obtenidos normalmente por rotura de los enlaces glucosídicos. La comparación de las masas de cada fragmento permite obtener la secuencia de las unidades de monosacárido. El análisis de RMN por sí solo, especialmente para oligosacáridos de tamaño medio, puede proporcionar mucha información sobre la secuencia, la posición de los enlaces y la configuración del carbono anomérico. Se utilizan procedimientos automatizados e instrumentos comerciales para las determinaciones de rutina de la estructura de los oligosacáridos, pero la secuenciación de los oligosacáridos ramificados unidos por más de un tipo de enlace continúa siendo mucho más compleja que la determinación de las secuencias lineales de proteínas o ácidos nucleicos, con sólo un único tipo de enlace.

RESUMEN 7.5 Análisis de glúcidos

- La determinación completa de la estructura de los oligosacáridos y los polisacáridos requiere establecer las posiciones de ramificación, la secuencia de cada rama, la configuración de cada monosacárido y las posiciones de los enlaces glucosídicos.
- Las estructuras de los oligosacáridos y de los polisacáridos normalmente se determinan por una combinación de métodos: hidrólisis enzimática específica para determinar la estereoquímica y producir fragmentos menores para su posterior análisis; análisis por metilación para localizar los enlaces glucosídicos; y degradación escalonada para determinar la secuencia y la configuración de los carbonos anoméricos.
- La espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución, aplicables a pequeñas muestras de glúcidos, suministran información esencial sobre la secuencia, la configuración en los carbonos anoméricos y en otros carbonos y las posiciones de los enlaces glucosídicos.

FIGURA 7-38 Métodos de análisis de glúcidos.
Un glúcido purificado en la primera fase de análisis a menudo necesita las cuatro rutas analíticas para su caracterización completa.



Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

glucoconjugado 238
monosacárido 238
oligosacárido 238
disacárido 238
polisacárido 238
aldosa 239
cetosa 239
fórmulas de proyección de Fisher 240
epímeros 240
hemiacetal 242
hemicetal 242
piranosa 242
furanosa 242
anómeros 242
carbono anomérico 242
mutarrotación 242
fórmulas de perspectiva de Haworth 242
azúcar reductor 244
enlaces glucosídicos 245
extremo reductor 245
glucano 247
almidón 248
glucógeno 248
matriz extracelular 253
glucosaminoglucano 253
ácido hialurónico 254
proteoglucano 256
glucoproteína 256
glucolípido 256
lectina 262
selectinas 263

Bibliografía

Generalidades sobre la química de glúcidos

Aspinall, G.O. (ed.) (1982, 1983, 1985) *The Polysaccharides*, vols. 1-3, Academic Press, Inc., New York.

Collins, P.M. & Ferrier, R.J. (1995) *Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Chichester, England.

Un texto completo de nivel de licenciado.

Fukuda, M. & Hindsgaul, O. (1994) *Molecular Glycobiology*, IRL Press at Oxford University Press, Inc., New York.

Tratamiento completo y avanzado de la química y la biología de los glúcidos de superficie celular. Buenos capítulos sobre lectinas, reconocimiento de glúcidos en las interacciones intercelulares y la síntesis química de oligosacáridos.

Lehmann, J. (Haines, A.H., trad.) (1998) *Carbohydrates: Structure and Biology*, G. Thieme Verlag, New York.

Se describen los fundamentos de la química y la biología de los glúcidos a un nivel accesible para estudiantes de licenciatura y licenciados.

Morrison, R.T. & Boyd, R.N. (1992) *Organic Chemistry*, 6.ª ed., Benjamin Cummings, San Francisco.

Los capítulos 34 y 35 tratan sobre la estructura, estereoquímica, nomenclatura y reacciones químicas de los glúcidos.

Pigman, W. & Horton, D. (eds.) (1970, 1972, 1980) *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, vols. IA, IB, IIA, y IIB, Academic Press, Inc., New York.

Tratado exhaustivo sobre la química de los glúcidos.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. & Marth, J. (1999) *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

La estructura, la biosíntesis, el metabolismo y la función de los glucosaminoglucanos, proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos tratados a nivel intermedio y muy bien ilustrados.

Glucosaminoglucanos y proteoglucanos

Esko, J.D. & Lindahl, U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* **108,** 169–173.

Esko, J.D. & Selleck, S.B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71,** 435–471.

Iozzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67,** 609–652.

Una revisión de los más recientes estudios genéticos y de la biología molecular de los proteoglucanos de la matriz. Se tratan en profundidad las relaciones entre estructura y función de algunos proteoglucanos paradigmáticos y se examinan los nuevos aspectos de su biología.

Jackson, R.L., Busch, S.J. & Cardin, A.D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* **71,** 481–539.

Una revisión avanzada sobre la química y la biología de los glucosaminoglucanos.

Roseman, S. (2001) Reflections on glycobiology. *J. Biol. Chem.* **276,** 41,527–41,542.

Revisión magistral de la historia de los estudios sobre glúcidos y glucosaminoglucanos por una de las principales figuras de este campo.

Turnbull, J., Powell, A. & Guimond, S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* **11,** 75–82.

Revisión de la química y la biología de los dominios con elevado contenido de sulfato en el sulfato de haparán.

Glucoproteínas

Gahmberg, C.G. & Tolvanen, M. (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **21,** 308–311.

Opdenakker, G., Rudd, P., Ponting, C. & Dwek, R. (1993) Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* **7,** 1330–1337.

Esta revisión trata de la génesis de las glucoformas, los papeles funcionales de la glucosilación y las relaciones estructura-función en varias glucoproteínas.

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3,** 97–130.

Glucobiología y el código de los azúcares

Angata, T. & Brinkman-Van der Linden, E. (2002) I-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 294–316.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. & Juliano, R.L. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50,** 197–263.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68,** 729–777.

Extensa revisión del papel biológico del sulfato de heparán.

Bertozzi, C.R. & Kiessling, L.L. (2001) Chemical glycobiology. *Science* **291,** 2357–2363.

Revisión de las aplicaciones de la síntesis química de los glúcidos para entender el papel biológico de los oligosacáridos.

Borén, T., Normark, S. & Falk, P. (1994) *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **2,** 221–228.

Una revisión de las funciones de los oligosacáridos que determinan el grupo sanguíneo en la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica, produciendo úlceras.

Cooper, D.N. (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 209–231.

Revisión de los datos genómicos a favor de la conservación de las galectinas, una familia de lectinas.

Cornejo, C.J., Winn, R.K. & Harlan, J.M. (1997) Anti-adhesion therapy. *Adv. Pharmacol.* **39,** 99–142.

Se utilizan análogos de oligosacáridos de reconocimiento para bloquear la adhesión de un patógeno a su célula huésped diana.

Dahms, N.M. & Hancock, M.K. (2002) P-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 317–340.

Gabius, H.-J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften* **87,** 108–121.

Descripción de los fundamentos de la elevada densidad de información contenida en los oligosacáridos, con ejemplos de la importancia del código de los azúcares.

Gabius, H.-J., Andre, S., Kaltner, H. & Siebert, H.C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 165–177.

Examina las razones del relativamente tardío reconocimiento de la información contenida en los oligosacáridos y polisacáridos.

Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4,** 202–212.

Helenius, A. & Aebi, M. (2001) Intracellular functions of *N*-linked glycans. *Science* **291,** 2364–2369.

Revisión de la síntesis de oligosacáridos *N*-unidos y sus funciones de destino.

Hooper, L.A., Manzella, S.M. & Baenziger, J.U. (1996) From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J.* **10,** 1137–1146.

Pruebas del papel de los oligosacáridos sulfatados en la vida media de hormonas peptídicas, en las interacciones simbióticas en las legumbres fijadoras de nitrógeno y en las interacciones de los linfocitos.

Horwitz, A.F. (1997) Integrins and health. *Sci. Am.* **276** (mayo), 68–75.

Artículo sobre el papel de las integrinas en la adhesión intercelular y sus posibles papeles en la artritis, las enfermedades cardíacas, la apoplejía, la osteoporosis y la propagación del cáncer.

Iozzo, R.V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Clin. Invest.* **108,** 165–167.

Introducción a la serie de artículos sobre el sulfato de heparán publicados en este ejemplar; todos de provechosa lectura.

Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 187–197.

Introducción a la serie de excelentes revisiones sobre las lectinas y sus funciones biológicas publicadas en este ejemplar.

Loris, R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 198–208.

McEver, R.P., Moore, K.L. & Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270,** 11,025–11,028.

Una breve revisión sobre la interacción de las selectinas con sus ligandos glucídicos.

Reuter, G. & Gabius, H.-J. (1999) Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell. Mol. Life Sci.* **55,** 368–422.

Excelente revisión de la diversidad química de los oligosacáridos y los polisacáridos y de los procesos biológicos dependientes del reconocimiento proteína-glúcido.

Selleck, S. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.* **16,** 206–212.

Una breve revisión de dificultad media sobre los datos genéticos existentes en favor de la intervención de los proteoglucanos en el desarrollo.

Weigel, P.H. & Yik, J.H. (2002) Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1572,** 341–363.

Weiss, W.I. & Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 441–473.

Un buen tratamiento de las bases químicas de las interacciones glúcido-proteína.

Análisis de glúcidos

Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F. (eds.) (1994) *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach,* 2.ª ed., IRL Press, Oxford.

Manual muy útil para el análisis de todo tipo de moléculas que contengan azúcares.

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectroscopy. *Science* **291,** 2351–2356.

Corta revisión sobre los usos de la MALDI MS y la MS/MS en la determinación de la estructura de los oligosacáridos.

Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J. & Wormald, M.R. (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **62,** 65–100.

Excelente revisión de los usos de la RMN, la espectrometría de masas y los enzimas para determinar la estructura de los oligosacáridos.

Fukuda, M. & Kobata, A. (1993) *Glycobiology: A Practical Approach,* IRL Press, Oxford.

Manual para el aislamiento y la caracterización de la fracción de oligosacárido de las glucoproteínas, utilizando las técnicas modernas disponibles. Accesible como una parte de las Practical Approach Series de IRL Press en CD-ROM de Oxford University Press (www.oup-usa.org/acadsci/pasbooks.html).

Jay, A. (1996) The methylation reaction in carbohydrate analysis. *J. Carbohydr. Chem.* **15,** 897–923.

Completa descripción del análisis de la metilación de glúcidos.

Lennarz, W.J. & Hart, G.W. (eds.) (1994) *Guide to Techniques in Glycobiology,* Methods in Enzymology, vol. 230, Academic Press, Inc., New York.

Guía práctica para trabajar con oligosacáridos.

McCleary, B.V. & Matheson, N.K. (1986) Enzymic analysis of polysaccharide structure. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **44,** 147–276.

Describe el uso de enzimas purificados en el análisis de la estructura y la estereoquímica.

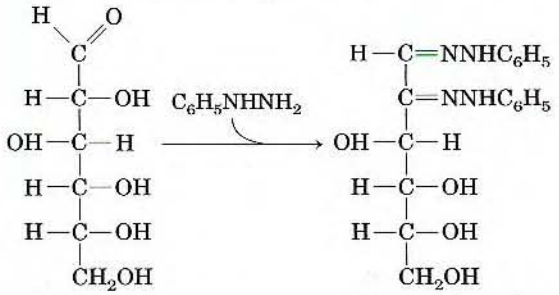
Rudd, P.M., Guile, G.R., Kuester, B., Harvey, D.J., Opdenakker, G. & Dwek, R.A. (1997) Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* **388,** 205–207.

Problemas

1. Determinación de una fórmula empírica A partir de hígado de ganso se aisló una sustancia desconocida que contenía solamente C, H y O. Una muestra de 0,423 g del compuesto produjo 0,620 g de CO_2 y 0,254 g de H_2O después de su combustión completa en presencia de un exceso de oxígeno. ¿Es compatible la fórmula empírica de esta sustancia con su posible naturaleza de glúcido? Justificar la respuesta.

2. Azúcares alcoholes El oxígeno del grupo carbonilo se reduce dando un grupo hidroxilo en los derivados monosacáridos conocidos como azúcares alcoholes. Por ejemplo, el D-gliceraldehído se puede reducir a glicerol. Sin embargo, este azúcar alcohol ya no se designa como D o L. ¿Cuál es la razón?

3. Los puntos de fusión de los derivados osazona de monosacáridos Muchos glúcidos reaccionan con la fenilhidracina ($C_6H_5NHNH_2$) para formar derivados cristalinos amarillo brillante conocidos como osazonas:



Glucosa — Osazona derivada de glucosa

Las temperaturas de fusión de estos derivados se determinan fácilmente y son características de cada osazona. Esta información se utilizó para ayudar a identificar los monosacáridos antes del desarrollo de la HPLC o de la cromatografía gas-líquido. Debajo hay un listado de los puntos de fusión (PF) de algunos derivados aldosa-osazona:

Monosacárido	*PF del monosacárido anhidro (°C)*	*PF del derivado osazona (°C)*
Glucosa	146	205
Manosa	132	205
Galactosa	165–168	201
Talosa	128–130	201

Como se muestra en la tabla, ciertos pares de derivados tienen los mismos puntos de fusión, aunque esto no ocurre en los monosacáridos no derivados. ¿Por qué la glucosa y la manosa por un lado y la galactosa y la talosa por otro forman derivados osazona con los mismos puntos de fusión?

4. Interconversión de las formas de la D-glucosa Una disolución de un estereoisómero de un monosacárido determinado es capaz de girar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (en sentido antihorario) y se denomina isómero levogiro, designado (−); el otro estereoisómero produce una rotación de la misma magnitud del plano de la luz polarizada, pero hacia la derecha (en sentido horario) y se denomina isómero dextrogiro, designado (+). Una mezcla equimolar de las formas (+) y (−) no produce la rotación en el plano de polarización de la luz.

La actividad óptica de un estereoisómero se expresa cuantitativamente mediante su *rotación óptica*, medida por la rotación en grados del plano de la luz polarizada al pasar a través de una determinada longitud de una disolución del compuesto de una concentración conocida. La *rotación específica* $[\alpha]_D^{25°C}$ de un compuesto ópticamente activo es:

$$[\alpha]_D^{25°C} = \frac{\text{rotación óptica observada (°)}}{\text{longitud del paso óptico (dm)} \times \text{concentración (g/mL)}}$$

Hay que especificar la temperatura y la longitud de onda de la luz empleada (generalmente la línea D del sodio, 589 nm).

Una disolución recién preparada de α-D-glucosa presenta una rotación específica de +112°. La rotación de la disolución decrece gradualmente con el paso del tiempo hasta alcanzar un valor de equilibrio de +52,5°. En cambio, una disolución recién preparada de β-D-glucosa presenta una rotación específica de +19°. La rotación de esta disolución aumenta con el tiempo hasta el mismo valor de equilibrio del anómero α.

(a) Dibuje las fórmulas de perspectiva de Haworth de las formas α y β de la D-glucosa. ¿Cuál es la característica que distingue las dos formas?

(b) ¿Por qué la rotación óptica de una disolución recién preparada de la forma α disminuye con el tiempo? ¿Por qué disoluciones de las formas α y β evolucionan hasta alcanzar el mismo valor de rotación específica en el equilibrio?

(c) Calcule el porcentaje de cada una de las dos formas de D-glucosa presentes en el equilibrio.

5. Sabor a miel La fructosa de la miel se encuentra principalmente como β-D-piranosa. Éste es uno de los glúcidos más dulces conocidos. La forma β-D-furanosa de la fructosa es mucho menos dulce. El dulzor de la miel disminuye gradualmente a elevadas temperaturas. Además, los jarabes de cereales con alto contenido de fructosa (un producto comercial en el cual la mayor parte de la glucosa del jarabe de cereales se transforma en fructosa) se utilizan para endulzar las bebidas *frías*, pero no las *calientes*. ¿Qué propiedad química de la fructosa podría justificar ambas observaciones?

6. La glucosa oxidasa en la determinación de la glucosa en sangre El enzima glucosa oxidasa aislado a partir del hongo *Penicillium notatum* cataliza la oxidación de la β-D-glucosa a D-glucono-δ-lactona. Este enzima es altamente específico para el anómero β de la glucosa y no afecta al anómero α. A pesar de esta especificidad, la reacción catalizada por la glucosa oxidasa se usa normalmente en un ensayo clínico de determinación de glucosa total en sangre, es decir, en disoluciones que contienen una mezcla de β- y α-D-glucosa. ¿Cómo es esto posible? Además de permitir la detección de menores cantidades de glucosa, ¿qué ventaja ofrece la glucosa oxidasa sobre el reactivo de Fehling en la determinación de la glucosa en sangre?

7. La invertasa "invierte" la sacarosa La hidrólisis de la sacarosa (rotación específica +66,5°) da lugar a una mezcla equimolar de D-glucosa (rotación específica +52,5°) y D-fructosa (rotación específica −92°). (Véase Problema 4 para los detalles acerca de la rotación específica.)

(a) Sugiera un método para determinar la velocidad de hidrólisis de la sacarosa por acción de una preparación enzimática extraída de la mucosa interna del intestino delgado.

(b) Explicar por qué la mezcla equimolar de D-glucosa y D-fructosa, resultado de la hidrólisis de la sacarosa, se denomina azúcar invertido en la industria alimentaria.

(c) Se deja que el enzima invertasa (actualmente se prefiere el nombre de sacarasa) actúe sobre una disolución de sacarosa al 10% (0,1 g/mL) hasta la hidrólisis completa. ¿Cuál será la rotación óptica de la disolución en una cubeta de 10 cm? (Ignore la posible pequeña contribución del enzima.)

8. Fabricación de chocolates rellenos La fabricación de chocolates que contienen un relleno líquido es una aplicación interesante de la ingeniería enzimática. El relleno líquido está formado básicamente por una disolución acuosa de azúcares rica en fructosa que endulza su sabor. El dilema técnico es: el recubrimiento de chocolate debe prepararse vertiendo chocolate fundido y caliente sobre un núcleo sólido (o casi sólido) y sin embargo el producto final debe tener un relleno lí-

quido, rico en fructosa. Sugiera un modo de solucionar este problema. (Sugerencia: la solubilidad de la sacarosa es mucho menor que la de una mezcla de glucosa y fructosa.)

9. ¿Anómeros de la sacarosa? A pesar de que la lactosa se presenta en dos formas anoméricas, no se han descrito formas anoméricas de la sacarosa. ¿Por qué?

10. Propiedades físicas de la celulosa y el glucógeno La celulosa prácticamente pura obtenida a partir de los filamentos de la semilla de las plantas del género *Gossypium* (algodón) es resistente, fibrosa y completamente insoluble en agua. En cambio, el glucógeno obtenido a partir de músculo o hígado se solubiliza fácilmente en agua caliente dando lugar a una disolución turbia. A pesar de que presentan propiedades físicas marcadamente diferentes, ambas sustancias están compuestas por polímeros de D-glucosa, de masa molecular comparable, unidos por enlaces (1→4). ¿Cuáles son las características estructurales que hacen que estos dos polisacáridos difieran en sus propiedades físicas? Explique las ventajas biológicas de sus respectivas propiedades.

11. Velocidad de crecimiento del bambú Las cañas de bambú pueden crecer a la asombrosa velocidad de 0,3 m/día en condiciones óptimas. Dado a que las cañas se componen casi totalmente de fibras de celulosa orientadas en la dirección del crecimiento, calcule el número de residuos de azúcar por segundo que deben añadirse enzimáticamente a las cadenas de celulosa para justificar esta velocidad de crecimiento. Cada unidad de D-glucosa tiene una longitud aproximada de 0,5 nm una vez incorporada a la molécula de celulosa.

12. El glucógeno como material de reserva energética: ¿Durante cuánto tiempo es capaz de volar un ave de caza? Desde hace mucho tiempo, se ha observado que ciertas aves de caza como el guaco, la codorniz y los faisanes se fatigan fácilmente. El historiador griego Jenofonte escribió: "Las avutardas... pueden ser capturadas si se las levanta con rapidez, puesto que son capaces de volar tan sólo una corta distancia y se cansan enseguida, como las perdices; y su carne es deliciosa". Los músculos de las alas de las aves de caza dependen casi exclusivamente de la utilización de glucosa 1-fosfato como fuente de energía, en forma de ATP (Capítulo 14). En las aves de caza, la glucosa 1-fosfato se forma por degradación del glucógeno almacenado en el músculo, catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa. La velocidad de producción de ATP está limitada por la velocidad de degradación del glucógeno. Durante un "vuelo súbito", la velocidad de degradación del glucógeno en las aves de caza es bastante elevada, aproximadamente 120 μmol/min de glucosa 1-fosfato producida por gramo de tejido fresco. Considerando que los músculos de las alas generalmente contienen un 0,35% de glucógeno en peso, calcule durante cuánto tiempo puede volar un ave de caza. (Suponga una masa molecular media para el residuo de glucosa en el glucógeno de 160 g/mol.)

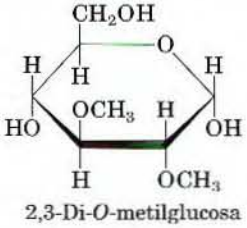
13. Volumen de sulfato de condroitina en disolución Una de las funciones más importantes del sulfato de condroitina es actuar como lubricante en las articulaciones óseas formando un medio parecido a un gel, capaz de resistir la fricción y los impactos. Esta función parece estar relacionada con una propiedad característica del sulfato de condroitina: el volumen ocupado por la molécula es mucho mayor en disolución que cuando forma un sólido deshidratado. ¿Por qué el volumen ocupado es mucho mayor en disolución?

14. Interacciones de la heparina La heparina es un glucosaminoglucano cargado muy negativamente, que se utiliza clínicamente como anticoagulante. Actúa uniéndose a varias proteínas del plasma, incluida la antitrombina III, un inhibidor de la coagulación sanguínea. La unión 1:1 de la heparina a la antitrombina III provoca un cambio conformacional en la proteína que incrementa mucho su capacidad para inhibir la coagulación. ¿Qué aminoácidos de la antitrombina III es probable que interaccionen con la heparina?

15. Contenido informativo de los oligosacáridos La porción de glúcido de algunas glucoproteínas puede servir de sitio de reconocimiento celular. Para ello, es necesario que los oligosacáridos de las glucoproteínas puedan adoptar una amplia variedad de estructuras. ¿Qué compuestos podrían dar lugar a una mayor variedad de estructuras: los oligopéptidos compuestos por 5 aminoácidos o los oligosacáridos compuestos por 5 monosacáridos? Justifique su respuesta.

16. Determinación del grado de ramificación de la amilopectina El grado de ramificación de la amilopectina [número de enlaces glucosídicos (α1→6)] se puede determinar mediante el siguiente procedimiento. Una muestra de amilopectina es tratada exhaustivamente con un agente metilante (yoduro de metilo) que reemplaza todos los hidrógenos de los grupos hidroxilo del azúcar por grupos metilo, convirtiendo los grupos —OH en grupos —OCH_3. Todos los enlaces glucosídicos de la muestra tratada se hidrolizan a continuación en una disolución acuosa ácida. Se determina la cantidad de 2,3-di-*O*-metilglucosa en la muestra hidrolizada.

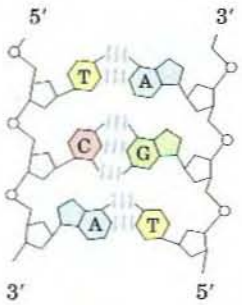
(a) Explique en qué se basa el método de determinación del número de puntos de ramificación (α1→6) de la amilopectina. ¿Qué sucede con los residuos de glucosa no ramificados de la amilopectina durante la metilación y la hidrólisis?



2,3-Di-*O*-metilglucosa

(b) Una muestra de amilopectina de 258 mg tratada del modo descrito anteriormente dio un rendimiento de 12,4 mg de 2,3-di-*O*-metilglucosa. Determine cuál es el porcentaje de residuos de glucosa que contienen un enlace (α1→6). (Suponga que la masa molecular media de un residuo de glucosa en la amilopectina es 162 g/mol.)

17. Análisis estructural de un polisacárido Se aisló un polisacárido de estructura desconocida y se sometió a un proceso de metilación exhaustiva y a una posterior hidrólisis. El análisis de los productos reveló la presencia de tres azúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glucosa, 2,4-di-*O*-metil-D-glucosa y 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucosa en una relación 20:1:1. ¿Cuál es la estructura del polisacárido?



capítulo 8

NUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS

8.1 Algunos conceptos básicos *273*
8.2 Estructura de los ácidos nucleicos *279*
8.3 Química de los ácidos nucleicos *291*
8.4 Otras funciones de los nucleótidos *300*

Una estructura tan hermosa tenía que existir.

—*James Watson,* The Double Helix, *1968*

Los nucleótidos desempeñan una amplia variedad de funciones en el metabolismo celular. Garantizan los intercambios. También actúan como señales químicas en los sistemas celulares, en respuesta a hormonas y otros estímulos extracelulares, y son también componentes estructurales de una serie de cofactores enzimáticos e intermediarios metabólicos. Por último, son los constituyentes de los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), que son los depositarios moleculares de la información genética. La estructura de cada una de las proteínas, y en último término de todas las biomoléculas y de cada uno de los componentes celulares, es producto de la información programada en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de la célula. La capacidad de almacenar y transmitir información genética de una generación a la siguiente es un requisito básico de la vida.

Este capítulo ofrece una visión general de la naturaleza química de los nucleótidos y los ácidos nucleicos presentes en las células. En la Parte III examinaremos más detalladamente la función de los ácidos nucleicos.

8.1 Algunos conceptos básicos

Los nucleótidos, componentes básicos de los ácidos nucleicos En el DNA celular se encuentran especificadas las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas y las secuencias de nucleótidos de todas las moléculas de RNA. Un segmento de DNA que contenga la información necesaria para la síntesis de un producto biológico funcional (proteína o RNA) recibe el nombre de **gen.** Una célula corriente tiene muchos miles de genes y, por tanto, no resulta sorprendente que las moléculas de DNA suelan ser muy grandes. Las únicas funciones conocidas del DNA son el almacenamiento y la transmisión de la información biológica.

En la célula hay varias clases de RNA, que cubren una amplia variedad de funciones. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** son componentes de los ribosomas, complejos que llevan a cabo la síntesis de proteínas. Los **RNA mensajeros (mRNA)** actúan como intermediarios, transportando la información desde un gen o unos pocos genes hasta el ribosoma, donde se sintetizan las proteínas. Los **RNA de transferencia (tRNA)** son moléculas adaptadoras que traducen con fidelidad la información genética contenida en el mRNA a secuencias específicas de aminoácidos. Además de estas clases principales, existe una amplia variedad de RNA que desempeñan funciones específicas, los cuales se describen en profundidad en la Parte III.

Los nucleótidos y ácidos nucleicos están formados por bases y pentosas características

Los nucleótidos están formados por tres componentes: (1) una base nitrogenada, (2) una pentosa y (3) un fosfato (Fig. 8-1). La molécula sin el grupo fosfato se denomina **nucleósido.** Las bases nitrogenadas derivan de dos compuestos parentales, **pirimidina** y **purina.** Las bases y las pentosas presentes en los nucleótidos comunes son compuestos heterocíclicos. Los átomos de carbono y de nitrógeno de las estructuras parentales se numeran de modo convencional con el fin de facilitar la nomenclatura y la identificación de sus muchos derivados. Las convenciones adoptadas para los anillos de pentosa siguen las reglas descritas en el Capítulo 7, pero a los números de los átomos de carbono de las pentosas de los nucleótidos se les

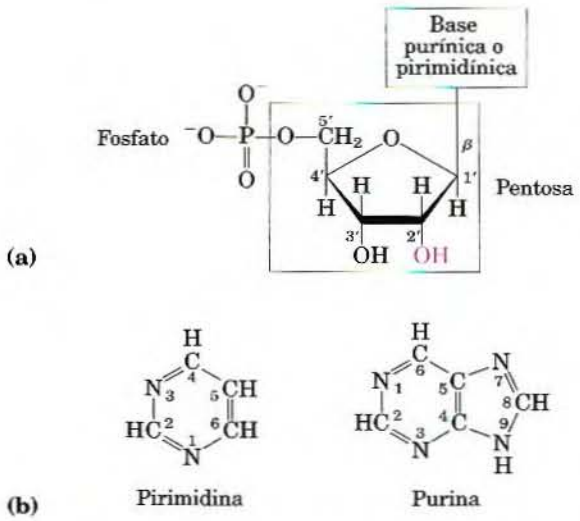


FIGURA 8-1 Estructura de los nucleótidos. **(a)** Estructura general con la numeración convencional del anillo de la pentosa. Se muestra la estructura de un ribonucleótido. En los desoxirribonucleótidos un —H reemplaza al grupo —OH del carbono 2′ (en rojo). **(b)** Los compuestos parentales de los que derivan las bases purínicas y pirimidínicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, con especificación de las convenciones para la numeración.

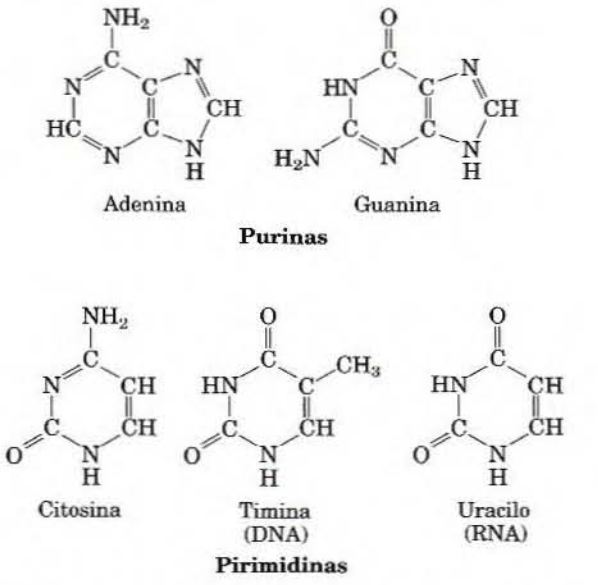


FIGURA 8-2 Bases purínicas y pirimidínicas principales de los ácidos nucleicos. Algunos de los nombres comunes de estos compuestos reflejan las circunstancias de su descubrimiento. La guanina, por ejemplo, se aisló por vez primera del guano (estiércol de aves) y la timina se aisló por primera vez de tejido del timo.

añade el signo prima (′) para distinguirlos de los átomos numerados de las bases nitrogenadas.

La base está unida covalentemente (por el N-1 en las pirimidinas y el N-9 en las purinas) a través de un enlace *N*-β-glucosídico con el carbono 1′ de la pentosa, y el fosfato está esterificado con el carbono 5′. El enlace *N*-β-glucosídico se forma por eliminación de agua (un grupo hidroxilo de la pentosa y un hidrógeno de la base), como ocurre en la formación de los enlaces *O*-glucosídicos (véase Fig. 7-31).

Tanto el DNA como el RNA contienen dos bases purínicas principales, la **adenina** (A) y la **guanina** (G). El DNA y el RNA contienen también dos bases pirimidínicas principales. La **citosina** (C) se encuentra en ambos tipos de ácido nucleico. Pero la segunda base pirimidínica es **timina** (T) en el DNA y **uracilo** (U) en el RNA. Es muy poco frecuente que se encuentre timina en el RNA o uracilo en el DNA. En la Figura 8-2 se muestran las estructuras de las cinco bases principales y en la Tabla 8-1 se resume la nomenclatura de sus correspondientes nucleótidos y nucleósidos.

Los ácidos nucleicos contienen dos tipos de pentosas. Los desoxinucleótidos del DNA contienen 2′-desoxi-D-ribosa y los ribonucleótidos del RNA D-ribosa. En los nucleótidos, ambos tipos de pentosas se hallan en la forma β-furanosa (anillo pentagonal cerrado). El anillo de la pentosa (Fig. 8-3) no es plano, sino que presenta diversas conformaciones distorsionadas, designadas generalmente como formas "ahuecadas".

En la Figura 8-4 se muestran las estructuras y los nombres de los cuatro **desoxirribonucleótidos** principales (desoxirribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales del DNA, y los cuatro **ribonucleótidos** principales (ribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales de los RNA. En el DNA, largas secuencias específicas de A, T, G y C almacenan la información genética.

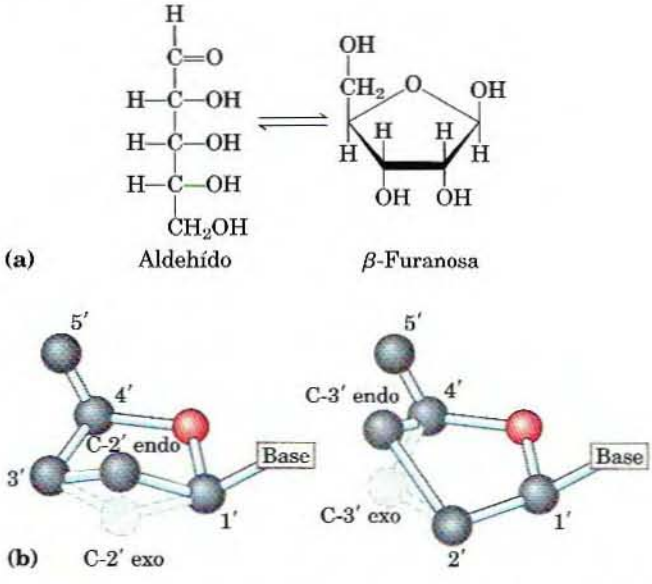
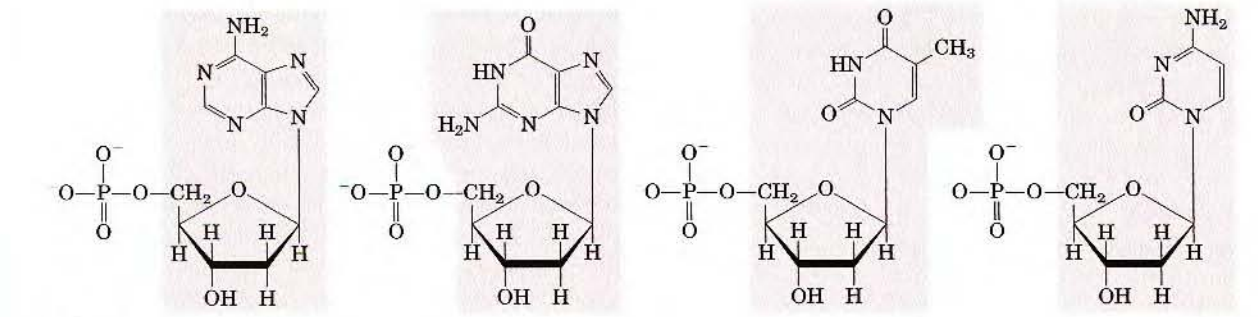
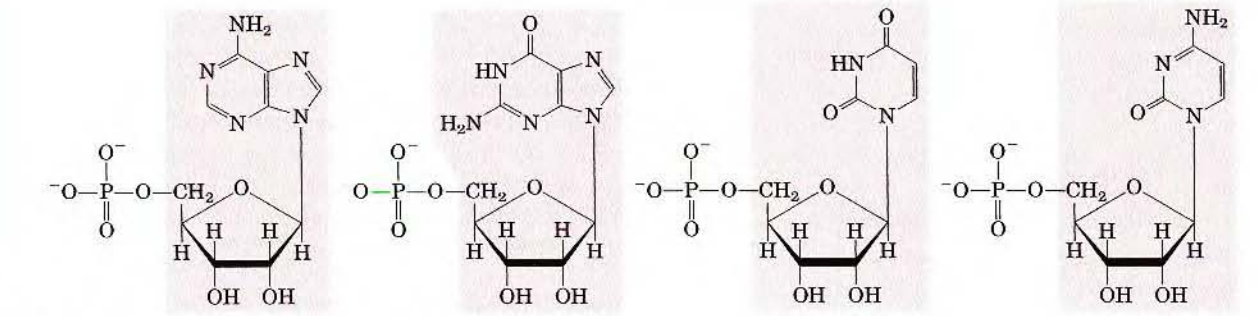


FIGURA 8-3 Conformaciones de la ribosa. **(a)** En disolución, las formas lineal (aldehído) y cíclica (β-furanosa) de la ribosa libre están en equilibrio. El RNA contiene sólo la forma cíclica, β-D-ribofuranosa. La desoxirribosa sufre una interconversión similar en disolución, pero en el DNA sólo se encuentra como β-2′-desoxi-D-ribofuranosa. **(b)** Los anillos de ribofuranosa pueden existir en cuatro conformaciones distintas. En todos los casos, cuatro de los cinco átomos están contenidos en un solo plano. El quinto átomo (C-2′ o C-3′) se encuentra en el mismo lado (endo) o en el lado opuesto (exo) del plano que el átomo C-5′.



	Desoxiadenilato (desoxiadenosina 5′-monofosfato)	Desoxiguanilato (desoxiguanosina 5′-monofosfato)	Desoxitimidilato (desoxitimidina 5′-monofosfato)	Desoxicitidilato (desoxicitidina 5′-monofosfato)
Símbolos:	A, dA, dAMP	G, dG, dGMP	T, dT, dTMP	C, dC, dCMP
Nucleósido:	Desoxiadenosina	Desoxiguanosina	Desoxitimidina	Desoxicitidina

(a) Desoxirribonucleótidos



	Adenilato (adenosina 5′-monofosfato)	Guanilato (guanosina 5′-monofosfato)	Uridilato (uridina 5′-monofosfato)	Citidilato (citidina 5′-monofosfato)
Símbolos:	A, AMP	G, GMP	U, UMP	C, CMP
Nucleósido:	Adenosina	Guanosina	Uridina	Citidina

(b) Ribonucleótidos

FIGURA 8-4 Desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos de los ácidos nucleicos. Todos los nucleótidos se muestran en su forma libre a pH 7,0. Los nucleótidos del DNA **(a)** suelen simbolizarse por A, G, T y C, y en ocasiones por dA, dG, dT y dC; los del RNA **(b)** por A, G, U y C. En su forma libre, los desoxinucleótidos se suelen abreviar como dAMP, dGMP, dTMP y dCMP; los ribonucleótidos, como AMP, GMP, UMP y CMP. En cada nucleótido, el nombre más común va seguido por el nombre completo entre paréntesis. Todas las abreviaturas suponen que el grupo fosfato se encuentra en posición 5′. La parte nucleosídica de cada molécula está sombreada en rojo. En esta ilustración y en las siguientes no se muestran los carbonos cíclicos.

TABLA 8-1 Nomenclatura de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos

Base	*Nucleósido*	*Nucleótido*	*Ácido nucleico*
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina o desoxitimidina	Timidilato o desoxitimidilato	DNA
Uracilo	Uridina	Uridilato	RNA

Nota: "nucleósido" y "nucleótido" son términos genéricos que incluyen tanto las formas ribo- como las desoxirribo-. Obsérvese que los ribonucleósidos y los ribonucleótidos se designan aquí simplemente como nucleósidos y nucleótidos (p. ej., la riboadenosina se denomina adenosina) y los desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos como desoxinucleósidos y desoxinucleótidos (p. ej., la desoxirriboadenosina se denomina desoxiadenosina). Ambas nomenclaturas son aceptables, pero se utilizan más comúnmente las denominaciones más cortas. La timina es una excepción; se utiliza el nombre ribotimidina para poner de manifiesto su presencia poco habitual en el RNA.

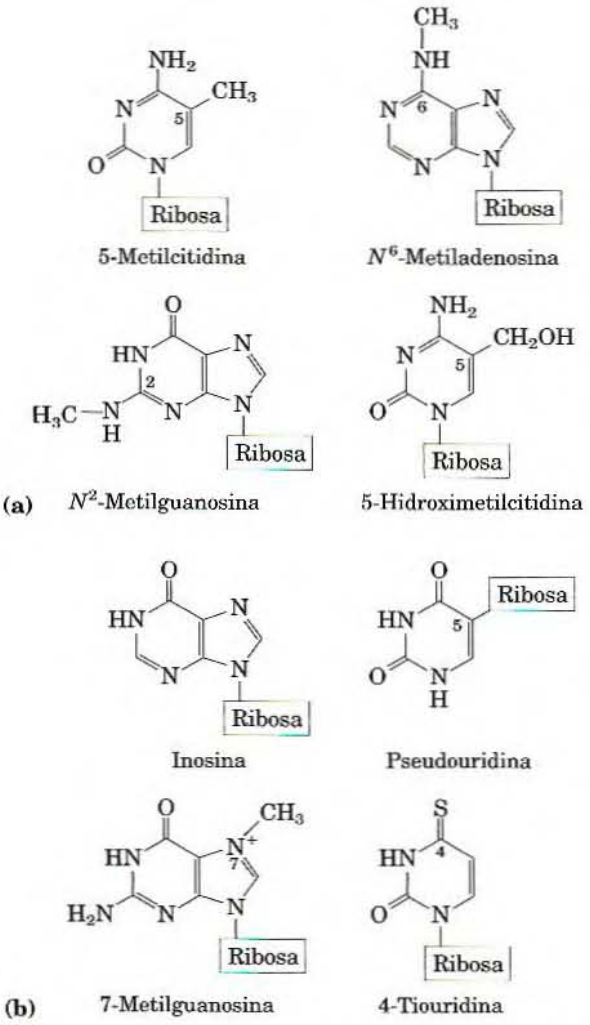


FIGURA 8-5 Algunas bases purínicas y pirimidínicas secundarias en su forma nucleosídica. **(a)** Bases poco abundantes en el DNA. La 5-metilcitosina está presente en el DNA de los animales superiores, la N^6-metiladenina en el DNA bacteriano y la 5-hidroximetilcitosina en las bacterias infectadas por diversos bacteriófagos. **(b)** Algunas bases poco abundantes presentes en los tRNA. La inosina contiene la base hipoxantina. Obsérvese que la pseudouridina, como la uridina, contiene uracilo; se distinguen por el punto de unión a la ribosa: en la uridina, el uracilo se une por el N-1, el punto de unión normal para las pirimidinas, mientras que en el pseudouracilo se une a través del C-5.

A pesar de que la mayoría de nucleótidos contienen solamente estas cuatro bases, el DNA y el RNA contienen también otras bases secundarias (Fig. 8-5). En el DNA, las más comunes son las formas metiladas de las bases principales; en algunos DNA víricos, ciertas bases pueden estar hidroximetiladas o glucosiladas. Las bases alteradas o poco comunes del DNA sirven a menudo como señales específicas para la regulación o la protección de la información genética. En el RNA, y en especial en el tRNA, se encuentran también bases secundarias de muchos tipos (véase Fig. 26-24).

La nomenclatura de las bases secundarias puede resultar confusa. Muchas tienen nombres comunes, al igual que las bases principales, como, por ejemplo, la hipoxantina, cuyo nucleósido inosina se muestra en la Figura 8-5. Para las formas sustituidas de estas bases, cuando la sustitución tiene lugar en un átomo de los anillos de purina o pirimidina, la convención más habitual (la utilizada aquí) consiste simplemente en indicar por su número la posición en el anillo donde se ha producido la sustitución: por ejemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina y 5-hidroximetilcitosina (mostradas en su forma nucleosídica en la Fig. 8-5). El elemento(N, C, O) al cual está unido el sustituyente no está especificado. Las convenciones cambian cuando el átomo sustituido es exocíclico (no incluido en el anillo), en cuyo caso se identifica el tipo de átomo y se indica la posición del anillo a la que está unido mediante un superíndice. El nitrógeno amínico unido al C-6 de la adenina se denominará N^6; análogamente, el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amínico en C-6 y C-2 de la guanina se denominarán O^6 y N^2, respectivamente. Ejemplos de esta nomenclatura son la N^6-metiladenosina y la N^2-metilguanosina (Fig. 8-5).

Las células contienen también nucleótidos con grupos fosfato en posiciones diferentes del carbono 5′ (Fig. 8-6). Los **ribonucleósidos 2′,3′-monofosfato cíclicos** son intermediarios aislables y los **ribonucleósidos 3′-monofosfato** son productos finales de la hidrólisis del RNA por ciertas ribonucleasas. Otros ejemplos son la adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cAMP) y la guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP), que se comentan al final de este capítulo.

Los nucleótidos sucesivos de los ácidos nucleicos están unidos por enlaces fosfodiéster

Los nucleótidos sucesivos del DNA y el RNA están unidos covalentemente mediante "puentes" de grupos fosfato, en los cuales

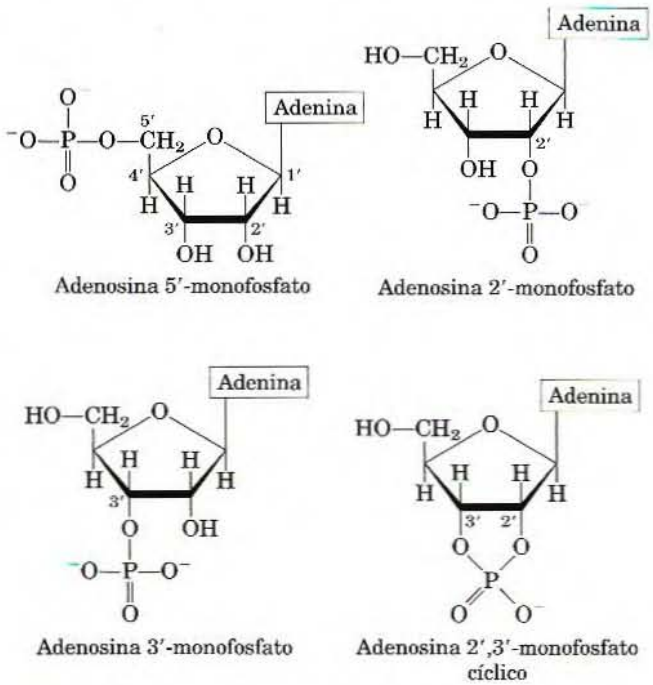


FIGURA 8-6 Algunos monofosfatos de adenosina. Las adenosinas 2′-monofosfato, 3′-monofosfato y 2′,3′-monofosfato cíclico son compuestos intermedios de la hidrólisis enzimática y alcalina del RNA.

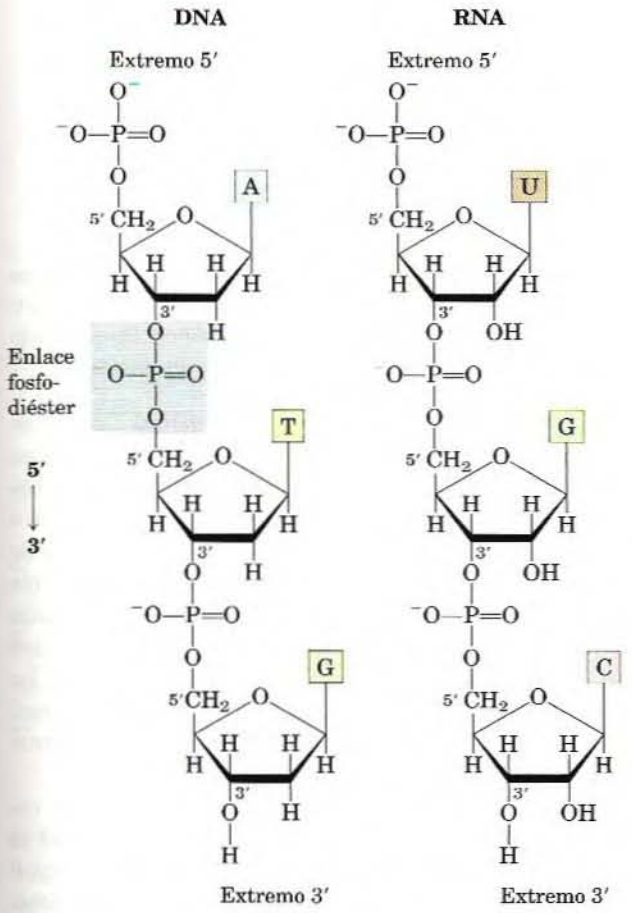


FIGURA 8-7 Enlaces fosfodiéster del esqueleto covalente del DNA y el RNA. Los enlaces fosfodiéster (uno de los cuales está sombreado en el DNA) unen los nucleótidos sucesivos. Las cadenas de azúcar-fosfato son muy polares en ambos tipos de ácido nucleico. El extremo 5′ carece de nucleótido en la posición 5′ y el extremo 3′ carece de nucleótido en la posición 3′.

el grupo hidroxilo en 5′ de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo en 3′ del nucleótido siguiente mediante un **enlace fosfodiéster** (Fig. 8-7). Por tanto, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en residuos alternados de fosfato y pentosa, mientras que las bases nitrogenadas pueden considerarse como grupos laterales unidos al esqueleto a intervalos regulares. Los esqueletos covalentes del DNA y el RNA son hidrofílicos. Los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar forman enlaces de hidrógeno con el agua. Los grupos fosfato tienen un pK_a cercano a 0 y se encuentran completamente ionizados y cargados negativamente a pH 7. Las cargas negativas están generalmente neutralizadas por interacciones iónicas con cargas positivas de proteínas, iones metálicos o poliaminas.

Todos los enlaces fosfodiéster tienen la misma orientación a lo largo de la cadena (Fig. 8-7), con lo cual cada cadena lineal de ácido nucleico tiene una polaridad específica y extremos 5′ y 3′ diferenciados. Por definición, el **extremo 5′** carece de nucleótido en posición 5′, mientras que el **extremo 3′** carece de nucleótido en posición 3′. Otros grupos (con frecuencia uno o más grupos fosfato) pueden estar presentes en uno o en ambos extremos

El esqueleto covalente del DNA y el RNA experimenta una lenta hidrólisis no enzimática de los enlaces fosfodiéster. Al contrario del DNA, el RNA en el tubo de ensayo se hidroliza rápidamente en condiciones alcalinas; los grupos hidroxilo en 2′ del RNA (ausentes en el DNA) están directamente implicados en el proceso. Los primeros productos de la acción del álcali sobre el RNA son 2′,3′-monofosfatos cíclicos, los cuales son rápidamente hidrolizados para producir una mezcla de 2′- y 3′-nucleósidos monofosfato (Fig. 8-8).

Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos pueden representarse esquemáticamente, tal como se ilustra a continuación para un segmento de DNA de cinco nucleótidos. Los grupos fosfato se representan con el símbolo Ⓟ y cada una de las desoxirribosas mediante una línea vertical que va

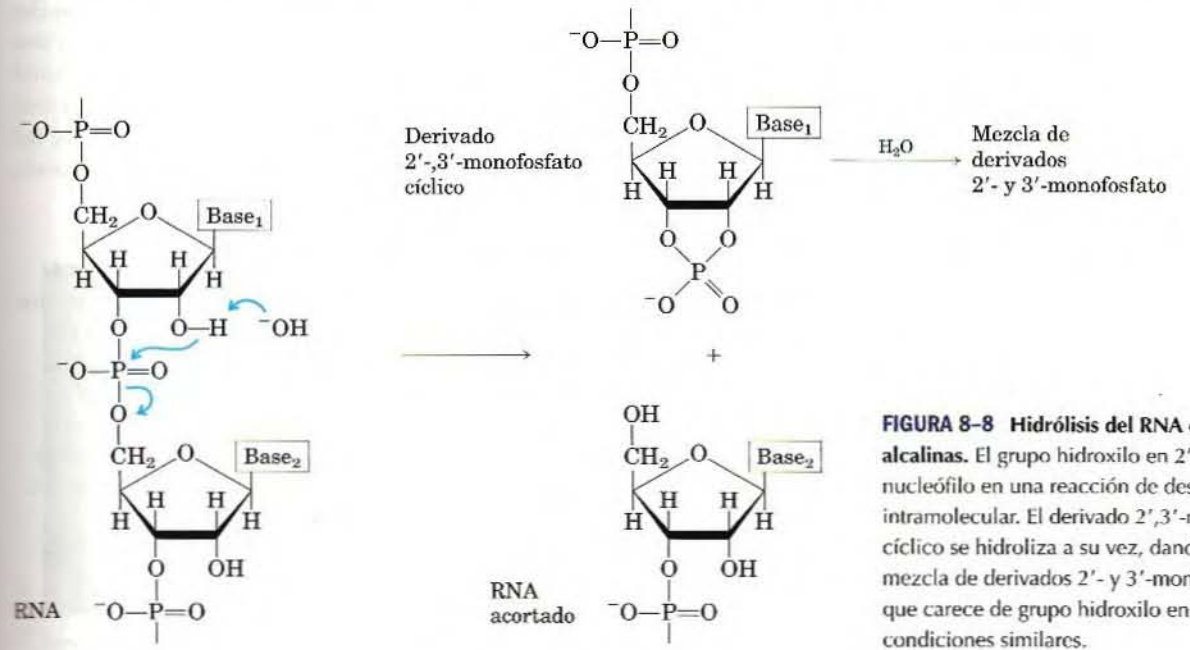
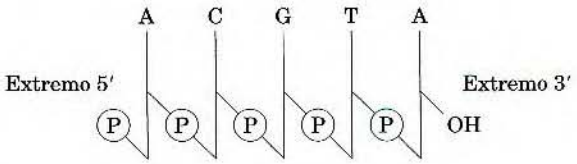


FIGURA 8-8 Hidrólisis del RNA en condiciones alcalinas. El grupo hidroxilo en 2′ actúa como nucleófilo en una reacción de desplazamiento intramolecular. El derivado 2′,3′-monofosfato cíclico se hidroliza a su vez, dando lugar a una mezcla de derivados 2′- y 3′-monofosfato. El DNA, que carece de grupo hidroxilo en 2′, es estable en condiciones similares.

del C-1′ en la parte superior de la línea vertical al C-5′ en la inferior (hay que señalar que en los ácidos nucleicos el azúcar se encuentra siempre en su forma de anillo cerrado, β-furanosa). Las líneas que conectan nucleótidos (que pasan a través de Ⓟ) se dibujan uniendo en diagonal el punto medio (C-3′) de la desoxirribosa de un nucleótido con el extremo inferior (C-5′) del siguiente.

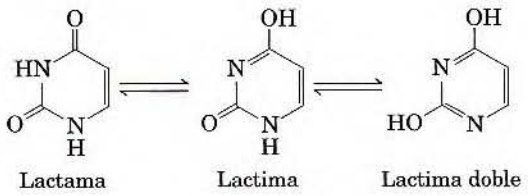


Por convención, la estructura de una cadena o hebra sencilla de ácido nucleico se escribe siempre con el extremo 5′ a la izquierda y el 3′ a la derecha; es decir, en la dirección 5′ → 3′. Otras representaciones más sencillas de este pentanucleótido son: pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA y pACGTA.

Un ácido nucleico de cadena corta se denomina **oligonucleótido.** El calificativo "corta" es en cierto modo arbitrario, aunque el término oligonucleótido se utiliza a menudo para polímeros de hasta 50 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de mayor longitud se denominan **polinucleótidos.**

Las propiedades de las bases de los nucleótidos influyen en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos

Las pirimidinas y purinas libres son compuestos débilmente básicos y por ello se denominan bases. Tienen una serie de propiedades químicas que afectan a la estructura, y en último término la función, de los ácidos nucleicos. Las purinas y pirimidinas presentes en el DNA y el RNA son moléculas altamente conjugadas (Fig. 8-2). Esta propiedad tiene efectos importantes sobre la estructura, la distribución electrónica y la capacidad de absorción de la luz de los ácidos nucleicos. La resonancia entre los átomos del anillo hace que la mayoría de los

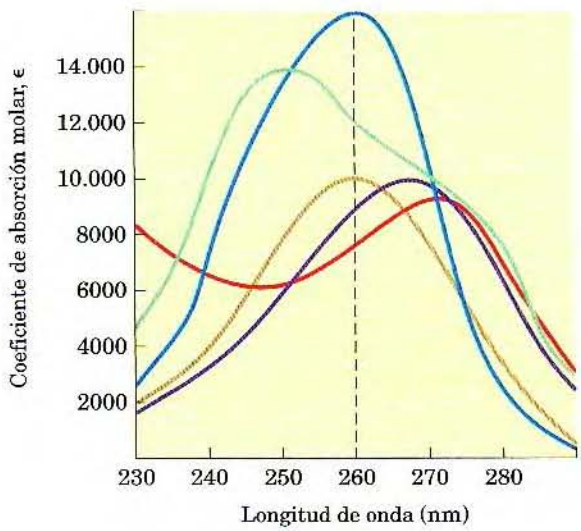


Uracilo

FIGURA 8-9 Formas tautoméricas del uracilo. A pH 7,0, predomina la forma lactama; las otras formas adquieren más importancia al disminuir el pH. Las otras pirimidinas libres y las purinas libres también poseen formas tautoméricas, pero son mucho menos abundantes.

enlaces tengan el carácter de doble enlace parcial. Como consecuencia de este hecho, las pirimidinas son moléculas planas y las purinas casi planas, con una ligera deformación. Las bases purínicas y pirimidínicas libres pueden existir en dos o más formas tautoméricas según el pH. Por ejemplo, el uracilo se presenta en las formas de lactama, lactima y lactima doble (Fig. 8-9). Las estructuras de las purinas y de las pirimidinas mostradas en la Figura 8-2 son los tautómeros predominantes a pH 7,0. Por efecto de la resonancia, todas las bases de los nucleótidos absorben la luz UV y los ácidos nucleicos se caracterizan por una fuerte absorción a longitudes de onda cercanas a 260 nm (Fig. 8-10).

Las bases purínicas y pirimidínicas son hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua en el pH celular cercano a la neutralidad. A pH ácido o alcalino las bases adquieren carga y aumenta su solubilidad en agua. Las interacciones hidrofóbicas de apilamiento, que sitúan paralelamente los planos de los anillos de dos o más bases (de forma análoga a una pila de monedas) son uno de los dos tipos principales de interacción entre las bases. El apilamiento también incorpora una combinación de interacciones de van der Waals y dipolo-dipolo entre las bases. El apilamiento de las bases ayuda a minimizar el contacto con el agua y es de gran importancia en la estabilización de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, como describiremos más adelante.



Coeficiente de absorción molar a 260 nm, ϵ_{260} ($M^{-1}cm^{-1}$)	
AMP	15.400
GMP	11.700
UMP	9900
dTMP	9200
CMP	7500

FIGURA 8-10 Espectros de absorción de los nucleótidos más comunes. Los espectros muestran la variación del coeficiente de absorción molar con la longitud de onda. Los coeficientes de absorción molar a 260 nm y pH 7,0 (ε_{260}) se muestran en la tabla. Los espectros de los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos correspondientes, así como los de los nucleósidos, son esencialmente idénticos. Para las mezclas de nucleótidos se utiliza la longitud de onda de 260 nm (líneas discontinuas verticales) para las mediciones.

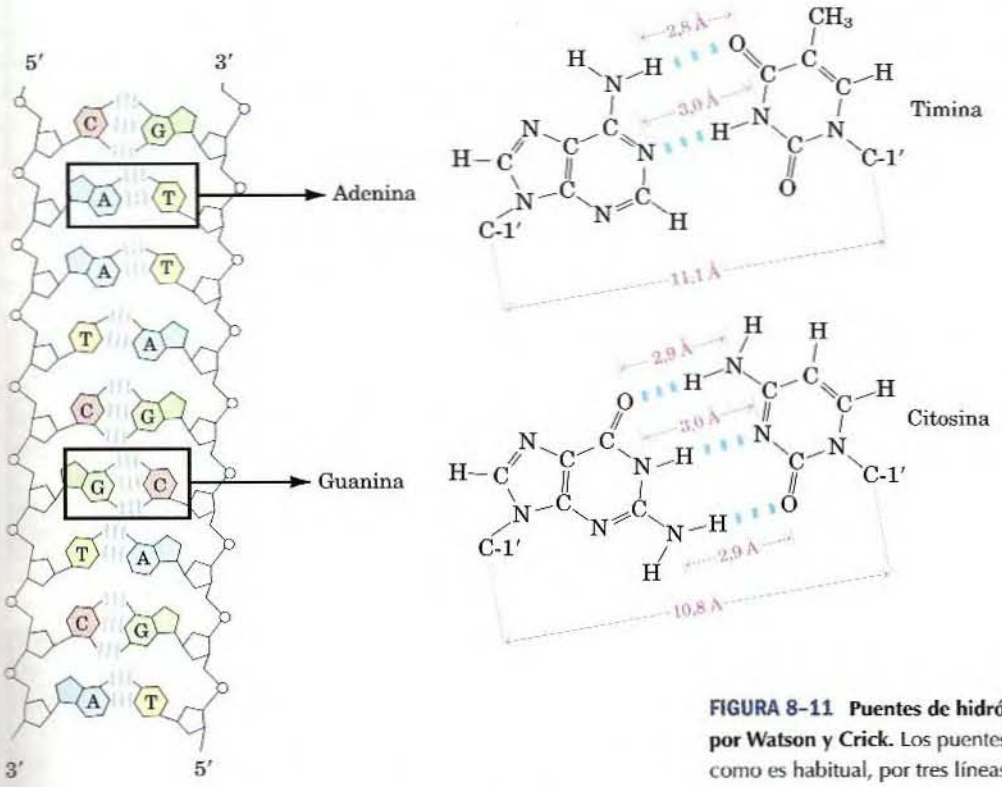


FIGURA 8-11 Puentes de hidrógeno de los pares de bases definidos por Watson y Crick. Los puentes de hidrógeno están representados, como es habitual, por tres líneas azules.

Los grupos funcionales más importantes de las purinas y pirimidinas son los grupos carbonilo y los átomos de nitrógeno del anillo y los grupos amino exocíclicos. La formación de enlaces de hidrógeno, en los que participan los grupos amino y carbonilo, constituye el segundo tipo principal de interacción entre las bases en las moléculas de ácidos nucleicos. Los enlaces de hidrógeno entre las bases permiten la asociación complementaria de dos (y en ocasiones de tres o cuatro) cadenas de ácido nucleico. Los patrones de enlaces de hidrógeno más importantes fueron definidos por James D. Watson y Francis Crick en 1953; en éstos, A se une específicamente con T (o U) y G se une con C (Fig. 8-11). Estos dos tipos de **pares de bases** predominan en el DNA y el RNA de doble cadena, y los tautómeros que se muestran en la Figura 8-2 son los responsables de estos apareamientos. Este apareamiento específico de las bases permite la duplicación de la información genética, como trataremos más adelante en este capítulo.

RESUMEN 8.1 Algunos conceptos básicos

- Un nucleótido está formado por una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar pentosa y uno o más grupos fosfato. Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster entre el grupo hidroxilo en 5′ de una pentosa y el grupo hidroxilo en 3′ de la siguiente.
- Existen dos tipos de ácidos nucleicos: RNA y DNA. Los nucleótidos del RNA contienen ribosa y las bases pirimidínicas comunes uracilo y citosina. En el DNA los nucleótidos contienen 2′-desoxirribosa y las bases pirimidínicas comunes timina y citosina. Las purinas principales son, tanto en el DNA como en el RNA, la adenina y la guanina.

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

El descubrimiento de la estructura del DNA por parte de James Watson y Francis Crick en el año 1953 fue un momento culminante en la historia de la ciencia, del que surgieron disciplinas completamente nuevas y que repercutió en el curso de otras muchas que ya estaban establecidas. Nuestros conocimientos actuales acerca de cómo se almacena y utiliza la información genética de una célula se basan en investigaciones que han sido posibles gracias a este descubrimiento. El conocimiento de las características principales del proceso de la información genética es en la actualidad requisito previo para la reflexión en cualquier área de la bioquímica. En este apartado nos centraremos en la estructura del DNA y en los pormeno-

James Watson

Francis Crick

res de su descubrimiento y también presentaremos los avances más recientes acerca de la estructura del RNA.

Como en el caso de la estructura de las proteínas (Capítulo 4), en ocasiones resulta de utilidad describir la estructura de los ácidos nucleicos en términos de niveles de complejidad jerarquizados (estructuras primaria, secundaria, terciaria). La estructura primaria de un ácido nucleico está definida por su estructura covalente y su secuencia de nucleótidos. Cualquier estructura regular y estable adoptada por algunos o por todos los nucleótidos de un ácido nucleico puede ser considerada como estructura secundaria. Todas las estructuras consideradas en el resto de este capítulo pueden englobarse bajo el epígrafe de estructura secundaria. En general, se considera estructura terciaria el plegamiento complejo de los grandes cromosomas en el nucleoide bacteriano o en la cromatina eucariótica; la estructura terciaria se trata en el Capítulo 24.

El DNA almacena información genética

La investigación bioquímica del DNA empezó con Friedrich Miescher, que realizó los primeros estudios químicos sistemáticos del núcleo celular. En 1868, Miescher aisló una sustancia que contenía fósforo, a la que denominó "nucleína", a partir de núcleos de células del pus (leucocitos) obtenidas de vendajes quirúrgicos. Encontró que la nucleína estaba formada por una parte acídica, que conocemos actualmente como DNA, y una parte básica, de proteína. Más tarde, Miescher encontró una sustancia acídica similar en la cabeza de las células del esperma de salmón. A pesar de que purificó parcialmente la nucleína y estudió sus propiedades, la estructura covalente (primaria) del DNA (tal como se muestra en la Fig. 8-7) no se conoció con total seguridad hasta finales de la década de 1940.

Miescher y muchos otros sospechaban que la nucleína (el ácido nucleico) estaba asociada de algún modo con la herencia celular, pero la primera prueba directa de que el DNA era el depositario de la información genética llegó en 1944 con Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, quienes hallaron que el DNA extraído de una cepa virulenta (que causa una enfermedad) de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, conocida también como neumococo, podía transformar genéticamente una cepa no virulenta de este mismo organismo, convirtiéndola en una forma virulenta (Fig. 8-12). Avery y sus

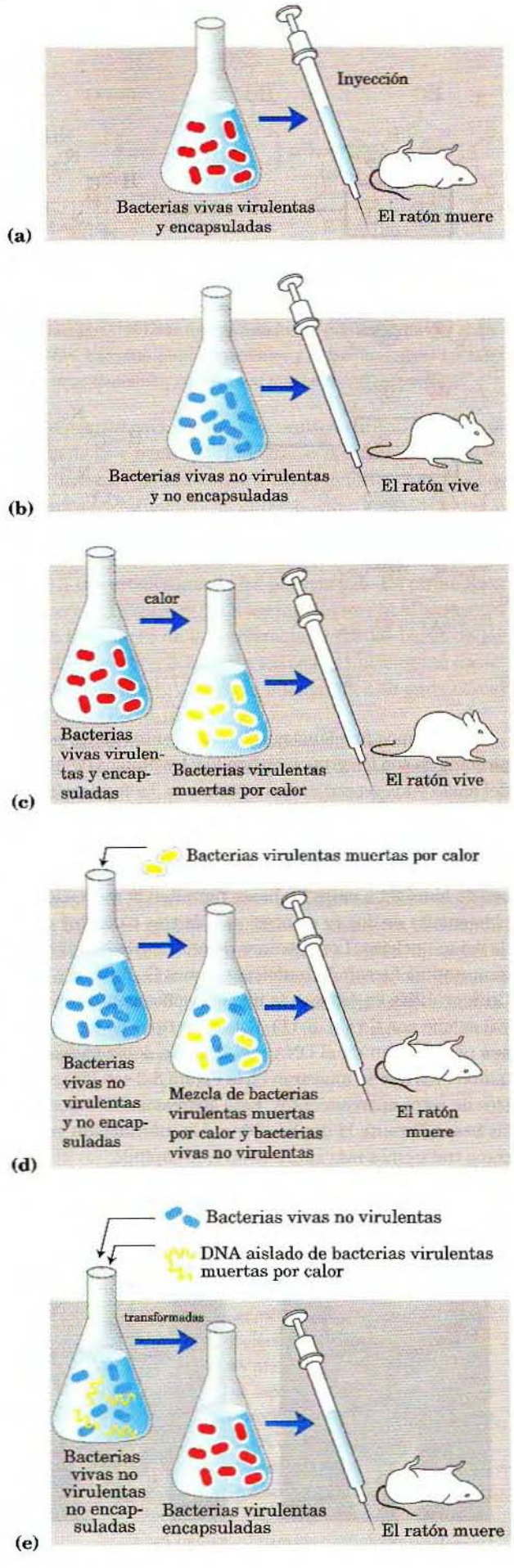


FIGURA 8-12 El experimento de Avery-MacLeod-McCarty. **(a)** Cuando se inyecta a ratones, la cepa encapsulada de neumococo es letal **(b)** mientras que la cepa no encapsulada es inocua **(c)** al igual que las células muertas por acción del calor de la cepa encapsulada. **(d)** Investigaciones anteriores a cargo del bacteriólogo Frederick Griffith habían demostrado que bacterias virulentas muertas por calor (inofensivas para los ratones) añadidas a una cepa viva no virulenta transformaban permanentemente esta última, convirtiéndola en una cepa encapsulada, virulenta y letal. **(e)** Avery y colaboradores extrajeron el DNA de neumococos virulentos muertos por calor, eliminando la proteína en la medida de lo posible, y añadieron este DNA a bacterias no virulentas. El DNA penetró en las bacterias no virulentas, que resultaron transformadas permanentemente en una cepa virulenta.

colaboradores concluyeron que el DNA extraído de la cepa virulenta transportaba el mensaje genético hereditario de la virulencia. No todos aceptaron estas conclusiones, pues impurezas de naturaleza proteica presentes en el DNA podían haber sido el verdadero transportador de la información genética. Esta posibilidad quedó pronto descartada, al observarse que el tratamiento del DNA con enzimas proteolíticos no destruía la actividad transformadora, mientras que el tratamiento con desoxirribonucleasas (enzimas que hidrolizan el DNA) sí lo hacía.

Un segundo experimento importante aportó pruebas adicionales de que el DNA es portador de información genética. En 1952, Alfred D. Hershey y Martha Chase utilizaron marcaje con fósforo (^{32}P) y azufre (^{35}S) radiactivos para demostrar que cuando el virus bacteriano (bacteriófago) T2 infecta a su célula huésped (*E. coli*) es el DNA de la partícula vírica, que contiene fósforo, no la proteína de la cápside del virus, que contiene azufre, el componente que penetra en la célula huésped y aporta la información genética para la replicación del virus (Fig. 8-13). Estos importantes experimentos y muchos otros han demostrado que el DNA es el único componente cromosómico que contiene la información genética en las células vivas.

Las moléculas de DNA tienen diferente composición de bases

Un elemento de gran importancia en el descubrimiento de la estructura del DNA fue el trabajo de Erwin Chargaff y colaboradores a finales de la década de 1940. Encontraron que las cantidades de las cuatro bases de los nucleótidos del DNA variaban según el organismo y que las cantidades relativas de ciertas bases estaban muy relacionadas. Estos datos, acumulados a partir de los DNA de un gran número de especies diferentes, permitieron a Chargaff concluir que:

1. La composición de bases del DNA normalmente varía de una especie a otra.
2. Las muestras de DNA aisladas a partir de tejidos diferentes de la misma especie tienen la misma composición de bases.
3. La composición de bases del DNA de una determinada especie no varía con la edad del organismo, ni con su estado nutricional, ni con las variaciones ambientales.
4. En *todos* los DNA celulares, independientemente de la especie, el número de residuos de adenina es igual al de residuos de timina (es decir, A = T) y el número de residuos de guanina es igual al número de residuos de citosina (G = C). A partir de estas relaciones se deduce que la suma de los residuos de purina es igual a la suma de los residuos de pirimidina; es decir, A + G = T + C.

Estas relaciones cuantitativas, denominadas en ocasiones "reglas de Chargaff", fueron confirmadas posteriormente por muchos investigadores. Fueron esenciales para la deducción de la estructura tridimensional del DNA y dieron pistas sobre cómo está codificada la información genética en el DNA y se transmite de una generación a la siguiente.

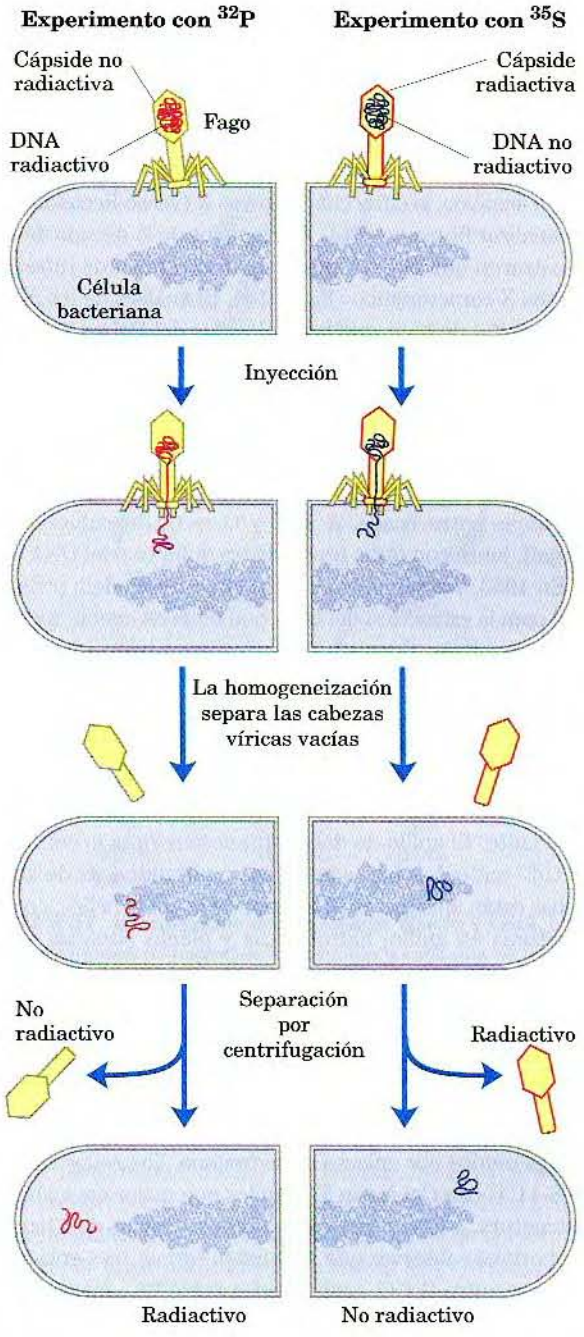


FIGURA 8-13 El experimento de Hershey-Chase. Se prepararon dos muestras de partículas de bacteriófago T2 marcadas isotópicamente. Una marcada con ^{32}P en los grupos fosfato del DNA y la otra con ^{35}S en los residuos aminoácidos que contienen azufre de las proteínas de la cápside. (El DNA no contiene S y las proteínas víricas no contienen P.) Suspensiones separadas de bacterias no marcadas fueron infectadas con las dos muestras de fagos marcados. Cada suspensión de células infectadas fue agitada en un homogeneizador para romper la unión entre las cápsides víricas y las bacterias. Se separaron por centrifugación las cápsides víricas vacías ("fantasmas") y las bacterias. Las células infectadas por el fago marcado con ^{32}P contenían ^{32}P: el DNA vírico marcado había penetrado en las células, y los fantasmas víricos no contenían radiactividad. Las células infectadas con el fago marcado con ^{35}S no contenían radiactividad, mientras que los fantasmas víricos contenían ^{35}S. Después de la eliminación de las cubiertas del virus se observó la presencia de progenie vírica en ambas suspensiones: el mensaje genético para la replicación de los virus debía haber sido introducido por el DNA de los virus y no por su proteína.

El DNA es una doble hélice

Rosalind Franklin y Maurice Wilkins utilizaron un poderoso método analítico, la difracción de rayos X (véase Recuadro 4-4), para analizar fibras de DNA. A principios de la década de 1950 demostraron que el DNA produce un diagrama de difracción de rayos X característico (Fig. 8-14). El análisis de los diagramas permitió deducir que las moléculas del DNA son helicoidales, con dos periodicidades a lo largo del eje longitudinal, una primaria de 3,4 Å y otra secundaria de 34 Å. El problema consistía, pues, en la construcción de un modelo tridimensional de la molécula de DNA que pudiera explicar no sólo los datos de difracción de rayos X sino también las equivalencias específicas entre bases, A = T y G = C, descubiertas por Chargaff, junto con otras propiedades químicas del DNA.

En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura del DNA que tenía en cuenta todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor del mismo eje, formando una doble hélice dextrógira (en el Recuadro 4-1 se describen las estructuras helicoidales dextrógiras y levógiras). Los esqueletos hidrofílicos formados por la desoxirribosa y los grupos fosfato alternados están en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. El anillo de desoxifuranosa adopta la conformación C-2′ endo. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo, hidrofóbicas y planas situadas a muy corta distancia unas de otras y en posición perpendicular al eje longitudinal de la hélice. La relación espacial de las dos cadenas da lugar a la formación de un **surco mayor** y un **surco menor** en la superficie de la doble hélice (Fig. 8-15). Cada base de una cadena está apareada en el mismo plano con una base de la otra cadena. Watson y Crick hallaron que los pares de bases unidos por enlaces de hidrógeno, ilustrados en la Figura 8-11, G con C y A con T, eran los que mejor encajaban en la estructura, a la vez que explicaban las reglas de Chargaff. Es importante observar que se pueden formar tres enlaces de hidrógeno entre G y C, simbolizados por G≡C, mientras que solamente se pueden formar dos entre A y T, simbolizados por A=T. Ésta es una de las razones de la mayor dificultad para separar las hebras apareadas del DNA cuanto mayor sea la relación de pares de bases G≡C con respecto a los A=T. Otros apareamientos diferentes tienden, en mayor o menor medida, a desestabilizar la estructura en doble hélice.

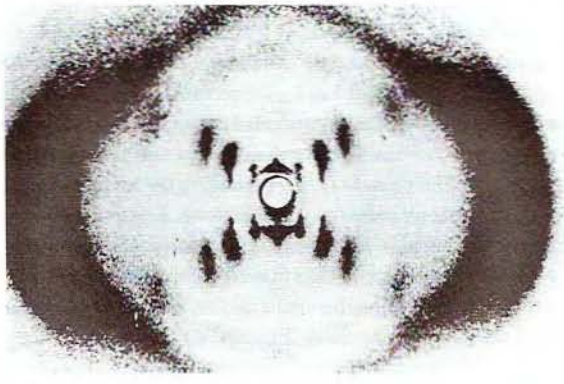


FIGURA 8-14 Diagrama de difracción de rayos X del DNA. Las manchas centrales en forma de cruz revelan la presencia de una estructura en hélice. Las bandas más intensas a la derecha y a la izquierda corresponden a la distancia entre las bases.

Rosalind Franklin, 1920–1958

Maurice Wilkins

Cuando Watson y Crick construyeron su modelo tuvieron que decidir desde el principio si las hebras del DNA debían ser **paralelas** o **antiparalelas,** es decir si sus enlaces 5′, 3′-fosfodiéster debían tener la misma dirección o bien direcciones opuestas. La disposición antiparalela proporcionó el modelo más satisfactorio. Trabajos posteriores con DNA polimerasas (Capítulo 25) aportaron argumentos experimentales a favor de que las hebras eran efectivamente antiparalelas, conclusión que fue definitivamente confirmada por análisis de difracción de rayos X.

Para explicar las periodicidades observadas en el diagrama de difracción de rayos X de fibras de DNA, Watson y Crick construyeron diversos modelos moleculares hasta llegar a una

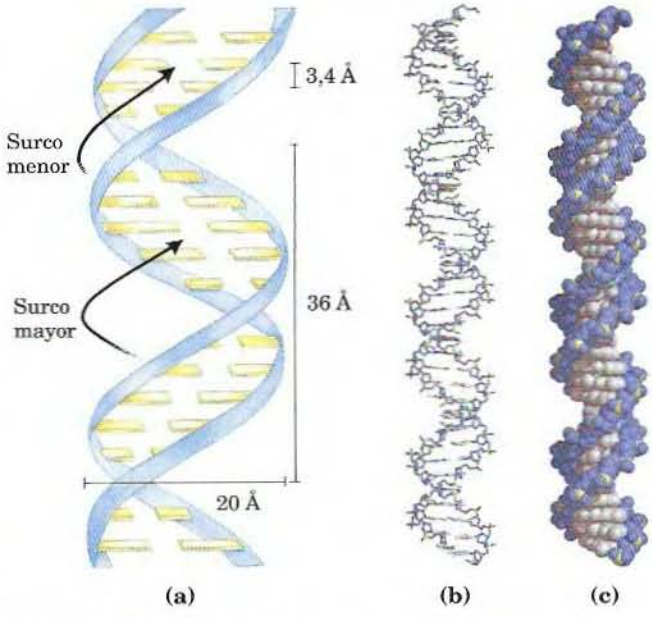


FIGURA 8-15 Modelo de Watson y Crick de la estructura del DNA. El modelo original de Watson y Crick tenía 10 pares de bases por vuelta y 34 Å (3,4 nm) por vuelta de hélice. Mediciones posteriores han mostrado que hay 10,5 bases por vuelta y 36 Å (3,6 nm) por vuelta. **(a)** Representación esquemática que muestra las dimensiones de la hélice. **(b)** Modelo lineal que muestra el esqueleto covalente y el apilamiento de las bases. **(c)** Modelo de esferas.

estructura con las bases apiladas verticalmente dentro de la doble hélice y separadas por una distancia de 3,4 Å; la repetición secundaria de unos 34 Å se explicaba por la incorporación de 10 pares de bases en cada vuelta completa de la doble hélice. En disolución acuosa, la estructura es ligeramente diferente y posee 10,5 pares de bases por vuelta (Fig. 8-15).

Como muestra la Figura 8-16, las dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas del DNA de doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición. En cambio, son **complementarias** entre sí. Siempre que hay adenina en una cadena, se encuentra timina en la otra; de igual forma, la presencia de guanina en una cadena implica la presencia de citosina en la otra.

La doble hélice o el dúplex del DNA se mantiene unido por dos tipos de fuerzas: los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias (Fig. 8-11) y las interacciones de apilamiento de las bases. La complementariedad de las hebras del DNA se debe a los enlaces de hidrógeno de los pares de bases. Las interacciones de apilamiento de las bases, que son esencialmente inespecíficas por lo que respecta a la identidad de las bases apiladas, contribuyen principalmente a la estabilidad de la doble hélice.

Las principales características del modelo del DNA en doble hélice están apoyadas por un gran número de resultados

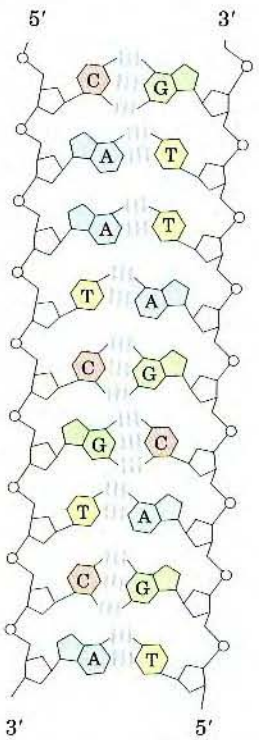


FIGURA 8-16 Complementariedad de las hebras del DNA de doble hélice. Las cadenas antiparalelas complementarias del DNA siguen las reglas de aparcamiento propuestas por Watson y Crick. Las dos cadenas antiparalelas apareadas tienen diferente composición: la cadena de la izquierda tiene una composición $A_3\ T_2\ G_1\ C_3$; la de la derecha, $A_2\ T_3\ G_3\ C_1$. La secuencia también es diferente cuando ambas cadenas se leen en dirección 5′ → 3′. Obsérvese las equivalencias de bases: A = T y G = C en el dúplex.

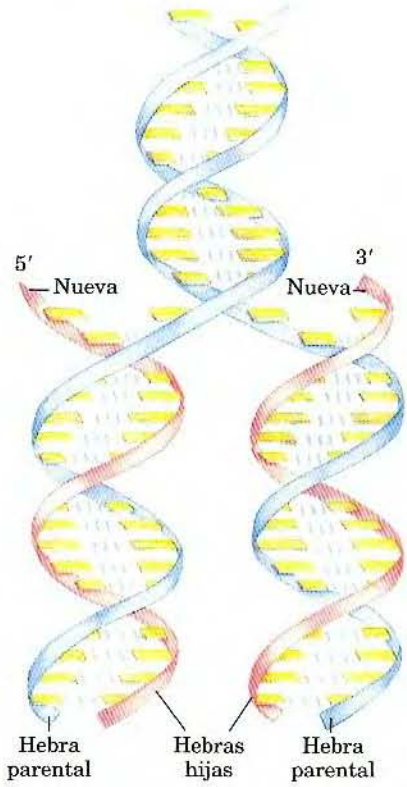
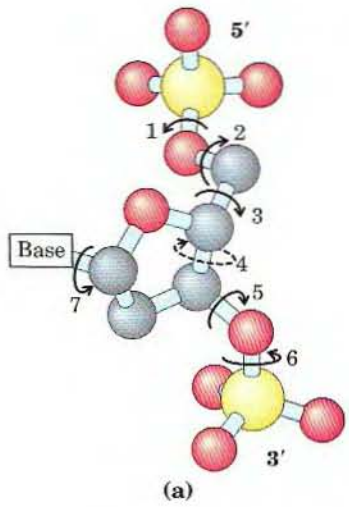


FIGURA 8-17 La replicación del DNA según Watson y Crick. Las hebras preexistentes o "parentales" se separan y cada una de ellas sirve de molde para la biosíntesis de una hebra complementaria "hija".

de tipo químico y biológico. Además, el propio modelo sugirió de inmediato un mecanismo para la transmisión de la información genética. La característica fundamental del modelo es la complementariedad de las dos hebras del DNA. Watson y Crick comprendieron, mucho antes de disponer de pruebas experimentales en su favor, que la replicación de la estructura podía tener lugar naturalmente a través de (1) la separación de las dos hebras y (2) la síntesis de hebras complementarias de cada una de ellas. Puesto que los nucleótidos de cada hebra nueva están unidos según una secuencia determinada por las reglas de apareamiento de bases explicadas anteriormente, cada hebra preexistente hace de molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria (Fig. 8-17). Estas hipótesis se confirmaron experimentalmente, comenzando así una revolución en nuestra comprensión de la herencia biológica.

El DNA adopta diferentes formas tridimensionales

El DNA es una molécula extraordinariamente flexible. Es posible una rotación considerable alrededor de una serie de enlaces de las cadenas de azúcar-fosfato y las fluctuaciones térmicas pueden provocar la curvatura, el estiramiento y el desapareamiento (fusión) de las hebras. En el DNA celular se observan muchas desviaciones significativas de la estructura de Watson y Crick, y muchas de ellas pueden jugar un papel importante en el metabolismo del DNA. Estas variaciones estructurales no tienen en general ningún efecto sobre las propiedades funda-



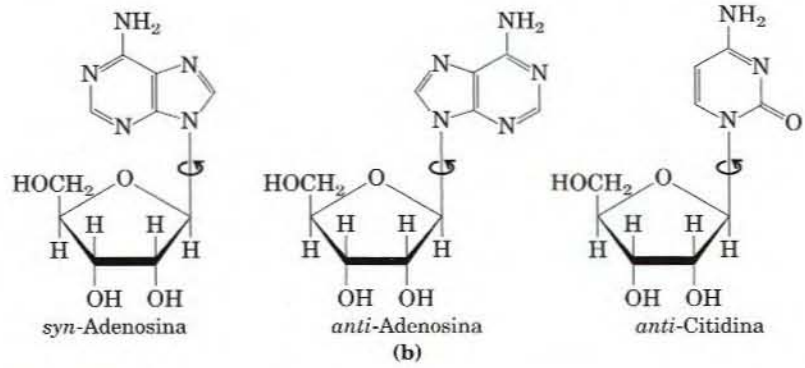
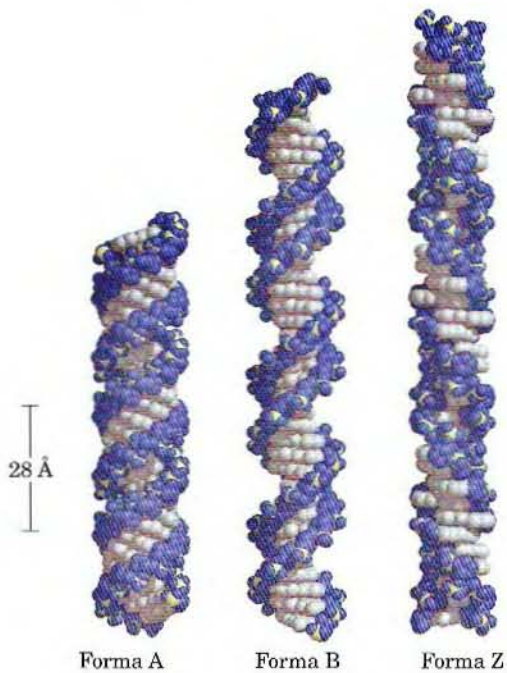


FIGURA 8-18 Variación estructural del DNA. **(a)** La conformación de un nucleótido en el DNA se ve afectada por la rotación en torno a siete enlaces diferentes. La rotación en torno a seis de estos enlaces es libre. La rotación limitada en torno del enlace 4 da lugar a la distorsión del anillo, de manera que uno de los átomos del anillo pentagonal de la furanosa se encuentra fuera del plano que contiene a los otros cuatro. Estas conformaciones son definidas como endo o exo en función de si el átomo se ha desplazado al mismo lado del plano que C-5′ o al lado opuesto (véase también Fig. 8-3b). **(b)** Con respecto a la unión a la ribosa, sólo dos conformaciones les están permitidas a las purinas en los nucleótidos, la anti y la syn. Las pirimidinas generalmente se encuentran en la conformación anti.

mentales del DNA definidas por Watson y Crick: la complementaricdad de las hebras, las hebras antiparalelas y el requerimiento de pares de bases A=T y G≡C.

La variación estructural del DNA refleja tres aspectos: las diferentes conformaciones posibles de la desoxirribosa, la rotación alrededor de enlaces adyacentes que constituyen el esqueleto de fosfodesoxirribosa (Fig. 8-18a) y la libre rotación en torno del enlace glucosídico C-1′-*N* (Fig. 8-18b). Debido a impedimentos estéricos los nucleótidos purínicos y pirimidínicos están limitados a dos conformaciones estables de la desoxirribosa que se denominan syn y anti (Fig. 8-18b). Las pirimidinas están limitadas generalmente a la conformación anti a causa de la interferencia estérica entre el azúcar y el oxígeno carbonílico C-2 de la pirimidina.

La estructura de Watson y Crick se conoce también como **forma B del DNA** o DNA B. La forma B es la estructura más estable que puede adoptar un DNA de secuencia al azar en condiciones fisiológicas y es el punto de referencia estándar en los estudios sobre las propiedades del DNA. Las **formas A** y **Z** del DNA son dos variantes estructurales que han sido caracterizadas a fondo en estructuras cristalinas. Estas tres conformaciones del DNA se muestran en la Figura 8-19. La forma A predomina en disoluciones relativamente pobres en agua. El DNA está todavía estructurado en una doble hélice dextrógira,



	Forma A	*Forma B*	*Forma Z*
Sentido de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Diámero	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Pares de bases por vuelta de hélice	11	10,5	12
Desplazamiento de la hélice por par de bases	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Inclinación de la base respecto al eje de la hélice	20°	6°	7°
Conformación del azúcar	C-3′ endo	C-2′ endo	C-2′ endo para las pirimidinas; C-3′ endo para las purinas
Conformación del enlace glucosídico	Anti	Anti	Anti para las pirimidinas; syn para las purinas

FIGURA 8-19 Comparación de las formas A, B y Z del DNA. Todas tienen 36 pares de bases. Las bases se muestran en gris, los fosfatos en amarillo y las ribosas y los oxígenos de los fosfatos en azul. El color azul es usado en los restantes capítulos para representar las hebras del DNA. La tabla resume algunas propiedades de las tres formas del DNA.

pero la hélice es más gruesa y el número de pares de bases por vuelta es de 11, en lugar de los 10,5 del DNA B. El plano de los pares de bases de la forma A tiene una inclinación de unos 20° con respecto al eje de la hélice. Estos cambios estructurales hacen que el surco ancho sea más profundo y el surco estrecho más superficial. Los reactivos utilizados para promover la cristalización del DNA tienden a deshidratarlo y por eso muchos DNA cortos cristalizan en forma A.

El DNA Z supone una desviación mucho más radical de la forma B; la diferencia más clara es la rotación a izquierdas (levógira) de la hélice. Contiene 12 pares de bases por vuelta y la estructura es más delgada y alargada. Las cadenas del DNA adoptan un plegamiento en zigzag. Ciertas secuencias de nucleótidos se pliegan más fácilmente que otras en hélices Z levógiras. Los ejemplos más característicos son las secuencias en las que se alternan pirimidinas y purinas, sobre todo aquellas en las que se alternan C y G o 5-metil-C y G. Con el fin de formar la doble hélice levógira del DNA Z las purinas adoptan la conformación syn y las pirimidinas conservan la conformación anti. En el DNA Z el surco mayor es apenas perceptible, mientras que el surco menor es estrecho y profundo.

No está claro aún que el DNA A se halle en las células, pero hay datos a favor de la presencia de fragmentos cortos (zonas) de DNA Z en procariotas y eucariotas. Estas regiones pueden tener un papel en la regulación de la expresión de algunos genes o en la recombinación genética.

Algunas secuencias de DNA adoptan estructuras no habituales

Se han encontrado, dentro de cromosomas grandes, otras variaciones estructurales dependientes de la secuencia que pueden afectar a las funciones y al metabolismo de fragmentos de DNA situados en su inmediata vecindad. Por ejemplo, siempre que se encuentren cuatro o más adeninas consecutivas en una de las hebras se produce la curvatura de la hélice. Seis adeninas seguidas causan una curvatura de aproximadamente 18°. La curvatura producida por ésta y otras secuencias puede tener importancia en la unión de algunas proteínas al DNA.

Un tipo de secuencia bastante común en el DNA es el **palíndromo.** Un palíndromo es una palabra, frase o verso que suena igual leyéndola del derecho o del revés; por ejemplo, "Dábale arroz a la zorra el abad". Este término se aplica a regiones del DNA con **repeticiones invertidas** de secuencia de bases con simetría binaria en las dos hebras del DNA (Fig. 8-20). Estas secuencias son autocomplementarias en cada una de las hebras y tienen el potencial de formar estructuras en **horquilla** o estructuras **cruciformes** (Fig. 8-21). Cuando la secuencia repetida invertida se encuentra en ambas hebras del DNA, recibe el nombre de **repetición especular.** Las repeti-

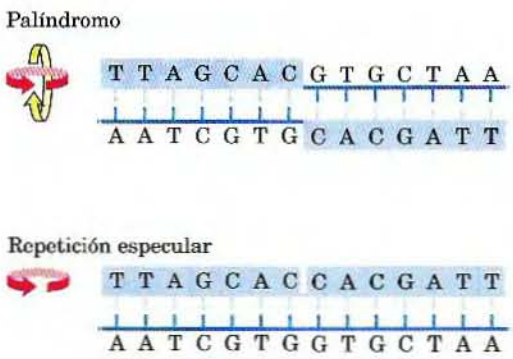


FIGURA 8-20 Palíndromos y repeticiones especulares. Los palíndromos son secuencias de los ácidos nucleicos de doble cadena que poseen un eje binario de simetría. Para superponer una repetición (secuencia sombreada) sobre la otra debe realizarse una rotación de 180° alrededor del eje horizontal y posteriormente otra alrededor del eje vertical, tal como muestran las flechas coloreadas. Por su parte, una repetición especular presenta una secuencia simétrica en cada hebra. La superposición de una repetición sobre la otra implica una única rotación alrededor del eje vertical.

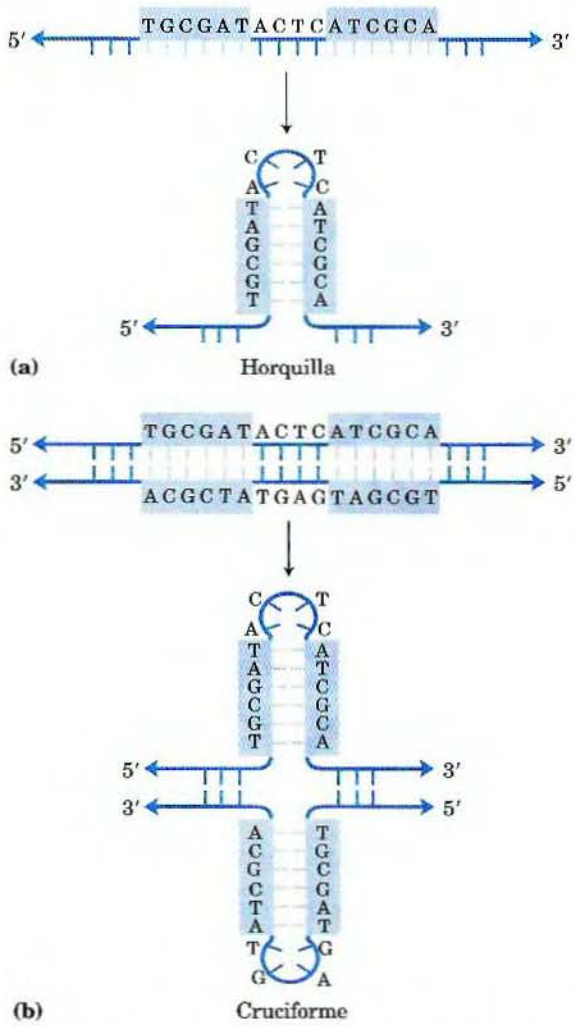
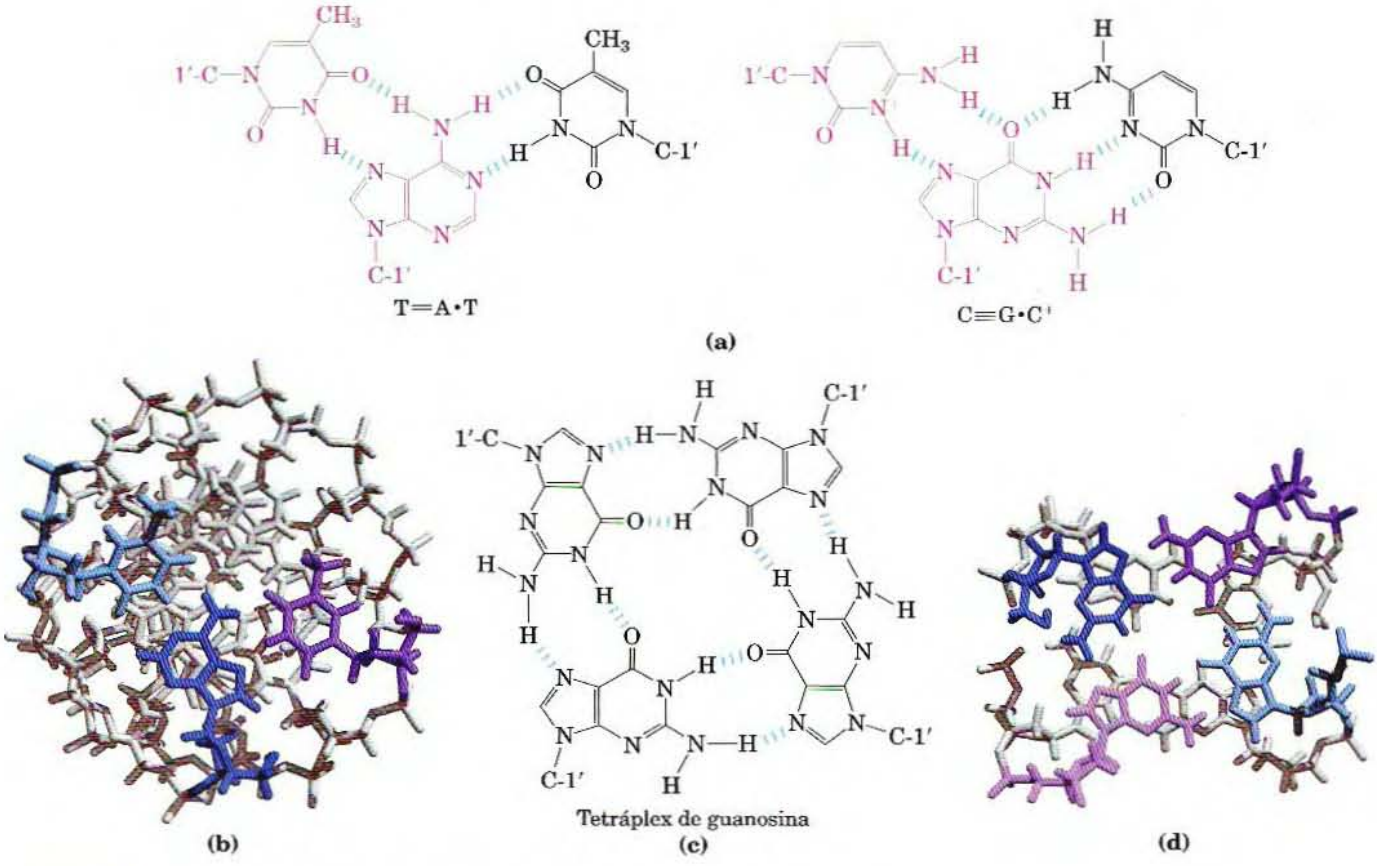


FIGURA 8-21 Horquillas y cruciformes. Las secuencias palindrómicas del DNA (o del RNA) pueden formar estructuras alternativas mediante apareamiento de bases intracatenario. **(a)** Cuando está implicada únicamente una de las hebras del DNA (o del RNA) se denomina estructura en horquilla. **(b)** Cuando están implicadas las dos hebras de un dúplex de DNA, la estructura se denomina cruciforme. El sombreado en azul resalta las secuencias asimétricas que pueden aparearse alternativamente con una secuencia complementaria en la misma hebra o en la hebra opuesta.

ciones especulares no tienen secuencias complementarias en la misma hebra y no pueden formar estructuras en horquilla o cruciformes. Secuencias de este tipo existen en casi todas las moléculas de DNA grandes y pueden ocupar entre unos pocos y varios miles de pares de bases. Se desconoce en qué medida los palíndromos adoptan la estructura cruciforme en las células; en *E. coli*, se ha demostrado la existencia in vivo de algunas estructuras cruciformes. Las secuencias autocomplementarias hacen que las hebras sencillas de DNA (o RNA) aisladas se plieguen en disolución en forma de estructuras complejas con múltiples horquillas.

Varias estructuras inusuales del DNA constan de tres o cuatro hebras de DNA. Estas variantes estructurales merecen ser estudiadas porque suelen ser los lugares donde comienzan o son regulados importantes procesos del metabolismo del DNA (replicación, recombinación, transcripción). Los nucleótidos que participan en los pares de bases de Watson y Crick (Figura 8-11) pueden formar puentes de hidrógeno adicionales, sobre todo con los grupos funcionales que se encuentran en el surco mayor. Por ejemplo, un residuo de citidina (si está protonado) puede aparearse con la guanosina de un par de bases G≡C, y la timidina puede aparearse con la adenosina de un par de bases A═T (Figura 8-22). Los átomos N-7, O^6 y N^6 de las purinas, que participan en los puentes de hidrógeno del DNA tríplex, son conocidos como **posiciones de Hoogsteen** y el apareamiento, que no sigue el patrón de Watson y Crick, se denomina **apareamiento de Hoogsteen,** en honor de Karst Hoogsteen, quien en 1963 sugirió por primera vez la po-



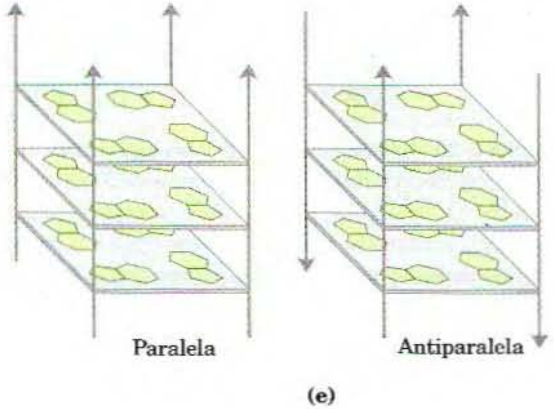


FIGURA 8-22 Estructuras de DNA con tres y cuatro hebras. (a) Patrones de apareamiento de una forma de DNA tríplex bien caracterizada. El par de Hoogsteen se muestra en rojo. **(b)** DNA de hélice triple con dos hebras de pirimidina [poli (T)] y una hebra de purina [poli (A)] (de PDB ID 1BCE). Las hebras azul oscuro y azul claro son antiparalelas y están asociadas por patrones de apareamiento normales de Watson y Crick. La tercera hebra (toda de pirimidinas) (púrpura) es paralela a la hebra de purina y está apareada con puentes de hidrógeno distintos de los de Watson y Crick. La vista es desde un extremo y se representan cinco tripletes. Sólo el triplete más cercano al observador está coloreado. **(c)** Patrón de apareamiento de bases en la estructura del tetráplex de guanosina. **(d)** Dos cuartetos sucesivos de un tetráplex de guanina (tetráplex G) (de PDB ID 1QDG), vistos desde un extremo y con el más cercano al observador en color. **(e)** Posibles variantes en la orientación de las hebras en un tetráplex G.

sibilidad de esta modalidad de apareamiento. Estos apareamientos permiten la formación de **DNA tríplex.** Los tríplex mostrados en la Figura 8-22 (a, b) son más estables a pH bajo porque el triplete C≡G • C^+ requiere una citosina protonada. En el tríplex, el pK_a de esta citosina es >7,5, mientras que su valor normal es de 4,2. Los tríplex también se forman más fácilmente con largas secuencias que contengan sólo pirimidinas o sólo purinas en una de las hebras. Algunos tríplex contienen dos hebras de pirimidina y una hebra de purina, otros contienen dos hebras de purina y una de pirimidina.

También es posible el aparcamiento de cuatro hebras para formar un tetráplex (también llamado cuadrúplex), pero sólo se forma con facilidad en secuencias de DNA con una alta proporción de residuos de guanosina (Fig. 8-22c, d). El tetráplex de guanosina, o **tetráplex G,** es muy estable en un amplio abanico de condiciones. La orientación de las hebras en el tetráplex puede variar, como se muestra en la Figura 8-22e.

Una estructura muy exótica, conocida como **DNA H,** se halla en regiones de polipurina o de polipirimidina que también incorporen una repetición especular. Un ejemplo sencillo es un fragmento largo de residuos de T y C alternados (Figura 8-23). El DNA H se caracteriza por una estructura en triple cadena [Fig. 8-22 (a, b)]. Dos de las tres hebras del DNA H contienen pirimidinas y la tercera purinas.

En el DNA celular, los sitios de reconocimiento de muchas proteínas que se unen a secuencias específicas (Capítulo 28) tienen secuencias palindrómicas y en las regiones implicadas en la regulación de la expresión de algunos genes eucarióticos se encuentran secuencias de polipurina y polipirimidina que pueden formar hélices triples o incluso DNA H. En principio, hebras de DNA sintético, diseñadas para aparearse con estas secuencias y formar hélices triples, podrían alterar la expresión génica. El control del metabolismo celular mediante estos métodos tiene cada vez mayor importancia comercial por sus potenciales aplicaciones en medicina y agricultura.

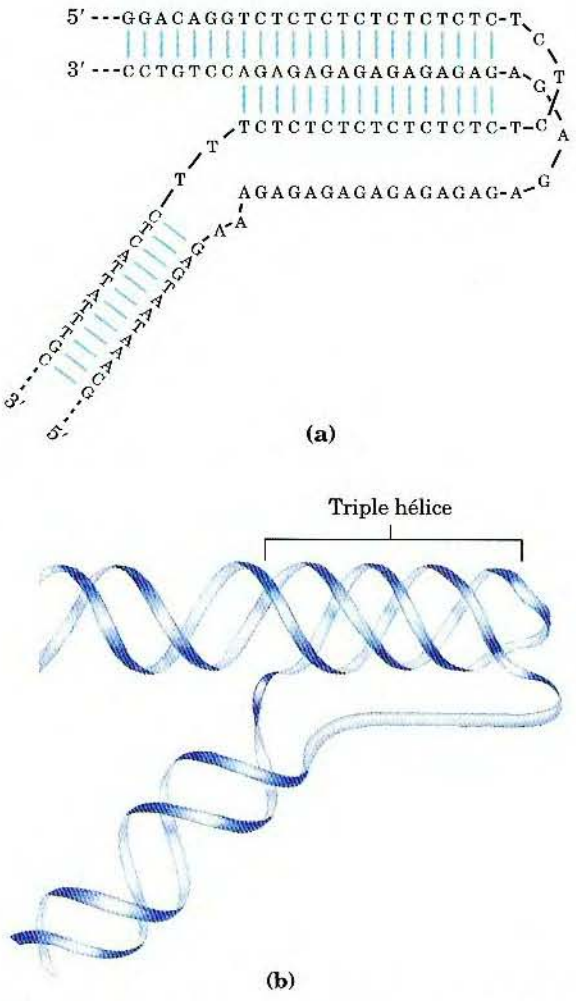


FIGURA 8-23 DNA H. (a) Una secuencia de residuos T y C alternados puede considerarse como una repetición especular centrada en uno de los residuos de T o C centrales. **(b)** Estas secuencias forman una estructura no habitual en la que las hebras de la mitad de la repetición especular están separadas y la hebra que contiene las pirimidinas (residuos de T y C alternos) está plegada sobre la otra mitad, formando una hélice triple. La hebra de purinas (en la que se alternan residuos de A y G) queda sin aparear. Esta estructura produce una curva cerrada en el DNA.

Los RNA mensajeros codifican las cadenas polipeptídicas

Vamos a desviar momentáneamente nuestra atención de la estructura del DNA a la expresión de la información genética que contiene. El RNA, el segundo tipo de ácido nucleico de la célula, desempeña muchas funciones. En la expresión génica, actúa como intermediario en la conversión de la información codificada en el DNA en la secuencia de aminoácidos de las proteínas funcionales.

En los eucariotas, el DNA se encuentra en su mayor parte confinado en el núcleo, mientras que la síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma. Por lo tanto, una molécula distinta del DNA debe transportar el mensaje genético necesario para la síntesis de proteínas desde el núcleo hasta el citoplasma. Ya en la década de 1950, el RNA fue considerado como el candidato lógico: se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y el aumento de la síntesis proteica está acompañado de un aumento de la cantidad de RNA en el citoplasma y de un aumento de su velocidad de recambio. Éstas y otras observaciones impulsaron a algunos investigadores a proponer que el RNA transporta la información genética desde el DNA hasta los ribosomas, donde se sintetizan las proteínas. En 1961, François Jacob y Jacques Monod presentaron una teoría unificada (esencialmente correcta) de los diversos aspectos de este proceso. Propusieron el nombre de RNA mensajero (mRNA) para la porción de RNA celular total que traslada la información genética desde el DNA a los ribosomas, donde los mensajeros actúan como molde para especificar las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. A pesar de que la longitud de los mRNA de genes diferentes puede variar mucho, los mRNA de un gen determinado tienen normalmente un tamaño definido. El proceso de formación del mRNA sobre un molde de DNA se conoce como transcripción.

En los procariotas, una única molécula de mRNA puede codificar una o varias cadenas polipeptídicas. Si únicamente

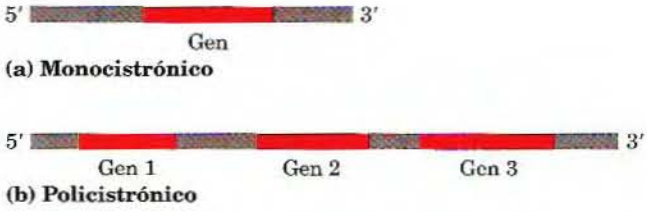


FIGURA 8-24 mRNA procariótico. Diagramas esquemáticos de un mRNA monocistrónico **(a)** y de otro policistrónico **(b)** de procariotas. Los segmentos rojos representan al RNA que codifica un producto génico; los segmentos grises representan RNA no codificante. En el transcrito policistrónico, los tres genes están separados por RNA no codificante.

contiene información para la síntesis de un solo polipéptido, el mRNA es **monocistrónico;** si codifica dos o más polipéptidos diferentes, el mRNA es **policistrónico.** Los mRNA eucarióticos son, en su mayoría, monocistrónicos. (El término "cistrón", en lo que respecta a esta discusión, es sinónimo de un gen. El término tiene sus raíces históricas en la genética, pero su definición genética rigurosa va más allá del ámbito de este texto.) La longitud mínima de un mRNA viene determinada por la longitud de la cadena polipeptídica que codifica. Por ejemplo, una cadena polipeptídica de 100 residuos aminoácidos requiere una secuencia codificante de RNA de al menos 300 nucleótidos, puesto que cada aminoácido está codificado por un triplete de nucleótidos (éste y otros detalles de la síntesis proteica son tratados en el Capítulo 27). Sin embargo, los mRNA transcritos a partir del DNA son siempre un poco más largos de lo estrictamente necesario para codificar una secuencia (o secuencias) polipeptídica(s). El RNA no codificante adicional incluye secuencias que regulan la síntesis proteica. En la Figura 8-24 se resume la estructura general de los mRNA procarióticos.

Muchos RNA tienen estructuras tridimensionales complejas

El RNA mensajero es sólo una de las varias clases de RNA celulares. Los RNA de transferencia actúan como moléculas adaptadoras en la síntesis proteica; unidos covalentemente a un aminoácido por un extremo, se aparean con el mRNA de forma que los aminoácidos se unen a la cadena polipeptídica en proceso de crecimiento con la secuencia correcta. Los RNA ribosómicos son componentes de los ribosomas. También se conoce una amplia variedad de RNA con funciones especiales, incluyendo algunos con actividad enzimática (denominados ribozimas). Todos ellos se describen en detalle en el Capítulo 26. Las diversas y a menudo complejas funciones de estos RNA son reflejo de una diversidad de estructuras mucho más rica que la observada en el DNA.

El producto de la transcripción del DNA es siempre un RNA de cadena sencilla. Las monohebras tienden a adoptar una conformación helicoidal dextrógira, determinada por las interacciones de apilamiento de las bases (Fig. 8-25). Las interacciones de apilamiento son más fuertes entre dos purinas que entre una purina y una pirimidina o entre dos pirimidinas. La interacción purina-purina es tan fuerte que una pirimidina que se encuentre entre dos purinas suele ser desplazada de la estructura de bases apiladas para que las dos purinas puedan interaccionar. Cualquier secuencia autocomplementaria de la molécula dará lugar a estructuras más complejas. El RNA puede formar pares de bases con regiones complementarias de RNA o de DNA. Las reglas estándar de apareamiento son idénticas a las del DNA: G se aparea con C y A con U (o con los raros residuos de T de algunos RNA). Una diferencia es que el apareamiento entre residuos de G y U, muy raro en el DNA, es bastante frecuente en el RNA (Fig. 8-27). Las hebras de RNA o de RNA y DNA se aparean de modo antiparalelo, como en el DNA.

A diferencia de la doble hélice del DNA, no existe una estructura secundaria regular y simple que pueda servir de referencia para la estructura del RNA. Las estructuras tridimensionales de muchos RNA, al igual que en las proteínas, son complejas y únicas. Las interacciones débiles, y en especial las interacciones de apilamiento de las bases, tienen un papel importante en la estabilización de la estructura, al igual que en el DNA. Allí donde se encuentran secuencias complementarias, la estructura en doble hebra predominante es la que equivale a la doble hélice dextrógira en forma A. En el laboratorio se han conseguido hélices en forma Z (en condiciones de alta fuerza iónica o elevada temperatura). No se ha observado la forma B en el RNA. Son frecuentes las interrupciones en la hélice A regular a causa de bases no apareadas o incorrectamente apareadas en una o en las dos hebras y ello da lugar a la formación de protuberancias o bucles internos (Fig. 8-26). Los bucles en

FIGURA 8-25 Típico apilamiento dextrógiro de un RNA de cadena sencilla. Las bases se muestran en color gris, los átomos de fósforo en amarillo y las ribosas y los oxígenos de los fosfatos en verde. El verde es usado en los siguientes capítulos para representar el RNA, del mismo modo que el azul se usa para representar el DNA.

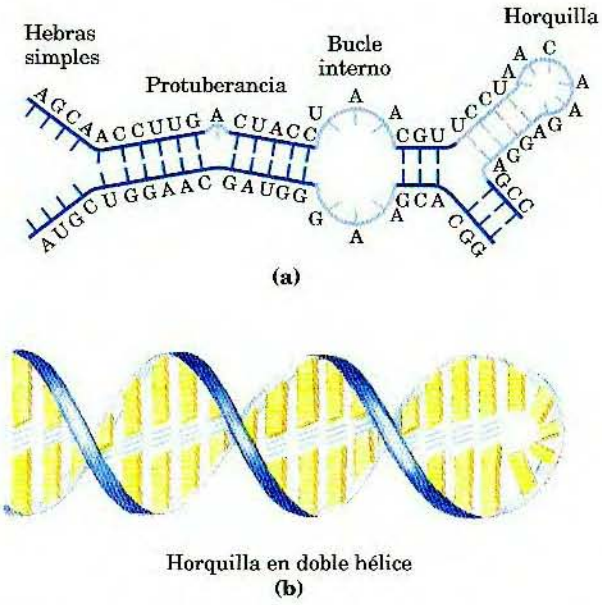


FIGURA 8-26 Estructura secundaria del RNA. (a) Protuberancia, bucle interno y bucle en horquilla. **(b)** Las regiones apareadas adoptan generalmente una estructura en hélice dextrógira en la forma A, como se muestra para una horquilla.

horquilla se forman entre secuencias autocomplementarias cercanas. El potencial de formación de estructuras helicoidales con apareamiento de bases es muy grande en muchos RNA (Fig. 8-27) y las horquillas resultantes son el tipo de estructura secundaria más común en el RNA. Ciertas secuencias específicas cortas, tales como UUCG, se encuentran a menudo en los extremos de las horquillas de RNA y se ha observado que forman bucles particularmente rígidos y estables. Es posible que estas secuencias tengan un papel importante en la nucleación del plegamiento de las moléculas de RNA en su estructura tridimensional precisa. Otros enlaces de hidrógeno diferentes a los enlaces estándar definidos por los apareamientos de Watson y Crick también contribuyen a la estructura. Por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa puede formar un enlace de hidrógeno con otros grupos. Algunas de estas propiedades pueden comprobarse con claridad en la estructura del fenilalanina-tRNA de levadura –el tRNA responsable de insertar residuos de Phe en los polipéptidos– y en dos enzimas de RNA o ribozimas, cuyas funciones, como las de las proteínas enzimáticas, dependen de la estructura tridimensional (Fig. 8-28).

El análisis de la estructura del RNA y de la relación entre estructura y función es un tema emergente de investigación, que presenta un grado de complejidad equivalente al del análisis de la estructura de las proteínas. La importancia del conocimiento de la estructura del RNA crece a medida que aumenta la información sobre el número de funciones que estas moléculas llevan a cabo.

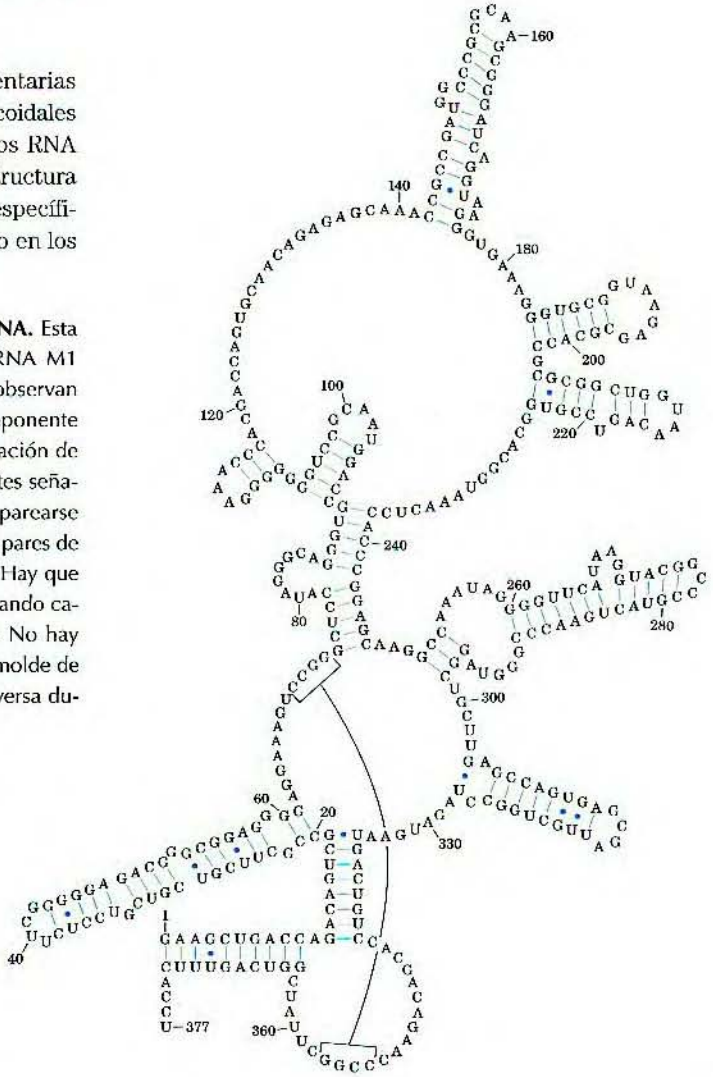
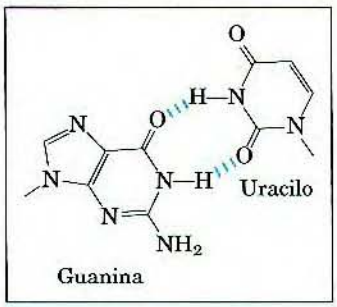


FIGURA 8-27 Estructuras helicoidales apareadas de un RNA. Esta ilustración muestra la posible estructura secundaria del RNA M1 componente del enzima RNasa P de *E. coli*, en la que se observan muchas horquillas. La RNasa P contiene también un componente proteico (no representado). Este enzima actúa en la modificación de los RNA de transferencia (véase Fig. 26-23). Los dos corchetes señalan secuencias complementarias adicionales que pueden aparearse en la estructura tridimensional. Los puntos azules indican los pares de bases G=U (en el recuadro) que no son de Watson y Crick. Hay que señalar que los pares de bases G=U se forman solamente cuando cadenas de RNA presintetizadas se pliegan sobre sí mismas. No hay RNA polimerasas (los enzimas que sintetizan RNA sobre un molde de DNA) que inserten un U enfrente de un molde de G o viceversa durante la síntesis de RNA.



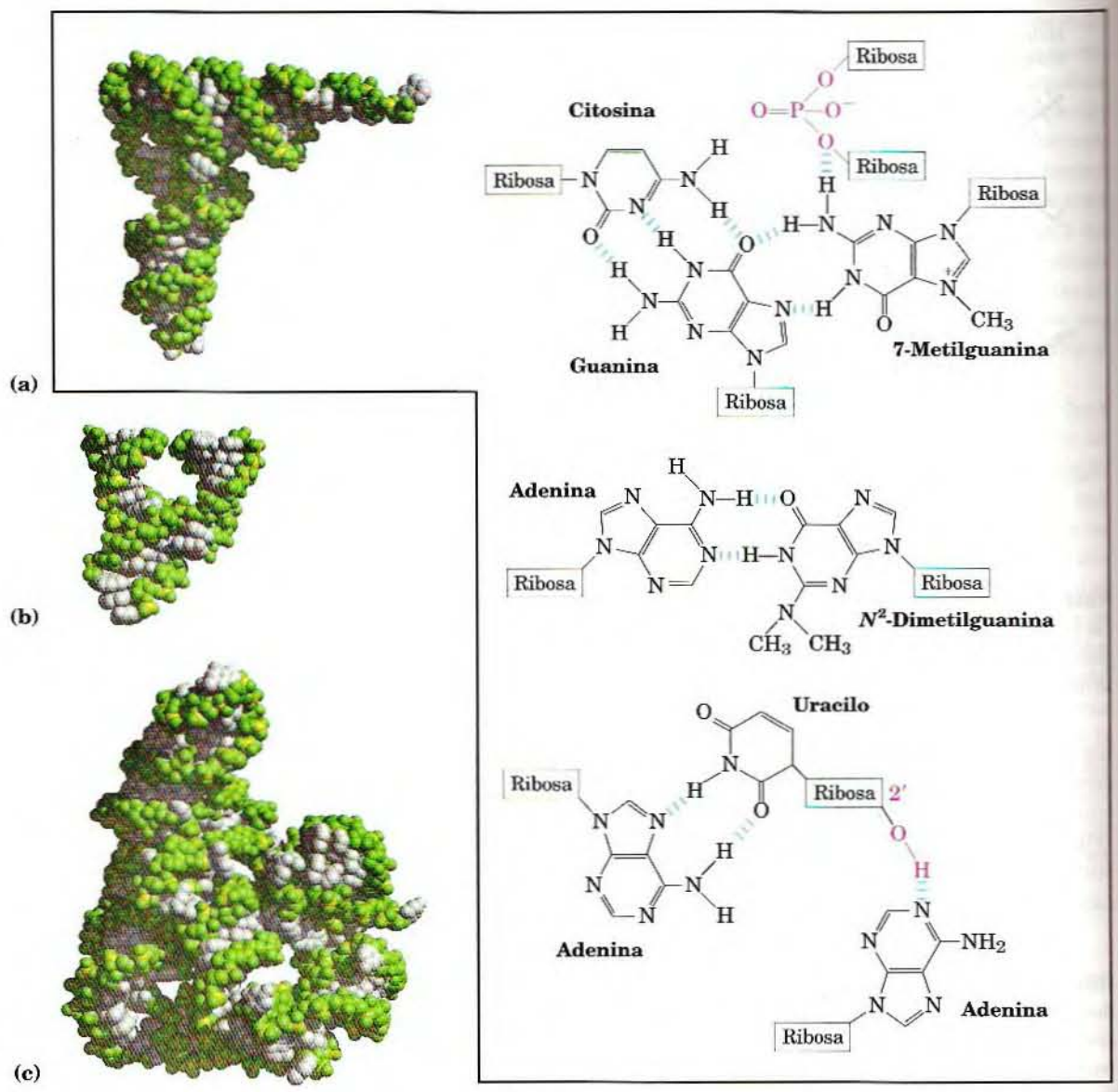


FIGURA 8-28 Estructura tridimensional del RNA. **(a)** Estructura tridimensional del fenilalanina-tRNA de levadura (PDB ID 1TRA). En este tRNA se encuentran algunos aparcamientos de bases no habituales. Obsérvese también la participación de un oxígeno de la ribosa del enlace fosfodiéster en un enlace de hidrógeno, y de un grupo 2'-hidroxilo en otro (ambos en rojo). **(b)** Ribozima en cabeza de martillo (llamado así porque la estructura secundaria en el centro activo recuerda a la cabeza de un martillo) de algunos virus vegetales (obtenido de PDB ID 1MME). Los ribozimas, o enzimas de RNA, catalizan una amplia variedad de reacciones, principalmente del metabolismo del RNA y de la síntesis proteica. Las complejas estructuras tridimensionales de estos RNA reflejan la complejidad inherente a la catálisis, tal como se ha descrito para los enzimas proteicos en el Capítulo 6. **(c)** Segmento de mRNA, con las características de un intrón, del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (obtenido de PDB ID 1GRZ). Este intrón (un ribozima) cataliza su propia escisión entre dos exones en una hebra de mRNA (tratado en el Capítulo 26).

RESUMEN 8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

- Hay muchos datos a favor de que el DNA contiene la información genética. En concreto, el experimento de Avery-MacLeod-McCarty reveló que el DNA aislado de una cepa bacteriana puede incorporarse y transformar las células de otra cepa, confiriéndoles algunas de las características heredables de la cepa donante. El experimento de Hershey-Chase mostró que el DNA de un virus bacteriano, pero no así su cápside proteica, contiene el mensaje genético para la replicación del virus en la célula huésped.
- Como resultado de la síntesis de muchos datos publicados, Watson y Crick propusieron que el DNA nativo consiste en dos cadenas antiparalelas dispuestas en forma de doble hélice dextrógira. Los

pares de bases complementarios A═T y G≡C se forman mediante puentes de hidrógeno dentro de la hélice. Los pares de bases están apilados perpendicularmente al eje mayor de la doble hélice, separados por 3,4 Å y con 10,5 pares de bases por vuelta.

- El DNA puede adoptar diferentes formas estructurales. Dos variantes de la forma de Watson y Crick, o DNA B, son el A y el Z. Algunos cambios dependientes de secuencia provocan la curvatura de la molécula de DNA. Hebras de DNA con secuencias apropiadas pueden formar bucles en horquilla/cruciformes o DNA tríplex o tetráplex.
- El RNA mensajero transfiere la información genética del DNA a los ribosomas para la síntesis proteica. El RNA de transferencia y el RNA ribosómico también están implicados en la síntesis proteica. El RNA puede ser estructuralmente complejo; las cadenas sencillas de RNA pueden formar horquillas, regiones de doble cadena y bucles complejos.

8.3 Química de los ácidos nucleicos

Para entender las funciones de los ácidos nucleicos, debemos conocer sus propiedades químicas y sus estructuras. En el DNA, el papel de depositario de la información genética depende en parte de su estabilidad intrínseca. Las transformaciones químicas del DNA en ausencia de un catalizador enzimático son generalmente muy lentas. Sin embargo, el almacenamiento de la información a largo plazo sin que sufra alteraciones es tan importante para la célula que incluso reacciones muy lentas que alteren la estructura del DNA pueden tener significado fisiológico. Procesos tales como la carcinogénesis y el envejecimiento pueden estar íntimamente ligados a la lenta acumulación de alteraciones irreversibles en el DNA. También son importantes las alteraciones no destructivas, como la separación de las hebras previa a la replicación o a la transcripción del DNA. Además de proporcionarnos información sobre procesos biológicos, el conocimiento de la química de los ácidos nucleicos nos ha dotado de una poderosa gama de metodologías que tienen aplicación en biología molecular, medicina y medicina legal. A continuación examinaremos las propiedades químicas del DNA y algunas de estas tecnologías.

El DNA y el RNA de doble hélice pueden desnaturalizarse

Las disoluciones de DNA nativo que haya sido cuidadosamente aislado son muy viscosas a pH 7,0 y temperatura ambiente (25 °C). Cuando una disolución de estas características se somete a valores extremos de pH o a temperaturas superiores a los 80 °C, su viscosidad desciende rápidamente, lo cual indica que el DNA ha sufrido un cambio en su estado físico. El calor y los valores extremos de pH provocan la desnaturalización o la fusión del DNA de doble hélice, del mismo modo que desnaturalizan las proteínas globulares. La rotura de los enlaces de hidrógeno de los pares de bases y del apilamiento de las bases provoca el desenrollamiento de la doble hélice, ya sea totalmente, dando lugar a dos hebras sencillas completamente separadas una de otra en toda su extensión, o bien parcialmente (desnaturalización parcial). La desnaturalización no rompe ningún enlace covalente del DNA (Fig. 8-29).

La renaturalización del DNA es un proceso rápido de un solo paso, siempre que todavía exista un segmento en doble hélice de una docena o más residuos que mantenga unidas las dos hebras. Cuando la temperatura y el pH retornan a valores situados dentro de los márgenes biológicos, los segmentos desenrollados de las dos hebras vuelven a enrollarse espontáneamente o a **hibridar** para restablecer el dúplex intacto (Fig. 8-29). Sin embargo, si las dos hebras están completamente separadas, la renaturalización se produce en dos pasos. En el primero, relativamente lento, las dos hebras se "encuentran" mediante colisiones al azar hasta formar un fragmento corto de doble hélice complementaria. El segundo paso es mucho más rápido: las bases no apareadas restantes entran en registro y se aparean sucesivamente como en una "cremallera" para formar la doble hélice.

Las interacciones de apilamiento de las bases de los ácidos nucleicos provocan una disminución de la absorción de la luz UV, en relación con la absorción de una disolución de nucleótidos libres de la misma concentración; la absorción disminuye todavía más cuando se forma la doble cadena. Este fenómeno

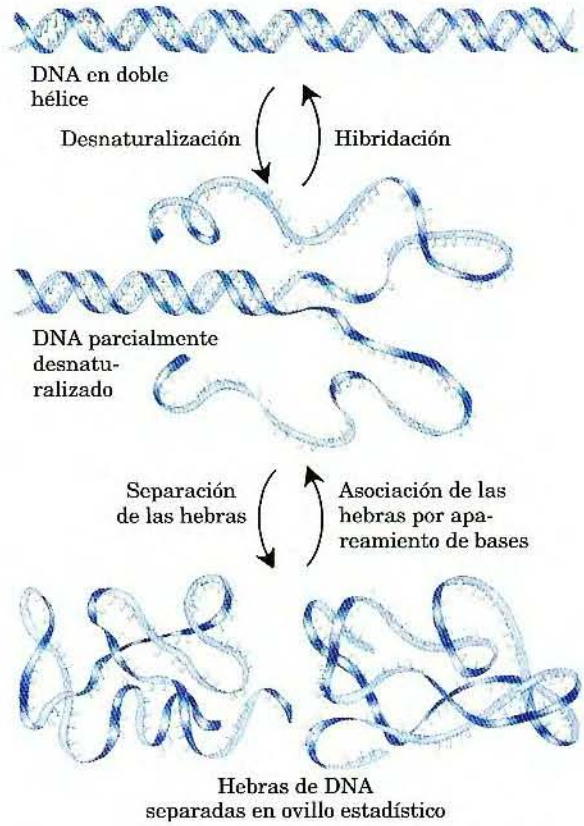
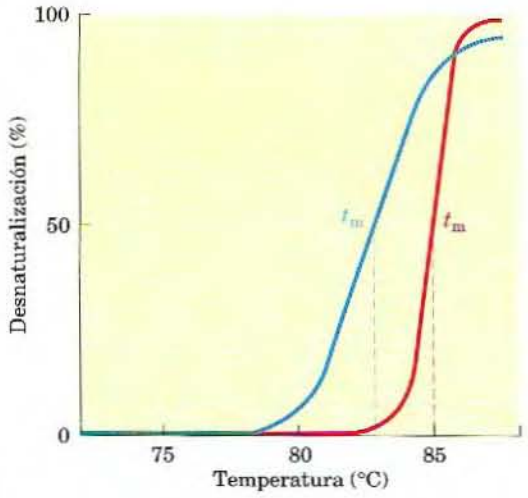


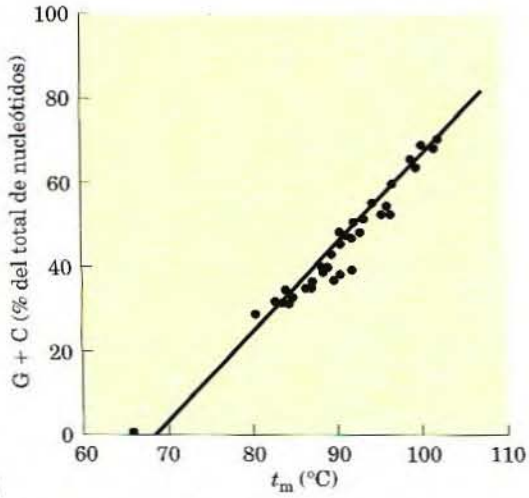
FIGURA 8-29 Desnaturalización e hibridación (renaturalización) reversible del DNA.

se denomina efecto hipocrómico. La desnaturalización de un ácido nucleico de doble cadena produce el efecto contrario, es decir, un incremento de la absorción, denominado efecto hipercrómico. La transición del DNA de cadena doble a la forma de cadena sencilla desnaturalizado puede seguirse, por tanto, midiendo la absorción de luz UV.

Las moléculas de DNA de origen bacteriano o vírico en disolución se desnaturalizan cuando se calientan lentamente (Fig. 8-30). Cada especie de DNA tiene una temperatura de desnaturalización característica, el punto de fusión (t_m): cuanto mayor es el contenido de G≡C, más alto es el punto de fusión del DNA. Ello es debido a que los pares de bases G≡C, con tres puentes de hidrógeno, requieren más energía calórica para disociarse que los pares A=T. La determinación cuidadosa de la temperatura de fusión de una muestra de DNA, en condiciones de pH y fuerza iónica definidas, puede proporcionar una estimación de su composición en bases. Si se controlan las condiciones de desnaturalización, las regiones ricas en pares A=T se desnaturalizarán específicamente, mientras que la mayor parte del DNA seguirá en forma de doble hebra. Estas regiones desnaturalizadas (burbujas) pueden observarse con el microscopio electrónico (Fig. 8-31). La separación de las hebras del DNA *debe* tener lugar in vivo durante procesos como la replicación y la transcripción. Como veremos, los lugares del DNA donde se inician estos procesos suelen ser ricos en pares A=T.



(a)



(b)

FIGURA 8-30 Desnaturalización térmica del DNA. **(a)** Desnaturalización o curva de fusión de dos muestras de DNA. La temperatura en el punto medio de la transición (t_m) es el punto de fusión; depende del pH, de la fuerza iónica y del tamaño y composición de bases del DNA. **(b)** Relación entre la t_m y el contenido de G≡C de un DNA.

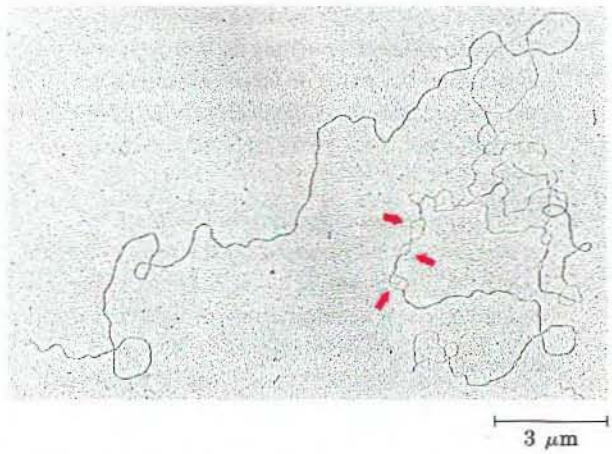


FIGURA 8-31 DNA parcialmente desnaturalizado. Este DNA fue parcialmente desnaturalizado y a continuación fijado para impedir su renaturalización durante la preparación de la muestra. El sombreado empleado para visualizar el DNA en esta micrografía electrónica aumenta su diámetro unas cinco veces e impide ver los detalles de la hélice. Sin embargo, pueden obtenerse medidas de longitud y las regiones de cadena sencilla se distinguen fácilmente de las de cadena doble. Las flechas señalan algunas burbujas de cadena sencilla, donde se ha producido desnaturalización. Las regiones que se desnaturalizan son altamente reproducibles y ricas en pares de bases A=T.

Los ácidos nucleicos de doble hebra formados por dos hebras de RNA o por una de RNA y otra de DNA (híbridos RNA-DNA) también pueden desnaturalizarse. Los dúplex de RNA son más estables que los dúplex de DNA. A pH neutro, un RNA de doble hélice se desnaturaliza a una temperatura 20 °C superior a la temperatura de desnaturalización de una molécula de DNA de secuencia comparable. La estabilidad de un híbrido RNA-DNA es normalmente intermedia entre la del RNA y la del DNA. Se desconoce la base física de estas diferencias de estabilidad térmica.

Los ácidos nucleicos de especies diferentes pueden formar híbridos

La capacidad de dos hebras complementarias de DNA para aparearse entre sí puede ser aprovechada para detectar secuencias de DNA similares en dos especies diferentes o en el genoma de una misma especie. Si los dúplex de DNA aislados de células humanas y de ratón se desnaturalizan completamente por acción del calor y a continuación se mezclan y mantienen a 65 °C durante muchas horas, una gran parte del DNA se renaturalizará. La mayor parte de las cadenas de DNA de

ratón se unirán a cadenas complementarias de DNA de ratón formando un dúplex de DNA de ratón; análogamente, la mayoría de moléculas de DNA humano hibridarán con hebras humanas complementarias. Sin embargo, una parte de las moléculas del DNA de ratón se asociará con DNA humano para dar lugar a **dúplex híbridos,** en los que fragmentos de la cadena de DNA de ratón estarán apareados con fragmentos de DNA humano (Fig. 8-32). Este fenómeno pone de manifiesto una herencia evolutiva común; diferentes organismos poseen generalmente un cierto número de proteínas y RNA con funciones similares y, a menudo, estructuras similares. En muchos casos, los DNA que codifican estas proteínas y estos RNA tienen secuencias similares. Cuanto más cercana sea la relación evolutiva entre dos especies, mayor será el grado de hibridación de sus DNA. Por ejemplo, el DNA humano hibrida mucho más con el DNA de ratón que con el de levadura.

La hibridación de hebras de DNA de origen diferente es la base de un conjunto de poderosas técnicas, esenciales para la práctica de la genética molecular moderna. Es posible detectar un gen o una secuencia específica de DNA en presencia de otras muchas secuencias si se dispone de antemano de la hebra de DNA complementario adecuada (normalmente marcada de algún modo) que pueda hibridarse con ella (Capítulo 9). El DNA complementario puede pertenecer a una especie diferente o a la misma especie; en algunos casos es sintetizado en el laboratorio, utilizando técnicas que se describen más adelante en este capítulo. Las técnicas de hibridación pueden modificarse para detectar un RNA específico en lugar de un DNA. El aislamiento e identificación de genes y RNA específicos se basa en estas técnicas y las nuevas aplicaciones de esta tecnología hacen actualmente posible la exacta identificación de un individuo a partir de un único cabello presente en la escena de un crimen o la predicción de la aparición de ciertas enfermedades en un individuo, décadas antes de que se puedan apreciar los primeros síntomas (véase Recuadro 9-1).

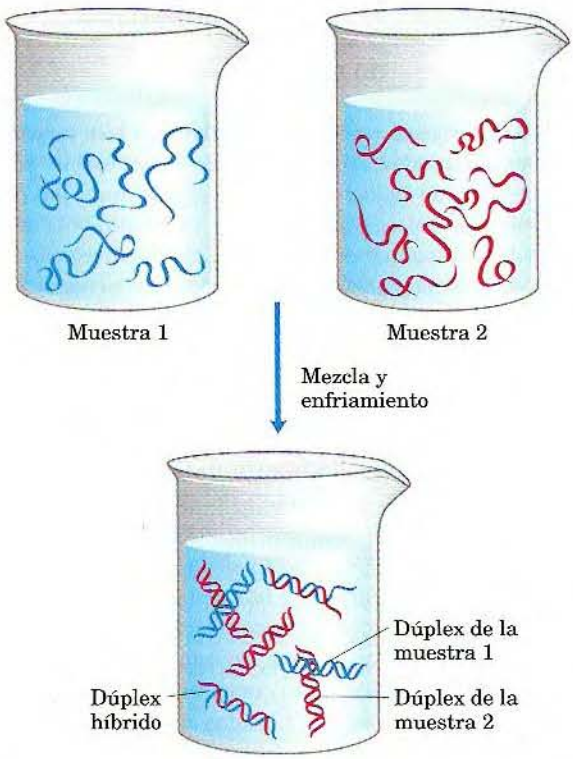


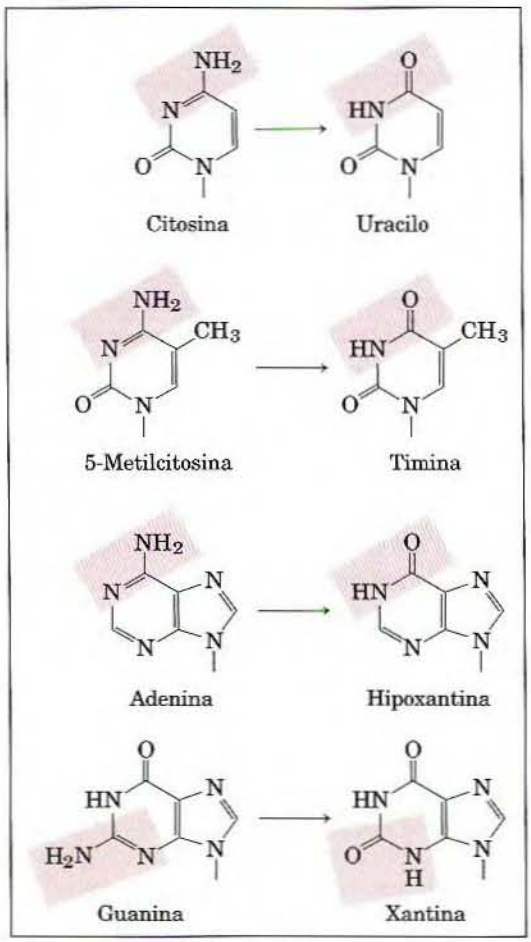
FIGURA 8-32 Hibridación del DNA. Dos muestras de DNA que deben compararse se desnaturalizan completamente por calor. Cuando las dos disoluciones se mezclan y se enfrían lentamente, las hebras de DNA de cada muestra se asocian con las hebras complementarias normales para formar dúplex. Si los dos DNA tienen secuencias que presentan una homología significativa, también tienden a formar dúplex parciales o híbridos entre sí: cuanto más similares sean las secuencias de los dos DNA, mayor será el número de híbridos formados. La formación de híbridos puede medirse usando diferentes procedimientos. Generalmente, uno de los DNA está marcado con un isótopo radiactivo para simplificar las mediciones.

Los nucleótidos y los ácidos nucleicos experimentan transformaciones no enzimáticas

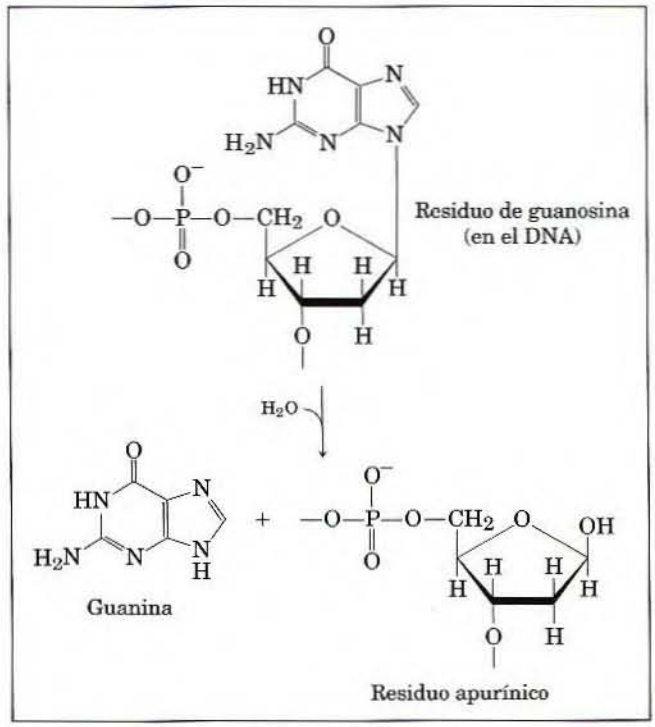
Las purinas y pirimidinas, junto con los nucleótidos de los que forman parte, experimentan una serie de alteraciones espontáneas de su estructura covalente. Estas reacciones son normalmente *muy lentas*, pero resultan fisiológicamente significativas a causa de la muy baja tolerancia de la célula a alteraciones de su información genética. Las alteraciones en la estructura del DNA que dan lugar a cambios permanentes en la información genética codificada por la molécula se denominan **mutaciones.** Hay muchas pruebas a favor de una estrecha relación entre la acumulación de mutaciones en un organismo y los procesos de envejecimiento y el cáncer.

Varias bases sufren la pérdida espontánea de sus grupos amino exocíclicos (desaminación) (Fig. 8-33a). Por ejemplo, en condiciones intracelulares típicas, la desaminación de una citosina (del DNA) para dar lugar a uracilo se produce en aproximadamente una de cada 10^7 citosinas cada 24 h. Ello equivale a unas 100 mutaciones espontáneas por día en una célula de mamífero. La desaminación de la adenina y la guanina es aproximadamente 100 veces más lenta.

La lenta reacción de desaminación de la citosina parece inocua a primera vista, pero es casi con toda seguridad la razón de que el DNA contenga timina en lugar de uracilo. El producto de la desaminación de la citosina (uracilo) es reconocido enseguida como extraño y es eliminado por un sistema de reparación (Capítulo 25). Si el DNA contuviera normalmente uracilo, el reconocimiento de los uracilos procedentes de la desaminación de la citosina sería más difícil y los uracilos no reparados causarían cambios permanentes en la secuencia al aparearse con adeninas en la replicación. La desaminación de la citosina provocaría una disminución gradual en la cantidad de pares de bases G≡C y un aumento en los A=U en el DNA de todas las células. En milenios de evolución, la desaminación de la citosina podría acabar con los pares de bases G≡C y con el código genético que los utiliza. Es posible que la fijación de la timina como una de las cuatro bases del DNA haya sido un momento crucial de la evolución, que hizo posible el almacenamiento de la información genética a largo plazo.



(a) Desaminación



(b) Despurinación

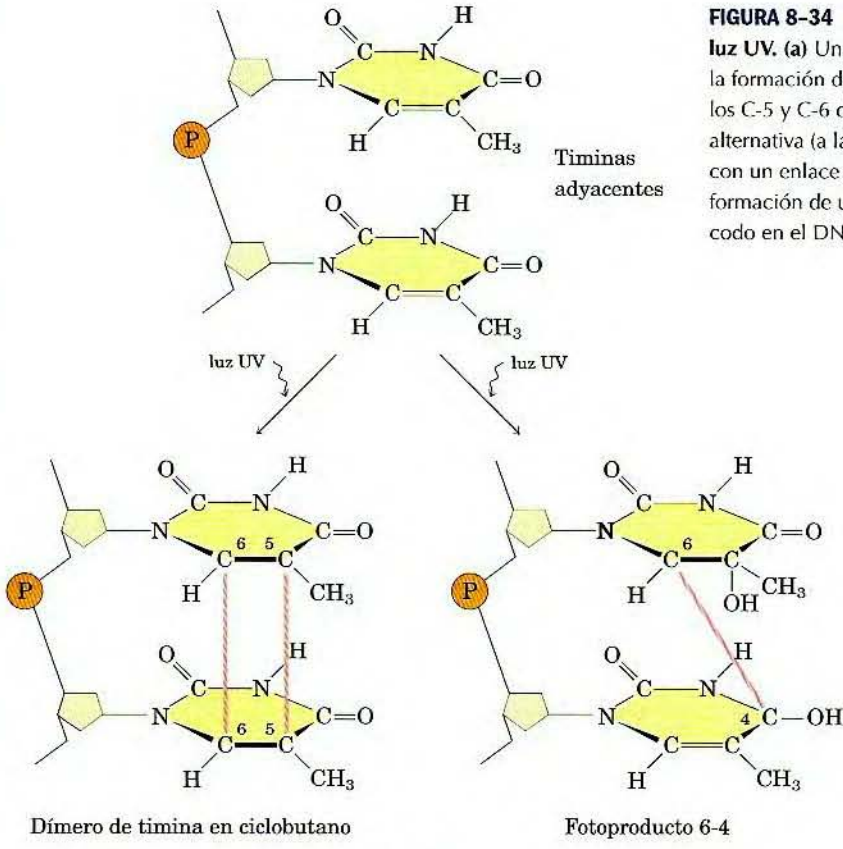
FIGURA 8-33 Algunas reacciones no enzimáticas bien caracterizadas de los nucleótidos. **(a)** Reacciones de desaminación. Sólo se muestra la base. **(b)** Despurinación, en la cual se pierde una purina por hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico. La desoxirribosa restante después de la despurinación se convierte rápidamente de la forma β-furanósica a la forma aldehído (véase Fig. 8-3). Otras reacciones no enzimáticas están ilustradas en las Figuras 8-34 y 8-35.

Otra reacción importante de los desoxinucleótidos es la hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico entre la base y la pentosa (Fig. 8-33b). Esta reacción se da con mucha mayor facilidad en las purinas que en las pirimidinas. En el DNA se pierde una de cada 10^5 purinas cada 24 h en condiciones celulares típicas (10.000 por célula de mamífero). La despurinación de los ribonucleótidos y del RNA es mucho más lenta y normalmente no se considera fisiológicamente significativa. En el laboratorio puede acelerarse la pérdida de purinas por tratamiento con ácido diluido. La incubación del DNA a pH 3 provoca la eliminación selectiva de las bases purínicas y produce un derivado denominado ácido apurínico.

Otras reacciones están favorecidas por ciertos tipos de radiación. La luz UV puede inducir la condensación de dos grupos etileno para formar un anillo de ciclobutano. En la célula, la misma reacción entre bases pirimidínicas adyacentes da lugar a dímeros de pirimidina en ciclobutano. Éstos se observan con mayor frecuencia entre residuos adyacentes de timina en la misma hebra del DNA (Fig. 8-34). Un segundo tipo de dímero de pirimidina, llamado fotoproducto 6-4, también se forma durante la irradiación UV. Las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gamma) pueden provocar la abertura de los anillos y la fragmentación de las bases, así como roturas en el esqueleto covalente de los ácidos nucleicos.

Prácticamente todas las formas de vida están expuestas a la acción de radiaciones de alta energía, capaces de provocar cambios químicos en el DNA. La radiación en la región del UV cercano (con longitudes de onda entre 200 y 400 nm), que representa una porción significativa del espectro solar, puede producir la dimerización de las pirimidinas y otros cambios químicos en el DNA de las bacterias y de las células cutáneas en humanos. Estamos expuestos a un campo permanente de radiación ionizante en forma de rayos cósmicos, que pueden penetrar profundamente en la tierra, así como a radiación emitida por elementos radiactivos tales como radio, plutonio, uranio, radón, ^{14}C y ^{3}H. Los rayos X utilizados en exámenes médicos son otra forma de radiación ionizante. Se estima que los UV y las radiaciones ionizantes son responsables de aproximadamente el 10% del total de lesiones en la estructura del DNA causadas por agentes medioambientales.

El DNA también puede ser dañado por reactivos químicos introducidos en el medio ambiente por la industria. Pueden no ser peligrosos en sí mismos, pero su metabolización por las células puede convertirlos en productos que sí lo sean. Dos clases principales de estos agentes (Fig. 8-35) son: (1) agentes desaminantes, en particular el ácido nitroso (HNO_2) o compuestos que pueden formar metabólicamente ácido nitroso o nitritos, y (2) agentes alquilantes.



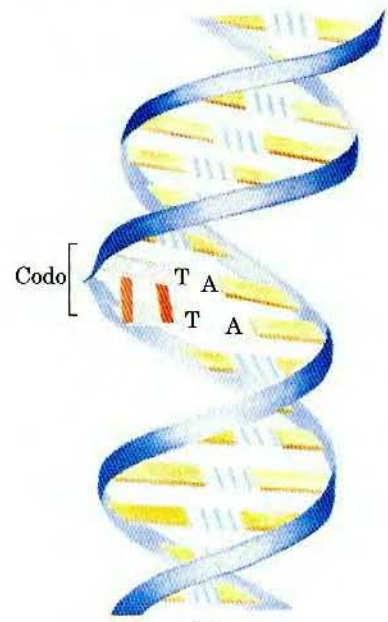
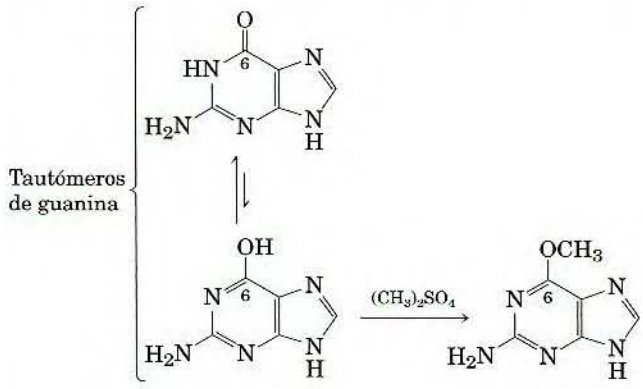


FIGURA 8-34 Formación de dímeros de pirimidina inducida por la luz UV. (a) Un tipo de reacción (a la izquierda) tiene como resultado la formación de un anillo de ciclobutilo en el que están implicados los C-5 y C-6 de residuos adyacentes de pirimidina. Una reacción alternativa (a la derecha) tiene como resultado un fotoproducto 6-4, con un enlace entre el C-6 de un residuo y el C-4 del vecino. **(b)** La formación de un dímero de pirimidina de ciclobutano introduce un codo en el DNA.

El ácido nitroso, formado a partir de precursores orgánicos como nitrosaminas y sales de nitrito y nitrato, es un reactivo que acelera poderosamente la desaminación de las bases. El bisulfito tiene efectos similares. Ambos compuestos se usan como conservantes en alimentos preparados para evitar el crecimiento de bacterias tóxicas. Parece ser que su utilización no aumenta significativamente el riesgo de cáncer, probablemente porque las cantidades empleadas son pequeñas y su efecto sobre el DNA resulta despreciable.

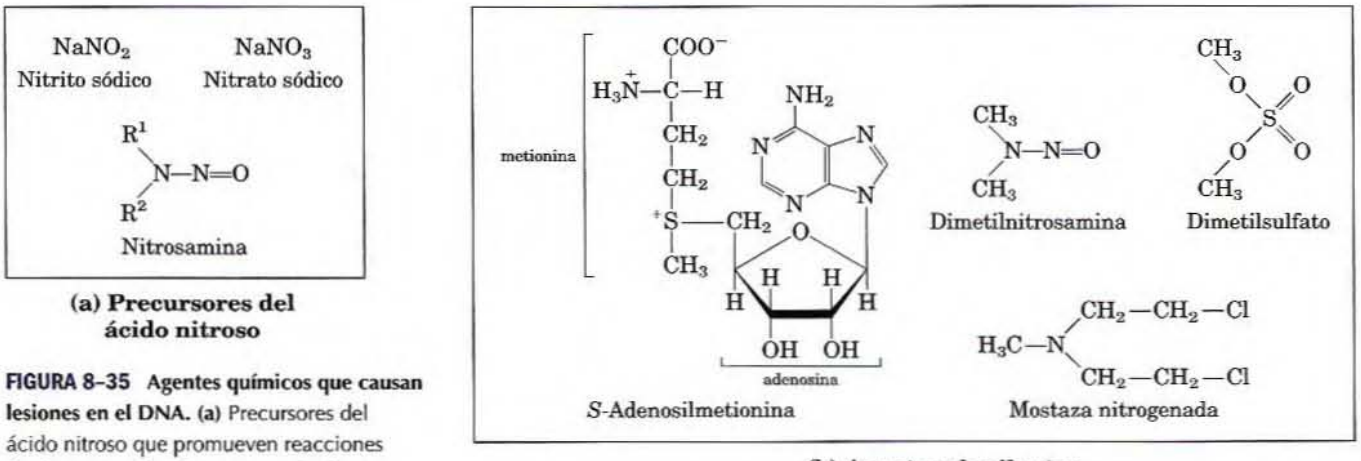
Los agentes alquilanes pueden alterar ciertas bases del DNA. Por ejemplo, el compuesto dimetilsulfato, muy reactivo (Fig. 8-35b), puede metilar un residuo de guanina y dar lugar a O^6-metilguanina, que no puede aparearse con la citosina.



Muchas reacciones similares son producidas por agentes alquilantes normalmente presentes en las células, como por ejemplo la *S*-adenosilmetionina.

Es posible que la fuente más importante de alteraciones mutagénicas en el DNA sean los procesos oxidativos. Las especies que contienen oxígeno reactivo, como el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y los radicales superóxido aparecen durante la irradiación o como productos secundarios del metabolismo aeróbico. De estas especies los radicales hidroxilo son responsables de la mayor parte de las lesiones oxidativas del DNA. Las células poseen un elaborado sistema de defensa para destruir las especies de oxígeno reactivas, del que forman parte enzimas tales como la catalasa y la superóxido dismutasa, que convierten especies de oxígeno reactivas en productos inocuos. Sin embargo, una fracción de estos agentes oxidantes escapa inevitablemente a las defensas celulares y se producen lesiones en el DNA, que resultan de un conjunto amplio y complejo de reacciones que van desde la oxidación de la desoxirribosa y de las bases hasta la rotura de las hebras. Todavía no se dispone de estimaciones exactas sobre el alcance de estas lesiones, pero está claro que el DNA de todas las células humanas está sometido cotidianamente a la acción de millares de reacciones oxidativas perjudiciales.

Lo que antecede es simplemente una muestra de las reacciones que lesionan el DNA mejor conocidas. Muchos compuestos cancerígenos presentes en la comida, el agua o el aire ejercen sus efectos a través de la modificación de las bases del



(a) Precursores del ácido nitroso

(b) Agentes alquilantes

FIGURA 8-35 Agentes químicos que causan lesiones en el DNA. (a) Precursores del ácido nitroso que promueven reacciones de desaminación. **(b)** Agentes alquilantes.

DNA. En la célula, sin embargo, la integridad del DNA como polímero se mantiene mejor que la del RNA o de las proteínas, gracias a que el DNA es la única macromolécula que posee sistemas bioquímicos de reparación. Estos procesos de reparación (descritos en el Capítulo 25) amortiguan en gran medida el impacto de las lesiones en la estructura del DNA.

Algunas bases del DNA están metiladas

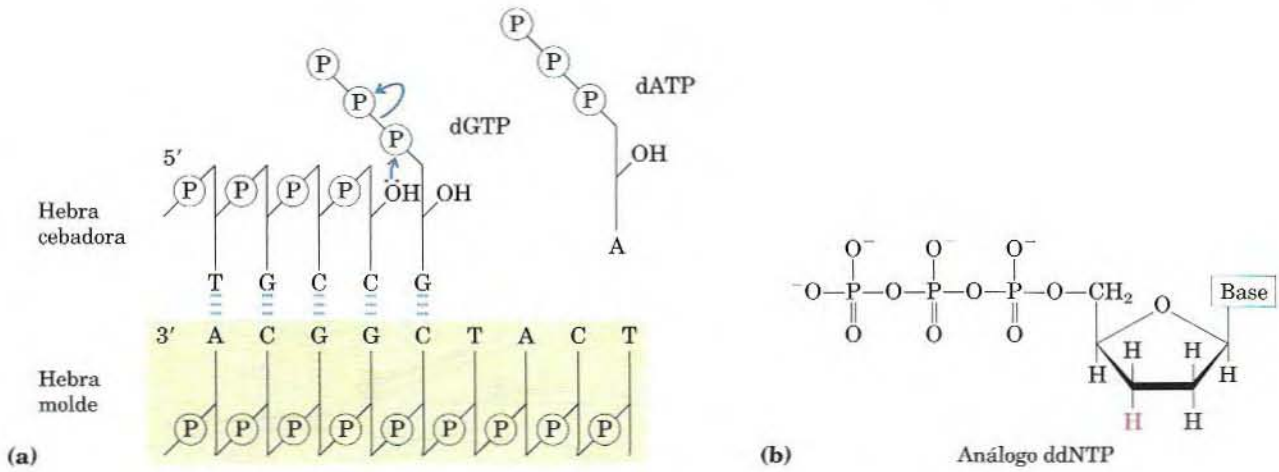
Algunas bases del DNA sufren con frecuencia metilación enzimática. La adenina y la citosina se encuentran metiladas con más frecuencia que la guanina y la timina. La metilación de estas bases suele restringirse a ciertas secuencias o regiones de la molécula de DNA. En algunos casos se conoce la función de la metilación; en otros es todavía desconocida. Todas las DNA metilasas conocidas utilizan *S*-adenosilmetionina como dador de grupos metilo. En *E. coli* existen dos sistemas de metilación principales. Uno de ellos actúa como parte de un mecanismo de defensa celular que ayuda a distinguir el DNA propio de la célula del DNA extraño marcando su propio DNA con grupos metilo y destruyendo el DNA (extraño) que no tiene grupos metilo (conocido como mecanismo de restricción-modificación, descrito en el Capítulo 9). El otro sistema metila los residuos de adenosina en la secuencia (5′)GATC(3′), convirtiéndola en N^6-metiladenosina (Fig. 8-5a). Este proceso está catalizado por la Dam metilasa (*D*NA *a*denine *m*ethylation), que funciona como parte de un sistema de reparación de pares de bases incorrectos formados ocasionalmente durante la replicación del DNA (véase Fig. 25-20).

En las células eucarióticas, aproximadamente el 5% de los residuos de citidina del DNA se encuentran metilados en forma de 5-metilcitidina (Fig. 8-5a). La metilación es muy frecuente en las secuencias CpG, lo que origina grupos metil-CpG simétricos en ambas hebras del DNA. El grado de metilación de las secuencias CpG varía en diferentes regiones del DNA eucariótico. La metilación suprime la migración de los segmentos de DNA llamados transposones o elementos transponibles, descritos en el Capítulo 25. La metilación de la citosina también tiene un significado estructural. La presencia de 5-metilcitosina en una secuencia CpG alternante aumenta considerablemente la tendencia de esta secuencia a adoptar la conformación Z.

Es posible determinar la secuencia de largas cadenas de DNA

La propiedad más importante del DNA como depositario de la información genética es su secuencia de nucleótidos. Hasta finales de la década de 1970, determinar la secuencia de un ácido nucleico de tan sólo cinco o diez nucleótidos era una tarea difícil y laboriosa. El desarrollo de dos nuevas técnicas en el año 1977, una por Alan Maxam y Walter Gilbert y la otra por Frederick Sanger, hizo posible la secuenciación de moléculas de DNA muy largas con una facilidad inimaginable hacía tan sólo unas pocas décadas. Estas técnicas se desarrollaron gracias a una mejor comprensión de la química de los nucleótidos y del metabolismo del DNA y se basan en métodos electroforéticos que permiten la separación de hebras de DNA que difieren en un solo nucleótido. La electroforesis de DNA es similar a la de proteínas (véase Fig. 3-19). Frecuentemente se utiliza poliacrilamida como matriz de los geles en el análisis de DNA cortos (hasta unos centenares de nucleótidos); para la separación de DNA más largos se emplea normalmente agarosa.

Tanto en el método de Sanger como en el de Maxam y Gilbert, el principio general consiste en generar cuatro grupos de fragmentos marcados. La reacción que da lugar a cada uno de los grupos es específica de base, de manera que las longitudes de los fragmentos corresponden a posiciones de la secuencia del DNA donde se halla una determinada base. Por ejemplo, en el caso de un oligonucleótido de secuencia pAATCGACT, marcado en el extremo 5′ (el extremo de la izquierda), una reacción que corte el DNA después de cada C generará dos fragmentos marcados de cuatro y siete nucleótidos, mientras que una reacción que corte el DNA después de cada G tan sólo generará un fragmento marcado de cinco nucleótidos. Al estar los fragmentos marcados radiactivamente en el extremo 5′, sólo se observarán los fragmentos del lado 5′ del corte. Los tamaños de los fragmentos corresponden a las posiciones relativas de los residuos C y G en la secuencia. Cuando se separan por elec-



troforesis en el mismo gel los grupos de fragmentos correspondientes a cada una de las cuatro bases, se produce un "escalonado" de bandas a partir del cual puede leerse directamente la secuencia de bases (Fig. 8-36). Mostramos solamente el método de Sanger porque es de uso más general y es técnicamente más sencillo. Este método requiere la síntesis enzimática de una hebra de DNA complementaria a la hebra analizada, usando

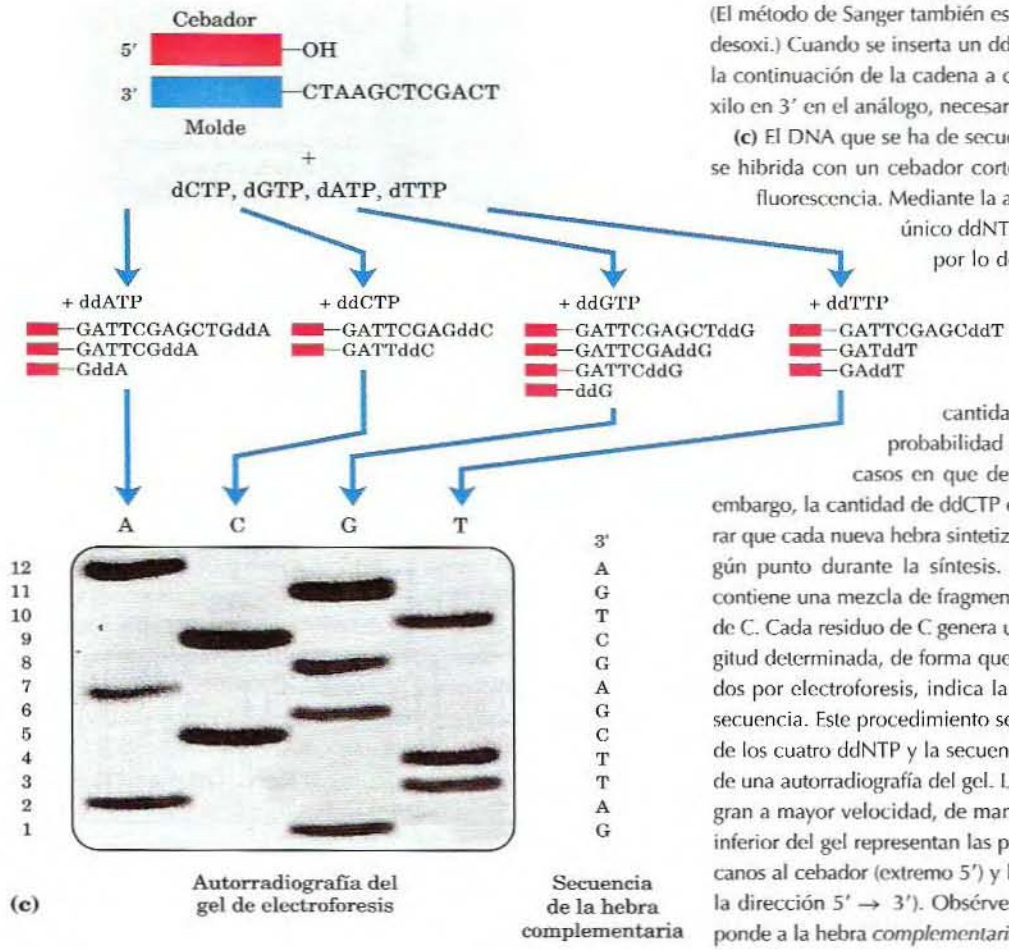


FIGURA 8-36 Secuenciación del DNA por el método de Sanger. Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA por las DNA polimerasas (Capítulo 25). **(a)** Las DNA polimerasas requieren un cebador (un oligonucleótido corto) al que añadir los nucleótidos y una hebra molde que dirija la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos que han de incorporarse a la secuencia. En las células, el grupo hidroxilo en 3′ del cebador reacciona con el desoxinucleósido trifosfato entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. **(b)** El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) para interrumpir la síntesis del DNA. (El método de Sanger también es conocido como el método de los didesoxi.) Cuando se inserta un ddNTP en lugar de un dNTP se detiene la continuación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3′ en el análogo, necesario para la siguiente reacción. **(c)** El DNA que se ha de secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto, marcado con radiactividad o con fluorescencia. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, a una reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán su crecimiento en algunas posiciones en las que normalmente se encuentre dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP en relación a ddCTP, la probabilidad de que se incorpore el análogo en los casos en que deba incorporarse dC es pequeña. Sin embargo, la cantidad de ddCTP es suficientemente grande para asegurar que cada nueva hebra sintetizada incorpore al menos un ddC en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos marcados acabados en un residuo de C. Cada residuo de C genera un conjunto de fragmentos de una longitud determinada, de forma que el tamaño de los fragmentos, separados por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los cuatro ddNTP y la secuencia puede leerse directamente a partir de una autorradiografía del gel. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, de manera que los más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de los nucleótidos más cercanos al cebador (extremo 5′) y la secuencia se lee de abajo arriba (en la dirección 5′ → 3′). Obsérvese que la secuencia obtenida corresponde a la hebra *complementaria* a aquella que está siendo analizada.

un "cebador" que está marcado radiactivamente y didesoxinucleótidos.

La secuenciación del DNA se realiza actualmente de modo automático, mediante una variante del método de Sanger, en la cual los didesoxinucleótidos utilizados en cada reacción están marcados con fluoróforos que emiten luz de diferente color (Fig. 8-37). Esta tecnología permite obtener secuencias de miles de nucleótidos en unas pocas horas. Se han secuenciado los genomas completos de muchos organismos (véase Tabla 1-4) y en la actualidad se está trabajando en proyectos de secuenciación de DNA a gran escala. El más ambicioso de estos programas es el Proyecto Genoma Humano, que ha permitido determinar la secuencia de los tres mil doscientos millones de pares de bases del DNA de una célula humana (Capítulo 9).

Secuenciación del DNA por el método de los didesoxi

La síntesis química de DNA ha sido automatizada

Otra de las tecnologías que ha favorecido el progreso de la bioquímica es la síntesis química de oligonucleótidos de cualquier secuencia. H. Gobind Khorana y colaboradores fueron los primeros en desarrollar la metodología química necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos en la década de 1970. El perfeccionamiento y la automatización de estos métodos han hecho posible la síntesis rápida y precisa de hebras de DNA. Esta síntesis se lleva a cabo con la cadena en crecimiento unida a un soporte sólido (Fig. 8-38) y se basa en principios similares a los empleados por Merrifield para la síntesis de péptidos (véase Fig. 3-29). La eficiencia de cada paso de adición es muy elevada, lo que hace posible sintetizar rutinariamente polímeros de 70 u 80 nucleótidos en el laboratorio y en algunos laboratorios cadenas mucho más largas. La posibilidad de disponer de polímeros de DNA con secuencias previamente diseñadas y a precios relativamente asequibles está teniendo un gran impacto en todas las áreas de la bioquímica (Capítulo 9).

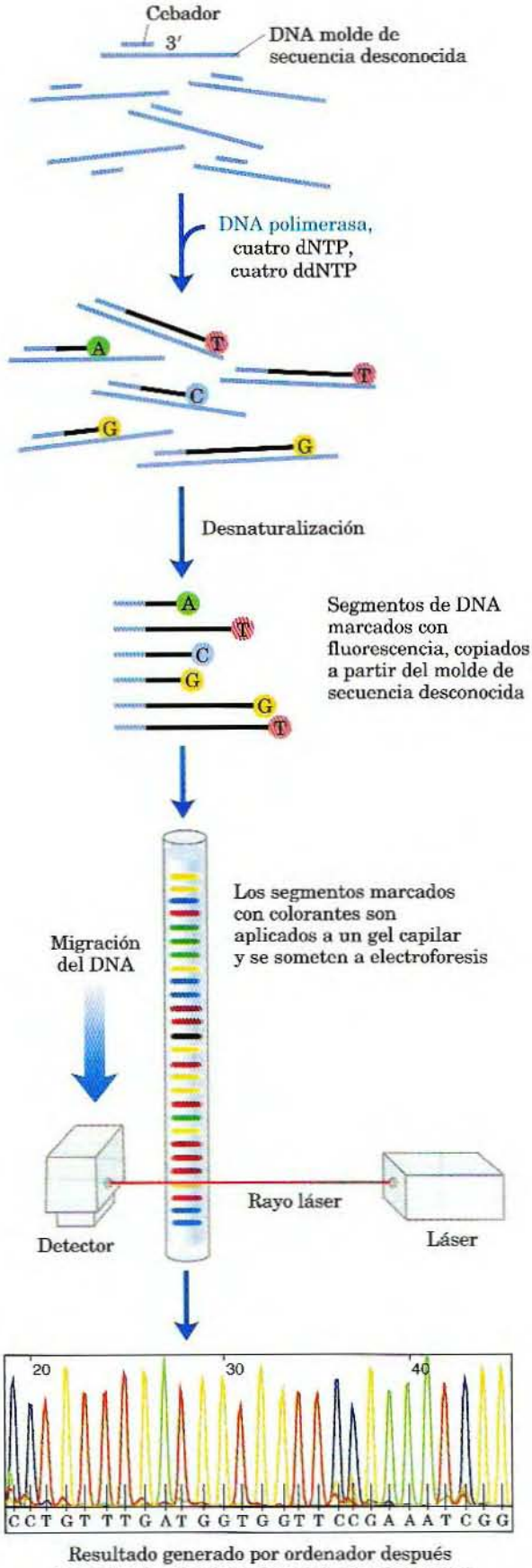


FIGURA 8-37 Una estrategia para la automatización de las reacciones de secuenciación del DNA. Cada didesoxinucleótido usado como cebador para la síntesis de DNA en el método de Sanger puede unirse a una molécula fluorescente que confiere a todos los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los cuatro ddNTP se añaden a un único tubo. Los fragmentos de DNA coloreado resultantes se separan a continuación por tamaño mediante electroforesis en un único gel contenido en un tubo capilar (una modalidad electroforética que permite separaciones más rápidas). Todos los fragmentos de una longitud determinada migran a través del gel en un solo pico y el color asociado a cada uno de ellos se detecta utilizando un rayo láser. La secuencia del DNA se lee a partir de la secuencia de los colores de los picos a medida que van pasando por el detector y la información obtenida se envía directamente a un ordenador que determina la secuencia.

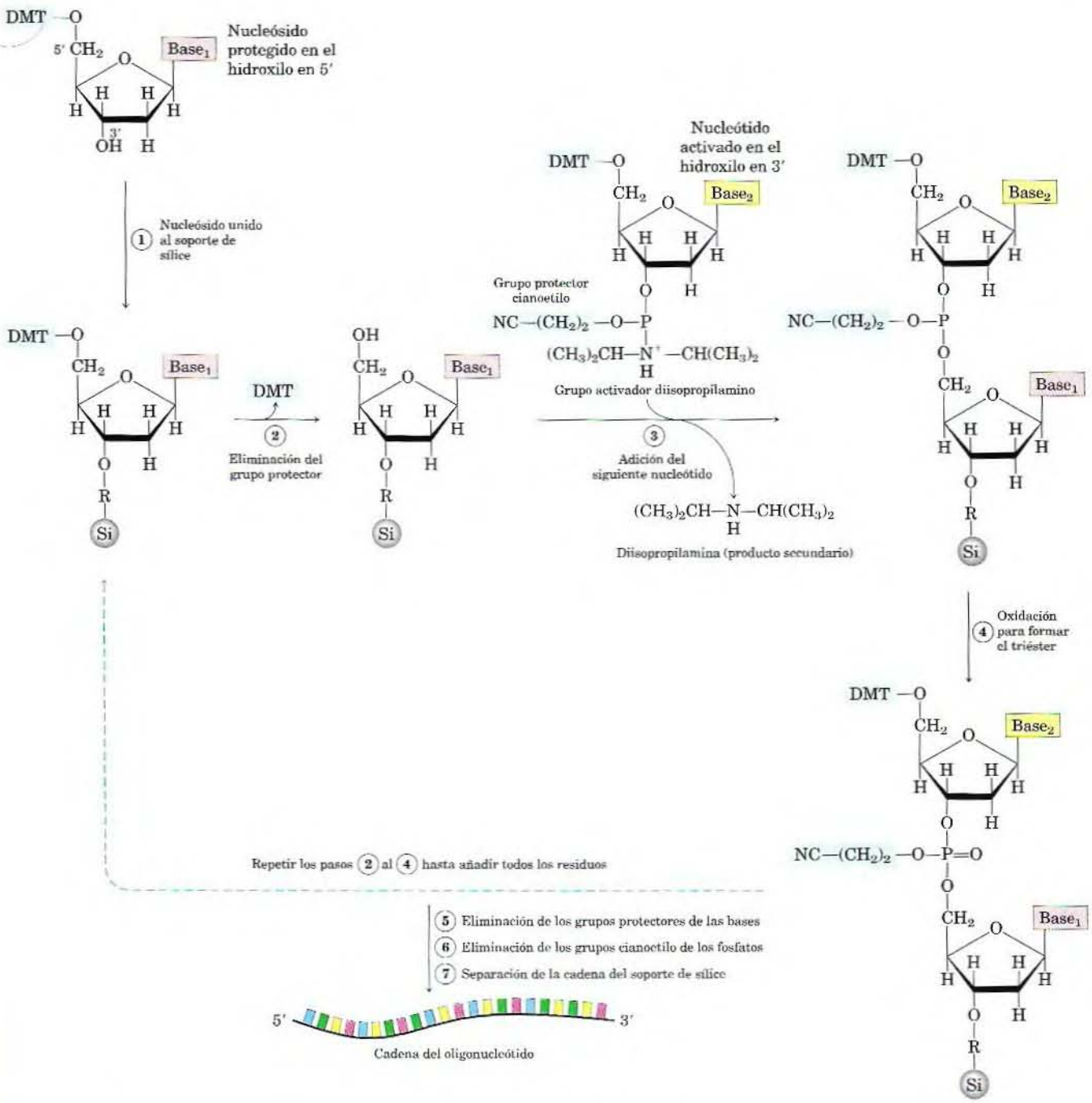


FIGURA 8-38 Síntesis química de DNA. La síntesis automatizada de DNA es conceptualmente análoga a la síntesis de polipéptidos sobre un soporte sólido. El oligonucleótido deseado se construye sobre un soporte sólido (sílice) nucleótido a nucleótido mediante la repetición de una serie de reacciones químicas con los precursores de los nucleótidos adecuadamente protegidos. (1) El primer nucleótido (que será el extremo 3′) se une al soporte de sílice por el grupo hidroxilo en 3′ (a través de un grupo de unión, R) y su grupo hidroxilo en 5′ está protegido por un grupo ácido lábil, el dimetoxitritilo (DMT). Los grupos reactivos de las bases también están protegidos químicamente. (2) El grupo protector DMT es eliminado mediante lavado con ácido (el grupo DMT tiene color, de manera que la reacción puede seguirse espectrofotométricamente). (3) El siguiente nucleótido es activado con un grupo diisopropilamino y se hace reaccionar con el nucleótido unido para dar lugar a un enlace 5′,3′, que en el paso (4) es oxidado con yodo para generar un enlace fosfotriéster. (Uno de los oxígenos del fosfato lleva un grupo protector cianoetilo.) Las reacciones (2) a (4) se repiten hasta añadir todos los nucleótidos. En cada paso el exceso de nucleótido es eliminado con anterioridad a la adición del siguiente. En los pasos (5) y (6) se eliminan los grupos bloqueantes de las bases y de los fosfatos, y en el paso (7) se separa el oligonucleótido del soporte sólido y finalmente se purifica. La síntesis química de RNA es algo más compleja a causa de la necesidad de proteger el grupo hidroxilo en 2′ de la ribosa sin que se produzcan efectos adversos en la reactividad del grupo hidroxilo en 3′.

RESUMEN 8.3 Química de los ácidos nucleicos

- El DNA nativo se desenrolla y sus hebras se separan reversiblemente (fusión) por efecto del calor o los pH extremos. Los DNA ricos en pares G≡C tienen temperaturas de fusión superiores a las del DNA rico en pares A=T.
- Los DNA de cadena sencilla desnaturalizados pueden formar dúplex híbridos, cuyo grado de hibridación depende del grado de similitud de las secuencias. La hibridación es la base de importantes técnicas para el estudio y aislamiento de genes específicos y RNA.
- El DNA es un polímero relativamente estable. Reacciones espontáneas, tales como la desaminación de ciertas bases, la hidrólisis de los enlaces base-azúcar *N*-glucosídicos, la formación de dímeros de pirimidina inducida por radiación y el daño oxidativo, ocurren muy lentamente; sin embargo, son importantes por la baja tolerancia de las células a los cambios en el material genético.
- Se puede determinar la secuencia del DNA y se pueden sintetizar polímeros de DNA mediante protocolos simples automatizados que incorporan métodos químicos y enzimáticos.

8.4 Otras funciones de los nucleótidos

Además de las funciones que les corresponden como subunidades de los ácidos nucleicos, los nucleótidos también desempeñan otras funciones en la célula: actúan como transportadores de energía, componentes de cofactores enzimáticos y mensajeros químicos.

Los nucleótidos transportan energía química en las células

Los ribonucleótidos pueden presentar uno, dos o tres grupos fosfato unidos covalentemente al grupo hidroxilo en 5′ de la ribosa. Se los conoce como nucleósidos mono-, di- y trifosfato,

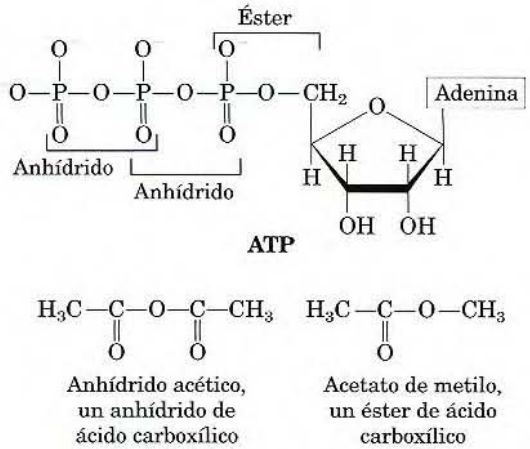
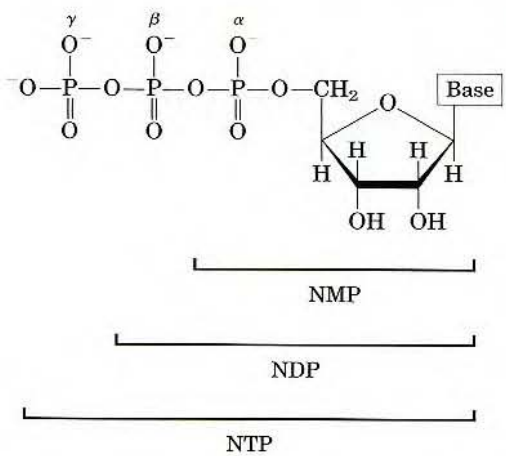


FIGURA 8-40 Los enlaces éster fosfato y anhídrido de ácido fosfórico del ATP. La hidrólisis de un enlace anhídrido libera más energía que la hidrólisis de un éster. Como comparación, se muestran un anhídrido y un éster de un ácido carboxílico.

respectivamente (Fig. 8-39). Partiendo de la ribosa, los tres grupos fosfato se suelen denominar α, β y γ. La hidrólisis de los nucleósidos trifosfato proporcionan la energía química para impulsar una amplia variedad de reacciones celulares. La adenosina 5′-trifosfato, ATP, es, con diferencia, el más ampliamente utilizado, aunque el UTP, el GTP y el CTP también se emplean en reacciones específicas. Los nucleósidos trifosfato también actúan como precursores activados en la síntesis de DNA y RNA, tal como se verá en los Capítulos 25 y 26.

La hidrólisis del ATP y otros nucleósidos trifosfato es una reacción que libera energía como consecuencia de la estructura química del grupo trifosfato. El enlace entre la ribosa y el fosfato α es de tipo éster. Los enlaces α,β y β,γ son anhídridos de ácido fosfórico (Fig. 8-40). La hidrólisis del enlace éster libera aproximadamente 14 kJ/mol en condiciones estándar, mientras que la de cada uno de los enlaces anhídrido libera aproximadamente 30 kJ/mol. La hidrólisis del ATP a menudo juega un importante papel termodinámico en las biosíntesis. Cuando se acopla con una reacción que presenta una variación de energía libre positiva, la hidrólisis del ATP desplaza el equilibrio del proceso global en favor de la formación de producto (recuérdese la



Abreviaturas de los ribonucleósidos 5′-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	AMP	ADP	ATP
Guanina	GMP	GDP	GTP
Citosina	CMP	CDP	CTP
Uracilo	UMP	UDP	UTP

Abreviaturas de los desoxirribonucleósidos 5′-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	dAMP	dADP	dATP
Guanina	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina	dCMP	dCDP	dCTP
Timina	dTMP	dTDP	dTTP

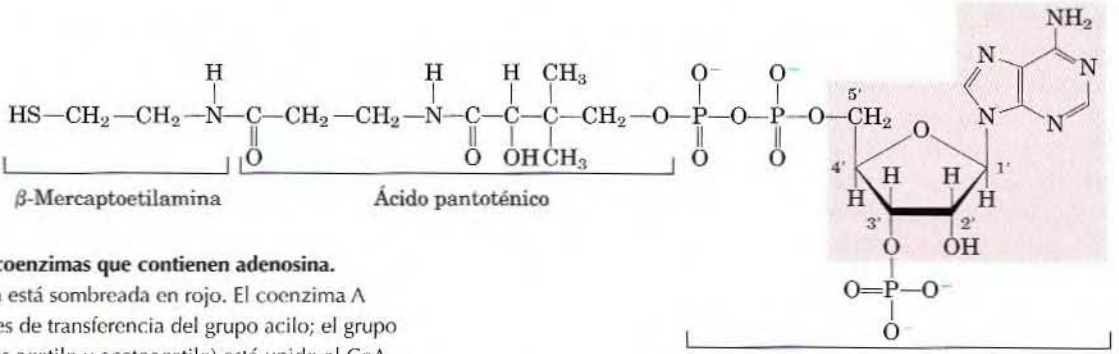
FIGURA 8-39 Nucleósidos fosfato. Estructura general de los nucleósidos 5′-mono-, di- y trifosfato (NMP, NDP y NTP) y sus abreviaturas estándar. La pentosa es 2′-desoxi-D-ribosa en los desoxirribonucleósidos fosfato (dNMP, dNDP y dNTP).

relación entre la constante de equilibrio y la variación de energía libre descrita por la Ec. 6-3 de la p. 195).

Los nucleótidos de adenina forman parte de muchos cofactores enzimáticos

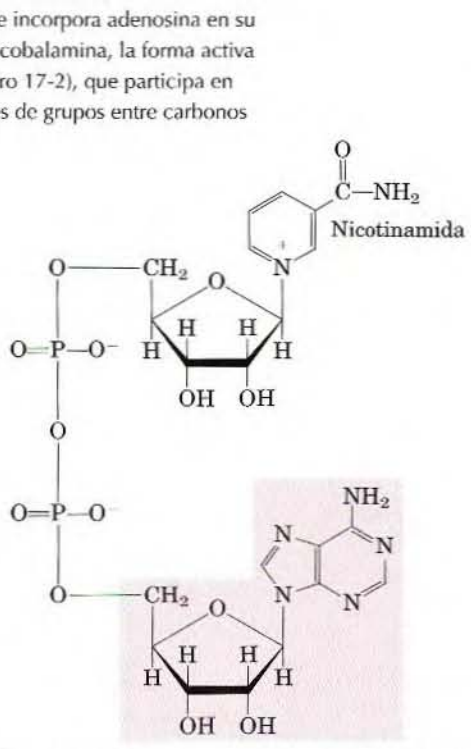
Un buen número de cofactores enzimáticos que llevan a cabo una amplia gama de funciones químicas incluyen la adenosina como parte de su estructura (Fig. 8-41). No tienen ninguna relación estructural entre ellos, aparte de la presencia de adenosina. En ninguno de ellos la porción de adenosina de la molécula participa directamente en su función primaria, pero si se elimina la adenosina de sus estructuras el resultado suele ser una drástica reducción de su actividad. Por ejemplo, la eliminación del nucleótido de adenina (3′-fosfoadenosina difosfato) del acetoacetil-CoA, el derivado del acetoacetato con el coenzima A, reduce su reactividad como sustrato de la β-cetoacil-CoA transferasa (un enzima del metabolismo lipídico) en un factor de 10^6. Aunque el papel de la adenosina no se ha estudiado en detalle, con seguridad tiene relación con la energía de unión entre el enzima y el sustrato (o cofactor), que está implicada tanto en la catálisis como en la estabilización del complejo enzima-sustrato inicial (Capítulo 6). En el caso de la β-cetoacil-CoA transferasa, el nucleótido parece actuar como un "asidero" de fijación que ayuda a tirar del sustrato (acetoacetil-CoA) para colocarlo en el interior del sitio activo. Es posible describir funciones parecidas para las porciones de nucleósido de otros cofactores nucleótidos.

Podemos preguntarnos ¿por qué se usa adenosina en estas estructuras en lugar de otra molécula de gran tamaño? La respuesta puede estar relacionada con cuestiones de economía evolutiva. Ciertamente, la adenosina no es la única molécula

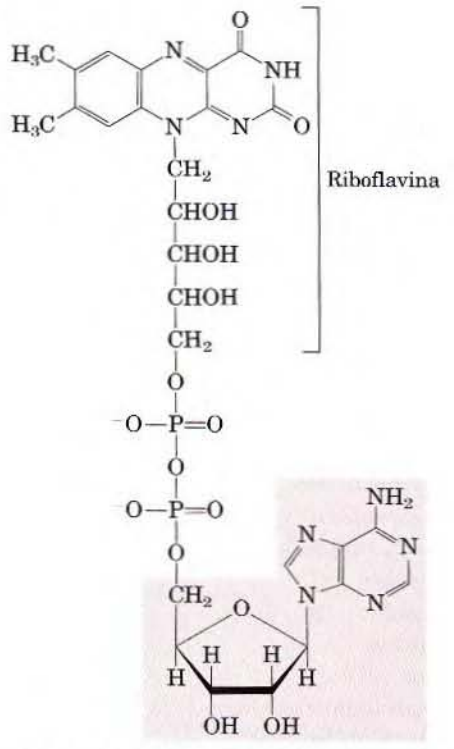


Coenzima A

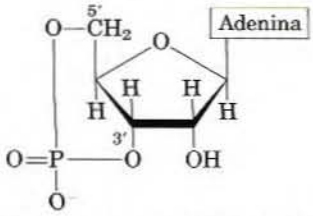
FIGURA 8-41 Algunos coenzimas que contienen adenosina. La fracción de adenosina está sombreada en rojo. El coenzima A (CoA) actúa en reacciones de transferencia del grupo acilo; el grupo acilo (tal como los grupos acetilo y acetoacetilo) está unido al CoA a través de un enlace tioéster en la porción β-mercaptoetilamina. El NAD^+ participa en la transferencia de hidruros y el FAD, la forma activa de la vitamina B_2 (riboflavina), en la transferencia de electrones. Otro coenzima que incorpora adenosina en su estructura es la 5′-desoxiadenosilcobalamina, la forma activa de la vitamina B_{12} (véase Recuadro 17-2), que participa en las transferencias intramoleculares de grupos entre carbonos adyacentes.



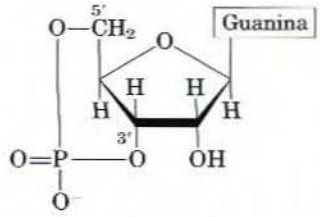
Nicotinamina adenina dinucleótido (NAD^+)



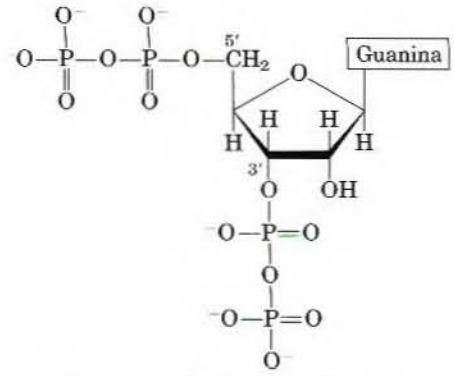
Flavina adenina dinucleótido (FAD)



Adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico
(AMP cíclico, cAMP)



Guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico
(GMP cíclico, cGMP)



Guanosina 5′-difosfato-3′-difosfato
(guanosina tetrafosfato)
(ppGpp)

FIGURA 8-42 Tres nucleótidos reguladores.

que puede aportar una cantidad suficiente de energía potencial de unión. Es posible que la importancia de la adenosina radique no tanto en alguna característica química concreta cuanto en la ventaja evolutiva de usar un compuesto con múltiples funciones. Una vez el ATP se convirtió en la fuente universal de energía química, los sistemas evolucionaron para sintetizar ATP con mayor eficiencia que otros nucleótidos; puesto que el ATP es abundante, resulta lógica su elección como parte de una amplia variedad de estructuras. Esta economía se hace extensiva a la estructura de las proteínas. Un único dominio proteico capaz de fijar adenosina puede utilizarse en una amplia variedad de enzimas diferentes. Este tipo de estructura, denominada **plegamiento de unión de nucleótidos,** se encuentra en muchos enzimas que unen ATP y cofactores nucleotídicos.

Algunos nucleótidos son moléculas reguladoras

Las células responden a su entorno exterior captando señales hormonales y de otro tipo. La interacción de estas señales químicas extracelulares ("primeros mensajeros") con los receptores de la superficie celular suele promover la producción de **segundos mensajeros** en el interior de la célula, que, por su parte, provocan cambios adaptativos en el interior de la célula (Capítulo 12). El segundo mensajero es a menudo un nucleótido (Figura 8-42). Uno de los más comunes es la **adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico** (**AMP cíclico** o **cAMP**), que se forma a partir del ATP, en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, asociada a la cara interna de la membrana plasmática. El AMP cíclico tiene funciones reguladoras en prácticamente todas las células que no pertenezcan al reino vegetal. El nucleótido guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP) se encuentra en muchas células y tiene también funciones reguladoras.

Otro nucleótido regulador, el ppGpp (Fig. 8-42), se produce en las bacterias como respuesta a la disminución de la síntesis proteica provocada por la eliminación de los aminoácidos del medio de cultivo. Este nucleótido inhibe la síntesis de las moléculas de rRNA y tRNA (véase Fig. 28-24), necesarias para la síntesis proteica, evitando así la producción innecesaria de ácidos nucleicos.

RESUMEN 8.4 Otras funciones de los nucleótidos

- El ATP es el portador central de energía química en las células. La presencia de la adenosina como parte de una variedad de cofactores enzimáticos puede estar relacionada con los requerimientos energéticos de la interacción.
- El AMP cíclico, formado a partir de ATP en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, es un segundo mensajero común producido en respuesta a hormonas u otras señales químicas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

gen 273
RNA ribosómico (rRNA) 273
RNA mensajero (mRNA) 273
RNA de transferencia (tRNA) 273
nucleótido 273
nucleósido 273
pirimidina 273
purina 273
desoxirribonucleótidos 274
ribonucleótido 274
enlace fosfodiéster 277
extremo 5′ 277
extremo 3′ 277
oligonucleótido 278
polinucleótido 278
par de bases 279
surco mayor 282
surco menor 282
forma B del DNA 284
forma A del DNA 284
forma Z del DNA 284
palíndromo 285
horquilla 285
cruciforme 285
DNA tríplex 286
tetráplex de G 287
DNA H 287
mRNA monocistrónico 287
mRNA policistrónico 288
mutación 293
segundo mensajero 302
adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (AMP cíclico, cAMP) 302

Bibliografía

General

Chang, K.Y. & Varani, G. (1997) Nucleic acids structure and recognition. *Nat. Struct. Biol.* **4** (supl.), 854–858.
Describe la aplicación de la RMN a la determinación de la estructura de los ácidos nucleicos.

Friedberg, E.C., Walker, G.C. & Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, W. H. Freeman and Company, New York.
Una buena fuente de información suplementaria sobre la química de los nucleótidos y los ácidos nucleicos.

Hecht, S.M. (ed.) (1996) *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, Oxford.
Una muy útil colección de artículos.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2.ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.
El mejor punto de partida para profundizar en el estudio de la estructura del DNA.

Sinden, R.R. (1994) *DNA Structure and Function*, Academic Press, Inc., San Diego.
Una interesante discusión de muchos de los temas tratados en este capítulo.

Referencias históricas

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, ed. ampliada, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Olby, R.C. (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.

Sayre, A. (1978) *Rosalind Franklin and DNA*, W. W. Norton & Co., Inc., New York.

Watson, J.D. (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, Atheneum, New York. [Edición en rústica, Touchstone Books, 2001.]

Variaciones de la estructura del DNA

Frank-Kamenetskii, M.D. & Mirkin, S.M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 65–95.

Herbert, A. & Rich, A. (1996) The biology of left-handed Z-DNA. *J. Biol. Chem.* **271,** 11,595–11,598.

Htun, H. & Dahlberg, J.E. (1989) Topology and formation of triple-stranded H-DNA. *Science* **243,** 1571–1576.

Keniry, M.A. (2000) Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* **56,** 123–146.
Excelente resumen de las propiedades estructurales de los cuadrúplex.

Moore, P.B. (1999) Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68,** 287–300.

Shafer, R.H. (1998) Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59,** 55–94.

Wells, R.D. (1988) Unusual DNA structures. *J. Biol. Chem.* **263,** 1095–1098.
Minirrevisión; un resumen conciso.

Química de los ácidos nucleicos

Collins, A.R. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21,** 238–246.

Marnett, L.J. & Plastaras, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* **17,** 214–221.

El ATP como transportador de energía

Jencks, W.P. (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52,** 65–73.
Un artículo relativamente corto, muy clarificador.

Problemas

1. Estructura de nucleótidos ¿Cuáles son las posiciones en un anillo de purina de un nucleótido purínico que poseen el potencial para formar enlaces de hidrógeno, pero que no los forman en los pares de bases de Watson y Crick?

2. Secuencia de bases de hebras de DNA complementarias Una hebra de un DNA en doble hélice tiene la secuencia (5′)GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3′). Escribir la secuencia de bases de la hebra complementaria. ¿Qué tipo especial de secuencia contiene este fragmento de DNA? ¿Puede la doble cadena de DNA formar estructuras alternativas?

3. El DNA del cuerpo humano Calcular el peso, expresado en gramos, de una molécula de DNA de doble hebra que se extendiera de la Tierra a la luna (~320.000 km). La doble hélice de DNA pesa aproximadamente 1×10^{-18} g por cada 1000 pares de nucleótidos; cada par de bases tiene 3,4 Å. Para establecer una comparación interesante, ¡pensar que el cuerpo humano contiene aproximadamente 0,5 g de DNA!

4. Curvatura del DNA Suponer que un fragmento de poli(A) de cinco pares de bases produce una curvatura en una hebra del DNA de aproximadamente 20°. Calcular la curvatura total (neta) producida en el DNA si los pares de bases del centro (el tercero de cinco) de dos fragmentos sucesivos de $(dA)_5$ se sitúan a (a) 10 pares de bases o (b) 15 pares de bases de distancia. Suponer que hay 10 pares de bases por vuelta en la doble hélice del DNA.

5. Diferencias entre la estructura del DNA y la del RNA Las secuencias palindrómicas de RNA o DNA de cadena simple pueden formar estructuras en horquilla. ¿En qué se diferencian las estructuras helicoidales en una horquilla larga y completamente apareada (excepto en los extremos) del RNA y del DNA?

6. Química de los nucleótidos En las células de muchos organismos eucarióticos existen sistemas altamente especializados para reparar específicamente los errores de aparea-

miento G-T en el DNA. El error de apareamiento se repara creando un nuevo par de bases G≡C (no A=T). La reparación del apareamiento erróneo G-T actúa al mismo tiempo que un sistema más general que repara prácticamente todos los errores de apareamiento. ¿Puede proponer una razón para explicar que las células necesiten un sistema especializado para reparar los errores de apareamiento G-T?

7. Estructura de los ácidos nucleicos Explique por qué aumenta la absorción de luz UV (efecto hipercrómico) al desnaturalizar el DNA.

8. Determinación de la concentración de proteína en una disolución que contiene proteínas y ácidos nucleicos La concentración de proteína o de ácido nucleico en una disolución que contenga ambos componentes puede estimarse aprovechando sus distintas propiedades de absorción de la luz. Las proteínas presentan una fuerte absorción a 280 nm, mientras que los ácidos nucleicos absorben la luz con más intensidad a 260 nm. Cuando en una disolución se hallan presentes proteínas y ácidos nucleicos, es posible estimar sus concentraciones respectivas midiendo la absorbancia (A) de la disolución a 280 nm y 260 nm y utilizando la tabla adjunta. La tabla indica el porcentaje de masa total que corresponde al ácido nucleico en función de $R_{280/260}$, la relación de absorbancias a 280 y 260 nm. El factor, F, permite corregir la lectura de A_{280} para obtener una mejor estimación de la concentración de proteína. La concentración de proteína (en mg/mL) es igual a $F \times A_{280}$ (suponiendo que la cubeta tenga 1 cm de paso de luz). Calcular las concentraciones de proteína y de ácido nucleico si $A_{280} = 0{,}69$ y $A_{260} = 0{,}94$.

$R_{280/260}$	Proporción de ácido nucleico (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

9. Apareamiento de las bases del DNA En dos muestras de DNA aisladas a partir de dos especies no identificadas de bacterias, X e Y, los porcentajes de adenina sobre el total de bases son 32% y 17% respectivamente, ¿Cuáles son las proporciones relativas de adenina, guanina, timina y citosina que esperaría encontrar en las dos muestras de DNA? ¿En qué supuestos se basa? Una de las bacterias se aisló de un manantial termal (64 °C). Sugiera qué especie corresponde a la bacteria termófila. ¿En qué se fundamenta su respuesta?

10. Solubilidad de los componentes del DNA Dibuje las siguientes estructuras y ordénelas según su solubilidad relativa en agua (de más soluble a menos soluble): desoxirribosa, guanina, fosfato. ¿Por qué están estas solubilidades en consonancia con la estructura tridimensional del DNA de doble cadena?

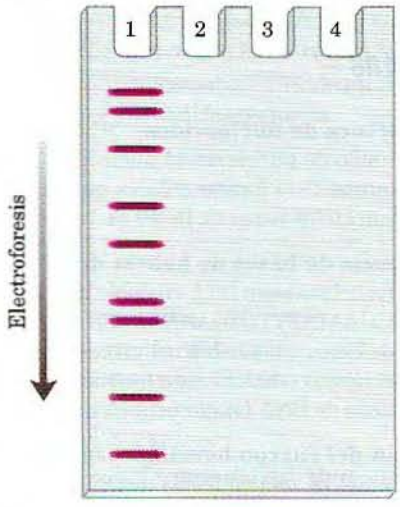
11. Secuenciación del DNA El siguiente fragmento de DNA fue secuenciado por el método de Sanger. El asterisco representa un marcador fluorescente.

*5′ —— 3′-OH
3′ —— ATTACGCAAGGACATTAGAC—5′

Una muestra de DNA fue tratada con DNA polimerasa y con cada una de las mezclas de nucleótidos (en un tampón apropiado) indicadas a continuación. Los didesoxinucleótidos (ddNTP) fueron añadidos en cantidades relativamente pequeñas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

El DNA resultante fue separado por electroforesis en gel de agarosa y las bandas fluorescentes localizadas. Se muestra el patrón de bandas obtenido con la mezcla de nucleótidos 1. Suponiendo que todas las mezclas fuesen analizadas en el mismo gel, ¿qué apariencia tendrían los restantes carriles?



12. Fosfodiesterasa de veneno de serpiente Una exonucleasa es un enzima que separa nucleótidos de forma se-

cuencial a partir del extremo de una cadena polinucleotídica. La fosfodiesterasa de veneno de serpiente, que hidroliza nucleótidos desde el extremo 3′ de cualquier oligonucleótido que tenga un grupo 3′ hidroxilo libre, corta entre el 3′ hidroxilo de la ribosa o desoxirribosa y el grupo fosforilo del siguiente nucleótido. Actúa tanto sobre DNA de cadena sencilla como sobre RNA y no presenta especificidad de base. Este enzima se utilizó en la determinación de secuencias antes del desarrollo de las técnicas modernas de secuenciación de ácidos nucleicos. ¿Cuáles son los productos de la digestión parcial por la fosfodiesterasa de veneno de serpiente de un oligonucleótido con la siguiente secuencia?

(5′)GCGCCAUUGC(3′)–OH

13. Conservación del DNA en las endosporas bacterianas Las endosporas bacterianas se forman cuando el ambiente ya no es adecuado para el mantenimiento del metabolismo celular activo. La bacteria del suelo *Bacillus subtilis*, por ejemplo, empieza el proceso de esporulación cuando se han agotado uno o más nutrientes. El producto final es una pequeña estructura metabólicamente inactiva que puede sobrevivir casi indefinidamente sin metabolismo detectable. Las esporas tienen mecanismos para impedir la acumulación de mutaciones potencialmente letales en su DNA durante períodos de latencia superiores a los 1000 años. Las esporas de *Bacillus subtilis* son mucho más resistentes al calor, radiación UV y agentes oxidantes, todos los cuales provocan mutaciones, que las células en crecimiento.

(a) Un factor que impide la lesión potencial del DNA en las esporas es la gran disminución de su contenido en agua. ¿De qué modo afectaría la deshidratación a algunos tipos de mutaciones?

(b) Las endosporas contienen una clase de proteínas denominadas pequeñas proteínas ácido-solubles (SASP) que se unen a su DNA impidiendo la formación de dímeros de tipo ciclobutano. ¿Qué produce los dímeros de ciclobutano y por qué necesitan las endosporas mecanismos para impedir su formación?

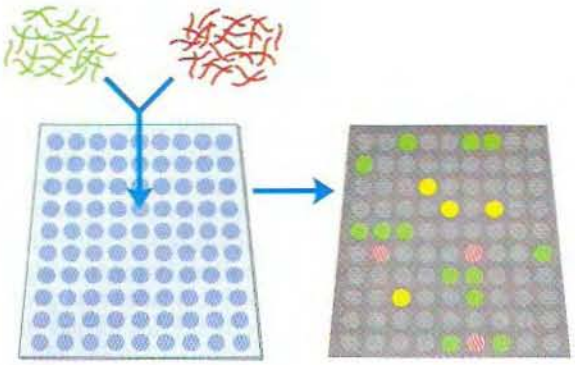
Bioquímica en Internet

14. La estructura del DNA El descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA ayudó a los investigadores a comprender cómo transmite esta molécula información que se puede replicar fielmente de una generación a la siguiente. Para ver la estructura secundaria del DNA de doble cadena vaya a la página web del Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). Utilice los identificadores del PDB indicados más adelante para bajar las páginas de datos de las dos formas de DNA. Abra las estructuras utilizando RasMol o Chime y utilice las diferentes opciones de visualización para completar los ejercicios siguientes.

(a) Obtenga el archivo 141D, que contiene una secuencia de DNA altamente conservada y repetida del extremo del genoma del VIH-1 (el virus que causa el sida). Muestre la molécula en forma de estructura de varillas o de bolas y varillas. Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. Localice e identifique las bases individuales. ¿Cuál es el extremo 5′ de esta molécula? Localice los surcos mayor y menor. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

(b) Obtenga el archivo 145D correspondiente a un DNA en la conformación Z. Muestre la molécula en forma de estructura de bolas y varillas. Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

(c) Para apreciar en su totalidad la estructura secundaria del DNA seleccione "Stereo" en el menú Options del visor. Verá dos imágenes de la molécula de DNA. Permanezca sentado con la nariz a unos 25 cm de la pantalla y enfoque la vista en la punta de la nariz. En el fondo tendría que ver tres imágenes de la hélice de DNA. Desplace el enfoque desde la punta de la nariz a la imagen central, que debería aparecer en forma tridimensional. Para más posibilidades consulte la Study Guide o la web del libro de texto (www.whfreeman.com/lehninger).



capítulo 9

TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN BASADAS EN EL DNA

9.1 Clonación del DNA: fundamentos *306*
9.2 De los genes a los genomas *317*
9.3 De los genomas a los proteomas *325*
9.4 Modificaciones de los genomas y nuevos productos biotecnológicos *330*

De todos los sistemas naturales, la materia viva es el que, frente a grandes transformaciones, conserva en su organización la parte más grande de su pasado histórico.

—Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, artículo en el Journal of Theoretical Biology, *1965*

En este capítulo nos ocupamos de una tecnología fundamental para el progreso de la biología moderna, definiendo las presentes y futuras fronteras de la bioquímica y explicando muchos principios importantes de la bioquímica. El descubrimiento de las leyes que gobiernan la catálisis enzimática, las estructuras macromoleculares, el metabolismo celular y las rutas de la información permite que la investigación afronte procesos bioquímicos cada vez más complejos. La división celular, la inmunidad, la embriogénesis, la vista, el gusto, la oncogénesis, la percepción, son procesos orquestados por un conjunto de interacciones moleculares y macromoleculares cada vez mejor conocidas. Las verdaderas implicaciones de la exploración bioquímica emprendida en el siglo XIX hay que buscarlas en la cada vez mayor capacidad para comprender y modificar los sistemas vivos.

La metodología bioquímica para comprender un proceso biológico complejo consiste en el aislamiento y estudio in vitro de sus componentes, para después juntar las distintas partes con la intención de lograr una visión coherente de la totalidad del proceso. Una de las principales fuentes de información sobre los procesos moleculares es el archivo de información de la célula, su DNA. Sin embargo, el gran tamaño de los cromosomas celulares es un enorme desafío: ¿cómo se puede encontrar y estudiar un gen particular entre las decenas de miles de genes distribuidos entre los miles de millones de pares de bases del genoma de un mamífero? Las soluciones empezaron vislumbrarse en la década de 1970.

Décadas de esfuerzos de miles de científicos, trabajando en genética, bioquímica, biología celular y química física, se materializaron finalmente en los laboratorios de Paul Berg, Herbert Boyer y Stanley Cohen, que idearon técnicas para la localización, aislamiento, preparación y estudio de pequeños segmentos de DNA procedentes de cromosomas mucho mayores. Las técnicas para la clonación del DNA han hecho posibles la **genómica** y la **proteómica** modernas, el estudio de los genes y las proteínas a nivel de células y organismos enteros. Estos nuevos métodos están transformando la investigación básica, la agricultura, la medicina, la ecología, la medicina forense y muchos otros campos y han planteado a la sociedad desconcertantes alternativas y difíciles dilemas éticos.

Comenzamos este capítulo con la descripción de los principios bioquímicos fundamentales de la ya clásica disciplina de la clonación del DNA. A continuación, después de poner las bases para abordar la genómica, ilustramos el abanico de aplicaciones y las potencialidades de esta tecnología, con especial énfasis en los avances actuales de la genómica y la proteómica.

9.1 Clonación del DNA: fundamentos

Un *clon* es una copia idéntica. Este término originalmente se aplicó al aislamiento y reproducción de una célula para crear una población de células idénticas. La **clonación del DNA** comporta la separación de un gen específico o de un fragmento de DNA de un cromosoma mucho mayor y su unión a una pequeña molécula de DNA portador, para después replicar este DNA modificado miles o millones de veces, mediante

el aumento del número de células y la creación de múltiples copias del DNA clonado en cada célula. El resultado es la amplificación selectiva de un gen o de un segmento de DNA particular. La clonación del DNA de cualquier organismo comprende cinco procedimientos generales:

1. *Cortar el DNA en lugares determinados.* Las endonucleasas específicas de secuencia (endonucleasas de restricción) hacen las veces de tijeras moleculares.
2. *Selección de una pequeña molécula de DNA capaz de autorreplicarse.* Estos DNA se denominan **vectores de clonación** (un vector es un agente de entrega). Normalmente se trata de plásmidos o de DNA víricos.
3. *Unión covalente de dos fragmentos de DNA.* El enzima DNA ligasa une el vector de clonación y el DNA que se desea clonar. Las moléculas de DNA compuestas por segmentos unidos covalentemente, procedentes de dos o más fuentes, se denominan **DNA recombinantes.**
4. *Traslado del DNA del tubo de ensayo a una célula huésped* que proporcionará la maquinaria enzimática necesaria para la replicación del DNA.
5. *Selección o identificación de las células huésped que contienen DNA recombinante.*

Los métodos utilizados para llevar a cabo estas tareas, y otras relacionadas, se denominan colectivamente **tecnología del DNA recombinante** o, de manera más informal, **ingeniería genética.**

En esta discusión inicial, nos centraremos en la clonación de DNA en la bacteria *Escherichia coli*, que fue el primer organismo utilizado en el trabajo con DNA recombinante y que todavía es la célula huésped más común. *E. coli* tiene muchas ventajas: se conoce bastante bien el metabolismo de su DNA (y muchos otros de sus procesos bioquímicos); muchos vectores de clonación que se encuentran asociados de manera natural con *E. coli*, tales como plásmidos y bacteriófagos (virus bacterianos, también denominados fagos), están bien caracterizados y se dispone de técnicas efectivas para la transferencia de DNA de una bacteria a otra. Posteriormente, en este capítulo trataremos la clonación de DNA en otros organismos.

Paul Berg

Herbert Boyer

Stanley N. Cohen

El DNA recombinante se produce con endonucleasas de restricción y DNA ligasa

Un conjunto de enzimas, disponibles gracias a décadas de investigación del metabolismo de los ácidos nucleicos, es de particular importancia para la tecnología del DNA recombinante (Tabla 9-1). En la base de la metodología general para producir y propagar una molécula de DNA recombinante se encuentran dos tipos de enzimas (Fig. 9-1). Primero, las **endonucleasas de restricción** (también denominadas enzimas de restricción) reconocen y cortan el DNA en secuencias específicas (secuencias de reconocimiento o sitios de restricción), generando una serie de fragmentos más pequeños. Segundo, el fragmento de DNA que debe ser clonado puede unirse a un vector de clonación adecuado mediante **DNA ligasas,** que empalman las moléculas de DNA. El vector recombinante se introduce a continuación en una célula huésped, que amplifica el fragmento a lo largo de muchas divisiones celulares.

Las endonucleasas de restricción se encuentran en muchas especies bacterianas. Werner Arber descubrió a principios de la década de 1960 que su función biológica es reconocer y

TABLA 9-1 Algunos enzimas utilizados en la tecnología del DNA recombinante

Enzima(s)	*Función*
Endonucleasas de restricción de tipo II	Cortan el DNA en secuencias específicas
DNA ligasa	Une dos moléculas o fragmentos de DNA
DNA polimerasa I (*E. coli*)	Rellena los huecos en el DNA dúplex por adición secuencial de nucleótidos en los extremos 3′
Transcriptasa inversa	Hace una copia de DNA a partir de una molécula de RNA
Polinucleótido quinasa	Añade un grupo fosfato al grupo OH del extremo 5′ de un polinucleótido para marcarlo o para permitir su ligación
Transferasa terminal	Añade colas homopoliméricas al grupo OH del extremo 3′ de un dúplex lineal
Exonucleasa III	Elimina nucleótidos de los extremos 3′ de una hebra de DNA
Exonucleasa del bacteriófago λ	Elimina nucleótidos de los extremos 5′ de un dúplex para exponer los extremos 3′ monohebra
Fosfatasa alcalina	Elimina fosfatos terminales tanto del extremo 5′ como del 3′ (o de ambos)

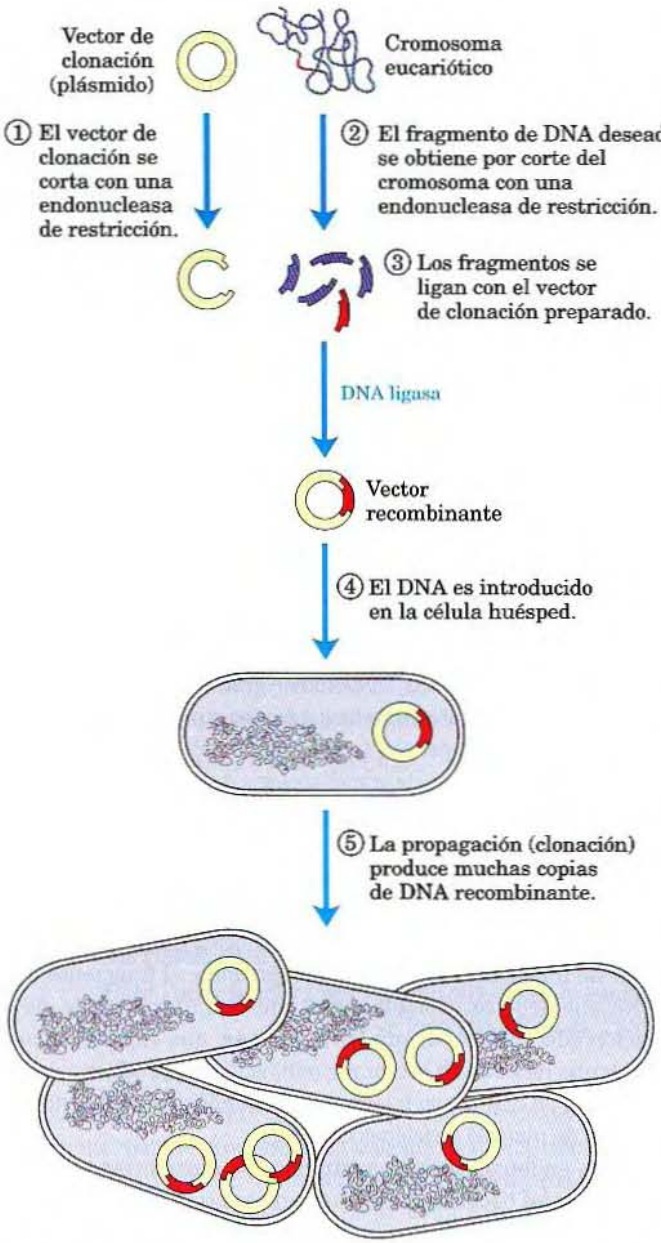


FIGURA 9-1 Representación esquemática de la clonación de DNA. El vector de clonación y los cromosomas eucarióticos se cortan por separado con la misma endonucleasa de restricción. Los fragmentos que tienen que clonarse se ligan con el vector de clonación. El DNA recombinante resultante (se muestra un solo vector recombinante) es introducido en una célula huésped para ser propagado (clonado). Obsérvese que esta ilustración no está a escala: el tamaño del cromosoma de *E. coli* en relación al de un vector de clonación típico (tal como un plásmido) es mucho mayor que el aquí representado.

cortar DNA foráneo (p. ej., el DNA de un virus infeccioso); se dice que este DNA está *restringido*. En el DNA de la célula huésped, la secuencia reconocida por su propia endonucleasa de restricción está protegida de la digestión por la metilación del DNA, catalizada por una DNA metilasa específica. El conjunto formado por la endonucleasa de restricción y la metilasa correspondiente se conoce como **sistema de modificación-restricción.**

Existen tres tipos de endonucleasas de restricción, designados como I, II y III. Los tipos I y III son, generalmente, grandes complejos formados por múltiples subunidades que contienen, simultáneamente, las actividades endonucleasa y metilasa. Las endonucleasas de restricción de tipo I cortan el DNA al azar, en lugares que pueden estar a 1000 pares de bases (pb) o más de la secuencia de reconocimiento. Las endonucleasas de restricción de tipo III cortan el DNA a unos 25 pares de bases de la secuencia de reconocimiento. Ambos tipos de enzimas se mueven a lo largo del DNA mediante un mecanismo que necesita la energía del ATP. Las **endonucleasas de restricción de tipo II,** aisladas por primera vez por Hamilton Smith, son más sencillas, no necesitan ATP y cortan el DNA en la misma secuencia de reconocimiento. La extraordinaria utilidad de estos enzimas fue demostrada por Daniel Nathans, que los usó por vez primera para desarrollar nuevos métodos para cartografiar y analizar genes y genomas.

Se han descubierto millares de endonucleasas de restricción en diferentes especies bacterianas y más de 100 secuencias de DNA diferentes son reconocidas por uno o más de estos enzimas. Las secuencias reconocidas tienen normalmente de 4 a 6 pb y son palindrómicas (véase Fig. 8-20). En la Tabla 9-2 se muestran unas pocas secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción de tipo II. En algunos casos, la interacción entre la endonucleasa de restricción y su secuencia diana ha podido determinarse con gran detalle; por ejemplo, la Figura 9-2 muestra el complejo formado por la endonucleasa de restricción de tipo II *Eco*RV y su secuencia diana.

Algunas endonucleasas de restricción realizan cortes indentados en las dos hebras del DNA, que dejan de dos a cuatro nucleótidos desapareados en cada extremo. Se los conoce como **extremos cohesivos** (Fig. 9-3a), debido a que pueden aparearse entre sí o con extremos cohesivos complementarios de otros fragmentos de DNA. Otras endonucleasas de restricción cortan ambas cadenas del DNA en los enlaces fosfodiéster opuestos, de modo que no dejan bases desapareadas en ningún extremo; estos extremos se denominan **extremos romos** (Fig. 9-3b).

El tamaño medio de los fragmentos producidos al cortar DNA genómico con una determinada endonucleasa de restricción depende de la frecuencia con que se encuentre su lugar de restricción en la molécula de DNA, que, a su vez, depende en buena medida del tamaño de la secuencia de reconocimiento. En una molécula de DNA de secuencia al azar, en la que todos los nucleótidos fuesen igualmente abundantes, una secuencia de 6 pares de bases reconocida por una endonucleasa de restricción tal como *Bam*HI ocurriría como promedio una vez cada 4^6 (4096) pb, suponiendo un contenido en G≡C del 50%. Los enzimas que reconocen una secuencia de 4 pares de bases producirían fragmentos de DNA más pequeños en una molécula de DNA de secuencia al azar; una secuencia de este tamaño debería encontrarse, como promedio, una vez cada 4^4 (256) pb. En el DNA natural las secuencias de reconocimiento suelen ocurrir con menor frecuencia de lo esperado según estos cálculos, porque las secuencias de nucleótidos en el DNA no son al azar y los cuatro nucleótidos no son igualmente abundantes. En experimentos de laboratorio el tamaño

TABLA 9–2 Secuencias de reconocimiento para algunas endonucleasas de restricción de tipo II

*Bam*HI	(5′) G G A T C C (3′) C C T A G G	*Hind*III	(5′) A A G C T T (3′) T T C G A A
*Cla*I	(5′) A T C G A T (3′) T A G C T A	*Not*I	(5′) G C G G C C G C (3′) C G C C G G C G
*Eco*RI	(5′) G A A T T C (3′) C T T A A G	*Pst*I	(5′) C T G C A G (3′) G A C G T C
*Eco*RV	(5′) G A T A T C (3′) C T A T A G	*Pvu*II	(5′) C A G C T G (3′) G T C G A C
*Hae*III	(5′) G G C C (3′) C C G G	*Tth*111I	(5′) G A C N N N G T C (3′) C T G N N N C A G

Las flechas indican los enlaces fosfodiéster hidrolizados por cada endonucleasa de restricción. Los asteriscos indican las bases que son metiladas por la correspondiente metilasa (si se conoce). N representa cualquier base. Obsérvese que el nombre de los enzimas consiste en una abreviatura de tres letras (en *cursiva*) del nombre de la especie bacteriana de la cual procede, seguida a veces por una indicación de la cepa y números romanos para distinguir diferentes endonucleasas de restricción aisladas de la misma especie bacteriana. Por lo tanto, *Bam*HI es la primera (I) endonucleasa de restricción procedente de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H.

medio de los fragmentos producidos por rotura de grandes moléculas de DNA por endonucleasas de restricción puede aumentarse simplemente terminando la reacción antes de que se haya completado. Este procedimiento se denomina digestión parcial. El tamaño de los fragmentos también puede aumentarse usando una clase especial de endonucleasas, denominadas endonucleasas mensajeras (véase Fig. 26-34), que reconocen y cortan secuencias de DNA mucho más largas (14-20 pb).

Cuando una molécula de DNA se ha cortado en fragmentos, un fragmento determinado de tamaño conocido puede ser enriquecido por electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida o por HPLC (pp. 92, 90). Sin embargo, la rotura de un genoma típico de mamífero por una endonucleasa de restricción origina demasiados fragmentos para poder aislar un determinado fragmento de DNA por electroforesis o HPLC. Un paso intermedio en la clonación de un gen específico o de un fragmento de DNA es, a menudo, la construcción de una genoteca de DNA (tal como se describe en la Sección 9.2).

Un vez aislado el fragmento de DNA diana, la DNA ligasa permite unirlo a un vector de clonación digerido de forma similar –es decir, un vector digerido con la *misma* endonucleasa de restricción; un fragmento generado por *Eco*RI, por ejemplo, generalmente no se unirá a un fragmento generado por *Bam*HI–. Como se describe con más detalle en el Capítulo 25,

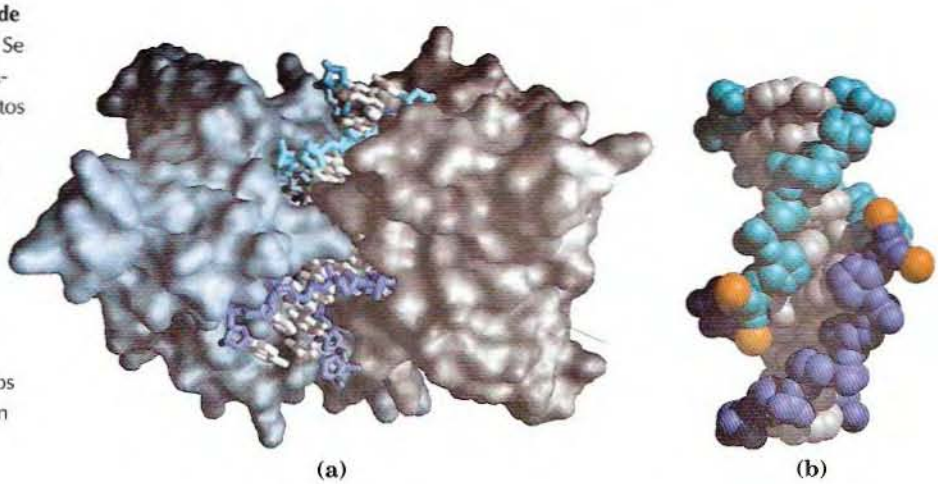


FIGURA 9-2 Interacción de la endonucleasa de restricción *Eco*RV con su secuencia diana. (a) Se muestra el enzima dimérico (con sus subunidades en gris y en azul claro) unido a los productos de corte del DNA en la secuencia reconocida por la endonucleasa. Las cadenas del DNA se muestran en dos tonos de azul para distinguir los segmentos separados por el corte (PDB ID 1RVC). **(b)** Aquí, la proteína se ha eliminado y el DNA se ha rotado 180°. El enzima crea extremos romos; los puntos de corte están indentados en las dos hebras del DNA porque el DNA está retorcido. Los átomos de magnesio unidos al DNA, que participan en la catálisis, se muestran en naranja.

Endonucleasas de restricción

(a) (b)

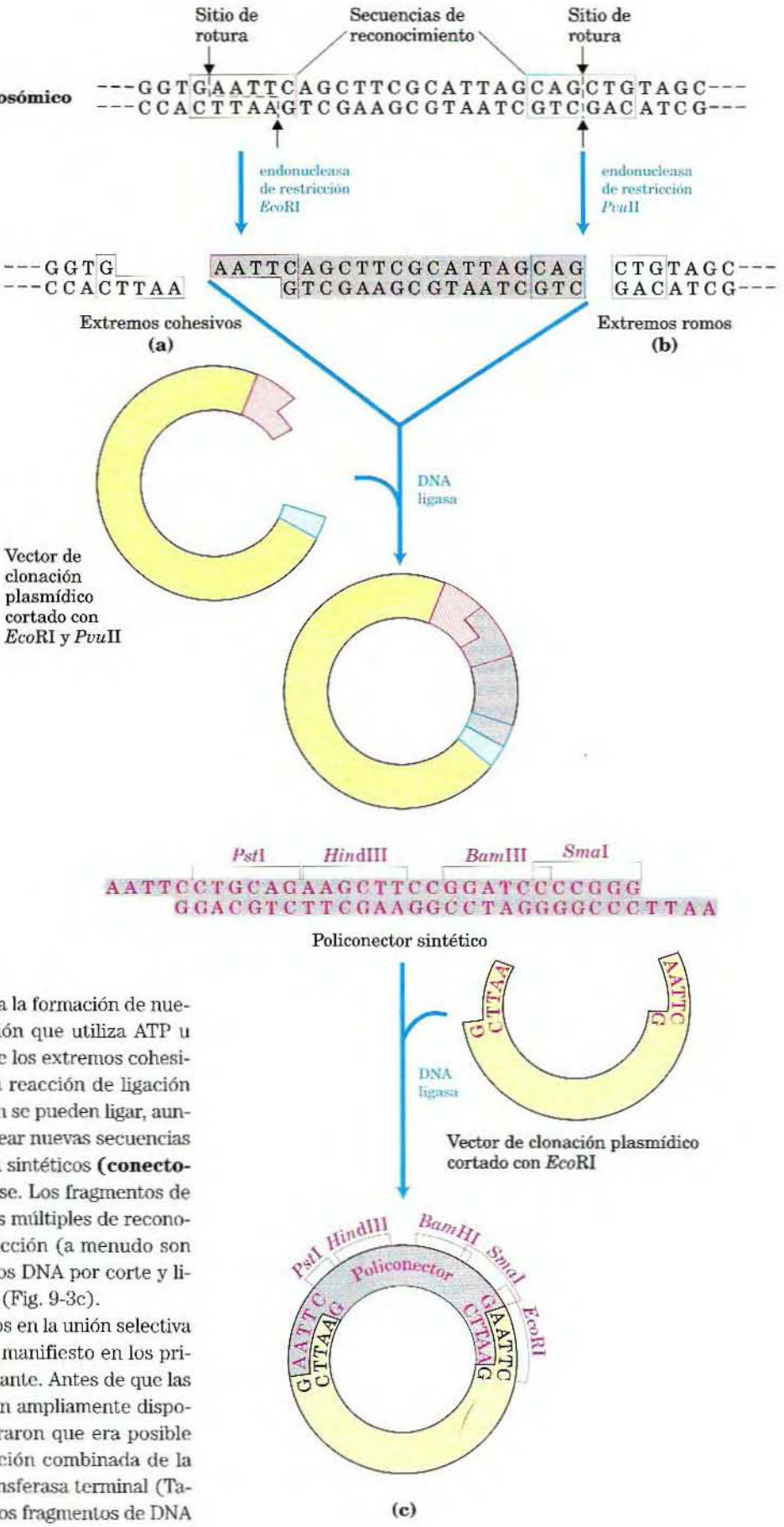


FIGURA 9-3 Corte de moléculas de DNA mediante endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción reconocen y cortan exclusivamente secuencias específicas, generando **(a)** extremos cohesivos (con cadenas sencillas protuberantes) o **(b)** extremos romos. Los fragmentos pueden ligarse a otros DNA, tales como el vector de clonación cortado (un plásmido) que aquí se muestra. Esta reacción está favorecida por el apareamiento de extremos cohesivos complementarios. Los fragmentos de DNA con extremos romos se ligan con menor eficiencia que aquellos que poseen extremos cohesivos complementarios, y los fragmentos de DNA con extremos cohesivos diferentes (no complementarios) no suelen ligarse. **(c)** Un fragmento sintético de DNA que contenga las secuencias de reconocimiento para varias endonucleasas de restricción se puede insertar en un plásmido tratado previamente con una endonucleasa de restricción. El inserto se denomina conector; un inserto con múltiples sitios de restricción se denomina policonector.

(véase Fig. 25-16), la DNA ligasa cataliza la formación de nuevos enlaces fosfodiéster en una reacción que utiliza ATP u otro cofactor similar. El apareamiento de los extremos cohesivos complementarios facilita mucho la reacción de ligación (Fig. 9-3a). Los extremos romos también se pueden ligar, aunque con menor eficiencia. Se pueden crear nuevas secuencias de DNA insertando fragmentos de DNA sintéticos **(conectores)** entre los extremos que van a ligarse. Los fragmentos de DNA sintético que contienen secuencias múltiples de reconocimiento para endonucleasas de restricción (a menudo son útiles como puntos de inserción de otros DNA por corte y ligación) se denominan **policonectores** (Fig. 9-3c).

La eficacia de los extremos cohesivos en la unión selectiva de dos fragmentos de DNA se puso de manifiesto en los primeros experimentos con DNA recombinante. Antes de que las endonucleasas de restricción estuviesen ampliamente disponibles, algunos investigadores encontraron que era posible generar extremos cohesivos por la acción combinada de la exonucleasa del bacteriófago λ y la transferasa terminal (Tabla 9-1). Mediante este procedimiento, los fragmentos de DNA

que debían unirse adquirían colas homopoliméricas complementarias. Este método fue utilizado por Peter Lobban y Dale Kaiser en 1971 en los primeros experimentos de unión de fragmentos de DNA naturales. Poco después, en el laboratorio de Paul Berg se utilizaron métodos similares para unir segmentos de DNA del virus 40 de simio (SV40) con DNA procedente del bacteriófago λ, generándose de este modo la primera molécula de DNA recombinante que contenía fragmentos de DNA de especies diferentes.

Los vectores de clonación permiten la amplificación de fragmentos de DNA insertados

Los principios que gobiernan las formas de presentación del DNA recombinante a las células huésped para su posterior clonación y amplificación pueden ilustrarse convenientemente considerando los tres vectores de clonación más comúnmente usados en los experimentos con *E. coli* –plásmidos, bacteriófagos y cromosomas bacterianos artificiales– y uno de los vectores usados para clonar grandes fragmentos de DNA en levadura.

Plásmidos Los plásmidos son moléculas de DNA circulares que se replican con independencia del cromosoma del huésped. Los plásmidos bacterianos naturales tienen tamaños de entre 5000 y 400.000 pb. Pueden introducirse en las células bacterianas mediante un proceso denominado **transformación.** Las células (generalmente *E. coli*) junto con el DNA plasmídico se incuban a 0 °C en una solución de cloruro cálcico, a continuación son sometidas a un choque térmico, elevando rápidamente la temperatura hasta 37-43 °C. Por razones no bien comprendidas, algunas de las células tratadas de este modo incorporan el DNA plasmídico. Algunas especies bacterianas son competentes por naturaleza para la incorporación de DNA y no requieren el tratamiento con cloruro cálcico. Un método alternativo consiste en aplicar un pulso de alto voltaje a las células incubadas con el plásmido. Este tratamiento, denominado **electroporación,** hace que la membrana bacteriana sea permeable transitoriamente a las grandes moléculas.

Con independencia del método utilizado, sólo unas pocas células captan el DNA plasmídico; se necesita, pues, un método para seleccionar las que lo hayan hecho. La estrategia más común consiste en incluir en el plásmido un gen que permita que la célula huésped crezca en determinadas condiciones, tal como un gen de resistencia a un antibiótico. Sólo aquellas células que hayan sido transformadas por el plásmido recombinante podrán crecer en presencia del antibiótico. Cualquier célula que contenga el plásmido será "seleccionable" en estas condiciones de cultivo. Esos genes se denominan marcadores seleccionables.

Se han desarrollado muchos vectores plasmídicos para la clonación mediante la modificación de plásmidos naturales. El plásmido de *E. coli* pBR322 es un buen ejemplo de las características útiles de un vector de clonación (Fig. 9-4):

1. pBR322 posee un origen de replicación, ori, en el cual los enzimas celulares inician la replicación (Capítulo 25). Esta secuencia es necesaria para propagar el plásmido y mantenerlo en un nivel de 10 a 20 copias por célula.

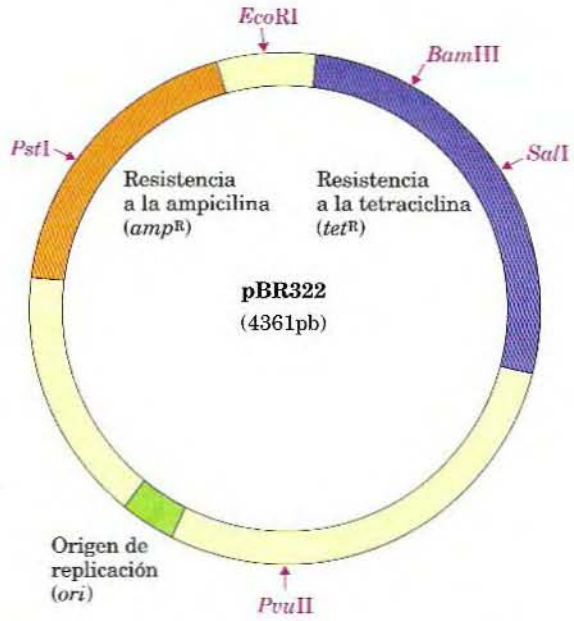


FIGURA 9-4 Diseño del plásmido pBR322. Obsérvese la localización de algunos sitios de restricción importantes para *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I y *Pvu*II; de los genes de resistencia a ampicilina y a tetraciclina y del origen de replicación (ori). Construido en 1977, fue uno de los primeros plásmidos diseñados específicamente para la clonación en *E. coli*.

2. El plásmido contiene dos genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos (tet^R, amp^R), lo que permite la identificación de las células que contengan el plásmido intacto o una versión recombinante del mismo (Fig. 9-5).
3. Varias secuencias únicas de reconocimiento para diferentes endonucleasas de restricción de pBR322 (*Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pvu*II) suministran los sitios donde cortar el plásmido para insertar las secuencias de DNA foráneo.
4. El pequeño tamaño del plásmido (4361 pb) facilita su entrada en la célula y la manipulación bioquímica del DNA.

La eficiencia de la transformación bacteriana con DNA purificado (proceso nunca muy eficiente) decrece al aumentar el tamaño del plásmido, siendo difícil la clonación de segmentos de DNA superiores a unos 15.000 pb cuando se usa un plásmido como vector.

Bacteriófagos El bacteriófago λ tiene un mecanismo muy eficiente para introducir sus 48.502 pb de DNA en una bacteria y puede usarse como vector para clonar fragmentos de DNA algo mayores (Fig. 9-6). Su utilidad se basa en dos características principales:

1. Alrededor de un tercio del genoma de λ no es esencial y puede ser reemplazado por DNA foráneo.
2. El DNA se empaqueta en partículas de fago infecciosas sólo si su tamaño se encuentra entre 40.000 y 53.000 pb, limitación aprovechable para lograr que solamente se empaquete el DNA recombinante.

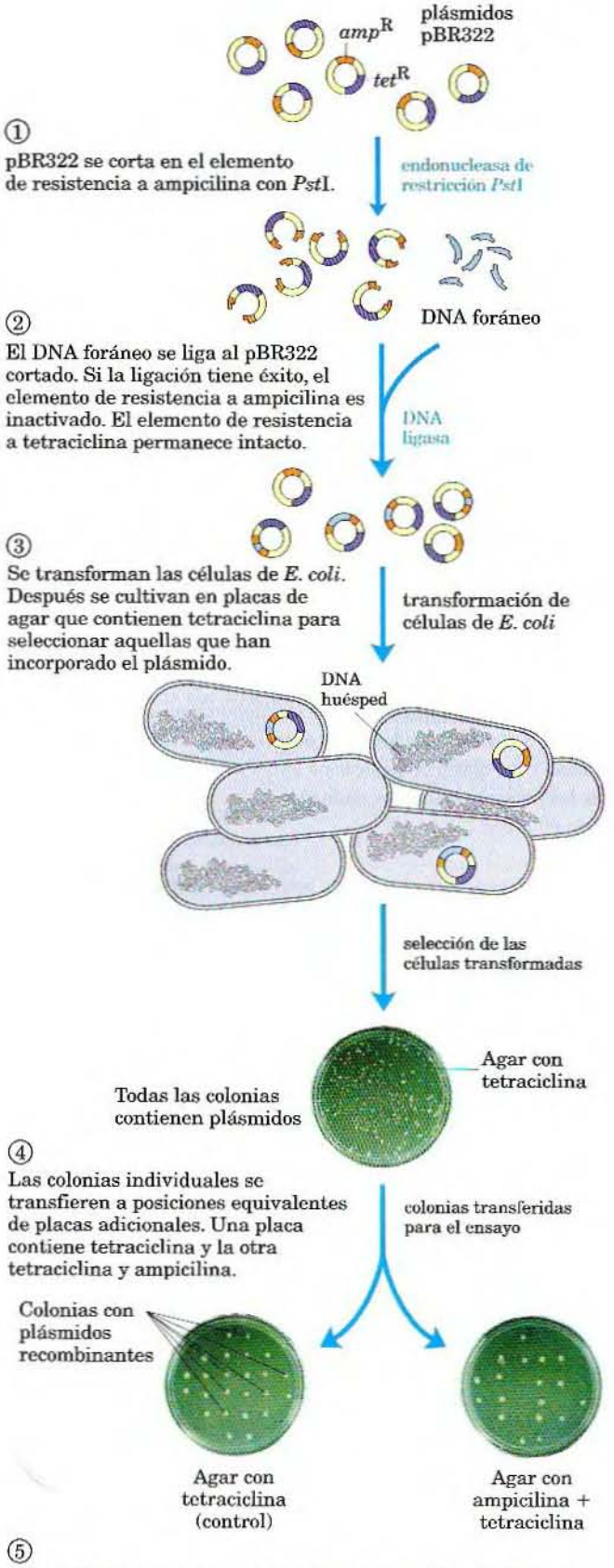


FIGURA 9-5 Clonación e identificación de DNA foráneo en *E. coli* con pBR322. Clonación de plásmidos

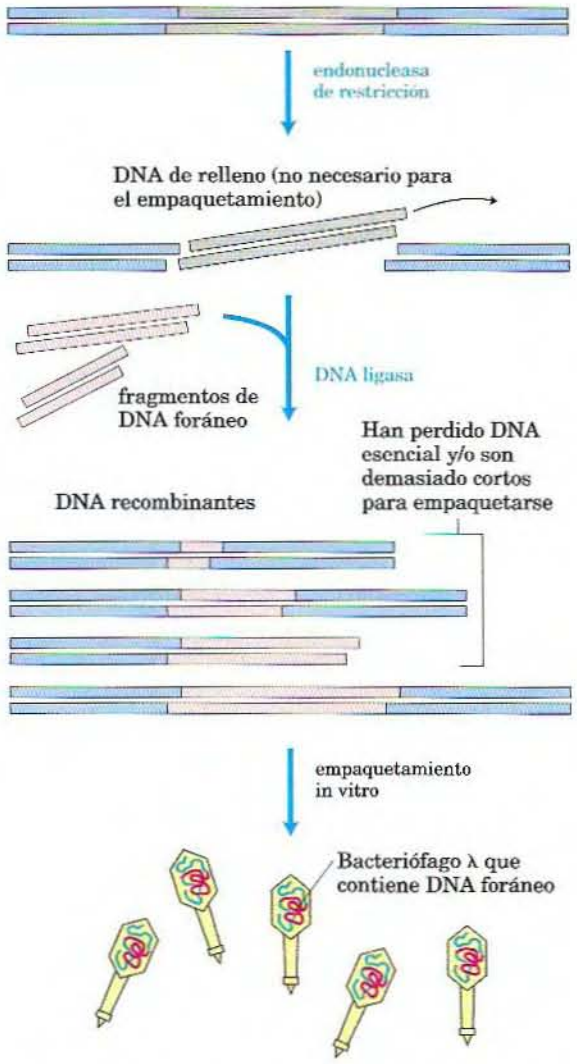


FIGURA 9-6 Vectores de clonación del bacteriófago λ. Se han utilizado los métodos del DNA recombinante para modificar el genoma del bacteriófago λ, eliminando los genes no esenciales para la producción del fago y reemplazándolos por DNA de "relleno" para hacer el DNA del vector lo bastante grande como para que se empaquete en las partículas de fago. Tal como se muestra aquí el DNA de relleno se puede reemplazar por DNA foráneo en los experimentos de clonación. Los recombinantes se empaquetan en partículas de fago viables in vitro solamente si contienen un fragmento de DNA foráneo de tamaño adecuado, además de los dos fragmentos esenciales de los extremos del DNA de λ.

Se han desarrollado vectores derivados del bacteriófago λ que se pueden cortar fácilmente en tres trozos, dos de los cuales contienen genes esenciales, que en total sólo suman unos 30.000 pb. El tercer trozo, o DNA "de relleno", es descartado cuando el vector se usa para la clonación. Por tanto, debe introducirse DNA adicional entre los dos segmentos esenciales para producir partículas de fago viables. El mecanismo de empaquetamiento *selecciona* eficazmente los DNA víricos recombinantes.

Los vectores del bacteriófago λ permiten la clonación de fragmentos de DNA de hasta 23.000 pb. Una vez los fragmentos del bacteriófago λ han sido ligados con fragmentos de DNA foráneo de tamaño adecuado, los DNA recombinantes resul-

tantes se pueden empaquetar como partículas de fago añadiendo un extracto crudo de células bacterianas que contenga todas las proteínas necesarias para formar un fago completo. Esta operación se denomina **empaquetamiento in vitro** (Fig. 9-6). Todas las partículas de fago viables contendrán un fragmento de DNA foráneo. La transmisión ulterior del DNA recombinante a células de *E. coli* es muy eficiente.

Cromosomas bacterianos artificiales (BAC) Los cromosomas bacterianos artificiales son simplemente plásmidos diseñados para la clonación de fragmentos de DNA muy largos (habitualmente entre 100.000 y 300.000 pb) (Fig. 9-7). Generalmente incluyen marcadores seleccionables, tales como la resistencia al cloranfenicol (Cm^R), así como un origen de replicación muy estable (ori), que mantiene una o dos copias del plásmido por célula. Fragmentos de DNA de varios centenares de miles de pares de bases pueden clonarse en vectores BAC. Estas grandes moléculas de DNA circular se introducen en las bacterias por electroporación. Las bacterias huésped usadas con los BAC recombinantes tienen mutaciones que afectan a la estructura de la pared bacteriana y facilitan la incorporación de estas grandes moléculas de DNA.

Cromosomas artificiales de levaduras (YAC) Las células de *E. coli* no son en absoluto los únicos huéspedes utilizados en ingeniería genética. Las levaduras son organismos eucarióticos especialmente aptos para este trabajo. Como en *E. coli*, la genética de las levaduras es bien conocida. El genoma de la levadura más comúnmente utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, contiene sólo 14×10^6 pb (un genoma simple para los estándares eucarióticos, menos de cuatro veces el tamaño del cromosoma de *E. coli*) y su secuencia se conoce en su totalidad. Las levaduras son también muy fáciles de mantener y de cultivar a gran escala en el laboratorio. Se han construido vectores plasmídicos para levadura, usando los mismos principios que se aplican a los vectores de *E. coli* descritos anteriormente. Actualmente se dispone de métodos eficaces para introducir y extraer DNA de células de levadura, que facilitan el estudio de muchos aspectos de la bioquímica de las células eucarióticas. Algunos plásmidos recombinantes contienen múltiples orígenes de replicación y otros elementos que hacen posible su uso en más de una especie (por ejemplo, levadura y *E. coli*). Los plásmidos que pueden propagarse en células de dos o más especies diferentes se denominan **vectores lanzadera.**

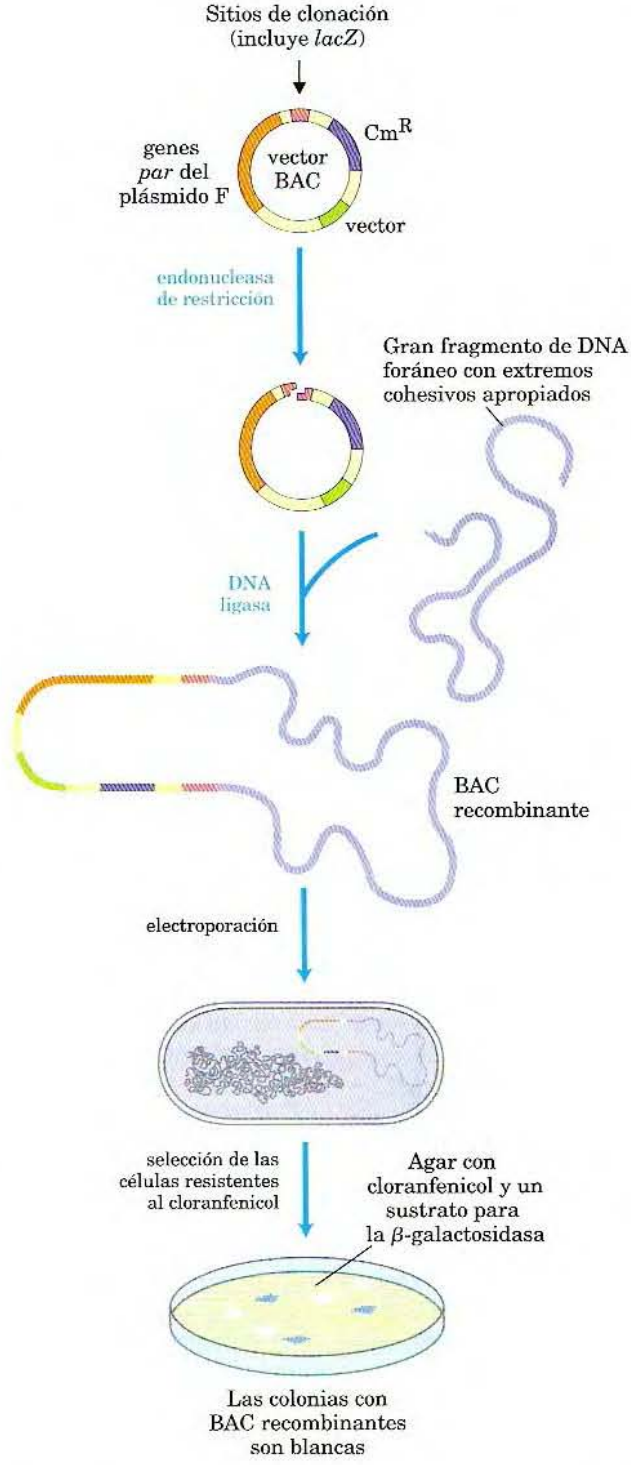


FIGURA 9-7 (arriba a la derecha) Clonación con cromosomas bacterianos artificiales (BAC). El vector es un plásmido relativamente simple, con un origen de replicación (ori) que dirige la replicación. Los genes *par*, procedentes de un tipo de plásmido denominado plásmido F, facilitan la distribución uniforme de los plásmidos entre las células hijas en la división celular. Ello favorece la probabilidad de que cada célula hija contenga una copia del plásmido, incluso cuando hay pocas copias. Conviene que el número de copias sea bajo porque así disminuyen las posibilidades de que se produzcan reacciones de recombinación no deseadas, que con el tiempo pueden alterar de forma imprevisible los fragmentos de gran tamaño de DNA clonado. En los BAC se incluyen marcadores seleccionables. Un gen *lacZ* (necesario para la producción del enzima β-galactosidasa) está situado en la región de clonación de manera que es inactivado por los insertos de DNA clonados. La introducción por electroporación de BAC recombinantes en las células es más fácil en células con la pared celular alterada (más porosa). El escrutinio de los DNA recombinantes se efectúa por resistencia al cloranfenicol (Cm^R). Las placas también contienen un sustrato artificial de la β-galactosidasa que da un producto coloreado. Las colonias con β-galactosidasa activa y, por tanto, sin inserto en el vector BAC, se vuelven azules; las colonias sin actividad β-galactosidasa y, por tanto, con los insertos de DNA desados, son blancas.

El trabajo con grandes genomas que exigen vectores de clonación de gran capacidad llevó al desarrollo de los **cromosomas artificiales de levadura (YAC;** Fig. 9-8). Los vectores YAC contienen todos los elementos necesarios para mantener un cromosoma eucariótico en el núcleo de la levadura: un origen de replicación de levadura, dos marcadores seleccionables y secuencias especializadas (procedentes de los telómeros y el centrómero, regiones del cromosoma descritas en el Capítulo 24), necesarias para la estabilidad y la segregación correcta de los cromosomas en la división celular. Antes de su uso en la clonación, el vector se propaga en forma de plásmido circular bacteriano. El corte con una endonucleasa de restricción (*Bam*H1 en la Fig. 9-8) elimina un trozo de DNA entre dos secuencias teloméricas (TEL), dejando los telómeros en los extremos del DNA linealizado. El corte en otro sitio interno (*Eco*RI en la Fig. 9-8) divide el vector en dos fragmentos de DNA, denominados brazos del vector, cada uno con un marcador seleccionable distinto.

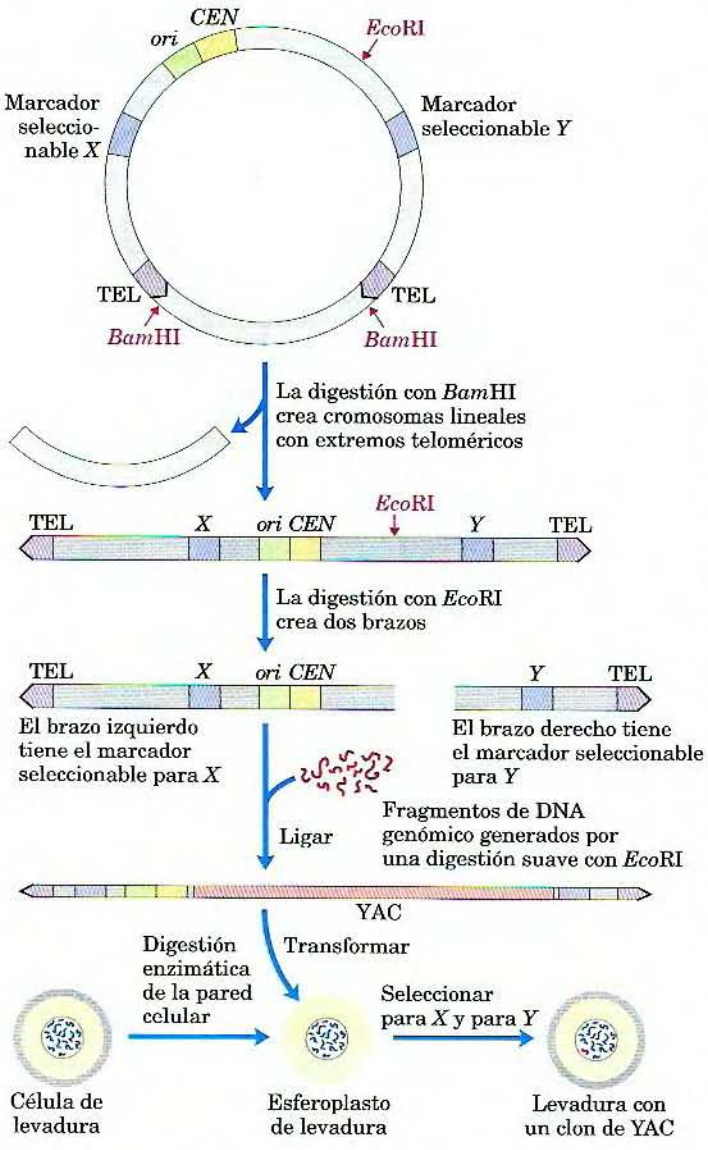


FIGURA 9-8 Construcción de un cromosoma de levadura artificial (YAC). Un vector YAC contiene un origen de replicación (ori), un centrómero (*CEN*), dos telómeros (TEL) y marcadores seleccionables (*X* e *Y*). La digestión con *Bam*H1 y *Eco*RI genera dos brazos de DNA separados, cada uno con un extremo telomérico y un marcador seleccionable. Es posible ligar un gran segmento de DNA (por ejemplo, de 2 × 10^6 pb de un cromosoma humano) con los dos brazos para crear un cromosoma artificial de levadura. El YAC puede transformar células de levadura (preparadas mediante eliminación de la pared celular con formación de esferoplastos), que serán seleccionadas con respecto a *X* e *Y*; las células de levadura supervivientes propagarán el inserto.

El DNA genómico se prepara por digestión parcial con endonucleasas de restricción (*Eco*RI en la Fig. 9-8). Los fragmentos genómicos se separan a continuación por **electroforesis en gel de campo pulsante,** una variante de la electroforesis en gel (véase Fig. 3-19) que permite la separación de trozos de DNA muy grandes. Los fragmentos de DNA de tamaño apropiado (hasta unos 2 × 10^6 pb) se mezclan y se ligan con los brazos del vector. La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar células de levadura con moléculas de DNA muy grandes. El cultivo en un medio que requiera la presencia de los dos marcadores genéticos seleccionables asegura que sólo crezcan las células de levadura que contengan un cromosoma artificial con un gran inserto entre los dos brazos del vector (Fig. 9-8). La estabilidad de los clones YAC aumenta con el tamaño hasta un determinado límite. Los que poseen insertos de más de 150.000 pb son casi tan estables como los cromosomas celulares normales, mientras que los que tiene insertos de menos de 100.000 pb van perdiéndose paulatinamente durante la mitosis (por ello generalmente no se encuentran clones de levadura con sólo los extremos del vector ligados o con insertos cortos). Los YAC que carecen de un telómero en cualquiera de los extremos son rápidamente degradados.

La hibridación permite la detección de secuencias específicas de DNA

La hibridación de DNA, introducida en el Capítulo 8 (véase Fig. 8-32) es la más común de las técnicas basadas en la secuencia para detectar un gen particular o un segmento de ácido nucleico. Hay muchas versiones del método básico, pero la mayoría usan un fragmento de DNA o de RNA marcado (por ejemplo, con radiactividad) denominado **sonda,** complementario del DNA buscado. En un método clásico para detectar una secuencia de DNA concreta en una genoteca (una colección de clones de DNA), se presiona con un papel de nitrocelulosa contra una placa de agar con muchas colonias bacterianas individuales, cada una de las cuales contiene un fragmento de DNA recombinante distinto. Algunas células de cada colonia se adhieren al papel, formando una réplica de la placa. El papel se trata con álcali para romper las células y desnaturalizar el DNA que contienen, el cual permanece unido al papel en la región de la colonia de procedencia. A continuación, se añade al papel la sonda de DNA marcada radiactivamente, que hibridará solamente con el DNA complementario. Después de lavar la sonda de DNA sobrante, el DNA híbrido puede detectarse por autorradiografía (Fig. 9-9).

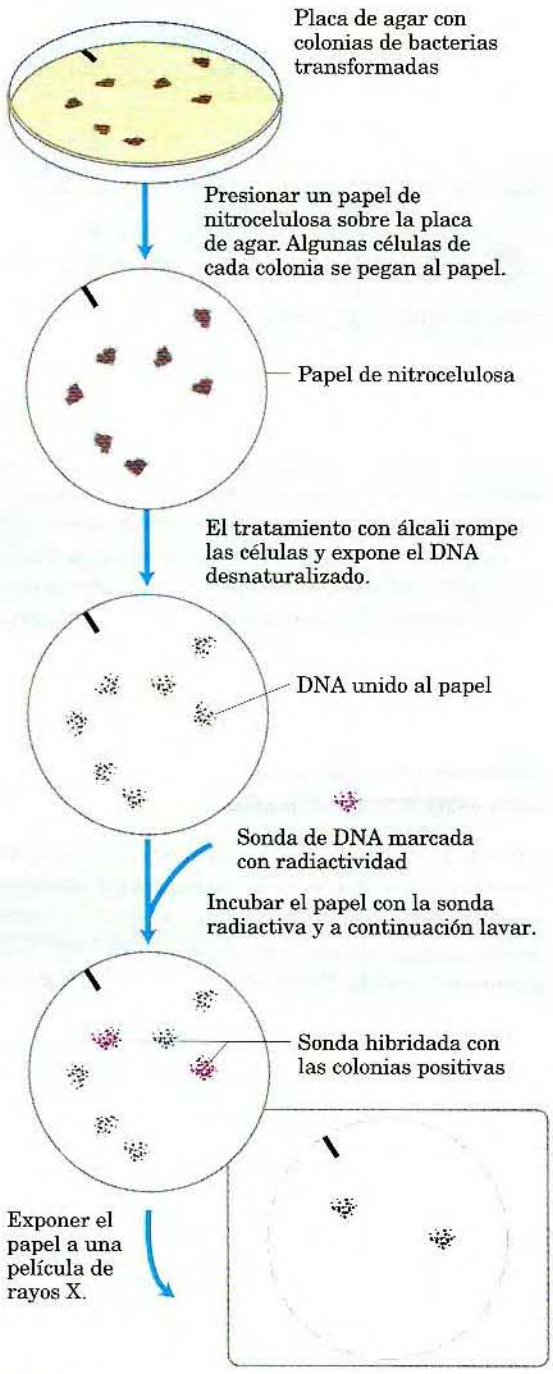


FIGURA 9-9 Identificación de un clon con un determinado fragmento de DNA por hibridación. La sonda de DNA radiactivo se hibrida con el DNA complementario y se revela por autorradiografía. Una vez identificadas las colonias marcadas, se pueden usar las correspondientes colonias de la placa de agar original como fuente de DNA clonado para posteriores estudios.

Frecuentemente, el paso limitante en la detección o en la clonación de un gen consiste en obtener una cadena complementaria de ácido nucleico para usarla como sonda. El origen de la sonda depende de lo que se conozca acerca del gen investigado. A veces, puede usarse un gen homólogo, clonado en otra especie. Si se ha purificado la proteína producto de un gen, se pueden diseñar y sintetizar sondas cuya secuencia corresponda a la de los aminoácidos (Fig. 9-10). En la actualidad, es frecuente obtener la información sobre las secuencias de DNA en bancos de datos, que almacenan información sobre la estructura de millones de genes pertenecientes a una gran variedad de organismos.

La expresión de genes clonados produce grandes cantidades de proteína

Frecuentemente, más que en el gen en sí mismo, el interés reside en su producto, sobre todo si la proteína tiene valor comercial, terapéutico o para la investigación. La comprensión de los fundamentos básicos del metabolismo del DNA, el RNA y las proteínas y su regulación en *E. coli* ha hecho posible la manipulación de células y la expresión de genes clonados para estudiar sus productos proteicos.

La mayoría de genes eucarióticos carecen de las secuencias –tales como los promotores, secuencias para la unión de la RNA polimerasa– necesarias para su expresión en *E. coli*; es pues necesario insertar las secuencias reguladoras bacterianas para la transcripción y la traducción en el vector de DNA en posiciones apropiadas en relación con el gen eucariótico. (Los promotores, las secuencias reguladoras y otros aspectos de la regulación de la expresión génica se tratan en el Capítulo 28.) En algunos casos, los genes clonados se expresan tan eficazmente que el producto proteico puede representar más del 10% de la proteína celular; se habla entonces de sobreexpresión. Algunas proteínas foráneas pueden matar las células de *E. coli* a tan altas concentraciones; en estos casos se ha de limitar la expresión génica a unas pocas horas antes de recoger las células.

Los vectores de clonación que contienen las señales de transcripción y traducción necesarias para regular la expresión de un gen clonado se denominan frecuentemente **vectores de expresión.** La velocidad de expresión del gen clonado se controla reemplazando las secuencias reguladoras del propio promotor del gen por versiones más eficientes y convenientes suministradas por el vector. En general, para la clonación se coloca un promotor bien caracterizado con sus elementos reguladores cerca de varios sitios de restricción únicos, de manera que los genes insertados en los sitios de restricción se expresen bajo el control del promotor (Fig. 9-11). Algunos de estos vectores incorporan otras características, tales como sitios de unión al ribosoma bacteriano para mejorar la traducción del mRNA derivado del gen o una secuencia de terminación de la transcripción.

Análogamente, los genes se pueden clonar y expresar en células eucarióticas, habitualmente en levaduras de diferentes especies. En los huéspedes eucarióticos a veces se incorporan modificaciones postraducción (cambios en la estructura proteica posteriores a la síntesis en los ribosomas) que pueden ser necesarias para la funcionalidad de la proteína clonada.

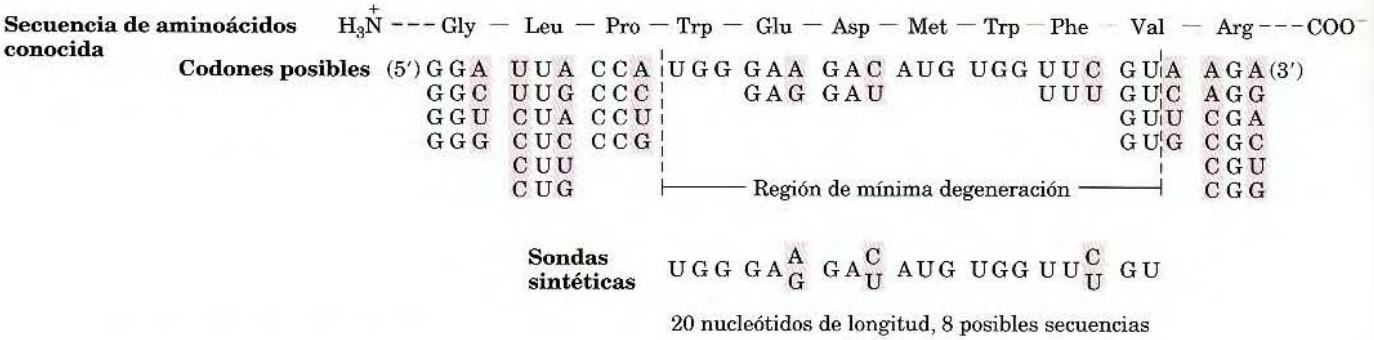


FIGURA 9-10 Diseño de una sonda para detectar el gen de una proteína de secuencia de aminoácidos conocida. Debido a que el código genético está "degenerado", hay varias secuencias de DNA que pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. (Tal como se describe en el Capítulo 27, un aminoácido está codificado por un conjunto de tres nucleótidos denominado *codón*. La mayoría de aminoácidos tienen dos o más codones; véase Fig. 27-7.) Como no se puede conocer la secuencia de DNA correcta de antemano, se diseña la sonda para que sea complementaria de una zona de mínima degeneración del gen, es decir, una región con el menor número posible de codones para los aminoácidos –dos codones como máximo en el ejemplo aquí mostrado–. Se sintetizan oligonucleótidos con secuencias selectivamente promediadas, de tal manera que contengan uno de los dos posibles nucleótidos en cada posición de degeneración potencial (sombreados en rosa). En el ejemplo mostrado, el oligonucleótido sintetizado consiste en una mezcla de ocho secuencias diferentes: una de las ocho será totalmente complementaria al gen y todas ellas tendrán al menos 17 de las 20 posiciones complementarias.

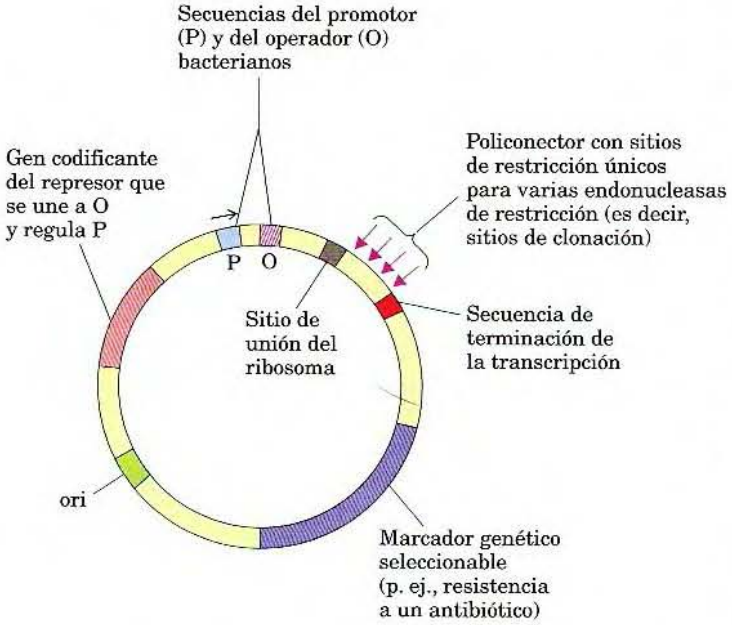


FIGURA 9-11 Tipos de secuencias de DNA presentes habitualmente en un vector de expresión en *E. coli*. Se inserta el gen que se desea expresar en uno de los sitios de restricción del policonector, cerca del promotor (P), con el extremo que codifica el extremo amino-terminal orientado hacia el promotor. El promotor posibilita una transcripción eficiente del gen insertado y la secuencia de terminación de la transcripción en ocasiones mejora la cantidad y estabilidad del mRNA producido. El operador (O) permite la regulación mediante un represor con el cual se une (Capítulo 28). El sitio de unión al ribosoma contiene las señales necesarias para una traducción eficiente del mRNA procedente del gen. El marcador seleccionable permite la selección de las células que contienen el DNA recombinante.

La alteración de los genes clonados produce proteínas modificadas

Las técnicas de clonación pueden usarse no sólo para obtener grandes cantidades de proteínas, sino también para producir proteínas ligeramente modificadas con respecto a las formas nativas. Se pueden cambiar aminoácidos individuales mediante **mutagénesis dirigida.** Esta poderosa metodología de estudio de la estructura y función de las proteínas consiste en cambiar la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante la modificación de la secuencia del DNA del gen clonado. Si la secuencia que se pretende modificar está flanqueada por lugares de restricción apropiados, se puede realizar el cambio simplemente por sustitución del fragmento original de DNA por un fragmento sintético idéntico al original salvo en los cambios deseados (Fig. 9-12a). Si no hay sitios de restricción localizados adecuadamente, se puede usar una aproximación denominada **mutagénesis dirigida por oligonucleótido** (Fig. 9-12b) para generar un cambio específico en la secuencia del DNA. Un corto fragmento de DNA sintético, con un cambio de base específico, se hibrida con una copia de cadena sencilla del gen clonado, insertada en un vector adecuado. Una base desapareada entre 15 a 20 pb no impide la hibridación, si se realiza a una temperatura adecuada. Este fragmento, una vez apareado, sirve de cebador para la síntesis de la hebra complementaria del vector plasmídico. El plásmido recombinante de doble cadena con el desapareamiento se utiliza seguidamente para transformar bacterias, en las que el desapareamiento será reparado por los enzimas celulares de reparación del DNA (Capítulo 25). Aproximadamente la mitad de las operaciones de reparación eliminarán y reemplazarán la base alterada, restableciendo la secuencia original del gen; la otra mitad eliminará y reemplazará la base *normal*, manteniendo la mutación de-

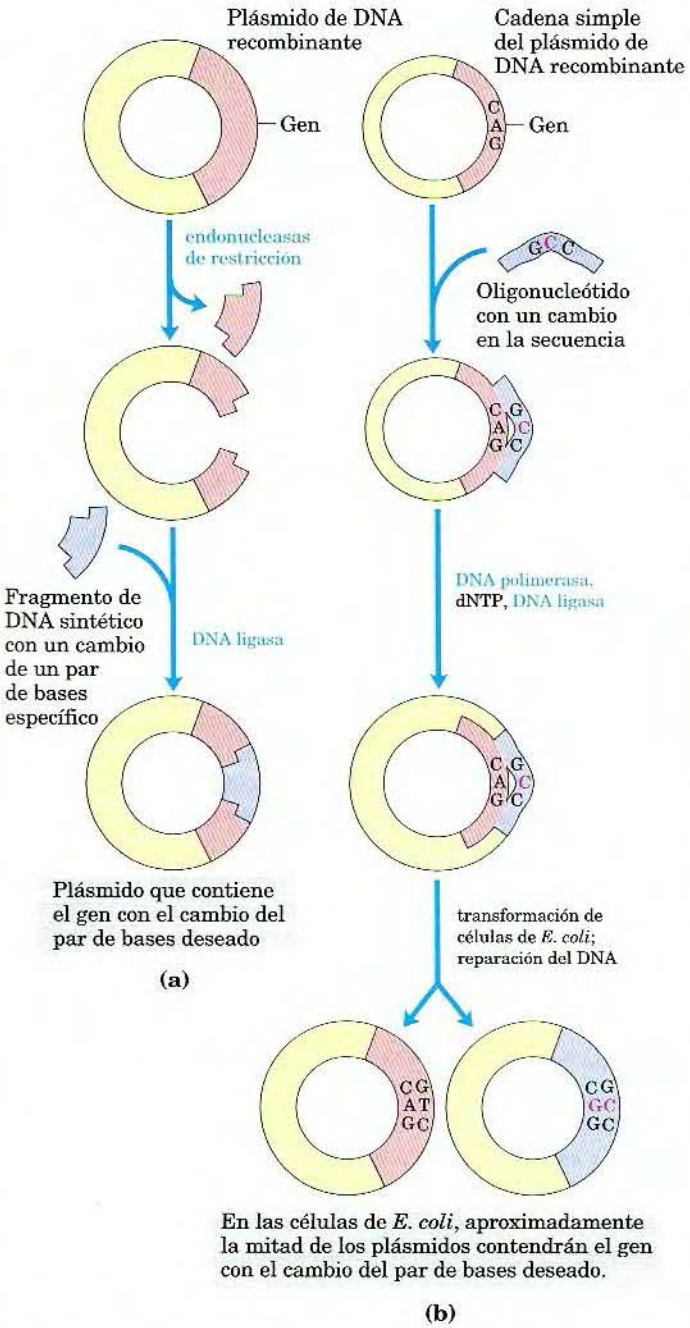


FIGURA 9-12 Dos procedimientos de mutagénesis dirigida. (a) Se sintetiza un segmento de DNA que se utiliza para reemplazar un fragmento de DNA que ha sido eliminado previamente mediante corte con una endonucleasa de restricción. **(b)** Se sintetiza un oligonucleótido con la secuencia deseada con un cambio en una posición. Éste se hibrida con una copia monocadena del gen que debe ser modificado y actúa como cebador para la síntesis de un DNA dúplex (con un desapareamiento), que se usa para transformar células. La reparación celular de los desapareamientos producirá el cambio de secuencia deseado en aproximadamente el 50% de los plásmidos.

seada. Los transformantes se analizan (generalmente, por secuenciación del DNA plasmídico) hasta encontrar una colonia que contenga un plásmido con la secuencia modificada.

También se pueden introducir cambios en más de un par de bases. Se pueden eliminar partes importantes de un gen, cortando un segmento con endonucleasas de restricción y ligando las porciones restantes para formar un gen más pequeño. Se pueden ligar partes de genes diferentes para crear nuevas combinaciones. El producto de este tipo de genes se conoce como **proteína de fusión.**

Hay ingeniosos métodos para realizar prácticamente cualquier tipo de alteración genética in vitro. La reintroducción del DNA modificado en la célula permite investigar las consecuencias de la alteración. La mutagénesis dirigida ha facilitado enormemente la investigación de las proteínas, permitiendo a los investigadores realizar cambios específicos en la estructura primaria de una proteína y examinar los efectos de estos cambios en el plegamiento, la estructura tridimensional y la actividad de la proteína.

RESUMEN 9.1 Clonación del DNA: fundamentos

- La clonación del DNA y la ingeniería genética entrañan el corte del DNA y la unión de segmentos de DNA en nuevas combinaciones –DNA recombinante.
- La clonación incluye el corte del DNA en fragmentos mediante enzimas, la selección y posible modificación del fragmento deseado, la inserción del fragmento de DNA en un vector de clonación adecuado, la transferencia del vector con el inserto de DNA a una célula huésped para su replicación y la identificación y selección de las células que contengan el fragmento de DNA.
- Entre los vectores de clonación se cuentan los plásmidos, bacteriófagos y, para los insertos de DNA de mayor longitud, los cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y los cromosomas artificiales de levadura (YAC).
- Las endonucleasas de restricción (especialmente los enzimas de tipo II) y la DNA ligasa son enzimas esenciales en la clonación.
- Las células que contienen secuencias de DNA determinadas se pueden identificar mediante métodos de hibridación.
- Las técnicas de ingeniería genética permiten manipular las células para que expresen y/o modifiquen los genes clonados.

9.2 De los genes a los genomas

La **genómica** moderna permite actualmente el estudio del DNA a escala celular, desde los genes individuales hasta el complemento genético completo de un organismo –su genoma–. Las bases de datos genómicos crecen rápidamente, a medida que los logros de la secuenciación van siendo superados por los que llegan a continuación. La biología del siglo xxi avanzará

con ayuda de fuentes de información inimaginables hace sólo unos pocos años. A continuación describiremos algunas tecnologías que hacen posibles estos avances.

Las genotecas suministran catálogos especializados de información genética

Una genoteca de DNA es una colección de clones de DNA reunidos con objeto de disponer de una fuente de DNA para secuenciar, descubrir nuevos genes o realizar estudios de la función génica. Hay distintos tipos de genotecas según el origen del DNA. Entre las mayores se encuentran las genotecas genómicas, producidas cuando el genoma completo de un organismo particular se corta en millares de fragmentos y *todos* los fragmentos son clonados por inserción en un vector de clonación.

El primer paso en la preparación de una biblioteca genómica es la digestión parcial del DNA con endonucleasas de restricción, de forma que cualquier secuencia se encontrará en fragmentos de un orden de tamaños –compatible con el vector de clonación, lo que asegura que virtualmente todas las secuencias estén representadas en los clones de la genoteca–. Los fragmentos que son demasiado grandes o demasiado pequeños para la clonación se eliminan por centrifugación o electroforesis. El vector de clonación, tal como un plásmido BAC o YAC, se corta con la misma endonucleasa de restricción y se liga con los fragmentos de DNA genómico. La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar células bacterianas o de levadura para preparar un conjunto de células, cada una de ellas con una molécula de DNA recombinante distinta. Idealmente, todo el DNA del genoma estudiado estará representado en la genoteca. Cada célula bacteriana o de levadura transformada crece y forma una colonia, o "clon", de células idénticas, cada una con el mismo plásmido recombinante.

Los clones individuales de una genoteca se pueden ordenar identificando clones con secuencias solapadas, mediante métodos de hibridación. Un conjunto de clones solapados constituye un catálogo de un largo segmento continuo de un genoma, a menudo designado como **cóntigo** (Fig. 9-13). Secuencias previamente estudiadas o genes enteros pueden ser ubicados dentro de la genoteca mediante métodos de hibridación para determinar qué clones de la genoteca contienen la secuencia conocida. Si la secuencia ha sido previamente cartografiada en un cromosoma, se puede determinar la localización (en el genoma) del DNA clonado y de cualquier cóntigo del que forme parte. Una genoteca bien caracterizada puede contener millares de largos cóntigos, todos ellos asignados y ordenados en cromosomas específicos para formar un mapa físico detallado. Las secuencias conocidas de la genoteca (denominadas **sitios marcados por secuencia** o **STS**) pueden servir de referencia en proyectos de secuenciación genómica.

A medida que se conocen más y más secuencias genómicas, la utilidad de las genotecas genómicas disminuye en favor de genotecas más especializadas, orientadas al estudio de la función génica. Un ejemplo es una genoteca que contenga solamente los genes que se *expresan* –es decir, que se transcriben en RNA– en un organismo o incluso en ciertas células o tejidos. Una genoteca de este tipo carece de las secuencias de

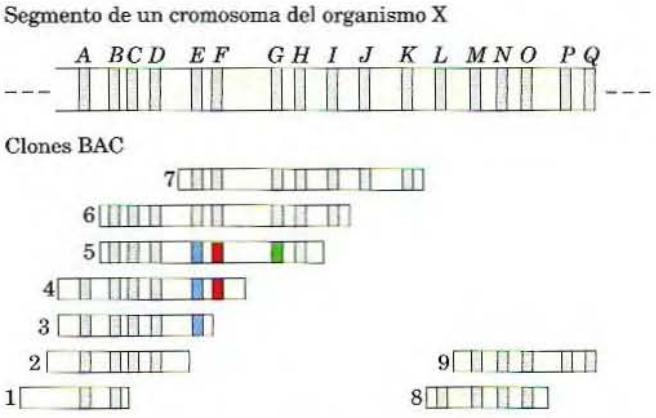


FIGURA 9-13 Ordenación de los clones de una genoteca de DNA. Se representa el fragmento de un cromosoma de un organismo hipotético X, con marcadores de a A a Q, que representan sitios marcados por secuencia (STS: segmentos de DNA de secuencia conocida, entre los que se encuentran genes conocidos). Debajo del cromosoma se muestra una serie de clones BAC ordenados, numerados del 1 al 9. La ordenación de los clones en el mapa genético es un proceso que tiene múltiples pasos. La presencia o ausencia de un STS en un clon individual puede determinarse por hibridación –por ejemplo, examinando cada clon con un DNA amplificado por PCR de un STS–. Una vez el STS de cada clon BAC ha sido identificado (así como los propios STS si su locación es todavía desconocida), los clones pueden ordenarse en el mapa. Por ejemplo, compárense los clones 3, 4 y 5. El marcador *E* (azul) se encuentra en los tres clones; *F* (rojo) en los clones 4 y 5, pero no en el 3; y *G* (verde) sólo en el clon 5. Ello indica que el orden de los sitios es *E, F, G*. Los clones están parcialmente solapados y su orden debe ser 3, 4, 5. La serie ordenada de clones resultante recibe el nombre de cóntigo.

DNA no codificantes que constituyen una gran parte de muchos genomas eucarióticos. En primer lugar, se extrae el mRNA de un organismo o de determinadas células del organismo y se sintetizan **DNA complementarios (cDNA)** a partir del RNA en una reacción de varios pasos catalizada por la transcriptasa inversa (Fig. 9-14). Los fragmentos de DNA de doble hebra resultantes se insertan en un vector adecuado y se clonan, generándose una población de clones denominada **genoteca de cDNA.** La búsqueda de un gen concreto es más fácil en una genoteca preparada a partir de los mRNA de una célula que exprese este gen. Por ejemplo, la clonación de los genes de las globinas puede ser más sencilla a partir de una genoteca de cDNA de las células precursoras de los eritrocitos, en las que aproximadamente la mitad de los mRNA codifican globinas. Para facilitar la cartografía de los grandes genomas, se puede secuenciar parcialmente al azar una genoteca de cDNA para obtener un tipo muy útil de STS, denominado **secuencia de identificación expresada (EST).** Las EST, de tamaños desde unas pocas docenas de pares de bases a varios centenares, se pueden situar en el mapa genómico general, proporcionando marcadores para los genes expresados. Centenares de miles de EST fueron incorporadas a los mapas físicos detallados usados como guía en la secuenciación del genoma humano

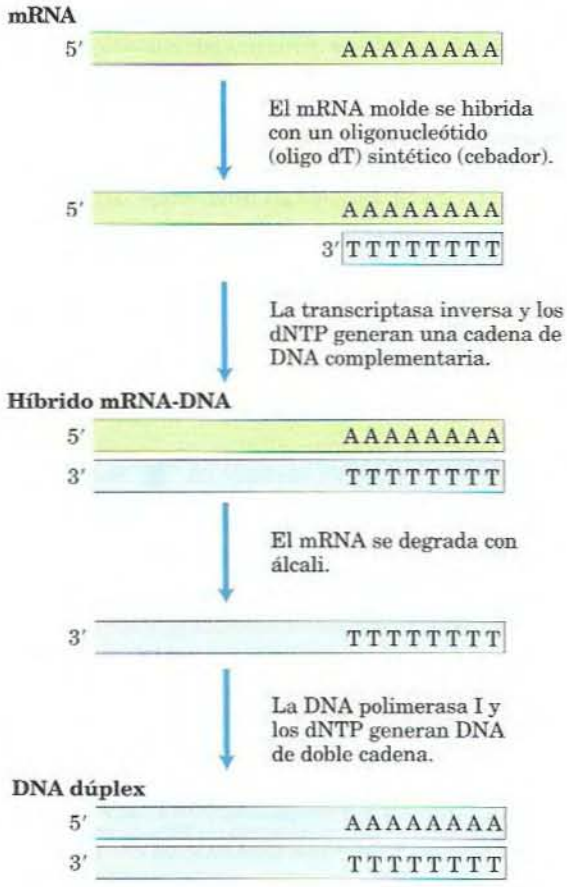


FIGURA 9-14 Construcción de una genoteca de cDNA a partir de mRNA. El mRNA de una célula contiene los transcritos de miles de genes y los cDNA generados son, en consecuencia, heterogéneos. El DNA dúplex producido de este modo se inserta en un vector de clonación adecuado. La transcriptasa inversa puede sintetizar DNA sobre un molde de RNA o de DNA (véase Fig. 26-29).

Una genoteca de cDNA puede estar todavía más especializada si se clona un cDNA o un fragmento de cDNA en un vector que empalme la secuencia del cDNA con la secuencia de un gen marcador. Los genes fusionados forman una "construcción de referencia". Dos marcadores útiles son los genes de la proteína fluorescente verde y los epítopos de identificación. Un gen diana empalmado con el gen de la **proteína fluorescente verde (GFP)** genera una proteína de fusión muy fluorescente (Fig. 9-15a). Con el microscopio se pueden observar unas pocas moléculas de esta proteína, para el estudio de su localización y movimientos en la célula. Un **epítopo de identificación** es una corta secuencia proteica unida fuertemente a un anticuerpo monoclonal bien caracterizado (Capítulo 5). La proteína marcada puede ser precipitada específicamente a partir de un extracto crudo de proteína por interacción con el anticuerpo (Fig. 9-15b). Si cualquier otra proteína se une a la proteína marcada, también precipitará, obteniéndose información sobre las interacciones proteína-proteína en la célula. La diversidad y utilidad de las genotecas especializadas de DNA crecen de año en año.

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica secuencias de DNA específicas

El Proyecto Genoma Humano, junto con otros muchos intentos de secuenciar los genomas de organismos de todo tipo, está suministrando información sin precedentes sobre la secuencia de los genes. Esto, a su vez, ha simplificado el proceso de clonación de genes para un análisis bioquímico más detallado. Si se conoce al menos la secuencia de las partes flanqueantes del segmento de DNA que se desea clonar, el número de copias de este segmento de DNA puede amplificarse enormemente con la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR),** técnica ideada por Kary Mullis en 1983. El DNA amplificado puede ser clonado directamente o usado en una amplia variedad de procedimientos analíticos.

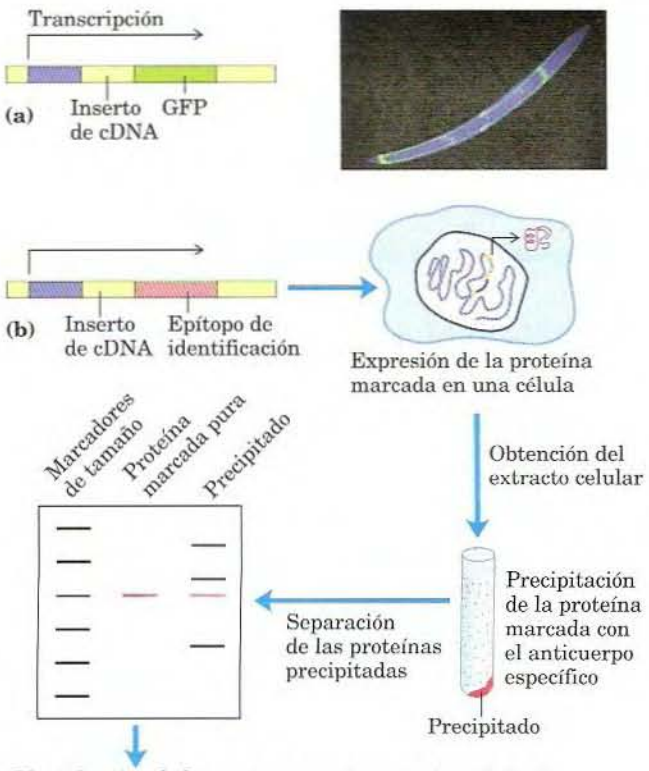


FIGURA 9-15 Genotecas de DNA especializadas. (a) El clonaje de un cDNA junto al gen de la proteína fluorescente verde (GFP) crea una construcción de referencia. La transcripción de RNA avanza a lo largo del gen de interés (gen insertado) y del gen marcador y el transcrito de mRNA se expresa como una proteína de fusión. La parte de proteína correspondiente a GFP es visible en el microscopio de fluorescencia. La fotografía muestra un gusano nematodo que contiene una proteína de fusión con GFP que sólo se expresa en las cuatro neuronas del "tacto" que se encuentran a lo largo del cuerpo. Construcciones de referencia **(b)** Si el cDNA se clona junto al gen de un epítopo de identificación, la proteína de fusión resultante puede precipitarse con anticuerpos contra el epítopo. Cualquier otra proteína que interaccione con la proteína marcada también precipitará, lo que ayuda a identificar las interacciones proteína-proteína.

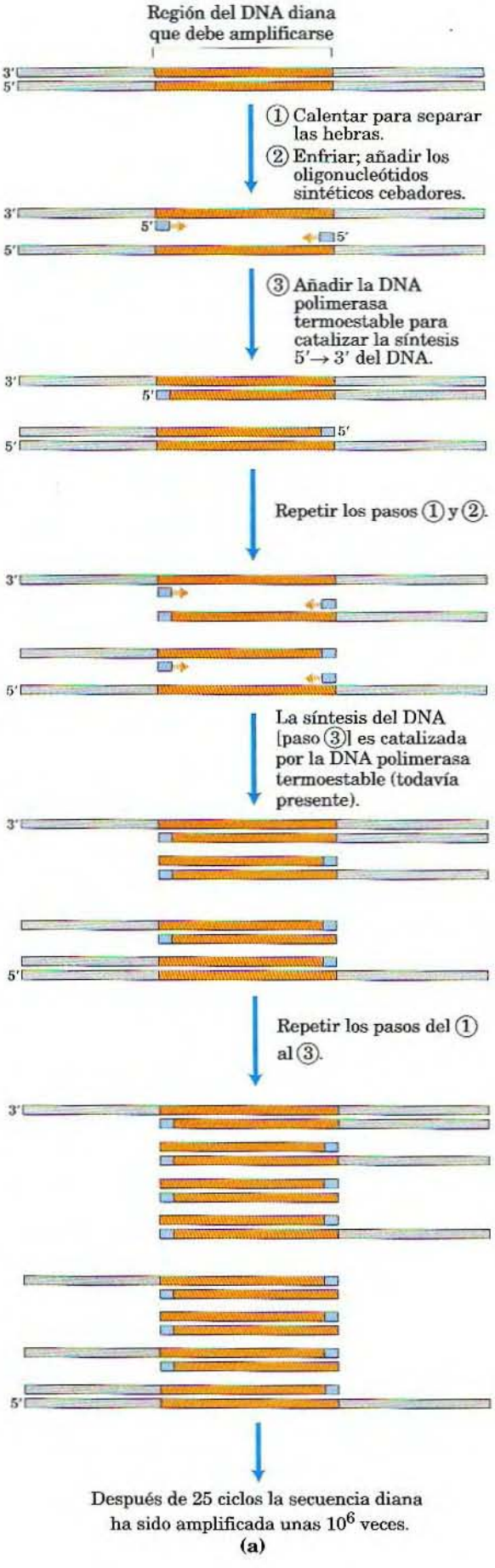


FIGURA 9-16 Amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa. **(a)** El procedimiento de la PCR tiene tres pasos. ① Se separan las cadenas de DNA por calentamiento, a continuación ② se hibridan con un exceso de cebadores de DNA sintético cortos (azul), que flanquean la región que se desea amplificar; ③ el DNA nuevo se sintetiza por polimerización. Los tres pasos se repiten unos 25 o 30 ciclos. La DNA polimerasa termoestable *Taq*I (de *Thermus aquaticus*, una especie bacteriana que vive en manantiales de agua caliente) no se desnaturaliza en las etapas de calentamiento. **(b)** El DNA amplificado por la PCR puede ser clonado. Los cebadores pueden incorporar DNA no complementario en los extremos que contengan el sitio de corte de una endonucleasa de restricción. Aunque estas partes de los cebadores no se aparean con el DNA diana, el proceso de la PCR los incorpora al DNA que es amplificado. El corte de los fragmentos amplificados en estos sitios crea extremos cohesivos que facilitan la ligación del DNA amplificado en un vector de clonación. **Reacción en cadena de la polimerasa**

La PCR es de una gran simplicidad. Se preparan dos oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario de secuencias de las hebras opuestas del DNA diana, situadas justo más allá de los extremos del segmento que se debe amplificar. Los oligonucleótidos sirven de cebadores para la replicación, con los extremos 3′ de las sondas hibridadas orientados uno hacia otro y posicionados para cebar la síntesis a lo largo del segmento de DNA deseado (Fig. 9-16). (Las DNA polimerasas sintetizan la hebras de DNA a partir de desoxirribonucleótidos, utilizando un molde de DNA, tal como se describe en el Capítulo 25.) El DNA aislado que contiene el segmento que se desea amplificar se calienta brevemente para desnaturalizarlo y a continuación se enfría en presencia de un gran exceso de los oligonucleótidos sintéticos que hacen de cebadores. A continuación, se añaden los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y el segmento de DNA que ha sido cebado es replicado selectivamente. El ciclo de calentamiento, enfriamiento y replicación se repite 25 o 30 veces en unas pocas horas por medio de un proceso automatizado que amplifica el segmento de DNA flanqueado por los cebadores hasta que pueda ser analizado o clonado fácilmente. En la PCR se usan DNA polimerasas termoestables, tales como la polimerasa *Taq* (obtenida de una bacteria que vive a 90 °C). El enzima permanece activo después de cada paso de calentamiento y no tiene que ser reemplazado. El diseño cuidadoso de los cebadores usados en la PCR, introduciendo, por ejemplo, sitios de corte para enzimas de restricción, puede facilitar la ulterior clonación del DNA amplificado (Fig. 9-16b).

Esta tecnología posee una gran sensibilidad: la PCR puede detectar y amplificar una sola molécula de DNA en casi cualquier tipo de muestra. Aunque el DNA se degrada lentamente con el tiempo (p. 293), con ayuda de la PCR se ha logrado clonar DNA de más de 40.000 años de antigüedad. Esta técnica se ha utilizado para clonar fragmentos de DNA procedentes de restos humanos momificados y de animales extintos tales como los mamuts; se han abierto, así, nuevas posibilidades para la arqueología y la paleontología moleculares. El DNA de sitios de enterramiento ha sido amplificado con la PCR y se ha usado para seguir antiguas migraciones humanas. La epidemiología puede utilizar muestras amplificadas por la PCR a partir de restos humanos para seguir la evolución de virus humanos patógenos. Además de su utilidad para clonar DNA, la PCR es una poderosa herramienta en medicina forense (Recuadro 9-1). También está siendo usada en la detección de infecciones víricas antes de la aparición de los primeros síntomas y en el diagnóstico prenatal de una amplia variedad de enfermedades genéticas.

El método de la reacción en cadena de la polimerasa también es importante para continuar avanzando en la secuenciación de genomas completos. Por ejemplo, el cartografiado de los marcadores de secuencia expresados en un cromosoma particular a menudo implica la amplificación de las EST por la PCR, seguida de hibridación del DNA amplificado con clones de una genoteca ordenada. En el Proyecto Genoma Humano se han desarrollado muchas otras aplicaciones de la PCR, que examinaremos a continuación.

Secuenciación de genomas enteros

El genoma es la fuente de información básica sobre un organismo y naturalmente el que suscita mayor interés es el nuestro. Menos de diez años después del desarrollo de métodos de secuenciación eficaces, se empezó a discutir seriamente sobre las posibilidades de secuenciar en su totalidad los tres mil millones de pares de bases del genoma humano. El Proyecto Genoma Humano surgió de una iniciativa internacional dotada de un presupuesto considerable y dio sus primeros pasos a finales de la década de 1980. Este esfuerzo aglutinó contribuciones importantes de 20 centros de secuenciación pertenecientes a seis naciones: Estados Unidos, Gran Bretaña, Japón, Francia, China y Alemania. La coordinación corrió a cargo de la Office of Genome Research de los National Institutes of Health, dirigida primero por James Watson y después de 1992 por Francis Collins. Al principio, la secuenciación de un genoma de 3×10^9 pb parecía una tarea irrealizable, pero poco a poco los avances tecnológicos la hicieron posible. La secuencia completa del genoma humano fue publicada en abril de 2003, varios años antes de lo previsto.

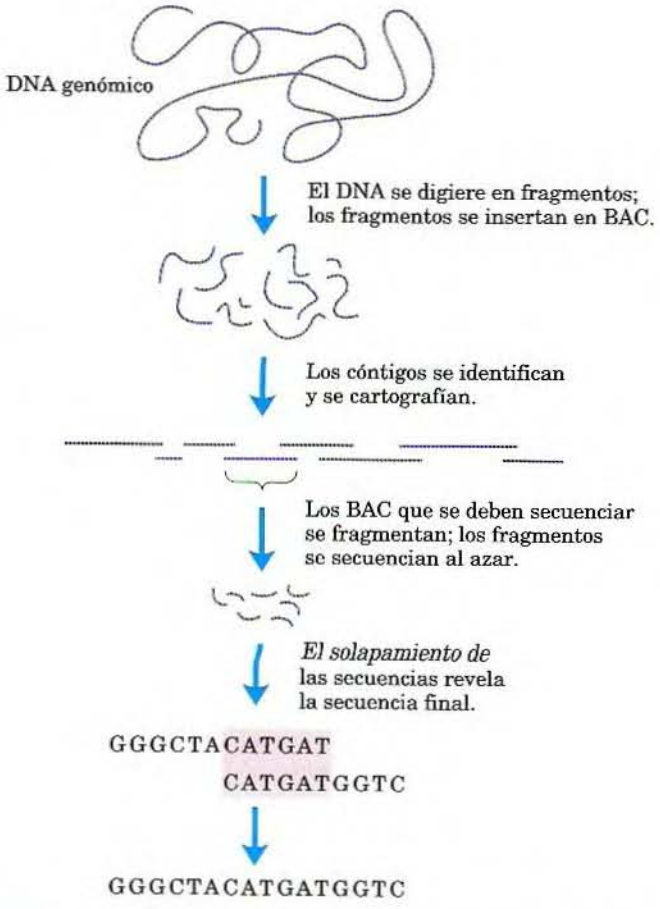


FIGURA 9-17 La estrategia del Proyecto Genoma Humano. Los clones aislados de una genoteca genómica se ordenaron en un mapa físico detallado; a continuación, los clones individuales fueron secuenciados mediante protocolos de secuenciación al azar. La estrategia utilizada en el proyecto privado prescindió de la elaboración del mapa físico y secuenció el genoma entero mediante clonación al azar.

RECUADRO 9–1 BIOQUÍMICA PRÁCTICA

Un arma poderosa para la medicina forense

Tradicionalmente, uno de los métodos más exactos para situar a un individuo en la escena de un crimen ha sido la toma de huellas dactilares. Un método basado en las técnicas del DNA recombinante, la **huella dactilar del DNA,** puede ser más poderoso que cualquier otro método.

La determinación de la huella dactilar del DNA se basa en los **polimorfismos de secuencia.** Se trata de pequeñas diferencias en las secuencias (generalmente cambios de un solo par de bases) de diferentes individuos, que se presentan, en promedio, una vez cada 1000 pb. Cada diferencia con respecto a la secuencia consenso del genoma humano (el primero en ser obtenido) se presenta en una parte de la población, pero todos los individuos presentan algunas diferencias. Algunos de los cambios de secuencia afectan a dianas de enzimas de restricción, originando diferencias individuales en los tamaños de los fragmentos de DNA producidos por digestión con un enzima de restricción determinado. Estas diferencias dan lugar a **polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).**

La detección de RFLP se basa en un procedimiento especial de hibridación llamado **transferencia Southern** (Fig. 1). Fragmentos de DNA procedentes de la digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción se separan según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de DNA se desnaturalizan por inmersión del gel en álcali y luego se transfieren a una membrana de nailon para reproducir la distribución de fragmentos del gel. A continuación, se sumerge la membrana en una disolución que contenga una sonda de DNA marcada con radiactividad. La sonda de una secuencia que se repita varias veces en el genoma humano identifica generalmente unos pocos de los millares de fragmentos de DNA generados cuando el genoma humano es digerido con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos que se hibridan con la sonda se revelan por autorradiografía, como en la Figura 9-9.

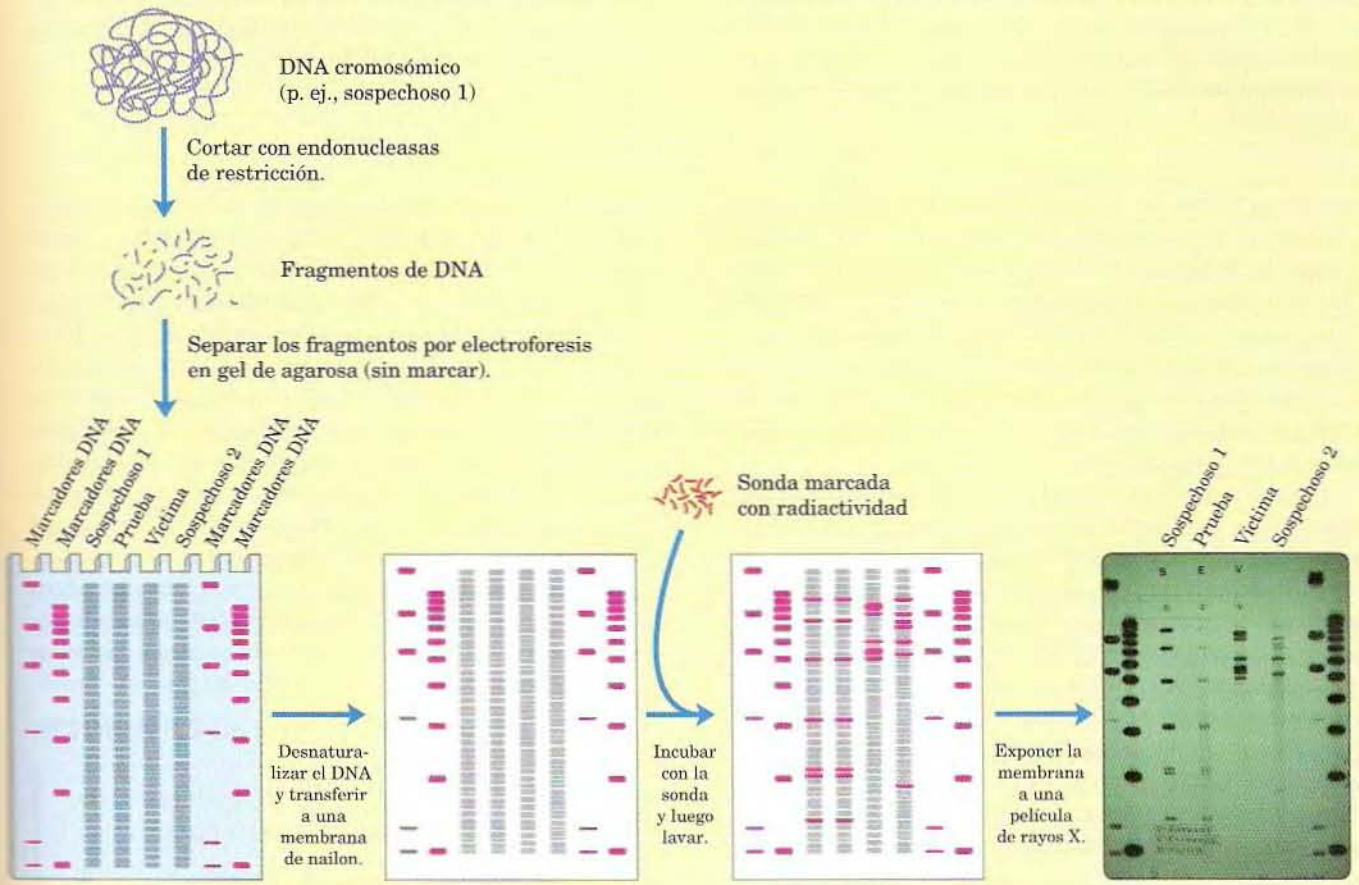
Las secuencias de DNA genómico usadas en estos ensayos son frecuentemente regiones que contienen DNA repetitivo (cortas secuencias repetidas miles de veces en tándem), que son frecuentes en los genomas de los eucariotas superiores (véase Fig. 24-8). El número de unidades que se repiten varía de un individuo a otro (excepto en el caso de los gemelos idénticos). Si se elige una sonda apropiada, la distribución de bandas en este tipo de experimento es distintiva para cada individuo. La combinación de varias sondas hace el ensayo tan selectivo que se podría identificar un individuo determinado entre toda la población humana. Sin embargo, el análisis de transferencia Southern necesita muestras de DNA relativamente recientes y una cantidad de DNA mayor que la que normalmente puede recuperarse de la escena de un crimen. La PCR, que permite amplificar muy pequeñas cantidades de DNA (véase Fig. 9-16a), aumenta la sensibilidad del análisis de RFLP. De esta forma, pueden obtenerse huellas dactilares de DNA a partir de un único folículo piloso, una gota de sangre, una pequeña muestra de semen de la víctima de una violación o muestras de meses e incluso años.

Las pruebas aportadas por estos métodos pueden resultar decisivas en los casos judiciales. En el ejemplo de la Figura 1, el DNA del semen obtenido de una víctima de violación y asesinato se compara con el DNA de la víctima y de dos sospechosos. Cada una de las muestras de DNA se cortó en fragmentos que se separaron por electroforesis en gel. Se utilizaron sondas de DNA radiactivas para detectar la pequeña parte de estos fragmentos que contenía secuencias complementarias a las sondas. El tamaño de los fragmentos identificados varió de un individuo a otro, tal como puede comprobarse observando los tres perfiles de los tres individuos (la víctima y los dos sospechosos). Uno de los sospechosos mostró un perfil de bandas idéntico al del semen obtenido de la víctima. En este caso se usó una única sonda, pero se utilizarían tres o cuatro sondas diferentes (en experimentos diferentes) para conseguir una identificación inequívoca.

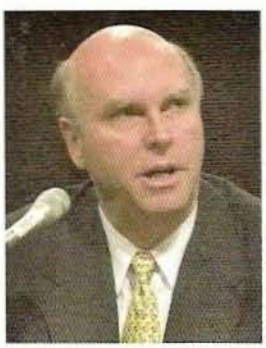
Este logro fue el resultado de un esfuerzo internacional cuidadosamente planificado a lo largo de 14 años. Los equipos de investigación confeccionaron primero un mapa físico detallado del genoma humano, con clones procedentes de cada uno de los cromosomas organizados en largos cóntigos (Fig. 9-17). Cada cóntigo contenía marcadores de tipo STS cada 100.000 pb como máximo. El genoma así cartografiado pudo dividirse entre los diferentes centros internacionales, para secuenciar los clones en BAC o YAC de los segmentos particulares del genoma que les correspondieron. Puesto que muchos de los clones tenían más de 100.000 pb de longitud y las modernas técnicas de secuenciación pueden resolver sólo de 600 a 750 pb de una vez, cada clon tuvo que ser secuenciado a trozos. La estrategia de secuenciación fue una aproximación al azar, con ayuda de nuevos secuenciadores automáticos muy eficaces, consistente en secuenciar fragmentos al azar de un clon determinado. La secuencia del clon completo se montaba mediante la identificación asistida por ordenador de los solapamientos. El número de trozos de clon secuenciados se determinó estadísticamente, de modo que la longitud completa del clon fue secuenciada una media de cuatro a seis veces. Las secuencias, a medida que se iban obteniendo, eran introducidas en un banco de datos que cubría el genoma completo. La construcción del mapa físico fue una larga tarea, cuyo progreso se reflejó en los informes anuales publicados en las principales revistas científicas a lo largo de la década de 1990, al final de la cual el mapa estaba prácticamente terminado. La finalización del proyecto de secuenciación estaba prevista para el año

Estos análisis han servido tanto para condenar como para absolver sospechosos y para establecer la paternidad con un extraordinario grado de confianza. El impacto de esta tecnología en los procesos judiciales continuará aumentando, conforme se llegue a acuerdos sobre las condiciones de su uso y los métodos se divulguen entre los laboratorios forenses. Casos que han permanecido sin resolver, incluso durante décadas, pueden ser investigados con estas técnicas: en 1996 se usó la huella dactilar del DNA para confirmar la identificación de los huesos del último zar de Rusia y de su familia, asesinados en 1918.

FIGURA 1 La transferencia Southern aplicada a la determinación de la huella dactilar de DNA. Este procedimiento recibe este nombre en honor de Jeremy Southern, quien desarrolló la técnica.



Francis S. Collins


J. Craig Venter

2005, pero las circunstancias y la tecnología hicieron posible acelerar el proceso.

En 1997 hubo una iniciativa comercial competitiva para secuenciar el genoma humano por parte de la compañía recién creada Celera Corporation. Dirigido por J. Craig Venter, el grupo Celera utilizó una nueva estrategia denominada "secuenciación al azar del genoma entero", que elimina la necesidad de confeccionar un mapa físico del genoma. El método consiste en secuenciar fragmentos al azar de todo el genoma. Los segmentos se ordenan gracias a la identificación de los solapamientos asistida por ordenador (con la referencia, no obstante, del mapa físico detallado elaborado por el proyecto público). En los inicios del Proyecto Genoma Humano, la secuenciación al azar a esta escala fue descartada por conside-

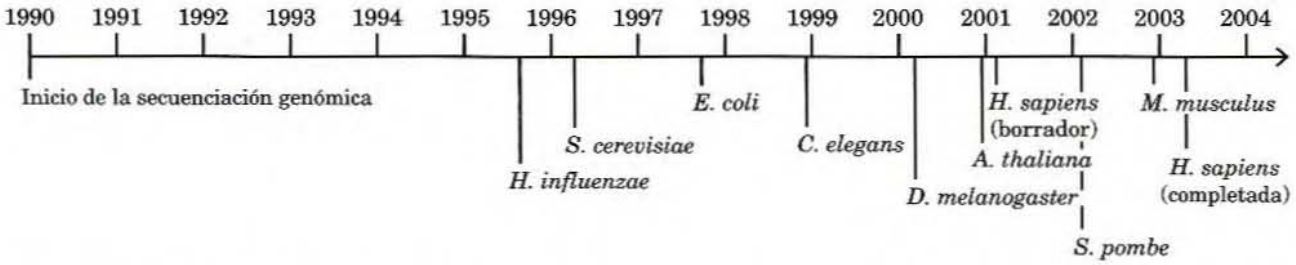


FIGURA 9-18 Cronología de la secuenciación genómica. Discusiones a mediados de los años ochenta condujeron al inicio del proyecto en 1989. El trabajo preparatorio, en el que figuraba el cartografiado exhaustivo para disponer de referencias en el genoma, ocupó buena parte de los años noventa. Se iniciaron diferentes proyectos para secuenciar los genomas de otros organismos importantes para la investigación. Entre las primeras secuencias completadas se encontraban muchas especies bacterianas (tales como *Haemophilus influenzae*), la levadura (*S. cerevisiae*), un gusano nematodo (*C. elegans*), la mosca del vinagre (*D. melanogaster*) y una planta (*A. thaliana*). Las secuencias completas de genomas de mamíferos, humanos incluidos, empezaron a aparecer en 2000. Cada Proyecto Genoma posee una página web que sirve de depositaria de los datos más recientes.

rarse impracticable. Sin embargo, los avances informáticos y la automatización de la secuenciación hicieron posible esta metodología hacia 1997. La carrera que se produjo a continuación entre la iniciativa pública y la privada acortó considerablemente el tiempo hasta completar el proyecto. La publicación del borrador de la secuencia del genoma humano en 2001 fue seguida por dos años de trabajo para eliminar cerca de un millar de discontinuidades y así disponer de secuencias de calidad en la totalidad del genoma.

El Proyecto Genoma Humano es la culminación de la biología del siglo xx y ofrece perspectivas científicas profundamente renovadas para el nuevo siglo. El genoma humano es sólo parte del esfuerzo emprendido. Los genomas de muchas otras especies están siendo (o han sido) secuenciados; entre ellos se encuentran las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (completado en 1996) y *Schizosaccharomyces pombe* (2002), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (1998), la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (2000), la planta *Arabidopsis thaliana* (2000), el ratón *Mus musculus* (2002), el pez cebra y docenas de bacterias y arquebacterias (Fig. 9-18). La mayor parte de los esfuerzos iniciales se han dedicado a especies habitualmente usadas en el laboratorio. Sin embargo, la secuenciación de genomas se extenderá necesariamente a muchas otras especies a medida que crezca la experiencia y mejore la tecnología. Actualmente, son numerosos los esfuerzos encaminados a cartografiar genes e identificar nuevas proteínas y genes responsables de enfermedades.

El resultado es un banco de datos con el potencial no sólo de impulsar rápidos avances en la biología, sino también de cambiar la visión que los humanos tienen de sí mismos. Algunas de las primeras conclusiones que pueden extraerse de la secuencia del genoma humano van desde lo misterioso hasta lo profundo. No somos tan complejos como pensábamos. Los humanos no poseemos 100.000 genes en los aproximadamente $3{,}2 \times 10^9$ pb, según las estimaciones de hace unas pocas décadas, sino solamente de 30.000 a 35.000. Esto representa aproximadamente tres veces más genes que la mosca del vinagre (con 13.000) y dos veces más que un gusano nematodo (18.000). Aunque los humanos han hecho su aparición hace relativamente poco tiempo, el genoma humano es muy antiguo. De las 1278 familias de proteínas identificadas en un escrutinio inicial, sólo 94 eran exclusivas de los vertebrados. Sin embargo, aunque compartimos muchos dominios proteicos con las plantas, los gusanos y las moscas, utilizamos estos dominios en combinaciones más complejas. Formas alternativas de expresión génica (Capítulo 26) permiten obtener más de una proteína de un solo gen –proceso que los humanos y otros vertebrados utilizan con mayor frecuencia que las bacterias, los gusanos o cualquier otra forma de vida–. Ello permite una mayor complejidad en las proteínas generadas a partir de nuestra dotación génica.

Sabemos ahora que solamente del 1,1% al 1,4% de nuestro DNA codifica proteínas (Fig. 9-19). Más del 50% de nuestro genoma consiste en secuencias cortas repetidas, la mayoría de las cuales –alrededor del 45% de la totalidad del genoma– proce-

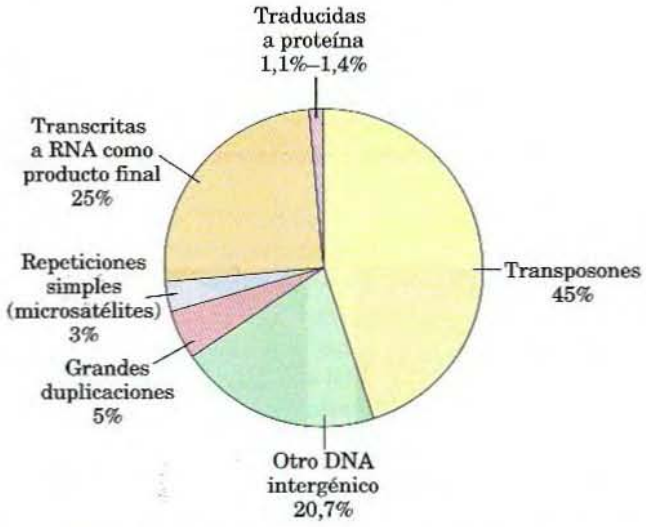


FIGURA 9-19 Tipos de secuencia en el genoma humano. El diagrama muestra las proporciones en nuestro genoma de varios tipos de secuencias.

den de transposones, cortos elementos móviles de DNA que son parásitos moleculares (Capítulo 25)–. Muchos transposones han permanecido en el mismo lugar desde hace mucho tiempo, al haber sufrido alteraciones y perdido la capacidad de moverse a nuevas localizaciones en el genoma. Otros todavía se mueven activamente con baja frecuencia, contribuyendo a que el genoma sea una entidad dinámica en continua evolución. Se conocen unos pocos transposones que han sido cooptados por el huésped y desempeñan funciones celulares útiles.

¿Qué nos dice toda esta información sobre la medida en que un ser humano difiere de otro? En la población humana hay millones de diferencias de una sola base, denominadas **polimorfismos de un solo nucleótido**, o **SNP.** Cada ser humano difiere de otro en aproximadamente 1 pb de cada 1000. De estas pequeñas diferencias genéticas procede la diversidad humana de la que todos somos conscientes –diferencias en el color del pelo, en la visión, en las alergias a los medicamentos, en el número de pie e incluso (en grado desconocido) en el comportamiento–. Algunos SNP están asociados a determinadas poblaciones humanas y pueden suministrar información sobre migraciones que ocurrieron hace miles de años y sobre nuestro pasado evolutivo más lejano.

Por muy espectaculares que parezcan estos avances, la secuenciación del genoma humano habrá sido fácil comparada con lo que está por venir –el intento de comprender la información contenida en cada genoma–. Las secuencias genómicas que son añadidas mensualmente a los bancos de datos internacionales son como mapas de carreteras, escritas en parte en un lenguaje que todavía no comprendemos. Sin embargo, son de gran utilidad para catalizar el descubrimiento de nuevas proteínas y procesos que repercuten en todos los ámbitos de la bioquímica, como se pondrá de manifiesto en los próximos capítulos.

RESUMEN 9.2 De los genes a los genomas

- La genómica consiste en el estudio de los genomas y su contenido génico.
- Los segmentos de DNA genómico pueden organizarse en genotecas –tales como las genotecas genómicas y de cDNA– con una gran variedad de diseños y propósitos.
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirve para amplificar segmentos seleccionados de DNA de una genoteca o del genoma entero.
- Como resultado de un esfuerzo internacional los genomas de muchos organismos, incluido el humano, han sido secuenciados en su totalidad y están disponibles en bancos de datos públicos.

9.3 De los genomas a los proteomas

Un gen no es una mera secuencia de DNA; es información que es convertida en un producto útil –una proteína o un RNA funcionales– siempre que éste sea necesario para la célula. El primer paso en la exploración de un genoma una vez secuenciado consiste obviamente en catalogar los productos de los genes que contiene. Los genes que codifican RNA como producto final son algo más difíciles de identificar que los que codifican proteínas, aunque éstos pueden ser muy difíciles de reconocer en un genoma de vertebrado. La súbita disponibilidad de gran número de secuencias ha hecho aún más evidente que pese a los muchos años de avances de la bioquímica todavía hay miles de proteínas en cada célula eucariótica (y otras muchas en las bacterias) completamente desconocidas. Estas proteínas pueden participar en procesos todavía no descubiertos o pueden contribuir de forma indeterminada en procesos que creemos entender. Además, las secuencias genómicas no nos dicen nada de la estructura tridimensional de las proteínas ni de cómo se modifican una vez sintetizadas. Las proteínas con sus múltiples funciones se han convertido en el objetivo prioritario de la bioquímica celular.

El conjunto de proteínas expresado por un genoma se denomina **proteoma,** término que hizo su aparición en la literatura científica en 1995. Este concepto dio rápidamente origen a un nuevo campo de investigación, denominado **proteómica.** El problema que plantea la proteómica es de fácil formulación, aunque su solución es ardua. Cada genoma contiene millares de genes que codifican proteínas, cuyas estructuras y funciones deseamos conocer en su totalidad. Teniendo en cuenta que muchas proteínas nos sorprenden incluso después de años de estudio, la investigación de un proteoma entero es una empresa formidable. El simple descubrimiento de la función de nuevas proteínas requiere un trabajo intensivo. Los bioquímicos disponen actualmente de atajos, fruto de un amplio abanico de técnicas nuevas o actualizadas.

La función de las proteínas puede describirse a tres niveles. La **función fenotípica** describe los efectos de una proteína sobre el organismo entero. Por ejemplo, la pérdida de la proteína puede redundar en un crecimiento más lento del organismo, en un patrón de desarrollo alterado o incluso la muerte. La **función celular** es una descripción del conjunto de interacciones de la proteína a nivel celular. Las interacciones con otras proteínas en la célula ayudan a definir los tipos de procesos metabólicos en los que participa la proteína. Finalmente, la **función molecular** se refiere a la actividad bioquímica concreta de la proteína, incluyendo detalles tales como las reacciones catalizadas por un enzima o los ligandos unidos por un receptor.

Se está realizando un esfuerzo masivo con varios genomas tales como el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la planta *Arabidopsis*, con objeto de inactivar cada uno de sus genes por ingeniería genética para investigar su efecto sobre el organismo. Si los patrones de crecimiento cambian (o si no hay crecimiento en absoluto), se obtiene información sobre la función fenotípica de la proteína producto del gen.

Hay otras tres maneras principales de investigar la función proteica: (1) comparaciones estructurales y de secuencia con genes y proteínas de función conocida, (2) determinación de dónde y cuándo se expresa un gen y (3) investigación de las interacciones de la proteína con otras proteínas. Examinaremos sucesivamente cada uno de estos aspectos.

Las relaciones entre las secuencias o las estructuras suministran información sobre la función de las proteínas

Una de las razones importantes para secuenciar numerosos genomas es construir un banco de datos que sirva para atribuir funciones a los genes a partir de la comparación de los genomas **(genómica comparada).** A veces, un gen recién descubierto puede ser relacionado por homología de secuencia con un gen ya estudiado en otra o en la misma especie y su función puede ser definida total o parcialmente por esta relación. Tales genes –de diferentes especies, pero con una clara relación de secuencia y función– se denominan **ortólogos.** Los genes relacionados de forma similar, pero pertenecientes a la misma especie, se denominan **parálogos** (véase Fig. 1-37). Si la función de un gen se ha caracterizado en una especie, esta información puede usarse para asignar la función del gen al ortólogo de una segunda especie. La identidad es más fácil de establecer cuando se comparan genomas de especies relativamente próximas tales como el ratón y los humanos, aunque muchos genes ortólogos se han identificado en especies tan lejanas como las bacterias y los humanos. A veces, incluso el orden de los genes en el cromosoma está conservado en largos segmentos del genoma de especies próximas (Fig. 9-20). La conservación del orden de los genes –**sintenia**– es otro argumento a favor de una relación ortóloga entre genes localizados en los mismos lugares de segmentos relacionados.

Alternativamente, ciertas secuencias asociadas con determinados motivos estructurales (Capítulo 4) pueden identificarse en las proteínas. La presencia de un motivo estructural puede sugerir que, por ejemplo, cataliza la hidrólisis del ATP, se une al DNA o forma un complejo con iones zinc, lo que puede ayudar a definir la función molecular. Estas relaciones se establecen con ayuda de programas de ordenador cada vez más refinados, limitados solamente por la información disponible sobre la estructura de los genes y de las proteínas.

Para impulsar la atribución de funciones a partir de las relaciones estructurales se ha puesto en marcha un proyecto a gran escala de proteómica estructural. La meta es cristalizar y determinar la estructura de tantas proteínas y dominios estructurales como sea posible, en muchos casos con poca o ninguna información previa sobre la función de las proteínas. El proyecto ha sido facilitado por la automatización de algunos de los pasos más tediosos de la cristalización de proteínas (véase Recuadro 4-4). A medida que las estructuras vayan determinándose podrán consultarse en los bancos de datos estructurales descritos en el Capítulo 4. Este esfuerzo debería contribuir a establecer el grado de variación de los motivos estructurales. Cuando una proteína recién descubierta contiene plegamientos estructurales claramente relacionados con motivos de función conocida en los bancos de datos, es posible sugerir una función molecular para la proteína.

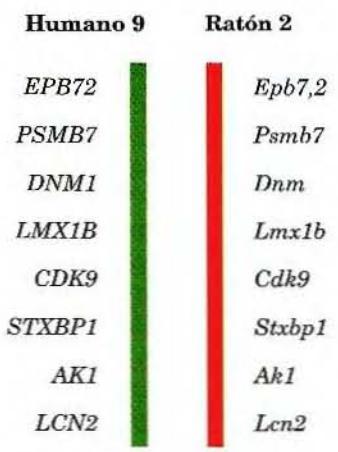


FIGURA 9-20 Sintenia en los genomas de ratón y humano. Grandes segmentos de los genomas de ratón y humano tienen genes estrechamente relacionados alineados en el mismo orden en los cromosomas, una relación denominada sintenia. El diagrama muestra segmentos del cromosoma 9 humano y del cromosoma 2 de ratón. Los genes de estos segmentos poseen un elevado grado de homología y el mismo orden de los genes. Los diferentes formatos de las letras de los nombres de los genes responden a las diferentes convenciones de la nomenclatura en los dos organismos.

Los patrones de expresión celular pueden revelar la función celular de un gen

En cada genoma recién secuenciado se encuentran genes que codifican proteínas sin una relación estructural evidente con genes o proteínas ya conocidos. En estos casos hay que utilizar otros métodos para obtener información sobre la función génica. Averiguar en qué tejidos se expresa un gen o qué circunstancias desencadenan la aparición del producto génico puede suministrar indicaciones valiosas. Para ello, se han desarrollado muchas metodologías diferentes.

Electroforesis en gel bidimensional Permite la separación y la visualización de hasta 1000 proteínas diferentes en un solo gel (véase Fig. 3-22). La espectrometría de masas (véase Recuadro 3-2) puede usarse a continuación para secuenciar parcialmente las proteínas individuales y así asignar cada una de ellas a un gen. La aparición o no aparición (o desaparición) de las manchas de una proteína determinada en muestras de diferentes tejidos, de tejidos similares en diferentes etapas del desarrollo o de tejidos tratados de manera que simulen diversas situaciones biológicas puede ayudar a definir su función celular.

Microchips de DNA Importantes avances en la tecnología de las genotecas, la PCR y la hibridación han hecho posible el desarrollo de los **microchips de DNA** (o **chips de DNA**), que permiten el escrutinio rápido y simultáneo de muchos miles de genes. Trozos de DNA de genes conocidos, de unas pocas docenas a varios centenares de nucleótidos de longitud, se amplifican por la PCR y se fijan sobre una superficie sólida, mediante dispositivos automáticos que depositan con precisión algunos nanolitros de una solución de DNA. Millares de gotas son depositadas en un casillero prediseñado que mide sólo unos pocos cm^2. Una estrategia alternativa consiste en sintetizar el DNA directamente sobre la superficie sólida, mediante fotolitografía (Fig. 9-21). Una vez confeccionado el chip

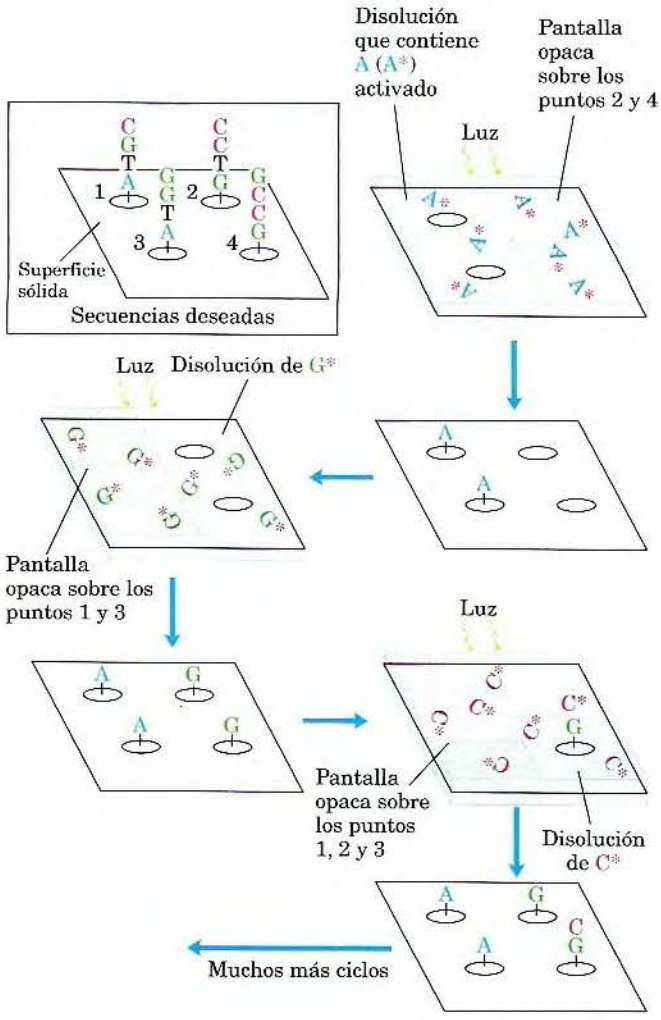


FIGURA 9-21 Fotolitografía. Esta técnica para preparar un chip de DNA usa precursores nucleotídicos que son activados por la luz; cada nucleótido se une al siguiente mediante una fotorreacción (al contrario del proceso químico de la Fig. 8-38). La síntesis de la secuencia oligonucleotídica en cada punto de una superficie sólida es dirigida por un ordenador. La superficie es lavada con disoluciones que contienen un tipo de nucleótido activado (A*, G*, etc.). Como en la síntesis química de DNA, los nucleótidos activados se bloquean para que sólo uno se añada a la cadena en cada ciclo. Una pantalla que cubre la superficie se abre sobre las áreas programadas para recibir un nucleótido determinado y un destello de luz une el nucleótido a los polímeros en las áreas descubiertas. El proceso continúa hasta finalizar las secuencias deseadas en cada punto de la superficie. En cada punto se generan muchas cadenas con la misma secuencia, no sólo una como se muestra. Las superficies poseen también millares de puntos con secuencias distintas (véase Fig. 9-22); este microchip contiene sólo cuatro puntos para ilustrar la metodología.

puede usarse para examinar los mRNA o los cDNA de un determinado tipo celular o de un cultivo celular para identificar los genes que se expresan en esas células.

Un microchip de DNA puede servir para averiguar qué genes se expresan en una fase determinada del desarrollo de un organismo. Se aísla el mRNA total de células en dos fases diferentes de desarrollo y se convierte en cDNA usando transcriptasa inversa y desoxinucleótidos marcados con fluorescencia. Los cDNA fluorescentes pueden mezclarse y usarse como sondas, que se hibridarán cada una de ellas con las secuencias complementarias del microchip. En el ejemplo de la Figura 9-22, los nucleótidos marcados usados para sintetizar los cDNA de cada muestra emiten fluorescencia de dos colores. Los cDNA de las dos muestras se mezclan antes de usarse como sonda con el microchip. Las manchas de fluorescencia verde representan los mRNA más abundantes en la fase de una sola célula; las de fluorescencia roja representan mRNA más abundantes en fases posteriores del desarrollo. El uso de una mezcla de dos muestras para medir la abundancia relativa de las secuencias en lugar de la abundancia absoluta corrige las diferencias en las cantidades de DNA depositadas originalmente en cada punto del casillero y otras posibles inconsistencias entre los diferentes puntos del microchip. Los puntos que emiten fluorescencia representan una instantánea de todos los genes que son expresados en las células en el momento en que han sido recogidas: una visión de la expresión génica a escala del genoma entero. En un gen de función desconocida, el momento y las circunstancias de su expresión pueden proporcionar pistas importantes acerca de su papel en la célula.

En la Figura 9-23 se muestra un ejemplo espectacular de las posibilidades de esta técnica. Segmentos de cada uno de los 6000 genes del genoma completamente secuenciado de levadura se amplificaron separadamente por la PCR y cada uno se depositó en una posición determinada para confeccionar el microchip. En cierto sentido, este microchip representa una instantánea del genoma entero de levadura.

Chips de proteína Las proteínas también pueden inmovilizarse sobre una superficie sólida y usarse para detectar la presencia o ausencia de otras proteínas en una muestra. Por ejemplo, se puede preparar un chip de anticuerpos frente a determinadas proteínas, inmovilizándolos individualmente en una superficie sólida. Se añade una muestra de proteínas y si ésta contiene una proteína que se une a cualquiera de los anticuerpos es posible detectarla por una modalidad de ELISA en estado sólido (véase Fig. 5-28). Se están desarrollando muchos otros tipos y aplicaciones de los chips de proteínas.

La detección de las interacciones proteína-proteína es útil en el estudio de las funciones celulares y moleculares

La determinación de las interacciones de una proteína es clave para definir sus funciones. En el caso de las interacciones proteína-proteína, la asociación de una proteína de función desconocida con otra de función conocida puede sugerir cuál puede ser la función desconocida. Las técnicas utilizadas en estas investigaciones son muy variadas.

Comparaciones de la composición de los genomas Aunque no se trate de una prueba de una asociación directa, la mera presencia de combinaciones de genes en genomas determinados puede sugerir la función proteica. Se puede simplemente buscar un

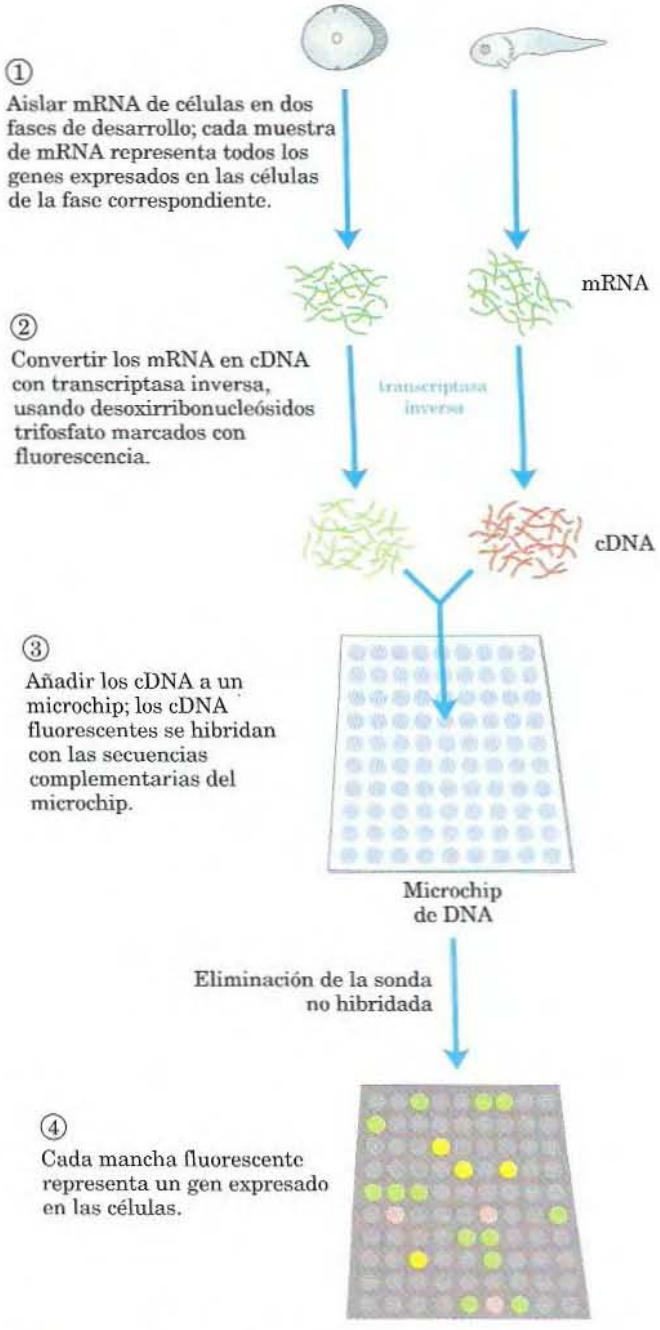


FIGURA 9-22 Microchip de DNA. El DNA puede obtenerse por síntesis química o por la PCR. El DNA es depositado sobre una superficie sólida (normalmente láminas de vidrio tratadas) con la ayuda de dispositivos automáticos capaces de depositar gotas muy pequeñas (nanolitros) en posiciones definidas. El DNA es anclado a las láminas de vidrio mediante luz UV. Una vez está unido a la superficie puede ser examinado con otros ácidos nucleicos fluorescentes. En este ejemplo, las muestras de mRNA son obtenidas de células de dos fases diferentes del desarrollo de la rana. Las sondas de cDNA de cada muestra se preparan con nucleótidos que emiten fluorescencia de diferentes colores; para el escrutinio del microchip se usa una mezcla de los cDNA. Las manchas que emiten fluorescencia verde representan los mRNA más abundantes en la fase de una sola célula y las que emiten fluorescencia roja representan secuencias más abundantes en fases más avanzadas del desarrollo. Las amarillas indican una abundancia prácticamente igual de cada fase. Síntesis de un chip de oligonucleótidos

gen en los bancos de datos genómicos y ver qué otros genes están presentes en los mismos genomas (Fig. 9-24). Cuando dos genes aparecen siempre juntos en un genoma es posible que las proteínas por ellos codificadas estén funcionalmente relacionadas. Estas correlaciones son más útiles si se conoce la función de al menos una de las proteínas.

Purificación de complejos proteicos Empleando genotecas de cDNA en las que cada gen se encuentre asociado (fusionado) a un epítopo de identificación, es posible inmunoprecipitar el producto proteico de un gen usando el anticuerpo que se une al epítopo (Fig. 9-15b). Si la proteína marcada se expresa en las células, otras proteínas que se unen a la misma pueden precipitar junto con ella. La identificación de las proteínas asociadas puede poner de manifiesto algunas de las interacciones proteína-proteína de la proteína marcada de forma similar. Hay muchas variantes de este procedimiento. Por ejemplo, un extracto crudo de células que expresen una proteína marcada se añade a una columna que contenga el anticuerpo inmovilizado. La proteína marcada se une al anticuerpo y las proteínas que interaccionan con ella a veces también son retenidas por la columna. La conexión entre la proteína y el identificador se

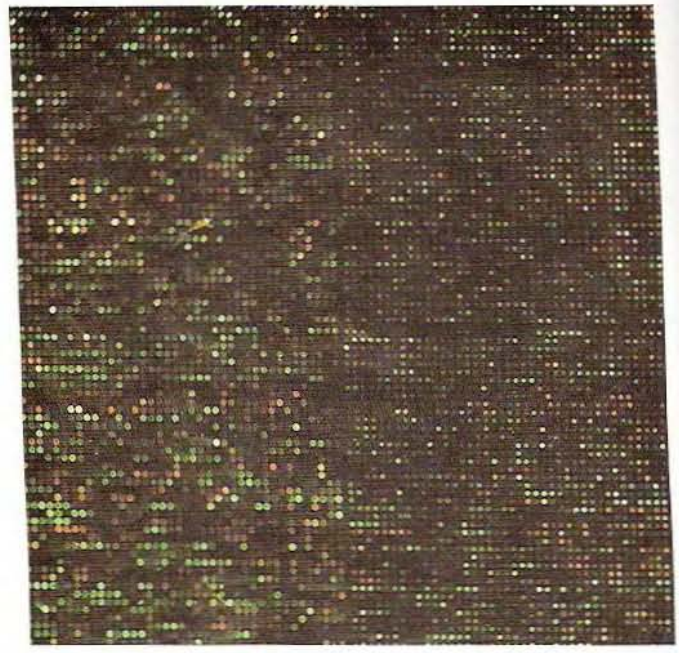


FIGURA 9-23 Imagen ampliada de un microchip de DNA. Cada mancha coloreada de este microchip contiene DNA de uno de los 6200 genes del genoma de levadura (*S. cerevisiae*), todos los cuales están representados en el chip. El microchip ha sido examinado con un ácido nucleico marcado con fluorescencia procedente del mRNA obtenido (1) de células en cultivo en crecimiento normal y (2) cinco horas después de que las células empezaran a formar esporas. Las manchas verdes corresponden a genes expresados con mayor intensidad durante el crecimiento normal; las manchas rojas a genes expresados con mayor intensidad durante la esporulación. Las manchas amarillas corresponden a genes cuyo nivel de expresión no cambia durante la esporulación. Esta imagen está ampliada; el microchip mide sólo 1,8 × 1,8 cm. Escrutinio de patrones de expresión con un microchip de oligonucleótidos

	Especie			
Proteína	1	2	3	4
P1	+	−	+	+
P2	−	−	+	−
P3	+	+	−	+
P4	+	−	+	−
P5	+	−	−	−
P6	+	+	−	+
P7	+	+	+	−

FIGURA 9-24 Aplicación de la genómica comparada a la identificación de genes relacionados funcionalmente. Uno de los usos de la genómica comparada consiste en obtener perfiles filogenéticos para identificar genes que siempre aparezcan juntos en el genoma. Este ejemplo muestra una comparación de genes de cuatro organismos, pero en la práctica las búsquedas por ordenador pueden examinar docenas de especies. La denominación P1, P2, etc. se refiere a las proteínas codificadas en cada especie. Esta técnica no requiere que las proteínas sean homólogas. En este ejemplo, puesto que las proteínas P3 y P6 siempre se encuentran juntas, es posible que estén funcionalmente relacionadas. Para confirmar esta posibilidad se requeriría información adicional.

corta con una proteasa específica y los complejos proteicos son eluidos de la columna y analizados. Estos métodos pueden utilizarse para estudiar las redes de interacciones en una célula.

Se dispone de una gran variedad de proteínas marcadoras útiles. Una marca frecuente es la histidina, a menudo simplemente una ristra de seis residuos de His. Una secuencia de poli-His se une fuertemente a metales tales como el níquel. Si se clona una proteína de modo que su secuencia sea contigua a una marca de His, poseerá los residuos de His extra en su extremo carboxilo. La proteína puede purificarse por cromatografía de columna con níquel inmovilizado. Estos procedimientos son útiles pero hay que ser cautelosos, porque los residuos aminoácidos adicionales de un epítopo o una marca de His pueden afectar a la actividad de la proteína.

Análisis del doble híbrido en levadura Un elaborado método genético para definir interacciones proteína-proteína se basa en las propiedades de la proteína Gal4 (Gal4p), que activa la transcripción de ciertos genes de levadura (véase Fig. 28-28). Gal4p tiene dos dominios, uno que se une a una secuencia de DNA específica y otro que activa la RNA polimerasa que sintetiza mRNA de un gen marcador adyacente. Los dominios son estables por separado, pero la activación de la RNA polimerasa requiere la interacción con el dominio de activación que, a su vez, requiere un correcto posicionamiento a cargo del dominio de unión al DNA. Por lo tanto, los dominios deben estar juntos para funcionar correctamente (Fig. 9-25a).

En este método, las regiones que codifican proteínas de los genes analizados se ligan con la región codificante de un dominio de unión a DNA o con el dominio de activación de

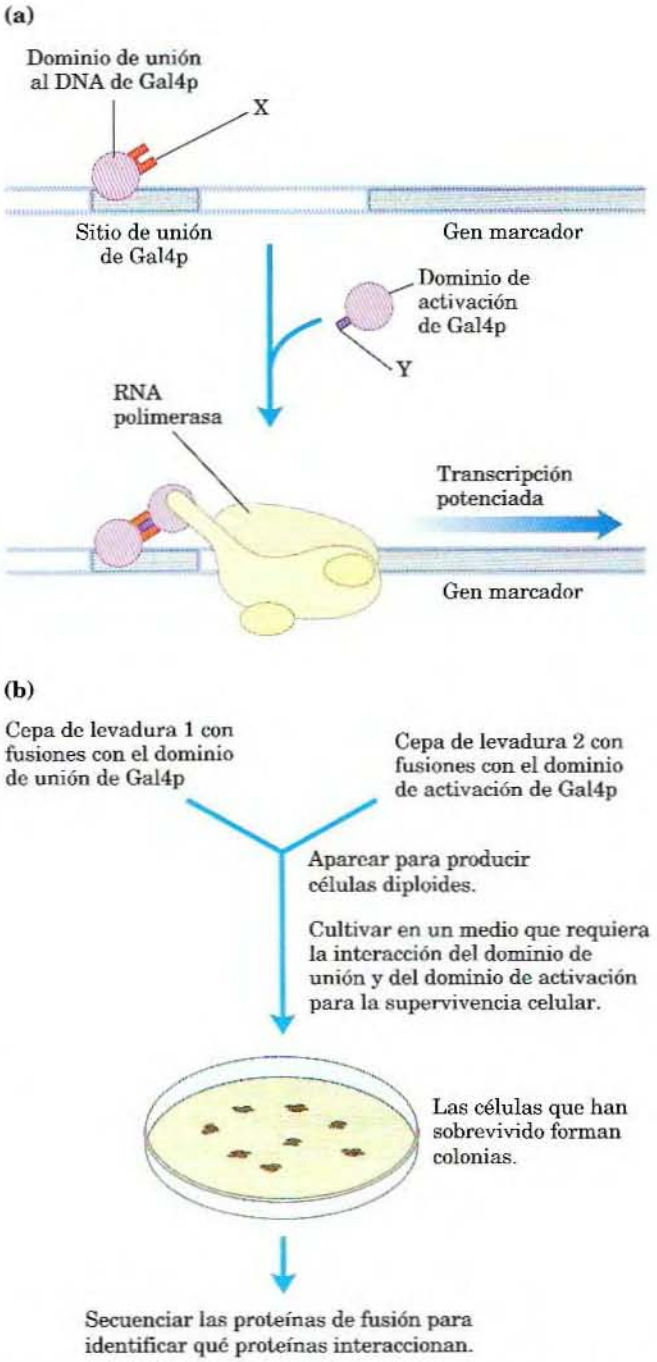


FIGURA 9-25 El sistema del doble híbrido en levadura. **(a)** Este sistema para detectar interacciones proteína-proteína se basa en aproximar el dominio de unión a DNA y el dominio de activación de la proteína Gal4 de levadura a través de la interacción de dos proteínas, X e Y, con las cuales está fusionado cada dominio. Esta interacción está acompañada de la expresión de un gen marcador. **(b)** Las dos fusiones se localizan en cepas separadas de levadura, que después son apareadas. La mezcla apareada se cultiva en un medio que no permita la subsistencia de la levadura a menos que se exprese el gen marcador. Por lo tanto, todas las colonias supervivientes contienen pares de proteínas de fusión que interaccionan. La secuenciación de las proteínas de fusión en las células supervivientes revela qué proteínas interaccionan. Síntesis de doble híbrido en levadura

Gal4p, de forma que los genes resultantes expresan las correspondientes proteínas de fusión. Si una proteína empalmada con el dominio de unión al DNA interacciona con una proteína empalmada con el dominio de activación, se activa la transcripción. El gen marcador transcrito como resultado de la activación generalmente codifica una proteína necesaria para el crecimiento o es un enzima que cataliza una reacción con un producto coloreado. Por lo tanto, las células, cultivadas en un medio apropiado, que contienen el par de proteínas que interaccionan, se distinguen fácilmente de aquellas que no lo contienen. Habitualmente, muchos genes de una cepa de levadura se ligan al dominio de unión a DNA de Gal4p y muchos otros genes se ligan al dominio de activación de Gal4p en otra cepa de levadura, la cepas de levadura se aparean y las células diploides individuales se cultivan hasta obtener colonias (Fig. 9-25b). Este procedimiento permite el escrutinio a gran escala de proteínas que interaccionan en la célula.

Todas estas técnicas suministran información valiosa sobre la función de las proteínas. Sin embargo, no pueden reemplazar a la bioquímica clásica. Sólo hacen posible una rápida incursión en nuevos problemas biológicos importantes; pero, finalmente, la comprensión detallada de la función de una nueva proteína requiere análisis bioquímicos tradicionales, tales como los utilizados en el estudio de muchas de las proteínas descritas en este texto. En combinación con las nuevas técnicas de bioquímica y biología molecular en rápida evolución, la genómica y la proteómica están acelerando no sólo el descubrimiento de nuevas proteínas sino también de nuevos procesos y mecanismos biológicos.

RESUMEN 9.3 De los genomas a los proteomas

- El proteoma es el conjunto de proteínas producido por el genoma de una célula. El nuevo campo de la proteómica pretende catalogar y determinar las funciones de todas las proteínas de una célula.
- Una de las maneras más efectivas de determinar la función de un nuevo gen es mediante la genómica comparada; es decir, la búsqueda en bancos de datos de genes con secuencias similares. Parálogos y ortólogos son genes (y sus proteínas) con funciones y secuencias claramente relacionadas pertenecientes a la misma o a diferentes especies. En ocasiones, la presencia sistemática de un gen junto a otros en varios genomas puede sugerir una posible función.
- Los proteomas celulares pueden ser visualizados con ayuda de la electroforesis bidimensional en gel y estudiados por espectrometría de masas.
- La función celular de una proteína puede a veces deducirse del estudio de dónde y cuándo se expresa su gen. Los chips de DNA y de proteína se usan para estudiar la expresión génica a nivel celular.
- Varias técnicas nuevas, como la genómica comparada, la inmunoprecipitación y el análisis de doble híbrido en levadura, sirven para identificar las interacciones proteína-proteína. Estas interacciones son muy útiles en el estudio de la función proteica.

9.4 Modificaciones de los genomas y nuevos productos biotecnológicos

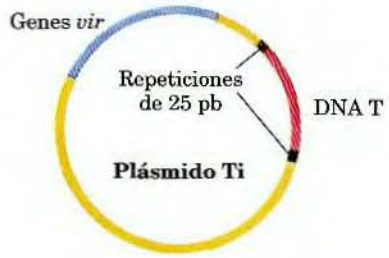
No hace falta mirar lejos para encontrar aplicaciones prácticas para las nuevas biotecnologías o para los descubrimientos en investigación básica. Ésas son las expectativas y los desafíos de la genómica. A medida que los conocimientos del genoma aumenten, mejorará la comprensión de todos los aspectos de las funciones biológicas. Mejoraremos nuestra capacidad de modificar organismos y producir nuevos fármacos y de mejorar la nutrición y la salud humanas. Estas posibilidades se materializarán solamente si se toman las precauciones oportunas para asegurar el uso responsable de estas técnicas.

Un parásito bacteriano facilita la clonación en plantas

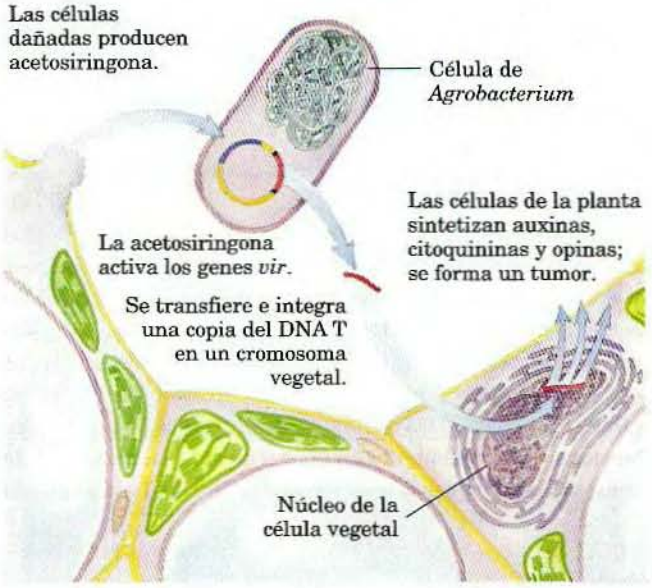
Con las nuevas tecnologías no sólo podemos comprender los genomas; también podemos modificarlos. La introducción de DNA recombinante en plantas tiene enormes posibilidades en agricultura. Puede contribuir a mejorar las propiedades nutritivas y el rendimiento de las cosechas o su resistencia al estrés ambiental, causado por plagas de insectos, enfermedades, frío, salinidad y sequía. En algunas especies, es posible obtener plantas fértiles a partir de una única célula transformada. De este modo, un gen introducido puede transmitirse a la descendencia a través de las semillas.

Todavía no se han encontrado plásmidos naturales en plantas que puedan facilitar la clonación en plantas, por lo que la principal dificultad técnica es la introducción del DNA en las células vegetales. Un importante y versátil aliado en esta tarea es la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria puede invadir la planta a través de las heridas, transformando las células cercanas, que forman un tumor llamado agalla en corona. *Agrobacterium* contiene un gran plásmido (de unos 200.000 pb), denominado **plásmido Ti** (inductor de tumores) (Fig. 9-26a). Cuando la bacteria entra en contacto con una célula dañada, un fragmento de 23.000 pb del plásmido Ti, denominado DNA T, se transfiere desde el plásmido y se integra en una posición al azar en uno de los cromosomas de la célula vegetal (Fig. 9-26b). La transferencia del DNA T desde *Agrobacterium* al cromosoma de la célula vegetal depende de dos repeticiones de 25 pb que flanquean el DNA T y de los productos de los genes de virulencia (*vir*) del plásmido Ti (Fig. 9-26a).

El DNA T codifica enzimas que convierten metabolitos de la planta en dos clases de compuestos beneficiosos para la bacteria (Fig. 9-27). La primera clase consiste en hormonas de crecimiento de la planta (auxinas y citoquininas), que estimulan el crecimiento de las células de la planta transformadas que forman el tumor de agalla en corona. La segunda clase consiste en una serie de aminoácidos poco frecuentes llamados opinas, que



(a)



(b)

FIGURA 9-26 Una bacteria parásita de las plantas transfiere DNA al interior de las células vegetales. **(a)** El plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. **(b)** Las células dañadas de las plantas producen y liberan el compuesto fenólico acetosiringona. Cuando *Agrobacterium* detecta este compuesto se expresan los genes de virulencia (*vir*) del plásmido Ti. Los genes *vir* codifican los enzimas necesarios para introducir el segmento de DNA T del plásmido Ti en el genoma de las células vegetales vecinas. Se sintetiza una copia monocadena del DNA T y se transfiere a la célula vegetal, donde se convierte en DNA dúplex que se integra en el cromosoma de la célula vegetal. El DNA T codifica enzimas que sintetizan hormonas de crecimiento y opinas (véase Fig. 9-27); estas últimas sólo son metabolizadas por *Agrobacterium* (que las usa como nutriente). La expresión de los genes T en las células vegetales transformadas da lugar a un crecimiento celular aberrante (formación de un tumor) y a la desviación de los nutrientes de las células de la planta hacia las bacterias invasoras.

sirven de nutrientes de la bacteria. Las opinas se producen en grandes cantidades en las células tumorales, que las segregan al entorno, donde sólo pueden ser metabolizadas por *Agrobacterium*, mediante enzimas codificados en otras regiones del plásmido Ti. De este modo, la bacteria desvía recursos de la planta, convirtiéndolos en formas que sólo ella puede aprovechar.

Éste es un ejemplo poco frecuente de transferencia de DNA de una célula procariótica a una eucariótica, mediante un proceso de ingeniería genética natural, que puede ser aprovechado para transferir DNA recombinante (en lugar del DNA T) al genoma de la planta. Una estrategia común de clonación utiliza un *Agrobacterium* que contiene dos plásmidos recombi-

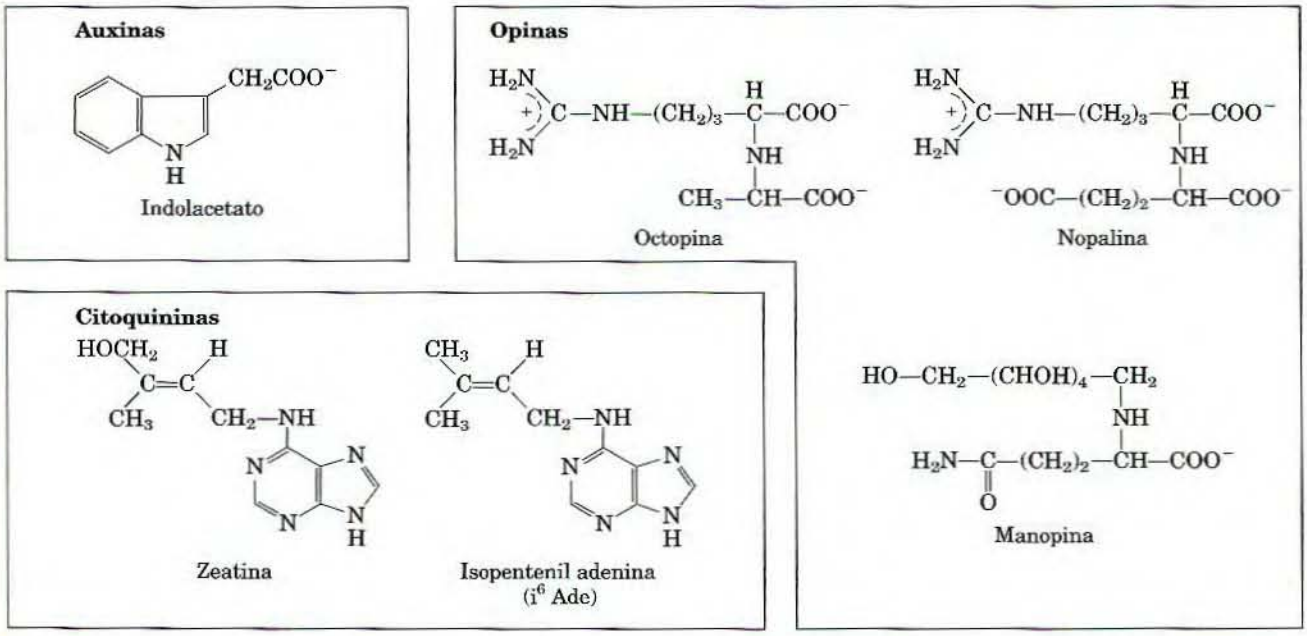


FIGURA 9-27 Metabolitos producidos en las células de una planta infectada por *Agrobacterium*. Las auxinas y las citoquininas son hormonas de crecimiento de los vegetales. La auxina más común es el indolacetato, un derivado del triptófano. Las citoquininas son derivados de la adenina. Las opinas suelen proceder de los aminoácidos; al menos 14 opinas diferentes son producidas por enzimas codificados por plásmidos Ti de diferentes especies de *Agrobacterium*.

UNIVERSIDAD DE TALCA
BIBLIOTECA CENTRAL

nantes diferentes. El primero es un plásmido Ti del cual se ha eliminado el DNA T en el laboratorio (Fig. 9-28a). El segundo es un vector lanzadera *Agrobacterium-E. coli*, en el que las repeticiones de 25 pb del DNA T flanquean el gen que se quiere introducir en la célula vegetal, junto con un marcador seleccionable, tal como la resistencia al antibiótico kanamicina (Fig. 9-28b). El *Agrobacterium* así modificado se usa para infectar una hoja, pero no se forman las agallas en corona porque los genes de los enzimas para la biosíntesis de auxina, citoquinina y opinas no se encuentran en ninguno de los plásmidos. En cambio, los productos de los genes *vir* del plásmido Ti modificado dirigen la transformación de las células de la planta por el gen flanqueado por las repeticiones de 25 pb del segundo plásmido. Las células vegetales transformadas se pueden seleccionar por crecimiento en placas de agar en presencia de kanamicina y la adición de hormonas de crecimiento induce la formación de nuevas plantas que contienen el gen foráneo en todas sus células.

El éxito de la transferencia de DNA recombinante a las plantas se puede ilustrar admirablemente con un experimento consistente en introducir el gen de la luciferasa de luciérnaga en una planta de tabaco (Fig. 9-29), que se usa con frecuencia porque sus células son fáciles de transformar con *Agrobacterium*. Las posibilidades de esta tecnología no se limitan, por supuesto, a la obtención de plantas que brillan en la oscuridad. Se han usado los mismos métodos para producir plantas resistentes a herbicidas, virus y plagas de insectos (Fig. 9-30). Entre los beneficios potenciales se encuentran mejores rendimientos y la reducción de las necesidades de compuestos químicos perjudiciales para el ambiente.

La biotecnología puede introducir nuevos caracteres en las plantas mucho más rápidamente que los métodos tradicionales de cruzamiento. Un ejemplo destacable es el desarrollo de sojas resistentes al herbicida de uso común glifosato. El glifosato se degrada rápidamente en el medio (plantas sensibles pueden plantarse en un área tratada al cabo de tan sólo 48 horas) y su uso no suele traer consigo la contaminación de las aguas ni perdurar de un año para otro. Un campo plantado con estas sojas puede ser tratado una vez durante la estación de crecimiento estival para eliminar todas las malas hierbas sin afectar a la soja (Fig. 9-31). Los efectos negativos potenciales de esta tecnología, tales como la aparición de malas hierbas resistentes al glifosato o la difusión de plantas recombinantes difíciles de controlar, son motivo de preocupación para los investigadores y para el público en general.

La manipulación de los genomas animales suministra información sobre la estructura de los cromosomas y la expresión génica

La transformación de células animales con material genético foráneo es una técnica importante para el avance del conocimiento sobre la estructura y la función de los genomas ani-

FIGURA 9-28 Estrategia del doble plásmido para crear una planta recombinante. (a) Uno de los plásmidos es un plásmido Ti modificado que contiene los genes *vir*, pero que carece de DNA T. **(b)** El otro plásmido contiene un fragmento de DNA con el gen foráneo (p. ej., el gen de la proteína insecticida, descrito en la Fig. 9-30) y un elemento de resistencia a un antibiótico (en este caso, resistencia a la kanamicina), flanqueado por las repeticiones de 25 pb del DNA T, requeridas para la transferencia de los genes del plásmido al cromosoma de la planta. El segundo plásmido también contiene el origen de replicación necesario para su propagación en *Agrobacterium*.

Cuando la bacteria penetra a través de las heridas (borde de la hoja cortada), los genes *vir* del primer plásmido hacen posible la transferencia del segmento del segundo plásmido flanqueado por las dos repeticiones de 25 pb al genoma de la planta. Se generan nuevas plantas cuando se coloca la hoja con las células transformadas en una placa de agar que contiene kanamicina y concentraciones adecuadas de hormonas de crecimiento. Las células no transformadas mueren por acción de la kanamicina. El gen foráneo y el elemento de resistencia al antibiótico se suelen transferir juntos; por tanto, las plantas que crecen en presencia de este antibiótico contienen generalmente el gen foráneo.

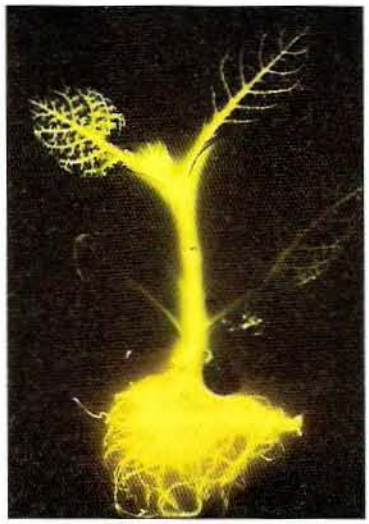
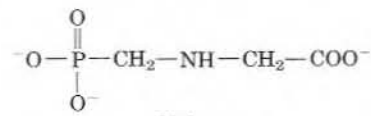


FIGURA 9-29 Planta de tabaco que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga. La luz se produjo después de que la planta fuese regada con una disolución de luciferina, sustrato de este enzima productor de luz (véase Recuadro 13-2). Sin embargo, no hay que esperar que pronto dispongamos de plantas que brillen en la oscuridad, ya que la luz que producen es muy débil; esta fotografía requirió una exposición de 24 horas. El auténtico interés de este experimento es mostrar que se pueden introducir nuevos caracteres en las plantas.

FIGURA 9-30 Plantas de tomate manipuladas genéticamente para ser resistentes a larvas de insectos. Dos plantas de tomate fueron expuestas a un número igual de larvas de polilla. La planta de la izquierda no fue alterada genéticamente. La planta de la derecha expresa el gen de una toxina proteica, derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta proteína, introducida con un protocolo similar al descrito en la Figura 9-28, es tóxica para las larvas de algunas especies de polilla, mientras que es inocua para los humanos y otros organismos. La resistencia a los insectos también se ha introducido genéticamente en el algodón y en otras plantas.

(a)

(b)



Glifosato

FIGURA 9-31 Plantas de soja resistentes al glifosato. Las fotografías muestran dos zonas de un campo de soja de Wisconsin. **(a)** Sin tratamiento con glifosato esta parte del campo de soja está ocupada por las malas hierbas. **(b)** Las plantas de soja resistentes al glifosato progresan en esta parte del campo tratado con glifosato. El glifosato se degrada rápidamente en el medio. El uso agrícola de plantas modificadas genéticamente progresa entre muchas deliberaciones, para equilibrar las extraordinarias posibilidades de esta tecnología y la exigencia de seleccionar los nuevos caracteres con prudencia. Tanto la ciencia como la sociedad en su conjunto tienen el mayor interés en asegurar que el uso de plantas recombinantes no tenga efectos adversos sobre el medio ambiente o la salud humana.

males, así como para la creación de animales con caracteres nuevos. Estas posibilidades han estimulado el desarrollo de métodos cada vez más refinados para la clonación de animales.

La mayor parte de estas técnicas necesitan una fuente de células para introducir el DNA. Aunque los tejidos intactos son difíciles de mantener y manipular in vitro, se pueden aislar y cultivar en el laboratorio muchos tipos de células animales si se satisfacen rigurosamente los requerimientos de su crecimiento. Las células procedentes de un determinado tejido animal, mantenidas en condiciones adecuadas de **cultivo de tejidos,** pueden conservar el estado diferenciado (por ejemplo, una célula hepática mantenerse como tal) durante semanas o incluso meses.

No se dispone de vectores similares a los plásmidos para introducir DNA en células animales, por lo que la transforma-

ción normalmente requiere la integración del DNA en un cromosoma de la célula huésped. La introducción eficaz del DNA en el núcleo celular y su integración en un cromosoma sin afectar a ningún gen esencial siguen siendo los problemas técnicos principales de la ingeniería genética de las células animales.

Los métodos disponibles para introducir DNA en las células animales difieren en eficiencia y comodidad. La captación espontánea de DNA o la electroporación, métodos comparables a los comúnmente utilizados en la transformación de bacterias, han dado resultados moderadamente satisfactorios. Sin embargo, son métodos poco eficientes, pues sólo alcanzan a transformar una de cada 100 a 10.000 células. La **microinyección** consiste en la inyección directa del DNA en el núcleo de una célula con ayuda de una aguja muy fina. En manos expertas, este método tiene una alta proporción de éxitos, pero el número total de células que puede ser tratado es pequeño, porque cada célula ha de inyectarse individualmente.

Los métodos más eficaces y más ampliamente usados para transformar células animales se basan en el uso de liposomas o vectores víricos. Los liposomas son pequeñas vesículas formadas por una bicapa lipídica que contiene un compartimiento acuoso (véase Fig. 11-4). Es posible fusionar liposomas que contengan una molécula de DNA con las membranas de células diana para así introducir el DNA en las células. El DNA a veces llega hasta el núcleo, donde puede integrarse en uno de los cromosomas (normalmente en posiciones al azar). Los **vectores víricos** son incluso más eficaces en la introducción del DNA. Los virus animales han desarrollado eficaces mecanismos para introducir sus ácidos nucleicos en las células y algunos también poseen mecanismos para insertar su DNA en los cromosomas de las células huésped. Algunos retrovirus (véase Fig. 26-30) y adenovirus han sido modificados para actuar como vectores víricos para introducir DNA foráneo en células de mamífero.

El trabajo con retrovirus ilustra algunas de las estrategias que se están usando (Fig. 9-32). Cuando un retrovirus modificado entra en la célula, su genoma de RNA es convertido en DNA por la transcriptasa inversa e integrado en el genoma del huésped por la integrasa vírica. Para que este proceso tenga lugar se requieren regiones de DNA especializadas: las repeticiones terminales largas (LTR) son necesarias para la integración del DNA retrovírico en el cromosoma huésped y la secuencia ψ (psi) es necesaria para empaquetar el RNA vírico en partículas víricas (véase Fig. 26-30).

Los genes *gag*, *pol* y *env* del genoma retrovírico, necesarios para la replicación y la formación de las partículas víricas, pueden ser reemplazados por DNA foráneo. Para la formación de virus que contengan la información genética recombinante, el DNA se ha de introducir en las células en cultivo junto con un "virus colaborador", que contenga los genes para producir partículas víricas, pero que carezca de la secuencia ψ, necesaria para el empaquetamiento. Ello permite la transcripción del DNA recombinante y que su RNA se empaquete en partículas víricas. Estas partículas pueden actuar como vectores para introducir el RNA recombinante en células diana. Los enzimas transcriptasa inversa e integrasa vírica (producidos por el virus colaborador) también se empaquetan en la partícula vírica y se introducen en las células diana. Una vez el genoma vírico recombinante se ha introducido en el interior de la célula, estos

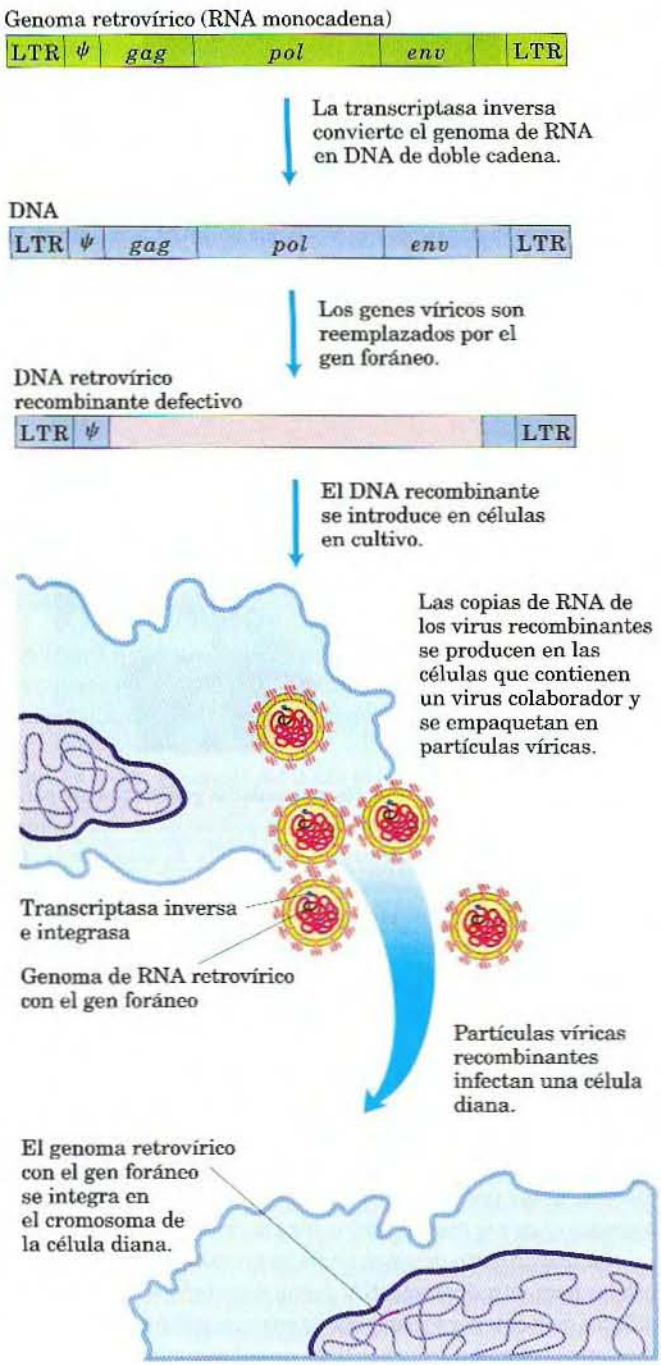


FIGURA 9-32 Clonación en células de mamífero con vectores retrovíricos. El genoma del retrovirus (aquí mostrado de forma simplificada), una vez modificado para que transporte el gen foráneo (rosa), es añadido al cultivo de células huésped. El virus colaborador (no mostrado) carece de la secuencia de empaquetamiento, ψ, por lo que sus transcritos de RNA no pueden ser empaquetados en partículas víricas. Sin embargo, suministra los productos de los genes *gag*, *pol* y *env*, necesarios para el empaquetamiento del retrovirus modificado en partículas víricas funcionales, que harán posible que el gen foráneo del genoma del virus recombinante se introduzca eficientemente en las células receptoras.

enzimas fabrican una copia de DNA a partir del RNA vírico, que se integra en un cromosoma de la célula huésped. El DNA recombinante integrado se convierte en una parte estable del cromosoma de la célula diana y se replica con el cromosoma en cada división celular. La propia célula no es puesta en peligro por el DNA vírico integrado porque el virus recombinante carece de los genes necesarios para producir copias de RNA de su genoma y para empaquetarlas en nuevas partículas víricas. Los retrovirus recombinantes son a menudo el mejor vehículo para introducir DNA en un número elevado de células de mamífero.

Cada tipo de virus tiene diferentes propiedades, por lo que se están modificando diferentes clases de virus animales para que sirvan de vectores para transformar células de mamífero. Por ejemplo, los adenovirus carecen de un mecanismo que permita la integración de su DNA en un cromosoma. El DNA recombinante introducido por un vector adenovírico es, pues, expresado sólo durante un corto tiempo y luego destruido. Ello puede ser útil si el objetivo es la expresión transitoria de un gen.

La transformación de células animales por cualquiera de las técnicas descritas puede presentar dificultades. El DNA foráneo generalmente se inserta al azar en el cromosoma. Incluso cuando el DNA foráneo contiene una secuencia similar a una secuencia del cromosoma huésped, que pueda dirigir su integración en esta posición, el número de integrados no homólogos continúa superando el número de integrados dirigidos en varios órdenes de magnitud. Si la integración daña genes esenciales, pueden alterarse, a veces, funciones celulares (la mayoría de células son diploides o poliploides, por lo que la integración deja, al menos, una copia no alterada de cualquier gen). Cuando una alteración activa de forma inadvertida un gen que estimula la división celular aparece una consecuencia especialmente problemática al crear una célula potencialmente cancerosa. Aunque se creyó durante algún tiempo que esta situación era rara, ensayos recientes sugieren que constituye un peligro significativo (Recuadro 9-2). Finalmente, el sitio donde se produce una integración puede determinar el nivel de expresión del gen integrado ya que los integrantes no se transcriben de igual manera en las distintas partes del genoma.

A pesar de estos problemas, la transformación de células animales se ha empleado frecuentemente para estudiar la estructura de los cromosomas, así como la función, la regulación y la expresión de genes. La introducción con éxito de DNA recombinante en el interior de un animal puede ilustrarse con un experimento que permitió alterar un carácter físico hereditario fácilmente observable. La microinyección de DNA en los núcleos de óvulos fecundados de ratón puede producir una transformación eficiente (integración cromosómica). Una vez inyectados, los óvulos se introducen en una hembra de ratón y se permite su desarrollo. El nuevo gen a menudo se expresa en algunos de los ratones recién nacidos. Examinando *su* descendencia, es posible identificar los ejemplares cuya línea germinal haya sido alterada. Mediante cruces adecuados, se puede establecer una línea de ratones **transgénicos** en la que todos los ratones sean homozigotos para el nuevo o los nuevos genes. Esta tecnología se ha usado para introducir en ratones el gen de la hormona de crecimiento humana, bajo el control de un promotor inducible. Cuando se alimentaron los ratones con una dieta que contenía el inductor, algunos individuos procedentes de los embriones inyectados crecieron hasta alcanzar un tamaño excepcionalmente grande (Fig. 9-33). Se han obtenido ratones transgénicos con una amplia gama de variantes genéticas, muchas de ellas relacionadas con enfermedades genéticas y su control, que señalan el camino de la terapia génica en humanos (Recuadro 9-2). Se utiliza una metodología muy similar para generar ratones con un gen determinado inactivado ("ratones genosuprimidos"), como una forma de establecer su función. Creación de ratones transgénicos

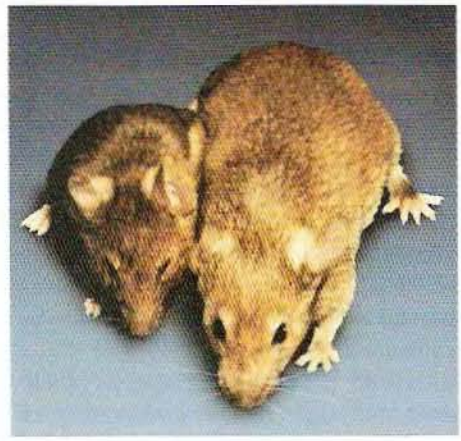


FIGURA 9-33 Clonación en ratones. Se ha introducido el gen de la hormona de crecimiento humana en el genoma del ratón de la derecha. La expresión del gen provoca un gran aumento en el tamaño.

Las nuevas tecnologías pueden facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos

Es difícil resumir las muchas formas en las que la genómica y la proteómica pueden facilitar el desarrollo de nuevos fármacos. Algunos ejemplos servirán para ilustrarlo. La hipertensión, el fallo cardíaco congestivo, la hipercolesterolemia y la obesidad se tratan con fármacos que alteran la fisiología humana. Los tratamientos se basan en la identificación de un enzima o receptor implicado en el proceso o en el descubrimiento de un inhibidor que interfiera en su acción. La proteómica jugará un papel creciente en la identificación de estas potenciales dianas farmacológicas. Por ejemplo, el vasoconstrictor más potente conocido es la hormona peptídica urotensina II. Descubierta en el fluido espinal de los peces, la urotensina II es un pequeño péptido cíclico, de 11 residuos aminoácidos en los humanos y de 12 o 13 en otros organismos. La vasoconstricción que provoca puede causar o exacerbar la hipertensión, el fallo cardíaco congestivo y la enfermedad de las arterias coronarias. Algunos de los métodos descritos en la Sección 9.3 para estudiar las interacciones proteína-proteína se han usado para demostrar que la urotensina II se une a un receptor acoplado a una proteína G denominado GPR14. Tal como veremos en el Capítulo 12 las proteínas juegan un papel importante en muchas rutas de señalización. No obstante,

El genoma humano y la terapia génica humana

A medida que la biotecnología fue ganando impulso en la década de 1980, la terapia génica fue adquiriendo atractivo. En principio, puede introducirse DNA en el interior de las células humanas para corregir deficiencias genéticas heredadas. La corrección genética puede incluso dirigirse a un tejido específico inoculando a un individuo un virus recombinante específico de tejido que contenga el DNA que haya que introducir en las células deficientes. El objetivo es atractivo, pero el camino está plagado de obstáculos.

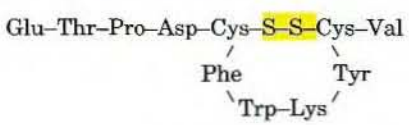
La alteración del DNA cromosómico conlleva riesgos importantes, que no pueden ser evaluados en las primeras etapas de la investigación. Por ello los primeros intentos en terapia génica humana se dirigieron a unas pocas enfermedades. Científicos y expertos en ética desarrollaron conjuntamente una serie de condiciones que debieron cumplirse para justificar el riesgo que entrañaban los experimentos, entre las que se encuentran las siguientes: (1) El defecto genético debe ser monogenético y estar bien caracterizado. (2) Tanto el gen normal como el mutante tienen que haber sido clonados y secuenciados. (3) A falta de una técnica para eliminar el gen mutante, el gen funcional debe funcionar bien en presencia del gen mutante. (4) Finalmente, la más importante, los riesgos inherentes a la terapia deben ser menores que los asociados a la enfermedad. Los protocolos para las pruebas clínicas en humanos fueron revisados por grupos de científicos de varias naciones desde el punto de vista del rigor científico y de las exigencias éticas; sólo entonces comenzaron los ensayos en humanos.

Entre los primeros objetivos de la terapia génica se encontraban el cáncer y las enfermedades genéticas del sistema inmunitario. La inmunidad corre a cargo de leucocitos (glóbulos blancos) de diferentes tipos, procedentes todos ellos de células madre indiferenciadas de la médula ósea. Estas células se dividen rápidamente y tienen requerimientos metabólicos especiales. La diferenciación puede bloquearse de diversas maneras y dar lugar a una dolencia denominada deficiencia inmunitaria combinada grave (SCID). Una de las formas de SCID se debe a defectos heredados genéticamente del gen que codifica la adenosina desaminasa (ADA), un enzima implicado en la biosíntesis de nucleótidos (estudiada en el Capítulo 22). Otra forma de SCID se debe a un defecto en el receptor proteico de superficie que responde a las señales químicas denominadas citoquinas, que desencadenan la diferenciación. En ambos casos, las células madre progenitoras no pueden diferenciarse en células inmunitarias maduras, tales como los linfocitos T y B (Capítulo 5). Los niños aquejados de estas enfermedades poco frecuentes son muy susceptibles a infecciones bacterianas y víricas y a menudo padecen problemas fisiológicos y neurológicos. En ausencia de un tratamiento efectivo, los niños deben ser necesariamente confinados en un ambiente estéril. Aproximadamente un 20% de estos niños tienen un hermano con un antígeno leucocitario humano (HLA) idéntico, que puede actuar como donante para el trasplante de médula ósea, procedimiento que puede curar la enfermedad. Los demás niños precisan de un tratamiento distinto.

La primera prueba de terapia génica se llevó a cabo en 1990 en los Institutos Nacionales de Bethesda, Maryland. La paciente era una niña de cuatro años afectada por una deficiencia de ADA. Células de la médula ósea de la paciente fueron transformadas en el laboratorio con un retrovirus modificado que contenía un gen funcional de ADA; cuando la manipulación de las células se realiza en el laboratorio en lugar de en el paciente, el procedimiento se denomina ex vivo. Las células tratadas fueron reintroducidas en la médula ósea de la paciente. Cuatro años más tarde, la niña llevaba una vida normal, iba a la escuela e incluso habló de su experiencia ante el Congreso. Sin embargo, su recuperación no puede atribuirse exclusivamente a la terapia génica. Antes del inicio de las pruebas clínicas de terapia génica se desarrolló un tratamiento para la deficiencia de ADA consistente en administrar un complejo de ADA sintética y polietilén glicol (PEG). En muchos pacientes con ADA-SCID la inyección del complejo ADA-PEG permite un cierto desarrollo del sistema inmunitario, con ganancia de peso y menos infecciones, aunque el sistema inmunitario no se restablezca por completo. La nueva terapia génica comportaba riesgos y la supresión del tratamiento de inoculación no fue considerada éticamente aceptable. Por lo tanto, los participantes en la prueba recibieron ambos tratamientos a la vez, lo que hizo imposible averiguar qué tratamiento era responsable del buen resultado clínico. Sin embargo, la prueba clínica dio una importante información: era posible transferir genes ex vivo a grandes cantidades de leucocitos y las células que contenían el gen transferido eran identificables muchos años después del tratamiento, lo que hacía suponer que la corrección a largo plazo era posible. Además, el riesgo asociado al uso de vectores retrovíricos era bajo.

A lo largo de la década de 1990 se realizaron centenares de pruebas clínicas de terapia génica humana dirigidas a paliar numerosas enfermedades genéticas, pero los resultados fueron, en general, desalentadores. Una de las dificultades principales procedía de la ineficiente introducción de nue-

GPR14 era un receptor "huérfano" en cuanto a que la secuenciación del genoma humano lo había identificado como un receptor acoplado a proteína G pero sin función conocida. La asociación de la urotensina II con el GPR14 hace de este último una diana preferente de los tratamientos basados en fármacos que interfieran en la acción de la urotensina II.



Urotensina II

vos genes en las células. La transformación a menudo fallaba y el número de células transformadas era insuficiente para suprimir la alteración. En las pruebas con ADA, conseguir una población celular suficiente era especialmente difícil debido a la aplicación concomitante del tratamiento con ADA-PEG. Normalmente, las células madre con el gen ADA correcto deberían tener un mayor crecimiento que las células no tratadas, con lo cual su población debería aumentar hasta predominar en la médula ósea. Sin embargo, las inyecciones de ADA-PEG a los mismos pacientes permitían que las células no transformadas (deficientes en ADA) vivieran y se desarrollaran, desposeyendo a las células transformadas de la ventaja en el crecimiento necesaria para expandir su población a expensas de las otras.

Una prueba de terapia génica iniciada en 1999 dio resultados positivos en la corrección de una forma de SCID causada por receptores defectuosos de las citoquinas (concretamente, una subunidad denominada γc), según los resultados publicados por investigadores de Francia, Italia y Gran Bretaña. Estos investigadores introdujeron el gen corregido de la subunidad γ del receptor de las citoquinas en células $CD34^+$. (Las células madre que producen las células del sistema inmunitario tienen una proteína denominada CD34 en su superficie; estas células pueden separarse de otras células de la médula ósea con anticuerpos contra CD34.) Las células transformadas fueron devueltas a la médula ósea de los pacientes. En este ensayo, la introducción del gen corregido claramente confirió una ventaja en el crecimiento con respecto a las células no tratadas. La funcionalidad del sistema inmunitario se restableció al cabo de 6 a 12 semanas y los niveles de los linfocitos T maduros del sistema inmunitario alcanzaron los niveles de sujetos control de la misma edad (que no padecían una deficiencia inmunitaria combinada grave) al cabo de 6 a 8 meses. La funcionalidad del sistema inmunitario se restableció y casi 4 años más tarde (a mediados de 2003) la mayoría de los niños hacían vida normal. Se han obtenido resultados similares con otros cuatro pacientes. Estos resultados son una demostración palmaria de que la terapia génica puede curar una grave enfermedad genética.

A principios de 2003 se produjo un serio revés. Uno de los cuatro pacientes iniciales desarrolló una forma grave de leucemia. Durante el tratamiento de terapia génica, uno de los retrovirus introducidos se insertó al azar en el cromosoma de una célula $CD34^+$, causando una expresión anormalmente elevada de un gen denominado LMO-2. La célula afectada se diferenció en una célula T del sistema inmunitario y la elevada expresión de LMO-2 provocó el crecimiento incontrolado de la célula, causando la leucemia. A mediados de 2003 el paciente había respondido positivamente a la quimioterapia; sin embargo no puede aún darse el caso por cerrado. Este incidente muestra que las reservas iniciales acerca del uso de vectores retrovíricos no eran infundadas. Después de revisar los protocolos de ensayos de terapia génica, y de consultar a expertos en ética y a los padres de los niños afectados por estas enfermedades, se han programado nuevos ensayos de terapia génica para niños que no son buenos candidatos para el trasplante de médula ósea. La razón es muy sencilla. Se ha considerado que los potenciales beneficios para los niños con estas graves dolencias superan los riesgos demostrados.

La terapia génica en humanos no se limita a las enfermedades genéticas. Los tratamientos también se aplican a las células cancerosas, mediante la introducción de genes de proteínas que puedan destruir las células o restablecer el control normal de la división celular. Células del sistema inmunitario asociadas con los tumores, denominadas linfocitos infiltradores de tumores, pueden modificarse genéticamente para producir el factor de la necrosis tumoral (TNF; véase Fig. 12-50). Cuando estos linfocitos, extraídos de un paciente con cáncer, son modificados e introducidos de nuevo en el paciente, migran hacia el tumor y el TNF producido provoca la regresión del tumor. El sida quizá llegue a tratarse también con terapia génica; cabría la posibilidad de introducir DNA que codificara una molécula de RNA complementaria de un mRNA esencial para el VIH en las células del sistema inmunitario (las dianas del VIH). El RNA transcrito a partir del DNA introducido se aparearía con el mRNA del VIH, impidiendo su traducción, interfiriendo así en el ciclo vital del virus. Alternativamente, se podría introducir un gen que codificara una forma inactiva de una subunidad de un enzima del VIH con múltiples subunidades; el enzima entero podría ser inactivado por una subunidad no funcional.

Nuestros cada vez mayores conocimientos del genoma humano y de la base genética de algunas enfermedades vaticinan un diagnóstico precoz y una intervención más eficaz en el futuro. Sin embargo, tal como muestran los primeros resultados, el camino que lleve hasta terapias eficaces será largo y sinuoso. Hemos de obtener más conocimientos sobre el metabolismo celular, sobre cómo interaccionan los genes y sobre las maneras de afrontar los riesgos. La perspectiva de llegar a vencer los defectos genéticos que destruyen la vida y otras enfermedades proporciona la motivación para no cejar en el esfuerzo.

Otro objetivo de la investigación médica es la identificación de nuevos agentes capaces de tratar las enfermedades causadas por patógenos humanos. Actualmente se busca identificar dianas enzimáticas en los patógenos microbianos que puedan inactivarse con un nuevo fármaco. La diana enzimática microbiana ideal debería (1) ser esencial para la supervivencia del patógeno, (2) estar bien conservada en una amplia variedad de patógenos y (3) estar ausente o ser significativamente diferente en humanos. La tarea de identificar procesos metabólicos esenciales para los microorganismos, pero ausentes en humanos, resulta mucho más fácil gracias a la genómica comparada y a la información suministrada por la genómica y la proteómica. ■

La tecnología del DNA recombinante ofrece nuevos productos y nuevas posibilidades

Con la tecnología del DNA recombinante se pueden obtener grandes cantidades de proteínas útiles comercialmente, se pueden diseñar microorganismos para llevar a cabo tareas especiales y se pueden modificar plantas o animales para dotarlos de características útiles para la agricultura o la medicina. Ya se han aprobado algunos de estos productos para el consumo o el uso profesional y muchos más se encuentran en fase de desarrollo. En pocos años, la ingeniería genética ha pasado de ser una tecnología prometedora a convertirse en una industria que mueve mucho dinero, en buena parte en el sector farmacéutico. En la Tabla 9-3 se muestran algunos de los tipos principales de los nuevos productos.

Uno de estos nuevos productos es la eritropoyetina. Esta hormona proteica (M_r 51.000) estimula la producción de eritrocitos. Los pacientes con enfermedades de riñón suelen padecer anemia debido a una deficiencia de esta proteína. La eritropoyetina producida por técnicas de ingeniería genética puede ser utilizada para el tratamiento de estos pacientes, reduciéndose la necesidad de repetidas transfusiones de sangre. ■

Continúan apareciendo nuevas aplicaciones de esta tecnología. Ya se están utilizando enzimas obtenidos por ingeniería genética para producir detergentes, azúcares y quesos. Se están usando proteínas modificadas como aditivos alimentarios, suplementos nutritivos, saborizantes y aromatizantes. Se están desarrollando microorganismos con vías metabólicas alteradas o completamente nuevas para extraer petróleo y minerales de depósitos del suelo, para digerir marcas negras y para destoxificar sustancias peligrosas de vertidos de basura y de aguas residuales. Las plantas modificadas con una mayor resistencia frente a la sequía, la congelación, las plagas y las enfermedades aumentan el rendimiento de los cultivos y a la vez reducen las necesidades de sustancias químicas en agricultura. Se pueden clonar animales completos introduciendo un núcleo con todo su material genético en un óvulo cuyo núcleo haya sido extraído.

Las extraordinarias posibilidades de la moderna biotecnología no están exentas de controversia. La clonación de mamíferos desafía las convenciones sociales y puede estar acompañada de serias deficiencias en la salud y la longevidad de los animales clonados. Aparte de fármacos útiles, también pueden producirse toxinas para la guerra biológica. La liberación de plantas u otros organismos modificados a la biosfera tiene riesgos potenciales. Las consecuencias a largo plazo de esta tecnología sobre nuestra especie y el medio ambiente son imposibles de prever, pero exigirán un conocimiento cada vez mayor del metabolismo celular y la ecología.

TABLA 9-3 Algunos productos del DNA recombinante en medicina

Tipo de producto	*Ejemplos/usos*
Anticoagulantes	El activador tisular de plasminógeno (TPA) activa la plasmina, un enzima implicado en la disolución de los coágulos; efectivo en el tratamiento de las víctimas de ataques de corazón.
Factores sanguíneos	El factor VIII promueve la coagulación y es deficiente en los hemofílicos. El uso del factor VIII obtenido por la tecnología del DNA recombinante elimina el riesgo de infección asociado con las transfusiones sanguíneas.
Factores de estimulación	Factores de crecimiento del sistema inmunitario que estimulan la producción de leucocitos; usados para tratar deficiencias del sistema inmunitario y para combatir infecciones.
Eritropoyetina	Estimula la producción de eritrocitos; utilizada para tratar la anemia en pacientes con enfermedades de riñón.
Factores de crecimiento	Estimulan la diferenciación y el crecimiento de varios tipos celulares; usados para estimular la curación de heridas.
Hormona de crecimiento humana	Usada para tratar el enanismo.
Insulina humana	Usada para tratar la diabetes.
Interferones	Interfieren en la reproducción vírica; también usados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.
Interleuquinas	Activan y estimulan distintos tipos de leucocitos; posibles usos en la cura de heridas, infección por VIH, cáncer, inmunodeficiencias.
Anticuerpos monoclonales	Extraordinaria especificidad de unión; se usan en ensayos de diagnóstico, para transporte dirigido de fármacos, toxinas o compuestos radiactivos a los tumores en el tratamiento del cáncer; muchas otras aplicaciones.
Superóxido dismutasa	Evita lesiones tisulares por especies reactivas de oxígeno cuando se restablece el flujo sanguíneo en tejidos privados de O_2 durante cortos períodos de tiempo a causa de intervenciones quirúrgicas.
Vacunas	Las proteínas procedentes de la cubierta vírica son "cebadores" del sistema inmunitario tan eficientes como los virus inactivos tradicionalmente usados para las vacunas, y más seguras. La primera en desarrollarse fue la vacuna de la hepatitis B.

RESUMEN 9.4 Modificaciones de los genomas y nuevos productos biotecnológicos

- Los progresos en la secuenciación de genomas completos y en los métodos de ingeniería genética están mejorando nuestra capacidad de modificar el genoma de cualquier especie.
- La clonación en plantas, que utiliza el vector plasmídico Ti de *Agrobacterium*, hace posible la introducción de nuevos caracteres.
- En la clonación en animales el DNA foráneo se introduce principalmente mediante vectores víricos o por microinyección. Con estas técnicas pueden obtenerse animales transgénicos y desarrollarse nuevos métodos para la terapia génica en humanos.
- La utilización de la genómica y la proteómica en la investigación básica y farmacéutica está acelerando el descubrimiento de nuevos fármacos. La biotecnología también está contribuyendo a la expansión de nuevos productos y tecnologías.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

clonación 306
vector 307
DNA recombinante 307
endonucleasas de restricción 307
DNA ligasa 307
plásmido 311
cromosoma bacteriano artificial (BAC) 313
cromosoma artificial de levadura (YAC) 314
mutagénesis dirigida 316
proteína de fusión 317
genómica 317
genoteca genómica 318
cóntigo 318
sitio marcado por secuencia (STS) 318
DNA complementario (cDNA) 318
genoteca de cDNA 318
secuencia de identificación expresada (EST) 318
epítopo de identificación 319
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 319
huella dactilar del DNA 322
polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) 322
transferencia Southern 322
polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) 325
proteoma 325
proteómica 325
ortólogos 326
sintenia 326
microchip de DNA 326
plásmido Ti 330
transgénico 335

Bibliografía

General

Jackson, D.A., Symons, R.II. & Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69,** 2904–2909.

El primer experimento de DNA recombinante en que se unieron DNA de organismos diferentes.

Lobban, P.E. & Kaiser, A.D. (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78,** 453–471.

El primer experimento de DNA recombinante.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Esta serie de tres volúmenes incluye mucha información útil sobre los principios biológicos, químicos y físicos, tanto de las técnicas clásicas como de otras todavía en uso.

Clonación de genes

Arnheim, N. & Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61,** 131–156.

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M. & Paabo, S. (2001) Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* **2,** 353–359.

Éxitos y fracasos en la recuperación de DNA de muestras muy antiguas.

Ivanov, P.L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W. & Parsons, T.J. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.* **12,** 417–420.

Lindahl, T. (1997) Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* **90,** 1–3.

Una buena descripción de cómo afecta la química del DNA a la recuperación de DNA en arqueología.

Genómica

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F. et al. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and Human Genome Project. *Science* **252,** 1651–1656.

El artículo que introdujo las secuencias de identificación expresadas (EST).

Bamshad, M. & Wooding, S.P. (2003) Signatures of natural selection in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **4,** 99A–111A.

Aplicaciones del genoma humano al estudio de la evolución humana.

Brenner, S. (2004) Genes to genomics. *Annu. Rev. Genet.* **38,** en prensa.

Carroll, S.B. (2003) Genetics and the making of *Homo sapiens*. *Nature* **422,** 849–857.

Clark, M.S. (1999) Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project. *Bioessays* **21,** 121–130.

Útil exposición de la importancia de secuenciar los genomas de muchos organismos.

Collins, F.S., Green, E.D., Guttmacher, A.E. & Guyer, M.S. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* **422,** 835–847.

Amplia revisión del potencial de la investigación genómica.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409,** 860–921.

Discusión del borrador del genoma elaborado por el Proyecto Genoma Humano internacional. En este ejemplar se encuentran muchos otros artículos interesantes.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291,** 1304–1351.

Descripción del borrador de la secuencia del genoma humano producido por Celera Corporation. Muchos otros artículos del mismo ejemplar contienen información adicional.

Proteómica

Brown, P.O. & Botstein, D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* **21,** 33–37.

Eisenberg, D., Marcotte, E.M., Xenarios, I. & Yeates, T.O. (2000) Protein function in the post-genomic era. *Nature* **405,** 823–826.

Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405,** 837–846.

Una descripción especialmente lograda de las diversas estrategias y métodos utilizados para identificar proteínas y sus funciones.

Zhu, H., Bilgin, M. & Snyder, M. (2003) Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* **72,** 783–812.

Biotecnología aplicada

Foster, E.A., Jobling, M.A., Taylor, P.G., Donnelly, P., de Knijff, P., Mieremet, R., Zerjal, T. & Tyler-Smith, C. (1999) The Thomas Jefferson paternity case. *Nature* **397,** 32.

Último artículo de una serie dedicada a las aplicaciones de la biotecnología al estudio de casos de interés histórico.

Hansen, G. & Wright M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4,** 226–231.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* **351,** 117–121.

La tecnología del DNA recombinante muestra cómo un solo gen determina el desarrollo de ratones cromosómicamente hembra en machos.

Lapham, E.V., Kozma, C. & Weiss, J. (1996) Genetic discrimination: perspectives of consumers. *Science* **274,** 621–624.

Ventajas e inconvenientes de conocer el propio genoma.

Mahowald, M.B., Verp, M.S. & Anderson, R.R. (1998) Genetic counseling: clinical and ethical challenges. *Annu. Rev. Genet.* **32,** 547–559.

Ohlstein, E.H., Ruffolo, R.R., Jr. & Elliott, J.D. (2000) Drug discovery in the next millennium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40,** 177–191.

Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. & Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300,** 611–615.

Descripción de cómo hacer un ratón gigante.

Pfeifer, A. & Verma, I. M. (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2,** 177–211.

Thompson, J. & Donkersloot, J.A. (1992) *N*-(Carboxyalkyl) amino acids: occurrence, synthesis, and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **61,** 517–557.

Resumen de la estructura y la función biológica de las opinas.

Wadhwa, P.D., Zielske, S.P., Roth, J.C., Ballas, C.B., Bowman, J.E. & Gerson, S.L. (2002) Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu. Rev. Med.* **53,** 437–452.

Problemas

1. Clonación Al unir dos o más fragmentos de DNA la secuencia se puede diseñar de muchas formas, como se muestra en los siguientes ejercicios.

(a) Dibuje la estructura de cada extremo de un fragmento de DNA lineal producido por digestión con *Eco*RI (incluyendo los remanentes de la secuencia de reconocimiento de *Eco*RI).

(b) Dibuje la estructura resultante de la reacción de la DNA polimerasa I con el extremo de esta secuencia en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (véase Fig. 8-36).

(c) Dibuje la secuencia producida en la unión si se ligan los dos extremos con la estructura procedente de (b) (véase Fig. 25-16).

(d) Dibuje la estructura resultante si la estructura derivada de (a) se trata con una nucleasa que sólo degrade DNA monohebra.

(e) Dibuje la secuencia producida en la zona de unión si un extremo con la estructura (b) se liga con un extremo con la estructura (d).

(f) Dibuje la estructura del extremo de un fragmento de DNA lineal producido por una digestión con *Pru*II (incluya las secuencias remanentes de la secuencia de reconocimiento de *Pru*II).

(g) Dibuje la secuencia producida en la zona de unión de un extremo con la estructura (b) y otro con la estructura (f).

(h) Suponga que se puede sintetizar un fragmento corto de DNA dúplex de cualquier secuencia deseada. Con este fragmento sintético y con los procedimientos descritos de (a) a (g), diseñe un protocolo para eliminar el sitio de restricción *Eco*RI de la molécula de DNA y para introducir un nuevo sitio de restricción para *Bam*HI en una localización similar (véase Fig. 9-3).

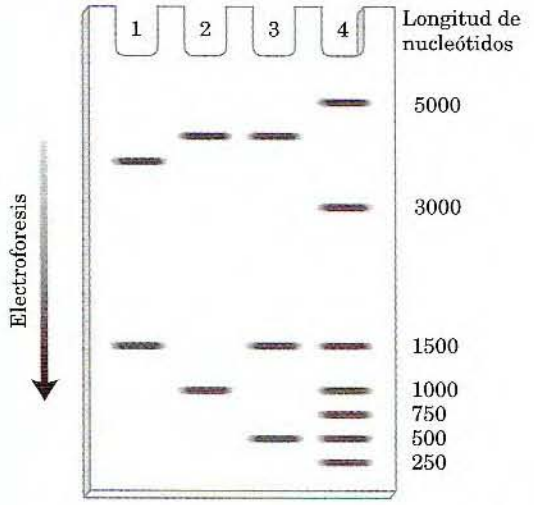
(i) Diseñe cuatro fragmentos cortos de DNA sintético de doble cadena que permitan la ligación de la estructura (a) con un fragmento de DNA producido por una digestión con *Pst*I. En uno de estos fragmentos, diseñe la secuencia de forma tal que la unión final contenga las secuencias de reconocimiento tanto para *Eco*RI como para *Pst*I. En el segundo y tercer fragmentos, diseñe las secuencias de tal modo que la unión contenga sólo el sitio de reconocimiento para *Eco*RI o para *Pst*I. Diseñe la secuencia del cuarto fragmento de tal modo que en la región de unión no aparezca ninguna de estas dos dianas.

2. Selección de plásmidos recombinantes Cuando se clona un fragmento de DNA foráneo en un plásmido en general es útil insertar el fragmento en un lugar que interrumpa un marcador seleccionable (tal como el gen de resistencia a la tetraciclina de pBR322). La pérdida de la función del gen interrumpido se puede usar para identificar clones que contengan plásmidos recombinantes con DNA foráneo. Con el bacteriófago λ como vector este criterio de selección es innecesario; no obstante, los vectores que han incorporado grandes fragmentos de DNA se distinguen fácilmente de los que no lo han hecho. ¿Cómo se identifican estos vectores recombinantes?

3. Clonación de DNA El vector de clonación plasmídico pBR322 (véase Fig. 9-4) se corta con la endonucleasa de restricción *Pst*I. Un fragmento de DNA aislado de un genoma eucariótico (también producido por corte con *Pst*I) se mezcla y se liga con el vector así preparado. A continuación, la mezcla de DNA ligados se usa para transformar bacterias y aquellas que contienen plásmidos se seleccionan por crecimiento en presencia de tetraciclina.

(a) Además de los plásmidos recombinantes deseados, ¿qué otros tipos de plásmidos resistentes a la tetraciclina se pueden encontrar en las bacterias transformadas resistentes a la tetraciclina? ¿Cómo pueden distinguirse?

(b) El fragmento de DNA clonado tiene una longitud de 1000 pb y tiene un sitio de restricción para *Eco*RI a 250 pb de un extremo. Tres plásmidos recombinantes diferentes cortados con *Eco*RI y analizados por electroforesis en gel dieron los patrones mostrados. ¿Qué información puede obtenerse sobre el DNA clonado a partir de cada patrón? Observe que en el pBR322 los sitios de restricción para *Pst*I y *Eco*RI se encuentran separados por 750 pb. El plásmido entero sin inserto tiene 4361 pb. Los marcadores de tamaño del carril 4 llevan indicado el número de nucleótidos.



4. Identificación de un gen de una proteína con una secuencia de aminoácidos conocida Con la Figura 27-7 para traducir el código genético, diseñe una sonda de DNA para identificar el gen de una proteína con la siguiente secuencia amino-terminal. La sonda ha de tener entre 18 y 20 nucleótidos, un tamaño que permite una especificidad adecuada si hay suficiente homología entre la sonda y el gen.

H_3N^+–Ala–Pro–Met–Thr–Trp–Tyr–Cys–Met–
Asp–Trp–Ile–Ala–Gly–Gly–Pro–Trp–Phe–Arg–
Lys–Asn–Thr–Lys–

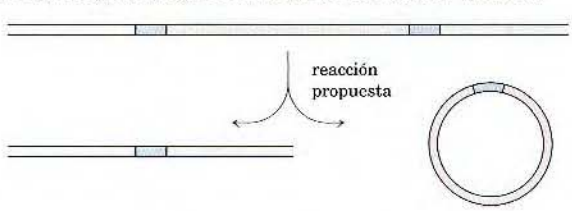
5. Diseño de un ensayo para el diagnóstico de una enfermedad genética La enfermedad de Huntington (EH) es una dolencia neurodegenerativa hereditaria, caracterizada por la pérdida gradual e irreversible de las funciones psicológicas, motoras y cognitivas. Los síntomas generalmente hacen su aparición en la madurez, pero pueden presentarse prácticamente a cualquier edad. El curso de la enfermedad puede prolongarse de 15 a 20 años. Las bases moleculares de la enfermedad se conocen cada vez mejor. La mutación genética causante de la EH ha sido localizada en un gen que codifica una proteína (M_r 350.000), cuya función es desconocida. En individuos que no desarrollarán la enfermedad, se encuentra una serie de 6 a 39 codones CAG (para la glutamina), repetidos en tándem en la región que codifica el extremo amino de la proteína. En los individuos en los que aparece la EH en la madurez este codón está repetido generalmente de 40 a 55 veces. En los casos de aparición en la infancia, este codón está repetido más de 70 veces. La longitud de la repetición del trinucleótido indica si un individuo desarrollará la enfermedad y aproximadamente a qué edad aparecerán los primeros síntomas.

A continuación se muestra una pequeña porción de la secuencia codificante amino-terminal del gen de 3143 codones de la EH. La secuencia de nucleótidos del DNA se muestra en negro, la correspondiente secuencia de aminoácidos en azul y la repetición de CAG está sombreada. Usando la Figura 27-7 para traducir el código genético, proponga un análisis basado en la PCR para el diagnóstico de la EH que pudiera realizarse con una muestra de sangre. Suponga que el cebador para la PCR es de 25 nucleótidos. Por convención, salvo indicación contraria, las secuencias codificantes de proteína se representan con la hebra codificante (la secuencia idéntica al mRNA transcrito a partir del gen) arriba, de modo que se leen de 5′ a 3′, de izquierda a derecha.

```
307 ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC
1   M  A  T  L  E  K  L  M  K  A  F  E  S  L  K  S  F

358 CAGCAGTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
18  Q  Q  F  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q

409 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCC
35  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  P  P  P  P  P  P  P  P

460 CCGCCTCCTCAGCTTCCTCAGCCGCCGCCG
52  P  P  P  Q  L  P  Q  P  P  P
```

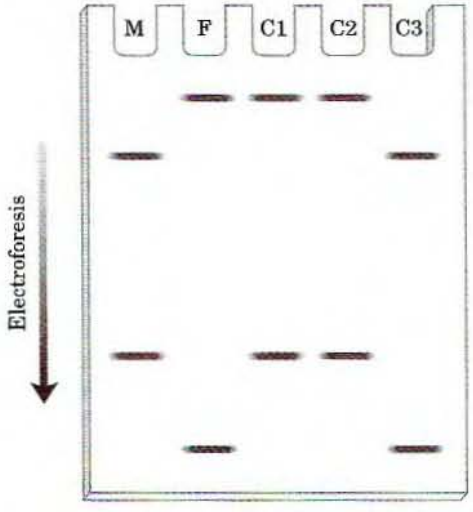
Fuente: The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72,** 971-983.

6. Aplicación de la PCR a la detección de moléculas de DNA circulares En ocasiones se suprime un segmento de DNA genómico de un protozoo ciliado. La supresión es una reacción programada genéticamente, asociada al apareamiento celular. Es posible que la supresión sea el resultado de un tipo de recombinación denominada recombinación específica de sitio en la que se empalman los dos extremos del DNA y el DNA suprimido producto de la reacción es circular.

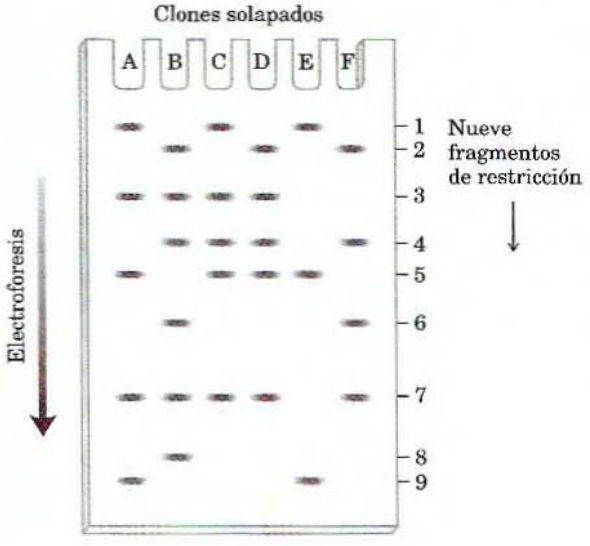


Sugiera de qué modo puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de la forma circular del DNA suprimido en un extracto del protozoo.

7. Prueba de paternidad mediante el análisis de los RFLP Los análisis de la huella del DNA y de los RFLP se usan a menudo para investigar la paternidad. Un niño hereda cromosomas del padre y de la madre, por lo que su DNA muestra fragmentos de restricción derivados de ambos progenitores. En el gel que aquí se muestra, ¿qué niño puede ser excluido como descendiente biológico del padre? Justifique su razonamiento. El carril M corresponde a la madre, F al padre y C1, C2 y C3 a los niños.

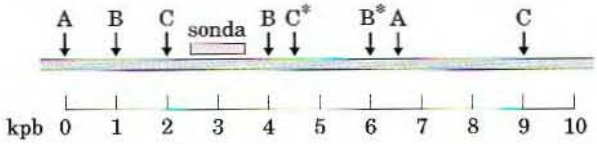


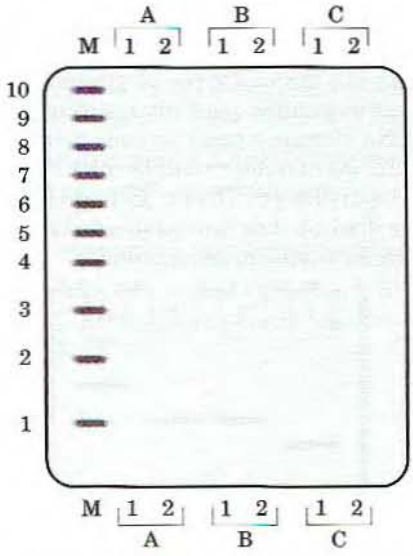
8. Cartografiado de un segmento cromosómico De una región de un cromosoma se aísla un grupo de clones solapados, designados de A a F. Se corta cada uno de los genes separadamente con un enzima de restricción y los trozos se separan por electroforesis en gel de agarosa, con los resultados que se muestran. En esta región cromosómica hay nueve fragmentos de restricción distintos, una parte de los cuales está presente en cada clon. A partir de esta información, deduzca el orden de los fragmentos de restricción en el cromosoma.



9. Clonación en plantas La estrategia indicada en la Figura 9-28 emplea células de *Agrobacterium* que contienen dos plásmidos distintos. Sugiera por qué las secuencias de los dos plásmidos no se combinan en uno solo.

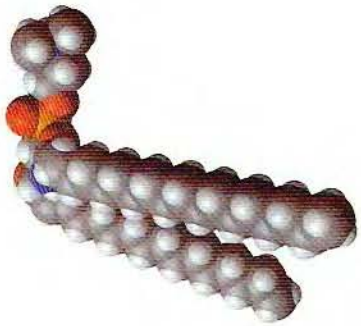
10. Huella del DNA mediante el análisis de los RFLP Se extrae el DNA de las células sanguíneas de dos individuos diferentes, 1 y 2. En experimentos separados, el DNA de cada individuo se corta con las endonucleasas de restricción A, B y C, y los fragmentos se separan por electroforesis. Se muestra el mapa hipotético de un fragmento de 10.000 pb de un cromosoma humano (1kpb = 1000 pb). El individuo 2 tiene mutaciones puntuales que eliminan los sitios de restricción B* y C*. Se incuba el gel con un oligonucleótido radiactivo complementario de la secuencia indicada y se expone una película de rayos X en contacto con el gel. Indique dónde se verían las bandas en la película. Los carriles del gel están indicados en el esquema adjunto.





11. Aplicación de la fotolitografía en la producción de microchips de DNA La Figura 9-21 muestra los primeros pasos del proceso de elaboración de un microchip de DNA mediante fotolitografía. Describa los pasos restantes necesarios para obtener las secuencias deseadas (una secuencia de cuatro nucleótidos diferente en cada uno de los cuatro puntos) mostradas en el primer panel de la figura. Después de cada paso, indique la secuencia nucleotídica resultante unida a cada punto.

12. Clonación en mamíferos Los vectores retrovíricos descritos en la Figura 9-32 posibilitan la integración eficiente de DNA foráneo en un genoma de mamífero. Explique de qué modo estos vectores, que carecen de los genes para la replicación y el empaquetamiento del virus (*gag, pol, env*), forman partículas víricas infecciosas. Sugiera por qué es importante que estos vectores carezcan de los genes para la replicación y el empaquetamiento.



capítulo 10

LÍPIDOS

10.1 Lípidos de almacenamiento *343*
10.2 Lípidos estructurales de las membranas *348*
10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos *357*
10.4 Trabajar con lípidos *363*

La sustancia grasa, separada de las bases salificables, se disolvió en alcohol hirviendo. Al enfriarse se obtuvo cristalizada y muy pura sometiéndose a examen en este estado. Ya que no se ha descrito hasta el momento... propongo llamarla margarina, del nombre griego que significa perla, ya que una de sus características es la de tener aspecto de nácar, el cual comunica a diversas combinaciones que forma con las bases salificables.

—Michel-Eugène Chevreul, artículo en Philosophical Magazine, *1814*

Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son igualmente diversas. En muchos organismos, las grasas y los aceites son las formas principales de almacenamiento energético, mientras que los fosfolípidos y los esteroles constituyen los principales elementos estructurales de las membranas biológicas. Otros lípidos, aun estando presentes en cantidades relativamente pequeñas, juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, pigmentos que absorben la luz, anclas hidrofóbicas para proteínas, "chaperonas" que ayudan en el plegamiento de las proteínas de membrana, agentes emulsionantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares. Este capítulo describe los lípidos representativos de cada tipo poniendo énfasis en su estructura química y propiedades físicas. La oxidación de los lípidos productora de energía se trata en el Capítulo 17 y su síntesis en el Capítulo 21.

10.1 Lípidos de almacenamiento

Las grasas y aceites, utilizados casi universalmente como formas de almacenamiento de energía en los organismos vivos, son compuestos derivados de los **ácidos grasos.** Los ácidos grasos son derivados hidrocarbonados con un nivel de oxidación casi tan bajo (esto es, tan reducidos) como el de los hidrocarburos de los combustibles fósiles. La oxidación de los ácidos grasos (a CO_2 y H_2O) en las células, al igual que la oxidación explosiva de los carburantes fósiles en los motores de combustión interna, es muy exergónica.

Introduciremos a continuación la estructura y la nomenclatura de los ácidos grasos que se encuentran con mayor frecuencia en los organismos vivos. Se describen dos tipos de compuestos que contienen ácidos grasos, los triacilgliceroles y las ceras, para ilustrar la diversidad estructural y las propiedades físicas en esta familia de compuestos.

Los ácidos grasos son derivados de hidrocarburos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos (C_4 a C_{36}). En algunos ácidos grasos, esta cadena está completamente saturada (no tiene dobles enlaces) y sin ramificar; otros contienen uno o más dobles enlaces (Tabla 10-1). Unos cuantos contienen anillos de tres carbonos, grupos hidroxilo o grupos metilo ramificados. La nomenclatura simplificada de estos compuestos especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces separados por dos puntos; el ácido palmítico, que tiene 16 átomos de carbono y es saturado, se abrevia 16:0 y el ácido oleico de 18 carbonos con un doble enlace es 18:1. Las posiciones de los dobles enlaces se especifican por exponentes que siguen a una Δ (delta); un ácido graso de 20 carbonos con un doble enlace entre C-9 y C-10 (C-1 es el carbono carboxílico) y otro entre C-12 y C-13 se designa 20:2($\Delta^{9,12}$), por ejemplo. Los ácidos grasos más abundantes tienen números pares de átomos de carbono en una cadena sin ramificar de entre 12 y 24 carbonos (Tabla 10-1). Tal como veremos en el Capítulo 21, el número par de carbonos es consecuencia de la forma de síntesis de es-

tos compuestos, que utiliza la condensación de unidades de acetato (de dos carbonos).

La posición de los dobles enlaces también es regular; en la mayoría de ácidos grasos monoinsaturados, el doble enlace se encuentra entre C-9 y C-10 (Δ^9); los restantes dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados suelen ser Δ^{12} y Δ^{15}. Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados casi nunca son conjugados (alternancia de enlaces dobles y sencillos como en —CH=CH—CH=CH—) sino que están separados por un grupo metileno (—CH=CH—CH_2—CH=CH—). Los dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos naturales están en la configuración cis. Los ácidos grasos trans se producen durante la fermentación en el rumen de los animales productores de lácteos y carne. También se forman durante la hidrogenación de aceites de pescado o vegetales. Dado que las dietas ricas en ácidos grasos trans están correlacionadas con niveles sanguíneos elevados de LDL (colesterol malo) y bajos de HDL (colesterol bueno), se recomienda evitar la ingestión de grandes cantidades de estos ácidos grasos. Por desgracia, las patatas fritas, los buñuelos y la repostería tienden a ser ricos en ácidos grasos trans.

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen vienen determinadas en gran parte por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. La cadena hidrocarbonada apolar explica la escasa solubilidad de los ácidos grasos en agua. Así, el ácido láurico (12:0, M_r 200), tiene una solubilidad en agua de 0,063 mg/g –muy inferior a la de la glucosa (M_r 180), que es de 1100 mg/g–. Cuanto más larga sea la cadena acílica grasa y menor el número de dobles enlaces, menor es la solubilidad en agua. El grupo ácido carboxílico es polar (y está ionizado a pH neutro); de ahí la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta.

TABLA 10-1 Algunos ácidos grasos naturales: estructura, propiedades y nomenclatura

Esqueleto carbonado	*Estructura**	*Nombre sistemático†*	*Nombre común (etimología)*	*Punto de fusión (°C)*	*Solubilidad a 30 °C (mg/g de disolvente)*	
					Agua	*Benceno*
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Ácido *n*-dodecanoico	Ácido láurico (del latín *laurus*, laurel)	44,2	0,063	2,600
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ácido *n*-tetradecanoico	Ácido mirístico (del latín *Myristica*, género de la nuez moscada)	53,9	0,024	874
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ácido *n*-hexadecanoico	Ácido palmítico (del griego *palma*, palmera)	63,1	0,0083	348
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ácido *n*-octadecanoico	Ácido esteárico (del griego, *stear*, grasa dura)	69,6	0,0034	124
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Ácido *n*-icosanoico	Ácido araquídico (del latín *Arachis*, género de legumbre)	76,5		
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Ácido *n*-tetracosanoico	Ácido lignocérico (del latín *lignum*, madera + *cera*, cera)	86,0		
16:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	1-0,5		
18:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-octadecenoico	Ácido oleico (del latín *oleum*, aceite)	13,4		
18:2($\Delta^{9,12}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico (del griego *linon*, lino)	1-5		
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-9,12,-15-octadecatrienoico	α-Ácido linolénico	−11		
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-,*cis*-5,8,11,14-octadecatrienoico	Ácido araquidónico	−49,5		

*Todos los ácidos se muestran en su forma no ionizada. A pH 7, todos los ácidos grasos libres tienen un carboxilato ionizado. Obsérvese que la numeración de los carbonos empieza en el carbono del grupo carboxilo.

†El prefijo *n*- indica la estructura "normal" sin ramificar. Por ejemplo, "dodecanoico" indica simplemente 12 átomos de carbono que se podrían disponer en una serie de formas ramificadas; "*n*-dodecanoico" especifica la forma lineal sin ramificar. En los ácidos grasos insaturados, se indica la configuración de cada uno de los dobles enlaces; en los ácidos grasos biológicos la configuración es siempre cis.

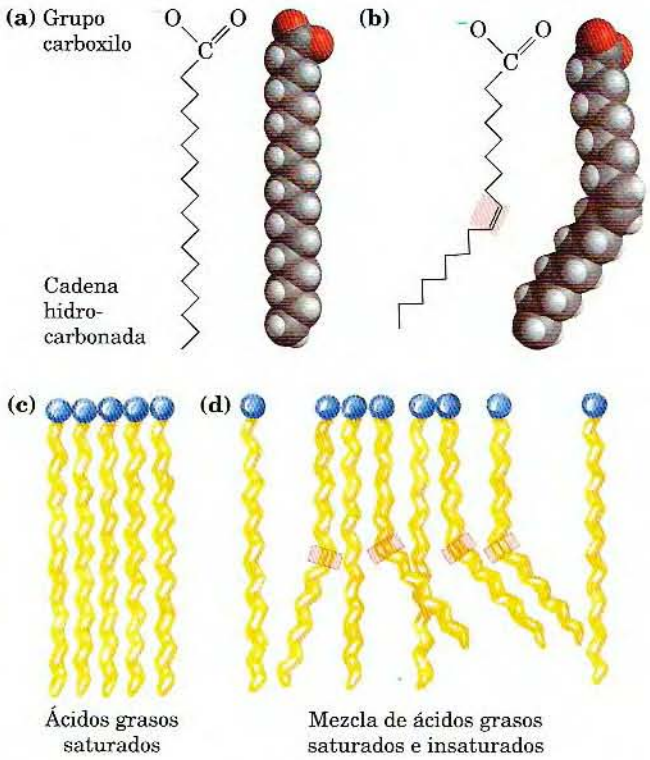


FIGURA 10-1 Empaquetamiento de los ácidos grasos en agregados estables. El grado de empaquetamiento de los ácidos grasos depende de su grado de saturación. **(a)** Dos representaciones del ácido graso saturado ácido esteárico (estearato a pH 7) se muestran en su conformación normal extendida. Cada línea del zigzag representa un enlace simple entre carbonos adyacentes. **(b)** El doble enlace cis (sombreado) del ácido oleico (oleato) no le permite la rotación e introduce un giro rígido en la cola hidrocarbonada. Todos los demás enlaces de la cadena pueden rotar libremente. **(c)** Los ácidos grasos totalmente saturados en la forma extendida se empaquetan en ordenamientos casi cristalinos estabilizados por muchas interacciones hidrofóbicas. **(d)** La presencia de uno o más dobles enlaces cis interfiere en este empaquetamiento apretado dando lugar a agregados menos estables.

Los puntos de fusión están también muy influidos por la longitud y grado de saturación de la cadena hidrocarbonada. A temperatura ambiente (25 °C), los ácidos grasos saturados desde 12:0 a 24:0 tienen una consistencia cérea, mientras que los ácidos grasos insaturados de estas longitudes son líquidos oleosos. Esta diferencia en los puntos de fusión se debe a los diferentes grados de empaquetamiento de las moléculas de los ácidos grasos (Fig. 10-1). En los compuestos totalmente saturados, la rotación libre alrededor de cada enlace carbono-carbono confiere gran flexibilidad a la cadena hidrocarbonada; la conformación más estable es la forma totalmente extendida, en la que los impedimentos estéricos entre átomos vecinos están reducidos al mínimo. Estas moléculas se pueden empaquetar fuertemente en ordenamientos casi cristalinos con contactos por uniones de van der Waals entre átomos a lo largo de la propia cadena y átomos de cadenas vecinas. En ácidos grasos insaturados, un doble enlace cis provoca un doblamiento en la cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos con uno o más doblamientos no se pueden empaquetar tan fuertemente como los ácidos grasos totalmente saturados, por lo que las interacciones entre ellos son más débiles. Dado que se necesita menos energía térmica para desordenar estos conjuntos poco ordenados de ácidos grasos insaturados, éstos tienen puntos de fusión claramente más bajos que los ácidos grasos saturados de la misma longitud de cadena (Tabla 10-1).

En los vertebrados los ácidos grasos libres circulan por la sangre unidos de forma no covalente a una proteína portadora, la albúmina sérica. No obstante, los ácidos grasos en su mayoría se encuentran presentes en el plasma sanguíneo en forma de derivados del ácido carboxílico tales como ésteres o amidas. Al carecer del grupo carboxilato cargado, estos derivados de los ácidos grasos son generalmente aún menos solubles en agua que los ácidos grasos libres.

Los triacilgliceroles son ésteres de ácidos grasos y glicerol

Los lípidos más sencillos obtenidos a partir de los ácidos grasos son los **triacilgliceroles.** Los triacilgliceroles están compuestos por tres ácidos grasos unidos por enlace éster con un solo glicerol (Fig. 10-2). Los que contienen el mismo tipo de

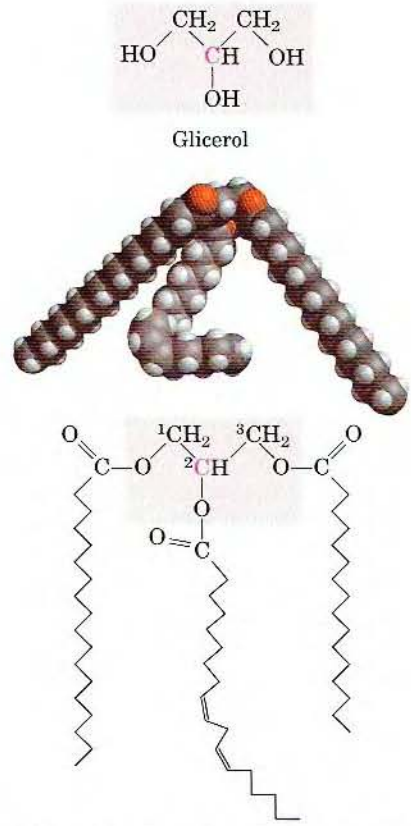


FIGURA 10-2 Glicerol y un triacilglicerol. El triacilglicerol mixto representado en esta figura tiene tres ácidos grasos diferentes unidos al armazón de glicerol. Cuando hay dos ácidos grasos diferentes en C-1 y C-3 del glicerol, el C-2 se transforma en un centro quiral (p. 76).

ácido graso en las tres posiciones se denominan triacilgliceroles simples y se denominan según el ácido graso que contienen. La triestearina, la tripalmitina y la trioleína son, respectivamente, ejemplos de triacilgliceroles sencillos que contienen 16:0, 18:0 y 18:1. La mayoría de los triacilgliceroles naturales son mixtos; éstos contienen dos o más ácidos grasos diferentes. Se han de especificar el nombre y posición de cada ácido graso para designar sin ambigüedades estos compuestos.

Dado que los hidroxilos polares del glicerol y los carboxilatos polares de los ácidos grasos están unidos por enlaces éster, los triacilgliceroles son moléculas apolares, hidrofóbicas, prácticamente insolubles en agua. Los lípidos tienen densidades específicas menores que el agua, lo que explica por qué las mezclas de agua y aceite tienen dos fases.

Los triacilgliceroles aportan energía almacenada y aislamiento

En la mayoría de células eucarióticas, los triacilgliceroles forman una fase separada de gotitas microscópicas oleosas en el citosol acuoso que sirven como depósito de combustible metabólico. Las células especializadas de los vertebrados, denominadas adipocitos o células grasas, almacenan grandes cantidades de triacilgliceroles en forma de gotitas de grasa que ocupan casi totalmente la célula (Fig. 10-3a). Los triacilgliceroles se almacenan también en las semillas de muchos tipos de plantas, proporcionando energía y precursores biosintéticos durante la germinación de las semillas (Fig. 10-3b). Los adipocitos y las semillas germinadas contienen **lipasas,** enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, liberando ácidos grasos que son exportados a otros lugares.

En tanto que combustibles almacenados, los triacilgliceroles tienen dos ventajas significativas sobre polisacáridos tales como el glucógeno o el almidón. (1) Los átomos de carbono de los ácidos grasos están más reducidos que los de los azúcares, por lo que la oxidación de los triacilgliceroles proporciona más del doble de energía, gramo por gramo, que la de los glúcidos. (2) Como los triacilgliceroles son hidrofóbicos y no están hidratados, el organismo que transporta combustible en forma de grasa no ha de transportar el peso adicional del agua de hidratación asociada con los polisacáridos almacenados (2 g por gramo de polisacárido). El tejido graso de los humanos, formado principalmente por adipocitos, se encuentra debajo de la piel, en la cavidad abdominal y en las glándulas mamarias. Las personas moderadamente obesas pueden tener de 15 a 20 kg de triacilgliceroles depositados en sus adipocitos, lo que es suficiente para cubrir sus necesidades energéticas durante varios meses. Por el contrario, el cuerpo humano ni siquiera puede almacenar las necesidades energéticas de un día en forma de glucógeno. Los glúcidos tales como la glucosa y el glucógeno ofrecen ciertas ventajas como fuentes rápidas de energía metabólica siendo una de ellas su fácil solubilidad en agua.

En algunos animales, los triacilgliceroles almacenados debajo de la piel no sólo sirven como almacenes de energía sino como aislamiento contra las temperaturas muy bajas. Las focas y las morsas están muy recubiertos por triacilgliceroles. En los animales hibernantes las reservas de grasa acumuladas antes de la hibernación también tienen una doble misión: aislamiento y depósito de energía (véase Recuadro 17-1). La baja densidad de los triacilgliceroles constituye la base de otra función notable de estos compuestos. En los cachalotes, un almacén de triacilgliceroles y de ceras les permite igualar la flotación de sus cuerpos con la de la zona que les rodea en las inmersiones profundas en agua fría (Recuadro 10-1).

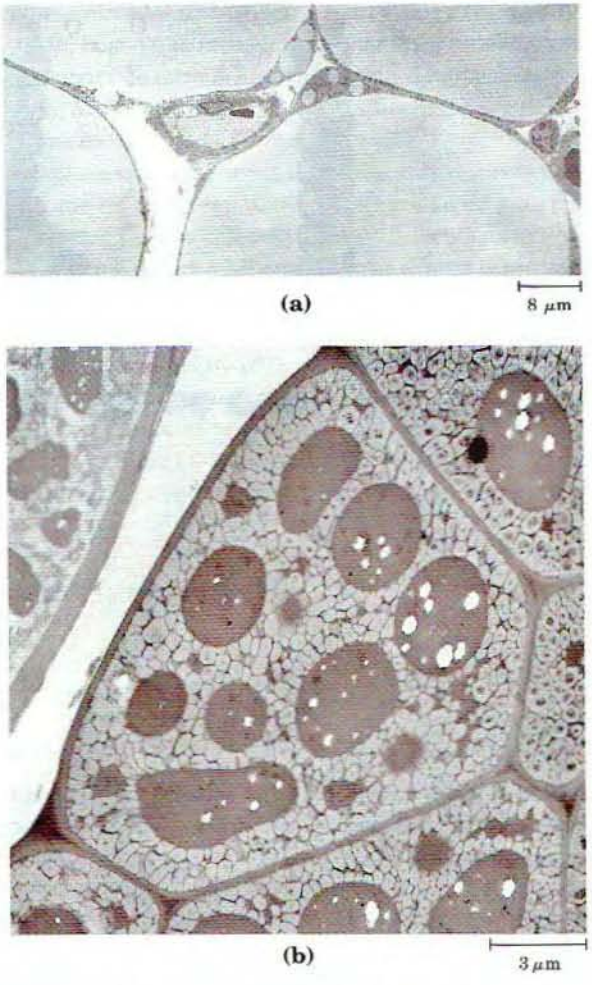


FIGURA 10-3 Almacenes de grasa en las células. **(a)** Sección transversal de cuatro adipocitos de cobaya que muestran grandes gotículas de grasa que llenan prácticamente las células. También son visibles varios capilares en sección transversal. **(b)** Sección transversal de una célula de cotiledón de una semilla de la planta *Arabidopsis*. Las amplias estructuras oscuras son cuerpos proteicos que están rodeados por aceites almacenados en los cuerpos oleosos de coloración clara.

Muchos alimentos contienen triacilgliceroles

La mayoría de grasas naturales son mezclas complejas de triacilgliceroles sencillos y mixtos. Estos últimos contienen diversos ácidos grasos que difieren en la longitud de la cadena y el grado de saturación (Fig. 10-4). Los aceites vegetales tales como el aceite de maíz y el de oliva están compuestos mayoritariamente por triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados, por lo que son líquidos a temperatura ambiente. Se convierten industrialmente en grasas sólidas por hidrogenación catalítica

RECUADRO 10–1 EL MUNDO DE LA BIOQUÍMICA

Cachalotes: cabezones de las profundidades

Los estudios sobre los cachalotes han puesto al descubierto otro aspecto en el que los triacilgliceroles son biológicamente útiles. La cabeza del cachalote es muy grande, constituyendo alrededor de un tercio de su peso corporal total. Alrededor del 90% del peso de la cabeza está constituido por el órgano de espermaceti, una masa grasa que contiene hasta 3600 kg de aceite de espermaceti, que es una mezcla de triacilgliceroles y ceras con un contenido abundante de ácidos grasos insaturados. Esta mezcla es líquida a la temperatura normal de reposo del cachalote, unos 37 °C, pero empieza a cristalizar hacia los 31 °C y se vuelve sólida cuando la temperatura desciende varios grados más.

La función biológica probable del aceite de espermaceti se ha deducido de investigaciones sobre la anatomía y el comportamiento alimentario del cachalote. Estos mamíferos se alimentan casi exclusivamente de calamares en aguas muy profundas. En sus inmersiones descienden 1000 m o más; la inmersión récord es de 3000 m. A estas profundidades el cachalote no tiene competidores por el calamar, que es muy abundante. El cachalote permanece quieto esperando que pasen los bancos de calamares.

Para que un animal marino pueda permanecer a una profundidad determinada, sin un esfuerzo natatorio constante, ha de tener la misma densidad que el agua que le rodea. El cachalote puede variar su flotabilidad de manera que sea igual a la densidad de su alrededor, desde la superficie del océano tropical hasta las grandes profundidades en donde el agua es mucho más fría y, por consiguiente, tiene una mayor densidad. La clave es el punto de congelación del aceite de espermaceti. Cuando la temperatura del aceite desciende varios grados durante una inmersión profunda, se congela o cristaliza haciéndose más denso, con lo que cambia la flotabilidad del cetáceo, que se iguala a la densidad del agua de mar. Existen diversos mecanismos fisiológicos que promueven el enfriamiento rápido del aceite durante la inmersión. Durante el retorno a la superficie el aceite de espermaceti congelado vuelve a calentarse y se funde, disminuyendo su densidad para igualarla con la del agua superficial. Vemos de este modo en el cachalote una adaptación anatómica y bioquímica notable. Los triacilgliceroles y las ceras sintetizados por el cachalote contienen ácidos grasos con la longitud de cadena y el grado de saturación necesarios para conferir al aceite de espermaceti el punto de fusión adecuado para los hábitats de inmersión del animal.

Desgraciadamente para la población de cachalotes, el aceite de espermaceti se consideró en ciertas épocas el mejor para lámparas de aceite y continúa siendo valioso comercialmente por su utilización como lubricante. Varios siglos de caza intensiva de estos mamíferos los han colocado en la lista de especies en peligro de extinción.

que reduce algunos de sus dobles enlaces a enlaces sencillos y otros a dobles enlaces trans. Los triacilgliceroles que sólo contienen ácidos grasos saturados, tales como la triestearina, componente principal de la grasa de buey, son sólidos blancos y grasos a temperatura ambiente.

Cuando los alimentos ricos en grasas se exponen demasiado tiempo al oxígeno del aire se pueden enranciar. El gusto y olor desagradables asociados con el enranciamiento provie-

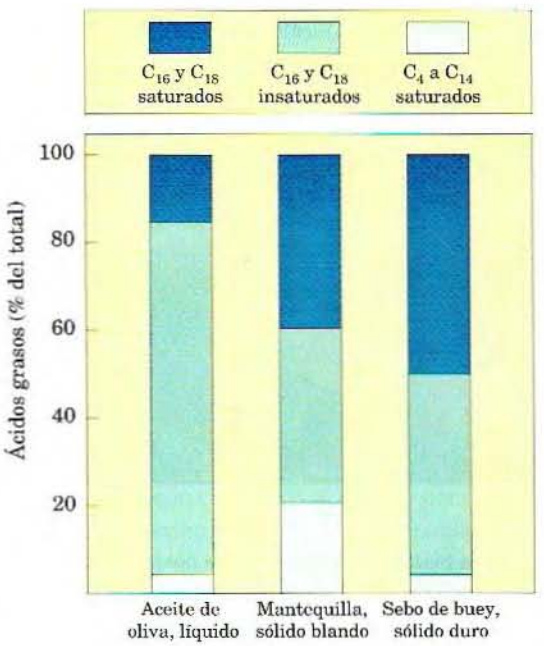


FIGURA 10–4 Composición en ácidos grasos de tres alimentos grasos. El aceite de oliva, la mantequilla y el sebo de buey están formados por mezclas de triacilgliceroles que difieren en su composición de ácidos grasos. Los puntos de fusión de estas grasas –y de ahí su estado físico a temperatura ambiente (25 °C)– están en función de su composición de ácidos grasos. El aceite de oliva tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) que explica su estado líquido a 25 °C. La mayor proporción de ácidos grasos saturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) en la mantequilla incrementa su punto de fusión, con lo que la mantequilla es sólida (blanda). El sebo de buey, con una proporción aún mayor de ácidos grasos saturados de cadena larga, es sólido (duro).

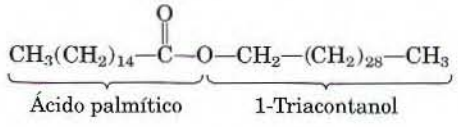
nen de la rotura oxidativa de los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados que produce aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena más corta y, por tanto, de mayor volatilidad.

Las ceras sirven como almacenes de energía y como cubiertas impermeables al agua

Las ceras biológicas son ésteres de ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados (de 14 a 36 átomos de carbono) con alcoholes de cadena larga (de 16 a 30 átomos de carbono)(Fig. 10-5). Sus puntos de fusión (60 a 100 °C) son generalmente más elevados que los de los triacilgliceroles. En el plancton, constituido por microorganismos marinos flotantes de vida libre que se encuentran en la base de la cadena alimenticia para los animales marinos, las ceras son la forma de almacenamiento principal de combustible metabólico.

Las ceras también realizan diversas funciones en la naturaleza, relacionadas con sus propiedades repelentes del agua y su consistencia firme. Ciertas glándulas de la piel de los vertebrados secretan ceras para proteger el pelo y la piel manteniéndolos flexibles, lubricados e impermeables. Las aves, sobre todo las acuáticas, secretan ceras que mantienen la impermeabilidad de sus plumas. Las hojas brillantes del acebo, rododendro y muchas plantas tropicales están recubiertas por una espesa capa de ceras que las protege de los parásitos e impide la evaporación excesiva del agua.

Las ceras biológicas tienen diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética y otras. La lanolina (de la lana de oveja), la cera de abeja (Fig. 10-5), la cera de carnauba (de una palmera brasileña) y el aceite de espermaceti (de los cachalotes; véase Recuadro 10-1) se utilizan ampliamente en la fabricación de lociones, ungüentos y pulimentos.



(a)

(b)

FIGURA 10-5 Cera biológica. **(a)** El triacontanilpalmitato, componente mayoritario de la cera de abeja, es un éster del ácido palmítico con el alcohol triacontanol. **(b)** Un panal, construido con cera de abeja, es rígido a 25 °C y totalmente impermeable al agua.

RESUMEN 10.1 Lípidos de almacenamiento

- Los lípidos son componentes celulares insolubles en agua y de estructuras diversas que se pueden extraer con disolventes apolares.
- Casi todos los ácidos grasos, que proporcionan el componente hidrocarbonado de los lípidos, tienen un número par (generalmente 12 a 24) de átomos de carbono, pudiendo ser saturados o insaturados; los dobles enlaces tienen casi siempre la configuración cis.
- Los triacilgliceroles contienen tres moléculas de ácido graso esterificadas con los tres grupos hidroxilo del glicerol. Los triacilgliceroles sencillos sólo contienen un tipo de ácido graso; los triacilgliceroles mixtos contienen dos o tres tipos diferentes. Los triacilgliceroles son mayoritariamente grasas de almacenamiento; se encuentran en muchos tipos de alimentos.

10.2 Lípidos estructurales de las membranas

La característica arquitectónica central de las membranas biológicas es una doble capa lipídica que constituye una barrera al paso de moléculas polares y de iones. Los lípidos de las membranas son anfipáticos; un extremo de la molécula es hidrofóbico y el otro hidrofílico. Sus interacciones hidrofóbicas entre ellos y las hidrofílicas con el agua dirigen su empaquetamiento hacia la formación de láminas llamadas bicapas membranosas. En esta sección se describen cinco tipos generales de lípidos de membrana: glicerofosfolípidos, en los que las regiones hidrofóbicas están compuestas por dos ácidos grasos unidos al glicerol; galactolípidos y sulfolípidos, que también tienen dos ácidos grasos esterificados con el glicerol pero que carecen del fosfato característico de los fosfolípidos; lípidos tetaéter de las arquebacterias, en los que dos cadenas alquílicas muy largas están unidas mediante enlace éter al glicerol de ambos extremos; esfingolípidos, en los que se une un solo ácido graso a una amina grasa, la esfingosina; y esteroles, que son compuestos que se caracterizan por tener un sistema rígido de cuatro anillos hidrocarbonados fusionados.

Las partes hidrofílicas de estos compuestos anfipáticos pueden ser muy sencillas, por ejemplo un simple grupo —OH en un extremo del sistema anular de los esteroles, o pueden ser mucho más complejas. Los glicerofosfolípidos y algunos esfingolípidos contienen un grupo polar que se une a una porción hidrofóbica mediante un enlace fosfodiéster; son los **fosfolípidos.** Otros esfingolípidos carecen de grupo fosfato pero tienen un azúcar sencillo u oligosacáridos complejos en sus extremos polares; constituyen los **glucolípidos** (Fig. 10-6). Dentro de estas clases de lípidos de membrana se produce una enorme diversidad debido a las diferentes combinaciones de "colas" de ácidos grasos y "cabezas" polares. El ordenamiento de estos lípidos en forma de membranas y sus papeles estructurales y funcionales en las mismas se tratan en el capítulo siguiente.

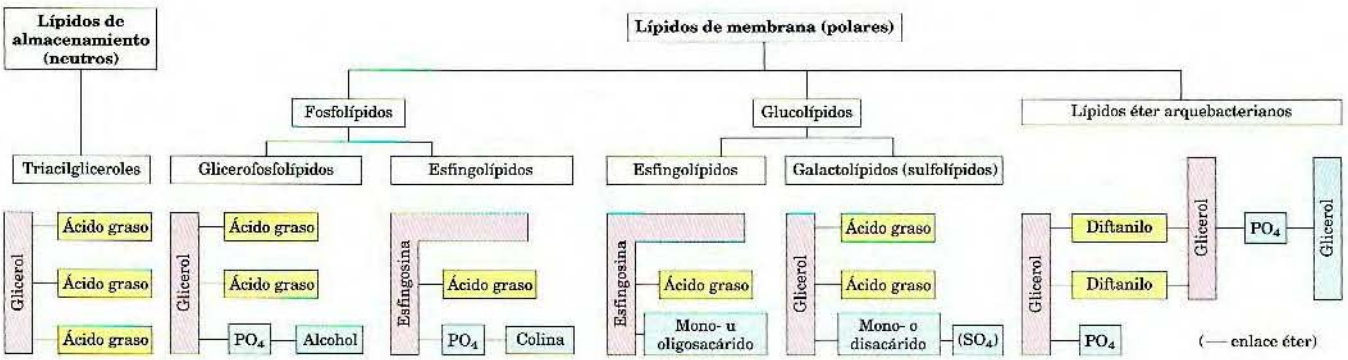
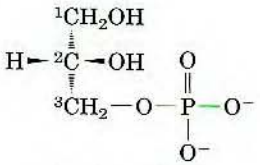


FIGURA 10–6 Algunos tipos comunes de lípidos de almacenamiento y de membrana. Todos los tipos de lípidos que se muestran tienen como armazón el glicerol o la esfingosina (recuadros rosa), a los que se unen uno o más grupos alquilo de cadena larga (amarillo) y un grupo de cabeza polar (azul). En los triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos, los grupos alquilo son ácidos grasos formando un enlace éster. Los esfingolípidos contienen un solo ácido graso formando enlace amida con el armazón de esfingosina. Los lípidos de membrana de las arquebacterias son variables; el que se muestra aquí tiene dos cadenas alquilo muy largas y ramificadas con sus dos extremos formando un enlace éter con la porción de glicerol. En los fosfolípidos, el grupo de cabeza polar está unido por un enlace fosfodiéster y los glucolípidos tienen una unión glucosídica directa entre el azúcar del grupo de cabeza y el armazón de glicerol.

Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico

Los **glicerofosfolípidos,** también llamados fosfoglicéridos, son lípidos de membrana en los que dos ácidos grasos están unidos por enlace éster al primer y segundo carbonos del glicerol y un grupo de cabeza muy polar o cargado está unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono. El glicerol es proquiral; no tiene carbonos asimétricos pero la unión del fosfato a cualquiera de los dos extremos lo convierte en un compuesto quiral que se denomina correctamente L-glicerol 3-fosfato, D-glicerol 1-fosfato o *sn*-glicerol (Fig. 10-7). Los glicerofosfolípidos, como derivados del ácido fosfatídico (Fig. 10-8), se nombran según el alcohol polar en el grupo de cabeza. Por ejemplo, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina tienen colina y etanolamina en sus grupos polares de cabeza. En todos estos compuestos, el grupo de cabeza se une al glicerol mediante un enlace fosfodiéster en el que el grupo fosfato tiene una carga negativa a pH 7,0. El alcohol polar puede estar cargado negativamente (como en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), ser neutro (fosfatidilserina) o estar cargado positivamente (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Como se verá en el Capítulo 11, estas cargas contribuyen significativamente a las propiedades superficiales de las membranas.



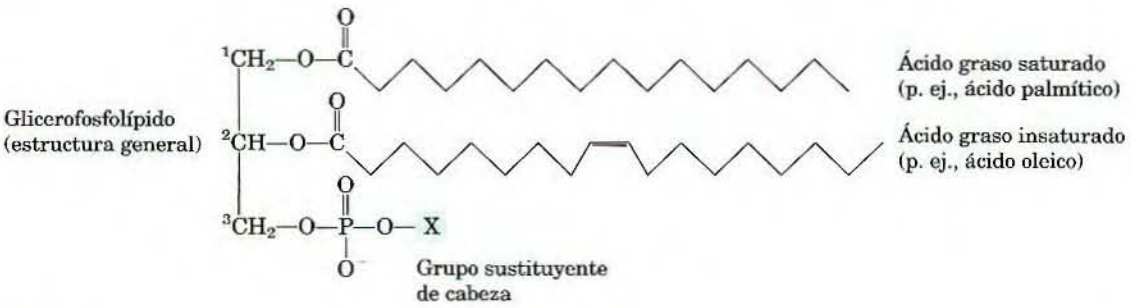
L-Glicerol 3-fosfato
(*sn*-glicerol 3-fosfato)

FIGURA 10–7 D-Glicerol 3-fosfato, el armazón de los fosfolípidos. El glicerol en sí no es quiral ya que tiene un plano de simetría a través del C-2. Sin embargo, el glicerol puede convertirse en un compuesto quiral al añadir un sustituyente tal como el fosfato a cualquiera de los dos grupos —CH_2OH; es decir, el glicerol es proquiral. Una nomenclatura sin ambigüedades para el glicerol fosfato es el sistema DL (descrito en la p. 77), en el que los isómeros se nombran según su relación estereoquímica con los isómeros del gliceraldehído. Según este sistema el estereoisómero del glicerol fosfato que se encuentra en la mayoría de lípidos se nombra correctamente como L-glicerol 3-fosfato o D-glicerol 1-fosfato. Otra manera de especificar los estereoisómeros es el sistema de numeración estereoespecífica *(sn)* en el que C-1, por definición, es el grupo del compuesto proquiral que ocupa la posición pro-S. La forma común del glicerol fosfato en los fosfolípidos es, según este sistema, *sn*-glicerol 3-fosfato.

Los ácidos grasos de los glicerofosfolípidos pueden ser muy variados, por lo que un fosfolípido dado puede estar formado por diversas especies moleculares, cada una con una dotación única de ácidos grasos. La distribución de las especies moleculares es específica de los distintos organismos, diferentes tejidos de un mismo organismo y distintos glicerofosfolípidos en la misma célula o tejido. En general, los glicerofosfolípidos contienen un ácido graso saturado de 16 o 18 carbonos (C_{16} o C_{18}) en C-1 y un ácido graso insaturado de entre 18 y 20 carbonos (C_{18} a C_{20}) en C-2. Con algunas excepciones, se desconoce todavía el significado biológico de la variación de los ácidos grasos y de los grupos de cabeza.

Algunos fosfolípidos tienen ácidos grasos unidos por enlace éter

Algunos tejidos animales y algunos organismos unicelulares son ricos en **lípidos con función éter,** en los que una de las dos cadenas acilo está unida al glicerol por enlace éter en lugar de enlace éster. La cadena unida por enlace éter puede ser saturada, tal como sucede en los lípidos alquílicos con función éter, o puede contener un doble enlace entre C-1 y C-2, tal como sucede en los **plasmalógenos** (Fig. 10-9). El tejido cardíaco de los vertebrados es único en su riqueza de lípidos con



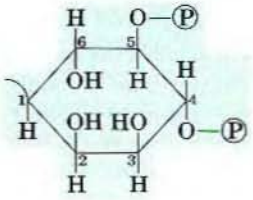
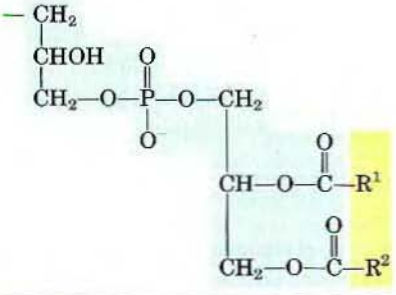
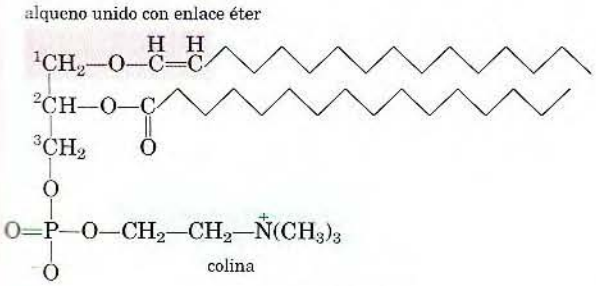
Nombre del glicerofosfolípido	Nombre de X	Fórmula de X	Carga neta (a pH 7)
Ácido fosfatídico	—	— H	−1
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina	— CH_2—CH_2—$\overset{+}{N}H_3$	0
Fosfatidilcolina	Colina	— CH_2—CH_2—$\overset{+}{N}(CH_3)_3$	0
Fosfatidilserina	Serina	— CH_2—$CH(\overset{+}{N}H_3)$—COO^-	−1
Fosfatidilglicerol	Glicerol	— CH_2—$CH(OH)$—CH_2—OH	−1
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	*myo*-Inositol 4,5-bisfosfato		−4
Cardiolipina	Fosfatidilglicerol		−2

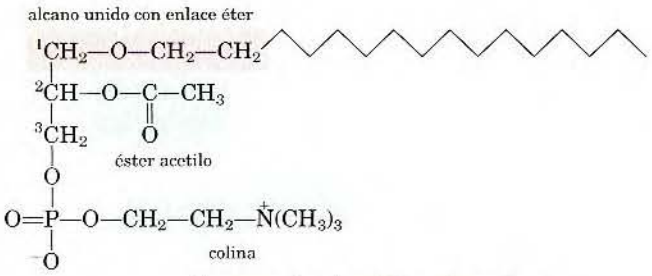
FIGURA 10–8 Glicerofosfolípidos. Los glicerofosfolípidos comunes son diacilgliceroles unidos a alcoholes del grupo de cabeza mediante un enlace fosfodiéster. El ácido fosfatídico, un fosfomonoéster, es el compuesto de referencia. Cada derivado se denomina según el alcohol del grupo de cabeza (X), con el prefijo "fosfatidil-". En la cardiolipina, un solo glicerol es compartido por dos ácidos fosfatídicos.

función éter; alrededor de la mitad de los fosfolípidos cardíacos son plasmalógenos. Las membranas de las bacterias halófilas, de los protistas ciliados y de ciertos invertebrados también contienen elevadas proporciones de lípidos con función éter. No se conoce su significación funcional en estas membranas; quizá su resistencia a las fosfolipasas que cortan ácidos grasos unidos por enlace éster de los lípidos de las membranas sea importante en algunas funciones.

Hay al menos un lípido con función éter, el **factor activador plaquetario,** que es una molécula señal importante. Se libera de glóbulos blancos denominados basófilos y estimula la agregación de las plaquetas y la liberación de serotonina (un vasoconstrictor) contenida en las mismas. Ejerce también diversos efectos sobre el hígado, músculo liso, corazón, tejidos uterino y pulmonar, y juega un papel importante en la inflamación y en la respuesta alérgica. ■



Plasmalógeno

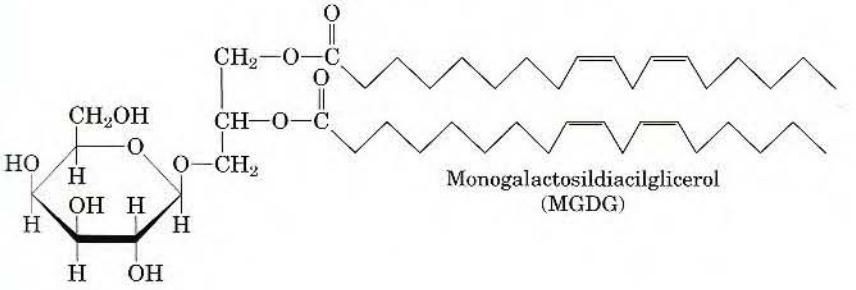


Factor activador de las plaquetas

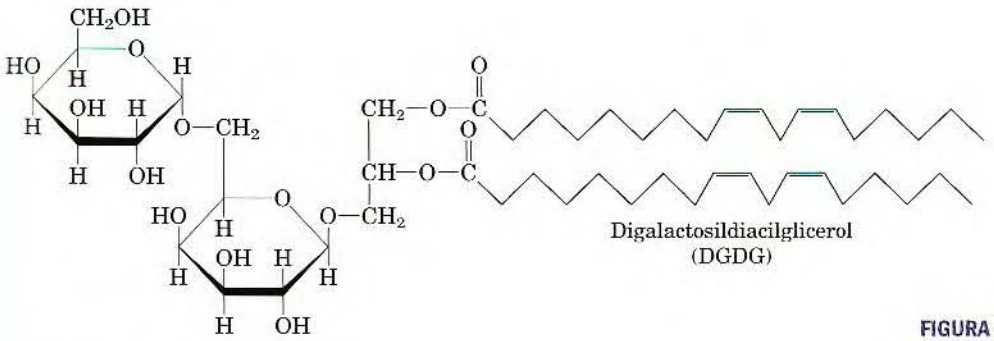
FIGURA 10-9 Lípidos con enlaces tipo éter. Los plasmalógenos tienen una cadena alquenílica unida por enlace éter en donde la mayoría de los glicerofosfolípidos tienen un ácido graso unido en enlace éster (compárese con Fig. 10-8). El factor activador plaquetario tiene una cadena alquílica larga que se encuentra unida por enlace éter al C-1 del glicerol, pero el C-2 está unido por enlace éster al ácido acético, lo que hace que el compuesto sea mucho más soluble en agua que la mayoría de glicerofosfolípidos y plasmalógenos. El alcohol del grupo de cabeza es la colina en los plasmalógenos y en el factor activador de las plaquetas.

Los cloroplastos contienen galactolípidos y sulfolípidos

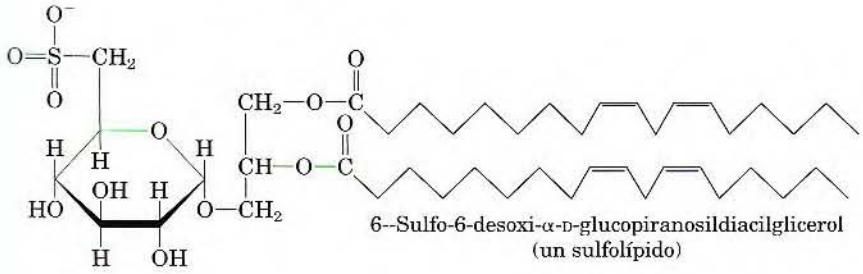
El segundo grupo de lípidos de membrana son los que predominan en las células vegetales; los **galactolípidos,** en los que uno o dos residuos galactosa están unidos por enlace glucosídico con el C-3 de un 1,2-diacilglicerol (Fig. 10-10; véase también Fig. 10-6). Los galactolípidos están localizados en las membranas tilacoides (membranas internas) de los cloroplastos; constituyen del 70 al 80% de los lípidos totales de membrana en las plantas vasculares. Son, probablemente, los lípidos de membrana más abundantes en la biosfera. El fosfato es a menudo el nutriente del suelo limitante para la planta, por lo que, quizá, la presión evolutiva para conservar el fosfato para papeles más críticos favoreció que las plantas fabriquen lípidos sin fosfato. Las membranas vegetales también contienen sulfolípidos, en los que un residuo de glucosa sulfonado se une a un diacilglicerol por medio de un enlace glucosídico. En los sulfolípidos, el sulfonato del grupo de cabeza es portador de una carga negativa, lo mismo que el grupo fosfato de los fosfolípidos (Fig. 10-10).



Monogalactosildiacilglicerol (MGDG)



Digalactosildiacilglicerol (DGDG)



6-Sulfo-6-desoxi-α-D-glucopiranosildiacilglicerol (un sulfolípido)

FIGURA 10-10 Tres glucolípidos de las membranas de cloroplastos. En los monogalactosildiacilgliceroles (MGDG) y en los digalactosildiacilgliceroles (DGDG) casi todos los grupos acilo son derivados del ácido linoeico [18:2($\Delta^{9,12}$)] y los grupos de cabeza no tienen carga. En el sulfolípido 6-sulfo-6-desoxi-α-D-glucopiranosildiacilglicerol, el sulfonato es portador de una carga negativa fija.

Las arquebacterias contienen lípidos de membrana particulares

Las arquebacterias, la mayoría de las cuales viven en nichos ecológicos con condiciones extremas –altas temperaturas (agua hirviendo), bajo pH o alta fuerza iónica, por ejemplo–, tienen lípidos de membrana que contienen hidrocarburos ramificados de cadena larga (32 carbonos) unidos en cada extremo al glicerol (Fig. 10-11). Estas uniones son a través de enlaces éter, que son mucho más estables a la hidrólisis a pH bajo y elevada temperatura que los enlaces éster que se encuentran en los lípidos de las eubacterias y los eucariotas. En su forma totalmente extendida, estos lípidos arquebacterianos son dos veces más largos que los fosfolípidos y esfingolípidos y abarcan el grosor de la membrana superficial. A cada extremo de la molécula extendida hay una cabeza polar que consiste en glicerol unido a residuos fosfato o azúcar. El nombre general de estos compuestos, glicerol dialquil glicerol tetraéteres (GDGT), refleja su estructura única. La porción glicerol de los lípidos arquebacterianos no es el mismo estereoisómero que el de los lípidos de eubacterias y eucariotas; el carbono central se encuentra en la configuración R en las arquebacterias y en la S en los otros reinos (Fig. 10-7).

Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina

Los **esfingolípidos,** la cuarta clase importante de lípidos de membrana, también tienen una cabeza polar y dos colas apolares pero, a diferencia de los glicerofosfolípidos y galactolípidos, no contienen glicerol. Los esfingolípidos están compuestos por una molécula del amino-alcohol de cadena larga esfingosina (también llamada 4-esfingenina) o uno de sus derivados, una molécula de un ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar unido por enlace glucosídico en algunos casos y por enlace fosfodiéster en otros (Fig. 10-12).

Los carbonos C-1, C-2 y C-3 de la molécula de esfingosina son estructuralmente análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. Cuando se une un ácido graso por enlace amida al $—NH_2$ del C-2, el compuesto que se obtiene es una **ceramida,** la cual es similar estructuralmente a un diacilglicerol. La ceramida es la unidad estructural fundamental común de todos los esfingolípidos.

Hay tres subclases de esfingolípidos, todas ellas derivadas de la ceramida, pero que difieren en sus grupos de cabeza: esfingomielinas, glucolípidos neutros (sin carga) y gangliósidos. Las **esfingomielinas** contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar, por lo que se clasifican como fosfolípidos junto con los glicerofosfolípidos (Fig. 10-6). Las esfingomielinas se parecen, por supuesto, a las fosfatidilcolinas en sus propiedades generales y en su estructura tridimensional y también por no tener carga neta en sus grupos de cabeza polares (Fig. 10-13). Las esfingomielinas se hallan presentes en las membranas plasmáticas de las células animales; la vaina de mielina que rodea y aísla los axones de las neuronas mielinadas constituye una buena fuente de esfingomielinas, de ahí el nombre "esfingomielinas".

Los **glucoesfingolípidos,** que se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana plasmática, tienen uno o más azúcares en su grupo de cabeza conectados directamente al —OH en C-1 de la porción ceramida; no contienen fosfato. Los **cerebrósidos** tienen un único azúcar unido a la ceramida; los que contienen galactosa se encuentran de manera característica en las membranas plasmáticas de células del tejido nervioso mientras que los que contienen glucosa se hallan en las membranas plasmáticas de células de tejidos no nerviosos. Los **globósidos** son glucoesfingolípidos neutros (sin carga) con dos o más azúcares, normalmente D-glucosa, D-galactosa o *N*-acetil-D-galactosamina. Dado que no tienen carga a pH 7, cerebrósidos y globósidos se denominan a veces **glucolípidos neutros.**

Los **glangliósidos** son los esfingolípidos más complejos. Contienen grupos de cabeza polares formados por oligosacáridos y uno o varios residuos terminales de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), también llamado "ácido siálico". El ácido

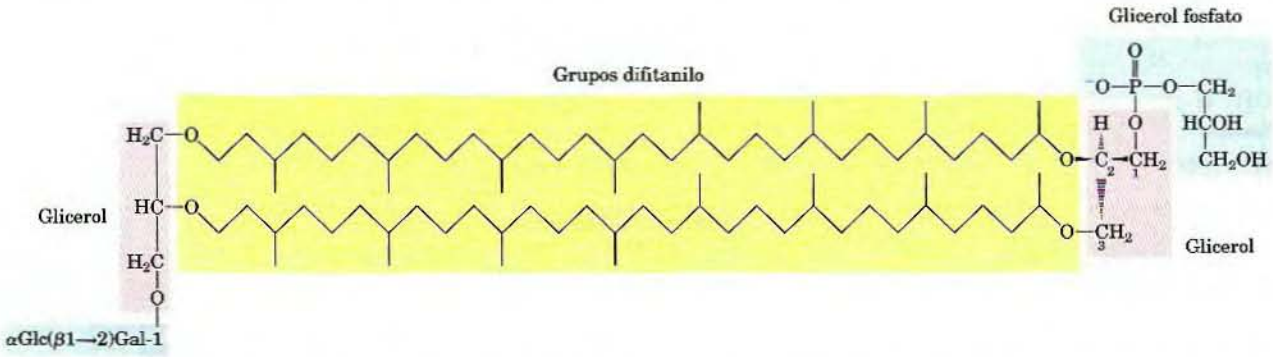
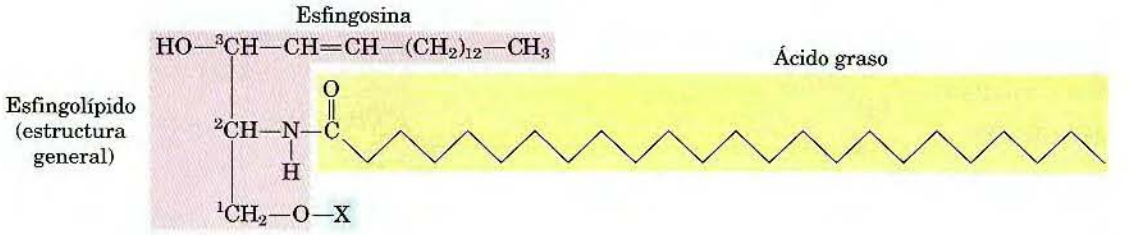
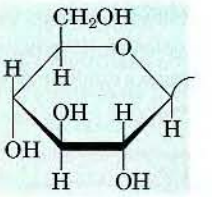
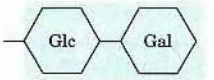
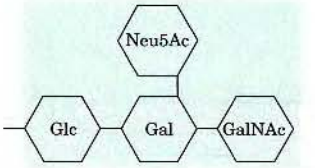


FIGURA 10-11 Lípido de membrana típico de arquebacteria. En este lípido difitanil tetraéter, las porciones difitanilo (amarillo) son hidrocarburos largos compuestos por ocho grupos isopreno de cinco carbonos condensados cola-cola (sobre la condensación de las unidades de isopreno véase Fig. 21-36; compárense también los grupos diftanilo con la cadena lateral de fitol de 20 carbonos presente en las clorofilas mostradas en la Fig. 19-40a). En esta forma extendida, los grupos difitanilo tienen el doble de longitud que un ácido graso de 16 carbonos típico de los lípidos de membrana de las eubacterias y eucariotas. Las porciones glicerol de los lípidos arquebacterianos tienen la configuración R, a diferencia de los de eubacterias y eucariotas, que tienen la configuración S. Los lípidos de las arquebacterias difieren en los sustituyentes de los gliceroles. En la molécula que se muestra en esta figura, un glicerol se encuentra unido al disacárido α-glucopiranosil-(1→2)-β-galactofuranosa; el otro glicerol está unido a un grupo de cabeza glicerol fosfato.

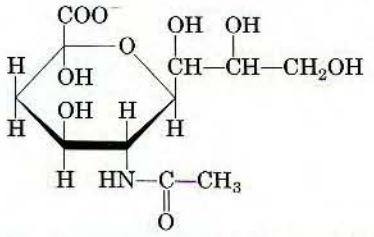


Nombre del esfingolípido	Nombre de X	Fórmula de X
Ceramida	—	— H
Esfingomielina	Fosfocolina	— P(=O)(O⁻)—O—CH₂—CH₂—N⁺(CH₃)₃
Glucolípidos neutros: Glucosilcerebrósido	Glucosa	
Lactosilceramida (un globósido)	Di-, tri- o tetrasacárido	
Ganglósido GM2	Oligosacárido complejo	

Johann Thudichum, 1829–1901

FIGURA 10-12 Esfingolípidos. Los tres primeros carbonos del extremo polar de la esfingosina son análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. El grupo amino en C-2 lleva un ácido graso unido por enlace amida. El ácido graso es habitualmente saturado o monoinsaturado y contiene 16, 18, 22 o 24 átomos de carbono. La ceramida es el compuesto de referencia de este grupo. Los distintos esfingolípidos difieren en el grupo de cabeza polar (X) unido a C-1. Los gangliósidos tienen grupos de cabeza oligosacáridos muy complejos. En esta figura se utilizan las abreviaturas estándar de los glúcidos: Glc, D-glucosa; Gal, D-galactosa; GalNAc, *N*-acetil-D-galactosamina; Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico).

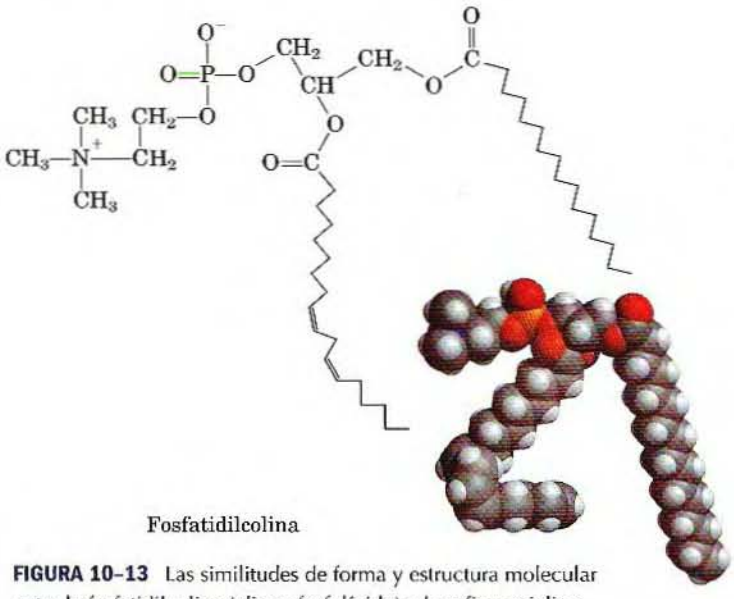
siálico aporta a los gangliósidos una carga negativa a pH 7 que los distingue de los globósidos. Los ganglósidos con un residuo de ácido siálico forman series GM (M de mono-), los que tienen dos ácidos siálicos forman series GD (D de di-) y así sucesivamente (GT, tres residuos de ácido siálico; GQ, cuatro).



Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) (Neu5Ac)

Los esfingolípidos de la superficie celular son sitios de reconocimiento biológico

Cuando hace un siglo el fisicoquímico Johann Thudichum descubrió los esfingolípidos, su papel biológico parecía tan enigmático como la Esfinge, de ahí su nombre. En humanos, se han identificado al menos 60 esfingolípidos diferentes en las membranas celulares. Muchos desempeñan un papel especialmente importante en las membranas plasmáticas de neuronas y algunos actúan en procesos de reconocimiento en la superficie celular, pero sólo se ha descubierto la función específica de unos pocos. La porción glucídica de ciertos esfingolípidos define los grupos sanguíneos humanos y determina el tipo de sangre que los individuos pueden recibir en las transfusiones sanguíneas (Fig. 10-14).



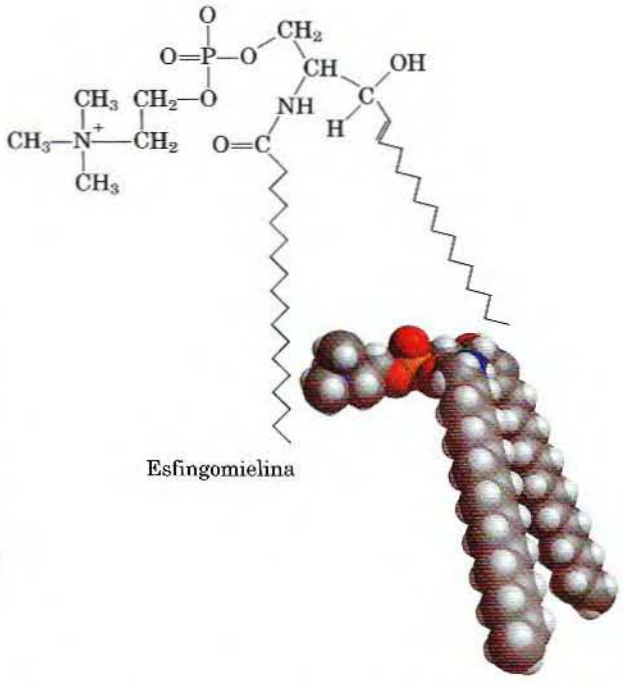


FIGURA 10-13 Las similitudes de forma y estructura molecular entre la fosfatidilcolina (glicerofosfolípido) y la esfingomielina (esfingolípido) son evidentes cuando se dibujan sus fórmulas estructurales y espaciales.

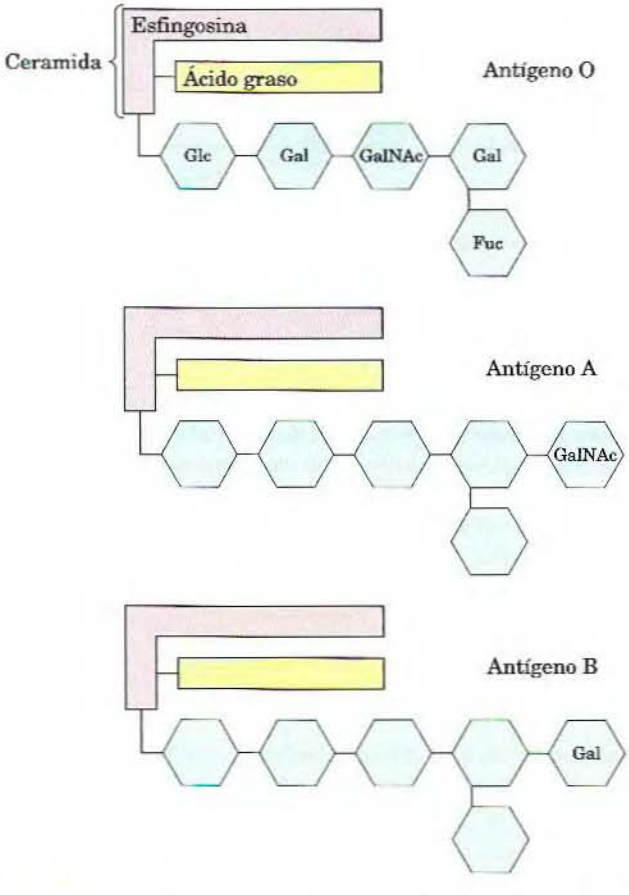


FIGURA 10-14 Los glucoesfingolípidos como determinantes de los grupos sanguíneos. Los grupos sanguíneos humanos (O, A, B) vienen determinados en parte por los grupos de cabeza oligosacáridos (azul) de estos glucoesfingolípidos. Los mismos tres oligosacáridos se encuentran también unidos a ciertas proteínas sanguíneas de individuos de los tipos O, A y B, respectivamente. (El símbolo Fuc representa el azúcar fucosa.)

Los gangliósidos se concentran en la superficie exterior de las células, en donde presentan puntos de reconocimiento para moléculas extracelulares o superficies de células vecinas. Los tipos y cantidades de gangliósidos en la membrana plasmática cambian drásticamente en el desarrollo embrionario. La formación de tumores induce la síntesis de un nuevo complemento de los gangliósidos y se ha encontrado que concentraciones muy bajas de un gangliósido específico inducen la diferenciación de células neuronales tumorales en cultivo.

Los fosfolípidos y los esfingolípidos se degradan en lisosomas

La mayoría de células degradan y reemplazan continuamente sus lípidos de membrana. Para cada uno de los enlaces hidrolizables de un glicerofosfolípido hay un enzima hidrolítico específico en los lisosomas (Fig. 10-15). Las fosfolipasas del tipo A eliminan uno de los dos ácidos grasos produciendo un lisofosfolípido. Las lisofosfolipasas eliminan el ácido graso restante.

Los gangliósidos son degradados por un conjunto de enzimas lisosómicos que catalizan la eliminación paso a paso de las unidades de azúcar, produciendo finalmente una ceramida. Un defecto genético en cualquiera de estos enzimas hidrolíticos lleva a la acumulación de gangliósidos en la célula, lo cual tiene consecuencias médicas importantes (Recuadro 10-2).

Los esteroles tienen cuatro anillos hidrocarbonados fusionados

Los **esteroles** son lípidos estructurales que se hallan presentes en la membrana de la mayoría de células eucarióticas. La estructura característica de este quinto grupo de lípidos de membrana es la del núcleo esteroideo, que consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco (Fig. 10-16). El núcleo esteroideo es casi plano y relativamente rígido; los anillos fusionados no permiten la rotación

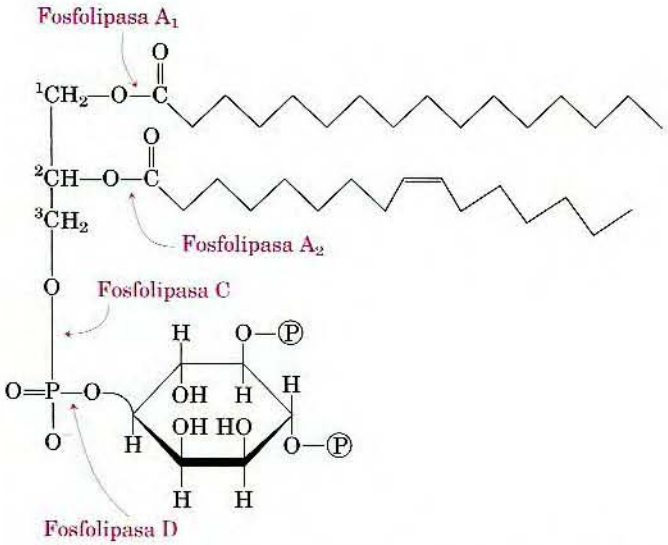


FIGURA 10–15 Especificidad de las fosfolipasas. Las fosfolipasas A_1 y A_2 hidrolizan los enlaces éster de glicerofosfolípidos intactos en C-1 y C-2 del glicerol, respectivamente. Las fosfolipasas C y D rompen cada una de ellas uno de los enlaces fosfodiéster del grupo de cabeza. Algunas fosfolipasas actúan solamente sobre un tipo de glicerofosfolípido, tal como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (que se muestra aquí) o la fosfatidilcolina; otras son menos específicas. Cuando se ha eliminado uno de los ácidos grasos por una fosfolipasa de tipo A, el segundo ácido graso es eliminado de la molécula por una lisofosfolipasa (no se muestra en la figura).

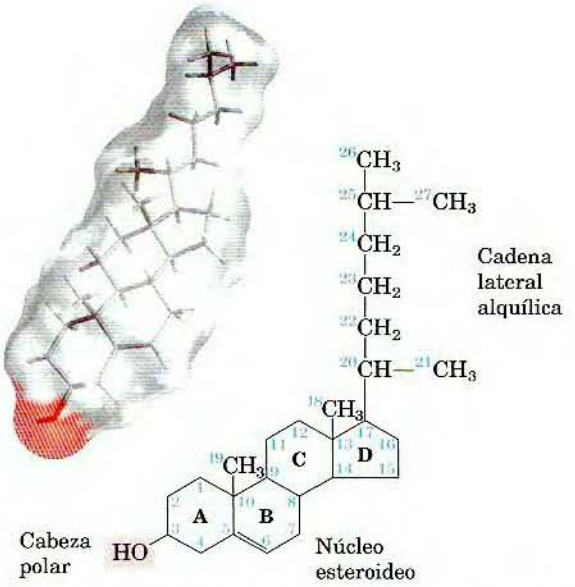
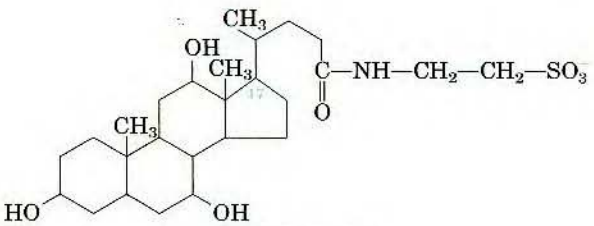


FIGURA 10–16 Colesterol. La estructura en forma de varillas del colesterol es visible mediante un modelo de molécula con contorno superficial transparente (a partir de coordenadas suministradas por Dave Woodcock). En la estructura química, para simplificar la referencia a los derivados del núcleo esteroideo, los anillos se marcan de A a D y los átomos de carbono se numeran en azul. El grupo hidroxilo en C-3 (rosa en ambas representaciones) es el grupo de cabeza polar. Para el almacenamiento y transporte del esterol, este grupo hidroxilo se condensa con un ácido graso formando un éster de esterol.

alrededor de los enlaces C—C. El **colesterol,** el principal esterol en los tejidos animales, es anfipático, con un grupo de cabeza polar (el grupo hidroxilo en C-3) y un cuerpo hidrocarbonado apolar (el núcleo esteroideo y la cadena lateral hidrocarbonada en C-17), que es casi tan largo como un ácido graso de 16 carbonos en su forma extendida. En otros eucariotas se encuentran esteroles similares: por ejemplo, el estigmasterol en plantas y el ergosterol en hongos. Las bacterias no pueden sintetizar esteroles; unas pocas especies bacterianas, no obstante, pueden incorporar esteroles exógenos en sus membranas. Los esteroles de todos los eucariotas se sintetizan a partir de subunidades isopreno de cinco carbonos, lo mismo que las vitaminas liposolubles, las quinonas y los dolicoles, que se describen en la Sección 10.3.

Además de su papel como constituyentes de membranas, los esteroles también son los precursores de diversos productos con actividades biológicas específicas. Las hormonas esteroideas, por ejemplo, son señales biológicas potentes que regulan la expresión génica. Los ácidos biliares son derivados polares del colesterol que actúan como detergentes en el intestino emulsionando las grasas de la dieta para hacerlas más accesibles a las lipasas digestivas. Volveremos al colesterol y a otros esteroles en posteriores capítulos para considerar la función estructural del colesterol en las membranas biológicas (Capítulo 11), la señalización por las hormonas esteroideas (Capítulo 12), la extraordinaria ruta biosintética del colesterol y su transporte por lipoproteínas transportadoras (Capítulo 21).



RESUMEN 10.2 Lípidos estructurales de las membranas

- Los lípidos polares, que tienen cabezas polares y colas apolares, son componentes principales de las membranas. Los más abundantes son los glicerofosfolípidos, que contienen dos ácidos grasos esterificados con dos de los grupos hidroxilo del glicerol y un segundo alcohol, el grupo de cabeza, esterificado con el tercer hidroxilo del glicerol a través de un enlace fosfodiéster. Otros lípidos polares son los esteroles.
- Los glicerofosfolípidos se diferencian en la estructura de su grupo de cabeza; la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina son glicerofosfolípidos comunes. Las cabezas polares de los glicerofosfolípidos tienen carga eléctrica a pH cercano a 7.
- Las membranas de los cloroplastos son excepcionalmente ricas en galactolípidos, compuestos por un

Algunas enfermedades genéticas humanas son consecuencia de una acumulación anormal de lípidos de membrana

Los lípidos polares de las membranas experimentan un recambio metabólico constante en el que la velocidad de su síntesis está normalmente contrarrestada por una velocidad de degradación igual. La degradación de los lípidos se consigue mediante enzimas hidrolíticos con capacidad para hidrolizar un enlace covalente específico cada uno de ellos. Cuando la degradación de esfingolípidos está alterada por un defecto en uno de estos enzimas (Fig. 1), los productos de la degradación parcial se acumulan en los tejidos, causando una enfermedad grave.

Por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick está causada por un defecto genético raro en el enzima esfingomielinasa que corta la fosfocolina de la esfingomielina. La esfingomielina se acumula en el cerebro, bazo e hígado. La enfermedad aparece en los lactantes y produce retraso mental y muerte temprana. Mucho más frecuente es la enfermedad de Tay-Sachs (Fig. 2), en la que se acumula el ganglиósido GM2 en el cerebro y en el bazo debido a la falta del enzima hexosaminidasa A. Los síntomas de la enfermedad de Tay-Sachs son retraso progresivo del crecimiento, parálisis, ceguera y muerte a los 3 o 4 años de edad.

El asesoramiento genético puede predecir y evitar algunas de estas enfermedades genéticas. Se han diseñado pruebas para detectar enzimas anormales en los futuros padres; seguidamente, pruebas de DNA pueden determinar la naturaleza exacta del defecto y el riesgo de afectar a la descendencia. Una vez producido el embarazo, se pueden hacer pruebas sobre células fetales tomando una muestra de una parte de la placenta (biopsia coriónica) o del líquido amniótico que rodea el feto (amniocentesis).

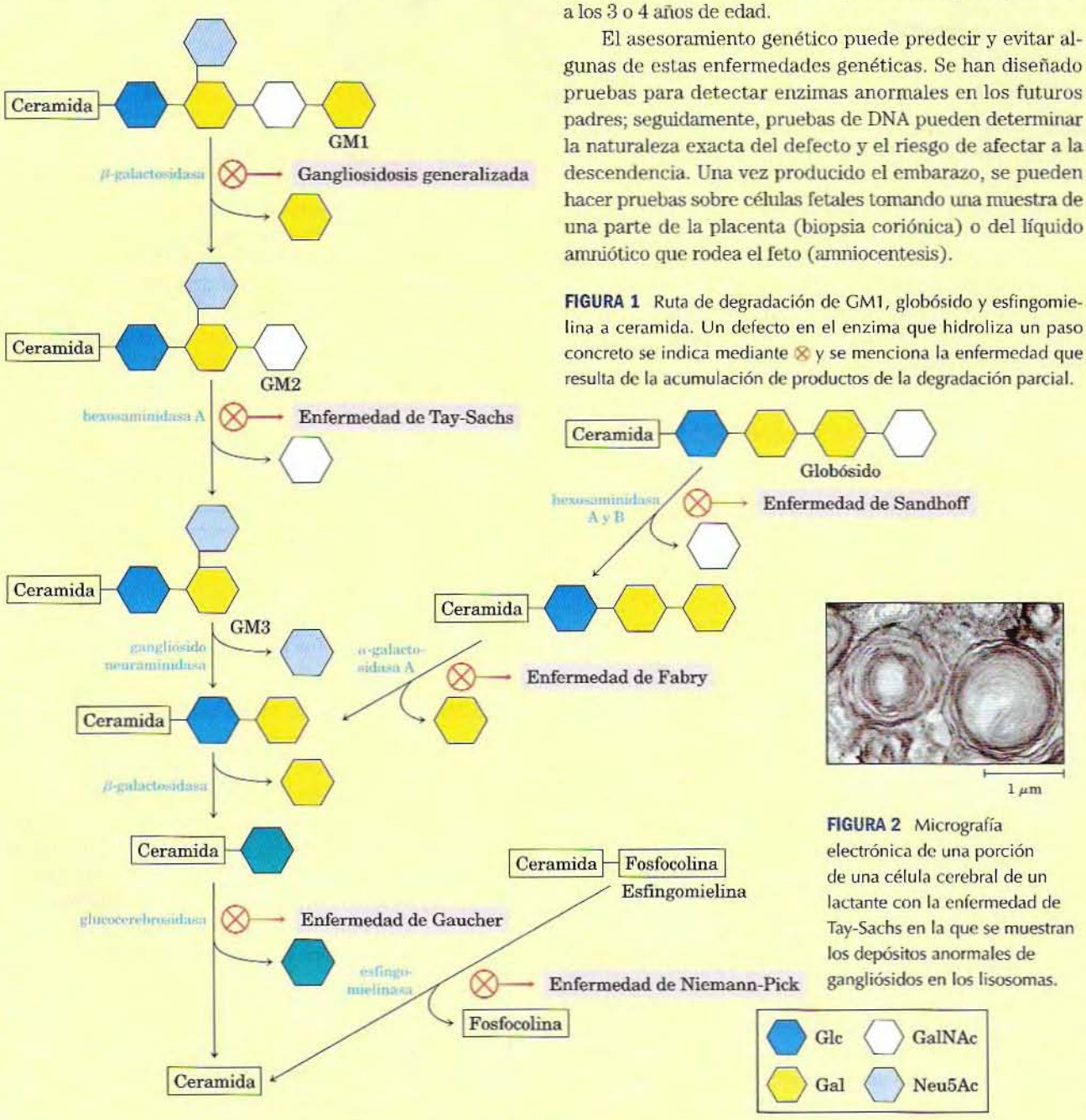


FIGURA 1 Ruta de degradación de GM1, globósido y esfingomielina a ceramida. Un defecto en el enzima que hidroliza un paso concreto se indica mediante ⊗ y se menciona la enfermedad que resulta de la acumulación de productos de la degradación parcial.

FIGURA 2 Micrografía electrónica de una porción de una célula cerebral de un lactante con la enfermedad de Tay-Sachs en la que se muestran los depósitos anormales de gangliósidos en los lisosomas.

diacilglicerol con uno o dos residuos de galactosa unidos, y en sulfolípidos, que son diacilgliceroles con un residuo glucídico sulfonado y, por tanto, con un grupo de cabeza cargado negativamente.

- Las arquebacterias tienen lípidos de membrana únicos con grupos alquilo de cadena larga unidos por enlace éter con glicerol en ambos extremos y con residuos glucídicos y/o fosfato unidos al glicerol para formar un grupo de cabeza polar o cargado. Estos lípidos son estables en las condiciones drásticas en que viven las arquebacterias.
- Los esfingolípidos contienen esfingosina, que es un amino-alcohol alifático de cadena larga, pero no glicerol. La esfingomielina tiene, además del ácido fosfórico y la colina, dos cadenas hidrocarbonadas largas, una de ellas aportada por un ácido graso y la otra por la esfingosina. Las otras tres clases de esfingolípidos son los cerebrósidos, los globósidos y los gangliósidos, que contienen diversos componentes glucídicos.
- Los esteroles tienen cuatro anillos fusionados y un grupo hidroxilo. El colesterol es, a la vez, un componente estructural de las membranas y un precursor de muchos esteroides.

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

Las dos clases funcionales de lípidos consideradas hasta el momento (lípidos de almacenamiento y lípidos estructurales) son componentes celulares mayoritarios; los lípidos de las membranas representan del 5 al 10% de la masa seca de muchas células y los lípidos de almacenamiento más del 80% de la masa de un adipocito. Si bien hay algunas excepciones importantes, estos lípidos juegan un papel *pasivo* en la célula; los combustibles lipídicos están almacenados hasta que son oxidados por enzimas y los lípidos de membrana forman barreras impermeables que separan las células y los compartimientos celulares. Hay otro grupo de lípidos que, aunque son componentes celulares relativamente minoritarios en cuanto a masa, tienen papeles *activos* en el tráfico metabólico como metabolitos y mensajeros. Algunos actúan como potentes señales –como las hormonas, transportadas en la sangre desde un tejido a otro, o como los mensajeros intracelulares generados en respuesta a una señal extracelular (hormona o factor de crecimiento)–. Otros funcionan como cofactores enzimáticos en reacciones de transferencia de electrones en cloroplastos y mitocondrias o en la transferencia de porciones de azúcar en un gran número de reacciones de glucosilación (adición de azúcar). Un tercer grupo consiste en lípidos con un sistema de dobles enlaces conjugados: moléculas de pigmentos que absorben luz visible. Algunos de éstos actúan como pigmentos captadores de luz en la visión y en la fotosíntesis; otros producen coloraciones naturales como el color anaranjado de calabazas y zanahorias y el amarillo de las plumas de canario. Lípidos especializados de este tipo proceden de lípidos de la membrana plasmática o de las vitaminas liposolubles A, D, E y K. En esta sección describiremos algunos de estos lípidos biológicamente activos. En capítulos posteriores se considerarán más detalladamente su síntesis y actividades biológicas.

Los fosfatidilinositoles son derivados de esfingosina que actúan como señales intracelulares

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados actúan a varios niveles para la regulación de la estructura y el metabolismo celulares (Fig. 10-17). El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Fig. 10-8) en el lado citoplasmático (interior) de las membranas plasmáticas sirve como sitio de unión específico para ciertas proteínas del citoesqueleto y para algunas proteínas solubles implicadas en la fusión de membranas durante la exocitosis. También sirve como depósito de moléculas mensajeras que se liberan en el interior de la célula como respuesta a señales extracelulares que interaccionan con receptores específicos de la superficie externa de la membrana plasmática. Las señales actúan mediante una serie de pasos (Fig. 10-17) que empieza con la eliminación enzimática del grupo de cabeza de un fosfolípido y acaba con la activación de un enzima (proteína quinasa C). Por ejemplo, cuando la hormona vasopresina se une a los receptores de la membrana plasmática de células epiteliales del conducto colector renal, se activa una fosfolipasa C específica.

La fosfolipasa C hidroliza el enlace entre el glicerol y el fosfato en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, liberando dos productos: inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que es hidrosoluble, y diacilglicerol, que permanece asociado con la membrana plas-

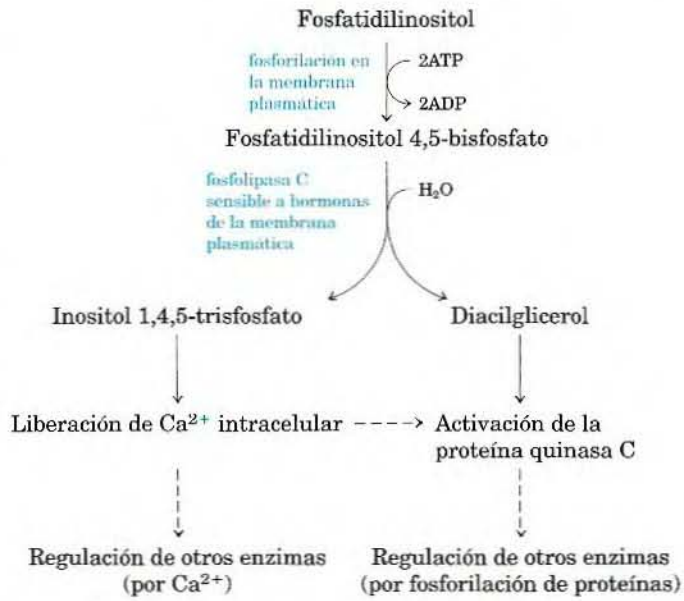


FIGURA 10-17 El fosfatidilinositol en la regulación celular. El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana plasmática es hidrolizado por una fosfolipasa C específica en respuesta a señales hormonales. Los dos productos de hidrólisis actúan como mensajeros intracelulares.

mática. El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. La combinación del diacilglicerol y del aumento de Ca^{2+} citosólico activa la proteína quinasa C. Este enzima cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del ATP a un residuo específico en una o más proteínas diana, alterando de este modo sus actividades y, en consecuencia, el metabolismo celular. Este mecanismo de señalización se describe de manera más detallada en el Capítulo 12 (véase Fig. 12-19).

Los fosfolípidos de inositol también actúan como puntos de nucleación para algunos complejos supramoleculares que intervienen en la señalización o en la exocitosis. Proteínas que contienen ciertos motivos estructurales, denominados dominios PH y PX (de *p*leckstrin *h*omology y *P*hox homology, respectivamente), unen fosfatidilinositoles en la membrana con elevada afinidad y especificidad, iniciando la formación de complejos multienzimáticos en la superficie citosólica de la membrana. Una serie de proteínas se unen específicamente al fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato y la formación de este fosfolípido en respuesta a señales extracelulares agrupa las proteínas en la superficie de la membrana plasmática (véase Fig. 12-8).

Los esfingolípidos de membrana actúan también como fuente de mensajeros intracelulares. Tanto ceramidas como esfingomielinas (Fig. 10-12) son potentes reguladores de las proteínas quinasa y se sabe que la ceramida o sus derivados intervienen en la regulación de la división celular, diferenciación, migración y muerte celular programada (también denominada apoptosis; véase Capítulo 12).

Los icosanoides son portadores de mensajes a las células vecinas

Los icosanoides son hormonas paracrinas, sustancias que actúan sólo en las células próximas al punto de síntesis en lugar de ser transportadas por la sangre para actuar en células de otros tejidos u órganos. Estos derivados de ácidos grasos tienen una diversidad de efectos extremadamente potentes sobre varios tejidos de vertebrados. Se sabe que intervienen en la función reproductora, en la inflamación, fiebre y dolor asociados a las lesiones o enfermedades, en la formación de coágulos de sangre y en la regulación de la presión sanguínea, en la secreción gástrica ácida y en diversos procesos importantes en la salud o enfermedad humanas.

Todos los icosanoides proceden del ácido araquidónico, ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos [20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)]

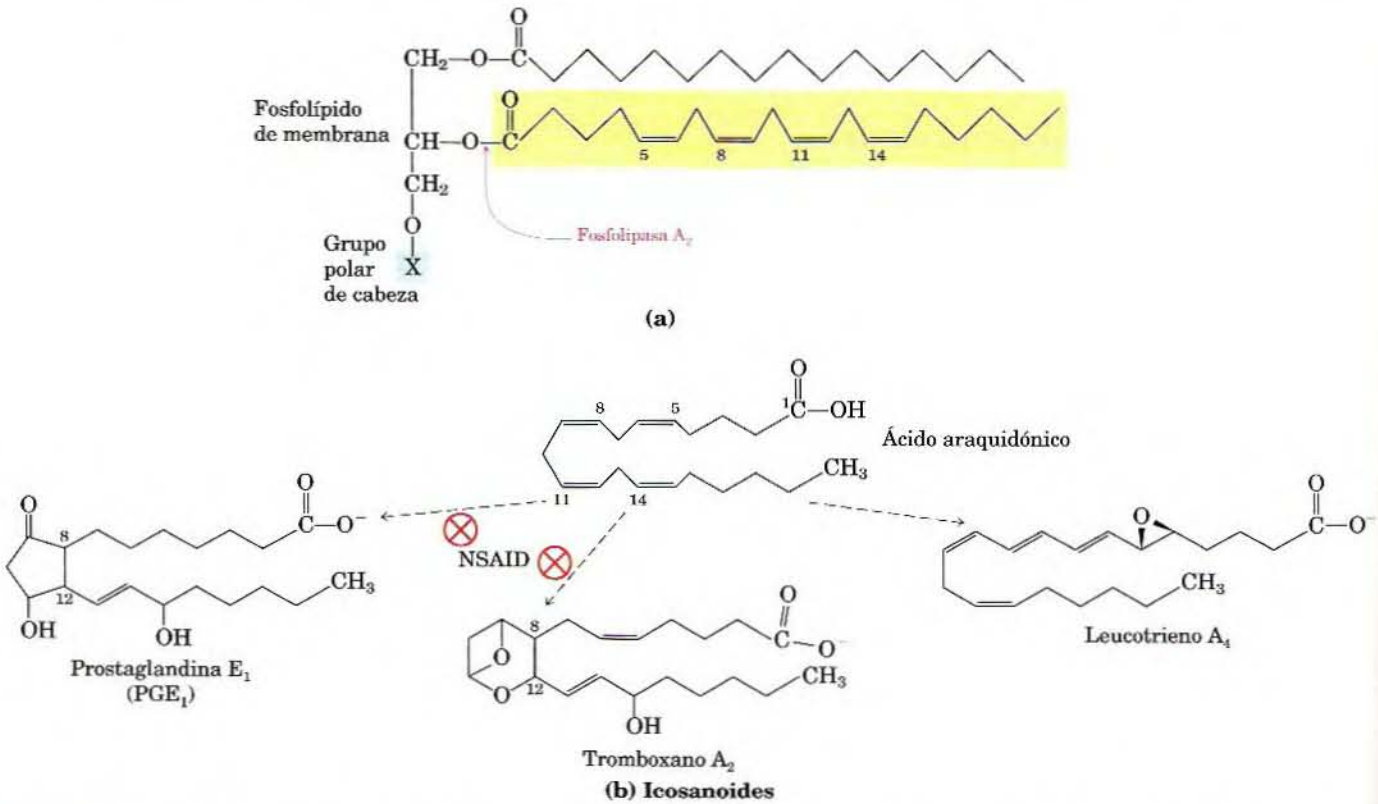


FIGURA 10-18 Ácido araquidónico y algunos de sus derivados icosanoides. **(a)** En respuesta a ciertas señales hormonales, la fosfolipasa A_2 libera ácido araquidónico (araquidonato a pH 7) de los fosfolípidos de las membranas que lo contienen; el ácido araquidónico es el precursor de varios icosanoides. **(b)** Entre ellos se encuentran las prostaglandinas tales como PGE_1, en las que C-8 y C-12 del araquidonato están unidos formando el característico anillo de cinco átomos. En el tromboxano A_2, C-8 y C12 están unidos y se añade un átomo de oxígeno para formar un anillo hexagonal. El leucotrieno A_4 contiene una serie de dobles enlaces conjugados. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), tales como la aspirina y el ibuprofeno, bloquean la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del araquidonato mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (prostaglandina H_2 sintasa).

John Vane, Sune Bergström y Bengt Samuelsson

(Fig. 10-18), del que toman su nombre general (del griego *eikosi*, "veinte"). Hay tres clases de icosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Las **prostaglandinas** (PG) contienen un anillo de cinco átomos de carbono que originalmente formaba parte de la cadena de ácido araquidónico. Su nombre proviene de la glándula prostática, primer tejido del que fueron aisladas por Bengt Samuelsson y Sune Bergström. Originalmente se definieron dos grupos: PGE, de soluble en éter, y PGF, de soluble en tampón fosfato. Cada uno contiene numerosos subtipos, denominados PGE_1, PGE_2, etc. Las prostaglandinas actúan en muchos tejidos regulando la síntesis de la molécula mensajera intracelular AMP 3′,5′-cíclico (cAMP). Debido a que el cAMP es el mediador en la acción de varias hormonas, las prostaglandinas afectan a una amplia gama de funciones celulares y tisulares. Algunas prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso del útero durante el parto o en la menstruación. Otras afectan al flujo sanguíneo a órganos específicos, al ciclo sueño-vigilia y a la capacidad de respuesta de ciertos tejidos a hormonas tales como la adrenalina y el glucagón. Prostaglandinas de un tercer grupo elevan la temperatura corporal (dando lugar a fiebre) y causan inflamación y dolor.

Los **tromboxanos** tienen un anillo de seis átomos que contiene una función éter. Son producidos por las plaquetas (también llamadas trombocitos) y actúan en la formación de coágulos sanguíneos y en la reducción del flujo sanguíneo hacia el sitio de un coágulo. Los antinflamatorios no esteroideos (NSAID) –aspirina, ibuprofeno y meclofenamato, por ejemplo– según demostró John Vane, inhiben el enzima prostaglandina H_2 sintasa (también llamado ciclooxigenasa o COX), que cataliza uno de los primeros pasos en la ruta del araquidonato a prostaglandinas y tromboxanos (Fig. 10-18; véase también Recuadro 21-2).

Los **leucotrienos,** encontrados por primera vez en los leucocitos, contienen tres dobles enlaces conjugados. Son señales biológicas poderosas. Por ejemplo, el leucotrieno D_4, derivado del leucotrieno A_4, induce la contracción del músculo que recubre las vías aéreas del pulmón. La sobreproducción de leucotrienos produce ataques asmáticos y su síntesis constituye una de las dianas de medicamentos antiasmáticos tales como la prednisona. La fuerte contracción de los músculos lisos del pulmón que tiene lugar en el shock anafiláctico es parte de la reacción alérgica, potencialmente fatal, en individuos hipersensibles a las picaduras de abeja, la penicilina y otros agentes. ■

Las hormonas esteroideas transportan mensajes entre tejidos

Los esteroides son derivados oxidados de los esteroles; poseen el núcleo del esterol, pero carecen de la cadena alquilo unida al anillo D del colesterol y, por ello, son más polares que el colesterol. Las hormonas esteroideas se desplazan a través del torrente circulatorio (en proteínas transportadoras) desde su sitio de producción hasta los tejidos diana, donde entran en las células, se unen a proteínas receptoras altamente específicas en el núcleo y provocan cambios en la expresión génica y en el metabolismo. Dada la elevadísima afinidad de los receptores por la hormona, son suficientes concentraciones muy bajas de hormona (nanomolares o inferiores) para producir el efecto sobre los tejidos diana. Los principales grupos de hormonas esteroideas son las hormonas sexuales masculinas y femeninas y las hormonas de la corteza suprarrenal, el cortisol y la aldosterona (Fig. 10-19). Prednisona y prednisolona son medicamentos esteroideos con potentes actividades antinflamatorias gracias, en parte, a la inhibición de la liberación del ácido araquidónico por la fos-

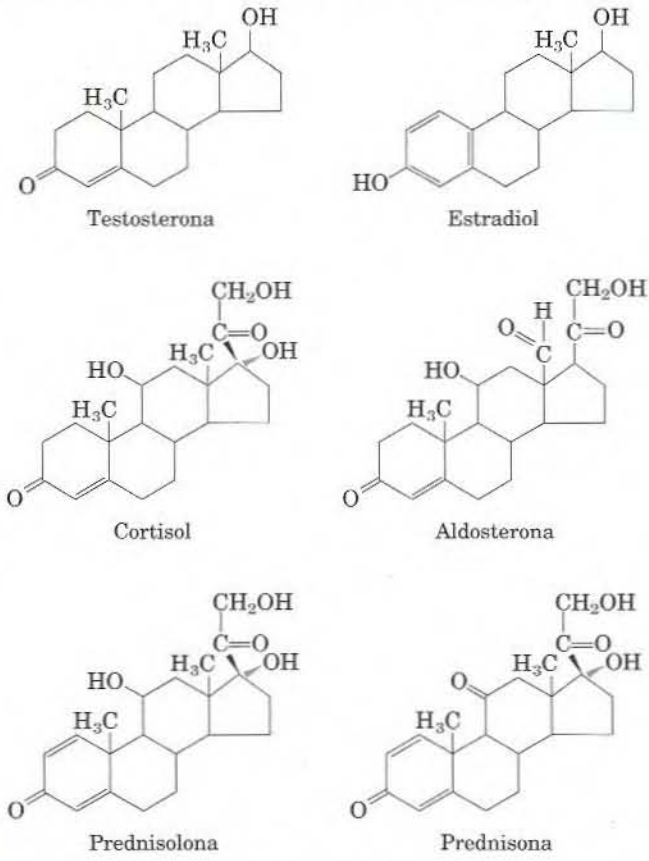
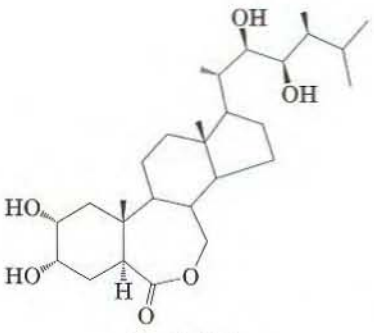


FIGURA 10-19 Esteroides derivados del colesterol. La testosterona, hormona sexual masculina, se forma en los testículos. El estradiol, una de las hormonas sexuales femeninas, se produce en los ovarios y en la placenta. El cortisol y la aldosterona son hormonas producidas en la corteza de las glándulas suprarrenales; regulan el metabolismo de la glucosa y la eliminación de sal, respectivamente. La prednisolona y prednisona son medicamentos esteroideos utilizados como agentes antiinflamatorios.

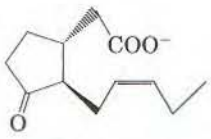
folipasa A_2 (Fig. 10-18) y la consiguiente inhibición de la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos. Existe una amplia variedad de aplicaciones médicas, entre las que se incluye el tratamiento del asma y de la artritis reumatoide. ■

Las plantas utilizan fosfatidilinositoles, esteroides y compuestos tipo icosanoide para enviar señales

Las plantas vasculares contienen fosfoatidilinositol 4,5-bisfosfato así como la fosfolipasa que libera IP_3, que es utilizado para regular las concentraciones intracelulares de Ca^{2+}. El brasinólido y el grupo relacionado de brasinosteroides son potentes reguladores del crecimiento de las plantas al aumentar la velocidad de alargamiento del tallo e influir en la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared celular durante el crecimiento. El jasmonato, procedente del ácido graso 18:3($\Delta^{9,12,15}$), que se encuentra en los lípidos de las membranas, es químicamente similar a los icosanoides de los tejidos animales, actuando también como una señal poderosa que pone en marcha las defensas de la planta en respuesta a las lesiones causadas por insectos. El éster metílico del jasmonato confiere el aroma característico del aceite de jazmín profusamente utilizado en la industria de perfumería.



Brasinólido
(un brasinosteroide)



Jasmonato

Las vitaminas A y D son precursores hormonales

Durante el primer tercio del siglo xx un foco importante de investigación en la química fisiológica fue la identificación de las **vitaminas,** compuestos esenciales para la salud del ser humano y otros vertebrados que no pueden ser sintetizados por estos animales, motivo por el cual deben ser obtenidos de la dieta. En los primeros estudios nutricionales se identificaron dos clases generales de este tipo de compuestos: los que eran solubles en disolventes orgánicos apolares

7-Deshidrocolesterol

Colecalciferol (Vitamina D_3)

1,25-Dihidroxicolecalciferol
(1,25-dihidroxivitamina D_3)

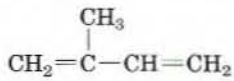
Antes del tratamiento

Después de 14 meses de tratamiento

(b)

FIGURA 10-20 Producción y metabolismo de la vitamina D_3. (a) El colecalciferol (vitamina D_3) se produce en la piel por irradiación UV del 7-deshidrocolesterol, que rompe el enlace sombreado en rosa. En el hígado, se añade un grupo hidroxilo en C-25 (rosa); en el riñón, una segunda hidroxilación en C-1 (rosa) produce la hormona activa, 1,25-dihidroxicolecalciferol. Esta hormona regula el metabolismo del Ca^{2+} en los riñones, intestino y huesos. **(b)** La vitamina D de la dieta evita el raquitismo, enfermedad que fue común en climas fríos en los que la ropa de abrigo abundante bloqueaba el componente UV de la luz solar necesario para la producción de vitamina D_3 por la piel. A la izquierda un niño de 2 años y medio con un raquitismo grave; a la derecha el mismo niño a la edad de 5 años después de un tratamiento de 14 meses con vitamina D.

(vitaminas liposolubles) y los que se podían extraer de los alimentos con disolventes acuosos (vitaminas hidrosolubles). Al final, el grupo liposoluble se resolvió en los cuatro grupos de vitaminas A, D, E y K, todas ellas compuestos isoprenoides sintetizados por condensación de múltiples unidades de isopreno. Dos de ellos (D y A) son precursores hormonales.



Isopreno

La **vitamina D_3,** también llamada **colecalciferol,** se forma normalmente en la piel a partir de 7-deshidrocolesterol mediante una reacción fotoquímica accionada por el componente ultravioleta de la luz solar (Fig. 10-20). La **vitamina D_3,** por sí misma, no es biológicamente activa, pero enzimas del hígado y los riñones convierten este precursor en 1,25-dihidroxicolecalciferol, hormona que regula la captación de calcio en el intestino y las concentraciones del calcio en el riñón y en los huesos. La deficiencia de vitamina D conduce a la formación defectuosa de los huesos propia de la enfermedad del raquitismo, que se cura de forma espectacular con la administración de vitamina D. La vitamina D_2 (ergocalciferol) es un producto comercial formado por la irradiación UV del ergosterol del levadura. La vitamina D_2 es similar estructuralmente a la D_3, con una pequeña modificación en la cadena lateral que se une al anillo esterol D. Ambas tienen los mismos efectos biológicos. La vitamina D_2 se añade habitualmente a la leche y a la mantequilla como suplemento dietético. Al igual que con las hormonas esteroideas, el producto del metabolismo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxicolecalciferol, regula la expresión génica –por ejemplo, poniendo en marcha la síntesis de una proteína intestinal fijadora de Ca^{2+}.

La **vitamina A (retinol)** en sus distintas formas funciona como hormona y como pigmento visual de los ojos de los vertebrados (Fig. 10-21). Actuando a través de proteínas receptoras en el núcleo celular, el ácido retinoico, derivado de la vitamina A, actúa a través de proteínas receptoras en el núcleo celular y regula la expresión génica en el desarrollo del tejido epitelial, incluyendo la piel. El ácido retinoico es el principio activo en el medicamento tretinoin (Retin-A), utilizado en el tratamiento de los acnés graves y pieles arrugadas. El retinal, derivado de la vitamina A, es el pigmento que inicia la respuesta

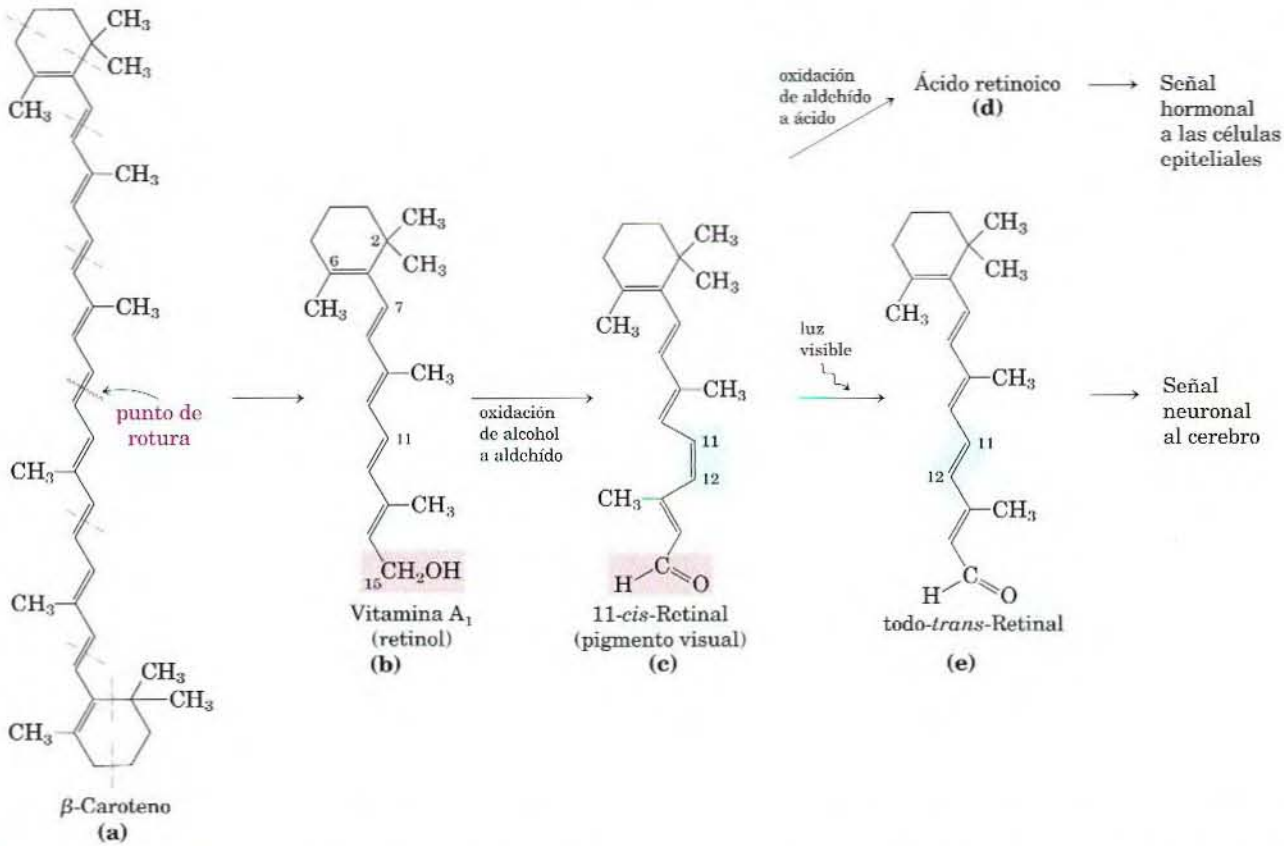


FIGURA 10-21 Vitamina A_1, sus precursores y derivados. **(a)** El β-caroteno es el precursor de la vitamina A_1. Se resaltan las unidades estructurales de isopreno mediante líneas de trazos rojas. La rotura del β-caroteno produce dos moléculas de vitamina A_1 (retinol). **(b)** La oxidación en C-15 convierte el retinol en su aldehído retinal **(c)** y la posterior oxidación produce ácido retinoico **(d),** una hormona que regula la expresión génica. La rodopsina (no mostrada), pigmento visual muy utilizado en la naturaleza, está formada por la combinación del retinal con la proteína opsina. En la oscuridad, el retinal de la rodopsina está en la forma 11-*cis* **(c).** Cuando se excita una molécula de rodopsina con luz visible, el 11-*cis*-retinal sufre varias reacciones fotoquímicas que lo convierten en todo-*trans*-retinal **(e)** forzando un cambio en la forma de la molécula completa de rodopsina. Esta transformación en los bastones de la retina de los vertebrados envía una señal eléctrica al cerebro que es la base de la transducción visual (tratado en más detalle en el Capítulo 12).

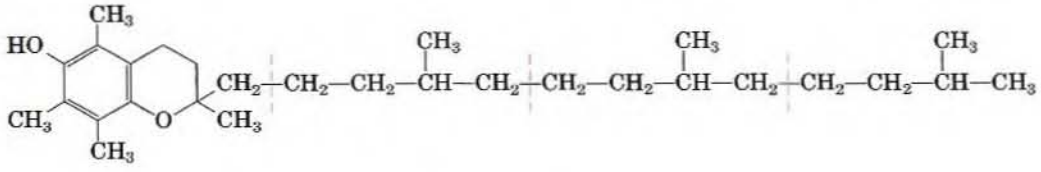
a la luz de los bastones y conos de la retina, produciendo una señal neuronal hacia el cerebro. Este papel del retinal se describe con detalle en el Capítulo 12.

La vitamina A fue aislada a partir de aceites de hígado de pescado; el hígado, huevos, leche entera y mantequilla son buenas fuentes de la dieta. En vertebrados, el β-caroteno, pigmento que confiere a las zanahorias y otras hortalizas amarillas su color, se puede convertir enzimáticamente en vitamina A. La deficiencia de vitamina A produce diversos síntomas en el ser humano, como sequedad de la piel, los ojos y las membranas mucosas; desarrollo y crecimiento retardados y ceguera nocturna, siendo esta última un síntoma temprano utilizado frecuentemente en el diagnóstico clínico de la deficiencia de vitamina A. ■

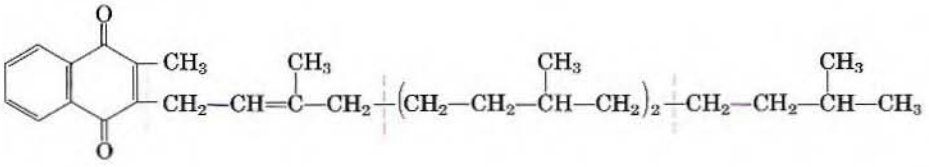
Las vitaminas E y K y las quinonas lipídicas son cofactores de oxidación-reducción

Vitamina E es el nombre de un grupo de lípidos estrechamente relacionados denominados **tocoferoles,** que contienen un anillo aromático sustituido y una cadena lateral isoprenoide larga (Fig. 10-22a). Dado que son hidrofóbicos, se asocian con las membranas celulares, depósitos lipídicos y lipoproteínas de la sangre. Los tocoferoles son antioxidantes biológicos. El anillo aromático reacciona con las formas más reactivas del oxígeno y otros radicales libres, destruyéndolos y protegiendo los ácidos grasos insaturados de la oxidación, previniendo las lesiones oxidativas de los lípidos de las membranas, lo cual puede causar fragilidad celular. Los tocoferoles se

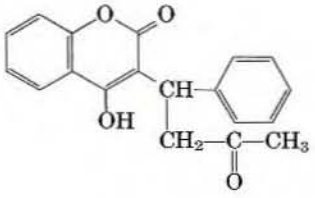
(a) Vitamina E: un antioxidante



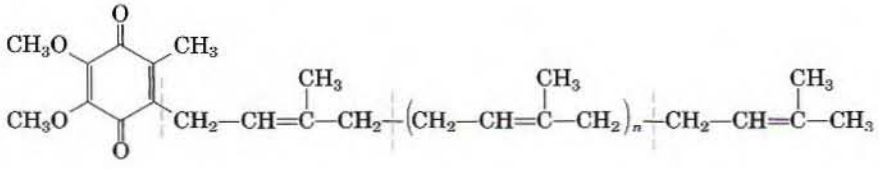
(b) Vitamina K_1: un cofactor de la coagulación sanguínea (filoquinona)



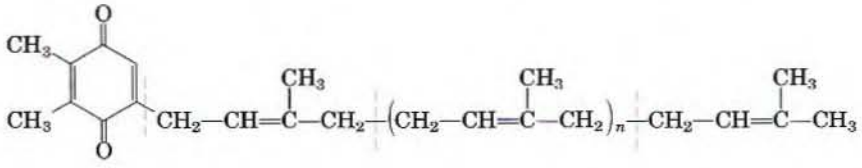
(c) Warfarina: un anticoagulante sanguíneo



(d) Ubiquinona: un transportador de electrones en las mitocondrias (coenzima Q) (n = 4 a 8)



(e) Plastoquinona: un transportador de electrones en los cloroplastos (n = 4 a 8)



(f) Dolicol: un transportador glucídico (n = 9 a 22)

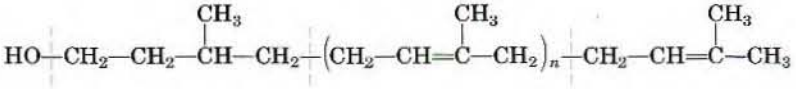


FIGURA 10-22 Compuestos o derivados isoprenoides biológicamente activos. La unidad estructural del isopreno se halla marcada por líneas de trazo rojas. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, la ubiquinona tiene diez unidades isopreno. Los dolicoles de animales tienen entre 17 y 21 unidades (de 85 a 105 átomos de C), los dolicoles de bacteria tienen 11 y los de plantas y hongos entre 14 y 24.

Edward A. Doisy, 1893–1986

Henrik Dam, 1895–1976

hallan en los huevos y aceites vegetales, siendo muy abundantes en el germen de trigo. En animales de laboratorio sometidos a dietas sin vitamina E aparece piel escamosa, debilidad muscular, pérdida de peso y esterilidad. La deficiencia de vitamina E en seres humanos es muy rara.

El anillo aromático de la **vitamina K** (Fig. 10-22b) experimenta un ciclo de oxidación y reducción durante la formación de la protrombina activa, una proteína del plasma sanguíneo esencial para la formación de coágulos sanguíneos. La protrombina es un enzima proteolítico que rompe enlaces peptídicos de la proteína sanguínea fibrinógeno, convirtiéndola en fibrina, la proteína fibrosa insoluble que mantiene unidos los coágulos de sangre. Henrik Dam y Edward A. Doisy descubrieron de forma independiente que la deficiencia de vitamina K da lugar a una coagulación de la sangre más lenta que puede ser fatal. La deficiencia de vitamina K es muy rara en humanos, aparte de un pequeño porcentaje de lactantes que padecen enfermedades hemorrágicas del recién nacido, un trastorno potencialmente fatal. En Estados Unidos, los recién nacidos reciben rutinariamente una inyección de 1 mg de vitamina K. La vitamina K_1 (filoquinona) se encuentra en las hojas de las plantas verdes mientras que una forma relacionada, la vitamina K_2 (menaquinona), es sintetizada por las bacterias que residen en el intestino de los vertebrados.

La warfarina (Fig. 10-22c) es un compuesto sintético que inhibe la formación de protrombina activa. Es muy venenoso para las ratas, en las que produce la muerte por hemorragia interna. Curiosamente, este potente rodenticida es también un valioso medicamento anticoagulante para el tratamiento de los pacientes con riesgo de coagulación excesiva de la sangre, tales como los pacientes operados y los que sufren trombosis coronaria.

La ubiquinona (también llamada coenzima Q) y la plastoquinona (Fig. 10-22d, e) son isoprenoides, que funcionan como transportadores de electrones lipofílicos en las reacciones de oxidación-reducción que impulsan la síntesis de ATP en las mitocondrias y en los cloroplastos, respectivamente. Tanto la ubiquinona como la plastoquinona pueden aceptar uno o dos electrones y uno o dos protones (véase Fig. 19-54).

Los dolicoles activan precursores glucídicos para la biosíntesis

En la formación de los glúcidos complejos de las paredes celulares bacterianas y en la adición de unidades polisacáridas a ciertas proteínas (glucoproteínas) y lípidos (glucolípidos) en eucariotas, las unidades glucídicas que se han de adicionar están activadas químicamente mediante unión a alcoholes isoprenoides denominados **dolicoles** (Fig. 10-22f). Éstos tienen interacciones hidrofóbicas fuertes con los lípidos de membrana, anclando los glúcidos unidos a la membrana, donde participan en reacciones de transferencia de glúcidos.

RESUMEN 10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

- Algunos tipos de lípidos, aunque presentes en cantidades relativamente pequeñas, tienen papeles críticos como cofactores o señales.
- El fosfatidilinositol bisfosfato es hidrolizado, dando dos mensajeros intracelulares, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trisfosfato. El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato constituye un punto de nucleación para los complejos proteicos supramoleculares que actúan en la señalización biológica.
- Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (los icosanoides), procedentes del ácido araquidónico, son hormonas extremadamente potentes.
- Las hormonas esteroideas provienen de los esteroles y actúan como señales biológicas potentes, tales como las hormonas sexuales.
- Las vitaminas A, D, E y K son compuestos liposolubles formados por unidades de isopreno. Todas tienen papeles esenciales en el metabolismo o la fisiología de los animales. La vitamina D es el precursor de una hormona que regula el metabolismo del calcio. La vitamina A proporciona el pigmento visual del ojo de los vertebrados y actúa como regulador de la expresión génica durante el crecimiento de las células epiteliales. La vitamina E actúa en la protección de los lípidos de membrana frente a la lesión oxidativa y la vitamina K es esencial en el proceso de coagulación de la sangre.
- Las ubiquinonas y plastoquinonas también son derivados isoprenoides que actúan como transportadores de electrones en las mitocondrias y cloroplastos.
- Los dolicoles activan y anclan sobre membranas celulares glúcidos utilizados en la síntesis de ciertos glúcidos complejos, glucolípidos y glucoproteínas.

10.4 Trabajar con lípidos

En la investigación del papel biológico de los lípidos en células y tejidos, es esencial saber qué lípidos se hallan presentes y en qué proporción. Debido a que los lípidos son insolubles en agua, su extracción y el posterior fraccionamiento requieren la utilización de disolventes orgánicos y algunas técnicas poco usadas en la purificación de moléculas hidrosolubles tales como

las proteínas y los glúcidos. En general, las mezclas complejas de lípidos se separan por las diferencias en la polaridad o solubilidad de sus componentes en disolventes apolares. Los lípidos que contienen ácidos grasos en enlace éster o amida se pueden hidrolizar tratándolos con un ácido o un álcali o con enzimas hidrolíticos altamente específicos (fosfolipasas, glucosidasas) para analizar sus componentes. Algunos métodos comúnmente utilizados para el análisis de lípidos se muestran en la Figura 10-23 y se tratan a continuación.

La extracción de lípidos requiere la utilización de disolventes orgánicos

Los lípidos neutros (triacilgliceroles, ceras, pigmentos, etc.) se extraen fácilmente de los tejidos con éter etílico, cloroformo o benceno, disolventes en los que no se produce la agregación de lípidos promovida por las interacciones hidrofóbicas. Los lípidos de membrana se extraen mejor con disolventes orgánicos más polares, tales como etanol o metanol, que reducen las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de lípidos pero que también debilitan los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas que unen los lípidos de membrana a las proteínas de membrana. Una disolución extractiva muy utilizada es una mezcla de cloroformo, metanol y agua, inicialmente en proporciones que sean miscibles, produciendo una sola fase (1:2:0,8). Después de homogenar el tejido en este disolvente para extraer todos los lípidos, se añade más agua al extracto resultante, que se separa en dos fases, metanol/agua (fase superior) y cloroformo (fase inferior). Los lípidos permanecen en el cloroformo y las moléculas más polares tales como proteínas y glúcidos se sitúan en la fase polar de metanol/agua.

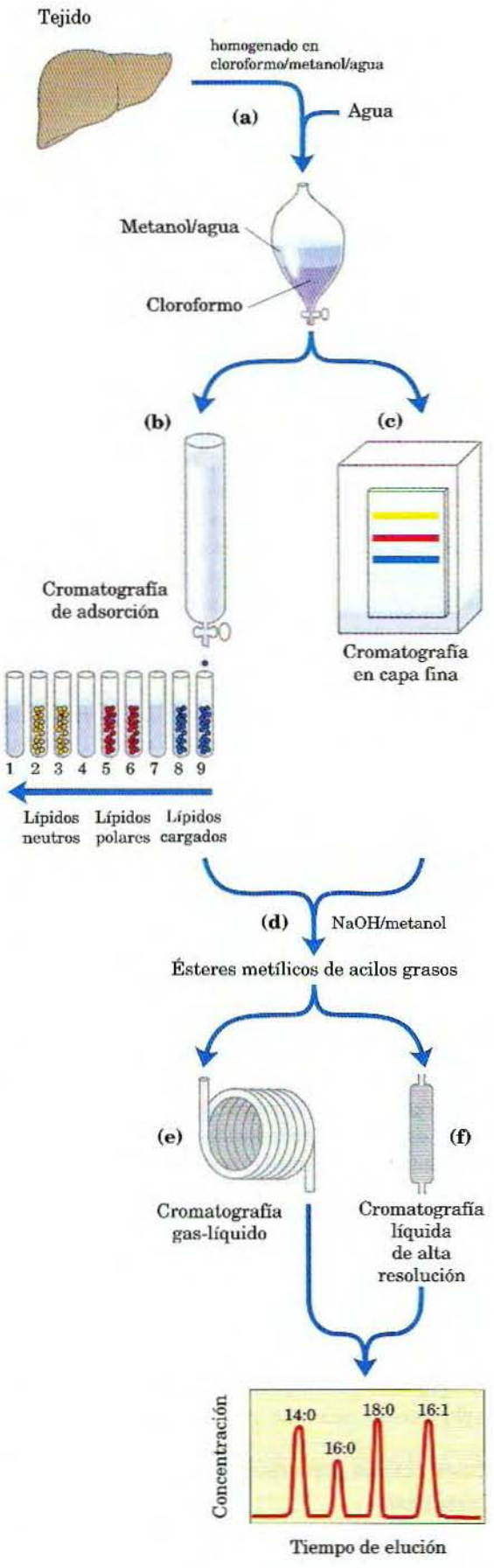


FIGURA 10-23 Algunos procedimientos comunes utilizados en la extracción, separación e identificación de lípidos celulares. **(a)** Se homogeneiza el tejido en una mezcla de cloroformo/metanol/agua, la cual al añadir más agua y eliminar el sedimento no extraíble por centrifugación proporciona dos fases. Se pueden extraer diversos lípidos de la fase cloroformo mediante **(b)** cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, a través de la que se hacen pasar disolventes de polaridad creciente o **(c)** cromatografía en capa fina (TLC), en la que los lípidos son arrastrados sobre una placa recubierta con gel de sílice por un frente de disolvente ascendente. Los lípidos menos polares se desplazan más rápidamente que los lípidos más polares o los que están cargados. La TLC con los disolventes adecuados también puede servir para separar especies lipídicas muy semejantes dentro de una misma clase: los lípidos cargados fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol se separan fácilmente en TLC.

Para la determinación de la composición de ácidos grasos, una fracción lipídica que contiene ácidos grasos unidos por enlace éster se transesterifica en una solución acuosa templada de NaOH y metanol **(d)** produciéndose una mezcla de ésteres metílicos de acilos grasos. Estos ésteres metílicos se separan en función de la longitud de cadena y grado de saturación por **(e)** cromatografía gas-líquido (GLC) o por **(f)** cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación precisa de la masa molecular por espectrometría de masas permite la identificación sin ambigüedades de los lípidos individuales.

La cromatografía de adsorción separa los lípidos de polaridad diferente

Las mezclas complejas de lípidos tisulares se pueden fraccionar mediante procedimientos cromatográficos basados en la diferente polaridad de cada clase de lípido. En la cromatografía de adsorción (Fig. 10-23b), se empaqueta un material polar insoluble, tal como el gel de sílice [una forma de ácido silícico, $Si(OH)_4$], en una columna de vidrio, aplicándose la mezcla de lípidos (en solución de cloroformo) en la parte superior de la columna. (En la cromatografía líquida de alta resolución, la columna tiene un diámetro menor y los disolventes se fuerzan a pasar a través de la columna a altas presiones.) Los lípidos polares se fijan fuertemente al ácido silícico polar mientras que los lípidos neutros pasan directamente a través de la columna y emergen en el primer lavado con cloroformo. A continuación se eluyen los lípidos polares, en orden de polaridad creciente, lavando la columna progresivamente con disolventes de mayor polaridad. Los lípidos polares sin carga (cerebrósidos, por ejemplo) se eluyen con acetona y los lípidos muy polares o cargados (tales como los glicerofosfolípidos), se eluyen con metanol.

La cromatografía en capa fina sobre ácido silícico utiliza el mismo principio (Fig. 10-23c). Se distribuye una fina capa de gel de sílice (ácido silícico) sobre una placa de vidrio a la que se adhiere. Se aplica una pequeña muestra de lípidos disueltos en cloroformo cerca del borde de la placa, la cual se sumerge en un recipiente poco profundo con un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes, contenidos dentro de una cámara cerrada saturada con vapor del disolvente. A medida que el disolvente asciende sobre la placa por acción de la capilaridad arrastra consigo los lípidos. Los lípidos menos polares son los que se desplazan más rápidamente, ya que tienen menos tendencia a unirse al ácido silícico. Después de su separación se pueden detectar los lípidos pulverizando sobre la placa con un colorante (rodamina) que presenta fluorescencia cuando se asocia con lípidos o bien exponiendo la placa a los vapores de yodo. El yodo reacciona reversiblemente con los dobles enlaces de los ácidos grasos, confiriendo a los lípidos que los contengan un color amarillo o marrón. Existe una gran variedad de reactivos que se pulverizan y que son también útiles en la detección de lípidos específicos. Para el análisis posterior, se pueden rascar las regiones de la placa que contienen los lípidos separado recuperándolos por extracción con un disolvente orgánico.

La cromatografía gas-líquido separa las mezclas de derivados lipídicos volátiles

La cromatografía gas-líquido separa los componentes volátiles de una mezcla según sus tendencias relativas a disolverse en el material inerte empaquetado en la columna cromatográfica y a volatilizarse, desplazándose a través de la columna arrastrados por una corriente de un gas inerte tal como el helio. Algunos lípidos son de naturaleza volátil, pero la mayoría han de modificarse previamente para aumentar su volatilidad (esto es, disminuir su punto de ebullición). Para el análisis de los ácidos grasos presentes en una muestra de fosfolípidos, se calientan primeramente los lípidos en una mezcla metanol/HCl o metanol/NaOH, que convierte los ácidos grasos que esterificaban el glicerol en sus ésteres metílicos (en un proceso de transesterificación; Fig. 10-23d). Se aplican a continuación estos ésteres metílicos de los acilos grasos en una columna de cromatografía gas-líquido y se calienta ésta para volatilizar los compuestos. Aquellos ésteres de acilo graso más solubles en el material de la columna se reparten (disuelven) en el mismo; los menos solubles son arrastrados por la corriente de gas inerte y emergen en primer lugar de la columna. El orden de elución depende de la naturaleza del adsorbente sólido de la columna y del punto de ebullición de los componentes de la mezcla lipídica. Con la utilización de estas técnicas se pueden separar completamente mezclas de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y diversos grados de insaturación (Fig. 10-23e).

La hidrólisis específica ayuda a determinar la estructura lipídica

Ciertas clases de lípidos son susceptibles de degradación en condiciones específicas. Por ejemplo, todos los ácidos grasos unidos por enlace éster en los triacilgliceroles, fosfolípidos y ésteres de esteroles se liberan mediante tratamiento ácido o alcalino suave, mientras que un tratamiento algo más fuerte libera los ácidos grasos unidos por enlace amida de los esfingolípidos. Los enzimas que hidrolizan específicamente ciertos lípidos también son útiles en la determinación de la estructura lipídica. Las fosfolipasas A, C y D (Fig. 10-15) hidrolizan enlaces específicos en los fosfolípidos, dando productos de solubilidad y comportamiento cromatográfico característicos. La fosfolipasa C, por ejemplo, libera un fosforil alcohol hidrosoluble (fosfocolina en la fosfatidilcolina) y un diacilglicerol soluble en cloroformo, cada uno de los cuales se puede caracterizar separadamente para determinar la estructura del fosfolípido intacto. La combinación de hidrólisis específica con caracterización de los productos por cromatografía en capa fina, cromatografía gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución permite, a menudo, la determinación de la estructura de un lípido.

La espectrometría de masas revela la estructura lipídica completamente

Para establecer sin ambigüedades la longitud de una cadena hidrocarbonada o la posición de los dobles enlaces, es de gran valor el análisis por espectrometría de masas de los lípidos o de sus derivados volátiles. Las propiedades químicas de lípidos similares (por ejemplo, dos ácidos grasos de longitud similar insaturados en posiciones diferentes o dos isoprenoides con un número diferente de unidades isopreno) son muy parecidas y a menudo la posición de elución utilizando varios métodos cromatográficos no los distingue entre sí. Sin embargo, cuando se acopla un espectrómetro de masas a la salida de una columna cromatográfica, los componentes de la mezcla lipídica pueden ser separados e identificados simultáneamente por su patrón de fragmentación característico (Fig. 10-24).

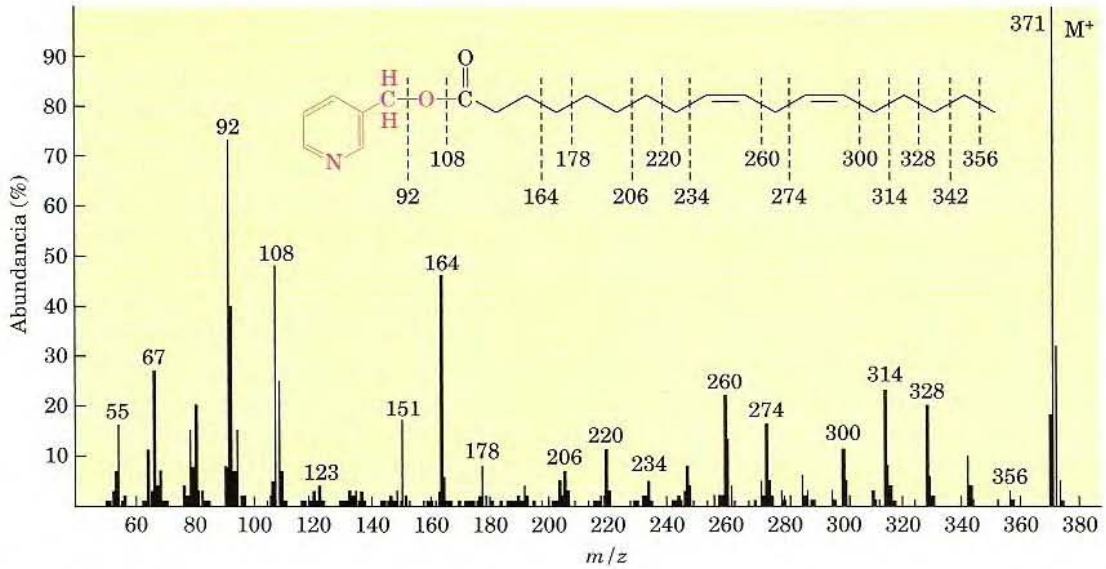


FIGURA 10-24 Determinación de la estructura de un ácido graso por espectrometría de masas. El ácido graso se convierte en primer lugar en un derivado que minimiza la migración de los dobles enlaces cuando se fragmenta la molécula mediante bombardeo por electrones. El derivado aquí mostrado es un éster picolinilo del ácido linoleico –18:2($\Delta^{9,12}$) (M_r 371)– en el que el alcohol es el pinolinol (rojo). Cuando se bombardea con una corriente de electrones, esta molécula se volatiliza y se convierte en el ion inicial (M^+; M_r 371), en el que el átomo de N lleva una carga positiva, y una serie de fragmentos menores producidos por rotura de enlaces C—C en el ácido graso. El espectrómetro de masas separa estos fragmentos cargados según su razón masa/carga (m/z). (Para una revisión de los principios de la espectrometría de masas véase Recuadro 3-2.)

Los iones prominentes a m/z = 92, 108, 151 y 164 contienen el anillo de piridina del picolinol y varios fragmentos del grupo carboxilo, lo que demuestra que el compuesto es, desde luego, un éster picolinilo. El ion molecular (m/z = 371) confirma la presencia de un ácido graso de C-18 con dos dobles enlaces. La serie uniforme de iones separados por 14 unidades de masa atómica (uma) representa la pérdida de sucesivos grupos metilo y metileno desde el extremo derecho de la molécula (C-18 del ácido graso), hasta que se llega al ion de m/z = 300. A éste le sigue un hueco de 26 uma para los carbonos del doble enlace terminal con m/z = 274; otro hueco de 14 uma para el grupo metileno C-11 a m/z = 260 y así sucesivamente. De esta manera se determina la estructura completa, aunque estos datos por sí solos no revelan la configuración (cis o trans) de los dobles enlaces.

RESUMEN 10.4 Trabajar con lípidos

- En la determinación de la composición lipídica, los lípidos se extraen primero de los tejidos con disolventes orgánicos y se separan mediante cromatografía en capa fina, gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución.
- Se pueden utilizar fosfolipasas específicas para uno de los enlaces de un fosfolípido con objeto de generar compuestos más sencillos para su posterior análisis.
- Los lípidos individuales se identifican por su comportamiento cromatográfico, su susceptibilidad a la hidrólisis por enzimas específicos o por espectrometría de masas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

ácido graso 343
triacilglicerol 345
lipasas 346
fosfolípido 348
glucolípido 348
glicerofosfolípido 349
lípido con enlace éter 349
plasmalógeno 349
galactolípido 351
esfingolípido 352
ceramida 352
esfingomielina 352
glucoesfingolípido 352
cerebrósido 352
globósido 352
glucolípidos neutros 352
gangliósidos 352
esteroles 354
colesterol 355
prostaglandinas 359
tromboxanos 359
leucotrienos 359
vitamina 360
vitamina D_3 361
colecalciferol 361
vitamina A (retinol) 361
vitamina E 362
tocoferoles 362
vitamina K 363
dolicol 363

Bibliografía

General

Gurr, M.I. & Harwood, J.L. (1991) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4.ª ed., Chapman & Hall, London.

Buena referencia general sobre la estructura y metabolismo de los lípidos. Nivel intermedio.

Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds.) (2002) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, New Comprehensive Biochemistry, vol. 36, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Excelente colección de revisiones sobre diversos aspectos de la estructura, biosíntesis y función de los lípidos.

Lípidos estructurales de las membranas

Bogdanov, M. & Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274,** 36,827–36,830.

Minirrevisión de la función de los lípidos de membrana en el plegamiento de las proteínas de membrana.

De Rosa, M. & Gambacorta, A. (1988) The lipids of archaebacteria. *Prog. Lipid Res.* **27,** 153–175.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 199–232.

Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R., Sandhoff, K., Suzuki, K. & Suzuki, K. (2001) The GM_2 gangliosidoses. En *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8.ª ed. (Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., eds.), pp. 3827–3876, McGraw-Hill, Inc., New York.

Este artículo contiene descripciones definitivas de los aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos de cientos de enfermedades metabólicas humanas. Una fuente autorizada y una lectura fascinante.

Hoekstra, D. (ed.) (1994) *Cell Lipids*, Current Topics in Membranes, vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego.

Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

Bell, R.M., Exton, J.H. & Prescott, S.M. (eds.) (1996) *Lipid Second Messengers*, Handbook of Lipid Research, vol. 8, Plenum Press, New York.

Binkley, N.C. & Suttie, J.W. (1995) Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J. Nutr.* **125,** 1812–1821.

Brigelius-Flohé, R. & Traber, M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13,** 1145–1155.

Chojnacki, T. & Dallner, G. (1988) The biological role of dolichol. *Biochem. J.* **251,** 1–9.

Clouse, S.D. (2002) Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell* **10,** 973–982.

Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* **350,** 1–18.

Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M. & McIntyre, T.M. (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* **69,** 419–445.

Schneiter, R. (1999) Brave little yeast, please guide us to Thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *BioEssays* **21,** 1004–1010.

Suttie, J.W. (1993) Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7,** 445–452.

Vermeer, C. (1990) γ-Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* **266,** 625–636.

Describe las bases bioquímicas de la necesidad de vitamina K en la coagulación de la sangre y la importancia de la carboxilación en la síntesis de la proteína trombina de la coagulación de la sangre.

Viitala, J. & Järnefelt, J. (1985) The red cell surface revisited. *Trends Biochem. Sci.* **10,** 392–395.

Incluye discusiones sobre los determinantes de los tipos sanguíneos A, B y O.

Weber, H. (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7,** 217–224.

Zittermann, A. (2001) Effects of vitamin K on calcium and bone metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4,** 483–487.

Trabajar con lípidos

Christie, W.W. (1998) Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33,** 343–353.

Descripción detallada de los métodos utilizados para obtener datos tales como los que se presentan en la Figura 10-24.

Christie, W.W. (2003) *Lipid Analysis*, 3.ª ed., The Oily Press, Bridgwater, England.

Hamilton, R.J. & Hamilton, S. (eds) (1992) *Lipid Analysis: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York.

Este texto, aunque agotado, se puede obtener como parte de la IRL Press *Practical Approach Series* en CD-ROM, de Oxford University Press (www.oup-usa/acadsci/passbooks.html).

Matsubara, T. & Hagashi, A. (1991) FAB/mass spectrometry of lipids. *Prog. Lipid Res.* **30,** 301–322.

Un estudio avanzado sobre la identificación de lípidos mediante espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos (FAB), una poderosa técnica para la determinación de estructuras.

Problemas

1. Definición operacional de lípidos ¿En qué aspecto es diferente la definición de "lípido" de los tipos de definiciones utilizados para otras biomoléculas ya consideradas, tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas?

2. Punto de fusión de los lípidos Los puntos de fusión de una serie de ácidos grasos de 18 carbonos son: ácido esteárico, 69,6 °C; ácido oleico, 13,4 °C; ácido linoleico, −5 °C y ácido linolénico, −11 °C.

(a) ¿Qué aspecto estructural de estos ácidos grasos de 18 carbonos puede correlacionarse con el punto de fusión? Dé una explicación molecular de la tendencia en los puntos de fusión.

(b) Dibuje todos los triacilgliceroles posibles que se pueden construir a partir de glicerol, ácido palmítico y ácido oleico. Ordénelos según el incremento en su punto de fusión.

(c) Los ácidos grasos de cadena ramificada se encuentran en lípidos de membrana de alguna bacterias. Su presencia ¿aumenta o disminuye la fluidez de las membranas (es decir, tienen éstas puntos de fusión menores o mayores)? ¿Por qué?

3. Preparación de salsa bearnesa Durante la preparación de la salsa bearnesa se incorporan yemas de huevo a la mantequilla fundida para estabilizar la salsa y evitar que se corte. El agente estabilizante de la yema de huevo es la lecitina (fosfatidilcolina). Sugiera cómo funciona.

4. Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de los lípidos de membrana Un rasgo estructural común de los lípidos de membrana es su naturaleza anfipática. Por ejemplo, en la fosfatidilcolina, las dos cadenas de ácidos grasos son hidrofóbicas y el grupo de cabeza fosfocolina es hidrofílico. De cada uno de los siguientes lípidos de membrana indique los componentes que constituyen las unidades hidrofóbicas y las hidrofílicas: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrósido; (d) ganglíosido; (e) colesterol

5. Labilidad a los álcalis de los triacilgliceroles Un procedimiento corriente para limpiar de grasa el sifón de un fregadero es añadir un producto que contiene hidróxido sódico. Explique por qué funciona.

6. Acción de las fosfolipasas Los venenos de la serpiente de cascabel del este de Estados Unidos y de la cobra de la India contienen fosfolipasa A_2, que cataliza la hidrólisis de ácidos grasos en la posición C-2 de glicerofosfolípidos. El producto de esta reacción de rotura del fosfolípido es la lisolecitina (la lecitina es una fosfatidilcolina). A elevadas concentraciones, éste y otros lisofosfolípidos actúan como detergentes, disolviendo la membrana de los eritrocitos y lisando las células. Esta hemólisis generalizada puede ser amenazadora para la vida.

(a) Los detergentes son anfipáticos. ¿Cuáles son las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la lisolecitina?

(b) El dolor y la inflamación causados por la mordedura de serpiente pueden tratarse con ciertos esteroides. ¿Cuál es la base de este tratamiento?

(c) Si bien niveles elevados de fosfolipasa A_2 pueden ser mortales, este enzima es necesario para varios procesos metabólicos habituales. ¿Cuáles son estos procesos?

7. Mensajeros intracelulares a partir de fosfatidilinositoles Cuando la hormona vasopresina estimula la rotura del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por la fosfolipasa C dependiente de hormona, se forman dos productos. ¿Cuáles son? Compare sus propiedades y solubilidades en agua y prediga si alguno de ellos difundirá rápidamente en el citosol.

8. Almacenamiento de vitaminas liposolubles A diferencia de las vitaminas hidrosolubles, que deben ser parte de nuestra dieta diaria, las vitaminas liposolubles se pueden almacenar en el cuerpo en cantidades suficientes para varios meses. Sugiera una explicación para esta diferencia de comportamiento basada en sus solubilidades.

9. Hidrólisis de lípidos Nombre los productos obtenidos en la hidrólisis suave con NaOH diluido de: (a) 1-estearil-2,3-dipalmitilglicerol; (b) 1-palmitil-2-oleilfosfatidilcolina.

10. Efecto de la polaridad sobre la solubilidad Clasifique en orden de solubilidad creciente en agua: un triacilglicerol, un diacilglicerol y un monoacilglicerol que contengan solamente ácido palmítico.

11. Separación cromatográfica de lípidos Se aplica una mezcla de los siguientes lípidos a una columna de gel de sílice y, a continuación, la columna se lava con disolventes cada vez más polares. La mezcla consiste en: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesteril palmitato (éster de esterol), esfingomielina, palmitato, *n*-tetradecanol, triacilglicerol y colesterol. ¿En qué orden espera que eluyan los lípidos de la columna? Explique su razonamiento.

12. Identificación de lípidos desconocidos Johann Thudichum, que practicó la medicina en Londres hace unos 100 años, también se interesó por la química de los lípidos en sus ratos libres. Aisló diversos lípidos del tejido nervioso caracterizando y poniendo nombre a muchos de ellos. Sus viales de lípidos aislados cuidadosamente sellados y marcados fueron redescubiertos muchos años después.

(a) ¿Cómo podría confirmar, utilizando técnicas que no estaban disponibles en época de Thudichum, que los viales marcados "esfingomielina" y "cerebrósido" contienen realmente estos compuestos?

(b) ¿Cómo podría distinguir la esfingomielina de la fosfatidilcolina mediante ensayos químicos, físicos o enzimáticos?

13. La ninhidrina para detectar lípidos en cromatografía de capa fina La ninhidrina reacciona específicamente con las aminas primarias, formando un producto azul purpúreo. Una cromatografía en capa fina que contiene fosfolípidos de hígado de rata se pulveriza con ninhidrina y se deja que se forme el color. ¿Qué fosfolípidos se pueden detectar de esta manera?