

Estructura tridimensional de macromoléculas biológicas

Dr. MARIO SUWALSKY, Ph. D.*

Laboratorio de Rayos X

Facultad de Ciencias

Universidad de Concepción

INTRODUCCION

Antes de presentar los resultados obtenidos de los estudios desarrollados en nuestro laboratorio acerca de las estructuras espaciales de macromoléculas de interés biológico, es conveniente aclarar previamente qué se entiende por macromoléculas biológicas y estructuras tridimensionales. En general los organismos vivientes producen una gran cantidad de compuestos químicos que son indispensables para la vida. Algunas de estas moléculas son relativamente pequeñas, tales como hormonas y vitaminas, constituidas en su mayoría por algunas decenas de átomos. Otras moléculas, sin embargo, están formadas por cientos y miles de átomos las que, en general, se denominan por su tamaño, macromoléculas. Dentro de este último grupo, encontramos dos tipos de compuestos que son absolutamente vitales y que están mutuamente relacionados entre sí, los ácidos nucleicos y las proteínas, las que analizaremos más adelante.

Las propiedades químicas de las moléculas, en el sentido más amplio de la palabra, es decir, propiedades bioquímicas, fisiológicas, farmacológicas, etc., dependen fundamentalmente de dos características esenciales: la presencia en ellas de grupos químicos específicos responsables de la acción

* Profesor de Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Concepción. Doctor en Ciencias del Instituto Weizmann de Israel. Profesor visitante de las Universidades de Harvard y Michigan de Estados Unidos y de Mainz de Alemania Federal.

Autor de publicaciones de su especialidad en revistas científicas chilenas y extranjeras de circulación internacional.

de estas moléculas y, por otra parte, de la distribución espacial de dichos grupos. Por esta razón es importante conocer no sólo la composición química de los compuestos y la ubicación de los grupos funcionales, sino que además su relación espacial.

El método más poderoso para determinar la estructura tridimensional de moléculas al estado sólido es el de difracción de rayos X. Consiste en hacer llegar un fino haz de rayos X a un cristal o fibra del material en estudio. Al recibir los átomos esta radiación, las emiten ellos a su vez en distintas direcciones. Sin embargo, por un fenómeno de interferencia, sólo algunos rayos resultan difractados, los que son emitidos en direcciones muy precisas y que, generalmente, se registran en películas fotográficas, aunque se dispone actualmente de sistemas electrónicos más convenientes. El número y tipo de reflexiones que se obtiene depende, entre otros factores, de la naturaleza y distribución de los átomos de la molécula en estudio y del grado de orden molecular. En efecto, si las moléculas están muy ordenadas constituyen cristales, los que dan origen a un elevado número de reflexiones que se caracterizan por ser casi puntuales, tal como se aprecia en la Figura 1. Si, por el contrario, las moléculas están muy

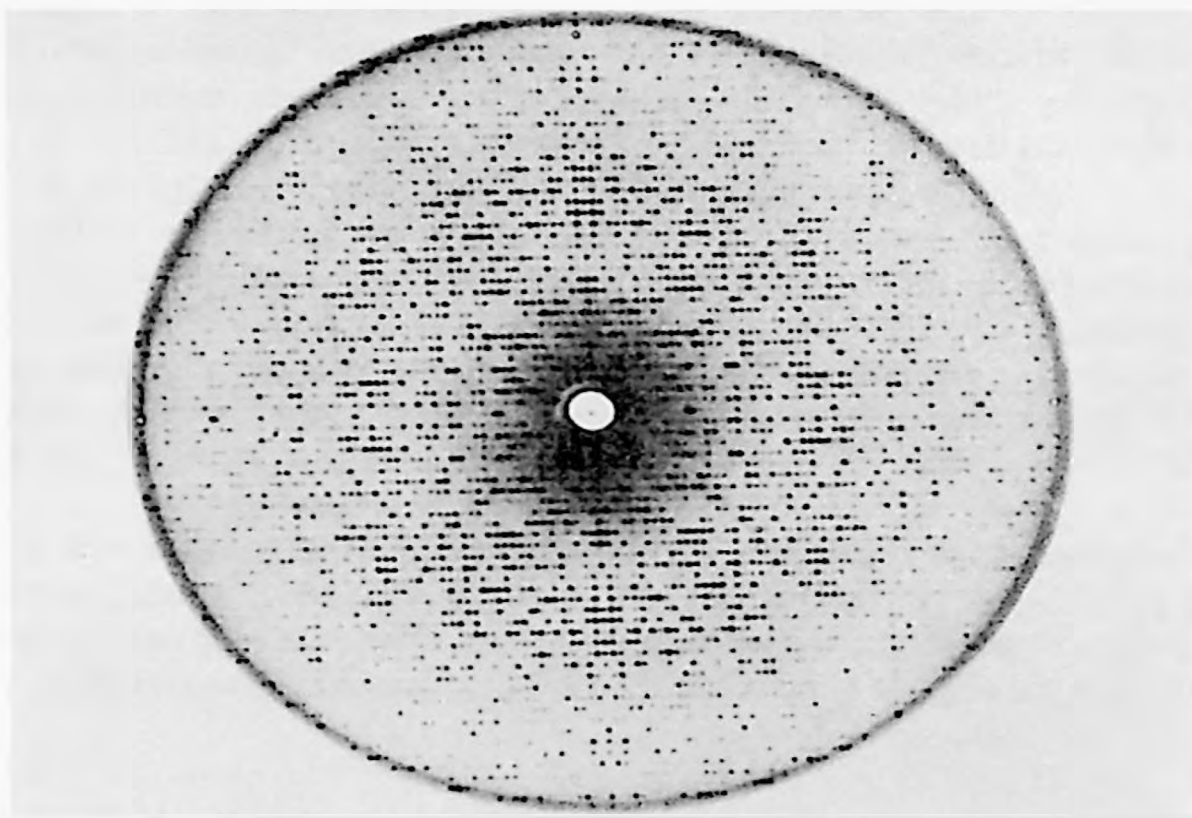


Figura 1

Diagrama de rayos X de un cristal de una proteína globular.

desordenadas, como en el caso del vidrio común, prácticamente no se obtiene ninguna reflexión.

Muchas macromoléculas biológicas, preferentemente aquellas que tienen una forma casi esférica, forman cristales. Existe además un alto número de macromoléculas, especialmente las de forma alargada, que no forman cristales. Sin embargo, es posible utilizar ciertas técnicas que permiten lograr un grado adecuado de orden molecular que, aunque menor que el de los cristales, dan origen a un número suficiente de reflexiones cuando son expuestas a los rayos X. Este orden parcial se obtiene generalmente mediante la preparación de fibras y películas finas. Los diagramas de rayos X se caracterizan por mostrar un número reducido de reflexiones y éstas ya no son puntuales como en el caso de los cristales sino que presentan la forma de arcos tal como se aprecia en la Figura 2.

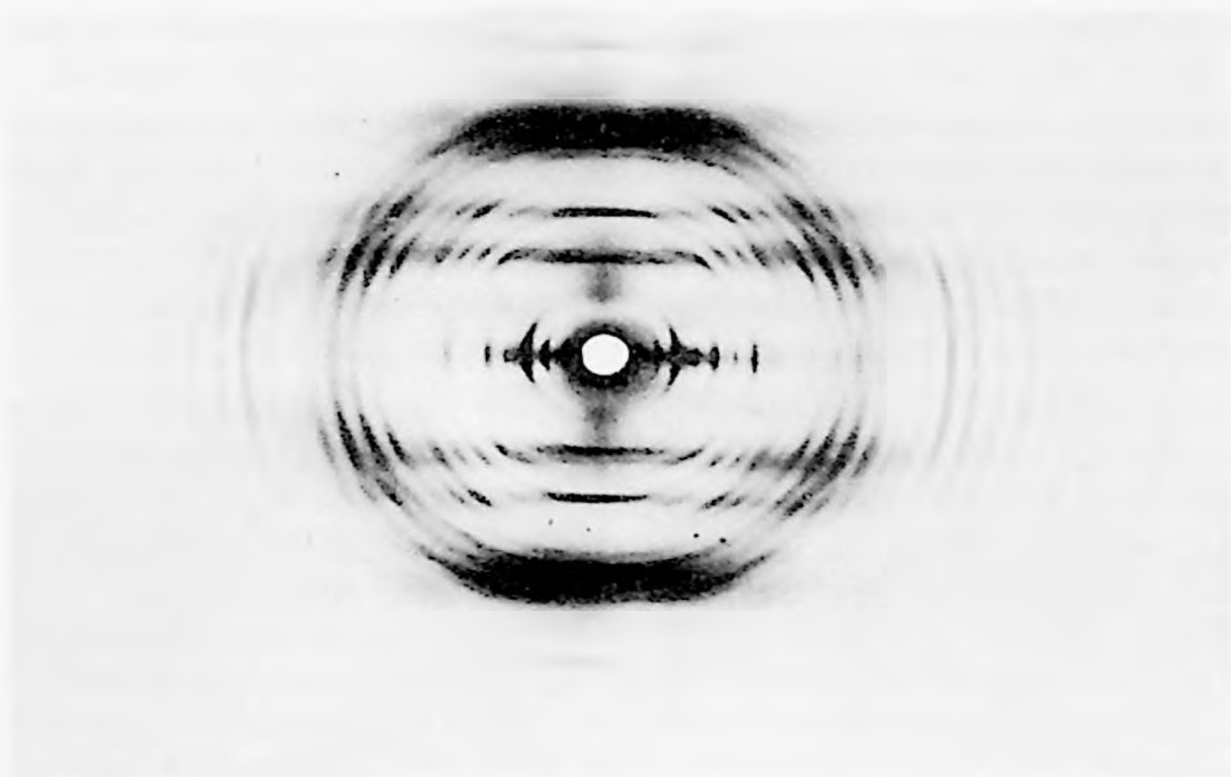


Figura 2

Diagrama de rayos X de una película orientada del fosfolípido DML.

PROTEINAS Y POLIPEPTIDOS SINTETICOS

Las proteínas constituyen las macromoléculas más numerosas presentes en la naturaleza viva y se caracterizan por el elevado y variado número de funciones que desarrollan. Una simple mirada a nuestros cuerpos nos

permite visualizar la piel, pelos, uñas, retina, todos ellos constituidos esencialmente por proteínas que cumplen funciones estructurales. En los huesos, músculos y tendones encontramos otras proteínas que cumplen funciones similares. En el proceso mismo de la respiración participan el par de proteínas hemoglobina —que transporta el oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos y el dióxido de carbono de éstos hacia los pulmones— y mioglobina, que almacena el oxígeno en los tejidos, que será utilizado posteriormente en las miles de reacciones químicas que se efectúan en las células. En estas reacciones participan, además, otro tipo de proteínas, las enzimas, cuya función es catalizar las reacciones, es decir, hacer posible que éstas se realicen con una velocidad, rendimiento y condiciones físico-químicas muchísimo más convenientes que las que ocurrirían en su ausencia.

Las proteínas, químicamente, son polímeros que guardan una gran similitud con los polímeros sintéticos que estamos familiarizados en nuestra vida diaria tales como polietileno, poliestireno, nylon, etc. Ambos tipos de polímeros, naturales y sintéticos, están constituidos por largas cadenas cuyos eslabones son los monómeros, grupos químicos que por uniones químicas entre sí forman las macromoléculas. Existen, sin embargo, diferencias notables entre ambos tipos de polímeros. Los polímeros sintéticos son generalmente de baja reactividad química, propiedad que es aprovechada para fabricar artefactos, vestimentas, muebles, etc.

Las proteínas, por otra parte, presentan en su gran mayoría una gran reactividad química, propiedad que les permite desarrollar la gran variabilidad de funciones que desempeñan. Esta diferencia se debe, básicamente, a que mientras los polímeros sintéticos están constituidos, por lo general, por un solo tipo de monómeros, como el polietileno en que siempre es etileno, o propileno que es el único monómero del polipropileno, en las proteínas los tipos de monómeros son aproximadamente veinte y todos ellos diferentes entre sí. Reciben el nombre genérico de aminoácidos y entre ellos podemos mencionar lisina, arginina, prolina, serina, etc. Justamente, una de las razones de la ingestión de proteínas en nuestra alimentación es la de proporcionar al organismo los aminoácidos para constituir posteriormente, en base a ellos, las proteínas necesarias.

La distinta proporción, especialmente el orden secuencial de los aminoácidos en las proteínas, es el factor determinante de la gran cantidad de proteínas diferentes, con funciones específicas, que se encuentran en las células, cuyo número puede alcanzar a varios cientos de miles. Así como con las veintisiete letras del alfabeto se puede formar un número infinito

de palabras, por diferentes combinaciones de los veinte aminoácidos se constituye un elevado número de proteínas.

En general, el orden o secuencia de los aminoácidos en una proteína se denomina estructura primaria, mientras que por estructura secundaria se designa la forma espacial que adquieren las moléculas. Un análisis de todas las proteínas conocidas hasta la fecha indica que ellas presentan en diferentes grados tres tipos fundamentales de estructuras secundarias: la hélice- α , la estructura β -plegada y la del colágeno. En la hélice- α , como se puede apreciar en la Figura 3, la cadena proteica adquiere la forma de espiral, de dimensiones definidas. En efecto, en cada vuelta del espiral hay tres monómeros y dos tercios. Entre un monómero y su vecino inmediato hay una diferencia de altura de 1.5 Å (Å es la abreviación de Angstrom, que equivale a la cienmillonésima de 1 cm.). Dentro de las proteínas más comunes que presentan esta estructura se encuentra la keratina, constituyente esencial de la lana. Estirar una fibra de lana equivale a estirar el resorte constituido por la hélice- α .

La estructura β -plegada está constituida por cadenas proteicas alargadas, paralelas y unidas entre sí por uniones laterales formando de este modo hojas ligeramente onduladas. La seda está constituida por una proteína con esa estructura, lo que explica la gran resistencia mecánica que presenta este material. La Figura 4 presenta esquemáticamente esta estructura.

Finalmente, la estructura de colágeno corresponde a tres cadenas proteicas entrelazadas entre sí formando una fibra altamente resistente a la tracción (Figura 5). Esta proteína se encuentra principalmente en los tendones. Todas las proteínas presentan, por lo menos en parte, algunas de las tres estructuras descritas.

Entre las proteínas que nos ha interesado estudiar figuran las nucleoproteínas. Ellas se encuentran generalmente asociadas al ácido desoxirribonucleico (DNA) y, al parecer, tienen un rol protector y regulador de la función del DNA. Algunas de estas nucleoproteínas, designadas como protaminas e histonas, contienen una gran cantidad de los aminoácidos básicos arginina y lisina. Sin embargo, no se ha podido determinar directamente la estructura tridimensional de estas proteínas por cuanto, debido al alto grado de desorden molecular, sus diagramas de rayos X no proporcionan ninguna información útil. Es por esta razón que pareció de interés estudiar sus homólogos, los polipéptidos sintéticos de lisina y arginina, es decir los polímeros polilisina y poliarginina. En realidad, el uso de polipéptidos sintéticos como modelos de estudio de proteínas naturales se encuentra muy extendido y de ellos se ha determinado una gran cantidad de propiedades y características que no sólo encuentran aplicación en la

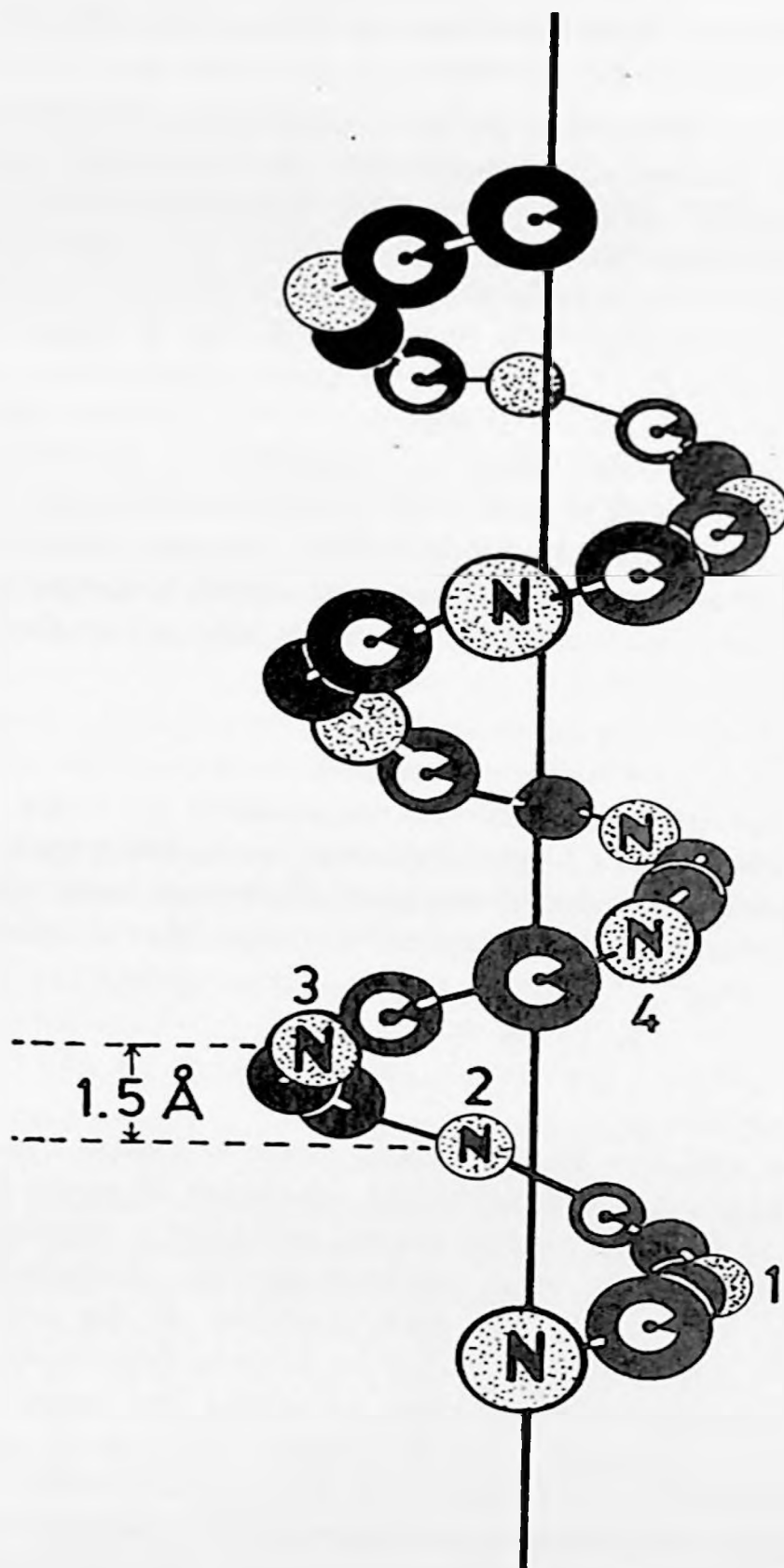


Figura 3

Representación esquemática de la hélice- α

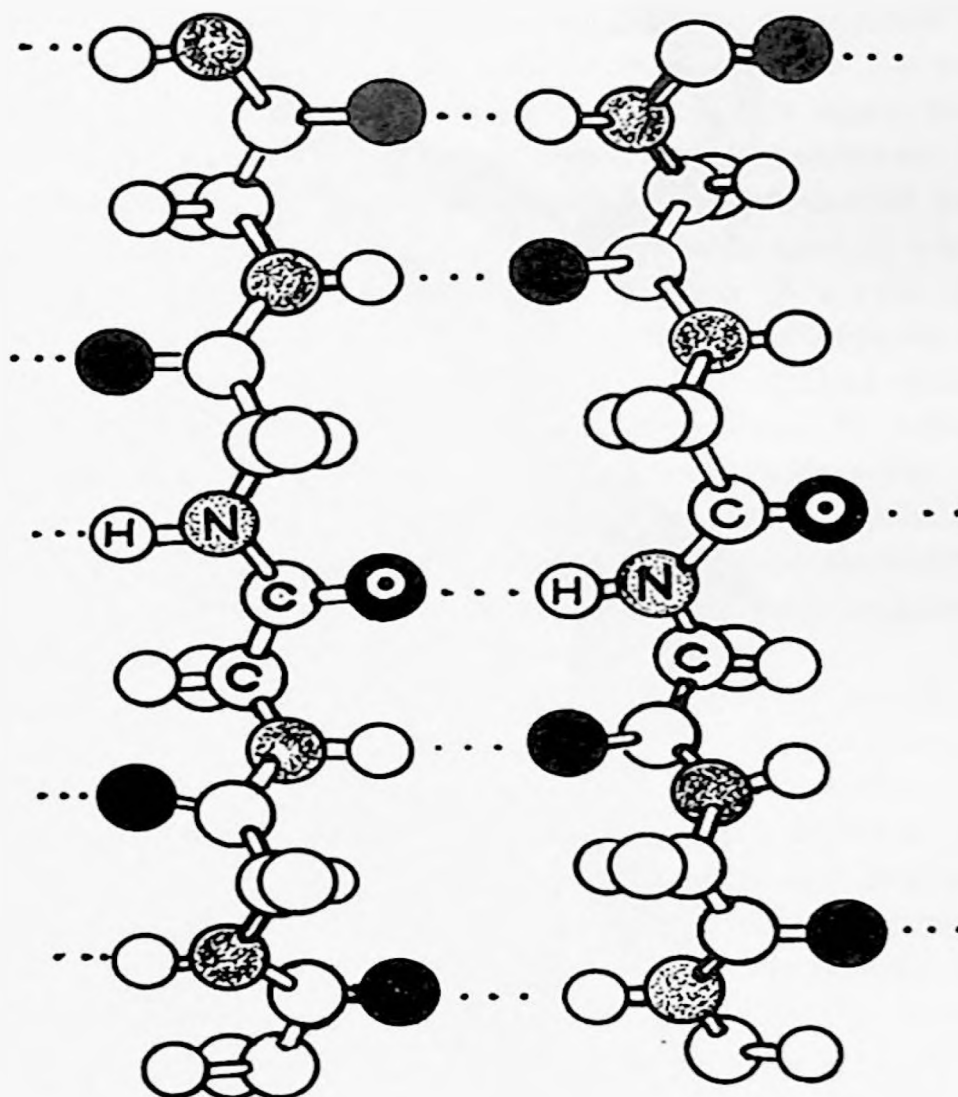


Figura 4

Representación esquemática de la estructura β -plegada. Los puntos corresponden a uniones químicas intermoleculares.

interpretación de fenómenos observados en proteínas, sino que, en general, en el campo de los polímeros.

Tanto polilisina como poliarginina, se estudiaron al estado de clorhidrato para hacerlos solubles en agua. De estas sustancias, al igual que otros polipéptidos que se analizaron posteriormente, se prepararon fibras o películas orientadas en las que las moléculas se ordenaban adecuadamente gracias a técnicas especiales. Estos especímenes, antes de ser sometidos



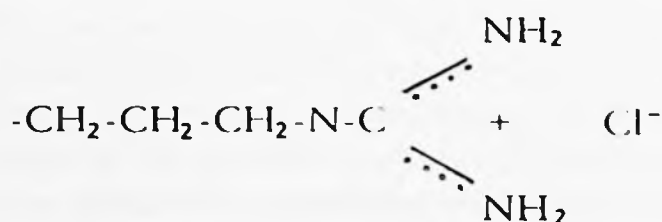
Figura 5

Representación esquemática de la estructura molecular del colágeno.

a la difracción de los rayos X, se dejaban equilibrar por varios días a humedades relativas constantes. Esto se hace debido a que las proteínas, así como casi todos los materiales biológicos, necesitan agua para conservar su integridad estructural¹. Mediante sencillos dispositivos las muestras orientadas se sometían a las humedades relativas producidas por soluciones saturadas de algunas sales específicas, de tal modo que si en una ocasión se necesitaba, por ejemplo, una humedad relativa (h.r.) de 33% se utilizaba solución de cloruro de magnesio, y para 92% tartrato de sodio. Desde luego, ellas eran fotografiadas a los rayos X en dichas condiciones, en cámaras especiales que consistían en finos colimadores de vidrio que dejan pasar un haz igualmente fino de rayos X el que incidía sobre las muestras. Los rayos difractados se detectaban mediante placas fotográficas especiales. Paralelamente, a cada muestra se le determinaba por gravimetría, es decir por pesada, sus contenidos en agua, los que se expresaban en número de moléculas de agua por molécula de monómero.

Los resultados obtenidos con ambos polipéptidos resultaron ser muy interesantes y curiosos. En efecto, se determinó que polilisina a hidrataciones inferiores a cinco moléculas de agua por monómero presentaba una estructura β -plegada, similar a la definida anteriormente. Sin embargo, cuando se aumentaba la hidratación, se producía un dramático cambio estructural ya que el polipéptido adquiría la conformación de hélice- α . Este cambio era totalmente reversible ya que si se disminuía la hidratación a menos de cinco moléculas de agua, la estructura volvía a ser β -plegada. De otra parte, los resultados observados en poliarginina fueron totalmente opuestos. En efecto, a hidrataciones inferiores a cinco moléculas de agua adquiere estructura de hélice- α , y se transforma en β -plegada a hidrataciones superiores.

Estos resultados, que han sido descritos detalladamente en trabajos publicados²⁻³, provocaron el interés de continuar estudiando el fenómeno de los cambios conformacionales de polipéptidos sintéticos básicos en función de la variación de sus hidrataciones. La única variable relevante en estos polipéptidos es la naturaleza y longitud de las cadenas laterales de los monómeros, ya que en lisina ésta es de fórmula $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$, mientras que en arginina, que posee el grupo guanidilo al término de su cadena, es:



Se decidió, entonces, estudiar el comportamiento de polipéptidos que contuviesen un grupo $-\text{CH}_2$ menos que lisina (poliornitina) y un grupo $-\text{CH}_2$ más que arginina (polihomoarginina). Estos polipéptidos se estudiaron en forma similar a los anteriores y los resultados obtenidos fueron igualmente sorprendentes.

Poliornitina, al igual que polilisina, presentó estructura β -plegada a bajas hidrataciones y hélice- α a hidrataciones mayores. Sin embargo las diferencias radicaban en que mientras la hidratación de transición entre ambas estructuras era de cinco moléculas en polilisina, en poliornitina es de cuatro. Por otra parte, la hélice- α de poliornitina es mucho menos estable que la de polilisina. Ambos efectos se explican en base a la diferente longitud de las cadenas laterales: a mayor longitud habría una mayor estabilidad de las hélices- α por la mayor interacción mutua de dichas cadenas⁴. Polihomoarginina, por otra parte, mostró solamente la estructura β -plegada a todos los rangos de hidratación⁵. Posteriormente, con el fin de estudiar la influencia del ácido asociado a estos polipéptidos, se reemplazó el ácido clorhídrico unido a polilisina por el ácido bromhídrico. Aunque se observaron algunas diferencias menores, debidas principalmente a las diferencias de tamaño entre los iones Br^- y Cl^- , se concluyó en que el cambio de ácidos no afecta mayormente las estructuras de polilisina⁶.

Estos estudios, que se pretende continuar, permiten concluir que los diferentes comportamientos observados en los polipéptidos estudiados guardarían relación con los de las proteínas básicas asociadas *in vivo* con DNA. En efecto, es muy posible que en estas condiciones, en que la hidratación es muy alta, regiones de histonas —ricas en lisina— tengan una conformación de hélice- α al estar asociadas a DNA. La pérdida de esta configuración implicaría, a su vez, cambios estructurales del DNA, lo que posibilitaría la acción del agente derrepresor⁷. Las protaminas, por otra parte, que están casi enteramente constituidas por arginina, se unirían al DNA conformando estructuras β . Este punto será analizado en la sección siguiente.

DNA Y NUCLEOPROTEINAS

Los ácidos nucleicos junto a las proteínas son las macromoléculas biológicas más importantes. Ambas están íntimamente relacionadas entre sí, ya que mientras los ácidos nucleicos contienen toda la información genética que permite la conservación de las características hereditarias de la especie, éstas se expresan mediante la síntesis celular de proteínas. El DNA es también

un polímero, en que el monómero es un nucleótido. Este está formado por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. Mientras el azúcar y el fosfato son siempre los mismos, las bases nitrogenadas son generalmente cuatro. Como éstos son los únicos grupos químicos que varían en el DNA, su diferente secuencia constituye lo que se conoce como código genético, el que determina finalmente qué proteínas se van a sintetizar. La estructura espacial del DNA es helicoidal, compuesta por dos cadenas polinucleotídicas paralelas que se enrollan, como en una espiral, alrededor de un eje común dando origen a dos tipos de surcos: uno ancho y profundo y otro angosto y menos profundo. Esta hélice, *in vivo*, está caracterizada por presentar diez monómeros en una vuelta completa. Entre un monómero y el siguiente hay una diferencia de altura de 3.4 Å. Esta estructura, presentada en la Figura 6, se designa generalmente como B. Sin embargo,

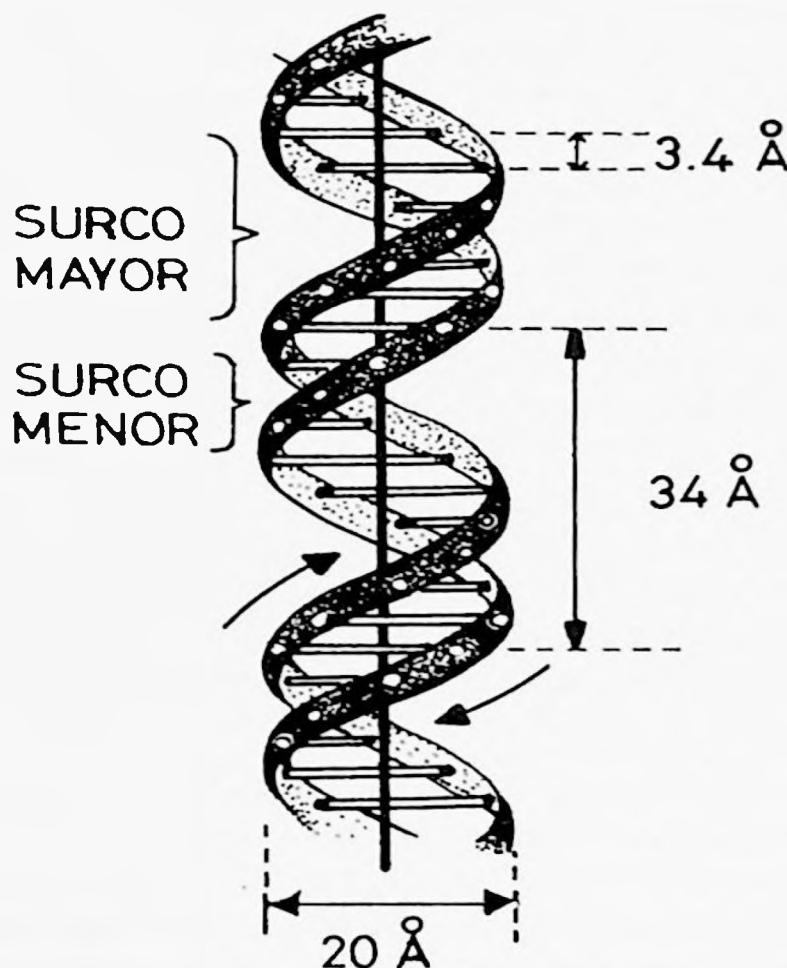


Figura 6

Representación esquemática del DNA en la forma B.

si se retira regularmente el agua del DNA, éste sufre ciertos cambios conformacionales menores, pasando gradualmente por las estructuras A y C, hasta que en ausencia de agua el DNA deja de tener una estructura regular.

Como se mencionó en la sección anterior, el DNA celular se encuentra asociado a histonas y protaminas, proteínas que tendrían un rol regulador y protector, respectivamente. Los diagramas de rayos X de las nucleoproteínas dan muy escasa información acerca del modo como las proteínas están unidas al DNA, conocimiento de gran interés ya que permitiría conocer, entre otros factores, el posible mecanismo regulador de la actividad del DNA, con todo lo que ello implica en términos de reproducción celular. Es por esta razón que se utilizó poliarginina y polilisina asociadas a DNA como posibles modelos estructurales de nucleoproteínas.

Las muestras, que fueron preparadas combinando cantidades estequiométricas de DNA con ambos polipéptidos, se presentaban en la forma de fibras muy largas y finas, las que fueron fotografiadas a los rayos X en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos fueron algo diferentes para DNA unido a polilisina que para DNA-poliarginina. Ambos complejos presentaban a humedades altas diagramas similares a nucleoproteínas naturales, aunque eran más ricos en detalles que estos últimos. El análisis de las reflexiones indicaron que ambos polipéptidos se encontraban totalmente extendidos y enrollados alrededor del DNA en la superficie del surco pequeño y siguiendo su dirección. Sin embargo, al disminuirse gradualmente la hidratación se observó un comportamiento diferente en ambos complejos. Mientras DNA-polilisina sufría cambios conformacionales similares a los de la nucleoproteína natural, incluido el desorden molecular cuando la deshidratación era casi completa, la estructura de DNA-poliarginina permaneció prácticamente invariable a dichos cambios. Ello se debería a la forma compacta como la poliarginina se uniría químicamente al DNA.

Las conclusiones de estos estudios⁸ fueron que, a diferencia de lo esperado, polilisina sería un modelo más adecuado de protaminas que poliarginina, a pesar del alto contenido de arginina de dichas proteínas. Es posible explicar esta aparente contradicción en base a la siguiente consideración: en las protaminas naturales, además de arginina, hay otros aminoácidos ubicados, sorprendentemente, cada cuatro argininas seguidas. El rol de estos aminoácidos adicionales sería el de dar una flexibilidad adecuada a las protaminas en su unión al DNA. Pretendemos explorar esta posibilidad mediante el estudio de un polipéptido que posea la secuencia de grupos de cuatro argininas intercalados por otro aminoácido.

Las membranas celulares son el medio que separa el interior de las células, o citoplasma, del exterior. En los últimos años, su estudio ha despertado un considerable interés, por cuanto gran parte de los fenómenos que ocurren a nivel celular incluyen el transporte de moléculas a través de las membranas o la interacción con sus superficies tanto internas como externas. Este fenómeno es igualmente válido en el caso de fármacos. Es por estas razones que el conocimiento de las estructuras moleculares de las membranas es importante, ya que podrá permitir la interpretación de estos fenómenos fisiológicos, así como un diseño más adecuado de drogas que ejercen su acción a nivel celular.

Hasta ahora el conocimiento íntimo de la arquitectura molecular tridimensional de las membranas es muy escaso, lo que se debe fundamentalmente a dos factores muy relacionados entre sí. Por una parte, las membranas se caracterizan por su gran heterogeneidad química, ya que, aunque básicamente están constituidas por fosfolípidos y proteínas, la cantidad y variedad de estos componentes puede ser muy alta. En membranas de glóbulos rojos humanos, por ejemplo, se han detectado más de doscientos tipos diferentes de proteínas. Por otra parte, todas estas moléculas no forman una estructura periódica regular sino que más bien predomina un alto grado de desorden. De este modo, membranas celulares fotografiadas directamente por rayos X dan un número de reflexiones muy escaso. Debido justamente a esta falta de información, han surgido una serie de modelos de membranas que se han propuesto para explicar observaciones y resultados experimentales. Prácticamente todos los modelos actuales coinciden en señalar que la estructura básica de las membranas sería la bicapa, constituida por fosfolípidos que forman una especie de matriz en la que se ubicarían de diferentes modos el resto de los componentes, especialmente proteínas y colesterol. El modelo más conocido y en el que se basan el resto de ellos es el de Singer, que se presenta en la Figura 7.

Con el objeto de dilucidar la estructura de las membranas se está trabajando en nuestro laboratorio, al igual que en los problemas presentados anteriormente, con sistemas modelos. En efecto, hemos estado estudiando, en una primera instancia, membranas artificiales formadas solamente por fosfolípidos y agua. Hemos analizado las características que presentan diferentes tipos de fosfolípidos y, actualmente, estamos incorporando a dichos sistemas algunos componentes menores tales como colesterol y ciertos iones metálicos. Esperamos para pronto incorporar algunas de las proteínas más significativas y, de este modo, tener una membrana artificial que debe

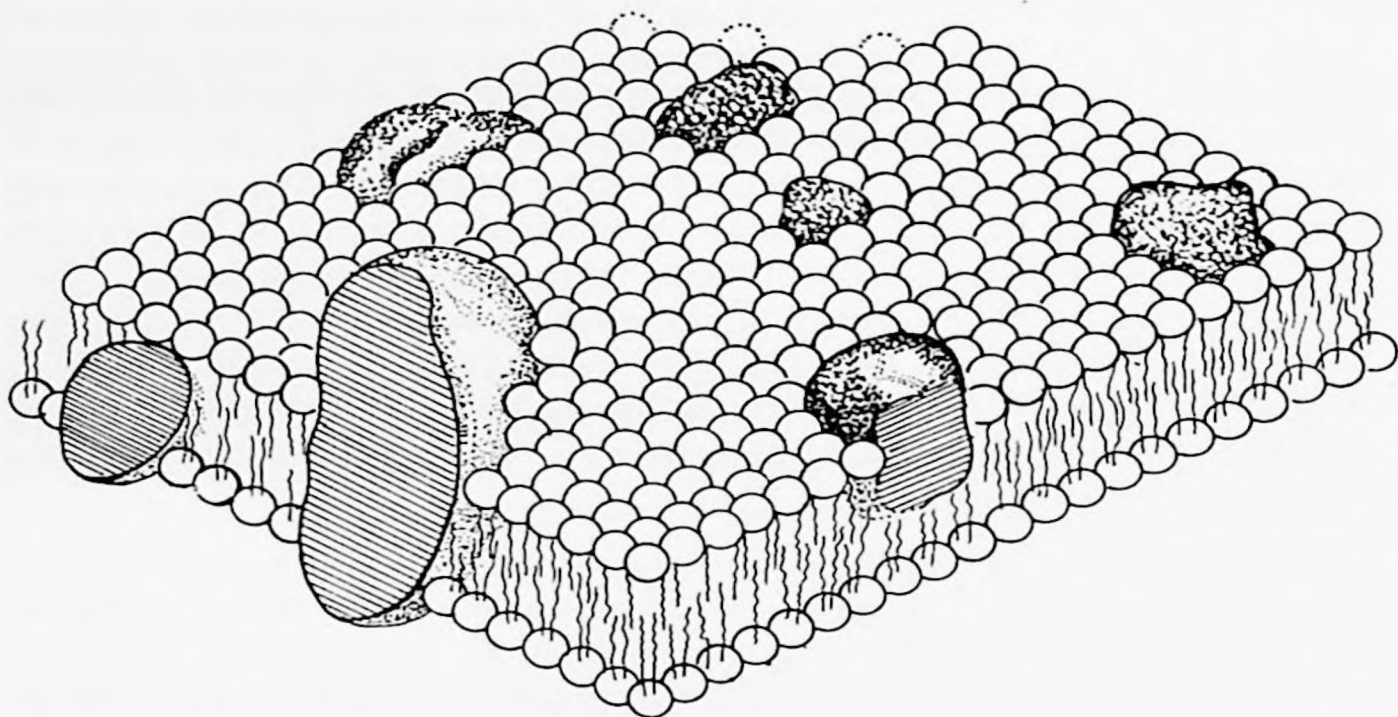


Figura 7

Representación esquemática de una membrana según el modelo de Singer. Las proteínas, presentadas como masas voluminosas, se ubican de diferentes formas en la bicapa de fosfolípido.

constituir un modelo idealizado de las membranas naturales. Por ahora sólo presentaremos algunos resultados preliminares de nuestros estudios con membranas de fosfolípidos y agua.

Los fosfolípidos son moléculas grandes, aunque no alcanzan el tamaño de las macromoléculas, que presentan algunas peculiaridades muy interesantes. Están constituidos de dos partes: una apolar, hidrofóbica, formada por cadenas largas hidrocarbonadas provenientes de ácidos grasos superiores tales como mirístico, palmítico, oleico, etc. La otra parte es polar, con estructura de zwitterion (es decir, que posee tanto cargas positivas como negativas). Los fosfolípidos que hemos estudiado son lecitinas y cefalinas, que se diferencian en que mientras en los primeros sus grupos polares terminan en el grupo colina, los segundos son derivados de la etanolamina. La Figura 8 presenta las fórmulas esquemáticas de ambos tipos de fosfolípidos.

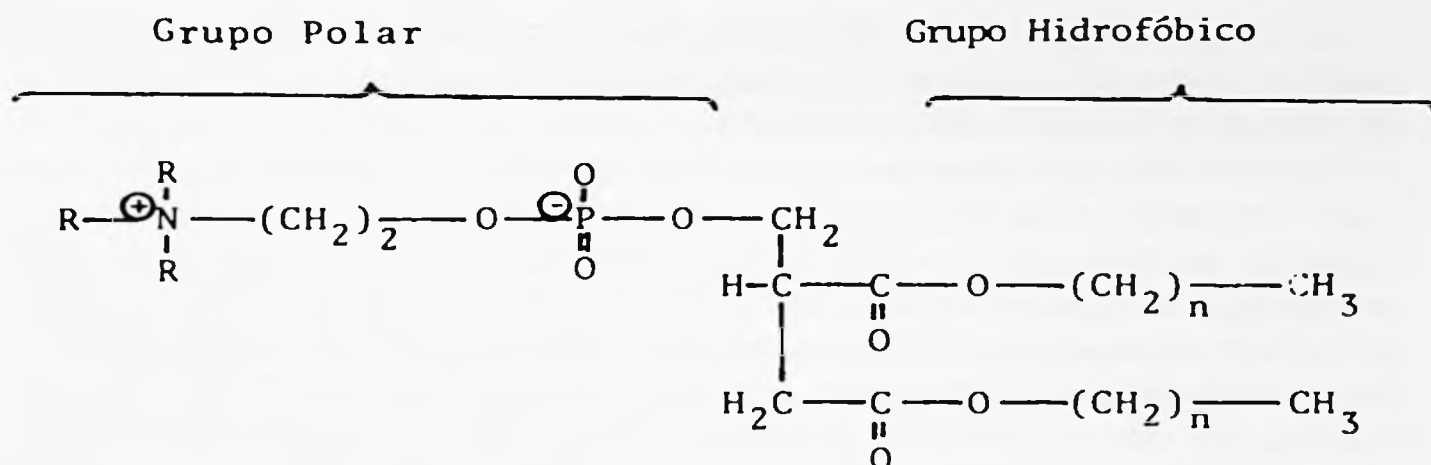


Figura 8

Fórmula esquemática de fosfolípidos. R corresponde a grupos $-\text{CH}_3$ en lecitinas, y a H en cefalinas. n varía, generalmente, entre 10 y 20.

Las membranas fueron preparadas disolviendo los fosfolípidos en solventes adecuados, generalmente una mezcla de cloroformo y metanol, dejándolos evaporar muy lentamente y secándolas sobre anillos metálicos. Las membranas así preparadas se montaban en los instrumentos descritos anteriormente y se fotografiaban a los rayos X a una temperatura constante de aproximadamente 21°C , a diferentes humedades relativas. Los diagramas obtenidos fueron altamente cristalinos, es decir, con un alto número de reflexiones, las que se mostraban muy bien orientadas. La Figura 2 muestra el diagrama de una membrana del fosfolípido que más hemos estudiado, la dimiristoil lecitina (DML), cuya estructura describiremos a continuación.

Mediante mediciones de modelos moleculares y cálculos de distancias atómicas, se determinó que la longitud de una molécula de DML totalmente lineal es de aproximadamente $32 \text{ \AA}$. Es decir, la bicapa de este fosfolípido debiera tener un ancho cercano a $64 \text{ \AA}$. Por otra parte, si las moléculas se ordenan en la forma más compacta posible, la separación lateral de las moléculas sería del orden de $7 \text{ \AA}$ y la vertical de algo más de $4 \text{ \AA}$. Sin embargo, el análisis de los diagramas de rayos X indican que las dimensiones de la celda unitaria, que dicho en forma simple corresponde a un volumen mínimo en forma de paralelepípedo que por translaciones sucesivas y periódicas en las tres dimensiones del espacio reproducen la estructura total, son aproximadamente $55, 10$ y $9 \text{ \AA}$. Estos valores están relacionados con el

ancho, separación lateral y separación vertical de los fosfolípidos a humedades relativas de 76%, en que hay, aproximadamente, cuatro moléculas de agua por molécula de fosfolípido.

Un modelo que permite explicar las dimensiones experimentales es el que se presenta en la Figura 9. Los grupos polares de los fosfolípidos, en lugar de ser colineales con las cadenas hidrocarbonadas, están inclinados casi perpendicularmente con respecto a estas últimas. Como resultado de este efecto se producen interacciones electrostáticas entre las cargas positivas y negativas de cada grupo polar, con las negativas y positivas de los grupos vecinos, las que contribuyen a estabilizar la estructura resultante que adquiere la forma de capas bidimensionales. Como efecto de esta conformación particular de cada fosfolípido, el ancho de la bicapa se reduce a aproximadamente 55 Å y la separación lateral aumenta a cerca de 10 Å, que co-

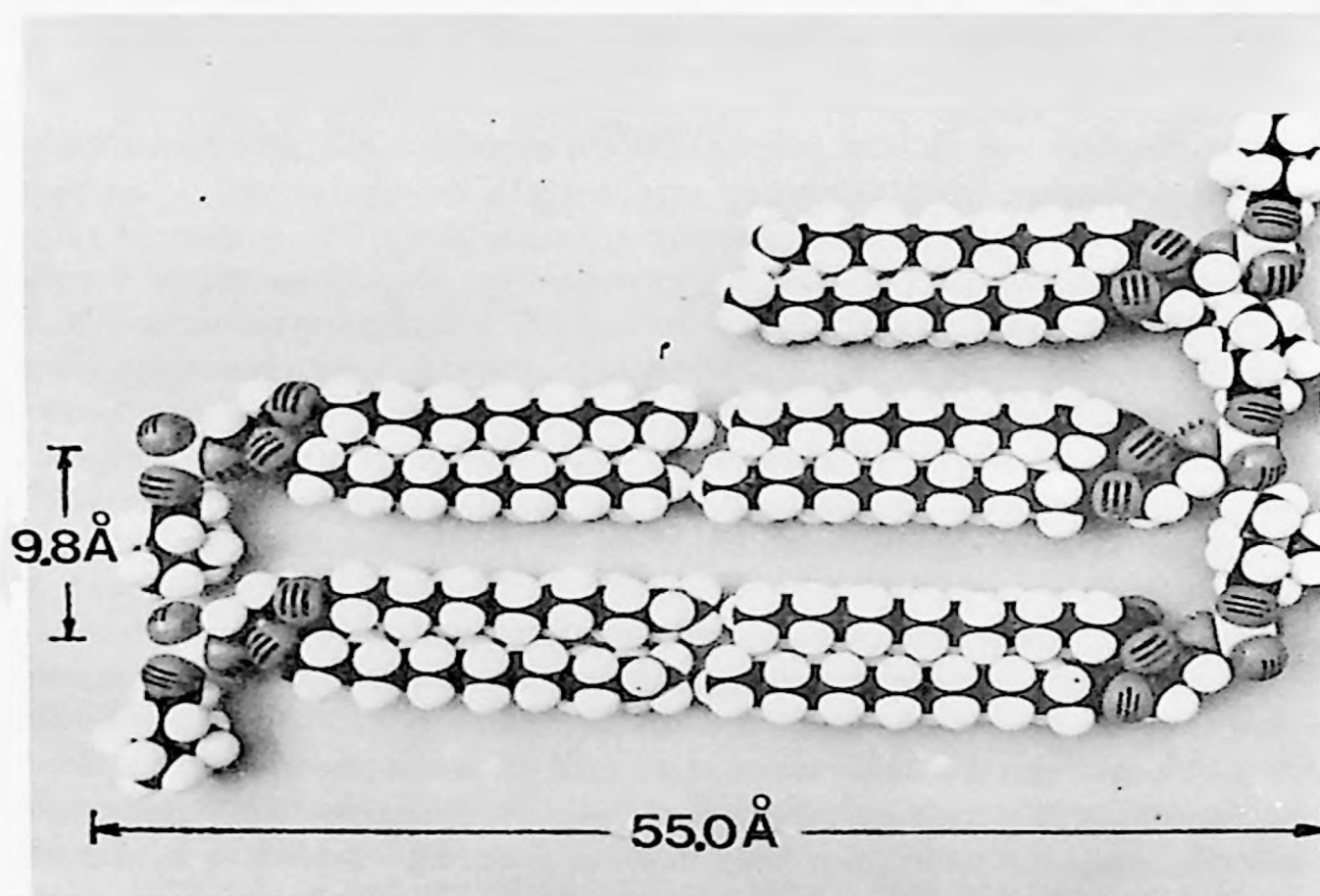


Figura 9

Fotografía de un modelo molecular del fosfolípido DML.

responde exactamente con los valores determinados experimentalmente. La separación vertical entre capas de $9 \text{ \AA}$, que es aproximadamente el doble de la esperada, implica que entre dos capas similares sucesivas, separadas por $9 \text{ \AA}$, hay una capa intermedia ubicada en forma diferente. Este modelo, que ha sido presentado en forma bastante simple, ha sido corroborado por una serie de experimentos y cálculos adicionales. Actualmente estamos calculando lo que se denomina perfil de densidad electrónica, que representa la distribución de los electrones del fosfolípido en estudio a lo ancho de la bicapa y que será la prueba final y conclusiva de la validez del modelo propuesto de bicapas del fosfolípido DML.

Creemos, sin embargo, de interés presentar dos resultados adicionales que refuerzan el modelo anterior. El primero de ellos se refiere al hecho que al ejercer una cierta presión sobre una muestra de DML y al fotografiarse ésta a los rayos X se obtiene una celda unitaria de forma y dimensiones diferentes a la anterior. En efecto, el ancho de la bicapa aumenta a aproximadamente $63 \text{ \AA}$, la separación de las moléculas se reduce a cerca de $7 \text{ \AA}$ y la distancia vertical entre capas queda reducida a la mitad de la anterior. La explicación es que por efecto de la presión aplicada los grupos polares de los fosfolípidos ya no están inclinados sino que se alinean colinealmente con el resto de las moléculas. Este efecto trae como consecuencia el incremento del ancho de la bicapa desde $55 \text{ \AA}$ a $63 \text{ \AA}$, y por otra parte un empaquetamiento más compacto de las moléculas, ya que la separación lateral de $10 \text{ \AA}$ disminuye a $7 \text{ \AA}$. (Ver Figura 10).

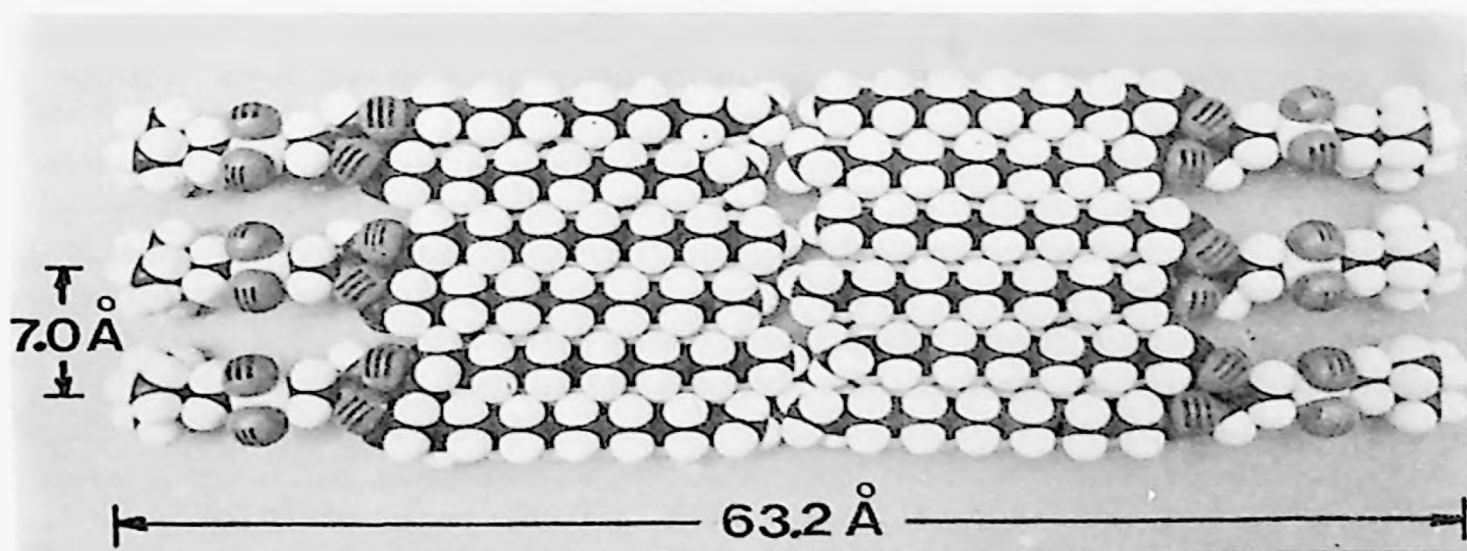


Figura 10

Fotografía del modelo molecular del DML mostrando los cambios introducidos por aplicación de presión.

La otra experiencia fue someter estas membranas artificiales a hidrataciones muy altas, similares a las condiciones reales en que se encuentran las membranas naturales. Los resultados observados indican que bajo estas condiciones las moléculas de fosfolípido se encuentran en forma totalmente lineal, pero en un estado mucho más desordenado que el descrito anteriormente. De hecho los diagramas de rayos X son semejantes a los observados en las membranas celulares, lo que sugiere que los fosfolípidos en estas condiciones tendrían conformaciones y modos de empaquetamiento similares a las membranas artificiales.

Estamos actualmente estudiando membranas artificiales de otros fosfolípidos, con agua y otros componentes. Los resultados obtenidos indican que, aunque hay algunas diferencias significativas, todas ellas se presentan bajo la forma de bicapas, confirmándose de este modo la validez de esta estructura.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados de nuestros estudios sobre las estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas por difracción de rayos X permiten comprobar la gran utilidad de este método para obtener información acerca de la conformación espacial de moléculas que no se presentan al estado cristalino, forma ideal para análisis estructurales tridimensionales. Se desprende, igualmente, la validez que presenta la utilización de sistemas modelos cuando las estructuras naturales no proporcionan toda la información necesaria.

En efecto, hemos visto cómo los polipéptidos sintéticos pueden servir como modelos de estudio de ciertas proteínas, ya sea libres o asociadas al DNA, y bicapas artificiales de fosfolípidos proporcionan una información muy aproximada acerca de la estructura existente en las paredes celulares.

Gran parte de estos trabajos, así como otros relacionados que no se describieron en esta ocasión, han sido desarrollados —y continúan siéndolo— en nuestros laboratorios de la Universidad de Concepción. Para ello, se ha contado con el valioso apoyo de la Vicerrectoría de Investigación (Proyectos 2.15.08 y 2.15.40), de CONICYT (Proyecto 26-1970) y de la Fundación Volkswagen de la R.F.A. (Proyecto 11-1744). Parte importante de estos trabajos fueron también efectuados en el Instituto Weizmann de Israel (Grant GM 08608 de la N.I.H.) y en la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, USA (Grant AAM 07300 de la N.I.H.), para lo cual el suscrito hizo uso de una beca de la Fundación Guggenheim.

Han participado además en estos trabajos W. Traub, L. de la Hoz, M. Bunster, A. Llanos, J. Tapia, E. Knight, L. Duk, y C. G. Seguel.

REFERENCIAS

1. BEALL, PAULA T. (1981). *The sciences* 21, 6.
2. SHMUELI, U. y TRAUB, W. (1965), *J. Mol. Biol.* 12, 205.
3. SUWALSKY, M. y TRAUB, W. (1972), *Biopolymers* 11, 623.
4. SUWALSKY, M. y DE LA HOZ, L. (1973). *Biopolymers* 12, 1997.
5. SUWALSKY, M. y BUNSTER, M. (1975). *Biopolymers* 14, 1197.
6. SUWALSKY, M. y LLANOS, A. (1977). *Biopolymers* 16, 403.
7. PARDON, J. y RICHARDS, B. M. (1973). En *Subunits in Biological Systems* Part. B (G. D. Fasman y S. N. Timasheff, Eds.). Marcel Dekker, New York, p. 1.
8. SUWALSKY, M. y TRAUB, W. (1972). *Biopolymers* 11, 2233.