

La síntesis enzimática de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleínico *

El «Premio Nóbel
de Medicina y
Fisiología 1959

Por DEMETRIO IGLESIAS VACAS

(Catedrático de Física y Química del Instituto «Eusebio de Guarda», de La Coruña)

EL Premio Nóbel de Medicina y Fisiología del año 1959 ha sido concedido por el Instituto Karolinska, de Suecia, conjuntamente al Profesor ARTHUR KORNBERG, de Brooklyn, Nueva York (EE. UU.), y al Profesor SEVERO OCHOA, de Luarca (España), por «... su descubrimiento del mecanismo de la síntesis biológica del ácido desoxirribonucleínico».

El producto sintético presenta propiedades físicas y químicas análogas a las del ácido nucleico preparado a partir del timo de ternera.

La trascendencia del descubrimiento se comprenderá en cuanto digamos que el ácido desoxirribonucleínico es la macromolécula que, existiendo en los genes de los cromosomas celulares, contiene la clave química de la herencia en la especie humana.

¿QUE ES UN ACIDO NUCLEINICO?

Los núcleos de las células se caracterizan por la presencia de una red de una sustancia que se colorea fuertemente con los colorantes básicos, designada por esta razón *cromatina*. La cromatina es el portador de los genes o factores de la herencia y está compuesta, en parte por *nucleoproteínas*, que son compuestos de *proteínas* básicas y *ácido nucleico*. Cada ácido nucleico se compone de cuatro unidades, llamadas *nucleótidos*. Cada nucleótido es el éster fosfórico de un *nucleósido*, y un nucleósido es una asociación de una *pentosa* y una base nitrogenada, que puede ser una *aminopurina* (adenina o guanina) o una *aminopiridina* (citosina o timina).

Los «ingredientes», pues, de un ácido nucleínico son:

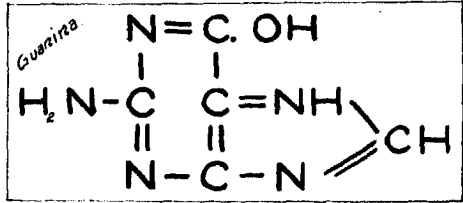
Acido fosfórico.

Azúcar ribosa (pentosa):

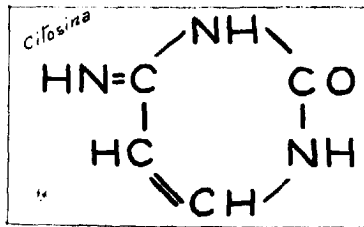


* Conferencia pronunciada a los alumnos del Curso Preuniversitario del Instituto de Plasencia en 7 noviembre 1959.

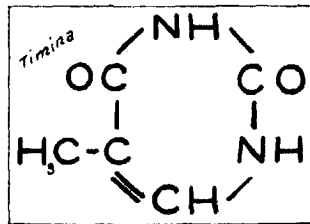
Guanina (2-amino-6-oxipurina):



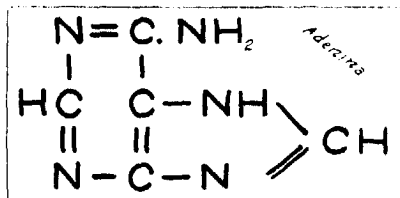
Citosina (2-oxi-4-amino pirimidina):



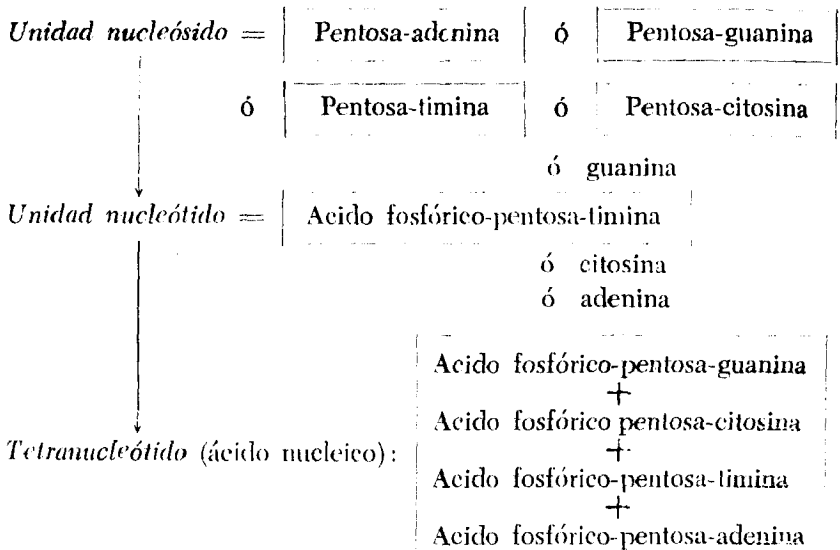
Timina (2,4-dioxi-5-metil pirimidina):



Adenina (6-amino purina):



La integración hasta llegar al estadio de ácido nucleico, es:



Se conocen dos tipos de ácido nucleico: el ácido nucleico de la levadura (el azúcar que entra en su composición es la D-ribosa ($C_5H_{10}O_5$) y el ácido timonucleico (el azúcar que entra en su composición es la D-2-desoxirribosa ($C_5H_{10}O_4$).

El ácido nucleico de la levadura se ha encontrado en la levadura, germen del trigo y otras fuentes de cromatina vegetal. El ácido timonucleico se ha encontrado en el timo, bazo, páncreas, hígado, riñón, esperma de los peces y otras fuentes de cromatina animal. Antiguamente se creía que el ácido nucleico de la levadura era el ácido nucleico típico de los vegetales y que el ácido timonucleico se encontraba únicamente en los animales; pero esta distinción se ha abandonado a causa del descubrimiento del ácido ribosa-nucleico en muchos tejidos animales.

ENZIMAS Y SINTESIS ENZIMÁTICA «IN VITRO»

Debemos indicar qué son enzimas para entender qué es una síntesis enzimática.

Los enzimas son: «catalizadores biológicos que se pueden obtener en forma soluble o coloidal» (WILLIAM ROBERT FEARON).

Biológicos, porque son producidos por los organismos vivos.

Solubles, porque se encuentran en las secreciones o pueden extraerse de los tejidos por medio de disolventes acuosos.

Coloidales, porque las dimensiones moleculares son mayores de una μ y, por tanto, las partículas no pasan a través de las membranas de colodión o de pergamino.

Enzimas son: «catalizadores de una naturaleza orgánica definida, con una actividad específica, formados únicamente por células vivas, pero que actúan independientemente de estas células» (WALDSCHMIDT-LEITZ).

Sabiendo ya que los enzimas son catalizadores biológicos, digamos algo que implica la importancia de la catálisis biológica: «La catálisis es uno de los artificios más importantes de la Naturaleza, ya que ésta ha dotado a los sistemas vivientes de su carácter fundamental de transformadores de energía, y que todos los hechos conocidos hacen pensar que ha tenido una intervención indispensable en el mundo viviente desde los primeros estadios de la evolución» (F. G. HOPKINS).

Indicado ya que un enzima es un catalizador biológico, precisemos lo que es un catalizador:

«Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción, pero que no puede provocarla» (BODENSTEIN).

«En una reacción catalizada, la composición química de uno de los reaccionantes es la misma que la de uno de los productos; esta sustancia es el catalizador» (FAIK y NORTHROP).

«Un catalizador es una sustancia que permite a ciertas moléculas sufrir cambios químicos, recibiendo una energía crítica que es inferior a la que necesitarían en ausencia de catalizador» (MOELWYN HUGHES).

Como los enzimas no son los únicos catalizadores biológicos, vamos a clasificar éstos para encuadrar los enzimas en el conjunto de catalizadores biológicos:

Los catalizadores fabricados y utilizados por los organismos vivientes se presentan bajo dos formas: a) superficies catalíticas, como las que existen dentro de las células, y b) solutos catalíticos, como los que se encuentran en la secreción y en los extractos tisulares.

Los solutos catalíticos se pueden dividir en: 1.º, catalizadores no coloidales, y 2.º, catalizadores coloidales.

Los catalizadores no coloidales son solubles, de peso molecular bajo tales como: H-iones, OH-iones, Cu-iones, otros electrolitos, el glutatión y el ácido ascórbico.

Entre los catalizadores coloidales están: los soles metálicos y los enzimas.

Propiedades de los enzimas.—Además de las características comunes a todos los catalizadores, que son: a) persistencia; b) continuidad de efecto, y c) independencia del equilibrio, los enzimas gozan de propiedades especiales que les son propias; a saber: 1.ª Características coloidales. 2.ª Sen-

sibilidad a la temperatura. 3.^a Gran especificidad. 4.^a Sensibilidad a la concentración de hidrogeniones. 5.^a Sensibilidad a los electrolitos. 6.^a Sensibilidad a factores específicos, incluyendo los coenzimas, los activadores y las toxinas.

Breve historia química de los enzimas.—Desde que el hombre tuvo la facultad de la observación racional, se dio cuenta de la existencia de cuatro cambios naturales espontáneos: 1.º La fermentación alcohólica de los azúcares. 2.º La fermentación láctica o agriamiento de la leche. 3.º La fermentación acética del vino; y 4.º La fermentación amoniacal de la orina.

En 1830, DUBRUNFAUT vio que el extracto de malta podía transformar la pasta de almidón en azúcar, de un modo parecido a la acción de un ácido fuerte, como había sido demostrado anteriormente por KIRCHOFF. En 1883, PAYN y PERSOZ separaron del extracto de malta el principio amiloclástico activo, por adición de exceso de alcohol. A este precipitado, el primer enzima verdadero aislado en estado bruto, lo llamaron diastasa, y lo compararon con uno de los «fermentos» naturales desconocidos que produce el agrietamiento de la leche o del vino.

BERZELIUS introdujo el término catálisis para describir los cambios que estos principios provocan.

Entre 1850 y 1870, PASTEUR demostró que las fermentaciones naturales se debían invariablemente al desarrollo de microorganismos, que él apeló «fermentos organizados». Los agentes no vivos los denominó «fermentos solubles o no organizados».

Habiéndose presentado confusiones respecto al significado de «fermentos», KUHNE, en 1870, introdujo el nombre de enzimas para describir los catalizadores biológicos con independencia de su origen.

En 1896, OSTWALD definió un catalizador como el acelerador de una reacción química. Ello estimuló la investigación de la fisicoquímica de los enzimas.

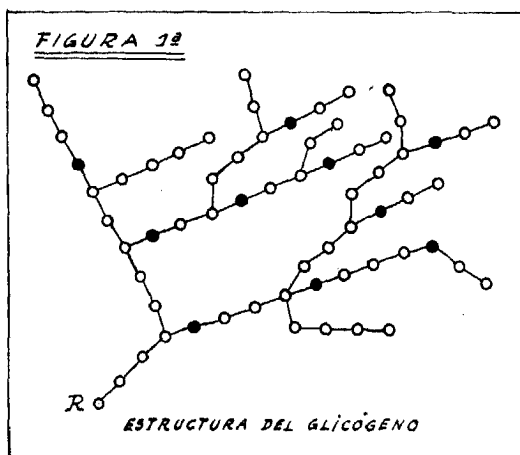
Desde 1900, el estudio de los enzimas se ha desarrollado tanto que cada enzima o una sola de sus propiedades de una clase de enzimas ha bastado para atraer la atención de un grupo de investigadores. Fechas importantes son: 1926, cristalización de la urea (SUMNER); 1932, descubrimiento de los enzimas flavínicos (WARBURG); 1933, aislamiento de los coenzimas; 1935, aislamiento de los virus proteínicas; 1940, síntesis enzimática del almidón, del glicógeno.

Una síntesis enzimática «in vitro» (como las de OCHOA y KORNBERG) consiste en reproducir, gracias al enzima conveniente, fuera de un organismo vivo, la misma síntesis bioquímica que se produce en el interior de las células vivas.

Antes de pasar a cualquier otra forma energética, la energía liberada en la degradación de los alimentos se transforma en una especie muy particular de energía química, que, acumulada en las ligazones pirofosfóricas del ácido adenosintrifosfórico, vuelve a liberarse por la hidrólisis de esas ligazones. Los enzimas son los factores que posibilitan esas hidrólisis y, por lo tanto, los «operarios» que ponen en funcionamiento esas «máquinas térmicas» de los organismos vivos.

ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE OCHOA Y KORNBERG. BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS

El antecedente inmediato de la síntesis realizada por OCHOA y de la realizada por KORNBERG es la síntesis enzimática «in vitro» del glicógeno y de otros carbohidratos altamente polimerizados.



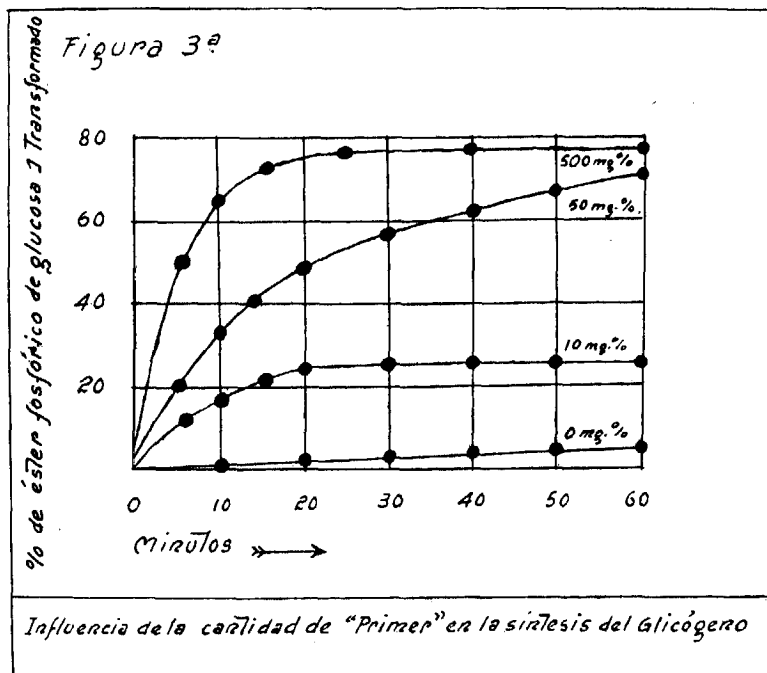
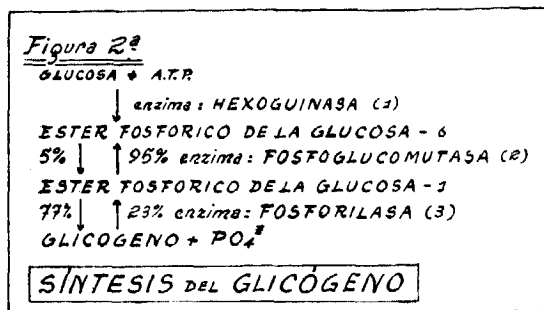
La figura 1.^a muestra la estructura del glicógeno, tal como la propuso por primera vez K. MEYER. El glicógeno, cuyo peso molecular es de muchos millones, está constituido exclusivamente por moléculas de *D*-glucosa, unidas entre sí por dos tipos de ligazón. Los círculos blancos de la figura representan la ligazón glucosa I-4, y los negros que aparecen en los lugares de ramificación, la ligazón glucosa I-6. El problema de construir artificialmente estas moléculas

comprende: a) Aclarar cómo se efectúan estos dos tipos de enlace. b) Qué enzima puede servir de catalizador. c) De dónde puede sacarse la energía necesaria para la reacción (de dónde la sacan las células vivas para realizarlo de la misma manera).

El problema se resolvió cuando se averiguó que: los enlaces son, o entre glucosa I-4 o glucosa I-6; que la fuente de energía para la ecuación era la contenida en los enlaces pirofosfóricos del ácido adenin-trifosfórico

y que los enzimas provocadores eran: la *hexoquinasa*, la *fosfoglucomutasa* y la *fosforitasa*.

La figura 2.^a es un esquema de la transformación enzimática de la glucosa en glicógeno. En la primera reacción, la glucosa se fosforila por el trifosfato de adenosina. Es en esta reacción donde se utiliza la energía contenida en el ATP. Una vez realizado este paso, siguen las reacciones 2 y 3, fácilmente reversibles, que conducen a la síntesis del glicógeno. Para investigar la reacción catalizada por la fosforilasa fue preciso aislarla. Se obtuvo, en estado cristalizado, a partir del músculo del conejo.



Se deduce, observando la figura 2.^a, que la reacción de la fosforilasa puede determinarse cuantitativamente por la cantidad de fosfato inorgánico liberado a partir del éster fosfórico de la glucosa-1.

Un estudio de este proceso muestra un hecho de gran importancia, también para la síntesis de otras macromoléculas, a saber: la simple presencia mutua del enzima y del éster fosfórico de la glucosa-1 no produce ninguna reacción. En cambio, al agregar a este sistema una pequeña cantidad de glicógeno, la síntesis del mismo se realiza en el acto y la velocidad de la reacción de síntesis aumenta proporcionalmente a la cantidad de glicógeno añadido, hasta llegar a un máximo. El hecho está reproducido en la figura 3.^a. Las abscisas representan minutos. Las ordenadas representan tantos por ciento de éster fosfórico de glucosa-1 convertidos en el tiempo que marcan las abscisas. Para cada cantidad de glicógeno añadido hay una curva distinta. Las cantidades de glicógeno añadido están dadas en miligramos por ciento de éster fosfórico de la glucosa-1. Como se ve por la curva, cuando no se añade glicógeno la reacción apenas se verifica; para la adición de glicógeno siempre hay un máximo y la velocidad de transformación es proporcional a la cantidad de glicógeno añadido.

El hecho de que la reacción no se produzca, si no se añade el glicógeno, significa que el enzima fosforilasa no puede construir por sí mismo cadenas de polisacáridos por la unión de varias moléculas de monosacáridos. Lo que hace la fosforilasa es alargar las cadenas que ya están formadas. Su acción es una acción de crecimiento. Este fenómeno, es decir, la necesidad de añadir pequeñas cantidades de la sustancia a sintetizar, se designa como efecto «primer» (cebo).

LOS TRABAJOS DE OCHOA Y DE KORNBERG

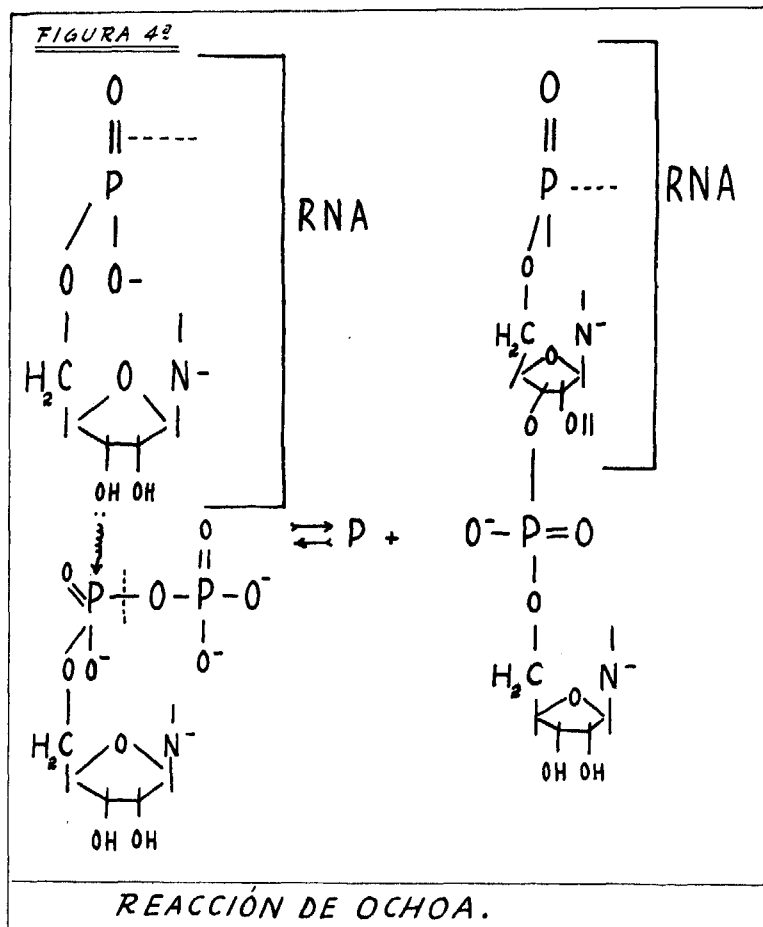
Además de las incógnitas que entrañaba el problema de la síntesis que acabamos de citar, la de los ácidos ribonucleínicos y la del ácido desoxirribonucleínicos entraña una más, a saber: la macromolécula de glicógeno contiene una sola molécula fundamental (la de glucosa), pero las macromoléculas de los ácidos sintetizados por OCHOA y KORNBERG contienen cuatro moléculas fundamentales, las de los cuatro nucleótidos que se van a unir en la síntesis (fosfórico-ribosa-adenina; fosfórico-ribosa-guanina; fosfórico-ribosa-timina; fosfórico-ribosa-citosina). Hay aquí otra cuestión a dilucidar: ¿En qué orden se agrupan estas cuatro moléculas?

Seguiremos en la explicación las descripciones originales de los autores OCHOA y KORNBERG.

Empezaremos por la reacción de OCHOA.

La figura 4.^a muestra la reacción tal como la describe OCHOA, quien utilizó un enzima de *nitrobacter* ampliamente purificado.

Los símbolos significan: N = bases nitrogenadas derivadas de la purina o de la pirimidina; R = ribosa; P = fosfato. Luego R — N será un nucleósido y N — R — P — P será un nucleótido.



La reacción es: $n(\text{N}-\text{R}-\text{PP}) \rightleftharpoons (\text{N}-\text{R}-\text{P})_n + n \cdot \text{P}$, que quiere expresar n nucleótidos de difosfato de ribosa y adenina (o guanina, o citosina, o timina) = n polinucleótidos + n moléculas de fosfórico.

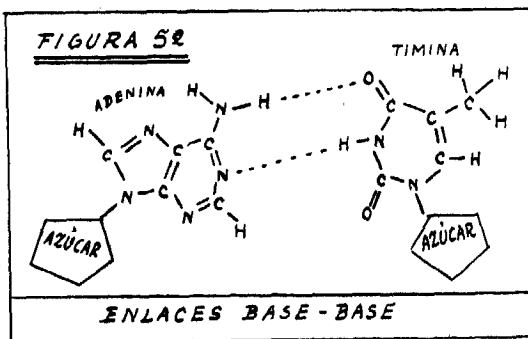
Si las bases nitrogenadas que se utilizan son todas iguales, resultan ácidos poliadenílicos, etc. Si no son las cuatro iguales, resultan ácidos poli-

nucleótidos mixtos; si son las cuatro distintas, resultan ácidos nucleóticos.

La reacción se produce únicamente con iones magnesio y es reversible como indican las flechas. Luego en la reacción de OCHOA intervienen: sintetizantes (los nucleótidos de fosfórico-ribosa bases nitrogenadas), catalizador biológico (el enzima extraído de *nitrobacter*), catalizador metálico (los iones magnesio) y fuentes de energía (las estructuras de ácido pirofosfórico). Si nos fijamos en la reacción, observaremos que el enzima de *nitrobacter* hace en ella el mismo oficio que el enzima fosforilasa en la síntesis enzimática del glicógeno, por lo que OCHOA designa al enzima de *nitrobacter* como fosforilasa de los polinucleótidos. El símil es completo, ya que, como se ve en la figura, se produce una escisión entre el fósforo y el oxígeno, realizándose una transfosforilación, lo mismo que en el caso del glicógeno hay una escisión entre el carbono y el oxígeno, dando lugar a una transglucosilación.

Partiendo de mezclas equimoleculares de los ésteres difosfóricos de los cuatro nucleósidos, OCHOA obtuvo un polinucleótido mixto que contiene las cuatro moléculas fundamentales en la misma ligazón y proporción que el ácido nucleico natural. Además, el producto sintético ofrece grandes semejanzas con el ácido natural, respecto a su peso molecular, estructura mostrada por los rayos X y su comportamiento en presencia de varios enzimas de degradación. También, como en el caso del glicógeno, se ha comprobado la necesidad de un «primer» (cebo); es decir, hay que añadir, para que la reacción se produzca, algo del ácido natural.

El problema del enlace de las bases nitrogenadas se resolvió previamente, y se ha comprobado que en el producto sintético (calco del natural) los enlaces ribosa-base y base-base son los que se muestran en la figura 5.^a

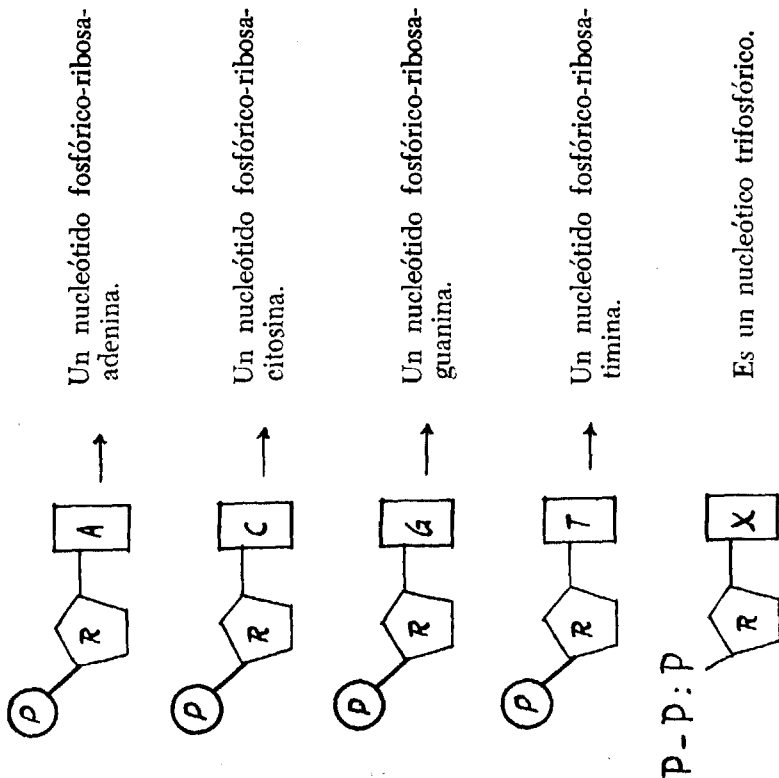
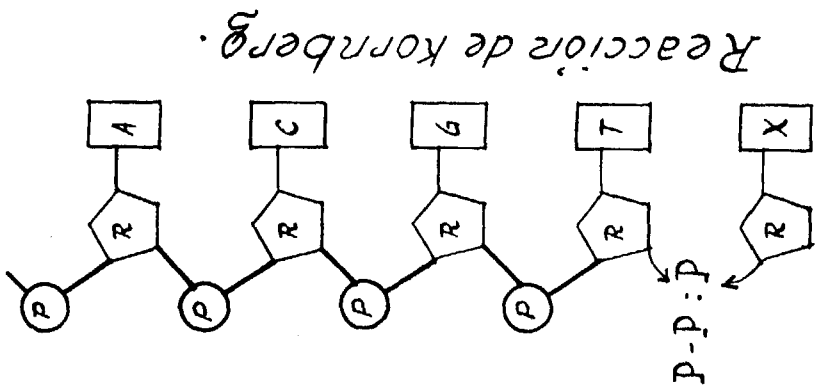


Como se indica en la figura 5.^a, los enlaces base-azúcar son enlaces C-O, y los enlaces base-base son enlaces H-O y H-N.

La reacción de Kornberg.—KORNBERG utilizó un enzima extraído del colibacilo, purificado unas dos mil veces. También trabajó con enzimas menos purificados, obtenidos de glándulas linfáticas, leucocitos leucémicos y cultivos tisulares.

(Se ha dicho—algo alegremente—que las reacciones de OCHOA y KORNBERG abrían perspectivas esperanzadoras con vistas a lograr la curación del cáncer. Ha dado pábulo a estas opiniones el que KORNBERG

LOS SÍMBOLOS REPRESENTAN:

FIGURA 62

demostrara que la síntesis del ácido desoxirribonucleico se facilitaba con enzimas extraídos de leucocitos leucémicos. Lo cierto es que las neoplasias implican un previo desarrollo exagerado de ese ácido en la célula. Si esa producción desahorada se evita, hay posibilidad de evitar el cáncer.)

La figura 6.^a reproduce esquemáticamente la reacción observada por KORNBERG.

La síntesis del ácido desoxirribonucleínico se produce por el alargamiento de la cadena del «primer» (cebo), al reaccionar enzimáticamente con el nucleósido trifosfórico. También son necesarios iones magnesio.

Así, pues, la síntesis del ácido ribonucleínico (OCHOA) y la del ácido desoxirribonucleínico (KORNBERG) transcurren siguiendo un mecanismo análogo, si bien existen diferencias importantes entre ambos reacciones. Primera: la síntesis del ácido ribonucleínico parte de ésteres difosfóricos de los nucleósidos, en tanto que la del ácido desoxirribonucleínico parte de ésteres trifosfóricos de los mismos. Segunda: en la primera reacción se escinde fosfato inorgánico y en la segunda se libera pirofosfato. Otra diferencia muy importante consiste en el hecho de que el enzima de OCHOA puede construir macromoléculas a partir de un solo componente, por ejemplo, el ácido poliadenílico a partir del éster difosfórico de la adenina. En cambio, el enzima de KORNBERG muestra solamente una reacción muy débil a partir de un nucleótido único. Sin embargo, la reacción se produce con rapidez si este enzima se adiciona a los cuatro nucleótidos componentes del ácido desoxirribonucleínico.

El producto sintético—de KORNBERG—presenta propiedades físicas y químicas análogas a las del ácido nucleínico preparado a partir del timo de ternera.

Como «primer» (cebo) sirvieron los ácidos desoxirribonucleínicos de diversas bacterias, levaduras, timo y bacteriófagos. En estos diversos preparados de ácido desoxirribonucleínico la proporción de las diferentes bases varía notablemente. Así, por ejemplo, la proporción adenina + timina + guanina + citosina es de 0,99 para el ácido del colibacilo, de 1,25 para el extraído del timo de ternera y de 1,91 para el obtenido de los bacteriófagos. Y es interesante que utilizando un determinado «primer» el producto sintético obtenido tiene una proporción de bases idéntica a la que existe en el «cebo». También es interesante que las bases presentes pueden ser sustituidas por bases análogas sin que haya variación de la especificidad. Por ejemplo: la timina puede ser sustituida por el uracil o el bromo-uracil; la citosina, por la metileitosina, y la guanina, por la hipoxantina.

* * *

Si se nos pregunta: ¿Qué trascendencia puede derivar de estos trabajos?, podemos contestar, y ya quedan valorizados: «Ellos pueden contribuir mucho a conocer el mecanismo de la «autoduplicación» del ácido

desoxirribonucleínico, macromolécula que contiene la complicada clave química de la herencia y, por lo tanto, de la diferencia funcional esencial entre organismo vivo y ser no vivo.»

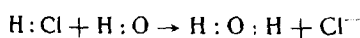
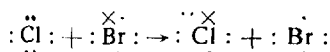
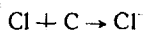
BIBLIOGRAFIA

- Prensa diaria (16-X-59): *Química orgánica* (PABLO KARRER).
Química de los compuestos orgánicos (CONANT-BLATT).
Introducción a la Bioquímica (WILLIAM ROBERT FEARON).
Química médica (ALFRED BURGER).
La Fisicoquímica en la Medicina y en la Biología (W. BLADERGROMEN).
Transformaciones energéticas en Biología (Prof. H. A. KREBS).
Biosíntesis de macromoléculas (Prof. C. F. CORI).
La síntesis enzimática del ácido ribonucleínico (Prof. S. OCHOA).
La síntesis enzimática del ácido desoxirribonucleínico (Prof. A. KORNBERG).

RECTIFICACION DE FORMULAS

Entre las fórmulas del artículo publicado por Andrés León Maroto sobre las conferencias dadas en la reunión organizada por el O. E. C. E. en Irlanda, en el mes de marzo último, hay algunas erratas, que rectificamos en las fórmulas siguientes:

Incorrecto



Correcto

