

**DISCURSO DEL  
EXCELENTÍSIMO SEÑOR DOCTOR DON  
JUAN JOSÉ ARAGÓN REYES**

Soluciones Gráficas Chile, S.L.L.  
Chile, 27, Local  
28016 MADRID  
Tel./Fax 91 359 57 55  
E-mail: [gchile@sistelcom.es](mailto:gchile@sistelcom.es)

Depósito Legal: M-14575-2008

*A Valentina, mi esposa,  
Y a mis hijas Victoria y Ana María*



## ÍNDICE

	Página
Discurso del Excmo. Sr. Dr. D. Juan José Aragón Reyes .....	7
1. La catálisis enzimática: un fenómeno fascinante.....	10
2. Los enzimas y el origen de la bioquímica moderna .....	17
3. La naturaleza de los enzimas y la base de su función .....	24
3.1. La naturaleza proteica de los enzimas .....	24
3.2. Consideraciones sobre la acción de los enzimas y su base estructural ..	26
3.3. Ribozimas, desoxirribozimas y abzymas.....	32
4. Los enzimas en la era de la biología estructural y el diseño de nuevas herramientas médicas .....	38
5. De los enzimas a la enfermedad: los errores innatos del metabolismo en la medicina de hoy .....	46
Bibliografía.....	54
Discurso de contestación del Excmo. Sr. Dr. D. Amando Garrido Pertierra	63



**Excmo. Señor Presidente**

**Excmos. Señoras y Señores Académicos**

**Señoras y Señores:**

Faltaría a la verdad si no admitiera sentirme abrumado hoy al ser acogido en esta Real Academia de Doctores de España, dada la relevancia de las personalidades que la integran. Emocionado también y, por encima de todo, profundamente agradecido a las Señoras y Señores Académicos que me otorgaron su confianza al admitirme entre ellos, confiriéndome un honor, sin duda muy superior a mis merecimientos.

Concreto mi agradecimiento a los Excmos. Señores Doctores Académicos que me honraron avalando mi candidatura y brindándome su consejo generoso: los Profesores Don Amando Garrido Pertierra, Don Antonio Bascones Martínez y Don Jesús Álvarez Fernández-Represa, con el empeño firme de que mi trayectoria por esta Real Academia no les defraude. Al Profesor Don Amando Garrido, hombre sabio y bondadoso, deseo darle adicionalmente las gracias con el mayor afecto, por haber aceptado amablemente dar contestación a este discurso de ingreso y por su ayuda, siempre disponible, y su ánimo al solicitar ser admitido en esta Institución.

Quiero expresar ahora mi profunda gratitud a aquellas personas e instituciones que, a lo largo de mi trayectoria, han contribuido más directamente a que hoy pueda dirigirme a ustedes.

A la memoria de mi maestro, el Profesor Alberto Sols (1917-1989), científico excepcional, cuyo trabajo fue clave para el inicio en España de una investigación bioquímica con calidad internacional, de quien aprendí a investigar,

me abrió el mundo deslumbrante de los enzimas y me infundió la necesidad constante de buscar el sentido fisiológico ante cualquier hecho nuevo. Al profesor John M. Lowenstein, mi maestro en los años de formación posdoctoral en los Estados Unidos, quien me enseñó a perseguir nuevas ideas, me transmitió su afán por el rigor experimental y supo convertir esa etapa en un tiempo inolvidable en aprendizaje y gozo con la ciencia.

A mis discípulos más directos en el laboratorio, Lisardo Boscá, Ruth Medina, María Esther Gómez, Fernando González, Antonio Estévez, Cristina Sánchez, Belén Santamaría, Cristina Ferreras y Eloy Hernández, que si algo les he enseñado, es más seguro que de todos he aprendido. Mi particular reconocimiento a los Doctores Oscar H. Martínez-Costa y Carmen Hermida, quienes además de iniciar conmigo su formación investigadora, son hoy mis colaboradores más estrechos. Y a todos aquellos investigadores de diferentes centros que confiaron y confían en mí, ofreciéndome su colaboración enriquecedora.

A mis amigos y compañeros de los centros de investigación en que me formé, el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas -hoy Centro Mixto "Alberto Sols" de la Universidad Autónoma de Madrid y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas-, y el Departamento de Bioquímica para Graduados de la Universidad de Brandeis en Waltham, Massachussets, que contribuyeron a delinear mi trayectoria científica. Testimonio también mi agradecimiento a mi Universidad Autónoma de Madrid, que me acogió primero como becario predoctoral y me dio luego la oportunidad de iniciar una carrera docente e investigadora.

Aun en la última mención, si bien de la mayor importancia, quiero expresar el cariño de mi gratitud más íntima a mi familia. Con el recuerdo a la memoria de mi padre, en quien vi de niño la veneración al saber y cuya muerte prematura fue semilla para hacerme a mí mismo. A mi madre, sin cuyos desvelos no hubiera podido iniciarme en los estudios y quien me señaló el camino de la diligencia en el trabajo. A mis hermanos, con los que crecí en el amor a la cultura y quienes, en los años del esfuerzo, fueron ejemplo para emprender mi futuro. Y, finalmente, a mi esposa Valentina, colaboradora y amiga, compañera de carga sin la que no podría entender mi vida, y a mis hijas, Victoria y Ana María, descanso y gozo, que por mi trabajo a tantas horas de asueto han sabido renunciar.

Termino estas palabras introductorias con un par de detalles sobre el tema y el marco general de mi exposición. El planteamiento de este discurso no podría ser otro que desde la perspectiva de mi condición: médico de

carrera, e investigador bioquímico y docente en el ámbito de la Medicina, de profesión. Ciertamente, el área de la Bioquímica y la Biología Molecular está llena de capítulos hermosos, ampliamente documentados. Sin embargo, a la hora de elegir el tema con el que dirigirme a ustedes, he preferido situarlo en torno a lo que hago, por la simple razón de que es lo único en que mi ignorancia es algo menor. Directa o indirectamente, mi actividad investigadora siempre ha implicado el estudio de los enzimas, de su función y su estructura, del control de su actividad y de su actuación fisiológica. Hablaré, pues, de estos agentes biológicos que son los responsables de que puedan tener lugar la miríada de procesos químicos que median la actividad vital, o lo que es igual, la vida misma. Los enzimas -nombre designado por la Real Academia Española de la Lengua como ambiguo (Real Academia Española, 2001), y por tanto utilizable igualmente en masculino o en femenino-, forman parte del núcleo más central de todos los sistemas vivos, de manera que si al final, los biólogos en general no entendemos como operan, aunque sea a un nivel intermedio, no entenderemos nada de la química de la vida (Cornish-Bowden, 1995). Disertaré entonces de lo que hacen y lo que son los enzimas, de cómo su estudio abrió las puertas al desarrollo de la Bioquímica y la Biología Molecular, del impulso espectacular que para el avance en su conocimiento supuso la revolución tecnológica del DNA recombinante y de su impacto trascendental en la Medicina de hoy (y en la de ayer), en una forma que va mucho más allá de su empleo como meras herramientas en el diagnóstico clínico, aun siendo esto de suma importancia. A la hora de preparar este discurso he tenido en cuenta, en primer lugar, la audiencia a la que va dirigido, de carácter ampliamente pluridisciplinar, cual es la naturaleza de esta Real Academia, por lo que he intentado confeccionarlo en forma lo más asequible posible a aquellos que cultivan áreas claramente distantes de la Medicina y las ciencias experimentales en general, o al menos, siempre que eso me ha resultado practicable sin menoscabo del rigor científico. Y en segundo lugar, he recordado en esta hora las palabras del peculiar, no sobrado de rigor a veces, pero siempre ingenioso Fray Antonio de Guevara (1485-1545), a propósito de la escritura, que *“ha de ser... por manera que satisfaga a la voluntad en leerla y no canse a la cabeza en oírla”* (Guevara, 1539). He procurado seguir esta indicación, consciente, no obstante, de la dificultad que por mi torpeza entraña.

## 1. LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA: UN FENÓMENO FASCINANTE

En 1837, Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), el químico más eminente de la primera mitad del siglo XIX y verdadero árbitro de la química de su tiempo, que elaboró la primera tabla de elementos químicos, con 43 de ellos, y a quien debemos el desarrollo de los símbolos químicos modernos, la teoría electroquímica y la introducción de términos como *isómero*, *polímero*, o *proteína* entre otros, acuñó la palabra *catálisis* por analogía con *análisis* (Berzelius, 1837), esto es, “desatar”, “soltar” en griego (Corominas y Pascual, 1980), describiendo lo que él llamó  *fuerza catalítica* como “*la capacidad de ciertas substancias [los catalizadores], por su mera presencia, ...de despertar afinidades que estaban dormidas a una temperatura dada... En este contexto, las substancias catalíticas se comportan entonces como el calor*”<sup>1</sup>. Para la época en que se hizo esta descripción, llama la atención la sensación de misterio generada por la impresión de que un catalizador pudiera, por su sola presencia, llevar a cabo un cambio químico acelerándolo, sin afectarse por el mismo. Misterio que en cierta parte permanece 170 años más tarde, pues aunque las razones de este hecho son hoy conocidas, nuestra comprensión de los mecanismos que sustentan la aceleración de las reacciones químicas por los enzimas es todavía incompleta. Por otro lado, sorprende poderosamente el interés clarividente por la necesidad del contacto y la comparación con el calor. El hecho de que la acción de un catalizador, en nuestro caso un enzima, exija ciertamente el contacto directo con el reactivo sobre el que opera, el sustrato, no fue demostrado hasta 50 años más tarde por Cornelius O’Sullivan (1842-1907) y Frederick W. Tompson (1859-1930) (O’Sullivan y Tompson, 1890). Finalmente, también es de destacar que Berzelius no hizo distinción alguna entre la acción de su  *fuerza catalítica* en la naturaleza viva y la no viva, puesto que la definió por igual a partir de observaciones en los dos sistemas. Como a propósito del efecto del platino calentado a elevadas temperaturas favoreciendo la combustión del alcohol por el aire atmosférico (un ejemplo de lo que se conoció como catalizador químico, en este caso el platino), o de la conversión del azúcar en etanol y dióxido de carbono que ocurre en la fermentación alcohólica provocada por una substancia entonces llamada *fermento* (ejemplo de lo que se consideraría un catalizador biológico, para el que luego se utilizaría el término *enzima*), pero sin reconocer Berzelius que este último pudiera ser un agente propio del mundo vivo.

---

<sup>1</sup> “The capacity that substances have, by their mere presence and not by their own affinity, to awaken affinities that are slumbering at a given temperature... In this context catalytic substances behave on the whole in the same way as heat” (Berzelius, 1837, p. 131).

Los enzimas, pues, son catalizadores biológicos que aceleran la velocidad de las reacciones químicas sobre las que actúan, como es de común conocimiento. Pero lo más sorprendente de su acción reside en las propiedades tan notorias con las que la ejecutan. Los enzimas son altamente específicos. Por un lado, respecto a la acción que llevan a cabo, en que la especificidad es virtualmente absoluta siempre, cada enzima cataliza un solo tipo de reacción. Por otro, respecto al sustrato sobre el que operan, especificidad que en algunas ocasiones es variable, lo que tiene una gran importancia biológica. Sin embargo, en muchos otros casos la especificidad de sustrato es también absoluta, de manera que con frecuencia, un enzima determinado sólo actúa sobre un compuesto dado y no sobre otro, por muy relacionado que esté químicamente. El descubrimiento de este hecho, de enorme trascendencia, fue realizado en 1894 por Emil Fischer (1852-1919), gigante entre los gigantes de la química orgánica de su época, que recibió el Premio Nobel en 1902 por sus trabajos sobre la síntesis de los azúcares y las purinas. Fischer observó que una  $\alpha$ -glicosidasa, que extraía de la levadura de cerveza, actuaba exclusivamente sobre el  $\alpha$ -metilglucósido, sin modificar para nada incluso al compuesto estructuralmente más parecido, su isómero  $\beta$ -metilglucósido, del que sólo se diferencia en la posición espacial de los cuatro átomos -o grupos atómicos- distintos unidos a uno de sus carbonos. Un resultado similar encontró estudiando la acción de una  $\beta$ -glicosidasa, que también extrajo de la levadura y que, en este caso, era específica para el  $\beta$ -metilglucósido (Fischer, 1894). Para poder apreciar el gran valor de estas observaciones, es importante mencionar un fenómeno común de la química orgánica: que los compuestos que contienen en su estructura uno o más átomos de carbono con estas características, llamados carbonos asimétricos o carbonos quirales, presentan actividad óptica, esto es, que hacen girar el plano de la luz polarizada al ser iluminados con ella a la izquierda (levógiros) o a la derecha (dextrógiros), según sea la orientación -a un lado u otro- de los cuatro sustituyentes diferentes unidos al carbono asimétrico. Estos compuestos poseen así estructuras quirales -las de cada uno de los dos isómeros correspondientes o estereoisómeros-, que son imágenes especulares una de la otra y no superponibles, al igual que nuestra mano derecha e izquierda. Por algo la palabra *quiral* procede del griego *khéir* "mano" (Moliner, 1991). Fischer se apercibió de inmediato de lo que su descubrimiento implicaba: en el enzima tenía que existir una asimetría molecular equivalente, que sería la responsable de la exquisita especificidad de ambas glicosidasas y cuya acción no podía ser otra que unir al metilglucósido correspondiente de forma complementaria, según él pensó. Hoy sabemos que esa exigencia estructural se restringe a una región privilegiada de la superficie del enzima, el centro activo o sitio catalítico, al que se une el sustrato de forma reversible y donde tiene lugar su transformación en producto (la catálisis).

Las palabras extraordinariamente intuitivas de Fischer a este respecto son parte esencial de la historia de la bioquímica: *“estas substancias [los enzimas]...indudablemente se componen de una molécula construida asimétricamente. Uno puede entonces explicarse la actividad restringida de estos enzimas sobre los glucósidos asumiendo que estos dos tipos de moléculas pueden aproximarse una a otra de una forma tal que conduzca al inicio del proceso químico solamente cuando tienen una estructura similar. Para usar una metáfora diré que con objeto de que puedan actuar químicamente una sobre la otra, el enzima y el glucósido deben ajustarse como una llave y una cerradura”*<sup>2</sup>. Célebre modelo, fácilmente entendible, que constituyó el punto de partida para todos los análisis realizados a partir de entonces sobre el modo de acción de los enzimas.

Esta observación histórica merece una reflexión ulterior. Es sabido que los compuestos quirales -y más en concreto los pares de estereoisómeros- se designan como D o L en relación a la configuración absoluta de uno de sus carbonos asimétricos con respecto a la de un compuesto patrón, independientemente de la naturaleza de su actividad óptica. La quiralidad es un fenómeno de la mayor relevancia para los seres vivos. La naturaleza es quiral, siendo biológicamente activa sólo una de las dos isoformas de las biomoléculas quirales. Así, sólo un D-azúcar interviene en la estructura del DNA y del RNA, siendo de hecho los D-azúcares los más abundantes en la naturaleza, y solamente los aminoácidos de la serie L forman parte de las proteínas. Razón por la cual se habla de la homoquiralidad de estos compuestos. La quiralidad molecular fue descubierta por Pasteur (1812-1895) en 1848, químico y luego padre de la microbiología, cuando examinó pacientemente con una lupa cristales del ácido tartárico que se deposita en las lías del vino, observando que constituían en realidad una mezcla de dos tipos de cristales asimétricos con actividad óptica opuesta, lo que se dio en llamar mezcla racémica, del latín *racemus*, uvas (Segura Munguía, 2003). Son extremadamente interesantes las palabras clarividentes de Pasteur preguntándose, tan prematuramente, por la razón molecular de este fenómeno: *“¿Se disponen los átomos de la forma dextro en una hélice dextrógira, o en los vértices de un tetraedro irregular, o tienen algún otro tipo de organización asimétrica? No podemos responder a*

---

<sup>2</sup> “These substances, ...undoubtedly possess an asymmetrically built molecule. One may hence explain the restricted activity of these enzymes on the glucosides by assuming that these two types of molecule can approach one another in a fashion that leads to the initiation of the chemical process only when they have a similar structure. To use a metaphor I wish to say that in order to be able to act chemically on one another, enzyme and glucoside must fit together like lock and key” (Fischer, 1894, p. 222).

*estas preguntas. Pero no hay duda que existe una estructura asimétrica que tiene una imagen no superponible. Y no es menos cierto que los átomos del ácido levo tienen exactamente una estructura asimétrica inversa a la del ácido dextro*” (citado en Losada et al., 1998). Esta predicción genial fue confirmada un siglo más tarde al analizar dichos cristales mediante difracción de rayos X, demostrándose que ambas formas son exactamente imágenes especulares una de otra y que los carbonos asimétricos se localizan en el centro de un tetraedro. El origen de la homociralidad de las biomoléculas es desconocido, sin que haya una explicación comúnmente aceptada para el mismo (Bada, 1995). Para algunos, la homociralidad es consecuencia de los procesos físico-químicos universales que tuvieron lugar en los primeros tiempos de la Tierra o en el ambiente extraterrestre. De hecho, se ha sugerido un origen extraterrestre para la homociralidad en base a la composición de algunos meteoritos (Engel et al., 1990), o a la formación de estructuras quirales bajo condiciones interestelares simuladas (Meierhenrich and Thiemann, 2004). La homociralidad también ha sido considerada como una condición necesaria para el origen de la vida, sin embargo, otros defienden que es en realidad una consecuencia de la vida, más que un prerrequisito para la misma (Bada, 1995). Quizás el ejemplo más doloroso de la importancia de la quiralidad sea el caso de la talidomida, que se presenta en dos formas isoméricas, la levógira, un sedante generalmente bien tolerado -que se utilizó en los primeros años 1960 para calmar las náuseas en los primeros meses de la gestación-, y la dextrógira, que provoca efectos teratogénicos severos sobre el desarrollo fetal, lo que se ignoraba en un principio. Como consecuencia del procedimiento de síntesis utilizado entonces, las dos formas estaban presentes en proporciones iguales en el preparado comercial, con las consecuencias catastróficas conocidas (Brown and Davies, 1989; Hashimoto, 2002).

A lo largo de millones de años de evolución, las complejas estructuras de los enzimas han desarrollado, pues, regiones a modo de moldes, más o menos rígidos, en su superficie (los centros activos) que en términos generales se adaptan a la configuración de una sola de las dos formas de un estereoisómero dado, y esta capacidad de distinguir entre ambas con la mayor precisión es vital para los sistemas vivos. Es precisamente esta capacidad tan exquisita de selección de acción y de sustrato que tienen los enzimas, lo que hace que puedan distinguir entre la inmensa variedad de compuestos biológicos y de sus intercambios químicos en el medio vivo. Merece la pena recordar a este respecto las palabras, lapidarias como en él era frecuente, pero certeras, de Otto Warburg (1883-1970), Premio Nobel en 1931 por sus magnas contribuciones al metabolismo celular y uno de los grandes padres de la bioquímica, “No

*importa lo complicada que pueda ser una mezcla de substratos, o grupos prostéticos, cada reacción enzimática tendrá lugar como si todas las demás substancias que no participan en ella no estuvieran presentes*<sup>3</sup>.

Pero si llamativa es la especificidad de los enzimas, verdaderamente fabulosa es la eficacia con que actúan, muchísimo más elevada que la de los catalizadores no biológicos en las mismas condiciones. El poder catalítico de los enzimas oscila entre alrededor del millar hasta decenas de millones de moléculas de sustrato, que pueden ser transformadas en producto por cada molécula de enzima en un segundo (Segel, 1993), de manera que por término medio aceleran la velocidad de las reacciones de  $10^5$  a  $10^{14}$  veces (Nelson y Cox, 2005). Por poner un ejemplo, el compuesto sintético o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido puede hidrolizarse por el ácido clorhídrico con una constante de velocidad de alrededor de  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , que en presencia del enzima  $\beta$ -galactosidasa se convierte en  $10^5 \text{ s}^{-1}$ , (Gutfreund, 1968), una aceleración de  $10^{12}$  veces. Las potencias marean, permítanme una sencilla -y muy simplificada- comparación. Imaginemos que el tiempo que tardase en transformarse un sustrato dado en producto fuese en determinadas condiciones de 1 segundo en presencia de un enzima específico (en realidad ese tiempo, el llamado ciclo catalítico, es del orden de milisegundos). Pues bien, si ese enzima fuera de los que aceleran la reacción  $10^6$  veces, no de los más activos, quiere decir que en su ausencia la reacción tardaría en torno a 1 año en completarse, y si fuese de los que aceleran  $10^{12}$  veces, lo que no es raro, la reacción espontánea tardaría entonces unos 30.000 años. Y existen enzimas mucho más rápidos, uno de los casos extremos es el de la orotidín monofosfato descarboxilasa, un enzima de la síntesis de los nucleótidos -los componentes del DNA y del RNA, entre otras importantes funciones- que acelera la reacción  $10^{17}$  veces a pH neutro. Teniendo en cuenta el tiempo de duración del ciclo catalítico de este enzima, se ha calculado que la misma reacción procedería en su ausencia con una vida media de 78 millones de años (Miller y Wolfenden, 2002).

Cabe preguntarse si existe un límite para la velocidad de las reacciones enzimáticas. En otras palabras, si sería posible encontrar enzimas ilimitadamente más rápidos, al menos en teoría, o bien manipular la secuencia proteica de uno de ellos, como hoy es habitual, de manera que fuese inmensamente más eficaz que el ejemplo anterior. Eficacia que, en realidad, no sólo depende del poder catalítico que mencioné antes, sino también de la afinidad, esto es, de

---

<sup>3</sup> “No matter how complicated a mixture of substances or prosthetic groups may be, every enzymatic reaction will take place as if all other substances not participating in it were not present” (Warburg en 1948. A. Sols, comunicación personal).

la fuerza con que el enzima une al sustrato (Fersht, 1985; Walsh, 1979). La respuesta a la pregunta es negativa. Existe sin duda un límite para la catálisis, que viene impuesto, lógicamente, por la velocidad de difusión en solución acuosa que limita el encuentro entre el enzima y el sustrato. La constante de esta velocidad es de  $10^8$  a  $10^9$  s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> (Fersht, 1985). Esta constante limita a su vez la presión selectiva para la evolución de los enzimas, sentando un criterio para juzgar su grado de evolución. Aquellos enzimas cuya eficacia está en ese rango, se dice de ellos que son catalizadores perfectos, en el sentido de que han alcanzado el final de su desarrollo evolutivo como catalizadores (Albery y Knowles, 1976; Fersht, 1985). De hecho, la mayor parte de las reacciones enzimáticas proceden con una eficacia que se aproxima a ese límite en unos dos órdenes de magnitud (Miller y Wolfenden, 2002).

La razón por la cual la evolución ha seleccionado estas máquinas tan extraordinariamente eficaces es sencilla, sólo con una gran potencialidad catalítica pueden llevarse a cabo los cambios químicos biológicos en las condiciones generalmente estrechas de pH, temperatura, presión y a las concentraciones moderadas de sustrato en que tiene lugar la vida. Valga un ejemplo clásico, la reacción del nitrógeno atmosférico con hidrógeno para la formación de amonio, de enorme valor industrial, puesto que es el proceso esencial para la producción química de fertilizantes, que junto con el refinado del petróleo consume casi el 90% de la producción industrial mundial de hidrógeno (Deffeyes, 2005). Esta reacción constituye la llamada síntesis de Haber, por la que Fritz Haber (1868-1934) recibió el Premio Nobel en 1918, y que contribuyó a paliar en Alemania el corte en la importación de salitre de Chile durante la primera guerra mundial. Sin olvidar que la pugna por los territorios ricos en nitrato y guano, como fertilizantes naturales, ya supuso una guerra, la guerra del guano, a finales del siglo XIX entre Chile, Perú y Bolivia, que costó además la salida al mar a este último país. Pues bien, para que esta reacción de la reducción del nitrógeno transcurra con un rendimiento apreciable es preciso llevarla a cabo a 500 °C y unas 900 atmósferas de presión, y en presencia de los mejores catalizadores metálicos; cuando la misma reacción la lleva a cabo la nitrogenasa de las bacterias fijadoras de nitrógeno de los nódulos radiculares de las leguminosas, a la temperatura y la presión del suelo.

Esta enorme eficacia de los enzimas es, pues, la razón de la suavidad de las condiciones con que pueden acontecer los fenómenos vitales. Un hecho que tanto ha llamado la atención en biología a lo largo del tiempo (Carracido, 1927; Garrido Pertierra, 2002; Núñez de Castro, 2001) y que fue, precisamente, lo que llevó a Berzelius a intuir la necesidad de la catálisis (Berzelius, 1837). De manera que la inmensa mayoría de los procesos vitales necesitan ser catalizados, aun los más sencillos. La mera hidratación del dióxido de carbono,

por ejemplo, sería tan lenta en ausencia de la anhidrasa carbónica -de hecho uno de los enzimas con mayor poder catalítico (Miller y Wolfenden, 2002)-, que no sería posible el intercambio de dióxido de carbono y oxígeno entre los alveolos pulmonares y los tejidos, ni podría mantenerse el pH del medio interno. No hay, pues, vida sin catálisis, la cual es la responsable de aquellas características que distinguen lo vivo, como la complejidad estructural, la capacidad de extraer, transformar y utilizar la energía del medio ambiente e incluso de la que es la quintaesencia de los seres vivos, su capacidad de autorreplicación. Aquella orden de la naturaleza a que alude Cervantes en el prólogo de la primera parte del Quijote: *“que en ella cada cosa engendra a sus semejantes”*. Autorreplicación que para tener lugar requiere, sin duda, catálisis. Podemos considerar entonces la aparición de la catálisis como el gran salto en la evolución molecular hacia la vida.

Los enzimas tienen todavía una propiedad distintiva más, que es igualmente clave. A diferencia de los catalizadores no biológicos, los enzimas, todos ellos, pueden regular su propia actividad en función de la concentración de sustrato. Y además de esto, algunos de ellos tienen la capacidad especial de reconocer a otros compuestos, que los hacen más o menos activos, merced a la unión de estos compuestos a sitios en su estructura diferentes del centro activo, conocidos como sitios alostéricos, de *allos*, “otro”, “diferente” en griego (Corominas y Pascual, 1980). Son los llamados enzimas alostéricos, término acuñado por Jacques Monod (1910-1976) para nombrar a este mecanismo en los años 1960 y del que inmediatamente se percató que era en realidad una forma general de control de la actividad biológica (Monod et al., 1963). El valor extraordinario de este sistema de regulación hace comprender la excitación de Monod cuando lo descubrió, se ha contado que exclamó que había descubierto el segundo secreto de la vida (Judson, 1980), el primero sería el de la estructura del DNA por Watson y Crick en 1953.

Con estas características formidables, especificidad exquisita, poder catalítico extraordinario y capacidad de regular su velocidad, los enzimas seleccionan de hecho, uno de entre los múltiples destinos químicos que un compuesto determinado puede tener. Consecuentemente, el enzima confiere además protección al sustrato, impidiéndole reaccionar con otros compuestos, algunos muy abundantes en la naturaleza, conservándolo así para su participación en el proceso adecuado (Gutfreund, 1968). El destino seleccionado no es, pues, necesariamente el químicamente más favorable, sino el que mejor conduce al desarrollo de la actividad vital. Ante estas consideraciones, se entiende bien que a los enzimas se les haya llamado con acierto agentes de la vida (Sols, 1977).

## 2. LOS ENZIMAS Y EL ORIGEN DE LA BIOQUÍMICA MODERNA

La historia es una necesidad básica en el ejercicio de la labor científica. Decía el biólogo evolucionista Ernst Mayr (1904-2005), que *“Realmente, la mayoría de los problemas científicos se entienden mucho mejor estudiando su historia que su lógica”*<sup>4</sup>, lo que en parte recuerda la afirmación de Aristóteles de que las cosas se entienden mejor cuando uno ha logrado ver con alguna claridad como se formaron (citado en Lain Entralgo, 1978). Incluso la propia exposición de un hallazgo o de la solución a un problema no resuelto, en la forma habitual de una publicación, sitúa al científico en un contexto histórico como ha señalado Herbert Friedman: *“Los artículos científicos tienen una forma clásica de presentar un descubrimiento en el marco de los antecedentes, de mostrar las nuevas ideas y observaciones del autor o autores frente al conocimiento previo del hecho aceptado o la teoría establecida. Por tanto los científicos, situándose conscientemente en un universo intelectual dado, necesariamente escriben su propia historia”*<sup>5</sup>. La aproximación histórica está, pues, necesariamente presente en todos los apartados de este discurso y primordialmente en el que ahora nos ocupa, puesto que fue el descubrimiento de los enzimas lo que marcó el inicio de la bioquímica actual. Por ello, me ha parecido apropiado destacar algunos detalles a este respecto.

En la protohistoria de este desarrollo, un movimiento tan oscuro y complejo como la Alquimia ofrece un antecedente de interés con el empleo de los *elixires*. Los alquimistas, protobioquímicos se les ha llamado (Florkin, 1972) por ser los primeros en usar el laboratorio -para ellos también oratorio-, creían firmemente, por diversas consideraciones, en la posibilidad de la transmutación de los metales y en particular su conversión en oro, como es conocido. Transmutación que sólo se imaginaba posible en presencia de la *piedra filosofal*, cuya preparación era tarea primordial, o también por acción de los *elixires*, como se extendió entre los alquimistas europeos. Curiosamente, se consideraba a un elixir como una sustancia capaz de inducir un cambio químico con sólo estar presente y que podía actuar en cantidades muy pequeñas. Concepto, que como es fácil de apreciar estaba bastante cercano al término moderno de *catalizador* mencionado al principio. Elixires

---

<sup>4</sup> “Actually, most scientific problems are far better understood by studying their history than their logic” (Mayr, 1982, p. 6).

<sup>5</sup> “Scientific papers have a time-honored way of presenting discovery in the framework of antecedents, of showing the author’s or authors’ new ideas and observations against the background of accepted fact or established theory. Hence scientists, by consciously placing themselves in a given intellectual universe, necessarily write their own history” (Friedman, 1981, p. xiv).

a cuya búsqueda se lanzan afanosamente los alquimistas, pudiendo serlo además cualquier sustancia del laboratorio, y que tenían también otras connotaciones, como poseer las máximas propiedades médicas: devolver la juventud, inducir larga vida e incluso la inmortalidad. Los trabajos de los alquimistas, aunque estériles en sus fines, condujeron no obstante a progresos en la química, como fue el descubrimiento del alcohol y de los ácidos minerales y el desarrollo de técnicas de laboratorio, particularmente la destilación. En el siglo XIII la alquimia adquiere respetabilidad filosófica con Roger Bacon y, en particular, con San Alberto Magno quien emplea, quizás por primera vez, la palabra *afinidad* en el sentido actual al decir que “*el azufre ennegrece la plata y abrasa en general a los metales a causa de la afinidad natural que tiene por ellos*” (citado en García Font, 1976).

A lo largo del siglo XIX fueron descubriéndose agentes biológicos diversos con capacidad catalítica (enzimas), algunos ya mencionados. E incluso ya en el siglo XVIII, René Réaumur (1683-1757) y Lázaro Spallanzani (1729-1799) establecieron la actividad digestiva del jugo gástrico o de la saliva, mucho antes de que el fenómeno de la catálisis fuese reconocido. Pero el proceso cuyo estudio contribuyó más directamente al conocimiento de los enzimas y al desarrollo de la bioquímica moderna fue sin duda la fermentación alcohólica, cuya naturaleza fue motivo de preocupación prácticamente desde la antigüedad, con intenso interés para los alquimistas y los adeptos a la teoría del flogisto. En los siglos XVII y XVIII, las ideas circulantes sobre este proceso eran considerablemente complejas. Mentos como la de Robert Boyle (1627-1691) lo asociaban a la fiebre, por la propiedad común de elevación de la temperatura, y por la misma época también se le ligó a la digestión. Un ulterior elemento a añadir fue la generación espontánea. La fermentación se iniciaba también aparentemente de la nada, lo que fue rebatido elegantemente de forma experimental por Spallanzani, aunque sus resultados fueron rechazados sin fundamento por los defensores a ultranza de la generación espontánea.

El proceso de la fermentación no comenzó a clarificarse hasta Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) con su inmensa obra química, a pesar de lo prematuro de su muerte, guillotinado por el Terror (“*la República no tiene necesidad de sabios*”<sup>6</sup>, pronunció el presidente del tribunal que le condenó). Lavoisier mostró mediante su análisis elemental que un simple cambio químico, la escisión del azúcar en alcohol y dióxido de carbono, reemplazaba a la hasta entonces considerada como entidad misteriosa, manteniéndose constante la cantidad total de materia a lo largo del proceso, y sin sufrir cambio

---

<sup>6</sup> “la République n’a pas besoin des savants” (citado en Babor e Ibarz, 1965).

alguno durante el mismo la levadura adicionada. Substancia esta última en forma de sedimento procedente de otra fermentación, sin la cual el proceso no tenía lugar y considerada entonces como algo meramente químico.

El problema clave fue discernir las causas del proceso, la naturaleza del *fermento* implicado, concretándose ya este término en el agente responsable de la transformación, puesto que hasta entonces se le había dado un significado altamente vago. El interés por resolver este problema fue tal, que en el año octavo de la República Francesa (hacia 1800), el Instituto Nacional de la Ciencias y las Artes de Francia convocó un premio consistente en una medalla de un kilogramo de oro, para quien averiguara las características que distinguen las substancias que actúan como fermentos de las que sufren la fermentación (Fruton, 1972). Interrogante que equivalía a formular nada menos que el problema central de la enzimología: conocer la diferencia entre lo que ahora llamamos enzima y lo que hoy conocemos como sustrato (Friedmann, 1981). El premio no llegó a concederse y fue retirado 4 años más tarde por falta de fondos.

Gay-Lussac (1778-1850), inspirado en la conservación doméstica de alimentos, pensaba que la fermentación se originaba por efecto del oxígeno, tras observar que al abrir botellas mantenidas cerradas conteniendo zumo de uvas, se iniciaba la fermentación en contacto con el aire. De manera que el *fermento* sería formado por acción del oxígeno en el líquido. Respecto a la levadura concluyó que era algo diferente del verdadero agente de la fermentación, al que llamó *fermento soluble*, a la vista de la naturaleza insoluble de la levadura, que permanecía como algo misterioso. Aunque ya un siglo antes, el pionero microscopista Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) había revelado la existencia de partículas microscópicas a modo de glóbulos en los sedimentos de la fermentación, que eran células de levadura, sin que entonces se reconociesen como tales. Gay-Lussac fue, no obstante, quien estableció la ecuación de este proceso, según la cual una molécula de glucosa es escindida en dos moléculas de dióxido de carbono y dos de etanol. O al menos así se acepta en términos generales, pues no parece que esta expresión se usase de esa forma en su notación química final en tiempos de Gay-Lussac (Schlenk, 1997).

La demostración de que los agentes responsables de la fermentación son organismos vivos y concretamente levaduras, fue realizada en 1837 de forma independiente y prácticamente simultánea por tres investigadores, Charles Cagniard-Latour (1777-1859), Theodor Schwann (1810-1882) y Friedrich T. Kützing (1807-1893). En contra de Gay-Lussac, Schwann mostró que la putrefacción que aparece tras pasar aire al medio fermentable ya hervido, podía evitarse si el aire se calienta antes a alta temperatura, con lo que probó

además la no formación de microorganismos por generación espontánea. Observó Schwann que la levadura estaba presente siempre que había fermentación, la cual no se producía en condiciones que visiblemente mataban este organismo, como por ejemplo el calor. Esto, junto a su intuición refiriendo que *“el sorprendente principio de la fermentación debe ser un material que es provocado e incrementado por el propio proceso, un fenómeno que solamente se aplica a los organismos vivos”*<sup>7</sup>, le llevó a concluir que era el desarrollo de un organismo vivo, la levadura -el hongo del azúcar como él la llamó (*“Zuckerpilz”*, luego denominado *Saccharomyces*)-, el agente responsable de la fermentación. Schwann contribuyó además significativamente al establecimiento de la Teoría Celular, considerando la célula como principio estructural y origen común a todos los seres vivos y como unidad básica del metabolismo, término acuñado por él mismo.

Sin embargo, la tesis de que la fermentación alcohólica era llevada a cabo por organismos vivos encontró un fuerte rechazo, particularmente por parte de algunos de los químicos más influyentes, como el propio Berzelius y, especialmente, Justus von Liebig (1803-1873), que hizo contribuciones trascendentales para la química orgánica y que lideraba con gran poder lo que podríamos llamar la “bioquímica” de entonces. Para Liebig, la fermentación estaba relacionada con su interpretación vitalista de la biología. De manera que al finalizar la fermentación, provocada por supuestas vibraciones tras la muerte de los organismos vivos una vez ausente la fuerza vital, se depositaría un sedimento *“llamado levadura”*. Liebig permaneció como un convencido vitalista, rehusando creer que las levaduras estuvieran vivas. Hasta el punto de que, junto con Wöhler (1800-1882) -quien en 1828 sintetizó por primera vez un compuesto orgánico, la urea- escribió un panfleto anónimo ridiculizando y atacando cruelmente la noción de que la fermentación pudiera deberse a una célula viva. Esta crítica fue particularmente sentida por Schwann, siéndole además muy perjudicial. Le impidió proseguir su actividad investigadora en Alemania, viéndose obligado a exiliarse en Bélgica como profesor de Anatomía de la Universidad Católica de Lovaina y acabando de hecho con su carrera científica.

Fue necesario esperar a la obra de Pasteur para que se hiciera justicia al hallazgo de Cagniard-Latour, Schwann y Kützing. Pasteur demostró que efectivamente la fermentación era correlativa con el desarrollo y multiplicación

---

<sup>7</sup> “the exciting principle in the fermentation process must be a material that is evoked and increased by the process itself, a phenomenon that applies only to living organisms” (citado en Fruton, 1972).

de la levadura y probó la inexistencia de la generación espontánea, lo que recibió reconocimiento general en 1872 marcando el comienzo de la moderna microbiología (Florkin, 1972). Sin embargo, Pasteur consideró insistentemente a la fermentación como necesaria e inextricablemente ligada al mantenimiento de la levadura como célula viva.

Por esta época se habían obtenido en forma soluble diversos agentes responsables de procesos degradativos. Como la diastasa (hoy amilasa), el primer enzima purificado, por A. Payen y J. F. Persoz en 1833 extrayéndolo de un extracto de malta; la sacarasa (entonces llamada invertasa), extraída de la levadura por Pierre Berthelot o la pepsina, identificada por Schwann para llamar al principio responsable de la digestión gástrica. Para estos agentes se acuñó el término de *fermentos solubles* (término ya utilizado por Gay-Lussac, aunque con sentido diferente) o *desorganizados*, frente a los llamados *fermentos insolubles* para aquellas actividades degradativas que no podían ser extraídas de organismos vivos, como la propia fermentación alcohólica, y que serían por ello los propios organismos como tales, por lo que también se les denominó *fermentos organizados*.

Por aquel entonces, a mediados del siglo XIX, los fermentos conocidos como *solubles*, generalmente con actividades de carácter hidrolítico, fueron considerados como catalizadores químicos, según el término ya acuñado por Berzelius. Lo que estuvo en disputa fue la cuestión de si existirían catalizadores similares en las células de levadura, que serían entonces los responsables de la fermentación de los azúcares (Fرتون, 1992). Esta fue la postura de Berthelot (1827-1907), proponiendo que este proceso resultaría de la producción por los organismos vivos de fermentos similares a los solubles, que actuarían como auténticos reactivos químicos, por lo que el camino a seguir pasaba por reproducir el mismo fenómeno con medios químicos e interpretarlos en términos exclusivamente mecánicos. Postura, pues, directamente enfrentada a las ideas de Pasteur, para quien los verdaderos fermentos eran los seres organizados. La posición de Berthelot fue fortalecida por Claude Bernard (1813-1878), cuyas observaciones sobre la digestión y particularmente sobre la degradación del glucógeno por un extracto hepático, le hicieron rechazar la idea de que un proceso de degradación química, como la conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono, fuese correlativo con la vida. E igualmente coincidente con estas ideas fue Moritz Traube (1826-1894), defendiendo la naturaleza química de los fermentos e incluso anticipando de forma clarividente que el fracaso en aislarlos a partir de microorganismos podía deberse a su alteración o inactivación (Kornberg, 1989). Como veremos más adelante, la postura de Pasteur, aunque errónea, no estuvo falta de apoyo experimental.

En este marco, Willy Khüne (luego Wilhelm Friedrich Kühne; 1837-1900) -quien introdujo las palabras *miosina* y *tripsina* para las respectivas sustancias que él mismo descubrió-, acuña en 1876 la palabra *enzima*, del griego *enzyme*, “en la levadura”, en el sentido de “encontrado en la levadura”, y por ende extraído de ella, describiendo el objetivo que persiguió con ello como “*Me tomé la libertad de dar el nombre de enzimas a algunas de las sustancias mejor conocidas que muchos llaman fermentos desorganizados*”<sup>8</sup>. O sea, no para denominar por igual a los dos tipos de fermentos que entonces se distinguían, como en alguna ocasión se ha referido (Segel, 1993), sino para llamar a los fermentos desorganizados o solubles, reconocidos como agentes químicos, con el fin, pues, de perpetuar la distinción con los fermentos organizados, a los que Khüne consideraba -al igual que muchos entonces-, radicalmente distintos y estrictamente correlativos con las células vivas, enfatizando así su carácter biológico frente al químico de los fermentos solubles. Bien es verdad que más tarde, el propio Khüne sugirió que se llamase enzimas a todos los fermentos, pero esta propuesta no tuvo entonces repercusión (Gutfreund, 1976). Resulta irónico que el término más antiguo de fermento, cuando no implicaba distinción alguna, e incluso en parte el de los elixires de los alquimistas, está mucho más cercano al concepto actual de enzimas como agentes biocatalizadores -química y biológicamente relacionados, que actúan sobre reacciones diferentes- que este nuevo término en el sentido con que fue acuñado (Friedmann, 1981). En realidad, la vieja expresión de fermento hacía igualmente referencia a la levadura, a la que de hecho se llamó así desde antiguo, derivándose del latín *fervere*, “hervir”, por alusión a la naturaleza agitante de los líquidos en fermentación (Corominas y Pascual, 1980). En medio de la polémica entonces planteada, no resulta extraño que la nueva palabra de enzima no fuese bien recibida por muchos (Friedmann, 1997). Entre otros, fue rechazada enérgicamente por Felix Hoppe-Seyler (1825-1895) -quien acuñó el término *bioquímica* en 1877 (Florkin, 1972) e inició los primeros intentos de independencia respecto de la fisiología-, manteniendo, al igual que Traube y Berthelot, que las fermentaciones eran procesos químicos que tenían que tener solamente causas químicas. En este contexto, es de mencionar que aunque, ciertamente, Emil Fischer utilizó la palabra enzima en 1894 -como hemos visto anteriormente en su clásico trabajo sobre el modelo de la llave y la cerradura (Fischer, 1894)-, al igual que O’Sullivan y Tompson -en su también clásico estudio sobre la formación del complejo enzima-sustrato (O’Sullivan y Tompson, 1890)-, en ambos casos lo hicieron para referirse a actividades enzimáticas (glicosidasas, invertasa) que se extraían de la levadura, y por ello consideradas entonces como fermentos desorganizados.

---

<sup>8</sup> “I took the liberty of giving the name enzymes to some of the better known substances that many call unorganized ferments” (Kühne, 1877, p. 170).

Así las cosas, en 1897 tiene lugar un descubrimiento absolutamente trascendental para la historia de la bioquímica. Eduard Buchner (1860-1917), en el laboratorio de su hermano Hans y con la ayuda de Martin Hahn, descubre de forma accidental que un extracto de levadura es capaz de llevar a cabo la fermentación alcohólica. Hans Buchner pretendía usar los extractos para estudios inmunológicos y con objeto de mejorar su preservación, Martin Hahn sugirió añadirles sacarosa a alta concentración, pensando en su uso doméstico como conservante. Y fue Eduard Buchner el que interpretó el fenómeno al percatarse de la fermentación en esas condiciones. El descubrimiento fue un ejemplo paradigmático de lo que en medios anglosajones se conoce como *serendipidad* (del inglés *serendipity*). Palabra de gran valor en investigación científica -no aceptada aún en nuestro idioma-, que fue acuñada en el siglo XVIII por Horace Walpole (1717-1797), tras leer un cuento titulado “El Viaje de los Tres Príncipes de Serendip” (la isla de Ceilán, la actual Sri Lanka), publicado en Venecia en el siglo XVI, narrando los múltiples descubrimientos fortuitos que hacían estos príncipes gracias a su sagacidad (Remer, 1965). Walpole usó esta palabra para llamar al hecho de encontrar algo nuevo, no por casualidad, sino cuando se va buscando otra cosa diferente, como de hecho ha ocurrido en muchos hallazgos científicos. El descubrimiento de Buchner fue producto de una mejora técnica; él y Martin Hahn habían perfeccionado el procedimiento de rotura de las levaduras, obteniendo extractos que estaban libres de células. De hecho, intentos de averiguar si un extracto de levadura fermentaba ya los habían hecho otros, pero sin éxito real por la contaminación celular de las preparaciones. Por ejemplo el mismo Pasteur, Berthelot o Claude Bernard, quien creyó haberlo conseguido. En el caso de Pasteur, parece ser que además utilizó una cepa de levadura menos adecuada que la de Buchner (Friedmann, 1997), y cuya invertasa -el primer enzima de la fermentación, encargado de romper la sacarosa- no soportaba el procedimiento de preparación del extracto, según se reveló mucho más tarde del examen de sus protocolos de trabajo (Kornberg, 1989). Fueron también dificultades técnicas -que impidieron a algunos repetir el experimento de Buchner-, lo que hizo que este trabajo no fuese aceptado desde el principio, amén del conservadurismo hacia las ideas de Pasteur, rechazándose con ello que pudieran existir enzimas intracelulares (Florkin, 1975; Fruton, 1992). Paradójicamente, fue un discípulo de Pasteur, Emile Duclaux -quien le sustituyó como director del Instituto Pasteur- el que de forma más convincente aceptó el hallazgo de Buchner. Este descubrimiento tan notable -cuyo impacto trascendió las fronteras de la biología (Friedmann, 1997)- acabó, pues, con la postura de Pasteur, zanjando la polémica en torno a la necesidad de la célula viva para que la fermentación tenga lugar y terminando así con la distinción entre fermentos organizados y desorganizados. Sin embargo, Buchner se guardó de llamar *enzima* al agente responsable de la fermentación y le denominó *zimasa*, a la vista de que, como él mismo refirió,

los enzimas eran “*meramente agentes hidrolíticos*”<sup>9</sup>, puesto que ese era el tipo de agentes para los que -como hemos visto- se acuñó ese término, mientras que la fermentación alcohólica era claramente un proceso de mayor complejidad (Buchner, 1897). Fue esta la razón por la cual la palabra enzima no fue universalmente aceptada hasta bien entrado el siglo XX. Todavía en los años 1930, y por lo mismo, nada menos que Warburg, el bioquímico de más prestigio de su época, rehusaba hablar de “enzimas” refiriéndose a ellos como “fermentos” (con el término alemán de “Fermente”) (Fruton, 1992).

El descubrimiento de Buchner supuso el nacimiento de la enzimología y por ende el de la bioquímica moderna, abriendo la célula para hacerla asequible al estudio de sus funciones; en curiosa coincidencia con el descubrimiento por Joseph J. Thomson (1856-1940) en 1897 de la primera partícula subatómica, el electrón, es decir, con lo que metafóricamente puede considerarse como la apertura del átomo. A partir de aquí, el extracto libre de células se constituyó en el método básico para el estudio químico de los seres vivos. Los extractos celulares suministraron el primer puesto de observación de un fenómeno y el punto de partida para el aislamiento y purificación del enzima o enzimas responsables, para poder investigar luego su función catalítica, la forma de regulación de su actividad, su asociación con otros enzimas y estructuras celulares y, eventualmente, el estudio de la base molecular de su función. La era de los “cazadores de enzimas”, como les llamó Arthur Kornberg (Kornberg, 1989), estaba abierta.

### 3. LA NATURALEZA DE LOS ENZIMAS Y LA BASE DE SU FUNCIÓN

#### 3.1. La naturaleza proteica de los enzimas.

Establecido ya por E. Buchner que los fermentos en el sentido de Pasteur no eran realmente diferentes de los enzimas en el sentido de Kühne, aunque Buchner pensase que los primeros fuesen químicamente mucho más complejos -por desconocerse que la fermentación alcohólica de la sacarosa es el resultado de 13 reacciones enzimáticas encadenadas-, podría esperarse que la estructura de estos agentes se consideraría como químicamente estudiable y conocible. Sin embargo no fue así, la naturaleza de la actividad catalítica de los extractos celulares comenzó a verse como algo misterioso e inescrutable. M. Traube, E. Fischer y el propio E. Buchner propusieron que los enzimas son proteínas (“*el agente del extracto que es activo en la fermentación es una substancia soluble,*

---

<sup>9</sup> “ordinary enzymes...are merely hydrolyzing agents” (Buchner, 1897, p. 30).

*sin duda una substancia albuminoide*<sup>10</sup>, escribió Buchner), pero esto fue intensamente rechazado, considerándose a las proteínas como simples soportes de los agentes catalíticamente activos. Permítaseme entresacar entre los ejemplos de esta actitud uno de nuestro propio país con la figura José R. Carracido, catedrático de la Facultad de Farmacia de la entonces llamada Universidad Central, regentando la primera cátedra de bioquímica (química biológica) establecida en la universidad española, quien en su interesante obrita “Compendio de Química Biológica”, editada hacia 1903 -quizás el primer libro de bioquímica escrito en España-, tras señalar, acertadamente, la necesidad de compuestos minerales para la acción de diversos fermentos, como el manganeso para “*los fermentos oxidantes llamados oxidadas*”, o el calcio para el “*fibrino-fermento que coagula la sangre*”, concluye diciendo: “*se cree que la materia orgánica de las zimadas [el término recién introducido por Buchner] sólo tiene la misión secundaria de ser vehículo de materias minerales que son las realmente activas*”. Carracido, hombre de su tiempo y al tanto de las ideas científicas de entonces, menciona a continuación una cita en este sentido de E. Duclaux a modo de resumen: “*El capítulo referente a la composición de las zimadas está en vísperas de ser escrito en otra forma más precisa, en la cual corresponderá el papel más importante a las sales que actualmente se conceptúan impurezas*”<sup>11</sup>. Esta idea de que las proteínas sólo intervendrían como vehículo de la actividad catalítica tuvo un cierto apoyo experimental con los trabajos de Richard Martín Willstätter (1872-1942), Premio Nobel en 1915 por sus estudios sobre la clorofila. Willstätter había logrado purificar enzimas con su novedoso método de la adsorción (como la tan conocida luego adsorción sobre alúmina), hasta etapas en las que la actividad enzimática era aún elevada, pero en las que -con los métodos de entonces- ya no llegaba a detectarse proteína, lo que le llevó a concluir que las proteínas eran verdaderamente un mero soporte sobre el que estarían adsorbidos los enzimas, cuyo peso molecular debería ser bajo -según él-, sentenciando que “*la molécula de un enzima consiste en un soporte coloidal y un grupo activo que funciona de forma puramente química*”<sup>12</sup>. En este escenario, James B. Sumner (1887-1955) consigue en 1926 cristalizar el primer enzima, la ureasa, en curiosa coincidencia con el primer compuesto orgánico sintetizado, la urea. Sin embargo las ideas de Willstätter tuvieron tanta influencia, como para que no fuese aceptado de inmediato este descubrimiento formidable. El

---

<sup>10</sup> “the agent of the juice which is active in fermentation is a soluble substance, doubtless an albuminoid substance” (Buchner, 1897, p. 29)

<sup>11</sup> Carracido, 1903, pp. 39 y 40.

<sup>12</sup> “...the molecule of an enzyme consists of a colloidal carrier and an active group that functions purely chemically” (Willstätter, 1926, p. 293).

que los enzimas son proteínas no fue reconocido definitivamente hasta 1930 a 1936 en que John H. Northrop (1891-1987) cristalizó la pepsina, la tripsina y el quimiotripsinógeno. Resulta irónico que hasta 1980 no se conoció que la ureasa es un metaloenzima que contiene níquel (Dixon et al., 1980), esencial además para su actividad, localizándose en su centro activo e interviniendo en la catálisis (Alagna et al., 1984). Como puede entenderse, la ignorancia de este hecho fue sin embargo beneficiosa para que el trabajo de Sumner pudiera llevar al convencimiento de la naturaleza proteica de los enzimas (Friedmann, 1981).

### **3.2. Consideraciones sobre la acción de los enzimas y su base estructural.**

Las proteínas que constituyen los enzimas están formadas en su mayoría por varias cadenas polipeptídicas, que varían en un rango de entre 60 a unos 1000 aminoácidos. En torno a la mitad de estas cadenas tienen una masa molecular de 30.000 a 50.000 daltons, formadas por 200 a 300 residuos aminoacídicos -asumiendo un promedio de 150 daltons por aminoácido-, de manera que la masa molecular de dichas cadenas polipeptídicas es de 100 a 200 veces superior a la masa molecular media de los metabolitos, los compuestos del metabolismo celular sobre los que actúan los enzimas y que intervienen como substratos. Es obvio así, que la unión del substrato al enzima sólo tiene lugar en una porción muy pequeña de la superficie de la proteína, el centro activo. Este centro está formado por unos pocos aminoácidos -frecuentemente no más de una docena- que, como suele decirse, intervienen unos ligando al substrato y otros promoviendo la catálisis, esto es, la transformación del substrato en producto. El resto de la molécula proteica en modo alguno es una carga inútil, aunque no pocos enzimas hayan sido parcialmente degradados por acción proteolítica (o con otras técnicas), sin sufrir pérdida apreciable de su actividad catalítica. La pregunta es inmediata, ¿por qué los enzimas son entonces tan grandes?. Es precisamente este enorme tamaño y, sobre todo su naturaleza proteica, lo que nos da la clave de su función. La respuesta a este interrogante descansa principalmente sobre las consideraciones que siguen.

En primer lugar, los aminoácidos que conforman el centro activo, el sitio catalítico, no tienen posiciones necesariamente contiguas en la cadena polipeptídica -a veces incluso ni pertenecen todos a la misma cadena, sino a cadenas adyacentes-, pero sí están en cambio extraordinariamente próximos en la estructura tridimensional de la proteína. La cadena polipeptídica, a modo de inmenso ovillo (en sentido amplio) -unido a su vez a otros como él-, contribuye así a reunir estos residuos en esa zona tan reducida de la superficie del enzima.

La segunda consideración es consecuencia de la propia función del enzima. Cualquier reacción química transcurre de manera que la molécula del sustrato acaba convirtiéndose en otra más estable, esto es, con menor energía libre, que constituye el producto, restringiéndonos a las reacciones más sencillas. Puesto que el sustrato es de por sí una molécula estable, resulta fácilmente comprensible que hay que suministrarle cierta energía (por ejemplo, calor) para que pueda ser transformado en producto, de lo contrario la reacción sería instantánea. Existe, pues, un cambio más o menos gradual en la estructura del sustrato que implica el paso por una forma con la máxima energía -y por ello la más inestable-, llamada *estado de transición*, a partir de la cual se llega en condiciones favorables a la formación del producto con la consiguiente pérdida neta de energía. Esa energía del estado de transición es la denominada *energía de activación*, que es precisamente la barrera energética que se opone a que la reacción sea instantánea. Los catalizadores, independientemente del tipo de que se trate, lo que hacen es rebajar esa barrera energética, de manera que al unírsele el sustrato se alcanza el estado de transición con menor energía de activación, aumentando entonces el número de moléculas en este estado, con la consiguiente aceleración de la reacción. Aunque la dificultad para desentrañar este fenómeno es considerable, hay al menos suficientes bases experimentales para proponer explicaciones razonables. Un catalizador químico -sea un metal- muy probablemente reduce la energía de activación mediante estabilización selectiva del estado de transición, por ejemplo, poniendo juntas a las moléculas de reactantes sobre la superficie del metal finamente dividido y favoreciendo así las interacciones entre ellas y por ello su desestabilización con menor suministro energético. Un catalizador biológico, un enzima, puede también estabilizar selectivamente el estado de transición por un mecanismo parecido en el entorno del centro activo, pero puede además desestabilizar las moléculas de sustrato en ese sitio induciendo en ellas cambios físicos (por ejemplo distorsión). Y más aún, parece claro que los enzimas actúan reemplazando una etapa única con elevada energía de activación por múltiples etapas con menores barreras de activación cada una y, por lo tanto, con una energía de activación media mucho más reducida, y de aquí su inmensamente mayor eficacia catalítica. Esta acción es ejercida a través de varios mecanismos, dependiendo, algunos de ellos, del tipo de reacción química de que se trate y sobre los cuales no procede detenerse aquí. Salvo uno -que ahora comentaremos-, general para prácticamente todas las reacciones enzimáticas, que nos acerca a lo más esencial del modo de actuación de un enzima y a su exigencia de poseer una gran estructura.

Como se refirió en el primer apartado de este discurso, la diferencia más obvia entre los enzimas y virtualmente todos los catalizadores químicos

ordinarios reside en que junto con su enorme poder catalítico, los enzimas muestran un grado extraordinario de especificidad. En 1975, William P. Jencks concibió acertadamente como ambas características surgen de las interacciones que tienen lugar entre el sustrato y el enzima en el centro activo y, más concretamente, de la energía que dichas interacciones liberan o *energía de ligamiento (binding energy)*. La magnitud de esta energía es lo suficientemente elevada como para contribuir en gran medida -junto con otros factores- a la reducción neta de la barrera energética antes mencionada que supone la energía de activación (Jencks, 1975; Jencks, 1997). La utilización de las interacciones no covalentes con los sustratos para producir catálisis es verdaderamente la principal distinción de los enzimas respecto de los catalizadores químicos. Esta combinación de atracciones y repulsiones que media dichas interacciones, constituye lo que Jencks describió con brillantez como el “*efecto Circe*”, para referirse a la capacidad que tienen los enzimas de usar estas fuerzas intensas para atraer al sustrato al centro activo, donde sufre la transformación de su estructura, su desestabilización y, por ende, su conversión en producto; por comparación con la atracción que la hechicera Circe de la Odisea ejercía con sus encantamientos, sobre los compañeros de Ulises en la isla de Ea para convertirlos en cerdos. El efecto Circe contribuye adicionalmente a entender el tamaño tan considerable de los enzimas, pues en palabras de Jencks “*Este efecto de anclaje suministra una explicación para el gran tamaño de los enzimas ... La energía procedente de las interacciones de unión específicas entre un enzima y un sustrato o coenzima es requerida para llevar a cabo el (altamente improbable) posicionamiento de los grupos reactivos en la forma óptima y tal unión requiere un alto grado de estructura tridimensional y un amplio área de interacción*”<sup>13</sup>. Esta hipótesis ha sido verificada en diversos enzimas, recientemente con la orotidín monofosfato descarboxilasa (Wu et al., 2000) mencionada anteriormente.

A partir de aquí podemos reflexionar, de manera sucinta, sobre lo más básico de los mecanismos moleculares para la utilización de la importante energía de ligamiento. Para ello es preciso volver a la idea elegante de Emil Fischer en 1894, proponiendo en base a sus estudios que los enzimas son estructuralmente complementarios a los sustratos, de manera que ambos se ajustan como una llave y una cerradura. Sin embargo -y a pesar de su gran

---

<sup>13</sup> “This anchoring effect provides a rationale for the large size of enzymes... Energy from the specific binding interactions between an enzyme and a substrate or coenzyme is required to bring about the (highly improbable) positioning of reacting groups in the optimum manner and such binding requires both a high degree of three-dimensional structure and a large interaction area” (Jencks, 1975, p. 296)

clarividencia-, este modelo puede llevar a error al aplicarlo a la catálisis enzimática, si se tienen en cuenta los razonamientos que se acaban de hacer. Un enzima con su centro activo enteramente complementario a su sustrato sería un catalizador verdaderamente pobre, puesto que lo ligaría tan estrechamente que virtualmente impediría la transformación de su estructura para alcanzar el necesario estado de transición. Mas aún, si la unión del enzima y el sustrato fuese estrictamente de esa manera, no se entiende cómo es posible que el enzima catalice también -y en la misma proporción- la reacción opuesta, esto es, la transformación del producto en sustrato -puesto que todas las reacciones son reversibles por definición (al menos en el tubo de ensayo)-, teniendo el producto una estructura obviamente diferente de la del sustrato. Estos y otros hechos, llevaron a John B. S. Haldane (1892-1964) y a Linus Pauling (1901-1994) a proponer que para que la catálisis tenga lugar, el centro activo del enzima debe ser complementario no al sustrato, sino al estado de transición (Haldane, 1930; Pauling, 1946), de manera que no es hasta que éste se alcanza cuando se puede disponer de la máxima energía de ligamiento. Esto hace que la distinción mencionada más arriba entre los aminoácidos -o los grupos químicos- del centro activo, en el sentido de que unos intervendrían sólo en la unión o ligamiento del sustrato y otros exclusivamente en la catálisis, sea en gran parte artificial, puesto que, como vemos, la catálisis requiere de la máxima afinidad en el ligamiento, lo que sólo se logra con el estado de transición (Miller y Wolfenden, 2002).

Por otro lado, en la cercanía de los años 1960, se comenzaron a acumular observaciones importantes sobre las características de especificidad de numerosos enzimas que el modelo -excesivamente rígido- de la llave y la cerradura no explicaba. Estas aparentes anomalías se referían al hecho de que compuestos muy parecidos al sustrato de un enzima dado -aunque estructuralmente más pequeños-, conteniendo los grupos químicos que son transformados cuando se convierte en producto, no se comportan como tales sustratos, a pesar de que entran perfectamente en el centro activo, tanto que de hecho compiten con el sustrato por dicho centro. Para explicar estas observaciones, Daniel E. Koshland propuso la noción de que el enzima no tiene una estructura complementaria a la del estado de transición en ausencia de sustrato, sino que la presencia de este último induce un cambio en la conformación del centro activo -a costa de una fracción de la energía de ligamiento-, que hace posible la puesta en contacto de los grupos catalíticos del enzima con los grupos reactivos del sustrato, alineándolos en la orientación correcta para optimizar al máximo el contacto y adquiriendo entonces el centro activo la estructura complementaria al estado de transición (Koshland, 1958; Koshland and Neet 1968), a la vez que se genera energía de interacción

adicional para la desestabilización de dicho estado de transición y la consiguiente catálisis (Jencks, 1975). Aquellos tipos de compuestos que -en contra de lo esperado- no actúan como sustrato, carecerían entonces de los grupos funcionales que promueven el cambio en la estructura del enzima. Este cambio conformacional -proporcionado por la energía derivada de las interacciones de estos grupos con el enzima-, es lo que se denominó como el modelo del *ajuste inducido* (*induced fit*), que hace posible la conversión del enzima en su forma activa, una vez que el sustrato está presente. Esta noción pone claramente de manifiesto el papel fundamental de la flexibilidad de los enzimas para ejercer su función, contribuyendo a la especificidad y a su poder catalítico (Koshland, 1976). Flexibilidad que les confiere precisamente su naturaleza como proteínas. Dada la movilidad limitada de los enlaces químicos que componen este tipo de macromoléculas, resulta lógicamente necesario que sean proteínas de gran tamaño, puesto que sólo así puede lograrse la cierta flexibilidad que contribuye a la efectividad catalítica.

La teoría del ajuste inducido tuvo una demostración brillante por Alberto Sols y sus colaboradores Gertrudis de la Fuente y Rosario Lagunas en nuestro país con la hexokinasa de levadura, el enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa a expensas de ATP, la reacción que permite a la célula utilizar este azúcar. Estos investigadores encontraron que azúcares muy parecidos a la glucosa -pero que no son sustratos de la hexokinasa-, provocaban, sin embargo, un gran incremento en su capacidad de hidrolizar el ATP al entrar en el centro activo, lo que sólo era explicable sobre la base de que inducían un cambio conformacional que hace activo al enzima, mostrando así que ese era el mecanismo a través del cual actúa el propio sustrato (DeLaFuente et al., 1970). Años más tarde, Thomas A. Steitz y su grupo demostraron la existencia física de este cambio en la estructura tridimensional de la proteína, al conseguir cristalizar la hexokinasa de levadura en ausencia y presencia de glucosa. (Anderson et al., 1979). Existen numerosos ejemplos de reacciones enzimáticas interpretadas en términos del ajuste inducido (Koshland and Neet 1968), habiéndose evaluado últimamente con precisión en varios casos la contribución que la movilidad de la estructura proteica hace a la catálisis (Hammes-Schiffer and Benkovic, 2006). Hoy sabemos, que este proceso va mucho más allá de los enzimas; en realidad, la función de cualquier proteína en dependencia de la unión de un ligando específico, está mediada por el cambio que la unión de ese compuesto induce en su estructura.

Es importante constatar que el cambio estructural implicado en este mecanismo, aunque a veces es de extensión amplia, no suele serlo así en muchos de los casos debido a lo ya mencionado de la flexibilidad limitada de las proteínas,

afectando solamente a una región del enzima. Generalmente se trata de cambios conformacionales pequeños, tanto que cuando se lograron resolver las dos primeras estructuras tridimensionales de enzimas mediante cristalografía de rayos X, la de la lisozima y la ribonucleasa (Blake et al., 1965; Wyckoff et al., 1967) en ausencia y presencia de sustratos, prácticamente no se dio importancia a los pequeños cambios estructurales que se detectaron, sin percatarse de su trascendencia funcional. Se han descrito cambios conformacionales tan reducidos como de sólo un angstrom de extensión, y sin embargo suficientes para producir catálisis (Koshland, 1998). Esto explica un hecho -en principio sorprendente-, como el que enzimas en estado cristalino muestren actividad catalítica, razón por la cual cuando se determina la estructura cristalina de un enzima en presencia de algún componente de la reacción suele ser acomplejada al producto, dado que en el tiempo -generalmente amplio- que dura la adquisición de datos de rayos X se ha consumido el sustrato. En ocasiones, las velocidades de reacción que se alcanzan con enzimas cristalinos son incluso similares a las que se observan en solución acuosa (Vas et al., 1979; Geremia et al., 2002); en otras en cambio, se presentan restricciones debidas a que la cristalización seleccione una de las conformaciones particulares del enzima (Fersht and Requena, 1971). Quiere esto decir que es suficiente la mínima movilidad promovida por las vibraciones atómicas en el cristal, como para inducir el cambio estructural necesario para que la catálisis tenga lugar en este estado. De hecho, ese cambio explica la no infrecuente fractura de los cristales de enzimas cuando se obtienen en presencia de sustrato (Koshland and Neet 1968). Sin embargo, es esencial dejar claro en este punto que la limitación en la flexibilidad de las proteínas, lejos de ser un inconveniente para los enzimas es, por el contrario, altamente ventajoso. Un enzima completamente flexible difícilmente distinguiría si liga el sustrato o el estado de transición, lo que reduciría la afinidad por este último, con la consiguiente reducción en la eficacia catalítica (Narlikar and Herschlag, 1997). Un cierto grado de rigidez -dado por el hecho de que los enzimas suelen ser proteínas globulares más que fibrosas, y muy compactas-, es paradójicamente necesario para maximizar la especificidad de las interacciones con el estado de transición, de manera que la eficacia de los catalizadores biológicos, aunque precisa sin duda de flexibilidad, también requiere rigidez; digamos esto último en honor a Emil Fischer. El gran tamaño de los enzimas constituye, pues, seguramente, una manifestación del requerimiento de flexibilidad limitada en los enzimas.

Finalmente, y en este orden de consideraciones, el elevado tamaño de las proteínas enzimáticas hace posible la creación en su superficie -a lo largo de la evolución- de nuevos sitios de unión para otros ligantes específicos diferentes del sustrato -e incluso múltiples y distintos entre sí-, que al unirse

al enzima modifican su actividad aumentándola o disminuyéndola. Este es el caso de los enzimas alostéricos (Monod et al., 1963), mencionado en el primer apartado de este discurso. Es importante señalar que este extraordinario sistema de regulación, el control alostérico, supone una extensión del mecanismo del ajuste inducido, puesto que la unión de uno de esos compuestos o efectores alostéricos a su sitio específico, provoca igualmente un cambio conformacional que se propaga a través de una ruta estructural precisa hasta el centro activo del enzima, alterando su forma y modificando así su función. El control alostérico es el mecanismo básico de los sistemas de transducción de señales que regulan la actividad biológica, de manera que las proteínas que intervienen en este tipo de sistemas, al recibir una señal mediada por la unión de un compuesto determinado -sea una hormona, un metabolito o un ión-, sufren un cambio en su estructura que modifica su capacidad de unir un ligante específico diferente -un substrato dado, si es un enzima-, o bien otra proteína, a la que transmite la señal recibida y en la cual se genera un nuevo cambio conformacional que modifica su función. El hallazgo reciente de interacciones alostéricas en la proteína receptora de cAMP, que no están mediadas tanto por un cambio conformacional neto, como por una alteración en la propia dinámica de las fluctuaciones en que se mueve su estructura (Popovych et al., 2006), es además un nuevo ejemplo particularmente notable del valor de la flexibilidad de las proteínas para comprender su función.

La multiplicidad de grupos funcionales constituidos por las cadenas laterales de los aminoácidos en la estructura proteica, es la base de los cada vez más numerosos ejemplos de las interacciones que los enzimas pueden establecer con otras proteínas, lo que -entre otras posibles consecuencias- les lleva en algunas ocasiones a ejercer una función diferente de su propia actividad catalítica, puesto que se ejerce por aminoácidos diferentes de los que intervienen en el centro activo. Constituyen este grupo las que se han dado en llamar "*moonlighting proteins*", esto es, proteínas con un trabajo extra, distinto del genuino que les es propio, y de las cuales la inmensa mayoría de las descritas son enzimas (Jeffery, 2003). Nosotros mismos encontramos uno de estos casos (Orosz et al., 1999), cuando sólo se consideraban como una rareza. Aunque este aspecto es de sumo interés, no nos adentraremos en ello al ser ajeno en sentido estricto a la propia función catalítica.

### **3.3. Ribozimas, desoxirribozimas y abzimas.**

El que todos los enzimas son proteínas es una regla a la que en los años 1980 se le encontró una pequeña, pero extraordinariamente interesante, excepción: la de un grupo restringido de moléculas de ácidos ribonucleicos

(RNA) con capacidad catalítica y a las que por ello se les dio el nombre de *ribozimas*. Este hallazgo se realizó en 1981 y 1982, cuando Thomas R. Cech y sus colaboradores encontraron que, sorprendentemente, un rRNA del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* era capaz de catalizar su propio procesamiento en ausencia completa de proteína (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982). En el caso de muchas bacterias y virtualmente en todas las células eucarióticas, la hebra de RNA recién sintetizada a partir del DNA nace en forma de un precursor -o transcrito primario-, cuya longitud es superior a la de la molécula finalmente activa para su función genética, que constituye el llamado RNA maduro. La conversión del RNA precursor en su forma madura, o procesamiento del RNA (*splicing*), consiste en la escisión del enlace fosfodiéster que une entre sí a los nucleótidos integrantes de esta molécula en varios sitios de la misma, eliminándose así diversos fragmentos sobrantes (los llamados *intrones*) y la posterior unión -a modo de empalme- de los fragmentos restantes (conocidos como *exones*) para generar de forma sucesiva la hebra final del RNA maduro, en un proceso similar al del montaje de una película. En el caso de los mRNA, los intrones no codifican para la proteína correspondiente, cuya secuencia codificante completa aparece ya de forma continua una vez reunidos los diversos exones en el mRNA maduro. El procesamiento del RNA es llevado a cabo generalmente por enzimas normales, esto es, constituidos por proteínas, pero no así en el caso primeramente descubierto por Cech con un rRNA de *Tetrahymena*, en que ese mismo RNA autocataliza su procesamiento llevando a cabo los dos tipos de reacciones implicadas en este proceso. Hasta hoy, sólo unos pocos ribozimas se han detectado en la naturaleza, encontrándose generalmente -además del caso mencionado y de la ribonucleasa P de *Escherichia coli*- en los genomas de virus RNA y de virus asociados con RNA, catalizando el autoprosesamiento o bien la autoescisión de algunos RNAs (Joyce, 2004).

El repertorio de reacciones enzimáticas que pueden ser catalizadas *in vitro* por ribozimas se ha ampliado -y continua haciéndolo- a otros ejemplos, como la formación de enlaces carbono-carbono y de tipo amida o de enlaces peptídicos, la adición de metales a porfirinas y otros, aunque no infrecuentemente con aumentos de velocidad relativamente bajos (Narlikar and Herschlag, 1997; Wilson and Szostak, 1999). El descubrimiento de los ribozimas mostró que el RNA es capaz de servir no sólo como transmisor de la información genética (mRNA y tRNA), sino también como catalizador al modo de las enzimas convencionales, con los que comparten en gran medida sus características básicas, tratándose, pues, de verdaderas enzimas. Este hallazgo le valió el Premio Nobel a Thomas R. Cech en 1989 y fue un hito en la comprensión de los fenómenos biológicos, abriendo un nuevo campo

dentro de la enzimología. Por otro lado, el descubrimiento de los ribozimas promovió una verdadera revolución en la comprensión de la función del RNA y, en particular, del origen de la vida, pues planteó la hipótesis interesante de que haya existido “un mundo de RNA” en la transición de la química prebiótica a la vida, en el que las moléculas de RNA fuesen precursoras de las primitivas formas de vida anteriores a la evolución del DNA y las proteínas. En este mundo previo, el RNA suministraría la catálisis suficiente para su autorreplicación y, posteriormente, para la propia síntesis de proteínas. Se abriría así el paso hacia la aparición de las proteínas enzimáticas, relegando a los ribozimas en la lucha evolutiva y ampliando extraordinariamente con máxima eficacia el tipo de transformaciones químicas catalizadas, base de la vida. Esta hipótesis no está probada, aunque la hacen cada vez más sugerente muchas de las investigaciones en este campo (Moore, 1992; Wilson and Szostak, 1999); si bien es de reseñar que también se han puesto reparos a la misma, no siendo el menos importante la dificultad de que el RNA se sintetizase en cantidades significativas en la tierra primitiva, como para que la vida se iniciase enteramente sobre este tipo de moléculas antes del origen de las proteínas (Joyce, 1989). En cualquier caso y al abrigo de estas consideraciones, los ribozimas suelen contemplarse en muchas ocasiones como los restos -a modo de fósiles- descendientes de la primitiva era pre-proteica. Esto ha sido apoyado además por su rareza en organismos más evolucionados. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que no sea necesariamente así en todos los casos. Se han encontrado ribozimas en genes codificantes de proteínas, cuyas características hacen pensar que puedan jugar también un papel regulando la expresión génica (Teixeira et al., 2004). Más aún, se han aislado recientemente varios RNAs codificados por el genoma humano que autocatalizan su escisión, estando dos de ellos presentes en todos los mamíferos (Salehi-Ashtiani et al., 2006), lo que sugiere que algunos ribozimas han evolucionado en organismos modernos mucho después del posible mundo de RNA.

Los ribozimas constituyen, pues, un ejemplo excepcional en la catálisis biológica. Es pertinente entonces la pregunta de por qué a lo largo de la evolución, prácticamente la universalidad de los enzimas surgieron como proteínas y no como RNAs catalíticos. Los ribozimas comparten, no obstante, con los enzimas de naturaleza proteica lo más básico de la estrategia catalítica. Así, poseen afinidades por sus substratos -las secuencias de nucleótidos sobre las que actúan- con valores similares a los de los enzimas convencionales, son marcadamente específicos y responden a variaciones en la concentración de substrato de forma similar (Cech and Bass, 1986; Wilson and Szostak, 1999); incluso algunos de ellos catalizan dos tipos de reacciones diferentes, algo que sólo los enzimas proteicos más refinados

ejecutan. Al igual que las proteínas, el RNA tiene estructura secundaria y terciaria que le capacita para formar centros activos eficientes, en los que tienen lugar interacciones no covalentes con el sustrato, que facilitan igualmente la formación de un estado de transición y su desestabilización. Se ha mostrado que RNAs catalíticos utilizan análogamente la energía de ligamiento para llevar a cabo la catálisis, como ha sido descrito con el ribozima llamado “cabeza de martillo” y con los intrones del grupo I (Narlikar and Herschlag, 1997), o con los ribozimas del virus de la hepatitis delta (Shih and Been, 2002); detalle que apoya que, efectivamente, el empleo de este tipo de energía es la característica general de los catalizadores biológicos. Sin embargo, el poder catalítico es con frecuencia claramente inferior en los ribozimas, aunque algunos de ellos, como la RNasa P o los intrones del grupo I, logran aumentos de la velocidad de reacción de alrededor de  $10^{11}$  veces respecto a la reacción no catalizada, lo que está en el rango de muchas enzimas convencionales. Son precisamente estos los ribozimas más grandes, recuérdese a este respecto lo reseñado más arriba sobre el requerimiento del tamaño para la eficacia catalítica. Si bien, aun en estos dos casos, el valor de aceleración que alcanzan es unas 1000 veces menor que el incremento de velocidad provocado por ribonucleasas proteicas (Narlikar and Herschlag, 1997). Apunta esto ya, a que hay diferencias esenciales entre estos dos tipos de catalizadores, las cuales contribuyen sin duda a que las proteínas enzimáticas lideren la catálisis biológica. La más importante -y más obvia- atañe a la mucho mayor diversidad de grupos funcionales en las proteínas que en el RNA; las primeras son polímeros de 20 aminoácidos diferentes, lo que suministra una gran variedad de grupos colaterales que no están presentes en los RNAs, constituidos a base de sólo 4 nucleótidos diferentes, cuyos grupos funcionales son además similares. Se ha señalado que esta fuerte reducción de diversidad de grupos funcionales en el RNA limita su empaquetamiento respecto a las proteínas, mucho más densamente empaquetadas y por tanto con un grado substancialmente mayor de rigidez en el centro activo -rigidez paradójicamente clave para la eficacia catalítica, como se indicó anteriormente-, y por ello con mayor afinidad para el posicionamiento del sustrato en el centro activo de la que pueden alcanzar incluso los mayores RNAs (Narlikar and Herschlag, 1997; Wilson and Szostak, 1999). Esta menor diversidad de grupos funcionales del RNA limita además muy severamente el tipo de reacciones que puede catalizar y la variedad de sustratos sobre los que actúa, de manera que su versatilidad catalítica es claramente reducida. Los ribozimas están, pues, mucho menos adaptados como para dirigir la extraordinaria diversidad de reacciones que median la actividad vital, por lo que es comprensible que a lo largo de la evolución las proteínas fuesen seleccionadas como catalizadores frente al RNA.

Al poco de descubrirse los ribozimas, se comenzó a especular sobre la posibilidad de que moléculas de DNA -cuya función es la de almacenar la información genética- pudiesen también ejercer catálisis; se trataría así de *desoxirribozimas* o *DNAzimas*. Aunque no existen desoxirribozimas naturales conocidos, puesto que la mayor parte de los DNAs biológicos son de doble cadena y por tanto con sus grupos químicos funcionales ocupados en el apareamiento de ambas hebras, en 1994, Breaker y Joyce, empleando métodos de selección in vitro a partir de grandes poblaciones de secuencias al azar de DNA monocatenario, aislaron el primer DNA capaz de catalizar la escisión específica -dependiente de plomo- de RNA a nivel de uno de sus enlaces fosfodiéster, con una velocidad de unas 1000 veces superior a la de la reacción no catalizada (Breaker and Joyce, 1994). Más tarde, se han aislado igualmente algunos otros desoxirribozimas que rompen también RNA en dependencia de metales -actuando de cofactores-, como calcio, magnesio o zinc (Wilson and Szostak, 1999), e incluso dependientes del aminoácido L-histidina (Roth and Breaker, 1998), lo cual es interesante, puesto que la cadena lateral de este residuo interviene con frecuencia en la catálisis de enzimas convencionales, como es el caso de la propia ribonucleasa A (Walsh, 1979). Recientemente se han producido combinaciones de un desoxirribozima y el ribozima cabeza de martillo, capaces de escindir RNA con actividad superior a la de cada uno de los miembros por separado (Sheng et al., 2007). Sin embargo, los DNAzimas generalmente actúan con velocidades muy inferiores a las de sus enzimas proteicas equivalentes, exhibiendo constantes catalíticas en torno a un millón de veces más reducidas (Joyce, 2004), por razones similares a lo ya reseñado para los ribozimas, como es, seguramente, el escaso rango de grupos funcionales y la menor capacidad de compactación en comparación con los enzimas proteicos. No obstante, la búsqueda de desoxirribozimas más activos, al igual que de ribozimas, es objeto de intenso interés hoy día, puesto que podrían utilizarse como herramientas en la rotura de RNAs a emplear en células aisladas e incluso en organismos enteros con objeto de silenciar la expresión de genes determinados.

Pero no termina con esto el catálogo -si bien reducido, no por ello menos interesante-, de moléculas biológicas con actividad catalítica diferentes de los enzimas convencionales. Hace casi 60 años, Linus Pauling llamó la atención sobre la similitud de los enzimas y los anticuerpos (citado en Hilvert and Hill, 1991), en el sentido de que puesto que según su propuesta -y la de Haldane- (Haldane, 1930; Pauling, 1946), los enzimas actuarían estabilizando el estado de transición, al que ligan con la máxima afinidad, sería esperable entonces que un anticuerpo que reconociese un compuesto parecido a este estado tuviese actividad catalítica sobre el mismo. William P. Jencks fue el primero en suge-

rir en 1969, que este principio podría explotarse para la obtención de anticuerpos catalíticos (Jencks, 1969). Aunque los anticuerpos son inmunoglobulinas que no catalizan normalmente reacciones químicas, son ciertamente proteínas que, al igual que los enzimas, ligan -con muy elevada afinidad de hecho- los antígenos contra los que están dirigidos y con especificidad exacta, interviniendo además en la unión interacciones químicas similares a las que tienen lugar en los centros activos de los enzimas. De hecho, estudios estructurales han revelado que los tamaños y formas básicas de los centros activos son bastante parecidos a los de los sitios de unión del antígeno en los anticuerpos (Hilvert and Hill, 1991). Dada, por otro lado, la espectacular diversidad inherente al sistema inmune, no era, pues, irrazonable esperar que se pudiesen obtener anticuerpos con actividad catalítica intrínseca. Y efectivamente, trabajos pioneros en los laboratorios de Richard A. Lerner y Peter G. Schultz en 1986 (Tramontano et al., 1986; Pollack, et al., 1986), lograron conseguir los primeros anticuerpos catalíticos al generarlos contra antígenos cuya estructura simulaba el estado de transición de reacciones de transferencia de grupos acilo, y para los cuales se acuñó el nombre de *abzimas* (*abzymes*, de la fusión con parte de la palabra inglesa para anticuerpo, *antibody*). Posteriormente se obtuvieron anticuerpos que catalizan una variedad relativamente amplia de reacciones químicas (Hilvert and Hill, 1991; Shokat and Schultz, 1991), cuya lista continua creciendo. Los abzimas exhiben afinidades y grados de especificidad que en el caso de anticuerpos monoclonales son incluso mayores que las de los enzimas convencionales, mostrando además estereoselectividad. Sin embargo, su poder catalítico suele estar muy por debajo del de los enzimas naturales responsables de las mismas reacciones. Estudios sobre el papel en la catálisis enzimática de las fluctuaciones de la estructura proteica, han sugerido que la menor capacidad catalítica de los abzimas se relaciona con una reducción en la dinámica de su estructura, en comparación con los enzimas convencionales (Kohen et al., 1999), una razón, pues, claramente diferente de la que concurre en el caso de los ribo y desoxiribozimas. De manera que el menor poder catalítico de los abzimas, parece deberse no a una flexibilidad excesiva, sino por el contrario, a una rigidez estructural por encima de la necesaria. No obstante, el desarrollo de anticuerpos catalíticos representa un nuevo, y muy activo, avance en la búsqueda de enzimas artificiales que degraden o generen compuestos específicos, por lo que cuentan con un gran potencial tanto médico como industrial. Quizás la mayor limitación que presenta la obtención de nuevos abzimas viene dada por la dificultad de sintetizar compuestos que simulen estados de transición, de por sí desconocidos en muchos casos (y prácticamente no aislables, dada su extremadamente corta vida media), puesto que implican desentrañar el mecanismo detallado de la reacción, con cuyos datos no siempre se cuenta.

A modo de resumen de este punto podemos concluir, pues, que las proteínas, como catalizadores convencionales, son hoy por hoy imbatibles.

#### **4. LOS ENZIMAS EN LA ERA DE LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL Y EL DISEÑO DE NUEVAS HERRAMIENTAS MÉDICAS**

El descubrimiento en los años 1960 del mecanismo básico de regulación de las vías metabólicas mediante inhibición *feedback* (o por retroalimentación) en las rutas de biosíntesis de aminoácidos en bacterias, de manera que el primero, o uno de los primeros enzimas de la vía, es inhibido por el producto final de la misma (Umberger, 1961; Wilson and Pardee, 1964), y la introducción por Monod, Changeux y Jacob (Monod et al., 1963) del concepto de enzimas alostéricos para llamar a los que son regulados de esa manera, supuso el inicio formal de la búsqueda apasionante para conocer las razones estructurales que dan cuenta de la función y el control de la actividad de los enzimas. La investigación de si los productos finales de una ruta metabólica dada -potenciales efectores alostéricos-, actúan sobre los enzimas que regulan uniéndose a un sitio en su superficie distinto del centro activo, se emprendió en aquellos años utilizando tratamientos más o menos drásticos, como el calor moderado por tiempos cortos, la desnaturalización suave con agentes como la urea, o el empleo de reactivos mercuriales, entre otros, persiguiendo eliminar la acción del efector (inhibición o activación) sin afectar significativamente a la actividad catalítica. El resultado positivo sugeriría fuertemente que el efector opera uniéndose a un sitio diferente del que liga al substrato; lo que se logró demostrar en ocasiones diversas (Gerhart and Pardee, 1962; Gerhart and Schachman, 1965). Un procedimiento algo más específico, y ampliamente utilizado, se introdujo más tarde con el uso de reactivos que modifican químicamente aminoácidos diferentes de manera selectiva, examinando igualmente su efecto sobre una característica reguladora determinada. Este análisis propició, y continúa propiciando (Setlow and Mansour, 1970; Rao et al., 1987), un paso adelante de gran valor en la búsqueda de los motivos estructurales responsables del funcionamiento de los enzimas, alcanzando mayor trascendencia una vez que comenzó a tenerse información sobre la secuencia de aminoácidos de las proteínas enzimáticas. Sin embargo, se estaba lejos todavía de poder estudiar e identificar en detalle los elementos de la estructura proteica que intervienen directamente en la función catalítica y, especialmente, en los mecanismos de modulación de los enzimas reguladores que median el control de la actividad biológica. El acceso a esta investigación vino de la mano del maridaje entre dos extraordinarias innovaciones tecnológicas, señeras del horizonte científico del siglo XX: el desarrollo de la potente

tecnología del DNA recombinante -lo que se dio en llamar ingeniería genética- y el análisis de la estructura tridimensional de las proteínas mediante técnicas de difracción de rayos X, las dos armas poderosas que han abierto la nueva era de la biología estructural.

El desarrollo de las técnicas de aislamiento, manipulación y amplificación de segmentos concretos de DNA (clonación) fue posible gracias al descubrimiento de diversos tipos de enzimas, de los que son de destacar al menos dos. Por un lado, el de los enzimas de restricción específicos, también llamados endonucleasas de restricción de tipo II, que reconocen secuencias específicas de bases en la doble cadena del DNA, cortándola en fragmentos discretos. El primero de estos enzimas, la endonucleasa de restricción *Hind*III de *Haemophilus influenzae* RD, fue aislado por Hamilton O. Smith en 1970 (Smith, H. O. and Wilcox, 1970; Kelly and Smith, 1970), compartiendo por ello el Premio Nobel con Werner Arber y Daniel Nathans en 1978. Se trata de enzimas presentes en bacterias que digieren el DNA de los virus que las infectan, restringiendo así su multiplicación. Por otro, el de las DNA ligasas, que unen entre sí fragmentos de DNA resultantes del corte con un enzima de restricción determinado; fueron descubiertas en *Escherichia coli* en 1967 (Zimmerman et al., 1967) y con ellas, Paul Berg, en 1972, consiguió unir (recombinar) fragmentos de DNA de orígenes diferentes (Jackson et al., 1972), con lo que logró obtener la primera molécula de DNA recombinante, por lo que obtuvo igualmente el Premio Nobel en 1980. Utilizando estos avances, los trabajos pioneros de Herbert Boyer y Stanley N. Cohen en 1973, con el desarrollo de vectores adecuados (virus y plásmidos) y de células receptoras apropiadas que portan la maquinaria enzimática necesaria para la replicación del DNA, junto con el diseño de sistemas de selección de las células portadoras del fragmento de DNA de interés y de las metodologías de secuenciación del mismo, se completó la batería básica de herramientas que constituyeron la tecnología del DNA recombinante. Tecnología que ha revolucionado la bioquímica y ha permeado la gran mayoría de la investigación en cualquiera de las ciencias de la vida, transformando virtualmente todas las ramas de la medicina, además de la agricultura y la industria. Sobre el núcleo tecnológico inicial, Kary B. Mullis, desarrolló en los años 1980 el ingenioso método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) (Mullis et al., 1986), que permite la obtención con facilidad de billones de copias de un fragmento dado de DNA, y para lo que fue clave el recurso a la DNA polimerasa de organismos termófilos, que es estable frente al calor. Mullis recibió el Premio Nobel en 1993 por el hallazgo de esta formidable metodología de amplificación, cuyo enorme potencial en la biología molecular en general y en la identificación de enfermedades genéticas, detección de patógenos y la

medicina forense, en particular, es notoriamente conocido. La reunión de este poderoso arsenal tecnológico, junto con otros desarrollos específicos y muy especialmente el avance extraordinario en el análisis informático -sin el cual no sería posible emplear estas metodologías, ni manejar el ingente caudal de información que suministran-, ha incidido profundamente en la medicina de hoy, suministrando armas diagnósticas nuevas que permiten la localización de los trastornos genéticos responsables de aquellas entidades patológicas cuya etiología es cada vez mejor conocida a este nivel, incluso con el examen del grado de expresión de numerosos genes en un solo análisis para la detección de procesos oncológicos y de otros tipos, además de la ya iniciada terapia génica. El auge creciente de esta tecnología permitió abordar en los años 1980 una tarea titánica que pudo parecer impensable, como fue la secuenciación del genoma humano, de unos tres mil millones de pares de bases -compárese con los cinco millones del genoma del *E. coli*-, que fue completada en 2003 (Collins et al., 2003) abriendo un panorama de posibilidades e investigación de dimensiones oceánicas. Hoy son ya en torno al millar los genomas secuenciados procedentes de organismos diferentes, y la lista continua creciendo.

Las técnicas de DNA recombinante abrieron horizontes inimaginables a la enzimología, facilitando enormemente el estudio de las características individuales de los enzimas, el examen directo de su valor fisiológico y, por fin, haciendo posible investigar la base molecular de su función. Esta tecnología permite, en primer lugar, la producción de grandes cantidades de enzimas -sin importar lo inaccesibles que puedan ser o lo escaso de sus niveles en la fuente original-, a través de la clonación de sus genes respectivos y la expresión heteróloga de los mismos en células receptoras adecuadas (como bacterias o levaduras), empleando vectores altamente eficientes, y conocer rápidamente su secuencia de aminoácidos, dada la facilidad con que puede obtenerse la secuencia del DNA correspondiente. La producción a gran escala de un enzima facilita extraordinariamente su purificación y por tanto el estudio de sus características, además del valor industrial obvio que semejante producción supone. Sin embargo, el disponer del gen de un enzima dado y conseguir la sobreproducción de la misma, permite algo aún más importante, como es la creación de mutaciones específicas en el gen y poder estudiar con facilidad las consecuencias, que el cambio originado en la secuencia aminoacídica del enzima ha tenido para su estructura y su función. A este fin, Michael Smith introdujo en 1982 la técnica de mutaciones dirigidas por oligonucleótidos -por lo que compartió el Premio Nobel con Mullis en 1993-, que permite la sustitución sistemática de virtualmente cualquiera de los aminoácidos de una proteína de forma individual (Zoller and Smith, 1982). Junto con la posibilidad de introducir igualmente mutaciones más extensas y la creación de proteínas

quiméricas a expensas de fusionar regiones de proteínas diferentes, esta metodología abrió lo que informalmente -y con no excesivo rigor- se conoce como ingeniería de proteínas e ingeniería de enzimas. La producción de mutaciones dirigidas o puntuales -hoy herramienta habitual en los laboratorios dedicado al estudio de las relaciones estructura/función en proteínas- ha hecho realidad el sueño dorado de cualquier enzímólogo, al permitir estudiar la contribución precisa de un aminoácido determinado de la secuencia de un enzima a la formación del centro activo o de cualquier otro sitio ligante, a la catálisis, al mecanismo de la reacción, al efecto de un regulador y a cualquiera de los cambios conformacionales que median su acción y el control de su actividad. No olvidaré la intensa emoción que nos produjo el primer análisis mutacional de un enzima que se realizó en mi laboratorio, gracias al trabajo de Belén Santamaría, Antonio Estévez y Oscar H. Martínez-Costa, el cual -para nuestra sorpresa- dio lugar a la aparición de propiedades extraordinarias que, estando ausentes en el enzima nativo, permitieron averiguar la razón molecular de su comportamiento (Santamaría et al., 2002). Con esta tecnología pueden, pues, generarse características nuevas en los enzimas, entre ellas la mejora de su actividad catalítica, mediante la manipulación adecuada de su centro activo, con el logro de enzimas más eficientes de gran importancia industrial. La manipulación específica del DNA permite igualmente el examen preciso de la función fisiológica de una proteína o un enzima dado, alterando su gen de manera que se impida su expresión e intercambiándolo con el gen normal, obteniéndose así los llamados mutantes nulos, primeramente generados en microorganismos. Más tarde, esta tecnología se amplió a animales enteros a través de la manipulación genética de su línea germinal, produciéndose animales transgénicos en los cuales se haya eliminado la expresión de un gen determinado (animales *knockout* para dicho gen), o bien se haya introducido un gen diferente, metodología por cuyo desarrollo en ratones, Mario Capecchi, Oliver Smithies y Martin Evans han logrado el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2007, y que se ha convertido en un arma potente para investigar directamente la trascendencia funcional de un gen determinado y en herramienta médica para la terapia de enfermedades genéticas.

Si bien es ya posible recorrer la estructura de un enzima para examinar el papel de aminoácidos determinados en la catálisis o en sus mecanismos reguladores, la obtención de la máxima información a este respecto requiere del conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína a través de cristalografía de rayos X, o al menos de la estructura de una isoforma o de una proteína relacionada, con objeto de poder dirigir el análisis sistemático a los elementos de su arquitectura que son de interés potencial. El desarrollo de la cristalografía de proteínas fue la gran obra de Max F. Perutz (1914-2002)

resolviendo la estructura tridimensional de la hemoglobina, que junto con la de la mioglobina, por John C. Kendrew (1917-1997), fueron las primeras proteínas en las que se determinó su estructura cristalográfica, uno de los mayores avances científicos del siglo XX y por el que ambos compartieron el Premio Nobel en 1962. Perutz supo percatarse de que la cristalografía podría revelar los detalles de la estructura a nivel atómico de las grandes moléculas biológicas, como las proteínas; lo que demostró empleando el método del reemplazamiento isomórfico, utilizado previamente para resolver la estructura cristalina de pequeñas moléculas orgánicas, con lo que abrió el camino para la determinación de cualquier molécula cristalina de gran tamaño. Aunque la imagen de rayos X es estática por naturaleza, Perutz fue también el primero que pasó con esta herramienta de la mera estructura de una proteína a la visión dinámica de su función, al lograr averiguar, tras 25 años de trabajo, que es el ligero movimiento del átomo de hierro en el plano del grupo hemo de la hemoglobina al ligar el oxígeno, lo que desencadena el cambio de forma de esta proteína. Estos cambios fueron extrapolables a los que tienen lugar en enzimas, en los que la unión del sustrato tiene características cinéticas similares a la de la unión del oxígeno por la hemoglobina (Perutz, 1970). Quedaron así sentadas las bases para observar luego las modificaciones conformacionales dependientes de la unión de sustrato, predichas por la teoría del ajuste inducido de Koshland, (Koshland and Neet 1968), al igual que para comenzar a verificar a nivel estructural los postulados del control alostérico de enzimas, como ha sido el caso de la fosfofructokinasa de bacterias (Schirmer and Evans, 1990), uno de los primeros ejemplos a este respecto. A partir de aquí, este tipo de estudios se están llevando a cabo en un número cada vez mayor de enzimas reguladores merced a su manipulación genética, en lo que se centra gran parte de nuestra labor investigadora actual (Santamaría et al., 2002; Martínez-Costa et al., 2004; Martínez-Costa et al., 2007).

La obtención a gran escala de proteínas puras con relativa facilidad mediante técnicas de DNA recombinante, el refinamiento de las metodologías de cristalografía de rayos X y el empleo cada vez más amplio de los intensos rayos X emitidos por los sincrotrones han expandido extraordinariamente el alcance de la moderna biología estructural, nacida en 1953 con la resolución de la estructura de la doble hélice del DNA por Watson y Crick, hasta el punto de que el banco de datos de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos, el Protein Data Bank (PDB, en la dirección de internet <http://www.rcsb.org>), contiene hoy depositadas más de 40.000 estructuras diferentes. De esta forma, la potencia del análisis estructural de enzimas ha permitido disecar aspectos de su función hasta hace poco inalcanzables. Baste citar algunos ejemplos a este respecto, como la resolución

reciente del misterio de la acción de las proteasas integrales de la membrana celular, cuyo centro activo se encuentra inmerso en el ambiente sumamente hidrofóbico de la doble capa lipídica, teniendo que incorporar agua en ese lugar para romper el enlace peptídico de las proteínas sobre las que actúan. Misterio aclarado al determinarse la estructura cristalina de una de esas proteasas, la GlpG, de la familia de las proteasas romboidales presentes en muchos organismos, entre ellos en el parásito *Toxoplasma gondii* y en cuya infección -la toxoplasmosis- intervienen; habiéndose encontrado que uno de sus dominios intramembrana -que participa en el centro activo- ofrece una cavidad hidrofílica suficiente como para alojar la molécula de agua necesaria para la hidrólisis del sustrato -el factor de crecimiento epidérmico- dentro de la propia membrana celular (Wang et al., 2006). Con estas armas, se ha solventado muy recientemente otro caso igualmente enigmático, el de la razón de la especificidad de expresión de los llamados genes con impronta (*imprinted genes*) de mamíferos placentarios y plantas en flor, que sólo se expresan en el nuevo ser dependiendo de que su origen sea paterno o materno. Pues bien, la obtención de la estructura y posterior modelación de una DNA metiltransferasa humana que selectivamente silencia el DNA al metilarlo, ha permitido conocer que sólo actúa sobre dinucleótidos de citosina-guanina que se encuentran a una periodicidad en el DNA precisa (de 8 a 10 pares de bases), que es exactamente la que se encuentra en los genes portadores de impronta (Jia et al., 2007). Y para hacerlo aún más difícil, también muy recientemente se ha logrado con estas herramientas algo tan inesperable como predecir la función de una proteína -en este caso un enzima- a partir de su estructura, sin conocer previamente la de ninguna proteína relacionada cuya función se supiese. Esto cobra particular interés ante la multiplicidad de genomas hoy secuenciados, en los que alrededor de la mitad de las secuencias que codifican para proteínas -las pautas de lectura abierta u *open reading frames* (ORFs)-, no se relacionan todavía con ninguna función conocida. Así ha ocurrido con la proteína TM0936 de la bacteria *Thermatoga maritima*, que pertenece por su secuencia a la familia de las amidohidrolasas, y cuya actividad (la reacción que cataliza) era completamente desconocida. Tras resolver la estructura de la proteína recombinante, tuvieron en cuenta el hecho -ya mencionado- de que los enzimas ligan con la mayor fuerza el estado de transición, examinaron varios miles de estructuras correspondientes a potenciales análogos del estado de transición para amidohidrolasas, los cuales modelaron en la estructura tridimensional del enzima usando métodos computacionales hasta encontrar el que mejor se ajustaba, llegando a medir incluso la actividad real del enzima sobre el sustrato correspondiente finalmente identificado (Hermann et al., 2007).

El empleo de inhibidores enzimáticos constituye uno de los pilares básicos en la terapéutica de múltiples procesos patológicos. En su gran mayoría, se trata de compuestos sintéticos cuya estructura suele ser muy parecida a la del sustrato de un enzima dado, o bien a la región del mismo que es esencial para su entrada en el centro activo, de manera que actúan como inhibidores competitivos. Así es el caso de la conocida familia de las estatinas, que inhiben a la HMG-CoA reductasa por ser análogos estructurales de su sustrato, el mevalonato, tan eficaces en el tratamiento de la hipercolesterolemia; de los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (enalapril, captopril, etc) para el tratamiento de la hipertensión arterial esencial; o de los antiinflamatorios no esteroideos inhibidores de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 participantes en la síntesis de prostaglandinas, utilizados en la osteoartritis o la artritis reumatoide, entre otros procesos; por citar algunos de los ejemplos más frecuentes de este tipo en la clínica diaria. En algunas ocasiones se utilizan inhibidores que actúan en realidad como verdaderos sustratos -y generalmente bastante mejores que el sustrato fisiológico-, pero cuyo producto inactiva irreversiblemente al enzima, son los conocidos como inhibidores suicidas; un ejemplo clásico lo constituye el allopurinol, tan socorrido en el tratamiento de la hiperuricemia por ser sustrato de la xantina oxidasa -responsable de la formación de ácido úrico-, quedando el producto de la reacción unido covalentemente al centro activo y por tanto inactivado.

Frente a esta manera clásica en la producción de este tipo de agentes farmacológicos, los avances en el análisis estructural de enzimas han abierto una nueva forma para la obtención de inhibidores mucho más potentes y selectivos, con la posibilidad de prepararlos específicamente para un número cada vez mayor de enzimas diferentes. Se trata de inhibidores diseñados no en base a la estructura de un sustrato u otros compuestos capaces de unirse a un enzima determinado, sino a partir de la propia estructura tridimensional del centro activo, de la predicción estructural del estado de transición o bien de la arquitectura del sitio de unión de un regulador alostérico, generándose así inhibidores mucho más eficaces y específicos, y por ello con efectos colaterales potencialmente más reducidos. Un ejemplo de esta nueva vía en la producción de fármacos se ha señalado a nivel de la glutamato racemasa, un enzima esencial para la biosíntesis de la pared bacteriana y por ello diana apropiada para la búsqueda de drogas antibacterianas. El análisis de su estructura ha permitido conocer en detalle los elementos que intervienen en sus mecanismos reguladores y diseñar varios inhibidores potentes capaces de bloquear la actividad del enzima presente en *Helicobacter pylori* (Lundqvist et al., 2007), el agente responsable de la mayoría de la úlceras gastroduodenales, con lo que pueden abrirse nuevas vías en el tratamiento de este proceso

atacando a la propia infección bacteriana. Particular actualidad en el desarrollo *ad hoc* de nuevas herramientas médicas -en base a datos estructurales de enzimas- están teniendo los estudios recientes a propósito de la acción de los antivirales oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza). Estos compuestos son inhibidores potentes de la neuraminidasa de la superficie del virus de la gripe aviar H5N1, sobre el que existe el temor fundado de que pueda evolucionar hacia una cepa con capacidad infecciosa en humanos en un futuro más o menos cercano y el desarrollo de la consiguiente pandemia, razón por la cual diversas naciones están haciendo acopio masivo de estos fármacos. Ambos inhibidores fueron diseñados a partir de la estructura cristalina del enzima, tras observar que su centro activo era similar en todos los subtipos del virus. Sin embargo, la resolución reciente de la estructura cristalina de neuraminidasas del virus ligadas a los referidos inhibidores, ha puesto en alerta sobre la eficacia general de estos agentes antivirales, al encontrarse que en el enzima de algunos subtipos existe una variación estructural en la cercanía del centro activo, que aunque restringida a una corta región, podría comprometer la acción de dichos agentes, ya que de presentarse en esa zona determinadas mutaciones en las futuras cepas virales los harían ineficaces (Russell et al., 2006) . Esto ha señalado la necesidad de verificar esos posibles cambios de secuencia en las cepas venideras del virus y ha iniciado el diseño de nuevos inhibidores -explotando las características estructurales encontradas-, dirigidos a neutralizar expresamente esa eventualidad.

El deseo de mejorar la eficacia catalítica es omnipresente tanto en la industria como en la investigación biomédica actual, y tanto más si se consideran las posibilidades ingentes que suministran las técnicas de ingeniería de enzimas y análisis computacional. Permítaseme reseñar un caso reciente a este nivel con potencial terapéutico, y no exento de curiosidad, en el que se ha recurrido a simular una situación fisiológica, cual es el aumento de eficacia catalítica que se presenta cuando diversos enzimas se encuentran muy próximos; sea porque formen un complejo -complejos multienzimáticos-, o bien sea porque esas actividades residan en la misma cadena polipeptídica (cada una con un centro activo distinto) -los enzimas multifuncionales-. Pues bien, siguiendo este principio, Oliver Yu del Donald Danforth Plant Science Centre en St. Louis y sus colaboradores, han conseguido mejorar altamente la producción intracelular del antioxidante resveratrol -el compuesto acreditado con los efectos saludables del vino tinto-, fusionando los genes de dos de los enzimas esenciales para su biosíntesis en las uvas y transformando con la construcción correspondiente células de levadura y también células de mamíferos. En las células transformadas no solamente se presentó una producción

elevada de resveratrol, sino además un aumento importante en la vida media de las mismas -seguramente por efecto de este antioxidante- (Zhang et al., 2006), razón por la cual estos estudios son de particular interés en terapias de reemplazo celular, puesto que suelen estar limitadas por la corta vida media de las células transplantadas, como es el caso del trasplante de células beta para el tratamiento de la diabetes tipo I.

El interés creciente por mejorar enzimas preexistentes, u obtener enzimas nuevos, dotados de poder catalítico y grados de especificidad muy elevados, con objeto de preparar reactivos y fármacos de forma más eficiente, ha multiplicado las estrategias en este área. Además de las ya mencionadas, como la producción de anticuerpos catalíticos, hoy han cobrado particular atractivo las técnicas de evolución molecular dirigida mediante la introducción de mutaciones aleatorias en los genes de interés, recombinación de las variantes y selección robótica a gran escala de las propiedades deseadas, con rondas sucesivas de mutación hasta obtener la forma de enzima más adecuada a los objetivos que se planteen (Alcalde, 2003; Aharoni et al., 2005). Muy recientemente, el grupo de Jack W. Szostak del Departamento de Biología Molecular del Massachusetts General Hospital, que tanto ha contribuido a la selección de RNAs catalíticos, han desarrollado una nueva metodología de evolución dirigida de enzimas, conocida como técnica de presentación de mRNA (*mRNA display*), partiendo de mRNAs generados desde genotecas apropiadas, que además de incrementar en varios órdenes de magnitud el número de variantes en las sucesivas rondas de mutación, permite seleccionar enzimas genuinamente nuevos que sean capaces de catalizar un proceso químico deseado (Seelig and Szostak, 2007), esto es, crear enzimas *ad hoc* con objeto de llevar a cabo a gran velocidad una reacción, no existente en la naturaleza, pero que pueda tener un interés particular industrial o farmacológico.

## **5. DE LOS ENZIMAS A LA ENFERMEDAD: LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO EN LA MEDICINA DE HOY**

El que una enfermedad puede deberse a la falta, o al mal funcionamiento, de un enzima fue propuesto por primera vez en 1902 por un médico pediatra, Archibald E. Garrod (1858-1936), a partir de algunos pacientes con alcaptonuria (Garrod, 1902). Una enfermedad rara -considerada entonces infecciosa por algunos (Florkin, 1975)-, que antes incluso de dar sintomatología presenta el signo extraordinario de que la orina se vuelve negra, debido al acúmulo masivo de un compuesto aromático, el ácido homogentísico. Incremento que sólo podía darse tras la ingestión de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina

o la tirosina, o de derivados suyos. Garrod, con gran perspicacia y un bagaje bioquímico llamativamente elevado -por aquella época la bioquímica moderna estaba naciendo, como hemos visto-, recogió las observaciones de que la administración oral de tirosina a alcaptonúricos resultaba en el consiguiente incremento de ácido homogentísico en la orina, y de que cuando era éste el compuesto que se administraba, sólo era excretado al ser ingerido por enfermos con este trastorno (en forma cuantitativa con lo ingerido) y no por sujetos normales. Él mismo administró triptófano -que también contiene un anillo bencénico- a un muchacho afecto de alcaptonuria, sin que hubiera cambio en la excreción de ácido homogentísico, indicando que no era un defecto en el catabolismo del triptófano (Garrod, 1909). Estas observaciones le llevaron a inferir que el ácido homogentísico era un intermedio en la degradación de la fenilalanina y la tirosina, y a concluir con una frase que hoy es historia: *“Podemos llegar a concebir que la rotura del anillo bencénico [del ácido homogentísico] en el metabolismo normal es el trabajo de un enzima especial, [y] que en la alcaptonuria congénita este enzima está ausente”*<sup>14</sup>. Interpretó entonces esta enfermedad como el resultado del bloqueo de una vía metabólica debido a la falta del enzima responsable; un concepto nuevo que extendería a otros trastornos relacionados. El enzima, la homogentisato dioxigenasa, fue encontrado más tarde y la evidencia de su deficiencia real en la alcaptonuria no fue hecha hasta 49 años después de esta predicción (La Du et al., 1958). Pero la sagacidad de Garrod le llevó a otro gran descubrimiento al percatarse de la particular distribución familiar de esta enfermedad, encontrada con frecuencia entre hermanos y hermanas de alcaptonúricos, pero rara vez entre sus padres e hijos, observando además que sus enfermos pertenecían a cinco familias que eran la descendencia de un matrimonio de primos hermanos. Esta es precisamente la distribución esperada si la alcaptonuria se hereda como un carácter recesivo, como le refirió William Bateson (1861-1926) -el que introdujo la palabra *genética*- a quien Garrod consultó, siendo ésta la primera descripción de herencia mendeliana en humanos. De aquí concluyó que este trastorno, debido a la deficiencia congénita de un enzima específico, era causado por la presencia en forma duplicada de un raro “factor mendeliano” (Garrod, 1909), lo que poco después se llamó gen. La consecuencia natural de esta conclusión era que la forma (el alelo) normal del gen alterado tenía que ser el prerequisite necesario para la formación del enzima específico en el organismo sano, pudiéndose establecer, por primera vez, una relación directa entre los genes, las unidades de la herencia, y los enzimas, las unidades de la catálisis (Harris,

---

<sup>14</sup> “We may further conceive that the splitting of the benzene ring in normal metabolism is the work of a special enzyme, that in congenital alkaptonuria this enzyme is wanting” (Garrod, 1909, p. 50).

1963). Estas ideas no las formuló Garrod con esa claridad, pues era demasiado pronto para darse cuenta de que los genes controlan la estructura de los enzimas, pero cristalizarían más tarde con la hipótesis de “un gen-un enzima”, tras los trabajos clásicos de George W. Beadle (1903-1989) y Edward L. Tatum (1909-1975) examinando las condiciones del crecimiento de mutantes del moho *Neurospora crassa*. Al recibir el Premio Nobel en 1958 junto con Tatum y Joshua Lederberg, Beadle reconoció el valor esencial de la obra de Garrod en la evolución gradual hacia la formulación de este concepto (Harris, 1963). Curiosamente, el avance extraordinario de la genética molecular y la progresiva secuenciación de genomas diferentes, han hecho considerablemente difícil definir lo que se entiende hoy por un gen, más allá de una región localizable de secuencia genómica correspondiente a una unidad de herencia; dificultad que ya se inició en 1977 al descubrirse el procesamiento alternativo del mRNA -por el que una misma secuencia de DNA puede codificar para más de una proteína-, modificando el paradigma de “un gen-una proteína”, y que hoy alcanza una complejidad cada vez mayor tras la identificación de genes solapantes, genes dentro de otros genes y otros ordenamientos génicos extraordinariamente variados (Pearson, 2006).

Con la alcaptonuria y tres trastornos más -el albinismo, la cistinuria y la pentosuria-, cuya etiopatogenia seguía una línea similar, Garrod introdujo el concepto de “*errores innatos del metabolismo*” (Garrod, 1908), hoy también conocidos como enfermedades metabólicas o disenzimias, que recogió especialmente en un tratado con ese mismo título (Garrod, 1909), un clásico considerado como uno de los cimientos sobre los que se apoyan los conocimientos presentes de la genética médica. Sin embargo, en su época las leyes de Mendel hacía poco que habían sido redescubiertas por Carl Correns y Hugo de Vries (Fru-ton, 1992) y estaban lejos de ser aceptadas entre los biólogos como clave para entender la herencia; la bioquímica humana estaba en su infancia y sus aplicaciones a la medicina no eran más que una esperanza para el futuro; y los cuatro trastornos que discute en su libro fueron considerados en la medicina de la época como poco más que curiosidades (Harris, 1963).

En poco tiempo, el número de entidades clínicas consideradas como errores innatos del metabolismo, en el sentido concebido por Garrod, comenzó a crecer progresivamente y con ello la notoriedad de su libro, que permaneció como referencia esencial hasta 1960. En ese año, este fundamento se expande con la compilación más notoria hasta ese momento de enfermedades metabólicas: el pronto célebre tratado editado por Standbury, Wyngarden y Fredrickson sobre las bases metabólicas de las enfermedades hereditarias titulado “*The Metabolic Basis of Inherited Disease*” (Stanbury et al.,

1960), que recoge 78 errores metabólicos congénitos en unas 1500 páginas. La identificación de centenares de trastornos de este tipo contribuye a que la última edición de esta obra -la octava, en 2001- ocupe 4 volúmenes y más de 6000 páginas (Scriver et al., 2001). La evolución de esta magna obra marcó un hito de trascendencia médica fundamental a partir de su séptima edición de 1995, pilotada ya por Charles R. Scriver, al pasar a referirse en su título a las bases moleculares, además de metabólicas, de las enfermedades hereditarias: “The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease”. El cambio es esencial, implicando una clara orientación molecular que permitió incluir procesos no metabólicos, esto es, más allá de los estrictamente relacionados con los clásicos errores innatos del metabolismo, mediante el análisis molecular de las variaciones genéticas que causan o predisponen a la enfermedad. Como los editores señalaron, la obra se convirtió entonces en un verdadero tratado de medicina molecular, y más en particular por lo que a la descripción de los mecanismos etiopatogénicos se refiere, prediciendo que en el futuro, los textos clásicos de medicina se parecerán cada vez más a este libro (Scriver et al., 1995).

Es, sin embargo, necesario poner un punto de contención a la hora de considerar la avalancha de observaciones que el análisis molecular suministra hoy a la medicina, puesto que la actual recopilación sistemática de alteraciones genéticas hereditarias en un número extraordinario, incluye entre ellas todas las variaciones genéticas asociadas a una misma proteína (McKusick, 2007), que en ocasiones son centenares y cuyo cuadro clínico es con frecuencia similar. Merece la pena recoger las palabras a este respecto de Alberto Sols, esclarecedoras, como en él solían ser, pronunciadas hace casi 20 años: *“el número real de enfermedades es mucho menor que el de variantes moleculares...Para la Medicina actual y de un futuro previsible la mayoría de las variantes carecen de interés específico: lo que cuenta es el trastorno funcional”* (Sols, 1989).

Clarificado este aspecto, resulta casi obvio señalar las cada día mayores dimensiones que el impacto del nivel molecular imprime ya en la clínica de hoy, arrojando luces y perspectivas más amplias a virtualmente todas las enfermedades. La genética es en realidad la nueva frontera de la medicina, de manera que raro es el número de cualquier revista médica líder que no incluya uno o varios artículos relacionados con enfermedades congénitas (Levy, 2005).

En cualquier caso -y es lo que más me interesa resaltar de este último apartado-, la importancia de los errores innatos del metabolismo trasciende de su mayor o menor rareza, puesto que además de llevar con su conocimiento al diagnóstico correcto de una entidad clínica, ponen en manos del médico

perspicaz y el investigador profesional los fenotipos preciosos de mutaciones a las que, obviamente, sólo por esta vía podemos acceder, por lo que suministran un camino esencial para avanzar en el conocimiento de la biología humana normal -como de hecho ya ocurrió con los propios descubrimientos de Garrod-, y ponen con frecuencia de manifiesto implicaciones más amplias de lo que puede ser un trastorno metabólico raro. Merece la pena destacar unos pocos ejemplos recientes, entre los muchos hoy conocidos, que señalan el interés cada vez mayor del estudio de estas alteraciones para la medicina actual.

Así, el hallazgo de una disminución dramática de glutamina en sangre -el aminoácido que normalmente alcanza niveles mayores-, debida a una deficiencia del enzima glutamina sintetasa -que convierte el glutamato en glutamina-, ha evidenciado el valor esencial de la interacción entre neuronas y astrocitos para la síntesis de neurotransmisores (Häberle et al., 2005). El estudio se realizó en dos lactantes sin relación familiar, con un trastorno cerebral profundo acompañado de deformaciones cerebrales, que les llevó a la muerte en el periodo neonatal, encontrándose en ambos una mutación puntual diferente en la cercanía del centro activo del enzima. Al ser el glutamato el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, que no puede entrar en las neuronas, este trastorno ha mostrado como la glutamina sintetizada en los astrocitos es la que accede a las neuronas para ser hidrolizada a glutamato por acción de la glutaminasa, de manera que el déficit de glutamina sintetasa en los astrocitos rompió la interacción entre ambos tipos celulares, impidiendo la formación del neurotransmisor y provocando la enfermedad.

La descripción de un trastorno de la plasticidad mitocondrial, ha ilustrado poderosamente sobre el valor fisiológico y clínico de un proceso cuya relevancia no estaba establecida con anterioridad. Las mitocondrias son organelas subcelulares que coordinan numerosos procesos metabólicos, incluyendo los que implican la producción del ATP necesario para todos los eventos celulares dependientes de energía. Aunque estas organelas se visualizan como elementos estáticos, están sometidas a procesos dinámicos de fusión y fisión mediados por diferentes enzimas, de los que la GTPasa DLP1 interviene en la fisión mitocondrial. El que estos procesos son clínicamente relevantes, lo ha puesto de manifiesto el encuentro muy reciente de una enfermedad letal (Waterham, 2007), causada por una mutación inactivante de ese enzima DLP1 en un lactante con alteraciones severas en el desarrollo y aberraciones metabólicas diversas, que falleció a los pocos días de nacer y en el que se detectó el déficit consiguiente de la fisión mitocondrial, evidenciando así que este proceso implica funciones que son verdaderamente esenciales para la vida.

En ocasiones, la atención clínica de una alteración metabólica facilita la comprensión integral de la enfermedad, al revelar conexiones desconocidas entre patologías diferentes. Así se ha manifestado a raíz del éxito terapéutico en un caso de deficiencia de mevalonato kinasa. Este trastorno, el primero descrito en la biosíntesis del colesterol, conduce a aciduria mevalónica y se caracteriza por ataques periódicos de fiebre intensa, inflamación y retraso psicomotor, entre otras alteraciones importantes, pudiendo originar un síndrome de hiperinmunoglobulinemia D. Paradójicamente, los niveles de colesterol asociado a lipoproteínas, apolipoproteínas y ácidos biliares primarios son normales en estos pacientes, lo que se explica por un aumento compensatorio de HMG-CoA reductasa y del receptor de colesterol-LDL, que son los reguladores clave de la síntesis del colesterol. El empleo de estatinas para inducir depleción de mevalonato, aunque mejora algunos síntomas, conduce a veces a una mayor descompensación clínica. El pronóstico de este trastorno es generalmente sombrío. Sin embargo, ante un caso particularmente grave, un niño de 3 años de edad con ataques febriles e inflamatorios incontrolables y amenaza severa de la vida, un trasplante alogénico de médula ósea para corregir la función inmunitaria, redundó en mejoría dramática de forma inmediata a la intervención (Neven et al., 2007). Además de ofrecer una opción terapéutica nueva, este caso ha mostrado la existencia de un vínculo singular entre un error innato del metabolismo, los efectos adversos de la estatinas y los trastornos reumáticos e inflamatorios.

En el apartado anterior, se refirió como la introducción de mutaciones dirigidas a aminoácidos específicos de la secuencia de un enzima permite examinar su contribución al centro activo, o a los mecanismos de control de su actividad. Por la misma razón, la identificación de mutaciones en el gen de un enzima, cuya deficiencia provoca un trastorno metabólico determinado, se ha convertido en un arma extraordinariamente valiosa para el análisis estructural de su función. Un ejemplo llamativo lo ha constituido la enfermedad de Canavan, un trastorno neurodegenerativo progresivo con desmielinización y deterioro espongiiforme de la sustancia blanca del cerebro, que lleva a la muerte en la primera década de la vida. Se trata de una alteración del metabolismo del aspartato motivado por la deficiencia de aspartoacilasa en los oligodendrocitos, reduciéndose la síntesis de lípidos necesaria para la formación de mielina. En esta enfermedad se han descrito unas 40 mutaciones a nivel del gen de la aspartoacilasa cuya estructura tridimensional ha sido resuelta recientemente, lo que ha permitido, por primera vez, localizar en la misma las mutaciones clínicas conocidas y correlacionarlas con el papel funcional de muchos de sus aminoácidos, facilitando así entender los mecanismos por los que los defectos genéticos conducen a los síntomas de esta enfermedad

mortal (Bitto et al., 2007) y diseñar ensayos de terapia génica, algunos de los cuales se encuentran actualmente en curso.

Y finalmente, la deficiencia de un enzima cuyo análisis ha contribuido al conocimiento de la fisiopatología de una enfermedad de origen desconocido. En este caso, un enzima verdaderamente de moda, del que con frecuencia se oye hablar incluso en los medios normales de difusión pública: la telomerasa. Enzima descubierto hace poco tiempo, que añade secuencias de DNA repetidas a los extremos de los cromosomas, los telómeros, los cuales se acortan si la telomerasa pierde actividad, fenómeno que lleva a la senescencia, observada en células en cultivo incluyendo células humanas. A partir de aquí, se sabe ya que la telomerasa y los telómeros son centrales para la biología del cáncer -donde la inhibición de este enzima se plantea como una estrategia terapéutica viable-, las células madre, el envejecimiento y otros procesos (Artandi, 2006), entre ellos el desarrollo de la hipertensión arterial -una característica física del envejecimiento (Pérez-Rivero et al., 2006)- y, recientemente, un trastorno hereditario raro, la disqueratosis congénita, que conduce a muerte prematura por anemia aplásica y fibrosis pulmonar, siendo la presentación clínica de este último cuadro similar a la de la fibrosis pulmonar familiar idiopática, esto es, de causa desconocida, que acarrea fracaso pulmonar y cuyo curso es generalmente fatal. Pues bien, esta coincidencia ha planteado la posibilidad de relación de la telomerasa con esta enfermedad. La relación se ha establecido al encontrar en un número significativo de pacientes afectados por fibrosis pulmonar familiar, mutaciones en los genes que codifican para los componentes de este enzima, concomitantes con el hallazgo en los mismos enfermos de acortamiento de los telómeros, lo que indicó una disminución clara en la actividad de la telomerasa (Armanios et al., 2007). De esta manera se ha llegado a encontrar el mecanismo fisiopatológico -sin excluir otros posibles- que lleva a la aparición de una enfermedad de etiología desconocida, como es la fibrosis pulmonar familiar.

He pretendido con estas reflexiones acercarlos al mundo fascinante de la catálisis biológica y hacer patente la condición de motor, que para el avance de las ciencias de la vida en general y de la Medicina en particular, tiene la investigación básica sobre enzimas, a los que yo no busqué cuando, ya lejos en el tiempo, inicié mi trabajo como investigador, pero cuyo comportamiento, siempre sorprendente, y observable además de manera directa, me sedujo desde el primer encuentro. Arthur Kornberg (1918-2007) -quien recibió en 1959 el Premio Nobel junto con Severo Ochoa (1905-1993) por el descubrimiento de la síntesis del DNA-, describió este sentimiento con mejores palabras de las que yo podría encontrar, en un precioso libro autobiográfico

que lleva el expresivo título de *For the Love of Enzymes* (*Por el Amor a los Enzimas*), diciendo: “*Nunca he encontrado un enzima aburrido. Desde la humilde hidrolasa que utiliza una molécula de agua para romper el NAD a la glamurosa polimerasa que ensambla las inmensas cadenas de DNA de los genes y los cromosomas, las proezas de los enzimas son todas asombrosas. Y los secretos que esconden son aún mucho más grandes... Sin conocer y respetar los enzimas, mejor aún amarlos, las respuestas a las cuestiones más básicas del crecimiento, el desarrollo y la enfermedad quedarán fuera de nuestro alcance*”<sup>15</sup>.

Sr. Presidente, finalizo reiterando con emoción mi agradecimiento más verdadero y profundo a la Real Academia de Doctores de España por recibirme entre sus ilustres miembros, manifestando también mi satisfacción adicional ante el carácter distintivamente pluridisciplinar de esta Institución, de la que parafraseando a Antonio de Nebrija podríamos decir que recoge “*los [saberes] que estaban por muchas partes derramados*”, y declarando sinceramente que, en la medida de mi modesta capacidad, pongo mi esfuerzo, desde el área de la investigación biomédica, al servicio de esta Real Corporación para trabajar por el logro de sus fines y particularmente del primero de ellos, descrito en el Artículo 2º de sus Estatutos: “*Contribuir al desarrollo de las Ciencias, las Letras, las Artes y todo aquello que tienda a la difusión de la Cultura*”.

He dicho.

---

<sup>15</sup> “I have never met a dull enzyme. From the humble hydrolase that uses a molecule of water to split NAD to the glamorous polymerase that assembles the vast DNA chains of genes and chromosomes, the feats of enzymes are all awesome. Yet the secrets they hold are far greater... Without knowing and respecting enzymes, better still loving them, answers to the most basic questions of growth, development, and disease will remain beyond reach” (Kornberg, 1989, p. 74)

## BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A., Griffiths, A. D. and Tawfik, D. S. (2005) High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 210-216.
- Alagna, L., Hasnain, S. S., Pigott, B. and Williams, D. J. (1984) The nickel environment in jack bean urease. *Biochem. J.* 220: 591-595.
- Albery, W. J. and Knowles, J. R. (1976) Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15: 5631-5640.
- Alcalde, M. (2003) Evolución molecular dirigida. *Investigación y Ciencia*. Noviembre: 69-77.
- Anderson, C. M., Zucker, F. H. and Steitz, T. A. (1979) Space-filling kinase clefts and conformation changes. *Science* 204: 375-380.
- Armanios, M. Y., Chen, J. J., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips 3rd, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W. and Loyd, J. E. (2007) Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 356: 1317-1326.
- Artandi, S. E. (2006) Telomers, telomerase, and human disease. *N. Engl. J. Med.* 355: 1195-1197.
- Babor, J. A. e Ibarz, J. (1965) *Química General Moderna*. Marín. Barcelona.
- Bada, J. L. (1995) Origins of homochirality. *Nature* 374: 594-595.
- Berzelius, J. J. (1837) On a so far rarely observed force which is probably active in the formation of organic substances. Reimpresión abreviada en inglés de “Ueber eine, bei der Bildung organischer Verbindungen wirksame, bis jetzt wenig bemerkte Kraft” in *Lehrbuch der Chemie, Arnoldische Buchhandlung*, vol. 6. En: *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol. 1, *Enzymes* (Friedmann, H.C. ed.) p. 129-132. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Bitto, E., Bingman, C. A., Wesenberg, G. E., McCoy, J. G., Phillips, G. N. Jr (2007) Structure of aspartoacylase, the brain enzyme impaired in Canavan disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 456-461.

- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 206: 757-761.
- Breaker, R. R. and Joyce, G. F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* 1: 223-229.
- Brown, J. M. and Davies, S. G. (1989) Chemical asymmetric synthesis. *Nature* 342: 631-636.
- Buchner, E. (1897) Alcoholic Fermentation Without Yeast Cells. Reimpresión abreviada en inglés de "Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung)" *Dtsch. Chem. Ges. Ber.* 30: 117-124. En *Great Experiments in Biology* (Gabriel M. L. and Fogel, S. eds.) p. 27-30. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1955.
- Carracido, J. R. (1927) La formación de la materia viva. Conferencias dadas en el Centro de Intercambio Intelectual Germano-Español. Segunda serie. Blass, Madrid.
- Carracido, J. R. (1903) Compendio de Química Biológica. Manuales Soler, N° 22, Sucesores de Manuel Soler. Barcelona, hacia 1903.
- Cech R. T. and Bass, B. L. (1986) Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 599-629.
- Cech, T. R., Zaug, A. J. and Grabowski, P. J. (1981) *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27: 487-96.
- Collins, F. S., Morgan, M. and Patrinos, A. (2003) The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science* 300: 286-290.
- Cornish-Bowden, A. (1995) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press. London.
- Corominas, J. y Pascual J. A. (1980) *Diccionario Crítico Etimológico Castellano e Hispánico*, vol. I. Gredos, Madrid.
- Deffeyes, K. S. (2005) *Beyond Oil. The View from Hubbert's Peak*. Hill and Wang, New York.

- DelaFuente, G., Lagunas, R. and Sols, A. (1970) Induced fit in yeast hexokinase. *Eur. J. Biochem.* 16: 226-233.
- Dixon, N. E., Gazzola, C. J., Asher, C. J., Lee, D. S., Blakeley, R. L. and Zerner, B. (1980) Jack bean uricase ( E.C. 3.5.1.5. ) II. The relationship between nickel, enzymatic activity, and the “abnormal” ultraviolet spectrum. The nickel content of jack beans. *Can. J. Biochem.* 58: 474-480.
- Engel, M. H., Macko, S. A. and Silfer, J. A. (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* 348: 47-49.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman, 2<sup>nd</sup> ed. New York.
- Fersht, A. R. and Requena, Y. (1971) Equilibrium and rate constants for the interconversion of two conformations of -chymotrypsin. The existence of a catalytically inactive conformation at neutral pH. *J. Mol. Biol.* 60: 279-90.
- Fischer, E. (1894) Influence of configuration on the activity of enzymes. *Chem. Soc. J. (Trans.)* 57: 834-931. Reimpresión en inglés de “Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme” in *Dtsch. Chem. Ges. Ber.* 27: 2985-2993. En: *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol. 1, *Enzymes* (Friedmann, H.C. ed.) p. 217-223. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Florin, M. (1972) *A history of Biochemistry, Part I Proto-Biochemistry, Part II From Proto-Biochemistry to Biochemistry*. *Comprehensive Biochemistry*, vol. 30. Elsevier. Amsterdam.
- Florin, M. (1975) *A History of Biochemistry, Part III History of the Identification of the Sources of Free Energy in Organisms*. *Comprehensive Biochemistry*, vol. 31. Elsevier. Amsterdam.
- Friedmann, H. C. (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol. 1, *Enzymes*. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts.
- Friedmann, H. C. (1997) From Friedrich Wöhler’s urine to Eduard Buchner’s alcohol. En: *New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge* (Cornish-Bowden, A. ed.) p. 67-122. Universitat de València.

- Fruton, J. S. (1972) *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons. New York.
- Fruton, J. S. (1992) *A Skeptical Biochemist*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- García Font, J. (1976) *Historia de la Alquimia en España*. Editora Nacional. Madrid, 1976.
- Garrido Pertierra, A. (2002) *La Unidad de la Vida*. Tebar, Madrid.
- Garrod, A. E. (1902) The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 2: 1616-1620.
- Garrod, A. E. (1908) The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. *Lancet* 2: 1-7, 73-79, 142-148, 214-220.
- Garrod, A. E. (1909) *Inborn Errors of Metabolism*. Reimpresión en "Garrod's Inborn Errors of Metabolism" (Harris, H. ed.) p. 1-93. Oxford university Press, London, 1963.
- Geremia, S., Campagnolo, M., Schinzel, R. and Johnson, L. N. (2002) Enzymatic catalysis in crystals of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *J. Mol. Biol.* 322: 413-423.
- Gerhart, J. C. and Pardee, A. B. (1962) The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* 237: 891-896.
- Gerhart, J. C. and Schachman, H. K. (1965) Distinct subunits for the regulation and catalytic activity of aspartate transcarbamylase. *Biochemistry* 4: 1054-1062.
- Guevara, A. (1539) *Aviso de Privados y Doctrina de Cortesanos*. Prólogo (Viuda de Melchor Alegre ed. Madrid 1673). Edición digital de las obras de Antonio de Guevara, <http://www.filosofia.org/org/guevara.htm>, 1999.
- Gutfreund, H. (1968) *Introducción al Estudio de los Enzimas*. Omega, Barcelona.
- Gutfreund, H. (1976) Wilhelm Friedrich Kühne; an appreciation. *FEBS Lett.* 62 suppl.: E1-E2.

- Häberle, J., Görg, B., Rutsch, F., Schmidt, E., Toutain, A., Benoist, J. F., Gelot, A., Suc, A. L., Höhne, W., Schliess, F., Häussinger, D. and Koch, H. G. (2005) Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N. Engl. J. Med.* 353: 1926-1933.
- Haldane, J. B. S. (1930) *Enzymes*. Longmans, Green and Co. London.
- Hammes-Schiffer, S. and Benkovic, S. J. (2006) Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 519-541.
- Harris, H. (1963) The “inborn errors” today. En: *Garrod’s Inborn Errors of Metabolism*. (Harris, H. ed.) p. 120-197. Oxford University Press, London.
- Hashimoto, Y. (2002) Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg. Med. Chem.* 10: 461-479.
- Hermann, J. C., Marti-Arbona, R., Fedorov, A. A., Fedorov, E., Almo, S. C., Shoichet, B. K. and Raushel, F. M. (2007) Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature* 448: 775-779.
- Hilvert, D. and Hill, K. W. (1991) Antibody catalysis of concerted, carbon-carbon bond-forming reactions. *Methods Enzymol.* 203: 352-369.
- Jackson, D. A., Symons, R. H., 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. U. S. A.* 69: 2904-2909.
- Jeffery, C. J. (2003) Multifunctional proteins: examples of gene sharing. *Ann. Med.* 35: 28-35.
- Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. MacGraw-Hill, New York.
- Jencks, W. P. (1975) Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43: 219-410.
- Jencks, W. P. (1997) From chemistry to biochemistry to catalysis to movement. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 1-18.

- Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A. and Cheng, X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449: 248-251.
- Joyce, G. F. (1989) RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338: 217-224.
- Joyce, G.F. (2004) Directed evolution of nucleic acid enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 791-836.
- Judson, H. F. (1980) *The Eighth Day of Creation*. Simon and Schuster. New York.
- Kelly, Jr., T. J. and Smith, H. O. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. II. Base sequence of the recognition site *J. Mol. Biol.* 51:393-400.
- Kohen, A., Cannio, R., Bartolucci, S. and Klinman, J. P. (1999) Enzyme dynamics and hydrogen tunnelling in a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Nature* 399: 496-499.
- Kornberg, A. (1989) *For the Love of Enzymes. The Odyssey of a Biochemist*: Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Koshland, Jr., D. E. (1958) Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44: 98-104.
- Koshland, Jr., D. E. (1976) Role of flexibility in the specificity, control and evolution of enzymes. *FEBS Lett.* 62, Suppl.: E47-E52.
- Koshland, Jr., D. E. (1998) Conformational changes: how small is big enough? *Nature Med.* 10: 1112-1114.
- Koshland, Jr., D. E. and Neet, K. E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 37: 359-410.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J, Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31:147-457.

- Kühne, W. (1877) Experiences and remarks on enzymes and ferments. Reimpresión abreviada en inglés de “Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente” *Physiol. Inst. Univ. Heidelberg Unters.* 1: 291-324. En *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol 1, Enzymes (Friedmann, H. C. ed.) p. 170-171. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- La Du, B. N., Zannoni, V. G., Laser, L. and Seegmiller (1958) The nature of the defect in tyrosine metabolism in alkaptonuria. *J. Biol. Chem.* 230: 251-260.
- Laín Entralgo, P. (1978) *Historia de la Medicina*. Salvat. Madrid.
- Levy, H. L. (2005) *Metabolic disorders in the center of genetic medicine*. N. Engl. J. Med. 353: 1968-1970.
- Losada, M., Vargas, M., de la Rosa, M. A., Florencio, F. J. (1998) *Los Elementos y Moléculas de la Vida. Introducción a la Química Biológica y Biología Molecular. Primera parte*. Rueda, Madrid.
- Lundqvist, T. Fisher, S. L., Kern, G., Folmer, R. H. A., Xue, Y., Newton, D. T., Keating, T. A., Alm, R. A. and de Jonge, B. L. M. (2007) Exploitation of structural and regulatory diversity in glutamate racemases. *Nature* 447: 817-822.
- Martínez-Costa, O.H., Hermida, C., Sánchez-Martínez, C., Santamaría, B. and Aragón, J. J. (2004) Identification of C-terminal motifs responsible for transmission of ATP inhibition of mammalian phosphofructokinase, and their contribution to other allosteric effects. *Biochem. J.* 377: 77-84.
- Martínez-Costa, O. H., Sánchez-Martínez, C., Sánchez, V. and Aragón, J. J. (2007) Chimeric phosphofructokinases involving exchange of the N- and C-terminal halves of mammalian isozymes. Implications for ligand binding sites. *FEBS Lett.*: 581, 3033-3038.
- Mayr, E. (1982) *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- McKusick, V. A. (2007) Mendelian inheritance in man and its online version, OMIM. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 588-604.

- Meierhenrich, U. J. and Thiemann, W. H. (2004) Photochemical concepts on the origin of biomolecular asymmetry. *Orig. Life Evol. Biosph.* 34: 111-121.
- Miller, B. G. and Wolfenden, R. (2002) Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 847-855.
- Moliner, M. (1991) *Diccionario de Uso del Español*. Gredos, Madrid.
- Monod, J., Changeux J. P. and Jacob F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol.* 6: 306-329.
- Moore P. B. (1992) RNA catalysis. The universe expands. *Nature* 357: 439.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn. G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Narlikar, G. J. and Herschlag, D. (1997) Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 19-59.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 4<sup>th</sup> ed. New York.
- Neven, B., Valayannopoulos, V., Quartier, P., Blanche, S., Prieur A. M., Debré, M., Rolland, M. O., Rabier, D., Cuisset, L., Cavazzana-Calvo, M., de Lonlay, P. and Fischer, A. (2007) Allogeneic bone marrow transplantation in mevalonic aciduria. *N. Engl. J. Med.* 356: 2700-2703.
- Núñez de Castro, I. (2001) *Enzimología*. Pirámide, Madrid.
- Orosz, F., Santamaría, B., Ovádi, J., and Aragón, J.J. (1999) Phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum* is a potent inhibitor of tubulin polymerization. *Biochemistry* 38, 1857-1865.
- O'Sullivan, C. and Tompson, F. W. (1890) Invertase: a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. *Chem. Soc. J. (Trans.)* 57: 834-931. Reimpresión abreviada en *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol. 1, Enzymes (Friedmann, H.C. ed.) p. 208-216. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.

- Pauling L. (1946) Molecular architecture and biological reactions. *Chem. Engng. News* 24: 1375-1377.
- Pearson, H. (2006) What is a gene? *Nature* 441: 399-401.
- Pérez-Rivero G., Ruiz-Torres, M. P., Rivas-Elena, J. V., Jerkic, M., Díez-Marques, M. L., Lopez-Novoa, J. M., Blasco M. A. and Rodríguez-Puyol, D. (2006) Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation* 114: 309-317.
- Perutz M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*. 228: 726-739.
- Pollack, S. J., Jacobs, J. W. and Schultz, P. G. (1986) Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 234: 1570-1573.
- Popovych, N., Sun, S., Ebright, R. H. and Kalodimos C. G. (2006) Dynamically driven protein allostery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 831-838.
- Rao, G. S. J., Wariso, B. A., Cook, P. F., Hofer, H. W. and Harris, B. G. (1987) Reaction of *Ascaris suum* phosphofructokinase with diethylpyrocarbonate. Inactivation and desensitization to allosteric modulation. *J. Biol. Chem.* 262: 14068-14073.
- Real Academia Española (2001). *Diccionario de la Lengua Española*. Vigésimo segunda edición. Madrid.
- Remer, T. G. (1965) *Serendipity and the Three Princes. From the Peregrinaggio of 1557.* (Remer, T.G. ed.) University of Oklahoma Press. Norman.
- Roth, A. and Breaker, R.R. (1998) An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 6027-6031.
- Russell, R. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Collins, P. J., Lin, Y. P., Blackburn, G. M., Hay, A. J., Gamblin, S. J. and Skehel, J. J. (2006) The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*. 443: 45-49.
- Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A. and Szostak, J. W. (2006) A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 313: 1788-1792.

- Santamaría, B., Estévez, A. M., Martínez-Costa, O. H. and Aragón, J. J. (2002) Creation of an allosteric phosphofructokinase starting with a non-allosteric enzyme: The case of *Dictyostelium discoideum* phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 277: 1210-1216.
- Schirmer, T. and Evans, P. R. (1990) Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343: 140-145.
- Schlenk, F. (1997) Early research on fermentation. A history of missed opportunities. En: *New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge* (Cornish-Bowden, A. ed.) p. 43-50. Universitat de València.
- Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Child, B., Kinzler, K. W. and Vogelstein (eds.) (2001) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. MacGraw-Hill, 8<sup>th</sup> ed. New York.
- Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., (eds.) (1995) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. MacGraw-Hill, 7<sup>th</sup> ed. New York.
- Seelig, B. and Szostak, J. W. (2007) Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold. *Nature* 448: 828-831.
- Segel, I. H. (1993) *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, New York.
- Segura Munguía, S. (2003) *Nuevo Diccionario Etimológico Latín-Español y de las Voces Derivadas*. Universidad de Deusto, Bilbao.
- Setlow, B. and Mansour, T. E. (1970) Studies on heart phosphofructokinase. Nature of the enzyme desensitized to allosteric control by photo-oxidation and by acylation with ethoxyformic anhydride. *J. Biol. Chem.* 245: 5524-5533.
- Sheng Y, Zeng Z, Peng W, Jiang D, Li S, Sun Y, Zhang J. (2007) Design and switch of catalytic activity with the DNAzyme-RNAzyme combination. *FEBS Lett.* 81: 1763-1768.
- Shih, I. H. and Been, M. D. (2002) Catalytic strategies of the hepatitis delta virus ribozymes. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 887-917.

- Shokat, K. M. and Schultz, P. G. (1991) Catalytic antibodies. *Methods Enzymol.* 203: 327-351.
- Smith, H. O. and Wilcox, K. W. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51: 379-391.
- Sols, A. (1977) Los enzimas, agentes de la vida. *Bol. Inf. Fund. March* 66: 3-19.
- Sols, A. (1989) El Nivel Molecular en la Medicina. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid.
- Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. and Fredrickson, D. S. (eds.) (1960) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. MacGraw-Hill, New York.
- Teixeira, A., Tahiri-Alaoui, A., West, S., Thomas, B., Ramadass, A., Martianov, I., Dye, M., James, W., Proudfoot, N. J. and Akoulitchev, A. (2004) Autocatalytic RNA cleavage in the human beta-globin pre-mRNA promotes transcription termination. *Nature* 432: 526-530.
- Tramontano, A., Janda, K. D. and Lerner, R. A.. (1986) Catalytic antibodies. *Science* 234: 1566-1570.
- Umbarger, H. E. (1961) Feedback control by endproduct inhibition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26: 301-312.
- Vas, M., Berni, R., Mozzarelli, A., Tegoni, M. and Rossi, G. L.( 1979) Kinetic studies of crystalline enzymes by single crystal microspectrophotometry. Analysis of a single catalytic turnover in a D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase crystal. *J. Biol. Chem.* 254: 8480-8486.
- Walsh, C. (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Wang, Y., Zhang Y. and Ha, Y. (2006) Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444: 179-183.
- Waterham, H. R., Koster, J., van Roermund, C. W., Mooyer, P. A., Wanders, R. J. and Leonard, J. V. (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356: 1736-1741.

- Willstätter, R. M. (1926) On progress in enzyme isolation. *Chem. Soc. J. (Trans.)* 57: 834-931. Reimpresión abreviada en inglés de “Über Fortschritte in der Enzyme-Isolierung” in *Dtsch. Chem. Ges. Ber.* 59: 1-12. En: *Benchmark Papers in Biochemistry*, vol. 1, Enzymes (Friedmann, H.C. ed.) p. 293. Hutchinson Ross, Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Wilson, C. and Pardee, A. B. (1964) Comparative aspects of metabolic control. En *Comparative Biochemistry*, vol. 6. (Florkin, M and Mason, H. eds.) p. 73. Academic Press, New York.
- Wilson, D. S. and Szostak, J. W. (1999) In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 611-647.
- Wu, N., Mo, Y., Gao, J. and Pai, E. F. (2000) Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 2017-2022.
- Wyckoff, H., W., Hardman, K. D., Allewell, N. M., Inagami, T., Tsernoglou, D., Johnson, L. N. and Richards, F. M. (1967) The structure of ribonuclease-S at 6 Å. *J. Biol. Chem.* 242: 3749-3753.
- Zhang, Y., Li, S. Z., Li, J., Pan, X., Cahoon, R. E., Jaworski, J. G., Wang, X., Jez, J. M., Chen, F. and Yu, O. (2006) Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 13030-13031.
- Zimmerman, S. B., Little, J. W., Oshinsky, C. K. and Gellert, M. (1967) Enzymatic joining of DNA strands: a novel reaction of diphosphopyridine nucleotide. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 57: 1841-1848.
- Zoller, M. J. and Smith, M. (1982) Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500.



**DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL  
EXCELENTÍSIMO SEÑOR DOCTOR DON  
AMANDO GARRIDO PERTIERRA**



**Excmo. Señor Presidente**  
**Excmos. Señoras y Señores Académicos**  
**Señoras y Señores:**

Es una distinción especial para un Doctor llegar a ser elegido y tomar posesión para pertenecer como Miembro Numerario a la Real Academia de Doctores de España, y otro honor, no menos singular, es el de presentar y dar la bienvenida a un excelente amigo. Yo siento en estos momentos una gran alegría al actuar como introductor para acompañar al Dr. Juan José Aragón a traspasar el umbral que le lleva a acceder como Numerario a esta Corporación con la medalla número 64 de la Sección de Medicina. Agradezco sinceramente a esta Corporación el encargo de este honroso cometido.

Considero que la Academia debe ser reflejo eficaz y espejo crítico de la sociedad actual; reflejo de sus conocimientos y espejo que genere criterios y modele conductas necesarias para un mejor entendimiento. La rápida transformación de la sociedad se caracteriza por el enorme desarrollo de conocimientos al que todas las instituciones, incluso las más tradicionales, han de acomodarse. Y es que, la manera más elegante de conservar la debida e insustituible tradición académica, sin perder nuestra singular multidisciplinaridad, es incorporarse a las corrientes científicas, humanísticas y artísticas que hacen huella en nuestros días. Las academias, al igual que otras sociedades e instituciones, serán lo que resulte del poder propio y del efectivo valer de sus miembros. Por ello, considero que, cuando hay una plaza vacante de Académico Numerario, se debe dar la máxima publicidad de la misma entre aquellos doctores de reconocido prestigio en los diferentes campos del conocimiento. Con esta idea, cuando apareció en el Boletín Oficial del Estado

una plaza de la Sección de Medicina, consciente de la valía profesional del Dr. Aragón me puse en contacto con él para sugerirle que debería presentar su candidatura a dicha plaza. Me contestó: *No creo que tenga suficientes méritos para ser Académico*. Dice el filósofo inglés Herbert Spencer: *La Ciencia aumenta nuestro poder en la medida que se reduce nuestra soberbia*. La respuesta del Dr. Aragón refleja por sí misma su personalidad: Un hombre sencillo en el que resalta su gran calidad humana.

El Dr. Aragón realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid obteniendo el premio extraordinario, y con un expediente tan brillante que la Comisión Nacional de Selección del Ministerio de Educación y Ciencia le concedió el Premio Nacional Mejores Becarios. Posteriormente inició su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid e Instituto de Enzimología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas dirigido por el eminente científico Alberto Sols, uno de los principales impulsores del engrandecimiento de la Bioquímica en España. La decidida vocación por la docencia del Dr. Aragón, su apasionamiento por la investigación y el acierto en la elección de un maestro excepcional, fueron claves en el encauzamiento de su vida académica y profesional.

El Dr. Aragón tuvo, además, la suerte de casarse con Valentina, una magnífica mujer como esposa y como colaboradora en sus trabajos de investigación. Para un hombre entregado a su profesión, el contar con una persona inteligente que le aporta confianza y que irradia sencillez, equilibrio, comprensión, afecto, energía a veces y serenidad siempre, es de un valor inestimable. Por ello, en este día de reconocimiento solemne de los méritos de Juan José, no sería justo dejar de mencionar los de Valentina que tan discretamente ha escondido siempre. Matrimonio con dos maravillosas hijas, Victoria y Ana María, la primera Ingeniero Químico y la segunda estudiante de Ciencias Físicas, completan una encantadora familia, a la que expreso mi sincera felicitación.

**Comentarios a su “currículum vitae”.** Desde muy joven el Dr. Aragón se sintió atraído por la docencia y la investigación. Su gran amor a la enseñanza le llevó a obtener el título de Maestro de Primera Enseñanza en 1966 y del que se siente especialmente orgulloso. Posteriormente cursó la Licenciatura de Medicina que finalizó, en 1974, con la calificación de sobresaliente y Premio extraordinario; tres años más tarde obtuvo el título de Doctor con la calificación de sobresaliente “cum laude” y Premio extraordinario. En 1980 es nombrado Profesor adjunto contratado de la Facultad de

Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y dos años más tarde obtiene, por oposición, la categoría de Profesor adjunto numerario. En 1989 gana la cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de dicha Universidad.

Por lo que se refiere a su actividad investigadora, al finalizar la tesis doctoral se traslada al Graduate Department of Biochemistry de la Universidad de Brandeis, Massachussets, en Estados Unidos, donde permaneció por espacio de tres años, primero con una Beca de la Fundación Juan March y, posteriormente, con otra del Comité Conjunto Hispano-Norteamericano. En 1982, regresó al mismo Departamento como científico visitante. El Dr. Aragón ha sido investigador principal en 17 proyectos de investigación; ha publicado numerosos artículos en revistas de gran prestigio científico en el área de Bioquímica y Biología Molecular. Así mismo ha presentado más de un centenar de comunicaciones en Congresos nacionales e internacionales, en 25 de los cuales fue especialmente invitado por la Presidencia para exponer sus trabajos científicos y ha presidido y/o participado en la organización de 15 de ellos. Es coinventor de varias patentes relacionadas con sus líneas de investigación, algunas de las cuales han sido extendidas a otros países y licenciadas a entidades privadas, lo que evidencia su interés en trasladar a la Clínica parte de sus resultados en la investigación básica con enzimas.

La actividad investigadora del Dr. Aragón se vierte, también, en la dirección de más de una docena de tesis doctorales, todas acreditadas con la máxima calificación; dos de ellas obtuvieron el Premio extraordinario. Ha obtenido varios premios de investigación y, además de los ya reseñados, deseamos destacar el Premio del I Concurso de Ideas en el Área de Biotecnología, otorgado por la Comunidad Autónoma de Madrid, en el 2004. De entre los cargos de gestión que ha llevado a cabo, subrayamos que ha sido Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Dr. Aragón es el arquetipo de investigador: enormemente disciplinado y exigente consigo mismo, sabiendo prescindir de todo a la hora de perseguir su objetivo. Es imaginativo, ágil, perfeccionista y posee un gran poder de observación. Para un investigador en el campo de las Ciencias de la vida, lo esencial es dar trascendencia a su investigación. Sabe que un avance en este campo presupone una esperanza, un paso decisivo en la resolución de alguno de los inescrutables problemas que rodean al ser humano. Por ello no se limita a diseñar un experimento, sino que estudia los resultados obtenidos, reflexiona sobre ellos y los sitúa dentro del contexto de la vida y su entorno.

Un ejemplo de estas cualidades personales se puede contemplar en sus investigaciones sobre la fosfofructoquinasa. Se trata de una enzima clave en la ruta central del metabolismo de los hidratos de carbono. En la especie humana una deficiencia de esta enzima se traduce en una capacidad limitada para realizar ejercicio acompañada de dolorosos calambres musculares. En la inmensa mayoría de las especies la enzima es reguladora alostérica, esto es, regula el flujo metabólico de la ruta, exhibe una cinética sigmoide y su actividad es controlada por diferentes moduladores. El Dr. Aragón y sus colaboradores encontraron que la fosfofructoquinasa del mohó unicelular *Dictyostelium discoideum* era, sorprendentemente, una enzima no alostérica. Para explicar este diferente comportamiento respecto a las otras fosfofructoquinásas, diseñaron una original y brillante estrategia experimental que implicaba la utilización de las más recientes técnicas de Ingeniería de proteínas y de Biología Molecular. A partir de la fosfofructoquinasa de este organismo construyeron una enzima alostérica que les proporcionó una interpretación del proceso de control en células eucarióticas. Demostraron que la conducta extraordinaria de la enzima de *Dictyostelium* residía en el último de los 834 aminoácidos de su extremo C-terminal y su eliminación permitía a la enzima recuperar sus propiedades reguladoras, esenciales para el control del metabolismo de los hidratos de carbono en las células vivas. Éste fue el primer caso descrito en la bibliografía universal en que, mediante manipulación genética de su secuencia, se convirtió en completamente reguladora a una enzima que no lo era.

**Comentarios a su discurso de entrada.** Cada ceremonia de recepción y de bienvenida, en esta Real Academia de Doctores de España tiene, en lo personal, en lo científico y en la elección del tema, connotaciones singulares. Una de las de este acto es la necesidad de echar una ojeada, al menos, al texto del discurso que acabamos de escuchar, para cerciorarnos de la intensa relación del tema con la aportación personal del Dr. Aragón, a su desarrollo.

No creo, evidentemente, en la contestación crítica del discurso de recepción, sobre todo hoy en que la especialización hace muy difícil la múltiple penetración erudita en campos diversos. Pero sí creo que, el encargado por la Academia para dar esta bienvenida, debe poder penetrar en la esencia del tema con el simple cometido de mostrar a los académicos y a los amigos que en este acto entrañable nos acompañan, algo más que los discursos científicos de los recipiendarios; algo que llame la atención sobre la importancia, el significado o la trascendencia de lo aquí expuesto. Esta tarea ha sido para mí relativamente sencilla puesto que el discurso del Dr. Aragón ha versado sobre un tema tan actual y de tanto interés, que su elaboración me ha resultado extraordinariamente grata.

En las últimas décadas, los avances tecnológicos y científicos han hecho que la Biología Molecular haya pasado de ser una ciencia dirigida al estudio pasivo de la vida, a otra que puede modificarla, casi, a voluntad. Como consecuencia de esta importante revolución en la Biología, también han comenzado a variar las prácticas médicas. Las técnicas desarrolladas en los últimos años basadas en la metodología del ADN recombinante han encontrado una rápida aplicación en el estudio de los mecanismos de las enfermedades, así como en la producción de nuevos fármacos y métodos de diagnóstico. Por otra parte, el conocimiento de la secuencia completa del genoma humano está cambiando la práctica de la clínica médica, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento. Todo ello, unido a los avances experimentales en la prevención, está revolucionando la lucha contra numerosas enfermedades consideradas, hasta ahora, incurables.

No voy a referirme a la historia de las enzimas, ni a su naturaleza, estructura, mecanismos de acción, inhibidores o eficacia catalítica, puesto que estos temas han sido desarrollados con profundo conocimiento y gran maestría por nuestro recipiendario en su magnífico discurso. Pero sí voy a insistir en mi contestación, recordando al Dr. Garrod y al que el Dr. Aragón ha dedicado varias líneas de su discurso, poniendo de manifiesto la importancia de sus trabajos y el papel esencial que la enzima homogentisato dioxigenasa juega en la enfermedad de la alcaptonuria. En 1994 el gen que codifica esta enzima en humanos fue mapeado localizándose en la posición q21-q23 del cromosoma 3, con un tamaño de 54.363 pares de bases y codificando un transcrito de 1715 nucleótidos, dividido en 14 exones de tamaños comprendidos entre 35 y 360 pares de bases. La alcaptonuria fue la primera patología humana interpretada como un déficit hereditario, el primer déficit enzimático demostrado bioquímicamente y el primer gen mapeado genéticamente. Actualmente han sido descritas más de 8000 patologías originadas por la alteración de un gen y 10 en las que intervienen varios genes, aunque, en estas últimas, todavía no se conoce cómo influye cada uno de ellos en la enfermedad.

El primer avance conceptual, que anunció la llegada de la Biología Molecular, fue la hipótesis propuesta por Beadle y Tatum en 1941 de “un gen-una enzima”, en la cual se afirmaba que un gen funciona dirigiendo la síntesis de una enzima en particular. Poco tiempo después se llegó a la generalización de que los genes dirigen, no sólo la síntesis de las enzimas, sino también del resto de proteínas. Las proteínas ocupan un lugar central en la estructura y dinámica de los organismos vivos. El crecimiento de éstos requiere la síntesis de nueva sustancia celular y, como las células están compuestas principalmente de proteínas, aquél debe basarse necesariamente en la síntesis

de estas sustancias. Las proteínas constan en su totalidad de unidades más pequeñas, aminoácidos, que proceden directamente del entorno o que han sido sintetizados de otros materiales nutritivos. Las proteínas recién formadas pueden ser utilizadas a través de un sinnúmero de procesos celulares. Si quisiéramos aproximarnos a una definición del concepto vida lo podríamos hacer en términos del papel único y vital que juegan estas sustancias en la célula. Aunque los bioquímicos hemos logrado la manera de iniciar “in vitro” una síntesis de proteínas limitada, en la Naturaleza sólo ocurre en la célula y no hay estructura inanimada, por complicada que sea, capaz de realizar este proceso. Este hecho es un recordatorio de la definición que dio Engel, en el siglo XIX de la naturaleza fundamental de la vida al decir que es *un modo de existencia de las sustancias albumosas (proteínas) que consiste esencialmente en la autorrenovación de los constituyentes químicos de estas sustancias*. Es el conjunto total de las proteínas que hay dentro de la célula el que le confiere su individualidad y sus características únicas, que de alguna manera se vuelven a expresar en la prole. Como los rasgos hereditarios de cualquier organismo dependen de la naturaleza de las proteínas que éste contiene, es evidente que el mecanismo de la herencia está relacionado con la síntesis de estas sustancias. Durante mucho tiempo se ha dicho entre los hombres de Ciencia: *Nuestros genes proporcionan información, pero “somos” nuestras proteínas*.

Aunque el ADN y las proteínas son polímeros lineales no ramificados, en otros aspectos difieren notablemente. En términos generales, todas las moléculas de ADN presentan una estructura semejante y desempeñan las mismas funciones: almacenamiento y transmisión del mensaje genético. Las proteínas, por el contrario, se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporciona una gran variedad de funciones: actúan de componentes estructurales, de mensajeros, de receptores de los mensajeros, de marcadores de la identidad individual, y de sistemas de defensa que atacan las células que presentan marcadores ajenos. Algunas proteínas se unen al ADN y regulan la expresión de los genes, y otras participan en la replicación, transcripción y traducción de la información genética. Pero sin duda, las proteínas más importantes son las enzimas, que actúan catalizando las reacciones químicas de la célula y determinan el ritmo y el rumbo de las actividades vitales. La conformación o estructura tridimensional de las proteínas, y en concreto de las enzimas, constituye una característica única y específica para cada una de ellas. De las infinitas posiciones que los aminoácidos de una proteína pueden tomar en el espacio, solamente en una posee actividad biológica y una pequeña alteración de la misma impide su acción y la hace inútil para la célula. En dicha conformación, denominada nativa, la proteína puede interactuar con otras moléculas con gran precisión y pequeñas

variaciones estructurales son suficientes para destruir la especificidad estereoquímica esencial para la interacción. Son bien conocidos muchos casos en los que la simple sustitución de un aminoácido por otro es suficiente para que la enzima se inactive.

Las proteínas intervienen también en los procesos de crecimiento y división celular, así como en varios procesos más complejos que se originan en los organismos pluricelulares. La diferenciación celular depende en gran medida de la regulación génica, esto es, que los genes que controlan aquellas proteínas que permiten a una célula especializarse en sus funciones, son activados en el momento apropiado por un conjunto de señales intracelulares y extrínsecas. ¿Cuándo y cómo son activados los genes? ¿Cuál es la naturaleza de dichas señales? Las investigaciones sobre estos procesos están siendo más difíciles de lo esperado. En primer lugar porque se ha descubierto que los genes no son unidades independientes sino que muchos se superponen y actúan en red compartiendo información. En segundo lugar porque hay varios genes que pueden codificar más de una proteína. Además, el ADN “basura”, que se ha encontrado en el genoma, no es inservible y sin función alguna, como se creía en un principio. Y por si fuera poco, todos estos elementos interactúan entre sí de forma compleja y superpuesta. Estos hechos invalidan la hipótesis de Beadle y Tatum y ponen en entredicho el dogma central de la Biología (ADN-ARN-Proteínas), los dos pilares de la Bioquímica y la Genética molecular durante décadas. Por ello, los investigadores se están replanteando las ideas que han mantenido durante mucho tiempo sobre qué son y hacen los genes y cómo evolucionan los sistemas funcionales en los organismos. El conocimiento sobre estos elementos podría aclarar los mecanismos moleculares de las células vivas y supondría un avance extraordinario para descubrir el origen de muchas enfermedades. En los últimos años se han realizado grandes progresos para identificar genes que directamente codifican proteínas. No obstante, esta clase de genes tan solo representan una pequeña fracción del genoma humano (2%). La completa secuenciación del genoma humano en el 2003 abrió grandes esperanzas en el conocimiento y terapia de enfermedades humanas con una base genética. Sin embargo, debido a la extraordinaria complejidad del genoma, los estudios en este aspecto se han llevado a cabo con mucha lentitud. El progreso en la investigación ha tenido que esperar al desarrollo y utilización de los *biochips* o *microchips* de ADN. Estos dispositivos, denominados así por su analogía con los *chips* microelectrónicos, consisten en material biológico inmovilizado sobre una superficie sólida. Los *biochips* están divididos en numerosas casillas (centenares de miles) y en cada una se adhiere un fragmento de ADN. Debido a la miniatu-

rización del sistema, una sola operación permite leer las secuencias de ADN hasta en 500.000 puntos diferentes del genoma de un organismo. Con los *biochips* los investigadores pueden comparar genomas de gran cantidad de pacientes con los de individuos sanos y encontrar diferencias que pueden estar asociadas con alguna enfermedad. Así, la aplicación de esta técnica ha permitido identificar variantes en los ADN que constituyen la base de siete enfermedades comunes y en apariencia muy distintas: El trastorno bipolar, la enfermedad coronaria, la enfermedad de Crohn, la hipertensión, la artritis reumatoide y las diabetes del tipo I y II. Otro importante hallazgo es que las variantes genéticas cercanas al gen PTNPN2 están asociadas con la enfermedad de Crohn y la diabetes tipo I; ambas son enfermedades autoinmunes y el gen participa regulando el sistema inmunológico. También se ha descubierto una variante genética en el cromosoma 7 que comporta un gran riesgo de artritis reumatoide en las mujeres pero ninguno en los hombres.

Referente a los procesos cancerosos se ha demostrado que son necesarias de cuatro a siete variantes genéticas para desencadenar una neoplasia. Sin embargo, permanece sin descubrir cómo actúan los genes, cuáles son los mecanismos que convierten la célula normal en una célula cancerosa y la naturaleza que adquiere con dicha transformación. Las principales propiedades o atributos que caracterizan la célula tumoral se pueden resumir en: un desequilibrio a favor de los estímulos de proliferación que la abocan a un crecimiento continuo y desordenado, alteraciones graves en su estructura, pérdida de la tendencia a la destrucción, facultad de estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para garantizar su desarrollo (neangiogénesis) y una fuerte capacidad de destruir el tejido que la circunda para abrirse paso por el torrente sanguíneo y linfático hasta anidar en ganglios y órganos distantes (metástasis). Las primeras medidas terapéuticas a nivel molecular fueron dirigidas a controlar algunas de estas propiedades extraordinarias. La utilización de los denominados fármacos antitumorales inició un nuevo desarrollo a principio de los años 80, con el descubrimiento de los oncogenes y la confirmación de que las células normales poseían en su interior todo el potencial necesario para convertirse en cancerígenas. A comienzos de este siglo se diseñaron y sintetizaron químicamente (fármacos de diseño) una serie de compuestos que bloquean algunas de las funciones primordiales de las células neoplásicas.

Un ejemplo paradigmático de la utilización de enzimas en Medicina lo constituye el proceso de inhibición de la tirosin quinasa por el fármaco Imatinib (Glivec) en la leucemia mielocítica crónica. Esta enfermedad, hasta hace poco tiempo incurable, está producida por una aberración cromosómica que genera la expresión de la enzima tirosin quinasa BCR-ABL, lo cual

conduce a una proliferación incontrolada de glóbulos blancos inmaduros; éstos acaban por destruir la médula ósea productora de las células sanguíneas normales. A finales del siglo pasado se pudo conocer el mecanismo inductor de la enfermedad y se diseñaron y probaron varias moléculas para bloquear la acción de la enzima, hasta encontrar una cuya eficacia sobrepasaba todo lo imaginable: la leucemia no sólo regresa clínicamente en el 90% de los enfermos, sino que, en muchos casos la aberración genética desaparece. Miles de pacientes en todo el mundo ven ahora como su enfermedad es controlada con el Imatinib. Un simple comprimido es capaz de producir resultados superiores al tratamiento utilizado hasta ahora: quimioterapia en dosis ablativas y con soporte de trasplante heterólogo de médula ósea. Un proceso terapéutico que lleva asociado una mortalidad del 20-30%. El Imatinib no sólo actúa sobre la leucemia mielocítica, sino que también es capaz de bloquear la expresión de otros genes aberrantes asociados a la leucemia linfoblástica aguda (LLA), a la leucemia eosinófila crónica (LEC), a mielodisplasias (EMD/EMP), a tumores del estroma gastrointestinal (TEGI) y al dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), enfermedades que hasta ahora carecían de tratamiento.

El Imatinib pertenece a una clase de fármacos específicos denominados antitirocin-quinasas, capaces de inhibir la actividad enzimática de algunas quinasas, bloqueando las señales provenientes de la estimulación de diferentes receptores por agentes externos a la célula tumoral. Mientras que los anticuerpos impiden la fijación del agente estimulador al receptor, estas moléculas impiden la transmisión de la señal posterior, responsable de la acción anómala de la célula tumoral.

A diferencia de la quimioterapia convencional cuya acción podría considerarse de amplio espectro al ser activa en diferentes tipos y localización de tumores, los fármacos de diseño se caracterizan por una mayor especificidad, por lo que, en ocasiones sólo actúan en un pequeño porcentaje de pacientes con un determinado tumor. El Trastuzumab (Herceptin) es un buen ejemplo ya que sólo actúa en el 20-25% de cánceres de mama que expresan el receptor Her-2, produciendo respuestas en el 20% de ellos. Su aplicación, complementaria a la cirugía de extirpación de estos tumores mamarios, produce un descenso muy significativo de la posibilidad de recidivar y, por tanto, de la mortalidad inducida por el cáncer.

Los bioquímicos creíamos a finales de los 60 que prácticamente se había descubierto todo lo fundamental sobre la estructura y la regulación de los genes. Sin embargo, C. Mello y A. Fire demostraron la interferencia por ARN bicatenario, un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes

específicos por dicha molécula; un nivel de control genético tan inesperado y crucial que, el 2 de Octubre de 2006, se concedió a estos investigadores el Premio Nobel de Medicina. Se sabe que, al menos la mitad del genoma humano, está formado de trasposones o elementos de ADN capaces de saltar de un lugar a otro del genoma. Estos elementos proceden de antiguos virus y a menudo obtienen copias (de ARN) de ambos cordones de su ADN. Estas moléculas de ARN forman un doble cordón y suelen ser destruidas por los mecanismos de defensa de la célula. Las células embrionarias forman continuamente ARN de doble cordón, cuya destrucción es controlada por un mecanismo esencial en el proceso de desarrollo. La administración externa de ARN de doble cordón se ha mostrado como una técnica poderosa para inactivar genes específicos y bloquear la síntesis de proteínas. Recientemente, el bioquímico español Massagué en el Instituto Médico Howard Hughes del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York comprobó que la mayoría de los tumores de cáncer humanos invasivos y agresivos carecen de tres moléculas claves de ARN denominadas miR-335, miR-126 y miR-206. La incorporación de estas moléculas de ARN a tumores de mama en ratas consiguió que perdieran su capacidad para extenderse y evitar la metástasis. Según Massagué: *Estos ARN evitan la expansión del cáncer, al interferir con la expresión de genes que proporcionan a las células cancerígenas la capacidad para proliferar y migrar*. Estos descubrimientos han abierto un área notable de investigación biomédica.

Otro ejemplo de la importancia de las enzimas en la terapia del cáncer lo constituye los estudios realizados sobre las topoisomerasas, enzimas encargadas en las células de relajar la estructura superenrollada del ADN. El ADN es un doble cordón de 2 metros de longitud que está plegado y compactado en un espacio celular minúsculo (inferior a una micra de diámetro), por lo que está sometido a grandes tensiones. Tanto la topoisomerasa I como la II desempeñan funciones importantes en la replicación, transcripción y recombinación del ADN y tienen varias características comunes. Ambas enzimas realizan, multitud de veces por segundo, cortes transitorios en la molécula de ADN para relajar la tensión. El grado de tensión es un parámetro regulador de la replicación del ADN y de la expresión de los genes; es también un elemento, junto a la topología, que la célula utiliza para proceder a activar un gen e iniciar la replicación. La topoisomerasa I corta sólo uno de los cordones del ADN por lo que no es muy eficaz para reducir la tensión en el conjunto de la molécula. Sin embargo, la topoisomerasa II corta ambos cordones simultáneamente, y éste es un hecho extraordinario porque permite que fragmentos de ADN, próximos al corte, pasen a través de este espacio eliminándose los nudos que se producen en el ADN y aligerando así la tensión de la molécula.

La topoisomerasa II bacteriana es el objetivo de diversos antibióticos que inhiben la enzima. La novobiocina bloquea la unión del ATP a la enzima; el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina, interfiere en la ruptura y posterior unión de las cadenas de ADN. Estos últimos inhibidores de la enzima se usan con mucha frecuencia para tratar, entre otras, infecciones del tracto urinario. Recientemente, se han encontrado varios fármacos antitumorales que utilizan la topoisomerasa II de células eucarióticas como diana y, al interferir, inhibir o modificar la acción de la enzima, ésta corta el ADN por lugares inadecuados y la célula cancerosa acaba muriendo.

Los fármacos de diseño dirigidos a enzimas que intervienen en procesos metabólicos, de desarrollo o de regulación, están generando grandes esperanzas en la lucha contra los procesos cancerosos. Actualmente miles de moléculas diferentes están en fase de investigación en los laboratorios de varios países con objeto de superar los mecanismos de resistencia y encontrar una terapia adecuada para cada tipo de tumor. Anhelamos que estas esperanzas pronto se conviertan en realidad.

Excmos. Señoras y Señores Académicos:

Estas palabras de presentación protocolaria han pretendido mostrarles algunas facetas de la personalidad del Doctor Aragón, como profesional, como científico, y como ser humano. Dice León Tolstoi: *De todas las ciencias que el hombre puede y debe aprender la más importante es la Ciencia del vivir, haciendo el mínimo posible de mal y el máximo posible de bien.* Esta es la actitud del Dr. Aragón ante la vida, que día a día practica con la dignidad, ética, y responsabilidad que le caracterizan. Por ello, esta Academia no puede por menos que sentirse orgullosa ante la incorporación en su seno de una persona tan llena de cualidades y méritos.

Querido Juan José, con la esperanza de que este acto sea el principio de importantes y fructíferas colaboraciones, en nombre de todos los académicos de esta Real Academia de Doctores de España a quienes ahora represento, y en el mío propio, me es muy grato darte la bienvenida, expresarte mis profundos sentimientos de admiración y afecto, y felicitarte por tu trayectoria científica y profesional. Deseo de todo corazón que tu permanencia entre nosotros sea fecunda y dichosa, tanto para tu satisfacción personal, como para el avance del conocimiento científico, cultural y el prestigio de nuestra Academia.

Muchas gracias

