

Trabajo de revisión

Estructura tridimensional de proteínas. Su importancia en biotecnología

A. DÍAZ

Unidad Analítica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en septiembre de 1987.

INTRODUCCION

Los objetivos de este trabajo son: ubicación que ocupa el estudio de la estructura tridimensional (a partir de aquí, 3D) de proteínas en el contexto de la industria biotecnológica; aportar los elementos que lo hacen necesario en diferentes problemas de este sector; analizar los métodos para el estudio de la estructura 3D y las limitaciones que presentan dichos métodos en la actualidad.

En general, todo lo que se dice para las proteínas en este campo, puede extenderse con sus particularidades a otras biomacromoléculas, pero por su importancia son las proteínas las que han sido estudiadas más ampliamente.

Cada proteína tiene una estructura 3D, es decir, una conformación espacial propia, establecida y mantenida por enlaces diferentes al enlace peptídico, como son:

- enlaces covalentes (puente de azufre)
- enlaces iónicos electrocovalentes no covalentes
- puentes de hidrógeno
- enlaces hidrofóbicos.

Con el conocimiento actual se han identificado seis niveles en la organización de las estructuras de las proteínas globulares (figura 1). Entre estos niveles existe una jerarquía, donde el nivel más importante lo ocupa la estructura primaria o secuencia de aminoácidos. Sin embargo, este esquema de jerarquía se cumple sólo parcialmente.

La especificidad de las proteínas al interactuar, o reaccionar entre ellas, con otras biomacromoléculas o pequeñas moléculas, está determinada por la complementariedad de las formas de sus superficies, y esta especificidad es una estereoespecificidad más o menos estrecha, a causa de que las moléculas deben tener los grupos funcionales dispuestos en una configuración espacial tal que puedan reaccionar o interactuar entre ellas (Weil, 1979).

Está claro que estos grupos no están próximos unos de otros desde el punto de vista de la estructura primaria, sino desde el punto de vista de su configuración 3D, o sea, son los repliegues de la cadena polipeptídica los que llevan a estos grupos a una vecindad, para formar los sitios o regiones de interacción. Por tal motivo, es necesario el conocimiento de la estructura 3D de las proteínas para explicar el funcionamiento de estas y conocer los mecanismos de interacción con otras moléculas.



Fig. 1. Niveles en la organización estructural de las proteínas globulares.

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA 3D DE LAS PROTEINAS

Métodos de modelación o predicción

Los métodos de modelación o predicción se basaron, en las primeras etapas de su desarrollo, en el hecho de que la secuencia de aminoácidos de una proteína debe contener una información estructural completa, por lo que sería posible determinar la estructura espacial basado en el conocimiento de dicha secuencia, sin ser necesaria la utilización de alguna otra técnica experimental (Schulz, Schirmer, 1979).

Habíamos dicho que existe una jerarquía en los niveles de organización de las proteínas, sin embargo, la experiencia ha confirmado que a pesar del rol fundamental de la estructura primaria, su jerarquía no es estricta, pues la formación de la estructura secundaria -segundo escalón en jerarquía- en un segmento de la cadena polipeptídica, no depende solamente de la estructura primaria de dicho segmento, sino también de otros segmentos a lo largo de la cadena.

Los métodos de modelación o predicción pueden dividirse en tres grandes grupos:

- probabilísticos
- fisicoquímicos
- comparativos.

Los dos primeros son conocidos también como métodos de correlación o de predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos. Los métodos probabilísticos extraen reglas y parámetros utilizando análisis estadísticos puros de la base de datos, fundamentalmente la de difracción de rayos X. Los métodos fisicoquímicos extraen información adicional de otras fuentes experimentales.

La aproximación más sencilla en los métodos probabilísticos se basa en considerar cada residuo por separado, sin tener en cuenta los demás. Así, a principios de la década del 70 varios grupos se dieron a la tarea de realizar un análisis puramente estadístico de los datos del banco de proteínas existente hasta ese momento, determinándose la frecuencia de

ocurrencia en las diferentes conformaciones de la estructura secundaria, para cada uno de los residuos aminoácidos existentes.

De esta manera se determinó la propensión de los 20 residuos a conformar los diferentes tipos de estructura secundaria. Posteriormente se introdujeron restricciones adicionales, se comenzaron a tener en cuenta las interacciones entre los residuos vecinos, etcétera.

Los métodos fisicoquímicos se subdividen en métodos basados en la *mecánica estadística* y en *métodos estereoquímicos*.

Los métodos que utiliza la mecánica estadística basan sus predicciones en cálculos energéticos, de acuerdo con la energía de la distribución atómica y con los aportes de los diferentes enlaces presentes.

Los métodos estereoquímicos analizan fundamentalmente el carácter hidrofóbico de los residuos aminoácidos en las proteínas.

Los métodos comparativos han sido utilizados para extender las estructuras 3D determinadas experimentalmente, a nuevas moléculas cuyas estructuras están próximamente correlacionadas.

En general, estos métodos se aplican a familias de proteínas que presentan homología en su estructura secundaria, y la homología en la estructura primaria debe ser superior al 50%. Estos métodos son importantes para determinar los sitios funcionales de proteínas cuyas estructuras 3D no han sido determinadas experimentalmente, así como para el estudio de la evolución de las proteínas (Greer, 1985; Scheraga, 1985).

Las consideraciones actuales sobre los métodos de modelación o predicción son:

- Los métodos de predicción basados solamente en la secuencia de aminoácidos no se toman en cuenta, excepto para realizar diagnósticos de regiones funcionales de las proteínas en determinadas subsecuencias (Van Rumpuy, 1987).
- Los métodos basados en la mecánica estadística son los que más prometen en el futuro. Son conocidos como *Computed Aided Protein Design* y utilizan el desarrollo de las técnicas de computación y los sistemas gráficos que se consideran una gran ayuda a la intuición. Existen aún dificultades en la selección de los coeficientes utilizados en la descripción de los potenciales empleados (Wodak, 1987), y limitaciones en el *software* empleado.

La tabla 1 resume los métodos de modelación o predicción utilizados en la determinación de la estructura 3D de las proteínas.

Tabla 1
METODOS DE MODELACION O PREDICCION

Método	Estado actual
PROBABILISTICO	No se toman en cuenta; solamente para hacer diagnósticos de regiones funcionales.
FISICO-QUIMICO	Mecánica estadística Son los que más prometen; hacen uso de las técnicas de modelación con computadoras
	Estereoquímicos Análisis por perfiles de hidrofobicidad de los aminoácidos.
COMPARATIVO	Necesaria una homología mayor del 50% en la secuencia de aminoácidos.

Métodos experimentales o físicos

A pesar de la importancia de los resultados reportados por los métodos de modelación o predicción, los métodos experimentales o físicos resultan obligatorios, pues constituyen la demostración práctica, o sea, el "criterio de la verdad" en el proceso del conocimiento de la estructura 3D de las proteínas. Los métodos experimentales que se utilizan en el estudio de las estructuras 3D de las proteínas son la difracción de rayos X (DRX), y la resonancia magnética nuclear (RMN).

DRX

Para el estudio de la estructura 3D de las proteínas mediante la DRX, es necesario que la proteína esté en forma cristalina, por lo que el estudio de la estructura 3D por esta técnica es conocido como *cristalografía de proteínas*.

La importancia de la cristalografía de proteínas se basa en que los resultados experimentales, desde que se resolvió la primera estructura de una proteína mediante dicho método, hasta el presente, son satisfactorios, y también porque la mayoría de las estructuras 3D de biomacromoléculas han sido resueltas mediante su utilización. Además, es la única técnica (hasta el presente) que ha resuelto las estructuras 3D a resolución atómica, es decir, menor que 2 Å, que es la resolución necesaria para explicar las funciones de las proteínas.

La cristalografía es conocida como ciencia desde el siglo pasado; fue utilizada en sus comienzos fundamentalmente para el estudio de los minerales y se constituyó en una rama fundamental de la física del estado sólido.

Con el descubrimiento del fenómeno de difracción de los rayos X por los cristales, efectuado por Bragg en 1912, la cristalografía tuvo un mayor desarrollo y la experiencia acumulada desde entonces la ha hecho altamente sistematizada, lo que no niega que se continúe desarrollando, tanto desde el punto de vista del equipamiento necesario, como de los diferentes métodos de resolución y refinamiento de las estructuras. La primera estructura 3D de proteína resuelta por DRX fue la molécula de mioglobina en 1960. Actualmente suman unas 250 las estructuras de proteínas resueltas por esta técnica a resolución atómica.

Como el objetivo de la determinación de la estructura 3D de una proteína es conocer su función, el conocimiento de una estructura 3D aislada es solamente el punto de partida de los experimentos que se diseñen para llegar al objetivo final. En la actualidad, la meta es lograr la determinación de las estructuras 3D de moléculas interactuantes (enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc.), lo que no está exento de dificultades por la rapidez de los procesos en relación con el tiempo necesario que exige el método.

A pesar de los resultados obtenidos, la cristalografía de proteínas presenta las limitaciones siguientes:

- **Necesidad de cristalizar la proteína.** Este aspecto ha suscitado discusiones con respecto a si la cristalización introduce cambios en la molécula, pero los resultados experimentales han mostrado que no es así en la mayoría de los casos (Mathwes, 1976).

Los resultados obtenidos dan una estructura estática, y es un promedio en el tiempo y en el conjunto de átomos, por lo que es solamente una estructura aproximada y no es posible, en general, realizar estudios dinámicos (Karplus, 1985).

- **Lentitud en la obtención de los resultados** (2 a 5 años).

RMN

En años recientes, el desarrollo de las técnicas de computación y de los altos campos magnéticos, ha permitido considerar a la RMN como un método experimental alternativo a la cristalografía de rayos X, para la determinación de la estructura 3D de las proteínas.

La principal ventaja que presenta la RMN sobre la cristalografía de proteínas, es la posibilidad de estudiar las proteínas en solución y su potencialidad para realizar estudios dinámicos.

La RMN es relativamente joven. Las primeras señales de núcleos resonantes fueron observadas en 1948. Posteriormente se desarrolló como método de análisis estructural, fundamentalmente en química orgánica. Solamente ha sido en la década de los años 80 que se ha comenzado la sistematización, fundamentalmente de la RMN protónica, para el estudio de las estructuras de las proteínas.

Este método presenta algunas limitaciones. Una de ellas es el tamaño de las proteínas a causa de la imposibilidad de realizar las asignaciones protónicas de las líneas del espectro, en virtud del gran número de ellas, cuando la talla de la proteína supera los 10 000 dalton. Los núcleos de ^{13}C y de ^{15}N pueden dar una solución a este problema, pero por sus respectivas bajas abundancias naturales relativas y también bajas sensibilidades, se ha hecho necesaria la utilización de técnicas de sustitución isotópica, lo que ha limitado su introducción práctica como solución al problema (Wüthrich, 1986).

La resolución que puede alcanzarse es comparable solamente con los resultados de DRX de 3 Å de resolución.

Analicemos este problema para un caso concreto, por ejemplo, para una proteína de peso molecular de 20 000, en la cristalografía de proteínas de alta resolución (1,8 Å) se obtienen normalmente 16 000 valores de intensidad, que representan los observables experimentales. Existiendo en este caso 1 200 átomos con cuatro parámetros desconocidos (las tres coordenadas y el factor de temperatura), estos dan la cifra de 4 800, por lo que la relación: observables/ parámetros desconocidos, es aproximadamente 3. Esta cifra puede elevarse a 6 para una resolución de 1,2 Å.

En RMN, los observables son las distancias protón-protón que miden entre 2 y 5 Å, las que son aproximadamente 200 en una proteína de talla similar. El número de parámetros desconocidos en este caso es 3 600, considerando solamente las coordenadas espaciales, lo que implica que la relación observables/parámetros desconocidos no supera el valor de 1, lo que hace necesario la búsqueda de otros observables o la disminución de los parámetros desconocidos.

En la actualidad este problema se resuelve con los cálculos energéticos teóricos, lo que disminuye el número de parámetros desconocidos, con la desventaja de que no son resultados experimentales.¹

Es necesario señalar que los aspectos positivos y las limitaciones de los métodos de estudio de la estructura 3D de las proteínas no hacen más que reflejar que todos contribuyen de una forma u otra al conocimiento de dicha estructura, y que todos constituyen a su vez diferentes aproximaciones al problema, complementándose, más que excluyéndose, los unos a los otros.

En la tabla 2 se resumen las ventajas y desventajas de los métodos experimentales de determinación de la estructura 3D de las proteínas.

¹ Dideberg, O. (comunicación personal)

Tabla 2
METODOS EXPERIMENTALES O FISICOS

Método	Ventajas	Desventajas
Cristalografía de proteínas	No límite al tamaño de la proteína Resolución atómica	Necesidad de cristalizar la proteína Estructura estática Resultados en 2-5 años
RMN	Posibilidad de realizar los estudios en solución y dinámicos	Proteínas con PM menor de 10 000 Resolución límite de 3 Å

CRISTALOGRAFIA DE PROTEINAS

Según expresamos anteriormente, hasta el momento actual los resultados de mayor relieve obtenidos en materia de la determinación de la estructuras espacial de biomacromoléculas, se han logrado mediante la cristalografía de proteínas; nos detendremos ahora a analizar cómo se plantea en el mundo actualmente la solución de las limitaciones que esta presenta.

La metodología más generalizada y con la que se ha logrado obtener la mayor parte de las estructura resueltas, es conocida como *reemplazamiento isomórfico* (Blundell y Johnson, 1976). El proceso de determinación de la estructura 3D mediante esta metodología es lenta, ya que es necesario obtener datos de difracción de rayos X, no sólo de la proteína nativa, sino también de, al menos, dos proteínas derivadas con átomos pesados.

La preparación de estos cristales sigue el método de prueba y error, aunque ya existen experiencias de automatización y valoración estadísticas que acorten el proceso.

Otro factor que contribuye a prolongar la determinación de la estructura es la medición de las intensidades de los rayos X difractados, lo que se realiza habitualmente con un difractómetro de cuatro círculos, el cual posee un contador de centelleo simple, y se recolectan una a una las intensidades, que son aproximadamente 10 000 para una proteína de talla media. Las soluciones que se plantean para acortar el tiempo de recolección de datos están encaminadas en dos direcciones:

- Utilizando los métodos de detección múltiple simultánea, que pueden ser fotográficos o electrónicos.
- Aumentando la brillantez del haz incidente de rayos X, bien sea mediante los generadores de rayos X de ánodo rotatorio o la radiación producida en un sincrotrón.

Existen otros métodos de determinación estructural dentro de la cristalografía de proteínas como lo es el reemplazamiento molecular, que utiliza simetrías no cristalográficas presentes en la molécula, mediante el cual se han resuelto las complejas estructuras de los virus. Otra posibilidad la constituye la dispersión anómala utilizando varias longitudes de onda de la radiación sincrotrónica, necesiándose solamente una derivada pesada, lo que simplifica el problema desde el punto de vista experimental, y disminuye, por tanto, el factor tiempo.

En relación con las soluciones que tratan de darse para obtener las estructuras 3D de los complejos moleculares relacionadas directamente con el problema estructura-función, se están realizando experimentos en dos direcciones:

- "Detener" las reacciones intermoleculares utilizando las técnicas de bajas temperaturas. Existen limitaciones prácticas para realizar estos experimentos, con motivo de que es necesario, en la mayoría de los casos, sustituir las soluciones donde usualmente

se conservan las proteínas, por solventes cuyas temperaturas de fusión estén muy por debajo de 0 (Douzou *et al.*, 1976).

- Aplicación del método de Laue; obtención de reacciones simultáneas de varias longitudes de onda, en instalaciones de rayos X de alta brillantez como la radiación sincrotrónica. En este caso, la escala de tiempo en que se obtiene el experimento es del orden de los milisegundos, lo que permitiría observar la mayoría de las interacciones intermoleculares que ocurren en dicho período. En condiciones favorables y con una alta simetría cristalina, se ha logrado una alta proporción de datos a una resolución de 3 Å, con una exposición simple (Hajdi, 1986).

SOLUCION DE PROBLEMAS FUNDAMENTALES EN BIOTECNOLOGIA BASADA EN EL CONOCIMIENTO DE LA ESTRUCTURA 3D DE LAS PROTEINAS

A pesar de las limitaciones que aún presentan los métodos de estudio de la estructura 3D de las proteínas, ya en la actualidad comienzan a resolverse problemas de gran interés en el campo de la biotecnología.

La diferencia fundamental que se logra al enfocar los problemas tomando como base el conocimiento de la estructura 3D de las proteínas, es que se hace de una forma más racional, pues se realiza con conocimiento de causa (Hol, 1987).

En la figura 2 se muestran diferentes tipos de problemas que pueden resolverse a partir del conocimiento de la estructura 3D de las proteínas.

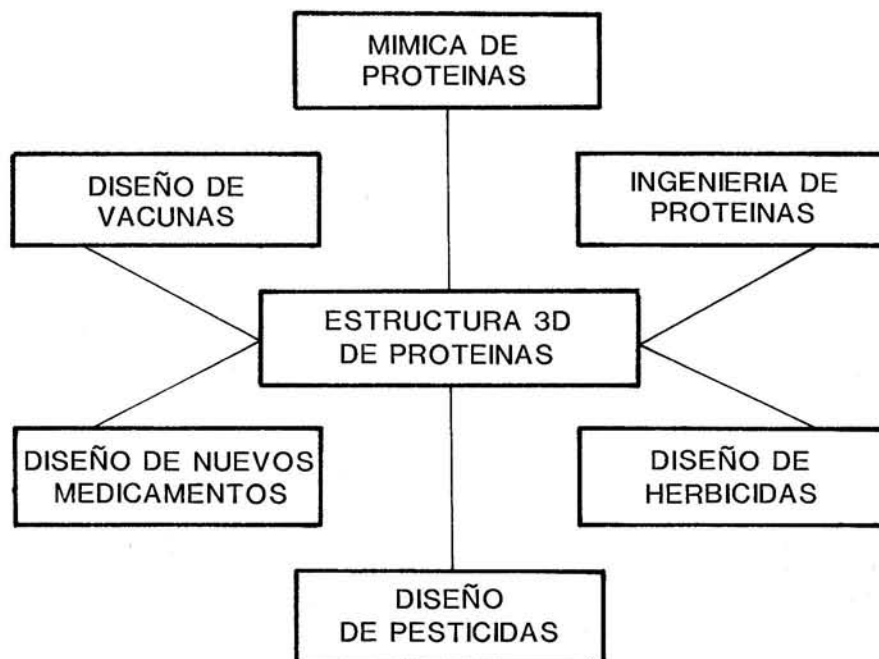


Fig. 2. Problemas por resolver en biotecnología sobre la base del conocimiento de la estructura 3D de proteínas. (Tomado de las notas del curso de Biofísica, Louvain, Bélgica, mayo de 1987, impartido por el Profesor W.Hol.)

Como *ingeniería de las proteínas* se entiende el desarrollo o la construcción de nuevas proteínas, con propiedades deseadas y no encontradas en la naturaleza (Ulmer, 1983).

En la actualidad, la comunicación entre los grupos dedicados al estudio de la estructura 3D y los que se dedican a la ingeniería genética, se está convirtiendo en algo habitual, sobre todo para realizar los diseños de los experimentos de mutagénesis dirigida, ya que permite conocer con anterioridad el o los posibles aminoácidos que deben ser sustituidos y por cuáles, para lograr los efectos deseados. En sus inicios, este tipo de trabajo ha estado fundamentalmente dirigido a la obtención de enzimas con propiedades especiales, como son: estabilidad en medios no acuosos y estabilidad térmica, mantener su actividad en pH específicos, etcétera (Maugh, 1984).

En la figura 3 se muestran los pasos a seguir en la ingeniería de proteínas. Para el diseño de vacunas son importantes los experimentos que se realizan al estudiar las estructuras 3D en complejos antígeno-anticuerpo y las proteínas "dianas" de los anticuerpos, como son las proteínas virales. En el estudio de los virus se identifican porciones de las proteínas que se encuentran en las superficies, que serán las porciones que interactuarán con la posible vacuna.

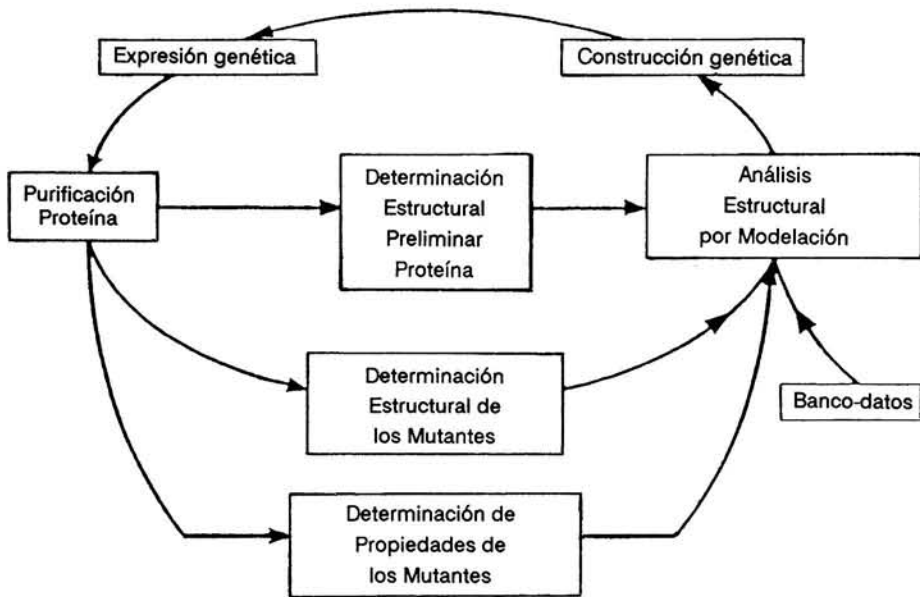


Fig. 3. Esquema de experimentos que se siguen en la ingeniería de proteínas. (Tomado de las notas del curso de Biofísica, Louvain, Bélgica, mayo de 1987, impartido por el Profesor W.Hol.)

En el diseño de nuevos medicamentos, cada día son más numerosas las firmas farmacéuticas que utilizan los métodos de investigación de la estructura 3D para estos fines. Se estudian las estructuras 3D de las posibles proteínas dianas a los medicamentos y se mimifican las posibles interacciones medicamento-proteína (Hol, 1986).

A continuación relacionaremos un grupo de proteínas que son estudiadas en la actualidad con vistas a la búsqueda de nuevos medicamentos, siguiendo la metodología indicada:

- la hemoglobina siclémica;
- enzimas similares a la renina para el control de la hipertensión;

- fosfolipasa A, enzima clave en los procesos de síntesis de prostaglandinas y otras enzimas mediadoras de la hipersensibilidad y la inflamación;
- enzimas que participan en la síntesis de las membranas bacterianas. Esta área es importante en relación con el hecho que se presenta actualmente de la resistencia desarrollada por diferentes bacterias contra los antibióticos, fundamentalmente la penicilina;
- proteínas virales, lo que ofrece la oportunidad de intervenir en el ensamblamiento de los virus;
- enzimas esenciales para la vida de ciertos patógenos, con homologías o no en el hombre, que puedan ser interferidas por drogas especiales. Actualmente se sigue un estudio con este enfoque en relación con las enzimas glicolíticas del *Trypanosoma brucei*, causante de la enfermedad del sueño.

En la búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer, el conocimiento de las estructuras 3D de diferentes proteínas puede ayudar en la selección de productos que interfieran solamente el desarrollo de las células cancerosas, eliminando los efectos secundarios, como ocurre con el metotrexate, que interfiere a la hidrofolatorreductasa, esencial también para la división celular de las células normales.

Además de los ya mencionados problemas metodológicos, es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos físicos microscópicos, lo que requiere un mayor desarrollo de investigaciones fundamentales en este campo. Es necesario, además, el desarrollo de un *software* adecuado que dé respuesta a los problemas planteados.

SOBRE EL ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS 3D DE LOS INTERFERONES

En el estudio de esta molécula se han realizado los estimados de la estructura secundaria por difracción circular, aplicando los métodos de predicción estadísticos (Langer, Pestka, 1985).

Basado en las mediciones de difracción circular, se ha estimado un contenido de hélices α entre 55 y 70%, sin la presencia aparente de plegamientos β (menor del 15 %). Los métodos de predicción estadística han coincidido con estos resultados (Sternberg, Cohen, 1982).

Se han propuesto dos posibles estructuras 3D para la molécula de los interferones, predichas por dichos autores. En este trabajo se concluye que los posibles sitios funcionales de la molécula del interferón se encuentran en las regiones 37-48 y 105-139, tomando como base el hecho de que, además de ser regiones espaciales cercanas, sus respectivas secuencias de aminoácidos se han conservado en las diferentes especies. Esta región, además, contiene el enlace disulfuro Cis31-Cis141 (IFN- β), Cis29-Cis139 (IFN- α); no se discute la diferencia funcional ligada a la ausencia de dicho enlace en el IFN- γ . Los métodos de estudio de fragmentos de interferón sugieren que la región 138-150 es esencial para la actividad biológica de la molécula, lo que coincide con el modelo de Sternberg.

Existe otro modelo más reciente (Ptitsen *et al.*, 1985) que predice la existencia de dos dominios en la molécula de interferón que coinciden con los resultados de los experimentos de proteólisis, lo que muestra que la molécula se separa en dos fragmentos, del residuo 1-110 y del 111-166, y que ambos fragmentos son resistentes a proteólisis posteriores (Ackerman *et al.*, 1984). Los experimentos de actividad del primer fragmento muestran que posee actividad antiviral, lo que no contradice lo concluido por Sternberg, pero impone severas restricciones a la zona activa.

En la figura 4 se comparan las estructuras secundarias predichas por diferentes autores para la moléculas del interferón.

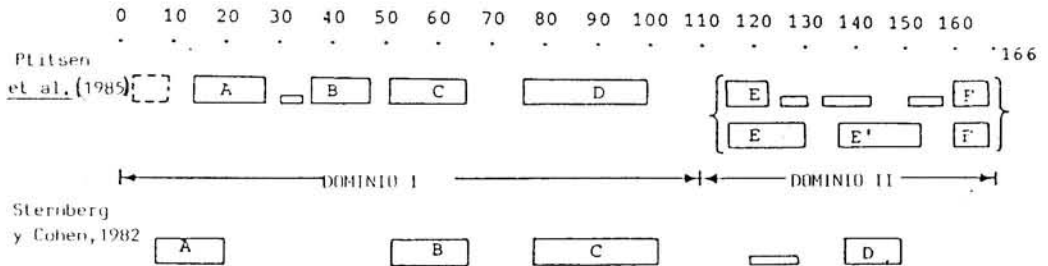


Fig. 4. Comparación de las estructuras secundarias para la molécula de interferón predichas por diferentes autores. La simbología es la siguiente: (□) hélices α ; (▭) capas β ; (---) hélices α , que pueden estar ausentes en algunos interferones.

Hasta el momento no existen datos estructurales finales de la molécula del interferón basados en la cristalografía de proteínas. Recientemente fue cristalizado el IFN- γ recombinante humano y se dieron los resultados cristalográficos preliminares para dicha molécula (Vijaykumar *et al.*, 1987). No ha sido reportada en la literatura la existencia de cristales adecuados para su estudio por DRX de las moléculas de los interferones humanos α y β (Miller *et al.*, 1982). Recientemente fue cristalizada la molécula de un IFN- β recombinante murino y se dieron los resultados cristalográficos preliminares (Matsuda *et al.*, 1986).

Recientemente se ha comenzado a establecer analogías de los interferones con otras moléculas, como son la molécula de interleukina-2 y la de la hormona de crecimiento humana (Cohen *et al.*, 1986). Estos resultados deberán abrir un camino en la explicación de los mecanismos de interacción de estas moléculas, determinar si tienen un ancestro común, etc. No se ha realizado un análisis estructural-funcional de estas moléculas como se ha mostrado en el presente trabajo, y que dé respuesta a las interrogantes planteadas a la maquinaria bioquímica de los mecanismos de interacción del interferón.

REFERENCIAS

- ACKERMAN, S. K.; B. Z. NEEDEN; M. HEINTZELMAN; M. HUNKARPILLER y K. ZOON (1985). *Biologic activity in a fragment of Recombinant Human Interferon α* . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**: 1045-1047.
- BLUNDELL, T. L. y L. N. JOHNSON (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press (London) Ltd. 13-17.
- COHEN, F. E.; P. A. KOSEN; I. D. KUNTZ; L. B. EPSTEIN; T. L. CIARDELLI y K. A. SMITH (1986). *Structure Activities Studies of Interleukin-2*. Science **234**: 349-352.
- DOUZOU, P.; G. H. HOA y G. A. PESTKO (1976). *Protein Crystallography at sub-zero Temp.* J.Mol. Biol. **96**: 381-392.
- GREER, J. A. (1985). *Protein Structure and Function by Comparative Model Building*. Annals N. Y. Acad. Sci. **439**: 44-63.
- HAJDI, J. (1986). *First Electron Density Map from Laue Photographs of Phosphorylase Crystal*. Information Quarterly for Protein Crystallography, Daresbury Lab. (England) March: 17-22.
- HOL, W. G. J. (1986). *Protein Crystallography and Computer Graphics toward Rational Drug Design*. Angew. Chem. **25**: 767-778.

- HOL, W. G. J. (1987). *Applying Knowledge of Protein Structure and Function*. Notas del Curso de Biofísica, Louvain, Bélgica, mayo 11-17.
- KARPLUS, M. (1985). *Dynamics Aspects of Protein Structure*. Annals N. Y. Acad. Sci. **439**: 107-123.
- LANGER, J. A. y S. PESTKA (1985). *Structure of Interferons*. Pharmac. Ther. **27**: 371-401.
- MATHWES, B. H. (1976). *X Ray Crystallographic Studies of Protein*. Annual Rev. Phys. Chem. **27**: 493-523.
- MATSUDA, S.; G. KAWANO; S. ITAH; Y. TITSUI y Y. IITAKA (1986). *Crystalization and Preliminary X-Ray Studies of Recombinant Murine Interferon β* . J. Biol. Chem. **261**: 16207-16209.
- MAUGH, T. H. (1984). *Need a Catalyst? Design an Enzyme*. Science **223**: 269-271.
- MILLER, D. L.; H. KUNZ y S. PESTKA (1982). *Crystalization of recombinant Human Leukocyte Interferon A*. Science **215**: 689-690.
- PIITSEN, O. B.; A. V. FINKELSTEIN y A. G. MURZIN (1985). *Structural Models for Interferons*. FEBS Lett. **186**: 143-148.
- SCHERAGA, H. A. (1985). *Calculation of the three Dimensional Structure of Proteins*. Annals N.Y. Acad. Sci. **439**: 171-193.
- SCHULZ, G. E. y R. H. SCHIRMER (1979). *Principles of Proteins Structure*. Springer-Verlag N.Y., pp. 66-130.
- STERNBERG, M. J. E. y F. E. COHEN (1982). *Predictions of the Secondary and Tertiary Structures of Interferons from four Homologous Aminoacids Sequences*. Int. J. Biol. Macrom. **4**: 137-144.
- ULMER, K. M. (1983). *Protein Engineering*. Science **219**: 666-671.
- VAN RUMPY, L. (1987). *Structural and Functional Information Deduced from Sequence Analysis of Proteins*. Notas del Curso de Biofísica, Louvain, Bélgica, mayo 11-17.
- VIJAYKUMAR, S.; S. E. SENADHI; S. E. EALIK; T. L. NAGABHUSHAN; P. P. TROTТА; R. KOSECKI; P. RICHERD y C.E. BUGG (1987). *Crystallization and Preliminary X Ray Investigation of a Recombinant Form of Human Interferon gamma*. J. Biol. Chem. **262**: 4804-4805.
- WEIL, J. H. (1979). *Biochimie Generale*. Masson, París: 31-36.
- WODAK, S. (1987). *Molecular Modelling*. Notas del Curso de Biofísica, Louvania, Bélgica, mayo 11-17.
- WUTHRICH, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons U.S.A. : 1-31.