

L'EMOCIÓ DE DESCOBRIR

SEVERO OCHOA

Conferència de la Sessió Inaugural del Curs 1987-88, pronunciada a la Sala Prat de la Riba de l'I.E.C., el dia 7 d'octubre de 1987.

Versió catalana de MERCÈ PIQUERAS i CARRASCO, a partir de l'adaptació castellana del propi Professor Ochoa de l'original anglès: "The Thrill of Discovery". *Comp. Biochem. Physiol.* 67B, (1980) 359-365.

Voldria, avui, discórrer sobre la satisfacció que pot produir el dedicar la vida a la investigació científica. Poques vegades he sentit una emoció més intensa com quan vaig creure que havia fet descobriments d'alguna transcendència. Us parlaré, doncs, d'alguns d'aquells moments de la meva vida que recordo amb més plaer. Els estudis de què us parlaré, abasten dues etapes de l'activitat investigadora del meu laboratori. Una, la fixació de CO₂ per animals i plantes; l'altra, el descobriment i l'estudi d'un enzim que catalitza la síntesi de compostos anàlegs a l'àcid ribonucleic (RNA) i la utilització d'aquests compostos en el desxiframent de la clau genètica.

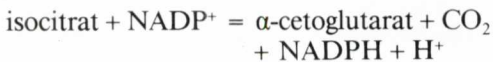
Vers la fi dels anys 30, durant una meva estada en el laboratori del professor PETERS a la Universitat d'Oxford, vaig interessar-me per l'estudi dels processos cel·lulars que fan l'energia metabòlica utilitzable pels éssers vius. L'energia de les oxidacions cel·lulars és canalitzada mitjançant la síntesi d'ATP (adenosina trifosfat) a

partir d'ADP (adenosina difosfat), fet que requereix al voltant de les 10.000 calories. Les 10.000 calories emmagatzemades a l'enllaç entre els dos últims fosfats de l'ATP són utilitzades en l'organisme en un gran nombre de processos biològics, tals com la contracció muscular, l'absorció intestinal, la conducció de l'impuls nerviós, la producció de calor, l'activitat mental, i d'altres; així com per a efectuar la síntesi (consumidora d'energia) d'un gran nombre de compostos dins la cèl·lula, tals com els hidrats de carboni, les proteïnes, els greixos, els àcids nucleics, i molts d'altres. La síntesi de l'ATP va acoblada a l'oxidació cel·lular dels hidrats de carboni, greixos i proteïnes. És per aquest motiu que es coneix aquest procés amb el nom de fosforilació oxidativa.

El 1938 vaig començar a treballar, a Oxford, en la fosforilació oxidativa, tasca que vaig continuar, més tard, a Nova York. A Oxford vaig trobar, en col·laboració amb Illona BANGA (del laboratori de

SZENT-GYÖRGYI i Rudolph PETERS) que extractes dialitzats de cervell de colom requerien la presència de nucleòtids d'adenina (AMP, ADP, ATP) per a realitzar l'oxidació d'àcid pirúvic, glucosa o d'altres productes del metabolisme hidrocarbonat. Aquest fet suggeria una interdependència entre l'oxidació de compostos metabòlics i fosforilació. Aquests resultats es corresponien amb resultats anteriors de KALCKAR a Dinamarca i de BELITZER i TSIBAKOVA a la Unió Soviètica. Es a dir, indicaven que l'energia requerida per a la síntesi d'ATP es generava no sols com a resultat de la deshidrogenació de determinats intermediaris metabòlics (per exemple, fosfogliceraldehid, un intermediari de la glicolisi), sinó durant el transport d'ions d'hidrogen i electrons a l'oxigen molecular a través dels nucleòtids de piridina (NAD, NADP), flavoproteïnes i citocroms, els anomenats catalitzadors de la cadena respiratòria.

Em va semblar, aleshores, que probablement mai no s'arribaria a comprendre el mecanisme de la fosforilació oxidativa si no se'n coneixien les reaccions enzimàtiques amb què estava acoblat. Aquestes reaccions són la causa, dins la cèl·lula, de l'oxidació completa de la glucosa i d'altres metabòlits a CO_2 i H_2O a través de diverses etapes intermediàries. Aquest procés és conegut com a cicle de l'àcid cítric de KREBS. En aquella època, però, sabíem relativament poca cosa de la natura i manera d'actuar dels enzims del cicle. Això va fer que em decidís a estudiar-ne alguns. Vaig començar per la deshidrogenasa de l'isocitrat. Aquest enzim catalitza la descarboxilació oxidativa de l'isocitrat a α -cetoglutarat i CO_2 en presència de NADP i de ions Mg o Mn; és a dir, la següent reacció:



L'isocitrat es forma a partir del citrat, com ja ho havia demostrat MARTIUS, passant per cis-aconitat; reacció que és cata-

litzada per l'enzim aconitasa. MARTIUS creia que la reacció catalitzada per la deshidrogenasa de l'isocitrat tenia lloc en dues fases:

1) oxidació de l'isocitrat a oxalosuccinat.

2) descarboxilació de l'oxalosuccinat a α -cetoglutarat i CO_2 .

Per comprovar-ne la certesa, vaig decidir preparar oxalosuccinat i estudiar-ne el comportament en presència de la deshidrogenasa de l'isocitrat. L'àcid oxalosuccínic és extremadament inestable i es descarboxila amb molta facilitat. El meu primer intent d'hidrolitzar l'èster etílic de l'àcid oxalosuccínic (comercialment a l'abast) amb HCl diluït va ser tot un èxit, si bé no n'he sabut mai el perquè. L'oxalosuccinat es reduïa a isocitrat, en presència de deshidrogenasa isocítrica i NADPH, i aquest mateix enzim n'accelerava la descarboxilació en presència d'ions Mn. La idea d'en MARTIUS semblava, per tant, encertada. Imagineu-vos el meu decensís quan, en haver acabat el meu primer oxalosuccinat, vaig tractar de preparar-ne més sense aconseguir-ho de cap de les maneres. No puc recordar quants assaigs vaig fer, utilitzant cada vegada HCl menys diluït, sense cap èxit. En la meva desesperació, vaig utilitzar HCl concentrat per a la hidròlisi i, vet aquí que allò va funcionar, amb gran sorpresa per part meva. No volent arriscar-me més, vaig preparar una gran quantitat d'àcid oxalosuccínic, el qual és molt estable en forma de sal de bari. En vaig preparar força per a completar tots els experiments que volia fer i proveir-ne, amb quantitats generoses, a d'altres investigadors, i encara me'n va sobrar.

Durant molt de temps s'havia cregut que la fixació biològica del CO_2 era patrimoni exclusiu de les plantes verdes i dels microorganismes anomenats autòtrofs. El 1938, però, WOOD i WERKMAN van demostrar que aquesta fixació també era realitzada per microorganismes heteròtrofs,

concretament per una espècie de bacteris que fermenten la glucosa a àcid propiònic (bacteris propiònics). Aquests bacteris incorporaven CO_2 marcat amb un isòtop pesant de carboni (C_{13}O_2), en els grups carboxílics d'àcids dicarboxílics tals com succínic, fumàric, màlic i oxalacètic. En aquell temps, eren molt pocs el laboratoris que havien començat a utilitzar isòtops, pesants o radioactius, per a les investigacions biològiques. En el laboratori d'EVANS a la Universitat de Chicago, es va utilitzar un isòtop radioactiu de vida extremament curta. Es va poder demostrar que la fixació de CO_2 no sols es donava en bacteris, sinó també en teixits animals, concretament en fetge de rata, i que el CO_2 , de la mateixa manera que en els bacteris, s'incorporava als grups carboxil dels àcids dicarboxílics. El mecanisme de fixació de CO_2 a nivell molecular era, però, desconegut. Se'm va acudir que una reacció com la catalitzada per la deshidrogenasa isocítrica, que en un sentit alliberava CO_2 , podria causar-ne la fixació en vas de ser reversible i poder actuar en sentit contrari. Si això era cert, seria possible demostrar la fixació del CO_2 , no únicament per mitjà dels isòtops, d'ús encara molt limitat aleshores, sinó amb un senzill mètode espectrofotomètric. De fet, com havia demostrat WARBURG, pot fer-se un seguiment de l'oxidació i la reducció dels nucleòtids de piridina gràcies als canvis en l'absorció de llum ultraviolada que origien. Tant el NADPH com el NADH mostren un màxim d'absorció a 340 nm, en tant que el NADP^+ i el NAD^+ en presenten un mínim. Si la deshidrogenasa isocítrica afavorís la fixació de CO_2 en els grups carboxílics de l'isocitrat (i, secundàriament, en el citrat que s'origina a partir d'aquell isocitrat), en conèixeríem el mecanisme enzimàtic, si més no, en un cas.

Vaig trigar força a dur a la pràctica aquest pensament, perquè em temia que allò no havia de rutllar. Aleshores, jo tenia un gran amic, Efraim RACKER, que també

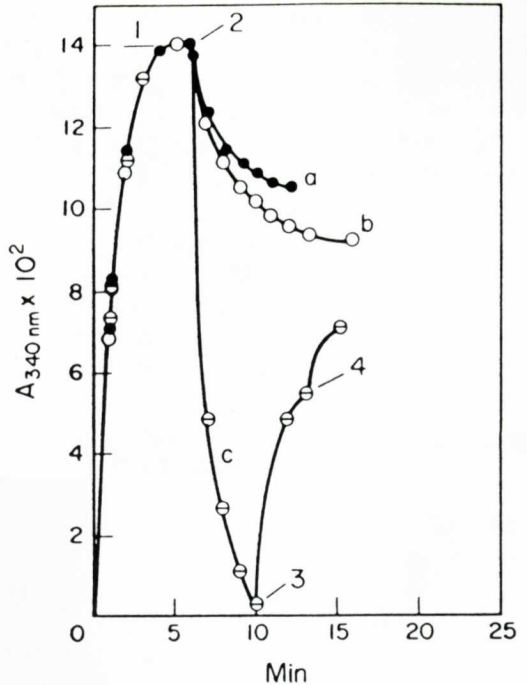


Fig. 1. Demostració espectrofotomètrica de la reacció catalitzada per la deshidrogenasa isocítrica (OCHOA, 1948).

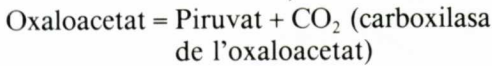
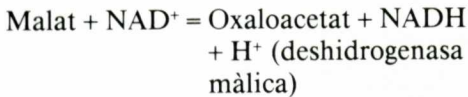
s'estava a la Facultat de Medicina de Nova York, amb qui anava a dinar cada dia i, sovint, també a fer un cafè. Les nostres converses giraven sempre al voltant de temes bioquímics. Un dia, vaig decidir-me a comunicar-li la meua idea, afegint-hi que no em decidia a dur-la a la pràctica perquè potser era massa ingènua. Sense dubtar-ho un moment, va dir-me que no la hi trobava, d'ingènua, i va animar-me a fer els experiments adients sense perdre un moment. El primer experiment va donar els resultats que veureu a la Figura 1. La cubeta de l'espectrofotòmetre contenia, a més d'una dissolució de bicarbonat saturada amb CO_2 , una petita quantitat d'un extracte de cor de porc (font de deshidrogenasa isocítrica), isocitrat i ions Mn. La mescla estava regulada a pH 7,2 i la temperatura era d'uns 22°. A temps zero vaig afegir, a la cubeta, NADP^+ i, com podeu veure

pel ràpid augment d'absorció de llum a 349 nm, en pocs minuts es va reduir a NADPH. En aquell moment (fletxa 2), hi vaig afegir α -cetoglutarat en concentracions creixents, en tres experiments diferents, és a dir: 3,4 (corba A), 6,8 (corba B) i 41,2 (corba C) micromols. Aleshores, la reacció va començar immediatament a canviar el seu sentit, tal com ho indica la disminució de ($A_{340\text{ nm}}$), és a dir, el NADPH previament format es reoxida a NADP⁺. La reoxidació fou pràcticament completa en el cas de la concentració més elevada d' α -cetoglutarat. Vaig tornar a comprovar la reversibilitat de la reacció bombollejant nitrogen dins la cubeta (en els moments indicats per les fletxes 3 i 4). El nitrogen desallotjava CO₂ i, com a conseqüència, en feia disminuir la concentració dins la dissolució. Aleshores, la reacció canviava de sentit i començava, de nou, la reducció del NADP⁺. De fet, aquesta reacció arriba a un punt d'equilibri que depèn de la concentració dels productes que es formen part. No crec que sigui capaç de transmetre-us la intensa emoció que vaig experimentar en observar aquests resultats. Recordo que vaig sortir de la petita cambra on es trobava l'espectrofotòmetre cridant: "*Veniu, veniu a veure això*". El meu entusiasme m'havia fet oblidar que eren les nou del vespre i que jo era l'única persona que encara es trobava en el laboratori.

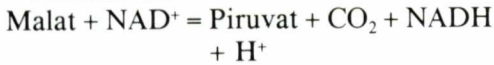
L'espectrofotòmetre amb què vaig dur a terme l'experiment tot just descrit era de la casa BECKMAN. L'havia comprat amb un ajut que vaig aconseguir de la Societat Filosòfica Nordamericana, i que havia demanat seguint el suggeriment del meu antic mestre Otto MEYERHOF, que n'era membre. La Societat Filosòfica adquiria l'aparell i me'l cedia per un any. Transcorregut aquest termini els l'havia de retornar. L'aparell duia una etiqueta on deia: "*propietat de l'American Philosophical Society*". En acabar l'any, trobant-me encara

immers en els meus experiments sobre la fixació de CO₂, vaig presentar a la Societat la corresponent memòria sobre el progrés realitzat, acompanyada d'una carta en què els demanava que em permetessin utilitzar l'espectrofotòmetre un any més. Justificava la meua petició amb la importància que jo creia que el treball tenia i adduint la necessitat d'aquell aparell per a poder-lo continuar. La Societat va accedir-hi generosament. Quan, en acabar el segon any, vaig fer-los, novament, la mateixa sol·licitud, la Societat va cedir l'espectrofotòmetre a la Universitat de Nova York per una quantitat nominal. Aquell va ser el meu primer espectrofotòmetre i l'únic que hi va haver en el meu laboratori durant molts d'anys. Un dels meus col·laboradors, el Dr. Alan GRAFLIN, va batejar-lo com el "*Beckman filosòfic*".

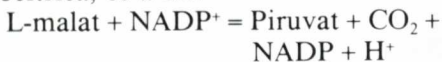
Jo creia que allò que ens deien deshidrogenasa isocítrica era en realitat una mescla de dos enzims: la deshidrogenasa isocítrica propiament dita i la carboxilasa (o descarboxilasa) de l'oxalosuccinat que, sens dubte, devia ser un intermediari de la reacció. Tanmateix, l'Alan GRAFLIN, a qui vaig encomanar l'estudi d'aquest problema, no ho va poder comprovar. En aquella època, jo tot just m'havia traslladat del Departament de Bioquímica, on el meu càrrec havia estat el de Professor Assistent, al de Farmacologia, on era Cap del Departament. Això era a la tardor del 1946. Allà vaig tenir el meu primer estudiant de doctorat, l'Alan MEHLER. També van estar-se amb mi en aquella època en Santiago GRISOLÍA i l'Arthur KORNBERG. Inicialment, vaig encarregar a MEHLER que veiés si era possible combinar una deshidrogenasa amb una descarboxilasa i obtenir-ne una descarboxilació oxidativa anàloga a la de l'isocitrat. Concretament, MEHLER va mesclar dos enzims coneguts: la deshidrogenasa màlica i la descarboxilasa de l'oxaloacetat. Aquests dos enzims catalitzen les següents reaccions:



Resultat net:



L'equilibri de la reacció catalitzada per la deshidrogenasa afavoreix força la formació de malat, mentre que el de la que és catalitzada per la carboxilasa afavoreix de tal manera la descarboxilació (vers la dreta), que la reacció pot ésser considerada pràcticament irreversible. MEHLER va tractar, primer, de veure si, afegint malat i NAD^+ a una mescla de deshidrogenasa i carboxilasa, n'obtenia una descarboxilació oxidativa, amb formació de piruvat, CO_2 i NADH ; però no va ser així. Va repetir els experiments moltes vegades, canviant-ne les condicions i provant també el sentit contrari, que resultaria en la formació de NAD^+ , en presència dels dos enzims, piruvat, CO_2 i NADH . Els experiments van ser sempre negatius. Tanmateix, un bon dia, l'Alan va observar que, en afegir NADP^+ , però no NAD^+ , a un extracte de fetge de colom, es produïa, en presència de ions Mn, una ràpida oxidació del malat. Aquest va ser l'origen del descobriment d'un nou enzim que vam anomenar enzim màlic. Aquest enzim catalitza una reacció anàloga a la catalitzada per la deshidrogenasa isocítrica, és a dir:



en presència de ions Mn. La reacció és reversible i, en el sentit de dreta a esquerra, causa la fixació de CO_2 en un dels carboxils del malat. De la mateixa manera que la reacció de la deshidrogenasa isocítrica, aquesta també pot seguir-se per espectrofotometria. Aquest enzim va ser purificat i estudiat detalladament per MEH-

LER, KORNBERG, GRISOLIA i d'altres investigadors del nostre laboratori. A la Figura 2, la cubeta de l'espectrofotòmetre contenia una solució regulada a pH 7,4, ions Mn i les addicions que ara detallaré. Per a la corba 1, NADP^+ , enzim màlic parcialment purificat i, a temps zero, L-malat. Com es pot veure per l'augment d'absorció de la llum a 340 nm, el NADP^+ es va reduir ràpidament, cosa que indica un progrés de la reacció d'esquerra a dreta. Per les corbes 2 i 3, es va afegir a la cubeta enzim màlic i NADPH (fixeu-vos en l'elevada absorció inicial a 340 nm) i, a temps zero, piruvat. En el cas de la corba 2, s'hi va afegir bicarbonat saturat amb CO_2 en el moment indicat per la lletra A. En el de la corba 3, s'hi va afegir piruvat i bicarbonat simultàniament a temps zero. És evident que l'addició de bicarbonat- CO_2 a una dissolució que contingui enzim màlic, NADPH i piruvat fa que la reacció progressi de dreta a esquerra, és a dir, en el sentit de la fixació de CO_2 . Els nostres experiments amb la deshidrogenasa isocítrica i l'enzim màlic van demostrar que, en teixits animals, hi ha enzims capaços de catalitzar la fixació de CO_2 en els grups carboxílics d'àcids policarboxílics com l'isocitrat i el malat i que aquesta fixació pot estudiar-se amb un senzill mètode espectrofotomètric. Arribem, per tant, a la conclusió que, encara que es tracti d'una reacció que té lloc en dues etapes, cadascun d'aquests dos enzims, la deshidrogenasa isocítrica i l'enzim màlic, poden ésser considerats com un enzim únic amb dos centres actius: un per a la hidrogenació-deshidrogenació i l'altre per a la carboxilació-descarboxilació.

Transcorregut un cert temps, Wolf VISHNIAC i jo vam obtenir, en el tub d'assaig, una reacció que podia considerar-se com a model de la reacció fonamental de la fotosíntesi. Vam fer una mescla d'enzim màlic i preparats de cloroplasts d'espínacs que, en ésser suplementats amb ions Mn,

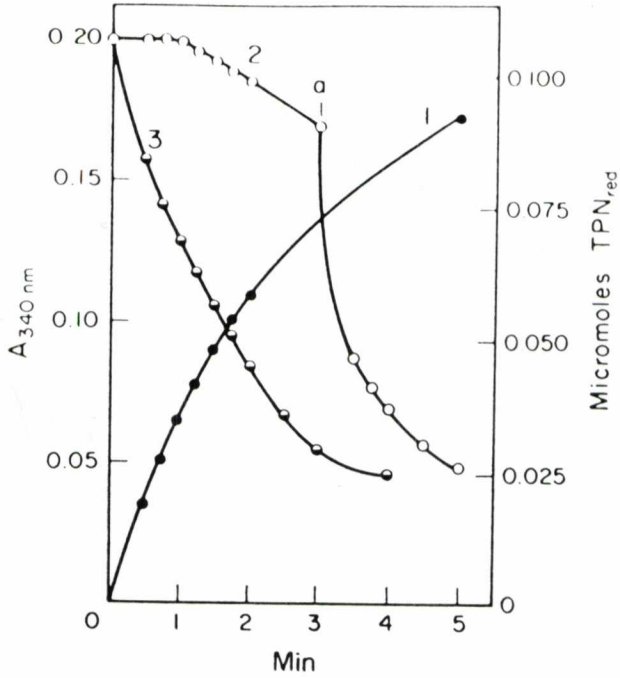


Fig. 2. Demostració espectrofotomètrica de la reacció catalitzada per l'enzim màlic (OCHOA *et al.*, 1948).

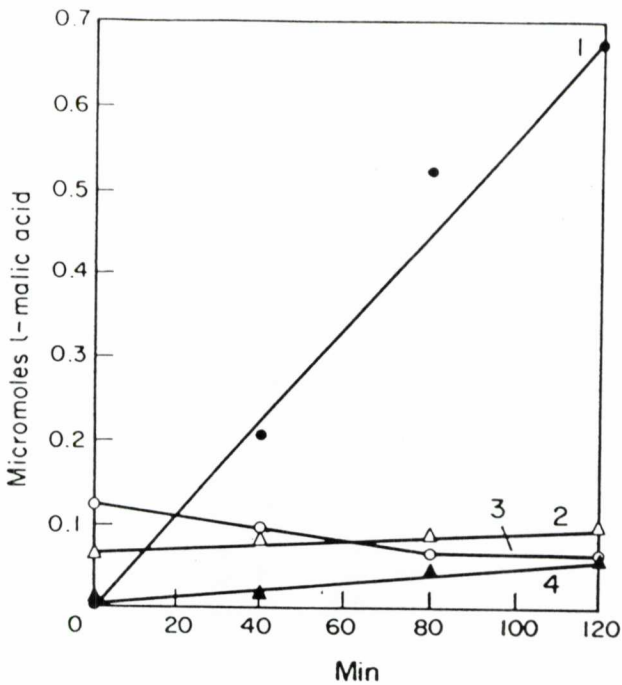


Fig. 3. Reducció fotoquímica de NADP⁺, en preparats d'espinaç, acoblada amb la reducció carboxilant (fixació de CO₂) de pivurat a L-malat en presència d'enzim màlic (WISHNIAC i OCHOA, 1951).

NADP, piruvat, bicarbonat saturat amb CO_2 , i il·luminats, sintetitzaven L-malat després d'uns quants minuts. La reacció es deu al fet que els cloroplasts, mitjançant l'energia lumínica, provoquen la reducció de NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$, i el NADPH promou la síntesi de L-malat a partir de piruvat i CO_2 , en presència de l'enzim màlic. Aquests experiments van demostrar, per primera vegada, la capacitat dels cloroplasts de produir la reducció fotoquímica dels nucleòtids de piridina, una reacció bàsica de la fotosíntesi. La Figura 3 il·lustra aquests experiments. El sistema complet contenia una preparació de cloroplasts, NADP^+ , enzim màlic, piruvat i bicarbonat saturat amb CO_2 . La corba 1 ens mostra la síntesi gradual de L-malat (determinat per un mètode enzimàtic) en el sistema il·luminat. No es produïa cap síntesi quan hi mancaven l'enzim màlic (corba 2), la llum (corba 3) o el NADP^+ (corba 4).

La polinucleòtid-fosforilasa i la clau genètica

El 1954, un deu anys després del meu últim treball sobre fosforilació oxidativa, em va semblar, de manera un tant ingènua, que ja anava essent hora de tornar a aquell tema. Vaig pensar, de manera molt simplista, que havia de buscar enzims capaços de convertir ADP en ATP i que la millor manera d'estudiar aquesta reacció era determinar la incorporació de fosfat radioactiu a l'ATP. Vaig creure també que tindria més possibilitats de trobar aquests enzims en extractes del bacteri *Azotobacter vinelandii*, que tenia la capacitat d'oxidar molt activament glucosa, piruvat i d'altres compostos intermediaris del cicle de l'àcid cítric. Feia poc havian arribat al laboratori dos estudiants postdoctorals: Ernie ROSE, procedent de la Universitat de Chicago, i Marianne GRUNBERG-MANAGO de l'Insti-

tut de Biologia Físico-Química (Fundació Rotschild) de París. Un altre dels problemes que en aquella època m'interessaven era el mecanisme de la fosforilació de l'acetat a acetilfosfat per un enzim bacterià. Vaig explicar els dos projectes als meus dos nous col·laboradors i els vaig demanar que em diguessin en quin d'ells preferien treballar. No s'ho van pensar gaire; Bernie va escollir l'acetilfosfat i Marianne la fosforilació oxidativa.

Els extractes d'*Azotobacter* semblaven promoure molt activament la incorporació de fosfat marcat amb ^{32}P en l'ATP i vam purificar parcialment la proteïna o proteïnes que catalitzaven aquesta incorporació. En aquell temps, la majoria dels productes utilitzats en la investigació bioquímica ja podien ésser obtinguts comercialment. Vam començar utilitzant un preparat amorf d'ATP, el més pur que hi havia aleshores en el mercat. Quan feia un mes o dos que havíem començat l'experiment, es va posar a la venda un preparat cristal·lí i, com que vam pensar que devia ser més pur, vam decidir d'utilitzar-lo. Amb aquest ATP cristal·lí, però, no es produïa cap reacció. De moment, això ens va alegrar, ja que vam pensar que l'ATP menys pur devia contenir un coenzim, fins aleshores desconegut, necessari per a la reacció. Però no era així. En analitzar el nostre ATP amorf, a la recerca del nou coenzim, vam trobar que l'ATP només estava contaminat per una petita quantitat d'ADP (producte de la seva hidròlisi) i que, quan la incubació es feia amb ADP en comptes d'ATP, l'ADP incorporava fosfat radioactiu. De moment, això va desanimar-nos. Indubtablement, aquest fenomen no podia tenir relació amb la fosforilació oxidativa, però, al cap i a la fi, ningú no havia demostrat l'existència d'una incorporació enzimàtica de radiofosfat en l'ADP en les condicions que nosaltres vam utilitzar. Sens dubte, teníem una nova reacció entre les mans. Aviat ens vam adonar que la incor-

poració de radiofosfat es produïa, no sols quan el preparat d'*Azotobacter* s'incubava amb ADP, sinó també quan s'incubava amb d'altres nucleòsid-difosfats tals com l'UDP, el CDP i l'IDP. La Taula I il·lustra la incorporació de radiofosfat en els nucleòsid-difosfats que tot just us he indicat amb preparats de l'enzim d'*Azotobacter* de diferent grau de puresa. L'enzim B era unes deu vegades més actiu per miligram de proteïna que l'enzim A. La incorporació de ^{32}P ortofosfat es va determinar després d'incubar l'enzim durant quinze minuts a 30° amb un nucleòsid-difosfat en presència de ions Mg. Es va prendre com a unitat d'enzim aquella quantitat que catalitza la incorporació d'un micromol de fosfat en quinze minuts, i la seva activitat específica es va expressar en unitats per mg de proteïna. A l'última columna veureu que la relació d'activitats específiques d'ambdós preparats és, pràcticament, la mateixa amb els diversos nucleòsids-difosfats. Això suggereix que un mateix enzim catalitza la reacció de tots ells. També vam trobar que l'enzim catalitza l'alliberament d'ortofosfat, si s'incubava amb nucleòsid-difosfats a concentracions relativament elevades. Aquest alliberament s'il·lustra en la Figura 4. Les dissolucions, regulades a pH 8,1, contenien enzim parcialment purificat, ions Mg i, o bé ADP, GDP, UDP, CDP ó IDP, o bé mescles d'ADP i UDP, ó d'ADP, GDP, UDP i CPD. En l'últim cas, la mescla contenia totes les bases (adenina, guanina, uracil i citosina) que es troben al RNA. Les dissolucions (a les quals es va afegir una gota de toluè com a bacteriostàtic) van ser incubades unes quantes hores i es va seguir el curs de la reacció per l'alliberament d'ortofosfat, fins arribar a l'equilibri. Feta excepció del GDP, que reacciona pobrament, la reacció va arribar a l'equilibri en alliberar-se de un 60 a un 80 per cent de la quantitat màxima de fosfat alliberable. Aleshores ens va semblar que havíem trobat una reacció enzimàtica d'es-

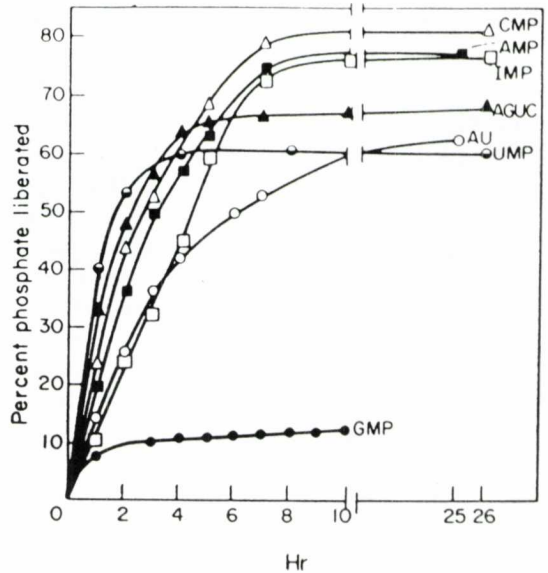


Fig. 4. Alliberació d'ortofosfat durant la síntesi de polinucleòtids, a partir de nucleòsid-difosfats, catalitzada per la polinucleòtid fosforilasa (GRUNBERG-MANAGO *et al.*, 1956).

càs o gens d'interès; és a dir, una hidròlisi de l'ADP i d'altres nucleòsid-difosfats a AMP i altres nucleòsids-monofosfats. En el cas de l'ADP.



El fet curiós era que la reacció fos reversible, com ho mostrava el fet de que hi hagués incorporació d'ortofosfat en els nucleòsid-difosfats, i no semblava probable que una reacció hidrolítica fos reversible. Al llarg d'uniques setmanes vam tractar de demostrar la formació d'AMP a partir d'ADP en presència de l'enzim d'*Azotobacter*. Finalment, ens vam adonar que l'ADP es convertia en un polímer d'elevat pes molecular amb alliberament d'ortofosfat. Aquest polímer era un àcid poliadenílic constituït per un gran nombre de residus d'AMP i el vam anomenar poli (A). Incubàvem ADP amb enzim parcialment purificat, en presència de ions Mg, i aturàvem la reacció per desproteïnitació amb àcid tricloroacètic. Pensant que l'ADP

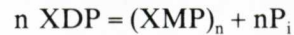
TAULA 1

Catàlisi per la polinucleòtid-fosforilasa de l'intercanvi d'ortofosfat marcat amb ^{32}P amb el fosfat terminal de diversos nucleòsid-difosfats (OCHOA, 1967)

Nucleòsid difosfat	Activitat específica		Relació b:a
	Enzim a	Enzim b	
ADP	50	528	10,6
GDP	45	450	10,0
UDP	77	690	9,0
CDP	48	425	8,8
IDP	60	515	8,6

s'hidrolitzava amb AMP (un compost àcid soluble) en separar-se la fracció soluble del precipitat proteic per centrifugació, cercàvem AMP a la fracció soluble, però mai no l'hi trobàvem. Vam veure, en canvi, que es formava un polímer insoluble en àcid tricloroacètic i que es trobava, per tant, en el precipitat. En dissoldre el precipitat en aigua, el polímer precipitava per addició d'etanol. Podeu imaginar-vos quina va ser la meua emoció quan vaig adonar-me d'allò que en realitat ocorria: la primera síntesi, fora de la cèl·lula, d'una reacció enzimàtica. La Taula 2 il·lustra la preparació de diversos polinucleòtids. Va incubar-se enzim d'*Azotobacter* amb diversos nucleòsid-difosfats, o amb mescles d'uns quants d'ells i es va determinar el progrés de la reacció per l'alliberament d'ortofosfat. En

tots els casos es va continuar la incubació fins al moment en què la reacció arribava a l'equilibri, fet que es va esdevenir entre les quaranta i quaranta-sis hores. Els polinucleòtids van ser aïllats per precipitació amb etanol, seguida de diàlisi exhaustiva contra aigua destil·lada i liofilització. Com que la presència de GDP alenteix la reacció, per a preparar polímers amb GDM, vam disminuir la concentració de GDD relativa a la dels altres nucleòsid-difosfats i vam augmentar força la quantitat d'enzim. Més endavant vam observar que alguns oligonucleòtids poden actuar com a iniciadors de la reacció amb GDP i augmenten considerablement la síntesi de polinucleòtids que contenen residus de GMP. El nou enzim catalitza la següent reacció:

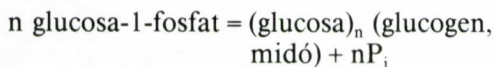


en què X representa una base nucleotídica (adenina, hipoxantina, guanina, uracil, citosina) i P_i l'ortofosfat. Com podeu veure, la reacció és reversible i, en el sentit de dreta a esquerra, causa la ruptura dels polinucleòtids per un procés de fosforilisi. La reversibilitat de la reacció explica perquè s'incorpora ortofosfat en la posició del fosfat terminal del nucleòsid-difosfat. La reacció és formalment anàloga a la catalitzada per l'enzim descobert per Carl i Gerty CORI, és a dir,

TAULA 2

Síntesi de diversos polinucleòtids amb polinucleòtid-fosforilasa d'*Azotobacter vinelandii* (GRUNBERG-MANAGO *et al.*, 1956)

Nucleòsid difosfats	Quantitat d'enzim	Tipus de polinucleòtid sintetitzat	Quantitat màxima de substrat polimeritzat (%)	Quantitat de polinucleòtid obtingut
(mg)	(unitats)			(mg)
ADP (1000)	80	Poli (A)	60	356
UDP (200)	20	Poli (U)	59	75
ADP (180)+UDP (180)	32	Poli (A.U)	46	88
IDP (200)	19	Poli (I)	80	82
CDP	16	Poli (C)	70	40
ADP (299), GDP (100), UDP (200), CDP (200)	725	Poli (A.G.U.C)	64	154



per la qual cosa vaig suggerir el nom de polinucleòtid-fosforilasa per el nou enzim.

La primera comunicació sobre la polinucleòtid-fosforilasa va aparèixer l'estiu de 1955 com una "carta als editors" del *Journal of the American Chemical Society*, malgrat la crítica adversa d'un del *referees*.

R. C. WARNER va descobrir, en el nostre laboratori, que, mesclant una dissolució de poli(A) amb una altra de poli(U) (A: adenina i U: uracil són bases complementàries que es lliguen mútuament mitjançant enllaços d'hidrogen), és produeix un visible augment de viscositat causat per la formació d'un complex bicatenari helicoidal [poli(A).poli(U)], d'estructura molt més rígida que els seus components. Alexander RICH (MIT) va aplicar l'anàlisi de difracció de raigs X a l'estructura d'aquests polímers i va observar que, de manera semblant el DNA, el poli(A).poli(U) també té una estructura de doble hèlix. Poc temps més tard, Paul DOTY (Harvard) va servir-se extensament dels polinucleòtids sintètics en el seu treball fonamental sobre l'enllaçament de cadenes complementàries d'àcids nucleics, base de les modernes tècniques d'hibridació.

Amb la col·laboració de WARNER (N.Y. University) i la de L. HEPPEL, R. HILLMOE i M. SINGER (NIH), vam establir que amb una mescla de nucleòsid-difosfats, corresponents als residus nucleotídics que es troben al RNA natural, la polinucleòtid-fosforilasa catalitza la síntesi de polinucleòtids molt semblants al RNA. L'estructura d'aquests polímers és idèntica a la del RNA; però, en tant que els nucleòtids del RNA natural es troben encadenats en un ordre característic de cada RNA, en els sintetitzats per la polinucleòtid-fosforilasa estan encadenats a l'atzar. Amb M. STAHELIN i D. BRUMMOND, vam observar que la polinucleòtid-fosforilasa es troba àmplia-

ment distribuïda en els bacteris. En canvi, només la vam trobar excepcionalment, i en quantitats ínfimes, en teixits animals. No semblava, per tant, que aquest enzim participés a la síntesi biològica del RNA; més aviat devia funcionar en la seva degradació. A hores d'ara encara no se sap si això és així. Algun temps més tard, en diversos laboratoris, entre els quals el nostre, es va trobar un enzim, la RNA polimerasa. Aquest enzim, servint-se d'una de les cadenes del DNA com a motlle o guió, en copia la seqüència de bases i dona lloc a l'anomenat RNA missatger. Aquest, al seu torn, actua de motlle en la síntesi de proteïnes de manera tal que la seqüència d'aminoàcids de què es componen ve determinada per la seqüència de les bases del DNA. Així és com s'expressa en els éssers vius la informació genètica continguda al DNA. El pas del DNA al RNA missatger és conegut com a transcripció i el del RNA missatger a proteïna com a traducció del missatge genètic.

La importància de la polinucleòtid-fosforilasa es basa en el fet que permet de sintetitzar una gran varietat de ribopolinucleòtids que han servit de model per l'estudi de certes propietats fonamentals dels àcids nucleics i, sobretot, en l'ús que se'n va fer en el nostre laboratori i en el de Marshall NIRENBERG (NIH) per a desxifrar la clau genètica. Es podria dir que la polinucleòtid-fosforilasa va jugar, en aquest cas, un paper semblant al de la famosa "Pedra de Rosetta" en el dels jeroglífics egipcis per CHAMPOLION.

El 1960 se suposava, per consideracions teòriques, i, sobretot, pels enginyosos experiments genètics de Francis CRICK i els seus col·laboradors, que cada tres bases consecutives del RNA missatger especifcaven un aminoàcid; és a dir, que la clau genètica era un codi de triplets. D'altra banda, NIRENBERG i d'altres havien preparat extractes bacterians (*E. coli*) capaços de sintetitzar proteïnes a partir d'una mescla

TAULA 3

Síntesi de polipèptids que contenen diversos aminoàcids en un sistema acel·lular d'*Escherichia coli* programat amb polinucleòtids sintetitzats amb polinucleòtid-fosforilasa (LENGYEL *et al.*, 1961; SPEYER *et al.*, 1962)

Aminoàcid marcat amb ^{14}C	Incorporació d'aminoàcids marcats amb ^{14}C *				
	Sense polinucleòtid	Amb Poli (U)	Amb Poli (U.C)	Amb Poli (U.A)	Amb Poli (U.G)
Fenilalanina	20	13000	7000	3000	1700
Serina	20	20	1000	10	20
Tirosina	20		20	750	30
Leucina	20	300	1500	460	370
Isoleucina	10	90	320	620	30
Prolina	20	20	600	30	10
Valina	20	20	10	40	300
Cisteïna	10	50	10	10	400

*Valors expressats en picomols per mg de proteïna ribosòmica.

Cada incubació contenia un dels aminoàcids marcats amb ^{14}C que s'indiquen a la primera columna, més els altres aminoàcids sense marca radioactiva, a més del tampó, Mg^{2+} , KCl, ATP, GTP, un extracte d'*E. coli* que contenia els RNAs de transferència amb les corresponents aminoacil-tRNA sintetases, i ribosomes d'*E. coli*. Després d'incubar una hora a 37°C es va determinar la incorporació de radioactivitat en productes (polipèptids) insolubles en àcid tricloroacètic calent. La proporció de bases en els copolinucleòtids utilitzats era de 5 U, 1 C, A o G, respectivament.

d'aminoàcids, en presència de GPT, ATP (com a font d'energia) i preparats de RNA natural que, possiblement, contenen mRNA. Aleshores vam pensar que, si polinucleòtids preparats amb polinucleòtid-fosforilasa actuaven com a missatgers en aquests sistema, devien dirigir la síntesi de proteïnes, depenent-ne la composició d'aminoàcids de la composició de bases dels mateixos i que potser podien ser utilitzats per a desxifrar la clau genètica. Els meus col·laboradors Peter LENGYEL i Joseph SPEYER estaven convençuts que aquells experiments obririen un camí per a la solució del problema i van iniciar-ne el treball a començaments de 1961. Malhauradament, NIRENBERG se'ns va avançar amb la sensacional observació que els extractes de *E. coli* formaven polifenilalanina en afegir-los poli(U) en comptes de RNA missatger. Així es va descobrir el primer triplet de la clau genètica, UUU. Aviat vam confirmar l'observació de NIRENBERG. Al mateix temps vam veure, però, que, en tant que el poli(U) tan sols promovia la incorporació de fenilalanina en un polipèptid (polifenilalanina) insoluble en àcid tricloroacètic, polinucleòtids com el poli(U.C) en promo-

vien la de fenilalanina, serina, tirosina, leucina i isoleucina; i el poli(U.G) la de fenilalanina, leucina, valina i cisteïna, com podeu veure a la Taula 3. Quan, en el nostre primer experiment, LENGYEL, SPEYER i jo vam observar amb ànsia el comptador de radioactivitat i vam veure que els polinucleòtids que contien dues bases diferents promovien la incorporació de diversos aminoàcids, el nostre entusiasme no tenia límits. Aquests resultats, que nosaltres vam ser els primers a obtenir, demostren clarament que el poli(U.C), a més de triplets UUU, que codificaven la fenilalanina, en tenien d'altres, com UCC, UCU, CUC, etc., que codificaven la leucina, isoleucina, serina i prolina; i que el poli(U.A) tenia, a més de UUU, triplets, com UGU, UUG, etc., que codificaven la leucina, valina i cisteïna. Sempre recordaré aquell moment com un dels més emocionants de la meua vida.

El setembre de 1961 hi va haver una reunió de la Secció de Microbiologia de l'Acadèmia de Medicina de Nova York en la què NIRENBERG va presentar els seus pioners resultats amb el poli(U). Ell també havia provat, com és lògic, l'efecte de co-

TAULA 4
Acció mutagènica de l'àcid nitrós sobre el poli (U.A) (BASILIO *et al.*, 1962)

<i>Aminoàcid marcat amb ¹⁴C</i>	<i>Incorporació d'aminoàcids marcats amb ¹⁴C* Poli (U.A) intacte</i>	<i>amb Poli (U.A) tractat amb HNO₂</i>
Fenilalanina	11800	3600
Leucina	1700	300
Isoleucina	1500	70
Tirosina	3100	120
Valina	0	330
Cisteïna	0	160

*Valors expressats en picomols per mg de proteïna ribosòmica. Les condicions experimentals foren com a la Taula 3 excepte que els valors corresponen a la incorporació neta d'aminoàcids obtinguda per substracció de les petites quantitats incorporades en absència de polinucleòtid missatger.

polinucleòtids que contenien més d'un tipus de base, els quals li havien estat proporcionats pels nostres antics col·laboradors HEPPEL i SINGER. De manera sorprenent, però, van resultar inactius. En aquella mateixa reunió jo vaig anunciar els nostres resultats positius, que van ser rebuts amb un entusiasme extraordinari. La primera publicació d'una llarga sèrie titulada "*Polinucleòtids sintètics i el codi d'aminoàcids*" va aparèixer el desembre de 1961 en els *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vam concloure aquest treball expressant la nostra convicció que, de manera paral·lela a NIRENBERG i els seus col·laboradors, havíem obert una via experimental per al desxiframent i estudi de la clau genètica. La nostra convicció que anàvem per bon camí va ser completa quan vam observar que hi havia un canvi en els aminoàcids codificats pel poli (U.A) després de tractar-lo amb àcid nitrós. Aquest àcid desamina la adenina i la converteix en hipoxantina, de tal manera que els seus residus d'AMP (àcid adenílic) es converteixen en residus d'IMP (àcid inosínic), un anàleg del GMP (àcid guanílic). Per tant, el poli(U.A) es converteix en poli(U.I), un anàleg del poli(U.G). El seu codi, doncs, hauria de canviar, d'acord amb aquesta conversió. Així va ser, efectivament, com ho podeu veure a la Taula 4. Després del tractament amb àcid nitrós, la

capacitat del poli(U.A) de promoure la incorporació de la isoleucina i tirosina va disminuir considerablement. Va aparèixer, en canvi, la capacitat de promoure la incorporació de valina i cisteïna. Com era d'esperar, el poli(U.I) causava la incorporació dels mateixos aminoàcids que el poli (U.G). Aquest resultat s'ajustaven a l'observació de WITTMANN (Institut Max Plank, Tübingen) que a la coberta proteica del virus del mosaic del tabac mutagenitzat amb àcid nitrós hi havia, entre d'altres, una substitució d'isoleucina per valina. Havíem provocat, per tant, una mutació del poli(U.A) que corresponia a una de les que l'àcid nitrós provoca en els virus.

En poc temps, el grup de NIRENBERG va preparar polinucleòtid-fosforilasa, amb què van obtenir copolinucleòtids actius i va iniciar-se, aleshores, una cursa entre els dos laboratoris que va resultar en la publicació de freqüents comunicacions en els *PNAS* amb resultats molt concordants. La nostra descoberta que el poli(A) dirigia la síntesi de polilisina (AAA codifica, per tant, la lisina) i la del grup de NIRENBERG de que el poli(C) dirigia la síntesi de poliprolina (CCC codifica, per tant la prolina) van facilitar sobremanera aquest estudi. En una mica més d'un any, havíem trobat la composició, però no la seqüència, de bases de la major part dels 64 triplets de la clau genètica, obrint el camí per el seu

desxiframent total pels grups de NIREMBERG i KHORANA. Com les proteïnes tan sols contenen 20 espècies d'aminoàcids, és evident que la clau genètica és redundants; es a dir, molts aminoàcids estan codificats per dos o més triplets.

En conclusió, voldria haver estat capaç de transmetre-us part de l'emoció que tot científic sent quan troba alguna cosa de nou, alguna cosa que ell és el primer a veure. Per a mi no hi ha emoció comparable a la que produeix l'activitat creadora, tant en ciència com en l'art, literatura o d'altres ocupacions de la intel·ligència humana. El meu missatge, que adreço sobretot als joves, és que, si senten inclinació per la Ciència, la segueixin, perquè no deixarà de proporcionar-los satisfaccions inigualables. És ben cert que abunden els moments de desànim i frustració; però aquests s'obliden aviat, en tant que les satisfaccions no s'obliden mai.

BIBLIOGRAFIA

1. BASILIO, C., WAHBA, A.J., LENGYEL, P., SPEYER, J.F. i OCHOA, S. (1962) Synthetic polynucleotides and the amino acid code. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48:613-616.
2. GRUNBERG-MANAGO, M., ORTIZ, P.J. i OCHOA, S. (1956) Enzymic synthesis of poliribonucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta* 20:269-285.
3. LENGYEL, P., SPEYER, J.G. i OCHOA, S. (1961) Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1936-1942.
4. OCHOA, S. (1948) Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III. Enzymatic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 174:133-157.
5. OCHOA, S. (1967) Enzymatic synthesis of polyribonucleotides. Properties and applications of polynucleotide-phosphorylase. En *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis* (editat per Koningsberger, V.V. and Bosch, L.) pp.77-90 Elsevier, Amsterdam.
6. OCHOA, S., MEHLER, A.H. i KORNBERG, A. (1948) Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalizing the reversible oxidative decarboxylation of l-malic acid. *J. Biol. Chem.* 174:974-1000.
7. SPEYER, J.F., LENGYEL, P., BASILIO, C. i OCHOA, S. (1962) Synthetic polynucleotides and the amino acid code II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48:63-68.
8. VISHNIAC, W. i OCHOA, S. (1951) Photochemical reduction of pyridine nucleotides by spinach grana and coupled carbon dioxide fixation. *Nature* 167:768-769.