

SEVERO OCHOA DE ALBORNOZ (1905-1993): DE 1936 a 1964

DR. PEDRO GARCÍA BARRENO

Años de guerra

Una vez tomada la decisión de marcharse fuera de España —según las propias palabras de Severo Ochoa: «No había en la España de entonces, aún sin guerra, la posibilidad de hacer la clase de ciencia que yo soñaba hacer»—, Ochoa se presentó al Dr. Juan Negrín, entonces Ministro de Hacienda, quien consideró justificada su marcha y le dio un «papelito» que decía «Misión especial». Entonces, cuenta Ochoa, comenzó su odisea; era septiembre de 1936. Desde Valencia, el matrimonio Ochoa partió en tren a Barcelona, donde se alojó en un «hotelucho» en el que había mucha gente que tenía el mismo «papelito» y que, según dijeron, no había servido para nada. Muchos llevaban meses intentando salir de España. A la mañana siguiente, Severo y Carmen García Cobián se dirigieron al edificio donde se obtenían los permisos de salida, encontrándose con una larguísima cola. Severo, muy disciplinado, fue a ponerse al final de la misma, pero Carmen, mucho más decidida, se dirigió a un individuo «mal encarado» que parecía ser el vigilante de aquella aglomeración. Cuenta Severo que la belleza

de Carmen debió impresionarle; la dijo que fuese a otro despacho y preguntase por otro camarada. A decir de Ochoa, la cosa «pitó» —que las cosas pitaran o no, era una expresión utilizada frecuentemente por Ochoa cuando hablaba en español—, y al cabo de poco tiempo consiguieron su pasaporte autorizándoles a pasar a Francia. Como la posibilidad de cruzar la frontera en tren era prácticamente nula, tuvieron la suerte de poderse embarcar en un barco francés enviado por aquel gobierno para sacar de España a unas monjas, llegando de esa manera a Marsella.

Con todo, la marcha del matrimonio Ochoa al extranjero fue posible por una circunstancia afortunada. Dos semanas antes del comienzo de la guerra civil había regresado Carmen de Puerto Rico, donde había ido para tratar de cobrar una deuda familiar: 7000 dólares, una cantidad importante para la época. Sin ese dinero habría sido muy difícil la marcha de España y poder subsistir en el extranjero. Antes de embarcar para Marsella fueron sometidos a una rigurosa inspección, pero Carmen había ocultado el cheque correspondiente en el interior de un cinturón de cuero que recosió sin que se notase nada.

Cuenta Ochoa que la alegría de verse en el barco hizo que tararease una y otra vez «Las Bodas de Fígaro» de Mozart, probablemente debido a que dicha música es muy alegre. Desde Marsella marcharon a París donde permanecieron un mes en la Casa de España de la Ciudad Universitaria, invitados por el director de la misma, Ángel Establier, antiguo amigo de Severo de sus tiempos de la Residencia de Estudiantes. Allí coincidió con Xavier Zubiri: «La extraordinaria inteligencia y la cultura enciclopédica de Zubiri hacían nuestras conversaciones enormemente interesantes. A ello contribuía también su naturalidad y sencillez. Zubiri tenía el raro don de enseñar de igual a igual aun cuando la disparidad intelectual entre él y sus oyentes fuese muy marcada».

Ochoa, ya en París, contactó con Otto Fritz Meyerhof quien le aceptó de nuevo en su laboratorio en Heidelberg, incorporándolo-

se al mismo en el mes de octubre, en calidad de investigador visitante. Debido al auge de los nazis, Meyerhof estaba en una situación precaria y algunos miembros de su familia habían abandonado ya Alemania, aunque su laboratorio era aún muy productivo.

Poco después de su llegada a Heidelberg la policía confiscó el pasaporte al matrimonio Ochoa y, un mes más tarde, Ochoa recibió una carta de la Embajada de España en Berlín en la que le expresaban su sorpresa de que estuviese en Alemania y no en España sirviendo a su patria. Ochoa contestó que, como científico, pensaba que servía mejor a España estudiando en Alemania, país que debía su esplendor en gran medida al estado avanzado de su ciencia y tecnología. Parece que esta respuesta de Ochoa fue convincente, pues al poco tiempo les devolvieron el pasaporte, y no volvió a ser molestado.

El laboratorio de Meyerhof había cambiado mucho desde el punto de vista científico. Cuando Ochoa se marchó en 1930 era un laboratorio de fisiología donde se podían ver músculos contrayéndose por todas partes. En 1936 se había convertido en un laboratorio de bioquímica. Los principales temas de trabajo eran el estudio de la glicolisis y la fermentación en extractos de músculo o levadura, o reacciones parciales de estos procesos catalizados por enzimas purificadas. Sus antiguos amigos David Nachmansohn y Fritz A. Lipmann ya no estaban allí. En este periodo Ochoa exploró la acción de la coenzima, luego conocida como DPN (nucleótido de difosfopiridina) y, definitivamente, NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina, a partir de músculo esquelético, y llevó a cabo estudios de transfosforilación en extractos de músculo en colaboración con Paul Ohlmeyer, de quien se hizo muy amigo. Sin embargo, debido al creciente auge del nazismo, la situación de Meyerhof se hizo insostenible, teniendo que emigrar a París, en agosto de 1939, donde trabajó en el *Institut de Biologie Physico-Chimique*. Meyerhoff, antes de partir y con la ayuda de Archibald Vivian Hill —había recibido el Premio Nobel de Fisiología o

Medicina 1923 con Meyerhof, y quién entabló una estrecha amistad con Ochoa—, consiguió una beca de seis meses para que Severo trabajase en el *Marine Biological Laboratory* en Plymouth. Ochoa y Meyerhoff coincidirían, años después, en EE. UU. «Meyerhof —escribiría Ochoa— fue el maestro que más contribuyó a mi formación y el que más influyó a la hora de orientar mi trabajo»

En Plymouth, Carmen ayudó a su marido y llegaron a publicar un trabajo, juntos, en la prestigiosa revista *Nature* sobre la fosforilación enzimática en el músculo de invertebrados y su contenido en cozimasa. Para este trabajo utilizaban langostas, que después se comían. Cuenta Ochoa que después de este trabajo estuvieron muchos años sin probar tales crustáceos.

Un año después Ochoa, con la ayuda de William R. G. Atkins, uno de sus amigos de Plymouth, consiguió una beca de la *Nuttfield Foundation* para trabajar con Rudolph A. Peters en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford sobre el papel de la vitamina B₁ (tiamina) y de la cocarboxilasa (éster difosfórico de tiamina) en la oxidación del piruvato. Peters y Ochoa determinaron que la cocarboxilasa y no la tiamina libre era el cofactor de la oxidación del piruvato. También demostraron el requerimiento de nucleótidos de adenina, lo que les sugirió que había un estrecho acoplamiento entre oxidación y fosforilación, y ello despertó el interés de Ochoa en la fosforilación oxidativa. El periodo de Oxford fue muy feliz y productivo, y, probablemente, el trabajo más sólido y trascendente de la producción de Ochoa en esta época fue el publicado en el *Journal of Biological Chemistry*, con el título: «Acoplamiento de la oxidación del ácido pirúvico con la fosforilación, en el cerebro».

El mecanismo de la fosforilación en las dispersiones de tejido cerebral es descrito por Ochoa del modo siguiente: «Con cantidades catalíticas de ácido adenílico y en ausencia de otros aceptores de fósforo, el trifosfato de adenosina formado al reaccionar el

ácido adenílico con el hipotético producto fosforilado, resultante de la oxidación del ácido pirúvico, es desfosforilado por la adenosín trifosfatasa regenerándose el ácido adenílico para nuevas reacciones: la concentración de fosfato inorgánico no se modifica. El consumo de oxígeno tiene lugar debido a que la presencia de la adenosín trifosfatasa hace innecesaria la presencia de un aceptor de fosfato: pero en ausencia de ácido adenílico añadido, la concentración de adenín nucleótido es demasiado baja en las dispersiones dializadas, para mantener el mecanismo antes descrito a velocidad suficiente, y el consumo de oxígeno desciende por debajo del nivel normal. En presencia de ácido adenílico (en cantidad catalítica) y de aceptores de fosfato para los grupos de fosfato hábiles del adenosín trifosfato, como la hexosa monofosfato o la glucosa, una proporción, mayor o menor, del trifosfato de adenosina resulta protegida de la acción de la adenosín trifosfatasa, transfiriendo fosfato a un aceptor con formación de difosfato de hexosa, mientras que desaparece una cantidad equivalente de fosfato inorgánico. El hecho que la fosforilación del ácido adenílico es un paso obligatorio en la deshidrogenación de ambos triosa fosfato y piruvato, hace que dicho proceso sea el mecanismo principal mediante el cual la energía de la respiración se pone a disposición de los tejidos».

Según cuenta Ochoa, los británicos tienen la cualidad de obtener resultados sin trabajar, aparentemente, muy duro, y siendo contagiosa esta capacidad. Hizo muy buenos amigos, entre ellos Ernst Chain, quien saltaba literalmente de la silla cuando les explicaba las propiedades maravillosas de la penicilina que estaba purificando. Pero después de dos años, su estancia en este laboratorio se vio de nuevo frustrada por la segunda guerra mundial. El laboratorio se vio inmerso en investigación militar. El sentimiento de soledad y de aislamiento hizo que el matrimonio Ochoa decidiese marchar a Estados Unidos por el bien de la carrera científica de Severo. Ochoa quería trabajar en el laboratorio de Carl F. Cori, por lo que le escribió, y cuenta que sintió una gran alegría cuando Cori le aceptó para ir a su laboratorio.

El Nuevo Mundo

En agosto de 1940, invitado por el matrimonio Carl y Gerty T. (Radnitz) Cori, el matrimonio Ochoa se embarcó en Liverpool, no sin cierta nostalgia pero llenos de esperanza y expectativas, con destino a la *Washington University School of Medicine* en St. Louis. El viaje lo hicieron en compañía del matrimonio Obrador. Para conseguir un visado, la Universidad de Washington le ofreció un puesto de investigador visitante con un sueldo virtual de 2.000 dólares, que el propio Ochoa tendría que pagarse. Finalmente fue la Fundación Rockefeller la que aportó una ayuda equivalente para que Ochoa pudiese trabajar en dicha Universidad. Según cuenta Ochoa, el laboratorio de los Cori era un lugar excitante. Allí las enzimas eran algo realmente importante y los trabajos sobre glicólisis y fosforilación estaban en su apogeo. También había científicos muy interesantes como Herman M. Kalckar, Earl Sutherland y Sydney Colowick.

Cori le propuso a Ochoa que estudiase la conversión de fructosa en glucosa en extractos de hígado. La idea era que la fructosa se fosforilase a fructosa-6-fosfato por una hipotética fructoquinasa, que la fructosa-6-fosfato se isomerizase a glucosa-6-fosfato por la fosfohexoisomerasa y que la glucosa-6-fosfato se desfosforilase por la glucosa-6-fosfatasa para dar glucosa. Sin embargo, cuando Ochoa incubaba fructosa con homogenados de hígado obtenía fructosa-1-fosfato en vez de fructosa-6-fosfato. Aunque Ochoa no obtuvo resultados, adquirió una buena formación en el manejo y caracterización de enzimas y de compuestos fosforilados del metabolismo de los hidratos de carbono. En una ocasión posterior, con motivo del homenaje que recibió en su septuagésimo aniversario, Ochoa comentaría que había sido muy afortunado al tener maestros como Meyerhof, Peters y Cori, y a pesar que su trabajo de investigación había resultado, en alguna ocasión, algo frustrante.

En Oxford, Ochoa había conocido a Bob Goodhart, especialista en nutrición de la Universidad de Nueva York y que disfru-

taba de un *Fellow* de la Fundación Rockefeller en el laboratorio de Peters, y quien estaba empeñado en incorporarle a aquella. A comienzos del año 1942, alentado por su mujer, Carmen, aceptó un puesto de Asociado de Investigación con una beca para trabajar dos años en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York, ocupando provisionalmente un espacio en el Hospital Psiquiátrico de Bellevue. Allí comenzó su independencia científica, aunque todavía no la académica, ya que su puesto dependía de una beca. Éste fue el comienzo de una fructífera y feliz asociación con la Universidad de Nueva York que duró más de 30 años.

En el Instituto Rockefeller se organizaron, en algún momento del año 1941, seminarios basados en el libro de David Green «*The mechanisms of biological oxidations*», publicado en 1940. David Green sugirió que esos seminarios se convirtiesen en un *Enzyme Club* en el que podrían participar los científicos del área de Nueva York interesados en enzimología y áreas relacionadas. Los miembros del Club se reunían una vez al mes para escuchar la presentación de algún invitado o de alguno de sus miembros. Se empezaba con un cóctel seguido de una cena. El conferenciante presentaba entonces el tema utilizando pizarra y tiza, pues no se permitían diapositivas, y se interrumpía al ponente con preguntas «planteadas con todo el rigor de Nueva York», según comentaría Slater. En abril de 1943 Ochoa hizo su primera presentación, titulada «El enlace fosfato en la oxidación del ácido pirúvico», a la que siguieron siete más, la última en abril de 1978, sobre regulación de la síntesis de proteínas.

Cuenta Arthur Kornberg que, cuando un domingo por la tarde regresó Ochoa al laboratorio después de haber asistido a «La Pasión según San Mateo» de Johann S. Bach, encontró que habían sacado al pasillo su mesa y sus aparatos, pues el nuevo jefe de Psiquiatría necesitaba el espacio. El Profesor Isidor Greenwald, que trabajaba en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y quien apreciaba mucho el trabajo de Ochoa, así como

sus cualidades personales, le ofreció un sitio en su laboratorio y Severo fue nombrado, a los 39 años de edad, Profesor ayudante de Bioquímica. Ésta fue la primera posición de plantilla que tuvo Severo en su vida; corría el año 1944.

En 1946, quedó vacante la cátedra de Farmacología y Keith Cannan, un biofísico inglés, director del Departamento de Bioquímica, pensó que Ochoa podía ser la persona adecuada para el cargo. Un prestigioso colega que le conoció bien en aquellos años, el Dr. Ephraim Racker escribió: «La dedicación humilde y total de Severo a la ciencia me quedó grabada por la siguiente anécdota. Aunque ya era maduro tanto en edad como en prestigio científico, Severo era todavía Profesor ayudante de Bioquímica en la Universidad de Nueva York cuando le ofrecieron la Cátedra de Farmacología. Recuerdo con precisión las muchas horas que estuvimos discutiendo. Severo no dejaba de decir: ¿por qué he de necesitar una cátedra? Puedo trabajar donde estoy ahora. ¿No se resentirá mi trabajo de investigación si llego a ser director de un departamento?... Creo que lo que le decidió finalmente a ocupar la cátedra fue la perspectiva de lograr un espacio adecuado de laboratorio y suficiente ayuda técnica que le compensase de las cargas administrativas que se le añadían». El Departamento de Farmacología, aunque estaba situado en un viejo edificio de la calle *26th* y para llegar a él había que pasar por la sala de anatomía donde los estudiantes estaban diseccionando los cadáveres, disponía de varios laboratorios nuevos y bien equipados, que había conseguido el anterior director James A. Shannon. Así pues, Ochoa pasó a ocupar la cátedra del Departamento de Farmacología, teniendo ya más espacio para realizar sus investigaciones; fue el segundo bioquímico en ocupar una Cátedra de Farmacología en una Facultad de Medicina norteamericana. Hasta entonces, Ochoa tuvo una posición académica modesta y trabajó solo y con medios bastante limitados; eran además los tiempos de la naciente enzimología, cuando el bioquímico trabajaba en relativo aislamiento y multiplicaba sus quehaceres entre la propia investigación, la síntesis y el análisis orgánico, y la purificación de enzimas y coenzimas aislados

en experimentos auxiliares. Allí permaneció nueve «apasionantes y productivos» años. Le encomendarían la dirección del Departamento dos años después, cargo que ocupó hasta el año 1954, cuando se trasladó al Departamento de Bioquímica.

Fosforilación oxidativa, fijación de CO₂ y enzimas del ciclo del ácido cítrico

Los primeros trabajos de Ochoa en la Universidad de Nueva York fueron sobre la fosforilación oxidativa, problema que había empezado a estudiar en Oxford en 1938, cuando demostró que la oxidación se acoplaba a la fosforilación de difosfato de adenosina (adenosina difosfato, ADP) para formar ATP (trifosfato de adenosina), a lo que sigue la transferencia de fósforo desde el ATP al azúcar. El acoplamiento obligado de la fosforilación con la oxidación del piruvato, también demostrado por Vladimir A. Belitzer de la Unión Soviética y por Herman Kalckar de Dinamarca, fue un descubrimiento importante. Utilizando homogeneizados de corazón Ochoa determinó la relación molecular entre fósforo esterificado y consumo de oxígeno: relación P/O. Una comparación entre la fosforilación causada por la oxidación del ácido pirúvico y la producida por la dismutación entre ácido fosfoglicérico y ácido pirúvico en extractos cardiacos, mostró una relación [P/O = 3] para la primera reacción; una relación que había sido anteriormente valorada como 2. Este último valor se debía a la pérdida causada por la hidrólisis de ATP por ATPasa (adenosina trifosfatasa). La relación de 3 fue posteriormente confirmada por Albert Lester Lehninger en mitocondrias. Sin embargo, Ochoa pensaba que el mecanismo de la fosforilación oxidativa no se entendería sin el conocimiento de las reacciones enzimáticas implicadas en oxidación y en especial, aquellas acopladas a fosforilación. Se conocía, gracias a los trabajos de Hans Krebs, que el ciclo del ácido cítrico (Fig. 1) era la vía principal de oxidación de sustratos energéticos en la célula, y por los trabajos de David Keilin y Otto Warburg que nucleótidos de piridinas, flavoproteínas y citocromo, estaban involucrados.

equipado para utilizar isótopos, y pensó que podría observar la reacción que, de existir, conduciría a la oxidación del dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) por espectrofotometría; ello, si el isocitrato se formaba por la fijación de CO_2 a α -cetoglutarato. Como escribió en su autobiografía, no creyó que aquello funcionara, y pospuso el experimento hasta que fue animado por su amigo Racker, quién trabajaba en el Departamento de Microbiología —un piso por debajo— y con el que mantenía frecuentes discusiones. Cuenta Severo que, una vez puesto en marcha el experimento, cuando vio por primera vez moverse la aguja del espectrofotómetro, lo que indicaba la oxidación del NADPH, se emocionó tanto que salió al pasillo del laboratorio gritando: «Venid a ver moverse la aguja del espectrofotómetro». Pero eran las nueve de la noche y no había nadie para acudir a verlo.

El espectrofotómetro utilizado en dicho experimento se había comprado con una ayuda de la *American Philosophical Society* y tenía que devolverse después de un año. Pero el éxito de los experimentos de la fijación de CO_2 y la necesidad que tenía Ochoa de un espectrofotómetro para su trabajo futuro, hicieron que la altruista Sociedad le dejase mantener el instrumento indefinidamente. De ahí que el aparato se conociese en el laboratorio como el «*Philosophical spectrophotometer*». Tras ello, Ochoa se convirtió en un experto de los estudios espectrofotométricos de las enzimas oxidativas.

Ochoa pensó que lo que habían denominado isocítrico deshidrogenasa era, en realidad, una mezcla de dos enzimas —isocítrico deshidrogenasa y oxalsuccínico carboxilasa—, aunque nunca puso demostrarlo. Entonces, recién trasladado al Departamento de Farmacología y habiéndose incorporado su primer doctorando —Alan Mehler, y también, sus dos primeros postdoctorales, Santiago Grisolia y A. Kornberg— decidió combinar dos enzimas conocidas —málico deshidrogenasa y oxalacético carboxilasa— para comprobar si era posible descarboxilar malato produciendo piruvato y CO_2 en presencia de NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida y ade-

nina, coenzima I), y/o convertir piruvato y CO_2 en malato en presencia de NADH (NAD reducido). «Todo ello fue un completo fracaso», escribió Ochoa.

Sin embargo, un día Mehler observó una rápida oxidación de malato cuando se añadía NADP^+ (dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina, coenzima II) pero no NAD, a extractos de hígado de paloma (cientos de ellos extraídos por el devoto técnico de Ochoa, Morton Schneider). Esta observación condujo al descubrimiento de la enzima málica, que cataliza la reacción reversible: malato + $\text{NADP}^+ \leftrightarrow$ piruvato + CO_2 + NADPH + H^+ .

La enzima fue estudiada en detalle por Mehler y Kornberg. Dado que la enzima málica puede catalizar la descarboxilación de oxalacetato a piruvato y CO_2 , tanto como la reducción del malato por NADPH, concluyeron que la enzima málica —al igual que la isocítrico deshidrogenasa que puede catalizar la descarboxilación de oxalosuccinato a α -cetoglutarato y CO_2 , y su reducción a isocitrato— es una enzima con dos centros activos, uno para la oxidación del isocitrato y otro para la del oxalosuccínico, y no una mezcla de dos enzimas, isocítrico deshidrogenasa y oxalosuccínico deshidrogenasa, como habían supuesto inicialmente. La enzima málica fue utilizada por Wolf Vishniac y Ochoa para obtener carboxilación reductora fotodependiente de piruvato a malato en granas y en presencia de NADP, lo que supuso la primera demostración de una reducción fotoquímica de nucleótidos de piridina en preparaciones de cloroplastos.

A principios de 1947, Warren Weaver, Director de la División de Ciencias Naturales de la Fundación Rockefeller, hizo una encuesta preguntando a un grupo reducido de bioquímicos que trabajaban en Estados Unidos su opinión respecto a la valía de un número de científicos, entre los que figuraba Ochoa. De la lista final, ordenada por la cantidad de signos positivos obtenidos, Ochoa ocupó el cuarto lugar, precedido por Carl Cori quien ocupó el primer puesto, Joseph Fruton y John H. Northrop. Es decir,

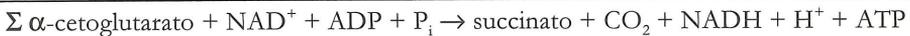
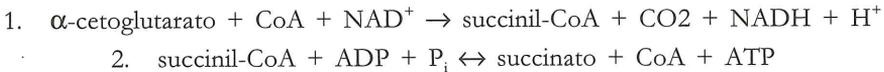
Severo Ochoa estaba entre los cuatro científicos más valorados por sus pares en Estados Unidos. Estos fueron los comienzos del auge científico de Severo Ochoa quien para 1955, fecha del descubrimiento de la polinucleótido fosforilasa, ya era uno de los «*top four*» de Estados Unidos. En el mes de enero de aquel mismo año, delegados de quince países —Elmer Stotz y el mismo Ochoa por los EE. UU.— se reunieron en la *Ciba Foundation House* en Londres para elegir la primera junta de gobierno de la recién creada *International Union of Biochemistry*, de la que Ochoa sería elegido presidente para el mandato entre 1964 y 1967.

En 1948 Joe Stern, quien había sido un estudiante de Hans Krebs en Sheffield, se incorporó al laboratorio de Ochoa como estudiante postdoctoral. Ochoa pensó que este era el momento de atacar uno de los problemas más interesantes del ciclo del ácido cítrico: la identificación de la enzima que «condensa» oxalacetato y «acetato activo» para formar citrato, y a la que denominaban enzima condensante. Esta enzima resultó ser insoluble en tejidos animales, pero cabía la posibilidad de que fuese soluble en bacterias. Así, combinando un extracto de *Escherichia coli* con un extracto de corazón de cerdo consiguieron sintetizar citrato a partir de acetil fosfato y oxalacetato, requiriendo la reacción cantidades catalíticas de coenzima A (CoA). Usando esta reacción como un sistema experimental, Joe Stern, Morton Schneider y el propio Ochoa consiguieron cristalizar la enzima condensante o citrato sintetasa, la primera enzima cristalizada del ciclo del ácido cítrico. El extracto de *E.coli* suministraba transacetilasa, enzima descubierta por Earl Stadtman, que catalizaba la transferencia de fosfato del acetil fosfato al CoA para formar acetil CoA y fosfato. Como Feodor Lynen había predicho, el acetil CoA era la forma «activa» del acetato. En colaboración con Lynen demostraron que la enzima condensante catalizaba la conversión reversible de acetil CoA y oxalacetato a CoA y citrato.

Ochoa estaba muy interesado en los pasos iniciales de oxidación del piruvato y en el mecanismo por el que esta molécula y el

oxalacetato reaccionan para dar citrato durante el ciclo del ácido cítrico. I. C. Gunsalus y Seymour Korkes encontraron que el NAD se reducía en presencia de piruvato y CoA, lo que indicaba que tenía lugar la reacción: piruvato + CoA + NAD⁺ → acetil CoA + NADH + H⁺.

Seymour Kaufman descubrió una enzima que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP, P_i y succinil CoA, que era desacilado a succinato y CoA; esa enzima fue denominada enzima fosforilante, enzima P_o, definitivamente, succínico tioquinasa. Por su parte, Joe Stern y Minor Ceen descubrieron una nueva enzima del metabolismo de los ácidos grasos, la CoA transferasa que cataliza la transferencia de CoA desde succinil CoA a acetoacetato. La enzima P daba cuenta de la fosforilación de un sustrato acoplada con la descarboxilación oxidativa de α -cetoglutarato en el ciclo del ácido cítrico:



Otra línea de investigación en el laboratorio de Ochoa trataba del metabolismo del propionato. Trabajos que señalaban que la oxidación de propionato requería fijación de CO₂ y formaba succinato llamaron su atención. El trabajo lo inició Martin Flavin, que utilizando extractos de corazón de cerdo demostró la conversión de propionato en ácido dicarboxílico. Luego, el trabajo de Yoshito Kaziro, entre otros, demostró que el propionato se convierte, primero, a propionil CoA y se carboxila a metilmalonil CoA, en presencia de ATP, por la enzima biotinilada propionil CoA carboxilasa. Luego, la metilmalonil CoA es isomerizada de la forma A a la B, y luego mutada por la metilmalonil CoA mutasa para formar succinil CoA. La metilmalonil CoA es una enzima del grupo de la familia de la vitamina B₁₂, y la propionil CoA carboxilasa fue cristalizada por Kaziro, quién demostró la participación estioiquiométrica de la enzima en la reacción. La propionil CoA carboxilasa es carboxilada, transfiriendo el grupo carboxilo al propionil CoA. Fue Lynen quién

demostró la formación de la carboxibiotinenzima, elucidando el mecanismo químico de la reacción.

Polinucleótido fosforilasa

En 1954, Keith Cannon pasó a ocupar el puesto de Jefe de la División de Medicina del Consejo Nacional de Investigación en Washington y se le ofreció a Severo la Jefatura del Departamento de Bioquímica. En verano de aquel año —Ochoa había sido elegido presidente de la *Harvey Society* el año anterior— se trasladó, como jefe del Departamento, a la cátedra de Bioquímica, en un nuevo edificio con nuevos laboratorios equipados para trabajar con material isotópicamente marcado. Morton Schneider era el jefe de los técnicos y Peter Lozina el responsable de la planta piloto. En aquella época, Ochoa quiso volver a sus estudios sobre la fosforilación oxidativa; pensaba que debería buscarse una fuente de enzimas capaz de convertir al ADP en ATP y que dicha reacción se podría seguir por incorporación de fosfato marcado con ^{32}P en ATP. Los extractos de la bacteria *Azobacter vinelandii* podrían ser una buena fuente de dichas enzimas, pues es una bacteria muy activa en la oxidación de hidratos de carbono y otros compuestos. Otro tema que interesaba a Ochoa era la fosforilación del acetato en acetilfosfato. Para entonces, Ochoa contaba con dos «postdoc», Marianne Grunberg-Manago, llegada desde París y Ernie Rose, este de Chicago y quién eligió el tema de la fosforilación del acetato. Marianne eligió la fosforilación oxidativa.

Los extractos de *Azobacter* incorporaban activamente fosfato marcado con ^{32}P en ATP. Sin embargo, cuando empleaba ATP cristalino en lugar de un ATP amorfo, no había reacción. ¿Habían dado con una nueva enzima? El examen del ATP procedente de la bacteria y aislado por cromatografía indicó que estaba contaminado con ADP y que el ^{32}P se incorporaba al ADP y no al ATP. La incorporación de ^{32}P tenía lugar también en otros nucleosido difosfatos: de uracilo (UDP), citosina (CDP), guanina (GDP) o de

inosina (IDP). La enzima también catalizaba la liberación de fosfato de los nucleosido difosfatos. En un principio pensaron que se trataba de una reacción de hidrólisis de ADP y otros difosfatos en AMP y otros monofosfatos: $ADP + H_2O \rightarrow AMP + Pi$.

En cualquier caso, el descubrimiento de la enzima ocurrió de forma casual. En palabras de Ochoa: «Estábamos (con Grunberg-Manago) interesados en los mecanismos de la fosforilación oxidativa y me pareció que podría ser interesante estudiar el proceso en extractos de *Azotobacter vinelandii*, una bacteria en la que los procesos de oxidación son muy intensos. El plan de los experimentos fue muy simple. Se incubaban extractos bacterianos con ATP y fosfato inorgánico marcado con ^{32}P para medir la incorporación de ^{32}P en el ATP. Los experimentos fueron inmediatamente positivos. Había una gran incorporación de radiactividad.

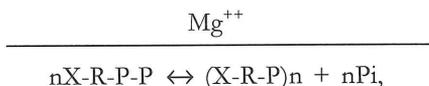
»El ATP que usábamos era un ATP amorfo. Un buen día nos llegó una preparación de ATP cristalino y cuando lo ensayamos nos encontramos con que no había incorporación alguna de radiactividad. Volvimos al ATP amorfo, que se purificó por cromatografía y se encontró una fracción muy activa, que era, simplemente, ADP. Se probaron entonces otros nucleósido-difosfatos (GDP, CDP y UDP) y todos mostraron actividad. La radiactividad se incorporaba en el fosfato interno (p. ej., en el caso del ADP: A-ribosa P*-P).

»Pronto se vio también que cuando la incubación de los extractos bacterianos se llevaba a cabo con concentraciones relativamente elevadas de difosfatos, se formaba fosfato inorgánico. La formación de P inorgánico a partir de ADP sirvió como método de ensayo para medir la actividad de la enzima. Creímos que el otro producto de reacción debería ser AMP ($ADP \rightarrow AMP + Pi$), como resultado de un proceso puramente hidrolítico. Sin embargo, cuando la mezcla de incubación era tratada con ácido tricloroacético no se encontraba AMP, que es soluble en ácido, en el sobrenadante; y no estaba, porque lo que se formaba era un polinucleótido, que es insoluble en ácido».

Por su parte, Grunberg-Manago escribe: «... Para mis estudios sobre fosforilación oxidativa que me había propuesto Ochoa, como no me gustaba matar ratas, utilicé bacterias... Elegí una bacteria aeróbica estricta como *A. vinelandii*, que oxida hidratos de carbono muy activamente... Decidí utilizar una reacción de intercambio entre PO_4 y ATP como método de aislamiento de alguna coenzima fosforilada nueva e interesante... Utilizaba ATP amorfo comercial como sustrato... Durante el estudio Sigma anunció que disponía de ATP cristalino, puro. Conseguí una pequeña muestra y, para mi sorpresa, no obtuve resultado alguno. Sin embargo, esto nos hizo felices a Ochoa y a mí, pues pensamos que la preparación amorfa pudiera contener un cofactor interesante. Decidí aislar una fracción de la preparación de ATP amorfo que, cuando se añadiera al ATP cristalino, restaurara el intercambio. Para mi sorpresa, el examen cromatográfico del ATP amorfo identificó el compuesto activo como ADP... Recuerdo que cuando di cuenta del descubrimiento en una comida de grupo nadie me creyó y Severo «offended me» diciéndome que aquello era imposible. Sin embargo, poco después, se echó atrás de su primera reacción, fue al laboratorio siendo fácil convencerle de que el sustrato real en la reacción de intercambio era ADP. Se excitó mucho, porque no conocía enzima alguna que fuera capaz de catalizar tal intercambio, y me alentó para que intentase descubrir cual era la reacción responsable del intercambio. Pronto encontré que la enzima no era específica para el difosfato de adenosina, sino que catalizaba el intercambio con otros nucleótidos difosfato (UDP, CDP, GDP e IDP).»

Una de las propiedades más singulares de la enzima es que cataliza no sólo la síntesis de ARN partiendo de los cuatro difosforribonucleótidos típicos, sino también la de otros polinucleótidos no naturales, conteniendo sólo uno, dos o tres tipos distintos de nucleótidos en sus cadenas. Otra característica de la enzima es que la incorporación de estos precursores en la macromolécula es proporcional a la concentración con que se añaden al comienzo de la reacción.

Inicialmente, la enzima se conoció como ARN sintetasa (denominación propuesta por Ochoa) —en una dirección de la reacción sintetiza un polinucleótido—, aunque su denominación definitiva fue polinucleótido fosforilasa (denominación propuesta por Grunberg-Manago), porque en el otro sentido de la reacción degrada los polinucleótidos por fosforolisis y no por hidrólisis. Por tanto, la reacción catalizada por la nueva enzima era:



donde X es una base nucleotídica (A, U, C, G ó I), R representa el azúcar ribosa y P una unidad de ácido fosfórico.

Bob Warner, quien trabajaba en el laboratorio de Ochoa, encontró que mezclando poli(A) y poli(U) sintetizados con la PNPasa se obtenía una solución viscosa de poli(A)-poli(U) de doble banda. Alex Rich demostró, por análisis de difracción de rayos X, que la estructura de este polímero era similar a la del ADN. Posteriormente, Paul Doty hizo uso de estos polinucleótidos en su trabajo sobre anillamiento de ácidos nucleicos de cadenas complementarias, que fueron la base de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Por otro lado, con la colaboración de Bob Warner en la Universidad de Nueva Cork y de Leon Heppel, Russell Hilmoe y Maxine Singer en Bethesda (*National Institutes of Health*), se estableció que utilizando una mezcla de nucleosido difosfatos —por ej., ADP, UDP, GDP y CDP—, la polinucleótido fosforilasa sintetizaba polímeros tipo ARN con una secuencia de bases aleatoria.

Los resultados se presentaron en la primavera de 1955 en la reunión de la Federación de Sociedades Americanas de Biología Experimental en San Francisco y en el Congreso Internacional de Bioquímica celebrado ese verano en Bruselas, despertando en ambos un gran interés. Esto es comprensible, pues por primera vez se había sintetizado en el tubo de ensayo polinucleótidos de

alto peso molecular con una estructura química primaria idéntica al del ARN natural. El trabajo se publicó en 1955 como una carta al editor de la revista *Journal of the American Chemical Society*, y a pesar de haber tenido una crítica muy adversa por parte de uno de los *referees*.

El estudio de la polinucleótido fosforilasa le supuso a Severo Ochoa —elegido recientemente presidente de la *American Society of Biological Chemistry*— la concesión del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 1959. Dicho Premio Nobel lo compartió con su antiguo discípulo y amigo Arthur Kornberg, este último por el descubrimiento de una enzima, la ADN polimerasa, capaz de sintetizar ácido desoxirribonucleico (ADN) *in vitro*. Comenta Kornberg que en la justificación del Premio «por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica del ácido ribonucleico y del ácido desoxirribonucleico», debería haberse sustituido «ácido ribonucleico» por «polímeros similares al ARN» anticipando el papel que esos polímeros jugarían en el desciframiento del código genético.

La esperanza inicial de que la polinucleótido fosforilasa fuese la responsable de la biosíntesis del ácido ribonucleico se descartó; ello, por no requerir molde para dirigir la formación de un ARN mensajero específico sino incorporar inespecíficamente ribonucleosido difosfatos en un polímero. Sin embargo, el uso de la polinucleótido fosforilasa fue esencial en el desciframiento inicial de la clave genética, ya que dio lugar a la preparación de polinucleótidos sintéticos de distinta composición de bases con los que el grupo de Severo Ochoa, en paralelo con el grupo de Marshall W. Nirenberg, llegaron a descifrar cuales son los tripletes o grupos de tres nucleótidos que codifican los distintos aminoácidos (Fig. 2).

Tras el descubrimiento de la polinucleótido fosforilasa, el laboratorio de Ochoa se centró en dos temas: la oxidación del pionato, de lo que se ocuparon una serie de postdocs tras la marcha

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	Tercera letra
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	
		AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	

FIGURA 2. El código genético o el alfabeto de la vida. Descifrado entre 1961 y 1966.

de Martin Flavio, y la enzima en cuestión. Ochoa había trabajado con un postdoc japonés, Sanai Mi, en las reacciones de síntesis con la idea de que, tras purificar la enzima, apareciese un primer o un templete o molde. Tales experimentos descartaron el papel de la enzima *in vivo*, pero fueron decisivos en la preparación de numerosos copolímeros. Gracias a ello, el laboratorio de Ochoa estuvo preparado para realizar los experimentos *in vitro* que condujeron al desciframiento del código genético.

Carlos Basilio, un médico chileno que se incorporó al laboratorio de Ochoa en agosto de 1959, refiere la participación del ya Premio Nobel en la ruptura de la clave genética: «Ochoa habría de atacar el problema más tarde o más temprano. Tenía en sus manos,

desde hacía años, la herramienta precisa que hizo posible el desciframiento de la clave, esto es, la polinucleótido fosforilasa, que había abierto la posibilidad de sintetizar una gran variedad de ácidos ribonucleicos de composición conocida. Faltaban sin embargo dos cosas: el concepto del ARN mensajero (mARN), avanzado por François Jacob y Jacques Monod al comienzo de 1961, y la observación aportada por Sydney Brenner en el simposio de Cold Spring Harbor del mismo año, sobre la especificidad poco estricta de los ribosomas bacterianos en cuanto a permitir la traducción de mARNs de distinto origen.

»Esta última observación fue realmente la que abrió las puertas del abordaje experimental. Esta idea naciente, como un ejemplo perfecto de dialéctica científica fue traducida en palabras de una forma clara por Ochoa: «... La observación de Brenner y cols... sugirió el empleo de polirribonucleótidos sintéticos con secuencias de nucleótidos conocidos como mensajeros, y un método posible de abordaje experimental para el código de los nucleótidos. La secuencia más simple posible es la de los homopolinucleótidos, los cuales, si fuesen activos, deberían prescribir la formación de cadenas de homopolipéptidos». Algunos miembros del departamento eran pesimistas respecto a las posibilidades de esta idea, pero un joven doctorando, Peter Lengyel, fue tenaz defensor de esta.

»Un hecho sorprendente, que solo podía ocurrir en los EE. UU., fue la variedad de nacionalidades de los miembros del laboratorio de Ochoa. Los colaboradores directos en los problemas del código fueron Lengyel, un ingeniero químico húngaro que trabajaba en su tesis para obtener el grado de Ph. D.; Joseph Speyer, un joven bioquímico de origen alemán que estaba estudiando la biosíntesis de proteínas *in vitro*, y finalmente, yo, un médico chileno, ocupado en estudiar la especificidad de la polinucleótido fosforilasa para análogos de los nucleosidodifosfatos. Las vertientes de nuestra especialización eran indudablemente apropiadas para atacar el problema, a lo que se sumaba el hecho de que la polinucleó-

tido fosforilasa era una especie de contaminante inevitable en la mayoría de nuestros congeladores de laboratorio.

»Cuando acabábamos de iniciar nuestro trabajo, Marshall Nirenberg comunicó en el Congreso Internacional de Bioquímica de Moscú, celebrado en el año 1961 —Ochoa fue elegido presidente de la Unión Internacional de Bioquímica—, que el ácido poliurídico promovía la síntesis de polifenilalanina. Algunos científicos testigos del Congreso contaron que los oyentes fueron electrizados por la noticia. Cuando volvió de Moscú un miembro de nuestro departamento y nos comunicó la novedad quedamos literalmente petrificados.

»Un mes más tarde —septiembre de 1961—, Ochoa y Nirenberg presentaron los resultados en la reunión de la Academia de Medicina de Nueva York. El auditorio recibió otra descarga eléctrica cuando Ochoa mostró los codones para once aminoácidos. Al día siguiente, Nirenberg nos visitó en el laboratorio e intercambiamos muchas ideas. Desde este momento, los grupos de Nueva York y de Bethesda iniciaron una carrera de competición académica que duró varios años... Los experimentos fueron una realidad a corto plazo, dando lugar a una serie de publicaciones —la primera apareció en diciembre de 1961— en los *Proceedings of the National Academy of Sciences* de EE. UU., bajo el título genérico de *Synthetic polynucleotides and the amino acid code*, en los que se describieron los codones para los diferentes aminoácidos, más otras observaciones afines...».

El último capítulo de la historia del código genético, comentó Ochoa, lo escribieron Nirenberg y Har Gobind Khorana. Muy pronto se tuvieron los resultados sobre la composición de bases de los tripletes que codifican los 20 aminoácidos y se estableció que el código genético está degenerado, es decir que, en muchos casos, varios tripletes codifican al mismo aminoácido. Por otra parte se encontró que los tripletes UAA, UAG y UGA no codifican a ningún aminoácido; e ingeniosos experimentos realizados por Sydney Brenner en Cambridge y por Al Garen en Yale, indicaron que

esos tripletes son señales de terminación de la síntesis de las proteínas. Y K. A. Marcker, en Cambridge, descubrió que AUG es un codón de iniciación de la cadena.

La polinucleótido fosforilasa puede considerarse la «piedra de Rosetta» del código genético. De acuerdo con Kornberg, Ochoa podía haber obtenido un segundo Premio Nobel en 1968 compartido con Robert W. Holley, Khorana y Nirenberg, quienes lo obtuvieron «por su interpretación de la clave genética y su función en la síntesis de las proteínas».

A partir de 1962, Severo Ochoa se adentró, por una parte, en los mecanismos de replicación de los virus que tienen ARN como material genético, y, por otra parte, en los mecanismos de la biosíntesis de proteínas. En agosto de 1964, Margarita Salas y Eladio Viñuela llegaban a Nueva York.

Bibliografía

- CARLOS ASENSIO Y FRANCISCO GRANDE (1977): «Severo Ochoa y el desarrollo de la bioquímica», en L. Cornudella, C. F. de Heredia, J. Oro y A. Sols, eds. *Avances de la Bioquímica* [recoge las versiones en español de los ensayos publicados por bioquímicos españoles en el libro: A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella y J. Oro, eds (1975): *Reflections on Biochemistry. In Honour of Severo Ochoa. New York, Pergamon Press*]. Barcelona, Salvat Editores S A; pp. 545-584.
- ASUNCIÓN GANDÍA BALAGUER, ed. (1997): *El Pensamiento Científico de Severo Ochoa: desde la fosforilación oxidativa hasta el código genético, y correspondencia científica*. Madrid, Fundación Ramón Areces.
- MARINO GÓMEZ-SANTOS (1994): *Severo Ochoa. La emoción de descubrir*. Madrid, Ediciones Pirámide SA.

- FRANCISCO GRANDE COVIÁN (1990): «La obra científica de Severo Ochoa», en Antonio Fernández-Rañada, ed. *Nuestros Orígenes: El Universo, La Vida, El Hombre. En homenaje a Severo Ochoa*. Madrid, Fundación Ramón Areces - Fundación Principado de Asturias; pp. 17-34.
- MARIANNE GRUNBERG-MANAGO (1997): «Severo Ochoa (24 September 1905–1 November 1993)». *Biogr Mem Fell R Soc Lond* 43: 349-365.
- MARIANNE GRUNBERG-MANAGO Y SEVERO OCHOA (1955): «Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: polynucleotide phosphorylase». *J Am Chem Soc* 77: 3165-3166.
- ARTHUR KORNBERG (1997): «Severo Ochoa (24 September 1905–1 November 1993)». *Proc Am Philos Soc* 141 (4): 478-491.
- PETER LENGYEL, JOHN F. SPEYER y SEVERO OCHOA (1961): «Synthetic polynucleotides and the amino-acid code». *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1936-1942.
- MANUEL LOSADA (1994): *Ochoa. Hombre de ciencia y de bien*. Sevilla, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- SEVERO OCHOA (1941): Coupling of phosphorylation with oxidation of pyruvic acid in brain. *J Biol Chem* 138: 751-773.
- SEVERO OCHOA (1980): The pursuit of a hobby. *Ann Rev Biochem* 49: 1-30.
- SEVERO OCHOA (1999): *Escritos* (2.^a ed. de Marino Gómez-Santos). Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- SEVERO OCHOA (2000): *Base Molecular de la Expresión del Mensaje Genético*. (2.^a ed. de María Jesús Santemas). Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Monografías 20).

MARGARITA SALAS (2006): «Severo Ochoa», en *Grandes Vidas de la España de Nuestro Tiempo*. 2. Madrid, Editorial Universitaria Ramón Areces-Servicio de Publicaciones Universidad Rey Juan Carlos; pp. 147-174.