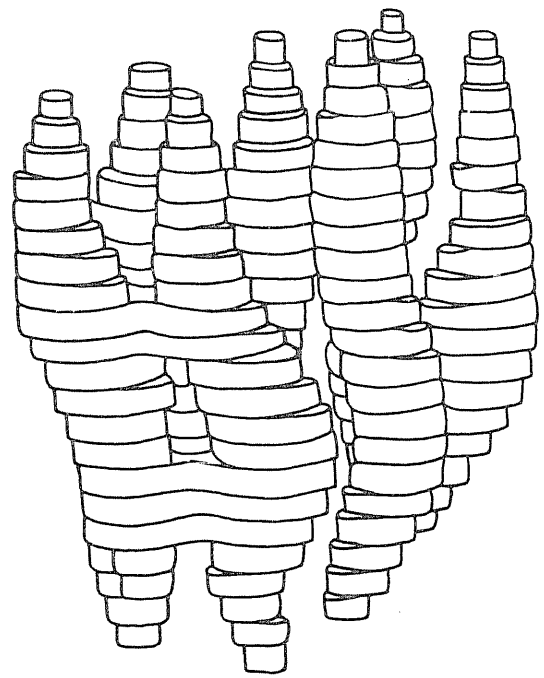
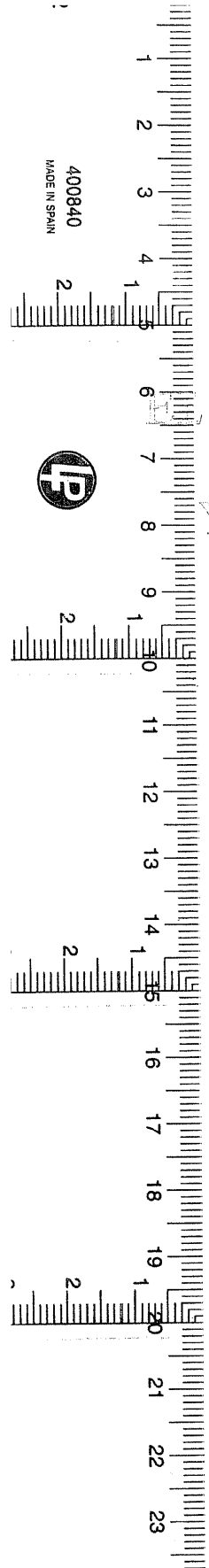


Yu. A. OVCHINNICOV
Doctor "Honoris Causa"

EL APROVECHAMIENTO DE LA LUZ
POR LOS SERES VIVOS
Y EL PROBLEMA DE LA VISION

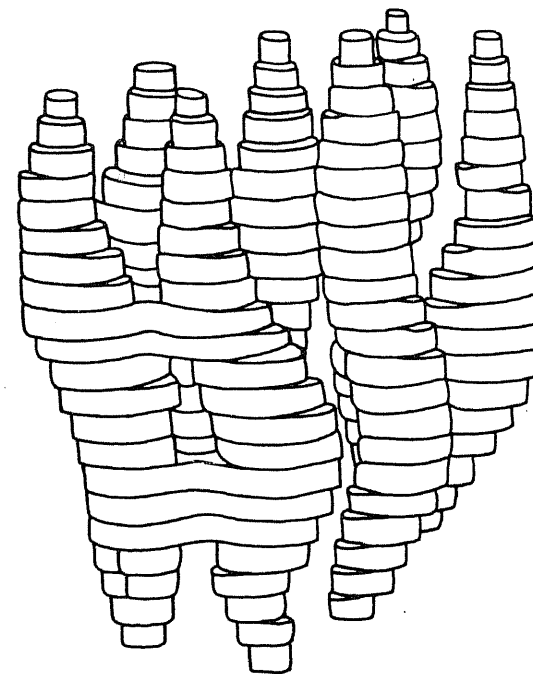


DISCURSO DE INVESTIDURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
20 MAYO 1983



Yu. A. OVCHINNIKOV
Doctor "Honoris Causa"

EL APROVECHAMIENTO DE LA LUZ
POR LOS SERES VIVOS
Y EL PROBLEMA DE LA VISION



DISCURSO DE INVESTIDURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
20 MAYO 1983

Yu. A. OVCHINNICOV
Doctor "Honoris Causa"

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	248790
N.º Copia	248804

EL APROVECHAMIENTO DE LA LUZ
POR LOS SERES VIVOS
Y EL PROBLEMA DE LA VISION



DISCURSO DE INVESTIDURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
20 MAYO 1983

PRESENTACION

Excmo. y Mgco. Sr. Rector
Excmos. e Ilmos. Señores
Señoras y Señores:

El estudio de la mente ha sido, es y será una de las más ambiciosas y nobles tareas del quehacer humano, que fundamentalmente hasta este siglo había sido una parcela casi exclusiva de las disciplinas tradicionalmente conocidas como Humanísticas. Hoy en día, está bien establecido que la mente procede de la compleja interacción de un conjunto de neuronas creadas de acuerdo con una «impronta genética» que, en una perfecta síntesis dialéctica, crece y se desarrolla en un medio creado por la cultura preexistente, la cual no es sino una historia particular embebida en las memorias o archivos de aquellos que la transmiten. Ejemplos de la influencia genética en la organización cerebral se están descubriendo continuamente, entre los que me gustaría glosar aquí, los genes que codifican ámbitos de conducta tales como facilidad de lectura, dificultad en el razonamiento espacial, facilidad de expresión oral, conservación del equilibrio y temores atávicos como el vértigo o la aversión al fuego, por citar algunos de los más llamativos que no entran dentro del capítulo que podríamos denominar patológico.

Traigo a colación estos estudios, no sólo porque el Profesor Ovchinnikov esté trabajando sobre las bases bioquímicas y fisicoquímicas de la transmisión nerviosa, sino porque creo que es relevante a esta solemne Ceremonia de Investidura.

De los dos factores anteriormente mencionados, es el educativo o cultural el que fundamentalmente nos distingue de los demás animales superiores, pues aunque éste no sea exclusivo del género humano, su importancia relativa en la formación de la mente del adulto es, sin lugar a dudas, muy superior a la de cualquier otra especie animal. De hecho, este aspecto que nos aleja de un ciego, aunque posiblemente variado, determinismo, es el que da sentido al continuo quehacer humano y, sobre todo, a una Institución como la nuestra, la Universidad. Por ello, la concesión de un Doctorado Honoris Causa no es sólo un galardón que honra tanto al que lo recibe como a la Universidad que lo concede, sino es, sobre todo, un singular acto discente, quizá uno de los más excelsos, si es que la apasionante labor educadora de la Universidad admite categorías.

Aunque la Universidad no podría ser tal sin esta función transmisora de conocimientos, sabemos que ello, *per se*, no es suficiente. El otro pilar básico sobre el que se edifica nuestra Institución y le da razón de ser, es la Investigación. Así, son actos como el presente los que nos recompensan de nuestra cotidiana y sorda labor en aulas y laboratorios, actividad muchas veces más llena de sinsabores que de alegrías. En realidad, la nominación de un investigador por excelencia, como es hoy el caso, es un motivo de enhorabuena para la investigación, más aún en un país como el nuestro en el que el profesor universitario no está legalmente obligado a investigar, sino solamente a impartir un número de lecciones más o menos magistrales por semana. Afortunadamente, la mayoría de nosotros no entendemos que puedan impartirse estudios superiores sin una labor intelectual y creadora en nuestra parcela del saber, es decir, sin realizar y fomentar la Investigación. Este es nuestro estímulo personal y por eso investigamos, todo ello a pesar de las innumerables trabas de diversa índole que continuamente nos incitan a una fácil y cómoda autojustificación exculpatoria, con la lógica consecuencia de convertirnos en repetidores de lo que otros crearon; en una palabra, en ser meros locutores del saber.

Por ello, es para mí motivo de una profunda satisfacción presentarles en nombre de mi Facultad al Profesor Yuri A. Ovchinnikov. Graduado por la Universidad Lomonosov de Moscú en 1957, de la que desde 1972 es Profesor y Director del Departamento de Química Bioorgánica, es hoy en día, a pesar de su juventud, reconocido internacionalmente por sus contribuciones científicas en el campo de la química-física biológica. El ser autor de

más de 250 publicaciones en revistas tanto soviéticas como occidentales me aconseja no citar ni siquiera las más significativas, porque aún en este caso serían demasiadas y no es mi deseo abrumarles. Quizá baste señalar sus contribuciones más destacadas en su campo de trabajo.

En los años sesenta, elucidó por vez primera las características conformacionales de la valinomicina, eniantinas y sus complejos con iones en disolución. Con ello, no sólo sentó las bases estereoquímicas de péptidos de una gran significación biológica, sino que contribuyó fundamentalmente al estudio de las interacciones de los iones metálicos con péptidos y proteínas. Una de las consecuencias inmediatas de este trabajo fue la creación de nuevos y potentes ionóforos artificiales en base a moléculas tales como valinomicina, eniantina, antamanida y gramicidina, que han contribuido poderosamente al estudio del transporte iónico a través de las membranas biológicas. Es decir, sus trabajos pioneros sentaron en gran parte las bases del estudio de biomembranas, campo ahora ampliamente investigado en el mundo entero.

Posteriormente, el Profesor Ovchinnikov y sus colaboradores se dedicaron al estudio de proteínas de membrana implicadas en procesos de transporte. Fue también el primero en elucidar las bases estructurales del funcionamiento de proteínas de membrana tan importantes como la bacteriorodopsina o la rodopsina. En este campo sigue investigando y de ello nos va a hablar a continuación con voz más autorizada que la mía. Otro campo muy cercano a éste, en el que ya tiene publicados avances significativos, es el estudio de un grupo peculiar de proteínas. Me refiero a ciertas toxinas que específicamente inhiben sistemas de transporte iónico tanto en las uniones sinápticas como en membranas excitables por el sistema nervioso.

Otro campo quizá menos llamativo, pero igualmente importante y donde la contribución del Profesor Ovchinnikov resulta inestimable, es el estudio de la estructura y función de péptidos y proteínas hidrosolubles. Así, él fue quien desarrolló las bases del análisis de la estructura primaria de proteínas por medio de la espectrometría de masas. Fue también su grupo el primero en proponer que la síntesis de péptidos sería mucho más efectiva usando un soporte polimérico sólido. Tampoco puedo ignorar en esta breve semblanza el desarrollo de los principios del análisis conformacional dinámico de péptidos en disolución mediante el uso de métodos físico-químicos.

La determinación de secuencias de proteínas es un campo poco rentable desde el punto de vista de publicaciones, por el gran esfuerzo que implica, pero, sin lugar a dudas, importantísimo y de todo punto necesario. Aquellas personas iniciadas en el campo son conscientes de las grandes dotes de paciencia necesaria para la determinación de la estructura primaria de una proteína, aún con la instrumentación sofisticada que hoy en día facilita esta labor. En este campo, el grupo del Profesor Ovchinnikov ha descifrado la estructura de enzimas tales como la aspartato transaminasa, clave en el metabolismo del nitrógeno, las subunidades α , β y β' de la RNA polimerasa de *E. Coli*, o de proteínas tales como las ribosomales L-3, L-10, L-25 y L-32.

Por último, dentro de este rápido recorrido por sus actividades investigadoras, no podía pasar por alto el reciente campo de la genética, o mejor dicho, de la ingeniería genética. A pesar de su novedad, no ha pasado por alto para su mente inquieta. Aunque apenas en sus comienzos, las secuencias de los genes que codifican a la RNA polimerasa o la obtención de neuropéptidos como la encefalina o algunos interferones de leucocitos humanos pueden contarse entre sus logros más recientes.

No es pues de extrañar que dados sus méritos científicos, su gran capacidad de trabajo y dinamismo, sea hoy requerido para multitud de actividades organizativas y cargos de responsabilidad en el mundo científico. Así, es Editor en Jefe y miembro del Comité Editorial de una gran cantidad de revistas científicas, entre las que destacaría, por sonar más familiares a nuestros oídos, a *Methods of Biochemical Analysis*, *Journal of Membrane Biology*, *Tetrahedron*, *Biopolymers*, *Biochimica et Biophysica Acta*, etc. Es a su vez Director del Instituto Shemyakin de Moscú, del Instituto de Investigación de Proteínas de Poutshino, Miembro del Presidium y Vice-Presidente de la Academia de Ciencias de la URSS, Presidente del Departamento de Química Tecnológica y Ciencias Biológicas del Presidium de la Academia de Ciencias de Moscú, etc., etc., etc. Para no cansarles más, sólo mencionaré un par de Comités Internacionales a los que pertenece: la Fundación CIBA para la Promoción Internacional de la Cooperación en la Investigación Médica y Química, y Miembro de la Academia Europea de Artes, Ciencias y Humanidades.

La consecuencia natural de estos méritos personales da lugar a que los nombramientos honoríficos abundan en su Curriculum. Entre éstos, de nuevo

he de hacer una selección, aún a riesgo de marginar quizá los por él más queridos, por lo que me disculpo sinceramente. Así, es miembro de las Academias de Ciencias de Bulgaria, Checoslovaquia, Alemania e India, y Doctor Honoris Causa por las Universidades de La Sorbona, Upsala, Lima y Gdansk.

Aunque verdaderamente su Curriculum abrume, hay un aspecto humano en el Profesor Ovchinnikov que a mí me impresiona más que todos sus méritos, con ser muchos. Me refiero a su constante afán de comunicación, de borrar fronteras, a su carácter universalista que le ha llevado entre otras actividades a ser Presidente del Comité Hispano-Soviético de Amistad y Cooperación. En diversas ocasiones hemos coincidido en que la Ciencia, por muy importante que sea *per se*, lo es tanto o más como lazo de unión entre hombres, no importa qué lejanos sean sus países, lenguas o condicionamientos políticos y sociales. Podría ser que la necesidad imperiosa para nuestros antecesores de reunirse en pequeños grupos y así aumentar sus posibilidades de defensa y búsqueda de alimento, considerando enemigo a todo el mundo exterior, sea una actitud atávica de nuestra mente que, por qué no, quizá esté también codificada genéticamente. Por ello, es hoy en día más necesario que nunca, destacar a aquellos de nuestros semejantes que se esfuerzan constantemente por mejorar estas relaciones humanas, por buscar un mundo mejor y en paz para nuestros hijos, tratando de desterrar para siempre esa dicotomía crónica a lo largo de la Historia de luchas entre griegos y persas, romanos y cartagineses, etc., etc.

Manuel Cortijo Mérida
Catedrático de Química Física
Facultad de Ciencias

DISCURSO

Magnífico y Excelentísimo Señor Rector de la Universidad,
Excmo. Señor Embajador de la Unión Soviética en España,
Estimados colegas e invitados, señores y señoras, amigos:

Me siento muy emocionado en este solemne acto. La obtención del título de Doctor Honoris Causa por esta Universidad famosa en todo el mundo es la apreciación más alta y generosa de mis modestos méritos y me siento profundamente reconocido al Consejo Científico por este honor.

Los vínculos permanentes entre los hombres de ciencia que estudian las leyes y los fenómenos de la Naturaleza y que han consagrado su vida a este maravilloso mundo de conocimientos son la condición imprescindible para el progreso en nuestro planeta. Precisamente esta alta misión inspira a los científicos a cruzar fronteras y vencer los obstáculos y distancias, unir sus esfuerzos, discutir juntos, pensar juntos, soñar juntos... La comunicación científica despierta nuevas ideas, hace más amplia la visión del mundo, a veces nos hace poner los pies en la tierra, más frecuentemente nos inspira. Pero los encuentros pueden ser también inolvidables y emocionantes, especialmente cuando están ligados con una brillante página en la vida del hombre. Precisamente estos pensamientos y sensaciones reinan en mi alma ahora mismo, en esta solemne sala.

Pienso, estimados colegas, que este gran honor que hacen recaer sobre mi persona es el reconocimiento a los nuevos caminos en la moderna biología, en la que me iniciaron mis maestros y mis compañeros y amigos me

ayudaron en los momentos más difíciles. Es, sin duda, un rendimiento de homenaje a mi país, donde la ciencia ocupa un digno lugar y el estudio de la Naturaleza viva se desenvuelve hoy día de un modo fructífero y veloz. Por fin, es el rendimiento de homenaje a la amistad que ya hace tiempo me vincula con la maravillosa España, antigua Granada, con buenos y fieles amigos en esta tierra. Desde este momento, una parte de mi suerte estará relacionada con esta Universidad, con antiguas paredes de la gloriosa Alhambra, con este soleado día de mayo que recordaré siempre. Espero que este acto sea una aportación a nuestra comprensión mutua, a la colaboración entre los pueblos, a la causa de la paz y el progreso en la Tierra.

En plena correspondencia con el acontecimiento de hoy, elegí el tema de la luz y su interacción con los seres vivos. La luz se identifica a menudo con la vida. El Sol mantiene la existencia de nuestro planeta, nos envía el calor y la luz, y hasta ahora ninguna otra fuente de energía, creada o imaginada por los físicos, es capaz de prometernos alguna otra alternativa alentadora. El Sol es la fuente principal para la vida de las plantas, independientemente de que sean: de la taigá siberiana o de la selva amazónica; gracias al Sol se acrecienta el mundo microscópico en la tierra y el océano. Por consiguiente, la luz es también alimento, vivienda y comodidades... Pero, al mismo tiempo, la luz es la belleza insuperable de la naturaleza, con amaneceres rosados y anocheceres violetas, con la gama poética de los colores del arco iris, con el azul oscuro del mar y el cielo azulado... Sin la luz, la vida del hombre se hace más pobre y pierde su brillo. La alegría que el hombre experimenta en su relación con la naturaleza la obtiene por medio de la luz y la vista. El ojo es una de las cumbres del mundo vivo que capta las pequeñísimas señales de la luz y de sus matices más finos. La luz... ¿cómo se siente, se capta y se analiza por el ser vivo, por el hombre? Conocemos la clorofila de las plantas verdes, la fluorescencia del mar, las luciérnagas en el bosque nocturno, la retina del ojo humano. Pero ¿cuáles son los fundamentos de su interacción con los sistemas celulares y moleculares de los organismos vivos? En muchos aspectos, es un secreto todavía no descubierto, una audaz hipótesis y raras veces una conclusión fundamentada. La ciencia solamente trata de penetrar, paso a paso, en este campo enigmático...

Yo trataré de exponer el estado actual del problema en relación con los trabajos realizados en este campo por nuestro laboratorio en el Instituto de Química Bioorgánica M. Shemyakin de la Academia de Ciencias de la

URSS. Este gran Centro científico es conocido por sus trabajos en la química de proteínas y ácidos nucleicos, por sus estudios de membranas, de ingeniería genética e inmunología, de antibióticos, esteroides, péptidos, enzimas... Nuestro Instituto será el organizador del Congreso de la Federación de las Sociedades Bioquímicas Europeas que tendrá lugar en Moscú en junio de 1984.

Las proteínas sensibles a la luz despertaron nuestro interés en los años 70. Estas proteínas están presentes en los cloroplastos de las plantas, en los cromatóforos de las bacterias fotosintetizantes, en los receptores lumínicos de la retina, conos y bastoncillos y, como es natural, concentramos nuestra atención el representante principal de estos sistemas: la rodopsina (Figura 1).

Dos tipos de células fotosensibles

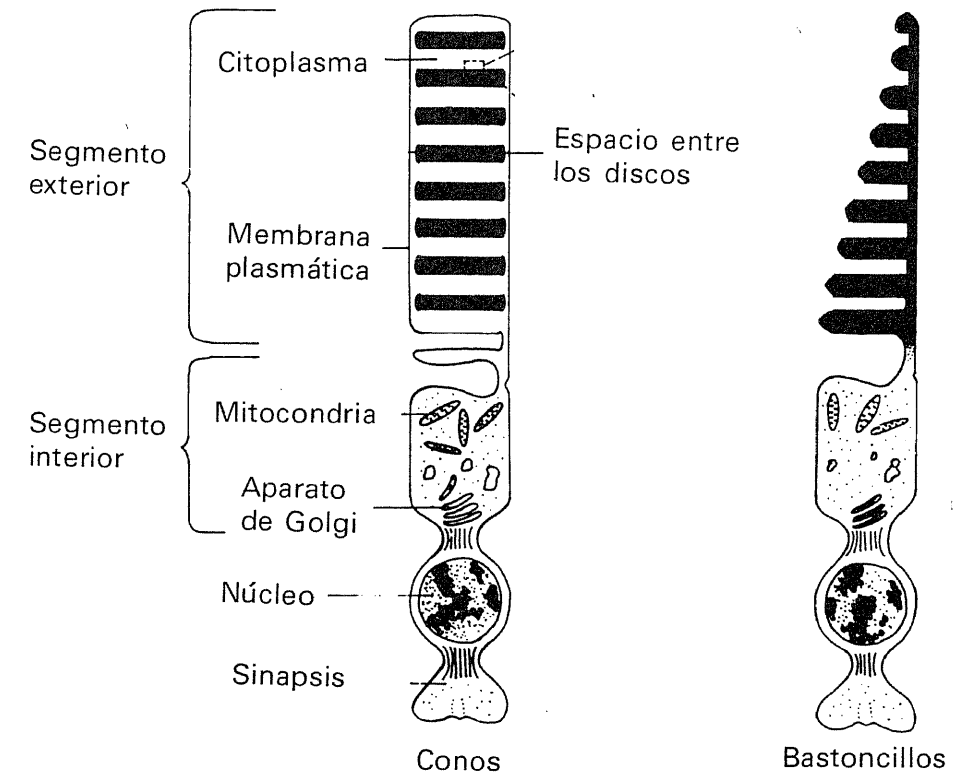


Figura 1.—Dos tipos de células fotosensibles.

Se puede considerar que el estudio de los fundamentos moleculares de la excitación óptica comenzó hace unos cien años, cuando F. Boll, fisiólogo alemán, descubrió la decoloración de la retina aislada de rana y llegó a la conclusión de que este proceso podía ser explicado por la «sustancia óptica». El pigmento, descubierto por F. Boll, obtuvo la denominación de «púrpura óptica» y hoy día se le conoce como rodopsina.

La transformación de la energía de la luz en la señal óptica ocurre a través de una compleja secuencia de procesos fotoquímicos, eléctricos, iónicos y enzimáticos. Al mismo tiempo, todo el mecanismo puede ser puesto en acción con la absorción de un único cuanto de luz por una molécula del pigmento óptico-rodopsina.

La retina de los vertebrados contiene dos grupos de receptores de la luz: conos y bastoncillos. La rodopsina se encuentra en los conos responsables de la visión crepuscular también llamada visión «negra-blanca». La capacidad de los bastoncillos de captar preferentemente los rayos azules, verdes y rojos se explica por la presencia en la misma de proteínas especiales llamadas iodopsinas que hasta ahora están menos estudiadas que la rodopsina. Propiamente, la fotorecepción transcurre en los segmentos exteriores de los conos, donde se encuentran las moléculas de rodopsina. El segmento exterior del cono representa una columna de discos rodeada por la membrana celular. Estructural y eléctricamente están aislados de la membrana celular, como si nadaran en el citoplasma del segmento exterior.

La membrana del disco es asombrosamente homogénea en cuanto a la composición proteínica. Casi el 80 por 100 es rodopsina. La molécula de rodopsina representa un complejo muy estable de la proteína, opsina, con el retinal, aldehído de la vitamina A. Precisamente la rodopsina tiene color rojo gracias al retinal unido a la proteína por medio de un enlace aldímico protonado. La energía de la luz, absorbida por el retinal, se usa en la fotoisomerización del mismo desde la forma 11-cis a su forma todo trans. Todos los procesos sucesivos, entre los que se encuentra la reestructuración conformacional de la proteína, son acontecimientos que pertenecen a la fase oscura de la visión y no necesitan la luz.

El resultado final de estas transformaciones es la variación del potencial eléctrico de la membrana plasmática del segmento exterior de la célula fotoreceptora como consecuencia del bloqueo de los canales iónicos¹.

Ha sido propuesto que la función de la rodopsina consiste en mantener un nivel determinado del mediador intracelular que controla la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula para los iones sodio. A comienzos de los años 70 fueron propuestos simultánea e independientemente para el papel de un tal mediador intracelular dos candidatos: iones calcio y nucleótidos cíclicos^{2,3}.

La elección definitiva entre estas dos hipótesis hasta ahora es imposible. No se excluye que la amplificación de la señal lumínica por medio de iones de calcio o cGMP esté interrelacionada.

Cualquiera que sea el mecanismo verdadero, es indudable que cumple también un importante papel la propia proteína, la opsina.

Sin embargo, hasta los últimos tiempos, a pesar de los esfuerzos invertidos por muchos laboratorios, eran desconocidas tanto la estructura primaria de la opsina, como la conformación de su cadena polipéptica en la membrana. Sin esta información, sin el conocimiento exacto de la naturaleza de los grupos funcionales que integran el «sitio» del cromóforo, es natural que no puedan conocerse las bases moleculares del funcionamiento de la rodopsina.

Es difícil predecir el desarrollo de las investigaciones sobre la rodopsina sin un reciente descubrimiento en un campo no relacionado a primera vista con los problemas de la visión. Estudiando los componentes de las membranas celulares de ciertos microorganismos halofílicos que habitan en los lagos salados, los investigadores encontraron fracciones de membranas con intenso color violeta. Fue demostrado que las membranas violetas (o púrpuras) son regiones especializadas de la membrana plasmática que contienen una única proteína de bajo peso molecular. Esta proteína, al igual que el pigmento óptico rodopsina, contenía como cromóforo el aldehído de la vitamina A —retinal en la configuración todo trans o 13-cis. Esta cromoproteína resultó ser semejante por una serie de propiedades al pigmento óptico, lo que explica precisamente su denominación: bacteriodopsina. Los estudios de la bacteriodopsina y la rodopsina se desarrollaron paralelamente, pero los de la bacteriodopsina se terminaron antes.

Se necesitaron solamente unos pocos años para explicar el papel de la bacteriodopsina en la célula. Por la absorción de un cuanto de luz, la

molécula de la bacteriodopsina sufre una serie de transformaciones fotoquímicas cíclicas. Cada ciclo va acompañado por el transporte a través de la membrana por lo menos de un protón y el gradiente electroquímico de los iones hidrógeno, creado en la membrana, se aprovecha por la célula para la síntesis de ATP y otras funciones vitales⁴.

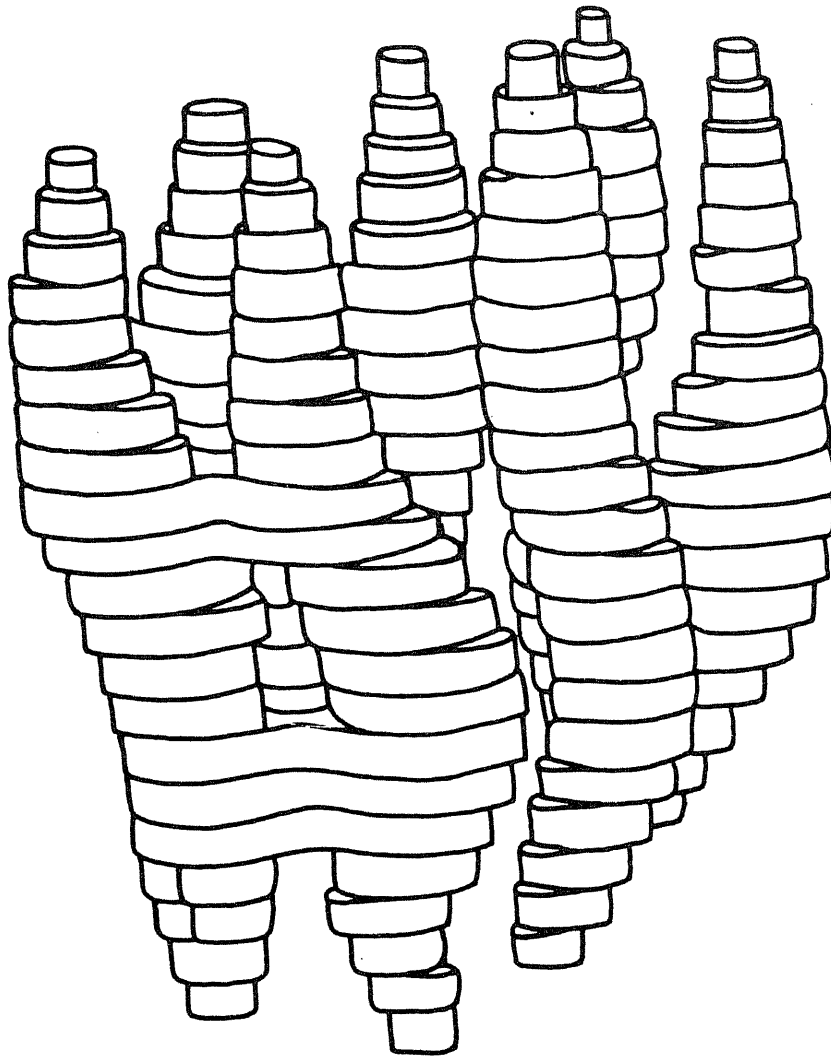


Figura 2.—La estructura tridimensional de la molécula de la bacteriorodopsina.

En la membrana púrpura, la bacteriodopsina está organizada ordenadamente, formando una estructura hexagonal. Esta circunstancia permitió a Henderson y Anwin aprovechar la combinación del método de difracción de los electrones y de la microscopía electrónica para esclarecer la organización tridimensional de la bacteriodopsina con una resolución de 7 \AA ⁵. De acuerdo con el modelo de Henderson, la molécula de bacteriodopsina se compone de siete barras bastante largas en estructura α -hélice que penetran toda la anchura de la membrana perpendicularmente a su superficie (Figura 2). Este trabajo demostró las grandes posibilidades del análisis estructural de los cristales bidimensionales de las proteínas de membrana; sin embargo, no proporcionó la respuesta para la pregunta: dónde se encuentra el resto del retinal, qué grupos funcionales de la proteína están a su alrededor o son esenciales para el transporte de protones.

Para resolver estos problemas, hay que conocer la estructura primaria de la proteína. Es indispensable el estudio de la relación estructura-función, por ejemplo, por medio de modificaciones químicas de determinados restos aminoácidos o del propio retinal. Precisamente en estas direcciones se desarrollaron las investigaciones de la bacteriodopsina en nuestro laboratorio.

La bacteriodopsina es una proteína intrínseca de membrana constituida preferentemente por restos aminoácidos hidrofóbicos y en estado nativo está casi por completo sumergida en la fase lipídica. Estas propiedades explican la poca solubilidad de la bacteriodopsina como un típico representante de las proteínas de membrana. Precisamente por eso la determinación de su secuencia de aminoácidos exigió elaborar una estrategia especial y nuevos métodos de análisis estructural.

El paso de la bacteriodopsina a disolución acuosa puede realizarse tratándola con disolventes orgánicos o por medio de diferentes modificaciones. Sin embargo, las preparaciones de la proteína, así obtenidas, resultan inaccesibles a la acción de enzimas proteolíticos y por eso en las investigaciones estructurales se requiere realizar la ruptura química de la cadena polipeptídica en medios en los que la proteína sea efectivamente soluble.

La buena solubilidad de los preparados delipados de la bacteriodopsina en ácido fórmico concentrado permitió escoger como método principal de

fragmentación la rotura de la cadena polipeptídica con bromuro de cianógeno, con lo que fueron identificados 10 fragmentos. La cromatografía de gel en ácido fórmico del 50 por 100 permitió separar los péptidos cortos y de mediana longitud que corresponden a las siguientes regiones de la cadena polipeptídica de la bacteriodopsina: 1-20, 21-32, 33-56, 57-60, 61-68 y 210-248.

Los péptidos 119-145, 146-163, así como los fragmentos 69-118 y 164-209, fueron separados por medio de cromatografía sobre biogel P-30 en ácido fórmico del 80 por 100 de los péptidos que se habían extraído con una mezcla de ácido fórmico del 50 por 100 y urea o guanidina 6M. De este modo, se logró separar 10 péptidos bromociánicos que abarcan toda la cadena polipeptídica de la proteína.

Para determinar el orden de disposición de los péptidos bromociánicos aprovechamos la fragmentación de la proteína por los restos triptófano usando BNPS-escatol. De la mezcla de péptidos formados se obtuvieron los péptidos 13-80 y 190-248, que solapaban con 8 péptidos bromociánicos y permitieron conocer los fragmentos N-terminal (1-119) y C-terminal (164-248) de la proteína.

Una información importante e indispensable para determinar la secuencia aminoacídica completa de la bacteriodopsina, se consiguió durante el estudio de los fragmentos obtenidos al tratar la membrana púrpura nativa con papaina. El análisis estructural de los grandes fragmentos, 4-65 y 73-231, formados en el curso de dicha operación, permitió solapar las restantes regiones de la proteína.

De esta manera, conseguimos determinar la estructura primaria completa de la bacteriodopsina, una proteína intrínseca de membrana⁶⁻⁸. En el trabajo de Khorana y colaboradores, publicado un año después⁹, fue precisada la determinación de varios restos aminoacídicos y, en general, confirmada la secuencia establecida por nosotros.

En el curso de la determinación de la secuencia aminoacídica total se obtuvieron importantes datos sobre su topografía en la membrana. A este respecto jugaron un papel decisivo los experimentos de proteólisis limitada con auxilio de reactivos impermeables tales como algunas enzimas proteo-

líticas. La membrana púrpura del *Halobacterium halodiu*m presenta una formación bastante compacta y medio cristalizada con una distribución mutua de sus componentes, proteínas y lípidos, más o menos rígida⁵. Por eso se podía esperar que con un tratamiento relativamente suave de la membrana púrpura, las enzimas proteolíticas atacaran exclusivamente a las regiones de la cadena polipeptídica expuestas al medio en el exterior de la membrana (si es que las había), al mismo tiempo que aquellas regiones profundamente embebidas en el interior de la membrana resistirían el ataque proteolítico.

En realidad, la investigación de la accesibilidad para la acción de quimotripsina, tripsina y papaina de fragmentos aislados de membrana púrpura, así como de células de *Halobacterium halobium* permitió identificar los restos de la cadena polipeptídica expuestos al medio. En la superficie exterior de la membrana son accesibles las regiones 1-4, 65-73 y en la parte citoplasmática —el enlace 162-163 y el fragmento 231-248.

Tomando en consideración los trabajos de Henderson y la información sobre el espesor de la membrana púrpura, así como el análisis de la distribución de los restos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena polipeptídica y los resultados de proteólisis limitada permitieron proponer un modelo de organización de la bacteriodopsina en la membrana⁷. En los últimos años, investigaciones teóricas y experimentales tanto en nuestro como en otros laboratorios^{10,11}, han llevado a un refinamiento del modelo, aunque sus características principales permanecen invariables (Figura 3).

A pesar del evidente progreso en las investigaciones de la bacteriodopsina, principalmente en el aumento de la resolución de los métodos difracciónométricos hasta un valor de 3,5 Å¹², hasta ahora no se ha logrado establecer exactamente la correspondencia entre cada uno de los siete segmentos helicoidales del modelo de Henderson y Anwin y el fragmento determinado de la secuencia aminoacídica.

Considerables esfuerzos fueron realizados para establecer la distribución del resto de retinal. Ya en 1971 se había encontrado⁴ que el retinal formaba una base de Schiff protonada con una lisina, pero se han necesitado más de 10 años para poder saber el resto de lisina determinada que sirve como aceptor del cromoforo. En la actualidad, se conoce que el retinal se une al resto Lys 216, con la particularidad de que esta conclusión no se base

únicamente en la reducción del enlace aldímico, sino en otras maneras, completamente independientes de abordar el problema¹³⁻¹⁶.

Especialmente importante fue el descubrimiento de que el complejo constituido por dos grandes fragmentos proteolíticos, no vinculados entre sí por relación covalente mostraba actividad funcional¹⁷. Aprovechando la reconstrucción del complejo de estos dos fragmentos, en uno de los cuales los restos de lisina fueron sometidos a modificación química, Khorana y colaboradores llegaron a la conclusión de que el resto de retinal está unido al fragmento 72-248, y los restos de lisina del fragmento 1.71 no son esenciales para la actividad funcional¹⁸. Es más, los datos anteriormente citados para la bacteriorodopsina, sometida a una metilación reductiva o succinilización, muestran que ninguno de los grupos ϵ -amino (excepto el de la Lys 216) son necesarios para el transporte protónico a través de la membrana. Podría pensarse que estos grupos se necesitasen para el autoensamblaje de la estructura nativa y el mantenimiento de su estabilidad, pero en realidad, no es así. Hemos logrado reconstruir el complejo lipoproteínico coloreado, de manera análoga a como se hace con la opsina no modificada, a partir de la bacteriorodopsina desnaturalizada, con 6 restos de lisina dimetilados, de fosfatidilcolina y retinal en forma todo trans.

Hoy en día, la bacteriorodopsina está caracterizada bastante bien tanto a nivel de su estructura química, como en términos de su orientación espacial. Esta información, de una u otra forma, subyace en las diversas hipótesis presentadas en la bibliografía sobre el mecanismo de transporte de los protones a través de la membrana púrpura.

En particular, dentro de este modelo de la topografía de la cadena polipeptídica en la membrana, cabe la posibilidad de que el transporte de protones ocurra a lo largo de la cadena de puentes de hidrógeno implicando también algunos restos de tirosina¹⁹. A este respecto, otra dirección prometedora es la investigación de la actividad funcional de fragmentos o análogos de la bacteriorodopsina obtenidos por medio de síntesis peptídica o de los métodos de la ingeniería genética.

Sin embargo, ya es hora de volver al pigmento óptico, la rodopsina, respecto a la cual la bacteriorodopsina puede considerarse, con mayor o menor grado de fundamento, como un análogo creado por la Naturaleza.

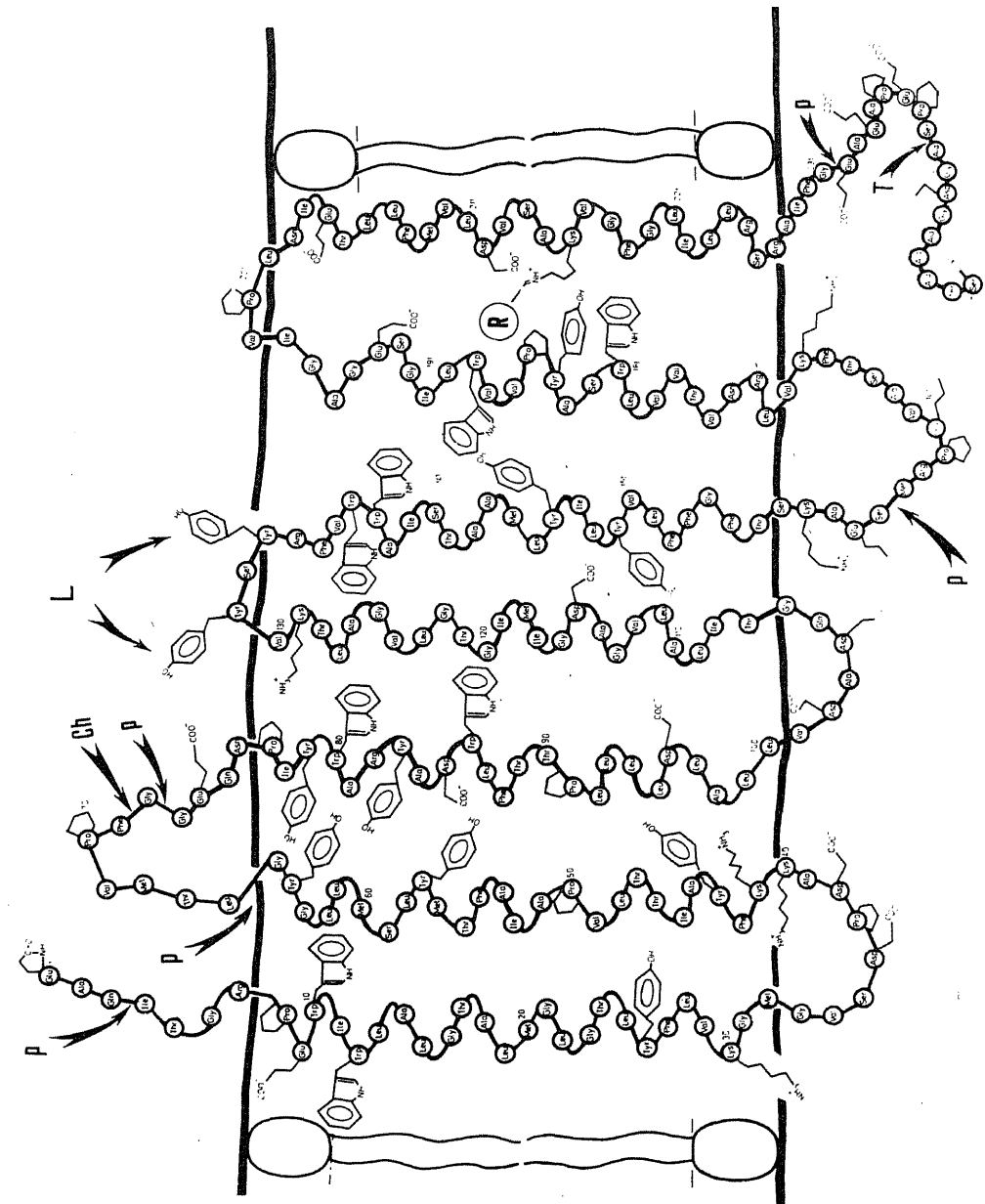


Figura 3.—La organización de la cadena polipeptídica de la bacteriorodopsina en la membrana púrpura.

Los esfuerzos de nuestro laboratorio se orientaron fundamentalmente a establecer la estructura primaria de la rodopsina de vaca y esclarecer la topografía de su cadena polipeptídica en la membrana. En este trabajo se hizo uso de los métodos y procedimientos metodológicos desarrollados durante las investigaciones de la relación estructura-función de la bacteriorodopsina.

Se obtuvo una importante información estructural durante el estudio de los fragmentos producidos por acción del bromuro de cianógeno sobre la rodopsina. El análisis de los productos obtenidos como resultado del ataque quimotriptico de las apomembranas fue extremadamente útil en la determinación de la secuencia de los péptidos obtenidos en el ataque del bromuro de cianógeno y de su ordenamiento dentro de la cadena polipeptídica. Los péptidos aislados contenían un total de 300 restos aminoacídicos. Con estos péptidos pudieron solaparse 8 de los 15 fragmentos bromociánicos y reconstruirse parcialmente la cadena polipeptídica de la proteína.

Hemos analizado también los grandes fragmentos (F-1 y F-2) que se forman durante el tratamiento de las membranas fotoreceptoras con termolisina. Los fragmentos F-1 y F-2 corresponden a las secuencias (1-240) y (241-327) de la rodopsina, respectivamente. Posteriormente se realizó el análisis estructural de los productos de ruptura de estos fragmentos con BNPS-escatol, N-bromosuccinimida y clorhídrico 0,03 M.

De este modo, el conjunto de los métodos utilizados permitió establecer la secuencia aminoacídica completa de la cadena polipeptídica de la rodopsina compuesta de 248 restos^{8, 20, 21}.

Una parte del estudio estructural de la rodopsina fue la identificación del resto de lisina responsable de la unión del retinal. Con esta finalidad, las membranas fotoreceptoras eran tratadas con NaBH₄ o NaBH₃CN, y luego rotas con termolisina en dos fragmentos, 1-240 y 241-327, que se separaban en una columna de sphadex LH-60 equilibrada con una mezcla de ácido fórmico y etanol (3:7). Únicamente el fragmento 241-327 mostraba radioactividad y fluorescencia. El análisis de los péptidos obtenidos demostró inequívocamente que el retinal se une al grupo ε-terminal de la Lys 296.

El establecimiento de la estructura primaria de la rodopsina permitió esclarecer la topografía de su cadena polipeptídica en la membrana fotore-

ceptora. Al igual que en el caso de la bacteriorodopsina, para solucionar este problema aprovechamos fundamentalmente el análisis de la accesibilidad de la rodopsina integrada en la membrana fotoreceptora a las enzimas proteolíticas.

Usando membranas nativas, se lograron identificar las regiones de la cadena polipeptídica expuestas a la superficie citoplasmática. Además, durante el estudio de la proteólisis limitada de los discos de orientación invertida, preparados con congelación y descongelación, fueron localizadas las regiones de la cadena polipeptídica en contacto con el espacio intradiscal.

La localización de los enlaces rotos enzimáticamente permitió determinar la longitud de varios fragmentos polipeptídicos que atraviesan todo el espesor de la membrana. Al tomar en consideración esta información y la longitud de la cadena polipeptídica que se encuentra dentro de la membrana, llegamos a la conclusión de que la parte intermembránica de la cadena polipeptídica de la rodopsina se compone de siete segmentos⁸.

Información adicional sobre las regiones de la molécula enterradas dentro de la membrana y las que quedan en la superficie se obtuvo durante el análisis de distribución de los restos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena polipeptídica. Las regiones «β-turn» más probables también deberían estar expuestas, fuera de la superficie de la membrana. Sobre la base de estos datos fue propuesto el modelo de la topografía de la rodopsina (Figura 4).

La principal característica de este modelo es la presencia de 7 varillas α-helicoidales que se extienden a todo lo ancho de la membrana. En ellas se puede destacar el fragmento central que contiene aproximadamente 20 restos aminoacídicos y se sitúa en el interior de la membrana, así como las regiones que pueden estar en contacto con las cabezas polares de los lípidos. Los fragmentos de la cadena que se encuentran dentro de la membrana tienen un carácter hidrofóbico más acentuado que las correspondientes α-hélices de la bacteriorodopsina.

Las siete varillas α-helicoidales de la rodopsina se unen por lazos hidrofílicos de diferente longitud que se encuentran más o menos expuestos en la superficie de la membrana, al mismo tiempo que varios de ellos son

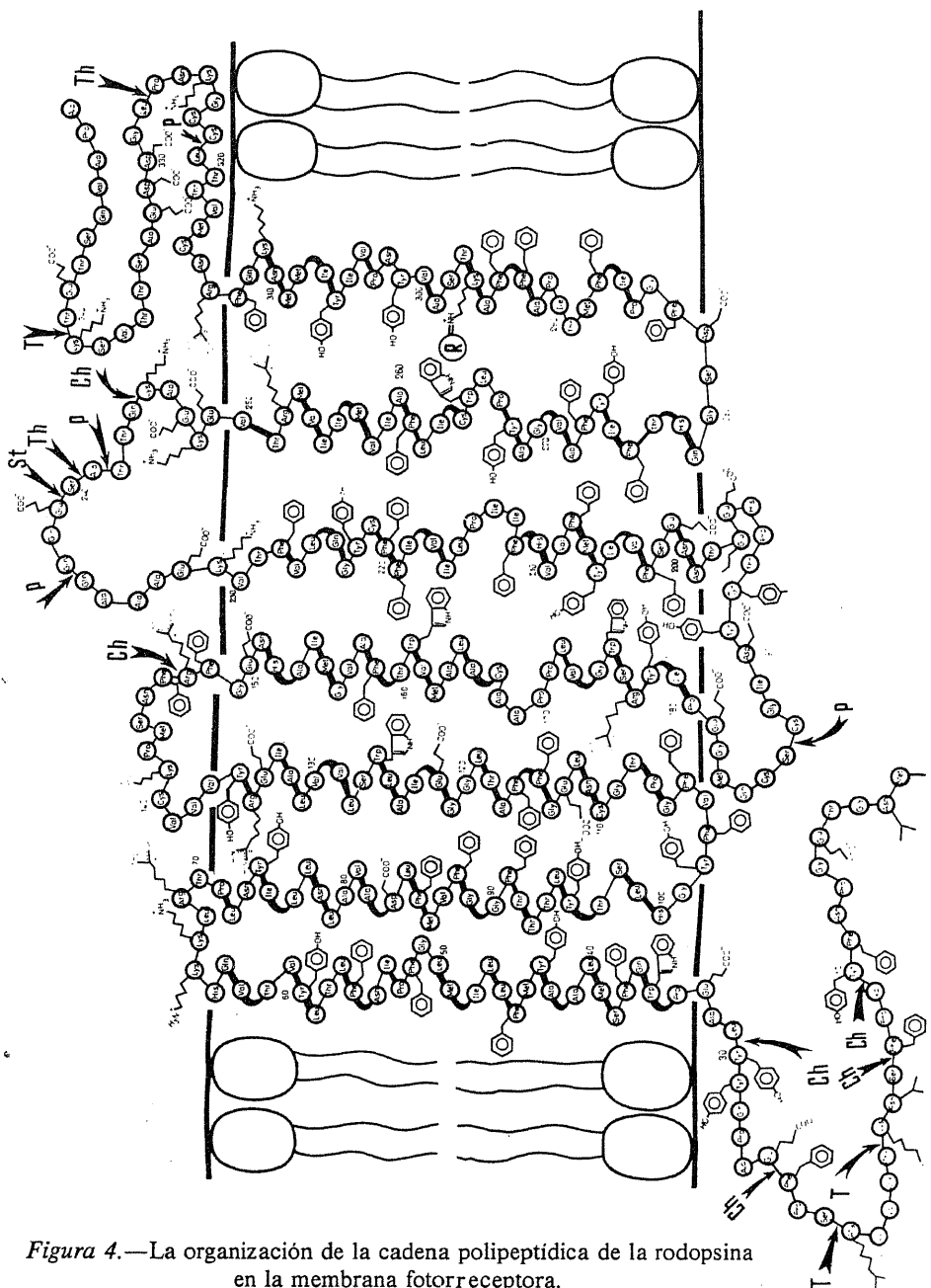


Figura 4.—La organización de la cadena polipeptídica de la rodopsina en la membrana fotorreceptora.

accesibles a enzimas proteolíticas. Un rasgo característico del modelo es la presencia de un lazo hidrofílico (restos 231-246) sobre la superficie citoplasmática. Esta región no sólo está expuesta a la acción de proteasas, sino que se modifica fácilmente con dansilcadaverina en presencia de transglutaminasa.

El fragmento N-terminal glucosilado de la proteína se localiza en el espacio intradiscal²². La región C-terminal, accesible a la actuación de opsina-quinasa y de otros agentes no penetrantes, está expuesta hacia el citoplasma²³. En la figura 4 se ve que el residuo Lys 296, responsable de la unión del cromoforo, está situado en el séptimo segmento, es decir, más cerca del centro de la membrana. Los datos de fluorescencia están de acuerdo con esta distribución del retinal respecto a la superficie de la membrana²⁴.

La disposición de las cadenas de rodopsina y bacteriorodopsina tiene muchos rasgos similares. Esta similitud se refiere, sobre todo, al número de segmentos que penetran la membrana y a la disposición de los residuos de lisina que forman el enlace aldímico en el fragmento C-terminal dentro de la membrana. Se podría esperar que la semejanza estructural de la rodopsina y bacteriorodopsina se reflejara en sus propiedades funcionales. Hasta ahora es difícil responder a esta pregunta. Es posible que sea esencial la similitud de las fases iniciales de las fototransformaciones de las dos cromoproteínas. En ambos casos los productos primarios son batofomas que se caracterizan por su absorción a mayores longitudes de onda en comparación con los pigmentos originales. En estas formas se acumula la energía del cuanto de luz indispensable para las transformaciones posteriores.

La determinación de la organización de la cadena polipeptídica de la rodopsina en la membrana es solamente el primer paso en el conocimiento del mecanismo de su funcionamiento. Pasará cierto tiempo antes de que se logre conseguir detalle de nuestros conocimientos, parecido al que se tiene con la bacteriorodopsina, aunque con esta última, todavía quedan, como hemos visto, muchos problemas por solucionar. Se puede esperar que con el tiempo las interacciones estructura-función de las proteínas de membrana podrán ser caracterizadas de una manera tan completa, como ocurre con ciertas proteínas hidrosolubles.

No obstante, en el estudio de la estructura de la rodopsina se ha alcanzado un progreso indudable. Ahora nos queda comprender ¿cómo

ejerce sus funciones?, ¿en qué procesos de la membrana participa?, ¿de qué manera la luz origina la señal nerviosa en la célula óptica?, ¿cómo esta señal se copia y transforma en las células nerviosas de la retina y del cerebro? y ¿cómo, por fin, aparece la imagen visual en el cerebro? El estudio de estos problemas es uno de los más interesantes retos a la biología moderna.

Las proteínas sensibles a la luz, como la rodopsina, no son solamente importantes elementos de los sistemas biológicos que captan y aprovechan la luz. Actualmente son, asimismo, modelos de dispositivos técnicos que aprovechan la luz modulada, por ejemplo, elementos holográficos que son ampliamente utilizados en computadores. Estas investigaciones se están desarrollando activamente y su objetivo principal es descubrir los secretos de la Naturaleza y ponerlos más y más al servicio del hombre.

Me siento muy atradecido por la atención, agradezco una vez más el alto honor y quiero expresar el deseo de que los éxitos de los científicos de esta Universidad dupliquen su fama mundial, de que se fortalezca la comprensión mutua y colaboración entre los científicos de España y la Unión Soviética.

¡Gracias!

BIBLIOGRAFIA

1. WALD, G., Molecular basis of visual excitation, *Science* 162: 230-239, 1968.
2. BITENSKY, M. W., GORMAN, R. E. and MILLER, W. H., Adenyl cyclase as a link between proton capture and changes in membrane permeability of frog photoreceptors, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 561-562, 1971.
3. HAGINS, W. A., The visual process: excitatory mechanisms in the primary receptor cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1: 131-158, 1972.
4. STOECKENIUS, W., Purple membrane of Halobacteria: a new light-energy converter, *Account. Chem. Res.* 13: 337-344, 1980.
5. HENDERSON, R. and UNWIN, P. W. T., Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature* 257: 28-31, 1975.
6. OVCHINNIKOV, Yu. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., KISELEV, A. V., LOBANOV, N. A. and NASIMOV, I. V., The amino acid sequence of bacteriorhodopsin, *Bioorg. Khim.* 4: 1573-1574, 1978.
7. OVCHINNIKOV, Yu. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., KISELEV, A. V. and LOBANOV, N. A., The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview, *FEBS Lett.* 100: 219-224, 1979.
8. OVCHINNIKOV, Yu. A., Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett.* 148: 179-191, 1982.
9. KHORANA, H. G., GERBER, G. E., HERLIHY, W. C., GRAY, C. P., ANDEREGG, R. J., NIHEI, K. and BBIEMANN, K., Amino acid sequence of bacteriorhodopsin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 5046-5050, 1979.
10. EHGELMAN, D. M., HENDERSON, R., McLACHLAN, A. D. and WALLACE, B. A., Path of the polypeptide in bacteriorhodopsin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 2023-2027, 1980.

11. KIMURA, K., MASON, T. L. and KHORANA, H. G., Immunological probes for bacteriorhodopsin. Identification of three distinct antigenic sites on the cytoplasmic surface, *J. Biol. Chem.* 257: 2859-2867, 1982.
12. HAYWARD, S. B. and STROUD, R. M., Projected structure of purple membrane determined to 3,7 Å resolution by low temperature electron microscopy, *J. Mol. Biol.* 151: 491-517, 1981.
13. BAYLEY, H., HUANG, K. S., RADHAKRISHNAN, R., ROSS, A. H., TAKAGAKI, Y. and KHORANA, H. G., Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 2225-2229, 1981.
14. LEMKE, H. D. and OESTERHELT, D., Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.* 128: 255-260, 1981.
15. MULLEN, E., JOHNSON, A. H. and AKHTAR, M., The Identification of Lys 216 as the retinal binding residue in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.* 130: 187-193, 1981.
16. RODIONOV, A. V., BAIRAMASHVILI, D. I., KUDELIN, A. B., FEIGINA, M. Yu., SHKROB, A. M. and OVCHINNIKOV, Yu. A., Acceptor lysine residue in the light-induced retinal migration in bacteriorhodopsin. *Bioorg. Khim.* 7: 1328-1334, 1981.
17. ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., KISELEV, A. V., OVCHINNIKOV, Yu. A., DRACHEV, L. A., KAULEN, A. D., KHITRINA, L. V. and SKULACHEV, V. P., Products of limited proteolysis of bacteriorhodopsin generate a membrane potential, *FEBS Lett.* 90: 190-194, 1978.
18. HUANG, K.-S., LIAO, M.-J., GUPTA, C.-M., ROYAL, N., BIETTMANN, K. and KHORANA, H. G., The site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. The epsilon-amino group in Lys-41 is not required for proton translocation, *J. Biol. Chem.* 257: 8596-8599, 1982.
19. MERZ, H. and ZUNDEL, G., Proton conduction in bacteriorhodopsin via a hydrogen-bonded chain with large proton polarizability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 540-546, 1981.
20. OVCHINNIKOV, Yu. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., ARTAMONOV, I. D., ZOLOTAREV, A. S., KOSTINA, M. B., BOGACHUK, A. S., MIROSHNIKOV, A. I., MARTINOV, V. I. and KUDELIN, A. B., The complete amino acid sequence of visual rhodopsin, *Bioorg. Khim.* 8: 1424-1427, 1982.
21. ABDULAEV, N. G., ARTAMONOV, I. D., BOGACHUK, A. S., FEIGINA, M. Yu., KOSTINA, M. B., KUDELIN, A. B., MARTYNOV, V. J., MIROSHNIKOV, A. I., ZOLOTAREV, A. S. and OVCHINNIKOV, Yu. A., Structure of light-activated proteins: visual rhodopsin, *Biochemistry Internat.* 5: 693-703, 1982.

22. ADAMS, A. J., TANAKA, M. and SHICHI, H., Concanavalin A binding to rod outer segment membranes: usefulness for preparation of intact disks, *Exp. Eye Res.* 27: 595-605, 1978.
23. WILDEN, U. and KUHN, H., Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites, *Biochemistry* 21: 3014-3022, 1982.
24. HARGRAVE, P. A. and KUHN, H., Light-induced binding of guanosinetriphosphatase to bovine photoreceptor membranes: effect of limited proteolysis of the membranes, *Biochemistry* 20: 2410-2417, 1981.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA



900248804

BIBL. GENERAL UNIVERSITARIA

