

11

CAPÍTULO

Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos constituyen la segunda macromolécula de importancia biológica después de las proteínas, y sus funciones están muy relacionadas con estas últimas. Como macromoléculas, presentan las características estructurales comunes a todas ellas, como ya fue estudiado en el capítulo 9, pero tienen aspectos que son exclusivos de ellas.

Las funciones de los ácidos nucleicos están relacionadas con el funcionamiento del aparato genético celular, o sea, con el conjunto de moléculas y mecanismos que garantizan la transmisión y expresión de los caracteres hereditarios de generación en generación y, por tanto, son de un gran valor en la perpetuación de las especies.

El descubrimiento de su estructura fue uno de los más importantes hitos de la biología contemporánea, y de ello hace apenas algo más de 40 años. Desde entonces, muchos son los datos que han enriquecido el conocimiento de la estructura y las funciones de estos compuestos, de forma tal, que en nuestros días existe una imagen bastante aproximada de ellas.

Dos son los tipos principales de ácidos nucleicos que se diferencian, tanto estructural como funcionalmente: los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y los ácidos ribonucleicos (ARN). De cada uno de ellos existen diferentes subtipos. Ambos surgen como consecuencia de la polimerización de unidades estructurales más sencillas, denominadas nucleótidos, que ya fueron estudiados en el capítulo 8. Presentan estructuras tridimensionales complejas muy relacionadas con las funciones que realizan y son portadores de información molecular.

Tipos y funciones

Desde el punto de vista funcional los ADN cumplen sólo la función de ser los reservorios celulares de la información genética, en tanto los ARN pueden realizar funciones diferentes, aunque todas ellas relacionadas con la síntesis y procesamiento de proteínas. Entre estas funciones tenemos:

1. Dirigen la síntesis de proteínas en el proceso de la traducción, como se estudiará en el capítulo 30.
2. Forman parte de la estructura de los ribosomas y parecen tener allí una participación funcional importante. Este aspecto será estudiado en detalles en el capítulo 29.
3. Preparan a los aminoácidos para la síntesis de las proteínas y los transfieren al ribosoma, como se verá en el capítulo 30.

4. Algunos ARN participan en el procesamiento de otros ARN. El estudio de esta función se realiza en el capítulo 27.
5. Participan en el proceso de secreción de proteínas, como se verá en el capítulo 29.
6. Algunos ARN presentan cierta actividad catalítica por sí y otros contribuyen a la actividad catalítica de las proteínas. Este aspecto se desarrolla en el capítulo 25.
7. Actúan como “chaperonas” moleculares en el procesamiento de algunos ARN transcritos primarios. Esta función será abordada en el capítulo 27.
8. En algunos organismos (virus) son los portadores de la información genética capítulo 78.

Por razones de índole didáctico en este capítulo se estudiará primero la estructura de los ADN y después la de los ARN, se resaltarán siempre que sea posible sus analogías y diferencias.

ADN como material genético

En 1928, *Frederick Griffith* realizó un experimento singular; para ello utilizó el *Diplococcus pneumoniae*, una bacteria que es el agente causal de algunos tipos de neumonía. Al crecer en un medio de cultivo las colonias de estas bacterias tienen un aspecto liso (L), pues están encapsuladas por un polisacárido gelatinoso que contiene el antígeno mediante el cual reconocen a las células que infecta. Un mutante carente de esa cubierta y, por tanto, no patógeno forma colonias rugosas (R).

Griffith inyectó ratones con bacterias L muertas por calor y R vivas. De manera sorpresiva los ratones morían por neumonía, pero más sorprendente fue el hecho de que en la sangre de los ratones se encontraron bacterias L vivas, las cuales al ser cultivadas originaban bacterias de tipo L. Estos resultados suponen que las bacterias L transformaron a las R y que esa transformación tenía carácter permanente.

En busca de la naturaleza química de ese principio transformante, en 1944 *Oswald Avery*, *Colin MacLeod* y *Maclyn McCarty* encontraron que el principio transformante no se afectaba por el tratamiento con tripsina, quimotripsina o ribonucleasa, pero era totalmente inactivo después de su exposición a la acción de las desoxirribonucleasas; por tanto, el principio transformante era el ADN. Este resultado no fue aceptado con simpatía por la comunidad científica. En esa época se pensaba que el ADN tenía una estructura tan simple que era incapaz de servir como portador de la información genética.

En 1952, *Alfred Hershey* y *Marta Chase* hicieron crecer el fago T2 en un cultivo de *Escherichia coli* que contenía ^{32}P y ^{35}S . De esta forma las proteínas del virus eran marcadas con el ^{35}S , mientras el ADN lo era con el ^{32}P . Se transfirió el fago hacia un cultivo de *E. coli* con medio no radiactivo y, después de un tiempo suficiente para producir la infección, el cultivo fue agitado vigorosamente en una licuadora doméstica para separar las partículas virales de la bacteria. La preparación se centrifugó en condiciones que facilitaban la sedimentación de las bacterias y que los materiales menos pesados quedaran en el sobrenadante. El análisis radiactivo mostró que la mayor parte del ^{35}S quedaba en el sobrenadante, mientras casi todo el ^{32}P se recobraba en el precipitado. Además, mientras en la progenie del virus sólo aparecía el 1 % del ^{35}S , en ésta se conservaba más del 30 % del ^{32}P . *Hershey* y *Chase* concluyeron que sólo el ADN era esencial para la reproducción del virus y, por tanto, debía ser el material genético.

En 1953, *James D. Watson* y *Francis H. C. Crick* propusieron un modelo molecular para el ADN basados en estudios de cristalografía de rayos X, que ha sido corroborado suficientemente con posterioridad. Este modelo no sólo permitía comprender cómo el ADN podía servir de reservorio de la información genética, también sugería el mecanismo básico para la transmisión de esa información de una generación a otra. De esta forma quedó firmemente establecida la idea de que la molécula portadora de la información genética es el ADN.

Estructura primaria de los ADN

En el estudio de las macromoléculas el concepto de estructura primaria se refiere al orden o sucesión de los precursores en la cadena polimérica. Estos precursores se unen por medio de enlaces covalentes que suelen ser los más fuertes entre todas las interacciones que contribuyen a mantener la estructura tridimensional de las macromoléculas. La estructura primaria de los ADN se define como el orden o sucesión de los desoxinucleótidos a lo largo de la cadena polinucleotídica. Ahora bien, como quiera que de los 3 componentes del desoxinucleótido sólo existe variación en la base nitrogenada, se acostumbra hablar de la sucesión de las bases y no de los desoxinucleótidos. Los desoxinucleótidos se unen por los hidroxilos de C3' y C5' mediante un grupo fosfato; este grupo se esterifica hacia ambas posiciones, por lo que el enlace recibe el nombre de 3', 5'-fosfodiéster, con lo cual se origina una cadena lineal, o sea, carente de ramificaciones, una característica que es común a casi todas las macromoléculas; la figura 11.1 representa un pequeño sector de una hebra de ADN.

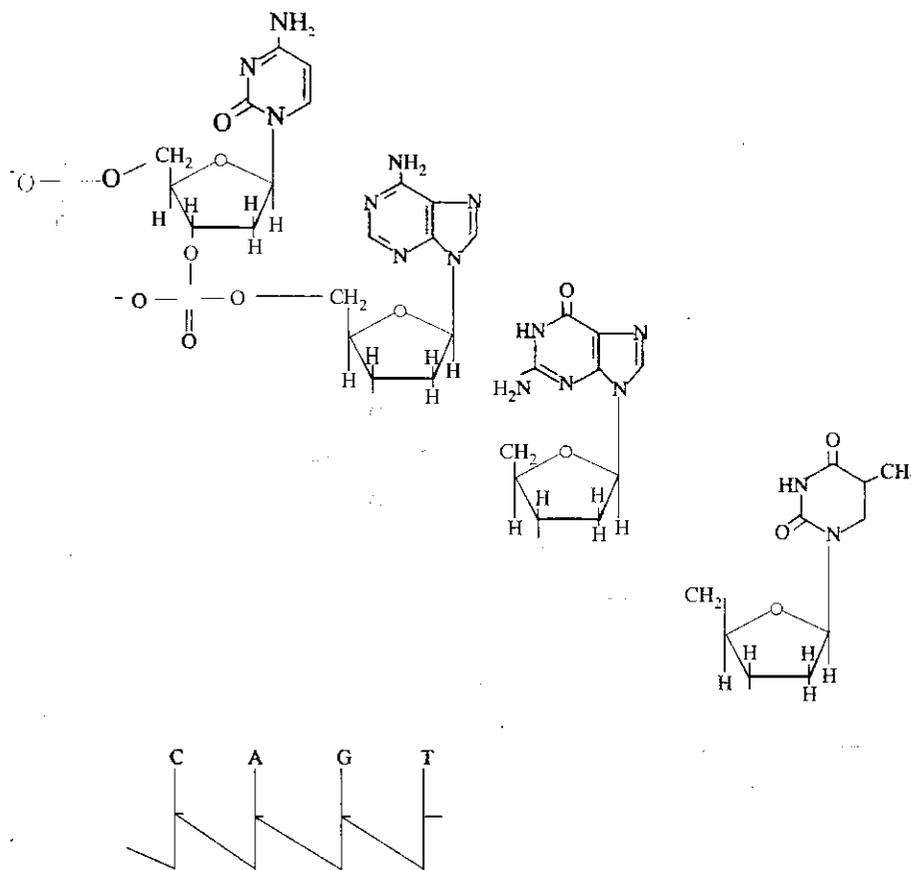


Fig. 11.1. Estructura polimérica del ADN. En la parte superior se muestra un segmento de una hebra del ADN donde aparece la estructura de sus 4 bases nitrogenadas características. Obsérvese la monotonía estructural del eje covalente principal, donde se alternan la desoxirribosa y el fosfato. Abajo una representación abreviada en la cual las letras mayúsculas representan a las bases, la línea vertical a la pentosa con su C3' en el centro y el C5' en el extremo inferior.

Si se observa una cadena polinucleotídica se verá que todos los desoxinucleótidos están unidos a otros 2 (uno por su C3' y otro por su C5') excepto los extremos. En un extremo sólo está comprometido en el enlace fosfodiéster el C3'-OH, mientras que el grupo fosfato de la posición C5' está libre; en el otro extremo es el C3'-OH el que se encuentra libre; esto significa que los 2 extremos de la cadena son diferentes, por eso se dice que la cadena polinucleotídica tiene polaridad. Se define como el primer componente de la cadena al desoxinucleótido que tiene libre el fosfato de la posición

C5' y el último al del C3'-OH, y se dice que la cadena tiene una polaridad 5'→3'; la figura 11.2 muestra estas características de una cadena polinucleotídica.

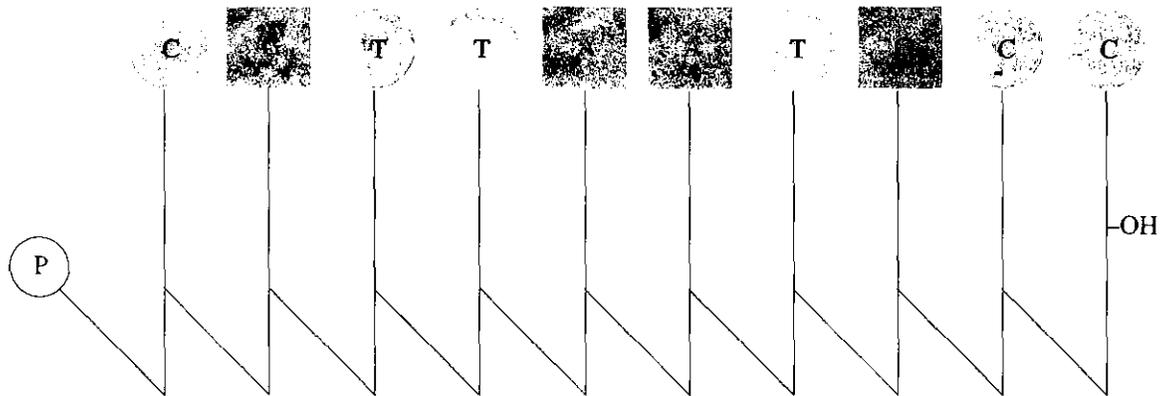


Fig. 11.2. Polaridad de una cadena polinucleotídica. Se muestra un sector de una cadena polinucleotídica en la cual las bases pirimidínicas aparecen como círculos azules y las purínicas como cuadrados rojos. La línea inclinada representa el enlace fosfodiéster. El primer nucleótido tiene libre el fosfato en la posición 5' y el último tiene libre el OH de la posición 3', por eso la polaridad de la cadena es 5' → 3'.

Cuando 2 cadenas se colocan una al lado de la otra, si los extremos 5' de las 2 cadenas coinciden, y por tanto coinciden los 3', se dice que las cadenas tienen una disposición paralela. En el caso contrario se les designan como antiparalelas.

El grupo fosfato se encuentra disociado a pH fisiológico, cada uno porta una carga negativa, por lo que el polímero posee características de un polianión que atrae fuertemente iones de carga contraria.

Durante la década de los años 40 *Edwing Chargaff* estudió la composición de bases de los ADN de diferentes orígenes. El ADN era hidrolizado y sus productos identificados y cuantificados por medio de cromatografía en papel; de esos estudios se derivaron importantes conclusiones:

1. La composición de bases del ADN es característica de cada especie.
2. Diferentes células o tejidos del mismo organismo tienen una composición de bases idénticas o casi idénticas y no varía con la edad, el desarrollo, el estado nutricional u otras condiciones fisiológicas o ambientales.
3. La composición de bases muestra una amplia variación de un organismo a otro (de 25 a 75 % de G+C). Esta variación es mayor entre las bacterias que entre organismos superiores. Esto se expresa con mayor claridad por el índice de disimetría $(A+T)/(G+C)$.
4. Mientras más cercana es la relación filogenética entre 2 organismos, mayor similitud tiene la composición de bases de sus ADN.
5. Todos los ADN "normales" exhiben algunas regularidades químicas que se definen como las reglas de Chargaff, éstas son: $A=T$; $G=C$; $A+G=C+T$ (purínicas = pirimidínicas); $A+C=G+T$ (6 ceto=6 amino; en la nomenclatura antigua el C4 de las pirimidinas se numeraba como C6). Estas reglas no pudieron tener una explicación comprensible hasta años más tarde cuando apareció el modelo molecular del ADN. En la tabla 11.1 se relaciona la composición de bases de ADN de algunas especies.

Tabla 11.1. Composición de bases del ADN de algunas especies

Especie	A	G	C*	T	A+T/C+G
Bacteriófago T4	32,3	17,6	16,7*	33,4	1,91
<i>Escherichia coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6	0,93
<i>Neurospora crassa</i>	23,0	27,1	26,6	23,3	0,86
Trébol	29,9	21,0	20,4	28,6	1,41
Zanahoria	26,7	23,1	23,2	26,9	1,16
Erizo de mar	28,4	19,5	19,3	32,8	1,58
Langosta	29,3	20,5	20,9	29,3	1,41
Salmón	28,9	22,4	21,6	27,1	1,27
Trucha	29,7	22,2	20,5	27,5	1,34
Tortuga de mar	28,7	22,0	21,3	27,9	1,31
Gallina	28,0	22,0	21,6	28,4	1,29
Rata	28,6	21,4	21,5	28,4	1,33
Buey	29,0	21,2	22,4	28,7	1,36
Oveja	29,3	21,1	21,9	28,7	1,38
Hombre	30,4	19,6	20,6	30,1	1,53

* Incluye tanto a la citosina como a su derivado metilado, la 5-metil citosina.

* Todo en forma de 5-hidroximetil citosina.

Conformación de los nucleótidos

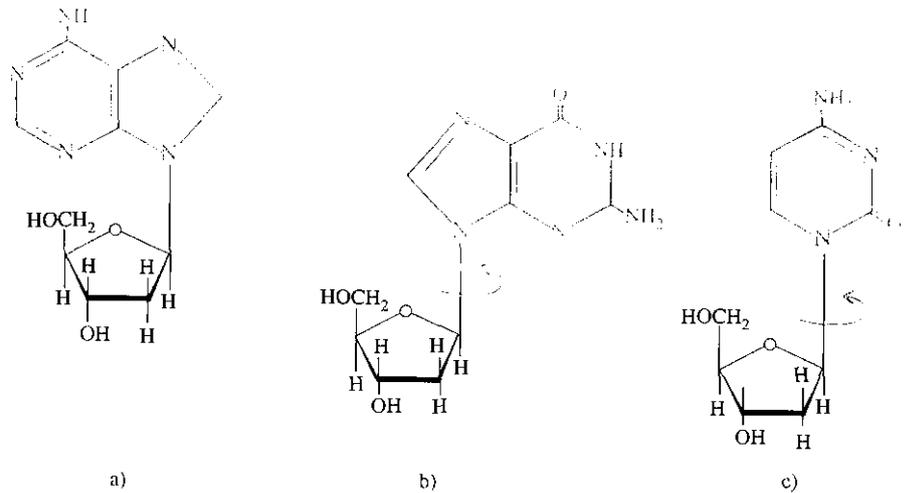
La estructura de los nucleótidos fue estudiada en el capítulo 8; ahora pretendemos hacer un breve análisis de las características espaciales de estos compuestos (las relaciones entre sus componentes) que influyen de forma importante en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, en especial de los ADN; por tanto es conveniente que el lector refresque el contenido del capítulo 8 antes de seguir adelante.

Relación base pentosa

Tanto en los ADN como en los ARN la base nitrogenada está unida mediante un enlace N-glicosídico al carbono 1 de la pentosa. Como se trata de un enlace simple debía existir una rotación relativamente libre de los anillos alrededor del enlace, pero existen factores como el volumen de los ciclos que lo impiden. De acuerdo con la posición relativa de la base y la pentosa, en relación con el enlace, pueden derivarse 2 conformaciones: la *syn* y la *anti*.

En el primer caso las 2 estructuras cíclicas se disponen del mismo lado del enlace, mientras en el segundo se disponen en lados contrarios. Cuando las bases son de tipo purínicas pueden adoptar cualquiera de las 2 conformaciones, pero en el caso de las pirimidínicas el átomo de oxígeno ligado al C2 le impide adoptar la conformación *syn* y por tanto, sólo existen en la configuración *anti*. En la figura 11.3 se representan estas formas isoméricas de los nucleótidos.

Fig.11.3. Formas isoméricas de los nucleótidos. Se representan las conformaciones derivadas de la posición de la base y la pentosa alrededor del enlace N-glicosídico. En a) la adenina en conformación *syn* y en b) la guanina en posición *anti*. En c) la citosina en la única conformación posible para ella, que es la *anti*. La saeta circular indica el giro de 180° dado por la base con respecto a la pentosa.



Conformación de la pentosa

La pentosa presente en la estructura de los ácidos nucleicos tiene una configuración D y está en la forma de su anómero β. Los 5 átomos que forman el anillo de la pentosa no se encuentran en el mismo plano, pues los sustituyentes de cada uno crean impedimentos estéricos que impiden la coplanaridad; esto obliga a que al menos uno de los átomos de carbono se encuentre fuera del plano. Si este átomo extraplano está orientado hacia la posición del carbono 5 se originan las formas *endo*, en tanto que si está hacia el lado contrario da lugar a las formas *exo*. En los ADN los carbonos que con más frecuencia se encuentran fuera del plano del anillo son el C2' y el C3', por lo cual se pueden originar 4 conformaciones, a saber, la C3'-endo, C2'-endo, C3'-exo y C2'-exo. El orden de frecuencia con que aparecen en el ADN es C2'-endo > C3'-endo > C3'-exo > C2'-exo. Otras conformaciones de la pentosa no se han reportado en el ADN. La figura 11.4 muestra las diferentes conformaciones de la pentosa.

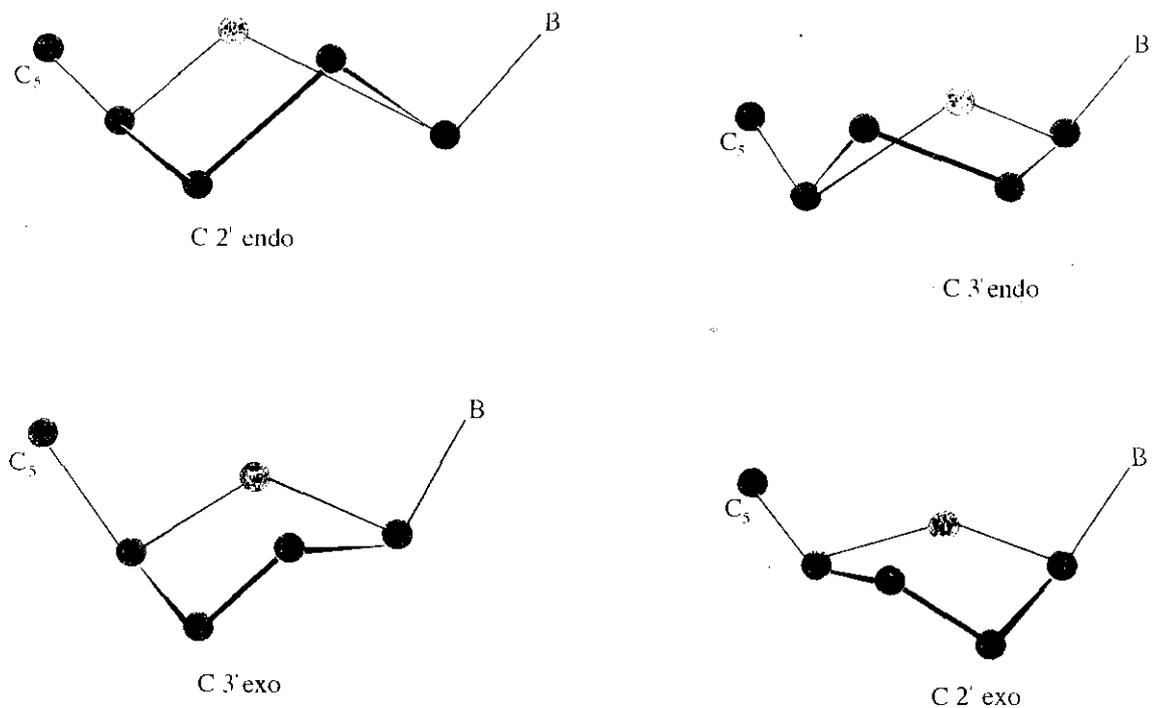


Fig. 11.4. Conformaciones de la pentosa. Se presentan las conformaciones de la pentosa que con mayor frecuencia aparecen en los ADN. Obsérvese cómo en las formas *endo* el carbono extraplano está orientado en la misma posición que el C5'.

Relación pentosa fosfato

En la estructura de los ácidos nucleicos las posiciones C3' y C5' están esterificadas en grupos fosforilos, dando lugar al enlace fosfodiéster. La conformación de la pentosa determina la orientación y separación de los grupos fosfatos unidos a C3' y C5'. Como se puede apreciar en la figura 11.5, en la forma C2'-endo, los grupos fosfatos se disponen a cada lado del plano de la pentosa y separados por una distancia de 0,7 nm, en tanto en la conformación C3'-endo, ambos grupos se localizan del mismo lado del plano del anillo y están separados por una distancia de sólo 0,59 nm.

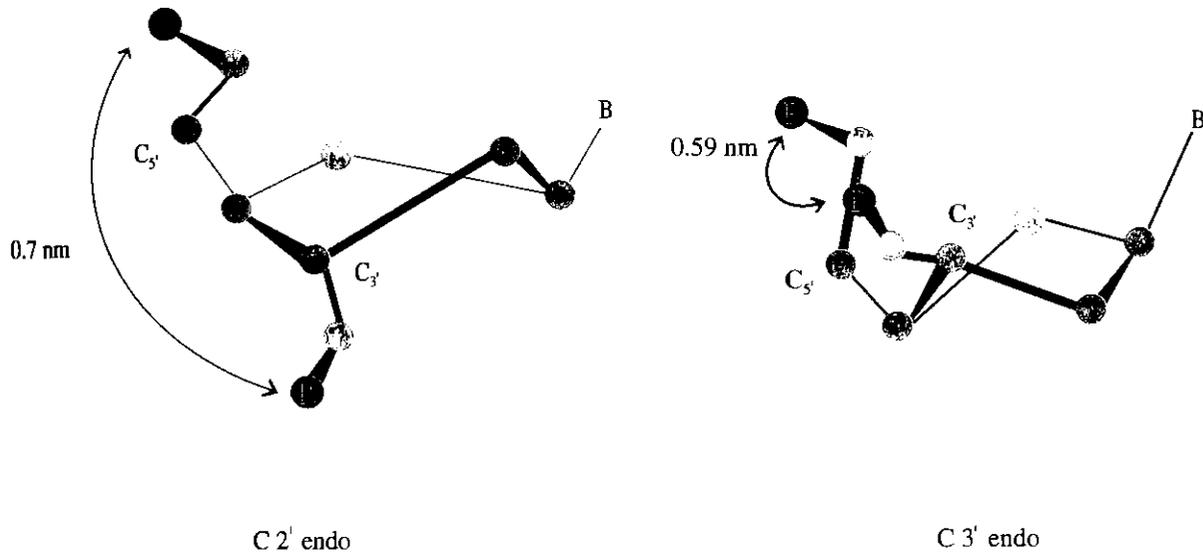


Fig. 11.5. Orientación de los grupos fosfatos. La conformación de la pentosa orienta al grupo fosfato. En la forma C2'-endo, los grupos fosfatos en C3' y C5' se orientan hacia lados distintos de la pentosa y están separados una distancia de 0,7 nm, en tanto en la C3'-endo se ubican hacia el mismo lado, pero separados sólo por 0,59 nm.

Estas relaciones espaciales influyen de manera notable en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos en general y de los ADN en particular.

Estructura secundaria de los ADN

Cuando en 1953 *Watson y Crick* dieron a conocer el modelo molecular del ADN, resumieron en apenas una página de *Nature*, más de una década de trabajos de varios laboratorios, y dieron explicación a numerosos resultados obtenidos previamente por otros grupos. Basado fundamentalmente en el método de difracción de rayos X el modelo consta de las características siguientes:

1. La molécula está formada por 2 cadenas poliméricas de desoxinucleótidos, enrolladas alrededor de un eje común con un giro hacia la derecha que adopta la forma de una doble hélice. Las cadenas enfrentadas son antiparalelas y se envuelven la una a la otra de manera que para separarlas hay que desenrollar la hélice (Fig. 11.6).
2. Las bases nitrogenadas están orientadas hacia el interior de la hélice, en tanto el eje pentosa-fosfato está hacia el exterior. Cada base de una cadena se para con una de

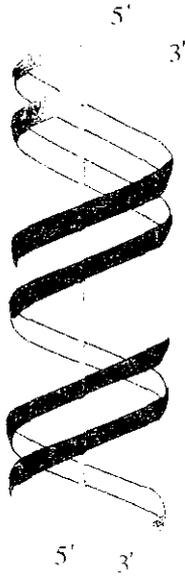


Fig. 11.6. Estructura secundaria del ADN. Esquema representativo del modelo de Watson y Crick. Las bandas azules representan el contorno del eje covalente principal formado por la alternancia de desoxirribosa y fosfato. La línea roja vertical representa el eje de la hélice. Los números indican los extremos y se puede advertir que las cadenas son antiparalelas. Nótese que las 2 hebras forman estructuras helicoidales derechas y al girar una sobre la otra no pueden separarse sin desenredar la hélice.

la cadena opuesta, formando pares que se disponen casi perpendicularmente al eje de la hélice (Fig. 11.7).

3. El modelo ideal tiene 2 nm de diámetro con 10 pares de bases (pb) por cada vuelta de la hélice (n), lo que representa un ángulo de rotación de 36° entre pares de bases vecinos. Como las bases nitrogenadas presentan un espesor de Van der Waals de 0,34 nm (d), la hélice tiene un avance (p) de 3,40 nm por cada vuelta (Fig. 11.8).

El hecho más sobresaliente de la estructura de Watson y Crick es que acomoda sólo 2 tipos de pares de bases, los formados por A y T y los de C y G, son los llamados apareamientos de Watson y Crick (Fig. 11.9).

Esta especificidad de apareamiento tiene su origen en la geometría de los pares; estos pares de bases son intercambiables, o sea, se puede sustituir un par AT por uno CG o viceversa, sin alterar la posición del C1' en el eje pentosa fosfato. Tampoco la hélice se altera por invertir las bases de cada par, es decir, de manera estructural, es lo mismo el par AT que el TA y también es igual el GC que el CG. Cualquier otro par de bases distorsionaría la hélice, pues requeriría una reorientación considerable del eje pentosa fosfato. Esta especificidad de apareamiento es el fundamento molecular de las reglas de Chargaff.

La superficie de la molécula de ADN está marcada por la existencia de 2 surcos de diferente tamaño como se muestra en la figura 11.8. El origen de estos surcos está por una parte, en el carácter asimétrico de la desoxirribosa y, por otra, porque en cada par de bases el borde superior es diferente al borde inferior. Si se traza una línea imaginaria del C1' -eje de la hélice-C1' se forman 2 ángulos diferentes: uno menor de 180° , que da origen al surco menor, y otro mayor que 180° , que formará el surco mayor. Aunque el

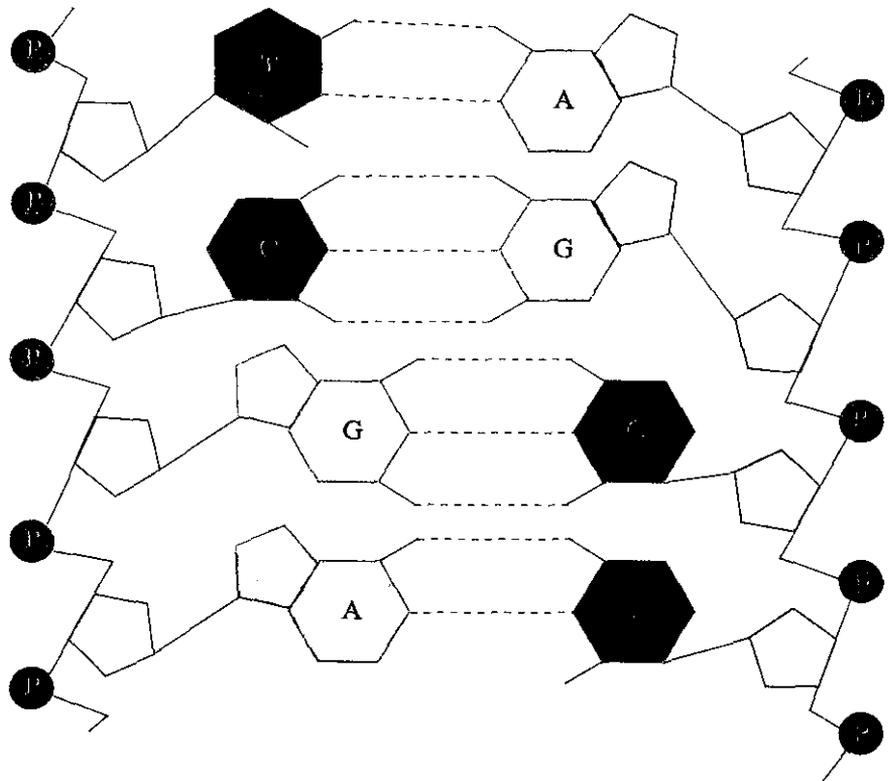


Fig. 11.7. Figura extendida del ADN. Se muestra un sector extendido de una molécula de ADN con las bases purínicas en rojo, las pirimidínicas en verde y el eje covalente principal de desoxirribosa y fosfato en azul. Observe la regularidad de la estructura que se logra con estos pares de bases, unidos por 2 puentes de hidrógeno (líneas de puntos) si son adenina (A) y timina (T), así como por 3 cuando son guanina (G) y citosina (C). La disposición del eje covalente principal no cambia con los distintos pares de bases.

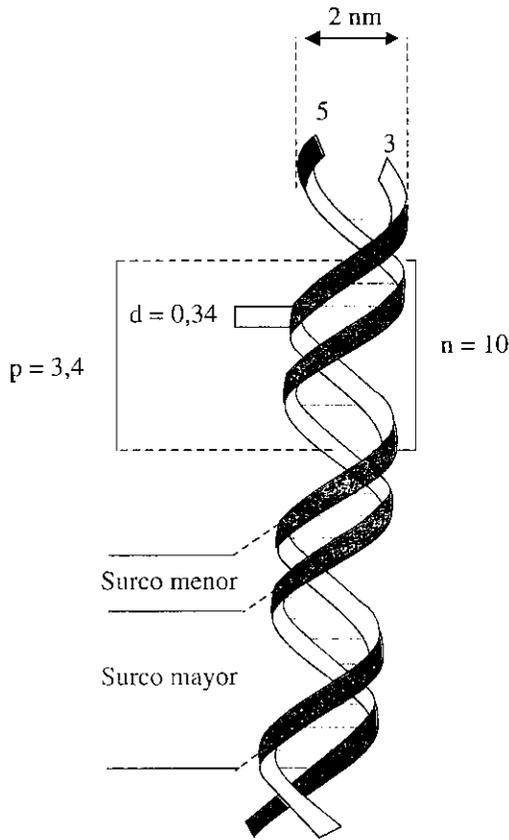


Fig. 11.8. Parámetros de la doble hélice. La representación es similar a la figura 11.6. Las líneas rojas horizontales representan los pares de bases separados una distancia (d) de 0,34 nm. El valor de $n = 10$ y el de $p = 3,4$ nm. También se han señalado el surco mayor y el menor.

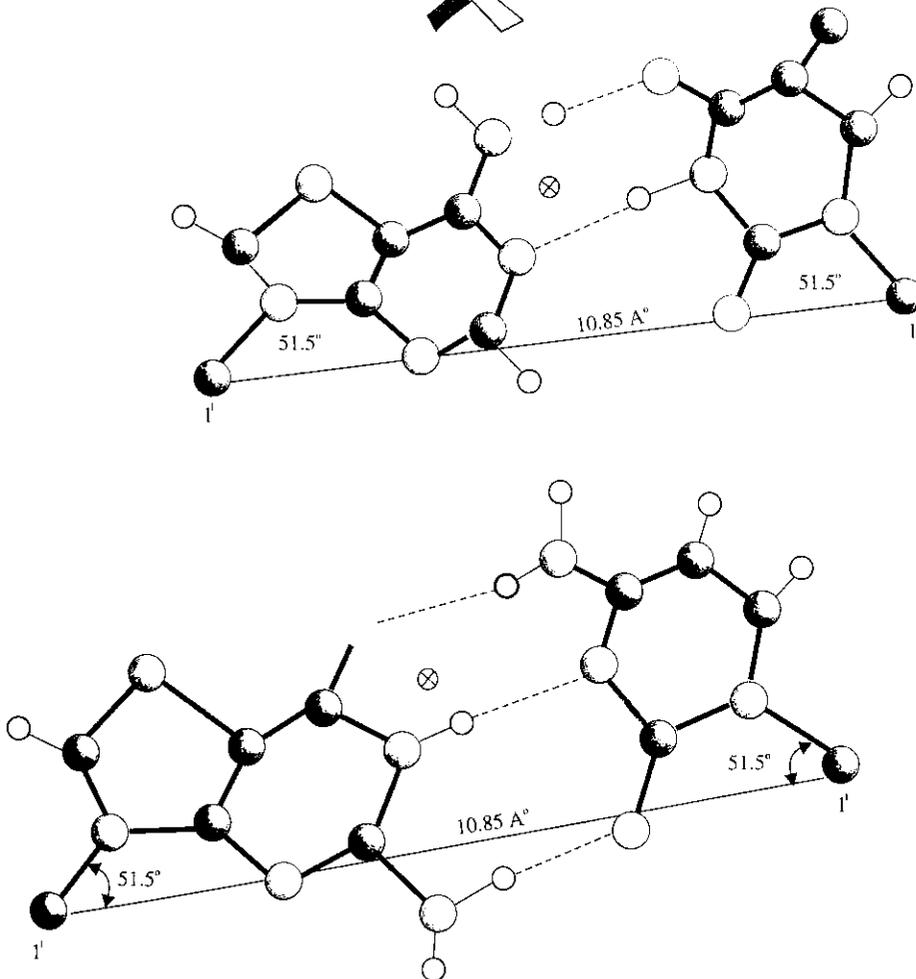


Fig. 11.9. Geometría de los pares de bases en el ADN. Arriba el par de bases adenina timina y abajo el par guanina citosina. La geometría de ambos pares es la misma, aunque las bases de cada par cambian de posición, pues su ubicación con respecto al C1' de la desoxirribosa es siempre la misma. El lado superior da hacia el surco mayor y el inferior hacia el surco menor. La cruz dentro del círculo indica la posición del eje de la hélice.

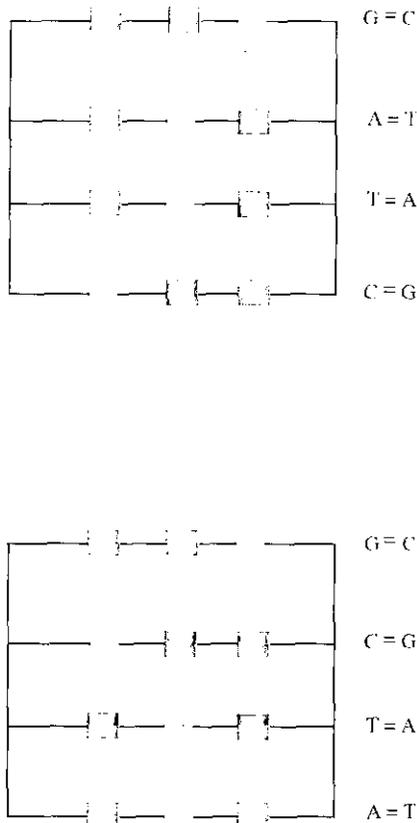


Fig. 11.10. Patrón de formación de puentes de hidrógeno. Se muestran 2 segmentos de ADN de 4 pares de bases cada uno, mirando hacia el surco mayor. Los cuadrados azules representan grupos aceptores para la formación de puentes de hidrógeno, y los círculos rojos, grupos donantes. Esta diferencia de patrones permite que otras macromoléculas, especialmente proteínas, puedan reconocer al ADN en secuencias específicas de bases.

surco menor es más estrecho que el mayor, ambos son casi de igual profundidad, pues los bordes de los pares de bases quedan aproximadamente a la misma distancia de la superficie de un cilindro que contuviera la doble hélice. Esto es consecuencia de la posición del eje de la hélice, que pasa aproximadamente por el centro del par de bases. Cuando los pares de bases se apilan para formar la hélice, las cadenas fosfatadas constituyen los lados de un surco mayor y un surco menor, enrollados alrededor de la hélice y los bordes de las bases forman los fondos de los surcos. Estos surcos tienen una importancia especial en las interacciones del ADN con las proteínas.

El fondo de los surcos, especialmente el del mayor, contiene átomos de nitrógeno y oxígeno que pueden formar puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas y, por tanto, pueden contener una información intrínseca valiosa. La distribución de estos átomos depende del par de bases. Si se recorre el surco mayor en un par AT, en ese orden, encontramos un N (aceptor de H), un NH₂ (donador de H) y un O (aceptor de H); en un par GC primero un N (aceptor), después un O (aceptor) y por último un NH₂ (donador). Al invertirse el orden de las bases en el par, el patrón de formación de puentes de hidrógeno cambia, y ofrece entonces 4 patrones diferentes para la interacción específica con proteínas.

Si se representa el grupo aceptor por A y el donador por D tendremos: A-D-A; A-A-D; A-D-A y D-A-A, por tanto el fondo del surco mayor contiene una información dependiente de la secuencia, que puede ser leída directamente por otra macromolécula. En la figura 11.10 se intenta representar la distribución del patrón de puentes de hidrógeno en una secuencia específica del ADN.

El surco menor es menos informativo, pues los pares AT y TA sólo tienen 2 grupos aceptores y los GC y CG, un donador entre 2 aceptores, que lo hace menos apropiado para la lectura, si se tiene en cuenta además, que su anchura representa un obstáculo estérico para su interacción íntima con otras macromoléculas. No obstante, se conocen proteínas que se unen al ADN por el surco menor, para lo cual generalmente provocan una curvatura de la doble hélice.

El modelo no impone ninguna limitación a la secuencia de bases de una cadena, siempre y cuando la otra cadena presente la base complementaria. El modelo así formulado sugiere que la información genética está codificada precisamente en la secuencia de las bases nitrogenadas del ADN. El modelo contiene en sí la explicación para el mecanismo de la replicación, pues el carácter complementario indica que durante el proceso de réplica cada una de las cadenas puede ser usada como un molde para dirigir la síntesis de la cadena opuesta.

Accidentes en la doble hélice

En 1953 no era posible aún obtener cristales de ADN y los estudios de difracción de rayos X se hicieron con fibras que contenían varias moléculas, por tanto, los patrones de difracción y los valores obtenidos para los parámetros de la estructura eran los promedios de los valores individuales. No fue hasta la década de los años 70 que se pudieron estudiar moléculas en estado cristalino.

Richard Dickerson y *Horace Drew* aplicaron los rayos X al estudio del polímero d(CGCGAATTGCGC) y obtuvieron que el avance de la hélice era de 3,40 nm, cada vuelta contenía 10,1 pb y cada par estaba girado un ángulo de 35,9° con respecto a su vecino; estos valores muestran gran concordancia con los promedios antes obtenidos; pero cada par individualmente se apartaba del comportamiento promedio.

Por analogía con la geografía, llamaremos accidentes a las desviaciones del ADN real en relación con el modelo descrito por *Watson* y *Crick*.

Los principales accidentes encontrados en el ADN son:

1. El ángulo de rotación entre los pares de bases es variable y puede tomar valores que van desde 28° hasta 42° .
2. El balanceo, o sea, la rotación del par de bases como un todo alrededor del eje mayor del par; este eje se define como una línea que pasa por el C8 de las purinas y el C6 de las pirimidinas. Cuando 2 pares de bases rotan se forma un ángulo que, si se abre hacia el surco mayor es negativo y si lo hace hacia el menor es positivo (Fig. 11.11 a).
3. El alabeo, o sea, la rotación de una base con respecto a su pareja; se dice que el alabeo es positivo cuando se mira a lo largo del eje mayor del par de bases, y la base más cercana al observador está girada en el sentido de las manecillas del reloj, y es negativo en caso contrario. Los estudios en cristales muestran que el alabeo es siempre positivo con un valor promedio de 12° . Esta rotación mejora el apilamiento de las bases en una cadena, pero aproxima demasiado las purinas de las cadenas opuestas, con lo cual se alteran otros parámetros estructurales (Fig. 11.11 b).
4. La inclinación del par de bases con respecto al eje de la hélice se aparta aproximadamente 2° de la perpendicular (Fig. 11.11 c). Un resumen de los principales accidentes de la doble hélice se presenta en la tabla 11.2.

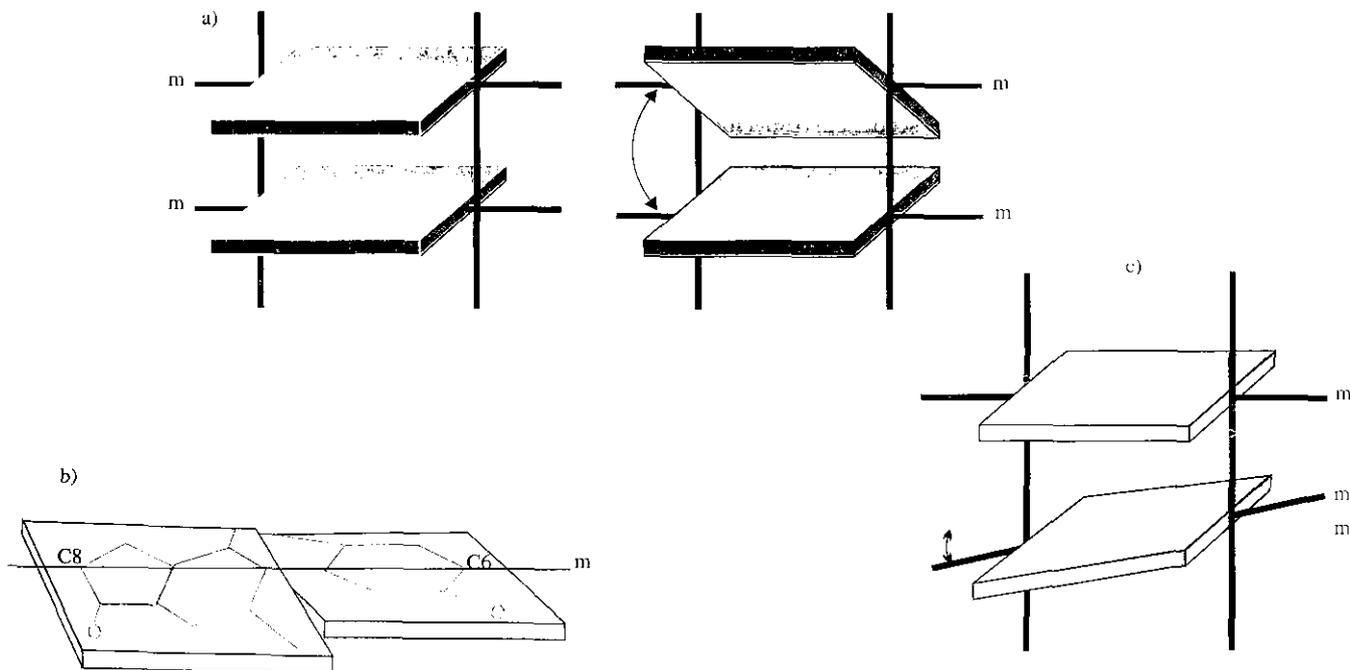


Fig. 11.11. Accidentes de la doble hélice. La figura resume las principales desviaciones de la posición de los pares de bases en ADN real en relación con el modelo ideal de Watson y Crick. En todos los casos, la molécula se observa por el surco mayor. En a) se muestra el efecto del balanceo cuando el par de bases, como un todo, ha girado en torno a su eje mayor y el ángulo marcado por la saeta, es negativo, pues se abre hacia el surco mayor. En b) aparece el efecto de alabeo que siempre es positivo. En c) se presenta la inclinación del par de bases en relación con el eje de la hélice. La línea m en todos los casos representa el eje mayor del par de bases que, como se muestra en b), pasa por el C6 de las pirimidinas y el C8 de las purinas.

Tabla 11.2. Valores de las medias y desviaciones típicas observadas para los principales accidentes del ADN en sus 3 tipos principales

Accidente	ADN A	ADN B	ADN Z
Rotación	33,1 ± 5,9	35,9 ± 4,3	-51,3 ± 1,6 -8,5 ± 1,1
Valor de "d"	0,292 ± 0,039	0,336 ± 0,042	0,352 ± 0,022 0,413 ± 0,018
Inclinación	13,0 ± 1,9	-2,0 ± 4,6	8,8 ± 0,7
Alabeo	15,4 ± 6,2	11,7 ± 4,8	4,4 ± 2,8
Balaceo	5,9 ± 4,7	-1,0 ± 5,5	3,4 ± 2,1

Los valores del parámetro "d" están dados en nm, los de los otros accidentes en grados (°). Para el ADN Z el primer valor en los 2 primeros accidentes corresponde al par G:C y el segundo al par C:G.

Por otra parte el eje de la hélice no es recto, más bien va experimentando una inclinación que está en dependencia del contenido y la proximidad de los pares GC. Estas variaciones dependen de la secuencia de bases y crean una superficie irregular en la molécula de ADN que permite la unión de proteínas, capaces por ello de reconocer secuencias específicas del ADN. Esta unión ADN proteínas es un paso determinante en la realización y regulación de las funciones genéticas del ADN.

ADN Z

Uno de los ejemplos más sobresalientes de la relación entre la secuencia y la conformación del ADN fue el descubrimiento del ADN Z. Al estudiar la estructura cristalina del d(CGCGCG) *Andrew Wang* y *Alexander Rich* observaron que se formaba una hélice con giro hacia la izquierda; esta hélice presenta un avance de 4,5 nm con 12 pb por vuelta, un surco menor profundo y el mayor apenas se distingue. La línea de unión de los grupos fosfatos forma un *zig zag* y de ahí la denominación de Z.

Los pares de bases están rotados 180° en relación con el modelo de Watson y Crick, como se muestra en la figura 11.12. Esto hace que la unidad repetitiva sea un didesoxinucleótido en vez de un desoxinucleótido. Esta conformación se adopta cuando aparecen bases purínicas y pirimidínicas alternadas como en d(GC)_n; d(AC)_n ó d(GT)_n (para n>1).

Se ha especulado mucho sobre la función biológica del ADN Z, pero su existencia *in vivo* no ha podido ser demostrada, sólo existen algunas evidencias indirectas de su existencia en el ADN de *E coli*. Tal vez estas zonas no estén permanentemente en conformación Z y puede existir la posibilidad de transconformaciones entre los distintos tipos de ADN, según las condiciones del interior celular, lo que puede servir como base de algún mecanismo de regulación de las funciones del ADN.

Otras estructuras del ADN

La estructura helicoidal descrita por *Watson* y *Crick* se obtiene cuando se emplea el Na⁺ como contracción y la humedad es del 92 %. A esta hélice se le ha denominado ADN B.

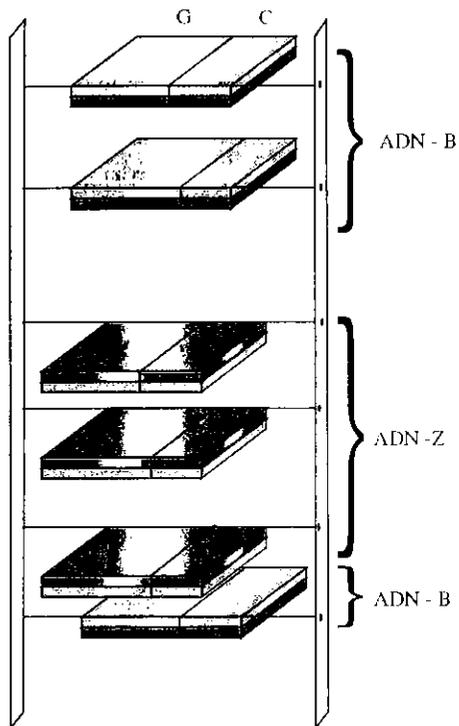


Fig. 11.12. El ADN Z. Se muestra el giro que da el par de bases GC cuando se encuentran consecutivos, que da origen al llamado ADN Z. El par de bases está rotado 180° en relación con su posición en el ADN B.

Al reducir la humedad al 75 %, la forma B se transforma en A, que es también una doble hélice derecha pero más ancha y aplanada que la B. La hélice tiene un avance de 2,8 nm. Los pares de bases presentan una inclinación de 13 a 19° en relación con el eje de la hélice y además, están desplazados hacia el exterior, de manera que el eje, en forma de un cilindro hueco, queda ubicado en el surco mayor y no toca los pares de bases; de esta forma se origina un surco mayor profundo y un surco menor superficial. El ADN A presenta 10,9 pb por vuelta y un ángulo promedio de rotación de $33,1^\circ$, con valores individuales de 16 a 44° ; además, existe un balanceo sistemático que se abre hacia el surco menor (positivo) con valores de $6 \pm 5^\circ$. En la tabla 11.3 se resumen los aspectos más relevantes de los 3 tipos principales de ADN.

Cuando la secuencia de bases en una cadena es complementaria a un sector cercano de la misma cadena, pueden originarse estructuras cruciformes por el apareamiento de las bases complementarias de la misma hebra. Estas estructuras cruciformes son de singular importancia para las funciones del ADN, pues representan señales muy específicas para la interacción con otras moléculas, generalmente proteínas, que participan en los mecanismos de procesamiento de la información genética.

Estabilidad de la doble hélice

Varias son las fuerzas moleculares que mantienen la doble hélice del ADN pero cada una contribuye de forma diferente. Como ya fue señalado, el enlace fosfodiéster es la fuerza fundamental para la formación del polímero y es la más fuerte de todas las interacciones presentes en la molécula; esto significa que es la más difícil de romper.

La disposición de las bases nitrogenadas en cada una de las hebras del ADN es casi perpendicular al eje pentosa fosfato, por tanto, los anillos aromáticos de las bases se disponen paralelos unos a otros como una especie de empalizado o pila de monedas; en esa disposición los orbitales p de las bases forman interacciones de cierta fortaleza, que contribuyen de forma decisiva a mantener la estructura helicoidal. El apareamiento de las 2 cadenas contribuye a aumentar la estabilidad.

Tabla 11.3. Resumen de los parámetros estructurales principales en los 3 tipos más frecuentes de ADN

Característica	A	B	Z
Tipo de hélice	Derecha	Derecha	Izquierda
Diámetro	2,6 nm	2,0 nm	1,8 nm
Valor de n	11	10	12
Rotación del par	33°	36°	60°
Paso o avance (p)	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
Valor de d	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Inclinación	20°	6°	7°
Surco mayor	Estrecho y profundo	Ancho y profundo	Plano
Surco menor	Ancho y superficial	Estrecho y profundo	Estrecho y profundo
Forma del azúcar	C(3')-endo	C(2')-endo	Y=C(2')endo R=(C3) endo
Enlace glicosídico	Anti	Anti	Y= anti R=sin

R = purinas Y = pirimidinas.

Al formarse la hélice los pares de bases se aproximan hasta una distancia de 0,34 nm que es el grosor de Van der Waals del par de bases; esta aproximación impide la penetración de moléculas pequeñas, especialmente el agua, entre los pares de bases, por lo cual a las fuerzas que tienden a formar el empalme se les denomina hidrofóbicas. El origen y la naturaleza de estas fuerzas hidrofóbicas en el ADN no están totalmente aclarados; aunque el nombre hidrofóbico no es el más adecuado para designar estas interacciones, la existencia de tales interacciones es indiscutible.

Las cadenas se mantienen unidas gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre las bases de cada par. Los pares CG se mantienen unidos por 3 puentes de hidrógeno, en tanto entre A y T sólo se forman 2, debido a que el anillo de A carece de sustituyente en C2 (Fig. 11.9). De esta situación se deriva que las moléculas de ADN serán más estables, mientras mayor sea su contenido en pares GC. Se debe recordar que esta característica es importante, pues como se verá en capítulos posteriores para las funciones del ADN es necesario la separación de las 2 hebras, lo cual será más fácil si en la zona que se debe separar abundan los pares AT.

No obstante, los puentes de hidrógeno contribuyen poco a la estabilidad de la hélice. Si a una solución acuosa de ADN se le añade etanol, la hélice se desestabiliza. El etanol aumenta la fortaleza de los puentes de hidrógeno pero debilita las interacciones hidrofóbicas; por tanto, son las interacciones hidrofóbicas y no los puentes de hidrógeno las que contribuyen en mayor medida a la estabilidad de la hélice.

ADN superenrollado

Cuando los extremos de la molécula de ADN no pueden rotar libremente, bien porque estén unidos por enlaces covalentes formando moléculas circulares, o estén asociados con proteínas, adquieren una conformación tridimensional superenrollada (Fig. 11.13). En esta estructura la doble hélice como un todo puede estar rotada hacia la derecha (superenrollado negativo) o hacia la izquierda (superenrollado positivo); mientras el superenrollado positivo favorece la formación de la hélice más compacta, el negativo favorece el desenrollamiento de la hélice y la separación de las 2 hebras, que como ya fue señalado, es necesario para las funciones del ADN.

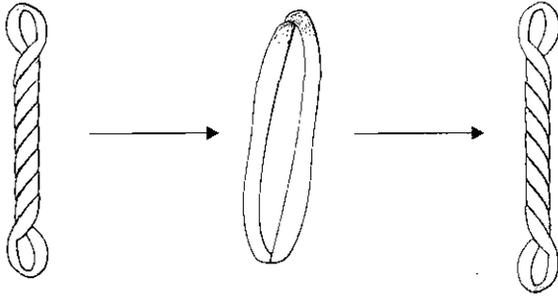


Fig. 11.13. ADN superenrollado. En el centro aparece una molécula de ADN circular totalmente relajada. A la izquierda, el mismo ADN con superenrollamiento negativo, y a la derecha, con superenrollamiento positivo. Obsérvese que en el superenrollamiento el eje de la doble hélice se enrolla sobre sí, unas veces en sentido derecho y otras en sentido izquierdo.

El ADN bacteriano circular presenta un superenrollamiento negativo, en tanto el ADN de los cromosomas de eucariotas no parece estar superenrollado por su asociación con proteínas que controlan el plegamiento del ADN.

Las diferentes formas y grados de superenrollamiento del ADN se refieren como topoisómeros, y las enzimas que convierten unos en otros reciben el nombre de topoisomerasas. Los diferentes topoisómeros del ADN pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa, donde cada topoisómero tiene una movilidad diferente formando bandas independientes. La molécula que presente un mayor grado de superenrollamiento realizará los movimientos migratorios más rápidos por presentar una estructura más compacta.

Desnaturalización del ADN

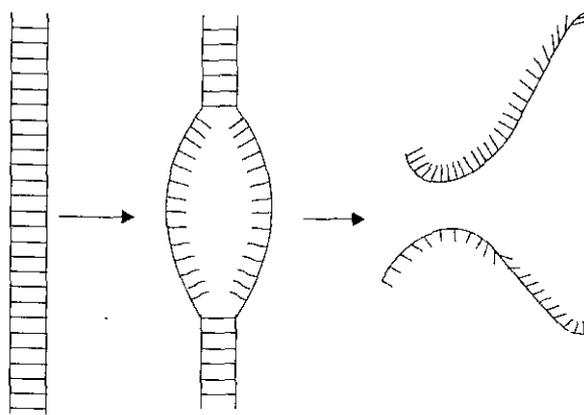
Cuando una solución de ADN doble helicoidal se calienta por encima de una temperatura determinada, las 2 cadenas se separan y las propiedades del ADN se alteran, este proceso se conoce como desnaturalización del ADN; de esas propiedades la más útil para seguir el desarrollo del proceso es la absorción de luz ultravioleta.

Los anillos aromáticos absorben la luz ultravioleta con menor intensidad cuando están apilados en la doble hélice que cuando están libres en disolución; ese aumento de absorción luminosa, que puede llegar a ser hasta de 40 % en todas las longitudes de onda, recibe el nombre de efecto hipercrómico.

De acuerdo con la estructura de la doble hélice la alteración de un sector de la molécula potencializa la desestabilización de un sector mayor, o sea, el proceso de desnaturalización tiene un carácter cooperativo; esto se evidencia porque el efecto hipercrómico ocurre en un rango estrecho de temperatura (Fig. 11.14).

Este fenómeno puede describirse como la fusión de un sólido monodimensional, las gráficas obtenidas del proceso se refieren como curvas de fusión y la temperatura de su punto medio se conoce como temperatura de fusión que se simboliza por T_m . La estabilidad del ADN y, por tanto, su T_m dependen de varios factores como la naturaleza

Fig. 11.14. Desnaturalización del ADN. Una doble hebra de ADN se calienta, y los pares de bases comienzan a separarse de forma cooperativa. Al final, las 2 hebras están totalmente separadas. En eso consiste la desnaturalización del ADN.



del solvente, el tipo y concentración de los iones, así como el valor del pH. Si estos factores se mantienen constantes y sólo se varía el ADN, entonces T_m es una función lineal creciente del contenido de pares GC, lo que indica la mayor estabilidad de éstos unidos por 3 puentes de hidrógeno que de los pares AT unidos sólo por 2.

Una vez que el ADN ha sido desnaturalizado se hace descender lentamente la temperatura hasta casi 25°C por debajo de T_m , las 2 cadenas vuelven a unirse completamente; este fenómeno recibe el nombre de renaturalización.

Este proceso de desnaturalización-renaturalización es el fundamento de las técnicas de hibridación, que permiten identificar secuencias específicas en el ADN; para ello se procede de la forma siguiente:

1. Se obtiene un polinucleótido marcado de forma radiactiva (usualmente con ^{32}P) que contiene la secuencia de bases específica de nuestro interés.
2. Se desnaturaliza el ADN problema y cuando las 2 hebras están separadas se añade el polinucleótido que sirve de sonda.
3. Se procede entonces a la renaturalización; si el ADN contiene una secuencia de bases complementaria a la sonda se apareará con ésta y la doble cadena podrá identificarse por la presencia del ^{32}P .
4. Pueden emplearse como sonda también, polirribonucleótidos; si la sonda es pequeña (100 nucleótidos) sólo se apareará a un sector estrictamente complementario, pero si es muy grande pueden aparearse cadenas sin que exista la complementariedad perfecta. Estas sondas son útiles en la localización de secuencias de ADN parecidas (no exactamente iguales) a la sonda. La importancia de este procedimiento se verá más adelante.

Formas de presentación del ADN

En este capítulo se ha presentado la estructura general de los ADN celulares, pero el ADN puede presentarse en otras formas con una estructura igual o diferente. La tabla 11.4 presenta una relación de ADN de diferentes orígenes con su peso molecular.

ADN virales

En los virus puede encontrarse ADN de una sola cadena como ocurre en el M13, cuyos 6 408 nucleótidos forman una sola hebra circular; de forma similar ocurre en el virus ϕX174 donde también el ADN es monofibrilar y circular con 5 386 nucleótidos.

Otros virus como los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) o simplemente fagos de *E. coli* de la serie T presentan su ADN bicatenario y lineal. El fago T4 tiene una sola molécula lineal de ADN, de unos 166 000 pb, y en vez de citosina presenta la hidroximetilcitosina y el T7 contiene 39 930 pb, cuya secuencia ha sido determinada.

Tabla 11.4. Tamaño del ADN de diferentes orígenes, tomando como referencia su peso molecular

Origen del ADN	Peso molecular
Plásmidos de <i>E. coli</i>	$1,4 \times 10^6$
Virus del polioma	$3,2 \times 10^6$
Fago 186	$18,0 \times 10^6$
Fago T7	$25,0 \times 10^6$
Fago λ	$32,0 \times 10^6$
Plásmido F	$62,0 \times 10^6$
Fago T4	$106,0 \times 10^6$
<i>Mycoplasma homina</i>	$5,3 \times 10^8$
Levaduras	$6,0 \times 10^8$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$7,9 \times 10^{10}$
Humanos	$8,0 \times 10^{10}$

Plásmidos

Otra forma de presentación del ADN son los plásmidos. Se trata de moléculas circulares de doble banda, que se encuentran ubicadas en el citoplasma especialmente de los organismos monocelulares, sean procariontes o eucariontes. Estos plásmidos tienen su replicación autónoma y suelen poseer genes importantes para la célula, por ejemplo, los plásmidos F que contiene el factor de fertilidad, los R que contienen genes que confieren resistencia a la acción de antibióticos y los Col que codifican toxinas que producen la muerte de otros organismos.

Es bueno diferenciar 2 tipos de plásmidos: los llamados de control estricto o de bajo número, éstos existen en 2 ó 3 copias por célula y su replicación ocurre simultánea con la del cromosoma bacteriano, segregándose en cantidades equivalentes a las células hijas durante la división celular. Los plásmidos de control relajado o de alto número existen en decenas y su replicación es independiente del cromosoma bacteriano. Un fenómeno notable es que si se inhibe la síntesis de proteínas en la célula, el número de estos plásmidos se incrementa y puede llegar a varios cientos. Como se verá en el capítulo 35 esto tiene una importante implicación práctica.

ADN mitocondrial

En las células eucariontes existe además el ADN mitocondrial (ADNmt) que, como su nombre indica, se localiza en este orgánulo citoplasmático; constituye menos del 1 % del ADN celular y se presenta como una molécula circular duplohelicoidal que en el humano tiene 16 569 pb. A veces se presenta como varios círculos encadenados y, en otras, como un gran círculo cerrado con 2 moléculas unidas por enlace covalente en una forma tipo cabeza-cola. Su sensibilidad a la hidrólisis alcalina y a la acción de las

ARNas hacía suponer que al menos en algunos sitios contenía ribonucleótidos, lo cual fue comprobado posteriormente.

Estos ribonucleótidos se encuentran en la zona que forma el origen de replicación y en otros sitios donde su función es desconocida. Las células humanas contienen unas 8 000 copias del ADNmt.

En el ADNmt se da un hecho singular, pues una de las hebras contiene la mayor proporción de las G y por eso se le denomina cadena pesada o H (*heavy*), mientras la otra contiene las C y por eso se nombra ligera o L (*light*); esto hace posible la separación de las cadenas por centrifugación en gradiente de densidad.

Otro hecho característico es la existencia de una pequeña zona de hebra triple denominada lazo D. En esta zona la cadena H está desplazada (de ahí D) y a la cadena L se aparea un pequeño fragmento llamado ADN 7S por su coeficiente de sedimentación.

El descubrimiento de que alteraciones del ADNmt pueden ser las causas de algunas enfermedades ha intensificado su estudio en los últimos años.

Cromosoma bacteriano

La mayoría de las bacterias presentan sus genes en una sola molécula de ADN de doble hebra circular superenrollado. En *E coli* la longitud total del círculo es aproximadamente 1 300 μm , lo que es igual a la longitud de 50 diámetros bacterianos, por tanto debe estar muy plegado, si tenemos en cuenta que la bacteria tiene un diámetro de 1 μm y una longitud de 3 μm .

Este ADN está asociado con ARN y proteínas, se presenta con una armazón central muy compactada de la cual irradian de 35 a 45 asas de ADN superenrollado, lo cual hace que el corte transversal sea sólo de 2 μm ; sus 3×10^6 pb le confieren un peso por partícula de 2×10^9 .

Cromosoma eucarionte

Los cromosomas eucariontes constituyen la forma de presentación más compleja de los ADN; por ejemplo, un cromosoma de *Drosophila melanogaster* tiene un peso de partícula superior a 10^{10} y una longitud de 1,2 cm; como el ancho de la molécula es de 2×10^{-7} cm, la relación longitud/anchura es de 6×10^6 .

El ADN de las células eucariontes se encuentra fundamentalmente en el núcleo celular, donde está unido a proteínas, formando asociaciones complejas de nucleoproteínas. El grado de "empaquetamiento" de esas nucleoproteínas varía sensiblemente durante el ciclo celular, mostrando la forma más compacta en la metafase de la mitosis y la más relajada durante la interfase. A la forma que adopta en la interfase se le denomina cromatina y a la que adopta en la mitosis, cromosoma; aunque en muchas ocasiones estos 2 nombres se emplean indistintamente. La estructura detallada de los cromosomas eucariontes se hará en el capítulo 23, dedicado al estudio del núcleo celular. En la tabla 11.5 se presentan el número de pares de bases y el contorno del ADN que contienen diferentes organismos por célula.

Métodos empleados en el estudio del ADN

Los métodos generales para el estudio de las macromoléculas fueron estudiados en el capítulo 9, aquí sólo se hará referencia a algunas particularidades de esos métodos en el estudio de los ADN.

Tabla 11.5. Contenido de ADN de algunos organismos de acuerdo con el número de pares de bases y la longitud de su contorno

Origen del ADN	Kilobases ^a	Contorno (μm) ^b
Fago λ	48,6	17
Fago T4	166	55
Polioma	5,1	1,7
<i>Mycoplasma hominis</i>	760	260
<i>Escherichia coli</i>	4 000	1 360
Levaduras ^c	13 500	4 600
Drosophila ^c	165 000	56 000
Humano ^c	2 900 000	990 000

^a 1 kilobase = 1 000 pb.

^b Contorno de la molécula extendida con 0,34 nm de separación entre cada par de bases.

^c Del total del número haploide de cromosomas.

Obtención del ADN

Se procede a la ruptura de las células por los métodos habituales de homogeneización. Como el ADN está siempre asociado con proteínas se debe proceder a desproteínizar el homogenato; si se quieren obtener moléculas de ADN de gran tamaño se puede agitar suavemente la preparación en una mezcla de fenol y alcohol isoamílico, con lo cual las proteínas precipitan y pueden separarse por centrifugación; también puede usarse cloruro de guanidino, detergentes o enzimas proteolíticas como la pronasa.

Para eliminar los ácidos ribonucleicos se trata la mezcla con ribonucleasa. Para proteger al ADN de las desoxinucleasas se añade EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), que secuestra los metales necesarios para la acción de las nucleasas.

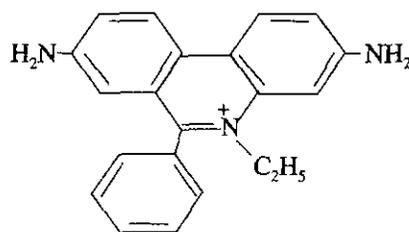
Todo el material de vidrio del laboratorio debe ser esterilizado en autoclave y se debe trabajar con guantes plásticos. De todas formas la manipulación del ADN es mucho más fácil que la de las proteínas.

Separación de los ADN

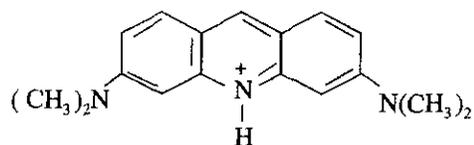
Los métodos más usados con este propósito son la cromatografía, electroforesis y ultracentrifugación.

El soporte cromatográfico más útil en la separación del ADN es la hidroxapatita, a la cual el ADN de doble cadena se une con más fuerza que cualquier otra molécula. Cuando la mezcla que contiene el ADN se deposita sobre una columna de hidroxapatita, ésta se lava con una solución *buffer* fosfato de baja concentración, que arrastra preferentemente los ácidos ribonucleicos y las proteínas. Al aumentar paulatinamente la concentración del *buffer* se produce la separación del ADN.

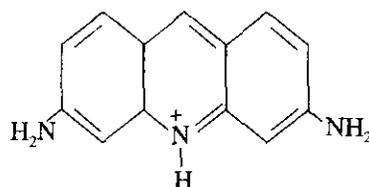
En la electroforesis se aprovecha la característica polianiónica del ADN, que hace que estas moléculas se muevan hacia el ánodo impulsadas por el campo eléctrico. La movilidad de las moléculas varía inversamente con su masa molecular y directamente con su carga. Los geles de poliacrilamida son útiles para separar moléculas de bajo peso, hasta aproximadamente 2 000 pb. Para moléculas mayores es necesario el empleo de geles de agarosa, con los cuales pueden separarse fragmentos de hasta 100 000 pb, con una concentración de agarosa de 0,1 %. Para localizar las moléculas el gel se tiñe con bromuro de etidio, proflavina o naranja de acridina.



Etidio



Naranja de acridina



Proflavina

Estas son moléculas aromáticas planas que se intercalan entre los pares de bases y exhiben fluorescencia cuando éstos son iluminados con luz ultravioleta.

La ultracentrifugación también es útil en la separación de los ADN. Una variante del método general descrito en el capítulo 9, permite separar los ADN por su composición. Para ello la centrifugación se realiza en un gradiente de CsCl; en esas condiciones el ADN se moverá hasta que su densidad coincida con la del medio; como la densidad del ADN es una función de su contenido en GC, moléculas con diferente composición se equilibrarán en diferentes posiciones y pueden obtenerse con el sencillo procedimiento de perforar el fondo del tubo y recoger pequeñas alícuotas de la solución.

Localización de ADN específicos

Si conocemos la secuencia de bases nitrogenadas de un ADN, podemos conocer si éste se encuentra en una célula determinada según el método de transferencia del ADN (*Southern blot*).

El método de transferencia del ADN aprovecha la valiosa propiedad de la nitrocelulosa, de unir tenazmente los ADN monocatenarios, pero no el bicatenario. Después de la electroforesis en gel del ADN bicatenario, este se sumerge en una solución de NaOH 0,5 M, que lo convierte en monocatenario y se cubre con una lámina de nitrocelulosa, que a su vez se recubre de varias capas de papel grueso absorbente y se presiona con una placa de presión. Esta presión hace que el líquido fluya del gel y lo obliga a pasar a través de la nitrocelulosa, donde el ADN monocatenario queda retenido en la misma posición que ocupaba en el gel; este paso puede acompañarse de electroforesis para ser más rápido, en un proceso conocido como electrotransferencia.

Después de secar al vacío el filtro de nitrocelulosa a 80°C, que fija el ADN en su lugar, el filtro se humedece con una cantidad mínima de una solución que contiene ARN ó ADN monocatenario, marcado de forma radiactiva y cuya secuencia es complementaria a la del ADN buscado; ésta es la sonda. El filtro humedecido se mantiene a una temperatura de renaturalización para permitir la hibridación entre la sonda y el ADN, se lava para eliminar la sonda no unida, se seca y se recubre con una placa fotográfica para la autorradiografía. La posición del ADN buscado se indica por la zona velada en la película. Así se puede detectar y aislar un ADN de interés. Como se trata de fragmentos grandes de polinucleótidos complementarios, la hibridación se produce eficientemente aun cuando existan pequeñas zonas de no apareamiento (Fig. 11.15).

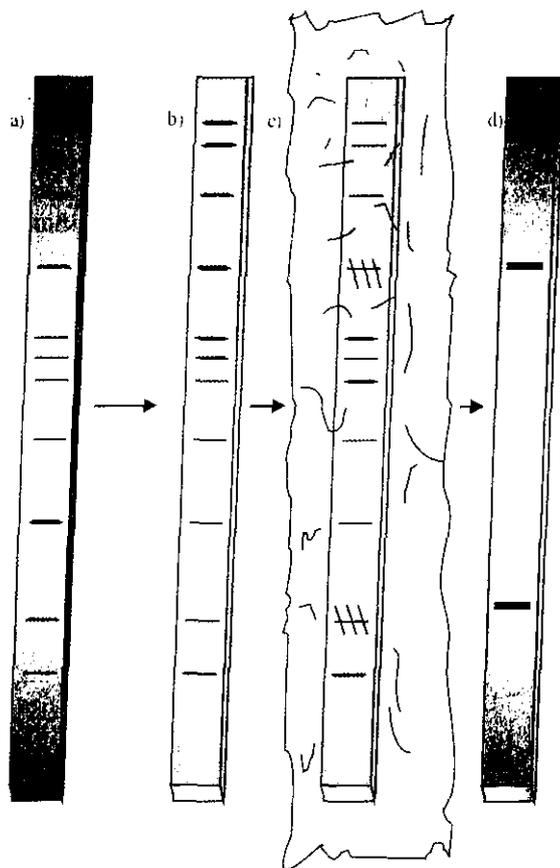


Fig. 11.15. Localización de ADN específicos. a) Lámina del gel donde se ha realizado la electroforesis de diferentes fragmentos de ADN. b) Los fragmentos de ADN previamente desnaturalizados se transfieren a un filtro de nitrocelulosa donde las cadenas monofibrilares se adhieren con fuerza. c) El filtro se sumerge en una solución que contiene la sonda y se deja el tiempo necesario para la hibridación; después se lava para eliminar el exceso de sonda, se seca y se recubre con una placa fotográfica. d) Al revelar la placa se tiene la localización exacta del fragmento de ADN buscado.

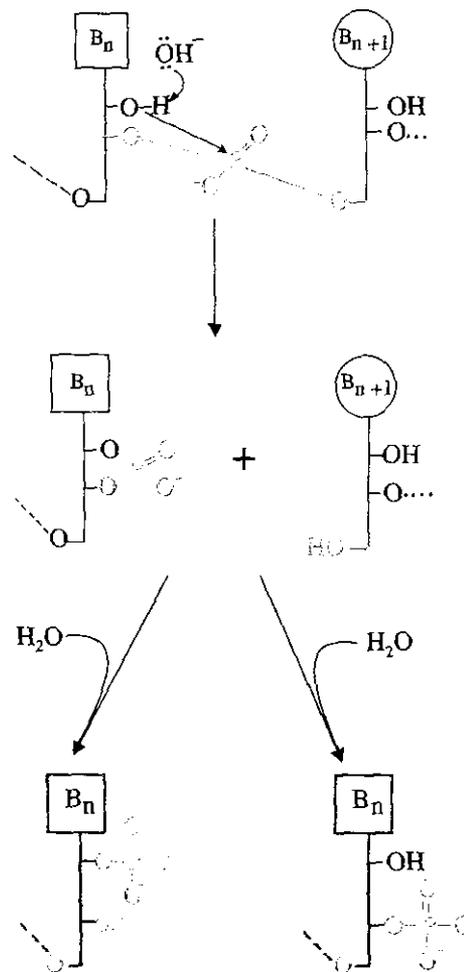
Estructura general de los ácidos ribonucleicos

Al igual que el ADN, los ARN se forman por la polimerización de unidades más simples denominadas ribonucleótidos o sencillamente nucleótidos. Los ribonucleótidos

contienen como pentosa la ribosa en vez de la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas purínicas son las mismas que las del ADN, pero entre las pirimidínicas los ARN contienen por lo general uracilo en vez de timina. Aun cuando la ribosa presenta un grupo hidroxilo en C2', en los ARN el enlace fosfodiéster se establece entre el C3' de un nucleótido y el C5' del vecino al igual que en el ADN; esto hace que también en los ARN se describa una dirección o polaridad que, al igual que en el ADN, es de 5 → 3. Sin embargo la composición de bases de los ARN es más heterogénea que la del ADN, pues en ellos existen numerosas bases modificadas que en algunos tipos de ARN llegan a representar hasta el 10 % del total de bases de la molécula. La modificación más frecuente es la adición a las bases típicas de grupos metilos, pero también pueden existir otros como el acetilo, isopentenilo, etcétera.

Una situación especial se presenta con la pseudouridina que en muchos casos se menciona como una base rara, lo cual no es cierto. La pseudouridina es un nucleótido anómalo, pues en él la base nitrogenada es el uracilo pero está unida a la ribosa por un enlace a través del C6 y no del N1, como en los nucleótidos normales. La pseudouridina se representa por la letra griega psi (ψ). Algunas especies moleculares de ARN contienen timidina que se refiere como ribotimidina.

La presencia del C2'-OH hace que los ARN sean susceptibles a la hidrólisis alcalina, pues la reacción requiere la formación de un intermediario fosfodiéster cíclico entre C2' y C3' que no es posible formar en los desoxinucleótidos del ADN.



Esta propiedad permite la separación de los monómeros del ADN y el ARN de la forma siguiente:

1. Se extraen los ácidos nucleicos de la célula como ya se explicó. La preparación se somete a una hidrólisis alcalina que sólo afecta al ARN.
2. Se somete a centrifugación de forma que el ADN de peso molecular elevado sedimente y los ribonucleótidos se mantengan en solución.
3. Se decanta la solución, el precipitado se resuspende y entonces se somete a una hidrólisis ácida con lo cual se obtendrán los desoxinucleótidos.

Los ARN presentan gran heterogeneidad en su tamaño. Los hay tan pequeños con apenas 80 nucleótidos hasta moléculas gigantes de varios miles de bases; es por ello que las propiedades físicas que dependen del peso, tamaño y forma de las moléculas también son muy variables en los ARN.

Aunque a diferencia de los ADN, los ARN están formados por una sola cadena polinucleotídica, ésta no adopta una forma fibrilar, sino que se pliega sobre sí, y en sectores donde las bases son complementarias forman estructuras duplohelicoidales. Estas formas de apareamiento pueden ser descritas por la combinación de varias estructuras sencillas que pueden considerarse como los elementos estructurales de los ARN.

Como se puede observar en la figura 11.16 a), la estructura más sencilla es la horquilla que contiene 2 elementos estructurales: una zona de apareamiento a veces llamada tallo y una zona ensanchada no apareada en ocasiones denominada asa. Para formar la horquilla la cadena debe variar su dirección en 180°. Dos horquillas o más pueden combinarse una a continuación de la otra, con segmentos conectores de mayor o menor longitud como se muestra en la figura 11.16 b).

Otra forma de combinación viene dada por la formación de asas internas; en este caso una gran horquilla contiene en el tallo zonas con apareamiento y sin él, estas últimas son las asas internas, como puede verse en la figura 11.16 c).

Por último las horquillas pueden interactuar con un sector externo; para ello algunas bases del asa se aparean con bases de otras zonas cercanas o lejanas y forman los llamados pseudonudos. Como consecuencia la cadena debe girar en el espacio, lo que contribuye a la formación de estructuras terciarias; esto se ilustra en la figura 11.16 d).

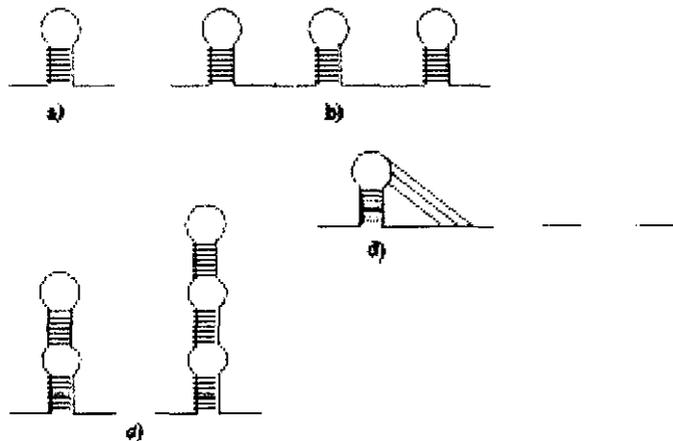


Fig. 11.16. Estructuras básicas de los ARN. a) Estructura en horquilla con una zona apareada (tallo) y una no apareada (asa). b) Combinación de secuencias de varias horquillas. c) Una misma horquilla con la formación de asas internas. d) Las bases de un asa se aparean con zonas fuera de la horquilla, formando pseudonudos, para la cual la cadena debe doblarse, por lo que esta estructura es importante en la formación de la estructura terciaria de los ARN.

La forma en que los pseudonudos pueden contribuir a la formación de la estructura terciaria de los ARN se muestra en la figura 11.17.

Las zonas apareadas son parecidas al ADN-A, pues la presencia del oxígeno en C2' impone limitaciones estéricas que no le permite adquirir la forma B. Es bueno señalar que el apareamiento de bases no es tan estricto como en el ADN, por ejemplo,

a) 5' GCGUUACGGGCG...UAGCCG 3'

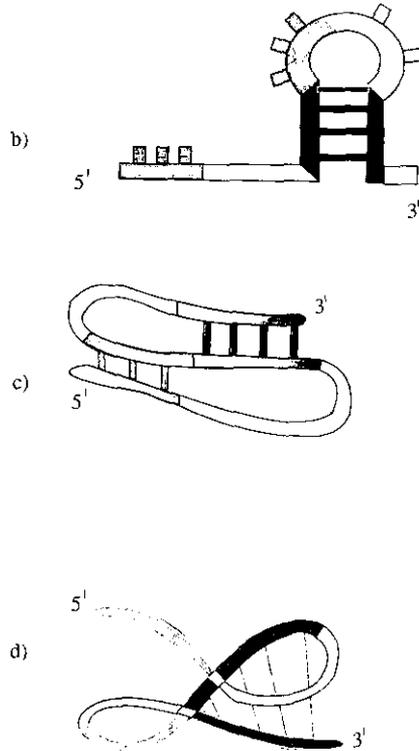


Fig. 11.17. Los pseudonudos en la estructura terciaria. En a) se representa un fragmento de una cadena de ARN. En b), cómo esta cadena da origen a una horquilla con su tallo y asa, pero por fuera de ella hay un sector complementario a las bases del asa. El apareamiento de estos 2 sectores puede dar origen a una estructura como la mostrada en c), formada por 2 lazos pero que aún se mantienen en el mismo plano o, por el contrario, formar la estructura representada en d), que ya no puede contenerse en el plano. Esta última organización es la que contribuye a la formación de la estructura terciaria de los ARN.

es frecuente encontrarse pares GU e incluso GG. Algunos de estos pares atípicos se muestran en la figura 11.18, donde cada par posee una geometría particular que se aparta en gran medida de la de los pares de bases del ADN.

En los ARN existe un número considerable de estructuras helicoidales, aun en ausencia de apareamiento de bases; esto se debe a las intensas fuerzas de "empalzado" entre las bases A, G y C. Estas fuerzas son mucho más importantes que los puentes de hidrógeno en la formación de interacciones inter e intramoleculares y actúan limitando las posibles conformaciones de los ARN.

Al igual que en el ADN la distancia limitada del eje pentosa fosfato y el enlace β -N-glicosídico, formando un ángulo casi perpendicular, impiden que las bases se coloquen directamente una sobre otra. En las dobles hélices las bases forman ángulos de rotación de 35° y la hélice contiene de 10 a 11 pb por vuelta. En las cadenas simples

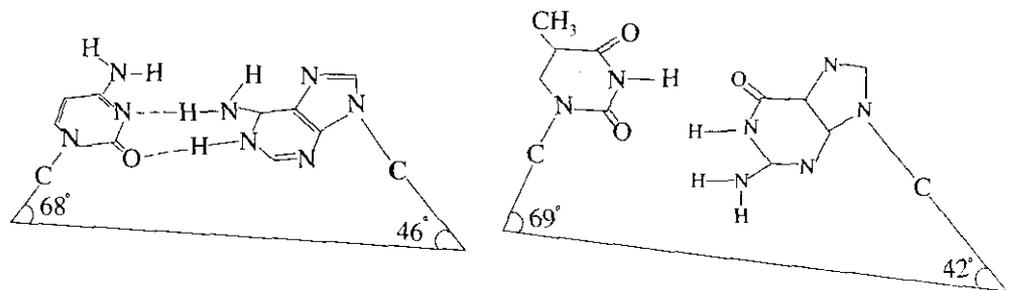


Fig. 11.18. Apareamiento de bases en los ARN. Se muestran los pares de bases CA y TG donde puede observarse que la geometría de éstos se aparta considerablemente de los apareamientos típicos del ADN. Los ángulos formados por el N de la base y el C1' son diferentes en cada caso, por lo cual no pueden acomodarse en una doble hélice como la del ADN.

el ángulo es de 60° y cada vuelta contiene 6 bases. Estos plegamientos con el máximo grado de apareamiento de bases se pueden representar sobre un plano y se refieren como la estructura secundaria de los ARN.

Esas conformaciones helicoidales permite un mejor apareamiento con otras moléculas de ARN ó ADN, que también presenten estructuras "empalizadas" y sus bases sean complementarias, pues son importantes en los mecanismos de expresión de la información genética.

La estructura tridimensional de los ARN se conoce como su estructura terciaria. Los estudios en este campo sólo han dado resultados en algunos tipos de ARN de pequeño tamaño. En moléculas grandes los resultados aún se esperan; sin embargo, en los ya conocidos se ha puesto de manifiesto que la estructura terciaria depende del establecimiento de interacciones entre las bases y la ribosa en unas ocasiones, así como con los grupos fosfato en otras.

En las células existen 3 tipos principales de ARN que se distinguen tanto estructural como funcionalmente. Tomando como criterio su participación en la síntesis de proteínas se han denominado ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) y ARN mensajero (ARNm). Se estudiará cada uno de ellos por separado y después con menor detalle otros ARN celulares.

ARN de transferencia

Los ARNt constituyen una familia de especies moleculares cuya función es la de transportar los aminoácidos hacia los ribosomas durante la síntesis de proteínas, por lo que deben existir tantos ARNt como aminoácidos diferentes contengan las proteínas; todos ellos presentan regularidades estructurales que permiten generalizar una estructura relacionada con su función.

Estructura primaria

Los ARNt son polinucleótidos pequeños que contienen de 60 a 95 nucleótidos, aunque la mayoría tiene 76. Lo más sobresaliente en su composición de bases es la presencia de numerosas bases modificadas que llegan a constituir hasta el 20 % de la molécula. La razón de esta elevada proporción se desconoce, pero pudiera de alguna manera contribuir a la formación de estructuras tridimensionales, unas veces en función favorable y otras impidiendo la formación de interacciones entre las bases.

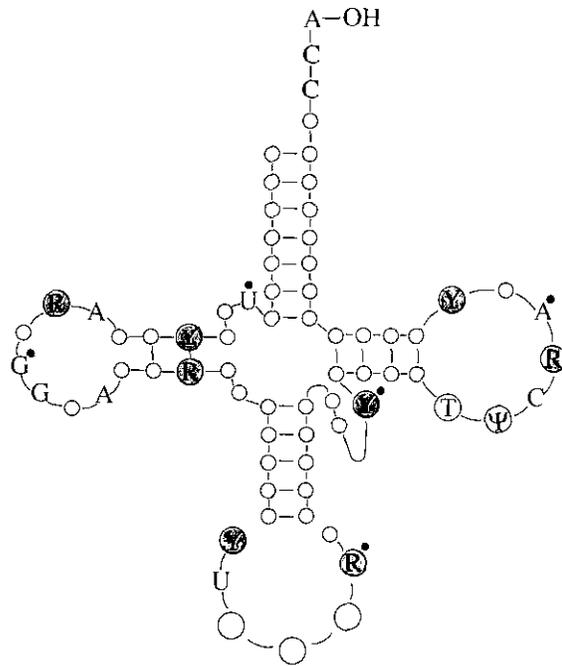
El estudio de la secuencia de bases de ARNt fue realizado por primera vez en 1965 por *Robert Holley*, en el ARNt de la alanina procedente de levaduras. Para este trabajo *Holley* tuvo que vencer numerosas dificultades técnicas, pero a partir de él se ha desarrollado una tecnología que permite realizar ese trabajo en pocos días, lo cual ha hecho que ya se conozca la secuencia de bases de más de 300 ARNt de diferentes especies.

El estudio comparativo de estas secuencias ha permitido llegar a conclusiones importantes. En todos ellos existen 13 bases invariantes, es decir, todos tienen la misma base en posiciones equivalentes y hay 8 bases semiinvariantes, es decir, en posiciones equivalentes siempre hay una purina o una pirimidina. En el extremo 3' siempre aparece el trío CCA.

Estructura secundaria

Holley estableció la estructura secundaria del ARNt de la alanina y vio que el grado máximo de apareamiento se lograba cuando la cadena polinucleotídica se representaba en forma de una hoja de trébol (Fig. 11.19).

Fig. 11.19. Estructura generalizada de los ARNt. La estructura en hoja de trébol de los ARNt. Las zonas apareadas se presentan con el número de pares típicos de cada asa. Las bases conservadas se presentan con sus iniciales. Las posiciones semiconservadas se representan por R para las purinas y Y para las pirimidinas; y se representa la pseudouridina. Las bases del anticodon aparecen sombreadas.



También supuso que si todos los ARNt cumplían la misma función debían poseer estructuras muy similares, lo cual ha sido confirmado posteriormente con el estudio de numerosos ARNt.

Según el modelo la cadena se pliega formando 4 sectores de apareamiento de bases llamados tallos, 3 de esos tallos terminan en zonas ensanchadas no apareadas llamadas asas. Un tallo y su asa correspondiente forman un brazo; cada brazo tiene una disposición y longitud características. Existe un quinto brazo que es variable en su longitud y composición, éste hace que el número de nucleótidos en los distintos ARNt varíe de 60 a 95 nucleótidos.

Una estructura generalizada de los ARNt debe contener los elementos siguientes derivados del análisis comparativo de las moléculas estudiadas:

1. El extremo 5' contiene un grupo fosfato y el extremo 3' termina con la secuencia CCA que no está apareada.
2. Las secuencias inmediatas a los extremos forman un tallo que incluye 7 pb, entre ellos el G-U. Este es el tallo aminoacídico o aceptor.
3. Existen 3 brazos constantes que, siguiendo la molécula en dirección 5' → 3', son los siguientes: el brazo D formado por un tallo de 4 ó 5 pb y un asa con dihidronridina; el brazo anticodon constituido por un tallo de 5 pb y el asa contiene el triplete anticodon; el brazo TΨC que está formado por un tallo de 5 pb y el asa contiene la secuencia invariante ribotimidina (T), pseudouridina (Ψ) y citosina (C); a esto debe sumarse el brazo variable ubicado entre el del anticodon y el TΨC, que puede contener de 3 a 21 nucleótidos con un tallo de hasta 7 pb.

Cuando se habla de posiciones equivalente se hace referencia a la localización en la estructura secundaria y no en la primaria, pues esta última puede variar con la longitud del brazo variable; así por ejemplo, la ribotimidina siempre se encuentra al inicio del asa TΨC, independiente de su localización en la estructura primaria.

Como se puede observar en la figura 11.19 casi todas las bases invariantes y semiinvariantes aparecen localizadas en las asas.

Estructura terciaria

Después de numerosos esfuerzos infructuosos por determinar la estructura tridimensional de los ARNt, en 1974 *Alexander Rich* y *Sung Hou Kim* por una parte y *Aaron Klug* por otra, mediante estudios de difracción de rayos X, lograron dilucidar la estructura del ARNt de fenilalanina de levadura, con una resolución de 0,25 nm. Los resultados mostraron que la molécula adopta la forma de una letra L invertida (Γ); el lado vertical se forma por el brazo D y el anticodon, en tanto el lado horizontal lo forman el brazo T ψ C y el tallo aceptor. En ambos lados la molécula forma una doble hélice similar al ADN A, pero con apareamientos menos estrictos. Cada lado tiene una longitud de 6 nm y un ancho de 2 a 2,5 nm. Los 2 extremos de la L formados por el anticodon y el CCA del aceptor están separados unos 7,6 nm (Fig. 11.20).

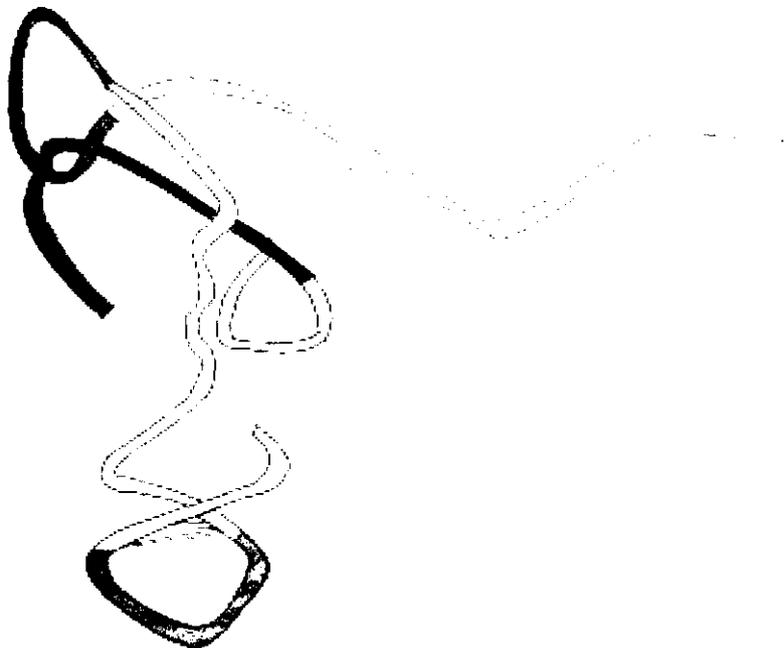


Fig. 11.20. Estructura terciaria de los ARNt. Las moléculas de los ARNt adoptan en el espacio una estructura que recuerda a una letra L invertida. En rojo se representa el asa del anticodon. En azul, el asa T ψ C, y en verde, el asa de la dihidouridina. Los pares de bases no siempre son del tipo Watson y Crick, además, las bases pueden interactuar con las ribosas y con los fosfatos.

La estructura se mantiene gracias a numerosas interacciones que se establecen entre sus componentes. Una proporción elevada de las bases participa en la formación de empalizados, otras forman pares de bases cruzados que por lo general no son del tipo Watson y Crick. La mayoría de las bases involucradas en estas interacciones son las invariantes o semiinvariantes. También participan en la estabilidad de las moléculas puentes de hidrógeno entre las bases y grupos fosfatos, en unos casos y en otros con el C2'-OH de la ribosa.

El hecho de que la estructura se establece principalmente por las bases invariantes y semiinvariantes sugiere que todos los ARNt tienen la misma estructura tridimensional. En el capítulo 30 se verá que esta forma tridimensional del ARN se adapta perfectamente a su función de transferir aminoácidos a los ribosomas durante la síntesis de proteínas.

ARN ribosomal

El ARN ribosomal (ARNr) se encuentra formando parte de los ribosomas donde está muy relacionado con proteínas. Como se verá con más detalles en el capítulo 29,

estas partículas citoplasmáticas pueden disociarse en 2 subunidades desiguales, la mayor denominada L (*large*) y la menor S (*small*).

El ARNr representa del 50 al 60 % del peso de la partícula y cada subunidad contiene moléculas de ARN que le son características. En los procariontes estas moléculas se refieren de acuerdo con su coeficiente de sedimentación como ARNr de 5, 16 y 23 S, lo cual significa que contienen alrededor de 120, 1 540 y 2 900 nucleótidos respectivamente. En los eucariontes estas especies principales se refieren como de 5, 18 y 28 S y existe una adicional de 5,8 S que contiene unos 160 nucleótidos. Por lo general la subunidad menor sólo contiene una especie molecular (16 ó 18 S), mientras las otras se encuentran en la mayor. A continuación se revisarán los aspectos más sobresalientes de sus estructuras.

Estructura primaria

Al igual que los ARNt, los ARNr presentan bases modificadas pero en menor proporción, pues apenas da cuenta del 1 % del total de bases. La modificación más frecuente es la metilación, aunque pueden haber otras. Las bases modificadas están por lo general agrupadas en pequeños sectores de la estructura primaria. A diferencia de los ARNt, los ARNr presentan grupos metilos en el C2' -OH de la ribosa y estas modificaciones se encuentran muy distribuidas en la molécula.

El análisis comparativo de la secuencia de bases de los ARNr de diferentes especies ha mostrado un elevado grado de conservación evolutiva. Existen secuencias de 10 a 20 nucleótidos que son esencialmente invariantes en todas las especies estudiadas; esto sugiere que dichas secuencias están involucradas en las funciones de los ARNr y no en la estructura. Se ha comprobado que las secuencias conservadas se localizan hacia la superficie del ribosoma, lo cual apoya su carácter funcional.

Estructura secundaria

Con el conocimiento de la estructura primaria, así como diferentes aproximaciones experimentales y teóricas se han construido modelos de estructuras secundarias de los tipos principales de ARNr. Estos modelos contemplan el establecimiento del mayor número de bases apareadas y "empalizadas" con lo cual disminuye considerablemente el contenido energético de la molécula. No obstante, se debe tener presente que estas moléculas existen en asociación con proteínas, y es posible que esas interacciones influyan en la estructura de los ARNr. Por otra parte, la estructura terciaria que aún es desconocida puede implicar la existencia de otro tipo de interacciones que podrían contribuir a la estabilidad de la molécula en mayor grado que las secundarias.

ARN mensajero

Poco se sabe de las estructuras de orden superior de los ARN mensajeros (ARNm) de eucariontes; esto se debe en parte a que la cantidad de ARNm específicos en la célula es muy baja, lo cual dificulta su purificación, y, por otra, al igual que los ARNr, se encuentra en el citoplasma en compleja unión con proteínas. Los ARNm suelen ser moléculas con metabolismo inestables, o sea, son degradados con rapidez y de ahí que presenten un tiempo de vida media muy corto en comparación con los ARNr y los ARNt.

Algunos detalles estructurales son característicos de los ARNm de los eucariontes. Todos presentan modificado el extremo 5' por la adición de un nucleótido de 7-metil-guanina mediante un enlace fosfoanhídrido; esta estructura recibe el nombre de casquete y suele abreviarse por su equivalente en inglés, *cap*; en ocasiones la

estructura se completa con la metilación del C2 -OH del primer nucleótido (*cap* 1) y del segundo (*cap* 2). Otra característica importante se observa hacia el extremo 3' donde muchos ARNm presentan una larga cola de poliadenina, poli(A), que puede tener más de 200 nucleótidos. La modificación en 5' parece estar relacionada con la unión del ARNm al ribosoma, en tanto la de 3' parece incrementar la estabilidad metabólica. La estructura de los ARNm será tratada con más detalles en el capítulo 27.

En su proceso de síntesis el ARNm se forma de moléculas mucho mayores, que se encuentran en el núcleo y han recibido el nombre de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn). El ARNhn ya presenta el *cap* y la cola de poli(A) y se va acortando por un proceso de maduración que también se estudiará en el capítulo 27.

ARN pequeños

Son moléculas de ARN que contienen de 90 a 400 nucleótidos, de una elevada estabilidad metabólica y que están presentes en las células por decenas de miles de copias cada uno; pueden estar localizados en el núcleo y se les denomina ARN pequeños nucleares (ARNsn del inglés *small nuclear*) o en el citoplasma como ARN pequeños citoplasmáticos (ARNsc del inglés *small cytoplasmic*).

El subtipo más conocido está formado por 6 especies moleculares diferentes, pero todas ellas con un elevado contenido en uridina, por lo que se les ha denominado como ARN-U y se designan del U1 al U6. Todos los ARN-U presentan modificado el extremo 5' con una estructura tipo *cap*, que del U1 al U5 es la trimetilguanina pero que en el U6 es diferente. Los ARNsn se presentan asociados con más de 10 proteínas diferentes, formando partículas de ribonucleoproteínas (RNPsn) que participan en el proceso de maduración de los ARNhn para originar los ARNm y del preARNr.

Los ARNsc se presentan en 3 tipos denominados Y1, Y2 y Y3 y al contrario de los U se encuentran en el citoplasma. Entre los ARNsc merece la pena destacar el ARN 7SL, que se encuentra unido a 6 proteínas, formando las partículas de reconocimiento del péptido señal (SRP) que participa en la translocación de las proteínas, las que deben ser procesadas en el retículo endoplásmico rugoso. Este ARN está formado por aproximadamente 300 nucleótidos y tiene tanto hacia el extremo 5' como hacia el 3' una secuencia de tipo Alu, llamada así por ser el sitio reconocido por la enzima de restricción Alu I (capítulo 26). La zona central formada por 150 nucleótidos recibe el nombre de dominio S. Esta molécula se encuentra plegada como lo demuestra el hecho de que el tratamiento con nucleasas da lugar a la formación de 2 subpartículas, una que contiene el dominio S y la otra los 2 extremos. La función de las SRP será estudiada con más detalle en el capítulo 30.

Métodos empleados para el estudio de los ARN

Para la obtención de los ARN se procede de forma similar que con el ADN. Después de la ruptura y homogeneización celular se puede hacer una centrifugación en diferentes velocidades (fraccionamiento celular) para separar núcleo, ribosomas y citoplasma soluble.

Los tratamientos con proteasas y ADNasa, así como el empleo de inhibidores de ARNasa también se utilizan, pues estas enzimas son muy activas en el citoplasma. Con el uso de la centrifugación en gradiente de densidad, la cromatografía y la electroforesis combinadas de forma adecuada se pueden obtener preparaciones de un elevado grado de pureza.

La purificación de los ARNm de eucariontes se hizo algo más simple a partir del conocimiento de la cola de poli(A), pues esto lo hace ideal para la técnica de cromatografía de afinidad. Con este objetivo para preparar la columna al soporte sólido se le une previamente, y de forma covalente, un fragmento de poli(U); cuando la

mezcla se deposita en la superficie superior de la columna se forman apareamientos entre el poli(U) del soporte y el poli(A) del ARNm; con una buena combinación de solventes se logra arrastrar primero las especies no unidas y al final el ARNm.

Para la localización de ARNm específicos puede usarse una técnica de transferencia en filtros de nitrocelulosa, como ya fue descrito para el ADN, y después localizarlo con una sonda radiactiva o fluorescente.

Como todos los métodos de purificación, los de ARN exigen una gran imaginación y un conocimiento adecuado de las características estructurales específicas de la o las moléculas buscadas.

ARN como material genético

Algunos virus bacterianos, fagos, poseen ARN como material genético; entre ellos los fagos de *E. coli* R17, MS-2, Q β , que tienen un ARN de cadena simple formando estructuras compactas debido a la presencia de interacciones débiles intracatenarias. En estos virus el ARN cumple 2 funciones: una servir de material genético y otra, sirve como ARNm y dirige la síntesis ribosomal de las proteínas virales.

Por su parte el fago $\Phi 6$ de *Pseudomonas phaseolica* posee 3 ARN de doble hebra con un peso molecular de 2,3; 3,1 y 5 x 10⁶ cada uno. El virus también contiene la enzima capaz de procesar el ARN, pues esa función no puede realizarla el hospedero.

Sólo se conoce un plásmido, formado por ARN de doble cadena, con un peso molecular de 1,5 x 10⁶ y que forma parte de la llamada "partícula asesina" en levaduras, pues codifica una sustancia de elevada toxicidad.

También los virus de las células eucariontes superiores pueden presentar ARN como material genético. El ARN puede ser de 2 tipos: el positivo (+), si también puede funcionar como ARNm y el negativo (-), si no puede. Algunos virus eucariontes tienen ARN bifibrilar. Un caso interesante es el de los retrovirus, por lo general, contienen 2 moléculas idénticas (o casi idénticas) de ARN monofibrilar, que gracias a la acción de una enzima viral es usado para la formación de un ADN bifibrilar, - de ahí el nombre de retrovirus- a este grupo pertenece el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Resumen

Los ácidos nucleicos constituyen las macromoléculas biológicas más importantes después de las proteínas, pues están relacionadas con las propiedades hereditarias de los seres vivos.

La estructura física del gen es la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN); ésta se forma por la polimerización de moléculas más simples llamadas desoxinucleótidos, cuyas bases nitrogenadas pueden ser del grupo de las purinas como la adenina y la guanina o del grupo de las pirimidinas como la citosina y la timina. Los desoxinucleótidos se unen mediante el enlace fosfodiéster que liga el hidroxilo de la posición C3' de uno de ellos con la C5' del vecino. Los 2 extremos de la cadena polimérica son diferentes y por eso se dice que presentan polaridad 5'→3'.

La estructura espacial del ADN se describe mediante el modelo de Watson y Crick. La molécula está formada por 2 hebras antiparalelas, con las bases nitrogenadas hacia el interior y el eje pentosa fosfato hacia el exterior. Las bases forman pares complementarios A con T y G con C unidos por puentes de hidrógeno, 2 en el primer caso y 3 en el segundo. El "empalzado" de las bases se mantiene por interacciones hidrofóbicas que son las fuerzas fundamentales en el mantenimiento de la estructura. A lo largo de la molécula del ADN existen numerosas irregularidades que dependen de la secuencia, como la inclinación del par de bases con respecto

al eje y los efectos de alabeo y balanceo que crean patrones espaciales de formación de puentes de hidrógeno y que permiten la interacción específica del ADN con otras macromoléculas. Cuando los extremos de las cadenas de ADN no pueden rotar libremente, como en los casos de ADN circular, la molécula puede adoptar formas topológicas diferentes denominadas topoisómeros.

El ADN puede desnaturalizarse mediante el calentamiento por encima de la temperatura de fusión T_m , y renaturalizarse al bajar la temperatura lentamente, lo que ha dado lugar a los métodos de hibridación.

Para estudiar el ADN se precisa extraerlo de la célula, rompiendo ésta y separándolo de las proteínas; después puede ser purificado utilizando una amplia variedad de métodos como la cromatografía, la electroforesis y la centrifugación. Las técnicas de transferencia permiten localizar ADN específicos.

Los ADN se pueden presentar en forma de una sola cadena como en los virus.

Las moléculas independientes del cromosoma, como en el caso de los plásmidos o del ADN mitocondrial, son de doble hebra.

Los ácidos ribonucleicos ARN son productos génicos primarios, lo que equivale a decir que su estructura está determinada directamente por el ADN. Constituyen un grupo heterogéneo de macromoléculas tanto desde el punto de vista estructural como funcional. En general sus funciones están vinculadas a los mecanismos de expresión de la información genética.

Los ARN están formados por una sola cadena de polinucleótidos enlazados mediante uniones fosfodiéster 5'-3'. Su composición de bases es menos regular que la del ADN, y entre las pirimidinas prevalece el uracilo en vez de la timina. La pentosa que contiene es la ribosa, cuyo C2'-OH impone limitaciones a su estructura tridimensional y los hace susceptibles a la hidrólisis alcalina.

La cadena única de los ARN se pliega sobre sí, formando zonas de bases apareadas separadas por zonas no apareadas (las asas), que pueden ser internas o terminales. Las interacciones de "empalizado" en primer término y los puentes de hidrógeno en segundo, contribuyen a estabilizar esa estructura secundaria. De la estructura terciaria poco se sabe.

En las células hay varios tipos de ARN: ARNt, ARNr, ARNm y ARN pequeños. Los ARNt contienen alrededor de 76 nucleótidos con casi el 20 % de sus bases modificadas. Todos presentan una estructura secundaria similar que se ajusta al modelo de la hoja de trébol. La estructura terciaria adopta la forma de una letra L invertida. Los ARNr presentan una estructura más compleja, pues algunos pueden tener más de 2 000 nucleótidos. Presentan una menor proporción de bases modificadas que los ARNt, pero la ribosa está metilada en gran número; su estructura secundaria sigue los patrones expuestos y la terciaria se desconoce. La estructura de los ARNm es más heterogénea y, en relación con el metabolismo, es el menos estable de todos los ARN. Presenta un casquete en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el 3' y está unido a proteínas formando ribonucleopartículas mensajeras. Desde el punto de vista bioquímico, deriva del ARN heterogéneo nuclear. Los llamados ARN pequeños forman varios grupos, los más conocidos son los pequeños nucleares tipo U que participan en la transformación del ARNhn en ARNm y los pequeños citoplasmáticos tipo Y, que al parecer intervienen en la síntesis de proteínas de secreción.

Los ARN pueden presentarse como el material genético en algunos virus, que en ocasiones adopta una estructura duplohelicoidal. Existe un plásmido de levadura constituido por ARN, aunque todos los demás contienen ADN.

Ejercicios

1. ¿Por qué se afirma que el ADN contiene toda la información necesaria para la transmisión de los caracteres hereditarios? ¿Cómo contiene esa información?

2. A un estudiante se le entrega una solución que contiene un fragmento de ADN de rata de una longitud de 250 pb y se le pide que determine la composición de bases del fragmento. Al llegar al laboratorio le informan que sólo tienen disponibles los métodos para la determinación de adenina ¿Cree usted que el estudiante pueda cumplir exitosamente la tarea encomendada?
3. Un posgraduado determina la composición de bases de un ADN y obtiene los resultados siguientes: A= 23 %, G= 30 %, T= 28 % y C= 19 % ¿Qué tipo de organismo está estudiando el posgraduado?
4. Escriba la fórmula de los pares de bases A-T y C-G. Infiera por qué el primero se mantiene por 2 puentes de hidrógeno y el segundo por 3.
5. Se sabe que las proteínas pA y pB se unen al ADN por el surco mayor. Estudios refinados demuestran que mientras pA se une al ADN por la secuencia CAATG, la pB lo hace por TGCCA ¿Cómo pueden estas proteínas distinguir una secuencia de otra?
6. A 2 estudiantes se les encomienda la tarea de analizar el ADN de 2 organismos diferentes, digamos pX23 y pY21. Los alumnos extraen el ADN y lo cortan en fragmentos de aproximadamente igual longitud. Al centrifugarlos en un gradiente de CsCl, el ADN del pX23 se concentra en una banda única. Por su parte el ADN del pY21 se distribuye en 3 bandas, una grande y 2 pequeñas ¿Cuáles son las características de la composición de estos ADN que pudieran explicar estos resultados?
7. ¿Por qué cree usted que los ARN puedan desarrollar un número mayor de funciones que los ADN?
8. Si usted tuviera que mencionar una función única para los ARN ¿Cuál seleccionaría?
9. Un estudiante ha determinado la composición de bases de un ARN y obtuvo los resultados siguientes: A= 21 %, G= 29 %, T= 21 % y C=29 % ¿A qué tipo de organismo pertenecía ese ARN?
10. ¿Cuál es la función que pueden desempeñar en los ARN las modificaciones que se producen en las bases nitrogenadas y en la ribosa?
11. ¿Por qué cree usted que todos los ARNt presentan una estructura terciaria similar, si sus secuencias de bases no son exactamente iguales?
12. Si a usted se le encarga la tarea de purificar un ARNt específico ¿Cuál pudiera ser un procedimiento importante para llevar al éxito su encomienda?
13. ¿Por qué cree usted que durante la evolución los organismos más evolucionados utilizan como material genético al ADN y no al ARN?