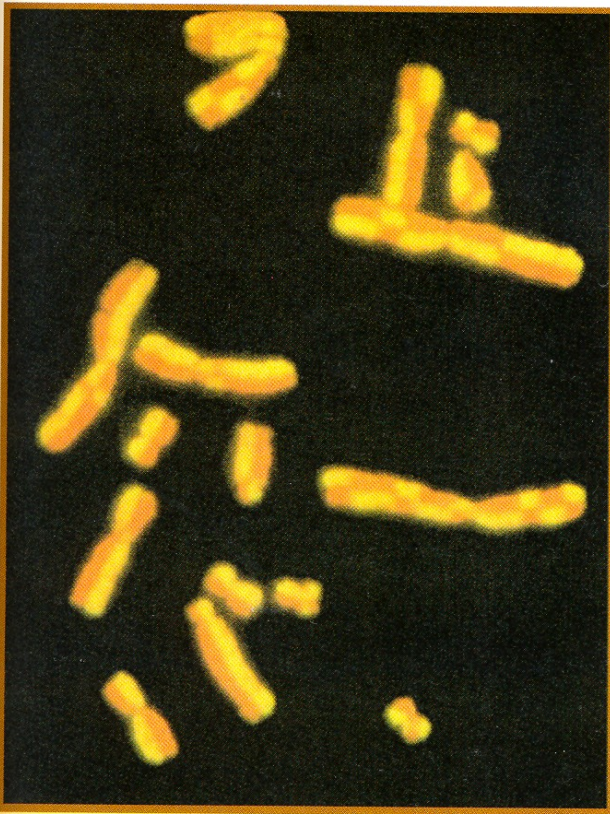


# 8

## ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL DNA



**Cromosomas en arlequín.** (Sheldon Wolff/University of California, San Francisco.)

### *Ideas fundamentales*

Células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo diferente; el agente transformante es el DNA.

Ciertos experimentos con fagos T2 marcados han permitido establecer que el material hereditario es el DNA.

James Watson y Francis Crick demostraron que la estructura del DNA es una hélice doble. Cada hélice es una cadena de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiésteres. Las dos cadenas helicoidales se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno específicos entre pares de bases.

La estructura del DNA asegura la fidelidad de la replicación porque la complementariedad entre las bases viene determinada por el establecimiento de puentes de hidrógeno específicos.

La replicación del DNA es semiconservativa, en cuanto que cada molécula doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada.

Se han caracterizado muchas de las enzimas que participan en la síntesis del DNA.

El esclarecimiento de la estructura del DNA por James Watson y Francis Crick, en 1953, fue uno de los descubrimientos más excitantes de la historia de la Genética. Abrió el camino a la comprensión en términos moleculares de la herencia y de la forma de actuar de los genes. Antes de que veamos cómo se logró resolver la estructura del DNA, resumamos qué se conocía sobre los genes y sobre el DNA en el momento en que Watson y Crick iniciaron su histórica colaboración:

1. Se sabía que los genes —los «factores» hereditarios descritos por Mendel— estaban asociados a caracteres concretos, pero se desconocía su naturaleza física.
2. La teoría «un gen-una enzima» (descrita con más detalle en el Cap. 9) postulaba que los genes controlan la estructura de las proteínas.
3. Se sabía que los genes estaban situados en los cromosomas.
4. Se descubrió que los cromosomas se componían de DNA y proteína.
5. Las investigaciones de Frederick Griffith y, subsecuentemente, las de Oswald Avery y sus colaboradores apuntaban al DNA como el material genético. Tales investigaciones, que se describen aquí, demostraban que las células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo distinto, y que el agente transformante es el DNA.

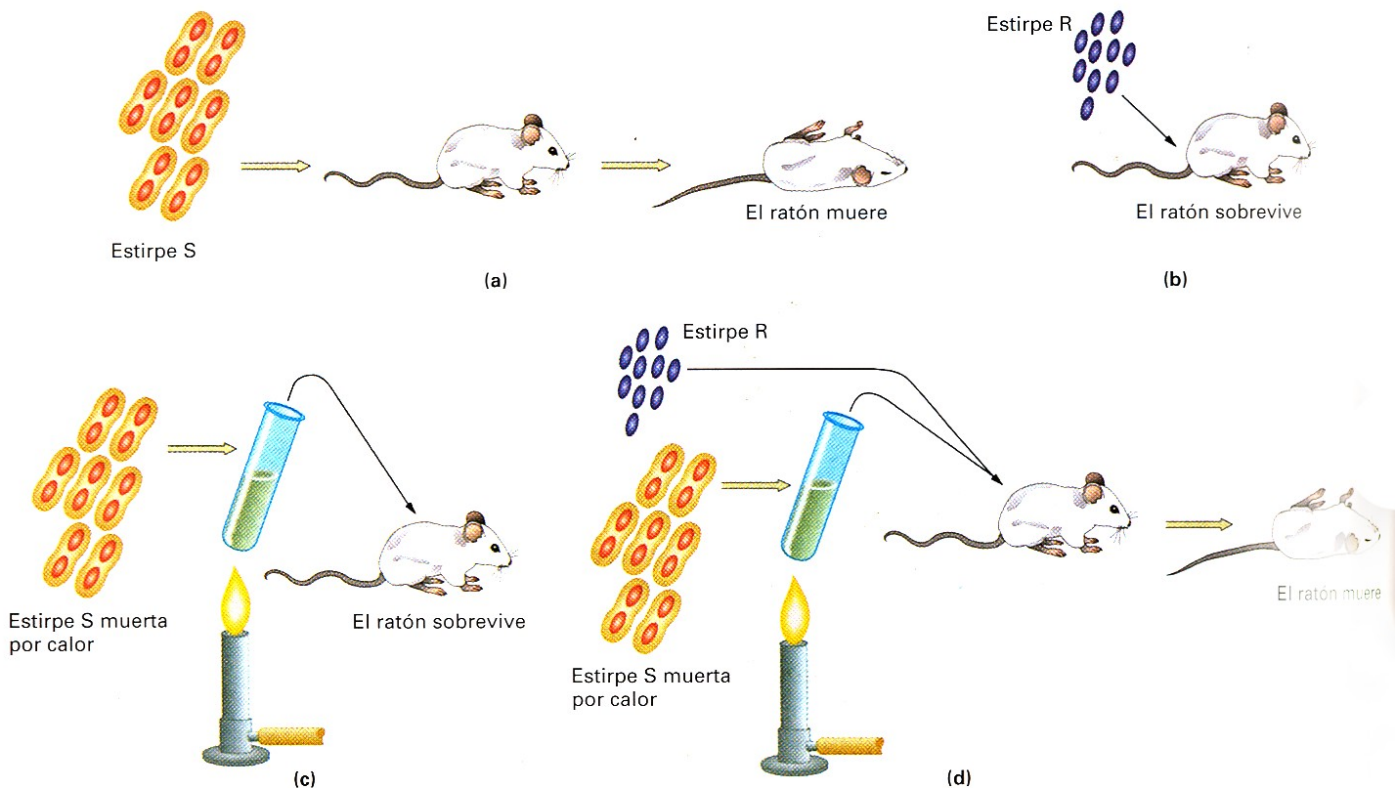
## El material genético: DNA

La naturaleza física del gen fascinó a los científicos durante años. Una serie de experimentos que se iniciaron en la década de 1920 acabaría por revelar que el material genético es el DNA.

### El descubrimiento de la transformación

En 1928, en el curso de sus experimentos con la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, Frederick Griffith hizo una misteriosa observación. Esa bacteria, causante de la neumonía humana, es normalmente letal para los ratones. Sin embargo, han aparecido distintas estirpes de esta especie bacteriana que difieren en cuanto a su virulencia (capacidad para provocar la enfermedad o la muerte). Griffith utilizó en sus experimentos dos estirpes que se distinguían por el aspecto de sus colonias crecidas en cultivos de laboratorio. Las células de una de las estirpes, un tipo virulento normal, están rodeadas por una cápsula de polisacáridos que le da a las colonias una apariencia lisa; de ahí que ésta sea denominada estirpe S. Las células de la otra estirpe de Griffith, un tipo mutante no virulento que se reproduce en los ratones pero no es letal, carecen de esta cápsula de polisacáridos, lo cual hace que las colonias tengan una apariencia rugosa; ésta se denomina estirpe R.

Griffith mató algunas células virulentas, hirviéndolas, e inyectó las células muertas en ratones. Los ratones sobrevivieron.



**Figura 8-1.** Primera demostración de la transformación bacteriana. (a) El ratón muere tras inoculación con la estirpe virulenta S. (b) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe R. (c) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe S muerta por calor. (d) El ratón muere tras inoculación con una mezcla de la estirpe R viva y la estirpe S muerta por calor. De alguna manera, la estirpe S muerta transforma a la estirpe R en virulenta. Las partes a, b y c constituyen los controles de este experimento. (Tomado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.<sup>a</sup> ed. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company. Según R. Sager y F. J. Ryan, *Cell Heredity*. Wiley, 1961.)

demostrándose así que las cápsulas de las células no provocan la muerte. Sin embargo, ratones inyectados con una mezcla de células virulentas muertas y de células no virulentas vivas, murieron. Además, podían recuperarse bacterias vivas de los ratones muertos; estas células producían colonias lisas y, en subsiguientes inyecciones, eran virulentas. De alguna manera, los restos celulares de las células S hervidas habían convertido a las células R vivas en células S vivas. Este proceso se denomina **transformación**. El experimento de Griffith se resume en la Figura 8-1.

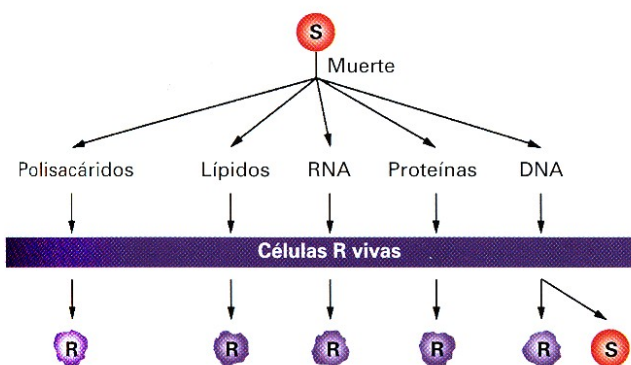
Este mismo método básico fue utilizado para determinar la naturaleza del *principio transformante* —el agente presente en los restos celulares, que es el responsable concreto de la transformación. En 1944, Oswald Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty separaron los distintos tipos de moléculas que se encuentran en las células S muertas y estudiaron su capacidad de transformación por separado. Estas pruebas demostraron que los propios polisacáridos no transforman a las células rugosas. Por tanto, la cubierta de polisacáridos, aunque claramente implicada en la acción patogénica, es sólo la expresión fenotípica de la virulencia. Tras el escrutinio de los diferentes compuestos, Avery y sus colaboradores descubrieron que sólo una clase de moléculas, el DNA, inducía la transformación de las células R (Fig. 8-2). Dedujeron que el DNA es el agente que determina la aparición del polisacárido y, por tanto, del carácter patogénico (véase una descripción del mecanismo de transformación en las págs. 219-220). Es más, parecía que proveer a las células R con el DNA de las células S era equivalente a proveerlas de los genes de las células S.

#### COROLARIO

La demostración de que el principio transformante es el DNA fue la primera demostración de que los genes se componen de DNA.

### El experimento de Hershey y Chase

Los experimentos llevados a cabo por Avery y sus colaboradores eran definitivos, pero muchos científicos se resistieron a aceptar como material genético al DNA (y no a las proteínas). La prueba definitiva fue obtenida en 1952 por Alfred Hershey y Martha



**Figura 8-2.** Demostración de que el DNA es el agente transformante. El DNA es el único compuesto que provoca la aparición de colonias lisas (S) al ser añadido a células rugosas (R) vivas.

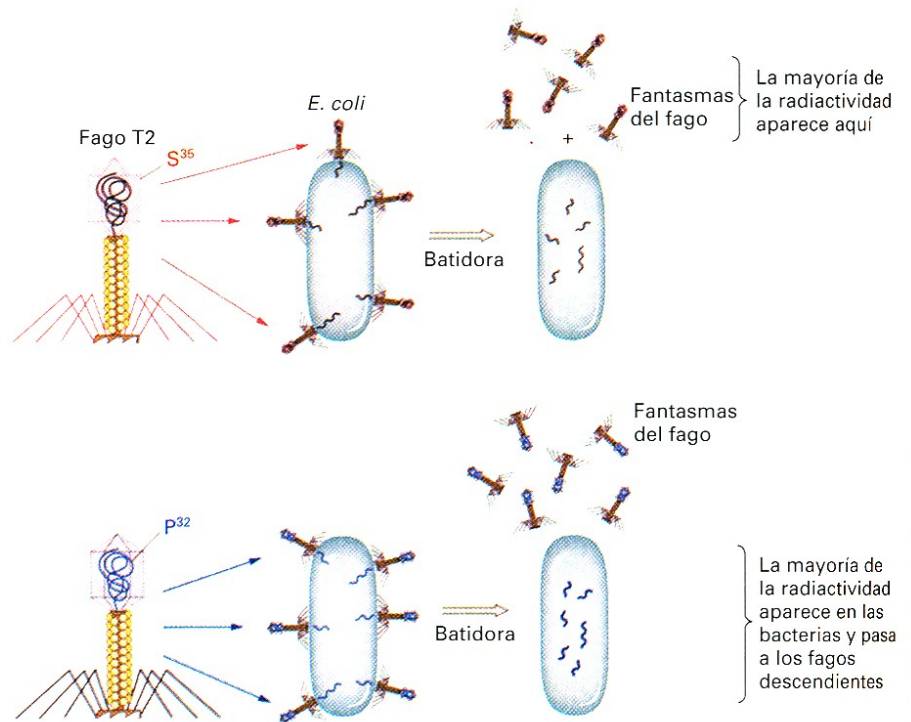
Chase usando el fago (virus) T2. Su razonamiento fue que la infección del fago debe implicar la introducción (inyección) dentro de la bacteria de la información específica que dicta la reproducción viral. El fago es relativamente simple en cuanto a composición molecular. La mayor parte de su estructura es proteína, estando el DNA en el interior de la envuelta proteica de su «cabeza».

En las proteínas no se encuentra fósforo, que sí forma parte del DNA; inversamente, el azufre está presente en las proteínas pero nunca en el DNA. Hershey y Chase marcaron el DNA del fago con el radioisótopo del fósforo ( $^{32}\text{P}$ ) y las proteínas con el del azufre ( $^{35}\text{S}$ ), en cultivos distintos de fagos. Usaron entonces cada cultivo, por separado, para infectar *E. coli* con muchas partículas de virus por célula. Tras dejar tiempo suficiente para que se produjera la infección, separaron de las células bacterianas las carcasas vacías de los fagos (llamadas *fantasmas*) mediante agitación en una batidora de cocina. Separaron las células bacterianas de los fantasmas de los fagos, mediante centrifugación, y midieron entonces la radioactividad de las dos fracciones. Cuando se utilizaron los fagos marcados con  $^{32}\text{P}$ , la mayor parte de la radioactividad terminaba en las células bacterianas, indicando que el DNA viral entraba en las células. También podía recuperarse  $^{32}\text{P}$  de los fagos descendientes. Cuando se usaron los fagos marcados con  $^{35}\text{S}$ , la mayor parte de la radioactividad terminaba en los fantasmas virales, indicando que la proteína viral nunca entra en la célula bacteriana (Fig. 8-3). La conclusión es ineludible: el DNA es el material hereditario; las proteínas del fago son meras empaquetadoras estructurales que se desechan después de inyectar el DNA viral en la célula bacteriana.

¿Por qué tal reticencia en aceptar esta conclusión? Se creía que el DNA era un compuesto químico más bien simplón. ¿Cómo podría una molécula tan simple almacenar toda la información sobre las múltiples características de un organismo? ¿Cómo podía ser transmitida tal información de una generación a la siguiente? Sin duda, el material genético debe poseer tanto la capacidad de poner en clave información específica como la de duplicar tal información de forma precisa. ¿Qué tipo de estructura, en una molécula tan simple, podría explicar unas funciones tan complejas?

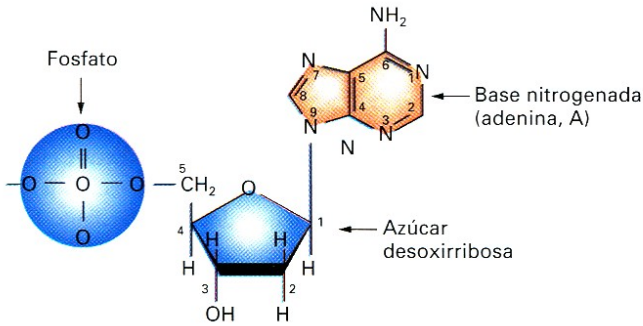
### La estructura del DNA

Aunque la estructura del DNA era desconocida, sus unidades básicas sí se conocían desde hacía muchos años. Los elementos básicos del DNA se habían aislado y analizado mediante rotura parcial de DNA purificado. Tales estudios demostraban que el DNA estaba compuesto sólo de cuatro moléculas básicas, llamadas **nucleótidos**, idénticas entre sí, excepto por contener cada una una base nitrogenada diferente. Cada nucleótido contiene fósforo, azúcar (del tipo llamado desoxirribosa) y una de las cuatro bases (Fig. 8-4). En ausencia del grupo fósforo, la base y la desoxirribosa forman un **nucleósido** en vez de un nucleótido. Las cuatro bases son **adenina**, **guanina**, **citocina** y **timina**. Los nombres químicos completos de los nucleótidos son 5'-monofosfato de desoxiadenosina (o desoxiadenilato, o dAMP), 5'-monofosfato de desoxiguanosina (o desoxiguanilato, o dGMP), 5'-monofosfato de desoxicitidina (o desoxicitidilato, o dCMP) y

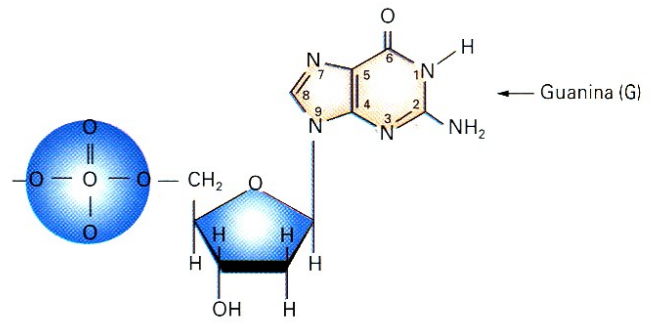


**Figura 8-3.** El experimento de Hershey y Chase, que demuestra que el material genético del fago es DNA, no proteína. El experimento emplea dos preparaciones de bacteriófagos T2. En una de ellas, las proteínas de la cubierta están marcadas con azufre radioactivo ( $^{35}\text{S}$ ), ausente del DNA. En la otra, el DNA está marcado con fósforo radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ), ausente de las proteínas. Sólo el  $^{32}\text{P}$  es inyectado dentro de *E. coli*, demostrando que el agente necesario para la producción de nuevos fagos es el DNA.

**Nucleótidos púricos**

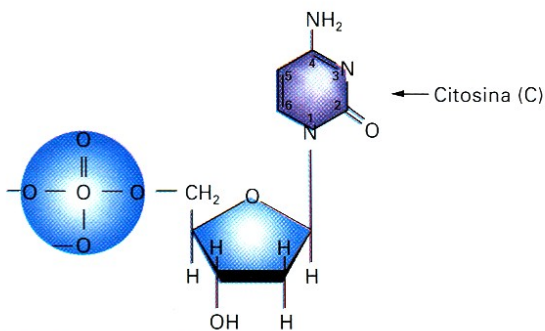


5 -fosfato de desoxiadenosina (dAMP)

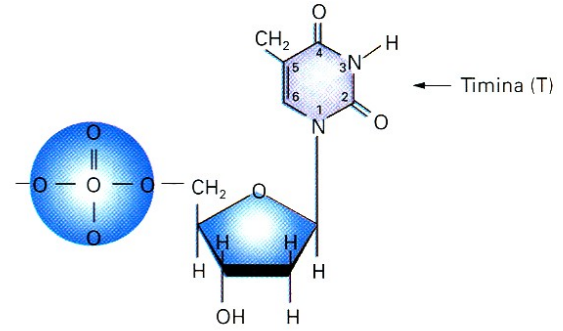


5 -fosfato de desoxiguanosina (dGMP)

**Nucleótidos pirimidínicos**



5 -fosfato de desoxicitidina (dCMP)



5 -fosfato de desoxitimidina (dTMP)

**Figura 8-4.** Estructura química de los cuatro nucleótidos (dos con bases púricas y dos con bases pirimidínicas) que constituyen los componentes fundamentales del DNA. El azúcar se denomina *desoxirribosa* porque es una variante del azúcar común ribosa, que tiene un átomo más de oxígeno.

5'-monofosfato de timidina (o desoxitimidilato, o dTMP). Sin embargo, resulta más cómodo referirse a cada nucleótido por la abreviatura de su base (A, G, C y T, respectivamente). Dos de las bases, adenina y guanina, son de estructura similar y se denominan **purinas**. Las otras dos bases, citosina y timina, también son similares y se denominan **pirimidinas**.

Después de que se hiciera evidente el papel central del DNA en la herencia, muchos científicos se dispusieron a determinar su estructura con exactitud. ¿Cómo puede una molécula con un rango tan limitado de componentes distintos almacenar la inmensa variedad informativa de las estructuras primarias de todas las proteínas de los seres vivos? Los primeros que tuvieron éxito en el empeño de encontrar una estructura razonable para el DNA—Watson y Crick, en 1953—trabajaron con dos tipos de pistas. En primer lugar, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins habían acumulado gran número de datos de difracción de rayos X sobre la estructura del DNA. En estos experimentos, se dirigen rayos X sobre fibras de DNA y se recoge la difracción de los rayos sobre una película fotográfica, en la que los rayos producen manchas. El ángulo de difracción representado por cada mancha de la película suministra información sobre la posición en la molécula de DNA de un átomo, o ciertos grupos de átomos. Este procedimiento no es fácil de llevar a cabo (ni de explicar), y la interpretación de las distribuciones de manchas resulta muy difícil. Los datos disponibles sugerían que el DNA es largo y muy fino, y que consta de dos partes similares que corren paralelamente una a otra a lo largo de la molécula. Los datos de rayos X demostraban también que la molécula es helicoidal (como una espiral). Se presentaban otras regularidades en la distribución de manchas, pero nadie había pensado todavía en una estructura tridimensional que diera cuenta exacta de esos patrones de manchas.

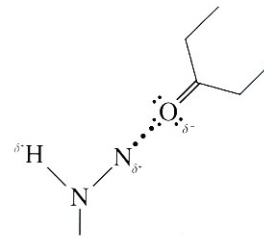
El segundo tipo de datos a disposición de Watson y Crick procedía del trabajo realizado varios años antes por Erwing Chargaff. Estudiando una variada gama de DNA de diferentes

organismos (Cuadro 8-1), Chargaff estableció ciertas reglas empíricas sobre las cantidades de cada componente del DNA:

1. La cantidad total de nucleótidos pirimidínicos (T + C) es siempre igual a la cantidad total de nucleótidos purínicos (A + G).
2. La cantidad de T es siempre igual a la de A, y la cantidad de C es siempre igual a la de G. Pero la cantidad de A + T no es necesariamente igual a la de G + C, como puede verse en la última columna del Cuadro 8-1. Este cociente varía entre distintos organismos.

## La hélice doble

La estructura que diseñaron Watson y Crick a partir de esas pistas es una **hélice doble**, parecida a dos muelles entrelazados. Cada muelle (hélice) es una ristra de nucleótidos unidos por **enlaces fosfodiésteres**, en los que un grupo fosfato forma un puente entre grupos —OH de dos residuos de azúcar adyacentes. Los dos «muelles» (hélices) se mantienen juntos mediante **puentes de hidrógeno**, en los que dos átomos electronegativos «comparten» un protón entre las bases. Los puentes de hidrógeno se forman entre átomos de hidrógeno con una pequeña carga positiva y átomos aceptores con una pequeña carga negativa. Por ejemplo,



Cada átomo de hidrógeno de un grupo  $\text{NH}_2$  es ligeramente positivo ( $\delta^+$ ) porque el átomo de nitrógeno atrae a los electrones implicados en el enlace  $\text{N—H}$ , dejando así al átomo de hidrógeno

**CUADRO 8-1.** Proporciones molares de las bases\* de DNA de distintos orígenes

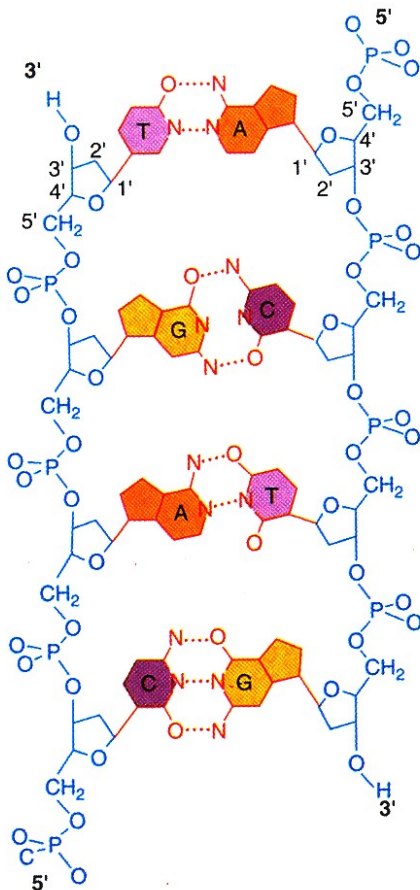
Organismo	Tejido	Adenina	Timina	Guanina	Citosina	$\frac{A + T}{G + C}$
<i>Escherichia coli</i> (K12)	—	26.0	23.9	24.9	25.2	1.00
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	29.8	31.6	20.5	18.0	1.59
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—	15.1	14.6	34.9	35.4	0.42
Levadura	—	31.3	32.9	18.7	17.1	1.79
<i>Paracentrotus lividus</i> (erizo de mar)	Esperma	32.8	32.1	17.7	18.4	1.85
Arenque	Esperma	27.8	27.5	22.2	22.6	1.23
Rata	Médula ósea	28.6	28.4	21.4	21.5	1.33
Hombre	Timo	30.9	29.4	19.9	19.8	1.52
Hombre	Hígado	30.3	30.3	19.5	19.9	1.53
Hombre	Esperma	30.7	31.2	19.3	18.8	1.62

\* Expresadas en moles de nitrógeno constituyente por cada 100 átomos gramo de fosfato del hidrolizado.

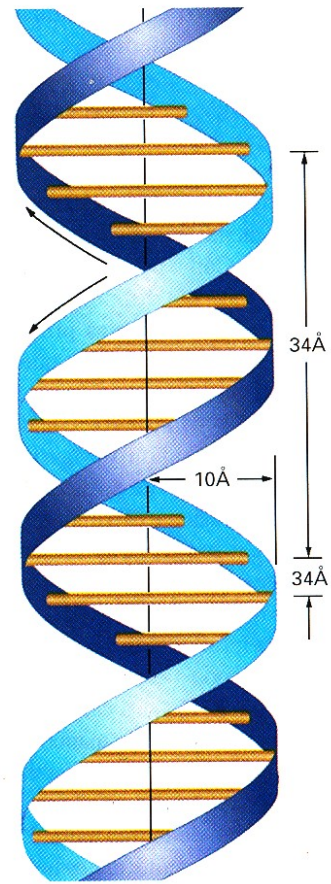
Fuente: E. Chargaff y J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

no ligeramente escaso de electrones. El átomo de oxígeno tiene seis electrones sueltos en su capa externa que lo hacen ligeramente negativo ( $\delta^-$ ). Se forma, pues, un puente de hidrógeno entre un H y un O. Los puentes de hidrógeno son enlaces muy débiles (del orden sólo del 3 % de la fuerza de un enlace químico covalente) pero, como veremos, esta debilidad juega una función importante en el papel de la molécula de DNA en la herencia. Un aspecto químico adicional importante: el puente de hidrógeno es mucho más fuerte si los átomos implicados «apuntan uno al otro» en las orientaciones más idóneas.

Los puentes de hidrógeno se forman entre pares de bases y están indicados por líneas discontinuas en la Figura 8-5, que muestra una parte de la doble estructura emparejada, con las hélices desenrolladas. Cada par de bases consiste en una purina y una pirimidina, emparejadas según la regla siguiente: G empareja con C, y A lo hace con T. En la Figura 8-6, un esquema simple de la doble hélice, cada par de bases se representa por un «palito» entre las «cintas» o «esqueletos azúcar-fosfato» de las cadenas de nucleótidos. Observe en la Figura 8-5 que las dos cade-



**Figura 8-5.** Doble hélice de DNA, desenrollada para mostrar los esqueletos azúcar-fosfato (en azul) y los escalones de pares de bases (en rojo). Los esqueletos corren en direcciones opuestas; los extremos se denominan 5' y 3' según la orientación de los átomos de carbono 5' y 3' de los anillos de azúcar. Cada par de bases consta de una purina, adenina (A) o guanina (G), y una pirimidina, timina (T) o citosina (C), conectadas mediante puentes de hidrógeno (*líneas punteadas*). (Tomada de R.E. Dickerson, «The DNA Helix and How it is Read». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



**Figura 8-6.** Modelo simplificado de la estructura helicoidal del DNA. Los palitos representan pares de bases, y las cintas representan los esqueletos azúcar-fosfato de las dos cadenas antiparalelas. Las distintas medidas se dan en angstroms (1 Å = 0.1 nm).

nas corren en direcciones opuestas; se dice que son **antiparalelas**, y (por razones aparentes en la figura) una se denomina cadena 5' → 3' y la otra cadena 3' → 5'.

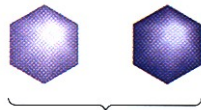
La doble hélice da cuenta perfectamente de los datos de rayos X y también se ajusta muy bien a los datos de Chargaff. Estudiando las maquetas que hicieron de la estructura, Watson y Crick notaron que el diámetro observado de la doble hélice (conocido por los datos de rayos X) se explicaría si una base purica empareja siempre (mediante puentes de hidrógeno) con otra pirimidínica (Fig. 8-7). Tal emparejamiento explicaría la regularidad  $(A + G) = (T + C)$  observada por Chargaff, pero predeciría cuatro posibilidades: T ... A, T ... G, C ... A y C ... G. Sin embargo, los datos de Chargaff indicaban que T empareja sólo con A y C lo hace sólo con G. Watson y Crick demostraron que sólo esos dos emparejamientos tienen las conformaciones complementarias, tipo «llave-cerradura», adecuadas para permitir la formación eficiente de los puentes de hidrógeno (Fig. 8-8).

Observe que el par G—C establece tres puentes de hidrógeno, mientras que el par A—T establece sólo dos. Predeciríamos que el DNA que contenga muchos pares G—C será más estable que el DNA que contenga muchos pares A—T. En realidad, tal predicción ha sido confirmada. La estructura del DNA explica pulcramente los datos de Chargaff (Fig. 8-9) y es consistente con los datos de rayos X.

### Imagen tridimensional de la doble hélice

Vistas en tres dimensiones, las bases aparecen más bien como estructuras planas que se apilan parcialmente unas sobre otras en la estructura retorcida de la hélice doble. Este apilamiento de bases coopera tremendamente a la estabilidad de la molécula al excluir las moléculas de agua de los espacios entre los pares de bases. (Este fenómeno se parece mucho a la fuerza estabiliza-

Pirimidina + pirimidina:  
DNA demasiado fino



Purina + purina:  
DNA demasiado grueso



Purina + pirimidina:  
diámetro compatible  
con los datos de rayos X



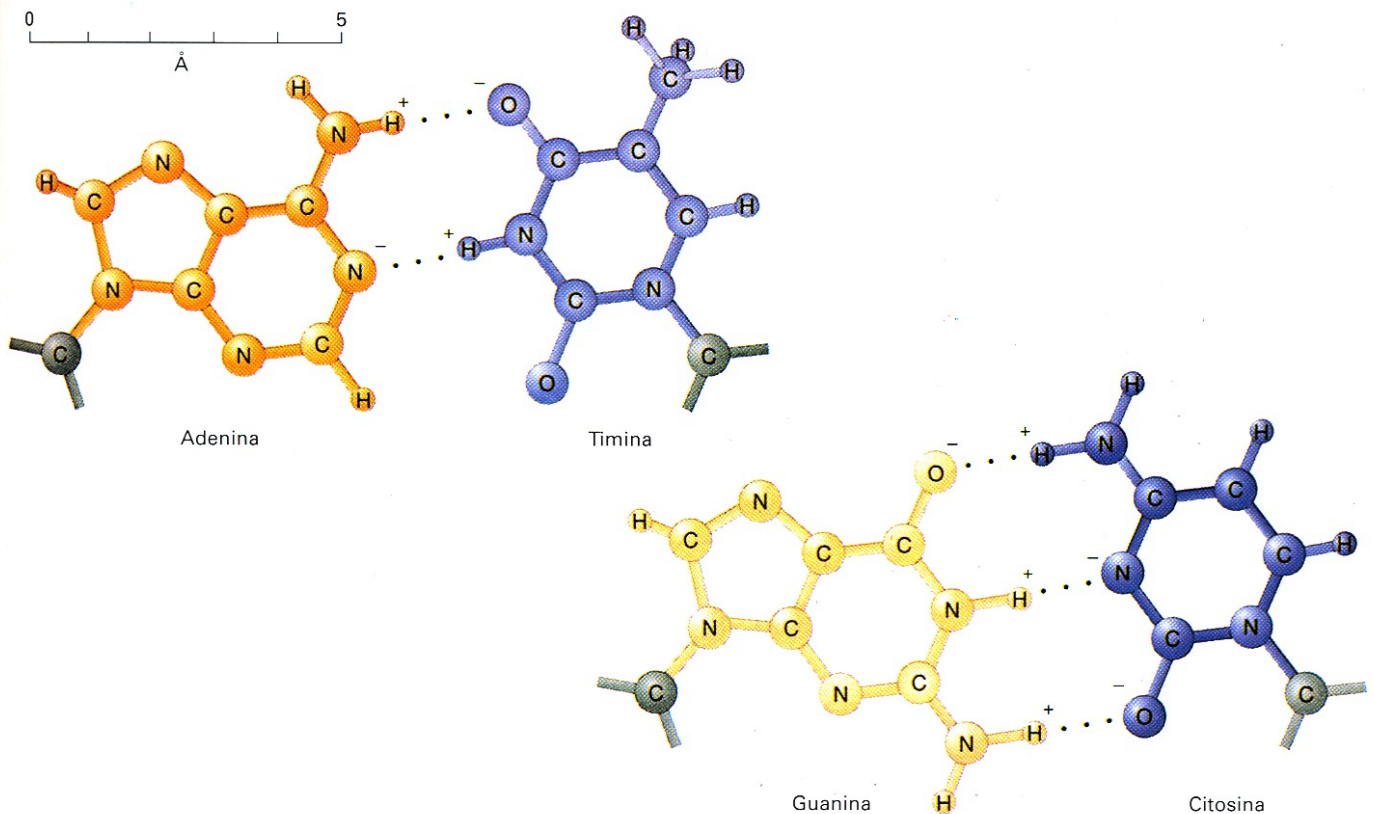
**Figura 8-7.** El emparejamiento de purinas y pirimidinas se corresponde exactamente con el diámetro de la hélice doble de DNA, calculado con los datos de rayos X. (Tomado de R. E. Dickerson, «The DNA Helix and How It Is Read». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

dora que se percibe al introducir en el agua dos placas de cristal unidas y se intenta, a continuación, separarlas). Posteriormente, se observó que había dos formas de DNA en las fibras analizadas mediante difracción. La **forma A** está menos hidratada que la **forma B**, y es más compacta. Se cree que la forma B del DNA es la que se encuentra comúnmente en las células vivas.

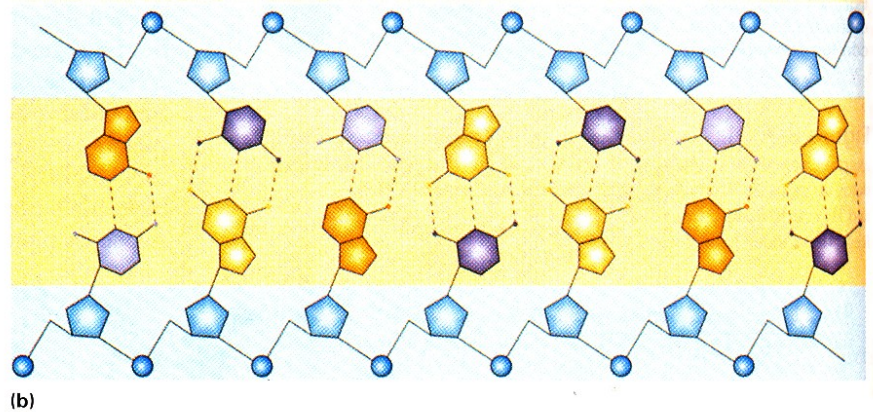
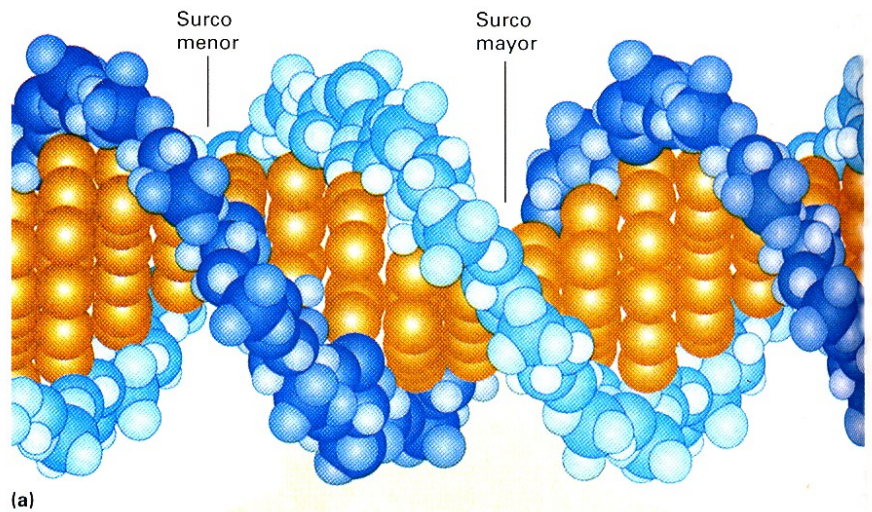
El apilamiento de las bases en la doble hélice genera dos surcos en los esqueletos azúcar-fosfato. Tales surcos se denominan surco **mayor** y surco **menor** y pueden observarse fácilmente en el modelo (tridimensional) de espacios atómicos de la Figura 8-9a.

### Implicaciones de la estructura del DNA

La elucidación de la estructura del DNA provocó una gran excitación entre los genetistas, y en todas las áreas de la Biología, por dos razones fundamentales. En primer lugar, la estructura sugería una forma obvia por la que la molécula puede ser **duplicada**, o **replicada**, ya que cada base determina a su complementaria mediante los puentes de hidrógeno. Hasta entonces, esta propiedad esencial de la molécula genética había sido un misterio. En segundo lugar, la estructura hace pensar que quizás la *secuencia* de pares de nucleótidos del DNA dicte la secuencia de aminoácidos de la proteína determinada por un gen. En otras palabras, algún tipo de **código genético** podría escribir información en el DNA como una secuencia de pares de nucleótidos y traducirla luego al lenguaje diferente de secuencias de aminoácidos de las proteínas.



**Figura 8-8.** Encaje mediado por puentes de hidrógeno, a modo de «llave y cerradura», entre A y T y entre G y C (Tomado de G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 de W.H. Freeman and Company).



**Figura 8-9.** (a) Modelo de espacios atómicos de la doble hélice de DNA. (b) Representación de un corto segmento de pares de nucleótidos desenrollado, en el que se aprecia cómo los emparejamientos A—T y G—C generan las proporciones de Chargaff. Este modelo corresponde a una de las diversas formas del DNA, llamada *forma B*. (Parte «a» tomada de C. Yanofsky, «Gene structure and Protein Structure». Copyright © 1967 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos. Parte «b» según en A. Konberg, «The Synthesis of DNA». Copyright © 1968, de Scientific American Inc. Reservados todos los derechos.)

Estos datos básicos sobre el DNA son ahora familiares a casi cualquiera que haya leído un texto de Biología en la escuela primaria o secundaria, o incluso periódicos y revistas. Pero trate de trasladarse al escenario de 1953 e imagine la excitación de entonces. Hasta ese momento, la evidencia de que el poco interesante DNA era el material genético resultaba descorazonadora y decepcionante. Pero la estructura de Watson y Crick abría de repente la posibilidad de explicar dos de los grandes «secretos» de la vida. James Watson ha contado la historia de este descubrimiento (desde su peculiar punto de vista, fuertemente cuestionado por otros participantes en esa historia) en un libro fascinante, titulado *La Doble Hélice*, que revela el intrincado juego de enfrentamientos entre personalidades, inteligentes apreciaciones, trabajo duro y puro azar, que rodea a avances científicos de esta importancia.

### Estructuras alternativas

Además de las formas A y B del DNA, se ha encontrado un nuevo tipo de estructura en cristales de un DNA sintético que contiene residuos nucleotídicos G y C alternados en la misma cadena. Este tipo de DNA, la **forma Z**, dispone su esqueleto en zigzag y genera una hélice «a izquierdas», mientras que las formas A y B del DNA son hélices «a derechas».

## Replicación del DNA

La transmisión fiel de la información hereditaria depende de la replicación exacta del material genético. Esta sección examina los mecanismos de replicación del DNA

### Replicación semiconservativa

La Figura 8-10 muestra un diagrama del posible mecanismo básico de replicación propuesto por Watson y Crick. Los esqueletos de azúcar-fosfato se representan como líneas y la secuencia de pares de bases es aleatoria. Imaginemos que la doble hélice es como una cremallera que se abre a partir de un extremo (el inferior de la Fig. 8-10). Vemos que, si la analogía de la cremallera es válida, el desenrollamiento de las dos cadenas dejará expuestas las bases de cada una de ellas. Debido a la estricta restricción de emparejamientos impuesta por la estructura del DNA, cada base expuesta emparejará sólo con su complementaria. Dada esta complementariedad de bases, cada una de las cadenas actuará como **molde**, o plantilla, y empezará a reproducir una hélice doble idéntica a la que se abrió. Se supone que los nuevos nucleótidos incorporados proceden de una reserva de nucleótidos libres que estaría presente en la célula.



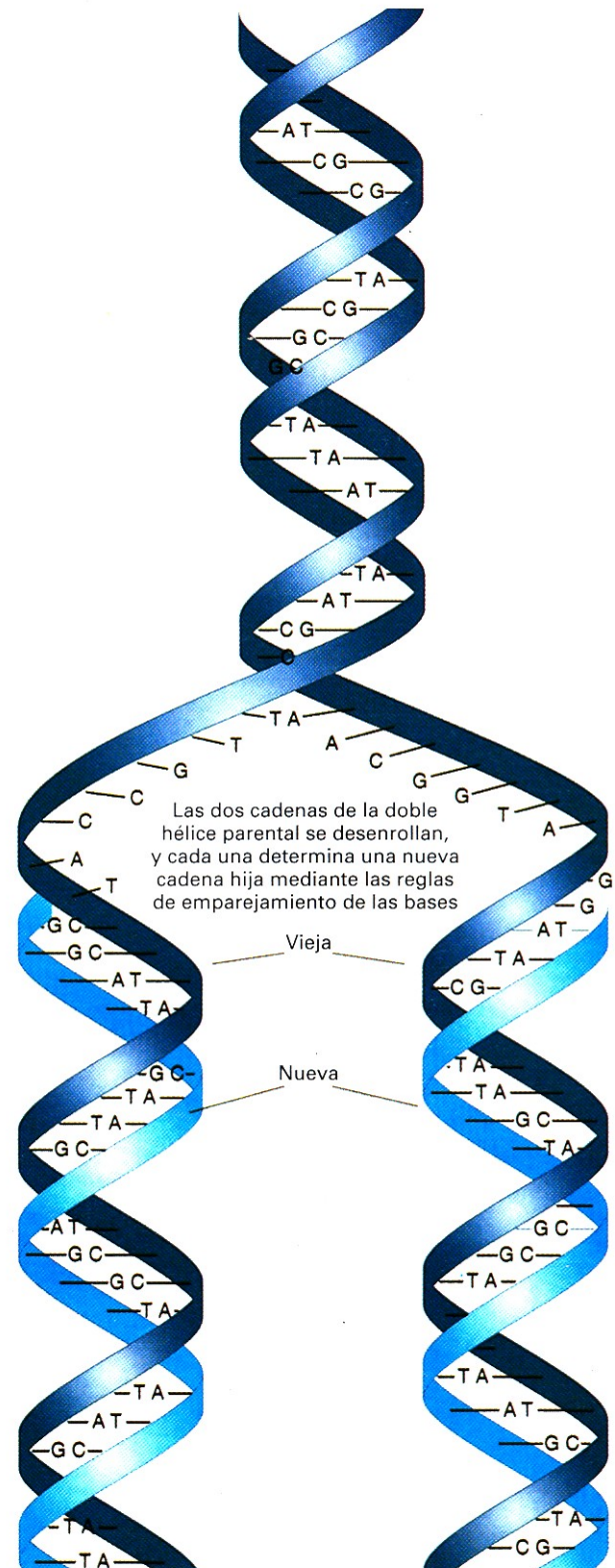
Si este modelo es correcto, cada molécula hija debe contener una cadena de nucleótidos parental y otra sintetizada de nuevo. Esta predicción se ha sometido a prueba tanto en procariontas como en eucariotas. Pensando un poco veríamos que la molécula de DNA parental podría estar relacionada con las moléculas hijas de tres formas diferentes. Estas formas diferentes se denominan semiconservativa (el modelo de Watson y Crick), conservativa y dispersiva (Fig. 8-11). En la **replicación semiconservativa**, cada hélice doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada. En la **replicación conservativa**, sin embargo, una hélice doble hija está formada por dos cadenas sintetizadas de nuevo, conservándose la hélice doble parental. La **replicación dispersiva** da lugar a dos moléculas hijas cuyas cadenas contienen sólo ciertos *segmentos* de DNA parental y otros sintetizados de nuevo.

### El experimento de Meselson y Stahl

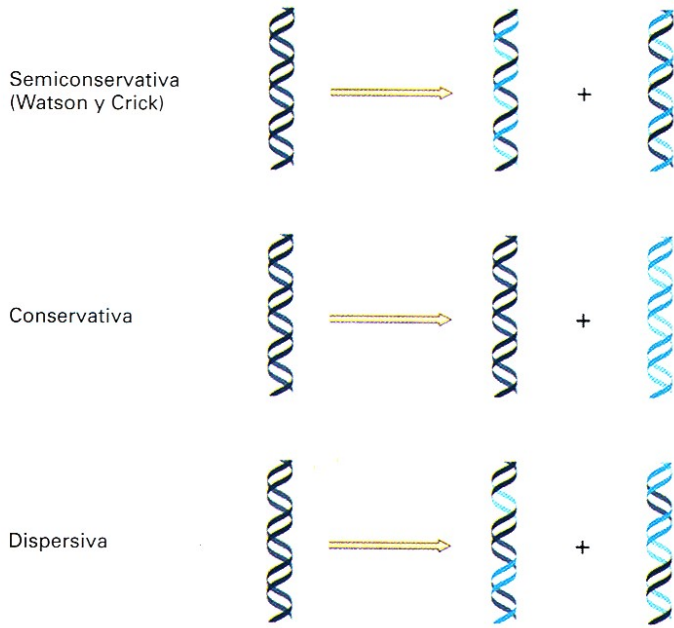
En 1958, Matthew Meselson y Franklin Stahl se propusieron distinguir experimentalmente entre esas tres posibilidades. Cultivaron células de *E. coli* en un medio que contenía un isótopo pesado del nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ) en vez del isótopo ligero normal ( $^{14}\text{N}$ ). El isótopo pesado se incorporó a las bases nitrogenadas, que se incorporarían a su vez a las nuevas cadenas de DNA. Tras muchas divisiones celulares en presencia de  $^{15}\text{N}$ , el DNA de todas las células debería estar bien marcado con el isótopo pesado. A continuación, separaron las células del medio con  $^{15}\text{N}$  y las pusieron en un medio con  $^{14}\text{N}$ , tomando muestras después de una y dos divisiones celulares. Extrañaron el DNA de las células de cada una de estas muestras y lo centrifugaron en una solución de cloruro de cesio ( $\text{CsCl}$ ).

Si el cloruro de cesio se centrifuga a gran velocidad (50 000 rpm) durante muchas horas, los iones de cloruro y de cesio son empujados por la fuerza centrífuga hacia el fondo del tubo. Al final, se establece un gradiente de iones  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el tubo, con mayores concentraciones de ellos en el fondo. También las moléculas de DNA en solución son empujadas hacia el fondo por la fuerza centrífuga. Pero en su trayecto hacia el fondo encuentran una concentración de sal cada vez mayor que tiende a empujarlas de nuevo hacia arriba, debido a la flotabilidad del DNA (su tendencia a flotar). Así pues, el DNA se «deposita» finalmente en cierta posición del tubo, justo donde la fuerza centrífuga compensa la flotabilidad de las moléculas en el gradiente de cloruro de cesio. La flotabilidad del DNA depende de su densidad (la cual, a su vez, depende de la relación de pares G—C a pares A—T). La presencia del isótopo más pesado del nitrógeno cambia la densidad de flotación del DNA. El DNA extraído de células que han crecido durante muchas generaciones en medio con  $^{15}\text{N}$  puede distinguirse con facilidad del DNA de las células que lo han hecho en medio con  $^{14}\text{N}$  por la posición de equilibrio que alcanzan en el gradiente de cloruro de cesio. Tales muestras se denominan familiarmente DNA *pesado* y *ligero*, respectivamente.

Meselson y Stahl comprobaron que una generación después de que las células *pesadas* se trasladaron a medio con  $^{14}\text{N}$  el DNA formaba una única banda, de densidad intermedia entre las densidades de los controles pesado y ligero. Después de dos generaciones en medio con  $^{14}\text{N}$ , el DNA formaba dos bandas: una en la posición intermedia y la otra en la posición ligera (Fig. 8-12). Éste es el resultado esperado del modo de replicación semiconservativa; de hecho, el resultado es compatible *sólo* con este mo-



**Figura 8-10.** El modelo de replicación del DNA propuesto por Watson y Crick está basado en la especificidad de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases. Las cadenas complementarias aparecen en distinto color. Este dibujo es una versión simplificada de nuestra idea actual de cómo ocurre la replicación, pero representa bien la idea básica sugerida por la estructura de Watson y Crick. El hecho de que las cadenas nuevas pueden alargarse sólo en dirección 5' a 3' añade mayor complejidad al mecanismo real de la replicación.



**Figura 8-11.** Tres formas alternativas de replicación del DNA. El modelo de Watson y Crick corresponde a la primera forma (semiconservativa). Las líneas de color azul claro representan las cadenas sintetizadas de nuevo.

delo, si el experimento se inicia con cromosomas constituidos por hélices dobles individuales (Fig. 8-13).

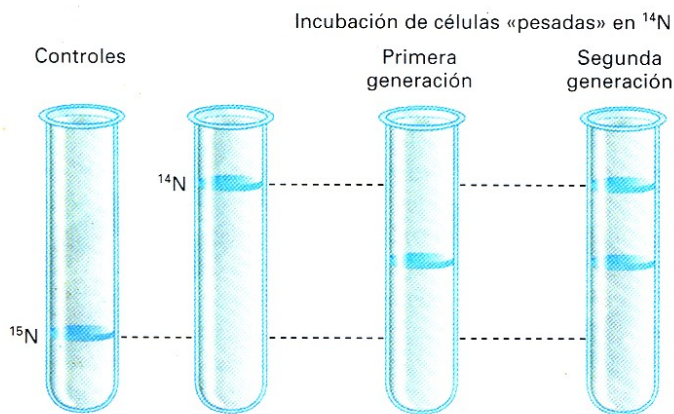
**Autorradiografía**

El experimento con *E. coli* de Meselson y Stahl fue prácticamente repetido con cromosomas de células de raíces de judía por Herbert Taylor, en 1958, utilizando técnicas citológicas. Taylor puso las células de raíz en una solución que contenía timidina tritiada [timidina-(<sup>3</sup>H)], el nucleótido timidina marcado con un

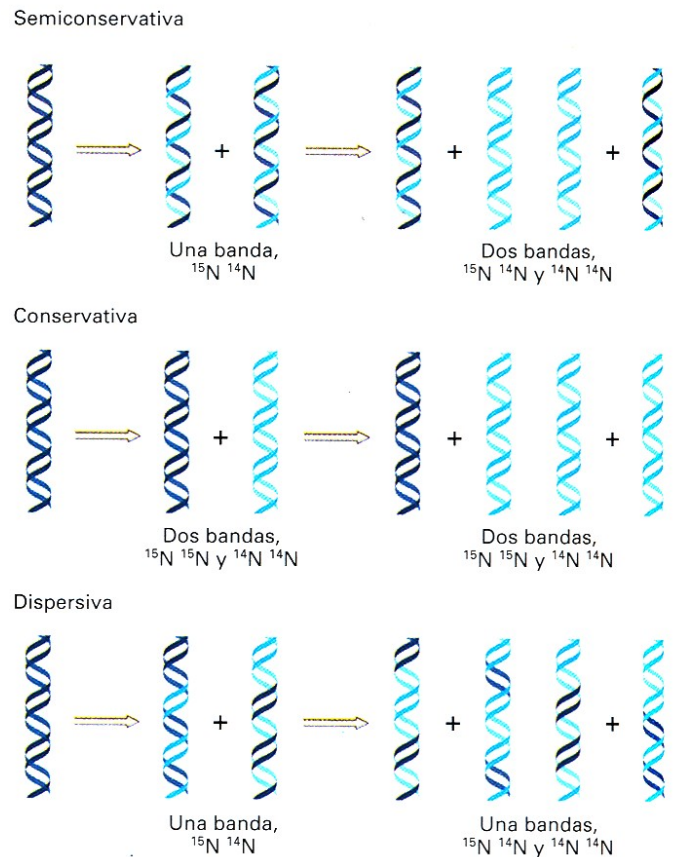
isótopo radiactivo del hidrógeno llamado *tritio*. Dejó que las células realizaran la mitosis en esta solución, de manera que la timidina-(<sup>3</sup>H) pudiera incorporarse al DNA. Lavó entonces las puntas de raíz y las trasladó a una solución que contenía timidina no radiactiva. La adición de colchicina a esta preparación inhibe la formación del huso acromático, de manera que los cromosomas metafásicos no se separan y las cromátidas hermanas permanecen unidas entre sí por el centrómero.

La localización celular del <sup>3</sup>H puede hacerse mediante **autorradiografía**. Al descomponerse, el <sup>3</sup>H emite una partícula beta (un electrón con energía). Si se coloca una lámina de emulsión fotográfica sobre una célula que contiene <sup>3</sup>H, se produce una reacción química allí donde una partícula beta choca con la emulsión. Ésta puede revelarse entonces como una fotografía, de forma que las emisiones de las partículas beta aparecen como granos o manchas negras. Además, la célula puede teñirse para hacer visibles sus estructuras e identificar la fuente de la radiactividad. La autorradiografía es un método en el que, en efecto, estructuras celulares radiactivas «se fotografían a sí mismas».

La Figura 8-14 muestra los resultados observados cuando se añade la colchicina durante la división en timidina-(<sup>3</sup>H) o durante la división mitótica siguiente. Estos resultados pueden inter-



**Figura 8-12.** Centrifugación de DNA en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los cultivos mantenidos durante muchas generaciones en medio con <sup>15</sup>N ó <sup>14</sup>N permiten establecer los controles de posición de las bandas de DNA pesado y ligero, respectivamente. Cuando células cultivadas en <sup>15</sup>N se transfieren a medio con <sup>14</sup>N, la primera generación produce una banda de DNA intermedia, y la segunda generación produce dos bandas, una intermedia y otra ligera.



**Figura 8-13.** Sólo el modelo semiconservativo de replicación del DNA predice resultados como los de la Figura 8-12: una banda intermedia en la primera generación y una intermedia y otra ligera en la segunda generación. (Véase explicación de los colores en la Fig. 8-11.) Recuerde que tras el crecimiento en <sup>15</sup>N, las células se pasaron a <sup>14</sup>N.

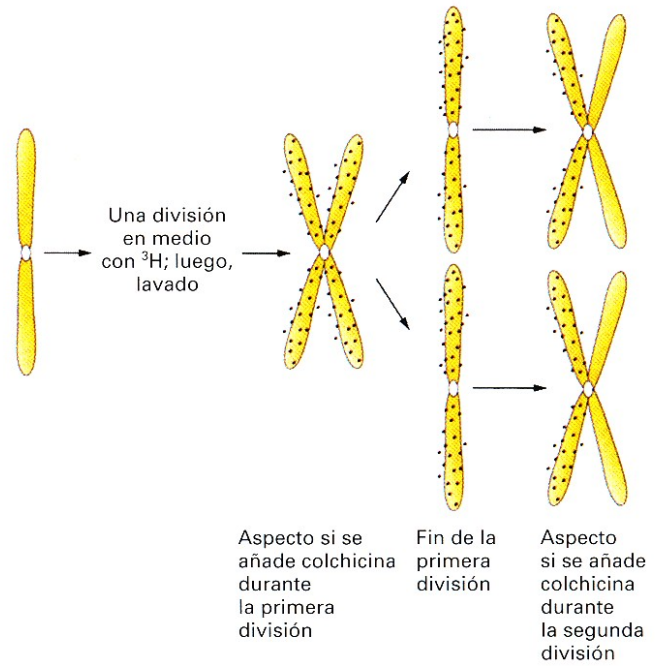
pretarse representando cada cromátida como una molécula única de DNA que se replica de forma semiconservativa (Fig. 8-15).

**Cromosomas en arlequín**

Usando una técnica de tinción más moderna, es posible visualizar la replicación semiconservativa de los cromosomas en mitosis sin necesidad de autorradiografía. En este método, se deja que los cromosomas sufran dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR). El patrón del marcado con BUdR, que aparece en la Figura 8-16a, es el recíproco del de la Figura 8-15, porque se emplea BUdR en las dos replicaciones, en vez de ser sustituida por timina normal durante la segunda replicación, como en el procedimiento de la autorradiografía. Entonces, se tiñen los cromosomas con Giemsa y con un colorante fluorescente; este método distingue entre las cromátidas híbridas, con una cadena que contiene BUdR y otra cadena original (teñidas de oscuro), y las cromátidas cuyas dos cadenas contienen BUdR (de color claro), generando los llamados **cromosomas en arlequín** (Fig. 8-16b). (Observe, de paso, que los cromosomas en arlequín son particularmente adecuados para detectar intercambios entre cromátidas hermanas en la mitosis; en la Figura 8-16b se ven dos ejemplos). Empleando técnicas similares, Taylor demostró que la replicación cromosómica durante la meiosis es también semiconservativa.

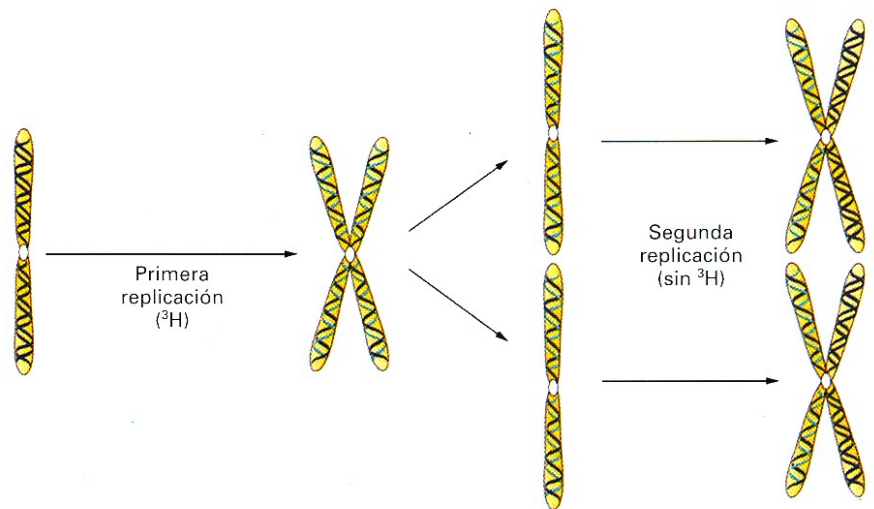
**La estructura del cromosoma**

Las Figuras 8-14 y 8-15 traen a colación una de las grandes cuestiones genéticas no resueltas todavía: un cromosoma eucariótico ¿es esencialmente una única molécula de DNA envuelta por una matriz de proteína? Dos hechos apoyan contundentemente que, en efecto, así es. En primer lugar, si hubiera muchas moléculas de DNA en el cromosoma (ya sea dispuestas unas al lado de otras, extremos con extremos, u orientadas al azar), sería casi imposible que los cromosomas se replicaran de forma semiconservativa (yendo todo el material marcado a una cromátida, según los resultados de Taylor). Estudios con cromosomas aislados y largas moléculas de DNA apoyan la idea de que cada cro-



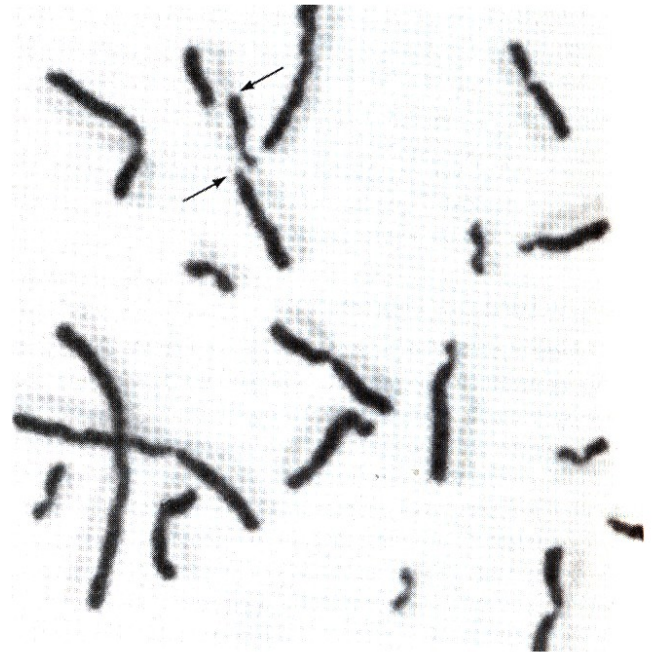
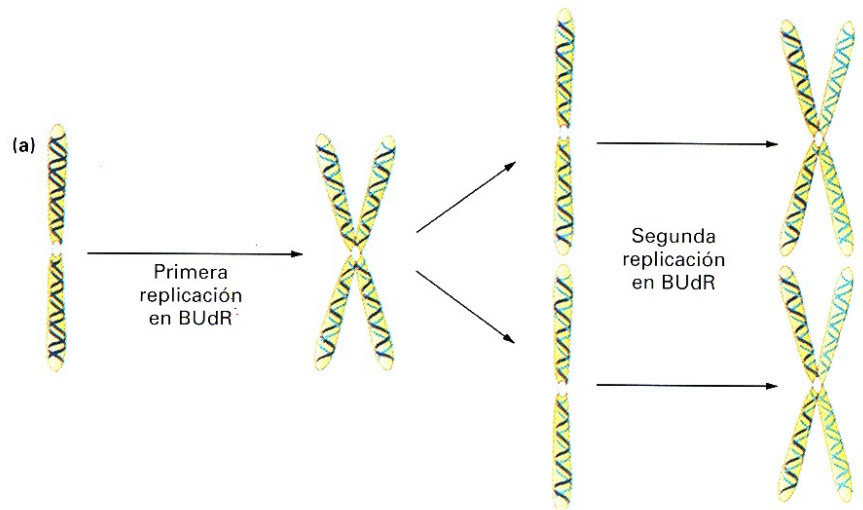
**Figura 8-14.** Esquema de la autorradiografía de cromosomas de células cultivadas durante un ciclo de división en presencia del isótopo radiactivo del hidrógeno <sup>3</sup>H (tritio) y cultivadas después en un medio no radiactivo durante una segunda división mitótica. Cada punto representa la huella dejada por una partícula de radiactividad.

mátida es una molécula única de DNA. El segundo hecho que apoya la hipótesis de una única molécula es que el DNA y los genes se comportan como si estuvieran unidos extremo con extremo en una única ristra o cadena, que llamamos un *grupo de ligamiento*. Todos los datos de ligamiento (Cap. 5) nos dicen que no necesitamos más que una única serie lineal de genes por cada cromosoma para explicar los fenómenos genéticos. Como vimos en el Capítulo 3, se ha demostrado de forma convincente que un cromosoma o cromátida contiene en realidad una sola molécula de DNA.



**Figura 8-15.** Interpretación de la Figura 8-14 al nivel del DNA. Las líneas en azul claro representan cadenas radiactivas. En la segunda replicación (que tiene lugar en una solución no tritiada) tanto la cadena hecha de <sup>3</sup>H como la cadena no tritiada actúan de molde para la incorporación de nucleótidos no radiactivos, generándose una cromátida híbrida y otra no tritiada.

**Figura 8-16.** (a) Esquema de la generación de cromosomas en arlequín. El método consiste en dejar que los cromosomas pasen dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR), que sustituye a la timidina en el DNA sintetizado de nuevo. Al teñir entonces los cromosomas con un colorante fluorescente y con Giemsa, se produce el aspecto de la figura. (Las líneas de color azul claro representan las cadenas que han incorporado BUdR). (b) Fotografía de cromosomas en arlequín de células de ovario de hámster chino (CHO). Las cromátidas con dos cadenas que contienen BUdR aparecen más claras en la fotografía, mientras que aquellas con una cadena original y otra hecha de BUdR aparecen más oscuras. En la parte superior (flechas), aparece un cromosoma que ha sufrido dos intercambios entre cromátidas hermanas. (Fotografía cortesía de Sheldon Wolf y Judy Bodycote.)



(b)

### La horquilla de replicación

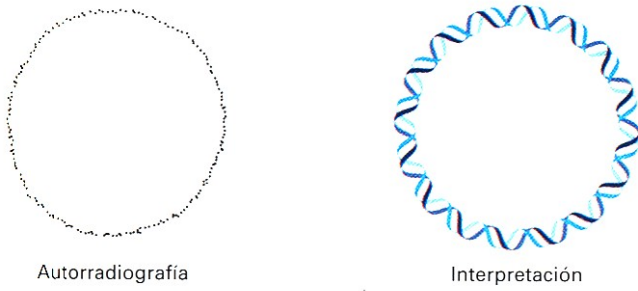
Una predicción del modelo de replicación del DNA de Watson y Crick es que, cuando está siendo replicada, en la molécula de DNA debe encontrarse una **horquilla** de replicación. John Cairns, en 1963, puso a prueba esta predicción dejando que el DNA en replicación de células bacterianas incorporara timidina tritiada. Teóricamente, cada molécula hija sintetizada de nuevo debe contener entonces una cadena radiactiva («caliente») y otra no radiactiva («fría»). Tras variar el período y el número de ciclos de replicación en medio «caliente», Cairns extrajo el DNA de las células, lo puso en un portaobjetos y lo autorradiografió para observarlo luego al microscopio óptico. Tras un ciclo de replicación en timidina- $^3\text{H}$ , aparecieron anillos de puntos en la autorradiografía. Cairns interpretó los anillos como se muestra en la Figura 8-17. En ella resulta aparente también que el cromosoma

bacteriano es circular —hecho que se deducía también de los datos genéticos descritos anteriormente (Cap. 7)—.

Durante el segundo ciclo de replicación, se vieron realmente las horquillas predichas por el modelo. Además, la densidad de granos en los tres segmentos era tal que podía interpretarse como aparece en la Figura 8-18. Cairns observó toda clase de tamaños en estos patrones autorradiográficos en forma de luna, en correspondencia con el movimiento progresivo de la cremallera de replicación, u horquilla, alrededor del anillo. Formas como las que aparecen en la Figura 8-18 se llaman **formas theta** ( $\theta$ ).

### Replicación mediante el círculo rodante

La replicación de ciertas moléculas circulares, como las de los plásmidos y ciertos virus, se produce por el mecanismo repre-

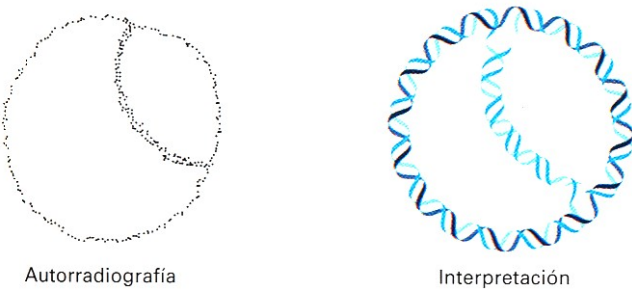


**Figura 8-17.** *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano después de un ciclo de replicación en timidina tritiada. Según el modelo de replicación semiconservativa, una de las dos cadenas debe ser radiactiva. *Derecha:* Interpretación de la autorradiografía. La línea azul claro representa la cadena tritiada.

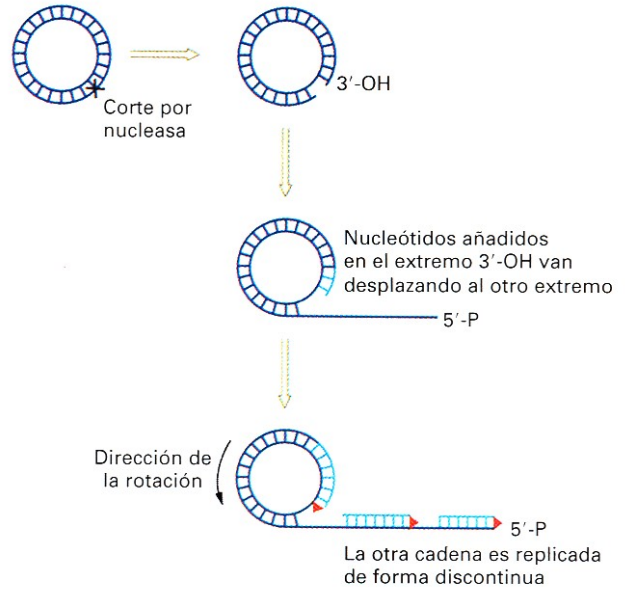
sentado en la Figura 8-19. Aquí, el corte mediante una nucleasa genera un extremo 3'-OH libre al que se van añadiendo los nucleótidos. Como se ve en la Figura 8-19, conforme progresa la síntesis, el otro extremo de la cadena es desplazado del círculo de doble cadena y luego copiado. Podemos imaginar este desplazamiento de la cadena como resultado de que el círculo fuera rodando. Como no hay un punto final de la replicación, la síntesis continúa a menudo más allá de una sola copia completa del círculo, generándose concadenados (serie de cadenas enlazadas), de tamaño equivalente a varios anillos completos, que serán procesados después por recombinación para generar círculos de tamaño normal.

### El mecanismo de la replicación del DNA

Watson y Crick razonaron, en primer lugar, que el apareamiento de bases complementarias constituye la base de la fidelidad de la replicación del DNA; es decir, que cada base de la cadena molde determina la base complementaria de la nueva cadena. Sin embargo, actualmente sabemos que el proceso de replicación del DNA es muy complejo y que necesita de la participación de



**Figura 8-18.** *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano durante el segundo ciclo de replicación en timidina tritiada. En esta estructura theta ( $\theta$ ), la hélice doble recién replicada que cruza el círculo podría contener ambas cadenas radiactivas (si la cadena parental fuera la radiactiva). *Derecha:* La doble densidad del trazado radiactivo del autorradiograma parece confirmar la interpretación que se hace aquí. Las hélices de color azul claro representan las cadenas «calientes».

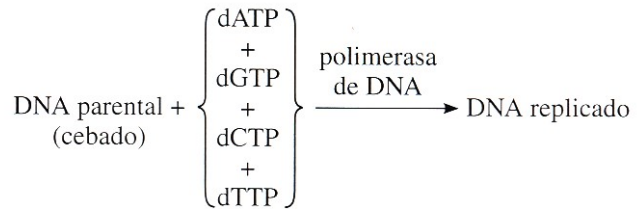


**Figura 8-19.** Replicación mediante el anillo rodante. El DNA sintetizado de nuevo es el de color azul. La cadena desplazada es utilizada para una replicación discontinua, como se describe en el texto. (Según D. L. Hartl y E. W. Jones. *Genetics: Principles and Analysis*, 4.ª ed. Jones and Barlett, 1998.)

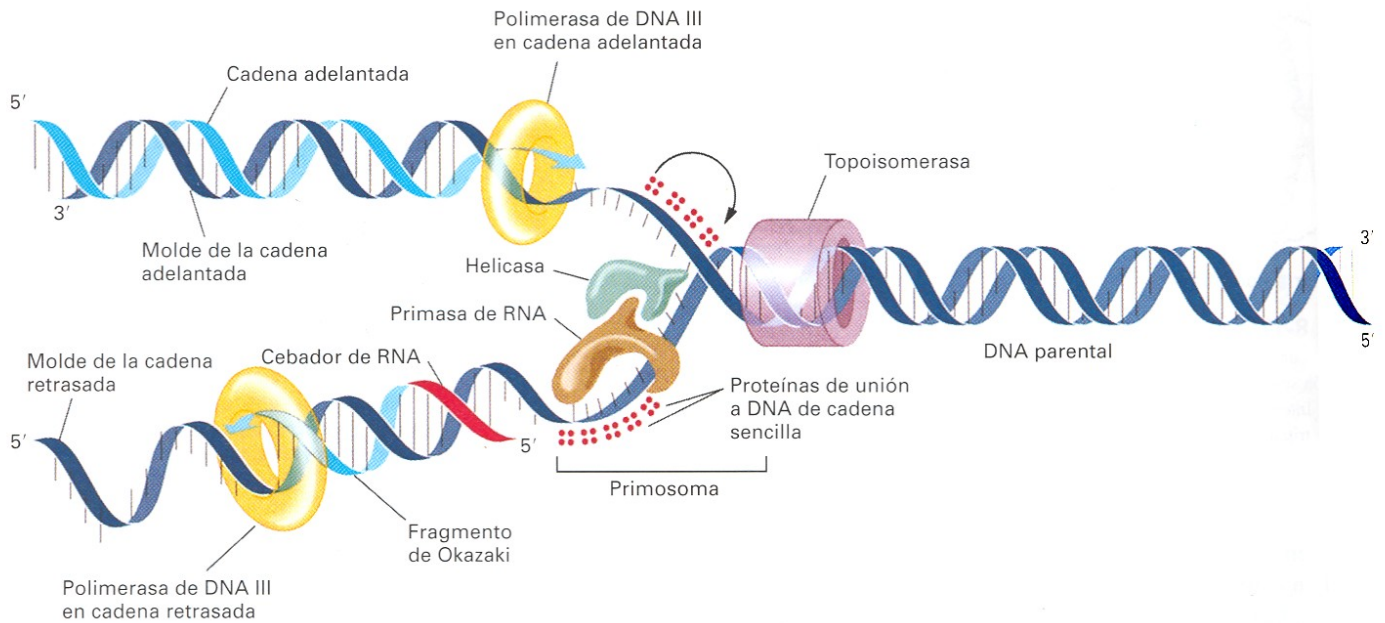
muchos componentes diferentes. Vamos a examinar cada uno de estos componentes y comprobar cómo actúan juntos para proporcionar el esquema actual de la síntesis de DNA en *E. Coli*, el sistema de replicación celular más estudiado. En la sección anterior, se introdujo el concepto de horquilla de replicación. La Figura 8-20 proporciona un esquema detallado del movimiento de la horquilla durante la replicación del DNA.

### Polimerasas de DNA

A finales de la década de 1950, Arthur Kornberg consiguió identificar y purificar la primera polimerasa de DNA, una enzima que cataliza la reacción de replicación:



Esta reacción funciona sólo con la forma trifosfato de los nucleótidos (como el trifosfato de desoxiadenosina, o dATP). Al término de la reacción, la cantidad total de DNA puede ser hasta 20 veces la cantidad de DNA de entrada, de manera que el DNA presente al final debe ser fundamentalmente DNA replicado. La Figura 8-21 ilustra la reacción de elongación de la cadena, o reacción de **polimerización**, catalizada por las polimerasas de DNA. Ahora sabemos que en *E. coli* hay tres polimerasas de DNA.



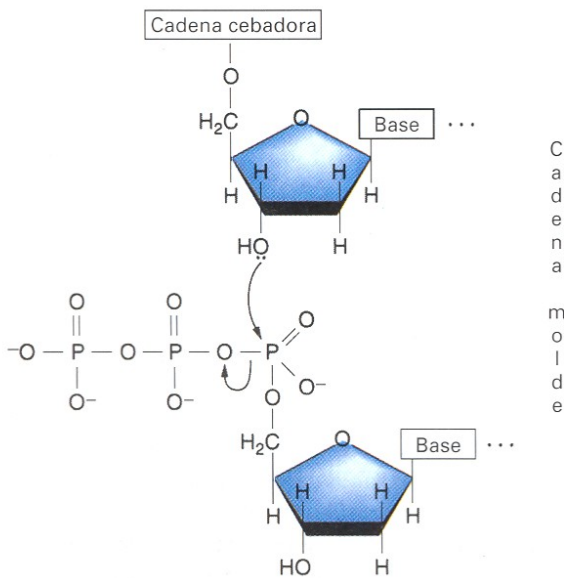
**Figura 8-20.** Horquilla de replicación del DNA.

La primera enzima purificada por Kornberg se denomina **polimerasa de DNA I** o **pol I**. Esta enzima posee tres actividades que parecen localizarse en tres regiones distintas de la molécula:

1. una actividad polimerasa que cataliza la elongación de la cadena en dirección  $5' \rightarrow 3'$ ;
2. una actividad exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  que elimina bases mal apareadas; y

3. una actividad exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  que degrada DNA de doble cadena

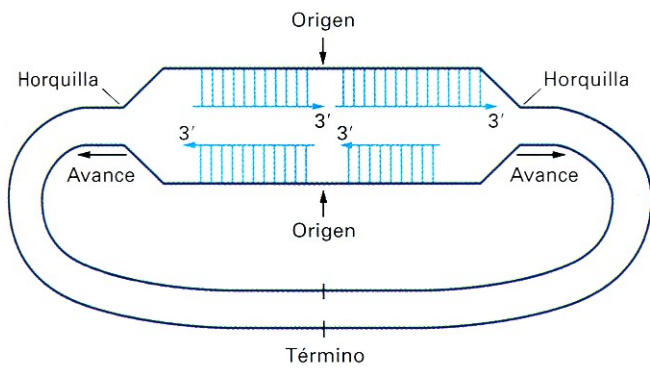
Posteriormente, se identificaron en *E. coli* dos polimerasas adicionales, pol II y pol III. A la enzima pol II no le ha sido asignado un papel concreto, aunque quizás repare daños del DNA. Pol III, junto con pol I, tiene un papel en la replicación del DNA de *E. coli* (Fig. 8-20). El complejo completo, u **holoenzima**, de pol III contiene al menos 20 subunidades polipeptídicas distintas, aunque el «cuerpo central» catalítico está formado sólo por tres subunidades, alfa ( $\alpha$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) y theta ( $\theta$ ). El complejo pol III completará la replicación de una molécula de DNA de cadena sencilla si ya hay presente al menos un tramo pequeño de doble cadena. El pequeño oligonucleótido que forma ese tramo de doble cadena se denomina **cebador**.



**Figura 8-21.** Reacción de elongación de la cadena catalizada por la polimerasa de DNA. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.<sup>a</sup> ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

### Orígenes de replicación procarióticos

En *E. coli*, la replicación se inicia en un punto de **origen** fijo, pero progresa luego **bidireccionalmente** (con horquillas en movimiento a ambos extremos de la zona en replicación), tal como aparece en la Figura 8-22, terminando en un punto denominado **término**. El origen único se llama *oriC* y está situado en el minuto 83 del mapa genético. Tiene una longitud de 245 pb y contiene varios elementos, como se muestra en la Figura 8-23. Primero hay una serie de secuencias casi idénticas de 13 pb en tándem, una a continuación de otra. Hay también una serie de sitios de unión de una proteína, la proteína DnaA. Un paso inicial de la síntesis de DNA es el desenrollamiento del DNA en el origen, en respuesta a la unión de la proteína DnaA. El resultado de la replicación bidireccional puede verse en la Figura 8-24, que ofrece una visión más completa de la replicación del DNA.

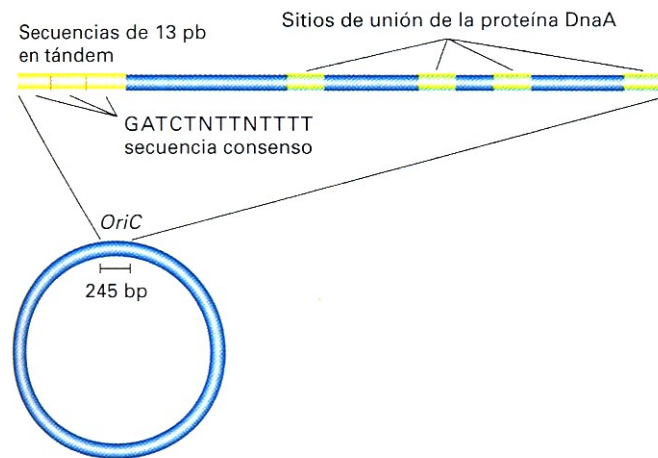


**Figura 8-22.** Diagrama de la replicación del DNA avanzando en las dos direcciones a partir del origen. (Tomado de A. Kornberg, *DNA synthesis*, Copyright © 1974, de W.H. Freeman and Company.)

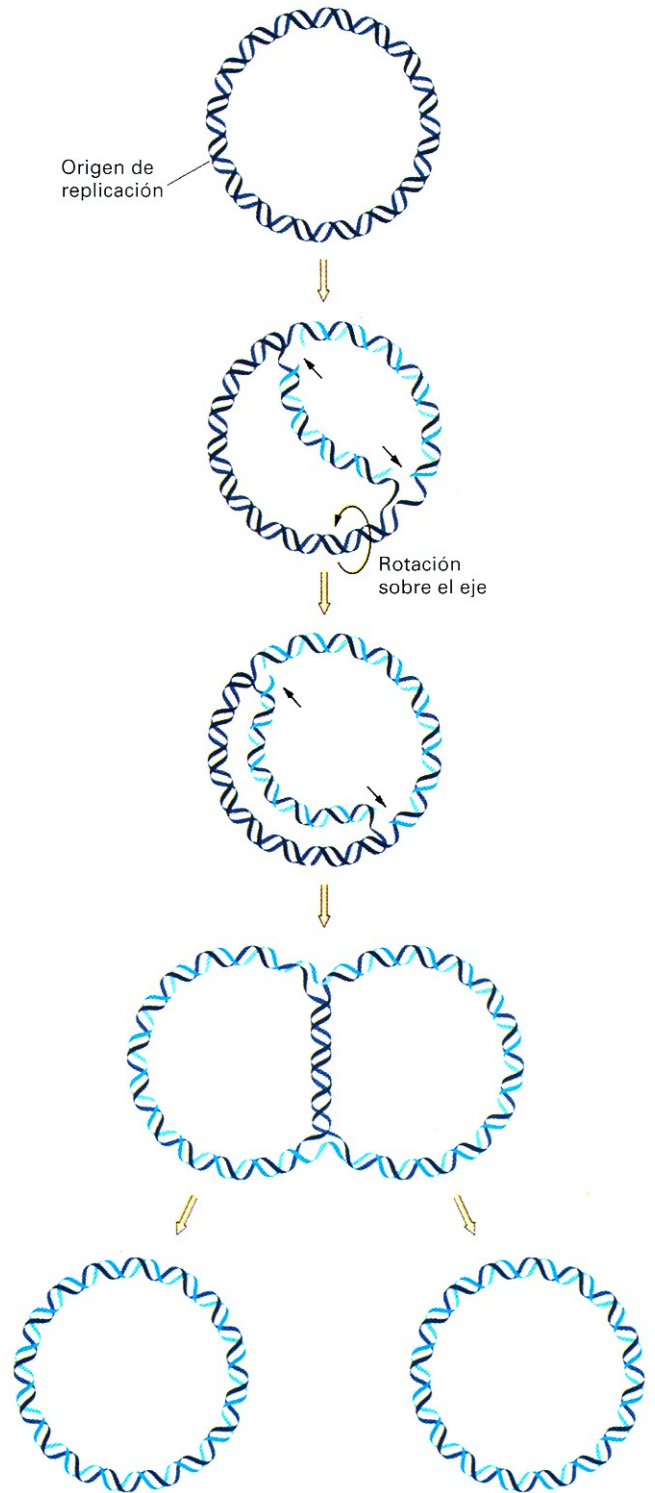
**Orígenes de replicación eucarióticos**

Bacterias como *E. coli* emplean normalmente 40 minutos en cada ciclo de replicación-división celular, pero los en eucariotas, la duración del ciclo varía desde las 1.4 horas de la levadura hasta las 24 horas de las células animales en cultivo, pudiendo durar de 100 a 200 horas en algunos casos. Los eucariotas tienen que resolver el problema de coordinar la replicación de más de un cromosoma, debiendo además replicar la compleja estructura del propio cromosoma (véase la descripción de la estructura cromosómica del Cap. 3).

En los eucariotas, la replicación progresa a partir de múltiples puntos u orígenes. Ello puede demostrarse mediante un experimento en el que exponemos brevemente una célula eucariótica a timidina-<sup>3</sup>H, paso denominado **pulso**, y añadimos luego timidina «fría» (no marcada) en exceso, paso denominado **caza**; se extrae entonces el DNA y se hace una autorradiografía. La Figura 8-25 muestra el resultado del experimento, con lo que parecen ser distintos tramos de la molécula de DNA replicándose



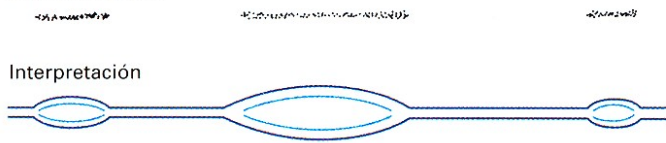
**Figura 8-23.** El origen de replicación de *E. coli*, *oriC*, tiene una longitud de 245 pb. Contiene tres secuencias casi idénticas de 13 nucleótidos, dispuestas en tándem, y cuatro sitios de unión de la proteína DnaA.



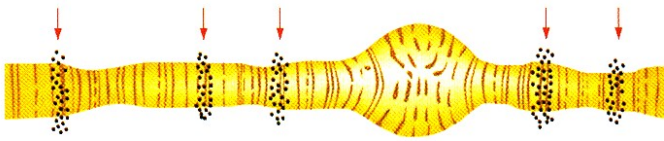
**Figura 8-24.** Replicación bidireccional de una molécula de DNA circular.

simultáneamente. La replicación parece comenzar en diferentes sitios de estos cromosomas eucarióticos. Un experimento similar de pulso, caza y autorradiografía de la replicación de los cromosomas politénicos (gigantes) de *Drosophila* revela muchas regiones en replicación dentro de un mismo brazo cro-

## Autorradiografía



**Figura 8-25.** Una forma de replicación del DNA, revelada por autorradiografía. Una célula es expuesta brevemente a timidina  $-(^3\text{H})$  (pulso) y transferida luego a timidina no radioactiva (fría) en exceso (caza). Se extiende el DNA sobre un portaobjeto y se autorradiografía. Según la interpretación que se muestra, habría varios puntos de replicación en una misma hélice doble de DNA.



**Figura 8-26.** Forma de replicación de un cromosoma de *Drosophila* revelada por autorradiografía. En un mismo cromosoma se ven varios puntos de replicación, señalados con flechas.

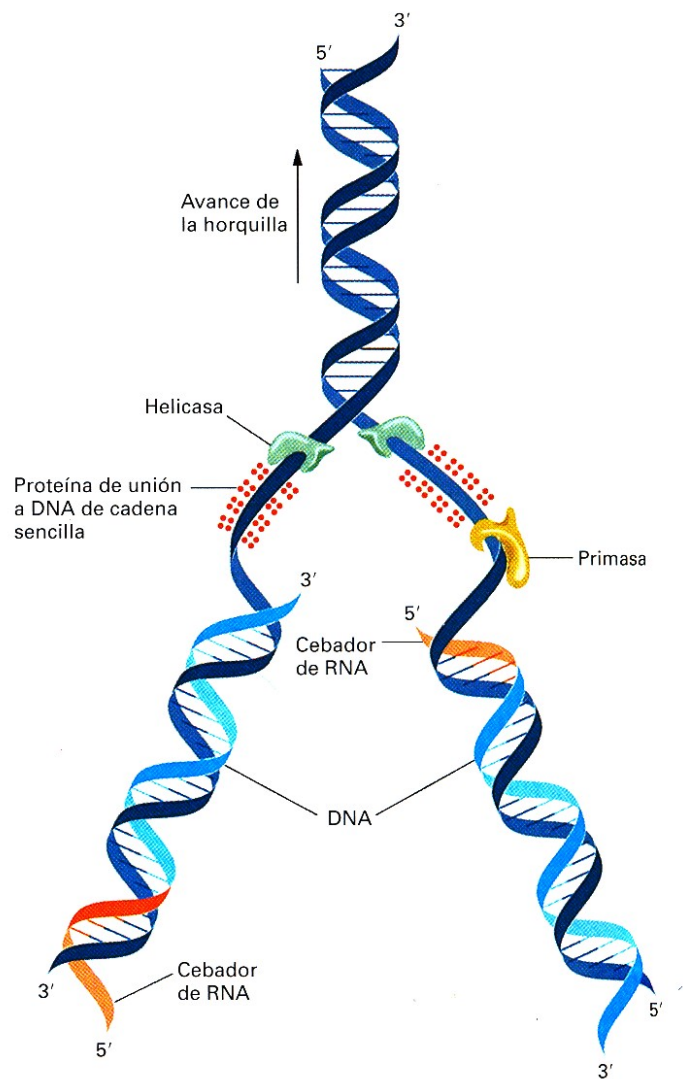
mosómico (Fig. 8-26). Así y todo, no hay una prueba contundente de que estas regiones correspondan en realidad a diferentes puntos de iniciación de una única molécula de DNA. Sin embargo, experimentos realizados con la levadura indican la existencia de unos 400 orígenes de replicación distribuidos a lo largo de los 17 cromosomas de ese organismo, y en humanos se estima que existen más de 10 000 horquillas de replicación.

### Iniciación de la síntesis de DNA

Las polimerasas de DNA pueden alargar una cadena, pero no iniciar su síntesis. Por tanto, como ya se ha comentado, la síntesis de DNA debe iniciarse a partir de un cebador, un corto oligonucleótido que genera un tramo de DNA de dos cadenas. La acción del cebador en la replicación del DNA puede verse en la Figura 8-27 (véase también la Fig. 8-20). Los cebadores, de RNA, son sintetizados bien por la polimerasa de RNA o bien por una enzima denominada **primasa**. Ésta sintetiza un fragmento corto de RNA (de unos 30 pb de largo) complementario de un tramo específico del cromosoma. La cadena es alargada luego como DNA por la polimerasa de DNA. La primasa de *E. coli* forma un complejo con el DNA molde y otras proteínas adicionales, como DnaB, DnaT, Pri A, Pri B y Pri C. El complejo completo recibe el nombre de **primosoma** (véase Fig. 8-20).

### Las cadenas adelantada y retrasada

Las polimerasas de DNA sintetizan cadenas nuevas sólo en dirección  $5' \rightarrow 3'$  y, por tanto, dado el antiparalelismo de la molé-



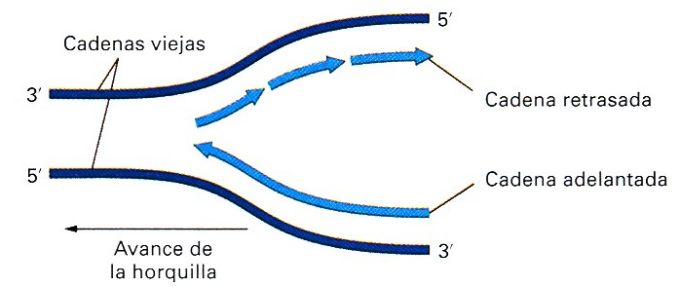
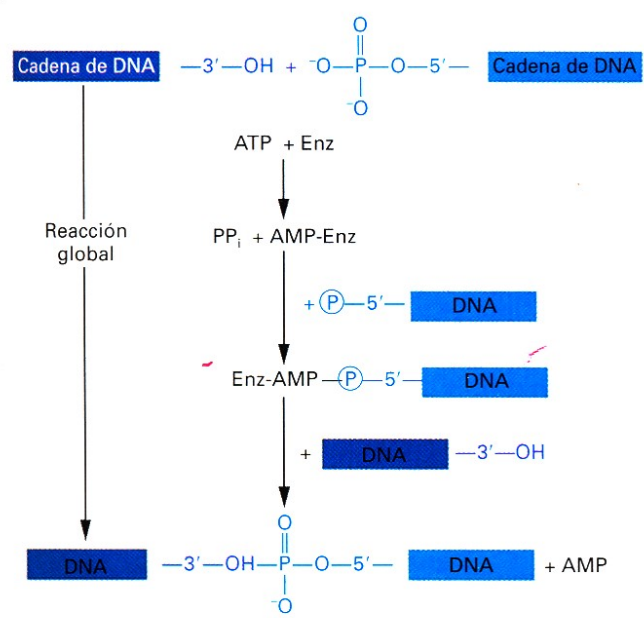
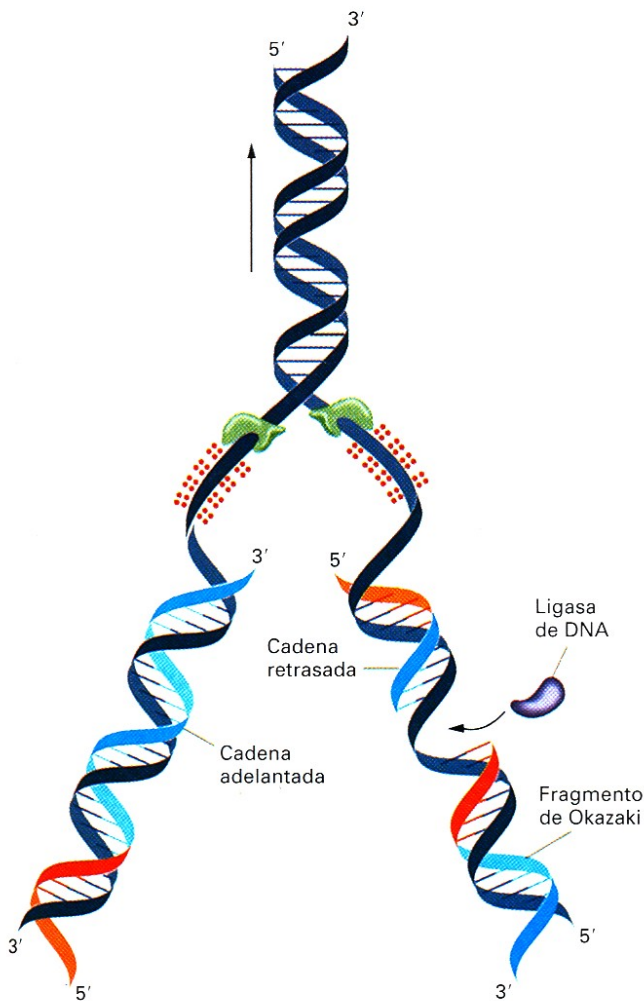
**Figura 8-27.** Iniciación de la síntesis de DNA mediante un cebador de RNA

cula de DNA, se desplazan *sobre la cadena molde* en la dirección  $3' \rightarrow 5'$  de ésta. Como consecuencia de esta polaridad, mientras una de las cadenas nuevas, la **cadena adelantada**, se fabrica de forma continua, la otra, la **cadena retrasada**, debe fabricarse de forma discontinua, a pequeños trozos, como puede observarse en la Figura 8-28 (véase también la Fig. 8-20). La adición de nucleótidos a lo largo de la cadena molde de la cadena retrasada debe producirse hacia el extremo  $5'$  de dicha cadena molde (porque la replicación *siempre* progresa a lo largo del molde en la dirección  $3' \rightarrow 5'$  de éste, de manera que la cadena nueva crezca en dirección  $5' \rightarrow 3'$ ). Así pues, la nueva cadena debe crecer en dirección opuesta al movimiento de la horquilla de replicación. Conforme el movimiento de la horquilla expone una nueva sección del molde de la cadena retrasada, se inicia un nuevo tramo de cadena retrasada que crece alejándose de la horquilla hasta que se para en el fragmento anterior. En *E. coli*, la pol III lleva a cabo la mayor parte de la síntesis de ambas cadenas del DNA, y la pol I rellena los huecos dejados en la cadena

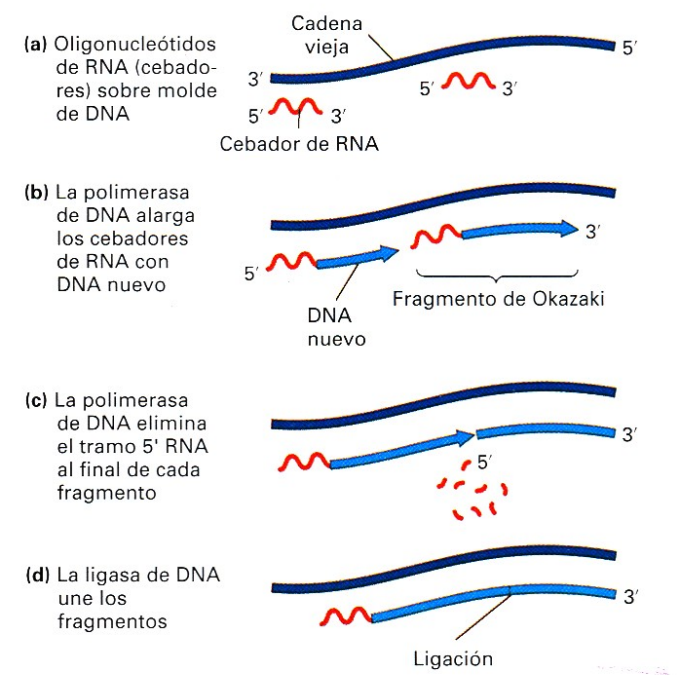


**Figura 8-28.** La síntesis de DNA se produce de forma continua en la cadena adelantada y discontinua en la cadena retrasada.

retrasada, que son luego sellados por la enzima **ligasa de DNA**. La ligasa de DNA une trozos sueltos de DNA catalizando la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' fosfato de un nucleótido emparejado a su complementario y un grupo 3' OH adyacente, como se muestra en la Figura 8-29. Es la única enzima capaz de sellar cadenas de DNA. La Figura 8-30 muestra la síntesis de la cadena retrasada y la reparación de huecos en detalle. Los cebadores necesarios para la síntesis discontinua de la cadena retrasada son fabricados por la primasa (paso «a»). Luego son alargados por la polimerasa de DNA (paso «b») apareciendo fragmentos de DNA que fueron detectados por primera vez por Reiji Okazaki y se denominan por ello **fragmentos de Okazaki**. La actividad exonucleasa 5' → 3' de la enzima pol I elimina los cebadores (paso «c»), y la misma enzima rellena con

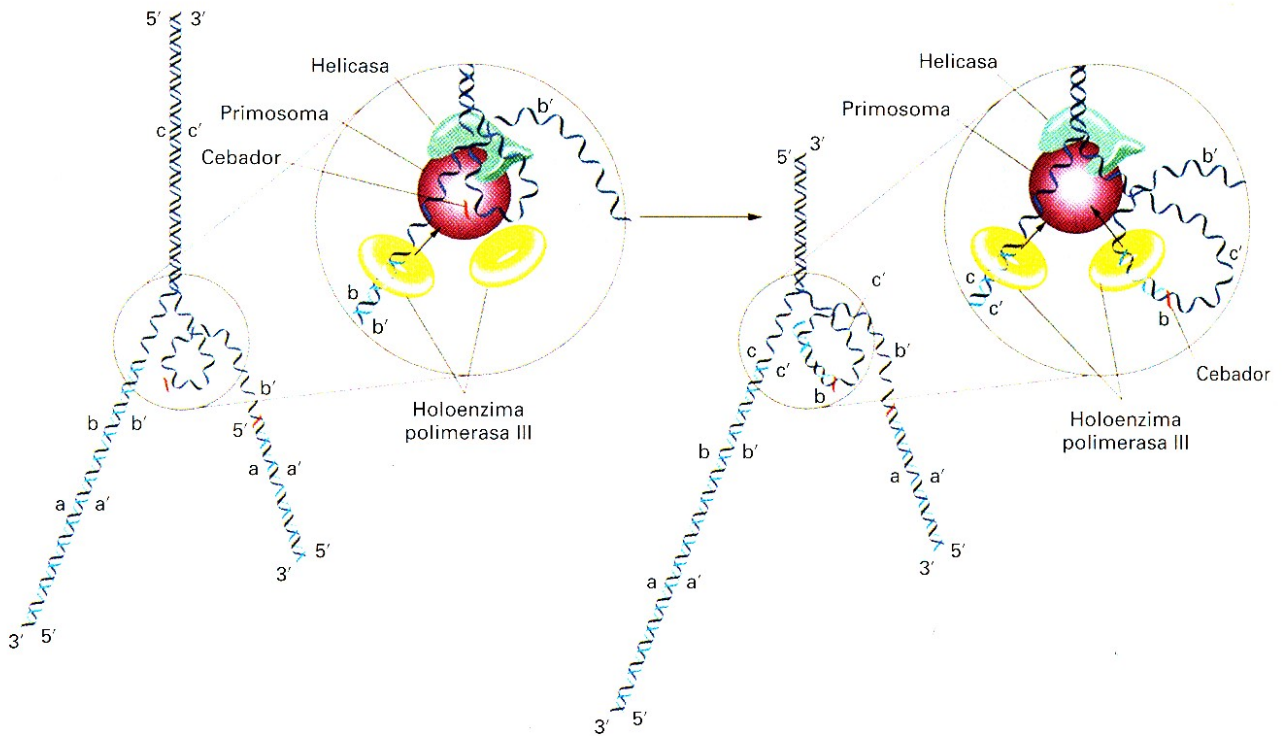


**Síntesis de la cadena retrasada**



**Figura 8-30.** Esquema general de una horquilla de replicación (arriba) y pasos sucesivos de la síntesis de la cadena retrasada. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

**Figura 8-29.** La reacción catalizada por la ligasa de DNA (Enz) une el extremo 3'-OH de un fragmento al extremo 5' fosfato del fragmento adyacente. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

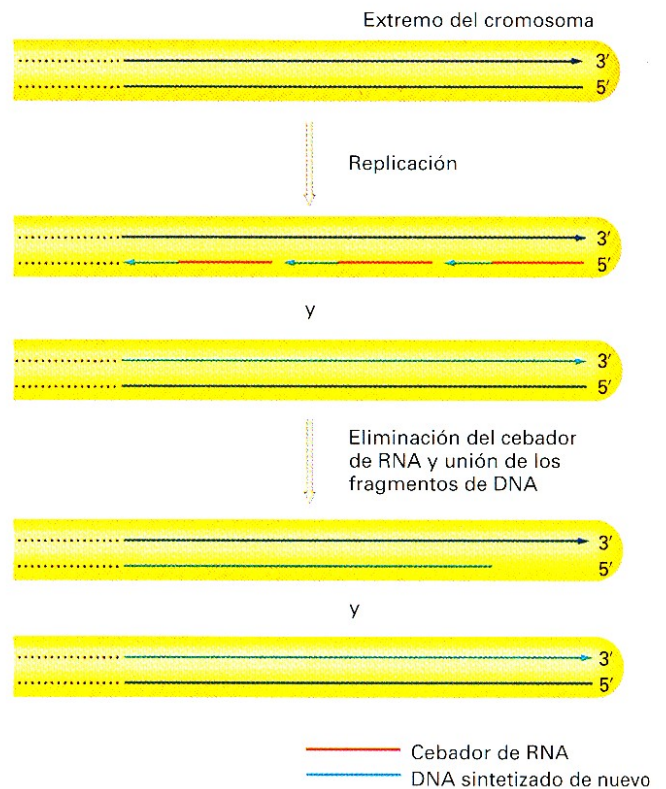


**Figura 8-31.** Un lazo en la cadena molde de la cadena retrasada permite que un dímero de la holoenzima polimerasa III se sitúe en la horquilla de replicación y fabrique las dos cadenas hermanas. (Cortesía de A. Kornberg. Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

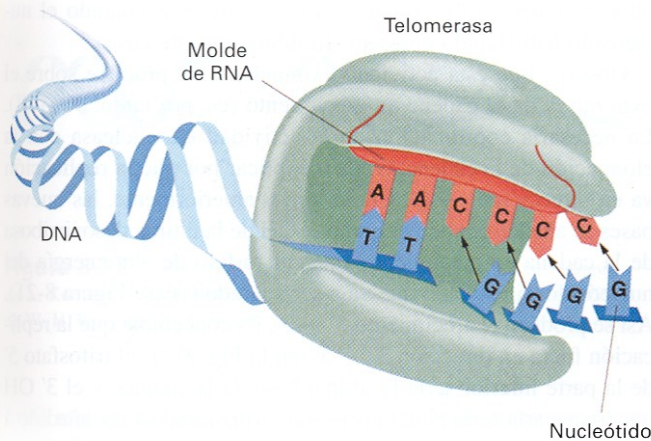
DNA los huecos, que son sellados por la ligasa de DNA (paso «d»). La Figura 8-31 muestra un mecanismo propuesto para permitir que una misma molécula dimérica de la holoenzima participe en la síntesis tanto de la cadena adelantada como de la cadena retrasada. Dicho mecanismo propone la formación en la cadena molde de la cadena retrasada de un lazo que permite a un único dímero de la enzima pol III generar ambas cadenas hermanas. Tras avanzar unos 1000 pares de bases, la enzima pol III soltaría al segmento de doble cadena retrasada, dejando que se forme un nuevo lazo.

### Replicación de los extremos de los cromosomas

Los extremos de los cromosomas crean un problema especial para el proceso de replicación. La Figura 8-32 presenta dicho problema. Considerando a la cadena adelantada, la extensión del polinucleótido durante la replicación puede llegar siempre al extremo sin problemas, ya que viene cebada desde atrás. La cadena retrasada, sin embargo, alcanza un punto en su extremo sobre el que su modo de cebar con RNA no puede actuar, queda un tramo sin polimerizar y se produciría un acortamiento del cromosoma. Para resolver este problema, los extremos de los cromosomas, llamados **telómeros**, contienen repeticiones en tándem de secuencias cortas de DNA. En el ciliado *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia repetida es TTGGGG; en humanos, es TTAGGG. Estas repeticiones no determinan un producto proteico o un RNA, sino que juegan un papel definido en la replicación. Una



**Figura 8-32.** El problema de la replicación de los extremos de los cromosomas. No hay forma de «cebar» el último tramo de la cadena retrasada y el cromosoma se iría acortando.



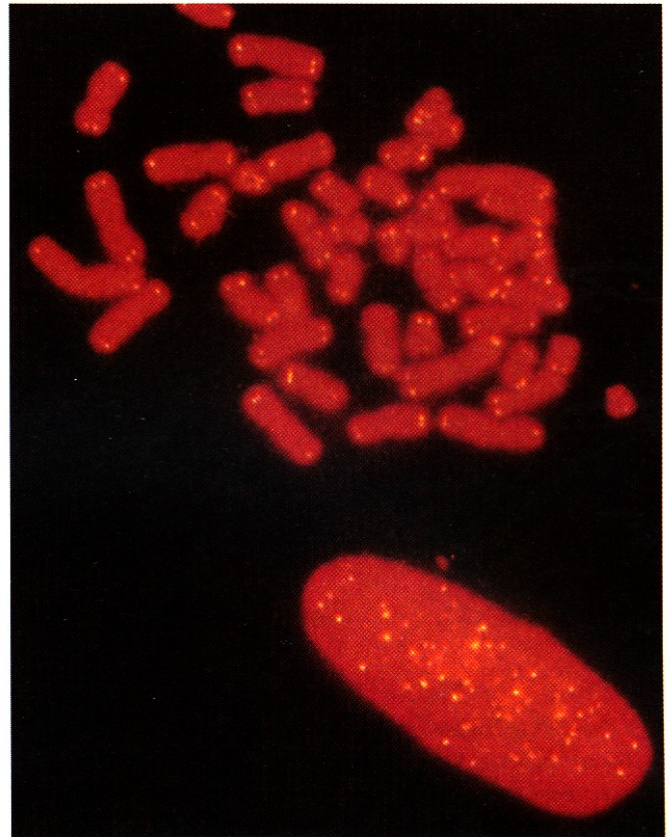
**Figura 8-33.** La telomerasa contiene una pequeña molécula de RNA que actúa como molde para la adición de una secuencia complementaria de DNA al extremo 3' de la hélice doble. En el ciliado *Tetrahymena*, la secuencia de DNA añadida es TTGGGG.

enzima llamada **telomerasa** añade esas secuencias cortas a los extremos de los cromosomas. La proteína telomerasa es un miembro de la clase de enzimas denominadas transcriptasas inversas, empleadas en situaciones especiales en las que se sintetiza DNA a partir de RNA. La telomerasa lleva una pequeña molécula de RNA, parte de la cual actúa como molde en la polimerización de la unidad telomérica repetida que se añade al extremo 3'. En *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia en el RNA es 3'-AACCCC-5', que actúa como molde para la unidad telomérica repetida 5'-TTGGGG-3' (Fig. 8-33). El DNA adicional puede actuar entonces como molde para la síntesis de la cadena retrasada. Este proceso contrarresta la tendencia al acortamiento durante la replicación normal. La Figura 8-34 muestra las posiciones del DNA telomérico, reveladas mediante hibridación *in situ*. En varios tejidos somáticos humanos se ha demostrado acortamiento gradual con la edad de la longitud de los telómeros. Además, fibroblastos humanos en cultivo muestran un progresivo acortamiento telomérico hasta que finalmente mueren. Tales observaciones han llevado a la teoría telomérica del envejecimiento, cuya validez está siendo ahora sometida a comprobación.

### Helicasas y topoisomerasas

Las **helicasas** son enzimas que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas en la doble hélice a las dos cadenas del DNA. La reacción requiere hidrólisis de ATP. Entre las helicasas de *E. coli* se encuentran las proteínas DnaB y Rep. La proteína Rep parece ayudar a desenrollar la hélice por delante de la polimerasa (véase la Fig. 8-20). El DNA desenrollado es estabilizado por la proteína SSB (del inglés, *single-stranded binding*) que se une a DNA de cadena sencilla e impide la regeneración de la doble hélice.

La acción de las helicasas durante la replicación genera retorcimientos del DNA circular que deben ser eliminados para que continúe la replicación. El DNA circular puede sufrir enrollamientos y retorcimientos, como los que pueden introducirse en



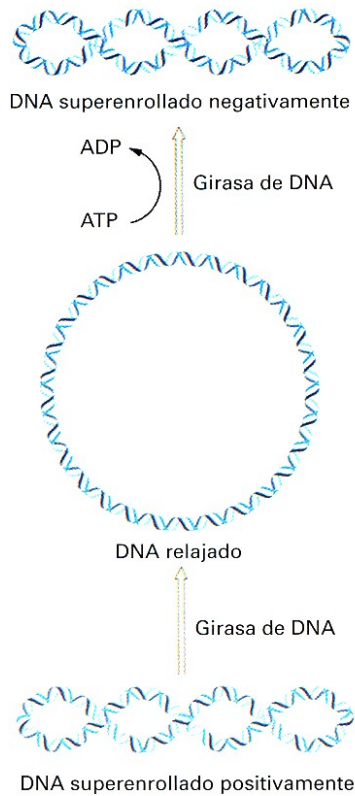
**Figura 8-34.** Cromosomas híbridos *in situ* con una sonda de DNA específica de telómeros que ha sido acoplada a un compuesto que, al microscopio, emite fluorescencia en amarillo. La sonda se une a ambos extremos de cada cromátida hermana. En la parte inferior de la fotografía aparece un núcleo intacto. (Robert Moyzis.)

una gomilla. Los **superenrollamientos** son generados y eliminados por enzimas denominadas **topoisomerasas**, una de las cuales es la llamada girasa de DNA (Fig. 8-35). Las topoisomerasas pueden también generar (*concadenar*) o eliminar (*desconcadenar*) nudos o enlaces en una cadena. Hay dos tipos básicos de topoisomerasas. Las enzimas de tipo I provocan una incisión en una de las cadenas del DNA de doble cadena. Las enzimas de tipo II provocan la rotura de ambas cadenas. En *E. coli*, las enzimas topo I y topo III son ejemplos de enzimas de tipo I, mientras que la girasa es una enzima de tipo II.

El desenrollamiento de las cadenas de DNA para abrir la horquilla de replicación genera retorcimientos extras en otras regiones, y el superenrollamiento relaja la tensión de esos retorcimientos (Fig. 8-36). La girasa es necesaria para eliminar superenrollamientos positivos generados por delante de la horquilla de replicación.

### Corrección mediante exonucleasa

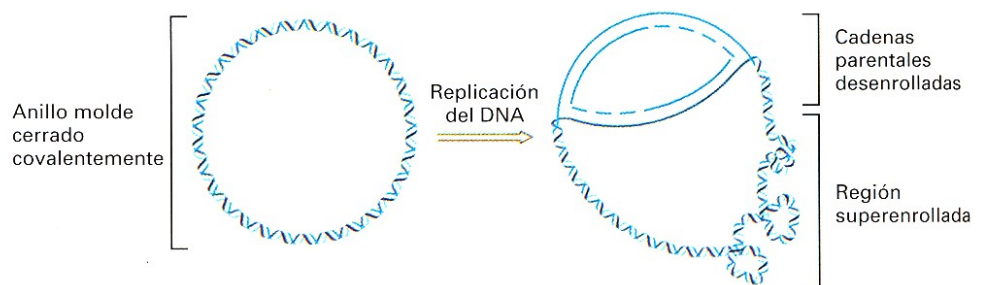
Tanto la polimerasa de DNA I como la polimerasa de DNA III poseen una actividad exonucleasa 3' → 5' que funciona como «lectora» y «correctora de pruebas», detectando apareamientos incorrectos que se hayan introducido erróneamente durante la



**Figura 8-35.** Superenrollamiento catalizado por la girasa de DNA. La replicación del DNA genera superenrollamientos «positivos», que aparecen en la parte inferior del dibujo, debidos a la rotación rápida del DNA en la horquilla de replicación. La girasa abre y cierra enlaces fosfodiésteres, relajando así el superenrollamiento, tal como aparece aquí (DNA relajado). La girasa también puede generar superenrollamientos en la dirección contraria, llamados superenrollamientos *negativos*; estos últimos facilitan la disociación de la doble hélice. (Según L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed., Copyright © 1995, de Lubert Stryer.)

polimerización y eliminándolos. La actividad correctora de la enzima pol III se localiza en la subunidad  $\epsilon$ , que debe estar unida a la subunidad  $\alpha$  para realizar su función correctora con máxima eficacia (Fig. 8-37). Las estirpes que carecen de una subunidad  $\epsilon$  activa muestran una mayor tasa de mutación (véase Cap. 16). La Figura 8-38 muestra la eliminación de un residuo de citosina que ha sido emparejado erróneamente con una adenina. Como puede observarse, la hidrólisis se produce en el extremo 5' de la base mal apareada; la eliminación de una base incorrecta deja el grupo 3'-OH de la base precedente, sobre el que puede ahora conti-

**Figura 8-36.** Acción giratoria de la topoisomerasa durante la replicación. Por delante de la horquilla de replicación se van acumulando retorcimientos (superenrollamientos positivos) conforme se van separando las dos cadenas. Para eliminarlos, se necesita una topoisomerasa que actúa como un girador (a modo de cojinete), que permite una replicación continuada. (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)



nuar libremente el crecimiento de la cadena, aceptando el nucleósido trifosfatado correcto (timidina, en este caso).

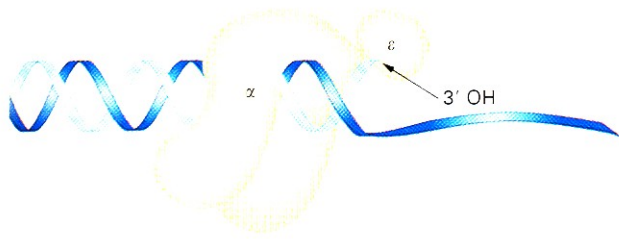
Observe que esta actividad exonucleasa se produce sobre el extremo 3' de la cadena en crecimiento (es, por tanto, 3' → 5'). La necesaria coordinación de la actividad exonucleasa con la elongación de la cadena ayuda a explicar por qué la replicación va en dirección 5' → 3'. Como vimos anteriormente, las nuevas bases se añaden cuando el grupo 3' OH de la última desoxirribosa de la cadena en crecimiento ataca al fosfato de alta energía del nucleósido trifosfatado que va a ser añadido (véase Figura 8-21). Así se produce el crecimiento 5' → 3'. Es concebible que la replicación fuera en dirección 3' → 5' (en la Fig. 8-21, el trifosfato 5' de la parte inferior sería la última base de la cadena, y el 3' OH que lo atacaría sería el del nucleósido trifosfatado a ser añadido a la cadena). Sin embargo, si la replicación fuera en esta dirección, las escisiones de la exonucleasa deberían producirse sobre el extremo 5' de la cadena. Cuando fuera eliminada una base mal apareada, quedaría un grupo 5' OH al final de la cadena en crecimiento. El grupo 3' OH del nuevo nucleósido trifosfatado que debiera incorporarse ahora se encontraría con ese grupo 5' OH, en vez de con el 5' trifosfato de alta energía necesario para la formación del enlace. Éste no se formaría y la elongación de la cadena se pararía. Por eso la replicación no va en dirección 3' → 5'.

### Polimerasas de DNA eucarióticas

En eucariotas superiores se encuentran al menos cinco polimerasas de DNA,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Las polimerasas del núcleo  $\alpha$  y  $\delta$  ejercen papeles similares a la pol I de *E. coli*. La polimerasa  $\beta$  actúa en la reparación del DNA y en el relleno de huecos. La polimerasa  $\gamma$  se encuentra en las mitocondrias y parece tomar parte en la replicación del DNA mitocondrial.

### Aplicaciones experimentales de la complementariedad entre secuencias de bases

En 1960, Paul Doty y Julius Marmur observaron que al calentar el DNA a 100 °C se deshacen todos los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas complementarias, y el DNA pasa a ser de cadena sencilla (Fig. 8-39). Si la solución se enfría lentamente, vuelve formarse DNA de cadena doble. Este proceso de **reaso-ciación** ocurre cuando dos cadenas colisionan de tal manera que las secuencias de bases complementarias se alinean y reconstituyen la hélice doble original. Como se muestra en la Figura 8-39, la reasociación de cadenas complementarias es muy específica, y ello constituye la base de muchas técnicas importantes en Bio-

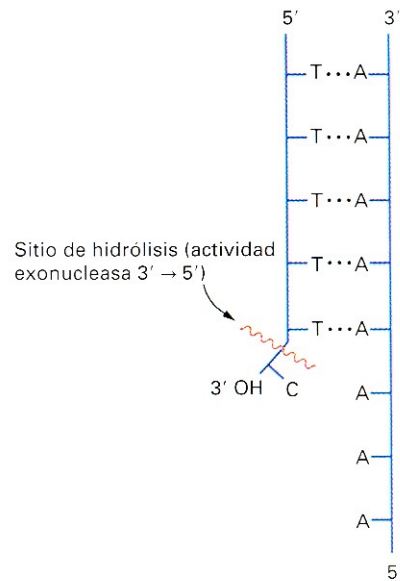


**Figura 8-37.** Corrección de pruebas del complejo pol III  $\alpha$ - $\epsilon$ . (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker. *DNA Replication*, 2.<sup>a</sup> ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)

logía molecular, tales como la identificación de tramos específicos de DNA mediante hibridación y el aislamiento de fragmentos concretos de DNA empleados en clonación, como se explica en el Capítulo 12. La Figura 8-40a muestra un perfil cinético típico de la disociación del DNA con el aumento de la temperatura. A una temperatura característica de cada tipo de DNA, éste empieza a «desnaturalizarse». Se define la temperatura de fusión,  $T_m$ , como la temperatura a la que la mitad de las moléculas están desnaturalizadas en cadenas sencillas. La temperatura de fusión depende de la proporción de pares G:C, porque tales pares de bases establecen tres puentes de hidrógeno, mientras que los pares A:T se mantienen unidos por dos puentes de hidrógeno. Como aparece en la Figura 8-40b, cuanto mayor es la proporción de pares G:C, mayor es la temperatura de fusión.

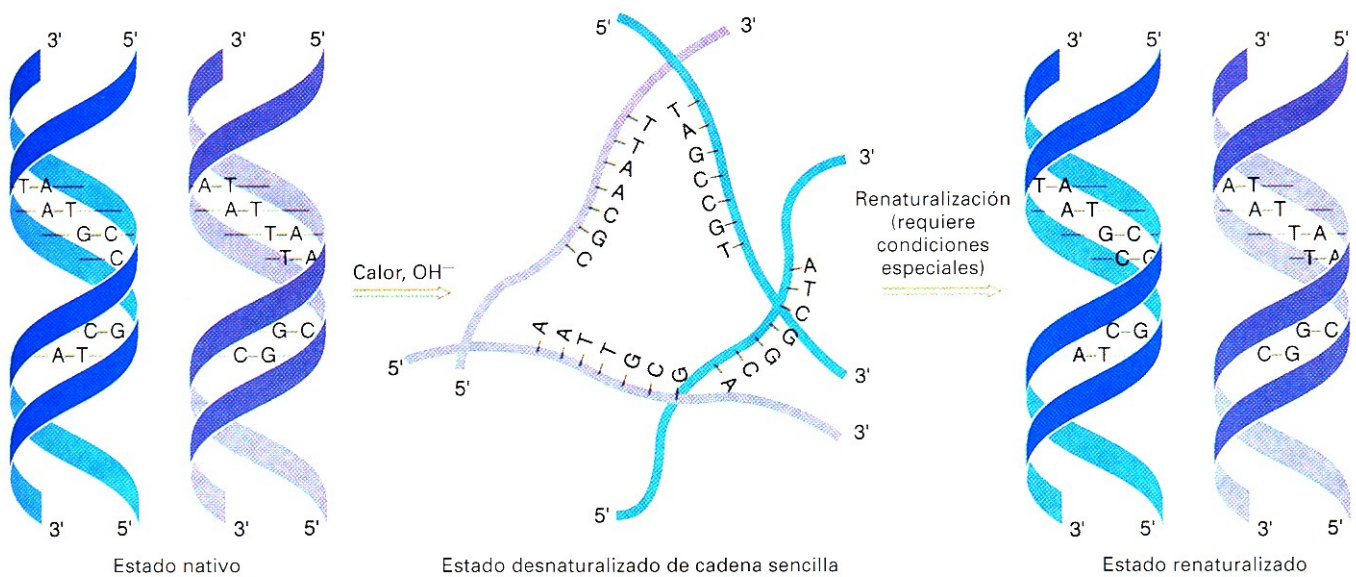
El descubrimiento de Doty y Marmur de que, en solución, cadenas sencillas separadas de una hélice doble se enlazan unas con otras, debido al emparejamiento complementario de sus bases, llevó a diversas aplicaciones experimentales que han tenido un efecto enorme en la investigación en Genética molecular.

1. **Análisis de la estructura genómica.** Si se disocia DNA genómico total y luego se le deja renaturalizar, se observan

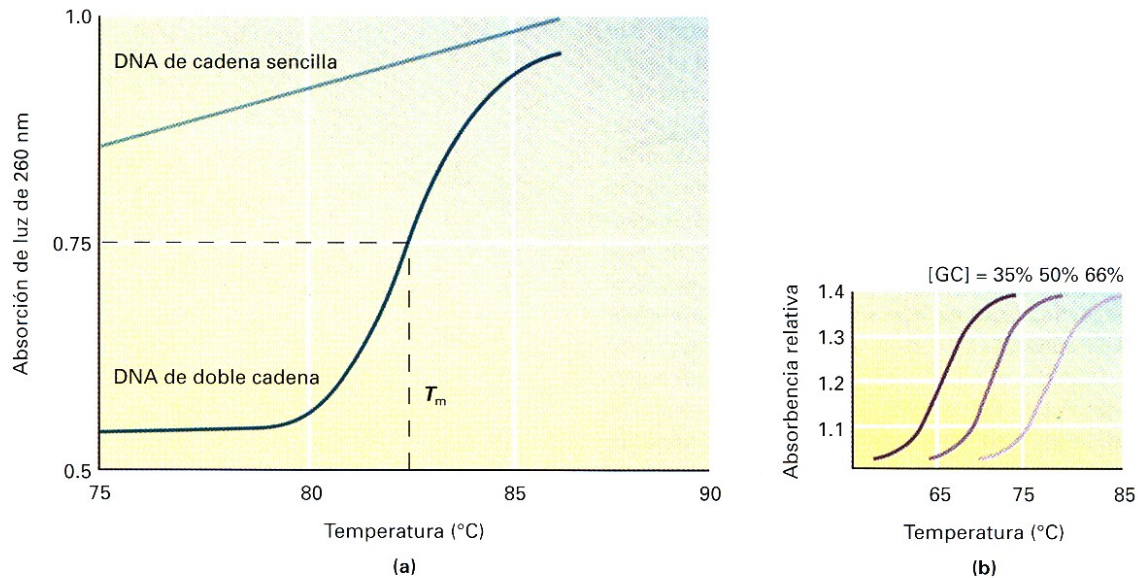


**Figura 8-38.** Acción exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  de la polimerasa III.

distintas fases en el proceso de reasociación. Hay una fase inicial de reasociación muy rápida. Esta fase corresponde al DNA muy repetido, porque existen muchas copias por genoma de ese DNA. Estas copias se encuentran unas a otras con más rapidez que los genes únicos, presentes en una sola copia por genoma haploide. Las fracciones que luego van reasociándose progresivamente contienen DNA cada vez menos repetido, reasociándose al final las secuencias únicas. Este comportamiento permitió a los científicos aislar y caracterizar las distintas clases de DNA repetido. Tal caracterización permitió, a su vez, caracterizar de forma general genomas de organismos de la mayoría de los grupos taxonó-



**Figura 8-39.** Desnaturalización y renaturalización de moléculas de DNA de doble cadena.



**Figura 8-40.** (a) Absorción de luz ultravioleta (longitud de onda de 260 nm) de soluciones de DNA de cadena sencilla y de doble cadena. Conforme se van disociando tramos de DNA de doble cadena, la absorción de esos tramos aumenta casi dos veces. La temperatura a la que la mitad de las bases del DNA de doble cadena se han desnaturalizado se denomina  $T_m$ . (b) Curvas de desnaturalización de DNA. Se representa la absorbencia relativa a la de 25 °C frente a la temperatura. (La longitud de onda de la luz incidente era de 260 nm.) La  $T_m$  del DNA de *E. coli* es 69 °C (50% de pares GC) y 76 °C la del DNA de *Pseudomonas aeruginosa* (68% de pares GC). (Parte «b» tomada de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © de Lubert Stryer.)

micos, ofreciendo otra estrategia de comparación evolutiva al nivel genético.

2. *Aislamiento de genes.* Muchos de los métodos para aislar genes (clonación de genes, véase Cap. 12) están basados en la hibridación de DNA por complementariedad de bases. El método más común aprovecha un fragmento de DNA desnaturalizado radiactivo, que se emplea como sonda para encontrar un clon con un gen concreto de interés en una mezcla de clones representativa de todo el genoma.
3. *Técnicas de hibridación de Southern y Northern.* Vimos en el Capítulo 1 que puede emplearse una sonda desnaturalizada radiactiva para identificar fragmentos genómicos concretos en una mezcla fraccionada en un gel de electroforesis (técnica de hibridación de Southern); con una técnica paralela, podemos detectar transcritos de RNA específicos en un gel de electroforesis (técnica de hibridación Northern). Dado al poder de resolución de estas técnicas, hoy día forman parte del repertorio metodológico empleado diariamente por genetistas de todo el mundo.
4. *Cartografía cromosómica.* La hibridación con sondas ha permitido la identificación de *marcadores de DNA* en posiciones cromosómicas concretas. [Un tipo de marcador de

DNA es el polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP); véase el Cap. 13]. Los marcadores de DNA han aportado muchos miles de nuevos loci con los que saturar el mapa cromosómico. Además, algunos de ellos son marcadores ligados a alelos de enfermedades hereditarias humanas, permitiendo su diagnóstico. En una técnica relacionada, puede añadirse una sonda marcada a DNA parcialmente desnaturalizado y todavía en forma de cromosoma para revelar la posición cromosómica del DNA homólogo a dicha sonda (hibridación *in situ*, véase el Cap. 14).

Vemos, por tanto, que la estructura del DNA ofrece no sólo dos propiedades críticas para su función biológica (replicación y depósito de información), sino también técnicas que resultan claves para la disección genética de los organismos y sus células.

#### COROLARIO

La especificidad de la complementariedad de las bases constituye el fundamento de la continuidad de la vida, vía replicación del DNA, y el fundamento del flujo de información del DNA a la proteína: determinante principal de la forma biológica. Esa misma especificidad es empleada por los genetistas como instrumento para investigar la estructura y función génica y genómica.

## RESUMEN

El trabajo experimental sobre la naturaleza molecular del material hereditario ha demostrado de forma concluyente que el material genético es DNA (no proteína, RNA u otra sustancia). Em-

pleando datos obtenidos por otros investigadores, Watson y Crick propusieron un modelo de hélice doble, con dos cadenas enrolladas entre sí y que corren de forma antiparalela. La especi-

Acididad de la unión de las dos cadenas está basada en el acoplamiento entre adenina (A) y timina (T) y entre guanina (G) y citosina (C). El primer par de bases se mantiene mediante dos puentes de hidrógeno, el segundo mediante tres.

El modelo de Watson y Crick descubre cómo el DNA puede replicarse en forma ordenada, un requerimiento esencial del material genético. La replicación se lleva a cabo de forma semiconservativa tanto en procariotas como en eucariotas. Una hélice doble es replicada en dos hélices idénticas, con la misma secuencia lineal de nucleótidos; cada una de las dos hélices dobles nuevas está formada por una cadena de DNA vieja y otra polimerizada de nuevo.

### MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

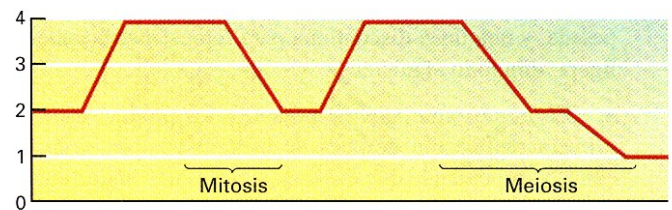
La replicación se lleva a cabo con la ayuda de varias enzimas, incluyendo polimerasa de DNA, girasa y helicasa. Se inicia en sitios especiales denominados orígenes de replicación y progresa a lo largo del DNA en ambas direcciones. Como la polimerasa de DNA actúa sólo en dirección 5' → 3', una de las cadenas nuevas de cada horquilla de replicación debe ser fabricada a trozos cortos que son unidos luego por la ligasa de DNA. La polimerización del DNA no puede iniciarse sin un pequeño cebador de doble cadena que es también fabricado por enzimas especiales.

hélice doble de DNA / nucleótidos / puentes de hidrógeno / semiconservativa / 5' / replicación / cromátida / mitosis / polimerasa de DNA / meiosis / fase S / gen / 3'

### PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

La mitosis y la meiosis se presentaron en el Capítulo 3. Teniendo en cuenta lo tratado en este capítulo sobre replicación de DNA, dibuje una gráfica que muestre el cambio con el tiempo del contenido en DNA de una célula que sufre mitosis y luego meiosis. Asuma que la célula es diploide.

#### ◆ Solución ◆



### PROBLEMAS RESUELTOS

1. Si una molécula de DNA contiene un 56 % de GC, ¿cuáles serán los porcentajes de cada una de las cuatro bases (A, T, G y C) de esa molécula?

#### ◆ Solución ◆

Si el contenido en GC es del 56 %, como G = C, el contenido de G es del 28 % y el de C del 28 %. El contenido de AT es 100 - 56 = 44 %. Como A = T, el contenido de A es del 22 %, y el de T del 22 %.

2. Describa el patrón de bandas esperado en el gradiente de CsCl del experimento de Meselson-Stahl en caso de replicación conservativa. Haga un dibujo.

#### ◆ Solución ◆

Vea la Figura 8-13 para una explicación adicional. Si la replicación fuera conservativa, y la bacteria es cultivada en presencia de <sup>15</sup>N y luego en <sup>14</sup>N, después de la replicación, una molécula de DNA será toda ella de <sup>15</sup>N y la otra toda de <sup>14</sup>N, apareciendo en

el gradiente una banda pesada y otra ligera. Después de la segunda generación, el DNA <sup>15</sup>N producirá una molécula hecha toda ella de <sup>15</sup>N y otra hecha toda ella de <sup>14</sup>N, mientras que la molécula hecha de <sup>14</sup>N producirá sólo DNA hecho de <sup>14</sup>N. Por tanto, de nuevo se generan dos tipos de DNA, uno hecho sólo de <sup>15</sup>N y otro sólo de <sup>14</sup>N, apareciendo de nuevo una banda pesada y otra ligera:

