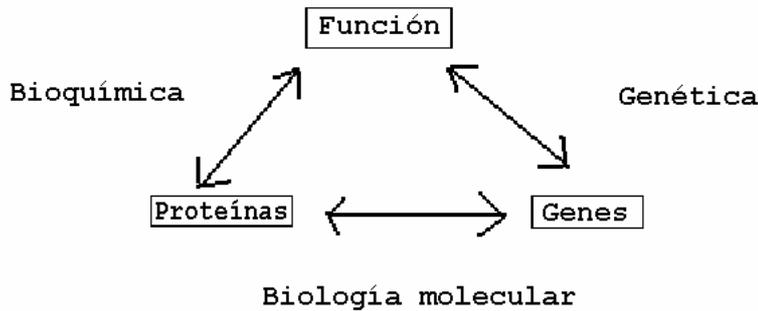


Biología molecular I

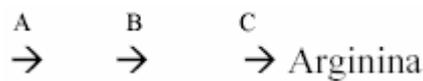


Bioquímica: el estudio de un sólo componente de un organismo.

Genética: el estudio de un organismo sin ese componente.

Genética bioquímica

Observe la ruta biosintética de la arginina:



Intermediarios: . .

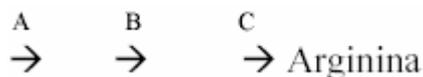
Enzimas: A,B,C

La ruta implica la conversión de vía dos intermediarios, y a arginina. Los tres pasos en la conversión de a arginina son catalizados por las tres enzimas: A, B y C (genes A, B y C).

Puede haber defectos en cualquiera de los 3 pasos de la síntesis de la arginina. Mientras que haya arginina en el medio, todos los mutantes de la arginina pueden crecer en un medio mínimo.

Dada una serie de mutantes de la arginina, es posible determinar qué mutantes tienen mutaciones en qué genes (pasos) de la ruta sintética, analizando el crecimiento de los mutantes y observando las acumulaciones de intermediarios en la ruta sintética.

Ruta y pasos defectuosos en cada mutante:



Mutante

Arg1	X			Arg1 tiene una mutación en el gen A
Arg3		X		Arg3 tiene una mutación en el gen B
Arg5			X	Arg5 tiene una mutación en el gen C
Arg1/Arg3	X	X		

(doble mutante: bloqueado en dos pasos)

Pruebas de Epistasis

La epistasis tiene lugar cuando el fenotipo asociado a un alelo oculta la expresión del fenotipo asociado a otro alelo.

Utilizando cepas mutantes, se pueden obtener intermediarios y observar el crecimiento de estos mutantes sujetos a ciertas condiciones. Utilizando este tipo de información, se pueden ordenar los genes en una ruta (si no se conociese el orden).

C de cepas sujetas a las siguientes condiciones:

Medio mínimo con:

	arginina			
wt	+	+	+	+
Arg1	-	-	-	-
Arg3	-	-	+	+
Arg5	-	-	-	+
Arg1/Arg3	-	-	+	+

“+” = crecimiento, “-” = no crecimiento Arg1/Arg3 es haploide con dos mutaciones

Interpretaciones:

Por ejemplo, dado un medio mínimo más “ ”, el mutante Arg1 no puede crecer porque tiene un defecto en el paso que convierte a en (mutación en el gen A).

El mutante Arg1 sólo puede crecer si se le añade o o o arginina al medio.

El mutante Arg1 acumulará porque no puede convertirlo en .

El mutante doble presenta defectos en dos pasos de la ruta. Este mutante tiene mutaciones en ambos genes: A y B. Es bloqueado en el paso previo de la ruta.

El doble mutante Arg1/Arg3 tiene los requisitos de crecimiento del mutante en el último de los dos pasos (Ej.: en este caso, el mutante Arg3).

El doble mutante Arg1/Arg3 acumula el intermediario como el mutante en el primero de los dos pasos (Ej.: en este caso, el mutante Arg1).

Este es un ejemplo de epistasis. El fenotipo del mutante Arg3 oculta el fenotipo del mutante Arg1 cuando se realizan pruebas de crecimiento con diferentes intermediarios.

La información que se deriva de este tipo de experimentos (pruebas de crecimiento) nos permite determinar el orden de los pasos (esto es, de los genes) de una ruta biosintética.

Biología molecular

En la primera mitad del siglo XX se realizaron varios experimentos clave para deducir la naturaleza del material genético.

1. Descubrimiento del “Principio de transferencia”

1928: F. Griffith realizó experimentos con bacterias.

Griffith estaba estudiando la bacteria pneumocócica – infectaba a los ratones y los mataba.

2 cepas:

1) Cepa lisa– infecciosa (virulenta); crece en colonias lisas en la placa Petri (**cepa S**) (Está encapsulada por unos polisacáridos que la hacen resistente al sistema inmunológico del ratón).

2) Cepa rugosa– no infecciosa (no virulenta); crece en colonias rugosas en la placa Petri (**cepa R**) (carece del revestimiento de polisacáridos por lo que es vulnerable al sistema inmunológico del ratón).

Griffith estudió el efecto de estas cepas de bacterias en los ratones.

Infectó a los ratones con bacterias pneumocócicas.

Experimentos:

- 1) Inyectó la cepa S a los ratones → Los ratones murieron
- 2) Inyectó la cepa R a los ratones → Sin efecto perjudicial
- 3) Inyectó la cepa S matada por el calor a los ratones → Sin efecto perjudicial
- 4) Inyectó una mezcla de cepa R viva y cepa S muerta por el calor → Los ratones murieron

Los resultados del experimento 4 fueron sorprendentes porque ni la cepa R ni la cepa S muerta por el calor eran consideradas virulentas, tomadas independientemente. Griffith aisló y cultivó la sangre del ratón muerto. ¡Encontró bacterias lisas en la sangre de dicho roedor!

Es decir, aisló cepas S vivas de la sangre de estos ratones. La cepa S matada por el calor debió de transformar la cepa R viva en cepa S.

Tenía que haber algún tipo de material en la cepa S muerta por el calor capaz de convertir una cepa R no virulenta en una cepa S virulenta.

En 1944: O. Averyt, C.Macleod y M.McCarty se propusieron descubrir la naturaleza del principio transformador.

-Repetieron los experimentos de transformación en un tubo de ensayo.

-Descubrieron que podían convertir la cepa R en cepa S simplemente añadiendo un extracto sin células de la cepa S a la cepa R.

¿Pero qué había en este extracto sin células capaz de convertir la cepa R en cepa S?

¿Era una proteína?

¿Era un ácido nucleico?

¿Era un lípido?

Para poder llegar a una conclusión, tomaron el extracto sin células y lo trataron con varias enzimas para probar si seguía siendo efectivo a la hora de transformar R → S.

- 1) Trataron el extracto sin células con proteasas (que cortan proteínas) → el extracto seguía siendo activo, por lo que no se trataba de una proteína

- 2) Trataron el extracto sin células con ribonucleasa (corta el ARN) → el extracto seguía siendo activo, por lo que no era el ARN.
- 3) Trataron el extracto sin células con deoxiribonucleasa (corta ADN) → NO era activo, DEBÍA SER EL ADN.

La naturaleza del material que transformaba la cepa R en cepa S era ADN (ácido desoxiribonucleico).

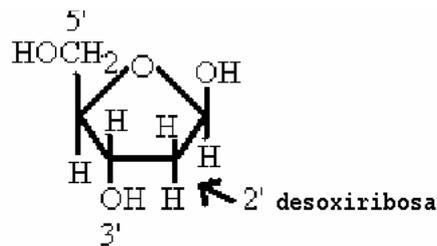
A pesar de la prueba que supusieron estos ensayos, la gente no estaba convencida de que el ADN constituyese el material genético.

¿Por qué? Porque el ADN se consideraba una molécula poco interesante. Las proteínas eran consideradas mucho más interesantes; ¡había muchos tipos de proteínas!

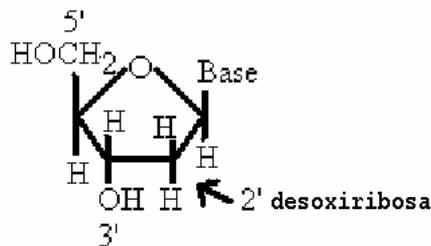
2. Estructura del ADN

El ADN está formado por 3 componentes:

- a) Azúcar (una pentosa)



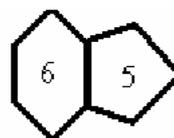
- b) Base: en el ADN hay 4 tipos:



azúcar + base = nucleósido

La base está ligada al carbón C1' del azúcar.

Bases del ADN: Purinas: Adenina (A) y Guanina (G).



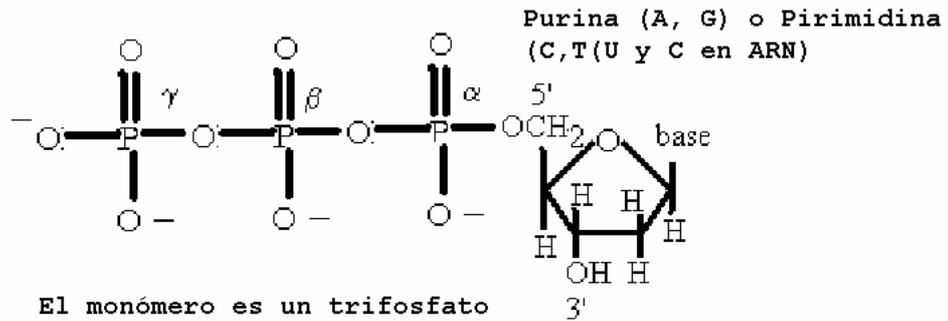
Estructura bicíclica
compuesta de átomos
de N, C, H y O.

Pirimidinas: Citosina (C) y Timina (T).



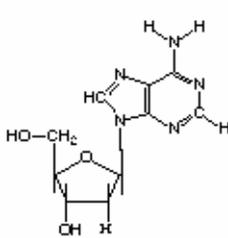
Estructura cíclica
compuesta de átomos
de C, H, O y N.

- c) Trifosfato: 3 grupos fosfato
Azúcar + base + grupo fosfato = nucleótido

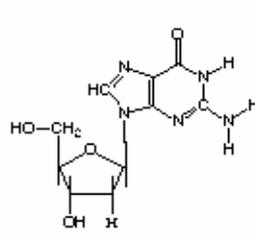


Desoxiribosa en ADN
Ribosa (tiene 2' OH) en ARN

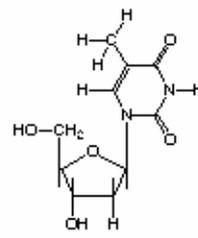
Los nucleósidos del ADN



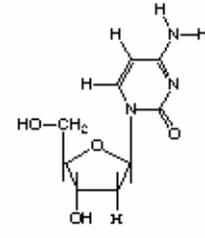
Adenina



Guanosina



Timina

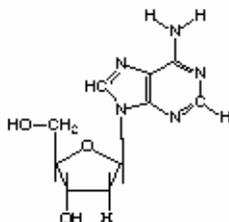


Citosina

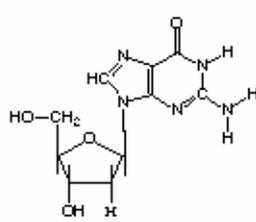
Purinas

Pirimidinas

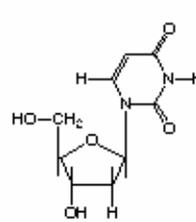
Los nucleósidos del ARN



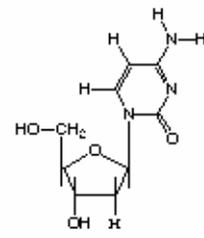
Adenina



Guanosina



Uracilo



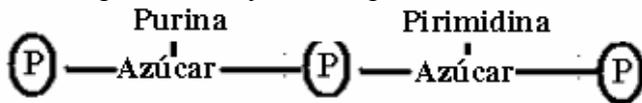
Citosina

Purinas

Pirimidinas

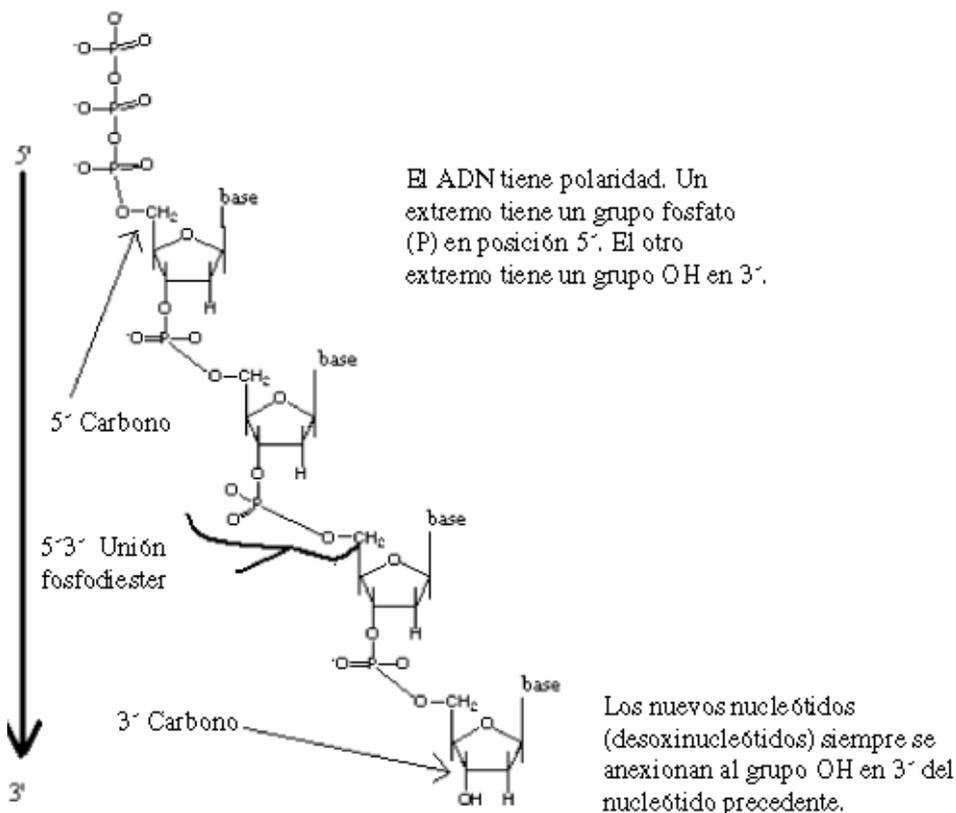
La polimerización de los nucleótidos:

El ADN está compuesto de monómeros denominados desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Los dNTPs están ligados entre sí mediante uniones de azúcar-fosfato, que constituyen el esqueleto del ADN:



El azúcar (la desoxiribosa) está ligada covalentemente al grupo fosfato a través de una unión fosfodiéster.

Esqueleto azúcar-fosfato del ADN:



ADN: Ácido desoxiribonucleico

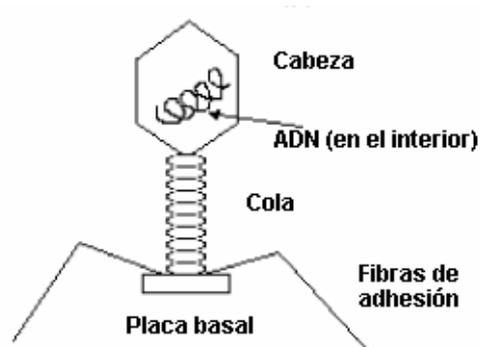
El ADN es un ácido nucleico porque el pKa del grupo fosfato es ~ 1.0

El ADN está cargado negativamente con un pH de 7.0 debido a los grupos fosfato.

3. Virus bacterianos y el experimento de Hershey-Chase

1952: El rol genético del ADN recibió más muestras de apoyo tras los experimentos realizados por A. Hershey y M. Chase con un virus que infecta a las bacterias E.coli.

Estos virus se denominan bacteriófagos (virus o patógenos que infectan a las bacterias).



El material genético del virus se almacena en el interior de una cápsida proteica.

Cuando el fago infecta las bacterias, inyecta su ADN viral en el interior de la célula. El ADN se replica y se crean nuevos viriones (partículas de virus). La célula se va lisando conforme se va liberando la descendencia del virus, resultando así la muerte celular.

¿Cómo tiene lugar el proceso de infección?

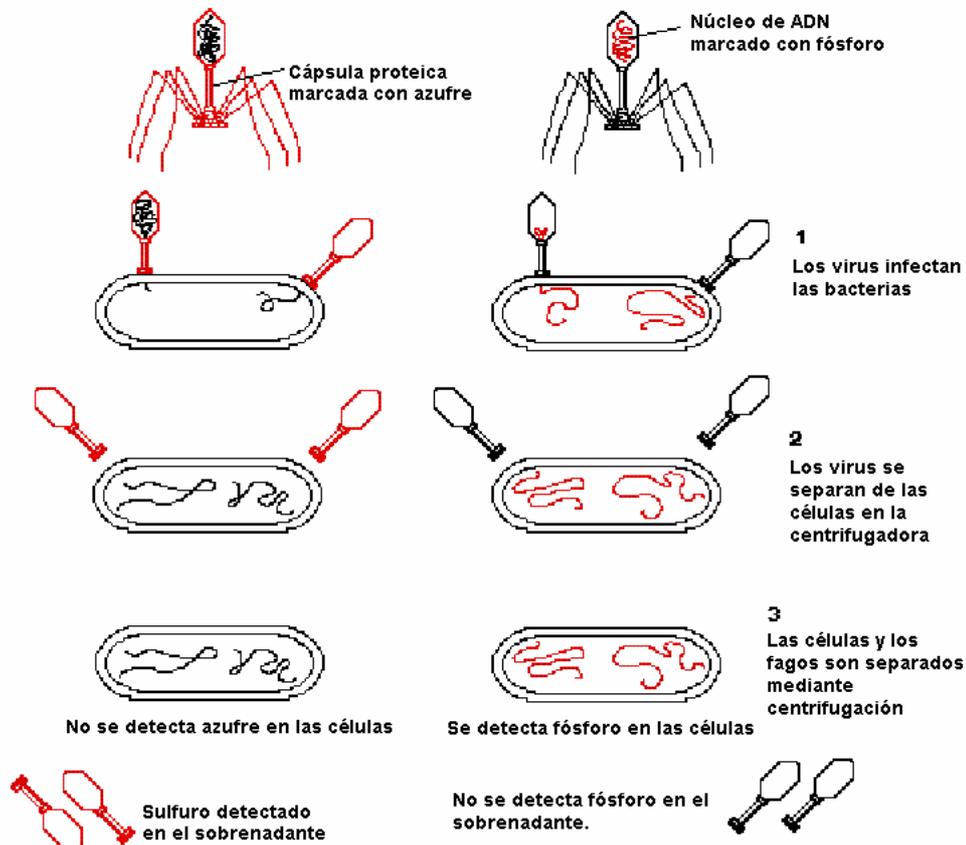
¿Inyecta el bacteriófago su ADN, su cápsida proteica o ambos?

Para poder identificar qué material se introducía en la célula, era necesario distinguir entre el ADN y las proteínas.

Para encontrar la ubicación del ADN y de la proteína en el interior de la célula, emplearon radioisótopos.

- Utilizaron el isótopo ^{32}P para marcar el ADN viral (sólo señala el ADN, porque el fósforo no está presente en las proteínas).
- Utilizaron el isótopo ^{35}S para marcar la proteína viral (sólo señala la proteína, porque el azufre no está presente en el ADN).

El experimento de centrifugación de Hersey-Chase



Las partículas de virus, más pequeñas que las bacterias, permanecieron, tras la centrifugación, o bien en la parte líquida o en el sobrenadante de la mezcla del tubo de ensayo. Las bacterias, por el contrario, y debido a su mayor peso, formaron una pequeña aglutinación en el fondo del tubo de ensayo.

Resultado del experimento:

- 1) La mayor parte del marcador ^{32}P (ADN del fago) se encontró en el interior de las células bacterianas.
- 2) La mayor parte del marcador ^{35}S (proteína del fago) se encontró en el sobrenadante.

Conclusión:

Ya que en el interior de las células se encontró principalmente ADN, concluyeron que el ADN era el material genético.

Se encontró una cierta cantidad de marcador ^{35}S asociado a las células bacterianas, por lo que algunas personas creyeron que el material genético era la proteína que estaba pegada a la célula.

PERO, en general, la mayoría de la gente creyó que el ADN era el material genético.

Estos experimentos reforzaron las nociones propuestas anteriormente por Avery, MacLeod y McCarty.

4. La estructura del ADN

Los estudios realizados por E.Chargaff (1950) y M.Wilkins (principios de los años cincuenta) permitieron obtener alguna información acerca de la naturaleza del ADN.

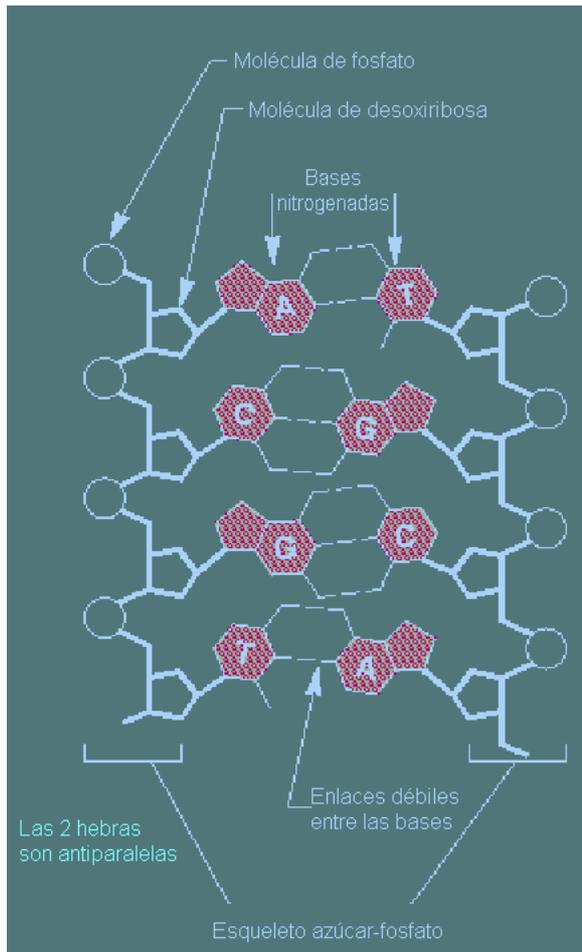
A partir de los resultados de estos estudios, J.Watson y F.Crick dedujeron la estructura del ADN en 1953.

Modelo de la estructura del ADN: 1953 J.Watson y F.Crick

- 1) El ADN consiste en 2 polinucleótidos antiparalelos y complementarios que se envuelven mutuamente formando una doble hélice dextrógira.
- 2) Las bases de purina y pirimidina se sitúan en el interior de la hélice mientras que el esqueleto azúcar-fosfato se ubica en el exterior de la hélice.
- 3) Las dos cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno, formados específicamente entre las bases:
 - Enlaces A con T 2 puentes de hidrógenos (A=T)
 - Enlaces C con G 3 puentes de hidrógeno (C≡G)
- 4) Hay 10 pares de bases (pb) en cada vuelta de hélice = 34 ángstroms
 - La distancia entre los pares de bases es de 0,34 nm; el ancho de la hélice es de 2nm (20 ángstroms)

****El aspecto más importante del modelo de ADN de Watson-Crick fue el emparejamiento de bases encontrado en el ADN.**

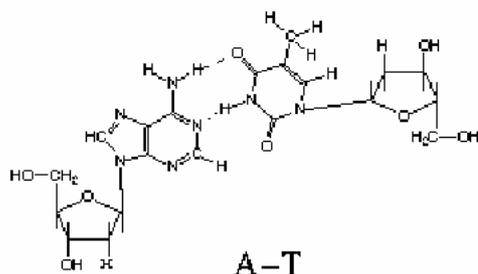
Las purinas siempre estaban emparejadas con las pirimidinas, pero la A sólo se podía emparejar con la T y la G sólo se podía emparejar con la C debido a los requisitos de los puentes de hidrógeno.



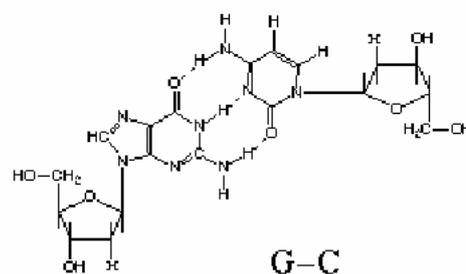
Pares de bases encontradas en el ADN:

Pares de bases del ADN

Pares de bases del ADN



**Adenosina-Timidina
(Adenina - Timina)**



**Guanosina - Citidina
(Guanina - Citosina)**

- Antes (en 1950, con anterioridad a los descubrimientos de Watson y Crick), E.Chargaff había analizado el contenido de purinas y pirimidinas de varias cadenas de ADN de fuentes diferentes: levaduras, bacterias, humanos, etc.

- Chargaff descubrió que el porcentaje de A era siempre igual al de T, y que el porcentaje de G era siempre igual al de C.

Reglas de Chargaff

$$\% A = \% T$$

$$\% G = \% C$$

Pero Chargaff no supo explicar sus descubrimientos. Hasta que Watson y Crick propusieron su modelo de la estructura del ADN, las reglas de Chargaff no “tuvieron sentido”.

Entonces, ahora que ya se había deducido el modelo del ADN, ¿qué es lo que hacía del ADN algo realmente emocionante?

¿Era el ADN el secreto de la vida? ¿Cómo transmite uno “la herencia” a los hijos?

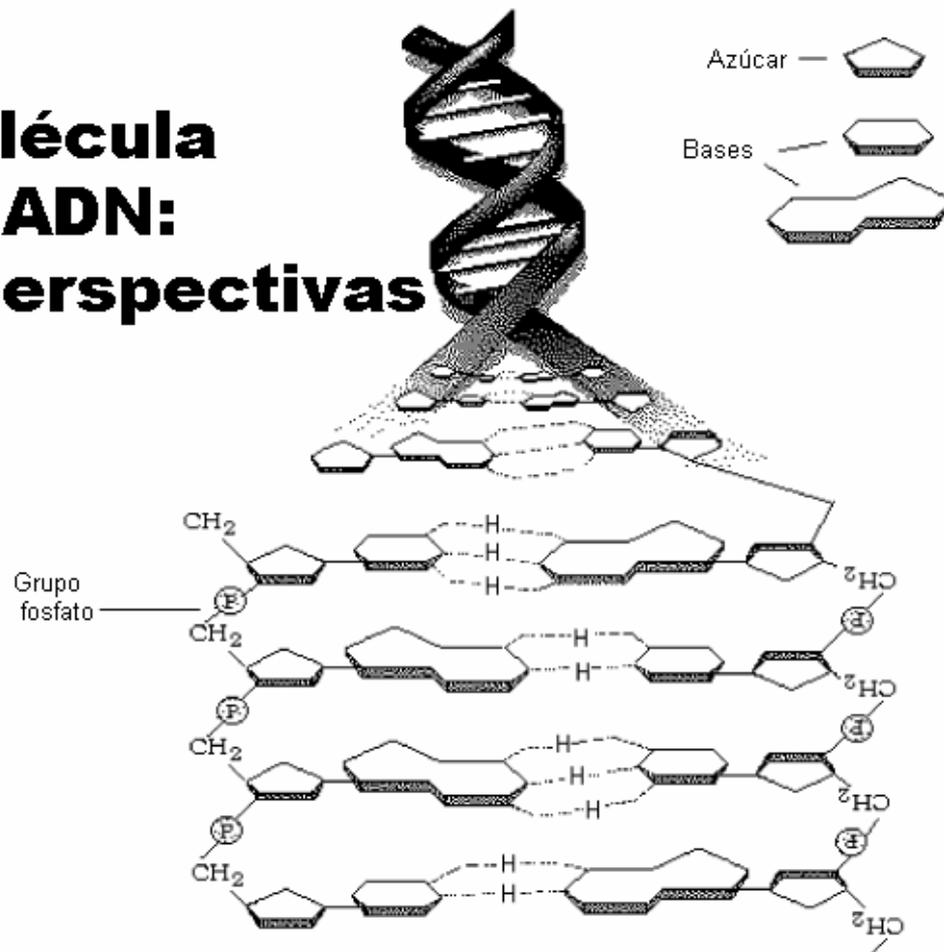
El conocimiento de la estructura del ADN permitió que se comenzasen a elaborar respuestas para algunas de estas preguntas.

Cada hebra de la doble hélice de ADN es una “copia” complementaria de la otra hebra.

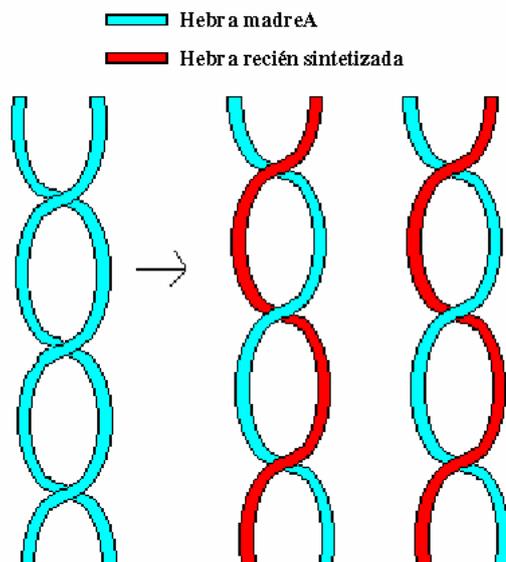
Observe esta corta secuencia de ADN:



Molécula de ADN: 2 perspectivas



El modelo de doble hélice del ADN sugería la existencia de un mecanismo para la replicación (copia) del ADN.



Las hebras se separan; cada hebra sirve de molde para la nueva hebra

Cada doble hélice de ADN está formada por una hebra madre y una hebra hija

La estructura del ADN (dos hebras complementarias de ADN) explica:

1) El proceso de replicación del ADN

Cada hebra actúa de molde para el copiado: acorde con el modelo de herencia

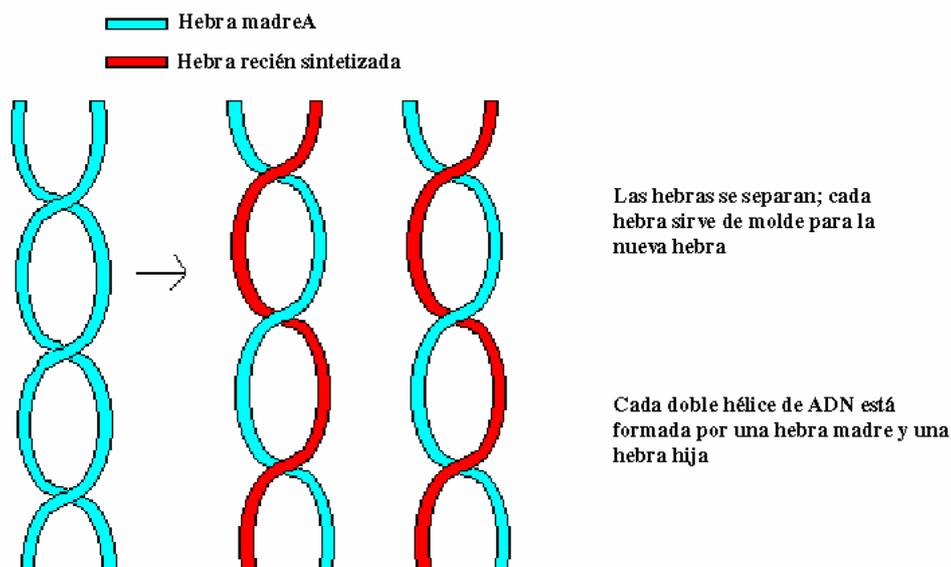
2) Las mutaciones

Las mutaciones (cambios en la secuencia de ADN) serían el resultado de errores en el proceso de replicación del ADN (la inserción de una base no complementaria en el copiado del ADN).

5. La puesta a prueba del modelo de Watson-Crick

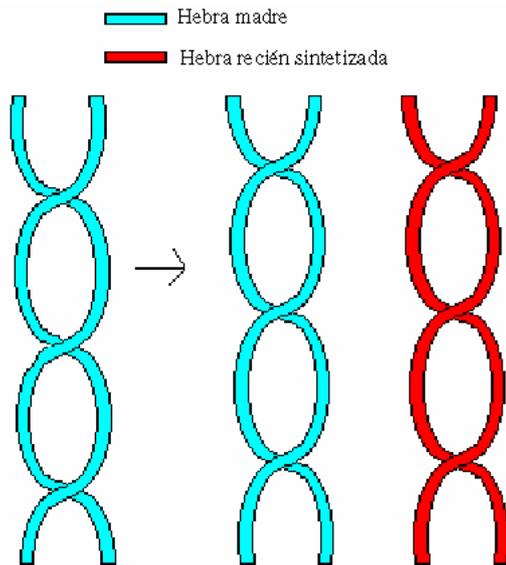
Durante la replicación del ADN, cada hebra sirve de molde para la síntesis de la otra hebra. Cada nueva molécula de ADN consistirá de una hebra parental (vieja) y una hebra hija (nueva).

Si cada hebra sirve de molde para la replicación del ADN, la replicación del ADN debería tener lugar mediante un mecanismo semiconservativo: esto es, cada nueva molécula de ADN está compuesta de una hebra nueva y otra vieja.



El mecanismo semiconservativo de la replicación del ADN fue propuesto por Watson y Crick.

Se propuso otro modelo: el del la Replicación Conservativa.



El duplex original de algún modo sirve de molde para la replicación. Sin embargo, una vez tiene lugar ésta, las hebras originales se vuelven a unir.

1957 M. Meselson y F. Stahl querían confirmar si la replicación del ADN tenía lugar mediante un mecanismo semiconservativo.

Para ello, utilizaron un isótopo pesado (^{15}N) de ^{14}N (nitrógeno).

Experimentos:

1) - Cultivaron bacterias E. Coli en un medio que contenía $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como única fuente de nitrógeno.

- El ^{15}N se incorpora a las bases de pirimidina y purina; por lo tanto, el ADN pasa a ser más pesado de lo habitual.

- Cultivaron muchas generaciones de bacterias en ^{15}N para que las hebras de ADN contuviesen ^{15}N . Aislaron una parte de este ADN pesado.

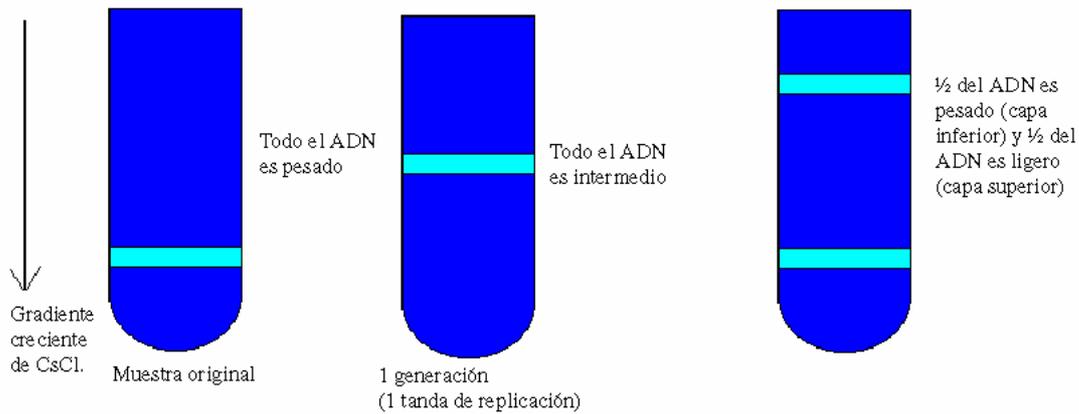
2) Tomaron las bacterias cultivadas en ^{15}N y las transfirieron a un medio que contenía $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$. El ADN fue aislado en varias ocasiones a partir de la nueva ubicación de la bacteria en el medio ^{14}N . Cultivaron las bacterias durante dos generaciones más y aislaron el ADN.

3) Utilizaron la técnica denominada centrifugación por gradiente de densidad, que permite separar entre sí moléculas de ADN según su densidad.

Centrifugación por gradiente de densidad

El ADN está mezclado con una solución de cloruro de cesio (CsCl). La mezcla de CsCl y ADN se centrifuga a una fuerza G alta en un tubo de centrifugación. El ADN dejará banda en el gradiente de CsCl (formada por la centrifugación) a su densidad correspondiente.

Se centrifugó una pequeña cantidad del $^{15}\text{N} / ^{15}\text{N}$ ADN y las diferentes muestras de ADN tomadas de las generaciones 1 y 2, en el gradiente CsCl. Tras la centrifugación de las diferentes muestras:



¿Por qué razón forma el ADN una “banda” en una posición determinada del gradiente CsCl?

El ADN se sedimenta formando una capa en la posición del tubo en la cual la densidad de la solución de CsCl es igual a la del ADN.

Los experimentos de Meselson y Stahl demostraron que el ADN se replica siguiendo un método semiconservativo.

** La ausencia de la banda en la posición pesada del gradiente tras 1 generación contradecía el método conservativo; por lo tanto, la replicación era semiconservativa.

** El modelo de Crick y Watson era correcto – la replicación del ADN mediante un método semiconservativo: 1 hebra de cada molécula de doble hebra de ADN se conserva en la nueva molécula hija de ADN.