

5-Réplica del D.N.A y del R.N.A

a) Réplica del D.N.A

El estudio de las estructuras electrónicas del D.N.A y del R.N.A, tal como se ha planteado hasta ahora, era un problema de tipo puramente "estático", ya que se suponía que las moléculas estaban en sus periodos de inactividad. El problema de la réplica o reproducción de estas moléculas es muchísimo más complejo, porque debe ser caracterizado como "dinámico", apareciendo entonces un número muy grande de interacciones que deben ser tenidas en cuenta.

El poder establecer con exactitud como se produce la réplica, es de fundamental importancia, ya que está estrechamente relacionado con el problema de "escritura" y "transcripción" del código genético, es decir con el mecanismo responsable de la estabilidad biológica.

Con respecto a estos últimos puntos, los resultados obtenidos hasta el presente, distan mucho de ser claros y concluyentes, por lo que todas las hipótesis enunciadas para explicarlos se basan, necesariamente, en un gran número de argumentos especulativos que dependen, en gran parte, de la interpretación de las experiencias realizadas en genética y biología.

Debemos recordar además, que todos los procesos explicados en base a la "lectura del código", dependen en última instancia del principio general de copia, es decir del concepto de complementaridad para los nucleótidos, el cual ha sido explicado a su vez y hasta el momento, como determinado por un código protón-electrón para las ligaduras hidrógeno.

El primer modelo viable para la molécula de D.N.A, el de Watson-Crick sugería simplemente que, durante la réplica, las dos ramas moleculares se separaban, construyendo cada una de ellas su complemento y, dando lugar de esta manera, a dos nuevas moléculas completas, (ver fig.15), idénticas a la original. Una cosa, en apariencia tan simple, involucra sin embargo un proceso físico sumamente complejo, ya que se deben cumplir los tres principios de conservación, esto es, conservación de la energía total, conservación del "momentum" lineal y conservación del "momentum" angular.

Uno de los principales argumentos en contra del modelo de réplica de Watson-Crick fue que la ruptura simultánea de todas las ligaduras hidrógeno insumiría una gran cantidad de energía, con gasto excesivo de la misma, considerándose más razonable

que la construcción del complemento fuese simultánea con la separación en ramas. De este modo, la formación de nuevas ligaduras hidrógeno proveería una cierta cantidad de energía, la cual sería usada a su vez para romper las siguientes ligaduras primitivas. El resultado neto, es entonces que se han formado dos hélices, a partir de una vieja hélice y tres nucleótidos. La energía implicada depende así del número de ligaduras hidrógeno formadas más la corrección que aparece por el grupo azúcar-fosfato adicional.

Siguiendo con las leyes de conservación, el principio de conservación del "momentum" lineal implica que el centro de masa de todo el sistema (hélice primitiva, hélices nuevas, encimas, etc.), no debe cambiar. Por último, como también debe conservarse el "momentum" angular, si una parte del sistema gira en torno a un eje específico, la otra parte debe girar en sentido contrario.

Con el objeto de seguir discutiendo este problema, introduciremos ahora las definiciones propuestas por Delbrück y Stent (1957), los cuales clasificaron a los procesos de réplica en tres tipos: conservativos, semiconservativos y disipativos.

Se dice que un proceso es conservativo, si al cabo de un número arbitrario de réplicas, una parte del sistema sigue siendo absolutamente parental y la otra es absolutamente nueva. Si la sustancia parental está formada por dos partes equivalentes, las cuales al comienzo de la réplica se dividen entre los dos hijos, producto de la duplicación, y luego de un número arbitrario de réplicas hay exactamente dos duplicados, cada uno de los cuales posee una de las partes originales de la sustancia parental, el proceso es semiconservativo, diciéndose que las partes parentales originales son los elementos conservativos del sistema. Por último, un proceso será disipativo, si la sustancia parental, luego de muchas réplicas, se ha distribuido en pequeñas piezas a lo largo de muchos de los duplicados. Esta definición es muy general, ya que no hace necesaria ninguna especificación acerca de la sustancia parental en sí misma, pudiendo aplicarse a cualquier tipo de molécula en réplica.

En base a lo anterior, el mecanismo de Watson-Crick es semiconservativo, en donde la hélice primitiva es la sustancia parental, siendo cada una de las ramas el elemento conservativo que se transmite íntegro.

Una de las primeras hipótesis respecto del mecanismo de réplica fue la enunciada por Delbrück (1955), el cual supuso que si bien la síntesis es simultánea con el rompimiento, este no es continuo, sino que se produce a cada media vuelta de la hélice,

es decir cada cinco eslabones, uniéndose luego cada complemento con la rama contraria, juntándose los últimos terminales con los extremos de igual polaridad de las nuevas ramas, en forma instantánea. Esta descripción corresponde a un mecanismo de réplica disipativo.

Otro tipo de mecanismo fue sugerido por Block (1955). Según este, las dos ramas se separarían totalmente y en forma instantánea, excepto el esqueleto de azúcar-fosfato que mantendría la unión. Las bases son entonces obligadas a girar 180° alrededor de las ligaduras glicósidas, para separar espacialmente el código "par protón-electrón". Cada rama forma entonces un molde sobre el que se construyen las dos ramas complementarias, apareciendo así un compuesto intermedio, constituido por cuatro partes. Se rompen ahora las nuevas ligaduras hidrógeno, girando las bases nuevas 180° , para poder formar las ligaduras hidrógeno típicas de la hélice. La nueva hélice fabrica su esqueleto azúcar-fosfato tomando elementos provistos por el medio y se separa, permitiendo a las viejas ramas girar nuevamente hacia su posición inicial, restaurando así la hélice de partida. De este modo, uno obtiene una hélice hija idéntica a la primitiva, la cual no ha perdido nada de su materia, por lo que el proceso sería netamente conservativo.

Si bien este último modelo ha sido muy criticado por el uso de tantos nucleótidos y por el giro de las bases, lo cual provocaría problemas espaciales, esta hipótesis es muy interesante, porque implica un modelo conservativo, siendo este el único caso en que se usó ese mecanismo para una hipótesis medianamente viable.

El modelo de Watson-Crick, llamado también modelo Y (ver fig. 15), de tipo semi-conservativo, propone rotaciones para las ramas y para la parte vertical, pero compensadas de tal manera que la Y no cambia su orientación en el espacio.

En el año 1960, Longuet-Higgins y Zimm calcularon la razón del desdoblamiento de las ramas en el D.N.A. Para ello supusieron que el torque rotatorio se realizaba utilizando la energía libre asociada al aumento de entropía producido por el pasaje de una estructura rígida a un arrollamiento al azar. Si bien el tiempo de desdoblamiento calculado es razonable, el modelo no toma en cuenta la síntesis de las nuevas ramas.

Las experiencias realizadas a partir de 1957, tales como las de Meselson y Stahl (1958) con "Escherichia coli" y las de Taylor (Taylor y al., 1957; Taylor y Taylor, 1958) en sus estudios de la réplica de cromosomas de "Vicia faba" (poroto ancho

inglés) indican, para estos casos, procesos netamente semiconservativos, dando así un firme soporte al modelo Y. El único inconveniente de estas experiencias es que ellas no han logrado determinar conclusivamente el carácter de las subunidades parentales que se mantienen intactas.

Una serie de experiencias realizadas por Hornberg (1959, a, b; 1962) introdujeron dudas respecto al modelo Y. Esto se debe a que el modelo, tal como fue estructurado presupone simetría, es decir que la división puede realizarse a partir de cualquiera de los dos extremos de la cadena, mientras que las experiencias indicaban que se producía siempre a partir de un extremo, lo cual implicaba a su vez un solo mecanismo de interacción para la cadena polinucleótida (fig. 57, B). La acción del D.N.A polimerizado, parecía ser tal que solo se activaba el extremo de la cadena que poseía un azúcar libre, por la admisión de un dextrinucleósido trifosfato, atacando al grupo hidroxilo en la posición C'-3 de la dextriribosa, hasta la eliminación del pirofosfato. Dado ese estado de cosas se supuso (ver por ej. Setlow y Pollard, 1962) que "el tipo Y de la réplica del D.N.A no puede ocurrir".

Los informes sucesivos indicaban que la molécula de D.N.A se reproducía como una pieza simple, empezando la réplica desde un extremo.

Un grupo, el de Joshikawa y Sueoka (1963, a, b) estudió la genética del "Bacillus Subtilis", el cual posee una molécula de D.N.A fácilmente sujeta a transformaciones. Utilizando luz ultravioleta este grupo produjo mutantes, los cuales requieren un factor específico de crecimiento, factor que sirve a su vez como "marca" para el correspondiente "locus". De esta manera, se pudo determinar que las marcas "met" y "ade" aparecen en posiciones finales. Provocando la réplica por métodos mecánicos se encontró que, durante el proceso de reproducción, una de las marcas finales aparecía en doble cantidad que la otra, es decir, apareció el doble de "ade" que de "met", o viceversa pareciendo entonces que la molécula se reproducía como una pieza simple a partir de uno de sus extremos (fig. 58).

Otro grupo experimental, el de J. Cairns (1963) trabajó con el cromosoma de "E. Coli", el cual consiste esencialmente en una pieza simple de D.N.A con dos ramas (fig. 59). Utilizando una técnica especial, este grupo logró hacer "figuras" de moléculas enteras de D.N.A durante varias etapas del proceso de réplica, obteniendo resultados que

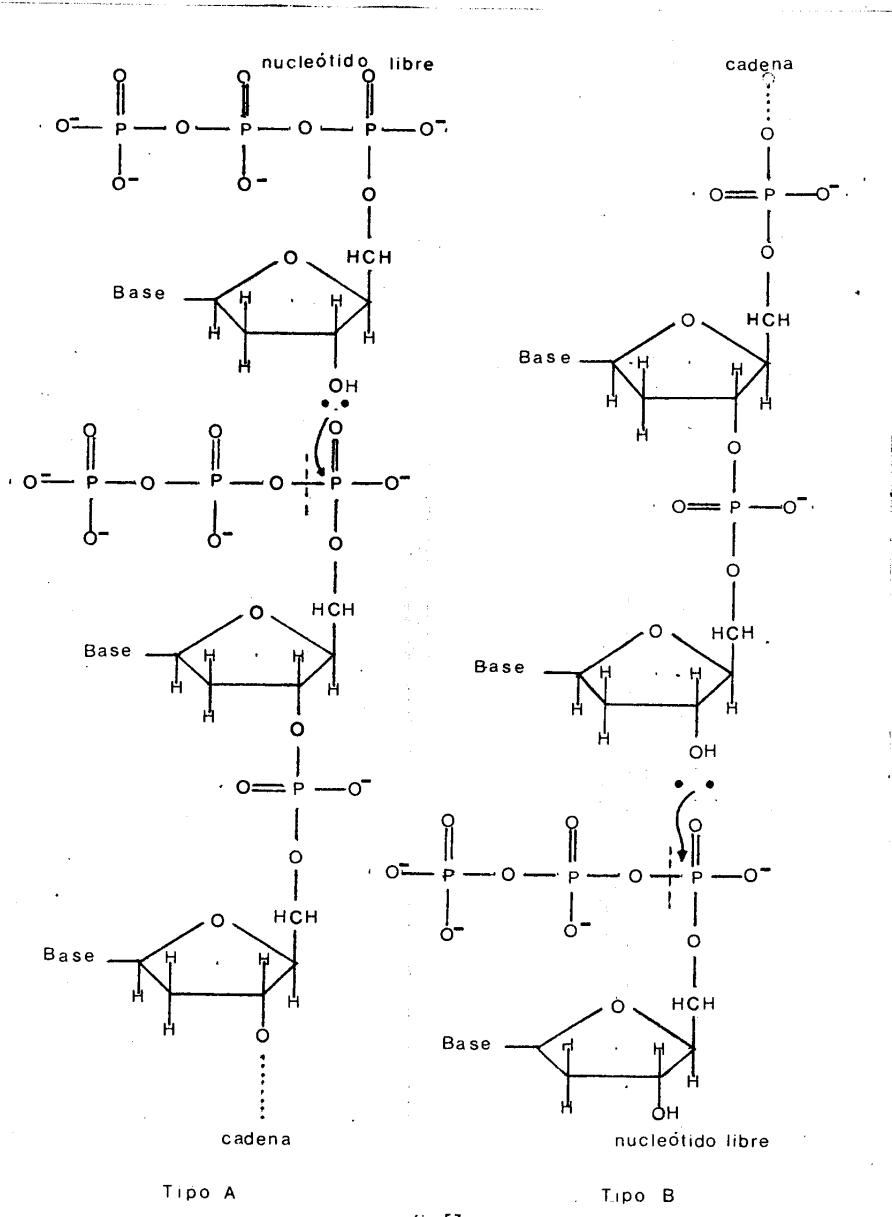


fig.57

Lineamientos de los dos mecanismos de Hornberg para la adición de nuevos nucleótidos a la cadena polinucleótida.

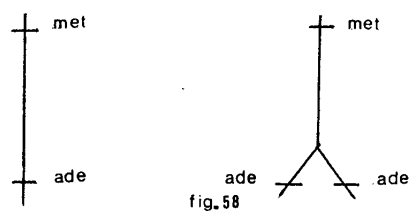


fig.58

Molécula de D.N.A con marcas finales. (a) Forma estable. (b) Durante la réplica.

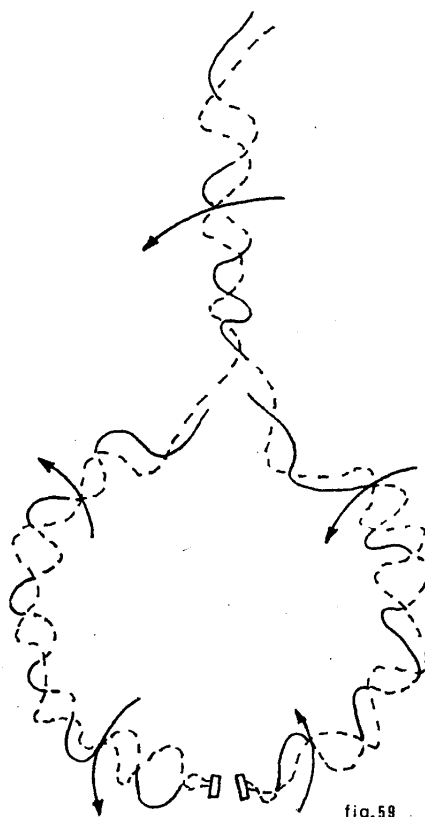


fig.59

Réplica del D.N.A. de acuerdo con el modelo de Cairns.

coinciden con los mecanismos de reproducción postulados para el modelo Y. Un resultado inesperado, fue que los extremos de la horquilla aparecían unidos por algún tipo de eslabón, lo cual implicaba que la molécula, en algunos momentos, podía sobrevivir como un círculo. Los datos experimentales de Cairns coincidían también con los postulados para el modelo Y, lo cual sirvió para dejar más firmemente establecido ese modelo (1966). En estos casos, entonces, la réplica se produce a través de ambas ramas, lo cual significa que los dos mecanismos de Hornberg (fig.57) deben ser activados y, dado que el único de esos mecanismos que es espontáneo es el del tipo B, podemos presuponer, en los casos necesarios, la existencia de algún tipo de enzima que active el mecanismo A.

b) Plano de réplica

Aun cuando la réplica del D.N.A. parece concordar con el modelo Y, los detalles del mecanismo real no son fácilmente discernibles. Es evidente, en base al concepto de complementariedad (ver 3-b), que las "condiciones espaciales" son particularmente importantes, ya que una base "corta", pirimidina, solo puede aceptar una base purina "larga" y viceversa. Tales condiciones espaciales determinan, entonces, la existencia de la doble

hélice, la que aparecería así, como una estructura ligeramente rígida, estabilizada por su propio enrollamiento en un encastre superficial. El problema consiste en determinar que le sucede a la cadena proteínica durante la réplica, pareciendo que sigue, mientras dura el proceso, a una de las ramas, sumando de ese modo estabilidad a su propia estructura. Por otra parte, como el esqueleto fosfato-azúcar contiene muchas ligaduras simples con barreras rotacionales bajas, la hélice parece perder parte de su rigidez estructural, lo cual es un factor peligroso durante la réplica. Esto implicaría entonces, que la naturaleza debe haber tomado algún tipo de precaución especial específica para soslayar el problema. Las soluciones posibles para el planteo anterior, son varias, pero aquí hablaremos solamente de una, la cual se basa en la definición de un "plano de réplica", el que posee propiedades sumamente interesantes.

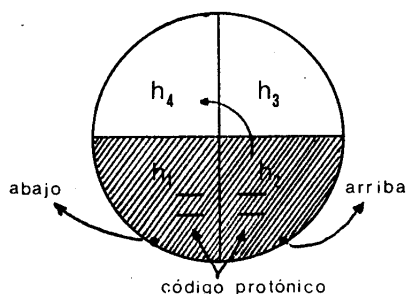


fig.60

Geometría de un plano base en el D.N.A.

Consideraremos ahora el modelo Y y el mecanismo de enrollamiento y desenrollamiento (fig.60). Es evidente que las dos ramas de la hélice deben separarse para formar el molde de réplica, pero en lugar de suponer que las ramas se separan a ambos lados de la hélice primitiva, veremos que posibilidades de intercambio existen en la hélice misma. Dado que cada base gira un ángulo de cerca de 90° , hay realmente espacio para cuatro hélices, además de algún esqueleto de azúcar-fosfato, lo suficientemente apretado (Löwdin, 1964-a). Llamemos h_1, h_2, h_3 y h_4 a las posibles posiciones de la hélice. Consideremos ahora a la hélice normal con sus pares base colocados en la posición h_1 y h_2 . Supongamos entonces que podemos romper todas las ligaduras hidrógeno al mismo tiempo; en ese caso, es posible rotar libremente h_2 sin que se produzca distorsión en la posición h_4 , con la formación de una nueva ligadura hidrógeno, con lo que la estructura tendrá el par electrónico clave en una "posición abierta". La posibilidad de un "código abierto", fue sugerida primeramente por Crick (1957), como alternativa a las rotaciones

de Bloch, el cual suponía que las bases rotaban alrededor de las ligaduras glicósidas. Más simétricamente aún, es posible rotar en 90° tanto a h_1 como a h_2 , llevándolas, en direcciones opuestas, a las posiciones h_4 y h_3 , respectivamente (fig.61). En esta forma de réplica, los dos esqueletos de azúcar-fosfato se alejan, aún más, por detrás del par base,

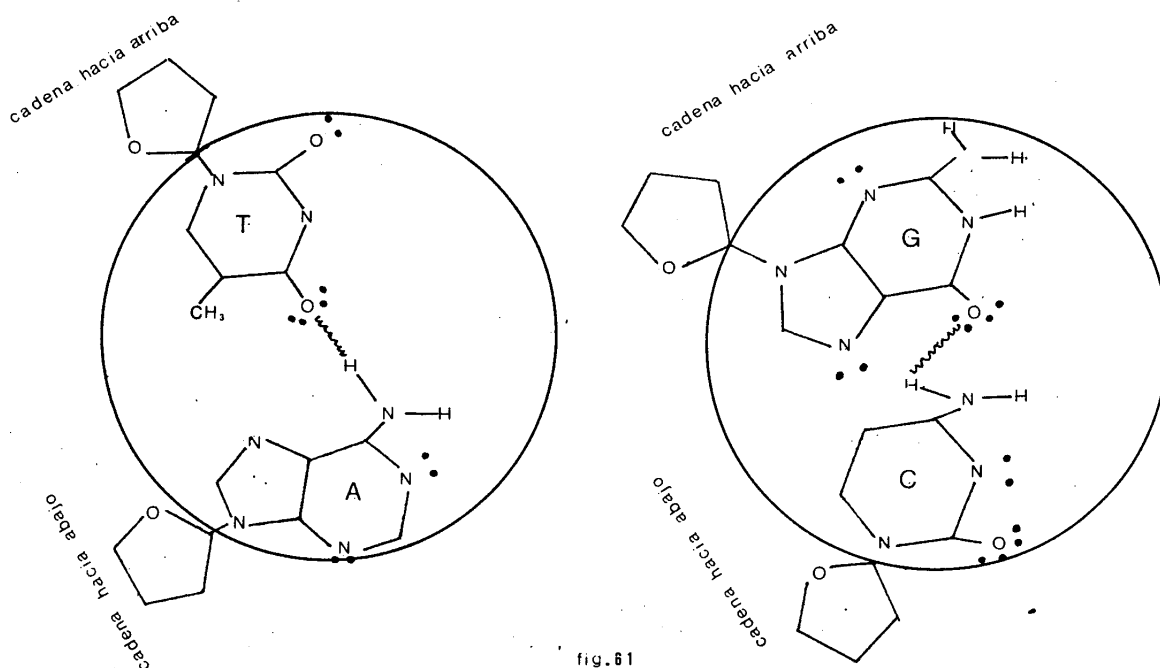


fig.61

Los dos pares base nucleótidos en el "plano de réplica" con el código protón-electrón abierto para la adición de dos bases complementarias. El símbolo  indica una ligadura hidrógeno temporal.

lo que facilita el movimiento de los nucleótidos dentro de la hélice, mientras que el código protónico queda a su vez sumamente protegido respecto de cualquier disturbio exterior que pueda alterar el mensaje genético. De este modo, toda la doble hélice actúa como molde, pero dado que cada plano posee una base purina y otra pirimidina, las condiciones espaciales para el proceso son muy específicas. Cada base puede aceptar ahora a una compañera que cumpla, a su vez, con la ligadura hidrógeno del código y con la geometría de la hélice (fig.62). Luego de la síntesis tendríamos, entonces, una cuádruple "hélice", con los dos pares h_1-h_2 y h_3-h_4 unidos a su vez por ligaduras hidrógeno transitorias (de cuatro a seis ligaduras en total), por lo que cada par estaría unido por un mínimo de dos ligaduras hidrógeno temporarias, las cuales, al romperse, darían lugar a dos moléculas de D.N.A hijas.

El mecanismo descrito no está en total concordancia con el modelo Y, y en realidad la cuádruple hélice podría limitarse a ser un "plano de réplica simple", situado en el punto de ruptura de las dos horquillas (fig.63). Es importante observar que este

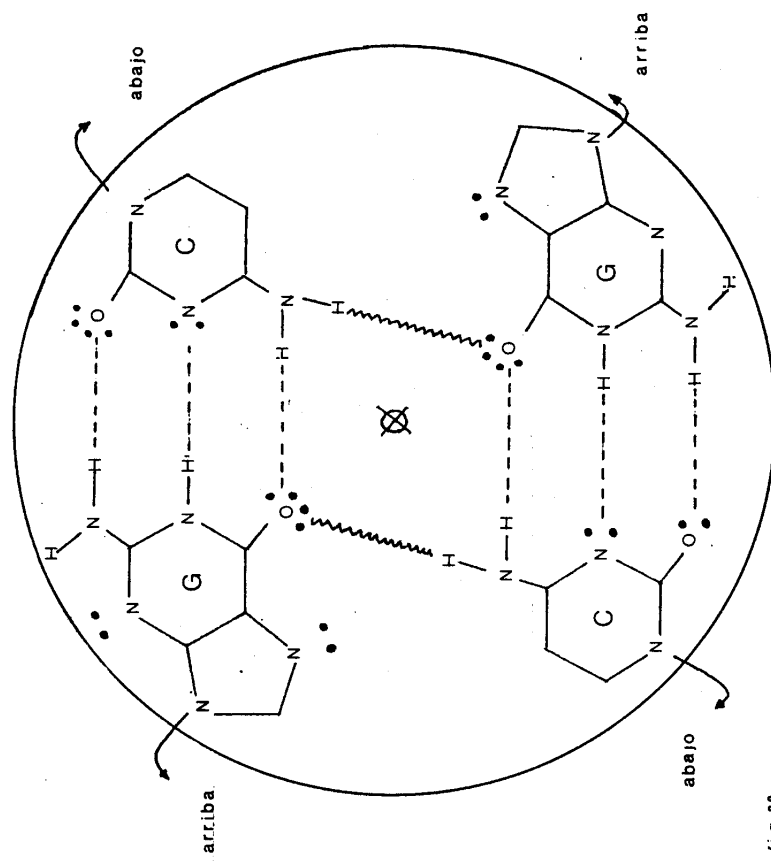
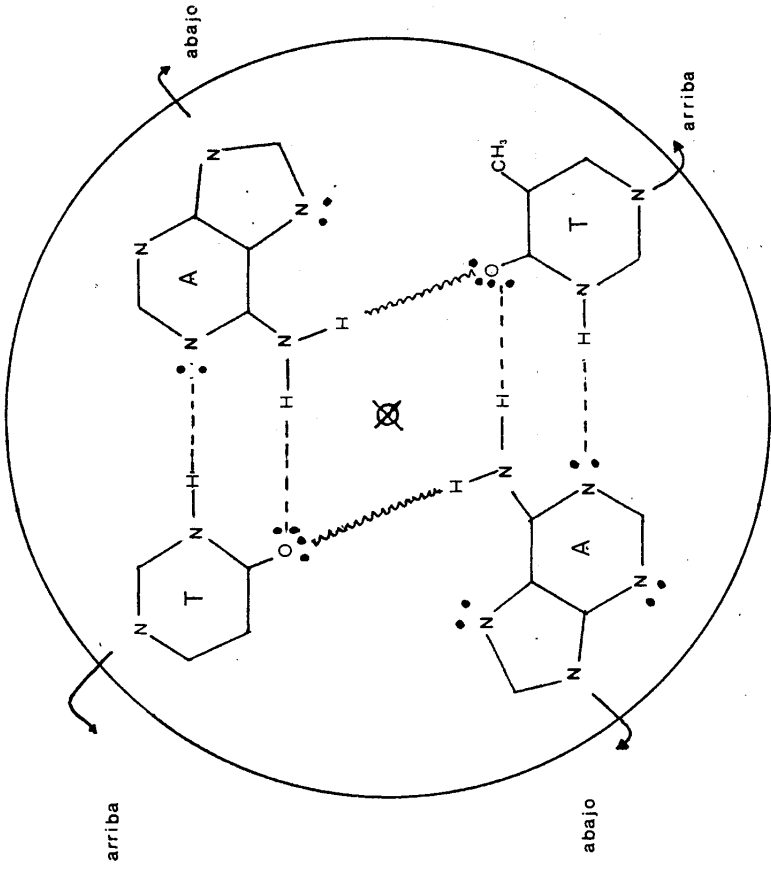
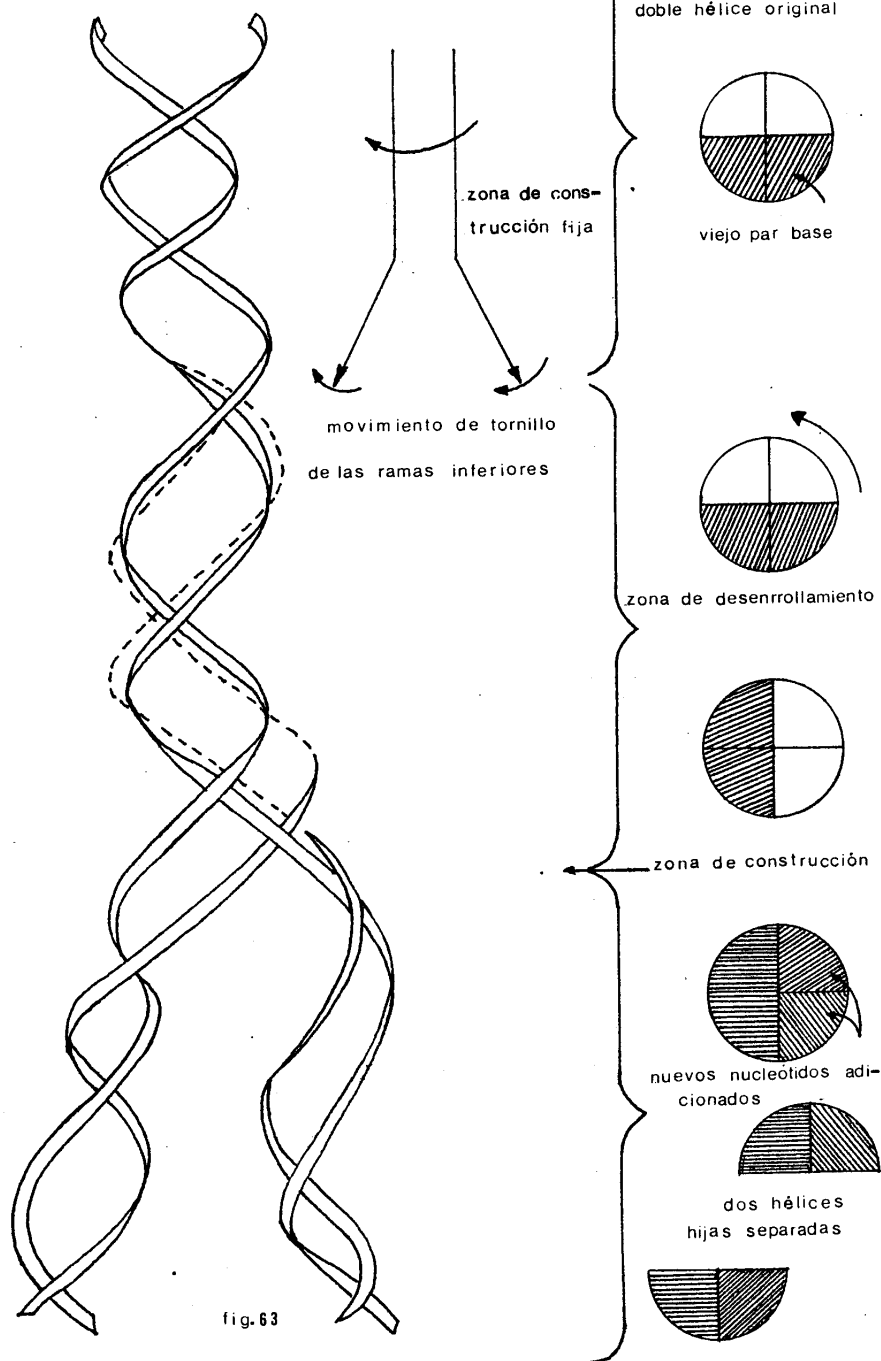


fig.82



Las cuatro bases en el "plano de réplica" durante la síntesis. Ambos pares son luego separados por el rompimiento de las ligaduras hidrógeno temporarias.



Formación de dos hélices hijas de acuerdo con el mecanismo de réplica sugerido para el D.N.A. proceso sería "semiconservativo", ya que las ramas simples (h_1 y h_2) representarían las unidades inalteradas.

De acuerdo con este modelo, el plano de réplica se iría moviendo a lo largo de la doble hélice, dejando atrás de él las dos nuevas moléculas hijas, enrollándose. Este proceso es evidentemente posible, ya que la formación de cinco a siete nuevas ligaduras hidrógeno, durante la síntesis, dejaría suficiente energía sobrante como para romper dos o tres ligaduras de la vieja hélice y las dos ligaduras hidrógeno "temporarias" del

plano de réplica previo. Por otra parte, solo un plano de la hélice original necesita estar en "forma de réplica", mientras que el resto de la hélice puede permanecer en forma normal (ver figs. 61 y 63). En la pequeña región intermedia, la hélice presentaría un esqueleto de azúcar-fosfato ligeramente deformado, correspondiendo al desenrollamiento de la hélice primitiva.

Este modelo está de acuerdo con lo postulado por Levinthal y Crane, ya que en él se presentan ambos mecanismos, desenrollamiento y enrollamiento, siendo además muy probable que la zona de construcción se mantenga quieta. Es evidente entonces, que el plano de réplica responde a las estrictas condiciones especiales exigidas por la complementariedad de Watson-Crick, presentando también dos ligaduras hidrógeno adicionales, las cuales servirían para prevenir la incorporación de errores al producirse el apareamiento de las bases.

Es también importante notar que en el centro del plano de réplica se forma un paralelogramo característico, formado por dos grupos "amino" y dos grupos "ceto", situados en esquinas opuestas, con lo que se presenta un doble apareamiento entre ellos, tal como fue postulado por Chargaff (1955, 1957, 1963). Este doble apareamiento serviría para prevenir la incorporación de alguna forma tautomérica simple, proveniente del medio exterior (Löwdin, 1964-c).

Como ejemplo de un proceso de incorporación, veremos el plano de réplica A-T en su forma normal, comparándolo con los dos planos que involucran a una base tautomérica simple, tal como sería incorporada, de acuerdo a lo previamente visto. Considerando solamente los cuatro grupos antes mencionados, se obtiene el esquema mostrado en la figura 64. Como los dos pares, protónico y electrónico están completos, la incorporación de un tautómero simple resultaría imposible, a la vez que se favorecería la incorporación de la base correcta, por medio de la ligadura hidrógeno temporaria adicional. Podríamos razonar de la misma manera con respecto al plano G-C, con lo cual tendríamos la estructura completa. Un elemento que podría llegar a poseer una gran importancia, es el par electrónico no neutralizado, situado en la posición N_7 del anillo de purina, ya que podría formar ligaduras hidrógeno débiles con los protones del grupo CH_3 de la timina, considerando el plano A-T, o competir con el par del grupo ceto (O:) formando una ligadura con uno de los protones del grupo amino (NH_3), en el plano G-C. Si bien estas ligaduras se-

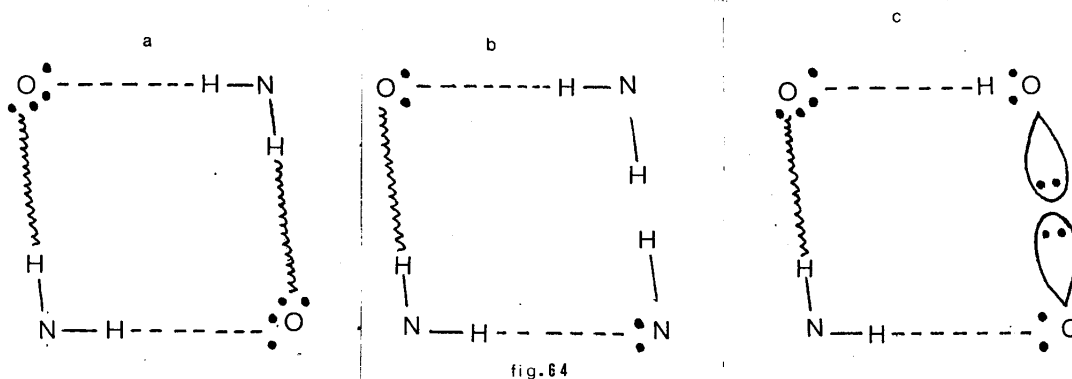


fig. 64

Los cuatro grupos clave alrededor del centro del plano de réplica en la réplica normal y en la incorporación de errores. Planos: (a) TA-AT; (b) TA-AC*; (c) TG*-AT. rían, desde el punto de vista energético, muy débiles, podrían llegar a desempeñar un

cierto papel espacial en las propiedades del plano de réplica.

Es evidente que el problema de los tautómeros es bastante grande, ya que estas formas no son, ni con mucho, tan raras como se pensó en un comienzo. Las constantes de equilibrio medidas para algunas de las bases pirimidínicas son comparativamente altas, tal como se indica a continuación:

metilcitosina	$K=10^{-4.7}$	(Kenner y al., 1955)
uracila	$K=10^{-3.3}$	(Katrizky y Waring, 1962)
bromuracila	$K=10^{-1.7}$	(" " " " , ")

(la falta de trabajos de este tipo durante los últimos años nos ha impedido hacer un tratamiento más actualizado del problema).

Esto implica que si el material nucleótido vecino está en un mínimo de equilibrio tautomérico, la probabilidad de incorporación de tautómeros es muy alta, con lo que debería aumentar proporcionalmente la razón de mutaciones en el sistema. A pesar de esto, los estudios realizados para determinar la probabilidad de cambio espontáneo en un par base (Freese, 1962), indicarían valores máximos entre 10^{-8} y 10^{-11} por generación, lo cual estaría en contradicción con lo anterior. Este hecho hizo que varios autores (Koch, 1963) postularan la existencia de una enzima especial, la cual estaría encargada de la "purificación" del material de nutrición. La existencia del plano de réplica, con la consiguiente seguridad en cuanto a los tautómeros, simplificaría en parte ese problema.

Diremos por último, que el mecanismo descrito no previene la incorporación de "pares de bases tautoméricas", ya que la probabilidad para que esto suceda está regulada, no por las constantes de equilibrio K y K' para un par de bases, sino por su producto, $K \times K'$. Si este producto entrase también dentro del rango 10^{-8} a 10^{-11} , este tautomeris-

ma quedaría también controlado. Algunas de las bases análogas, por ej. la bromurocila presenta, por excepción, una constante de equilibrio mucho mayor, lo cual explicaría su carácter altamente mutágeno.

c) Formación del R.N.A

Aparentemente, la sustancia hereditaria tiene la propiedad de realizar, no solo su propia réplica, sino también de transcribir el mensaje genético a la célula y a todo el organismo. Esto es principalmente cierto en los organismos superiores (eucariotas), ya que se han encontrado organismos primitivos (procariotes), que no poseen D.N.A. En los primeros entonces, la transcripción genética se realizaría a través del R.N.A mensajero, el cual quedaría así en condiciones de servir a su vez como molde para fabricar las proteínas específicas necesarias para cada organismo particular (ver introducción y 3-a). Por supuesto, el mecanismo involucrado en la formación del R.N.A mensajero es muy incierto, aunque las evidencias experimentales (Volkin y Astrachan, 1956; Belozersky y Spirin, 1958; Volkin y al., 1958; Ycas, 1959; Ycas y Vincent, 1960; Volkin, 1960; Nomuar y al., 1960; Stevens, 1961) indican que el proceso de réplica es muy similar al del D.N.A, por lo que es natural suponer que en estos casos, la última molécula nombrada actúa como modelo. La hipótesis más simple consiste en suponer que el proceso de transcripción se produce de la misma manera que el proceso de réplica, esto es: el código genético se abre temporalmente y una de las ramas queda como molde para la síntesis de una molécula de R.N.A mensajero de cadena simple.

La doble hélice de D.N.A consta de dos surcos, uno superficial y otro profundo, ricos ambos en protones y pares solitarios. Sabemos ya que el surco superficial está ocupado por una proteína helicoidal (histona) que sirve para estabilizar toda la molécula, pero las funciones del surco profundo son mucho menos conocidas. En 1958, Stern observó que este surco posee un par solitario que actúa como lo haría un par código, el cual podría servir entonces como molde para una tercera hélice, la que ocuparía ese lugar. La formación de las ligaduras hidrógeno necesarias para que se verifique este proceso, tal como lo sugirió Stern, está mostrada en la fig. 65. En esta figura, los círculos blancos y negros representan átomos de oxígeno y nitrógeno respectivamente, y la flecha de uno a otro átomo, un salto tautomérico. Construyendo un modelo espacial de la triple hélice, vemos que, para que el esqueleto de azúcar-fosfato quede en la posición correcta, un lado de la cadena debe girar un ángulo de 180° alrededor de

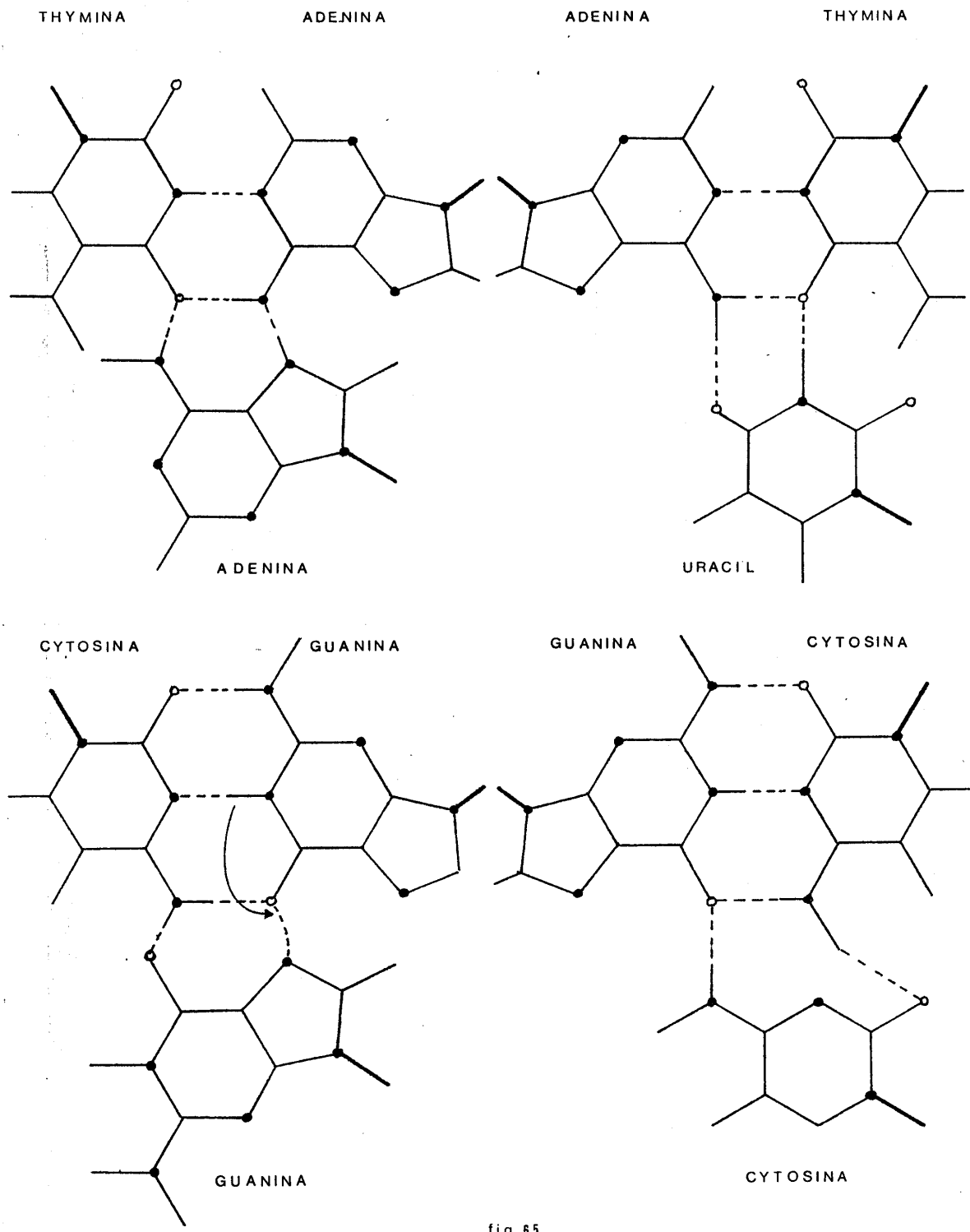


fig.65

Transcripcion del codigo genetico de acuerdo con Stent (1958).

la ligadura glucósida. Este modelo, sin embargo, de acuerdo con Crick (1957) es, desde el punto de vista espacial, muy poco probable.

Una de las cosas que debe respetar cualquier modelo sugerido, es la relación entre los cocientes:

$$\left(\frac{G + C}{A + U} \right)_{RNA} \qquad \left(\frac{G + C}{A + T} \right)_{DNA}$$

de los cuales se habló ya en la parte 3 de este trabajo. En base a todo esto, Zubay (1958, a, b; 1962) sugirió otras dos posibilidades para la triple hélice, las cuales tendrían las características de transcripción mostradas en el siguiente cuadro:

Modelo A			Modelo B		
TA	→	C	TA	→	A
AT	→	G	AT	→	U
CG	→	U	CG	→	G
GC	→	A	GC	→	C

Estas dos hélices se muestran con más detalle en la fig. 66. Ambas están contenidas dentro de márgenes espaciales razonables. En su momento, y aún cuando las razones de las bases antes mencionadas señalan, la una inversa de la otra, Zubay favoreció el modelo A. Más adelante, y de acuerdo al mayor número de datos experimentales, se tendió a suponer más probable el modelo B.

Las experiencias realizadas con polinucleótidos sintéticos (Rich, 1958, a, b; 1959 a, b, c; 1960) han demostrado la existencia de moléculas helicoidales tri-ramadas y el ácido polinucleosínico con las tres bases hipoxantina en el plano, es particularmente importante, debido a la simetría que aparece entre las ligaduras hidrógeno de los constituyentes. El estudio de este tipo de molécula tri-ramada es muy importante para la comprensión del problema planteado.

Hall y Spiegelman (1961), realizaron una experiencia que confirmó en gran medida la hipótesis de complementariedad enunciada por Watson-Crick en 1953, ya que llevaba a la idea que una sola rama del D.N.A actuaba como molde para la síntesis de un R.N.A complementario, mono-ramado. Si bien estudiaremos ahora en mayor detalle las condiciones necesarias para que funcione un mecanismo de este tipo, debemos recordar que el mecanismo genético real no puede ser tan simple, ya que se han encontrado organismos muy primitivos (no-virus), que poseen solamente R.N.A, en algunos casos bi-ramados y que algunos

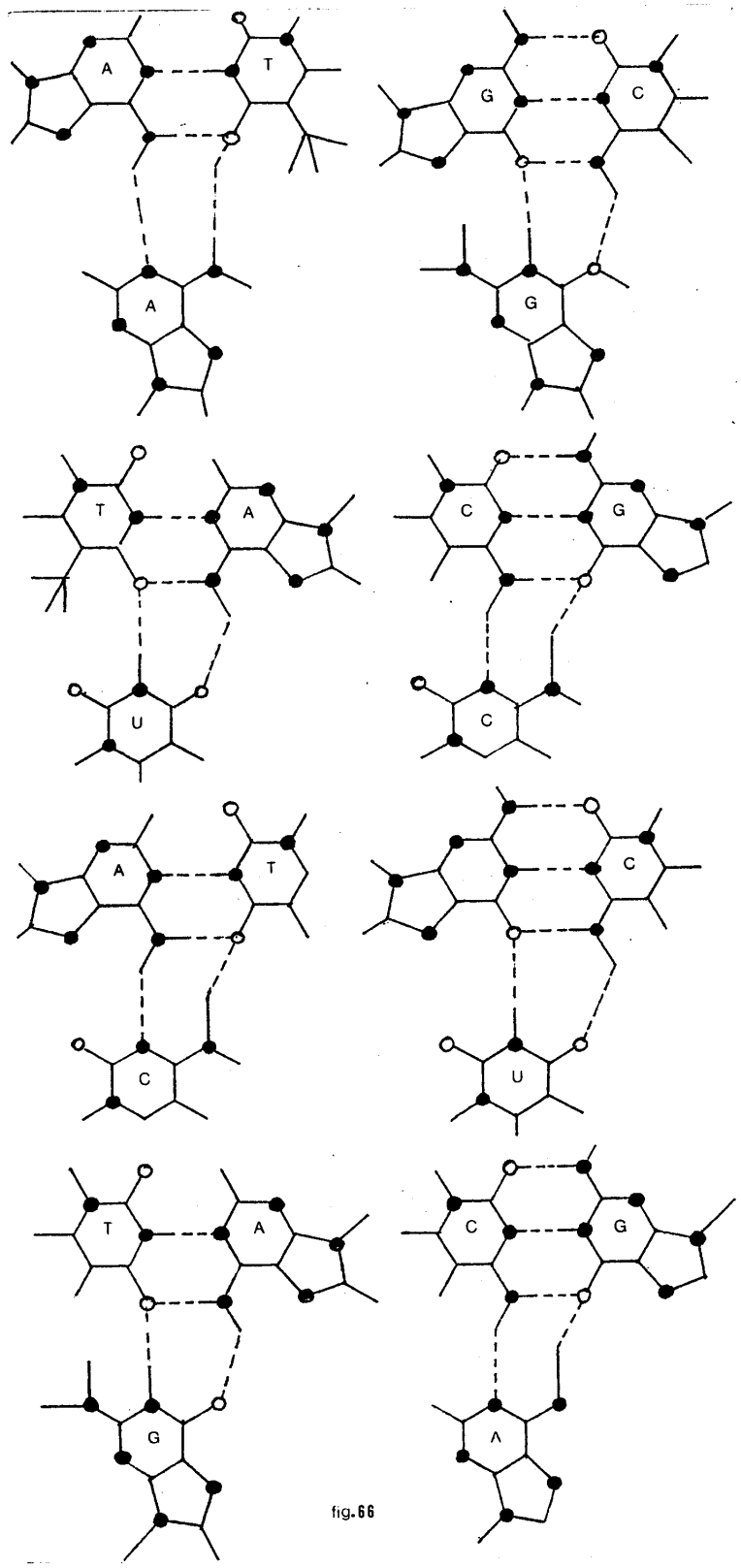
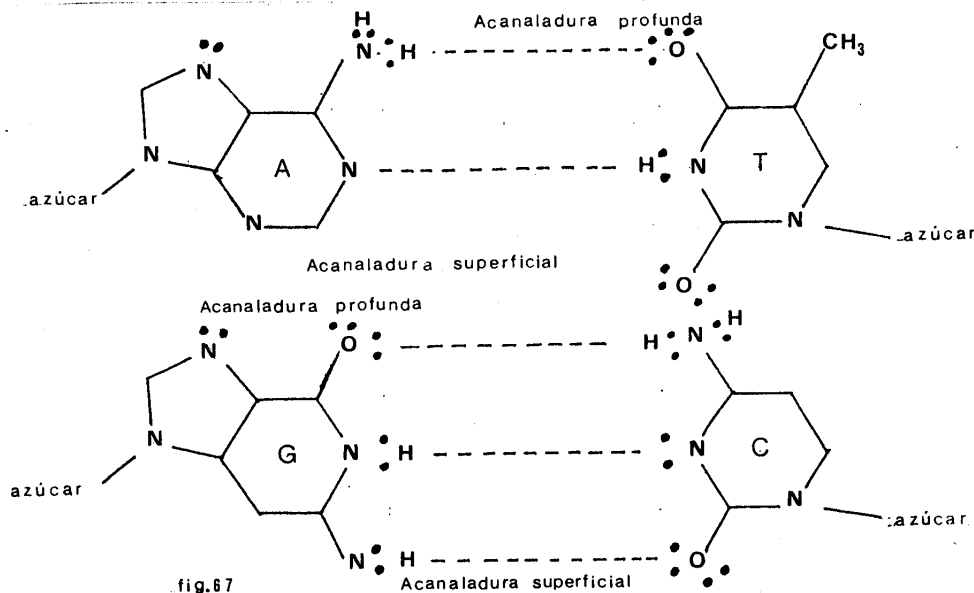


fig.66

Formación de un par base de D.N.A y una base tri-nucleósida en la acanaladura profunda según Zubay (1958). Los círculos oscuros y claros representan átomos de nitrógeno y oxígeno respectivamente. La base inferior de cada fig. corresponde al componente de R.N.A.

R.N.A de transferencia poseen la propiedad de auto-duplicarse (Mills, Kramer y Spielgelman, 1973).

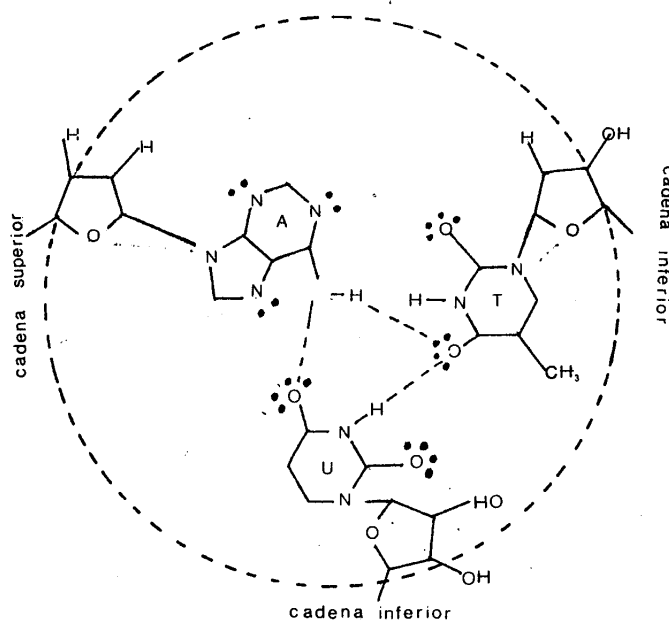
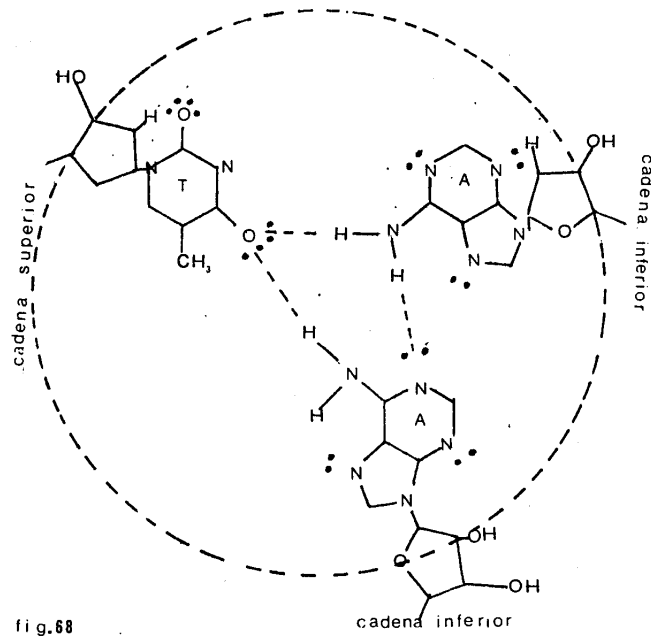
Al estudiar los pares base normales se puede observar (fig.67) que el par protón-electrón, expuesto por una de las bases en la acanaladura superficial, aparece también en la profunda. La distancia entre el protón y el par solitario, es sin embar-



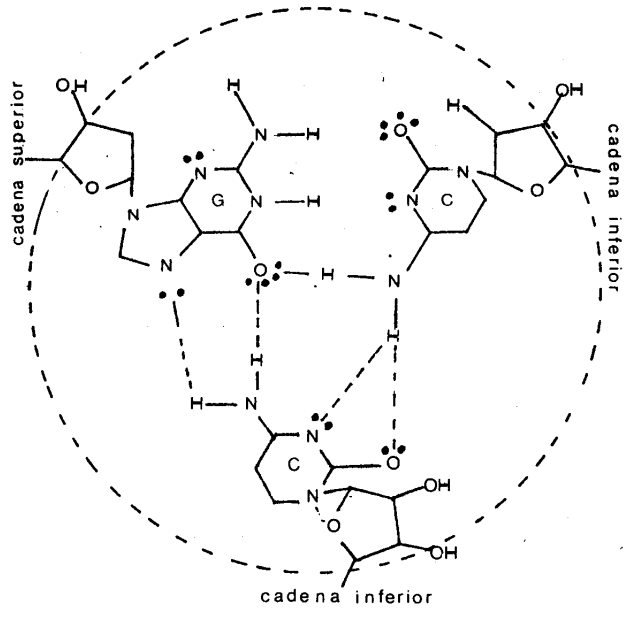
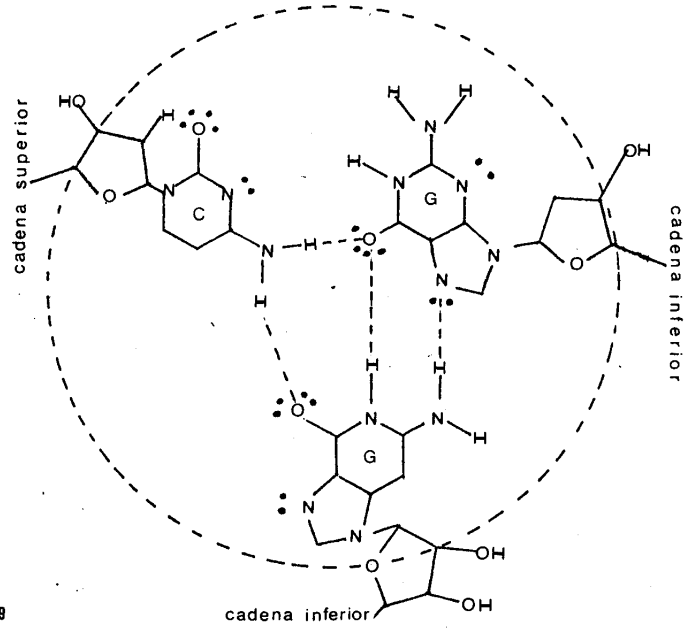
El código protón-electrón en el par base, en la acanaladura de D.N.A.

go bastante mayor que en la base, existiendo también un cierto desfase en la estructura angular, el cual debería modificarse. Si uno pudiese rotar el par base entre 15° y 30° , aún cuando se alteren algo los otros parámetros, obtendríamos una estructura ideal para la "transcripción". Esta rotación puede realizarse sin llegar a romper las ligaduras con la proteína estabilizadora (histona) arrollada en la acanaladura superficial, debido a que esta posee algunos dobleces de más que le permiten estirarse un poco. Si se produce este proceso, la hélice queda en "posición de transcripción", lo que permite la formación de una tercera hélice, la cual quedaría en la acanaladura profunda, con la base determinada por la ligadura hidrógeno (figs. 68 y 69).

Podemos agregar todavía algunas cosas acerca de la geometría de esta tercera hélice. Dado que las bases pirimidinas son considerablemente más cortas que las purinas, cuando giran hacia afuera para unirse a los grupos pentosa la posición 3' de las primeras queda aproximadamente equivalente (equivalencia espacial) que la posición 2' de las segundas. Sería muy interesante determinar si esta equivalencia es también de carác-



Combinación de pares bases de D.N.A y una tercera base nucleótida en la acanaladura profunda de D.N.A en la forma de transcripción.



Idem figura anterior.

ter químico, ya que se ha encontrado que tanto en el D.N.A como en el R.N.A se verifican solamente uniones C₂ - C₅. (Davidson, a, b, 1960; Chantrenne, 1961), por lo cual, si existiese verdadera equivalencia, en el R.N.A mensajero habría uniones C₃ - C₅.

En realidad, si uno observa los planos de réplica de las figs. 68 y 69 y los compara con el de la fig. 62, ve que son muy parecidos. Sin embargo, las condiciones espaciales en el caso que estamos tratando ahora no son tan estrictas como en la transcripción del D.N.A, por lo que podría suceder que durante una transcripción una base pirimidina pudiese ser reemplazada por una purina, es decir, una uracila o citosina sería eliminada, quedando en su lugar una base guanina.

Estudiando las ligaduras hidrógeno en el plano de transcripción se vé, sin embargo que los grupos en posición 2 poseen una especificidad suplementaria, tal que se rigen por ciertas reglas de "escritura exacta" : A → A; T → U; G → C y C → G. A partir de la experiencia de Hall y Spiegelman (1961) se determinó que no es necesario que exista una complementariedad completa en el sentido de Watson-Crick, sino que basta con que las ramas involucradas sean complementarias con respecto a la ligadura hidrógeno solitaria.

Observando las figs. 68 y 69 se vé que solo es "leída" una rama del D.N.A, obteniéndose la energía de la misma manera, ya explicada, que en la transcripción del D.N.A y formándose el R.N.A a lo largo del eje. El mecanismo energético ya explicado permitiría que la nueva molécula de R.N.A se suelte, quedando libre y afuera de la doble hélice, a medida que avanza su formación. El torque necesario para que la nueva rama se desenrolle podría producirse por la rotura de nucleósidos trifosfatos, lo cual proveería la energía necesaria.

Leyendo una sola rama del D.N.A, la primera ley de Chargaff es respetada, ya que puede cumplirse que:

$$(G + C) : (A + T) = 1$$

y $(G + C) : (A + U) = 1$

para el D.N.A y el R.N.A, respectivamente. Sin embargo, si la transcripción se realizase de esa manera, el R.N.A quedaría conformado por un conjunto unívoco de solo dos de las cuatro bases que se han encontrado en él y la ley de Chargaff, respecto a su estructura

$$A + C = G + U$$

no podría cumplirse.

Dada esta situación, la única solución posible consiste en que la lectura avance primero a lo largo de una rama, la distancia unitaria, es decir un "gen", y retorne luego, por la otra hasta el punto de ruptura. De esta manera, se obtendría una molécula de R.N.A, de rama simple, con cada una de sus dos mitades conectadas, por medio de una presilla, a la rama patrón de D.N.A correspondiente. Si no hay degeneración, la composición base de cada una de las mitades del R.N.A sería una copia de la rama de D.N.A correspondiente, obteniéndose así: $A = U$ y $C = G$, con lo que la segunda ley de Chargaff quedaría satisfecha. La molécula así obtenida sería una copia de su propio complemento. Todo este mecanismo no logra explicar, sin embargo, por que, en lugar de encontrar que A reemplaza a U y que G reemplaza a C, cosa que podría suceder, dada la equivalencia de las bases, se encuentra siempre la relación 6-amino = 6-ceto.

Este tipo de lectura explicaría también la tendencia de la molécula de R.N.A de plegarse sobre sí misma, sin llegar a formar necesariamente una doble hélice. Hall y Spiegelman ven en esta característica especial, el indicio de la existencia de un código suplementario entre ambas partes de la molécula.

El problema de si se lee una o las dos ramas ha llevado a muchas discusiones, ya que las experiencias "in vitro" favorecen la segunda hipótesis, mientras que las realizadas "in vivo" lo hacen con la primera. Esto es sumamente importante, ya que de ser cierta la lectura de una sola rama, el R.N.A mensajero no respetaría la segunda ley de Chargaff. Ahora bien, dada la corta existencia de esta molécula (solo aparece durante la síntesis de una proteína específica), es casi imposible determinar en forma experimental el cumplimiento o no, de la ley.

Toda la teoría hasta ahora enunciada se basa en dos ideas: la posible existencia de hélices múltiples (Rich) y la existencia de una copia del código genético en la canaladura profunda del D.N.A a la cual, por otra parte, no se le ha encontrado función que no sea esta, y que podría servir para la transcripción (Stent, Zubay). Los modelos sugeridos por Zubay (ver adelante), serían obtenidos leyendo las dos ramas.

Existen otros modelos para el proceso de transcripción, por ej. la apertura y la lectura del código genético ordinario o la formación de un R.N.A tipo stencil, que serviría para la copia sucesiva de moléculas (Ochoa, 1962). Esta última teoría, sin embargo, es la menos favorecida por los científicos, teniéndose en cuenta para la discusión solamente la desarrollada en este punto y la primera de las últimas nombradas.