

BREVE HISTORIA DEL ADN, SU ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Palabras clave: Genética, Leyes de Mendel, ADN, Difracción de Rayos-X, Biología Molecular.
Key words: Genetics, Mendel's Laws, DNA, X-ray Diffraction, Molecular Biology.

Durante 2012 se celebraron dos acontecimientos científicos relacionados. Uno de ellos es el Centenario de un descubrimiento cardinal de la Física, esto es el fenómeno de difracción de rayos-X por cristales, realizado por Walter Friedrich, Paul Knipping y Max von Laue. La instrumentación e interpretación de este fenómeno por el trabajo pionero de William Henry Bragg y su hijo William Lawrence Bragg inició el desarrollo de los hoy poderosos métodos de análisis estructural. Dichos métodos estructurales por difracción de rayos-X resultarían clave en el otro acontecimiento que se conmemoró en 2012: el Cincuentenario del Premio Nobel en Fisiología o Medicina otorgado a Francis Crick, James Watson y Maurice Wilkins por sus trabajos de 1953 sobre la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN), la sustancia de la herencia, un hallazgo fundamental para el entendimiento del fenómeno natural más extraordinario: la Vida. A sesenta años de la culminación de aquellos trabajos, hacemos aquí una descripción sucinta de los eventos que desembocaron en uno de los descubrimientos científicos más importantes del siglo XX.

"En el campo de las observaciones, la suerte favorece sólo a la mente preparada".
Louis Pasteur.

During 2012 two related scientific breakthroughs were celebrated. One of them was the Centennial of a cardinal discovery in Physics, namely the X-ray diffraction by crystals, by Walter Friedrich, Paul Knipping and Max von Laue. The instrumentation and interpretation of this phenomenon by the pioneer work of William Henry Bragg and his son William Lawrence Bragg paved the way for the development of the today powerful methods of structural analysis. These X-ray diffraction methods would play a key role in the other discovery celebrated in 2012: the fifty years of the Nobel Prize in Physiology or Medicine awarded to Francis Crick, James Watson and Maurice Wilkins for their work of 1953 on the molecular structure of deoxyribonucleic acid (DNA), the substance of the heredity, a fundamental finding for the understanding of the most extraordinary natural phenomena: Life. In the sixtieth anniversary of the culmination of those works, we succinctly describe here the events that lead to one of the major scientific discoveries of the twentieth century.

"In the field of the observations, luck only favors the prepared minds".
Louis Pasteur.

■ PARTE 1. BREVÍSIMA HISTORIA DE LA GENÉTICA CLÁSICA HASTA INICIOS DE LOS 1950'S

1.1 PRE-HISTORIA DE LA GENÉTICA.

A pesar que se trata de una disciplina científica con sólo unos 150 años de desarrollo, el interés en los fenómenos biológicos relacionados con la Genética puede remontarse a la Era Neolítica (alrededor de 10.700 a 9.400 AC) cuando el crecimiento de la población demandó cambios en los métodos ancestrales

para la obtención de alimentos mediante la recolección, caza y pesca. Entonces, dio comienzo (principalmente en Medio Oriente) el desarrollo de la agricultura y la ganadería con la siembra de plantas y la cría de animales domésticos (Pierce, 2007). Pronto se descubre que se pueden modificar los cultivos y los animales mediante su reproducción selectiva cuando rasgos (*fenotipos*) deseables de los progenitores eran transmitidos a su descendencia (*herencia*).

En paralelo y desde tiempos re-

■ Oscar E. Piro

Departamento de Física e Instituto de Física
La Plata (CONICET), Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, CC 67, 1900
La Plata, Argentina.

piro@fisica.unlp.edu.ar

mos, ya se habían observados dichos fenómeno de herencia en los humanos y el describir y entender sus mecanismos en Occidente ocupó la mente de los filósofos griegos. Entre ellos, Leucipo de Mileto (Siglo V AC), Anaxágoras (500-428 AC) y Demócrito (460-370 AC) notaron que virtualmente todas las partes del cuerpo exhiben diferencias hereditarias. Así concluyeron que cada órgano y estructura del cuerpo producía pequeños sedimentos (más tarde llamados *gémulas*) que por vía sanguínea llegaban a los órganos reproductores desde donde eran pasa-

dos al embrión en el momento de la concepción (ver Fig. 1). En el marco de este concepto, que más tarde se conocería como *pangénesis*, Anaxágoras creía que un perfectamente preformado y diminuto humano (*homúnculo*) preexistía en el aparato reproductor masculino y era transmitido a la madre durante la procreación para su desarrollo embrionario en la matriz (Guttman et al., 2004).

Por aquella época se creía que sólo el hombre contribuía a la herencia de sus descendientes y también que podía transmitir *caracteres adquiridos* durante su vida a dicha progenie. El filósofo griego Aristóteles (384-322 AC) adhirió a este último concepto pero creía que ambos sexos contribuían a los rasgos de

la descendencia, considerando por lo tanto incorrecta la hipótesis del homúnculo. Rechazó también el concepto de pangénesis, señalando, además, que a veces la gente se parece más a sus ancestros que a sus propios padres.

A pesar que durante la Antigua Roma (hasta la caída del Imperio Romano de Occidente en 476 AD) se contribuyó poco al entendimiento de la herencia, durante ese período se desarrollaron exitosamente por el método de prueba y error un cierto número de técnicas de cría de animales y de crecimiento de plantas. Se avanzaría muy poco en el entendimiento de la Genética durante los próximos 1000 años. Las antiguas ideas erróneas sobre pangénesis y

herencia de caracteres adquiridos, junto con las técnicas empíricas de cría de animales y plantas, sobrevivían durante el surgimiento de la ciencia moderna en los siglos XVII y XVIII de nuestra era, llegando a tener gran influencia hasta fines del siglo XIX (Guttman et al., 2004).

1.2. AVANCES DEL SIGLO XVII. BIOLOGÍA MÁS ALLÁ DE LA RESOLUCIÓN DEL OJO HUMANO

Empleando los primeros microscopios, en 1665 Robert Hooke (naturalista inglés, 1635-1703) estudiaba el origen de la baja densidad del corcho mediante la observación de delgadas láminas. Allí descubre que el vegetal está constituido por *celdas* organizadas espacialmente de una manera similar a un panal de abejas. No pudo demostrar el significado biológico de estas celdillas en los seres vivos, por cuanto lo que estaba observando eran células vegetales muertas que retenían su característica forma poligonal.

Antón van Leeuwenhoek (fabricante de lentes holandés, 1632-1723) fue probablemente la primera persona en observar bacterias (organismos unicelulares) y otros microorganismos. En 1674 observa protozoarios; en 1677 descubre los espermatozoides humanos y de otros animales (a los que llamó *animáculos*). Entusiastas practicantes de la microscopía durante esa época creyeron ver que un minúsculo *homúnculo* reside en el espermatozoide humano, reavivando antiguas creencias en *preformacionismo* de hace más de 2000 años (ver Fig. 2)

Durante la misma década de los 1670's, Régnier de Graaf (médico y anatomista holandés, 1641-1673) describió por primera vez el folículo ovárico, la estructura en la cual se forman los ovocitos, células precursoras del óvulo humano. Aunque el

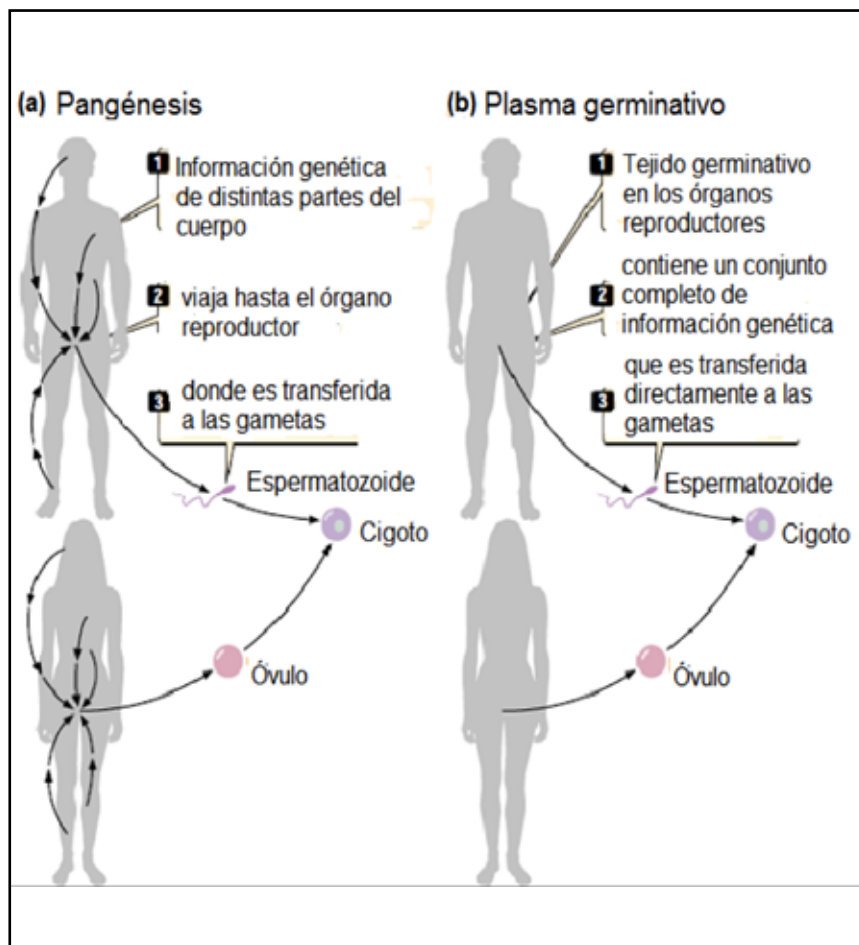


Figura 1: Antiguo concepto de herencia a través de la pangénesis (a) comparado con la moderna teoría del plasma germinativo (b). Figura adaptada de Pierce (2007).

óvulo real no se visualizó hasta pasados otros 150 años, su existencia fue rápidamente aceptada. De hecho, de Graaf atrajo a una escuela de adeptos, liderados por Marcello Malpighi (anatomista y biólogo italiano, 1628-1694), llamados *ovistas*, que creían que era el óvulo femenino el que contenía el futuro ser humano y no el espermatozoide como sostenía la escuela que se dio a llamar *animalculista* o *espermista*. ¡La controversia entre las dos escuelas se extendió por décadas!

Otra noción previa al desarrollo científico de la genética establecía equivocadamente que la descendencia adquiriría una *herencia mezcla* de los caracteres aportados por los padres.

1.3. DESCUBRIMIENTOS GENÉTICOS DEL SIGLO XIX. LEYES DE MENDEL SOBRE LA HERENCIA

Karl Reinhold Ernst von Baer (naturalista alemán del Báltico, 1792-1876) descubre en 1827 los óvulos mamíferos, cuya existencia fue predicha por Régnier de Graaf unos 150 años antes.

Robert Brown (botánico escocés, 1773-1858) describe en 1831 el núcleo de células eucariotas.

Matthias Jakob Schleiden (botánico alemán, 1804-1881) y su compatriota Friedrich Theodor Schwann (naturalista, 1810-1882) establecen en 1839 la *teoría celular*: todos los animales y plantas consisten en agregados de células, las que constituyen la mínima unidad de vida. Proponen que todo organismo comienza con una única célula y que las criaturas multicelulares se forman por sucesivas divisiones celulares (ver Fig. 3).

Charles Darwin (naturalista inglés, 1809-1882) enuncia en 1859 su famosa teoría sobre el *origen y evolución de las especies*. Darwin adoptó el modelo de pangénesis para la herencia, lo que le impidió desarrollar la base genética subyacente en su teoría de la evolución a través de la selección natural.

Gregor Johann Mendel (monje católico y naturalista austríaco, 1822-1884) establece en 1865 las leyes de la herencia, fundando la

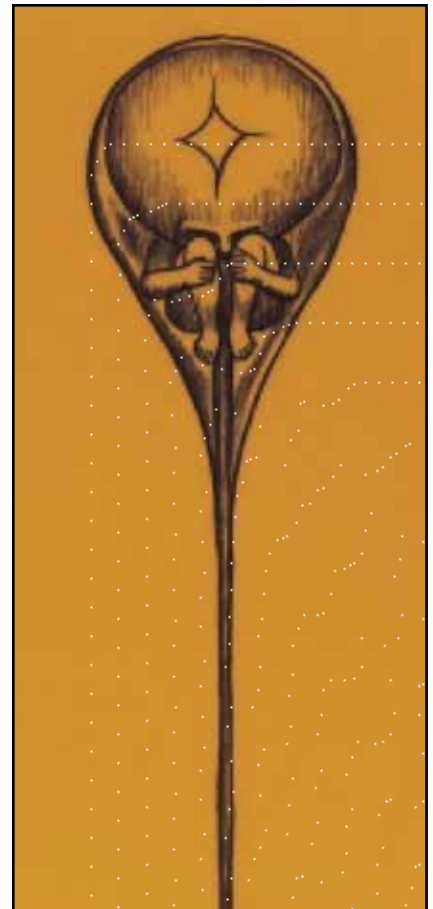


Figura 2: Grabado de 1694 mostrando un homúnculo en la cabeza de un espermatozoide humano.

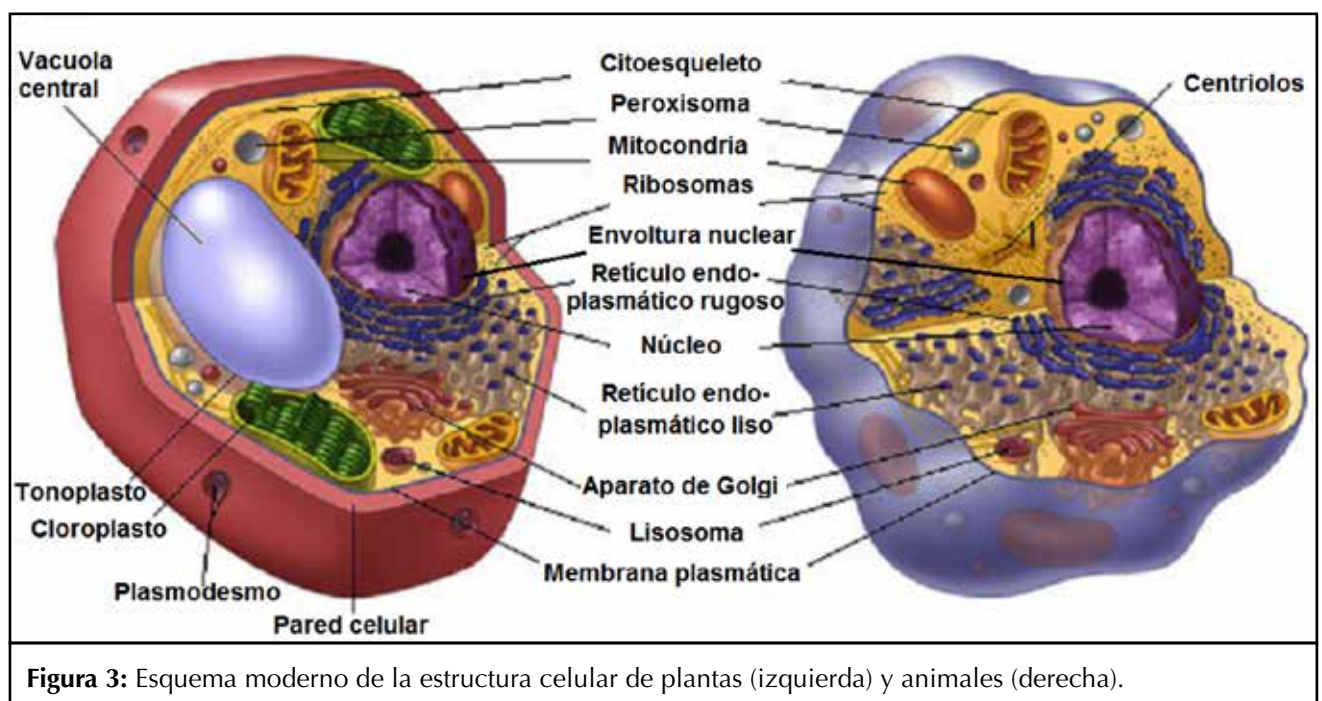


Figura 3: Esquema moderno de la estructura celular de plantas (izquierda) y animales (derecha).

disciplina científica de la Genética. Los trabajos de Mendel durante el período 1856-1863 precisan y cuantifican resultados de sus predecesores, valiéndose de i) Numerosos y precisamente controlados experimentos de fertilización cruzada entre diversas variedades de arvejas (usó unas 28.000 plantas) con siete bien determinadas características fenotípicas, tales como el color (amarillas o verdes) y la textura (lisas o rugosas) de las semillas, el color de las flores (blancas o púrpuras), etc. ii) Seguimiento de los patrones de herencia a lo largo de varias generaciones y iii) Empleo de conceptos simples de matemática combinatoria y estadística para derivar las leyes de la herencia.

Mendel trabajó con variedades 'puras' de arvejas con respecto a un dado rasgo (fenotipo): cruzadas entre sí a lo largo de varias generaciones mostraban consistentemente siempre el mismo fenotipo. Cada experimento consistió en cruzar genéticamente entre sí dos de tales variedades puras que difieren en sólo uno de las siete características fenotípicas seleccionadas (monohibridización). Las plantas híbridas resultantes pueden exhibir cierta combinación de rasgos que fueron seguidos en posteriores cruzamientos. Ejemplifiquemos esto con la experiencia donde Mendel cruzó una variedad pura de arvejas de semillas verdes con la correspondiente variedad pura de semillas amarillas mediante la remoción del aparato polinizador de cada planta de un tipo seguido de su fertilización manual mediante polen extraído de la variedad opuesta, obteniendo el siguiente patrón (Guttman et al., 2004):

P **Amarillo x verde**



F₁ **Todas amarillas (se cruzan en sí)**



F₂ **Mayoría amarillas, algunas verdes**

Donde

P: Generación parental

F₁: Primera generación filial

F₂: Segunda generación filial

A pesar que las ideas previas de *herencia mixta* predecían que los híbridos F₁ deberían presentar un color intermedio verde-amarillento, sin embargo la experiencia mostró que *todas* las semillas resultaron amarillas, como si el rasgo verde ¡hubiera desaparecido! Sorprendentemente, en la generación siguiente F₂, obtenida por cruce de la F₁ entre sí, ¡las semillas verdes (a pesar que en menor proporción) reaparecieron!

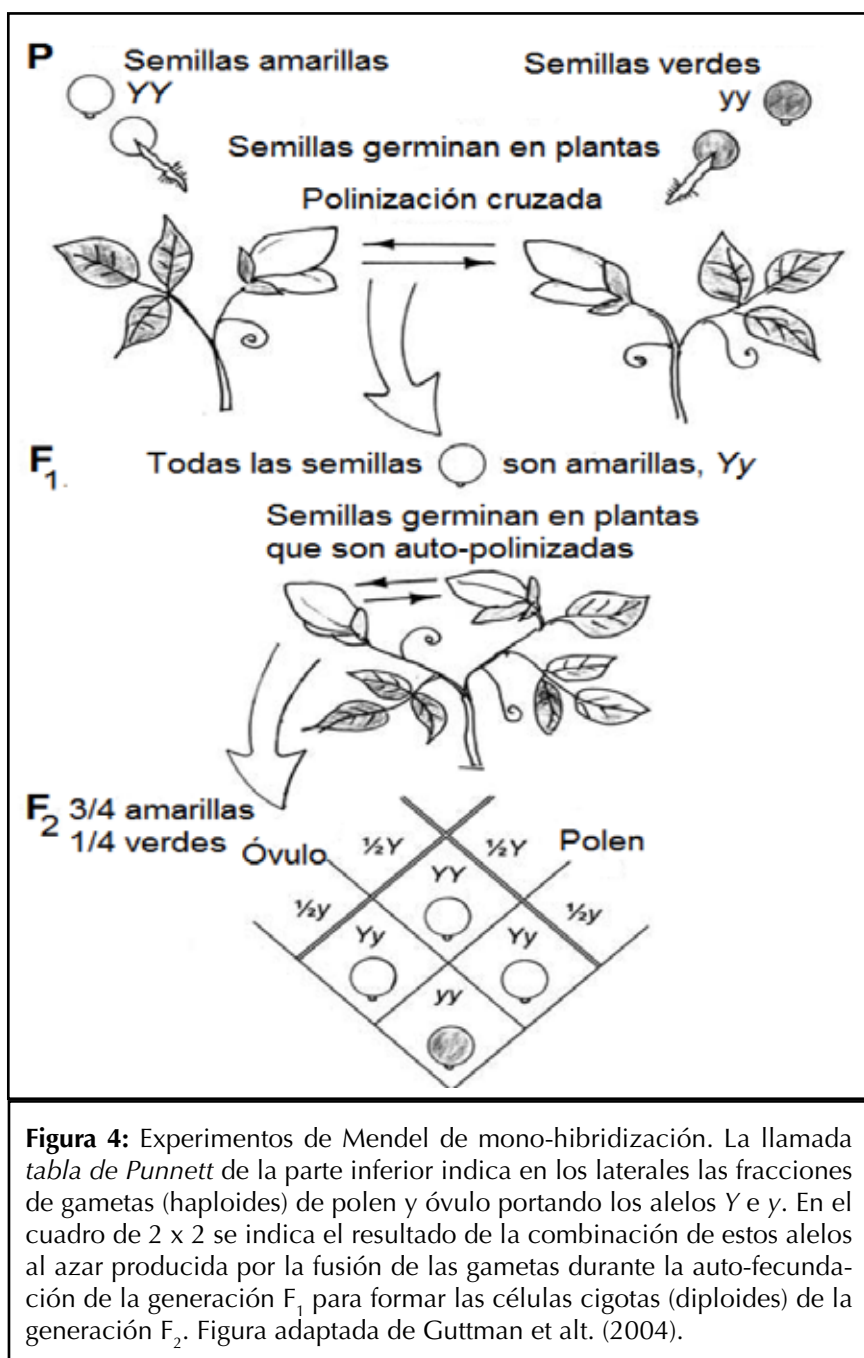
Los otros rasgos estudiados por Mendel siguieron el mismo patrón. Así al repetir sus experimentos comenzando con sendas variedades puras de arvejas con flores púrpuras y blancas, observó sólo flores púrpuras en la generación F₁ (no una intermedia violeta) y la reaparición de flores blancas en la generación F₂.

Cuantitativamente, en el caso del seguimiento del color de las semillas, Mendel obtuvo en F₂ 6022 amarillas y 2001 verdes. En el caso del seguimiento del color de las flores, obtuvo en la generación F₂ 705 púrpuras y 224 blancas. Mendel notó que ambos conjuntos de números presentan un radio muy próximo a 3:1. La explicación de esta observa-

ción lo llevaría a la elaboración de un modelo hipotético y al enunciado de su primera ley de *segregación*.

El modelo de Mendel postulaba que las plantas contienen *factores* que determinan la herencia de cada rasgo de las mismas y que cada planta porta *un par* de factores hereditarios por cada rasgo, respectivamente suministrados por ambos progenitores. Además, él postuló que cuando la planta posee dos factores diferentes, uno de ellos es *dominante* (su efecto fenotípico es visible) mientras que el otro es *recesivo* (su efecto no se manifiesta). Así, el color amarillo de las semillas de arveja debe ser dominante, mientras que el verde es recesivo; el color púrpura de las flores es dominante frente al color blanco. En Genética, se acostumbra simbolizar un factor hereditario dominante con una letra mayúscula (por ejemplo Y) y el correspondiente recesivo con la letra minúscula correspondiente (y). Modernamente, identificamos estos dos factores como formas de un solo gen (que determina ya sea el color de las semillas o el de las flores) y que llamamos *alelos* uno de otro.

La Figura 4 muestra la explicación de los resultados experimentales de Mendel, basada en su modelo. Su variedad pura conteniendo semillas amarillas deben portar dos factores dominantes Y (YY), mientras que la variedad pura de semillas verdes debe contener dos factores recesivos y (yy). Dado que ambos factores en estas variedades son los mismos, se los llama *homocigóticos* o se dice que las plantas son *homocigotas*. Cada una de las plantas contribuye un factor determinante del color, así que todas las plantas F₁ son Yy; dado que ellas portan diferentes factores, estas plantas son *heterocigotas*. Cuando se reproducen mediante cruce entre ellas, cada una produce dos tipos de gametas, la mi-



proporciones iguales.

Además de su trabajo en mono-híbridos, Mendel también realizó cruzamientos entre variedades puras de arvejas con respecto a *dos* rasgos característicos (doble hibridización). Por ejemplo, creció una variedad homocigota de arvejas que producían semillas lisas (factor *RR*) y amarillas (*YY*) dominantes y también otra variedad homocigota que producía semillas rugosas (*rr*) y verdes (*yy*) recesivas. Al cruzar estas dos variedades entre sí observó que *toda* la progenie *F₁* consistía en semillas lisas y amarillas. Luego procedió a cruzar la progenie *F₁* entre sí para obtener en la subsecuente generación *F₂* la siguiente distribución: 315 semillas lisas y amarillas; 101 rugosas y amarillas; 108 lisas y verdes; y 32 rugosas y verdes. Mendel observó que estos fenotipos guardaban entre sí aproximadamente las proporciones 9:3:3:1 (Pierce, 2007).

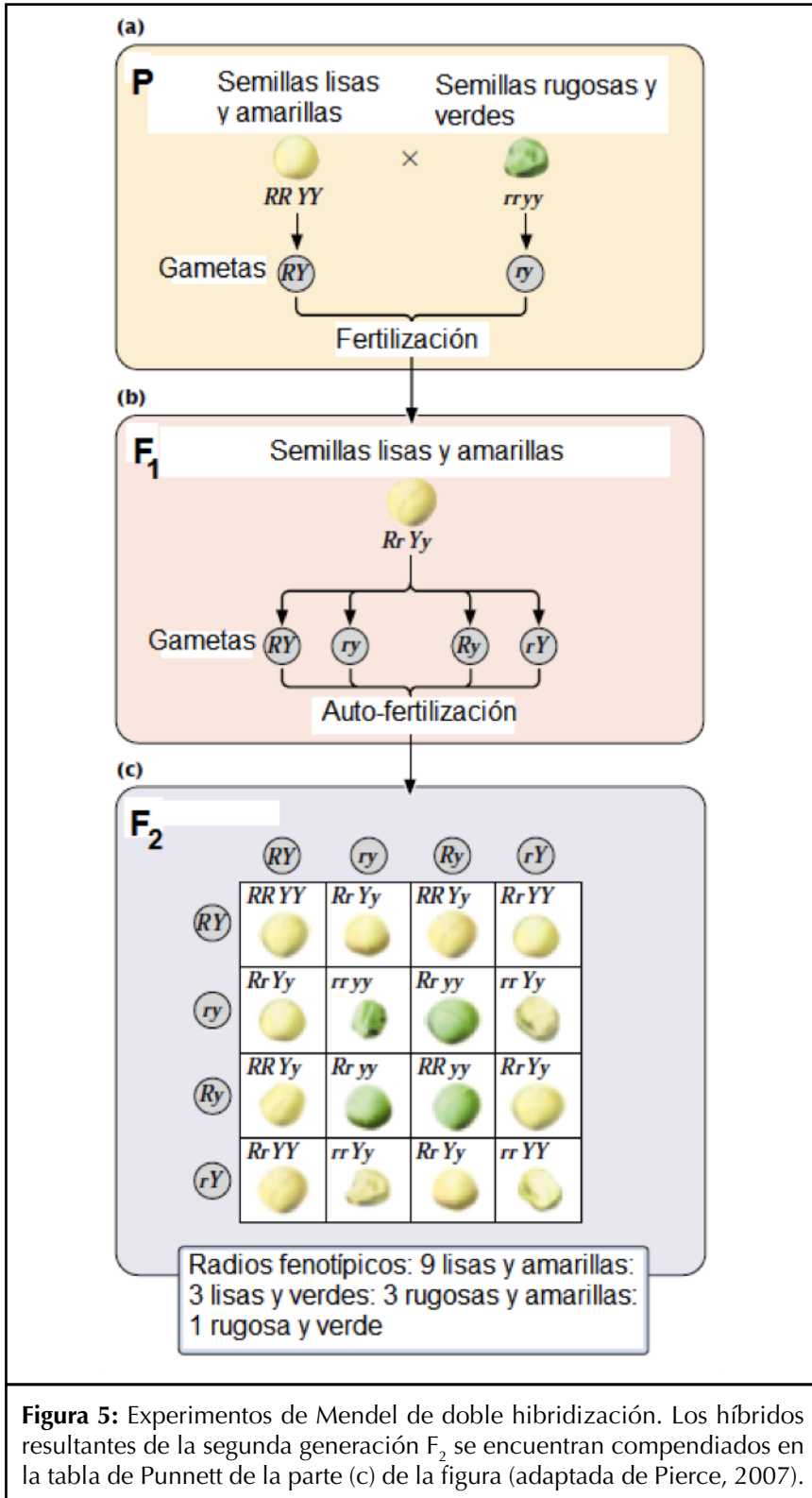
Mendel repitió estos cruces di-híbridos con otros pares tomados entre sus siete características fenotípicas para obtener *siempre* las mismas proporciones 9:3:3:1. Este resultado puede entenderse en el marco de los principios de segregación y dominancia anteriores si se agrega un tercer principio, el de la **recombinación independiente de los factores** (*Segunda Ley de Mendel*). Este principio establece que alelos que codifican diferentes rasgos fenotípicos se separan y se transmiten *independientemente* entre sí. Esto es, diferentes rasgos son heredados independientemente unos de otros; por lo tanto el patrón de herencia de un rasgo no afectará al patrón de herencia de otro.

Mendel fue afortunado en seleccionar sus siete rasgos característicos en las plantas de arvejas. Ahora se sabe que los genes correspondientes residen en cromosomas dis-

tad portando el alelo *Y* y la otra mitad el alelo *y*. Estas gametas se combinan al *azar* durante la fecundación para producir una de cuatro posibles combinaciones: *YY*, *Yy*, *yY*, o *yy*. Sólo la última (que posee dos factores y recesivos) es verde; las otras tres conteniendo el alelo dominante *Y* dan lugar a semillas amarillas, de esta manera explicando la razón amarillo/verde de 3:1 observada.

Las conclusiones de Mendel

acerca de la herencia derivadas de sus cruzamientos mono-híbridos han sido posteriormente desarrolladas y formalizadas en el **principio de segregación** (*Primera Ley de Mendel*) aplicable a toda reproducción sexual. Este principio establece que cada organismo diploide posee dos alelos por cada rasgo característico (fenotipo). Estos dos alelos se segregan (separan) durante la formación de las gametas (haploide), yendo cada alelo a diferentes gametas en



Walther Flemming (médico y biólogo cito-genetista alemán, 1843-1905) publica primero en 1878 y luego en su libro seminal de 1882 sobre "Sustancia celular, núcleo y división celular" una descripción detallada de las diversas fases durante el proceso de división celular (mitosis).

La meiosis es un tipo especial de división celular necesaria en la reproducción sexual de organismos eucariotas (con células nucleadas). Las células producidas por meiosis se llaman gametas. En muchos organismos, incluyendo todos los animales y plantas terrestres (exceptuando algunos otros grupos, tales como los hongos), las gametas son llamadas también células espermáticas y óvulos. La meiosis fue descubierta y descrita por primera vez en 1876 por Oscar Hertwig (zoólogo alemán, 1849-1922). Fue descrita (a nivel de cromosomas) nuevamente en 1883 por Edouard Joseph Marie Van Beneden (zoólogo belga, 1846-1910). Sin embargo, la relevancia de la meiosis para la reproducción y herencia fue descrita recién en 1890 por Friedrich Leopold August Weismann (biólogo evolucionista alemán, 1834-1914) quien notó que se necesitan dos divisiones celulares para transformar una célula diploide en cuatro células haploides manteniendo el número de cromosomas. Una descripción esquemática moderna de los procesos de mitosis y meiosis se muestra en la Fig. 6.

Hacia fines del siglo XIX ya se reconocía que el núcleo celular contenía la información sobre la herencia.

1.4. DESCUBRIMIENTOS GENÉTICOS DEL SIGLO XX

Hugo de Vries (botánico holandés, 1848-1935), Carl Franz Joseph Erich Correns (genetista y botánico alemán, 1864-1933) y Erich von

tintos, una condición necesaria para la estricta validez de su segunda ley.

Johan Friedrich Miescher (biólogo y médico suizo, 1844-1895) identifica en 1868 el ADN como un

ácido débil constituyente químico del núcleo de células eucariotas, obtenidas de los glóbulos blancos de la sangre en pus colectado en hospitales.

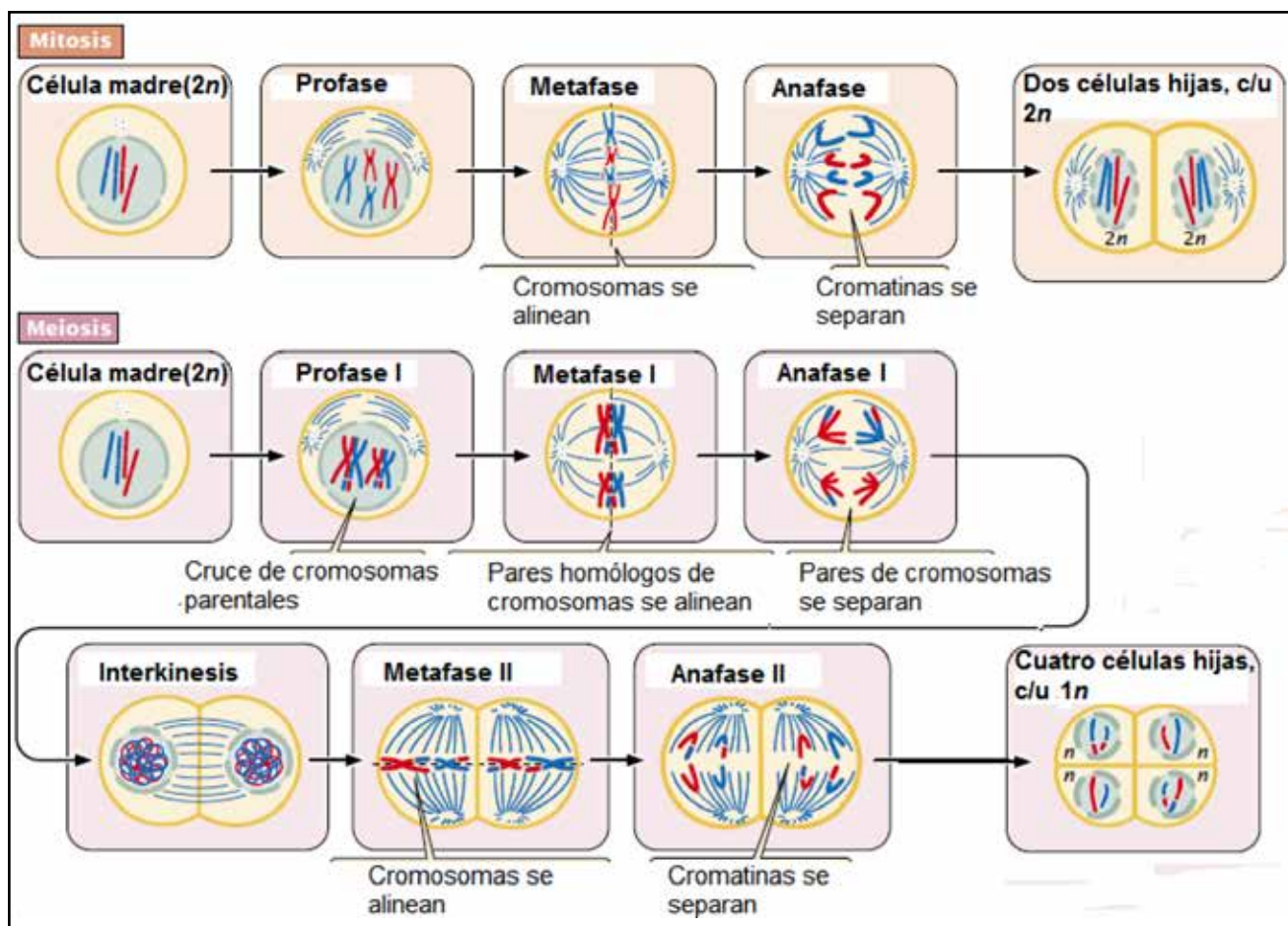


Figura 6: Comparación esquemática de los procesos de mitosis y meiosis en células eucariotas. Por simplicidad se ha considerado una célula madre diploide ($2n$) con sólo dos pares de cromosomas ($n=2$). Los colores azul y rojo distinguen los cromosomas aportados a la célula madre por ambos progenitores. El ejemplo de meiosis indicado corresponde al caso de la *espermatogénesis* animal donde por cada célula madre se producen cuatro espermatozoides. En el caso equivalente de la *ovogénesis* femenina sólo se forma un óvulo con capacidad reproductiva por célula madre. Figura adaptada de Pierce (Pierce, 2007).

Tschermak-Seysenegg (agronomo austríaco, 1871-1962) re-descubren independientemente en 1900 las Leyes de Mendel.

Walter Stanborough Sutton (médico y genetista estadounidense, 1877-1916) y Theodor Heinrich Boveri (biólogo alemán, 1862-1915), independientemente, proponen en el período 1902-1903 que las unidades de herencia (genes) están localizados en los cromosomas, integrados por ADN y proteínas (histonas). La propuesta resultó controversial hasta su confirmación en 1915 por los trabajos de Thomas Hunt Morgan (genetista estadounidense, 1866-

1945) sobre la herencia y cruce de cromosomas parentales en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), siendo posteriormente reconocida como **teoría cromosomática de la herencia** o **teoría de Sutton-Boveri**. La teoría identifica los cromosomas con los factores (*alelos*) apareados requeridos por las Leyes de Mendel de la herencia. También establece que los cromosomas poseen una *estructura lineal* con los genes localizados en sitios específicos a lo largo de ellos.

Durante el período 1909-1929, Phoebus Aaron Theodore Levene (médico y bioquímico ruso-esta-

dounidense, 1869-1940) determina la estructura molecular y modo de polimerización de los nucleótidos en el ADN (ver Fig. 7). Cada monómero del polímero consiste de un grupo fosfato (PO_4) con uno de sus oxígenos vinculados a un azúcar deoxirribosa a través de su carbono en la posición 5' (enlace éster). La polimerización se logra mediante el enlace éster del C3' de la ribosa con un oxígeno del fosfato próximo sobre la cadena. Así resulta un polímero con una orientación 3'-5' constante a lo largo del mismo. Unida covalentemente al C1' de la deoxirribosa existe una de cuatro bases nitrogenadas diferentes que

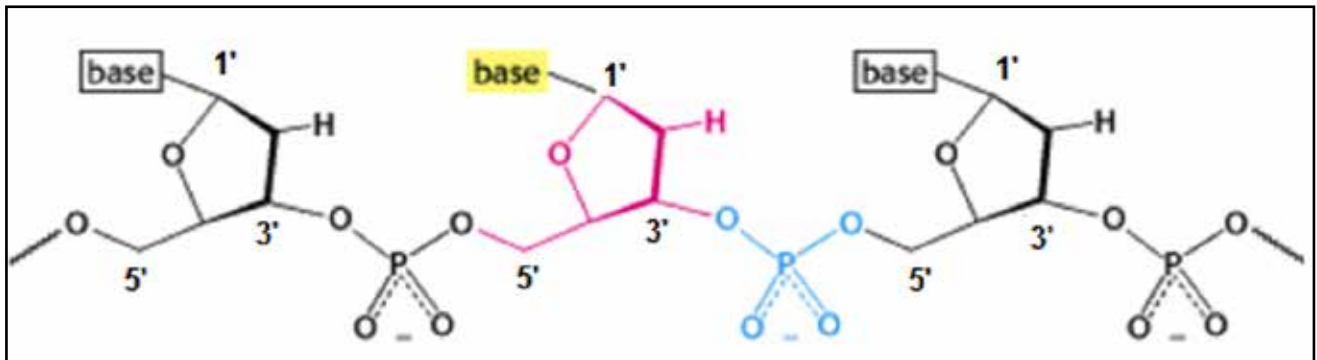


Figura 7: Estructura química de un poli-nucleótido de ADN.

caracterizan al nucleótido. Dos de ellas son pirimídicas: citosina (C) y timina (T), las otras dos purínicas: adenina (A) y guanina (G).

Sin embargo, Levene formula la hipótesis incorrecta que el ADN consiste en tetra-nucleótidos CATG repetidos (...CATGCATGCATGCATG...), que en su momento desvió la consideración de los ácidos nucleicos como sustrato para la información genética (formarían polímeros repetitivos ‘poco inteligentes’) hacia las proteínas, otro importante componente de todos los organismos. Como el ADN (¡y por profundas razones de biología molecular!) las proteínas biológicas son polímeros lineales (no ramificados) cuyas unidades monoméricas consisten en

uno de 20 posibles aminoácidos levógiros (L), tal como muestra la Fig. 8. De esta forma, en un polímero de dimensión N dichos aminoácidos pueden arreglarse en principio de 20^N maneras diferentes, un número muy grande aún para las proteínas más pequeñas (para sólo $N=4$ ya se tienen teóricamente ¡160.000 combinaciones diferentes!).

Por sus comparativamente sencillos sistemas genéticos y rápida reproducción, los genetistas comienzan en la década de 1940 a usar virus capaces de infectar bacterias, llamados bacteriófagos (que ‘comen’ bacterias) o, simplemente, fagos, para estudiar la organización y estructura de los genes. Algunos genetistas se organizan en el llamado

“Grupo de los Fagos”.

En 1928, Frederick Griffith (médico y genetista británico, 1879-1941) mostró que la virulencia de la cepa Tipo III (S) de la bacteria neumococo puede transferirse desde células muertas de esta cepa a la cepa atenuada Tipo II (R) de bacterias vivas (Griffith, 1928). Basados en este resultado, Oswald Theodore Avery (médico e investigador canadiense, 1877-1955), Colin Munro MacLeod (genetista canadiense-estadounidense, 1909-1972) y Maclyn McCarty (genetista estadounidense, 1911-2005) en un experimento clave identifican en 1944 al ADN como el material genético transferido (por aquél entonces llamado “principio transformador”), responsable por la

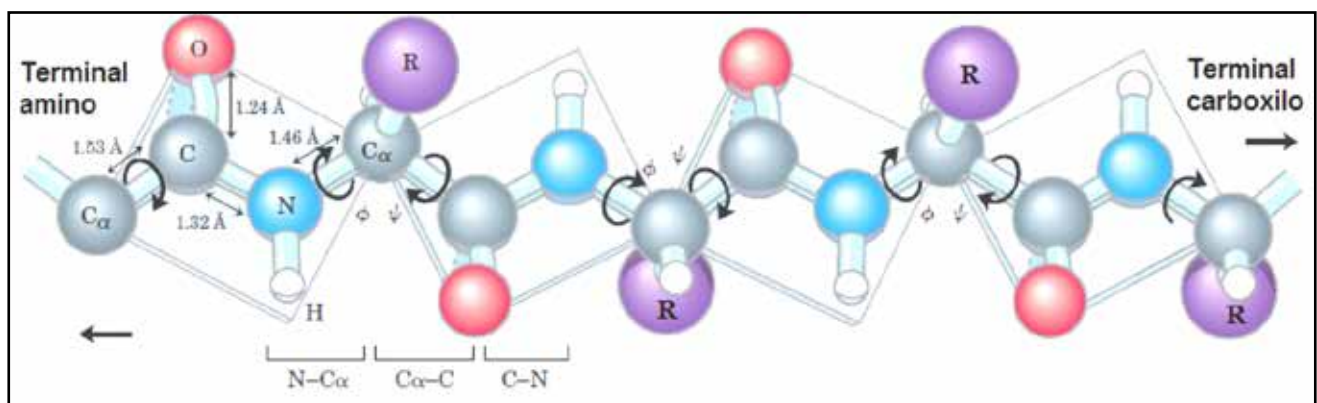


Figura 8: Vista de un polímero integrado por aminoácidos. R indica uno de 20 posibles grupos químicos laterales. Los aminoácidos se conectan entre sí vía un enlace peptídico C-N que (por ser parcialmente doble) no puede rotar, lo que determina la planaridad molecular indicada. Los enlaces simples $N-C_{\alpha}$ y $C_{\alpha}-C$, en cambio, pueden rotar (ángulos de torsión ϕ y ψ) libremente, sujetos a impedimentos estéricos. Los valores de ϕ y ψ a lo largo de la cadena determinan la conformación espacial de la proteína. Por referencia, se incluyen algunas distancias de enlace ($1\text{\AA}=10^{-8}\text{ cm}$). Figura adaptada de Lehninger, Nelson & Cox, 2005.

virulencia del neumococo Tipo III (Avery, MacLeod & McCarty, 1944).

Erwin Chargaff (bioquímico austriaco-estadounidense, 1905-2002) descubre en 1950 que los cuatro nucleótidos no están presentes en los ácidos nucleicos de diversos organismos en la misma proporción, como proponía Levene. También descubre que parecen valer ciertas reglas generales (ahora llamadas *reglas de Chargaff*): por un lado el número de nucleótidos conteniendo la base adenina (A) es igual a aquellos que contienen la base timina (T); por el otro el número de nucleótidos que tienen guanina (G) iguala el de

aquellos que contienen citosina (C) (Chargaff et al., 1949; Vischer, Zamenhof & Chargaff, 1949).

El primero de estos descubrimientos cardinales mostró que la teoría de los tetra-nucleótidos de Levene era incorrecta y que la secuencia de bases del ADN era suficientemente rica en arreglos como para almacenar la información genética usando algún tipo de codificación. En efecto, una cadena de N nucleótidos puede arreglarse en 4^N formas distintas (para $N=10$, ya se tienen ¡1.048.576 combinaciones diferentes!).

Sin embargo, Chargaff no advirtió en su momento la relevancia del segundo de sus descubrimientos, esto es las igualdades $A=T$ y $G=C$. Escribiría: "Una comparación de las proporciones molares revela ciertas sorprendentes, pero tal vez *sin sentido*, regularidades" (Vischer, Zamenhof & Chargaff, 1949). Dichas enigmáticas igualdades jugarían un papel clave en la determinación por Watson y Crick a inicios de 1953 de la estructura molecular del ADN, la que a su vez proveería una explicación simple de las mismas.

En 1952, los estadounidenses Alfred Day Hershey (bacteriólogo y genetista, 1908–1997) y Martha Cowles Chase (genetista, 1927–2003) realizan un experimento fundamental probando que la información genética de los bacteriófagos (y de todos los otros organismos) reside en el ADN y no en las proteínas (Hershey & Chase, 1952).

■ PARTE 2. ADN, LA MOLÉCULA DE LA HERENCIA. HISTORIA DE SU ESTRUCTURA

2.1. VER PARA ENTENDER. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X: UN MICROSCOPIO DE X100.000.000 AUMENTOS QUE REVELA DETALLES A RESOLUCIÓN ATÓMICA

La visualización de células y de los procesos de división celular (mitosis) y de síntesis de gametas (meiosis) a nivel macroscópico requiere una magnificación de unos 1000-2000 aumentos (ver Fig. 9).

Detalles aún más finos pueden visualizarse mediante microfotografías electrónicas que, en la práctica, pueden proveer aumentos de hasta 10^6 (ver Fig. 10).

Esto puede lograrse con un microscópico óptico o electrónico cuyo principio de funcionamiento

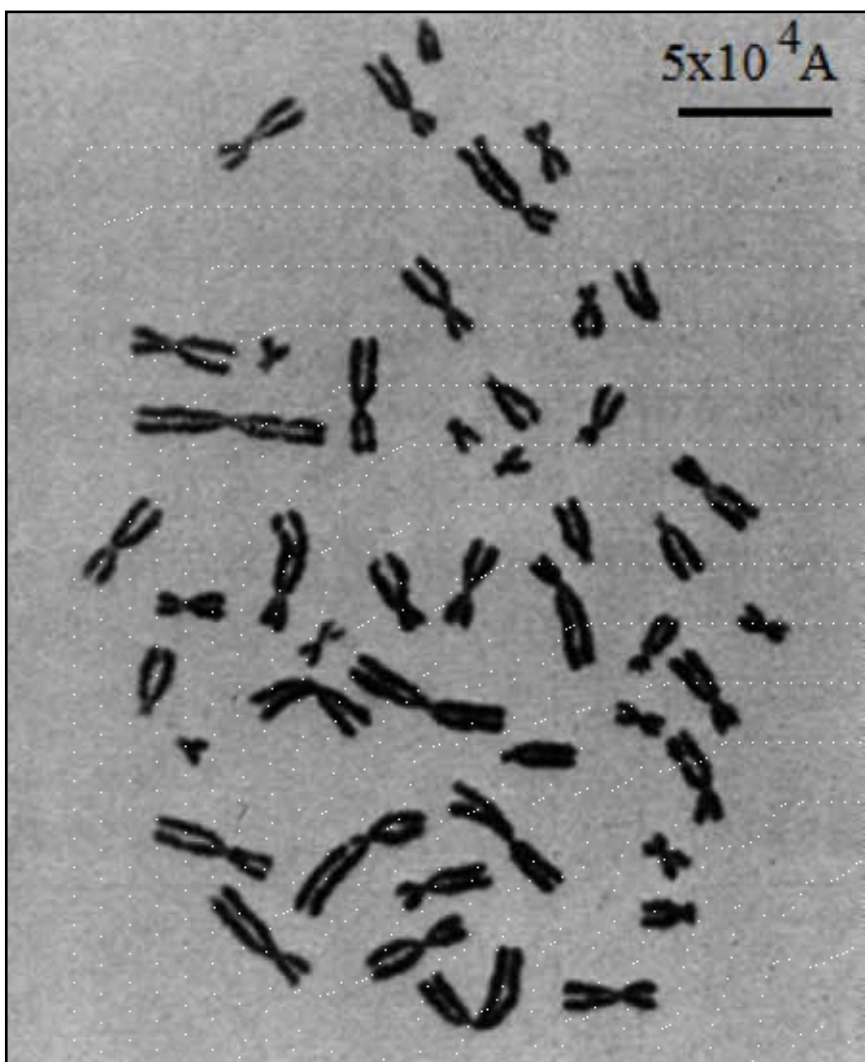


Figura 9: Micrografía óptica (unos 2000 aumentos) mostrando la duplicación de los 46 cromosomas humanos durante la profase de la mitosis (Guttman et al., 2004).

en términos de la óptica geométrica se esquematiza en la Fig. 11.

A pesar de que la construcción geométrica parece indicar que el aumento de un microscopio óptico puede incrementarse indefinidamente acercando el foco objeto F a la red, el carácter ondulatorio de

la luz invalida esta noción y limita la máxima resolución de tal instrumento a la longitud de onda λ de la luz. Esto es, no podemos ver detalles estructurales a escalas menores que unos 5000 Å. De esta manera, si queremos divisar procesos en la escala atómica y molecular (objetos con un tamaño de unos cien

millonésimos de centímetros, esto es, $10^{-8} \text{ cm} = 1 \text{ Å}$, se requiere luz de $\lambda \sim 1 \text{ Å}$, esto es, rayos-X. Sin embargo, no es posible el diseñar un microscopio de rayos-X por una razón muy simple: no existen lentes que desvíen luz de alta frecuencia. En efecto, el índice de refracción resulta de la polarización inducida en el medio por el campo eléctrico del haz de luz. Para las altas frecuencias de los rayos-X (unos 10^{18} ciclos por segundo), aún las partículas cargadas más livianas, esto es los electrones, sólo pueden seguir las oscilaciones del campo excitatriz con una amplitud extremadamente pequeña. Esto implica una polarización inducida minúscula en cualquier material y, consecuentemente, un índice de refracción que difiere del valor uno para el vacío en unas pocas partes en 10^6 .

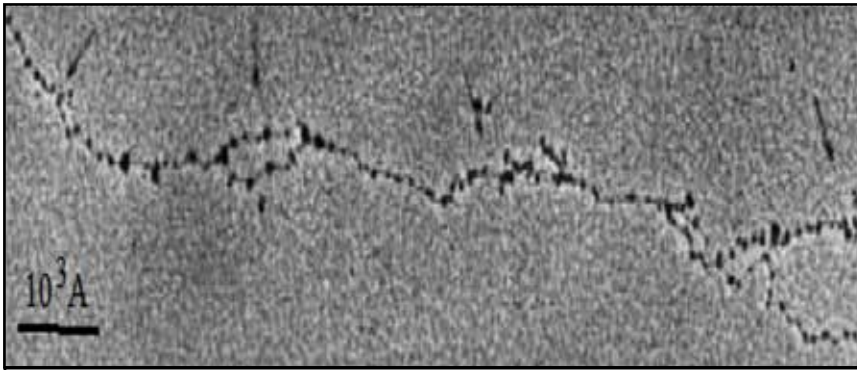


Figura 10: Micrografía electrónica (unos 100.000 aumentos) mostrando ADN de células eucariotas en proceso de duplicación durante la interfase de la mitosis (Pierce, 2007).

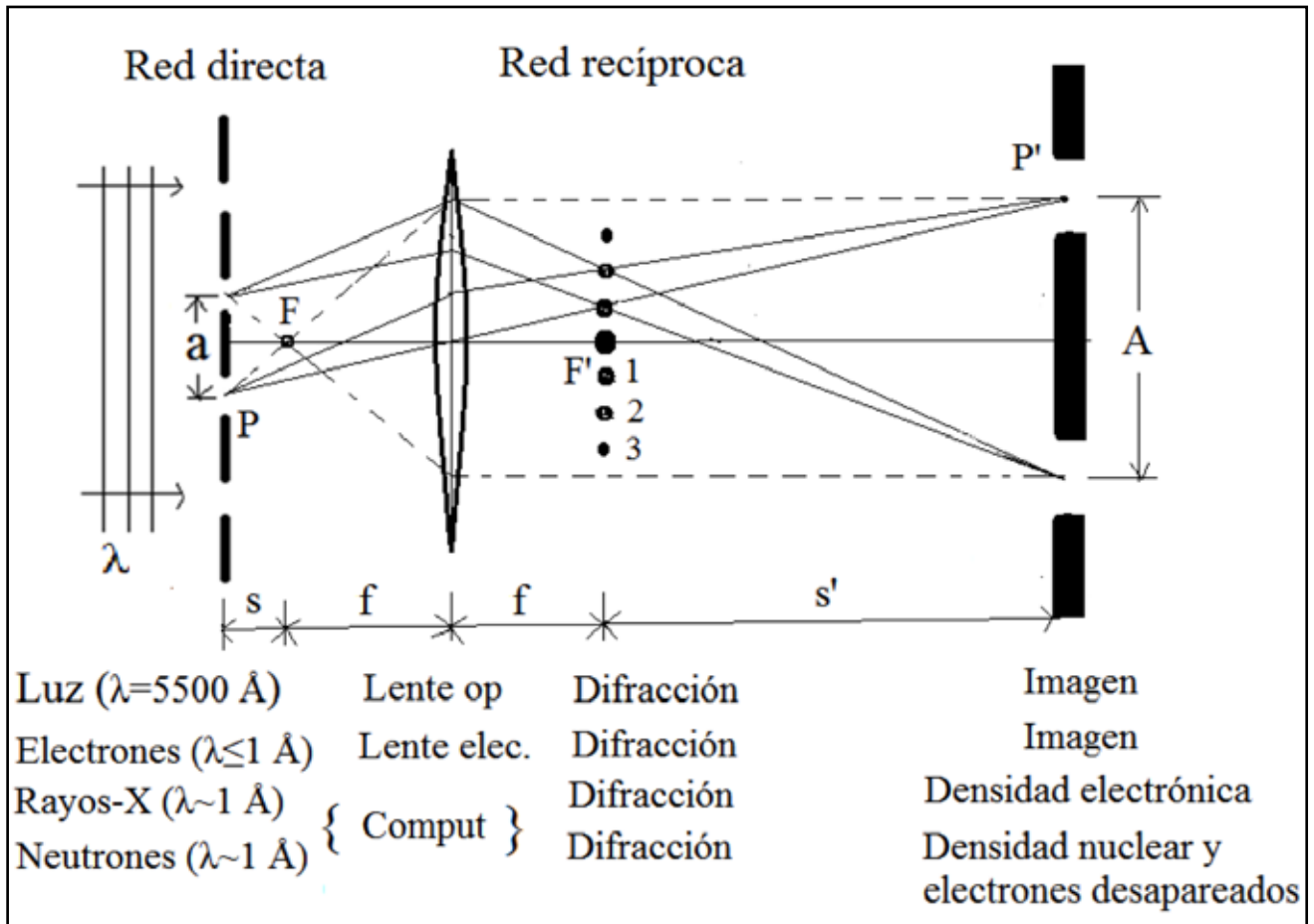


Figura 11: Reconstrucción de imágenes en microscopios.

Sin embargo, como ocurre en el rango óptico, aun tenemos el patrón de difracción que no requiere de lentes y el obtener aumentos de $\times 10^8$ se reduce a resolver el problema inverso de reconstruir la densidad de

electrones a partir de la figura de difracción de rayos-X producida por la dispersión de los mismos.

Ejemplifiquemos el problema inverso mediante el análogo óptico de

la Fig. 12. Allí, el problema consiste en derivar la estructura de la red (regiones transparentes y opacas a la luz) a través de su figura de difracción. La amplitud F de la luz dispersada por toda la red consiste en un

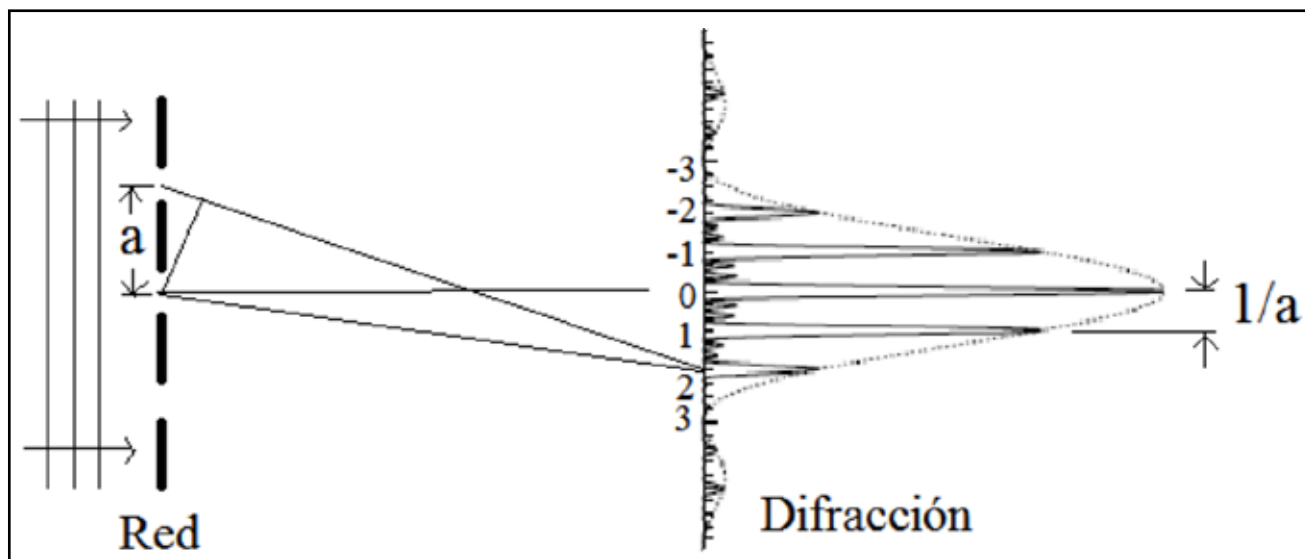


Figura 12: Figura de difracción de un arreglo de ranuras idénticas uniformemente espaciadas.

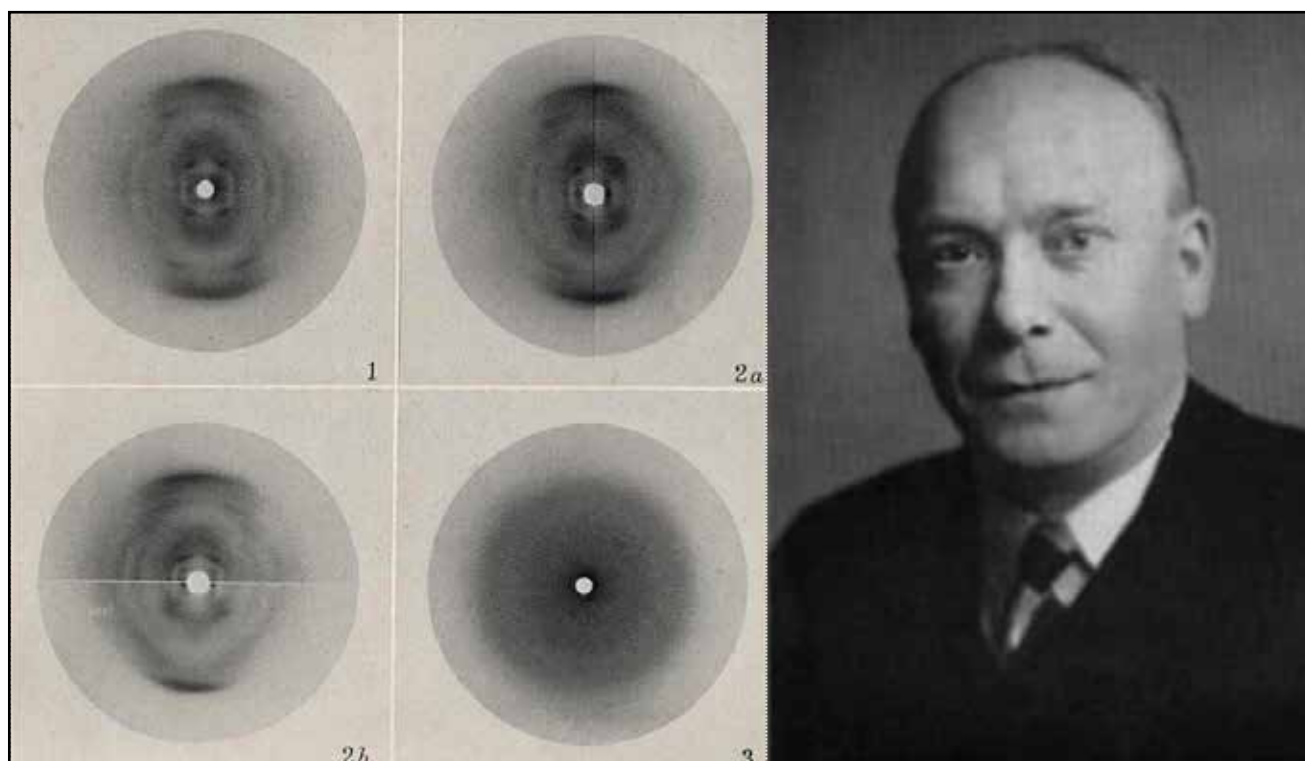


Figura 13: *Izquierda.* Placa 1: difracción de rayos-X en fibras (orientadas verticalmente) de la sal sódica de ADN extraído de timo de cabra (NaADN). Placas 2a,b: comparaciones de los patrones de difracción de ADN de cabra con ADN de arenque. El haz incidente es perpendicular a las fibras y al plano de las placas. Placa 3: difracción en polvos de ADN de levadura. *Derecha:* William Thomas Astbury (1898-1961).

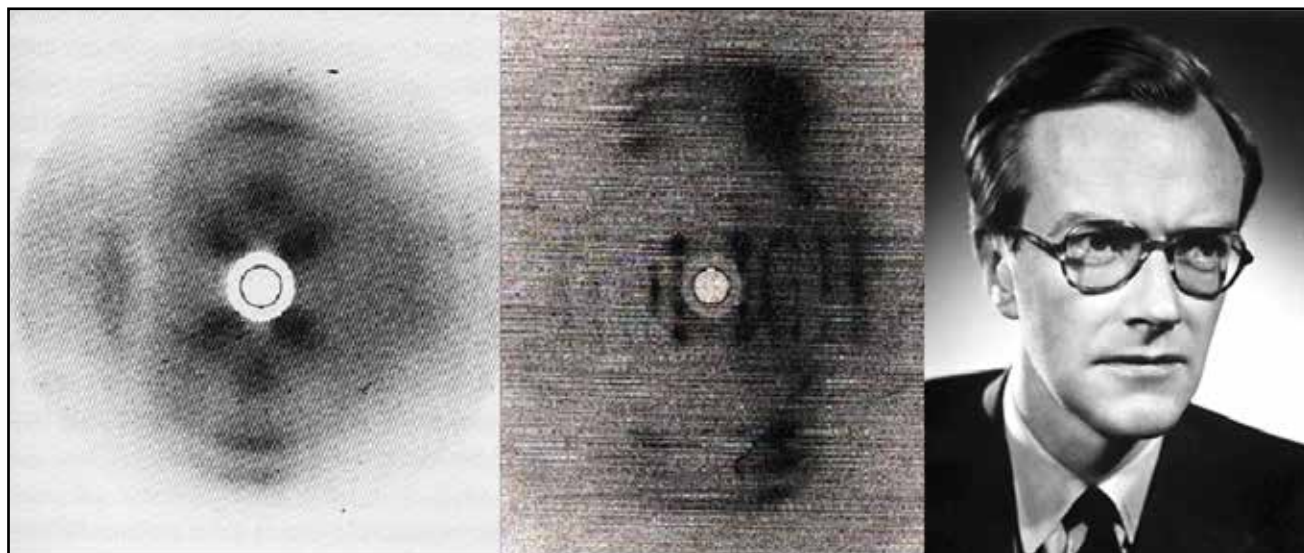


Figura 14: Izquierda: primeras figuras de difracción de rayos-X en fibras de ADN obtenidas en el King's College de Londres. Derecha: Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916-2004).

patrón de difracción proporcional al de una sola ranura muestreado uniformemente a intervalos $1/a$, donde ocurren los máximos de interferencia. Cambios de signo en la amplitud de difracción F indican oscilaciones de la luz en contra-fase. En la región de rayos-X no se pueden determinar experimentalmente estos cambios de signos, sólo la intensidad F^2 indicada en la figura ('Problema de las fases').

Si la separación entre ranuras idénticas está distribuida al azar, los máximos de interferencia desaparecen y sólo queda una figura proporcional a la *difracción continua de una sola ranura*.

2.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN ADN. PRIMEROS ESTUDIOS

Los primeros estudios de difracción de rayos-X en ADN fueron realizados por W. T. Astbury en la Universidad de Leeds, Inglaterra, durante el período 1937-1947 (Astbury, 1947). Los patrones de difracción fotográficos resultaron demasiado difusos como para extraer más que unas pocas dimensiones molecula-

res características del ADN (ver Fig. 13)

2.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN ADN POR WILKINS Y FRANKLIN DEL KING'S COLLEGE DE LONDRES

En el King's College de Londres, Inglaterra, y bajo la dirección de su ex-supervisor de tesis John Randall, Maurice Wilkins comienza en 1946 un proyecto sobre estudios de ADN por microscopía UV, visible e infrarroja polarizada, espectroscopia de absorción infrarroja y difracción de rayos-X (Wilkins, Gosling & Seeds, 1951; Wilkins, 2003). En colaboración con el doctorando Raymond Gosling obtiene las primeras fotos de difracción de ADN extraído de esperma de arenque (ver Fig. 14). Las fotos resultan de una calidad informativa tan pobre como las de Astbury.

Durante un congreso en Londres, Wilkins obtiene muestras extremadamente puras de ADN (extraído del timo de cabra) provistas por el bioquímico suizo Rudolph Signer y la calidad de las fotos de difracción co-

mienza a mejorar substancialmente.

Vista la relevancia de los estudios por difracción de rayos-X, a mediados de 1950 Randall contrata por tres años a Rosalind Franklin (Foto en Fig. 15), una fisicoquímica con formación en Cristalografía, con un doctorado de la Universidad de Cambridge obtenido en 1945.

Franklin había trabajado en la estructura del carbón mineral y del grafito, primero en Inglaterra y luego en París, desde donde arribó a Londres hacia fines de 1950. A pesar de que inicialmente se le había asignado el estudio de proteínas en solución, a último momento y con el acuerdo de Wilkins y la misma Franklin, Randall cambia su plan de trabajo a difracción de rayos-X en fibras de ADN. También acuerdan que el trabajo del tesista Gosling pasara a ser supervisado por ella. En una reunión con Randall y Gosling cuando Wilkins estaba de vacaciones, Franklin recibe las excelentes muestras de Signer y el mejor equipamiento de rayos-X del laboratorio, esto es, el liderazgo de los estudios sobre difracción en ADN. Esto no es



Figura 15: Rosalind Elsie Franklin (1920–1958).



Figura 16: Francis Harry Compton Crick (1916–2004) y James Dewey Watson (1928).

lo que Wilkins entendía iba a ser la participación de ella en el proyecto y el conflicto que se suscitó entorpeció el desarrollo del mismo.

2.4. MODELADO DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ADN POR WATSON Y CRICK EN CAMBRIDGE.

Inicialmente interesado en ornitología, James Watson ingresa en 1943 a la Universidad de Chicago a la edad de 15 años. Influenciado por la lectura en 1946 del libro de Erwin Schrödinger titulado *What Is Life?* (Schrödinger, 1946), Watson cambió su interés profesional de la ornitología a la genética. En 1947 obtiene el grado de BS en Zoología de la Universidad de Chicago. En 1950 (a la edad de 22 años) completa su PhD en la Universidad de Indiana bajo la supervisión del genetista Salvador Luria. Por ese entonces integraba el llamado Grupo de los Fagos, liderado por Luria y el físico Max Delbrück, y ya tenía conocimiento del experimento de Avery, MacLeod y McCarty de 1944 que sugería que el ADN y no las proteínas codificaban la información genética. En Sep-

tiembre de 1950 Watson comienza una estadía por un año como postdoctorando en la Universidad de Copenhague, Dinamarca, inicialmente en el Laboratorio del bioquímico Herman Kalckar. Éste estaba interesado en el metabolismo de los ácidos nucleicos y quería usar fagos como sistema experimental. Sin embargo, Watson quería explorar la estructura del ADN y este interés no coincidía con el de Kalckar. Luego de trabajar parte del año con él, Watson invirtió el resto del tiempo en Copenhague realizando experimentos con el fisiólogo microbiano Ole Maaloe, entonces también un miembro del Grupo de los Fagos. Durante los meses de Abril-Mayo de 1951, Watson visita la Estación Zoológica de Nápoles, Italia. Durante la última semana de su estadía atiende un congreso sobre la determinación de la estructura 3-D de moléculas por métodos de difracción de rayos-X. Allí llama su atención una comunicación de Wilkins sobre difracción de rayos-X en ADN que lo convence que sólo a través de esta herramienta puede determinarse la estructura molecular del ácido nucleico. Watson transmite a Luria su interés en

formarse en el empleo de dichos métodos de cristalografía estructural. Durante el verano de 1951, Luria contacta a John C. Kendrew de Cambridge y arregla un nuevo proyecto post-doctoral de investigación (sobre la estructura de la hemoglobina) para Watson en Inglaterra.

Watson arriba a Cambridge en el otoño de 1951. Con una formación en Zoología, por aquel entonces un novicio en cristalografía estructural, estableció una cordial y altamente complementaria colaboración con el físico Francis Crick (Foto de Fig. 16), un brillante cristalógrafo teórico. Crick estaba realizando su trabajo doctoral sobre cristalografía de proteínas en el grupo de Max Perutz y John Kendrew del laboratorio Cavendish dirigido por William Lawrence Bragg. Watson y Crick deciden dilucidar la estructura molecular del ADN mediante modelización consistente con los datos experimentales accesibles.

2.5. NUEVOS DATOS Y DESCUBRIMIENTOS DE FRANKLIN

Hasta la incorporación de

Franklin al proyecto, se había estado trabajando esencialmente con fibras de la sal sódica de ADN (NaADN) en una forma cristalina poco hidratada (obtenida con una humedad relativa próxima al 75%) llamada forma A. En Septiembre de 1951, Franklin realiza un importante descubrimiento. Controlando cuidadosamente la humedad de las muestras de ADN encuentra, a partir de los patrones de difracción colectados con humedades relativas del orden del 92%, una nueva forma de ADN que llamó forma B. Más todavía, descubre que las formas A y B se inter-convierten reversiblemente (ADN-A \leftrightarrow ADN-B) bajo cambio de humedad (ver Fig. 17). La forma B origina un patrón de difracción de unos pocos picos difusos, correspondientes a moléculas de ADN relativamente orientadas según el eje de la fibra pero desordenadas entre sí (Franklin & Gosling, 1953a). Este hallazgo permite explicar el carácter poco informativo de los difractogramas de rayos-X previos colectados por Astbury y por Wilkins y Gosling: probablemente trabajaron con muestras que eran mezclas de las dos formas. Siguiendo su instinto de cristalografía, Franklin no se interesa demasiado en la forma B y concentra sus esfuerzos en la forma crista-

lina A con un número mayor y más preciso de datos.

Para Wilkins y su colaborador el físico Alec Stokes, sin embargo, el patrón de difracción de la forma B era revelador, pues confirmaba una presunción de Stokes de un año atrás de que la molécula de ADN era helicoidal. Durante un viaje en tren, Stokes había derivado la forma característica de la difracción por una hélice aislada que indicaba la carencia de reflexiones sobre o cerca del meridiano del patrón de rayos-X (a lo largo de la fibra). Este cálculo acordaba cualitativamente con la figura en X del difractograma observado por Franklin para la forma B.

A mediados de Noviembre 1951 Franklin dicta un seminario en el King's College donde describe sus nuevas fotos de difracción en cristales de NaADN (mejores que las previas de Wilkins y Gosling) y sus medidas precisas del contenido de agua, Watson asiste al seminario y sólo colecta información memoriosa.

Probablemente, las fibras de ADN-A empleadas por Franklin consistían en poli-cristales fuertemente orientados a lo largo del eje

de la fibra (coincidente con el eje-c cristalográfico vertical en la Fig. 18) con una distribución angular uniforme de micro-cristales alrededor del eje. De esta manera, el patrón de difracción de rayos-X distribuido en capas obtenido con una muestra estacionaria de ADN es similar al de una fotografía de rotación en 360° de un único mono-cristal (Warren, 1990). Seguramente, el uso de unas pocas fibras ultra delgadas (18-30 μm) irradiadas por un haz de rayos-X fuertemente colimado (100 μm) contribuyó a reducir sensiblemente el ancho acumulado en los picos de difracción y así mejorar la calidad de los datos fotográficos.

Empleando un ingenioso procedimiento basado en la función de Patterson (que fuera sugerido a Franklin en París a fines de 1951 por su amigo y experimentado cristalógrafo, Vittorio Luzzati), Franklin y Gosling determinaron a partir de patrones de difracción similares al de la Fig. 18 la red de Bravais (monoclínica centrada-C) y las correspondientes constantes de celda del NaADN. Luego procedieron a indexar diversas reflexiones (66) distribuidas en las nueve capas de red recíproca perpendicular al eje-c (ver Fig. 18). Por aquella época, los métodos de

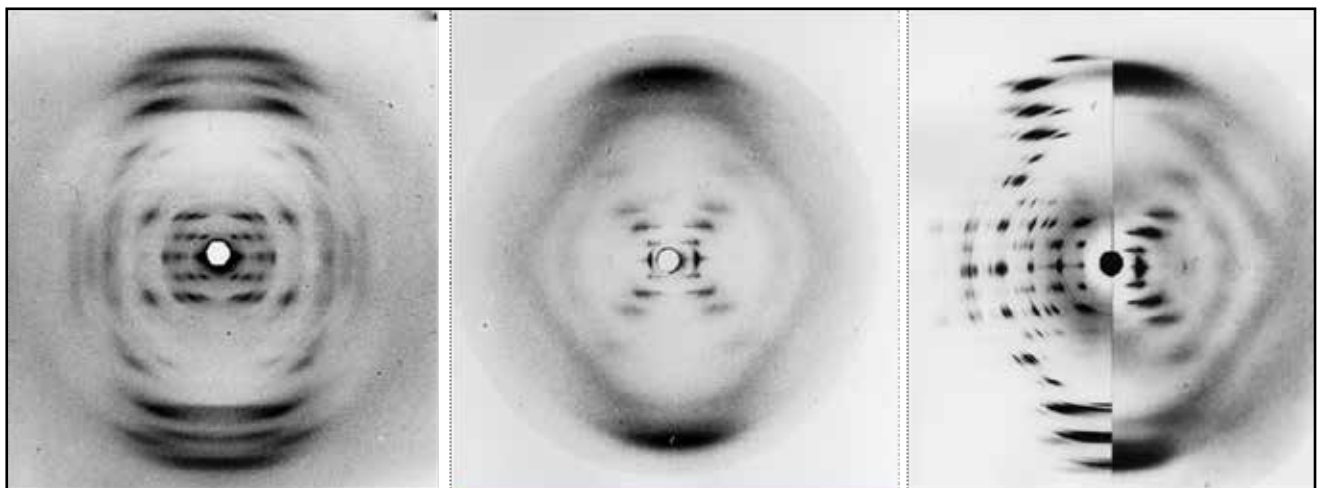


Figura 17: Izquierda: foto de difracción de rayos-X de ADN-A (75% humedad). Centro: foto de ADN-B (92% humedad). Derecha: comparación de ambos patrones.

resolución estructural a partir de datos de difracción de rayos-X estaban en su infancia, por no mencionar las limitaciones en las facilidades computacionales para realizar las sumas de Fourier de muchos térmi-

nos requeridas en estos métodos. A pesar de ello, valiéndose de un método diseñado por H. Lipson y C. A. Beveers en 1936 (Lipson & Beveers, 1936) y empleando una calculadora de escritorio, Franklin y Gosling realizaron la laboriosa síntesis de los mapas de Patterson (Franklin & Gosling, 1953b).

2.6. MODELO DE TRES HÉLICES DE WATSON Y CRICK

Creuyendo tener suficientes datos y basándose en la información memoriosa de Watson sobre el contenido del seminario de Franklin en Londres de mediados de Noviembre 1951, Watson y Crick construyen hacia fines de ese mes un modelo de ADN. El mismo consistía en tres hélices con los fosfatos hacia dentro y sus cargas negativas neutralizadas por iones Mg^{2+} , tal como muestra el esquema original de la Fig. 19.

Wilkins es invitado a Cambridge para opinar sobre el modelo. Viaja de inmediato, acompañado por Franklin y otros colaboradores del laboratorio. Franklin provee argumentos contundentes que demuelen el modelo: i) El ión Mg^{2+} no puede jugar el rol de neutralizar la repulsión electrostática entre fosfatos negativos vecinos pues en un medio

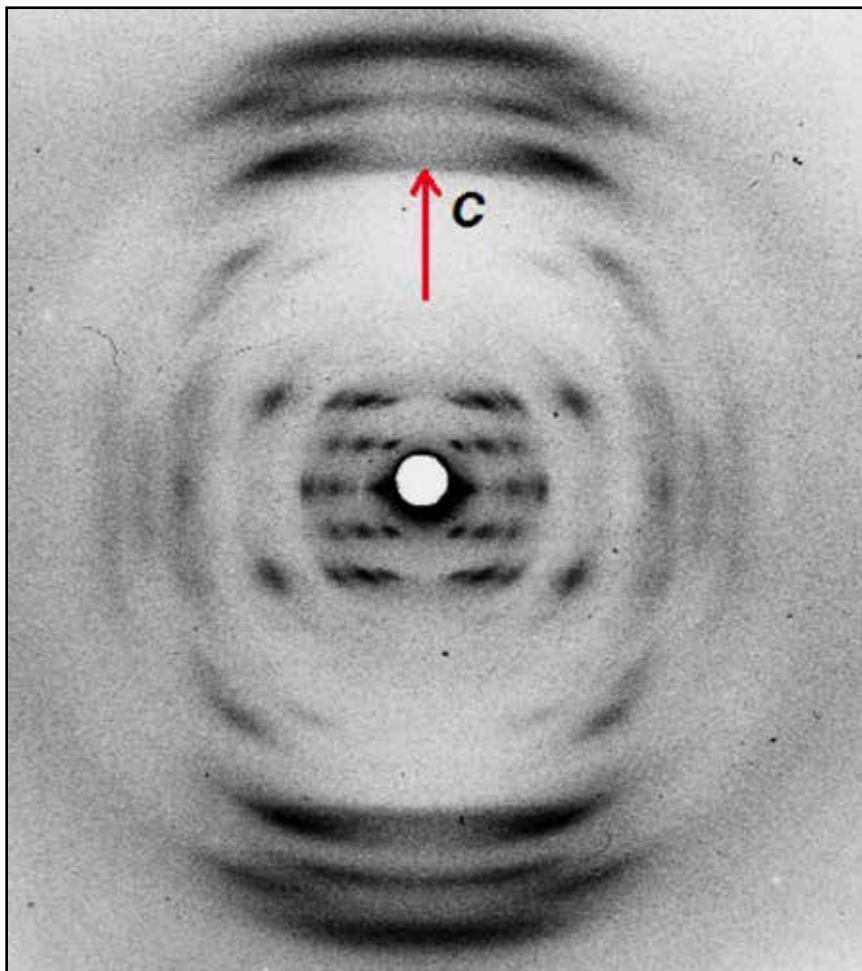


Figura 18: Fotografía de difracción de rayos-X de tres fibras (18-30 μm de espesor) de NaADN deshidratado (humedad relativa del 75%) mostrando la forma cristalina A del ácido nucleico. La foto fue tomada por Franklin y Gosling luego de una larga exposición (116 h).

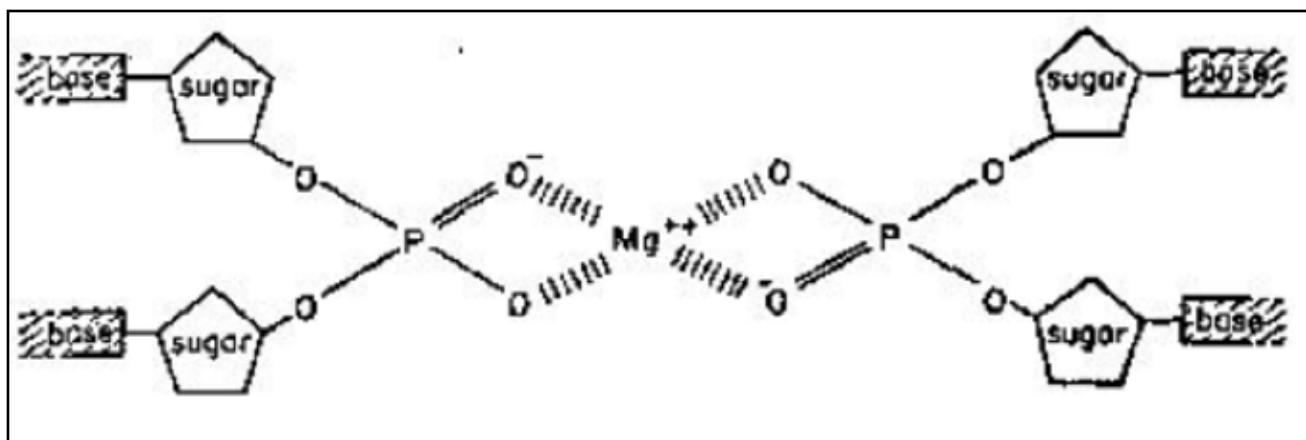


Figura 19: Esquema del modelo preliminar de ADN de Watson y Crick consistente en tres hélices (se muestran sólo dos) con las bases proyectándose hacia fuera y los grupos fosfatos hacia el eje helicoidal. La repulsión electrostática entre las cargas negativas de fosfatos próximos se vería compensada por iones Mg^{2+} coordinados.

biológico estaría rodeado por una coraza de moléculas de agua; ii) El ADN está fuertemente hidratado, contrariamente al modelo propuesto que contiene ¡diez veces menos agua que el valor experimental!; iii) La gran afinidad del ADN por el agua sugiere que los fosfatos (hidrofílicos) deben estar en el exterior, no en el interior de la molécula.

Enterado del fiasco, Bragg ordena a Watson y Crick que vuelvan a sus tareas específicas (la estructura de la hemoglobina) y dejen el estudio estructural del ADN a los investigadores de Londres.

2.7. UNA LECCIÓN RELEVANTE DE CRISTALOQUÍMICA

En un informe de laboratorio fechado el 7 de Febrero de 1952, Franklin reporta el indexado tentativo del patrón de la forma A del Na-ADN en términos de una celda de Bravais monoclinica C. Los grupos espaciales posibles para esta cel-

da son cinco: $C2$, Cm , $C2/m$, Cc y $C2/c$. Durante la primavera de 1952, Franklin viaja a Oxford donde muestra sus fotos a la cristalógrafa Dorothy Hodgkin y le manifiesta que había reducido las posibilidades de grupos espaciales a tres ($C2$ y, posiblemente, Cm y $C2/m$). Hodgkin le señala que dos de ellos (conteniendo planos espejo) no pueden ser, debido a la quiralidad (propiedad estructural de una molécula que no coincide con su imagen especular) de los azúcares en ADN. Esto deja a $C2$ como *único grupo espacial*. Como veremos más adelante, la presencia de ejes de simetría diádicos en ADN-A resultó una pieza de información clave para Crick en el modelado del ADN-B.

2.8. MODELO DE TRES HÉLICES DE LINUS PAULING

Desde Caltech en Pasadena, California, USA, surge un poderoso rival en la carrera por la estructura del ADN: Linus Pauling. Era un fi-

sicoquímico estadounidense y uno de los científicos más importantes del siglo XX. Él mismo se llamaba cristalógrafo, biólogo molecular e investigador médico. Fue uno de los primeros químicos cuánticos, realizando trabajos fundamentales describiendo la naturaleza de los enlaces químicos, por los que recibiría el Premio Nobel en Química en 1954. Ya en dos oportunidades anteriores había prevalecido compitiendo científicamente con Bragg:

i) En 1929 con la estructura de silicatos, tales como topacio, talco, mica, etc. (Pauling, 1929). Sus conocimientos en química estructural le dieron a Pauling una ventaja frente a Bragg en la resolución del problema. En efecto, Pauling modeló correctamente los silicatos como integrados por unidades tetraédricas covalentes de grupos SiO_4 (ver Fig. 20). Bragg, por su parte, suponía que la estructura podría derivarse del empaquetamiento óptimo de átomos considerados como esferas

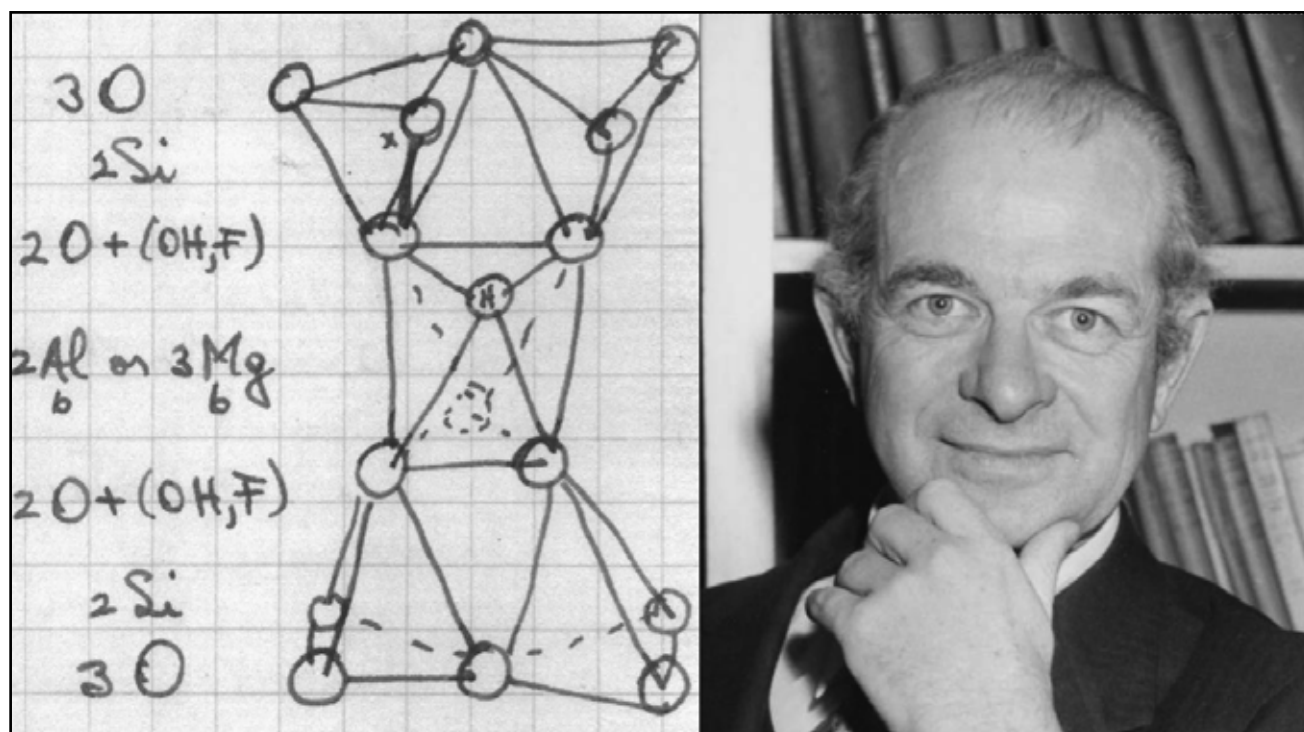


Figura 20: Izquierda: notas de laboratorio de Pauling indicando su metodología en el modelado de la estructura cristalina de silicatos. Derecha: Linus Carl Pauling (1901-1994).

cargadas de diferentes radios, una hipótesis que le fue útil en la determinación de la estructura de cristales iónicos, tales como los haluros alcalinos (NaCl, KCl, etc.).

ii) En 1951 con la estructura secundaria de hélice- α en proteínas (Pauling, Corey & Branson, 1951). Aquí Pauling poseía mayor información sobre cristalografía por difracción de rayos-X en aminoácidos aislados y en cadenas poli-peptídicas cortas (dos y tres aminoácidos). Estos datos confirmaban la *naturalidad plana del enlace peptídico* predicho por la teoría de enlaces resonantes que el mismo Pauling había contribuido a desarrollar (ver Fig.

8). Adoptando de partida esta propiedad molecular, procedió a modelar arreglos helicoidales que optimizaran los enlaces de hidrógeno N-H...O intra-moleculares. Bragg y colaboradores (Bragg, Kendrew & Perutz, 1950), sin embargo, aceptaron la hipótesis errónea de que la estructura helicoidal debía poseer un número entero de aminoácidos por vuelta. También se equivocaron al relajar la condición de planaridad de los enlaces peptídicos (Fig. 21).

Basándose en los difusos difractogramas de Atsbury y sin contar con el acceso a los excelentes datos de Franklin, en Febrero de 1953 Pauling publica con Robert Corey un artícu-

lo proponiendo una estructura para el ADN en forma de triple hélice, con los fosfatos en el interior y las bases nitrogenadas proyectadas hacia fuera, como muestra la Fig. 22 (Pauling & Corey, 1953).

El 28 de Enero de 1953, Peter Pauling (entonces doctorando de John Kendrew en Cambridge), que compartía la oficina 103 con Watson y Crick, les alcanza un pre-print con el artículo del padre (quien había también enviado una copia a Bragg). El desasosiego inicial de aquellos se disipa luego que una rápida lectura del trabajo indicaba una propuesta de estructura para el ADN similar a su frustrado intento de fines de No-

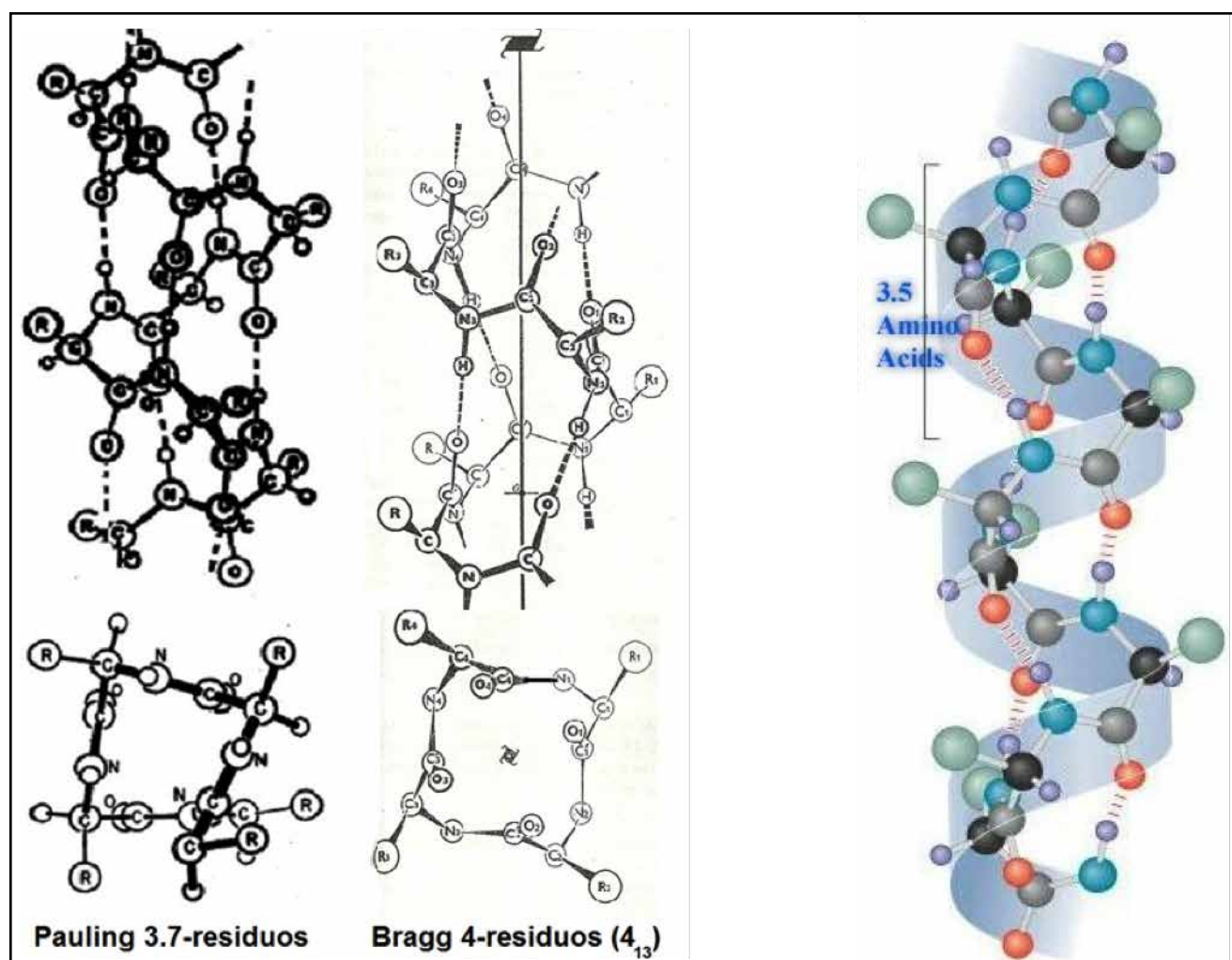


Figura 21: Comparación de las estructuras helicoidales de proteínas propuesta por Pauling, Corey & Branson (1951) (izquierda: 3.7 péptidos/vuelta) y por Bragg, Kendrew & Perutz (1950) (centro: 4 péptidos/vuelta). Derecha: esquema molecular actual de la estructura secundaria de hélice- α en proteínas.

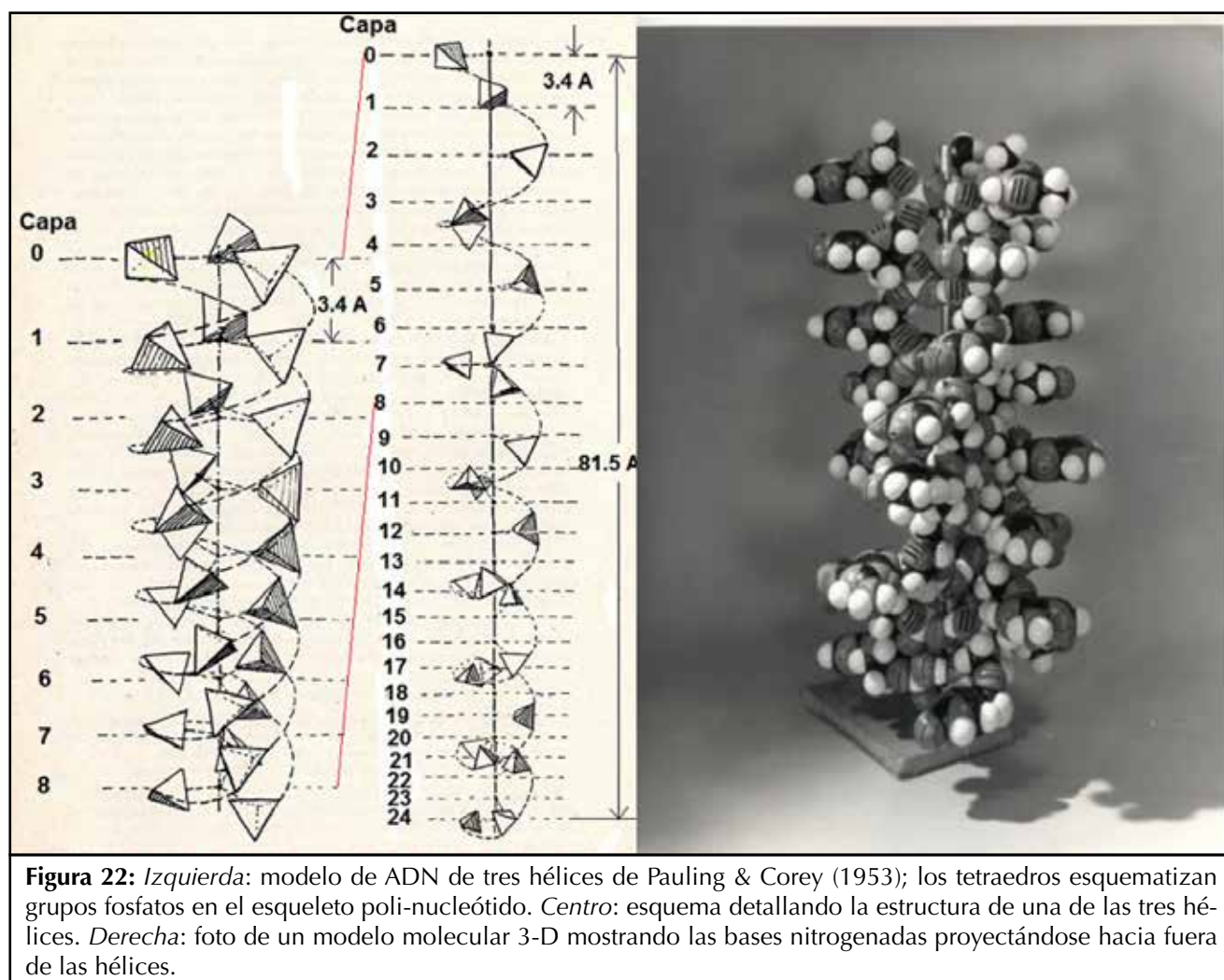


Figura 22: *Izquierda:* modelo de ADN de tres hélices de Pauling & Corey (1953); los tetraedros esquematizan grupos fosfatos en el esqueleto poli-nucleótido. *Centro:* esquema detallando la estructura de una de las tres hélices. *Derecha:* foto de un modelo molecular 3-D mostrando las bases nitrogenadas proyectándose hacia fuera de las hélices.

viembre pasado.

2.9. WATSON VISITA A FRANKLIN Y WILKINS EN LONDRES

El viernes 30 de Enero de 1953 Watson visita intempestivamente a Franklin en su laboratorio londinense para recabarle opinión acerca del modelo de ADN propuesto en el artículo de Pauling y Corey y establecer una eventual colaboración. Desalojado de la sala por Franklin, Watson visita a Wilkins. En el transcurso del encuentro Wilkins, desprevenidamente y sin el consentimiento o conocimiento de Franklin, le muestra la mejor foto de la forma B tomada por ella y Gosling (ver Fig. 23) y que le alcanzara este último ese mismo día (Wilkins, 2003).

El examen de la foto impactó a Watson con la fuerza de una revelación: "En el instante que vi la foto quedé boquiabierto y mi pulso se aceleró", comentaría más tarde (Watson, 1968, 1981).

Esa noche los dos hombres continuarían discutiendo durante la cena sobre la posible estructura helicoidal del ADN. Watson continuó recabando de Wilkins información cuantitativa derivada de aquella foto de la forma B, obteniendo algunos números: el paso de la hélice era de 34.4 Å.

En el tren de regreso a Cambridge, Watson dibuja de memoria el patrón de difracción en forma de X en el margen de un periódico. Este esquema de la Foto 51 de Franklin sugiere a Crick que se trata de una

hélice y que los datos obtenidos de Wilkins sobre las dimensiones críticas pueden utilizarse en la construcción del modelo helicoidal para la forma B.

Los acontecimientos comienzan a desarrollarse rápidamente. Al día siguiente, sábado 31 de Enero de 1953, Bragg levanta la 'moratoria' a la dupla de trabajar en el ADN y accede al pedido de Watson de que el taller del Cavendish le provea representaciones moleculares en escala hechas de chapas y alambres. El miércoles 4 de Febrero, Watson retoma el modelado de la estructura del ADN.

Durante la siguiente semana (9-14 Febrero 1953), Crick and Watson confirman la información memoriosa de éste último cuando tienen ac-

ceso (facilitado por M. Perutz) a un informe privado sobre el estado de avance de las investigaciones en la unidad de biofísica del King's College. El mismo fue elevado al Medical Research Council (MRC) durante la visita del comité de evaluación realizada el 15 de Diciembre del año anterior. La sección del informe con los resultados cuantitativos de Franklin sobre las formas A y B del ADN es más que reveladora para ellos. Allí se detalla la transformación reversible entre ambas formas bajo cambio del contenido de agua y, aún más importante para Crick, información cristalográfica precisa sobre la forma deshidratada A. Esta forma cristalizaba en la red de Bravais monoclinica centrada-C, con las constantes de celda $a=22.0 \text{ \AA}$, $b=39.8 \text{ \AA}$, $c=28.1 \text{ \AA}$ y $\beta=96.5^\circ$ y pertenecía al grupo espacial C2, que contiene un eje doble.

2.10. DATOS DE DIFRACCIÓN DE FRANKLIN CLAVES EN EL MODELO DE LA FORMA B DEL ADN

El patrón de difracción de rayos-X por fibras de ADN-B corresponde

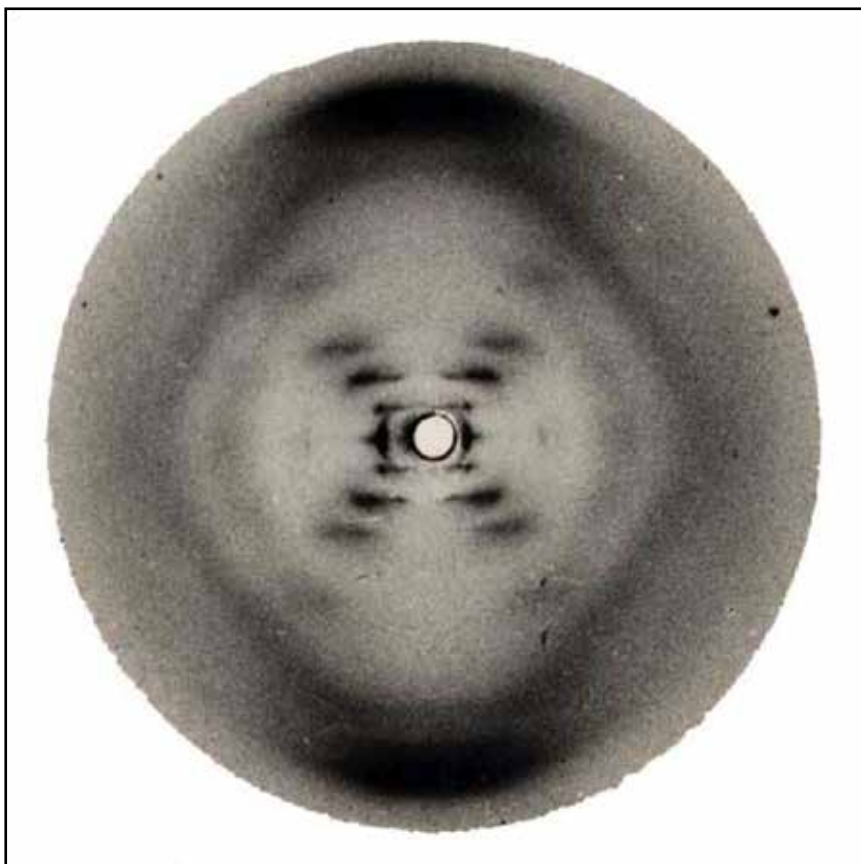


Figura 23: La ahora famosa "Foto 51" con el patrón de difracción de rayos-X de la forma B fuertemente hidratada (92% de humedad) de Na-ADN. La foto fue tomada por Franklin y Gosling el viernes 2 de Mayo de 1952 mediante una exposición prolongada (62 h) de una sola fibra de 50 μm de espesor (como el de un cabello). La distancia muestra-film fue de 15 mm y se empleó un colimador de 100 μm de diámetro.

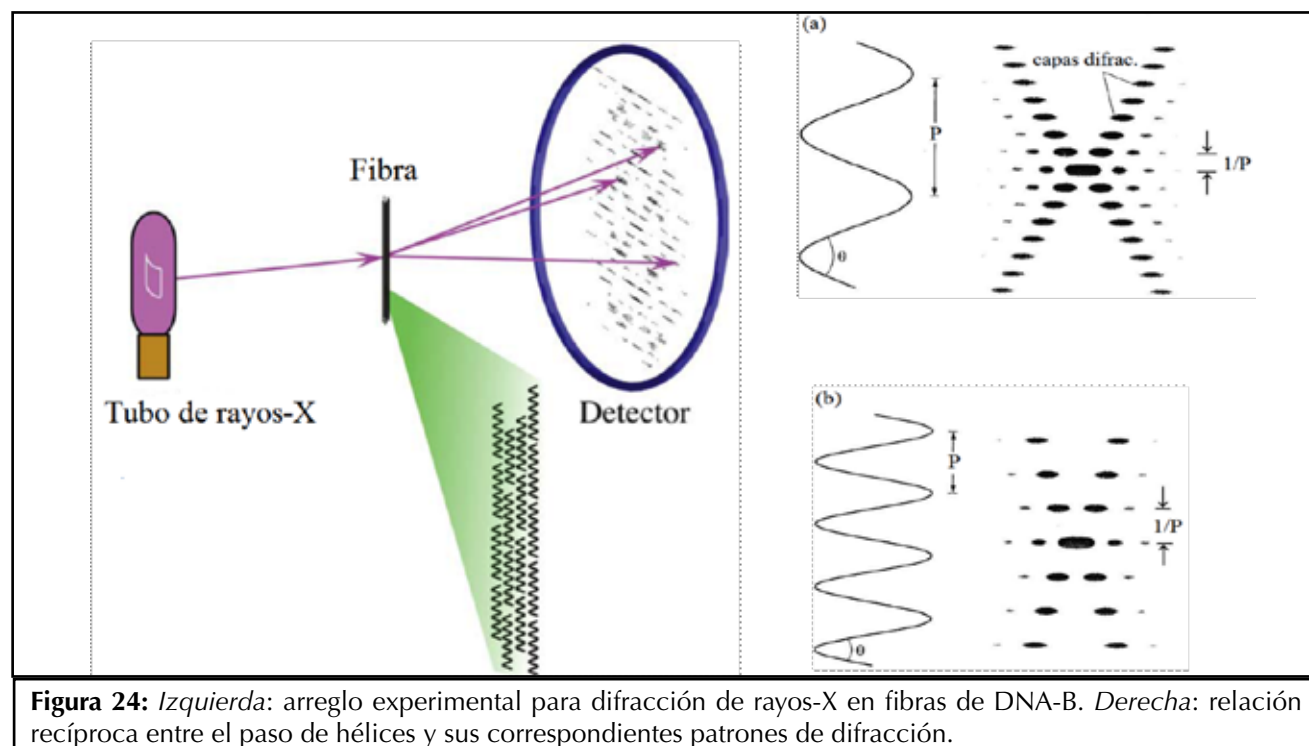


Figura 24: Izquierda: arreglo experimental para difracción de rayos-X en fibras de DNA-B. Derecha: relación recíproca entre el paso de hélices y sus correspondientes patrones de difracción.

al de moléculas de ADN alineadas pero desordenadas entre sí (ver Secciones 2.1 y 2.5 y Fig. 24).

Para una hélice continua aislada, la amplitud F_n de dispersión de rayos-X (factor de estructura) de la n -ésima capa (ver Fig. 24) viene dada por (Cochran, Crick & Vand, 1952):

$$F_n = J_n(2\pi kR) \exp[in(\psi + \pi/2)],$$

donde $J_n(x)$ es la función de Bessel (ubicadas en la solución de problemas físico-matemáticos con simetría cilíndrica) de orden n , R es el radio de la hélice, y k y ψ son la coordenada radial y acimutal de una posición en el espacio recíproco (de difracción). Las funciones de Bessel de los órdenes más bajos se indican en la Fig. 25.

Así, la intensidad de difracción de una hélice aislada con una densidad lineal de electrones uniforme resulta proporcional a $J_n^2(x)$. La Fig. 26 muestra el patrón de difracción de la forma B del ADN y su interpretación teórica.

En la Fig. 26, el ángulo de la X con el ecuador es igual al ángulo que forma la hélice con el eje de la misma. Del patrón resulta $P=34 \text{ \AA}$, $p=3.4 \text{ \AA}$ y $R=10 \text{ \AA}$. La ausencia de la reflexión en la cuarta capa sugiere la presencia de una segunda hélice idéntica desplazada en $3/8P$ a lo largo del eje que produce efectos de interferencia destructiva (extinciones sistemáticas) en las capas con $n = 4, 12, 20$, etc.

Watson y Crick tenían ahora valiosas piezas de información experimental, cruciales para la elaboración de su modelo para la forma B del ADN:

- a) El polímero ADN se encuentra arreglado en forma de hélices.
- b) Los fosfatos se encuentran en el

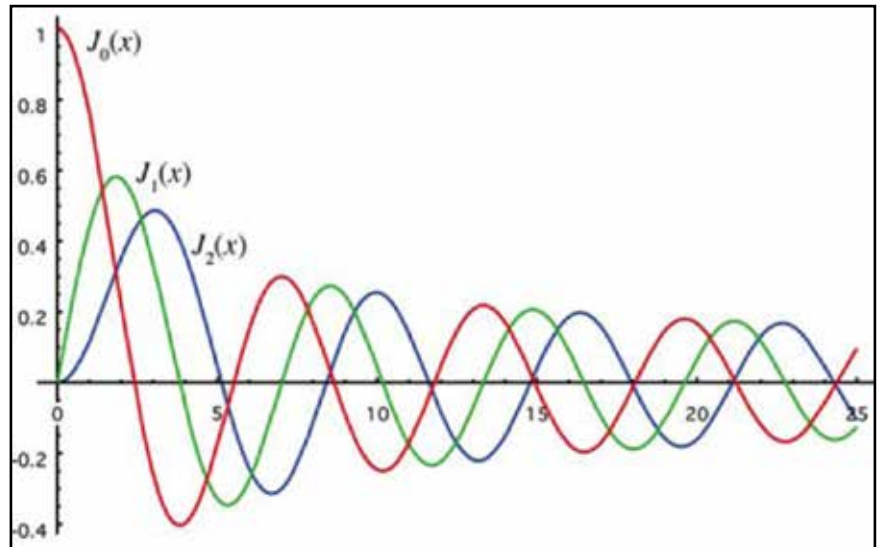


Figura 25: Primeras tres funciones de Bessel $J_n(x)$.

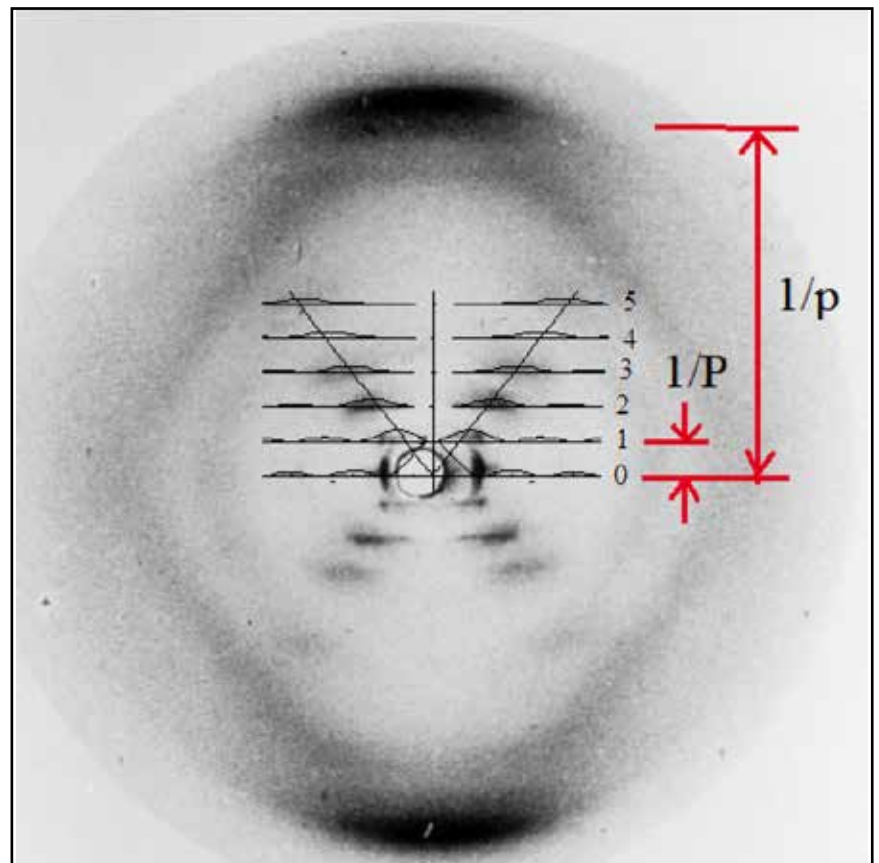
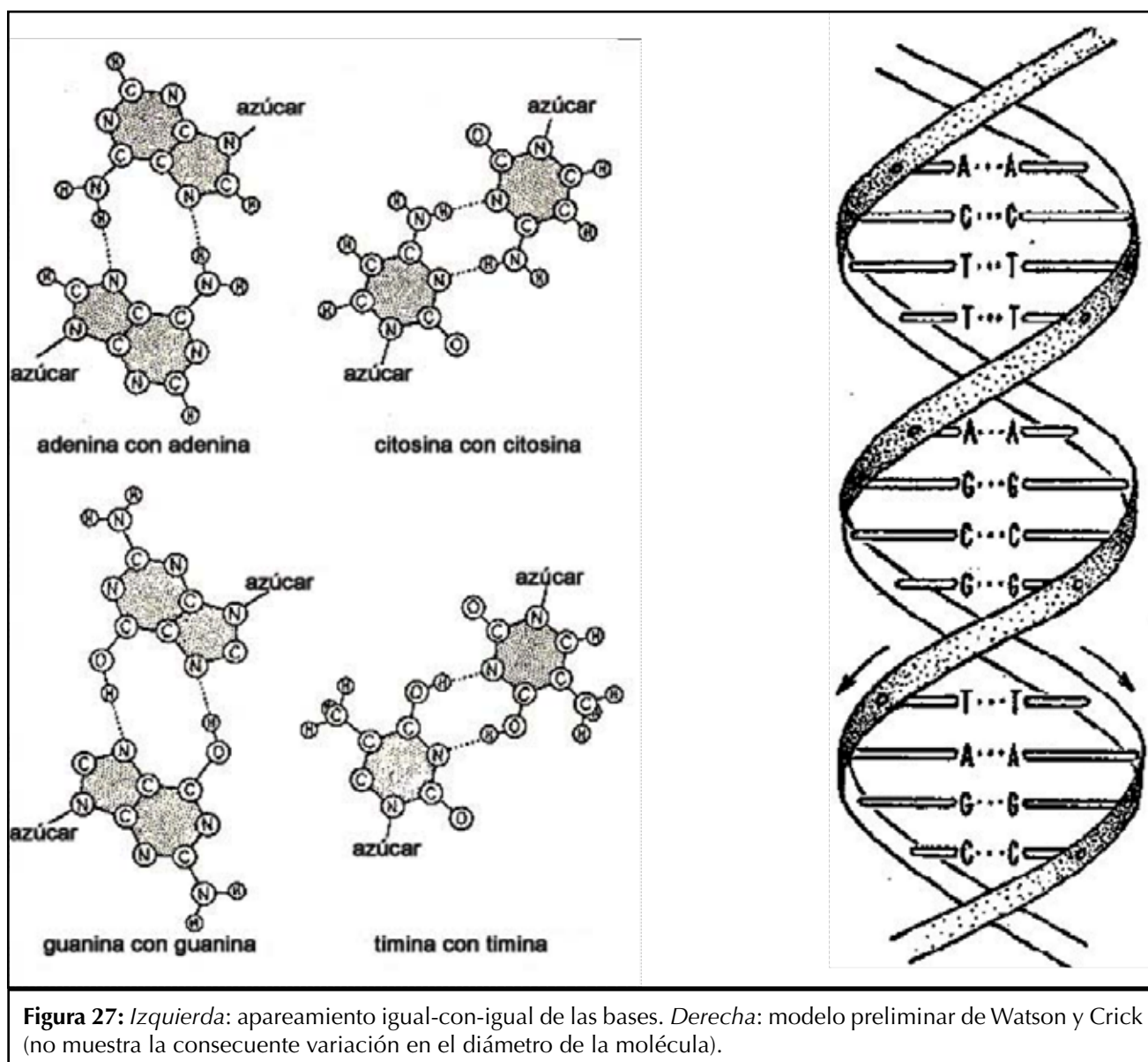


Figura 26: Interpretación de la Foto 51 de Franklin en términos de la intensidad de difracción calculada, correspondiente a una hélice aislada de paso P y con una densidad lineal de electrones constante. La intensa difracción meridional que se observa a alto ángulo se debe a la fuerte reflexión por parte de las bases nitrogenadas, apiladas con una separación uniforme p entre ellas.

- exterior de la hélice a unos 10 \AA c) Las bases se disponen hacia el interior de la hélice, son paralelas

- y uniformemente separadas en 3.4 Å entre sí (como una pila de platos).
- d) El paso de la hélice es de unos 34 Å y, por lo tanto, comprende unos 10 nucleótidos por vuelta.
- e) Haciendo la suposición razonable que la forma-A cristalina del ADN tenía la misma conformación (topología) básica que la forma-B más hidratada, entonces el grupo espacial C2 determinado por Franklin para el cristal sugirió claramente a Crick una característica estructural fundamental para el ADN: debe tratarse de dos hélices enrolladas alrededor de un eje común con sus marcos de fosfato-ribosa polimerizados aproximadamente relacionados entre sí por un eje doble perpendicular al eje de la molécula. Consecuentemente, el par de hélices tienen sus respectivos esqueletos moleculares corriendo en *direcciones opuestas*, una en la dirección 3'→5' de los carbonos del azúcar, la otra en la orientación 5'→3' (ver Fig. 7).
- f) Las dos hélices están desplazadas entre sí en 3/8 del paso común P .
- g) Para la conformación 3-D de los nucleótidos aislados, disponían de la estructura cristalográfica determinada en 1949 por S. Furberg del Birkbeck's College de Londres (Furberg, 1950). Este trabajo muestra la importante característica molecular que las bases son prácticamente *perpendiculares* al plano medio del azúcar ribosa, contrariamente a la conclusión derivada por Astbury, a partir de difracción de rayos-X en fibras de ADN, que dichos planos eran *paralelos* entre sí.



2.11. ARREGLO DE LAS BASES NITROGENADAS

Para completar el modelo restaba determinar el arreglo de las bases. Entendiendo que las bases que se proyectaban hacia el centro desde los esqueletos helicoidales a lados opuestos del eje sólo pueden estar vinculadas a través de puentes de hidrógeno, Watson comenzó a aparear las cuatro bases en todas las combinaciones posibles. Notó a partir de modelos moleculares que las bases igual-con-igual se aparean mediante un par de puentes de hidrógeno (ver Fig. 27) y propuso un modelo estructural para el ADN y un mecanismo para su replicación. Sin embargo, el tamaño de las asociaciones diméricas de bases variaba grandemente en tamaño, hecho que se reflejaría en un arrollamiento ci-

lindrico con protuberancias y adelgazamientos (como ocurre con una pila de monedas de diferentes valores). Esto contrariaba la regularidad observada en la Foto 51 de Franklin, que implicaba un enrollamiento cilíndrico con un diámetro relativamente constante.

Una circunstancia fortuita por un lado descalificaría su modelo, mientras que por el otro indicaría el camino para encontrar el apareamiento correcto de las bases. En un escritorio de la oficina 103 que ocupaban Crick y Watson estaba Jerry Donohue, un competente cristalógrafo que había sido estudiante graduado de Pauling en Caltech y se encontraba realizando un post-doctorado en el Cavendish. Donohue le hizo notar a Watson que los modelos moleculares que estaba usando para

las bases timina y guanina (tomados del libro de J. N. Davidson sobre *The Biochemistry of the Nucleic Acids*), esto es las formas *enólicas* (ver Fig. 27), eran incorrectos y le sugirió el empleo de las formas *cetónicas* (ver Fig. 28) que liberaban un oxígeno para actuar como aceptor de un puente de hidrógeno adicional.

Con esta nueva información, y sin esperar que el taller del Cavendish completara los modelos metálicos en escala de las bases A, T, C y G, a mediados de Febrero de 1953 Watson retomó el modelado del ADN empleando representaciones moleculares recortadas en cartón. Luego de intentos infructuosos asociando bases igual-con-igual, logró el posicionamiento correcto de las bases opuestas vinculadas a través de enlaces de hidrógeno optimizados que estabilizan la estructura de doble hélice (ver Fig. 29). Otros apareamientos de bases tienden a desestabilizar dicha estructura.

2.12. REGLA DE CHARGAFF A=T Y G=C EXPLICADA. COPIADO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

El aspecto más importante de la asociación en pares de las bases es que sólo ciertos pares pueden formar parte de una doble hélice de diámetro uniforme. Un miembro del par debe ser una base de mayor tamaño purina y, complementariamente, la otra la más pequeña pirimidina. Si (como en el frustrado modelo previo de Watson y Crick) el par consistiera de dos purinas, la hélice mostraría allí un ensanchamiento; si consistiera en dos pirimidinas, la hélice tendría un estrechamiento. La optimización de los enlaces de hidrógeno llevaría a una restricción adicional: los únicos pares de bases posibles son

Adenina (A) con Timina (T)

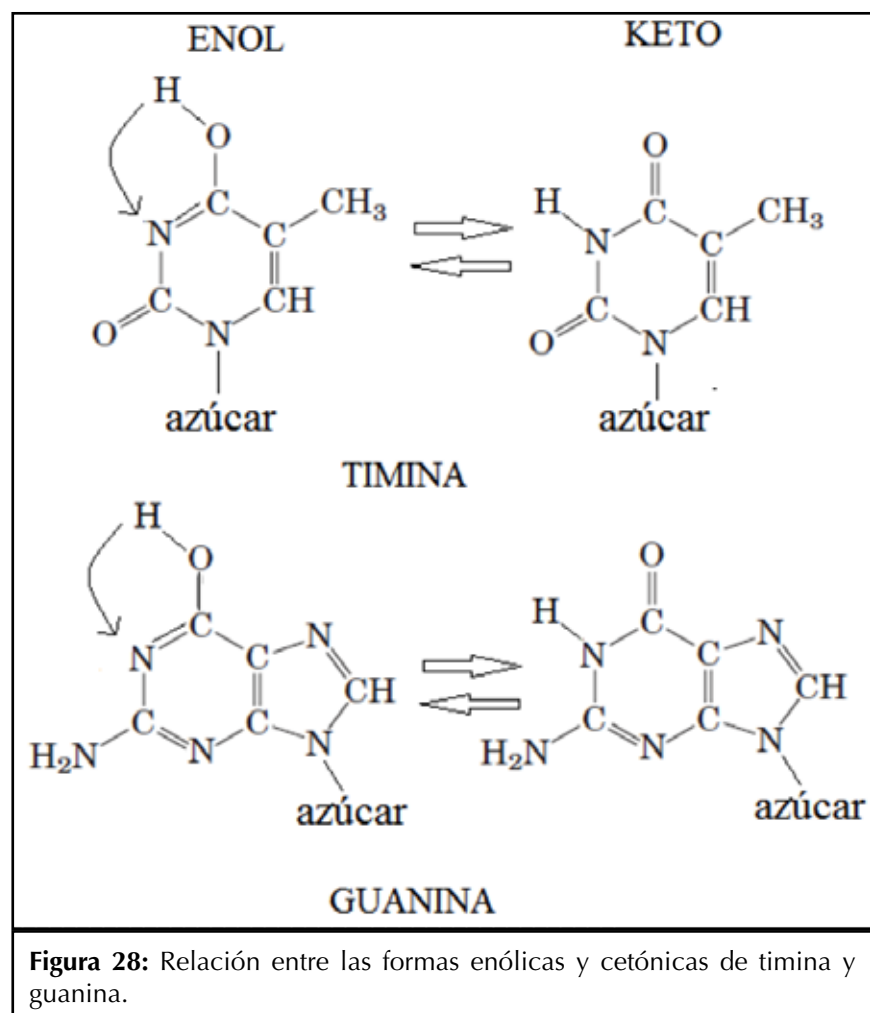


Figura 28: Relación entre las formas enólicas y cetónicas de timina y guanina.

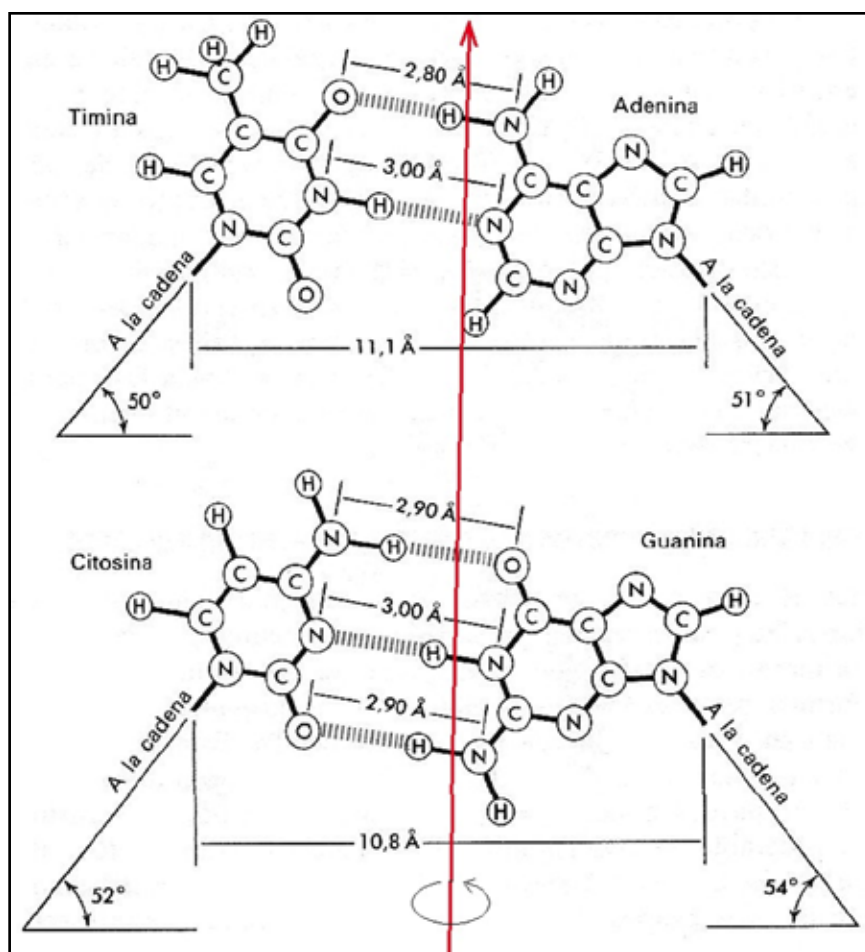


Figura 29: Apareamiento optimizado de las bases nitrogenadas A=T y G=C vía puentes de hidrógeno (Watson et al., 2006). El puente (guanina) N-H...O=C(citosina) no fue tenido en cuenta en el modelo original de Watson y Crick. Notar que el apareamiento confiere al ADN una serie de pseudo-ejes dobles (o ejes diádicos) de simetría (línea en rojo), pasantes por el centro de cada par de bases y perpendiculares al eje común de las hélices.

Guanina (G) con Citosina (C)

Como un bono inesperado, esta propiedad estructural explicaba un enigmático resultado experimental, la llamada *regla de Chargaff*. A pesar que el porcentaje de las bases

nitrogenadas variaban ampliamente de una especie a otra, sin embargo, las relaciones molares A/T y G/C eran siempre muy próximas a uno, tal como lo sugiere la tabla siguiente (adaptada de Chargaff et al., 1949).

Fuente de ADN	Adenina (A)	Timina (T)	Guanina (G)	Citosina (C)
Timo de cabra	1.7	1.6	1.2	1.0
Bazo de vaca	1.6	1.5	1.3	1.0
Levadura	1.8	1.9	1.0	1.0
Bacilo de la tuberculosis	1.1	1.0	2.6	2.4

¡Todas las piezas del rompe-ca-bezas caían ahora maravillosamente en su lugar! La dupla pudo entonces completar rápidamente su modelo 3-D (ver Fig. 30) y ser los primeros en admirar la elegancia con que la Naturaleza había diseñado la arquitectura molecular del código genético. Ellos propusieron que la molécula de ADN toma la forma de una doble hélice dextrógira (como la espiral de un tirabuzón común) que recuerda una escalera algo retorcida a lo largo de su extensión. Las barandas de la escalera están hechas de grupos químicos fosfato y azúcar deoxirribosa ligados covalentemente entre sí y dispuestos de manera alternada para formar una estructura polimérica. Los peldaños están compuestos de un par de bases nitrogenadas (que se proyectan hacia el eje de la hélice desde sendos azúcares sobre hélices opuestas) enlazadas entre sí por puentes de hidrógeno.

Era el sábado 28 de Febrero de 1953. De acuerdo con Watson (Watson, 1968, 1981), a la hora del almuerzo Crick entró exultante en "The Eagle" (una 'pub' cercana al laboratorio) y anunció a quien pudiera oírle que habían encontrado el *secreto de la Vida*.

Convencidos de la corrección de tan atractivo modelo hipotético y sin pruebas experimentales propias que lo sustenten, Watson y Crick escriben rápidamente el 2 de Abril de 1953 los resultados en un sucinto artículo titulado "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid" ("Una Estructura para el Ácido Deoxi Ribonucleico") y lo envían para su publicación a la prestigiosa revista Nature (Watson & Crick, 1953a). No reconocen el empleo de información experimental clave producida por Franklin o Wilkins mas allá de declarar el haber sido estimulados por el conocimiento de la 'naturaleza general de resultados experi-

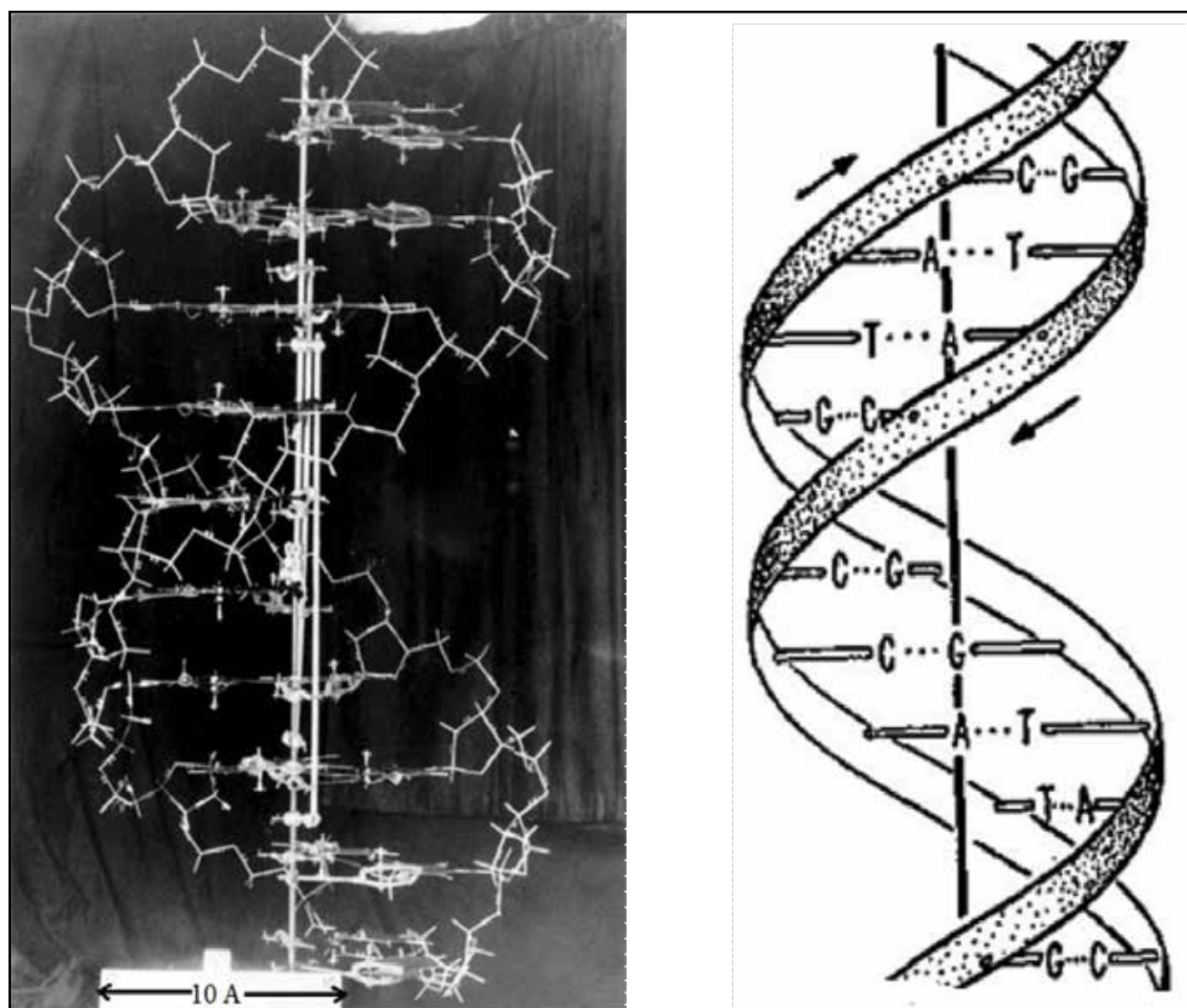


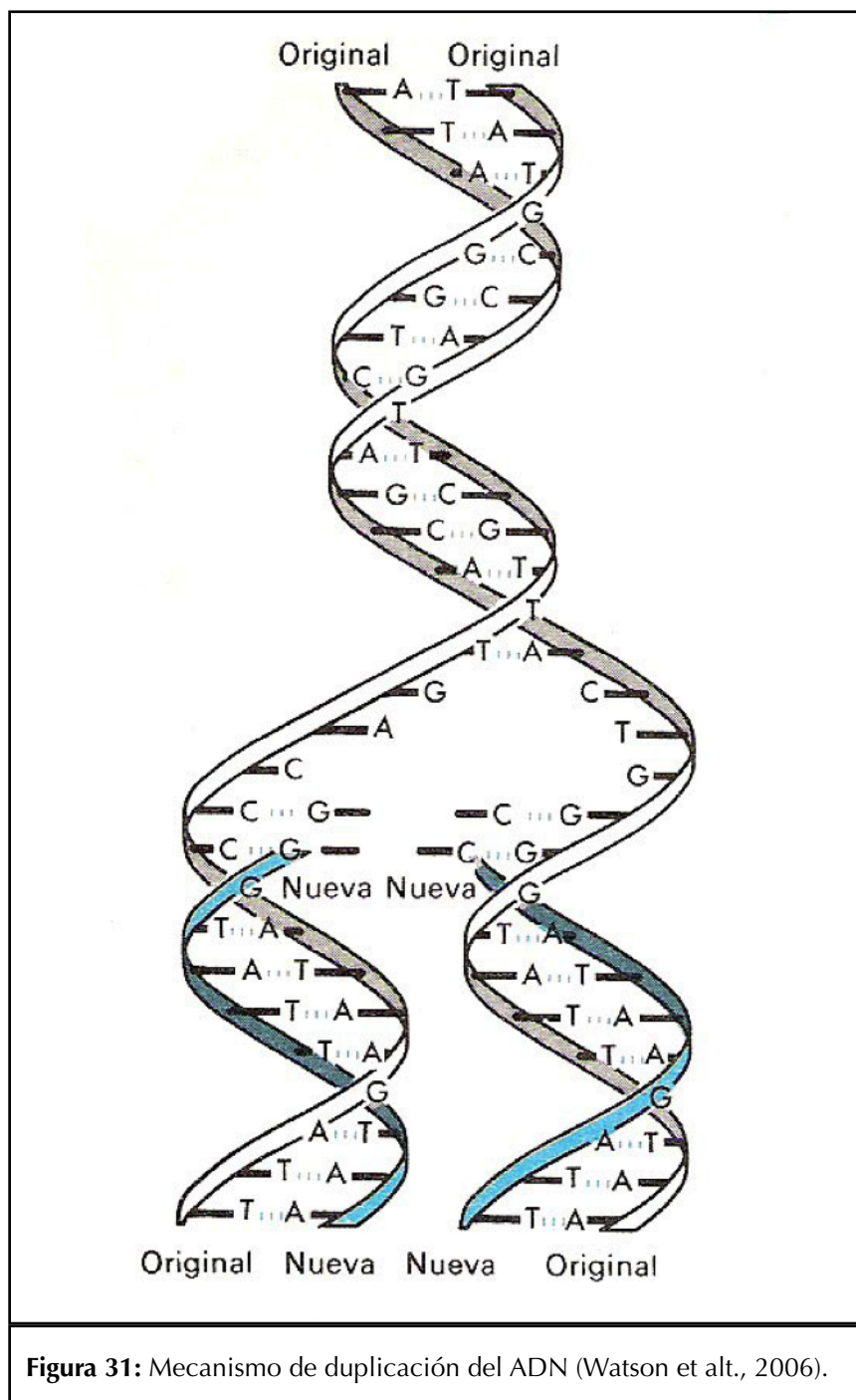
Figura 30: *Izquierda:* Modelo original en escala de Watson y Crick de la molécula de ADN-B (hecho de alambres y chapas). La tira horizontal al pie del modelo indica la magnificación del mismo y corresponde a una longitud de 10 Å. El modelo se extiende verticalmente un paso de la hélice (unos 34 Å). *Derecha:* esquema original del ADN (adaptado de Watson & Crick, 1953).

mentales e ideas no-publicadas de Wilkins, Franklin y sus colegas del King's College de Londres'.

Mediante un arreglo entre los directores del Cavendish (Bragg) y del grupo del King's College (Randall) con el Editor de Nature, se acordó en que los resultados de Wilkins (Wilkins, Stokes & Wilson, 1953) y Franklin (Franklin & Gosling, 1953c) se publicaran separadamente en el mismo volumen (Nature, Vol. 171, April 1953), siguiendo el artículo de Watson y Crick.

La estructura de doble hélice con apareamiento específico entre bases propuesta tendría una implicancia aún más extraordinaria en desentrañar el mecanismo molecular por el cual durante millones de años los organismos se desarrollaban y reproducían. Tan extraordinaria que Watson no se atrevió a explicitarlo en el primer artículo en Nature, a pesar de la opinión en contrario de Crick (Crick, 1974, 1989). Los autores alcanzaron una solución de compromiso que reza: "No ha escapado a nuestra consideración que

el apareamiento específico postulado sugiere inmediatamente un posible mecanismo de copiado de la información genética". Los autores dejaron rápidamente de lado esta hesitación y poco después publicaron las importantes consecuencias genéticas implicadas por su modelo (Watson & Crick, 1953b). La Fig. 31 muestra (esquemáticamente) el mecanismo propuesto de duplicación del ADN.



Fisiología o Medicina “por su descubrimiento relacionado con la estructura molecular de ácidos nucleicos y su importancia para la transferencia de información en la materia viva”. En sus respectivas conferencias Nobel, Watson, Crick y Wilkins realizaron 83, 23 y 24 citaciones, ninguna de Franklin. Sólo Wilkins incluyó a ella en sus reconocimientos (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/).

Existe la opinión generalizada que el Premio Nobel debió haberse otorgado también a Rosalind Franklin, en razón que sus datos experimentales fueron una clave muy importante en la resolución de la estructura del ADN. Sin embargo, Franklin falleció de cáncer en 1958 y el Premio Nobel no se otorga *post-mortem*; así que el Premio de 1962 estaba fuera de cuestión. Pero ella pudo haber sido nominada en vida. Los archivos Nobel que, entre otra información, contienen las nominaciones relacionadas con los galardones se mantienen cerrados durante un cierto tiempo después que un premio particular ha sido otorgado. Así, en 2008 fue posible el encontrar si Rosalind Franklin fue alguna vez nominada para el Premio Nobel en relación con sus trabajos sobre el ADN. La respuesta es que nadie la nominó ni para el Nobel en Fisiología o Medicina o el de Química (http://nobelprize.org/educational_games/medicine/dna_double_helix/readmore.html).

2.13. EPÍLOGO

Favorecidos por desintelencias entre Franklin y Wilkins del grupo del King's College de Londres, el acceso a la excelente información experimental producida por Franklin y Gosling, la momentánea desorientación de Pauling en Caltech en la determinación de la estructura del ADN, y algunas circunstancias for-

tuitas, Crick y Watson estuvieron en condiciones de ‘tomar un atajo’ al problema, proponiendo un modelo molecular que resultó, esencialmente, correcto. De esta manera ganaron, en una suerte de ‘sprint final’, la no-declarada carrera por la estructura de la molécula biológica más importante y así la inmortalidad científica. En 1962 Watson, Crick y Wilkins recibieron el Premio Nobel en

■ REFERENCIAS

- Astbury W.T. (1947) Nucleic Acids, Symposium of the Society for Experimental Biology, No. 1, Cambridge University Press, 66-76.
- Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal

- Types. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *Journal of Experimental Medicine* **79**, 137-157.
- Bragg W.L., Kendrew J.C., Perutz M. (1950) Polypeptide chain configuration in crystalline proteins. *Proc. Roy. Soc.* **A203**, 321-357.
- Chargaff E., Vischer E., Doninger R., Green C., Misani F. (1949) The composition of the desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. *J. Biol. Chem.* **177**, 405-416.
- Cochran W., Crick F.H.C., Vand V. (1952) The Structure of Synthetic Polypeptides. I. The Transform of Atoms on a Helix. *Acta Cryst.* **5**, 581-586.
- Crick F.H.C. (1974) The Double Helix: A Personal View. *Nature* **248**, 766-769.
- Crick F.H.C. (1989) *What Mad Pursuit. A Personal View of Scientific Discovery.* Penguin Books, England.
- Franklin R.E., Gosling R.G. (1953a) The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content. *Acta Cryst.* **6**, 673-677.
- Franklin R.E., Gosling R.G. (1953b) The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. II. The Cylindrically Symmetrical Patterson Function. *Acta Cryst.* **6**, 678-685.
- Franklin R.E., Gosling R.G. (1953c) Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **171**, 740-741.
- Furberg S. (1950) An X-ray Study of the Stereochemistry of the Nucleosides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 751-761.
- Griffith F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene (Cambridge University Press)* **27**, 113-159.
- Guttman B., Griffiths A., Suzuki D., Cullis T. (2004) *Genetics*, Oneworld Publications, Oxford.
- Hershey A., Chase M. (1952) Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology.* **36**, 39-56.
- Lehninger A., Nelson D.L., Cox M.M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry.* Freeman Publisher, 4th Edition.
- Lipson H., Beevers C.A. (1936) An improved numerical method of two-dimensional Fourier synthesis for crystals. *Proc. Phys. Soc.* **48**, 772-780.
- Pauling L. (1929) The principles determining the structure of complex ionic crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 1010-1026.
- Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. (1951) The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **37**, 205-211.
- Pauling L., Corey R.B. (1953) A proposed structure for the nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **39**, 84-97.
- Pierce B.A. (2007) *Genetics: A Conceptual Approach.* Freeman Publisher, 3rd Edition.
- Schrödinger E. (1946) *What is Life? The Physical Aspect of Living Cell.* Cambridge University Press; MacMillan Company, New York.
- Vischer E., Zamenhof S., Chargaff E. (1949) Microbial Nucleic Acids: the Desoxypentose Nucleic Acid of Avian Tubercle Bacilli and Yeast. *J. Biol. Chem.* **177**, 429-438.
- Warren B.E. (1990) *X-ray Diffraction.* Dover Publications, New York.
- Watson J.D. (1968, 1981) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA.* Athenaeum, New York (1968); Weidenfeld and Nicholson, London (1981).
- Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2006) *Biología Molecular del Gen.* Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición.
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953a) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738.
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953b) Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **171**, 964-967.
- Wilkins M. (2003) *The Third Man of the Double Helix*, Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Wilkins M.H.F., Gosling R.G., Seeds W.E. (1951) Physics Studies of Nucleic Acids. *Nature*, London **167**, 759-760.
- Wilkins M.H.F., Stokes A.R., Wilson H.R. (1953) Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acid. *Nature*, London **171**, 738-740.

Otras referencias, reivindicatorias de la personalidad y labor científica de R. Franklin:

- Klug A. (1974) Rosalind Franklin and the Double Helix. *Nature* **248**, 787-788.
- Maddox B. (2003) *Rosalind Franklin, the Dark Lady of DNA.* Harper Collins Publishers.
- Sayre A. (1975) *Rosalind Franklin and DNA.* Norton & Company, New York.