

## 1. Estructura del ADN: primaria, secundaria y terciaria

## 2. Replicación del ADN

## 3. Transcripción y traducción

## 4. Vectores: plásmidos

### 1. Estructura del ADN: primaria, secundaria y terciaria

#### ■ Estructura primaria

La estructura primaria del ADN consiste en la formación de largas cadenas de polinucleótidos por unión de desoxirribonucleótidos-5'-monofosfato.

Los nucleótidos se encadenan mediante enlaces éster: el grupo fosfato que se encuentra en posición 5' de un nucleótido esterifica al grupo  $-OH$  situado en posición 3' del nucleótido siguiente; de esta forma se va alargando la cadena por el encadenamiento de nucleótidos en las posiciones  $5' \rightarrow 3' \rightarrow 5' \rightarrow 3' \dots$ , donde cada molécula del grupo fosfato forma un puente fosfodiéster entre dos moléculas de desoxirribosa.

En un polinucleótido se pueden diferenciar dos partes:

- El **esqueleto de polidesoxirribosa fosfato**, que es común para todas las clases de ADN. En cada cadena aparece un extremo 5', que posee un grupo fosfato libre unido al carbono 5' del nucleótido, y un extremo 3', que posee el  $-OH$  alcohol en posición 3' del nucleótido también libre.
- Las **diferentes bases**, A, C, T y G, alineadas a lo largo de este esqueleto, constituyen el elemento característico y diferenciador entre las distintas clases de ADN. Aparece aquí, al igual que en las proteínas, la noción de secuencia.

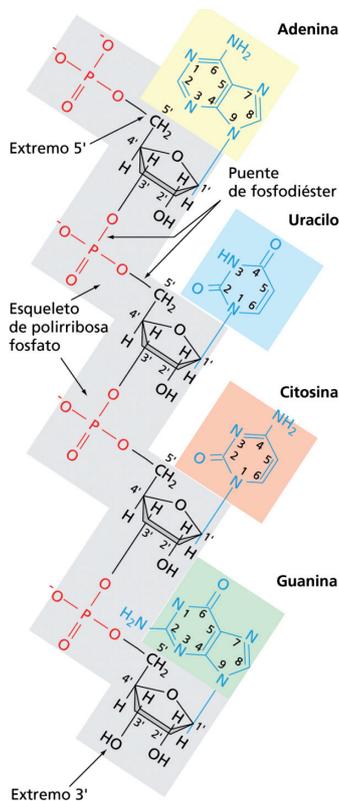
Los polinucleótidos de la estructura primaria del ADN difieren entre sí en la composición o en el porcentaje de cada una de sus bases y por la secuencia, es decir, el orden de distribución de los cuatro tipos de bases (A, G, C, T) a lo largo del esqueleto de polidesoxirribosa fosfato. De este modo, cada molécula de ADN está caracterizada por una composición y secuencia definida de sus bases, y es en la naturaleza misma de esta secuencia donde reside la información necesaria para la síntesis de las proteínas.

#### ■ Estructura secundaria

El modelo de la estructura secundaria del ADN en forma de **doble hélice dextrógira (forma B)**, propuesto por Watson y Crick, pone de manifiesto que la molécula de ADN está formada por dos cadenas de polinucleótidos enfrentadas por sus bases y unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno.

Ahora bien, si te fijas en la cadena del polinucleótido de la imagen superior, ¿cómo debe situarse la otra cadena para que queden enfrentadas sus bases y puedan unirse mediante puentes de hidrógeno? Las cadenas polinucleotídicas son antiparalelas, es decir, una se encuentra en la dirección opuesta a la otra (si una presenta la dirección  $5' \rightarrow 3'$ , la otra posee dirección  $3' \rightarrow 5'$ ).

La estructura secundaria resultante se asemeja a una escalera de caracol, cuyos pasamanos corresponden a los esqueletos de polidesoxirribosa fosfato y los peldaños son los pares de bases enfrentadas entre sí. Aunque, en realidad, el conjunto se pliega sobre sí mismo obligado por los puentes de hidrógeno entre diferentes regiones de la molécula, hasta adoptar la conformación más estable, que es la doble hélice. En esta estructura destacan las siguientes características:



Estructura primaria del ADN. En cada polidesoxirribonucleótido se diferencia el esqueleto de polidesoxirribosa fosfato y las distintas bases alineadas en este esqueleto y dispuestas según una secuencia característica.

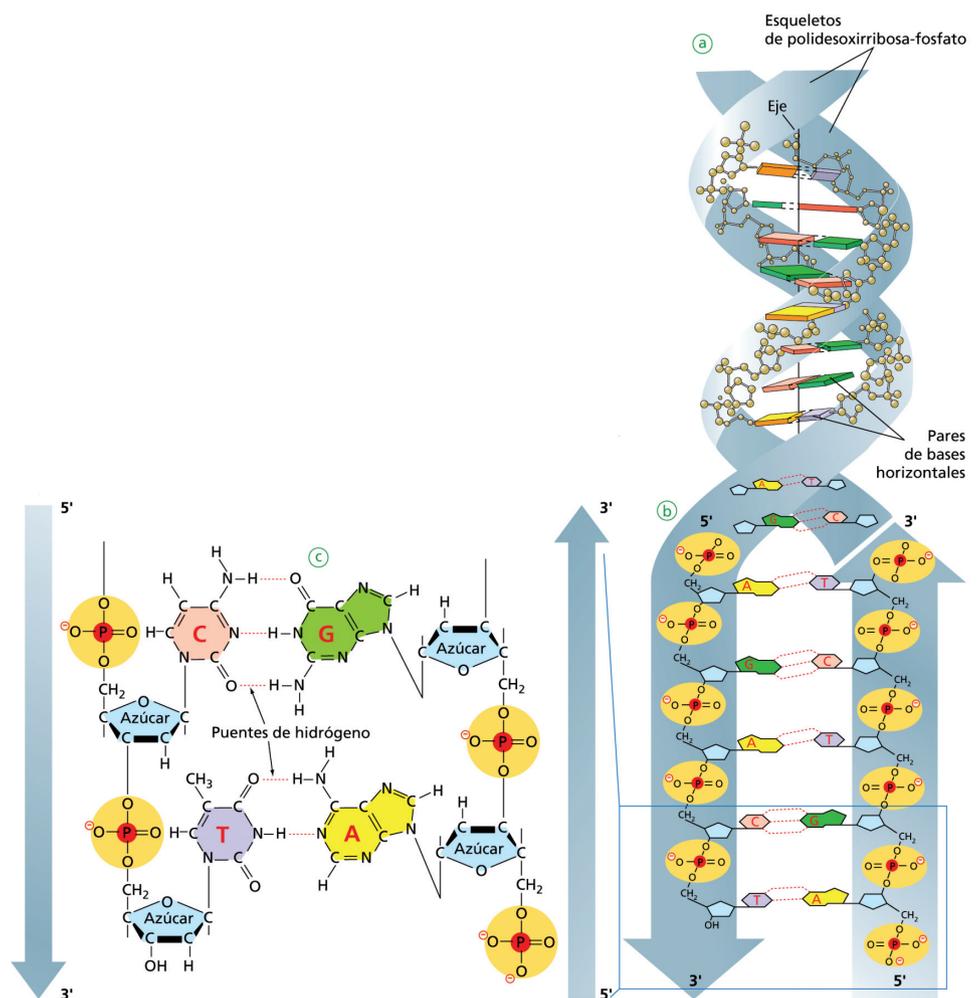
# Textos de ampliación

- El enrollamiento entre las dos hebras de la doble hélice es dextrógiro y de tipo plectonómico, como si estuvieran trenzadas.
- Las secuencias de bases son complementarias, pues existe una correspondencia entre las bases de ambas cadenas, de tal forma que la adenina solo puede estar frente a la timina (y viceversa) y la guanina frente a la citosina (y viceversa). Es decir, las bases púricas, que son más grandes, se encuentran enfrentadas a las bases pirimidínicas, más pequeñas, y la unión se realiza por puentes de hidrógeno entre los grupos polares de las bases: dos puentes de hidrógeno en los pares A = T y tres en los pares G ≡ C.

La correspondencia entre las bases es la causa de que las dos cadenas de la doble hélice de ADN posean secuencias complementarias, esto es, si una posee la secuencia GATC, la otra cadena tendrá la secuencia CTAG.

## Estructura secundaria del ADN.

- Plegamiento plectonómico de la doble hélice del ADN en el modelo de Watson y Crick, también llamado forma B: los pares de bases están horizontales y el eje los atraviesa prácticamente por su centro.
- Disposición antiparalela de las dos cadenas de ADN en la estructura secundaria.
- Apareamiento entre bases complementarias mediante puentes de hidrógeno: las bases púricas A y G se aparean con las pirimidínicas, T y C, respectivamente.



## ■ Estructura terciaria

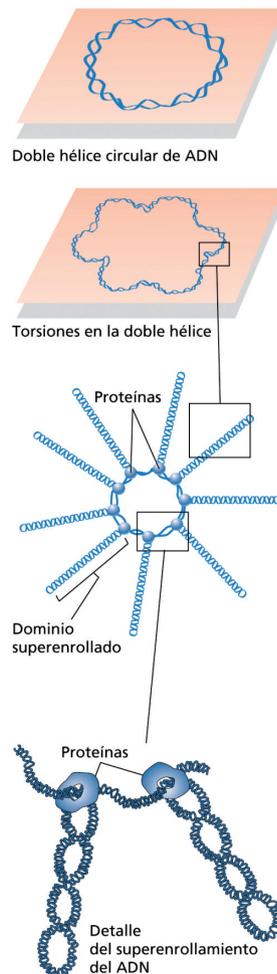
Tanto en el citoplasma de las células procariontas como en el núcleo de las células eucariotas debe resolverse el mismo problema: cómo almacenar grandes cantidades de ADN en un volumen reducido y, al mismo tiempo, que la información que contiene resulte accesible.

## Textos de ampliación

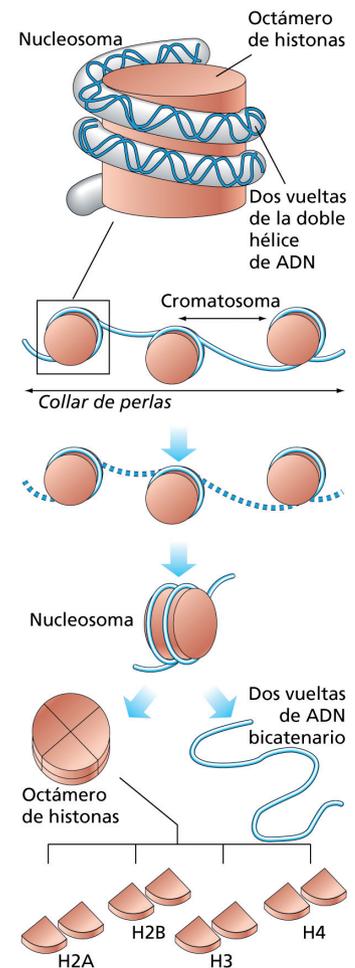
En general, el ADN de los procariotas y también de las mitocondrias y cloroplastos de las células eucariotas, es una doble hélice (excepto en algunos grupos bacterianos, que es lineal). En un principio se consideró que era «desnudo», pero actualmente se sabe que está asociado a un pequeño número de proteínas que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de su estructura y en el empaquetamiento.

El cromosoma bacteriano se pliega como una superhélice en forma de ochos y da lugar a una serie de bucles que le permiten ocupar un espacio mínimo.

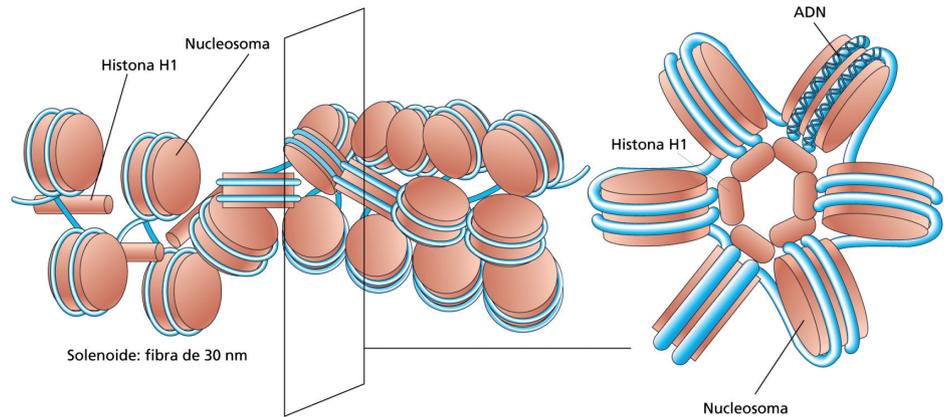
En eucariotas el problema consiste en introducir en cada célula, por ejemplo, en una célula humana, más de un metro de ADN en el interior de un núcleo de apenas 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Evidentemente el empaquetamiento debe ser aún más compacto que en procariotas, y para ello el ADN se asocia con un tipo particular de proteínas llamadas **histonas**.



*Empaquetamiento del ADN en bacterias. El cromosoma de E. coli contiene unos 50 dominios enrollados en superhélice que se estabilizan mediante un conjunto de proteínas a las que se unen.*

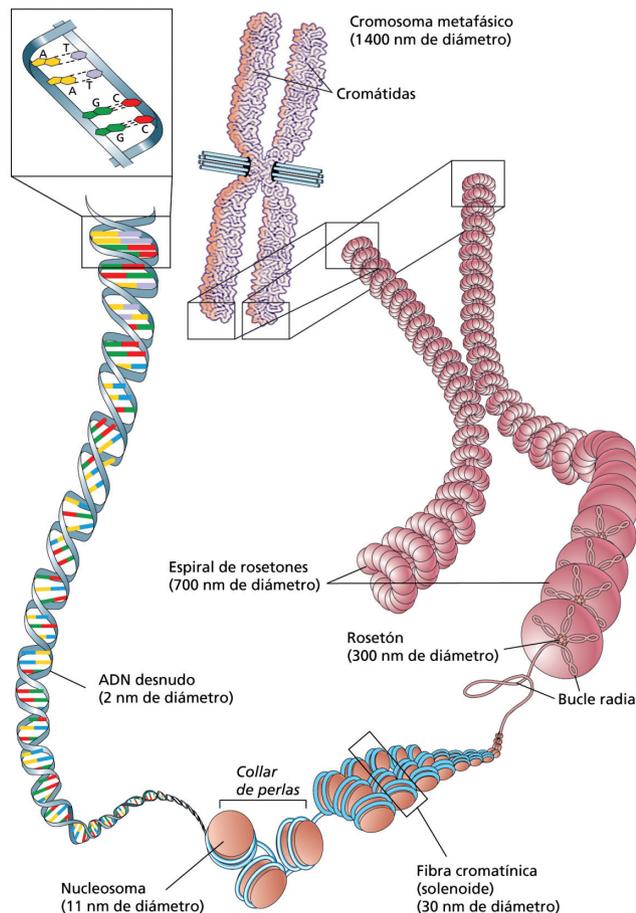


*Nivel de empaquetamiento de «collar de perlas» y estructura del nucleosoma.*



Nivel de empaquetamiento de solenoide y sección transversal de un solenoide: disposición del «collar de perlas» alrededor de las histonas H1.

La forma compacta que adquiere el ADN unido a las histonas en el núcleo de las células eucariotas se conoce como  **cromatina** , y aunque aparentemente se asemeja a un conjunto de fibras entremezcladas y apelotonadas, en realidad esconde una estructura enormemente compleja y ordenada, en la que se distinguen diferentes niveles de organización estructural: nucleosoma y «collar de perlas», fibra cromatínica o de 30 nanómetros, dominios estructurales en forma de bucles radiales, rosetón, espiral de rosetones y, por último, cromosoma.



Niveles de organización del empaquetamiento del ADN en las células eucariotas.

## 2. Replicación del ADN

La **replicación** del ADN consiste en el desenrollamiento y apertura de la doble hélice, de modo que cada una de las cadenas actúa como molde para que se forme otra cadena que posee una secuencia de nucleótidos complementaria. El resultado es la obtención de dos moléculas de ADN bicatenario, idénticas a la doble hélice de ADN original, que se repartirán una a cada célula hija. La replicación del ADN se dice que es **semiconservativa**, pues en la doble hélice de cada célula hija se conserva una cadena original de la célula madre (el molde).

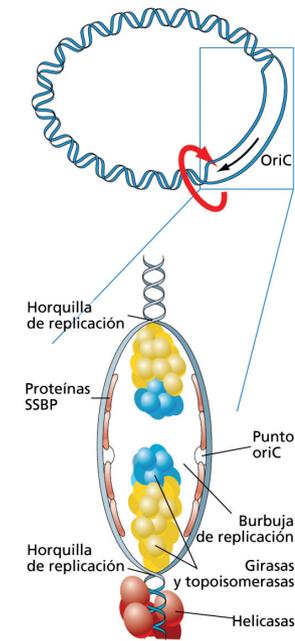
La replicación comienza cuando se forma una burbuja de replicación, que se extiende y da lugar a dos horquillas de replicación, en las cuales cada hebra de ADN sirve de molde para que se sintetice una cadena complementaria. Las horquillas se desplazan en sentidos opuestos hasta que se encuentran en el punto de terminación. La separación de las cadenas comienza en un punto concreto denominado **origen de replicación**.

Intervienen un conjunto de enzimas: **helicadas, girasas y topoisomerasas** facilitan el desenrollamiento y eliminan las tensiones generadas por la torsión; las **ADN polimerasas** leen la secuencia de las cadenas y elaboran dos copias con secuencias complementarias.

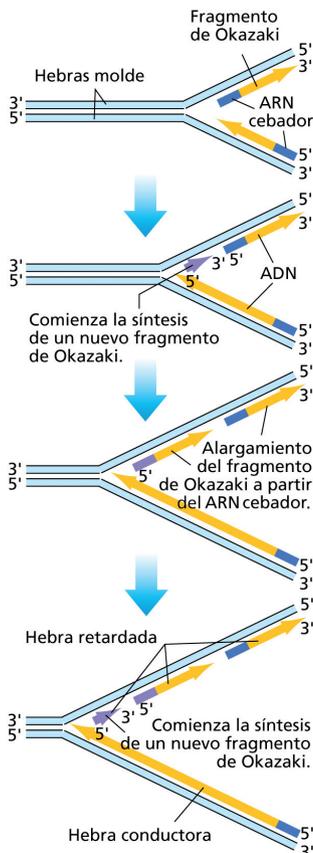
Las ADN polimerasas deben resolver dos problemas:

- En primer lugar, solo pueden leer las secuencias de las hebras molde en el sentido  $3' \rightarrow 5'$ , mientras que las nuevas cadenas se sintetizan y crecen en el sentido  $5' \rightarrow 3'$ . Por tanto, la hebra del molde orientada en el sentido  $3' \rightarrow 5'$  es copiada de manera continua por la enzima; la nueva réplica, que crece en sentido  $5' \rightarrow 3'$ , recibe el nombre de **hebra conductora o líder**.

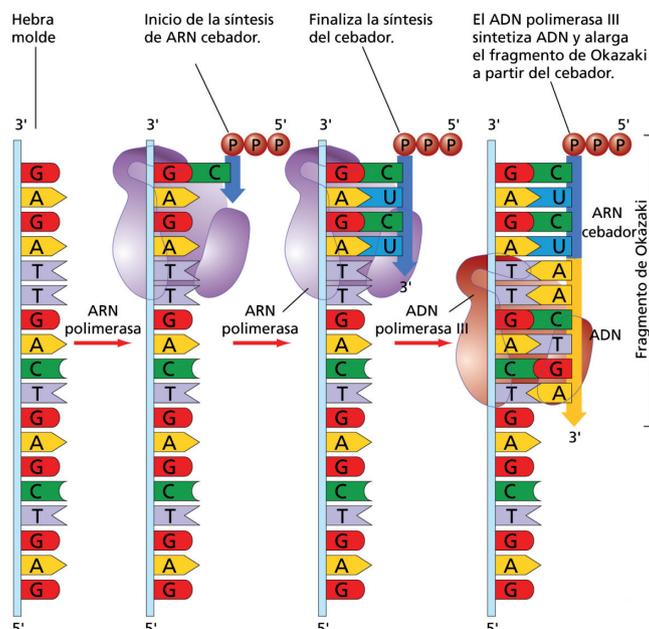
Pero la otra hebra molde, al estar orientada en el sentido  $5' \rightarrow 3'$ , no puede ser leída en ese sentido. Este problema se soluciona abriendo porciones de la hebra molde suficientemente grandes que permitan a la enzima ir retrocediendo para leer en el sentido adecuado y así sintetizar pequeños fragmentos de ADN denominados **fragmentos de Okazaki**. Estos crecen en sentido  $5' \rightarrow 3'$  y más tarde se unen para formar la otra réplica, que se denomina **hebra retardada**, ya que tarda más tiempo en sintetizarse.



Burbuja de replicación.



Horquilla de replicación.



Síntesis de un fragmento de Okazaki.

## Textos de ampliación

- El otro problema planteado se debe a que la ADN polimerasa no puede iniciar por sí sola la síntesis de una nueva cadena de ADN. Necesita un corto fragmento de ARN, llamado **cebador**, que proporciona extremos hidroxilo 3' libres sobre los que adicionar nuevos nucleótidos. Actúa como iniciador de las réplicas y posteriormente se elimina del ADN formado.

## 3. Transcripción y traducción

La expresión de los genes transcurre en dos etapas: transcripción y traducción.

### 3.1 Transcripción

La **transcripción** es la primera fase de la expresión génica, durante la cual se transfiere la información del ADN al lenguaje del ARN. Este proceso consiste en la síntesis de una molécula de ARN.

En los eucariotas, todos los tipos de ARN se sintetizan en el núcleo y luego se exportan al citoplasma, a través de los poros nucleares, para que participen en la traducción.

Para que se lleve a cabo la transcripción en eucariotas se necesitan tres elementos básicos: una cadena de ADN molde, ribonucleótidos trifosfato de adenina, guanina, citosina y uracilo, y la enzima ARN polimerasa II. Transcurre en tres etapas diferentes, seguidas de un proceso de maduración.

#### ■ Iniciación

La transcripción comienza cuando ciertos factores de transcripción activadores (1) interactúan con las histonas y desempaquetan la cromatina (2).

Otros factores activadores (3) se unen por una parte a las secuencias potenciadoras (4) y por otra a las moléculas coactivadoras (5), que actúan de intermediarias para ordenar el correcto ensamblaje de los factores basales (6) con la enzima ARN polimerasa II (7). Cuando los factores basales reconocen la secuencia TATA del promotor, secuencia de ADN que controla la iniciación de la transcripción, (8) «avisan» a la ARN polimerasa II de que el inicio del gen se aproxima.

#### ■ Elongación

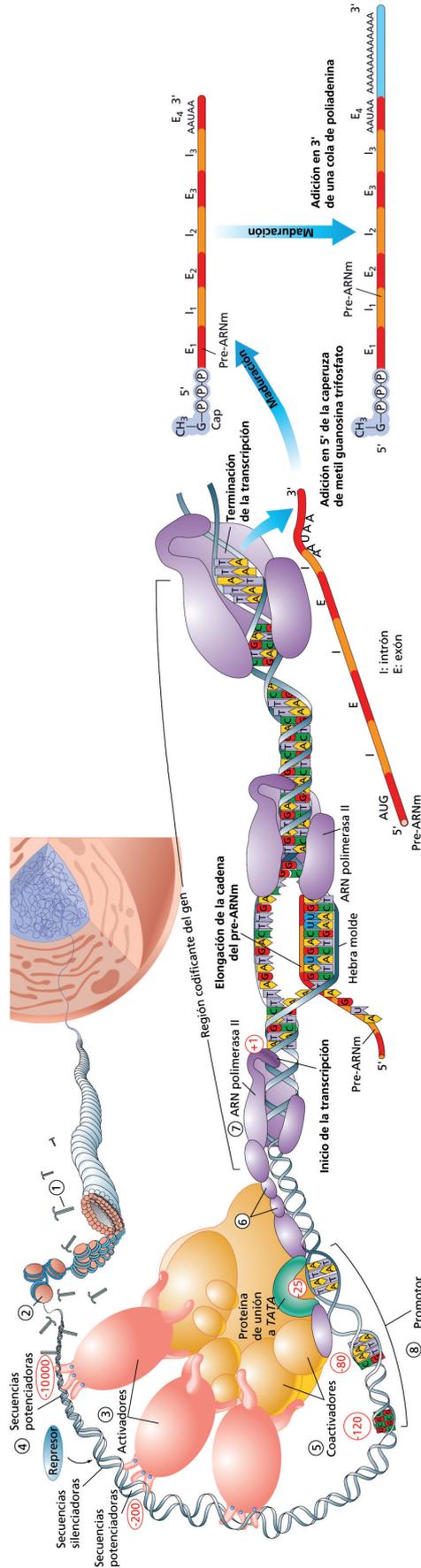
La ARN polimerasa II recorre la hebra molde en sentido  $3' \rightarrow 5'$ , mientras que la cadena del ARNm transcrito primario continúa creciendo en la dirección  $5' \rightarrow 3'$ , a razón de unos 30 nucleótidos por segundo, transcribiéndose tanto los intrones (secciones del ADN que al final del proceso serán eliminadas) como los exones (zonas de un gen que codifican una proteína).

#### ■ Terminación

La transcripción finaliza cuando la enzima ARN polimerasa II reconoce la secuencia de finalización TTATTT. En este momento, se separa la cadena de ARNm transcrito primario recién sintetizada de la hebra molde de ADN.

#### ■ Maduración

La maduración del ARNm transcrito primario consiste en un conjunto de modificaciones en ambos extremos de la molécula, en la eliminación de intrones y en la alteración de ciertas secuencias codificantes en algunos ARNm.



Etapas de la transcripción del ARNm.

## 3.2 Traducción

La **traducción** es la etapa que sigue a la transcripción mediante la cual se descodifica el mensaje genético que contiene el ARNm para que se sintetice una proteína (cadena peptídica).

El código genético establece las correspondencias entre nucleótidos y aminoácidos, lo que permite traducir el idioma de los genes al de las proteínas: los aminoácidos están codificados por palabras de tres letras, que son tripletes de bases del ARNm, también llamados **codones**.

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	Tercera letra
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

*Código genético.*

Los ARN de transferencia (ARNt) son los verdaderos artífices de la traducción, pues son intérpretes que se encargan de mantener las correspondencias entre los tripletes del ARNm y los aminoácidos.

### ■ Iniciación

El primer paso de la traducción en eucariotas consiste en la construcción del complejo de iniciación 80 S, que está formado por un ribosoma unido al ARNm y al ARNt iniciador cargado con el aminoácido metionina (ARNt<sub>i</sub>Met).

### ■ Elongación

La elongación es el proceso catalizado por el complejo enzimático peptidil transferasa, mediante el cual los sucesivos aminoácidos que se van añadiendo a la cadena peptídica, en el seno del ribosoma, quedan unidos mediante enlace peptídico.

### ■ Terminación

La síntesis de la cadena peptídica se detiene cuando, en el momento de producirse la última translocación del ribosoma, aparece en el sitio A uno de los tres codones de terminación del ARNm (UAA, UAG o UGA).



## TRADUCCIÓN

### **Primera fase: entrada del ARNt-aminoácido.**

El ribosoma presenta tres regiones: sitio A, sitio P y sitio E. En el sitio P entra el ARNt unido al primer aminoácido; el sitio A es el punto de entrada de los demás aminoacil-ARNt; el sitio E es el de salida del ARNt, una vez descargado su aminoácido a la cadena peptídica.

El sitio P está ocupado inicialmente por el ARNt<sub>i</sub>Met, y los sitios A y E están vacíos. En nuestro ejemplo, el triplete siguiente al de iniciación es el codón ACU que es la señal para que se aloje en el sitio A el ARNt<sub>i</sub>Met, cuyo anticodón es UGA. En esta etapa intervienen el factor de elongación (FE-1), y energía suministrada por el GTP (nucleótido de guanina con función energética).

### **Segunda fase: formación del enlace peptídico.**

El ARNr 23 S del complejo enzimático peptidil transferasa, firmemente asentado en la subunidad grande del ribosoma, cataliza la siguiente reacción: la metionina, unida con su grupo carboxilo (-COOH) al ARNt<sub>i</sub>, rompe su enlace y se vuelve a asociar mediante un enlace peptídico con el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de la treonina, que continúa enlazada a su ARNt. El resultado es la formación de un dipéptido (dos aminoácidos, Met-Thr, unidos mediante enlace peptídico) unido al ARNt de la treonina y alojado provisionalmente en el sitio A.

### **Tercera fase: translocación.**

Interviene ahora un segundo factor de elongación (FE-2) que, utilizando la energía suministrada por el GTP, obliga al ribosoma a desplazarse exactamente tres nucleótidos a lo largo del ARNm, en sentido 5' → 3': primero se transloca (cambia de posición) y avanza la subunidad grande del ribosoma, quedando un nuevo codón en un sitio A libre, y luego lo hace la subunidad pequeña. Este desplazamiento transloca todo el complejo peptidil-ARNt-ARNm del sitio A al P:

– El sitio P queda ocupado por el péptido en formación unido al ARNt (Met-Thr-ARNt).

– El sitio A queda vacante y dispuesto a recibir a otro ARNt cargado con su correspondiente aminoácido (ARNt<sub>i</sub>Phe).

– El sitio E queda ocupado con el ARNt<sub>i</sub> correspondiente a la metionina liberado de su carga. La entrada de un tercer ARNt cargado con su correspondiente aminoácido provoca la salida del ARNt<sub>i</sub>Met del sitio E y se repiten las tres fases anteriores.

### **Incorporación del último aminoácido a la cadena peptídica**

Las proteínas recién sintetizadas poseen metionina en su extremo N-terminal, aunque se suele eliminar en una etapa posterior. El ARNm eucariótico tiene una vida media muy corta (entre 1 minuto y 24 horas), y transcurrido ese tiempo, se degrada.

Cuando ya han transcurrido varias fases de elongación que han permitido la unión de los sucesivos aminoácidos: Met, Thr, Phe, Glu y, por último, Lys, en la etapa de terminación se separa el péptido del ribosoma, queda libre en el citoplasma y se disocian las dos subunidades ribosómicas.

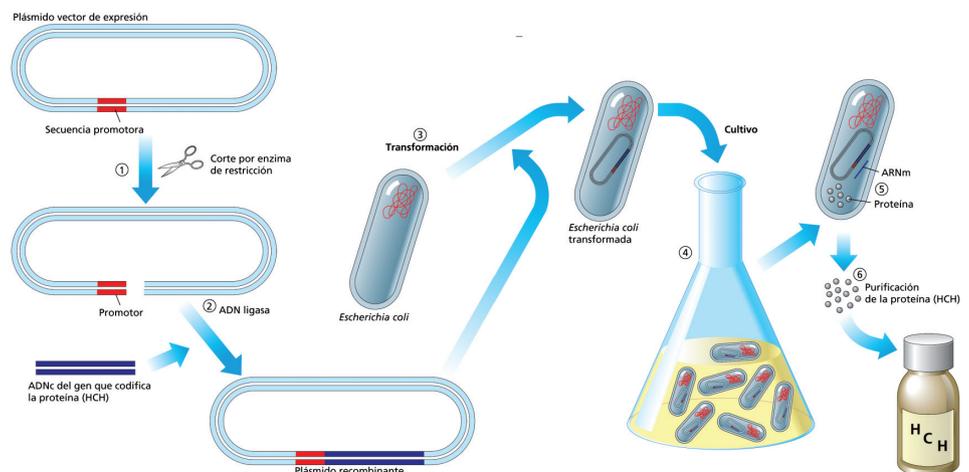
## 4. Vectores: plásmidos

Se denominan **vectores de expresión** los virus o plásmidos que transportan una secuencia de ADN al interior de una célula huésped, desde donde dirige la síntesis de una proteína determinada. Un plásmido es una molécula circular de ADN extracromosómico, mucho más pequeña que el cromosoma. Contiene genes que no son esenciales para el crecimiento y la replicación de la célula, y se encuentran en organismos procariontes. Se utilizan en ingeniería genética para la producción de ADN recombinante.

Los vectores de expresión más utilizados son plásmidos especialmente diseñados que contienen, en una posición adyacente al gen insertado, una secuencia promotora muy activa. Así se consigue producir a partir de ese gen grandes cantidades de ARNm que puede ser traducido a proteína en la «factoría celular» elegida.

Actualmente se dispone de numerosos vectores de expresión para diferentes tipos de «factorías celulares», lo cual permite obtener fácilmente proteínas útiles como la insulina, la hormona del crecimiento y los antígenos virales necesarios para la elaboración de vacunas. La obtención de estas proteínas por otros medios resulta más difícil y costosa.

Cuando se utilizan bacterias o levaduras para obtener proteínas de eucariotas superiores, debe tenerse en cuenta que aquellas carecen de la maquinaria necesaria para modificar el ARN transcrito de un gen completo (con intrones, que son regiones del ADN que deben eliminarse en el ARN transcrito). Por eso se utiliza el clon de ADN complementario (ADNc) correspondiente que, al proceder de ARNm, contiene solo la secuencia del gen sin intrones. Los ADNc se obtienen de los ARNm maduros de una célula, por acción de la enzima transcriptasa inversa.



*Producción de la hormona del crecimiento humana en un cultivo de Escherichia coli modificada genéticamente.*

En primer lugar, el vector de expresión se trata con una enzima que lo abre (1) y permite la inserción del ADNc que codifica la proteína que se desea producir (2). De este modo, se obtiene un ADN recombinante, que se utiliza para la transformación de *E. coli* (3).

Las bacterias transformadas se cultivan en condiciones adecuadas (4), que permiten que el ADNc insertado se transcriba a ARNm y este a su vez sea traducido obteniéndose la proteína (5).

El último paso consiste en la purificación de esa proteína (6), lo cual se consigue rompiendo las bacterias que la han producido.