

ESTRUCTURA Y FUNCION DEL DNA

1. DNA: pasado y presente	1
2. La estructura primaria	3
3. La doble hélice	8
4. Desnaturalización y renaturalización	13
5. Tamaño	17
6. Forma	21
7. Composición de bases	25
8. Funciones	27

1. DNA: Pasado y presente¹⁻²

La historia conocida del DNA puede dividirse en tres periodos:

1869 - 1943. Esta era se abrió con el descubrimiento de un nuevo compuesto fosfórico orgánico, en las células ricas en materia nuclear. Llamado primeramente nucleína y luego cromatina, se demostró luego que este compuesto constaba de ácido desoxirribonucleico (DNA) y de proteína. A este le siguieron otros descubrimientos. El análisis del DNA mostró que contenía cuatro clases de unidades estructurales, llamadas nucleótidos. El DNA se distingue del ácido ribonucleico (RNA) por tener un azúcar diferente, la desoxirribosa, en lugar de la ribosa, y una base distintiva, la timina, en vez del uracilo.

-
1. Fruton, J. S. (1972) *Molecules and Life* (Moléculas y vida) John Wiley and Sons, N.Y.
 2. McElroy, W. D. y Glass, B. (eds.) 1975. *The Chemical Basis of Heredity* (La base química de la herencia), John Hopkins Press, Baltimore

Aunque había razones para creer que el DNA podría ser el material genético, había aún más razones para asignar este papel a las proteínas. Se pensaba que cada molécula de DNA era un polímero repetitivo de una clase de unidad tetranucleotídica. Como existen solamente 256 posibles ordenaciones de las cuatro bases en un tetranucleótido, solo podría haber 256 clases de moléculas de DNA. ¿Cómo podría entonces ser expresada la complejidad de los genes, usando una capacidad de información tan limitada? Las proteínas, con un tamaño mayor y compuestas de veinte aminoácidos, parecían más aptas para desempeñar un papel genético. Y es preciso también recordar que, en la década de 1930, el DNA era todavía llamado ácido timonucleico y existía la creencia ampliamente difundida de que se encontraba solamente en las células animales. El RNA había sido aislado solo de células vegetales y era denominado ácido zimónucleico. De hecho, las células vegetales y las animales se distinguían a veces sobre la base de esta característica química.

1944 - 1960. Este periodo se inicia con la primera evidencia importante de que el DNA es la sustancia genética: el descubrimiento realizado en 1944³ de que el DNA preparado a partir de una cepa de neumococo, podía "transformar" a otra cepa. El DNA purificado transportaba un mensaje genético que podía ser asimilado y expresado por células de otra cepa. Posteriormente se admitió que el DNA era una molécula mucho más compleja que la repetición de un tetranucleótido y que variaba su composición de unos organismos a otros⁴. Sin embargo, como las trazas de proteína no podían ser excluidas como contaminantes del DNA transformante, quedaron algunas dudas acerca de si el DNA era el material genético y el impacto de estos descubrimientos genéticos resultó relativamente pequeño.

Se hicieron luego dos descubrimientos muy persuasivos. El primero fué la demostración en 1952⁵ de que la infección de *E. coli* por el bacteriófago T2 implicaba la inyección del DNA del virus dentro de la célula huésped. Las estructuras proteicas del virus parecían no servir más que para inyectar el DNA en el interior de la bacteria y luego eran en su mayor parte abandonadas fuera de la célula. El DNA del virus dirigía por tanto a la célula bacteriana, haciéndola producir muchas copias idénticas del virus que la había infectado. Este experimento expuso, de forma dramática, el papel del DNA como portador de información para producir las proteínas propias del virus y para duplicar su DNA muchas veces.

Un segundo hecho notable fué el descubrimiento en 1956⁶,

3. Avery O.T., McLeod, C.M., y McCarty, H. (1944) *J. Exp. Med.* 79, 137. Hotchkiss, R. D. in McElroy, W.D. y Glass (eds) (1957) *The Chemical Basis of Heredity.* (La base química de la herencia) Johns Hopkins Press, Baltimore p. 321

4. Chargaff, E. (1950) *Experientia* 6, 201

5. Hershey, A.D. (1953) *CSHS* 18, 135

de la estructura complementaria y bifilar (duplex) del DNA y con ello el reconocimiento de cómo podía replicarse esta molécula. El apareamiento complementario de los constituyentes del nucleótido de una cadena con los de la segunda cadena fué postulado para explicar, de una forma sencilla, como un DNA duplex puede dirigir el ensamblaje de dos moléculas idénticas a él mismo. Según este modelo, cada cadena del duplex sirve de molde sobre el cual se fabrica la cadena complementaria.

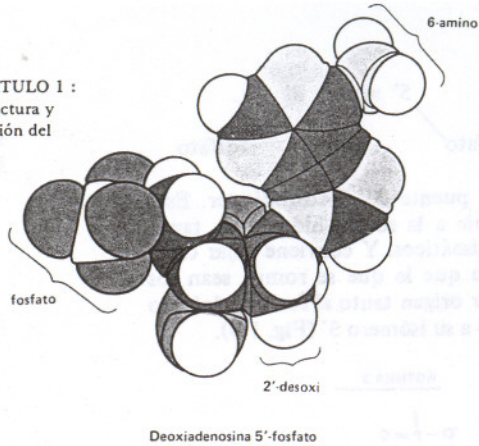
Estos descubrimientos y otros importantes que les siguieron, condujeron al conocimiento de que el DNA tiene dos funciones principales, separadas entre sí. Una consiste en transportar la información genética que conlleva el fenotipo especial de la célula; el DNA es transcrito a RNA y el RNA es luego traducido al lenguaje de los aminoácidos de las proteínas. La otra función principal del DNA es su propia replicación. Para duplicar el genotipo de la célula, el DNA actúa de molde para convertir un cromosoma en dos cromosomas idénticos.

1960 - el tiempo presente. El comienzo de esta época no está marcado por ningún suceso específico. Es una época en que los conceptos generalmente sostenidos, tanto en relación con la estructura como con las funciones dobles del DNA no han promovido ningún reto, sino que más bien van ganando terreno. A pesar de que no haya descubrimientos que marquen esta época, la justificación para distinguir un tercer periodo se basa en un cambio radical del punto de vista en relación al DNA. La genética y el DNA se han convertido en una rama de la bioquímica. A pesar de su complejidad química, el DNA está siendo modificado, diseado, analizado y sintetizado en el tubo de ensayo. Empieza a vislumbrarse el dinamismo metabólico del DNA que no había sido anticipado. El DNA sufre lesiones y es reparado. Las moléculas de DNA intercambian entre sí partes de las mismas. Las moléculas de DNA son degradadas y modificadas, retorcidas y relajadas, de forma específica; son transcritas en reverso a partir de RNA y también directamente en RNA. El DNA ejerce su función no solo en el núcleo, sino también en las mitocondrias y en los cloroplastos. Hay ahora un estímulo para determinar la secuencia total de bases del DNA y para volver a sintetizarle. Existe también confianza en que los giros metabólicos del DNA en la célula podrían ser comprendidos con tanto lujo de detalles como por ejemplo los de la glucosa o el ácido glutámico.

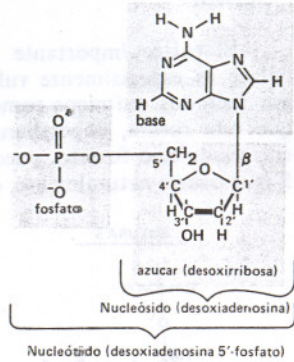
2. La Estructura Primaria⁷

Las dos clases de ácido nucleico, los ácidos ribonucleicos, RNA, y los ácidos desoxirribonucleicos, DNA, son polímeros de nucleótidos.

6. Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953) *CSHS* 18, 123



Deoxiadenosina 5'-fosfato



Nucleótido (deoxiadenosina 5'-fosfato)

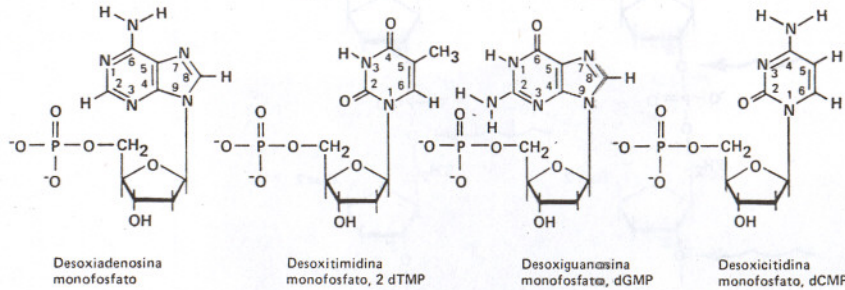


FIGURA 1-1

Un nucleótido (Fig. 1-1) tiene tres componentes: (i) una base púrica o pirimídica, unida a través de uno de sus nitrógenos, mediante un enlace N-glicósido, a (ii) un azúcar cíclico de cinco carbonos (la combinación de la base con el azúcar se denomina nucleósido) y (iii) un fosfato, esterificado con el carbono en posición 5 del azúcar. Los nucleótidos existen también en formas activas, tipo di- y trifosfato, en las que uno o dos grupos fosfato están unidos al nucleótido por enlaces de anhídrido fosfórico (pirofosfato).

En cada una de las dos clases principales de ácidos nucleicos hay solo cuatro tipos de nucleótidos. Estos se distinguen por sus bases: adenina (A), guanina (G), uracilo (U) y citosina (C) en los RNA y adenina, guanina, timina (T) y citosina en los DNA. Las bases y sus formas como nucleósido y nucleótido aparecen en la

7. Sober, H.A. (ed) (1970) *Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology*. (Manual de Bioquímica, Datos seleccionados para Biología molecular) 2.^a edición. The Chemical Rubber Co., Cleveland (Sección G.)

TABLA 1 - 1

Nomenclatura de los ácidos nucleicos

Base	Nucleósido ^a	Nucleótido ^a	Acido nucleico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	RNA
Guanina	guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
{ Hipoxantina	Inosina	Inosinato	Precursor del adenilato y guanilato
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina	Timidilato	DNA
Uracilo	Uridina	Uridilato	RNA

^a. Nucleósido y nucleótido son términos genéricos que incluyen tanto formas ribo- como desoxirribo. Los desoxirribonucleósidos y los desoxirribonucleótidos se designan como desoxinucleósidos y desoxinucleótidos, respectivamente, para hacer los nombres menos complicados. Los nucleótidos de hipoxantina van entre llaves porque son precursores de los purinnucleótidos, pero no son componentes comunes de los ácidos nucleicos.

Tabla 1-1. En cuanto a la composición de bases, solo hay una diferencia entre RNA y DNA: el RNA contiene uracilo, en tanto que el DNA contiene timina (5-metil uracilo). Excepciones a esta regla pueden encontrarse en el RNA de transferencia y en los DNA de ciertos fagos. El significado de las estructuras de las varias bases se hace patente al considerar la estructura secundaria de los ácidos nucleicos (véase la sección siguiente). La otra única distinción entre RNA y DNA está en el esqueleto de azúcar-fosfato: el RNA contiene solo ribosa y el DNA contiene solo 2-desoxirribosa.

La designación de los nucleósidos y nucleótidos que contienen desoxirribosa con el prefijo deoxi- ó desoxi-ribo ha sido aceptada en todos los casos excepto para aquellos que contienen timina. Como se pensó originalmente que la timina solo se encontraba en el DNA, parecía una redundancia utilizar el prefijo y se aceptaron los términos de timidina, monofosfato de timidina y timidilato. Sin embargo, una vez que ya se ha confirmado la existencia natural del ribotimidilato como uno de los nucleótidos poco corrientes en el RNA de transferencia y ahora que ya se puede conseguir el ribonucleótido (y el ribonucleósido) por síntesis química y enzimática, ha surgido una confusión en la

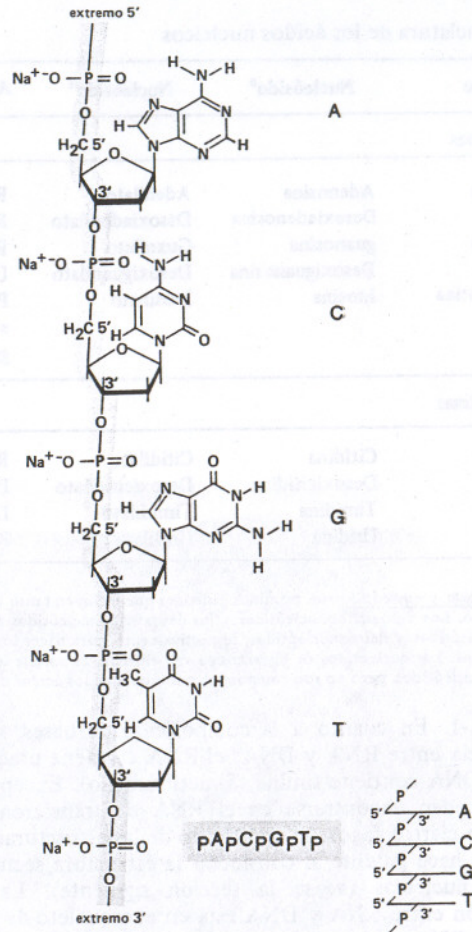
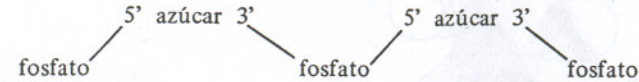


FIGURA 1-2
Segmento de un polidesoxinucleótido, como sal sódica.

nomenclatura. En la práctica ordinaria, los términos timidina y desoxirribotimidina (desoxitimidina) se usan indistintamente y el ribonucleósido y los ribonucleótidos de timina llevan el prefijo *ribo*.

Las cadenas polinucleotídicas son largos polímeros sin ramificaciones y con enlaces entre el fosfato 5' de un nucleótido y el hidroxilo en posición 3' del azúcar del siguiente (Fig. 1-2). El diagrama esquemático de cadenas de nucleótidos (Fig. 1-2, abajo a la derecha) resulta con frecuencia de utilidad y puede visualizarse tanto en dirección horizontal como vertical. Por tanto, la columna vertebral del polímero es una cadena de:



El enlace importante es el puente 3', 5'-fosfodiéster. Este enlace es especialmente vulnerable a la rotura hidrolítica, tanto por métodos químicos como enzimáticos. Y conviene dejar claro que esta rotura, dependiendo de que lo que se rompa sean los enlaces de tipo fosfato, puede dar origen tanto al fosfonucleósido 5' que ocurre naturalmente, como a su isómero 3' (Fig. 1-3).

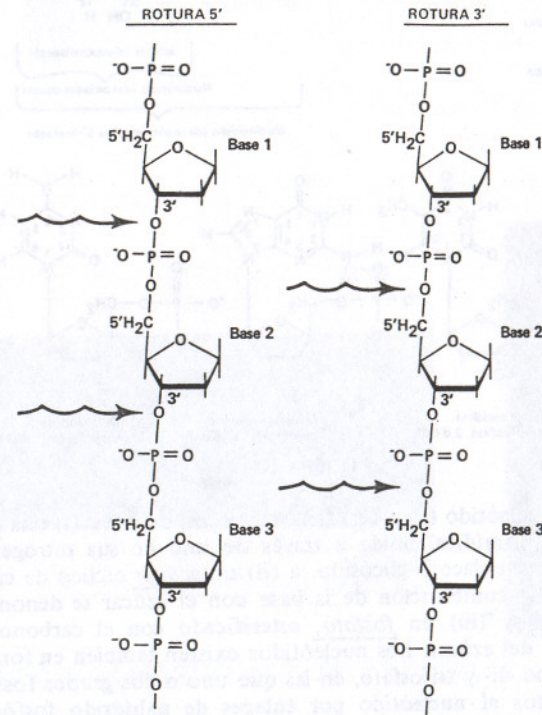


FIGURA 1-3
Roturas de las cadenas polinucleotídicas. La rotura en 5' libera 5'-mononucleótidos (5'-fosforil terminí); la rotura en 3' libera 3'-mononucleótidos (3' fosforil terminí).

Debido a la libre rotación en torno a los enlaces de tipo fosfato, las cadenas de polinucleótido se consideraron en un principio como altamente flexibles y capaces de adoptar conformaciones esencialmente al azar. Sin embargo, estudios⁸ más detallados han indicado ya que los principales grados de libertad

8. Lewitt, M. (1972) en *Polymerization in Biological Systems*. (Polimerización en sistemas biológicos), *Ciba Foundation Symposium 7*. Elsevier, N.Y. p. 147.

de rotación están limitados a los dos enlaces O-P en la unión fosfodiéster y al enlace glucosídico entre la base y el azúcar. Por tanto, existen una serie de restricciones impuestas sobre la columna vertebral del ácido nucleico que le permiten adoptar relativamente pocas conformaciones y que le confieren una considerable rigidez. Considerar a la cadena única de polinucleótido como algo que puede plegarse al azar, no ofrece garantía.

3. La Doble Hélice⁹⁻¹⁰

Hay que distinguir dos cosas entre las bases nitrogenadas de los nucleótidos, que son cruciales para la estructura secundaria de los ácidos nucleicos. Una de ellas se basa en la presencia de grupos cetónicos y amínicos, que ofrecen la oportunidad de que se formen puentes de hidrógeno. Sobre esta base, T ó U, ambos compuestos cetónicos, pueden aparearse con A, un compuesto amínico, mediante un enlace de hidrógeno. G y C, que tienen tanto grupos cetónicos como amínicos, pueden formar dos puentes de hidrógeno. De hecho, puede formarse un puente de hidrógeno adicional entre los nitrógenos del núcleo en el par A-T y también en el par G-C (Fig. 1-4).

La segunda importante diferencia entre las bases es que tienen distinto tamaño: las pirimidinas T ó U y C son más pequeñas que las purinas A y G. Sin embargo, los pares de bases A-T y G-C resultan tener un tamaño idéntico, mientras que un par de pirimidinas sería mucho más grande. Y resulta además que los pares de bases A-T y G-C, no solo tienen el mismo tamaño, sino también la misma forma.

Estas características del apareamiento de las bases en los nucleótidos son las responsables del apareamiento de dos cadenas para formar un duplex rígido, fuertemente estabilizado (Figs. 1-2, 1-6). Cuando dos cadenas se autoalinean de esta manera, adoptan la estructura de una doble hélice, tal como han puesto de manifiesto con todo detalle los estudios de difracción de rayos X¹¹ por fibras de DNA y la construcción de modelos. La doble hélice del DNA tiene una serie de notables características.

(i) Las columnas vertebrales azúcar-fosfato de las dos cadenas forman hélices que giran hacia la derecha, con las mismas dimensiones en cada hélice y un eje de hélice común. El diámetro de la hélice es 20 Å. La hélice tiene dos surcos, uno profundo y otro poco hondo.

(ii) Las columnas vertebrales de azúcar-fosfato de las dos cadenas están conectadas por enlaces de hidrógeno entre las bases, cuyos planos superficiales son perpendiculares al eje de las hélices

9. Watson, J. D. y Crick, F.H.C. (1953) *CSHS* 18, 123

10. Arnott, S., Wilkins, M.H.F., Hamilton, L.D. y Langridge, R. (1965) *JMB* 11, 391.

11. Arnott, S., Wilkins, M.H.F., Hamilton, L.D. y Langridge, R. (1965) *JMB* 11, 391.

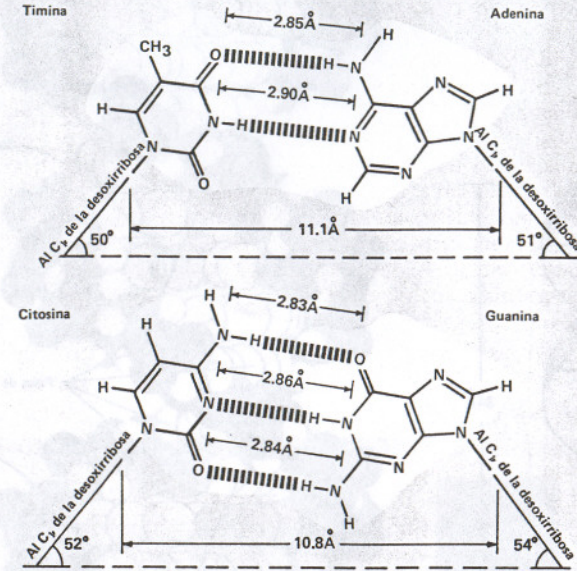


FIGURA 1-4

Pares de bases unidas por hidrógenos. Las distancias interatómicas y los ángulos son casi los mismos para las parejas A-T y G-C.

(Fig. 1-7). Las bases están en el interior y la columna vertebral en la parte externa. Los planos de dos pares de bases vecinos están separados 3,4 Å. Hay diez pares de bases dentro de cada paso de rosca de la hélice, de tal manera que cada par de bases está rotado 36° en relación con su par vecino y cada paso de rosca completo tiene una longitud de 34 Å.

(iii) El apilamiento de las bases, a pesar de las interacciones hidrofóbicas entre sus superficies planas aromáticas (Fig. 1-7), estabiliza la estructura helicoidal frente a la fuerza electrostática de repulsa que existe entre los grupos fosfóricos cargados negativamente. Esta energía estabilizante puede ser igual o mayor que la que establece puentes de hidrógeno entre las bases de dos cadenas.

(iv) Las dos cadenas son antiparalelas. Desde el punto de vista químico están dispuestas en direcciones opuestas, es decir que la estructura... P-5' azúcar-3' P... se opone a la estructura... P-3' azúcar-5'-P. Cuando las cadenas se trazan desde el extremo 5' al extremo 3' (5' → 3') la dirección es ascendente en una hélice y descendente en la otra (Fig. 1-8).

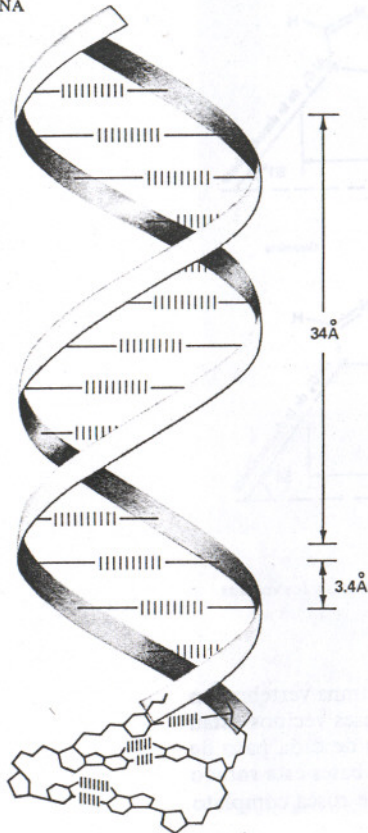
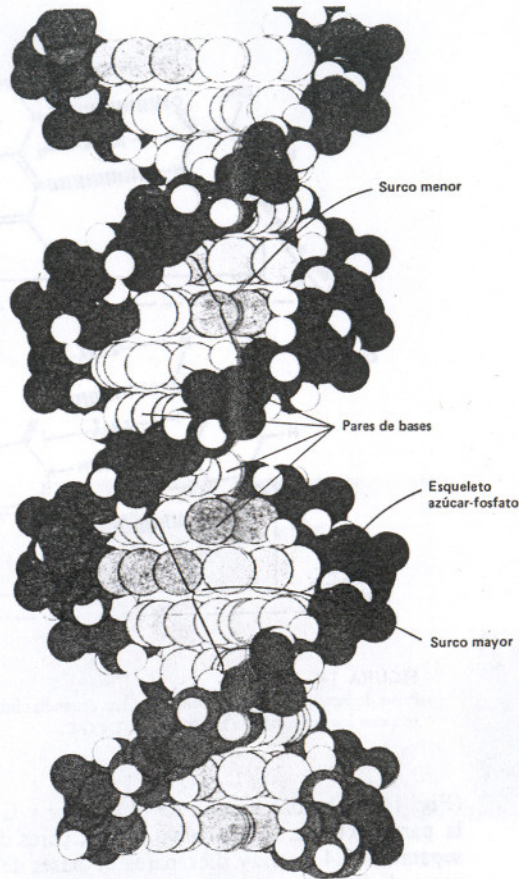
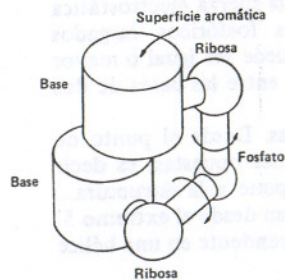
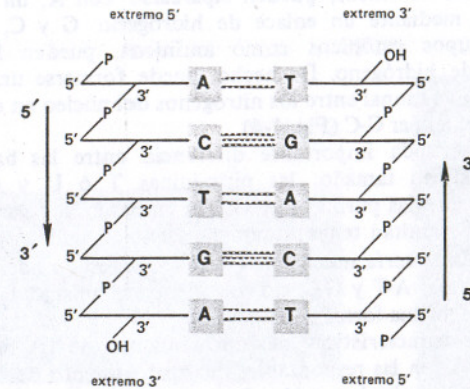


FIGURA 1-5

FIGURA 1-6
Modelo en el espacio de la doble hélice del DNAFIGURA 1-7
Modelo esquematizado de un dinucleótido. Este modelo muestra las superficies aromáticas planas de las bases, la rigidez de la columna vertebral y los principales grados de libertad de los enlaces. (Cortesía del Dr. M. Levitt)

(v) Los únicos pares de bases que permiten esta estructura son A-T y G-C. Todos los pares de bases tienen la misma forma y el mismo tamaño. Los enlaces glicosídicos tienen las mismas posiciones y orientaciones en estos pares. Las bases modificadas (véase Capítulo 2, Sección 10) pueden entrar también en la formación de pares, siempre que formen puentes de hidrógeno con su pareja correspondiente.

(vi) Un importante elemento de simetría en la hélice es un doble eje de rotación (diada) que pasa a través del plano de cada par de bases y relaciona los enlaces glicosídicos N-C. La rotación de un par de bases 180° permite a los grupos correspondientes, el azúcar y el fosfato de las dos cadenas antiparalelas, tener la misma conformación. Como resultado de ello, la conexión entre los átomos de carbono glicosídicos puede hacerse a través de cualquiera de los cuatro pares de bases A-T, T-A, G-C y C-G.

FIGURA 1-8
Segmento de un DNA duplex mostrando la orientación antiparalela de las cadenas complementarias.

(vii) Debido a que los cuatro pares de bases encajan igualmente bien, es posible una secuencia cualquiera dentro de la cadena, y la doble hélice sigue teniendo un diámetro uniforme en toda su longitud.

(viii) La rotación en torno al enlace N-glicosídico permite establecer varias relaciones geométricas entre la base y el azúcar. El rango de conformación designado como *anti* ocurre con mayor frecuencia que las conformaciones opuestas 180° , designadas como *sin* (Fig. 1-9)¹².

(ix) Las dobles hélices antiparalelas pueden formarse también entre una cadena de DNA y una cadena de RNA. Estas se llaman cadenas híbridas DNA-RNA. Ejemplos de pares de bases

12. Sundaralingam, M. (1969) *Biopolymers* 7, 821.

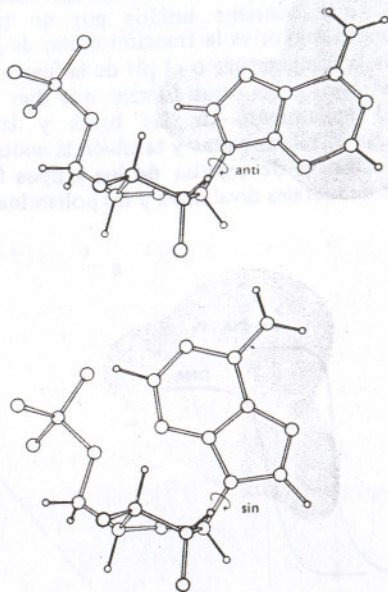


FIGURA 1-9
Modelo de rotación en torno al enlace N-C glicosídico.
La conformación *anti* se ve favorecida ante la *sin*. (Cortesía del
Prof. H. Sundaralingam)

híbridos son desoxi A. ribo-U, desoxi T. ribo A, desoxi C. ribo G y desoxi G. ribo C. Estos pares de bases existen en los híbridos de transcripción generados por la RNA polimerasa (véase Capítulo 10).

Una significativa consecuencia de esta estructura es que cualquier secuencia de bases es tolerada dentro de una determinada cadena. DNAs de idéntica composición de bases pueden tener secuencias de bases totalmente diferentes. Sin embargo, una vez dada la secuencia y la orientación de una cadena, el apareamiento de bases se ajusta a las reglas y el antiparalelismo determina la secuencia y orientación de la cadena complementaria.

La más importante consecuencia del modelo duplex para la estructura del DNA es la introducción del concepto de complementariedad¹³, el cual proporciona la explicación para una precisa replicación de una cadena muy larga (Fig. 1-10). Esta característica inherente a la estructura del DNA es la base no solo de su replicación, sino también de su capacidad para transmitir información. La complementariedad ha venido a explicar la transcripción y la traducción y de esta manera la secuencia completa de

13. Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953) *CSHS* 18, 123.

acontecimientos que ocurren para la expresión de las funciones genéticas.

Existe una interesante excepción a la regla de que el DNA que existe de forma natural es bicatenario (duplex). El DNA de ciertos virus bacterianos pequeños, tales como el ϕ x 174 y el M13 forma un lazo cerrado monocatenario, con una longitud aproximada de 2μ y conteniendo unos 6.000 residuos. Sin embargo, una vez que penetra en el huésped, *E. coli*, el DNA viral se convierte en una doble circunferencia. Subsiguientemente la cadena complementaria sintetizada sobre el DNA del virus como molde, es utilizada a su vez repetidamente como molde para la producción de cadenas virales para nuevas partículas de fago. Aunque el DNA monocatenario puede encontrarse en solución formando un repliegue al azar, ciertas partes de estos plegamientos pueden formar duplex helicoidales (Fig. 1-11). La resistencia del uno por ciento aproximadamente de los DNAs de ϕ x 174 y M13 frente a las nucleasas específicas de cadenas sencillas, indica la presencia de una ó más porciones duplex en forma de horquilla¹⁴, conteniendo cada una de ellas unos veinte pares de bases. Esto puede resultar muy importante en la replicación de estos cromosomas víricos (Capítulo 8).

4. Desnaturalización y Renaturalización

Una de las más notables características de la hélice de DNA y que además es crucial para sus funciones durante la replicación y la transcripción, es la facilidad con que sus cadenas componentes pueden separarse y volverse a juntar. Son muchas las técnicas que se han encontrado para medir esta conducta de fusión y "reannealing" (reasociación). Sin embargo, quedan por resolver importantes cuestiones acerca de la cinética y la termodinámica de la desnaturalización y la renaturalización y acerca de como estos procesos pueden estar influenciados por otras moléculas, tanto en el tubo de ensayo como en la célula.

Desnaturalización

Las cadenas del DNA duplex se separan cuando se rompen los enlaces de hidrógeno existentes entre las bases. Esta fusión de la estructura secundaria puede llevarse a cabo en solución, aumentando la temperatura ó bien por titulación con ácidos ó álcalis. Los ácidos protonizan los nitrógenos del anillo de A, G y C; los álcalis desprotonizan los nitrógenos del anillo de G y T. La poca corriente labilidad de los enlaces glicosídicos de la purina a bajo pH hace que la utilización de ácidos no sea conveniente para los experimentos de desnaturalización.

14. Schaller, H., Voss, H. y Gucker, S. (1969) *JMB* 44, 445.

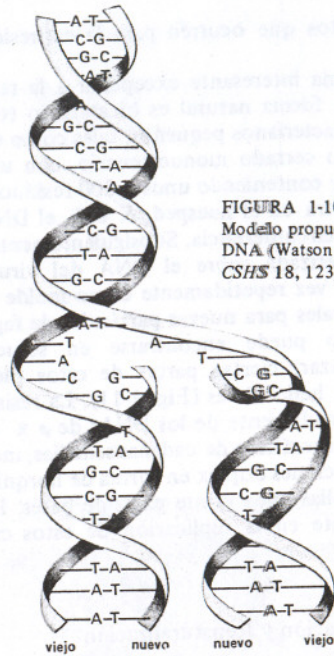


FIGURA 1-10
Modelo propuesto para la replicación del
DNA (Watson J.D. y Crick, F.H.C. (1953)
CSHS 18, 123).

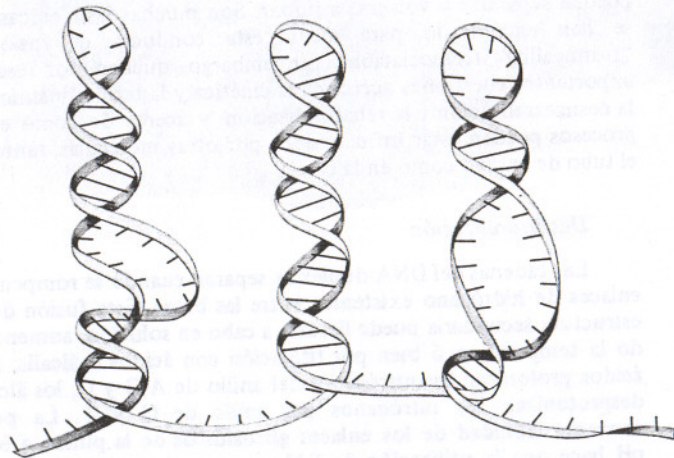


FIGURA 1-11
Estructura secundaria en un DNA monocatenario. Los duplex se forman
por annealing (asociación) de regiones complementarias.

La estabilidad del duplex es una función directa del número de pares G-C que contiene unidos por un triple enlace de hidrógeno; cuanto mayor es la fracción molar de pares G-C, tanto más elevada es la temperatura o el pH de la fusión. Además de los enlaces de hidrógeno, las otras fuerzas que dan estabilidad a la hélice son el apilamiento de las bases y las interacciones hidrofóbicas con él relacionadas y también la neutralización de las fuerzas electrostáticas de repulsión de los grupos fosfatos por las sales, los iones de metales divalentes y las poliaminas.

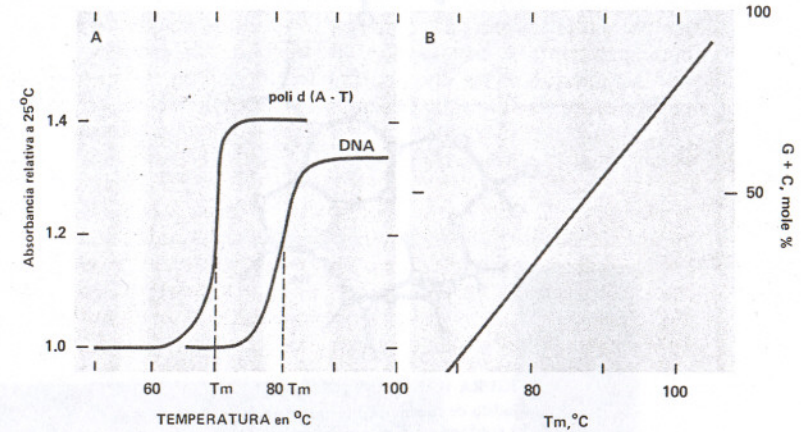


FIGURA 1-12
Curvas de fusión de DNA (a la izquierda) y dependencia entre T_m y contenido
de G-C (a la derecha).

En la fusión por calor (Fig. 1-12)¹⁵ el desenrollado de las cadenas se inicia por las regiones ricas en los pares de bases A-T¹⁶ y continúa hacia regiones de contenido cada vez más elevado de pares G-C. El proceso de fusión se puede monitorizar convenientemente mediante el incremento de la absorbancia (efecto hiper-crómico) que resulta al alterarse el apilamiento de las bases. La temperatura correspondiente al punto medio de la fusión del DNA (T_m) está determinada por su contenido en G-C.

Renaturalización

La desnaturalización es reversible incluso después de que las dos cadenas han sido totalmente separadas. Cuando se incuban cadenas complementarias a una temperatura de 25° por debajo de

15. Marmur, J., Rownd, R. y Schildkraut, C. L. (1963) en *Prog. N.A. Res. and Mol. Biol.* 1, 231.

16. Inman, R.B. (1967) *JMB* 28, 103.

la T_m , empiezan a reasociarse y llega un momento en que vuelven a formar la hélice original. La renaturalización suele medirse en función del descenso en la absorbancia (efecto hipocrómico), por su comportamiento durante la sedimentación ó bien por su falta de susceptibilidad frente a las nucleasas específicas para cadenas sencillas.

Un ejemplo de la precisión de la renaturalización se encuentra en el "annealing" (asociación) de una cadena de DNA del tipo salvaje del fago λ con la cadena complementaria de un mutante de λ que lleva una deleción de 100 ó mas residuos. El producto parece ser normal al microscopio electrónico, excepto en que, en la parte correspondiente a la deleción, el trozo de cadena sencilla del tipo salvaje que no ha podido aparearse forma un asa que sirve de puente entre las dos regiones duplex¹⁷. Tales moléculas *hetero-duplex* permiten realizar un refinado mapeo físico de la localización de los genes en el cromosoma.

La cinética de la renaturalización proporciona una medida precisa y sensible de la complementariedad (o diversidad) existente en una población de moléculas de DNA. La renaturalización es un proceso que se realiza en dos pasos y que comienza con una lenta nucleación durante la cual pequeñas secuencias de bases que se complementan forman pares. Esto va seguido de un rápido "cierre en cremallera" de las secuencias vecinas para formar el duplex. El ritmo del proceso total esta gobernado por la cinética de segundo orden de la reacción de nucleación. La constante de este ritmo K_2 debe ser inversamente proporcional al número de pares de bases N , en el DNA, cuando el genoma no tiene regiones repetitivas en su secuencia¹⁸:

$$K_2 \propto \frac{1}{N}$$

Las tasas de renaturalización pueden representarse en una gráfica (Fig. 1-13)¹⁹ relacionando C/C_0 con el log de $C_0 t$, según la ecuación de segundo orden:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + K_2 C_0 t}$$

C es la concentración de cadenas simples de un tipo complementario en el tiempo t y C_0 es la concentración cuando t es igual a cero. Cuando la fracción reasociada C/C_0 es el 50 por ciento, $C_0 t = 1/K_2$. Este valor, denominado $(C_0 t)_{1/2}$ es proporcional a N y es una medida directa de la complejidad del DNA.

17. Davis, R. W. y Davidson N. (1968) *PNAS* 60, 243. Westmoreland, B.C., Szybalski, W. y Ris, H. (1969) *Science* 163, 1343.
18. Wetmur, J.G. y Davidson, N. (1968) *JMB* 31, 349.
19. Britten, R. J. y Kohne, D. E. (1968) *Science* 161, 529.

Las "curvas $C_0 t$ " para virus y bacterias (Fig. 1-13) se aproximan a la cinética de segundo orden esperada y a valores de N que son iguales al número total de bases en el cromosoma. Hay muy pocas, si es que hay alguna, secuencias que se repiten. Por el contrario, la cinética de la renaturalización del DNA eucariótico muestra, generalmente, una curva compleja que refleja la presencia de varias clases de secuencias. Parte del DNA, caracterizado por sedimentación como un satélite de la banda principal (Capítulo 1, Sección 7) tiene una secuencia sencilla repetida 10^7 veces o más y se renaturaliza muy rápidamente. La mayor parte del DNA es única y se renaturaliza lentamente; el valor de N es muy elevado.

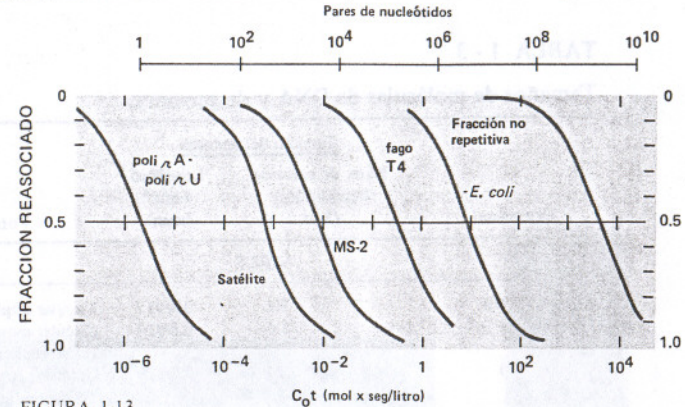


FIGURA 1-13
Reasociación de DNAs fundidos, como función del tiempo y de la concentración. El DNA recortado fué aproximadamente de una longitud de 400 nucleótidos (Britten R.I. y Kohne, D.E. (1968) *Science*, 161, 529. Editado en 1968 por la American Association for the Advancement of Science (Asociación Americana para el progreso de la Ciencia).

5. Tamaño²⁰

El DNA es largo y sin ramificaciones; su longitud ha sido medida directamente en el microscopio electrónico y por autorradiografía. Una rigurosa medida del tamaño de los duplex que contienen hasta 50.000 pares de bases se ha conseguido marcando con ³²P cada uno de los extremos 5'²¹. También se ha calculado el tamaño a partir de las medidas de velocidad de sedimentación, viscosidad y dispersión de la luz.

Los organismos más complejos requieren un DNA más complejo (Tablas 1-2, 1-3). El cromosoma más sencillo, tal como el de los virus del polio ó el SV40, lleva información para solo cinco o diez genes, a lo largo de su longitud de 1,7 micras. Otros

20. Sober, H.A. (ed) (1970) *Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology*, 2.^a Edición. The Chemical Rubber Co. Cleveland (Sección H).
21. Weiss, B. y Richardson, C.C. (1967) *JMB* 23, 405.

TABLA 1 - 2
Equivalencias aproximadas masa-longitud del DNA

	Pares de bases ^a	Longitud		Peso molecular
		cm	μ	
DNA duplex ^b (Na ⁺ , forma B)	3×10^3	1.0×10^{-4}	1.0	2×10^6

^a El peso molecular medio de un par de bases es 660

^b 1×10^{-12} g (un picogramo) de DNA duplex contiene 9.1×10^8 pares de bases y tiene 30.9 cm., de longitud.

TABLA 1 - 3
Tamaños de moléculas de DNA y de genomas

Organismo	Tamaño del genoma		Forma
	Núm. de pares de bases (miles) (Kb)	Longitud total ^a (mm)	
VIRUS			
Polioma, SV40	5.1	0.0017	Circular duplex
ϕ X 174	5.4	0.0018	Circular monocatenario; forma replicativa duplex
M 13 (fd, fl)	5.74	0.0019	Circular monocatenario forma replicativa duplex
P ₄	15.0	0.0051	Lineal
T ₇	35.4	0.0120	Lineal
P2, P22	40.5	0.0138	Lineal
λ	49	0.0166	Lineal
T ₂ , T ₄ , T ₆ , P ₁	180	0.061	Lineal
Vacuna	183	0.062	Lineal
BACTERIAS			
<i>Mycoplasma hominis</i>	760	0.26	Circular
<i>Escherichia coli</i>	4000	1.36	Circular
EUCARIOTAS			
		N ^o cromosomas (haploide)	
Levadura	13,500	4.6	17
<i>Drosophila</i> (mosca de la fruta)	165,000	56	4
Hombre	2,900,000	990	23
Pez pulmonado	102,000,000	34,700	19

^a longitud = (Kb) (3.4×10^{-4}) mm.

virus más grandes, como λ y el de la vacuna, por ejemplo, tienen un DNA que es diez y cincuenta veces mayor, respectivamente. La longitud del DNA en organismos más complejos, tales como las

bacterias o los animales, es proporcionalmente mayor. El cromosoma de *E. coli* tiene más de 1 mm., de longitud (1.000 veces la longitud de la bacteria), y contiene 4 millones de pares de bases. Puede calcularse de forma grosera que en *E. coli* pueden formarse 4.000 genes, si se admite que 1.000 pares de bases (que codifican una proteína de unos 40.000 daltons) es el valor medio de la longitud de un gen y que hay solo una copia de cada uno de ellos.

Es difícil obtener y medir cadenas muy largas de DNA, debido a su sensibilidad a sufrir deterioros durante su aislamiento. Hacia 1960, los DNAs aislados de fagos, bacterias y células animales, medían todos unos 15.000 pares de bases (10×10^6 daltons). El tamaño del DNA estaba delimitado por la técnica experimental, es decir por la presión uniforme del dedo pulgar sobre una jeringa al depositar (y en el mismo proceso al cizallarse) el DNA a través de una aguja. Cuando este efecto de rotura se hizo evidente y se tuvo cuidado de evitarle, aumentó mucho el valor de las medidas del tamaño del DNA. En el microscopio electrónico pudo verse DNA de fagos con una longitud de 50μ y por autorradiografía pudieron visualizarse cromosomas bacterianos circulares, de 1 mm. de longitud. El fragmento más largo de DNA animal medido fué también de 1 mm., aproximadamente. Sin embargo, los cromosomas humanos contienen entre 48 y 240 millones de pares de bases (con pesos moleculares entre 32×10^9 y 160×10^9 daltons) y su DNA si es continuo, debería medir entre 1,6 y 8,2 cm. (Fig. 1 - 14).

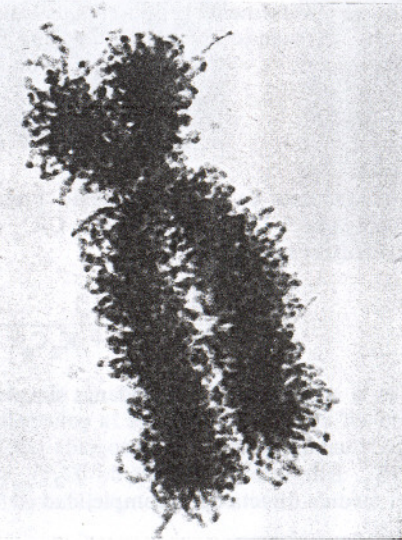


FIGURA 1-14
Micrografía electrónica de un cromosoma humano. Cromosoma XII de un cultivo de células He-La (Cortesía del Dr. E. Du Praw).

Especie	Estirpe	Cromosoma más grande (a escala)	Peso molecular del DNA de mayor tamaño
<i>D. melanogaster</i>	tipo silvestre		41×10^9
	inversión		42×10^9
	translocación		58×10^9
<i>D. hydei</i>	tipo silvestre		40×10^9
	delección		24×10^9
<i>D. virilis</i>			47×10^9
<i>D. americana</i>			79×10^9

FIGURA 1-15
Longitud del DNA en el cromosoma más grande de diversas especies de *Drosophila*, determinadas por viscosimetría (Kavenoff, R. y Zimm, B. H. (1973) *Chromosoma* 41, 1; (1973) *CSHS* 38, 1).



DNA circular



DNA lineal

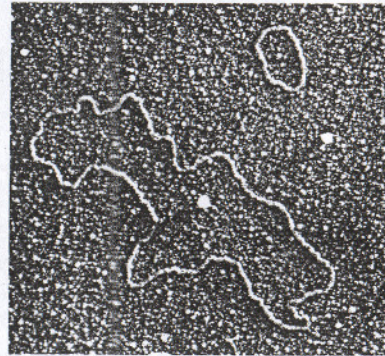


FIGURA 1-16
Diagramas de formas circular y lineal de DNA y micrografía electrónica de plásmidos de *E. coli*. (λ dv, el plásmido del fago defectivo λ arriba y el miniplásmido 15 T abajo) (Micrografía, cortesía del Dr. Tom Broker)

Ciertos análisis que hacen uso de las propiedades viscoelásticas del DNA, han revelado ahora la longitud intacta del DNA de los cromosomas de muchas células animales y bacterianas²². El DNA tiene la medida del cromosoma. Se han medido DNAs cromosómicos hasta de cuatro centímetros de longitud, correspondientes a pesos moleculares hasta de 80×10^9 . Existe un notable acuerdo entre la longitud del cromosoma más grande de *Drosophila* que se ha medido por esta técnica y la masa de DNA determinada citológicamente (Fig. 1 - 15). Las moléculas corren a lo largo de toda la longitud del cromosoma sin que haya discontinuidad en el centrómero. La continuidad se conserva a lo largo de todo el ciclo de la célula. Estos datos son la más completa confirmación de que un cromosoma animal, del mismo modo que un cromosoma bacteriano ó vírico, esta compuesto por una sola molécula de DNA en forma de filamento o cadena.

6. Forma

El DNA extendido sobre una rejilla del microscopio electrónico aparece como un círculo duplex (un lazo cerrado) y como una varilla (Fig. 1 - 16). En la naturaleza sin embargo, el DNA está condensado en el cromosoma de una célula o en la cabeza de un virus²³, después de plegarse miles de veces.

Es lamentable que se conozca tan poco de la disposición del DNA en el cromosoma²⁴. En la estructura del cromosoma eucariótico las proteínas histónicas tienen una importante influencia; las proteínas no histonas y el RNA pueden jugar también un cierto papel. La única molécula de DNA duplex de un cromosoma eucariótico está en forma de complejo con estas proteínas, formando una sola fibra de cromatina enrollada sobre sí misma. Como resultado de ello, la longitud del cromosoma resulta mucho más reducida que la del DNA contenido dentro de él.

Los duplex circulares aislados de virus, bacterias y mitocondrias aparecen como plegados sobre si mismos²⁵ (Fig. 1 - 17). Estas formas se denominan superplegadas (superenrolladas o superhelicoidales) debido a que contienen un número mayor del standard de pares, adecuado a su longitud duplex y consecuentemente poseen en compensación un número extra de vueltas negativas. Se piensa que los superenrollamientos se originan durante el proceso de cerrado del círculo duplex, cuando en parte de su longitud las bases no están apareadas sino formando el complejo con las proteínas. La subsiguiente eliminación de la proteína al aislar el DNA, deja el círculo desenrollado.

22. Kavenoff, R. y Zimm, B. H. (1973) *Chromosoma*, 41, 1; (1973) *CSHS*, 38, 1.

23. Richards, K.E., Williams, R.C. y Calendar, R. (1953) *JMB* 78, 255.

24. The Organization of Genetic Material in Eukaryotes (La organización del material genético en los eucariotes) (1973) *CSHS* 38.

25. Vinograd, J., Lebowitz, J. y Watson, R. (1968) *JMB* 33, 173.

La molécula superenrollada desplegada puede tener un número extra de pares de bases distribuidos al azar a lo largo de su longitud, de acuerdo con un punto de vista²⁶, o bien localizadas como si fueran una burbuja desnaturalizada, según opinión de otros²⁷. Este último modelo ofrece una más obvia, aunque no necesariamente más correcta explicación para la observada capacidad del DNA viral superenrollado para ligarse o soltarse de una región específica, por proteínas con una gran afinidad por DNA monocatenario²⁸. A través de cualquiera de estos dos puntos de vista resulta claro que en el DNA cerrado covalentemente y superenrollado negativamente, hay almacenada energía libre positiva, que es liberada cuando el DNA se desenrolla y queda *relajado*.

El retorcido extra del superenrollamiento puede relajarse de varias maneras. La rotura de una cadena, como si fuese mediante una escisión endonucleolítica, permite el desenroscamiento favorecido desde el punto de vista energético; la ligazón enzimática de los extremos rotos restauraría el círculo covalente. Los álcalis y el calor relajan el superenrollamiento. Y hay aún otra manera, al lograr intercalar, entre los pares de bases apilados²⁹, una molécula plana como la del bromuro de etidio. Se ha calculado que cada molécula de bromuro de etidio desenrosca 12° el superenrollamiento, por lo cual se requieren 30 moléculas de bromuro de etidio por paso de rosca. Después de la descarga completa del superenrollamiento negativo, la posterior adición de bromuro de etidio hace que el DNA se superpliegue y se superenrolle de nuevo, pero esta vez con revueltas en sentido positivo.

El DNA procariótico está organizado como un cromosoma pero sin histonas. En su lugar, todo descansa sobre el RNA, de una sola manera. Los intentos realizados para ver el plegado del DNA en el cromosoma de *E. coli* se deben al reciente éxito logrado al aislar la estructura intacta³⁰⁻³¹. Esferoplastos preparados por degradación de la pared celular con lisozíma, son lisados posteriormente con un detergente no iónico, en presencia de una elevada concentración de sales o de una poliamina (por ej. espermidina). Los cromosomas intactos, plegados, permanecen unidos a fragmentos de membrana, si la temperatura se mantiene por debajo de los 10° (véase Capítulo 7, Sección 12). El cromosoma contiene alrededor de unos 50 lazos retorcidos, cada uno de unos 20 μ de longitud, organizados en una estructura con múltiples enroscamientos (Fig. 1 - 18a). La rotura de un solo filamento de un lazo,

26. Bauer, W. y Vinograd, J. (1970) *JMB* 47, 419; Davidson, N. (1972) *JMB* 66, 307.
27. Kato, A. C., Bartok, K., Fraser, M.J. y Denhardt, D.T. (1973) *BBA* 308, 68.
28. Beard, P., Morrow, J.F. y Berg, P. (1973) *J. Virol.* 12, 1303; Morrow, J.F. y Berg, P. (1973) *J. Virol.* 12, 653.
29. Crawford, L.V. y Waring, M.J. (1967) *JMB* 25, 23.
30. Stonington, G.O. y Pettijohn, D.E. (1971) *PNAS* 68, 6; Pettijohn, D.E. Miles, E. y Hecht, R. (1973) *CSHS*, 38, 31.
31. Worcel, A. y Burgi, E. (1972) *JMB*, 71, 127; Worcel, A., Burgi, E., Carlson, L. y Robinson, J. (1973) *CSHS* 38, 43; Delius, H. y Worcel, A. (1974) *JMB* 82, 107.

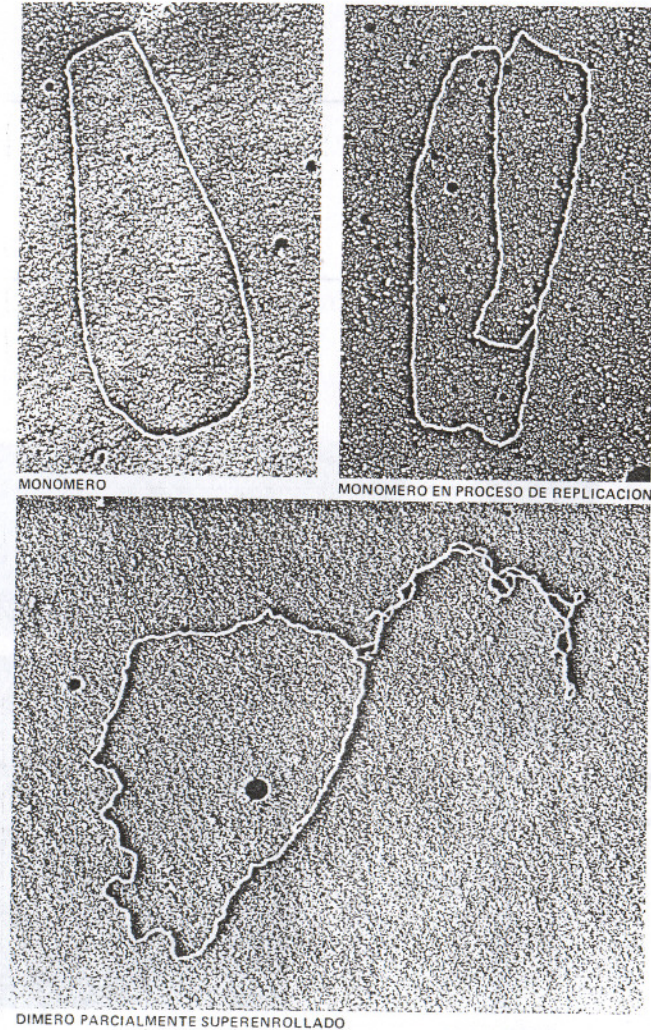


FIGURA 1-17

Formas superenrollada y relajada del DNA mitocondrial de células de riñón de hamster muy joven, transformadas por el virus del polioma. La longitud del contorno del monómero es de unas 5 micras (Cortesía del Prof. J. Vinograd).

mediante la acción de una DNasa permite el relajamiento de ese lazo en particular, sin afectar a los otros (Fig. 1 - 18b). Tratamientos con RNasa A, que actúa sobre RNA monocatenario, o con RNasa H, que actúa sobre el RNA de un híbrido DNA-RNA, despliegan el cromosoma (Fig. 1 - 18a, b). Estos resultados sugieren que las columnas vertebrales del RNA forman el núcleo que organiza los lazos de DNA dentro del cromosoma condensado de *E. coli*.

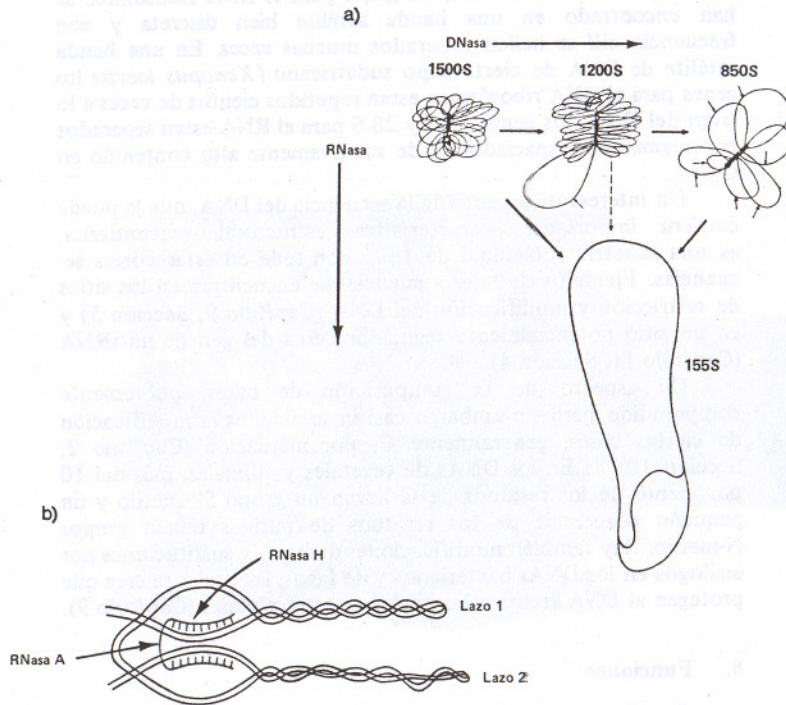


FIGURA 1-18

Un esquema para el cromosoma plegado de *E. coli*. El cromosoma contiene unos 50 superenrollados, organizados por un núcleo central de RNA. La acción cortante de las DNasa relaja lazos individuales y reduce progresivamente el valor de sedimentación (S) desde 1550 a 155. El tratamiento con RNasa despliega por completo el cromosoma para darle la forma que sedimenta lentamente. Los resultados de la acción de la RNasa A (sobre regiones de cadena única) y de la RNasa H (sobre RNA híbrido con DNA) sugiere un modelo de disposición del RNA en el cromosoma plegado (Según Worcel, A y Burgi, E. (1972) *JMB* 71, 127).

7. Composición de bases³²

Los análisis del DNA realizados, establecen que todas las especies tienen una equivalencia de A para T y de G para C. La proporción del contenido de bases amínicas se ajusta a la de bases cetónicas. El número de purinas es igual al de pirimidinas. Esta notable característica de la composición de bases del DNA no se comprendió hasta después de haberse descubierto, cuando la construcción de un modelo demostró el apareamiento de bases A con T y G con C mediante enlaces de hidrógeno. La amplia e inmediata aceptación del modelo de bases apareadas, para el DNA, no fué sin embargo universal y tres años después de su publicación fué propuesto un modelo "en el que dos cadenas de polinucleótidos están unidas a un polipéptido, de tal manera que cada grupo carbonilo del péptido está ligado por un enlace de hidrógeno al grupo amínico en posición 6 de la adenina o de la citosina y cada grupo amínico del péptido se une al grupo cetónico en 6 de la guanina o del uracilo (o de la timina)"³³.

El contenido (fracción molar, frecuencia) de cada una de las cuatro bases standard (A, T, G y C) en el DNA duplex establece el contenido de cada una de las otras tres. La composición de bases de los DNAs se expresa generalmente por su contenido en G más C. En un duplex esta es la fracción molar de pares G-C (es decir el número de pares G-C dividido por el número total de pares de bases). La regla de la complementariedad dicta también que el contenido relativo de G-C en el duplex es igual en cualquiera de los dos filamentos.

La composición de bases puede determinarse por sedimentación hasta equilibrio en cloruro de cesio; la densidad de flotación medida es una función directa del contenido en G-C³². Las medidas de la estabilidad del DNA duplex, tales como el punto medio de la fusión térmica, pueden también correlacionarse directamente con el contenido G-C. Las cadenas individuales con composiciones de bases distintivas pueden separarse por sedimentación de un duplex desnaturalizado.

El contenido G-C es el mismo en todas las células de una especie, pero varía considerablemente de una especie a otra, especialmente entre las bacterias, donde oscila entre 0,3 y 0,7; el contenido de G-C en los organismos superiores es generalmente inferior a 0,50 (en el hombre es 0,40).

Las bases pueden estar o no distribuidas uniformemente en toda la longitud del DNA. El DNA procedente de especies bacterianas (procarióticas) fragmentado en varios cientos de pedazos, todos ellos de un tamaño aproximado correspondiente a 10^4 pares de

32. Sober, H.A. (ed) (1970) *Handbook of Biochemistry. Selected Data for Molecular Biology* (Manual de Bioquímica. Datos Seleccionados para Biología molecular) 2.^a Edición. The Chemical Rubber Co. Cleveland (Sección II).

33. Chargaff, E. en McElroy, W.D. y Glass, B. (eds) (1975) *The Chemical basis of Heredity* (La base química de la herencia) Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 521.

bases, sedimenta hasta equilibrio en un gradiente de densidad en cloruro de cesio, formando un pico simétrico. Por el contrario, el DNA fragmentado de organismos superiores (eucarióticos) está con frecuencia distribuido de manera asimétrica, con uno o más picos más pequeños separados del pico principal (Fig. 1-19)³⁴. El DNA del pico más pequeño o correspondiente a los hombros del pico principal se llama DNA satélite y puede tener un contenido en G-C, considerablemente diferente del correspondiente al DNA principal.

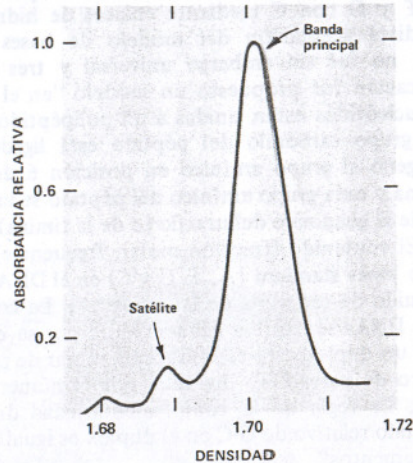


FIGURA 1-19
DNA nuclear embrionario de *Drosophila melanogaster*
(Cortesía del Prof. D.S. Hogness).

En un satélite de DNA de ratón³⁵ pueden reiterarse ciertas secuencias hasta 10^6 veces. Un satélite poco corriente, hallado en varias especies de cangrejos, es esencialmente un copolímero de A y T alternantes, con solo un tres por ciento de residuos de G y C distribuidos entre ellos³⁶. El poli d (A-T) semejante al del satélite (véase Capítulo 4, Sección 15) puede constituir hasta una cuarta parte de DNA total. En una especie de *Drosophila* se han determinado las secuencias de las tres bandas satélites, comprobándose que se trata de un particular heptanucleótido repetido unas 10^7 veces³⁷. Las secuencias alineadas como se muestra a continuación, están estrechamente relacionadas:

5' - ACAAATT - 3'
5' - ACAAACT - 3'
5' - ATAAACT - 3'

34. Schachat, F.H. y Hogness, D.S. (1973) *CSHS* 38, 371.

35. Pyeritz, R.E., Lee, C.S. y Thomas, C.A. Jr. (1971) *Chromosoma*, 33, 284.

36. Swartz, M.N., Trautner, T.A. y Kornberg, A. (1972) *JBC* 237, 1316.

37. Gall, J. (1973) en *Symp. Mol. Cytogen* (Harkalo, B. y Papaconstantino, J. eds) Plenum Press.

Una banda satélite principal que representa el 11 por ciento del DNA de la rata canguro posee la siguiente secuencia repetitiva de un decanucleótido³⁸.

5' - GGACACAGCG - 3'

Una medida cuantitativa de la fracción total de DNA que esta fuertemente reiterada, puede lograrse fácilmente determinando la velocidad con que se reasocia (reanneal) el DNA fragmentado que ha sido *desnaturalizado*.

Aunque la función genética de los DNAs satélites esta en su mayor parte indeterminada, los genes para el RNA ribosómico se han encontrado en una banda satélite bien discreta y con frecuencia allí se hallan reiterados muchas veces. En una banda satélite de DNA de cierto sapo sudafricano (*Xenopus laevis*) los genes para el RNA ribosómico están repetidos cientos de veces a lo largo del DNA; los genes 18 S y 28 S para el RNA están separados por segmentos (espaciadores) de relativamente alto contenido en G-C³⁹.

Un interesante aspecto de la secuencia del DNA, que le puede conferir importantes características estructurales secundarias, es una simetría rotacional de 180° con sede en estas cortas secuencias. Ejemplos de tales secuencias se encuentran en los sitios de restricción y modificación del DNA (Capítulo 9, Sección 5) y en un sitio potencialmente regulador cerca del gen de un tRNA (Capítulo 11, Sección 4).

Un aspecto de la composición de bases, pobremente comprendido pero sin embargo casi invariable, es la modificación de ciertas bases, generalmente C, por metilación (Capítulo 2, Sección 10)⁴⁰. En los DNAs de vegetales y animales, más del 10 por ciento de los residuos de C llevan un grupo 5' -metilo y un pequeño porcentaje de los residuos de purinas tienen grupos N-metilo. Hay también modificaciones de bases y sustituciones por análogos en los DNAs bacterianos y de fagos, las cuales se cree que protegen al DNA frente a las nucleasas intracelulares (Capítulo 9).

8. Funciones

En último término, la estructura del DNA debe comprenderse de acuerdo con todas sus funciones y lo inverso es igualmente cierto. Debemos resolver y reconstituir cada una de las funciones de la célula y comprender su localización y regulación dentro de la célula. Sin embargo, como admitimos que hay un creciente número y variedad de funciones del DNA y como conocemos que

38. Fry, K., Poon, R., Whitcome, P., Idriss, J., Salser, W., Mazrimas, J. y Hatch, F. (1973) *PNAS*, 70, 2642.

39. Brown, D.D., Wensink, P.C. y Jordan, E. (1972) *JMB*, 63, 57; Brown, D.D. (1973) *Sci. Amer.*, 229, núm. 2, 21.

40. Evans, H.H., Evans, T.E. y Littman, S. (1973) *JMB* 74, 563.

el número de enzimas que se necesitan para catalizarlas se multiplica, esta meta podría parecer inalcanzable. Otra barrera posterior para resolver el problema se basa en artefactos de organización académica, más que en la naturaleza de la organización celular. La estructura del DNA es estudiada por químicos, su función por biólogos y los enzimas por bioquímicos.

Puede resultar de utilidad en este primer capítulo, enumerar las ideas actuales acerca de las funciones del DNA y los enzimas que actúan sobre él (Fig. 1 - 20, Tabla 1 - 4). Como en los capítulos sucesivos se consideran con más detalle las funciones y los enzimas, se irán sugiriendo funciones fisiológicas para cada uno de los enzimas. Pero a medida que vayan surgiendo, se hará hincapié en las limitaciones para asignar a cada enzima sus funciones.

I) La actividad enzimática medida *in vitro* es solamente una estimación grosera de su actividad en la célula y no necesita estar relacionada con sus funciones *in vivo*. El hecho de hallarse un nivel enzimático alto o bajo, e incluso ningún nivel de enzima, no prueba su estado de actividad en la célula. La naturaleza específica de la acción de un enzima y su control pueden ser diferentes *in vivo*.

II) Los estudios genéticos proporcionando mutantes con errores, sin sentido y con deleciones, pueden proporcionar información crucial para evaluar el papel de las actividades

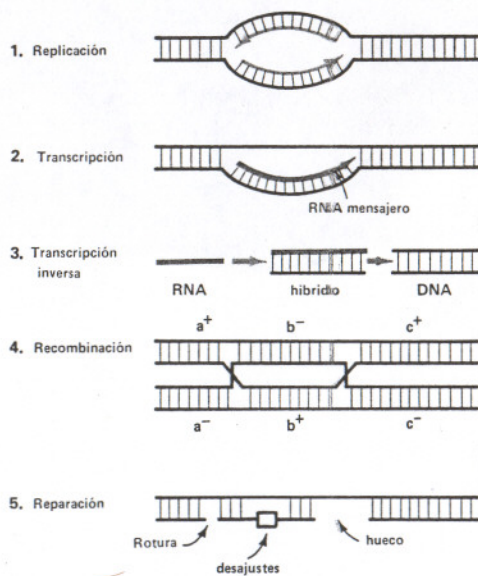


FIGURA 1-20
Algunas funciones del DNA

TABLA 1 - 4

Funciones del DNA y enzimas

Funciones	Esquema	Enzimas implicados*
Replicación	$n(\text{dNTP}) + \text{DNA} \rightarrow (\text{dNMP})_n - \text{DNA}$	1, 3, 4, 5, 6
Transcripción	$n(\text{rNTP}) \rightarrow (\text{tNMP})_n$ RNA	3
Transcripción inversa	$n(\text{dNTP}) \rightarrow (\text{dNMP})_n$	2
Recombinación †	$\text{DNA} + \text{DNA} \rightarrow \text{DNAs}$ $a^+ b^- c^+ + a^- b^+ c^- \rightarrow a^+ b^+ c^+ + a^- b^- c^-$ $+ a^+ b^- c^+ + a^- b^+ c^-$	1, 4, 5, 6
Reparación	DNA (con defecto) \rightarrow DNA (reparado)	1, 4, 5
Modificación	DNA \rightarrow DNA metilado o glicosilado	7
Restricción	DNA \rightarrow fragmentos de DNA	5

*Enzimas

1. DNA Polimerasas (dirigidas por DNA ó dependientes de DNA).
2. Transcriptasa inversa (DNA polimerasa dependiente de RNA).
3. RNA polimerasas (RNA polimerasa dependiente de DNA).
4. Ligasas.
5. Exonucleasas y endonucleasas.
6. Proteínas desenrollantes.
7. Metil y glucosil transferasas.

† $a^+ b^- c^+$ representan la disposición de estos genes en un segmento de DNA.

enzimáticas *in vivo*. Sin embargo, los mutantes erróneos y sin sentido pueden tener pérdidas, y bajos niveles de determinada actividad enzimática en la célula pueden ser suficientes para mantener la tasa de crecimiento y una conducta fisiológica buena. La actividad enzimática perdida por completo por deleción de un gen puede también ser remplazada por un sistema enzimático auxiliar.

III) Las funciones, definidas a grosso modo, incluyen muchos pasos individuales, y muchas funciones diferentes pueden tener pasos individuales en común. Por tanto, diferentes funciones pueden implicar a muchos de los mismos enzimas. Por otra parte, las actividades enzimáticas que parecen similares *in vitro*, pueden tener en la célula localizaciones y papeles completamente diferentes.