

Genética General y Aplicada

Apuntes de Cátedra

Cátedra de Genética General y Aplicada

Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo

Índice general

Estructura del material hereditario	3
El material hereditario	3
Química de los ácidos nucleicos	5
Cromatina y cromosomas	7
Tipos de secuencias en el ADN de organismos eucariontes	11
ADN DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS	13
Actividades	14
Reproducción del material hereditario	16
REPLICACIÓN DEL ADN	16
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	19
Actividades	20

Estructura del material hereditario

Objetivos

- Repasar y profundizar los conocimientos sobre estructura, composición, propiedades físico-químicas del ADN.
- Analizar la organización y la estructura del material genético en eucariotas.

Bibliografía

KLUG, W. S. y CUMMINGS, M. R. Conceptos de Genética. Capítulo 10.

El material hereditario

Para que una molécula atienda a la función de material genético debe poseer cuatro características principales:

- Replicación.
- Almacenaje de información.
- Expresión de esta información.
- Variación por mutación.

La **replicación** del material genético es una de las facetas del ciclo celular, una propiedad fundamental de todos los organismos vivos para subsistir en el tiempo. Una vez que éste se ha replicado, debe repartirse equitativamente en las células hijas.

La necesidad de que el material genético tenga que codificar la casi infinita variedad de productos génicos en las distintas formas de vida presentes en nuestro planeta es inherente al concepto de **almacenaje**. El lenguaje químico del material genético debe ser capaz de realizar esta tarea.

Sin embargo, esta información almacenada no debe utilizarse en todo momento ni en todas las células. La **expresión** de la información genética almacenada está regulada por múltiples mecanismos que determinan cuáles genes se expresan y cuáles no.

El material hereditario debe permitir cierto número de cambios para que exista variabilidad en los organismos, a través del proceso de **mutación**. Si una mutación está presente en los gametos, ésta pasará a las futuras generaciones y, con el tiempo, puede extenderse a la población.

¿Cuál es la molécula de la herencia?

La idea de que el material genético se transmite de manera física de los progenitores a sus descendientes fue aceptada desde los inicios del concepto de herencia. Aunque tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se consideraban como los mejores candidatos para desempeñar la función de material genético, hasta la década de 1940 muchos genetistas se inclinaban por las proteínas.

El químico suizo Friedrich Miescher fue el primero en estudiar el ADN, en 1869. Tras separar los núcleos del citoplasma celular, aisló una sustancia ácida de los núcleos a la que llamó nucleína. Miescher demostró que la nucleína contenía grandes cantidades de fósforo, pero no de azufre, características que la diferenciaba de las proteínas. Cuando las técnicas analíticas mejoraron se observó que los ácidos nucleicos, incluyendo el ADN, estaban formados por cuatro bloques moleculares similares llamados nucleótidos.

Como una estructura de cuatro nucleótidos unidos covalentemente es relativamente simple, los genéticos creyeron que los ácidos nucleicos no suministraban la suficiente cantidad de variación química que se esperaba para el material genético. Las proteínas, en cambio, contienen 20 aminoácidos diferentes, lo que proporciona la base para una variación substancial. El resultado de todo esto fue que se desvió la atención de los ácidos nucleicos, reforzando las especulaciones de que las proteínas eran el material genético.

El experimento de Hershey-Chase

En 1952, Alfred Hershey y Martha Chase publicaron los resultados de unos experimentos destinados a esclarecer los sucesos que conducen a la reproducción de los fagos.

En la época de Hershey y Chase se sabía que:

1. Los fagos T2 estaban formados aproximadamente por un 50% proteína y un 50% ADN.
2. La infección se iniciaba por la unión de las fibras de la cola del fago a la célula bacteriana.
3. La producción de nuevos virus se daba dentro de la célula bacteriana.

Parecía que algún componente molecular del fago, el ADN y/o la proteína, entraba en la célula bacteriana y dirigía la reproducción vírica. ¿Cuál de ellos era? Para poder seguir los componentes moleculares de los fagos durante la infección, Hershey y Chase utilizaron los radioisótopos ^{32}P y ^{35}S . El ^{32}P marca específicamente el ADN ya que éste contiene fósforo (P) pero no azufre, y el ^{35}S marca solo las proteínas ya que éstas contienen azufre (S) pero no fósforo. Este fue el punto clave del experimento. Si se cultivan las células de **Escherichia coli** en presencia de ^{32}P ó ^{35}S y se infectan posteriormente con virus T2, los hijos del fago tendrán marcado radiactivamente el núcleo de ADN o la cubierta proteica, respectivamente. Los fagos marcados pueden aislarse y usarse para infectar bacterias no marcadas.

Hershey y Chase pudieron demostrar, tras detectar los radioisótopos, que la mayoría del ADN marcado con ^{32}P se había transferido al interior de las células bacterianas; por otro lado, la mayoría de la proteína marcada con ^{35}S permanecía fuera de la célula bacteriana,

en las cubiertas vacías de los fagos. Después de esta separación, las células bacterianas, que contenían ahora el ADN vírico, se lisaron al producirse los nuevos fagos. Los fagos de la progenie contenían ^{32}P , pero no ^{35}S .

Hershey y Chase interpretaron estos resultados como una indicación de que la proteína de la cubierta del fago permanece fuera de la célula huésped y no está implicada en dirigir la producción de nuevos fagos. Por otro lado, y más importante aún, el ADN del fago entra en la célula huésped y dirige su reproducción. Habían demostrado que, en el fago T2, el material genético es el ADN, y no la proteína.

Este experimento proporcionó pruebas convincentes para la mayoría de los genetistas de que el ADN era la molécula responsable de la herencia.

Química de los ácidos nucleicos

Los nucleótidos: las piezas que forman los ácidos nucleicos

Estas unidades estructurales constan de tres componentes esenciales: una base nitrogenada, una pentosa (azúcar de cinco carbonos) y un grupo fosfato. Hay dos tipos de bases nitrogenadas: las purinas, con un doble anillo de nueve lados, y las pirimidinas, con un solo anillo de seis lados. En los ácidos nucleicos se encuentran generalmente dos tipos de purinas y tres tipos de pirimidinas. Las dos purinas son la adenina y la guanina, abreviadas como A y G, respectivamente. Las tres pirimidinas son la citosina, la timina y el uracilo, que se abrevian como C, T y U, respectivamente. Tanto el ADN como el ARN contienen A, C y G únicamente el ADN contiene la base T, mientras sólo el ARN contiene la base U. Cada átomo de nitrógeno o de carbono de las estructuras anulares de las purinas y pirimidinas se designa por un número (sin la marca de prima). El nombre de los ácidos nucleicos viene dado por el azúcar que presentan. Los ácidos ribonucleicos (ARN) contienen ribosa, mientras que los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) contienen desoxirribosa. Cada átomo de carbono se distingue por un número con el signo prima.

Una molécula compuesta por una base (purina o pirimidina) y por un azúcar (ribosa o desoxirribosa) forma una unidad química denominada **nucleósido**. Si se añade un grupo fosfato a un nucleósido, la nueva molécula recibe el nombre de **nucleótido**. Los nucleósidos y los nucleótidos reciben el nombre de la base nitrogenada específica (A, T, G, C o U) que forma parte de su molécula.

Polinucleótidos

La unión entre dos mononucleótidos consiste en un grupo fosfato unido a dos azúcares. Se forma entonces un **enlace fosfo-diéster**; ya que el ácido fosfórico se une a dos alcoholes (grupos hidroxilo de los dos azúcares) por una unión éster en ambos lados. Tanto en el ADN como en el ARN se encuentra el mismo enlace. Cada estructura tiene un extremo C-5' y uno C-3'. La unión de dos nucleótidos forma un dinucleótido; la de tres nucleótidos, un trinucleótido; y así sucesivamente. Cadenas cortas de menos de 20 nucleótidos reciben el nombre de oligonucleótidos y cadenas más largas se denominan polinucleótidos.

Estructura del ADN

Hasta ahora hemos visto que el ADN es el material genético y los componentes químicos básicos que los forman, pero ¿cómo es la estructura precisa del ADN?

Entre 1940 y 1953, muchos científicos se interesaron en resolver la estructura del ADN.

En 1953, James Watson y Francis Crick propusieron que la estructura del ADN tiene la forma de una doble hélice. Publicaron su propuesta en un corto artículo en la revista Nature.

Los datos de que disponían Watson y Crick, cruciales para el desarrollo de su propuesta, provinieron básicamente de dos fuentes: (1) el análisis de la composición de bases de muestras hidrolizadas de ADN, y (2) estudios de difracción de rayos X del ADN. El éxito analítico de Watson y Crick puede atribuirse a la construcción de un modelo que se ajustaba a los datos existentes.

El modelo de Watson y Crick

Este modelo tiene las características principales siguientes:

1. Dos largas cadenas polinucleotídicas están enrolladas alrededor de un eje central, formando una doble hélice enrollada hacia la derecha (dextrógira).
2. Las dos cadenas son antiparalelas; es decir, la orientación 5'-3' va en direcciones opuestas.
3. Las bases de las dos cadenas yacen formando estructuras planas y perpendiculares al eje; están “apiladas” unas sobre otras, separadas 3,4 Å (0,34 nm), y se encuentran en el interior de la estructura.
4. Las bases nitrogenadas de las cadenas opuestas están apareadas como resultado de la formación de puentes de hidrógeno. Solo se permiten los emparejamientos A=T y G C.
5. Cada vuelta completa de la hélice tiene una longitud de 34 Å (3,4 nm); de este modo, cada vuelta de la cadena contiene 10 pares de bases.
6. En cualquier segmento de la molécula, se observa un surco mayor y un surco menor que se alternan a lo largo del eje.
7. La doble hélice mide 20 Å (2,0 nm) de diámetro.

La clave del modelo propuesto por Watson y Crick es la especificidad en el emparejamiento de bases. Los datos de Chargaff sugieren que las cantidades de A y T son iguales, y que las de G y C también. Watson y Crick se dieron cuenta de que si A se empareja con T y C lo hace con G, justificando estas proporciones, los componentes de estos pares de bases formarían puentes de hidrógeno, proporcionando la estabilidad química necesaria para mantener las dos cadenas juntas. Ordenadas de este modo, se hace aparente a lo largo del eje un surco mayor y uno menor. Más aún, una purina (A o G) está al otro lado de una pirimidina (T o C) en cada “escalón de la escalera de caracol” de la hélice propuesta, justificando los 20 Å (2 nm) de diámetro sugeridos por los estudios de difracción de rayos X. El emparejamiento específico entre las bases A=T y G C es la base del concepto de complementariedad, que describe la afinidad química entre bases proporcionada por los

puentes de hidrógeno. Aunque dos o tres puentes de hidrógeno aislados son energéticamente muy débiles, la estabilidad química en la doble hélice de DNA se ve incrementada por los miles de puentes en tándem que se establecen en hélices más largas. Otro factor estabilizante es la disposición de azúcares y de bases a lo largo del eje. En el modelo de Watson y Crick, el esqueleto azúcar-fosfato hidrofóbico está por afuera del eje, donde ambos componentes pueden interaccionar con el agua; mientras que las bases nitrogenadas, relativamente hidrofóbicas, se encuentran en el interior del eje, protegidas del agua. Esta disposición molecular proporciona una importante estabilidad química a la hélice.

Cromatina y cromosomas

Cromatina

En los organismos eucariontes, el ADN está unido íntimamente a proteínas básicas llamadas histonas constituyendo lo que se denominó **cromatina** (substancia que se coloreaba en la interfase). La cromatina observada en la interfase del ciclo celular presentaba distintos grados de condensación, y se llamó **eucromatina** a la menos condensada y **heterocromatina** a la de mayor nivel de condensación.

¿Cómo se produce la descondensación y condensación del material hereditario durante el ciclo celular? ¿Cómo se produce el pasaje de cromatina a cromosoma?

Para tener una idea de la magnitud de este fenómeno analicemos el siguiente caso:

El cromosoma del primer par en humanos que mide (en metafase) 10 m de longitud contiene en forma sumamente apretada aproximadamente 7,2 cm de ADN. Esto significa que el ADN se ha compactado unas 7.000 veces en el cromosoma metafásico.

Para que esto sea factible el ADN sufre un “**empaquetamiento**” en distintas etapas.

El nucleosoma

Representa el primer nivel de empaquetamiento del ADN. En el nucleosoma hay un “corazón” de proteínas (octámero de histonas) y el ADN da dos vueltas sobre él. Otra molécula de histona, la denominada histona H1, “sella” estas dos vueltas. Los nucleosomas se hallan separados entre sí por trozos de ADN, cuya longitud puede variar entre 20 y 60 pares de nucleótidos. El nucleosoma tiene un diámetro mayor de unos 100Å (10 nm) y es la medida de la fibra de cromatina en su estado más estirado. Esta fibra es conocida también como *collar de cuentas* por el aspecto que posee al ser observada con el microscopio electrónico.

Un solenoide formado por nucleosomas

La cadena de nucleosomas se pliega adquiriendo una estructura helicoidal que tiene 6 nucleosomas por vuelta. En esta de 30 nm de ancho, el ADN está empaquetado unas 40 veces.

Hay datos experimentales que permiten imaginar un modelo de cromosoma en el cual **proteínas no histónicas** (proteínas de andamiaje) **forman un armazón central**.

Las evidencias existentes sugieren que las fibras de solenoides (30 nm) formarían los lazos o dominios que emanan del armazón proteico y que este armazón estaría a su vez enrollado formando una espiral. Los dominios de ADN se mantienen unidos al armazón proteico por unas regiones denominadas abreviadamente SARs en inglés (Scaffold Attachment Regions).

Cromosomas

Estructura externa de los cromosomas: forma, tamaño y número

Estudiar la estructura externa de los cromosomas en una especie eucariótica es analizar la forma, el tamaño y el número de cromosomas que tiene. Para realizar estos estudios el momento ideal es cuando los cromosomas poseen su mayor grado de condensación; que, como ya se mencionó, ocurre en la metafase mitótica.

Los cromosomas, en la metafase mitótica, ya han pasado por la etapa de síntesis S del ciclo celular (donde se ha sintetizado el ADN y las proteínas histónicas o, dicho de otra forma, ya se ha producido la reproducción cromatídica). Al producirse la duplicación del ADN, cada cromátida tiene una molécula de ADN y la información genética entre las cromátidas de un cromosoma es idéntica (igual secuencia de nucleótidos).

El estudio de la estructura externa de los cromosomas termina con la obtención del cariotipo.

Forma La forma de los cromosomas está determinada por la posición del **centrómero**, el cual es el sitio o punto donde las cromátidas están unidas. El centrómero también se denomina **constricción primaria**.

En el centrómero, las cromátidas interaccionan con las fibras del huso acromático para separarse a polos distintos en las anafases mitóticas y meióticas. Las estructuras centroméricas que interaccionan con las fibras del huso se denominan cinetocoros.

Los extremos de los cromosomas se denominan telómeros.

Por la posición del centrómero los cromosomas se clasifican en:

- **Metacéntricos:** el centrómero se ubica en el centro del cromosoma y lo divide en dos partes iguales denominadas **brazos**.
- **Submetacéntricos:** el centrómero está desplazado hacia un lado, dividiendo al cromosoma en dos brazos, uno un poco más largo que el otro. Por convención al **brazo corto se lo identifica con la letra “p” y al largo con la letra “q”**.
- **Subtelocéntricos o Acrocéntricos:** la posición del centrómero divide al cromosoma en brazos marcadamente desiguales, uno muy largo y otro muy corto.
- **Telocéntricos:** en estos cromosomas el centrómero está ubicado en un extremo y, por ende, tienen un solo brazo.

Algunos cromosomas eucarióticos, además de poseer la constricción primaria o centrómero, presentan las denominadas constricciones secundarias. En esta zona (que también se observa en los preparados citológicos menos teñida que el resto del cromosoma) se encuentra, como ya mencionamos en el tema de transcripción génica, el ADN con la información para sintetizar el ARN-ribosómico. Esta zona se llama ****Región Organizadora del Nucléolo**** (abreviadamente NOR). Los cromosomas con NOR suelen

Tamaño Los cromosomas tienen variaciones en su tamaño a lo largo del ciclo celular y el tamaño se determina en la metafase mitótica. Es importante considerar que los tratamientos realizados para teñir los cromosomas y para obtener las metafases mitóticas influyen sobre el tamaño de los cromosomas. En general, se puede decir que hay especies eucarióticas con cromosomas grandes y especies con cromosomas pequeños.

Las monocotiledóneas entre las especies vegetales y los anfibios y ortópteros entre las especies animales tienen cromosomas muy largos (10 a 20 micrones). Las especies de dicotiledóneas, las algas, los hongos y la mayoría de las de las especies animales poseen cromosomas pequeños, longitudes inferiores a 5 micrones.

Número El **número de cromosomas somático** de una especie se simboliza como “**2n**” y el número de cromosomas de una gameta se simboliza con la letra “**n**”.

El conjunto mínimo de cromosomas con información genética para diferentes características constituye el **genoma de la especie** y su **número se denomina número genómico o número básico y se representa con la letra “X”**.

Las células somáticas de la mayoría de las especies eucarióticas tienen dos juegos del número básico de cromosomas, son especies diploides. Por extensión, se dice que una célula, un tejido, o un órgano de un individuo son diploides cuando sus núcleos tienen los **2x** cromosomas típicos del individuo al cual pertenecen.

En las especies diploides, todos los cromosomas de las células somáticas se encuentran en parejas, los miembros de cada par se denominan cromosomas homólogos existiendo por lo tanto **n parejas de homólogos**. Los cromosomas homólogos **tienen información para las mismas características**, aunque **pueden no poseer idéntica secuencia de bases nitrogenadas**, ya que en una ****posición determinada o *locus**** del cromosoma (*locus* es el lugar del cromosoma donde se término que proviene de principios del siglo pasado del siglo pasado (Genética Mendeliana). En cambio, las cromátidas de un mismo cromosoma poseen exactamente la misma información genética (la misma secuencia de bases nitrogenadas).

Ejemplo sobre número de cromosomas en cebolla:

El **número gamético** es $n = x = 8$.

El **número somático** es $2n = 2x = 16$.

El número de cromosomas $2n$ varía mucho de unas especies a otras y no hay relación entre el número de cromosomas y la complejidad evolutiva, ni entre el número de cromosomas y la cantidad de ADN. ****Pero siempre el número de cromosomas es constante en una especie****.

El cariotipo

El cariotipo es el conjunto de cromosomas de la especie ordenado por parejas, tamaño y posición del c

Para obtener el cariotipo de una especie se efectúan preparados citológicos donde puedan observarse células en metafases mitóticas. En varias células en metafase mitótica, de muchos individuos distintos de la especie se determina el número, la forma y el tamaño de los cromosomas.

En las especies diploides, como la especie humana, el número de cromosomas normal es $2n = 46$. Hay 22 pares de **autosomas** (cromosomas que portan información para características q o cromosomas sexuales (cromosomas que determinan el sexo). En mamíferos el sexo femenino es XX y el masculino XY.

El **idiograma** es la representación esquemática a través de un dibujo en escala del cariotipo de una especie.

Técnicas de Bando cromosómico

Hay tratamientos químicos y colorantes que permiten teñir los cromosomas y obtener en ellos una secuencia característica de **bandas e interbandas transversales**. Las bandas que se obtienen varían con las distintas técnicas de tinción.

En una misma especie, con igual técnica de tinción los cromosomas no homólogos tienen diferentes bandas, pero la importancia de estas técnicas es que **los patrones de tinción entre los cromosomas homólogos no varían para individuos con un cariotipo normal dentro de la especie**.

Estas técnicas permiten distinguir anomalías cromosómicas o aberraciones, como translocaciones (intercambios de segmentos entre cromosomas), deleciones (pérdidas de segmentos, etc).

Las técnicas de bandeo más frecuentes son el bandeo G, bandeo C, el bandeo R, y bandeo Q.

El valor C y la paradoja del valor C

El valor C es la cantidad de ADN contenida en el genoma haploide de la especie.

En un organismo diploide el valor C es el contenido de ADN medido en una gameta. El contenido $2C$ es el contenido de ADN de una célula somática, determinado en la fase G1 del ciclo celular. En las fases S y G2 del ciclo celular hay $4C$.

Al estudiar el valor C de distintas especies a lo largo de la escala evolutiva, se ha observado una falta de relación entre el contenido en ADN y la posición que la especie posee en dicha escala.

El tamaño de los genomas no correlaciona con la complejidad del organismo. Por ejemplo, en el hombre el valor C es 2,8 pg (picogramos), mientras que otros vertebrados como los

anfibios urodelos poseen hasta 100 pg y algunos insectos 7,5 pg. Incluso en los vegetales hay mayor cantidad de ADN que en la especie humana.

Podemos plantearnos el siguiente interrogante: **¿El contenido de ADN refleja su capacidad informativa? La respuesta es negativa y se conoce como la paradoja del valor C.** *La paradoja del valor de C surge de la creencia de que el contenido de ADN de los genomas eucariontes (el valor de C) puede ser excesivo, en el sentido de que existe mucho más ADN en el genoma de lo que sería necesario para codificar todas las proteínas especificadas en él.*

En el genoma humano solo un 15 a 30% es codificante. Surge otro interrogante: **¿Qué significado genético tiene el 85 o 70 % restante?** Los estudios de **cinética de la renaturalización o reasociación** han proporcionado una explicación al menos parcial a este interrogante. Se ha encontrado que en los organismos eucariontes existen distintos tipos de secuencias, muchas de las cuales están repetidas y algunas no tienen aún función conocida.

Tipos de secuencias en el ADN de organismos eucariotes

Entre los distintos tipos de **secuencias encontradas en el ADN de organismos eucarióticos podemos mencionar las siguientes:**

1. Secuencias funcionales de copia única: Son las secuencias de ADN que codifican para la mayoría de los polipéptidos, también llamados genes estructurales.

2. Secuencias repetidas:

- **Familias de genes y de pseudogenes relacionados.** Las familias de genes son secuencias funcionales que codifican para proteínas relacionadas, las cuales se han originado por duplicación de secuencias individuales y una posterior evolución divergente (las mutaciones han afectado en forma diferente a las copias existentes de la secuencia). Los pseudogenes son secuencias de ADN que debido a las mutaciones han dejado de ser funcionales y que por tanto no se transcriben. Un ejemplo de familias de genes son las secuencias de ADN para hemoglobinas humanas. **Las familias de genes pueden estar dispersas por el genoma.** Algunos tipos de proteínas están codificadas por familias de genes distribuidas por todo el genoma.

- **Secuencias repetidas en tándem:**

Son las secuencias de genes que han derivado por duplicación de secuencias ancestrales. **Son funcionales y las copias son idénticas tanto en secuencia como en función.** Su existencia les permite a los organismos generar una gran cantidad de determinados productos en poco tiempo. Algunos ejemplos de este tipo de secuencias son:

- **Secuencias de ADN-r:** contienen información para el ARN-r. Están localizadas en los cromosomas en la zona denominada organizador nucleolar (NOR). En *Drosophila*

melanogaster existen unas 130 copias de estos genes, en *Xenopus laevis* alrededor de 400 a 500 copias por genoma haploide.

- **Secuencias de ADN-5S:** son las secuencias que contienen la información para el ARN5S, el cual forma parte de la subunidad grande de los ribosomas.
- **ADN-t:** Los genes que codifican para los ARN-transferentes encargados de transportar los aminoácidos durante el proceso de traducción.
- **ADN-h:** Son las secuencias de ADN que codifican para histonas.
- **El ADN de los telómeros.** Contiene secuencias **repetidas en tándem** con función conocida, pero que no codifican para ningún ARN o proteína.
- **Secuencias altamente repetidas y que carecen de función conocida**

Secuencias altamente repetidas que suelen agruparse en zonas concretas de los cromosomas como el ya mencionado ADN satélite.**

VNTRs: Secuencias repetidas en tándem un número variable de veces. Son secuencias donde la unidad de repetición está constituida por secuencias cortas (entre 15 y 100 pb). El número de veces que está repetida varía entre los individuos de una misma especie, formando regiones de 1000 a 5000 pares de bases de longitud. Este tipo de secuencias se denominan **minisatélites**. También hay VNTRs en los que el tamaño de la secuencia que se repite es más pequeño (entre 1 y 10 pb) y que se denominan **microsatélites**.

La existencia de este tipo de secuencias ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares que permiten diferenciar el ADN de individuos de una misma especie, efectuando lo que se llama “**huellas dactilares de ADN**” y cuya aplicación agro-nómica es muy importante.

*ADN espaciador:** la función de este tipo de secuencias no es conocida, posiblemente sea simplemente separar a los genes. Se encuentran por ejemplo entre los genes de histonas y son en este caso secuencias ricas en pares A-T.

En la figura a continuación, se presenta un esquema que sintetiza los distintos tipos de ADN que pueden hallarse en el genoma de los organismos eucarióticos.

Relación entre empaquetamiento y función.

El material genético condensado es inactivo (no hay transcripción), como veremos en el tema de regulación génica. Desde el punto de vista funcional podemos distinguir dos tipos de cromatina: **eucromatina** y **heterocromatina**.

La **eucromatina** es la cromatina que se expresa en interfase. La que no se expresa en interfase se denomina **heterocromatina**. Este último tipo podemos subdividirla en dos:

- La **heterocromatina constitutiva** que nunca se transcribe a ARN o, dicho de otra forma, que carece de expresión génica.

- La **heterocromatina facultativa**, constituida por ADN que en ciertos tipos celulares o en momentos especiales del desarrollo se condensa fuertemente y no se expresa. El ejemplo mejor conocido es la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las hembras de mamíferos denominado cuerpo o corpúsculo de Barr.

El porcentaje de guanina y citosina (G – C) se refleja en su densidad, la cual puede medirse mediante centrifugación en gradiente de densidad. En los organismos eucariontes cuando se analiza el ADN por esta técnica, generalmente se observan dos bandas de diferente densidad.

El ADN de la denominada banda principal y el ADN denominado satélite. En los estudios de **cinética de la reasociación** se pudo comprobar que el ADN separado como satélite por centrifugación en gradiente de densidad de CsCl coincide con el aislado como de secuencia altamente repetida.

El ADN satélite está constituido por secuencias cortas que se repiten en tándem en el orden de cientos $10^3 - 10^6$ veces en un **genoma**. Siendo el genoma la información genética contenida en el ADN de una célula de la especie. Estas secuencias carecen de función codificadora (inactivas genéticamente) y se acumulan en regiones determinadas de los cromosomas constituyendo la heterocromatina constitutiva. La heterocromatina constitutiva se ha encontrado flanqueando las regiones centroméricas y algunas veces también se encuentra en regiones peri-teloméricas.

ADN DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS

Los organismos eucariontes además de poseer ADN en el núcleo, también tienen ADN en orgánulos citoplásmicos.

Las especies vegetales contienen en el citoplasma de sus células cloroplastos y mitocondrias, mientras que las células de especies animales contienen solo mitocondrias en su citoplasma.

ADN de cloroplastos

Los cloroplastos al igual que las mitocondrias poseen un sistema genético autónomo distinto del que se encuentra en el núcleo. Este sistema incluye ADN como fuente de información genética y un aparato completo de síntesis proteica. No obstante, los componentes moleculares de la traducción provienen de la información nuclear y de la cloroplástica. Una de las enzimas fotosintéticas más importantes es la **ribulosa -1-5bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO)**. La subunidad pequeña de esta enzima es codificada por un gen nuclear y la subunidad mayor esta codificada por el **ADNcp**.

El **ADNcp** es una molécula doble hélice circular, se replica semiconservativamente y no se encuentra asociado a las proteínas características del ADN nuclear. Posee un tamaño que varía entre 120 y 160 Kpb y el número de moléculas de ADNcp por cloroplasto es variable, en plantas superiores como en maíz el número oscila entre 20 a 40, mientras que en algas se han encontrado mayor número de copias.

ADN Mitocondrial

En la mayoría de los eucariotas, el ADN mitocondrial (**ADN_{mt}**) es una molécula de doble hélice que replica de manera semiconservativa y no está asociado con las proteínas características del ADN nuclear.

El tamaño del ADN mitocondrial en las especies animales es inferior al de las especies vegetales y oscila entre 15 y 18 Kpb (15.000 a 18.000 pares de bases).

En vertebrados se han encontrado entre 5 y 10 moléculas de ADN por orgánulo.

Se ha comprobado que el ADN mitocondrial codifica para muchos productos necesarios en las funciones de respiración celular de estos orgánulos.

La denominada **Teoría endosimbionte**, defendida por Lynn Margulis y otros científicos afirma que los antepasados de las mitocondrias y los cloroplastos serían organismos procarióticos unicelulares. Los antepasados de las mitocondrias serían las bacterias y los de los cloroplastos serían por ejemplo las cianobacterias.

En la evolución de esta relación endosimbionte perdieron la capacidad de funcionar independientemente y la célula huésped eucariótica llegó a ser dependiente de ellos.

Actividades

1. ¿Qué características debe reunir una molécula para cumplir su rol como material hereditario?
2. ¿Cuáles de las siguientes relaciones cumplen las leyes de Chargaff y se ajustan al modelo propuesto por Watson y Crick? ¿Porqué?
 - A. $G+C/A+T=1$
 - B. $G+A/C+T=1$
 - C. $\text{Pirimidinas/Purinas}=1$
 - D. $(G+C+A) / T=1$
3. ¿Qué tipos de secuencias de ADN encontramos en una célula eucariota? Menciónelas.
4. Defina los siguientes términos:
 - * Eucromatina
 - * Heterocromatina
 - * Cromátidas hermanas
 - * Cromosomas homólogos

* Número gamético (n)

* Número somático ($2n$)

* Número haploide

5. Realice los siguientes esquemas:

a. Cromátidas hermanas

b. Un par de cromosomas homólogos

c. Un núcleo diploide perteneciente a un individuo con $2n=2x=8$.

d. Un núcleo haploide del individuo del punto anterior.

6. ¿Qué relación existe entre el contenido de ADN de los organismos y su complejidad?

7. ¿Qué consecuencias puede producir en los cromosomas la pérdida del centrómero y cuál la de los telómeros?

Reproducción del material hereditario

Objetivos

- Conocer los mecanismos de replicación, su aplicación en la técnica de PCR y su utilidad en la generación de marcadores moleculares.

Bibliografía

KLUG, W. S. y CUMMINGS, M. R. Conceptos de Genética. Capítulo 11.

REPLICACIÓN DEL ADN

En todos los seres vivos la información genética debe ser conservada y transmitida en cada generación celular. El pasaje de información de una célula madre a las células hijas exige previamente que esta información sea duplicada.

En abril de 1953 cuando Watson y Crick proponen a la comunidad científica el modelo estructural para la molécula de ADN mencionan que el emparejamiento específico de las bases, que ellos postulan, sugiere inmediatamente un mecanismo copiator para el material genético. En mayo de ese mismo año publican el trabajo denominado: “Implicaciones genéticas de la estructura del ácido desoxirribonucleico”. En este trabajo proponen que al replicarse la molécula de ADN podría separar sus cadenas y cada una de ellas servir de molde para la síntesis de una cadena nueva, siguiendo las reglas de complementariedad de las bases nitrogenadas. Este modelo para la duplicación del ADN recibió el nombre de **semiconservativo**, ya que las dos moléculas de ADN recién sintetizadas poseen una cadena vieja y otra cadena nueva.

Frente al modelo Semiconservativo propuesto por Watson y Crick (1953) se postularon otros posibles modelos de replicación del ADN, uno de ellos se denominó modelo conservativo y el otro modelo dispersivo.

En el **modelo conservativo**, cuando el ADN se replica una de las moléculas tiene las dos cadenas viejas y la otra molécula doble hélice posee las cadenas de nueva síntesis.

En el **modelo dispersivo** luego de la replicación, cada molécula tiene fracciones de cadenas viejas y cadenas de reciente síntesis.

Meselson y Stahl trabajando en *E. coli* obtuvieron las pruebas experimentales que avalan el modelo semiconservativo.

Mecanismo enzimático de la replicación

El genoma (conjunto de la información genética) completo de una célula procariota o eucariota, debe replicarse con exactitud una vez por cada división celular. En los organismos eucariontes se produce en la fase S del ciclo celular.

La molécula de ADN para replicarse necesita de enzimas, la principal es la ADN polimerasa que cataliza la formación de cadenas de nucleótidos por la adición sucesiva de nucleótidos trifosfato (NTP). Al incorporarse el NTP, se liberan dos de los tres fosfatos para aportar la energía necesaria a la reacción química. Fue Arthur Kornberg quién descubrió, trabajando en *E. coli*, la polimerasa del ADN o enzima encargada de la duplicación del ADN. Por este descubrimiento se le otorgó el premio Nobel en 1959, premio compartido con Severo Ochoa.

Para que se produzca la replicación es necesaria la apertura de las cadenas, esta separación comienza en puntos concretos llamados “puntos de iniciación” o “punto de origen” (una secuencia específica de nucleótidos). A partir de ese punto se van separando las dos cadenas de ADN formando la llamada burbuja de replicación. Los dos extremos de la burbuja reciben el nombre de *horquillas de replicación*. La replicación es bidireccional a partir del origen.

La apertura de las cadenas ocurre por la acción de las enzimas conocidas como helicasas que rompen los puentes de hidrógeno. Esta separación provoca una serie de tensiones topológicas en el ADN que hacen necesaria la intervención de otras enzimas, las topoisomerasas, para eliminar dichas tensiones. Las proteínas de unión a cadena simple, conocidas en la literatura inglesa con la sigla SSBP o SSB, mantienen separadas las cadenas abiertas.

La ADN polimerasa es capaz de elongar una cadena, en la dirección 5'-3' pero no puede iniciar la síntesis de una nueva cadena. Necesita un fragmento previamente sintetizado o cebador ('primer' en inglés). El cebador es sintetizado por la enzima primasa, una ARN polimerasa que inicia, en código de ARN la copia de la cadena molde.

La copia de una de las cadenas molde está rezagada respecto a la otra. La denominada cadena adelantada se sintetiza en la dirección 5' a 3' en forma continua. Hay, en este caso, un solo cebador de ARN ubicado en el sitio de origen de la replicación. La cadena rezagada también se sintetiza en la dirección 5' a 3', a pesar de que esta dirección es opuesta a la del movimiento de la horquilla de replicación. El problema se resuelve mediante la síntesis discontinua de una serie de fragmentos, los fragmentos de Okazaki. Los fragmentos de Okazaki reciben este nombre porque Reiji Okazaki fue quien comprobó experimentalmente que una de las cadenas de ADN recién sintetizado se hacía en forma de pequeños fragmentos.

Las moléculas de ADN de cadena doble y lineal presentan el problema de la replicación de sus extremos. Como ya vimos, las ADN polimerasas necesitan un extremo 3' OH al cual van incorporando nucleótidos. La cadena de nueva síntesis que va de 5' a 3' (cadena

adelantada) va a ser copiada hasta el final y al removerse el cebador inicial de la cadena, el hueco podrá ser rellenado porque existirá un extremo 3' OH donde la ADN polimerasa incorpore en base a la cadena molde los nucleótidos faltantes. En la otra cadena de nueva síntesis, cuando el último cebador (extremo 3') sea removido el hueco no podrá ser rellenado (no hay un extremo 3' OH libre para que la ADN polimerasa incorpore los nucleótidos faltantes y la nueva cadena será más corta que la cadena molde. Como consecuencia en cada división celular queda un corto segmento al final sin copiarse y se iría acortando el ADN por ese extremo en cada ronda de replicación.

Los extremos de los cromosomas eucarióticos se denominan telómeros. En la década de 1940-50, despertaron el interés de Bárbara McClintock y Herman Müller quienes propusieron que los telómeros tenían como misión prevenir que los cromosomas se fusionaran si estaban en contacto por sus extremos, hecho que produciría consecuencias desastrosas para las células.

La secuenciación del ADN del telómero de *Tetrahymena* permitió conocer que éste tenía secuencias cortas y repetidas en tándem de pocos nucleótidos.

Los telómeros de células humanas tienen la repetición en tandem de seis nucleótidos (TTAGGG).

En 1984 se describió la existencia de una enzima llamada telomerasa, una enzima distinta a las ADN polimerasas conocidas hasta el momento, cuya función era la reconstitución del telómero.

La existencia de la telomerasa permitió aclarar “el problema de la replicación de los extremos en los cromosomas lineales”. Esta enzima tiene ARN con una corta secuencia (por ejemplo, AACCCC) el cual sirve de molde para sintetizar la secuencia repetida de los extremos (TTGGGG). Por el mecanismo de acción, esta enzima es una transcriptasa inversa, ya que tomando como molde ARN sintetiza ADN. La adición de las secuencias cortas que lleva a cabo la telomerasa impide el acortamiento de los telómeros durante la replicación normal. En el ser humano la telomerasa es activa en células de la línea germinal y en muchos tumores malignos. En contraste, su actividad está reprimida en células somáticas normales, excepto en algunos tejidos con alto potencial regenerativo, como células hematopoyéticas y epidérmicas y cada vez que ocurre una división se pierden entre 50 a 200 nucleótidos del telómero.

En los últimos años se relacionó a los telómeros con el cáncer. El hecho de que la telomerasa no esté activa en las células somáticas, y por ello los telómeros se acorten en cada división, pero sí esté activa en las células cancerosas, ha convertido a esta enzima en un campo de estudio muy importante que puede permitir avanzar en la lucha contra esta enfermedad. Se ha planteado, además, otro interrogante ¿es por acortarse los telómeros que las células somáticas luego de un número determinado de divisiones mueren? ¿qué relación existe entre el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento?

En mayo de 1999, se descubrió que la célebre oveja Dolly estaba envejeciendo de una forma prematura. El análisis de sus células permitió comprobar que los extremos de sus cromosomas estaban bastante deteriorados para un animal de su edad. Este descubrimiento sugirió que las técnicas de clonación podrían resultar peligrosas, al acelerar el proceso

de envejecimiento celular.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una de las aplicaciones más simples de PCR es la amplificación de grandes cantidades de una secuencia de ADN específica. Se basa en la amplificación de una región específica del DNA molde, que se encuentra entre dos segmentos cortos de DNA (10 a 25 bases) llamados primers o cebadores. Esta técnica permite trabajar con cantidades mínimas de ADN, unas 1000 veces menos de lo que se necesita en otras técnicas moleculares. Es un proceso cíclico que se basa en tres pasos básicos. Primero se desnaturaliza el DNA con calor y luego se hibridan los primers que son complementarios, uno a una parte del inicio del gen en una hebra y el otro al final en la otra hebra. La enzima ADN polimerasa en presencia de los nucleótidos Adenina, Timina, Citosina y Guanina copia la hebra de DNA molde a partir de los lugares donde se hibridaron los primers. Se utiliza una enzima específica llamada Taq ya que se obtuvo de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en aguas termales, por lo tanto soporta altas temperaturas (aproximadamente 95°C) y trabaja a una temperatura óptima de 72°C. El fragmento de DNA se amplifica exponencialmente obteniéndose cerca de 1000×10^6 copias después de 30 a 40 ciclos. Al obtenerse millones de copias de DNA no es necesario marcarlo radioactivamente para poder detectarlo, los fragmentos se separan por electroforesis, coloreados con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta.

La amplificación se realiza en un termociclador automático que permite elevar y bajar la temperatura durante el número de ciclos programados. El programa generalmente consta de los siguientes pasos:

- A. Desnaturalización inicial a 95° C durante 3 a 5 minutos.
- B. 30 a 40 ciclos con los siguientes pasos:
 - * 92 °C por 30 seg. a 1 minuto.
 - * Hibridización (annealing) de los primers al DNA molde, de 35 a 65 °C por 30 seg.
 - * Copia del DNA a partir del lugar donde se hibridaron los primers, 72 °C por 2 min
- C. Un paso final de extensión a 72 °C por 2 min., esto es para que la Taq polimerasa termine de copiar.

Un aspecto clave de la técnica es que la copia de la hebra original de DNA resulta en una secuencia de ADN de longitud definida, la longitud está dada por la distancia que queda entre los dos primers que se hibridan al inicio y final del gen.

Es necesario calcular la temperatura a la que se hibridan los primers y ésta varía según la longitud y el contenido de G - C de los primers. Una formula práctica para calcular la temperatura de hibridación o temperatura de fusión (T_m) es la siguiente:

$$Tm = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Por ejemplo, el siguiente primer de 10 bases GCCTCGTAGG, tendrá una temperatura de fusión de 34 C.

Existen otras fórmulas más complejas que principalmente toman en cuenta la concentración salina del buffer en el que se lleva a cabo la reacción.

Reacción de PCR para amplificar un gen específico

Gen a amplificar 94°C, se separan las hebras de DNA

Entre 35 y 60 °C se hibridan los primers Ciclo 1

A 72°C La Taq polimerasa replica el DNA (Representa la enzima) 94°C

Ciclo 2

Después de n ciclos se tiene un máximo teórico de 2^n moléculas de DNA doble hebra.

Marcadores moleculares basados en la técnica de PCR.

Este tema se puede leer en el siguiente artículo: Masuelli, R. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Avances en Horticultura. Avances en Horticultura 4(1). 1999.

Actividades

1. El experimento de Meselson y Stahl, consistió en cultivar colonias de *E. coli* en medios con N14 y N15.
 - a. Observando el siguiente esquema explique qué sucede, en la primera y segunda generación.
Controles
Incubación de células crecidas en N15 y pasadas a N14
N14 N15 1era generación en N14
2da generación en N14
- b. ¿Cuáles hubieran sido los resultados si la replicación del ADN fuera dispersiva?
2. A modo de repaso conteste verdadero o falso a las siguientes afirmaciones:
 - a. La replicación del ADN se inicia tanto en la cadena líder como en la cadena retrógrada.
 - b. Los fragmentos de Okazaki se unen por la acción de una ADN ligasa. ()
 - c. Si se añade DNA polimerasa a los 4 nucleótidos sin un ADN molde, se sintetiza ADN.
 - d. En algunas bacterias el material genético es ARN. ()

e. La suma de las bases A+T en una cadena de ADN nunca es igual a la suma de las ba