

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DISCURSO INAUGURAL

DEL AÑO ACADÉMICO 1985-1986

LEIDO EN LA SESIÓN CELEBRADA EL DÍA 30 DE OCTUBRE 1985

POR EL ACADEMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. D. JESUS MORCILLO RUBIO

SOBRE

FUNDAMENTOS FÍSICOQUÍMICOS
DE LAS PROPIEDADES SINGULARES
DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS



M A D R I D
DOMICILIO DE LA ACADEMIA
VALVERDE 22 - TELÉFONO 221 25 29
1 9 8 5

FUNDAMENTOS FISICOQUIMICOS DE LAS PROPIEDADES SINGULARES DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

PRESENTACION

Durante los últimos cuarenta años, dos clases de compuestos naturales, proteínas y ácidos nucleicos, han acaparado la atención de la mayoría de los investigadores en el campo de la llamada Biología Molecular, término utilizado por primera vez en 1945 por el cristalógrafo inglés William T. Astbury, para referirse al estudio de la estructura y propiedades físico-químicas de los compuestos biológicos.

En la actualidad está completamente demostrado el papel fundamental de estos dos tipos de compuestos en todos los procesos celulares. Como es bien sabido, los ácidos nucleicos son los portadores de la información genética, mientras que las proteínas son las responsables de la ejecución de la mayoría de los procesos biológicos. Para cumplir estas diferentes misiones, sus respectivas estructuras son asimismo bastante distintas. Así, la casi invariabilidad y exactitud de la información genética se debe, en gran parte, a la rigidez de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) y a su estabilidad físicoquímica en las condiciones fisiológicas. En cambio, las proteínas son completamente adaptables a diferentes cometidos, debido a que pueden sufrir una gran variedad de interacciones químicas. Sus estructuras son bastante flexibles y pueden modificarse por la acción de otros compuestos, como substratos, cofactores, etc. Aunque todas las proteínas son polímeros de aminoácidos, cada especie de proteína tiene una estructura tridimensional única, determinada principalmente por su secuencia de aminoácidos, en contraste con las macromoléculas de DNA, que tienen una estructura universal, en general en forma de doble hélice. Esto hace que el estudio físicoquímico de las proteínas sea verdaderamente complejo, si bien, como contrapartida, la gran diversidad de sus estructuras moleculares capacita a las proteínas para llevar a cabo miles de diferentes procesos celulares.

La capacidad de las células para mantener un elevado grado de orden en un universo caótico proviene de la información genética que está expresada, mantenida, propagada, reproducida y a veces mejorada, mediante cuatro procesos genéticos básicos: replicación del DNA, reparación del

DNA, recombinación genética y síntesis de proteínas. Estos procesos, que proporcionan y mantienen los ácidos nucleicos y proteínas característicos de las células son monodimensionales, esto es, en cada uno de ellos, la información contenida en una secuencia lineal de nucleótidos se utiliza para producir otra cadena lineal de nucleótidos (moléculas de DNA o de RNA), o bien una cadena lineal de aminoácidos (moléculas de proteínas). Los procesos genéticos son, por lo tanto, conceptualmente simples, en comparación con la mayoría de los otros procesos celulares, que implican la expresión y reconocimiento de la información contenida en las superficies tridimensionales de las macromoléculas de proteínas. Esta es una de las causas por las que el conocimiento de los mecanismos genéticos es bastante mejor que el de muchos otros procesos celulares.

Por todos estos motivos, me ha parecido oportuno dedicar esta disertación a analizar brevemente los fundamentos fisicoquímicos que justifican las propiedades singulares de los ácidos nucleicos. Dada la gran amplitud del tema, baste decir que se han publicado recientemente más de veinte textos y miles de trabajos de investigación, utilizando las más variadas técnicas físicas experimentales, nos tendremos que limitar a indicar, de forma esquemática elemental y lo más asequible, las líneas básicas que explican las propiedades de los ácidos nucleicos asociadas con su principal función de almacenar, transferir y procesar la información genética. Para ello, no es suficiente disponer de especies macromoleculares semejantes a una secuencia de diferentes «signos» (dígitos o letras). Es necesario, además, que estos «signos» sean capaces de ejercer interacciones físicas muy específicas responsables de la propiedad única de los ácidos nucleicos de autoduplicación y transmisión del código genético.

ANTECEDENTES HISTORICOS

El origen de nuestros conocimientos sobre los procesos hereditarios y sus fundamentos fisicoquímicos provienen de los trabajos realizados de forma totalmente independiente y casi simultánea por dos pioneros. En primer lugar, por el monje austríaco Gregor Mendel, quien, en 1866, publicó sus famosos experimentos, realizados durante ocho años, y que constituían las leyes básicas de la herencia, aunque, como ha ocurrido con otros importantes descubrimientos, fueron ignorados hasta comienzos de nuestro siglo, en el que se empezó a vislumbrar su trascendental importancia. En segundo lugar, por el químico alemán Friedrich Miescher, quien, en 1868, a partir de núcleos de células de pus, consiguió aislar una sustancia macromolecular a la que llamó **nucleína** y que desde su descubrimiento se pensó que formaba el esqueleto de la estructura de los cromosomas.

Diez años más tarde, Albrecht Kossel emprendió los estudios químicos de la nucleína, descubriendo que contenía las bases púricas adenina y guanina, junto con las bases pirimidínicas timina y citosina. Por estos trabajos se le concedió el Premio Nobel de Medicina en 1910.

Aunque suele atribuirse a Miescher el descubrimiento del ácido nucleico, nunca lo pudo aislar en forma pura, puesto que la nucleína contenía alrededor de un 70 por ciento de proteínas y era probablemente lo que ahora conocemos como nucleoproteína o cromatina. En realidad, fue Altman quien, en 1889, consiguió por primera vez separar el contenido proteínico de la nucleína de levadura, aislando una sustancia que llamó ácido nucleico. El propio Kossel realizó análisis químicos de este ácido nucleico, dando a conocer, en 1891, que contenía un azúcar, que fue identificado como D-ribosa, en 1908, por P. A. Levene y W. A. Jacobs. Asimismo, Levene también encontró e identificó el azúcar 2'-desoxi-D-ribosa, propio del DNA. Conviene resaltar que hasta 1910 no se llegó a saber que había dos clases de ácidos nucleicos: el obtenido del timo (DNA), que contenía desoxirribosa, y el procedente de levadura (RNA), conteniendo ribosa. Pero aún por entonces, se ignoraba que ambos tipos de ácidos nucleicos podían encontrarse en las mismas células, sino que se creía que el DNA era el ácido nucleico de los animales, mientras que el RNA era el de los vegetales.

Hasta finales de la década de los años veinte, los ácidos nucleicos habían despertado muy escasa atención, excepto en unos pocos laboratorios de Alemania. La posibilidad de que pudiesen ser portadores de la información genética no se le había pasado a nadie por la imaginación. Únicamente, a raíz de los experimentos (con *Streptococcus pneumoniae* o *Pneumococcus*) realizados, en 1928, por el bacteriólogo inglés Fred Griffith, surgió la idea de la existencia de una sustancia, de naturaleza desconocida por entonces, que actuaba como «principio transformador» de la herencia de unas células a otras. Sin embargo, la hipótesis errónea de una estructura cerrada en forma de tetranucleótido, propuesta en 1931 por el prestigioso Levene y su colaborador Bass, para el DNA, le hacía incapaz de contener cualquier tipo de información genética. Fue, por ello, necesario el transcurso de más de 14 años hasta que los doctores Avery, MacLeod y McCarty, del Instituto Rockefeller de Nueva York se atreviesen modestamente a insinuar, en 1944, el papel del DNA como soporte de la información genética (1), lo que, después de interesantes investigaciones con bacteriófagos, fomentadas por Max Delbrück y su «Phage Group», en el Cold Spring Harbor Laboratory, de Long Island (Nueva York), fue finalmente confirmado, en 1952, por el brillante trabajo de Alfred Hershey y Martha Chase, del Departamento de Genética de dicho Laboratorio (2).

Por esta época, comienzo de los años cincuenta, estaba a punto de invertirse la situación con respecto a los ácidos nucleicos, cuyo interés empezaba a despertar la atención en todo el mundo de investigadores de muy diversos campos, genéticos, microbiólogos, bioquímicos, fisicoquímicos, cristalógrafos, etc. Los importantes avances conseguidos por los trabajos del «grupo fago», planteaban una serie de cuestiones fundamentales sobre la herencia difíciles de contestar. Es curioso, a este respecto, que de los directores del grupo, el físico teórico de origen alemán Delbrück confiaba en que los experimentos puramente genéticos podrían resolver el problema, mientras que el microbiólogo italiano Salvatore Luria dudaba de que la solución pudiese alcanzarse antes de conocer la estructura química del material genético. Por ello, creyó muy conveniente enviar a Copenhague, para realizar estudios de postdoctorado sobre la química del DNA con el bioquímico Herman Kalckar, a uno de sus primeros discípulos, James D. Watson, que poco tiempo después, en el otoño de 1951, se marcharía al Cavendish Laboratory de Cambridge, para trabajar en la unidad de cristalografía biológica, dirigida por el químico de origen austríaco Max Perutz (que había llegado a Inglaterra en 1936) y con el que colaboraba John Kendrew (que compartieron el Premio Nobel de Química en 1962 por sus estudios estructurales de proteínas globulares), así como el joven investigador Francis H. C. Crick, a quien se le asignó la tarea de instruir en las técnicas de difracción de rayos X al recién llegado becario norteamericano Watson. Precisamente en 1951 había publicado Furberg, en «Acta Crystallographica» la primera estructura resuelta de un nucleósido, la citidina (3). Unos años antes (4), William Astbury había obtenido unas figuras de difracción de rayos X, que mostraban una fuerte reflexión meridional, lo que sugería un apilamiento de las bases con una separación vertical de unos 3,4 Å. Las fotografías no eran suficientemente claras para mostrar otros detalles estructurales. Al mismo tiempo, se realizaban diversos trabajos químicos que proporcionaron valiosas informaciones adicionales, entre las que cabe destacar el crucial descubrimiento de Erwin Chargaff y colaboradores (5), quienes, mediante las nuevas técnicas de separación por cromatografía de papel y análisis por espectroscopía de absorción en ultravioleta, utilizando numerosas muestras de DNA procedentes de una gran variedad de organismos, pudieron demostrar, en 1950, la llamada regla de la equivalencia o del apareamiento de bases, esto es, que el contenido molar de las bases púricas es igual al de las pirimidínicas.

La gran variedad de datos, que a comienzos de la década de los años cincuenta formaban una especie de complicado rompecabezas, fueron ordenados magistralmente por Watson y Crick, presentando en 1953 su audaz modelo de doble hélice para la estructura molecular del DNA (6), mediante el cual podían explicarse, por primera vez, de forma unificada todos los resultados disponibles, biológicos, físicos y químicos. Este des-

cubrimiento, con todas sus implicaciones biológicas, como la replicación del material genético, insinuada por Watson y Crick en su primer trabajo y explicada más tarde (7, 8), está considerado como un de los más importantes acontecimientos científicos de nuestro siglo. Es sorprendente el gran número de investigaciones que ha inspirado, habiendo provocado una profunda transformación en las Ciencias biológicas, hasta tal punto que suele considerarse como fecha del nacimiento de la Biología Molecular.

A la elucidación de la estructura helicoidal del DNA contribuyeron de forma decisiva los diagramas de rayos X obtenidos en el King's College de Londres por los grupos de Rosalind Franklin y de Maurice Wilkins, que mantenían una estrecha colaboración con el Cavendish Laboratory y cuyos trabajos se publicaron a continuación del de Watson y Crick en el célebre número de abril de 1953 de la revista «Nature» (9, 10). Por ello, el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1962 fue compartido por Watson, Crick y Wilkins. Rosalind Franklin había muerto en 1958 a la temprana edad de 37 años.

El modelo de doble hélice, propuesto por Watson y Crick para el DNA, contestó a muchas cuestiones pendientes, pero al mismo tiempo planteó muchas otras nuevas, relativas a la explicación, a nivel atómico-molecular, de las funciones genéticas del DNA, que en esencia se podrían resumir en sus dos misiones fundamentales:

1) Almacenamiento y transmisión exacta de la información genética a la descendencia. Este proceso, llamado **replicación**, implica la copia exacta de una molécula de DNA para formar dos conjuntos idénticos de DNA celular.

2) Transmisión y codificación de dicha información genética en la síntesis de proteínas. Este proceso consta de dos etapas diferenciadas, que reciben el nombre de **transcripción** y **traducción**, en las que intervienen varias clases de ácidos ribonucleicos (RNA).

Tras numerosas investigaciones, se ha podido comprobar que el principio fundamental de todos estos procesos es idéntico en todos los organismos y se basa en el apareamiento específico de los bloques componentes de los ácidos nucleicos: nucleobases, nucleósidos o nucleótidos. Asimismo, se ha visto que cuando se producen algunos errores, llamados **mutaciones**, se deben a cambios accidentales, físicos o químicos en dichos bloques, y que afectan a su apareamiento.

ASOCIACION DE COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS

El factor más importante en la determinación de la especificidad en las funciones genéticas de los ácidos nucleicos es la asociación por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias de las dos hélices, si bien su

contribución a la estabilidad estructural, sobre todo en medio acuoso, parece ser relativamente pequeña. Actualmente, se considera que la principal contribución a la estabilidad de los ácidos nucleicos corresponde al apilamiento de las bases, manteniendo paralelos los planos de sus anillos.

El estudio sistemático, a nivel fisicoquímico, de las unidades monoméricas componentes de los ácidos nucleicos (bases, nucleósidos y nucleótidos), llevado a cabo en diversos centros de investigación, entre otros en la Laboratorio de Biología Molecular, dirigido por el Dr. E. Gallego, ha proporcionado una valiosa información acerca de los principios básicos que determinan las especiales propiedades de los ácidos nucleicos.

El estudio, tanto de los ácidos nucleicos como de sus componentes en estado sólido, se ha realizado mediante la técnica de difracción de rayos X, que es la que proporciona una información más rigurosa sobre la estructura detallada de las unidades monoméricas, así como de la estructura general de diversos tipos de ácidos nucleicos (11). No es fácil, sin embargo, valorar hasta qué punto son aplicables los datos obtenidos en estado sólido, al estado real de las moléculas en disolución. Por ello, tienen gran interés los estudios realizados sobre asociación de unidades monoméricas en diversos disolventes, especialmente en disoluciones acuosas, ya que su estado conformacional y los mecanismos de interacción están condicionados no solamente por las propiedades estructurales intrínsecas de estas moléculas, sino también, y en un grado importante, por su interacción con el disolvente y con los iones presentes en la disolución. Estos estudios se han llevado a cabo utilizando diversos métodos de espectroscopía molecular (de absorción en ultravioleta, en infrarrojo, Raman-láser, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , dicroísmo circular), así como otras técnicas físicas, principalmente osmometría, medidas de presión de vapor, coeficientes de difusión, equilibrio de sedimentación, microcalorimetría, etc.

Los resultados más significativos obtenidos por estos métodos de investigación, permiten deducir que, en disolventes orgánicos, el único mecanismo de interacción entre unidades monoméricas es mediante formación de enlaces de hidrógeno, no siendo detectables, en este tipo de disolventes, los efectos de apilamiento. En cambio, en disoluciones acuosas, la interacción entre unidades monoméricas da lugar, principalmente, a una asociación por apilamiento vertical de las mismas. No obstante, la evidencia experimental es todavía insuficiente para afirmar que esta asociación se deba exclusivamente a fuerzas de apilamiento, ya que sólo los resultados obtenidos por RMN pueden considerarse específicos del apilamiento.

Entre los primeros estudios sistemáticos sobre asociación de bases en disolventes orgánicos merecen destacarse los realizados por Lord y colaboradores mediante espectroscopía en infrarrojo (12). La escasa solubi-

lidad de las bases y de los nucleósidos en estos disolventes (en general, cloroformo y tetracloruro de carbono) ha obligado al empleo de alquil o ciclohexil derivados en N-9 de bases púricas o en N-1 de bases pirimidínicas, con otros sustituyentes (metilo, bromo, yodo, etc.). Los resultados obtenidos confirman, en general, la tendencia al apareamiento entre bases complementarias, cuyas constantes de asociación son muy superiores a las constantes de autoasociación.

En las disoluciones acuosas de unidades monoméricas de ácidos nucleicos, estudiadas por osmometría y sobre todo por RMN (13-16), se ha podido comprobar que la asociación es más intensa en las purinas que en las pirimidinas, resultando el orden siguiente:

purina — purina > purina — pirimidina > pirimidina — pirimidina.

Comparando una base con su nucleósido correspondiente, se observa que la presencia del grupo ribosa (o desoxirribosa) apenas influye sobre la asociación. En cambio, la metilación de las bases, incluso en las posiciones donadoras de protones, suele exaltar la asociación. Estos resultados experimentales han conducido a suponer que la asociación entre las unidades monoméricas no se realiza por enlace de hidrógeno horizontal, sino por apilamiento vertical de las bases, que se aproximan entre sí manteniendo sus planos paralelos. La prueba de esta hipótesis se basa en los resultados obtenidos por RMN, puesto que, a medida que aumenta la concentración de las unidades monoméricas, se observa un desplazamiento hacia alto campo de las señales características de los protones de la base (o de la ribosa próximos a ella). Este efecto es bien conocido en sistemas aromáticos y se atribuye a la anisotropía magnética causada por la corriente de anillo en las moléculas próximas (apiladas). Apenas se observa en las pirimidinas, debido a su débil corriente de anillo, salvo si están en presencia de purinas. En cambio, cuando se forma un enlace de hidrógeno, la señal del protón implicado se desplaza hacia bajo campo, como consecuencia de la disminución del apantallamiento magnético del núcleo por el desplazamiento de los electrones de valencia.

Las diferencias en la magnitud de los desplazamientos químicos para diferentes protones de un determinado nucleósido (o nucleótido), proporcionan cierta información sobre la geometría del apilamiento. Se han propuesto varios modelos, entre los que el llamado cara contra cara parece ser el más favorecido por resultar menor el impedimento estérico de los anillos de ribosa y porque, además, en esta disposición, se reduce la repulsión entre los momentos dipolares de las bases adyacentes.

En cuanto a la cinética de la asociación, se puede afirmar que tiene lugar a una velocidad muy elevada, puesto que el espectro de RMN no muestra señales correspondientes a los dos estados, asociado y no aso-

ciado, y la señal única que aparece apenas presenta ensanchamiento. Las constantes de velocidad, determinadas por medidas de atenuación de ultrasonidos y técnicas de relajación (17, 18), son del orden de $10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, para el proceso de asociación y bastante menores, del orden de 10^7 s^{-1} para el proceso de disociación, siendo en este último proceso menor la velocidad de disociación del complejo formado entre bases complementarias. Estos valores elevados de las constantes de velocidad sugieren que el mecanismo de asociación está controlado por un proceso ultrarrápido de difusión.

En todos los trabajos anteriores, debido a la falta de sensibilidad de las técnicas experimentales utilizadas, no se habían podido estudiar disoluciones muy diluidas de componentes de ácidos nucleicos. Por ello, nos pareció interesante emprender un estudio sistemático acerca de la auto-asociación y heteroasociación de una amplia serie de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos en el mayor intervalo posible de concentraciones en disoluciones acuosas. A pesar de las dificultades experimentales y de interpretación que implican las disoluciones acuosas, es imprescindible su estudio, ya que el agua es el medio biológico natural de los ácidos nucleicos y de sus componentes. La técnica experimental utilizada principalmente ha sido la espectroscopía ultravioleta que, si bien proporciona una información menos detallada, que la espectroscopía de vibración (infrarroja o Raman), sobre las agrupaciones atómicas que intervienen en la asociación, resulta mucho más adecuada para el estudio cuantitativo preciso en un amplio intervalo de concentraciones.

Entre los resultados obtenidos merece destacarse que se ha demostrado, por primera vez, la existencia de un doble efecto hipocrómico en los espectros ultravioleta de los numerosos y variados componentes de ácidos nucleicos (19, 20). El primer efecto hipocrómico tiene lugar a concentraciones muy diluidas, inferiores a 10^{-3} M (hasta el límite detectable estudiado de 10^{-6} M). El segundo efecto hipocrómico se pone de manifiesto a concentraciones superiores a 10^{-3} M (hasta el límite impuesto por la solubilidad, aproximadamente $0,1 \text{ M}$). Este segundo efecto es el único que había sido detectado en trabajos anteriores utilizando diversas técnicas experimentales, que no permitían el estudio cuantitativo de disoluciones muy diluidas.

El doble efecto hipocrómico se ha interpretado en función de un multiequilibrio de asociación, suponiendo que el primer efecto se debe a la formación de dímeros, mientras que el segundo efecto corresponde a la formación de sucesivos polímeros. Partiendo de esta hipótesis básica, se ha desarrollado un método de cálculo para la determinación de las magnitudes termodinámicas de los equilibrios de asociación de componentes de ácidos nucleicos (21). Los valores de las constantes de equi-

librio correspondientes al primer efecto hipocrómico son superiores en 2 a 3 órdenes de magnitud a las del segundo efecto, si bien son análogos a los obtenidos para asociaciones por enlace de hidrógeno entre diversos compuestos orgánicos (22, 23).

Con objeto de conocer los mecanismos de interacción y las fuerzas intermoleculares que intervienen en los procesos de asociación se ha estudiado la influencia producida por diversos cambios inducidos en el medio, como la naturaleza del disolvente (agua, etanol, dimetilsulfóxido) (24), los iones presentes en la dilución (25), el pH (26) y la temperatura (22). Los resultados experimentales ponen de manifiesto que los mecanismos de asociación responsables de cada uno de los efectos hipocrómicos observados son de distinta naturaleza. Del análisis conjunto de todos los datos obtenidos se deduce que la autoasociación de unidades monoméricas en disolución acuosa está condicionada, principalmente, por un mecanismo de apilamiento, si bien determinados resultados experimentales son compatibles con la hipótesis de que el primer efecto hipocrómico se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases.

Por otra parte, se han determinado los parámetros termodinámicos ΔH° y ΔS° , cuyo signo y magnitud revelan que la asociación de las unidades monoméricas en medio acuoso se debe principalmente a la contribución entrópica, lo que indica que las interacciones hidrofóbicas deben ser el factor condicionante de la asociación (27). Ello está asimismo de acuerdo con los valores estimados de los diversos factores que contribuyen a la energía total de interacción, utilizando la aproximación de dipolo para el tratamiento teórico del hipocromismo (28).

Con el fin de dilucidar las contribuciones del apilamiento y de la posible formación de enlaces de hidrógeno en cada uno de los efectos hipocrómicos observados en los procesos de asociación de componentes de ácidos nucleicos, se ha estudiado también por espectroscopía ultravioleta, la autoasociación en disolución acuosa, de la propia purina y de cuatro bases xánticas (xantina, teobromina, teofilina y cafeína), que contienen el núcleo de purina con dos grupos carbonilo y metilos bloqueando dos o los tres grupos N-H donadores de protones (29). La analogía entre los parámetros de autoasociación obtenidos para la xantina (con tres enlaces N-H libres) y la cafeína (con los tres enlaces N-H bloqueados por grupos metilo), comparables asimismo con los de las bases púricas adenina y guanina, sugiere que la asociación de todos estos compuestos debe tener lugar por un mismo mecanismo de interacción, principalmente por apilamiento, como se ha indicado en diversos trabajos (30-31). Estudios muy recientes sobre asociación de nucleótidos en disolución acuosa (D_2O), utilizando técnicas muy refinadas de RMN con transformada de Fourier, mediante medidas de desplazamientos químicos de ^{31}P e 1H (32) o de coefi-

cientes de difusión (33), confirman la interpretación habitual por apilamiento. Sin embargo, conviene advertir que el intervalo de concentraciones estudiado corresponde a nuestro segundo efecto hipocrómico, por lo que no puede descartarse la formación de enlaces de hidrógeno que podría tener lugar en disoluciones más diluidas. Por consiguiente, la separación de los efectos debidos al apilamiento y al enlace de hidrógeno continúa siendo un problema sin resolver (34). No cabe duda que la espectroscopía de vibración (infrarroja o Raman) sería la técnica más adecuada para obtener información sobre los mecanismos responsables de la asociación, como ya hemos apuntado en unos estudios preliminares (35). Sin embargo, la gran absorbancia del agua (ligera o pesada) en la región infrarroja causa grandes dificultades experimentales para realizar medidas cuantitativas con cierta precisión en disoluciones muy diluidas, que estamos tratando de resolver en la actualidad.

FORMACION Y RUPTURA DE LA DOBLE HELICE

Como es sabido y ya hemos indicado anteriormente, la información genética está constituida por una larga secuencia lineal de las cuatro bases (adenina, A; citosina, C; guanina, G, y timina, T, sustituida a veces por uracilo, U), que, en forma de los correspondientes nucleótidos, se suceden a lo largo de cada una de las hélices que componen las enormes macromoléculas de DNA. Como dato curioso, citaremos que, en el hombre, el mensaje genético está formado por más de mil millones de bases. Esta información genética se transmite a las sucesivas generaciones mediante la **replicación** del DNA, y se materializa, en la síntesis de las proteínas características, a través de los procesos de **transcripción** desde el DNA al RNA mensajero y la **traducción** del mensaje genético escrito con las cuatro letras A, C, G y T (o U), a la secuencia de los 20 aminoácidos que forman las proteínas, vía los RNA de transferencia y siguiendo las reglas de traducción conocidas como **código genético**. En estos tres procesos fundamentales, el reconocimiento de la secuencia de bases, mediante el apareamiento complementario de Watson-Crick es crucial, pero, además es necesario que la doble hélice del DNA se desenrolle, para poder ser copiada (en forma de DNA o bien de mRNA), y que vuelvan a enrollarse las nuevas moléculas de DNA. Esto exige que las estructuras en doble hélice de las macromoléculas de DNA se comporten como entidades bastante flexibles y no como estáticas columnas helicoidales, lo que se explica, desde el punto de vista fisicoquímico, por la intervención de diversas fuerzas de interacción relativamente débiles, pero que actúan de forma cooperativa.

Cuando Watson y Crick propusieron la estructura de doble hélice para el DNA, resultaba obvio que los enlaces de hidrógeno entre los pares de

bases complementarias eran los que mantenían unidas las dos hebras de la doble hélice. Esta creencia se mantuvo durante años, apoyada además por la mayor estabilidad del DNA al aumentar el contenido de pares GC (con tres enlaces de hidrógeno frente a los dos que forman las parejas AT), como demostraron los trabajos de Doty y colaboradores sobre curvas de fusión de muestras de DNA con distinto contenido en GC (36). Sin embargo, el descubrimiento, en 1962, de que ciertos aniones, en particular trifluoroacetato, disminuyen notablemente la temperatura de fusión del DNA al aumentar su concentración, hizo sospechar que la estabilidad de la doble hélice no dependía exclusivamente de los enlaces de hidrógeno, que no deberían afectarse por la presencia de dichos aniones (47). En cambio, al comprobarse, también en 1962, que estos aniones rompían la estructura del agua (al mismo tiempo que aumentaban la solubilidad de las bases) se llegó a la conclusión de que las **fuerzas hidrofóbicas** contribuían a la estabilidad del DNA (38). Por esta época diversos estudios, llevados a cabo mediante las técnicas de dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular, entre los que destacan los de Tinoco y colaboradores (39), demostraron que cadenas simples de polinucleótidos (incapaces de formar enlaces de hidrógeno) podían adoptar una estructura helicoidal más o menos rígida, surgiendo así la idea de interacciones entre los anillos de bases adyacentes, esto es, el llamado **apilamiento**. La naturaleza de las fuerzas que determinan el apilamiento no está claramente establecida, pero parece evidente que dicho apilamiento está originado por un variado conjunto de interacciones diferentes (40). Las fuerzas hidrofóbicas no pueden explicar por sí solas algunos efectos relativos a determinadas bases, por ejemplo, que las purinas se apilen mejor que las pirimidinas, o que la metilación de las bases favorezca el apilamiento. Estas propiedades se relacionan con la estructura electrónica de las bases (en particular con el sistema de electrones π) y se deben principalmente a las fuerzas de dispersión de London (41), así como a las interacciones dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido (42). Estas interacciones resultan bastante específicas, hasta tal punto que se habla de complementariedad electrónica.

Numerosos trabajos posteriores han confirmado que la estabilidad de los ácidos nucleicos se debe, por un lado, a las interacciones directas y de varios tipos entre las bases púricas y pirimidínicas, favorecidas por su baja solubilidad en agua (fuerzas hidrofóbicas) y, por otro lado, a la elevada solubilidad de los grupos azúcar y fosfato, que interaccionan con las moléculas de agua, junto con la restricción que impone la conformación del esqueleto fosfato-ribosa. Por ello, las cadenas simples de polinucleótidos adoptan una estructura helicoidal con las bases apiladas, lo que hace mínimo su contacto con el agua. La doble hélice del DNA presenta mayor estabilidad, puesto que esta disposición permite una elevada hidratación del esqueleto fosfato-ribosa, mientras que evita el contacto con el agua

de las bases, creando un entorno hidrófobo en las posiciones dadoras y aceptoras de protones, que hace posible el apareamiento coplanar de las bases complementarias por enlaces de hidrógeno.

La influencia del grupo fosfato-ribosa se ha puesto claramente de manifiesto en nuestros estudios sobre asociación de varios dinucleótidos monofosfato en disolución acuosa (43). Los espectros ultravioleta de estas disoluciones muestran una hipocromicidad adicional respecto a sus unidades monoméricas, lo que indica un aumento de la interacción entre las bases inducido por el enlace 3'-5' fosfodiéster. Ello sugiere que, con este enlace, se inicia ya, a nivel de los dinucleósidos-monofosfato la estructura helicoidal característica de los polinucleótidos. Parece significativo resaltar que el enlace 3'-5' fosfodiéster apenas influye en el primer efecto hipocrómico, mientras que contribuye notablemente en el segundo efecto hipocrómico, poniendo de manifiesto, una vez más, la distinta naturaleza de estas dos etapas en la asociación.

De forma análoga, hemos observado que en los oligonucleótidos se presenta también un efecto hipocrómico adicional, respecto a sus unidades monoméricas constituyentes (44), lo que indica que los enlaces 3'-5' fosfodiéster inducen una mayor ordenación de las nucleobases, que aumenta con la longitud de la cadena, alcanzándose un límite máximo para unos 10 nucleótidos, esto es, aproximadamente para una vuelta completa en la estructura de doble hélice.

Se ha propuesto un mecanismo cooperativo de tipo cremallera para la formación de la doble hélice entre poli(A) y poli(U) (45). El primer paso es la formación de un par A · U, cuya constante de estabilidad se expresa como un producto del parámetro de nucleación, β (cuyo valor es del orden de 10^{-3}) por el parámetro de crecimiento, s (que vale 10, a 0°C, y 1 a la temperatura de fusión), determinados mediante cinética de relajación. Este primer par aislado es bastante inestable debido al factor β , pero en la formación del segundo y sucesivos pares A · U sólo influye s y no interviene β . Por ello, una vez que se ha superado el proceso desfavorable (con ΔG positivo) de nucleación, hasta formar 3 ó 4 pares A · U apilados, la adición de nuevos pares A · U supone un ΔG negativo, con lo que la doble hélice crece espontáneamente, de forma parecida a como se cierra una cremallera, debido principalmente a las restricciones geométricas impuestas por el esqueleto fosfato-ribosa. En contraste con el llamado **modelo isodésmico**, propuesto para el apilamiento, en el que cada paso es independiente de los restantes, en el **proceso cooperativo** anterior, descrito según el llamado modelo lineal de Ising, la formación y apilamiento de cada nuevo par está influenciado por sus próximos vecinos (excepto la formación del primero). Utilizando oligonucleótidos, con definidas secuencias, como modelos, se han podido determinar los parámetros termodiná-

micos para añadir o quitar un determinado par de nucleótidos a una doble hélice (46, 47), y hasta se ha propuesto una Tabla de valores de doble entrada, llamada **matriz de estabilidad** (48), para predecir la estabilidad de la doble hélice del DNA según la secuencia de bases. Con esta tabla se han calculado las temperaturas de fusión de una docena de polímeros sintéticos de DNA con secuencias conocidas, obteniendo valores que concuerdan satisfactoriamente con los experimentales (desviación media = 2,1°C).

En cuanto a la ruptura de la estructura en doble hélice, se han calculado los parámetros termodinámicos para la formación de lazos y protuberancias, tanto internos como terminales (49), así como los valores de ΔG y las probabilidades para la apertura de un par complementario central, que dependen bastante de los pares situados a ambos flancos (50). El par complementario G · C es del orden de 100 veces más estable que el par A · U. La influencia de los pares adyacentes hace que la probabilidad de apertura del par G · C sea de $0,3 \cdot 10^{-5}$, cuando también está rodeado a ambos lados por pares G · C, que aumenta a $1,2 \cdot 10^{-5}$, si uno de los pares adyacentes es A · U y aún más, $4,2 \cdot 10^{-5}$, cuando en ambos flancos los pares son A · U. Por el contrario, la probabilidad máxima de apertura, $120 \cdot 10^{-5}$, es la del par A · U, cuando está rodeado a ambos lados por otros pares A · U, disminuye algo, $100 \cdot 10^{-5}$, si uno de los dos pares adyacentes es G · C, y aún más, $70 \cdot 10^{-5}$, cuando son G · C los dos pares adyacentes. Mediante cálculos de este tipo, se puede estimar que en una larga estructura en doble hélice, formada por un millón de pares de nucleótidos, hay unos 10 pares G · C y unos 500 A · U (o A · T) que están abiertos. Estos podrían servir de núcleos iniciales para el comienzo de la separación de las dos hebras de la doble hélice, necesaria en los procesos de replicación y transcripción, que podría proseguir mediante la unión de ciertas proteínas, que producen cambios en las propiedades de las bases y del esqueleto fosfato-ribosa (variaciones en las interacciones hidrofóbicas, bloqueo de centros dadores y aceptores de protones, etc.).

Para terminar, conviene indicar que, a pesar de los avances espectaculares, que se han producido en los últimos años, en el conocimiento de los procesos genéticos que constituyen el llamado **dogma central**, aún quedan grandes problemas que solucionar para poder explicar dichos procesos desde un punto de vista fisicoquímico y a nivel atómico-molecular. Entre ellos podemos citar, por ejemplo, que apenas se conoce el modo fisicoquímico de actuar de la polimerasa sobre el DNA, en qué surco se une y cómo abre la estructura de doble hélice. Tampoco está bien aclarado cómo reconocen las moléculas de represores (proteínas) a su operador y cuál es su forma de unión en lugares específicos del DNA. Parece que ciertas conformaciones particulares de las proteínas se ajustan perfecta-

mente sobre la doble hélice. Para ello es necesario admitir la influencia de la estructura terciaria del DNA y, por lo tanto, que la información que determina la regulación genética es tridimensional. Asimismo, la estructura terciaria del RNA de transferencia se cree que es esencial para que pueda ser reconocido selectivamente por la aminoacil-tRNA sintetasa. Ahora bien, ¿cómo influye la secuencia de bases en dicha estructura terciaria? ¿Desempeña el DNA sólo un papel pasivo en el reconocimiento, insertándose las cadenas laterales de los aminoácidos en los surcos de una doble hélice estática, o por el contrario, la secuencia de bases modifica la estructura de la doble hélice, contribuyendo a su reconocimiento por las proteínas reguladoras? Muchas de estas cuestiones, así como la relación de la quiralidad (hélices a derechas, A, B, o a izquierdas, Z), con la secuencia de bases y sus funciones biológicas, constituyen problemas de máxima actualidad (51), y se están estudiando en numerosos laboratorios. No obstante, será necesario un enorme trabajo de investigación conjunta en todos los campos, genético, bioquímico, fisicoquímico, etc., para poder llegar a conocer con detalle, a nivel molecular, cada uno de los procesos que hacen posible la transmisión de la información genética a las sucesivas generaciones.

Agradecimiento

Me complace hacer constar públicamente mi profundo agradecimiento a los doctores D. Ernesto Gallego, D. Angel Rodríguez y D. Fernando Peral, sin cuya valiosa colaboración no hubiesen podido llevarse a cabo las investigaciones sobre ácidos nucleicos realizadas en nuestro Departamento de Estructura Atómico-Molecular y Espectroscopía.

BIBLIOGRAFIA

Obras de carácter general

1. B. PULLMAN (Editor): **Molecular Associations in Biology**. Academic Press. New York (1968).
2. G. FASMAN y S. N. TIMASHEFF (Editors): **Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids**. Marcel Dekker. New York (1970).
3. B. JANIK: **Physicochemical characteristics of oligonucleotides and polynucleotides**. Plenum Press. New York (1971).
4. F. S. PARKER: **Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine**. Adam Hilger. London (1971).
5. J. DUCHESNE (Editor): **Physico-chemical Properties of Nucleic Acids**. 3 vols. Academic Press. London (1973).
6. C. IANFORD: **The Hydrophobic Effect**. Wiley-Interscience. New York (1973).
7. V. A. BLOOMFIELD, D. M. CROTHERS y I. TINOCO: **Physical Chemistry of the Nucleic Acids**. Harper and Row. New York (1974).
8. J. C. SPEAKMAN: **The hydrogen bond and other intermolecular forces**. The Chemical Society. London (1975).
9. M. SUNDARALINGAN y S. T. RAO (Editors): **Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interaction**. Univ. Park Press. London (1975).
10. W. GUSCHLBAUER: **Nucleic Acid Structure**. Springer-Verlag. New York Heidelberg, Berlin (1976).
11. B. PULLMAN (Editor): **Quantum-Mechanics of Molecular Conformations**. Wiley. New York (1976).
12. P. SCHUSTER, G. ZUNDEL y C. SANDORFY: **The hydrogen Bond**. 3 vols. North-Holland. Amsterdam (1976).
13. D. FREIFELDER: **The D.N.A. Molecule. Structure and Properties**. W. H. Freeman. San Francisco (1978).
14. B. PULLMAN (Editor): **NMR Spectroscopy in Molecular Biology**. *Jerus. Sympos. Quant. Chem. Biochem.* 11. Reidel. Dordrecht (1978).
15. M. N. JONES (Editor): **Biochemical Thermodynamics**. Elsevier. Amsterdam (1979).
16. C. R. CANTOR y P. R. SCHIMMEL: **Biophysical Chemistry**. W. H. Freeman. San Francisco (1980).
17. D. B. DAVIES, W. SAENGER y S. S. DANYLUK (Editors): **Methods in Structural Molecular Biology**. Plenum Press. London (1981).
18. S. NEIDLE (Editor): **Topics in Nucleic Acid Structure**. MacMillan Press. London. Vol. 1 (1981); Vol. 2 (1982).
19. C. SANDORFY y T. THEOPHANIDES: **Spectroscopy of Biological Molecules**. D. Reidel. Dordrecht (1984).
20. A. R. PEACOCKE: **An Introduction to the Physical Chemistry of Biological Organization**. Oxford Univ. Press (1984).
21. W. SAENGER: **Principles of Nucleic Acid Structure**. Springer-Verlag. Heidelberg (1984).
22. D. G. GORENSTEIN (Editor): **Phosphorus-31 NMR. Principles and Applications**. Academic Press. New York (1984).

Trabajos citados

- (1) O. AVERY, C. MACLEOD y M. McCARTY: *J. Expt. Med.*, **79**, 137 (1944).
- (2) A. D. HERSHEY y M. CHASE: *J. General Phys.*, **36**, 39 (1952).
- (3) S. FURBERG: *Acta Crystallogr.*, **3**, 325 (1951).
- (4) W. T. ASTBURY: *Symp. Soc. Exp. Biol. (Nucleic Acids)*, **1**, 66 (1947).
- (5) S. ZAMENHOF, G. BRAWERMANN y E. CHARGAFF: *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 402 (1952).
- (6) J. D. WATSON y F. H. C. CRICK: *Nature*, **171**, 757 (1953).
- (7) J. D. WATSON, F. H. C. CRICK: *Nature*, **177**, 964 (1953).
- (8) F. H. C. CRICK y J. D. WATSON: *Proc. Roy. Soc. (London)*, **Ser. A**, **223**, 80 (1954).
- (9) M. H. F. WILKINS, A. R. STOCKER y H. R. WILSON: *Nature*, **171**, 738 (1953).
- (10) R. E. FRANKLIN y R. GOSLING: *Nature*, **171**, 740 (1953).
- (11) S. NEIDEL y H. M. BERMAN: *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **41**, 43 (1983).
Las obras 17 y 20 contienen bastante información obtenida por difracción de rayos X.
- (12) Y. KYOGOKU, R. C. LORD y A. RICH: *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 496 (1967); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 250 (1967).
- (13) R. A. NEWMAR y C. R. CANTOR: *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4010 (1968).
- (14) M. RASZKA y N. O. KAPLAN: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2025 (1972).
- (15) H. IWAHASHI y Y. KYOGOKU: *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 7761 (1977).
- (16) P. R. MITCHELL y H. SIGEL: *Eur. J. Biochem.*, **88**, 149 (1978).
- (17) G. G. HAMMES y A. C. PARK: *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4151 (1968).
- (18) D. PÖASCHKE y F. EGGERS: *Eur. J. Biochem.*, **26**, 490 (1972).
- (19) A. RODRIGUEZ DE BODAS: *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid (1975).
- (20) E. GALLEG0, J. MORCILLO y A. RODRIGUSZ: *Rev. Real Acad. Ciencias. Homenaje Prof. Lora-Tamayo*, 637 (1975).
- (21) A. RODRIGUEZ, E. GALLEG0 y J. MORCILLO: *An. Quím.*, **75**, 1085 (1977).
- (22) F. PERAL FERNANDEZ: *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid (1979).
- (23) E. GALLEG0, A. RODRIGUEZ y F. PERAL: *An. Quím.*, **77**, 98 (1981).
- (24) E. GALLEG0, F. PERAL y J. MORCILLO: *Rev. Real Acad. Ciencias*, **74**, 387 (1980).
- (25) A. BASCONES, F. PERAL y E. GALLEG0: *An. Quím.*, **77**, 118 (1981).
- (26) E. GALLEG0, F. PERAL y J. MORCILLO: *An. Quím.*, **77**, 118 (1981).
- (27) P. D. ROSS y S. SUBRAMANIAN: *Biophys. J.*, **32**, 79 (1980).
- (28) H. DE VOE y I. TINOCO: *J. Mol. Biol.*, **4**, 500 (1962).
- (29) F. PERAL, E. GALLEG0 y J. MORCILLO: *An. Quím.*, **80**, 558 (1984).
- (30) A. A. MAEVSKY y I. B. SUKHORUKOV: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3029 (1980).
- (31) K. RAMASWAMY y D. ANBANANTHAN: *Acustica*, **51**, 190 (1982).
- (32) K. HIROTA, Y. INOUE y R. CHŪJŌ: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 247 (1984).
- (33) R. RYMDEN y P. STILES: *Biophys. Chem.*, **21**, 145 (1985).
- (34) M. PETERSHEIM y D. H. TURNER: *Biochemistry*, **22**, 256 (1985).
- (35) F. PERAL, A. BASCONES y E. GALLEG0: *Rev. Real Acad. Ciencias*, **73**, 68 (1979).
E. GALLEG0, F. PERAL y J. MORCILLO: *Opt. Pura y Apl.*, **12**, 139 (1979).

- (36) J. MARMUR y P. DOTY: **J. Mol. Biol.**, **5**, 109 (1962).
- (37) K. HAMAGUCHI y E. P. GEIDUSCHEK: **J. Amer. Chem. Soc.**, **84**, 1329 (1962).
- (38) T. T. HERSKOVITS: **Arch. Biochem. Biophys.**, **97**, 474 (1962).
- (39) H. DE VOE y I. TONOCO, Jr.: **J. Mol. Biol.**, **4**, 500 (1962).
- (40) D. PÖRSCHKE y F. EGGERS: **Eur. J. Biochem.**, **26**, 490 (1972).
- (41) S. HANLON: **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **28**, 861 (1966).
- (42) P. O. P. TS'O, N. S. KONDO, R. K. ROBINS y A. D. BROOM: **J. Amer. Chem. Soc.**, **91**, 5625 (1969).
- (43) E. GALLEGÓ, F. PERAL y J. MORCILLO: **An. Quím.**, **78**, 213 (1982).
- (44) F. PERAL, J. MORCILLO y E. GALLEGÓ: **An. Quím.**, **78**, 206 (1982).
- (45) D. PÖRSCHKE: **Mol. Biol. Biochem. Biophys.**, **24**, 191 (1977).
- (46) P. N. BORER, B. BENGLER, I. TINOCO, Jr. y O. C. UHLENBECK: **J. Mol. Biol.**, **86**, 843 (1974).
- (47) P. L. PRIVALOV y V. V. FILIMONOV: **J. Mol. Biol.**, **122**, 447 (1978).
- (48) O. GOTOH y Y. TAKASHIRA: **Biopolymers**, **20**, 1033 (1981).
- (49) I. TINOCO, Jr., P. N. BORER, B. DENGLER, M. D. LEVINE, O. C. UHLENBECK, D. M. CROTHERS y J. GRALLA: **Nature New Biol.**, **246**, 40 (1973).
- (50) J. GRALLA y D. M. CROTHERS: **J. Mol. Biol.**, **78**, 301 (1973).
- (51) R. E. DICKERSON: **Invest. y Ciencia**, **89**, 42 (1984).