

Breve historia del descubrimiento de la estructura del DNA

Dr. Alberto Fierro

Departamento Medicina Interna Clínica Las Condes

El 15 de febrero de este año las revistas *Nature* y *Science*, han publicado una primera versión de la secuencia de nucleótidos del genoma humano. Este avance traerá un profundo cambio en nuestra manera de ejercer la medicina, de comprender la enfermedad y la vida.

Para apreciar su significado debemos remontarnos a los hitos fundamentales de la genética y la biología molecular... En el siglo XIX, Mendel establece las leyes fundamentales de la herencia. En el primer cuarto del siglo XX se establece que el sustrato físico de la herencia se encuentra en los cromosomas. Luego se descubre la transferencia génica y se establece que el ADN es el componente fundamental de los cromosomas. Pasando la mitad del siglo se descubre la estructura del ADN y en el último cuarto se desarrollan los sistemas que permiten su secuenciación y la reacción de polimerasa en cadena.

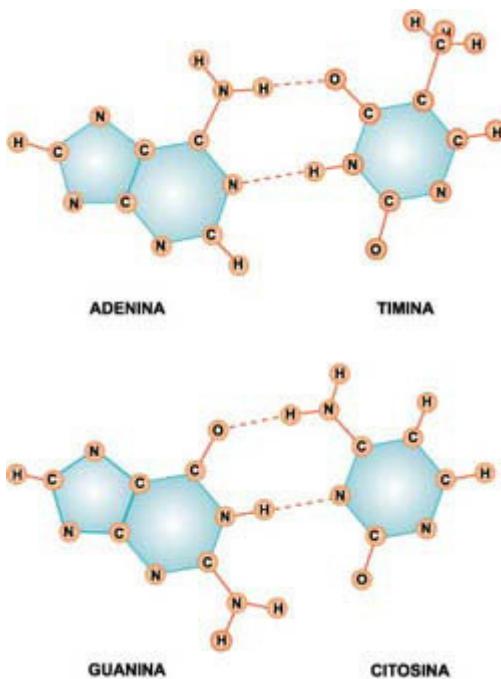


Figura 1.
Pares de bases adenina-timina y guanina-citosina, como lo comprendieron Watson y Crick. Como se observa el área sombreada es igual en ambas combinaciones. Posteriormente se descubrió que la unión guanina-citosina tiene un tercer enlace hidrogenado

Las publicaciones recién aparecidas son el resultado de un esfuerzo en que han trabajado miles de científicos en cientos de laboratorios y cuyo inicio puede situarse en el descubrimiento de la estructura del ADN. Esa es la historia que pasamos, brevemente, a relatar... Sucede en Cambridge, Inglaterra, en el año 1953.

En la mañana de uno de los últimos días de invierno, el joven de 25 años, James Watson jugaba en su escritorio con unos modelos de cartulina que él mismo había recortado el día anterior. De pronto, se dio cuenta que al juntar adenina con timina en ciertas posiciones tomaban la misma forma que al juntar citosina con guanina (Figura 1). Ese era el último eslabón que faltaba para imaginar la estructura del ADN. Esa misma noche le contó a su hermana que él junto a Francis Crick habían encontrado una respuesta que revolucionaría la biología. Y esa respuesta era increíblemente bella y

simple.

Aquella mañana cristalizaba un esfuerzo en que participaron fundamentalmente cinco personas: James Watson y Francis Crick, de los laboratorios Cavendish de Cambridge, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, del Kings College de Londres y Linus Pauling, del California Institute of Technology. Todos recibieron el Premio Nobel con la excepción de Rosalind Franklin. Ella, quien entregó la mayor parte de la evidencia experimental, falleció antes de recibirlo. El cáncer acabó con la vida de Rosalind a los 37 años. Su contribución al descubrimiento de la estructura del ADN se reconoce ahora en forma creciente.

La doble hélice

Rosalind Franklin era una experta en cristalografía por rayos X. Había trabajado en París, en el Laboratoire Central des Services Chimique de l'Etat hasta que el jefe de la Unidad de Investigación en biofísica en el King's College de Londres: Sir John Randall la invitó a trabajar en su laboratorio. Para Rosalind era la oportunidad de aplicar sus conocimientos a la biología y el laboratorio de Randall se encontraba en el mejor nivel de desarrollo. Lamentablemente, una serie de malos entendidos condujo a un conflicto permanente con su colega de trabajo Maurice Wilkins. Este llevaba largo tiempo trabajando en ADN y había tomado la primera fotografía relativamente clara de su difracción cristalográfica. Wilkins había sido el primero en reconocer en ésta los ácidos nucleicos y no estaba dispuesto a la competencia interna. Sin embargo, Rosalind Franklin era una mujer de carácter.

En ese tiempo se conocía la forma deshidratada de la molécula (forma A), la que no sugería una forma helicoidal. Rosalind se concentró primero en interpretar los patrones de difracción utilizando las laboriosas fórmulas de Patterson. Las primeras imágenes obtenidas en Londres con el ADN deshidratado se conocieron en Cambridge. Watson había tenido ocasión de asistir a la clase que dio Franklin en noviembre de 1951 sobre el avance de sus investigaciones. Rápidamente, con Francis Crick se pusieron a la tarea de imaginar su estructura y para ello, trabajaron principalmente con modelos atómicos a escala. Este primer intento terminaría en un fracaso rotundo. Watson y Crick invitaron a Franklin y Wilkins a Cambridge para darles a conocer su propuesta. Esta consistía en

un modelo helicoidal con tres cadenas. Iones de Magnesio sostenían unidos los fosfatos y hacia la periferia las pentosas y las bases nitrogenadas. Rosalind Franklin pulverizó sus argumentos. La cantidad de agua en el modelo no correspondía al de los estudios de difracción. Los fosfatos y, por lo tanto, el “esqueleto” de la molécula tenían que estar en el exterior de la misma. No existía en realidad ningún indicio consistente de que la estructura fuera helicoidal. La conocida flema inglesa seguramente impidió la catástrofe. De todos modos, el rumor llegó a la cabeza del laboratorio: Sir Lawrence Bragg, quien decidió prohibir a Watson y Crick que sus estudios en el ADN continuaran. La astucia se impuso: James Watson se concentró en el estudio del virus del mosaico del tabaco. Este tiene al ARN como uno de sus constituyentes fundamentales. Dilucidar esta estructura le permitiría acercarse al ADN y de paso profundizar sus conocimientos en cristalografía.

Durante 1952 Rosalind Franklin repitió los estudios cristalográficos con diferentes grados de hidratación. Al hidratarse la difracción era completamente distinta (forma B). Como sabemos ahora, las fibras de ADN se alejan entre ellas y toman su forma nativa.

A principios de 1953 las imágenes de la forma B (hidratada) llegaron a las manos de Watson y Crick (Figura 2). Sin autorización de Rosalind, Wilkins se las mostró primero a James Watson y, posteriormente, un informe de Rosalind Franklin a Sir John Randall es entregado a Watson y Crick. Francis Crick había trabajado en descifrar cómo se verían las estructuras helicoidales de las proteínas en imágenes de cristalografía. Y eso era justamente lo que tenía al frente. Más aún, el reflejo de 3.4 \AA en la meridiana (ver recuadro) implicaba que esa era la distancia entre los nucleótidos de una misma cadena de ADN. Al aplicar estas mediciones a la forma A y corregirla por la contracción y la densidad de la molécula sólo había lugar para dos nucleótidos en cada plano transversal. Si eso era así, lo más lógico es que las cadenas fueran también dos.

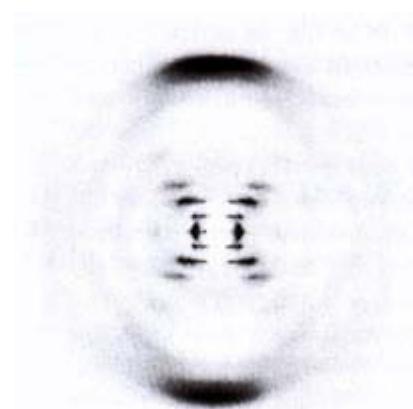


Figura 2.
Fotografía de la difracción de rayos X de la forma B, hidratada. Esta figura se explica en el recuadro adjunto.

Linus Pauling era, en esa época, un científico ampliamente reconocido. Sus contribuciones en la química inorgánica eran lugar común en las universidades y desde hacía algunos años se dedicaba al estudio de la estructura molecular especialmente de las proteínas. Su trabajo condujo a dilucidar la estructura de aminoácidos y polipéptidos; resaltó la importancia de las uniones de hidrógeno en la conformación de su estructura secundaria y contribuyó al descubrimiento de los pliegues helicoidales de las proteínas (hélices alfa y beta). Este fue uno de los peldaños que permitió imaginar la estructura del ADN. En noviembre de 1952, Pauling se puso a la tarea de dilucidar su estructura. Partiendo de imágenes obtenidas por Robert Carey concibió una estructura helicoidal con tres cadenas. El manuscrito de este artículo llegó a manos de Watson y Crick quienes reconocieron inmediatamente el error. Los átomos de fósforo se encontraban neutralizados por átomos de hidrógeno y de esa forma el ácido desoxirribonucleico dejaba de ser ácido. Es decir el artículo desafía una de las leyes fundamentales de la química. Pauling no tuvo acceso hasta mucho después a las fotografías de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins. Cosas de la política: cuando Pauling quiso visitar Inglaterra en mayo de 1952 su pasaporte no le fue otorgado por sospecha de comunismo. Si ello no hubiera sucedido la historia del ADN sería probablemente distinta.

La complementariedad de los ácidos nucleicos.

A comienzos de 1953 tanto en Londres como en Cambridge estaba claro que el ADN sería una doble hélice, los grupos fosfatos formarían, por su cara externa, la estructura de sostén y los nucleótidos mirarían hacia el centro. Aún faltaba por comprender cómo se unen los nucleótidos y determinan la especificidad biológica. Watson y Crick se esforzaron por enlazar los nucleótidos en el centro de la molécula. Se imaginaron primero cada nucleótido al frente de otro igual: adenina con adenina etc. (Figura 3). Dado que las purinas tienen un doble anillo y las pirimidinas uno simple, algunos segmentos serían anchos y otros estrechos. Ello no coincidía con el suave contorno del ADN. Más aún, Chargaff había descubierto que siempre adenina y timina se encuentran en el núcleo celular en igual cantidad y lo mismo sucedía entre guanina y citosina. Al enlazar estos elementos en la molécula de ADN la explicación salta a la vista. Al combinarse adenina con timina en ciertas posiciones la forma y las distancias son las mismas que al combinar guanina con citosina (Figura 1), lo que hace posible que ambas combinaciones existan sin tensiones al interior de la doble hélice. Sólo esas combinaciones existen: adenina con timina y guanina con citosina lo que lleva a concebir las cadenas como complementarias: una es la base de la otra. Ello permite imaginar de inmediato la multiplicación celular y la herencia.

La simplicidad de la molécula contrasta con las múltiples combinaciones posibles de estos cuatro elementos a lo largo del ADN. Las posibilidades de formar diferentes proteínas son prácticamente infinitas y la secuencia de estos nucleótidos es la que ha sido recién publicada en su primera versión. En la tarde del mismo día en que imaginaron que las bases son complementarias Francis Crick visitó su fuente de soda habitual, The Eagle. Allí afirmó, sin modestia, a quien quiso escucharlo que él y Watson habían descubierto "el secreto de la vida".

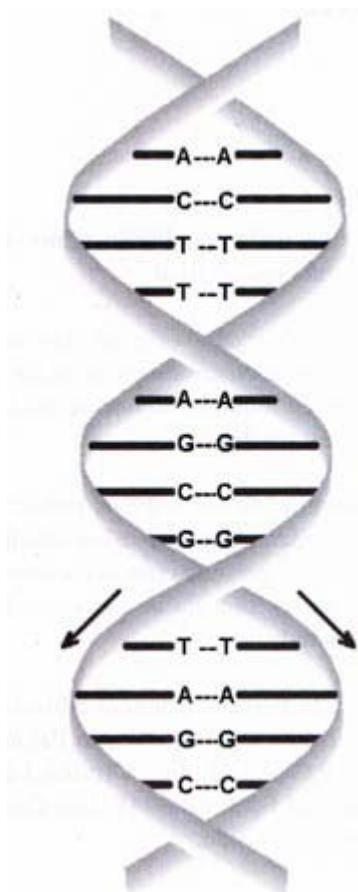


Figura 3.
Una visión esquemática del ADN construido con pares de nucleótidos iguales. Este modelo no es posible pues los segmentos en que se unen timina con timina y citosina con citosina serían más angostos que los que unen adenina con adenina y guanina con guanina.

¿CÓMO DERIVARON WATSON Y CRICK LA ESTRUCTURA HELICOIDAL DEL ADN A PARTIR DEL PATRÓN DE DIFRACCIÓN DEL B-ADN?

El patrón de difracción del B-ADN puede comprenderse a partir de las leyes de difracción de Bragg. Si un objeto se interpone en un haz de rayos X, el rayo es reflectado (Figura 3) por la interacción con los electrones del objeto y porque las dimensiones del objeto están en el mismo rango que la longitud de onda λ de los rayos X ($\lambda=1.54$ Å para la radiación más comúnmente empleada en los laboratorios) (Figura 1). La reflexión en un ángulo 2θ corresponde a una distancia d en el objeto (d es también la resolución). La relación está dada por la ley de Bragg: ($n\lambda = 2d \sin \theta$). Unos pocos números que son importantes para el B-ADN se observan en la Tabla 1 del recuadro. Estos números significan –por ejemplo– que una reflexión observada a un ángulo de $26,2^\circ$ corresponde a una resolución de 3.4 Å.

En la Figura A se observa un esquema del patrón de difracción del B-ADN. Para obtener este patrón de difracción el ADN debe separarse en fibras y debe ser expuesto a la radiación X en forma perpendicular al eje de las fibras. Las características más importantes de este patrón son:

La reflexión meridional en 3,4 Å (A), la cual corresponde a los asentamientos de los anillos de las bases nitrogenadas.

Las reflexiones lineales en estratos de $34/n$ Å (B), con $n=1,2,\dots,10$ (no todas estas reflexiones son visibles en el patrón obtenido por Rosalind Franklin). Estas reflexiones corresponden a la repetición de la hélix cada 34 Å y forman la típica cruz helicoidal (Figura 2).

Con este patrón, así como las dos regiones vacías E y F, Watson y Crick pudieron claramente deducir que la estructura era helicoidal y que debería contener 10 nucleótidos por vuelta. Francis Crick ya había publicado un artículo sobre la difracción que debería obtenerse con una hélix simple. Más aún, partiendo de las posiciones exactas de las reflexiones lineales en estratos era posible deducir el diámetro de la hélix que tendría aproximadamente 20 Å.

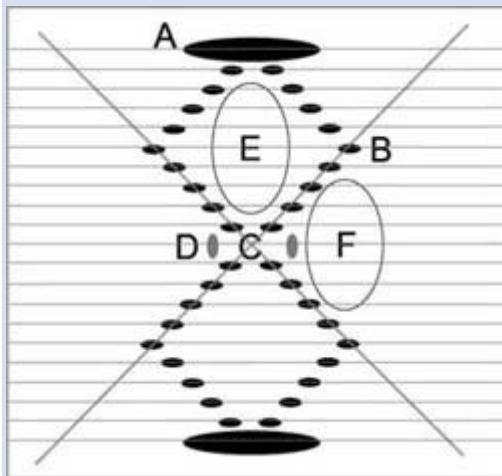
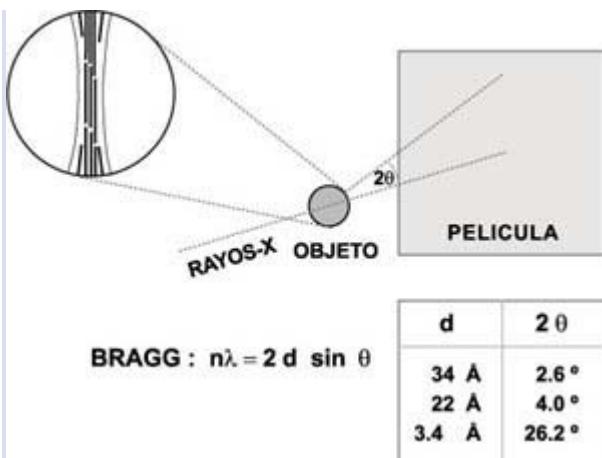


Figura A

El hecho que las reflexiones lineales en estratos sean relativamente estrechas sugiere que una porción sustancial de la masa de la hélice estaba en el perímetro externo. Estos tenían que ser los grupos fosfato pues tienen muchos más electrones que los átomos de nitrógeno o carbono. Este argumento no es especialmente sólido como se desprende del hecho que el primer modelo de Watson y Crick así como el modelo de Pauling tenían los grupos fosfato en el interior de la hélice. La región vacía C es provocada por la detención del haz y tiene sólo razones técnicas. También se observa un reflejo ecuatorial (D) que sugiere que las hebras ordenadas en forma paralela en la fibra se encuentran separadas a una distancia de 22-24 Å, lo cual es concordante con el diámetro deducido de aproximadamente 20 Å.

Todavía quedaba abierta la pregunta sobre el número de cadenas de la hélix. De hecho, los primeros modelos incorrectos de Watson y Crick así como el modelo de Pauling tenían tres cadenas en la hélix. Los cálculos de densidad fueron realizados, pero éstos no dieron una respuesta clara si se trataba de dos o de tres cadenas. El principal logro de Watson y Crick fue usar dos en vez de tres cadenas. Esta pregunta podría haberse respondido también a partir de las leyes de Chargaff puesto que sólo dos cadenas son compatibles con éstas. Siempre es más fácil decir en retrospectiva lo que podría o debería haberse hecho. La belleza del modelo de Watson y Crick es que era esteroquímicamente razonable, que explicaba todos los datos experimentales disponibles y que sugería inmediatamente mecanismos biológicos como la replicación, traslación y transcripción.

Manfred Weiss, PhD

Departamento de Biología Estructural y Cristalografía

Instituto de Biotecnología Molecular, Jena

E-mail: msweiss@imb-jena.de

Epílogo

La edición de *Nature* del 25 de abril de 1953 publicó lo que Watson y Crick consideran una "sugerencia" de la estructura del ADN (Figura 4). Esta no fue recibida sin objeciones. Durante años persistió la duda de cómo podrían separarse las cadenas del ADN si ambas estaban torcidas sobre sí mismas. A la fecha de publicarse ese artículo Rosalind Franklin dejó el King's College por el Birkbeck's y falleció cuatro años después, víctima del cáncer. Esos últimos años fueron los más productivos de su corta vida al publicar 17 trabajos. El año 1962, el año del Nobel para James Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins, ella ya no estaba para acompañarlos. Linus Pauling recibió el Premio Nobel en dos oportunidades. Fue premio Nobel de Química en 1954 por sus múltiples contribuciones en el campo de los enlaces y estructuras atómicas y Nobel de la Paz el año 1962, por su permanente contribución contra los ensayos atómicos y la guerra fría.



Figura 4.
Dos páginas que han marcado la historia de la biología: La edición de "Nature" del 25 de abril de 1953.

Bibliografia

Watson JD and Crick FHC. A structure for Deoxiribose Nucleic Acid. Nature April 25, 1953; 737-8.

Watson James D. The Double Helix. A personal Account of the Discovery of the Structure of DNA. A Norton Critical Edition. Norton. New York, London. 1980

Anne Piper. Light on a dark lady. Trends in Biochemical Sciences 1998, 23: 151-4.

Olby R. DNA before Watson-Crick. Nature 1974; 248: 782-5.

Crick F. Looking backwards: a birthday card for the double helix. Gene 1993; 135: 15-8.

Brec DL. The double helix-Watson & Crick "freak find" of how like begets like. JAMA 1993; 269: 1040-5.

International Human Genome sequencing consortium. Nature 2001; 409: 860-921.

Venter JC et al. The sequence of the Human Genome. Science 2001; 291: 1304-51