

UF4

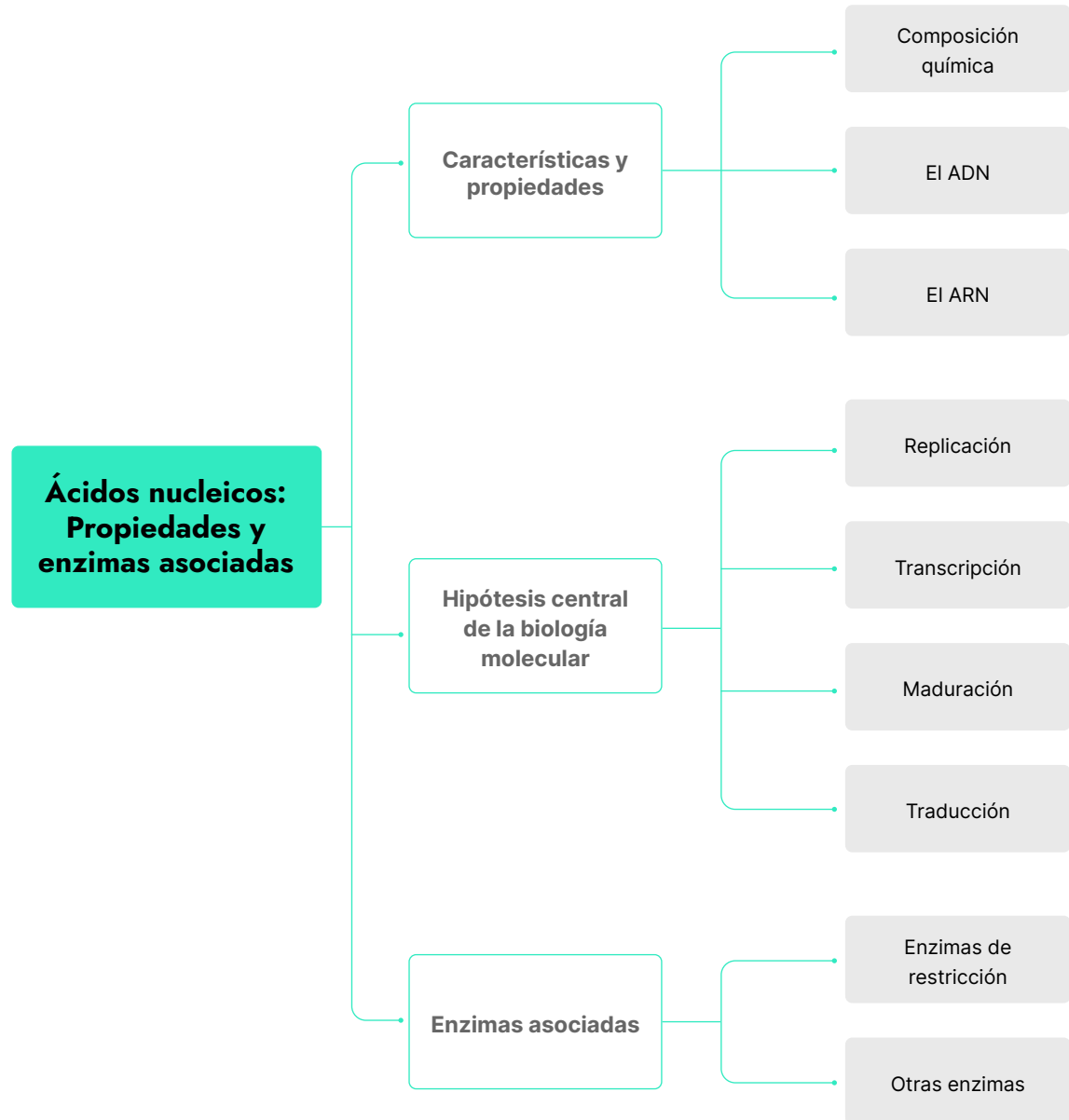
Ácidos nucleicos: propiedades y enzimas asociadas

Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual	03
1. Ácidos nucleicos: características y propiedades.....	04
1.1. Composición química	04
1.2. El ADN.....	08
1.3. El ARN	11
A. ARNm.....	13
B. ARNt.....	14
C. ARNr	15
2. Hipótesis central de la biología molecular	17
2.1. Replicación	18
A. Fase de inicio	20
B. Fase de síntesis	21
2.2. Transcripción.....	22
A. Fase de iniciación	23
B. Fase de elongación	23
C. Fase de terminación.....	23
2.3. Maduración.....	24
2.4. Traducción	26
A. Fase de iniciación	28
B. Fase de elongación	29
C. Fase de terminación.....	29
3. Enzimas de restricción y otras enzimas.....	32
3.1. Enzimas de restricción	34
3.2. Otras enzimas	37

Mapa conceptual



01 Ácidos nucleicos: características y propiedades

En los actuales laboratorios de biología molecular, la mayoría de los procesos y técnicas que se llevan a cabo tienen como objetivo la manipulación o detección de los **ácidos nucleicos**. Existen dos tipos de ácido nucleico: el **ácido ribonucleico (ARN)** y el **ácido desoxirribonucleico (ADN)**. La composición, la localización y las funciones de estos se detallarán durante los siguientes apartados.

Los **ácidos nucleicos** son biomoléculas formadas por la repetición de monómeros cuya función radica en almacenar, transmitir y expresar la información genética contenida, mayormente, en las células.

DEFINICIÓN

1.1. Composición química

Tanto el ADN como el ARN son cadenas poliméricas formadas por la repetición de monómeros, conocidos como **nucleótidos**, que están unidos entre sí mediante enlaces covalentes, en particular mediante el **enlace fosfodiéster**.

Los nucleótidos están constituidos por tres estructuras químicas distintas:

- » Glúcido.
- » Base nitrogenada.
- » Grupo fosfato.

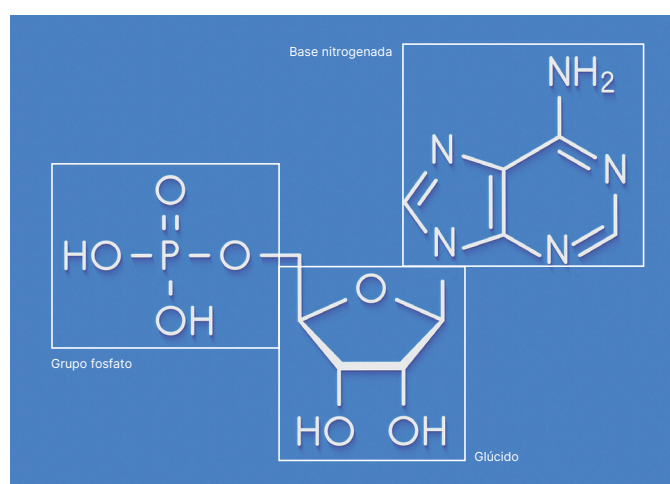


Fig. 1. Estructura de un nucleótido de ARN.

El glúcido que forma los nucleótidos se conoce como **ribosa** y está constituido por cinco carbonos (**pentosa**) además de átomos de oxígeno e hidrógeno. Cabe destacar que existen dos tipos de ribosa que confieren la principal diferencia entre el ADN y el ARN:

- » La **β-D-ribosa** forma parte de la estructura del ARN.
- » La **β-2-desoxi-D-ribosa** compone el ADN.

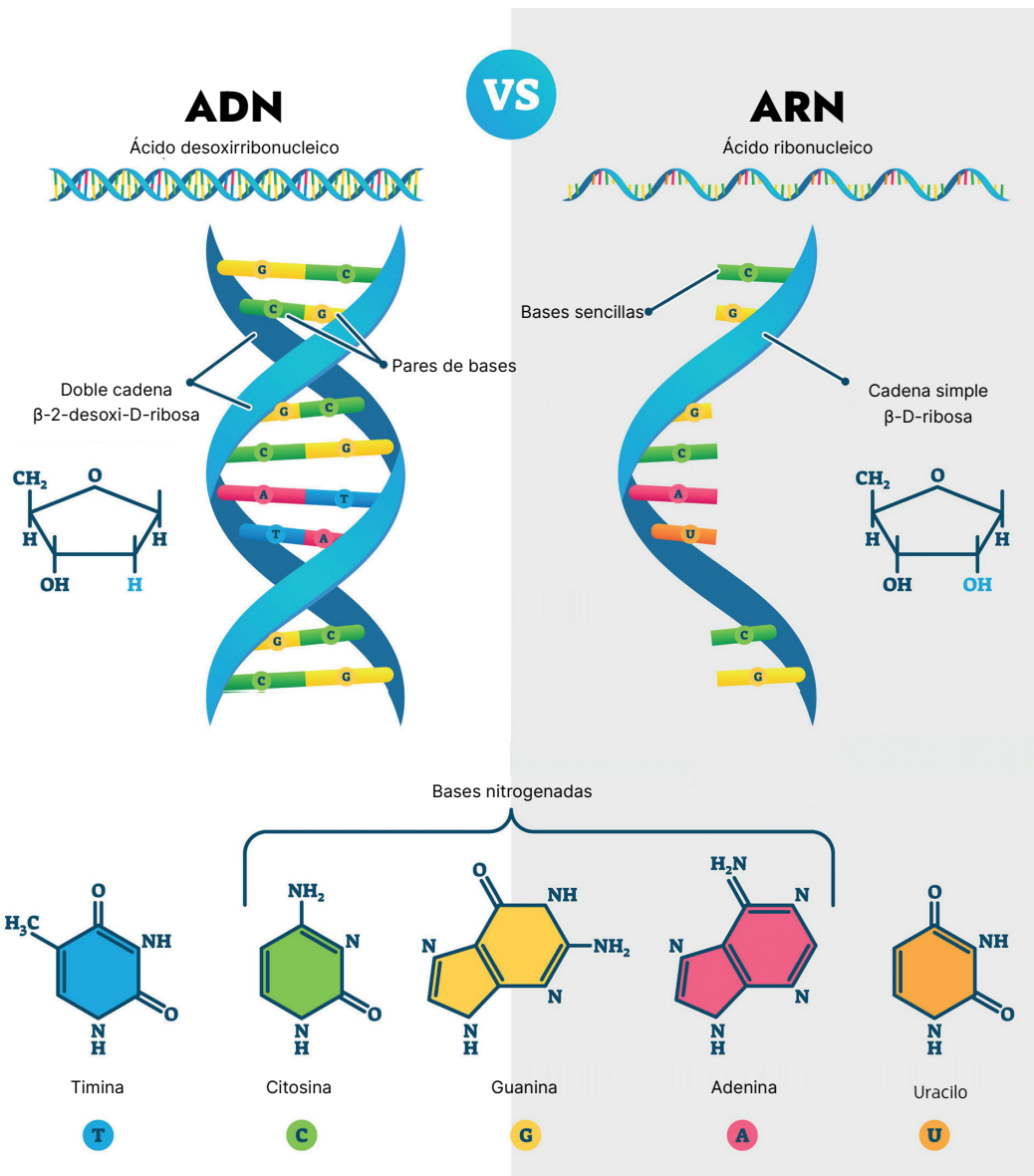


Fig. 2. Estructuras químicas de la pentosa.

Por otro lado, la **base nitrogenada** es un compuesto químico nitrogenado heterocíclico que puede ser de dos tipos:

- » **Bases púricas.** Derivan de la purina y se encuentran en el ADN y el ARN. Dentro de estas bases, están la **adenina** (A) y la **guanina** (G).
- » **Bases pirimidínicas.** Derivan del anillo de pirimidina y se encuentran formando el ADN [**citocina** (C) y **timina** (T)] y el ARN [**citocina** y **uracilo** (U)].

En algunos casos más aislados, existen otras formas de bases nitrogenadas, como es el caso de la N2-dimetilguanina, que se encuentra en el ARN transferente (ARNt).

El tercer componente, el grupo fosfato, es un ácido fosfórico que se encuentra en forma de **anión fosfato** (PO_4^{3-}) y que confiere un carácter ácido a los ácidos nucleicos, es decir, es el responsable de dotar de carga negativa al ADN y al ARN.

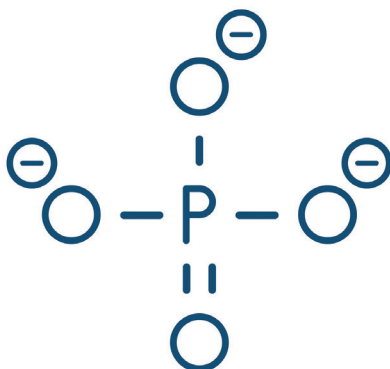


Fig. 3. Grupo fosfato.

IMPORTANTE

A veces, los nucleótidos contienen más de un grupo fosfato, unidos entre sí mediante un enlace anhidro. Ejemplo de ello es la adenosin-5'-trifosfato (ATP). El **ATP**, como veréis en el módulo de fisiopatología general, es la molécula de intercambio energético que participa en casi todos los procesos moleculares de las células.

Cabe destacar que la unión de la base nitrogenada con la pentosa, mediante un enlace **N-glucosídico**, formaría lo que se conoce como **nucleósido**. Y el nucleósido más la unión del grupo fosfato, mediante un enlace éster, formaría el nucleótido.

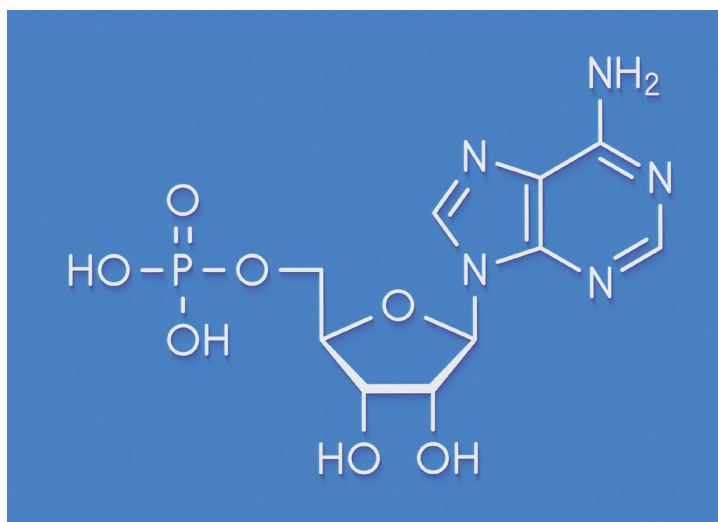


Fig. 4. Estructura química del nucleótido de ARN.

Por último, y como se ha descrito al principio del apartado, los ácidos nucleicos se componen de uniones de nucleótidos conectados por **enlaces fosfodiéster**.

Esta unión se produce por generación de un enlace fosfodiéster entre el **carbono cinco (C5)** de un nucleótido y el **carbono tres** del otro nucleótido (**C3**). Por ello, las cadenas de nucleótidos tendrán siempre en un extremo al C5 y en el otro extremo al C3, y es de aquí de donde surge la direccionalidad de las cadenas que se suelen representar **de 5'→3'**.

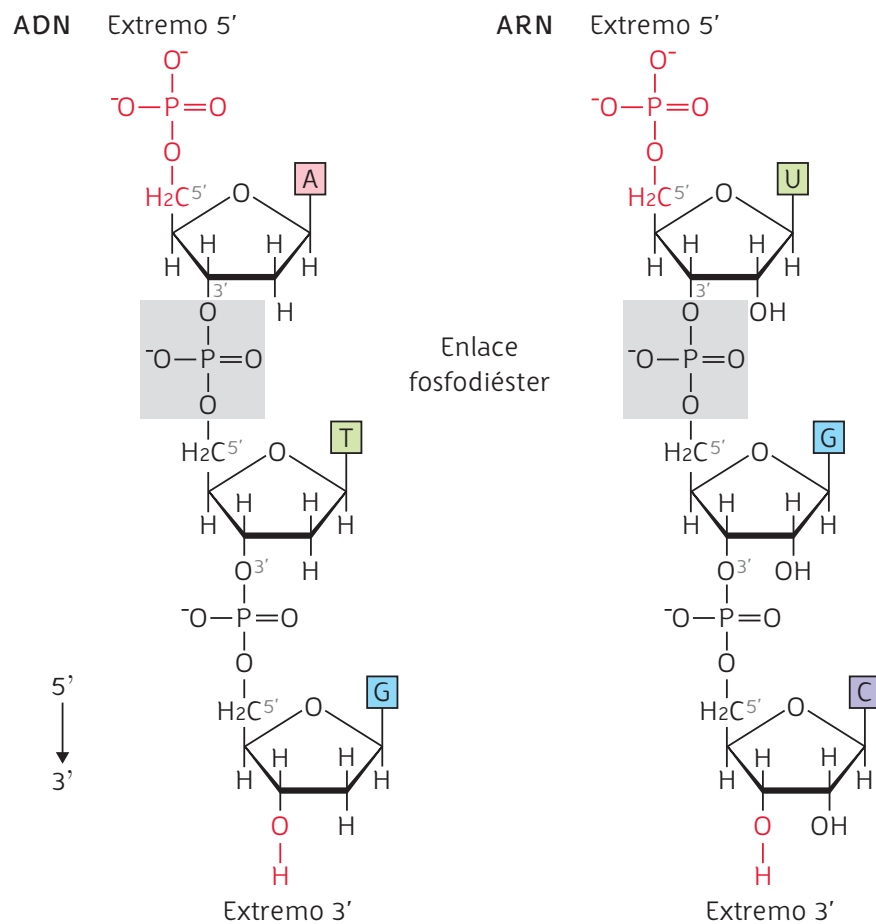


Fig. 5. Cadenas de nucleótidos donde se observan los enlaces fosfodiéster y la direccionalidad de ambas cadenas.

1.2. El ADN

El **ADN o ácido desoxirribonucleico** es el material hereditario donde reside la información genética para poder generar un nuevo organismo o célula.

Su **localización** depende del tipo celular que se observe:

Eucariotas	Procariotas
El ADN se encuentra principalmente en el núcleo de las células, también conocido como ADN genómico o ADNg . Además, en las células animales se halla el conocido ADN mitocondrial o ADNmt , mientras que en las vegetales se halla en las mitocondrias y en los cloroplastos (ADNcp).	En el caso de los procariotas (bacterias y arqueobacterias), el ADN se encuentra disperso por el citoplasma, y concretamente forma el nucleoide . Además, algunas bacterias contienen un ADN extracromosómico de replicación independiente conocido como ADN plasmídico .
Virus	
Los virus o agentes infecciosos no celulares pueden contener ADN o ARN como material genético envuelto en sustancias lipídicas o proteicas, pero nunca los dos juntos. A diferencia de las eucariotas y procariotas, este ADN puede ser monocatenario (ADNss) o incluso ARN bicatenario (ARNbc).	

Esquema 1. Localización de los diferentes tipos de ADN.

Respecto a su **organización**, el ADN presenta una **estructura básica o primaria** donde los nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster, en el que los nucleótidos (nt) tienen **direccionalidad** (extremo 5' y 3'), por lo que la información no se lee igual de un extremo a otro (véase la Figura 5). La **longitud o tamaño** de una molécula de ADN se refiere al número de nucleótidos por los que esté formada, pudiendo distinguir entre oligonucleótidos (<30 nt) o polinucleótidos (>30 nt). Además de la longitud, la **composición** y la **secuencia** sirven para caracterizar una molécula concreta, algo que será muy importante como veremos más adelante en procedimientos como la purificación de los ácidos nucleicos (UF Procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos), la PCR (UF PCR y electroforesis) o el diseño de las sondas para la hibridación (UF Técnicas de hibridación) y la secuenciación de ácidos nucleicos (UF Secuenciación de ácidos nucleicos).

La **estructura secundaria** del ADN resulta de la unión complementaria de dos cadenas de ADN mediante puentes de hidrógeno. Esto forma una **doble hélice o hebra bicatenaria (ADNds)**, la cual presenta una serie de características que hacen viable su formación en la naturaleza:

- Las cadenas son **antiparalelas**, es decir, cada hebra monocatenaria tiene una orientación diferente (ejemplo: 5'→3' y su complementaria será de 3'→5').
- Las cadenas se mantienen **equidistantes** enrolladas en un eje imaginario donde las bases nitrogenadas (hidrofóbicas) se encuentran en el interior, mientras que la pentosa y el grupo fosfato (hidrofílicas) se hallan en el exterior.

- El **principio de complementariedad** de bases permite que ambas cadenas se unan mediante puentes de hidrógeno entre los nucleótidos complementarios. La adenina se unirá siempre con la timina mediante dos puentes de hidrógeno ($A = T$); en cambio, la citosina se unirá siempre con la guanina mediante tres puentes de hidrógeno ($C \equiv G$). Por ello, el contenido total de A será igual al contenido de T, y lo mismo para C y G. Teniendo en cuenta esto, la composición de bases que hay en la hebra se suele referir como **%A-T** y **%G-C**. La característica de la complementariedad, junto al tamaño de la cadena del que hemos hablado antes, determinan las temperaturas con las que se trabaja con el ADN en algunas técnicas de biología molecular, ya que condicionan el número de puentes de hidrógeno que forman la hebra.
- La doble hélice es **dextrógira** (gira hacia la derecha) y **plectonémica** (se necesita desenrollar las cadenas para poder separarlas).

IMPORTANTE

El tamaño del ADN se mide en pares de bases (pb) y, al igual que ocurre con otras medidas físicas, se utilizan prefijos para describir el aumento de dicha medida.

Giga base $\rightarrow 1\text{Gb} = 10^9\text{pb}$; Mega base $\rightarrow 1\text{Mb} = 10^6\text{pb}$; Kilo base $\rightarrow 1\text{Kb} = 10^3\text{pb}$

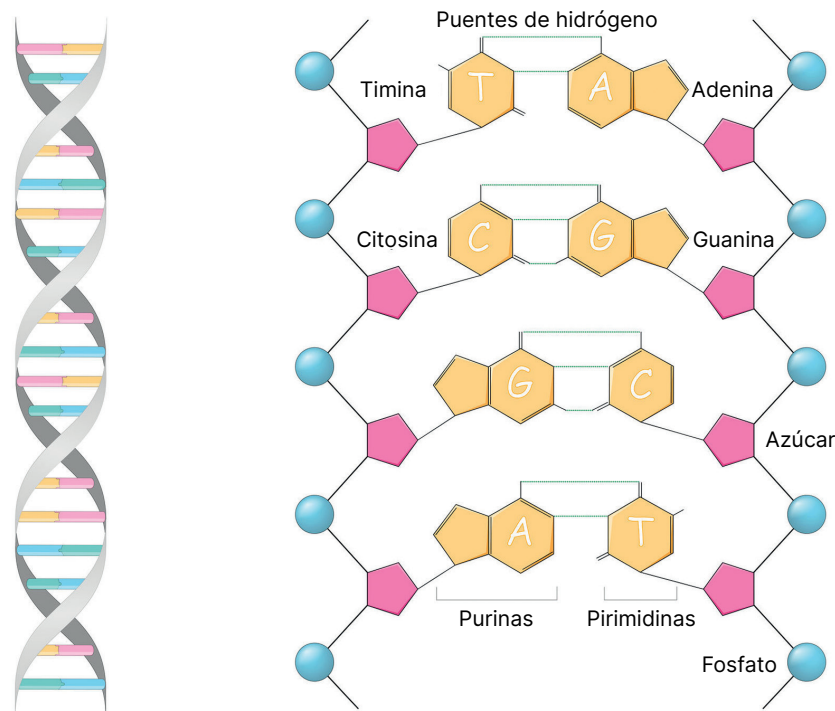


Fig. 6. Estructura secundaria del ADN. Izda.: estructura secundaria; dcha.: estructura primaria.

Se conoce como **ADN-B** a la estructura de doble hélice descrita por Waston y Crick, con la ayuda de Rosalind Franklin. Esto indica que el ADN puede adoptar diferentes estructuras, como son el **ADN-A** (en condiciones artificiales de baja humedad y temperatura) o el **ADN-Z** (con giro levógiro).

La **estructura terciaria** del ADN hace referencia a la forma tridimensional que presenta la molécula en las células, ya que, debido a su gran tamaño (el del genoma humano es de 3,05 Gb), debe estar compactado para poder almacenarse.

En procariotas se compacta para formar el **nucleoide** o cromosoma bacteriano. Este ADN es bicatenario y circular, con tamaños genómicos más pequeños que en eucariotas, como es el caso de la bacteria *Escherichia coli* que posee un tamaño de genoma entre 4,5 y 5,5 Mb. Además, poseen plásmidos con tamaños de unos miles de pares de bases (Kb).

En eucariotas, se compacta en forma de cromatina, donde el ADN se pliega gracias a la ayuda de una familia de proteínas llamadas **histonas**. También existen otras proteínas asociadas al ADN que no son histonas, como algunas enzimas o factores reguladores. Junto con las histonas, el ADN forma el **nucleosoma**, y estas organizaciones de nucleosomas se compactan para formar el **solenioide**, que dará lugar a una estructura superenrollada denominada **cromatina**.

El **grado máximo de compactación** se adquiere en la fase de división celular donde la cromatina se condensa en las **cromátidas** de los cromosomas metafásicos (véase la Unidad 3 para más información). Este ADN es bicatenario y lineal, dividido en 23 pares de cromosomas en humanos.

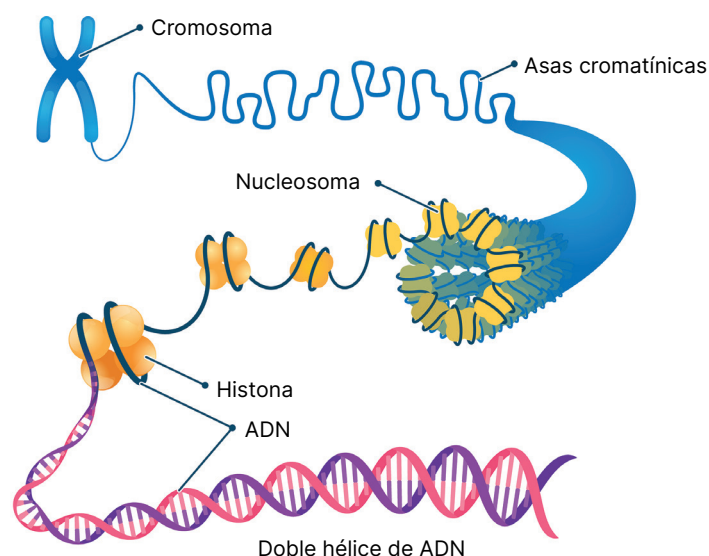


Fig. 7. Estructura terciaria del ADN.

Por último, todas estas características generan en el ADN unas propiedades fisicoquímicas específicas:

- **Desnaturalización** (separarse las cadenas) y **renaturalización** (unirse las cadenas).
- Tienen **carga negativa** debido al grupo fosfato.
- Máxima **absorbancia a 260 nm** (servirá para medir concentraciones, como veremos en la próxima unidad).

La **desnaturalización** es proceso por el cual se rompen los puentes de hidrógeno y, por ende, se separan las cadenas de la hebra de ADN. Esto se produce por el aumento de la temperatura o del pH del medio. El proceso contrario es la **renaturalización**, donde se unen las cadenas cuando se disminuyen la temperatura o el pH. La **hibridación**, al igual que la renaturalización, es el proceso de unión de cadenas complementarias pero que tienen orígenes distintos.



¿SABÍAS QUE...?

Un tipo de ADN especial es el **ADN complementario** (ADNc) que aparece como consecuencia de la retrotranscripción del ARNm, proceso inverso a la transcripción del ADN en ARN. Para ello se emplea como hemos visto, una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (ver epígrafe 2). Este ADN, está formado solamente por las regiones que provienen de los exones que se han transcrito al ARN, por lo que tiene la misma información codificante pero no la misma información total del gen a partir del cual se ha generado el ARNm.

1.3. El ARN

El **ARN** o ácido ribonucleico es el encargado, entre otras funciones, de transmitir la información contenida en el ADN para que la célula sea capaz de **sintetizar proteínas**. Es el más abundante de los dos. Su localización, a diferencia de lo que ocurre con el ADN, es muy diversa. En eucariotas y procariotas se puede encontrar en el núcleo (solo eucariotas), citoplasma, asociado a proteínas y fuera de las membranas celulares. En los virus, algunos contienen su información genética codificada directamente en ARN.

Su organización resulta mucho más simple que la del ADN, pues la mayoría de las moléculas de ARN son **monocatenarias (ARNss)**, de tamaño reducido (Kb) y lineales. Están formados por azúcares de ribosa y por cuatro bases nitrogenadas (A, U, C y G) que, al igual que en el ADN, se unen por enlaces de hidrógeno siguiendo este patrón (**A = U** y **C ≡ G**). Existen otras bases nitrogenadas que son modificaciones químicas de las cuatro anteriormente nombradas como la dihidrouridina (DHU), la metilguanósina (mG) o la pseudouridina (ψ).

Gran parte de estas moléculas, al ser monocatenarias, presentan apareamientos intracatenarios llamados **horquillas** y regiones no complementarias de bases denominadas **bucles**.

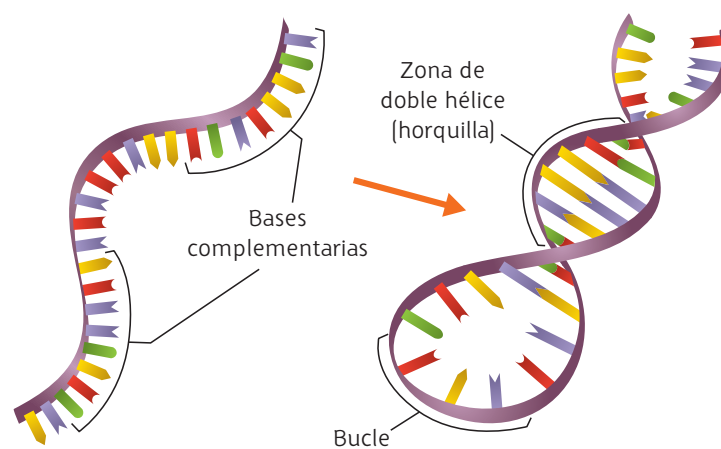


Fig. 8. Estructura terciaria del ADN.

Se ha identificado una gran cantidad de **tipos de ARN** que varían en su función y estructura, pero se describirán tan solo aquellos de mayor importancia biológica.

FUNCIONES	TIPOS DE ARN	DEFINICIÓN
Implicados en la síntesis de proteínas	ARN heterogéneo nuclear, transcrito primario o ARNhn	Es el sintetizado por la ARNpol en el proceso de transcripción. En eucariotas, actúa como molde para la producción del ARNm. En procariontes, es el molde para la síntesis de proteínas.
	ARN mensajero o ARNm	Contiene la información para la síntesis de proteínas (eucariotas).
	ARN ribosómico o ARNr	Forma los ribosomas junto con las proteínas.
	ARN transferente o ARNt	Transporta los aminoácidos hasta los ribosomas.

FUNCIONES	TIPOS DE ARN	DEFINICIÓN
Reguladores de la expresión génica	Micro ARN o ARNmi	Inhibe la traducción del ARNm.
	ARN interferente pequeño o ARNsi	Es monocatenario y elimina ARN virales o de origen endógeno.
Actividad catalítica (ribozimas)	ARN spliceosoma o ARN pequeño nuclear ARNsn (ARNsn o ARNpn)	Implicado en la maduración del ARNm eliminando los intrones.
	ARN pequeño nucleolar o ARNsno	Precursor de algunos ARNt y ARNr.
	ARN autocatalítico	Participa en la replicación del ARN de viroides (virus de plantas).

Tabla 1. Tipos de ARN clasificados según su actividad celular.

De todos los tipos de ARN nombrados, el **ARNm**, el **ARNt** y el **ARNr** son los de mayor importancia biológica y se explicarán en detalle a continuación.

A. ARNm

El **ARN mensajero** o ARNm contiene codificada en su cadena la secuencia de nt para dar lugar a una o varias proteínas. Dentro de las células existen miles de moléculas con diferentes tamaños que viajarán hasta los ribosomas para ser moldes de la síntesis de proteínas. Poseen una región de **iniciación** (**codón**: AUG) en el extremo 5' y una región de **terminación** en el extremo 3' (codones: UAA, UAG o UGA).

En **eucariotas**, tras el proceso de maduración del ARNhn a ARNm (que se explicará en el siguiente apartado), este ARN tiene una estructura característica formada por una caperuza (7-metilguanosina o m⁷G), un dominio regulador 5'UTR, una región codificante de proteína conocida como CDS, un dominio regulador de la traducción 3'UTR y una cola poliA en el extremo 3'. Son secuencias **monocistrónicas**, es decir, que codifican para una sola proteína.

En **procariotas**, la estructura del ARNm es diferente, pero no así su función. Hay que destacar que son **policistrónicas** (una única molécula de ARNm o ARNhn codifica para varias proteínas).

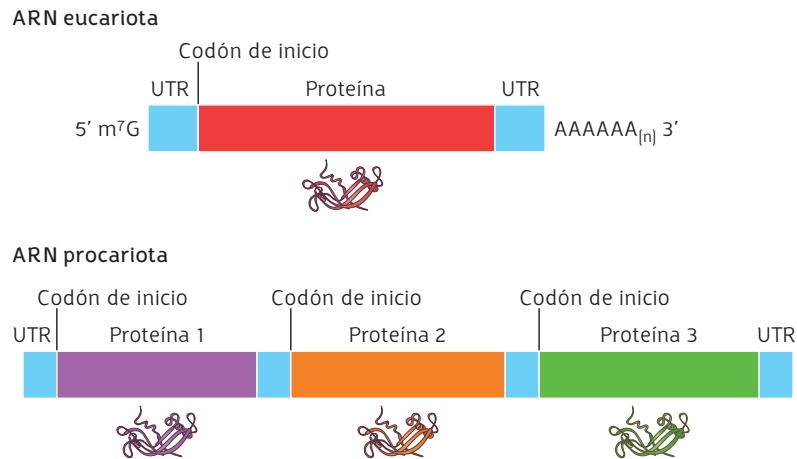


Fig. 9. Estructura del ARNm en procariotas y eucariotas.

B. ARNt

El **ARN de transferencia** o ARNt son cadenas de 75-90 nt de longitud que tienen una estructura muy peculiar parecida a un trébol de tres hojas. En humanos existen 60 tipos diferentes de ARNt. Presentan nucleótidos no usuales como DHU, mG o ψ , descritos anteriormente.

Esta organización tridimensional se produce por la complementariedad de bases de su secuencia monocatenaria, la cual está formada por cuatro horquillas y tres bucles o *loops* (regiones no complementarias) con funciones específicas. El **bucle anticodón** contiene los tripletes de bases complementarias al ARNm, el **bucle D** es el lugar de unión de la enzima aminoacil ARNt sintetasa y el **bucle T** es el lugar por donde se une al ribosoma.

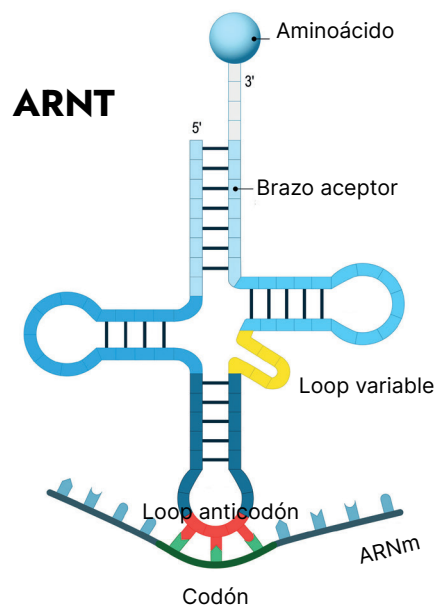


Fig. 10. Estructura del ARNt.

C. ARNr

En último lugar, el **ARN ribosómico** o ARNr está presente en los ribosomas, orgánulos celulares implicados en la producción de proteínas. Su estructura presenta plegamientos complejos que le permiten interactuar con proteínas y con otros ARNr y ARNt. Es el ARN más **abundante** de todos, ya que aproximadamente el 80% del ARN presente en la célula es ARNr.

Su asociación con proteínas forma los ribosomas, los cuales pueden dividirse, según el coeficiente de sedimentación (S), en dos subunidades: subunidad pequeña y subunidad grande.

TIPO CELULAR	TAMAÑO TOTAL	SUBUNIDAD GRANDE	SUBUNIDAD PEQUEÑA
Procariota	70S	50S (23S y 5S)	30S (16S + 21 proteínas)
Eucariota	80S	60S (28S, 5S y 5,8S)	40S (18S + 33 proteínas)

Tabla 2. Comparación de los ARNr entre procariotas y eucariotas.

1

CASO PRÁCTICO



CUESTIÓN DE PROPORCIONES

Como técnico y experto en el tema, se te pide que razones por qué los ARNr son los más abundantes (aproximadamente el 80% del total de ARN) en las células y, por el contrario, los ARNm, que generan todos los genes necesarios para la supervivencia de la célula, no alcanzan el 5% del ARN celular total.

SOLUCIÓN

El ARNr es uno de los componentes de los ribosomas, que son unos orgánulos celulares encargados de sintetizar las proteínas a partir del ARNm, en el proceso llamado traducción. La síntesis de proteínas es un proceso fundamental en la célula, por lo que se requiere una gran cantidad de ARNr para mantener la actividad ribosomal y la producción constante de proteínas. La cantidad de ARNm está regulada de forma muy precisa para controlar la expresión génica, así que la cantidad de ARNm permite a la célula ajustar la producción de proteínas según las señales internas y las condiciones ambientales.

Además, el ARNr es una molécula estructuralmente más estable, que se mantiene activo durante más tiempo en los ribosomas, mientras que el ARNm se degrada rápidamente después de haber sido traducido a proteínas.

02 Hipótesis central de la biología molecular

El ADN contiene la información genética recogida en sus cuatro bases nitrogenadas, la cual se divide en unidades funcionales llamadas **genes**. La información contenida dentro de estos sirve como guía para la producción de proteínas o ARN mediante un proceso conocido como **expresión genética**.

DEFINICIÓN

Se denomina **«dogma» central de la biología molecular** a la relación direccional que permite la producción de proteínas, a partir de los genes contenidos en el ADN con un paso intermedio de producción de ARNm.

No obstante, la biología es una ciencia dinámica que no se asienta sobre dogmas, razón por la cual, desde su descripción en 1970 por Francis Crick hasta la actualidad, han surgido nuevas excepciones que muestran que **no existe una única direccionalidad en el flujo de la información genética**.

Ejemplo de ello es la capacidad de algunos virus de pasar de ARN a ADN mediante una enzima llamada transcriptasa inversa o de autorreplicar su ARN sin necesidad de pasar por ADN. Además, los priones (agentes infecciosos que no contienen ácidos nucleicos, solo proteínas) tienen la capacidad de replicarse para formar más proteínas modificadas. Por último, algunos investigadores han generado proteína a partir de ADN, sin pasar por ARN, en experimentos *in vitro*.

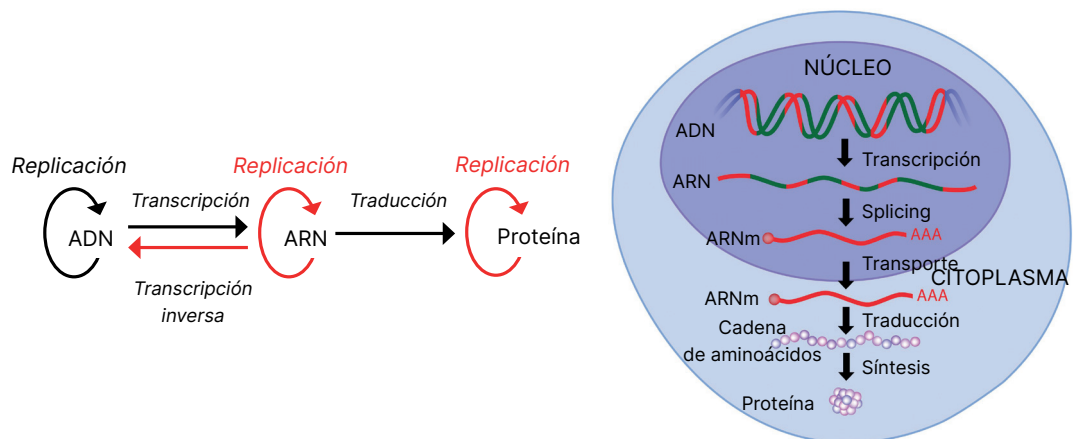


Fig. 11. Flujo de la información genética.

A continuación, trataremos cada uno de los procesos representados en la Figura 11 y se deberá prestar atención para identificar si los procesos ocurren en procariotas o eucariotas, ya que variarán bastante los pasos o proteínas asociados a cada uno de los procesos.

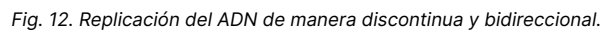
2.1. Replicación

DEFINICIÓN

La **replicación** del ADN es el proceso por el cual una célula duplica su material genético para poder pasarlo a su célula hija durante el proceso de división celular (ocurre en la **fase S** de la interfase), lo cual da como resultado dos moléculas de ADN con secuencias idénticas.

La replicación del ADN en eucariotas y procariotas presenta una serie de características comunes e importantes que se deben tener en cuenta:

- » **Origen de replicación.** *Loci* concretos donde empieza la replicación del ADN. En procariotas existe un único origen de replicación, mientras que en eucariotas existen varios lugares donde se inicia este proceso.
- » **Semiconservativa.** Al terminar la replicación, las dos moléculas de ADN generadas tendrán una cadena procedente de la hebra madre y otra cadena generada de nueva síntesis.
- » **Bidireccional.** La nueva cadena que se está generando ocurre a la vez en ambas hebras en dirección 5'→3', lo que provoca la formación de dos burbujas de replicación en los dos sentidos.
- » **Semidiscontinua.** Debido a que las ADN polimerasas tan solo polimerizan en sentido 5'→3' en cada hebra, siempre existirá una hebra adelantada o continua (con polimerización en sentido de la apertura de la burbuja de replicación) y otra retardada o discontinua, conocida por la formación de los **fragmentos de Okazaki** (con polimerización en sentido opuesto a la apertura de la burbuja de replicación).



ENZIMAS DEL REPLISOMA	FUNCIÓN
Primasa	Sintetiza cebadores de ARN para que la ADN pol puede comenzar la polimerización. Es una ARN polimerasa.
Ligasa	Une los fragmentos sellando los huecos existentes entre las cadenas sintetizadas mediante la formación de enlaces fosfodiéster.
Helicasa	Desnaturaliza las cadenas de ADN rompiendo los enlaces de puente de hidrógeno que unen las dos cadenas complementarias.
Proteína de unión a cadena sencilla o SSBP	Se encarga de mantener separadas las cadenas de ADN tras la acción de la helicasa.
Topoisomerasa	Su función es eliminar la tensión (superenrollamiento) surgida de la burbuja u horquilla de replicación a través de cortes en ambas cadenas. Dentro de esta familia de enzimas destaca la ADN girasa.
ADN polimerasa	Se encarga de crear las nuevas cadenas de ADN mediante la incorporación de nt, complementarios a la cadena molde (3'-5'), en los extremos 3' de las cadenas en construcción. Todas las ADN pol sintetizan las cadenas en dirección 5'→3'.

Tabla 3. Enzimas implicadas en la replicación del ADN.

En **eucariotas** existen seis ADN polimerasas diferentes (α , β , δ , ϵ , γ , ζ). Tres de estas (pol α , β , ϵ) son imprescindibles en la replicación del ADNg. Otras dos (pol β , ζ) intervienen en la reparación del ADN y la última de ellas (pol γ) está implicada en la síntesis del ADNmt.

En **procariotas**, en cambio, existen cinco ADN polimerasas (**pol I, II, III, IV, V**). La ADN pol I está implicada en la síntesis de las hebras retardadas. La ADN pol II participa en la reparación del ADN. La ADN pol III es la enzima principal encargada de la síntesis de las hebras conductoras. Y las ADN pol IV y V participan en mecanismos de reparación en caso de emergencia celular.

Debido a la gran complejidad que entraña la replicación en eucariotas, solo se explicarán las fases para la **replicación en procariotas**: la **fase de inicio** y la **fase de síntesis**.

A. Fase de inicio

La fase de inicio tiene lugar en las siguientes etapas:

1

Las **proteínas iniciadoras de la replicación** reconocen el origen de replicación (*OriC*), se unen al mismo, y se produce la activación de las helicasas.

2

La enzima **helicasa** se acopla a la hebra de ADN para romper los puentes de hidrógeno y se separan las dos cadenas que forman la hebra de ADN.

3

Entran las **proteínas SSBP** para sujetar las cadenas y evitar que vuelvan a juntarse, consiguiendo que el ADN no se renaturalice.

4

Las **topoisomerasas** cortan y pegan las hebras en las zonas de los extremos reduciendo la tensión en el resto de la doble hélice debido a la de la torsión de la hebra.

5

Las **primasas** sintetizan cebadores de ARN en sentido 3'→5' en ambas cadenas, proporcionando un extremo libre 3' para que la **ADN polimerasa III** pueda sintetizar el ADN.

B. Fase de síntesis

Durante esta fase, la ADN polimerasa III se une al ADN en la horquilla de replicación y comienza a duplicar el ADN, pero debido a su estructura antiparalela (véase apartado 1.2., página 8), esta síntesis se realiza de forma diferente en cada cadena. Podemos hablar entonces de dos hebras, una **conductora** y otra **retardada**. Aunque el proceso se produce de forma simultánea, vamos a explicar por separado lo que ocurre en cada hebra:

Hebra conductora

La polimerasa sintetiza la cadena de forma continua en sentido 5'→3', ya que la horquilla se va desenrollando en este sentido.

En primer lugar, la ADN polimerasa reconoce el extremo 3' libre del cebador y se une a la cadena que debe copiar y va incorporando nucleótidos complementarios a la cadena molde uniéndolos mediante enlace fosfodiéster. Esta enzima solamente presenta actividad exonucleasa en dirección 3'→5', por lo que no es capaz de eliminar los ribonucleótidos que forman el cebador de ARN. Esto tendrá lugar al final del proceso, y será llevado a cabo por otra enzima.

Hebra retardada

Para copiar la hebra retardada, la horquilla se desenrolla en sentido 3'→5', y debido a esto, la polimerasa no puede sintetizar la nueva cadena de forma continua, ya que no es capaz de leer la cadena en este sentido, por lo que debe ir haciéndolo en forma de fragmentos discontinuos llamados **fragmentos de Okazaki**.

Para sintetizar cada uno de estos fragmentos, se debe formar un cebador de ARN corto por la primasa. Luego, la ADN polimerasa III extiende el cebador con nucleótidos de ADN desde su extremo libre 3', y cada vez que termina de sintetizar un fragmento de Okazaki, la polimerasa se desplaza hacia atrás a lo largo de la hebra molde para sintetizar el siguiente fragmento. Los fragmentos de Okazaki recién sintetizados se unirán después mediante la acción de la ligasa.

Cuando finaliza esta segunda fase, tanto en una hebra como en la otra, los ribonucleótidos que formaban los cebadores son sustituidos por desoxirribonucleótidos por la **ADN polimerasa I** y la **ligasa** crea nuevos enlaces fosfodiéster para eliminar las mellas o huecos generados, de forma que las nuevas cadenas sean continuas.

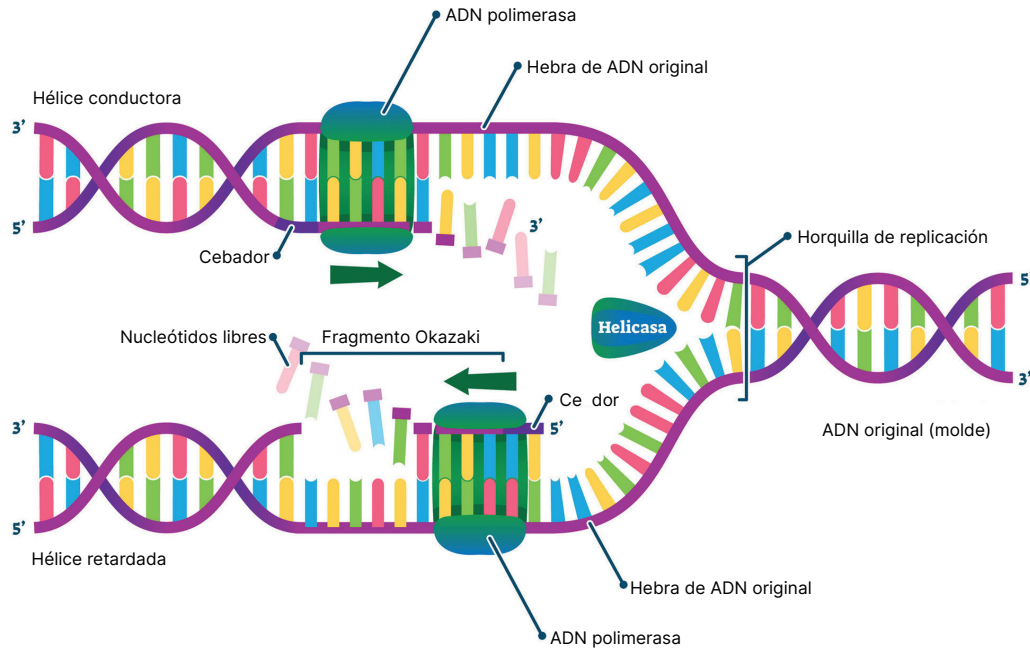


Fig. 13. Replicación del ADN en procariotas.

2.2. Transcripción

El **proceso de transcripción** implica el primer paso de la **expresión genética** donde una de las dos cadenas de ADN se transfiere a una secuencia complementaria de ARN. Este ARN inicial se conoce como ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), transcrito primario, ARN inmaduro o pre-ARNm.

La enzima principal implicada en este proceso es la **ARN polimerasa o transcriptasa**, que lee los nucleótidos de ADN de la cadena molde y sintetiza la cadena de ribonucleótidos complementarios.

IMPORTANTE

En **procariotas**, solo hay un ARN polimerasa o ARN polimerasa, mientras que en **eucariotas** existen tres tipos de ARN polimerasa (pol I, II, III). La ARN polimerasa I sintetiza precursores del ARN ribosómico, la ARN polimerasa II precursores del ARN mensajero, y la ARN polimerasa III, se encarga del ARN ribosómico y ARN de transferencia.

También existen otras proteínas necesarias para que ocurra este proceso, como son los **factores de transcripción**, proteínas que se unen a regiones concretas de ADN (promotores) para indicar qué región o gen del genoma se debe transcribir a ARN.

Al igual que en la replicación, para facilitar la comprensión se explicará el proceso de transcripción en procariotas dividiéndolo en tres fases diferentes: **iniciación, elongación y terminación**.

A. Fase de iniciación

Comienza por la unión de los **factores de transcripción** a las regiones promotoras, las cuales se ubican antes de los genes que controlan y mandan señales para que se una a la **ARN pol** que, junto con otras proteínas que desnaturalizan el ADN, da paso a la siguiente fase de elongación.

B. Fase de elongación

En esta fase la ARN pol se desliza en dirección 3'→5' (dirección de lectura) por una de las dos cadenas molde de ADN, sintetizando ribonucleótidos complementarios a los desoxirribonucleótidos de la secuencia de ADN. El crecimiento de la cadena de ARN es en dirección 5'→3' (dirección de síntesis).

C. Fase de terminación

Ocurre cuando la ARN pol, tras reconocer una secuencia específica de terminación (**Rho independiente**), provoca la detención de esta y la liberación de la cadena de ARN recién sintetizada. También existe otra forma de finalizar este proceso, conocida como **terminación dependiente de Rho**. El factor Rho es una proteína que sigue a la cadena de ARN hasta que se encuentra con la ARN pol y detiene su actividad, con lo que se da por finalizado el proceso.

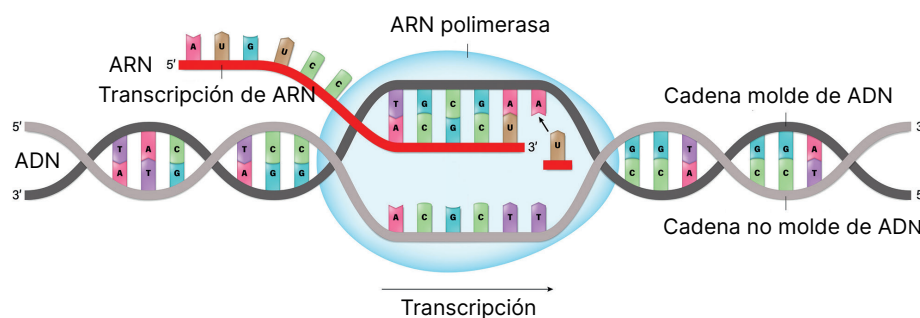


Fig. 14. Transcripción en procariotas.

2.3. Maduración

DEFINICIÓN

Se denomina **maduración** al proceso por el cual, a partir de un ARN transcrito primario, se originan el resto de ARN, como el ARNm. Como se ha visto durante este apartado, existen diferencias entre la maduración en procariotas y en eucariotas.

En **procariotas** este proceso es más simple, pues únicamente se realizan una serie de cortes que dan lugar a los diferentes tipos de ARN. El ARNm de estos organismos **no requiere de modificación** previa, debido a que toda la secuencia nucleotídica contenida en la hebra de ARN se traducirá a proteína. Cabe destacar que, en las bacterias, la traducción puede empezar antes de que finalice la transcripción mediante el acoplamiento de los ribosomas a los extremos 5' de los ARNm.

En **eucariotas**, este mecanismo es más complicado, ya que las secuencias transcritas contienen dos tipos de regiones, conocidas como **intrones y exones**. Además, al hallarse dentro del núcleo, el ARNm debe salir de este para poder ser traducido en los ribosomas que se encuentran en el citoplasma, por lo que se deben **identificar y proteger** ambos extremos de la cadena de **ARNm**.

DEFINICIÓN

Los **intrones** son regiones del ADN transcritas y que **no codifican para proteínas**, por lo que habrá que eliminarlos para no que no se traduzcan.

Los **exones** o regiones codificantes, que son las secuencias que contienen la información para **síntesis de proteínas**, se transcriben y se traducen.

Los pasos para la maduración del ARN en eucariotas son los siguientes:

- » **Adición de caperuza en 5'.** Se añade una caperuza 7-metilguanosina (m^7G) durante la fase de elongación de la transcripción en eucariotas. Esta tiene función de **protección del ARNm** cuando salga del núcleo, ya que en el citoplasma existen proteínas que eliminan los ARN extraños que no se identifican como propios.
- » **Ajuste o *splicing*.** Proceso de eliminación de los intrones y de empalme de los exones que ocurre durante la transcripción. Los intrones contienen los llamados **sitios de empalme**, que son secuencias cortas de nucleótidos que pueden ser sitios de empalme 5' (donantes) y sitios de empalme 3' (aceptores), que serán reconocidas

por los ARNsn que, junto con otras proteínas llamadas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o RNPSn, forman el complejo del espliceosoma encargado de eliminar estos intrones. Para reconocer los sitios de empalme, se produce una interacción entre secuencias de nucleótidos del ARN precursor y las proteínas y el ARN del espliceosoma. Una vez que se han identificado los sitios de empalme, tienen lugar dos reacciones:

- En la primera se forma un enlace entre el extremo 5' del intrón y un nucleótido del propio intrón, libereando el extremo 3' del exón 1.
- En la segunda se forma el enlace entre el extremo 3' del intrón 1 y el extremo 5' del exón 2, liberando el intrón en forma de estructura de lazo. Esta estructura es rápidamente degradada por enzimas específicas.

Existen casos donde los intrones se eliminan y los exones se reagrupan de maneras diferentes, es decir, que para un mismo gen existen diferentes ARNm (**splicing alternativo**). Esto aporta variabilidad genética a los organismos debido a que un mismo gen puede codificar diferentes proteínas, denominadas **isoformas**, dependiendo del número y la posición de los exones que contenga el ARNm maduro.

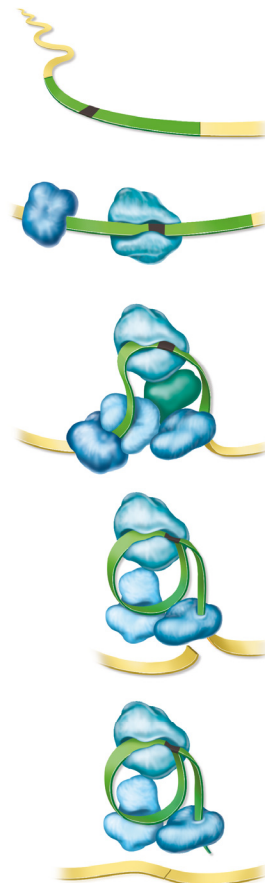


Fig. 15. Proceso de splicing del ARN.

- » **Poliadenilación del extremo 3'.** Una vez finaliza la transcripción, se produce un corte por una endonucleasa (enzima que corta dentro de una secuencia nucleotídica) en la secuencia AAUAA, lo que deja libre el extremo 3'. Finalmente, a este extremo se le añadirán ribonucleótidos de adenina para generar una cola poliA en el extremo 3'.

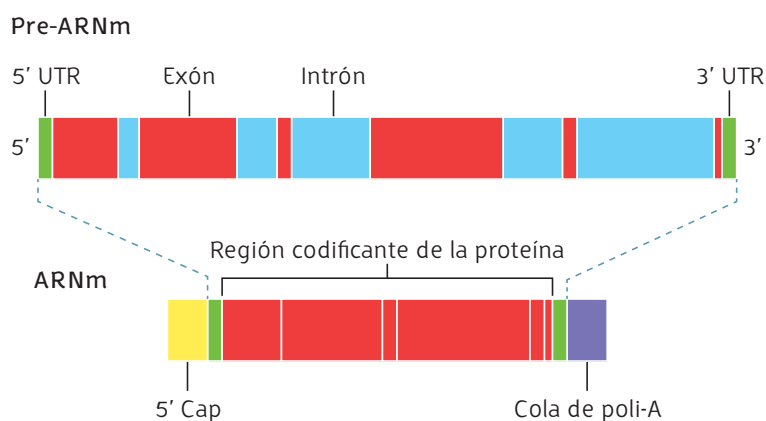


Fig. 16. Maduración del ARNm en eucariotas.

2.4. Traducción

DEFINICIÓN

La **traducción** es el proceso que permite extraer la información contenida en el ARNm para que pueda traducirse en diferentes aminoácidos, los cuales acabarán formando las proteínas o polipéptidos.

Para que a partir de una secuencia de ARNm se formen polipéptidos, es necesario que la maquinaria celular tenga algún tipo de referencia que le permita convertir con precisión cada **tripleto o codón** (conjunto de tres nucleótidos de ARNm) en un determinado aminoácido. Esto es gracias al **código genético**, un tipo de «diccionario biológico» que contiene los 64 posibles codones, cuatro nucleótidos posicionados en tres posibles posiciones del tripleto (4^3), que formarán cada uno de los 20 aminoácidos.

Para entender mejor las características del código genético y, por ende, de la traducción, se describirán las siguientes **propiedades del código genético**:

- » **No ambiguo.** Cada tripleto codifica para un único aminoácido.

- » **Degenerado.** Un aminoácido puede ser especificado por más de un codón. Esto ocurre para 18 de los 20 aminoácidos, solo la metionina (M) y el triptófano (W) son codificados por un único codón.
- » **Delimitado.** El código genético contiene codones de inicio (AUG) y de terminación (UAA, UAG y UGA) de la traducción.
- » **Continuo.** Se dice que no contiene comas, es decir, que una vez iniciada la traducción los codones se leen de forma ininterrumpida.
- » **No solapado.** Cada nucleótido o posición específica del ARNm solo puede formar parte de un único codón. A esto se lo conoce como la **pauta de lectura**.
- » **Universal.** Todos los organismos (procariotas y eucariotas) y agentes infecciosos comparten el mismo código genético. Existen algunas excepciones, como el ADNmt humano, donde el codón UAG, que debería ocasionar la terminación de la traducción, genera el aminoácido W. También se ha observado en algunas bacterias y protozoos ciliados.

		Segunda base de ARNm					
		U	C	A	G		
Primera base de ARNm (extremo 5')	U	UUU Phenylalanine	UCU Serine	UAU Tyrosine	UGU Cysteine	U	
		UUC	UCC	UAC	UGC	C	
		UUA Leucine	UCA	UAA STOP	UGA STOP	A	
		UUG	UCG	UAG	UGG Tryptophan	G	
C		CUU Leucine	CCU Proline	CAU Histidine	CGU Arginine	U	
		CUC	CCC	CAC	CGC	C	
		CUA	CCA	CAA Glutamine	CGA	A	
		CUG	CCG	CAG	CGG	G	
A		AUU Isoleucine	ACU Threonine	AAU Asparagine	AGU Serine	U	
		AUC	ACC	AAC	AGC	C	
		AUA	ACA	AAA Lysine	AGA Arginine	A	
		AUG START Methionine	ACG	AAG	AGG	G	
G		GUU Valine	GCU Alanine	GAU Aspartic acid	GGU Glycine	U	
		GUC	GCC	GAC	GGC	C	
		GUA	GCA	GAA Glutamic acid	GGA	A	
		GUG	GCG	GAG	GGG	G	

- nonpolar
- polar
- basic
- acidic
- stop codon

Fig. 17. Diccionario del código genético.

Para que ocurra el proceso de traducción, en este proceso son imprescindibles varios **componentes**, que se detallan a continuación.

COMPONENTES DE LA TRADUCCIÓN	FUNCIÓN
Factores de iniciación (IF)	Proteínas que se unen al ribosoma para iniciar la traducción.
ARNm	Lleva la información para la codificación de los polipéptidos.
ARNt	Transporta los aminoácidos hasta los ribosomas.
Aminoacil ARNt sintetasa	Enzima que carga los ARNt, en el extremo 3', con su aminoácido correspondiente.
Peptidil transferasa	Enzima que cataliza la formación del enlace peptídico, es decir, que une los aminoácidos de la cadena polipeptídica en crecimiento.
Subunidad pequeña del ribosoma	Lugar donde se unirá el ARNm que traducir.
Subunidad grande del ribosoma	Estructura del ribosoma que contiene tres sitios destacables: sitio A o aminoacil (se une el ARNt complementario al codón del ARNm), sitio P o peptidil (se sitúa la cadena polipeptídica en crecimiento) y sitio E (lugar de salida de los ARNt no cargados).
Factores de liberación	Proteínas que cortan la cadena polipeptídica del ARNt terminal y liberan el complejo de traducción.

Tabla 4. Enzimas implicadas en la traducción del ADN.

El proceso de traducción implica tres fases que se explicarán a continuación: iniciación, elongación y terminación.

A. Fase de iniciación

Comienza cuando el ARNm se une a la subunidad pequeña del ribosoma junto con los **factores de iniciación**. Acto seguido, otras proteínas del complejo de iniciación facilitan la unión del **ARNt_{met}** (codón de inicio que codifica para una **metionina**; la gran mayoría de los organismos comienzan las cadenas polipeptídicas con este aminoácido). Tras este paso, la subunidad grande se une al complejo para liberar los factores de iniciación y facilitar la unión del ARNt_{met} al **sitio A**.

B. Fase de elongación

Comienza cuando un segundo ARNt cargado se une al sitio A y desplaza al ARNt_{met}. La **peptidil transferasa** catalizará el enlace peptídico, lo que provocará el desplazamiento de la subunidad pequeña tres bases hacia la dirección 3'. El ARNt saldrá por el **sitio E** mientras que el dipéptido se encontrará en el **sitio P**. A continuación, llegará otro ARNt cargado y complementario al tercer codón del ARNm, donde se formará la unión del nuevo péptido creando una **cadena tripeptídica en el sitio P**. Este proceso se repetirá hasta que se alcance el codón *stop* o de terminación.

C. Fase de terminación

Ocurre cuando el proceso reconoce un **codón de terminación** (UAG, UAA y UGA), ya que estos codones no codifican para ningún aminoácido, por lo que no llaman a un nuevo ARNt para situarse en el **sitio A**. Pero este codón *stop* será reconocido por los factores de liberación que liberarán la proteína recién generada del complejo de traducción.

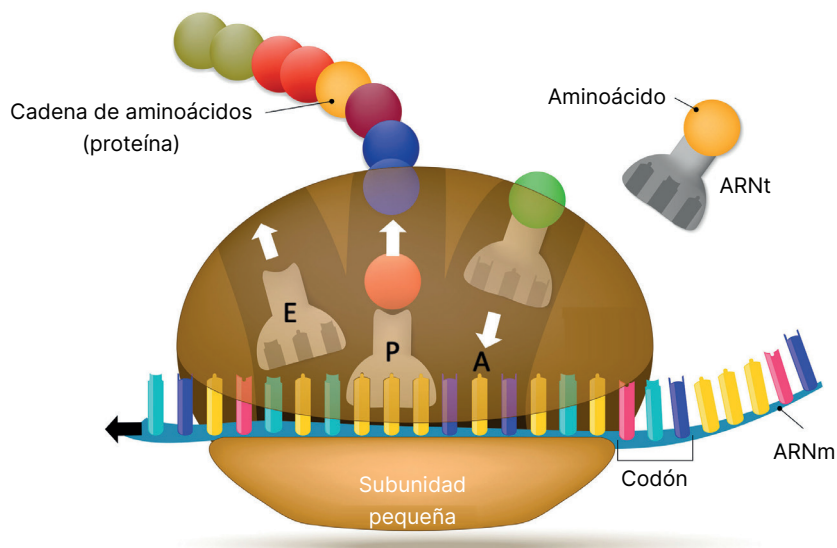


Fig. 18. Traducción del ARNm a proteína.

Debido a que las células necesitan producir muchas proteínas en cortos periodos de tiempo, la evolución ha permitido que varios ribosomas se puedan unir a un único ARNm, lo que da como resultado la producción de muchas proteínas. Si estos procesos se observan al microscopio electrónico, se ven los denominados **polirribosomas o polisomas** (Figura 19).

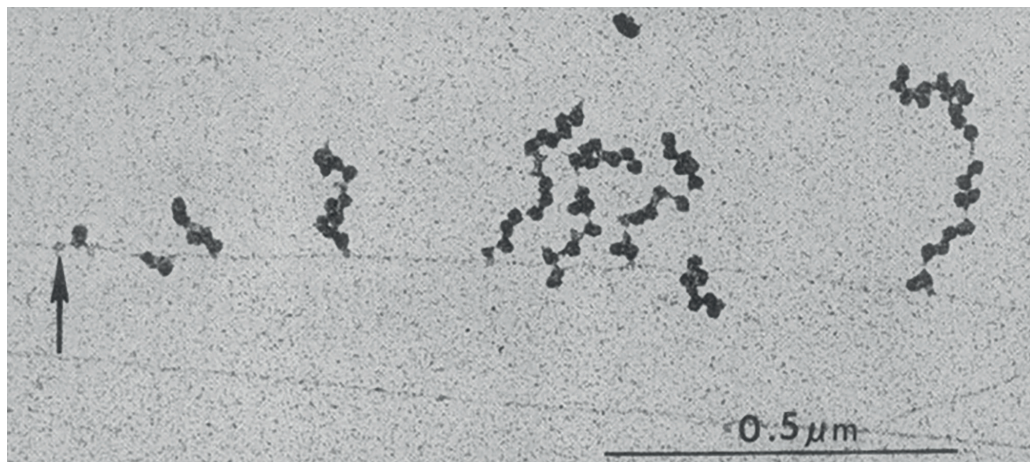


Fig. 19. Polisomas asociados al cromosoma de E. coli. Tomado de: <https://go.nature.com/3zeQnol>.

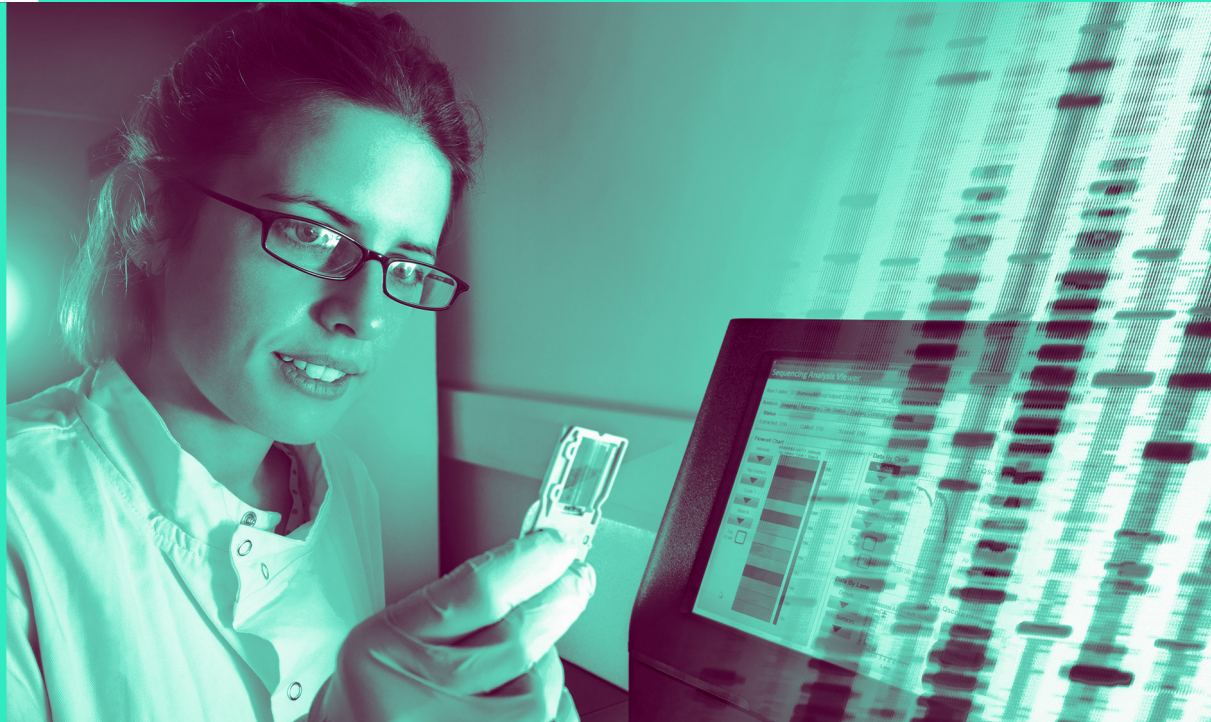


VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente video sobre el **proceso en que un gen se transforma en proteína**, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

2

CASO PRÁCTICO



TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN

En eucariotas, el ARN^{hn} debe madurar para formar el ARN^m, eliminando los intrones y empalmando los exones. También debe protegerlo con una serie de modificaciones en los extremos de la cadena de ARN^m.

¿Por qué en procariotas no se debe madurar el ARN^m y este se traduce directamente? Razona tu respuesta.

SOLUCIÓN

La gran mayoría de genes en eucariotas contienen regiones no codificantes (intrones) que deben eliminarse antes de traducirse a proteínas. De hecho, en los organismos eucariotas prácticamente la totalidad del genoma son regiones intrónicas.

En cambio, los procariotas no tienen casi regiones intrónicas, por lo que la mayoría de sus genes no necesitan eliminar estas regiones. Además, al tener su genoma libre por el citoplasma, no necesitan añadir ni caperuza ni cola para protegerlo, y tienen otras formas de identificar y proteger su propio ADN del ADN exógeno.

03 Enzimas de restricción y otras enzimas

Antes de explicar las enzimas más importantes en biología molecular, es primordial saber qué es una proteína y en qué consisten sus características esenciales.

DEFINICIÓN

Las proteínas **son secuencias lineales** de aminoácidos que desarrollan diversas funciones en las células. Pueden estar constituidas por una cadena (**monoméricas**) o varias cadenas polipeptídicas (**oligoméricas**). Son necesarias para la correcta estructura, regulación y función de cualquier organismo o agente infeccioso. Hay que recordar que los extremos de las proteínas están delimitados por un **grupo amino** ($-\text{NH}_2$), en un extremo, y por un **grupo carboxilo** ($-\text{COOH}$), en el otro.

En las proteínas se pueden encontrar las siguientes estructuras:

- » **Estructura primaria:** está presente en todas las proteínas y es la secuencia lineal de aminoácidos que la componen. Está determinada por la secuencia de nucleótidos en el ADN que codifica para la proteína.
- » **Estructura secundaria:** se refiere a la organización localizada de la cadena polipeptídica que se pliega de distintas formas gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Se pueden encontrar patrones regulares como hélices alfa y láminas beta.
- » **Estructura terciaria:** hace referencia a su plegamiento tridimensional único y específico, que está determinado por las interacciones entre los grupos laterales de los aminoácidos que están en la cadena, incluyendo enlaces de hidrógeno, puentes disulfuro y fuerzas de Van de Waals.
- » **Estructura cuaternaria:** algunas proteínas están formadas por varias subunidades que se ensamblan para formar una estructura funcional completa. Esta estructura no está presente en todas las proteínas, y se refiere a la organización tridimensional de estas subunidades y sus interacciones entre sí.

Según su función biológica, se pueden clasificar en varios grupos, claramente definidos:

TIPOS	FUNCIÓN
Transportadoras	Permiten el paso de iones o metabolitos hacia el interior o el exterior de la célula. Ejemplo: ATPasa.
Contráctiles	Cambian de longitud de manera reversible. Ejemplo: actina.
Estructurales	Mantienen la estructura de moléculas, células y tejidos. Ejemplo: colágeno.
Hormonales	Trasmiten señales para la correcta regulación del metabolismo. Ejemplo: insulina.
Receptoras	Transducen señales desde el exterior hasta el interior celular. Ejemplo: tirosina quinasa.
Enzimáticas	El grupo más numeroso en cuanto a tipos de proteínas, que está constituido por proteínas efectoras que catalizan reacciones metabólicas. Ejemplo: enzimas de restricción.

Tabla 5. Tipos de proteínas ateniéndose a su función biológica.

De todos los tipos presentes en la tabla anterior, se destacarán las **enzimas**. Estas proteínas se identifican rápidamente por contener en su nombre el **sufijo «-asa»**. Debido a su amplia diversidad, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (**IUPAC**) clasifica a las enzimas en seis grandes grupos:

- » **Oxidoreductasas.** Grupo 1. Estas proteínas realizan las reacciones de óxido-reducción. Ejemplo: citocromo c oxidasa.
- » **Transferasas.** Grupo 2. Son las que transfieren un grupo químico de un donador a un aceptor. Ejemplo: ADN polimerasas.
- » **Hidrolasas.** Grupo 3. Ruptura hidrolítica (perdida de una molécula de agua) de enlaces. Ejemplo: enzimas de restricción.
- » **Liasas.** Grupo 4. Ruptura no hidrolítica de los enlaces. Ejemplo: acetato descarboxilasa.
- » **Isomerasas.** Grupo 5. Realizan reacciones de isomerización (modificación de la posición de algunos radicales). Ejemplo: topoisomerasa.
- » **Ligasas.** Grupo 6. Forman enlaces covalentes entre dos moléculas. Ejemplo: ADN ligasa.



¿SABÍAS QUE...?

Todas estas enzimas que vamos a tratar en los siguientes apartados están disponibles en el mercado y se pueden adquirir a través de los laboratorios que las comercializan.

DEFINICIÓN

3.1. Enzimas de restricción

Las **enzimas de restricción, restrictasas** o nucleasas son un tipo de enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas. Estas proteínas cortan y **degradan** el ADN (**ADNasas**) o ARN (**ARNasas**) mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos.

Según donde se sitúen los enlaces que cortan, se pueden clasificar a su vez en **endonucleasas** (cuando rompen enlaces internos) o **exonucleasas** (cuando rompen enlaces de los nucleótidos que se sitúan en los extremos de las cadenas). En el centro activo de algunas ADN polimerasas tiene lugar la actividad exonucleasa que utilizan para corregir errores tras incorporar erróneamente nucleótidos.

La mayoría de las nucleasas degradan moléculas **bicatenarias** de nucleótidos, pero existen algunas pocas que son capaces de cortar moléculas **monocatenarias**. Por otro lado, algunas nucleasas son capaces de reconocer **secuencias concretas** y cortan próximas a ellas; otras, en cambio, cortan de manera **aleatoria**.

Las nucleasas más utilizadas en biología molecular son las **endonucleasas que cortan el ADN bicatenario en sitios concretos o tipo II**. Estas se extraen de las bacterias que las utilizan como una barrera de defensa frente a fagos (virus que infectan tan solo bacterias) o ácidos nucleicos exógenos. Este tipo de endonucleasa genera dos tipos de extremos al cortar las cadenas (Figura 20):

- » **Extremos romos.** Es un corte recto en ambas cadenas, es decir, que las dos cadenas de ADN se cortan por el mismo punto.
- » **Extremos cohesivos.** El corte se produce en una región concreta, pero por diferentes puntos en cada cadena.

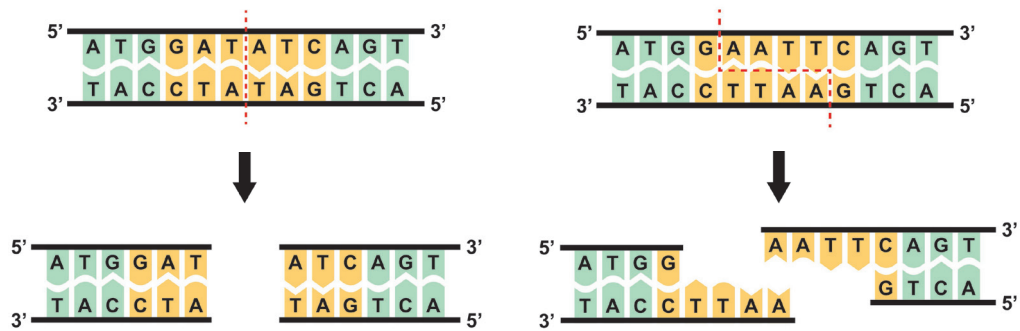


Fig. 20. Tipos de cortes de las endonucleasas de restricción. Izda.: extremos romos; dcha.: extremos cohesivos.

Estas enzimas **se nombran con tres o cuatro letras**, según si provienen de una cepa bacteriana o no, y **con un número romano**, en este orden. La primera letra corresponde al **género de la bacteria** de la que se ha extraído dicha enzima. La segunda y la tercera letra pertenecen a la **especie** en concreto. La cuarta letra, si se diera el caso, pertenece al tipo de cepa de la determinada especie. Y el número romano hace referencia al **orden en que se ha aislado la nucleasa** de la especie, ya que es posible que para una especie existan varias enzimas catalogadas.

Ejemplo de lo anterior sería la enzima **BamH I**, primera nucleasa extraída de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* H (la H hace referencia a la cepa).

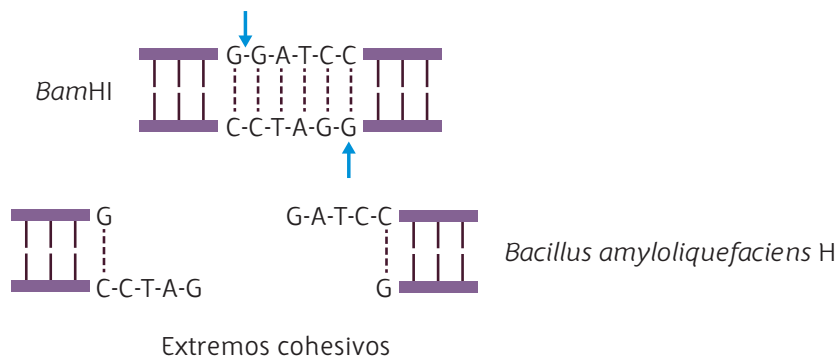


Fig. 21. Algunas enzimas de restricción. Adaptado de: William S. Klug, *Conceptos de genética*, ISBN 978-8415552499.

Un tipo de enzimas que se han descubierto recientemente y que también cortan el ADN, son las Cas9 (*CRISPR associated protein 9*). Estas nucleasas, de origen bacteriano, no se consideran enzimas de restricción en el sentido clásico, como EcoRI o HindIII, porque se dirigen a secuencias específicas del ADN mediante el emparejamiento de bases entre una secuencia de ARN guía y la secuencia de ADN objetivo. Una vez que las Cas9 encuentran su objetivo, realizan un corte en la doble cadena en un sitio concreto. En la naturaleza, actúan como un sistema inmunológico que defiende a las bacterias de virus y ADN exógeno que las pueden dañar.

Estas enzimas se usan en la técnica CRISPR-Cas9, desarrollada muy recientemente y que se ha convertido en una herramienta muy potente para la edición genética tanto en humanos como en otras especies (Más información en la siguiente página web: bit.ly/3UkZ77t)

Estas nucleasas de restricción son de gran utilidad en los laboratorios de biología molecular, ya que permiten **diagnosticar mutaciones**, clonar (se refiere al proceso de multiplicar secuencias, genes o incluso genomas) secuencias de ADN, realizar **estudios filogenéticos** o **incluso identificar individuos** a partir de muestras de ADN.

Aunque actualmente existen técnicas como la **PCR o la secuenciación** que permiten realizar de manera precisa, barata y en menor tiempo algunas de estas técnicas, todavía se siguen utilizando las enzimas de restricción para algunos procesos como la generación de ADN recombinante.

La **generación de ADN recombinante** es la introducción de ADN exógeno dentro de otro organismo, normalmente dentro de una bacteria o levadura. Para ello, hace falta extraer y aislar el ADN problema. Después, se busca una endonucleasa que permita cortar la región de interés del ADNg y que, a su vez, corte el plásmido donde se insertará esta región o gen. Para unir ambos fragmentos, se utiliza una ligasa que unirá los huecos dejados por el corte de las nucleasas. Ejemplo de esta técnica es la **generación de insulina** recombinante en levaduras que permite generar la proteína de la insulina humana (INS) en grandes cantidades y, así, salvar millones de vidas cada día.

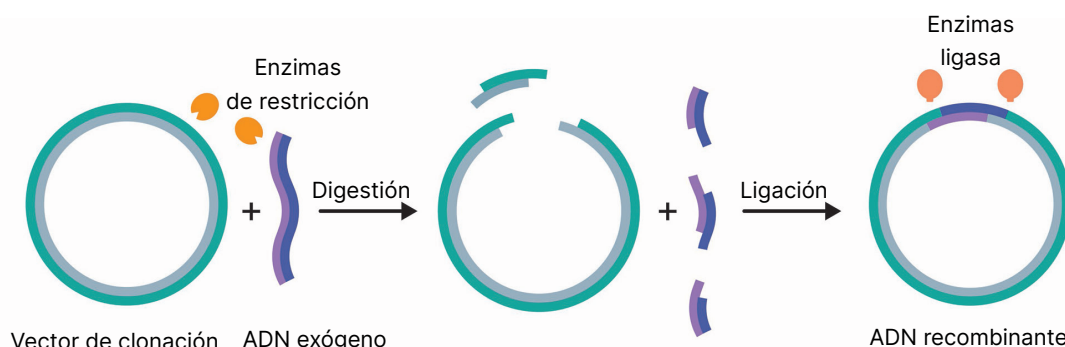


Fig. 22. Procesos de generación de ADN recombinante.

3.2. Otras enzimas

Existen multitud de enzimas utilizadas en procesos biológicos y citogenéticos. Así pues, para tratar de facilitar la comprensión, vamos a distinguir algunas de las proteínas más ampliamente utilizadas en los laboratorios y empresas biotecnológicas.

Las **ADN polimerasas** se utilizan prácticamente para cualquier técnica de biología molecular debido a que, una vez **extraído y purificado** el ADN, este se debe copiar miles de veces para poder utilizarse en los procesos o investigaciones correspondientes. Técnicas como la **PCR**, la **secuenciación** o la **hibridación** necesitan de la acción de estas enzimas para llevarse a cabo.

Existen **varios tipos** de ADN polimerasa atendiendo a su poder de polimerización o a su capacidad de corrección de errores o actividad exonucleasa.

Cabe destacar la **Taq polimerasa**, que es la enzima más utilizada en la industria. Se trata de una polimerasa **termoestable** (capaz de mantenerse estable a temperaturas mayores de 90 °C) extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*. Polimeriza en dirección 5'→3' pero no presenta corrección de errores, es decir, no tiene actividad exonucleasa 5'→3'.

Se ha descrito anteriormente que la enzima **ligasa** une fragmentos de ADN de forma covalente, de lo que se deriva la utilidad de esta enzima en muchas técnicas de biología molecular, como la clonación de genes, la secuenciación de ADN, la creación de genotecas y la modificación del genoma.

Por otro lado, la enzima **TdT** o desoxinucleotidil transferasa terminal **añade** nucleótidos de ADN al extremo 3' de una molécula de ADN sin necesidad de un cebador ni de una cadena molde. Se usa para el diseño de sondas marcadas con nucleótidos modificados.

Otras enzimas ampliamente utilizadas son las **transcriptasas reversas**, ADN polimerasas extraídas de los virus que generan moléculas de ADN a partir de cadenas de ARN, usadas como molde. Estas se utilizan en procesos de detección de **SARS-CoV-2** en personas o técnicas de diagnóstico basadas en la hibridación de ácidos nucleicos.

3

CASO PRÁCTICO



ADN POLIMERASA EN LA INDUSTRIA

Desde el Departamento de Citogenética te piden que compres una nueva ADN polimerasa, concretamente la enzima Accuzyme. Pero antes te solicitan que expliques sus características principales: tasa de error, tamaño máximo de amplificación y actividad exonucleasa. Detalla brevemente las características de esta enzima.

SOLUCIÓN

La solución puede variar según la casa comercial consultada. En este caso la información obtenida es la empresa *Meridian Bioscience* (<https://bit.ly/3G4b7TD>).

- Tasa de error: ofrece una tasa de error de 3×10^{-6} para una mayor fidelidad de la PCR en comparación con la polimerasa de ADN Taq.
- Tamaño máximo de amplificación: hasta 5 kb.
- Actividad exonucleasa: posee una actividad de exonucleasa de corrección de errores de 3'-5'.

X T A R T
FP SALUD