

Boletín de Matemáticas
Vol. XIX, N° 2 (1985)

CONSIDERACIONES TOPOLOGICAS

EN LA TEORIA DE REPLICACIONES DEL ADN*

Bayardo Villegas V.

Resumen: Se exponen algunos argumentos de tipo topológico en contra de la conformación del ADN en doble hélice; para fundamentarlos, se hace una breve exposición sobre la teoría del grado.

Introducción. En lo deferente al ADN, este artículo se basa en un escrito de William F. Pohl y George W. Roberts [3], en el que se critica la teoría generalmente aceptada de Watson-Crick, en la cual la molécula de ADN consta de dos ramas complementarias enrolladas una alrededor de la otra en una conformación de doble hélice; la mo-

* Seminario presentado como requisito de la carrera de Matemáticas, bajo la dirección del Prof. David Mond, del Departamento de Matemáticas y Estadística de la Universidad Nacional.

lécula se replica por separación de sus ramas y formación de la rama complementaria de cada una para así generar dos moléculas hijas.

La directriz de este trabajo es la de intentar establecer un equilibrio entre el rigor matemático y el desacuerdo aludido en el anterior párrafo, de manera que el primero sirva para fundamentar el segundo y no para convertir el artículo en un tratado meramente matemático.

Ya que, como posteriormente se verá, el meollo de las críticas está en la separación de las ramas, es procedente ver un concepto matemático íntimamente ligado a ella: el grado de una aplicación.

I. El grado de una aplicación suave y el número de entrelazamiento de dos curvas cerradas.

Si C_1 y C_2 son dos curvas cerradas y orientadas, en el espacio \mathbb{R}^3 , con $C_1 \cap C_2 = \emptyset$, es posible definir su número de entrelazamiento, $E(C_1, C_2)$, que mide "cuántas veces gira la una alrededor de la otra".

$E(C_1, C_2)$ se mide de la siguiente manera.

Primero, se escoge un punto de vista desde el cual (si se cierra un ojo) las dos curvas aparecen como curvas planas suaves que se cruzan

transversalmente. Para el propósito de esta descripción, será conveniente imaginar que el ojo está por encima de las curvas mirando hacia abajo. Una vez escogida esta posición, se cuenta el número de veces que C_2 cruza por encima de C_1 , según una regla que dice que si C_1 cruza por debajo de C_2 de derecha a izquierda (respecto a la orientación de las dos curvas), el cruce vale +1, y si lo hace de izquierda a derecha, el cruce vale -1: ahora bien, $E(C_1, C_2)$ es la suma de estos valores. En la Figura 1 se muestran ejemplos de este conteo.

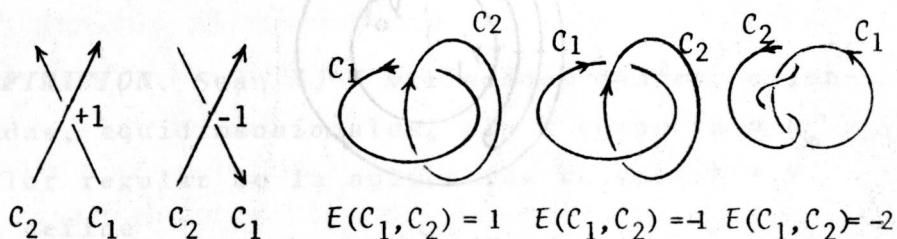


Figura 1

La manera que hemos descrito de calcular $E(C_1, C_2)$ por observación es muy fácil de usar. Sin embargo tiene el defecto de no dejar en claro que si se eligiera otro punto de vista y se hiciera el mismo conteo desde allí, el resultado sería el mismo. Para probar que sí lo es y deducir algunas propiedades de este número de entrelazamiento, es necesario dar una definición más intrínseca, que se hace por medio de la no-

ción del grado de una aplicación suave.

Si X y Y son dos variedades suaves, orientadas, de la misma dimensión, con X compacta, el grado de una aplicación suave $f:X \rightarrow Y$ es un número entero que mide el número de veces que f cubre efectivamente a Y . No basta simplemente contar el número de preimágenes que tiene un punto de Y , porque este número varía según el punto en Y escogido (ver Figura 2). Es necesario

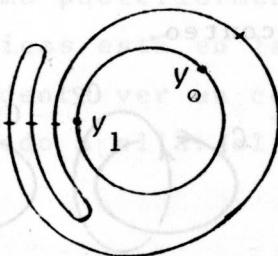


Figura 2

distinguir entre preimágenes "negativas" y preimágenes "positivas", para obtener un número que no varía. Con mira a ello veremos ciertos conceptos y teoremas necesarios para la fundamentación del tema; pero, en concordancia con la directriz del trabajo, para la demostración de algunos de los segundos remitimos al lector al escrito "Teoría del grado en variedades diferenciables", de David Mond [2].

DEFINICION. Sean X y Y variedades suaves y $f:X \rightarrow Y$ una aplicación suave; $y \in Y$ es valor regular de f si para todo $x \in f^{-1}(y)$, $d_f x:T_x X \rightarrow T_y Y$ es epimorfismo.

Nota. Esta noción comprende todo $y \in Y$ tal que $f^{-1}(y) = \emptyset$

DEFINICION. Si $T_x X$ y $T_y Y$ son orientados y si $d_f x:T_x X \rightarrow T_y Y$ es un isomorfismo, se define

$$\text{signo}(d_f x) = \begin{cases} 1, & \text{si } d_f x \text{ preserva orientación} \\ -1, & \text{si } d_f x \text{ invierte orientación} \end{cases}$$

DEFINICION. Sean X , Y variedades suaves, orientadas, equidimensionales, con X compacta y y_0 valor regular de la aplicación suave $f:X \rightarrow Y$.

Se define

$$\text{grado}(f; y_0) = \sum_{x \in f^{-1}(y_0)} \text{signo}(d_f x)$$

TEOREMA 1. Dados X, Y , f y y_0 que satisfacen la anterior definición y y_1 también valor regular de f , si Y es conexa, entonces $\text{grado}(f; y_0) = \text{grado}(f; y_1)$.

Este teorema permite hablar del grado de f , notado $\text{grado}(f)$, sin necesidad de especificar el valor regular escogido, pues garantiza su independencia de él.

TEOREMA 2. Si f es homotópica a g , entonces $\text{grado}(f) = \text{grado}(g)$.

Sean ahora C_1 y C_2 dos curvas cerradas y orientadas en \mathbb{R}^3 , con $C_1 \cap C_2 = \emptyset$. Definimos una aplicación

$$e: C_1 \times C_2 \rightarrow S^2$$

por

$$e(s, t) = \frac{t-s}{\|t-s\|}$$

Orientamos $C_1 \times C_2$ con la orientación producto, y damos a S^2 la orientación usual. Entonces, no es difícil ver que el grado de la aplicación e es igual al número de entrelazamiento $E(C_1, C_2)$. En efecto, el valor regular de e en S^2 , y_0 , cuyas preimágenes en $C_1 \times C_2$ se cuentan para obtener el grado de e , corresponden al punto de vista que se elige para luego contar las veces que C_2 cruza por "encima" de C_1 ; y cada cruce de estos es una preimagen de y_0 . Nótese que entonces el Teorema 1 garantiza que el conteo que se hace para medir $E(C_1, C_2)$ arroja un resultado que es independiente del punto de vista escogido.

TEOREMA 3. Sean C_1, C_2 dos curvas suaves, cerradas, orientadas y disyuntas en \mathbb{R}^3 y $H: \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^3$ un difeomorfismo. Si $C_i' = H(C_i)$ con la orientación heredada de C_i , entonces

$$E(C'_1, C'_2) = \begin{cases} E(C_1, C_2) & \text{si } H \text{ preserva orientación} \\ -E(C_1, C_2) & \text{si } H \text{ invierte orientación.} \end{cases}$$

TEOREMA 4. Sean $f:S' \rightarrow C_1 \subset \mathbb{R}^3$, $g:S' \rightarrow C_2 \subset \mathbb{R}^3$ difeomorfismos que preservan orientación, y, $f_t:S' \rightarrow \mathbb{R}^3$ y $g_t:S' \rightarrow \mathbb{R}^3$ familias de curvas con $C_{1t} = f_t(S')$, $C_{2t} = g_t(S')$, y, $f_0 = f$, $g_0 = g$. Si para cada t , f_t y g_t son difeomorfismos sobre sus imágenes y $f_t(S') \cap g_t(S') = \emptyset$, entonces $E(C_{1t}, C_{2t}) = E(C_1, C_2)$.

Demostración. Si $e_t(u, v) = \frac{g_t(v) - f_t(u)}{\|g_t(v) - f_t(u)\|}$, entonces e_t es homotópica a e ($= e_0$) y por tanto, por la invarianza bajo homotopía del grado de una aplicación (Teorema 2), grado $(e_t) = \text{grado}(e)$.

Nota. Por el anterior teorema, $E(C_1, C_2)$ es *invariante bajo deformaciones continuas*.

DEFINICIÓN. C_1 y C_2 están desentrelazadas si es posible deformarlas continuamente, sin que en ningún momento de la deformación se intersecten, hasta situarlas en lados opuestos de un plano (es decir, separarlas).

TEOREMA 5. Si C_1, C_2 están situadas en lados opuestos de un plano, entonces $E(C_1, C_2) = 0$.

Demostración. Sean π un plano en cuyos lados opuestos están C_1 y C_2 , v un vector unitario en π y $e: C_1 \times C_2 \rightarrow S^2$ como se ha definido anteriormente. Ya que todo vector de C_1 hacia C_2 ha de atravesar π , para v (que pertenece a S^2), $e^{-1}(v) = \emptyset$. Luego, por definiciones, v es valor regular de e y grado $(e; v) = 0$. Como el grado de una aplicación es independiente del valor regular escogido (Teorema 1), grado $(e) = 0$. En definitiva, $E(C_1, C_2) = 0$ (Ver Figura 3).

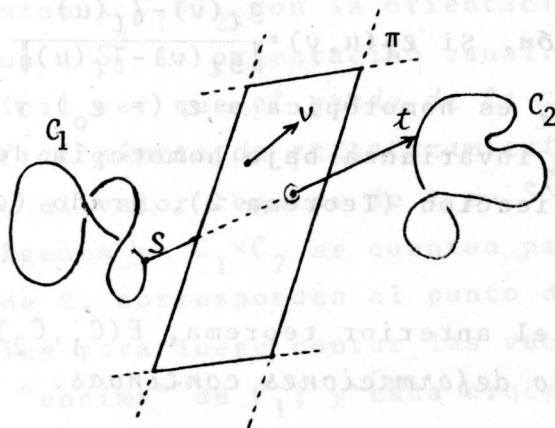
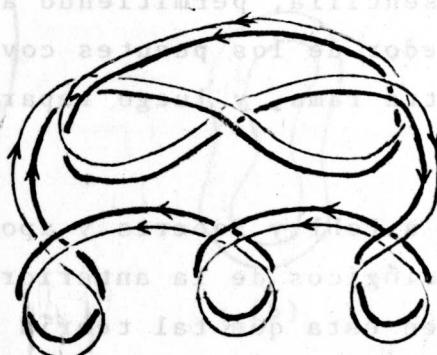


Figura 3

Nota. De los dos teoremas inmediatamente anteriores se tiene que si $E(C_1, C_2) \neq 0$, entonces C_1 y C_2 no pueden separarse (se sobreentiende que la separación no se puede llevar a cabo mediante deformaciones continuas). La recíproca no es cierta; es decir, si $E(C_1, C_2) = 0$, entonces no nece-

sariamente es el caso que C_1 y C_2 puedan separarse. Por otra parte, podría parecer que si C_1 y C_2 son los lados opuestos de una cinta y $E(C_1, C_2) = 0$, entonces pueden separarse. Pero como lo muestra la Figura 4 ni siquiera esto es cierto. Sin embargo, parece ser cierto (y no hemos encontrado un contraejemplo) que si C_1 y C_2 son los lados opuestos de una cinta y además C_1 no está anudada, entonces pueden separarse si $E(C_1, C_2) = 0$.

Esperamos que la regla dada para calcular a ojo el número de entrelazamiento de dos curvas y el resumen de la teoría del grado de una aplicación expuesta en esta sección haga que el concepto sea intelectible y aplicable para un no-matemático.



$$C_1 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$C_2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

Figura 4

II. Críticas a la teoría Watson-Crick.

En la teoría de Watson-Crick, desde un principio se notó que la conformación de doble hélice parece oponerse a la separación de las ramas. Pues si éstas se hallan enrolladas una alrededor de la otra, es difícil para ellas separarse, máxi me si la molécula de ADN, como es de común ocurrencia, es extremadamente larga y aún circular. En este último caso hay de hecho un obstáculo topológico para su separación. En el interín, se demostró experimentalmente que las ramas en efecto se separan y se aislaron varias proteínas que parecían operar para la separación de las ramas. En base a ello una teoría de separación se ideó según la cual "proteínas destorsionantes" separan las ramas y una encima "pivotasa"⁽¹⁾ hace roturas de rama-sencilla, permitiendo a la molécula rotar alrededor de los puentes covalentes intactos de la otra rama, y luego repara las roturas (1,10).

Siguiendo a Pohl y Roberts y apoyado en los argumentos topológicos de la anterior sección, se demostrará en ésta que tal teoría no resuelve la paradoja. Se darán aclaraciones y generalizaciones.

(1) Traducción del autor del término "swivelase", corriente en la literatura en inglés.

ciones y se establecerá el problema del alineamiento, que debe ser resuelto en cualquier teoría de replicación del ADN. Luego se examinarán las varias soluciones concebibles asumiendo que el ADN es de doble hélice.

Replicación del cromosoma bacterial y el problema del alineamiento.

Con el fin de entender el problema del alineamiento en una situación concreta, consideremos los procesos de separación y replicación de una molécula grande circular de ADN, tal como el cromosoma de E. Coli. Asumamos que aquella es de doble hélice Watson-Crick y que está sobre un plano, como se representa en la Figura 5(a).

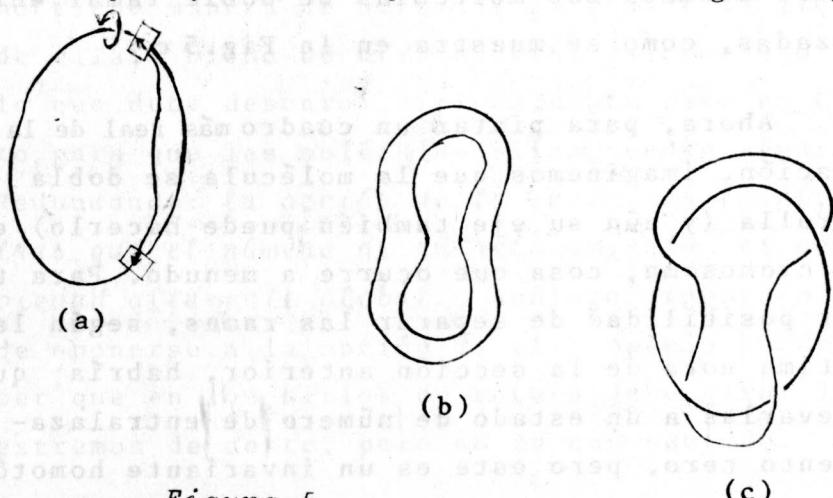


Figura 5

En ella las líneas curvas representan ADN de do-

doble ramal. Los complejos "separación-replicación" se representan por rectángulos y contienen proteínas destorsionantes y cualesquiera otros constituyentes nombrados como la pivotasa.

Supongamos que los complejos de separación-replicación avanzan alrededor de la molécula en las direcciones indicadas, hasta que ellos se encuentran, momento en que se rompen y desaparecen. Si ellos, al avanzar, permanecen paralelos al plano, finalizamos con dos moléculas circulares de doble ramal desentrelazadas, como en la Fig. 5 b. Pero, si se ladean respecto al plano, es decir, si rotan alrededor del eje de la doble hélice, como se indica mediante la flecha circular, al final tenemos dos moléculas de doble ramal entre lazadas, como se muestra en la Fig. 5 c.

Ahora, para pintar un cuadro más real de la situación, imaginemos que la molécula se dobla y enrolla (y aún su eje también puede hacerlo) en el cromosoma, cosa que ocurre a menudo. Para tener posibilidad de separar las ramas, según la última nota de la sección anterior, habría que llevarlas a un estado de número de entrelazamiento cero, pero este es un invariante homotópico, es decir, es invariante bajo cualquier deformación continua tal que una curva-rama no pase a través de la otra. Entonces el complejo de

separación-replicación habría de realizar una de las siguientes cosas (o combinaciones de ellas):

1. Hacer una sola rotura en una de las ramas, devanar un extremo de corte o ambos alrededor de la otra y luego unir los extremos de corte (obsérvese que el proceso puede asumirse simultáneo en ambas ramas);
2. por cada dos sobrecrezamientos sucesivos hacer una rotura de rama-sencilla, girar los extremos de corte sobre los puentes covalentes intactos de la otra rama y luego reparar la rotura.

En contra de la opción 1 puede decirse que, siendo el complejo de separación-replicación un objeto pequeño frente a la molécula entera, él no tiene manera de detectar la geometría global de ella. Dicho de otra manera, el complejo sabe lo que debe desenrollar localmente pero no cuánto, para que las moléculas hijas queden separadas. Redundando: la acción de la encima es local, mientras que el número de entrelazamiento es una propiedad altamente global. Análogo argumento puede oponerse a la opción 2: el complejo puede saber que en los sitios de rotura debe girar los extremos de corte, pero no en qué sentido.

En este punto vale la pena anotar algunos números: el cromosoma bacterial, si es de doble hélice, tiene dos ramas cerradas con número de en-

trelazamiento alrededor de 300.000 y se replica en 20 minutos (bajo circunstancias favorables). Entonces, asumiendo ahora que la replicación es bidireccional, (como se indica en la Fig. 5 a), resulta que 7.500 vueltas son sacadas por minuto a cada bifurcación replicante. Este es un aspecto dudoso de la teoría de la doble hélice.

Por otra parte, la molécula de ADN de doble hélice tiene una simetría local helicoidal. Si la rotamos aproximadamente 36° alrededor de su eje y la trasladamos más o menos 3.4 \AA a lo largo de él, enviamos la estructura en sí misma; ella no tiene ningún "lado preferido". No bastará decir que el complejo sólo tiene que contar vueltas, ya que la noción de vuelta no tiene ningún significado geométrico o físico preciso si al eje central se le permite doblarse y enrollarse.

Habiendo explorado el problema del alineamiento en una situación concreta, estamos preparados para formularlo en general: cuál es el principio de control del complejo de replicación que coloca las moléculas hijas de manera que ellas estén desentrelazadas?

Examinemos enseguida las soluciones concebidas al problema, asumiendo que la molécula de ADN es de doble hélice y considerando otra vez el cromosoma bacterial.

1) Puede aducirse que no hay tal problema. Cuando las moléculas están entrelazadas al final del proceso de replicación, una catenasa, hace y repara las roturas de doble ramal necesarias para separarlas. Esto nos regresa al problema anteriormente anotado: la encima tendría que saber cómo desarrollar las operaciones, pero ello está determinado por la situación topológica global que la encima no puede sentir.

2) Ya que el complejo de separación-replicación puede sólo sentir la situación local, tal vez sea que el estado topológico global se refleje en alguna forma precisa, en la estructura local. En términos de la estructura de la molécula en sí misma, omitiendo la secuencia de parejas de bases, la única posibilidad es un lado preferido determinado por la posición respecto al eje de cierta pareja de bases que se detecta por conteo de la una a la siguiente. Una tal organización de la molécula sería concebiblemente casi simple; así, por ejemplo, el complejo puede alinearse por sí mismo fijándose siempre en la misma forma, sobre todo, digamos, décima pareja de bases. El complejo entonces tendría que tener una enumerasa para hacer el conteo. Si la organización fuese más complicada, por ejemplo, si el complejo alterna sus posiciones relativas de fijamiento, una encima más complicada, una aritmética, podría ne-

cesitarse. Un tal proceso parece bastante sencillo en principio: sin embargo, la teoría no tiene sentido a menos que explique cómo la organización de alineamiento de la molécula es heredada por las moléculas hijas, pues si no lo fuese, no habría moléculas nietas.

Aquí podemos añadir que la *girasa*, una encima que desportilla y enrrolla la molécula, tendría que excluirse, a menos que sea una *giro-enumeradora* que pueda llevar la cuenta del número de vueltas que introduce, pues si no, tal encima destruiría la organización de alineamiento.

3) Tal vez la situación topológica global se refleje localmente gracias a alguna estructura fuera de la molécula, mediante proteínas asociadas que formen un retículo o una estructura cristalina, de modo que el complejo separación-replicación se deslice como sobre una senda. Algunos estudios indican que éste no es el caso [7,8].

4) Es concebible que el complejo de replicación esté rígidamente sujeto a la pared celular y que la molécula sea halada a través de ella, o que las ramas sean haladas aparte y enrolladas dentro mediante algún determinado mecanismo. Pero lo segundo exigiría la cooperación de procesos a cierta distancia uno del otro. Además ambas posibilidades requerirían acortamiento de lazos individuales.

duales, lo que seguramente conduciría a enmarcamiento.

5) Puede argumentarse que aunque la molécula sea de doble hélice, las ramas estén efectivamente desentrelazadas. Esto puede ocurrir por una alteración a lo largo de la molécula de largas secciones (de hélices) dextrorsas y sinistrorsas. Si lo anterior es posible geométricamente es un interesante problema no resuelto, y si ello fuera así implicaría un apretado empaquetamiento de la molécula y sería necesario un mecanismo de replicación muy complicado, que pase la propiedad "desentrelazadas" a la progenie.

Estamos ahora listos para formular nuestra objeción a la teoría de la doble hélice en una forma precisa y breve. Cuando un cromosoma bacterial se replica, se producen dos curvas cerradas que tienen una precisa relación topológica: ellas están desentrelazadas. Puede decirse, por tanto, que representan información topológica. Ella proviene de la información de la posición relativa de las moléculas hijas al dejar ellas el complejo de replicación. Esta información no puede aparecer de la nada; debe provenir de la molécula, del complejo de replicación o de algo fuera de ambos. Asumiendo que la molécula es de doble hélice, hemos rechazado la primera posibilidad en 2) y 5); la segunda, en 4) y, la tercera, en 3). De

ahí que el cromosoma bacterial no es de doble hélice (!)

Los argumentos acá expuestos se aplican primariamente a grandes moléculas circulares, pero pueden adaptarse y aplicarse a moléculas lineales.

III. Alternativas a la conformación de doble hélice.

En esta sección queremos ser consecuentes con el aforismo "si no se es parte de la solución, se lo es del problema".

El principal candidato en el momento es la conformación lado-a-lado ideada, por separado, por Rodley et al. [5] y Sasisekharan et al. [6], quienes han construído modelos y hecho muchas medidas y cálculos. De acuerdo con ellos, tal conformación es compatible con los datos de difracción de rayos X y conocidos requisitos estereoquímicos. Tiene ramas desentrelazadas y entonces en él puede relevarse a la pivotasa de la ardua faena de hacer muchas muescas y repararlas rápidamente y sin ningún error.

Además, un grupo suizo [9] ha preparado in vitro un ADN que no es de doble hélice; y la primera alta resolución por difracción de rayos X sobre muestra de ADN cristalizado, indica que no es de doble hélice y, de hecho, muy diferente del modelo Watson Crick.

Conclusión.

El autor es consciente de que, aparte de los argumentos acá expuestos en contra de la conformación de doble hélice Watson-Crick, los hay también a su favor. La solución al impasse dependerá de un futuro trabajo, en el cual es de esperar una fructífera interacción de la Biología Molecular y la Matemática (particularmente en sus ramas Geometría Diferencial y Topología).

REFERENCIAS

- [1] Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 2nd Edition, 1975, Worth Publishers, Inc., New York.
- [2] Mond, D., "Teoría del grado en variedades diferenciables". Primer Coloquio Distrital de Matemáticas, 1984, Universidad Nacional, Bogotá.
- [3] Pohl, W.F., Roberts, G.W., "Topological considerations in the theory of replication of DNA", *J.Math. Biology* 6, 383-402 (1978).
- [4] Pohl, W.F., "DNA and Differential Geometry", *Math. Intell.* 3 (1), 20-27 (1980).
- [5] Rodley, G.A., Scobi, R.S., Bates, R.H.T., Lewitt R.M., "A possible conformation for double-Strand polynucleotides", *Proc.Natl. Acad. Sci., USA.* 73, 2959-2963 (1976).

- [6] Sasisekharan, V., Pattabiraman, N., Gupta, G.
"Some implications of an alternative structure for DNA", Proc Natl. Acad. Sci. USA 75, 4092-4096 (1978).
- [7] Simpson, R.T. Whitlock, Jr., J.P., Bina-Stein M., Stein, A., "Histone - DNA interactions in chromatin core particles", Quant Biol. 42(1), 127-136 (1977).
- [8] Stein, A., Bina-Stein, M., Simpson, R.T.,
"Crosslinked histone octamer as a model of the nucleosome core", Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74, 2780-2784 (1977).
- [9] Stettler, V.H., Weber, H., Koller, T., Weissmann, C., "Preparation and characterization of form V DNA, the duplex DNA resulting from association of complementary circular single-stranded DNA", J. Molec. Biology, 131, 21-40 (1979).
- [10] Watson, J.D., "Molecular Biology of the gene", 3rd Edition, 1976, W.A. Benjamin, Menlo Park, Calif.