

UNO DE LOS NUESTROS

DESCIFRANDO EL CÓDIGO GENÉTICO O cómo pasar de un lenguaje de 4 letras a uno de 20

Pedro García

Área de Genética, Departamento de Biología Molecular, Facultad de CC. Biológicas y Ambientales, Universidad de León.

Aunque siempre es buen momento para recordar cómo se han realizado los descubrimientos que han marcado la Biología actual, la celebración de un aniversario "redondo" nos proporciona una excusa perfecta. En este 2018 se cumplen 50 años desde que se concedió el premio Nobel en Fisiología o Medicina a tres investigadores por su *interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas*: Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana y Robert W. Holley.

En esta historia también tuvieron un papel decisivo otros muchos científicos, varios de los cuales habían obtenido el premio Nobel previamente como Severo Ochoa, James D. Watson y Francis H. C. Crick, o lo obtendrían posteriormente como Sydney Brenner.

A lo largo del presente trabajo repasaremos brevemente cómo se consiguió establecer la verdadera relación que existe entre los genes y las proteínas, la aportación del numeroso grupo de investigadores implicados al desciframiento del código, en especial la de los tres premiados en 1968, y por último algunos nuevos conocimientos que se han obtenido sobre este tema desde dicho año.

La relación entre genes y proteínas antes de la doble hélice

Desde el nacimiento de la Genética como ciencia en 1900, con el redescubrimiento de los trabajos de Mendel por Carl Correns, Hugo de Vries y Erich von Tschermak, se aceptó que las características que presentan los organismos venían determinadas por unas unidades misteriosas que se denominaron genes. Su naturaleza fue desconocida durante los 40 años posteriores, pero no transcurrió mucho tiempo hasta que se encontró una relación entre los genes y las proteínas. El primero en aportar datos en este sentido fue el médico inglés Archibald Garrod en su libro *Inborn Errors of Metabolism* publicado en 1909. Garrod

Forma de mencionar este artículo: García, P. 2018, Descifrando el código genético, o cómo pasar de un lenguaje de 4 letras a uno de 20. AmbioCiencias, 16, 69-94. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

estudió determinadas patologías humanas que aparecían de manera recurrente en algunas familias, como la alcaptonuria, y observó que su aparición seguía una herencia mendeliana, de modo que los individuos homocigotos para el alelo recesivo de un gen manifestaban la patología analizada. Puesto que las personas con alcaptonuria acumulan ácido homogentísico, un producto de la degradación de la tirosina, Garrod propuso que el problema residía en que las personas homocigotas no presentaban la enzima que metabolizaba dicho ácido. De este modo se sugería la relación entre genes y enzimas.



A. E. Garrod,

Figura 1. Archibald Edward Garrod, de "Archibald Edward Garrod", Obituary notices of Fellows of the Royal Society, 1936-1938, volume 2, pages 225-228.

La hipótesis de Garrod no fue demostrada hasta la década de los 40 del siglo pasado por George Beadle y Edward Tatum utilizando mutantes nutricionales del hongo *Neurospora*, trabajo por el que se les concedió el premio Nobel en 1958. *Neurospora* es un hongo que puede crecer en medios muy pobres (medio mínimo) porque es capaz de sintetizar por sí mismo los aminoácidos, vitaminas y demás componentes necesarios. Utilizando rayos X para provocar mutaciones en el material genético (efecto descubierto por Hermann Muller en 1927, premio Nobel en 1946) que tuvieran efecto sobre las capacidades del hongo, Beadle y Tatum aislaron una serie de cepas que necesitaban para su crecimiento la adición de diferentes componentes. Así algunas sólo crecían se añadía al medio una vitamina determinada,

otras requerían la presencia de un aminoácido concreto, etc. Mediante cruza- mientos entre las cepas mutantes y la cepa normal demostraron que cada cepa presentaba una mutación en un único gen y que existían mutantes que presenta- ban unas mismas características que tenían alterados genes diferentes. Así un conjunto de mutantes se mostró incapaz de crecer en un medio que careciera de un aminoácido concreto, por lo que todas estas mutaciones habrían interrumpido la ruta biosintética de este aminoácido, una ruta en la que unos compuestos se van transformando en otros gracias a la acción de enzimas que catalizan los diferentes pasos. Sin embargo, cada mutante se comportaba de modo distinto cuando se añadían al medio mínimo compuestos intermediarios en la síntesis, de modo que unos crecían normalmente y otros no eran capaces de crecer. Tenien-

do en cuenta que si se añade un compuesto intermediario anterior a la interrupción de la ruta, no se podría sintetizar el aminoácido, mientras que si el compuesto añadido era posterior a la interrupción, sí se podría, Beadle y Tatum fueron ordenando los pasos metabólicos afectados en cada mutante.

Puesto que cada uno de los mutantes carecía de una actividad enzimática concreta, los resultados indicaban que los genes normales serían los responsables de que aparecieran dichas enzimas en el organismo. Así Beadle y Tatum propusieron la hipótesis "un gen - una enzima" que relacionaba la función de un gen con la función de una enzima, aportando una idea que resultó fundamental para conocer la verdadera función de los genes.

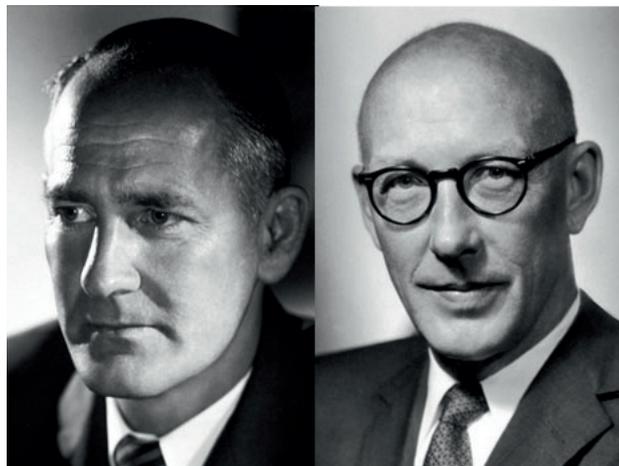


Figura 2. Beadle (a la izquierda) y Tatum (a la derecha). Fotos procedentes del Archivo de la Fundación Nobel.

Posteriormente otros autores comprobaron que los genes no sólo estaban relacionados con enzimas, sino también con otros tipos de proteínas, de modo que la hipótesis se redefinió a "un gen - un polipéptido", y aunque actualmente sabemos que no todos los genes están relacionados con proteínas, ya que algunos sólo dan lugar a ARNs (ARNs ribosomales, transferentes, etc.), o que hay genes relacionados con varias proteínas simultáneamente, la idea de Beadle y Tatum continúa siendo uno de los avances fundamentales en el conocimiento sobre la función génica.

La relación entre genes y proteínas apoyada por estos experimentos estaba de acuerdo con lo que la mayoría de los científicos pensaban en aquellos años: los genes eran proteínas.

Un cambio radical sucedió cuando Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty demostraron en 1944 que el material de los genes era ADN. Aunque este trabajo no fue aceptado de manera general, tuvo como consecuencia importante el que varios investigadores centraran su atención en esta molécula, aportando el conjunto de conocimientos necesarios que desembocarían en la

propuesta de doble hélice para la estructura del ADN por Watson y Crick, publicada en Nature en abril de 1953.

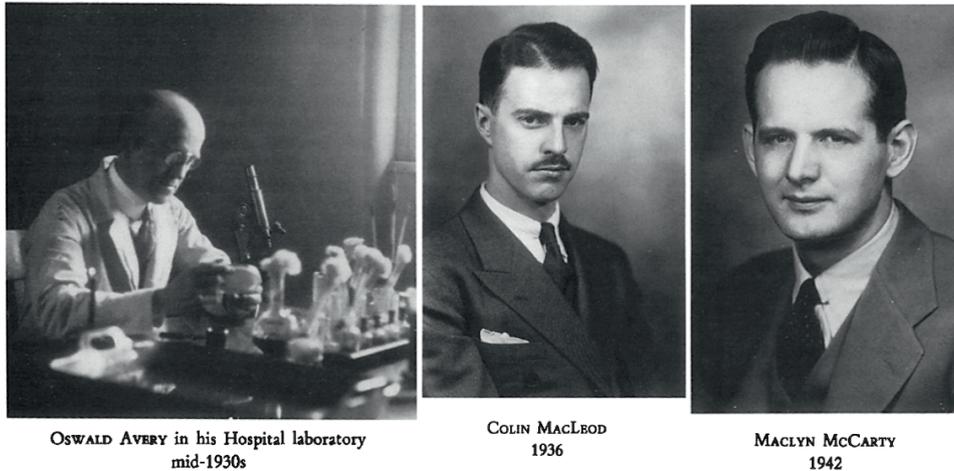


Figura 3. Avery, MacLeod y McCarty, Fotos procedentes del artículo de Steinman y Moberg (1994).

Después de la doble hélice: ideas sobre el código genético en la década de 1950

La doble hélice propuesta por Watson y Crick supuso una auténtica revolución porque dicha estructura se podía relacionar con las características conocidas más importantes que debía presentar el material hereditario, como su duplicación exacta, la infinidad de formas distintas que podía presentar y su capacidad de contener la información genética. En todos estos aspectos, el punto crítico reside en las interacciones exactas entre las bases nitrogenadas (adenina -A- siempre aparece con timina -T-, y guanina -G- con citosina -C-). Las implicaciones generales de la estructura de la doble hélice fueron recogidas por Watson y Crick en un segundo artículo que publicaron en Nature en mayo de 1953. En relación con el código genético, la frase incluida en este trabajo: *De ello se deduce que en una molécula larga (de ADN) son posibles muchas permutaciones diferentes, y por tanto parece probable que la secuencia concreta de bases sea el código que porta la información genética*, hace explícita por primera vez la existencia de un código, en el que reside la información contenida en los genes, información a partir de la cual se podría sintetizar una proteína concreta.

Debido a que la naturaleza de dicho código podía ser extraordinariamente compleja, Watson y Crick (y otros investigadores) dejaron aparcado el problema hasta que en julio de 1953 recibieron una carta del físico George Gamow. Este investigador era un científico muy conocido en su campo por ser uno de los autores del artículo de 1948 que proponía la teoría del "Big Bang" para explicar el origen

del universo, pero sus inquietudes eran muy amplias. Entre ellas estaba la divulgación científica a través de una serie de libros protagonizados por el personaje Mr. Tompkins, al que trató de incluir como autor en algún artículo, pero no pasó la revisión de los editores. Su particular sentido del humor también se pone de manifiesto en el hecho de haber incluido a un físico amigo suyo, Hans Bethe, como coautor del artículo de 1948, simplemente para que la cita del mismo fuera Alpher, Bethe y Gamow (de hecho actualmente se le conoce como el artículo alfa-beta-gamma).

En su carta, Gamow proponía que el ADN era directamente el molde sobre el que se irían encajando los aminoácidos dependiendo de la secuencia de bases. Según su idea, los pares de bases sucesivos en el ADN formaban cavidades en forma de rombo, de los que se podrían distinguir 20 tipos distintos, por lo que se podrían acoplar 20 aminoácidos diferentes. Gamow sugirió también un listado (en parte erróneo) de qué aminoácidos serían.

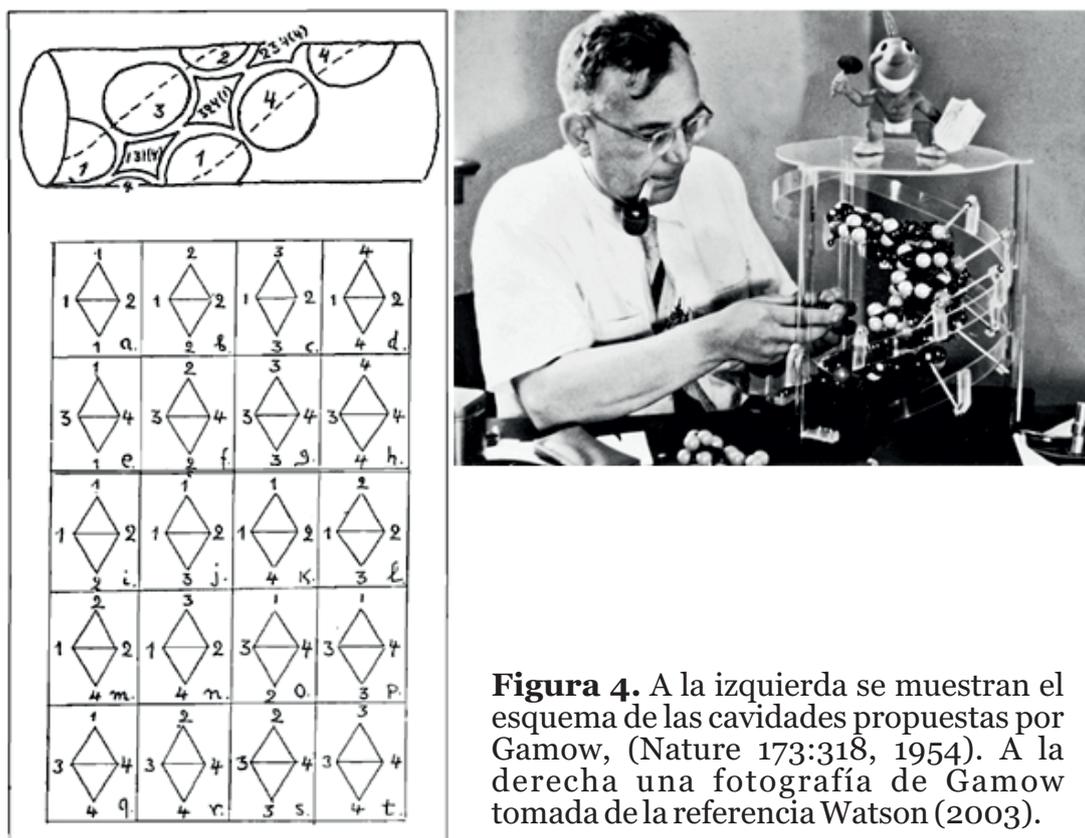


Figura 4. A la izquierda se muestran el esquema de las cavidades propuestas por Gamow, (*Nature* 173:318, 1954). A la derecha una fotografía de Gamow tomada de la referencia Watson (2003).

Watson y Crick detectaron inmediatamente las debilidades de la hipótesis propuesta, ya que no era probable que las cavidades de Gamow pudieran tener la especificidad requerida. Además, las pruebas indicaban la síntesis de proteínas tenía lugar en el citoplasma de las células, en el que se podía encontrar con

Ideas on Protein Synthesis (Oct. 1956)

The Doctrine of the Triad.

The Central Dogma: "Once information has got into a protein it can't get out again". Information here means the sequence of the amino acid residues, or other sequences related to it.

That is, we may be able to have

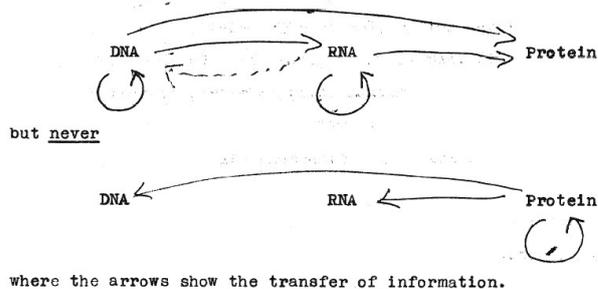


Figura 5. Primer esquema de Crick sobre el Dogma Central de la Biología Molecular

(<http://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/SCBBFT.pdf>)

abundancia otro ácido nucleico, el ARN, pero no ADN que está confinado en el núcleo. Por esta causa, muchos investigadores, entre los que estaban Watson y Crick, consideraban al ARN como la molécula intermediaria que portaría el mensaje desde el ADN a las proteínas. Esta idea fue desarrollada formalmente por Crick en 1956 en lo que primero denominó "la Doctrina de la Tríada" y después en el conocido "Dogma Central de la Biología Molecular".

A pesar de todo, la idea de Gamow sirvió para que Watson y Crick consideraran la relación

ADN-proteína como un problema teórico, independientemente de las complejidades bioquímicas que pudieran surgir, y para que comenzaran a recopilar datos sobre la composición de aminoácidos en las proteínas.

De las secuencias proteicas conocidas, Watson y Crick observaron que algunos aminoácidos aparecían frecuentemente, mientras que otros sólo se detectaban en casos muy concretos y parecían derivados o modificaciones de los anteriores. De esta manera establecieron una lista que incluía 20 aminoácidos proteicos, curiosamente el mismo número que cavidades de Gamow, y que sorprendentemente ha resultado correcta.

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de proteínas se realiza en el citoplasma, lugar en el que abunda el ARN. A diferencia del ADN, el ARN tiene ribosa en su composición en lugar de desoxirribosa, suele ser una molécula de una sola hebra, y presenta la base uracilo (U) en vez de timina (T), aunque ambas son capaces de aparear con adenina (A). Estas características hacían sencilla conceptualmente la visualización de cómo la información contenida en el ADN podía transmitirse por complementariedad de bases a una hebra de ARN en el núcleo, y posteriormente el ARN saldría al citoplasma para dirigir la síntesis de las proteínas. De este modo los esfuerzos científicos se centraron en descifrar cómo una secuencia de cuatro bases (A, G, C, U) se convertía en una secuencia de 20 aminoácidos.

Con objeto de intercambiar ideas de una manera informal y discutir hipótesis, Gamow creó el denominado Club de la Corbata de ARN (RNA Tie Club) for-

mado por 24 componentes, 20 por cada uno de los aminoácidos y 4 miembros honoríficos por cada una de las bases del ARN. El distintivo del Club era una corbata con un dibujo que esquematizaba una molécula de ARN y un alfiler de corbata con las tres letras que identificaban el aminoácido que se les había asignado, por ejemplo Crick era tirosina (Tyr) y Watson prolina (Pro). Los miembros de este club fueron elegidos por el propio Gamow, y en él se incluyeron no sólo biólogos, sino también físicos, químicos o matemáticos amigos que estuvieran interesados en el problema de la codificación genética o en teoría de la información. El intercambio de ideas entre este grupo se realizaba mediante cartas entre ellos y a través de una publicación informal cuyo lema era "Do or die, or don't try" (Hazlo o muere, o no lo intentes).



Figura 6. Algunos miembros del Club de la Corbata de ARN fotografiados con la corbata característica del club. De izquierda a derecha: Crick, Rich, Orgel y Watson. Fotografía procedente del archivo de Alexander Rich.

Entre las muchas hipótesis que se lanzaron, algunas fueron superando las objeciones de los miembros del Club, y sobre todo podrían comprobarse o refutarse experimentalmente, como es esencial en el método científico. Por ejemplo que un aminoácido concreto vendría determinado por la secuencia concreta de tres bases contiguas en el ARN, triplete al que Sydney Brenner bautizó como codón. En un primer momento esta idea surgió del hecho de que es el número mínimo para que aparezcan suficientes combinaciones de las 4 bases ($4 \times 4 \times 4 = 64$) para poder especificar los 20 aminoácidos. Como podemos ver, el número excede en mucho al de combinaciones necesarias, lo que podría indicar que existirían 20 combinaciones que determinan aminoácidos y el resto no (codones sin sentido) o que varios codones pueden especificar el mismo aminoácido, dando lugar a lo que se ha denominado un código genético "degenerado".

También se discutió animadamente sobre si se trataba de un código sola-

pado, es decir una base del ARN participaría en más de un codón, o no solapado. En su forma más simple se puede suponer que el solapamiento se debería a que la lectura de las bases del ARN avanza una posición en cada paso. Así una secuencia AGUCCAUGUAGG..... daría lugar a los siguientes codones AGU, GUC, UCC, CCA, etc. si el código fuera solapante, mientras que en caso contrario la lectura originaría los tripletes AGU, CCA, UGU, AGG, etc. La consecuencia de un código genético solapado es la aparición de restricciones entre qué aminoácidos pueden aparecer contiguos, ya que al compartir dos bases, un codón concreto (por ejemplo AGC) sólo podría estar sucedido por 4 codones (GCA; GCG; GCC; GCU). Si se encontrara en las proteínas un aminoácido sucedido por 5 aminoácidos diferentes, habría que suponer que presenta al menos dos codones diferentes capaces de especificarlo, si fueran 9, tendrían que ser al menos tres y así sucesivamente. Brenner analizó de este modo las secuencias de proteínas conocidas por aquel entonces, y llegó a la conclusión de que se necesitarían muchas más combinaciones que los 64 tripletes posibles, por lo que un código solapante parecía muy improbable.

Por otra parte, un código solapante implicaba que una mutación que afectara a un par de bases se reflejaría en cambios simultáneos en varios aminoácidos consecutivos, y lo más frecuente es que el cambio sólo afecte a uno, como se había demostrado en el caso de la mutación en el gen de la hemoglobina que causa la anemia falciforme.

Otro asunto misterioso consistía en cómo un codón atrae a un aminoácido concreto. A este respecto, Crick propuso en 1955 una idea en la que Brenner también tuvo un papel decisivo: la hipótesis del adaptador. Según ésta, existirían 20 adaptadores, uno por aminoácido, que estarían formados por unos pocos nucleótidos y que mediante acciones enzimáticas muy específicas se unirían al aminoácido correspondiente. Estos adaptadores interaccionarían mediante el apareamiento de bases complementarias con el ARN portador de la información genética y situarían a los aminoácidos en sus lugares correctos para que pudieran unirse dando lugar a la proteína. Es asombroso cómo esta idea ha resultado esencialmente cierta cuando no se tenía ningún otro tipo de prueba experimental, y aunque el adaptador ha resultado ser de un tamaño mayor (los ARNs de transferencia tienen más de 70 nucleótidos), su papel es justamente el descrito en la hipótesis de Crick y Brenner.

Mientras se discutían ideas teóricas sobre la naturaleza del código genético en el Club de la Corbata de RNA, cada vez estaba más clara la necesidad de una aproximación experimental. Crick y Brenner volvieron al laboratorio para realizar experimentos con mutantes de un virus de *E. coli*, el fago T4, para in-

tentar demostrar que realmente la unidad que codifica un aminoácido concreto está formada por tres bases. Para ello utilizaron mutantes de los genes *rII*, obtenidos mediante la exposición a una sustancia denominada acridina, cuyo efecto era la adición o eliminación de un par de bases en el ADN. Si un gen sufre este tipo de mutaciones en la zona que codifica la proteína, daría lugar a un ARN con un cambio radical en sus codones y la proteína correspondiente no sería funcional. El efecto sería similar al que tendría una frase con palabras de tres letras en la que se introduce o se elimina una letra. Supongamos la frase con sentido

por fin ahí veo una vía con luz

si se elimina una letra, por ejemplo la *r* de por, y se continúa leyendo en agrupaciones de tres, tendríamos

pofina hív eou nav íac onluz

lo mismo ocurriría si introdujéramos una letra en la frase. Sin embargo, si se consigue un doble cambio de distinto signo, especialmente si ocurren en posiciones cercanas, el significado se recupera en su mayor parte. Por ejemplo, eliminando la *r* de por y añadiendo una *s* después de la *f*

pofsin ahí veo una vía con luz

además si en el gen se introducían tres mutaciones del mismo tipo en posiciones cercanas (tres adiciones o tres eliminaciones), la lectura también sería casi correcta, permitiendo la formación de una proteína funcional. Por ejemplo

por fin aho una vía con luz o por fix zyn ahí veo una vía con luz

en su razonamiento estaban implícitas varias ideas todavía no demostradas sobre el funcionamiento general del código, como que la lectura de los tripletes comenzaba en un punto concreto, a partir del cual las bases se irían leyendo sucesivamente en grupos de tres, lo que determinaba un único modo de lectura de la información. Igualmente suponía que la molécula no presentaba señales que indicaran qué codones eran los correctos, y no existiría solapamiento entre los codones.

En los experimentos realizados para comprobar la validez de las ideas de Crick y Brenner, tuvo un papel fundamental Leslie Barnett, que en un primer momento fue contratada por Crick como técnico de laboratorio a tiempo parcial, pero pronto demostró su gran capacidad por lo que se la contrató como científica.

Cuando se realizaron los experimentos definitivos, Brenner estaba realizando una estancia en París, por lo que Crick, al ver los resultados, le dijo a Barnett:

¡Somos las dos únicas personas que sabemos que es un código de tripletes!



Figura 7. Leslie Barnett, Francis Crick y Sydney Brenner en 1986. Fotografía del archivo de Cold Spring Harbor Laboratories.

La importancia y repercusión que tuvieron estos experimentos está fuera de duda, aunque realmente no demostraran inequívocamente las hipótesis en las que se basaba. Un código en el que los codones estuvieran formados por múltiplos de tres bases también sería compatible con los resultados obtenidos, aunque se consideró que esta idea era demasiado improbable como para ser tenida en cuenta seriamente.

Crick siempre se mostró crítico con la importancia otorgada a este trabajo, ya que según él "si bien apoyaba la codificación en tripletes, esta idea ya estaba tan arraigada por aquel entonces en la comunidad científica que el verdadero descubrimiento hubiera sido que los codones estuvieran formados por cuádrupletes". Claramente el resto de los científicos no lo consideró así, como lo demuestra el elevado número de citas del artículo publicado en *Nature* en 1961 con el título de *General nature of the genetic code for proteins* y el valor de 13.145 £ que alcanzó en 2004 el manuscrito original en una subasta.

Durante este tiempo, también otros investigadores estaban poniendo las bases experimentales que llevarían al desciframiento del código genético. Entre ellos hay que destacar al grupo de Severo Ochoa que en 1955 consiguió purificar por primera vez una enzima capaz de sintetizar una molécula de ARN *in vitro*: la poli(ribo)nucleótido fosforilasa. La trascendencia de este logro fue reconocida con la concesión del premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1959.

Para que se formara una molécula de ARN, la enzima necesitaba de ribonucleósidos di-fosfato, que iba uniendo entre sí al azar y liberando un grupo fosfato en cada reacción. De este modo si en la reacción sólo se añadía ADP, el ARN que se obtenía era un polímero que únicamente presentaba esta base (poli-A); si se añadían dos ribonucleósidos di-fosfato diferentes, por ejemplo ADP y UDP, el

ARN resultante presentaba una secuencia aleatoria en la que aparecían A y U.

Este trabajo lo realizó fundamentalmente Marianne Grunberg-Manago, una científica francesa nacida en San Petersburgo, bajo la dirección de Ochoa. En un principio, tanto Grunberg-Manago como Ochoa pensaron que la enzima sería la responsable de sintetizar las moléculas de ARN en el proceso de transcripción. Pronto comprendieron, aunque a Ochoa le llevó un poco más de tiempo convenirse, que las características que presentaba la enzima hacían muy poco probable dicho papel. La capacidad de sintetizar ARNs con secuencias aleatorias, sin necesidad de copiar moléculas de ADN, no es lo que se espera de una enzima que tenga que transferir la información contenida en el ADN a otra de ARN, y de hecho el papel real en la célula de la polinucleótido fosforilasa es el contrario del descrito: romper las moléculas de ARN en nucleósidos difosfato. Aunque un poco decepcionados, Grunberg-Manago y Ochoa reconocieron la gran utilidad que podría tener la enzima, aunque debían demostrar que las moléculas que se obtenían en el laboratorio tenían las mismas características que los ARNs celulares. Con este objetivo, Ochoa se puso en contacto con Leon Heppel, el máximo experto de Estados Unidos en el análisis la composición de los ácidos nucleicos mediante cromatografía y electroforesis. Heppel y Maxine Singer, una estudiante que estaba finalizando su tesis por aquel entonces, comprobaron que los ARNs sintéticos eran indistinguibles de los ARNs celulares, y como subproducto de sus experimentos fueron acumulando un conjunto de ARNs sintéticos que se habían sintetizado a partir de diferentes composiciones de bases, colección que se hizo disponible para la comunidad científica en 1960.

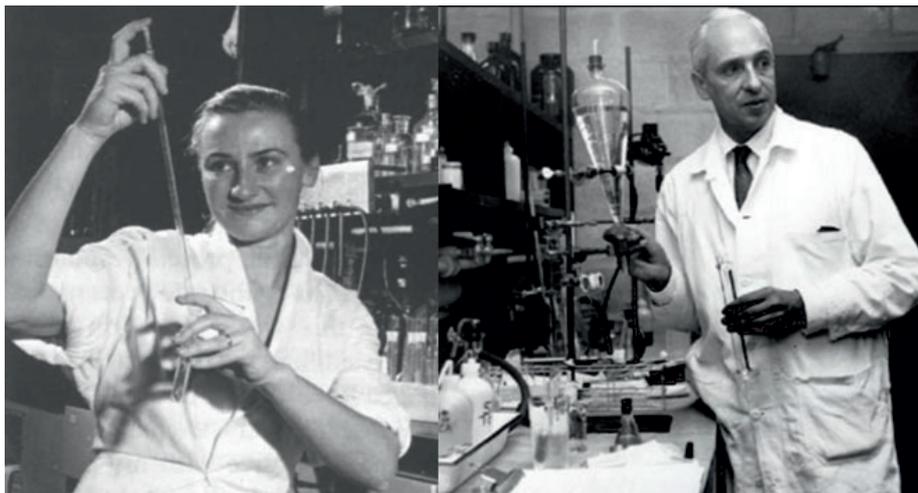


Figura 8. Marianne Grunberg-Manago y Severo Ochoa. Fotografías procedentes de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (M. Grunberg-Manago) y del archivo de El País, Associated Press (S. Ochoa).



Figura 9. Maxine Singer. Fotografía de Dick Darcey procedente del archivo de la Biblioteca del Congreso de Estados Unidos (Maxine Singer Papers).

Otro avance fundamental durante este periodo fue el desarrollo de un sistema acelular de traducción *in vitro*. Muchos investigadores, como Paul Zamecnik, Alfred Tissières y François Gros, aportaron ideas y mejoras técnicas que finalmente permitieron hacia 1960 sintetizar proteínas en un tubo de ensayo utilizando ribosomas de la bacteria *Escherichia coli*.

Preparados, listos, ¡ya!: la carrera para descifrar el código genético

Mientras la élite de los biólogos moleculares iba realizando pequeños adelantos en la comprensión del código genético, dos desconocidos realizaban un experimento fundamental que aceleraría frenéticamente el ritmo de los descubrimientos: Marshall Warren Nirenberg y J. Heinrich Matthaei.

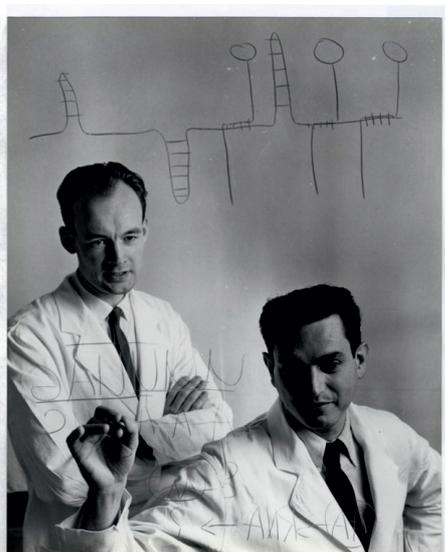


Figura 10. Heinrich Matthaei (izquierda) y Marshall Nirenberg (derecha). Fotografía procedente de los archivos de Marshall W. Nirenberg.

Nirenberg defendió su tesis doctoral en bioquímica en 1957, y posteriormente obtuvo una beca de dos años de duración en el Instituto de Artritis y Enfermedades Metabólicas, una sección del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH). Cuando en 1959 obtuvo un puesto como investigador, consideró que los trabajos sobre regulación genética publicados por Monod y Jacob, y los relacionados con la síntesis *in vitro* de las proteínas eran los que ofrecían campos más prometedores, y aunque carecía de experiencia en los mismos, decidió dedicarse a algún tema relacionado con ellos. Más concretamente, su objetivo inmediato fue determinar si la síntesis de proteínas *in vitro* se incrementaba cuando se añadía ARN o ADN. La idea final era demostrar si realmente existía un ARN especial que sirviera de intermediario entre el ADN y las proteínas, y que hoy en día conocemos como ARN mensajero (ARNm). Para ello se centró en la síntesis de una enzima inducible en la bacteria *Bacillus cereus*, la penicilinasa. Utilizando el sistema *in vitro* descrito previamente por Zamecnik determinaba si se inducía la síntesis de penicilinasa cuando se añadía ADN o ARN procedente de ribosomas de *E. coli* o de *B. cereus*, ya que se pensaba por entonces que los ribosomas contenían el ARNm. Sólo cuando el ARN procedía de cultivos de *B. cereus* que expresaban la penicilinasa se detectaba un incremento en la síntesis *in vitro* de esta proteína, aunque la respuesta era muy reducida, por lo que Nirenberg concluyó que necesitaba un método mucho más sensible que el que estaba utilizando.

Durante año y medio, Nirenberg no realizó avances significativos en la metodología, pero la incorporación de Matthaei cambió radicalmente la situación. Heinrich Matthaei era un científico alemán que estaba de estancia postdoctoral en el NIH y deseoso de trabajar en el campo de la síntesis de proteínas *in vitro*. Según el propio Nirenberg, Matthaei llegó al NIH pensando que al ser una institución con un gran número de científicos, habría varios equipos trabajando dicho campo, pero la realidad es que en aquel momento sólo él estaba relacionado con el tema, por lo que fue asignado a su laboratorio. Por suerte Matthaei también era muy experto y meticuloso en el trabajo de laboratorio, y entre ambos desarrollaron rápidamente una técnica de síntesis acelular de proteínas *in vitro* mucho más sencilla, eficiente y sensible utilizando fracciones obtenidas de *E. coli*.

Con los nuevos avances técnicos, Nirenberg y Matthei demostraron definitivamente que sólo el ARN obtenido a partir de los ribosomas de cepas inducidas de *B. cereus* incrementaba la síntesis de penicilinasa en el tubo de ensayo, mientras que el ADN, el ARN de cepas sin inducir o el ARN de *E. coli* no tenía ningún efecto. Además fraccionando el ARN de los ribosomas comprobaron que

no se necesitaba todo el ribosoma, sino sólo una pequeña fracción: por fin se había demostrado la existencia del ARNm.

El siguiente paso en sus experimentos fue comprobar si los ARNs artificiales también eran capaces de dirigir la síntesis de proteínas. Esto fue posible porque Leon Heppel, que tenía su laboratorio justo al lado, les proporcionó pequeñas cantidades de algunos de los ARNs sintéticos que tenía en su colección. En estos experimentos utilizaron un aminoácido marcado radiactivamente diferente en cada tubo de ensayo, mientras que los otros 19 no presentaban ningún tipo de marcaje, de modo que el efecto de cada ARN era analizado en 20 casos. El 27 de mayo de 1961 marca una fecha clave, ya que cuando añadieron al sistema *in vitro* un ARN que sólo presentaba uracilos (poli-U) se sintetizó una proteína en cuya composición sólo aparecía fenilalanina radiactiva. El primer codón se había descifrado: UUU codifica fenilalanina.

Nirenberg presentó este resultado en una pequeña charla de 10 minutos el V Congreso Internacional de Bioquímica que se celebró en Moscú en agosto de 1961. Según las crónicas, en la sala no habría más de 30 personas, quizás porque el título de la ponencia no reflejaba realmente su revolucionario contenido: *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic template RNA*. Entre la escasa audiencia interesada se encontraba Matthew Meselson, científico que en 1957 demostró junto con Franklin Stahl que la replicación del ADN es semiconservativa. Meselson informó a Crick, entre otros, de la importancia de la comunicación de Nirenberg, e inmediatamente Crick le invitó a repetir su charla al día siguiente, para una audiencia ahora multitudinaria y entusiasta.

La idea de utilizar ARNs sintéticos para descifrar el código también la habían tenido en el grupo de Ochoa, aunque no habían tenido éxito utilizando poli-A. Los detalles, ya públicos, de la metodología permitieron al grupo de Ochoa replicar el resultado de Nirenberg y Matthei con poli-U, y comenzar el análisis de otros ARNs sintéticos. En septiembre de 1961, Nirenberg tuvo conocimiento de que el grupo de Ochoa había realizado enormes avances en sólo seis semanas, utilizando ARNs artificiales de secuencia aleatoria sintetizados con dos bases diferentes. Así utilizando poli(UC) se incorporaban a las proteínas los aminoácidos fenilalanina, serina y leucina, mientras que poli(UA) dirigía la incorporación de fenilalanina y tirosina.

La utilización de dos bases diferentes para sintetizar un ARN de manera aleatoria suponía la formación de ocho codones diferentes. Por ejemplo con U y C, pueden aparecer en la secuencia los tripletes UUU, UUC, UCU, CUU, UCC, CUC, CCU y CCC, lo que dificulta la relación entre triplete y aminoácido. Sin em-

bargo, en función de las concentraciones en las que se añaden las bases al sistema se pueden deducir las características que tendrían los tripletes de un aminoácido concreto.

Por ejemplo en la **Fig. 11**, las líneas discontinuas representan la frecuencia con la que aparecerían diferentes tripletes en función del porcentaje de C en el experimento, y los tripletes sólo indican el contenido de cada base, pero no su orden. Así AAC correspondería a los codones con dos A y una C (AAC, ACA, CAA) y ACC a los de una A y dos C (ACC, CAC, CCA).

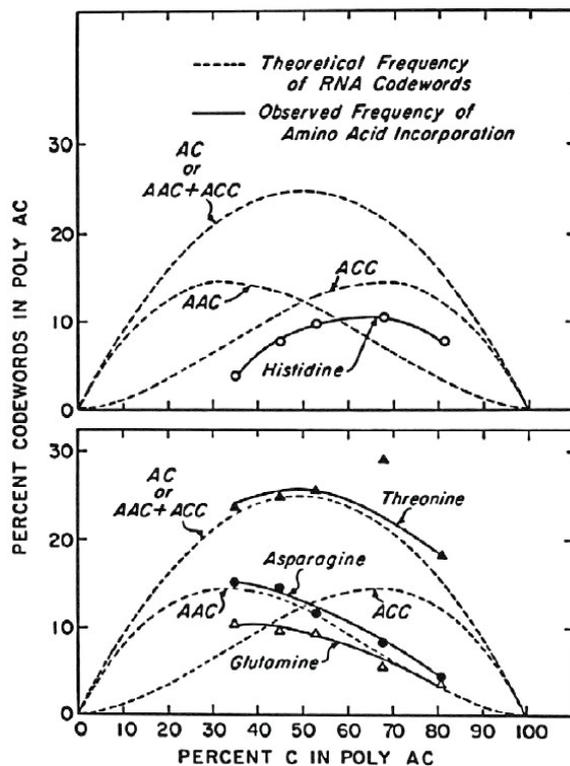


Figura 11. Figura procedente de la referencia Nirenberg (2004).

Comparando en la **Fig. 11** la aparición de distintos aminoácidos con las de las curvas teóricas de los codones, se puede deducir que histidina vendría codificada por un triplete que presenta una A y dos C, o que treonina estaría codificada por un triplete con dos A y una C y por otro con una A y dos C, aunque el triplete concreto no se pudiera determinar en este tipo de experimentos. Estos datos demostraron también que un aminoácido podía estar codificado por más de un codón, de modo que se trataría de un código degenerado o redundante, y que los codones estaban formados por tres bases contiguas.

El conocimiento de los avances de Ochoa y su grupo preocupó a Nirenberg, porque tenemos que recordar que Ochoa ya había recibido el premio Nobel en aquel momento y era un científico respetado y con un grupo sólido. Aunque Nirenberg trató de buscar una cooperación entre ambos, esta no fue

posible, por lo que se decidió a contratar a nuevos investigadores como Bob Martin y Bill Jones, que le permitieran acelerar los experimentos.

La competencia entre el grupo de Ochoa y el de Nirenberg produjo un enorme número de trabajos en muy poco tiempo. Como ejemplo podemos decir que el grupo de Ochoa publicó una serie de 9 artículos relacionados con el desciframiento del código y los primeros 5 trabajos fueron terminados en sólo 18 semanas. A principios de 1962, ya se conocían las características de los tripletes para cada uno de los aminoácidos, si bien faltaba por determinar su secuencia exacta.

Después de toda esta avalancha de datos, llegó un periodo de decepción puesto que realmente sólo se conocía con certeza la relación entre tres codones y sus aminoácidos (UUU - fenilalanina; CCC - prolina; AAA - lisina; el ARN sintético poli-G no había funcionado *in vitro*). Eran necesarias nuevas técnicas que se basaran en la síntesis de ARNs de secuencias conocidas.

En la resolución de este problema, el laboratorio de Nirenberg desarrolló nuevas tecnologías, mientras que el de Ochoa se quedó atascado y en su lugar apareció el de un nuevo científico, Har Gobind Khorana.

En 1963 se publicó un artículo que demostraba la capacidad que tenían los ARNs sintéticos de atraer hacia los ribosomas a los complejos que formaban los aminoácidos unidos a sus adaptadores (complejo aminoacil-ARNt). Este dato le proporcionó a Nirenberg la idea de probar si un ARN de sólo tres bases sería capaz de atraer al complejo adecuado marcado radiactivamente al ribosoma, de modo que la estructura formada y por tanto la radiactividad, quedara retenida en un filtro. Utilizando ARNs de dos, tres, cuatro, cinco y seis bases iguales (uracilos o adeninas), demostraron que los tripletes UUU y AAA atraían al ribosoma a los complejos fenilalanina-ARNt y lisina-ARNt, respectivamente, mientras que los ARNs de dos bases no tenían ningún efecto. Adicionalmente comprobaron que la cantidad de radiactividad retenida dependía de múltiplos de 3 (los ARNs de tres, cuatro y cinco bases retenían la misma cantidad de radiactividad, y el ARN de seis bases, el doble), justo lo que cabía esperar de una interacción entre los complejos y los tripletes.

Por tanto la resolución completa del código quedaba supeditada a la disponibilidad de los 64 tripletes posibles, lo que en aquel momento no era posible. Con la ayuda de Maxine Singer, Marianne Grunberg-Manago, Leon Heppel, Phil Leder, Mert Bernfield y Richard Brimacombe, el grupo de Nirenberg desarrolló dos técnicas enzimáticas basadas en la polinucleótido fosforilasa y en la RNasa A, que partiendo de dinucleótidos y añadiendo una base daban lugar a trinucleótidos de secuencia conocida, tal como se muestra en la **Fig. 12**.

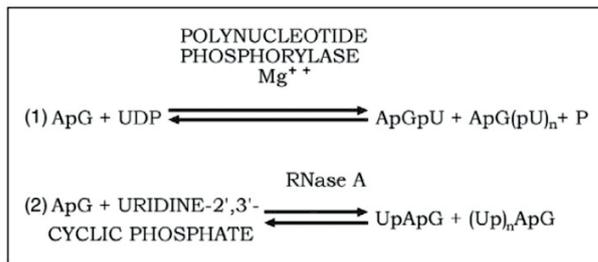


Figura 12. Métodos para obtener trinucleótidos de secuencia conocida (figura procedente de Nirenberg, 2004).

De este modo el grupo de Nirenberg logró sintetizar en un año los 64 codones y descifrar el significado de 54.

Khorana también fue capaz de sintetizar ARNs y triplete con secuencias concretas, aunque su metodología fue diferente. Este investigador de origen hindú nació en Raipur (actualmente Pakistán), y después de varias estancias en distintos laboratorios de la India y de Reino Unido, se trasladó a la Universidad de Wisconsin en 1960.

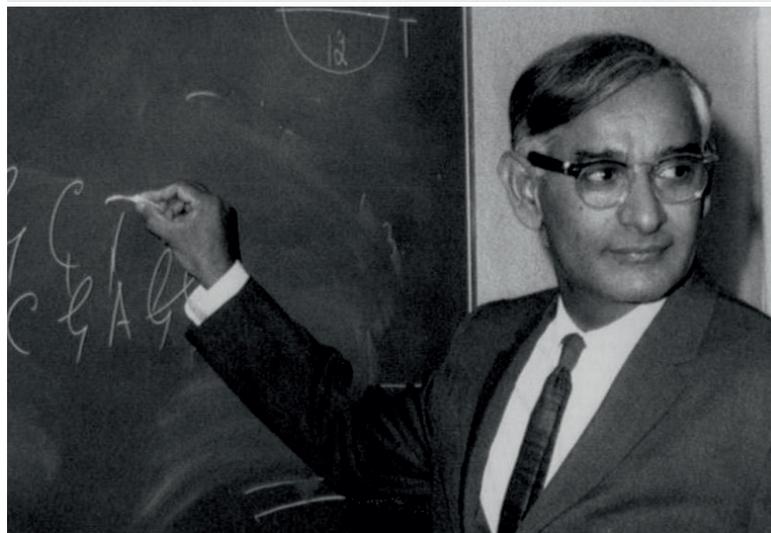
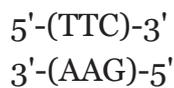


Figura 13. Har Gobind Khorana (fotografía procedente del archivo de Associated Press).

Siendo un experto en la síntesis de ácidos nucleicos, era lógico que se interesara en la obtención de ARNs que permitieran el desciframiento del código genético. Debido a que la síntesis de ADN sintéticos estaba un poco más avanzada en aquella época, lo que permitía sintetizar moléculas de 10-15 nucleótidos de longitud con secuencias concretas, su idea fue utilizarlas como molde para que la ARN polimerasa sintetizara el ARN complementario. Sin embargo, independientemente de la longitud del ADN utilizado, las moléculas de ARN obtenidas siempre presentaban una longitud mucho mayor. Este resultado extraño, fue investigado y se comprobó que se debía a un "deslizamiento" o "tartamudeo" de la

enzima, de modo que el ARN presentaba repeticiones de la secuencia original del ADN. Durante una visita al laboratorio de Kornberg, Khorana comprobó que lo mismo ocurría si se utilizaba una ADN polimerasa, con la diferencia de que lo que se obtenía eran moléculas largas de ADN.

Utilizando esta estrategia consiguió moléculas de ADN con secuencias conocidas en las que se repetía constantemente una pequeña secuencia. Por ejemplo, añadiendo al tubo de ensayo la ADN polimerasa, los 4 desoxirribonucleótidos y dos hebras de ADN consistentes en 5'-TTCTTCTTCTTC-3' y 5'-GAAGAAGAA-3', conseguía sintetizar un ADN de doble cadena y de gran longitud en el que se repetía constantemente la unidad



Mediante la utilización de la ARN polimerasa y los ADNs sintetizados, se obtuvieron un gran número de ARNs de secuencia simple y repetitiva que se utilizaron para la síntesis de proteínas, ayudando a delimitar el significado algunos tripletes. Por ejemplo, al utilizar un ARN con secuencia ...UCUCUCUCUCUCUCUCUC..., se producía un polipéptido ...Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-..., de modo que los codones UCU y CUC codificarían serina y leucina, aunque seguía sin completarse la asignación concreta. A pesar de estas limitaciones, la importancia de estos experimentos radica en que fue la primera vez que se demostró de manera experimental y directa que la secuencia del ADN determina la secuencia de las proteínas utilizando un ARN como intermediario.

Para finalizar la asignación de los codones, el equipo de Khorana también recurrió a la idea de Nirenberg de utilizar la capacidad de los trinucleótidos para retener los complejos aminoácido-ARNt. Para ello mejoraron las técnicas de síntesis y caracterización de pequeños ARNs, consiguiendo finalmente los 64 tripletes posibles, y confirmaron y corrigieron algunos errores en las asignaciones que se habían realizado previamente.

Básicamente el código genético ya se había descifrado, pero quedaban algunos detalles que era necesario investigar. Entre ellos, el papel de tres codones que no tenían asignado ningún aminoácido (UAG, UAA, UGA). Utilizando mutantes del fago T4 que producían una proteína más corta de lo normal, Brenner determinó en 1964 que el triplete UAG era una señal para que se produjera el fin de la síntesis de la proteína. El mismo significado tenían los otros dos codones, si bien para UGA no se pudo demostrar hasta 1967 en un trabajo conjunto de Brenner y Crick. Con el desciframiento de este último codón, se puede considerar que terminó el desciframiento del código genético.

Es asombroso que este proceso, que cambió completamente nuestra comprensión de cómo funcionan los organismos se llevara a cabo en sólo seis años, de 1961 a 1967.

Table 5. *The genetic code as established for E. coli*

The generally accepted convention is used in showing trinucleotide sequences. Thus in the trinucleotide codons for phenylalanine, UUU and UUC, the first letter is at the left (the 5'-hydroxyl end) and U or C are the third letters at the 3'-hydroxyl end. C.I. stands for chain initiation; abbreviations for amino acids are standard.

First letter	Second letter ...	Genetic code				Third letter
		U	C	A	G	
U		Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U		Leu	Ser	'Nonsense'	'Nonsense'	A
U		Leu	Ser	'Nonsense'	Trp	G
C		Leu	Pro	His	Arg	U
C		Leu	Pro	His	Arg	C
C		Leu	Pro	Gln	Arg	A
C		Leu	Pro	Gln	Arg	G
A		Ile	Thr	Asn	Ser	U
A		Ile	Thr	Asn	Ser	C
A		Ile	Thr	Lys	Arg	A
A		Met. (C.I.)	Thr	Lys	Arg	G
G		Val	Ala	Asp	Gly	U
G		Val	Ala	Asp	Gly	C
G		Val	Ala	Glu	Gly	A
G		Val (C.I.)	Ala	Glu	Gly	G

Figura 14. El código genético. Imagen tomada de la referencia Khorana (1968a).

Algunos detalles adicionales

Un aspecto importante en la síntesis de proteínas era conocer en qué dirección se leía la molécula del ARNm. Los polinucleótidos, sean de ADN o de ARN, presentan dos extremos diferentes que se denominan 5' y 3', y la lectura de los codones podría ir en cualquier sentido. Las proteínas también presentan dos extremos distintos denominados amino (NH₂-) y carboxilo (-COOH), y todas las pruebas de la época indicaban que la síntesis ocurría desde el extremo amino al carboxilo.

En la resolución de esta incógnita volvió a jugar un papel fundamental el equipo de Ochoa, especialmente Margarita Salas, al diseñar una serie de experimentos publicados en 1965 en los que a un ARN poli-A se le añadía una C en uno de los extremos. De este modo, la mayoría del mensaje estaría formado por codones AAA (codifica lisina), mientras que en un extremo aparecería un codón AAC (codifica asparagina). De los análisis de los péptidos sintetizados *in vitro*, se deducía que la asparagina aparecía en el comienzo (extremo amino) cuando la C se añadía al extremo 5' del ARN, y en el final (extremo carboxilo) cuando se añadía al extremo 3', lo que demostraba una dirección de lectura de la información desde 5' a 3'.



Figura 15. Severo Ochoa y Margarita Salas. Fotografía David Castro (Agencia EFE) procedente de El País.

Otro asunto a resolver residía en determinar cómo se escoge el marco de lectura de los codones en las células. Ya Crick y Brenner habían demostrado en sus experimentos con mutantes de los genes *rII* que la lectura de los codones comienza en un punto concreto a partir del cual se leen las bases de tres en tres. Mientras que en los experimentos *in vitro*, debido a las condiciones artificiales utilizadas, la lectura puede comenzar en cualquier punto del ARN y utilizar todos los posibles marcos, en las células sólo se utiliza uno de ellos, el que es capaz de producir la proteína correcta. En 1964, Marcker y Sanger descubrieron *E. coli* un ARNt especial que se unía al aminoácido metionina y que era necesario para que comenzara la síntesis de proteínas en condiciones fisiológicas. Adicionalmente la metionina presentaba una modificación, su grupo amino estaba formilado. En 1966 Clark y Marcker demostraron que el ARNt especial reconocía el codón de metionina (AUG) y en ocasiones el codón GUG (codifica valina), y este primer triplete era el que marcaba el resto de la lectura.

La última incógnita era la más trascendental. El código genético se había descifrado a partir de la maquinaria celular de una bacteria, *E. coli*, ¿pero qué ocurriría con el resto de los organismos? ¿seguirían el mismo lenguaje y por tanto se trataría de un código genético universal? ¿o habría múltiples códigos?

La universalidad del código se había asumido desde que comenzaron las discusiones teóricas en el Club de la Corbata de ARN, pero no existían pruebas experimentales concluyentes. Para abordar este problema, dos investigadores postdoctorales del laboratorio de Nirenberg, Thomas Caskey y Richard Marshall obtuvieron extractos celulares de un anfibio, *Xenopus laevis*, y de un mamífero,

el hámster, decididos a analizar el significado de los codones. En ambos casos la relación entre tripletes y aminoácidos era idéntica a la encontrada en *E. coli*, resultado que ponía de manifiesto la unidad de todas las formas de vida que existen en el planeta.

Robert W. Holley y los ARNs transferentes

Llegados a este punto, seguro que echamos en falta al tercer galardonado con el premio Nobel en 1968: Robert W. Holley. Su papel en esta historia se relaciona con el análisis de la molécula adaptadora propuesta por Crick, que es la responsable de relacionar el lenguaje de cuatro bases con el de 20 aminoácidos.

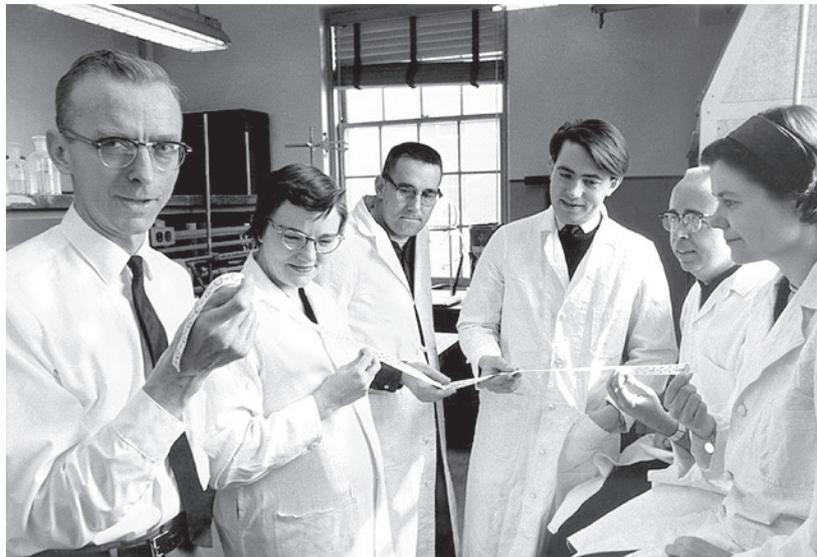


Figura 16. Robert W. Holley (a la izquierda) y su equipo (fotografía de Sol Goldberg).

El relato comienza a mediados de la década de 1950 en el laboratorio de Paul Zamecnik, un científico que frente a las especulaciones teóricas del Club de la Corbata, prefería las demostraciones experimentales, aunque entre ambos grupos hubo un intercambio de opiniones muy fluido, especialmente con Crick. Junto con los datos de otros investigadores, Zamecnik había demostrado que la incorporación de los aminoácidos a las proteínas necesitaba una activación previa, consistente en su unión a AMP (adenosina-5'-monofosfato) y a una enzima que era específica para cada aminoácido. Parecía bastante probable que este estado fuera necesario para que posteriormente el aminoácido se uniera a la molécula adaptadora propuesta por Crick. Utilizando aminoácidos marcados radiactivamente, el grupo de Zamecnik, y de manera independiente Ogata y Nohara, publicaron la unión de los aminoácidos a un ARN de pequeño tamaño, al que denominaron ARN soluble y que hoy conocemos como ARN de transferencia

(ARNt), que aunque más grande de lo propuesto, cumplía los requisitos de la molécula adaptadora de Crick. Adicionalmente, los análisis indicaban que los aminoácidos no competían por los mismos ARNs, de modo que cada uno debía contar con una o más moléculas adaptadoras específicas.

La purificación y análisis de los ARNt se convirtió en un objetivo para varios laboratorios, entre ellos el de Holley, localizado en la Universidad de Cornell y dependiente del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Los problemas técnicos para aislar los ARNt fueron importantes, pero partiendo del ARN soluble de levadura que podían obtener en grandes cantidades, el grupo de Holley consiguió identificar las fracciones en las que aparecían los ARNt específicos de alanina, tirosina, histidina y valina. Como se puede observar en la **Fig. 17** las fracciones para los ARNt de valina e histidina aparecen solapadas en parte de su rango, mientras que la de tirosina se obtiene en las fracciones finales. Esto les condujo a trabajar principalmente en la purificación del ARNt de alanina para su posterior análisis. La disponibilidad de material purificado siempre constituyó un limitante, de modo que los experimentos realizados se hacían con cantidades del orden de miligramos. Holley estima que durante los tres años que les llevó realizar todos los análisis, utilizarían como mucho 1 gramo de ARNt de alanina, para lo que necesitaron 200 g de ARNt total que fueron capaces de obtener a partir de 140 kg de levadura.

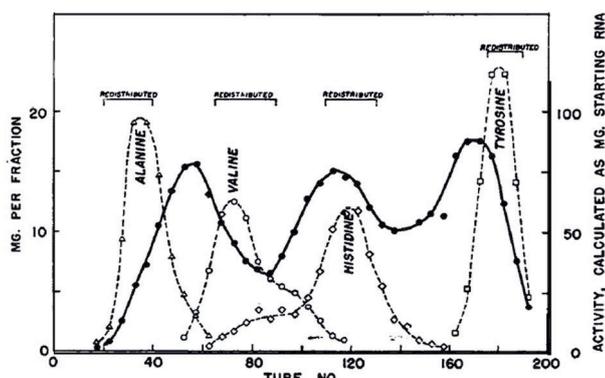


Fig. 2. 200-Transfer countercurrent distribution of 500 mg of bulk yeast transfer RNA

Figura 17. Imagen tomada de la referencia Holley (1968).

La obtención del ARNt purificado sólo representaba el primer reto, ya que su tamaño, de unos 80 ribonucleótidos, constituía un nuevo obstáculo para su completa caracterización. Los métodos de la época no permitían conocer la secuencia de un ARN si superaba unos pocos nucleótidos, por eso era necesario romperlo en fragmentos pequeños, individualizarlos, secuenciarlos y posteriormente resolver el rompecabezas. La utilización de la enzima ribonucleasa T1 permitía conocer la secuencia de un dinucleótido, pero afortunadamente métodos basados en nuevas enzimas como la fosfodiesterasa de veneno de serpiente am-

pliaron esta capacidad hasta unos seis. Después de dos años y medio, el grupo de Holley fue capaz de secuenciar todo el ARNt, y una de las primeras sorpresas fue la detección de muchas bases inusuales en la molécula, como la pseudouridina (Ψ), el dihidrouracilo (DHU), la inosina (I) o la timina (T), entre otras, y que posteriormente se comprobó que se debían a modificaciones posteriores a la formación del ARN.

Conocida la secuencia, el objetivo de Holley pasó a ser la determinación de la posible estructura secundaria que presentaría el ARNt. Claramente su interés residía en localizar la situación de las tres bases que reconocen el codón, el anticodón.

Partiendo de zonas de la secuencia que presentaban complementariedad de bases, y del análisis de zonas especialmente sensibles a la acción de las ARNasas, sugirieron la famosa estructura en trébol que todos tenemos en mente cuando hablamos de los ARN de transferencia.

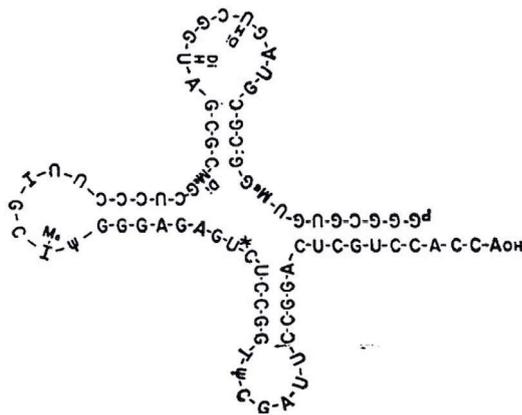


Fig.12. Suggested secondary structure of the alanine transfer RNA (from ref.25).

Figura 18. Imagen tomada de la referencia Holley (1968).

Todos los ARNt que secuenciaron desde 1965 eran capaces de presentar el mismo tipo de estructura, y siempre las tres bases que constituían el anticodón aparecían en el lazo intermedio. Aunque por sus estudios estaba claro que esta estructura, se plegaría de un modo más complejo, fueron necesarias nuevas técnicas para poder determinar la auténtica estructura tridimensional de los ARNt.

El gran esfuerzo realizado por todos los investigadores del grupo de Holley, necesitó un periodo posterior de tranquilidad en forma de año sabático, y como el propio Holley manifestó en su conferencia de aceptación del premio Nobel "*I strongly recommend sabbatical leaves*".

Consideraciones finales

El enorme logro que supuso el desciframiento del código genético ha determinado el modo en que hoy en día comprendemos cómo la información que contiene el ADN en su secuencia de bases da lugar a las proteínas de nuestras células, y en último término a las características que nos definen como organismos. Evidentemente quedaban nuevos descubrimientos relacionados con la codificación de la información, pero podemos considerarlos como particularidades o refinamientos del código principal.

De todos ellos, quizás el más importante fue el descubrimiento de que el código universal tenía excepciones. En 1979, Barrell, Bankier y Drouin, comparando la secuencia de la subunidad II de la proteína citocromo oxidasa con la del gen mitocondrial que la codifica llegaron a la conclusión de que el codón UGA codifica triptófano, en lugar de actuar como un codón de fin de la síntesis de la proteína. Otras diferencias puntuales se fueron descubriendo a lo largo de los años a medida que la secuenciación de ADN y de proteínas se convertía en algo rutinario. En general las excepciones se encuentran en el código de bacterias concretas, mitocondrias de organismos eucariotas y en los códigos nucleares de eucariotas unicelulares, y suelen afectar a alguno de los codones de fin que pasan a codificar algún aminoácido. En la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi?chapter=cgencodes>) se describen a día de hoy 30 códigos con sus peculiaridades puntuales que los diferencian del código genético universal.

También se descubrió posteriormente que, además de los 20 aminoácidos usuales, algunas proteínas concretas pueden contener dos aminoácidos diferentes que no se deben a modificaciones posteriores, sino que son capaces de incorporarse directamente durante el proceso de la síntesis. Estos aminoácidos - selenocisteína que es codificado por algunos genes concretos de eucariotas, bacterias y arqueas, y pirrolisina, detectado sólo en algunas arqueas y bacterias - utilizan codones de fin para su incorporación y ARNt propios, pero para su decodificación es necesario que los codones de fin se encuentren cercanos a secuencias concretas por las que el ARNm adquiere una estructura secundaria característica, si bien en el caso de la pirrolisina todavía se discute la señal que interviene en su codificación.

Estos hallazgos han abierto el camino hacia la recodificación *in vitro*, en la que un codón adquiriera otro significado, de modo que se puedan obtener proteínas que incorporen aminoácidos artificiales, dotándolas de características nuevas.

Para finalizar sólo comentar que desde que se descifró el código genético,

se abrieron múltiples campos de investigación que intentaban comprender las razones de que la codificación tuviera las relaciones encontradas y no otras diferentes. El origen y la evolución del código representan un reto que todavía está por resolver.

Seguramente los nuevos descubrimientos que se hagan en el futuro seguirán sorprendiéndonos, pero el impacto que tuvieron los descubrimientos realizados en las décadas de 1950 y 1960 parece difícil de superar.



Figura 19. Los galardonados con el Premio Nobel en 1968. De izquierda a derecha H. Gobind Khorana, Robert W. Holley, Luis W. Alvarez (Física), Marshall W. Nirenberg, Lars Onsager (Química) y Yasunari Kawabata (Literatura). Fotografía procedente del Archivo Bettmann.

Bibliografía

- Cobb, M. 2015. Life's greatest secret. *The race to crack the genetic code*. Basic Books.
- Crick, F. 1962. On the genetic code. Nobel Lecture (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/crick/lecture/>).
- Crick, F.H.C. 1963. The recent excitement in the coding problem. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 1: 163-217.
- Crick, F. 1989. *Qué loco propósito. Una visión personal del descubrimiento científico*. Tusquets Editores.
- Erdmann, V. A., y Barciszewski, J. 2011. 2011: 50th anniversary of the discovery of the genetic code. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 9546-9552.

- Franco Vera, L. 2008. El código genético cumple 40 años. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 102: 201-213.
- Grunberg-Manago, M. 1997. Severo Ochoa. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 43: 351-365.
- Holley, R. W. 1968. Alanine transfer RNA. Nobel Lecture (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/holley/lecture/>)
- Judson, H.F. 1987. El octavo día de la creación. Ediciones Castell Mexicana. S.A.
- Khorana, H. G. 1968a. Synthesis in the study of nucleic acids. The fourth jubilee lecture. *Biochemical Journal* 109: 709-725.
- Khorana, H. G. 1968b. Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. Nobel Lecture (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/khorana/lecture/>)
- Lengyel, P. 2012. Memories of a senior scientific on passing the fiftieth anniversary of the beginning of deciphering the genetic code. *Annual Review of Microbiology* 66: 27-38.
- Nirenberg, M. 1968. The genetic code. Nobel Lecture. (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/nirenberg/lecture/>).
- Nirenberg, M. 2004. Historical review: Deciphering the genetic code - a personal account. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 46-54.
- Ochoa, S. 1959. Enzymatic synthesis of ribonucleic acid. Nobel Lecture (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1959/ochoa/lecture/>).
- Ochoa, S. 1964. Chemical basis of heredity, the genetic code. *Experientia* 20: 57-112.
- Salas, M., Smith, M.A., Stanley, W.M., Wahba, A.J., y Ochoa, S. 1965. Direction of reading of the genetic message. *The Journal of Biological Chemistry* 240: 3988-3995.
- Steinman, R. M. y Moberg, C. L. (1994). A triple tribute to the experiment that transformed biology. *Journal of Experimental Medicine* 179:379-384.
- Szymanski, M., y Barciszewski, J. 2017. The path to the genetic code. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861: 2674-2679.
- Watson, J.D. 2003. ADN. *El secreto de la vida*. Taurus. NOTA: existe una segunda edición revisada y actualizada publicada por Taurus en 2018.
- Watson, J.D. 2006. *Genes, chicas y laboratorios. Después de la doble hélice*. Tusquets Editores. NOTA: el título original del presente libro es *Genes, Girls and Gamow. After the double helix*.
- Watson, J.D., y Crick, F.H.C. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-967.