

ÁNGEL HERRÁEZ

Texto ilustrado e interactivo de

Biología molecular e ingeniería genética

— 2.^a edición —

Conceptos, técnicas y aplicaciones
en ciencias de la salud



Texto ilustrado e interactivo de
**Biología molecular
e ingeniería genética**

Conceptos, técnicas y aplicaciones
en ciencias de la salud

2.^a edición

ÁNGEL HERRÁEZ

Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá,
Alcalá de Henares, Madrid

Autores de la primera edición: José Luque y Ángel Herráez



ELSEVIER

Ámsterdam Barcelona Beijing Boston Filadelfia Londres Madrid
México Milán Múnich Orlando París Roma Sídney Tokio Toronto



Primera edición 2001

© 2012 Elsevier España, S.L.
Travessera de Gràcia, 17-21. 08021 Barcelona, España

Fotocopiar es un delito (Art. 270 C.P.)

Para que existan libros es necesario el trabajo de un importante colectivo (autores, traductores, dibujantes, correctores, impresores, editores...). El principal beneficiario de ese esfuerzo es el lector que aprovecha su contenido.

Quien fotocopia un libro, en las circunstancias previstas por la ley, delinque y contribuye a la «no» existencia de nuevas ediciones. Además, a corto plazo, encarece el precio de las ya existentes.

Este libro está legalmente protegido por los derechos de propiedad intelectual. Cualquier uso fuera de los límites establecidos por la legislación vigente, sin el consentimiento del editor, es ilegal. Esto se aplica en particular a la reproducción, fotocopia, traducción, grabación o cualquier otro sistema de recuperación de almacenaje de información.

ISBN: 978-84-8086-647-7

Depósito Legal: B-6282-2012
Coordinación y producción editorial: Foletra S.A.
Impreso en España por Gráficas Muriel

Sección I

Estructura y función del material genético

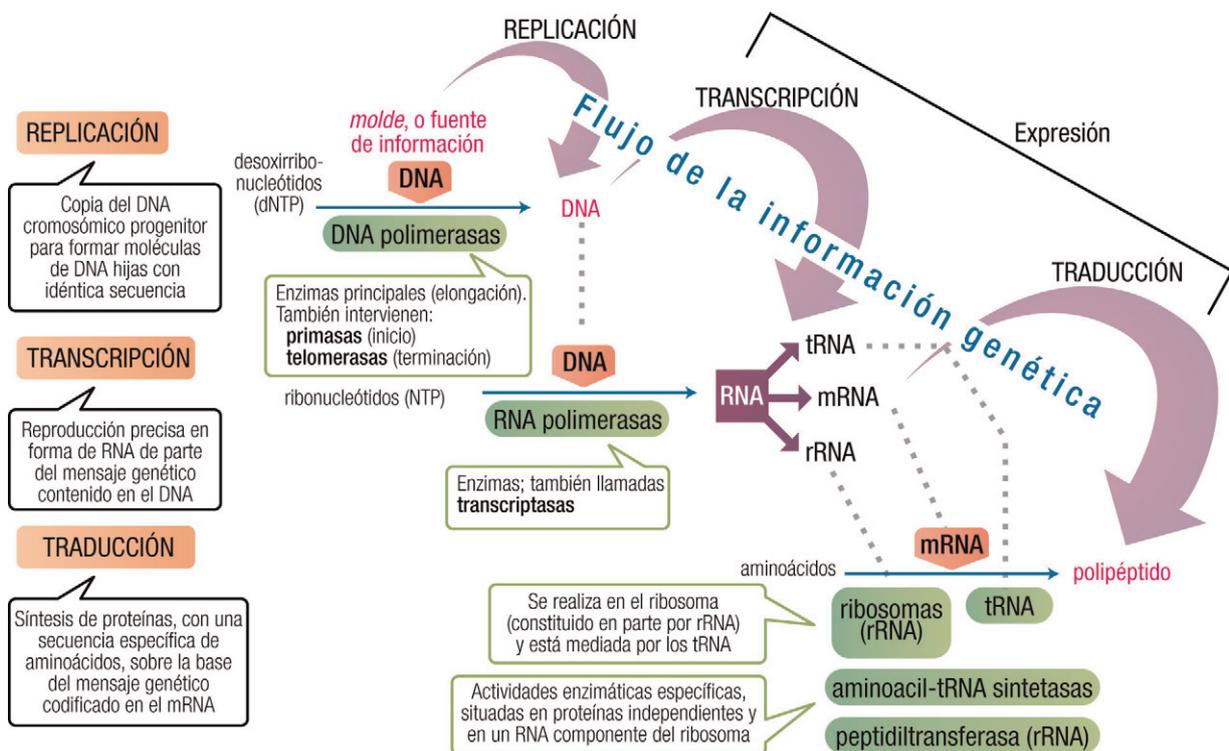


Introducción y aspectos generales

1.1 TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA	3	1.3.1 Genoma de procariotas y eucariotas	5
1.2 EL DNA COMO MATERIAL GENÉTICO	4	1.3.2 Magnitud del genoma nuclear de eucariotas	7
1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA	5	1.3.3 Magnitud y características del genoma mitocondrial	10

A modo de introducción general al planteamiento de la biología molecular y la ingeniería genética en este texto, se comenzará describiendo de modo sucinto los tres aspectos que mejor ponen de manifiesto el papel de los ácidos nucleicos en la célula y en especial del DNA como portador de la información genética: por un lado, la descripción global de las rutas de transmisión de la información genética; en segundo lugar, los antecedentes experimentales que demostraron el importante papel de los ácidos nucleicos; finalmente, las características generales del genoma de eucariotas, como punto de partida para el estudio posterior en profundidad de los conceptos teóricos, las tecnologías y las aplicaciones de esta materia en las ciencias de la salud.

1.1 TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA



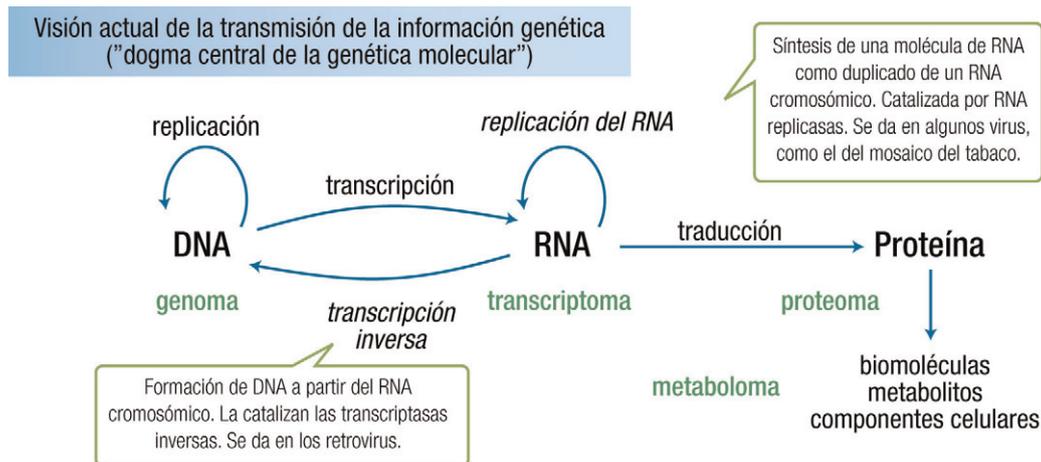
1.1

Francis Crick introdujo el término “dogma central de la genética molecular” para describir, incluso antes de conocerse por completo su relevancia en los seres vivos, el flujo de la información genética y la utilización

de dicha información en las células. En concreto, la transmisión de la información contenida en la secuencia del DNA a las células y organismos descendientes mediante la replicación, y su expresión en biomoléculas funcionales mediante los procesos de transcripción y traducción. Esta descripción comprende, pues, el conjunto de relaciones generales existentes entre el DNA, el RNA y las proteínas.

Debe evitarse la posible interpretación errónea de la representación abreviada de este “dogma”, $DNA \rightarrow RNA \rightarrow proteína$, que no indica la transformación de una molécula en otra, tal como se utiliza normalmente en las rutas metabólicas, sino que cada elemento en este esquema aporta la información necesaria para la síntesis del siguiente. En este sentido, es importante el concepto de *plantilla* o *molde* molecular: aunque cada paso está catalizado por una enzima, los sustratos (nucleótidos, aminoácidos) no son seleccionados por dicha enzima, sino que vienen especificados por la intervención del molde, en concreto por su secuencia de nucleótidos.

El progreso en el conocimiento de los procesos de transmisión de la información genética obligó a la ampliación de este esquema básico original para acomodar otros procesos que también ocurren, al menos en algunos organismos particulares, como es el caso de algunos virus:



1.2

Debe resaltarse también el papel esencial de los productos finales (proteínas y algunos RNA) como componentes estructurales de todas las células y como responsables de la catálisis de las reacciones bioquímicas que conducen a la formación de las biomoléculas.

1.2 EL DNA COMO MATERIAL GENÉTICO

El conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos se inicia en el siglo XIX con el aislamiento a partir de núcleos celulares de un compuesto denominado inicialmente **nucleína**, formado por una parte ácida (hoy, DNA) y una parte básica (proteína), así como con el estudio parcial de las propiedades de la nucleína y de su relación con la herencia celular. Sin embargo, la estructura sólo se conoció a mediados del siglo XX, tras demostrarse que el DNA era el componente cromosómico depositario de la información genética. Cabe destacar en este sentido, como antecedentes clave, los experimentos de Frederick Griffith, Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, en 1928 y 1944, y de Alfred D. Hershey y Martha Chase, en 1952, que constituyen sendos hitos en la identificación del DNA como material genético.

WWW

Web 1.1. Experimentos que demostraron la identidad molecular del material genético.

Tras estas aportaciones iniciales identificando el DNA como portador de la información genética, el verdadero inicio de la biología molecular moderna lo constituyó la propuesta de estructura en doble hélice para el DNA, formulada en 1953 por James D. Watson y Francis Crick. A partir de este momento, casi todo el esfuerzo realizado se centra en el estudio del DNA genómico, desde el punto de vista estructural y funcional, en procariontas y eucariontas, con una atención especial a mamíferos en general y humanos en particular. Los avances logrados, tanto teóricos como técnicos y aplicados, han sido enormes. A ello ha contribuido la aparición de la ingeniería genética, como principal área derivada de la biología molecular. Una vez concluido en 2003 el Proyecto Genoma Humano (genómica estructural) se inició el análisis de las funciones de cada gen

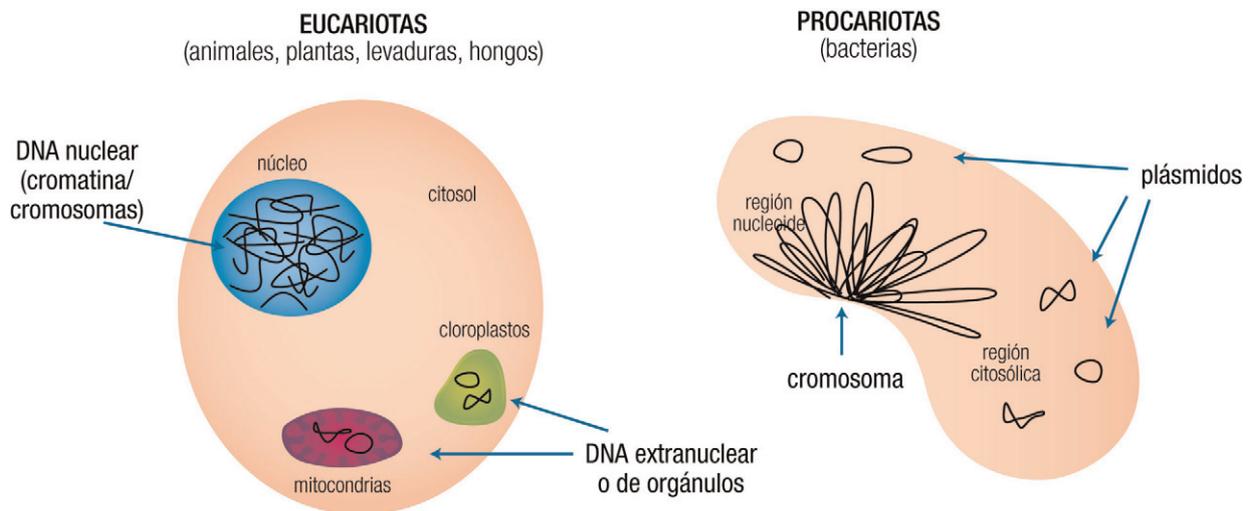
(genómica funcional) y la disección de la estructura y función de las proteínas (proteómica). Como expresión de estos nuevos conocimientos ha surgido una gran variedad de campos de actividad en las ciencias de la salud (medicina, farmacia y veterinaria), tales como anticuerpos monoclonales, métodos inmunoquímicos, biochips para el diagnóstico, clonación molecular y clonación animal, farmacogenes, ingeniería de proteínas, proteínas recombinantes de interés diagnóstico y terapéutico, sondas de hibridación, terapia celular y terapia génica, transferencia de genes, vectores, virus, etc. Nuestro objetivo no es describir los aspectos concretos de estos campos, sino sólo poner de manifiesto las bases moleculares que les sirven de soporte, como punto de partida para un estudio detenido de cada campo en su correspondiente área de conocimiento. Con este fin se presentan en este primer capítulo las características generales del genoma de eucariotas.

1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA

1.3.1 Genoma de procariontes y eucariotas

Conceptualmente, el genoma (de la raíz griega *gen*, origen) puede ser considerado como el “patrimonio genético” de un organismo, es decir, el conjunto total de material genético hereditario presente en una célula. Debe incluirse en este concepto tanto el material genético existente en el núcleo como el que contienen mitocondrias y cloroplastos. Por otra parte, es más adecuada esta definición que la que se emplea en ocasiones, “conjunto de genes de un organismo” pues, como se estudiará más adelante, existe gran cantidad de material genético que no se expresa. La mayoría de organismos poseen un genoma constituido por DNA, pero algunos virus tienen un genoma de RNA. La parte codificante del genoma específica, en forma de genes, la información necesaria para dar lugar a productos génicos, moléculas funcionales que son las proteínas y los RNA. Estos productos son responsables de toda la actividad celular, de sus características morfológicas y de muchas de las claves del comportamiento de un organismo, desde la embriogénesis a su crecimiento, maduración física e intelectual, estado adulto, reproducción, y todas sus funciones metabólicas y actividades fisiológicas.

Con respecto al estudio del genoma, comenzaremos por resaltar las características diferenciales de procariontes y eucariotas:



Nota: Aunque, por claridad, en la figura no se haya reflejado, el tamaño de las células eucarióticas es, en general, bastante mayor comparativamente con las procariontes. Además, la cantidad de DNA que forma los cromosomas eucarióticos es muy superior a la correspondiente al cromosoma procarionte. Igualmente, los cromosomas de orgánulos son mayores que los plásmidos.

1.3

Recuérdese que los **procariontes** (o **procariontes**) son organismos unicelulares (bacterias y arqueas) de tamaño pequeño (entre 0,2 y 5 μm de diámetro), con membrana plasmática rodeada generalmente por una pared celular rígida y con diversas estructuras superficiales (pili, flagelos, etc.), pero carecen de membrana nuclear, de orgánulos y de cualquier otro tipo de compartimentación interna. El **genoma de procariontes** es, comparativamente, de pequeño tamaño y relativamente sencillo. Se reduce a un único *cromosoma* formado por una molécula circular de DNA, localizada en suspensión en el citosol pero anclada a la membrana

constituyendo la *zona nuclear* o *nucleoide*, sin membrana que la delimite. Es frecuente encontrar, además, una pequeña cantidad de material genético extra, no esencial, en forma de pequeñas moléculas circulares de DNA, llamadas *plásmidos*. Los plásmidos poseen la propiedad de replicación autónoma, es decir, sin coordinación alguna con la división celular. Desempeñan un papel importante, al codificar proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otros materiales tóxicos, y ofrecen una importante aplicación como herramientas en la tecnología del DNA recombinante, concretamente como vectores para la incorporación de DNA a células.

Las células de **eucariotas** (o **eucariontes**), tanto multicelulares (animales y plantas) como unicelulares y multicelulares simples (protozoos, hongos y algas), son más variadas y complejas. Son de mayor tamaño (entre 10 y 50 μm), poseen membrana plasmática, pueden poseer *pared celular* (plantas), tienen citoesqueleto interno, y muestran una gran compartimentación citoplasmática, con diferentes tipos de orgánulos subcelulares (*mitocondrias* en animales y plantas, *cloroplastos* en plantas, *lisosomas* en animales, etc.) y otras estructuras (*retículo endoplásmico*, *complejo de Golgi*, etc.). El *núcleo* tiene como característica esencial la presencia de una *membrana nuclear* doble. En el genoma de eucariotas debe distinguirse entre el genoma nuclear y el de orgánulos. El **genoma nuclear** aparece bajo dos formas estructuralmente diferentes a lo largo del ciclo celular: la **cromatina** como material filamentososo disperso por la mayor parte del núcleo en la interfase (entre divisiones), y los **chromosomas**, fácilmente observables como entidades morfológicas o corpúsculos independientes en los momentos previos a la división celular. Ambas formas están constituidas por las mismas moléculas lineales muy largas de DNA bicatenario, estrechamente asociado a proteínas. El **genoma de orgánulos** (cloroplastos y mitocondrias) está formado por cromosomas circulares, al igual que el de procariontas.

Algunas características diferenciales del genoma humano (célula somática, diploide, 2n)

	NUCLEAR	MITOCONDRIAL
Tamaño	6,4 Gb = 6.400 Mb = 6.400.000 kb = $6,4 \cdot 10^9$ pb	16,5 kb $\times m$
Tipo de DNA	Lineal, bicatenario	Circular, bicatenario
Número de cromosomas	23 distintos, 2 copias: 46 en total	Uno, con varias copias en cada mitocondria; entre 200 y 2.000 copias por célula
Presencia de nucleosomas	Sí	No
Proteínas asociadas	Alrededor del 50% de la masa, histonas y otras	Poco numerosas o ausentes
DNA codificante	Entre 2 y 5%	$\sim 93\%$
DNA repetitivo	Abundante ($\sim 40\%$)	Prácticamente nada
Número de genes	~ 25.000	37
Densidad de genes	~ 1 gen cada 128 kb	1 gen cada 0,45 kb
Presencia de intrones en los genes	En la mayoría	Ausentes

Las cifras relativas al número de genes han sufrido fuertes variaciones en los años recientes y aún son dispares dependiendo de la fuente que se consulte. Ello se debe a que no es sencillo definir qué región del DNA genómico es o no un gen, e incluso identificar con certeza sus puntos de comienzo y de fin, los que definen un “marco de lectura abierto” (pág. 314); las técnicas de detección e identificación de genes en la secuencia del genoma continúan evolucionando. Como ejemplos de situaciones que hacen difícil esta precisión pueden mencionarse la existencia de copias de genes que no son funcionales (pseudogenes, pág. 113); el tamaño mucho menor de las regiones codificantes (exones) en la mayoría de genes frente a las no codificantes; la posibilidad de expresión en formas alternativas de algunos genes, dando lugar a diferentes productos (ajuste alternativo, pág. 306); los genes que codifican RNA funcionales son cortos y carecen de marco de lectura, etc. Todo ello complica la definición e identificación inequívocas de un segmento del genoma como un gen. Igualmente varían las cantidades derivadas, como la fracción del genoma constituida por regiones codificantes. Lo importante es, en todo caso, transmitir una idea de las cifras aproximadas, los diferentes tipos de secuencia implicados y las diferencias entre el genoma nuclear de los eucariotas y los genomas de orgánulos y de procariontas.

1.3.2 Magnitud del genoma nuclear de eucariotas

El material genético contenido en el núcleo supone generalmente más del 90% del total de DNA celular. El primer aspecto a destacar es su **magnitud** con respecto al genoma mitocondrial y al de procariotas. Además, a diferencia de éstos, el genoma nuclear está repartido en varios cromosomas, en número diferente según la especie, generalmente muy grandes y con el DNA muy condensado al estar estrechamente asociado con histonas y otras proteínas.

La magnitud del genoma nuclear viene determinada por la cantidad total de DNA en el conjunto de cromosomas de una célula. Ésta se puede expresar de varias formas:

- En número de cromosomas, designado por n en organismos haploides y $2n$ en diploides, en los que hay 2 copias de cada cromosoma.
- En masa de DNA (**pg** = picogramos).
- Como **valor C**, notación que expresa la cantidad de DNA total en el genoma de una célula con respecto a la presente en una célula haploide de la misma especie. Como se verá, en células diploides el valor puede ser de $2C$ o $4C$, dependiendo del estadio del ciclo celular.
- Lo más habitual es expresarlo en longitud: **pb** = pares de bases en bicatenario, o **nt** = nucleótidos en monocatenario. Para moléculas largas se emplean kilobases (**kb** o **kpb** = 10^3 pb) o megabases (**Mb** o **Mpb** = 10^6 pb).

Comparaciones que resaltan la magnitud del DNA nuclear en eucariotas:

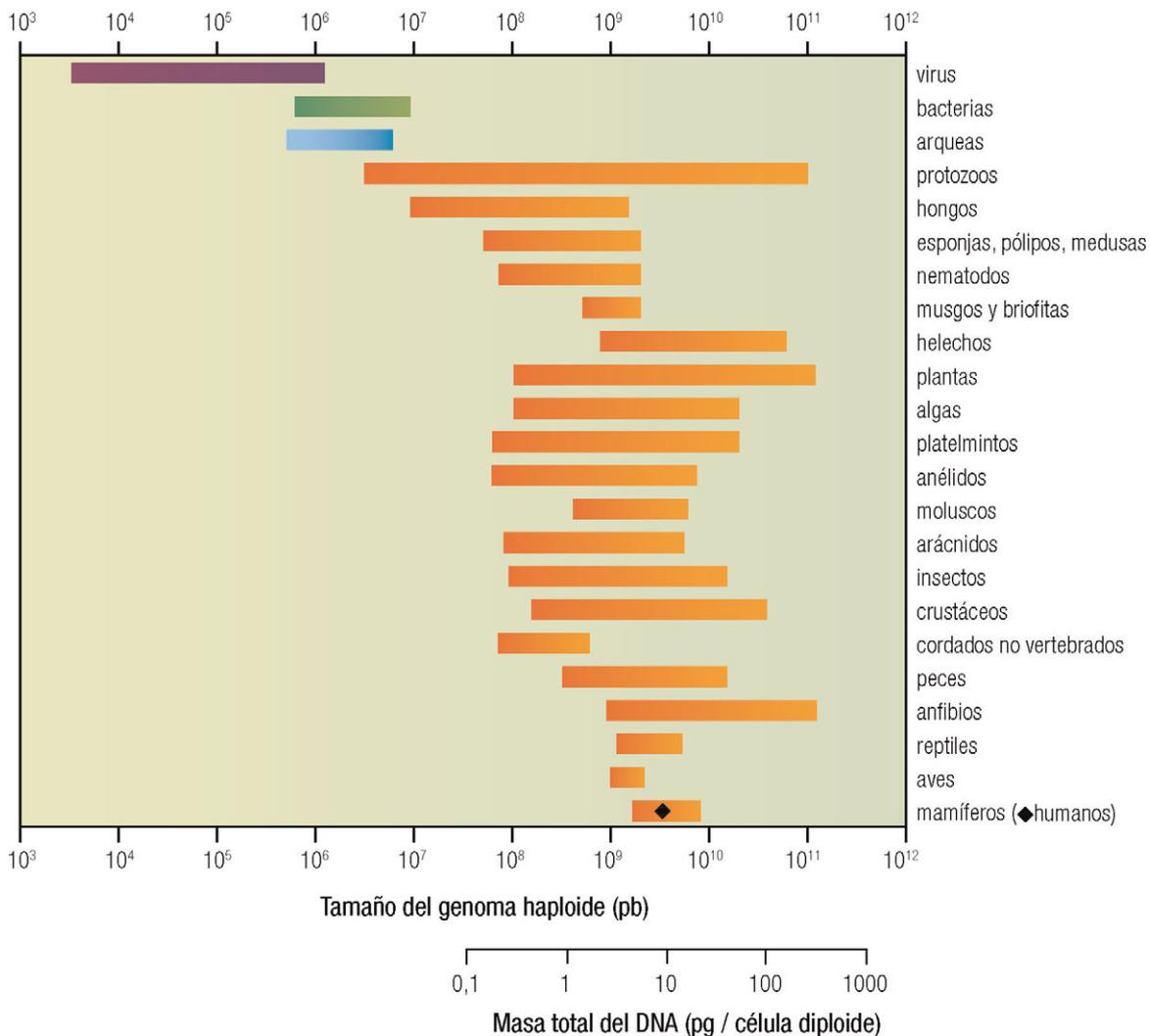
- Por regla general, la cantidad total de DNA en una célula diploide eucariótica es entre 10 y 1.000 veces superior que la de una célula procariótica, aunque la diferencia puede llegar hasta un factor de 200.000, por ejemplo, considerando los casos extremos de algunas plantas y anfibios respecto a la bacteria de menor tamaño, el micoplasma.
- En forma lineal, la longitud total del DNA de una célula humana somática (diploide, 46 cromosomas) sería de unos **2,2 metros**.
- Al referir esta cifra al número de células del cuerpo humano, la longitud total resultante, **110 billones de metros** ($110 \cdot 10^{12}$ m), equivale a casi 3 millones de vueltas a la Tierra, 143.000 viajes de ida y vuelta a la Luna o 370 viajes de ida y vuelta al Sol.
- Para escribir la secuencia completa del genoma de una célula humana diploide se necesitarían 1.280 tomos, que ocuparían 64 m de estantería.
- Para leer en voz alta dicha secuencia se necesitarían 20 años y 3 meses.
- Para almacenar la secuencia completa del genoma de una célula humana diploide en formato electrónico se requieren 1,5 GB (gigabytes).
- Las cifras se hacen casi incomprensibles si se quiere considerar la magnitud total del DNA de la humanidad (actualmente $7 \cdot 10^9$ individuos).
- Datos empleados:
 - N.º de células en el cuerpo: estimado al menos en unos 50 billones = $50 \cdot 10^{12}$ células.
 - Circunferencia de la Tierra: 40.000 km.
 - Distancia promedio entre la Tierra y la Luna: 384.000 km.
 - Distancia promedio entre la Tierra y el Sol: 150 millones de km.
 - 5.000 letras por página y 1.000 páginas por tomo, con un grosor de 5 cm.
 - Velocidad de lectura: 10 letras por segundo.

Procede, por otra parte, analizar la magnitud del genoma de forma comparativa tanto entre individuos de una misma especie como entre especies diferentes:

- a) Todas las células de los individuos **de una misma especie** poseen la misma cantidad total de DNA y número de cromosomas. De esta generalización deben exceptuarse las células germinales, dedicadas a la reproducción del individuo, que poseen la mitad. En todos los casos, estas cifras se refieren a células en un mismo estado de división celular (normalmente la interfase) pues, como se verá posteriormente

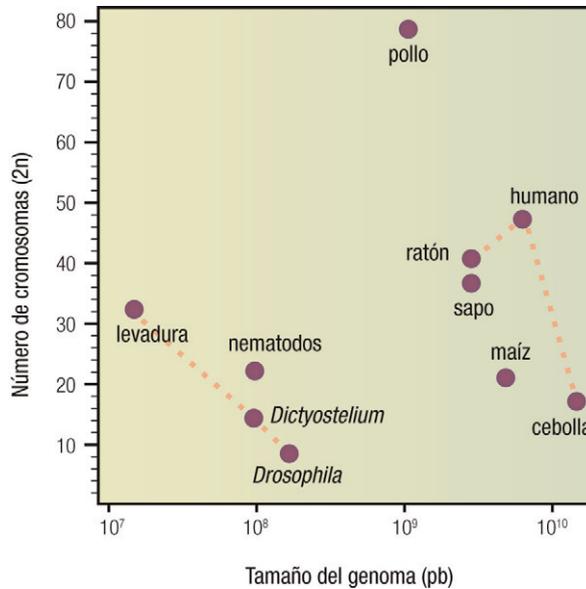
(capítulo 8), la cantidad total de DNA, aunque no el número de cromosomas, varía en una célula a lo largo del ciclo celular.

- b) El contenido total de DNA, expresado en pg o en n.º de pb, y el número de cromosomas varían ampliamente **entre especies diferentes**. A menudo se ha asumido que el tamaño del genoma pueda estar relacionado con el grado de complejidad del organismo, o su posición en la escala evolutiva, pero hoy en día está claro que esto no es así. Solamente al comparar virus, procariotas y eucariotas se aprecia una diferencia significativa en la magnitud del genoma. Dentro de los eucariotas, el tamaño del genoma varía ampliamente pero de forma independiente de la posición en la escala evolutiva o de lo que pudiera, bajo un punto de vista antropocéntrico, entenderse como *complejidad* de la especie. Así, por ejemplo, la célula humana contiene 700 veces más DNA que la de *E. coli*, pero 300 veces menos que las células de algunas salamandras y plantas angiospermas, e incluso menos que algunos protozoos (eucariotas unicelulares).



1.4

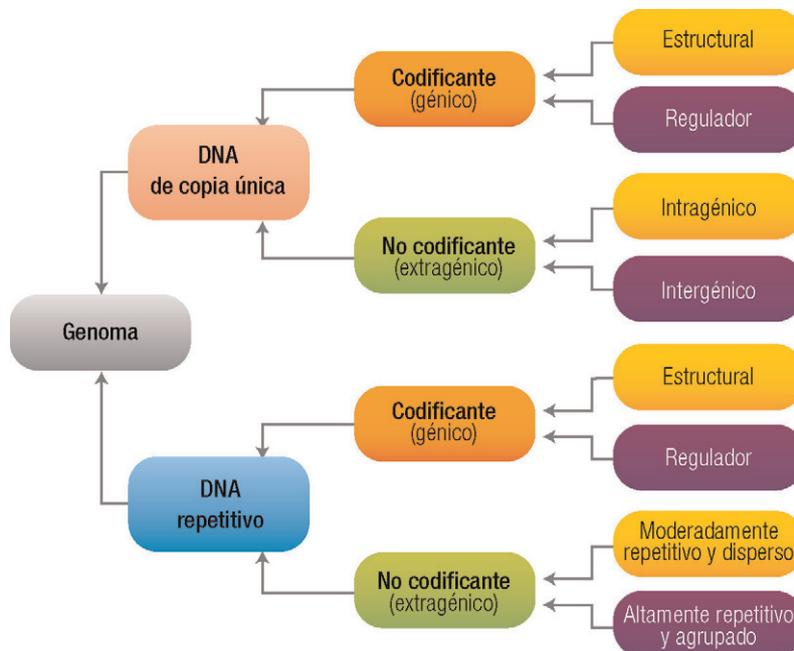
Por otro lado, no existe correlación alguna entre el tamaño del genoma de una especie y el número de cromosomas que lo componen. Por ejemplo, mientras que el genoma humano diploide ($6,4 \cdot 10^9$ pb) está repartido en 46 cromosomas (23 pares, $n = 23$), las células de ratón, con un genoma menor ($3 \cdot 10^9$ pb), poseen menor número de cromosomas (40), mientras que en las células de cebolla un genoma 2 veces mayor que el humano ($1,5 \cdot 10^{10}$ pb) está contenido en sólo 16 cromosomas. De forma similar, la mosca de la fruta, con un genoma ($1,7 \cdot 10^8$ pb) mucho mayor que el de la levadura ($1,6 \cdot 10^7$ pb), posee un número muy inferior de cromosomas (8 frente a 32).



1.5

Esta ausencia de correlación entre cantidad de material genético y complejidad del organismo es una de las pautas para sugerir que el tamaño de los genomas de organismos superiores es muy superior al necesario y, por tanto, que una gran parte es *no codificante*, es decir, no está organizado en genes, nunca traduce su información a un producto génico (RNA o proteína). De todos modos, se debe ser cauto al considerar una categorización de los organismos de acuerdo a su *complejidad*, pues es muy discutible que un ser humano sea más complejo que, digamos, un gusano. En cualquier caso, la hipótesis de una importante fracción no codificante en el genoma se ha confirmado. Por ejemplo, se ha encontrado que los genes tienen una longitud media de alrededor de 1.000 pb. Asumiendo esta cifra, el genoma humano haploide podría contener unos 3,2 millones de genes y, sin embargo, se estima hoy en día que sólo contiene unos 25.000, de modo que la fracción codificante sólo alcanza alrededor del 1% del DNA total.

Aunque la función de los genes está bien establecida para una pequeña fracción del total presente en el genoma humano, la diversidad en la cantidad total de DNA en los genomas puso de manifiesto la necesidad de estudiar con mayor precisión la organización estructural de genes y genomas a nivel molecular (capítulos 9 y 17). Las características más relevantes del genoma nuclear son la presencia de grandes regiones que no codifican producto génico alguno (*DNA no codificante*) y la existencia de secuencias de DNA que se repiten un número más o menos elevado de veces (*DNA repetitivo*). Como se estudiará con detenimiento posteriormente, hay que unir a ello la existencia de una enorme diversidad en la secuencia (polimorfismo, capítulo 24) en distintas regiones del DNA, tanto sencillas como repetitivas, codificantes o no.



1.6

1.3.3 Magnitud y características del genoma mitocondrial

El genoma de orgánulos (mitocondrias en animales, mitocondrias y cloroplastos en plantas) es, posiblemente, un vestigio del cromosoma de bacterias arcaicas que accedieron al citoplasma de eucariotas primitivos, para dar lugar tras la evolución a dichos orgánulos (hipótesis endosimbionte). Se cree que la mitocondria (orgánulo que aporta casi toda la energía que necesitan las células) surgió al acumularse el oxígeno en la atmósfera terrestre. Posiblemente, la mitocondria y el núcleo de la célula eucariótica se formaron en paralelo, al incorporarse por endocitosis células procariotas aeróbicas al interior de la célula eucariótica anaeróbica y fusionarse ambas. Con el tiempo, la mayoría de los genes procarióticos (genes protomitocondriales) se integraron en el genoma nuclear, con lo que el eucariota primitivo anaeróbico ya podía vivir en una atmósfera rica en oxígeno; sólo una pequeña fracción del genoma procariótico primigenio permaneció en la mitocondria.

Las células animales poseen un número muy variable de mitocondrias, dependiendo de la especie y del tejido. Cada mitocondria posee varias copias de un único cromosoma (habitualmente menos de una decena), situadas en la matriz mitocondrial y ancladas a la membrana interna. En consecuencia, el número de copias de DNA mitocondrial (mtDNA) en una célula oscila entre 200 y 2.000 (algunas referencias hablan de hasta 100.000 en casos puntuales). El cromosoma mitocondrial es bicatenario y circular, como el de procariotas, aunque de tamaño muy inferior: 16.569 pb en humanos, con una longitud de 5 μm y una masa molecular de 10 MDa; esto supone una longitud 3.000 veces inferior a la del cromosoma nuclear más pequeño. Teniendo en cuenta el número de copias totales (2 del genoma nuclear frente a múltiples, y muy variables, del mitocondrial), se puede calcular que el DNA mitocondrial total supone, dependiendo del tejido, entre un 0,05 y un 0,5% del DNA total de la célula (quizás hasta el 20% en los casos extremos mencionados). Finalmente, la situación es similar para el cromosoma de cloroplastos, que es igualmente bicatenario y circular, pero de mayor tamaño que el mitocondrial.

A diferencia del DNA nuclear, con abundantes repeticiones y regiones no codificantes, el mtDNA es en su casi totalidad no repetitivo y codificante. En concreto, el cromosoma mitocondrial humano contiene un total de 37 genes que suponen el 93% del DNA. Entre ellos se cuentan 2 genes para RNA ribosómico, 22 para RNA transferente y 13 para proteínas; éstas forman parte de los complejos enzimáticos respiratorios I, III, IV y V, pero suponen sólo el 5% de las proteínas mitocondriales, estando el resto codificadas por DNA nuclear.

Condensación del DNA y cromosomas

7.1 SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA	79		
7.1.1 Superenrollamiento del DNA circular	80	7.2.2.1 Disposición en nucleosomas y fibra de 10 nm	86
7.1.1.1 Conformación relajada	80	7.2.2.2 Formación de la fibra de 30 nm	87
7.1.1.2 Conformaciones superenrolladas	80	7.2.2.3 Cromatina o cromosoma interfásico	87
7.1.1.3 Demostración experimental del superenrollamiento	81	7.2.2.4 Cromosoma metafásico	89
7.1.2 Análisis teórico del superenrollamiento	82	7.3 EL CROMOSOMA METAFÁSICO	89
7.1.3 Superenrollamiento del DNA lineal	83	7.3.1 Aspectos citogenéticos	89
7.2 CONDENSACIÓN DEL DNA EN EUCARIOTAS	83	7.3.1.1 Morfología de los cromosomas	89
7.2.1 Proteínas componentes de la cromatina	84	7.3.1.2 Cariotipo y su análisis	90
7.2.1.1 Histonas	84	7.3.1.3 Bandeado	92
7.2.1.2 Proteínas no histónicas	84	7.3.2 Regiones con significado funcional	93
7.2.2 Niveles de condensación del DNA nuclear eucariótico	85	7.3.2.1 Centrómero	93
		7.3.2.2 Telómeros	94

Los ácidos nucleicos no se encuentran en las células en las formas extendidas correspondientes a su estructura primaria y secundaria, sino molecularmente más compactados, lo que hemos denominado (pág. 28) nivel estructural “de orden superior”. En el caso del DNA, parte de esta compactación o *condensación* viene representada por el denominado *superenrollamiento*, o retorcimiento de la cadena sobre sí misma. La condensación se completa mediante la asociación estrecha con proteínas que inducen el plegamiento de la doble hélice del DNA. La contribución de esta asociación con proteínas posee una relevancia especial en el caso del DNA nuclear eucariótico.

7.1 SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA

El superenrollamiento, como parte de la condensación del DNA en general, posee un especial significado para entender la organización estructural del cromosoma. En concreto, contribuye a explicar cómo un DNA de tan gran magnitud puede alojarse en el interior de la célula (procariontas) o del núcleo (eucariotas), cuyas dimensiones son muy inferiores a la longitud teórica del DNA en doble hélice. Por ejemplo:

DNA	Tamaño	Longitud en forma de B-DNA	Dimensiones en las que se compacta
<i>E. coli</i>	$4,7 \times 10^6$ pb	1,6 mm = 1.600 μ m	2 μ m (célula)
Cada cromosoma humano	$50 - 250 \times 10^6$ pb	17-85 mm	4-6 μ m (núcleo)
Genoma humano diploide	$6,4 \times 10^9$ pb	2,1 m	



Se entiende por *superenrollamiento* (enrollar algo que ya está enrollado) del DNA el retorcimiento o giro sobre sí misma de la doble hélice (que ya lleva implícito el **enrollamiento** mutuo de dos hebras), de forma que el eje de la doble hélice no sigue una línea recta, sino otra hélice (una “superhélice”). Su origen, como se verá a continuación, es la introducción de una tensión estructural en la propia molécula. Aparece de algún modo en todos los DNA celulares y se encuentra estrechamente regulado *in vivo* por la acción de las *topoisomerasas* (pág. 155). En resumen, las dos hebras del DNA sufren un enrollamiento, mientras que la doble hélice sufre un superenrollamiento.

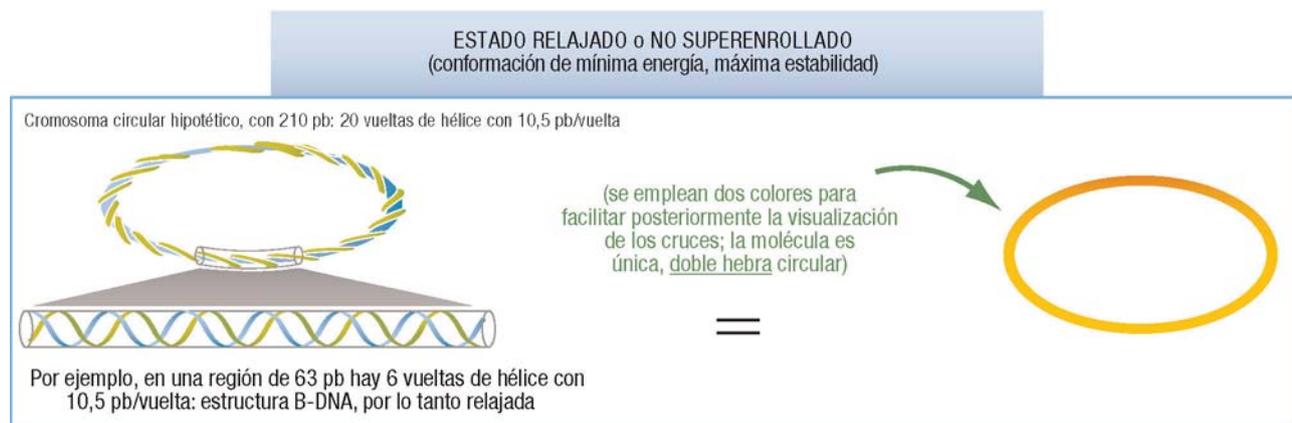
Un ejemplo intuitivo del concepto de superenrollamiento es el cordón del teléfono, que de por sí presenta un enrollamiento helicoidal y, con el uso cotidiano, termina por adoptar un enrollamiento adicional (cordón retorcido). Este símil se utilizó para explicar muchas propiedades del DNA vírico (circular y pequeño). Un modelo más próximo a la estructura del DNA es una cuerda formada por dos hebras arrolladas entre sí. Aunque la cuerda tiende a mantener ese arrollamiento, puede ser forzada manualmente a un mayor o menor número de vueltas entre sus hebras (torsión), con lo que se genera una tensión que se libera mediante la formación de superenrollamientos (v. web 7.1).

7.1.1 Superenrollamiento del DNA circular

Aunque afecta tanto a procariotas como a eucariotas, el superenrollamiento es más conocido y de comprensión más sencilla en los primeros, por lo que así se abordará a continuación. Estas consideraciones también son válidas para el DNA de plásmidos procarióticos y el de cromosomas mitocondriales y cloroplásticos de eucariotas, dado que en todos estos casos la molécula de DNA muestra una estructura *circular* o cerrada (una doble hélice con sus extremos unidos entre sí por enlace covalente), en la que es fácil apreciar los fenómenos de superenrollamiento.

7.1.1.1 Conformación relajada

La conformación adoptada por el DNA en su forma B (aproximadamente 10,5 pb/vuelta) corresponde a un estado **estable**, de mínima energía, que se considera **no superenrollado** o *relajado* cuando el eje de la doble hélice se puede disponer por completo sobre un plano.



7.2

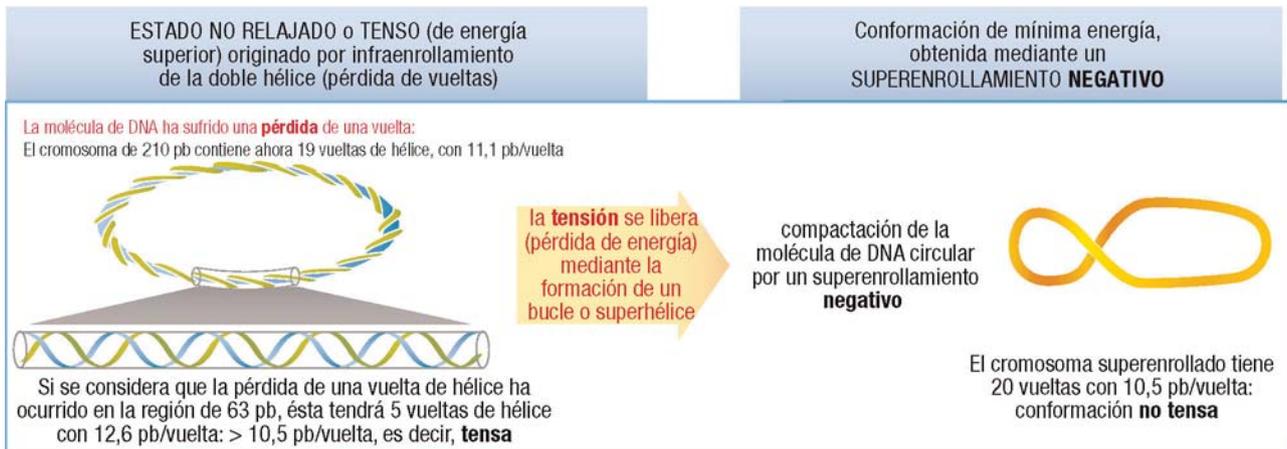
7.1.1.2 Conformaciones superenrolladas

En las células, el DNA generalmente no se encuentra en la conformación relajada, sino en un estado **no relajado**, **superenrollado** y más compacto. Éste lo producen topoisomerasas que, mediante el corte transitorio de una o ambas hebras, introducen un aumento o una disminución en el número de vueltas de hélice (pág. 155).

En ambos casos se produce una tensión estructural, debida a un plegamiento local de las hebras y a una posición relativa de los nucleótidos diferentes de su geometría energéticamente más estable, la del B-DNA. Esta tensión se contrarresta en la molécula mediante la formación de un superenrollamiento: la cadena entera del DNA gira sobre sí misma de forma que las bases puedan disponerse de nuevo del modo más próximo a la conformación B-DNA.

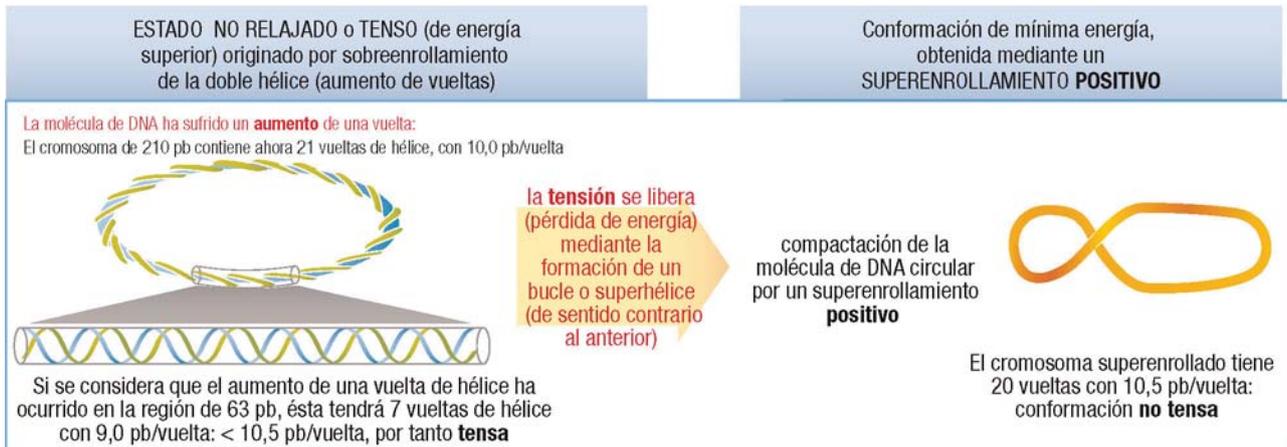
En primer lugar, si se **reduce** el número de vueltas de hélice, la tensión se libera formando una superhélice a la que se le asigna un valor **negativo** de superenrollamiento.

7.3a



Si, por el contrario, se **aumenta** el número de vueltas de hélice, la tensión se libera por formación de una superhélice de sentido opuesto, con un superenrollamiento **positivo**.

7.3b



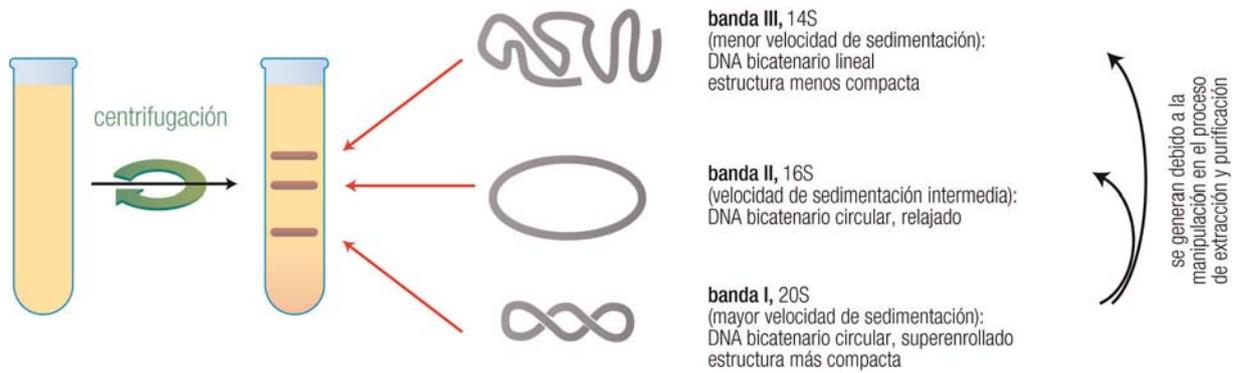
www

Web 7.1. Generación de superenrollamientos positivo y negativo.

7.1.1.3 Demostración experimental del superenrollamiento

De estas dos posibilidades, el DNA se encuentra habitualmente en las células en un estado de **superenrollamiento negativo**. El primer indicio experimental que llevó a proponer la hipótesis del superenrollamiento de las cadenas se obtuvo gracias a la aplicación de la técnica de *ultracentrifugación isopícnica* (basada en el equilibrio de sedimentación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio, pág. 126).

Se observó que el DNA del *polioma*, un pequeño virus que causa cáncer a ratones, se separaba formando tres bandas en el gradiente. Las tres fracciones, sin embargo, tenían la misma masa molecular, por lo que la diferencia debía estar en su forma o estructura. Se pudo comprobar que las moléculas menos densas eran lineales, mientras que las demás eran circulares. Sólo tras la hipótesis del superenrollamiento se pudo explicar la diferencia entre esas dos fracciones más densas.

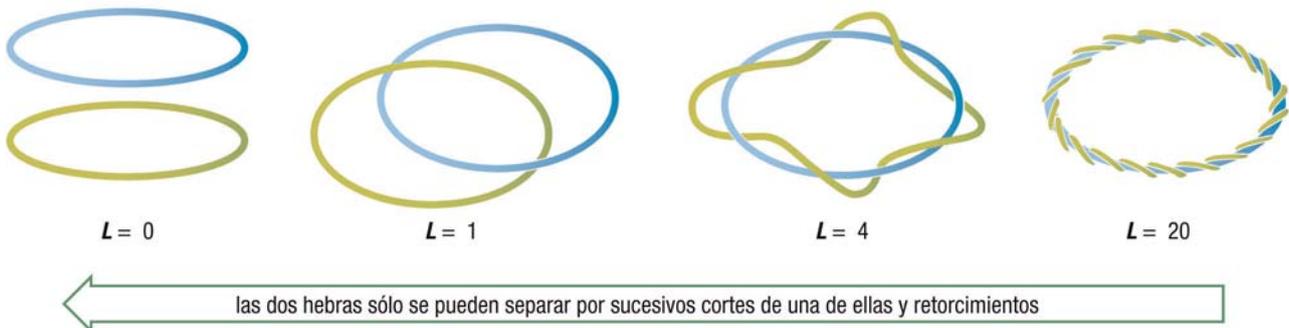


7.4

7.1.2 Análisis teórico del superenrollamiento

El empleo de la **topología** (rama de las matemáticas que estudia las propiedades de posición relativa de las partes de un objeto, propiedades que no cambian al ser sometido a deformación) ha permitido aclarar la estructura del DNA superenrollado. El signo y magnitud del superenrollamiento se asignan a partir de dicho estudio topológico, del cual sólo se comentan aquí los aspectos más fundamentales.

Posibles disposiciones teóricas de dos hebras (por ejemplo, dos cuerdas) con diferente grado de enrollamiento entre sí (diferente *número de enlace*). L = número de enlace = nº de veces que las hebras se cruzan.
(El modelo de la derecha, con $L = 20$, correspondería al DNA relajado de 210 pb considerado anteriormente)



7.5

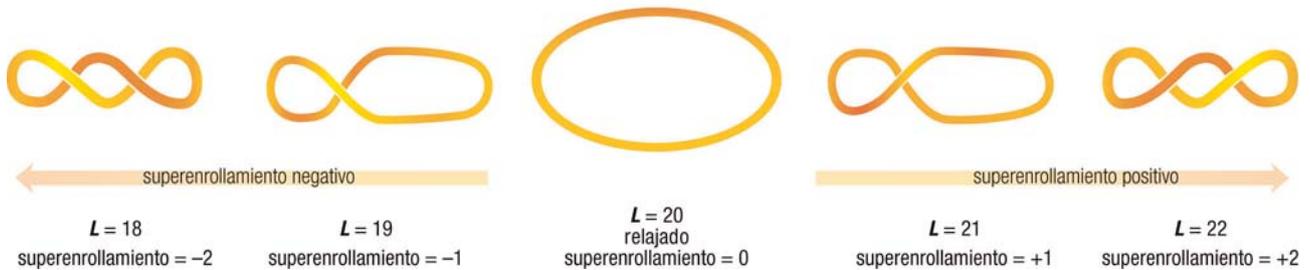
Se define el **índice o número de enlace topológico** (L o Lk , de *linking number*) como el número de veces que las dos hebras se cruzan entre sí; más específicamente, el número de veces que una hebra cruza el plano definido por la otra (como anillo o curva cerrada). Se le asigna valor positivo cuando el cruce se produce girando hacia la derecha.

Se habla de **enlace topológico** porque cuando $L \neq 0$ las dos hebras están físicamente ligadas (es decir, no se pueden separar), a pesar de que no hay enlaces covalentes entre ellas. Sólo se podrían separar (y conseguir así $L = 0$) rompiendo de forma transitoria algún enlace covalente (es decir, cortando una hebra). Lo mismo es aplicable para cualquier cambio del valor L (por ejemplo, pasar de $L = 9$ a $L = 10$ requiere la ruptura de un enlace fosfodiéster). Por la misma razón, la deformación, plegamiento, etc., de las hebras, sin cortarlas, no alteran el número de enlace ni el número de superenrollamiento.

Para el caso del DNA, la conformación relajada posee, por tanto, un número de enlace que coincide con el número de vueltas de hélice, siempre positivo puesto que la doble hélice del DNA es dextrorsa. Como ya se ha estudiado, las situaciones de superenrollamiento surgen de cambios en el número de vueltas de hélice, es decir, en el número de enlace L .

Para discernir y cuantificar los estados superenrollados se refiere su valor de L al del estado relajado, definiendo un nuevo valor numérico de **superenrollamiento** como la diferencia (ΔL) entre el número de enlace de una conformación concreta del DNA y el número de enlace de su forma relajada. Este valor de superenrollamiento puede, lógicamente, ser positivo o negativo y coincide con el número de vueltas de superhélice formadas para que la molécula libere la tensión y alcance de nuevo localmente la conformación más estable de doble hélice B.

Para un DNA bicatenario circular de 210 pb de longitud, la estructura B tiene $210 \text{ pb} / 10,5 \text{ pb/vuelta} = 20$ vueltas. Por tanto, la conformación relajada de ese DNA sería la de $L=20$. Por encima y por debajo de $L=20$ se habla de un superenrollamiento positivo o negativo, respectivamente. (Todas las formas representadas son las de mínima energía para cada caso)



7.6

7.1.3 Superenrollamiento del DNA lineal

En eucariotas, el superenrollamiento del DNA es menos evidente y más difícil de estudiar debido a que, por la naturaleza lineal de las moléculas de DNA, las conformaciones superenrolladas no son estables por sí mismas. La libertad de giro de las cadenas con extremos libres permite que las superhélices se deshagan de manera espontánea, salvo que exista algún impedimento a su libre giro. Precisamente, es la unión de proteínas al DNA lineal lo que permite la estabilización de estados superenrollados, y debe considerarse éste como uno de los componentes que contribuyen a la condensación del genoma nuclear eucariótico (v. el ejemplo de las asas radiales en la cromatina, pág. 87).

Por otra parte, en los DNA eucarióticos se aprecia otra forma de superenrollamiento: la unión a proteínas permite el superenrollamiento *toroidal*, diferente al considerado hasta ahora, que se denomina *plectonémico*. El ejemplo principal del primero es el resultante del arrollamiento del DNA bicatenario en torno al octámero de histonas en la estructura de los nucleosomas (pág. 86).

WWW

Web 7.2. Superenrollamientos *plectonémico* y *toroidal*.

7.2 CONDENSACIÓN DEL DNA EN EUCARIOTAS

Para completar la descripción de la estructura del DNA como material genético, y como requisito previo al estudio del genoma en el ciclo celular (Capítulo 8), es conveniente analizar el complejo problema de la condensación del DNA nuclear, que tiene lugar a lo largo de la interfase de dicho ciclo. Este aspecto, junto al proceso enzimático de replicación del DNA (Capítulo 11) durante la fase S, es de la mayor importancia desde el punto de vista básico y de sus aplicaciones.

Como ya se ha indicado, la **condensación** del DNA comprende dos aspectos, en teoría independientes pero funcionalmente relacionados y subordinados entre sí:

Condensación del DNA

Superenrollamiento propiamente dicho de la molécula de DNA bicatenario (doble hélice dextrorsa de tipo B).

Es análogo al superenrollamiento negativo ya descrito para procariontes; se conoce peor en eucariotas por su mayor complejidad, debida en parte a la gran magnitud del genoma.

Empaquetamiento, plegamiento o compactación de la molécula de DNA debido a la asociación con proteínas, para dar lugar a nucleoproteínas.

Es característico del genoma nuclear eucariótico. Este aspecto apenas existe en procariontes y orgánulos de eucariotas, donde no hay histonas y la condensación se basa principalmente en el superenrollamiento de la doble hélice.

7.7

La **condensación** del DNA desde la doble hélice extendida hasta cromatina y luego cromosoma tiene lugar de forma gradual durante la fase G_2 del ciclo celular (Capítulo 8), mientras que el proceso inverso, la

descondensación del DNA, comienza después de la división celular (fase M) y continúa durante la fase G₁ hasta alcanzar de nuevo la condición difusa que permite la replicación (fase S). No se conocen con precisión los aspectos moleculares de ambos procesos, aunque se asume una gran analogía y se considera, por tanto, que ambos transcurren por los mismos mecanismos, pero en sentido inverso.

7.2.1 Proteínas componentes de la cromatina

7.2.1.1 Histonas

Las histonas son las principales proteínas que forman parte del material genético de eucariotas; su masa es equivalente a la del DNA. Su función fundamental es **estabilizar la estructura del DNA** y contribuyen de forma notable a compactarla. Las histonas constituyen una familia de proteínas semejantes, de tamaño relativamente pequeño y con un contenido muy elevado (casi 1/3 del total) de aminoácidos básicos (con pI de 9 a 10). Gracias a ello, muestran naturaleza policationica a pH fisiológico (numerosas cargas positivas en cada molécula) y se asocian fuertemente, mediante interacciones electrostáticas, con los grupos fosfato del esqueleto polianiónico del DNA.

	% Lisina	% Arginina	% (Lys + Arg)	Nº de aminoácidos	Masa molecular
H1	24,8-29,5	1,3-2,6	27,4-30,8	215-244	21,1-23,0 kDa
H2A	10,9	9,3	20,2	129	14,0 kDa
H2B	16,0	6,4	22,4	125	13,8 kDa
H3	9,6	13,3	22,9	135	15,3 kDa
H4	10,8	13,7	24,5	102	11,2 kDa

Existen **cinco tipos** principales de histonas, bien caracterizadas, que se diferencian en su composición y, como se verá después, en su papel estructural en la organización del nucleosoma y la cromatina. La histona H1 se presenta en distintas especies o tejidos con mayor diversidad de secuencia y de tamaño, mientras que las otras cuatro están altamente conservadas. En algunos casos, se encuentran histonas alternativas; por ejemplo, H1 puede ser sustituida por una H5 que posee especial afinidad por la cromatina, lo que refuerza el empaquetamiento y la inactividad transcripcional.

El grado de condensación del DNA se regula en parte mediante la acetilación, fosforilación y metilación de las histonas (págs. 284 y 359-361), afectando así a la accesibilidad del DNA para la transcripción; de este modo las histonas se ven implicadas en uno de los mecanismos de control de la expresión génica.

7.2.1.2 Proteínas no histónicas

En la cromatina se encuentran, asimismo, otras proteínas, aunque menos abundantes, más variables entre tejidos y especies y en general peor caracterizadas:

a) Con función estructural

- Proteínas básicas:
 - **Protaminas:** Desempeñan la función equivalente a las histonas en tipos celulares concretos, particularmente el espermatozoide. Son proteínas pequeñas (50 aminoácidos, en algún caso) con elevada proporción de Arg, Ala y Ser, y estructura predominantemente en hélice α . Su menor tamaño permite la compactación del DNA en el espacio mínimo disponible en el espermatozoide.
- Proteínas ácidas:
 - **HMG:** Hasta un 5% de las proteínas nucleares son moléculas relativamente pequeñas que se incluyen en el grupo llamado HMG (*high mobility group*), proteínas de alta movilidad electroforética debido a su carácter ácido. De ellas, algunas se asocian al nucleosoma (al menos *in vitro*), mientras que otras interaccionan con el DNA espaciador (págs. 86-87). Este grupo incluye también algunos factores de transcripción (Capítulo 18).
 - **Proteínas del esqueleto o matriz nuclear:** Esta estructura, que sirve de soporte o guía en el empaquetamiento de la cromatina (pág. 87), está formada por diversas proteínas, incluyendo algunas HMG y otras proteínas de carácter ácido.

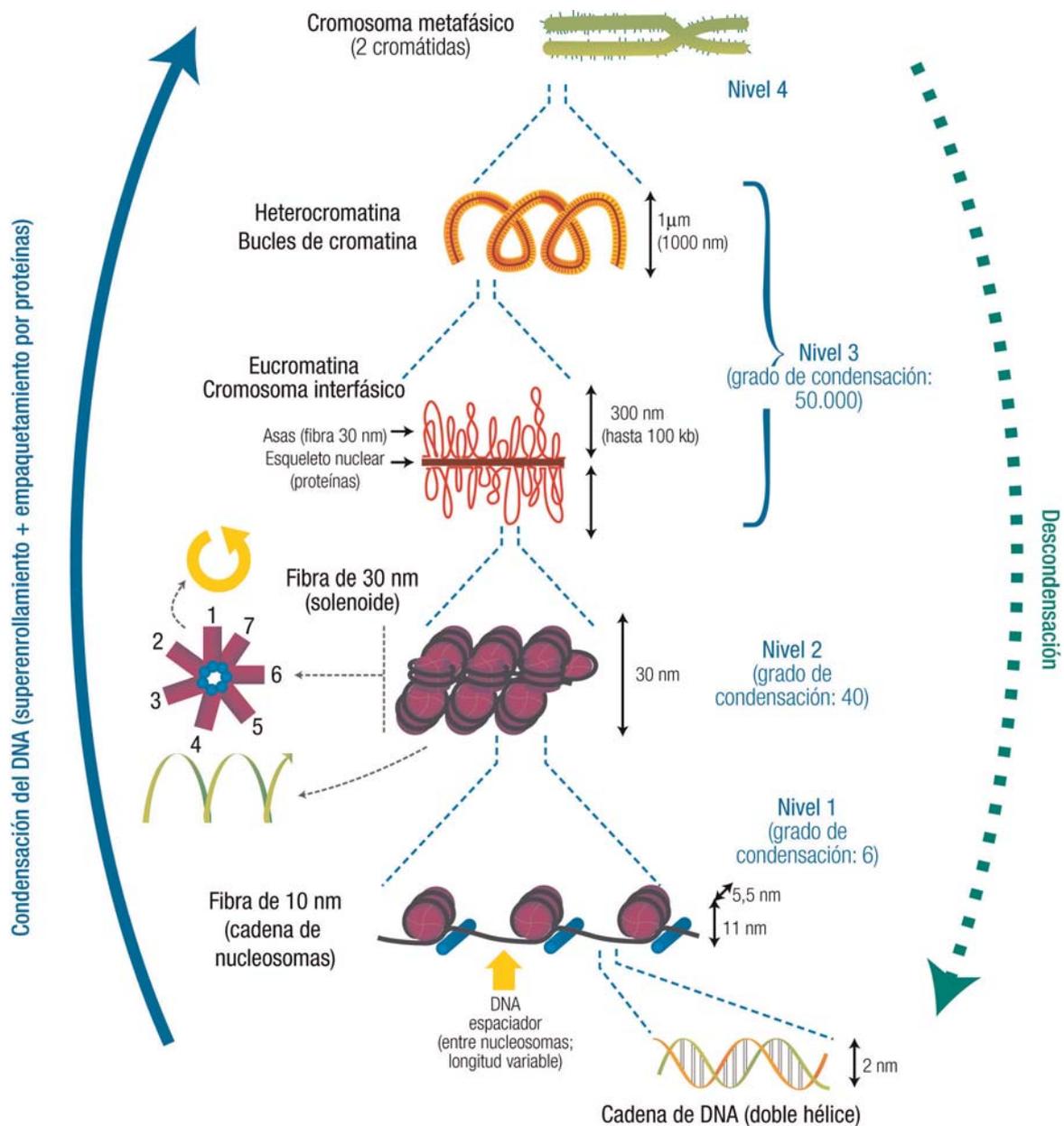
b) Con otras funciones

Asociadas a la cromatina, aunque en mínima cantidad y sin función estructural, se pueden encontrar numerosas proteínas, muy diferentes, que intervienen en la replicación y transcripción (Capítulos 11 y 17), así como en la regulación del grado de condensación de la cromatina: DNA- y RNA-polimerasas, sus proteínas auxiliares, factores de replicación, factores de transcripción, receptores de hormonas, topoisomerasas, etc.

7.2.2 Niveles de condensación del DNA nuclear eucariótico

Se puede resaltar el elevado grado de condensación que alcanza el DNA en las células recordando que la longitud de la molécula en doble hélice es varios órdenes de magnitud superior a las dimensiones de las estructuras celulares que la albergan (pág. 79). Se denomina *grado de condensación o de empaquetamiento* al cociente entre la longitud del B-DNA bicatenario y el tamaño del mismo una vez condensado. Este parámetro se utilizará para comparar los distintos niveles de compactación.

Para facilitar su comprensión, la condensación del DNA se describe aquí en cuatro niveles, aunque esta división es relativa, ya que no hay límites precisos y la comprensión con detalle de este fenómeno a nivel molecular es aún limitada. Es importante indicar que la condensación y la descondensación a través de esos niveles están estrechamente asociadas a la progresión por las distintas fases del ciclo celular (págs. 102-103).



7.2.2.1 Disposición en nucleosomas y fibra de 10 nm

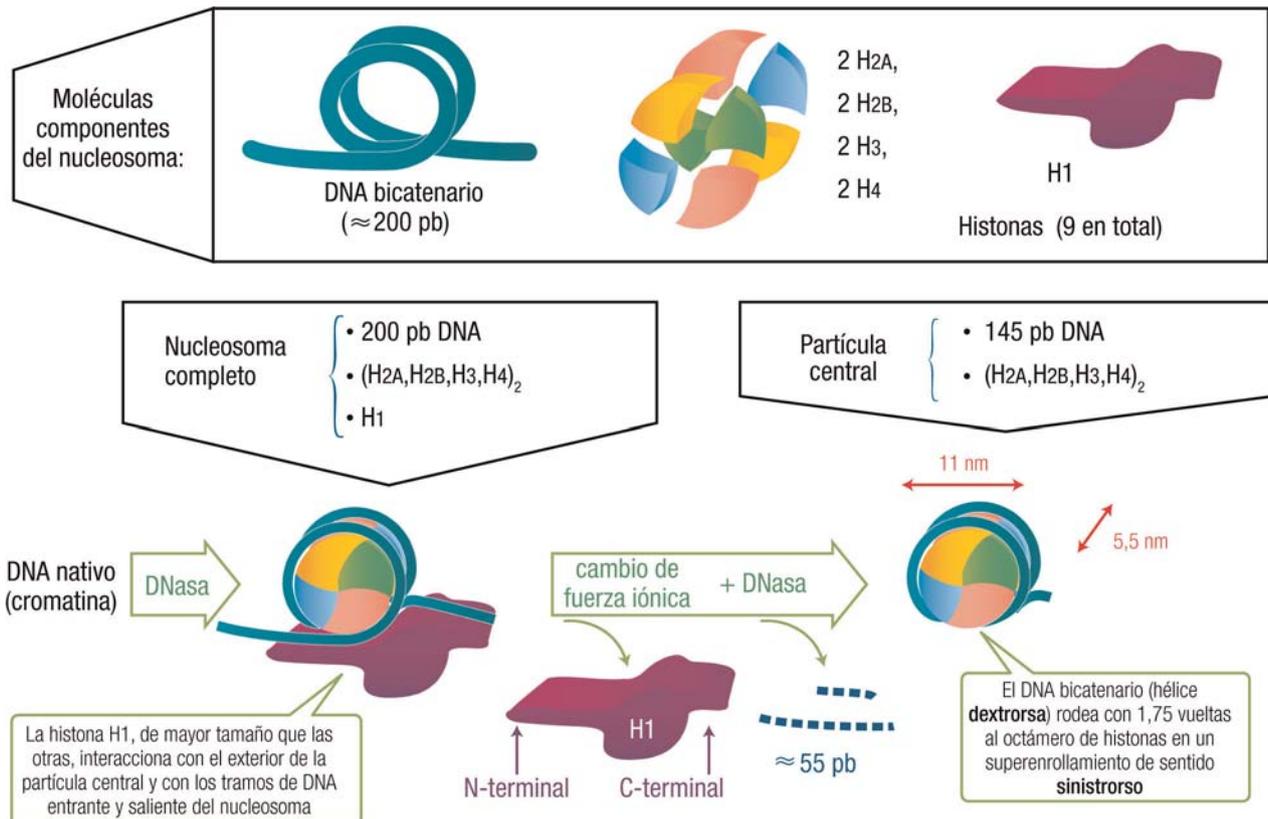
El nucleosoma es un complejo plurimolecular resultante de la asociación estrecha del DNA con las histonas; se trata, pues, de un ejemplo de nucleoproteido. En términos estructurales, se considera la unidad elemental constituyente de la cromatina y de los cromosomas, siendo así responsable de la organización estructural del material genético en todos los organismos eucarióticos. Tanto el nucleosoma como sus componentes y las fibras en las que se integra se han obtenido y analizado gracias a técnicas diversas, como digestión con DNAsas, entrecruzamiento covalente, hibridación, difracción de rayos X, microscopía electrónica, difracción de neutrones, microscopía circular y ultracentrifugación analítica.

La propuesta de la existencia del nucleosoma surgió del estudio de la acción de DNAsas: el tamaño de los fragmentos producidos a partir de un DNA nativo es siempre múltiplo de unos 200 pb, mientras que si previamente se le trata para retirar las histonas, los fragmentos de DNA producidos por la DNasa son de tamaños aleatorios. Esto sugirió que las histonas protegen regiones de DNA con una extensión próxima a 200 pb. Este fenómeno se pudo comprender al averiguar los detalles de la estructura molecular, descrita a continuación.

WWW

Web 7.3. Acción de DNAsas sobre el DNA genómico.

Cada **nucleosoma** está formado por 9 moléculas de histonas y un tramo de la molécula de DNA con aproximadamente 200 pb. En el centro se ubica un octámero de histonas, alrededor del cual se enrolla el DNA bicatenario, y más externamente se une la novena histona.



7.9

WWW

Web 7.4. Estructura del nucleosoma.

Bajo ciertas condiciones experimentales se puede liberar la histona H1, localizada externamente, lo que hace accesible a la DNasa una parte adicional del DNA. El nucleosoma queda así reducido a la llamada **partícula central**, formada por el octámero de histonas rodeado por DNA.

Una misma molécula de DNA envuelve sucesivamente a distintos octámeros de histonas, de modo que los nucleosomas están conectados entre sí. La porción presente entre dos nucleosomas sucesivos se denomina **DNA espaciador**, ligador o internucleosómico; su longitud puede variar entre 10 y 80 pb, dependiendo del organismo.

o incluso del tejido dentro de un mismo organismo. Esta estructura de nucleosomas espaciados a lo largo de la molécula de DNA se denomina **fibra básica** de cromatina o **fibra de 10 nm**, pues su grosor corresponde al diámetro del nucleosoma. El grado de empaquetamiento alcanzado es unas 6 veces superior al de la doble hélice del DNA extendida. La fibra de 10 nm también se denomina “estructura en cuentas de rosario”, por su aspecto característico al microscopio electrónico, que en general sólo se observa cuando se prepara *in vitro* a baja fuerza iónica (por ejemplo, 1 mM), mientras que dentro de la célula la cromatina se encuentra mayoritariamente en formas más condensadas, y su disposición en este estado relativamente extendido se limita, en todo caso, a pequeñas zonas.

También participan en la estructura otras proteínas no histónicas: HMG-14 y HMG-17 se asocian, al menos *in vitro*, con cada nucleosoma, mientras que HMG-1 y HMG-2 interactúan con el DNA espaciador.

El arrollamiento sinistrorso del DNA sobre el octámero de histonas supone un superenrollamiento toroidal, de signo negativo, de la cadena. En contraste, en procariotas no existen nucleosomas y el superenrollamiento –plectonómico– se consigue por simple retorcimiento del DNA circular, sin una dependencia tan directa de la unión de proteínas.

7.2.2.2 Formación de la fibra de 30 nm

En las preparaciones de cromatina obtenidas *in vitro* a mayor fuerza iónica (por ejemplo, hasta 100 mM), en lugar de la fibra de 10 nm se observa una forma más condensada, denominada **fibra de 30 nm**, que supone un grado de empaquetamiento al menos 40 veces superior al de la doble hélice original. Aún no se ha podido confirmar su estructura exacta *in vivo*; uno de los primeros modelos propuestos consiste en el arrollamiento de la fibra de 10 nm sobre sí misma en una espiral o **solenoides**, de sentido sinistrorso, con algo más de 6 nucleosomas por cada vuelta y con la histona H1 situada en el interior del solenoide, acercando los nucleosomas entre sí; el DNA espaciador se flexiona para conectar los sucesivos nucleosomas a lo largo de la espiral. En otros modelos se propone que la cadena de DNA describe un zig-zag para que el DNA espaciador, que se mantiene rígido, conecte nucleosomas dispuestos en caras opuestas de la fibra. Se postulan también actualmente modelos en los que las vueltas de solenoide se intercalan consiguiendo un empaquetamiento aún más denso, y se cree que la disposición exacta puede ser variable, para acomodar espaciadores de distinta longitud mientras se mantienen constantes los puntos de contacto entre nucleosomas adyacentes en la espiral de la fibra de 30 nm. Estas formas más densas de la fibra podrían ya corresponder a los estados de compactación superiores que se describen someramente a continuación (eucromatina y heterocromatina). La fibra de 30 nm es probablemente la forma fisiológica más descondensada de la cromatina, adoptada por la mayor parte del DNA durante la interfase.

WWW

Web 7.5. Estructura de la fibra de 30 nm.

En todo caso, de forma experimental se ha confirmado que la histona H1 es un requisito necesario para la formación de la fibra de 30 nm, mientras que no lo es para la de 10 nm. Además, los extremos amino-terminales o “colas” de las histonas centrales, que sobresalen del octámero, parecen también desempeñar un papel en la organización de la fibra de 30 nm, estableciendo contactos con los tramos de DNA espaciador y con los nucleosomas vecinos. Dichas colas contienen precisamente los residuos que sufren acetilación, fosforilación y metilación como mecanismo de regulación de la condensación y, en consecuencia, de la actividad transcripcional de la cromatina (págs. 284 y 359-361).

7.2.2.3 Cromatina o cromosoma interfásico

Este nivel de condensación supone la presencia de lazos y superenrollamientos de la estructura anterior. Los **bucles o asas radiales**, formados por entre 50 y 100 kb de fibra de 30 nm, emergen de un armazón de proteínas no histónicas denominado andamiaje, matriz o **esqueleto nuclear**. Estos bucles sufren superenrollamiento, regulado por topoisomerasas asociadas al esqueleto. Parece que, además de contribuir al empaquetamiento del DNA, los bucles constituyen unidades de transcripción, habiéndose observado la presencia dentro de un solo bucle de un gen completo o bien de un grupo de genes regulados de forma conjunta. Es típica la observación de asas radiales en la interfase de cromosomas politénicos gigantes de larvas de insectos y en los cromosomas plumosos meióticos de oocitos de anfibios.

A partir de esta estructura se forman enrollamientos superiores, que hacen que la cromatina posea durante la interfase un grado de condensación variable; se calcula que se multiplica el grado de condensación del DNA por 1.000 o 2.000. Esta diversidad local en la densidad de condensación se observa en forma de la presencia simultánea de **euromatina** y **heterocromatina** en una célula en interfase.

	Heterocromatina	Euromatina*
Aspecto al microscopio bajo tinción (definición original)	Se tiñe intensamente con el colorante May-Grünwald-Giemsa	Se tiñe débilmente y con aspecto difuso
Grado de condensación del DNA	Máxima condensación de la cromatina (próxima, aunque menor, a la del cromosoma metafásico)	Forma menos condensada
Contribución al total de la cromatina	Minoritaria; sólo algunas porciones del material genético se encuentran en esta forma: Heterocromatina constitutiva: regiones del genoma que se encuentran permanentemente en forma de heterocromatina (durante toda la interfase) y en todas las células. Se descondensa el tiempo mínimo necesario para replicarse durante la fase S del ciclo celular. Incluye el <i>DNA satélite</i> (pág. 116), concentrado especialmente en las regiones teloméricas y centromérica de los cromosomas (págs. 93-94) Heterocromatina facultativa: se encuentra como heterocromatina sólo en algunas células de un mismo organismo o en algunos individuos de una especie; puede pasar a euromatina, en respuesta a determinadas señales. Uno de los ejemplos es la inactivación de uno de los 2 cromosomas X en la mujer, puesto que se puede inactivar tanto el X materno como el paterno. Uno permanece condensado como heterocromatina, mientras el otro está en forma de euromatina Al final de la fase G ₂ , previa a la división por mitosis o meiosis, toda la cromatina de la célula adopta la forma de heterocromatina (antes de condensarse aún más para dar el cromosoma)	Mayoritaria durante la interfase
Accesibilidad de la molécula de DNA para su interacción con proteínas (DNA polimerasas, RNA polimerasas, factores de transcripción, etc.; pág. 268)	No es accesible, debido a su elevada condensación. Se habla de cromatina <i>transcripcionalmente inactiva</i> . Se replica al final de la fase S. Los genes que contiene no se expresan	Es accesible: cromatina <i>transcripcionalmente activa</i> . Se replica al principio de la fase S. Sus genes se expresan

*El nombre "euromatina" significa etimológicamente "cromatina verdadera".

7.2.2.4 Cromosoma metafásico

Aunque al final de la profase cada cromosoma ya está condensado como heterocromatina, durante la metafase se condensa aún más, adquiriendo el aspecto típico de los **cromosomas metafásicos**, corpúsculos observables al microscopio óptico que poseen, en general, aspecto de bastoncillos con dos **cromátidas** más o menos separadas entre sí.

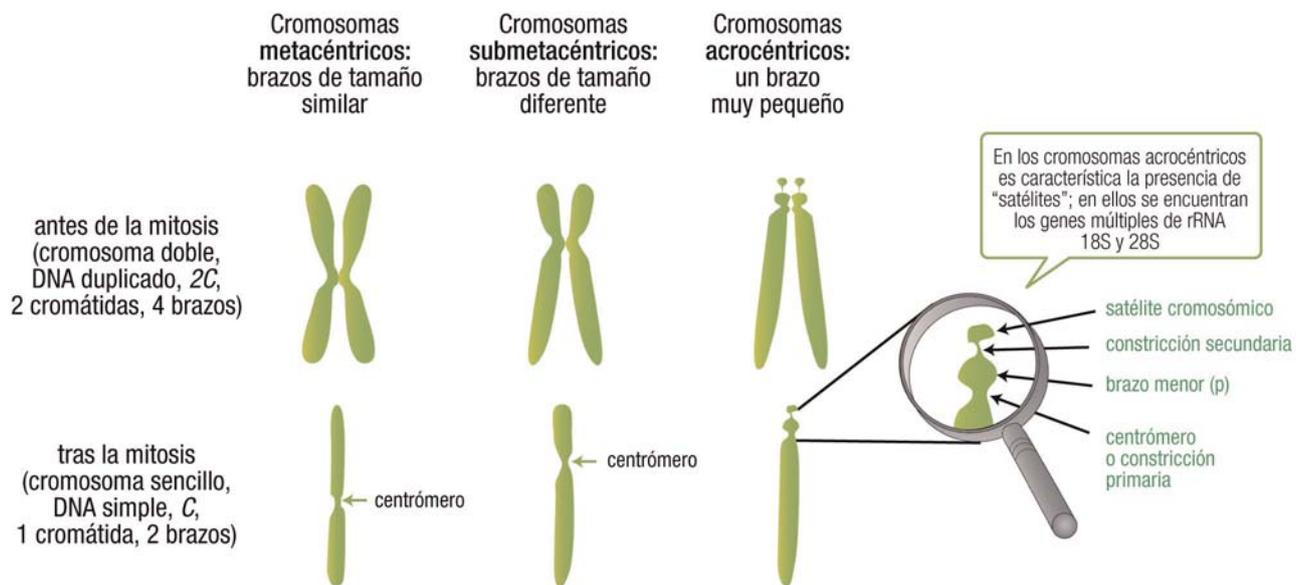
Las fibras de heterocromatina se arrollan en una primera espiralización para formar una **espiral menor** de paso muy pequeño, que se arrolla a su vez sobre sí misma (en unas 10 a 30 vueltas) para dar la **espiral somática**. Con esa doble espiralización se acorta la cromátida a una vigésima parte, sin aumentar apenas su diámetro. Esto la hace más visible al microscopio óptico. Algunas regiones de la cromátida sólo alcanzan el arrollamiento en espiral menor, como, por ejemplo, la zona del centrómero.

7.3 EL CROMOSOMA METAFÁSICO

7.3.1 Aspectos citogenéticos

7.3.1.1 Morfología de los cromosomas

Se llama **centrómero**, **constricción primaria** o **central** a la región más estrecha del cromosoma metafásico, por la que permanecen unidas las dos cromátidas hermanas. El centrómero delimita además los **brazos cromosómicos** (cuatro antes de la mitosis, dos tras ella). Los brazos cortos se designan con la letra **p** y los largos con **q** (la p procede del francés *petit*, pequeño y la q, dependiendo de las fuentes, de *queue*, cola, o bien simplemente por ser la letra siguiente a la p). Cada brazo se nombra, pues, por el número del cromosoma al que pertenece, seguido de la letra **p** o **q**. Por ejemplo, **6p** es el brazo corto del cromosoma 6, **8q** el brazo largo del cromosoma 8, etc. Los cromosomas se clasifican atendiendo a la posición del centrómero y, por tanto, según el tamaño relativo de los brazos:

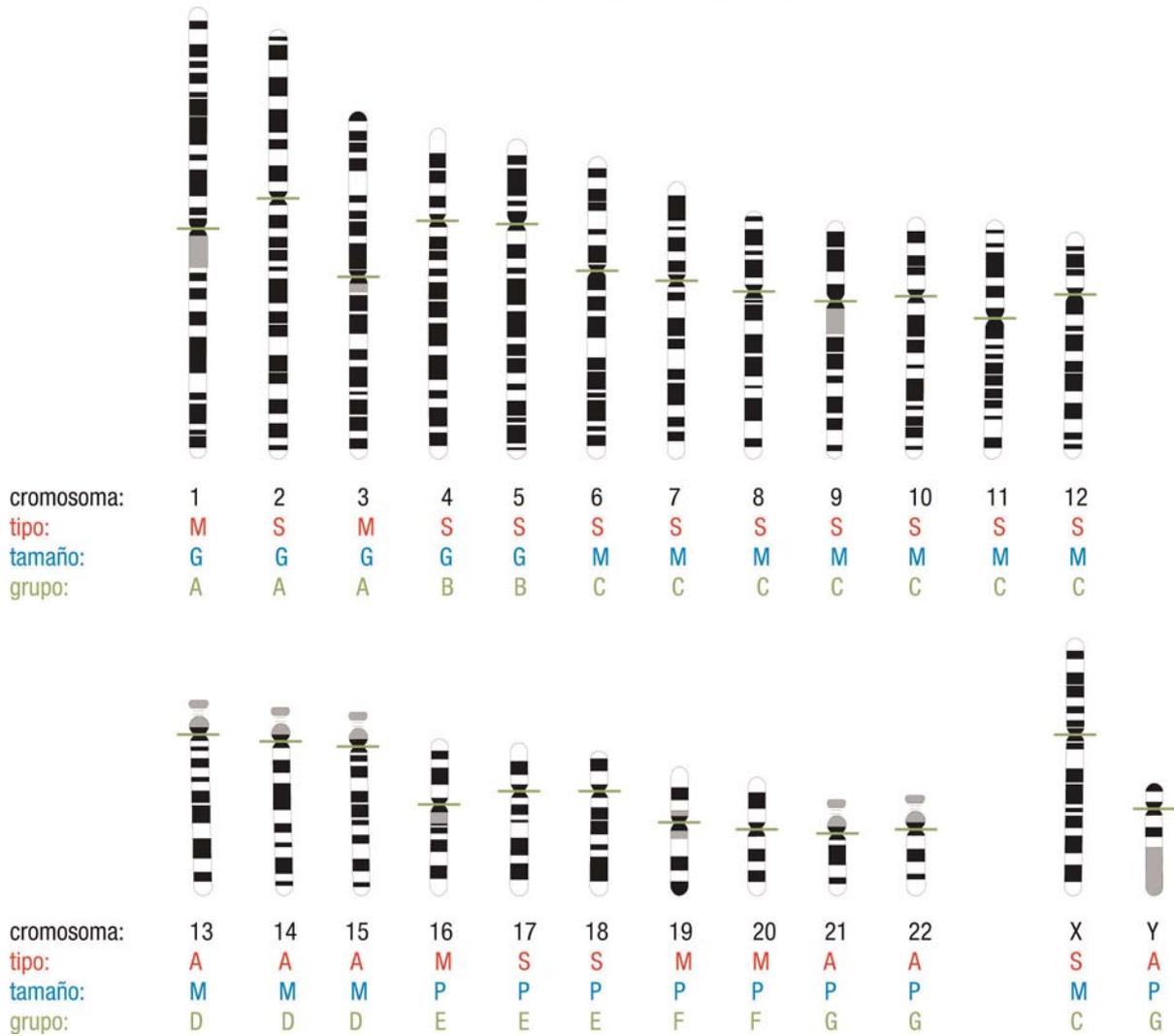


7.10

En los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (excepto el Y) existen, además, otros estrechamientos de la cromátida, denominados **constricciones secundarias**, zonas en las que la espiral somática presenta un diámetro más reducido. Delimitan una sección terminal en el cromosoma, a modo de una pequeña esfera, a la que se llama **satélite cromosómico**.

Clasificación de los cromosomas humanos, según:

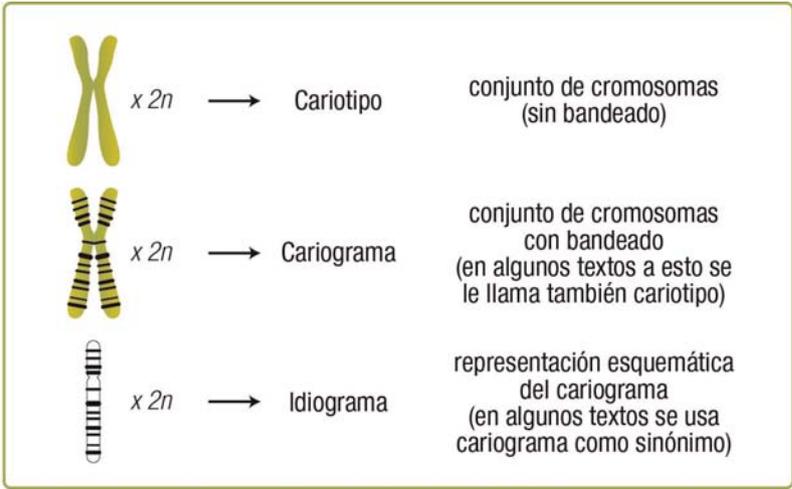
- tipo (Metacéntrico, Submetacéntrico o Acrocéntrico)
- tamaño (Grande, Mediano, Pequeño)
- grupo de clasificación (A,B,C,D,E,F,G)



7.11

7.3.1.2 Cariotipo y su análisis

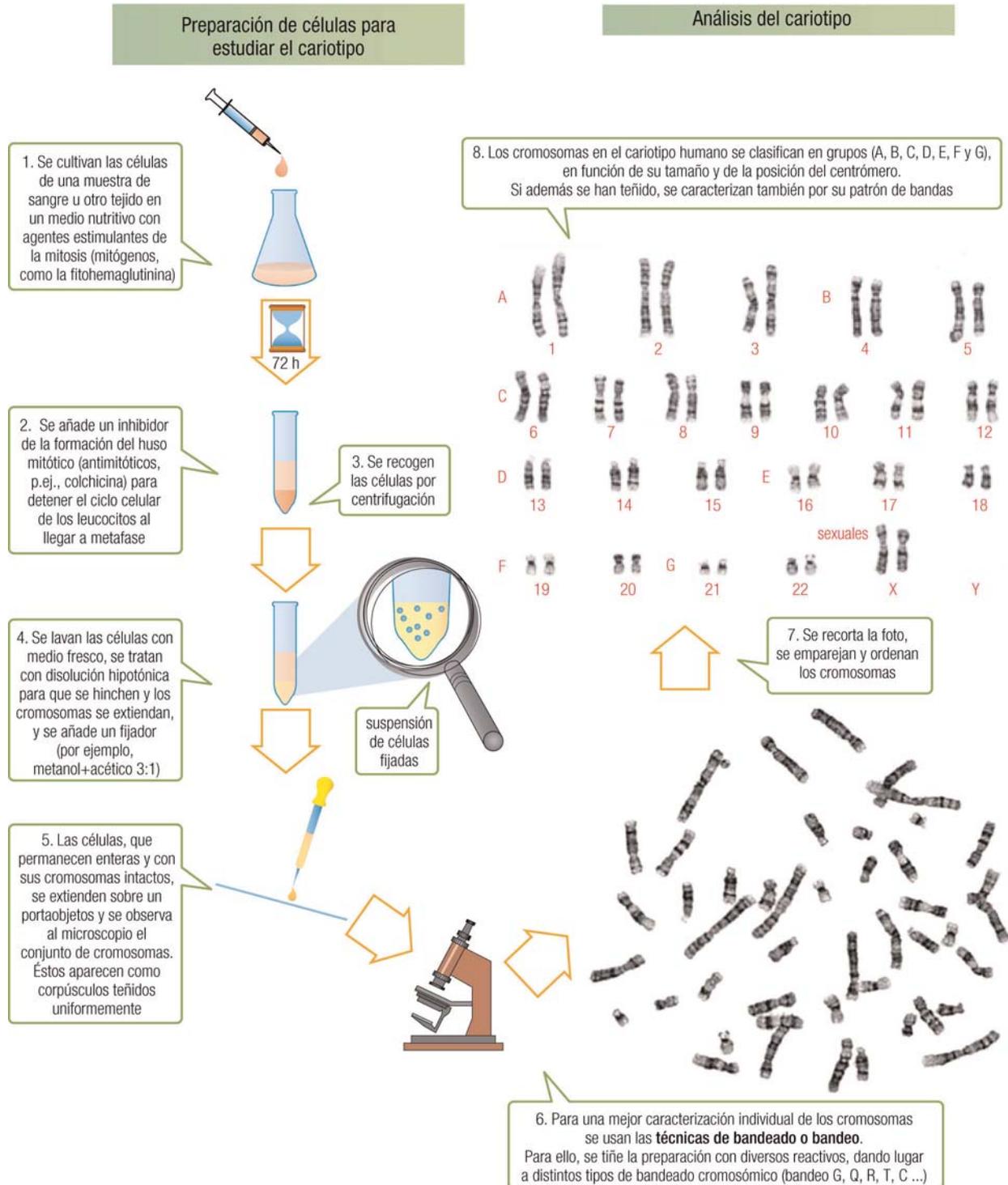
Cariotipo =
 constitución cromosómica o *complemento* cromosómico de un individuo.
 Es un rasgo característico de cada especie: todos los organismos de una especie tienen el mismo cariotipo.
 Sin embargo, especies muy similares pueden tener cariotipos muy diferentes.



7.12

Son varios los métodos desarrollados para el análisis del cariotipo. Habitualmente, este estudio se realiza sobre cromosomas en el estado de prometafase o metafase. Las preparaciones de cromosomas metafásicos se emplean, además, para analizar anomalías cromosómicas y determinar alguna ausencia o la presencia de cromosomas extra.

A este fin, el método original y más sencillo de obtención de cromosomas parte de leucocitos, como células nucleadas del organismo más asequibles.



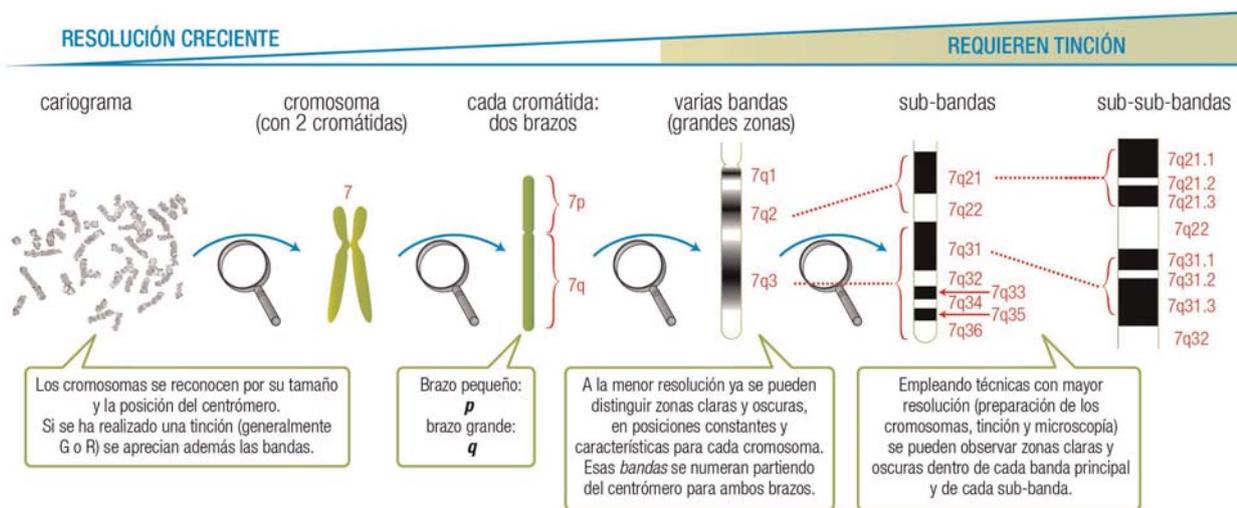
Actualmente, se parte ya no sólo de cultivos de leucocitos, con la desventaja de su vida corta, de 3 a 4 días, sino también de cultivos a largo plazo de células de diversos tipos de tejidos (fibroblastos, médula ósea, líquido amniótico, biopsias, etc.). Las más usadas son las de mayor potencial de división o mayor facilidad

de cultivo. Asimismo, existe una variedad de tratamientos de desnaturalización o degradación enzimática de la cromatina, y de tinciones con colorantes específicos para el DNA. Por último, se han desarrollado sistemas de cariotipificación que pueden ser informatizados de forma que seleccionen automáticamente las células a analizar, el tipo de tinción y el análisis de los cromosomas.

7.3.1.3 Bandedo

Aplicando distintas técnicas de tinción, utilizadas de forma sistemática en laboratorios de citogenética, se pueden observar en los cromosomas bandas pálidas y oscuras alternativamente, que definen grandes regiones cromosómicas llamadas **isocoros**. Este **bandedo** o **bandedo** de cromosomas no es consecuencia de agrupamientos fortuitos, sino que está relacionado con la organización estructural del genoma, reflejando variaciones tales como composición de bases, grado de condensación, conformación de la cromatina, secuencias repetitivas y no transcritas, etc.

Los patrones de bandas de cada cromosoma son prácticamente idénticos en células diferentes, y en casi todos los tejidos, pero pueden diferir entre individuos; por ejemplo, al menos 12 cromosomas muestran variaciones en la longitud de ciertos segmentos en distintas personas. Se pueden llegar a apreciar hasta 500 bandas en un cromosoma; en función de la resolución microscópica alcanzada, las **bandas** principales se subdividen sucesivamente en **subbandas** y **subsubbandas**. A todas ellas se les asigna un identificador, que incluye el cromosoma, el brazo y un número correlativo desde el centrómero hacia los extremos.



7.14

Para el bandedo de cromosomas se emplean diversos métodos de tinción del DNA con colorantes específicos:

a) Bandedo G

Es la técnica más utilizada. Se basa en una desnaturalización controlada de las proteínas cromosómicas (en general por digestión con tripsina), seguida de tinción con Giemsa y observación al microscopio (el reactivo de Giemsa es una mezcla compleja de colorantes; de él procede el nombre de bandedo G). Cada par de cromosomas muestra así patrones característicos de tinción, con bandas oscuras (G-positivas o bandas G) y bandas claras (G-negativas).

b) Bandedo Q

Los cromosomas se tiñen con un compuesto fluorescente, como mostaza de quinacrina (hidrocloruro de quinacrina), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o Hoechst 33258, que se intercalan en el DNA bicatenario. Se requiere, por tanto, un examen mediante microscopía de fluorescencia. Aparece un patrón específico de bandas brillantes (bandas Q o Q-positivas), que se corresponden casi exactamente con las bandas G (G-positivas, G-oscuras).

Las bandas G y Q contienen DNA que, en general, es algo más rico en pares AT (55-60%), pues la quinacrina se inserta preferentemente entre estos pares. Corresponden a cromatina altamente condensada, con DNA de replicación tardía dentro de la fase S del ciclo celular, relativamente inactivo transcripcionalmente.

c) Bando R

Se basa en un tratamiento de los cromosomas con calor (para desnaturalizar el DNA rico en AT), antes de la tinción con Giemsa. Resultan así bandas oscuras (bandas R) que coinciden con las bandas G o Q claras (el nombre deriva de patrón reverso). También se consigue el mismo patrón de bandas empleando olivomicina, un fluorocromo con afinidad por los pares GC.

Las bandas R contienen DNA rico en GC (50-60%), de baja condensación cromatínica, que se replica en etapas tempranas de la fase S y es relativamente activo transcripcionalmente.

d) Bando T

Identifica un subconjunto de bandas R especialmente concentradas en los telómeros, las de tinción más intensa, y se visualizan empleando un tratamiento térmico particularmente severo antes de teñir los cromosomas con Giemsa o una combinación de tinciones y fluorocromos.

e) Métodos especiales

Otros métodos de cultivo cromosómico y de tinción se utilizan para situaciones particulares: **bando C**, para regiones heterocromáticas; **tinción NOR**, para la *región organizadora del nucléolo*, que contiene los genes de rRNA 18S y 28S; **bando de profase y prometafase**, o **de alta resolución**, sobre cromosomas detenidos en una etapa temprana de la mitosis, con un estado relativamente descondensado (su mayor longitud permite apreciar más detalles, llegándose a observar hasta 850 bandas en un solo cromosoma), etc.

Finalmente, la **citogenética molecular** emplea sondas de DNA clonado (preparadas por técnicas de DNA recombinante, pág. 180) para examinar cromosomas, de forma similar a los ensayos de hibridación molecular pero sobre preparaciones de cromosomas completos. Ésta es la técnica denominada **hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, fluorescence in situ hybridization, pág. 177)**. Se dispone de sondas específicas para cromosomas individuales y para regiones cromosómicas, que permiten, por ejemplo, identificar reordenamientos cromosómicos particulares u obtener un diagnóstico rápido de la existencia de un número anómalo de cromosomas.

7.3.2 Regiones con significado funcional

Los cromosomas eucarióticos muestran tres elementos esenciales para una función correcta del ciclo celular y de la división, imprescindibles para la expresión, duplicación y segregación de los cromosomas: el **centrómero** (lugar de unión del cromosoma a las fibras del huso acromático), los **telómeros** (regiones que constituyen los extremos de los cromosomas) y los **orígenes de replicación** (puntos numerosos en cada cromosoma donde se inicia la copia de las dos hebras de DNA). Se tratan a continuación los aspectos morfológicos relacionados con los dos primeros; el análisis de los orígenes de replicación se pospone hasta que se estudie el proceso de replicación (pág. 153).

7.3.2.1 Centrómero

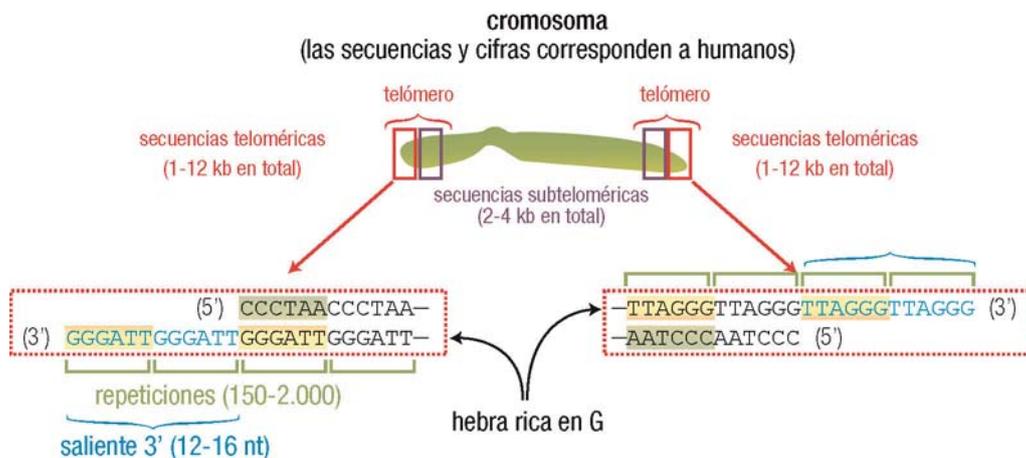
Además de ser el punto de contacto de las dos cromátidas y la frontera que delimita los dos brazos del cromosoma, funcionalmente la importancia del centrómero radica en que sobre él se sitúan los **cinetocoros**, estructuras proteicas en las que se anclan las fibras que constituyen el huso acromático o huso mitótico. Estas fibras, filamentos contráctiles o microtúbulos, de naturaleza proteica, ejercen la tracción necesaria para separar las dos cromátidas durante la división celular. De esta forma se produce la segregación ordenada de los cromosomas y cada célula hija recibe una cromátida de cada cromosoma, es decir, idéntica dotación genética. La ausencia de centrómero (cromosoma **acéntrico**) impide que el cromosoma se una al huso mitótico y, por tanto, que se reparta de manera correcta entre las células hijas.

Las secuencias esenciales para la función de los centrómeros son muy ricas en pares AT, tienen unos 170 pb en humanos y se repiten entre 2.000 y 30.000 veces en cada centrómero. Forman, pues, parte del llamado DNA repetitivo (pág. 116) y además suponen una parte importante de la fracción de heterocromatina constitutiva, la que sólo llega a descondensarse un tiempo mínimo en el ciclo celular, el preciso para su replicación.

7.3.2.2 Telómeros

Telómero es una palabra de etimología griega: *telos*, extremo, y *meros*, parte o región, que hace referencia a regiones situadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias especializadas de DNA asociado a proteínas, y con características estructurales y funcionales propias que las diferencian de otras regiones cromosómicas.

Los telómeros de la mayoría de eucariotas están formados por dos tipos de secuencias de DNA. Una de ellas, denominada **secuencia telomérica**, **repetición telomérica** o **repetición terminal**, constituye el extremo de la cadena de DNA del cromosoma, mediante la repetición en tándem de un oligonucleótido corto (variable según especies; en humanos es TTAGGG). En general esta secuencia telomérica es más rica en G en una de las hebras, la que forma el extremo 3', que sobresale unos 12-16 nucleótidos sobre la hebra que aporta el extremo 5'. Ese extremo saliente es reconocido por **proteínas ligantes del telómero** (TBP, *telomere binding proteins*), que actúan a modo de "caperuza" protectora de dicho DNA terminal. Existen también unas secuencias más complejas adyacentes a las anteriores (es decir, más internas en el cromosoma), que se denominan **asociadas a telómeros** o **secuencias subteloiméricas**.



7.15

Se han relacionado los telómeros con varias funciones:

- Participar en la estabilización y mantenimiento de la integridad estructural del cromosoma: en ausencia de telómeros, el extremo del cromosoma tiende a unirse a otros y aumentan las posibilidades de que sufra recombinación y degradación. Por otra parte, los telómeros permiten a las enzimas encargadas de la reparación del DNA diferenciar entre el extremo natural del cromosoma y uno que resulte de la fragmentación accidental de la cadena de DNA; en este último caso se detiene el ciclo celular, evitando la replicación hasta que se haya reparado la lesión.
- La función más importante consiste en asegurar la replicación completa de los extremos del cromosoma. Este aspecto se estudiará una vez considerado con detalle el proceso de la replicación del DNA (pág. 158).
- Se especula también con la implicación del telómero en la arquitectura tridimensional del núcleo o la del emparejamiento cromosómico.

Organización del genoma eucariótico

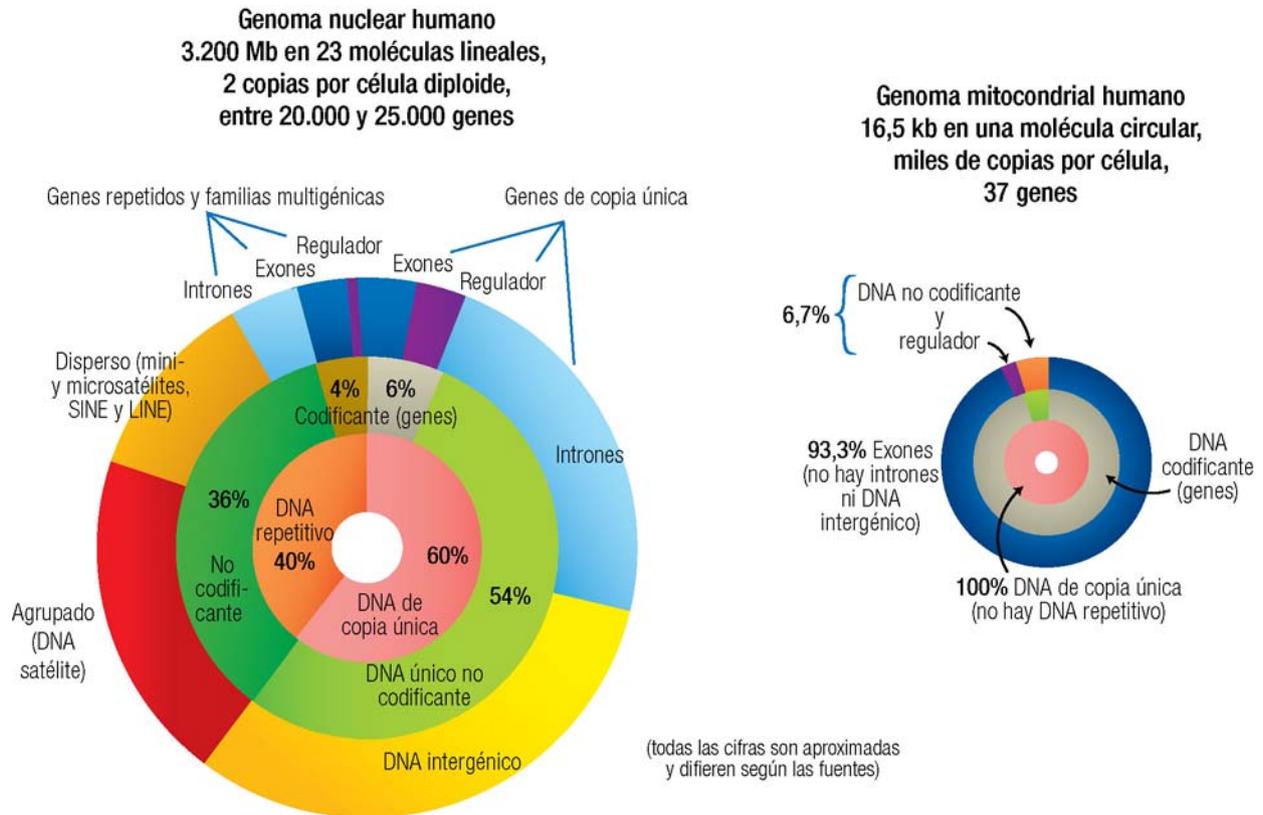
9.1 ESTRUCTURACIÓN DEL GENOMA EUCARIÓTICO	109	9.4.2 DNA repetitivo no codificante	116
9.2 DNA CODIFICANTE: INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO DE GEN	110	9.4.2.1 DNA altamente repetitivo y agrupado: DNA satélite	116
9.3 DNA DE COPIA ÚNICA, SIMPLE O NO REPETITIVO	111	9.4.2.2 DNA moderadamente repetitivo y disperso	117
9.4 DNA REPETITIVO	111	a) Bloques dispersos de repeticiones en tándem: DNA minisatélite y DNA microsatélite	117
9.4.1 DNA repetitivo codificante	112	b) Repeticiones dispersas: SINE y LINE	118
9.4.1.1 DNA repetitivo codificante agrupado	112		
a) Familias génicas clásicas	112		
b) Familias multigénicas de genes agrupados	113		
9.4.1.2 DNA repetitivo codificante disperso: familias multigénicas de genes dispersos	115		
		9.5 ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA COMPLEJIDAD EN EL GENOMA EUCARIÓTICO	118

En los **procariotas** prácticamente todo el DNA existe en forma de copia única y codifica productos génicos (proteínas o RNA). Sin embargo, esto no se cumple en el genoma nuclear de **eucariotas**; por ejemplo, se calcula que sólo 100 Mb del total de 3.200 Mb del genoma humano haploide son codificantes. Además, el genoma eucariótico se caracteriza por la repetición de secuencias. El objetivo de este capítulo es plantear esta distinción entre *DNA de copia única* y *DNA repetitivo*, así como estudiar con detalle este último en el genoma humano. El carácter *codificante*, aunque se incluye también aquí, se comprenderá mejor en capítulos posteriores, al estudiar la expresión génica (transcripción, maduración y traducción). Los aspectos experimentales que han permitido la demostración de la presencia de DNA repetitivo en el genoma eucariótico se describen al final del capítulo. Basándose en toda esta información, se podrá abordar más adelante su aplicación a problemas biotecnológicos en general y clínicos en particular.

9.1 ESTRUCTURACIÓN DEL GENOMA EUCARIÓTICO

Para el estudio de la distribución de secuencias dentro del genoma humano éste puede subdividirse en distintas categorías de DNA en función de su repetitividad y de su carácter codificante:





9.2

A diferencia del nuclear, el genoma de la mitocondria, de tamaño muy pequeño (16.569 pb en humanos, por tanto 200.000 veces inferior al genoma nuclear haploide), está formado casi en su totalidad por DNA codificante.

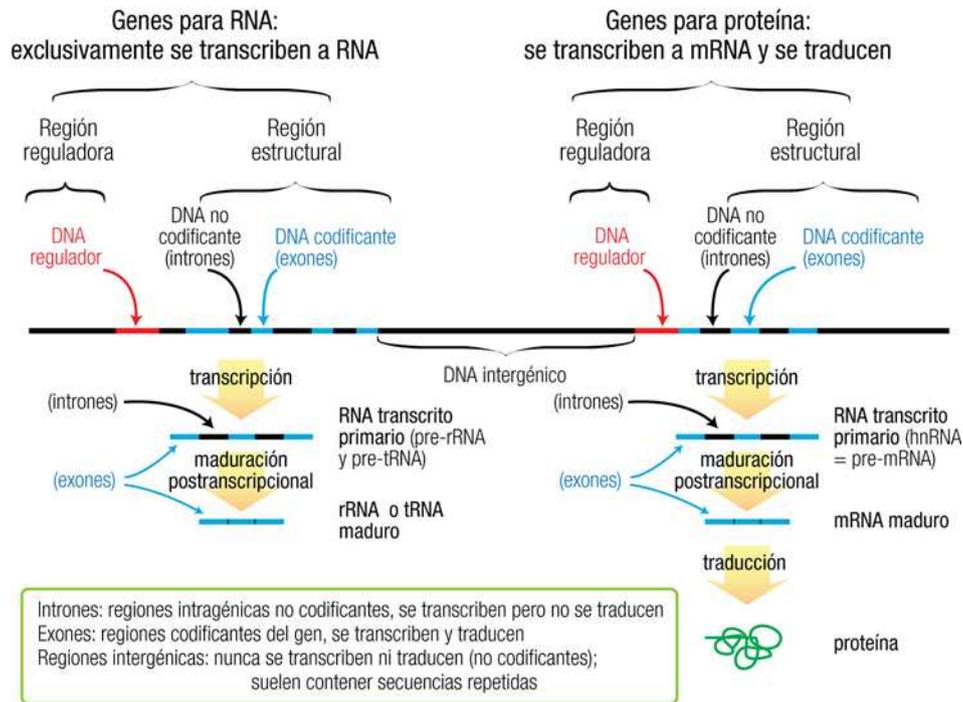
Todas estas cifras que cuantifican la proporción de DNA codificante y los distintos subtipos de DNA repetitivo varían de forma notable entre diferentes textos. La razón de esta discrepancia puede proceder, entre otros factores, de si se cuentan como codificantes los intrones o las regiones de control de la expresión génica. A todo ello se suma la incapacidad, al menos en este momento, para asignar fehacientemente todas las secuencias del genoma a un producto génico o función concretos. Respecto a las secuencias repetitivas, la clasificación aquí planteada en términos de tamaño, número de las repeticiones y ubicación, posee, obviamente, fronteras no siempre precisas.

Por tanto, las cifras aquí recogidas deben tomarse como una orientación con un interés didáctico más que como valores certeros. La relevancia de conocer esta realidad de los genomas eucarióticos no depende de la frecuencia precisa de cada tipo de secuencia.

9.2 DNA CODIFICANTE: INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO DE GEN

El concepto de gen, aunque ha sufrido una gran evolución en eucariotas, haciéndose más complicado y con múltiples componentes, se sigue definiendo bajo un criterio estrictamente funcional, siempre en relación con la transmisión de la información desde DNA a RNA y, en su caso, desde mRNA a proteínas. El estudio detallado de las características de los genes eucarióticos se deja para más adelante, cuando se analice su expresión (Capítulo 17).

Brevemente, un gen es aquella región del DNA necesaria para que pueda sintetizarse una macromolécula funcional, un **producto génico**; éste puede ser bien una proteína, bien un RNA. Más en concreto, un gen comprende tanto *secuencias estructurales* como *secuencias reguladoras*. Las primeras –comúnmente consideradas como la parte **codificante** del gen– se transcriben de forma exclusiva en RNA (región estructural de genes de tRNA, rRNA o RNA pequeños), o bien se transcriben en un mRNA que, a su vez, se traduce a proteína. Las segundas actúan en ambos casos controlando la transcripción de las regiones estructurales.



9.3

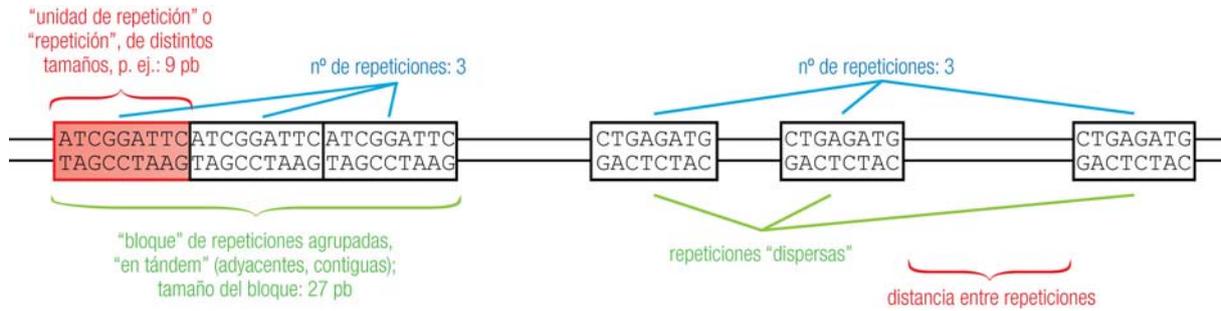
9.3 DNA DE COPIA ÚNICA, SIMPLE O NO REPETITIVO

El DNA no repetitivo constituye la mayor parte del genoma, aunque en una proporción variada dependiendo del tipo de organismo (100% en procariotas, 80% en eucariotas inferiores, 50-70% en animales superiores). Parte de este DNA ($\approx 5\%$) constituye las secuencias de genes, que codifican los RNA y proteínas celulares; otra parte ($\approx 5\%$) es responsable del control de la expresión de esas secuencias, mientras que el resto, mayoritario ($\approx 50\%$), es DNA no codificante, cuya función, si existe, apenas se conoce.

El DNA de copia única se asoció durante mucho tiempo al concepto de gen; hoy se sabe que también una pequeña parte del DNA repetitivo forma algunos genes eucarióticos, como se estudiará a continuación.

9.4 DNA REPETITIVO

Las secuencias de DNA que aparecen en copias múltiples, o DNA repetitivo, constituyen entre un 30 y un 50% del total del genoma humano, dependiendo de las fuentes. Esta abundancia es una característica determinante de la gran complejidad del genoma eucariótico. Las secuencias repetidas, llamadas **unidades de repetición** o simplemente **repeticiones**, poseen tamaños diversos y cada una aparece de forma idéntica o casi idéntica muchas veces en el genoma. Su distribución puede darse en **forma dispersa** por todo el genoma, entremezcladas con las secuencias de copia única, o bien en **forma agrupada**, localizada en regiones concretas de un cromosoma. En ambos casos, el número de copias de la unidad de repetición varía desde unas centenas o miles (DNA **moderadamente repetitivo**) hasta cientos de miles (DNA **altamente repetitivo**). Esto coincide en muchos casos con una distribución en forma dispersa y agrupada, respectivamente.



9.4

Una parte del DNA repetitivo tiene carácter **codificante**, es decir, contiene la información para expresar un producto funcional (RNA o proteína). Para el resto del DNA repetitivo no se conoce una función clara; alguno posiblemente contribuya a mantener la estructura de los cromosomas, mientras que se ha llegado a proponer que una parte sea *DNA chatarra* o *DNA basura*, un vestigio evolutivo sin función actual. Finalmente, debe destacarse que algunas de las secuencias repetidas no codificantes (en concreto, las denominadas minisatélites y microsatélites), aun con función desconocida, tienen gran relevancia aplicada en pruebas de identificación y en estudios familiares, debido a su variabilidad entre individuos (polimorfismo, Capítulo 24).

La repetitividad del DNA posee probablemente un origen evolutivo. Por un lado, las repeticiones agrupadas pueden surgir debido a errores en la replicación o en la recombinación genética. Por otro, la separación entre repeticiones dispersas puede provenir de translocaciones o transposiciones cromosómicas.

9.4.1 DNA repetitivo codificante

Se le llama también **DNA repetitivo funcional**, pues forma genes que se expresan (aunque no todos ellos, como se verá). Su tamaño se estima alrededor del 10% del genoma (esta cifra incluye probablemente las regiones de control e intrones respectivos, por lo que la fracción realmente codificante será inferior). Aparece en forma de "familias de genes", cuyos miembros se caracterizan por su homología, al haberse originado mediante duplicaciones (pág. 407) y variaciones de un gen ancestral.

Tipos de DNA repetitivo codificante y ejemplos característicos:		
homología, expresión, funcionalidad	1. Agrupado:	
	<p>a) Familias génicas clásicas o conservadas, con genes repetidos en tándem (contiguos)</p> <p>Muestran un alto grado de homología de secuencia, es decir, son copias prácticamente idénticas, lo que indica su relación evolutiva y funcional. Se expresan todas las repeticiones.</p>	Histonas: Ej. 1 rRNA: Ej. 2 tRNA snRNA
	<p>b) Familias multigénicas con genes agrupados (no contiguos)</p> <p>Situados en localizaciones específicas del genoma (pero sin relación con las regiones centroméricas y teloméricas). Sus repeticiones presentan menor homología: variantes, pseudogenes, genes truncados y fragmentos de genes. Sólo se expresan algunas de las repeticiones.</p>	Globinas: Ej. 3 HLA-1 (y otras muchas)
	2. Disperso: Familias multigénicas con genes dispersos	Aldolasa Actina Ferritina GA3PDH

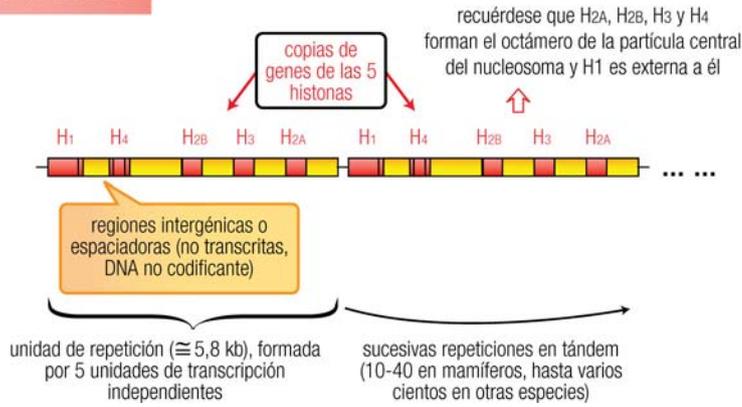
9.4.1.1 DNA repetitivo codificante agrupado

a) Familias génicas clásicas

Contienen secuencias repetidas que codifican un mismo RNA o proteína, que puede, así, sintetizarse con rapidez y en gran cantidad. Son ejemplos característicos los genes de histonas y los de RNA ribosómico,

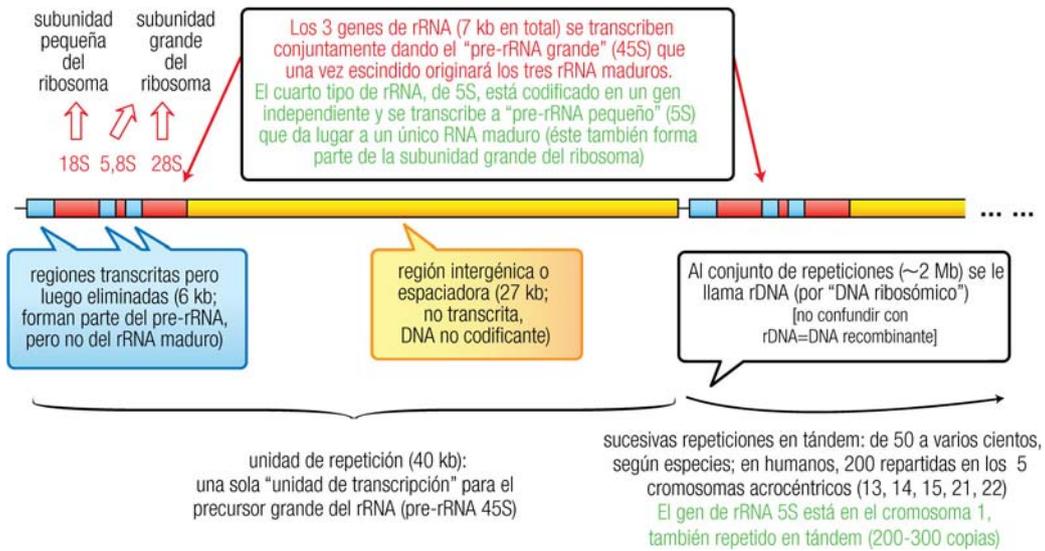
productos ambos que la célula necesita en abundancia (las histonas –pág. 84– deben sintetizarse rápidamente en la fase S del ciclo celular, para asociarse al nuevo DNA procedente de la replicación, mientras que el rRNA –capítulo 6– supone el 75% del total de RNA celular).

Ej. 1 Genes de histonas



9.5

Ej. 2 Genes de RNA ribosómico



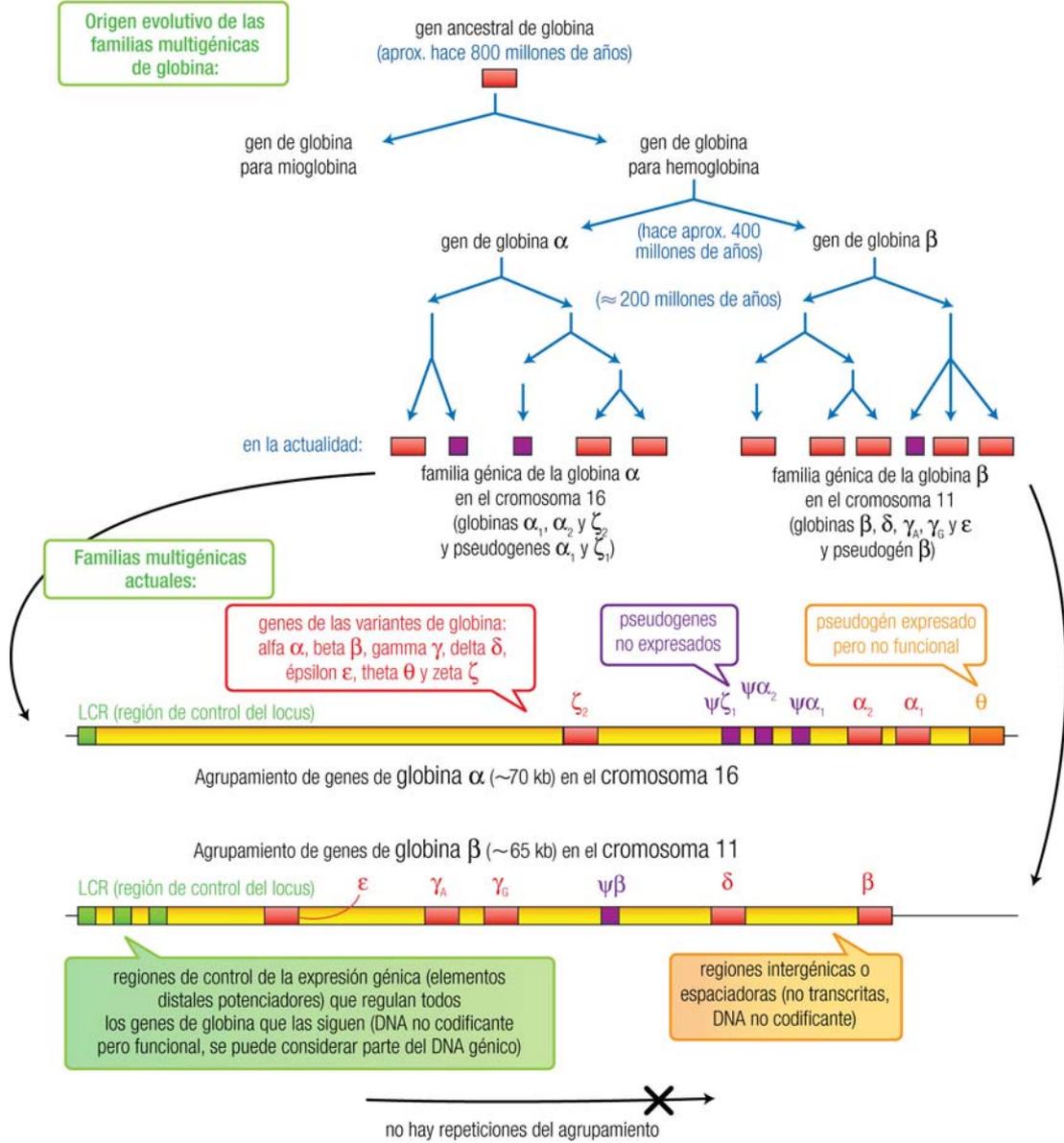
9.6

b) Familias multigénicas de genes agrupados

A diferencia de las anteriores, los miembros de cada familia son genes con cierta diversidad de secuencia. Se pueden incluir en este grupo tres tipos de familias:

- Las que presentan homología sólo en parte de la secuencia de DNA, que da lugar a proteínas con grandes regiones de secuencia y estructura comunes (*dominios*).
- Familias con homología escasa en las secuencias del DNA, lo que genera proteínas con pequeños *motivos* comunes, cada uno de pocos aminoácidos.
- Grandes "**superfamilias**", con muy débil homología en la secuencia de DNA y, por tanto, en la de las proteínas, a pesar de lo cual éstas mantienen una similitud estructural (en parte de su molécula, *dominios* comunes) y una relación funcional. Los genes que forman cada superfamilia parecen estar relacionados evolutivamente, pero más distantes entre sí que los miembros que componen las familias anteriores.

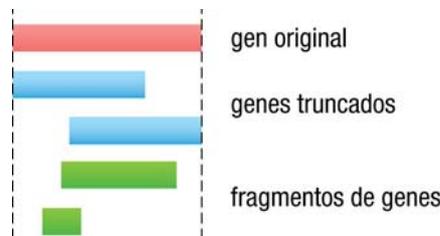
Ej. 3 Familias de genes de las cadenas α y β de globina:



9.7

Como consecuencia de los procesos evolutivos que dan lugar a las familias multigénicas, aparecen con frecuencia en ellas miembros con ciertas características diferenciales:

- **Copias de genes (variantes)** con pequeñas diferencias de secuencia, que codifican productos génicos funcionales pero de características ligeramente distintas (por ejemplo, diferencias en actividad enzimática, parámetros cinéticos, especificidad por sustrato, afinidad por su ligando, etc.). Es común que se active de forma alternativa la expresión de una u otra variante en función del estadio de desarrollo o de diferenciación celular, el tipo de tejido, etc.

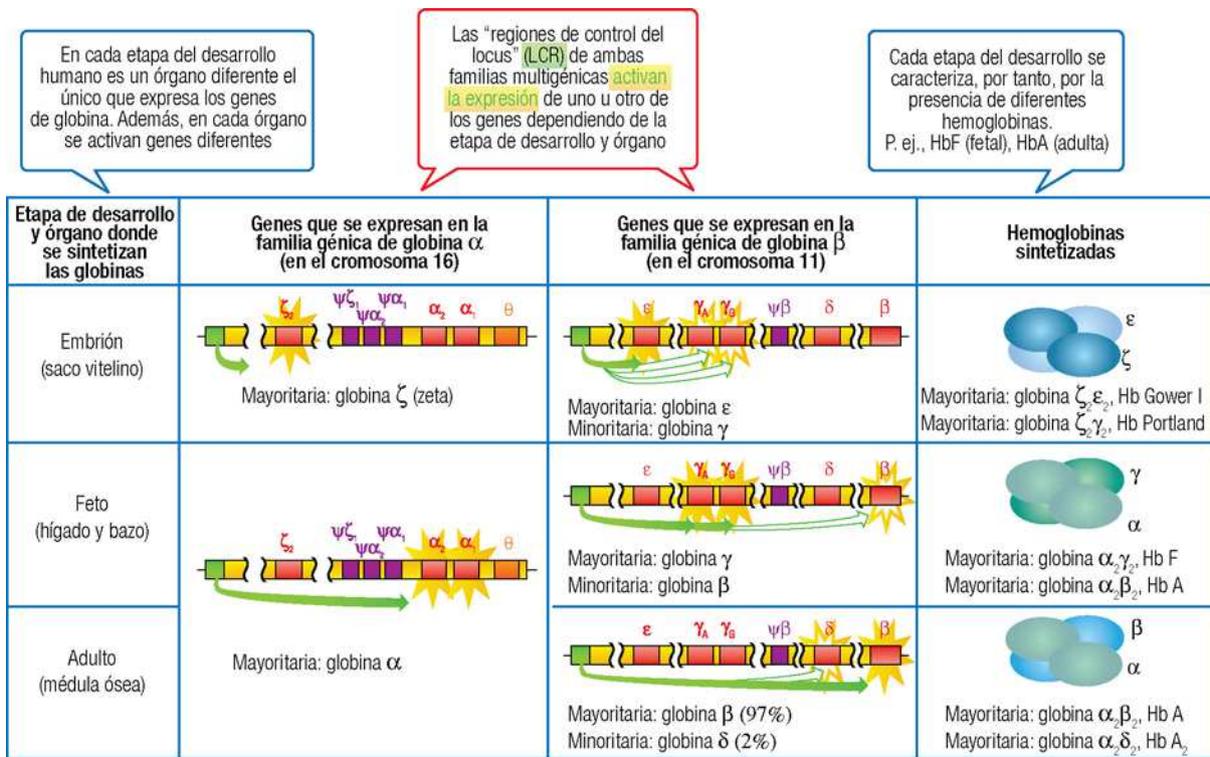


9.8

- **Pseudogenes:** se aplica este término (abreviado como ψ) a copias inactivas de un gen, es decir, que nunca se expresan, o que, aun expresándose, no son funcionales. En general, la inactivación se ha producido por acumulación de mutaciones durante la evolución en lo que inicialmente era un duplicado del gen. Existen tipos diversos de pseudogenes, en función de si se expresan y si sufren procesamiento postranscripcional, así como de su origen evolutivo.
- **Genes truncados:** se trata de copias incompletas del gen, por pérdida de una región situada en uno de los extremos (5' o 3').
- **Fragmentos de genes:** en este caso se conserva sólo una porción del interior de la secuencia del gen (se han perdido ambos extremos).

Obviamente, sólo las copias idénticas (familias clásicas) y las variantes conducen a productos génicos funcionales, mientras que los pseudogenes, genes truncados y fragmentos de genes parecen ser vestigios evolutivos sin función actual.

Los genes de la globina constituyen uno de los ejemplos más representativos de familias multigénicas con genes agrupados, implicado en una función tan importante como es el transporte de oxígeno en la corriente sanguínea. Su estudio incluye consideraciones evolutivas, de desarrollo y diferenciación, de regulación de la expresión génica, etc.



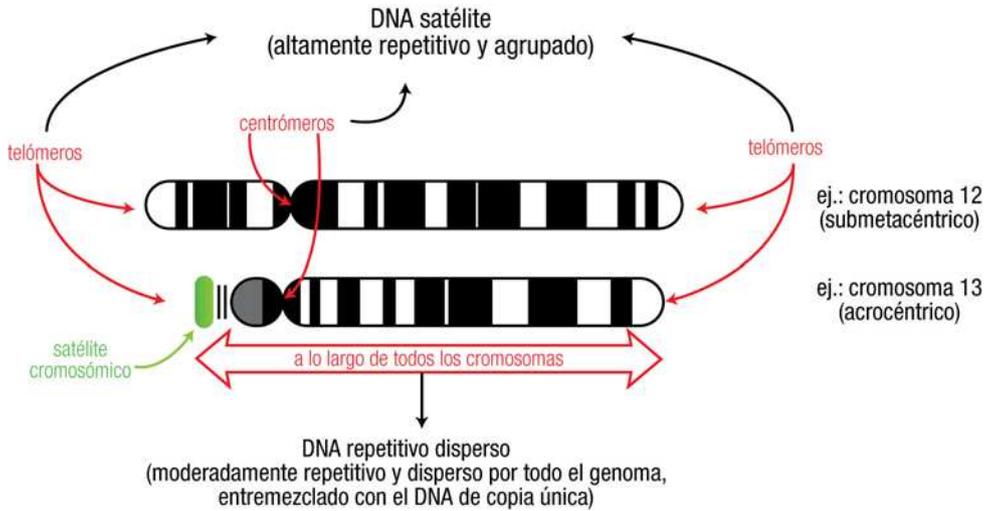
9.9

9.4.1.2 DNA repetitivo codificante disperso: familias multigénicas de genes dispersos

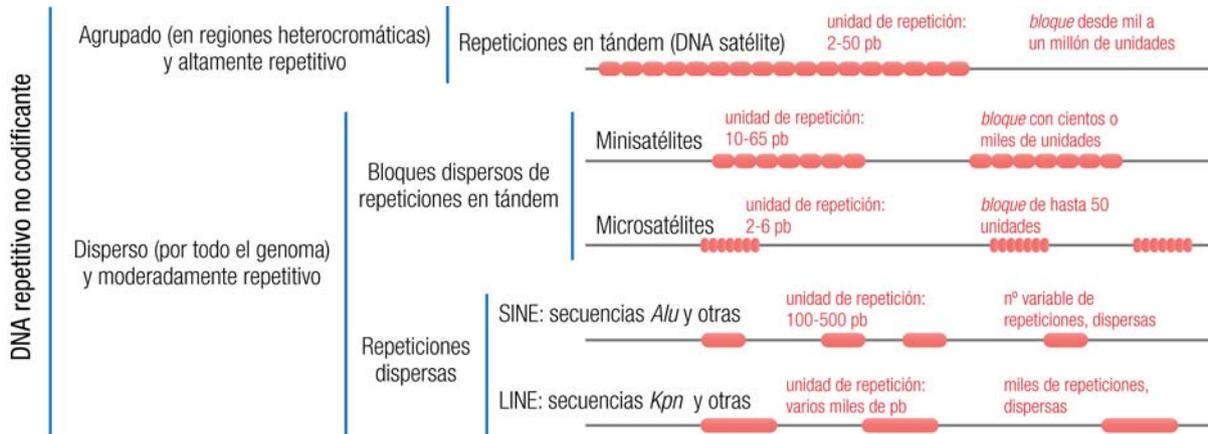
Mientras que en las familias multigénicas anteriores las repeticiones se disponen **agrupadas**, próximas en la secuencia lineal del genoma, en otras los genes que forman la familia (copias idénticas, variantes, pseudogenes, etc.) se localizan de forma **dispersa** por el genoma, a menudo incluso en cromosomas distintos. Entre estas familias se encuentran genes que codifican proteínas de funciones diversas: enzimáticas, reguladoras, de almacenamiento, estructurales, etc. Por ejemplo, la familia de aldolasa comprende 3 genes funcionales y 2 pseudogenes, repartidos en 5 cromosomas; los genes de actina forman otra familia con 6 genes y más de 20 pseudogenes en 12 cromosomas.

9.4.2 DNA repetitivo no codificante

Ésta es la fracción del genoma a la que el término *DNA repetitivo* se refiere de forma más habitual. Su tamaño se estima entre un 30 y un 40% del DNA genómico total. Como ya se ha indicado, se subdivide en dos categorías: el moderadamente repetitivo, que se ubica en forma dispersa, y el altamente repetitivo, que además es agrupado. Su distribución general en el genoma puede representarse de forma gráfica como se muestra en la figura, para dos cromosomas representativos.



9.10



9.11

9.4.2.1 DNA altamente repetitivo y agrupado: DNA satélite

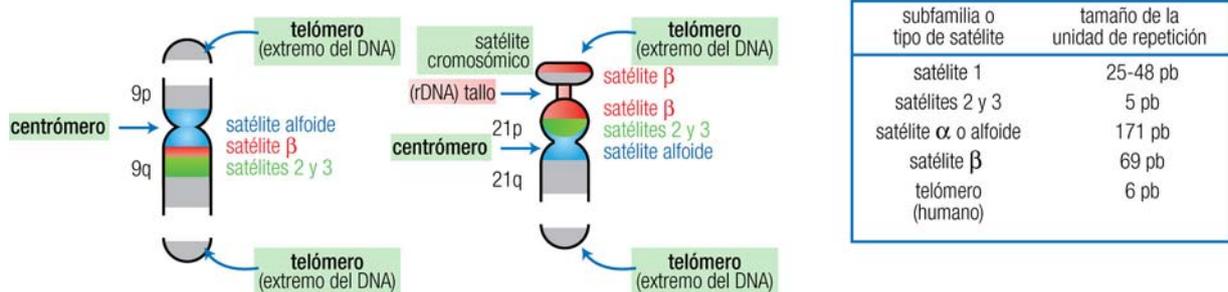
Supone entre un 10 y un 20% del genoma, y se denomina también **DNA repetitivo en tándem**. No debe confundirse con los DNA *minisatélite* y *microsatélite* (ambos corresponden al DNA moderadamente repetitivo y disperso, pág. 117) ni con los *satélites cromosómicos*, las pequeñas masas de cromatina que forman el extremo de los brazos cortos de un cromosoma acrocéntrico (pág. 89).

Este tipo de DNA está formado por unidades de pequeño tamaño (entre 2 y 50 pb) repetidas en tándem entre miles y un millón de veces, con lo que el bloque de repetición abarca cientos de kb o incluso varias Mb. También es característica su **localización agrupada** en lugares específicos de varios cromosomas, correspondientes a las **regiones heterocromáticas**, principalmente en torno al centrómero y en los telómeros. Se conoce el papel de este DNA satélite en las regiones teloméricas (págs. 94 y 158), pero aún no su función exacta en el centrómero.

El nombre de *DNA satélite* tiene un origen metodológico: debido a su alta tasa de repetición, las regiones de este tipo de DNA poseen una composición de bases diferente a la del resto del genoma, que es más promediada. Cuando el DNA total se fragmenta (por ejemplo, por fuerzas de cizalla) y se analiza en gradientes de densidad

de cloruro de cesio (págs. 137-138), los fragmentos procedentes de las regiones de DNA satélite, que poseen menor densidad debido a su menor contenido en G + C, se separan de la banda principal de DNA formando “*bandas satélites*”. Cada una de ellas corresponde a una subfamilia de DNA satélite (como 1, 2, 3, α y β), con distinta secuencia de repetición o número de repeticiones.

Ejemplos de ubicación de DNA satélite en centrómeros y telómeros



9.12

9.4.2.2 DNA moderadamente repetitivo y disperso

Como indica su nombre, este tipo de DNA se distribuye a lo largo de todos los cromosomas, con un número de repeticiones no muy elevado (entre 10^2 y 10^4). Se puede subdividir en dos categorías, en función de la forma en que se distribuyen las repeticiones: en primer lugar, algunas secuencias se repiten en tándem formando bloques, los cuales aparecen de forma dispersa por el genoma. El segundo tipo consiste en repeticiones igualmente dispersas por todo el genoma, pero que no se agrupan en bloques.

a) Bloques dispersos de repeticiones en tándem: DNA minisatélite y DNA microsatélite

Se distinguen estos dos subgrupos en función del tamaño de la unidad de repetición. Constituyen conjuntamente entre el 15 y el 20% del genoma. A pesar de la similitud de nombre, no deben confundirse con el *DNA satélite* (pág. 116), del que se diferencian por estar localizados de forma dispersa por el genoma, aunque se asemejan a él en la presencia de repeticiones en tándem.

La importancia práctica del DNA minisatélite y microsatélite radica en su gran variabilidad entre individuos, que permite utilizarlo como marcador molecular en medicina forense, pruebas de paternidad y diagnóstico de enfermedades moleculares; estas aplicaciones se describen más adelante al hablar de polimorfismo genético (pág. 424).

a1) DNA minisatélite:

Está formado por repeticiones de 10 a 65 pb, ricas en G + C, agrupadas en tándem formando bloques relativamente grandes, de cientos o miles de repeticiones; dichos bloques se encuentran repartidos por todo el genoma.

Algunas de estas repeticiones, denominadas “*DNA minisatélite hipervariable*”, se caracterizan por su elevado polimorfismo (diferencias tanto en secuencia como en número de repeticiones), no sólo entre individuos de una especie, sino también incluso entre dos cromosomas homólogos de un individuo. Sus repeticiones, de 10 a 24 pb, presentan la secuencia consenso GGCAGGANG (donde N representa cualquier nucleótido). Este DNA es importante por las aplicaciones derivadas de su polimorfismo, principalmente la obtención de **huellas de DNA**, donde una sonda para la secuencia consenso puede hibridar de manera simultánea con múltiples *loci* minisatélites diferentes distribuidos por todos los cromosomas, lo que da lugar a un esquema o patrón de hibridación distinto para cada individuo (pág. 425).

Algunos autores consideran al DNA telomérico como parte del minisatélite. No obstante, según los criterios de clasificación adoptados en este texto, ni el tamaño de su unidad de repetición ni su disposición agrupada en pocos lugares del cromosoma permiten su asignación a esta categoría.

a2) DNA microsatélite:

Se aplica este término cuando la unidad de repetición es inferior a 7 pb. Se presentan agrupadas en tándem en bloques de hasta 50 repeticiones, también distribuidos de forma dispersa por el genoma. Su polimorfismo se aplica igualmente para la obtención de huellas genéticas, para pruebas de identidad y para estudios familiares.

Aunque las secuencias teloméricas se han clasificado anteriormente como DNA repetitivo agrupado (DNA satélite), por su ubicación en puntos concretos del cromosoma, algunos autores las consideran DNA microsatélite por el hecho de compartir con éste características de tamaño, número y disposición en tándem de las repeticiones.

b) Repeticiones dispersas: SINE y LINE

De nuevo, la longitud de la unidad de repetición sirve de criterio para subdividir las:

b1) Secuencias SINE:

Las siglas proceden de *Short Interspersed Nuclear Elements*, **elementos nucleares dispersos cortos**. Se habla comúnmente de unidades de entre 100 y 500 pb, repetidas hasta 20 veces. Sin embargo, el ejemplo más característico, el elemento *Alu*, de 300 pb, aparece en el genoma humano entre medio millón y un millón de veces. Su nombre se debe a que contiene un sitio diana para la enzima de restricción *Alu* I. Se trata en realidad de una familia de secuencias, con un 85% de homología, que supone por sí sola alrededor de un 5% del genoma, de modo que, en promedio, existe una secuencia *Alu* cada 4 o 5 kb.

Se cree que los elementos *Alu* se originaron evolutivamente por la integración en el genoma de múltiples copias (*retroposones*) formadas por transcripción inversa del gen del RNA 7SL, un RNA citoplásmico pequeño (scRNA) componente de la *partícula de reconocimiento de señal* (pág. 357). A pesar de la homología (parcial) de secuencia, las secuencias *Alu* no ejercen la función de este scRNA.

b2) Secuencias LINE:

En este caso, se trata de **elementos nucleares dispersos largos** (*Long Interspersed Nuclear Elements*), con unidades de mayor tamaño, generalmente varios miles de pb, que se repiten hasta 50.000 veces en forma dispersa. La principal familia LINE en humanos la constituyen las secuencias *Kpn*, también denominadas *L1* o *LINE-1*. Se encuentran en el genoma de 50.000 a 100.000 repeticiones dispersas, de tamaños comprendidos entre 1,4 y 6,1 kb cada una, debido a su diversidad.

9.5 ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA COMPLEJIDAD EN EL GENOMA EUCARIÓTICO

El descubrimiento y análisis del DNA repetitivo, característico del genoma eucariótico, se ha basado fundamentalmente en las **técnicas de reasociación** del DNA desnaturalizado.



Web 9.1. Estudio experimental de la complejidad en el genoma eucariótico.

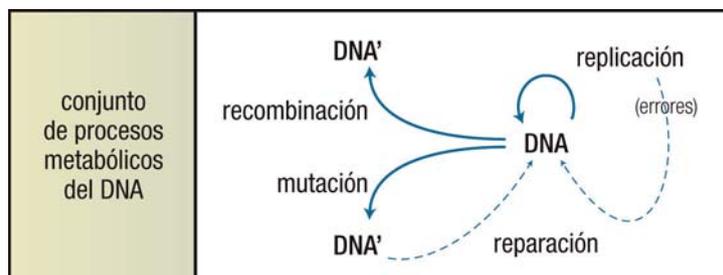
Replicación del DNA

11.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN	145		
11.1.1 Carácter semiconservador	146		
11.1.1.1 Demostración experimental de la replicación semiconservadora	147		
11.1.2 Síntesis simultánea, secuencial y bidireccional	148		
11.1.3 Inicio monofocal o multifocal	148		
11.2 ENZIMOLOGÍA DE LA REPLICACIÓN	148		
11.2.1 Requerimientos de la reacción de síntesis de DNA	148		
11.2.2 Mecanismo de la reacción	149		
11.2.3 Dirección de la síntesis	149		
11.2.4 Tipos de polimerasas	149		
11.2.4.1 DNA polimerasas procarióticas: actividades polimerasa y exonucleasas.	149		
11.2.4.2 DNA polimerasas eucarióticas: actividades polimerasa y exonucleasa	151		
11.2.5 Velocidad de replicación	152		
11.3 ETAPAS EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN	153		
11.3.1 Iniciación	153		
11.3.2 Elongación	154		
		11.3.2.1 Conexión entre la iniciación y la elongación: proteínas necesarias	154
		a) Helicasas	154
		b) Proteínas ligantes de DNA monocatenario	155
		c) Topoisomerasas	155
		d) Primasa	156
		11.3.2.2 Asimetría de la replicación en ambas hebras	156
		11.3.2.3 Mecanismo de la elongación	157
		11.3.2.4 Maduración de los fragmentos de Okazaki	158
		11.3.3 Terminación	158
		11.3.3.1 Final de la elongación	158
		11.3.3.2 Replicación de los telómeros	158
		11.3.3.3 Telomerasa: componentes y características	160
		11.3.3.4 Mecanismo de acción de la telomerasa.	160
		11.3.3.5 Funcionalidad de la actividad telomerasa en las células	160
		11.4 REPLICACIÓN MITOCONDRIAL	161

11.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN

La replicación es el proceso, conceptualmente sencillo pero molecularmente complejo, mediante el cual a partir de una molécula de DNA *progenitora* o *parental* se sintetiza una nueva, originándose así dos moléculas de DNA *hijas*, de secuencia idéntica a la del DNA original. Esto permite el paso de la información genética a la descendencia (tanto la de una célula como la del individuo).

Aunque la replicación constituye el aspecto esencial del **metabolismo del DNA**, también se deben considerar como parte del mismo otros procesos relacionados directa o indirectamente: la **recombinación** o reordenamiento de la información genética, la **mutación** o alteración de la secuencia, y la **reparación** de las alteraciones o daños en el DNA. Cabe también añadir la degradación o catabolismo del DNA hacia nucleótidos, mediado por las nucleasas.



11.1

La replicación se produce de forma coordinada con la división celular (Capítulo 8), concretamente en la fase S, durante las interfases previas tanto a la mitosis como a la meiosis I, de forma que, en el caso de la mitosis, las dos células hijas reciban la misma dotación genética que tenía la célula progenitora. En cuanto a la meiosis,

puesto que da lugar a cuatro células hijas, la replicación previa permite que éstas reciban la mitad de dicha dotación genética, y no una cuarta parte (pág. 104). La relación entre el estado de replicación y la progresión por el ciclo celular se puede resumir en los siguientes principios generales:

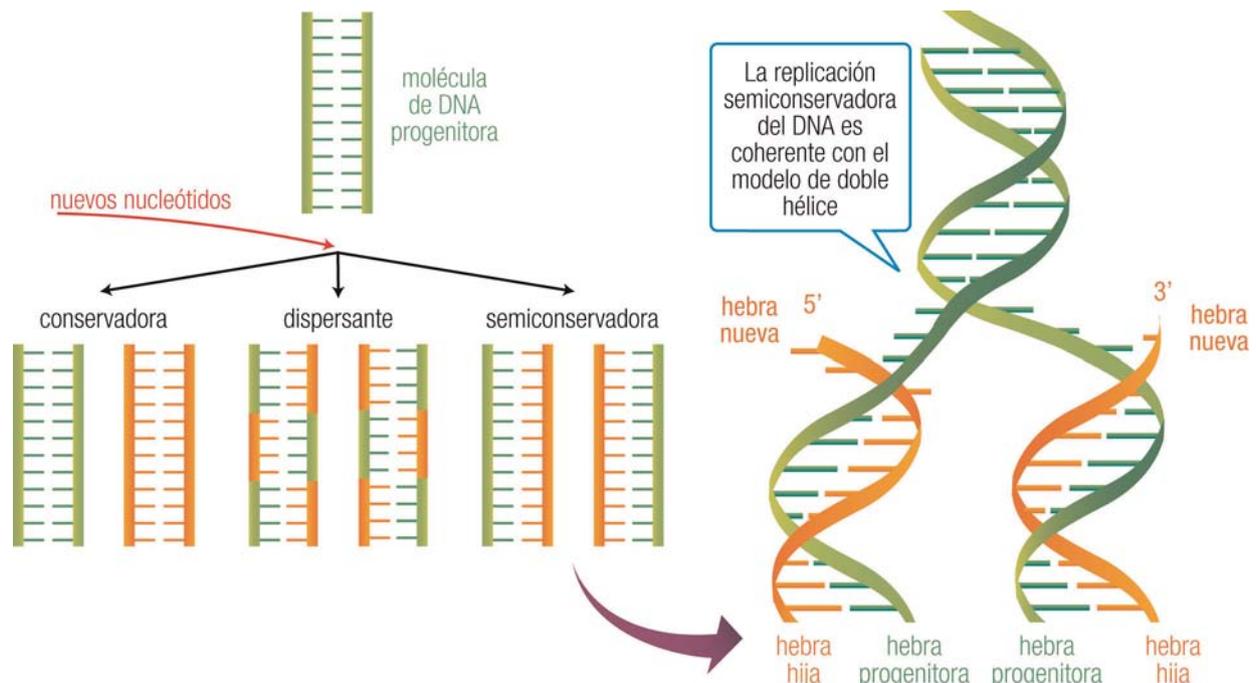
- El inicio de la replicación del DNA obliga a la célula a emprender una división.
- Una vez iniciada la replicación, no puede tener lugar la consiguiente división hasta que se haya completado dicha replicación. En realidad, el final de la replicación constituye posiblemente una señal para la división.
- El proceso de replicación se lleva a cabo sin necesidad de una separación completa de la cadena progenitora: la doble hélice se desenrolla gradualmente y sus dos hebras se van separando a la par que se produce su replicación.

Antes de estudiar los detalles moleculares de la síntesis de un nuevo DNA, procede analizar las características principales del proceso, atendiendo a un criterio eminentemente didáctico. Éstas son: carácter **semi-conservador**, realización **simultánea** en ambas hebras, de forma **secuencial** y con carácter **bidireccional**, y **origen** monofocal (procariotas) o multifocal (eucariotas). Otra característica destacada, el carácter **semidiscontinuo**, se explicará una vez que se conozca el mecanismo de la reacción.

11.1.1 Carácter semiconservador

Aunque hipotéticamente se pueden plantear **tres mecanismos** para la replicación, pronto se demostró que sólo el tercero tiene lugar en las células:

Replicación conservadora	Replicación dispersante	Replicación semiconservadora
Un complejo enzimático recorrería el DNA, reconociendo la secuencia en ambas hebras para copiarlas simultáneamente, de forma que el DNA progenitor bicatenario se conservaría intacto mientras que la molécula hija de DNA contendría dos hebras totalmente nuevas	La síntesis se produciría por fragmentos, que se combinarían con partes del DNA progenitor, dando lugar a las dos moléculas hijas de DNA, ambas con fragmentos tanto nuevos como de las dos hebras del DNA progenitor	Es el mecanismo real. Las dos hebras del DNA <i>progenitor</i> sirven de molde para la síntesis de sus respectivas hebras complementarias. Cada molécula hija de DNA está formada por una hebra <i>progenitora</i> y otra <i>hija</i> (recién sintetizada). El mecanismo se repite en sucesivas generaciones de células. El nombre alude, precisamente, a que siempre se conserva la mitad de la molécula original



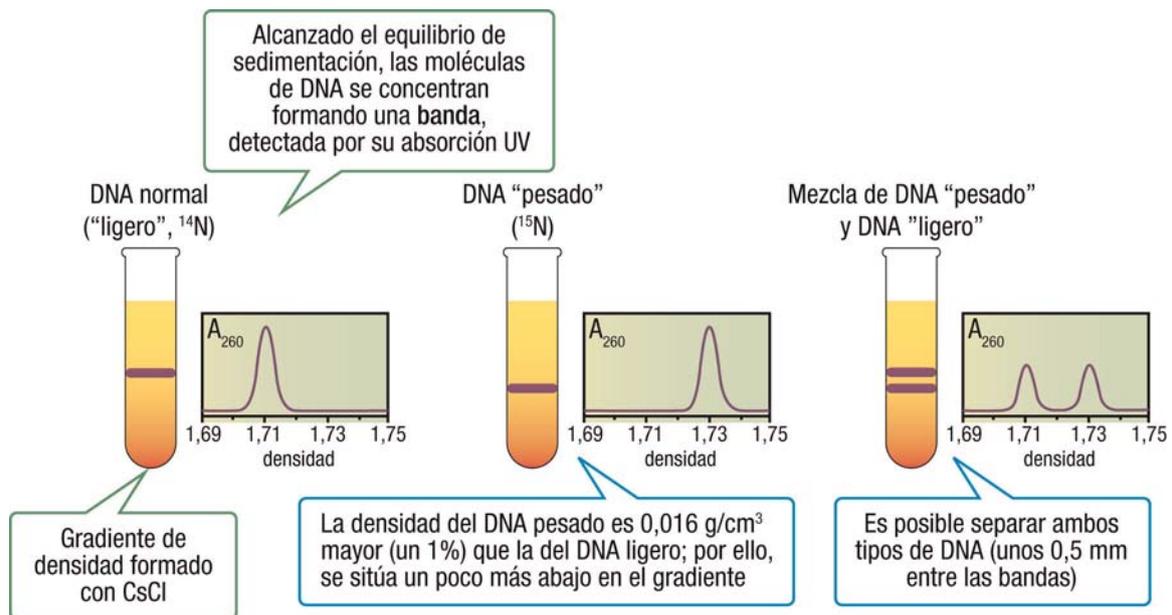
11.1.1.1 Demostración experimental de la replicación semiconservadora

El mecanismo real de la replicación lo demostraron por primera vez Mathew Meselson y Franklin W. Stahl en 1958, mediante experimentos muy completos, sencillos y representativos de muchos otros realizados en diversas áreas de la biología molecular. Aunque los aspectos moleculares de la replicación se establecieron posteriormente con el estudio de la DNA polimerasa, el experimento de Meselson y Stahl tiene interés, aparte de por su propio diseño, por haber sido la primera vez que se aplicaron tanto la técnica de sedimentación en gradiente de densidad como la introducción de isótopos en las moléculas de DNA (^{15}N , infrecuente, y ^{14}N , isótopo habitual).

Para comprender la novedad y trascendencia de estos experimentos en su momento y contexto, se van a considerar los antecedentes y el planteamiento antes de describir el resultado. Se aprovecha así este ejemplo para ilustrar el método científico, en especial cómo un diseño adecuado del experimento, que parece simple, permite obtener una información notable.

a) Antecedentes

El primer lugar, se examina la posibilidad de aplicar la técnica de equilibrio de sedimentación en gradiente de densidad, o centrifugación isopícnica (pág. 126), al análisis de muestras de DNA cuya densidad es diferente por estar marcado o no con el isótopo ^{15}N .



11.3

b) Planteamiento y diseño del experimento

Aplicando esta técnica de marcaje del DNA con ^{15}N y su análisis mediante centrifugación isopícnica, se diseñó el experimento de forma que los resultados obtenidos permitieran diferenciar cuál de las hipótesis era la correcta.

WWW

Web 11.1. Experimento de Meselson y Stahl.

c) Resultados obtenidos y conclusión

El resultado observado al realizar el experimento fue de una banda de DNA con densidad intermedia en la primera generación de células y dos bandas en la segunda generación, con densidades baja e intermedia. Estos datos experimentales coinciden con los resultados previsibles a partir de la **hipótesis semiconservadora**, de modo que ésta debe ser la correcta; es decir, en la replicación del DNA cada una de las moléculas hijas conserva una hebra del DNA progenitor y tiene otra hebra de nueva síntesis.

11.1.2 Síntesis simultánea, secuencial y bidireccional

De cara a la descripción del mecanismo de la replicación es importante destacar algunas características, observadas por primera vez en *E. coli* pero igualmente válidas para eucariotas. La principal estrategia experimental para obtener estas conclusiones ha sido añadir al medio de cultivo timidina tritiada, con lo que se marca el DNA de nueva síntesis y luego puede detectarse por métodos autorradiográficos.

- La síntesis no comienza al azar, sino en puntos concretos de la molécula, denominados **orígenes** de replicación. En cada uno de ellos se produce la apertura local de la doble hélice y comienza la síntesis **simultánea** de las dos nuevas hebras (no debe confundirse simultáneo con el carácter continuo de la síntesis de una sola de las hebras, que se estudiará más adelante).
- Como consecuencia, las dos hebras nuevas se van alargando de forma progresiva, por adición **secuencial** de nucleótidos.
- La separación de las hebras progenitoras, que comienza en cada origen, progresa en ambas direcciones, por lo que se afirma que la replicación es **bidireccional**. Los puntos de transición entre doble hebra y hebras sencillas se denominan horquillas de replicación, y van alejándose entre sí.
- Finalmente, no debe pasarse por alto el hecho de que, dado que las dos hebras del DNA son antiparalelas, su separación con el avance de la horquilla progresa en sentido opuesto, para una hebra de 3' hacia 5' y para la otra en sentido 5' → 3' (y a la inversa en la otra horquilla).

WWW

Web 11.2. Formación y avance de las horquillas de replicación.

11.1.3 Inicio monofocal o multifocal

En el cromosoma circular único de procariontes la replicación comienza siempre en un punto determinado, denominado origen (y etiquetado como *oriC*); se afirma que la replicación es **monofocal**. En consecuencia, progresa formando dos horquillas de replicación. Por el contrario, en eucariotas la replicación es **multifocal**, pues en cada uno de los cromosomas existen múltiples orígenes de replicación (centenares o miles), que dan lugar a dos horquillas cada uno. Gracias a ello se hace posible completar en un tiempo razonable la replicación de los cromosomas, mucho más largos que en procariontes.

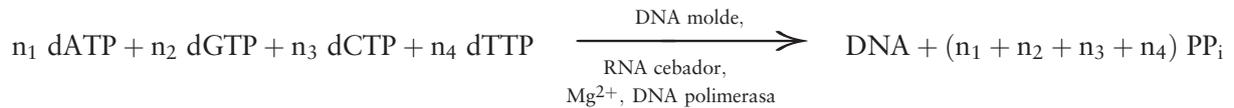
11.2 ENZIMOLOGÍA DE LA REPLICACIÓN

11.2.1 Requerimientos de la reacción de síntesis de DNA

- **Sustratos:** se utilizan como sustratos el conjunto de los cuatro desoxinucleósidos-trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. De cada uno de ellos queda incorporado en el nuevo DNA la parte dNMP de la molécula. Tanto dNMP como dNDP no sirven como sustratos.
- **Cofactores:** para una actividad óptima se requiere un ion metálico divalente como cofactor, asociado a los dNTP y a la polimerasa. Aunque *in vitro* este papel pueden desempeñarlo tanto Mn^{2+} como Mg^{2+} , es este último el que actúa *in vivo*.
- **Molde o plantilla:** ésta es, quizá, la principal característica de la reacción. El orden correcto de incorporación de los nucleótidos viene determinado por su complementariedad de bases con la secuencia de cada hebra de DNA, que actúa así como *molde* o *plantilla*.
- **Cebador:** la síntesis de una nueva hebra de DNA no puede comenzarse a partir de dos nucleótidos, sino que requiere un fragmento monocatenario iniciador, denominado *cebador*, que aporte un grupo 3'-OH libre. Se trata de un oligonucleótido, por lo común RNA, que debe estar emparejado con la hebra progenitora de DNA, de forma complementaria y antiparalela. Este requisito puede expresarse afirmando que la replicación no es autoiniciadora (a diferencia de la transcripción, pág. 268), sino que sólo **elonga** o alarga moléculas preexistentes.

II.2.2 Mecanismo de la reacción

Se inicia la reacción con el emparejamiento de un dNTP complementario al nucleótido de la hebra molde (DNA) en la posición vecinal al extremo 3' de la hebra en crecimiento (inicialmente, el RNA cebador; luego, la hebra que se está sintetizando). La reacción propiamente dicha consiste en la unión del dNTP seleccionado, que queda como dNMP, liberándose PP_i. Ello implica la formación de un enlace fosfoéster entre el fosfato α del dNTP que se incorpora y el 3'-OH libre de la cadena en crecimiento (inicialmente, del cebador). La ruptura del enlace fosfoanhídrido (α-β) del dNTP proporciona la energía necesaria para impulsar la reacción, ayudada por la subsiguiente hidrólisis del PP_i a 2 P_i catalizada por la pirofosfatasa. Tras muchas reacciones similares sucesivas, el producto es la nueva hebra de DNA:



WWW

Web 11.3. Mecanismo de la reacción de síntesis de DNA.

II.2.3 Dirección de la síntesis

Puesto que la **adición de nucleótidos** se realiza siempre mediante 5'-trifosfatos y sobre un extremo 3'-OH libre, la hebra crece por su extremo 3', y se afirma que la síntesis transcurre **en dirección 5' → 3'**. Éste es un mecanismo universal: todas las DNA polimerasas, tanto de procariotas como de eucariotas, así como todas las RNA polimerasas, sintetizan exclusivamente en dicho sentido.

II.2.4 Tipos de polimerasas

Aunque la reacción de síntesis de DNA es universal, es decir, tiene lugar de idéntica forma en todos los organismos y ubicaciones subcelulares, su catálisis la efectúan en cada caso distintas enzimas, bajo la denominación común de **DNA polimerasas** (abreviadas como **DNApol**). Estrictamente su nombre es más completo, *polimerasas de DNA dirigidas por DNA* (o *dependientes de DNA*), para indicar tanto la molécula que sintetizan como la que emplean como molde. Más adelante se estudiarán otras polimerasas de DNA o de RNA que utilizan distintos moldes; para ofrecer una visión unificada se resumen a continuación:

Molécula sintetizada	Molécula molde	Nombre completo	Ejemplos (nombre común)
DNA	DNA	Polimerasa de DNA dirigida por DNA	• DNA polimerasas
RNA	DNA	Polimerasa de RNA dirigida por DNA	• RNA polimerasas o transcriptasas • Primasas
DNA	RNA	Polimerasa de DNA dirigida por RNA	• Transcriptasas inversas • Telomerasas
RNA	RNA	Polimerasa de RNA dirigida por RNA	• RNA replicasas

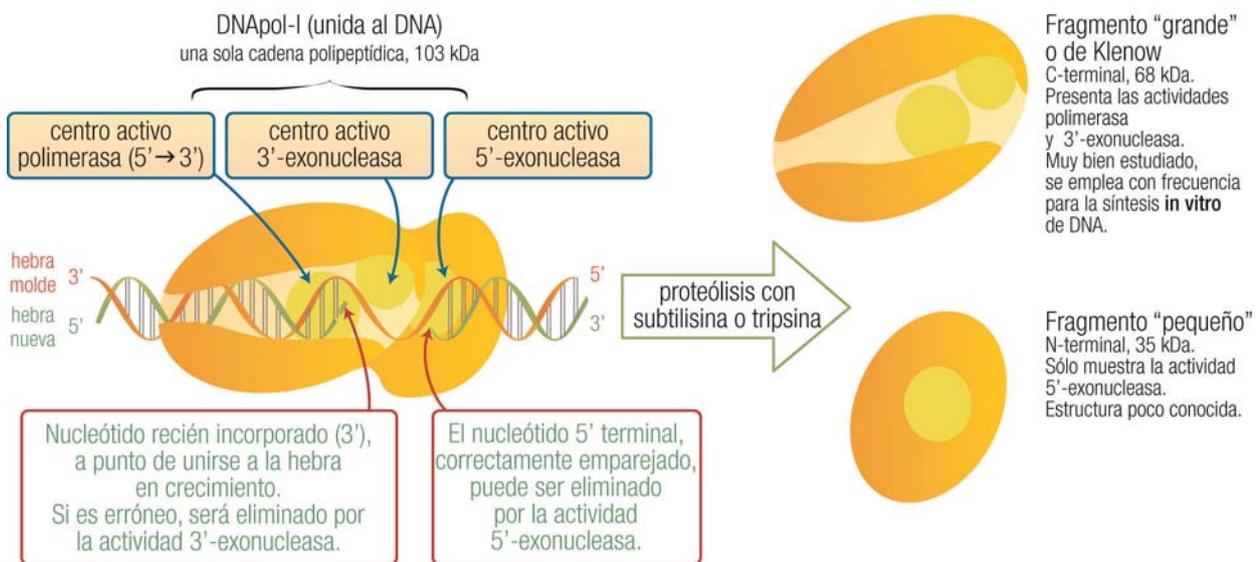
II.2.4.1 DNA polimerasas procarióticas: actividades polimerasa y exonucleasas

La primera DNA polimerasa descubierta (Arthur Kornberg, 1958) y la mejor estudiada hasta la fecha es la **DNApol-I** de *Escherichia coli*. La comprobación de que su actividad no es suficiente para justificar la velocidad de replicación del cromosoma bacteriano *in vivo* condujo a la búsqueda y descubrimiento de otras enzimas: **DNApol-II** y **DNApol-III** y, más tarde, **DNApol-IV** y **DNApol-V**. Todas ellas coexisten en *E. coli*, con funciones especializadas: pol-III realiza la mayor parte de la tarea de replicación, mientras que las otras se

encargan de distintas funciones auxiliares (sus características particulares se exponen en la tabla de pág. 151, junto con las de las polimerasas eucarióticas).

Varias de las DNA polimerasas presentan, además de su actividad enzimática como polimerasa, una o dos **actividades exonucleasa**. La actividad **3'-exonucleasa** (también denominada **exonucleasa 3' → 5'**) permite hidrolizar el nucleótido situado en el extremo 3' de la hebra de DNA, sólo un nucleótido cada vez. Esta eliminación tiene lugar de forma inmediata, cuando el nucleótido recién incorporado por la actividad polimerasa a la cadena en crecimiento es erróneo, es decir, no empareja correctamente con el de la hebra molde de DNA. La polimerasa es así capaz de reconocer el error, detener la adición de más nucleótidos y liberar ese último dNMP mal incorporado. Los centros activos polimerasa y exonucleasa son diferentes. En resumen, las DNA polimerasas corrigen sus propios errores, en sentido (3' → 5') contrario al de la polimerización (5' → 3'); por ello, esta actividad 3'-exonucleasa se denomina también **actividad correctora de pruebas** (o de galeradas, por analogía al proceso en imprenta) o, alternativamente, **exonucleasa revisora**. De este modo, mejora la fidelidad de la replicación, aumentándola entre 10² y 10³ veces sobre la que aporta la incorporación de nucleótidos complementarios por la polimerasa (que tiene una tasa de error de un nucleótido por cada 10⁴ o 10⁵).

CARACTERÍSTICAS DE LA DNA POLIMERASA I DE *E. coli*



11.4

WWW

Web 11.4. Estructura de la DNA polimerasa, centros activos y unión al DNA.

La DNApol-I de procariontes es única entre las polimerasas por poseer, además, una segunda actividad exonucleasa, en este caso **5'-exonucleasa** (o **exonucleasa 5' → 3'**), que le permite hidrolizar secuencialmente DNA o RNA a partir del extremo 5' de la hebra. De nuevo, el centro activo es independiente de los anteriores; en este caso está situado en el fragmento pequeño. Esta actividad desempeña un papel fundamental en la replicación del DNA procariótico, al eliminar el RNA cebador y sustituirlo por DNA durante la síntesis discontinua de la hebra retardada (pág. 158). También complementa la actividad 3'-exonucleasa corrigiendo errores de distinto tipo, y en ocasiones se denomina **actividad de reparación**; por ejemplo, interviene en la escisión de los dímeros de pirimidina que se forman por exposición del DNA a luz UV (pág. 398). Experimentalmente, se aprovecha la actividad 5'-exonucleasa, por ejemplo, para la preparación de sondas marcadas (pág. 187).

Algunas características de las DNA polimerasas, desde el punto de vista bioquímico y funcional

Polimerasa:	Procariotas			Eucariotas				
	I	II	III	α	β	γ	δ	ϵ
Ubicación subcelular				Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Actividades enzimáticas:								
Primasa (inicio)	No	No	No	Sí	No	No	No	No
Polimerasa 5' → 3' (elongación)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3'-Exonucleasa (o 3' → 5') (corrección de pruebas)	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí
5'-Exonucleasa (o 5' → 3') (eliminación de cebadores)	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Función en la célula:								
Replicación (síntesis continuada de hebras nuevas, adelantada y retardada)	No	No	Sí	Sólo inicialmente	No	Sí	Sí	Sí
Empalme de fragmentos de Okazaki	Sí	No	No	No	No		Sí (con nucleasas)	
Velocidad de replicación:								
Velocidad de polimerización (nucleótidos/segundo)	16-20	2-7	250-1.000					
Procesividad (nucleótidos añadidos antes de su disociación)	Baja 3-200	Media ≥ 10.000	Muy alta $\geq 5 \times 10^5$	Baja 100-200	Baja	Elevada	Elevada con PCNA ≥ 5.000	Elevada con/sin PCNA

11.2.4.2 DNA polimerasas eucarióticas: actividades polimerasa y exonucleasa

En **eucariotas**, las DNA polimerasas son diferentes a las de procariotas, aunque presentan cierta similitud de secuencia y estructura. Se han descrito más de **cinco enzimas**. La **DNApol α** posee dos actividades enzimáticas independientes: polimerasa (de DNA) y primasa (polimerasa de RNA). Gracias a su actividad primasa se encarga de formar un RNA cebador –necesario para iniciar la replicación– y, por su actividad polimerasa, de la elongación inicial de ese cebador. Esta tarea se cede luego a las **DNApol δ** y **ϵ** , responsables de la mayor parte de la elongación de ambas hebras; de hecho, ambas tienen actividades similares, pero aún no está claro si desempeñan indistintamente la misma función o si están especializadas. La **DNApol β** no interviene en la replicación, sino que está implicada en la reparación de errores o daños en el DNA (procesos en los que también participan otras polimerasas, incluyendo δ y ϵ). Mientras estas cuatro enzimas son responsables de la replicación, reparación y recombinación del DNA nuclear, el DNA mitocondrial lo sintetiza una polimerasa diferente, la **DNApol γ** . Por último, se han descubierto otras polimerasas nucleares, peor conocidas (θ [theta], ζ [zeta], λ [lambda], μ [mu], κ [kappa], η [eta], ι [iota]), que están implicadas sobre todo en reparación y recombinación.

En cuanto a la actividad exonucleasa de las DNA polimerasas eucarióticas, sólo las 3 que se encargan de la elongación (δ , γ y ϵ , v. tabla) poseen actividad **3'-exonucleasa**, la responsable de la capacidad de corrección de errores cometidos al incorporar los nucleótidos a la hebra que se está sintetizando. Ninguna de las polimerasas eucarióticas parece tener actividad 5'-exonucleasa; la función de eliminación de cebadores la desempeñan dos nucleasas independientes, aunque las polimerasas δ y ϵ sí se encargan de rellenar el hueco con DNA; todos estos detalles se estudian posteriormente (pág. 158).

La función específica de cada polimerasa sólo se puede comprender en el contexto de los mecanismos de iniciación y elongación de las cadenas de DNA, que se estudian con detalle dentro de la etapa de elongación (pág. 157).

Bajo el alcance de este libro no parece adecuado describir las propiedades estructurales de las distintas polimerasas. En la tabla siguiente se resumen los datos relativos a tamaño y composición en subunidades, pero debe tenerse en cuenta que la variabilidad de cifras es elevada, en especial para las enzimas eucarióticas, e incluso la interpretación de éstas en los distintos organismos estudiados, como para su generalización a todos los eucariotas.

Características estructurales de las DNA polimerasas

Polimerasa:	Procariotas ¹			Eucariotas ²				
	I	II	III	α	β	γ	δ	ϵ
Masa total (kDa) ⁽³⁾	103	90	$\cong 900$	356	39	160	173	313
N.º de subunidades	1	≥ 4	22	4	1	3	2 o 3	4
Masa de subunidades			(4)	(5)		125 35	125 48	258 55

¹Al menos en *E. coli* se han identificado otras dos polimerasas, IV y V.

²Los datos corresponden a humanos. Existen otras DNA polimerasas minoritarias o no esenciales.

³Masa molecular de la holoenzima, o enzima funcional con todas sus subunidades.

⁴La DNAPol-III de *E. coli* está formada por 22 subunidades de 10 tipos, con una composición global $(\alpha, \epsilon, \theta)_2 \tau_2 (\gamma, \delta, \delta', \theta, \psi)_2 \beta_4$. De ellas, la agrupación $(\alpha, \epsilon, \theta)$ se conoce como “núcleo” o “centro” de la polimerasa. El centro activo polimerasa está en la subunidad α (130 kDa), mientras que el centro 3'-exonucleasa o actividad correctora de pruebas está en la ϵ .

⁵La DNAPol α humana está formada por 4 subunidades diferentes: 180 kDa, con el centro activo polimerasa; 48 kDa, con el centro activo primasa; 58 kDa, cofactor de la primasa; 70 kDa, reguladora de la polimerasa.

11.2.5 Velocidad de replicación

Dado el gran tamaño del genoma de una célula, para que su replicación completa se lleve a cabo en un tiempo razonable el proceso de síntesis debe ser muy rápido. En procariotas, la velocidad alcanza 1.000 nucleótidos por segundo. En eucariotas, el mayor tamaño del genoma hace pensar en la necesidad de una gran velocidad de replicación que, sin embargo, no precisa ser tan elevada gracias a la existencia de varios orígenes de replicación en cada cromosoma, lo que reduce la longitud de DNA que debe sintetizar cada molécula de polimerasa.

La consecución de una alta velocidad de síntesis sólo es posible gracias a un mecanismo peculiar, según el cual la molécula de DNA polimerasa se mantiene unida a la cadena de DNA molde, a la vez que asociada por su centro activo al extremo 3'-OH de la hebra creciente. De esta forma puede incorporar numerosos nucleótidos sucesivamente, con una reducción del tiempo necesario para la adición de cada uno: por ejemplo, la polimerasa puede tardar un minuto en soltarse y volverse a unir al DNA (por mera difusión de las moléculas), mientras que para añadir un nucleótido sin haberse soltado le bastan unos milisegundos. Esta capacidad de las polimerasas, variable entre ellas, se recoge bajo el término *procesividad*, que se define como el número de nucleótidos que son incorporados a la hebra antes de que la enzima se separe del molde (coloquialmente se diría añadidos “de un tirón”). Un valor elevado de procesividad en una polimerasa es mucho más importante para la replicación que una velocidad alta de catálisis.

Las polimerasas de mayor procesividad son las que intervienen en la elongación de las cadenas de DNA (v. tabla en pág. 151), mientras que las de baja procesividad se encargan de tareas que podrían calificarse de auxiliares, tales como la síntesis y eliminación de cebadores, su sustitución por DNA y la reparación. En general, la alta procesividad se consigue gracias a una molécula que “abrazo” o rodea la cadena de DNA, evitando así que la enzima se separe; este mecanismo se denomina de “abrazadera deslizante”, pues permite el deslizamiento continuado de la polimerasa a lo largo de la cadena de DNA, sin separarse de ella.

11.3 ETAPAS EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN

Mientras que en procariotas es probable que la replicación tenga lugar en conexión con la membrana celular, pues el único cromosoma está anclado a ella en la zona nucleoide, en eucariotas el proceso ocurre, lógicamente, en la matriz nuclear. El DNA se replica una vez por ciclo celular, durante la fase S.

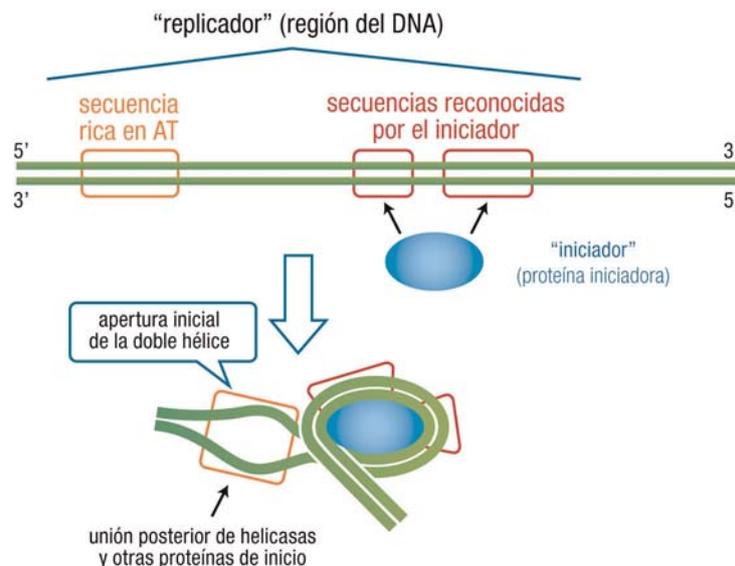
El mecanismo del proceso de replicación permite definir una unidad funcional denominada **replicón**, como aquella región de DNA que se replica a partir de cada origen (v. web 11.2). Cada replicón contiene, pues, un origen de replicación y se replica mediante dos horquillas. Mientras en procariotas el cromosoma completo constituye un solo replicón, en eucariotas son numerosos y sufren la replicación de forma casi simultánea, lo que supone la existencia de un complejo mecanismo de control que coordine el inicio, elongación y terminación en todos los replicones de cada cromosoma. El conocimiento preciso de estos aspectos está pendiente, al igual que otros relacionados, por ejemplo, con la replicación de los centrómeros y de otras regiones heterocromáticas altamente condensadas.

Centrándonos en el inicio y progreso de la replicación en cada replicón, deben plantearse cuestiones relativas a cómo son las interacciones específicas entre DNA y proteínas que desencadenan la iniciación, a la consiguiente actuación de estas proteínas y al control del proceso. Por delante de la horquilla de replicación debe producirse la descondensación de los cromosomas, la disociación de los nucleosomas y la separación de las histonas y las proteínas no histónicas (Capítulo 7). Por detrás de la horquilla, deben reutilizarse las histonas y proteínas no histónicas para la reasociación de los nucleosomas, volverse a condensar la cromatina, etc.

11.3.1 Iniciación

La replicación siempre comienza en puntos definidos de la molécula de DNA, con secuencias características. Como se ha comentado (web 11.2), en **procariotas** el cromosoma tiene un origen de replicación único (llamado *oriC*) mientras que en **eucariotas** la enorme longitud de los cromosomas requiere la existencia de numerosos orígenes de replicación que, aunque se conocen con menos precisión, también poseen secuencias características.

La definición de los puntos de inicio depende de dos regiones en el DNA: el **replicador**, que es la zona que determina la apertura inicial de la doble hebra, y el **origen** propiamente dicho, el punto donde comienza la síntesis sobre el molde de la molécula abierta. El replicador incluye zonas donde la doble hélice puede desenrollarse con facilidad (secuencias ricas en pares AT) y otras que interaccionan específicamente con **proteínas iniciadoras**. La unión de estas proteínas provoca la flexión de la cadena de DNA, generando una tensión superhelicoidal negativa que, sumada a la interacción más débil entre las bases A y T, contribuye a la separación de las hebras. En eucariotas, en particular, se han identificado también proteínas iniciadoras que, en lugar de flexionar el DNA, se unen a regiones palindrómicas que pueden formar estructuras cruciformes (pág. 55); el resultado es análogo, pues las cruciformes reducen la tensión de superenrollamiento y así facilitan la apertura de la doble hélice.



Las proteínas iniciadoras también actúan uniendo otras proteínas, que son así reclutadas al sitio de inicio. Una vez abierta la doble hebra (lo que supone una desnaturalización local, v. pág. 164), tanto la helicasa como el resto de proteínas responsables del inicio –incluidas las propias DNA polimerasas– ya pueden asociarse al DNA y comenzar el proceso de síntesis.

WWW

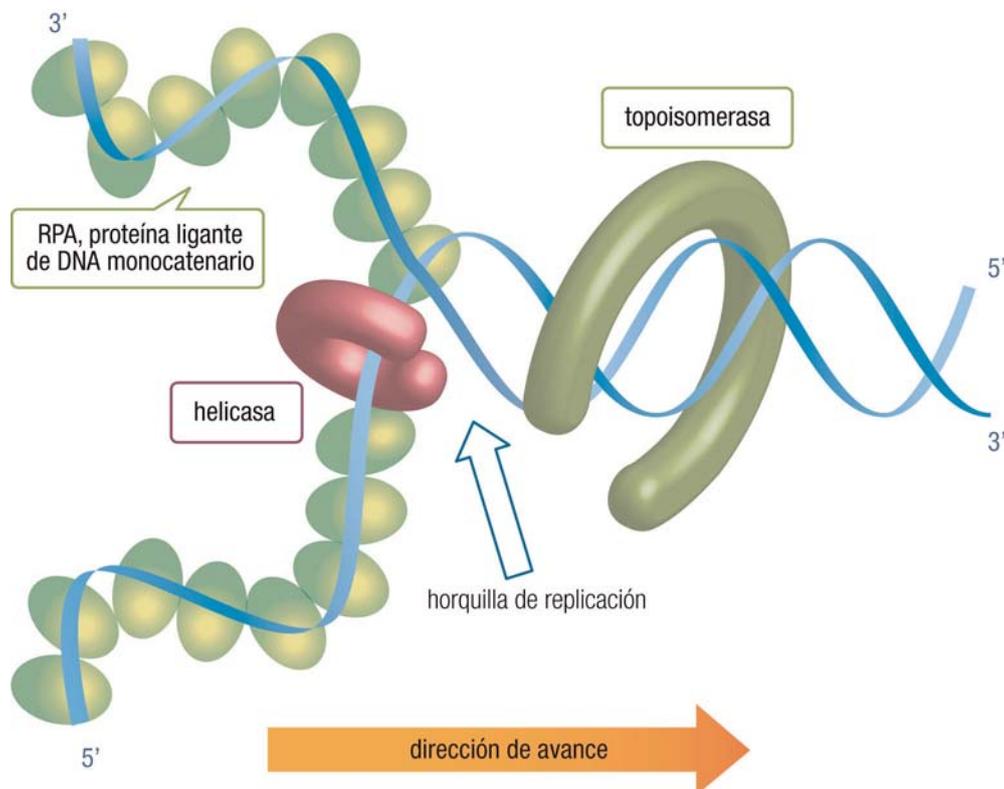
Web 11.6. Inicio de la replicación.

11.3.2 Elongación

11.3.2.1 Conexión entre la iniciación y la elongación: proteínas necesarias

Una vez formado el complejo de iniciación, la replicación precisa el desenrollamiento de la doble hélice, a fin de hacer accesibles las bases como molde para formar las nuevas hebras. El desenrollamiento inicial en el tramo correspondiente al origen de replicación, por efecto de las proteínas iniciadoras, debe continuar avanzando por delante de la polimerasa, encabezando la horquilla de replicación. Además, a medida que se van sintetizando las hebras nuevas se debe ir recuperando el enrollamiento en las dos dobles hélices recién formadas. En estas operaciones de avance, desenrollamiento o relajación y enrollamiento o compactación intervienen diversas proteínas especializadas. El complejo multiproteico formado por éstas y por las DNA polimerasas, que viaja asociado a cada horquilla realizando la replicación, se conoce como **replisoma**.

Aunque la identidad molecular y el nombre de las proteínas implicadas varían dependiendo del tipo de organismo (bacterias, levaduras, mamíferos, etc.) básicamente todos utilizan el mismo conjunto de actividades enzimáticas y siguen mecanismos análogos.



11.6

a) Helicasas

Estas proteínas se unen al DNA una vez que éste se ha abierto en el origen y actúan propagando la separación de sus dos hebras, en un proceso que requiere la hidrólisis simultánea de ATP. En general son hexámeros en forma de anillo que rodea a una de las hebras del DNA. Una vez creadas las dos horquillas de replicación,

comienzan a avanzar en sentidos opuestos, cada una liderada por una helicasa seguida inmediatamente por el resto de componentes del replisoma o complejo de elongación asociado a la horquilla.

b) Proteínas ligantes de DNA monocatenario

Una vez separadas las hebras por la helicasa, intervienen las “proteínas ligantes de DNA monocatenario”, que evitan el reemparejamiento de las hebras. De esta forma, las hebras molde pueden acoger a los nucleótidos que se incorporan en la replicación. Se las denomina **proteínas SSB** (*single strand binding proteins*), también de forma genérica pero de modo específico en procariotas. En eucariotas desempeña esta función la **proteína de replicación A (RPA)**.

c) Topoisomerasas

La apertura de la doble hélice ocasionada por la progresión de la helicasa a lo largo del DNA bicatenario conlleva la aparición de superenrollamientos positivos por delante de la horquilla. Si se tratase de un DNA lineal y corto, el superenrollamiento se podría eliminar por simple rotación de la molécula, en torno a su eje, en sentido contrario. Sin embargo, esto no es posible en los DNA circulares (procarióticos) ni en los lineales de gran tamaño (eucarióticos), que están restringidos topológicamente (Capítulo 7) debido a su naturaleza circular y a su unión a proteínas, respectivamente. Para aliviar esa tensión de torsión se requiere, pues, algún tipo de mecanismo giratorio; de lo contrario, el superenrollamiento acumulado por delante de la horquilla llegaría a impedir el avance de la replicación. Este problema se resuelve gracias a la acción de las topoisomerasas, enzimas que alteran el estado de superenrollamiento del DNA sin modificar su estructura en otros aspectos. Es decir, interconvierten topoisómeros modificando el *número de enlace* del DNA (número de vueltas que da una hebra respecto a la otra, pág. 82). Las topoisomerasas también intervienen en los procesos de recombinación y, posiblemente, en la transposición, constituyendo un mecanismo básico general de modificación topológica de la molécula de DNA.

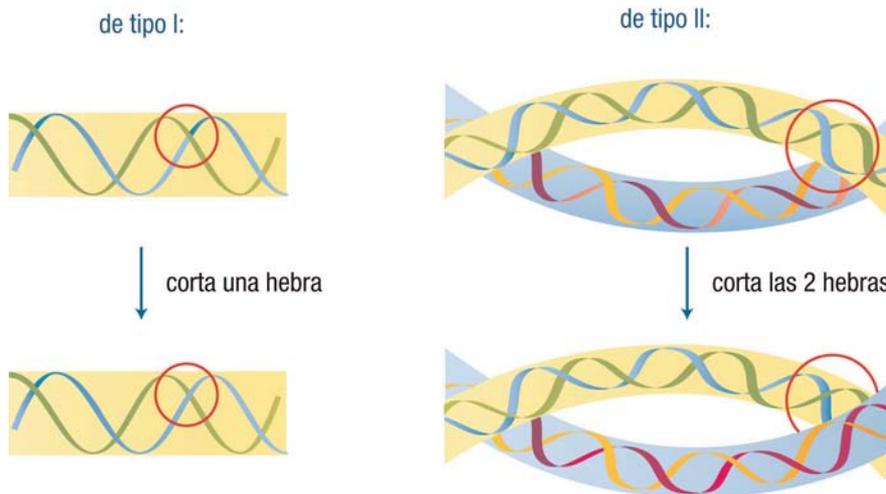
WWW

Web 11.7. Superenrollamiento asociado al avance de la replicación.

Atendiendo a su modo de acción, se distinguen dos familias de topoisomerasas:

Las **topoisomerasas de tipo I** escinden de manera transitoria una hebra del DNA (un enlace fosfodiéster), dejan pasar la otra por la brecha abierta y vuelven a ligar la primera hebra. Como consecuencia, el número de enlace aumenta o disminuye en una unidad. La reacción transcurre a través de un intermediario covalente entre uno de los extremos del corte y un residuo de tirosina de la enzima. Al permanecer la enzima unida así al DNA abierto durante la acción catalítica, se controla en todo momento el grado de tensión liberado.

Acción de las topoisomerasas



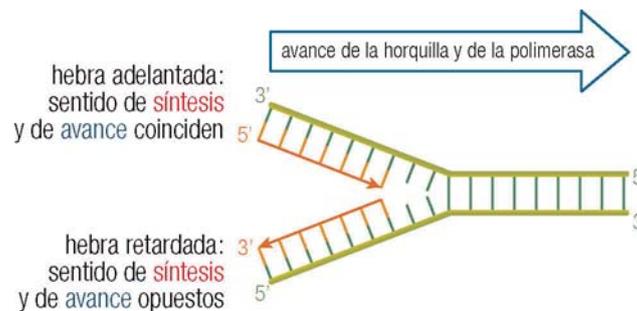
Las **topoisomerasas de tipo II**, cuyo ejemplo clásico es la **girasa** procariótica, cortan de manera transitoria las dos hebras del DNA, permiten el paso de otra doble hebra, intacta, por la brecha abierta y finalizan resellando los cortes. Por consiguiente, el número de enlace aumenta o disminuye en dos unidades. La misión de estas enzimas es generalmente inducir superenrollamientos negativos que facilitan el posterior desemparejamiento local. El consumo energético del proceso es importante: se hidroliza una molécula de ATP por cada corte de la cadena.

d) Primasa

Como ya se ha indicado, las DNA polimerasas no son capaces de iniciar la síntesis de una molécula de DNA, es decir, unir los dos primeros nucleótidos, sino sólo de elongar una hebra preexistente; por ello, el inicio de las hebras nuevas requiere un cebador. Éste lo sintetiza una polimerasa de RNA dirigida por DNA (pág. 149), denominada **primasa** (de *primer*, cebador en inglés), que produce cadenas cortas de RNA, complementarias de cada una de las hebras desemparejadas en el origen de replicación. En procariotas, la primasa es una proteína independiente que forma parte de un complejo proteico denominado *primosoma*, asociado a la horquilla. En eucariotas, la actividad primasa reside en una de las subunidades de la DNA polimerasa α , distinta de la subunidad que posee el centro activo polimerasa (v. tabla en pág. 152); por ello, esta proteína con dos actividades se llama **DNApol α /prim**.

En resumen, la replicación no sólo depende de la DNA polimerasa, sino de numerosas enzimas y factores proteicos (más de 20 en *E. coli*). Este conjunto de proteínas que, como se ha indicado, recibe el nombre de *replisoma* o *complejo de replicación*, se asocia en torno a la horquilla de replicación, participando de forma directa o indirecta en la síntesis simultánea de ambas hebras.

11.3.2.2 Asimetría de la replicación en ambas hebras



11.8

Conceptualmente, el principal problema de la replicación surge al constatar que ambas hebras se copian de manera simultánea, a medida que avanza la horquilla, mediante enzimas (DNA polimerasas) que sólo son capaces de sintetizar en dirección $5' \rightarrow 3'$. Al abrirse la horquilla, una de las hebras progenitoras se va exponiendo en el sentido correcto para actuar de molde, $3' \rightarrow 5'$, por lo que la síntesis de su hebra complementaria puede transcurrir por simple avance de la polimerasa a lo largo del molde a la par que avanza la horquilla. Esta hebra nueva recibe el nombre de **hebra adelantada** (*leading strand*; a veces, hebra líder o hebra guía); en ocasiones, su hebra molde recibe el mismo nombre, pero para evitar confusiones la llamaremos “molde de la hebra adelantada”. Por el contrario, la otra hebra progenitora se expone en sentido $5' \rightarrow 3'$, por lo que no puede actuar como molde a medida que avanza la horquilla. Como se verá en seguida, la síntesis de su complementaria requiere un mecanismo particular que, entre otras cosas, supone un desfase con la síntesis de la hebra adelantada, por lo que se denomina hebra **retardada** o **retrasada** (*lagging strand*).

La solución al problema de síntesis de la hebra retardada se desveló al observar que durante la replicación era posible aislar pequeñas moléculas de DNA recién sintetizado (más cortas en eucariotas que en procariotas), conocidas como **fragmentos de Okazaki** en honor a Reiji y Tuneko Okazaki, quienes fueron sus descubridores. Se pudo entonces proponer un mecanismo que explicase la síntesis de la hebra retardada en paralelo al desplazamiento de la horquilla de replicación. Dicho mecanismo consiste en la síntesis discontinua de la hebra retardada: cada fragmento de Okazaki corresponde a una porción de dicha hebra, cuya síntesis sólo comienza

(de ahí el nombre) cuando el avance de la horquilla ha liberado suficiente longitud de DNA monocatenario como para que la polimerasa lo utilice como molde, en sentido $3' \rightarrow 5'$. Se propone para ello que la hebra sencilla forma un bucle para permitir la síntesis en el sentido $5' \rightarrow 3'$ propio de la polimerasa. La síntesis conjunta de ambas hebras (la adelantada, de forma continua, y la retardada, de forma discontinua), por sendas moléculas de DNA polimerasa se dice que es *semidiscontinua*.

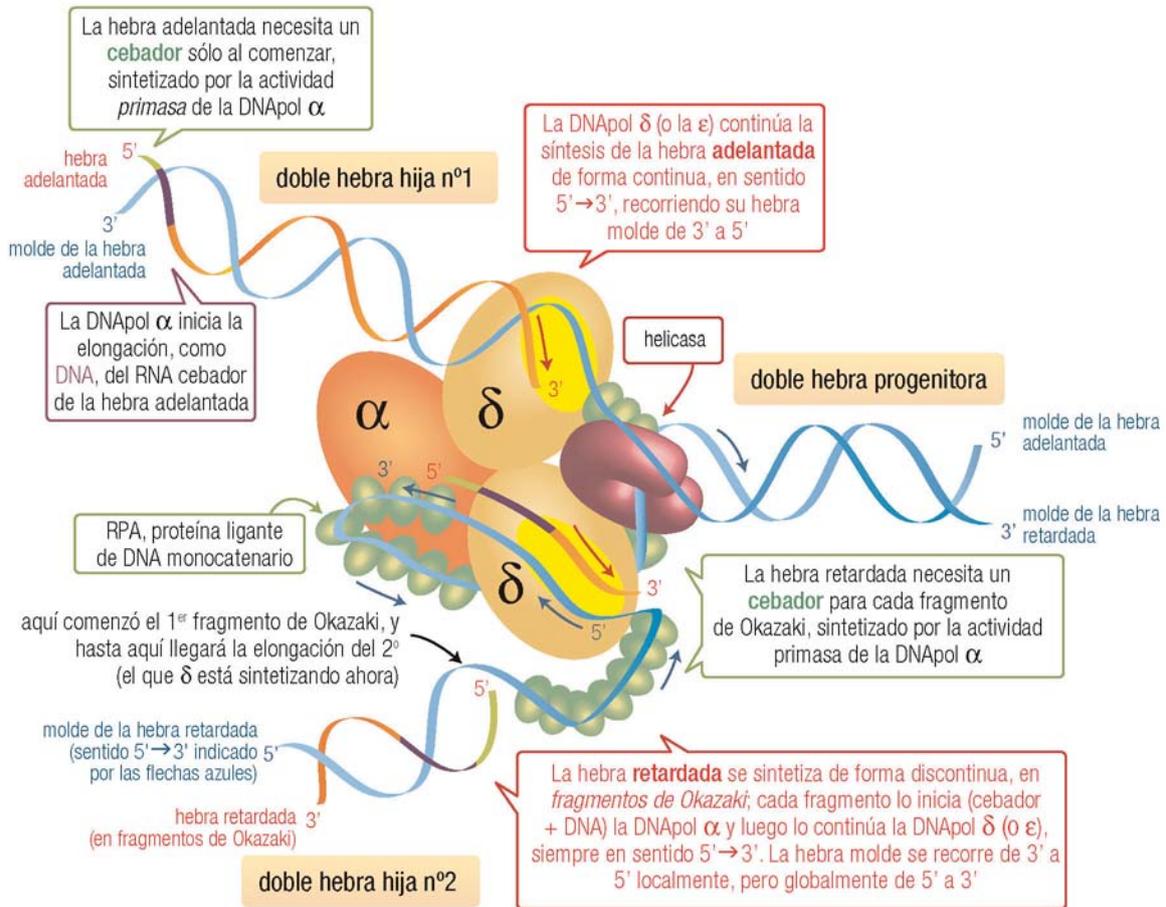
Lógicamente, la síntesis de cada fragmento de Okazaki requiere un RNA cebador, sintetizado por una actividad primasa (parte del *primosoma* en procariontes, DNAPol α /prim en eucariotas) que viaja con la horquilla y que también sintetizó en el origen de replicación el único cebador requerido por la hebra adelantada.

11.3.2.3 Mecanismo de la elongación

WWW

Web 11.8. Mecanismo de la elongación en replicación y organización del replisoma.

Representación global aproximada de la organización de las proteínas responsables de la replicación (componentes del replisoma) en torno a la horquilla de replicación. La situación mostrada corresponde a un momento intermedio de la elongación, con un fragmento de Okazaki sintetizado a medias (p.ej., el nº 2 en las figuras anteriores, etapa B). Por claridad, no se muestran otros factores proteicos, como el PCNA que va asociado a las DNAPol δ , el sistema de nucleasas FEN1/RNasa H1 que madura los fragmentos de Okazaki, la DNA ligasa I, y las topoisomerasas que regulan el superenrollamiento en las dobles hebras progenitora e hijas.



11.3.2.4 Maduración de los fragmentos de Okazaki

Para completar la síntesis de la hebra retardada deben unirse los fragmentos de Okazaki. Este proceso, denominado globalmente maduración, requiere la eliminación de los cebadores, la elongación del fragmento adyacente para rellenar con DNA el hueco dejado por cada RNA cebador y la unión o empalme de los extremos resultantes para dar una hebra continua. Todo ello tiene lugar posiblemente en las proximidades de la propia horquilla, o bien posteriormente, lejos de ella.

WWW

Web 11.9. Maduración de los fragmentos de Okazaki: eliminación de cebadores y reemplazo con DNA.

La última etapa en esta maduración de la hebra retardada, la unión de los fragmentos, la catalizan DNA ligasas (o simplemente ligasas). Estas enzimas forman el enlace fosfoéster que falta entre el grupo OH del extremo 3' de un fragmento de Okazaki y el fosfato del extremo 5' del siguiente, asegurando así que la hebra retardada sea una cadena continua. Además de este papel fisiológico, las ligasas son enzimas de gran utilidad en el laboratorio, junto con las nucleasas de restricción, especialmente para la preparación de moléculas de DNA recombinante (pág. 218).

11.3.3 Terminación

Una vez descritos los detalles particulares del inicio y la elongación de la replicación corresponde estudiar los mecanismos de la terminación. Debe indicarse que este proceso no se conoce tan bien como los anteriores, entre otras razones por la propia amplitud y complejidad del concepto de terminación. Se tratará aquí de exponer los problemas que plantea la terminación desde un punto de vista lógico y asumiendo su limitada confirmación experimental.

11.3.3.1 Final de la elongación

Se puede considerar, conceptualmente, que la terminación comprende varios aspectos. El primero de ellos es la finalización propiamente dicha de la elongación por la DNA polimerasa, que se verifica en las dos horquillas de replicación de cada replicón, previsiblemente cuando en su avance alcancen a las horquillas respectivas de replicones adyacentes. Éste es un proceso prácticamente desconocido en términos moleculares, pero cuya resolución no plantea dificultad conceptual, pues el relleno de huecos y la unión de los dos tramos de nueva hebra pueden resolverse de la misma forma que la maduración y unión de los fragmentos de Okazaki.

Por otra parte, como segundo problema, falta por aclarar cuál es el número de replicones implicados de forma simultánea en la replicación de cada cromosoma, así como los mecanismos de control que coordinan el proceso en todos ellos. A diferencia del caso anterior, no existe aún una hipótesis previsible.

WWW

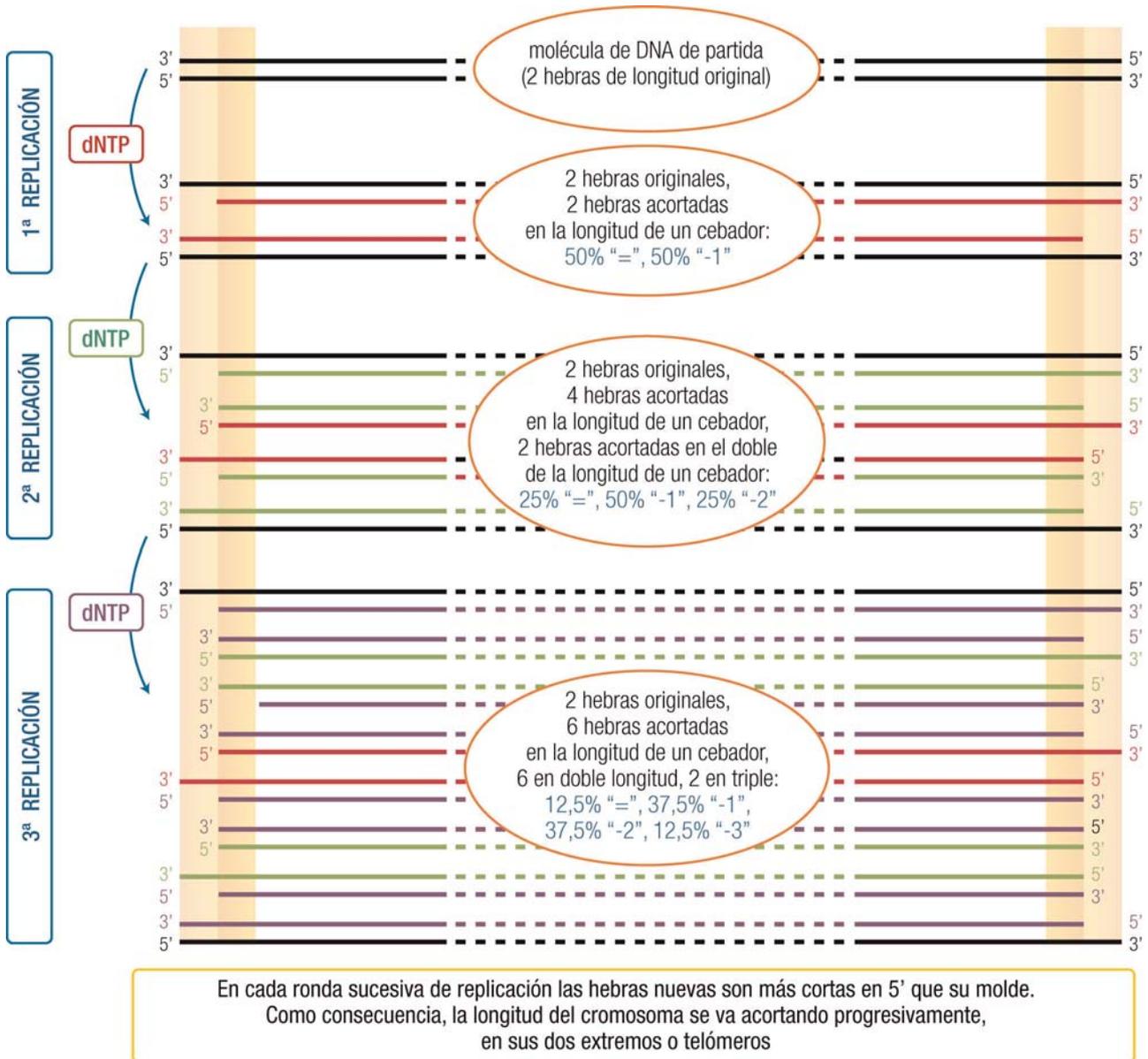
Web 11.10. Sentido de la replicación en los diferentes replicones y replicación incompleta de los extremos.

11.3.3.2 Replicación de los telómeros

La replicación de los extremos del cromosoma eucariótico supone el tercer problema de la terminación, pues, como se verá en seguida, no puede llevarse a cabo mediante la elongación por la DNA polimerasa. Este proceso es, por ahora, el mejor conocido de la terminación, posiblemente por su mayor trascendencia fisiológica y patológica.

Como ya se ha estudiado, los telómeros son regiones situadas en los extremos de los cromosomas lineales de la mayoría de eucariotas (pág. 94), a las que se unen ciertas proteínas. Están constituidos por una de las familias de DNA repetitivo no codificante (pág. 116), formando bloques de 1 a 12 kb de longitud, con unidades de 6 a 8 pb repetidas en tándem centenas o miles de veces. Para entender la implicación de los telómeros en la replicación deben recordarse sus dos características principales: la abundancia de repeticiones en tándem y el carácter *cohesivo* de los extremos (que recuerda, aunque sin relación funcional alguna, a los extremos resultantes de la acción de ciertas enzimas de restricción sobre un DNA, pág. 215).

El carácter cohesivo, en forma de salientes 3' en una de las hebras de cada extremo de los cromosomas, tanto progenitores como filiales, se explica por el mecanismo de replicación discontinua de la hebra retardada (v. web 11.10). Como consecuencia adicional de dichos salientes 3', se produce un acortamiento progresivo de las hebras de DNA en sucesivas rondas de replicación.



11.10

WWW

Web 11.11. Acortamiento de los telómeros en la replicación.

Este acortamiento de las regiones teloméricas (calculado entre 50 y 200 pb por cada división celular) supone la disminución progresiva de la longitud del cromosoma a lo largo de sucesivas divisiones celulares, con el consiguiente problema para la perpetuación del mensaje genético. Este problema se resuelve en la célula gracias a la actuación, también durante la fase S del ciclo celular (Capítulo 8), de un nuevo tipo de enzima, la **telomerasa**, que alarga los telómeros, compensando así la pérdida anterior.

11.3.3.3 Telomerasa: componentes y características

Se ha propuesto que la telomerasa es un resto evolutivo de una ribozima (pág. 71) que pudo servir anteriormente para catalizar la síntesis de DNA; también, que pudo suponer un intermediario en la transición evolutiva desde las RNA replicasas a las transcriptasas inversas proteicas. Se trata de una enzima de tipo DNA polimerasa, concretamente una *polimerasa de DNA dirigida por RNA* (pág. 149) y, por tanto, es una transcriptasa inversa (págs. 207 y 223), pero con características especiales. En efecto, se trata de una ribonucleoproteína que sólo es capaz de sintetizar una secuencia determinada de DNA, y que está formada por **dos componentes**:

1. **Componente ribonucleico** o “RNA de la telomerasa” (*TR* o *TER*, de *telomerase RNA*), de tamaño variable según especies (desde 146 nucleótidos hasta 1.544), que forma parte integral de la enzima. Incluye una secuencia, característica para cada especie, de 9 a 28 nt y complementaria a la secuencia telomérica respectiva. Por ejemplo, el RNA componente de la telomerasa humana (*hTR*) tiene 450 nt entre los que hay una secuencia rica en C, (5')CCCUAA(3'), complementaria y antiparalela a la hebra rica en G de la repetición telomérica (5')TTAGGG(3'). Gracias a ella, como se verá luego, el TR sirve de molde para la síntesis de nuevas secuencias teloméricas.
2. **Componente proteico**, que contiene la actividad enzimática, o “transcriptasa inversa de la telomerasa” (*TRT* o *TERT*, de *telomerase reverse transcriptase*). Ésta es la **actividad telomerasa** propiamente dicha. A diferencia de la transcriptasa inversa vírica y del resto de DNA polimerasas, para sintetizar el DNA telomérico no utiliza un cebador de RNA sintetizado a tal fin, sino que elonga el extremo telomérico 3' precedente. La segunda diferencia importante es que el molde necesario para su acción es la parte RNA de la propia enzima (el TR). Generalmente el TRT suele ir acompañado de otras subunidades no catalíticas, también proteicas.

11.3.3.4 Mecanismo de acción de la telomerasa

WWW

Web 11.12. Mecanismo de acción de la telomerasa.

11.3.3.5 Funcionalidad de la actividad telomerasa en las células

En las células somáticas de la mayoría de tejidos adultos apenas existe actividad telomerasa, mientras que sí está presente en células de la línea germinal, en tejidos fetales y en ciertas células troncales (principalmente, hematopoyéticas), todas ellas células poco diferenciadas y en rápida proliferación. Esto se debe a la regulación de la expresión génica, al igual que para cualquier otra proteína (Capítulo 18), pero aquí no se necesita entrar en los mecanismos por los que se evita la expresión de la telomerasa, sino que interesa destacar sus consecuencias.

En **ausencia de telomerasa**, a medida que las células se van dividiendo –y envejeciendo– sufren un proceso constante de acortamiento de sus telómeros (pág. 159). Dado el carácter repetitivo y no codificante de éstos, inicialmente esa pérdida de los extremos de cada cromosoma no tiene consecuencias, pero llega un punto, agotadas todas las repeticiones teloméricas, en que afecta a regiones codificantes, y entonces la función celular se ve perjudicada y la célula termina por morir. Se ha considerado este acortamiento como parte de un *reloj biológico* o *celular* que mide el proceso de envejecimiento, “llevando la cuenta” del número de divisiones hasta que la célula debe morir, para controlar así su proliferación correcta en los tejidos.

Puesto que en la mayor parte de las células de un organismo no hay actividad telomerasa, este acortamiento es fisiológico y se produce continuamente durante toda la vida de un individuo. En efecto, se ha demostrado que la pérdida de repeticiones teloméricas aumenta proporcionalmente al número de divisiones mitóticas experimentadas o a la edad del individuo al que pertenecen las células. En consonancia con este hecho, se ha observado que la introducción artificial de telomerasa en células somáticas normales repone la pérdida de telómeros. Se concluye, por tanto, que el acortamiento telomérico está relacionado de forma inversa con el grado de inmortalidad celular y, en definitiva, que el **envejecimiento es una consecuencia de la pérdida de telómeros con la edad**. Ello está también de acuerdo con la pérdida acelerada de telómeros observada en pacientes que sufren varios síndromes de envejecimiento prematuro.

La telomerasa está presente, por el contrario, en casi todas las células que proliferan, en especial las células tumorales, y contribuye, junto a otros factores, a la proliferación indefinida de los tumores. Así, el aumento de actividad telomerasa observado en fases tardías del progreso tumoral puede ser necesario para el crecimiento del tumor, al impedir la muerte celular.

Por consiguiente, se ha propuesto la inhibición de la actividad telomerasa como un principio de **terapia antitumoral** y la telomerasa se considera una diana terapéutica. Se buscan inhibidores específicos del componente catalítico de la telomerasa humana, fármacos y factores que actúen modulando la telomerasa o cualquier otro componente asociado a los telómeros. Estos aspectos tienen un gran interés aplicado en relación con los problemas de envejecimiento y cáncer.

II.4 REPLICACIÓN MITOCONDRIAL

La replicación del cromosoma mitocondrial humano se realiza por un mecanismo peculiar, diferente al estudiado para los casos de procariotas y genoma nuclear de eucariotas. Previamente, se deben introducir algunos conceptos relativos a esta molécula de DNA.

En el cromosoma mitocondrial, circular, una de las hebras posee un mayor contenido de bases purínicas, por lo que se conoce como **hebra pesada o H** (de *heavy*, en inglés), mientras que la otra es la **hebra ligera o L** (*light*). Por otra parte, una zona particular de la molécula recibe el nombre de **asa de desdoblamiento o de desplazamiento**, o **bucle D** (*D-loop*); se trata de la única región no codificante del DNA mitocondrial, que desempeña el papel de región de control, pues contiene el origen de replicación de la hebra H y los orígenes de transcripción de ambas hebras.

La replicación requiere un cebador, sintetizado por la RNA polimerasa mitocondrial usando la hebra L como molde (a partir del promotor P_L, situado también en la región del bucle D, pág. 276). Entonces la DNA polimerasa γ comienza la replicación propiamente dicha a partir del origen O_H, elongando el cebador para sintetizar la hebra H hija. El progreso de la elongación requiere la participación de proteínas ligantes de DNA monocatenario, mtSSB. Una vez que la horquilla de replicación ha sobrepasado la posición del origen O_L se comienza sobre él la replicación de la otra hebra, empleando como molde la hebra H y sintetizando la nueva hebra L.

WWW

Web 11.13. Replicación del cromosoma mitocondrial.

La primera característica singular de la replicación del DNA mitocondrial es que no tiene lugar de manera específica en la fase S, sino a lo largo de todo el ciclo celular. Esto concuerda con la división de las mitocondrias durante la interfase, en desfase con la división de otros orgánulos y de la célula. Además, no todas las moléculas de DNA se replican una vez por ciclo, sino que lo hacen al azar.

La segunda peculiaridad que diferencia esta replicación de la del genoma nuclear es su avance **unidireccional**, mediante dos horquillas que parten de orígenes distintos y avanzan en sentido opuesto sintetizando una sola hebra cada una. Como consecuencia de este mecanismo, la replicación también se diferencia de la del DNA nuclear por ser **no simultánea**, **bifocal** y **continua** (no se forman fragmentos de Okazaki, las dos hebras se sintetizan como adelantadas).

Carácter	Replicación del genoma nuclear de eucariotas	Replicación del genoma mitocondrial de eucariotas	Replicación del genoma procariótico
Semiconservadora	Sí	Sí	Sí
Simultánea en ambas hebras	Sí	No	Sí
Secuencial	Sí	Sí	Sí
Bidireccional	Sí	No	Sí
Origen	Múltiples (multifocal)	Dos, uno para cada hebra (bifocal)	Único (monofocal)
Semidiscontinua	Sí	No (continua en ambas hebras)	Sí