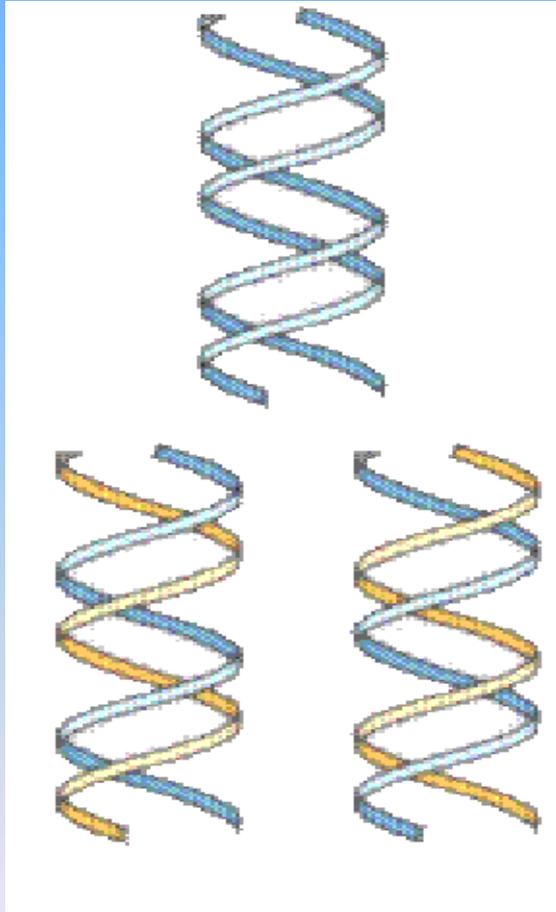


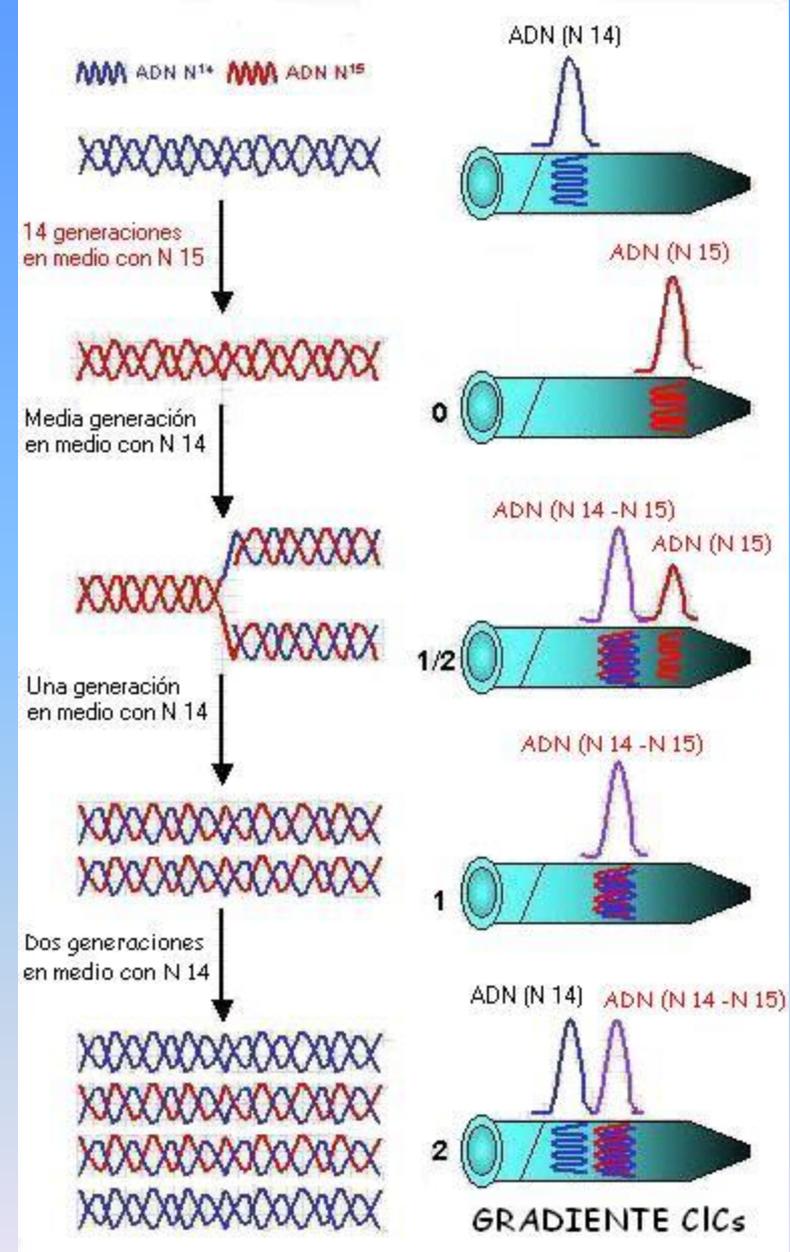
DUPLICACIÓN DEL ADN Y TELÓMEROS

© JOSÉ MARÍA ROMERO ROMERO

Watson y Crick (1953) intuyeron el modo de duplicarse el ADN al proponer que la doble hélice se abre y cada una de las dos hebras de nucleótidos sirve como patrón para formar las respectivas hebras complementarias (Modelo semiconservativo)



Meselson y Stahl (1957) demostraron, mediante un elegante experimento con isótopos de nitrógeno, que el modelo propuesto por Watson y Crick era correcto.



Actualmente, los conocimientos acerca de la duplicación del ADN se han incrementado notablemente. Todo el proceso se divide, para su estudio, en dos fases: *fase de iniciación* y *fase de elongación*

Para explicar el proceso empleando criterios pedagógicos, vamos a utilizar el siguiente esquema para representar al ADN.



Las dos hebras del ADN son complementarias y antiparalelas

FASE DE INICIACIÓN

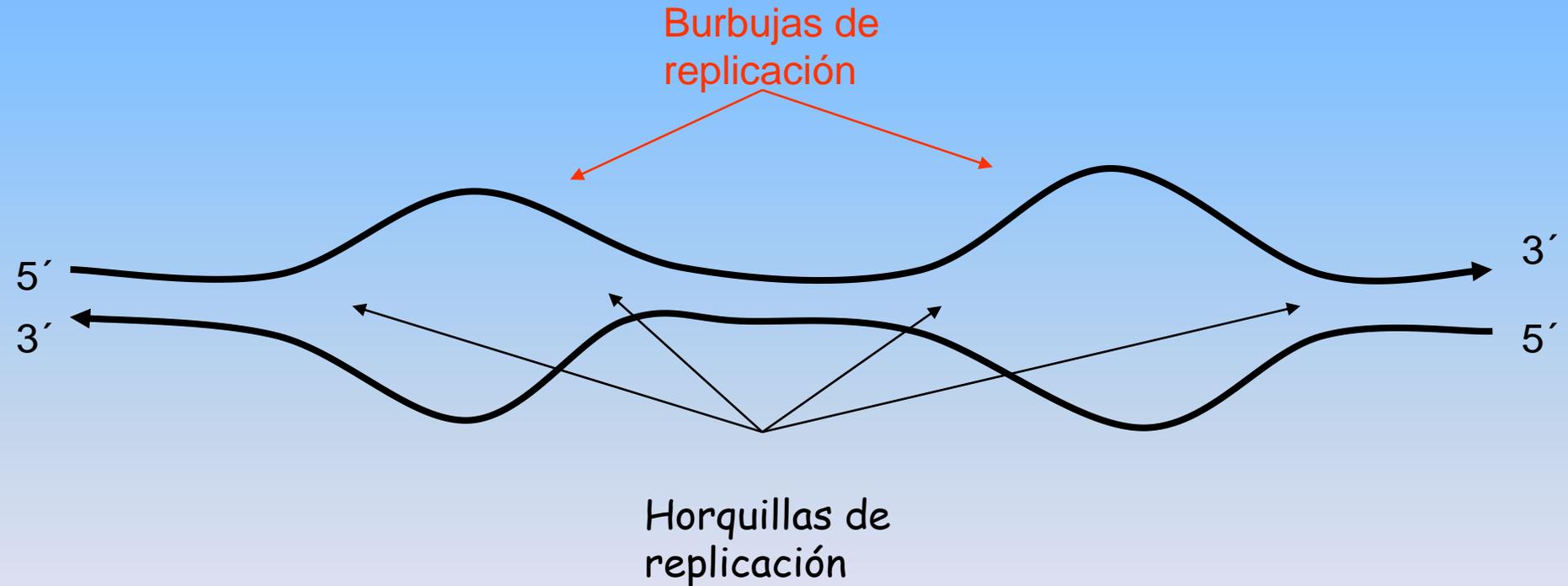
Para que el proceso se lleve a cabo con la máxima celeridad, la duplicación comienza simultáneamente en muchos puntos de la doble cadena, puntos de iniciación (oriC) en los que abundan las secuencias **GATC**.

...ACGT**GATC**GGGCTA....ACCG**GATC**ACATCGG.....AGGC**GATC**TTACG...
...TGCA**CTAG**CCCGAT...TGG**CTAG**TGTAGCC TCCG**CTAG**AATGC...

Los puntos de iniciación son reconocidos por proteínas específicas, entre las que caben citar a las helicasas, que rompen los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, las girasas, las topoisomerasas, y las proteínas SSB (single Strand Binding-DNA) o proteínas estabilizadoras de las dos hebras de ADN cuando están separadas.

FASE DE INICIACIÓN

A partir de los puntos de iniciación se originan las denominadas **burbujas de replicación**, las cuales presentan dos zonas con forma de Y llamadas horquillas de replicación que se van abriendo gradualmente a medida que se sintetiza nuevas hebras complementarias de ADN



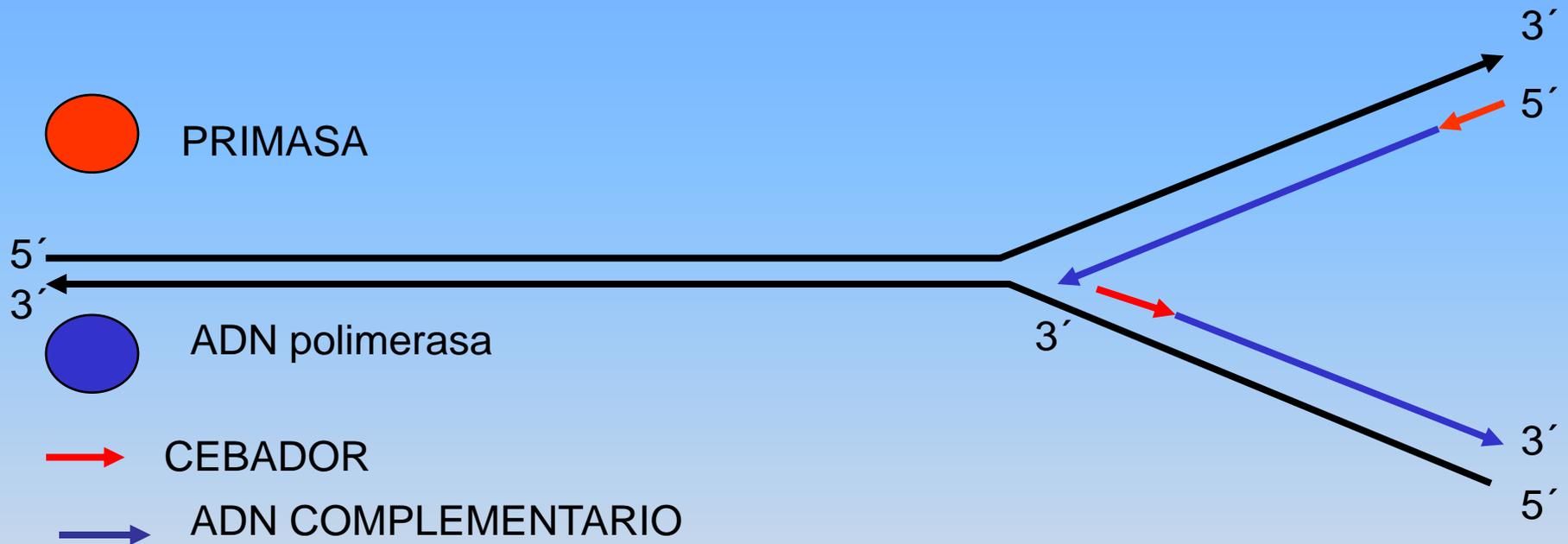
FASE DE ELONGACIÓN

Es la fase en la que tiene lugar la síntesis de nuevas hebras de ADN complementarias a cada una de las dos hebras de ADN originales. En esta fase intervienen varios tipos de ADN polimerasas que se nombran como I, II y III. La actividad de estas enzimas es por una parte **polimerasa**, es decir que seleccionan y unen entre sí los nucleótidos que corresponden a los complementarios de la hebra molde a medida que la van recorriendo, y actividad **exonucleasa**, por la cual se eliminan nucleótidos erróneos o mal apareados y fragmentos de ARN colocados provisionalmente, como se verá posteriormente.

Para entender el proceso, vamos a centrar la atención en una sólo horquilla de replicación, y para un mejor entendimiento se verá independientemente lo que sucede en cada hebra, sabiendo que el proceso transcurre casi simultáneamente en las dos hebras.

FASE DE ELONGACIÓN

Se inicia con la enzima **PRIMASA**, que coloca en cada horquilla unas hebras cortas de ARN complementarias llamadas **CEBADORES** en el sentido 5' a 3'. Posteriormente, la ADN polimerasa comienza la síntesis añadiendo nucleótidos en el extremo 3'



La hebra que vemos arriba crece de forma continua, mientras que la otra lo va a hacer de forma discontinua

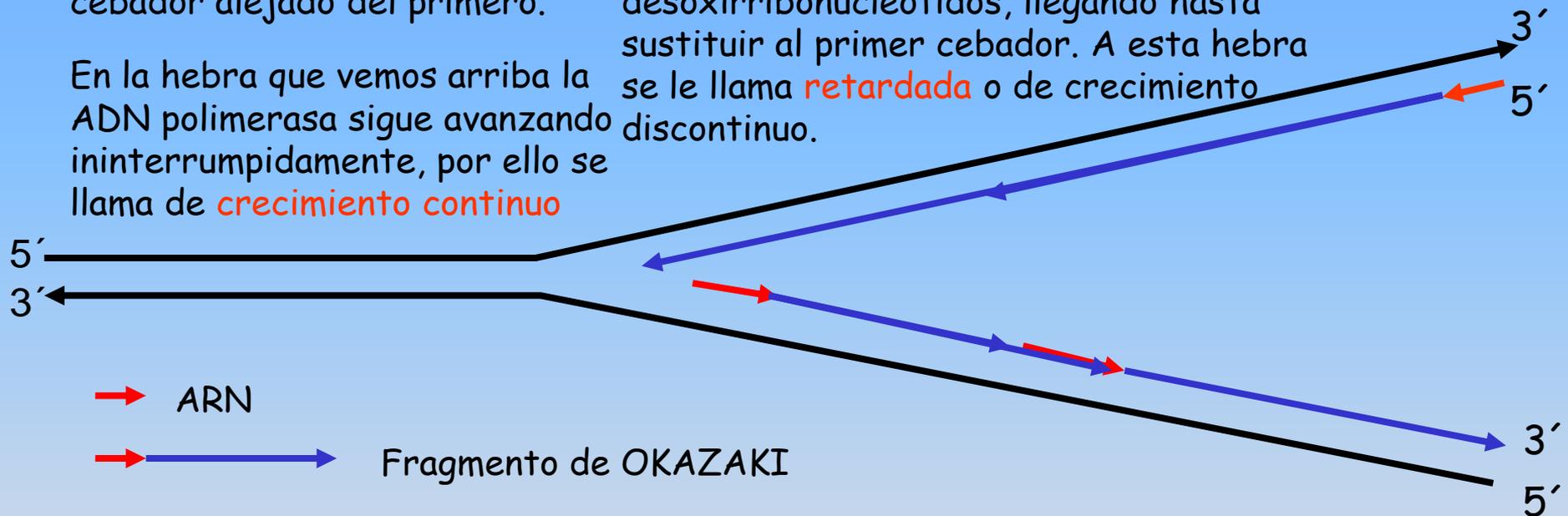
FASE DE ELONGACIÓN

Vamos seguidamente a ver como a medida que la horquilla de replicación se va abriendo y se produce el avance en la síntesis de las nuevas hebras complementarias.

Para que siga creciendo la otra hebra se ha de formar un nuevo cebador alejado del primero.

En la hebra que vemos arriba la ADN polimerasa sigue avanzando ininterrumpidamente, por ello se llama de **crecimiento continuo**

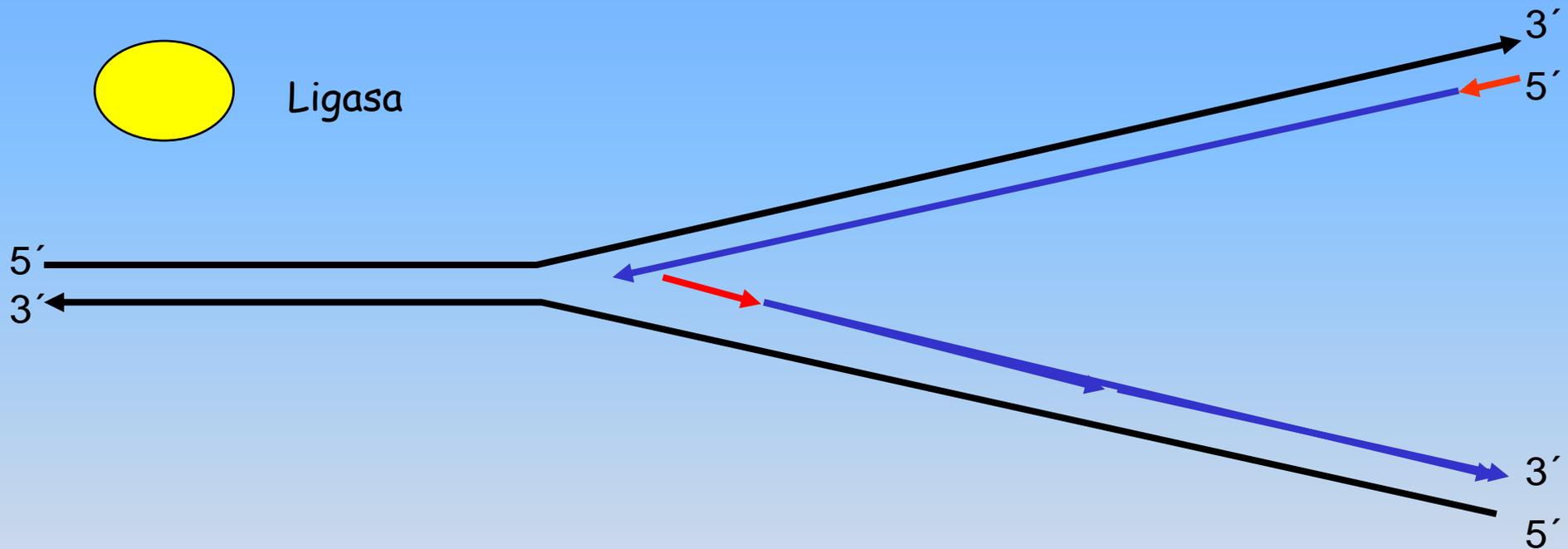
Seguidamente las ADN polimerasas continúan en esta hebra colocando desoxirribonucleótidos, llegando hasta sustituir al primer cebador. A esta hebra se le llama **retardada** o de crecimiento discontinuo.



Hemos visto que las ADN polimerasas colocan desoxirribonucleótidos complementarios de la hebras moldes (3' a 5') y que también sustituye los ribonucleótidos de las cadenas cortas de ARN (5' a 3'), pero no une los nucleotidos vecinos de la misma hebra.

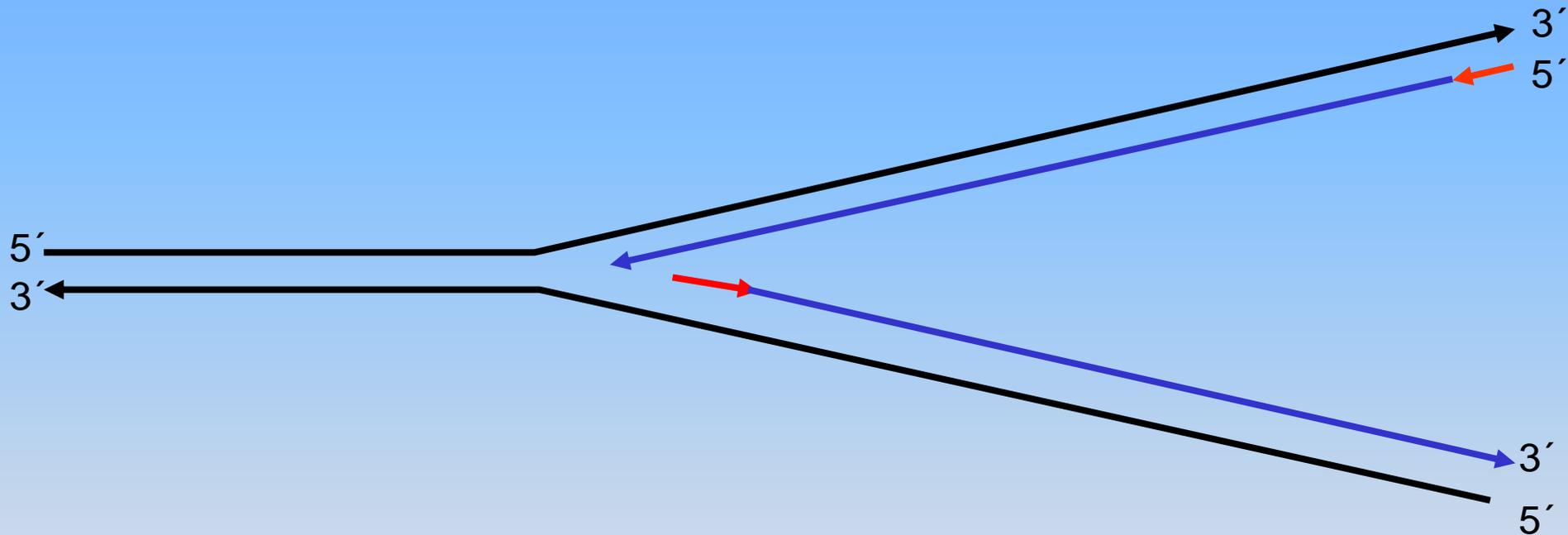
FASE DE ELONGACIÓN

Para que los nucleótidos de la hebra de crecimiento discontinuo tengan continuidad hace falta la acción de un enzima llamado **LIGASA**.



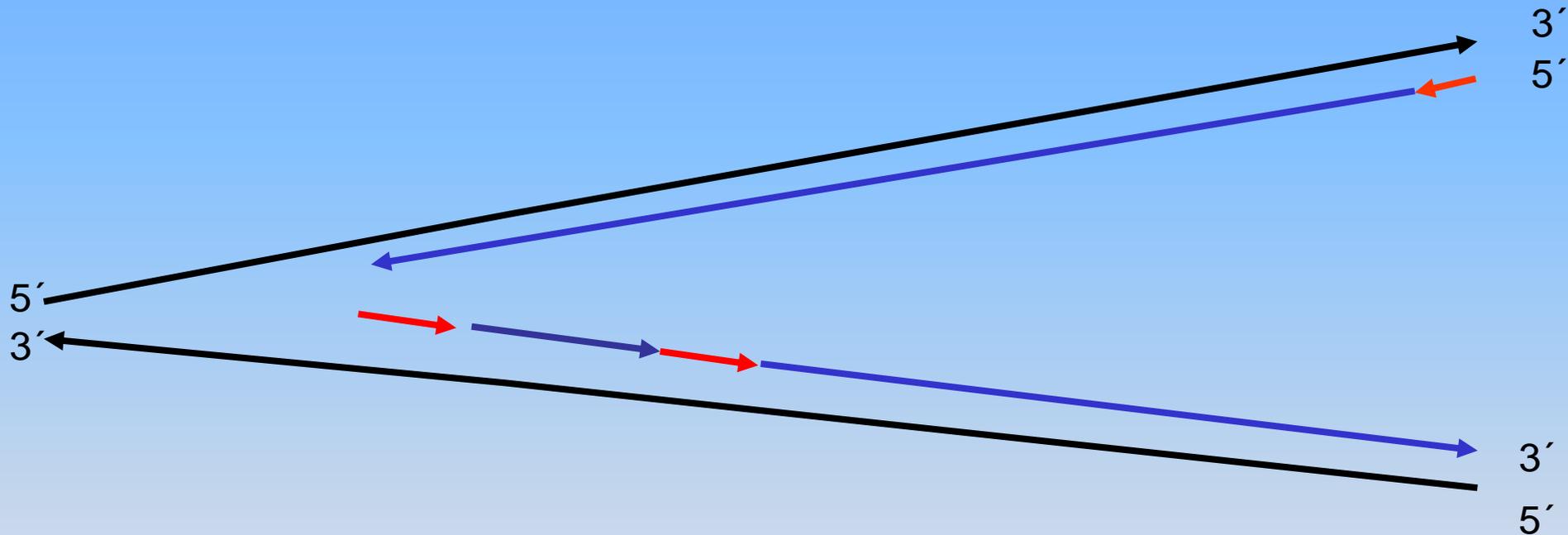
FASE DE ELONGACIÓN

El proceso visto se repite en las dos horquillas de replicación de cada burbuja hasta que se llegan a encontrar las nuevas hebras que se han formado en horquillas vecinas y con sentido opuesto.



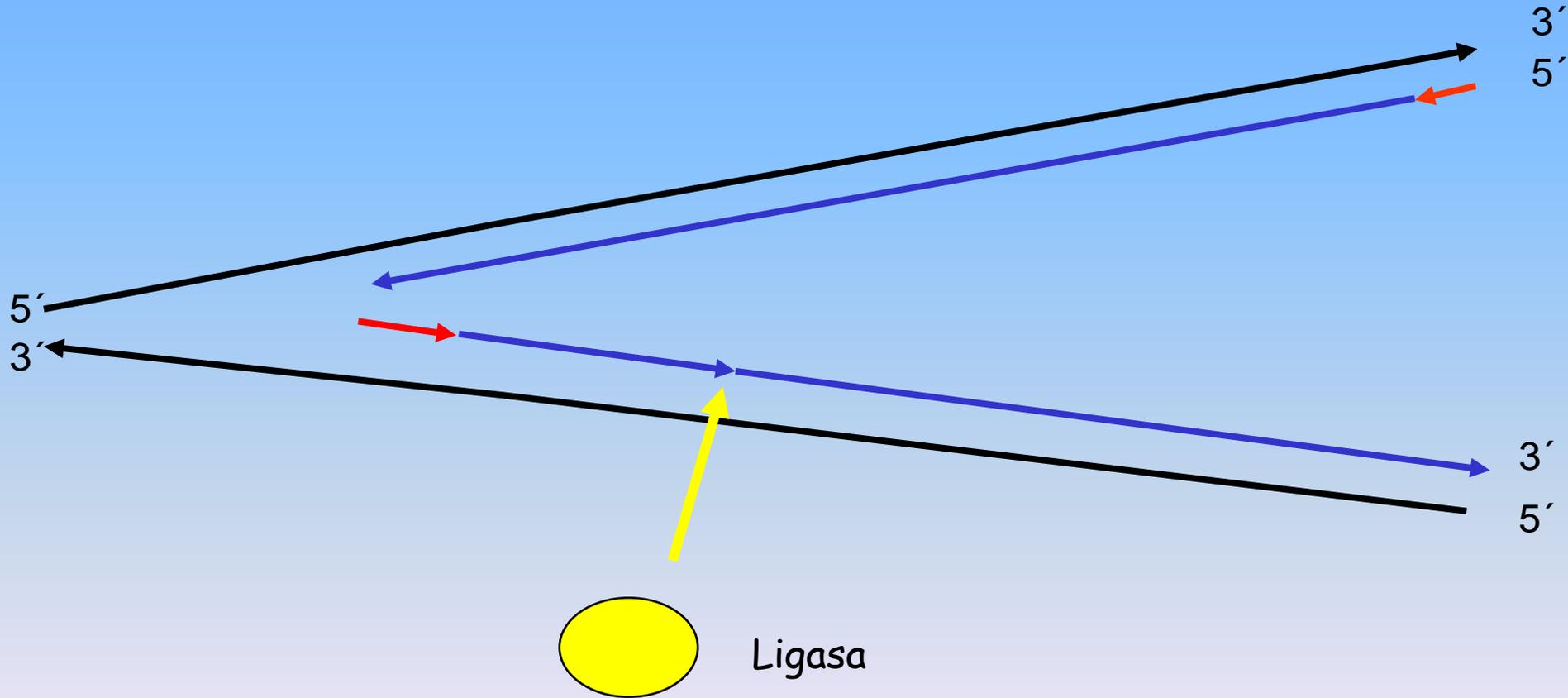
FASE DE ELONGACIÓN

El avance en la hebra superior es continuo. En la inferior se forma otro nuevo cebador y un fragmento de ADN (OKAZAKI)



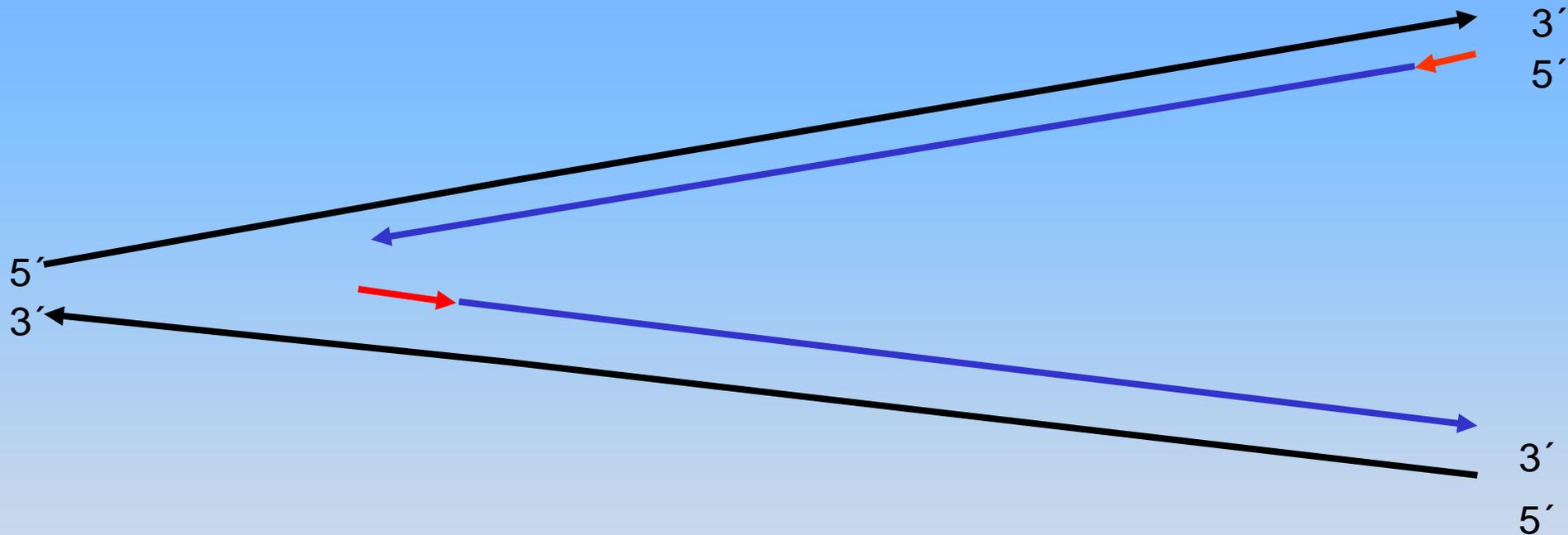
FASE DE ELONGACIÓN

Ha desaparecido un cebador. Ahora queda que la ligasa una los desoxirribonucleótidos de la hebra de crecimiento discontinuo.



FASE DE ELONGACIÓN

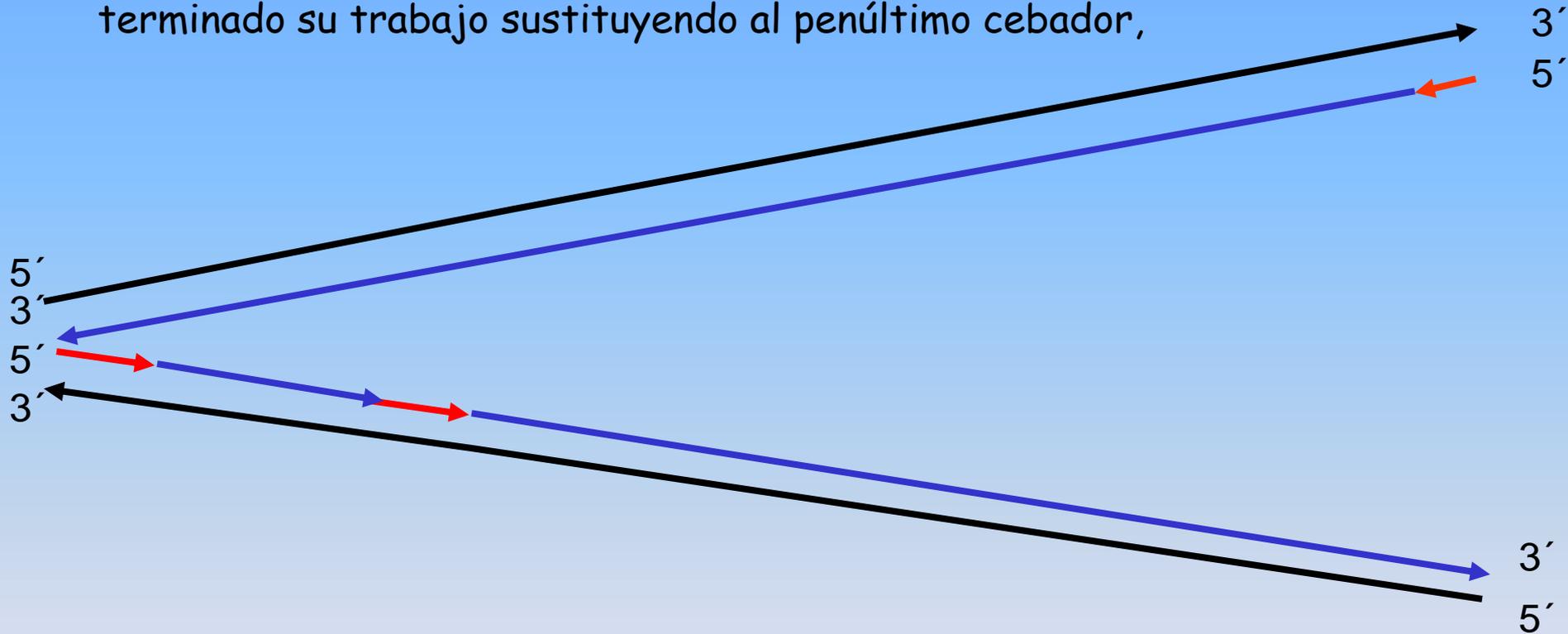
Ya hay continuidad en la hebra inferior.



Supongamos que sólo queda un fragmento de ADN por copiar.

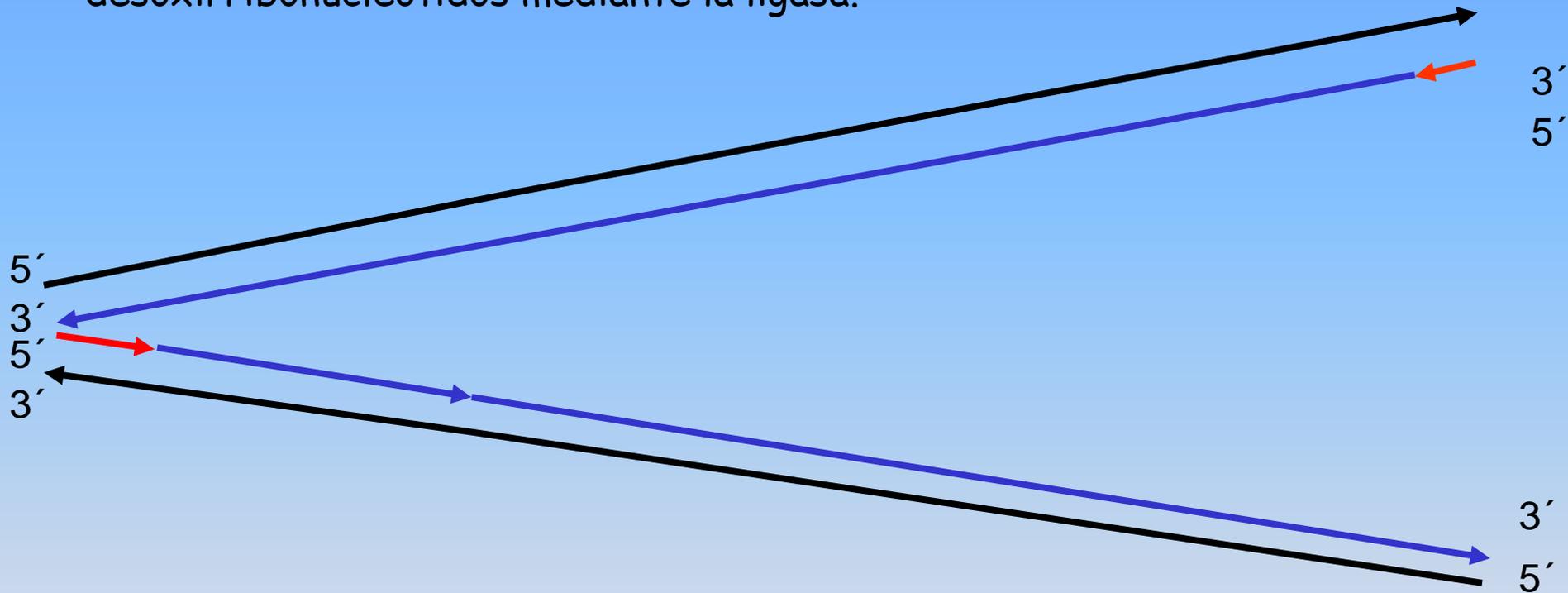
FASE DE ELONGACIÓN

Aquí vemos que se ha colocado el último cebador en la cadena inferior y que la ADN polimerasa aún no ha terminado su trabajo sustituyendo al penúltimo cebador,



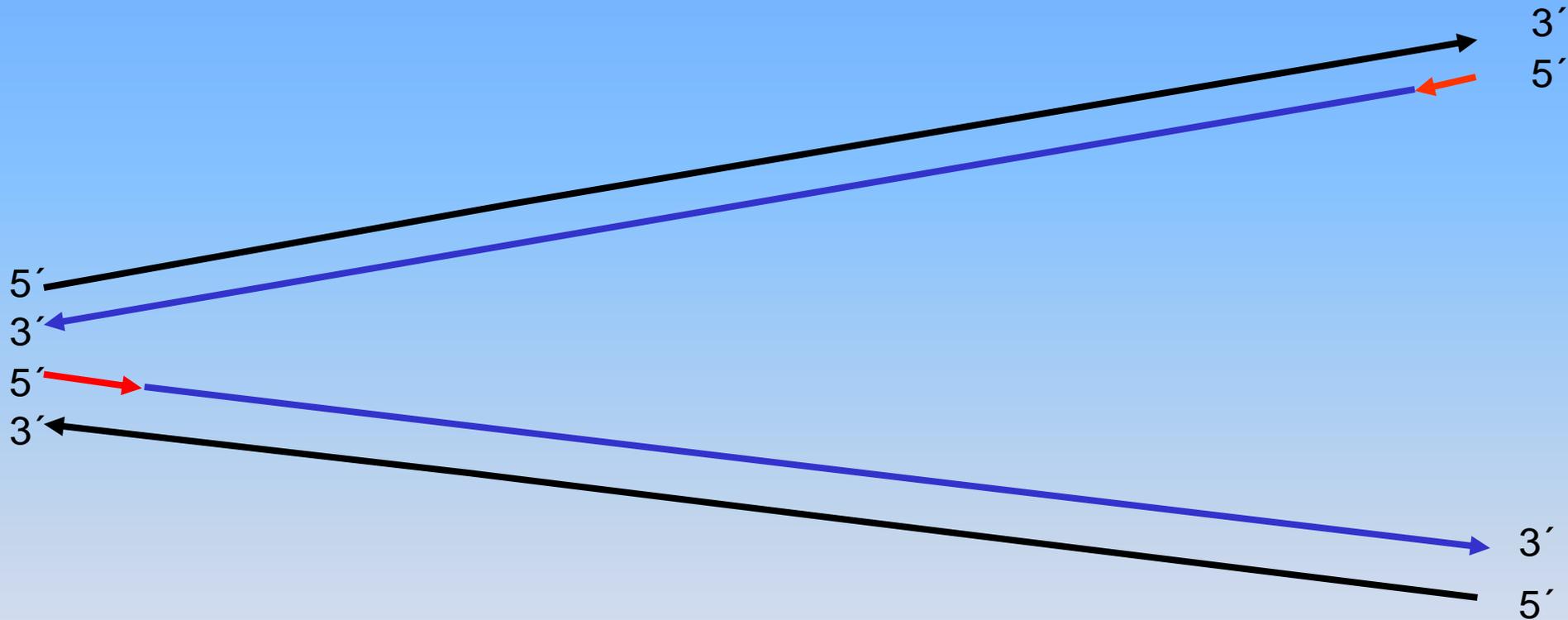
FASE DE ELONGACIÓN

Ya ha sido sustituido el penúltimo cebador, pero falta unir los desoxirribonucleótidos mediante la ligasa.



FASE DE ELONGACIÓN

Finalmente, vemos total continuidad en las dos hebras, pero observamos que en las copias hijas hay fragmentos de ARN.



FASE DE ELONGACIÓN

En ésta imagen vemos, nuevamente, al resultado de la duplicación todavía con las cadenas cortas de ARN o cebadores que le hicieron falta a la ADN polimerasa para llevar a cabo el proceso.



Para concluir la duplicación, esos dos cebadores colocados en los extremos han de ser eliminados mediante la actividad exonucleasa de el enzima ADN polimerasa I.

FASE DE ELONGACIÓN

Apreciamos como el resultado final son dos moléculas de ADN a las que le falta en una de sus hebras un pequeño fragmento final.



CONCLUSIÓN

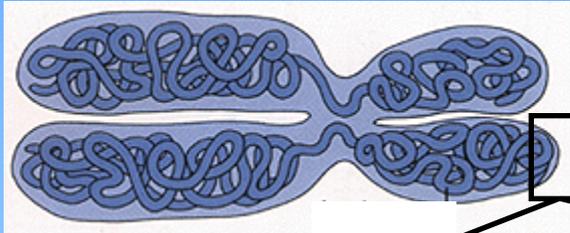
La replicación es un proceso clave en el ciclo celular y necesario para que se lleve a cabo la división celular.

Las ADN polimerasas necesitan siempre un fragmento corto de ARN, cebador, con un extremo hidroxilo 3' libre para añadir nucleótidos. Las ADN polimerasas siempre recorren la hebra molde en el sentido 3' - 5'.

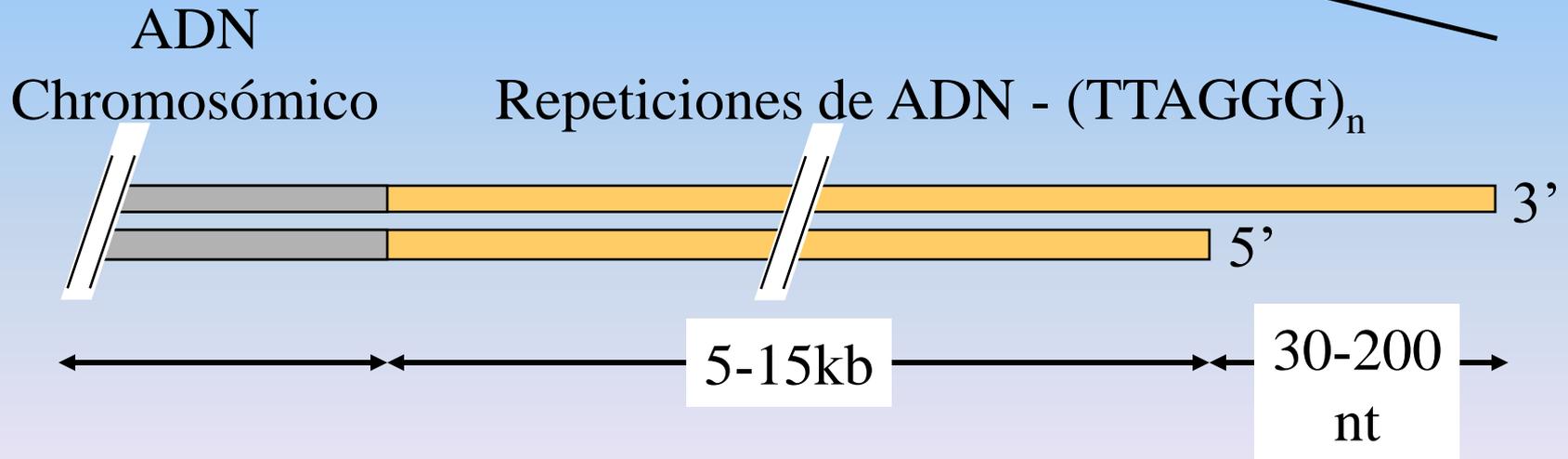
Las hebras que se sintetizan en cada división celular siempre son ligeramente más cortas que las parentales, debido al hueco dejado por los ARN cebadores.

Como es fácil de adivinar, con las sucesivas divisiones celulares se irán acortando progresivamente las copias de las nuevas hebras que se sintetizan. Estos déficits son los causantes de los acortamientos de los TELÓMEROS. La pérdida de los telómeros trae consecuencias fatales para las células.

Telomeros – los extremos de los cromosomas



Modelo de un telomero humano



Normal cells can only divide a limited number of times

- Limited division of somatic cells is termed “replicative senescence”
- Foetal fibroblasts will divide around 50 times after which they enter a G_0 -like state
- Senescence is a population phenomena - individual cells may divide more or less than 50 times.
- Immortalised cells, stem cells or cancerous cells evade senescence and continue division

Senescence hypotheses:

- Physiological stress results in chemical damage to cellular components, particularly DNA, which trigger senescence
- Progressive telomere shortening induces senescence once telomeres reach a certain critical length - “molecular clock”

Telomeres and senescence

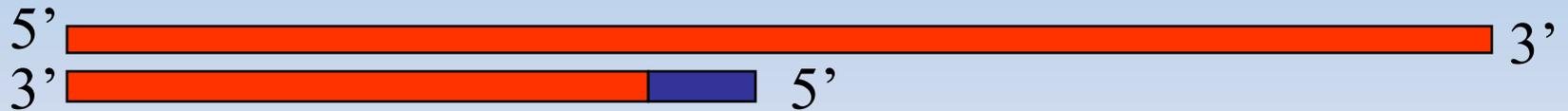
- Primary cultures of human fibroblasts show reduction of telomeric repeats with cell division (Harley et al (1990) Nature 345; 458-)
- Telomerase is expressed only in stem cells and cancer cells
- Senescent cells can have telomeres 5-10 kb, other division-competent cells can have shorter telomeres (it's more than just length)
- Degradation of single-stranded telomeric DNA may correlate with senescence (Stewart et al. (2003) Nature Genetics 33; 492-)

Telomeres cannot be maintained by semi-conservative DNA replication

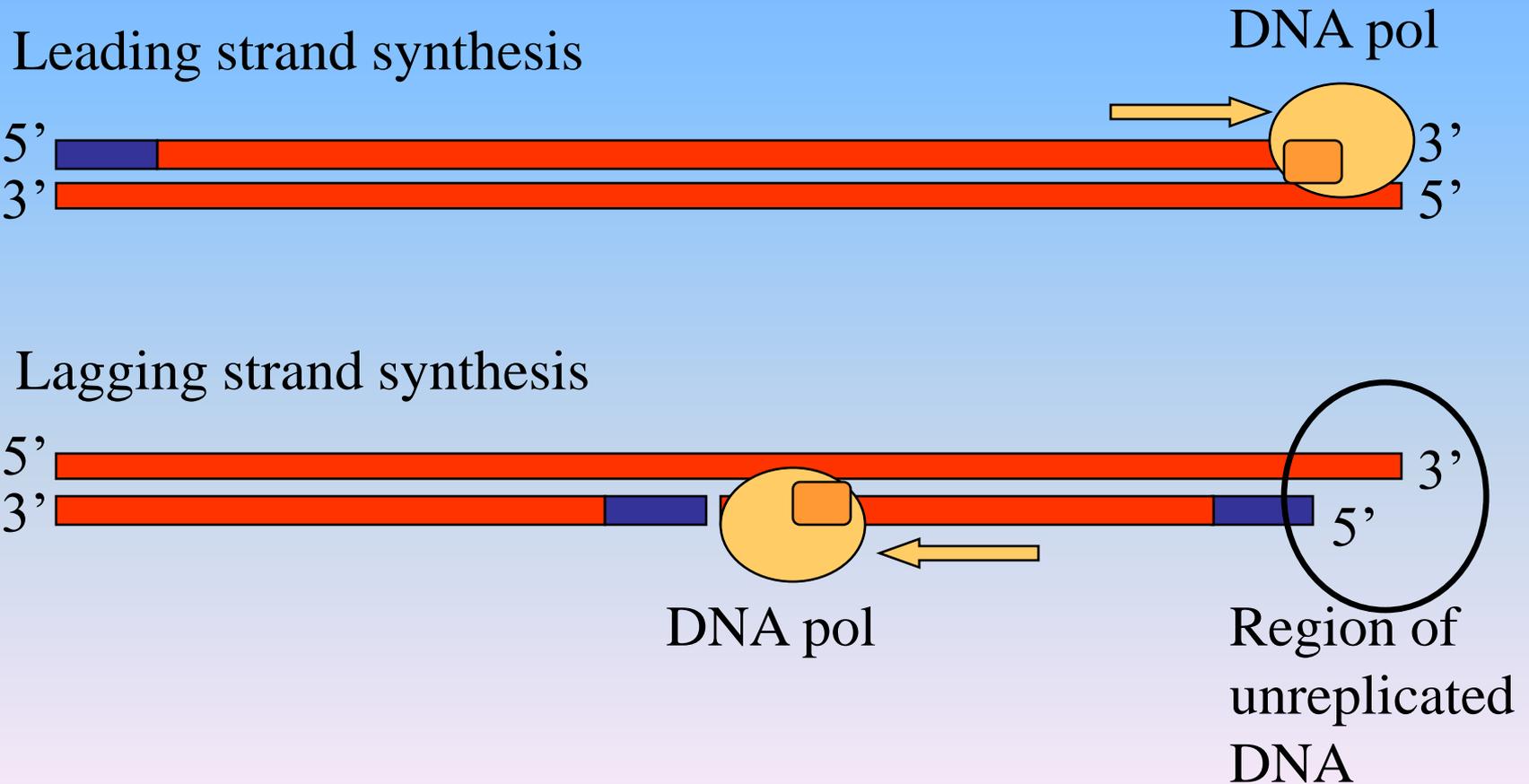
Leading strand synthesis



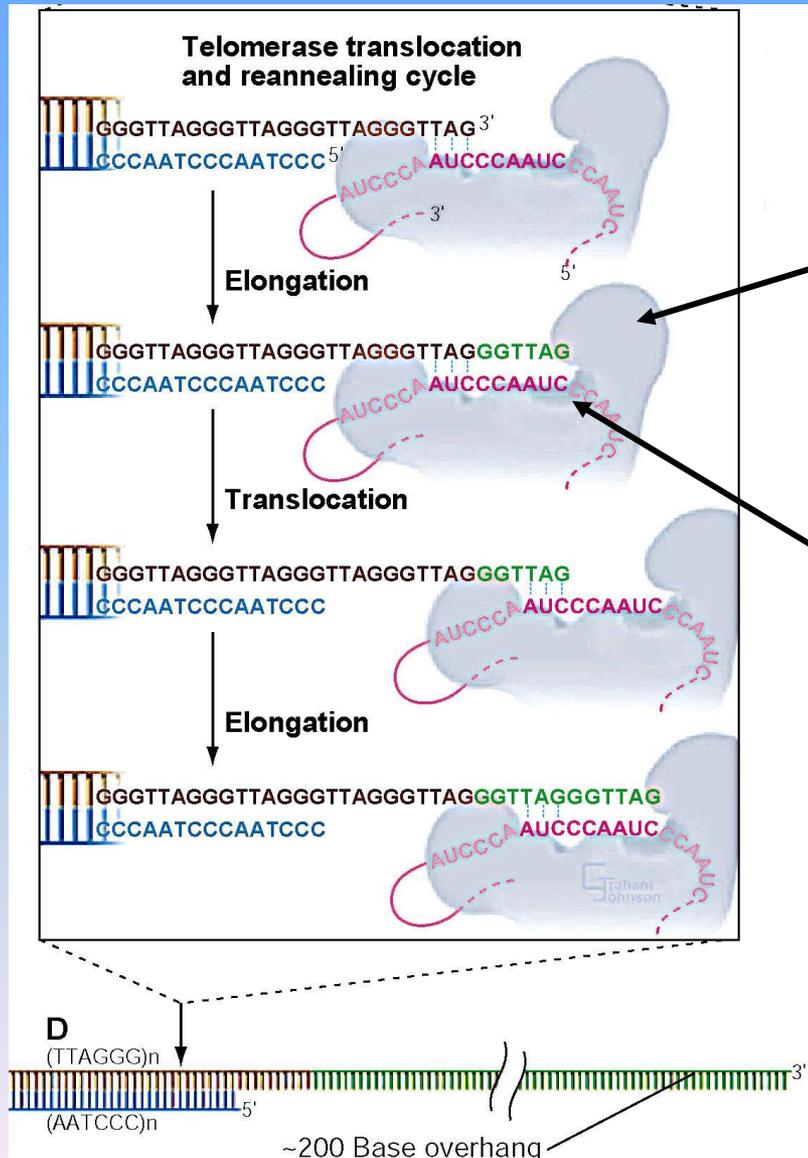
Lagging strand synthesis



Telomeres cannot be maintained by semi-conservative DNA replication



Replicating telomeric DNA - I

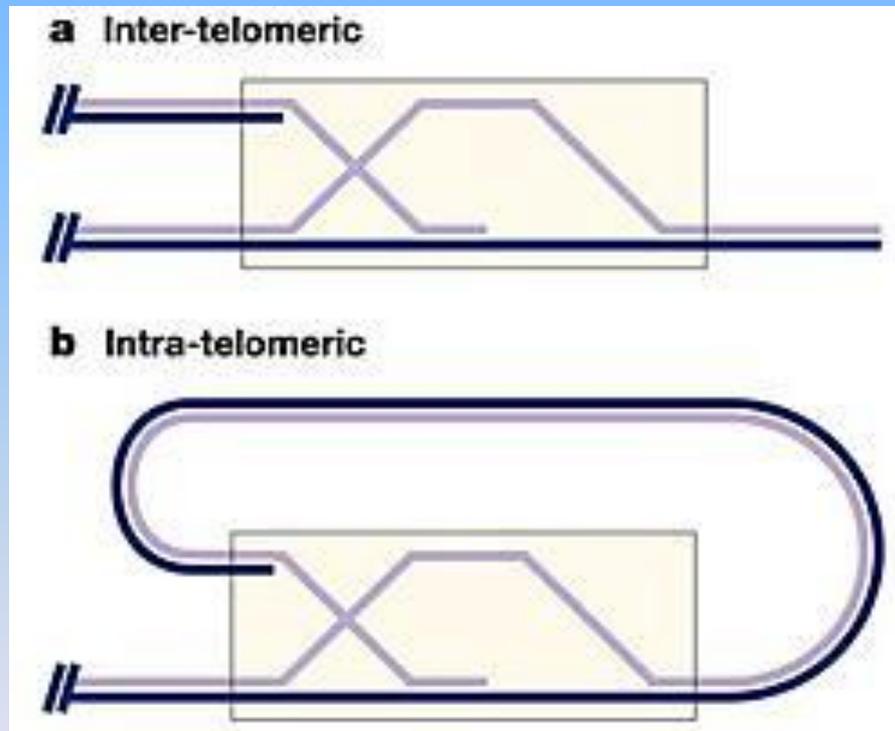


Telomerase proteins:
Est2 (reverse-transcriptase) and
Est1 (regulatory factor)

Telomerase RNA:
TLC1 (primer for DNA synthesis)

Replicating telomeric DNA - II

ALT - Alternative lengthening of telomeres



Recombination-mediated telomere lengthening

T-LOOP



D-LOOP

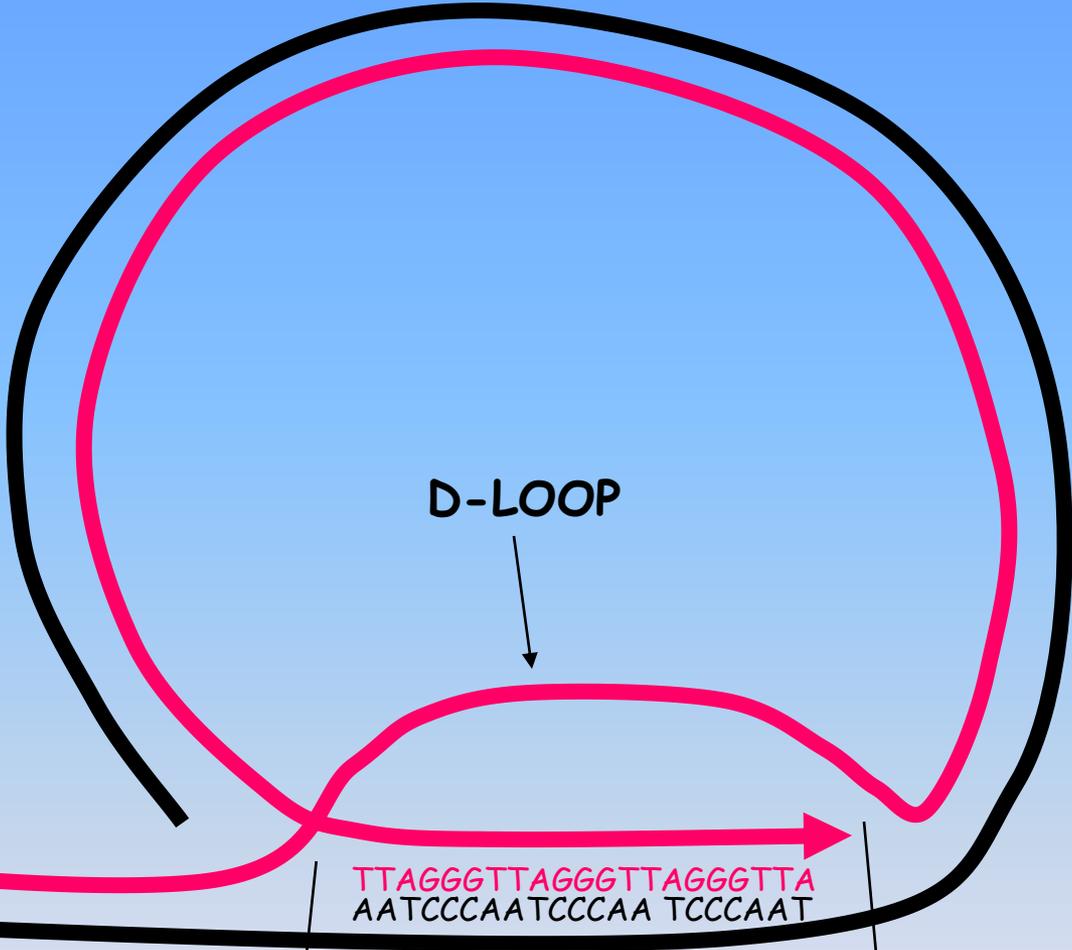


5'

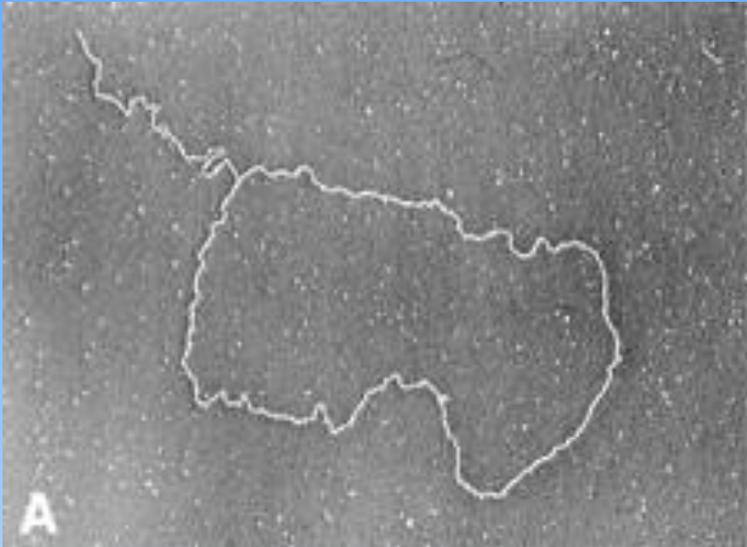
3'

TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
AATCCCAATCCCAA TCCCAAT

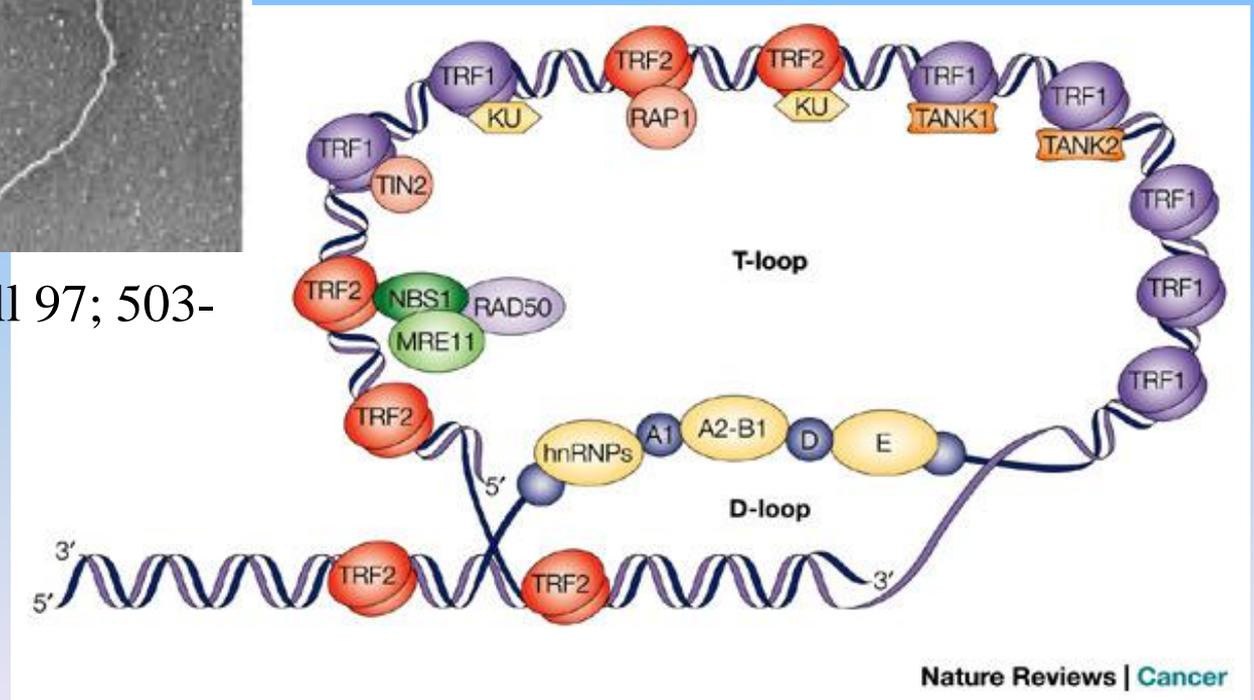
3' overhang



Telomere structure: the t-loop



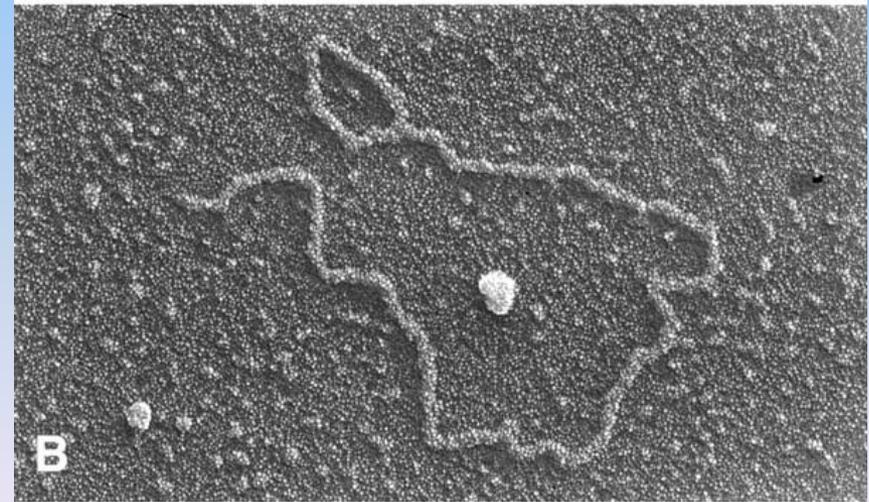
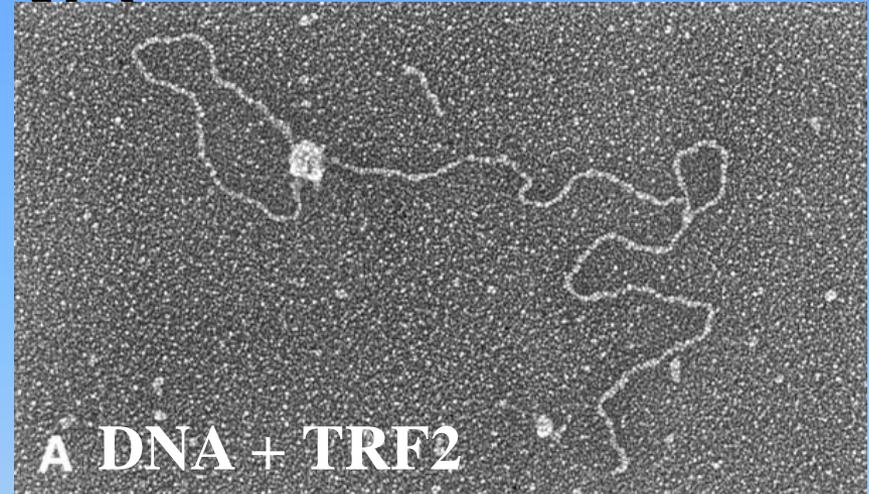
Griffith et al. (1999) Cell 97; 503-



Neumann and Reddel (2002) Nature Rev. Cancer 2; 879-

TRF2 induces lariat structure in DNA

- TRF2 (telomeric repeat binding factor 2) binds TTAGGG repeats in double-stranded DNA
- Present in mammal and *S. pombe*
- Addition of TRF2 to telomeric repeat DNA *in vitro* leads to lariat formation
- TRF2 localises to the telomeres in mammalian cells



Loss of TRF2

- Dominant negative TRF2 allele functions by binding to active TRF2, forming a heterodimer that cannot bind DNA
- TRF2 inhibition in lymphocytes leads to immediate, p53 dependent, apoptosis
- In ATM deficient cell lines, TRF2 inhibition fails to activate apoptosis - suggests telomeres can activate the DNA damage response

