

ESTRUCTURA "IN VITRO" DE SECUENCIAS TELOMERICAS EN DNA SUPERHELICOIDAL.

Huertas, D., y Azorín, F. Dto de Biología Molecular y celular, (CID-CSIC), Barcelona.

Los télómeros son las estructuras que se hallan al final de los cromosomas eucariotas. La función de los mismos es mantener estables los cromosomas, preservándolos de la degradación por nucleasas, y evitando la fusión entre extremos. Así mismo son los responsables de la completa replicación eucariota, evitando la pérdida de material genético en cada vuelta de replicación.

Los télómeros están constituidos por dos tipos de secuencias repetitivas: las secuencias subteloméricas y las secuencias teloméricas. Las secuencias subteloméricas son las más internas y están formadas por elementos de repetición compleja desde cientos de pares de bases hasta de kilobases. Las secuencias teloméricas son externas y están formadas por elementos de repetición simple cuya unidad de repetición comprende de 6 a 8 nucleótidos situados en tandem en una extensión que varía desde 36 pares de bases a cientos de kilobases en vertebrados. El elemento de repetición se halla muy conservado en todas las especies eucariotas con una secuencia "consensus" 5' T₁₋₃(T/A)G₃₋₄ 3'. Existe una polaridad de cadena de modo que la cadena rica en citosinas transcurre hacia el extremo 5' y la cadena rica en guaninas lo hace hacia el extremo 3'. En especies de ciliados se ha observado que la cadena rica en guaninas se prolonga en una cadena sencilla protuberante de 16-18 nucleótidos.

La caracterización estructural de oligonucleótidos de cadena sencilla ricos en guaninas ha revelado que éstas pueden establecer interacciones intra e intermoleculares estabilizadas por enlaces de tipo Hoogsteen entre el N7 de guaninas y la presencia de cationes monovalentes. A estas estructuras se les ha denominado cuartetos de Guaninas en el plegamiento intramolecular y G4-DNA en las asociaciones intermoleculares, ya que en ambos casos coexisten 4 guaninas enlazadas en un mismo plano.

En el trabajo que se presenta se ha profundizado en el análisis estructural de las secuencias teloméricas en DNA superhelicoidal. La secuencia telomérica elegida ha sido la presente en los cromosomas de todos los vertebrados, incluido el hombre, cuya unidad de repetición es **TTAGGG**.

Las secuencias teloméricas se obtuvieron a partir de oligonucleótidos sintéticos, los cuales se polimerizaron en diferentes grados de oligomerización y fueron insertados en plásmidos superhelicoidales.

El análisis estructural se desarrolló "in vitro" mediante dos tipos de ensayos: la digestión con nucleasa P1, específica de cadenas sencillas, y la utilización de reactivos químicos que modifican el DNA selectivamente.

Los resultados obtenidos en el ensayo de P1 indican que estas secuencias teloméricas adoptan una conformación alterada muy dependiente de pH, densidad superhelicoidal y tamaño, puesto que sólo se observan a pHs inferiores a 4.5, densidades superhelicoidales inferiores a -0.04 y tamaño superior a 6 unidades de repetición.

El patrón de reactividad química obtenido indica que la cadena rica en citosinas se pliega sobre sí misma con apareamientos C⁺-C, mientras que la cadena de las guaninas se estructura en diferentes dominios de conformación.