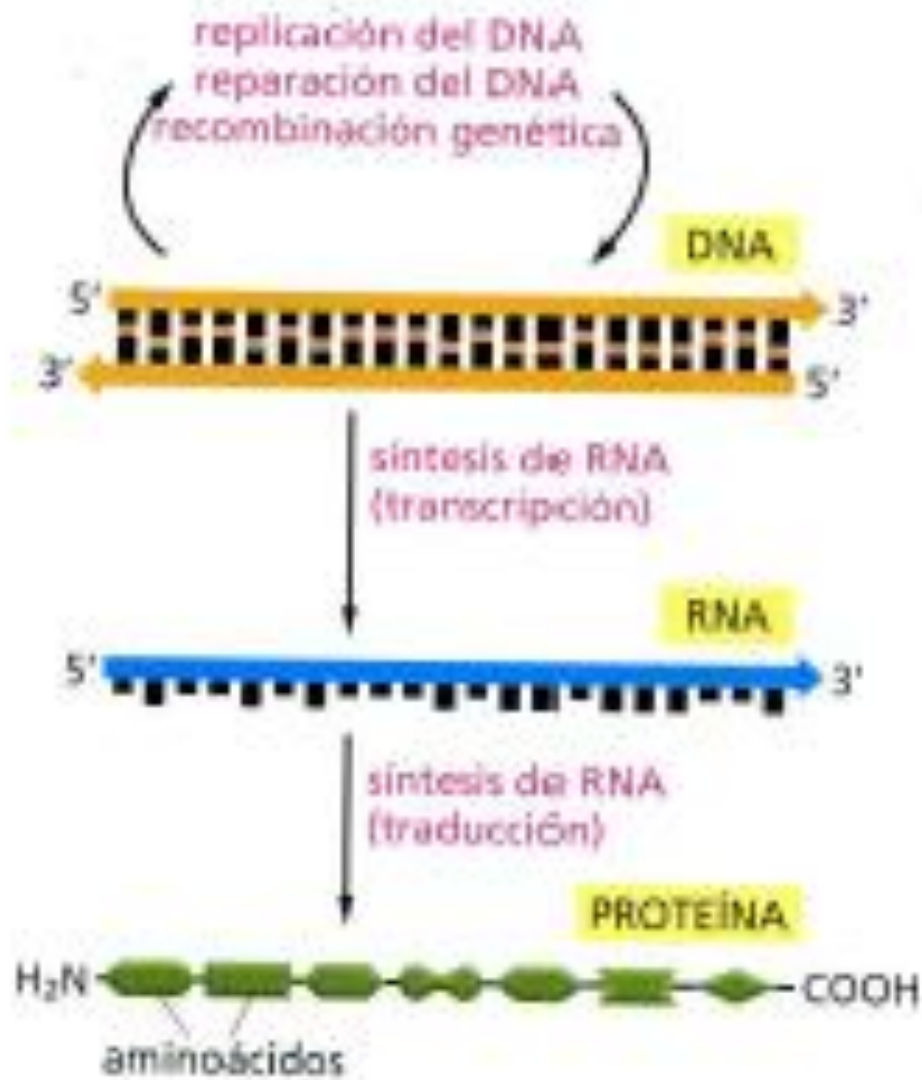
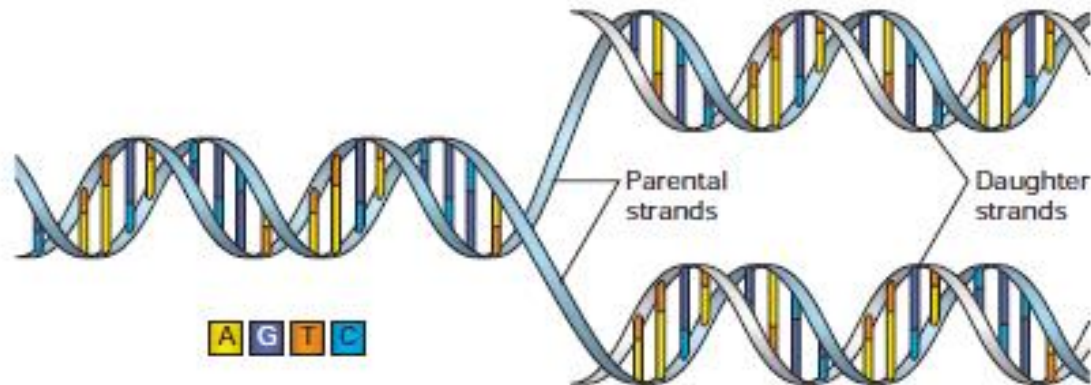


Conservación y Transferencia de la Información Genética



Replicación del ADN



Review

O'Donnell et al.

Principles and concepts of DNA replication in *Bacteria, Archaea and Eukarya*.

Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013

Replicón

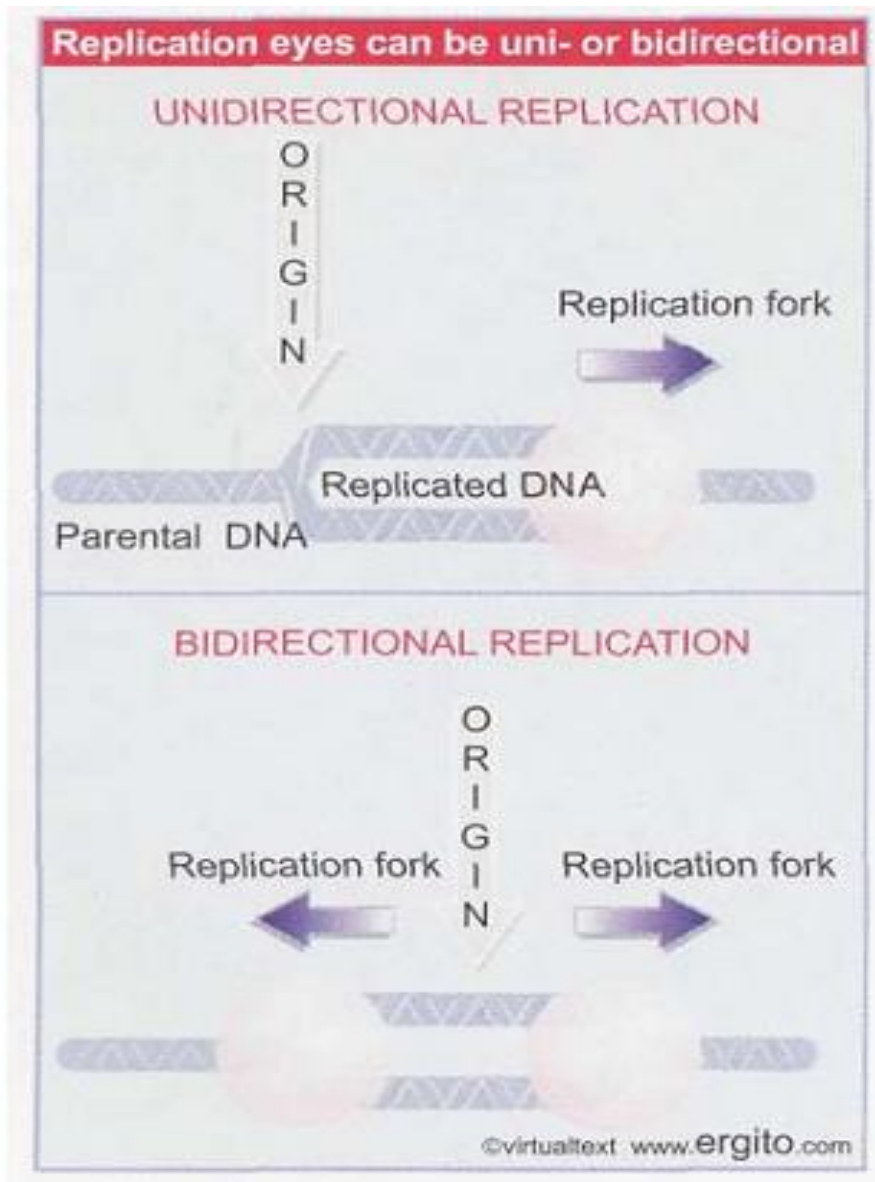
Fragmento de ADN capaz de replicarse en forma independiente

Posee elementos de control: **origen (ori)** y **terminador** (en bacterias).

Ejemplos :

- Cromosoma bacteriano (un único ori)
- Plásmidos (ADN extracromosomal presente en algunas bacterias)
- Virus , bacteriófagos
- Cromosomas eucariotas (varios replicones, cada uno con un ori)

La replicación se inicia en regiones llamadas **origen (ORI)**



A partir de un ori, la replicación puede ser:

unidireccional (una horquilla)

bidireccional (dos horquillas opuestas)

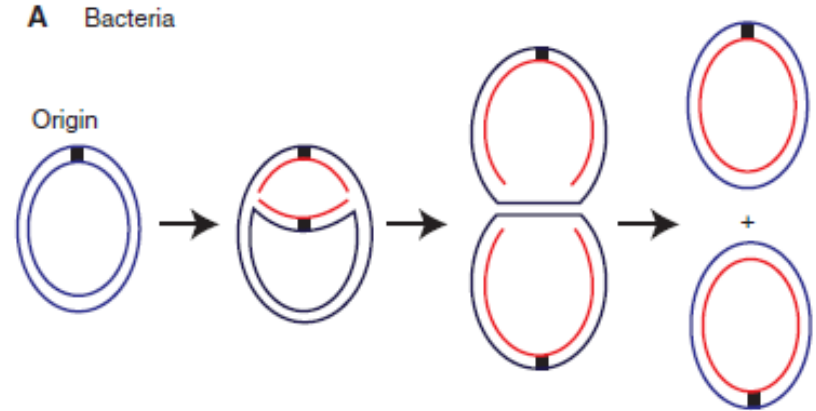
Inicio de la replicación

La replicación se inicia en los ori y es generalmente bidireccional

A. Bacterias.

Poseen un cromosomas circular con **un origen**. Dos horquillas proceden en direcciones opuestas (**replicación bidireccional**)

Ej. *Escherichia coli*

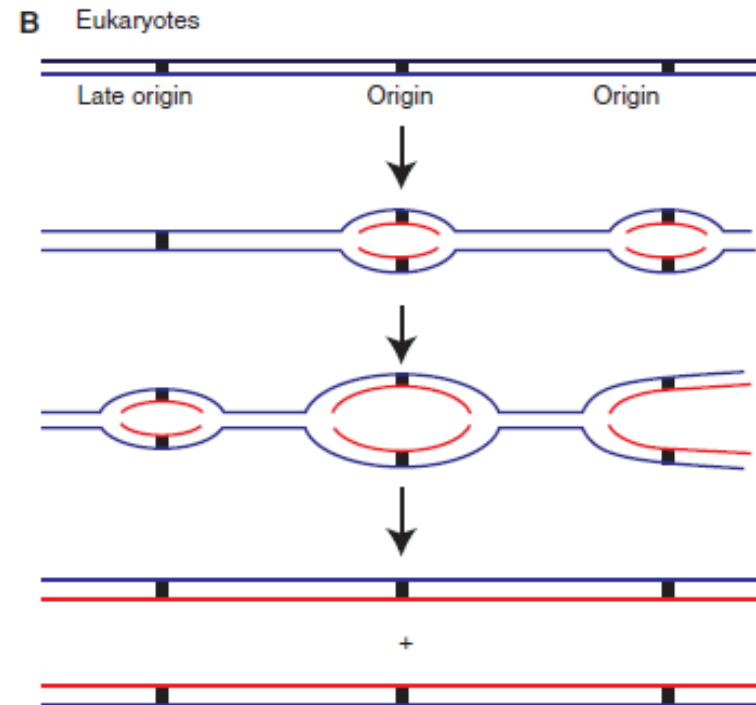


B. Eucariotas.

Poseen cromosomas lineales largos.

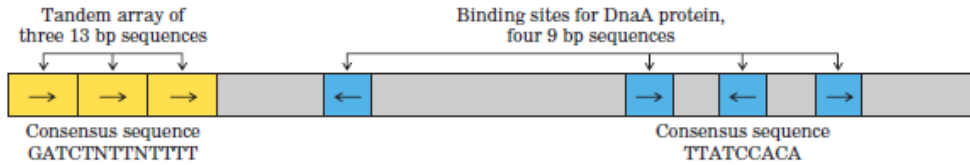
Replicación **bidireccional** iniciada en **múltiples ori** en cada cromosoma.

Saccharomyces cerevisiae (levadura), organismos multicelulares



Inicio de la replicación en el cromosoma bacteriano

El origen del cromosoma de *E. coli* (**oriC**) tiene 245 pb y es **rico en secuencias de nt AT**.



Funciones del *ori*:

Iniciar la replicación, controlar la frecuencia de eventos de iniciación.

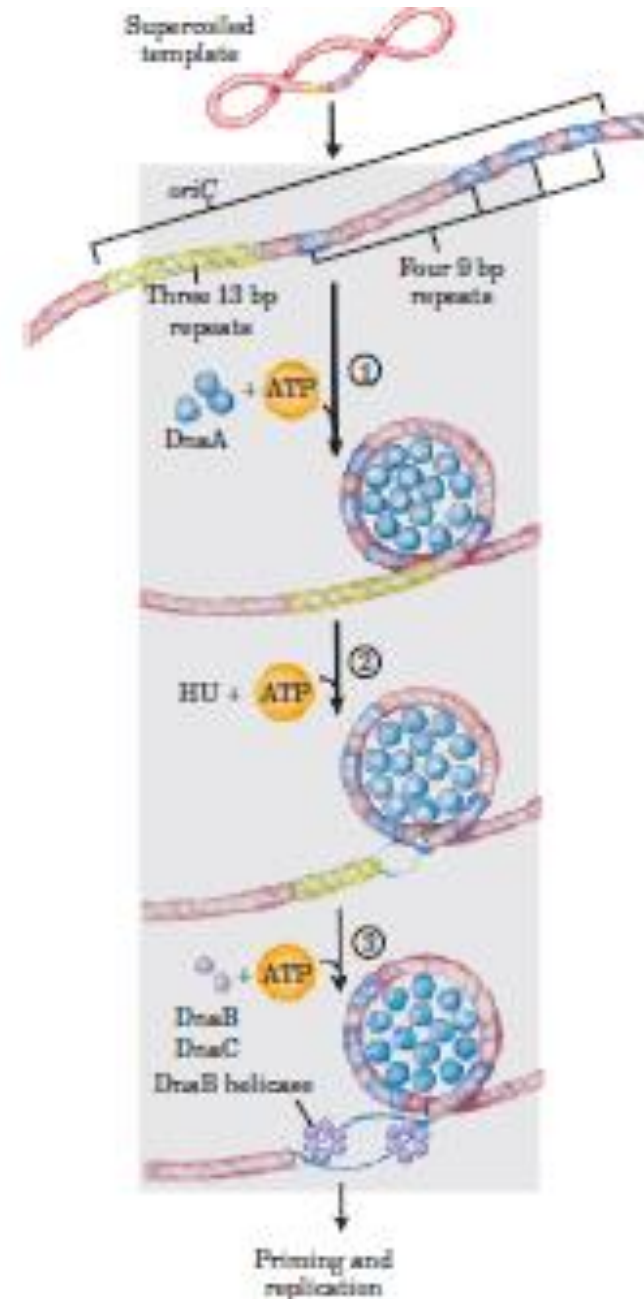
Proteínas que participan en la iniciación de la replicación:

Proteína iniciadora (DnaA): se une al oriC, inicia el desenrollamiento de la doble cadena de ADN, recluta otras proteínas involucradas en síntesis de ADN

Helicasa (DnaB): desnaturaliza la doble cadena de ADN

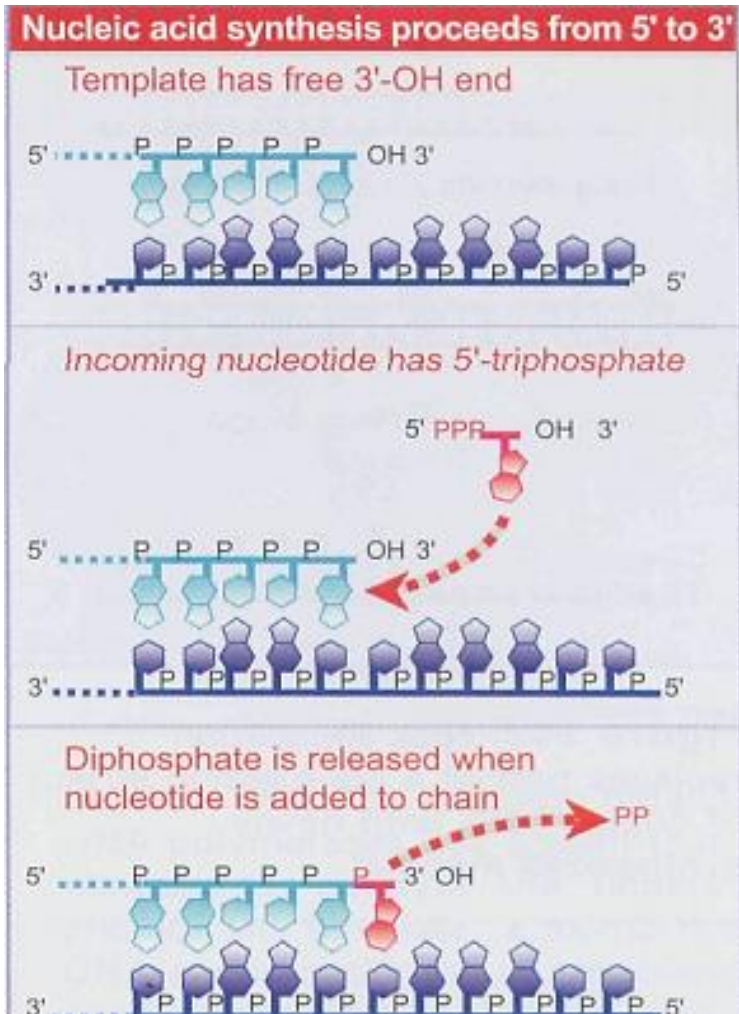
Cargador de la helicasa (DnaC)

Primasa: síntesis del cebador (ARN)

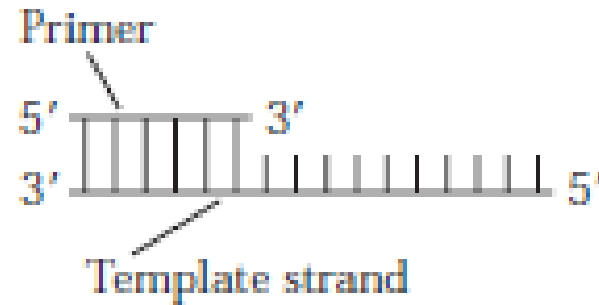


Mecanismo general

Síntesis de ADN semiconservativa



La **ADN polimerasa** necesita una **hebra molde** (*template*) como guía y un **cebador** (*primer*) (ARN ~10-12 nt) para iniciar la replicación



La **síntesis de ADN** procede siempre en **dirección 5' - 3'**

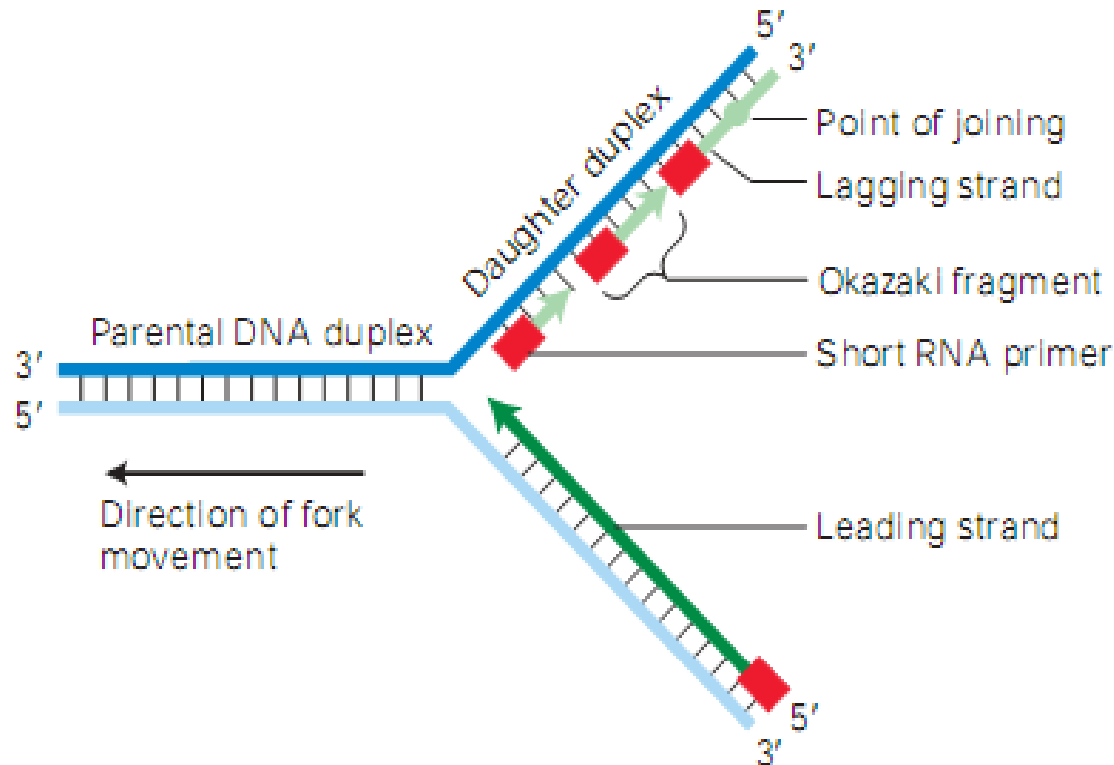
La hebra templado se lee en sentido 3'-5'

Ambas hebras se sintetizan coordinadamente y en forma simultánea creciendo en sentido 5'-3'.

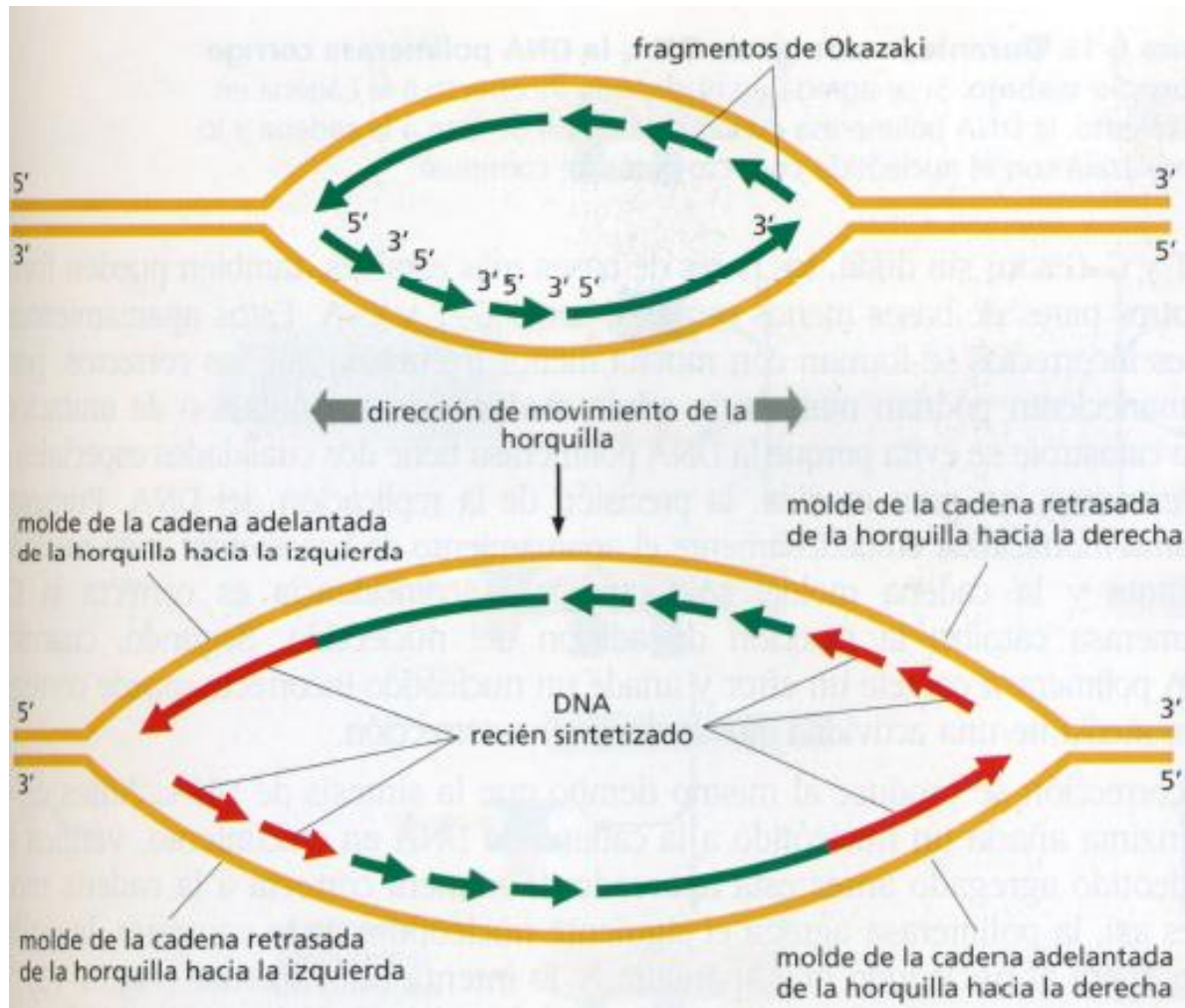
Una de las hebras se sintetiza en forma **continua** (**hebra conductora**) en igual dirección que la horquilla de replicación

La otra en forma **discontinua** en sentido opuesto a la horquilla de replicación (**hebra rezagada**) en fragmentos pequeños.

Los **fragmentos de Okazaki** pueden tener diferente longitud (~1000-2000 nt en bacterias y ~ 200 nt en eucariotas)



Mecanismo bidireccional de replicación del ADN



Las horquillas de replicación son asimétricas

ADN polimerasas

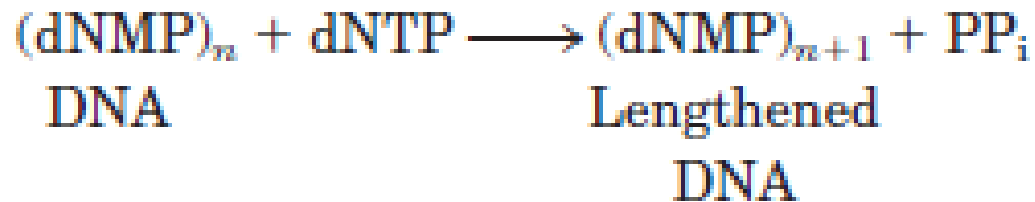
Enzimas que catalizan la polimerización del ADN

Requieren de una hebra de ADN molde y un cebador (simple cadena complementaria asociada a la hebra molde con OH extremo 3' libre)

Hay varias ADN polimerasas que participan en **replicación o reparación del ADN**

Replicasas están involucradas en la replicación

Poseen actividad de síntesis en sentido **5'-3'** y **actividad exonucleasa** (remoción de nt) en sentido **3'-5'** (corrección o *proofreading*).



dNMP= dnt monoP

dNTP= dnt triP

Las bacterias (*E. coli*) poseen 5 polimerasas asignadas a diferentes funciones

<i>E. coli</i> has 5 DNA polymerases		
Enzyme	Gene	Function
I	<i>polA</i>	major repair enzyme
II	<i>polB</i>	minor repair enzyme
III	<i>polC</i>	replicase
IV	<i>dinB</i>	SOS repair
V	<i>umuD'₂C</i>	SOS repair

©virtualtext www.ergito.com

ADN Pol I

Descrita por Kornberg 1955. Único polipéptido PM103 kDa

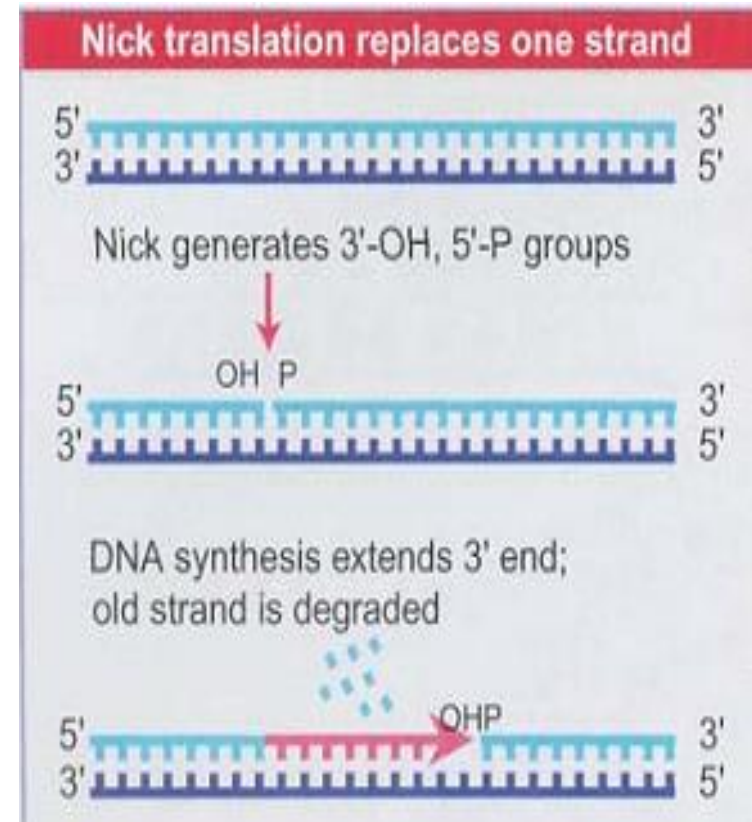
Rol accesorio en replicación (remoción de cebadores y rellenado en hebra rezagada)

Reparación de ADN

Posee actividad 5'-3' exonucleasa (remoción de los cebadores)

Remoción de ~10 nt en sentido 5'-3' coordinada con actividad de síntesis permite el reemplazo de un trozo de ADN a partir de una mella (*nick translation*)

Es la única ADN polimerasa que posee actividad **5'-3' exonucleasa**



ADN pol III

ADN Polimerasa principal en la replicación bacteriana

Formada por varias subunidades (900 kDa)

Unidad catalítica x2 (core):

Subunidad Polimerasa 5'-3' (α)

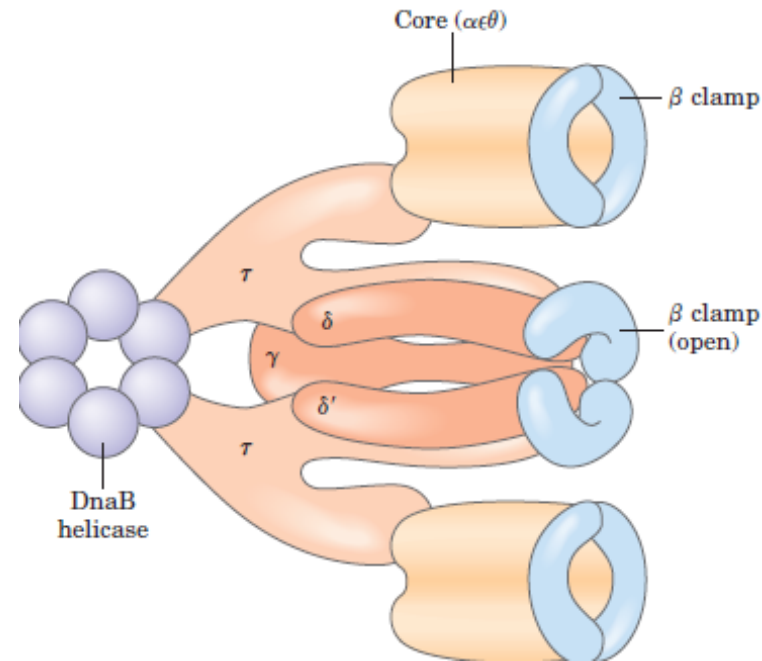
Subunidad Exonucleasa 3'-5' (ϵ)

Cada unidad catalítica se une a una hebra de ADN templado

Unidad de dimerización (t, tau x 2). Mantienen las unidades catalíticas unidas

Unidad de procesividad x2 (β x 2), llamada abrazadera (sliding clamp). Mantiene a la unidad catalítica unida al templado

El **cargador de la abrazadera (γ) (Clamp loader)** acopla las abrazaderas al templado



Proteínas de la replicación del ADN

Son comunes en todos los tipos celulares

Replisoma

Helicasa: desnaturalización de doble cadena de ADN

Topoisomerasas (girasa): libera tensión por delante de las horquillas

SSB (proteínas de unión a simple cadena): estabilización de simples cadenas

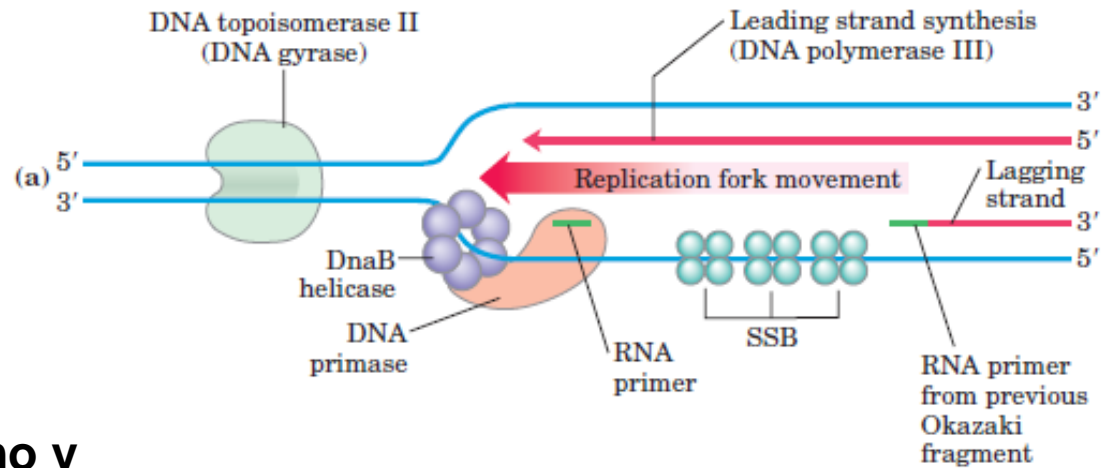
Primasa: síntesis de cebadores (ARN)

ADN polimerasas: polimerización/corrección ADN

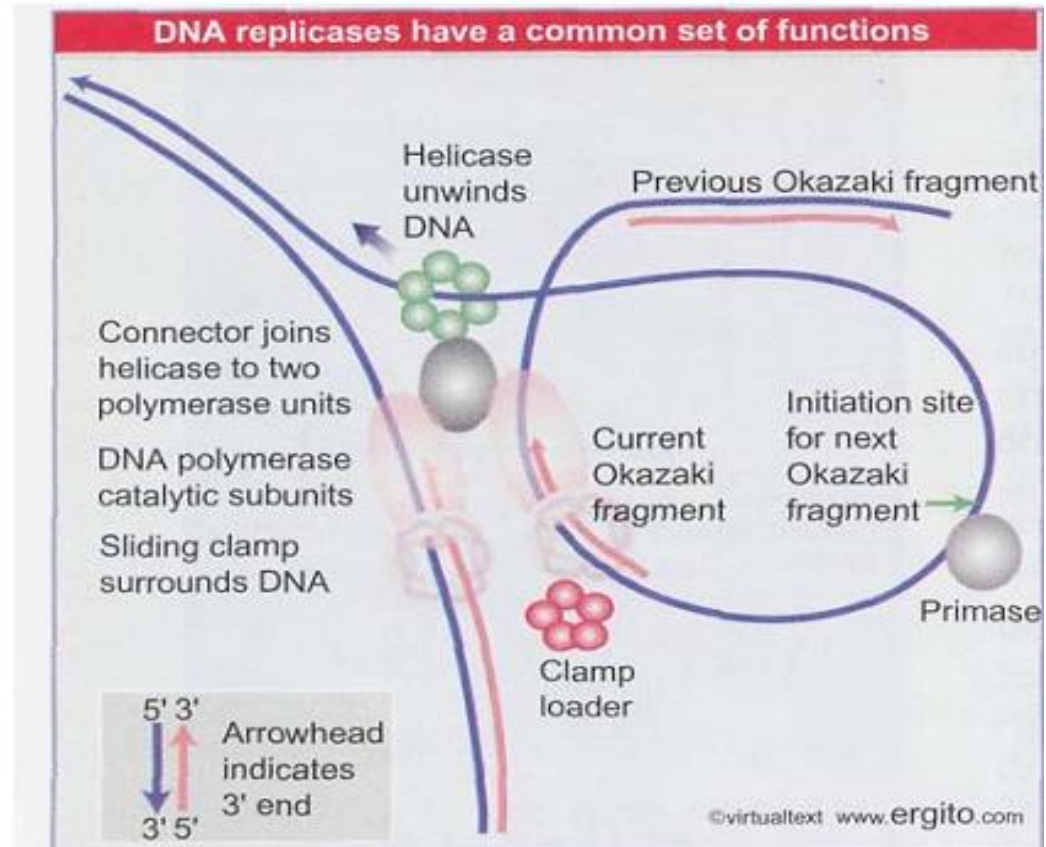
Abrazaderas (*sliding clamps*): aumenta procesividad de ADN polimerasa

Cargador de la abrazadera (*clamp loader*): carga la abrazadera para la síntesis de cada fragmento de Okazaki

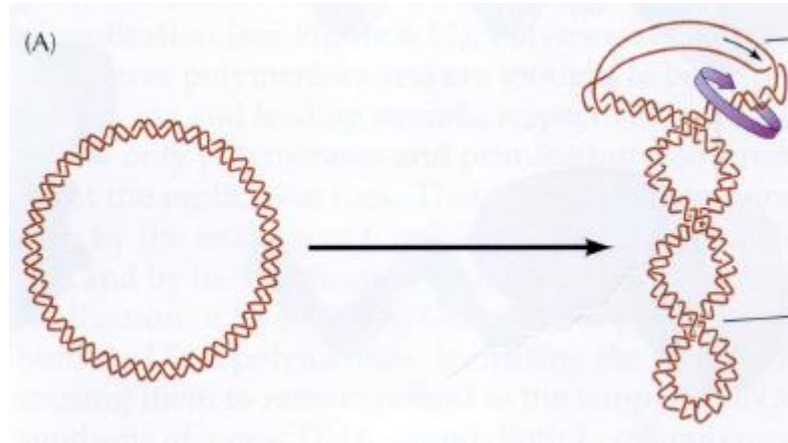
Proteínas accesorias: remoción de cebadores, ligasas



Modelo del mecanismo y proteínas involucradas en la replicación en las bacterias (*E. coli*)

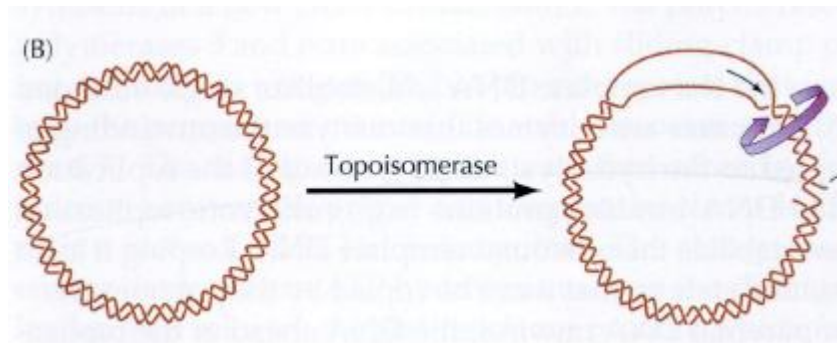


Las **topoisomerasas** relajan la tensión (*supercoils*) generada delante de la horquilla de replicación por el desenrollamiento del ADN



Desenrollamiento del ADN parental

Torción/superenrollamiento de las hebras de ADN por delante de la horquilla de replicación



El corte transitorio de la cadena permite la libre rotación de las hebras de ADN

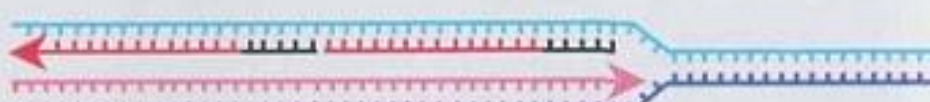
Each Okazaki fragment is synthesized as a discrete unit



Primase synthesizes RNA



DNA polymerase III extends RNA primer into Okazaki fragment



Next Okazaki fragment is synthesized



DNA polymerase I uses nick translation to replace RNA primer with DNA



Ligase seals the nick

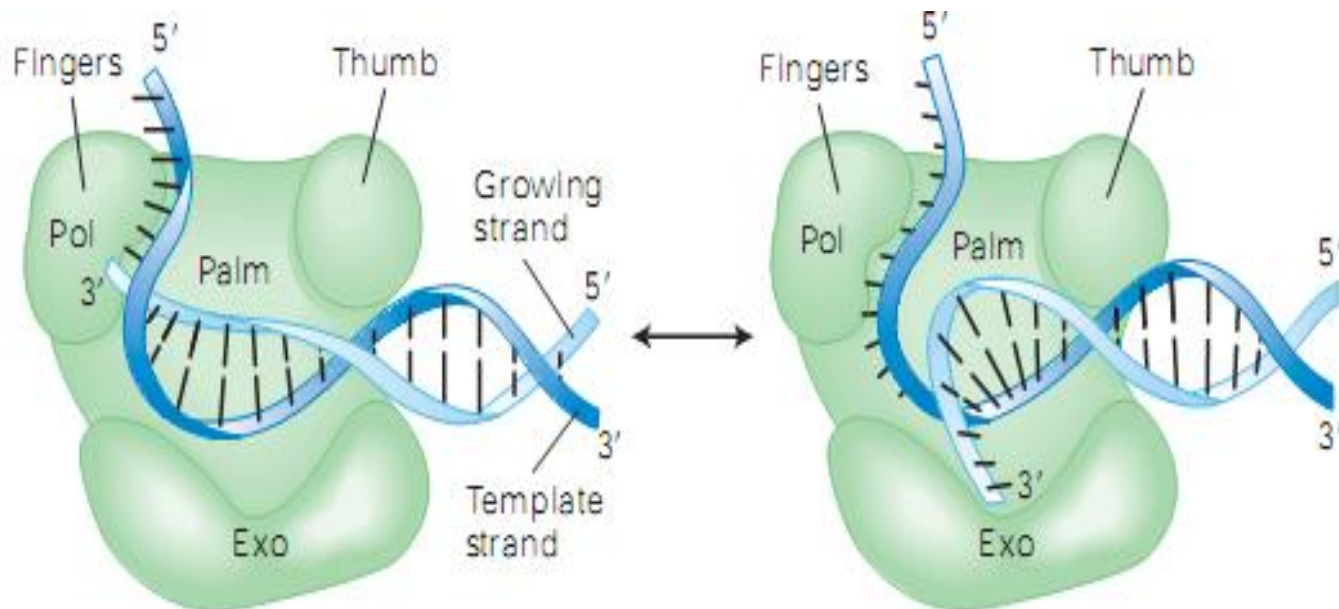
Control de la fidelidad de la replicación

Errores de la ADN Polimerasa:

- **Cambio del marco de lectura**, mejorado por la **procesividad** de la polimerasa (tendencia a mantenerse asociada al templado)
- **Sustitución de bases**, mejorado por la eficiencia de **corrección** o **proofreading** de la polimerasa

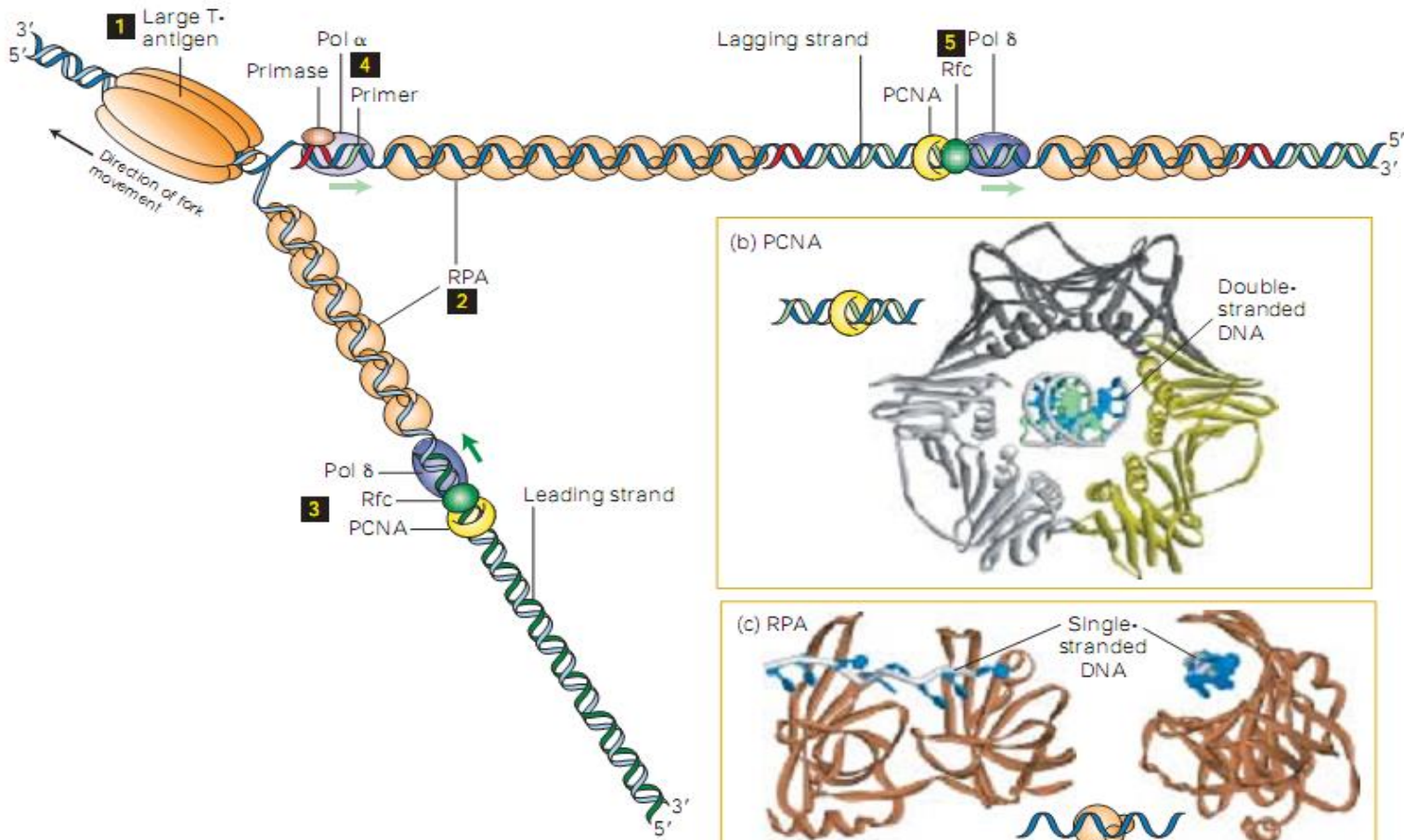
Actividad exonucleasa 3'-5' participa en la remoción de bases incorrectas (**proofreading**), mejora >100 veces la fidelidad de la ADN polimerasa.

Tasa de error de la ADN pol en bacterias ($\sim 10^{-8}$ 10^{-9} por cada par de bases que se replican)



Replicación en eucariontes. Modelo de la replicación en el virus SV 40

(a) SV40 DNA replication fork



Antígeno T: proteína iniciadora, helicasa

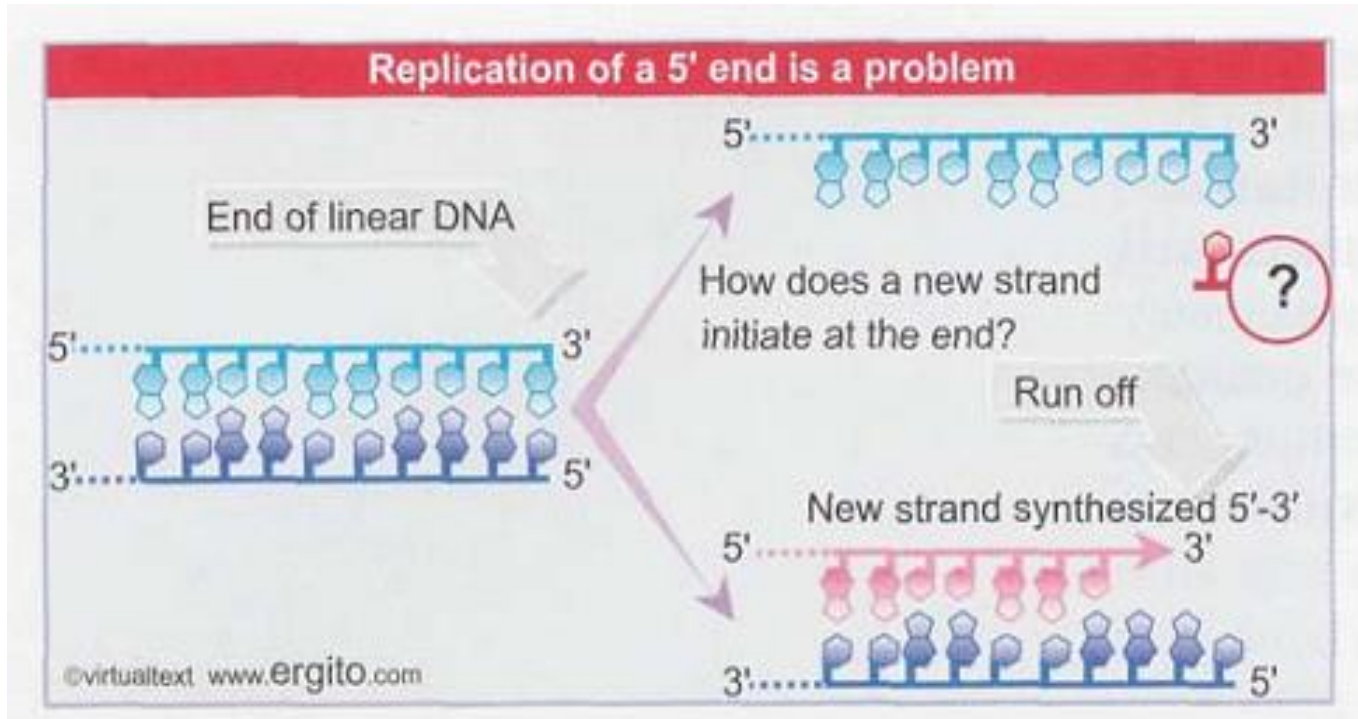
ADN Pol α /primasa. Síntesis de **cebadores mixtos**: ~10 nt **ARN**+ 20-30 nt **ADN**.

ADN Pol δ / ϵ : Elongación de hebra líder (pol ϵ/δ) y hebra rezagada (pol δ)

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*): abrazadera

Exonucleasas MF1 y FEN-1; RNsa H: Remoción de cebadores de ARN y ADN

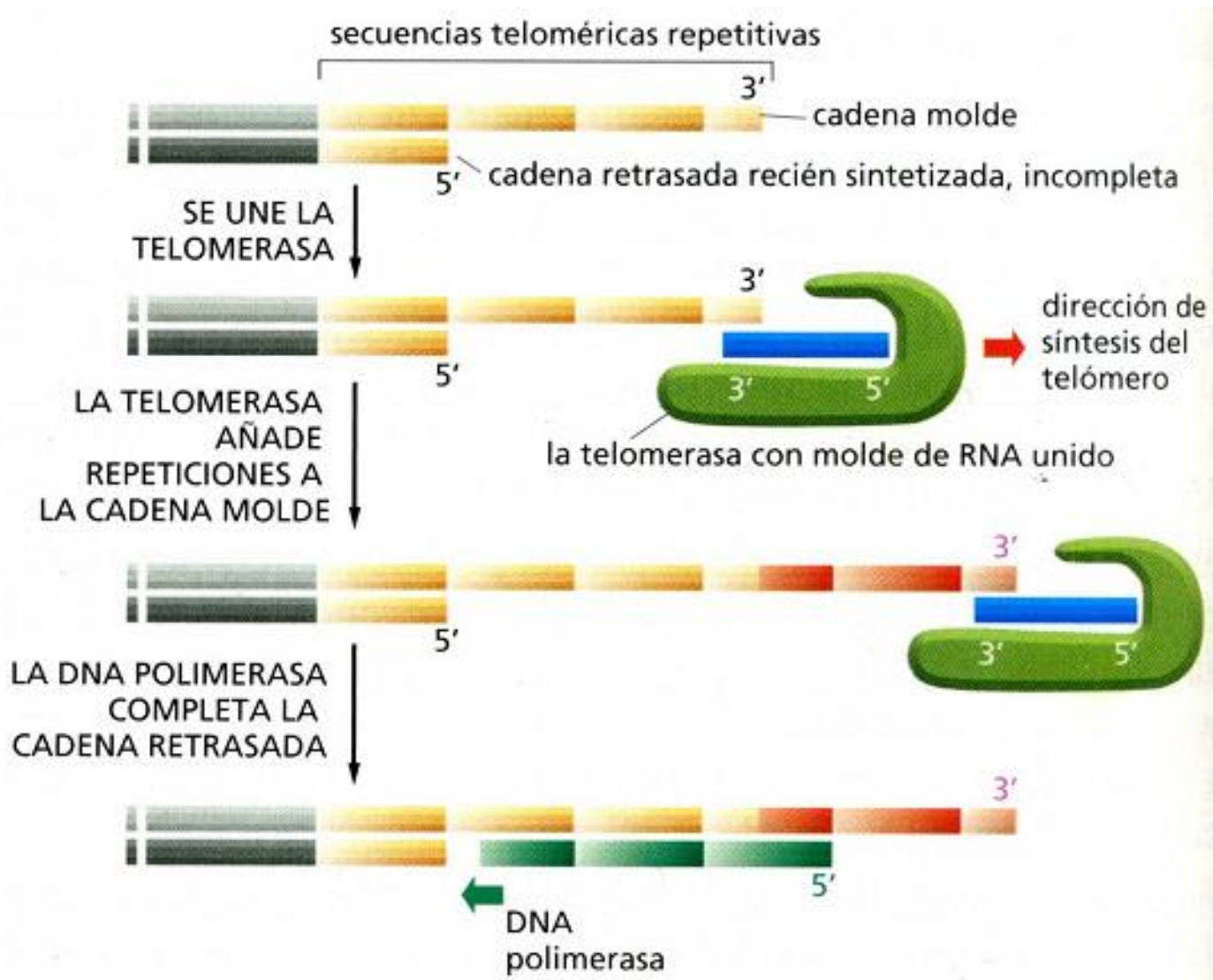
La replicación de los extremos de un ADN lineal doble cadena requiere adaptaciones



Cuando se elimina el último cebador de ARN de la hebra discontinua no existe una hebra donde la ADN pol. pueda iniciar la síntesis para rellenar la hebra faltante. Por lo tanto, la hebra hija se acortaría en cada ciclo de división celular.

El acortamiento de los extremos del cromosoma lineal se soluciona por el agregado de **secuencias teloméricas** en los extremos de cada cromosoma.

Los telómeros permiten que se complete la síntesis de ADN (hebra retrasada) en los extremos de los cromosomas eucariontes



Telómeros

Extremos físicos de cromosomas lineales

Poseen ~1000 **repeticiones en tandem de secuencias cortas de ADN ricas en G** (TTAGGG en vertebrados) **en el extremo 3' terminal de cada cromosoma**. Esta hebra posee una prolongación de cadena simple de 12-16 nt.

Son sintetizados por la **telomerasa** que es un **complejo de ARN + proteína**.

El ARN sirve de molde para la adición de nt en el extremo del telómero

Genes humanos que expresan telomerasa son activos en células germinales e inactivos en la mayoría de los tejidos adultos con baja tasa de replicación

Estos genes se reactivan en las células cancerígenas

Inhibidores de la telomerasa como posibles agentes terapéuticos

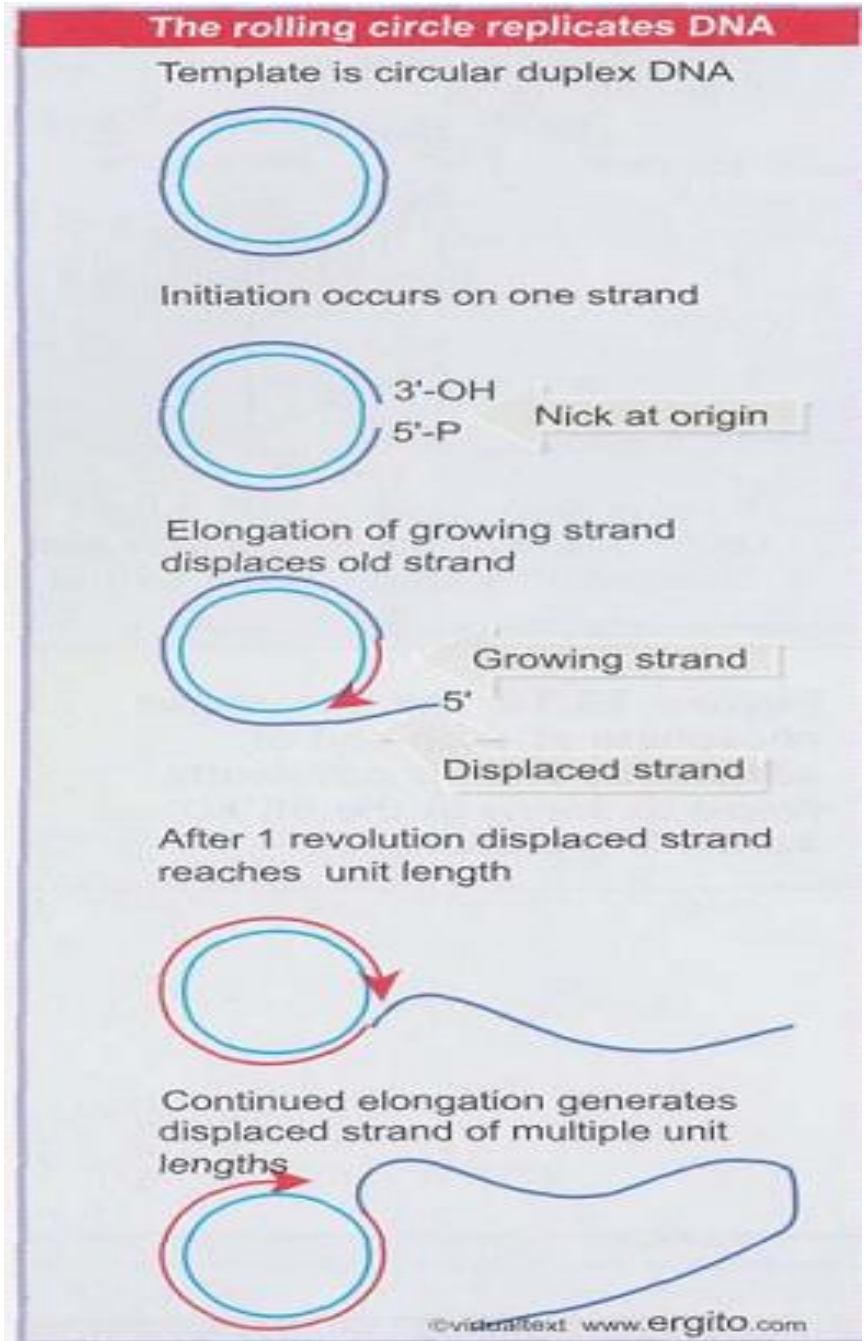
Ausencia de telomerasa da lugar a que el cromosoma se trunque gradualmente durante las sucesivas replications, contribuye a la senescencia de las células.

Replicación en círculo rodante

Es un mecanismo de replicación unidireccional

Puede generar copias múltiples del genoma en simple cadena concatenadas

Replicación de fagos y plásmidos bacterianos conjugativos



Reparación del ADN

El ADN puede dañarse a causa de:

- ✓ Escisión espontánea en enlaces químicos del ADN
- ✓ Reacción con químicos del ambiente o subproductos del metabolismo celular normal , ej. especies reactivas de oxígeno (ROS)
- ✓ Radiación UV e ionizante
- ✓ Errores de copiado de la ADN polimerasa

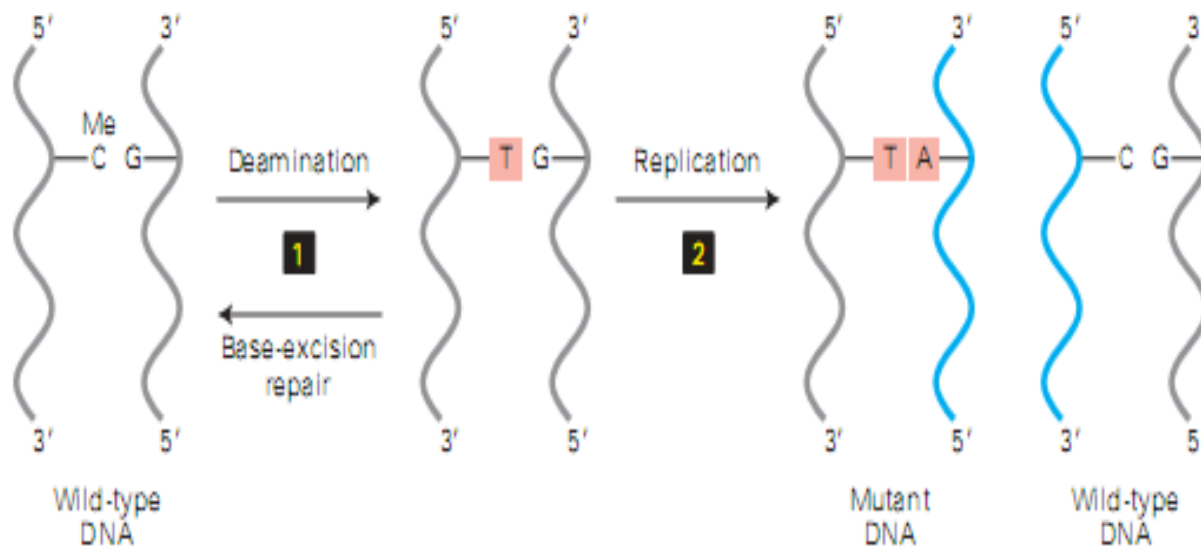
Los sistemas de reparación del ADN mantienen la fidelidad con que el ADN es replicado y evitan mutaciones

Las células cancerosas carecen de uno o varios tipos de sistemas de reparación del ADN, acumulan mutaciones

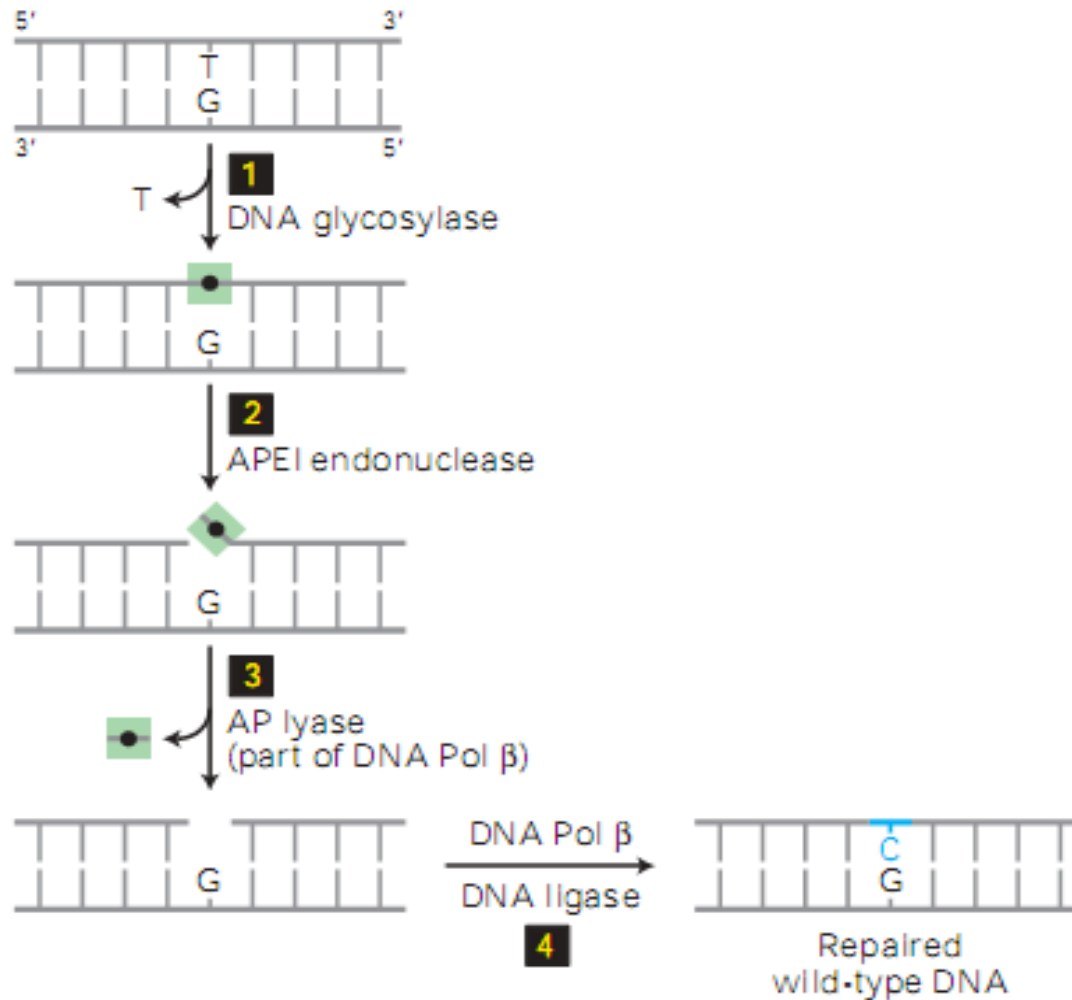
Reparación por escisión de bases (REB)

Modificación espontánea de bases. Si no se repara se genera una mutación puntual.

No afectan la replicación o transcripción



Reparación por escisión de bases de un apareamiento G-T incorrecto



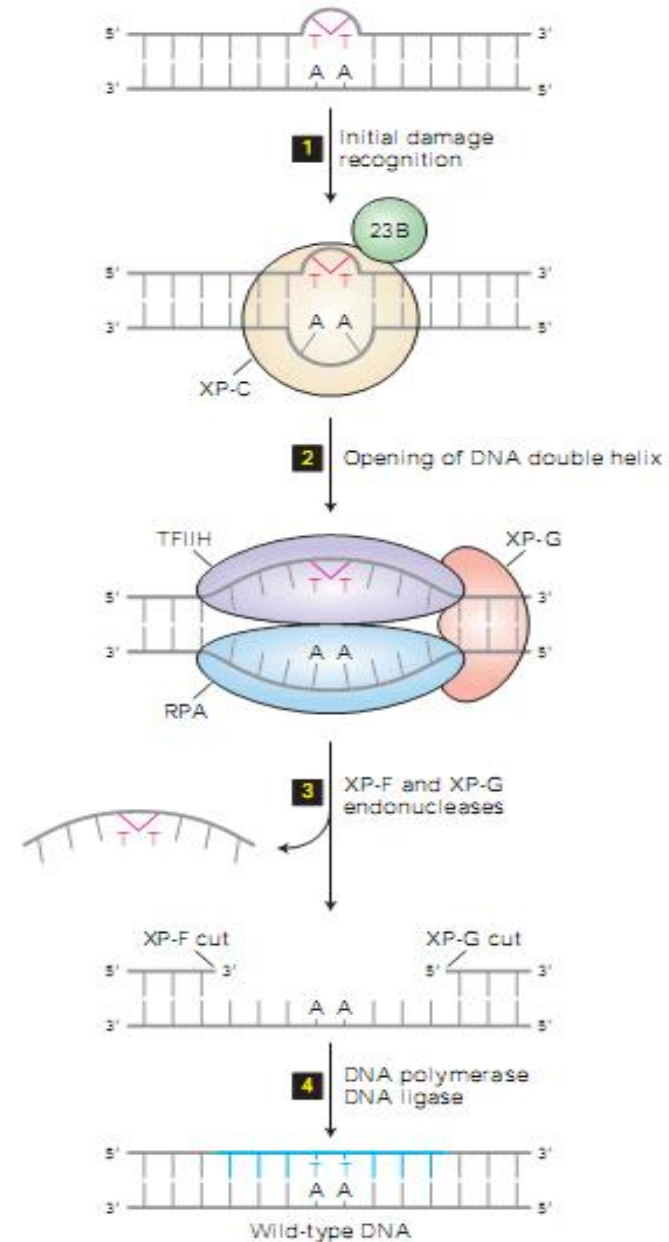
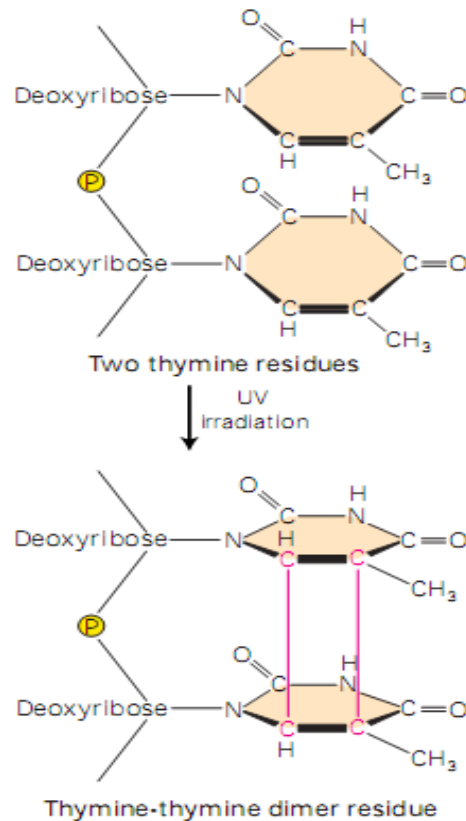
Reparación por escisión de nucleótidos (REN)

Reparación de aductos químicos T-T; bases modificadas x carcinógenos, distorsionan localmente la molécula de ADN

Afectan replicación y transcripción

Mecanismo estudiado en individuos con xerodermia pigmentosa, enfermedad asociada con predisposición al cáncer de piel

Formación de dímeros de timina,
a causa de la radiación UV

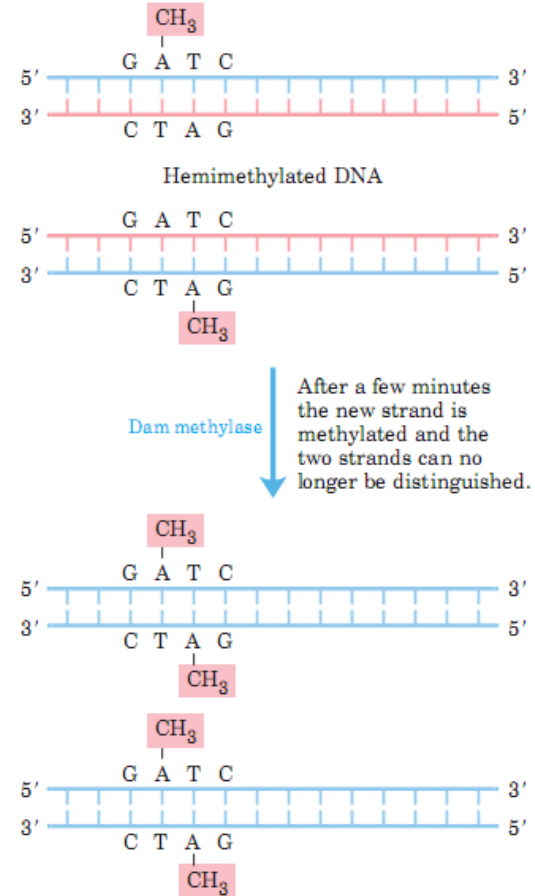
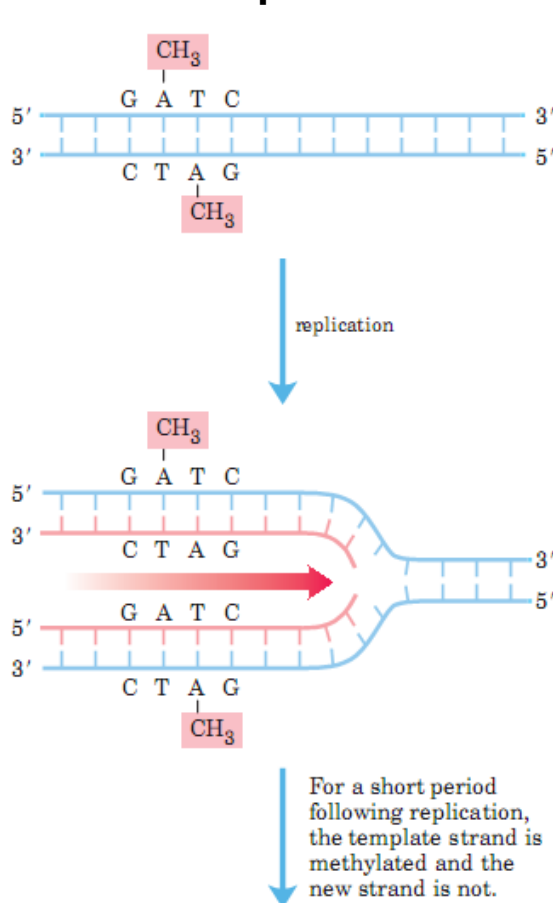


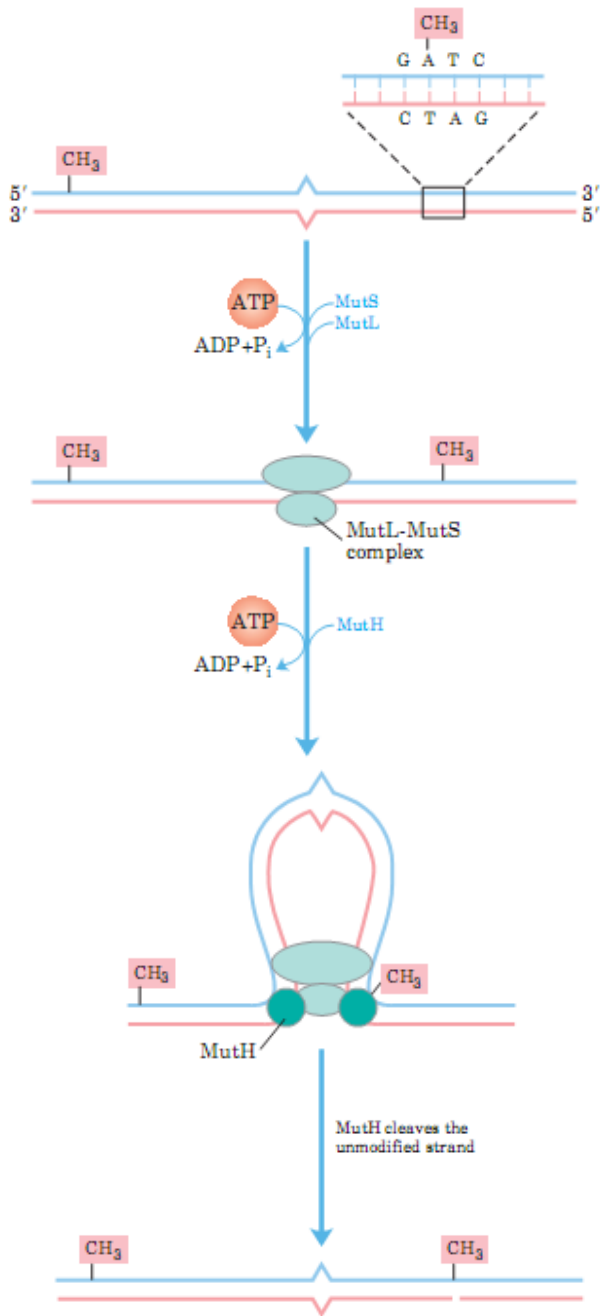
Reparación del apareamiento de bases incorrecto (*mismatch*)

Corrige errores durante la replicación del ADN

El sistema reconoce la hebra nueva (no metilada) con respecto a la molde (metilada)

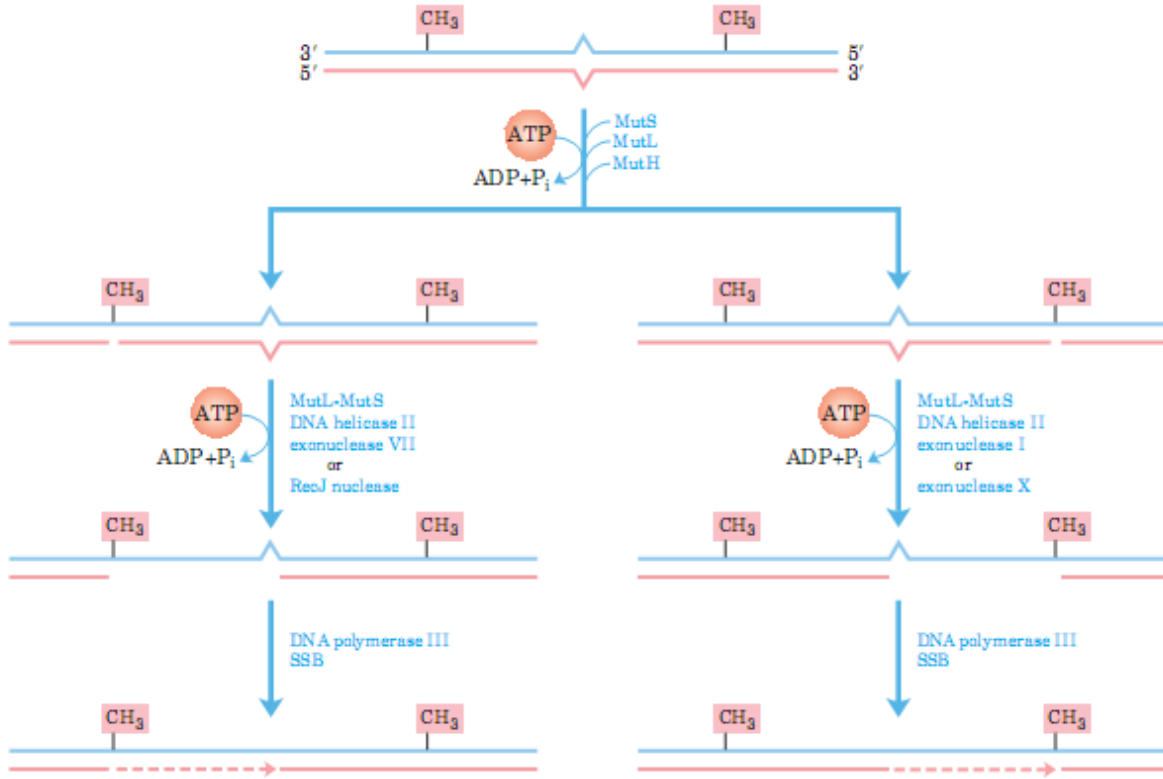
Metilación del ADN por metilasa Dam en bacterias





Reparación del *mismatch*

1. Reconocimiento del sitio metilado y del *mismatch*, corte en 5'G del GATC hebra no metilada.
2. Remoción de segmento de ADN en la hebra nueva mediante exonucleasas (5'-3' o 3-5').
3. Rellenado x DNA pol y ligación (ligasa)

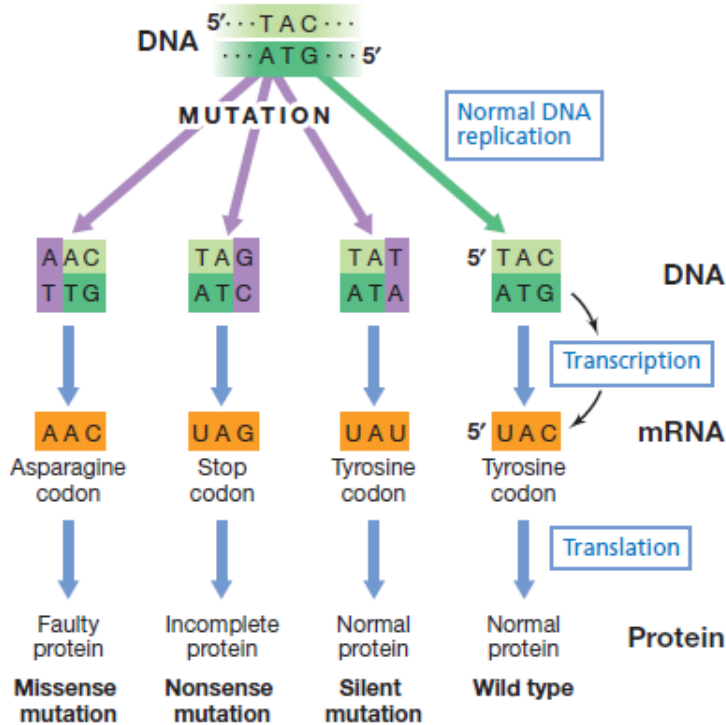


Mutación

Cambio estable en la secuencia del ADN

Afectan el genotipo (sec del ADN) y pueden causar alteraciones en el fenotipo (características observables)

Posibles efectos de mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas



M. silenciosas (*silent*). No cambia el aa

M. erróneas (*missense*). Cambia el aa

M. sin sentido (*nonsense*). Cambia a un codón de terminación de la traducción

