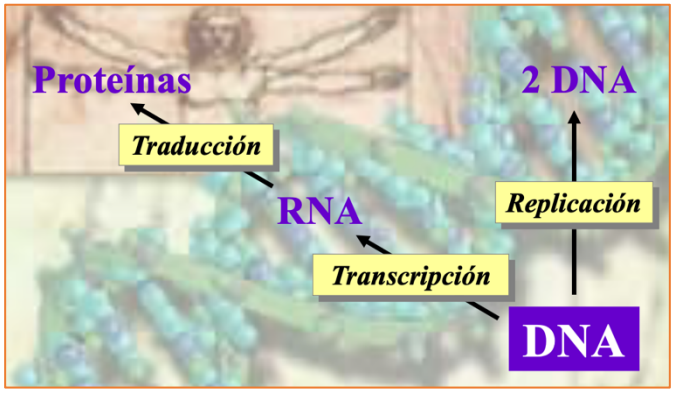
T10. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL DNA

Flujo de la información genética. "Dogma central" de la biología molecular.

El **dogma central de la biología molecular** es un concepto que ilustra los mecanismos de transmisión y expresión de la herencia genética tras el descubrimiento de la codificación de ésta en la doble hélice del ADN. Nos propone que existe una unidireccionalidad en la expresión de la información contenida en los genes de una célula, es decir, que el ADN se transcribe como ARN mensajero y que éste se traduce como proteína, elemento que finalmente realiza la acción celular. El dogma también postula que sólo el ADN puede duplicarse y, por lo tanto, reproducirse y transmitir la información genética a la descendencia. Francis Crick expresó el dogma central por primera vez en 1958.



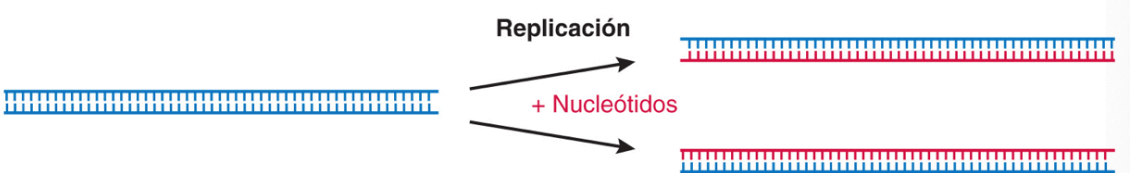
Replicación: proceso bioquímico por el que **obtenemos, a partir de una molécula de DNA, dos moléculas "hijas" de DNA "idénticas" a la original**. Intuitivamente, la replicación es muy sencilla.

"No se nos ha pasado por alto que el apareamiento específico (de las bases en el DNA) que hemos postulado sugiere, inmediatamente, un posible mecanismo de copia del material genético" Watson y Crick, Nature, 1953.

Características de la replicación

- **OPERATIVIDAD** (se tiene que llevar a cabo muy rápidamente ya que el ciclo celular es muy corto) y **FIDELIDAD** (para evitar errores, pues cada uno de esos errores provoca una mutación en la célula y estos permanecen de por vida).

- La replicación de la doble hélice de ADN es **semiconservadora (**Meselson & Stahl): cada una de las cadenas de una doble hélice de ADN ya existente sirve como plantilla para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Al final de este proceso, cada una de las dos dobles hélices contiene una de las antiguas cadenas de ADN y una de las cadenas de ADN recién sintetizadas.



- **Total (Completa)**: Todo el DNA de la célula se tiene que replicar. El punto de control es el origen, una vez se inicia la replicación, cada uno de los pares de cromosomas se replica y de ahí a la división de la célula. La replicación está ligada a la división celular. *Por ejemplo, una neurona que no se divide nunca replicará su material genético (diferencia fundamental con la transcripción, que será un proceso selectivo)*.

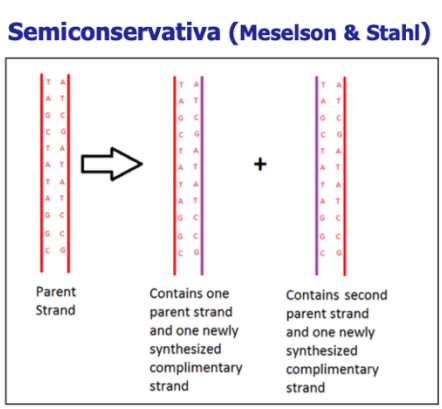
- **Ligada al ciclo celular (Normalmente)**: Cuando repliquemos el DNA (en la fase S del ciclo celular), la célula se obligará a realizar inmediatamente la división celular pasando el DNA replicando a las células hijas. Hay excepciones, que son patologías (como células cancerígenas), en algunas células hay 2, 3 o 4 veces más del material genético del que se debe. Cuanta más cantidad de DNA, el tumor es más agresivo. De igual forma, el DNA mitocondrial se replica cuando es necesario, y su replicación puede ser independiente de la del DNA nuclear.

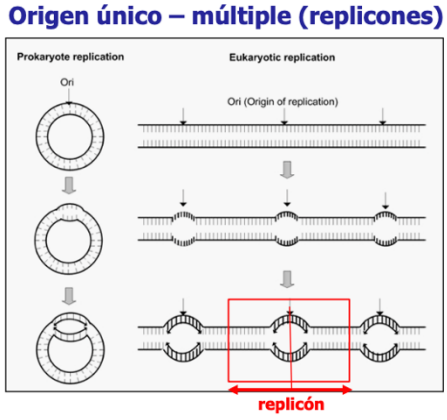
- Tiene **capacidad correctora:** las DNApol, enzima de doble lectura o correctora de pruebas, cada vez que coloca un nucleótido sufre un cambio conformacional que hace que lea si el par de bases es el correcto: si lo es continua y si no lo elimina rompiendo el enlace éster y colocando de nuevo el nucleótido y volviendo a controlar.

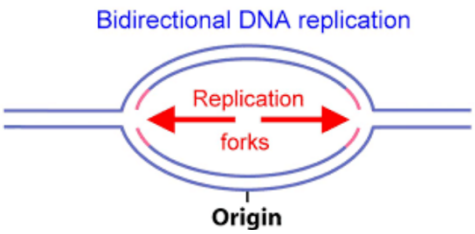
- **Origen**:

  - Procariotas: **único**, a partir de un solo punto (**gen oriC**)

  - Eucariotas: **múltiple**. La replicación en eucariotas es muy complicada y hoy en día no se conoce concretamente el proceso. Tenemos entre 1000 y 10000 orígenes de replicación. Se sabe que hay orígenes alternativos empleados por algunos tipos celulares. Se ha comprobado que algunos orígenes van asociados a tetraplex.







Problema
Las DNA polimerasas sólo fabrican DNA en sentido 5´-3´

Las zonas que se replican son zonas ricas de G Y C, puntos de regulación epigenética, puntos donde el DNA está desprovisto de histonas...

- **Bidireccional** (5'→3'): se inicia en un punto y esta replicación se realiza en ambas direcciones a nivel macroscópico, formando un replicón. Se observa que una cadena parental tendrá la polaridad 5'→3', mientras que la otra cadena tendrá una polaridad 3'→5'. Por lo tanto, las nuevas cadenas de DNA, al ser **antiparalelas**, **tendrán orientación opuesta a las parentales**.

- Es **compleja** mecanísticamente por su gran velocidad (50 nucleótidos/seg) y fidelidad (obtiene un DNA idéntico). También tiene un gran número de proteínas implicadas.

- Hay un **gran gasto energético:** con la incorporación de cada nucleótido en la secuencia de DNA que se está fabricando (partiendo del nucleótido trifosfato, incorporando el monofosfato y se liberan los dos fosfatos terminales en forma de pirofosfato que las pirofosfatasas cortan) se consumen **dos enlaces de alta energía por cada nucleótido** que incorporemos.

DNA polimerasas. Principales enzimas de la replicación: requerimientos para su funcionamiento

Encargadas de **fabricar el DNA**. Todos los enzimas capaces de polimerizar nucleótidos no son DNApol. Son DNApol cuando tienen un molde, sobre el que colocan los nucleótidos complementarios. Además, necesitan un cebador o primer. Los requerimientos para su funcionamiento son:

- **Molde de DNA: síntesis de DNA dirigida por molde.** Una hebra monocatenaria de DNA, que les indique el orden en el que tienen que ir poniendo los nucleótidos por complementariedad, ya que las enzimas necesitan tener una hebra que copiar para realizar su función, sino no actúan.

- **Cebador (o *primer*):** Secuencia corta de nucleótidos. **Les proporciona un extremo 3' -OH libre**, sobre el que las DNA polimerasas pueden ir ya colocando los siguientes nucleótidos, las DNA polimerasas no pueden iniciar una síntesis, sino alargar una hebra previamente sintetizada. Es necesario porque la actividad correctora de las DNApol van delante de la actividad polimerizadora. Por esto necesitan un trocito bicatenario correctamente emparejado para su reconocimiento y así comenzar la polimerización.

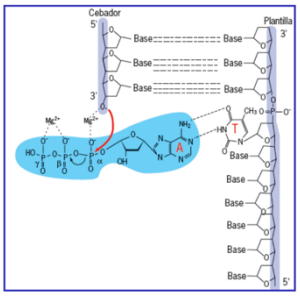
- **DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS (dNTP) TRIFOSFATO y Mg2:** Sustrato para la fabricación de DNA, este sobre todo para aquellas reacciones en las que participan el ATP y nucleótidos, porque las enzimas (en este caso DNApol) las utilizan como complejos con el magnesio, que bloquea parte de las cargas negativas que presentan los nucleótidos.

La **reacción que catalizan: reacción de elongación 5' → 3'**

$$(DNA)_n + dNTP \xrightarrow[Mg^{2+}]{} (DNA)_{n+1} + PPi$$

PPi —(*Pirofosfatasas*)→ 2Pi

En resumen, lo que hacen es tomar el molde de DNA, el cebador, y seleccionar el dNTP (nucleótidos trifosfato) por complementariedad con las bases del molde, añadiendo el monofosfato en la secuencia y liberando un resto pirofosfato al ser atacado el fosfato alfa (interno) formando un enlace éster que incorpora al nuevo nucleótido. Las enzimas pirofosfatasas (muy activas en las células) rompen el pirofosfato en dos moléculas de fosfato. Esta rotura le da al proceso energía para continuar la polimerización en dirección 5' → 3'.



El Mg^{2+} permite bloquear las cargas negativas de los nucleótidos para que éstos puedan incorporarse al centro activo del enzima

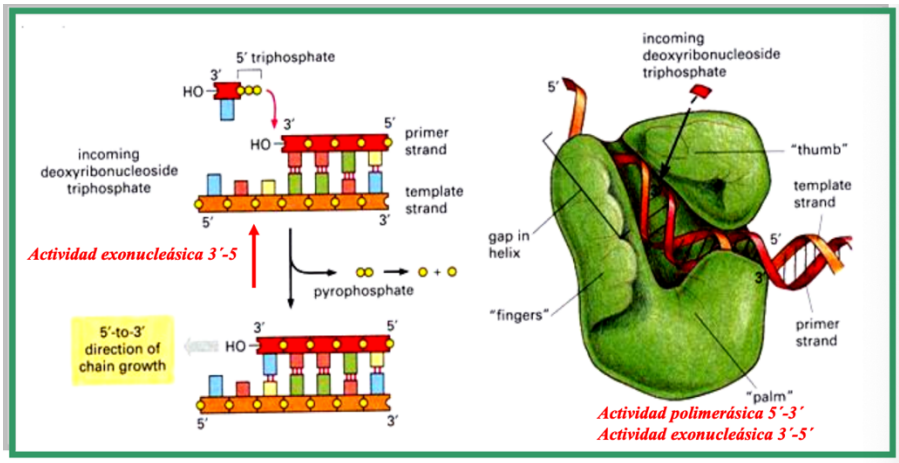
La mayoría de reacciones en las que intervienen nucleótidos los requieren en forma de complejos con el Mg^{2+}

Los verdaderos **sustratos para la síntesis de DNA (o RNA) son los nucleótidos trifosfato en forma de complejos con el magnesio**. Este elimina las cargas negativas de los nucleótidos.

La **DNA polimerasa III** es un complejo multiprotéico que lleva a cabo la mayor parte del trabajo de replicación del DNA. Tiene asociada principalmente dos funciones:

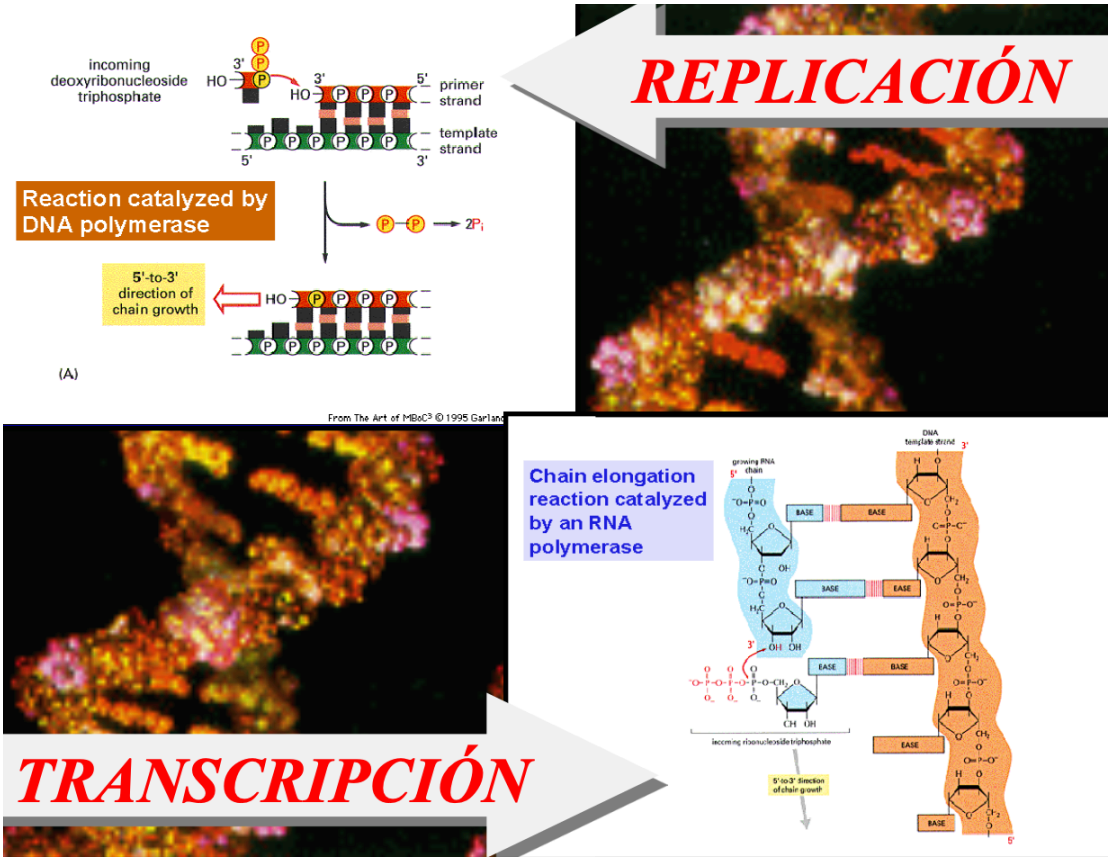
- **Actividad polimerásica 5'→ 3':** que permite la síntesis de la nueva hebra.
- **Actividad exonucleásica 3'→ 5':** que realiza la función de corrección durante la lectura. Esta función es primordial para mantener la fidelidad de la nueva copia.

La **DNA polimerasa I** tiene estas dos mismas funciones, pero, además, presenta la **actividad exonucleasa 5' → 3'**, que permitirá que la propia enzima retire el *primer* de RNA que la primasa ha añadido y rellene este hueco con desoxirribonucleótidos recién sintetizados.



Diferencias entre replicación y transcripción

En la **transcripción** no necesitamos cebador, las RNApol pueden comenzar a sintetizar. No vamos a tener capacidad correctora puesto que los enzimas no tienen capacidad de volver atrás. Un cambio en el RNA no es mutación, es un cambio con una utilidad u otra.

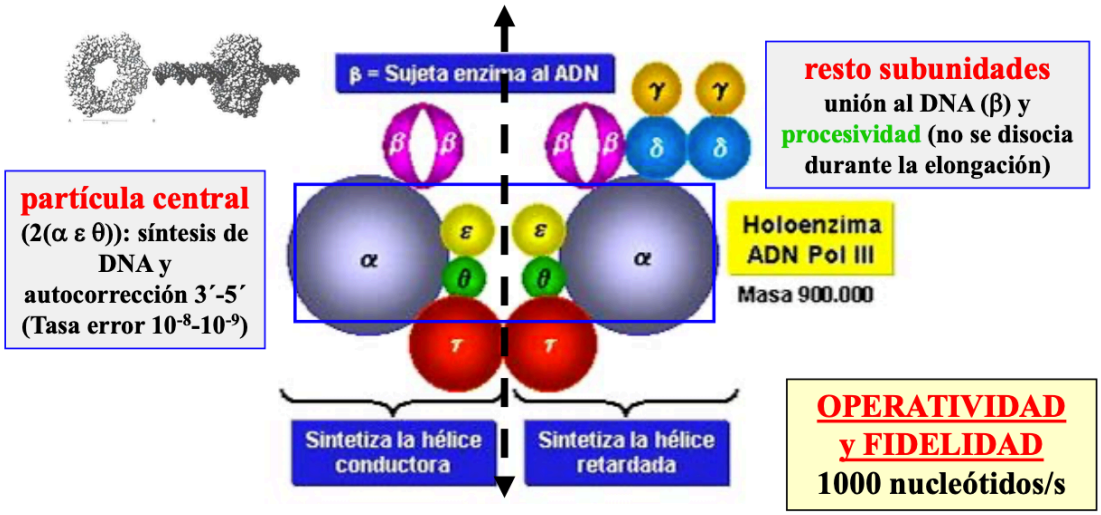


DNA polimerasas de procariotas y su función

Una vez que comienza a trabajar las enzimas encargadas de abrir las horquillas de replicación y que la primasa ha colocado los primers, la DNApol podrá comenzar a sintetizar las nuevas hebras de DNA de las dos bandas. La **DNA polimerasa** de *E. Coli* es la mejor estudiada y está formado por cinco tipos diferentes de enzimas: dos de ellas, las **DNA polimerasas I y III**, se encargan de la polimerización/replicación de las nuevas hebras; mientras que las otras tres son enzimas encargadas de reparar daños que pueda sufrir el DNA durante este proceso.

DNA polimerasa I: reparación del DNA y **REPLICACIÓN**
DNA polimerasa II: reparación DNA (**NO** en la replicación)
DNA polimerasa III: síntesis DNA y corrección en la **REPLICACIÓN**

Holoenzima DNApol III: "dímero asimétrico" (900kDa)



La **holoenzima de la ADN polimerasa III** es la enzima principal involucrada en la replicación del ADN en los procariotas. Es un **dímero asimétrico:** agregado de subunidades que se disponen como dos partes desiguales. Es de gran tamaño y se mantendrá unido como un agregado durante toda la replicación (nunca se separan).

La síntesis de las dos hebras de las cadenas de DNA es diferente. En el agregado menor (izquierdo) se replica **hebra conductora**. Por otro lado, el agregado mayor (derecho) replica la **hebra retardada**, en la que el sentido es contrario (por lo que deben llevar a cabo un giro). La hebra retardada se va a hacer a partir de los **fragmentos e Okazaki**.

La cadena o hebra que crece sin interrupción en dirección 5'→ 3' se denomina cadena líder/hebra continua/hebra conductora; mientras que la que crece mediante pequeños fragmentos, llamados de Okazaki, se denomina cadena retrasada/hebra discontinua/hebra retardada.

En cuanto a su estructura; consta de:

- Posee una **partícula central** formada por tres subunidades, dos de cada, donde se sintetiza DNA y se lleva a cabo la corrección (actividad exonucleásica). En gran parte la replicación se va a hacer en esta partícula central.

- **Dos subunidades beta** en cada agregado: que se une al DNA como una pinza e impide que se separe del enzima durante el proceso, lo que se conoce como procesividad (no se separa hasta el final). Una de las consecuencias por las que tiene que invertir su sentido para poder replicar la hebra retardada.

- **Cuatro subunidades** en la parte de la síntesis de la hebra retardada: para permitir que el DNA invierta su sentido y pueda ser copiado a medida que avanza la DNA polimerasa en la hebra retardada.

El conjunto de todas las subunidades funciona muy bien, permitiendo una capacidad de síntesis de 1000 polinucleótidos por segundo en el caso de E. Coli, actuando con una gran fiabilidad.

Proteínas necesarias en la replicación:

Se precisa la colaboración de numerosas proteínas durante el proceso.

- **DNA polimerasas (III y I)** Actúan si se les prepara todo: estructuras, enzimas que gastan ATP (gasto energético elevadísimo) Estos requerimientos aplican a todos los organismos (tanto procariotas como eucariotas).
- **Proteínas que localicen el inicio de la replicación**, que comienza por unos genes concretos, en el caso de E. Coli es el gen oriC y la proteína es la **DNA A**.
- **Helicasas**: van a permitir que se **separen las dos hebras de DNA**, rompiendo los puentes de hidrogeno entre las cadenas dejando así el DNA monocatenario. Ejemplo: **DNA B, DNA C.**
- **Proteínas estabilizadoras de DNA monocatenario**, hasta que este pueda ser copiado por la DNA polimerasa (el DNA monocatenario no es estable, hay que estabilizarlo). Ejemplo: **SSB.**
- **Primasas:** sintetiza pequeños fragmentos de RNA (cebadores). Son la **RNA polimerasa–DNA dependiente** y la **DNA G**, no necesita cebador para comenzar la síntesis. Son las únicas capaces de hacer la síntesis de DNA de Nuevo.
- **Ligasas:** se encargan de unir los fragmentos de Okazaki (**DNA ligasas**). Forman enlaces éster entre fragmentos de ADN monocatenarios adyacentes.
- **Topoisomerasas:** A medida que se van abriendo las hebras, en los extremos de las horquillas el DNA se va compactando y superenrollado positivamente el ADN. Las topoisomerasas van a tener que ir por delante de cada horquilla de replicación eliminando esos superenrollamientos positivos o nudos para que pueda progresar, ya que de lo contrario llegaría un momento en el que el proceso se detendría. (**DNA girasa**). Las topoisomerasas son dianas de antibióticos (para así bloquear la replicación)
- **Proteínas que determinan el final de la replicación (Tus)**: Necesitan de unos genes determinados (**ter**).

Proteínas necesarias para la replicación tanto en procariotas como en eucariotas
Los nombres en rojo, entre paréntesis, corresponden a las proteínas procarióticas (E coli)

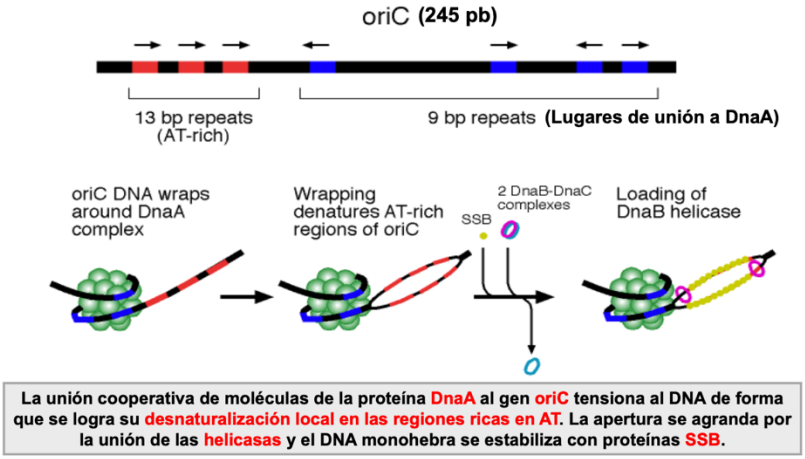
Replicación en procariotas

El DNA bacteriano ha servido de modelo de estudio para descifrar la compleja maquinaria de replicación del DNA.

Origen: el DNA circular bacteriano tiene un único origen de replicación. Esta secuencia, denominada **oriC**, consta de un mínimo de **245 pb** donde se unirá específicamente una **proteína iniciadora** (**DnaA** en E. Coli).

Apertura de las hélices: una vez fijada la proteína iniciadora, se unirán otras proteínas capaces de desenrollar la doble hélice. La enzima **DNA helicasa** se encarga de romper los puentes de hidrógeno entre cadenas complementarias (solo lo hará si se ha unido la proteína iniciadora al origen de replicación). Las bandas separadas volverían a unirse, si no fiera porque las proteínas de unión de cadena sencilla (**SSB**, del inglés *Single Strand*

Binding proteins) se unen rápidamente a las bandas sencillas impidiendo su reanillamiento. Otra enzima necesaria para la apertura de la hélice es la **DNA girasa**, una topoisomerasa que relaja la tensión que se va acumulando por la apertura de la horquilla (rompe la cadena de DNA, libera tensión y sella de nuevo la cadena).



Repeticiones ricas en AT: en esta zona donde tiene lugar la apertura de la cadena de DNA son ricas en adenina-timina (es una zona más débil donde es más fácil separa y desnaturalizar)

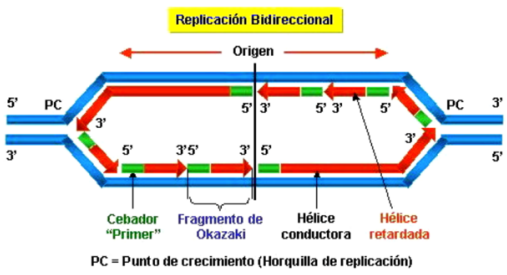
Inicio de la síntesis del DNA: cada vez que la **DNA polimerasa** comienza la replicación de un fragmento de DNA requiere un **cebador o primer de RNA** que aporte el 3' -OH de un nucleótido sobre el que seguirán uniéndose los demás. Este pequeño fragmento de RNA o primer de 10 o 12 ribonucleótidos va a ser sintetizado por la enzima **primasa** (un tipo de RNA polimerasa que, a diferencia de la DNA polimerasa, no necesita un 3' -OH para unir el primer nucleótido). La cadena continua solo necesitará una vez la acción de la primasa; sin embargo, la cadena retrasada necesitará que la primasa añada un primer cada vez que comience un nuevo fragmento de Okazaki.

Para que el proceso avance se requiere la acción de la topoisomerasa II (DNA girasa), la primasa y la DNA polimerasa III,

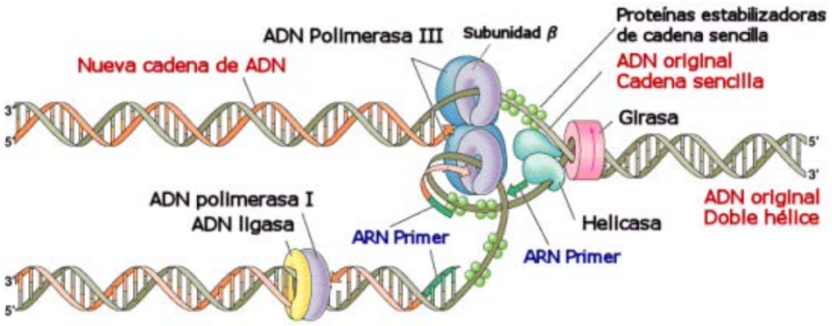
A AMBOS LADOS DE LA APERTURA:

DOS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN

Síntesis del DNA: una vez que comienza a trabajar las enzimas encargadas de abrir la horquilla de replicación y que la primasa ha colocado los primers, la DNA polimerasa podrá comenzar a sintetizar las nuevas hebras de DNA de las dos bandas.



Para que el proceso avance EN LA HEBRA RETARDADA el DNA tiene que invertir su sentido y hacerlo coincidir con el de avance de la maquinaria de replicación

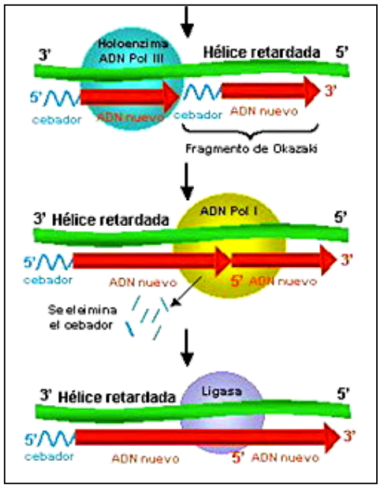


Esta maquinaria se mueve en dirección 5'-3', continuamente en la hebra. Por tanto, se trata de un proceso bidireccional:

*1. **La hebra conductora** no tiene ningún problema de replicación porque el sentido de avance de la horquilla de replicación coincide con el sentido de polimerización de la DNA polimerasa (5'-3'), por lo que a medida que se desenrolla el DNA se puede copiar la hebra conductora.*

*2. **La hebra retardada**, al ser antiparalela, el avance de la maquinaria de replicación es contrario a la dirección de síntesis de DNA de la DNA polimerasa, por lo que su síntesis se va a hacer a fragmentos (fragmentos de Okazaki: 1000-2000 nucleótidos).*

Para obtener DNA continuo en la HEBRA RETARDADA el DNA se requiere la acción de la DNA polimerasa I (traslación de la mella) y de la ligasa



DNA polimerasa I

Elimina el cebador de RNA con su actividad exonucleásica 5´-3´

Rellena el hueco del cebador con DNA con su actividad polimerásica 5´-3´ tomando como cebador el extremo 3´-OH del fragmento de Okazaki adyacente

Ligasa

Establece un enlace éster entre extremos 3´-OH y 5´-P de dos fragmentos de Okazaki consecutivos

Replicación en eucariotas

La replicación en células eucariota es más complicada y desconocida. Realmente, el proceso que acabamos de ver se puede aplicar también en eucariotas, ya que estas diferencias son menores.

- Tiene lugar en la **Fase S del ciclo celular**, regulado por ciclinas. Donde se produce la replicación del material genético, habrá una síntesis muy activa de histonas ya que tras fabricar el nuevo DNA hay que crear gran cantidad de nucleosomas.

- En las cel. eucariota hay **múltiples orígenes de replicación** (1000-10000) mientras que en procariota solo hay uno. Además, todos estos orígenes de replicación **no se activan al mismo tiempo**, la eucromatina aparece antes y se extiende a la heterocromatina. Zonas donde se suele promover la replicación son islotes CPG, zonas cerca de promotores, con presencia de tetraplex, sin histonas, etc.

- La **velocidad** en eucariota es **menor**, de unos **50 nucleótidos por segundo**, mientras que en las procariotas es de 1000.

- Los **fragmentos de Okazaki** en eucariota son **más cortos** (sobre **100 nucleótidos**).

- Las **DNA polimerasa** en eucariotas son **más numerosas** (la mayoría no están implicadas en la replicación, sino en funciones de reparación para así tener las mínimas mutaciones posibles:

    - α: **INICIA REPLICACION**. TIENE ACTIVIDAD PRIMASA ASOCIADA. Replica muy pocos nucleótidos (en la hebra retardada) y es sustituida por las dos últimas.
    - β: **reparación DNA.**
    - γ: **replicación DNA mitocondrial**
    - δ: **replicación hebra retardada formando el complejo-PCNA** [antígeno nuclear de las células en proliferación = subunidad beta para que no se separe durante la replicación (procesividad)]uniendo la polimerasa al DNA
    - ε: **replicación / reparación DNA de la hebra continua (complejo-PCNA)**

- Durante la replicación se tiene que desorganizar la estructura de los nucleosomas y volver a formarse cuando termine el proceso. Esta **unión de las histonas para formar el nucleosoma** se controla al inicio. Síntesis de histonas durante la fase S.

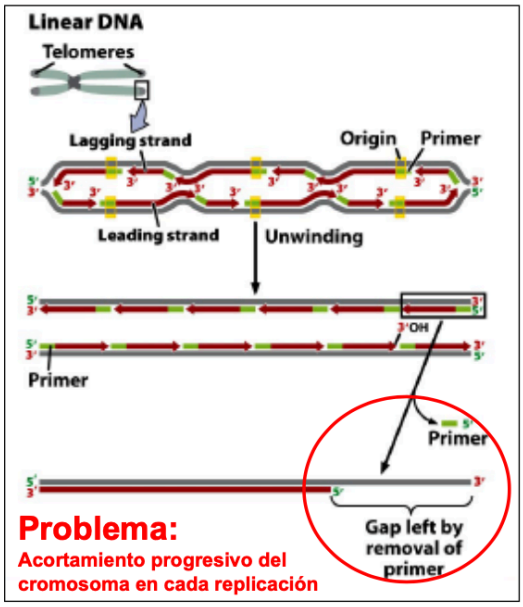
- **Control**: en el **inicio** (como en procariotas).

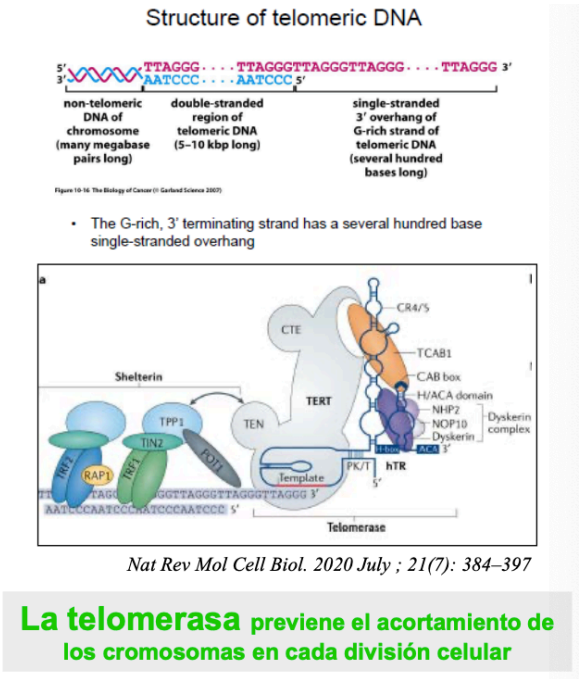
- **Telomerasas**: **replicación en los extremos de los cromosomas.**

Importancia de las telomerasas en la replicación en eucariotas

¿Cómo se resuelve la replicación de los extremos en una molécula lineal? La replicación de los **telómeros** (extremos del cromosoma) ha proporcionado nuevas claves para comprender la "fecha de caducidad" de las células.

Si se observa la horquilla de replicación avanzando hacia el extremo de un cromosoma, la banda retrasada habrá generado un primer complementario al extremo 3' -OH, que la DNA polimerasa correspondiente se encargará de retirar. Sin embargo, en este caso no hay un extremo 3' -OH libre para que la DNA polimerasa continue rellenando el espacio dejado al retirar el primer. Queda un extremo protuberante que debe ser rellenado por la enzima **telomerasa**, una ribozima (una porción protéica y otra de RNA).





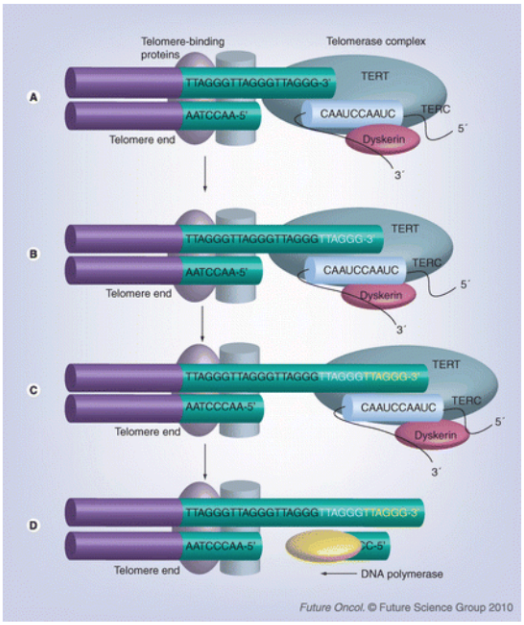
Los telómeros presentan secuencias repetitivas ricas en G y la porción de RNA de la telomerasa posee una secuencia de unos 15-20 ribonucleótidos que son complementarios aa este extremo protuberante. Esta porción de RNA sirve de molde para que la actividad polimerasa de la telomerasa sintetice DNA complementario al RNA de la propia enzima. De esta forma, se extiende el extremo del cromosoma impidiendo que se acorte cada vez que se replica.

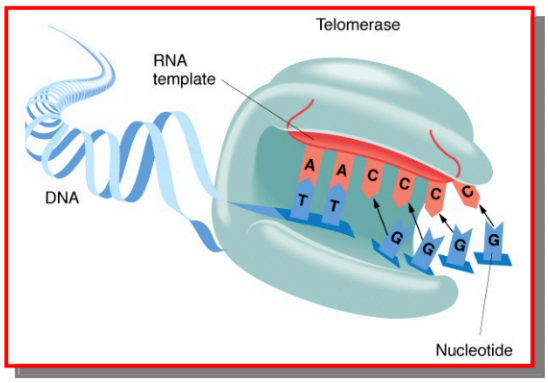
Estudios han indicado que las células que están en crecimiento presentan una alta actividad telomerasa, mientras que las células somáticas (al tener una baja actividad telomerasa) van sufriendo un acortamiento de los cromosomas hasta que la célula muere. Se podría decir que la fecha de caducidad de las células depende de la actividad de la telomerasa.

La mayoría de células germinales tienen una abundante cantidad de telomerasas.
Hay conexión entre los telómeros y el cáncer. La capacidad para mantener los telómero funcionales puede ser una de las razones del crecimiento indefinido.

La telomerasa impide el acortamiento de los cromosomas en cada división celular

Telomerasa: ribonucleoproteína con actividad transcriptasa reversa





Importancia en el envejecimiento y en el cáncer

Aplicación práctica de conocer el mecanismo de la replicación: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Técnica que se desarrolla a partir de la replicación y que nos permite obtener copias de DNA a partir de una sola molécula de DNA, es decir, **amplificar exponencialmente el DNA "in vitro"**. Esta técnica, se basa en conocer el mecanismo de la replicación y aplicarlo in vitro para replicar el DNA.

Para ello se coloca el DNA en un tubo de ensayo sometiéndole a cambios de temperatura en tiempos muy cortos (se da un proceso cíclico):

1. **Desnaturalización:** Se sube mucho la T para que se desnaturalicen las dos hebras del DNA.

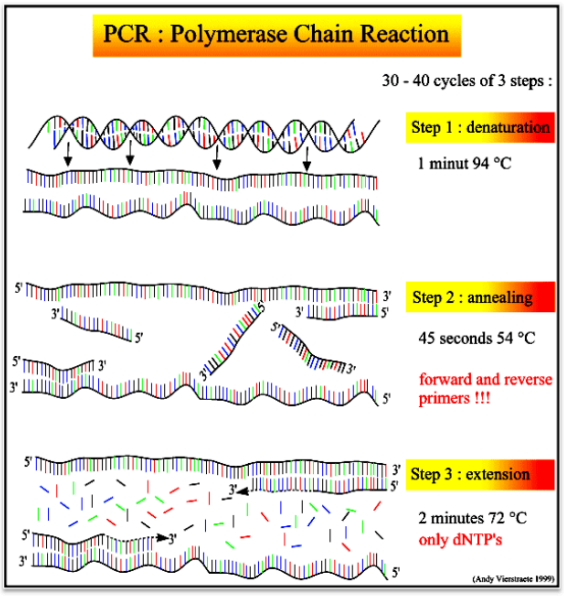
2. **Hibridación:** Se baja la T para que el DNA desnaturalizado hibride con los cebadores que hemos puesto.

3. **Polimerización:** Se sube la T para que se produzca la polimerización, es decir, se realiza la copia de DNA.

Este proceso se realiza en un **termociclador**.

El secreto es que se pone una DNA polimerasa de un organismo termófilo que aguanta las altas temperaturas (**Taq polimerasa**). Sus aplicaciones son ilimitadas (diagnóstico)

Hay muchas modalidades: RT (retrotranscripción: expresión génica), PCR en tiempo real (conservar las proporciones).



Amplificación exponencial del ADN "In vitro"

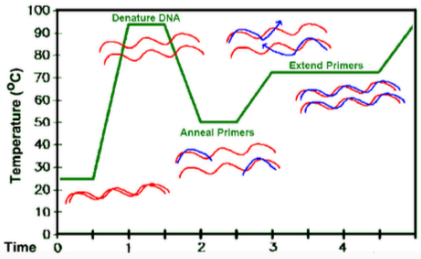
Proceso cíclico (tiempos muy breves):

- **Desnaturalización**
- **Hibridación**
- **Polimerización**

Automatizable: termociclador

Secreto: Taq polimerasa

Aplicaciones: ilimitadas (diagnóstico)



Modalidades: **RT-PCR, PCR en tiempo real**