

Tema 12. Replicación y reparación del genoma.

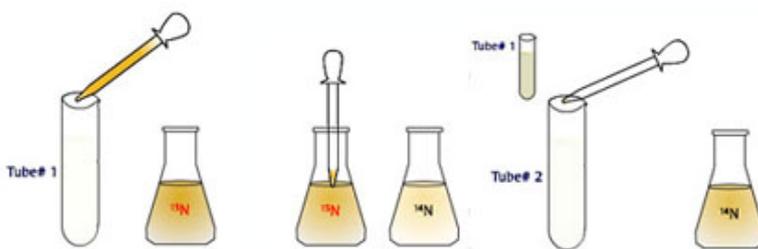
Replicación semiconservativa del DNA. Enzimología de la replicación. DNA polimerasa I. Otras polimerasas procariotas: características y función. DNA polimerasas eucarióticas. Orígenes de replicación. Iniciación de la replicación. Elongación de las cadenas de DNA. Replicación de los telómeros: telomerasa. Mutaciones, mutágenos y reparación del DNA.

BIOQUÍMICA-1º de Medicina
Dpto. Biología Molecular
Isabel Andrés

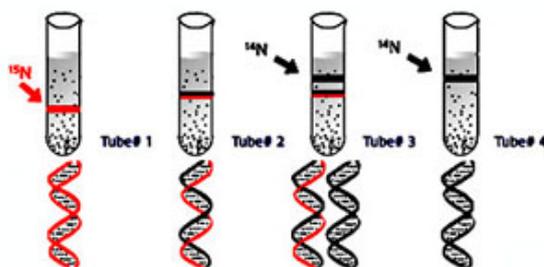


Replicación semiconservativa

Experimento de Meselson y Stahl



Se creció la bacteria *Escherichia coli*, durante muchas generaciones, en un medio que contenía un isótopo pesado del N (N^{15}). Al cabo de ese tiempo se tomó una muestra (tubo1). Las bacterias restantes se cambiaron a un medio con el isótopo ligero del N (N^{14}) y se recogieron muestras después de una generación (tubo2), 2 generaciones (tubo3), 3 generaciones (tubo4), etc.
El DNA aislado de cada tubo se centrifugó hasta el equilibrio en una solución que forma un gradiente de densidad y luego se determinó en qué posición bandea el DNA de cada tubo. La posición intermedia que ocupa el DNA aislado después de una generación indica que la replicación es semiconservativa y que cada molécula recién sintetizada está formada por una hebra antigua y una nueva.



Posiciones de bandeo de los DNAs

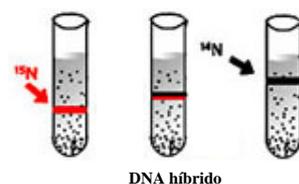


TABLA 25-1 Comparación de las DNA polimerasas de *E. coli*

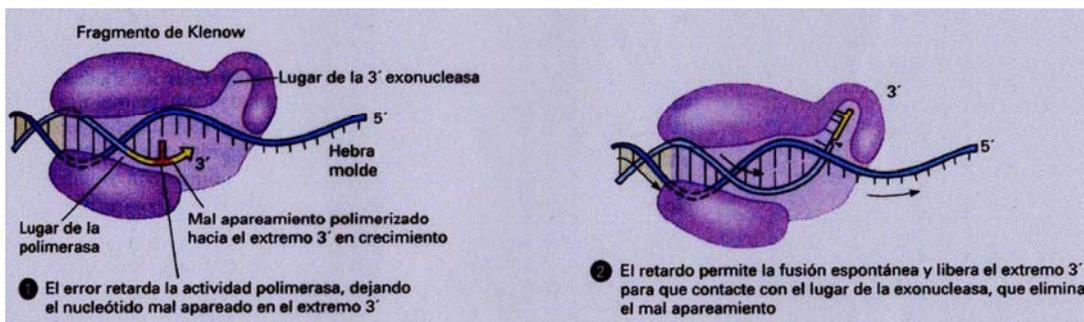
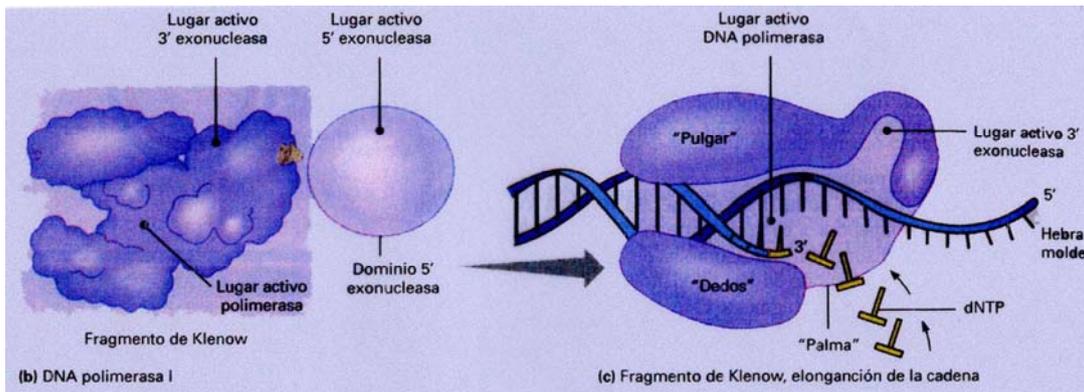
| | DNA polimerasa | | |
|--|----------------|---------------------|--------------------|
| | I | II | III |
| Gen estructural* | <i>polA</i> | <i>polB</i> | <i>polC (dnaE)</i> |
| Subunidades (número de tipos diferentes) | 1 | 7 | ≥10 |
| M_r | 103.000 | 88.000 [†] | 791.500 |
| Exonucleasa 3'→5' (correctora de pruebas) | Sí | Sí | Sí |
| Exonucleasa 5'→3' | Sí | No | No |
| Velocidad de polimerización (nucleótidos/s) | 16-20 | 40 | 250-1000 |
| Procesividad (nucleótidos añadidos antes de la disociación de la polimerasa) | 3-200 | 1500 | ≥500.000 |

*Para los enzimas con más de una subunidad, el gen citado codifica la subunidad con actividad polimerizante. *dnaE* es una designación anterior del gen denominado actualmente *polC*.

[†]Se refiere solamente a la subunidad polimerizante. La DNA polimerasa II comparte varias subunidades con la DNA polimerasa III, entre ellas las subunidades β , γ , δ , δ' , χ y ψ (véase Tabla 25-2).



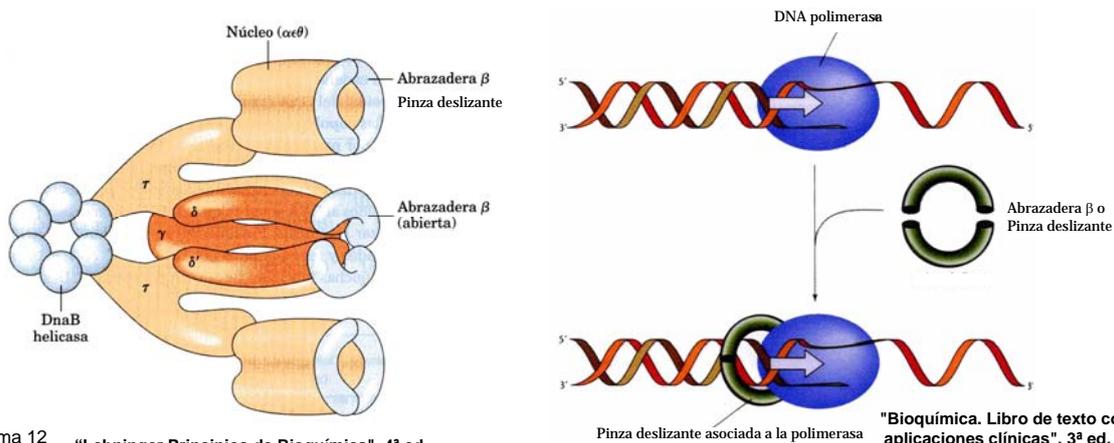
Actividad polimerizante y correctora de errores de la DNA polimerasa I



Estructura de la DNA polimerasa III

TABLA 25-2 Subunidades de la DNA polimerasa III de *E. coli*

| Sub-unidad | Número de subunidades por holoenzima | M _r de la subunidad | Gen | Función de la subunidad | |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---|---|
| α | 2 | 129.900 | <i>polC (dnaE)</i> | Actividad polimerizante | Polimerasa núcleo |
| ϵ | 2 | 27.500 | <i>dnaQ (mutD)</i> | Actividad exonucleasa 3'→5' correctora de pruebas | |
| θ | 2 | 8600 | <i>holE</i> | Unión estable del molde; dimerización del enzima núcleo | Complejo de carga de la abrazadera (γ) que carga las subunidades β en la hebra rezagada en cada fragmento de Okazaki |
| τ | 2 | 71.100 | <i>dnaX</i> | | |
| γ | 1 | 47.500 | <i>dnaX^c</i> | Cargador de la abrazadera | |
| δ | 1 | 38.700 | <i>holA</i> | Abridor de la abrazadera | |
| δ' | 1 | 36.900 | <i>holB</i> | Cargador de la abrazadera | |
| χ | 1 | 16.600 | <i>holC</i> | Interacción con SSB | |
| ψ | 1 | 15.200 | <i>holD</i> | Interacción con γ y χ | |
| β | 4 | 40.600 | <i>dnaN</i> | Abrazadera del DNA necesaria para una procesividad óptima | |



Tema 12 "Lehninger Principios de Bioquímica", 4ª ed. Nelson, D.L. y Cox, M.M. Omega. 2006

"Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas". 3ª ed. Devlin, T.M. Ed. Reverté. 2000

5

DNA polimerasas eucariotas

Tabla 24.3. Propiedades de las DNA polimerasas de los eucariotas

| | α | β | γ | δ | ϵ |
|-----------------------------------|--|--------------------|----------------------------------|--|------------|
| Compartimiento celular | Núcleo | Núcleo | Mitocondria | Núcleo | Núcleo |
| Primasa asociada | Sí | No | No | No | No |
| Función biológica | * Replicación de hebra retardada (adición de primeros) | Reparación del DNA | Replicación del DNA mitocondrial | * Replicación de la hebra conductora hebra retardada | Reparación |
| Número de subunidades | 4 | 1 | 4 (idénticas) | 2 | ? |
| Procesividad (intrínseca) | Moderada | Baja | Alta | Baja | Alta |
| Procesividad (con PCNA) | Moderada | Baja | Alta | Alta | Alta |
| 3' exonucleasa | No | No | Sí | Sí | Sí |
| Homólogo en <i>E. coli</i> | PRIMASA | DNApol II | ----- | DNApol III | DNApol I |

- DNApol α añade los primeros y 10-15 d-ribonucleótidos
- DNApol δ completa el fragmento de Okazaki y sintetiza la hebra conductora
- DNApol ϵ rellena los huecos que dejan los primeros al ser eliminados



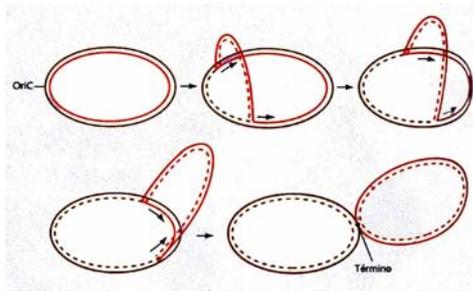
Tema 12

"Bioquímica" 2ª ed. Mathews, C.K. Van Holde, K.E. y Ahern, K.G. Ed. Addison Wesley. 1998.

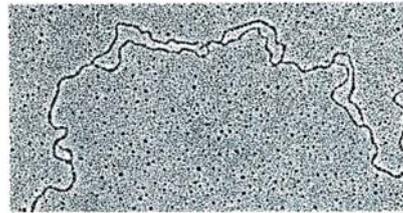
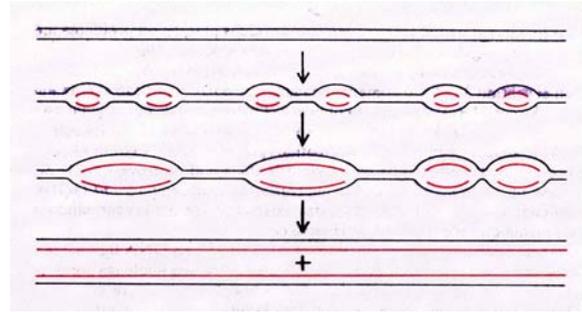
6

Orígenes de replicación en organismos procariotas y eucariotas

En organismos **procariotas** la replicación tiene lugar de forma bidireccional desde un único origen.



Los organismos **eucariotas** replican su material genético de forma bidireccional desde muchos orígenes.



Tema 12 "Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas". 3ª ed. Devlin, T.M. Ed. Reverté. 2000.

"Bioquímica". 3ª ed. Stryer, L. Ed. W.H. Reverté. 1988.

7

Proteínas necesarias para la replicación de *Escherichia coli*

TABLA 25-3 Proteínas requeridas para iniciar la replicación en el origen de *E. coli*

| Proteína | M_r | Número de subunidades | Función |
|--|---------|-----------------------|---|
| Proteína DnaA | 52.000 | 1 | Reconoce la secuencia origen; abre el dúplex en sitios específicos del origen |
| Proteína DnaB (helicasa) | 300.000 | 6* | Desenrolla el DNA |
| Proteína DnaC | 29.000 | 1 | Requerida para la unión de DnaB en el origen |
| HU | 19.000 | 2 | Proteína tipo histona; proteína de unión al DNA; estimula el inicio |
| Primasa (proteína DnaG) | 60.000 | 1 | Sintetiza cebadores de RNA |
| Proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) | 75.600 | 4* | Se une al DNA de cadena sencilla |
| RNA polimerasa | 454.000 | 5 | Facilita la actividad de la DnaA |
| DNA girasa (DNA topoisomerasa II) | 400.000 | 4 | Libera la tensión torsional generada por el desenrollamiento del DNA |
| Dam metilasa | 32.000 | 1 | Metila secuencias (5')GATC en <i>oriC</i> |

*En estos casos las subunidades son idénticas

TABLA 25-4 Proteínas de la horquilla de replicación de *E. coli*

| Proteína | M_r | Número de subunidades | Función |
|-----------------------------------|---------|-----------------------|--|
| SSB | 75.600 | 4 | Unión a DNA de cadena sencilla |
| Proteína DnaB (helicasa) | 300.000 | 6 | Desenrollamiento del DNA; componente del primosoma |
| Primasa (proteína DnaG) | 60.000 | 1 | Síntesis de RNA cebador; componente del primosoma |
| DNA polimerasa III | 791.500 | 17 | Elongación de la cadena nueva |
| DNA polimerasa I | 103.000 | 1 | Relleno de huecos, eliminación de cebadores |
| DNA ligasa | 74.000 | 1 | Ligación |
| DNA girasa (DNA topoisomerasa II) | 400.000 | 4 | Superenrollamiento |

Modificado de Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA Replication*, Tabla S11-2, W. H. Freeman and Company, New York.

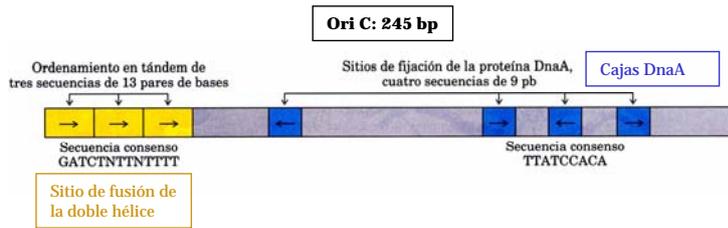


Tema 12

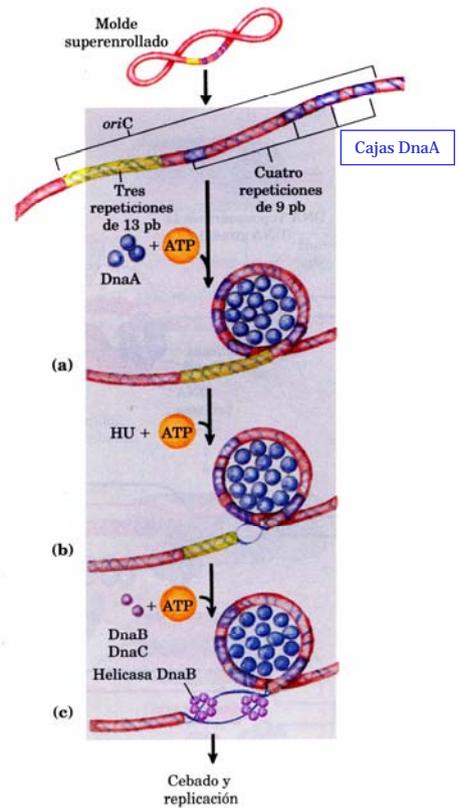
"Lehninger Principios de Bioquímica", 4ª ed. Nelson, D.L. y Cox, M.M. Omega. 2006

8

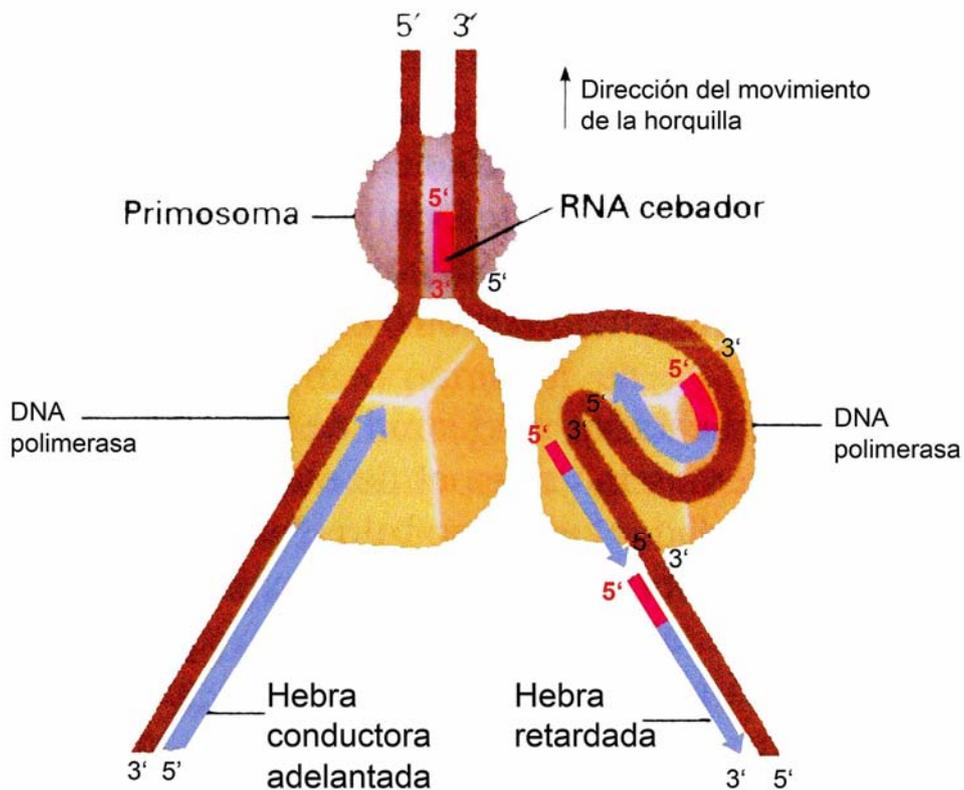
Iniciación de la replicación del DNA



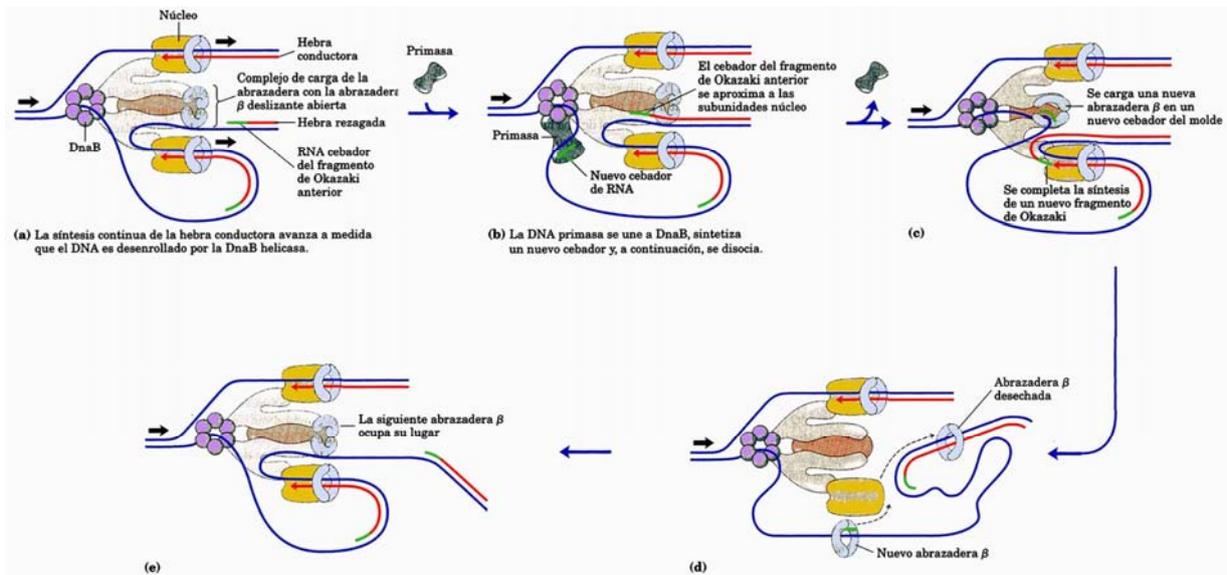
La unión de DnaA a sus sitios de fijación y la fusión de la doble hélice promueve la asociación secuencial de una serie de proteínas que desenrollan el DNA y forman la horquilla de replicación. Una vez que la helicasa DnaB, ayudada por la proteína DnaC se sitúa en la burbuja de replicación la primasa DnaG se une al complejo, formando el "primosoma". La unión posterior de la DNA pol III origina el "replisoma" que lleva a cabo la replicación de todo el DNA.



Mecanismo de replicación de las hebras adelantada y rezagada del DNA



Elongación de la cadena rezagada

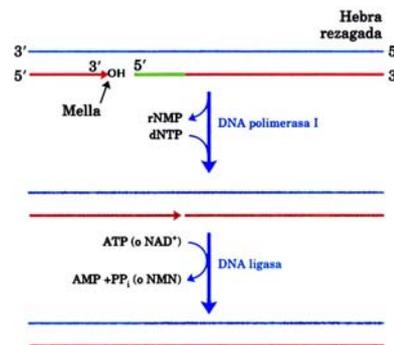


La elongación de la cadena rezagada requiere la participación de varias proteínas:

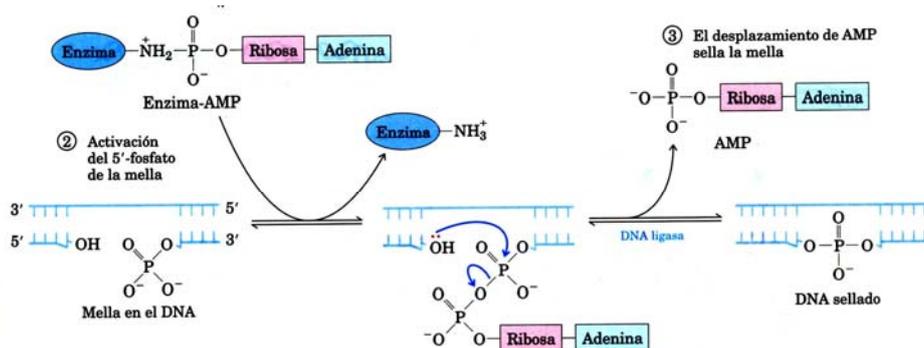
- Primasa que se asocia a la helicasa DnaB
- Complejo de carga de la abrazadera
- Abrazadera o pinza deslizante
- Núcleo de la DNA pol III



Unión de los fragmentos de Okazaki



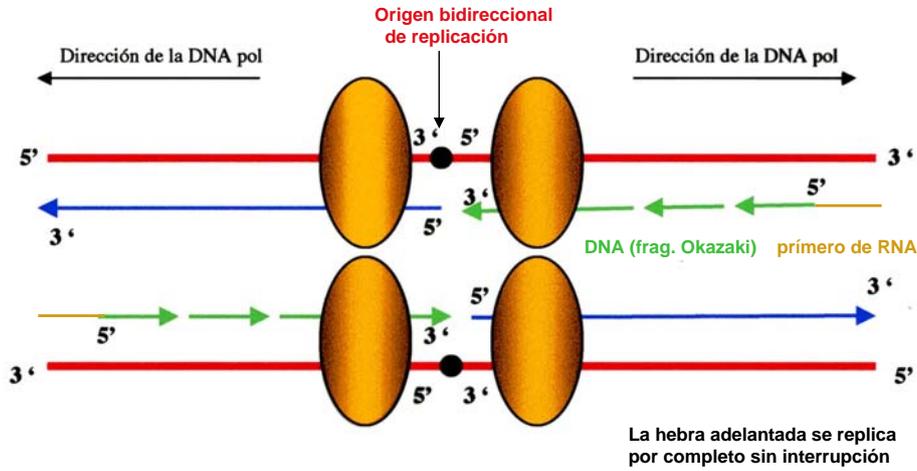
Actuación de la DNA ligasa



Acortamiento de los Telómeros

¿Porqué se acortan los telómeros?

Los telómeros tienden a acortarse, en cada ronda de replicación en la hebra rezagada, porque la DNApol no puede actuar sin primero y la primasa no puede colocar un primero más externo si no tiene un molde de DNA

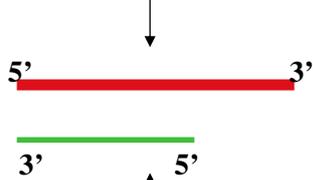


Acortamiento de los Telómeros

Si no actúa la Telomerasa, en cada ronda de replicación se generan un cromosoma más corto y otro con la hebra recién sintetizada más corta



El primero es eliminado



La hebra de nueva síntesis es más corta que la molde.

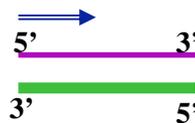
Cada vez que sirva de molde en la siguiente ronda de replicación originará un cromosoma más corto que el original

La hebra original volverá a generar una hebra más corta



La hebra roja originará siempre una hebra más corta que la original

La hebra morada originará siempre un cromosoma más corto que el inicial

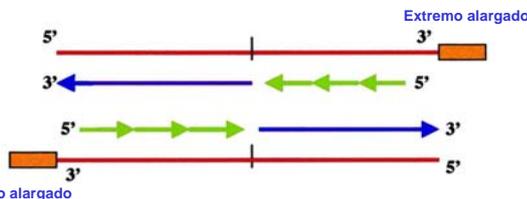


La hebra morada dará un cromosoma aún más corto

La hebra verde dará un cromosoma tan corto como es ella

La flecha indica la dirección de síntesis del DNA

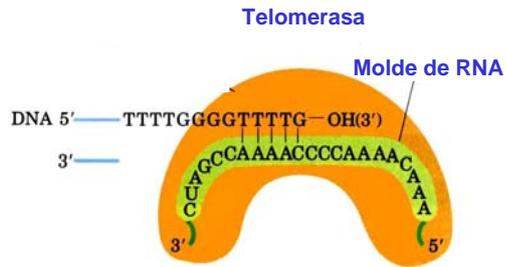
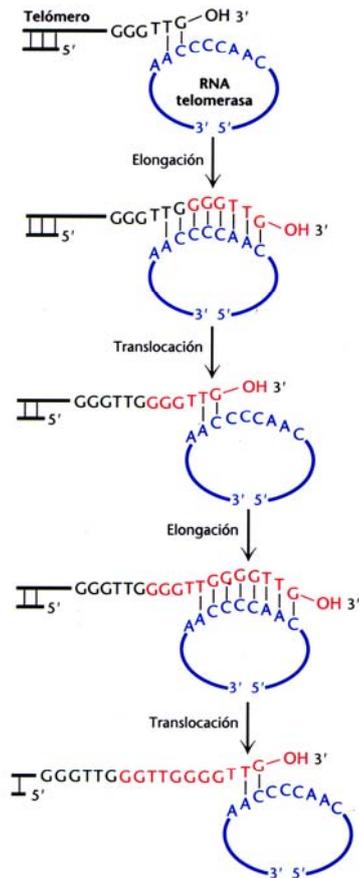
Las líneas de trazo fino indican el DNA recién sintetizado



La Telomerasa añade secuencias teloméricas en el extremo 3' de las dos hebras molde. Este alargamiento permite a la Primasa añadir un primero más externo sobre el que la DNApol puede añadir dNTPs



Alargamiento del telómero por la Telomerasa



La molécula de RNA de la Telomerasa sirve de molde para añadir repeticiones de 6 nucleótidos al extremo 3' de los telómeros.
La subunidad catalítica de la Telomerasa es inactiva en la mayor parte de las células somáticas de los mamíferos aunque se mantiene activa en las células germinales.

¿Qué consecuencias tiene el acortamiento de los telómeros?

En cada ronda de replicación se van perdiendo secuencias teloméricas y los cromosomas se hacen inestables: se unen a otros cromosomas o sufren grandes reorganizaciones que alteran el material genético

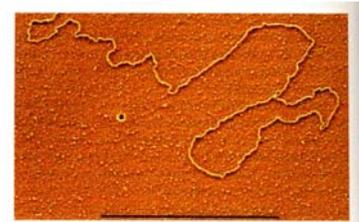


Tema 12

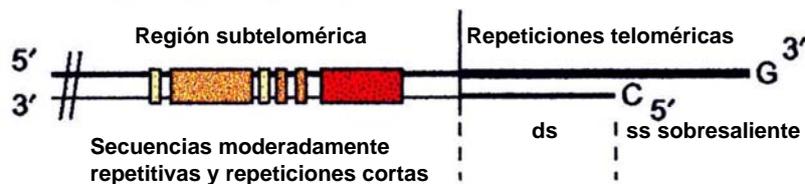
“Bioquímica”. 5ª ed. Berg, J., Tymoczko, J. Stryer, L. Ed. W.H. Reverté. 2003.

15

Estructura del telómero



1. El telómero replicativo



H. Sapiens

5 -- 15 Kb

300 nt TTAGGG

“cadena rica en Gs” (T₂AG₃)



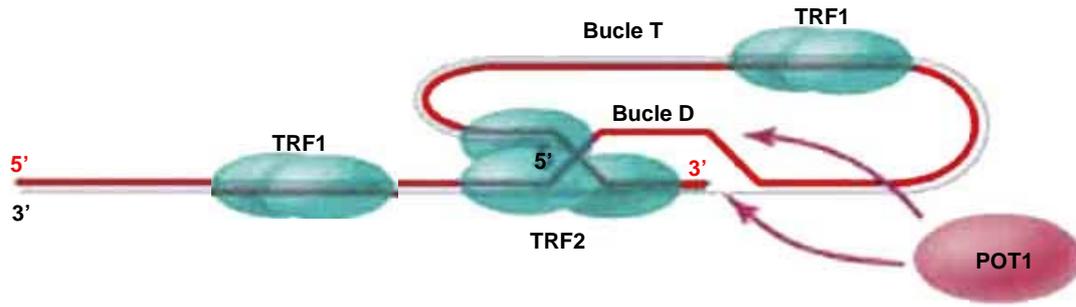
Tema 12

“Lehninger Principios de Bioquímica”, 4ª ed. Nelson, D.L. y Cox, M.M. Omega. 2006

16

Estructura del telómero protegido

2. Estructura del telómero protegido



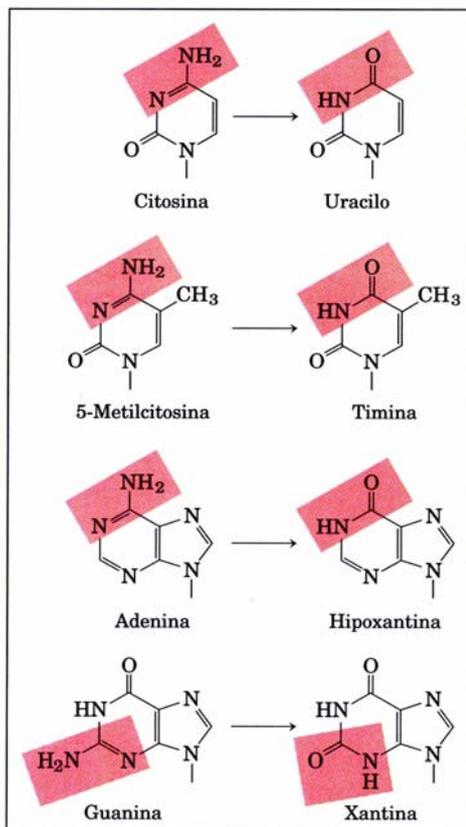
TRF2: formación del bucle T

TRF1: mide de la longitud del telómero

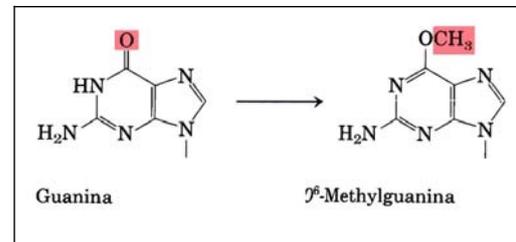
POT1: controla el acceso de la telomerasa al extremo 3'

} control de la longitud del telómero

Modificación de bases por agentes químicos

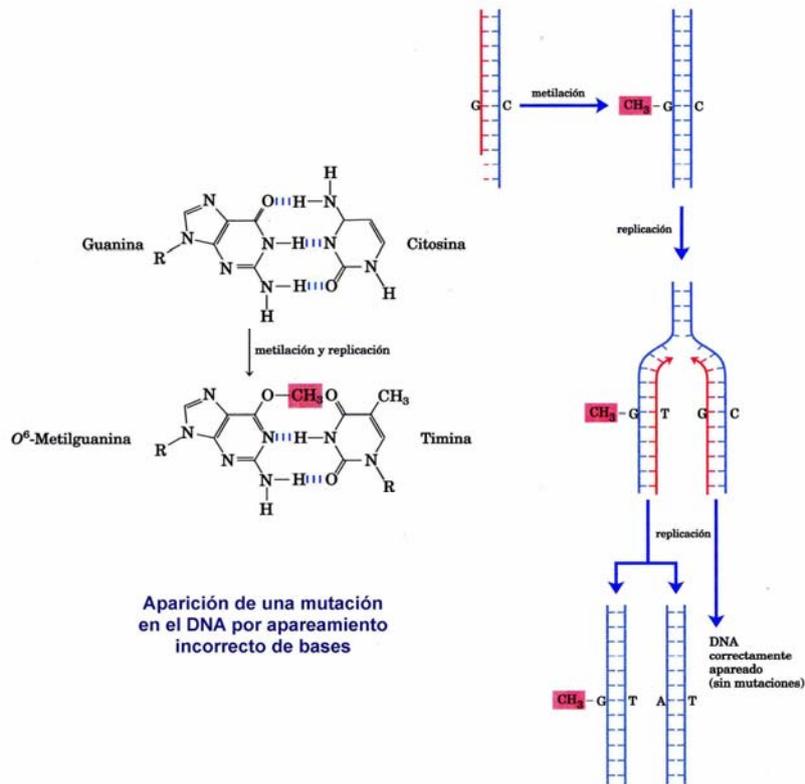


Desaminación



Metilación

Efecto de la aparición de mutaciones puntuales en el DNA

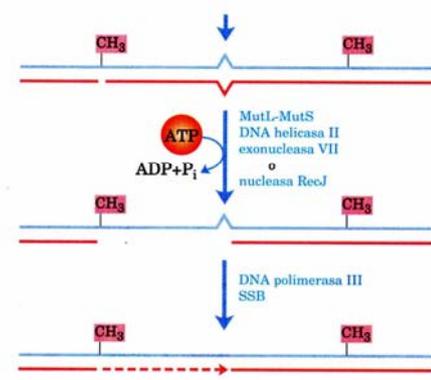
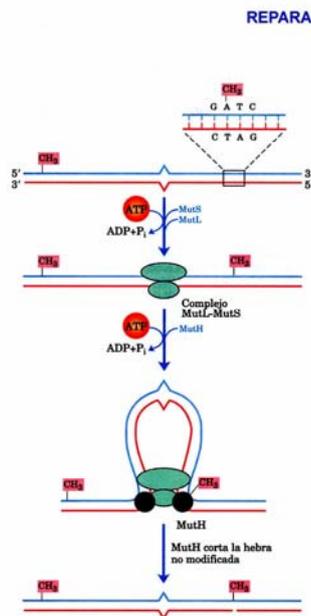
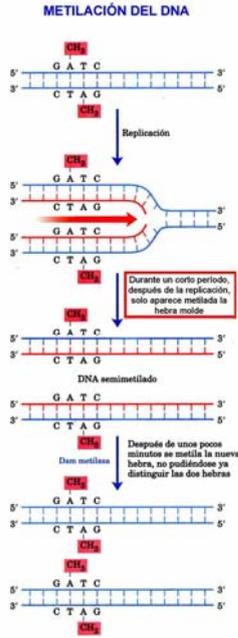


Tipos de sistemas de reparación del DNA en *E. coli*

| Enzimas/proteínas | Tipo de lesión |
|---|--|
| Reparación de apareamientos incorrectos | |
| Metilasa Dam | Apareamientos incorrectos |
| Proteínas MutH, MutL, MutS | |
| DNA helicasa II | |
| SSB | |
| DNA polimerasa III | |
| Exonucleasa I | |
| Exonucleasa VII | |
| Nucleasa RecJ | |
| Exonucleasa X | |
| DNA ligasa | |
| Reparación por escisión de base | |
| DNA glucosilasas | Bases no habituales (uracilo, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; dímeros de pirimidina en algunos otros organismos |
| AP endonucleasas | |
| DNA polimerasa I | |
| DNA ligasa | |
| Reparación por escisión de nucleótido | |
| ABC excinucleasa | Lesiones del DNA que causan importantes cambios estructurales (p. ej., dímeros de pirimidina) |
| DNA polimerasa I | |
| DNA ligasa | |
| Reparación directa | |
| DNA fotoliasas | Dímeros de pirimidina |
| O ⁶ -Metilguanina-DNA metiltransferasa | O ⁶ -Metilguanina |



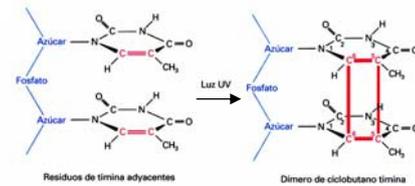
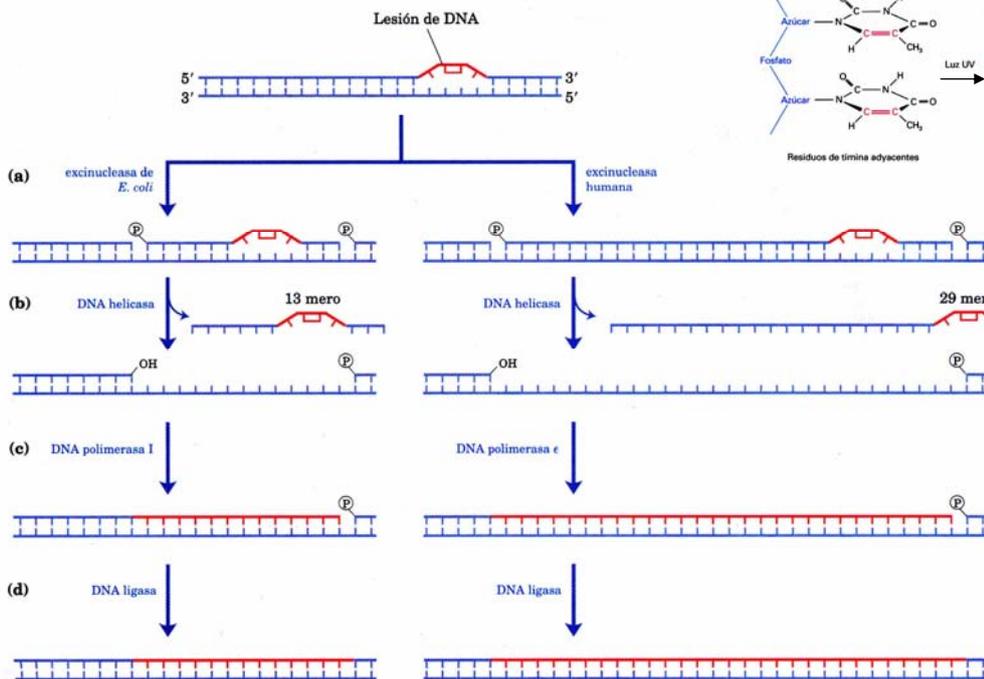
Reparación de errores cometidos durante la replicación



La reparación es posible porque la hebra molde está marcada previamente por metilación de la A de todas las secuencias GATC presentes en ella



Reparación de dímeros de Timina

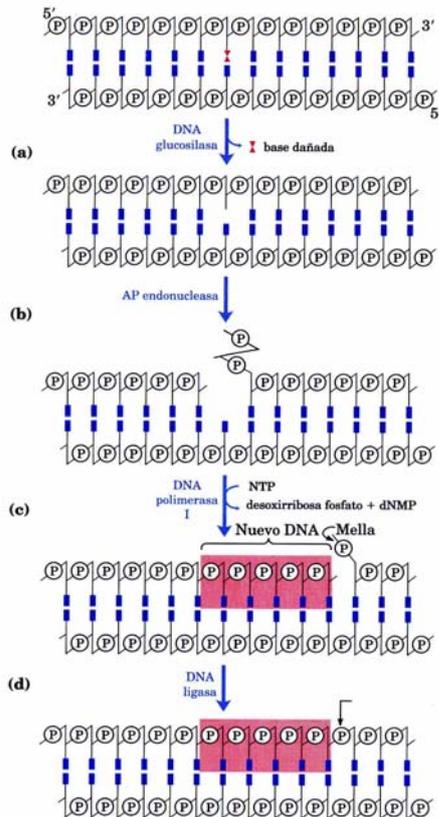


La **excinucleasa** se diferencia de las demás nucleasas en que corta la hebra dañada por dos puntos, en 5' y en 3' de la lesión

Tanto *E.coli* como el hombre poseen sistemas homólogos para reparar este tipo de lesión



Reparación por pérdida de bases



La acción de los agentes químicos da lugar a la aparición de bases dañadas que son eliminadas por **DNA glucosilasas específicas**

La hidrólisis espontánea también conduce a la pérdida de bases o apurinización

A diferencia de las escinucleasas las **endonucleasas AP** solo cortan la hebra dañada por un punto situado en 5' de la lesión

La **DNApol I** en organismos procariontas y la **DNApol** en organismos eucariotas van eliminando nucleótidos y rellenando el hueco hasta rebasar la lesión.

Finalmente la **DNA ligasa** sella los dos extremos de la cadena de DNA