

## REPLICACIÓN DEL ADN

### INTRODUCCIÓN

La unidad básica de información en los seres vivos es el **gen**, definido en células eucariotas como un segmento de ADN que lleva la información necesaria para la síntesis de una proteína o de un ARN. La cantidad, tamaño y distribución de los genes varía según la especie analizada. En el hombre, el número de genes que codifican proteínas se calcula que es tan sólo el 3 % del ADN; siendo el resto, secuencias reguladoras y estructurales.

La comprensión de los mecanismos de almacenamiento y de las formas de utilización de la información ha servido para poder aclarar muchas de las incógnitas planteadas sobre la estructura y la función celular. La célula realiza esta actividad a través de las rutas de la información genética; estas vías constituyen el principio fundamental de la genética molecular. Son tres procesos denominados:

- a) **Replicación** o copia del ADN paterno para formar moléculas de ADN hijas idénticas a su progenitor, e idénticas entre sí.
- b) **Transcripción** o copia de la información de una parte del ADN a moléculas de ARN.
- c) **Traducción** o copia de la información genética del ARN a la secuencia aminoacídica específica de una proteína.

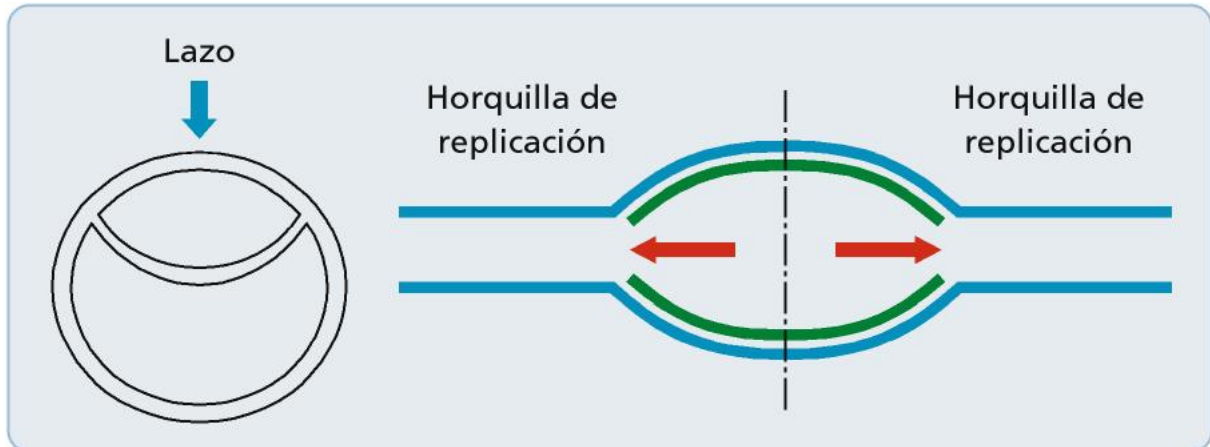
### REPLICACIÓN DEL ADN

Las propiedades de la replicación son básicamente iguales en todos los seres vivos, y siendo así que la mayoría de los estudios se han realizado en *Escherichia coli*, se describirá el proceso a nivel del organismo bacteriano; y a continuación, se indicarán algunas características propias de organismos eucariotas.

#### Principales características de la replicación

- 1) La replicación es un proceso semiconservador.  
Cada cadena de la molécula de ADN parental actúa de molde para la síntesis de una nueva cadena produciéndose dos nuevas moléculas de ADN, cada molécula nueva posee una cadena vieja y una nueva.

- 2) La replicación comienza en un punto del ADN.



Las dos cadenas de ADN se replican al mismo tiempo y comienzan en un punto denominado origen. En dicho punto el ADN parental se desenrolla y forma una estructura de lazo cuyos extremos se denominan **horquillas de replicación**. En el caso del cromosoma circular bacteriano, el punto inicial de la replicación es un gen denominado oriC.

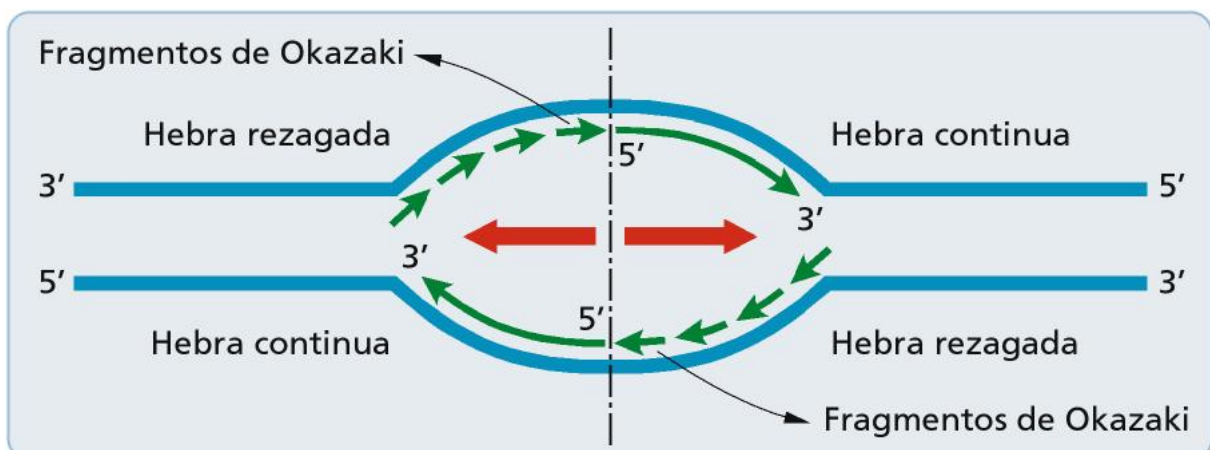
- 3) La replicación es bidireccional.

Comenzada en un punto de la molécula de ADN el proceso se desarrolla hacia los dos extremos de la cadena; en cada lazo, los extremos u horquillas de replicación avanzan en el proceso de síntesis hasta completar la copia.

- 4) La síntesis de ADN se desarrolla en dirección 5' → 3'.

La dirección en que actúan las enzimas es fija y única de 5' a 3'. Esto determina que la cadena *molde* ha de tener la dirección 3'→5', para que la nueva cadena en formación, complementaria y antiparalela tenga la dirección 5' →3' coincidente con el sistema de trabajo de la enzima. Al ser la horquilla de replicación bidireccional, el sistema descrito implicaría que la otra cadena parental 5'→3' debería estar siendo copiada en dirección 3'→5', situación imposible debido a la limitación de las enzimas sintéticas. Este problema es obviado debido a que,

- 5) La síntesis de ADN es semidiscontinua.

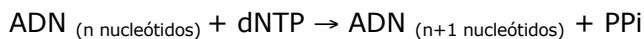


En una cadena, la inicialmente comentada en el punto anterior, la replicación es continua y en la segunda la síntesis es discontinua. Esta solución fue descrita por *Reiji Okazaki* quien encontró que en el procedimiento de copia de las dos cadenas del ADN parental, se formaba una cadena nueva continua (también denominada conductora) en la que la síntesis se desarrolla en la misma dirección de la enzima o de la horquilla de replicación; mientras que la otra cadena nueva era discontinua (también denominada cadena rezagada o retrasada) ya que su síntesis se realizaba en contra de la dirección de la horquilla mediante fragmentos, **los fragmentos de Okazaki**, secuencias formadas por unos centenares o miles de nucleótidos dependiendo de la célula.

## ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA REPLICACIÓN

### ADN polimerasas

La reacción básica que tiene lugar en la replicación es una reacción de polimerización, de formación de un enlace fosfodiéster entre nucleótidos. En una cadena de ADN en crecimiento se incorpora un nucleótido cuya base es la complementaria a la de la cadena molde. Los nucleótidos que se incorporan han de hacerlo en su forma activada o nucleótido trifosfatados (dNTP). La reacción que tiene lugar es la siguiente:



La reacción de polimerización es termodinámicamente favorable por la hidrólisis del pirofosfato; pero no sólo por el desdoblamiento del pirofosfato, sino también por las interacciones no covalentes que se establecen entre las bases. Esta reacción es catalizada por varias enzimas, las ADN-polimerasas, cada una con un tipo de actividad muy específica pero con una serie de requisitos de funcionamiento comunes, que son:

- 1) Necesitan una cadena de **ADN molde**, el proceso de replicación es dirigido por la cadena de ADN molde, y sigue el principio de complementariedad de bases fijando el nucleótido que debe incorporarse a la cadena en formación según tal regla.

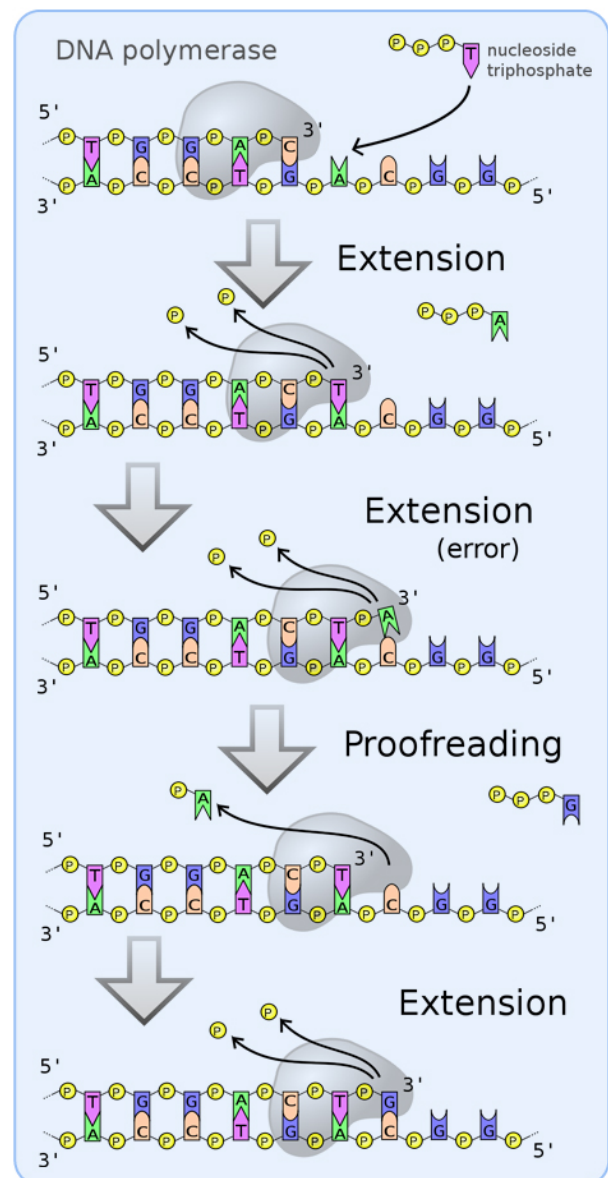
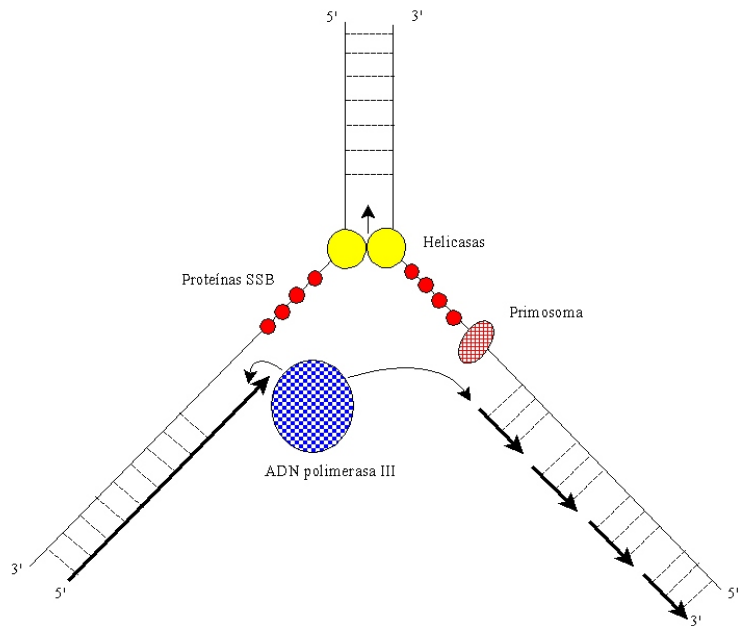


Diagram of DNA polymerase extending a DNA strand and proof-reading (© Madeleine Price Ball).

2) Necesitan un **cebador**, la polimerización que realizan estas enzimas requiere que exista una cadena previa inicial (cebador) ya que son incapaces de coger sobre su centro activo dos nucleótidos individuales y comenzar la síntesis. Uno de los sustratos necesarios de la reacción es, por tanto, una cadena preexistente, y ninguna de estas enzimas es capaz de iniciar la síntesis de una cadena nueva desde su primer nucleótido.



3) Su dirección de síntesis es fija de **5' → 3'**, esto significa que adicionan nucleótidos a la cadena siempre por un extremo fijo, el extremo 3'. O bien, que de los dos extremos del nucleótido libre que se va a incorporar, utilizan su grupo fosfato o extremo 5' para añadirlo a la cadena en crecimiento.

4) La velocidad con que adicionan nucleótidos, o **procesividad**, se mide como el número de nucleótidos incorporados en la unidad de tiempo y es una característica propia de cada polimerasa.

Una cualidad de todas las ADN-polimerasas es la precisión con que realizan la replicación, estimándose en *Escherichia coli* que se comete un error en uno de cada  $10^9$  a  $10^{10}$  nucleótidos, lo cual en el cromosoma de *Escherichia coli* supone un error cada 1.000 a 10.000 replications. Estos errores son corregidos por las mismas polimerasas mediante una actividad enzimática independiente, la actividad exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$ ; esta actividad les permite eliminar el último nucleótido incorporado si éste es erróneo, para a continuación, seguir con la polimerización. Esta capacidad de corrección, mediante la discriminación entre bases correctas e incorrectas, mejora la precisión de la replicación. Si se añade el hecho de que, además, existen otros sistemas de corrección que actúan después de acabada la replicación, puede observarse la fidelidad y garantía del proceso.

Existen tres polimerasas denominadas **ADN polimerasa I** (la primera que se describió), **ADN polimerasa II** y **ADN polimerasa III**. Si se comparan algunas características diferenciales entre ellas, se puede observar que la ADN polimerasa III es la más compleja. Está formada por diez subunidades diferentes y tiene una capacidad de polimerización infinitamente superior a cualquiera de las otras dos, siendo, por tanto, la principal enzima de la replicación.

La ADN polimerasa I es importante por su tarea de corrección, capaz de realizarla tanto en la dirección descrita como en la dirección contraria, debido a que posee la actividad exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$ , careciendo de la misma el resto de polimerasas.

### Otros enzimas que participan en el proceso de replicación

Para la replicación se necesitan, aparte de las ADN polimerasas descritas, alrededor de 20 proteínas diferentes, el conjunto de las mismas se denomina sistema ADN replicasa o replisoma ya que aunque no formen una unidad física, constituyen una unidad funcional.

Dentro de las enzimas que participan están:

- 1) Helicasas**, enzimas que separan las dos cadenas de la molécula de ADN parental. Desplazándose a lo largo de la molécula de ADN eliminan los enlaces entre las cadenas consumiendo en el proceso ATP.
- 2) Topoisomerasas**, enzimas que desenrollan el ADN y lo relajan. Existen cuatro topoisomerasas (I a IV) que actúan eliminando superenrollamientos negativos; o bien induciéndolos, dependiendo del grado de plegamiento que tenga el ADN en su estado natural.
- 3) Proteínas fijadoras de ADN**, proteínas que estabilizan las cadenas separadas uniéndose a ellas.
- 4) Primasas**, enzimas que sintetizan el cebador, éste suele ser un corto fragmento de ARN, necesario para que pueda comenzar la ADN polimerasa III, y que posteriormente será eliminado y sustituido por un fragmento de ADN por la ADN polimerasa I.
- 5) ADN ligasas**, enzimas que se encargan de unir trozos formados de cadenas, realizando un enlace fosfodiéster entre los nucleótidos pertenecientes a dos segmentos de una cadena.

Todas estas enzimas participan en el proceso de la replicación de forma coordinada, permitiendo que se desarrolle de una manera secuencial y organizada.

## FASES DE LA REPLICACIÓN

Se pueden distinguir tres fases según las enzimas que participan en las mismas:

### 1. Fase de inicio

El origen de la replicación es una porción de ADN que contiene una secuencia característica de bases. Este segmento es reconocido por una proteína denominada ADN-A.

### 2. Fase de elongación

La elongación consiste en la formación del cebador y la síntesis de la cadena de ADN. El proceso se caracteriza por no desarrollarse de forma idéntica en ambas hebras. La síntesis en la cadena conductora o continua requiere únicamente que actúe la primasa formando un cebador de ARN de unos 10 a 60 nucleótidos, para a continuación penetrar la ADN polimerasa III y realizar la polimerización de desoxirribonucleótidos.

En la cadena retrasada se forma un conjunto proteico en el que se localizan siete proteínas distintas además de la primasa (primosoma). Este grupo se desplaza a lo largo del molde de la hebra retrasada en dirección 5' → 3' sintetizando a intervalos un corto cebador de ARN, al que se unirá ADN formado por la ADN polimerasa III. El hecho de que las direcciones de trabajo de la primasa y la polimerasa sean contrarias a la dirección de crecimiento de la hebra, y de que el proceso sea uniforme en ambas hebras, viene justificado por el hecho de que la ADN polimerasa III es una proteína dimérica. Esta enzima obliga a la cadena molde de la hebra retrasada a formar un bucle sobre la misma. De esta forma, la dirección de síntesis es la misma en ambas hebras. Al ir desarrollándose la polimerización el bucle aumenta hasta contactar con el fragmento de Okazaki previo, forzando a la polimerasa a separarse o disociarse y a recomenzar de nuevo el proceso dónde se ha formado el nuevo cebador y ella creará el nuevo bucle.

En una fase posterior se eliminan los segmentos de ARN cebador, por acción de la actividad exonucleasa 5' → 3' de la ADN polimerasa I, quien también se encarga de rellenar los trozos ocupados por el cebador. Por último, la ADN ligasa une los segmentos catalizando la formación de un enlace fosfodiéster.

### 3. Fase de terminación

En el caso de *Escherichia coli* con un cromosoma circular, las dos horquillas de la replicación se encuentran en el extremo contrario al origen terminando así la replicación y necesitando, únicamente, la presencia de una topoisomerasa para la separación de las dos moléculas.

## **REPLICACIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS**

Las moléculas de ADN en células eucariotas son mucho mayores y más complejas ya que el proceso de la replicación es bastante más complicado.

Los orígenes de la replicación son secuencias mayores, en levaduras de unos 400 pares de bases, que se presentan en varios puntos de los cromosomas. La velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación es de unos 50 nucleótidos por segundo, una velocidad relativamente baja si se compara con la de los procariotas (10 veces mayor). Para incrementar la velocidad global del proceso, en eucariotas existen varios puntos de origen sobre la misma molécula de ADN, estando separados entre 30.000 y 300.000 pares de bases. La presencia de múltiples horquillas de replicación acelera el proceso, y permite que la replicación en eucariotas se desarrolle a velocidades mayores que en los procariotas.

Los fragmentos de Okazaki en el ADN eucariota son más cortos, generalmente contienen 135 nucleótidos, debido a que la horquilla de replicación se mueve más despacio.

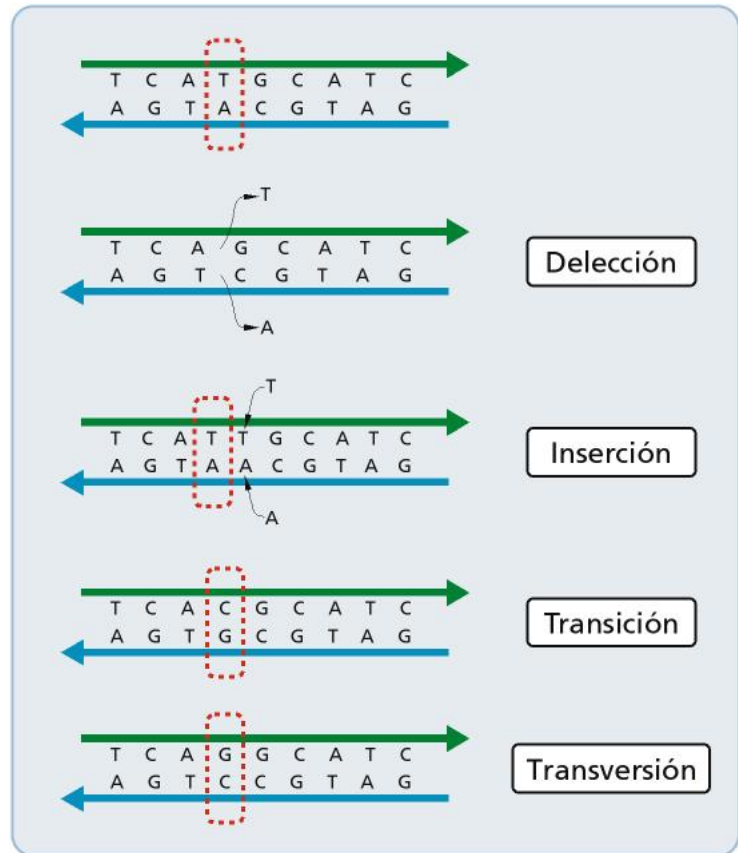
También se han descrito diferencias respecto a las ADN polimerasas en eucariotas, la ADN polimerasa  $\alpha$  es una proteína oligomérica, en la que una de sus subunidades tiene acción primasa.

Por último, el ADN eucariota está unido a las histonas y empaquetado en los nucleosomas. El proceso de replicación ha de ir acompañado por el proceso de síntesis de histonas, ya que en cada ciclo de replicación no sólo se ha de duplicar el ADN sino también las histonas. Las enzimas que desarrollan ambos procesos son distintas pero han de ir coordinadas, ya que la velocidad debe ser igual. Las histonas recién sintetizadas se incorporan a la molécula de ADN que lleva la hebra retrasada, mientras que las viejas histonas permanecen en el dúplex que lleva la hebra conductora.

## MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

El mantenimiento de la información codificada en el ADN es absolutamente imprescindible para la célula, ya que éstas son moléculas insustituibles.

Una alteración en la molécula de ADN produce un cambio en la secuencia de bases, que en el caso de que la molécula se replique se transmite a las generaciones futuras. Los cambios permanentes se denominan **mutaciones**. Si la mutación se produce sobre ADN que no es relevante, o bien tiene un efecto pequeño sobre un gen, la mutación se denomina "silenciosa", por carecer de efectos aparentes. Si la mutación es favorable aporta ventajas adaptativas a las células o al organismo que la desarrolla, y si bien estas mutaciones son raras, por lo estables



que son las moléculas de ADN y por los mecanismos de reparación existentes, su existencia ha permitido la variación necesaria para el desarrollo de la evolución de las especies. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones son deletéreas para la célula, y en los mamíferos está comprobada una estrecha correlación entre la acumulación de mutaciones y el cáncer.

A lo largo de tan solo un día se acumulan gran cantidad de lesiones sobre el genoma celular; se estima que cada veinticuatro horas se pierden alrededor de 5000 bases púricas por destrucción de sus enlaces glicosídicos con la desoxirribosa. Sin embargo, gracias a los mecanismos de reparación, estas lesiones son eliminadas prácticamente en su totalidad, las que no lo son se convierten en mutaciones. Existen varios tipos de mutaciones, clasificadas según el tipo de cambio que se produce sobre la molécula de ADN:

- 1) Sustitución de una base por otra:
  - a) Transición si el cambio es de una base por otra del mismo grupo, base púrica por base púrica o pirimidínica por pirimidínica.
  - b) Transversión, si el cambio es de base púrica a pirimidínica, o a la inversa.
- 2) Inserción de un par de bases, o adición de nucleótidos.
- 3) Delección de un par de bases o eliminación de nucleótidos.



La reparación del ADN es posible debido a la existencia de hebras dobles que funcionan como moldes ya que en caso de que una de ellas sufra algún tipo de lesión, puede eliminarse y sustituirse por una correcta, utilizando la información de la hebra complementaria.

- a)** Reparación de apareamientos incorrectos.
- b)** Reparación por corte de base.
- c)** Reparación de grandes lesiones.
- d)** Reparación directa.
- e)** Reparación por rcombinación.