

La REPLICACIÓN

La **replicación** es el proceso por el cual una molécula de DNA genera otra igual, a partir de ella misma. **Watson** y **Crick** cuando presentaron el modelo de doble hélice del DNA ya introdujeron un mecanismo hipotético por el cual la molécula de DNA disocia progresivamente ambas hebras para generar dos nuevas, aprovechando la complementariedad de bases nitrogenadas. El resultado son dos moléculas hijas, compuesta cada una de ellas por una cadena antigua y otra de nueva síntesis. Es un tipo de replicación **semiconservativa**.

Las características más destacables de la replicación son las siguientes:

- Es un proceso **semiconservativo**, donde cada cadena hija está formada por una parental y otra de nueva síntesis. **Meselson** y **Stahl**, fueron los primeros que confirmaron experimentalmente el modelo.
- La replicación es un proceso **bidireccional**. Avanza en los dos sentidos con dos horquillas de replicación. Podemos observar esta evidencia mediante el uso de **timina tritiada**.
- Además, es un proceso **semidiscontinuo**, pues una de las cadenas se sintetiza de forma continua (cadena líder), mientras que la otra se sintetiza discontinuamente; son los **fragmentos de okazaki**.
- Una serie de **actividades enzimáticas** entre las cuales destaca la **polimerasa**, actividad que necesita la presencia de cebadores de RNA.

Tipos de Replicación

Replicación **conservativa** durante la cual se produciría un ADN completamente nueva durante la replicación.

En la replicación **semiconservativa** se originan dos moléculas de ADN, cada una de ellas compuesta de una hebra de el ADN original y de una hebra complementaria nueva. En otras palabras el ADN se forma de una hebra vieja y otra nueva. Es decir que las hebras existentes sirven de molde complementario a las nuevas.

La replicación **dispersiva** implicaría la ruptura de las hebras de origen durante la replicación que, de alguna manera se reordenarían en una molécula con una mezcla de fragmentos nuevos y viejos en cada hebra de ADN.

La replicación tiene lugar gracias a la existencia de actividades enzimáticas, tales como la **DNA POLIMERASA**, que permiten la elongación de las cadenas hijas y ponen el cebador inicial que permite el inicio de la elongación de las cadenas hijas.

Kornberg fue el primero en comenzar el análisis de los componentes celulares necesarios para la replicación del DNA de **E.Coli** con el objetivo de describir la reacción en detalle.

Consiguió sintetizar DNA en una mezcla de reacción donde había fragmentos de DNA, los cuatro **desoxiribonucleótidos trifosfatados** (dNTP) marcados radiactivamente y un extracto de células bacterianas.

Procedieron entonces a analizar el extracto para determinar cual de sus componentes era el responsable de la síntesis. Aislaron un enzima que denominaron el **enzima de Kornberg** (DNA Polimerasa I), el cual demostró estar capacitado para realizar la replicación in vitro, de forma que concluyeron que para que se diera síntesis, necesitábamos que se cumpliera la siguiente reacción;



Esta reacción implica que la **DNA polimerasa** cataliza la formación de **enlaces fosfodiéster** entre el grupo 3'-OH de la desoxiribosa del último nucleótido de la cadena y el fosfato 5' del desoxiribonucleósido

trifosfato precursor. Esta reacción comporta la **liberación** de dos de los tres grupos fosfato presentes en el precursor dNTP. Así, podemos ver que la cadena de DNA en crecimiento actúa como **cebador** de la reacción. Además, la adición de nucleótidos en la cadena no tiene lugar al azar, sino que estos son **seleccionados** por la polimerasa según su *correcta complementariedad* con el nucleótido correspondiente de la cadena que actúa como molde. Por último, destacar que el **sentido de síntesis** de la nueva cadena de DNA es de 5'!3'.

Posteriormente se descubrió que el **enzima de Kornberg** no era el único encargado de la polimerización del DNA, pues cuando hacíamos afuncional este enzima no se producía la muerte de la célula, sino que era capaz de replicarse y vivir. Ello llevó al descubrimiento hacia 1970 de la **DNA polimerasa II** y la **DNA polimerasa III**, de forma que esta última parece ser un **holoenzima** formado por varias subunidades necesarias para el desarrollo de la función del enzima. La subunidad es la encargada de la polimerización. Entre otras características podemos encontrar las siguientes:

PROPIEDADES	DNA POL I	DNA POL II	DNA POL III
<i>Polimerización 5'!3'</i>	SÍ	SÍ	SÍ
<i>Exonucleasa 3'!5'</i>	SÍ	SÍ	SÍ
<i>Exonucleasa 5'!3'</i>	SÍ	NO	SÍ
<i>Procesividad</i>	3-200	>10000	>500000
<i>Velocidad (nucl/s)</i>	16-20	~7	250-1000

In vivo es un proceso muy complejo que requiere la actuación conjunta de numerosas actividades enzimáticas. Veamos en resumen cuales son esas actividades.

Helicasa: se encarga de la **abertura** de la doble hélice del DNA. LA energía que necesita para la función, la extrae de la hidrólisis de nucleósidos trifosfato. Conocemos ocho diferentes pero sólo se conoce la actuación de 4 de ellas.

Suelen unirse en regiones de DNA de cadena sencilla, de forma que necesitan una desnaturalización previa de la doble hélice.

Además, pueden actuar de diferente manera. **RepA** va desplazándose sobre la cadena y abriéndola, mientras que **helicasa II** abre 5 pares de bases, dejando entonces que se otra molécula, etc.

Topoisomerasa: elimina **tensión** topológica creada delante de la horquilla de replicación, producida por el desenrollamiento de las cadenas parentales. Esta acción provoca cambios en el número de enlace de la molécula. Las más conocidas son las **DNA girasas** y las **DNA topoisomerasa I**.

Proteínas SSB: encargadas de mantener la doble hélice separada. La hélice es muy inestable cuando está separada, de forma que necesitamos una proteína que las haga estables en este estado desnaturalizado. Es un polipéptido de 177 aminoácidos con forma de tetrámero. La unión es cooperativa.

Primasa: resuelve el problema que implica el que las DNA polimerasas no puedan comenzar la síntesis sin el molde que supone el cebador. Sintetiza cortos fragmentos de RNA que posteriormente son alargados con desoxiribonucleótidos, gracias a la acción de la polimerasa. Su actividad es importante en la cadena retrasada, pues deben sintetizarse cortos fragmentos de DNA continuamente. El problema es que esta **primasa** no es completamente activa por sí misma, sino que necesita estar en un complejo proteico denominado **primosoma**, el cual sintetiza cebadores de pequeña longitud.

Actividad polimerasa: consiste en la incorporación de nucleótidos al extremo 3' de moléculas previamente existentes, y a partir del patrón presente en la cadena molde, de forma que al final obtenemos dos dobles cadenas. En la replicación de **E.Coli**, actúan dos polimerasas. La **DNA polimerasa III** se considera un

dímero asimétrico, con dos núcleos enzimáticos que actúa con elevada procesividad, no separándose del molde mientras sintetiza. La **procesividad** depende del número de subunidades que incluye; así, a medida que las va perdiendo, disminuye la capacidad de procesividad. Requiere la hidrólisis del **ATP** para funcionar y es capaz de elongar 1000 nucleótidos por segundo. Cada núcleo enzimático está adecuado a la función que realiza; uno sintetiza la cadena líder, mientras que el otro sintetiza la rezagada, necesitando muchos inicios de replicación para dar origen a los sucesivos fragmentos de okazaki. La **DNA polimerasa I**, también está capacitada para elongar a partir del cebador, pero su función in vivo está relacionada con la eliminación del cebador de RNA de todos los fragmentos de okazaki y de la cadena líder.

Actividad exonucleasa 3'!5': es la actividad correctora de la replicación. Es el proceso por el cual las polimerasas poseen capacidad para reparar rápidamente un error de copia y conseguir una alta fiabilidad, aunque la replicación transcurra muy rápida. Suele haber un error cada 10⁸–10⁹ nucleótidos, incorporados.

Es el mecanismo por el cual, los nucleótidos pueden hidrolizar el enlace fosfodiéster que une los últimos nucleótidos de la cadena en crecimiento, que han sido apareados incorrectamente.

Actividad exonucleasa 5'!3': permite la hidrólisis de los nucleótidos localizados en el extremo 5' fosfato de una cadena de DNA y de RNA emparejada con el molde y que se encuentre en una posición avanzada respecto a la polimerasa, de forma que llega un momento en que la polimerasa se lo encuentra en su camino. Este es el caso de los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada. Esta actividad sólo la usan in vivo las **DNA polimerasas I**.

Ligasa: se encarga de cerrar los Nicks o huecos que se encuentran entre los fragmentos de nucleótidos para obtener ya las cadenas continuas.

La replicación se inicia en una zona muy concreta denominada **zona de inicio**, que en *E. Coli* es una zona denominada **OriC** o región de origen. Es una región de 245 pares de bases necesaria, que funciona bidireccionalmente.

Es una secuencia rica en pares **A=T** para facilitar la apertura de la hélice y permitir la estructuración del **primosoma**, el cual comenzará a elongar el pequeño cebador a partir del molde de DNA que tengamos, proporcionando el extremo 3' que deberá ser elongado. El primosoma avanza en dirección **5'!3'**, como siempre, desplazándose gracias a una proteína que obtiene energía de la hidrólisis del ATP, aunque también elimina las **SSB** al paso del primosoma.

El problema que se nos plantea en estos momentos es la síntesis de la cadena rezagada, pues sabemos que la polimerasa sólo puede elongar en dirección **5'!3'** (en otro sentido no tiene lugar la replicación). Si la replicación fuera lineal, la cadena rezagada debería sintetizarse en dirección contraria, mecanismo que se soluciona creando un **bucle de inversión** en esta cadena, el cual permite la elongación en la dirección usual. Esto explica, además el que la **PolIII** sea un dímero asimétrico para adaptarse a la elongación simultánea de las hebras. Por otro lado, tenemos el **replisoma** que está formado por el primosoma y todas las actividades enzimáticas comentadas anteriormente. Como nos referimos a una horquilla de replicación, tendremos dos replisomas por molécula de DNA en replicación. El proceso avanza como es usual.

Modelos de Replicación; Circulo Rodante

Es un mecanismo presente en organismos de genoma reducido, tales como bacteriófagos. Son genomas que pueden necesitar en un momento dado muchas replications. Un ejemplo de este mecanismo, lo sufre el fago *X174*, produciéndose sus **concatémeros** mediante este tipo de replicación; suele servir para replicar pequeños genomas de **cadena sencilla** circulares, tales como fragmentos extracromosómicos portadores de agrupaciones de genes para el *rRNA* y para **factores F** de plásmidos bacterianos.

La replicación de este genoma, la podemos dividir en tres fases principales:

- Cuando el virus infecta la célula huésped, el genoma se introduce en la bacteria y lo transforma a cadena de DNA monocatenaria, que recibe el nombre de **cadena +**, se convierte en una doble hélice o **forma replicativa RF** después de la síntesis de la cadena de DNA complementaria, que recibe el nombre de **cadena -**, gracias a DNA polimerasa III y los cebadores.
- La forma replicativa **bicatenaria** se replica varias veces y produce poblaciones de **moléculas RF**.
- Por último, estas poblaciones se replican asimétricamente y dan lugar a una progenie de moléculas **monocatenarias +**. Estas últimas se asocian con las proteínas de cubierta del fago y completan su ciclo reproductivo. En las dos últimas fases, la síntesis de DNA tiene lugar por el mecanismo de círculo rodante.

El proceso del **círculo rodante** se **inicia** con una **actividad endonucleasa** específica de secuencia que permite a la denominada **proteína A** romper la cadena positiva de la forma **replicativa parental RF** en un punto que puede considerarse como origen de la replicación. Su acción provoca extremos **3'-OH** y **5'** fosfato en esta cadena, mientras que la **cadena -** queda intacta.

El extremo libre **5'** fosfato va siendo desenrollado y liberado de la molécula, a la vez que la **cadena -** gira sobre su eje y forma una especie de círculo con una pequeña cola. A medida que el círculo va girando sobre sí mismo, el extremo **5'** va siendo desplazado, liberado de la molécula, mientras la polimerasa va elongando la **cadena +** desde el extremo **3'-OH**, usando como molde la **cadena -**. Como resultado de uno de estos ciclos, obtenemos una nueva forma replicativa parental abierta en la **cadena +**, junto con un DNA monocatenario de tipo **cadena +**. Esta **cadena +** es el genoma del virus, de forma que esta puede volver a convertirse en **RF**. Esta **cadena +** puede volver a dar otra (-) discontinuamente, gracias a la **DNA polimerasa III** y **I**.

El paso de la segunda a la tercera fase en la que ya no se forman cadenas RF, sino que sólo se sintetizan **cadena +**, que son en definitiva **genomas víricos**, se produce cuando la célula comienza la producción de **proteínas de cubierta** propias del virus. Estas cubiertas se unen rápidamente a las cadenas que son desplazadas fuera del círculo, e impiden que se formen nuevas **cadena -** complementarias. Pueden formarse, además, muchos genomas víricos unidos.

En todo este proceso de replicación del fago *X174*, la **proteína A** cumple un papel fundamental, pues entre otras cosas:

- Presenta la actividad endonucleasa específica de secuencia.
- Se mantiene unida covalentemente al extremo **5'** fosfato producido, lo que le permite mantener la energía liberada por el enlace roto en la **cadena +**.
- Además, se mantiene unida a la horquilla de replicación, mientras esta sintetiza la **cadena +** usando como molde la (-), a lo largo de la cual se desplaza.
- Cuando se acaba de realizar un ciclo, la proteína A genera una **cadena +** completa y covalentemente cerrada, ya que rompe el nuevo origen y liga el extremo **3'-OH** acabado de producir con el antiguo **5'** fosfato.
- Finalmente queda covalentemente unida al extremo **5'** fosfato que acaba de producir y también a la horquilla de replicación, con lo que se encuentra en disposición de volver a comenzar un ciclo de replicación.

Replicación en Eucariota

El mecanismo es similar al que acabamos de ver en procariota. Es una replicación semiconservativa y bidireccional, de forma que también necesitamos un cebador. Una vez se inicia la replicación de un **replicón** (tramo de DNA que se replica a partir de un mismo origen de replicación), de forma que una vez se inicia la replicación continúa hasta el final.

En *E. Coli* sólo existe un replicón, pero conforme avanzamos en organismos eucariotas, podemos encontrar un mayor número de replicones, observando que son bastante más pequeños que los de *E. Coli*.

Mientras que en levadura tenemos unos 500, un ratón puede llegar a tener 25000. No todos los replicones de una misma célula funcionan al mismo tiempo, sino que a lo largo de la replicación existe una ordenación temporal en cuanto al momento en que se replican.

El que organismos superiores posean tal cantidad de replicones se debe a la gran cantidad de material hereditario de estos organismos, de forma que son utilizados para que el proceso no se alargue excesivamente.

Encontramos en eucariota una gran cantidad de **inicios de replicación** distribuidos a lo largo del genoma. En cada inicio se produce la desnaturalización del DNA y su replicación bidireccional. La replicación se lleva a cabo a partir de 2 **DNA polimerasas** que trabajan sincrónicamente en la horquilla de replicación. En *levadura* se han observado secuencias de 200 pares de bases que pueden ser consideradas los inicios de replicación, pues además coinciden en número con el número de replicones. Además, cuando las añadimos a moléculas circulares de DNA extracromosómico, confieren a esta capacidad para **auto-replicarse** de forma autónoma dentro de la célula de levadura. En algunos animales también se han identificado secuencias de este tipo. Estas secuencias se denominan **secuencias de replicación autónomas** o **ARS**. Son secuencias ricas en pares **A=T**, dando inestabilidad que provoca la apertura de las zonas.

En bacterias, la división celular ocurre justo tras la replicación del cromosoma, incluso muchas veces, antes de terminar la replicación comienza la división, pero en los eucariotas, tenemos entre estos dos pasos, la fase **G2**. Esto ocurre incluso en células con gran desarrollo, de forma que todas estas dificultades vitales hacen que los eucariotas se enfrenten a problemas que no poseen las bacterias.

Una de ellas es como se compatibiliza la actuación de 2 **DNA polimerasas** en la replicación de eucariota. También como segregan los cromosomas en las células hijas, de forma que otro aspecto es como se resuelve la replicación de zonas lineales de los cromosomas.

Encontramos enzimas similares en eucariota y procariota. El origen de replicación se **SV40** es una región de 64 pares de bases, con secuencias concretas y particulares. Tenemos un **antígeno T** (dos hexámeros de **antígeno T**), que reconoce la secuencia **Ori** e interacciona con ella, de forma que encontramos actividad **helicasa** en el antígeno T, la cual para ser activada necesita la proteína **RF-A** que se encuentra en el huésped. Una vez ocurre la activación con gasto energético de ATP, también actuaría como proteína de unión a las cadenas sencillas **SSB**, de forma que a diferencia de procariota, el inicio de replicación es en la región palindrómica rica en **A=T**, también.

En eucariota, podemos encontrar 5 polimerasas distintas, que son α , β , β' , γ , δ . Las polimerasas α , β , β' han sido descritas en el núcleo, mientras que la polimerasa δ parece ser mitocondrial. α , β , β' replican el DNA nuclear (equivalentes a DNA polimerasa I y III), mientras que la δ interviene en reparación.

La polimerasa α posee cuatro subunidades, una de las cuales inhibe la actividad **exo 3'!5'**, de forma que si no se separa no tendrá la capacidad de corrección de errores. Otras dos subunidades presentan **actividad primasa**, factor importante que diferencia la replicación eucariota de la procariota, en este caso, la actividad primasa no es independiente de la polimerasa. La cuarta subunidad es la DNA polimerasa propiamente dicha. Como en todos los casos, la actividad exonucleasa 3'!5' y la 5'!3' se encuentran en el **amino terminal**, mientras que la actividad polimerásica se encuentra en el extremo **carboxilo terminal**.

La polimerasa α sólo está formada por dos subunidades, y en presencia de una proteína auxiliar denominada **ciclina** o **PCNA**, es mucho más activa y procesiva que la polimerasa β . Se ha propuesto un mecanismo de del DNA eucariota, según el cual la polimerasa α unida a **PCNA** sintetizaría la cadena adelantada, mientras que la polimerasa β , junto con la primasa, sintetizaría los fragmentos de okazaki de la cadena retrasada, los cuales

son más pequeños que los procariotas. Por último, cabe destacar el hecho de la replicación de la cromatina, de forma que el DNA que se sintetiza en la **fase S** en seguida se encuentra formando parte de los nucleosomas, que están diseñados para abrirse transitoriamente y permitir el paso de la horquilla de replicación sin que se de la disgregación de las histonas.

En cuanto a la formación de los octámeros de histona, no se forman por un proceso semiconservativo, sino que las ocho proteínas son de nueva síntesis. Además, aunque no está claro el mecanismo de distribución de los nucleosomas entre las dos fibras de cromatina originadas, se han propuesto dos modelos alternativos; todos los nucleosomas parentales aparecen en la misma fibra de cromatina o bien, los nuevos nucleosomas se distribuyen aleatoriamente entre las dos fibras de cromatina originadas en la replicación.

Para que trabaje la ADN polimerasa es necesario la presencia, en el inicio de cada nuevo fragmento, de pequeñas unidades de ARN conocidas como cebadores, a posteriori, cuando la polimerasa toca el extremo 5' de un cebador, se activan otras enzimas, que remueven los fragmentos de ARN, colocan nucleótidos de ADN en su lugar y, una ADN ligasa los une a la cadena en crecimiento.

Replicación de Genomas o Cromosomas Lineales

Una de las características comunes de las polimerasas, es su dirección de polimerización de 5' a 3', hecho que plantea un problema a la hora de replicar los extremos de los replicones lineales, ya que en principio, se ven incapacitados para replicar el fragmento correspondiente al cebador situado en el extremo 5' de la nueva cadena sintetizada. Si eliminamos los cebadores sin más, tendremos cromosomas cada vez más cortos

La replicación de estos extremos puede efectuarse de cuatro maneras distintas. En primer lugar, un replicón lineal puede convertirse en una molécula circular o concatémica lineal.

Algunos fagos, como el lambda o T4 usan esta estrategia. Tras la replicación, los extremos 5' incompletos, pero complementarios de diferentes moléculas (o de la misma si forma un círculo) pueden emparejarse y formar concatémeros. Los vacíos pueden ser completados y al acabar, cerrados por la actividad ligasa. Seguidamente, la acción de una endonucleasa específica puede originar extremos protuberantes 5' que pueden ser usados como molde por la polimerasa para obtener la molécula completa.

Una segunda estrategia puede ser adoptar **estructuras palindrómicas** en los extremos de la molécula, de forma que al aparearse las secuencias complementarias, deja de haber un extremo libre, en el sentido de que el extremo 3' de cada cadena puede ser usado como cebador para la síntesis del segmento no replicado en el extremo 5' de la complementaria.

La acción posterior de una endonucleasa específica que rompa al comienzo de las secuencias repetidas invertidas, crearía un extremo 3' libre que permitiría obtener una molécula completa.

La tercera estrategia consiste en presentar unos **extremos de longitud variable**, no determinados con exactitud. Así, se puede variar el número de copias de una pequeña secuencia concreta presentes en la región terminal; disponiendo de un mecanismo para añadir o eliminar algunas de estas secuencias no hace falta replicar la molécula hasta el extremo.

En *Tetrahymena* se describió una polimerasa denominada **telomerasa** que puede sintetizar la secuencia TTGGGG en el extremo 3' de la región telomérica de los cromosomas, pero sin copiar ningún molde de DNA, sino siguiendo las instrucciones de una secuencia 3'-AACCCCAAC presente en la cadena de RNA que forma parte del mismo **riboenzima**. Se alarga el extremo 3' de la molécula añadiendo repeticiones en tándem de la secuencia TTGGGG. La síntesis de la cadena complementaria (**AACCCC**)_n para formar el telómero definitivo puede ser iniciada por una actividad primasa. El problema de rellenar el espacio no replicado que continúa originándose en el extremo 5' ya no tiene importancia, debido a la gran redundancia de las repeticiones en

tándem presentes en la región. La telomerasa actúa como transcriptasa inversa.

Replicación del Genoma de RNA

La principal diferencia entre replicación de DNA y RNA es que esta última posee menos fidelidad de copia. La falta de actividad de prueba de lectura por parte de las RNA polimerasas, que se traduce en una tasa de error de 10^{-3} y la mayor inestabilidad de las moléculas de RNA, por la posibilidad de que sean hidrolizadas, imponen limitaciones a la longitud de los genomas de RNA.

Las moléculas de RNA pueden ser hidrolizadas debido a la formación de un enlace cíclico entre el fosfato y el grupo hidroxilo 2' del azúcar del nucleótido, esto provoca la rotura del enlace fosfodiéster que une dos ribonucleótidos, a nivel del carbono 5'.

Esto provoca que sus genomas sólo puedan codificar un mínimo de proteínas esenciales. Ello condiciona la estructura y el mecanismo de replicación de estos genomas. Los virus de **RNA de doble cadena**, no pueden replicar semiconservativamente, pues no disponen de enzimas capacitados para separar las cadenas parentales, como ocurre con el DNA. En este caso, gracias a un proceso de transcripción, se origina una progenie de hebras positivas, generándose después las cadenas negativas y al final, las moléculas bicatenarias. Tendremos moléculas de nueva síntesis, luego este tipo es conservativo.

El virus de **RNA monocatenario** lo tiene más difícil, pues el fragmento de cadena de nueva síntesis no puede ser muy largo, porque si no quedarían unidas las dos cadenas. Una solución es que los virus con un genoma de cadena positiva suelen presentar un alto grado de apareamiento intracelular que impide la unión de ambas cadenas.

Otros virus **monocatenarios de cadena positiva (retrovirus)**, necesitan un intermediario de DNA bicatenario que se origina gracias a un enzima denominado **transcriptasa inversa** capacitado para sintetizar DNA a partir de RNA.

Este enzima usa la cadena de RNA + infectiva para sintetizar una cadena de DNA en dirección 5'!3' y crear una molécula híbrida de RNA/DNA. Luego, la actividad **RNAsa** de la transcriptasa elimina la cadena de RNA y el mismo enzima usa entonces la cadena de DNA como molde para originar una cadena de DNA bicatenaria que puede integrarse en el genoma de la molécula huésped, entonces se transcribe a RNA, de forma que unas secuencia se traducen a proteínas y otras son empaquetadas dentro de las **cápsidas virales** y dan lugar a virus maduros.