

CAPÍTULO 11

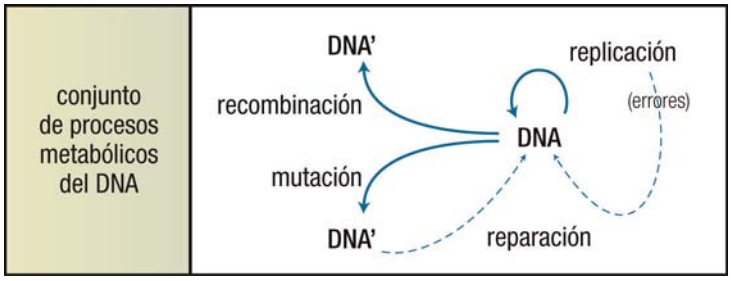
Replicación del DNA

11.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN 145
11.1.1 Carácter semiconservador 146
11.1.1.1 Demostración experimental de la replicación semiconservadora 147
11.1.2 Síntesis simultánea, secuencial y bidireccional 148
11.1.3 Inicio monofocal o multifocal 148
11.2 ENZIMOLOGÍA DE LA REPLICACIÓN 148
11.2.1 Requerimientos de la reacción de síntesis de DNA 148
11.2.2 Mecanismo de la reacción 149
11.2.3 Dirección de la síntesis 149
11.2.4 Tipos de polimerasas 149
11.2.4.1 DNA polimerasas procarióticas: actividades polimerasa y exonucleasas. 149
11.2.4.2 DNA polimerasas eucarióticas: actividades polimerasa y exonucleasa 151
11.2.5 Velocidad de replicación 152
11.3 ETAPAS EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN 153
11.3.1 Iniciación 153
11.3.2 Elongación 154
11.3.2.1 Conexión entre la iniciación y la elongación: proteínas necesarias 154
a) Helicasas 154
b) Proteínas ligantes de DNA monocatenario 155
c) Topoisomerasas 155
d) Primasa 156
11.3.2.2 Asimetría de la replicación en ambas hebras 156
11.3.2.3 Mecanismo de la elongación 157
11.3.2.4 Maduración de los fragmentos de Okazaki 158
11.3.3 Terminación 158
11.3.3.1 Final de la elongación 158
11.3.3.2 Replicación de los telómeros 158
11.3.3.3 Telomerasa: componentes y características 160
11.3.3.4 Mecanismo de acción de la telomerasa. 160
11.3.3.5 Funcionalidad de la actividad telomerasa en las células 160
11.4 REPLICACIÓN MITOCONDRIAL 161

11.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN

La replicación es el proceso, conceptualmente sencillo pero molecularmente complejo, mediante el cual a partir de una molécula de DNA *progenitora* o *parental* se sintetiza una nueva, originándose así dos moléculas de DNA *hijas*, de secuencia idéntica a la del DNA original. Esto permite el paso de la información genética a la descendencia (tanto la de una célula como la del individuo).

Aunque la replicación constituye el aspecto esencial del **metabolismo del DNA**, también se deben considerar como parte del mismo otros procesos relacionados directa o indirectamente: la **recombinación** o reordenamiento de la información genética, la **mutación** o alteración de la secuencia, y la **reparación** de las alteraciones o daños en el DNA. Cabe también añadir la degradación o catabolismo del DNA hacia nucleótidos, mediado por las nucleasas.



11.1

La replicación se produce de forma coordinada con la división celular (Capítulo 8), concretamente en la fase S, durante las interfases previas tanto a la mitosis como a la meiosis I, de forma que, en el caso de la mitosis, las dos células hijas reciban la misma dotación genética que tenía la célula progenitora. En cuanto a la meiosis,

© 2012. Elsevier España, S.L. Reservados todos los derechos

puesto que da lugar a cuatro células hijas, la replicación previa permite que éstas reciban la mitad de dicha dotación genética, y no una cuarta parte (pág. 104). La relación entre el estado de replicación y la progresión por el ciclo celular se puede resumir en los siguientes principios generales:

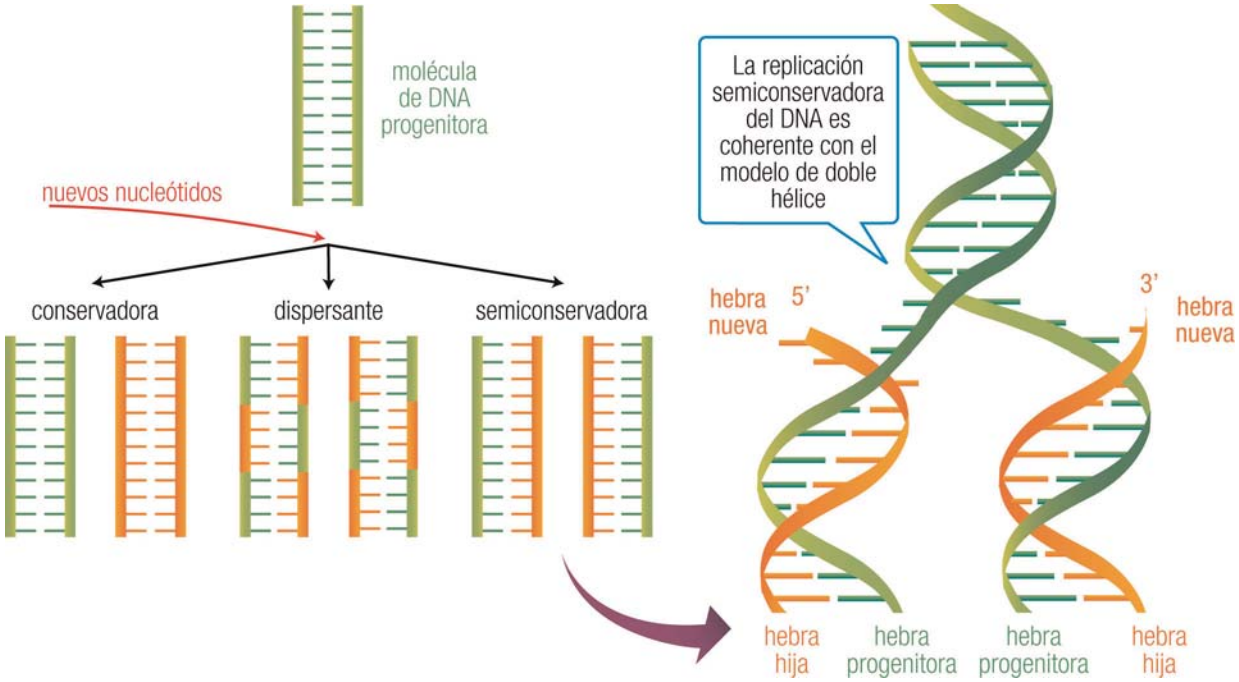
- El inicio de la replicación del DNA obliga a la célula a emprender una división.
- Una vez iniciada la replicación, no puede tener lugar la consiguiente división hasta que se haya completado dicha replicación. En realidad, el final de la replicación constituye posiblemente una señal para la división.
- El proceso de replicación se lleva a cabo sin necesidad de una separación completa de la cadena progenitora: la doble hélice se desenrolla gradualmente y sus dos hebras se van separando a la par que se produce su replicación.

Antes de estudiar los detalles moleculares de la síntesis de un nuevo DNA, procede analizar las características principales del proceso, atendiendo a un criterio eminentemente didáctico. Éstas son: carácter **semiconservador**, realización **simultánea** en ambas hebras, de forma **secuencial** y con carácter **bidireccional**, y **origen** monofocal (procariotas) o multifocal (eucariotas). Otra característica destacada, el carácter **semidiscontinuo**, se explicará una vez que se conozca el mecanismo de la reacción.

11.1.1 Carácter semiconservador

Aunque hipotéticamente se pueden plantear **tres mecanismos** para la replicación, pronto se demostró que sólo el tercero tiene lugar en las células:

Replicación conservadora	Replicación dispersante	Replicación semiconservadora
Un complejo enzimático recorrería el DNA, reconociendo la secuencia en ambas hebras para copiarlas simultáneamente, de forma que el DNA progenitor bicatenario se conservaría intacto mientras que la molécula hija de DNA contendría dos hebras totalmente nuevas	La síntesis se produciría por fragmentos, que se combinarían con partes del DNA progenitor, dando lugar a las dos moléculas hijas de DNA, ambas con fragmentos tanto nuevos como de las dos hebras del DNA progenitor	Es el mecanismo real. Las dos hebras del DNA *progenitor* sirven de molde para la síntesis de sus respectivas hebras complementarias. Cada molécula hija de DNA está formada por una hebra *progenitora* y otra *hija* (recién sintetizada). El mecanismo se repite en sucesivas generaciones de células. El nombre alude, precisamente, a que siempre se conserva la mitad de la molécula original



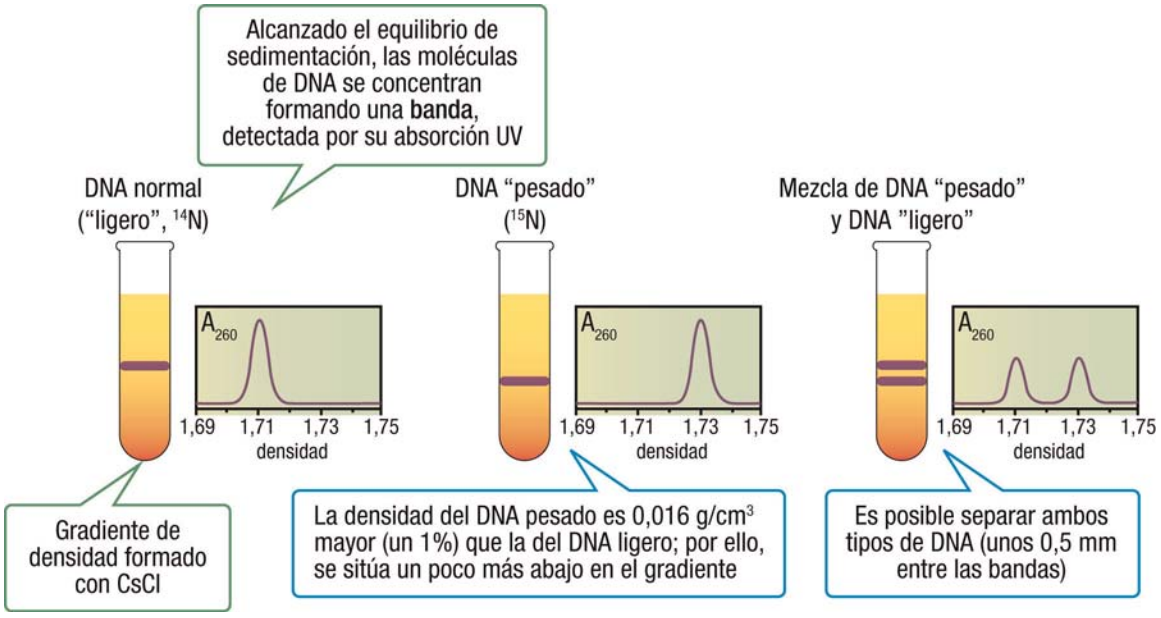
11.1.1.1 Demostración experimental de la replicación semiconservadora

El mecanismo real de la replicación lo demostraron por primera vez Mathew Meselson y Franklin W. Stahl en 1958, mediante experimentos muy completos, sencillos y representativos de muchos otros realizados en diversas áreas de la biología molecular. Aunque los aspectos moleculares de la replicación se establecieron posteriormente con el estudio de la DNA polimerasa, el experimento de Meselson y Stahl tiene interés, aparte de por su propio diseño, por haber sido la primera vez que se aplicaron tanto la técnica de sedimentación en gradiente de densidad como la introducción de isótopos en las moléculas de DNA (^{15}N, infrecuente, y ^{14}N, isótopo habitual).

Para comprender la novedad y trascendencia de estos experimentos en su momento y contexto, se van a considerar los antecedentes y el planteamiento antes de describir el resultado. Se aprovecha así este ejemplo para ilustrar el método científico, en especial cómo un diseño adecuado del experimento, que parece simple, permite obtener una información notable.

a) Antecedentes

El primer lugar, se examina la posibilidad de aplicar la técnica de equilibrio de sedimentación en gradiente de densidad, o centrifugación isopícnica (pág. 126), al análisis de muestras de DNA cuya densidad es diferente por estar marcado o no con el isótopo ^{15}N.



11.3

b) Planteamiento y diseño del experimento

Aplicando esta técnica de marcaje del DNA con ^{15}N y su análisis mediante centrifugación isopícnica, se diseñó el experimento de forma que los resultados obtenidos permitieran diferenciar cuál de las hipótesis era la correcta.

WWW *Web 11.1. Experimento de Meselson y Stahl.*

c) Resultados obtenidos y conclusión

El resultado observado al realizar el experimento fue de una banda de DNA con densidad intermedia en la primera generación de células y dos bandas en la segunda generación, con densidades baja e intermedia. Estos datos experimentales coinciden con los resultados previsibles a partir de **la hipótesis semiconservadora**, de modo que ésta debe ser la correcta; es decir, en la replicación del DNA cada una de las moléculas hijas conserva una hebra del DNA progenitor y tiene otra hebra de nueva síntesis.

11.1.2 Síntesis simultánea, secuencial y bidireccional

De cara a la descripción del mecanismo de la replicación es importante destacar algunas características, observadas por primera vez en *E. coli* pero igualmente válidas para eucariotas. La principal estrategia experimental para obtener estas conclusiones ha sido añadir al medio de cultivo timidina tritiada, con lo que se marca el DNA de nueva síntesis y luego puede detectarse por métodos autorradiográficos.

- La síntesis no comienza al azar, sino en puntos concretos de la molécula, denominados **orígenes** de replicación. En cada uno de ellos se produce la apertura local de la doble hélice y comienza la síntesis **simultánea** de las dos nuevas hebras (no debe confundirse simultáneo con el carácter continuo de la síntesis de una sola de las hebras, que se estudiará más adelante).
- Como consecuencia, las dos hebras nuevas se van alargando de forma progresiva, por adición **secuencial** de nucleótidos.
- La separación de las hebras progenitoras, que comienza en cada origen, progresa en ambas direcciones, por lo que se afirma que la replicación es **bidireccional**. Los puntos de transición entre doble hebra y hebras sencillas se denominan horquillas de replicación, y van alejándose entre sí.
- Finalmente, no debe pasarse por alto el hecho de que, dado que las dos hebras del DNA son antiparalelas, su separación con el avance de la horquilla progresa en sentido opuesto, para una hebra de 3' hacia 5' y para la otra en sentido 5' → 3' (y a la inversa en la otra horquilla).

WWW *Web 11.2. Formación y avance de las horquillas de replicación.*

11.1.3 Inicio monofocal o multifocal

En el cromosoma circular único de procariotas la replicación comienza siempre en un punto determinado, denominado origen (y etiquetado como *oriC*); se afirma que la replicación es **monofocal**. En consecuencia, progresa formando dos horquillas de replicación. Por el contrario, en eucariotas la replicación es **multifocal**, pues en cada uno de los cromosomas existen múltiples orígenes de replicación (centenares o miles), que dan lugar a dos horquillas cada uno. Gracias a ello se hace posible completar en un tiempo razonable la replicación de los cromosomas, mucho más largos que en procariotas.

11.2 ENZIMOLOGÍA DE LA REPLICACIÓN

11.2.1 Requerimientos de la reacción de síntesis de DNA

- **Sustratos**: se utilizan como sustratos el conjunto de los cuatro desoxinucleósidos-trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. De cada uno de ellos queda incorporado en el nuevo DNA la parte dNMP de la molécula. Tanto dNMP como dNDP no sirven como sustratos.
- **Cofactores**: para una actividad óptima se requiere un ion metálico divalente como cofactor, asociado a los dNTP y a la polimerasa. Aunque *in vitro* este papel pueden desempeñarlo tanto Mn^{2+} como Mg^{2+}, es este último el que actúa *in vivo*.
- **Molde o plantilla**: ésta es, quizá, la principal característica de la reacción. El orden correcto de incorporación de los nucleótidos viene determinado por su complementariedad de bases con la secuencia de cada hebra de DNA, que actúa así como *molde* o *plantilla*.
- **Cebador**: la síntesis de una nueva hebra de DNA no puede comenzarse a partir de dos nucleótidos, sino que requiere un fragmento monocatenario iniciador, denominado *cebador*, que aporte un grupo 3'-OH libre. Se trata de un oligonucleótido, por lo común RNA, que debe estar emparejado con la hebra progenitora de DNA, de forma complementaria y antiparalela. Este requisito puede expresarse afirmando que la replicación no es autoiniciadora (a diferencia de la transcripción, pág. 268), sino que sólo **elonga** o alarga moléculas preexistentes.

11.2.2 Mecanismo de la reacción

Se inicia la reacción con el emparejamiento de un dNTP complementario al nucleótido de la hebra molde (DNA) en la posición vecinal al extremo 3' de la hebra en crecimiento (inicialmente, el RNA cebador; luego, la hebra que se está sintetizando). La reacción propiamente dicha consiste en la unión del dNTP seleccionado, que queda como dNMP, liberándose PP_i. Ello implica la formación de un enlace fosfoéster entre el fosfato α del dNTP que se incorpora y el 3'-OH libre de la cadena en crecimiento (inicialmente, del cebador). La ruptura del enlace fosfoanhídrido (α-β) del dNTP proporciona la energía necesaria para impulsar la reacción, ayudada por la subsiguiente hidrólisis del PP_i a 2 P_i catalizada por la pirofosfatasa. Tras muchas reacciones similares sucesivas, el producto es la nueva hebra de DNA:

$$n_1\ dATP + n_2\ dGTP + n_3\ dCTP + n_4\ dTTP \xrightarrow[\text{RNA cebador, } Mg^{2+}\text{, DNA polimerasa}]{\text{DNA molde,}} DNA + (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)\ PP_i$$

WWW *Web 11.3. Mecanismo de la reacción de síntesis de DNA.*

11.2.3 Dirección de la síntesis

Puesto que la **adición de nucleótidos** se realiza siempre mediante 5'-trifosfatos y sobre un extremo 3'-OH libre, la hebra crece por su extremo 3', y se afirma que la síntesis transcurre **en dirección 5' → 3'**. Éste es un mecanismo universal: todas las DNA polimerasas, tanto de procariotas como de eucariotas, así como todas las RNA polimerasas, sintetizan exclusivamente en dicho sentido.

11.2.4 Tipos de polimerasas

Aunque la reacción de síntesis de DNA es universal, es decir, tiene lugar de idéntica forma en todos los organismos y ubicaciones subcelulares, su catálisis la efectúan en cada caso distintas enzimas, bajo la denominación común de **DNA polimerasas** (abreviadas como **DNApol**). Estrictamente su nombre es más completo, *polimerasas de DNA dirigidas por DNA* (o *dependientes de DNA*), para indicar tanto la molécula que sintetizan como la que emplean como molde. Más adelante se estudiarán otras polimerasas de DNA o de RNA que utilizan distintos moldes; para ofrecer una visión unificada se resumen a continuación:

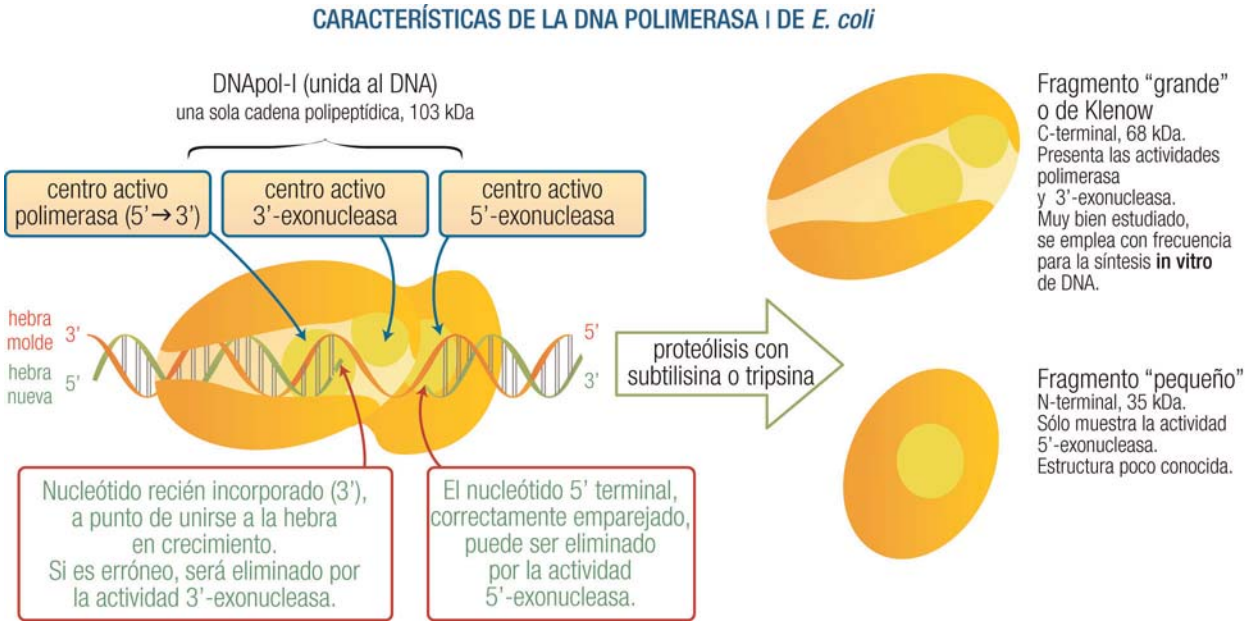
Molécula sintetizada	Molécula molde	Nombre completo	Ejemplos (nombre común)
DNA	DNA	Polimerasa de DNA dirigida por DNA	• DNA polimerasas
RNA	DNA	Polimerasa de RNA dirigida por DNA	• RNA polimerasas o transcriptasas • Primasas
DNA	RNA	Polimerasa de DNA dirigida por RNA	• Transcriptasas inversas • Telomerasas
RNA	RNA	Polimerasa de RNA dirigida por RNA	• RNA replicasas

11.2.4.1 DNA polimerasas procarióticas: actividades polimerasa y exonucleasas

La primera DNA polimerasa descubierta (Arthur Kornberg, 1958) y la mejor estudiada hasta la fecha es la **DNApol-I** de *Escherichia coli*. La comprobación de que su actividad no es suficiente para justificar la velocidad de replicación del cromosoma bacteriano *in vivo* condujo a la búsqueda y descubrimiento de otras enzimas: **DNApol-II** y **DNApol-III** y, más tarde, **DNApol-IV** y **DNApol-V**. Todas ellas coexisten en *E. coli*, con funciones especializadas: pol-III realiza la mayor parte de la tarea de replicación, mientras que las otras se

encargan de distintas funciones auxiliares (sus características particulares se exponen en la tabla de pág. 151, junto con las de las polimerasas eucarióticas).

Varias de las DNA polimerasas presentan, además de su actividad enzimática como polimerasa, una o dos **actividades exonucleasa**. La actividad **3'-exonucleasa** (también denominada **exonucleasa 3' → 5'**) permite hidrolizar el nucleótido situado en el extremo 3' de la hebra de DNA, sólo un nucleótido cada vez. Esta eliminación tiene lugar de forma inmediata, cuando el nucleótido recién incorporado por la actividad polimerasa a la cadena en crecimiento es erróneo, es decir, no empareja correctamente con el de la hebra molde de DNA. La polimerasa es así capaz de reconocer el error, detener la adición de más nucleótidos y liberar ese último dNMP mal incorporado. Los centros activos polimerasa y exonucleasa son diferentes. En resumen, las DNA polimerasas corrigen sus propios errores, en sentido (3' → 5') contrario al de la polimerización (5' → 3'); por ello, esta actividad 3'-exonucleasa se denomina también **actividad correctora de pruebas** (o de galeradas, por analogía al proceso en imprenta) o, alternativamente, **exonucleasa revisora**. De este modo, mejora la fidelidad de la replicación, aumentándola entre 10^2 y 10^3 veces sobre la que aporta la incorporación de nucleótidos complementarios por la polimerasa (que tiene una tasa de error de un nucleótido por cada 10^4 o 10^5).



11.4

WWW *Web 11.4. Estructura de la DNA polimerasa, centros activos y unión al DNA.*

La DNApol-I de procariotas es única entre las polimerasas por poseer, además, una segunda actividad exonucleasa, en este caso **5'-exonucleasa** (o **exonucleasa 5' → 3'**), que le permite hidrolizar secuencialmente DNA o RNA a partir del extremo 5' de la hebra. De nuevo, el centro activo es independiente de los anteriores; en este caso está situado en el fragmento pequeño. Esta actividad desempeña un papel fundamental en la replicación del DNA procariótico, al eliminar el RNA cebador y sustituirlo por DNA durante la síntesis discontinua de la hebra retardada (pág. 158). También complementa la actividad 3'-exonucleasa corrigiendo errores de distinto tipo, y en ocasiones se denomina **actividad de reparación**; por ejemplo, interviene en la escisión de los dímeros de pirimidina que se forman por exposición del DNA a luz UV (pág. 398). Experimentalmente, se aprovecha la actividad 5'-exonucleasa, por ejemplo, para la preparación de sondas marcadas (pág. 187).

Algunas características de las DNA polimerasas, desde el punto de vista bioquímico y funcional

	Procariotas			Eucariotas				
Polimerasa:	I	II	III	α	β	γ	δ	ε
Ubicación subcelular				Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Actividades enzimáticas:								
Primasa (inicio)	No	No	No	Sí	No	No	No	No
Polimerasa 5' → 3' (elongación)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3'-Exonucleasa (o 3' → 5') (corrección de pruebas)	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí
5'-Exonucleasa (o 5' → 3') (eliminación de cebadores)	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Función en la célula:								
Replicación (síntesis continuada de hebras nuevas, adelantada y retardada)	No	No	Sí	Sólo inicialmente	No	Sí	Sí	Sí
Empalme de fragmentos de Okazaki	Sí	No	No	No	No		Sí (con nucleasas)	
Velocidad de replicación:								
Velocidad de polimerización (nucleótidos/segundo)	16-20	2-7	250-1.000					
Procesividad (nucleótidos añadidos antes de su disociación)	Baja 3-200	Media ≥ 10.000	Muy alta $\geq 5 \times 10^5$	Baja 100-200	Baja	Elevada	Elevada con PCNA ≥ 5.000	Elevada con/sin PCNA

11.2.4.2 DNA polimerasas eucarióticas: actividades polimerasa y exonucleasa

En **eucariotas**, las DNA polimerasas son diferentes a las de procariotas, aunque presentan cierta similitud de secuencia y estructura. Se han descrito más de **cinco enzimas**. La **DNApol** α posee dos actividades enzimáticas independientes: polimerasa (de DNA) y primasa (polimerasa de RNA). Gracias a su actividad primasa se encarga de formar un RNA cebador –necesario para iniciar la replicación– y, por su actividad polimerasa, de la elongación inicial de ese cebador. Esta tarea se cede luego a las **DNApol** δ y ε, responsables de la mayor parte de la elongación de ambas hebras; de hecho, ambas tienen actividades similares, pero aún no está claro si desempeñan indistintamente la misma función o si están especializadas. La **DNApol** β no interviene en la replicación, sino que está implicada en la reparación de errores o daños en el DNA (procesos en los que también participan otras polimerasas, incluyendo δ y ε). Mientras estas cuatro enzimas son responsables de la replicación, reparación y recombinación del DNA nuclear, el DNA mitocondrial lo sintetiza una polimerasa diferente, la **DNApol** γ. Por último, se han descubierto otras polimerasas nucleares, peor conocidas (θ [theta], ζ [zeta], λ [lambda], μ [mu], κ [kappa], η [eta], ι [iota]), que están implicadas sobre todo en reparación y recombinación.

En cuanto a la actividad exonucleasa de las DNA polimerasas eucarióticas, sólo las 3 que se encargan de la elongación (δ, γ y ε, v. tabla) poseen actividad **3'-exonucleasa**, la responsable de la capacidad de corrección de errores cometidos al incorporar los nucleótidos a la hebra que se está sintetizando. Ninguna de las polimerasas eucarióticas parece tener actividad 5'-exonucleasa; la función de eliminación de cebadores la desempeñan dos nucleasas independientes, aunque las polimerasas δ y ε sí se encargan de rellenar el hueco con DNA; todos estos detalles se estudian posteriormente (pág. 158).

La función específica de cada polimerasa sólo se puede comprender en el contexto de los mecanismos de iniciación y elongación de las cadenas de DNA, que se estudian con detalle dentro de la etapa de elongación (pág. 157).

Bajo el alcance de este libro no parece adecuado describir las propiedades estructurales de las distintas polimerasas. En la tabla siguiente se resumen los datos relativos a tamaño y composición en subunidades, pero debe tenerse en cuenta que la variabilidad de cifras es elevada, en especial para las enzimas eucarióticas, e incluso la interpretación de éstas en los distintos organismos estudiados, como para su generalización a todos los eucariotas.

Características estructurales de las DNA polimerasas

	Procariotas[1]			Eucariotas[2]				
Polimerasa:	I	II	III	α	β	γ	δ	ε
Masa total (kDa)[3]	103	90	≅ 900	356	39	160	173	313
N.° de subunidades	1	≥ 4	22	4	1	3	2 o 3	4
Masa de subunidades			[4]	[5]		125 35	125 48	258 55

[1]Al menos en *E. coli* se han identificado otras dos polimerasas, IV y V.
[2]Los datos corresponden a humanos. Existen otras DNA polimerasas minoritarias o no esenciales.
[3]Masa molecular de la holoenzima, o enzima funcional con todas sus subunidades.
[4]La DNApol-III de *E. coli* está formada por 22 subunidades de 10 tipos, con una composición global $(\alpha, \varepsilon, \theta)_2\tau_2(\gamma, \delta, \delta', \theta, \psi)_2\beta_4$. De ellas, la agrupación (α,ε,θ) se conoce como "núcleo" o "centro" de la polimerasa. El centro activo polimerasa está en la subunidad α (130 kDa), mientras que el centro 3'-exonucleasa o actividad correctora de pruebas está en la ε.
[5]La DNApol α humana está formada por 4 subunidades diferentes: 180 kDa, con el centro activo polimerasa; 48 kDa, con el centro activo primasa; 58 kDa, cofactor de la primasa; 70 kDa, reguladora de la polimerasa.

11.2.5 Velocidad de replicación

Dado el gran tamaño del genoma de una célula, para que su replicación completa se lleve a cabo en un tiempo razonable el proceso de síntesis debe ser muy rápido. En procariotas, la velocidad alcanza 1.000 nucleótidos por segundo. En eucariotas, el mayor tamaño del genoma hace pensar en la necesidad de una gran velocidad de replicación que, sin embargo, no precisa ser tan elevada gracias a la existencia de varios orígenes de replicación en cada cromosoma, lo que reduce la longitud de DNA que debe sintetizar cada molécula de polimerasa.

La consecución de una alta velocidad de síntesis sólo es posible gracias a un mecanismo peculiar, según el cual la molécula de DNA polimerasa se mantiene unida a la cadena de DNA molde, a la vez que asociada por su centro activo al extremo 3'-OH de la hebra creciente. De esta forma puede incorporar numerosos nucleótidos sucesivamente, con una reducción del tiempo necesario para la adición de cada uno: por ejemplo, la polimerasa puede tardar un minuto en soltarse y volverse a unir al DNA (por mera difusión de las moléculas), mientras que para añadir un nucleótido sin haberse soltado le bastan unos milisegundos. Esta capacidad de las polimerasas, variable entre ellas, se recoge bajo el término *procesividad*, que se define como el número de nucleótidos que son incorporados a la hebra antes de que la enzima se separe del molde (coloquialmente se diría añadidos "de un tirón"). Un valor elevado de procesividad en una polimerasa es mucho más importante para la replicación que una velocidad alta de catálisis.

Las polimerasas de mayor procesividad son las que intervienen en la elongación de las cadenas de DNA (v. tabla en pág. 151), mientras que las de baja procesividad se encargan de tareas que podrían calificarse de auxiliares, tales como la síntesis y eliminación de cebadores, su sustitución por DNA y la reparación. En general, la alta procesividad se consigue gracias a una molécula que "abraza" o rodea la cadena de DNA, evitando así que la enzima se separe; este mecanismo se denomina de "abrazadera deslizante", pues permite el deslizamiento continuado de la polimerasa a lo largo de la cadena de DNA, sin separarse de ella.

WWW *Web 11.5. Estructura de la abrazadera deslizante.*

11.3 ETAPAS EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN

Mientras que en procariotas es probable que la replicación tenga lugar en conexión con la membrana celular, pues el único cromosoma está anclado a ella en la zona nucleoide, en eucariotas el proceso ocurre, lógicamente, en la matriz nuclear. El DNA se replica una vez por ciclo celular, durante la fase S.

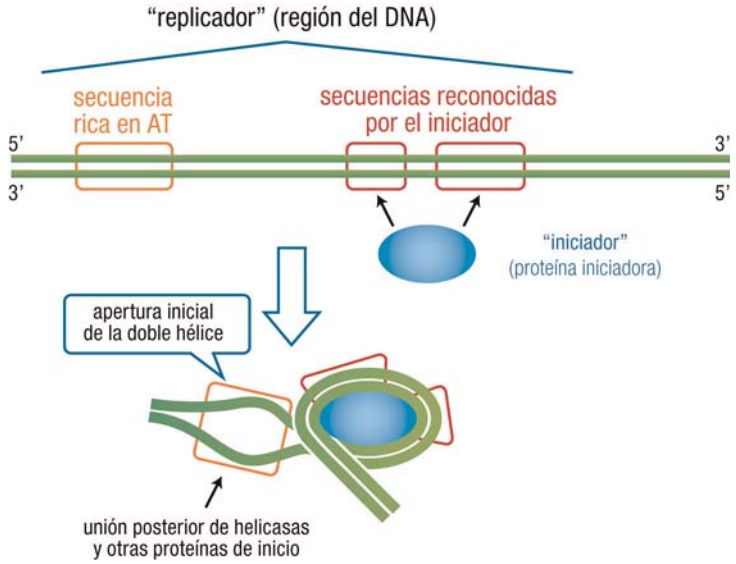
El mecanismo del proceso de replicación permite definir una unidad funcional denominada **replicón**, como aquella región de DNA que se replica a partir de cada origen (v. web 11.2). Cada replicón contiene, pues, un origen de replicación y se replica mediante dos horquillas. Mientras en procariotas el cromosoma completo constituye un solo replicón, en eucariotas son numerosos y sufren la replicación de forma casi simultánea, lo que supone la existencia de un complejo mecanismo de control que coordine el inicio, elongación y terminación en todos los replicones de cada cromosoma. El conocimiento preciso de estos aspectos está pendiente, al igual que otros relacionados, por ejemplo, con la replicación de los centrómeros y de otras regiones heterocromáticas altamente condensadas.

Centrándonos en el inicio y progreso de la replicación en cada replicón, deben plantearse cuestiones relativas a cómo son las interacciones específicas entre DNA y proteínas que desencadenan la iniciación, a la consiguiente actuación de estas proteínas y al control del proceso. Por delante de la horquilla de replicación debe producirse la descondensación de los cromosomas, la disociación de los nucleosomas y la separación de las histonas y las proteínas no histónicas (Capítulo 7). Por detrás de la horquilla, deben reutilizarse las histonas y proteínas no histónicas para la reasociación de los nucleosomas, volverse a condensar la cromatina, etc.

11.3.1 Iniciación

La replicación siempre comienza en puntos definidos de la molécula de DNA, con secuencias características. Como se ha comentado (web 11.2), en **procariotas** el cromosoma tiene un origen de replicación único (llamado *oriC*) mientras que en **eucariotas** la enorme longitud de los cromosomas requiere la existencia de numerosos orígenes de replicación que, aunque se conocen con menos precisión, también poseen secuencias características.

La definición de los puntos de inicio depende de dos regiones en el DNA: el **replicador**, que es la zona que determina la apertura inicial de la doble hebra, y el **origen** propiamente dicho, el punto donde comienza la síntesis sobre el molde de la molécula abierta. El replicador incluye zonas donde la doble hélice puede desenrollarse con facilidad (secuencias ricas en pares AT) y otras que interaccionan específicamente con **proteínas iniciadoras**. La unión de estas proteínas provoca la flexión de la cadena de DNA, generando una tensión superhelicoidal negativa que, sumada a la interacción más débil entre las bases A y T, contribuye a la separación de las hebras. En eucariotas, en particular, se han identificado también proteínas iniciadoras que, en lugar de flexionar el DNA, se unen a regiones palindrómicas que pueden formar estructuras cruciformes (pág. 55); el resultado es análogo, pues las cruciformes reducen la tensión de superenrollamiento y así facilitan la apertura de la doble hélice.



Las proteínas iniciadoras también actúan uniendo otras proteínas, que son así reclutadas al sitio de inicio. Una vez abierta la doble hebra (lo que supone una desnaturalización local, v. pág. 164), tanto la helicasa como el resto de proteínas responsables del inicio –incluidas las propias DNA polimerasas– ya pueden asociarse al DNA y comenzar el proceso de síntesis.

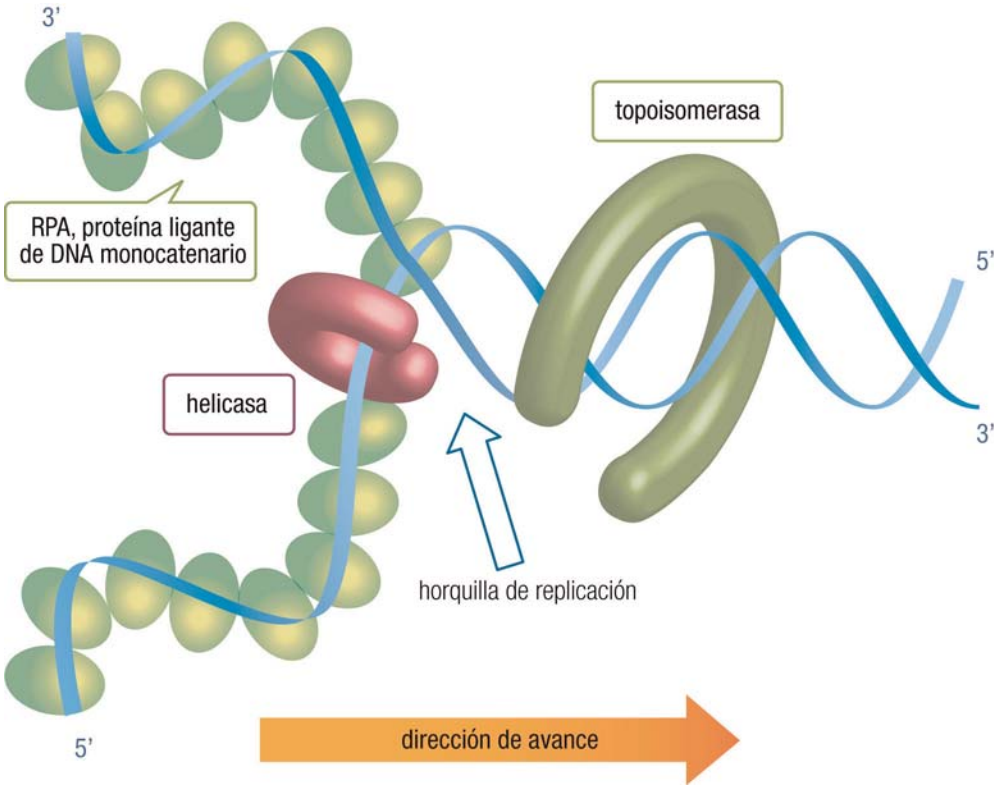
WWW *Web 11.6. Inicio de la replicación.*

11.3.2 Elongación

11.3.2.1 Conexión entre la iniciación y la elongación: proteínas necesarias

Una vez formado el complejo de iniciación, la replicación precisa el desenrollamiento de la doble hélice, a fin de hacer accesibles las bases como molde para formar las nuevas hebras. El desenrollamiento inicial en el tramo correspondiente al origen de replicación, por efecto de las proteínas iniciadoras, debe continuar avanzando por delante de la polimerasa, encabezando la horquilla de replicación. Además, a medida que se van sintetizando las hebras nuevas se debe ir recuperando el enrollamiento en las dos dobles hélices recién formadas. En estas operaciones de avance, desenrollamiento o relajación y enrollamiento o compactación intervienen diversas proteínas especializadas. El complejo multiproteico formado por éstas y por las DNA polimerasas, que viaja asociado a cada horquilla realizando la replicación, se conoce como **replisoma**.

Aunque la identidad molecular y el nombre de las proteínas implicadas varían dependiendo del tipo de organismo (bacterias, levaduras, mamíferos, etc.) básicamente todos utilizan el mismo conjunto de actividades enzimáticas y siguen mecanismos análogos.



11.6

a) Helicasas

Estas proteínas se unen al DNA una vez que éste se ha abierto en el origen y actúan propagando la separación de sus dos hebras, en un proceso que requiere la hidrólisis simultánea de ATP. En general son hexámeros en forma de anillo que rodea a una de las hebras del DNA. Una vez creadas las dos horquillas de replicación,

comienzan a avanzar en sentidos opuestos, cada una liderada por una helicasa seguida inmediatamente por el resto de componentes del replisoma o complejo de elongación asociado a la horquilla.

b) Proteínas ligantes de DNA monocatenario

Una vez separadas las hebras por la helicasa, intervienen las "proteínas ligantes de DNA monocatenario", que evitan el reemparejamiento de las hebras. De esta forma, las hebras molde pueden acoger a los nucleótidos que se incorporan en la replicación. Se las denomina **proteínas SSB** (*single strand binding proteins*), también de forma genérica pero de modo específico en procariotas. En eucariotas desempeña esta función la **proteína de replicación A** (**RPA**).

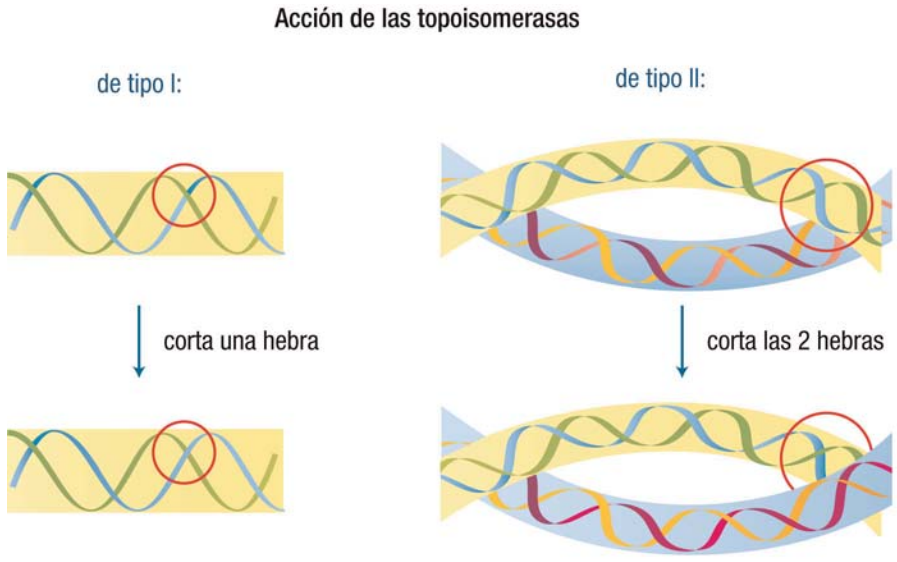
c) Topoisomerasas

La apertura de la doble hélice ocasionada por la progresión de la helicasa a lo largo del DNA bicatenario conlleva la aparición de superenrollamientos positivos por delante de la horquilla. Si se tratase de un DNA lineal y corto, el superenrollamiento se podría eliminar por simple rotación de la molécula, en torno a su eje, en sentido contrario. Sin embargo, esto no es posible en los DNA circulares (procarióticos) ni en los lineales de gran tamaño (eucarióticos), que están restringidos topológicamente (Capítulo 7) debido a su naturaleza circular y a su unión a proteínas, respectivamente. Para aliviar esa tensión de torsión se requiere, pues, algún tipo de mecanismo giratorio; de lo contrario, el superenrollamiento acumulado por delante de la horquilla llegaría a impedir el avance de la replicación. Este problema se resuelve gracias a la acción de las topoisomerasas, enzimas que alteran el estado de superenrollamiento del DNA sin modificar su estructura en otros aspectos. Es decir, interconvierten topoisómeros modificando el *número de enlace* del DNA (número de vueltas que da una hebra respecto a la otra, pág. 82). Las topoisomerasas también intervienen en los procesos de recombinación y, posiblemente, en la transposición, constituyendo un mecanismo básico general de modificación topológica de la molécula de DNA.

WWW *Web 11.7. Superenrollamiento asociado al avance de la replicación.*

Atendiendo a su modo de acción, se distinguen dos familias de topoisomerasas:

Las **topoisomerasas de tipo I** escinden de manera transitoria una hebra del DNA (un enlace fosfodiéster), dejan pasar la otra por la brecha abierta y vuelven a ligar la primera hebra. Como consecuencia, el número de enlace aumenta o disminuye en una unidad. La reacción transcurre a través de un intermediario covalente entre uno de los extremos del corte y un residuo de tirosina de la enzima. Al permanecer la enzima unida así al DNA abierto durante la acción catalítica, se controla en todo momento el grado de tensión liberado.



11.7

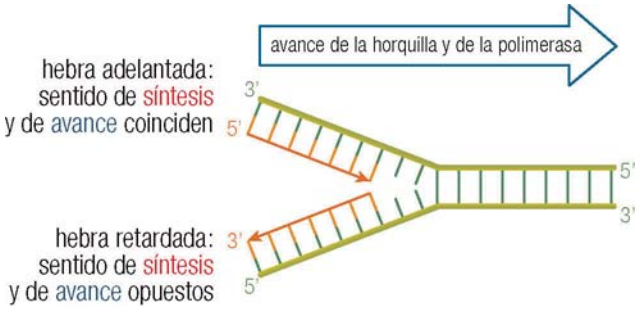
Las **topoisomerasas de tipo II**, cuyo ejemplo clásico es la **girasa** procariótica, cortan de manera transitoria las dos hebras del DNA, permiten el paso de otra doble hebra, intacta, por la brecha abierta y finalizan resellando los cortes. Por consiguiente, el número de enlace aumenta o disminuye en dos unidades. La misión de estas enzimas es generalmente inducir superenrollamientos negativos que facilitan el posterior desemparejamiento local. El consumo energético del proceso es importante: se hidroliza una molécula de ATP por cada corte de la cadena.

d) Primasa

Como ya se ha indicado, las DNA polimerasas no son capaces de iniciar la síntesis de una molécula de DNA, es decir, unir los dos primeros nucleótidos, sino sólo de elongar una hebra preexistente; por ello, el inicio de las hebras nuevas requiere un cebador. Éste lo sintetiza una polimerasa de RNA dirigida por DNA (pág. 149), denominada **primasa** (de *primer*, cebador en inglés), que produce cadenas cortas de RNA, complementarias de cada una de las hebras desemparejadas en el origen de replicación. En procariotas, la primasa es una proteína independiente que forma parte de un complejo proteico denominado *primosoma*, asociado a la horquilla. En eucariotas, la actividad primasa reside en una de las subunidades de la DNA polimerasa α, distinta de la subunidad que posee el centro activo polimerasa (v. tabla en pág. 152); por ello, esta proteína con dos actividades se llama **DNApol α/prim**.

En resumen, la replicación no sólo depende de la DNA polimerasa, sino de numerosas enzimas y factores proteicos (más de 20 en *E. coli*). Este conjunto de proteínas que, como se ha indicado, recibe el nombre de *replisoma* o *complejo de replicación*, se asocia en torno a la horquilla de replicación, participando de forma directa o indirecta en la síntesis simultánea de ambas hebras.

11.3.2.2 Asimetría de la replicación en ambas hebras



11.8

Conceptualmente, el principal problema de la replicación surge al constatar que ambas hebras se copian de manera simultánea, a medida que avanza la horquilla, mediante enzimas (DNA polimerasas) que sólo son capaces de sintetizar en dirección 5' → 3'. Al abrirse la horquilla, una de las hebras progenitoras se va exponiendo en el sentido correcto para actuar de molde, 3' → 5', por lo que la síntesis de su hebra complementaria puede transcurrir por simple avance de la polimerasa a lo largo del molde a la par que avanza la horquilla. Esta hebra nueva recibe el nombre de ***hebra adelantada*** (*leading strand*; a veces, hebra líder o hebra guía); en ocasiones, su hebra molde recibe el mismo nombre, pero para evitar confusiones la llamaremos "molde de la hebra adelantada". Por el contrario, la otra hebra progenitora se expone en sentido 5' → 3', por lo que no puede actuar como molde a medida que avanza la horquilla. Como se verá en seguida, la síntesis de su complementaria requiere un mecanismo particular que, entre otras cosas, supone un desfase con la síntesis de la hebra adelantada, por lo que se denomina hebra ***retardada*** o ***retrasada*** (*lagging strand*).

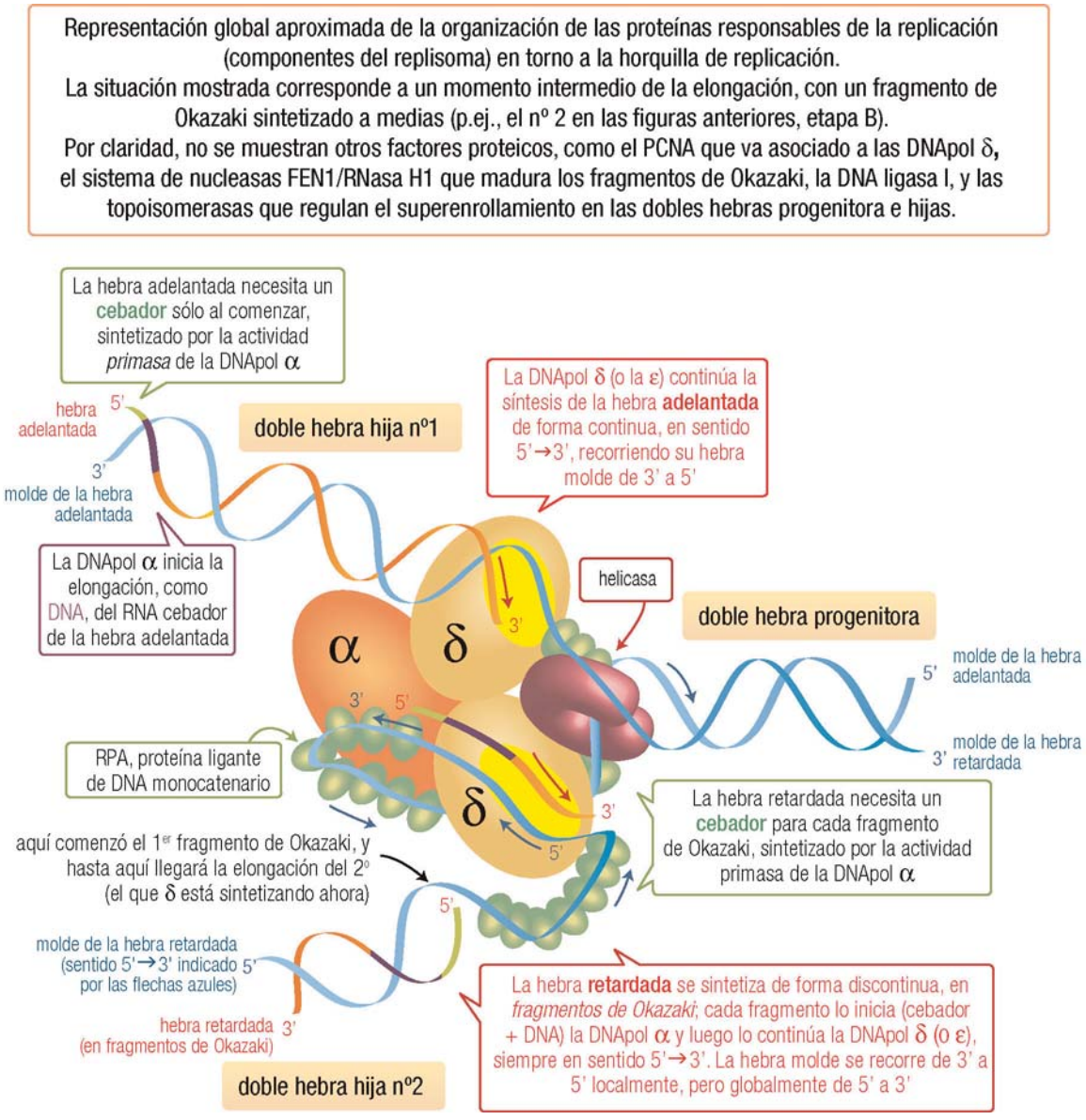
La solución al problema de síntesis de la hebra retardada se desveló al observar que durante la replicación era posible aislar pequeñas moléculas de DNA recién sintetizado (más cortas en eucariotas que en procariotas), conocidas como ***fragmentos de Okazaki*** en honor a Reiji y Tuneko Okazaki, quienes fueron sus descubridores. Se pudo entonces proponer un mecanismo que explicase la síntesis de la hebra retardada en paralelo al desplazamiento de la horquilla de replicación. Dicho mecanismo consiste en la síntesis discontinua de la hebra retardada: cada fragmento de Okazaki corresponde a una porción de dicha hebra, cuya síntesis sólo comienza

(de ahí el nombre) cuando el avance de la horquilla ha liberado suficiente longitud de DNA monocatenario como para que la polimerasa lo utilice como molde, en sentido 3' → 5'. Se propone para ello que la hebra sencilla forma un bucle para permitir la síntesis en el sentido 5' → 3' propio de la polimerasa. La síntesis conjunta de ambas hebras (la adelantada, de forma continua, y la retardada, de forma discontinua), por sendas moléculas de DNA polimerasa se dice que es ***semidiscontinua***.

Lógicamente, la síntesis de cada fragmento de Okazaki requiere un RNA cebador, sintetizado por una actividad primasa (parte del *primosoma* en procariotas, DNApol α/prim en eucariotas) que viaja con la horquilla y que también sintetizó en el origen de replicación el único cebador requerido por la hebra adelantada.

11.3.2.3 Mecanismo de la elongación

WWW *Web 11.8. Mecanismo de la elongación en replicación y organización del replisoma.*



11.9

11.3.2.4 Maduración de los fragmentos de Okazaki

Para completar la síntesis de la hebra retardada deben unirse los fragmentos de Okazaki. Este proceso, denominado globalmente maduración, requiere la eliminación de los cebadores, la elongación del fragmento adyacente para rellenar con DNA el hueco dejado por cada RNA cebador y la unión o empalme de los extremos resultantes para dar una hebra continua. Todo ello tiene lugar posiblemente en las proximidades de la propia horquilla, o bien posteriormente, lejos de ella.

WWW *Web 11.9. Maduración de los fragmentos de Okazaki: eliminación de cebadores y reemplazo con DNA.*

La última etapa en esta maduración de la hebra retardada, la unión de los fragmentos, la catalizan **DNA ligasas** (o simplemente **ligasas**). Estas enzimas forman el enlace fosfoéster que falta entre el grupo OH del extremo 3' de un fragmento de Okazaki y el fosfato del extremo 5' del siguiente, asegurando así que la hebra retardada sea una cadena continua. Además de este papel fisiológico, las ligasas son enzimas de gran utilidad en el laboratorio, junto con las nucleasas de restricción, especialmente para la preparación de moléculas de DNA recombinante (pág. 218).

11.3.3 Terminación

Una vez descritos los detalles particulares del inicio y la elongación de la replicación corresponde estudiar los mecanismos de la terminación. Debe indicarse que este proceso no se conoce tan bien como los anteriores, entre otras razones por la propia amplitud y complejidad del concepto de terminación. Se tratará aquí de exponer los problemas que plantea la terminación desde un punto de vista lógico y asumiendo su limitada confirmación experimental.

11.3.3.1 Final de la elongación

Se puede considerar, conceptualmente, que la terminación comprende varios aspectos. El primero de ellos es la finalización propiamente dicha de la elongación por la DNA polimerasa, que se verifica en las dos horquillas de replicación de cada replicón, previsiblemente cuando en su avance alcancen a las horquillas respectivas de replicones adyacentes. Éste es un proceso prácticamente desconocido en términos moleculares, pero cuya resolución no plantea dificultad conceptual, pues el relleno de huecos y la unión de los dos tramos de nueva hebra pueden resolverse de la misma forma que la maduración y unión de los fragmentos de Okazaki.

Por otra parte, como segundo problema, falta por aclarar cuál es el número de replicones implicados de forma simultánea en la replicación de cada cromosoma, así como los mecanismos de control que coordinan el proceso en todos ellos. A diferencia del caso anterior, no existe aún una hipótesis previsible.

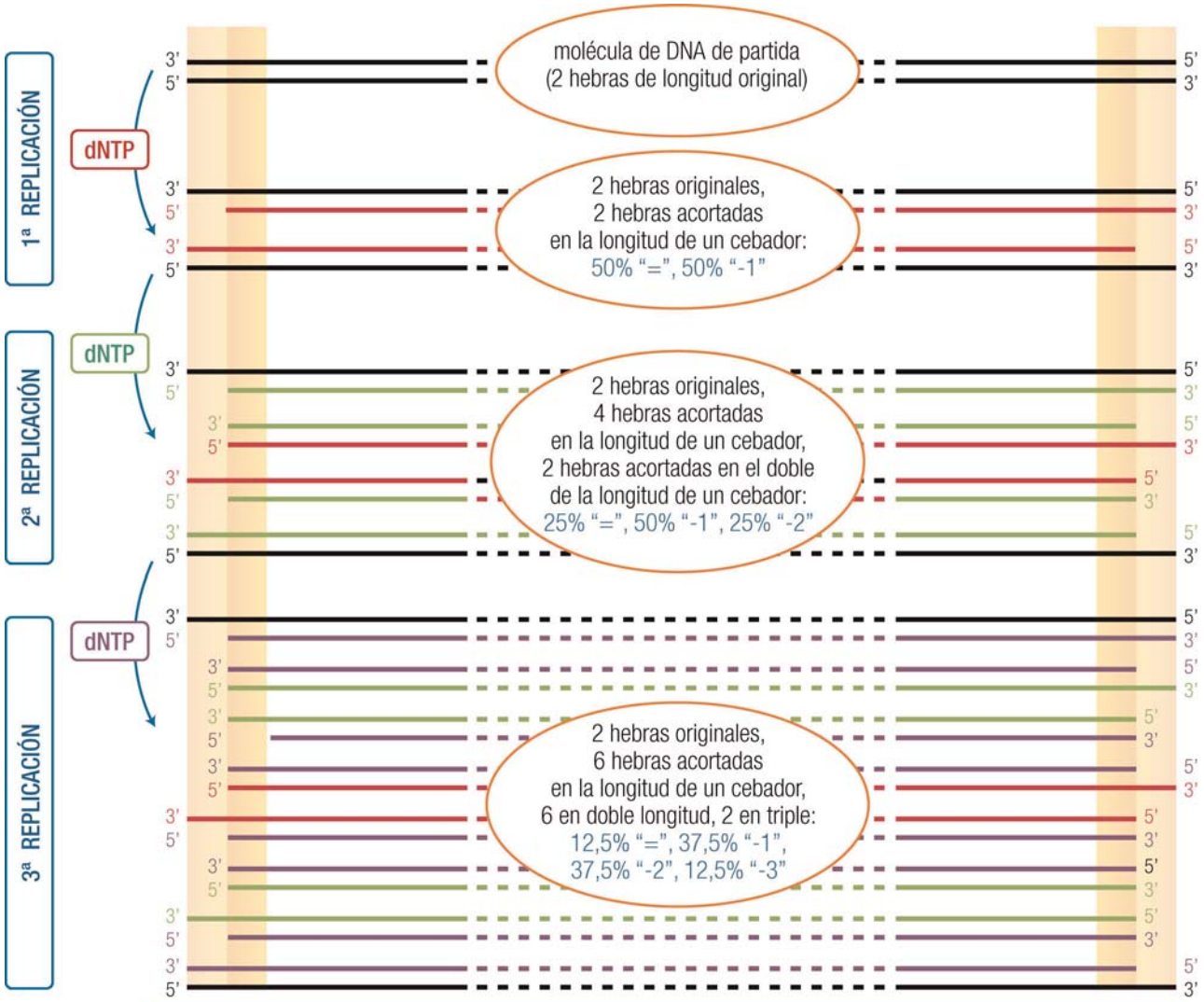
WWW *Web 11.10. Sentido de la replicación en los diferentes replicones y replicación incompleta de los extremos.*

11.3.3.2 Replicación de los telómeros

La replicación de los extremos del cromosoma eucariótico supone el tercer problema de la terminación, pues, como se verá en seguida, no puede llevarse a cabo mediante la elongación por la DNA polimerasa. Este proceso es, por ahora, el mejor conocido de la terminación, posiblemente por su mayor trascendencia fisiológica y patológica.

Como ya se ha estudiado, los telómeros son regiones situadas en los extremos de los cromosomas lineales de la mayoría de eucariotas (pág. 94), a las que se unen ciertas proteínas. Están constituidos por una de las familias de DNA repetitivo no codificante (pág. 116), formando bloques de 1 a 12 kb de longitud, con unidades de 6 a 8 pb repetidas en tándem centenares o miles de veces. Para entender la implicación de los telómeros en la replicación deben recordarse sus dos características principales: la abundancia de repeticiones en tándem y el carácter *cohesivo* de los extremos (que recuerda, aunque sin relación funcional alguna, a los extremos resultantes de la acción de ciertas enzimas de restricción sobre un DNA, pág. 215).

El carácter cohesivo, en forma de salientes 3' en una de las hebras de cada extremo de los cromosomas, tanto progenitores como filiales, se explica por el mecanismo de replicación discontinua de la hebra retardada (v. web 11.10). Como consecuencia adicional de dichos salientes 3', se produce un acortamiento progresivo de las hebras de DNA en sucesivas rondas de replicación.



11.10 En cada ronda sucesiva de replicación las hebras nuevas son más cortas en 5' que su molde. Como consecuencia, la longitud del cromosoma se va acortando progresivamente, en sus dos extremos o telómeros

WWW *Web 11.11. Acortamiento de los telómeros en la replicación.*

Este acortamiento de las regiones teloméricas (calculado entre 50 y 200 pb por cada división celular) supone la disminución progresiva de la longitud del cromosoma a lo largo de sucesivas divisiones celulares, con el consiguiente problema para la perpetuación del mensaje genético. Este problema se resuelve en la célula gracias a la actuación, también durante la fase S del ciclo celular (Capítulo 8), de un nuevo tipo de enzima, la **telomerasa**, que alarga los telómeros, compensando así la pérdida anterior.

11.3.3.3 Telomerasa: componentes y características

Se ha propuesto que la telomerasa es un resto evolutivo de una ribozima (pág. 71) que pudo servir anteriormente para catalizar la síntesis de DNA; también, que pudo suponer un intermediario en la transición evolutiva desde las RNA replicasas a las transcriptasas inversas proteicas. Se trata de una enzima de tipo DNA polimerasa, concretamente una *polimerasa de DNA dirigida por RNA* (pág. 149) y, por tanto, es una transcriptasa inversa (págs. 207 y 223), pero con características especiales. En efecto, se trata de una ribonucleoproteína que sólo es capaz de sintetizar una secuencia determinada de DNA, y que está formada por **dos componentes:**

1. **Componente ribonucleico** o "RNA de la telomerasa" (***TR*** o ***TER***, de *telomerase RNA*), de tamaño variable según especies (desde 146 nucleótidos hasta 1.544), que forma parte integral de la enzima. Incluye una secuencia, característica para cada especie, de 9 a 28 nt y complementaria a la secuencia telomérica respectiva. Por ejemplo, el RNA componente de la telomerasa humana (***hTR***) tiene 450 nt entre los que hay una secuencia rica en C, (5')CCCUAA(3'), complementaria y antiparalela a la hebra rica en G de la repetición telomérica (5')TTAGGG(3'). Gracias a ella, como se verá luego, el TR sirve de molde para la síntesis de nuevas secuencias teloméricas.
2. **Componente proteico**, que contiene la actividad enzimática, o "transcriptasa inversa de la telomerasa" (***TRT*** o ***TERT***, de *telomerase reverse transcriptase*). Ésta es la **actividad telomerasa** propiamente dicha. A diferencia de la transcriptasa inversa vírica y del resto de DNA polimerasas, para sintetizar el DNA telomérico no utiliza un cebador de RNA sintetizado a tal fin, sino que elonga el extremo telomérico 3' precedente. La segunda diferencia importante es que el molde necesario para su acción es la parte RNA de la propia enzima (el TR). Generalmente el TRT suele ir acompañado de otras subunidades no catalíticas, también proteicas.

11.3.3.4 Mecanismo de acción de la telomerasa

WWW *Web 11.12. Mecanismo de acción de la telomerasa.*

11.3.3.5 Funcionalidad de la actividad telomerasa en las células

En las células somáticas de la mayoría de tejidos adultos apenas existe actividad telomerasa, mientras que sí está presente en células de la línea germinal, en tejidos fetales y en ciertas células troncales (principalmente, hematopoyéticas), todas ellas células poco diferenciadas y en rápida proliferación. Esto se debe a la regulación de la expresión génica, al igual que para cualquier otra proteína (Capítulo 18), pero aquí no se necesita entrar en los mecanismos por los que se evita la expresión de la telomerasa, sino que interesa destacar sus consecuencias.

En **ausencia de telomerasa**, a medida que las células se van dividiendo –y envejeciendo– sufren un proceso constante de acortamiento de sus telómeros (pág. 159). Dado el carácter repetitivo y no codificante de éstos, inicialmente esa pérdida de los extremos de cada cromosoma no tiene consecuencias, pero llega un punto, agotadas todas las repeticiones teloméricas, en que afecta a regiones codificantes, y entonces la función celular se ve perjudicada y la célula termina por morir. Se ha considerado este acortamiento como parte de un *reloj biológico* o *celular* que mide el proceso de envejecimiento, "llevando la cuenta" del número de divisiones hasta que la célula debe morir, para controlar así su proliferación correcta en los tejidos.

Puesto que en la mayor parte de las células de un organismo no hay actividad telomerasa, este acortamiento es fisiológico y se produce continuamente durante toda la vida de un individuo. En efecto, se ha demostrado que la pérdida de repeticiones teloméricas aumenta proporcionalmente al número de divisiones mitóticas experimentadas o a la edad del individuo al que pertenecen las células. En consonancia con este hecho, se ha observado que la introducción artificial de telomerasa en células somáticas normales repone la pérdida de telómeros. Se concluye, por tanto, que el acortamiento telomérico está relacionado de forma inversa con el grado de inmortalidad celular y, en definitiva, que el **envejecimiento es una consecuencia de la pérdida de telómeros con la edad.** Ello está también de acuerdo con la pérdida acelerada de telómeros observada en pacientes que sufren varios síndromes de envejecimiento prematuro.

La telomerasa está presente, por el contrario, en casi todas las células que proliferan, en especial las células tumorales, y contribuye, junto a otros factores, a la proliferación indefinida de los tumores. Así, el aumento de actividad telomerasa observado en fases tardías del progreso tumoral puede ser necesario para el crecimiento del tumor, al impedir la muerte celular.

Por consiguiente, se ha propuesto la inhibición de la actividad telomerasa como un principio de **terapia antitumoral** y la telomerasa se considera una diana terapéutica. Se buscan inhibidores específicos del componente catalítico de la telomerasa humana, fármacos y factores que actúen modulando la telomerasa o cualquier otro componente asociado a los telómeros. Estos aspectos tienen un gran interés aplicado en relación con los problemas de envejecimiento y cáncer.

11.4 REPLICACIÓN MITOCONDRIAL

La replicación del cromosoma mitocondrial humano se realiza por un mecanismo peculiar, diferente al estudiado para los casos de procariotas y genoma nuclear de eucariotas. Previamente, se deben introducir algunos conceptos relativos a esta molécula de DNA.

En el cromosoma mitocondrial, circular, una de las hebras posee un mayor contenido de bases purínicas, por lo que se conoce como **hebra pesada o H** (de *heavy*, en inglés), mientras que la otra es la **hebra ligera o L** (*light*). Por otra parte, una zona particular de la molécula recibe el nombre de **asa de desdoblamiento o de desplazamiento**, o **bucle D** (*D-loop*); se trata de la única región no codificante del DNA mitocondrial, que desempeña el papel de región de control, pues contiene el origen de replicación de la hebra H y los orígenes de transcripción de ambas hebras.

La replicación requiere un cebador, sintetizado por la RNA polimerasa mitocondrial usando la hebra L como molde (a partir del promotor P_L, situado también en la región del bucle D, pág. 276). Entonces la DNA polimerasa γ comienza la replicación propiamente dicha a partir del origen O_H, elongando el cebador para sintetizar la hebra H hija. El progreso de la elongación requiere la participación de proteínas ligantes de DNA monocatenario, mtSSB. Una vez que la horquilla de replicación ha sobrepasado la posición del origen O_L se comienza sobre él la replicación de la otra hebra, empleando como molde la hebra H y sintetizando la nueva hebra L.

WWW *Web 11.13. Replicación del cromosoma mitocondrial.*

La primera característica singular de la replicación del DNA mitocondrial es que no tiene lugar de manera específica en la fase S, sino a lo largo de todo el ciclo celular. Esto concuerda con la división de las mitocondrias durante la interfase, en desfase con la división de otros orgánulos y de la célula. Además, no todas las moléculas de DNA se replican una vez por ciclo, sino que lo hacen al azar.

La segunda peculiaridad que diferencia esta replicación de la del genoma nuclear es su avance **unidireccional**, mediante dos horquillas que parten de orígenes distintos y avanzan en sentido opuesto sintetizando una sola hebra cada una. Como consecuencia de este mecanismo, la replicación también se diferencia de la del DNA nuclear por ser **no simultánea**, **bifocal** y **continua** (no se forman fragmentos de Okazaki, las dos hebras se sintetizan como adelantadas).

Carácter	Replicación del genoma **nuclear** de eucariotas	Replicación del genoma **mitocondrial** de eucariotas	Replicación del genoma procariótico
Semiconservadora	Sí	Sí	Sí
Simultánea en ambas hebras	Sí	**No**	Sí
Secuencial	Sí	Sí	Sí
Bidireccional	Sí	**No**	Sí
Origen	Múltiples (multifocal)	**Dos**, uno para cada hebra (bifocal)	Único (monofocal)
Semidiscontinua	Sí	**No** (continua en ambas hebras)	Sí