

## Duplicación de ADN. Foco en algunas enzimas

Dr. Alfredo Rigalli

### Tabla de contenidos

1.Duplicación del ADN y ciclo celular.....	1
2.Duplicación o replicación del ADN: .....	2
2.1.Enzimas involucradas. Detalles .....	4
2.1.1.Helicadas.....	4
2.1.2.DNA polimerasa .....	5
2.1.3.Antígeno nuclear de proliferación celular.....	5
2.1.4.Proteína MCM.....	5
2.1.5.Proteína WDHD1.....	6
2.1.6.Factor de replicación C.....	6
2.1.7.Primasa.....	6
2.1.8.Topoisomerasas.....	6
2.1.9.Telomerasas.....	6
2.1.10.Ribonucleasa.....	7
2.1.11.DNA ligasa.....	7
2.2.Otras enzimas importantes, pero que no actúan en la replicación sino en la transcripción.....	7

### 1. Duplicación del ADN y ciclo celular

La duplicación del ADN es un proceso que ocurre en las células durante la fase S del ciclo celular. El ciclo celular se divide en dos fases: mitosis e interfase. La interfase que es de nuestro interés en este caso se divide en fases G1, S y G2. Luego de esta última se ingresa a la mitosis para dar origen a dos células genéticamente idénticas, si el proceso de replicación del ADN fue correcto.

En el control del ciclo celular participan diferentes factores

Cdk: kinasas dependientes de ciclinas (constante)

Ciclinas: varían a lo largo de ciclo

CAK: kinasas activadoras de Cdk

CKI: inhibidores de Cdk

Cdc: proteínas de genes cdc (ciclo de división celular)

Ubiquitina ligasa: degradan ciclinas y otras proteínas: SPC, etc

proto-oncogenes: p27, p53, Myc.

Receptores de factores de crecimientos y mitógenos

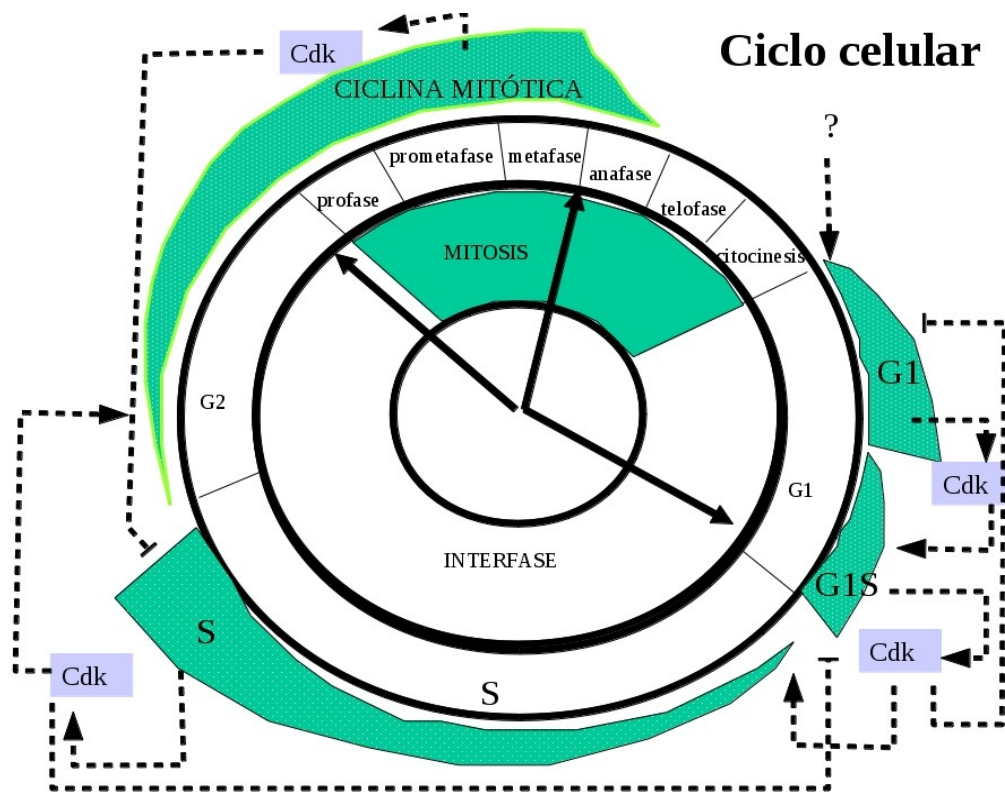
A su vez el ciclo celular tiene lo que se conocen como "check points". Estos son puntos en los que se controlan algunas variables y de hallarse en su valor adecuado, el ciclo continúa sino se produce la apoptosis. Estos son:

Check point G1-S: Relación ADN-volumen celular:

Check point S-M: todo el ADN debe estar duplicado y no haber horquillas de duplicación.

Check point: metafase-anafase: Cinetocoros unidos a microtúbulos:

La figura siguiente ilustra el ciclo celular.



Ante un estímulo (?), se produce el aumento de la concentración de la ciclina G1, que al alcanzar cierto valor estimula a una Cdk la que estimula la acumulación de la ciclina G1S. Esta última al llegar a cierto valor estimulará otra Cdk que por un lado estimulará la acumulación de la ciclina S y por otro lado inhibe la ciclina G1. La acumulación de ciclina S conduce a la estimulación de una Cdk que inhibe a la ciclina G1S y estimula la acumulación de la ciclina M, que activará la última Cdk. De esta manera se va impulsando el ciclo. Cada Cdk activa factores que permiten iniciar la síntesis del ADN, la unión de microtúbulos a cinetocoros de cromosomas y su separación hacia los polos de la célula para la posterior división.

Existen tres check points. Básicamente podríamos resumirlos así.

Check point G1-S: Relación ADN-volumen celular. Mientras el citoplasma es pequeño en relación al núcleo no se activa la Cdk dependiente de ciclina G1S y por lo tanto no comienza la fase S y por ende la replicación. Cuando el citoplasma es grande para el núcleo se activa la Cdk que conduce a la fase S, se comienza a replicar el ADN,

Check point S-M: mientras haya horquillas de duplicación en el ADN no habrá activación de la Cdk que conduce a la fase G2. Se chequea si todo el ADN debe estar duplicado y no hay horquillas de duplicación. Una vez terminada la duplicación de ADN se comienza a acumular ciclina M

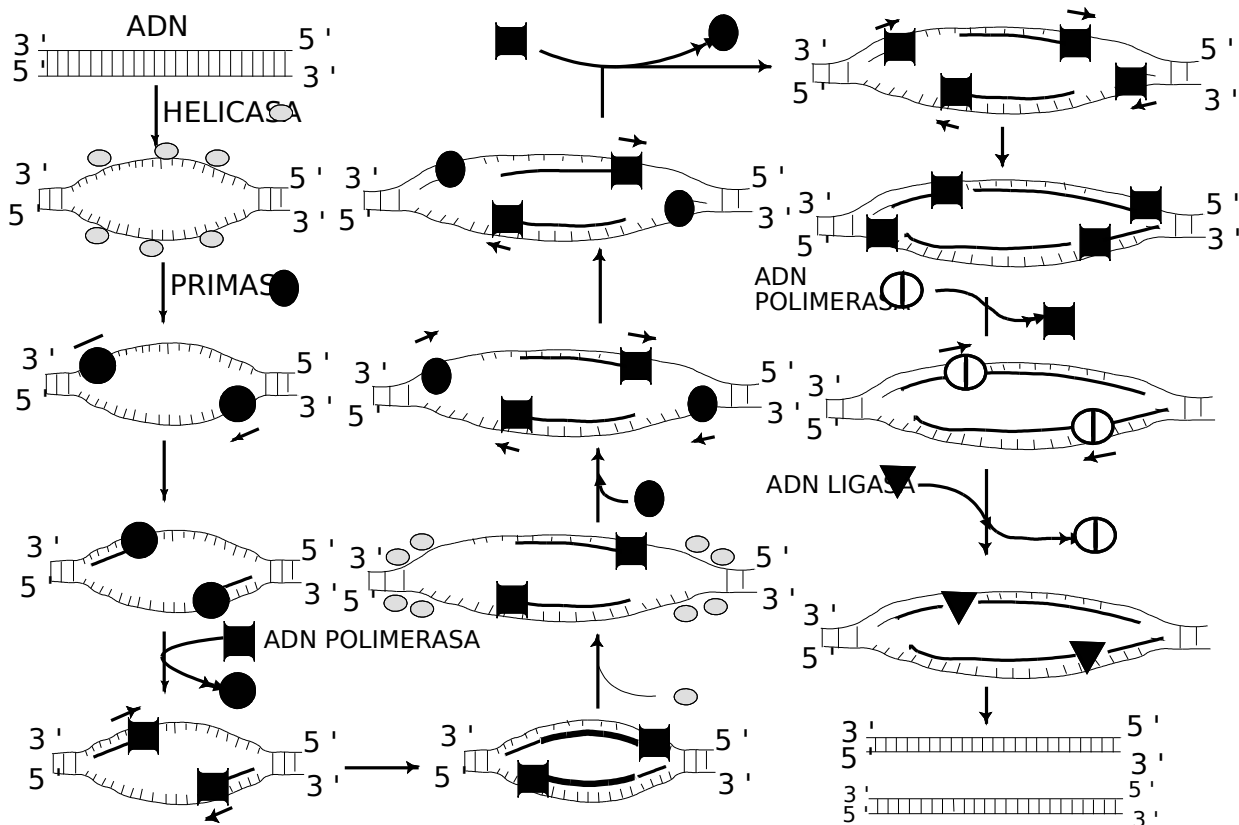
Check point: metafase-anafase: se unen microtúbulos a cinetocoros no se progresará a la mitosis

## 2. Duplicación o replicación del ADN:

Generalidades: El proceso de duplicación o replicación del ADN ocurre durante la fase S del ciclo celular, previo a la realización de la mitosis. Se trata de un proceso extremadamente complejo en el que participan una gran cantidad de factores y enzimas. Se dará una descripción muy simplificada del proceso.

Las enzimas que participan en el proceso de copia del ADN tienen la particularidad que se desplazan sobre la hebra que utilizan como molde, en el sentido 3' a 5'. Como consecuencia van sintetizando una hebra complementaria en el sentido 5' a 3'. En el proceso de síntesis se copia una hebra nueva sobre una de las hebras de la molécula madre. Al final del proceso cada nueva molécula de ADN tiene la

mitad de la molécula que le dio origen. Por lo anterior se dice que la duplicación es semiconservativa. Descripción del proceso: se irán describiendo los pasos representados en la figura 15.13. En el primer paso la molécula de ADN se separa gracias a la acción de la proteína desenrolladora o helicasa. Esta enzima inestabiliza los enlaces puente de hidrógeno entre las bases nitrogenadas produciendo la separación de las hebras y formando de esta manera una burbuja o ampolla de duplicación en la que quedan expuestas las bases nitrogenadas.



**Figura 15.13 - replicación del ADN**

Luego de la acción de la helicasa comienza a actuar la primasa o ARN polimerasa, enzima que cataliza la formación de ARN. Como se mencionó anteriormente esta enzima lee la hebra utilizada como molde en el sentido 3' a 5' y sintetiza una cadena en el sentido 5' a 3'. Utiliza como sustratos nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, UTP y GTP) incorporando nucleótidos monofosfato y liberando pirofosfato. Por cada nucleótido que se incorpora se gastan por lo tanto 2 enlaces macroérgicos. Esta enzima sintetiza una porción de ARN llamado "primer" o cebador.

Luego de la síntesis del "primer", la enzima primasa da lugar a la ADN polimerasa, enzima que a continuación del "primer" sintetizará ADN, en el mismo sentido que lo venía haciendo la primasa. Esta enzima utiliza desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), incorporando desoxinucleótidos monofosfato a la cadena en formación, ligándolos por enlace 3'-5' fosfodiéster. Esta enzima sintetiza ADN hasta completar la burbuja de duplicación. Se necesita luego la acción nuevamente de la helicasa que amplía la burbuja de duplicación. De esta manera la ADN polimerasa puede continuar la síntesis en el sentido que lo venía haciendo.

Para completar los extremos 3' de la burbuja se necesita la acción nuevamente de la primasa que forma un primer, a continuación del cual una nueva molécula de ADN polimerasa completa con ADN la porción restante. De esta manera sobre una hebra, utilizada como molde, a partir del sitio en que se inició la duplicación se producen dos procesos: en el sentido 3' a 5' la ADN sintetiza ADN en forma continua, esta es la hebra conductora o guía. En el sentido 5' a 3' se sintetiza de a porciones compuestas

por un "primer" y luego ADN, llamadas fragmentos de Okasaki. La porción de ARN de estos fragmentos es luego eliminada por la acción de una nueva ADN polimerasa que posee dos actividades enzimáticas: ribonucleasa que hidroliza ARN y ADN polimerasa que sintetiza en su lugar ADN. Luego de la acción de esta enzima cada hebra de la molécula madre queda copiada, salvo que quedan algunos enlaces 3'-5' fosfodiéster por formar entre los fragmentos. La acción de una enzima llamada ADN ligasa cataliza la formación de estos enlaces completando la copia del sector.

Este proceso continúa desde el punto de iniciación ampliando la burbuja de duplicación hasta completar el proceso y tener así dos moléculas idénticas a la que le dio origen.

## 2.1. Enzimas involucradas. Detalles

En realidad el proceso de síntesis de ADN es muchísimo más complejo y participan numerosas proteínas que en primer lugar nombraremos

Helicasa

Topoisomerasa I

Topoisomerasa II

Proteína fijadora de ADN monocatenario (RPA: replication protein A)

ADN polimerasa alfa (unida a primasa): actúa en el inicio de la duplicación. La subunidad primasa forma un segmento de poliribonucleotídico de una decena de nucleótidos y luego actúa la actividad DNA polimerasa que sintetiza a continuación una cadena corta de desoxirribonucleótidos.

ADN polimerasa beta: participa básicamente en la reparación de la cadena de ADN.

ADN polimerasa gamma: participa en la replicación mitocondrial

ADN polimerasa delta: participa en la progresión de la duplicación luego de la acción de la ADN polimerasa alfa.

ADN polimerasa epsilon: participa en procesos de reparación de ADN.

Factor de replicación C (FRC)

Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Ribonucleasa H1

Ribonucleasa FEN1

Telomerasas

Veremos algunos detalles a continuación

### 2.1.1. **Helicasas**

Son enzimas dependientes de ATP. Existe una gran variedad, de las cuales se citan algunas que como se verá comparten propiedades

ATP-dependent RNA helicase DDX3X ([Q00571](#))

Involucrada básicamente en transcripción, maduración del mRNA, exportación y traducción. Requiere ATP para su función al que hidroliza a ADP y P

Transcriptional regulator ATRX ([P46100](#))

participa en replicación

ATP-dependent RNA helicase A ([Q08211](#))

desenrolla dobles hebras de ADN y ARN en dirección 3'→5'. Se halla en núcleo y citoplasma, pudiendo cambiar de uno a otro. La fosforilación y metilación de residuos modifica su ubicación (núcleo citoplasma) y la unión a RNA doble hebra.

### 2.1.2. **DNA polimerasa**

Como se ha visto existen diferentes tipos que actúan en diferentes etapas de la duplicación

DNA polimerasa alfa subunidad catalítica ()

Forma parte del complejo alfa polimerasa y es responsable del inicio de la replicación. El complejo de la alfa polimerasa está compuesto por la subunidad catalítica POLA1/p180, la subunidad regulatoria POLA3/p70 y dos subunidades primasas PRIM1/p49 y PRIM2/p58. El complejo es reclutado en la horquilla de duplicación por la interacción de MCM10 y WDHD1

La subunidad primasa inicia la oligomerización de un primer de RNA y luego la subunidad alfa lo elonga y luego transfiere su función a la polimerasa epsilon y delta

POLA1 no tiene actividad de 3' exonucleasa y no puede hacer correcciones ante errores de replicación.

Es inhibida por nucleótidos de purina como cladribine, clorafamine, fludarabine, etc , usados como antineoplásico.

DNA polymerase subunits beta ([P06746](#))

Tiene actividad en reparación, con actividad escisión-reparación. Puede hidrolizar el fosfato ubicado en 5' (actividad 5' deoxinucleótido-5-fosfato liasa) y puede realizar una unión 3'->5'. Actúa en general reparando y colocando un nucleótido, más que de manera continua.

DNA polymerase subunits delta ([P28340](#))

Encargada de la progresión de la duplicación luego de la acción de DNA polimerasa alfa/primasa. Tiene actividad polimerasa 5'->3' y actividad exonucleotídica 3'->5' por lo cual puede producir eliminación de una base colocada y su reemplazo, teniendo poder reparador de errores. participa en la construcción de fragmentos de Okazaki. Actúa en conjunto el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y con el factor de replicación C (RFC).

Alteraciones del gen están asociadas a cáncer colorrectal y ciertas hipoplasias de mandíbula.

DNA polymerase subunits gama ([P54098](#))

Se asocia con ADN mitocondrial y participa en su replicación. Se halla en la matriz mitocondrial. Su mutación está asociada a la patología conocida como *Oftalmoplegia progresiva externa con delección del ADN* ([157640](#)) caracterizada por pérdida de la fuerza de músculos oculares, del párpado y en menor medida de otros músculos. Se presenta una enfermedad autosómica dominante y otra recesiva. Existen otras patología asociadas con diferentes síntomas y gravedades (ver OMIM)

DNA polimerasa epsilon catalitic subunit ([Q07864](#))

participa en reparación del DNA y duplicación cromosómica. Tiene actividad 3'->5' exonucleasa. Basa su acción en el proceso escisión-reparación que consiste en eliminar una secuencia de nucleótidos de una cadena y luego agregar en sentido 5'->3' los nuevos nucleótidos (gap-filling)

### **2.1.3. Antígeno nuclear de proliferación celular**

Proliferating cell nuclear antigen ([P12004](#)).

Antígeno nuclear de proliferación celular: Es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta que estimula su actividad 3'->5' exonucleasa, pero no las actividades apurínicas y apirimidínicas endonucleasas (APEX2)

### **2.1.4. Proteína MCM**

Protein MCM10 homolog ([Q7L590](#))

es un factor iniciador que actúa junto con helicasa, DNA polimerasa alfa/primasa. Se une a los sitios de inicio de la replicación en simples hebras del ADN.

### 2.1.5. *Proteína WDHD1*

WDHD1 ([O75717](#))

proteína que se une a helicasa y DNA polimerasa alfa en el inicio de la replicación.

### 2.1.6. *Factor de replicación C*

Replication factor C ([P35251](#), RFC)

también conocido como activator 1 es requerido para la progresión de la replicación del ADN polimerasa delta. Se une a PCNA y a la cadena molde de ADN previamente "primed".

### 2.1.7. *Proteína fijadora de ADN monocatenario*

(SSBP1, SSBP2, SSBP3) son varias proteínas de unión a cadena simple de ADN que participan en el proceso de duplicación del ADN.

### 2.1.8. *Primasa*

DNA Primase small subunit ([P49642](#)) PRIM1

Forma los primers en los fragmentos de Okazaki durante la replicación discontinua del ADN

Forma parte del primosome complex, junto con la helicasa. Es una proteína de 420 aminoácidos que se expresa en todos los tejidos y se halla en el nucleoplasma. Forma heterodímero de small and large subunit.

DNA primase large subunit ([P49643](#))

SE halla en el nucleoplasma en el primosome complex. forma heterodímero con la small subunit.

### 2.1.9. *Topoisomerasas*

Topoisomerasa I

([P11387](#)) Elimina las tensiones de la hebra de ADN por corte y ensamble de una sola cadena. Introduce un corte del enlace 3'->5' fosfodiéster. Se forma una unión 3' con una tirosina de la estructura de la enzima, liberando el extremo 5' con un oxhidrilo, luego de eliminar las tensiones, se desplaza el enlace 3' fosfotirosina y se restablece la unión 3'->5' fosfodiéster.

Topoisomerasa II

([Q02880](#)) produce un corte en las dos hebras del ADN durante la duplicación.

### 2.1.10. *Telomerasas*

(Telomerase reverse transcriptase) Es una ribonucleoproteína esencial para la replicación de los extremos de los cromosomas en eucariotas. Son muy activas en células tumorales y células progenitoras y muy poco o nada en células somáticas diferenciadas. Agrega como una transcriptasa reversa una secuencia repetida de nucleótidos utilizando como molde el ARN de su propia estructura, en el extremo 3'. Las estructuras agregadas son repetidas 5' TTAGGG 3'. A través de un dominio se une a la hebra simple de ADN y agrega nucleótidos en un sector adyacente.

Poseen en su estructura RNA con la secuencia 3' CCCAAUCCC5'

En el telómero la estructura queda luego de la acción en la hebra rezagada de la primasa y ADN poli alfa

3' AAA                                      CCCAAUCCC    RNA DE LA TELOREMASA  
5' TTT CCC GCCGCTGGG                      AGREGARÁ NUCLEÓTIDOS EN SENTIDO 5'->3'

3' AAA                      CCCAAUCCC  
5' TTT CCC GCCGCTGGGTTAGGG

3' AAA                      CCCAAUCCC  
5' TTT CCC GCCGCTGGGTTAGGG                      SEGUIRÁ AGREGANDO Y ELONGANDO

Luego actuará la primasa/DNA polimerasa alfa que sintetizará un **primer** y la **hebra complementaria** completará el telómero

3' AAA **GGGCGGCGACCC** **AATC**  
5' TTT CCC GCCGCTGGGTTAGGG

### 2.1.11. Ribonucleasa

Ribonucleasa H1  
([O60930](#)) hidroliza híbrido DNA – RNA a través de la actividad endonucleotídica hidrolizando el enlace 5' fosfato.

Ribonucleasa FEN1  
Flap endonuclease 1 ([P39748](#))  
**Tiene actividad** exonucleasa 5'→3, actúa hidrolizando el enlace 5' fosfato del fragmento de Okazaki downstream, generando así una mella para la acción de la ligasa.

### 2.1.12. DNA ligasa

DNA ligase 4 ([P49917](#))  
une dos nucleótidos en una mella en una hebra de ADN utilizando ATP

## 2.2. Otras enzimas importantes, pero que no actúan en la replicación sino en la transcripción

DNA directed RNA Polymerase II subunidad RPB1 ([P24928](#))  
Catalizan la formación de RNA utilizando DNA como molde, pudiendo iniciar una cadena de novo.  
sintetiza RNAm y nhRNA

DNA directed RNA Polymerasa I subunit RPA34 ([O15446](#))  
Sintetiza RNAr excepto el 5S,

DNA directed RNA Polymerasa III subunit RPA34 ([O14802](#))  
sintetizan tRNA y rRNA 5S.