

REPLICACIÓN DEL ADN

Pablo J. Patiño MD, MSc, Dr. Sci.¹, Maria Teresa Rugeles L, Bact, MS, Dr. Sci.²

¹ Profesor Asociado, Grupo Inmunodeficiencias Primarias - Corporación Biogénesis,

² Profesora Asociada, Grupo Inmunovirología - Corporación Biogénesis
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Introducción

El modelo de la doble hélice de ADN propuesto por Watson y Crick permitió suponer un mecanismo para la replicación del ADN, el cual fue demostrado posteriormente por medio de los experimentos realizados por Matthew Meselson y Franklin Stahl a finales de la década de los cincuentas. Para ese momento existían dos hipótesis que explicaban la replicación del ADN. Una era la replicación semiconservativa, en la que la doble hélice se abre y cada cadena sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena; de esta manera, la molécula nueva de ADN quedaba compuesta por una cadena vieja y una nueva complementaria a la otra (Figura 1A). La otra hipótesis era la replicación conservativa, en la que de alguna forma se copiaban ambas cadenas de ADN y las moléculas recién sintetizadas constituían la nueva doble hélice (Figura 1B).

El experimento de Meselson y Stahl que demostró la replicación semiconservativa (Figura 2), consistió en crecer bacterias en un medio de cultivo que contenía nitrógeno 15 (¹⁵N), un isótopo más pesado del nitrógeno, el cual es incorporado en las bases de la molécula de ADN. Luego se permitió que estas bacterias tuvieran un ciclo de replicación en presencia de ¹⁴N (átomo de nitrógeno menos pesado). Posteriormente se purificó el ADN bacteriano y se sometió a centrifugación. De esta manera, se podría

separar el ADN en tres fracciones diferentes: una inferior más pesada constituida por ADN con ¹⁵N, una intermedia que contenía ADN conformado tanto por ¹⁴N como por ¹⁵N y una superior de ADN con solo ¹⁴N. El resultado obtenido después de un ciclo de replicación fue una sola banda intermedia, lo que indicaba que el ADN de las bacterias que se originaban después de un solo ciclo de replicación contenía tanto ¹⁴N como ¹⁵N, lo cual solo era explicable por el modelo de replicación semiconservativa. Después de varios ciclos de replicación en presencia de ¹⁴N se continuaba obteniendo la fracción de menor peso, lo cual confirmaba que la replicación del ADN era semiconservativa.

A continuación se hará una revisión de los eventos moleculares relacionados con el fenómeno de replicación del ADN, el cual es fundamental para explicar la permanencia y transmisión de la información genética en todos los sistemas que hoy en día se consideran como organismos vivos en la tierra.

Sitio de origen de la replicación

La replicación del ADN depende de la existencia de sitios específicos en el genoma que permiten la apertura de la doble hélice y el ensamblaje de toda la maquinaria enzimática para la copia de las nuevas hebras de ADN. (Figura 3). Aunque se han descrito varios tipos de sitios

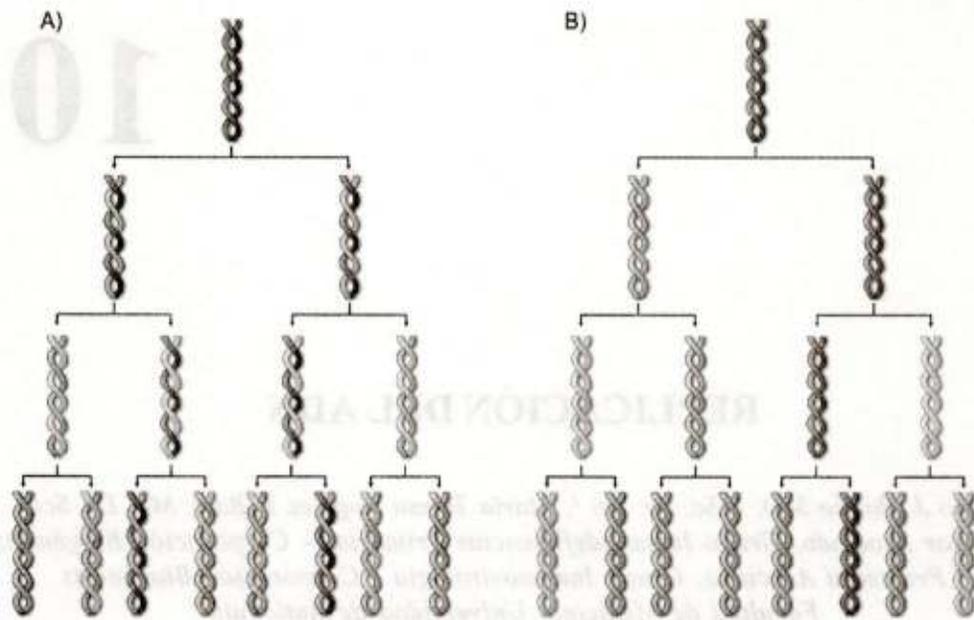


Figura 1. Hipótesis alternativas para explicar la replicación del ADN. A. Una posibilidad la constituía el modelo de replicación semiconservativa, según el cual la doble hélice se abre y cada cadena sirve como molde para la síntesis de una cadena nueva antiparalela. B. El modelo alternativo correspondía a una replicación conservativa, en la que de alguna forma se copiaban ambas cadenas de ADN y las moléculas recién sintetizadas se unían luego para conformar una nueva doble hélice.

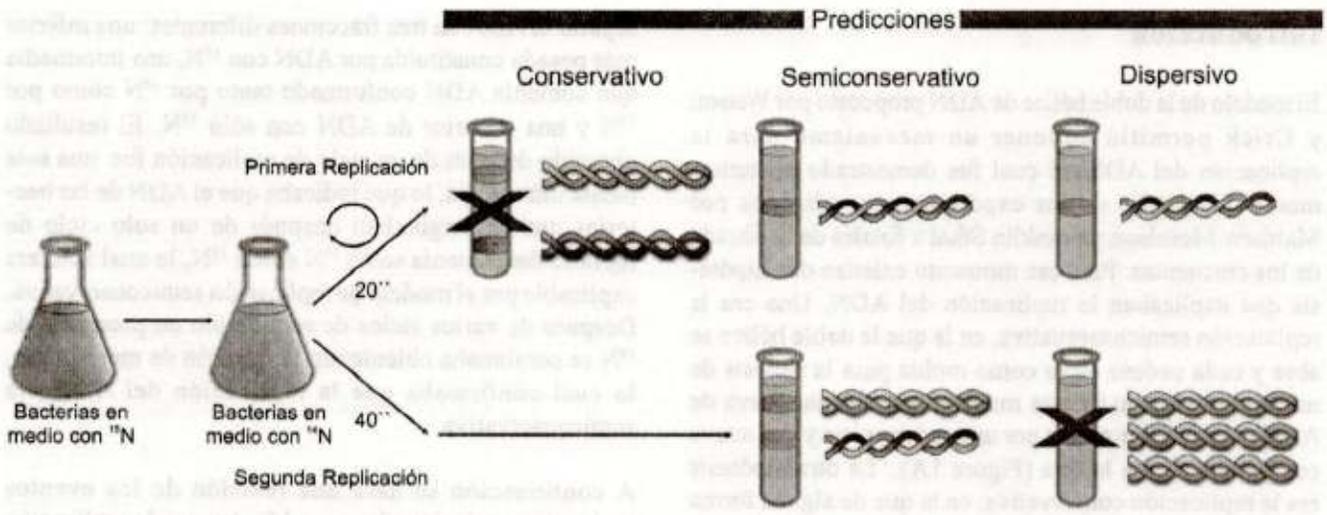


Figura 2. La replicación semiconservativa se comprobó gracias al experimento de Meselson y Stahl. Éste consistió en crecer bacterias inicialmente en un medio de cultivo que contenía ^{15}N , luego de lo cual estas bacterias tuvieron un ciclo de replicación en presencia de ^{14}N . Posteriormente se purificó el ADN bacteriano y se sometió a centrifugación, lo cual permitía separar el ADN en tres fracciones diferentes: una inferior mas pesada constituida por ADN con ^{15}N , una intermedia que contenía ADN conformado tanto por ^{15}N como por ^{14}N y una superior de ADN con solo ^{14}N . Puesto que después de un ciclo de replicación solo se obtuvo una banda intermedia se demostró que el ADN de las nuevas bacterias tenía un solo tipo de doble hélice conformada por cadenas viejas y recientes. Una tercera alternativa, modelo dispersivo, en el cual se distribuía aleatoriamente el ADN marcado con ^{15}N se descartó porque en el segundo ciclo de replicación sólo se evidenciaron dos bandas: una de moléculas livianas y otra de moléculas de peso intermedio.

de origen de la replicación en los genomas de distintos organismos, ellos comparten varias características. En primer lugar, los sitios de origen son segmentos de ADN particulares que contienen secuencias cortas repetidas.

Segundo, dichas secuencias repetidas son reconocidas por proteínas específicas de unión a sitios de origen, las cuales son necesarias para permitir que se ensamble la ADN polimerasa con toda la maquinaria de replicación.

Tercero, las secuencias repetitivas cortas son ricas en adeninas y timinas, lo cual facilita el desenrollamiento de la doble hélice debido a que se requiere menos energía para desestabilizar el apareamiento entre A y T que entre G y C. Una vez la doble hélice se abre y se une toda la maquinaria enzimática se forma una estructura conocida como horquilla o vértice de replicación (Figura 3A).

En *E. coli* el sitio de origen de la replicación del ADN consiste de 245 pares de bases y ha sido denominado *oriC*. Cualquier ADN circular, entre ellos los plásmidos, que contengan secuencias *oriC* son capaces de iniciar y realizar la replicación en presencia de la maquinaria enzimática de la *E. coli*. Al comparar el *oriC* de *E. coli* con secuencias de inicio de otras bacterias se descubrió que estas regiones contienen un segmento repetitivo de 9 pb (nanómetro) y secuencias repetitivas de 13 pb ricas en AT (13-meros), los cuales son sitios de unión de la proteína DnaA responsable del inicio de la replicación (Figura 3B). Por su parte, en los organismos eucariotes, particularmente levaduras, se ha demostrado la presencia de elementos de ADN similares denominados Secuencias de Replicación Autónoma (ARS) (Figura 3B) que tienen al-

rededor de 100 pares bases de longitud. Los cromosomas de una levadura poseen cerca de 400 secuencias de replicación autónoma, de tal forma que la duplicación del ADN puede iniciarse en todos estos sitios. Estudios en células normales y mutantes de levadura indican que la replicación se inicia después de que las proteínas denominadas complejo de reconocimiento del origen (ORC) se unen a las ARS, aunque se requieren otras proteínas para que la replicación tenga lugar.

Extensión de la replicación

Una vez ocurre el reconocimiento de los sitios de origen de replicación, se inicia y prosigue la polimerización de la nueva cadena de ADN. Sin embargo, existen algunas diferencias en la extensión de la replicación dependiendo de la estructura del genoma que se va a duplicar. La manera más sencilla como se duplica el ADN se presenta en el genoma lineal de los virus, como por ejemplo en los adenovirus. En este ADN, la maquinaria de replicación sintetiza una sola cadena a partir del punto de origen de replicación, que se encuentra en el extremo del ADN li-

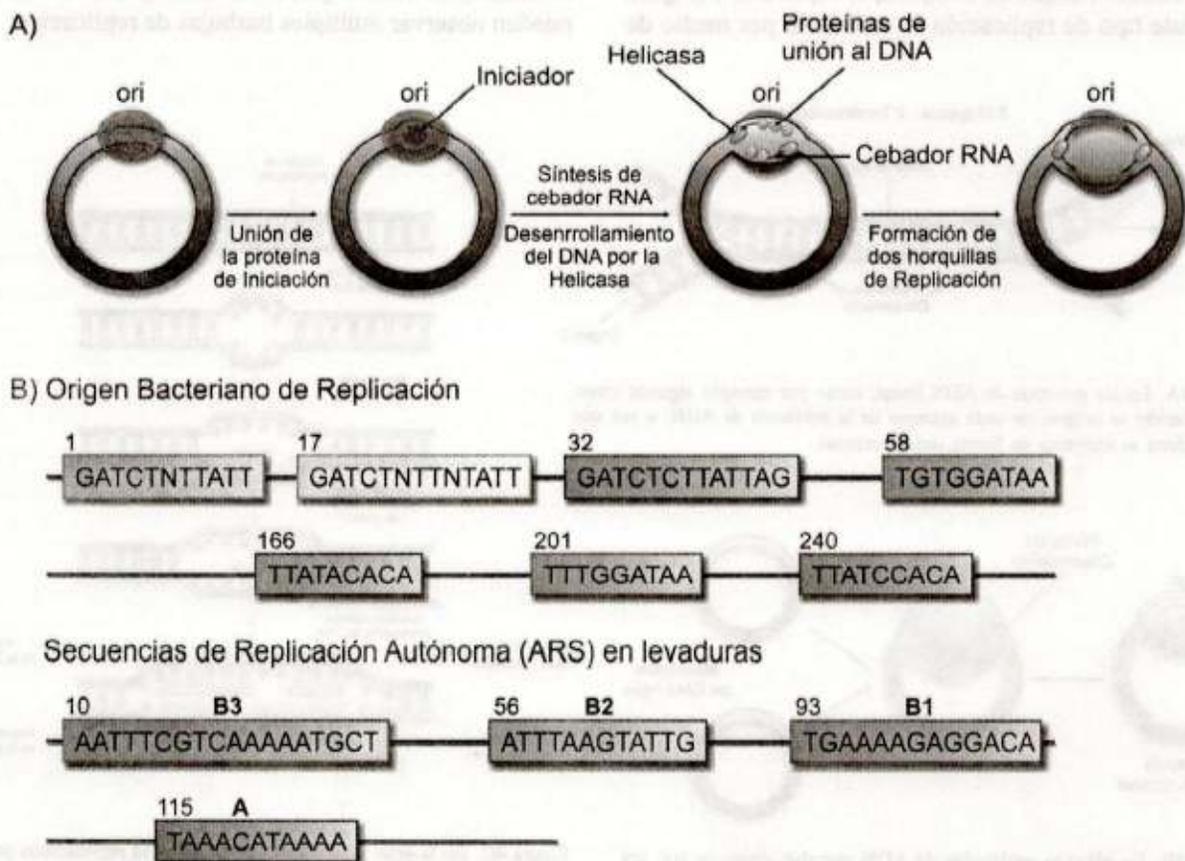


Figura 3. A. Sitio de origen de la replicación del ADN, el cual se abre para permitir la unión de toda la maquinaria necesaria para realizar la copia de las cadenas moldes. B. Tanto en procariotes como en eucariotes existen secuencias específicas para el inicio de la replicación del ADN. En ambos tipos de genomas el sitio de origen de replicación contiene secuencias repetitivas ricas en nucleótidos de Adenina y Timina.

neal, o sea que ocurre la síntesis unidireccional de una sola cadena; por lo tanto es necesario que existan dos sitios de origen de replicación para poder replicar todo el ADN, uno en cada extremo de la molécula. (Figura 4A). Una segunda forma de replicación consiste en la formación de una sola horquilla de replicación que permite la síntesis simultánea de las 2 cadenas de ADN a medida que se desplaza la maquinaria replicativa; sin embargo, el desplazamiento es en una sola dirección, y por lo tanto la duplicación de la molécula completa de ADN solo ocurre en esa dirección. Esta forma de replicación se ha descrito en varios plásmidos bacterianos (Figura 4B).

Finalmente, la forma más frecuente de replicación, tanto en eucariotes como en procariontes, consiste en que a partir de un sitio de origen se forman 2 horquillas de replicación, las cuales se desplazan en direcciones opuestas y permiten la síntesis simultánea de ambas cadenas de ADN. En las moléculas de ADN circular (plásmidos, bacterias y algunos virus), por lo general es suficiente con que exista un solo sitio de origen de la replicación, a partir del cual se forman 2 horquillas de replicación, una en cada dirección, las cuales se encuentran en el lado opuesto del círculo cuando se completa la replicación (Figura 4C). Este tipo de replicación se evidenció por medio de

microscopía electrónica, pues es posible visualizar las denominadas burbujas de replicación en el ADN, las cuales se forman en los sitios de origen y crecen en ambas direcciones.

La replicación completa del genoma circular de la bacteria *E. coli* tarda alrededor de 42 minutos. Puesto que este genoma tiene un poco más de 4.639.000 pares de bases, se ha calculado que cada horquilla de replicación, de las dos que se generan en el sitio *ori*, debe moverse a una velocidad aproximada de 1000 pares de bases por segundo. Por su parte, el genoma de una célula humana se duplica aproximadamente en 8 horas y se han obtenido datos que indican que la velocidad de desplazamiento de cada horquilla de replicación en estas células es de unos 100 pares de bases por segundo, por lo tanto deben existir alrededor de 1000 sitios de origen para cubrir todo el genoma. Sin embargo, diferentes experimentos indican que pueden existir entre 10.000 y 100.000 unidades de replicación (replicones) en un genoma humano, cada uno de los cuales es activo solo durante una parte de las 8 horas de la replicación. Se ha calculado que cada replicón en los cromosomas de eucariotes varía entre 15 y 100 mm de longitud (50-300 kilobases) de forma que, al microscopio electrónico, se pueden observar múltiples burbujas de replicación.

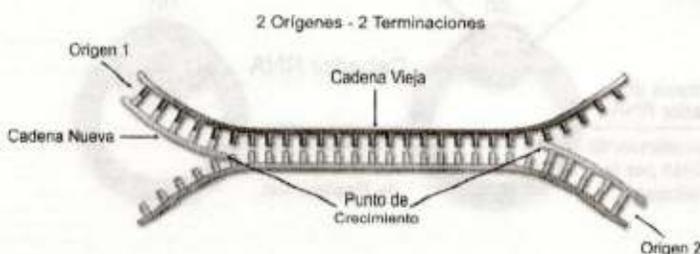


Figura 4A. En los genomas de ADN lineal, como por ejemplo algunos virus, la replicación se origina en cada extremo de la molécula de ADN, o sea que cada cadena se sintetiza de forma unidireccional.

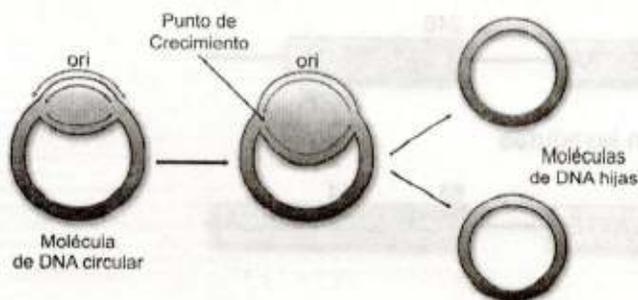


Figura 4B. En algunas moléculas de ADN circular, como lo son los plásmidos, se forma una sola horquilla de replicación que permite la síntesis simultánea de las 2 cadenas de ADN en una sola dirección; en este caso la duplicación de la molécula completa de ADN ocurre en esa dirección.

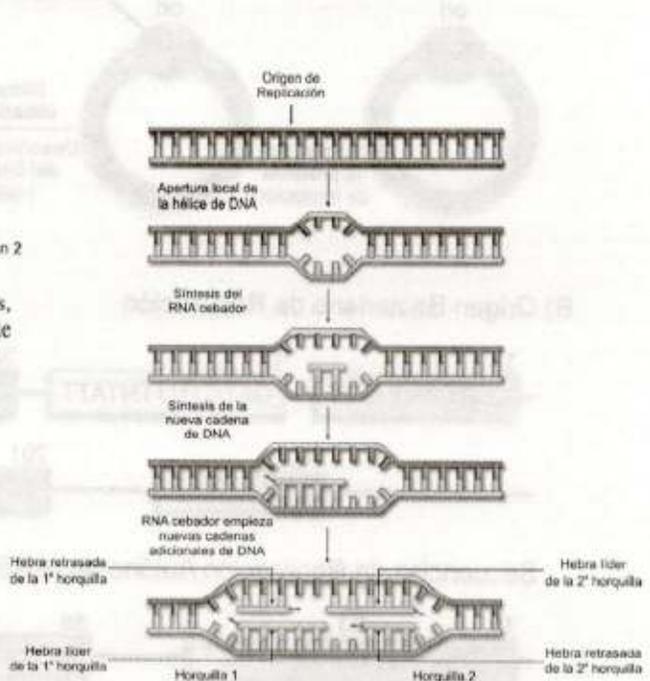


Figura 4C. En la gran mayoría de los genomas la replicación a partir de un sitio de origen se forman 2 horquillas de replicación, las cuales se desplazan en direcciones opuestas y permiten la síntesis simultánea de ambas cadenas de ADN.

Mecanismo molecular de la replicación del ADN

Los mecanismos moleculares de la replicación del ADN han sido entendidos gracias a los estudios realizados con la bacteria *E. coli*, y ahora que se conoce la estructura y función de una gran diversidad de genomas eucariotes es evidente que la replicación en estos organismos se realiza por proteínas análogas y ocurre gracias a reacciones similares. Por lo tanto, se hará una descripción de lo que ocurre durante la replicación en *E. coli* y se especifica-

rán las diferencias más importantes que se dan en eucariotes.

La replicación del ADN es un proceso activo y dinámico que requiere de diferentes proteínas, particularmente enzimas que se encargan de abrir la doble hélice y sintetizar las cadenas de ADN complementarias a las existentes, las cuales se describen en la Tabla 1. De lo anterior se puede deducir que este proceso consume una cantidad importante de la energía celular, por lo tanto requiere de un consumo constante de ATP.

Tabla 1. Proteínas y enzimas necesarias para el proceso de replicación (Figura 5)

Proteína	Acción
Dna A	Principal proteína iniciadora de la replicación que se une al sitio OriC o a las ARS
Topoisomerasas	Estas enzimas son responsables de facilitar el desenrollamiento de la doble hélice, pues tienen la capacidad de realizar cortes en una o ambas cadenas de DNA. De esta forma, se disminuye la tensión que se genera por el enrollamiento y superenrollamiento que sufre la estructura de DNA en los seres vivos y que podría impedir la apertura de la doble hélice en el vértice de replicación. Existen 2 tipos de topoisomerasas. Las topoisomerasas tipo I que generan rupturas en una sola cadena de DNA, mientras que las tipo II producen rupturas en ambas cadenas de DNA. (Figura 6)
Helicasa o Dna B	La helicasa se encarga de destruir los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias y así separar las 2 cadenas originales de DNA una vez la topoisomerasa elimina el superenrollamiento. Debido a la atracción que existe entre los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas complementarias, la separación de dichas cadenas de DNA requiere del consumo de ATP. (Figura 7)
Proteínas unidoras de DNA de cadena sencilla (SSB)	El DNA de cadena sencilla es inestable y tiende a unirse a la cadena complementaria o puede formar estructuras dentro de la misma cadena que eviten la replicación. Las proteínas unidoras de DNA de cadena sencilla interactúan con el DNA una vez la helicasa separa la doble hélice, lo cual permite que ésta se mantenga abierta y estable. (Figuras 8A y 8B)
Primasa o Dna G	La primasa es una polimerasa de RNA que se encarga de sintetizar una secuencia corta de RNA denominado iniciador o cebador, el cual permite que la DNA polimerasa inicie la síntesis del DNA. Esta RNA primasa se encuentra formando parte de un agregado de proteínas junto con la helicasa y todo el conjunto se denomina primosoma.
DNA polimerasas	Las DNA polimerasas se encargan de la polimerización del DNA gracias a que tienen la posibilidad de seleccionar el deoxinucleótido trifosfato (dNTP) libre que es apropiado para aparearse al deoxinucleótido presente en la cadena molde y formar un enlace fosfodiéster covalente con el deoxinucleótido precedente en la cadena que se está formando. Las DNA polimerasas son un conglomerado de diferentes subunidades proteicas, de manera que constituyen holoenzimas. Existen formas diferentes de la DNA polimerasa. En los organismos procariotes la DNA polimerasa I aunque participa en la replicación del DNA, está más involucrada en los procesos de reparación; el papel de la DNA pol II no está claramente establecido, mientras que la DNA pol III es la principal enzima responsable de la síntesis de las cadenas complementarias de DNA. Una limitante que tienen las DNA polimerasas es que no pueden dar inicio a la síntesis de DNA sobre una cadena sencilla de DNA, pues siempre necesitan de un grupo 3'OH libre al cual puedan unir un dNTP. Por eso se requiere la primasa descrita anteriormente. Una vez se inicia la síntesis del DNA, el cebador de RNA es eliminado por la RNasa H y el espacio que queda se completa por la DNA polimerasa I. De otro lado, las células eucariotes contienen 5 DNA polimerasas: α , β , γ , δ y ϵ . La pol γ está localizada en mitocondria y es la responsable de la replicación del DNA mitocondrial; las polimerasas α , δ y ϵ están más involucradas en replicación de DNA nuclear mientras que la pol β juega un papel importante en el proceso de reparación.
Ligasa	La DNA pol I es incapaz de hacer un enlace covalente entre los grupos 3'OH y 5'fosfato cuando quedan adyacentes, por lo tanto se necesita una ligasa de DNA para unir estos grupos y así sellar los espacios que queden en el DNA.

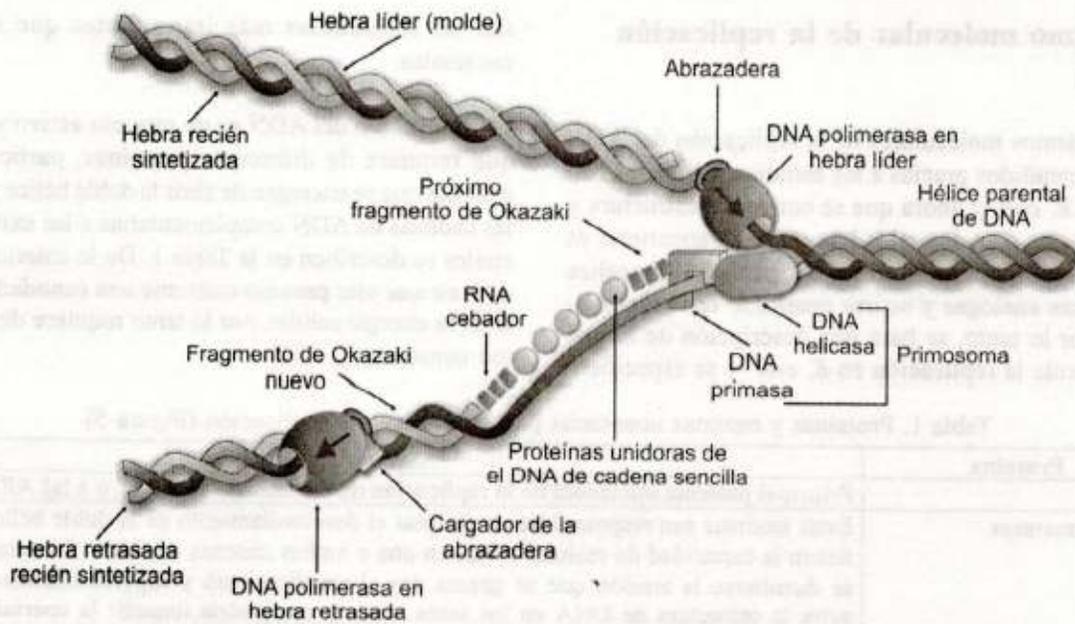


Figura 5. En esta figura se presentan las diversas moléculas que son necesarias para el proceso de síntesis de una nueva molécula de ADN en la horquilla de replicación.



Figura 6. Durante la replicación se abre la doble hélice del ADN en el vértice de replicación lo cual origina un superenrollamiento de esta molécula. Para disminuir la tensión que genera este superenrollamiento se requiere de las topoisomerasas, enzimas que producen cortes en una o ambas cadenas de ADN.

Secuencia de la replicación

En la figura 9 se presenta un esquema del modelo que hoy se conoce como el más aproximado a la secuencia de eventos moleculares que ocurren durante el proceso de copiado del ADN.

Como se describió antes, el inicio de la replicación en el sitio *ori* depende de la unión de la proteína llamada DnaA,

la cual interactúa con las secuencias específicas en el *ori*, lo que conduce a la formación de un complejo inicial que contiene entre 10 y 20 subunidades de proteínas. La unión de la DnaA a estas secuencias facilita la separación inicial de la doble cadena de ADN y el reclutamiento de las demás proteínas que constituirán la unidad de replicación. Este proceso requiere energía suministrada por ATP y genera lo que se ha llamado el complejo abierto.

Una vez la proteína DnaA se une al ori y permite el reclutamiento de las proteínas necesarias para dar origen a la replicación, la doble hélice de ADN se separa por acción de la helicasa también conocida como DnaB (Figura 7). Una molécula de DnaB, es un hexámero de subunidades idénticas que forma una abrazadera alrededor de cada una de las dos cadenas sencillas de ADN que aparecen en el complejo abierto; esta unión también requiere de ATP. Esta helicasa se desplaza a lo largo del ADN y utiliza la energía liberada por la hidrólisis del ATP para destruir los puentes de hidrógeno y así separar las cadenas de ADN. Como ocurre con otras proteínas que se unen al ADN, las helicasas exhiben direccionalidad con respecto al desenrollamiento. Por tanto la DnaB se mueve a lo largo de la cadena sencilla de ADN que se abre hacia el extremo 3'. La proteína no se desprende del ADN hasta que alcanza el final de la cadena o hasta que es retirada por otra proteína. La reasociación entre las cadenas de ADN que se han separado se evita gracias a la acción de las proteínas SSB, las cuales interactúan con las cadenas de ADN una vez están separadas (Figura 8).

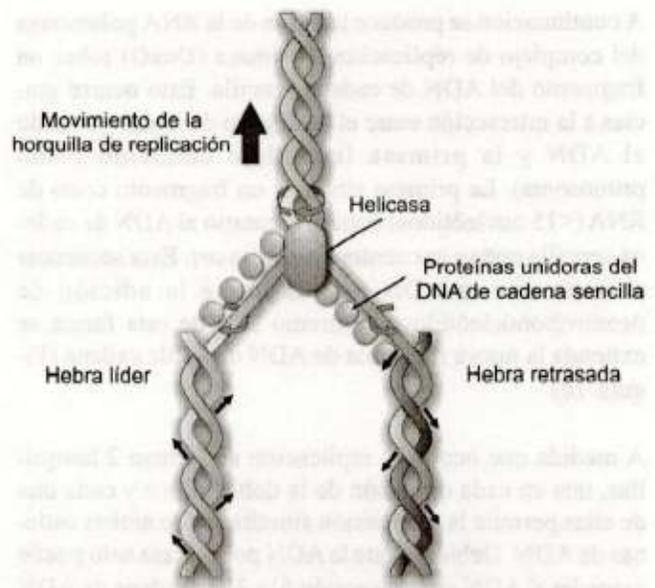


Figura 7. Durante la formación de la horquilla de replicación la helicasa se encarga de destruir los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias en el vértice y de esa manera logra separar las dos cadenas originales de ADN. Este proceso es dependiente del consumo de ATP.

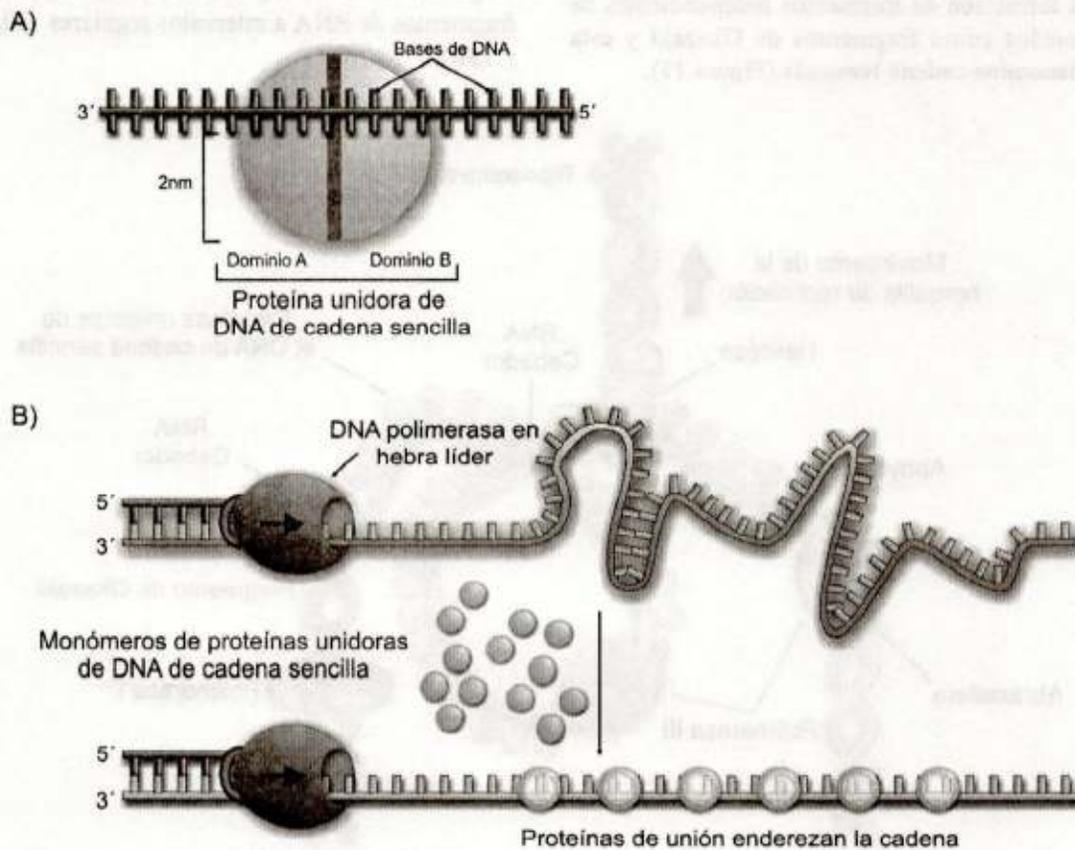


Figura 8. A. Las proteínas unidoras de ADN de cadena sencilla interactúan con las bases nitrogenadas libres en esta molécula. B. El ADN de cadena sencilla es inestable y tiende a unirse a la cadena complementaria o puede formar estructuras dentro de la misma cadena que eviten la replicación, las proteínas unidoras de ADN de cadena sencilla lo estabilizan en una conformación lineal.

A continuación se produce la unión de la RNA polimerasa del complejo de replicación o primasa (DnaG) sobre un fragmento del ADN de cadena sencilla. Esto ocurre gracias a la interacción entre el hexámero de DnaB ya unido al ADN y la primasa (complejo conocido como primosoma). La primasa sintetiza un fragmento corto de RNA (<15 nucleótidos) complementario al ADN de cadena sencilla que se encuentra en el sitio *ori*. Esta secuencia permite que la ADN pol III inicie la adición de deoxirribonucleótidos al extremo 3' y de esta forma se extiende la nueva molécula de ADN de doble cadena (Figura 10)

A medida que ocurre la replicación se forman 2 horquillas, una en cada dirección de la doble hélice y cada una de ellas permite la replicación simultánea de ambas cadenas de ADN. Debido a que la ADN polimerasa solo puede extender el ADN en la dirección 5' a 3', la cadena de ADN que es complementaria a la cadena 3'⇒5' original es la única que se puede sintetizar de manera continua, por lo cual se denomina cadena líder o conductora. Por su parte, la síntesis de la cadena complementaria a la que tiene el sentido 5'⇒3' ocurre de forma discontinua pues depende de la formación de fragmentos independientes de ADN, conocidos como fragmentos de Okazaki y esta cadena se denomina cadena rezagada (Figura 11).

La razón para que las ADN polimerasas solo actúen en dirección 5'⇒3' es la diferencia en la estabilidad química que existe entre los extremos de los nucleótidos: el grupo trifosfato presente en el extremo 5' de los nucleótidos libres es muy inestable en las condiciones iónicas y de pH de la célula y se puede desdoblarse fácilmente a monofosfato y pirofosfato inorgánico, lo cual impide que se unan nuevos nucleótidos al extremo 5'. Por su parte, el extremo 3' de los nucleótidos tiene un grupo OH que siempre está disponible para reaccionar con el nucleótido que adiciona la polimerasa (Figura 12A). Además, una polimerización del ADN de 3' a 5' limitaría la posibilidad de corregir una inserción inadecuada de nucleótidos (Figura 12B).

A medida que se va desplazando la horquilla de replicación y se abre espacio suficiente se inicia la replicación de la cadena molde que tiene dirección 5'⇒3' por medio de la formación de fragmentos de Okazaki. Para la síntesis de la cadena líder solo se necesita un iniciador de RNA en el sitio de inicio de la replicación, mientras que para la cadena rezagada se sintetiza un iniciador para cada fragmento de Okazaki. Esto ocurre porque la RNA primasa se va desplazando en la horquilla de replicación y sintetiza los fragmentos de RNA a intervalos regulares (Figuras 13A y 13B).

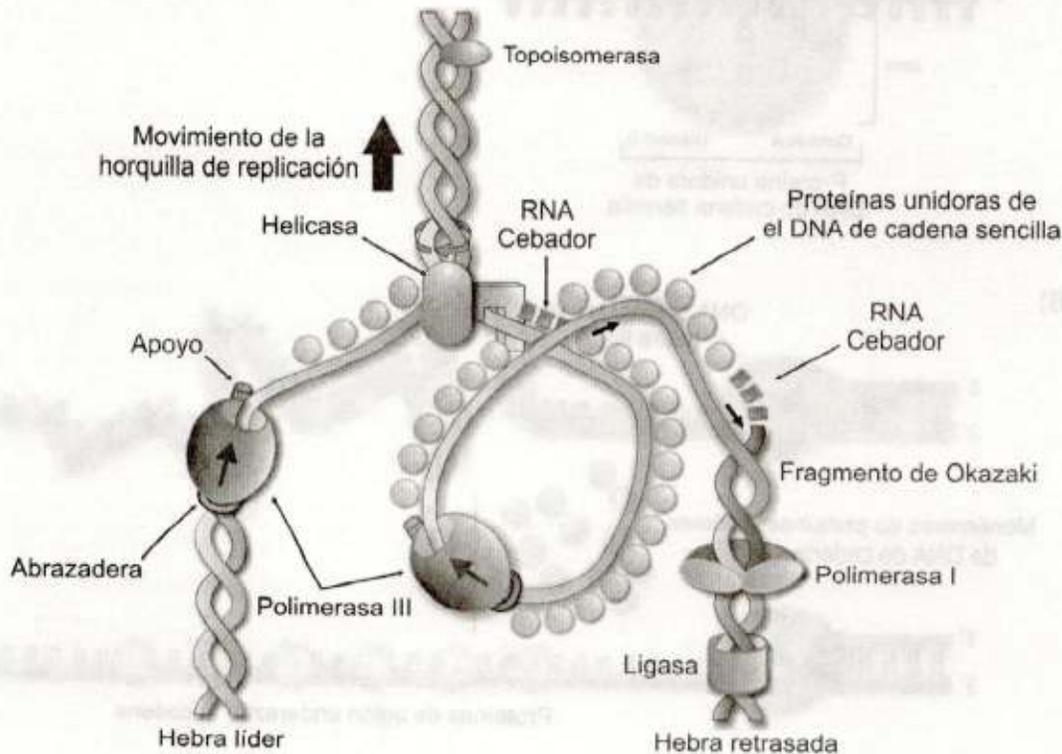


Figura 9. En esta figura se presenta un modelo que indica la secuencia de eventos y las moléculas que están comprometidas durante el proceso de replicación del ADN.

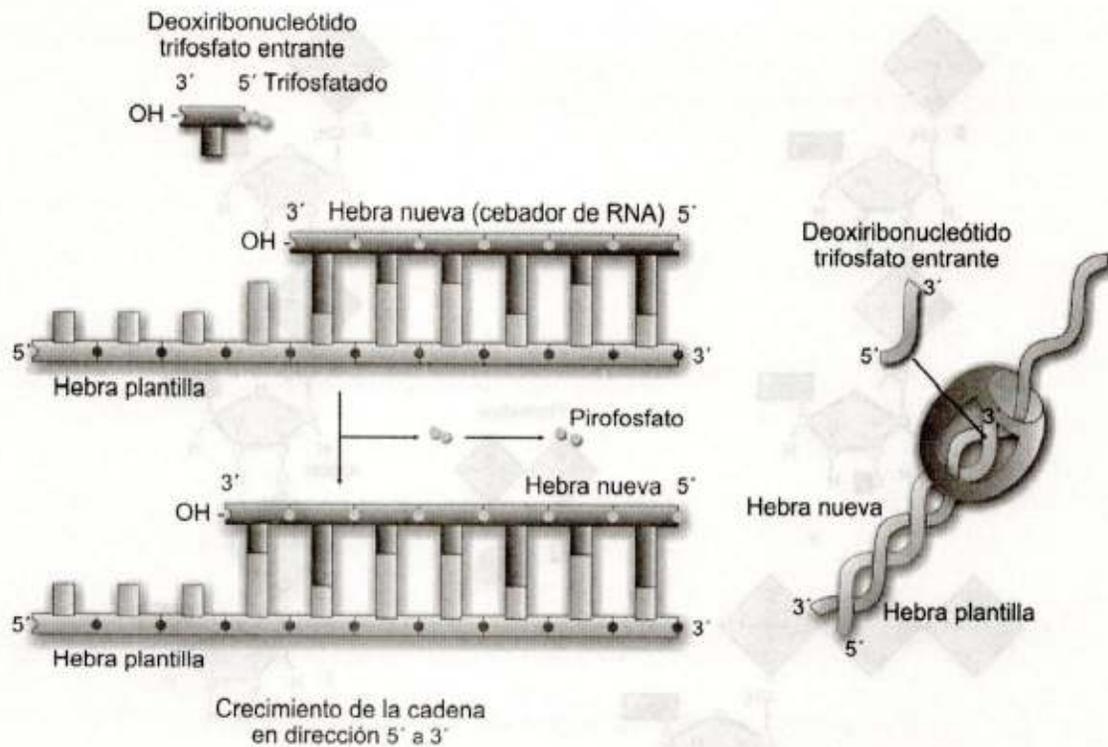


Figura 10. Durante la replicación la ADN polimerasa adiciona los deoxirribonucleótidos al extremo 3' de la cadena nueva, para lo cual se requiere la síntesis de un cebador de RNA, pues esta ADN pol no tiene la capacidad de iniciar la polimerización en ausencia de una cadena con un extremo 3' libre. De esta forma se extiende la nueva molécula de ADN de doble cadena.

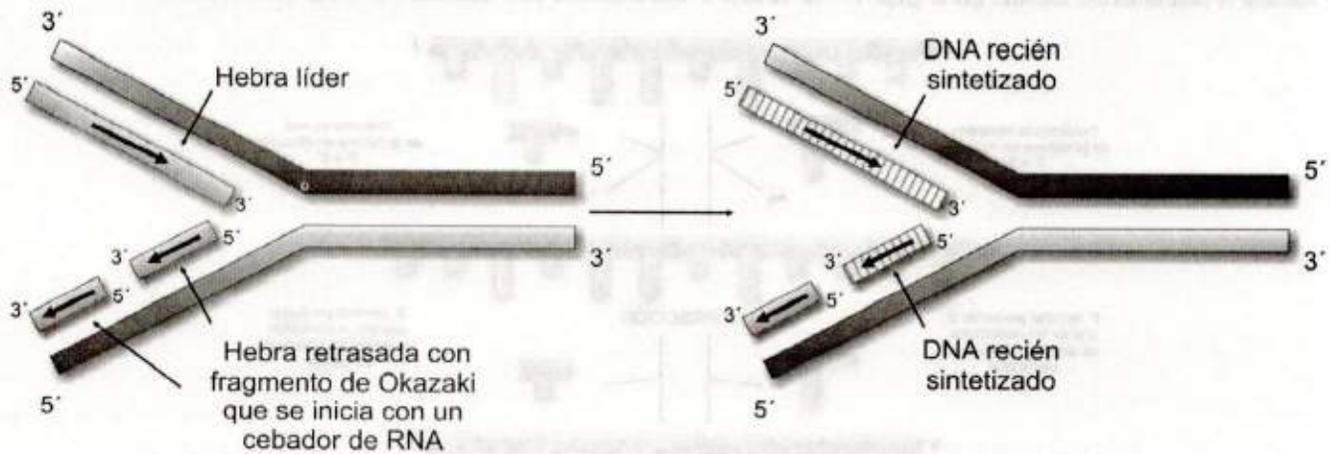


Figura 11. Debido a que la ADN polimerasa solo puede adicionar nucleótidos en la dirección 5' a 3', la cadena nueva de ADN que se sintetiza usando como molde la cadena 3'⇒5' es la única que se puede sintetizar de manera continua, por lo que se denomina cadena líder. De otro lado, la síntesis de la cadena que usa como molde aquella que tiene el sentido 5'⇒3' ocurre de forma discontinua gracias a la formación de fragmentos independientes de ADN, conocidos como fragmentos de Okazaki, ésta se denomina cadena rezagada.

Una vez que la cadena nueva de ADN se extiende por acción de la ADN pol III y alcanza el extremo 5' del fragmento de Okazaki adyacente, el RNA primer debe ser removido y reemplazado con ADN; este proceso es realizado por la RNasa H en conjunto con la ADN polimerasa I. Puesto que la ADN pol no puede crear enlaces fosfodiéster

entre los nucleótidos ya unidos a la molécula de ADN, se necesita de una ADN ligasa que una los nucleótidos adyacentes (Figura 14). Además de su función durante la replicación, la ADN pol I parece ser la enzima más importante para llenar los espacios durante la reparación del ADN, como se verá más adelante.

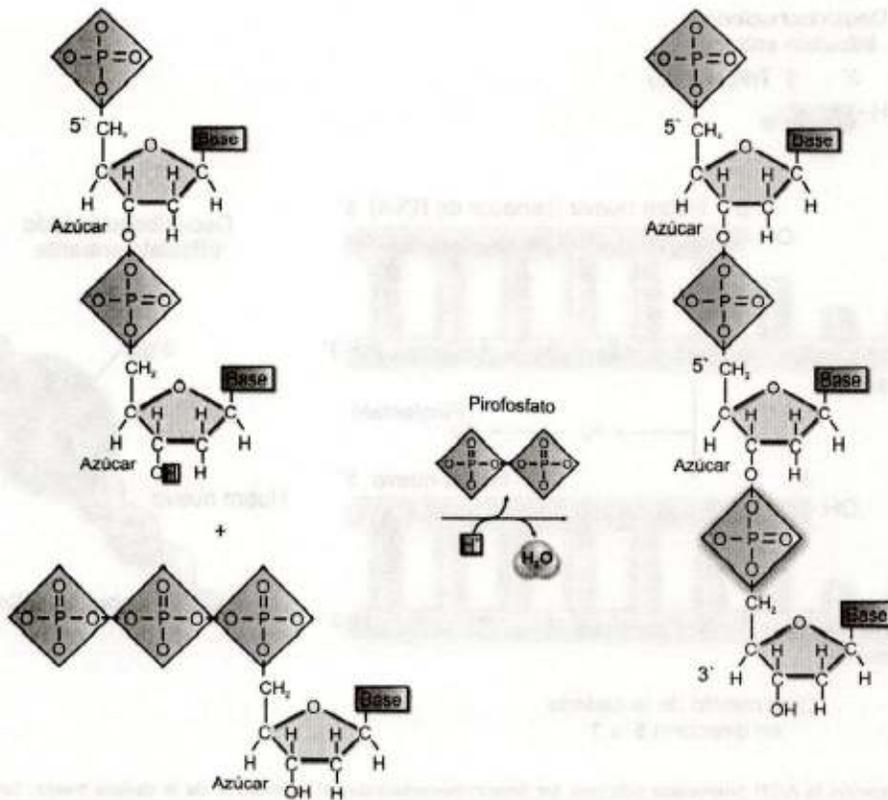


Figura 12A. La polimerización de los ácidos nucleicos solo ocurre en dirección $5' \Rightarrow 3'$ debido a la diferencia en la estabilidad química que existe entre los extremos de los nucleótidos: el grupo trifosfato del extremo $5'$ es muy inestable y se puede hidrolizar en las condiciones fisiológicas, lo cual limitaría la polimerización, mientras que el grupo OH del carbono $3'$ está disponible para reaccionar con el siguiente nucleótido.

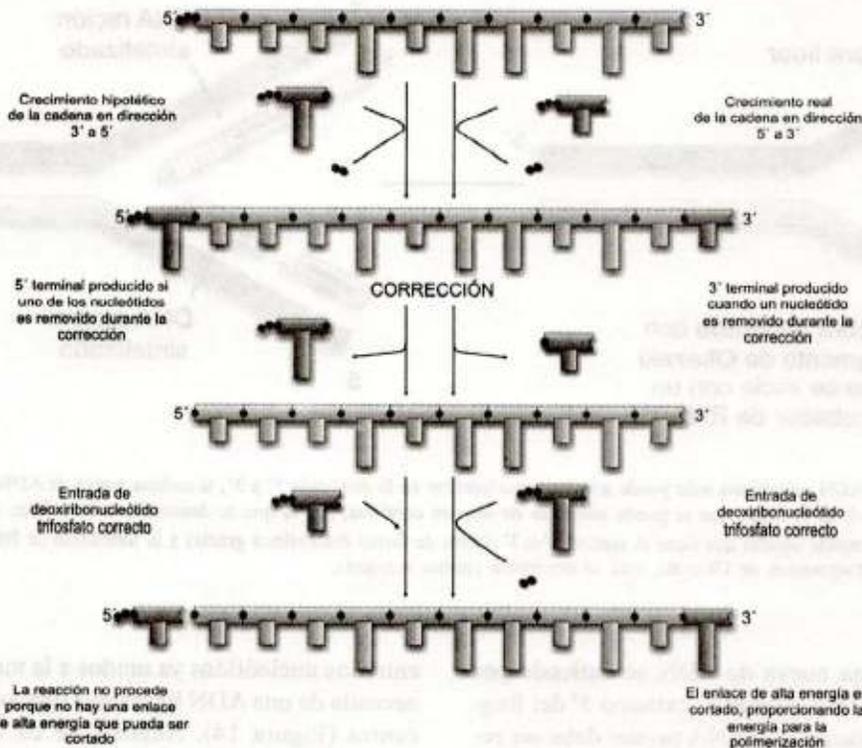


Figura 12B. Otra razón por la que la polimerización de los ácidos nucleicos solo ocurre en dirección $5' \Rightarrow 3'$ es porque si se adicionaran nucleótidos en el extremo $5'$ se limitaría la posibilidad de corregir la inserción anormal de un nucleótido, pues no habría posibilidad de cortar el enlace de alta energía necesario para suplir la energía que se requiere para realizar un nuevo enlace.

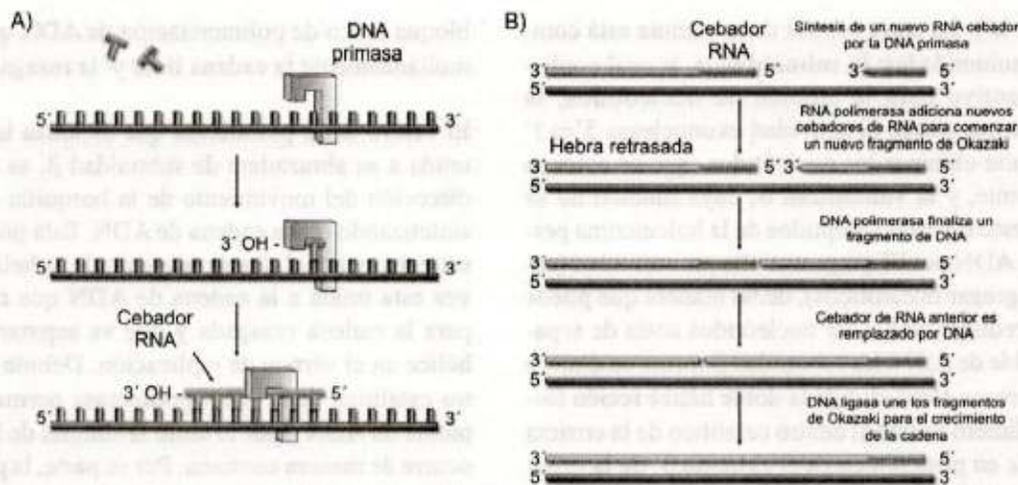


Figura 13. A. Puesto que la ADN polimerasa solo puede actuar extendiendo la cadena a partir de un grupo hidroxilo 3', el inicio de la polimerización del ADN requiere de otra polimerasa conocida como primasa; esta enzima copia un molde de ADN para formar un polinucleótido (cebador) de RNA. Para la síntesis de la cadena líder solo se necesita un iniciador de RNA en el sitio de inicio de la replicación, mientras que para la cadena rezagada se sintetiza un iniciador para cada fragmento de Okazaki. B. A medida que se va desplazando la horquilla de replicación y se abre espacio suficiente se inicia la síntesis de la cadena rezagada mediante la formación de fragmentos de Okazaki. Esto ocurre porque la RNA primasa se va desplazando en la horquilla de replicación y sintetiza los fragmentos de RNA a intervalos regulares. Luego la ADN polimerasa continúa la síntesis de la cadena hasta el siguiente cebador de RNA, el cual es eliminado por una nucleasa y el espacio se llena por otra ADN polimerasa.

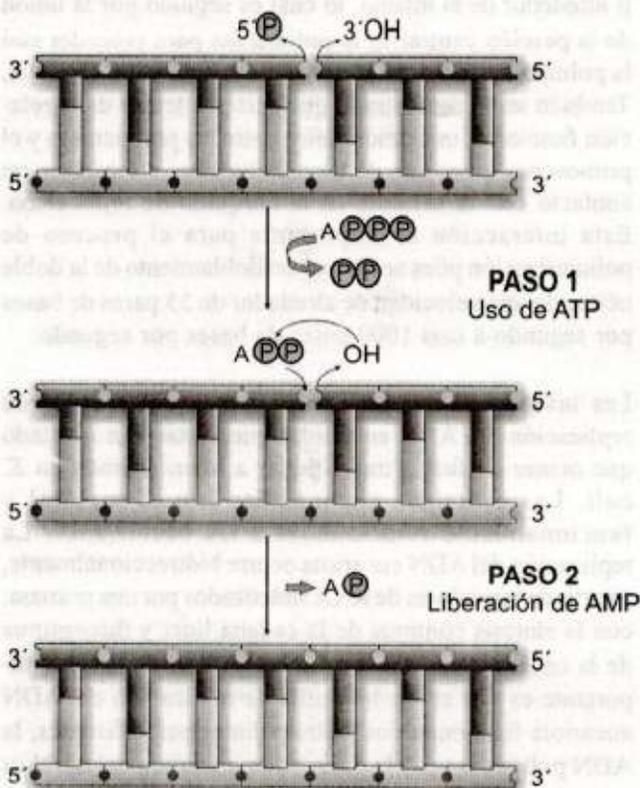


Figura 14. Cuando la ADN polimerasa encuentra la cadena de ADN del siguiente fragmento de Okazaki se desprende y entra en función una ADN ligasa que une los nucleótidos adyacentes.

Algo muy importante en el proceso de replicación es que en cada horquilla de replicación existe un solo complejo macromolecular encargado de la replicación de ambas cadenas de ADN (líder y rezagada). Esto se logra gracias a que la cadena rezagada y su molde de ADN se plegan de tal forma que la ADN polimerasa responsable de la síntesis de la cadena conductora se coloca en contacto con la ADN polimerasa que está sintetizando la cadena rezagada. Gracias a este plegamiento, el extremo final de un fragmento de Okazaki queda cerca al sitio donde se sintetiza el iniciador de RNA para dar inicio a otro fragmento de replicación (Figura 9).

En los organismos procaríotes cada fragmento de Okazaki tiene una longitud entre 1000 y 2000 nucleótidos, mientras en los eucariotes éstos son mucho más cortos, varían entre 100 y 200 nucleótidos. Además, como se mencionó antes la velocidad de polimerización es mucho mayor en procaríotes que en eucariotes. Como ya se mencionó anteriormente, para subsanar esta menor velocidad de la maquinaria de replicación, los cromosomas eucariotes tienen múltiples sitios de origen de la replicación, cada uno de los cuales constituye una unidad de replicación.

Estructura de la polimerasa

Según se describió previamente, la ADN pol III de *E. coli* es una holoenzima compuesta de 10 polipéptidos diferentes, que en total tiene un peso molecular mayor de 600

kDa (Figura 15). La parte central de la enzima está compuesta de 3 subunidades: **la subunidad α** , la cual contiene el sitio activo para la adición de nucleótidos, **la subunidad ϵ** que posee la actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ que le permite eliminar los nucleótidos que se colocan incorrectamente, y **la subunidad σ** , cuya función no se conoce. El resto de los polipéptidos de la holoenzima permiten que la ADN pol III tenga una alta procesividad (capacidad de agregar nucleótidos), de tal manera que puede adicionar alrededor de 5×10^4 nucleótidos antes de separarse del molde de ADN. La subunidad β forma un dímero en forma de rosca alrededor de la doble hélice recién formada. Este dímero se une al centro catalítico de la enzima y lo mantiene en posición cerca al extremo $3'$ de la cadena que está sintetizando. Una vez se asocia con el ADN, el dímero de la subunidad β funciona como una abrazadera que se desplaza a lo largo del ADN a medida que la ADN polimerasa se mueve. Cinco de las subunidades de la holoenzima (γ , δ , δ' , χ y ψ) conforman el complejo denominado γ , el cual por una parte permite la ubicación de las subunidades β alrededor del dúplex de ADN y también se encarga de desarmar la abrazadera de esta subunidad una vez se ha completado la síntesis de la cadena de ADN. Estas reacciones requieren de hidrólisis de ATP como fuente de energía. La última subunidad de la polimerasa (τ) permite la dimerización de las porciones centrales de las dos ADN polimerasas, lo que permite la formación de un

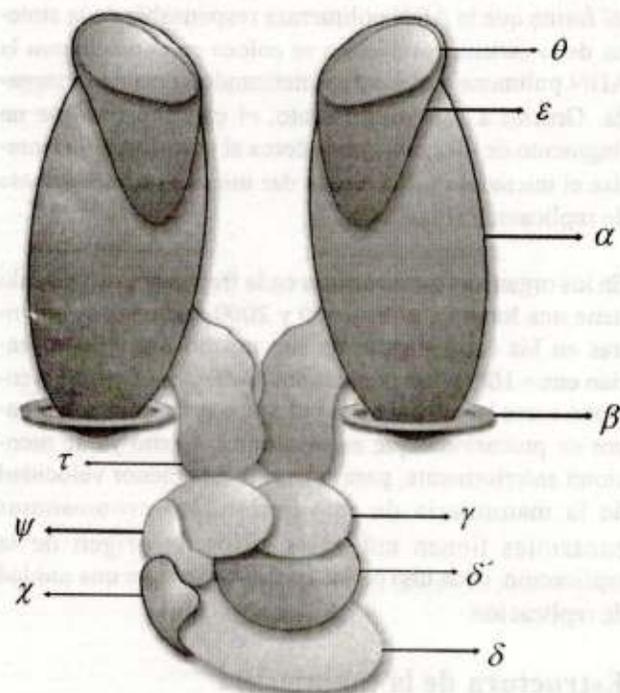


Figura 15. La ADN pol III de *E. coli* es una holoenzima compuesta de 10 polipéptidos diferentes. La parte central de la enzima está compuesta de 3 subunidades: la subunidad α la cual contiene el sitio activo para la adición de nucleótidos, la subunidad ϵ que posee la actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ y la subunidad σ .

bloque único de polimerización de ADN que sintetiza simultáneamente la cadena líder y la rezagada.

El centro de la polimerasa que sintetiza la cadena líder, unida a su abrazadera de subunidad β , se desplaza en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación sintetizando dicha cadena de ADN. Esta polimerasa sigue estrechamente el desplazamiento de la helicasa, que a su vez esta unida a la cadena de ADN que sirve de molde para la cadena rezagada y que va separando a la doble hélice en el vértice de replicación. Debido a esto, el centro catalítico de la ADN polimerasa permanece unido al molde de ADN y por lo tanto la síntesis de la cadena líder ocurre de manera continua. Por su parte, la polimerización discontinua de la cadena rezagada, se puede dar de manera simultánea con la de la cadena líder, gracias a que las ADN polimerasas forman un solo bloque. Una vez la unidad central de la polimerasa de la cadena rezagada completa un fragmento de Okazaki se disocia del molde de ADN, pero permanece unida la subunidad τ . Simultáneamente, una molécula de primasa se une a la helicasa e inicia la síntesis de otro iniciador de RNA. El complejo ADN-iniciador atrae una nueva abrazadera de subunidades β alrededor de sí mismo, lo cual es seguido por la unión de la porción central de la polimerasa para proceder con la polimerización del ADN a partir del iniciador de RNA. También se ha demostrado que existe, además de la relación funcional, una unión física entre las polimerasas y el primosoma, pues una de las subunidades τ establece un contacto con la helicasa en la horquilla de replicación. Esta interacción es importante para el proceso de polimerización pues acelera el desdoblamiento de la doble hélice de una velocidad de alrededor de 35 pares de bases por segundo a casi 1000 pares de bases por segundo.

Las investigaciones realizadas acerca del proceso de replicación del ADN en células eucariotas han revelado que ocurre de forma muy similar a lo encontrado en *E. coli*. Las proteínas encontradas son estructural y funcionalmente relacionadas a las bacterianas. La replicación del ADN eucariote ocurre bidireccionalmente, a partir de iniciadores de RNA sintetizados por una primasa, con la síntesis continua de la cadena líder y discontinua de la cadena rezagada. Sin embargo, una diferencia importante es que en la horquilla de replicación del ADN eucariota funcionan dos ADN polimerasas diferentes, la ADN polimerasa α y la δ . La polimerización del ADN es iniciada por la ADN pol α , la cual luego es desplazada por una proteína similar a la subunidad β de la ADN pol III y reemplazada por la ADN pol δ . Este mecanismo incrementa la procesividad de la polimerasa y de esta forma puede sintetizar fragmentos más grandes de ADN antes de que se separe del replisoma.

Fidelidad de la replicación

La supervivencia de un organismo depende de que se garantice la copia fiel de su genoma. Un error en la copia del ADN de la célula que resulte en una mutación permanente podría ser responsable de eliminación de la progenie de dicha célula. Se ha estimado que en *E. coli*, la probabilidad de que ocurra y permanezca la inserción de un nucleótido equivocado es de alrededor de 10^{-9} . En otras palabras, solamente 1 de cada mil millones de nucleótidos incorporados está apareado erróneamente. La bacteria *E. coli* posee un genoma de alrededor de 4×10^6 nucleótidos, de acuerdo con estos datos, menos de 1 nucleótido se modifica con cada 100 replications, lo que representa la tasa de mutación espontánea de la bacteria.

Esta fidelidad de replicación depende de las actividades de prueba de lectura y de nucleasa que poseen las holoenzimas de ADN polimerasa. La prueba de lectura permite verificar que haya sido insertada la base correcta en la cadena nueva de ADN, mientras que la actividad de nucleasa consiste en cortar deoxinucleótidos y así eliminar errores que pudiera haber introducido (Figura 16).

Replicación en los extremos de los cromosomas eucariotes

A diferencia de los cromosomas bacterianos, los cuales son circulares, los cromosomas eucarióticos son lineales

y terminan en unos extremos especializados denominados telómeros. Los telómeros consisten de secuencias repetitivas de oligómeros con alto contenido de G en la cadena que tiene dirección $5' \rightarrow 3'$ hacia el telómero. La presencia de estas secuencias altamente repetitivas es necesaria para permitir la replicación de los extremos de los cromosomas. A medida que la horquilla de replicación se acerca al fin del cromosoma, la síntesis de la cadena líder continua hasta que finaliza el cromosoma y la doble hélice nueva se libera. Sin embargo, la cadena rezagada no se puede sintetizar totalmente porque su síntesis es discontinua. Una vez se elimina el último iniciador de RNA no existe una cadena de ADN que permita la acción de la ADN polimerasa para llenar el espacio dejado por el iniciador. Por lo tanto, se necesita de un mecanismo especial de replicación para evitar que el cromosoma se acorte con cada división celular.

La secuencia de ADN de los telómeros es similar en diversos organismos como protozoos, hongos, plantas y mamíferos. Los telómeros consisten en repeticiones en tandem (una detrás de la otra) de secuencias cortas que contienen un bloque de nucleótidos de Guanina. En humanos, esta secuencia es GGGTTA y contiene cerca de 10,000 nucleótidos. La telomerasa reconoce las regiones ricas en guanina existentes en el telómero y adiciona nucleótidos en dirección $5'$ a $3'$.

La telomerasa es una enzima con actividad de transcriptasa reversa que se encarga de la replicación de los telómeros

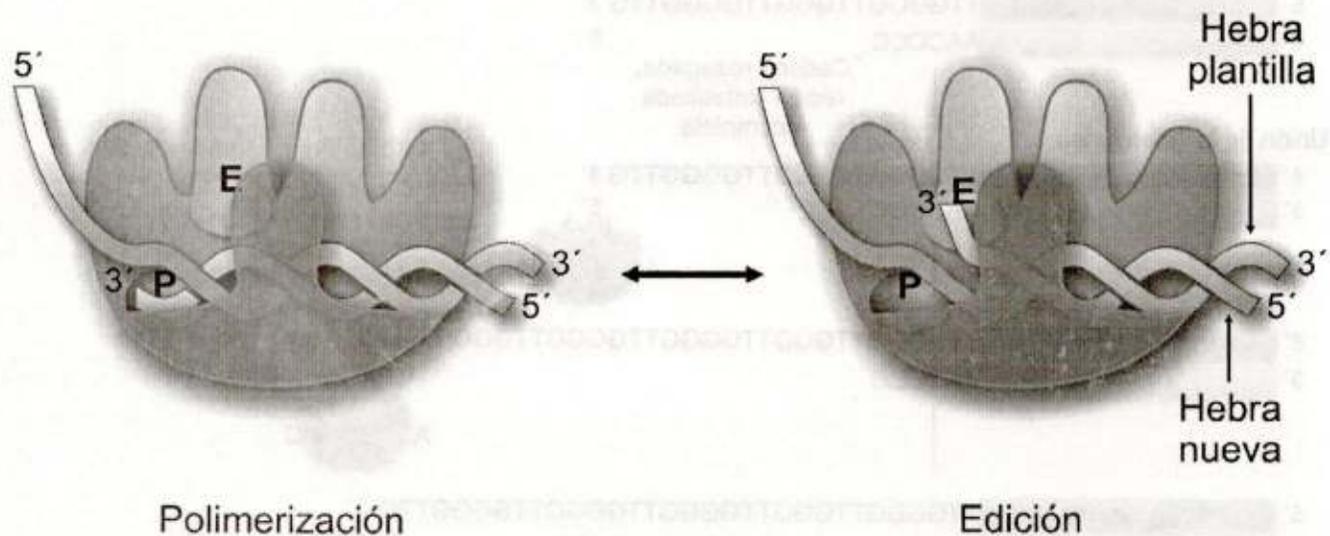


Figura 16. La fidelidad de la replicación depende de las actividades de prueba de lectura y de nucleasa que posee la ADN polimerasa. La prueba de lectura permite verificar que haya sido insertada la base correcta en la cadena nueva de ADN, mientras que la actividad de nucleasa elimina deoxinucleótidos erróneos.

(Figura 17). Esta enzima es una ribonucleoproteína en cuya porción proteica contiene un sitio activo que es capaz de agregar deoxirribonucleótidos sobre un molde de RNA y contiene además el molde de RNA necesario para la síntesis del ADN. De esta manera, al adicionarse varias secuencias de telomerasa, se prolonga el extremo 3' de la cadena de ADN que es molde de la cadena rezagada, y una vez esta cadena está lo suficientemente extendida, se sintetizan iniciadores de RNA que permiten la polimerización del ADN. La adición de un número variable de secuencias de telomerasa es lo que explica que los telómeros tengan oligómeros repetitivos (Figura 18).

En las células de muchos organismos, la longitud de los telómeros se incrementa sustancialmente en las etapas tempranas del desarrollo. La mayoría de las células somáticas humanas se replican en ausencia de telomerasa, lo que hace que se eliminen gradualmente las secuencias teloméricas repetitivas que se adicionaron durante las etapas de desarrollo. Se ha sugerido que la duración de las células en un individuo está determinada por el número de repeticiones teloméricas con las que estas células comenzaron, pues a medida que ocurran divisiones celulares de sus células somáticas va disminuyendo la longitud de los cromosomas hasta un momento crítico en el que las células mueren.

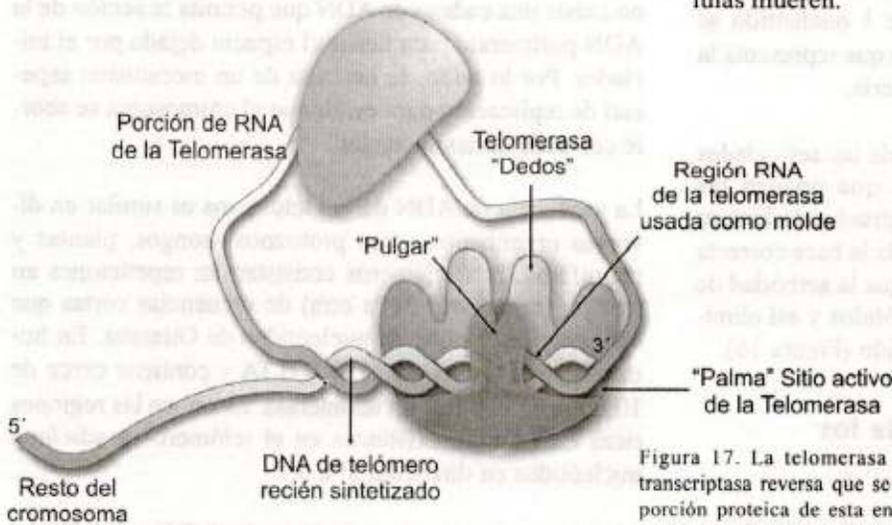


Figura 17. La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa reversa que se encarga de la replicación de los telómeros. La porción proteica de esta enzima contiene un sitio activo que es capaz de agregar deoxirribonucleótidos sobre un molde de RNA, mientras que la porción de RNA sirve de molde para la síntesis del ADN en el extremo del cromosoma.

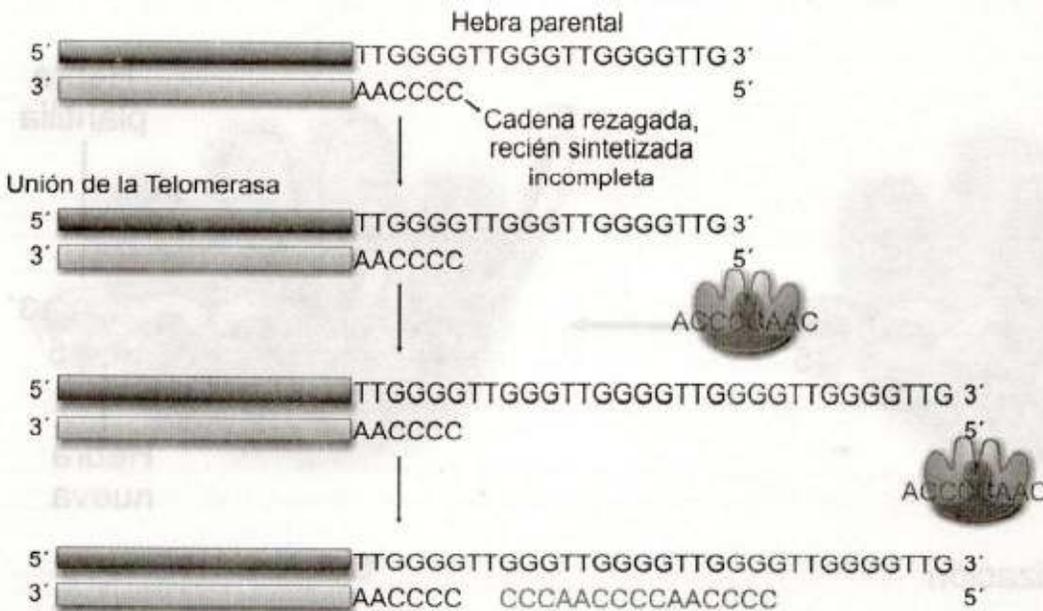


Figura 18. Gracias a la adición de varias secuencias de RNA de la telomerasa, se prolonga el extremo 3' de la cadena de ADN que es molde de la cadena rezagada; una vez dicha cadena está lo suficientemente extendida, se sintetizan iniciadores de RNA que permiten la polimerización del ADN faltante en el extremo del cromosoma.