

7. MECANISMOS DE REPLICACION EN PROCARIONTES

ESQUEMA. Mecanismos de replicación en procariontes

1. El bacteriófago M13

- Paradigma de la replicación de la cadena conductora

2. El bacteriófago Φ X174

- Biosíntesis de la cadena (-)
Paradigma de la replicación de la cadena retrasada
- Biosíntesis de la cadena (+)
Paradigma de la replicación de la cadena conductora

3. Replicación del DNA en *E. coli*

- Mecanismo de la biosíntesis del DNA
- Iniciación de la replicación
- Control de la iniciación de la replicación
- Terminación
- Fidelidad en la replicación del DNA

El bacteriófago M13. Paradigma de la replicación de la cadena conductora

ssDNA: cadena (+). Al infectar *E. coli*, se sintetiza la cadena (-)

→ Obtención de un **dsDNA** a partir de un solo cebador

Mecanismo

1. Unión de las SSBs al ssDNA, excepto por un **fragmento palindrómico** que forma una horquilla
2. **RNA-polimerasa:** síntesis de un cebador de 20-30 nucleótidos antes de la horquilla: dsDNA-RNA
3. El dsDNA de la horquilla → **ssDNA + SSBs**
4. **DNA-polimerasa III:** síntesis de la cadena (-)
5. **DNA-polimerasa I:** elimina el cebador de RNA y rellena el hueco (*"nick translation"*)
6. La **DNA ligasa** une los diversos fragmentos
7. Formación de **dsDNA** superenrollado por la DNA girasa

El bacteriófago Φ X174. Biosíntesis de la cadena (-) Paradigma de la replicación de la cadena retrasada (I)

ssDNA (cadena +) \rightarrow Síntesis de la cadena (-)

\rightarrow Obtención de un **dsDNA** a partir de varios cebadores

Mecanismo

1. Unión de las **SSBs** al ssDNA, excepto a **PAS** – (*Primosome Assembly Site*)

2. **PriA, PriB y PriC** reconocen PAS

3. Unión de **DnaB (x6) y DnaC (x6)** [+ DnaT (ATP)] & separación de la proteína DnaC \rightarrow Formación del **Preprimosoma**

4. Unión de la **primasa** \rightarrow Formación del **Primosoma**

5. El primosoma avanza en sentido **5' \rightarrow 3'** sobre la cadena (+) separando las SSBs del DNA

Hidrólisis de **ATP** por PriA y DnaB

El bacteriófago Φ X174. Biosíntesis de la cadena (-) Paradigma de la replicación de la cadena retrasada (II)

6. Síntesis aleatoria de **cebadores** por la **primasa**
Cambio de orientación de la primasa
Participación de las proteínas DnaB + hidrólisis de ATP
 7. **DNA-polimerasa III**: síntesis de la cadena (-)
→ extensión de los **fragmentos de Okazaki**
 8. **DNA-polimerasa I**: elimina los cebadores
rellena los huecos
Mecanismo de “***desplazamiento de mella***”
 9. La **DNA ligasa** une los diversos fragmentos
 10. Formación de **dsDNA** superenrollado por la DNA girasa
- El primosoma permanece unido al DNA para sintetizar la cadena (+)

El bacteriófago Φ X174. Biosíntesis de la cadena (+) Paradigma de la replicación de la cadena conductora

Modelo del círculo rodante ó replicación en σ

1. Unión de la proteína del **gen A** del fago y rotura de un enlace fosfodiéster
Unión covalente **Tyr-DNA**
2. Unión de la proteína **Rep** a la cadena (-)
Acción conjunta con el primosoma para desenrollar el dsDNA en 5' de la cadena (+)
3. Unión de **SSBs** a la cadena (+) en forma de ssDNA
4. **DNA-polimerasa III**: extensión de la cadena (+) a partir del 3' -OH libre
Extremo 5' de la cadena (+) esta unido a la proteína del gen A
→ **círculo rodante (*rolling circle*)**
5. Replicación de la cadena (+) finalizada: la proteína del gen A corta la cadena antigua y une los dos extremos
6. Repetición del proceso, generando múltiples copias de la cadena (+)
→ **Cada cadena (+) dirige la síntesis de su propia cadena (-)**

LA REPLICACION DEL DNA EN *E. coli* (I)

1. **DnaB** ó **helicasa**

Desenrolla el dsDNA (sobre la cadena rezagada)

Hidrólisis de **ATP**

2. Las **SSBs** se unen al ssDNA

3. La **primasa**: síntesis de los cebadores de RNA

4. El holoenzima **DNA-polimerasa III**

Sintetiza la cadena conductora a partir del cebador de RNA (5'→3')

Subunidad β = “*clamp*” + complejo γ = “*clamp loader*”

→ aumentan la procesividad de la DNA polimerasa III

5. La **DNA girasa** introduce superenrollamientos negativos

La replicación del DNA en *E. coli* (II)

6. DNA-polimerasa III

Síntesis continua de la **cadena conductora**

Síntesis de la **cadena retrasada** por **fragmentos de Okazaki**

- tamaño de los fragmentos de Okazaki en procariontes: **1000 – 2000 nt**
- es necesario “cargar” la subunidad β al principio de cada fragmento de Okazaki. Por eso, la subunidad β = “*clamp*” y el complejo γ = “*clamp loader*” permanecen unidos al núcleo de la DNA polimerasa III
- una vez terminado de sintetizar un fragmento de Okazaki, la pinza β se abre, la polimerasa se separa del molde y se sitúa sobre un nuevo cebador de RNA de la cadena retrasada

→ **Síntesis coordinada de las dos cadenas de DNA por medio del mismo complejo multiproteico**

7. La **DNA polimerasa I** elimina los cebadores de RNA y rellena los huecos

8. **DNA ligasa**: unión de los diversos fragmentos de DNA

La replicación del DNA en *E. coli* (III)

Esquema de la horquilla de replicación en *E. coli*

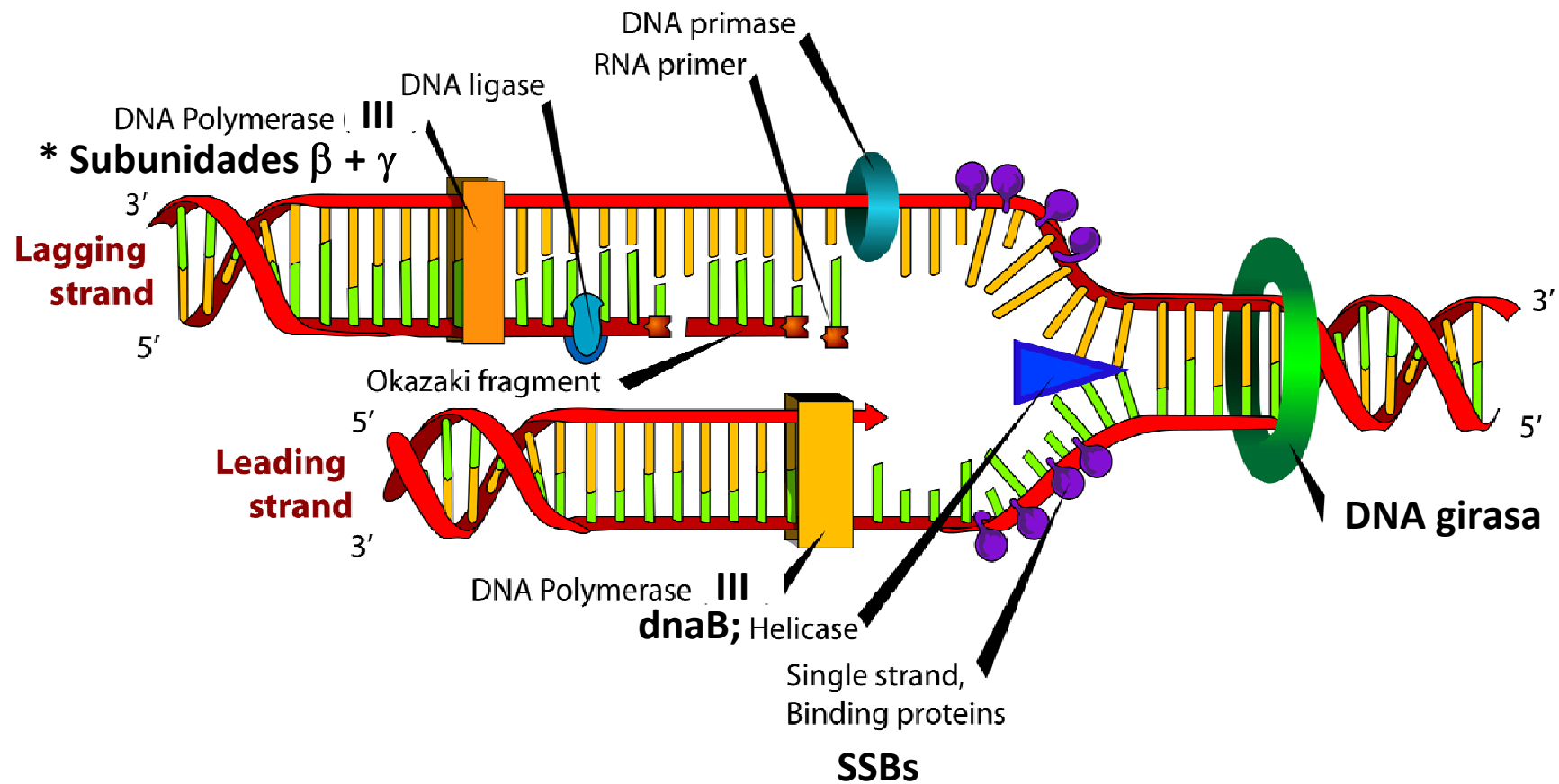


Imagen modificada a partir de:
<http://en.wikipedia.org>
Creative Commons Attribution-Share Alike license

La replicación del DNA en *E. coli* (IV)

Replisoma

Síntesis coordinada de las dos cadenas de DNA por medio del mismo complejo multiproteico

Este complejo esta compuesto por: **Proteínas que desenrollan el DNA**

Primosoma

DNA-polimerasa III

DNA molde

Dos núcleos de DNA-polimerasa III dimerizan a través de las subunidades θ y τ

- Un núcleo $\alpha\epsilon\theta$ sintetiza la cadena conductora
- Un núcleo $\alpha\epsilon\theta + \delta\delta'\gamma\beta$ sintetiza la cadena retrasada

Bucle (*loop*) en la cadena retrasada

La cadena retrasada progresa aparentemente en la misma dirección que la cadena conductora. La síntesis transcurre aparentemente en sentido $3' \rightarrow 5'$, ya que la horquilla de replicación se mueve en un solo sentido

La hebra líder siempre termina de sintetizarse antes que la cadena retrasada

INICIACION DE LA REPLICACION DEL DNA EN *E. coli* (I)

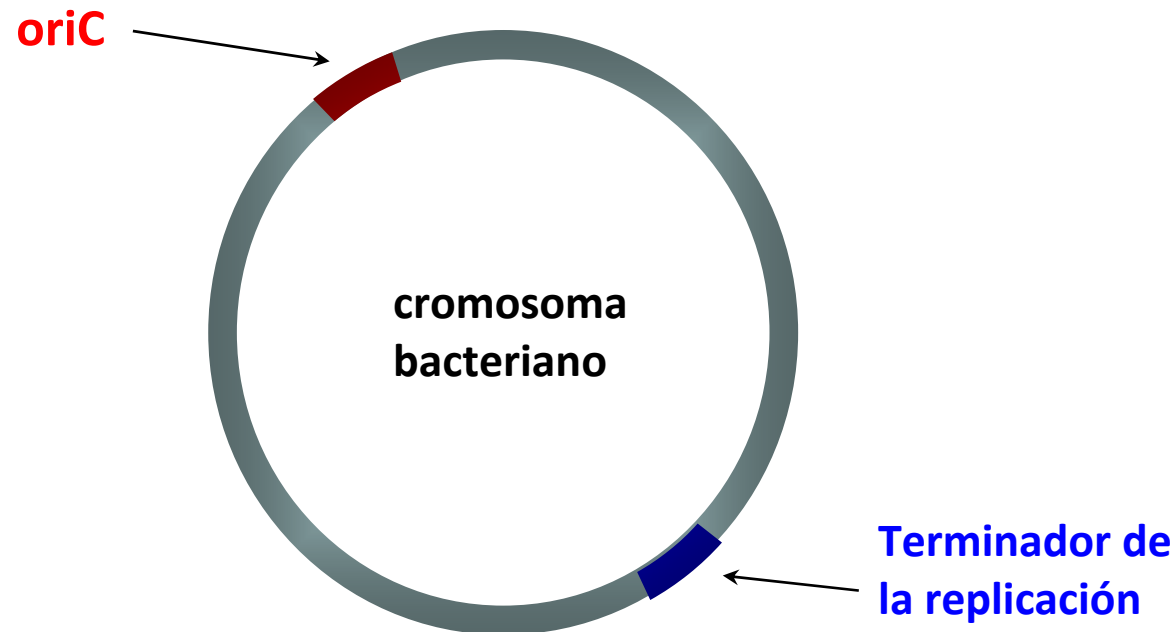
Replicación en θ a partir de un solo origen de replicación: oriC

oriC = *origin of chromosomal replication*

Locus de 245bp con replicación bidireccional; altamente conservado en Gram -

3 repeticiones en tándem de 13bp que son ricas en **AT** (5' GATCTnTTnTTTT 3')
(Tm baja)

4 segmentos (repeats) de 9bp = **DnaA boxes**



Iniciación de la replicación del DNA en *E. coli* (II)

1. La proteína DnaA reconoce 4 segmentos (repeats) de 9bp = DnaA boxes

→ Formación de un complejo oriC DNA con superenrollamiento negativo y 30 proteínas **DnaA**

Participación de las **proteínas HU** (histone-like) ó IHC para permitir que el DNA se doble sobre sí mismo

2. Las 3 repeticiones en tándem de 13bp que son ricas en AT son abiertas (*melted*) sucesivamente por las proteínas DnaA → **complejo abierto de 45bp**

El hecho de que las regiones en tándem sean ricas en AT y presenten una baja T_m facilita el proceso

Presencia de la proteína **DnaA y ATP**: DnaA une fuertemente ATP y lo hidroliza cuando se une al DNA

3. Formación del “**prepriming complex**” ó **complejo preiniciador**

La proteína DnaA guía y permite la unión de las proteínas **DnaB₆·DnaC₆** a la región del cromosoma con ssDNA

DnaB = helicasa

Hidrólisis de ATP + separación de las proteínas DnaC

Iniciación de la replicación del DNA en *E. coli* (III)

4. Unión de las **SSBs** y de la **girasa**

DnaB = helicasa sigue abriendo las dos cadenas de DNA en ambas direcciones, permitiendo el acceso de la primasa y de la RNA polimerasa

5. Unión de la **RNA primasa** y **RNA polimerasa** con la ayuda de las proteínas **PriA, PriB y PriC**

Una vez unida la primasa, PriB y PriC se separan, mientras que PriA permanece unida a la primasa

6. **RNA polimerasa** participa en la **síntesis del cebador** de la cadena conductora en el oriC y la **primasa** sintetiza el resto de los cebadores

Nota: las regiones ricas en AT del oriC son similares a los promotores que son reconocidos por la RNA polimerasa

7. Ensamblaje del **primosoma** & **Replicación bidireccional** por la holoenzima **DNA-polimerasa III**

A la vez que progresa el primosoma, las proteínas DnaA se separan del DNA

CONTROL DE LA REPLICACION DEL DNA EN *E. coli* (I)

Control estricto de la replicación del DNA

Sólo ha de tener lugar una vez por ciclo de división

Ha de estar coordinada con el aumento de masa celular y con la división celular

Tiempo de replicación del cromosoma bacteriano = 40 min aproximadamente
(asumiendo una procesividad de 1000 nt/s)

Tiempo de división del citoplasma = 20 min

Si el tiempo de generación es inferior a 60 min, aparecen cromosomas con múltiples horquillas de replicación

Control de la replicación

1. **Niveles de ATP**: competición ADP # ATP por la unión a DnaA
2. La replicación es iniciada por **acumulación de DnaA**
3. **Niveles de metilación en el oriC**

Metilación del oriC en *E. coli* y control de la replicación (I)

La secuencia de metilación GATC está presente 14 veces en el oriC

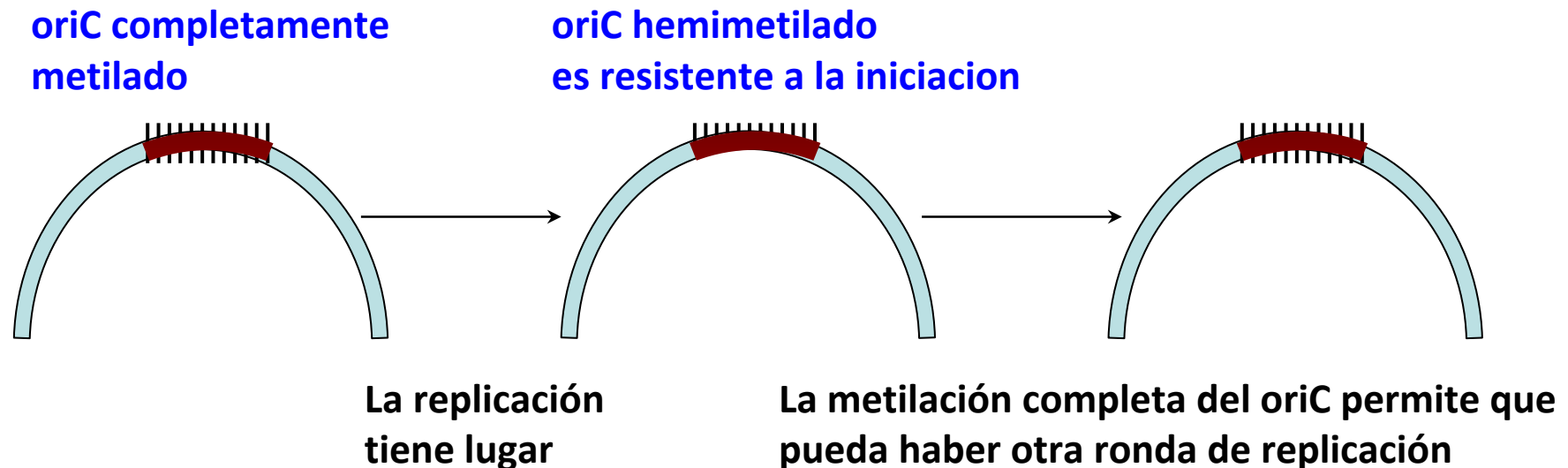
→ un aumento en la metilación desencadena la replicación del DNA

1. DNA parental: metilado

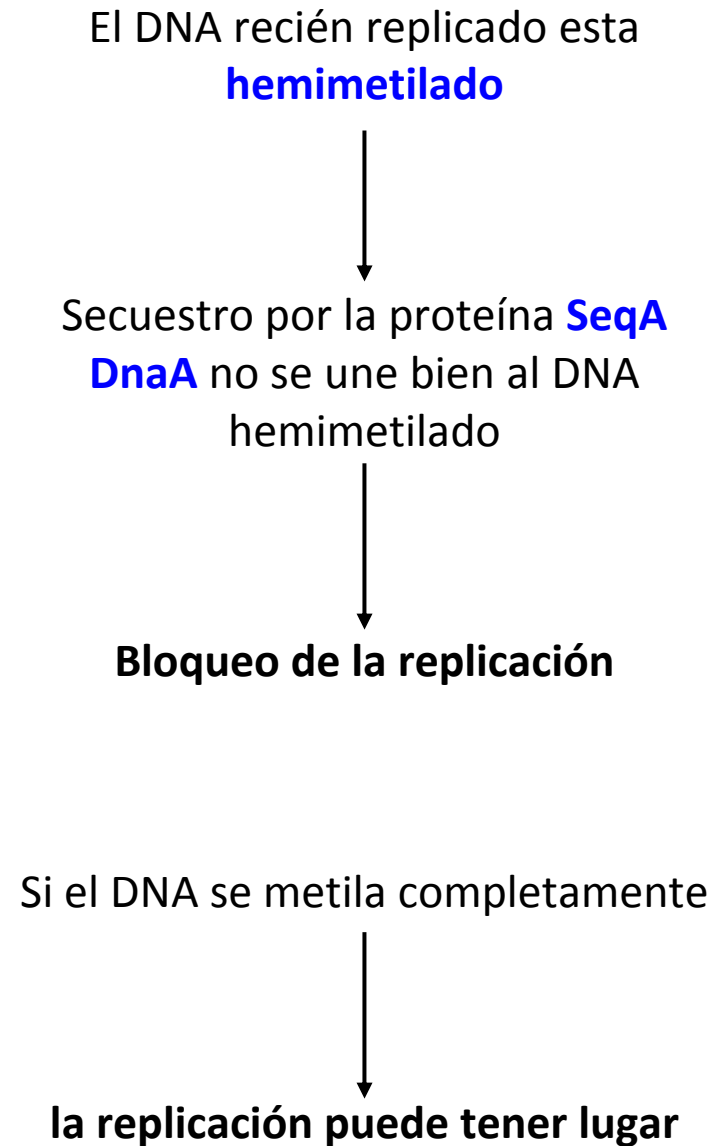
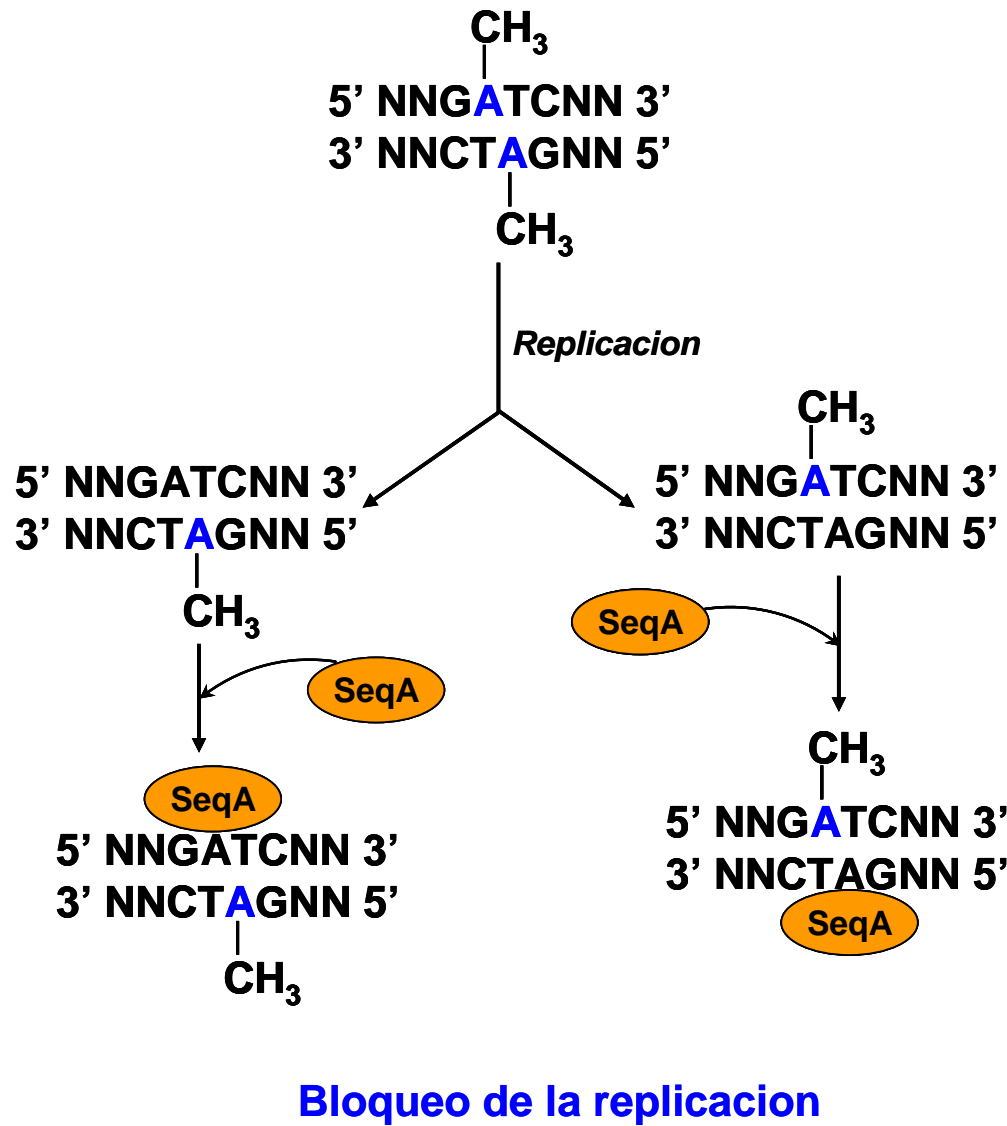
2. DNA recién replicado = hemimetilado

El DNA hemimetilado es secuestrado por la proteína SeqA y no se puede replicar, ya que las proteínas DnaA no se unen bien al DNA hemimetilado

3. El DNA se metila completamente → la replicación puede tener lugar



Metilación del oriC en *E. coli* y control de la replicación (II)

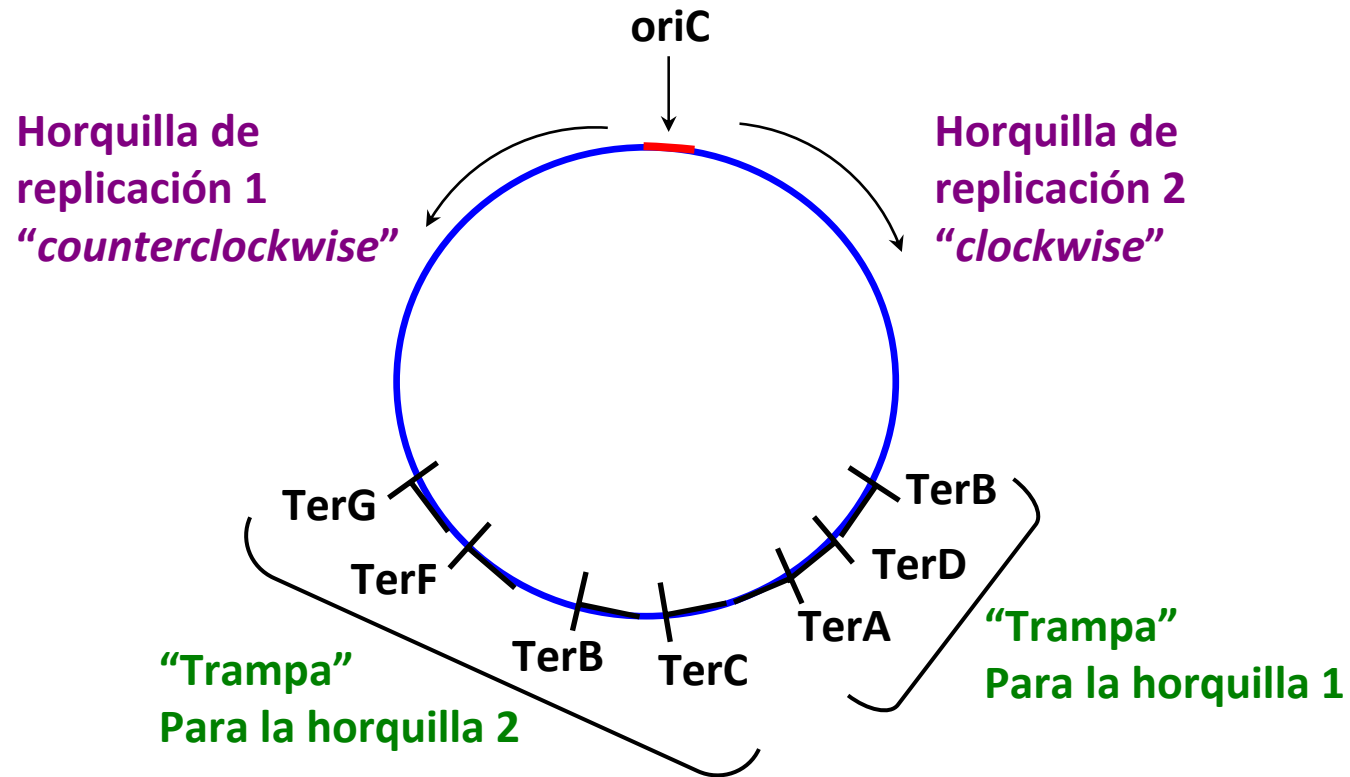


TERMINACION DE LA REPLICACION DEL DNA EN *E. coli* (I)

Locus de 350 Kb con sitios de terminacion Ter

Localizado en el punto opuesto del oriC

Sistema Tus - Ter



Terminación de la replicación en *E. coli* (II)

Sistema Tus – Ter

TER

Fragmentos de 23bp no palindrómicos y casi idénticos entre sí

Ricos en GTs

TerE, TerD y TerA en un lado: para la horquilla de replicación “*counterclockwise*”

TerF, TerB y TerC en el otro lado: para la horquilla de replicación “*clockwise*”

Mecanismo

La horquilla de replicación en sentido contrario a las agujas del reloj pasa por

TerF, TerB y TerC y se para al llegar a TerE, TerD y TerA

TerA verdadero sitio de STOP; los otros dos son puntos adicionales de STOP

Al revés para la horquilla de replicación en sentido de las agujas del reloj

Punto de no retorno: una vez que las horquillas entran en los puntos de STOP, no pueden salir de ellos

Terminación de la replicación en *E. coli* (III)

Sistema Tus – Ter

Proteína Tus

Monómero de 309 $\alpha\alpha$ codificada por el gen *tus*
(*tus* = *Terminator Utilization Substance*)

Se une al sitio Ter, evitando la apertura de la dsDNA por la helicasa
→ bloqueo de la horquilla de replicación

Probablemente existe una **interacción entre Tus y DnaB**

→ **Tus actúa como Contrahelicasa**

Parece que el sistema no es imprescindible, ya que si se eliminan los sitios Ter, las dos horquillas de replicación colisionan y se paran

Finalmente, **las dos cadenas de dsDNA hijas han de ser separadas entre sí por una topoisomerasa II = girasa**

FIDELIDAD EN LA REPLICACION DEL DNA (I)

6 Claves para conseguir una alta tasa de fidelidad

1. Niveles equivalentes de todos los dNTPs

→ Regulación de la ribonucleótido reductasa
la biosíntesis de nucleótidos

2. Fidelidad de las DNA polimerasas : ajuste inducido de los dNTPs

Complementariedad de bases entre el DNA molde y la cadena naciente

3. Necesidad de un molde en la replicación: no hay síntesis *de novo*

4. Necesidad de un cebador de RNA que sera eliminado

5. Actividad 3' → 5' exonucleasa en la propia polimerasa

6. Sistema de reparación de errores en el DNA post-replicación

Fidelidad en la replicación del DNA (II)

Probabilidad de error de introducir un nucleótido erróneo

1. Polimerización 5'→3': 10^{-5}
2. Actividad exonucleasa 3' → 5': 10^{-2}
3. Sistema de reparación de errores: 10^{-2}

Probabilidad total de error : 10^{-8} - 10^{-10}

Enfermedades por expansión de tripletes (*trinucleotide repeat disorders*)

Expansión de secuencias repetitivas de tres nucleótidos

Origen: la polimerasa “resbala” al replicar secuencias repetitivas
bucles de secuencias repetitivas en las cadenas del DNA

La expansión puede afectar a la expresión de un gen
la función de una proteína

Enfermedades que cursan con degeneración neuronal y muscular

- Expansión de CTG = PoliGln -corea de Huntington
ataxia espinocerebelosa tipo 1
- Síndrome del cromosoma X frágil: expansión de CGG
- Distrofia miotónica: expansión de CTG

Anticipación: El número de expansiones aumenta de generación en generación

La enfermedad se manifiesta a edad mas temprana