

25

CAPÍTULO

Replicación de los ADN

La transferencia de la información genética de padres a hijos constituye el fenómeno más importante de la materia viva, esto no sólo garantiza la sucesión de la vida, sino además, constituye el mecanismo básico de conservación de las especies, pues los descendientes siempre poseen características estructurales y funcionales similares a los progenitores. En los organismos monocelulares esta transferencia es directa, pues se produce por el mecanismo de división celular ya estudiado (capítulo 23). En los organismos pluricelulares, sin embargo, existen células especializadas en esta función que son las células sexuales. Las células sexuales masculina (espermatozoide) y femeninas (óvulo), portando cada una la información genética de la especie, se unen en la fecundación y mediante procesos complejos, más o menos prolongados, dan origen al organismo completo. Al ser los gametos haploides en la fecundación se restituye el número diploide característico de la especie. Como la fecundación es específica, todos los seres vivos darán descendientes iguales a sí, o sea, de la misma especie; esa transferencia de información de una célula o un organismo a sus descendientes tiene su fundamento molecular precisamente en la duplicación o replicación de los ácidos desoxirribonucleicos.

La replicación de los ADN de doble cadena es un proceso complejo que no está completamente esclarecido. Esta complejidad se deriva de diferentes factores como son: la estructura tridimensional de los ADN y su grado de superenrollamiento, la especificidad de las proteínas replicativas, la necesidad de una fuente energética y la elevada fidelidad que requiere el proceso.

Las dificultades para su comprensión aumentan al no existir una forma única de replicación para todos los organismos que contienen ADN de doble cadena.

En este texto se examinarán algunas características comunes a la replicación de los ADN de doble hebra. Después se estudiará de forma más detallada cada aspecto del proceso, se comenzará por los organismos procariontes y se concluirá con los aspectos conocidos del proceso en los organismos eucariontes. Cada etapa se estudiará de acuerdo con los conocimientos actuales. El aspecto más desarrollado será el sistema replicativo de la bacteria *E. coli*, por ser el mejor conocido de todos y porque a partir de las investigaciones en este organismo se han podido comprender muchos de los mecanismos implicados, y establecer los modelos, tanto teóricos como experimentales, para el esclarecimiento de un fenómeno tan trascendental en los seres vivos.

Historia del problema

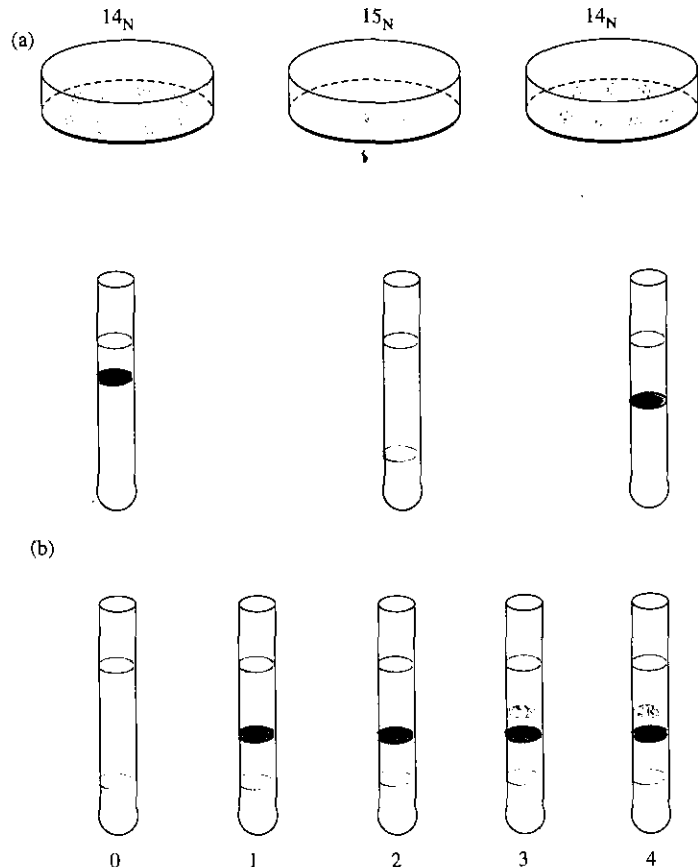
Unas semanas después de dar a la publicidad el modelo molecular del ADN en 1953, James D. Watson y Francis H. Crick propusieron un modelo general para la replicación, el

cual consistía en que cada una de las cadenas de polidesoxinucleótidos servía de molde o patrón para la formación de una nueva cadena complementaria a la original. Esta hipótesis ofrecía 2 posibilidades fundamentales: la conservativa, en la cual una vez sintetizadas las nuevas cadenas, éstas se separaban del molde y se apareaban entre sí dando lugar a una nueva molécula de doble banda, y la semiconservativa, en la que las nuevas moléculas estarían formadas por una cadena del molde y otra recién sintetizada.

En 1957, *Mathew S. Meselson* y *Franklin W. Stahl* diseñaron un elegante experimento para dilucidar cuál de las modalidades era la que realmente ocurría en la naturaleza. Ellos utilizaron cultivos de *E. coli* de los cuales extraían el ADN y lo centrifugaban en un gradiente de densidad de CsCl, observando que dicho ADN se concentraba en una estrecha banda en el tubo de la centrifuga, donde la densidad de la muestra coincidía con la del medio de centrifugación; cultivaron entonces las bacterias en un medio cuya única fuente de nitrógeno era NH_4Cl marcado con ^{15}N ; este último no es radiactivo, pero sí más pesado que el isótopo habitual ^{14}N . Al extraer el ADN y centrifugarlo, se obtenía igualmente una banda, pero localizada más hacia el fondo del tubo. Si las células se hacían crecer en un medio ligero (con ^{14}N) durante un tiempo prolongado, después se transferían a un medio pesado (con ^{15}N) y se dejaban el tiempo necesario para que ocurriera un solo ciclo replicativo, se extraía el ADN, se centrifugaba y se obtenía de nuevo una sola banda, pero su localización era intermedia entre las 2 anteriores. Estos resultados se interpretan de la forma siguiente: si la replicación fuera conservativa al pasar al medio pesado, se encontrarían 2 tipos de moléculas, las ligeras que sirvieron de molde y las pesadas recién formadas. Al aparecer una sola banda, se comprueba que sólo existe una especie molecular y, como su posición en el tubo de la centrifuga es intermedia entre la pesada y la ligera, se concluye que está formada por una cadena pesada y otra ligera, o sea, la replicación es semiconservativa (Fig. 25.1).

Fig. 25.1. Experiencia de Messelson y Stahl.

Esta experiencia demostró que al menos en la *E. coli* la replicación tenía carácter semiconservativo. (a) Se muestra cómo las bacterias al crecer en un medio con ^{14}N , su ADN, al ser centrifugado en gradiente de CsCl, se agrupa en una fina banda donde su densidad corresponde con la del medio de centrifugación. Si crecen en ^{15}N forman también una banda, pero desplazada hacia el fondo del tubo, pues su densidad es mayor. Si se les hace crecer primero en ^{15}N y se pasan al medio con ^{14}N , sólo se mantienen en ese medio el tiempo necesario para un ciclo replicativo, aparece una sola banda cuya densidad es intermedia entre las 2 anteriores, lo cual significa que todas las moléculas tienen la misma densidad y esto sólo es posible si cada una de ellas contiene una banda con ^{14}N y otra con ^{15}N , que la replicación es semiconservativa. (b) Se observa que el ADN de bacterias que crecieron en ^{15}N y después fueron transferidas a un medio con nitrógeno ligero forma una sola banda, pero que al dejarlas crecer después en un medio con nitrógeno ligero en cada ciclo replicativo, la banda que representa al ADN híbrido se hace cada vez más tenue, en tanto la del ADN con nitrógeno ligero se hace cada vez más intensa.



Los intentos por llevar a cabo la replicación *in vitro* comienzan a tener sus primeros éxitos cuando, en 1955, *Arthur Kornberg* descubre una enzima capaz de formar polidesoxinucleótidos a la que llamó ADN polimerasa (hoy ADN polimerasa I o pol I); después de múltiples esfuerzos infructuosos por utilizar sistemas de células animales se decidió utilizar extractos libres de células de *E. coli* y, como ADN a replicar, el del virus ϕ X174; para ello se siguió el procedimiento siguiente: el ADN molde se obtuvo del ϕ X174 y se marcó con tritio, el isótopo radiactivo del hidrógeno, el tritio serviría después continuamente como señal para identificar el molde. Se añadieron al molde junto con dATP, dTTP, dCTP y dGTP, la ADN-polimerasa, ADN-ligasa (descubierta por aquel entonces) y NAD⁺. Uno de los dNTP estaba marcado con fósforo radiactivo que serviría para identificar el material sintético, al igual que el tritio para el molde. La interacción entre los reactivos tuvo lugar hasta que el número de unidades nucleotídicas polimerizadas fue exactamente igual al número de nucleótidos del molde, lo cual podía determinarse fácilmente comparando la radiactividad del tritio en el molde con la del fósforo en el material sintético. Varios medios físicos, incluidos el microscopio electrónico, demostraron que la replicación había ocurrido de forma completa. Experimentos posteriores pusieron de manifiesto el carácter infectivo del ADN sintetizado *in vitro*, con lo cual se comprobaba que era igual al molde utilizado, es decir, que tenían la misma estructura y función. Todo este trabajo se extendió durante 14 años hasta que se pudieron anunciar los resultados. A partir de ese momento comenzó, ya sobre bases firmes, el trabajo para desentrañar el mecanismo de la replicación.

Aspectos generales

Toda la información genética contenida en el ADN reside en su secuencia de bases, por lo tanto la función primordial de cualquier modo de replicación es duplicar la secuencia de bases de la molécula progenitora. La especificidad de los apareamientos de bases –adenina con timina y citosina con guanina– provee el mecanismo usado por todos los sistemas replicativos.

Otro aspecto común es que los nucleótidos son añadidos uno a uno al extremo 3' -OH de una cadena en crecimiento por enzimas llamadas ADN-polimerasas. La secuencia de bases de cada una de las cadenas del ADN es copiada en forma complementaria, así cuando en la hebra que sirve de molde aparece la timina, en la hebra nueva se incorporará adenina y lo mismo sucede al aparecer cualquiera de las bases.

En los ADN de doble hebra el proceso de replicación se produce copiándose ambas cadenas de manera simultánea, por lo que las moléculas formadas contendrán una banda que proviene del ADN, que sirve de molde o patrón y una banda neoformada. Como la molécula de ADN que se está copiando está formada por 2 bandas complementarias, y cada una de ellas sirve de molde para la síntesis de una cadena nueva, resultará que gracias a este mecanismo las moléculas nuevas no sólo serán iguales al molde en su secuencia de bases, sino que serán iguales entre sí. De acuerdo con el mecanismo explicado, las moléculas de ADN de doble hebra que se obtienen como resultado del proceso contienen una cadena del ADN que sirvió de molde y una cadena nueva, lo que significa que durante la replicación se conserva la mitad de la molécula original, por lo que se dice que este proceso es semiconservativo (Fig. 25.2).

La reacción básica de la polimerización consiste en la adición de un desoxinucleósido trifosfatado al extremo 3' -OH del desoxinucleótido precedente, con la liberación de pirofosfato, la cual conduce a la formación del enlace fosfodiéster; esto quiere decir que la cadena se va formando del extremo 5' -P al 3' -OH, luego el crecimiento de la cadena es unidireccional.

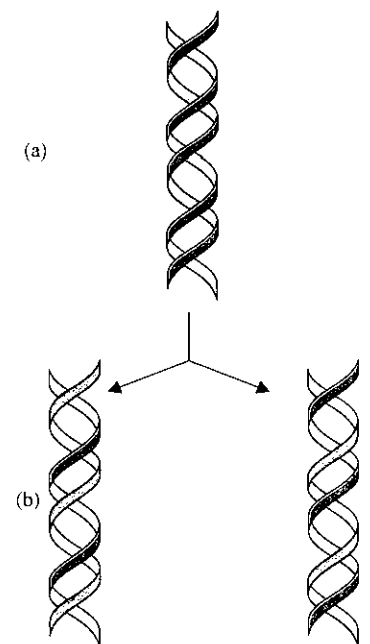


Fig. 25.2. Carácter semiconservativo. El modelo general de la replicación acorde con la experiencia de Messelson y Stahl consiste en que una molécula duplohelicoidal de ADN (a) se separa en sus 2 cadenas y cada una de ellas sirve de molde para la síntesis de la cadena complementaria. Cada molécula nueva (b) está formada por una banda parental (en azul) y una neoformada (en rojo). Luego todas ellas son iguales entre sí.

Esta reacción es muy reversible, pero el acoplamiento a la hidrólisis del pirofosfato favorece el crecimiento de la cadena –la reacción global de polimerización (Fig. 25.3).

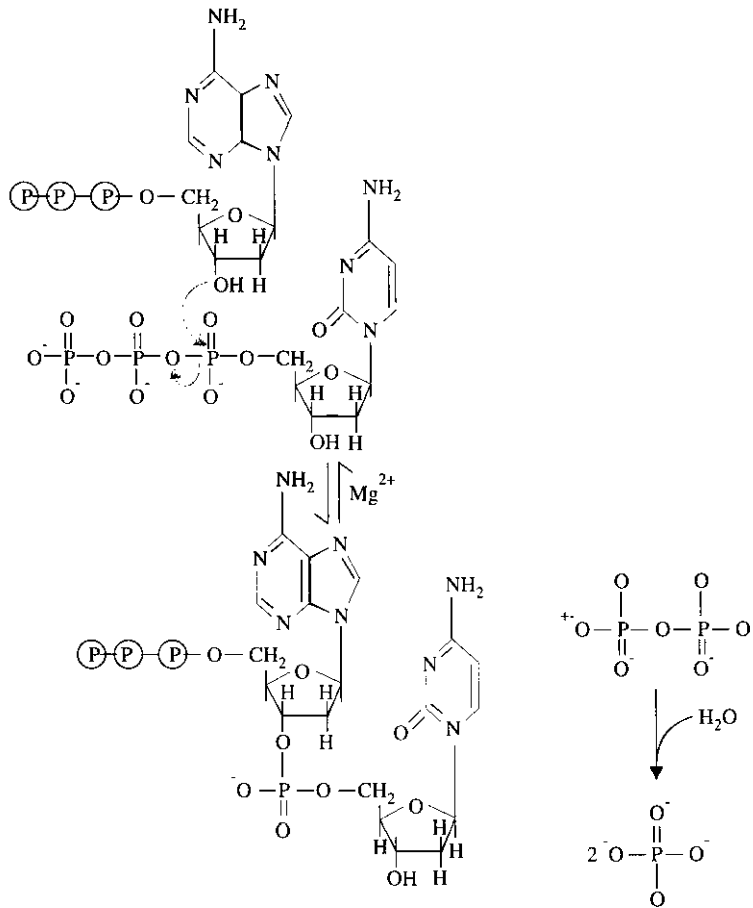


Fig. 25.3. Reacción de polimerización. Todas las ADN polimerasas catalizan la misma reacción. Tomando como sustratos nucleósidos trifosfatados (NTP), los unen mediante la formación de un enlace fosfodiéster. En la figura el fosfato más interno del dCTP se une al 3'-OH del dATP con liberación de P-P, cuya hidrólisis impulsa la reacción hacia la derecha. El ion Mg^{2+} es imprescindible.

Las cadenas de las moléculas de ADN son antiparalelas (de polaridad opuesta); esta disposición es la que permite mejor apareamiento de las bases. En el proceso de síntesis, las polimerasas se van desplazando sobre la cadena de ADN en la dirección $3' \rightarrow 5'$ a la vez que forman la nueva cadena en sentido $5' \rightarrow 3'$, lo que significa que el proceso presenta también carácter antiparalelo; esto hace que la doble hebra que se va formando tenga ya una estructura en doble hélice como las moléculas originales, lo cual le confiere una elevada estabilidad (Fig. 25.4).

En resumen, la replicación se produce por complementariedad de bases, añadidas una a una en forma unidireccional y antiparalela, tiene carácter semiconservativo y está acoplada a la hidrólisis del pirofosfato.

Requerimientos de la replicación

Para que la replicación tenga lugar hace falta un número considerable de moléculas, en especial de macromoléculas, entre ellas se encuentran los 4 tipos de nucleósidos trifosfatados y los 4 desoxinucleósidos trifosfatados. así como iones divalentes, especialmente el Mg^{2+} que siempre acompaña a los nucleótidos en sus reacciones. El total de proteínas que participa en la replicación es desconocido, pero se sabe que constituye un número considerable, entre ellas se encuentran las proteínas estabilizadoras del

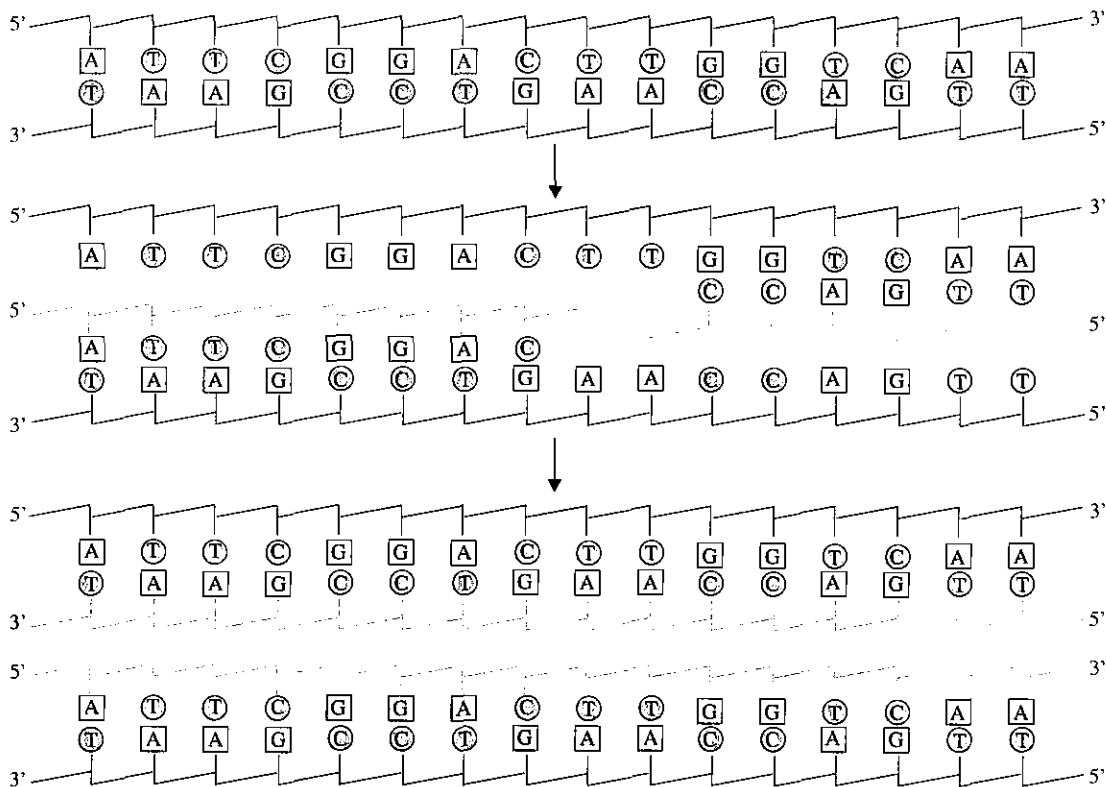


Fig. 25.4. Carácter antiparalelo. Las 2 hebras del ADN sirven de molde para la formación de su cadena complementaria, pero en sentido contrario. En ambos casos la hebra que sirve de molde tiene dirección $3' \rightarrow 5'$, en tanto, la neoformada crece en sentido $5' \rightarrow 3'$. En esto consiste el carácter antiparalelo de la replicación.

ADN de hebra simple, SSB (*single stranded DNA binding proteins*) y un grupo que participa en el reconocimiento de las diferentes señales genéticas del ADN, que garantizan la correcta colocación de las proteínas enzimáticas. Las enzimas que participan en la replicación del ADN no se corresponden en su denominación exactamente con la clasificación de las enzimas estudiadas en el capítulo 15, por eso es necesario hacer algunas breves consideraciones sobre ellas.

En primer lugar están las polimerasas; estas enzimas catalizan la unión de un nucleósido trifosfatado al OH de la posición $3'$ de otro nucleótido en forma reiterativa, de manera que se produce la polimerización de los nucleótidos. Teniendo en cuenta que el producto resultante sea ADN o ARN, estas enzimas se designan como ADN polimerasas, o ARN polimerasas, respectivamente.

Las topoisomerasas interconvierten los topoisómeros del ADN. Por lo general estas enzimas introducen superenrollamientos negativos y se clasifican en tipo I o tipo II, según produzcan el corte de una o las 2 hebras del ADN, respectivamente; ambos tipos se requieren en la replicación. Por su parte, las helicasas son enzimas que desenrollan la doble hélice del ADN, produciendo zonas monocatenarias para lo cual necesitan estar acopladas a la hidrólisis del ATP. Finalmente las ligasas unen 2 fragmentos de una hebra de ADN que se encuentren contiguos, es decir, entre 2 nucleótidos sucesivos, siempre que estos fragmentos estén formando parte de una molécula de ADN de doble hebra. Durante todo el capítulo se trata de forma extensa acerca de cada una de estas enzimas.

Etapas de la replicación

El estudio de la replicación ha sido dividido de forma tradicional en 5 grandes etapas, cuyo conocimiento no es uniforme, pues la complejidad de cada una es diferente. La preiniciación consiste en el ensamblaje del sistema replicativo; la iniciación, en la colocación adecuada del primer precursor; la elongación, en el crecimiento de la cadena y la terminación, en el final del proceso, así como la postterminación se refiere a *modificaciones que experimenta la molécula recién formada hasta ser totalmente funcional*.

Estas mismas etapas, aunque con contenidos diferentes, serán consideradas en los demás procesos –transcripción y traducción– relacionados con los mecanismos de transferencia de la información genética y se resaltarán la similitud formal que existe entre ellos.

Replicación en procariontes

Como sucede casi siempre en la ciencia, los estudios experimentales sobre la replicación comenzaron por los organismos más sencillos y, a partir de ellos, se establecieron no sólo los modelos teóricos, sino también los procedimientos experimentales para los estudios en organismos más complejos.

Este estudio comenzó por los organismos procariontes y especialmente por los virus que los infectan que, como utilizan una parte considerable del sistema replicativo del hospedero, pueden considerarse, teniendo presente las diferencias de complejidad, como una buena aproximación al estudio del proceso en las células bacterianas.

Replicación en *E. coli*

De todos los sistemas replicativos estudiados el mejor conocido es el de la bacteria *E. coli*, un procarionte, cuyo cromosoma contiene una molécula única de ADN circular de doble hebra, de aproximadamente 4×10^6 pb. Si se representa esa molécula como un círculo en el cual se va señalando la localización relativa de los genes, se obtiene el mapa genético de *E. coli*; este círculo ha sido dividido en 100 unidades denominadas minutos. Siguiendo el símil con el reloj, el punto 0 del mapa se corresponde con las 12, el 25 con las 3, el 50 con las 6 y el 75 con las 9, de esta manera la posición de un gen o una región del ADN queda definida por el minuto o los minutos que le corresponden en el mapa. Para dilucidar el mecanismo replicativo se han utilizado tanto técnicas bioquímicas, por ejemplo la extracción y purificación de los componentes del sistema, como procedimientos genéticos que consisten en la producción de organismos mutantes, en los cuales se detecta la falta de algunos de los componentes y se correlaciona con los defectos producidos en el proceso; esto hace que el sistema replicativo sea estudiado con más detalle y que pueda servir de punto de referencia para el estudio de los demás sistemas.

Es conveniente esclarecer la nomenclatura. En la genética de la *E. coli*, los genes se designan por 3 letras minúsculas y, cuando hay varios relacionados, se añade una letra mayúscula por orden alfabético; los relacionados con el metabolismo del ADN se nombran dnaA, dnaB, dnaC, etcétera. Por su parte, el producto del gen se escribe con los mismos símbolos, pero con la inicial mayúscula; de esta forma DnaB es la proteína producto del gen dnaB. Es costumbre utilizar las abreviaturas del nombre en inglés, pues es el idioma preferido en las revistas científicas de circulación internacional. En todos los casos se mencionará la palabra inglesa de donde proviene la abreviatura empleada.

Origen de la replicación

El ADN de la *E. coli* se presenta en la célula con determinado grado de "empaquetamiento" y superenrollado de forma negativa. Para que la replicación pueda producirse es necesario aumentar el grado de superenrollamiento negativo y además producir la separación de las 2 cadenas, de forma que las bases nitrogenadas queden expuestas y puedan servir de molde o patrón para el ordenamiento de las bases nitrogenadas de la cadena que debe sintetizarse.

En la *E. coli* esto ocurre siempre en un punto fijo del ADN, que se conoce como origen de la replicación, *oriC* localizado en los 84 minutos del mapa genético. En el ciclo celular bacteriano se llama C al período de replicación del ADN, es aproximadamente de 40 minutos, y el tiempo necesario para la segregación del citoplasma y la formación del *septum* llamado D es constante e igual a 20 minutos, después de terminar la replicación del cromosoma. Por lo tanto, el ciclo vital de *E. coli* tiene una duración aproximada de 60 minutos. Mucho se ha investigado sobre las características del ADN en esta región; se ha llegado al convencimiento de que se trata de una secuencia de bases específicas que sirve como señal molecular para indicar dónde debe comenzar la replicación.

Para localizar la señal se tomaron fragmentos de ADN, se incorporaron a plásmidos que se replican de forma autónoma y se insertaron en la zona donde habitualmente comienza la replicación de plásmido. Si este ADN lograba replicarse, la secuencia introducida funcionaba como señal de iniciación, de lo contrario se probaba con otra secuencia. Por medio de estos estudios se ha podido determinar el origen mínimo de replicación, o sea, la secuencia de ADN más corta que puede cumplir eficientemente esa función. Se trata de una secuencia de 245 pb, muy conservada entre las enterobacterias y que contiene 3 regiones características:

1. Cuatro copias de la secuencia 5'-TTAT(C/A)CA(C/A)C-3', 2 en un sentido y otras 2 en sentido contrario en posiciones muy conservadas, designadas R1 a R4, que sirven para la unión de DnaA.
2. Tres zonas de 13 nucleótidos, cada una rica en pares AT (5'-GATCTNTTNTTTT-3'), se localizan a la izquierda de las anteriores y favorecen la desnaturalización local del ADN. En la secuencia señalada y en todas de aquí en adelante N representa a cualquier nucleótido.
3. Once copias de la secuencia 5'-GATC-3', que es el sitio de reconocimiento de la metilasa codificada por el gen *dam*. La Dam metilasa reconoce esta secuencia y metila la citosina. Al parecer el grado de metilación es importante para la unión del ADN a la membrana de la bacteria.

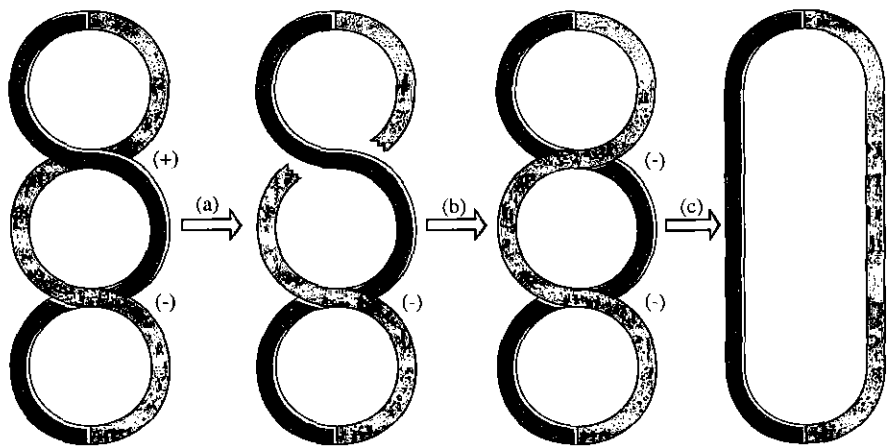
Eventos previos a la iniciación (preiniciación)

El primer evento es tener acceso al sitio *oriC*, lo cual se logra por la acción de las topoisomerasas de tipo II, que por su modo de actuar, como se muestra en la figura 25.5, favorecen la formación de topoisómeros negativos que son los adecuados para la replicación. La preiniciación consiste en la separación de las 2 cadenas en el *oriC*, de manera que las proteínas replicativas puedan acceder a la secuencia de bases del ADN.

Como esta separación origina superenrollamientos positivos hacia a ambos lados de *oriC*, son necesarias las topoisomerasas tipo I y tipo II para mantener el superenrollado negativo requerido para la replicación.

Los eventos que ocurren en *oriC* tienen el orden siguiente: la proteína DnaA se va uniendo a las secuencias de 9 nucleótidos R1-R4 de forma cooperativa, y además, favoreciendo interacciones entre ellas, de manera que al *oriC* pueden quedar unidas de

Fig. 25.5. Acción de la topoisomerasa II. El ADN circular de la *E. coli* existe superenrollado negativamente y es la topoisomerasa II la que se une al ADN, y corta la molécula en sus 2 bandas (a) luego cruza la banda intacta por la abertura y vuelve a sellar (b) haciendo cada vez el topoisómero más negativo que es la forma que favorece la replicación. En la figura se representan las 2 mitades de la molécula en colores diferentes para diferenciar su recorrido.



10 a 20 moléculas de DnaA. Este proceso requiere la hidrólisis del ATP y es muy estimulado por la HU, una proteína parecida a las histonas, la cual provoca dobleces de hasta 90° en el ADN y hace pensar que su función es cooperar con DnaA en el plegamiento del ADN. De esta forma, el ADN se enrolla alrededor del múltiplo de DnaA provocando la separación de las 2 cadenas en la zona de 13 nucleótidos ricos en AT que se abren de manera secuencial, primero, la más cercana a R1 y después las otras. En esas condiciones DnaA guía la translocación hacia la zona abierta de un complejo formado por DnaB y DnaC, formando el llamado complejo de preiniciación.

En presencia de la ADN girasa (topoisomerasa II) y de SSB, la DnaB que posee actividad de helicasa $5' \rightarrow 3'$ procede a alargar la abertura del ADN, para lo cual requiere la hidrólisis del ATP; de esta manera queda formada una estructura en forma de burbuja u ojal, donde las hebras están recubiertas por SSB. Los extremos del ojal forman las horquillas de replicación y obviamente son 2; en cada una de las horquillas se produce la replicación y, como en la medida que avanza el proceso ellas se van separando, la replicación toma carácter bidireccional (Fig. 25.6).

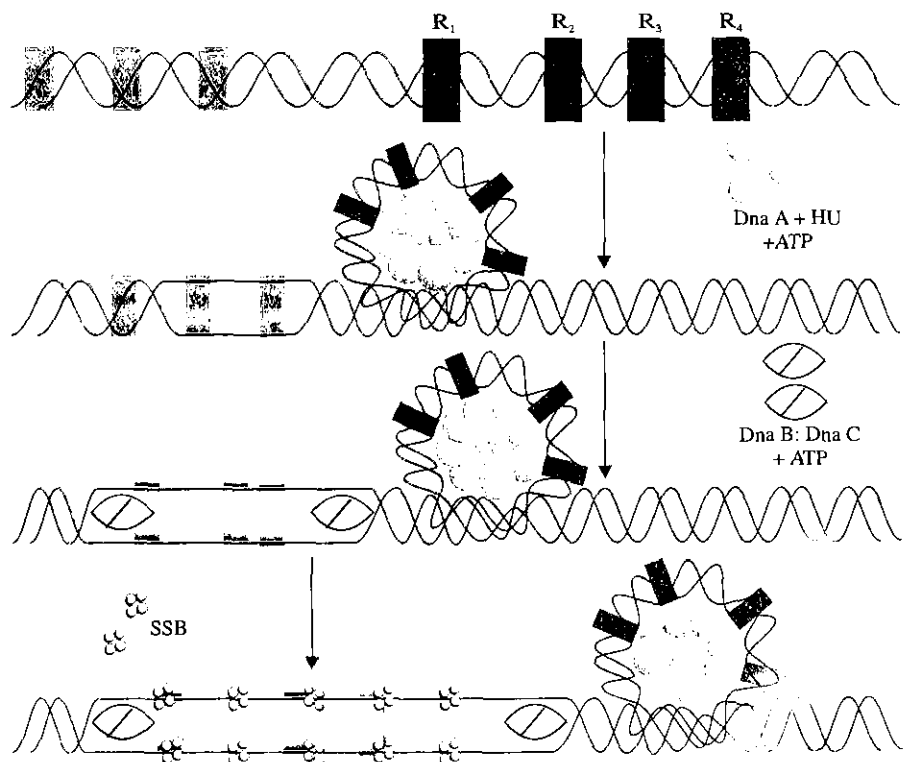


Fig. 25.6. Formación de la horquilla de replicación. Las regiones R1 a R4 sirven de sitio de unión a DnaA que, con la cooperación de HU y el ATP, forman agregados que van curvando al ADN hasta que éste queda enrollado a su alrededor. Esto crea tensiones que se alivian cuando las 3 secuencias ricas en pares AT se separan, originando pequeños sectores de hebras simples. La acción combinada del complejo DnaB|DnaC y las SSB estabilizan esta estructura en forma de ojal sobre la cual se formarán las horquillas de replicación.

En resumen, la preiniciación consiste en la separación de las 2 hebras del ADN en *oriC*, para formar 2 horquillas de replicación. Para su formación son necesarias las proteínas DnaA, DnaB, DnaC, HU, ADN girasa y SSB, así como la hidrólisis del ATP.

Iniciación

Para hacer progresar la horquilla es necesario otro grupo de proteínas. Al quedar separadas las 2 hebras del ADN queda expuesta una secuencia de unos 70 nucleótidos, denominada sitio de ensamblaje del iniciador o PAS (*primosome assembly site*). El sitio PAS es reconocido por la proteína PriA, que se une a él y permite la unión posterior de PriB; entonces se une DnaT y promueve hacia ese sitio la translocación de un complejo constituido por DnaB:DnaC:PriC. El complejo de 6 proteínas formado se mueve sobre el ADN en las 2 direcciones gracias a la actividad de helicasa 5' → 3' de DnaB y la 3' → 5' de PriA.

En lugares específicos el complejo reconoce alguna señal y a él se une la DnaG que tiene actividad iniciadora y forma polirribonucleótidos de aproximadamente 10 unidades de largo, el ARN iniciador. La acción iniciadora de DnaG depende de la presencia de DnaB; esta acción combinada de iniciadoras y helicasas es un tema que se repite en todos, o casi todos los sistemas replicativos estudiados. Al conjunto de todas estas proteínas, incluyendo a DnaG se le denomina complejo iniciador (Fig. 25.7).

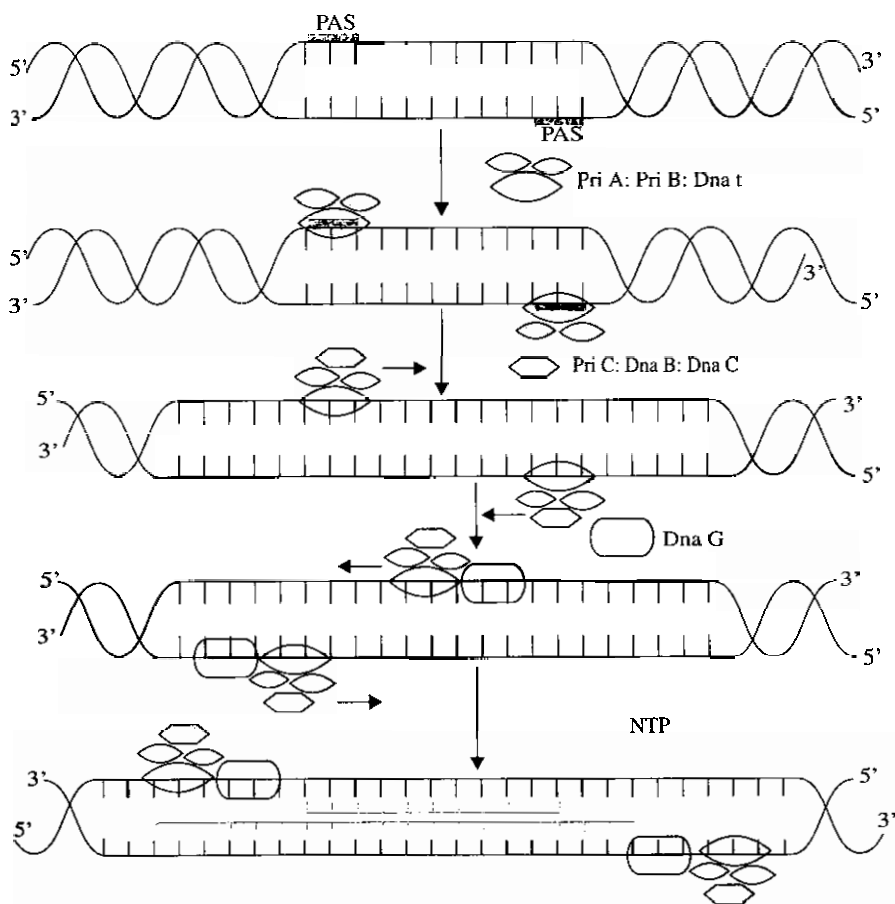


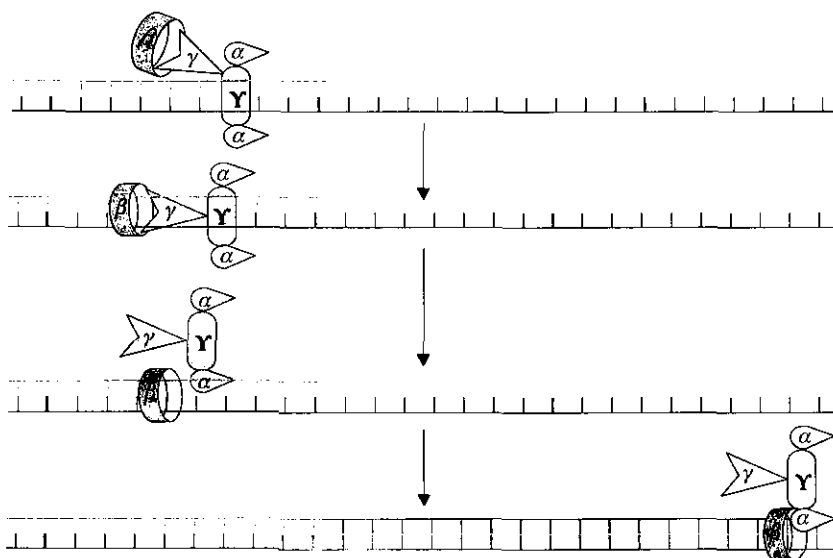
Fig. 25.7. Formación del corpúsculo iniciador. Al progresar la abertura del ojal se descubre el PAS al cual se unen en forma sucesiva PriA, PriB y DnaT, y estos a su vez promueven la incorporación del complejo formado por DnaB|DnaC|PriC, con la formación de un corpúsculo que se mueve en las 2 direcciones sobre el ADN en busca de la señal necesaria para la formación del ARN iniciador. Localizada la señal se incorpora DnaG que tiene actividad de ARN polimerasa iniciadora y se forma el ARN iniciador.

En estas circunstancias se une al sistema la holoenzima de la ADN polimerasa III en un proceso dependiente de ATP. La enzima utiliza el C3'-OH de los ARN iniciadores para alargarlos, por la sucesiva adición de desoxinucleótidos uno a uno según la secuencia de las bases nitrogenadas del ADN molde. Este complejo proteínico recibe el nombre de replisoma.

La ADN polimerasa III de *E. coli* es una enzima muy compleja formada por al menos 10 subunidades diferentes. Cada célula contiene de 10 a 20 copias de la holoenzima, por lo cual, para purificar 1 mg se deben utilizar de 2 a 3 kg de células. Para describir su organización se emplean diferentes niveles de ensamblaje. El más sencillo es el núcleo de la polimerasa formado por las subunidades α, ϵ, θ ; la subunidad α posee actividad de polimerasa, en tanto, la ϵ es una exonucleasa 3' \rightarrow 5' que participa en el mecanismo de edición descrito al final del capítulo, y la subunidad θ estimula la actividad de la ϵ . El segundo nivel de organización llamado Pol III' contiene 2 núcleos y un dímero de τ . Para la formación del nivel siguiente, llamado Pol III* se requiere la incorporación del complejo γ que está formado por las subunidades $\gamma, \delta, \delta', \chi$ y ψ , por lo tanto, en la formación del Pol III* intervienen 14 polipéptidos representados en la fórmula subunitaria $\alpha_2\epsilon_2\theta_2\tau_2\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$. La holoenzima se completa con la adición de la subunidad β .

En general la "procesividad" de la polimerasa se incrementa en la medida que se incorporan las subunidades al núcleo, pero tanto la procesividad como su alta velocidad tienen un requerimiento absoluto de la subunidad β ; esto se debe a la forma en que la polimerasa se ensambla sobre el ADN. Una vez formado el ARN iniciador, el complejo γ se asocia al híbrido ADN|ARN y promueve la incorporación de la subunidad β ; esta proteína está formada realmente por 2 subunidades que presentan una forma circular hueca. El complejo γ produce la abertura del anillo que después se cierra con el híbrido ADN|ARN en su interior. Este proceso requiere ATP y es el único momento que la ADN polimerasa III necesita ATP para funcionar. La estructura particular de la subunidad β le permite deslizarse sobre el ADN de doble hebra hasta localizar en una de ellas un extremo 3'-OH. En cualquier momento, el núcleo de la polimerasa desplaza al complejo γ y se une al anillo deslizante formado por la subunidad β ; al núcleo se incorporan sucesivamente el resto de las subunidades. La importancia de que el complejo Pol III* contenga 2 copias del núcleo ($\alpha\epsilon\theta$) se verá inmediatamente cuando se trate la elongación. La incorporación de la ADN polimerasa III al ADN preiniciado se muestra en la figura 25.8.

Fig. 25.8. Incorporación de la ADN polimerasa III al ADN preiniciado y formación del replisoma. El híbrido ADN|ARN iniciador es reconocido por el complejo γ y el complejo τ . El complejo γ promueve la incorporación del anillo deslizante que forma la subunidad β , para lo cual requiere la hidrólisis del ATP. Después el núcleo de la polimerasa del que sólo se representa la subunidad α desplaza al complejo γ ; de esta forma la polimerasa se desliza por el híbrido hasta encontrar el extremo 3'-OH del ARN iniciador, al cual comienza a añadir los desoxinucleótidos complementarios a los de la hebra molde.



Resumiendo, el hecho clave de la iniciación es la formación del ARN iniciador realizado por la DnaG; para que eso ocurra se requiere la participación de varias proteínas (PriA, PriB, PriC, DnaB, DnaC y DnaT) que forman el complejo iniciador. Con la incorporación de la ADN polimerasa III y la formación del replisoma puede darse por terminada la fase de iniciación.

Elongación

La elongación comprende la serie secuencial de eventos que implican el alargamiento de las cadenas del ADN y donde interviene otro grupo de proteínas enzimáticas.

Es bueno destacar la diferencia entre 2 aspectos que pueden confundirse. Al tratar los aspectos generales se señaló que el crecimiento de las cadenas nuevas (hijas) es unidireccional, porque las enzimas provocan el crecimiento de la cadena del extremo 5' al 3'. Sin embargo, la replicación en las 2 cadenas es bidireccional, o sea, la burbuja de replicación se mueve en las 2 direcciones a partir del punto de origen, llegando a formarse, en la medida que el proceso transcurre, 2 horquillas que se mueven en direcciones opuestas sobre la doble banda del ADN; por eso se verá lo que ocurre en una horquilla, pues igual sucede en la otra.

Una vez incorporado el primer desoxinucleótido, la pol III —utilizando la subunidad β para deslizarse— continúa incorporando uno a uno los desoxinucleótidos siguientes, cuyas bases son complementarias a la que ocupa el lugar correspondiente en el ADN; luego se trata de un proceso repetitivo. En la otra hebra, la horquilla se mueve en dirección contraria a la síntesis, o sea, en dirección 3' \rightarrow 5'. Como la ADN polimerasa III sólo sintetiza en dirección 5' \rightarrow 3', el movimiento de la horquilla detendría su funcionamiento, pero se sabe que esto no ocurre así; en esta banda la síntesis se produce por fragmentos, a los cuales se les conoce como fragmentos de Okazaki, en honor a su descubridor el japonés *Reiji Okasaki*.

La holoenzima de la ADN polimerasa III contiene 2 copias del núcleo, por eso una sola holoenzima es capaz de sintetizar las 2 hebras de ADN de forma simultánea; para ello la hebra conducida forma un lazo alrededor de la holoenzima, de manera que cambia la dirección de la hebra, y permite que la enzima pueda alargar las 2 hebras al mismo tiempo (Fig. 25.9).

Cada cierto tramo de la molécula del ADN se forma un nuevo segmento de ARN iniciador, que permite un nuevo crecimiento. En el proceso de la replicación del cromosoma de *E. coli* se forman entre 2 000 y 4 000 de estos fragmentos con una longitud de 1 a 2 kb. La ADN polimerasa III es capaz de incorporar unos 1 000 desoxinucleótidos por segundo, de ahí que la síntesis de un fragmento de Okazaki demora de 1 a 2 segundos. Cuando la pol III encuentra un híbrido ADN | ARN no puede continuar incorporando nucleótidos. Simultáneo al desplazamiento de la ADN polimerasa III, el complejo γ es capaz de ensamblar anillos deslizantes de las subunidades β por delante de la horquilla, y hacia ese anillo se transfiere el núcleo de la polimerasa cuando el movimiento de la enzima cesa al encontrar el híbrido ADN | ARN.

Este proceso se va repitiendo constantemente en una de las cadenas, por lo que se dice que la síntesis es discontinua. En la otra banda, sin embargo, la síntesis progresa sin interrupciones, pues se realiza en favor del movimiento de la horquilla, por lo que en ella la síntesis es continua; de ahí se describe la replicación como un proceso que es al mismo tiempo continuo y discontinuo—algunos autores lo llaman semidiscontinuo—, esta característica del proceso se ilustra en la figura 25.10.

Como resultado del proceso descrito, una de las hebras del ADN se encuentra casi completamente replicada, en tanto la otra hebra presenta como productos de la replicación fragmentos que contienen ARN iniciador hacia el extremo 5'; entonces interviene otra enzima, la ADN polimerasa I. Esta enzima, además de la actividad polimerasa, posee actividad de exonucleasa 5' \rightarrow 3' para ADN de doble cadena o híbridos ADN | ARN; debido a esta actividad, ella va eliminando uno a uno los

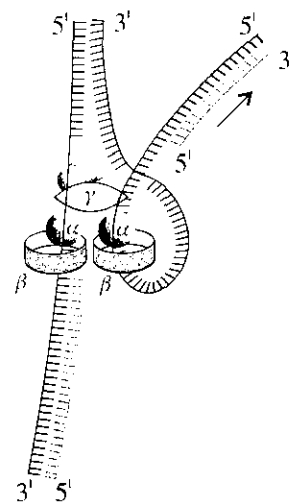


Fig. 25.9. Acción de la ADN polimerasa III durante la elongación. Durante la fase de elongación la ADN polimerasa III forma un complejo de composición asimétrica sobre las 2 hebras del ADN. En cada una de las hebras existe el núcleo unido a la subunidad β que le da la movilidad necesaria. Las demás subunidades se agrupan más hacia la hebra conductora; esta estructura hace que el ADN forme un gran lazo alrededor de la polimerasa de forma que las 2 hebras del ADN, al entrar en contacto con la superficie de la enzima, queden con una orientación 5' \rightarrow 3' y de esta forma la polimerasa III es capaz de sintetizar de manera simultánea la hebra conductora y la conducida.

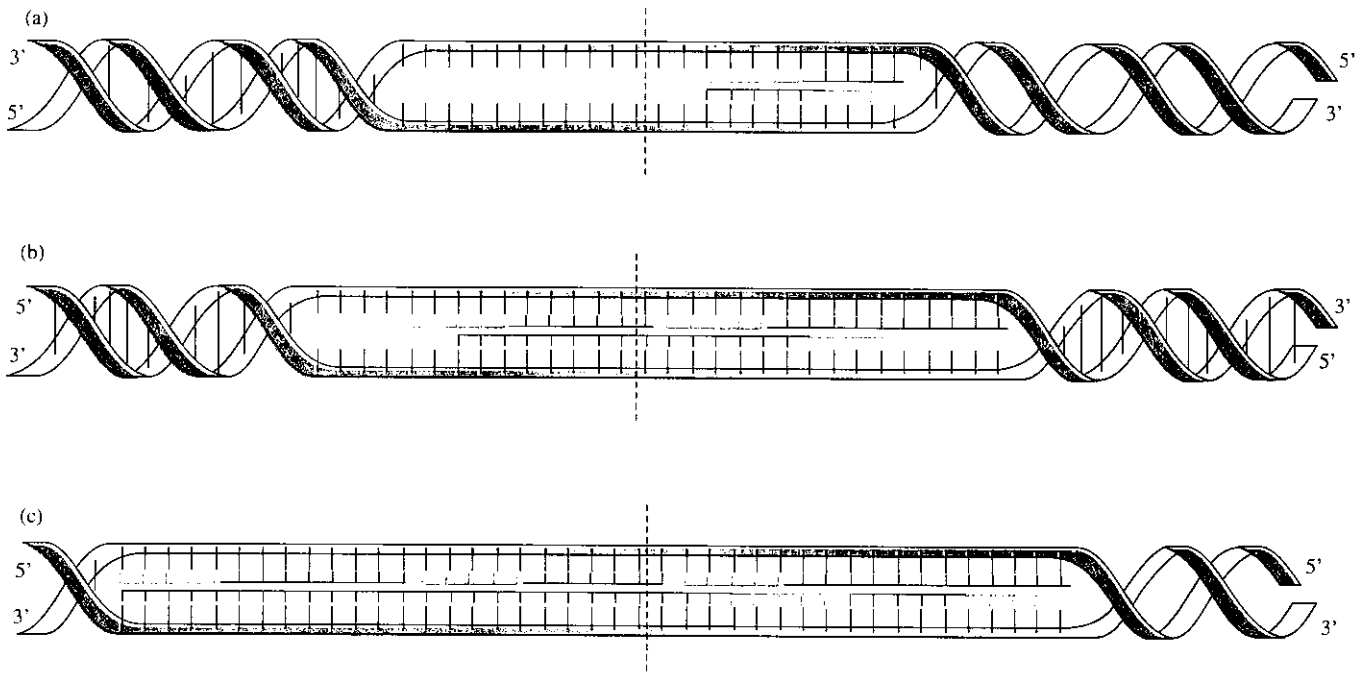


Fig. 25.10. Carácter semidiscontinuo. Durante la elongación las 2 bandas del ADN se replican de forma diferente. (a) La replicación comienza en un punto específico llamado origen (O) y a partir de él la horquilla avanza en ambas direcciones. La banda superior se sintetiza de manera continua hacia la derecha de O. (b) Cuando la banda representada en la parte inferior pasa por el sitio O su síntesis se hará de forma continua hacia la izquierda. (c) Se puede observar que la banda superior se forma continuamente hacia la derecha de O pero de manera discontinua hacia la izquierda, en tanto, la banda inferior lo hace continuamente hacia la izquierda pero de forma discontinua hacia la derecha. Por lo tanto, en cualquier sitio que se analice el proceso siempre se encontrará que una banda se sintetiza de forma continua y la otra discontinua, de ahí el calificativo de semidiscontinuo.

ribonucleótidos del ARN iniciador y por su actividad polimerasa va alargando la cadena de ADN. Al llegar al ADN de doble banda están todos los desoxinucleótidos, pero hay 2 de ellos que no están unidos por enlace fosfodiéster y existe una mella en la cadena (Fig. 25.11).

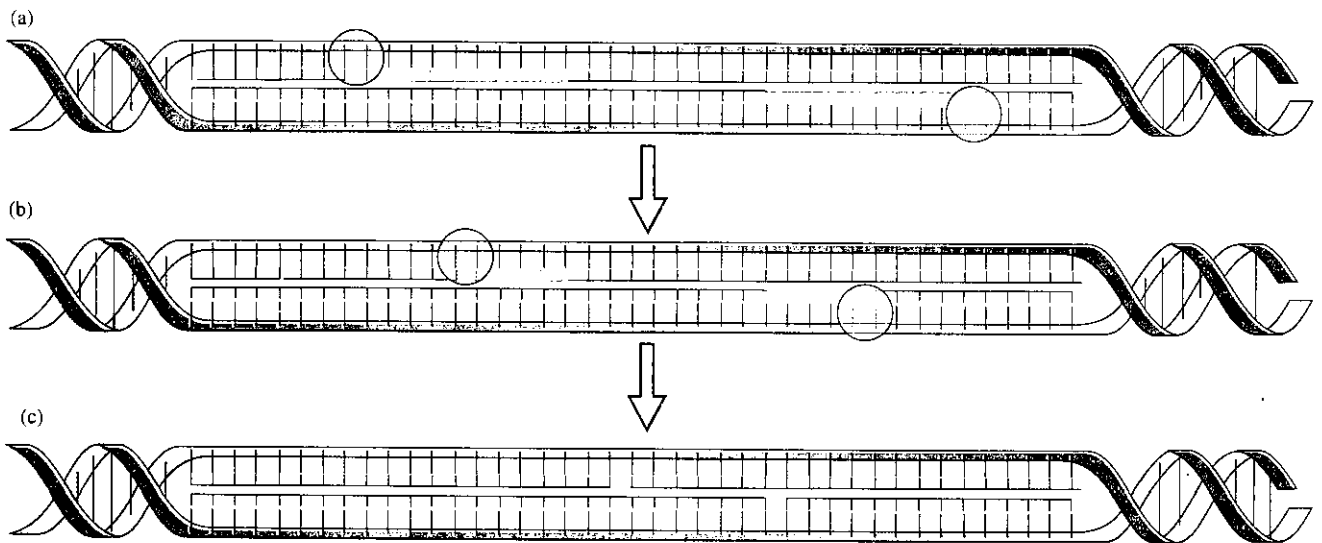


Fig. 25.11. Acción de la ADN polimerasa I. (a) La ADN polimerasa I por su acción de exonucleasa va eliminando los ribonucleótidos que forman parte del ARN iniciador y a la vez va uniendo dNTP al extremo 3'-OH de la cadena formada por la ADN polimerasa III, de forma que no quedan espacios vacíos. (b) La acción de la polimerasa hace que la brecha entre los nucleótidos se vaya desplazando a lo largo de la cadena del ADN. (c) Cuando todos los ribonucleótidos han sido retirados, la enzima se separa del ADN.

Para sellar esas mellas se requiere la ADN ligasa, que cataliza la formación del enlace fosfodiéster y sella la brecha que existía en el ADN (Fig. 25.12).

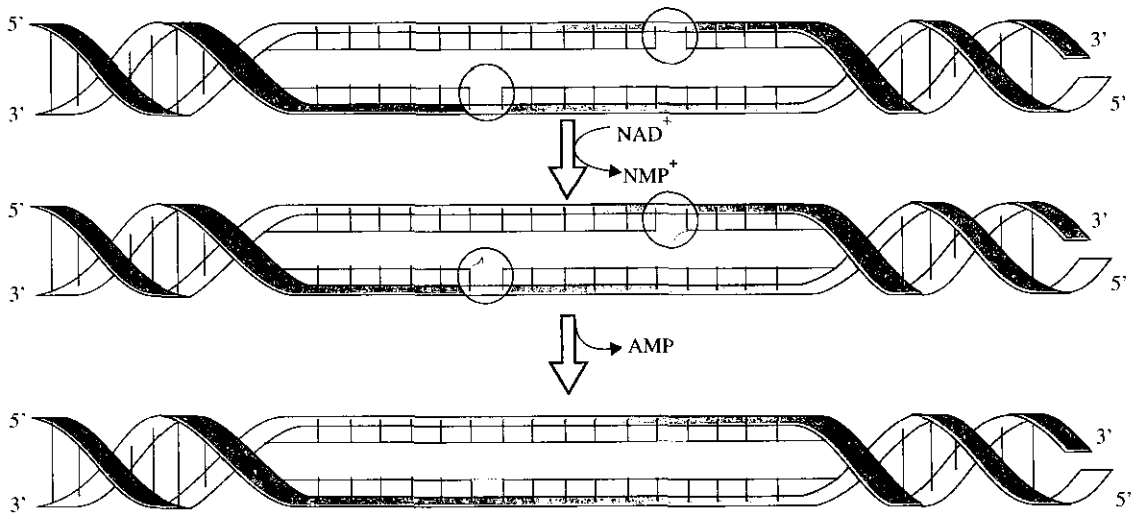


Fig. 25.12. Acción de la ADN ligasa. Utilizando como cofactor el NAD^+ , la ADN ligasa de la *E. coli* une nucleótidos contiguos mediante la formación de un enlace fosfodiéster, con lo cual los fragmentos formados en la banda conducida se unen unos con otros y se forma una banda continua.

La ADN polimerasa I es una enzima más sencilla que la pol III, pues se trata de una cadena polipeptídica única de 109 kD; además de las actividades mencionadas también posee actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$, cuya importancia se verá más adelante. En su movimiento sobre el ADN es capaz de provocar el desenrollamiento.

La ADN ligasa es también una enzima sencilla, formada por una sola cadena polipeptídica de 77 kD y fue descubierta en 1966 en 5 laboratorios simultáneamente. Para la unión de 2 oligodesoxinucleótidos se requiere que estén formando parte de una doble cadena de ADN. La formación del enlace fosfodiéster entre los fragmentos necesita de una fuente de energía que en la *E. coli* la proporciona el NAD^+ (Fig. 25.13).

Como las 2 horquillas se mueven en dirección opuesta, la cadena que se sintetiza de manera continua (en favor del movimiento de la horquilla) no es la misma en cada horquilla y recibe el nombre de banda conductora, en tanto, la que se sintetiza discontinuamente recibe el nombre de banda conducida.

En la *E. coli* se conoce además otra enzima, la ADN polimerasa II, cuya función parece estar más bien relacionada con los mecanismos de reparación del ADN, pues algunos mutantes que carecen de ella no presentan alteraciones en la replicación. El movimiento de las horquillas se favorece por la acción de las helicasas, y las torsiones que se generan se alivian por la topoisomerasa I (Fig. 25.14).

En resumen, la nota más sobresaliente de la elongación es la actividad de la ADN polimerasa III que añade uno a uno los desoxinucleótidos en una hebra dirigida por la secuencia de la hebra contraria; de esta forma el proceso transcurre rápidamente. Este alargamiento se produce de manera diferente en cada una de las 2 hebras, para la fibra conductora sólo hace falta la participación de la pol III; la otra se alarga discontinuamente y requiere la participación del complejo iniciador, la pol III, la pol I y la ADN ligasa. En la *E. coli* se utiliza NAD^+ como fuente de energía para la acción de las ligasas.

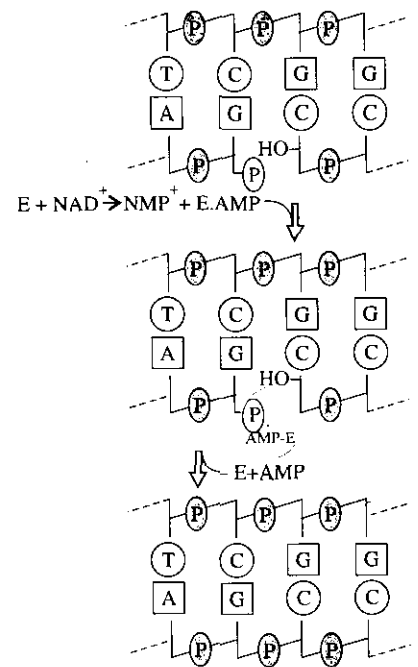


Fig. 25.13. Mecanismo de acción de la ADN ligasa. La reacción ocurre en varias etapas. La enzima reacciona con el NAD^+ y forma un complejo intermediario E:AMP. En un paso posterior la transferencia del grupo adenilato activa el extremo $5' \text{-P}$, con lo cual se facilita la formación del enlace fosfodiéster. La ligasa y el AMP se separan del ADN y la molécula queda formada íntegramente.

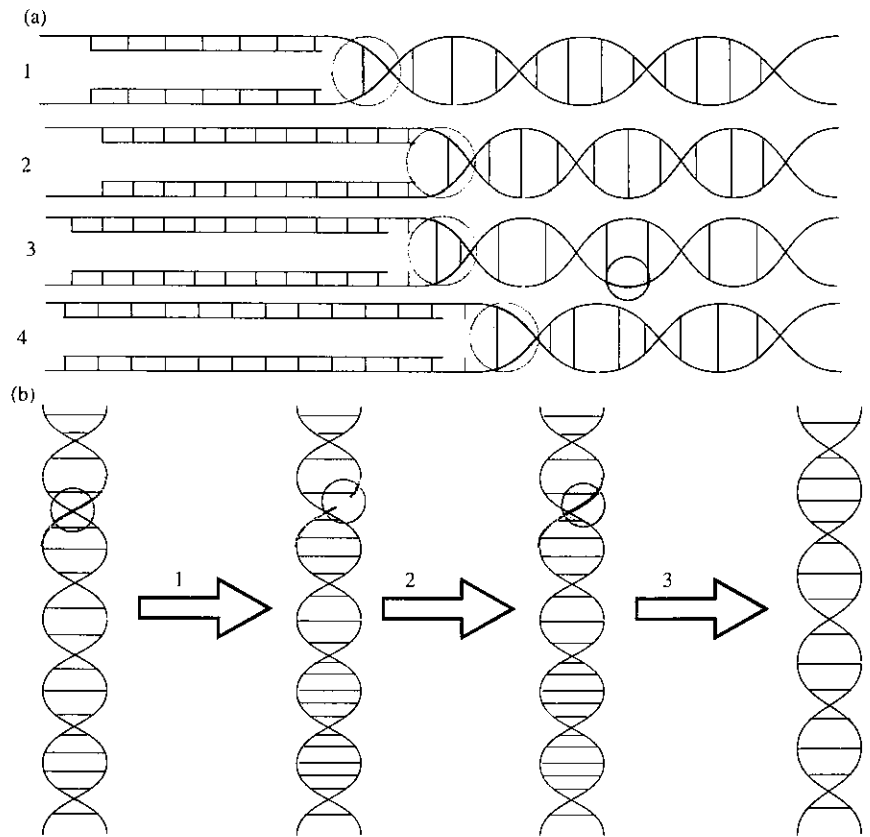


Fig. 25.14. Función de la topoisomerasa I en la elongación. (a) El desplazamiento de la helicasa va creando zonas de tensión por delante de la horquilla que dificultan su avance. La topoisomerasa I relaja esas tensiones y facilita el proceso. (b) Esquema del mecanismo de la topoisomerasa I que consta de 2 pasos: 1ro. corte de una banda del ADN que queda unido a la enzima y 2do., paso de la otra banda por la brecha y cierre del corte.

Terminación

La terminación de un ADN circular puede imaginarse como un proceso relativamente sencillo. Al unirse las 2 horquillas que venían moviéndose en dirección opuesta, se forma una sola, pero en realidad estos eventos no son bien conocidos y se estima que deben ser muy diferentes en los ADN lineales y circulares.

En la *E. coli*, la terminación ocurre en una zona denominada *terC* que está localizada a unos 180° de *oriC*. Es una región larga, de aproximadamente 350 kb, flanqueada a ambos lados por los sitios de terminación *terA*, *terB*, *terC* y *terD*. Los *terA* y *terB* inhiben el desplazamiento de la horquilla de replicación que se mueve en dirección contraria a las agujas del reloj, en tanto, los *terB* y *terC* tienen el mismo efecto sobre la otra horquilla.

Se ha identificado que el producto del gen *tus* se une con elevada afinidad a los sitios *ter* e inhibe la replicación. *Tus* es una proteína de 36 kD, que se une al surco mayor del ADN en los sitios *ter*, de modo que su efecto presenta el fenómeno de la polaridad, es decir, inhibe el movimiento de una horquilla que se mueve en un sentido, pero no la que se mueve en sentido contrario. A pesar de estos datos aún falta mucho por aclarar en cuanto a terminación de la replicación.

Al terminar la replicación, las cadenas circulares quedan entrelazadas una con otra y se requiere un mecanismo llamado descatenarización, en el que interviene la topoisomerasa II para separarlas. El mecanismo de esta transformación es similar al estudiado para las topoisomerasa II, con la diferencia de que en este caso es cortada una de las moléculas, y por la brecha que se origina se hace pasar la otra molécula (Fig. 25.15).

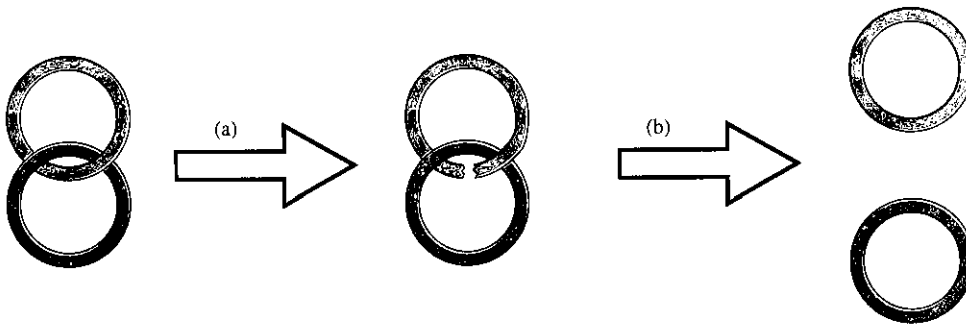


Fig. 25.15. Descatenarización. La topoisomerasa II deshace los catenatos formados al final de la replicación de un ADN circular, para lo cual corta una molécula en sus 2 bandas (a) que quedan unidas a la enzima y pasa la otra molécula por la abertura (b) y vuelve a cerrar.

En resumen, la terminación culmina el proceso de replicación y da como resultado la separación de las 2 moléculas de ADN hijas, cada una de ellas contiene una cadena de ADN paterno y una recién formada. Al igual que la iniciación, se produce en un sitio fijo del ADN y necesita del concurso de proteínas específicas.

Modificación del ADN (postterminación)

Una vez concluida la replicación, el ADN de la *E. coli* es metilado en una serie de bases específicas, proceso que recibe el nombre de modificación del ADN. Esta modificación tiene varios significados biológicos: sirve para identificar la cadena molde de la neoformada durante el proceso de replicación, lo cual es de gran importancia en la rectificación de lectura como se verá más adelante; también constituye, al parecer, un mecanismo que regula la expresión de los genes durante el ciclo de vida de la célula y, por último, protege al ADN de la acción de enzimas que reconocen secuencias específicas de desoxinucleótidos, catalizando la hidrólisis del enlace fosfodiéster en puntos específicos (enzimas de restricción). Estas enzimas, de las cuales se conocen cientos, constituyen un importante instrumento de trabajo para la ingeniería genética como se verá en el capítulo 35.

Replicación en eucariontes

El estudio de la replicación en eucariontes ha ido desarrollándose de manera simultánea con el de procariontes, pero se encuentra menos avanzado. Varios de los componentes del sistema replicativo se han aislado y caracterizado parcialmente.

El estudio de la replicación en eucariontes ha tenido también sus mejores resultados con la reconstrucción de sistemas replicativos en virus, que infectan organismos eucariontes y en eucariontes monocelulares.

Complejidad del proceso

La replicación de los cromosomas de eucariontes presenta muchos problemas no encontrados en los procariontes, debido a varios factores como el enorme tamaño del ADN eucarionte y la complejidad geométrica impuesta por la organización del ADN en nucleosomas.

La velocidad de movimiento de una horquilla de replicación en *E. coli* es de 10 000 pares de bases por minuto. Las polimerasas de eucariontes son mucho menos activas y tienen una velocidad que varía entre 500 y 5 000 pares de bases por minuto según la enzima. Como una célula animal típica contiene aproximadamente una cantidad de ADN que es 50 veces mayor que el de la bacteria, el tiempo de replicación del ADN eucarionte sería unas 1 000 veces mayor que el de *E. coli*, esto es unos 30 días; sin embargo, la replicación sólo demora unas pocas horas.

Los cromosomas de eucariontes utilizan múltiples puntos como orígenes de la replicación y ésta es bidireccional. Se han calculado hasta 5 000 sitios de iniciación en un mismo cromosoma, cada uno separado por unos 30 000 pares de bases. En los huevos fecundados se han calculado hasta 50 000 sitios de iniciación, con lo que la duración de la replicación es de unos pocos minutos. Sin embargo, todos estos orígenes no se activan simultáneamente, más bien existe un programa de activación, pues unos puntos comienzan la replicación al inicio de la fase S, otros en un momento intermedio y otros al final (Fig. 25.16).

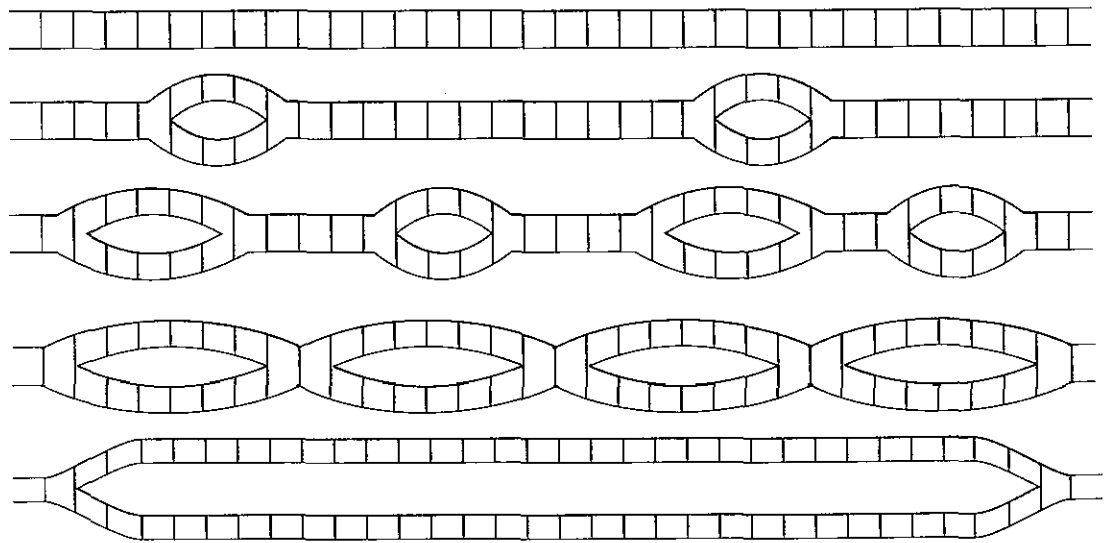


Fig. 25.16. Horquillas múltiples en los eucariontes. La replicación en eucariontes se produce con la formación de numerosas horquillas que al crecer bidireccionalmente se encuentran unas con otras y se fusionan, con lo cual se aumenta considerablemente la velocidad del proceso. Pero como se muestra no todos los sitios de iniciación se activan simultáneamente.

El enorme número de horquillas es un reflejo del número de polimerasas. Mientras la *E. coli* contiene de 10 a 20 moléculas por célula, los eucariontes contienen de 20 000 a 60 000 moléculas de la polimerasa α que es la principal.

La estructura nucleosómica del ADN eucarionte debe disociarse del complejo ADN-proteína y reformarse con las moléculas neoformadas. Se ha comprobado que esto sucede simultáneamente con la replicación del ADN. Las histonas sólo se sintetizan durante el período S, de ahí que es más correcto referirse a la replicación del cromosoma que a la del ADN.

Por último, se debe recordar que las células de los animales superiores, como el hombre, contienen una doble dotación de genes (son diploides) y cuando se produce la duplicación de los cromosomas contendrá 4 copias de genes homólogos (tetraploides); esto significa que el número de copias de un mismo gen es variable durante el ciclo celular, en G1 es doble, durante el período S la información se duplica y, por lo tanto, es cuádruple durante todo el período G2. En el período M la información se divide en 2 y van a parar a cada una de las células hijas, que reinician su ciclo celular con una dotación doble de la información genética.

Replicación en eucariontes pluricelulares

Del estudio de los sistemas simples se ha partido para reconstruir el proceso en eucariontes complejos. En estos estudios se han podido caracterizar varios genes implicados en el proceso y se ha emprendido la purificación de muchas proteínas replicativas; entre las especies estudiadas se encuentran numerosas líneas humanas. Para no hacer extensa la descripción del proceso en los organismos eucariontes, ésta se hará tomando como referencia el sistema replicativo de la *E. Coli*, que ya fue estudiado, pues en líneas generales los procesos se asemejan mucho. Sólo se insistirá en las diferencias y en las homologías funcionales, estructurales o ambas entre los componentes de uno y otro sistemas replicativos.

El origen de la replicación en eucariontes es más complejo y su estructura definitiva no ha sido dilucidada por completo; contiene secuencias funcionalmente homólogas al de *E. coli*, pero también motivos estructurales específicos como algunos que sirven de sitios de unión para factores de transcripción. La unión de proteínas específicas produce también el desenrollamiento local de la doble hebra del ADN en sitios que sirven para alojar proteínas que formarán el complejo de preiniciación, cuya estructura no está del todo conocida.

El origen de replicación es reconocido por un grupo de 6 proteínas de pesos moleculares variables, que forman el llamado complejo de reconocimiento del origen, ORC (*origin recognition complex*). Se ha encontrado que existe una gran similitud en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas, en especies tan diferentes como la *Drosophila* y el hombre, lo cual indica que realizan funciones similares en todos los organismos.

La proteína estabilizadora del ADN de hebra simple (SSB) recibe el nombre de proteína replicativa A (RP-A de *replication protein*) que se presenta en forma de heterotrímeros, los que estabilizan las zonas monofibrilares en la horquilla de replicación.

Se conocen 2 ADN ligasas cuya principal diferencia con la de los procariontes es que utilizan ATP en vez de NAD⁺ como cofactor. También han sido caracterizadas varias helicasas. Los 2 tipos de topoisomerasas se han obtenido de diferentes organismos eucariontes; las de tipo I se encuentran localizadas en zonas de intensa transcripción, principalmente en el nucléolo, y la tipo II ha sido identificada como la principal proteína que participa en la organización molecular de los cromosomas, presenta asociada una actividad de proteína quinasa cuya significación es desconocida.

Existen al menos 5 ADN polimerasas: la α que es la principal y presenta asociada una actividad de iniciadora; la β , es la más pequeña de todas las ADN polimerasas conocidas, aparece sólo en animales superiores y parece estar implicada en los mecanismos de reparación; la γ que sólo aparece en las mitocondrias; la δ resulta una proteína grande y es la única donde se ha descrito actividad de 3' -OH exonucleasa; y la ϵ , que está relacionada con los mecanismos de reparación.

El ensamblaje del replisoma ocurre de forma similar al proceso en la *E. coli*, pero presenta algunas diferencias importantes. En los eucariontes participan 2 ADN polimerasas, la α que produce la iniciación de las dos hebras y la δ que funciona en la elongación. El homólogo de la subunidad β es una proteína denominada antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA de *proliferating cell nuclear antigen*), un trímero que forma el anillo deslizante que proporciona el movimiento del replisoma. La translocación del PCNA hacia la horquilla de replicación se realiza por una proteína formada por 5 subunidades, que se denomina factor de replicación C (RF-C de *replication factor*) y, por lo tanto, es el homólogo funcional del complejo γ . Una vez formado el replisoma, el proceso de la replicación ocurre de forma similar al de *E. coli*, sólo que en cada cromosoma existen numerosos orígenes de replicación, por lo cual cada replisoma tiene que sintetizar pequeños sectores de ADN. Aun en el caso de la hebra conducida, la longitud de los fragmentos de Okasaki es menor y se calcula entre 150 y 200 nucleótidos, que es el tamaño que se corresponde con la estructura de un

nucleosoma. La dificultad principal que no se presenta en la *E. coli* es la replicación de los telómeros, que será descrita en el acápite siguiente.

Replicación de los telómeros

Uno de los grandes problemas que presenta la replicación de un ADN no circular, es la replicación de los extremos, que en los cromosomas recibe el nombre de telómeros. Desde el punto de vista estructural estos extremos se caracterizan por presentar pequeñas secuencias de desoxinucleótidos, repetidas muchas veces, y la hebra de dirección 5' → 3' posee un segmento final monofibrilar de 12 a 16 nucleótidos. La dificultad estriba en el hecho de que una de las 2 hebras no puede replicarse completamente por los mecanismos conocidos y eso implica la pérdida progresiva de material genético a partir de los extremos. Hace unos pocos años fue descubierta y purificada una enzima que cataliza la formación de los telómeros, por ello se le dio el nombre de telomerasa; tal vez lo más interesante, en la forma de actuar de esta enzima, es que emplea como cofactor una molécula de ARN, al cual utiliza como molde para añadir desoxinucleótidos a los extremos teloméricos. Como los telómeros presentan secuencias repetidas, el ARN puede aparearse con parte de esa secuencia, y la parte no apareada sirve de molde a la telomerasa para alargar la hebra de ADN. Una vez terminado el alargamiento, la enzima se desplaza, produce un nuevo alargamiento y así sucesivamente hasta que el número de repeticiones sea el característico de la especie. El mecanismo de síntesis de la hebra complementaria no está esclarecido (Fig. 25.17).

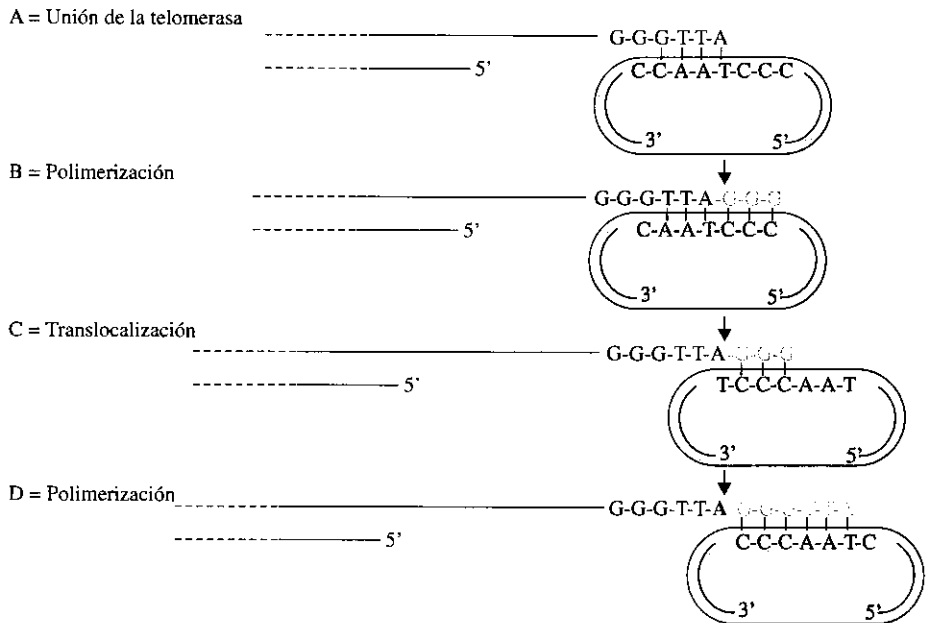


Fig. 25.17. Acción de la telomerasa. La síntesis de los telómeros se lleva a cabo por acción de la telomerasa en un proceso que puede ser dividido en 3 etapas. (A) La enzima se une al extremo del telómero, utilizando el mecanismo de apareamiento de bases entre su ARN y el ADN telomérico. (B) Utilizando como molde su ARN la enzima alarga el extremo 3' de la hebra del ADN. (C) Una vez alargado el telómero la enzima se separa y vuelve a unirse al nuevo extremo y (D) comienza un nuevo ciclo de polimerización.

Estudios recientes parecen demostrar que la longitud de los telómeros está relacionada con la posibilidad de división de la célula, de modo que mientras más corto es el telómero, menor es la potencialidad proliferativa de la célula; esto ha hecho que la telomerasa se convierta en un posible blanco para el tratamiento del cáncer.

Fidelidad del proceso

La replicación del ADN ocurre una sola vez durante el ciclo de vida de la célula, de ahí la necesidad de que el proceso se realice con una elevada fidelidad

de copia, que las moléculas hijas contengan exactamente la misma secuencia de bases nitrogenadas que la molécula paterna. En estudios con bacterias que se reproducen rápidamente y que permiten estudiar en corto tiempo varias generaciones de células, se ha calculado que en la replicación se comete un error, o sea, se incorpora una base errónea por cada mil a cien mil millones de bases incorporadas (10^9 a 10^{11}). Si el genoma de la *E. coli* posee aproximadamente 4×10^6 pb, la posibilidad de error es menor que una base incorrecta por ciclo replicativo. Ninguno de los mecanismos conocidos por sí solos son capaces de explicarlo, pero la acción conjunta de todos ellos puede crear un efecto potencializador, es decir, todos juntos provocan una fidelidad mucho mayor que la suma de todos ellos por separado. Algunos de estos mecanismos se comentarán a continuación y se hará énfasis en varios de ellos.

El primer factor de fidelidad es la elevada especificidad del apareamiento de bases formando los pares adenina-timina y citosina-guanina. El otro es la elevada especificidad de las polimerasas, las cuales sólo incorporan los desoxinucleótidos que forman pares complementarios al ADN que se está copiando.

Otro factor que contribuye a la fidelidad es la utilización de un ARN iniciador, ya que como éste es eliminado y reemplazado por el segmento de ADN correspondiente, estas zonas son rectificadas siempre. De usarse un segmento de ADN como iniciador, estas zonas no se leerían de nuevo y cualquier error en ellas se podría mantener.

Existe, además, un mecanismo de rectificación. A pesar de todo lo anterior, cuando se incorpora una base errónea entra a funcionar el mecanismo denominado de edición. La base incorrecta no forma pares de bases tan estables como la correcta y esa zona del ADN se debilita; esto hace que en ocasiones los desoxinucleótidos añadidos posteriormente no se unan bien a la banda complementaria, lo que sirve como señal a la ADN polimerasa III, que con su actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ comienza a eliminar los nucleótidos mal apareados. Cuando llega a una zona donde el apareamiento es correcto detiene su acción y entonces la polimerasa III continúa alargando la cadena de forma adecuada. En este mecanismo también pueden intervenir endonucleasas que producen la hidrólisis del enlace fosfodiéster próximo a las bases mal apareadas, haciéndolo siempre en la cadena neoformada, pues ésta no tiene aún el patrón de metilación característico, y con ello se diferencia de la cadena que sirve de molde o patrón. Todos estos mecanismos contribuyen a que los errores de copia sean mínimos y el proceso transcurra con una elevada fidelidad.

Inhibidores de la replicación

Existe un numeroso grupo de sustancias, de las cuales muchas de ellas son antibióticos, que actúan como inhibidores de la replicación y cuyo empleo ha contribuido a dar la visión actual sobre el proceso. Atendiendo a su mecanismo de acción se clasifican en 2 grupos: los que actúan sobre el ADN molde y los que actúan sobre las proteínas replicativas.

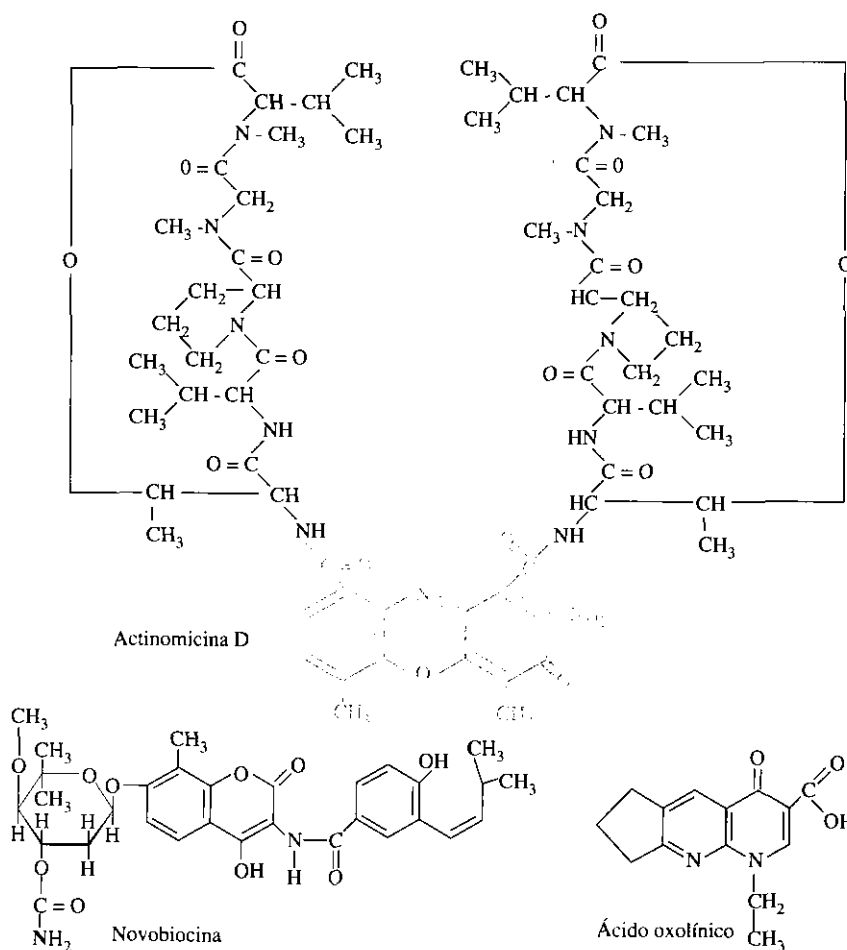
Al primer grupo pertenecen los colorantes de acridina, la actinomicina D y el etidio, que se intercalan entre las bases y dificultan la separación de las cadenas; la netropsina y la distamicina A, que se unen fuertemente a zonas ricas en pares A-T; y la bleomicina y neocarzinostatina, que producen roturas de los enlaces entre los carbonos $3'$ y $4'$ de la desoxirribosa.

Al segundo grupo pertenecen la afidicolina, que inhibe la ADN polimerasa alfa; y la novobiocina y el ácido nalidixico, que actúan sobre la topoisomerasa II.

Un importante grupo de inhibidores lo constituyen los 2'-3'-didesoxirribonucleósidos trifosfatados, que se han empleado para determinar la secuencia de bases de los ADN; sólo actúan *in vitro*, ya que los nucleósidos trifosfatados no atraviesan la membrana celular (Fig. 25.18).

Fig. 25.18. Inhibidores de la replicación.

En la figura se muestra la estructura de la actinomicina D que está compuesta por un anillo triple de fenoxazona y 2 polipéptidos cíclicos laterales. Al interactuar con el ADN el anillo de fenoxazona se intercala entre 2 pares de bases (preferiblemente GC) y los péptidos interactúan con las zonas vecinas fortaleciendo la unión entre las 2 bandas. Las proteínas replicativas al llegar al sitio donde está la actinomicina D no pueden separar las bandas del ADN y se detiene el movimiento de la horquilla. La novobiocina y el ácido oxolníco por su parte son inhibidores de las topoisomerasas y su acción dificulta la replicación.



A manera de conclusiones

Hasta aquí se han desarrollado los aspectos más sobresalientes de uno de los más importantes procesos de la materia viva. Como se vio al inicio, se planteaban una serie de problemas importantes para su realización, problemas cuya complejidad hacían prever respuestas complejas y así ha resultado.

Pero cabría preguntarse ¿por qué resulta tan complejo este proceso? ¿No existen mecanismos más simples e igualmente probables para un proceso de esta naturaleza? ¿Por qué se requiere un número tan elevado de enzimas, con tan elevados grados de complejidad estructural y funcional?

Por supuesto, que estas respuestas no las tiene nadie. Cuando se analiza un mecanismo de este tipo sólo podemos decir las ventajas que representa con respecto a otro alternativo, sin llegar a saber por qué los organismos con estas características han sido seleccionados de manera evolutiva sobre otros: esa es la base del razonamiento que haremos a continuación.

La replicación se produce sólo una vez durante la vida de la célula, por lo cual errores que se cometan durante el proceso pueden acarrear consecuencias trascenden-

tes para el organismo y para la especie. Según parece, ésta es la razón primaria del elevado grado de complejidad, lo que está apoyado, además, por el hecho de que en la medida que aumenta la longitud del ADN en las células es mayor el grado de complejidad del proceso y mayor el número de factores proteínicos específicos involucrados.

El elevado grado de precisión que requiere la transferencia de información, de generación en generación, con un elevado grado de fidelidad, obliga a la complejidad del proceso molecular que constituye su fundamento final.

Resumen

La transmisión de la información genética de un organismo a sus descendientes constituye el fenómeno más importante de la materia viva, y aunque adquiere diferentes formas de acuerdo con el tipo de organismo, su fundamento final es el mecanismo de replicación del ADN. Toda la información genética está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN, y el apareamiento específico de ellas es el mecanismo básico utilizado en todos los sistemas replicativos. La replicación tiene un carácter reiterativo, pues los desoxinucleótidos son añadidos por el mismo mecanismo al extremo de una cadena en crecimiento, procede por complementariedad, acoplada a la hidrólisis del pirofosfato y de forma antiparalela y semiconservativa.

La replicación más sencilla es la de los virus de los procariontes, cuyo estudio ha permitido esclarecer algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso. En la replicación del ADN de la *E. coli* participan numerosas enzimas como las topoisomerasas, helicasas, polimerasas, ligasas, etcétera, así como otras muchas proteínas de carácter no enzimático, pero cuya participación es indispensable en el proceso. Para su estudio, este proceso se ha dividido en 5 etapas. La preiniciación ocurre en un sitio específico, denominado origen y en él las topoisomerasas II aumentan el superenrollamiento negativo, las helicasas separan las 2 cadenas y las SSB estabilizan esta estructura que se denomina horquilla de iniciación. En la iniciación un conjunto de proteínas forman el complejo iniciador que mediante la hidrólisis del ATP, como fuente de energía, localiza una secuencia específica y sintetiza un oligorribonucleótido complementario al ADN denominado ARN iniciador, el cual aporta el grupo 3' -OH necesario para la incorporación del primer desoxirribonucleótido por la ADN-polimerasa III. La elongación ocurre de forma diferente en las 2 hebras. En la banda conductora el proceso es continuo y con la sola participación de la ADN-polimerasa III. En la banda conducida el proceso es discontinuo y resulta necesaria la formación de muchos ARN iniciadores en la medida que crece el tamaño de la horquilla. La ADN polimerasa III añade los desoxinucleótidos hasta encontrar un ARN iniciador. Los ARN iniciadores son eliminados por la ADN polimerasa I que, además, llena con desoxinucleótidos los sitios ocupados anteriormente por el ARN. La ADN ligasa une los fragmentos formados dando integridad a la cadena neoformada. El movimiento de la horquilla es facilitado por la acción combinada de las helicasas, las topoisomerasas I y las SSB. La terminación constituye la etapa menos conocida; existe un sitio específico para la terminación, al cual se unen proteínas que provocan la terminación de la replicación. En los ADN circulares se forman catenatos para cuya separación es necesaria la acción de las topoisomerasas II. Posterior a la terminación ocurre la modificación que consiste en la metilación de bases específicas, con lo cual se protege al ADN de la acción hidrolítica de las enzimas de restricción. Todo el proceso presenta una elevada fidelidad de copia que viene dada, entre otros factores, por la precisión del apareamiento de bases, la especificidad de las polimerasas, la eliminación del ARN iniciador y el mecanismo de rectificación.

El estudio de la replicación en eucariontes está aún en sus primeros pasos, debido a la compleja estructura de los cromosomas y a la dificultad para la obten-

ción de grandes cantidades de mutantes que permitan seguir una estrategia similar a la utilizada en procariontes. No obstante, los estudios realizados en virus y levaduras han dado sus primeros frutos. A partir de esos estudios, y con la identificación de genes y caracterización de proteínas involucradas en la replicación, es posible en estos momentos tener una representación bastante aproximada del proceso en los organismos superiores, aunque aún quedan muchos detalles importantes por esclarecer.

Numerosos son los antibióticos cuya acción específica consiste en actuar como inhibidores de la replicación, los cuales, además del beneficio que han reportado a la lucha contra las enfermedades infecciosas, han sido de inestimable valor para el estudio del complejo proceso de la replicación del ADN.

Los resultados obtenidos experimentalmente en diferentes sistemas replicativos permiten intentar una descripción generalizada del proceso, que tendrá su expresión particular en cada organismo dado. La replicación comienza en sitios específicos del ADN, denominados orígenes de replicación, que contienen secuencias de bases nitrogenadas que sirven para la unión de proteínas específicas. La unión de estas proteínas producen el desenrollamiento local de la doble hebra del ADN, que por acción de otras proteínas es agrandado. Un sistema enzimático específico forma el ARN iniciador, que será alargado por el replisoma que contiene, al menos, las actividades de ADN polimerasa y de exonucleasa 3' → 5' y que funciona en el mecanismo de edición. Una de las hebras se forma de manera continua, en tanto, la otra se sintetiza por fragmentos que luego son unidos por la acción de ADN ligasas. Todo el proceso se caracteriza por la elevada velocidad de polimerización, la alta procesividad y la extraordinaria fidelidad de copia.

Ejercicios

1. Demuestre que en el proceso de replicación se cumplen los principios siguientes:
 - a) De los cambios graduales.
 - b) De acoplamiento.
 - c) De transferencia de información.
2. Teniendo en cuenta las características de su acción explique por qué es necesario que en la preiniciación intervenga la topoisomerasa II y durante la elongación la topoisomerasa I.
3. ¿Por qué algunos autores afirman que la replicación es un proceso semidiscontinuo?
4. ¿Cuál es la justificación molecular de la necesidad de formar el ARN iniciador?
5. ¿Puede un mutante de la *E. coli* que carezca de helicasas realizar la replicación de manera eficiente?
6. ¿Cuál es la diferencia funcional durante la replicación entre la ADN polimerasa I y la ADN polimerasa III?
7. Para poder aislar con facilidad los fragmentos de Okasaki se prefiere utilizar bacterias mutantes que son deficientes en la actividad de la ADN ligasa. ¿Por qué cree usted que sea así?
8. Teniendo en cuenta las características funcionales de todas las ADN polimerasas conocidas, plantee un modelo que pueda explicar cómo es posible la replicación de una molécula lineal (no circular) de ADN.
9. Para investigar si existía un sitio para la terminación en el cromosoma circular de la *E. coli* se realizó el experimento siguiente: el ADN fue cortado y se extrajo un fragmento de gran tamaño, después los 2 extremos fueron unidos y se estudió el proceso de replicación, tomando muestras seriadas y analizándolas por autorradiografía. Deduzca cuáles deben ser los resultados esperados:
 - a) Si en efecto existe un sitio para la terminación.
 - b) Si el sitio de terminación no existe.