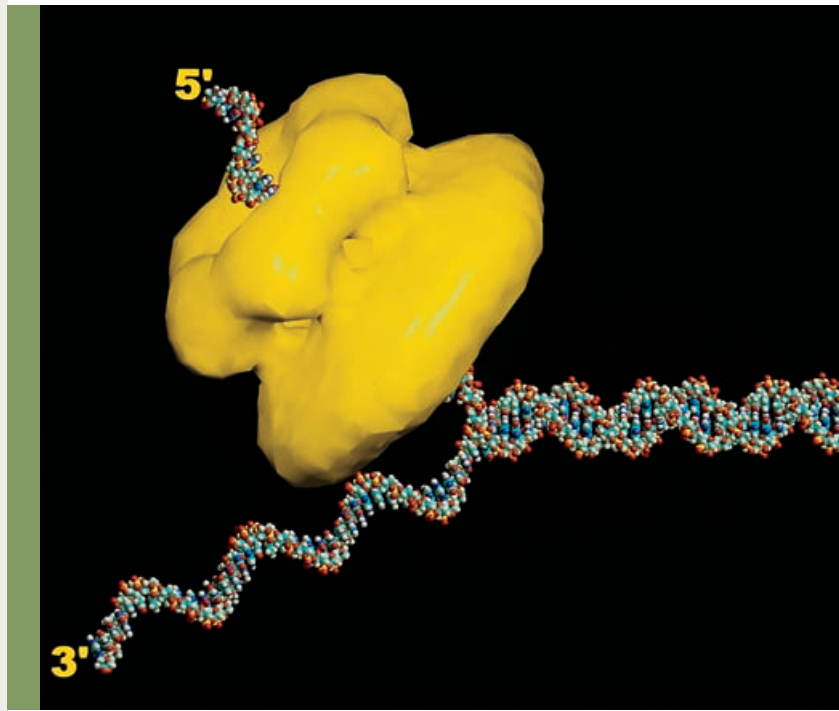


# 13



## Replicación y reparación del DNA

**13.1** Replicación del DNA

**13.2** Reparación del DNA

**13.3** Entre la replicación y la reparación

### **Perspectiva humana:**

Consecuencias de las deficiencias del sistema de reparación del DNA

La reproducción es una propiedad fundamental de todos los sistemas vivos. Es un proceso que puede observarse en diferentes niveles: los organismos se duplican por medio de la reproducción sexual o asexual, las células por división celular y el material genético por **replicación del DNA** (ácido desoxirribonucleico). La maquinaria que replica el DNA también tiene otra capacidad: la reparación del material genético dañado. Estos dos procesos (replicación y reparación del DNA), son los temas de este capítulo.

Se presume que la capacidad de autorreplicación fue una de las primeras propiedades importantes que aparecieron durante la evolución de las formas de vida primitiva más tempranas. Sin la capacidad de propagarse, cualquier molécula biológica primitiva estaba destinada a desaparecer. Los portadores tempranos de la información genética fueron tal vez las moléculas de RNA (ácido ribonucleico), capaces de autorreplicarse. A medida que la evolución progresó y las moléculas de RNA se reemplazaron por moléculas de DNA como material genético, el proceso de la replicación adquirió complejidad y requirió un gran número de componentes auxiliares. En consecuencia, a pesar de que una molécula de DNA contiene la información para su propia duplicación, carece de la capacidad para realizar esta actividad por sí misma. Como Richard Lewontin expresó, “la imagen común del DNA como molécula autorreplicable se describe de mejor forma como una carta que se autoduplica. La carta necesita una fotocopidora; el DNA necesita una célula”. A continuación se describe la forma en que las células llevan a cabo esta actividad. ■

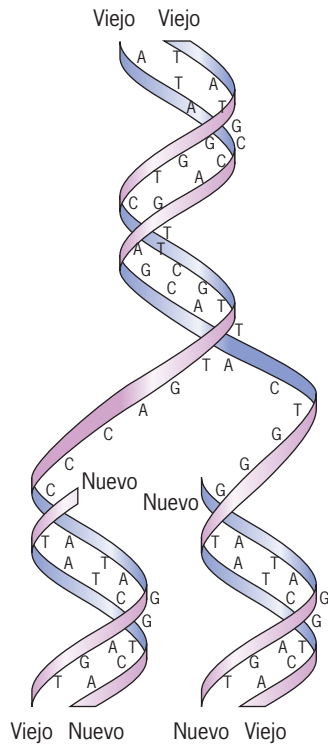
*Modelo tridimensional de una DNA helicasa codificada por el bacteriófago T7. La proteína consta de un anillo de seis subunidades. Cada subunidad contiene dos dominios. En este modelo, el agujero central rodea sólo una de las dos cadenas de DNA. Impulsada por la hidrólisis de ATP, la proteína se mueve en sentido 5' → 3' a lo largo de la cadena a la cual está unida, con lo que desplaza la cadena complementaria y desenrolla el dúplex. La actividad de DNA helicasa es necesaria para la duplicación del DNA. (CORTESÍA DE EDWARD H. EGELMAN, UNIVERSITY OF VIRGINIA.)*

### 13.1 REPLICACIÓN DEL DNA

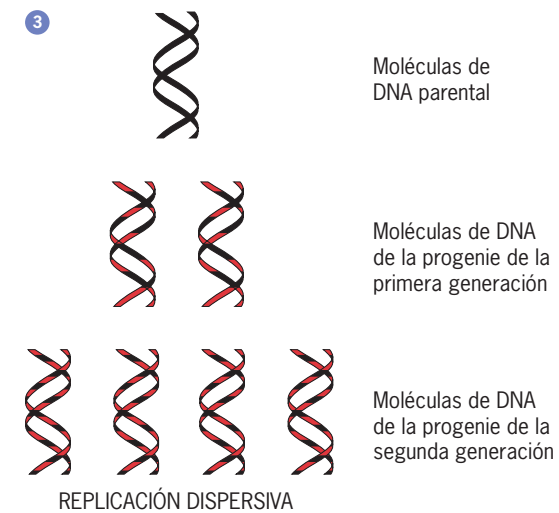
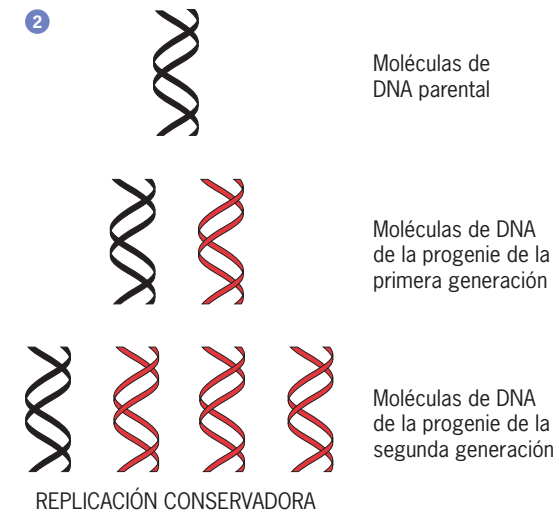
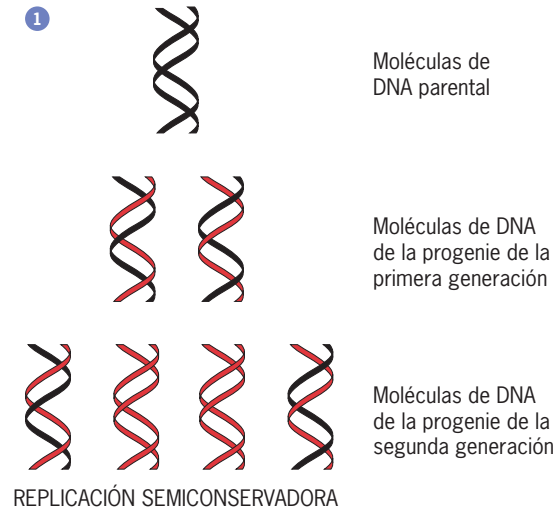
La estructura que propusieron Watson y Crick en 1953 para el DNA incluía un mecanismo que sugería su “autoduplicación”. Las dos cadenas de la doble hélice se mantienen juntas por medio de puentes de hidrógeno entre las bases. De manera individual, tales puentes son débiles y pueden romperse con facilidad. Watson y Crick supusieron que la replicación ocurría por separación gradual de las cadenas de la doble hélice (fig. 13-1), algo muy semejante a la separación de las dos mitades de una cremallera. Como las dos cadenas son complementarias, cada cadena contiene la información requerida para la construcción de la otra cadena. Una vez que las cadenas se separan, cada una puede actuar como plantilla para dirigir la síntesis de la cadena complementaria y restaurar el estado de doble cadena.

#### Replicación semiconservadora

La propuesta de Watson y Crick había establecido ciertas predicciones acerca de la conducción del DNA durante la replicación. De acuerdo con esta propuesta, cada uno de los dúplex hijos debía consistir en una cadena completa heredada del dúplex parental y una cadena completa sintetizada de nueva cuenta. La replicación de este tipo (fig. 13-2, esquema 1) se dice que es **semiconservadora** puesto que cada dúplex descendiente contiene una cadena de la estructura parental. En ausencia de información del mecanismo encargado de la replicación, se consideraron otras dos propuestas relacionadas con este proceso. En la replicación

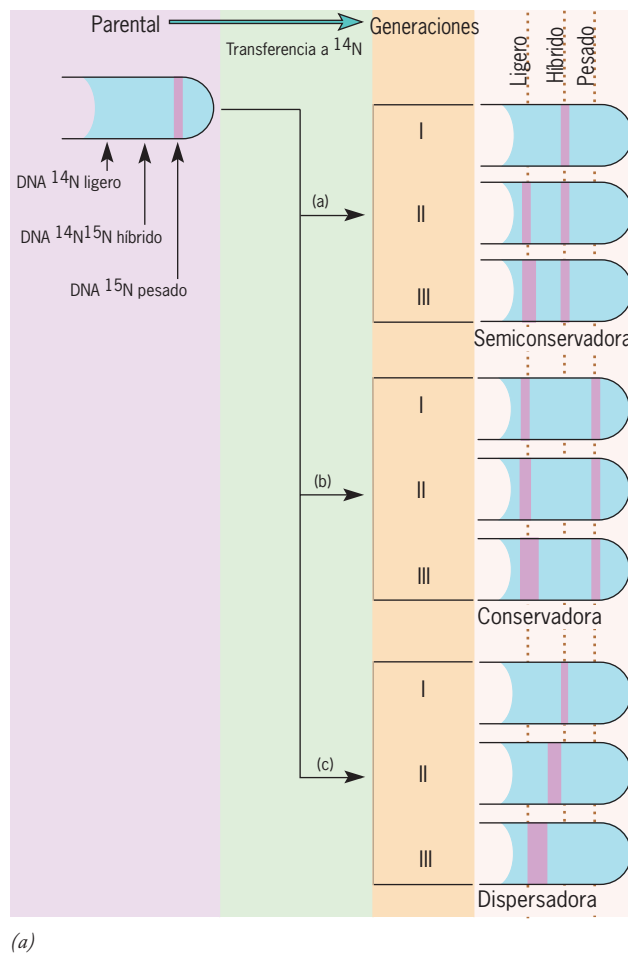


**FIGURA 13-1** Propuesta original de Watson y Crick para la duplicación de una molécula de doble hélice de DNA. Durante la duplicación, la doble hélice se desenrolla, y cada una de las cadenas paternas sirve como plantilla para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Como se expone en este capítulo, se han cumplido estos dogmas básicos.



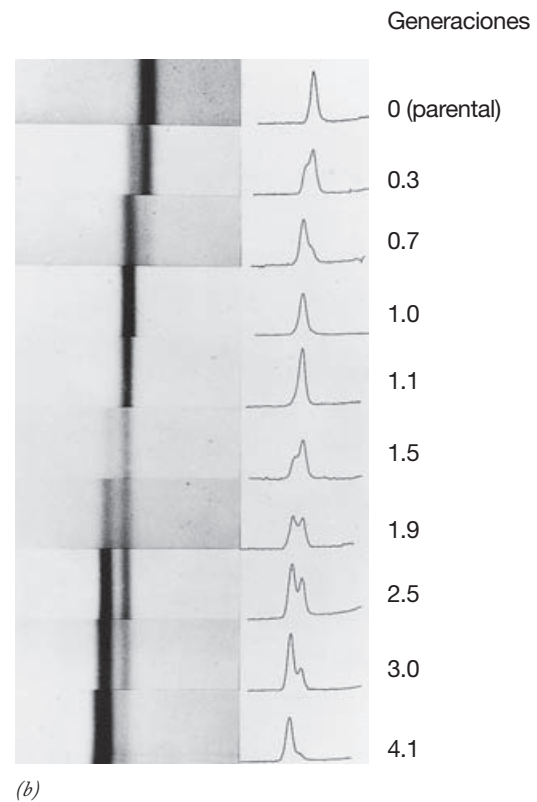
**FIGURA 13-2** Tres esquemas alternativos de la replicación. La replicación semiconservadora se muestra en el esquema 1, la replicación conservadora en el 2 y una replicación dispersiva en el 3. En el texto se describen los tres modos alternos de replicación.

*conservadora* (fig. 13-2, esquema 2), las dos cadenas originales debían permanecer juntas (después de servir como plantillas), así como también las dos cadenas sintetizadas de nuevo. Como resultado, una de las cadenas dúplex hijas debía contener sólo el DNA parental, mientras que las otras dúplex hijas, sólo el DNA resintetizado. En la replicación dispersiva (fig. 13-2, esquema 3), las cadenas parentales deben cortarse en fragmentos y las nuevas cadenas sintetizarse en segmentos cortos. Por consiguiente, los fragmentos previos y los nuevos deben unirse para formar cadenas completas. Como resultado, los dúplex hijas contendrían cadenas constituidas por DNA nuevo y antiguo. A primera vista, la replicación dispersiva luce como una solución improbable, pero a Max Delbrück le pareció la única forma de evadirla al parecer imposible tarea de desenrollar las dos cadenas de DNA dúplex para su replicación (como se analiza en la página 538).



**FIGURA 13-3** Demostración experimental de que la replicación del DNA en bacterias es semiconservadora. El DNA se extrajo de la bacteria en diferentes fases del experimento, se mezcló con una solución concentrada de cloruro de cesio ( $\text{CsCl}$ ) y se centrifugó hasta el equilibrio a alta velocidad en una ultracentrífuga. Los iones de cesio tienen suficiente masa atómica para afectarse por la fuerza de centrifugación y forman un gradiente de densidad durante el periodo de centrifugación con la concentración más baja (más baja densidad) de cesio en la parte superior del tubo y la concentración más alta (más alta densidad) en la parte inferior del tubo. Durante la centrifugación, los fragmentos de DNA en el tubo se localizan en una posición que tiene una densidad igual a la suya propia, que a su vez depende de la relación de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  pre-

Para decidir entre estas tres posibilidades fue necesario distinguir las cadenas de DNA sintetizadas de nueva cuenta a partir de las cadenas de DNA original que sirvieron como plantillas. Esto lo llevaron a cabo en 1957 Matthew Meselson y Franklin Stahl del *California Institute of Technology* en estudios que utilizaron bacterias e isótopos de nitrógeno pesado ( $^{15}\text{N}$ ) y ligero ( $^{14}\text{N}$ ) para distinguir entre las cadenas de DNA parentales y las resintetizadas (fig. 13-3). Estos investigadores cultivaron bacterias en un medio que contenía cloruro de amonio- $^{15}\text{N}$  como única fuente de nitrógeno y, por consiguiente, las bases nitrogenadas del DNA de estas células sólo contenían el isótopo pesado de nitrógeno. Los cultivos de bacterias "pesadas" se lavaron para liberarlas del medio antiguo y se incubaron en medio fresco con compuestos ligeros que contenían  $^{14}\text{N}$  y que luego se removieron a intervalos crecientes durante un periodo de varias generaciones. Se extrajo el DNA de las muestras de bacterias y se sometió a centrifugación de equilibrio de gradiente de densidad (fig. 18-35). En este procedimiento, el DNA se mezcla con una solución concentrada de cloruro de cesio y se centrifuga hasta que las moléculas de doble cadena de DNA entran en equilibrio de acuerdo con su densidad.

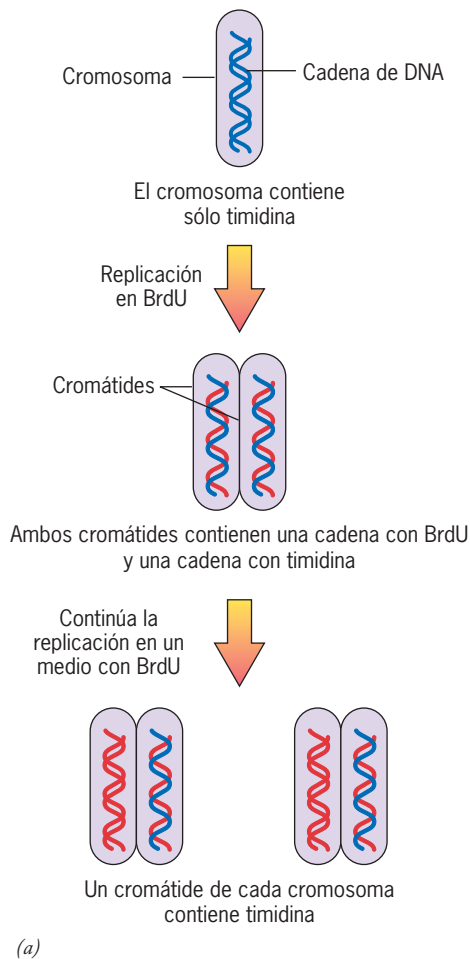


sente en sus nucleótidos. Cuanto más grande sea el contenido del  $^{14}\text{N}$ , mayores son los fragmentos de DNA en equilibrio en el tubo. (a) Resultados esperados en este tipo de experimento para cada uno de los tres posibles esquemas de replicación. El tubo único de la izquierda indica la posición del DNA parental y las posiciones en las cuales los fragmentos de DNA ligeros o híbridos deberían generar las bandas. (b) Resultados experimentales obtenidos por Meselson y Stahl. La aparición de una banda de híbrido y la desaparición de la banda pesada después de una generación eliminan la replicación conservadora. La aparición posterior de las dos bandas, una ligera y una híbrida, elimina el esquema dispersador. (B: TOMADA DE M. MESELSON Y F. STAHL, PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 44:671, 1958.)

En el experimento de Meselson-Stahl, la densidad de una molécula de DNA es directamente proporcional al porcentaje de átomos que contiene de  $^{15}\text{N}$  o  $^{14}\text{N}$ . Si la replicación es semiconservadora, cabría esperar que la densidad de las moléculas del DNA disminuyera durante el cultivo en el medio que contiene nitrógeno 14 ( $^{14}\text{N}$ ), como se muestra en los tubos de centrifugación de la parte superior de la figura 13-3a. Después de una generación, todas las moléculas de DNA deben ser híbridas,  $^{15}\text{N}$ - $^{14}\text{N}$ , y su densidad de flotación debe ser la mitad entre las esperadas para las cadenas pesadas y las ligeras de DNA (fig. 13-3a). Conforme la replicación continúa más allá de la primera generación, las cadenas sintetizadas de nueva cuenta deben contener aun sólo los isótopos ligeros y aparecer dos tipos de dúplex en los gradientes: los que contienen híbridos  $^{15}\text{N}$ - $^{14}\text{N}$  y los que poseen sólo  $^{14}\text{N}$ . A medida que prosigue el crecimiento en el medio de cultivo ligero, un porcentaje cada vez mayor de las moléculas de DNA presentes debe corresponder a las ligeras. Sin embargo, si la replicación es

todavía semiconservadora, las cadenas pesadas progenitoras originales deben permanecer intactas y presentes en las moléculas de DNA híbridas que representan cada vez un porcentaje más y más pequeño del DNA total (fig. 13-3a). Los resultados de los experimentos del gradiente de densidad obtenidos por Meselson y Stahl se muestran en la figura 13-3b y demuestran de modo inequívoco que la replicación tiene lugar de manera semiconservadora. Los resultados que debieron obtenerse si la replicación ocurriera por los mecanismos conservadores o dispersivos se indican en los dos grupos de tubos de centrifugación de la figura 13-3a.<sup>1</sup>

Hacia 1960 ya se había demostrado que la duplicación ocurre de manera semiconservadora también en eucariotas. Los experimentos originales fueron realizados por J. Herbert Taylor de la *Columbia University*. Pronto se demostró que la replicación semiconservadora también sucede en células eucariotas. El dibujo y la fotografía de la figura 13-4 muestran los resultados de un experimento más reciente en el cual se permitió que las células de mamífero cultivadas realizaran replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU), un compuesto que se incorpora en el DNA en lugar de la timidina. Después de la replicación, un



<sup>1</sup>El lector interesado en explorar las circunstancias que llevaron a este anunciado esfuerzo de investigación y a examinar los giros y desvíos experimentales que se presentaron puede consultar el libro de Frederick Lawrence Holmes *Meselson, Stahl, and the Replication of DNA*, 2001.



**FIGURA 13-4 Demostración experimental de que la replicación del DNA en células eucariotas es semiconservadora.** (a) Diagrama esquemático de los resultados de un experimento en el cual las células se transfirieron de un medio que contenía timidina, a uno con bromodesoxiuridina (BrdU) y se permitió completar los dos ciclos sucesivos de replicación. Las cadenas de DNA que contienen BrdU se muestran en rojo. (b) Resultados de un experimento similar al de a. En este experimento, las células de mamífero cultivadas crecieron en BrdU por dos ciclos de replicación antes que los cromosomas mitóticos se prepararan y tiñeran con colorantes fluorescentes.

tes y tinción de Giemsa. Mediante este procedimiento, los cromátides que contienen timidina dentro de una o ambas cadenas se tiñen de oscuro y los que poseen sólo BrdU presentan una coloración ligera. La fotografía indica que, tras dos ciclos de replicación en BrdU, un cromátide de cada cromosoma duplicado contiene sólo BrdU, mientras que el otro muestra una cadena de DNA marcado con timidina. (Algunos de los cromosomas experimentan intercambio de porciones homólogas entre los cromátides hermanos. Este proceso de intercambio de cromátides hermanos es común durante la mitosis, pero no se revisa en el texto.) (A: CORTESÍA DE SHELDON WOLFF.)



cromosoma se conforma de dos cromátides. Luego de un ciclo de replicación en BrdU, los dos cromátides de cada cromosoma contienen BrdU (fig. 13-4a). Tras dos ciclos de replicación en BrdU, uno de los cromátides de cada cromosoma presentó dos cadenas con BrdU, si bien el otro cromátide era un híbrido que consistía en una cadena que contenía BrdU y una cadena con timidina (fig. 13-4a,b). Esta última cadena había sido parte de la molécula de DNA parental original antes de la adición de BrdU al cultivo.

### Replicación en células bacterianas

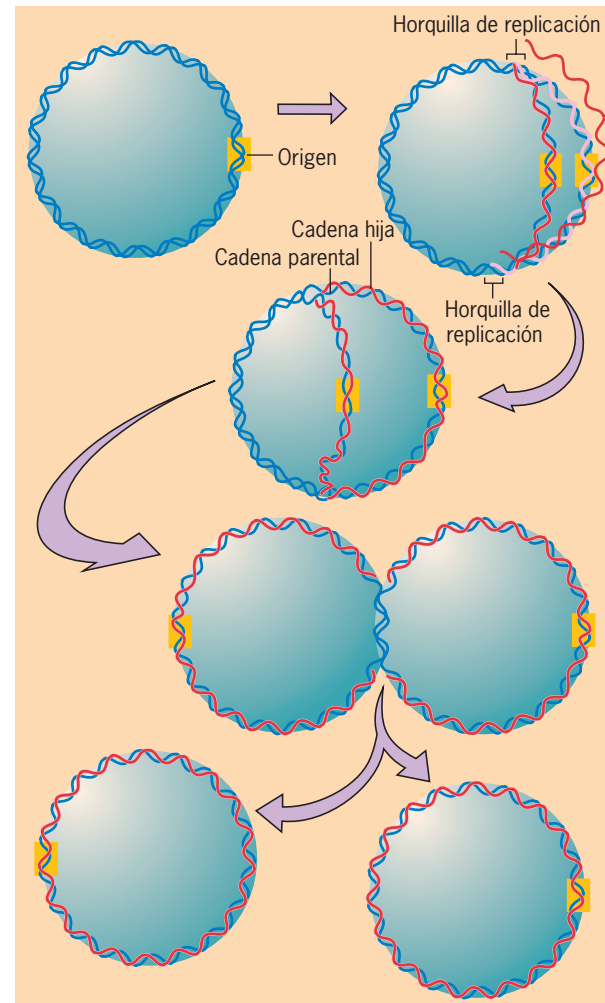
En esta sección del capítulo se describen las células bacterianas, toda vez que la replicación procariota es más fácil de entender que el proceso correspondiente de los eucariotas. Los primeros avances de la investigación en bacterias fueron impulsados por técnicas genéticas y bioquímicas como las siguientes:

- Disponibilidad de mutantes que no pueden sintetizar una u otra proteína requerida para el proceso de replicación. El aislamiento de mutantes incapaces de replicar su cromosoma puede parecer paradójico: ¿cómo pueden las células con un defecto en este proceso vital cultivarse? La paradoja se ha resuelto al obtener mutantes **sensibles a la temperatura (TS)**, en los que la deficiencia sólo es evidente a una temperatura elevada, denominada temperatura *no permisiva* (o *restrictiva*). Cuando estas bacterias crecen a baja temperatura (*permissiva*), la proteína mutante puede funcionar de manera adecuada para realizar su actividad requerida y las células pueden continuar su crecimiento y división. Se han aislado mutantes sensibles a la temperatura que afectan virtualmente todos los tipos de actividad fisiológica (véase pág. 269) y estas mutantes han sido de particular importancia en el estudio de la síntesis de DNA, tal y como opera durante la replicación, la reparación del DNA y la recombinación genética.
- Desarrollo de sistemas *in vitro* en los cuales la replicación se puede estudiar mediante componentes celulares purificados. En algunos estudios, las moléculas de DNA al replicarse se incuban con extractos celulares de los cuales se eliminan las proteínas específicas con sospecha de ser esenciales para la función. En otros estudios, el DNA se incubaba con una gran variedad de proteínas purificadas cuya actividad está bajo prueba.

En conjunto, estas técnicas han revelado la actividad de al menos 30 proteínas diferentes requeridas para la replicación del cromosoma en *E. coli*. En las siguientes páginas se revisan las actividades de varias de estas proteínas cuyas funciones se han definido con claridad. La replicación en procariotas y eucariotas tiene lugar por mecanismos muy similares y de esta forma la mayor parte de la información que se presenta en la revisión de la replicación bacteriana se aplica también a las células eucariotas.

**Horquillas de replicación y replicación bidireccional** La replicación comienza en un sitio específico en el cromosoma bacteriano conocido como el **origen**. El origen de replicación en el cromosoma de *E. coli* es una secuencia específica llamada *oriC* en la que diferentes proteínas se unen para **iniciar** el proceso de replicación.<sup>2</sup> Tras comenzar, la replicación se aleja del origen en

<sup>2</sup>El tema del inicio de la replicación se analiza con detalle en la página 547 del modo como ocurre en eucariotas.

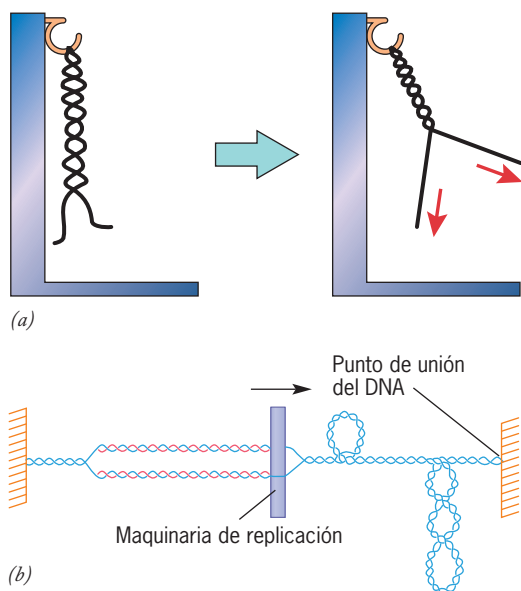


**FIGURA 13-5** Modelo de un cromosoma circular que sufre replicación semiconservadora bidireccional. Dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas desde un solo origen. Cuando las horquillas de replicación se hallan en el punto opuesto del círculo, se termina la replicación y los dos dúplex replicados se despegan el uno del otro. Las nuevas cadenas de DNA se muestran en rojo.

ambas direcciones, es decir, en forma *bidireccional* (fig. 13-5). Los puntos en la figura 13-5 donde el par de segmentos replicados se unen con los segmentos no replicados se denominan **horquillas de replicación** (*replication forks*). Cada horquilla de replicación corresponde al sitio donde: 1) la doble hélice parental se separa y 2) los nucleótidos se incorporan en las cadenas complementarias resintetizadas. Las dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas hasta que llegan a un punto a través del círculo desde el origen, donde la replicación concluye. Las dos cadenas dúplex, replicadas, nuevamente, se separan una de la otra y al final se dividen en dos células diferentes.

**Desenrollamiento del dúplex y separación de las cadenas** La separación de las cadenas de un DNA dúplex circular tiene diferentes problemas topológicos. Para visualizar las dificultades hay que observar primero la analogía entre un DNA dúplex y un fragmento de cuerda de doble hélice. Considérese lo que sucedería si se colocara un fragmento de cuerda en una

pared, sujeta por un gancho en un extremo, y se separaran las dos hebras que conforman la cuerda, algo semejante a lo que sucede al separar las dos cadenas de DNA durante la replicación. Es obvio que la separación de las cadenas de la doble hélice sufre un proceso de *desenrollamiento* de la estructura. En el caso de la cuerda, que puede rotar con libertad alrededor de su eje, la separación de las cadenas a partir de un extremo se acompaña de un movimiento de rotación de toda la fibra como medio de oponerse al desarrollo de la tensión dentro de la estructura. ¿Qué pasaría si se separan las cadenas cuando el extremo de la tira está fijado a un gancho en la pared (fig. 13-6a). Bajo estas circunstancias, la separación de las dos cadenas a partir del extremo libre genera una fuerza de torsión creciente en la cuerda y provoca que la porción no separada se enrolle cada vez de modo más apretado. La separación de las dos cadenas de una molécula de DNA circular (o una molécula lineal que no pueda girar con libertad, como ocurre con un gran cromosoma eucariota) es análoga a tener un extremo de la molécula lineal fijado a la pared; en todos estos casos, la tensión que se desarrolla dentro de la molécula no puede liberarse por rotación de toda la molécula. A diferencia de la cuerda, que puede quedar apretadamente sobre enrollada (como en la figura 13-6a), una molécula de DNA sobre enrollada adquiere un superenrollamiento positivo (pág. 391). Por lo tanto, el movimiento de la horquilla de replicación genera un superenrollamiento positivo en la porción no replicada del DNA por delante de la horquilla (fig. 13-6b). Cuando se considera que un cromosoma circular completo de *E. coli* contiene alrededor de 400 000 vueltas y lo duplican dos horquillas de replicación en 40 min, la magnitud del problema es evidente.



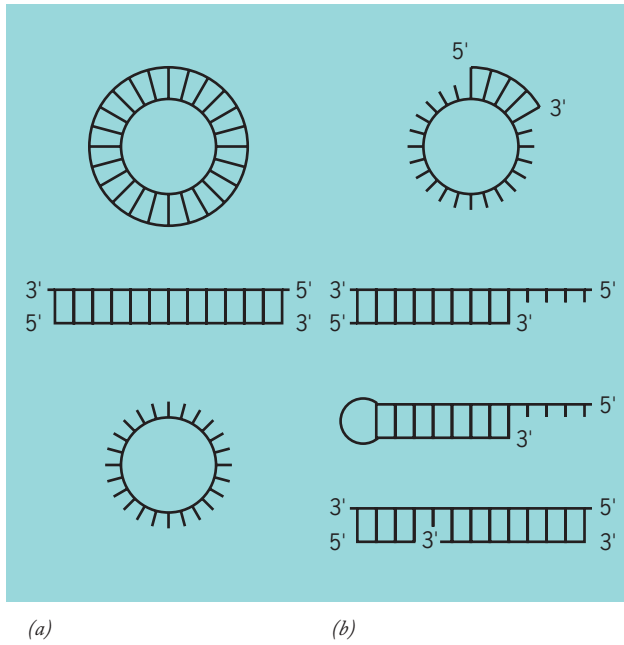
**FIGURA 13-6 El problema del desenrollamiento.** (a) Efecto de desenrollar dos haces de una cuerda en la que uno de sus extremos está unido a un gancho. La porción no separada es la que se enrolla de manera más estrecha. (b) Cuando una molécula de DNA circular o unida se replica, el DNA se sobre enrolla antes de la replicación y acumula enrollamientos positivos. Las células poseen topoisomerasas, como la DNA girasa de *E. coli* que remueve los superenrollamientos positivos. (B: REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE J. C. WANG, NATURE REVIEWS MOL. CELL BIOL 3:434, 2002; © 2002 MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

En la página 391 se mencionó que las células contienen enzimas, llamadas topoisomerasas, capaces de cambiar el estado de superenrollamiento de la molécula de DNA. Una enzima de este tipo, denominada **DNA girasa**, una topoisomerasa tipo II, libera la tensión mecánica que se crea durante la replicación en *E. coli*. Las moléculas de la DNA girasa se desplazan a lo largo del DNA por delante de la horquilla de replicación y eliminan los superenrollamientos positivos. La DNA girasa realiza esta tarea al cortar las dos cadenas del DNA dúplex; un segmento del DNA pasa a través de la rotura de la doble cadena hacia el otro lado y entonces se ligan los cortes de nueva cuenta, un proceso que se lleva a cabo por liberación de energía durante la hidrólisis de ATP (trifosfato de adenosina, y se muestra con detalle en la figura 10-14b). Las células eucariotas poseen enzimas similares que realizan esta función.

**Propiedades de las DNA polimerasas** Se analizan primero el mecanismo de la replicación del DNA y algunas de las propiedades de las **DNA polimerasas**, las enzimas que sintetizan nuevas cadenas de DNA. Arthur Kornberg de la *Washington University* comenzó en la década de 1950 los estudios de estas enzimas. En sus experimentos iniciales, Kornberg et al. purificaron una enzima de extractos bacterianos a la que incorporaron precursores de DNA marcados con radiactividad en un polímero ácido insoluble de DNA. La enzima se denominó *DNA polimerasa* (y más tarde, después del descubrimiento de las enzimas que polimerizan DNA, *DNA polimerasa I*). Para que tuviera lugar la reacción, la enzima requería la presencia de DNA y los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido (dTTP, dATP, dCTP y dGTP). El DNA recién sintetizado y marcado con radiactividad tenía la misma composición de bases que el DNA original no marcado, lo cual sugería que las cadenas de DNA original habían servido como **plantillas** para la reacción de polimerización.

A medida que se descubrieron propiedades adicionales de las DNA polimerasas se volvió evidente que la replicación era más compleja de lo que se pensaba. Cuando se probaron distintos tipos de plantillas de DNA, se encontró que esta plantilla de DNA tenía que poseer ciertas características estructurales para promover la incorporación de precursores marcados (fig. 13-7). Por ejemplo, en una doble cadena intacta de DNA no se estimulaba la incorporación. No sorprendió considerar que la doble hélice debe separarse para que suceda la replicación. Era menos obvio por qué una cadena sencilla de una molécula circular también era incapaz de estimular la actividad de polimerización; se esperaba que esta estructura fuera la plantilla ideal para dirigir la síntesis de una cadena complementaria. En cambio, cuando se probó con una molécula de DNA de doble cadena parcial, la mezcla de reacción generó una incorporación inmediata de nucleótidos.

Pronto se descubrió que el DNA monocatenario circular no servía como plantilla para la DNA polimerasa porque la enzima no puede *iniciar* la formación de una cadena de DNA. Más bien, ésta sólo puede agregar nucleótidos en el extremo hidroxilo 3' terminal de una cadena preexistente. La cadena que provee el OH 3' terminal se denomina **iniciador**. Todas las DNA polimerasas (de procariotas y eucariotas) tienen estos dos requerimientos básicos (fig. 13-8a): una cadena de DNA plantilla para copiar y una cadena iniciadora en la cual pueden agregarse los nucleótidos. Tales requerimientos explican por qué ciertas estructuras de DNA no pudieron promover la síntesis de DNA (fig. 13-7a).

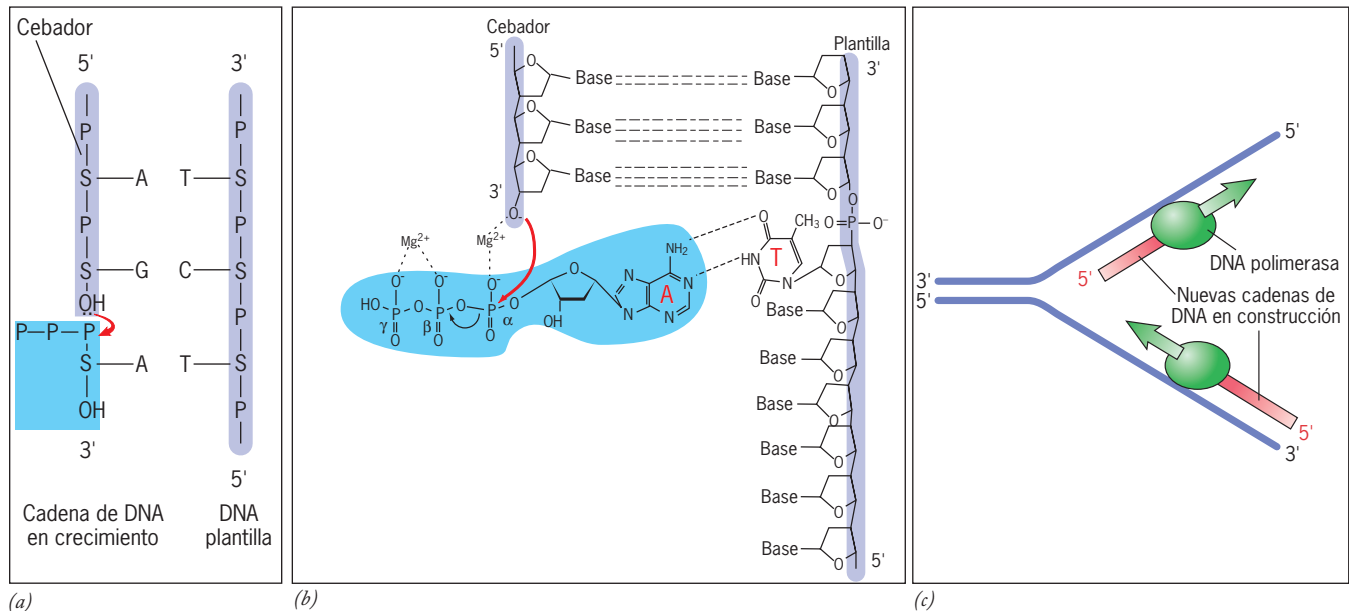


**FIGURA 13-7 Plantillas y no plantillas que estimulan la actividad de las DNA polimerasas.** (a) Ejemplos de estructuras de DNA que no estimulan la síntesis de DNA *in vitro* y la DNA polimerasa aislada de *E. coli*. (b) Ejemplos de estructuras de DNA que estimulan la síntesis de DNA *in vitro*. En todos los casos, las moléculas en b contienen una cadena plantilla para copiar y una cadena iniciadora con un 3' OH al cual se agregan los nucleótidos.

Una doble hélice lineal intacta provee el extremo hidroxilo 3' terminal pero no tiene la plantilla. Por otra parte, una cadena sencilla circular provee un DNA plantilla pero carece del iniciador. La molécula de doble cadena parcial (fig. 13-7b) satisface ambos requerimientos y promueve la incorporación de nucleótidos. El hallazgo de que la DNA polimerasa no puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA generó una pregunta crucial: ¿de qué manera la síntesis de una nueva cadena se inicia en la célula? Esta pregunta se revisa más adelante.

La DNA polimerasa que purificó Kornberg fue difícil entender en términos de su presumible función como enzima replicante: ésta sólo sintetizaba DNA en la dirección 5' a 3' (escrito como 5' → 3'). El diagrama que presentaron Watson y Crick (fig. 13-1) mostraba sucesos como ellos *esperaban* que ocurrieran en la horquilla de replicación. El diagrama sugería que una de las cadenas nuevamente sintetizadas se polimerizaba en la dirección 5' → 3', mientras que la otra cadena lo hacía en la dirección 3' → 5'. ¿Acaso había otras enzimas encargadas de la construcción de la cadena en la dirección 3' → 5'? ¿la enzima trabajaba en condiciones diferentes en la célula que bajo condiciones *in vitro*? Más adelante se analiza esta pregunta.

Durante el decenio de 1960 hubo indicios de que la “enzima de Kornberg” no era la única DNA polimerasa en una célula bacteriana. Entonces, en 1969, se aisló una cepa mutante de *E. coli* y se observó que tenía menos de 1% de la actividad normal de la enzima, pero era capaz de multiplicarse a una tasa normal. Estudios posteriores revelaron que la enzima de Kornberg, o *DNA polimerasa I*, era sólo una de las distintas DNA polimerasas presentes en las células bacterianas. La principal enzima responsable de la replicación del DNA (p. ej., la polimerasa que



**FIGURA 13-8 Actividad de una DNA polimerasa.** (a) Polimerización de un nucleótido en el extremo 3' terminal de una cadena iniciadora. La enzima selecciona nucleótidos para la incorporación basada en su capacidad para formar pares en los nucleótidos de la cadena plantilla. (b) Modelo simplificado del mecanismo de dos iones metálicos para la reacción en la cual los nucleótidos se incorporan a una cadena de DNA que crece por medio de una DNA polimerasa. En este modelo, uno de los iones de magnesio empuja

al protón hacia afuera del grupo hidroxilo 3' del nucleótido terminal del iniciador, lo cual facilita el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno 3' de carga negativa en el fosfato α del trifosfato de nucleósido entrante. El segundo ion de magnesio promueve la liberación del pirofosfato. Los dos iones metálicos se unen a la enzima mediante residuos de ácido aspártico muy conservados en el sitio activo. (c) Diagrama esquemático que muestra la dirección del movimiento de la polimerasa a lo largo de las dos cadenas plantilla.



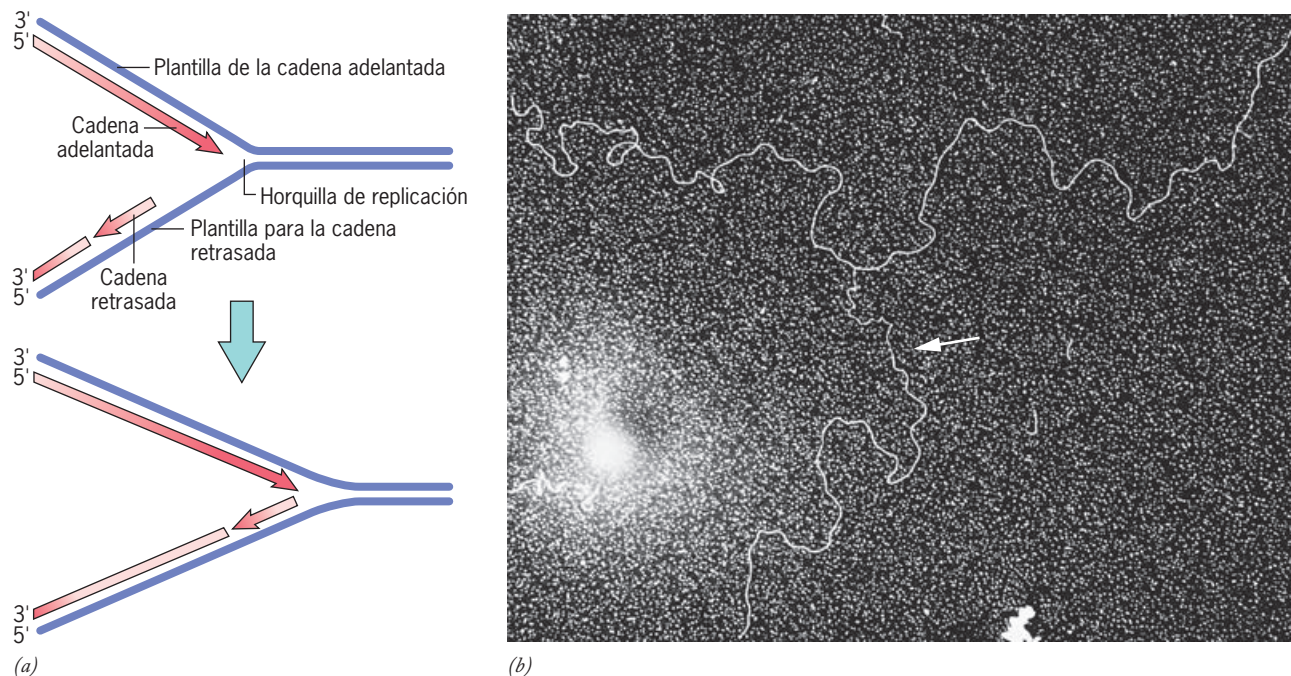
se replica), es la *DNA polimerasa III*. Una célula bacteriana típica contiene 300 a 400 moléculas de DNA polimerasa I, pero sólo unas 10 copias de la DNA polimerasa III. Las cantidades mucho mayores de la DNA polimerasa I en la célula han minimizado la presencia de la DNA polimerasa III. Sin embargo, el descubrimiento de las otras DNA polimerasas no resolvía las dos preguntas básicas mencionadas antes; ninguna de estas enzimas puede iniciar las cadenas de DNA ni construir cadenas en la dirección  $3' \rightarrow 5'$ .

**Replicación semidiscontinua** La ausencia de actividad de polimerización en dirección  $3' \rightarrow 5'$  tiene una explicación más directa: no se pueden sintetizar cadenas de DNA en dicha dirección. Ambas cadenas recién sintetizadas se ensamblan en la dirección  $5' \rightarrow 3'$ . Durante la reacción de polimerización, el grupo  $-\text{OH}$  en el extremo  $3'$  del iniciador lleva a cabo un ataque nucleofílico en el fosfato  $\alpha$   $5'$  del trifosfato de nucleósido que entra, como se muestra en la figura 13-8b. Las moléculas de la polimerasa encargadas de la construcción de las dos cadenas de DNA se mueven en una dirección  $3'$  a  $5'$  a lo largo de la *plantilla* y ambas construyen una cadena que crece desde su extremo  $5'$  fosfato terminal (fig. 13-8c). Por consecuencia, una de las cadenas resintetizadas crece en dirección del asa de replicación donde las cadenas de DNA parental se separan, mientras la otra cadena crece y se aleja de la horquilla.

Aunque esto resuelve el problema en relación con una enzima que sólo puede sintetizar una cadena en una dirección, genera un

dilema aún más difícil. Es evidente que la cadena que crece hacia la horquilla en la figura 13-8c se puede construir mediante adición continua de nucleótidos a su extremo  $3'$ . ¿Pero cómo se sintetiza la otra cadena? Pronto se obtuvo evidencia de que la cadena que crece y se aleja de la horquilla de replicación se sintetizaba de manera *discontinua*, esto es, en fragmentos (fig. 13-9). Antes de que la síntesis de un fragmento pueda iniciarse, se debe exponer un tramo adecuado del DNA plantilla para el desplazamiento de la horquilla de replicación. Una vez iniciada ésta, cada fragmento crece y se aleja de la horquilla de replicación hacia el extremo  $5'$  de un fragmento previamente formado al cual se une después. Por lo tanto, las dos cadenas hijas se sintetizan por procesos muy diferentes. La cadena que se sintetiza de modo continuo se conoce como **cadena adelantada** debido a que lo hace conforme avanza la horquilla de replicación. La cadena que se sintetiza de forma discontinua se llama **cadena retrasada** dado que el inicio de cada fragmento debe esperar a que las cadenas progenitoras se separen y expongan un fragmento (fig. 13-9). Como se revisa en la página 542, ambas cadenas se sintetizan con probabilidad de manera simultánea, así que los términos *adelantada* y *retrasada* no pueden ser apropiados como se pensaba al principio. En virtud de que una cadena se sintetiza de modo continuo y la otra de manera discontinua, la replicación es *semidiscontinua*.

Reiji Okazaki de la Universidad de Nagoya en Japón descubrió, después de varios experimentos de marcaje, que una cadena se sintetiza primero como un pequeño fragmento; él encontró que en bacterias incubadas con timidina [ $^3\text{H}$ ] por pocos segundos



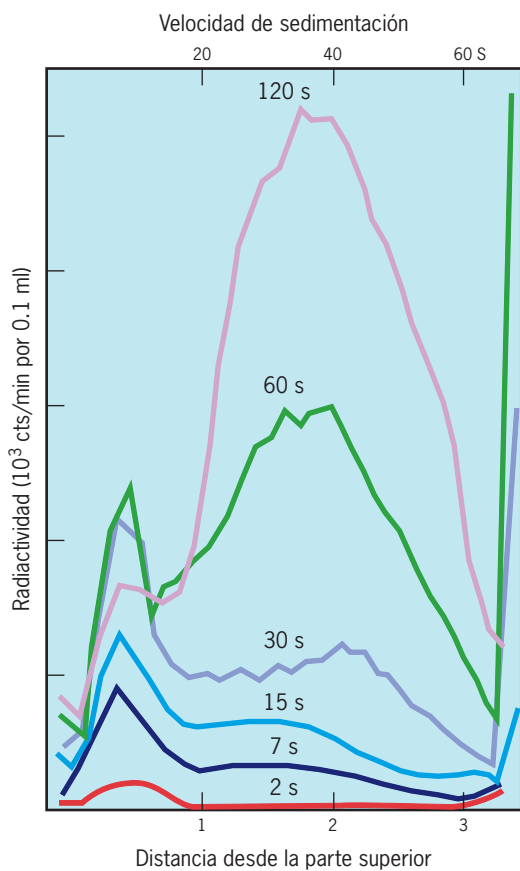
**FIGURA 13-9 Una secuencia de eventos diferentes sintetiza a las dos cadenas de una doble hélice.** Las moléculas de la DNA polimerasa se mueven a lo largo de una plantilla sólo en dirección  $3' \rightarrow 5'$ . Como resultado, las dos cadenas recién ensambladas crecen en direcciones opuestas, una hacia la horquilla de replicación y la otra en el sentido contrario. Una cadena se ensambla en forma continua y la otra como fragmentos unidos de manera enzimática. (a) Diagrama esquemático que muestra las diferencias en las síntesis de las dos cadenas. (b) Micrografía electrónica de

una molécula de DNA de bacteriófago en replicación. Los dos extremos de la izquierda son los dúplex en replicación y el extremo de la derecha es el dúplex no replicado. La cadena retrasada del DNA replicado *de novo* contiene una porción de cadena sencilla expuesta (o más delgada) que discurre desde la horquilla de replicación que muestra la flecha. (B: TOMADA DE J. WOLFSON Y DAVID DRESSLER, REPRODUCIDA CON AUTORIZACIÓN DE THE ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, VOLUME 29; © 1975, POR ANNUAL REVIEWS, INC.)



e inmediatamente cosechadas, la mayor parte de la reactividad podría encontrarse como parte de fragmentos pequeños de DNA de unos 1000 a 2000 nucleótidos de longitud. En cambio, si las células se incubaban con el DNA marcado precursor por 1 a 2 min, casi toda la radiactividad incorporada formó parte de moléculas de DNA mucho más grandes (fig. 13-10). Estos resultados indicaron que una porción del DNA se construyó en pequeños segmentos (más tarde conocidos como **fragmentos de Okazaki**) que se ligaron con rapidez a piezas mucho más grandes sintetizadas con anterioridad. La enzima que une los fragmentos de Okazaki en una cadena continua se conoce como **DNA ligasa**.

El descubrimiento de que la cadena retrasada se sintetiza en piezas suscitó una nueva pregunta acerca del inicio de la síntesis del DNA. ¿De qué manera la síntesis de cada uno de estos fragmentos comienza cuando ninguna de las DNA polimerasas son capaces de iniciar la cadena? Estudios posteriores revelaron que el inicio no lo lleva a cabo una DNA polimerasa sino más bien un

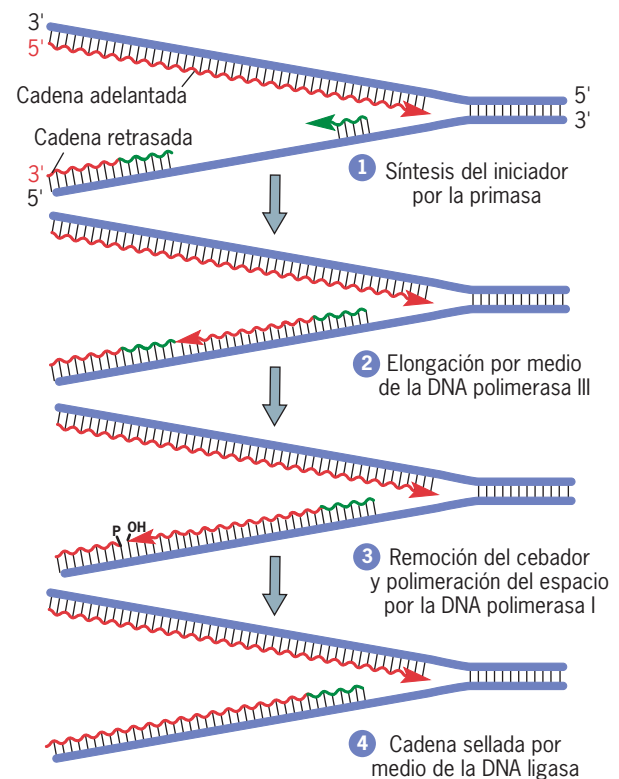


**FIGURA 13-10** Resultados de un experimento que muestran la parte del DNA que se sintetiza en fragmentos pequeños. Perfiles del gradiente de densidad de sacarosa del DNA de un cultivo de células de *E. coli* infectadas con fago. Las células se marcaron en diferentes tiempos y se determinó la velocidad de sedimentación del DNA marcado. Cuando el DNA se preparó después de pulsos muy cortos, un porcentaje significativo de radiactividad apareció en fragmentos muy cortos de DNA (representado por el pico cercano a la parte superior del tubo a la izquierda). Después de periodos de 60 a 120 s, la altura relativa de este pico descendió a medida que los fragmentos marcados de DNA se unieron a los extremos de las moléculas de peso molecular elevado. (TOMADA DE R. OKAZAKI ET AL, COLD SPRING HARBOR SYM. QUANT. BIOL. 33:130, 1968.)

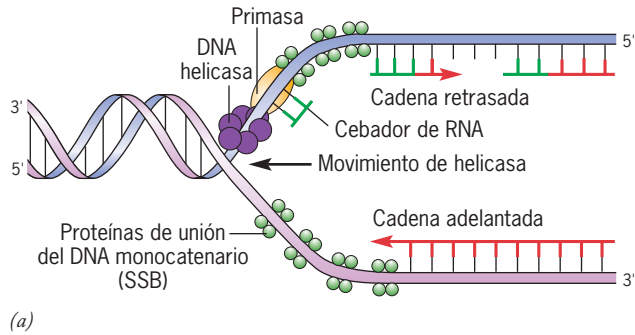
tipo distinto de RNA polimerasa, la denominada **primasa**, que sintetiza una secuencia corta de RNA, no de DNA. La secuencia adelantada, cuya síntesis comienza en el origen de la replicación, también la inicia una molécula de primasa. El fragmento corto de RNA lo sintetiza una primasa en el extremo 5' de la cadena adelantada y el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki que sirve como el iniciador que se requiere para la síntesis de DNA por medio de una DNA polimerasa. Los iniciadores de RNA se eliminan después y los espacios resultantes en la cadena se llenan y entonces se ligan por medio de una DNA ligasa. Estos sucesos se ilustran de manera esquemática en la figura 13-11. La formación de iniciadores transitorios de RNA durante el proceso de replicación del DNA es una actividad compleja. Quizá sea mayor la probabilidad de cometer errores durante el inicio que durante el alargamiento; por lo tanto, el empleo de un segmento de RNA corto que puede degradarse elimina la inclusión de bases erróneas.

### La maquinaria que opera en la horquilla de replicación

La replicación supone más que la incorporación de nucleótidos. El desenrollamiento del dúplex y la separación de las cadenas requiere la ayuda de dos tipos de proteínas que se unen al DNA, una **helicasa** (o enzima que desenrolla al DNA) y **proteínas que se unen al DNA monocatenario (SSB)**. Las DNA helicasas desenrollan al dúplex del DNA en una reacción que utiliza energía liberada a partir de la hidrólisis del ATP para separar los puentes de hidrógeno que mantienen juntas a las dos cadenas, lo cual expone a las plantillas de DNA monocatenario. *E. coli* tiene



**FIGURA 13-11** Uso de fragmentos cortos de RNA como iniciadores removibles para iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada. Los pasos principales se indican en la figura y se describen en el texto. En las figuras siguientes se señala la función de las diferentes proteínas accesorias que intervienen en estas actividades.

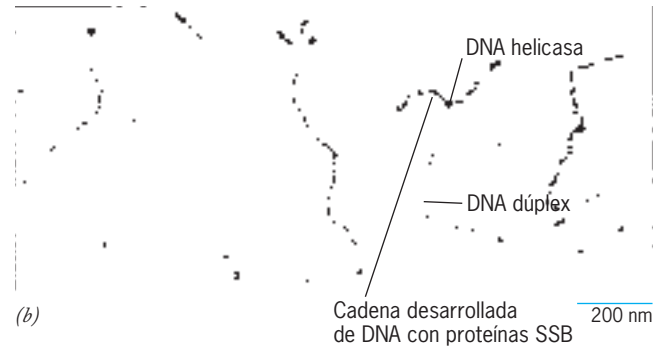


**FIGURA 13-12 Funciones de la DNA helicasa, las proteínas de unión al DNA monocatenario y la primasa en la horquilla de replicación.** (a) La helicasa se mueve a lo largo del DNA y cataliza el desenrollamiento del ATP del dúplex. Conforme el DNA se desenrolla, las cadenas evitan la formación del dúplex por medio de proteínas de unión del DNA de cadena sencilla (SSB). La primasa relacionada con la helicasa sintetiza los iniciadores de RNA, es decir, cada uno de los fragmentos de Okazaki. Los iniciadores de RNA, que tienen un tamaño aproximado de 10 nucleótidos, se

por lo menos 12 helicasas diferentes, que usa en distintos aspectos del metabolismo del DNA (y RNA). Una de estas helicasas (el producto del gen *dnaB*) sirve como la máquina principal de desenrollamiento durante la replicación. La helicasa DnaB consiste en seis subunidades estructuradas que forman una proteína semejante a un anillo que encierra a una sola cadena de DNA (fig. 13-12a). La helicasa DnaB se coloca primero sobre el DNA en el origen de replicación (con la ayuda de la proteína DnaC) que se desplaza en una dirección  $5' \rightarrow 3'$  a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada, lo que desenrolla la hélice durante este proceso (fig. 13-12). En la página 533 se muestra un modelo de helicasa similar de bacteriófago que incluye la separación de las cadenas durante la replicación. El desenrollamiento del DNA por la helicasa se mantiene por la unión de las proteínas SSB a las cadenas separadas de DNA (fig. 13-12). Estas proteínas se unen de manera selectiva al DNA monocatenario manteniéndolo en un estado extendido y evitando que se vuelva a enrollar o se dañe. Un esquema de la acción combinada de las DNA helicasas y las proteínas SSB sobre la estructura del DNA de doble hélice se ilustra en la micrografía electrónica de la figura 13-12b.

Hay que recordar que una enzima llamada primasa inicia la síntesis de cada fragmento de Okazaki. En las bacterias, la primasa y la helicasa se relacionan de manera transitoria para formar lo que se llama un “primosoma”. De los dos miembros del primosoma, la helicasa se mueve a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada de manera procesiva (esto es, sin separarse de la plantilla de la cadena durante el tiempo que dura la horquilla de la replicación). Conforme la helicasa “viaja” a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada y abre las cadenas del dúplex, la primasa se une de manera periódica a la helicasa y sintetiza los iniciadores cortos de RNA que comienzan la formación de cada fragmento de Okazaki. Como se dijo antes, los iniciadores de RNA se polimerizan después como DNA por medio de una DNA polimerasa, de modo específico la DNA polimerasa III.

La evidencia sugiere que la misma DNA polimerasa III sintetiza fragmentos sucesivos de la cadena retrasada. Para llevar a cabo esto, la molécula de polimerasa III se recicla del sitio donde ha terminado un fragmento de Okazaki y pasa al próximo sitio



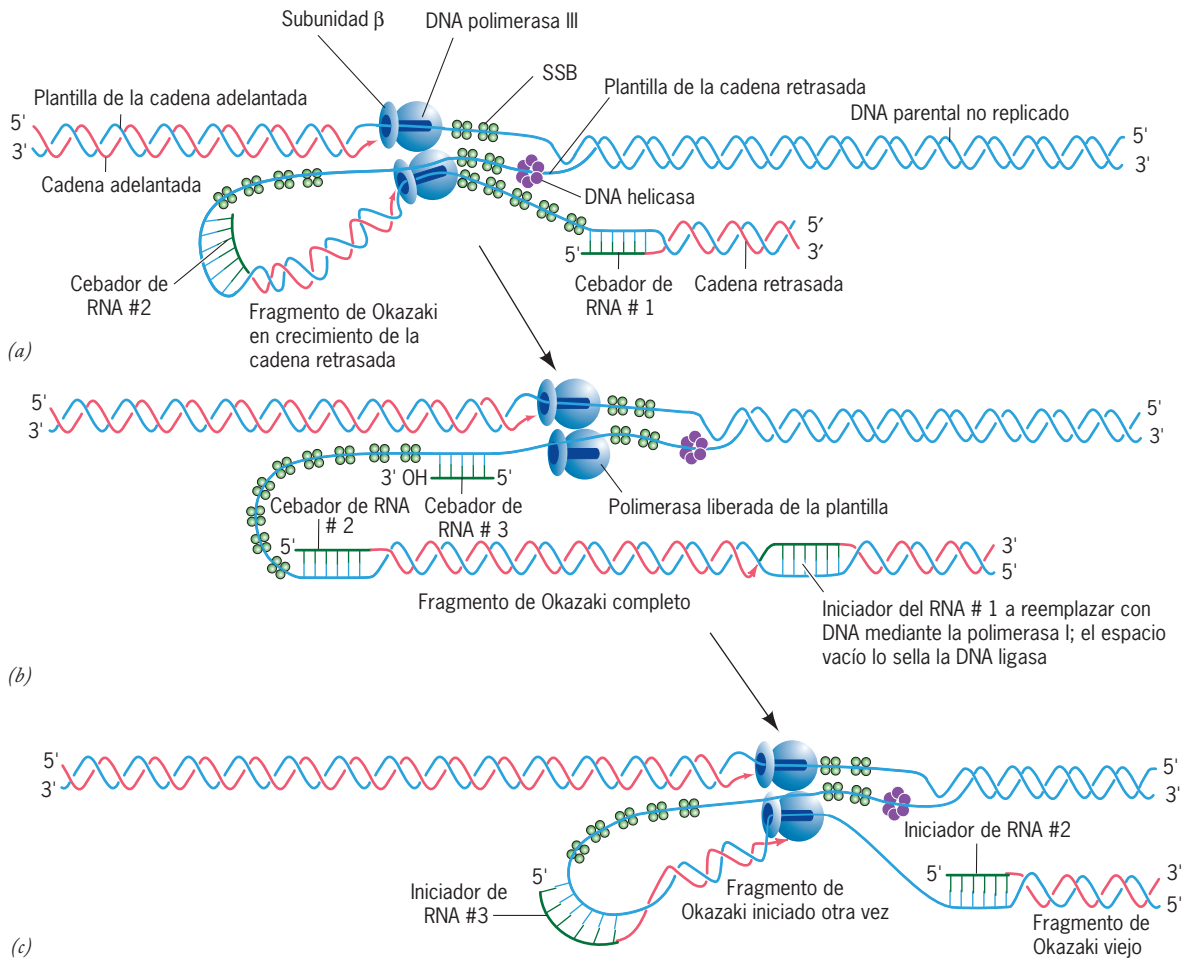
eliminan después. (b) Serie de cinco micrografías electrónicas que muestran moléculas de DNA incubadas con una DNA helicasa viral (antígeno T, pág. 550) y proteínas SSB de *E. coli*. Las moléculas de DNA se desenrollan progresivamente de izquierda a derecha. La helicasa aparece en la partícula circular en la horquilla y las proteínas SSB están unidas a los extremos de cadena sencilla, lo que hace parecer a éstas, cuentas de un collar. (B: TOMADA DE RAINER WESSEL, JOHANNES SCHWEIZER Y HANS STAHL, J. VIROL. 66:807, 1992; © 1992 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY.)

a lo largo de la cadena retrasada muy cerca del lugar donde se desenrolla el DNA. Una vez en su nuevo sitio, la polimerasa se une al extremo  $3' \text{ OH}$  del iniciador de RNA que se ha colocado por delante de una primasa y comienza a incorporar desoxirribonucleótidos en el extremo del RNA corto.

¿De qué forma una polimerasa III se mueve de un sitio de la cadena retrasada a otro sitio cercano a la horquilla de replicación? Se cree que la enzima logra esto al “aprovechar el viaje” con el mecanismo de duplicación de la plantilla de la cadena adelantada que se desplaza en esa dirección. Aunque las dos polimerasas se mueven en direcciones opuestas a lo largo de sus respectivas cadenas, pueden actuar como si fueran parte del mismo complejo de proteínas (fig. 13-13). Las dos polimerasas pueden replicar ambas cadenas al formar un asa en el DNA de la cadena retrasada sobre sí misma, lo que causa que esta plantilla tenga la misma orientación que la cadena adelantada. Las dos polimerasas pueden moverse juntas como parte de un solo complejo de replicación, sin violar la “regla  $5' \rightarrow 3'$ ” para la síntesis de una cadena de DNA (fig. 13-13). Una vez que las polimerasas ensamblan la cadena retrasada alcanzan el extremo  $5'$  del fragmento de Okazaki sintetizado durante la vuelta previa, la plantilla de la cadena retrasada se libera al parecer y la polimerasa comienza a trabajar en el extremo  $3'$  del próximo iniciador de RNA hacia la horquilla de replicación. Este modelo que se muestra en la figura 13-13 se refiere a menudo como el “modelo del trombón” porque el asa de DNA crece de manera repetida y se acorta durante la replicación de la cadena retrasada, lo que semeja el movimiento del “asa” de un trombón.

### Estructura y funciones de las DNA polimerasas

La enzima que sintetiza las cadenas de DNA durante la replicación en *E. coli* es la DNA polimerasa III, que es parte de una “maquinaria de replicación” llamada *holoenzima DNA polimerasa III* (fig. 13-14). Uno de los componentes no catalíticos de la holoenzima denominada **pinza  $\beta$  (abrazadera)**, mantiene la polimerasa relacionada con la plantilla de DNA. Las DNA polimerasas (como las polimerasas de RNA) poseen dos propiedades contrastantes: 1) tienen que permanecer vinculadas con la plantilla

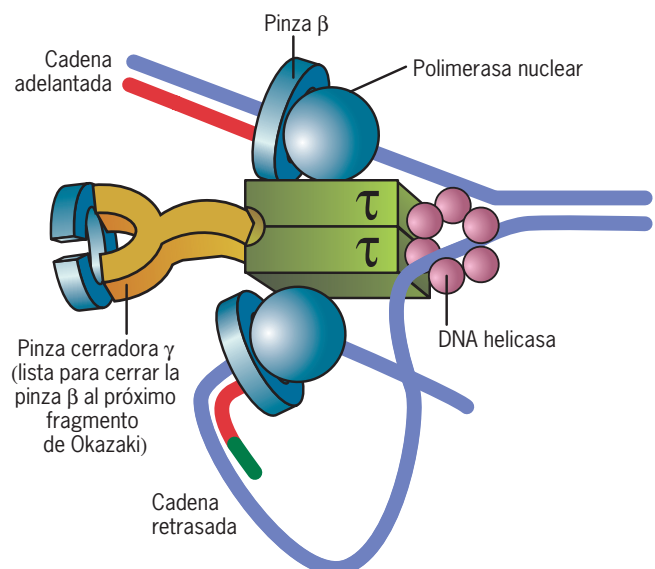


**FIGURA 13-13** Dos DNA polimerasas que trabajan de manera conjunta como parte de un complejo único llevan a cabo la replicación de las cadenas adelantada y retrasada en *E. coli*. (a) Las dos moléculas de la DNA polimerasa III discurren juntas y de esa forma se desplazan hacia el extremo opuesto de sus moldes respectivos. Esto sucede porque una de las cadenas de la plantilla de la cadena retrasada forma un asa. (b) La polimerasa libera la plantilla de la cadena retrasada cuando ésta

encuentra al fragmento de Okazaki ya sintetizado. (c) La polimerasa que participó en el ensamble de los fragmentos previos de Okazaki se une ahora otra vez al DNA plantilla de la cadena retrasada por delante del DNA sometido a síntesis en el extremo del iniciador #3 del RNA construido por la primasa. (TOMADA DE D. VOET Y J.G. VOET, *BIOCHEMISTRY*, 2ND ED.; © 1995 JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY AND SONS, INC.)

sobre largos tramos para sintetizar una cadena complementaria continua y 2) no se pueden fijar con tanta fuerza que les impida desplazarse de un nucleótido al siguiente. Estas propiedades contrastantes se deben a la forma de dona de la pinza  $\beta$  que rodea al DNA (abrazadera de DNA) (fig. 13-15a) y se desliza de manera

**FIGURA 13-14** Representación esquemática de la holoenzima DNA polimerasa III. La holoenzima contiene 10 subunidades diferentes organizadas en varios componentes distintivos. Como parte de la holoenzima se incluyen 1) dos polimerasas centrales que replican el DNA, 2) dos o más pinzas  $\beta$  que permiten que la polimerasa permanezca relacionada con el DNA y 3) un complejo ( $\gamma$ ) para cargar la pinza que carga cada pinza deslizante en el DNA. El cargador de pinza de una horquilla de replicación activa contiene dos subunidades  $\tau$ , que sujetan las polimerasas centrales en el complejo y también unen a la helicasa. El término *replisoma* se usa a menudo para referirse al complejo completo de proteínas que están activas en la horquilla de replicación, incluidas la holoenzima DNA polimerasa III, la helicasa, SSB y primasa. (BASADA EN DIBUJOS DE M. O'DONNELL.)



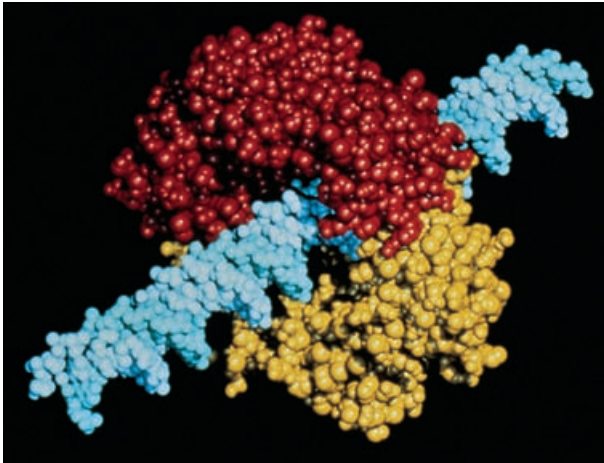
libre a lo largo de éste. A medida que la DNA polimerasa se une a una "pinza deslizante"  $\beta$ , se puede mover progresivamente de un nucleótido al próximo sin pasarse más allá de la plantilla. La polimerasa en la cadena adelantada permanece unida a una sola pinza  $\beta$  durante la replicación. En cambio, cuando la polimerasa en la cadena retrasada completa la síntesis de un fragmento de Okazaki, ésta se desengancha de la pinza  $\beta$  y otra vez se une a una pinza  $\beta$ , la cual se halla ensamblada a la unión entre el iniciador de RNA y el DNA plantilla localizado muy cerca de la horquilla de replicación (fig. 13-15*b*). Pero, ¿cómo es que una molécula de DNA con gran elongación entra en una pinza en forma de anillo (abrazadera) como en la figura 13-15*a*? El ensamblaje de la pinza  $\beta$  alrededor del DNA requiere un *cargador de pinza* multisubunitario que también es parte de la holoenzima DNA polimerasa III (figs. 13-14, 13-15*c*). En estado unido a ATP, el cargador de pinza se une a una unión iniciador-plantilla al tiempo que mantiene la pinza  $\beta$  en una conformación abierta como se ilustra en la figura 13-15*c*. Una vez que el DNA ha pasado a través de la abertura en la pared de la pinza, el ATP unido al cargador de

pinza se hidroliza, con lo que se libera de la pinza; entonces ésta se cierra alrededor del DNA. La pinza  $\beta$  está lista para unirse con la polimerasa III, como se muestra en la figura 13-15*b*.

La DNA polimerasa I, que consiste sólo en una subunidad, interviene de manera primaria en la reparación del DNA, proceso mediante el cual se corrigen las secciones dañadas del DNA (pág. 552). La DNA polimerasa I también elimina los iniciadores de RNA en el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki durante la replicación y reemplaza a éstos con DNA. La capacidad de la enzima para llevar a cabo esta tarea se revisa en la siguiente sección.

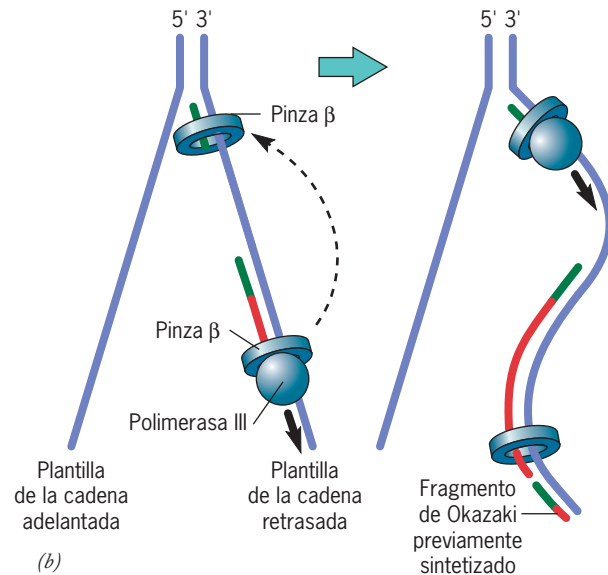
### Actividades de la exonucleasa de las DNA polimerasas

Ahora que se han explicado las diferentes propiedades desconcertantes de la DNA polimerasa I, como la incapacidad de la enzima para iniciar la síntesis de una cadena, se mencionan otras observaciones curiosas. Kornberg encontró que las preparaciones de la DNA polimerasa I siempre contienen actividades de exonucleasa, es decir, son capaces de degradar polímeros de DNA

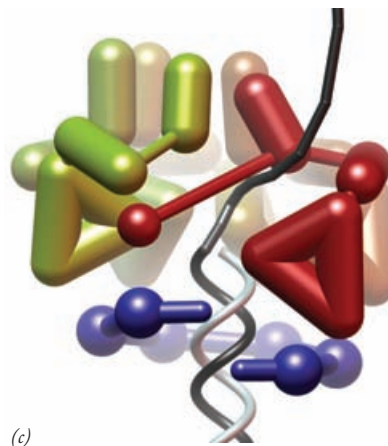


(a)

**FIGURA 13-15** Pinza deslizante  $\beta$  y cargador de pinza. (a) Modelo de espacio lleno que muestra las dos subunidades que integran la estructura en forma de rosquilla de la pinza deslizante  $\beta$  de *E. coli*. (b) Diagrama esquemático de la polimerasa que circula por la cadena seguidora. La polimerasa es mantenida en contacto con el DNA por la pinza deslizante  $\beta$  conforme ésta se mueve a lo largo de la cadena utilizada como plantilla, y sintetiza la cadena complementaria. Después de la terminación del fragmento de Okazaki, la enzima se desprende de su pinza  $\beta$  y circula hacia una pinza recién ensamblada que "espera" en una unión del iniciador de RNA-plantilla de DNA en dirección 5'. La pinza  $\beta$  original se deja atrás por un tiempo en el fragmento de Okazaki terminado, pero luego se desensambla y reutiliza. (c) Modelo de un complejo de pinza deslizante y cargador de pinza de un procarionta arquea con base en el análisis de imágenes de microscopía electrónica. El cargador de pinza (mostrado con subunidades en rojo y en verde) se une a la pinza deslizante (azul), que se mantiene en una conformación en espiral abierta parecida a una rondana de presión. El DNA se ha abierto a través del hueco en la pinza. La cadena iniciadora del DNA termina dentro del cargador de pinza, mientras que la cadena que sirve de plantilla, se extiende a través de una abertura en la parte superior de la proteína. El cargador de pinza ha sido descrito como un "tapón con rosca" que se acopla en el DNA de tal modo que los subdominios de la proteína forman una espiral la cual puede "enroscarse" en el esqueleto de DNA helicoidal. (A: TOMADA DE JOHN KURIYAN, CELL,



(b)



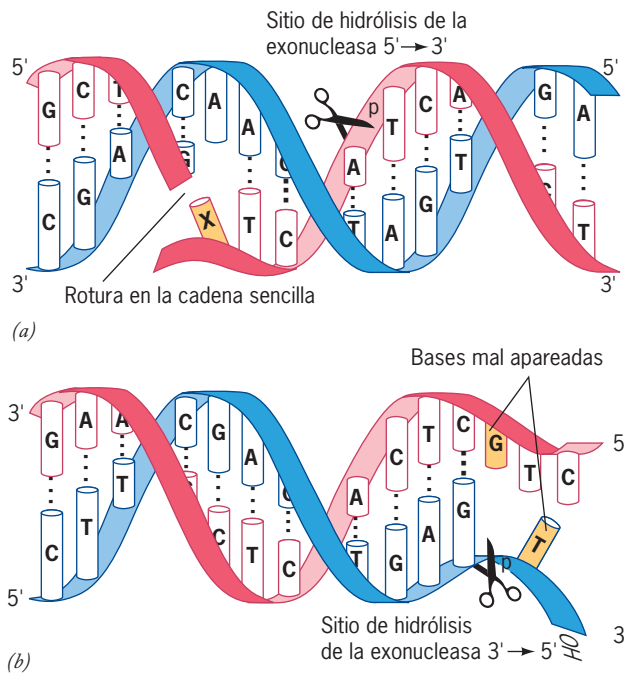
(c)

69:427, 1992; © CELL PRESS. B: TOMADA DE P. T. STUKENBERG, J. TURNER Y M. O'DONNELL, CELL 78:878, 1994; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; C: TOMADA DE T. MIYATA, ET AL., PROC. NAT'L. ACAD. SCI. U.S.A. 102:13799, 2005; CORTESÍA DE K. MORIKAWA.)



al eliminar uno o más nucleótidos del extremo de la molécula. Al principio, Kornberg asumió que esta actividad se debía a la contaminación con enzima porque la acción de las exonucleasas es contraria a la capacidad de síntesis de DNA. No obstante, la actividad de exonucleasa no pudo eliminarse de las preparaciones de polimerasa y de hecho es una actividad real de la molécula de la polimerasa. Luego se mostró que todas las polimerasas bacterianas poseen la actividad de exonucleasa. Las exonucleasas pueden dividirse en actividades de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  y  $3' \rightarrow 5'$ , según sea la dirección en la cual se degrada la cadena. La DNA polimerasa I tiene ambas actividades de exonucleasa,  $3' \rightarrow 5'$  y  $5' \rightarrow 3'$ , además de su actividad de polimerización (fig. 13-16). Estas tres actividades se localizaron en diferentes dominios de un solo polipéptido. De esta forma, la DNA polimerasa I posee tres enzimas en una. Las dos actividades de exonucleasa tienen funciones por completo diferentes en la replicación. Primero se describe la actividad de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$ .

Casi todas las nucleasas son específicas para DNA o RNA, pero la exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  de la DNA polimerasa I puede degradar los dos tipos de ácido nucleico. El inicio de los fragmentos de Okazaki por medio de la primasa deja un segmento de RNA en el extremo  $5'$  de cada fragmento (véase el iniciador de RNA 1 de la figura 13-13b), el cual se remueve por la actividad de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  de la DNA polimerasa I (fig. 13-16a). A medida que la enzima remueve los ribonucleótidos del iniciador,



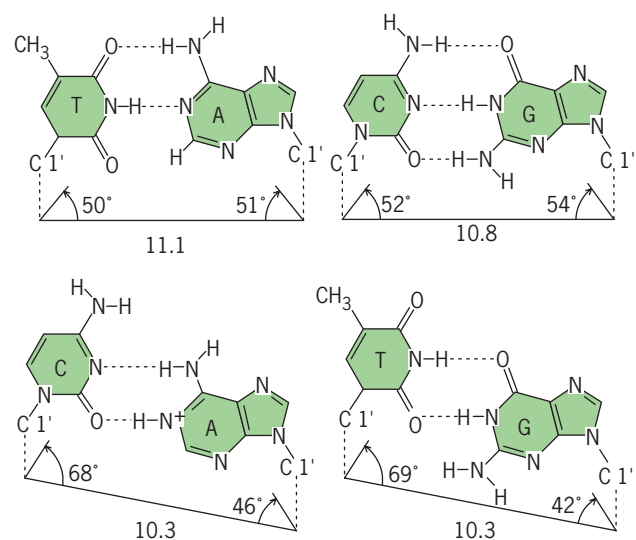
**FIGURA 13-16** Las actividades de exonucleasa de la DNA polimerasa I. (a) La función de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  remueve los nucleótidos desde el extremo  $5'$  de una cadena sencilla con rotura. Esta actividad tiene una función clave para remover los iniciadores de RNA. (b) La función de exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  desplaza los nucleótidos mal apareados del extremo  $3'$  de la cadena en crecimiento del DNA. Esta actividad tiene una función clave en el mantenimiento de la precisión de la síntesis de DNA. (TOMADA DE D. VOET Y J.G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2ND ED.; © 1995 JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY AND SONS, INC.)

su actividad de polimerasa rellena de manera simultánea el espacio resultante con desoxirribonucleótidos. El último desoxirribonucleótido incorporado se liga de manera covalente al extremo  $5'$  terminal del fragmento de DNA antes sintetizado por medio de una DNA ligasa. La función de la exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  se revisa en la siguiente sección.

### Aseguramiento de la alta fidelidad durante la replicación del DNA

La supervivencia de un organismo depende de la duplicación precisa de su genoma. Un error en la síntesis de la molécula del mRNA por una RNA polimerasa genera la síntesis de una proteína defectuosa, pero una molécula de mRNA es sólo una plantilla de vida corta entre una gran población de estas moléculas; por lo tanto, un error en una de ellas es insignificante. En cambio, un error durante la replicación del DNA crea una mutación permanente y la posible eliminación de la progenie celular. En *E. coli*, la probabilidad de que un nucleótido incorrecto se incorpore en el DNA durante la replicación y permanezca allí es menor de  $10^{-9}$  o tan baja como una en mil millones de nucleótidos. Debido a que el genoma de *E. coli* contiene alrededor de  $4 \times 10^6$  pares de nucleótidos, esta frecuencia de error corresponde a tan poco como una alteración nucleotídica por cada 100 ciclos de replicación. Esto representa la *velocidad de mutación espontánea* en esta bacteria. Se piensa que los seres humanos tienen una frecuencia de mutación espontánea similar para la replicación de las secuencias que codifican proteínas.

La incorporación de un nucleótido en particular en el extremo de una cadena naciente depende de que el trifosfato de nucleósido entrante pueda formar una complementación correcta con el nucleótido de la cadena plantilla (fig. 13-8b). Los análisis de las distancias entre los átomos y ángulos de enlace indican que el apareamiento de bases A-T y G-C tienen una geometría muy parecida (tamaño y forma). Cualquier desviación de estos apareamientos resulta en una geometría diferente, como se muestra en la figura 13-17. En cada sitio a lo largo del molde, la DNA polimerasa debe discriminar entre los cuatro diferen-

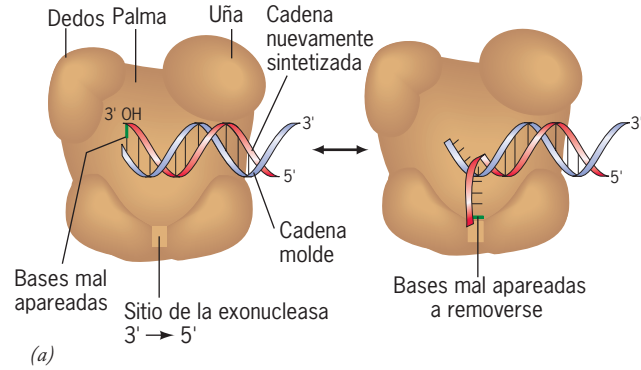


**FIGURA 13-17** Geometría del apareamiento de bases apropiado y erróneo. (TOMADA DE H. ECHOLS Y M.F. GOODMAN, REPRODUCIDA CON AUTORIZACIÓN DE THE ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, VOL 60; © 1991 ANNUAL REVIEWS INC.)

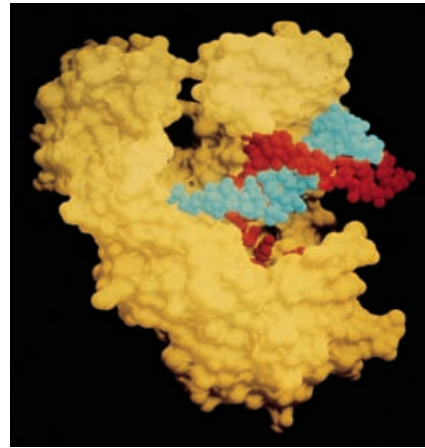
tes precursores potenciales conforme se mueven dentro y fuera del sitio activo de la enzima. Entre los cuatro posibles trifosfatos de nucleósido que pueden entrar, sólo uno con una geometría apropiada puede encajar perfectamente con el DNA plantilla y ello produce un apareamiento de bases A-T o G-C que puede llenar el sitio activo de la enzima. Este es sólo el primer paso en el proceso de discriminación. Si la enzima “percibe” el nucleótido entrante como correcto se observa un cambio conformacional en el cual el “dedo” de la polimerasa gira hacia la “palma” (fig. 13-18a), con lo que evita la unión del nucleótido entrante. Este es un ejemplo de cómo un apareamiento erróneo puede inducir un cambio, como se revisa en la página 98. Si el apareamiento de bases recién formado presenta una geometría inadecuada, el sitio activo no puede adquirir la conformación requerida para la catálisis y el nucleótido incorrecto no se incorpora. En cambio, si el apareamiento de bases presenta una geometría adecuada, el nucleótido entrante se une de manera covalente al extremo de la cadena que está en crecimiento.

En ocasiones, la polimerasa incorpora un nucleótido incorrecto, lo que significa un apareamiento de bases diferente de A-T o G-C. Se estima que un apareamiento incorrecto ocurre de manera aleatoria una vez por cada  $10^5$  a  $10^6$  nucleótidos incorporados, una frecuencia que es  $10^3$  a  $10^4$  veces mucho más grande que la frecuencia de mutación espontánea próxima a  $10^{-9}$ . ¿Por qué la frecuencia de las mutaciones es tan baja? Parte de la respuesta se encuentra en la segunda de las dos actividades de exonucleasa mencionadas, la actividad  $3' \rightarrow 5'$  (fig. 13-16b). Cuando la DNA polimerasa incorpora un nucleótido incorrecto, la enzima se detiene y el extremo de la cadena sintetizada nuevamente tiene una tendencia aumentada para separarse de la plantilla y formar una cadena sencilla  $3'$  terminal. Cuando sucede esto, la enzima sufre un cambio conformacional que dirige el extremo de la cadena recién sintetizada al sitio de exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  (fig. 13-18), el cual remueve al nucleótido erróneo. Este trabajo de “lectura y corrección” es uno de los más importantes de todas las actividades enzimáticas e ilustra la forma en que la maquinaria de las moléculas biológicas ha evolucionado con gran complejidad. La actividad de exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  remueve alrededor de 99 de cada 100 bases mal pareadas, lo que incrementa la fidelidad a casi  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ . Además, la bacteria posee un mecanismo llamado reparación del apareamiento erróneo que opera después de la replicación (pág. 554) y corrige casi todas las uniones erróneas que escapan del paso de lectura y corrección. En conjunto, todos estos procesos reducen la frecuencia de error observada en alrededor de  $10^{-9}$ . Así, la fidelidad de la replicación del DNA se basa en tres actividades distintas: 1) selección precisa de los nucleótidos, 2) lectura y corrección inmediata y 3) una reparación del apareamiento erróneo después de la replicación.

Otra característica importante de la replicación en bacterias es la velocidad. La replicación de un cromosoma bacteriano completo en unos 40 min a  $37^\circ\text{C}$  exige que cada horquilla de replicación se mueva cerca de 1000 nucleótidos por segundo, lo cual es equivalente a la longitud de un fragmento de Okazaki completo. De esta forma, el proceso completo de la síntesis del fragmento de Okazaki, incluidos la formación de un iniciador de RNA, la elongación del DNA, la lectura y corrección simultánea por medio de la DNA polimerasa, la eliminación del RNA, su reemplazo con DNA y la ligación de las cadenas, ocurre en alrededor de 1 s. Aunque *E. coli* tarda casi 40 min en replicar



(a)



(b)

**FIGURA 13-18 Activación de la exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  de la DNA polimerasa I.** (a) Modelo esquemático de una porción de la DNA polimerasa I conocido como fragmento de Klenow, el cual contiene las actividades de polimerasa y exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$ . La actividad de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  se localiza en una porción diferente del polipéptido, que no se muestra aquí. Se refiere a menudo que las regiones del fragmento de Klenow son semejantes a la forma de una mano derecha parcialmente abierta y de ahí que las porciones se designen como “dedos”, “palma” y “uñas”. Los sitios catalíticos de la polimerización se hallan en el subdominio de la “palma”. El extremo  $3'$  terminal de la cadena creciente puede proyectarse entre la polimerasa y el sitio activo de la exonucleasa. La adición de bases erróneas del extremo de la cadena en crecimiento produce una cadena sencilla libre  $3'$  terminal que entra al sitio de exonucleasa, donde se remueve. (Los sitios de la polimerasa y exonucleasa de la polimerasa III operan de manera similar pero se encuentran en diferentes subunidades.) (b) Modelo molecular del fragmento de Klenow que forma un complejo con el DNA. La cadena de DNA plantilla que se copia aparece en azul y en rojo la cadena iniciadora en la cual los nucleótidos próximos deben agregarse. (A: TOMADA DE T. A. BAKER Y S.P. BELL, CELL 92:296, 1998; SEGÚN LA REPRESENTACIÓN DE C.M. JOYCE Y T. A. STEITZ, CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; B: CORTESÍA DE THOMAS A. STEITZ.)

su DNA, un nuevo ciclo de replicación puede iniciar antes de que el ciclo previo se complete. Por consecuencia, cuando estas bacterias crecen a su máxima velocidad, duplican su número en alrededor de 20 min.

### La replicación en las células eucariotas

Como se mencionó en el capítulo 10, los nucleótidos de la secuencia del genoma humano podrían llenar un libro de un millón de páginas de extensión. Mientras que esto representa para

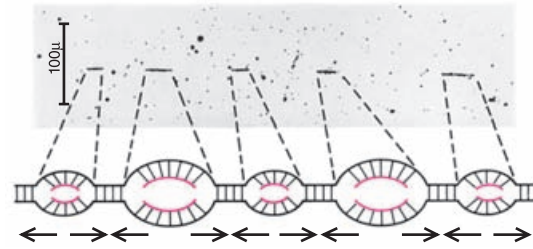


cientos de investigadores, con el uso de computadoras de alta velocidad, varios años para secuenciar el genoma humano, un solo núcleo celular de unos 10  $\mu\text{m}$  de diámetro puede copiar todo el DNA en unas cuantas horas. Dado que las células eucariotas tienen amplios genomas y complejas estructuras de cromosomas, el entendimiento de la replicación en tales células ha sido lento en comparación con las bacterias. Esta diferencia se ha superado de forma gradual con el desarrollo de sistemas experimentales eucariotas aplicados junto con los utilizados por décadas en el estudio de la replicación en procariotas. Pueden mencionarse los siguientes:

- El aislamiento de mutantes de levaduras incapaces de crear productos de genes específicos requeridos para diferentes aspectos de la replicación.
- El análisis de la estructura y el mecanismo de acción de las proteínas de duplicación de especies de arqueas (como en la figura 13-15c). En estos procariotas la duplicación requiere de proteínas homólogas a las de las células eucariotas pero menos complejas y más fáciles de estudiar.
- El desarrollo de sistemas *in vitro* en los que la replicación puede llevarse a cabo en extractos celulares o mezclas de proteínas purificadas. En el más valioso de estos sistemas se ha utilizado la rana *Xenopus*, que comienza la vida en la forma de un enorme huevo que contiene todas las proteínas requeridas para llevar a cabo más de una docena de ciclos de división celular. Pueden prepararse extractos a partir de los oocitos de la rana, los cuales replican cualquier DNA que se agregue, sin importar cuál sea la secuencia. Los oocitos de la rana también mantienen la replicación y la división mitótica de los núcleos celulares de mamífero, por lo cual dichas estructuras son en particular útiles como sistema libre de células. Pueden usarse anticuerpos para eliminar de los extractos partículas proteínicas específicas y de esta manera puede evaluarse la capacidad de replicación del extracto en la ausencia de las proteínas afectadas.

**Inicio de la replicación en células eucariotas** La replicación en *E. coli* comienza sólo en un sitio a lo largo del cromosoma circular (fig. 13-5). Las células de los organismos superiores pueden tener mucho más de mil veces el DNA que las bacterias tienen, si bien sus polimerasas incorporan nucleótidos en el DNA a velocidades mucho más lentas. Para adecuar estas diferencias, las células eucariotas replican su genoma en pequeñas porciones, denominadas *replicones*. Cada replicón tiene su propio origen de replicación desde el cual avanza la horquilla de replicación en ambas direcciones (fig. 13-24a). En las células humanas, la replicación comienza en alrededor de 10 000 a 100 000 diferentes orígenes de replicación. La existencia de replicones se demostró primero en experimentos de autorradiografías en los que las moléculas de DNA únicas mostraron que la replicación se llevaba a cabo de manera simultánea en diferentes sitios a lo largo de la molécula (fig. 13-19).

Alrededor de 10 a 15% de los replicones se dedican activamente a la duplicación en cualquier momento dado durante la fase S del ciclo de vida (fig. 14-1). Los replicones que se hallan muy cerca entre sí en un cromosoma dado tienden a efectuar la replicación de forma simultánea (como es evidente en la figura 13-19). Sin embargo, estos replicones activos en un tiempo determinado durante un ciclo de síntesis de DNA tienden a ser



**FIGURA 13-19** Demostración experimental de que la replicación en cromosomas eucariotas comienza en muchos sitios a lo largo del DNA.

Las células se incubaron en [ $^3\text{H}$ ] timidina por un breve periodo antes de la preparación de fibras de DNA para autorradiografía. Las líneas de los granulos oscuros indican los sitios que han incorporado el precursor de DNA radiactivo durante el periodo de marcaje. Es evidente que la síntesis sucede en sitios separados a lo largo de la misma molécula de DNA. Como se indica en la línea trazada en la parte inferior, el inicio tiene lugar en el centro de cada sitio de la incorporación de timidina y se forman dos horquillas de replicación que se apartan una de la otra hasta que encuentran sus horquillas próximas. (MICROGRAFÍA CORTESÍA DE JOEL HUBERMAN.)

activos en un estado comparable en los ciclos subsecuentes. En células de mamíferos, el tiempo de la replicación de una región cromosómica se correlaciona de manera regular con la actividad de los genes en la región o el estado de compactación. La presencia de histonas acetiladas, que están muy relacionadas con la transcripción de genes (pág. 516), es un factor común en la determinación de la replicación temprana de loci génicos activos. Las regiones más compactadas del cromosoma, que son las menos acetiladas, están empaquetadas en la heterocromatina (pág. 485) y son las últimas en replicarse. La diferencia en el tiempo de replicación no se relaciona con la secuencia del DNA porque la heterocromatina inactiva del cromosoma X en las células de hembra de mamífero (pág. 486) se replica en la parte final de la fase S, en tanto que la eucromatina del cromosoma X activo se replica en un estadio mucho más temprano.

El mecanismo por medio del cual la replicación se inicia en eucariotas fue tema importante de investigación en la década pasada. Los progresos más grandes en esta área se realizaron en las células de levadura debido a que los orígenes de replicación pueden removerse del cromosoma de levadura e insertarse en moléculas de DNA bacteriano, lo que confiere a estas bacterias la capacidad de replicarse en las células de levadura o extractos celulares que contienen las proteínas de replicación necesarias para el proceso. Como estas secuencias promueven la replicación del DNA, se conocen como *secuencias de replicación autónoma* (ARS, *autonomous replicating sequences*). Las ARS que se han aislado y analizado comparten distintos elementos. El elemento central de una ARS consiste en una secuencia conservada de 11 pares de bases, que funciona como un sitio de unión específico para un complejo multiproteínico esencial llamado *complejo de reconocimiento de inicio* (ORC, *origin recognition complex*) (fig. 13-20). Si la ARS muta de modo que sea incapaz de unirse al ORC, no es posible el inicio de la replicación.

Se ha probado que los orígenes de replicación de las células de vertebrado son más difíciles de estudiar que las células de levadura. Parte del problema se explica por el hecho de que de manera virtual cualquier tipo de DNA purificado está disponible para la replicación mediante extractos celulares de oocitos de rana. Estos estudios sugieren que a diferencia de las levaduras, el DNA de



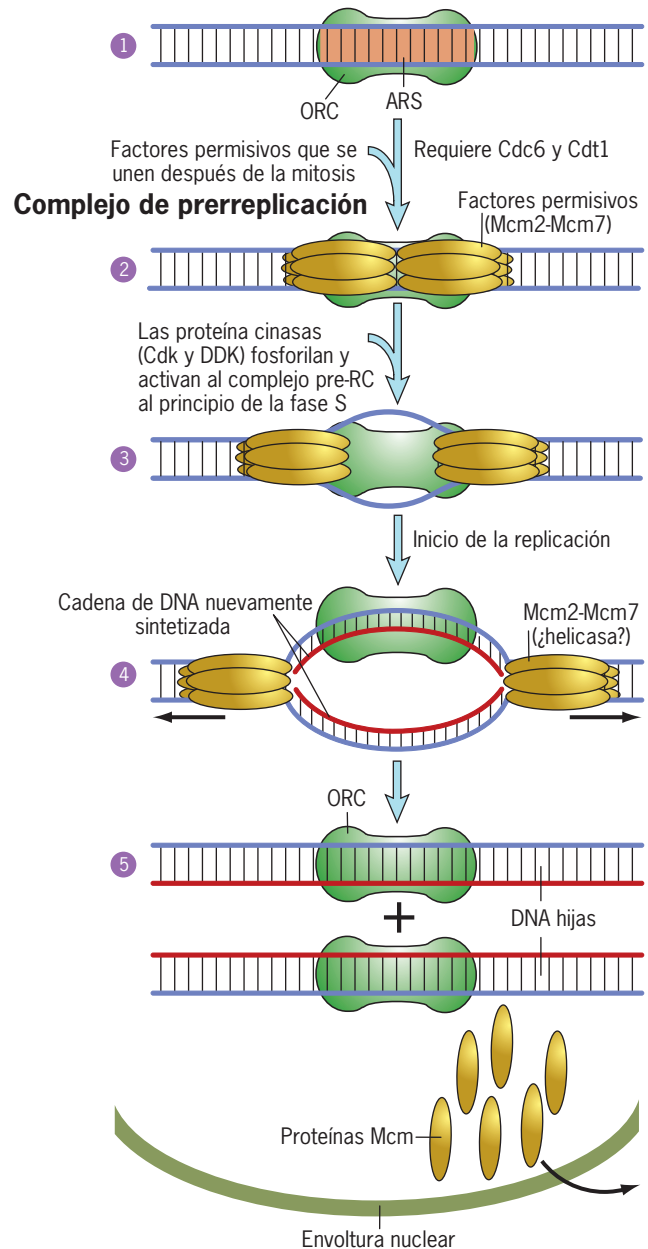
vertebrados no posee secuencias específicas (p. ej. ARS) en los cuales se inicia la replicación. No obstante, los estudios de replicación de cromosomas de mamífero intactos *in vivo* sugieren que la replicación comienza en sitios específicos a lo largo del DNA, no tanto por una selección aleatoria, como ocurre en los extractos de oocitos de anfibio. Se piensa que una molécula de DNA contiene muchos sitios donde la duplicación del DNA *puede* iniciarse, pero que sólo un subconjunto de estos sitios se usa de hecho en un momento dado en una célula dada. Las células que se reproducen por ciclos celulares más cortos, como las de embriones jóvenes de anfibios, utilizan una mayor cantidad de sitios como orígenes de replicación que las células con ciclos celulares más largos. Se considera que la elección real de sitios se rige por factores epigenéticos reales (pág. 496), como las posiciones de los nucleosomas, los tipos de modificaciones de histonas, el estado de metilación del DNA, el grado de superenrollamiento y el nivel de transcripción.

**La replicación se restringe a una por ciclo celular** Es esencial que cada porción del genoma se replique una vez, y sólo una vez, durante el ciclo celular. En consecuencia, deben existir mecanismos que eviten el reinicio de la replicación en el sitio en que ya se ha duplicado. El inicio de la replicación en un origen en particular requiere el paso del origen a través de diferentes estados. Algunos de estos pasos ocurren al parecer en el origen de replicación en una célula de levadura y se ilustran en la figura 13-20. Pasos similares requieren proteínas homólogas y se ha observado que se realizan en plantas y animales, lo cual sugiere que el mecanismo básico de inicio de la replicación está conservado entre los eucariotas.

1. En el paso 1 (fig. 13-20), al origen de replicación lo une un complejo proteínico llamado ORC, que se relaciona con el origen a través del ciclo celular. Al ORC se lo ha denominado la “pista de aterrizaje molecular” en virtud de su función en la unión de proteínas necesarias para los pasos subsiguientes.

**FIGURA 13-20 Pasos realizados en la replicación del replicón de levadura.** Los orígenes de replicación de las levaduras contienen una secuencia conservada (ARS) que une el complejo de reconocimiento de origen de replicación (ORC) de multisubunidades (paso 1). La presencia del ORC unido es necesaria para el inicio de la replicación. El ORC se une al origen a través de todo el ciclo celular. En el paso 2, los factores permisivos (identificados como proteínas Mcm) se unen al origen durante los siguientes pasos de la mitosis y establecen un complejo de prerreplicación capaz de iniciar la replicación con los estímulos adecuados. La presencia de proteínas Mcm en el origen requiere proteínas adicionales (Cdc6 y Cdt1, que no se muestran). En el paso 3, la replicación del DNA se inicia después de la activación de proteína cinasas específicas, incluida una cinasa dependiente de ciclina (Cdk). El paso 4 muestra un estado en el que la replicación ha avanzado corta distancia en ambas direcciones desde el origen. En este modelo, las proteínas Mcm forman una DNA helicasa replicativa que desenrolla al DNA en direcciones opuestas desde las horquillas de replicación. Las otras proteínas requeridas para la replicación no se muestran en esta ilustración, pero sí en la figura siguiente. En el paso 5, las dos cadenas del dúplex original se han replicado, un ORC está presente en ambos orígenes y las proteínas de replicación, incluidas las helicinas Mcm, se han desplazado del DNA. En las levaduras, las proteínas Mcm migran desde el núcleo y el reinicio de la replicación no puede ocurrir hasta que la célula ha pasado por la mitosis. [En las células de vertebrados, diferentes sucesos parecen prevenir el reinicio de la replicación, entre ellos: 1) la continua actividad de la Cdk, desde la fase 5 en la mitosis, 2) la fosforilación de Cdc6 y su exportación posterior desde el núcleo y 3) la inactivación de Cdt1 por la unión de un inhibidor.]

2. Las proteínas que se conocen como “factores permisivos” se unen al ORC (paso 2, fig. 13-20) para ensamblar un complejo proteínico-DNA, llamado *complejo de prerreplicación (pre-RC)*, que es “permisivo” (competente) para iniciar la replicación. Los estudios de la naturaleza molecular de los factores permisivos han encontrado un grupo de seis proteínas Mcm relacionadas (Mcm2-Mcm7). Las proteínas Mcm se cargan en el origen de duplicación en una fase tardía de la mitosis, o poco tiempo después de ésta. Los estudios indican que las proteínas Mcm2-Mcm7 son capaces de relacionarse en un complejo anular que tiene actividad helicasa (como en el paso 4, fig. 13-20). La mayor parte de la evidencia sugiere que el complejo Mcm2-Mcm7 es la helicasa replicadora eucariota; o sea, la helicasa encargada de desenrollar el DNA en la horquilla de replicación (análoga a la DnaB en *E. coli*).
3. Justo antes de iniciar la fase S del ciclo celular, la activación de proteína cinasas clave conduce a la activación de la helicasa





**CUADRO 13-1** Algunas proteínas requeridas para la replicación

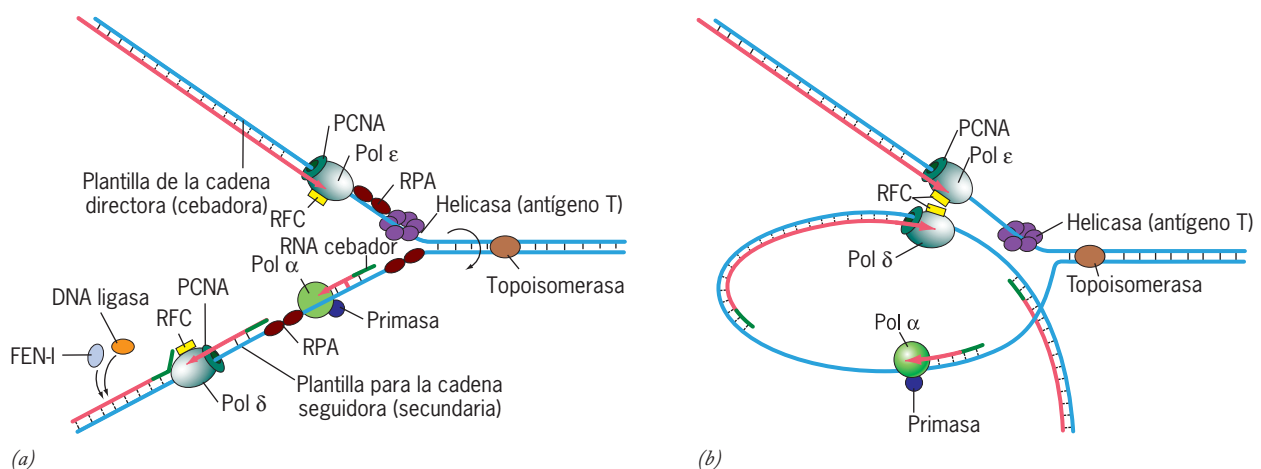
Proteína en <i>E. coli</i>	Proteína eucariota	Función
DnaA	Proteínas ORC	Reconocimiento del origen de la replicación
Girasa	Topoisomerasa I/II	Libera supercolas positivas antes de la de replicación
DnaB	Mcm	DNA helicasa que desenrolla el dúplex parental
DnaC	Cdc6, Cdt1	Coloca la helicasa sobre el DNA
SSB	RPA	Mantiene el DNA en un estado monocatenario
Complejo $\gamma$	RFC	Subunidades de la holoenzima de la DNA polimerasa que montan la pinza sobre el DNA
Núcleo de la polimerasa III	Polimerasa $\delta/\epsilon$	Enzima de replicación primaria; sintetiza por completo la cadena adelantada y los fragmentos de Okazaki; tiene capacidad de lectura y corrección
Pinza $\beta$	PCNA	Subunidad en forma de anillo de la holoenzima de la DNA polimerasa que pinza la polimerasa replicante sobre el DNA; trabaja con la polimerasa III en <i>E. coli</i> y la polimerasa $\delta$ o $\epsilon$ en eucariotas
Primasa	Primasa	Sintetiza iniciadores de RNA
_____	Polimerasa $\alpha$	Sintetiza oligonucleótidos cortos de DNA como parte del iniciador RNA-DNA
DNA ligasa	DNA ligasa	Une a los fragmentos de Okazaki en una cadena continua
Pol I	FEN-1	Remueve a los iniciadores de RNA; la polimerasa I de <i>E. coli</i> también llena los espacios con DNA

Mcm2-Mcm7 y el inicio de la replicación (paso 3, fig. 13-20). Una de estas proteína cinasas es una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) cuya función se revisa con detalle en el capítulo 14. La actividad de las Cdk es importante desde la fase S hasta la mitosis, la cual suprime la formación de nuevos complejos de prerreplicación. En consecuencia, cada origen sólo puede activarse una vez por cada ciclo celular. El final de la actividad de las Cdk en la última parte de la mitosis posibilita el ensamble del pre-RC para iniciar el próximo ciclo celular.

- Una vez que la replicación comienza en la parte inicial de la fase S, las proteínas del Mcm se mueven con la horquilla de replicación (paso 4) y son esenciales para completar la replicación de un replicón. El destino de las proteínas Mcm después de replicación depende de las especies estudiadas. En

levaduras, las proteínas Mcm se desalojan de la cromatina y se movilizan desde el núcleo (paso 5). En cambio, las proteínas Mcm en las células de mamíferos se desplazan del DNA pero al parecer permanecen en el núcleo. A pesar de todo, las proteínas Mcm no pueden volver a relacionarse con un origen de replicación ya “utilizado”.

**La horquilla de replicación eucariota** En general, las actividades que ocurren en la horquilla de replicación son muy similares, sin importar cuál sea el tipo de genoma bajo replicación: vírica, procariota o eucariota. Las diferentes proteínas de la replicación, “el estuche de herramientas”, de las células eucariotas se listan en el cuadro 13-1 y se muestran en la figura 13-21. Todos los sistemas de replicación requieren helicasas, proteínas de



**FIGURA 13-21** Esquema de los componentes principales de la horquilla de replicación en los eucariotas. (a) Proteínas necesarias para la replicación en los eucariotas. El antígeno viral T se muestra como la helicasa de replicación en esta figura porque se usa de manera predominante en los estudios *in vitro* de la replicación del DNA. Se cree que las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  son las principales enzimas para la síntesis de DNA de las cadenas rezagada y líder, respectivamente. PCNA actúa como una pinza deslizante para las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ . La pinza deslizante es colocada (“cargada”) en el DNA por la proteína RFC (factor de duplicación C), que es similar en estructura y función al cargador de pinza  $\gamma$  de *E. coli*. RPA es una proteína trimérica de unión a DNA monocatenario comparable en función a la proteína SSB

utilizada en la duplicación de *E. coli*. El movimiento continuo de la polimerasa  $\delta$  desplaza los iniciadores de RNA-DNA sintetizados por el complejo polimerasa  $\alpha$ -primasa, lo que genera una “aleta” de RNA-DNA que es eliminada por la endonucleasa FEN-1. Una DNA ligasa sella el hueco. Como en *E. coli*, se requiere una topoisomerasa para eliminar los superenrollamientos positivos que se forman antes de la horquilla de duplicación. (b) Versión simplificada de los sucesos ocurridos en la horquilla de replicación que muestra de qué manera las polimerasas de replicación actúan juntas como parte de un replisoma sobre las plantillas directora y seguidora. Hasta ahora no hay evidencia definitiva de que las cadenas líder y rezagada se repliquen por acción de un complejo replicador único, como en *E. coli*.

unión con DNA monocatenario, topoisomerasas, primasa, DNA polimerasa, pinza deslizante y cargador de la pinza, así como DNA ligasa. Cuando se estudia la replicación eucariota *in vitro*, los investigadores combinan a menudo proteínas de replicación de mamíferos con una helicasa vírica conocida como *antígeno T grande*, codificado por el genoma del virus SV40. El antígeno T grande induce la separación de las cadenas del origen de replicación de SV40 y desenrolla el DNA para que avance la horquilla de replicación (como se muestra en la figura 13-21a).

Como en las bacterias, el DNA de una célula eucariota se sintetiza de una manera semidiscontinua, pese a que los fragmentos de Okazaki de cadena retrasada son considerablemente más pequeños que en una bacteria, cercanos a 150 nucleótidos de longitud. Como en la DNA polimerasa III de *E. coli*, la polimerasa que replica el DNA eucariota está presente como un dímero, lo que sugiere que las cadenas adelantada y retrasada se sintetizan de manera coordinada por un solo complejo de replicación o *replisoma* (fig. 13-21b).

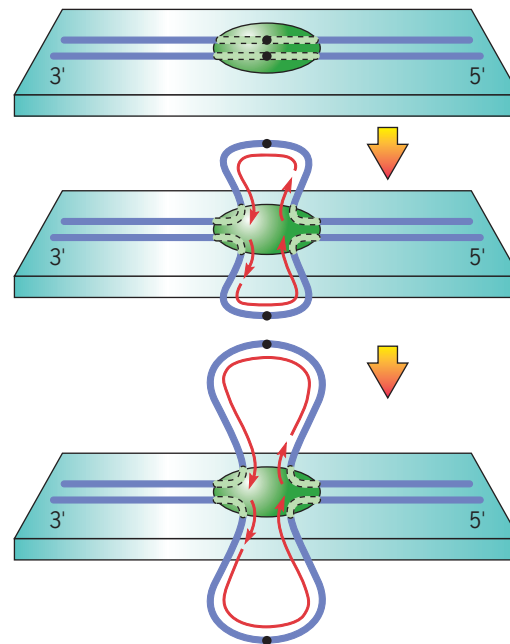
En la actualidad se han aislado las cinco DNA polimerasas “típicas” de las células eucariotas y se conocen como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . De estas enzimas, la polimerasa  $\gamma$  replica el DNA mitocondrial y la  $\beta$  funciona en la reparación del DNA. Las otras tres polimerasas tienen funciones de replicación. La polimerasa  $\alpha$  está muy relacionada con la primasa y juntas inician la síntesis de cada fragmento de Okazaki. La primasa comienza la síntesis por el ensamble de un iniciador corto de RNA, el cual se amplía por la adición de unos 20 desoxirribonucleótidos por medio de la polimerasa  $\alpha$ . Se cree que la polimerasa  $\delta$  es la principal enzima sintetizadora de DNA durante la replicación de la cadena reza-gada, mientras que la polimerasa  $\epsilon$  se considera la principal enzima sintetizadora de DNA durante la replicación de la cadena líder. De la misma manera que la principal enzima de replicación de *E. coli*, las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  requieren una “pinza deslizante” que mantiene unida la enzima al DNA y ello hace posible a ésta moverse de manera continua a lo largo de la plantilla. La pinza deslizante de las células eucariotas es muy similar en estructura y función a la pinza  $\beta$  de la polimerasa III de *E. coli* que se muestra en la figura 13-14. En eucariotas, la pinza deslizante se conoce como PCNA. El cargador de pinza que coloca a la PCNA sobre el DNA se llama RFC y es análogo al complejo cebador de pinza de la polimerasa III de *E. coli*. Después de sintetizar un iniciador de RNA-DNA, la polimerasa  $\alpha$  se sustituye en la unión de plantilla e iniciador por el complejo PCNA-polimerasa  $\delta$ , que completa la síntesis del fragmento de Okazaki. Cuando la polimerasa  $\delta$  alcanza el extremo 5' del fragmento de Okazaki recién sintetizado, la polimerasa continúa a lo largo de la plantilla de la cadena seguidora, desplazando al iniciador (que se muestra como una aleta verde en la fig. 13-21a). Una endonucleasa (FEN-1) corta del DNA recién sintetizado el iniciador desplazado, y una DNA ligasa sella la muesca resultante en el DNA. Se cree que FEN-1 y la DNA ligasa se atraen a la horquilla de replicación mediante la interacción con la pinza deslizante PCNA. De hecho, se cree que PCNA tiene una participación importante en la orquestación de los fenómenos que ocurren durante la replicación, reparación y recombinación del DNA. Por esta capacidad para unirse con un conjunto diverso de proteínas, PCNA se ha denominado “cinturón de herramientas moleculares”.

Como las polimerasas procariontas, todas las polimerasas de eucariotas construyen cadenas de DNA en una dirección 5'  $\rightarrow$  3' al agregar nucleótidos a los grupos hidroxilo 3' y ninguno de

éstos es capaz de iniciar la síntesis de un DNA sin un iniciador. Las polimerasas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  poseen una exonucleasa 3'  $\rightarrow$  5', cuya actividad de lectura y corrección garantiza que esta replicación ocurra con una gran eficiencia. Otras DNA polimerasas diferentes (entre ellas  $\eta$ ,  $\kappa$  y  $\iota$ ) poseen una función especializada que permite a las células replicar el DNA dañado como se describe en la página 558.

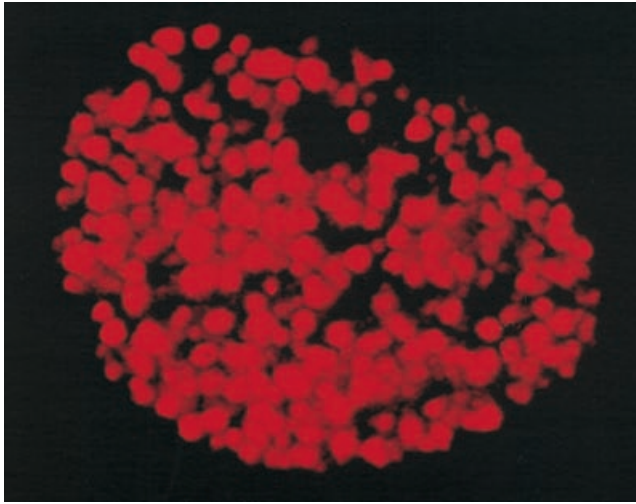
**Replicación y estructura nuclear** Hasta este punto del capítulo, las ilustraciones de la replicación muestran a una polimerasa replicante que se mueve como una locomotora a lo largo de una vía estacionaria de DNA. Sin embargo, el aparato de replicación consiste en un complejo de proteínas que opera dentro de los confines de un núcleo estructurado. Mucha evidencia sugiere que la maquinaria de replicación está presente en estrecha conexión con la lámina nuclear (pág. 477) y con la matriz nuclear (pág. 499). Cuando las células se someten a pulsos muy cortos de precursores de DNA radiactivo, más de 80% de la marca incorporada se vincula con la matriz nuclear. Si en lugar de fijar las células inmediatamente después del pulso se les permite incorporar precursores de DNA *no marcado* por 1 h o más antes de la fijación, la mayor parte de la radiactividad se detecta en la matriz, en las asas del DNA circundante. Este último hallazgo sugiere que más que permanecer estacionario, el DNA en replicación se mueve como un convoy a través de un aparato de replicación inmóvil (fig. 13-22).

Estudios adicionales señalan que la horquilla de replicación activa en un momento particular no se distribuye de forma aleatoria a través del núcleo celular; en realidad, se localiza en 50 a 250 sitios, conocidos como **lugares de replicación** (fig. 13-23). Se estima que cada uno de los puntos luminosos rojos indicados

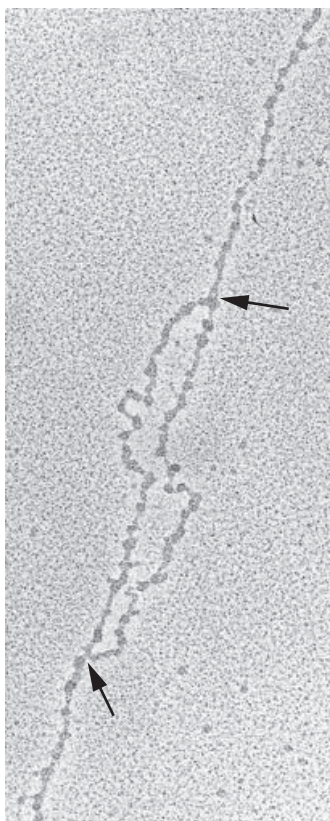


**FIGURA 13-22** Función de la matriz nuclear en la replicación del DNA.

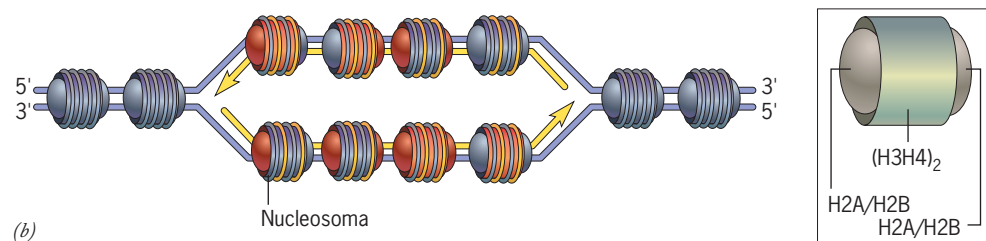
Los orígenes de la replicación se muestran como puntos negros y las flechas indican la dirección del crecimiento de las cadenas. De acuerdo con este modelo esquemático, la maquinaria de replicación no se mueve a lo largo de segmentos estacionarios de DNA, pero el DNA se impulsa a través del aparato de replicación que está unido firmemente a la matriz nuclear.



**FIGURA 13-23** Demostración de que las actividades de replicación no se realizan de manera aleatoria en el núcleo, pero se confinan a distintos sitios. Antes del comienzo de la síntesis del DNA al principio de la fase S, diferentes factores requeridos para el inicio de la replicación se ensamblan en sitios discretos dentro del núcleo y forman centros de prerreplicación. Los sitios se observan como pequeños objetos rojos en la micrografía teñida con un anticuerpo fluorescente dirigido contra el factor de replicación A (RPA), el cual es una proteína de unión del DNA de cadena sencilla requerida para comenzar la replicación. Otros factores de replicación, como el PCNA y el complejo polimerasa-primasa también se localizan en estos sitios. (TOMADA DE YASUHISA ADACHI Y ULRICH K. LAEMMLI, EMBO J. VOL. 13, CUBIERTA NÚM. 17, 1994.)



(a)



**FIGURA 13-24** Distribución de complejos de nucleos de histona a las cadenas hijas después de la replicación. (a) Micrografía electrónica de la cromatina aislada de un núcleo en división rápida del embrión de *Drosophila* en el que se muestra un par de horquillas de replicación (flechas) que se alejan una de la otra en direcciones opuestas. Entre las dos horquillas de replicación se observan regiones de DNA nuevamente replicado ya cubiertas por partículas nucleosomales con una densidad semejante a la de las cadenas parentales que todavía no han sufrido la replicación. (b) Diagrama esquemático de la configuración de los nucleosomas después de la replicación del DNA. Cada partícula nuclear del nucleosoma en el esquema se compone de un tetrámero  $(H3H4)_2$  central flanqueado por dos dímeros H2A/H2B. Las histonas presentes en los nucleosomas parentales antes de la replicación se indican en azul; las histonas recién sintetizadas aparecen en rojo. De acuerdo con este modelo, los tetrámeros parentales  $(H3H4)_2$  permanecen intactos y se distribuyen al azar en ambas parejas hijas. En cambio, los pares de dímeros H2A/H2B presentes en los nucleosomas parentales se separan y recombinan al azar con los tetrámeros  $(H3H4)_2$  en las parejas hijas. Ya se presentaron otros modelos en los que el tetrámero parental  $(H3H4)_2$  se divide a la mitad mediante una chaperona de histona y los dos dímeros H3-H4 resultantes se distribuyen en cadenas de DNA diferentes (descrito en *Cell* 128:721, 2007 y *Trends Cell Biol.* 19:29, 2009). (A: POR CORTESÍA DE STEVEN L. MCKNIGHT Y OSCAR L. MILLER, JR.)

en la figura 13-23 contiene alrededor de 40 horquillas de replicación que incorporan nucleótidos en las cadenas de DNA de manera simultánea. El agrupamiento de asas de horquillas de replicación puede proveer un mecanismo para la coordinación de la replicación de los replicones adyacentes en cromosomas individuales (como se muestra en la figura 13-19).

**Estructura y replicación de la cromatina** Los cromosomas de las células eucariotas consisten en DNA unido en complejos con conjuntos regulares de proteínas histonas que se presentan en forma de nucleosomas (pág. 481). Se cree que el movimiento de la maquinaria de replicación a lo largo del DNA desplaza a los nucleosomas que se encuentran en su trayecto. Aun así, el examen de la molécula de DNA en replicación con el microscopio electrónico revela nucleosomas en las dos parejas hijas muy cerca de la horquilla de replicación (fig. 13-24a), lo que indica que el nuevo ensamble de los nucleosomas es un fenómeno muy rápido. En conjunto, los nucleosomas que se forman durante el proceso de replicación están formados por una mezcla más o menos equivalente de moléculas de histona heredadas de los cromosomas de los progenitores y moléculas de histona recién sintetizadas. Recuérdese que en la página 482 se indicó que el octámero central de histona de un nucleosoma consiste en un tetrámero  $(H3H4)_2$  junto con un par de dímeros H2A/H2B. La forma en que los nucleosomas parentales se distribuyen durante la replicación ha sido tema de debate reciente. Según una línea de investigación, los tetrámeros  $(H3H4)_2$  presentes antes de la replicación permanecen intactos y se distribuyen en forma aleatoria entre las dos parejas hijas. Como resultado, parece que los tetrámeros  $(H3H4)_2$  antiguos y nuevos se mezclan en la molécula de DNA de cada hija, como indica el modelo mostrado en la figura 13-24b. Según este modelo, los dos dímeros H2A/H2B de cada nucleosoma parental no permanecen juntos cuando la horquilla de replicación se mueve por la cromatina, sino que los dímeros H2A-H2B de un nucleosoma se separan y se unen al



azar con los tetrámeros (H3H4)<sub>2</sub> nuevos y antiguos ya presentes en las parejas hijas (fig. 13-24b). Según otro punto de vista, el tetrámero (H3H4)<sub>2</sub> de los nucleosomas parentales puede dividirse en dos dímeros H3-H4, cada uno de los cuales puede combinarse con un dímero H3-H4 recién sintetizado para formar un tetrámero mixto (H3H4)<sub>2</sub>, que luego se ensambla con dímeros H2A-H2B. Sin importar el patrón con el que ocurra, el ensamble por pasos de los nucleosomas y su espaciado ordenado en el DNA se facilita por una red de proteínas accesorias. Entre estas proteínas se incluyen varias chaperonas de histona capaces de aceptar histonas parentales o recién sintetizadas y transferirlas a cadenas hijas. La mejor estudiada de estas chaperonas de histona, CAF-1, se atrae a la horquilla de replicación en movimiento mediante una interacción con la pinza deslizante PCNA.

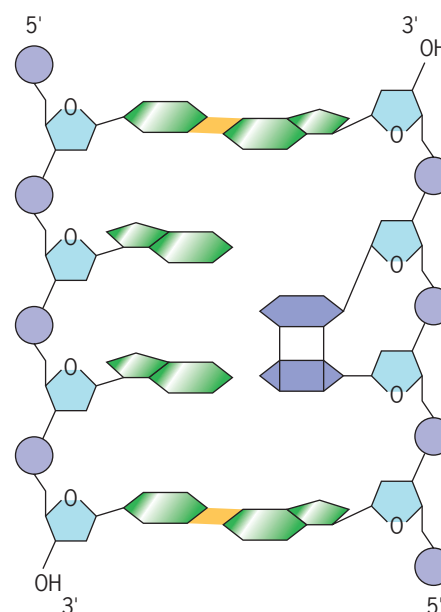
## REVISIÓN

1. La propuesta original de Watson y Crick para la replicación del DNA predecía la síntesis continua de las cadenas de DNA. ¿Cómo y por qué este concepto se ha modificado en los años posteriores?
2. ¿Qué significa que la replicación sea semiconservadora?, ¿cómo se demostró esta propiedad de la replicación en células bacterianas y células eucariotas?
3. ¿Por qué no existen cadenas pesadas en la parte superior de los tres tubos de centrifugación de la figura 13-3a?
4. ¿Cómo es posible obtener mutantes cuyos defectos se localizan en genes que se requieren para la actividad esencial como la replicación del DNA?
5. Describa los sucesos que ocurren en el origen de la replicación durante el inicio de la replicación en las células de levadura. ¿Cuál es el sentido de que la replicación sea bidireccional?
6. ¿Qué hace que las moléculas de DNA que se muestran en la figura 13-7a sean incapaces de estimular la polimerización de nucleótidos por medio de la DNA polimerasa I?, ¿qué propiedades de una molécula de DNA permiten que sirva como plantilla para la incorporación de nucleótidos por medio de la DNA polimerasa I?
7. Describa los mecanismos de acción de las DNA polimerasas que operan en las dos cadenas de DNA plantilla y el efecto que éste tiene en la síntesis de la cadena retrasada en comparación con la cadena adelantada.
8. Compare la función de las DNA polimerasas I y III en la replicación bacteriana.
9. Describa las funciones de la DNA helicasa, proteínas SSB, pinza beta, DNA girasa y DNA ligasa durante la replicación en las bacterias.
10. ¿Cuál es la consecuencia de que el DNA de molde para la cadena retrasada forme un asa sobre sí misma como se muestra en la figura 13-13a?
11. ¿Por qué las dos actividades de exonucleasa de la DNA polimerasa I difieren entre sí?, ¿cuáles son sus funciones respectivas en la replicación?
12. Describa los factores que contribuyen a la gran fidelidad durante la replicación del DNA.
13. ¿Cuál es la principal diferencia entre las bacterias y los eucariotas que le permite a éstos replicar su DNA en un tiempo razonable?

## 13.2 REPARACIÓN DEL DNA

La vida en la Tierra está sujeta a múltiples fuerzas destructivas que se originan en el interior y el ambiente externo de un organismo. De todas las moléculas en una célula, el DNA está colocado en la posición más precaria. Por un lado, es esencial que la información genética permanezca de manera primordial sin cambio conforme ésta pasa de una célula a la siguiente y de un individuo a otro. Por otra parte, el DNA es una de las moléculas celulares más susceptible al daño ambiental. Cuando se afecta por radiación ionizante, el esqueleto de la molécula de DNA sufre con frecuencia roturas; cuando se expone a diversos reactivos químicos, algunos de los cuales se generan por el metabolismo de la célula misma, las bases de una molécula de DNA pueden alterarse de manera estructural; cuando se someten a radiación de tipo ultravioleta, las pirimidinas adyacentes en las cadenas de DNA tienden a interactuar entre sí para formar complejos covalentes y crear un dímero (fig. 13-25). De igual forma, la absorción de energía térmica producida por el metabolismo es suficiente para eliminar las bases de adenina y guanina de su unión a los azúcares en el esqueleto de DNA. ¡La magnitud de estas alteraciones espontáneas, o *lesiones*, puede reconocerse si se considera que cada célula de un mamífero de sangre caliente pierde alrededor de 10 000 bases por día! La falla para reparar estas lesiones produce anomalías permanentes, o mutaciones, en el DNA. Si la mutación tiene lugar en una célula destinada a ser un gameto, la alteración genética puede pasar de una generación a la próxima. Las mutaciones también tienen efectos en las células somáticas (p. ej., células que no pertenecen a la línea germinal); pueden interferir con la transcripción y la replicación, lo que causa la transformación maligna de una célula o acelera el proceso por medio del cual un organismo envejece.

Al considerar las consecuencias potencialmente lesivas de las alteraciones en las moléculas del DNA y la elevada frecuencia con que suceden, es esencial que las células posean mecanismos



**FIGURA 13-25** Un dímero de pirimidina formado dentro del DNA dúplex después de la radiación con luz ultravioleta.



para reparar el DNA dañado. De hecho, las células tienen una amplia variedad de sistemas de reparación que corrigen casi cualquier tipo de daño al cual una molécula de DNA es vulnerable. Se ha estimado que menos de un cambio de base en miles escapa a los sistemas de reparación en una célula. La existencia de estos sistemas provee un excelente ejemplo de los mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis celular. La importancia de la reparación del DNA puede reconocerse al examinar las consecuencias que tiene en los seres humanos el resultado de las deficiencias en la reparación del DNA, un tema que se revisa en la sección Perspectiva humana en la página 556.

Tanto las células procariontas como las eucariotas poseen una variedad de proteínas que recorren extensos tramos de DNA y buscan alteraciones químicas o distorsiones sutiles del DNA dúplex. En algunos casos, el daño puede repararse de modo directo. Por ejemplo, los seres humanos tienen enzimas que pueden reparar de forma inmediata el daño producido por agentes alquilantes capaces de causar cáncer. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de reparación requiere que la sección dañada del DNA se *elimine*, esto es, se remueva de manera selectiva. Una de las grandes virtudes del DNA dúplex es que cada cadena contiene la información necesaria para la construcción de su contraparte. En consecuencia, si uno o más nucleótidos se eliminan de una cadena, la cadena complementaria puede servir como plantilla para la reconstrucción del dúplex. La reparación del daño del DNA en células eucariotas es complicada por la inaccesibilidad relativa del DNA dentro de las fibras de cromatina plegadas del núcleo. Como en el caso de la transcripción, la reparación del DNA requiere de máquinas que remodelan la cromatina, como enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de nucleosomas que se exponen en la página 517. Aunque es de esperar que sean importantes en la reparación del DNA, los cometidos de estas proteínas no se consideran en la siguiente exposición.

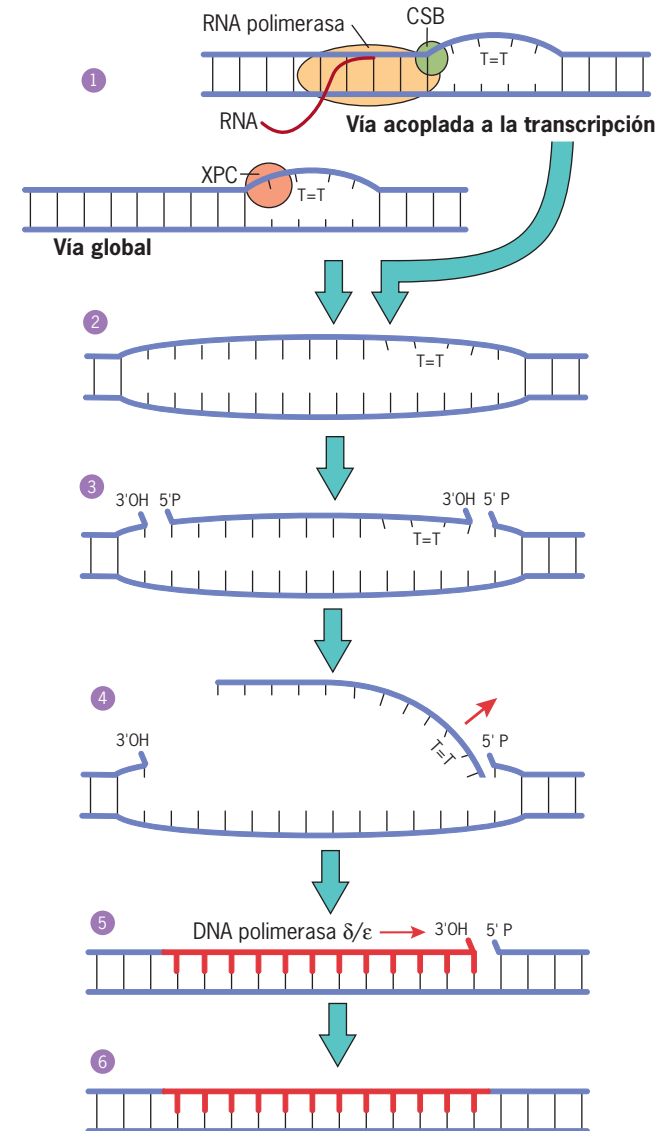
### Escisión de nucleótidos y reparación

La **reparación de la escisión nucleotídica (NER, nucleotide excision repair)** opera por un mecanismo de corte y pegado que elimina diversas lesiones voluminosas, incluidos los dímeros de pirimidina y los nucleótidos en los cuales distintos grupos químicos se unen. Se conocen dos vías de NER:

1. Una *vía acoplada a la transcripción* en la cual las cadenas de DNA plantilla de los genes que se transcriben de forma activa se reparan de manera preferencial. La reparación de una cadena plantilla ocurre al parecer a medida que el DNA se transcribe y la presencia de la lesión puede señalarla una RNA polimerasa atorada. Esta vía de reparación preferencial garantiza que estos genes de gran importancia para la célula, que son los genes que la célula transcribe de manera activa, reciban la prioridad más alta en la "lista de reparación".
2. Un mecanismo lento y menos eficiente es la *vía genómica global* que corrige las cadenas de DNA en el resto del genoma.

A pesar de que el reconocimiento de la lesión lo realizan quizá diferentes proteínas en las dos vías de NER (paso 1, fig. 13-26), los pasos que suceden durante la reparación de la lesión son muy similares, como se indica en los pasos 2 a 6 de la figura 13-26. Un componente clave de la maquinaria de reparación NER es el factor TFIIH, una gran proteína que también participa en el

inicio de la transcripción. El descubrimiento de la participación de TFIIH estableció un nexo crucial entre la transcripción y la reparación del DNA, dos procesos que antes ya se asumía que eran independientes el uno del otro. Incluidas dentro de las diferentes subunidades de TFIIH están dos subunidades (XPB y XPD) que poseen actividad de helicasa; estas enzimas separan las dos cadenas del dúplex (paso 2, fig. 13-26) en la preparación para la eliminación de las lesiones. Un par de endonucleasas (paso 3) corta entonces la cadena dañada en ambos lados de la lesión y el



**FIGURA 13-26** Reparación de la escisión de nucleótido. Los siguientes pasos se muestran en el diagrama y se describen en el texto: 1) el reconocimiento del daño en la vía global lo media una proteína XPC, pero el reconocimiento del daño en las vías acopladas a la transcripción tiene quizás la mediación de una RNA polimerasa en conjunción con una proteína CSB; 2) separación de las cadenas de DNA (por medio de las proteínas XPB y XPD, dos subunidades de helicasa de TFIIH); 3) corte (mediante la proteína XPG en el extremo 3' y el complejo XPF-ERCC1 en el extremo 5'); 4) eliminación; 5) reparación del DNA por medio de la síntesis (a través de una DNA polimerasa delta o épsilon); y 6) liganza (mediante una DNA ligasa I).

segmento de DNA se elimina (paso 4). Una vez suprimido, el espacio se reocupa por medio de una DNA polimerasa (paso 5) y la cadena se liga por medio de una DNA ligasa (paso 6).

### Reparación por escisión de bases

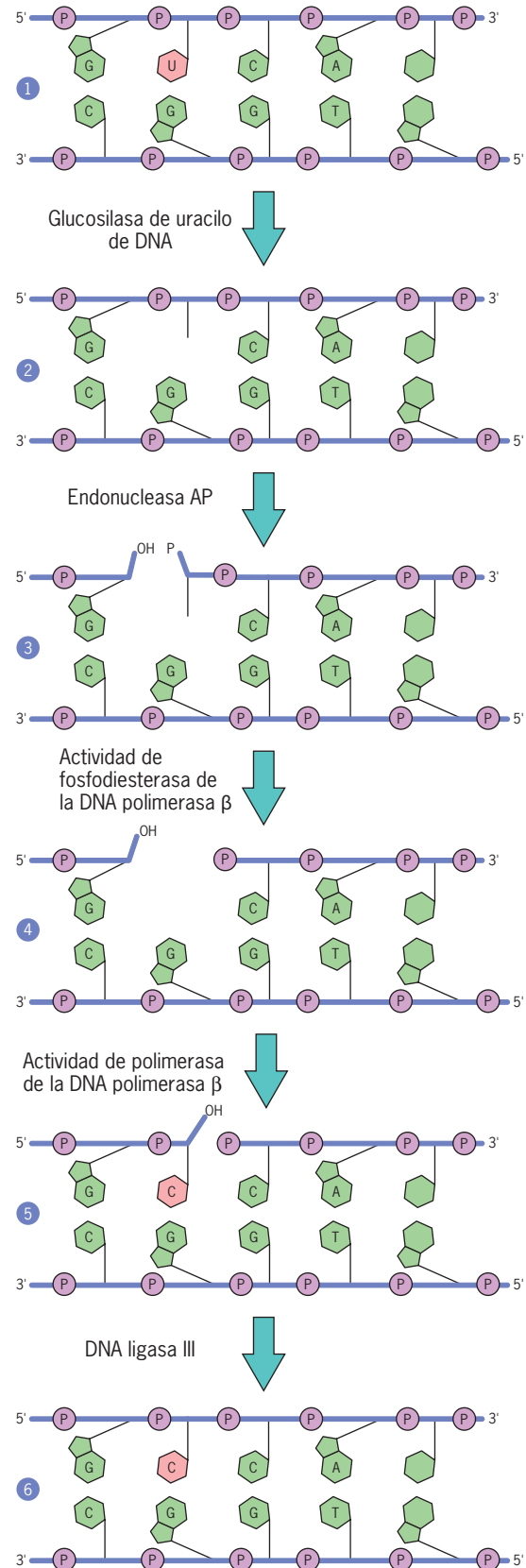
Un sistema de reparación por escisión elimina los nucleótidos alterados generados por los reactivos químicos presentes en la dieta o por el metabolismo. Los pasos en esta vía de reparación en eucariotas, que recibe el nombre de **reparación por escisión de bases (BER, base excision repair)**, se muestran en la figura 13-27. El proceso de BER lo inicia una *DNA glucosilasa* que reconoce la alteración (paso 1, fig. 13-27) y remueve la base por medio del corte del enlace glucosídico que une la base al azúcar de desoxirribosa (paso 2). Se han identificado diferentes glucosilasas de DNA, cada una de ellas más o menos específica para un tipo en particular de base alterada, incluidos el uracilo (formado por la remoción hidrolítica del grupo amino de la citosina), la 8-oxoguanina (secundaria al daño de radicales libres del oxígeno, página 34) y la 3-metiladenina (generada por la transferencia de un grupo metilo de un donador de metilo, página 431).

Los estudios estructurales de la DNA glucosilasa que retira la 8-oxoguanina (oxoG) mutágena indican que esta enzima difunde con rapidez por el DNA e “inspecciona” cada uno de los pares de bases G-C en el DNA dúplex (fig. 13-28, paso 1). En el paso 2, la enzima pasó por un par de bases oxoG-C. Cuando esto ocurre, la enzima inserta una cadena lateral de aminoácido específica en la hélice de DNA, lo que hace que el nucleótido rote (“se voltee”) 180 grados fuera de la hélice de DNA y quede dentro del cuerpo de la enzima (paso 2). Si en realidad el nucleótido contiene una oxoG, la base se ajusta en el sitio activo de la enzima (paso 3) y se divide de su azúcar relacionado. En cambio, si la base extruida es una guanina normal, que sólo difiere en estructura de la oxoG por dos átomos, es incapaz de embonar en el sitio activo de la enzima (paso 4) y es devuelta a su posición apropiada dentro de la pila de bases. Una vez que la purina o pirimidina alteradas se eliminan, el remanente “decapitado” de la desoxirribosa de fosfato en el sitio se suprime por la acción combinada de una endonucleasa especializada (AP) y una DNA polimerasa. La AP corta el esqueleto de DNA (fig. 13-27, paso 3) y la actividad de fosfodiesterasa de la polimerasa  $\beta$  elimina el azúcar-fosfato remanente que estaba unido a la base eliminada (paso 4). La polimerasa  $\beta$  ocupa entonces el espacio al insertar un nucleótido complementario a la cadena no dañada (paso 5) y la cadena se liga por medio de una DNA ligasa III (paso 6).

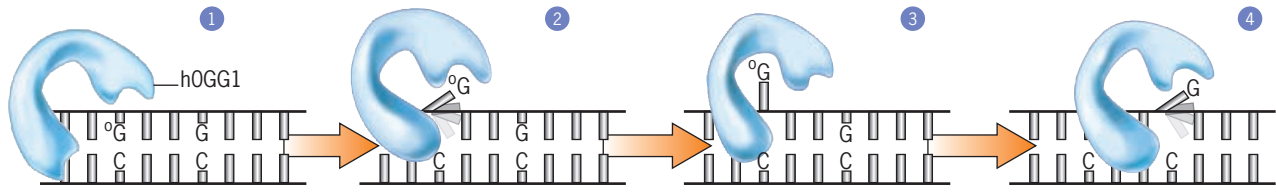
El hecho de que la citosina pueda convertirse en uracilo puede explicar porqué la selección natural favoreció el uso de la timina, más que el uracilo, como una base del DNA, a pesar de que el uracilo estuvo al parecer presente en RNA cuando éste sirvió como material genético durante la evolución temprana de la vida (pág. 448). Si el uracilo se hubiera retenido como una base de DNA habría causado dificultades en los sistemas de reparación para distinguir entre un uracilo “relacionado” con un sitio particular y uno que se generó a partir de una alteración de la citosina.

### Reparación de la unión deficiente

Ya se mencionó que las células pueden eliminar bases mal unidas incorporadas por la DNA polimerasa y las que se escapan de la lectura y corrección por medio de la enzima exonucleasa. Este



**FIGURA 13-27** Reparación de la escisión de bases. Los pasos se describen en el texto. Se conocen otras vías para el BER y se ha mostrado que este mecanismo posee otras vías acopladas para la transcripción y reparación global.



**FIGURA 13-28** Detección de daños de bases durante la BER. En el paso 1, una DNA glucosilasa (llamada hOGG1) inspecciona una base pareada con citosina. En el paso 2, la base es proyectada fuera del DNA dúplex. En este caso, la base resulta ser una versión oxidada de guanina, la 8-oxoguanina, y tiene la capacidad de embonar en el sitio activo de la enzima (paso 3) en el punto en que se escinde de su azúcar acompañante.

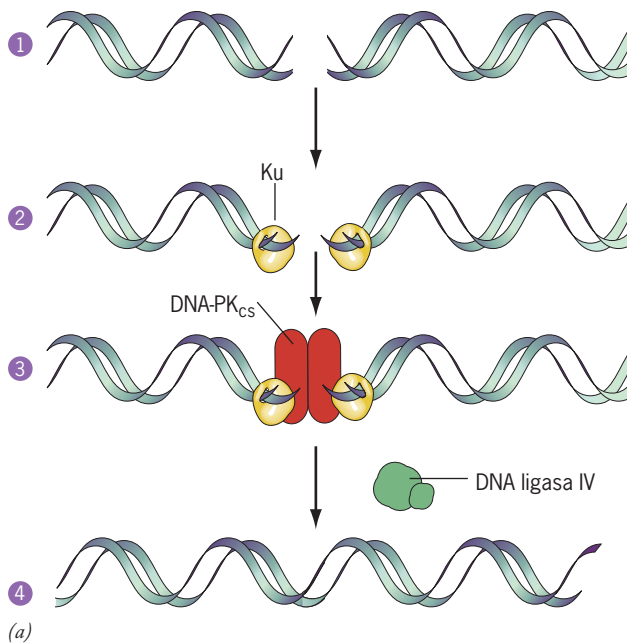
Los pasos posteriores de la BER se mostraron en la figura 13-27. En el paso 4, el azúcar extruido es una guanina normal, que no embona en el sitio activo de la glucosilasa y es devuelta a la pila de bases. (BASADA EN UNA FIGURA DE S. S. DAVID, CON AUTORIZACIÓN DE NATURE 434:569, 2005; © COPYRIGHT 1005 POR MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

proceso se conoce como **reparación de la unión deficiente**. Un apareamiento erróneo de pares de bases causa una distorsión en la geometría de la doble hélice que puede reconocer una enzima de reparación. Empero, ¿de qué forma la enzima par “reconoce” qué miembro del apareamiento erróneo es el nucleótido incorrecto? Si se eliminara uno de los nucleótidos al azar, debería haber una probabilidad de cometer error en el 50% de las veces, lo que crearía una mutación permanente en el sitio. Por lo tanto, para reparar el problema del apareamiento erróneo luego que la DNA polimerasa pasa por el sitio, es indispensable que el sistema de reparación pueda distinguir la cadena recién sintetizada que contiene nucleótido incorrecto de la cadena progenitora que

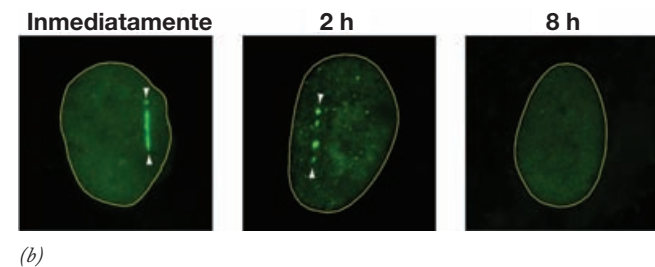
posee el nucleótido correcto. En *E. coli*, las dos cadenas se distinguen por la presencia de residuos de adenosina metilados en la cadena parental. Parece que el sistema MMR de los eucariotas no utiliza la metilación de DNA y aún no se conoce el mecanismo de identificación de la cadena recién sintetizada. Se han identificado varias vías MMR distintas, que no se describen aquí.

### Reparación de la rotura de doble cadena

Los rayos X, los rayos gamma y las partículas liberadas por los átomos radiactivos se describen como **radiación ionizante** porque generan iones que atraviesan la materia. Millones de rayos gamma pasan a través del cuerpo cada minuto. Cuando estas formas de radiación colisionan con una molécula frágil, como el DNA, provocan a menudo roturas en ambas cadenas de la doble hélice. Las **roturas de la doble cadena (DSB)** también pueden deberse a ciertos químicos, incluidos los utilizados en la quimioterapia del cáncer (p. ej., bleomicina) y radicales libres generados por el metabolismo normal de la célula (pág. 34). Las DSB también se inducen durante el daño al DNA en la replicación. Una sola rotura de la doble cadena puede causar anomalías cromosómicas serias y, al final, letales para las células. Las DSB pueden repararse por medio de diferentes vías alternas. La vía principal en las células de mamíferos se llama **unión de extremos no homólogos**



**FIGURA 13-29** Reparación de la rotura de doble cadena por medio de la **unión de extremos no homólogos**. (a) En este modelo simplificado de la reparación de la rotura de la doble cadena, una proteína heterodimérica en forma de anillo llamada Ku detecta la lesión (paso 1) y se une a los extremos rotos del DNA (paso 2). La proteína Ku unida al DNA recluta a otra proteína, denominada DNA-PK<sub>cs</sub>, la cual es la subunidad catalítica de una cinasa dependiente de DNA (paso 3). La mayoría de los sustratos fosforilados por esta cinasa de proteína se desconocen. Estas proteínas mantienen juntos los extremos del DNA roto en una forma tal, que es posible que los una la DNA ligasa IV para regenerar un DNA dúplex intacto (paso 4). La vía NHEJ también podría incluir las actividades de



nucleasas y polimerasas (no mostradas), y es más proclive al error que la vía homóloga de recombinación de reparación de DSB. (b) Análisis temporal de la localización de Ku en sitios de formación de DSB inducida por la irradiación con microhaces láser en un sitio indicado por las puntas de flecha. La proteína Ku NHEJ se localiza en el sitio del daño inmediatamente después de la irradiación pero sólo permanece ahí un breve instante, que se supone es lo que dura la reparación del daño. Las micrografías se tomaron 1) inmediatamente después, 2) a las 2 h y 3) 8 h después de la irradiación. (B: TOMADA DE JONG-SOO KIM ET AL., CORTESÍA DE KYOKO YOKOMORI, J. CELL BIOL. 170:344, 2005; CON AUTORIZACIÓN DEL TITULAR DEL COPYRIGHT, LA ROCKEFELLER UNIVERSITY.)



(NHEJ), en la cual un complejo de proteínas se une a los extremos rotos del DNA dúplex y cataliza una serie de reacciones que de nueva cuenta unen las cadenas rotas. Los pasos que suceden durante la NHEJ se describen en la figura 13-29a. La figura 13-29b muestra los núcleos de fibroblastos humanos previamente tratados con láser para inducir un grupo localizado de rotura de la doble cadena y luego teñidos para detectar la presencia de la proteína Ku en varios instantes después del tratamiento con láser. Se observa que esta proteína de reparación NHEJ se localiza en el sitio de las DSB inmediatamente después de su aparición. Otra vía de reparación DSB incluye la *recombinación genética* y es considerablemente más compleja. Los pasos que ocurren durante la recombinación homóloga son similares a los

de la recombinación genética mostrados en la figura 14-47. Los defectos en ambas vías de reparación se han vinculado con un incremento de la susceptibilidad al cáncer.

## REVISIÓN

1. Compare los sucesos de la reparación de la escisión de nucleótidos y la reparación de la escisión de bases.
2. ¿Por qué es importante en la reparación del apareamiento erróneo que la célula distinga las cadenas parentales de las cadenas nuevamente sintetizadas?, ¿cómo se lleva a cabo lo anterior?



## PERSPECTIVA HUMANA

### Consecuencias de las deficiencias del sistema de reparación del DNA

Nuestra existencia es posible por la luz solar, que suministra la energía captada durante la fotosíntesis. Sin embargo, el sol también emite una corriente continua de rayos ultravioleta que envejece y provoca mutaciones en las células de la piel. Los efectos nocivos del sol se muestran de manera más notable al analizar una rara enfermedad genética recesiva, el *xeroderma pigmentoso (XP)*. Los pacientes con XP poseen un sistema de reparación deficiente que no puede remover segmentos de DNA dañados por la radiación ultravioleta. Como resultado, las personas con XP son muy sensibles a la luz solar; incluso la exposición muy limitada a los rayos directos del sol puede ocasionar la aparición de un gran número de manchas pigmentadas de color oscuro sobre las regiones expuestas del cuerpo (fig. 1) y un riesgo elevado de desarrollar cánceres de piel letales y desfigurantes. Para los individuos con XP es útil el uso de cremas (Di-



**FIGURA 1** Son evidentes las regiones pigmentosas oscuras de la piel en este niño con xeroderma pigmentoso. El área de la piel por debajo del mentón se encuentra protegida del sol y no muestra ninguna lesión. (KEN GREER/VISUALS UNLIMITED.)

mericine) dérmicas que contienen una enzima bacteriana que repara el DNA. Esta enzima está contenida en liposomas que al parecer penetran la capa externa de la piel y participan en la reparación del DNA.

El XP no es el único trastorno genético caracterizado por deficiencia del sistema de reparación de la escisión de nucleótidos. El síndrome de Cockayne (CS) es una alteración hereditaria reconocible por una sensibilidad aguda a la luz, alteraciones neurológicas secundarias como la desmielinización de neuronas y anomalías del desarrollo, aunque con incremento escaso o nulo de padecer cáncer de piel. Las células de las personas con CS son deficientes en la vía preferencial por medio de la cual se repara un DNA activo desde el punto de vista transcripcional (pág. 553). El resto del genoma se repara a una tasa normal, lo que al parecer explica porqué estos individuos no están sujetos a mayor probabilidad de cáncer dérmico. ¿Por qué las personas con deficiencias en el mecanismo de reparación están sometidas a alteraciones específicas como el enanismo? En la mayor parte de los casos de CS puede encontrarse una mutación en uno de los dos genes, ya sea *CSA* o *CSB*, que participan en el acoplamiento de la transcripción a la reparación del DNA (fig. 13-26). Las mutaciones en estos genes, además de afectar la reparación del DNA, también pueden alterar la transcripción de ciertos genes y llevar al retraso del crecimiento y un desarrollo anormal del sistema nervioso. Esta posibilidad la apoya el hallazgo de que en algunos casos los síntomas de CS también pueden observarse en personas con XP que portan mutaciones específicas en el gen *XPB*. Como se señaló en la página 553, el gen *XPB* codifica a una subunidad de un factor de transcripción TFIIH requerido para el inicio de la transcripción. Las mutaciones en el gen *XPB* podrían llevar a los defectos de la reparación del DNA y la transcripción. Ciertas mutaciones en el gen *XPB* causan otra enfermedad, la tricodistrofia (TTD), que también combina síntomas sugestivos de defectos en la reparación del DNA y la transcripción. Al igual que los pacientes con CS, los individuos con TTD muestran mayor sensibilidad a la luz solar pero sin el riesgo incrementado de desarrollar cáncer. Los enfermos con TTD sufren síntomas adicionales que incluyen pelo quebradizo y piel con escamas. Tales datos indican que los tres padecimientos distintos (XP, CS y TTD) se deben a defectos en un solo gen, con la enfermedad determinada de manera particular por las mutaciones específicas presentes en el gen. Estudios estructurales de moléculas *XPB* mutantes sugieren que estas distintas mutaciones afectan las funciones de la proteína.

En otra parte de este libro se describieron las circunstancias que conducen al envejecimiento prematuro (o acelerado) en seres humanos o modelos animales: como resultado de 1) el aumento de los radicales li-

bres (pág. 34), 2) incremento de las mutaciones en el DNA mitocondrial (pág. 202) y 3) por mutaciones en una proteína de la envoltura nuclear (pág. 477). En 2006, un niño de 15 años de edad que sufría quemaduras solares frecuentes y ciertas características de envejecimiento prematuro llamó la atención de investigadores clínicos. El análisis genético mostró que el niño portaba una mutación en el gen *XPF*, cuya proteína codificada hace uno de los cortes en la vía NER (fig. 13-26). Los pacientes con mutaciones leves en *XPF* desarrollan XP y tienen NER anormal. Este niño tenía una mutación más grave en el gen *XPF*, lo que hacía que sus células fueran incapaces de reparar los enlaces covalentes que se forman en ocasiones entre las dos cadenas de un DNA dúplex. Los estudios en las células del paciente, así como en ratones con una mutación correspondiente, sugerían que los enlaces no reparados aumentaban la muerte celular (apoptosis), lo que promueve el envejecimiento prematuro en forma directa o indirecta. Según una hipótesis, los defectos en los sistemas de reparación de DNA que conducen sobre todo a un aumento en la velocidad de mutación de las células se relacionan con una mayor susceptibilidad al cáncer, mientras que los defectos en los sistemas de reparación del DNA que conducen principalmente a la muerte celular se relacionan con envejecimiento acelerado.<sup>a</sup> Aún se debate si alguno de estos síndromes de envejecimiento prematuro aporta información sobre los mecanismos del envejecimiento normal.

Las personas con alteraciones de la reparación del DNA no son los únicos individuos que deben preocuparse acerca de la exposición al sol. Incluso en células de la piel cuyas enzimas de reparación funcionan a niveles óptimos, cierta fracción de las lesiones no se elimina y sustituye. Las alteraciones del DNA pueden ocasionar mutaciones capaces de convertir una célula en maligna. Así, una consecuencia de la corrección incompleta del daño inducido por luz ultravioleta es el riesgo de cáncer de piel. Considérense las siguientes estadísticas: más de 1 millón de personas desarrollan una de las tres formas de cáncer cutáneo cada año en Estados Unidos y algunos de estos casos se atribuyen a la exposición excesiva a los rayos ultravioleta del sol. Por fortuna, las dos formas más comunes de cáncer de la piel (carcinoma de células basales y carcinoma celular escamoso), rara vez se diseminan a otras partes del cuerpo y por

<sup>a</sup> Por diversas razones, no se ha mencionado en esta revisión que dos de los genes que con mayor frecuencia causan síndromes de envejecimiento prematuro codifican miembros de un tipo particular de la familia de DNA helicasa llamadas helicasas RecQ. Los genes en cuestión son *WRN* y *BLM*, que cuando mutan causan las enfermedades hereditarias síndrome de Werner y síndrome de Bloom, respectivamente, caracterizados por aumento en el riesgo de cáncer y rasgos de envejecimiento acelerado. Se sugiere que estas helicasas participan en ciertos tipos de escisión de bases y en las vías de reparación de DSB. Parecen tener importancia particular en la solución de situaciones en las que la DNA polimerasa se atasca en alguna lesión y la horquilla de replicación "colapsa" (se desensambla). El tema se trata en *Trends Biochem. Sci.* 33:609, 2008.

### 13.3 ENTRE LA REPLICACIÓN Y LA REPARACIÓN

La sección Perspectiva humana describe una enfermedad hereditaria (el xeroderma pigmentoso [XP]), que provoca incapacidad para reparar ciertas lesiones consecutivas a la exposición a la radiación ultravioleta. Los sujetos con la forma "típica" del XP tienen un defecto en uno de los siete genes que intervienen en la reparación de la escisión de nucleótidos (pág. 553). Estos genes se designan como *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF* y *XPG* y algunas de sus funciones en el NER se indican en el pie de la figura 13-26. Se ha identificado a otro grupo de individuos que, tal y como los que padecen XP, es muy susceptible a desarrollar cáncer

lo general pueden eliminarse en el consultorio. Estos dos tipos de tumoración se originan en las células epiteliales de la piel.

Sin embargo, el melanoma maligno, un tercer tipo de cáncer de la piel, es un asesino potencial. A diferencia de los otros, los melanomas se desarrollan a partir de las células pigmentarias de la piel. El número de casos de melanoma diagnosticados en Estados Unidos se ha incrementado a una velocidad alarmante hasta 4% por año debido a la mayor cantidad de horas que la gente se expone al sol en las últimas décadas. Los estudios sugieren que uno de los factores más importantes de riesgo para desarrollar melanoma en un adulto es la presencia de quemaduras solares en la infancia o la adolescencia. Las personas con mayor riesgo son caucásicas con piel muy clara. Muchos de estos individuos tienen células pigmentarias cuya superficie carece de receptor funcional (llamado MC1R) para una hormona que se secreta en las células epiteliales cercanas de la piel como respuesta a la radiación ultravioleta. Los melanocitos responden a la activación de MC1R mediante la producción del pigmento oscuro melanina, lo que hace que el individuo se broncee. La piel bronceada está más protegida contra los rayos UV que la piel clara sin broncear, aunque la radiación UV es la que induce la respuesta de bronceado. ¿Y si fuera posible inducir el bronceado de la piel sin sufrir la exposición UV? Varios grupos de investigadores trabajan en una estrategia así mediante el uso de varios recursos distintos a la exposición a luz solar con UV a fin de estimular la respuesta de bronceado en las células pigmentarias. Aún debe averiguarse si alguna de estas estrategias es segura y eficaz.

El cáncer cutáneo no es la única enfermedad favorecida por la deficiencia o exceso en los sistemas de reparación de DNA. Se ha estimado que más de 15% de los casos de cáncer de colon puede atribuirse a mutaciones de los genes que codifican las proteínas requeridas para la reparación de los apareamientos de bases erróneos. Las mutaciones que inutilizan al sistema de reparación de los apareamientos de bases erróneos llevan de modo inevitable al aumento de la frecuencia de las mutaciones de otros genes debido a que los errores cometidos durante la replicación no se corrigen.

El cáncer también es una de las consecuencias de la rotura del DNA bicatenario no reparado, o reparado de forma incorrecta. Las roturas en el DNA pueden ser secundarias a una variedad de agentes ambientales comunes, como rayos X, rayos gamma y emisiones radiactivas. El peligro ambiental más serio es el que proviene quizá del radón (<sup>222</sup>Rn), un isótopo radiactivo formado durante la desintegración del uranio. Algunas áreas del planeta contienen altos niveles de uranio en el suelo y las casas construidas en estas regiones pueden contener niveles peligrosos del gas. Cuando se inhala pueden ocasionarse daños del DNA, como la rotura de la doble cadena, que incrementan el riesgo de cáncer pulmonar. Una fracción notoria de muertes de cáncer pulmonar en los no fumadores se debe tal vez a la exposición del radón.

de piel como resultado de la exposición al sol. Sin embargo, a diferencia de las células de los pacientes que tienen XP, las células de estos sujetos poseen el mecanismo de reparación de la escisión de nucleótidos y sólo fueron un poco más sensibles a la luz ultravioleta en comparación con las células normales. Esta sensibilidad a la luz ultravioleta incrementada se reveló durante la replicación, cuando estas células producen con frecuencia cadenas hijas fragmentadas después de la exposición a radiación ultravioleta. Los sujetos de este grupo padecen una variante de la XP llamada XP-V. Más adelante se vuelve a este defecto básico de la XP-V.

Como se revisó en la sección previa, las células pueden reparar una gran variedad de lesiones del DNA. Sin embargo, en ocasiones una lesión en el DNA no se repara al momento

que este segmento se somete a replicación. En ciertas ocasiones, la maquinaria de replicación llega al sitio dañado en la cadena plantilla y permanece allí. Cuando esto sucede, algún tipo de señal emitida lleva al reclutamiento de una polimerasa especializada que es capaz de saltar la lesión.<sup>3</sup> Supóngase que la lesión en cuestión es un dímero de timidina (fig. 13-25) y se debe a la exposición a la radiación ultravioleta en una célula de la piel. Cuando la polimerasa de replicación (pol  $\delta$ ) alcanza el obstáculo, la enzima se reemplaza de forma temporal por una DNA polimerasa “especializada” designada como  $\eta$ , la cual es capaz de insertar dos residuos de A en la cadena nuevamente sintetizada enfrente de los dos residuos de T que están unidos de manera covalente como parte de un dímero. Una vez que este “salto del daño” se realiza, la célula regresa a la polimerasa de replicación normal y la síntesis de DNA continúa sin mostrar ningún signo

<sup>3</sup>Una célula tiene otras opciones para enfrentar una horquilla de replicación atascada, pero son más complejas y no se comprenden bien, y no se describen aquí.

## SINOPSIS

**La replicación del DNA es semiconservadora, lo que significa que durante la división celular cada una de las células hijas recibe una mitad del dúplex original.** Este mecanismo de replicación lo sugirieron por vez primera Watson y Crick como parte de su modelo de la estructura del DNA. Ellos señalaron que la replicación ocurre por la separación gradual de las cadenas debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno, de modo que cada cadena puede servir como plantilla para la formación de una cadena complementaria. Pronto se confirmó este modelo en las células bacterianas y eucariotas al demostrar que las células de una generación que se transfieren a medios marcados con radiactividad producen células hijas cuyo DNA posee una cadena marcada y una cadena no marcada (pág. 534).

**El mecanismo de replicación se entiende mejor en células bacterianas.** La replicación se inicia en un solo origen sobre el cromosoma bacteriano circular y procede hacia afuera en ambas direcciones como un par de horquillas de replicación. Las horquillas de replicación son sitios en los que se desenrolla la doble hélice y se incorporan nucleótidos en ambas cadenas recién sintetizadas (pág. 537).

**Una familia de DNA polimerasas cataliza la síntesis del DNA.** La primera de estas enzimas que se caracterizó fue la DNA polimerasa I de *E. coli*. Para catalizar la reacción de polimerización, la enzima requiere cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido, un plantilla de la cadena que debe copiar y un iniciador que contenga un OH 3' libre al cual se puedan añadir nucleótidos. El iniciador es necesario porque la enzima no puede empezar la formación de una cadena de DNA. Más bien sólo es capaz de añadir nucleótidos en el extremo 3' terminal hidroxilo de una cadena existente. Otra característica inesperada de la DNA polimerasa I es que sólo puede polimerizar una cadena en dirección 5'  $\rightarrow$  3'. Se presupone que las dos cadenas nuevas se sintetizarían en direcciones opuestas por polimerasas que se mueven en direcciones opuestas a lo largo de las dos cadenas progenitoras plantilla. Este proceso se explicó al demostrar que las dos cadenas se sintetizan de manera muy diferente (pág. 538).

**Una de las cadenas recién sintetizadas (la cadena adelantada) crece en dirección de la horquilla de replicación y se sintetiza de manera continua. La otra cadena recién sintetizada (la cadena retrasada) crece y se aleja de la horquilla y se sintetiza de manera discontinua.** En células bacterianas, la cadena retrasada se sintetiza como fragmentos de unos 1000 nucleótidos de largo, denominados fragmentos de Okazaki, que se unen por enlaces covalentes entre

de que se ha resuelto un problema serio. Como se ha notado, los pacientes afectados con el XP-V tienen una mutación en el gen que codifica a la polimerasa  $\eta$  y tienen dificultad para reparar los pasados dímeros de timidina.

Descubierta en 1999, la polimerasa  $\eta$  es un miembro de una familia de DNA polimerasas especializadas en incorporar nucleótidos de tipos opuestos en las lesiones del DNA de la cadena plantilla. Las polimerasas de esta familia están capacitadas en la *síntesis translesional (TLS)*. Los estudios de cristalografía con rayos X revelan que las polimerasas TLS tienen un sitio activo más espacioso de lo usual, capaz de recibir nucleótidos alterados que no cabrían en el sitio activo de una polimerasa replicadora. Estas polimerasas TLS sólo son capaces de incorporar unos cuantos nucleótidos de la cadena de DNA (carecen de la capacidad de ser procesivas), tampoco tienen la capacidad de lectura y corrección y es mucho más común que incorporen un nucleótido incorrecto (p. ej., no complementario) que las polimerasas clásicas.

sí mediante una DNA ligasa. En cambio, la cadena adelantada se sintetiza como cadena simple continua. Ni la cadena continua ni los fragmentos de Okazaki pueden iniciarse por acción de la DNA polimerasa; en vez de ello, empiezan como un iniciador de RNA corto sintetizado por un tipo de RNA polimerasa llamado primasa. Después de ensamblar el iniciador de RNA, la DNA polimerasa continúa la síntesis de la cadena o el fragmento como DNA. A continuación el RNA se degrada y el espacio lo ocupa DNA (pág. 540).

**Los sucesos observados en la horquilla de replicación exigen una variedad de diferentes tipos de proteínas que tienen funciones especializadas.** Entre tales proteínas figuran las siguientes: una DNA girasa, que es un tipo de topoisomerasa II necesaria para liberar la tensión que se genera como resultado del desenrollamiento del DNA; una DNA helicasa que desenrolla el DNA y separa las cadenas; proteínas que se unen de modo selectivo al DNA monocatenario y evitan que se vuelvan a reconectar; una primasa, que sintetiza los iniciadores de RNA; y una DNA ligasa que sella los fragmentos de la cadena retrasada para formar un polinucleótido continuo. La DNA polimerasa III es la enzima que sintetiza el DNA de manera primaria y añade nucleótidos a cada iniciador de RNA, en tanto que la DNA polimerasa I se encarga de eliminar los iniciadores de RNA y reemplazarlos con DNA. Se cree que dos moléculas de DNA polimerasa III se desplazan juntas en forma de un complejo a lo largo de sus respectivas cadenas plantilla. Esto se efectúa conforme la cadena retrasada se pliega hacia atrás sobre sí misma (pág. 541).

**Las DNA polimerasas poseen sitios catalíticos separados para la polimerización y degradación de las cadenas de ácido nucleico.** La mayor parte de las DNA polimerasas tiene actividades de exonucleasa 5'  $\rightarrow$  3' y 3'  $\rightarrow$  5'. La primera actúa para degradar los iniciadores de RNA de cada fragmento de Okazaki y la segunda remueve los nucleótidos inapropiados después de su incorporación errónea, lo cual contribuye a la fidelidad de la replicación. Se estima que alrededor de uno de cada  $10^9$  nucleótidos se incorpora de manera incorrecta durante la replicación en *E. coli* (pág. 544).

**La replicación en células eucariotas sigue un mecanismo similar y emplea proteínas semejantes a las utilizadas por los procariontes.** Todas las DNA polimerasas que participan en la replicación alargan las cadenas de DNA en dirección 5'  $\rightarrow$  3'. Ninguna de éstas inicia la síntesis de cadenas sin un iniciador. La mayor parte posee una actividad de exonucleasa 3'  $\rightarrow$  5', lo que garantiza que la replicación



ocurra con gran fidelidad. A diferencia de los procariotas, la replicación en los eucariotas se inicia de manera simultánea en muchos sitios a lo largo del cromosoma, con las horquillas de replicación hacia adelante en ambas direcciones de cada sitio de inicio. Estudios de levaduras indican que los orígenes de replicación contienen sitios de unión específica para un complejo multiproteínico esencial llamado ORC. Los sucesos en el origen aseguran que la replicación de cada segmento de DNA ocurra una vez y sólo una vez por cada ciclo celular (pág. 546).

**La replicación en células eucariotas se relaciona de forma estrecha con estructuras nucleares.** Hay evidencia que indica que buena parte de la maquinaria requerida para la replicación se vincula con la matriz nuclear. Además, las horquillas de replicación que son activas en cualquier momento se hallan dentro de unos 50 a 250 sitios conocidos como lugares de replicación. El DNA recién sintetizado se relaciona en poco tiempo con nucleosomas. Tetrámeros (H3H4)<sub>2</sub> presentes antes de la replicación permanecen intactos y pasan a las estructuras dúplex hijas, mientras que los dímeros H2A/H2B están separados el uno del otro y se unen de modo aleatorio a los tetrámeros (H3H4)<sub>2</sub> nuevos y viejos en las dúplex hijas (pág. 550).

**El DNA está expuesto a muchas influencias ambientales nocivas, entre ellas radiación ionizante, sustancias químicas comunes y radiación ultravioleta.** Las células poseen diferentes sistemas para reconocer y reparar los daños resultantes. Se estima que menos de una base se modifica en mil salvamentos estructurados por los sistemas de reparación de la célula. Se conocen cuatro tipos principales de sistemas para la reparación del DNA. Los sistemas de reparación de la escisión de nucleótido (NER) funcionan al remover una pequeña

sección de la cadena de DNA que contiene la lesión, como un dímero de pirimidina. Durante la NER, las cadenas de DNA que alojan la lesión se separan por acción de una helicasa; una endonucleasa efectúa un par de incisiones, la abertura se llena mediante la acción de una DNA polimerasa y una DNA ligasa sella la cadena. La NER repara de forma preferencial las cadenas plantilla de genes que están bajo transcripción activa. La reparación de la escisión de bases elimina diferentes nucleótidos alterados que producen distorsiones menores en la hélice del DNA. Las células poseen una variedad de glucosilasas que reconocen y remueven diferentes tipos de bases alteradas. Una vez que las bases se remueven la porción restante del nucleótido se desplaza por medio de una endonucleasa, el espacio se elimina por medio de la acción de una fosfodiesterasa y se llena y sella mediante una polimerasa y una ligasa. La replicación de los pares de bases de apareamiento incorrecto es un mecanismo que se encarga de eliminar los nucleótidos incorrectos incorporados durante la replicación que escapan a la corrección de pruebas efectuadas por la actividad de la polimerasa. En bacterias, la cadena sintetizada de nueva cuenta se selecciona para la reparación en virtud de la falta de grupos metilo si se compara con la cadena parental. La rotura de doble cadena se repara en la forma de proteínas que se unen a ambos extremos rotos y se conectan otra vez en sus extremos (pág. 552).

**Además de las DNA polimerasas comunes que intervienen en la replicación del DNA y la reparación, las células también poseen un ordenamiento de DNA polimerasas que facilita la replicación en sitios de lesiones del DNA o alineamientos defectuosos.** Estas polimerasas, que actúan en la síntesis translesión, no tienen la procesividad y la capacidad de lectura y corrección y muestran más tendencia al error que las polimerasas típicas (pág. 557).

## PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Considérese que Meselson y Stahl permitieron en sus experimentos el crecimiento de las células en medios con <sup>14</sup>N y luego las transfirieron a un medio con <sup>15</sup>N. ¿Cómo aparecerían las bandas en el tubo de centrifugación si la replicación fuera, de modo respectivo, semiconservadora, conservadora y dispersiva?
2. Suponga que aísla una cepa mutante de levadura que replica su DNA más de una vez por ciclo celular. En otras palabras, cada gen en el genoma se replicó varias veces entre divisiones celulares sucesivas. ¿Cómo explicaría este fenómeno?
3. ¿De qué forma los cromosomas del experimento de las células eucariotas mostrado en la figura 13-4 deberían aparearse si la replicación ocurre por un mecanismo conservador o dispersivo?
4. Se ha señalado que las células poseen una enzima especial para eliminar el uracilo del DNA. ¿Qué sucedería si los grupos uracilo no se eliminaran? (Debe considerar la información presentada en la figura 11-44 respecto de las propiedades de apareamiento del uracilo.)
5. Dibuje una molécula de DNA bicatenario que no sirviera como plantilla para la síntesis de DNA por medio de la DNA polimerasa I.
6. Algunas bacterias mutantes sensibles a la temperatura detienen su replicación inmediatamente después de la elevación de la temperatura, pero otras continúan la replicación del DNA por un tiempo antes de suspender su actividad y otras prosiguen hasta completar un ciclo de replicación. ¿En qué aspectos difieren estos tres tipos de mutantes?
7. Si la tasa de error durante la replicación en las células humanas fuera igual que en bacterias (cerca de 10<sup>-9</sup>). ¿Cuál sería el efecto en los dos tipos celulares?
8. La figura 13-19 muestra los resultados de un experimento en el cual las células se incubaron con [<sup>3</sup>H] timidina por menos de 30 min antes de la fijación. ¿Qué debería esperar en esta fotografía después de 1 h de marcaje? ¿Es posible concluir que la replicación total del genoma se realiza en 1 h? ¿Si no es así, cuál es la razón?
9. Los orígenes de replicación tienen una región muy rica en pares de bases A-T. ¿Para qué sirven estas secuencias?
10. ¿Qué ventajas cabría esperar de que la replicación del DNA ocurra en conjunto con la matriz nuclear en oposición al nucleoplasma?, ¿cuáles son las ventajas de que la replicación suceda en pocos lugares?
11. ¿Cuáles son algunas de las razones que explican por qué se esperaría que las células humanas tuvieran mecanismos de reparación más eficientes que los de las ranas?
12. Al comparar autorradiografías de dos células expuestas a [<sup>3</sup>H] timidina, una se obtuvo de la replicación del DNA (fase S) y la otra no. ¿Cuál sería la diferencia entre estas autorradiografías?
13. Construya un modelo que explique cómo el DNA activo desde el punto de vista transcripcional se repara de modo preferencial en comparación con el DNA inactivo.