

# CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL FCEyN-INTI

Materia de Articulación CEBI\_A5

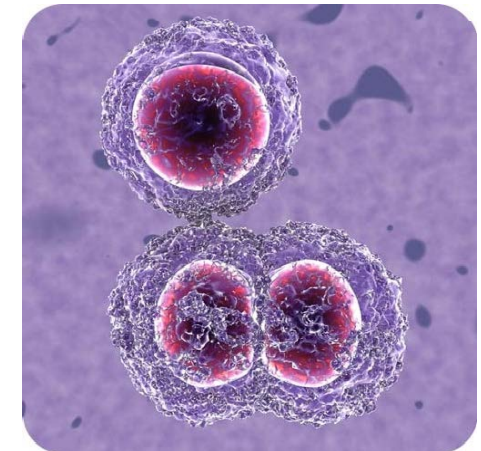
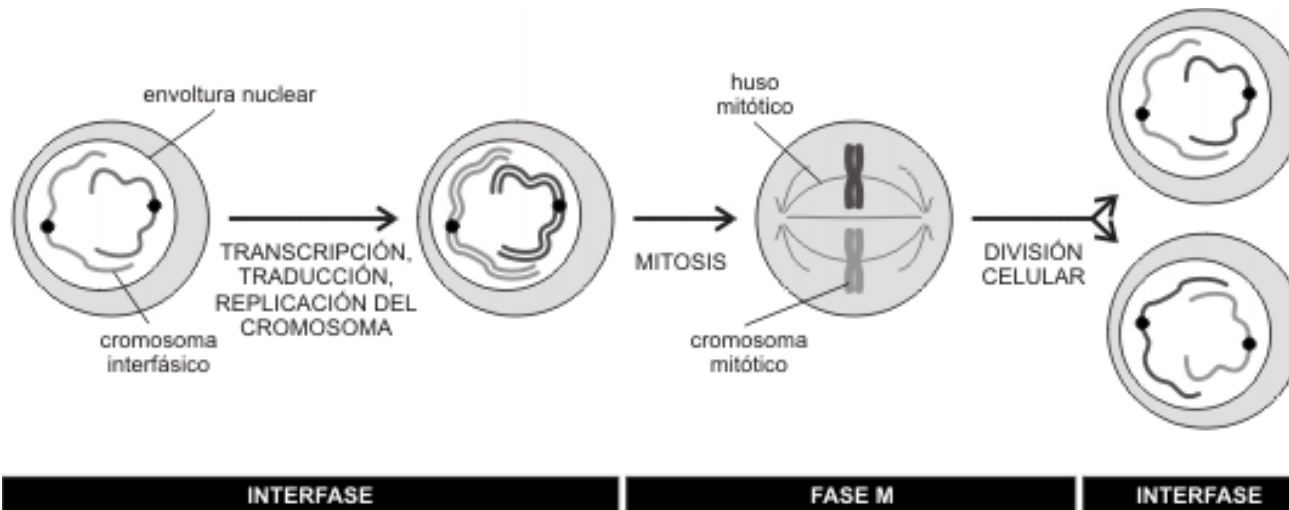
**Biología Molecular**

Teórica 2 - Replicación del DNA

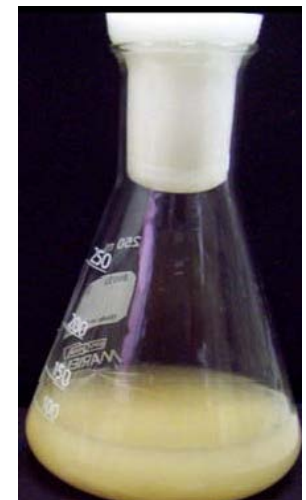
# Duplicación del DNA

Todas las células duplican su material genético antes de dividirse

## Eucariotas

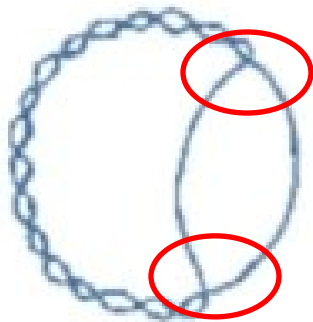


## Procariotas

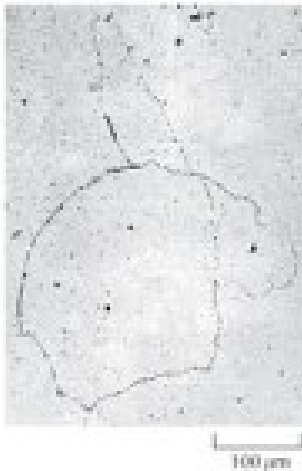


# Conceptos

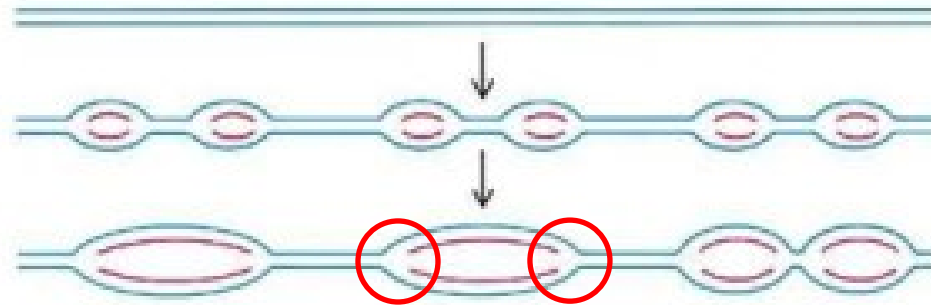
## Procariotas



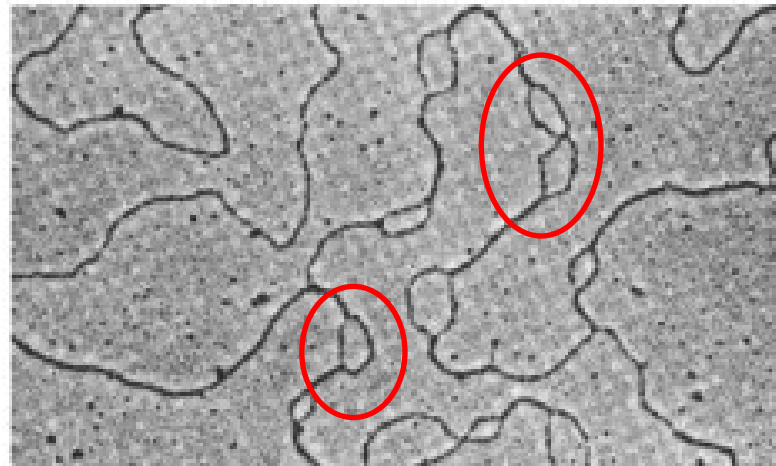
Burbuja de replicación en procariotas



## Eucariotas



Burbujas de replicación en eucariotas

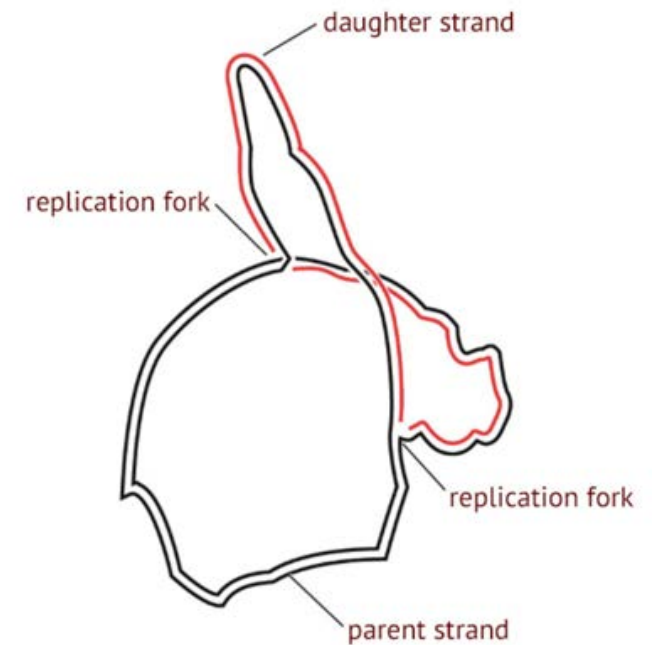


Origen de replicación

Horquilla de replicación

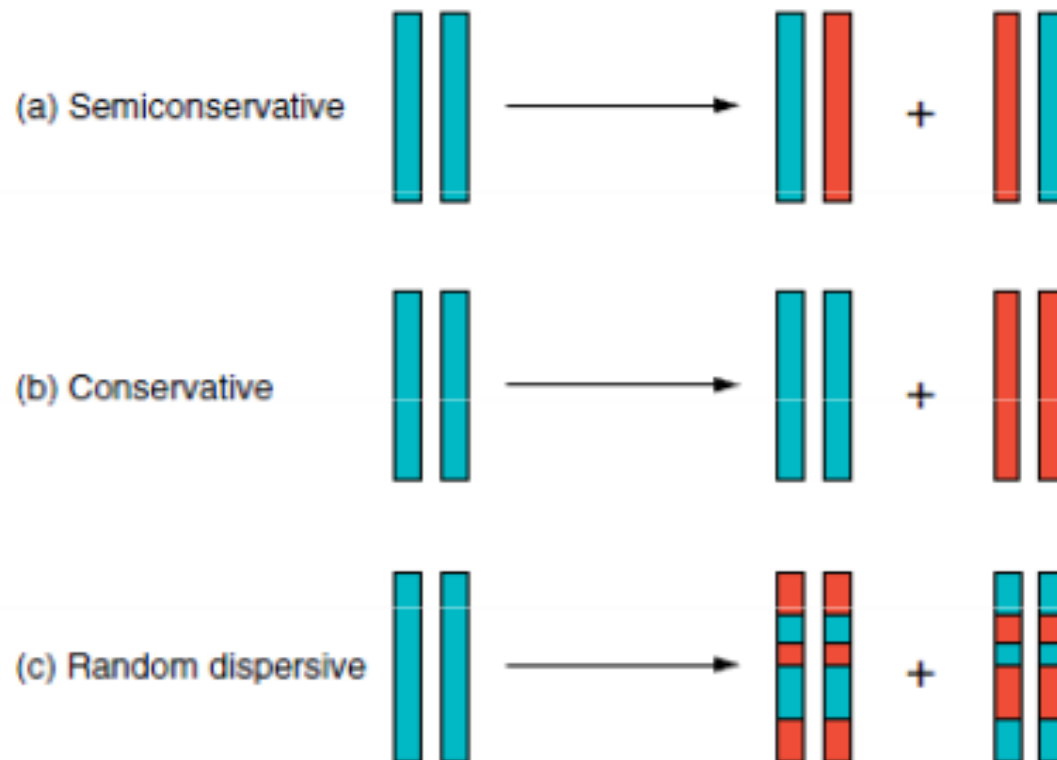
Burbuja u ojo de replicación

b)



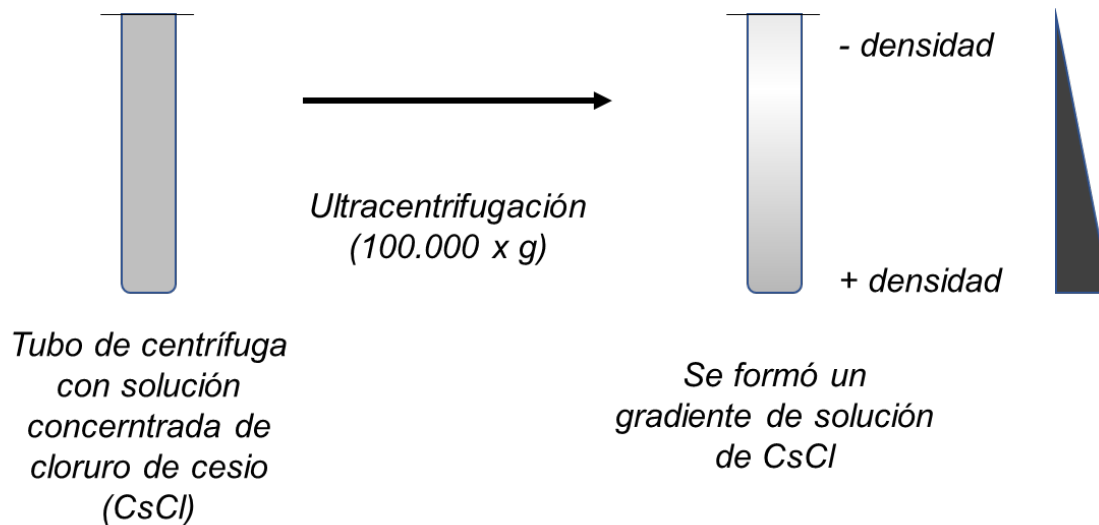
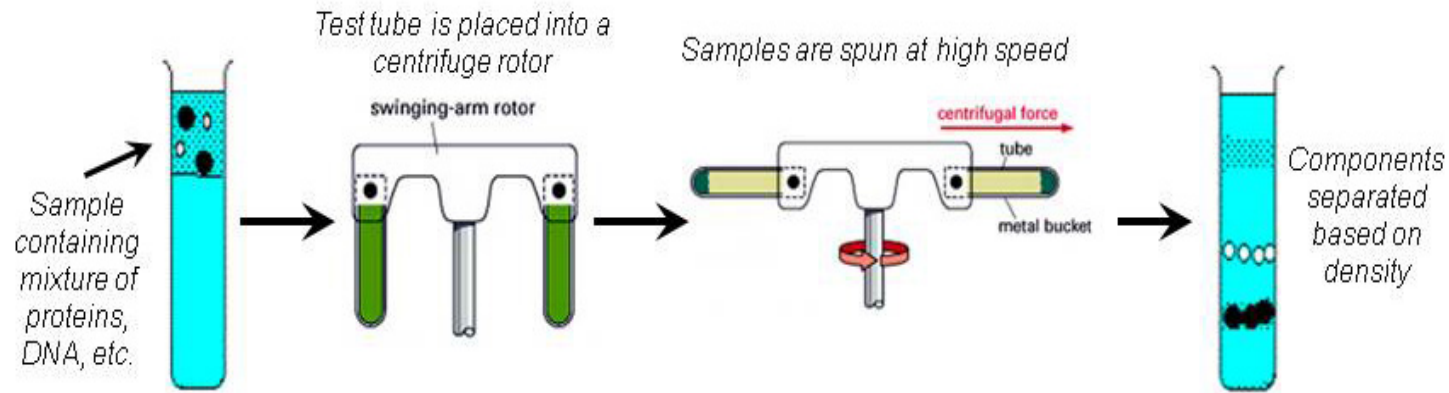
# La replicación del DNA

Hipótesis sobre como el DNA se replica y se distribuyen las hebras en las moléculas nuevas



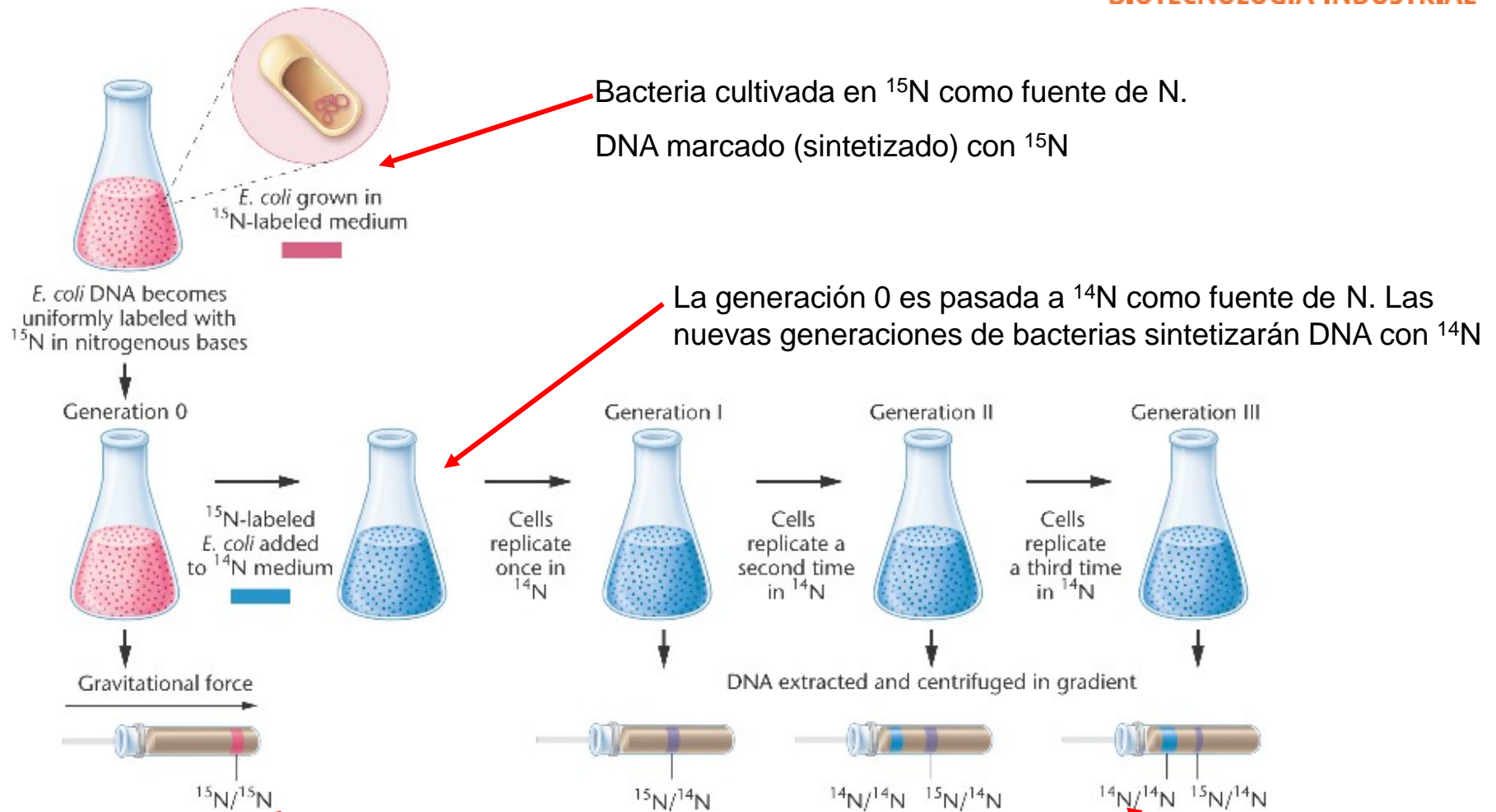
# Experimento de Meselson y Stahl (1958)

Experimentos de centrifugación de DNA en gradientes de CsCl



El CsCl forma gradientes de densidad y las moléculas centrifugadas se mueven hasta igualar densidad con el gradiente

# Experimento de Meselson y Stahl (1958)

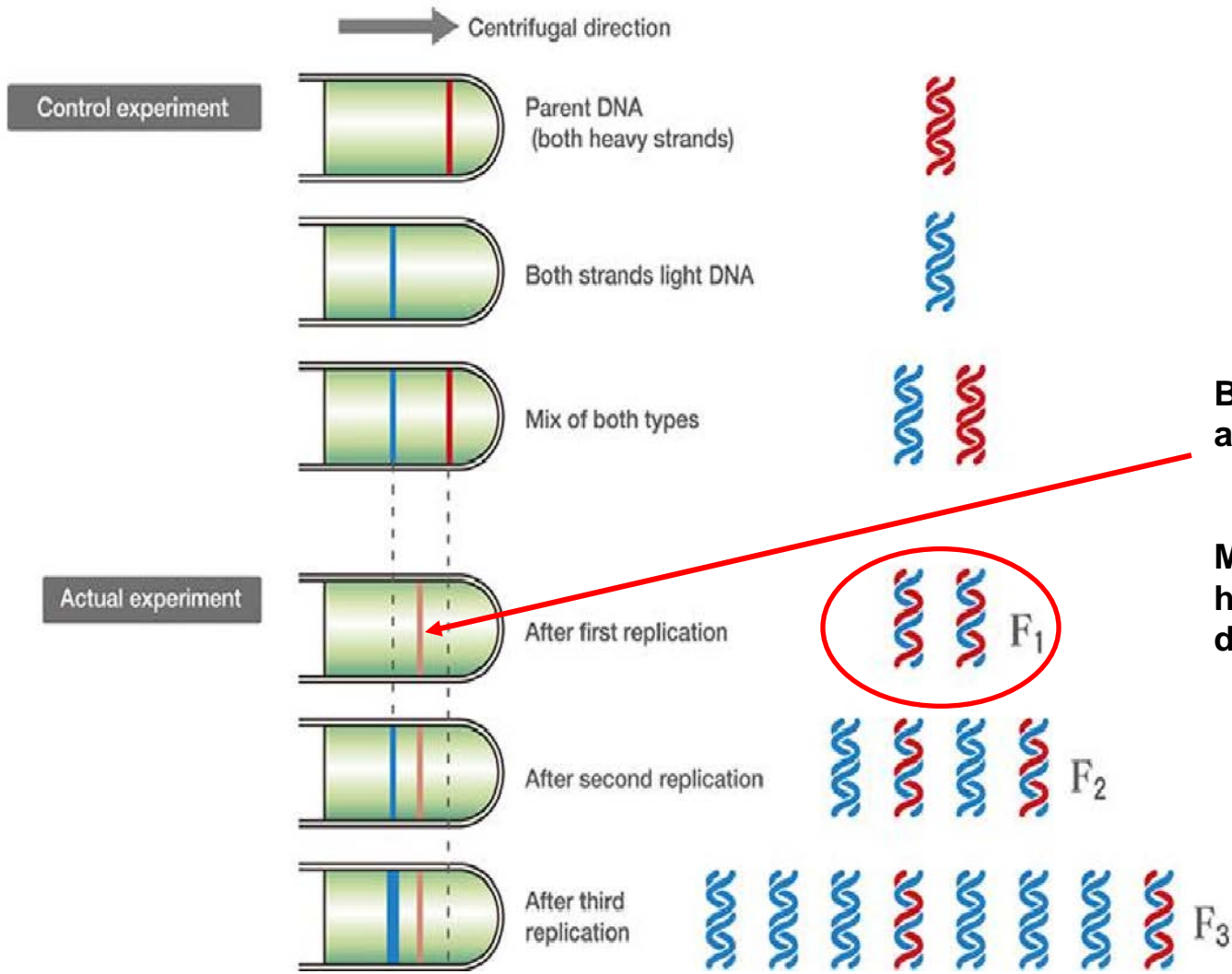


Bacteria cultivada en  $^{15}\text{N}$  como fuente de N.  
DNA marcado (sintetizado) con  $^{15}\text{N}$

La generación 0 es pasada a  $^{14}\text{N}$  como fuente de N. Las nuevas generaciones de bacterias sintetizarán DNA con  $^{14}\text{N}$

DNA con  $^{15}\text{N}$ , isótopo pesado del N. Tendrá una migración distinta al DNA con  $^{14}\text{N}$  en la centrifugación porque tiene distinta densidad

# Experimento de Meselson y Stahl (1958)

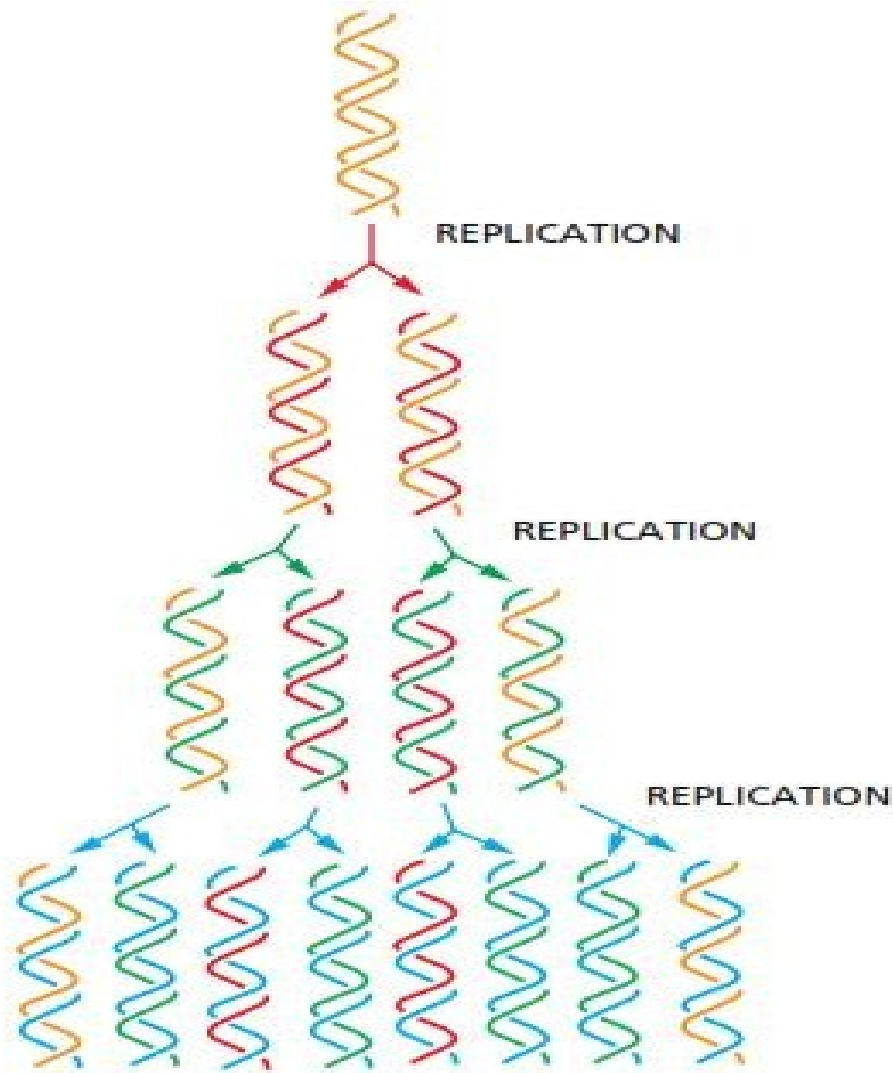


Banda de ADN que corresponde a una densidad intermedia

Moléculas de ADN con una hebra con 15N (parental) y otra de 14N (hija)



# Experimento de Meselson y Stahl (1958)

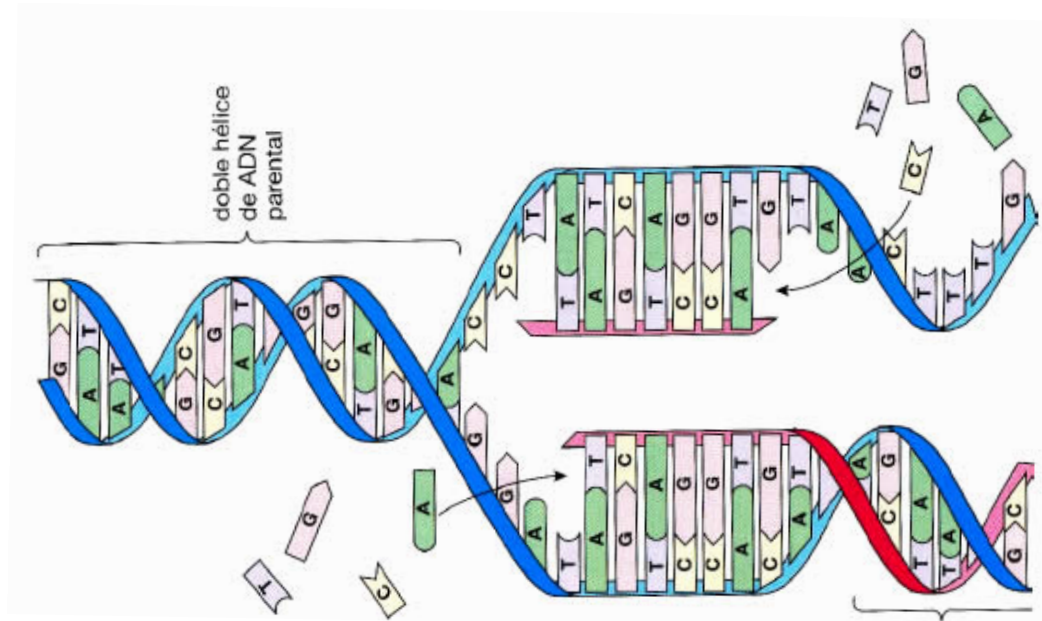


Debido a que cada una de las dos células hijas de una célula en división hereda una nueva doble hélice de DNA que contiene un hebra original y una hebra nueva, se dice que la doble hélice de DNA se replica “**semiconservativamente**”.



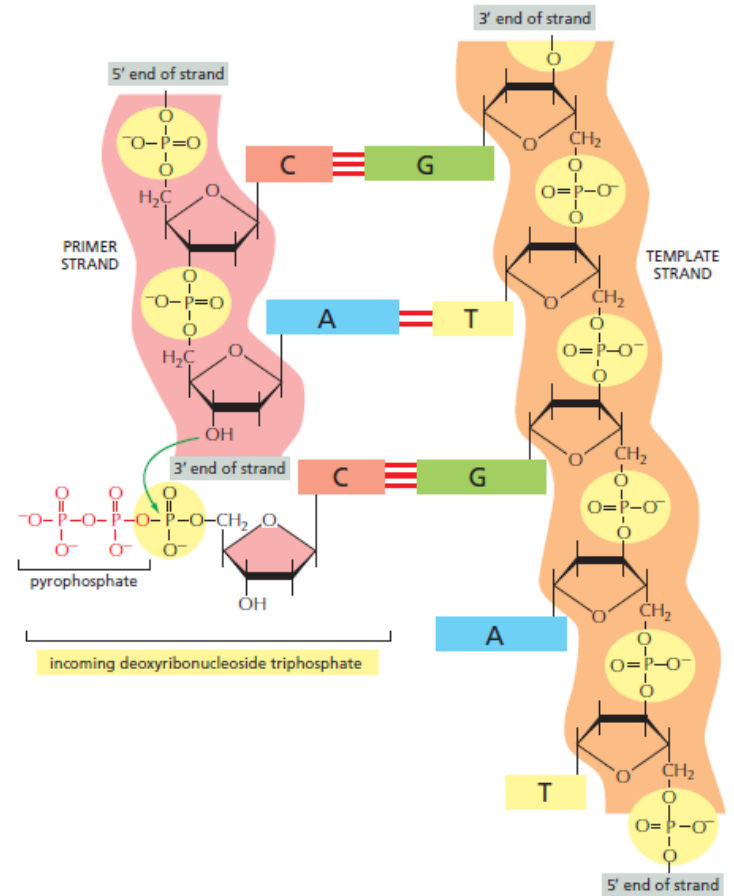
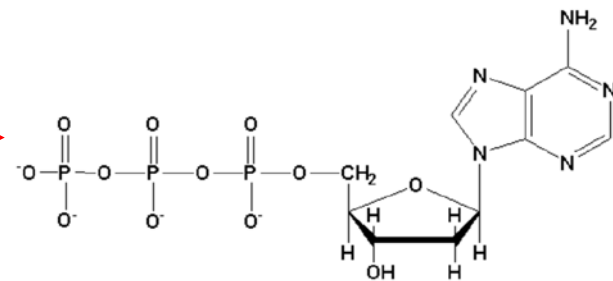
# Replicación del DNA

"Máquina de replicación" alta precisión, y alta velocidad (500-1000 nucleótidos por segundo)



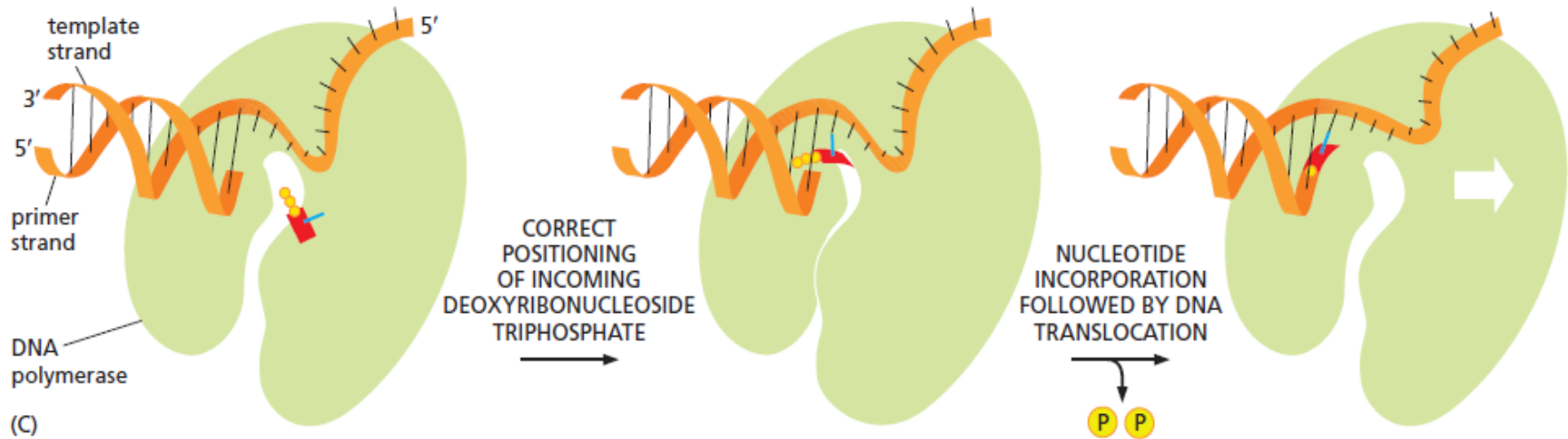
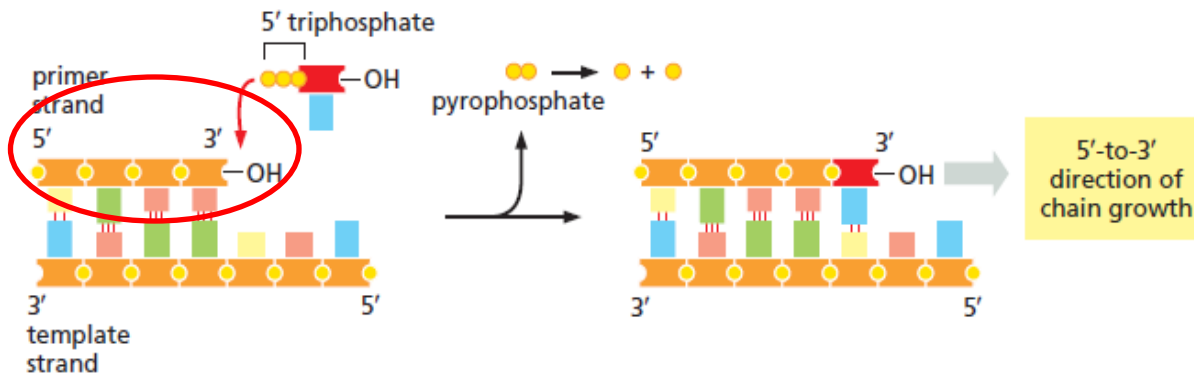
Este proceso requiere la separación de las hebras de la doble hélice de DNA en dos hebras molde

- **DNA molde**
- **Primer:** oligonucleótido de RNA
- **Desoxinucleósidos trifosfato:** dATP  
dTTP  
dGTP  
dCTP

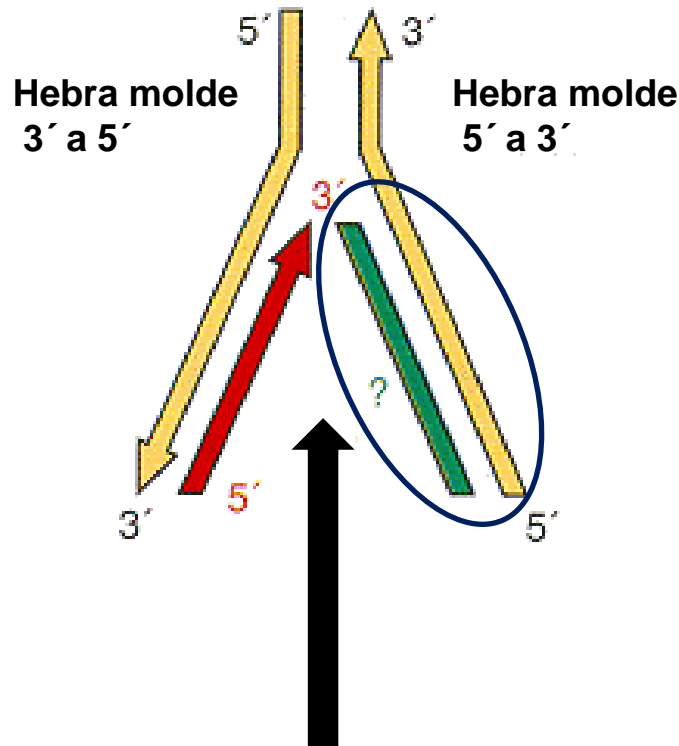


# Replicación en *E. coli*

## DNA polimerasa III RNA dependiente con actividad polimerasa 5' a 3'



# Replicación en la horquilla de replicación



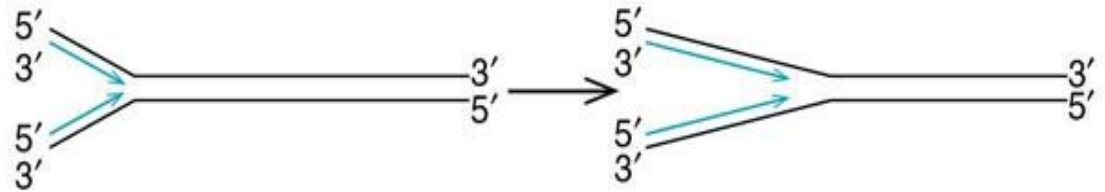
Dirección de la replicación

Sólo se había descubierto la DNA polimerasa con actividad 5'→3'

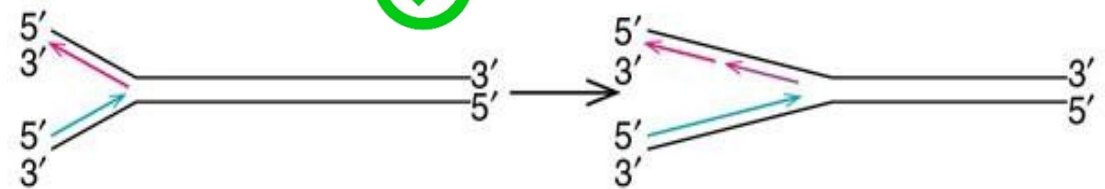
Plantea un problema para copiar la hebra que va en dirección 5' a 3'

## Modelos de replicación

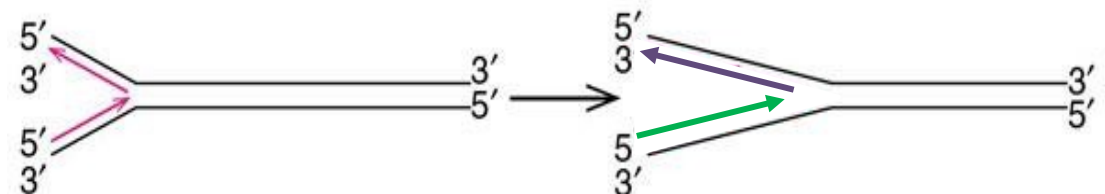
Continuuous: ❌ No hay polimerasas en dirección 3' a 5'



Semidiscontinuos: ✅



Discontinuos: ❌ La polimerasa no se aleja de la horquilla de replicación



# La replicación del DNA es semidiscontinua

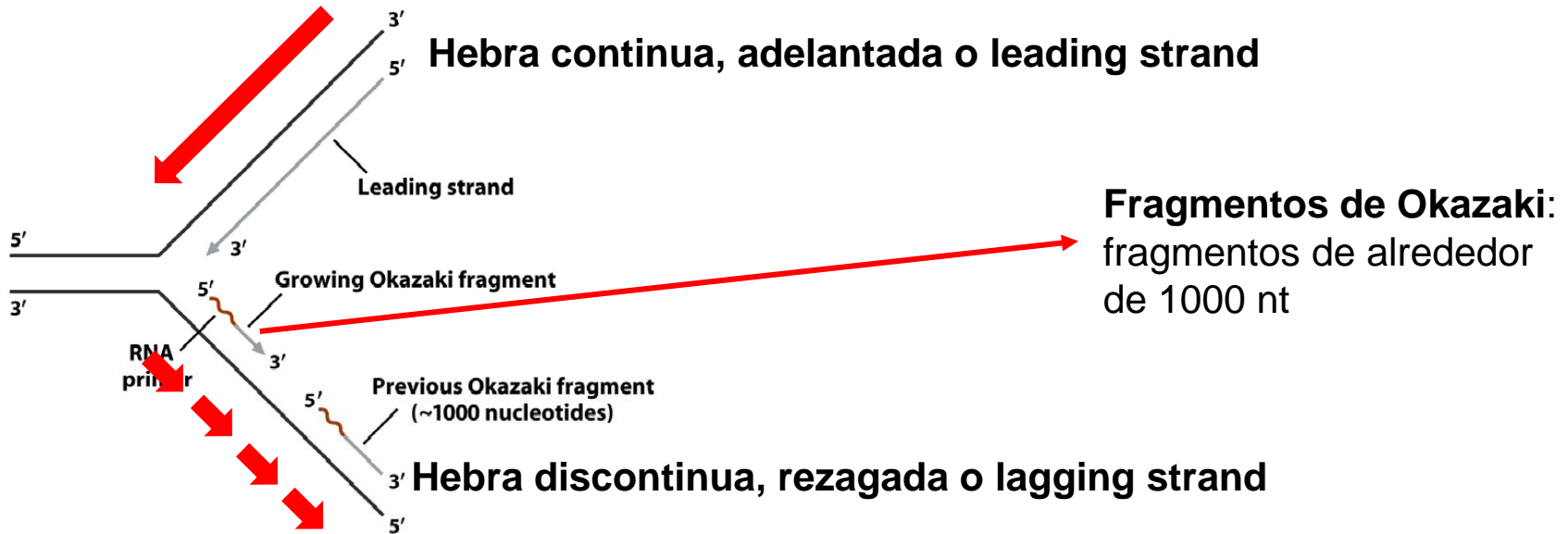
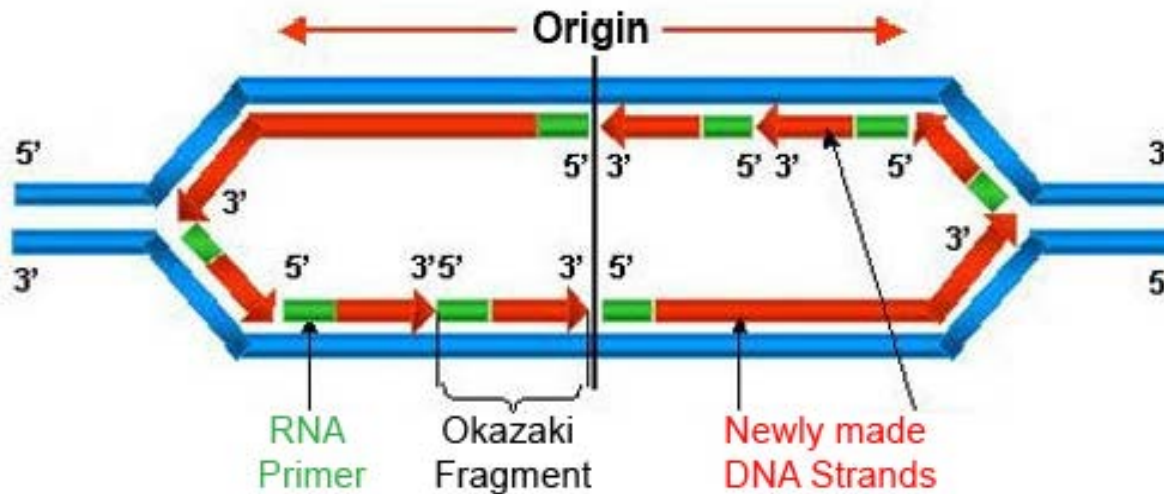


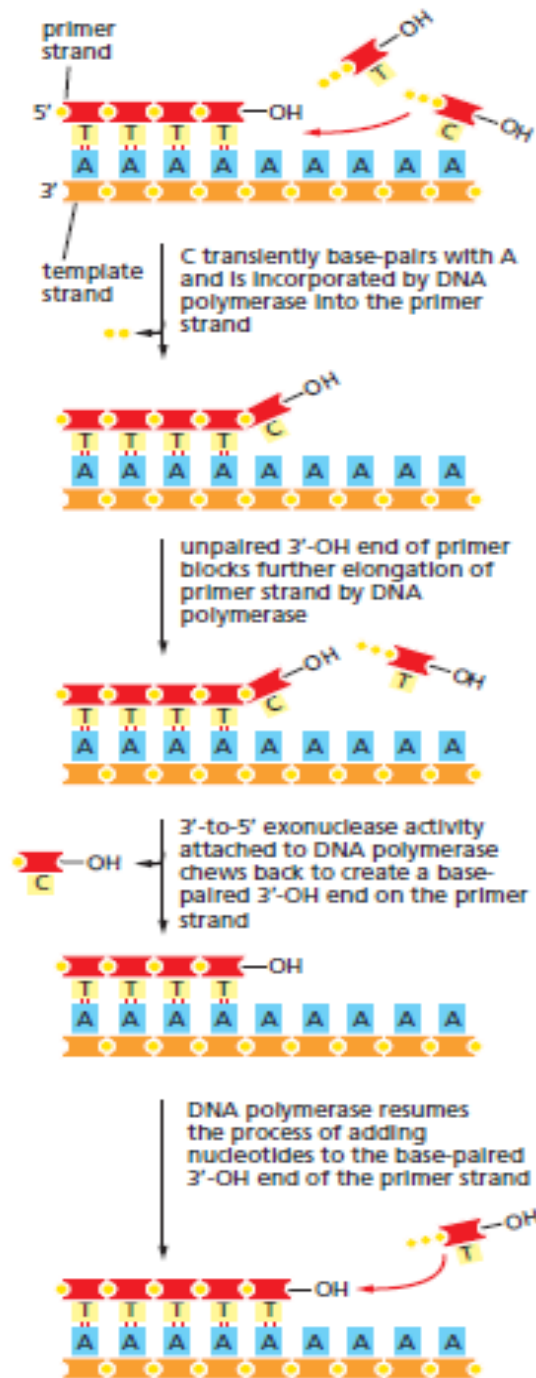
Figure 20-11 Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

## Replication Fork



**Replicación bidireccional del DNA**

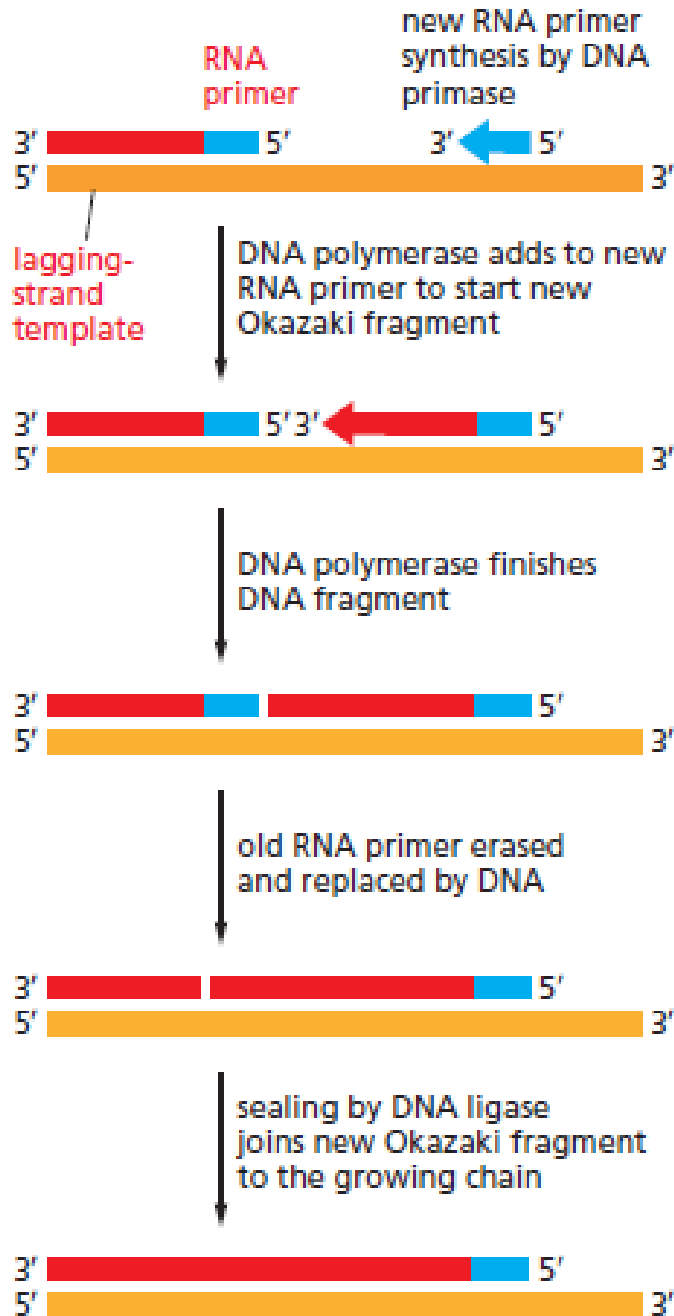
# Funciones de la DNA polimerasa III



## Actividad 3' a 5' exonucleasa: corrección de errores o 'proofreading'

- Nucleótidos que no aparecen son reconocidos como simple cadena y removidos
- Aumenta la fidelidad en la replicación
- **No es perfecta, base de la mutación**

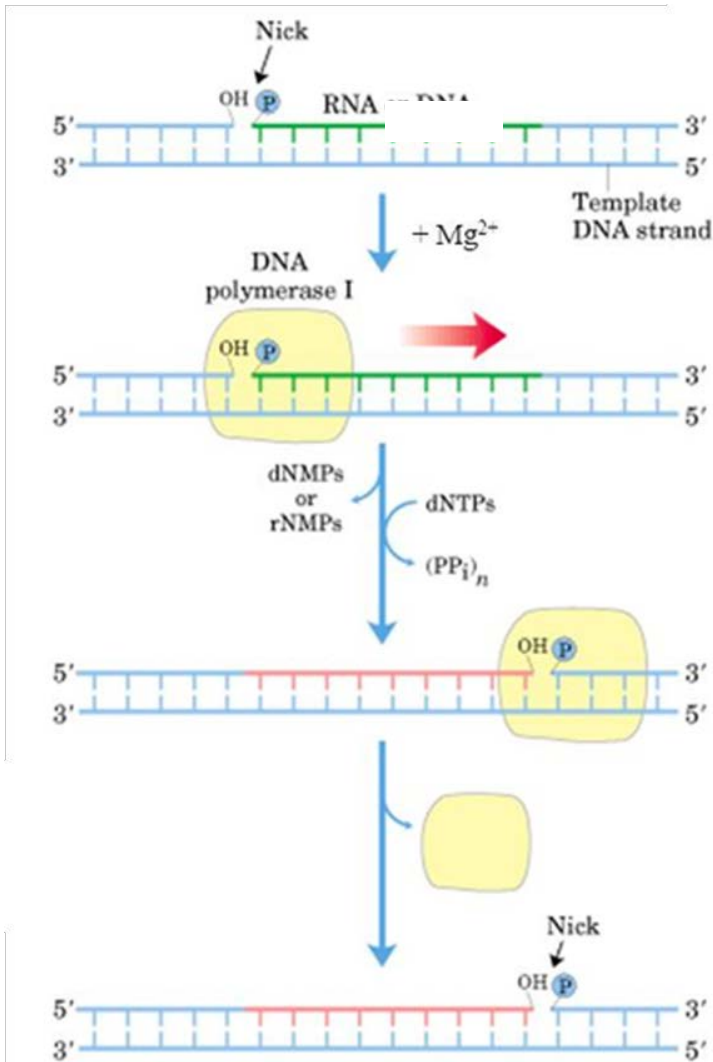
# Finalización de la hebra discontinua



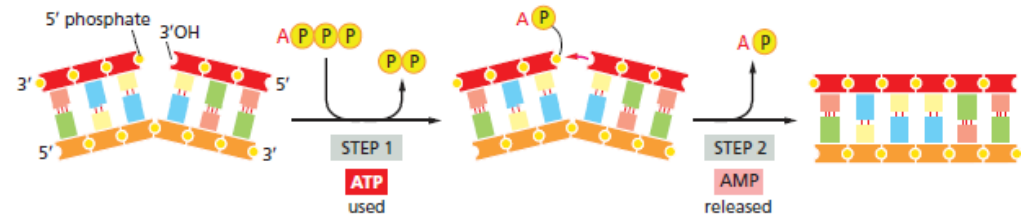
- Primers de RNA son reemplazados por DNA por la DNA Polimerasa I
- Los fragmentos de Okazaki son unidos por la enzima ligasa

# Finalización de la hebra discontinua

## Actividad 5' a 3' exonucleasa de la DNA Pol I: traslado de la muesca o Nick translation



## Ligasa



## DNA Pol I

Fue la primera descubierta en extractos de *E. coli* (Arthur Kornberg, Premio Nobel 1959)

Tiene 3 funciones:

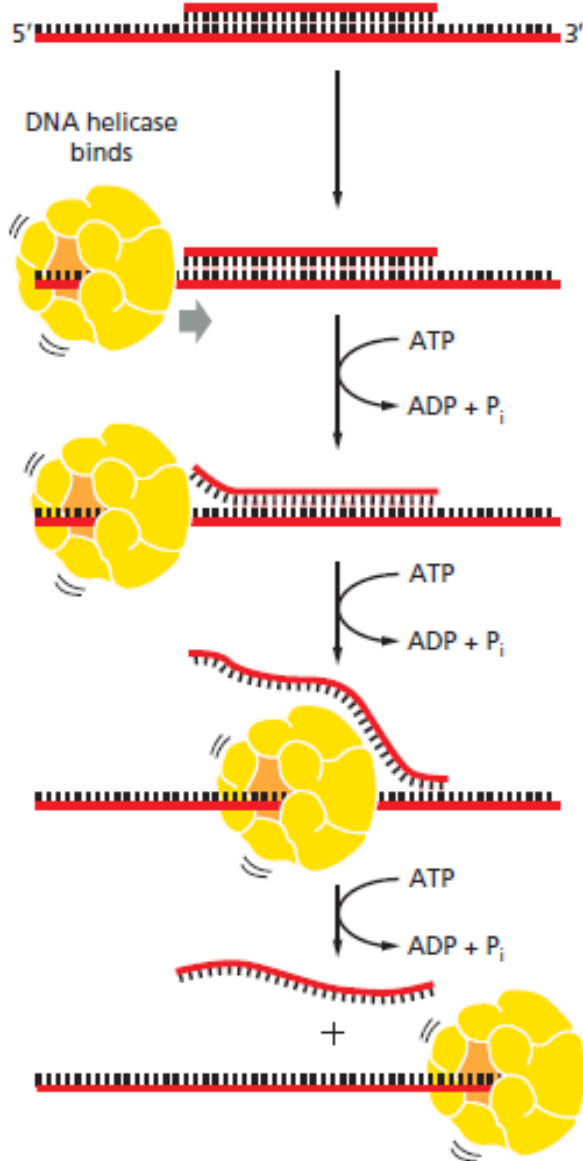
- Polimerasa 5' a 3'
- Exonucleasa 5' a 3'
- Exonucleasa 3' a 5'



# Maquinaria enzimática de la replicación

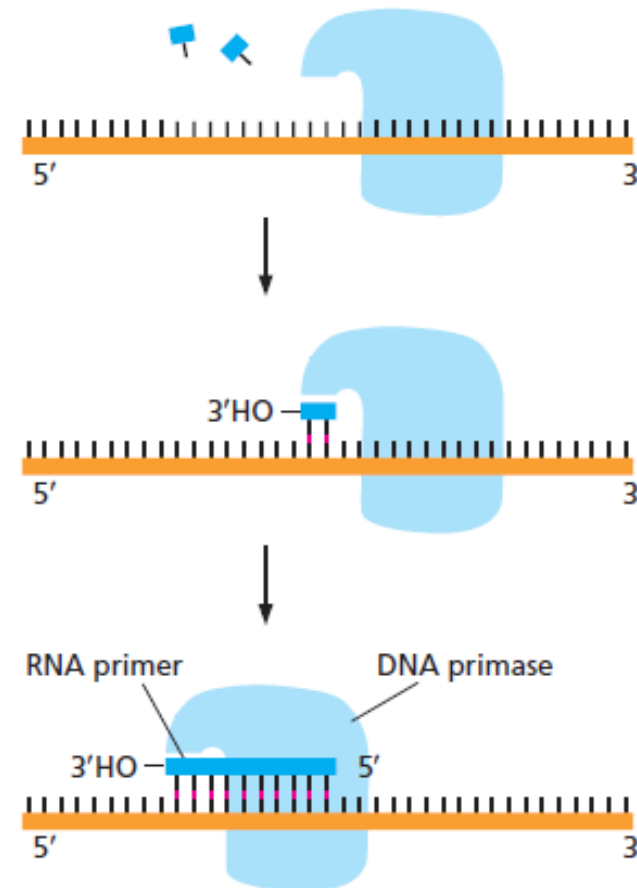
## Helicasa

Separación de las hebras de DNA  
Usan ATP (aporte de Energía)

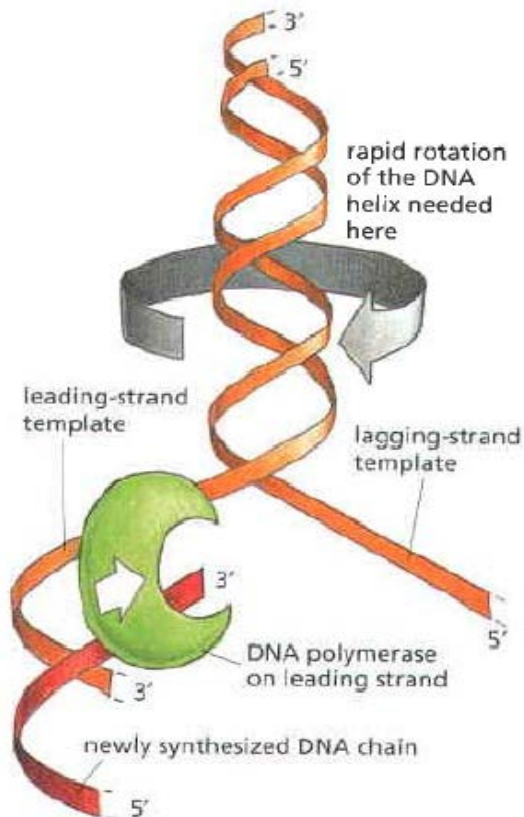
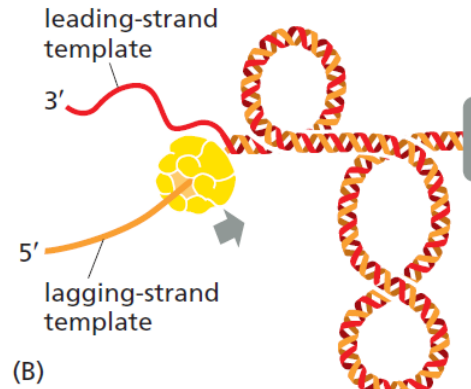
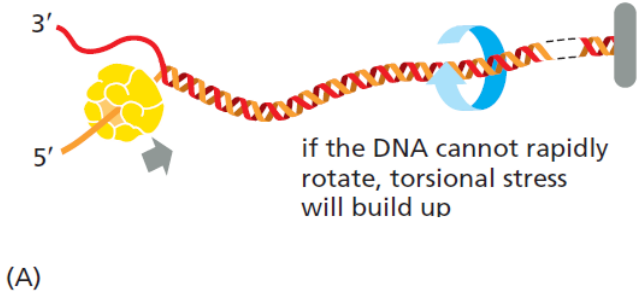


## DNA primasa

Síntesis de primer  
RNA Polimerasa DNA dependiente  
Sin actividad proofreading

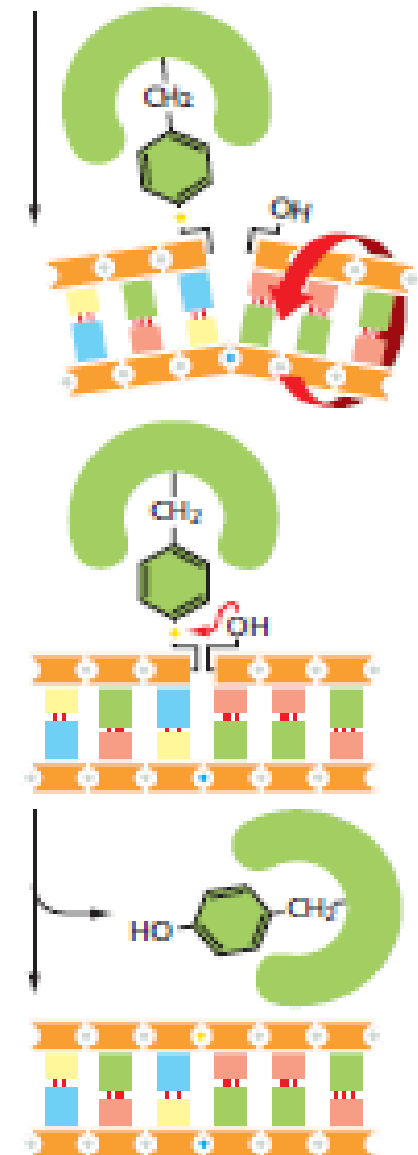


# Maquinaria enzimática de la replicación



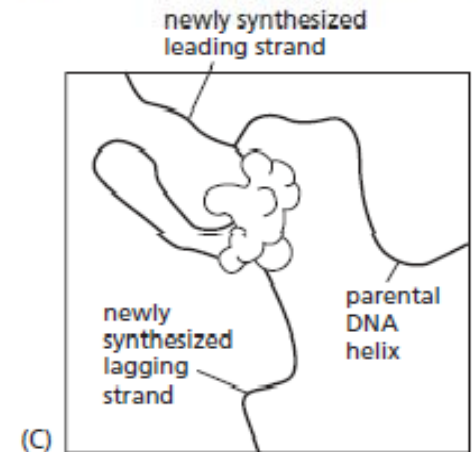
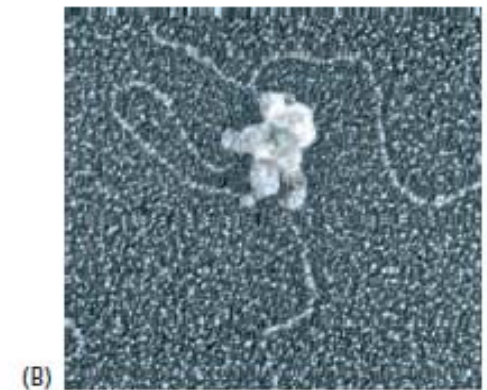
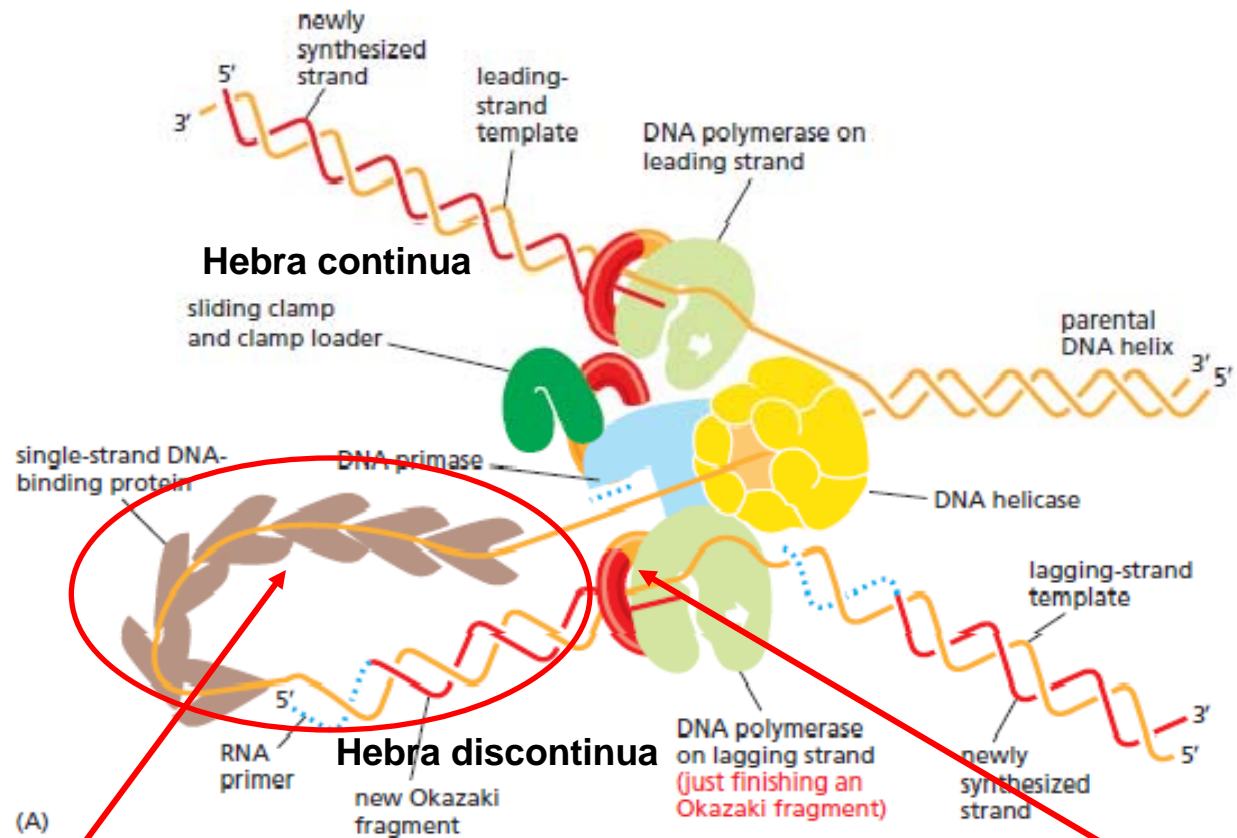
## Topoisomerasa

Generación de nicks para aliviar el superenrollamiento del DNA causado por la DNA polimerasa y la helicasa



# Replicación in vivo en la horquilla

La hebra rezagada (lagging) forma un lazo



**Proteína de unión a simple cadena (SSBP)**  
Estabiliza la cadena molde discontinua para ser copiada correctamente

**Proteína abrazadera o Clamp**  
Sujeta las subunidades polimerizadoras al DNA molde  
**Procesividad**

# DNA polimerasas

*E. coli* tiene 5 polimerasas

## ADN pol I

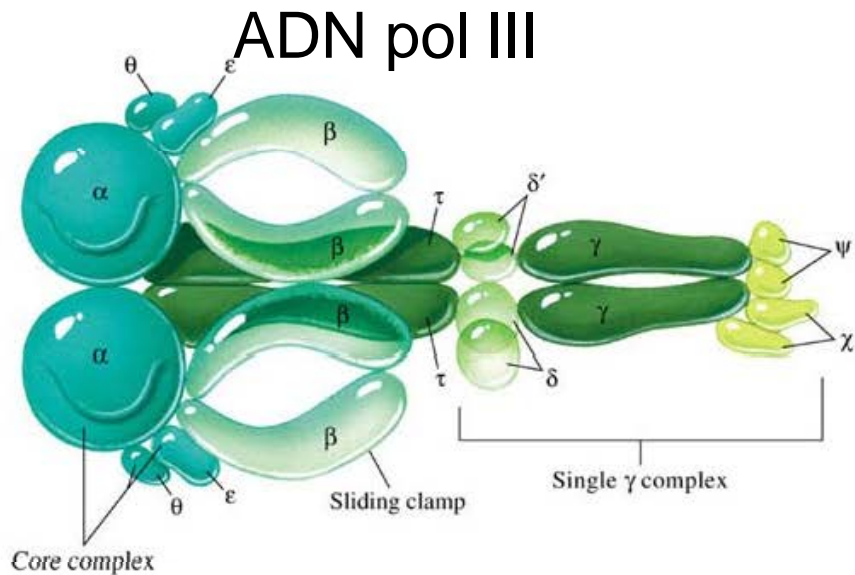
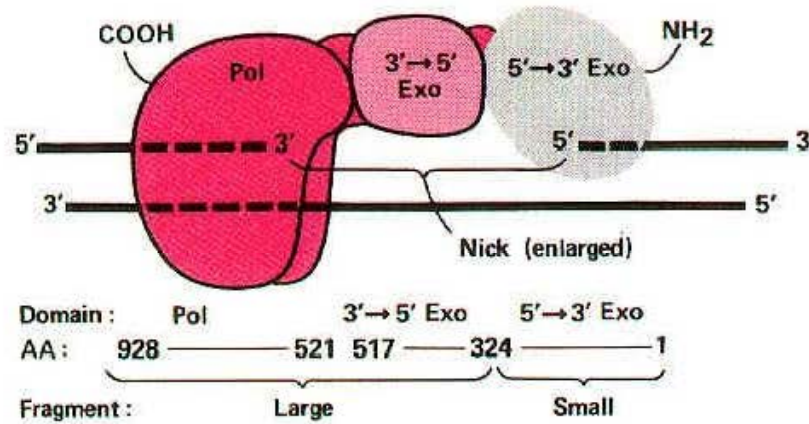


Table 25-2

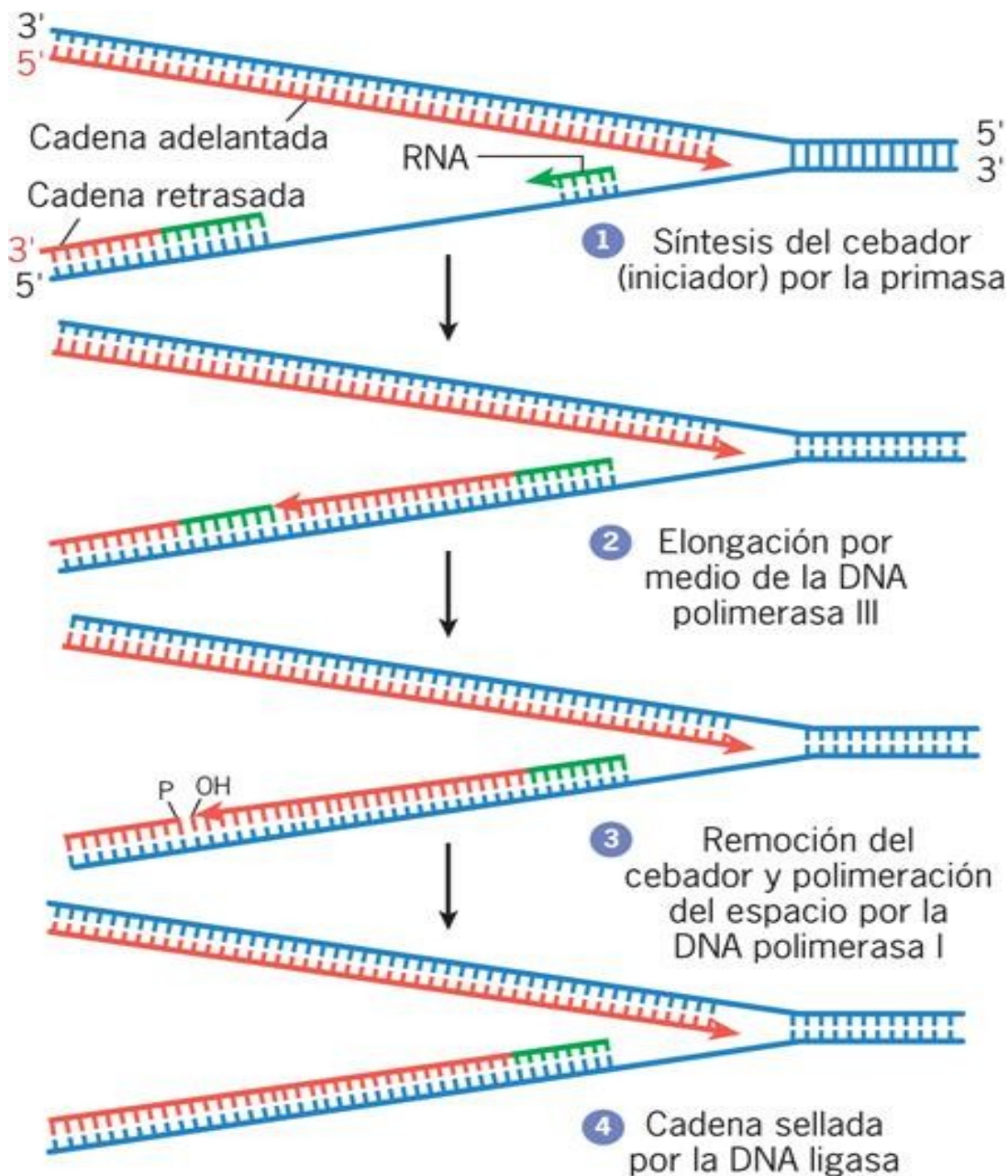
Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

Subunit	Number of subunits per holoenzyme	$M_r$ of subunit	Gene	Function of subunit
$\alpha$	2	132,000	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity 3'→5' Proofreading exonuclease
$\epsilon$	2	27,000	<i>dnaQ (mutD)</i>	
$\theta$	2	10,000	<i>holE</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization
$\tau$	2	71,000	<i>dnaX</i>	
$\gamma$	2	52,000	<i>dnaX*</i>	Clamp-loading complex that loads $\beta$ subunits on lagging strand at each Okazaki fragment
$\delta$	1	35,000	<i>holA</i>	
$\delta'$	1	33,000	<i>holB</i>	
$\chi$	1	15,000	<i>holC</i>	
$\psi$	1	12,000	<i>holD</i>	DNA clamp required for optimal processivity
$\beta$	4	37,000	<i>dnaN</i>	

\*The  $\gamma$  subunit is encoded by a portion of the gene for the  $\tau$  subunit, such that the amino-terminal 80% of the  $\gamma$  subunit has the same amino acid sequence as the  $\tau$  subunit. The  $\gamma$  subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (see Box 28-1) that leads to premature translational termination.



# Resumen



# Características de la Replicación

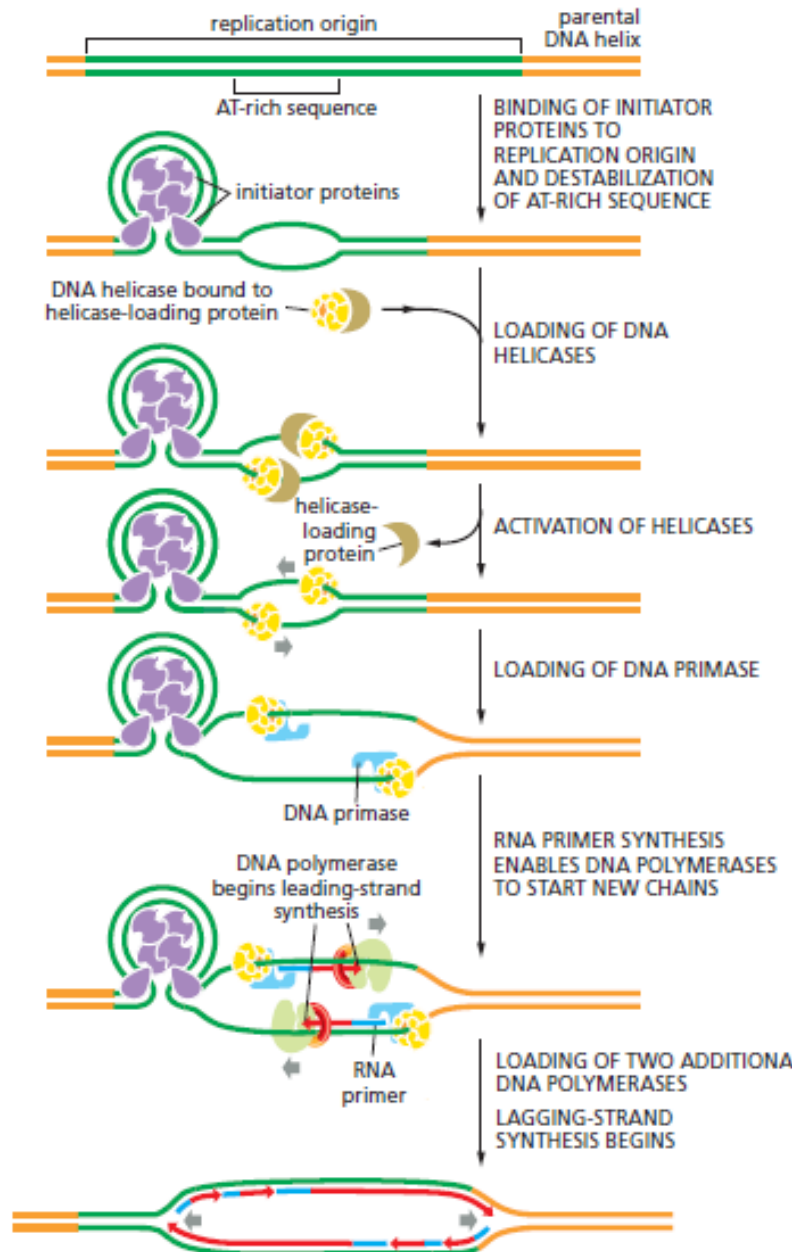
## Características comunes

- ✓ Semiconservativa
- ✓ Bidireccional
- ✓ Semidiscontinua
- ✓ La replicación en cada hebra ocurre siempre de 5' a 3'
- ✓ Las DNA polimerasas necesitan un primer y tienen actividad correctora de errores
- ✓ La RNA polimerasa no necesita primer y no tiene actividad correctora

## Procarionotas vs Eucariotas

- Origen único de replicación vs múltiples orígenes
- Origen de región definida vs. no definidos

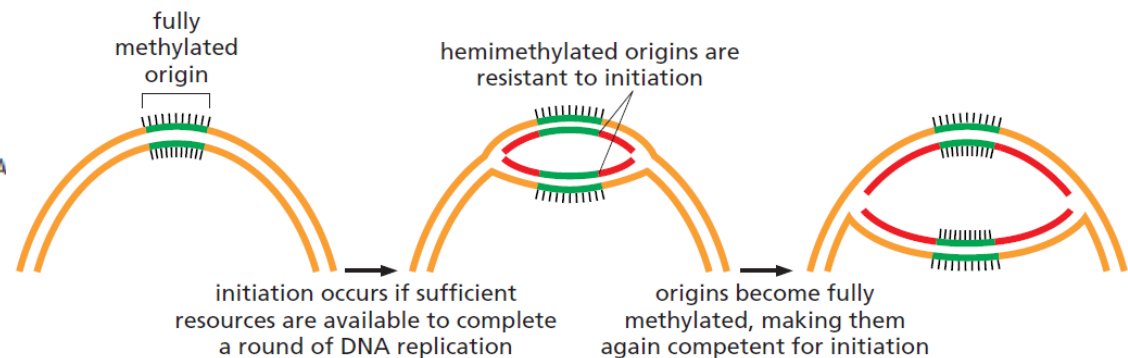
# Iniciación de la replicación en procariontas



- Regiones ricas en bases AT
- Disponibilidad de nutrientes
- Proteínas iniciadora DnaA unida a ATP → Bucle desestabilizador
- El complejo recluta a DnaC que a su vez recluta a la Helicasa

## Luego de la replicación

- El origen permanece hemimetilado → DnaA no puede unirse → **Solo una replicación por ciclo celular**
- El ATP es hidrolizado y DnaA no puede unirse del DNA
- DnaA es secuestrada por secuencias en el DNA

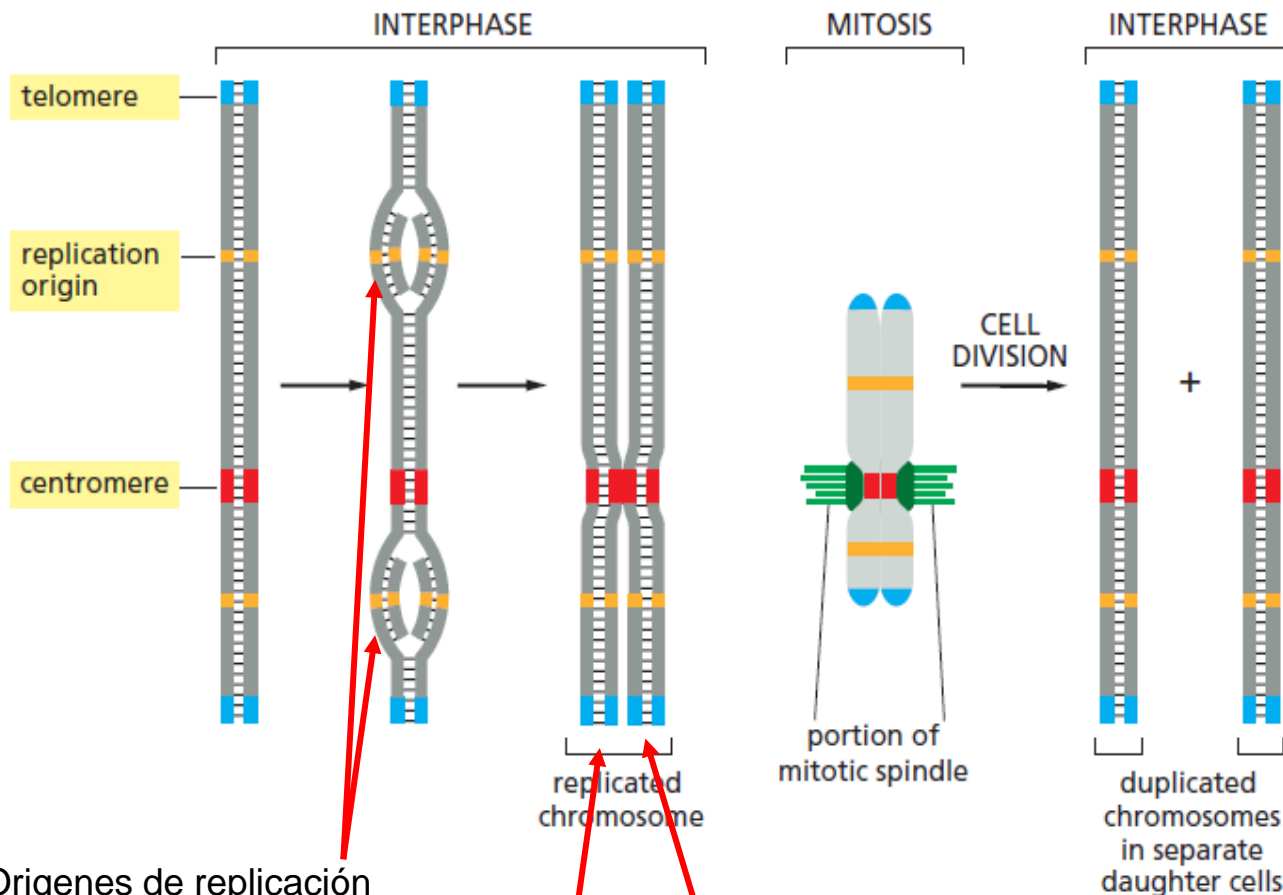




# Replicación en células eucariotas

## Cromosomas lineales

- Origen de replicación
- Centrómero
- Telómero



Orígenes de replicación  
30000-50000 por cromosoma

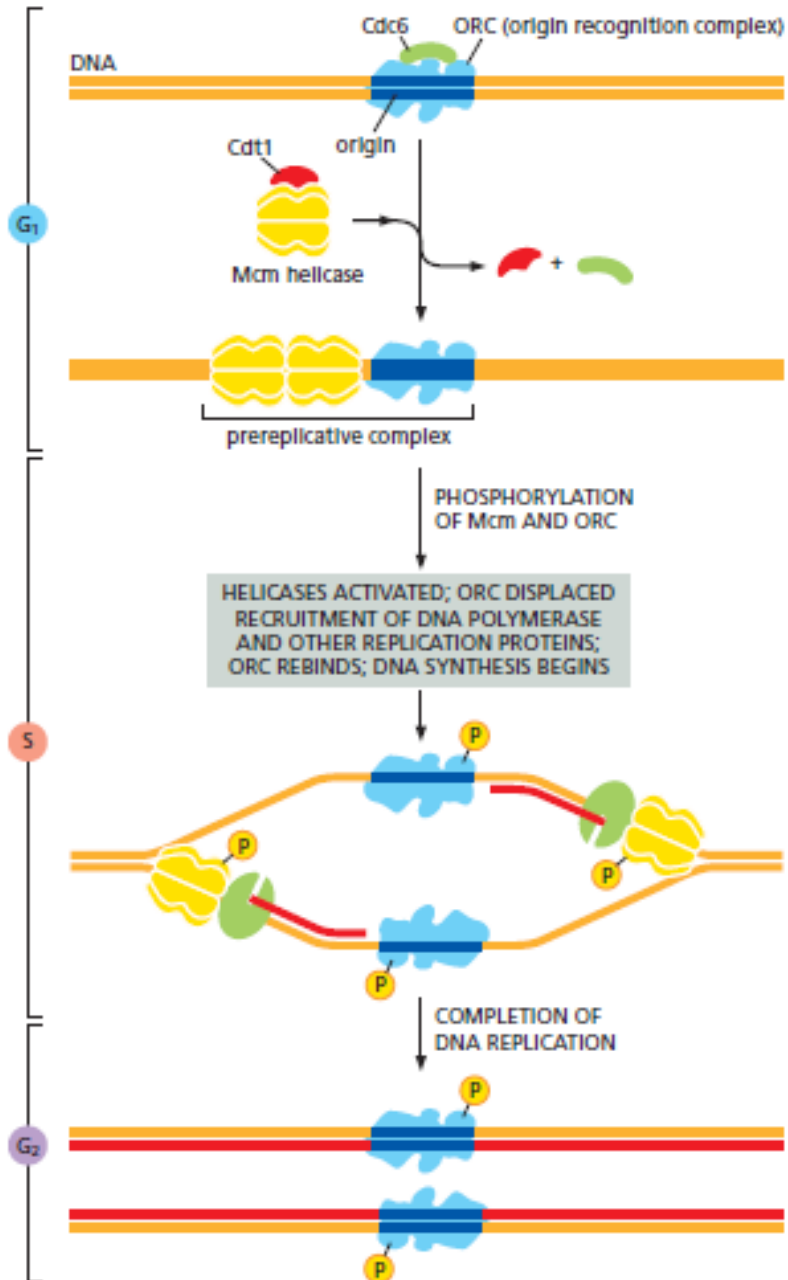
Cromátidas hermanas

Replicación solo durante la fase S del ciclo celular

Más lento que en bacterias

No todos los orígenes se usan y no todos se usan al mismo tiempo (estructura de la cromatina)

# Iniciación en células eucariotas



## Etapa prereplicativa

**ORC:** proteína iniciadora

Se une al origen de replicación cercana a regiones AT

La helicasa es reclutada

## Fase S

La helicasa es activada, se abre la burbuja de replicación

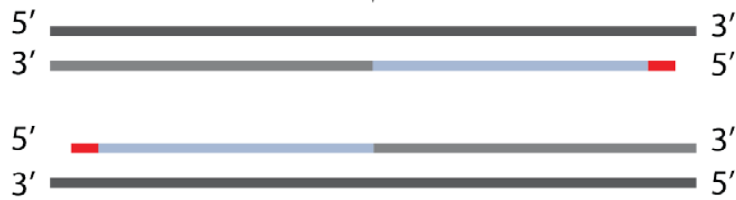
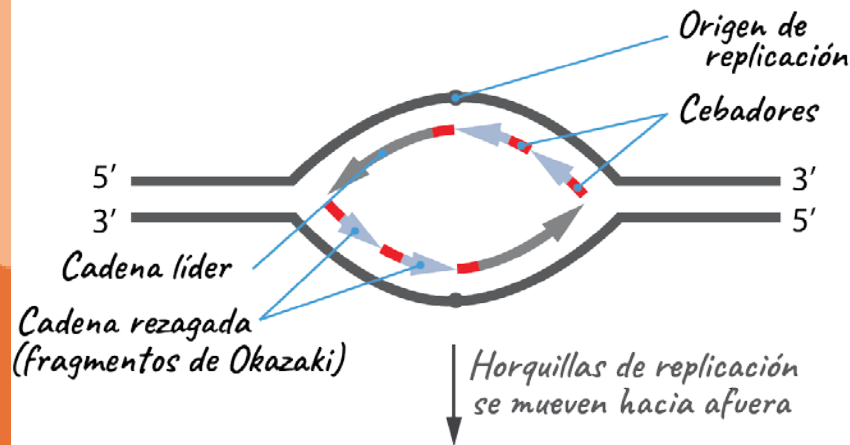
## Luego de la replicación

ORC permanece unido al DNA inactivado con un grupo fosfato adicional



Cada origen se usa una sola vez por ciclo, se asegura solo 1 replicación

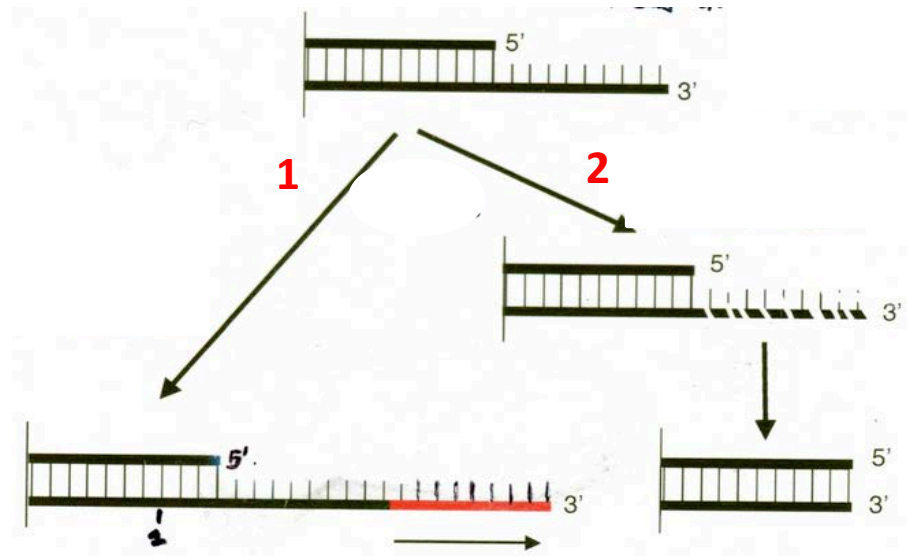
# Replicación en los telómeros



RNAsa H degrada los primers de los extremos

Los primers de los extremos de los cromosomas lineales son degradados y no pueden ser reemplazados por DNA

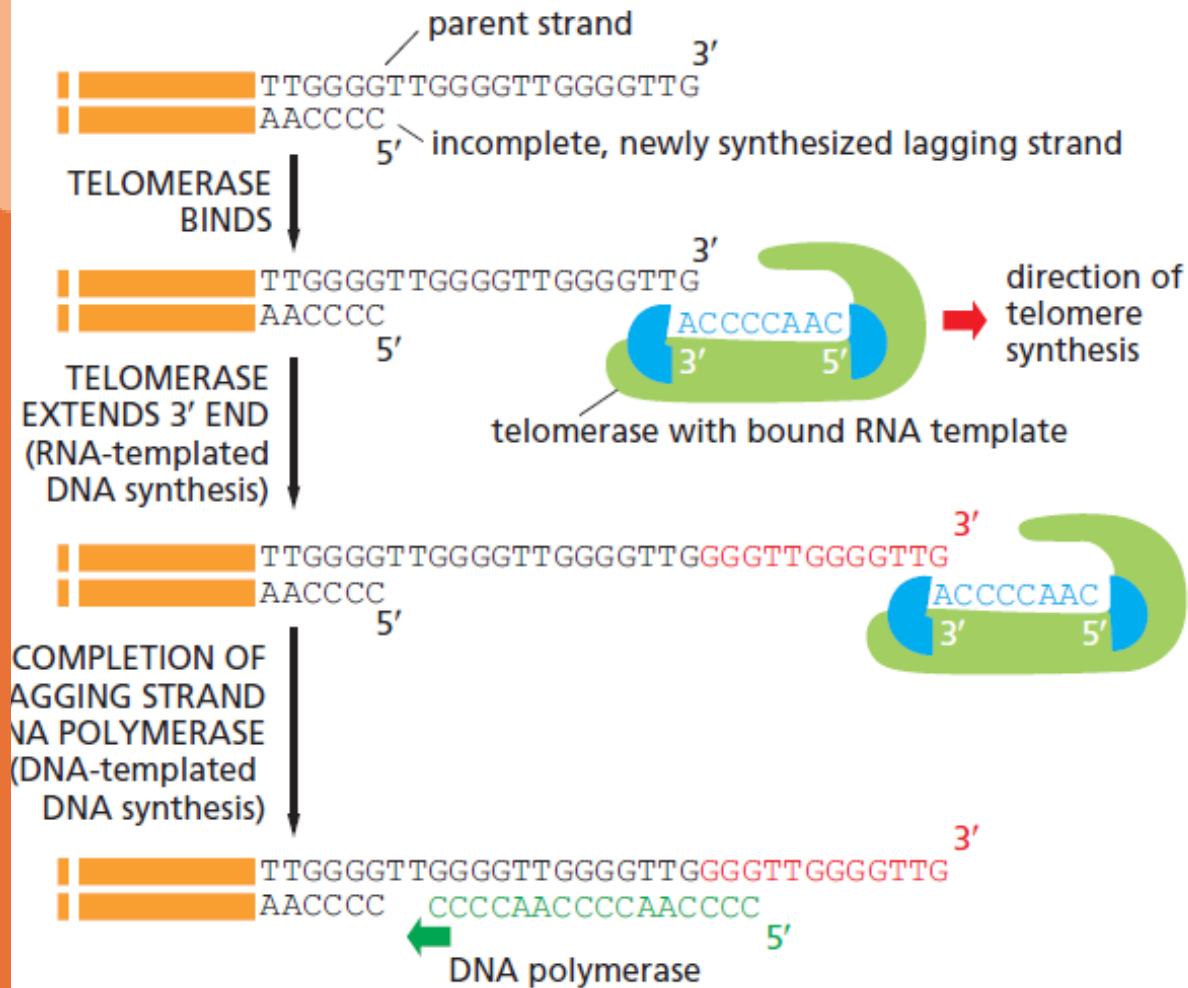
Dos caminos posibles



Los telómeros son alargados y la hebra se usa como molde para la síntesis de DNA doble cadena

El extremo sobresaliente es degradado

# Alargamiento de los telómeros



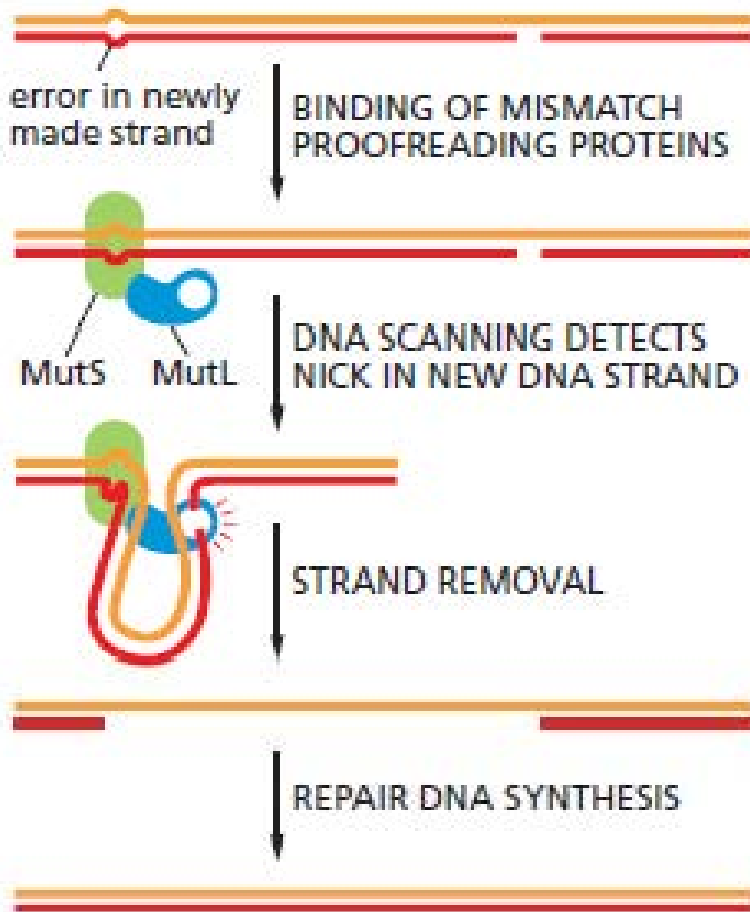
## Enzima telomerasa: proteínas + RNA → ribonucleoproteína

- El RNA reconoce una secuencia repetitiva de 6 nucleótidos presentes en los telómeros
- Sirve como molde para la síntesis de nuevo DNA
- El nuevo DNA es utilizado como primer y la DNA Pol puede completar la secuencia

Enzima telomerasa es una transcriptasa reversa

# Mantenimiento de la fidelidad replicativa

- Baja tasa de error de la Pol III
- Actividad exonucleasa 3' a 5'
- Sistema de corrección de errores de apareamiento (Strand-directed mismatch repair)



Actividad de reparación utilizando la hebra complementaria como molde

- MutS escanea el DNA en busca de distorsiones
- MutH y MutL se encargan de generar un nick y degradar la hebra nueva

TABLE 5-1 The Three Steps That Give Rise to High-Fidelity DNA Synthesis

Replication step	Errors per nucleotide added
5' → 3' polymerization	1 in 10 <sup>5</sup>
3' → 5' exonucleolytic proofreading	1 in 10 <sup>2</sup>
Strand-directed mismatch repair	1 in 10 <sup>3</sup>
Combined	1 in 10 <sup>10</sup>

The third step, strand-directed mismatch repair, is described later in this chapter. For the polymerization step, "errors per nucleotide added" describes the probability that an incorrect nucleotide will be added to the growing chain. For the other two steps, "errors per nucleotide added" describes the probability that an error will not be corrected. Each step therefore reduces the chance of a final error by the factor shown.

# Defectos en la maquinaria de replicación y reparación del DNA

**TABLE 5–2 Some Inherited Human Syndromes with Defects in DNA Repair**

Name	Phenotype	Enzyme or process affected
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	Colon cancer	Mismatch repair
Xeroderma pigmentosum (XP) groups A–G	Skin cancer, UV sensitivity, neurological abnormalities	Nucleotide excision repair
Cockayne syndrome	UV sensitivity; developmental abnormalities	Coupling of nucleotide excision repair to transcription
XP variant	UV sensitivity, skin cancer	Translesion synthesis by DNA polymerase $\nu$
Ataxia telangiectasia (AT)	Leukemia, lymphoma, $\gamma$ -ray sensitivity, genome instability	ATM protein, a protein kinase activated by double-strand breaks
BRCA1	Breast and ovarian cancer	Repair by homologous recombination
BRCA2	Breast, ovarian, and prostate cancer	Repair by homologous recombination
Werner syndrome	Premature aging, cancer at several sites, genome instability	Accessory 3'-exonuclease and DNA helicase used in repair
Bloom syndrome	Cancer at several sites, stunted growth, genome instability	DNA helicase needed for recombination
Fanconi anemia groups A–G	Congenital abnormalities, leukemia, genome instability	DNA interstrand cross-link repair
46 BR patient	Hypersensitivity to DNA-damaging agents, genome instability	DNA ligase I

# Análisis del DNA en el laboratorio

## Visualización

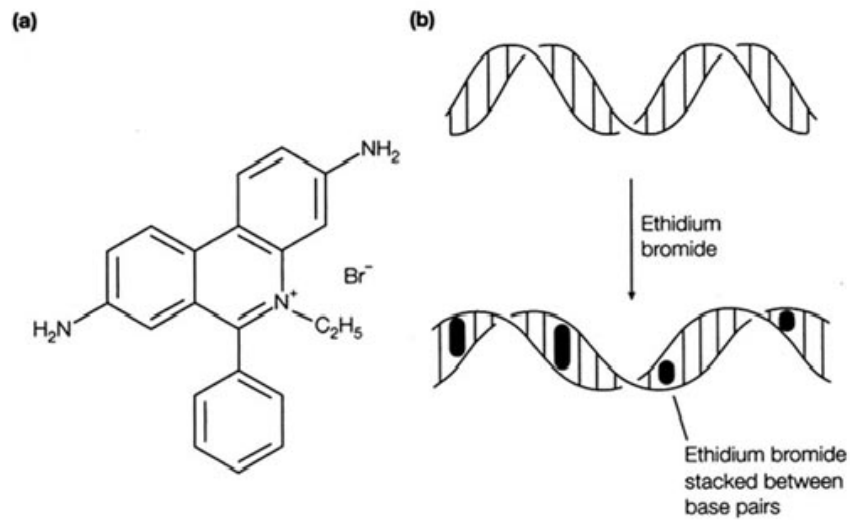
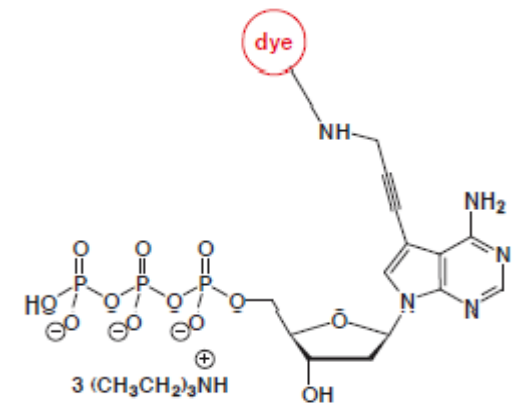
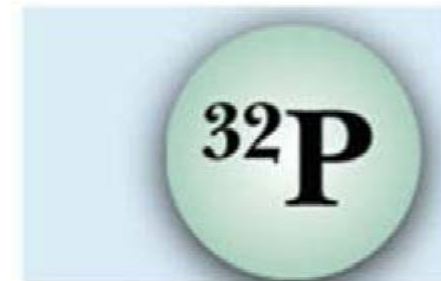


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

1) Colorante intercalante (unión no covalente)



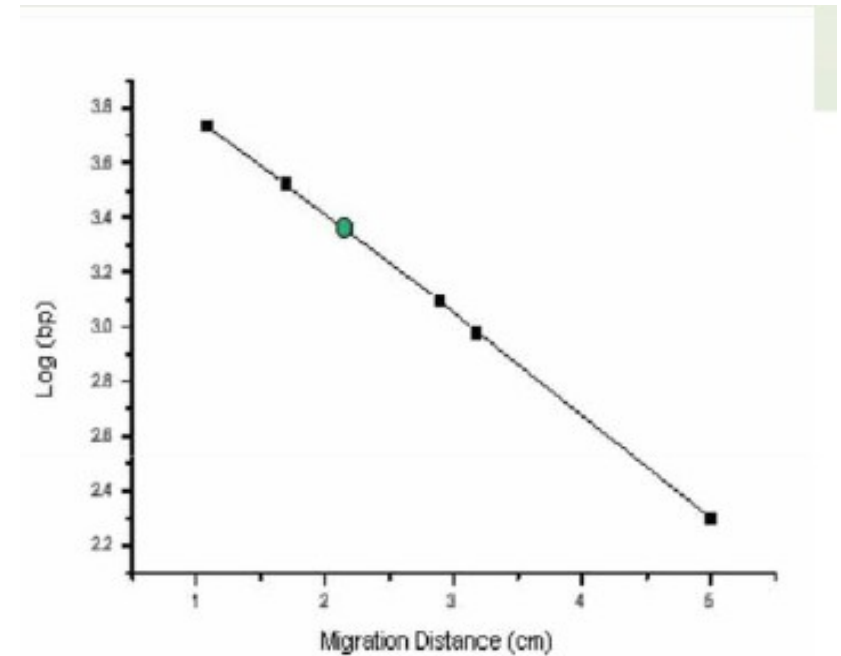
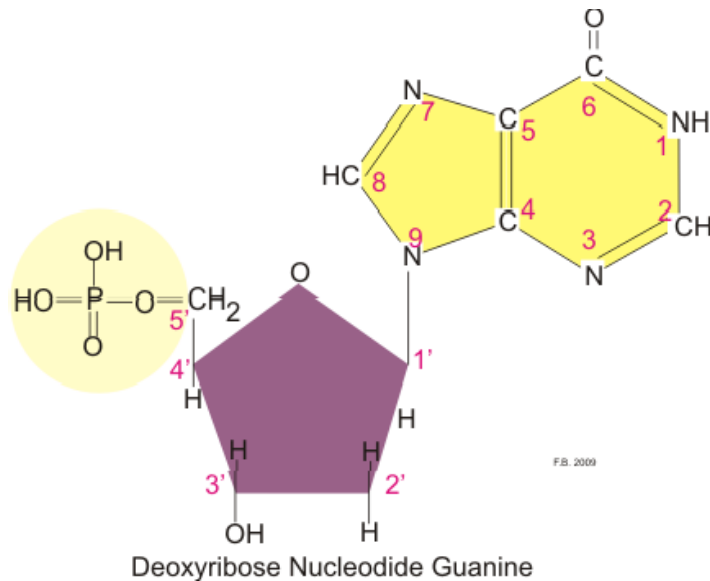
2) Unión covalente a un fluoróforo



3) Marcación con fósforo radiactivo



# Electroforesis en gel de agarosa

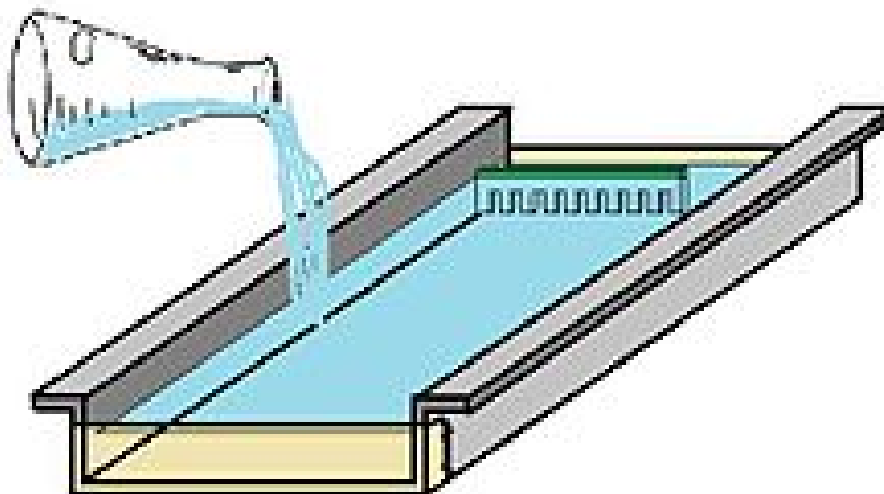


El DNA por ser ácido está cargado negativamente al pH del interior de una célula (7)

Las moléculas de DNA se mueven hacia el **polo positivo** de un campo eléctrico a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño

# Electroforesis en gel de agarosa

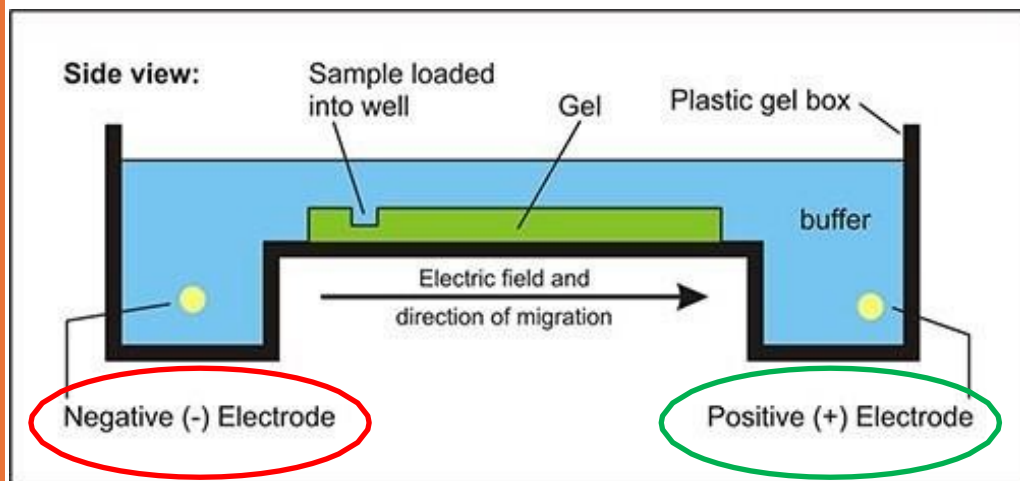
Se arma el gel con un peine para crear pocillos



En cada pocillo se carga la muestra a analizar



Corrida aplicando el campo eléctrico

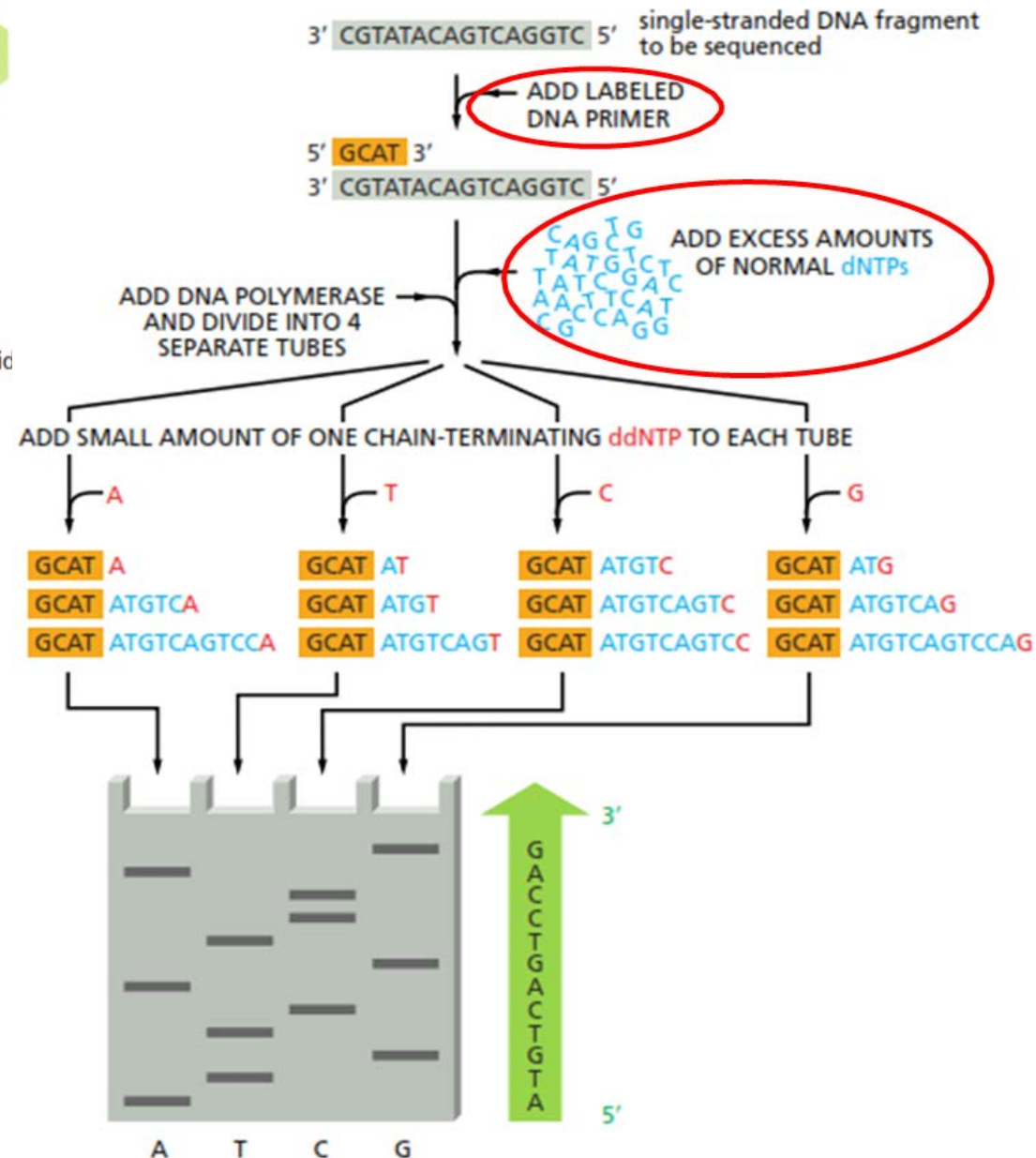
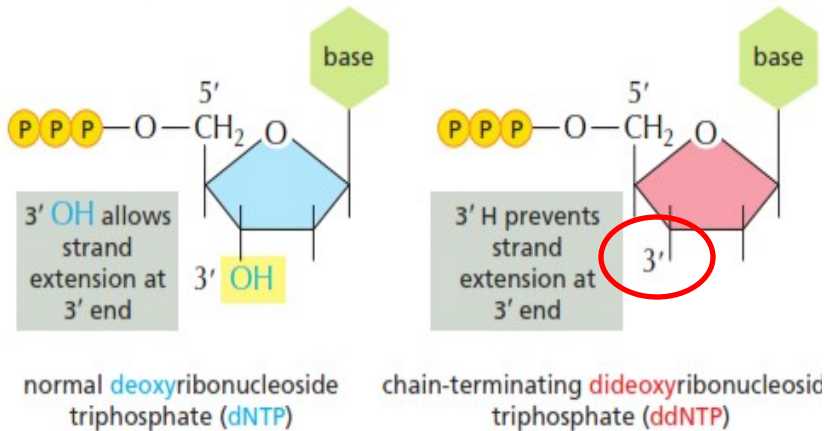


Visualización con bromuro de etidio



# Secuenciación del ADN-Método de Sanger

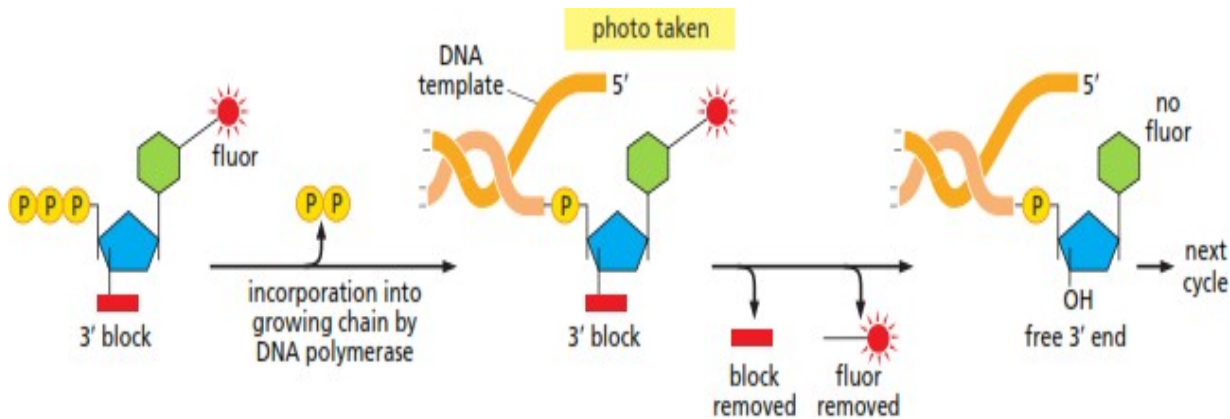
## DNA SEQUENCING



- Dideoxinucleótidos, terminan la reacción al ser incorporados
- Se realiza la reacción con uno solo de los ddNTPs por tubo
- Se obtienen todos los fragmentos posibles
- Cada tubo se analiza en electroforesis en gel

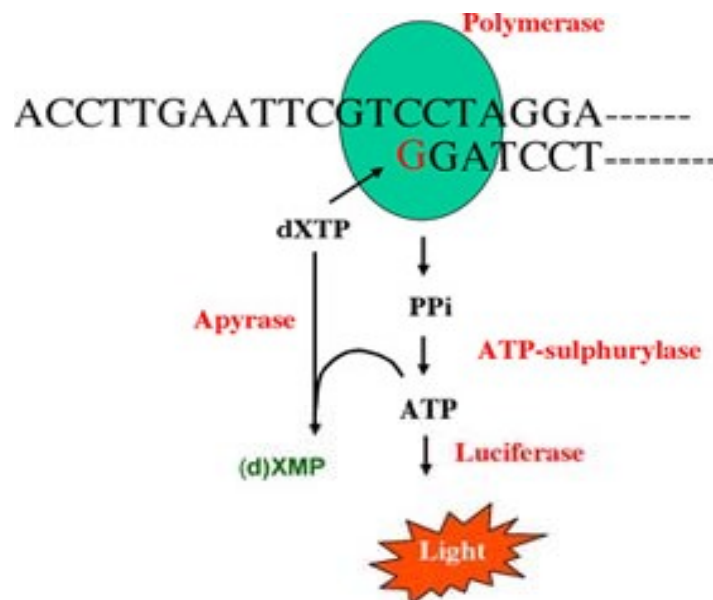
# Secuenciación masiva o de nueva generación

Analizan miles de fragmentos al mismo tiempo



## Illumina

- Nucleótidos con fluoróforos agregados al mismo tiempo
- Permiten elongación



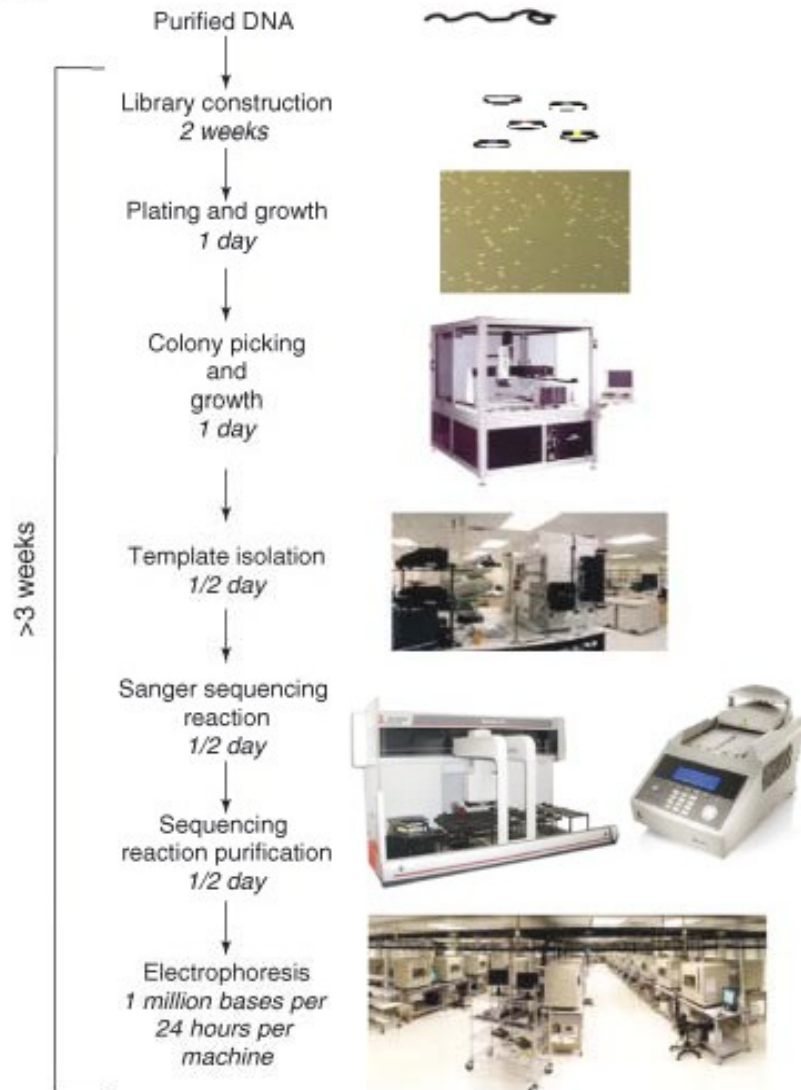
## Pirosecuenciación

- Nucleótidos no modificados agregados de a 1
- Agregan enzimas y reactivos que generan una señal de luz cuando son incorporados

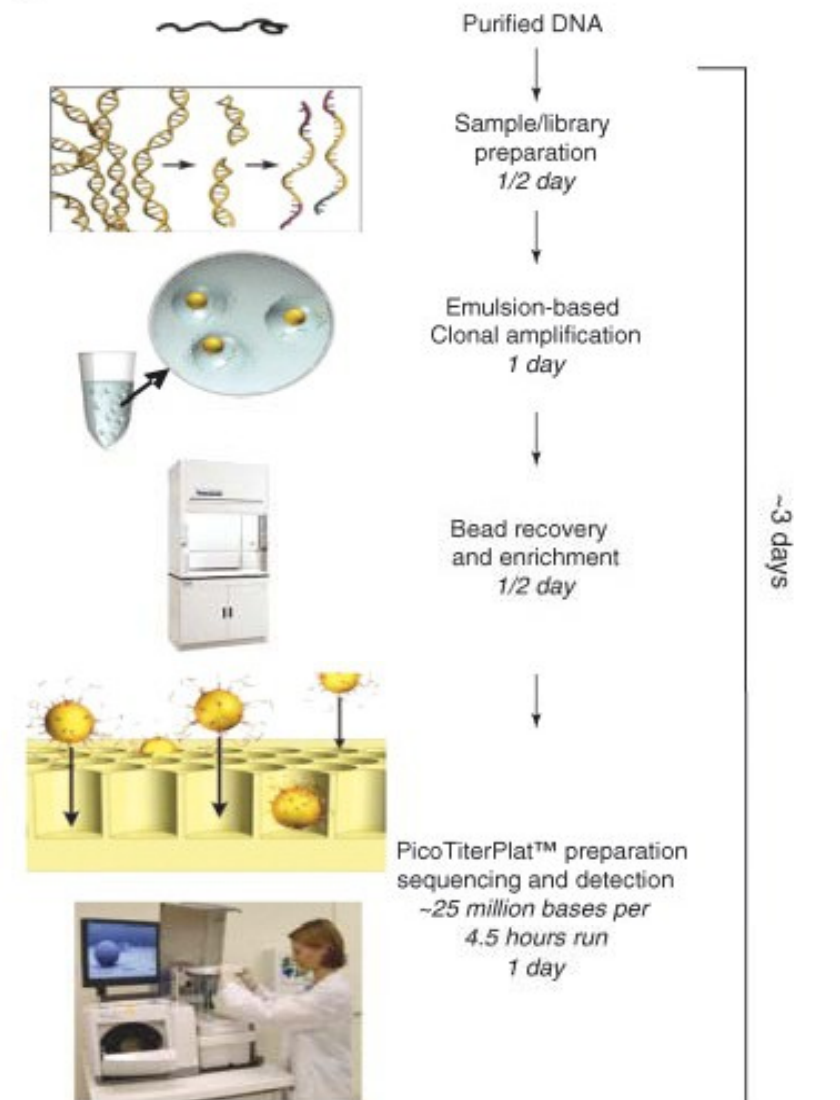
# Secuenciación masiva o de nueva generación



(a)



(b)

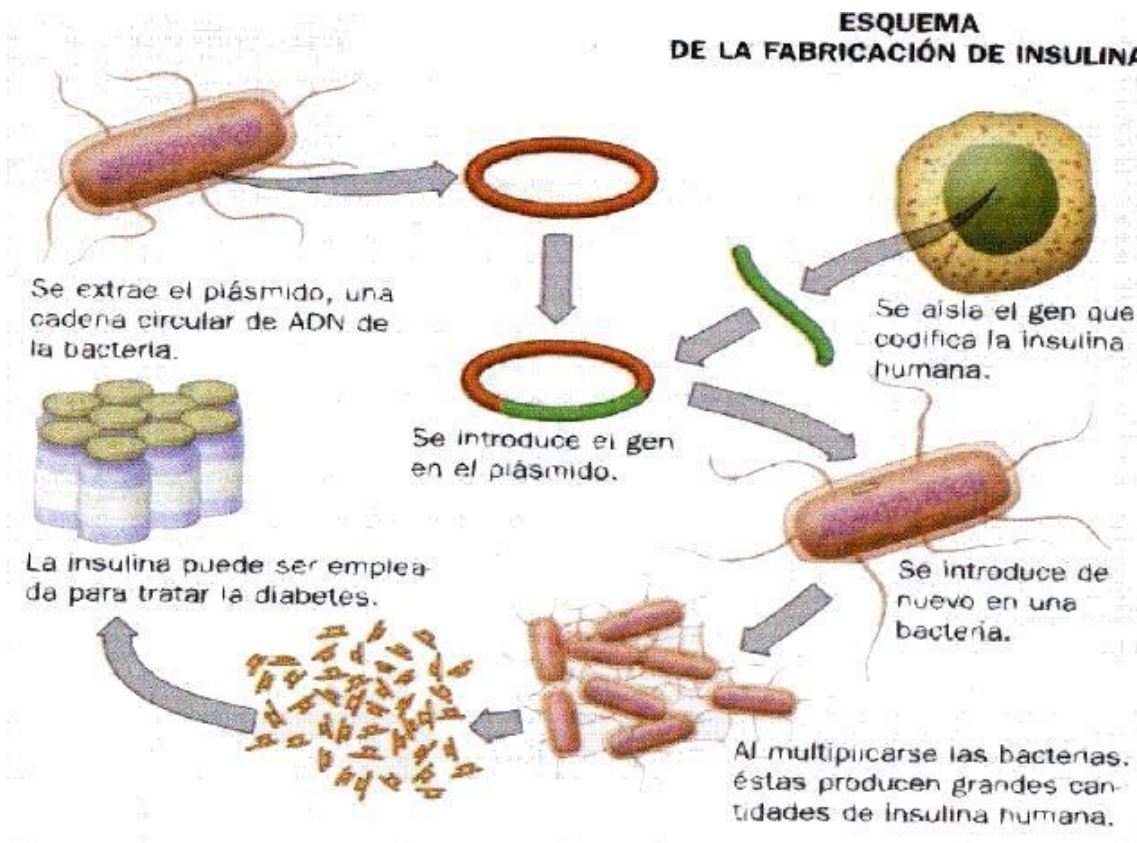




# Clonado de genes

- Si quiero estudiar o vender una proteína necesito mucha cantidad, pero la mayoría de las proteínas son poco abundantes

- Si aislo el gen que codifica la proteína que quiero expresar, puedo usar bacterias (o levaduras, etc.) como biofábricas para producirla en grandes cantidades



Dos herramientas simplificaron mucho el clonado de genes:

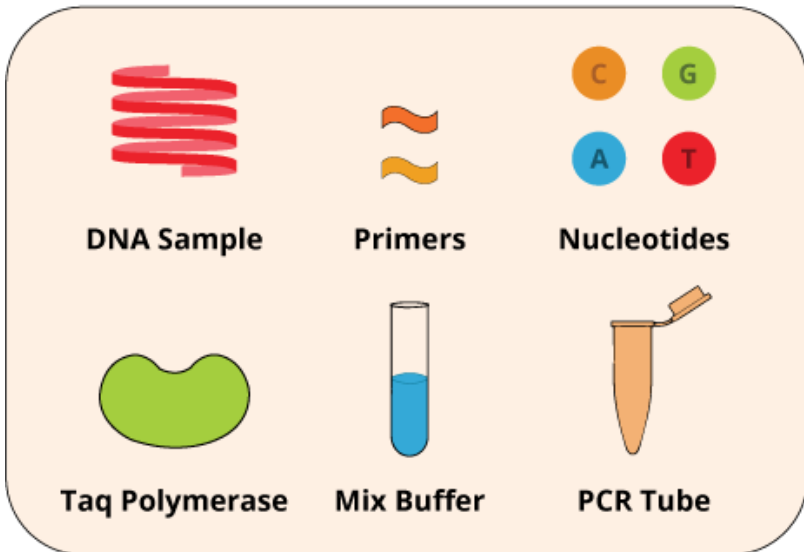
- La disponibilidad de secuencias de genomas completos
- La amplificación por PCR



# PCR: polymerase chain reaction

Kari Mullis (Nobel 1993)

## PCR Components



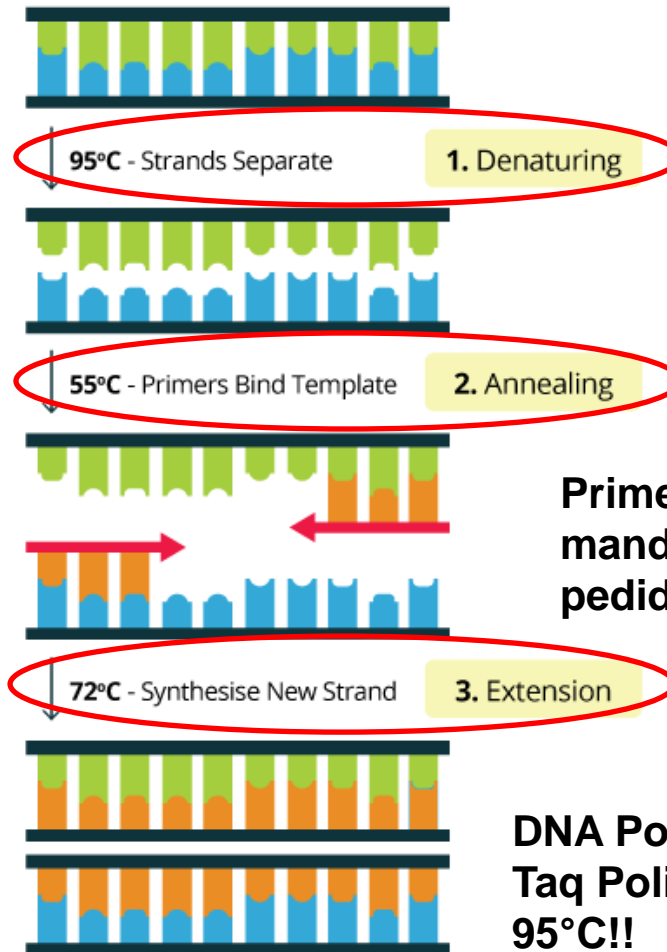
Thermal Cycler



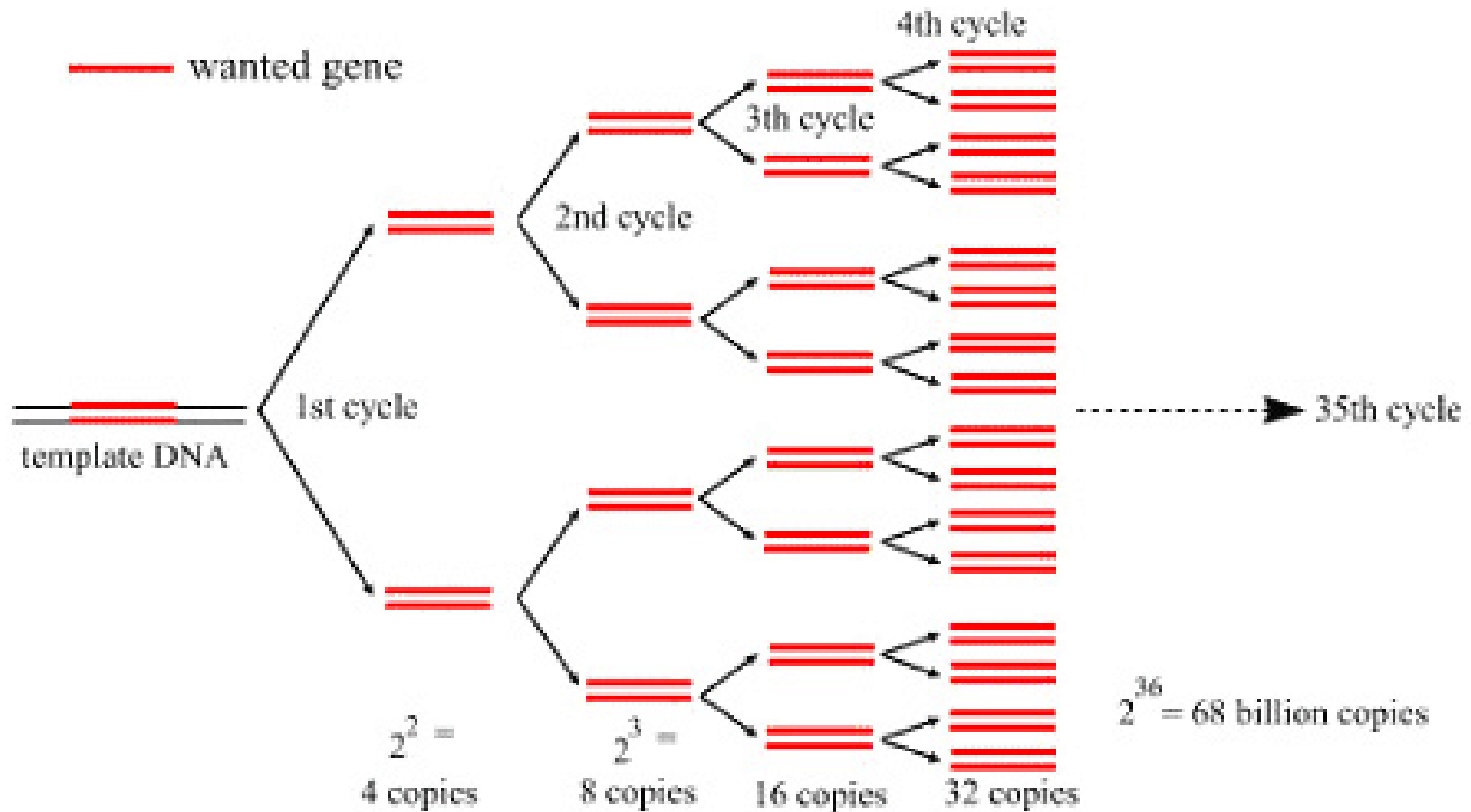
PCR Cycle

Ciclador o pecerrera

## PCR Process (One Cycle)



# Amplificación exponencial

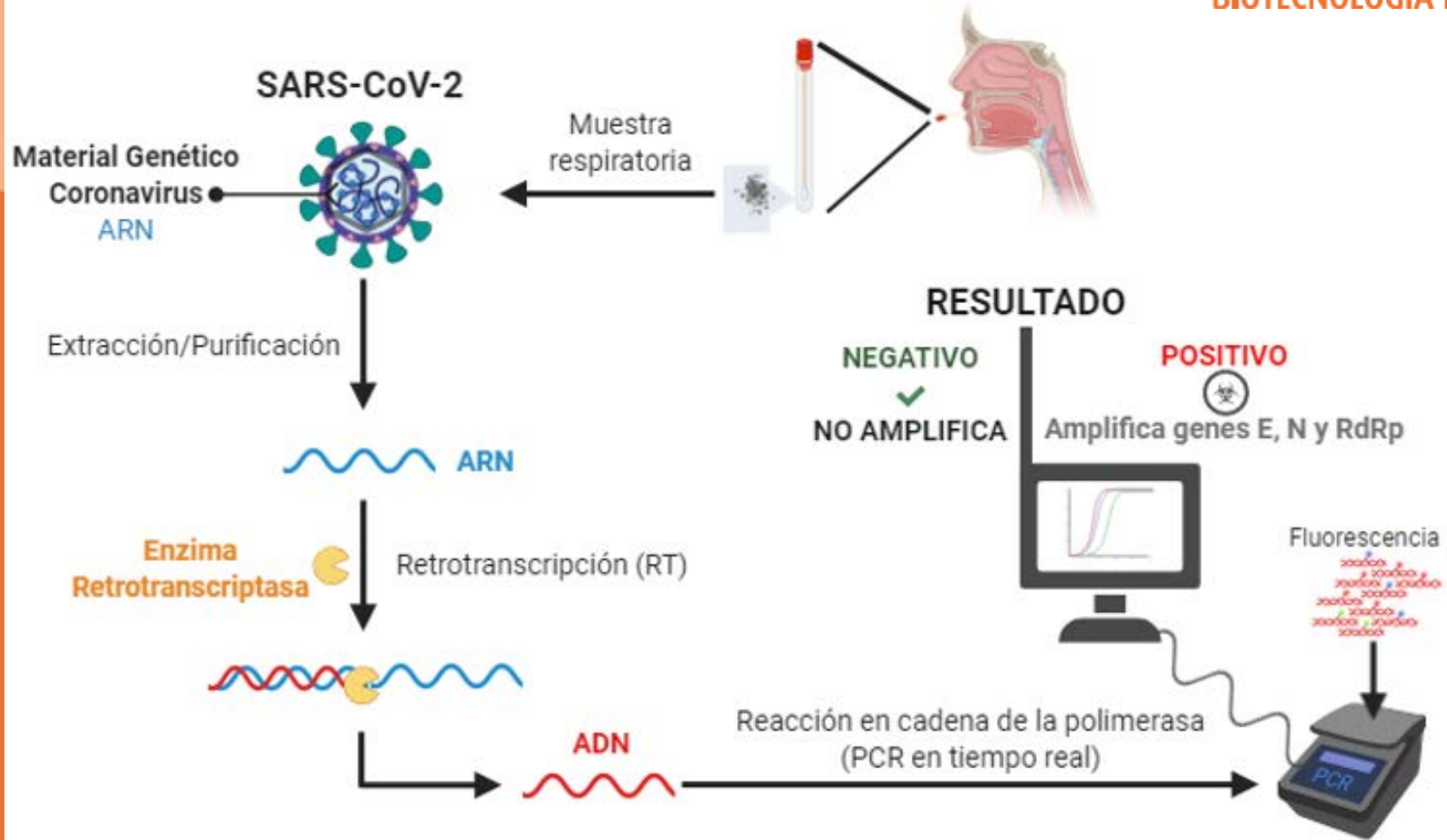


En cada ciclo el DNA doble cadena se desnatura y los primers vuelven a aparearse a su secuencia complementaria

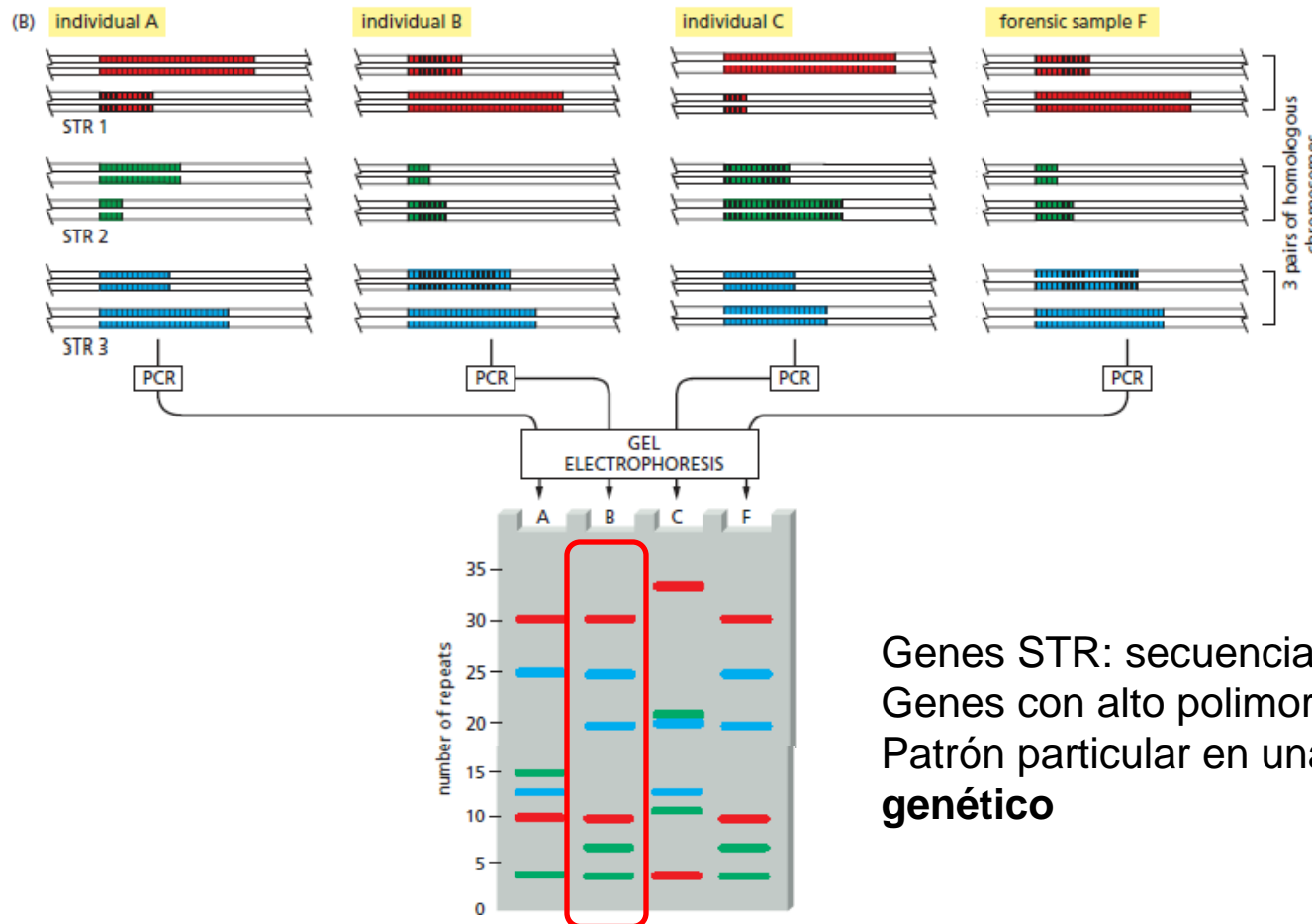
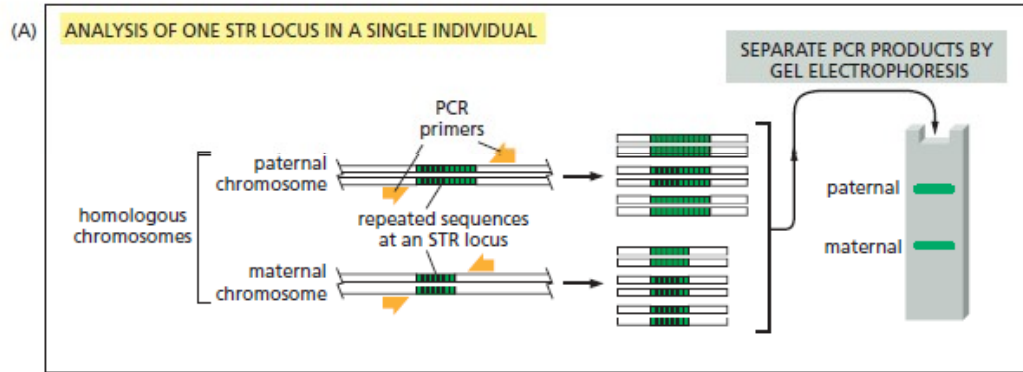
## Algunas aplicaciones de la PCR

- Diagnóstico de presencia de virus, bacterias, parásitos
- Diagnóstico de mutaciones que causan enfermedades hereditarias (pre-natal, pre-sintomático, portadores)
- Tipificación genética de tumores malignos para diseñar su mejor tratamiento
- Filiación, paternidad
- Medicina forense, identificación de sospechosos de crímenes
- Identificación de pedigrees de reproductores
- Determinación de contaminación de alimentos
- Determinación de predisposiciones genéticas a enfermedades que no lo son
- Clonado de genes y mutagénesis
- Epigenética

# RT-PCR: reverse transcriptase-PCR



# Análisis de filiación por PCR



Genes STR: secuencias simples repetitivas  
Genes con alto polimorfismo  
Patrón particular en una electroforesis → **Perfil genético**








[http://www.inbiohw.com.ar/productos\\_equipamiento.html](http://www.inbiohw.com.ar/productos_equipamiento.html)

Formularios de los servicios: secuenciación y genotipificación de ácidos nucleicos (ADN) por electroforesis capilar

Desde aquí podrá bajar los archivos adjuntos que permiten solicitar el servicio de secuenciación y genotipificación de ADN del Instituto de Biotecnología.

Descargar archivos de este documento:

-  [UGB RE 4.4-01 Solicitud de Análisis Secuenciación por Electroforesis Capilar.xls](#) (application/vnd.ms-excel - 47Kb)
-  [UGB RE 5 10-01 Autorización para la entrega de Informes.xls](#) (application/vnd.ms-excel - 17Kb)
-  [UGB-RE-4 4 02 Solicitud de Análisis Genotipificación.xls](#) (application/vnd.ms-excel - 33Kb)
-  [UGB-DC-4.4 02 Unidad Genómica Condiciones de analisis.pdf](#) (PDF - 417Kb)
-  [UGB-DC-4.4 01 Unidad Genómica Aranceles Vigentes.pdf](#) (PDF - 226Kb)

<http://inta.gob.ar/documentos/formularios-del-servicio-secuenciacion-de-acidos-nucleicos-adn-por-electroforesis-capilar/view>



CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN  
**BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

**genbiotech**



<http://www.genbiotech.com.ar>



Institucional I + D NGS Novedades Contacto RRHH

Roche 454 Genome Sequencer FLX+



El sistema de secuenciación 454 Genome Sequencer FLX+ produce más de 1 millón de lecturas de alta calidad por corrida con longitudes promedio de entre 800-1000 bp. La flexibilidad del sistema y el amplio abanico de aplicaciones posibles incluyen la secuenciación de novo de genomas y transcriptomas completos, la re-secuenciación de genomas y regiones diana-blanco y la caracterización metagenómica de muestras complejas, entre otras.

<http://www.indear.com/roche-454-genome-sequencer-flx/>