



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Química

Curso de Genética y Biología Molecular
Licenciatura

Química Farmacéutico Biológica (1630)
Química en Alimentos (0144) (Optativa)

Dra. Herminia Loza Tavera

Profesora Titular de Carrera

Departamento de Bioquímica

Laboratorio 105, Edificio E

5622-5280

hlozat@unam.mx

IV. METABOLISMO DEL DNA

- **Objetivo general**

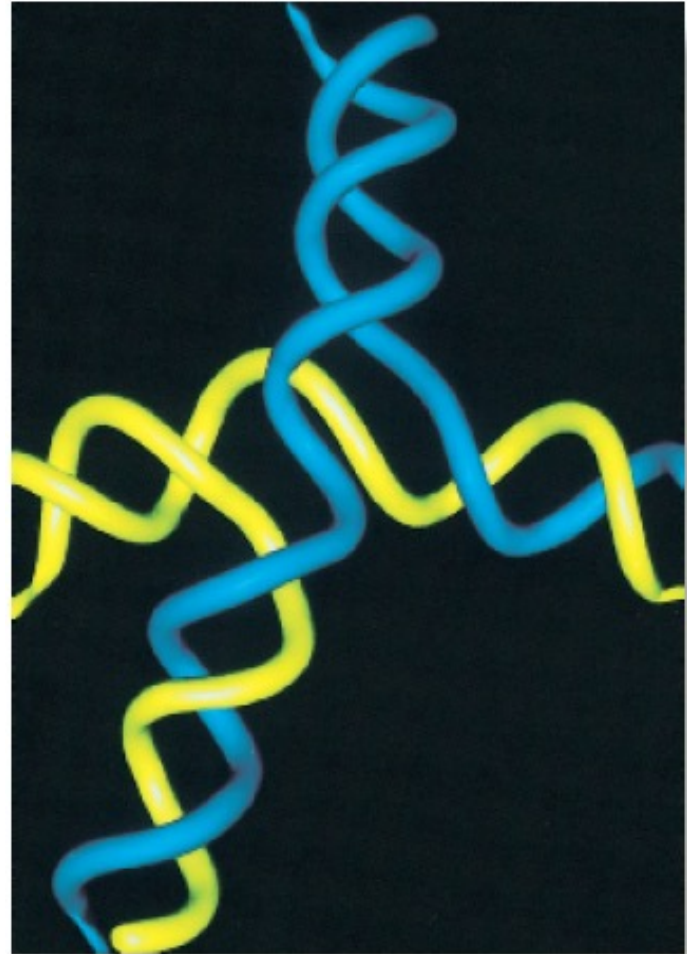
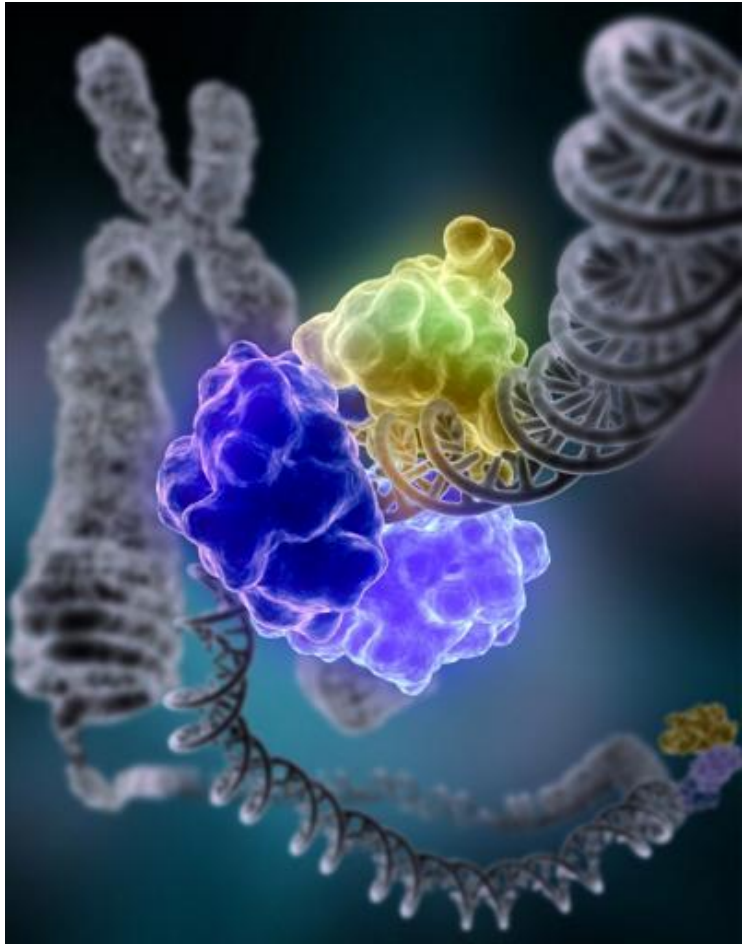
- El alumno revisará los diferentes procesos metabólicos en los que el DNA es la molécula central, *i.e.* la replicación, la reparación y la recombinación. Describirá la enzimología de los diferentes procesos y destacará la importancia de la fidelidad de la replicación y de la necesidad de conservar la estructura y función del DNA

Objetivos particulares

IV. METABOLISMO DEL DNA	El alumno...	Conoci- miento	Compren- sión	Aplica- ción
4. Recombinación del DNA	4.1. Reconocerá la función de la recombinación en la generación de la diversidad biológica y describirá el mecanismo general de recombinación.		X	
	4.2. Describirá el mecanismo general de recombinación (ejemplo de bacteria para reparación de errores en el DNA).		X	
	4.3. Conocerá el Modelo de Holiday de recombinación.	X		
	4.4. Definirá el concepto de recombinación homóloga y su función durante la meiosis.	X		
	4.5. Describirá la función de la proteína RecBCD en la recombinación en procariontes.	X		
	4.6. Describirá la función de la proteína RecA en la recombinación en procariontes.	X		
	4.7. Describirá la función de las proteínas RuvA-B-C en la resolución de las cadenas cruzadas.	X		
	4.8. Aplicación técnica: Edición de genes por recombinación, CRISPR-CAS			X

TERCER EXAMEN: Tema III y Tema IV.

RECOMBINACIÓN DEL DNA



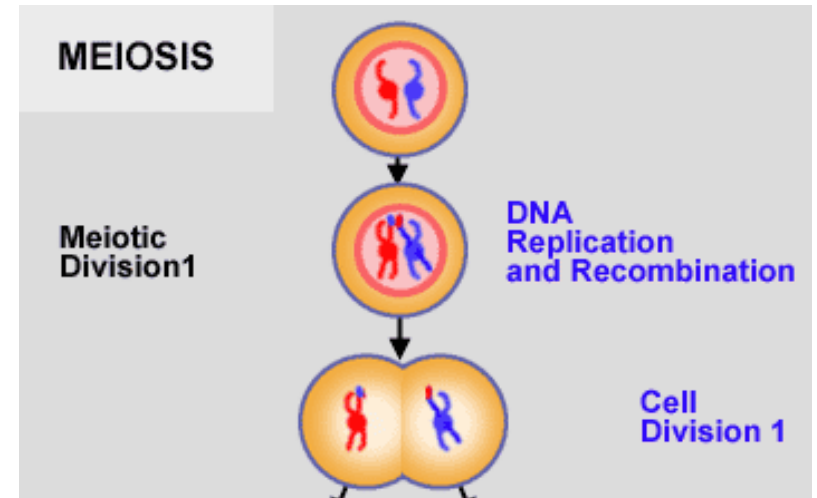
Rearreglo de la información en el DNA en el que se involucra la interacción de dos moléculas de DNA

Importancia biológica de la recombinación

1. Generación de nuevas combinaciones de alelos (crossing over durante la meiosis)
2. Generación de nuevos genes (e.g., re-arreglo de los genes de las inmunoglobulinas)
3. Integración de un elemento específico de DNA
4. Reparación del DNA

Función de la recombinación

EN EUKARIONTES. Durante la meiosis I. Ocorre recombinación e intercambio después de la primera división celular.



EN PROCARIONTES. Para incorporar DNA a su cromosoma, después de que éste entró por **transformación**, **transducción** o **conjugación**. En eventos de reparación de DNA.

TIPOS DE RECOMBINACIÓN

1. **RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA O GENERALIZADA.** Intercambio genético entre dos moléculas de DNA (o dos segmentos de la misma molécula de DNA) que comparten una región de secuencias homólogas.
2. **RECOMBINACIÓN SITIO ESPECÍFICO.** Intercambio genético en secuencias definidas de DNA (Ej. integración del DNA de fago λ al genoma de *E. coli*)
3. **TRANSPOSICIÓN DE DNA.** Inserción de elementos de DNA que se mueven de un lugar a otro, usualmente tienen poca similaridad en su secuencia (transposón).

La recombinación homóloga no solo se da durante la meiosis sino también se da para reparación en células mitóticas

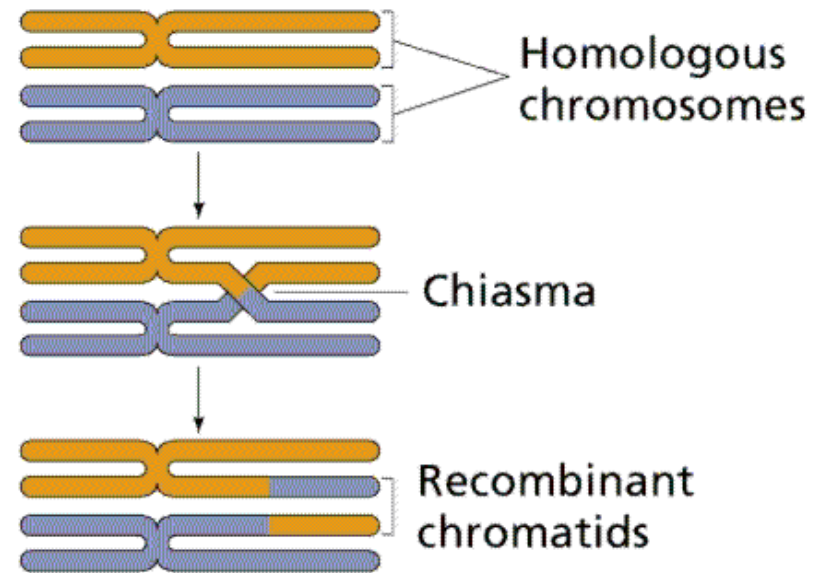
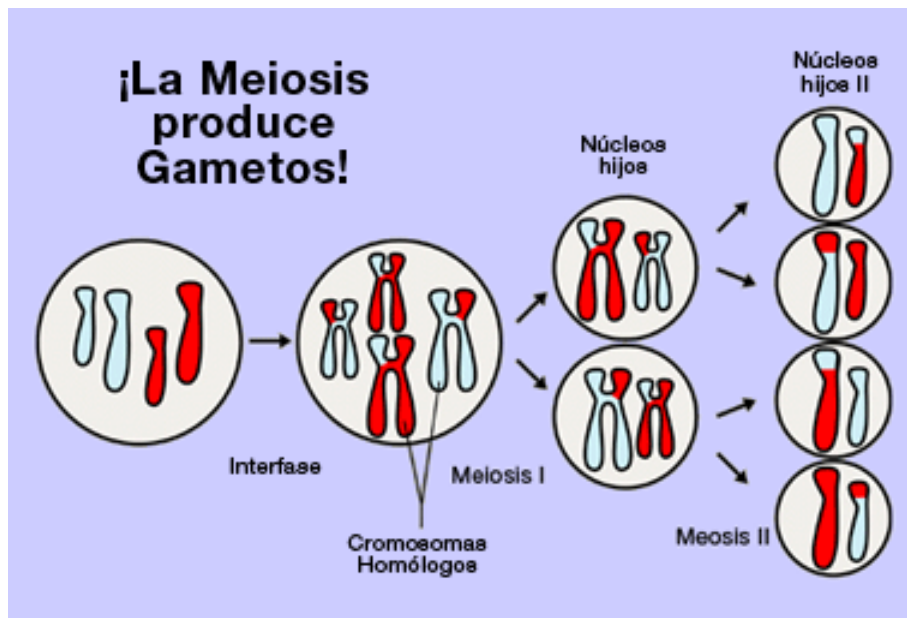
Para reparación se conoce como el modelo de reparación de ruptura de DNA de doble cadena (DNA double-strand break repair (DSBR) model)

Pasos generales en la recombinación homóloga y la reparación DSBR

1. Iniciación
2. Apareamiento homólogo e intercambio de cadena de DNA
3. DNA heteroduplex extensión (branch migration)
4. Resolución

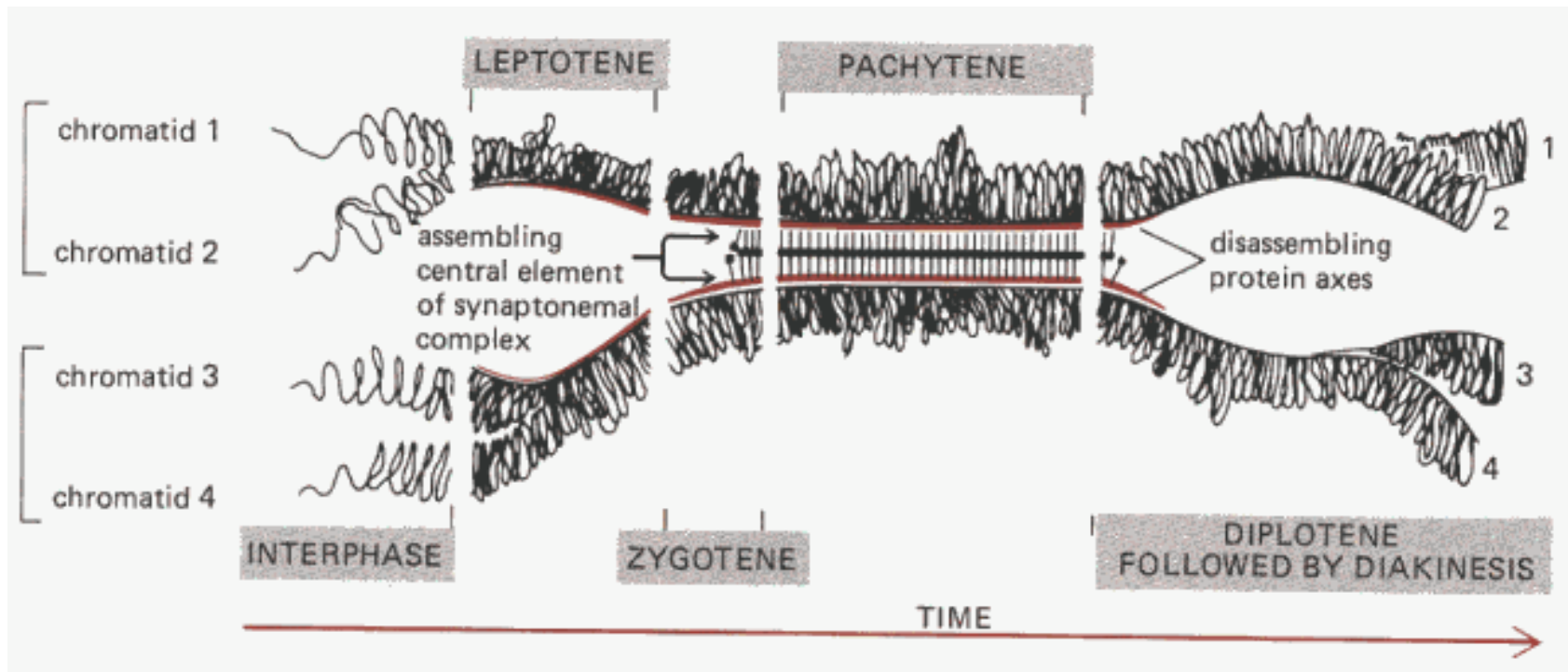
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA O GENERALIZADA

Meiosis

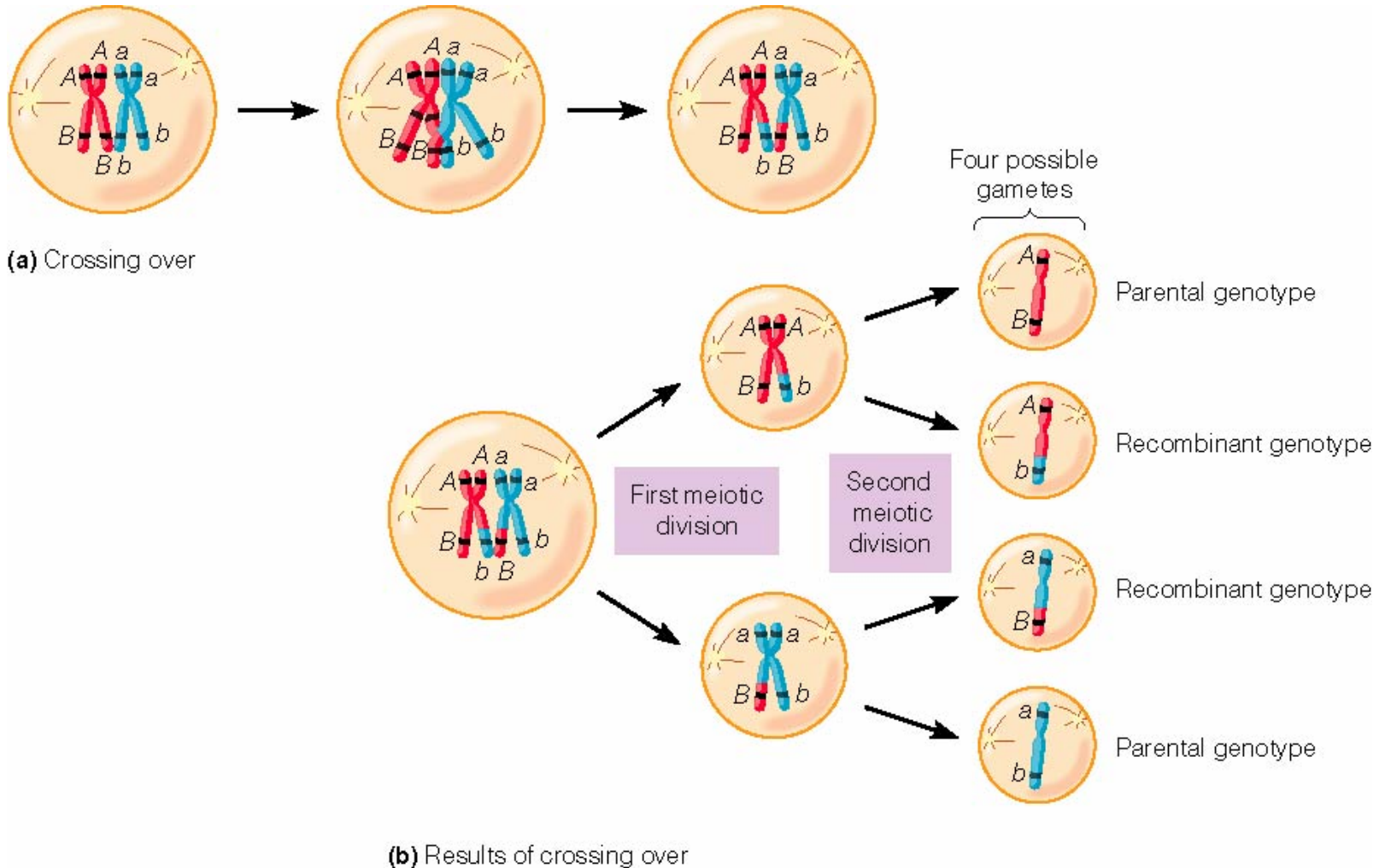


En **células germinales** ocurre la división celular llamada meiosis que comprende dos rondas de divisiones nucleares sucesivas, con un sólo evento de replicación del DNA.

La recombinación ocurre durante la formación del complejo sinaptonémico en la subfase paquiteno de la profase I

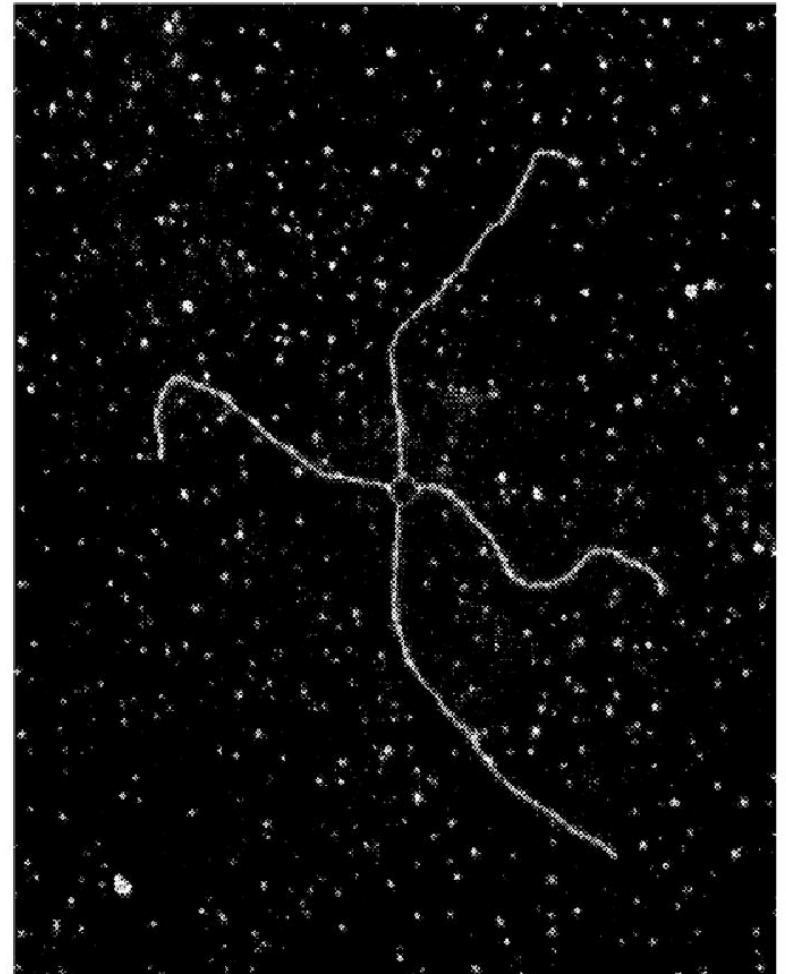


Recombinación homóloga



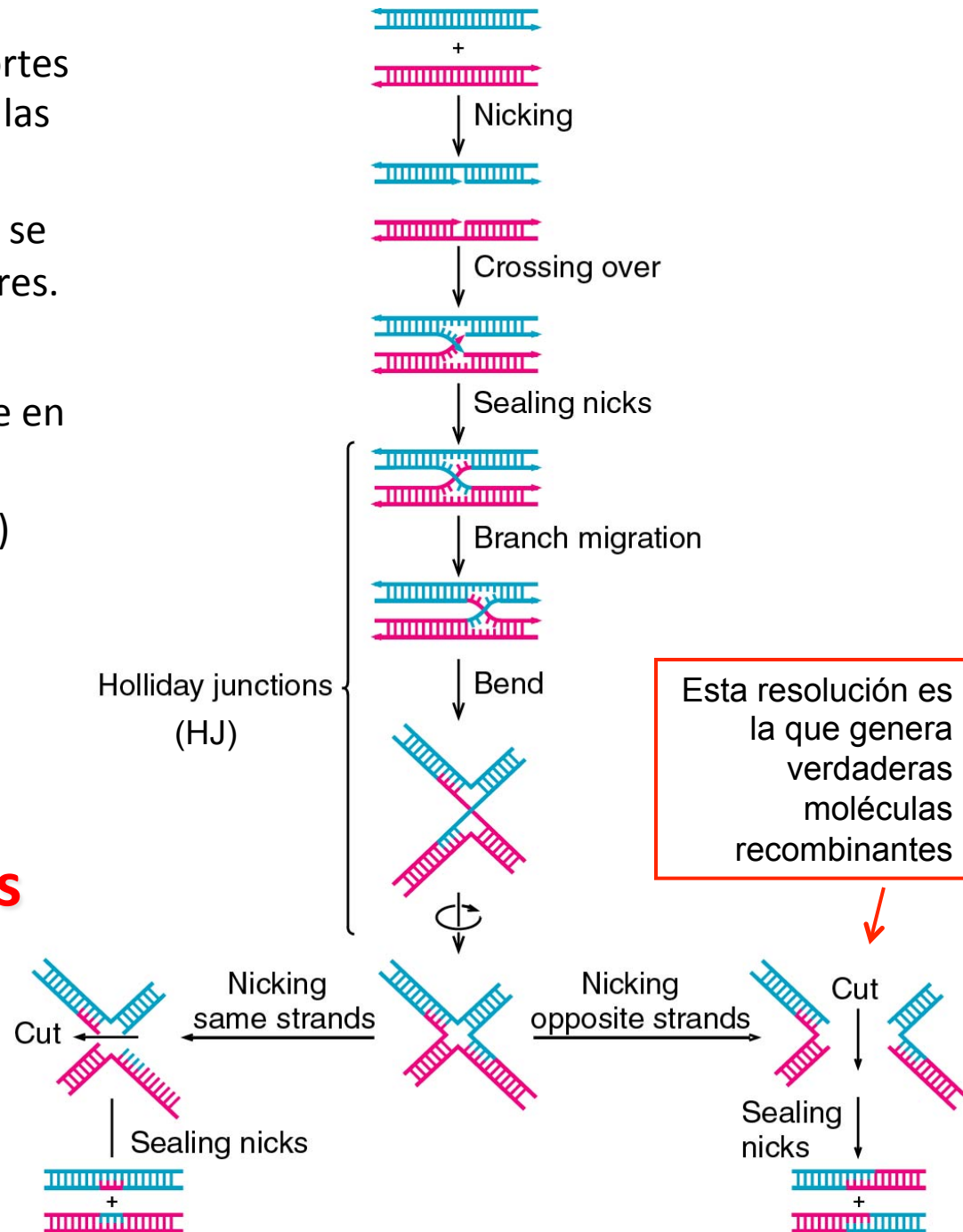
En 1964, Robin Holliday propuso un mecanismo para explicar la recombinación

Las uniones de Holliday (Holliday junctions, HJ) se forman durante la recombinación.

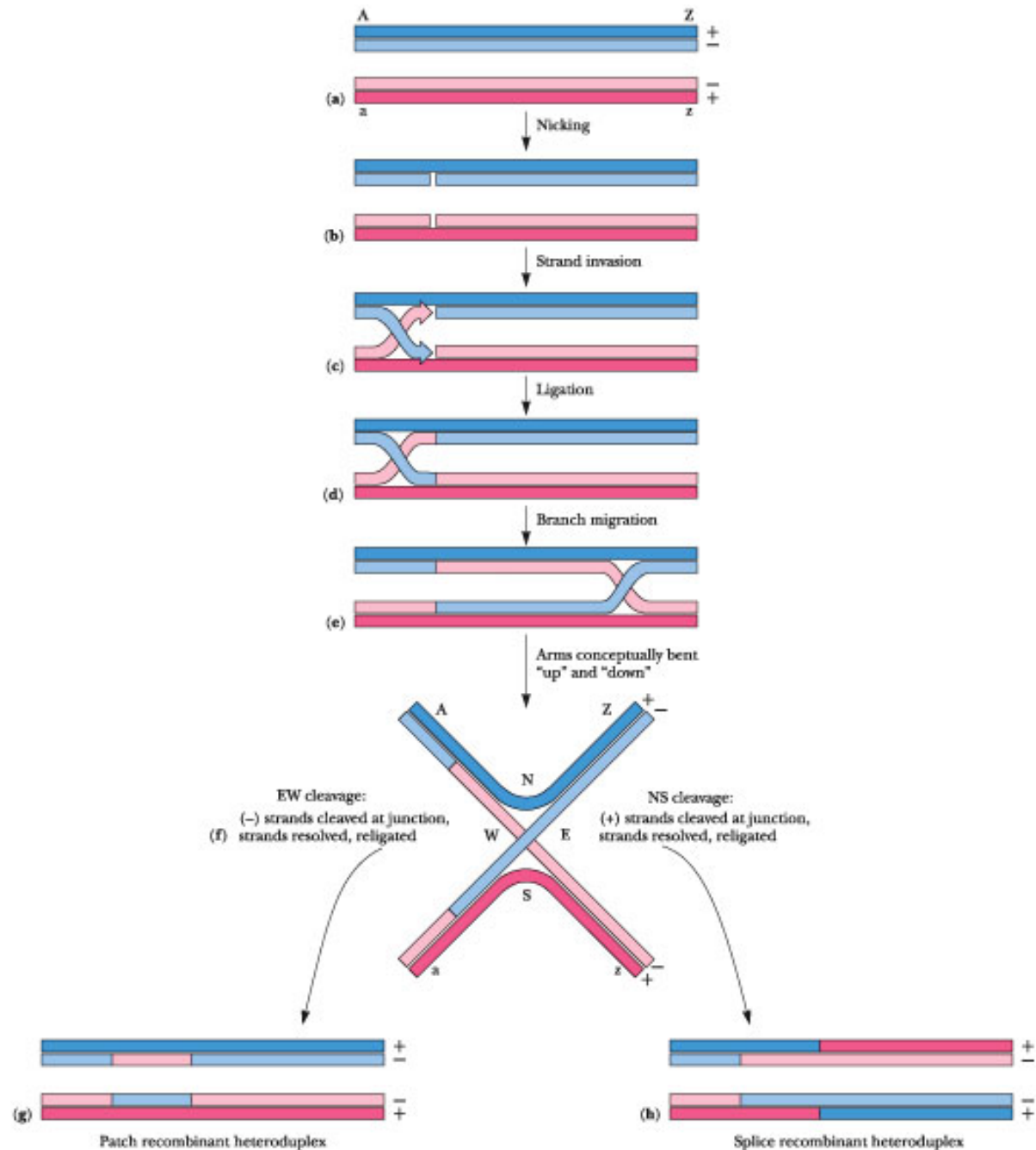


- Apareamiento de los DNA duplex y cortes en las posiciones correspondientes de las dos cadenas de DNA.
- Los extremos libres se intercambian y se unen formando enlaces intermoleculares.
- Se sellan los enlaces.
- Una de las cadenas puede desplazarse en cualquier dirección.
- Migración de rama (Branch migration)
- Ruptura de los intermediarios.
- Las HJs pueden ser resueltas de dos maneras aunque sólo una produce verdaderas moléculas recombinantes.

Recombinación entre dos moléculas de DNA apareadas. Modelo de Holliday.



Aunque el modelo de Holliday explica el resultado del proceso de recombinación, no proporciona una explicación del mecanismo para las reacciones del intercambio de cadenas y otros detalles moleculares del proceso



Modelo molecular genérico para la recombinación homóloga

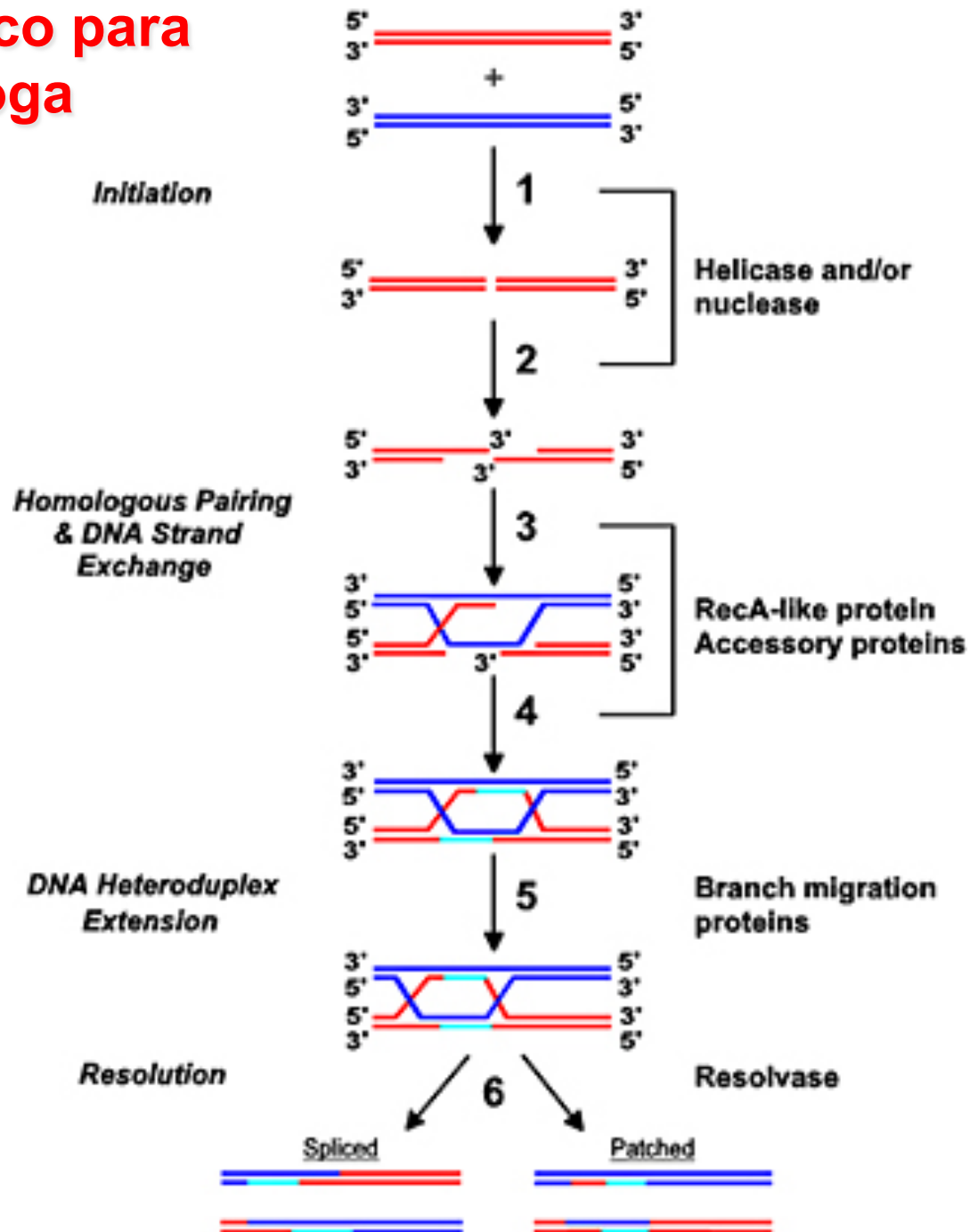
In **step 1**, a double strand break (DSB) is introduced into one of the DNA substrates. The formation of this DSB could be due to a programmed *in vivo* process or to environmental circumstances.

In **step 2**, the DSB is processed by either a helicase, a nuclease, or both, to yield a free 3' -ssDNA overhang(s).

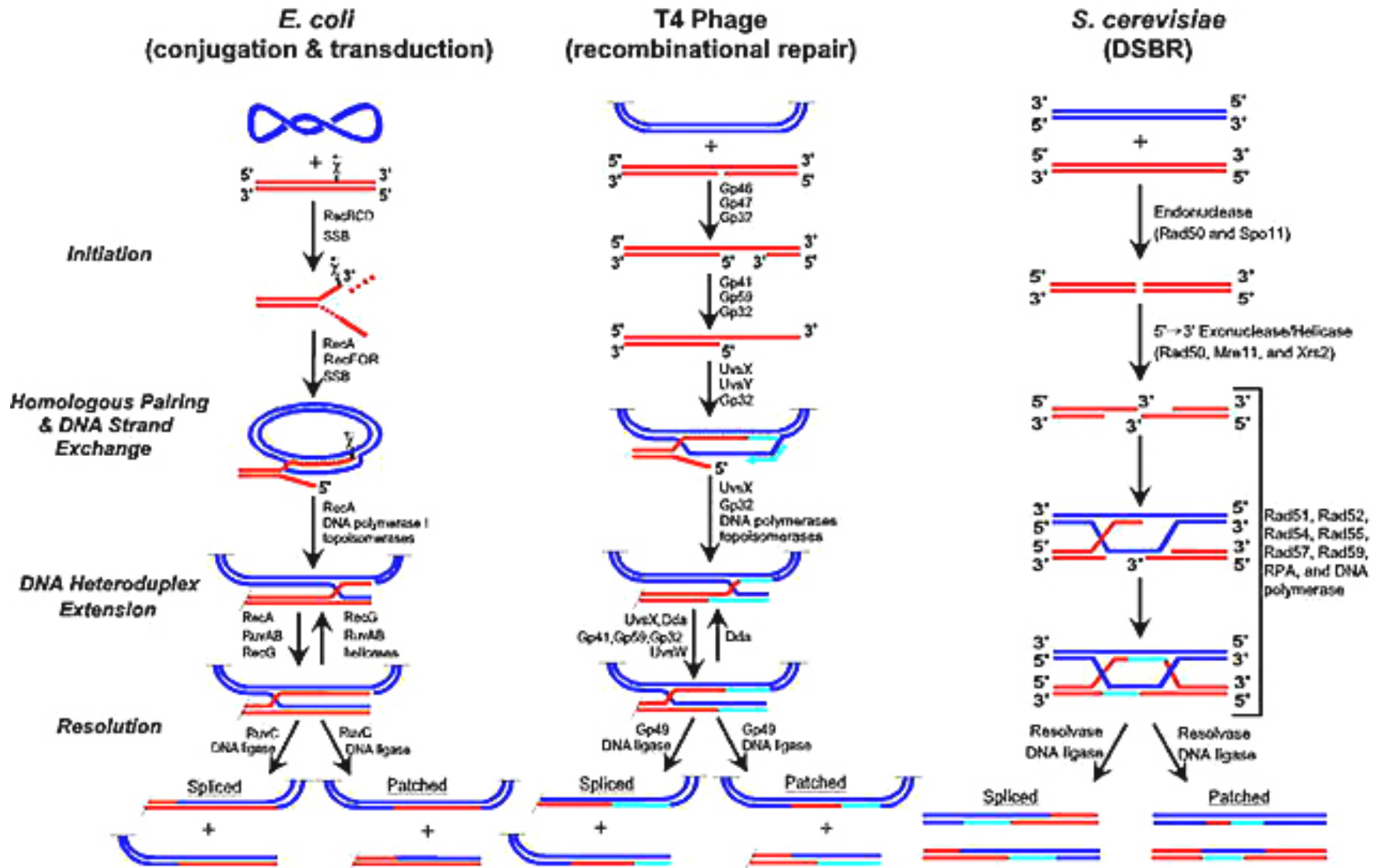
In **step 3**, this free 3' -terminal end is homologously paired with its homologue by a RecA-like protein to form an intermediate known as a joint molecule. Following joint molecule formation, pairing of the displaced complementary strands results in the formation of characteristic intermediates known as Holliday junctions (**step 4**).

In **step 5**, the Holliday junction(s) is extended unidirectionally by branch migration proteins.

Finally, in **step 6**, the Holliday junction is cleaved by a resolvase to yield recombinant products (e.g. spliced or patched).

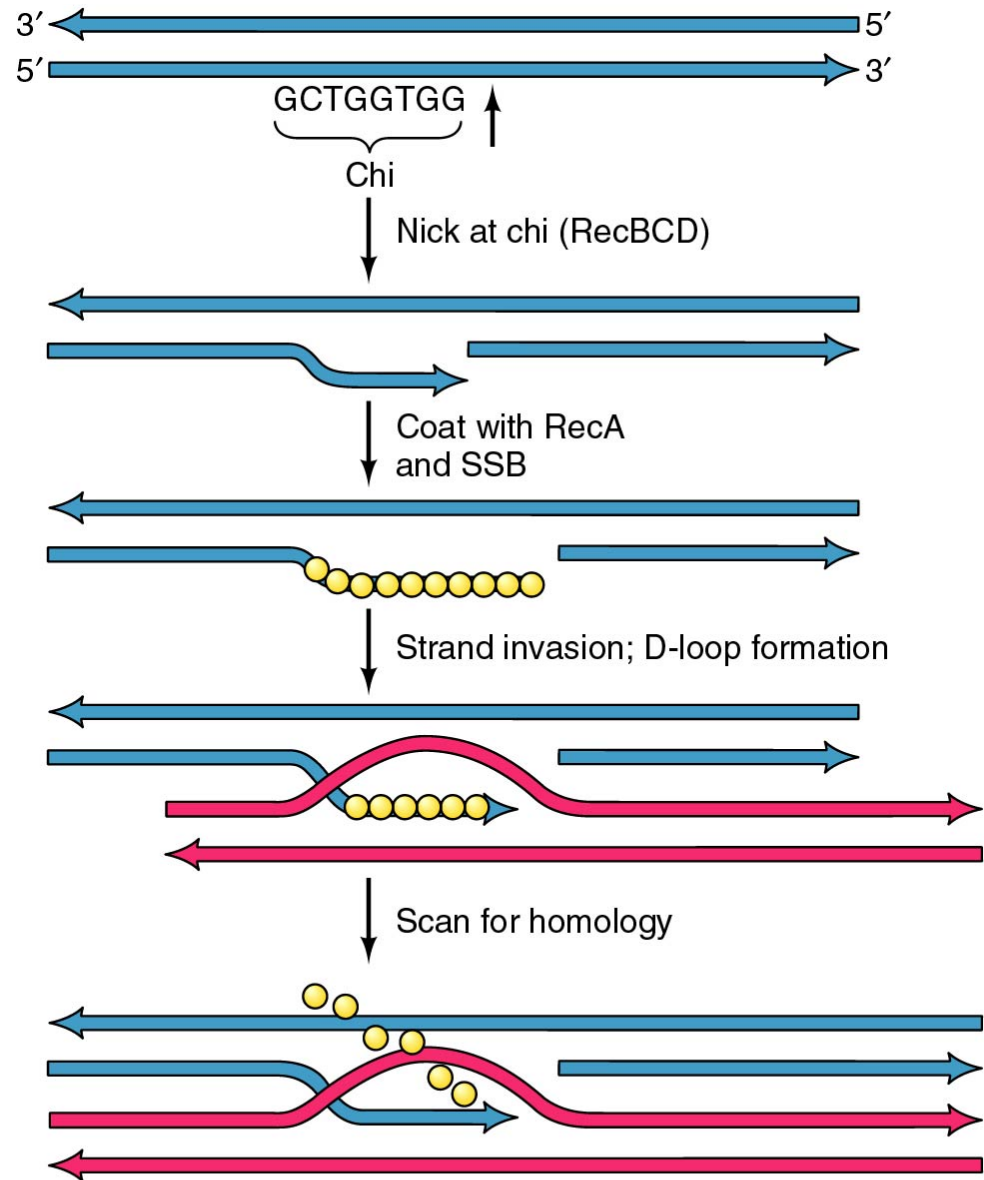


Los mecanismos de recombinación son semejantes en diversos organismos



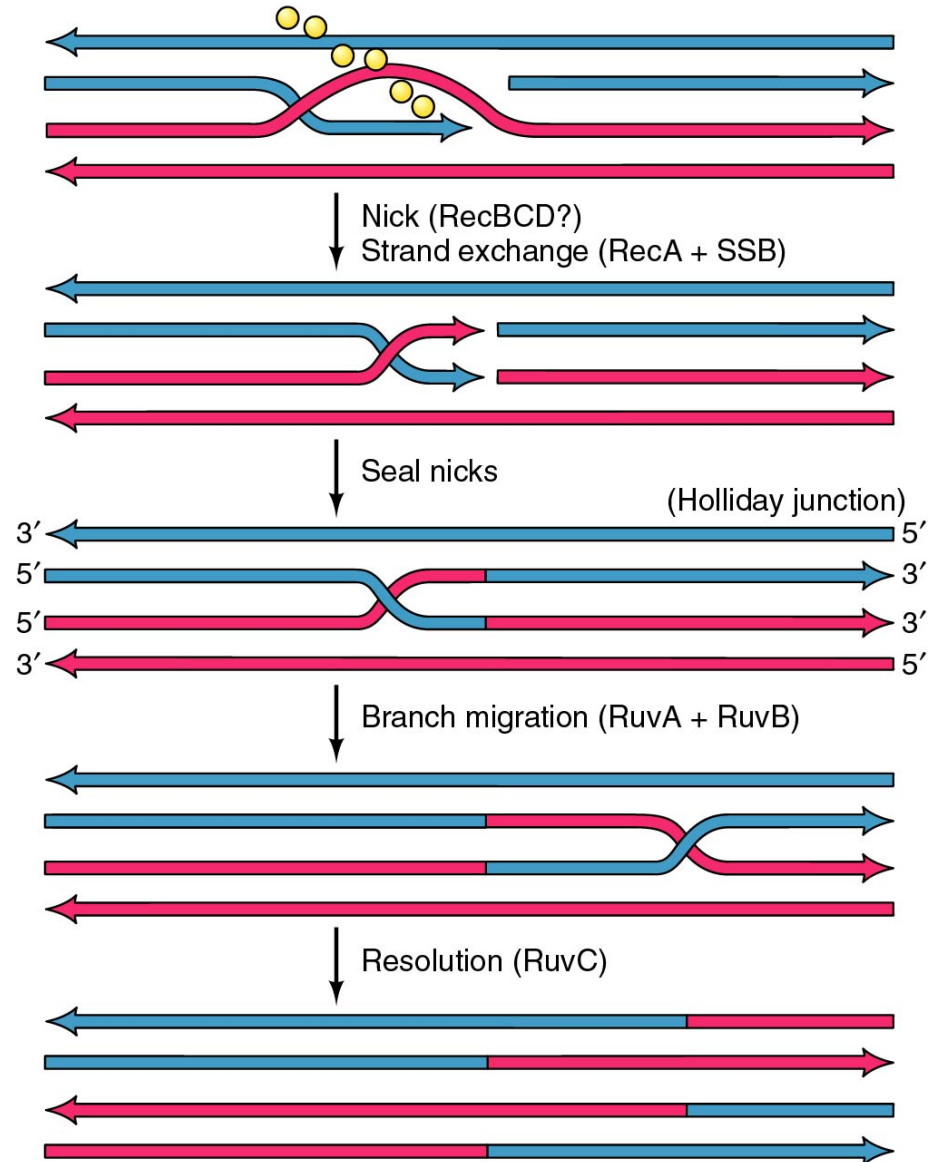
El sistema recBCD, de recombinación homóloga de *E. coli*, como modelo. Parte I. Corte e intercambio

- La proteína RecBCD produce un corte en el extremo 3' de la secuencia "Chi" en el DNA invasor.
- RecBCD también tiene actividad de helicasa, desenrollando el DNA invasor.
- La cadena sencilla es cubierta con las proteínas RecA y SSB (proteínas de unión a DNA de cadena sencilla).
- La cadena sencilla de DNA invade y desplaza una cadena del DNA duplex invadido.
- Ocurre identificación y apareamiento con secuencias homólogas en el DNA duplex desplazado. Apareamiento en la región homóloga.



El sistema recBCD, de recombinación homóloga de *E. coli*, como modelo. Parte II. Migración y resolución.

- La cadena desplazada sufre un corte y se aparea ahora con la cadena homóloga del DNA invasor.
- Se sellan los cortes por acción de la DNA ligasa generando la Holliday junction.
- RuvA + RuvB = Helicasa dependiente de ATP participan en el desplazamiento de la rama.
- RuvC: Resolvasa, hace los cortes en las dos cadenas para la generación de las dos moléculas de DNA duplex recombinadas.



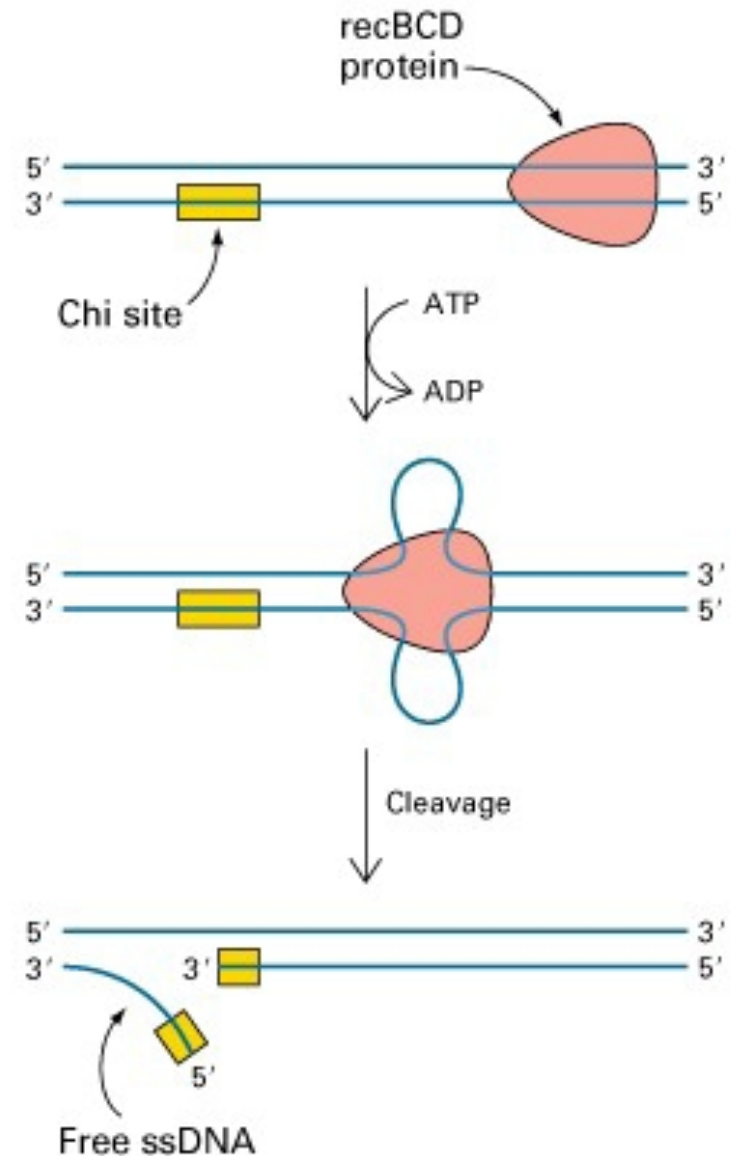
RecBCD

Esta enzima tiene cinco actividades:

Exonucleasa V, helicasa, endonucleasa, ATPasa y exonucleasa sobre DNAs (DNA de cadena sencilla)

La actividad de helicasa genera asas grandes antes de que el DNA se vuelva a renaturalizar.

Cuando **RecBCD** encuentra una secuencia **Chi**, se disocia la subunidad D y la enzima RecBC actúa como helicasa para abrir el DNA en un evento dependiente de ATP. Se realiza el corte en el DNA y se genera la cadena sencilla de DNA que es estabilizada por RecA y SSB para iniciar el proceso de recombinación.



RecBCD: una enzima compleja

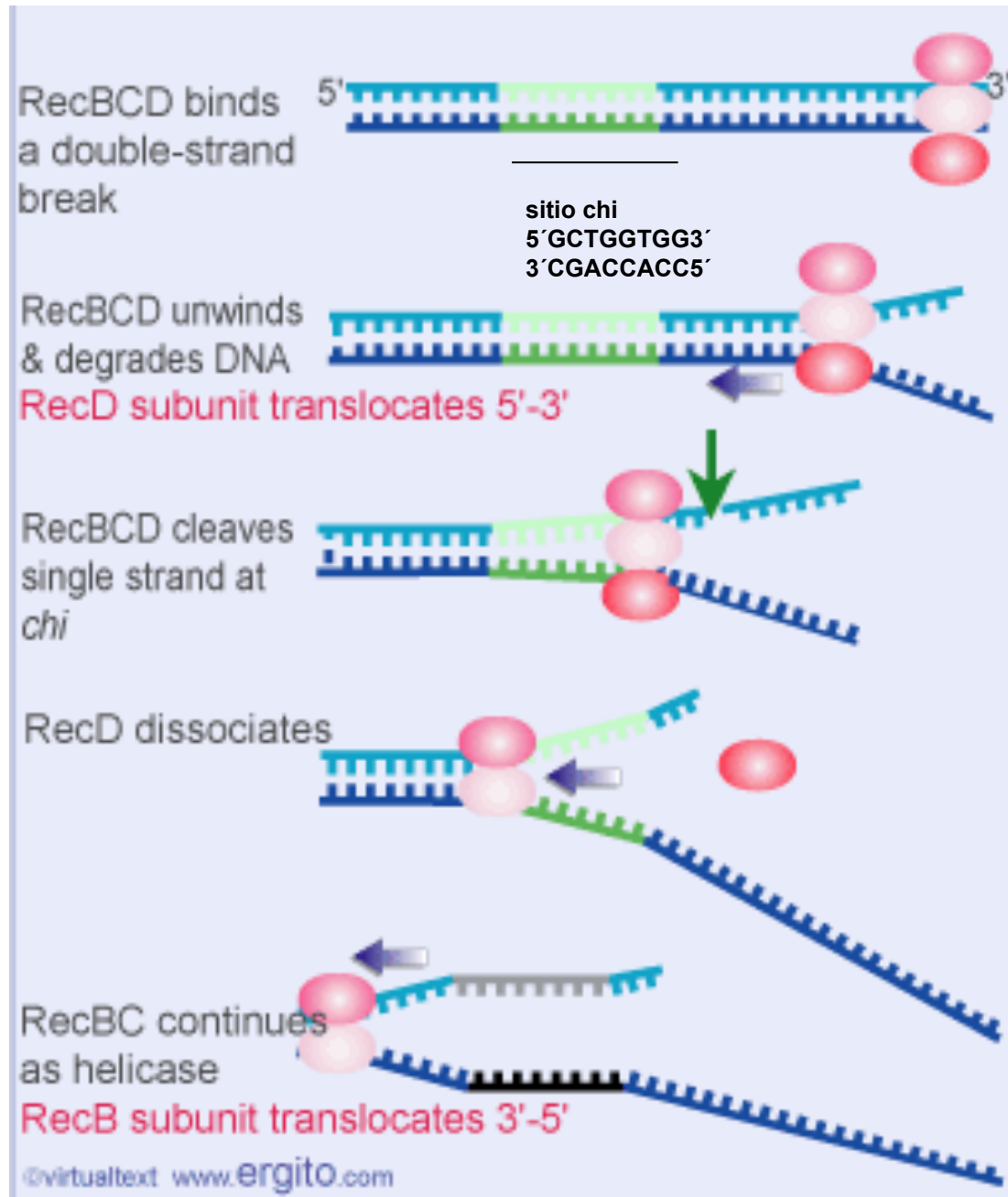
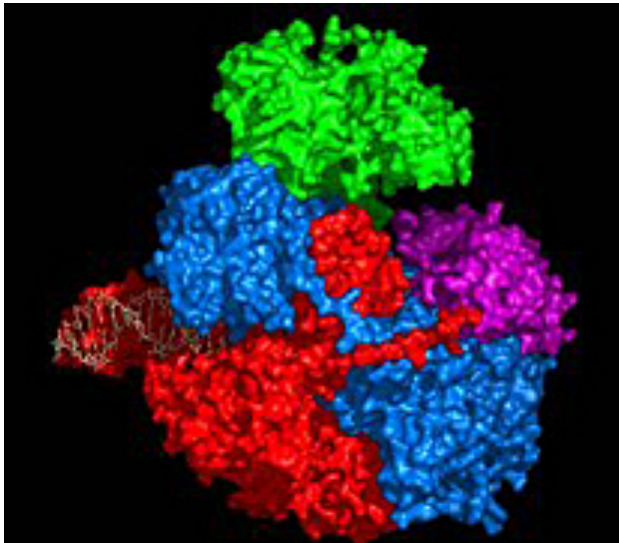
RecBCD tiene:

1. Subunidades de endonucleasa (*recBCD*) que cortan una cadena de DNA cercana a la secuencia Chi
2. DNA helicasa (subunidad *recBC*)
3. ATP-asa dependiente de DNA
 - Desenrolla al DNA para generar regiones de DNA de cadena sencilla (SS)

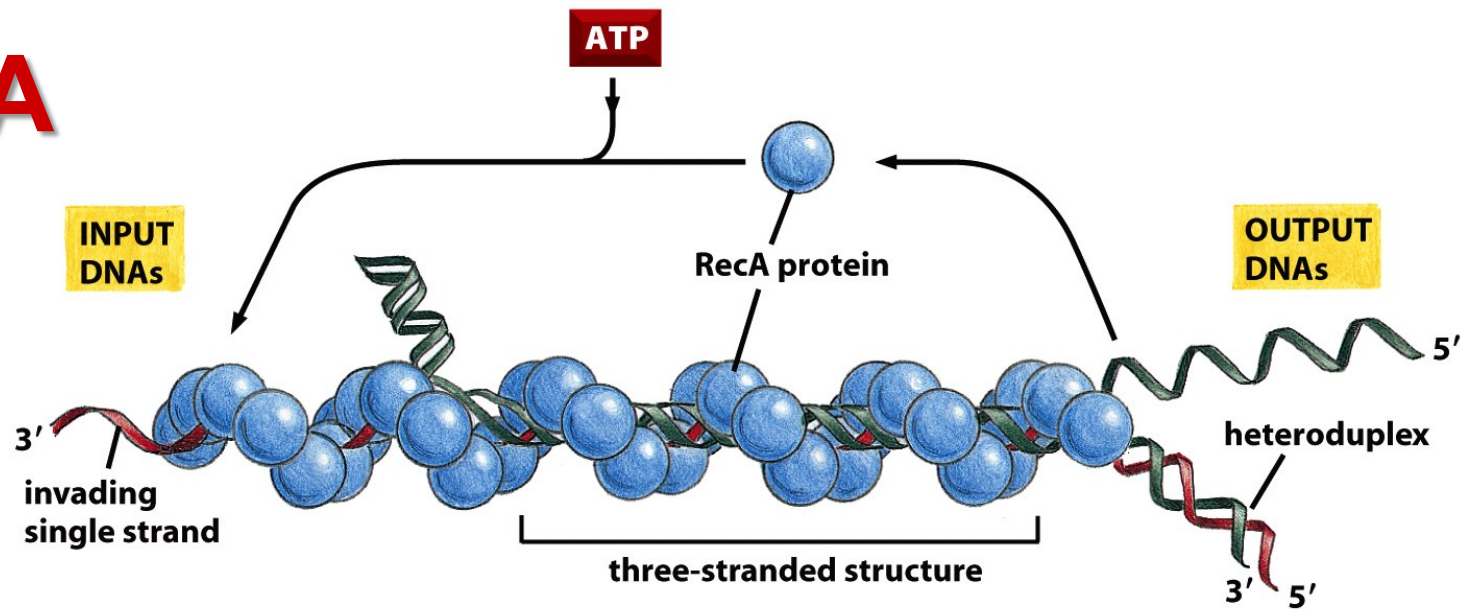
Actividades 2 y 3 están ligadas

RecBCD

helicasa y nucleasa
generan DNA de cadena
sencilla con el 3'OH,
sustrato para RecA



Rec A



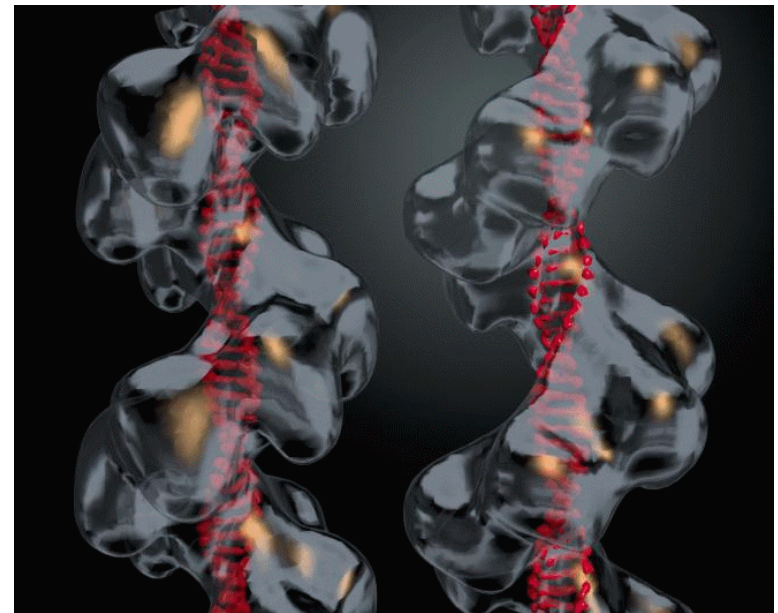
Proteína de 38 kDa que une DNA de cadena sencilla con más fuerza que DNA de cadena doble. Promueve intercambio de cadenas *in vitro*.

Participa en tres pasos:

Pre-sinapsis. RecA se une al DNAs

Sinapsis. Alineamiento de las secuencias complementarias que participan en el intercambio.

Post-Sinapsis. La cadena sencilla desplaza y reemplaza a la cadena (+) del DNA de doble cadena.



Condiciones para la actividad de RecA

RecA promoverá el intercambio de cadenas entre dos moléculas de DNA solamente si:

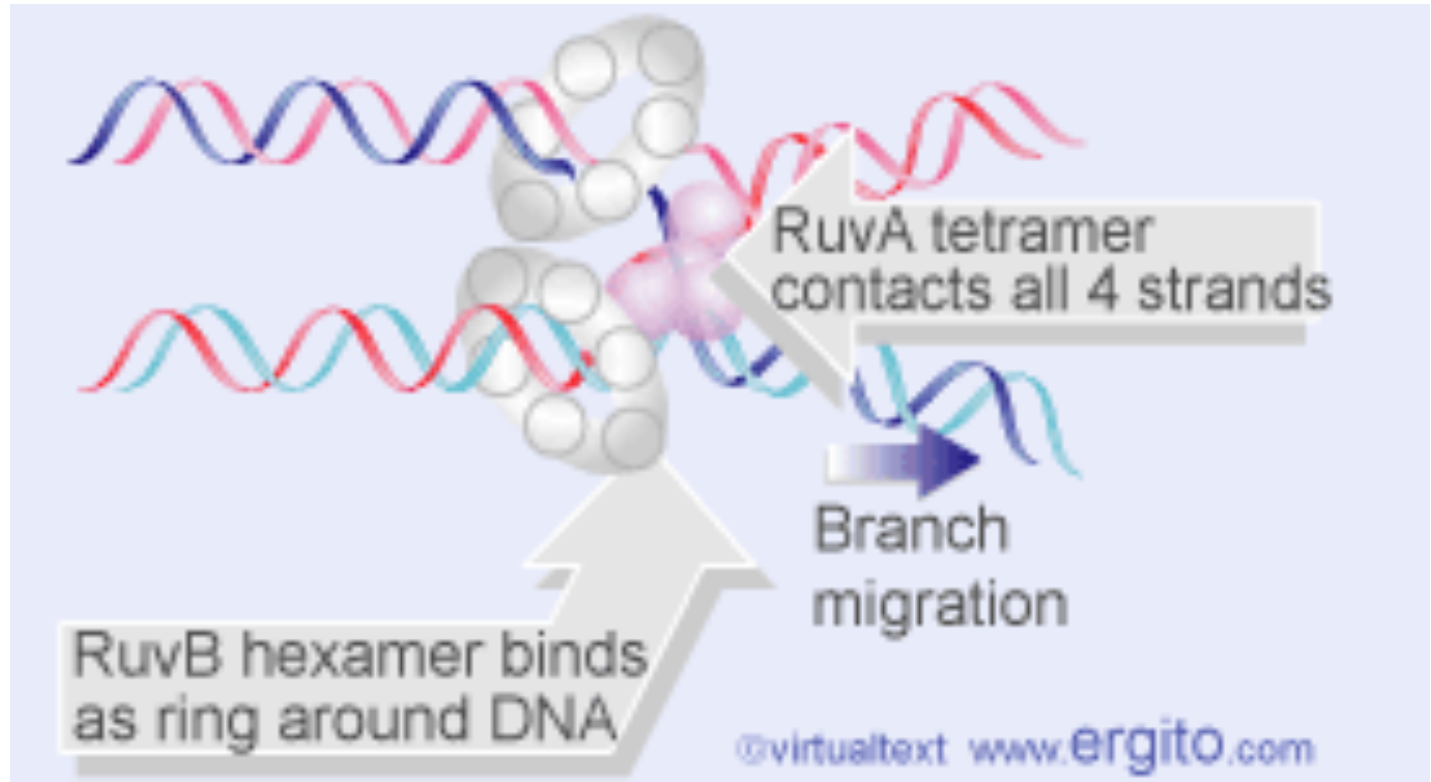
1. Una de las dos moléculas tiene una región de DNA de cadena sencilla a la cual se puede unir RecA.
2. Las dos moléculas deben tener una región de homología (casi idéntica) de un mínimo de 50 – 150 pb.
3. Debe haber un extremo libre en esa región de homología que pueda iniciar el intercambio de cadenas.

In vivo el DNA está de doble cadena, por lo que RecA requiere de RecBCD para generar ssDNA .

Resolución de las uniones de Holliday

Ruv A es un tetrámero que se une a las cuatro hebras del intermediario de Holliday

Ruv B es un hexámero con actividad helicasa y ATPasa que sirve de motor para su movimiento. El consumo de ATP permite a la molécula girar

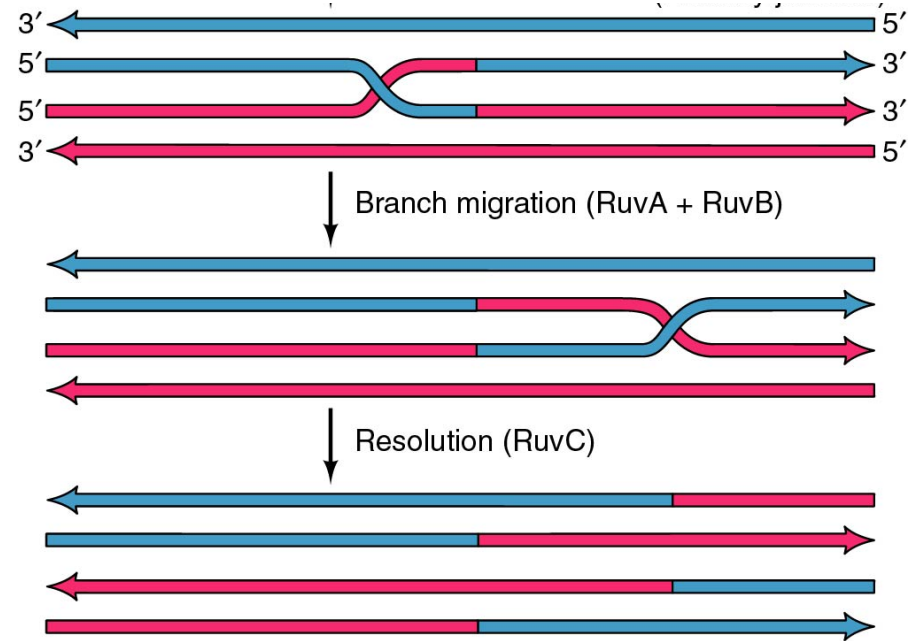
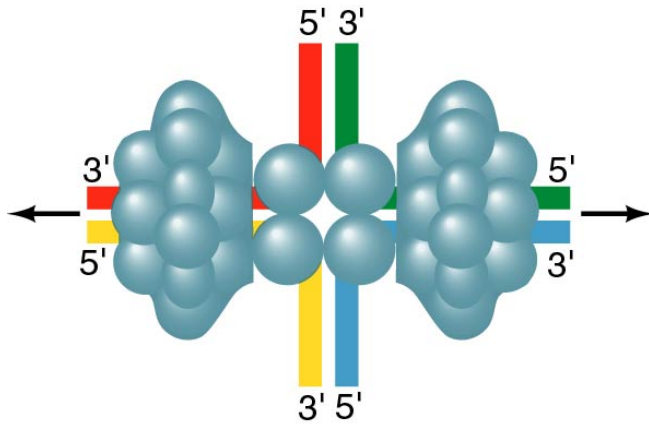


Ruv C es una endonucleasa que corta las dos cadenas de DNA en la Holliday junction y resuelve los intermediarios de Holliday

En eucariontes no se han encontrado homólogos para las proteínas Ruv, pero sí para RecA (Rad51)

RuvA + RuvB. Desplazamiento de la rama

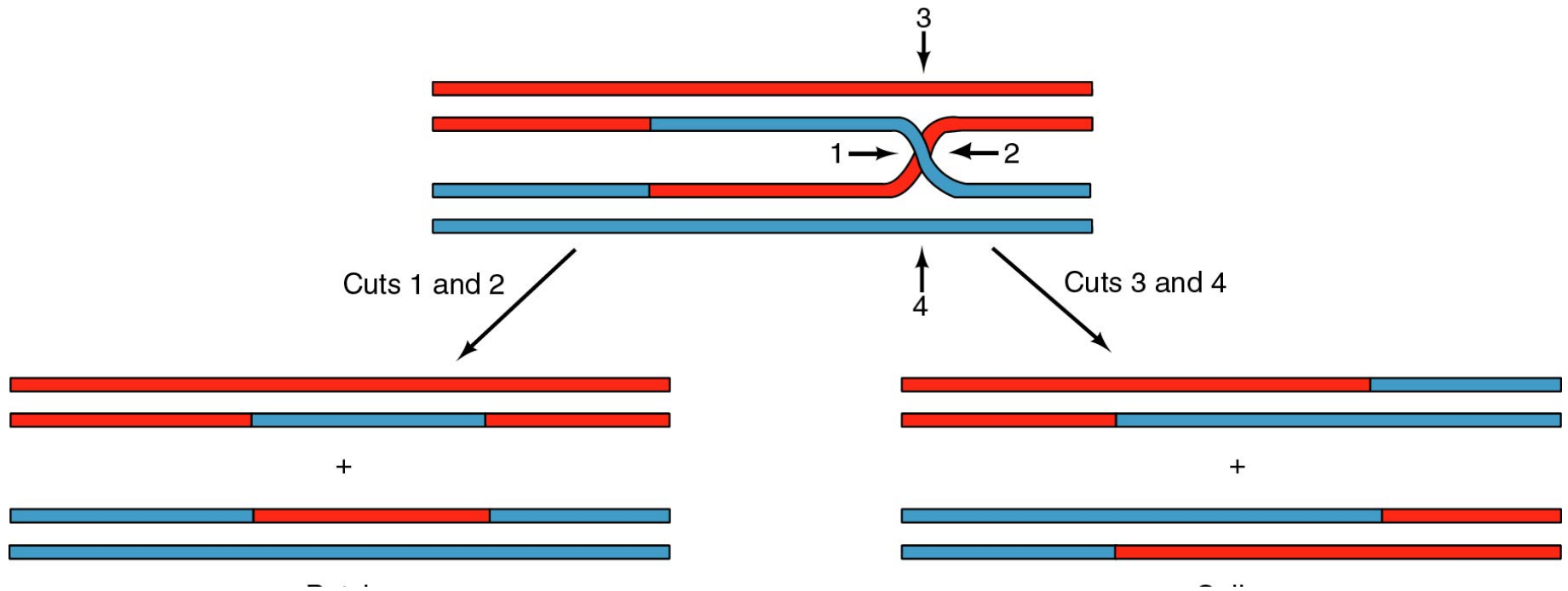
Estas proteínas se unen en el cruce de Holliday y son las responsables del desplazamiento de la rama.



RuvA es un homotetrámero con simetría cuadrada plana que reconoce y se une al cruce de Holliday. Esto facilita la unión del hexámero RuvB. Helicasa dependiente de ATP, abre la cadena y la desplaza lo necesario para la migración de la rama.

RuvC Resolvasa

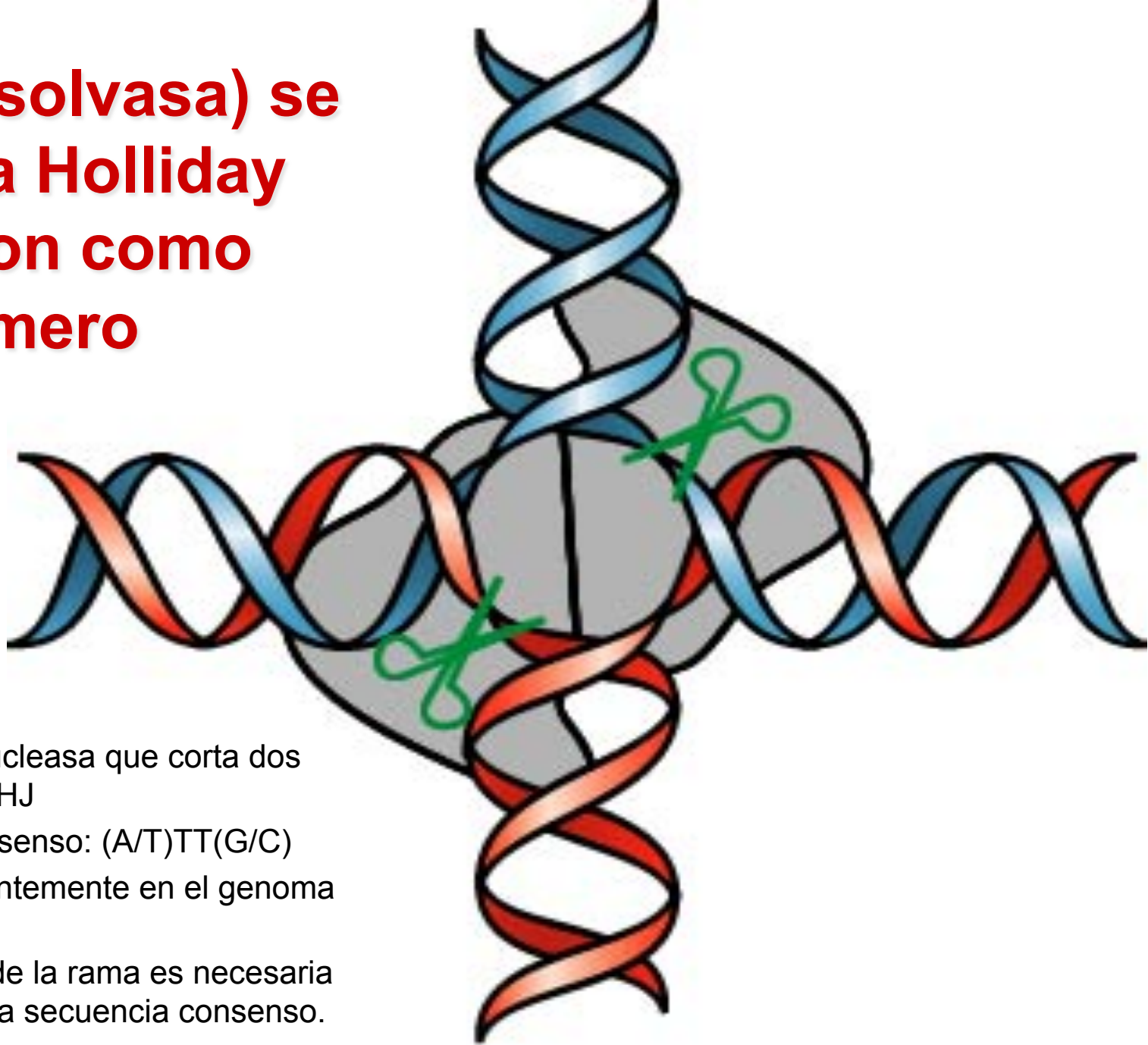
Una vez que se han recombinado las cadenas y se han desplazado, debe ocurrir un corte para liberar el par de DNA duplex.



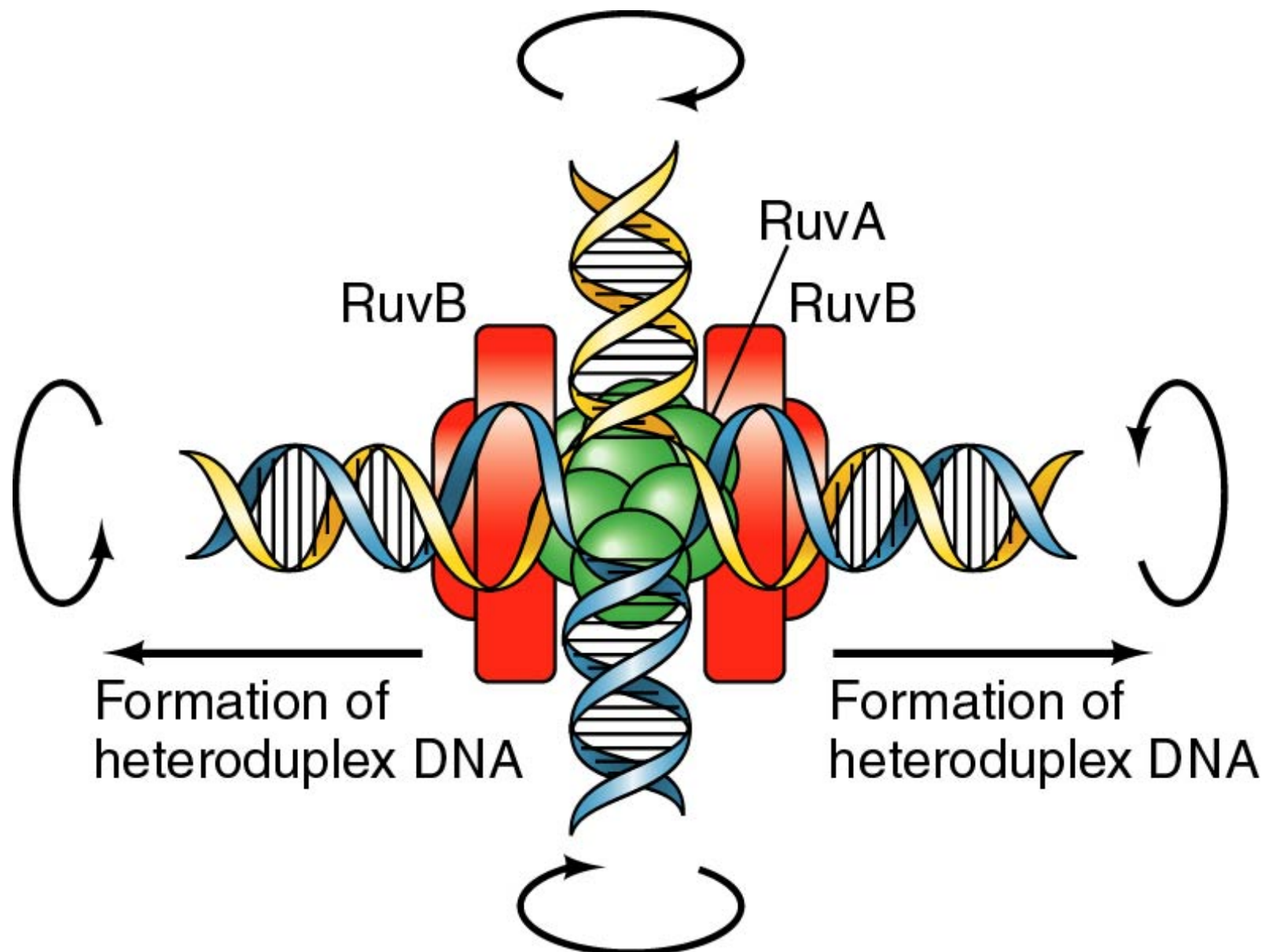
Hay secuencias consenso de reconocimiento:

5'- (A/T)TT (G/C)-3'

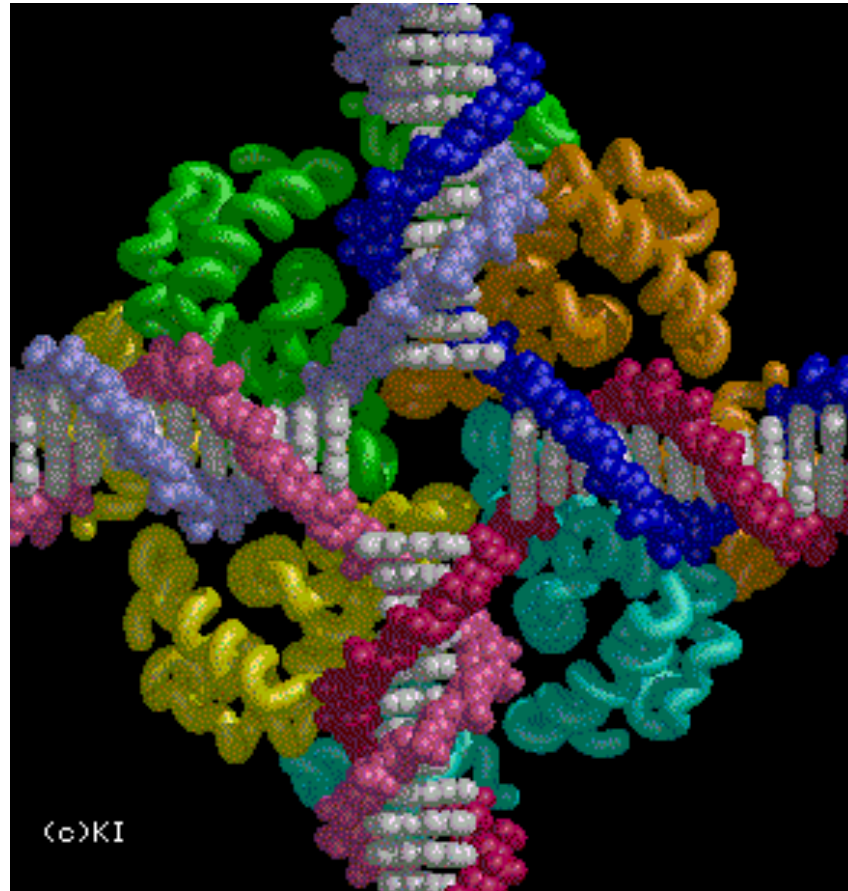
RuvC (resolvasa) se une a la Holliday junction como dímero



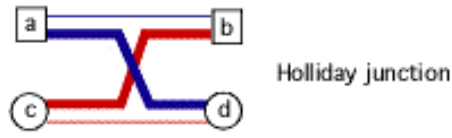
- Es una endonucleasa que corta dos cadenas en la HJ
- Secuencia consenso: (A/T)TT(G/C)
 - ocurre frecuentemente en el genoma de *E. coli*.
 - la migración de la rama es necesaria para alcanzar la secuencia consenso.



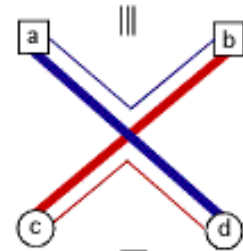
Actividad de la resolvasa



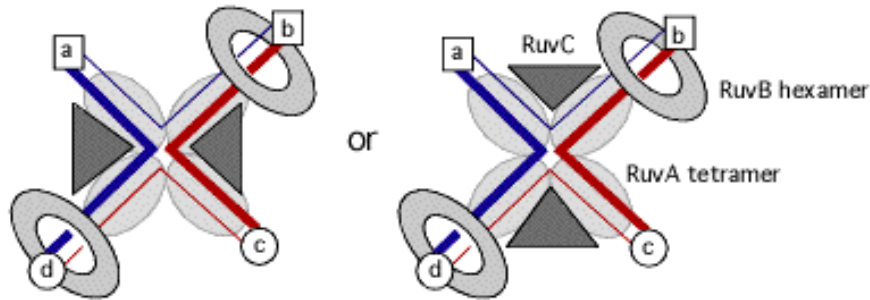
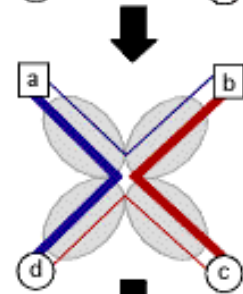
Resolución de las uniones de Holliday



Holliday junction



A different, but equivalent view

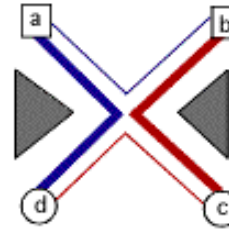


RuvC cutting in East-West orientation

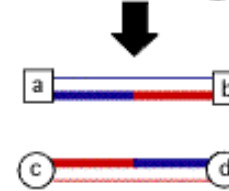
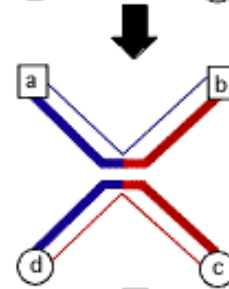
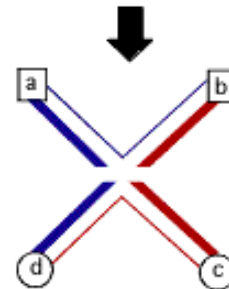
RuvC cutting in North-South orientation

RuvC is involved in the late step of recombination. RuvC cleaves Holliday junctions by introducing nicks into strands with the same polarity. The nicks leave a 5' terminal phosphate and a 3' terminal hydroxyl group which are ligated by DNA ligase. The active form of RuvC protein is a dimer.

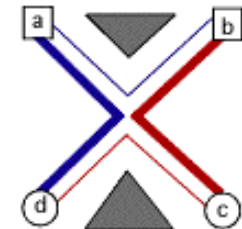
The Ruv proteins have been stripped from the following figures to make it easier to see the cutting and joining of DNA strands.



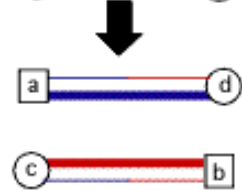
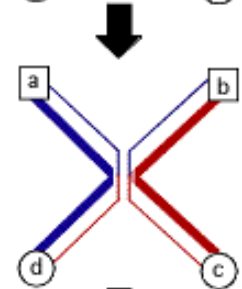
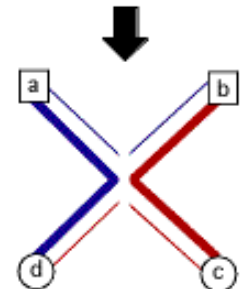
RuvC cutting in East-West orientation



Heteroduplex



RuvC cutting in North-South orientation

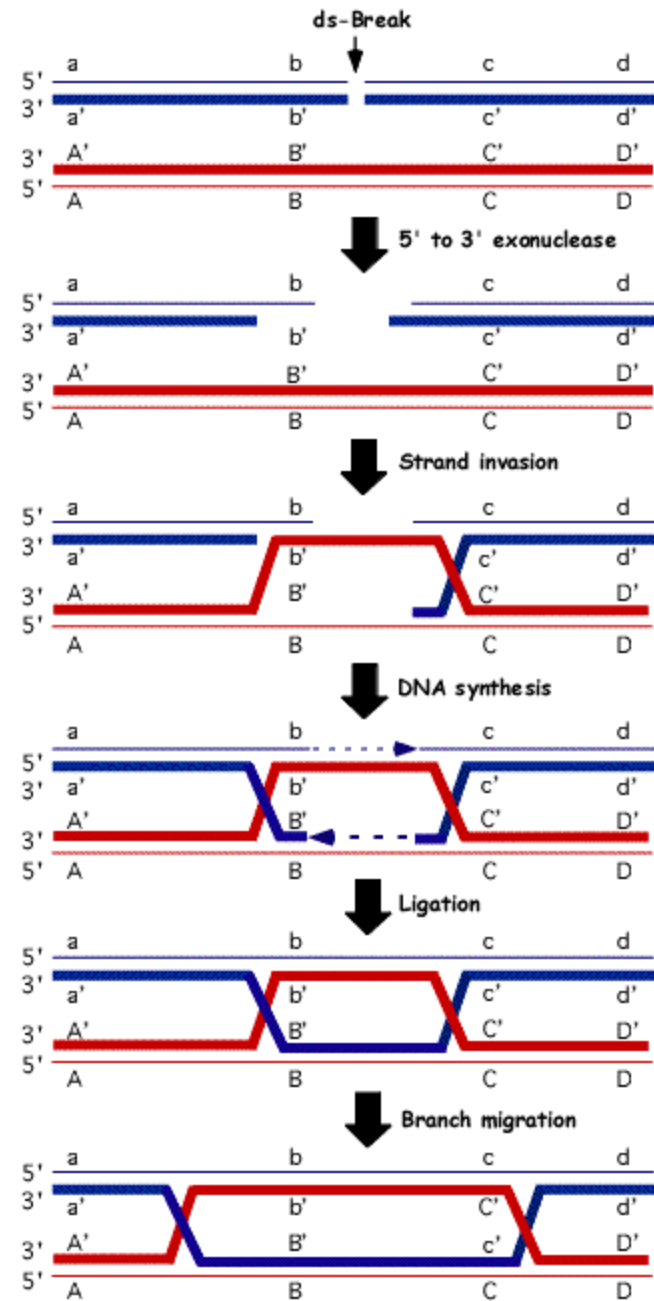


Recombinant
(Note outside markers)

Las letras son sólo para mostrar como ocurre la recombinación, no corresponden a genes.

Pasos en la Recombinación

- Corte del dsDNA
- Degradación exonucleolítica 5'-3'
- Invasión de una cadena de DNA a otra molécula de DNA (tiene que haber homología)
- Síntesis de DNA
- Ligación
- Migración de la rama
- Resolución (separación de las dos cadenas)



Acción de las topoisomerasas durante la recombinación

