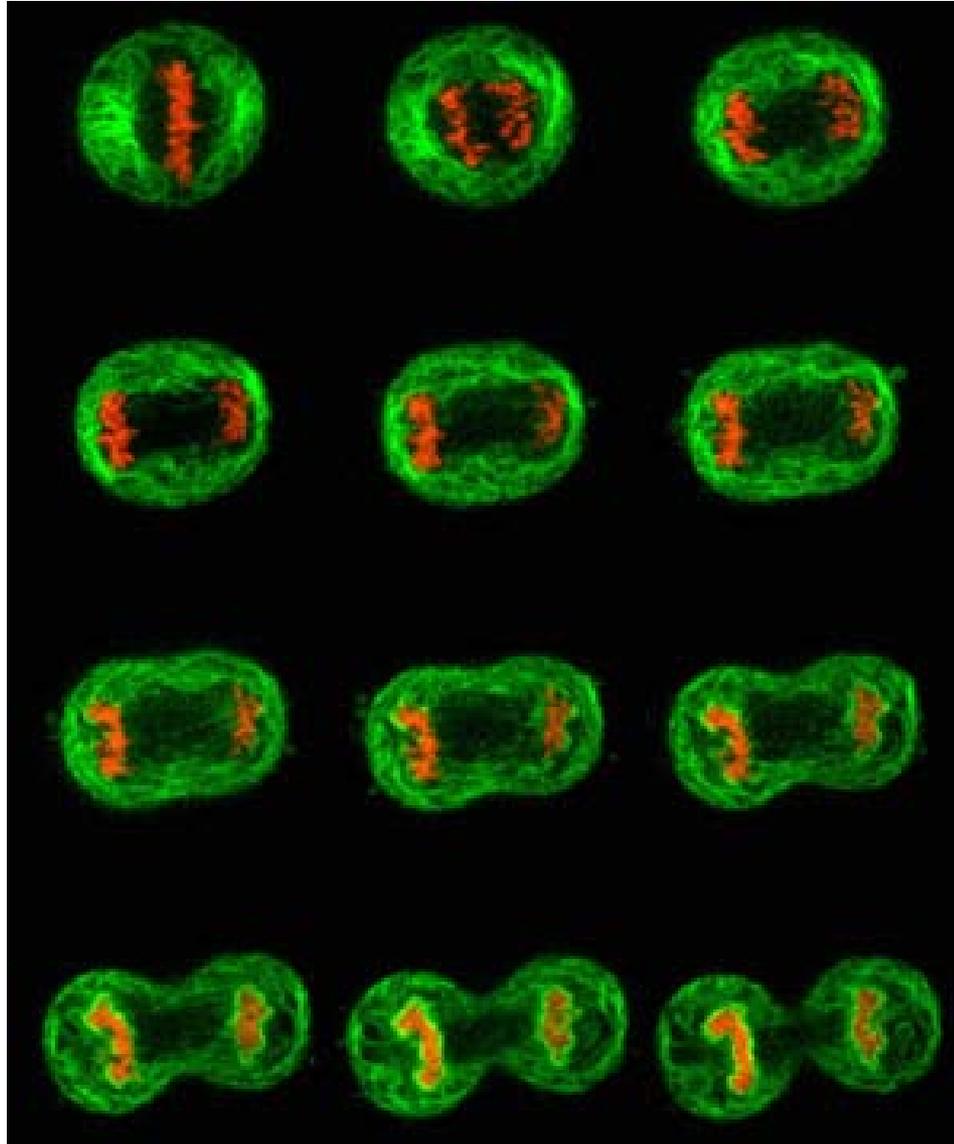


CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN: REPLICACIÓN DEL DNA Y MITOSIS

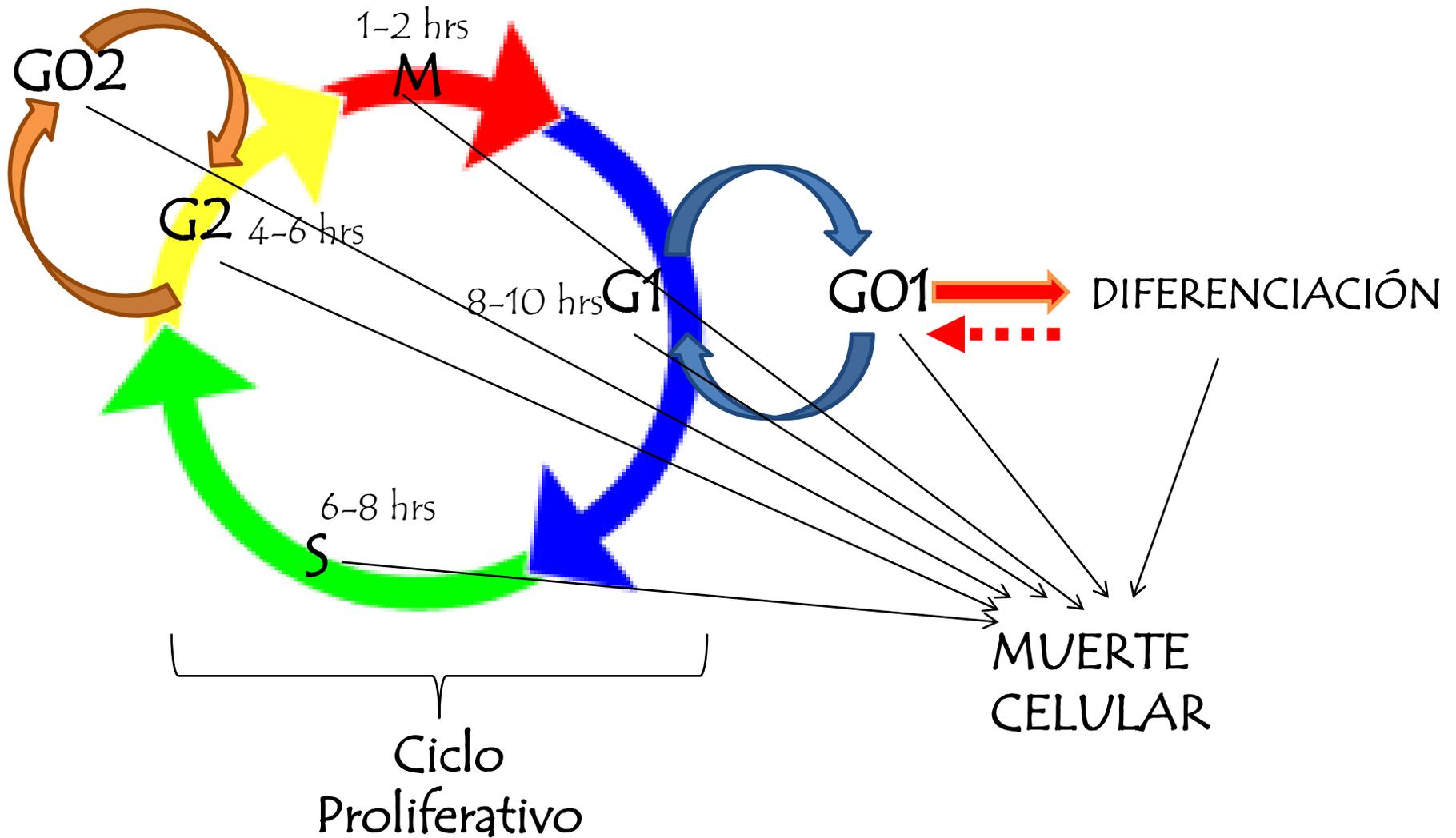


Gonzalo
Cabrera

CICLO CELULAR

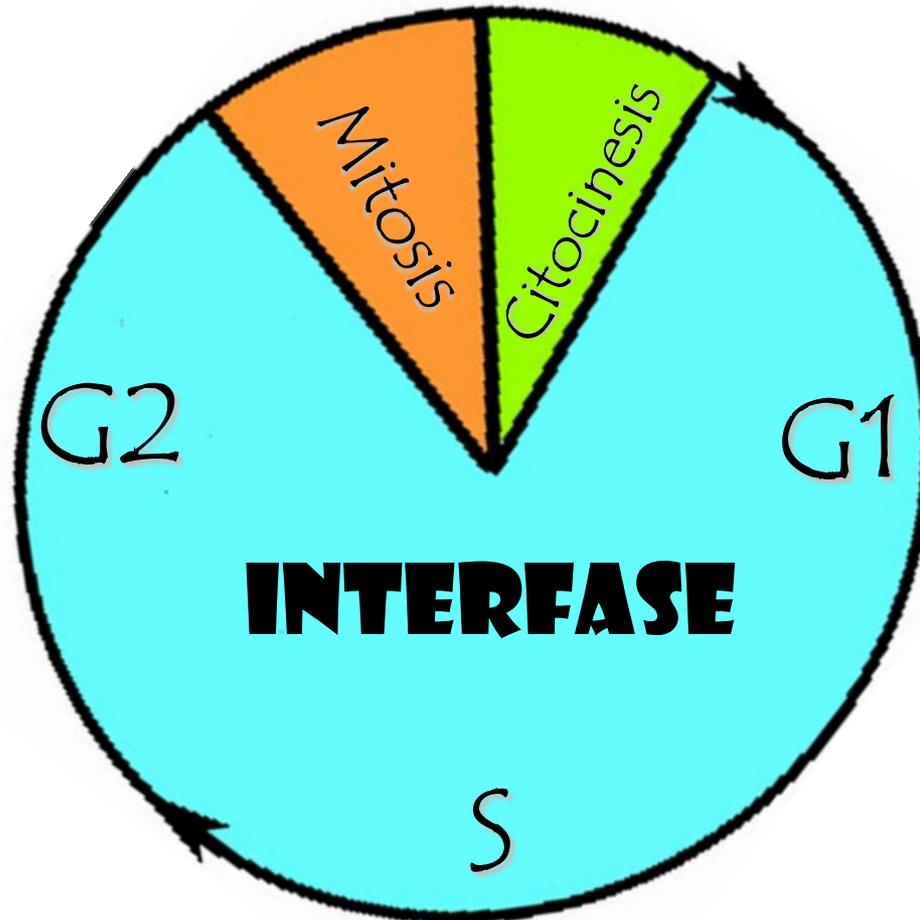
Procesos celulares, regulados a nivel genético-molecular, que llevan a una célula desde una mitosis a la siguiente, o la derivan hacia un estado diferenciado, de reposo proliferativo y funcionalidad definida. Desde el reposo proliferativo una célula puede regresar al ciclo de división celular, o ingresar a un estado de diferenciación irreversible, que termina en muerte celular.

CICLO CELULAR



Etapas del ciclo proliferativo

FASE M

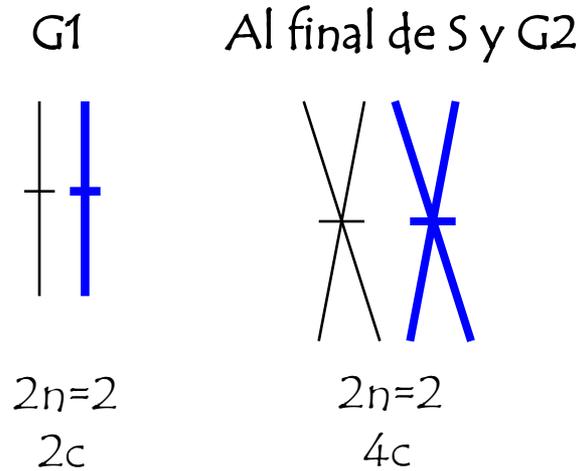


Sucesos fundamentales del ciclo proliferativo

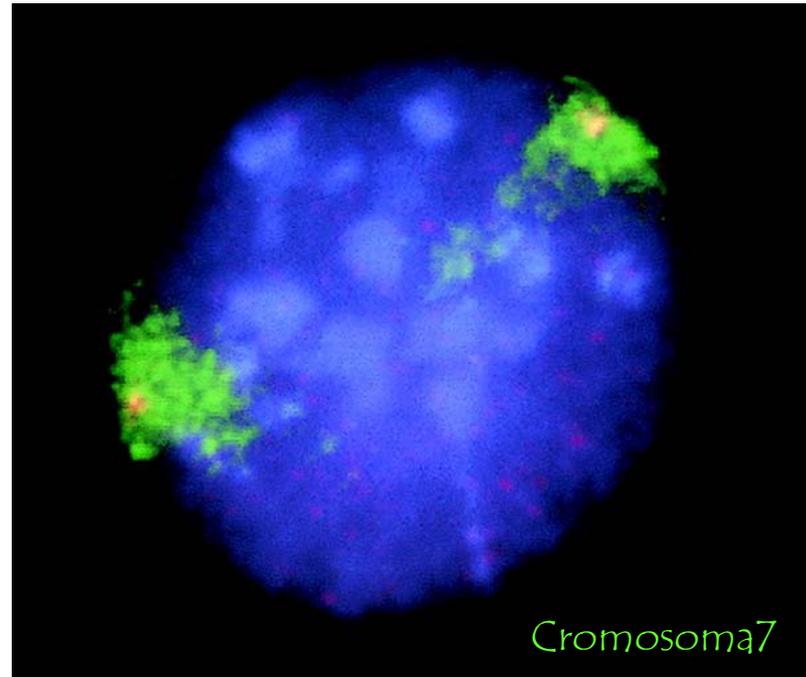
- **Crecimiento en masa de la célula:** Síntesis de RNAs y proteínas. Mínimo en metafase. Aumenta hasta el inicio de la próxima mitosis. No es necesariamente preciso.
- **Replicación del genoma (DNA):** Ocurre en un período definido (la fase S). Errores tienen graves consecuencias
- **Segregación del material duplicado:** En un período definido (la fase M). Implica segregación del genoma (mitosis) y la división del citoplasma (citocinesis). Errores tienen graves consecuencias
- **Sistema de detección de errores:** implica, entre otros, la reparación de daño al DNA y detención del ciclo proliferativo

Definiciones

- Diploide – $2n$ – doble set de cromosomas
- Haploide – $1n$ – un set de cromosomas

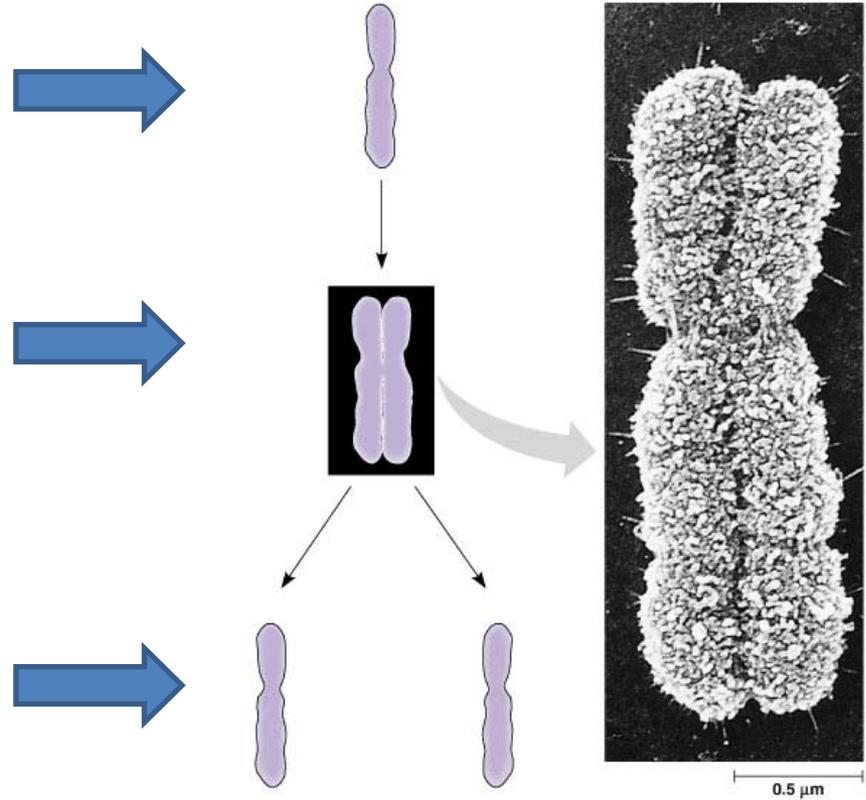


Los seres humanos somos
diploides ($2n$: 46 cromosomas)

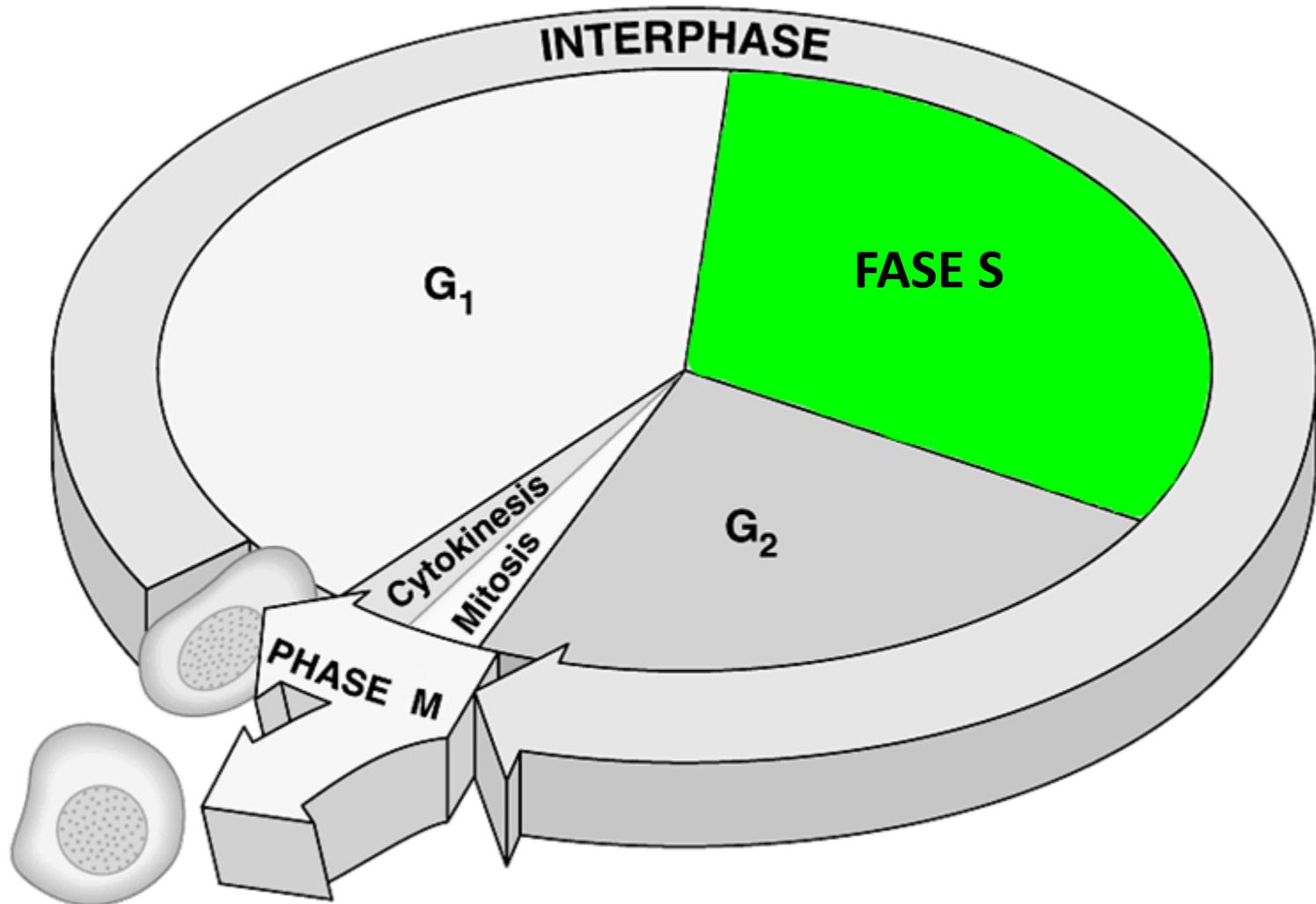


Resultado de la mitosis en un cromosoma

- Cromosoma previo a la duplicación del DNA
- Mismo cromosoma duplicado
- Dos nuevos cromosomas luego de la división

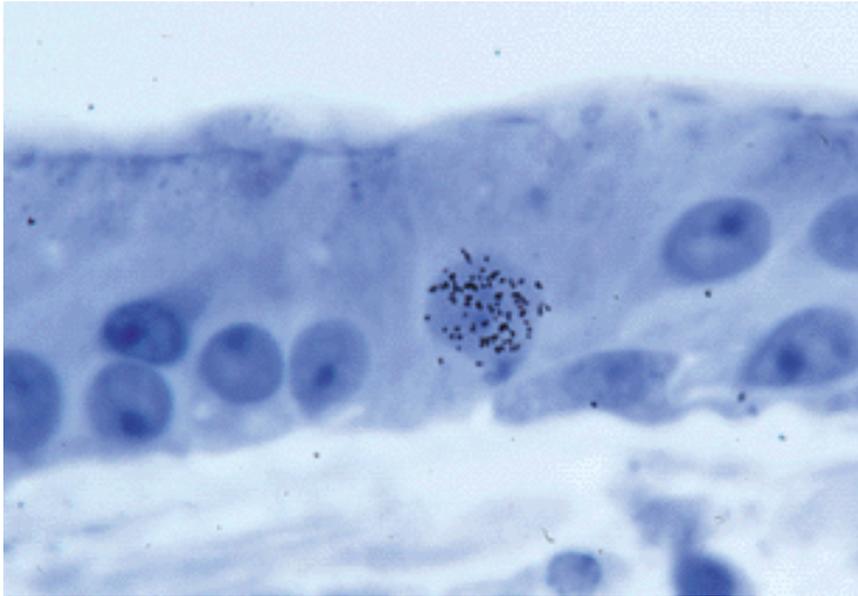


FASE S



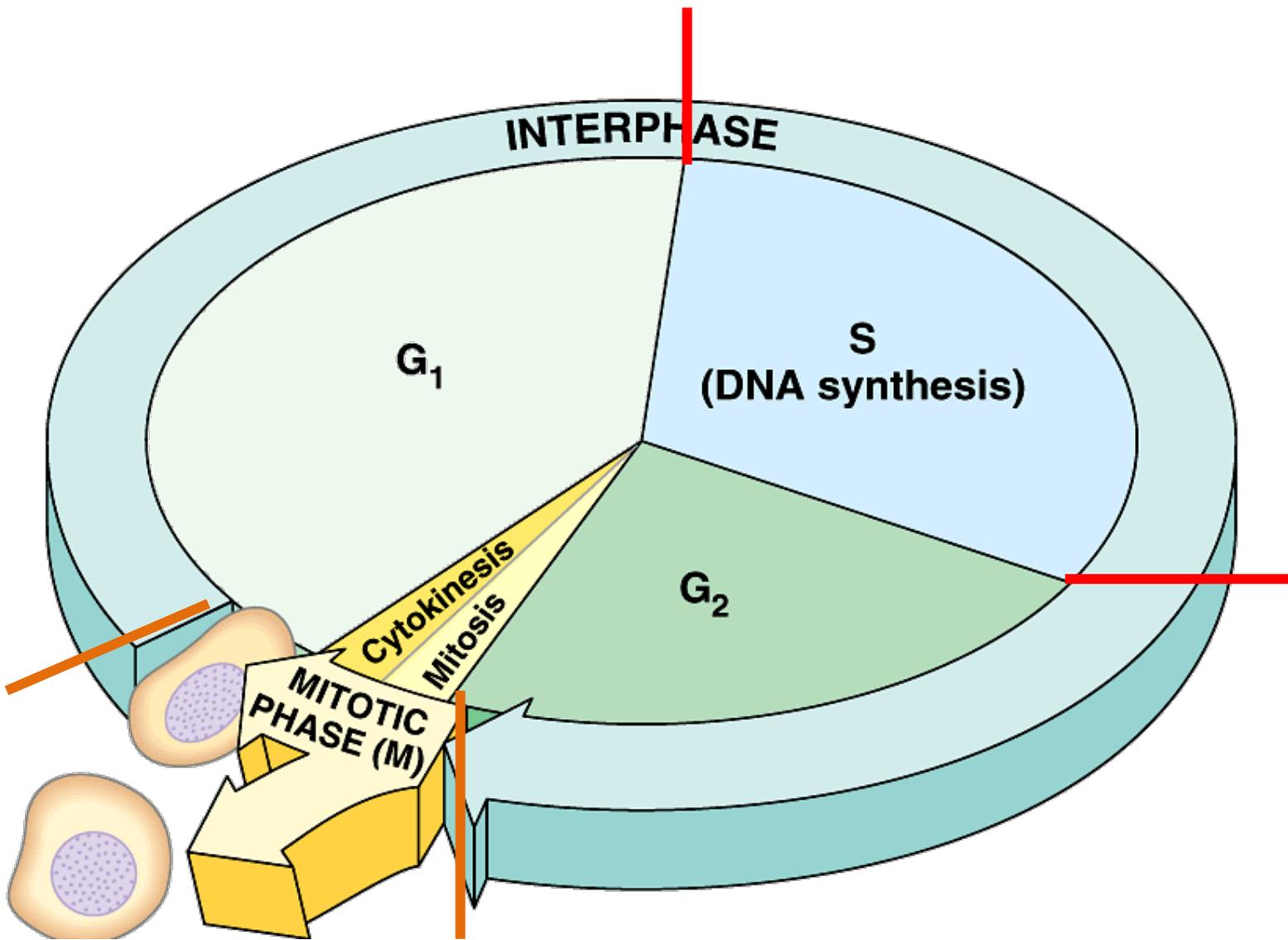
Identificación de células en S

Thy-H³ y autoradiografía



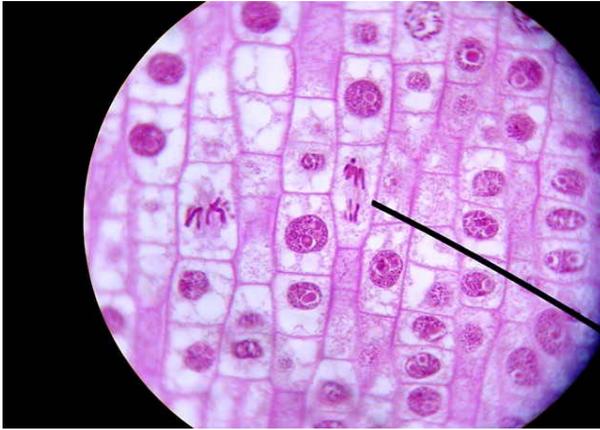
BrdUr e inmunodetección





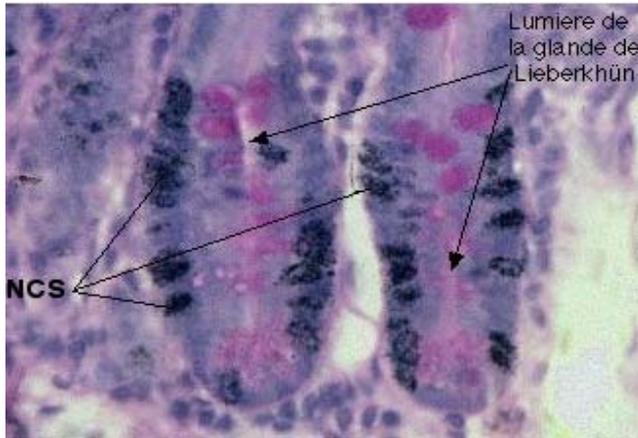
Por la duración de los procesos, es más probable observar células en S que en M

Ciclo Celular. Mediciones corrientes



Índice mitótico:

N° de células en mitosis / N° total de células



Índice de marcación:

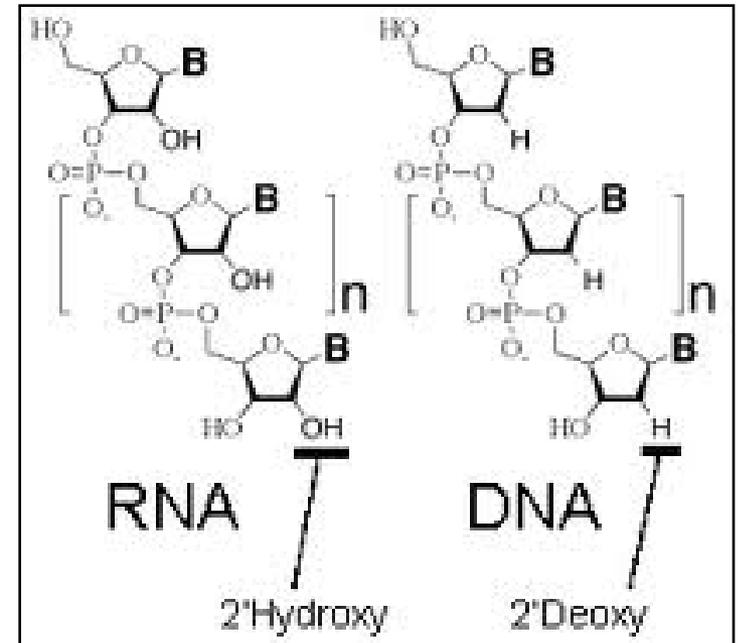
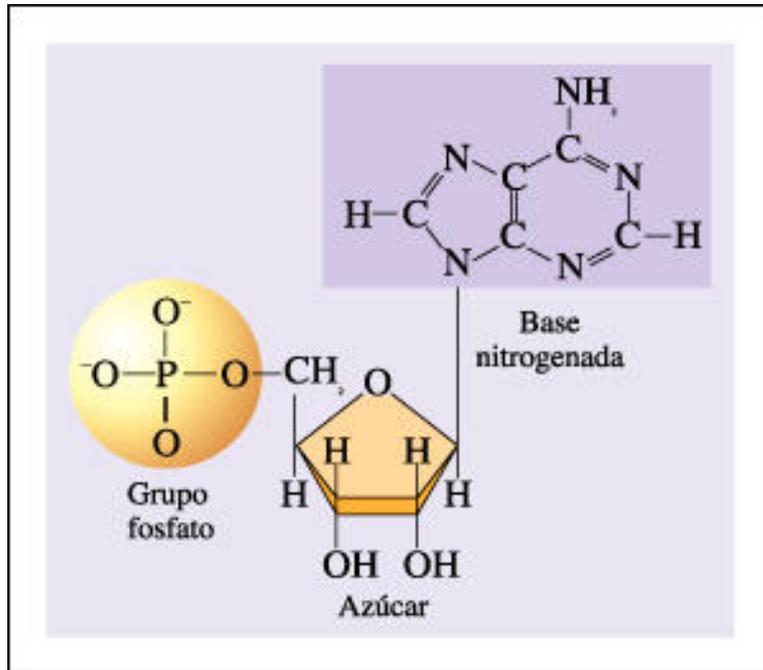
N° de células en fase S / N° total de células

FASE S: Replicación del DNA



Estructura del DNA

Los nucleótidos son las subunidades del **DNA** (ácido desoxirribonucleico) y del **RNA** (ácido ribonucleico).



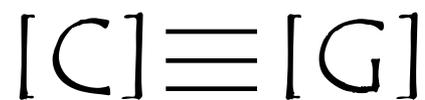
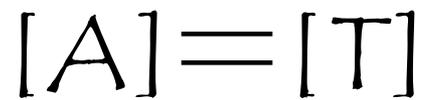
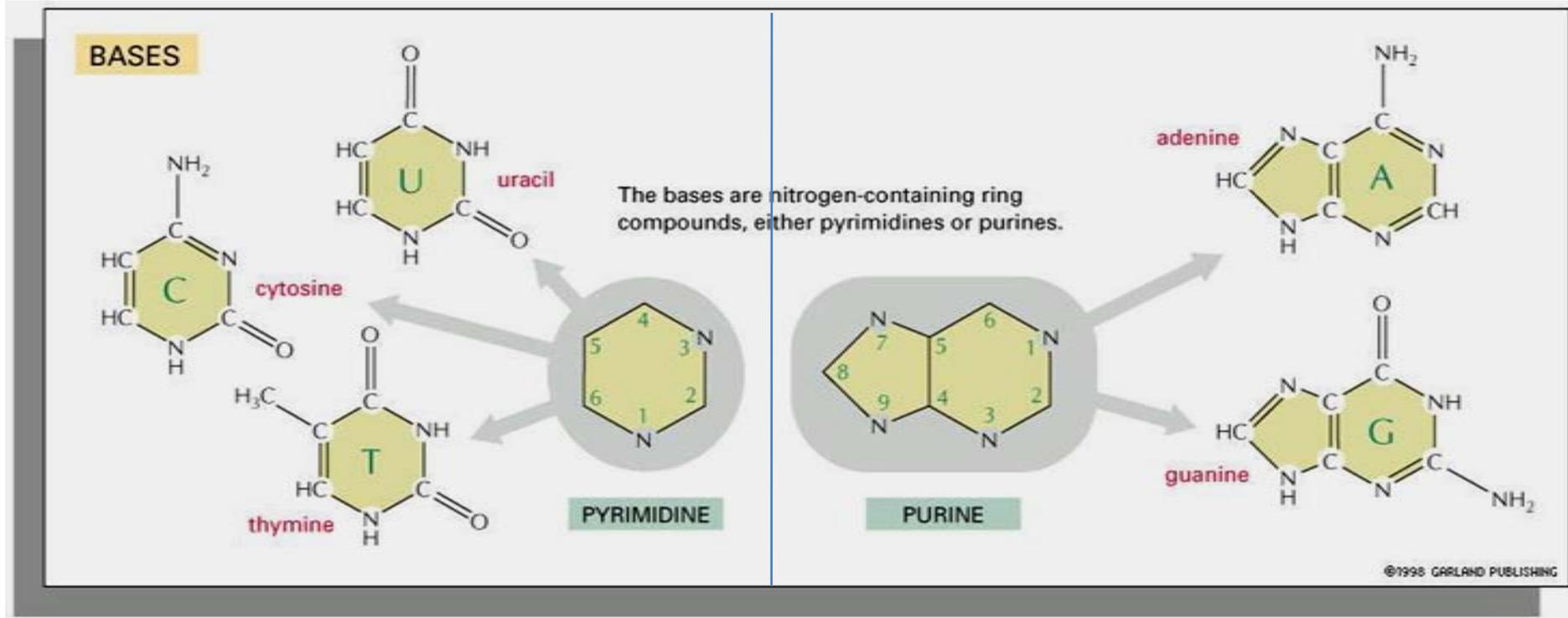
Desoxirribosa (H)

Ribosa (OH)

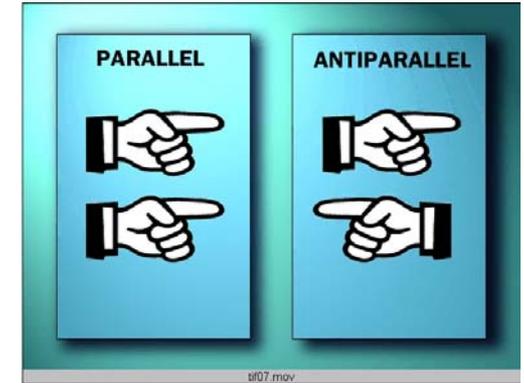
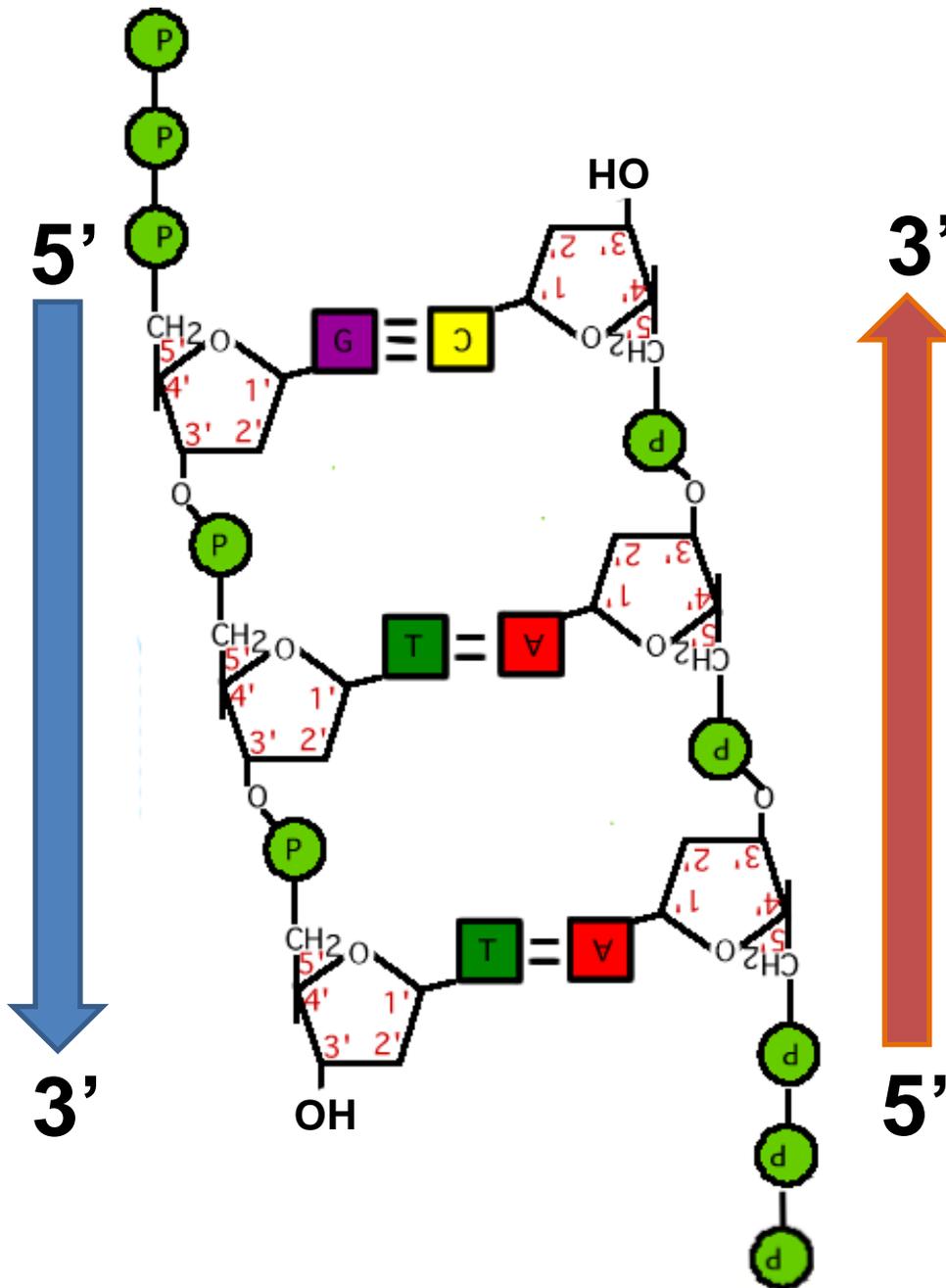
ÁCIDOS NUCLÉICOS (Nucleótido):

- Azúcar (pentosa): Ribosa o Desoxirribosa
 - Base nitrogenada
 - Grupo fosfato
- } Nucleósido

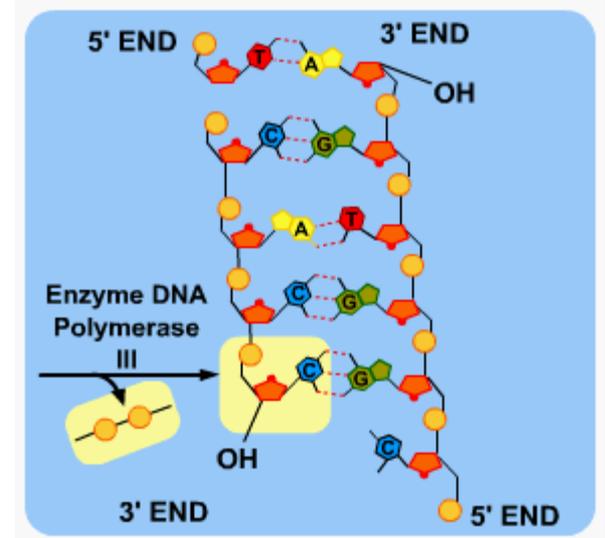
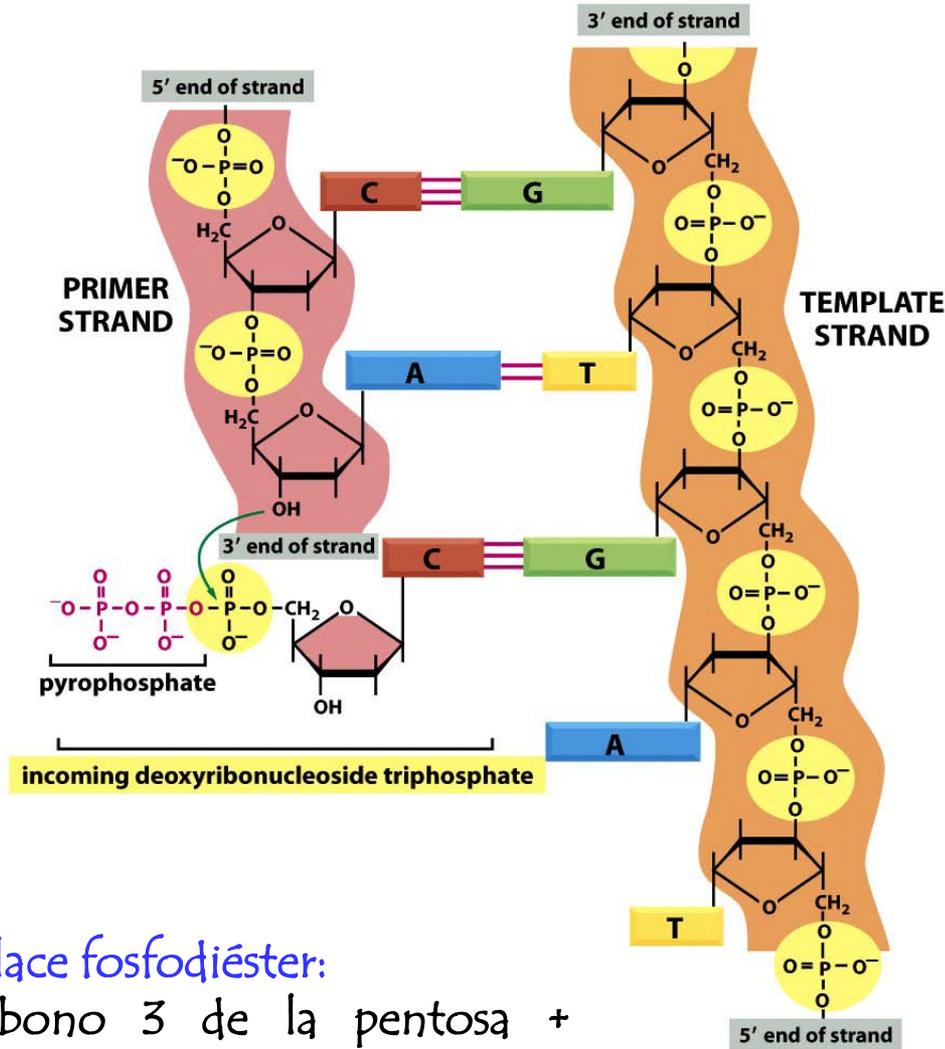
Bases Nitrogenadas



Antiparalelismo del DNA



Enlaces entre nucleótidos



Enlace fosfodiéster:
carbono 3 de la pentosa +
carbono 5 de la pentosa del
nucleótido adyacente

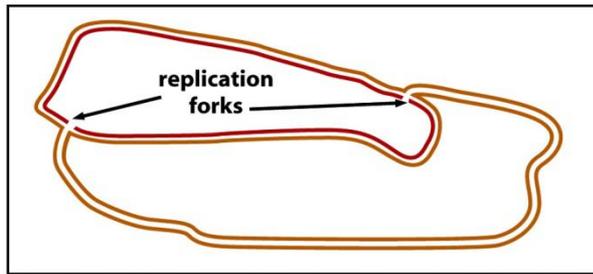
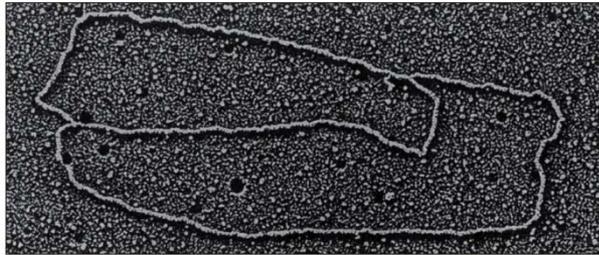


Orígenes de replicación

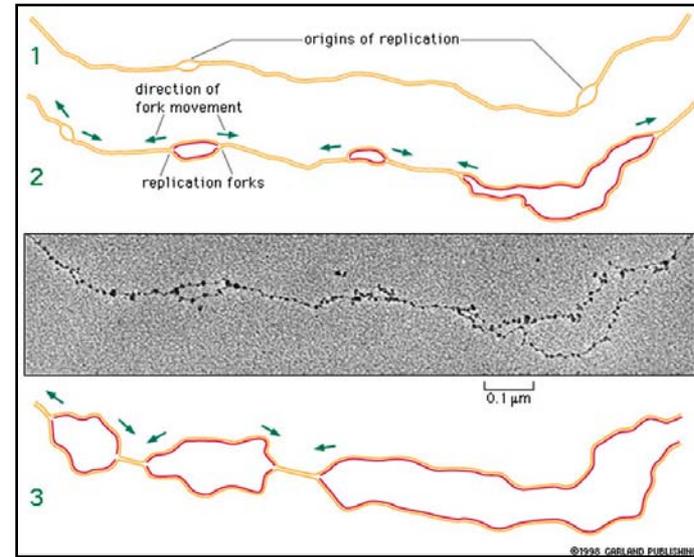
- Genoma humano: 3.000×10^6 bases
- 1 cromosoma promedio: 150×10^6 bases
- Velocidad de replicación: 50–90 bases por segundo
- Tiempo teórico de duplicación: 800 horas !!!!
- Tiempo real de duplicación del genoma: 8 horas

Orígenes de replicación

Procariontes

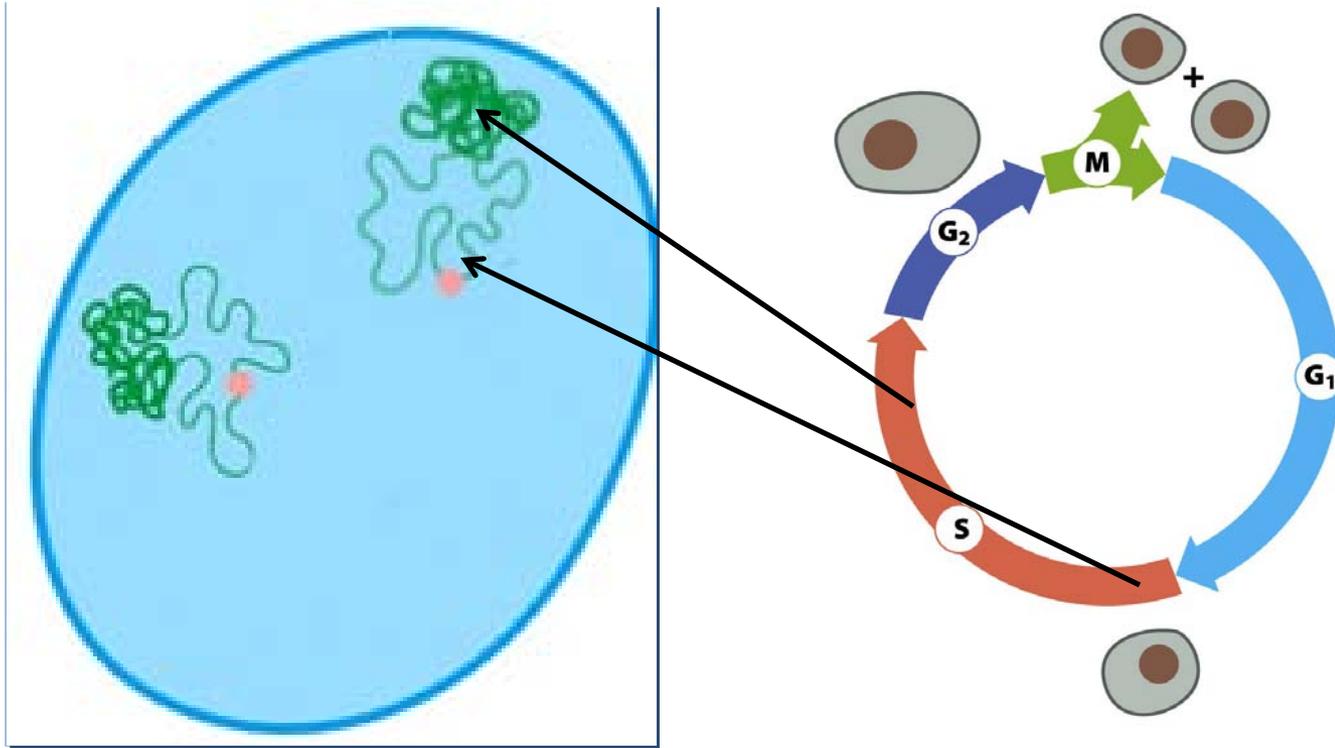


Eucariontes



- ◇ Tanto en eucariontes como en procariontes, la replicación comienza en lugares específicos del DNA llamados orígenes de replicación.
- ◇ En estos puntos, las dos hebras de DNA se separan formando una horquilla de replicación.
- ◇ La presencia de múltiples orígenes de replicación (replicones) aumenta la eficiencia del proceso.

Orígenes de replicación

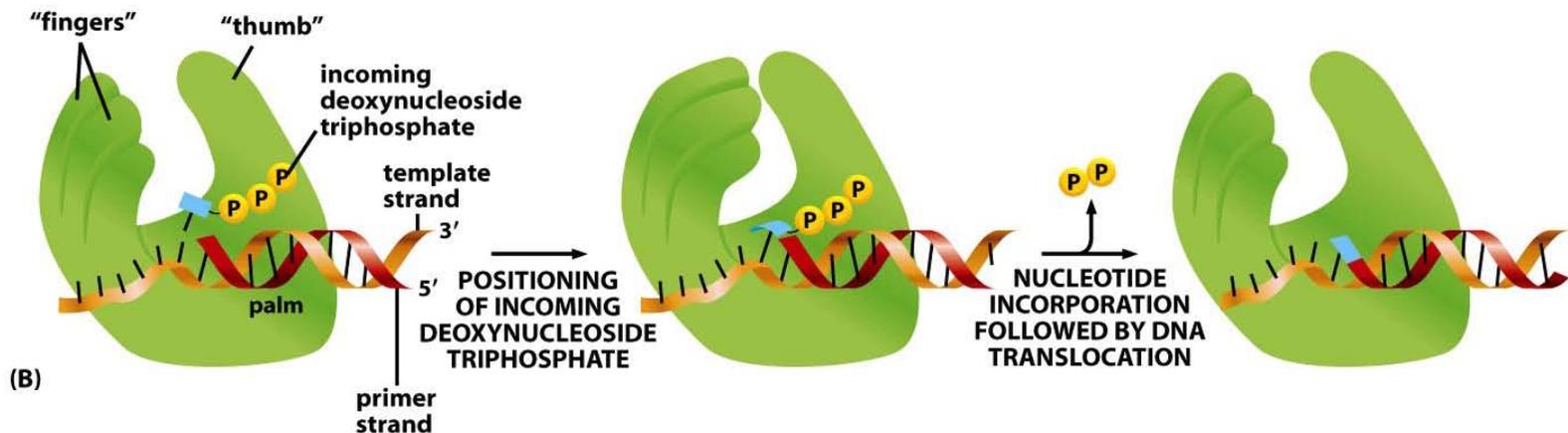


- ◇ No todos los orígenes de replicación se activan simultáneamente, esto depende, en parte, del grado de condensación de la cromatina
- ◇ En general:
 - Cromatina menos condensada replica temprano en la fase S
 - Cromatina condensada replica en S tardío

DNA polimerasas eucariontes

- Dos de ellas replican los cromosomas:
 - (α) comienza la síntesis del DNA de novo porque presenta una subunidad primasa
 - (δ) alarga los fragmentos de DNA
- Algunas de ellas están relacionadas con reparación del DNA (β y ϵ)
- Una de ellas replica y repara el DNA mitocondrial (γ)

OJO: Las DNA polimerasas sólo sintetizan DNA en dirección 5' a 3'



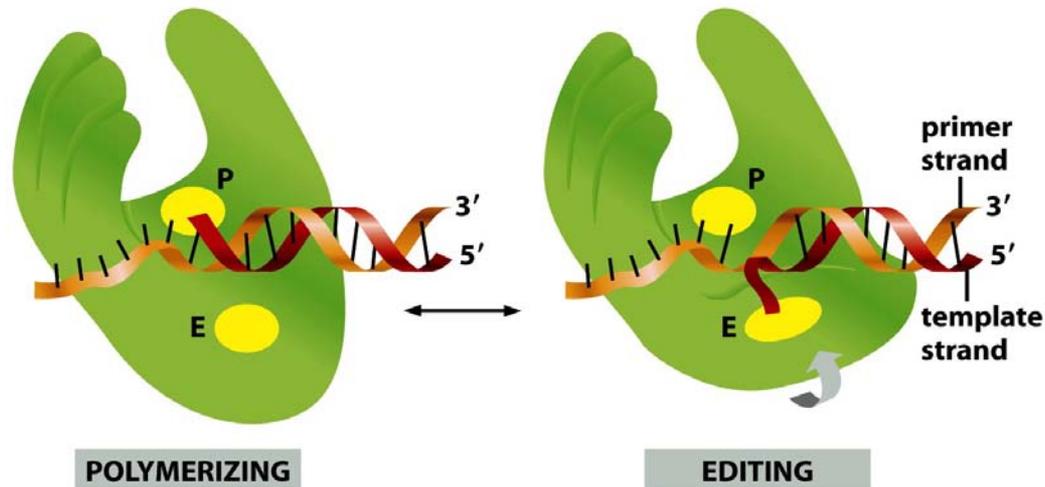
Rectificación de errores de la replicación

La DNA polimerasa δ comete 1 error cada 10^5 nucleótidos. Sin embargo, luego de la replicación sólo es posible detectar 1 error cada 10^9 nucleótidos.

Proofreading o corrección de copia

Durante la replicación (fase S):

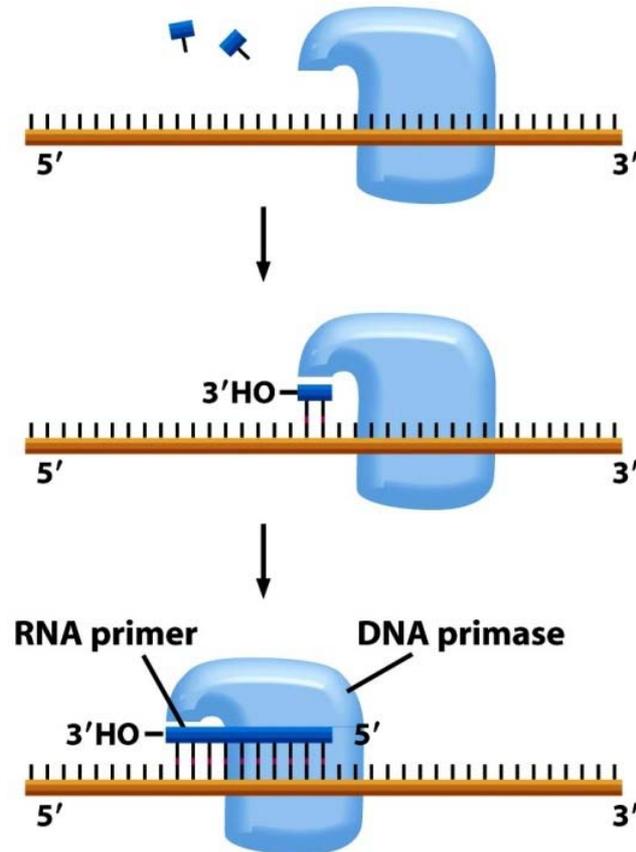
La reparación de errores de replicación se lleva a cabo por la acción **exonucleasa 3' - 5'** de la DNA polimerasa, que **elimina la base errónea y la reemplaza por la correcta**. Esta función se denomina "proofreading" o corrección de copia y ocurre durante la replicación. La polimerasa detecta la distorsión que ocurre por el mal apareamiento de bases



DNA Primasa

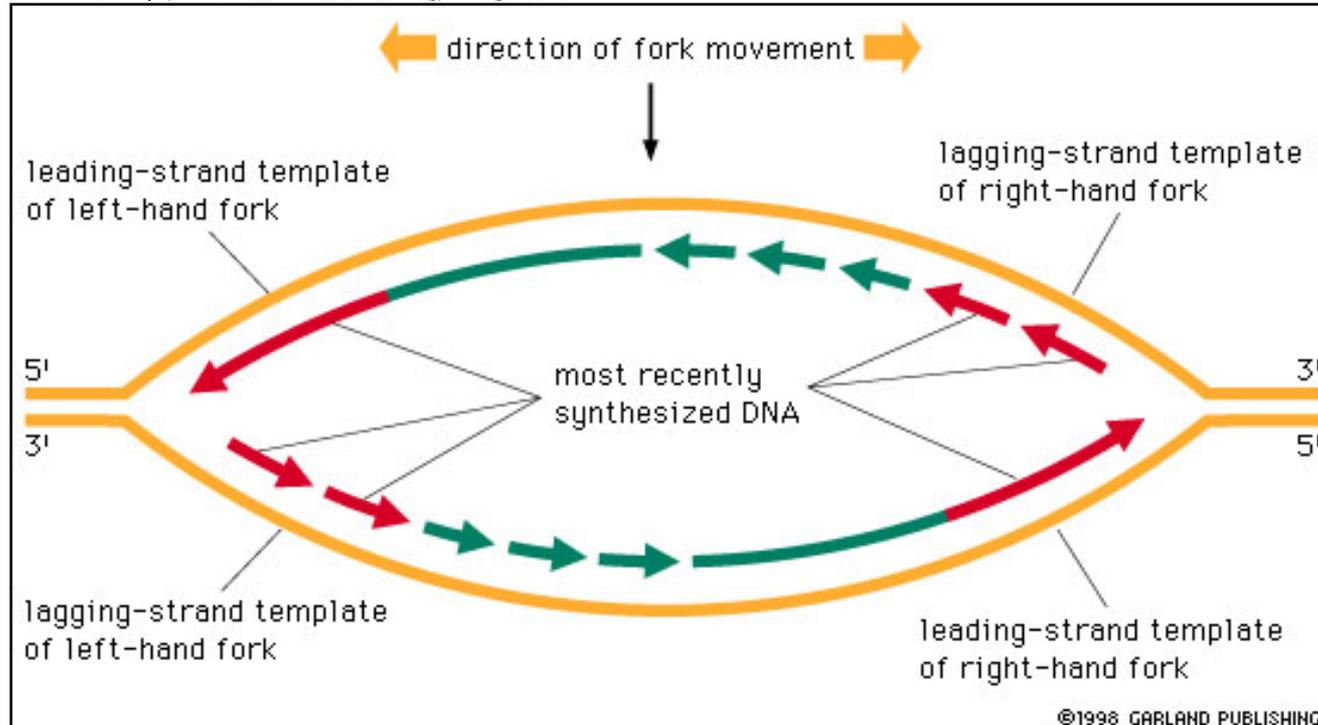
Las DNA polimerasas **NO PUEDEN INICIAR** la síntesis de DNA de novo.

La DNA plimerasa α presenta una subunidad DNA primasa que cataliza la síntesis de pequeños partidores de RNA de aproximadamente 10 nucleótidos, para que a partir de esta molécula (**cebador o primer**) se comience a polimerizar DNA.



¿Cómo puede crecer la cadena de DNA en dirección 3'-5'?

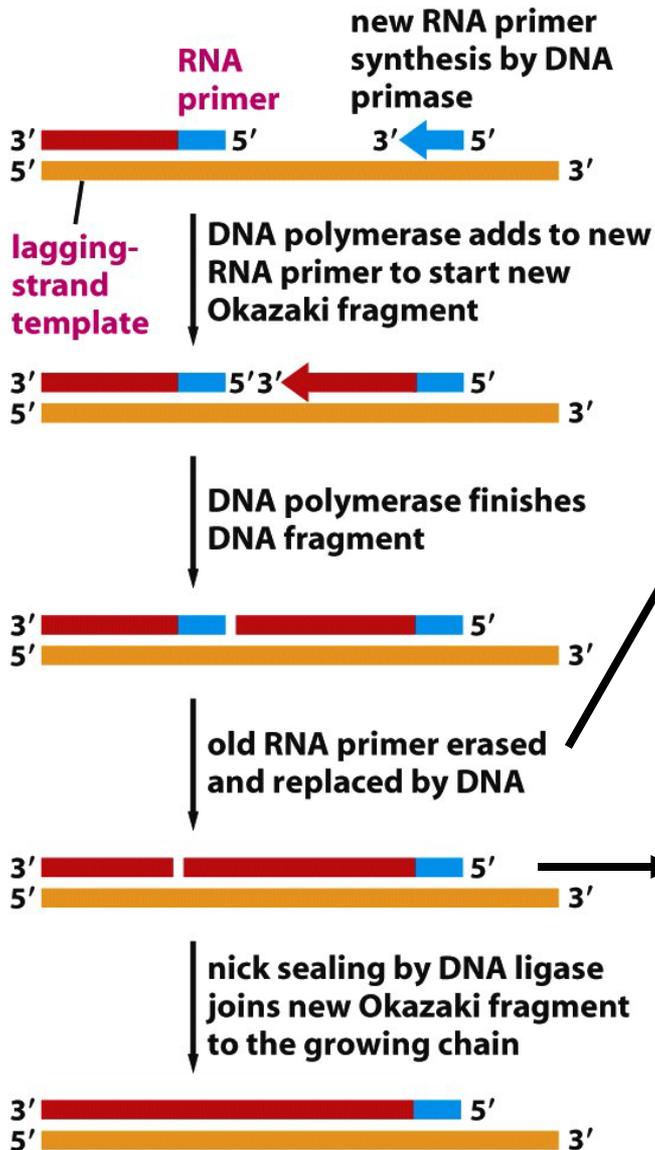
BURBUJA DE REPLICACIÓN



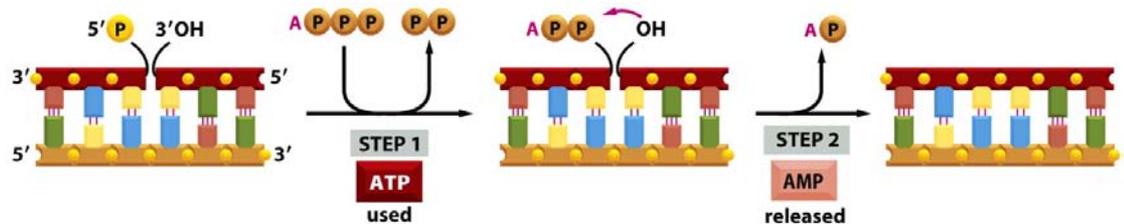
HORQUILLA DE REPLICACIÓN



Síntesis de fragmentos de DNA en la hebra retrasada

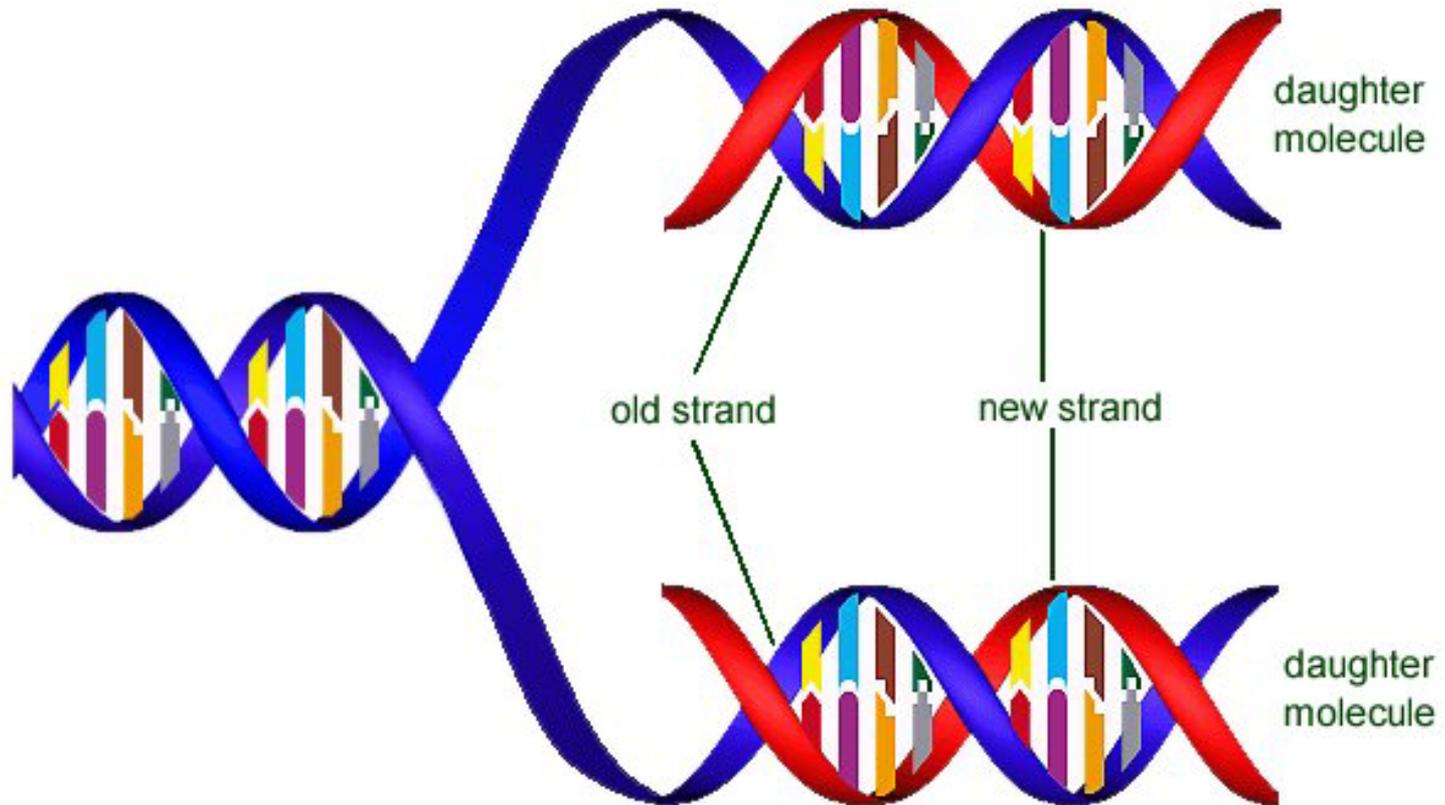


RNAse H



DNA LIGASA: sella los enlaces fosfodiester de cadenas contiguas. Utiliza ATP

Replicación del DNA: Semiconservativa

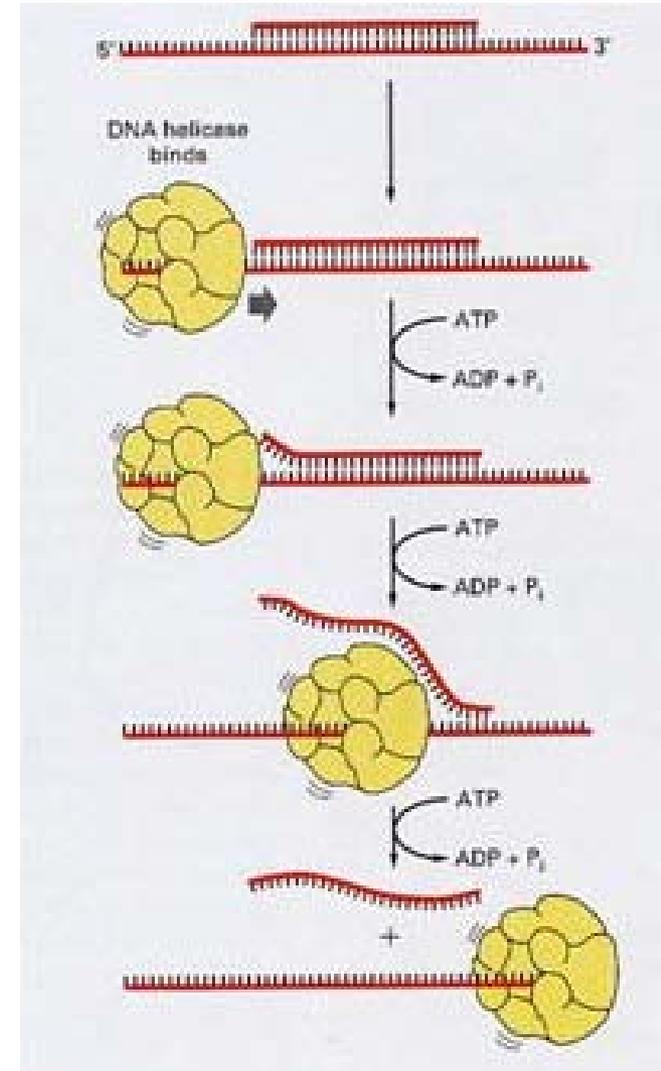
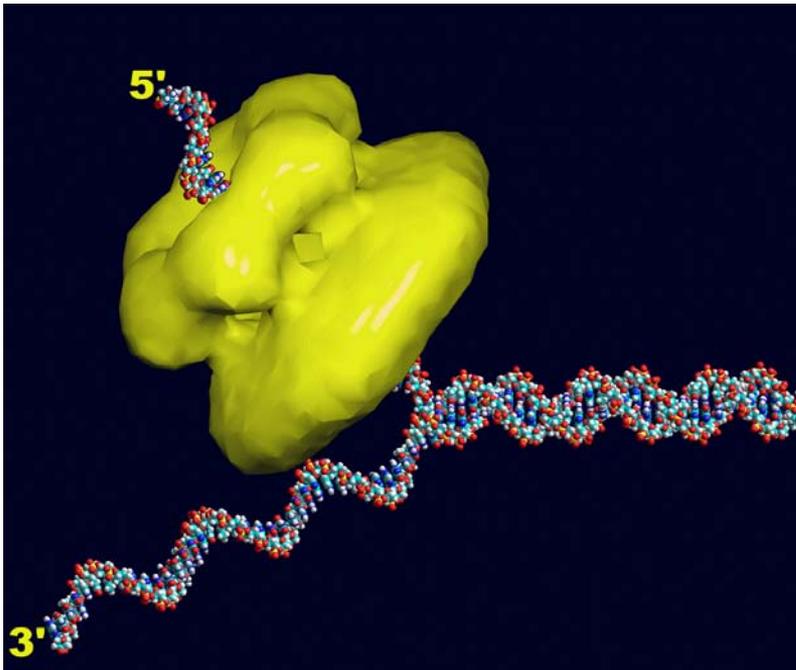


Así, la replicación del DNA es un proceso:

- Bidireccional (2 horquillas)
- Semiconservativo
- Semidiscontinuo (fragmentos de okazaki)

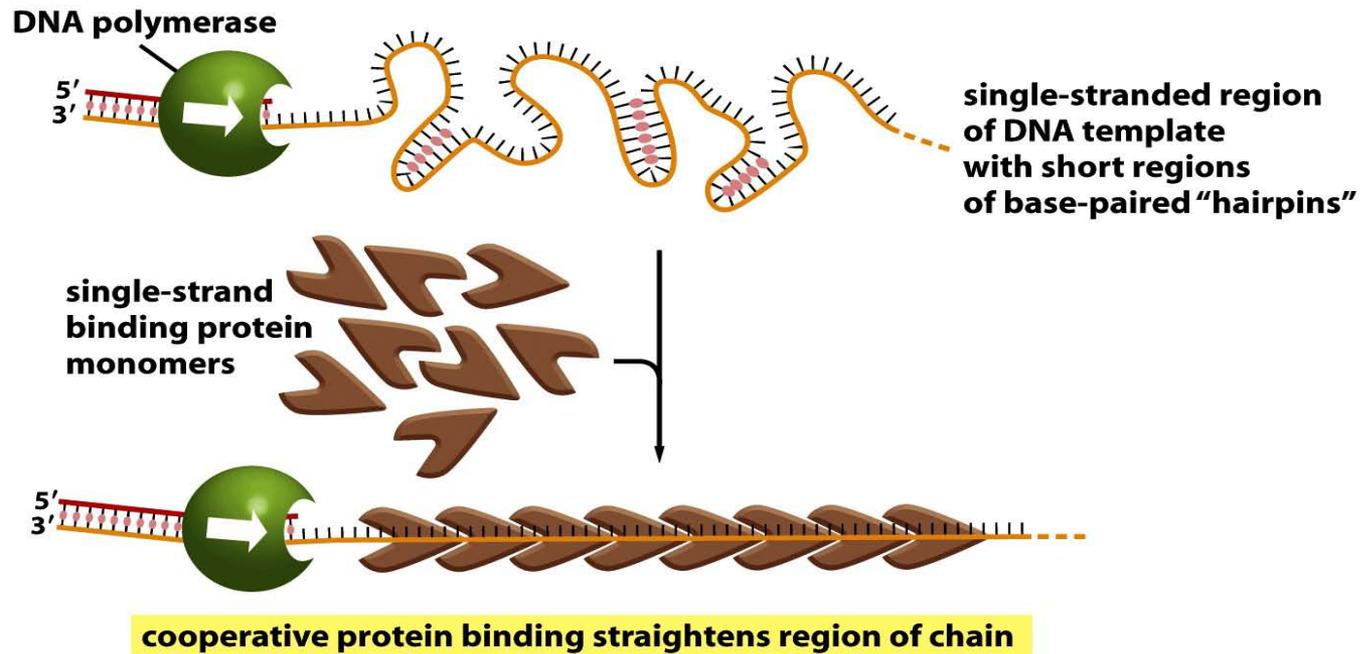
DNA Helicasa

Rompe los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas del DNA, haciendo posible que las DNAs polimerasas puedan realizar la síntesis de DNA



Proteínas de unión a la hebra simple del DNA

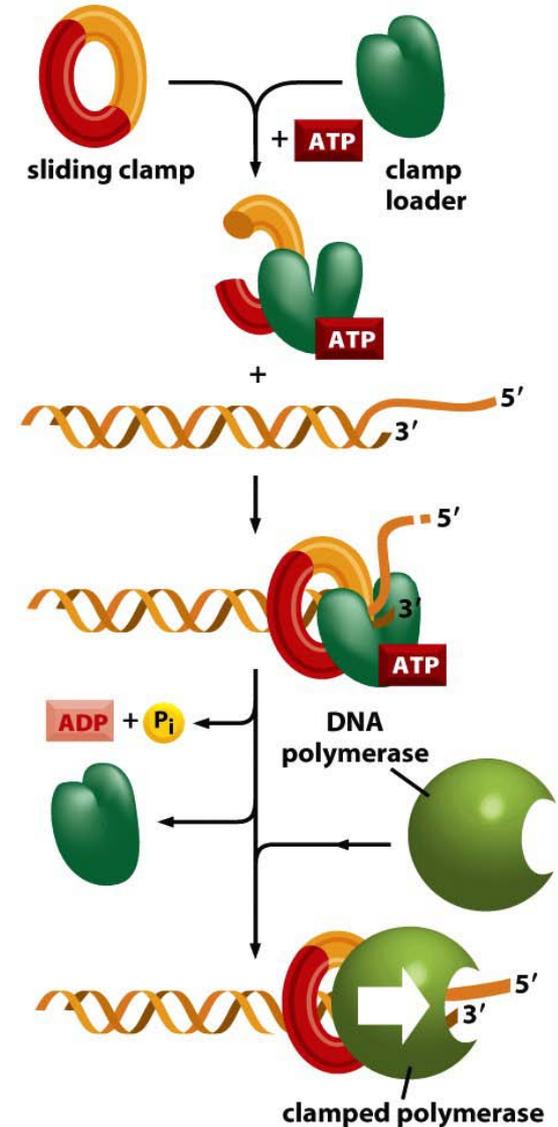
(Single-strand DNA-binding proteins or SSB proteins)



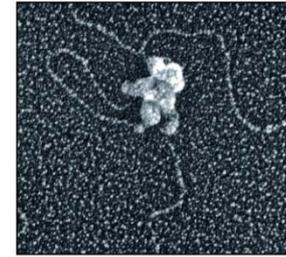
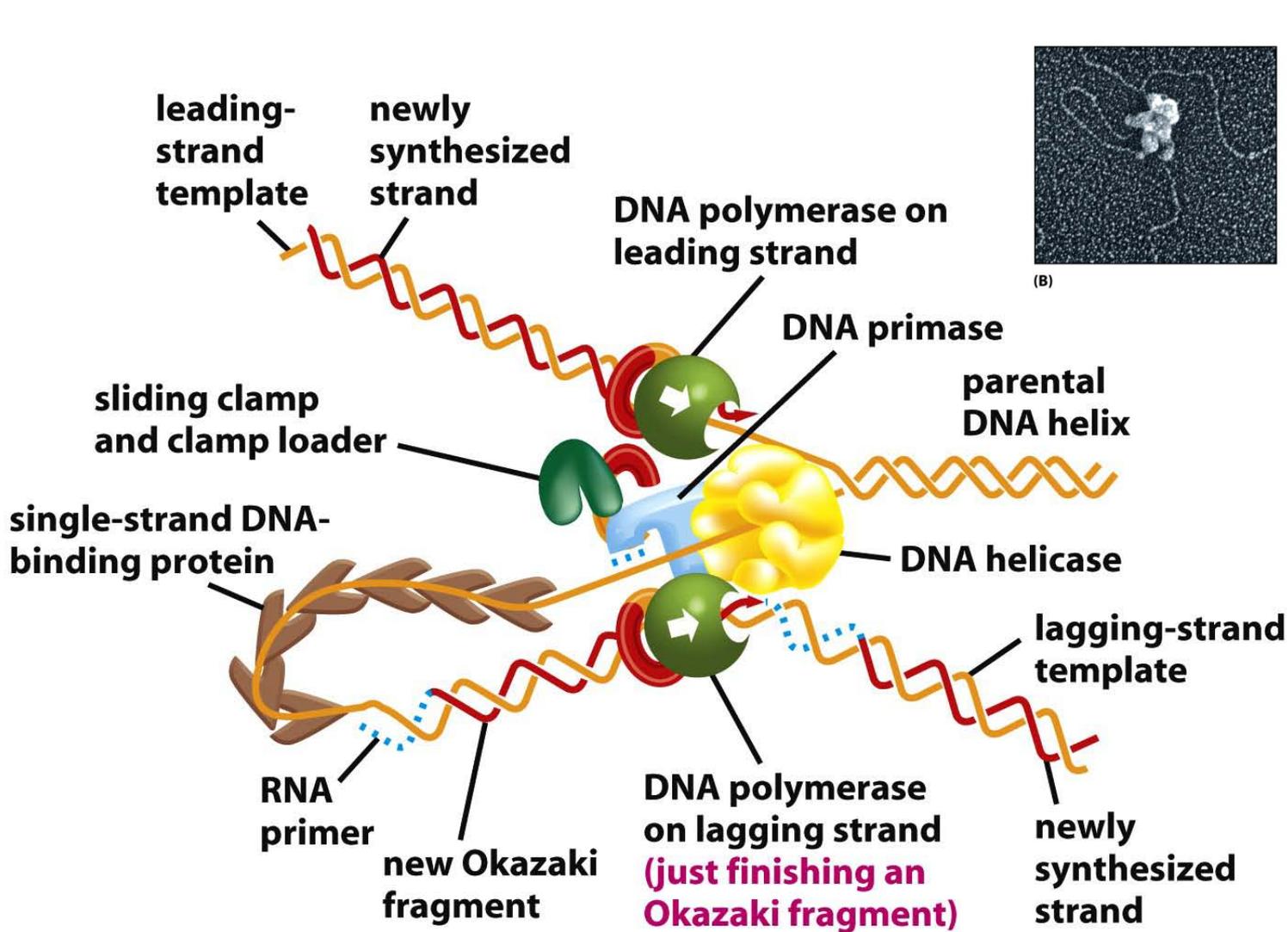
1. Exponen DNA de hebra simple, sin ocultar las bases, para que sea utilizado por las DNAs polimerasas como molde.
2. Impiden la formación de estructuras secundarias del DNA de hebra simple principalmente en la hebra retrasada

Sliding Clamp o PCNA (abrazadera deslizante)

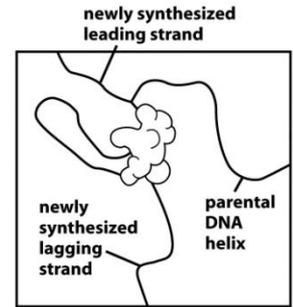
Mantiene la DNA polimerasa firme en el DNA
(procesividad) y se libera al alcanzar una región de
DNA doble hebra



Maquinaria de replicación



(B)



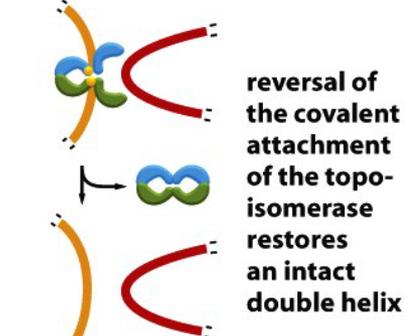
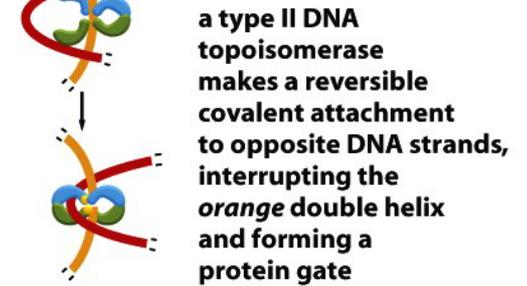
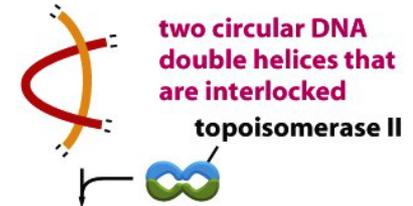
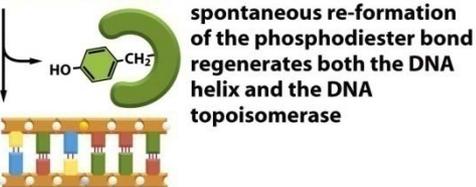
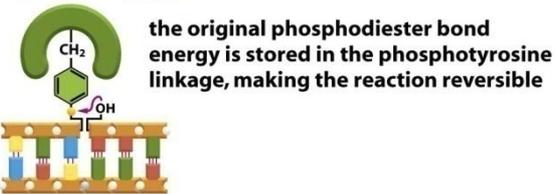
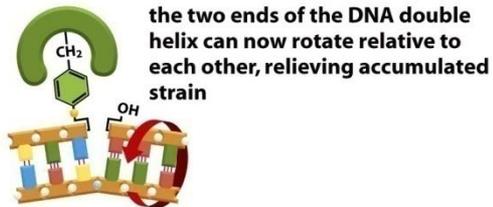
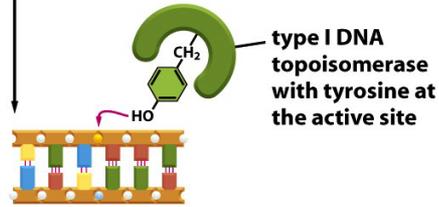
(C)



DNA topoisomerase I

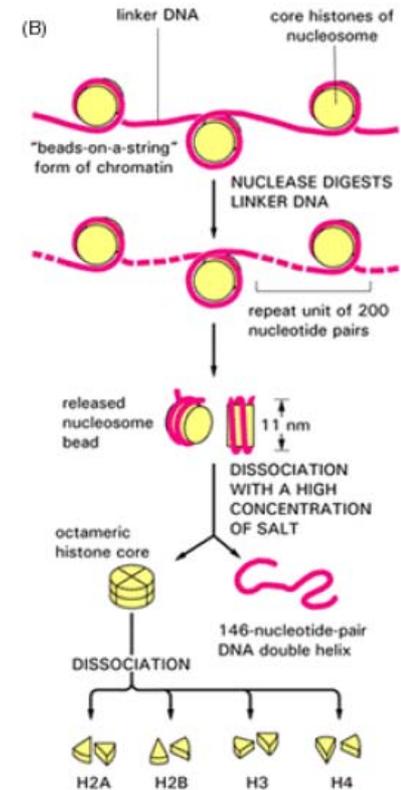
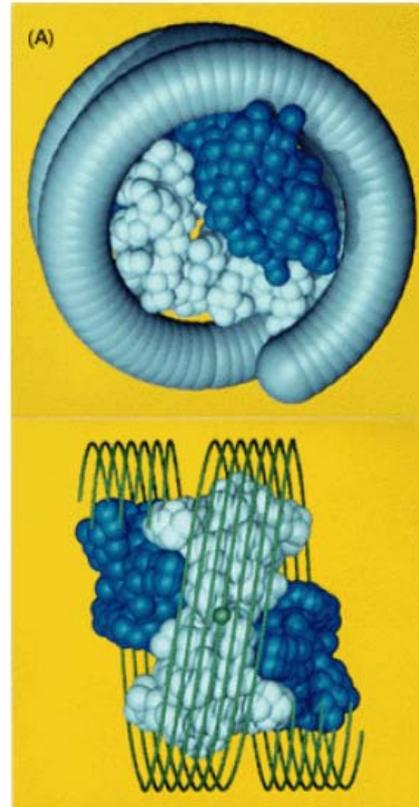
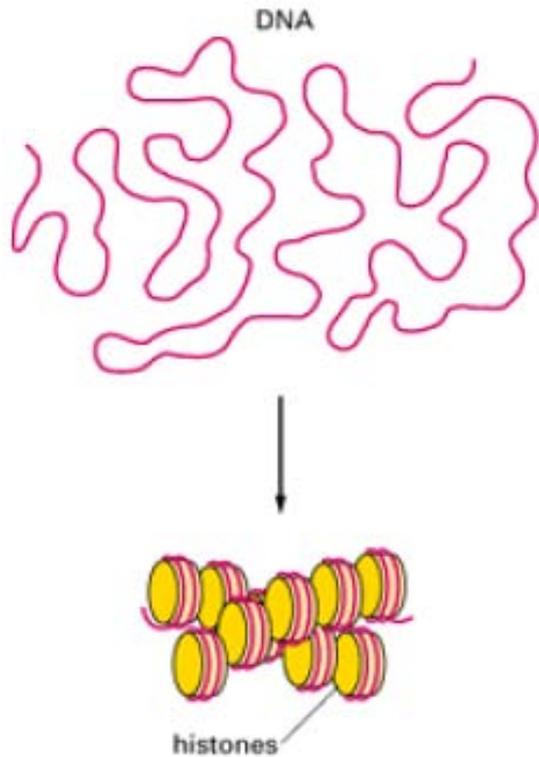
DNA topoisomerase II

one end of the DNA double helix cannot rotate relative to the other end



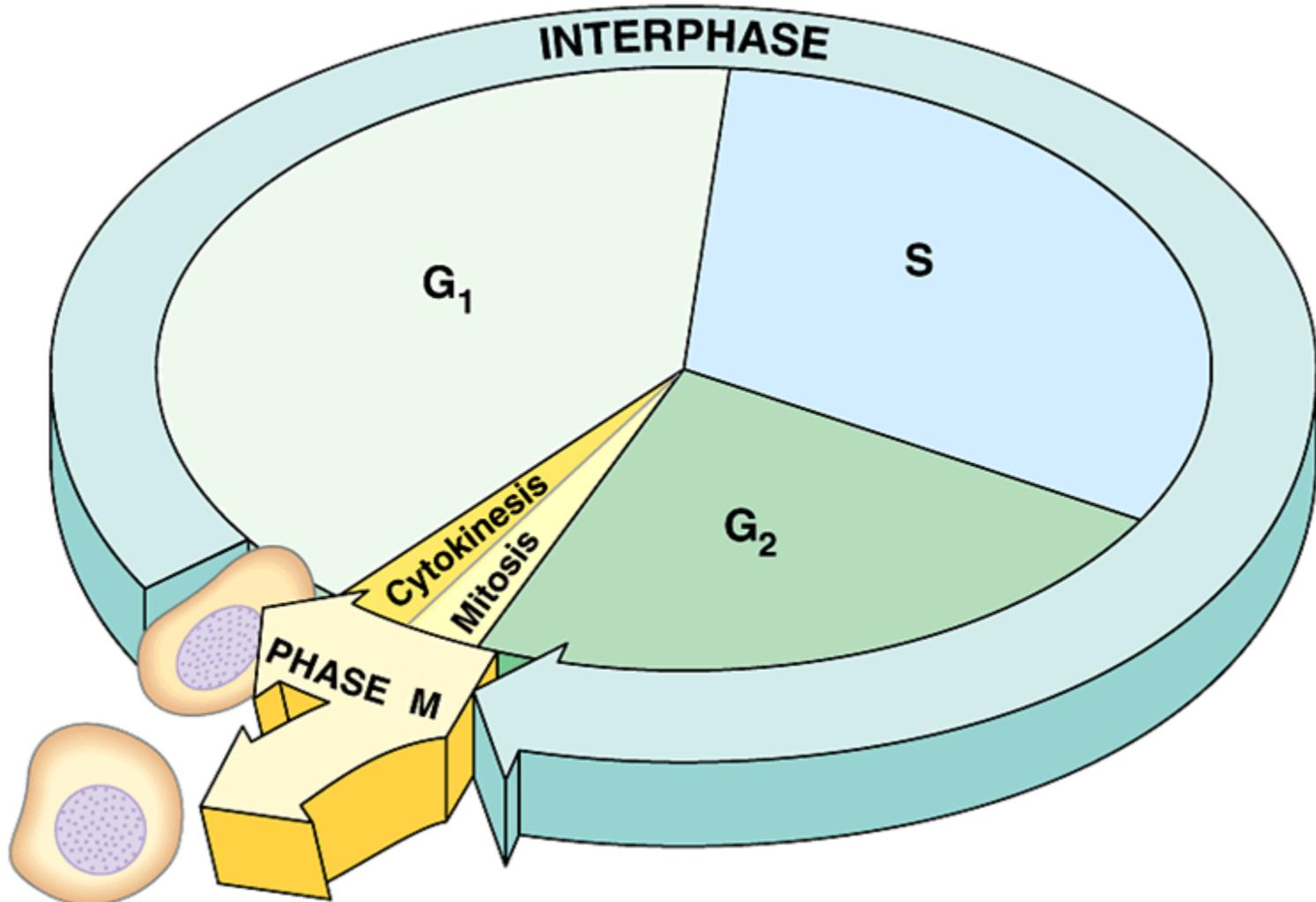
two circular DNA double helices that are separated

El DNA se encuentra asociado a histonas (cromatina)

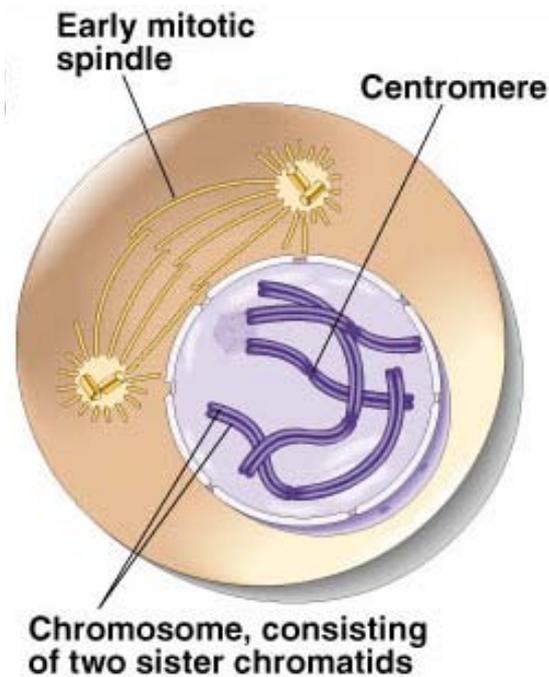


- ◇ Se requiere de **proteínas encargadas de remodelar la cromatina**, que permiten desestabilizar la asociación DNA-histonas para que avance la maquinaria de replicación
- ◇ Se necesita la **activa síntesis de histonas en la fase S**.

FASE M

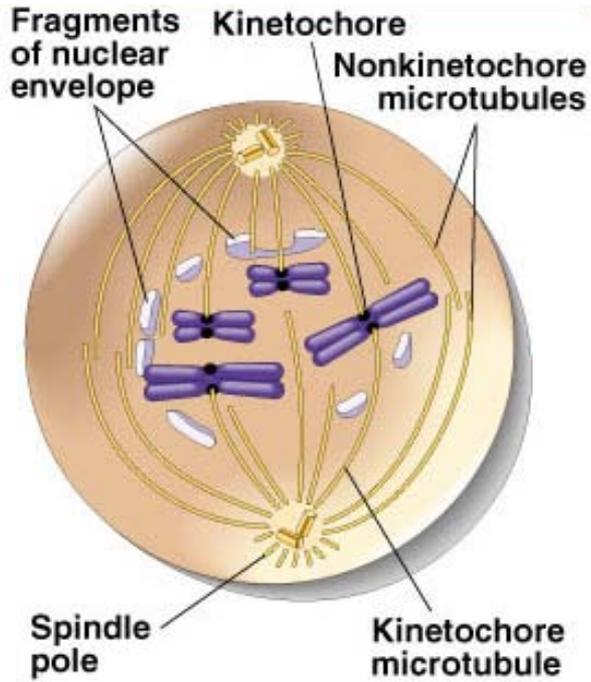
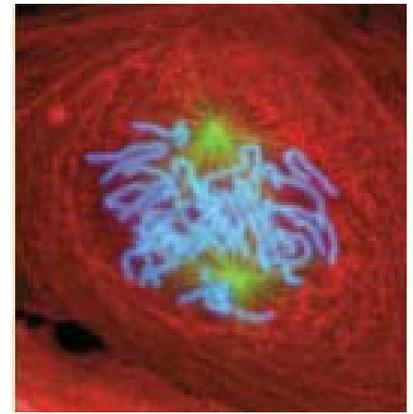


1. Profase



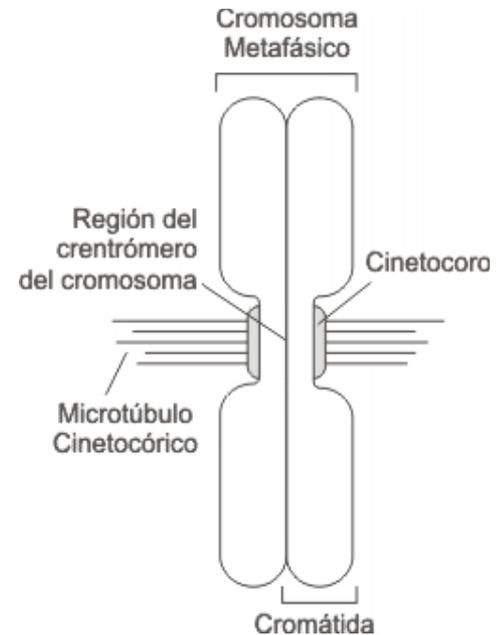
- La cromatina, se condensa lentamente formando cromosomas definidos, cuyo número exacto es característico de cada especie.
- Cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas.
- Pares de centriolos comienzan a separarse. Se organiza entre ambos pares un sistema de microtúbulos que constituyen el huso mitótico

2. Prometafase

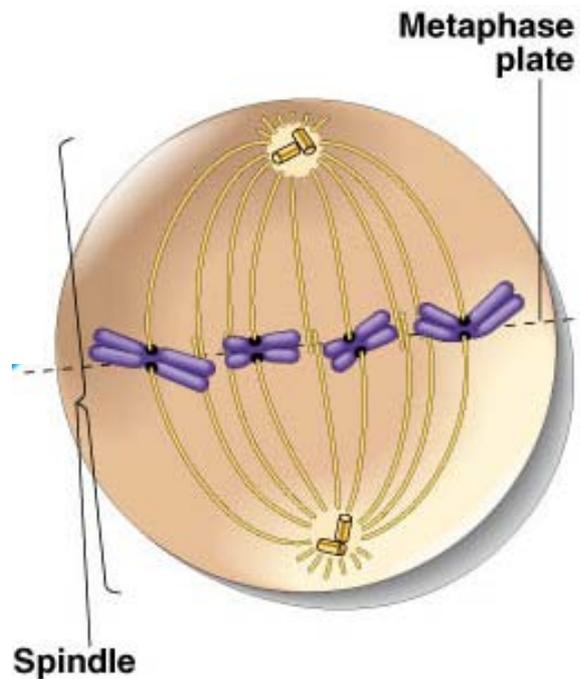
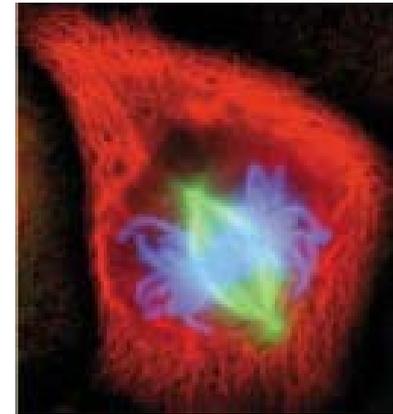


- Desintegración de la envoltura nuclear (NO EXISTE NUCLEO DEFINIDO).

- En cada centrómero maduran complejos proteicos llamados **cinetocoros** que se unen a los microtúbulos del huso.

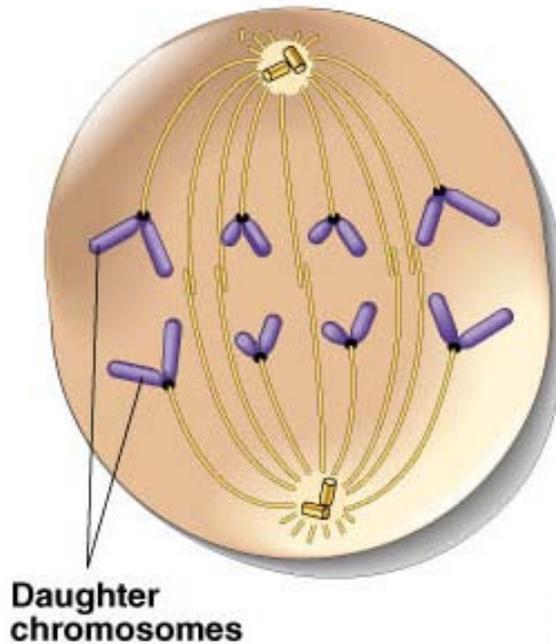
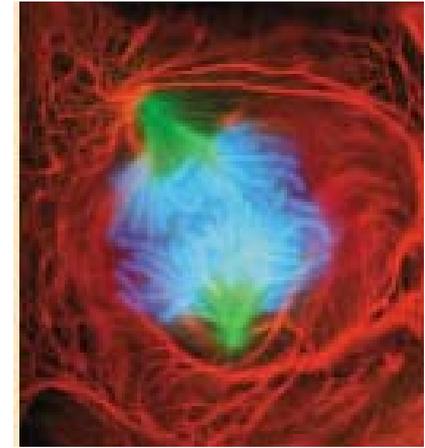


3. Metafase



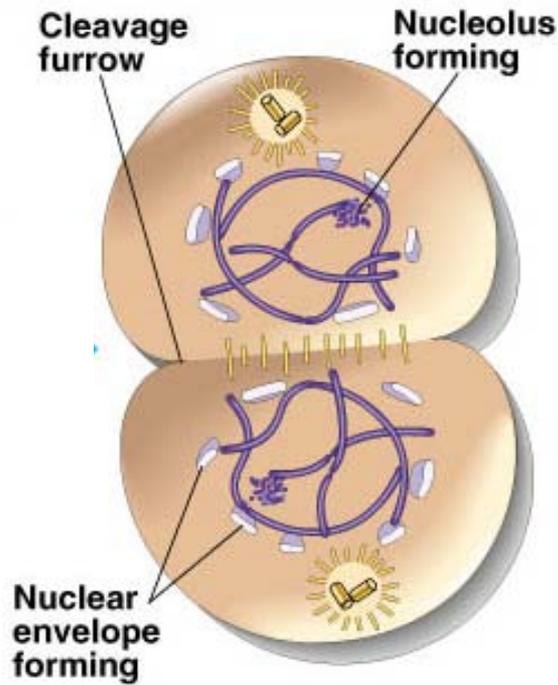
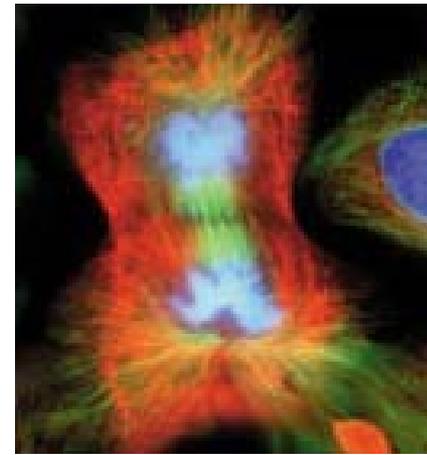
- Los microtúbulos del cinetocoro alinean los cromosomas en un plano ecuatorial de la célula.
- Cada cromosoma se mantiene en tensión por los cinetocoros apareados y por los microtúbulos cinetocóricos asociados, los cuales están unidos a los polos opuestos del huso (centrosomas).

4. Anafase



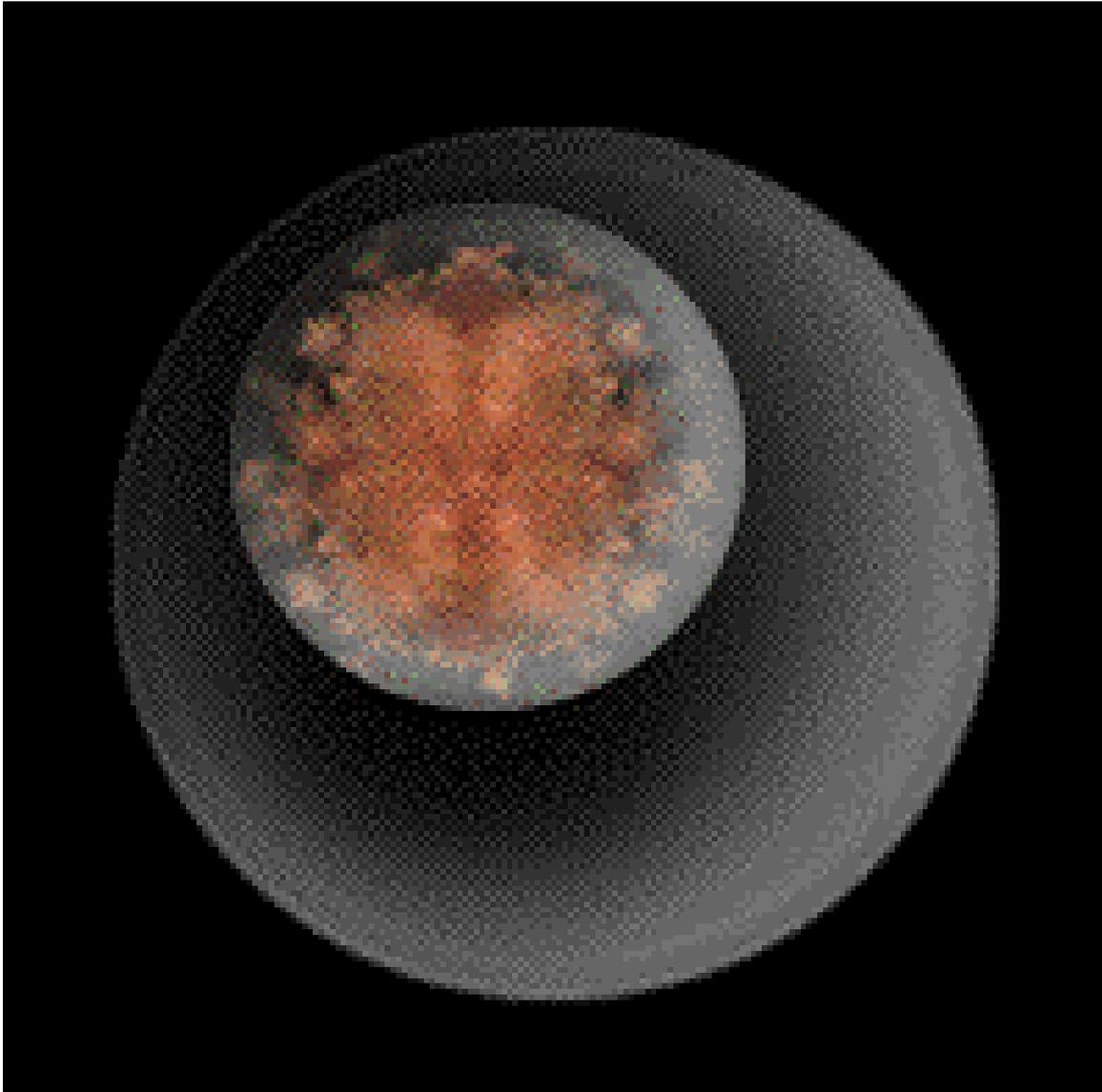
- Los cinetocoros apareados se separan, permitiendo que cada cromátida (ahora llamado cromosoma) sea arrastrada lentamente hacia un polo.
- Los microtúbulos polares se alargan y los microtúbulos cinetocóricos se acortan

5. Telofase



- Los **cromosomas** llegan a los **polos** y los microtúbulos del cinetocoro desaparecen.
- Se vuelve a **ensamblar** la **envoltura nuclear**.
- La **cromatina condensada** comienza a **decondensarse**
- Los **nucleolos** reaparecen

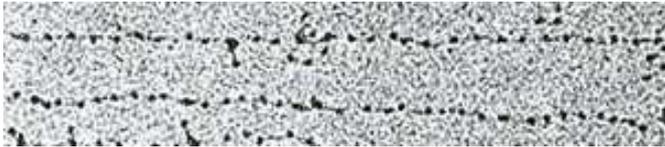
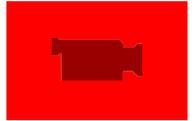
Mitosis: proceso continuo



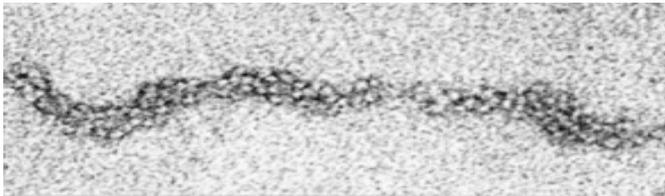
Condensación de la cromatina

Inicio: Profase

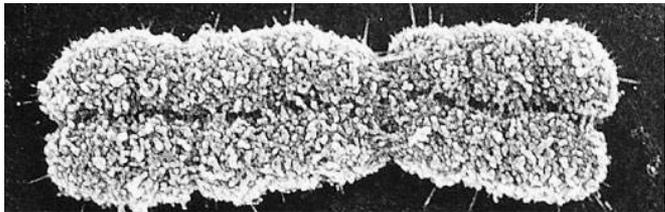
Máxima condensación: Metafase



Compactación fibra nucleosomal: ~7 veces



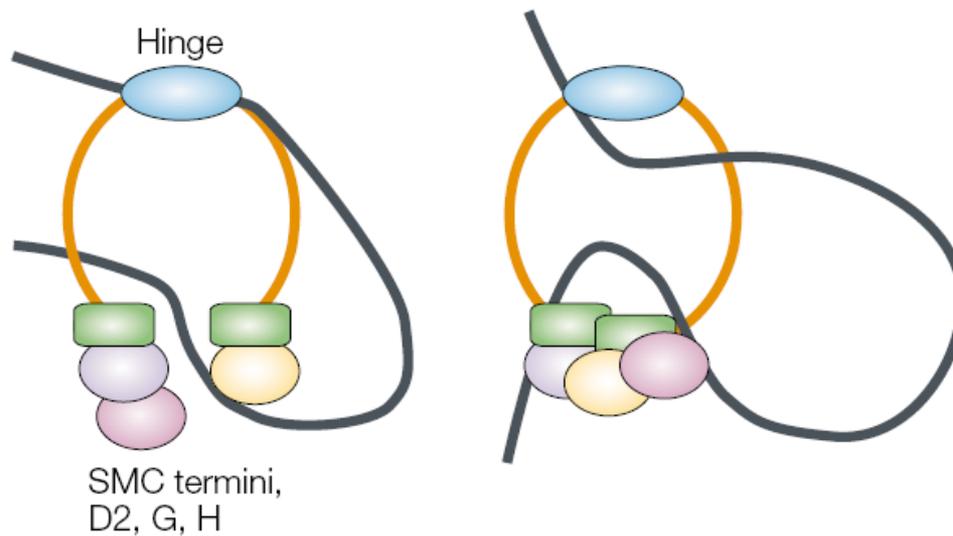
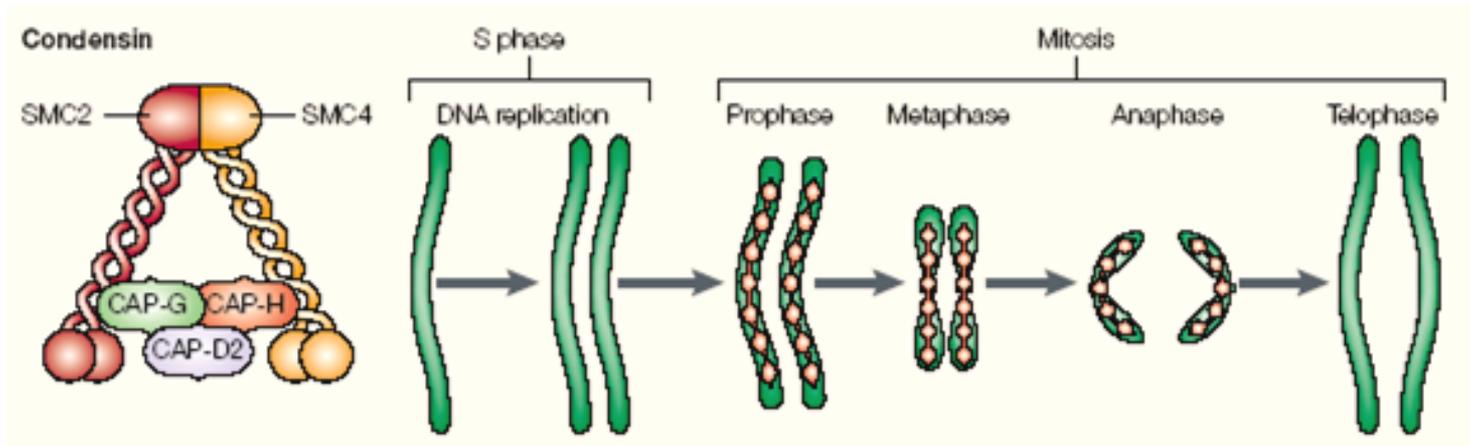
Compactación fibra 30nm: ~100 veces



Compactación cromosoma mitótico: ~10.000 veces

Condensación de la cromatina

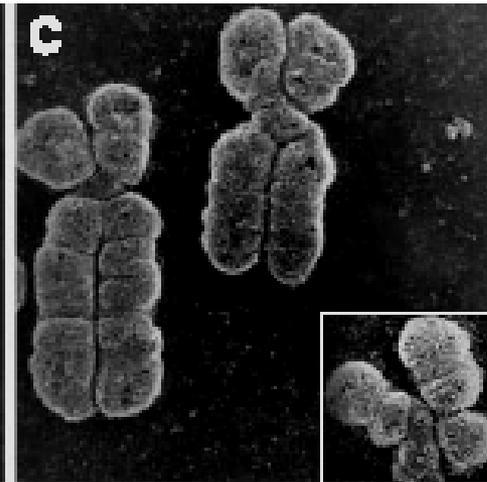
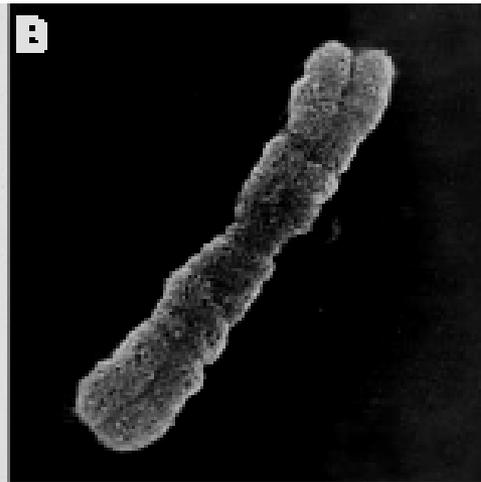
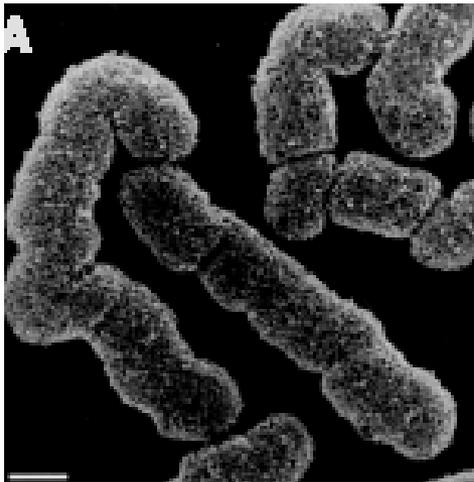
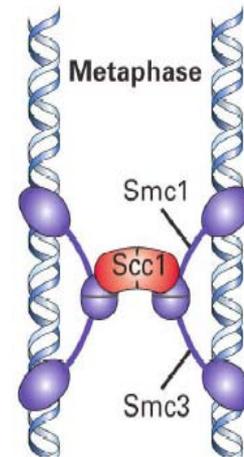
Condensinas



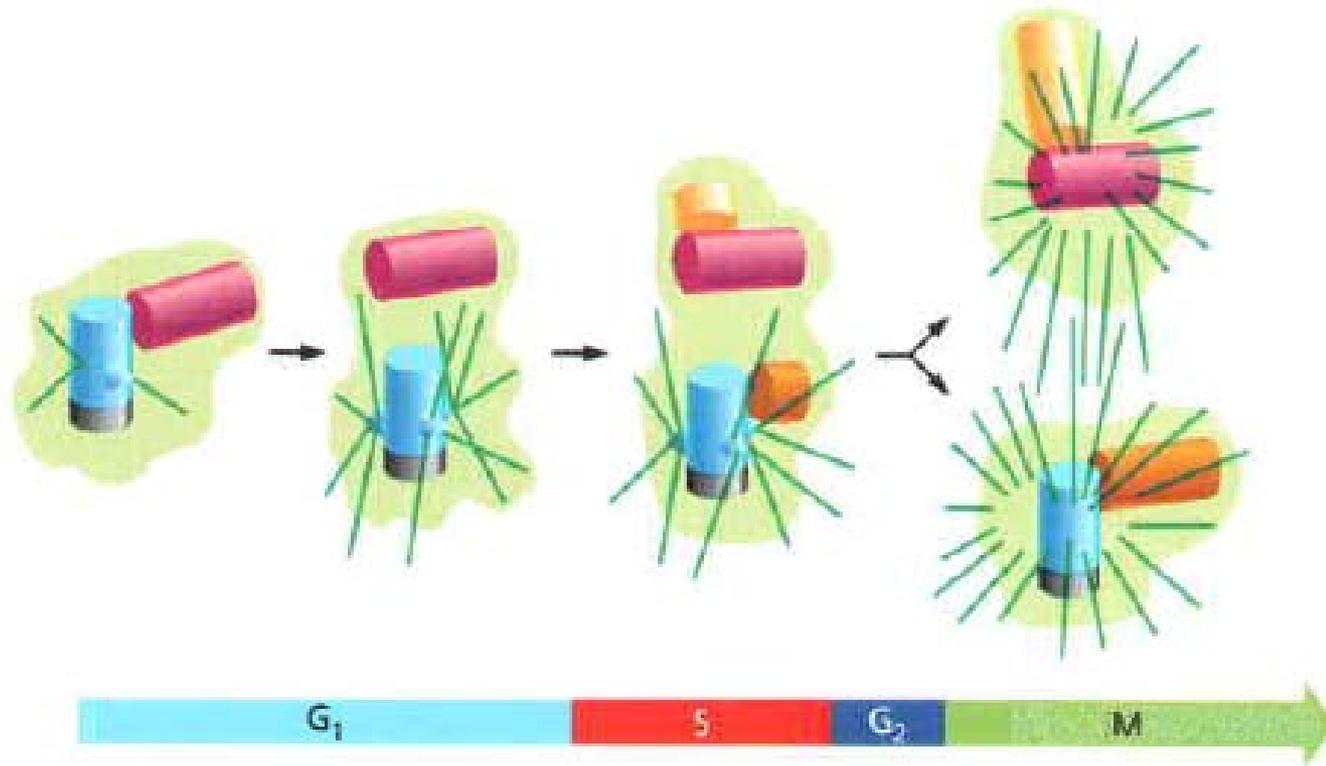
Cohesión de cromátidas hermanas

Cohesinas

Metafase: se pierde
cohesión, excepto en
centrómero

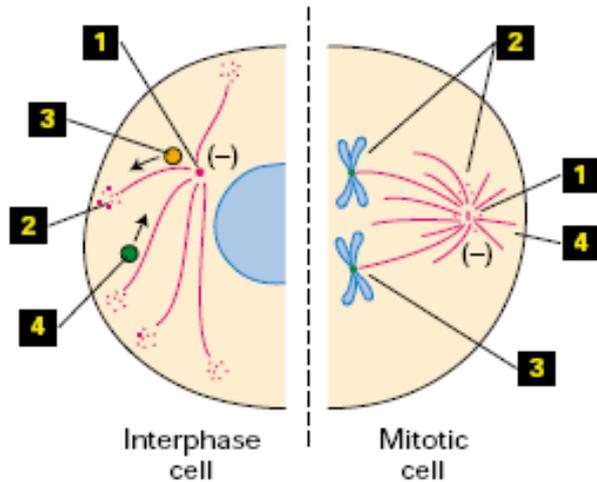


Duplicación de centrosomas



Huso Mitótico:

Centro Organizador de Microtúbulos

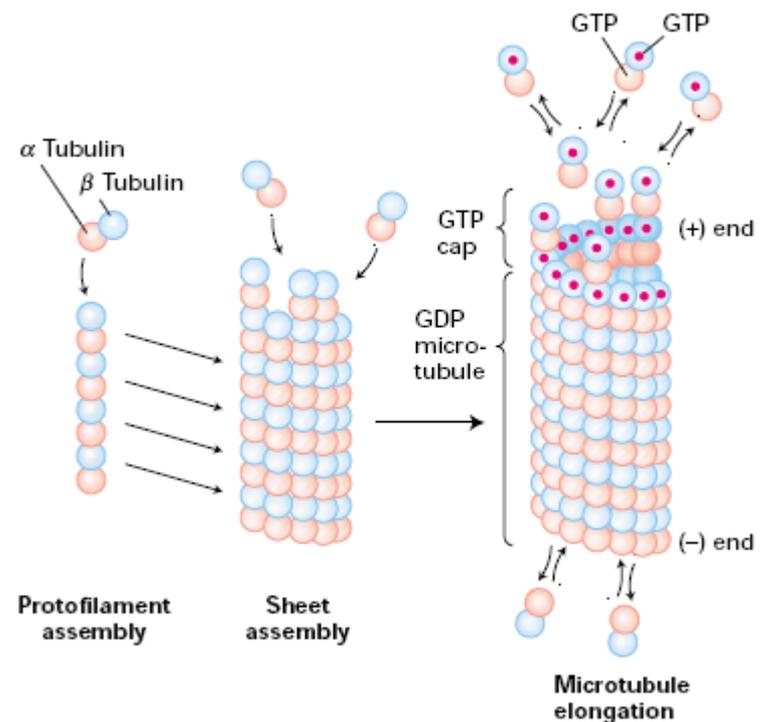


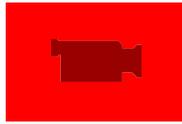
CYTOSKELETAL COMPONENT

CELL FUNCTION

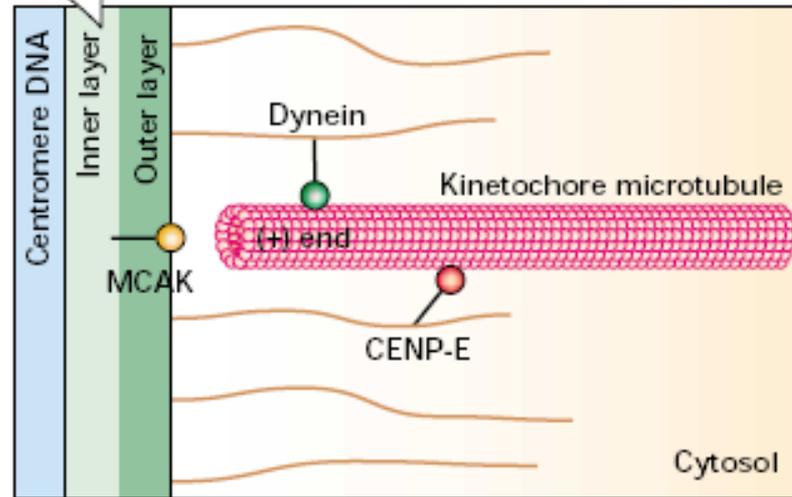
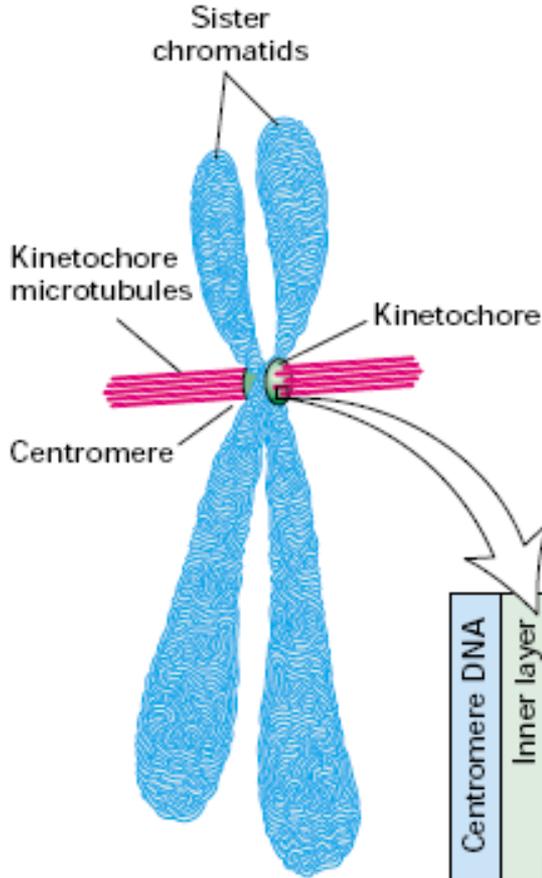
- 1** MTOC, spindle pole
- 2** Microtubule dynamics
- 3** Kinesin motors
- 4** Dynein motors

- Organizing cell polarity
- Chromosome movements
MT assembly
- (+) end-directed vesicle and
chromosome transport
- (-) end-directed vesicle
transport spindle assembly

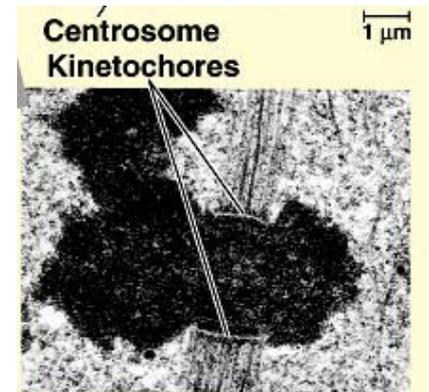




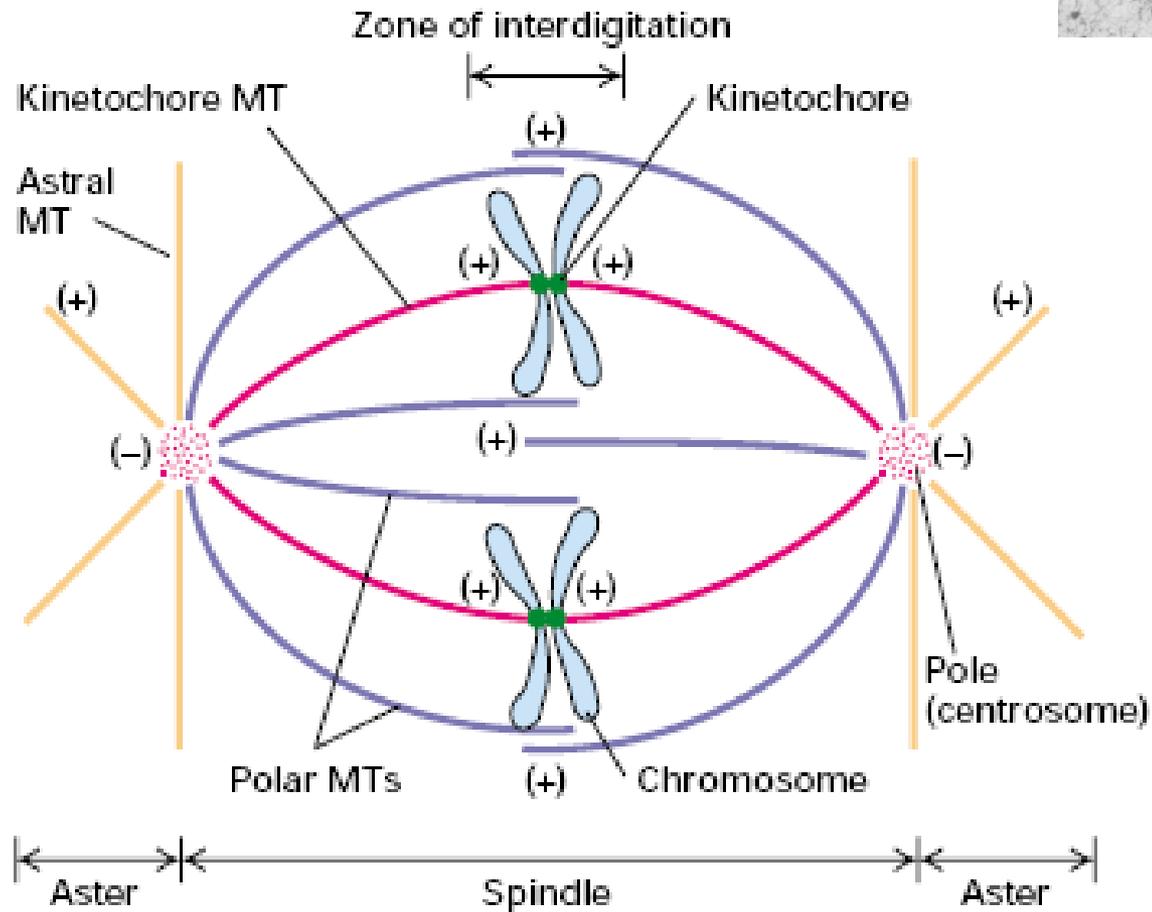
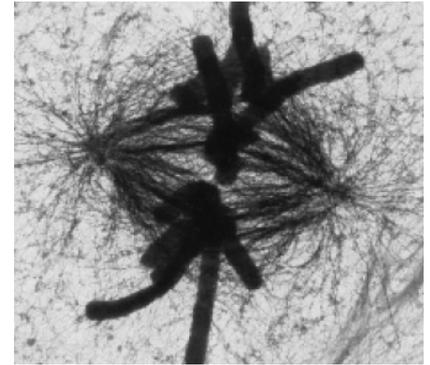
Huso Mitótico: Cinetocoro y Centr6mero



Corona Fibrosa

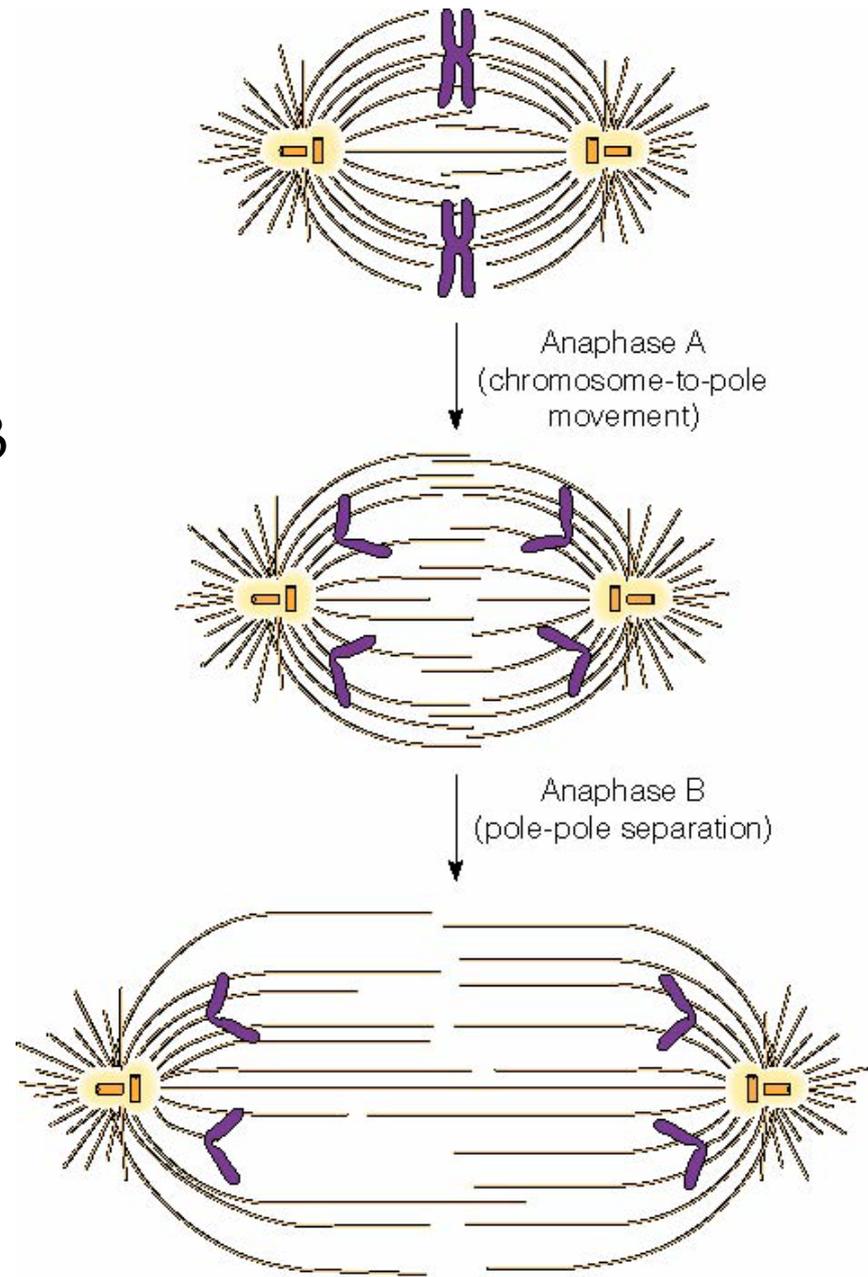


Huso Mitotico Microtubulos



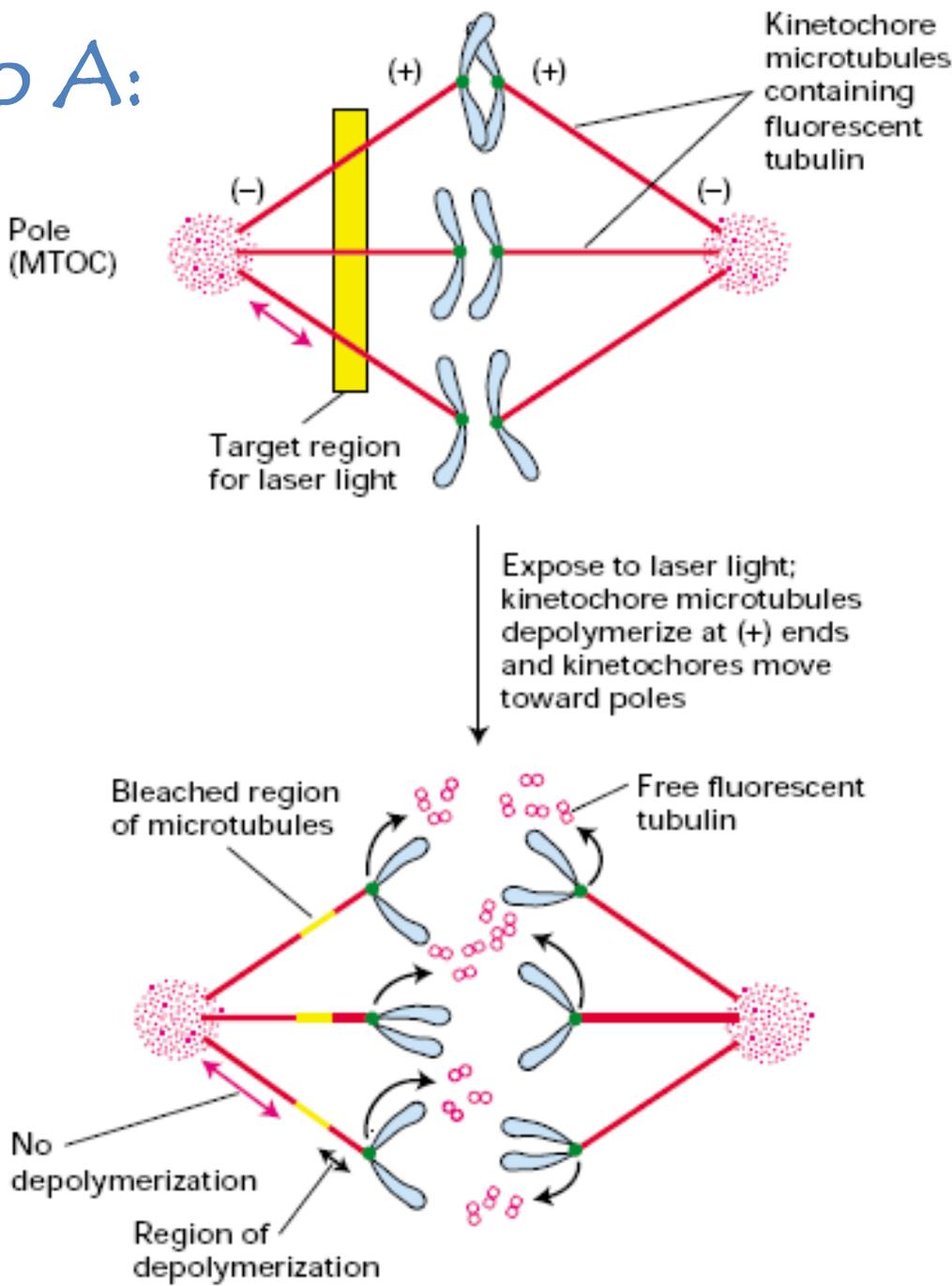
Huso Mitótico y Anafase

Movimientos anafásicos A y B
(segregación de cromosomas)



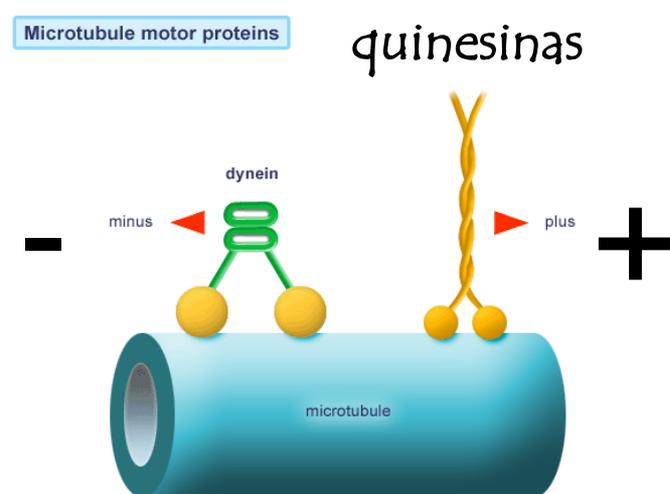
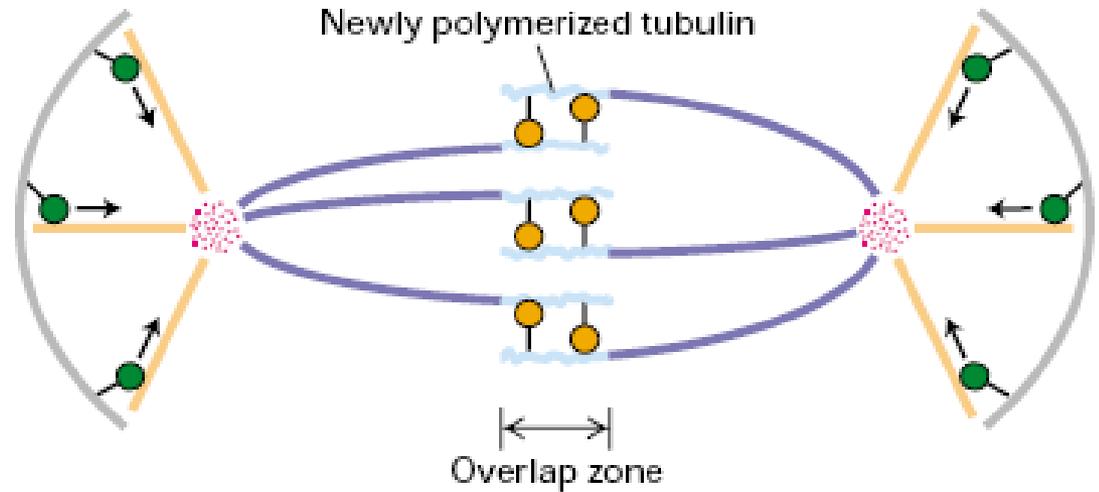
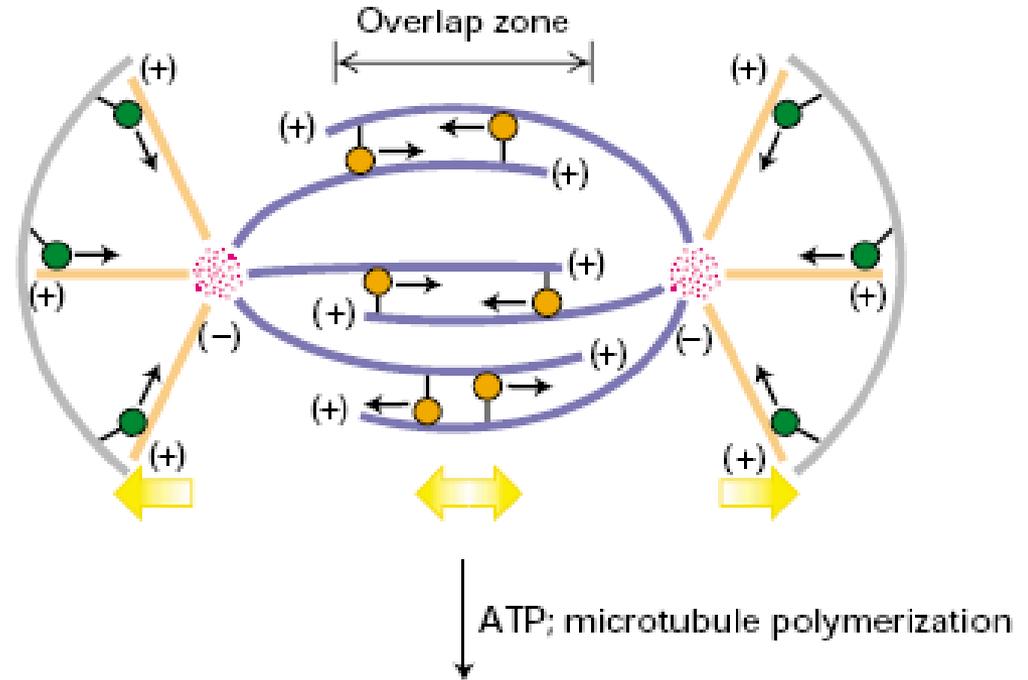
Movimiento anafásico A:

Acortamiento del extremo (+) de los microtúbulos cinetocóricos



Movimiento anafásico B (Movimiento de los polos)

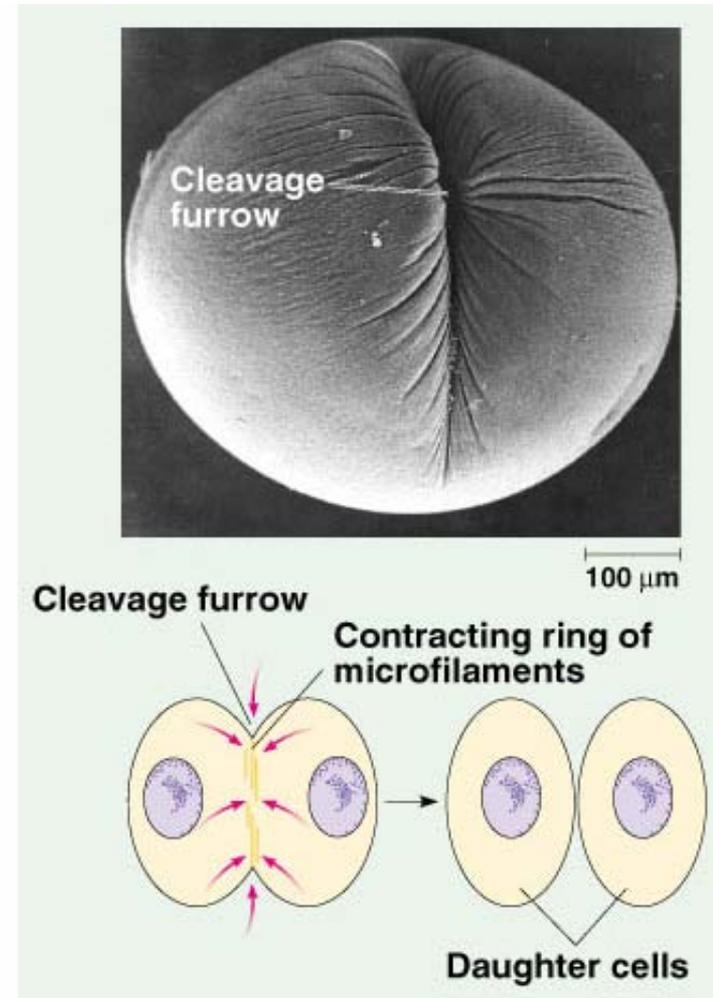
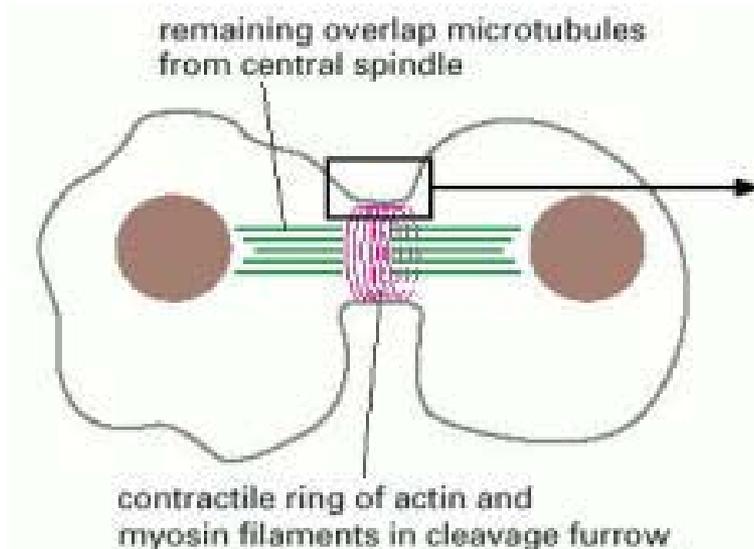
Polimerización y asociación de las fibras del huso en la zona de solapamiento de los microtubulos polares de ambos extremos



Citocinesis



ACTINA y **MIOSINA**
en el anillo contráctil



La partición en dos células hijas se da gracias a movimientos contráctiles producidos por los filamentos de actina y miosina presentes en el momento de la citocinesis.

CONTROL DEL CICLO CELULAR

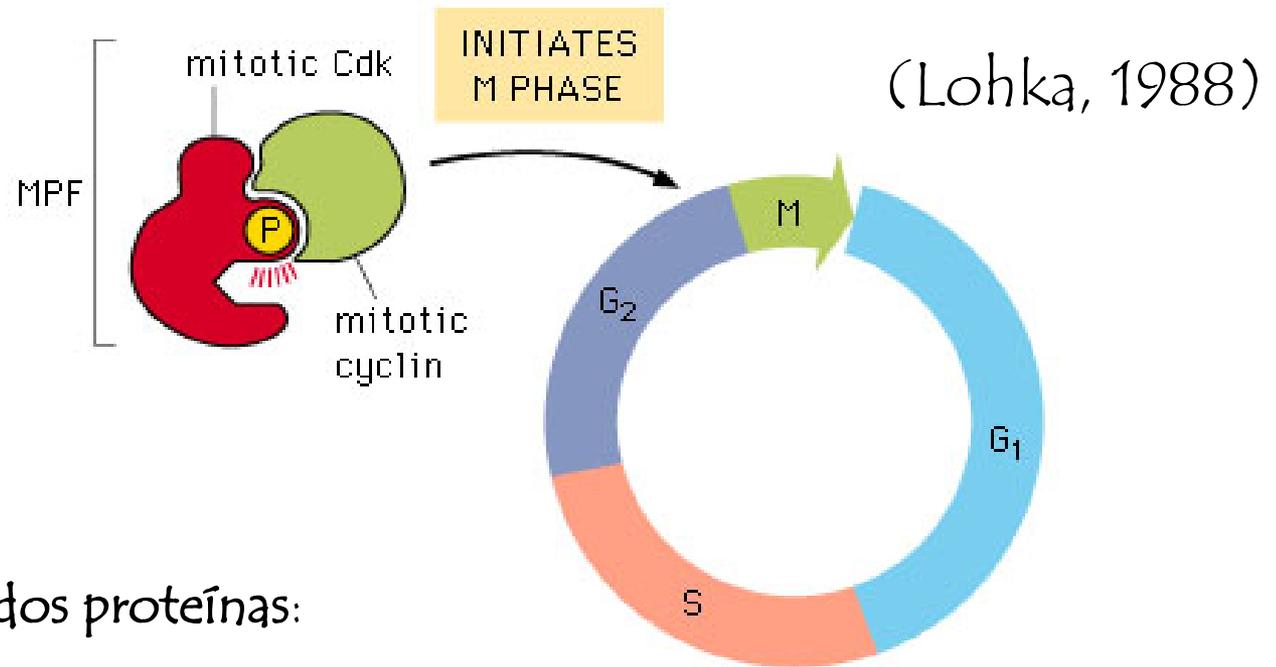


Pérdida del control del Ciclo Celular



MPF

Factor Promotor de la fase M



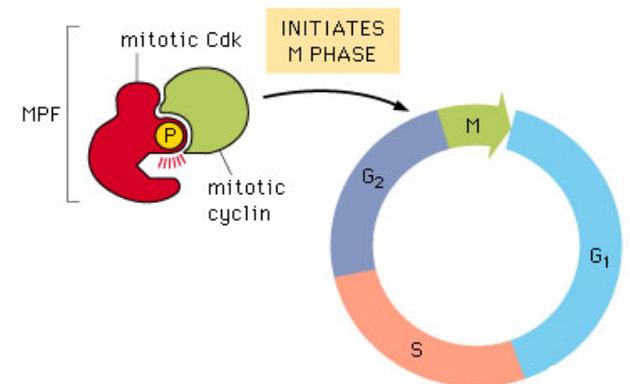
Complejo formado por dos proteínas:

1. **Quinasas dependientes de ciclinas (Cdk o Cdc):** al ser activadas por las ciclinas, fosforilan (en Serina y Treonina) a otras proteínas cruciales para la división celular (ej. Proteínas lámina para el desarme del núcleo).
2. **Ciclinas:** cuyo nombre se debe a que en el curso de cada ciclo celular alternan un periodo de síntesis creciente seguido por otro de rápida degradación (vida media corta). Le entrega especificidad de sustrato a Cdk. Todas presentan un motivo similar llamado **caja de destrucción**

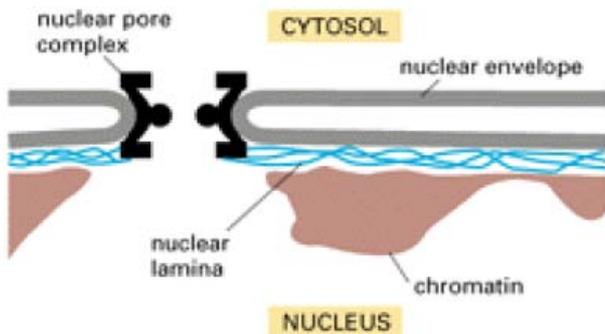
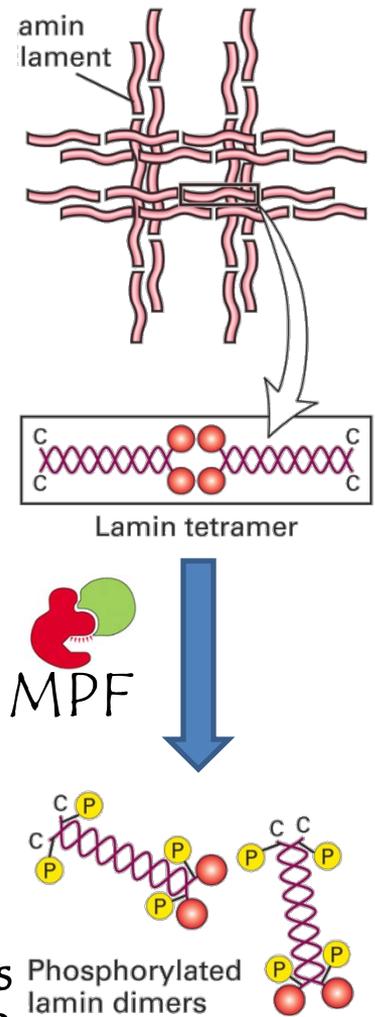
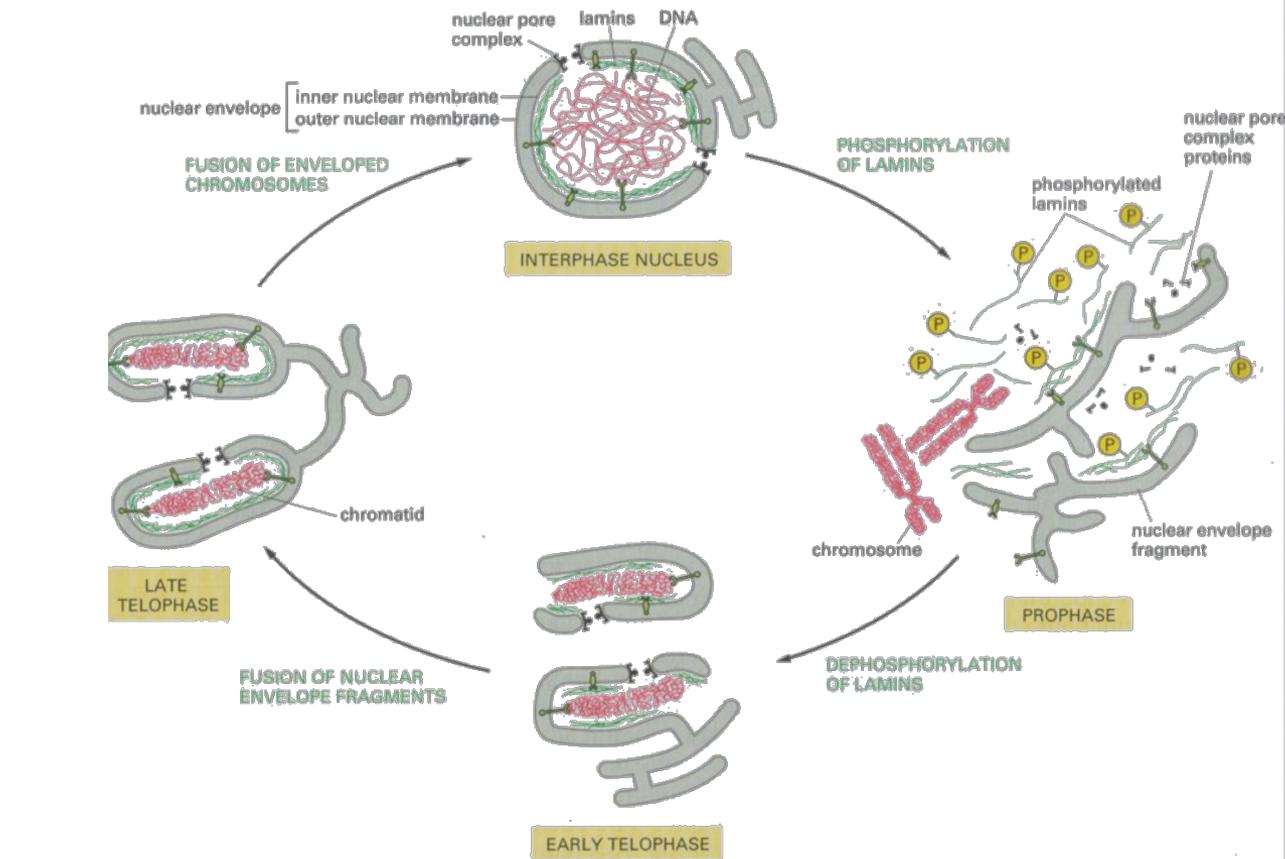
Complejo Cdk-Ciclina Mitótica (MPF): ciclina B asociada a Cdk1 *induce el inicio de la fase M.*

Blancos que fosforila MPF

- Fosforilación de Condensinas
- Fosforilación de Proteínas lámina de la envoltura nuclear
- Fosforilación de Miosina II (actúa en citocinesis en conjunto con actina)
- APC (complejo promotor de la anafase)
- Factores de transcripción basal, inhibiéndolos

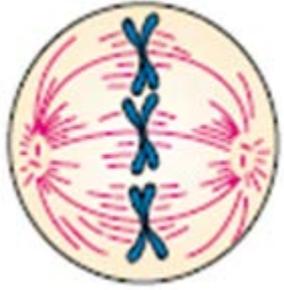


Desensamble de la envoltura nuclear

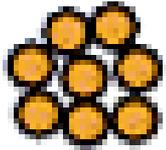


Proteínas lámina A y C fosforiladas quedan en solución. Lámina B permanecen asociadas a membrana interna del núcleo por ancla de isoprenilo

Salida de la fase M

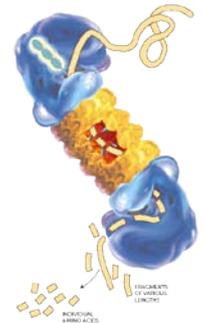
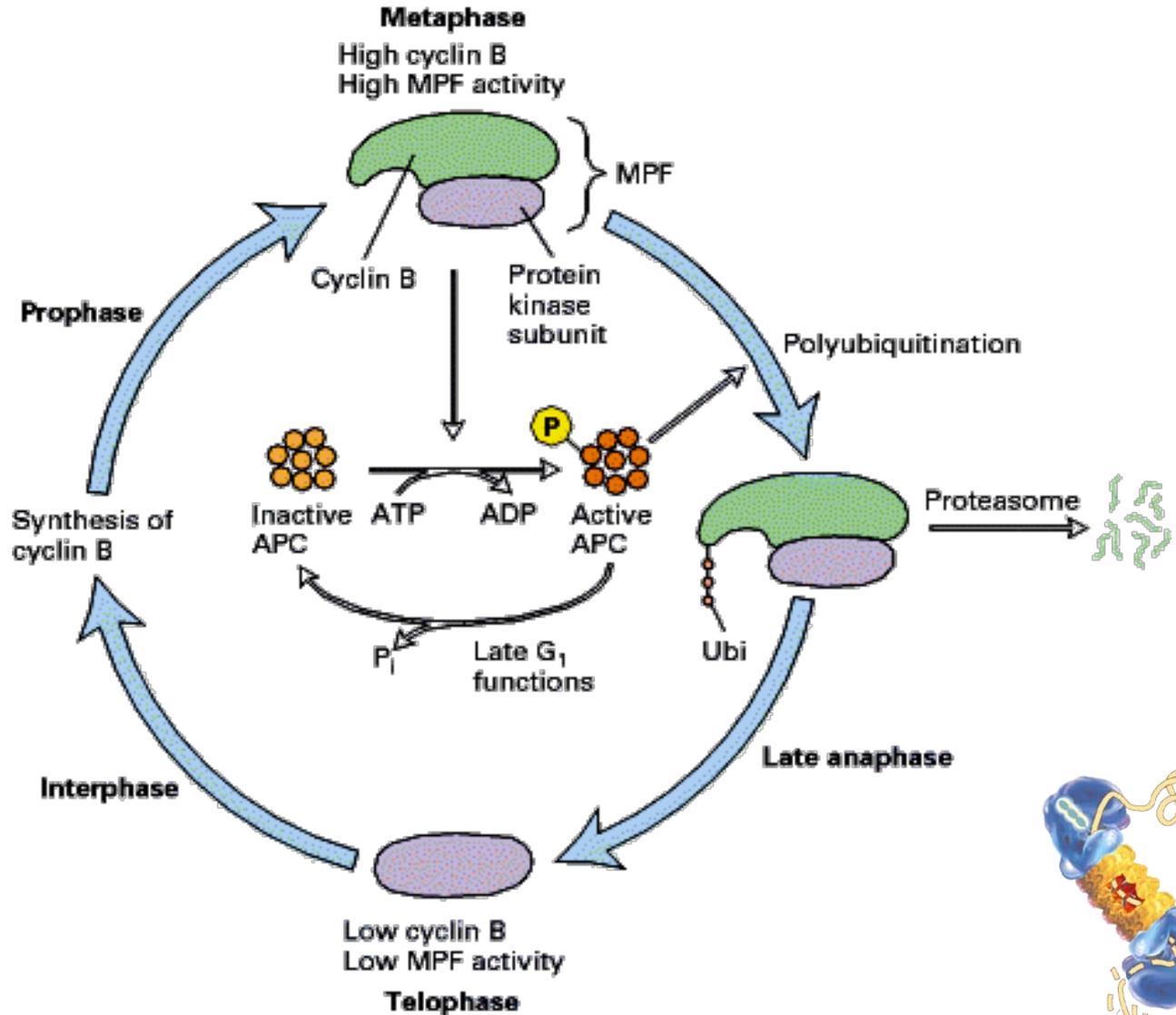


Arresto metafásico



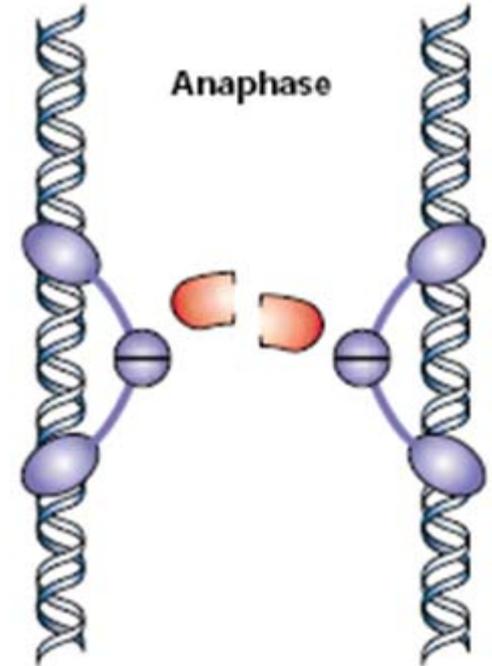
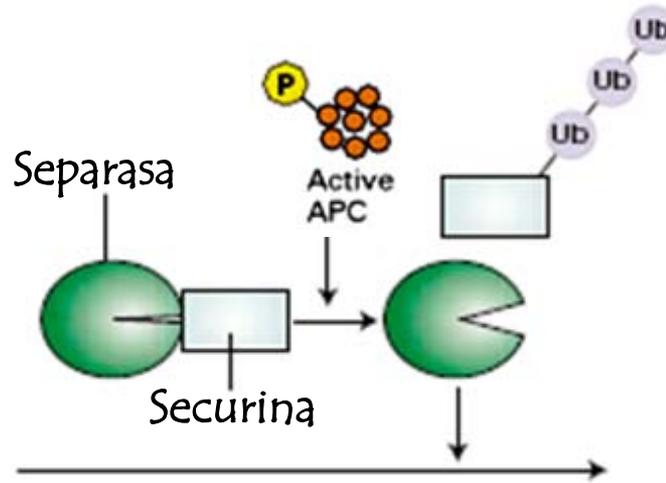
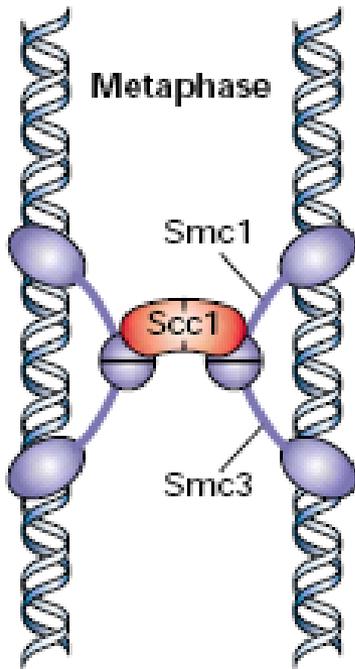
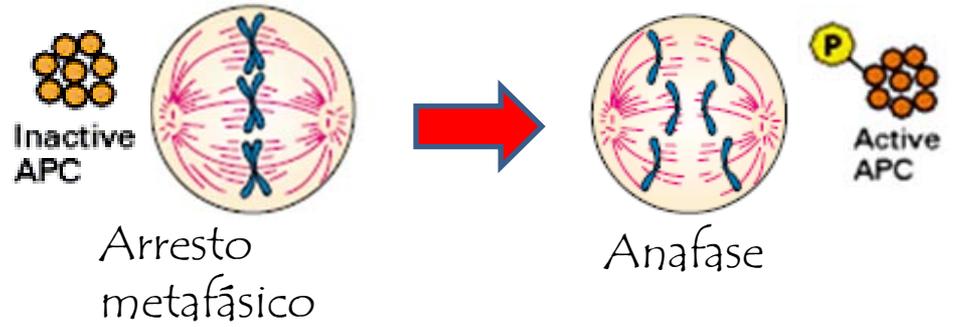
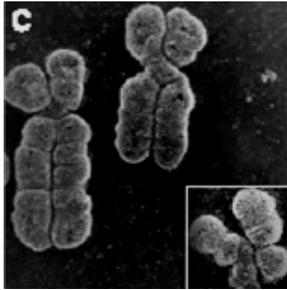
Inactive
APC

APC (complejo promotor de la anafase)

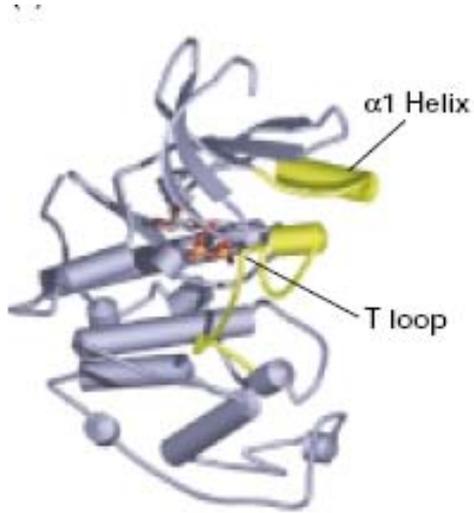
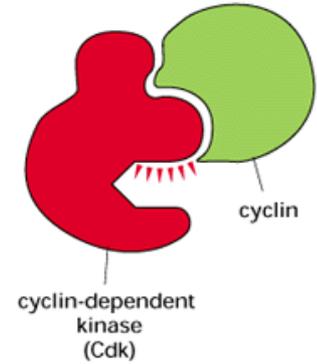


Proteosoma

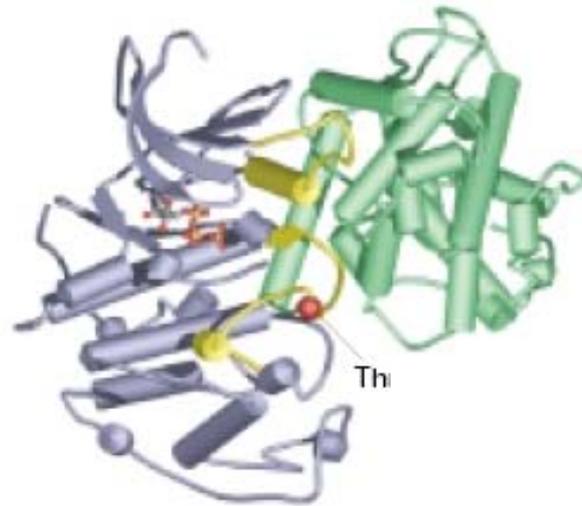
Anafase



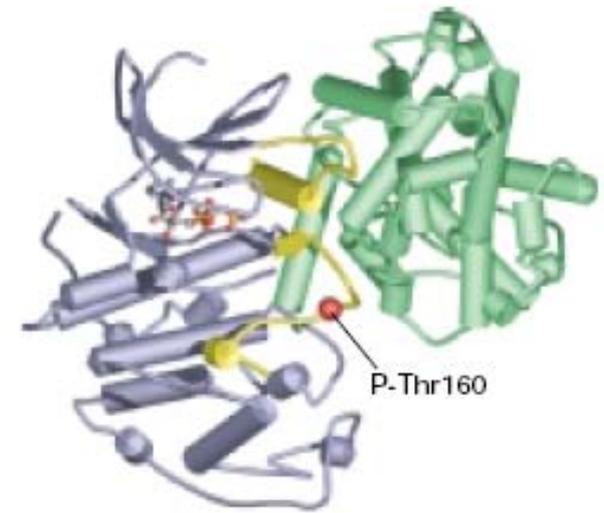
REGULACIÓN DE MPF



Cdk



Cdk-Ciclina inactiva

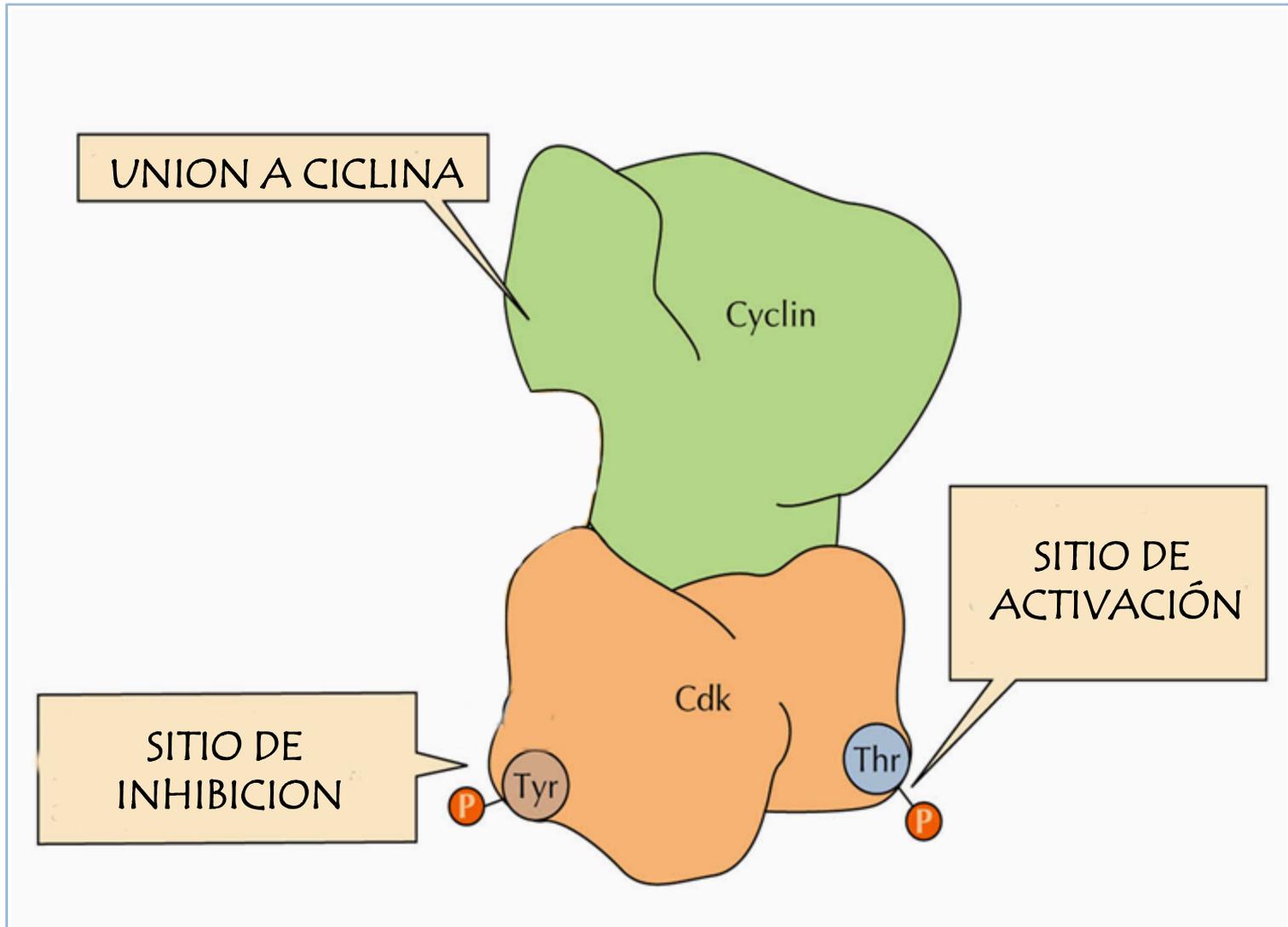


Cdk-Ciclina activa

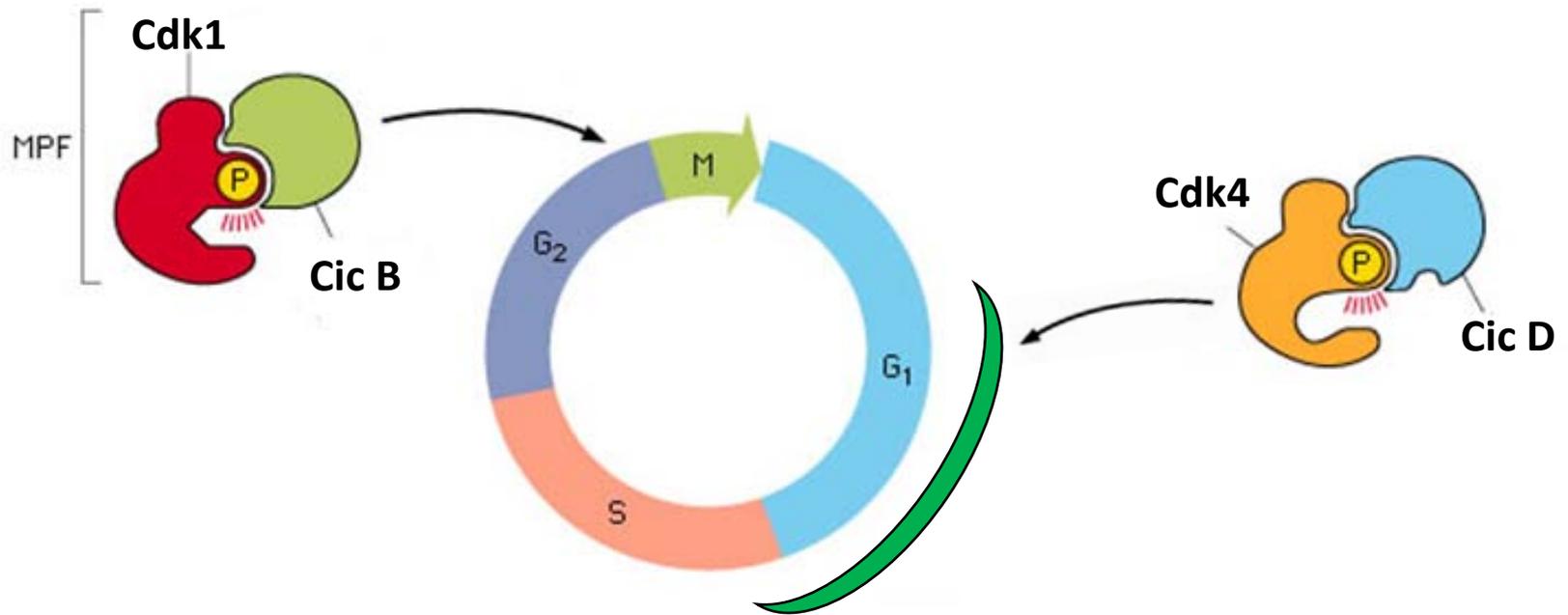
- Fosforilado en sitio activador
- Desfosforilado en sitio inhibidor

REGULADORES DEL CICLO CELULAR

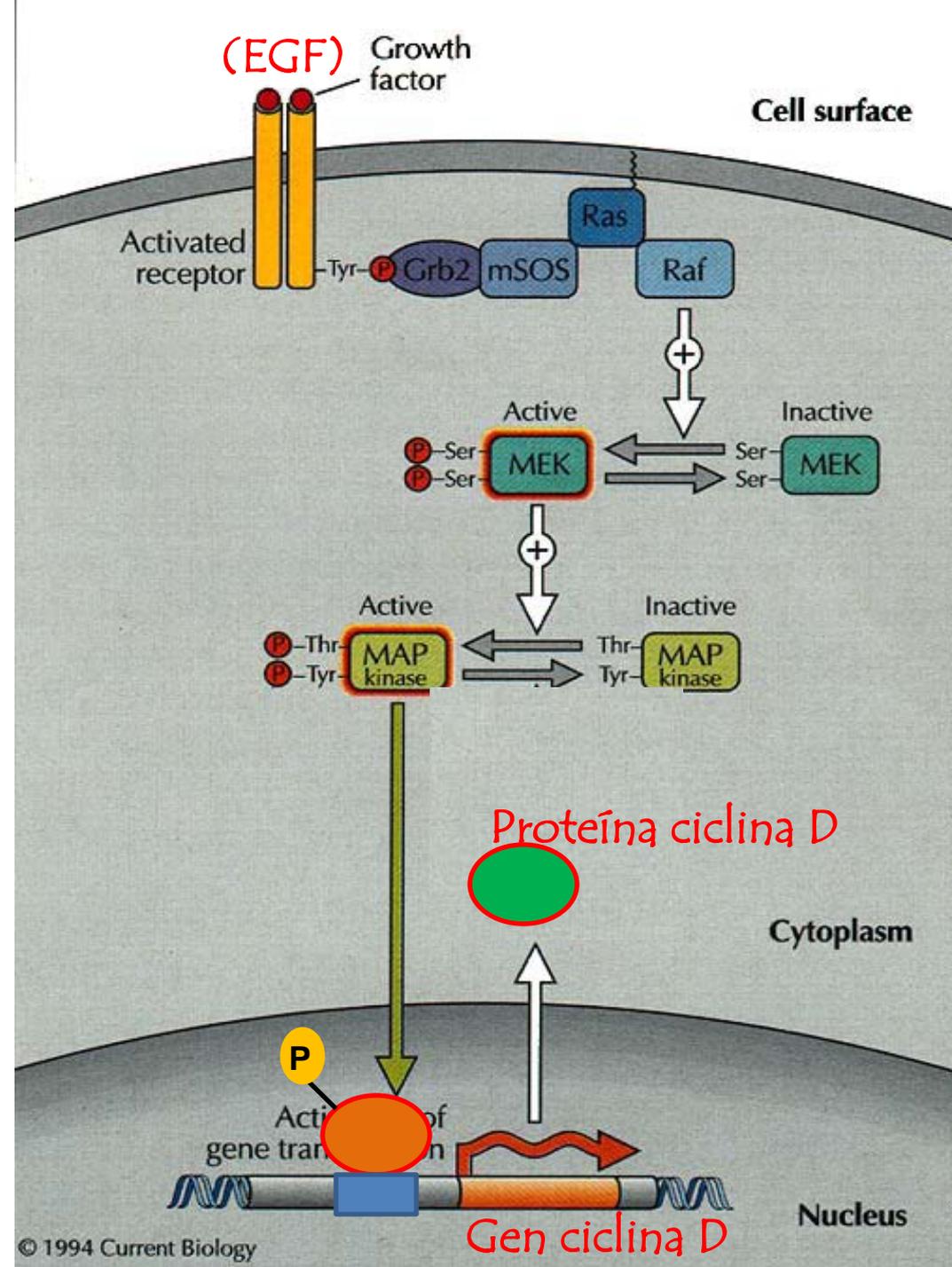
Mecanismos de regulación de las Cdk

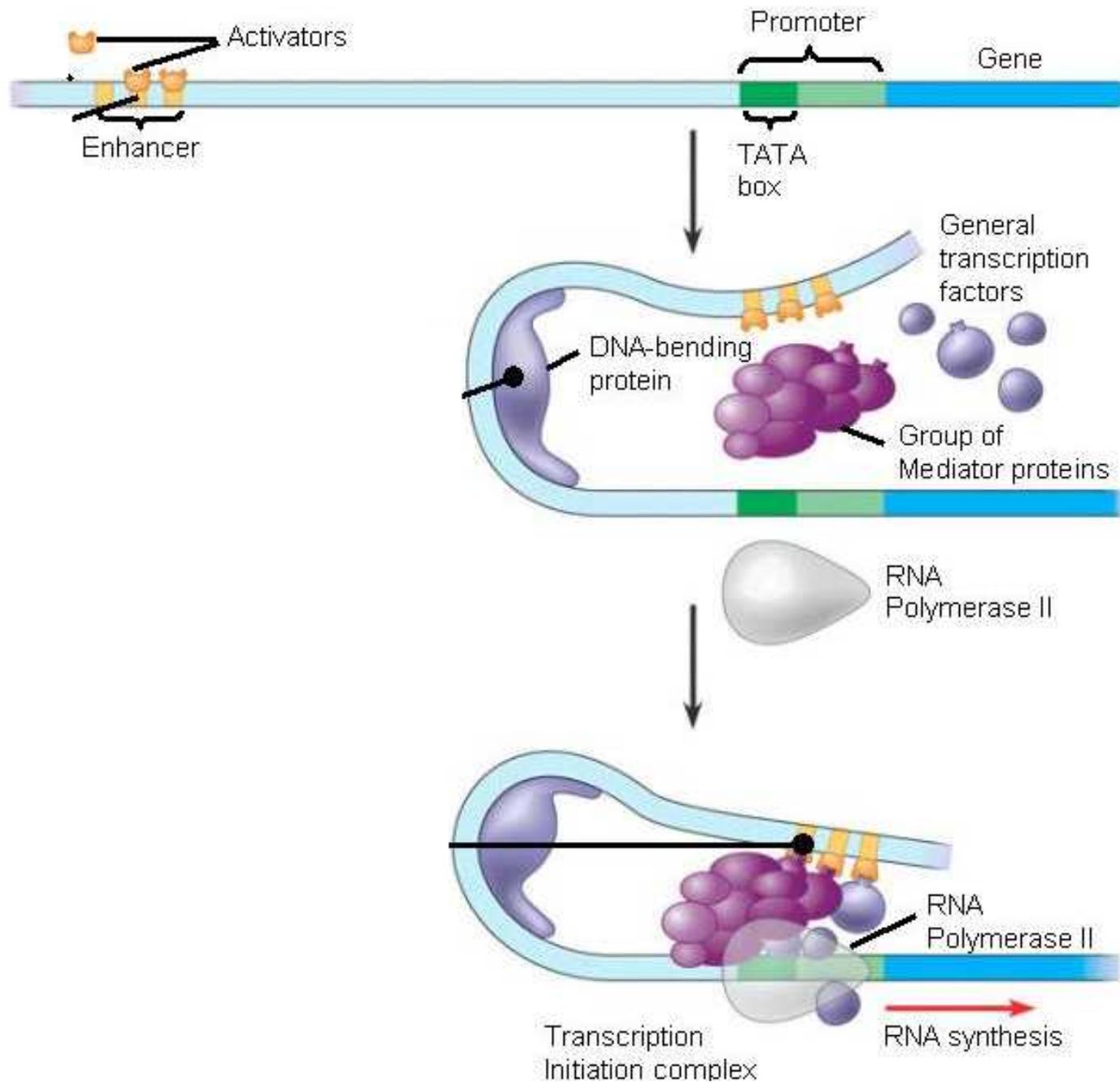


Ciclina G1 (ciclina D): actúa junto con otras Cdk (Cdk4 o Cdk6) en el punto de control G1-S.

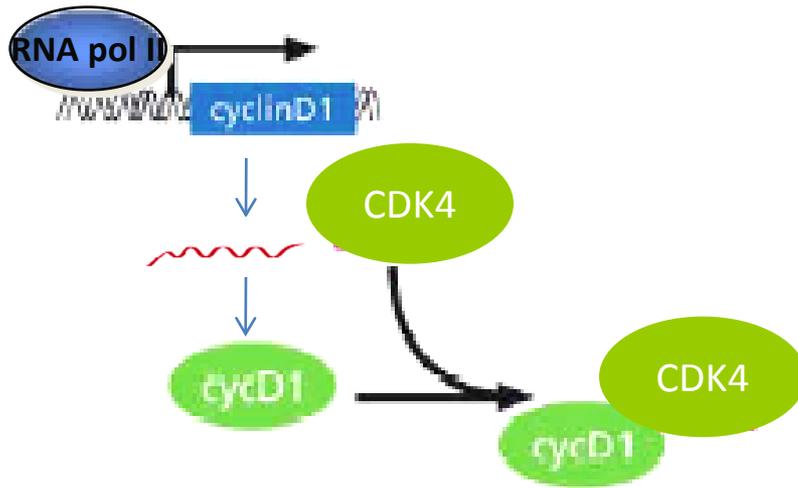


Síntesis de ciclina D





Durante G1

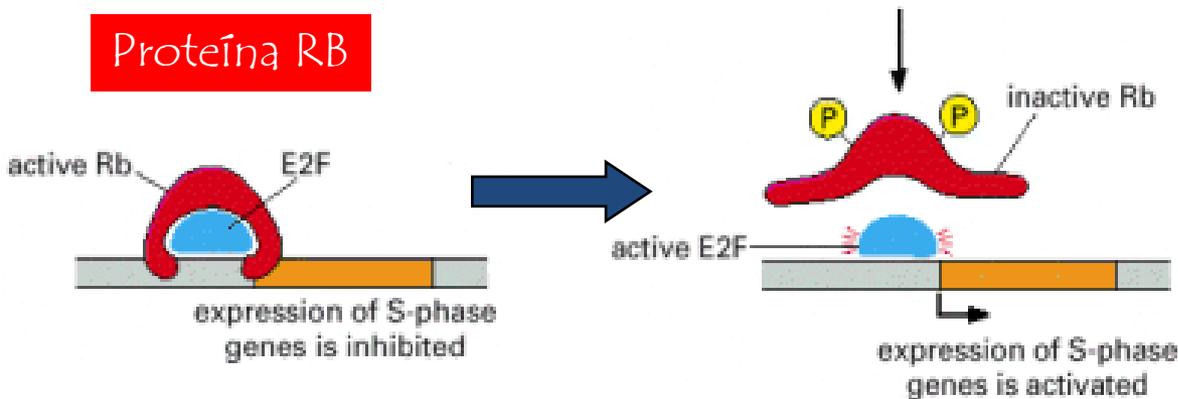


- Proteína Retinoblastoma (Rb):
Permite paso de G1 a S. En estado hipofosforilado secuestra el factor de transcripción E2F involucrado en la replicación del DNA impidiéndole actuar.

- Hiperfosforilación de Rb dada por Cdk-ciclina G1 permite la liberación de E2F (factor de transcripción)

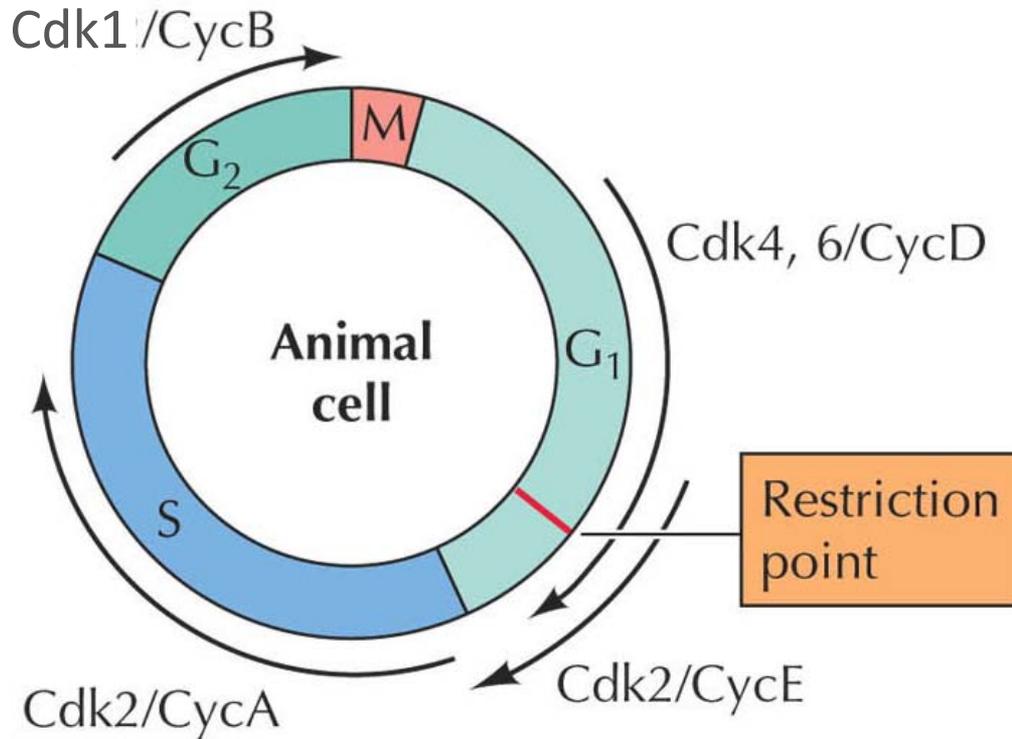


Proteína RB



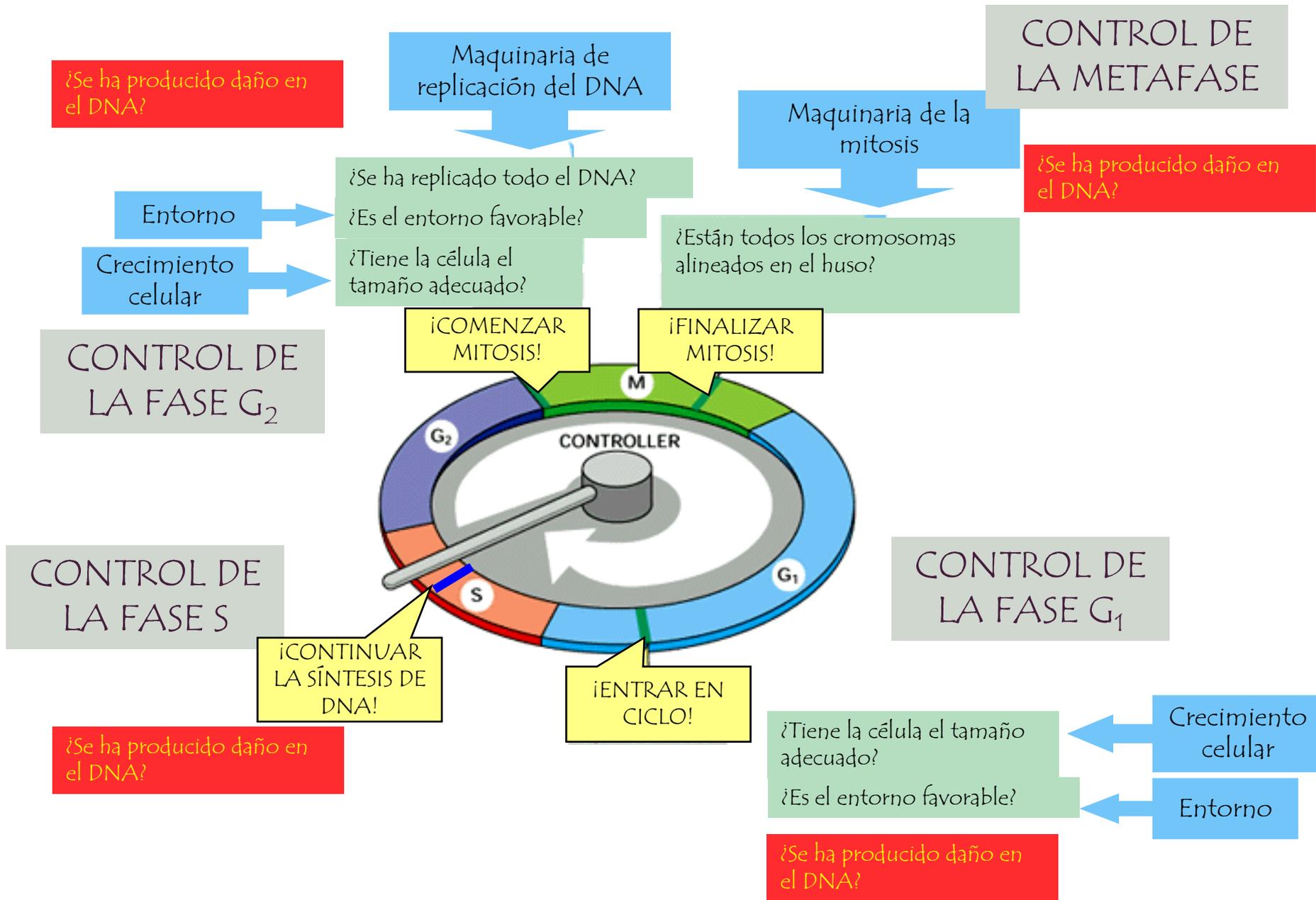
Ciclina A y E
(Fase S)

Control Ciclo Celular

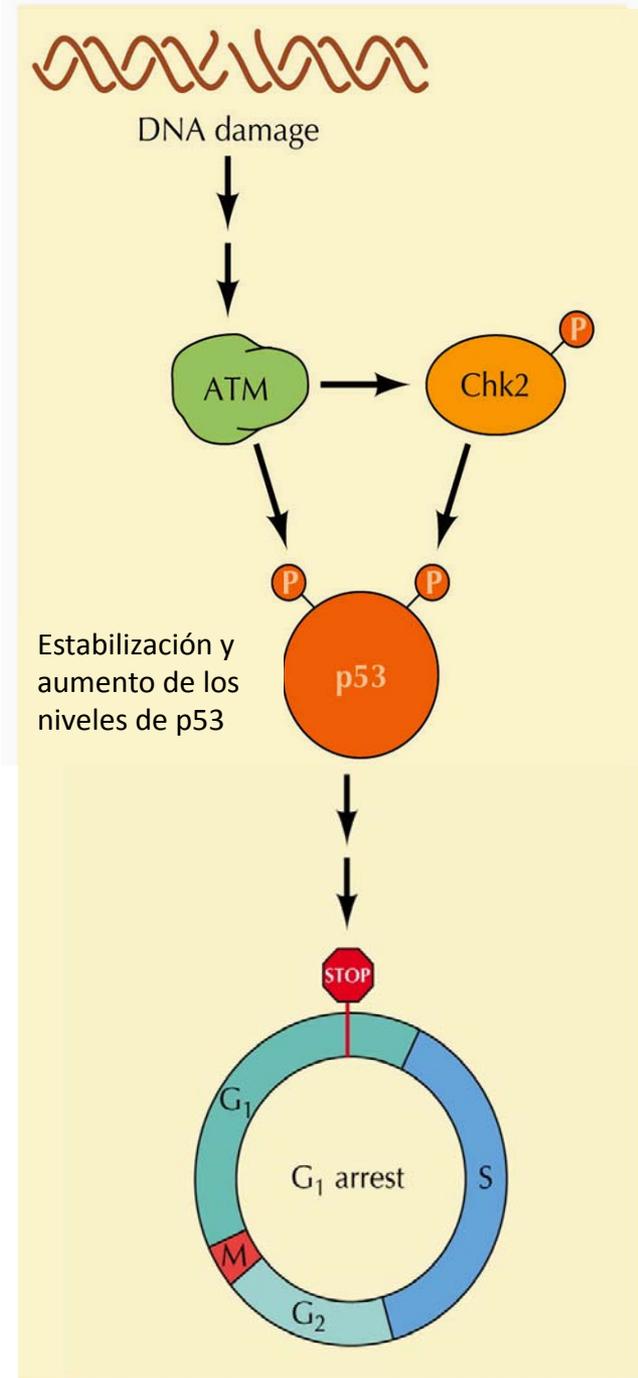


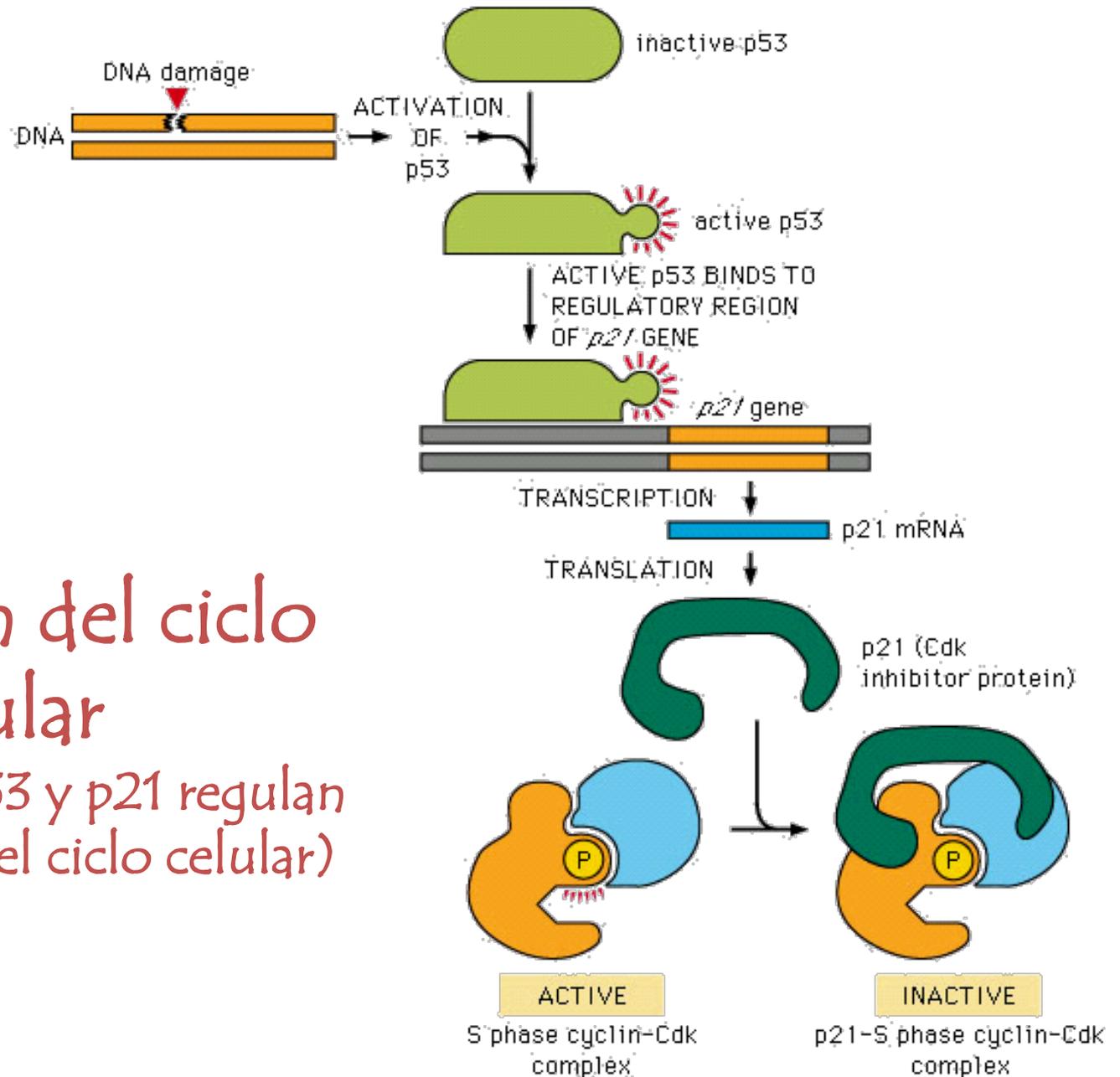
Las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) se asocian con distintas ciclinas en las diferentes etapas del ciclo celular, formando el complejo Cdk-ciclina. La activación de este complejo dispara procesos que conducen a la célula a través de las distintas fases del ciclo. La degradación de las ciclinas inactiva el complejo

PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR



Papel de p53 en el punto de control G₁

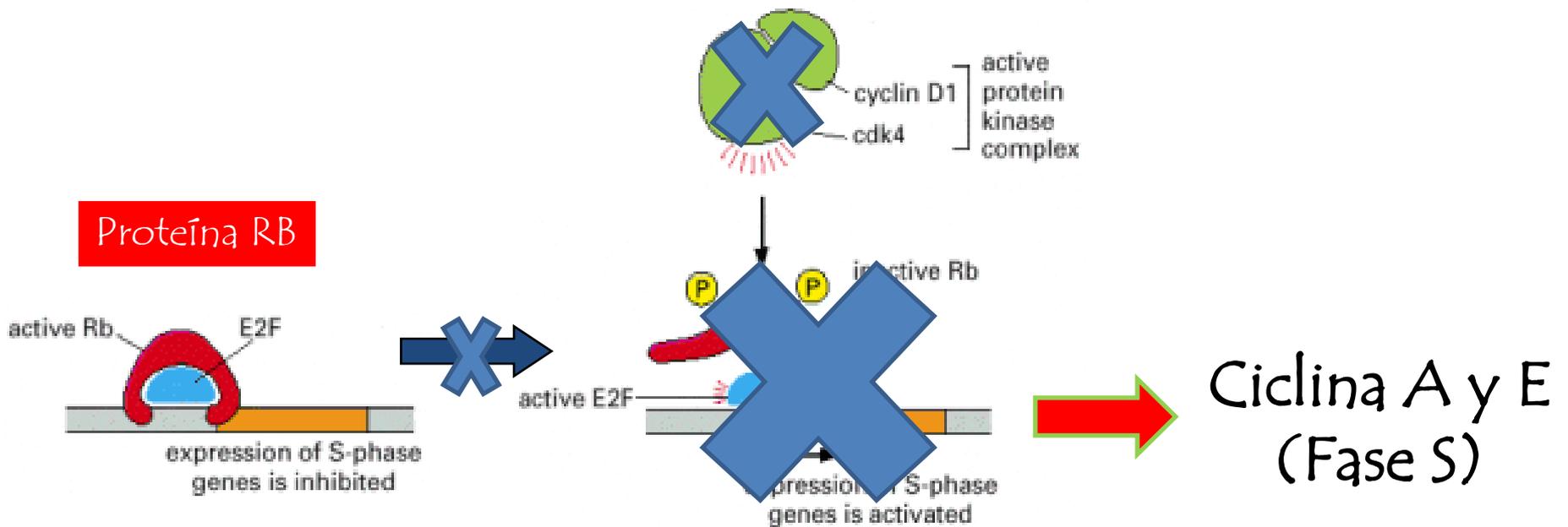




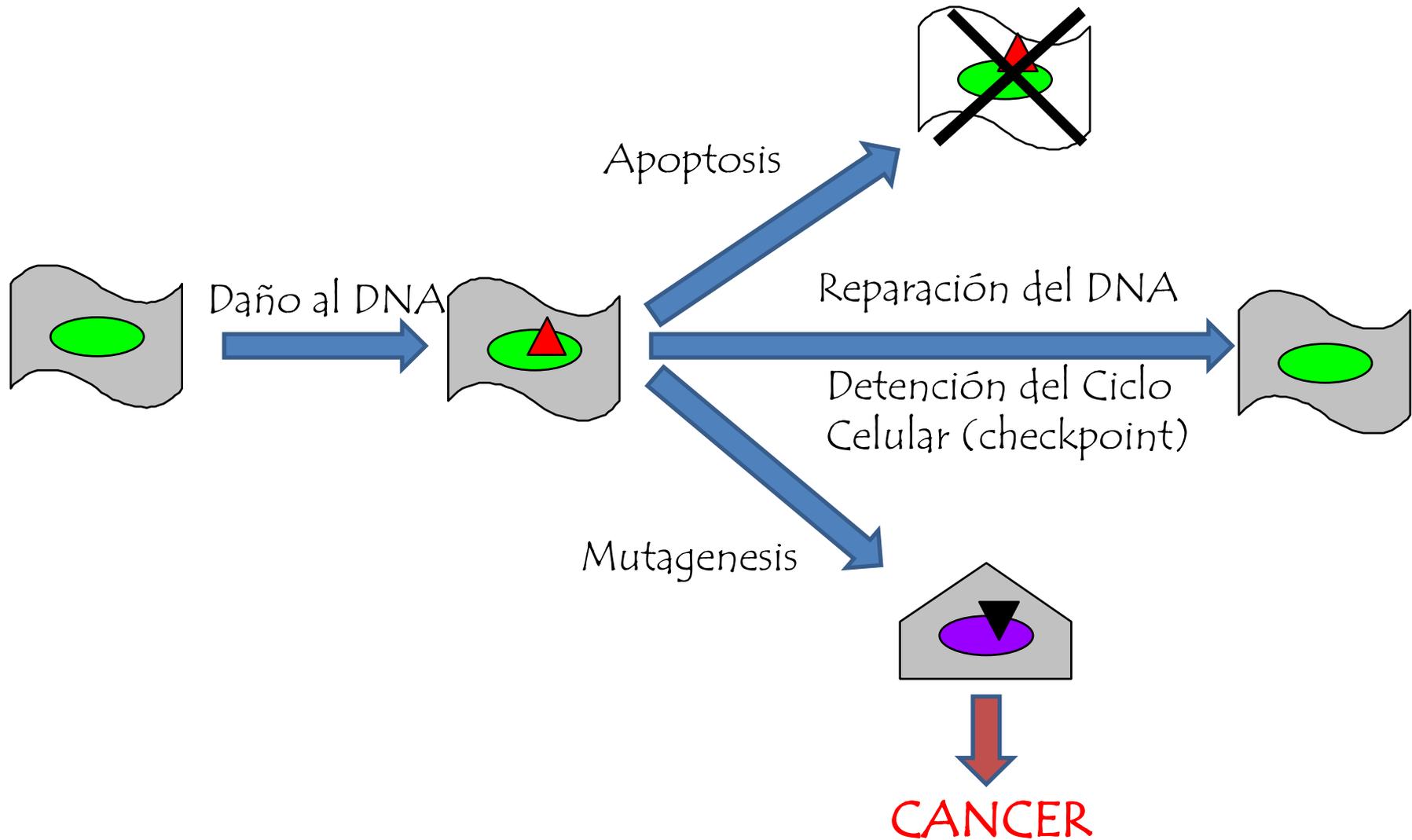
Detención del ciclo celular

(las proteínas p53 y p21 regulan negativamente el ciclo celular)

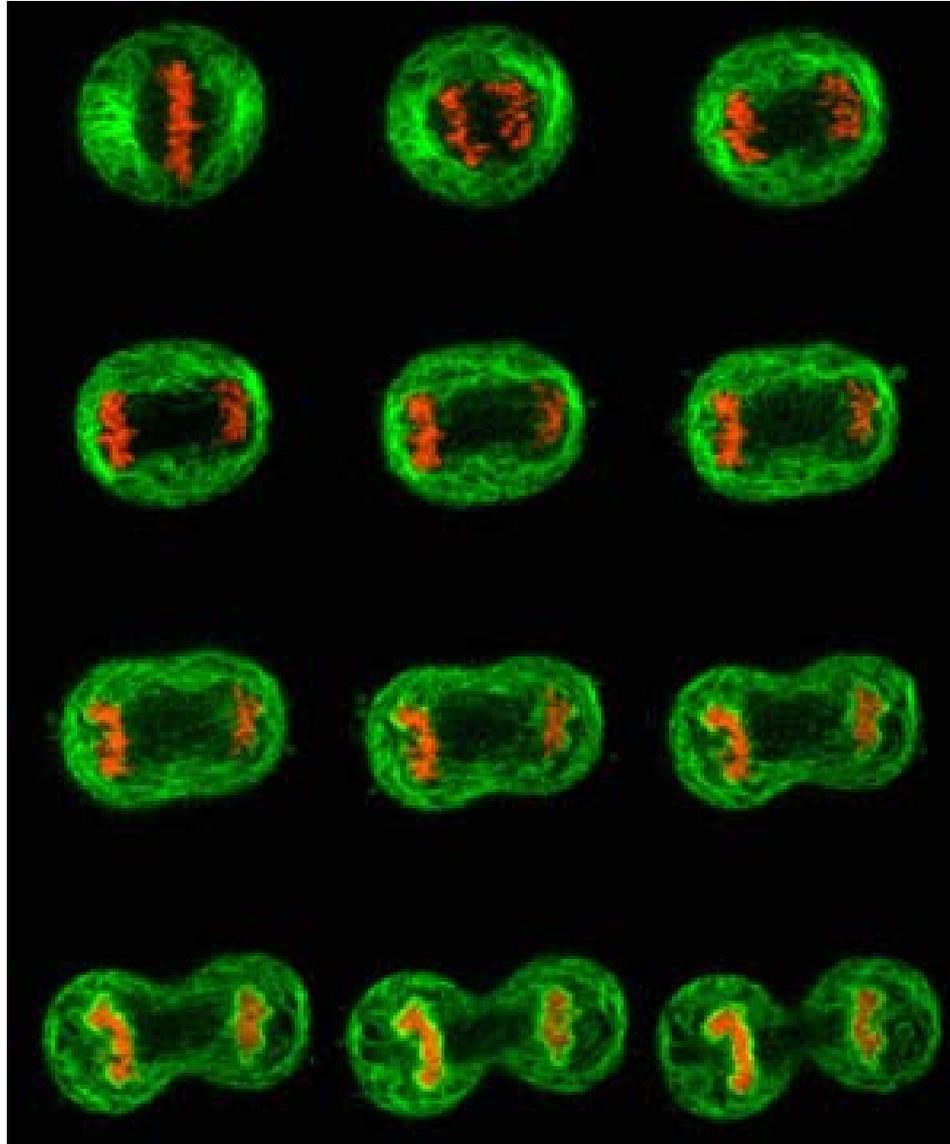
Inhibición de Cdk 4/ciclina D mediada por p21 durante G1



Respuesta celular frente al daño del DNA



CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN: REPLICACIÓN DEL DNA Y MITOSIS



Gonzalo
Cabrera