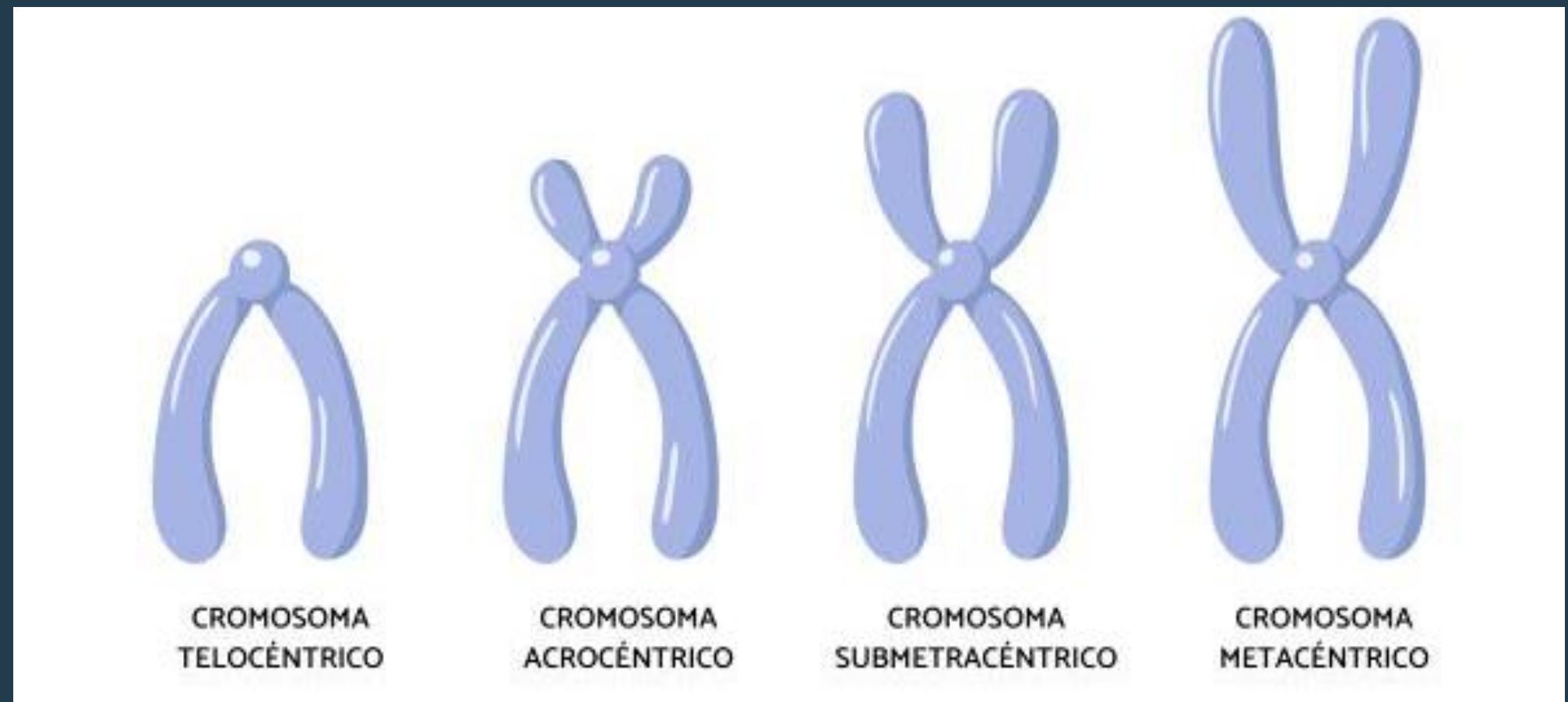


Efecto en la actividad génica

The genomic structure of a human chromosome 22 nucleolar organizer region determined by TAR cloning (Kim et AL., 2021).

- Cromosomas humanos: 13, 14, 15, 21, 22 y Y. acrocéntricos. Cromosomas 1, 3, 16, 19 y 20 que son metacéntricos. Submetacéntricos: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18 y X.



The genomic structure of a human chromosome 22 nucleolar organizer region determined by TAR cloning (Kim et AL., 2021).



- Vacíos - la organización y el grado de divergencia de las unidades de ADNr humano dentro de una región organizadora nucleolar (NOR).
- Clonación por recombinación asociada a transformación (TAR) para aislar unidades de ADNr individuales del cromosoma 21.
- Heterogeneidad.
- Matriz completa de ADNr de extremo a extremo a partir de una copia del cromosoma 22. La secuenciación de aislados de TAR proporcionó la secuencia NOR completa, incluidas las uniones proximales y distales que pueden estar involucradas en la función nucleolar.
- Comparaciones: variantes que se comparten en el ADNr humano en individuos de diferentes grupos étnicos, muchas de ellas con alta frecuencia.
- El análisis infiere divergencias intra e interindividuales comparables de unidades de ADNr en cromosomas iguales y diferentes.
- Los resultados proporcionan una ruta para investigar más a fondo el papel de la variación del ADNr en la formación nucleolar y en las asociaciones empíricas de los nucléolos con la **patología**.

Polimorfismos entre individuos de la misma especie y divergencia entre individuos de diferentes especies.

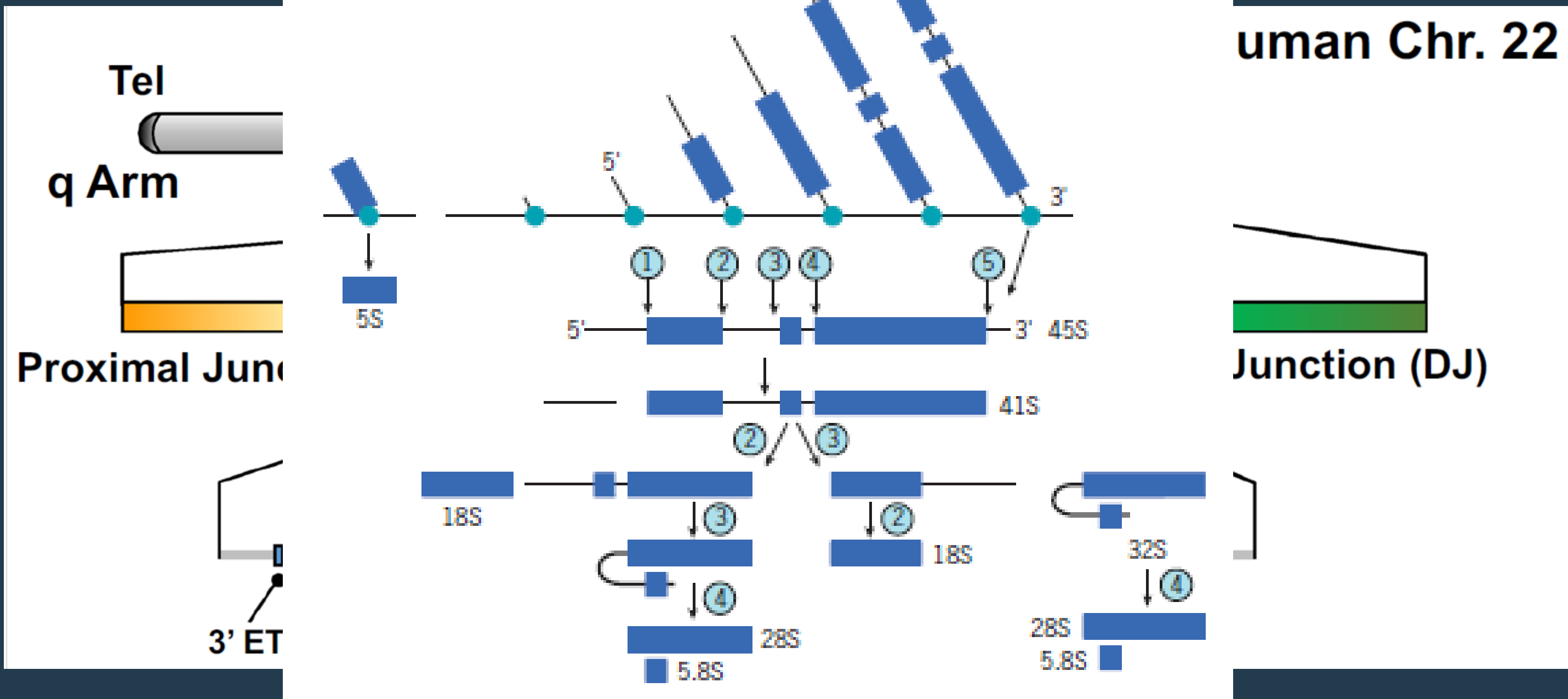
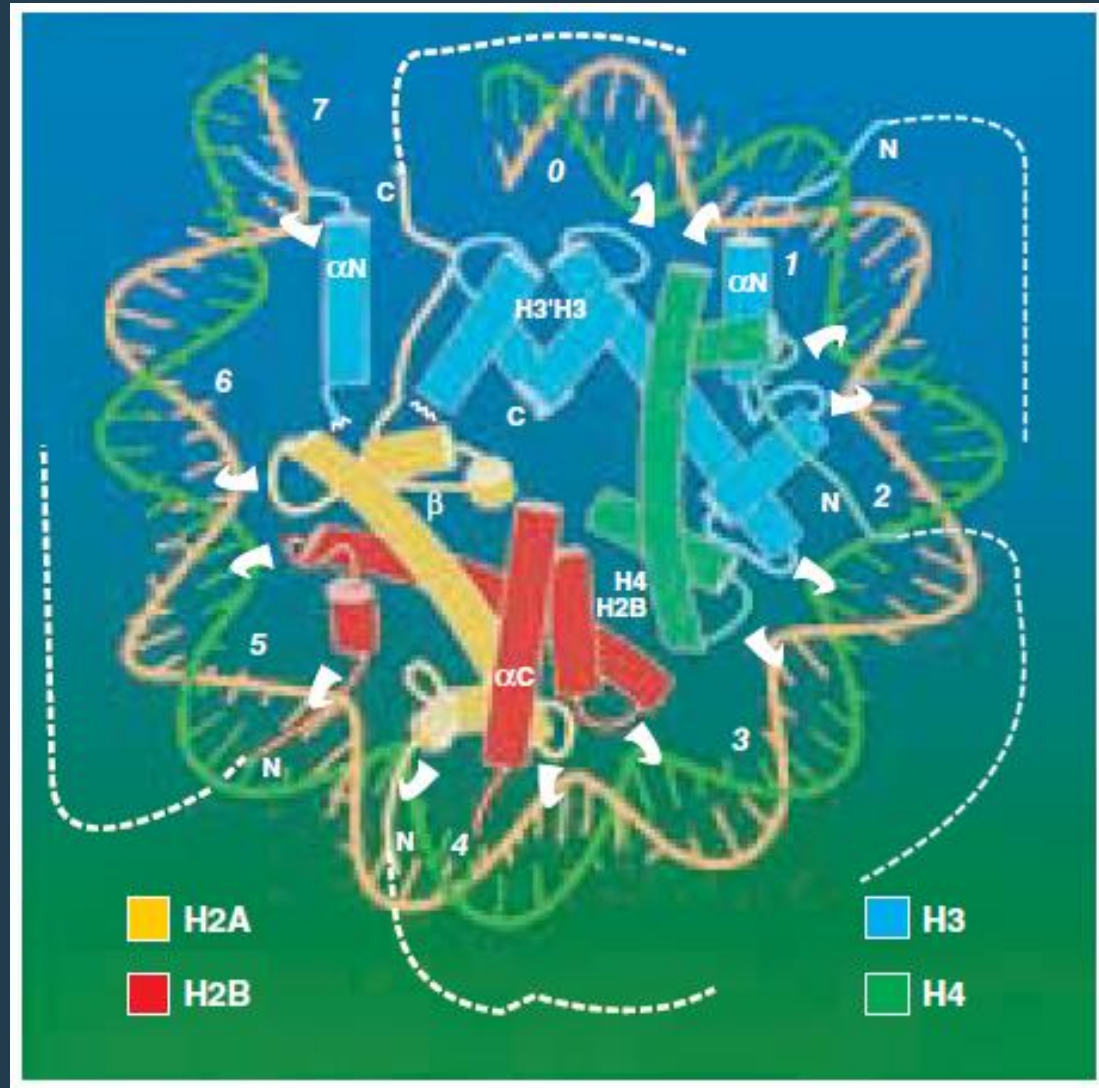


FIGURA 11-14 Un esquema propuesto para el procesamiento del RNA ribosomal de mamíferos. La transcripción primaria para el rRNA es una molécula 45S de unas 13 000 bases. Los cortes principales durante el procesamiento de este pre-rRNA se indican por medio de los números encerrados en círculo. El corte de la transcripción primaria en los sitios 1 y 5 elimina las secuencias transcritas externas 5' y 3' y produce un intermediario 41S. El segundo corte puede ocurrir en los sitios 2 o 3 según el tipo de célula. El corte en el sitio 3 genera el intermediario 32S visto en las curvas de la figura anterior. Durante los pasos finales del procesamiento, las secciones 28S y 5.8S se separan y los extremos de diferentes intermediarios se procesan a su tamaño maduro final. (TOMADA DE R. P. PERRY, J CELL BIOL 91:29S, 1981; CON AUTORIZACIÓN DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

Efecto en la actividad génica



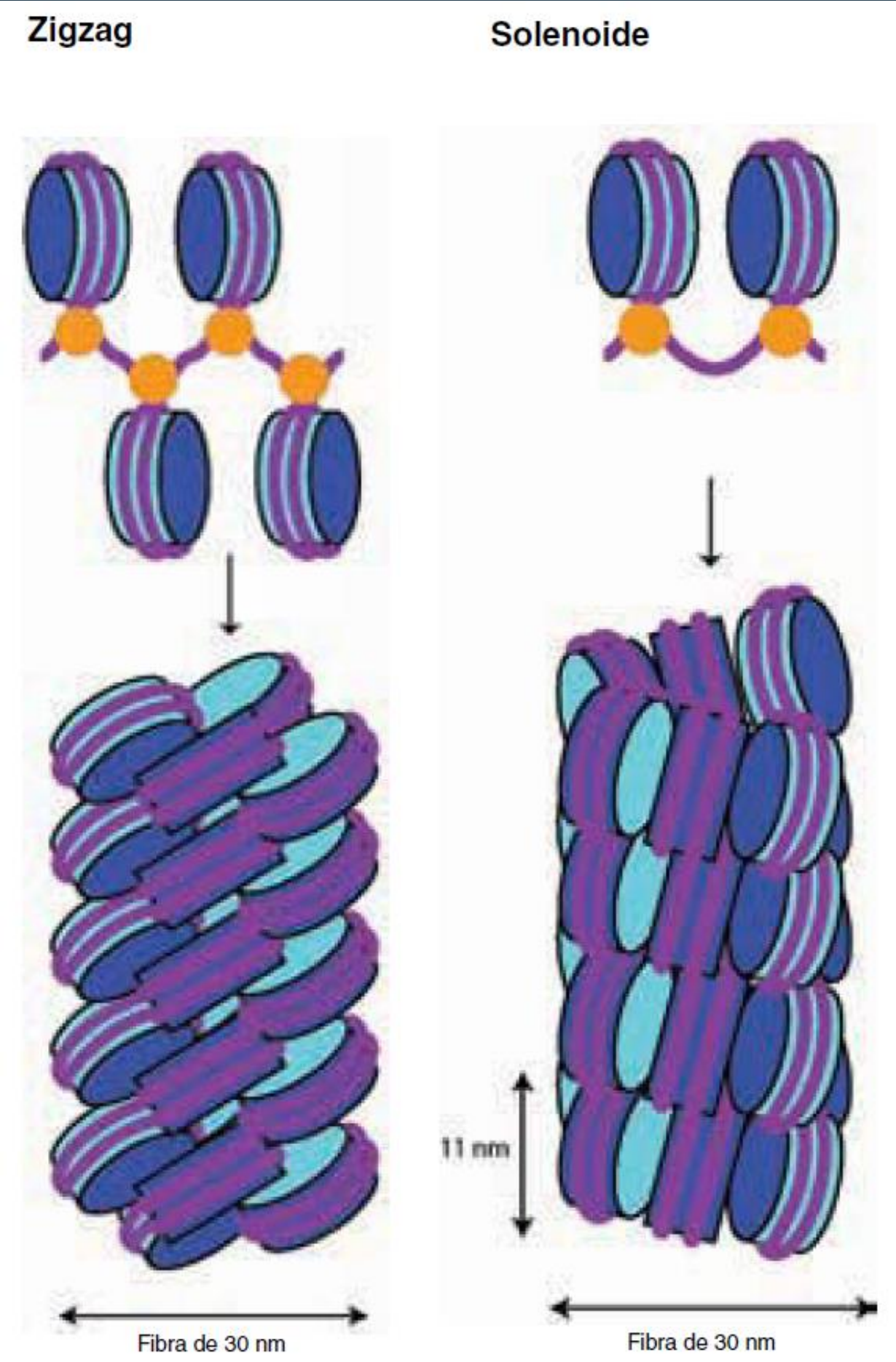
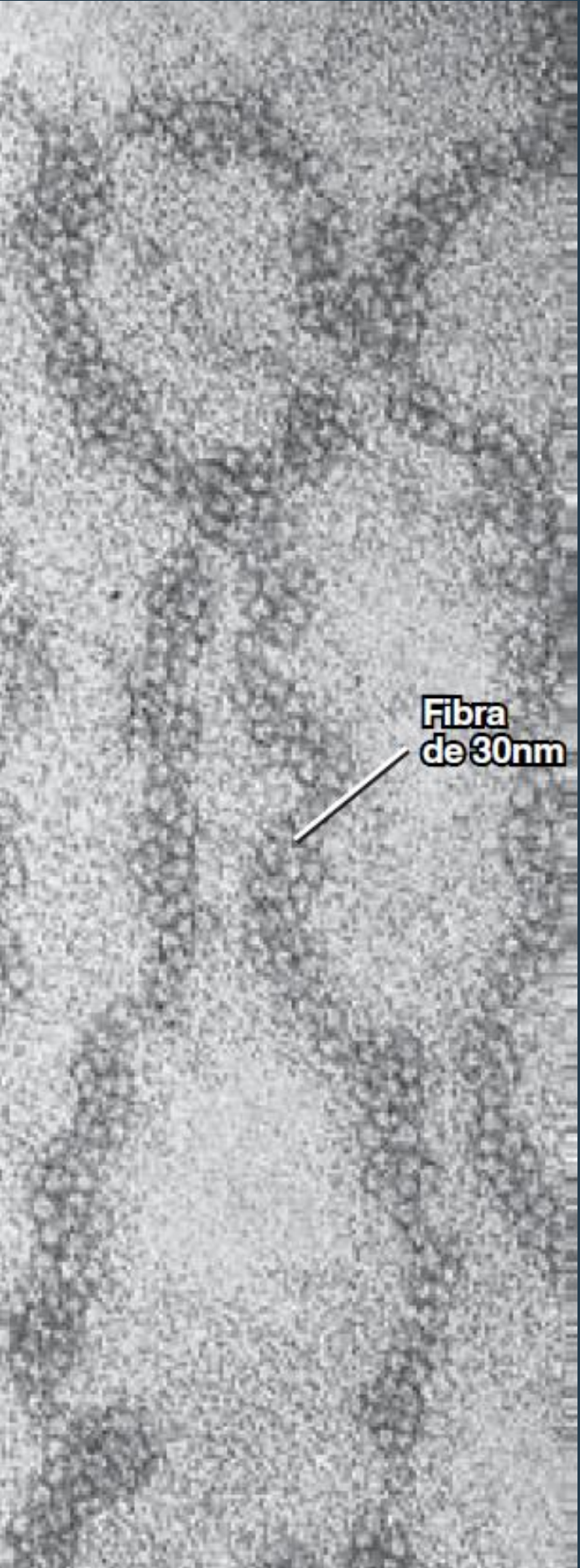
Estructura tridimensional de un nucleosoma como se revela mediante cristalografía de rayos X. 1) una región globular, conocida como “histona plegada”, que consiste en tres hélices alfa (representadas por los cilindros) y 2) una cola N-terminal extendida y flexible (indicada por la letra N) que se proyecta fuera del disco de histona mas allá de la doble hélice de DNA. Los puntos intermitentes de interacción entre las moléculas de histona y el DNA se indican con ganchos de color blanco. Las líneas punteadas señalan la porción mas externa de las colas de histona; estas colas flexibles carecen de una estructura terciaria definida.

Las dos moléculas hacen contacto en sitios donde el surco menor del DNA (A-T vs GC) se relaciona con el núcleo de la histona, lo que ocurre a intervalos aproximados de 10 pares de bases

Tipo	Variante	Localización	Función relacionada
H2A	H2AX	A lo largo de la cromatina	Reparación del DNA
	H2AZ	Eucromatina	Transcripción
	macroH2A	Inactivación del cromosoma X	Silenciamiento transcripcional
H3	CENP-A	Centrómero	Ensamble del cinetocoro
	H3.3	Transcripción de loci	Transcripción



Factores de transcripción y otras moléculas.



Topoisomerasas II

Eucromatina

Heterocromatina facultativa

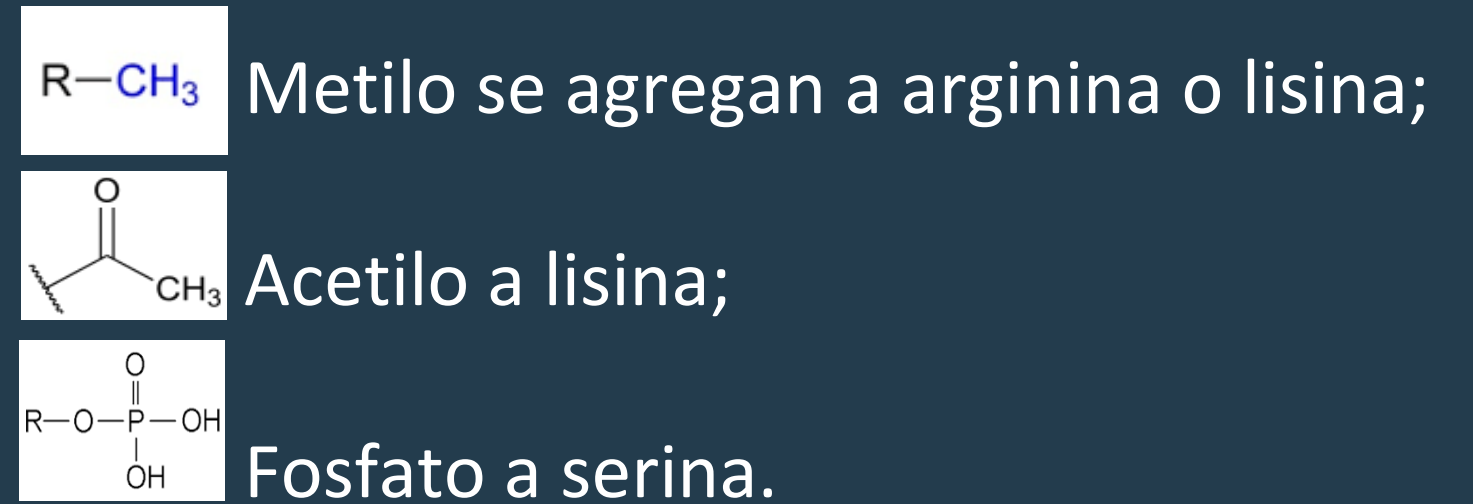
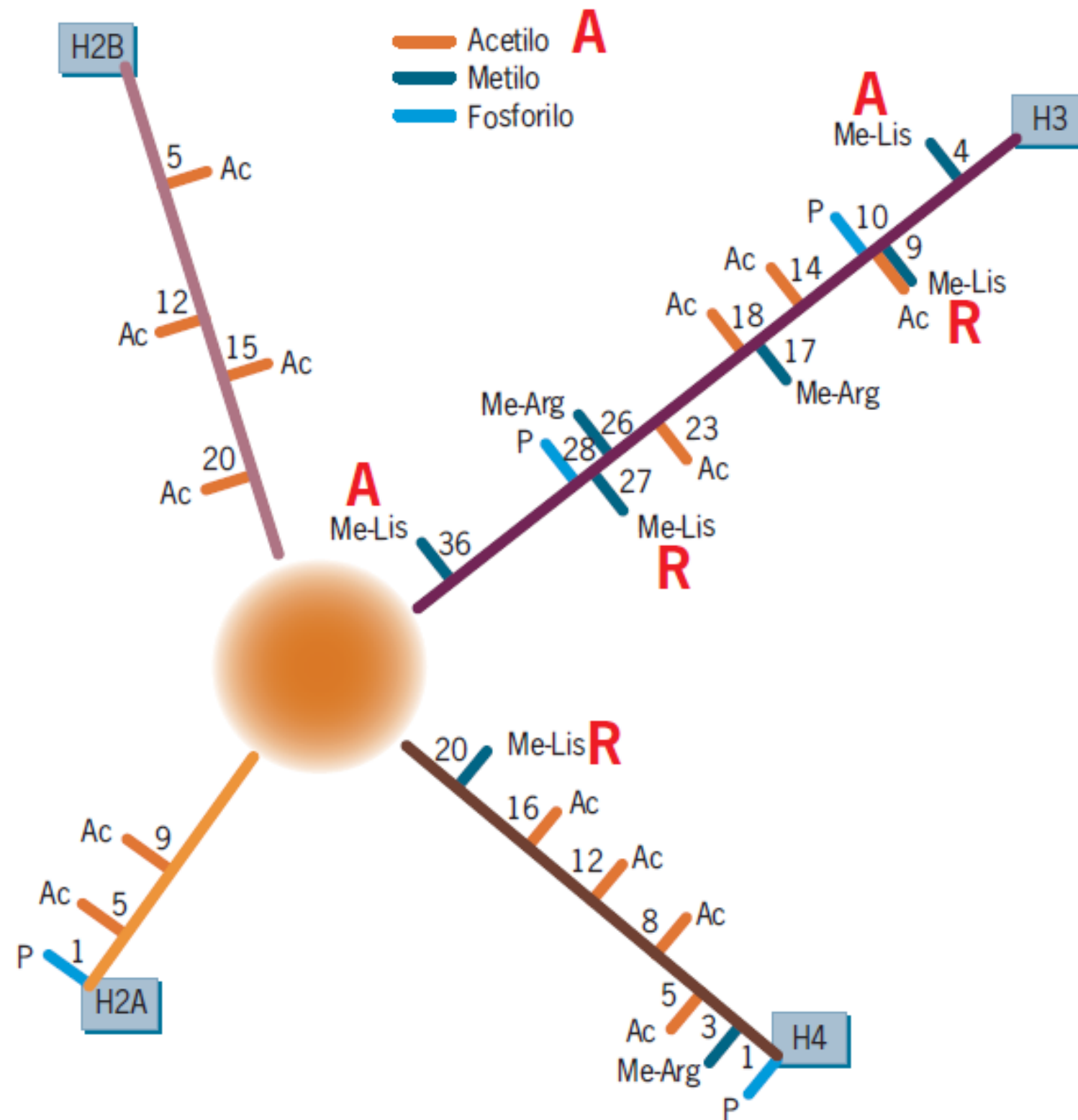
Heterocromatina constitutiva



Cambios de posición son resultado de transposición o translocación, tienden a silenciarse desde el punto de vista transcripcional: *efecto de posición*.

Diseminación de la heterocromatina a lo largo de los cromosomas es bloqueada por secuencias barrera especializadas (*elementos de frontera*) - histona H2AZ.

Modificaciones histónicas y “código histónico”

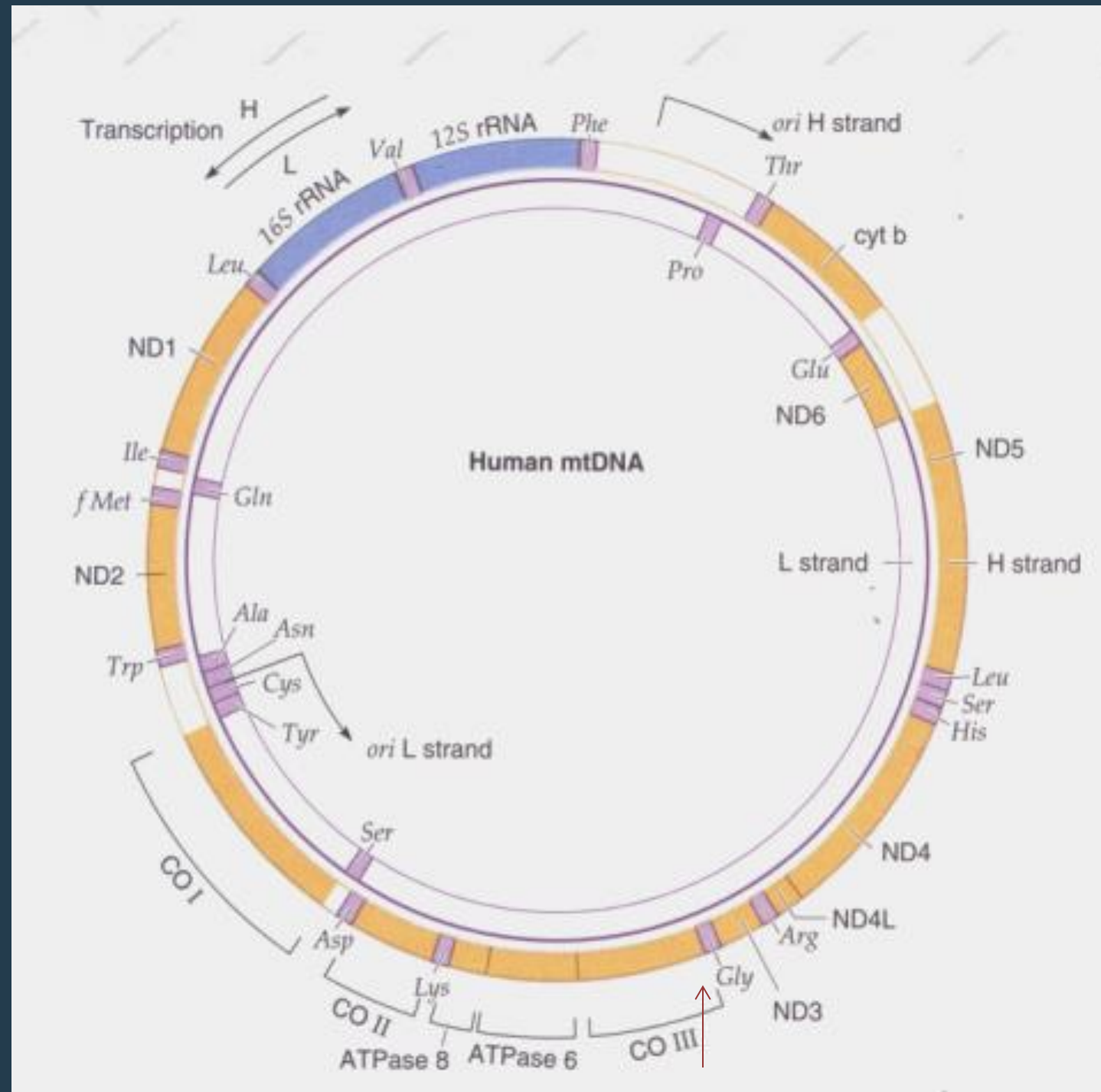


La acetilación de lisinas en las histonas H3 y H4 se correlaciona con activación transcripcional. Los efectos de la metilación de las lisinas de H3 y H4 dependen en gran medida de cual de estos residuos se modifique.

La metilación de la lisina 9 de la histona H3 (esto es, H3K9) suele estar presente en la heterocromatina y se vincula con la represión transcripcional. La metilación de H3K27 y H4K20 también se relaciona fuertemente con represión transcripcional, mientras que la metilación de H3K4 y H3K36 se vincula con activación.

ADNmt - mitogenoma

Genotipo en núcleo
Haplotipo en mitocondria



Cadena pesada (Heavy) - ligera (Light)



Proporción de C - G muy diferente



peso molecular muy distinto



bases púricas - H



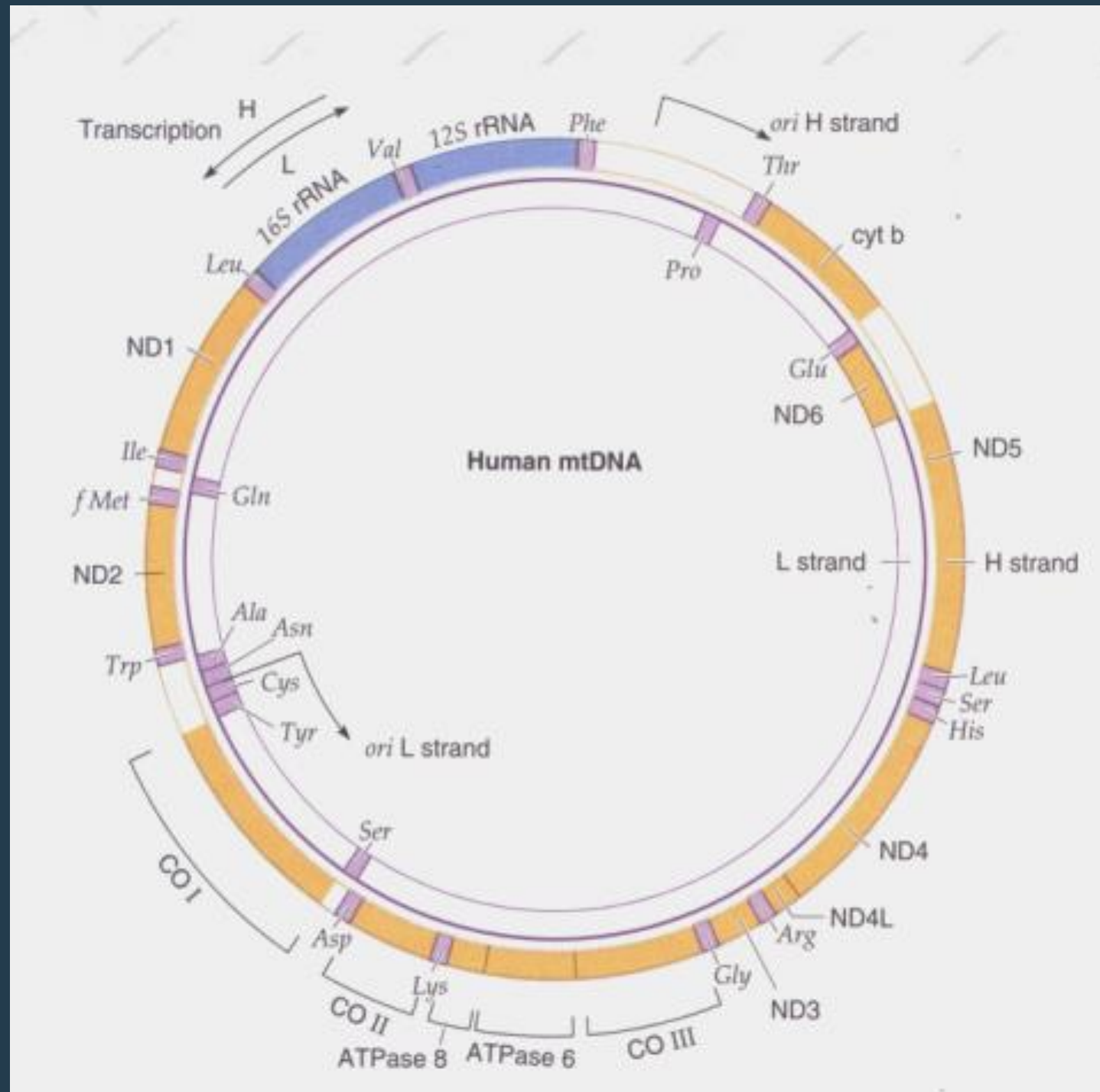
pirimidinas - L

37 genes:

- 2 rRNA (12S, 16S)
- 22 tRNA
- 13 genes estructurales:

7 subunidades (Complejo I),
1 cytb (Complejo III),
3 subunidades (Complejo IV),
2 de ATPasa (Complejo V)

ADNmt - mitogenoma



- Información compacta
- 3% de secuencias no codificantes
- La región control ↑ polimórfica Promotora, región hipervariable (D-loop - HV): HVI; HVII 16024 - 16569 y 1 - 576

Regulación de la replicación

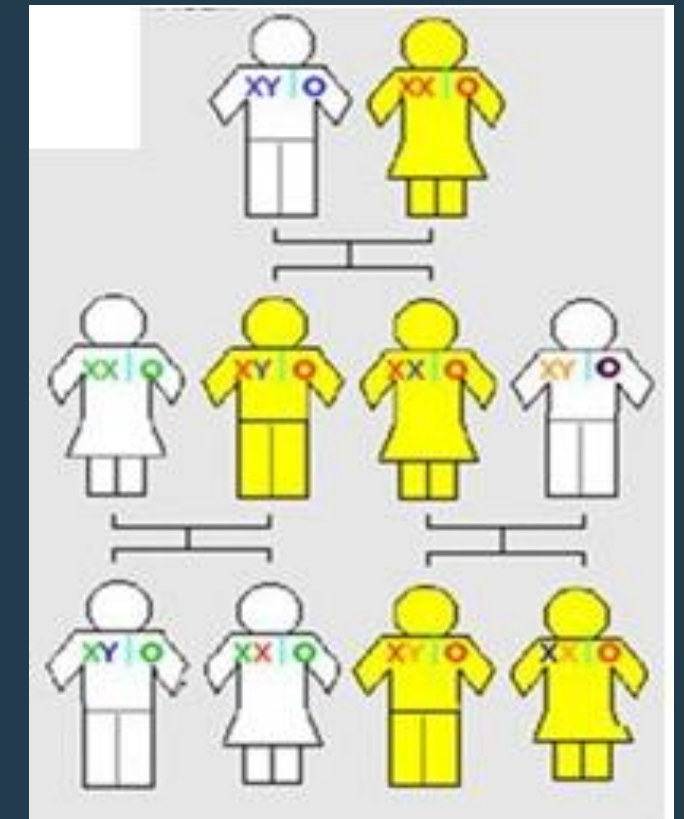
Transcripción

Diversidad genética (variaciones para rastreo de linaje materno, evolución de las poblaciones).

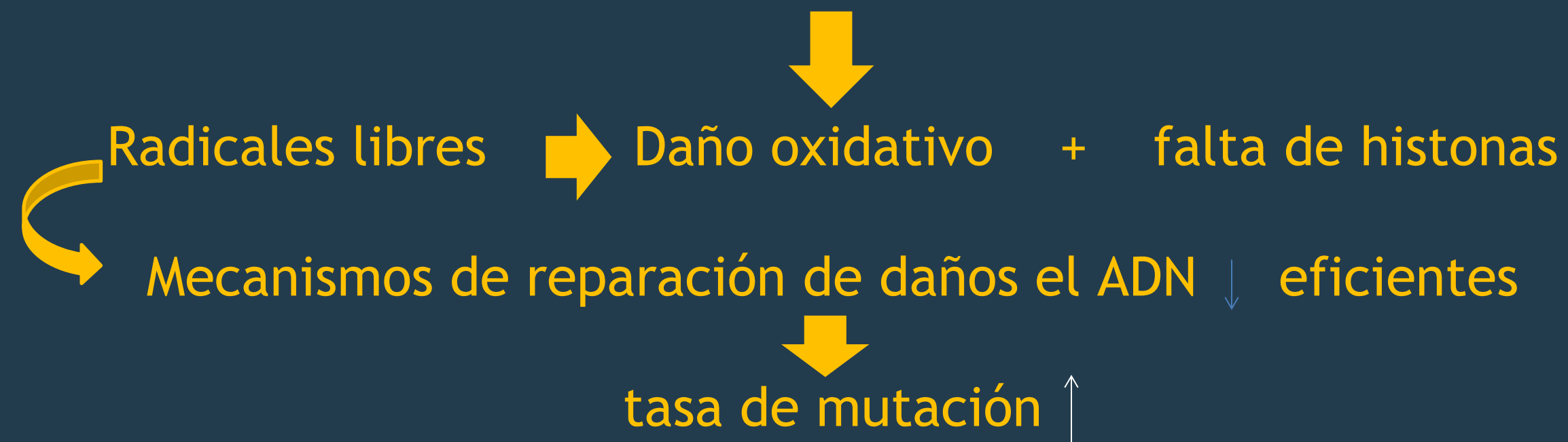
Medicina forense

Diagnóstico

- El ADN mitocondrial está en replicación constante.
-
- Transferencia sucesiva de muchos genes.
- Pequeño en tamaño.
- Porcentaje muy elevado de ADN codificante.
- Falta generalizada de secuencias repetidas y genes de ARNr comparativamente pequeños, parecidos a los de procariotas.



Producción de energía celular y procesos de fosforilación oxidativa

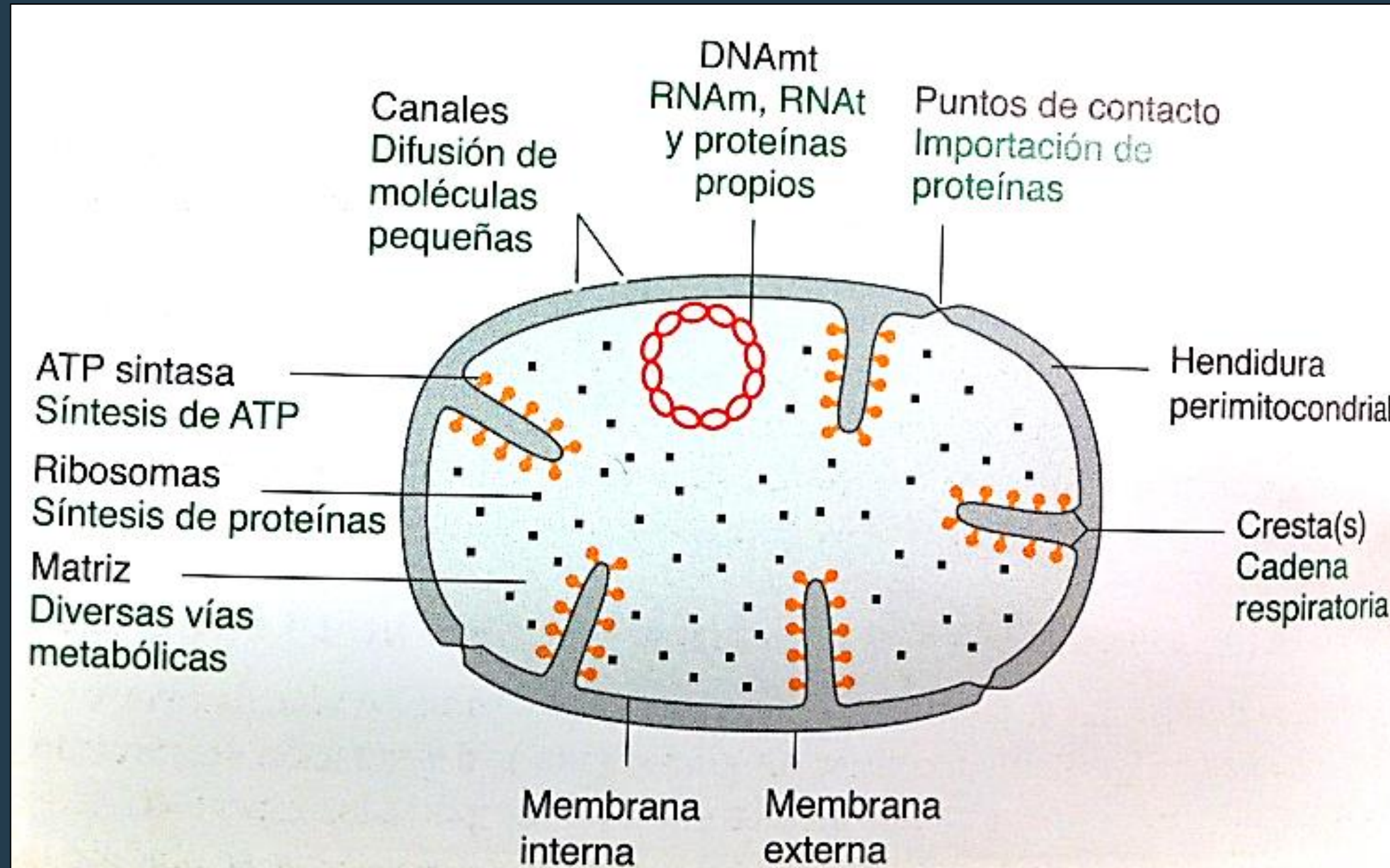


Importación

Puntos de contacto

1. Proteínas TOM y TIM
(Translocasa de membrana externa/interna)

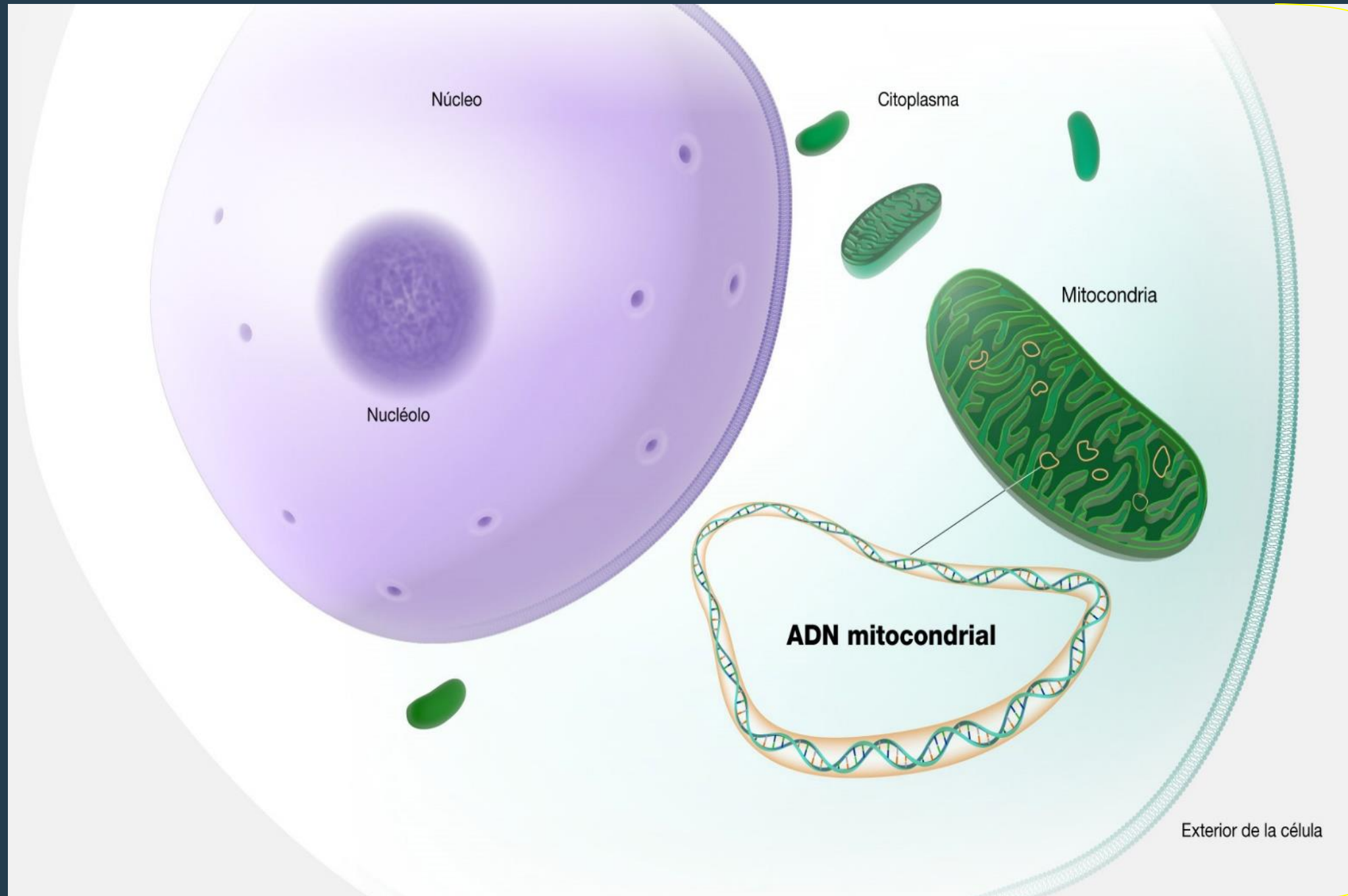
Secuencias específicas de orientación a un blanco



MITOGENOMA

- $\approx 16000 - 17000$ pb
- Mitocondria $\approx 100 - 1000$ copias de ADN
- Intrones
- Linaje materno, tasa de errores es mayor
- 37 genes: 22 tRNA, 13 protein-coding (PCGs; coding sequences - CDSs), 2 rRNA

Cadena H (*heavy*) y la cadena L (*light*), debido a su diferente densidad cuando son centrifugadas en gradiente de CsCl.



*Whole Genome Sequencing,
WGS*

Shotgun sequencing

Long-range PCR

Primer walking

Calidad, limpieza, <i>merged</i> -----	FastaQC, Trimmomatic
Ensamblaje -----	SPAdes
Anotación, ORFs-----	MITOS, Geneious Prime[®] 2023.2.1
Alineamiento -----	MAAFT, BMGE
Análisis filogenéticos -----	ModelFinder Bayesian Inference, MrBayes v3.2.7 Maximum Likelihood, IQ-TREE <i>Sistema operativo Linux</i> <i>Toolkits - various pipelines</i>

Importancia de los mitogenomas para comprender la diversidad

Paula A. Ossa-López; Juan E. Uribe; Héctor E. Ramírez-Chaves; Fredy A. Rivera-Páez



Systematic & Applied Acarology 29(1): 93–108 (2024)

<https://doi.org/10.11158/saa.29.1.7>

ISSN 1362-1971 (print)

ISSN 2056-6069 (online)

Article

First mitochondrial genome of *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Evidence for studying species within the *A. maculatum* group

PAULA A. OSSA-LÓPEZ^{1,2}, JUAN E. URIBE³, HÉCTOR E. RAMÍREZ-CHAVES^{2,4} & FREDY A. RIVERA-PÁEZ^{2*}

1. Extracción de ADN



2. Cuantificación



3. *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*, plataforma Illumina (secuenciación masiva).

Nova Seq 6000 150 PE (150 × 2 bp; 10 Gb/sample) - long-range PCR

4. PCR



26 parejas de "primers".
primer-walking sequencing



2nd Generation

- Secuenciación masiva, alto rendimiento, secuencias cortas.
- Genómica, transcriptómica.

3rd Generation

- Lecturas largas, facilita el estudio de regiones complejas del genoma y el ensamblaje.
- Menor precisión.

Calidad, limpieza, fusión



Linux



ubuntu

Ensamblaje



geneIOUS

Anotación

MITOS WebServer

Alineamiento

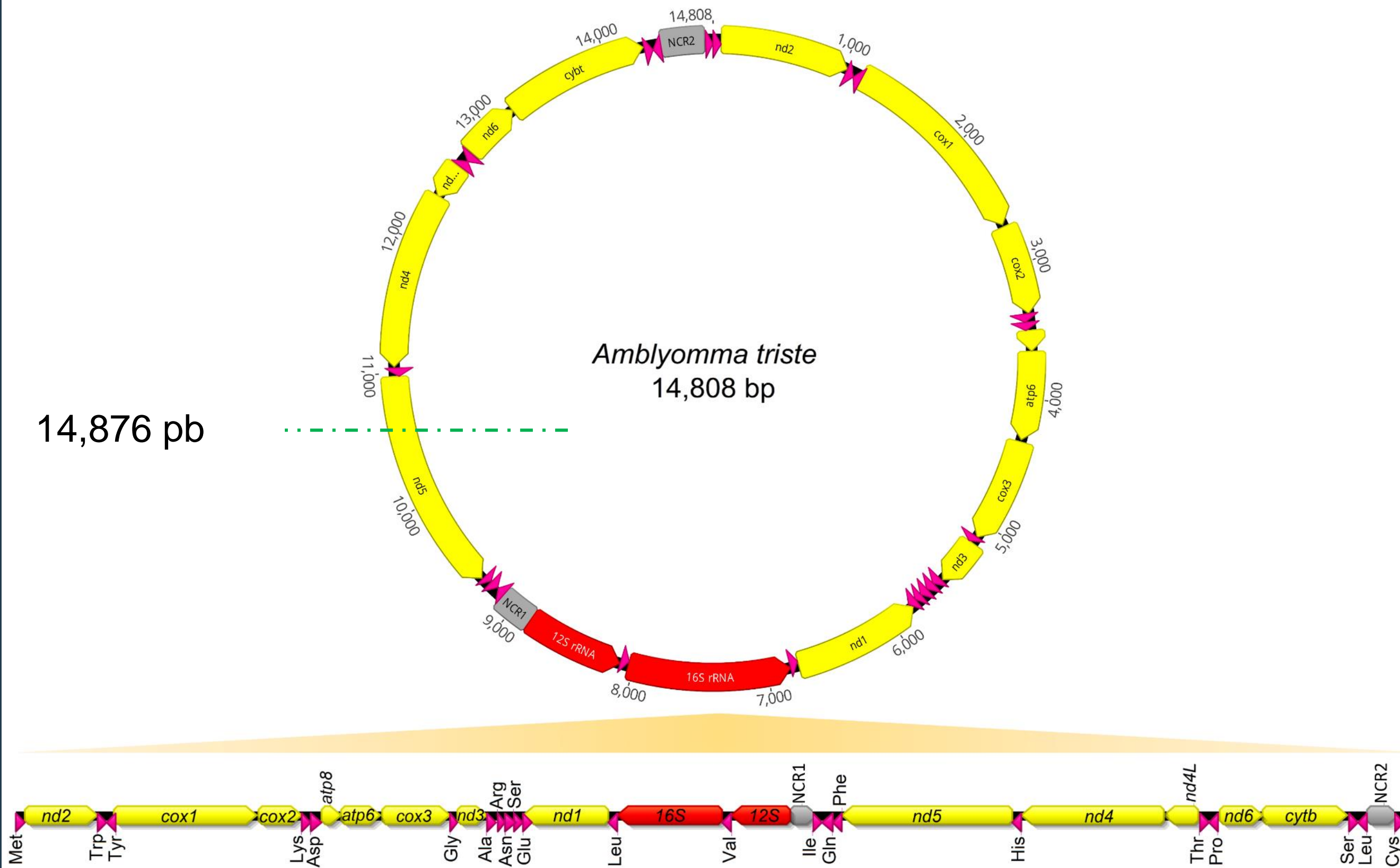


Análisis filogenéticos

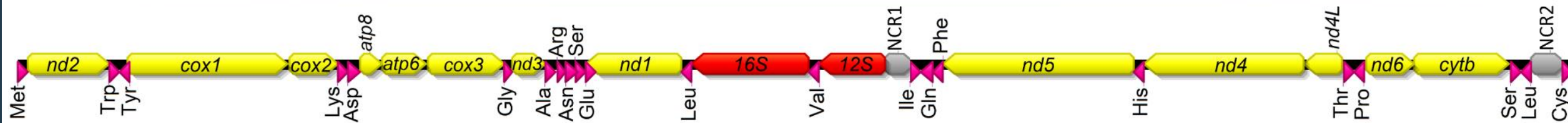
PhyloSuite

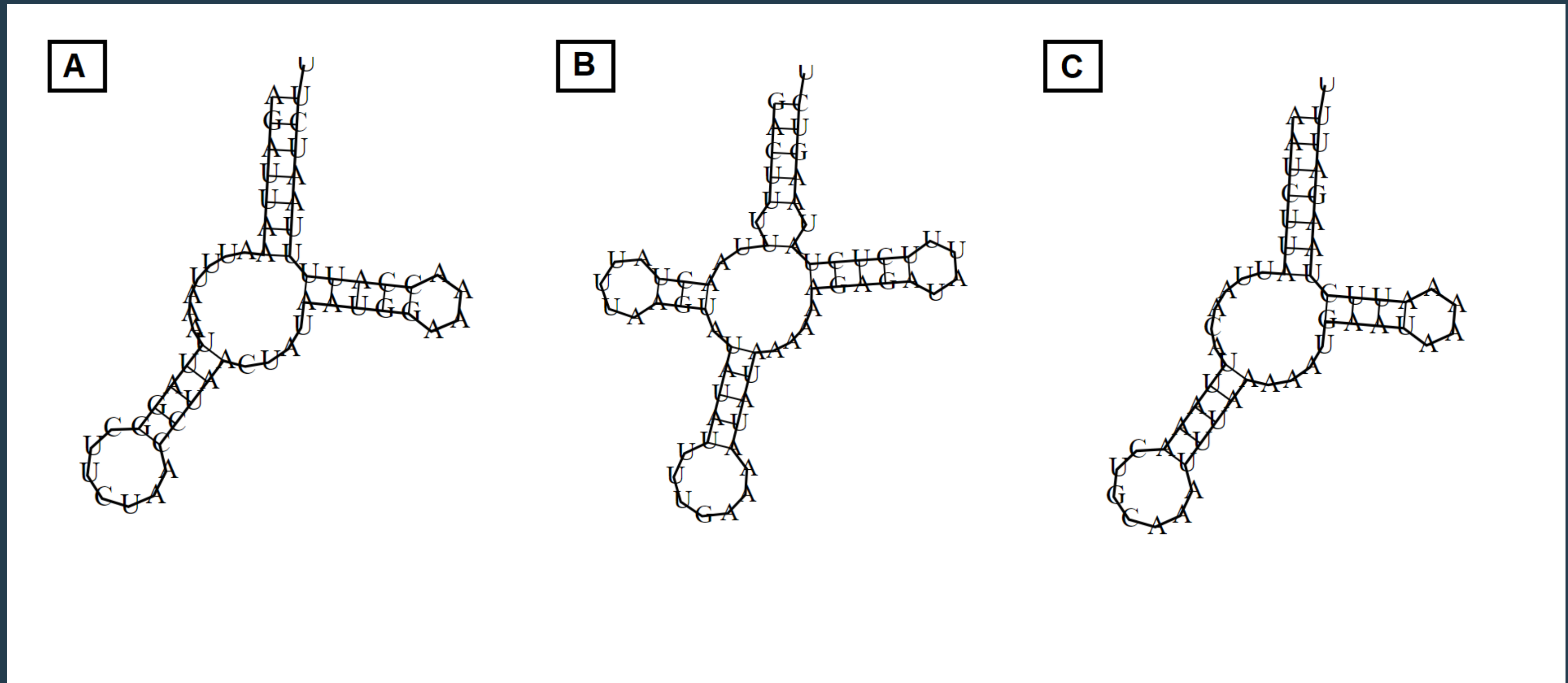
14,876 pb

Amblyomma triste
14,808 bp



*start codons inferred
are ATT and ATG,
and termination
codons are mainly
TAA and sometimes
use "T";*





Predicción de la estructura secundaria de los genes *tRNA* de *A. triste* obtenidos con el servidor web MITOS. A. *tRNA-Ser^{AGA}* (S1), estructura con carencia de DHU; B. *tRNA-Ser^{UCA}* (S2) , estructura normal en trébol; C. *tRNA-Cys^{UGC}*, estructura con carencia de DHU.

Distancias (porcentaje) de los genes mitocondriales (*CDS* y *rRNA*) entre *A. maculatum* y *A. triste*, de acuerdo al método *p-distance*.

	Genes	<i>A. maculatum</i> (MW71925)
<i>A. triste</i>	atp6	3.9
	atp 8	4.3
	cox 1	4.2
	cox 2	3.0
	cox 3	3.8
	cybt	3.7
	nd1	3.6
	nd2	3.7
	nd3	5.4
	nd4	4.1
	nd4L	3.3
	nd5	5.0
	nd6	3.4
	12S	2.1
16S	2.9	

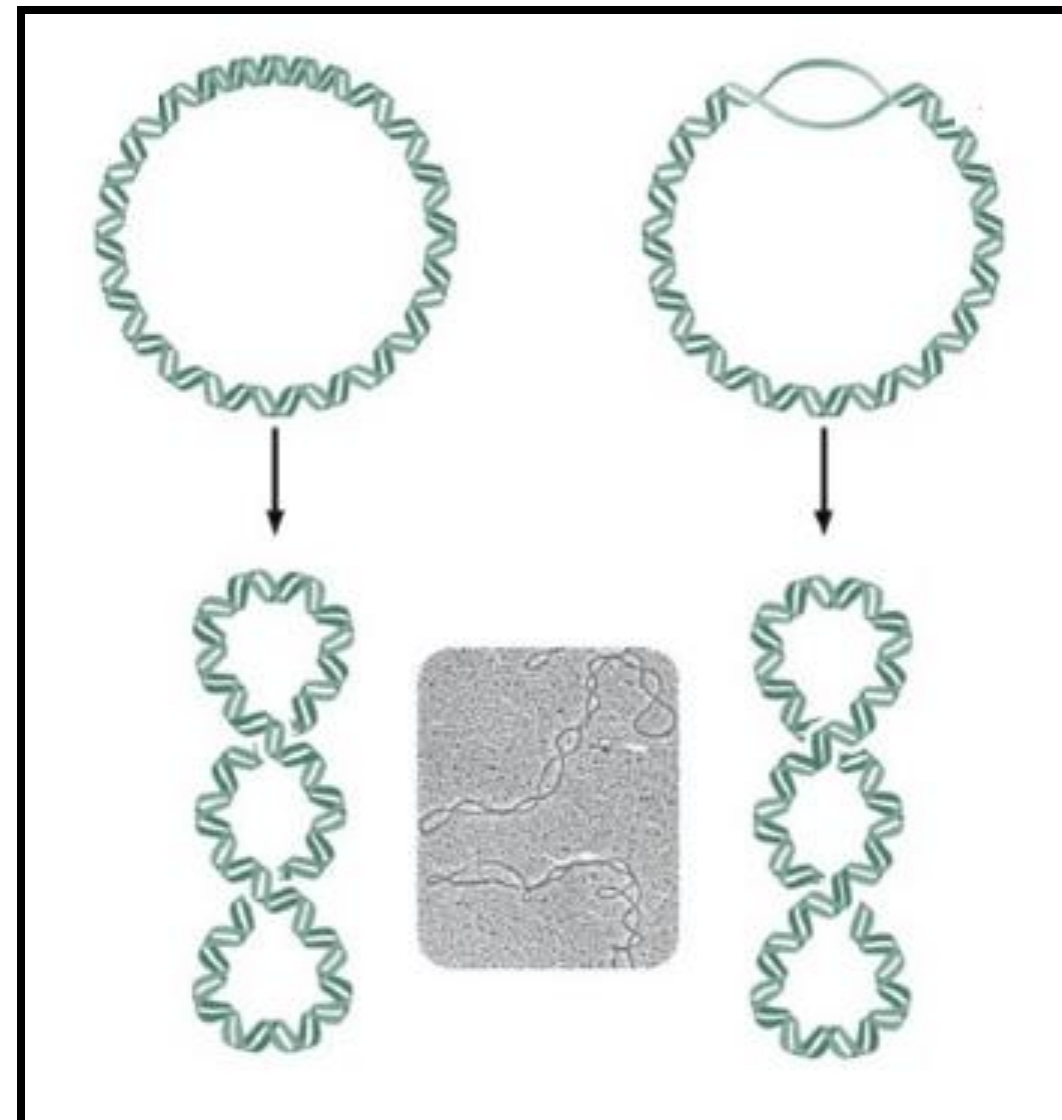
- 37 genes: 13 *protein-coding genes* “CDSs”, 22 *transfer RNA genes* “tRNAs” y dos rRNA genes; dos regiones control o *non-coding region* “NCR”.
- Contenidos de A+T; codones
- Evaluación de otros genes (*nad1*, *nad2*, ***nad5***, *cox1* y ***atp8***)

Superhélice ADN

2 ADN circulares, peso molecular idéntico con velocidad de sedimentación diferente



Superhélice + y -



Topoisomerasas

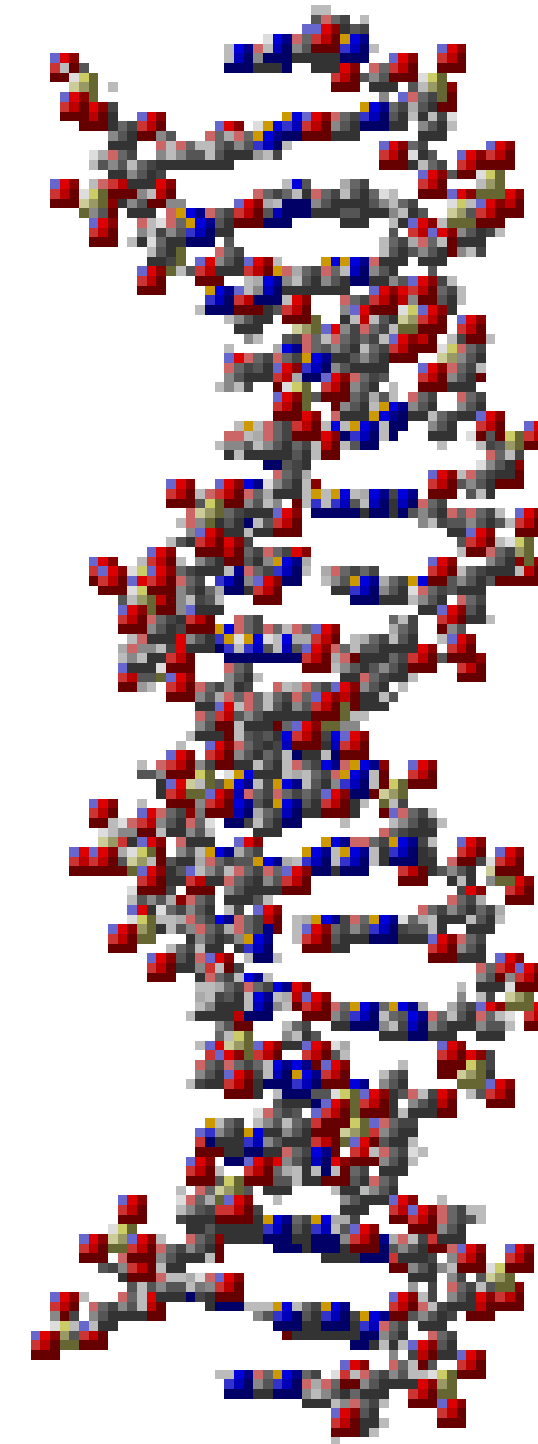
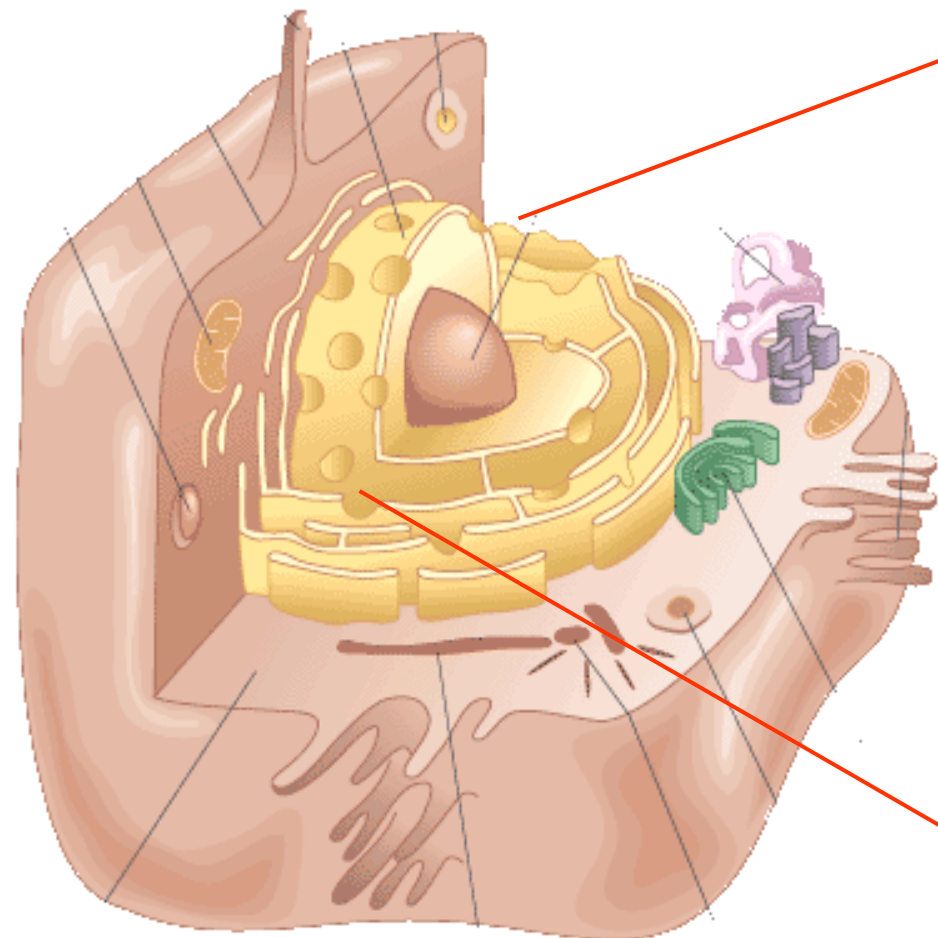


relajación

desanudar

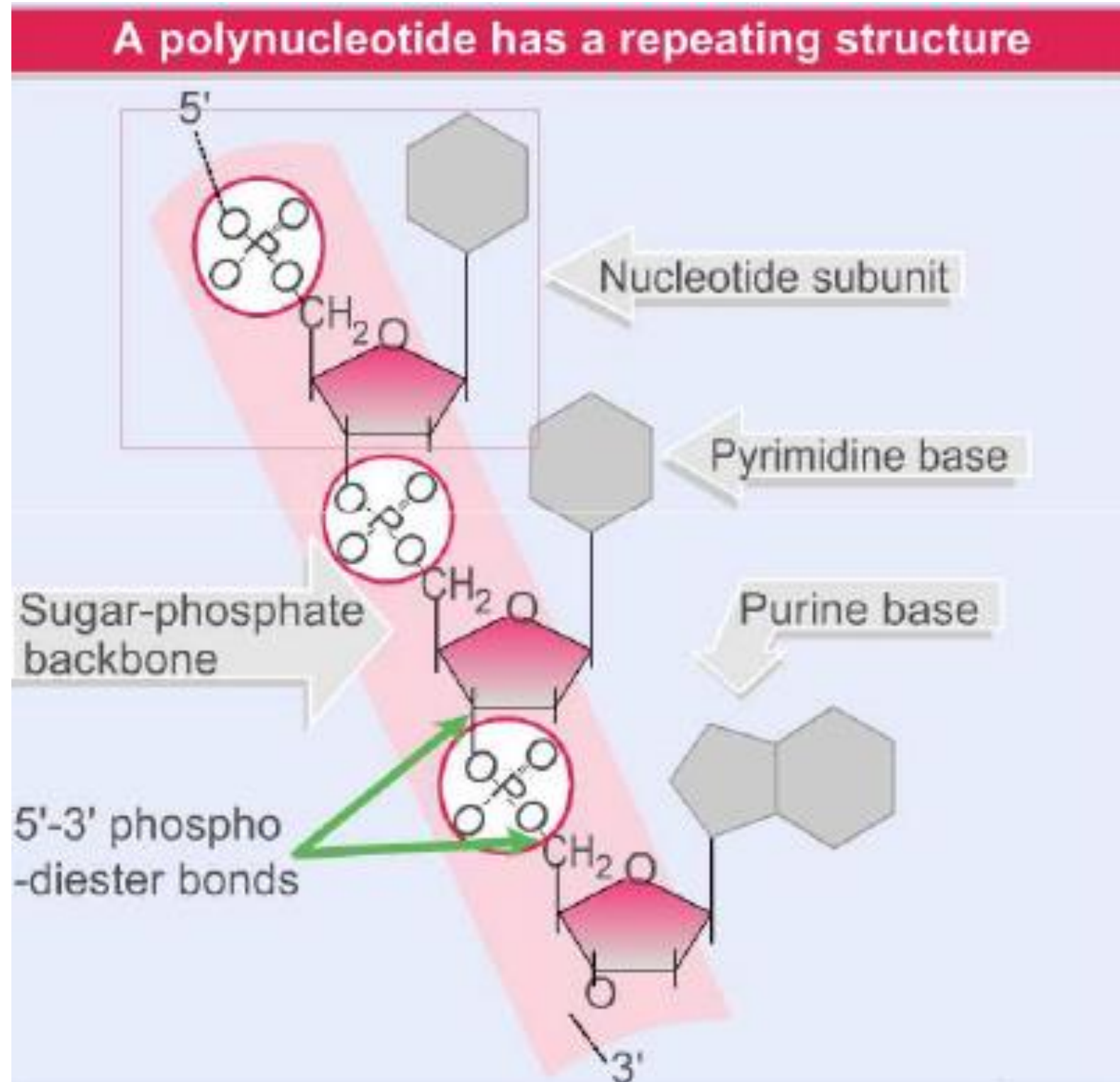
desencadenar

ADN



Semiconservativa

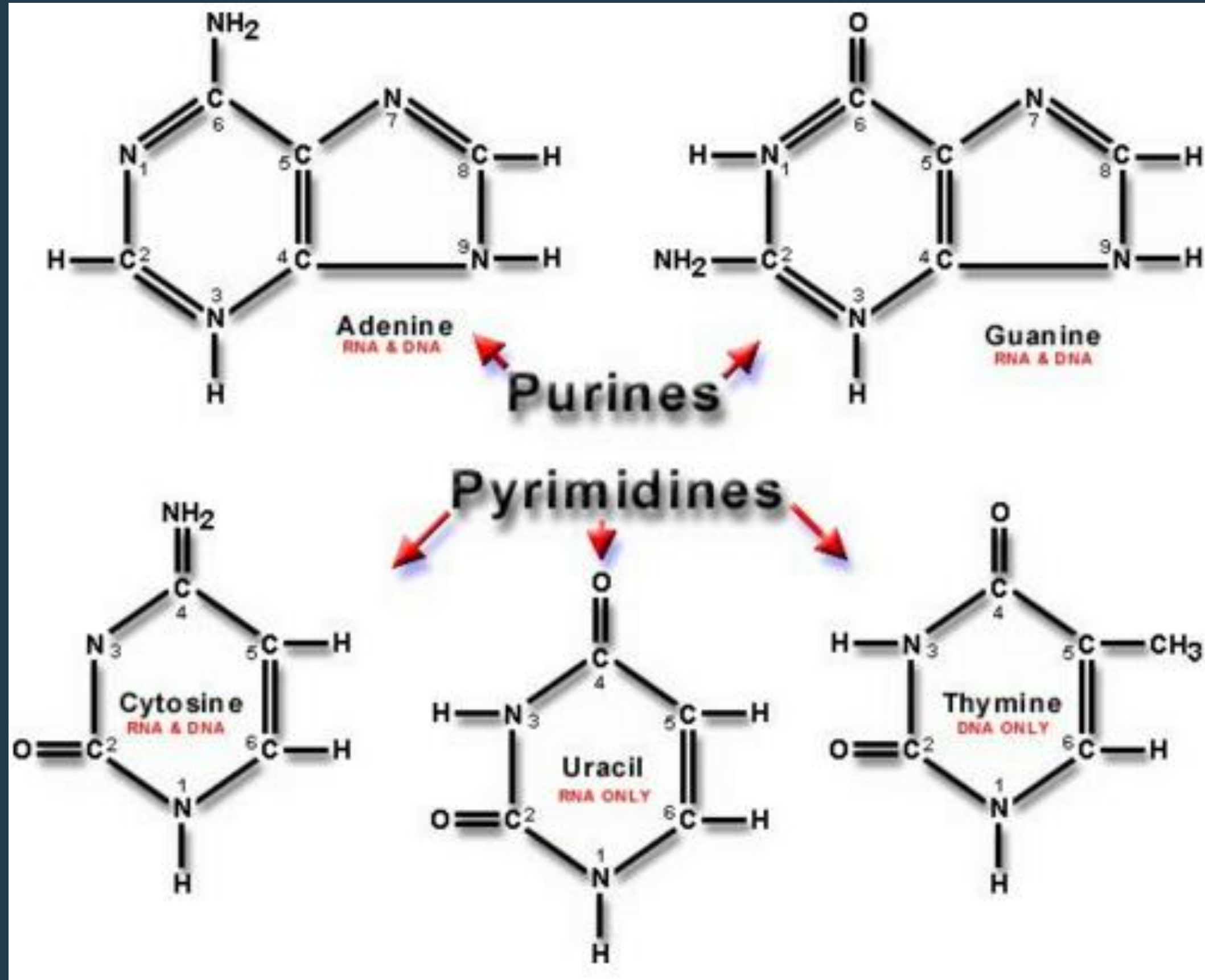
El ADN esta formado por la unión de moléculas denominadas nucleótidos



Purinas: Adenina y Guanina

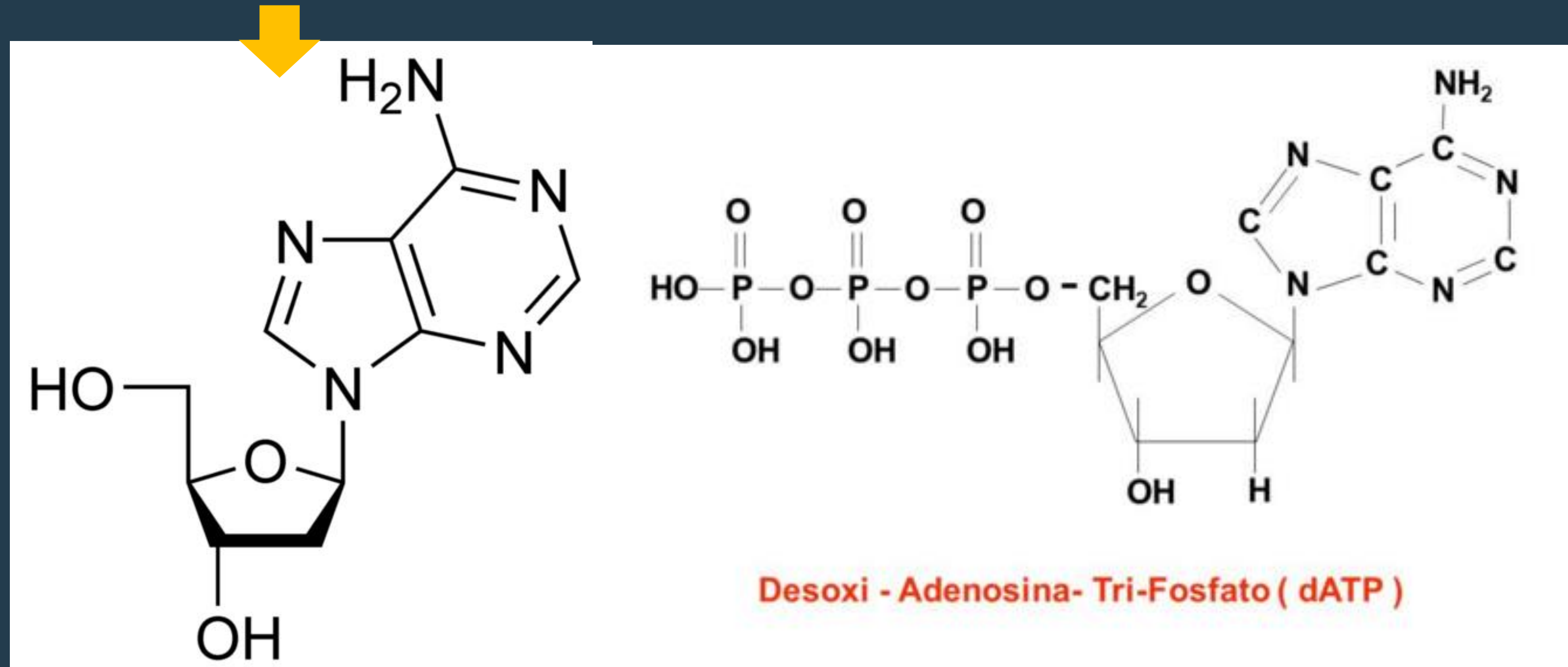
Pirimidinas: Timina, Citosina, Uracilo

Bases nitrogenadas en condiciones fisiológicas normales



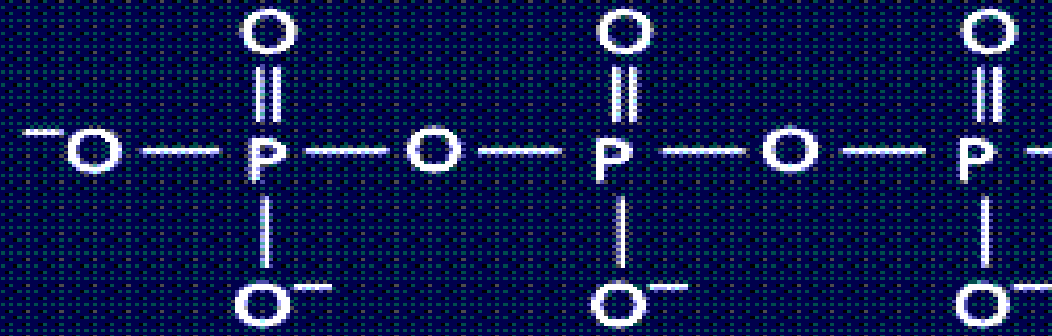
PRECURSORES DEL ADN Y ARN

2'-desoxiadenosina; 2'-desoxiguanosina; 2'-desoxicitidina; 2'-desoxitimidina

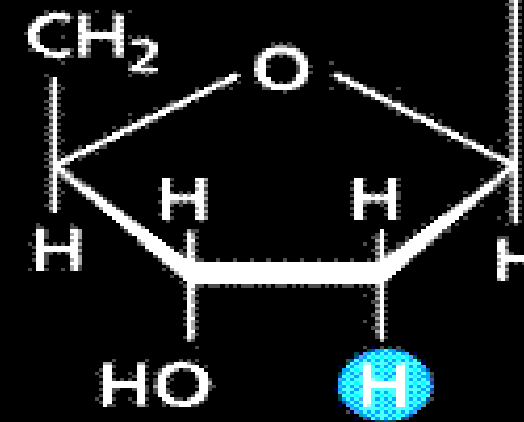
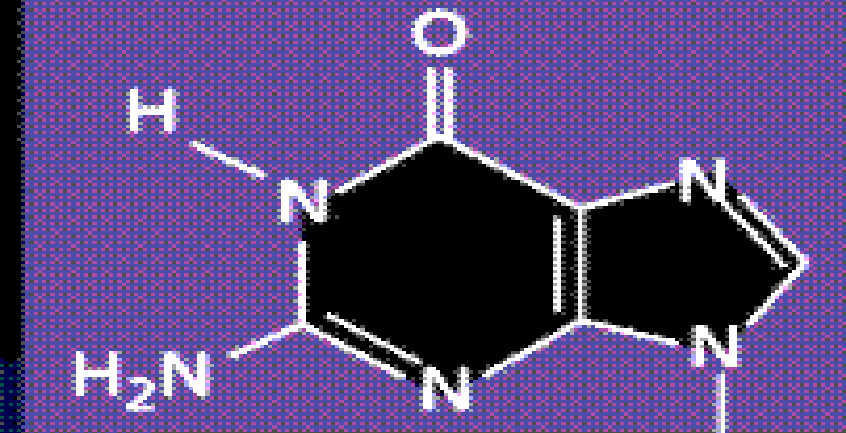


Replicación de ADN

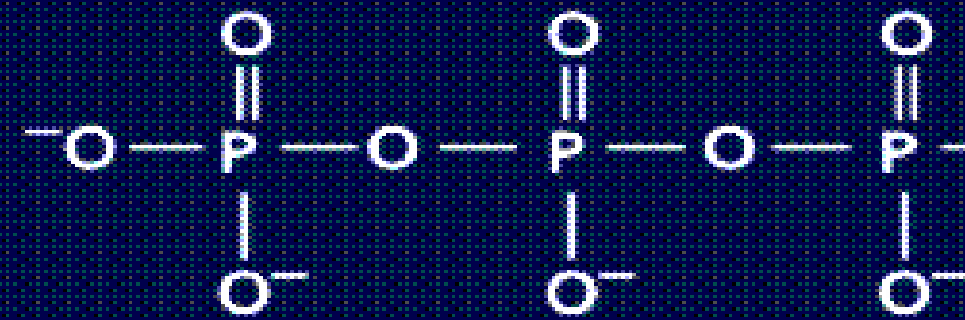
Desoxi-GTP



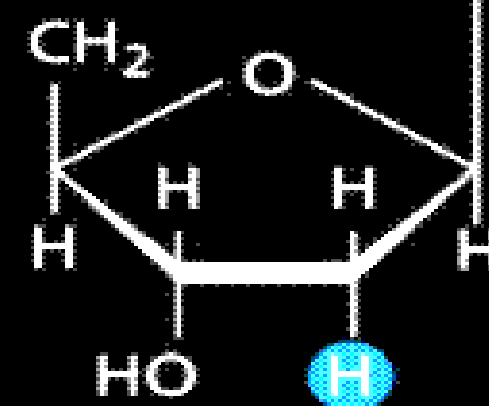
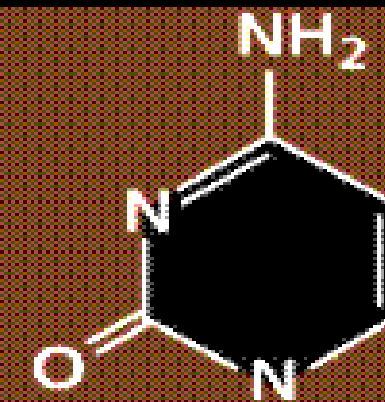
Guanina



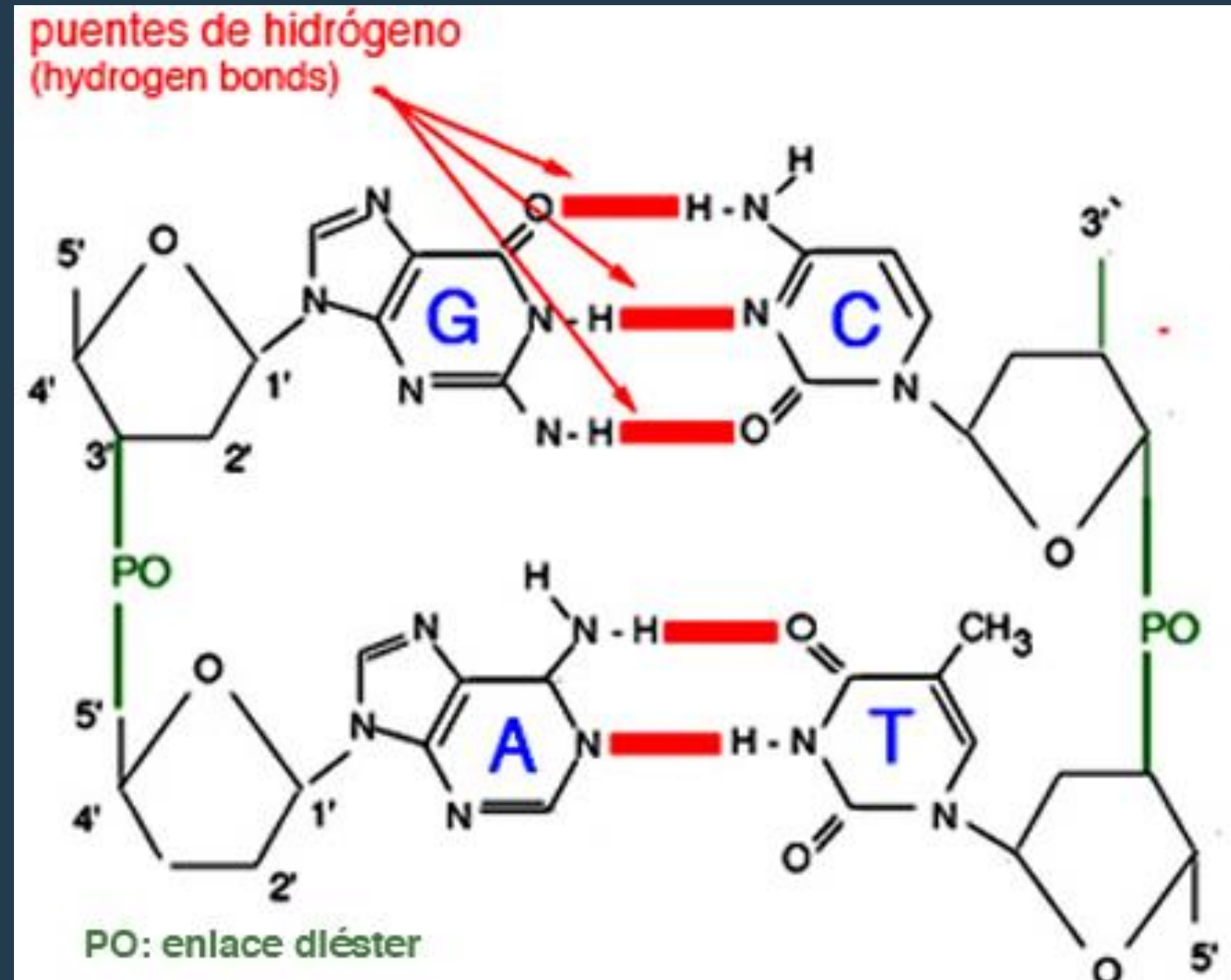
Desoxi-CTP



Citosina

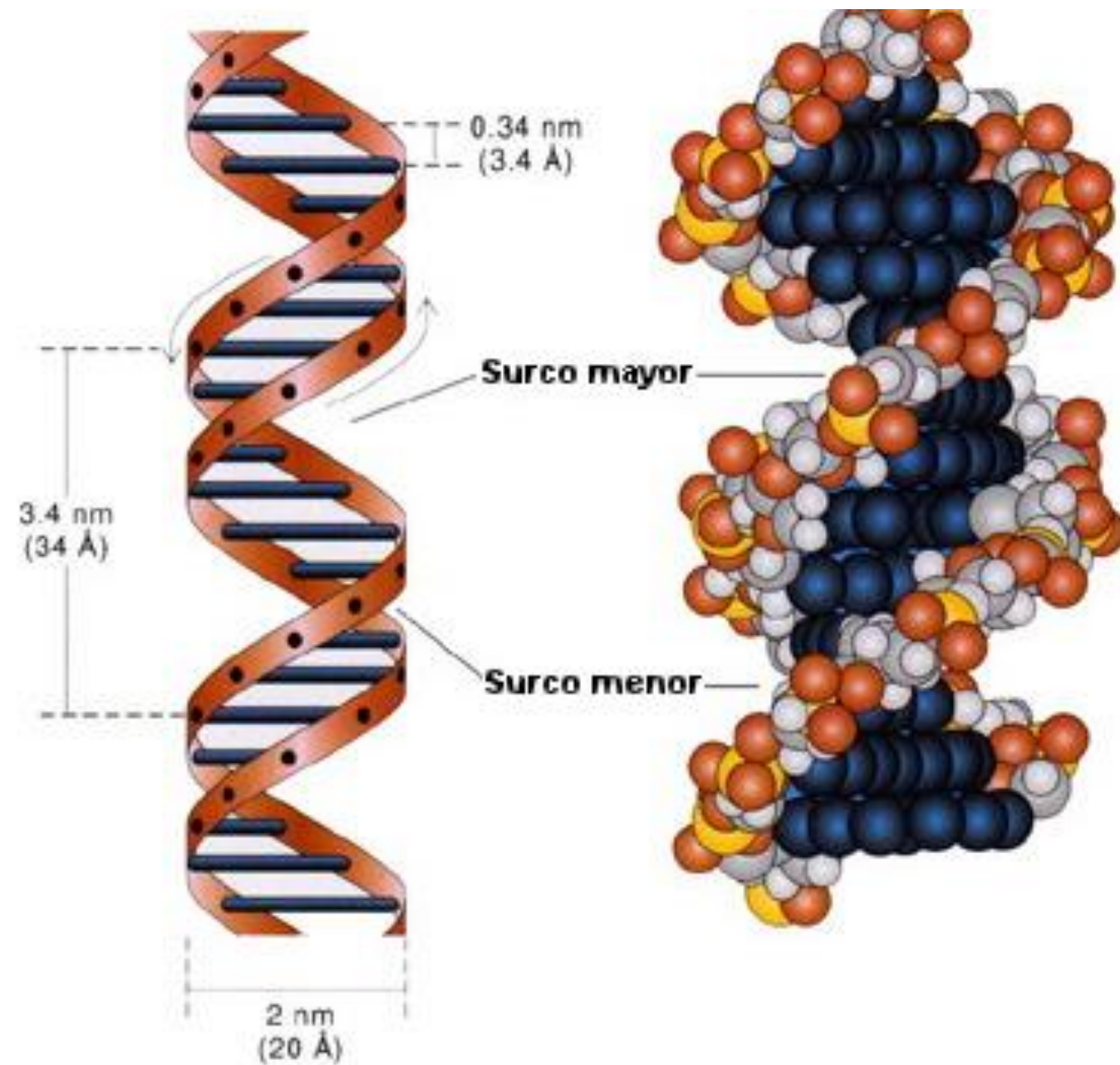


Puentes de hidrógeno



Las dos hebras son antiparalelas, es decir, que en los extremos tenemos el carbono 3' de una cadena y el 5' de la otra.

- LA HEBRA DE ADN ES HELICOIDAL



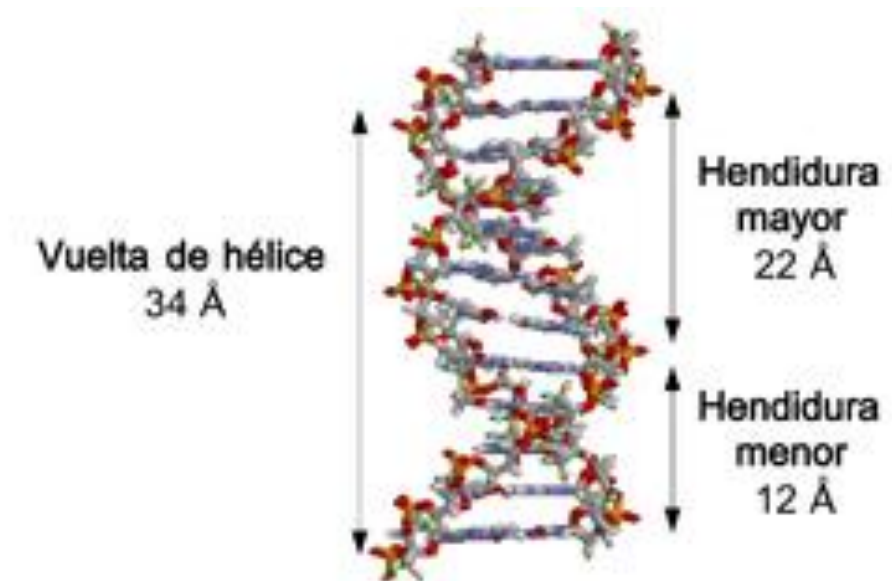
Diámetro constante → 20 °A

1 Vuelta → 34 °A

Apilamiento de las bases → 3,4 °A

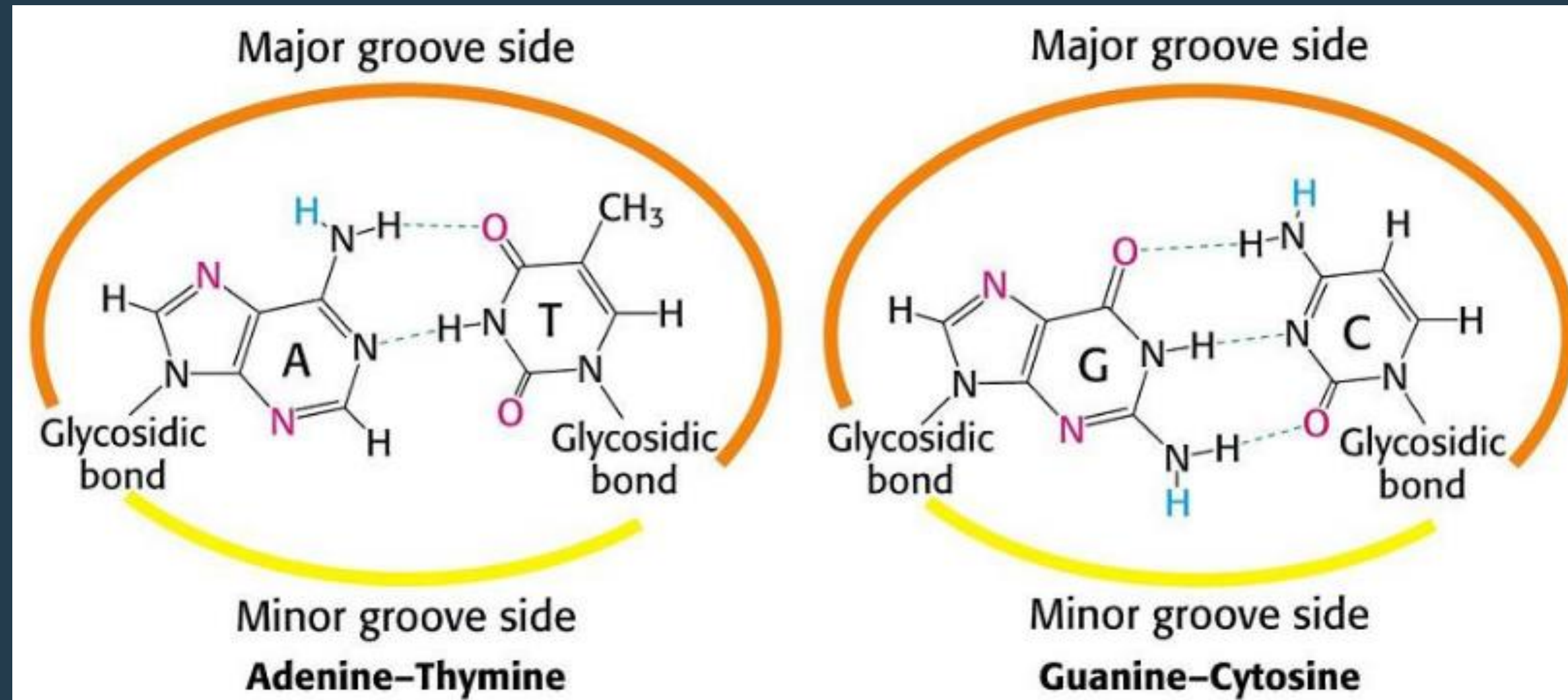
Vuelta completa → 10 pb

Dextrógira

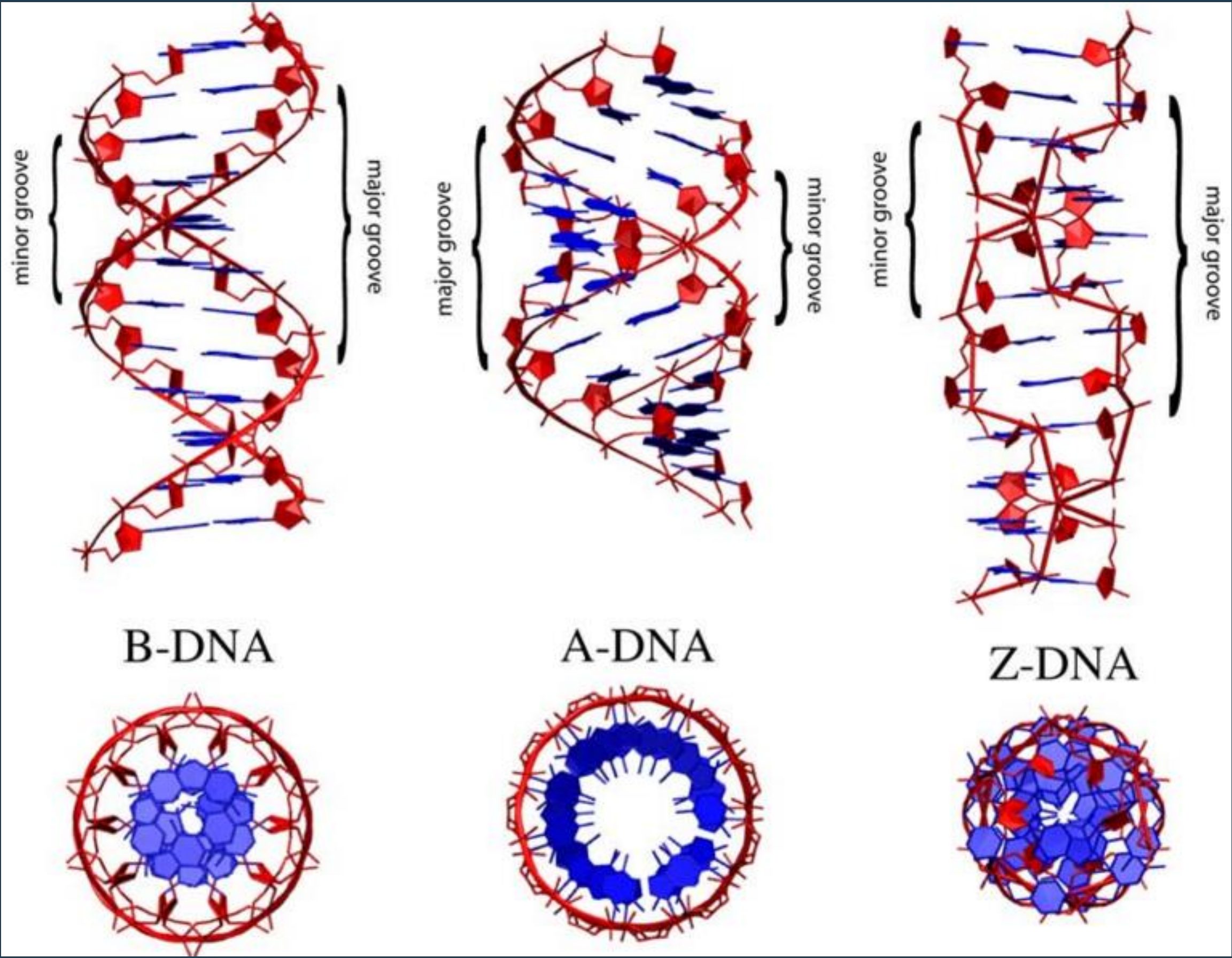


FORMA A: 11pb y 23 °A (compacta, adenovirus)

FORMA Z: Levógira, 12pb y 18 °A (G-C, salinidad, regulación de la expresión y recombinación, regiones repetidas, reorganización génica)



Enlaces glicosídios entre un par de bases no está diametralmente opuestos entre sí.



minor groove

major groove

major groove

minor groove

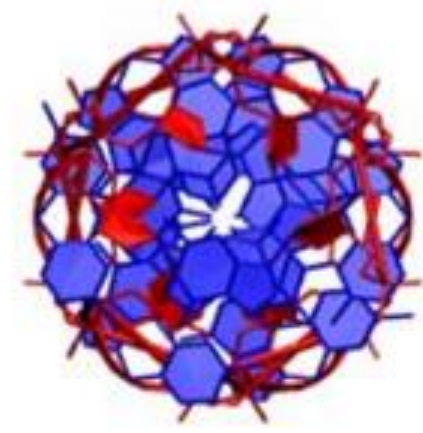
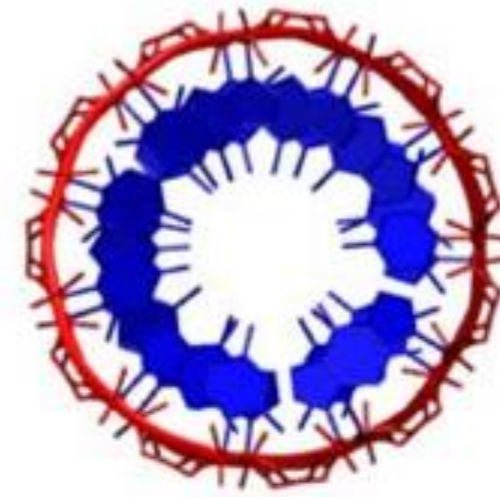
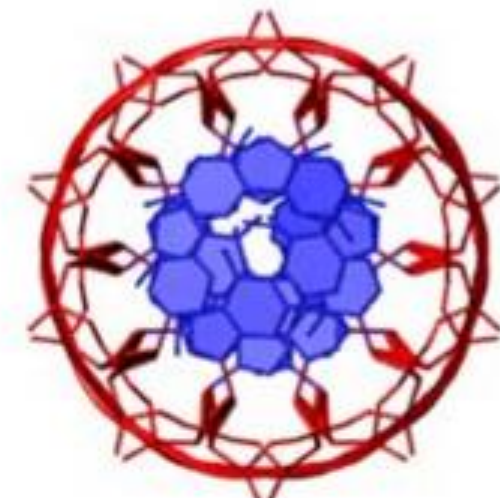
minor groove

major groove

B-DNA

A-DNA

Z-DNA



Un ADN-B de doble hélice tiene un tamaño de 91500 pb.

¿Cuántas vueltas aproximadamente tiene la doble hélice?

¿Cuál es su masa molecular?

¿cuántos átomos de fósforo contiene?

Si la relación de $A+G / T+C$ en una hélice de ADN es 0,7 ¿cuánto valdrá en la molécula completa ?







	A-DNA	Z-DNA
Es una doble hélice	Sí	Sí
Es más corta que la forma B	Sí, avance por cada par de bases es menor: 0.23 nm en el A-DNA frente a 0.34 nm en el B-DNA	No, avance de 0.38 nm por cada par de bases.
Las dos hebras no son antiparalelas	No; son antiparalelas siempre en todas las formas	No
La inclinación de las bases es diferente a la forma B	Sí, mayor, 12° frente a 1.2°	Sí, mayor, 9°
Algunas bases están desapareadas	No	No
Aparece U en lugar de T	No, U es propio del RNA	No

REPLICACIÓN

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 γ	RFC	Subunidades de la holoenzima de la DNA polimerasa que montan la pinza sobre el DNA
Núcleo de la polimerasa III	Polimerasa δ/ϵ	Enzima de replicación primaria; sintetiza por completo la cadena adelantada y los fragmentos de Okazaki; tiene capacidad de lectura y corrección
Pinza β	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 δ o ϵ en eucariotas
Primasa	Primasa	Sintetiza iniciadores de RNA
_____	Polimerasa α	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

- La DNA POL α (alpha)  (Retrasada). EL cebador: 10 bases de ARN y 20 de ADN.
- Las DNA POL ϵ - δ (Epsilon, Delta)  (Conductora - Retrasada).
- La DNA POL β (Betha)  Procesos de reparación.
- La DNA POL γ (Gama)  Mitocondrias.

- El DNA eucariota contiene múltiples replicones.

- La replicación es bidireccional.

