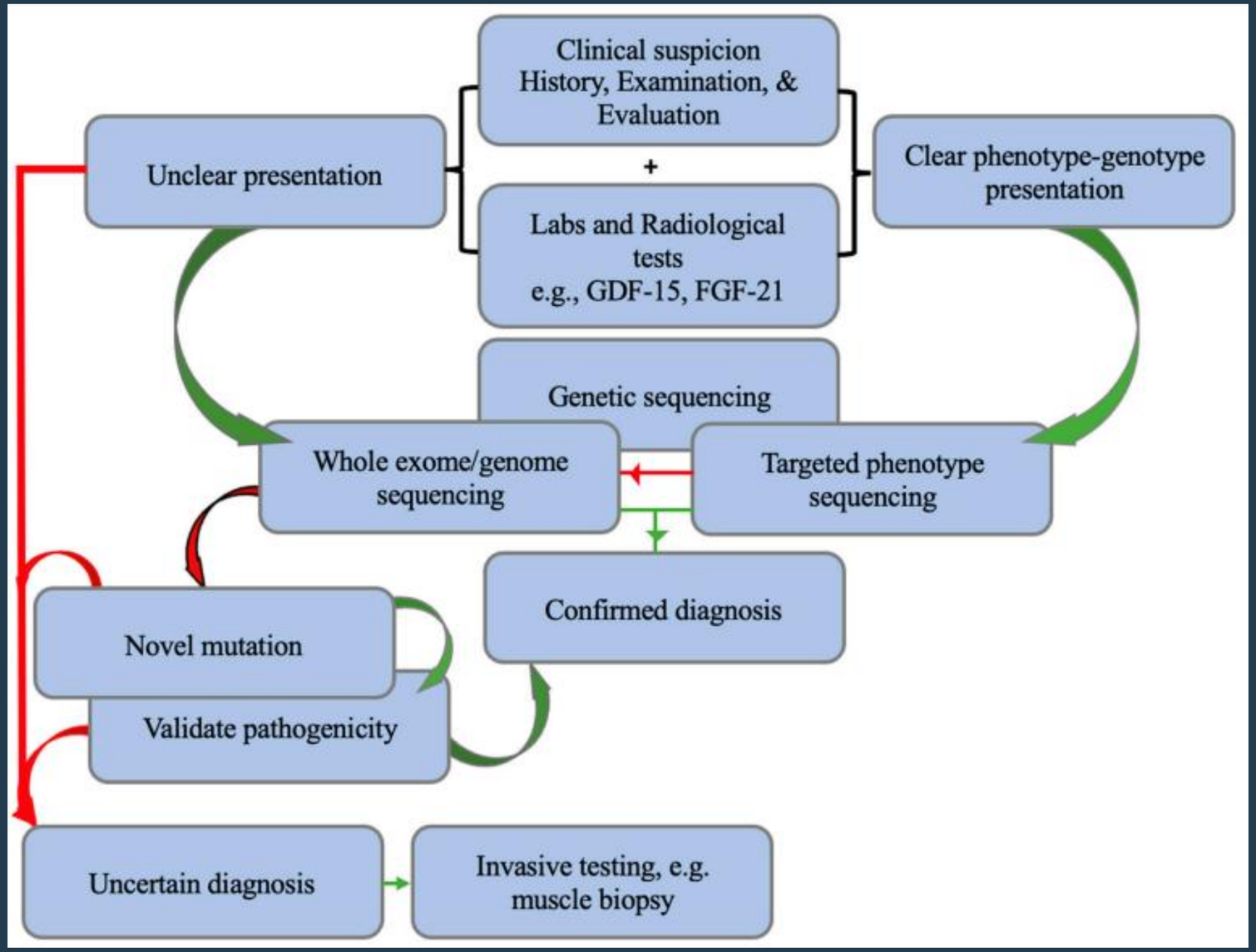
Maternal transmission of mitochondrial diseases
(Chiaratti et añ., 2020)

Mitochondrial Chronic Progressive External Ophthalmoplegia
(Ali et al., 2024)

“*Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) is a rare disorder that can be at the fore front of several mitochondrial diseases. This review overviews mitocondrial CPEO encephalomyopathies to enhance accurate recognition and diagnosis for proper management. Methods: This study is conducted based on publications and guidelines obtained by selective review in PubMed*.”

Mitochondrial DNA Deletion/Depletion Disorders Causing CPEO

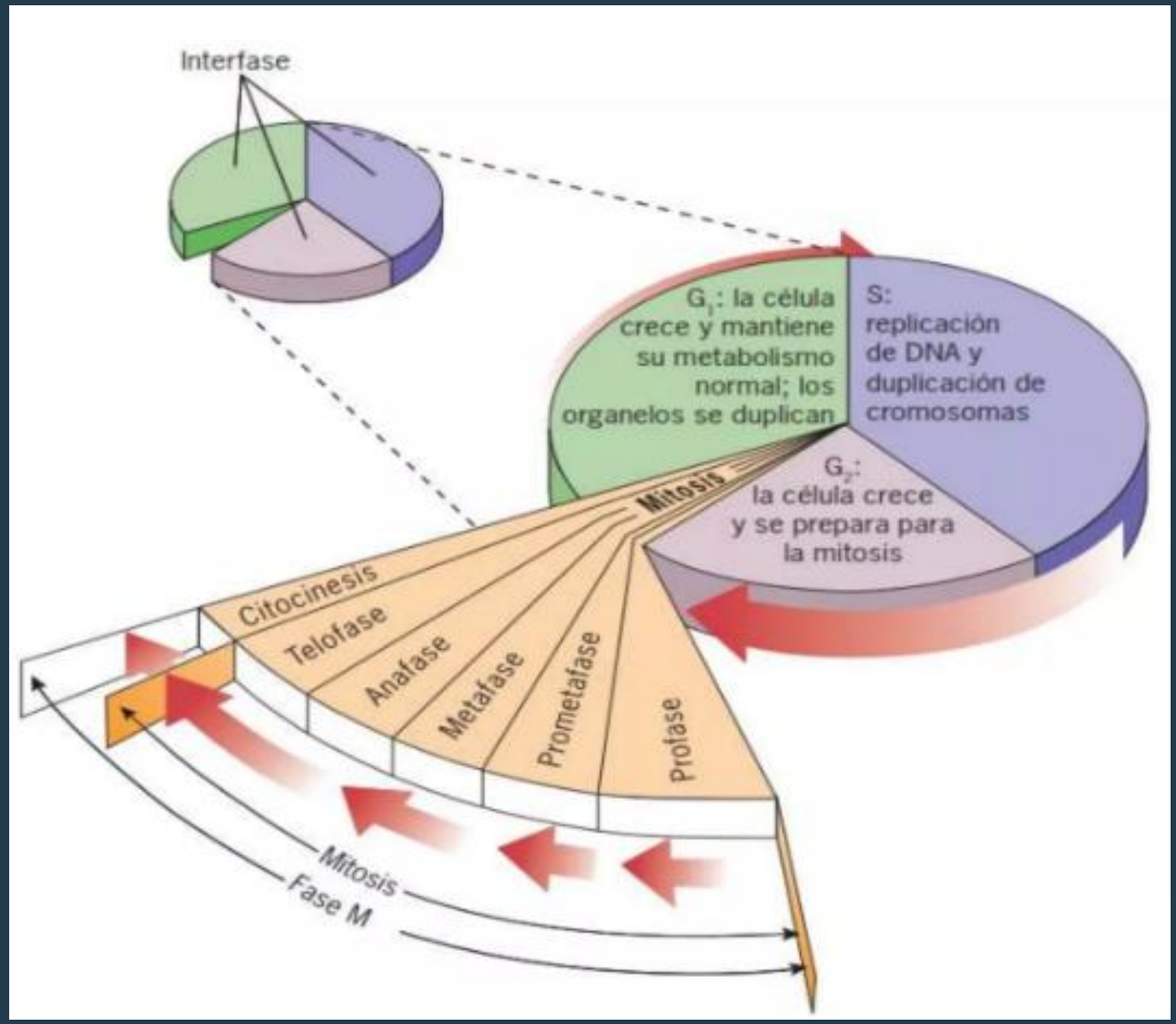
Pearson syndrome (PS), also known as Pearson marrow–pancreas syndrome, is a rare fatal multisystemic mitochondrial disease due to deletions in mtDNA, and it typically affects infants... The diagnosis of Pearson syndrome is challenging due to the atypical presentation in infancy. It can be confirmed via ***mtDNA sequencing and observing multiple deletions of varying lengths.***



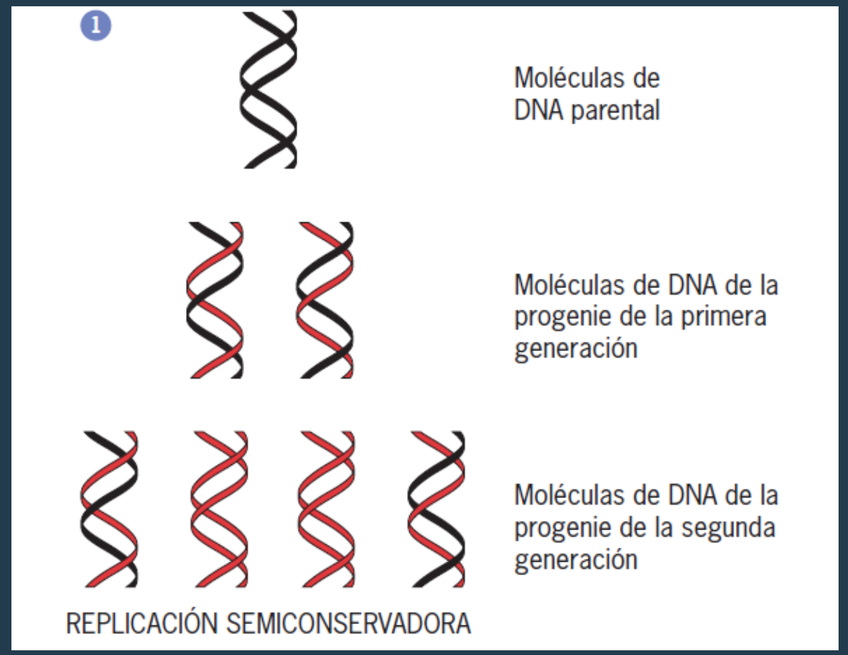
A summary of the proposed diagnostic pathway by Watson et al., where invasive testing is preceded by genetic sequencing, the gold standard of diagnosis. The green line indicates a yes, while the red line indicates no.

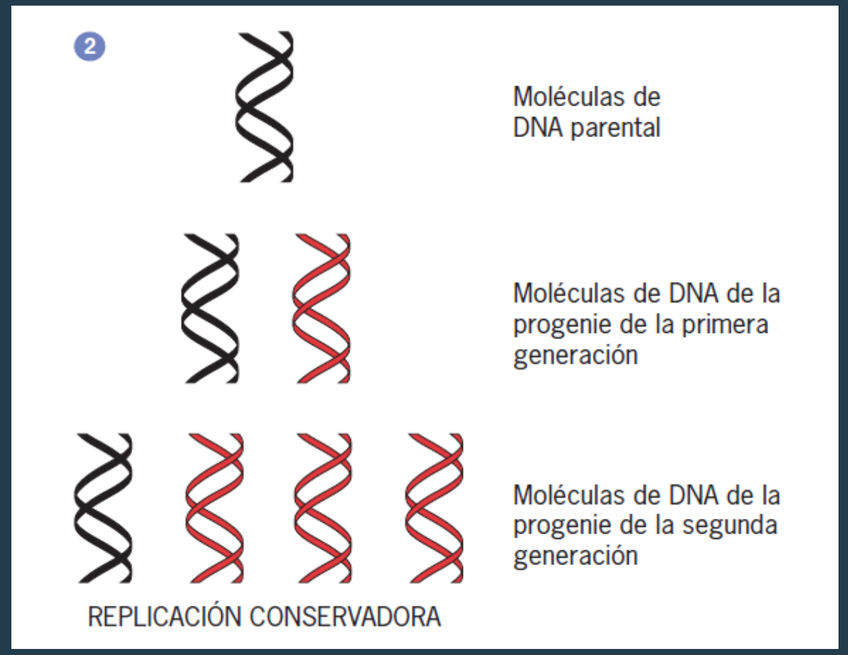
Replicación del ADN

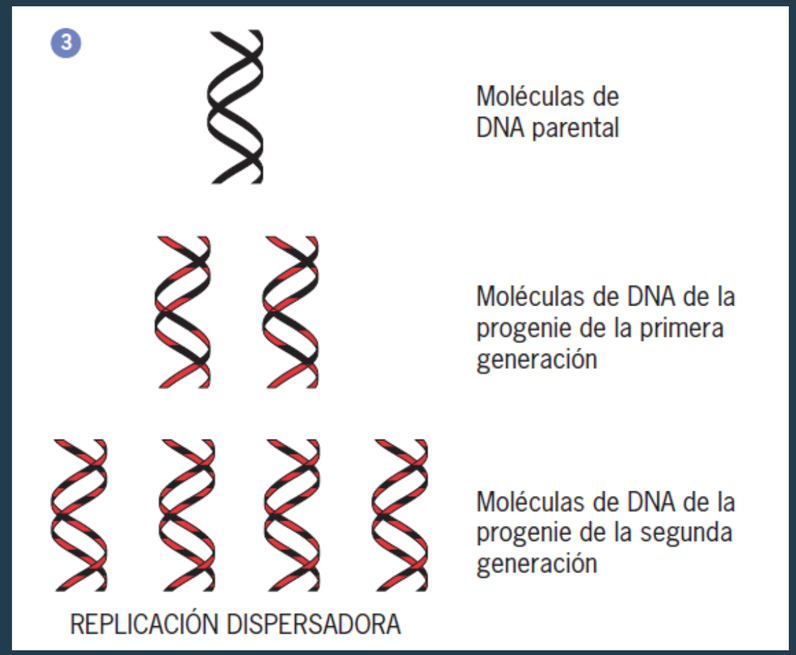
Replicación del ADN



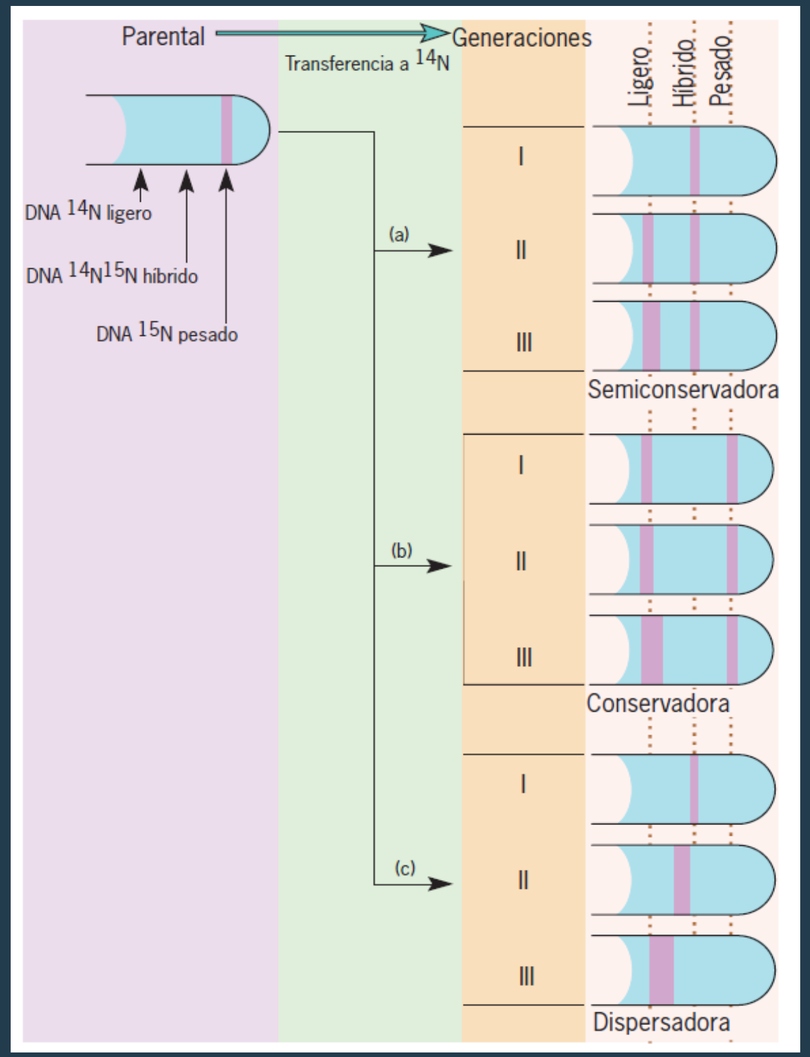
Tres esquemas alternativos de la replicación…

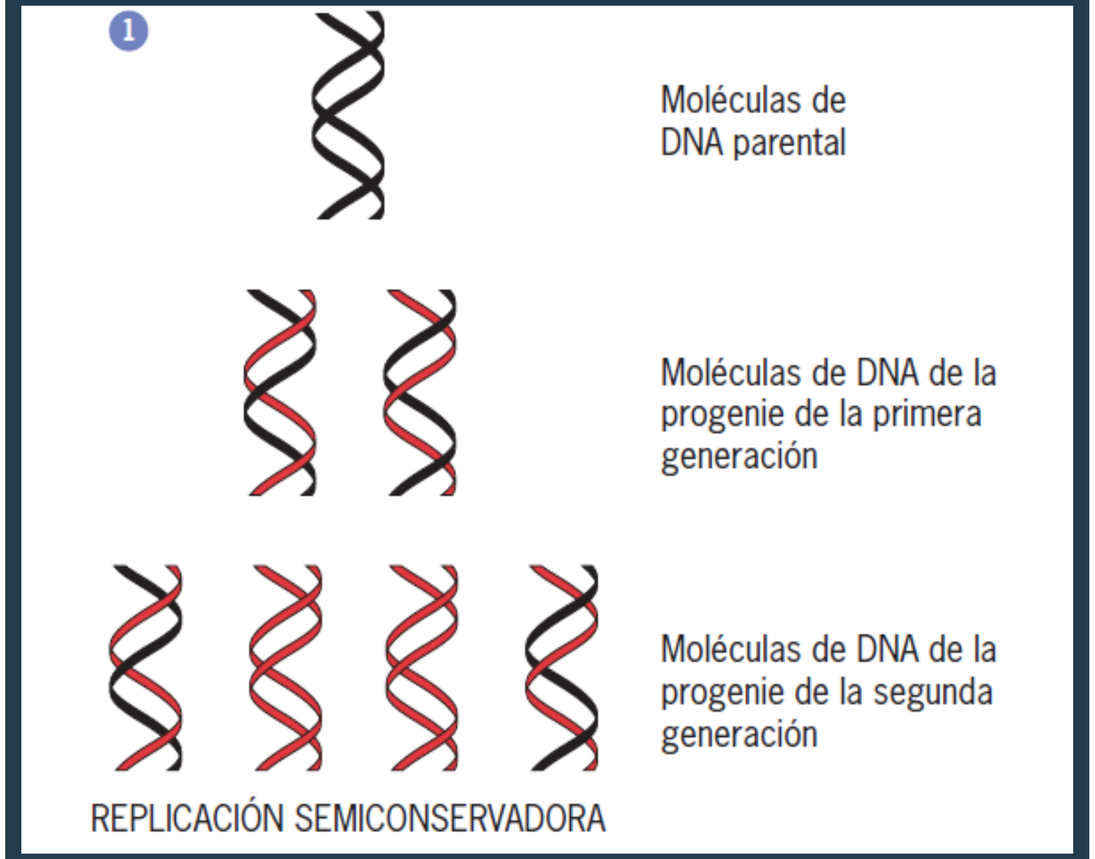


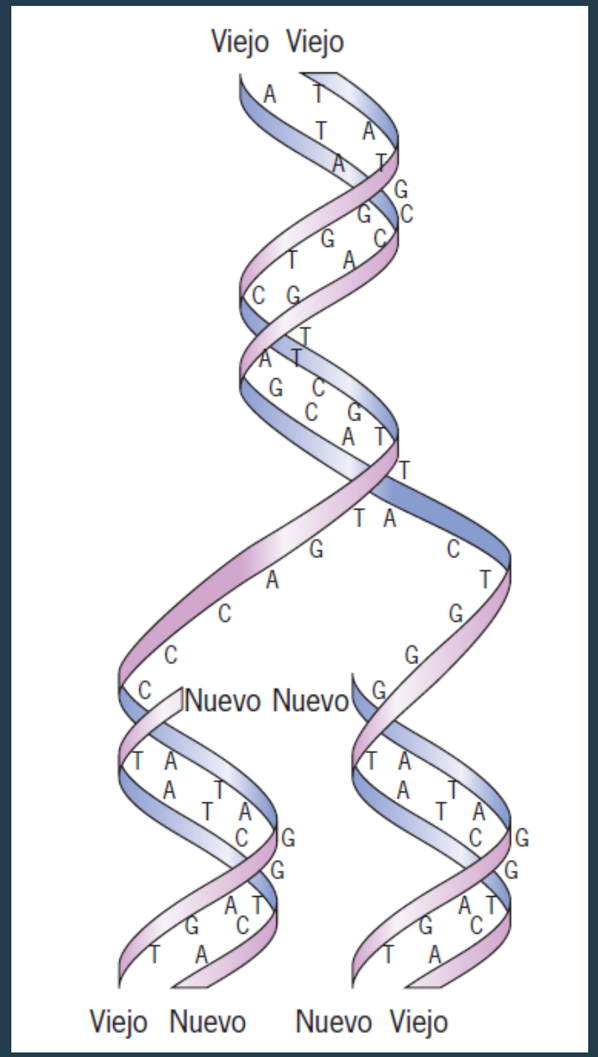




Replicación semiconservadora







Meselson-Stahl

"Por cada molécula de DNA que se replica surgen 2 moléculas idénticas entre si e idénticas a la molécula que las origino."

- **Proceso altamente eficiente sin embargo cuando falla, una o ambas moléculas hijas resultan diferentes a la molécula original:** → **Mutación**
- **Los fallos en la replicación son eventos muy raros, por lo que el proceso es muy eficiente:**

LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS VA PASANDO A LAS CÉLULAS HIJAS FIELMENTE DURANTE MUCHAS GENERACIONES.

Mutaciones → **Variantes genéticas**

Eliminadas

Indiferentes

Caracteres que darán ventaja biológica frente a otros individuos*

Mutación

- Cambio en la secuencia de ADN.
- **Frecuencia baja** en la población.
- Tradicionalmente: < 1%.
- Suele asociarse a enfermedad (aunque no siempre).

Ejemplo: mutaciones patogénicas en **TP53** en cáncer.

Polimorfismo

- Variante genética común.
- **Frecuencia ≥ 1%** en la población.
- Generalmente no causa enfermedad por sí sola.
- Puede influir en susceptibilidad, metabolismo de fármacos, rasgos normales.

Ejemplo: SNPs en genes del citocromo P450 que afectan farmacocinética.

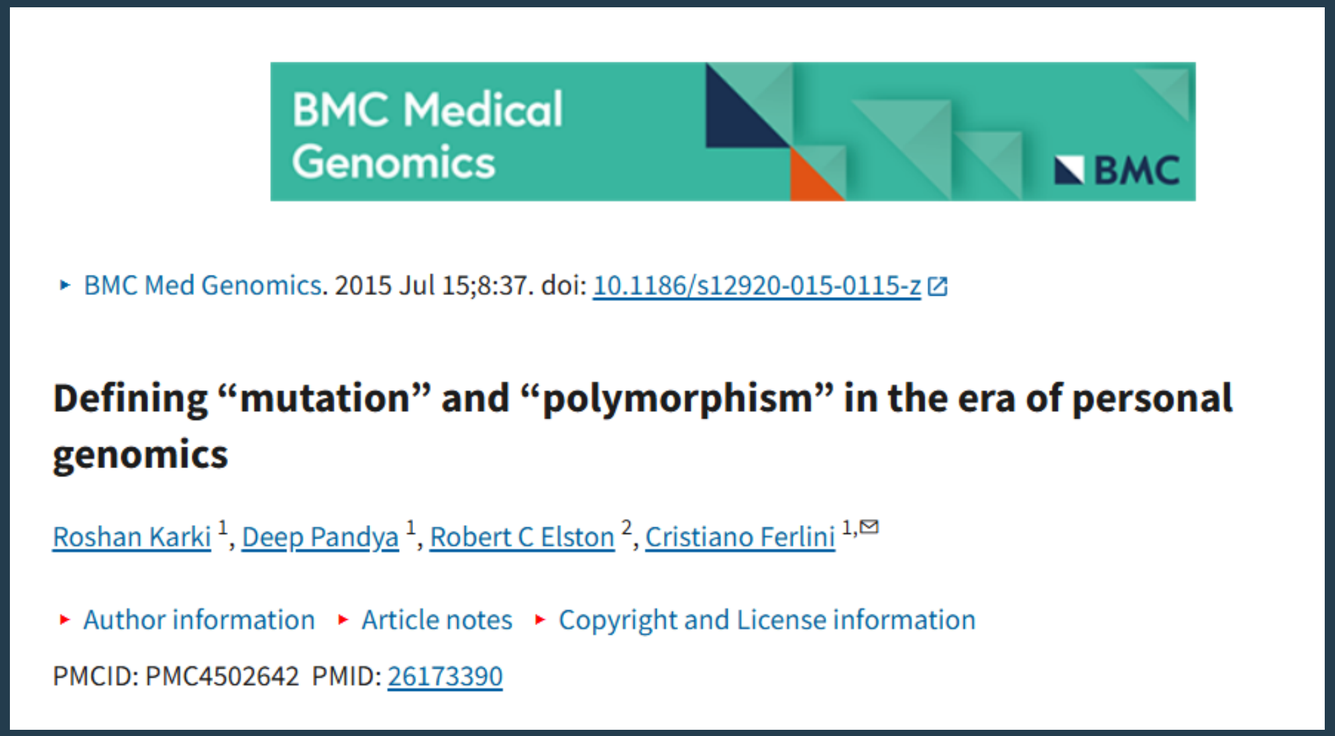
American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recomendó abandonar los términos “mutación” y “polimorfismo” y reemplazarlos por “variante” (*variant*), clasificadas como:

1. Patogénica
2. Probablemente patogénica
3. De significado incierto (VUS - *Variant of Uncertain Significance*)
4. Probablemente benigna
5. Benigna

Esta clasificación evita asumir erróneamente que “mutación” implica enfermedad o que “polimorfismo” implica inocuidad.

- Un “polimorfismo” puede ser patogénico en ciertos contextos.
- Una “mutación” puede ser neutra.

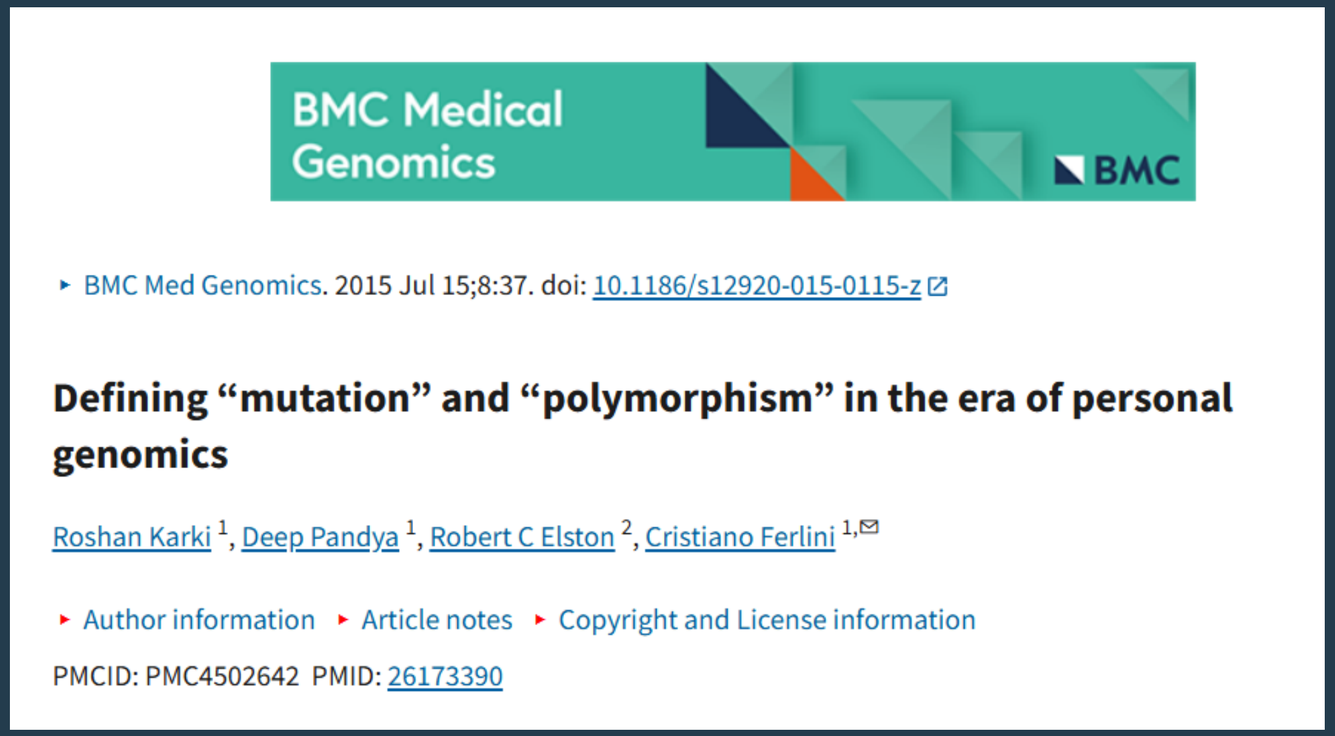
https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4502642/



Molecularmente son el mismo tipo de evento (cambio en ADN).

X Frecuencia en la población.

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4502642/



- La frecuencia depende de la población estudiada.
- Una variante >1 % puede causar enfermedad en homocigosis (ej. anemia falciforme).
- Una variante <1 % puede ser completamente benigna.
- Las bases de datos actuales muestran que muchas “mutaciones raras” superan el 1 % en ciertas etnias.

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4502642/

a) La mayor parte del genoma consiste en DNA localizado entre los genes y representa el DNA intergénico.
b) Alrededor de 25 000 genes que codifican proteínas - secuencias no codificantes (DNA intrónico). Tomados en conjunto, estos hechos indican que la porción del genoma que codifica a proteínas representa un pequeño porcentaje del DNA total (que se estima en alrededor de 1,5%).
c) La mayor parte del DNA intergénico e intrónico del genoma no contribuye a las capacidades de supervivencia y reproductivas de un individuo, de modo que no hay una presión selectiva que mantenga su secuencia inalterada.

En cambio, aquellos segmentos del genoma que codifican secuencias proteínicas o contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión génica están sometidos a la selección natural.

"La selección natural, en la que los rasgos heredables que le ayudan a un organismo a sobrevivir y reproducirse, se vuelven más comunes en una población a lo largo del tiempo".

Esta tiende a eliminar a los individuos cuyo genoma contiene mutaciones en estos elementos funcionales.

Proteínas de replicación *E. coli*

PROTEÍNA	FUNCIÓN
DnaB (Helicasa)	Desenrrolla la doble hélice.
DnaA	Reconocimiento del origen de replicación.
DnaC	Coloca la DnaB sobre el ADN.
Girasa (Topoisomerasa)	Relaja el superenrrollamiento ocasionado por el desenrrollamiento.
Primasa	Sintetiza el RNA cebador.
SSB	Estabiliza las hebras sencillas.
DNA Pol III	Sintetiza el DNA.
DNA pol I	Elimina el cebador y rellena huecos.
DNA ligasa	Une los extremos del DNA.

Replicón:

Una molécula de DNA que contiene un origen de replicación. (Unidad de replicación).

Cromosoma de virus → 1 origen de replicación

Cromosoma bacteriano → 1 origen de replicación

Cromosomas eucariotas → Múltiples orígenes de replicación

Múltiples replicones

ORIGEN DE REPLICACIÓN:

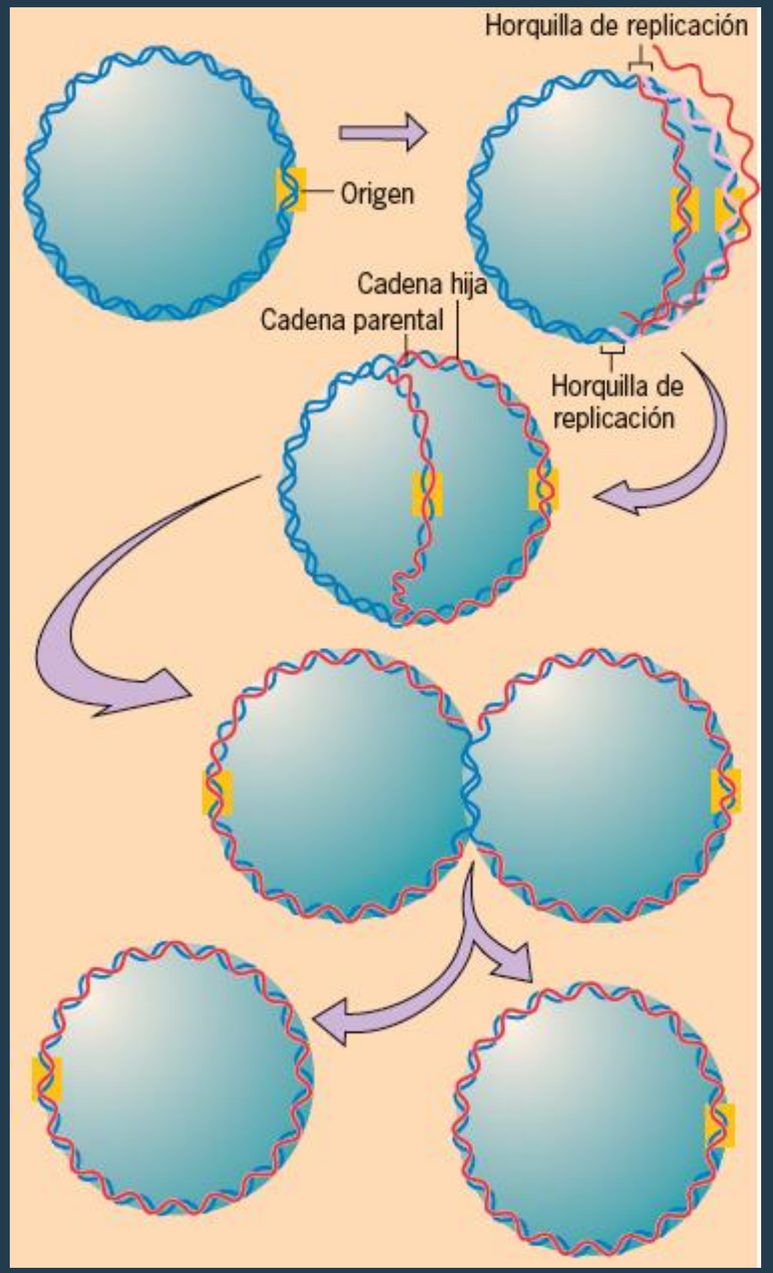
- **Punto donde la doble hélice vieja se separa en sus dos hebras para iniciar la replicación.**

E. coli y plásmidos: El cromosoma circular comienza a abrirse por el origen de replicación hasta generar 2 cromosomas completos.

- **Antibióticos ⟶ Girasas**

Novobiocina: Impide la unión del ATP a las girasas.

Ác. nalidixico y ciprofloxacina: Interrumpe la ruptura y el empalme de las hebras de DNA.



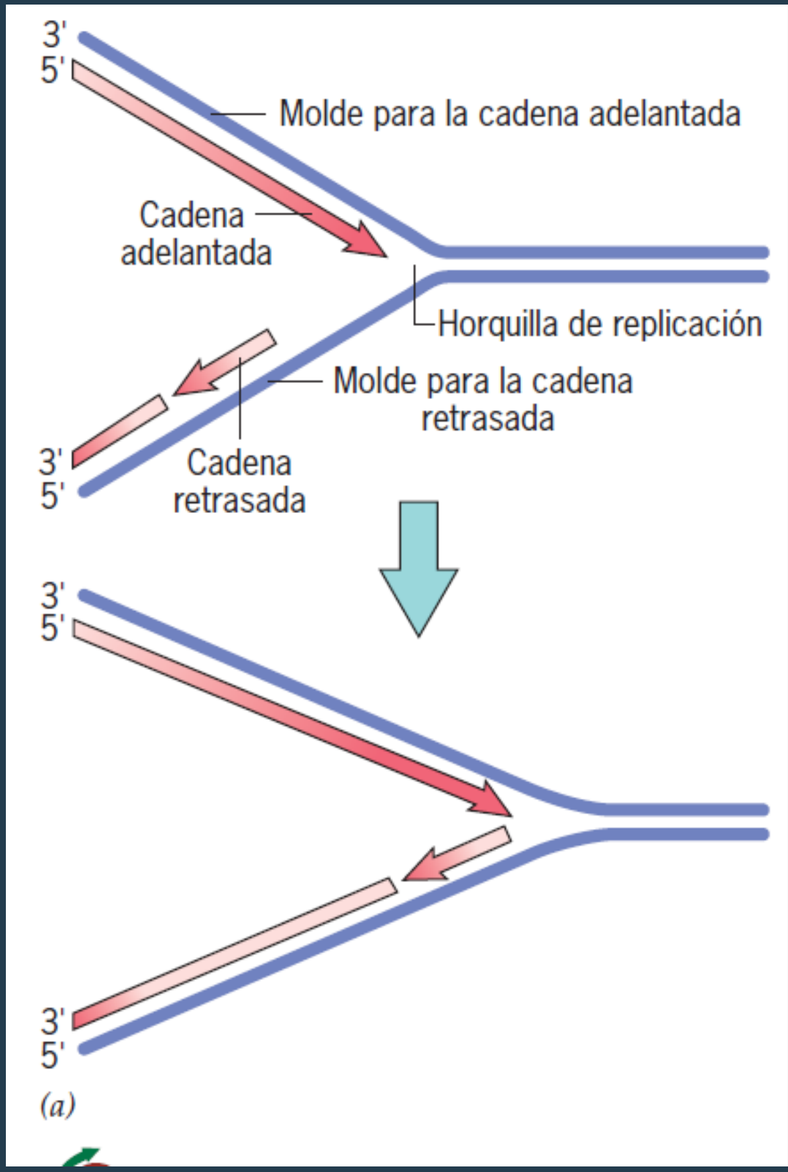
“ Una hebra se sintetiza en fragmentos y la otra en forma continua ”

- **Las 2 hebras sirven como molde.**
- **Las hebras son antiparalelas**
- **Todas las DNA POLIMERASAS sintetizan en dirección**

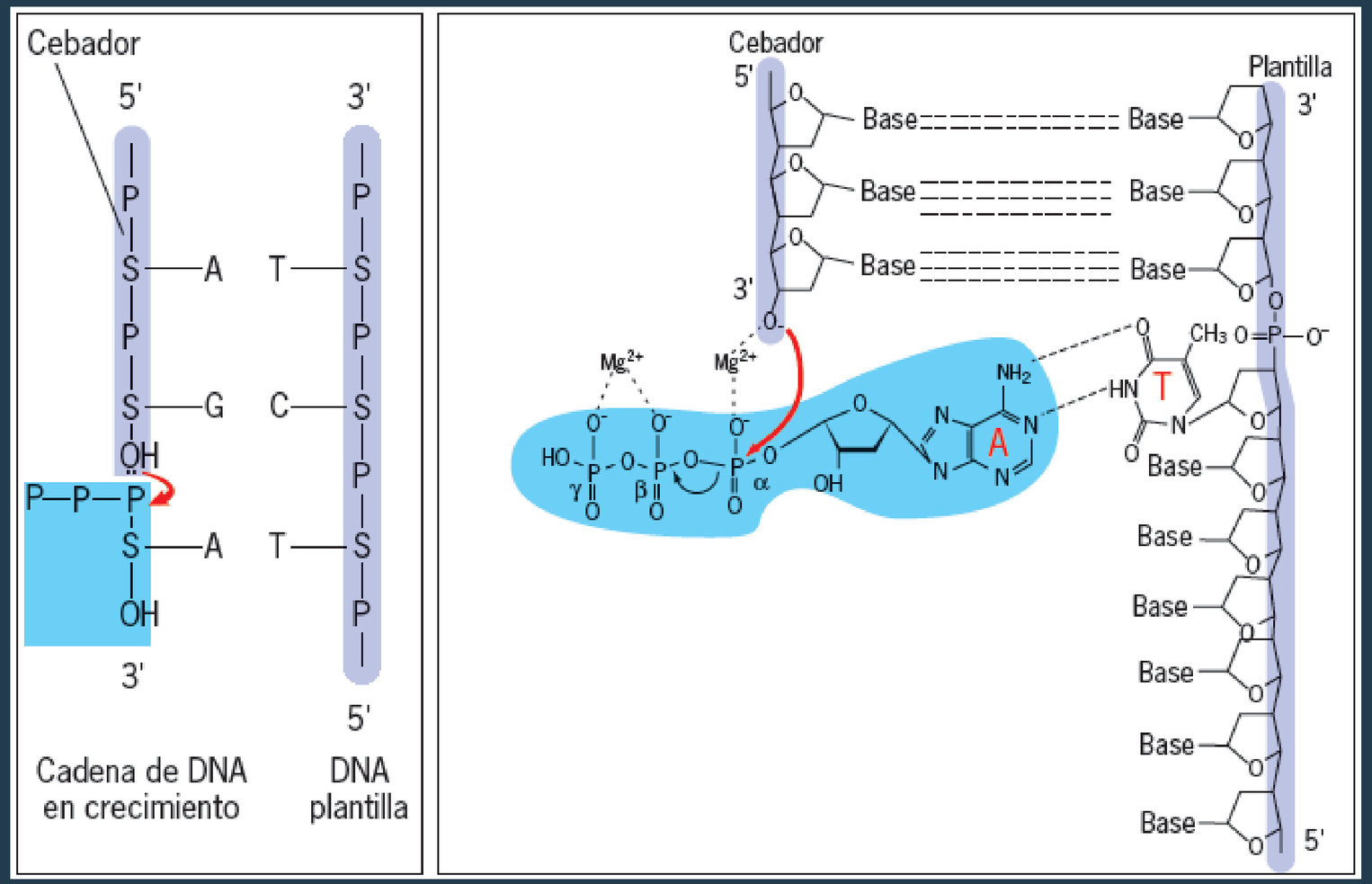
  5’ ⟶ 3’.

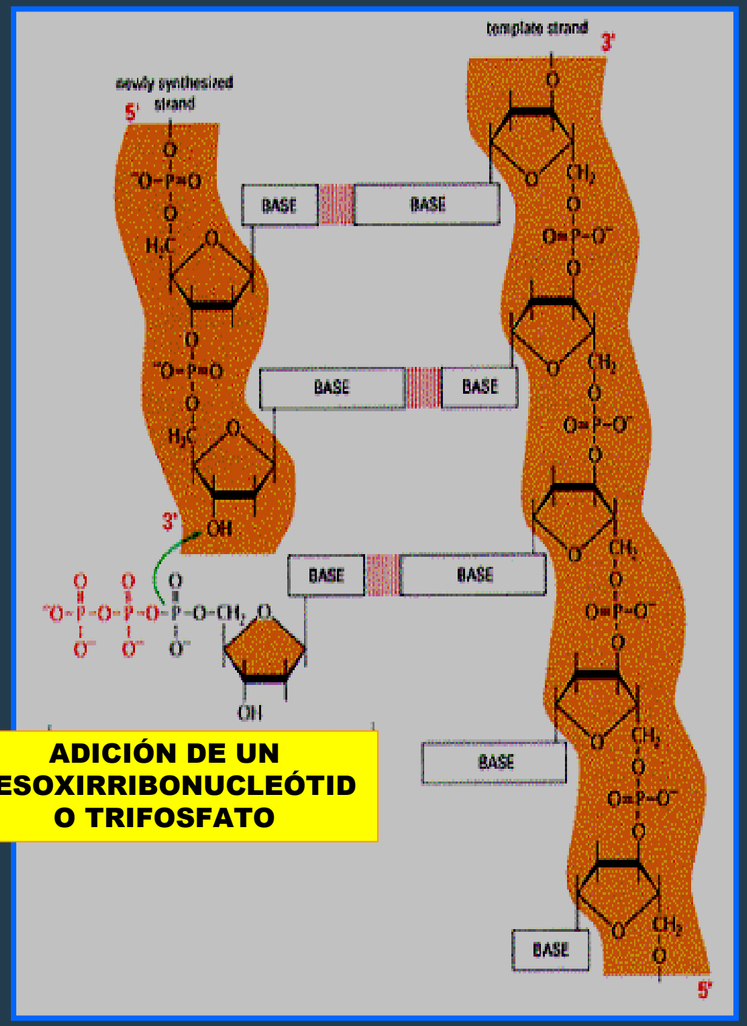
- **3’ ⟶ 5’ (hebra guía o conductora).**

5’ ⟶ 3’ La hebra nueva crece sobre la otra hebra en dirección 5’ ⟶ 3’en fragmentos de 1000 - 2000 nucleótidos llamados de OKASAKI (hebra retrasada).



- **Los fragmentos de OKASAKI se unen por medio de la DNA ligasa.**
- **DNA LIGASA ⟶ Cataliza la formación de un enlace fosfodiéster de una cadena de DNA con el 5'- fosfato de la otra.**





ADICIÓN DE UN DESOXIRRIBONUCLEÓTIDO TRIFOSFATO

Se unen a la enzima mediante residuos de ácido aspártico – sitio activo

REPLICACIÓN

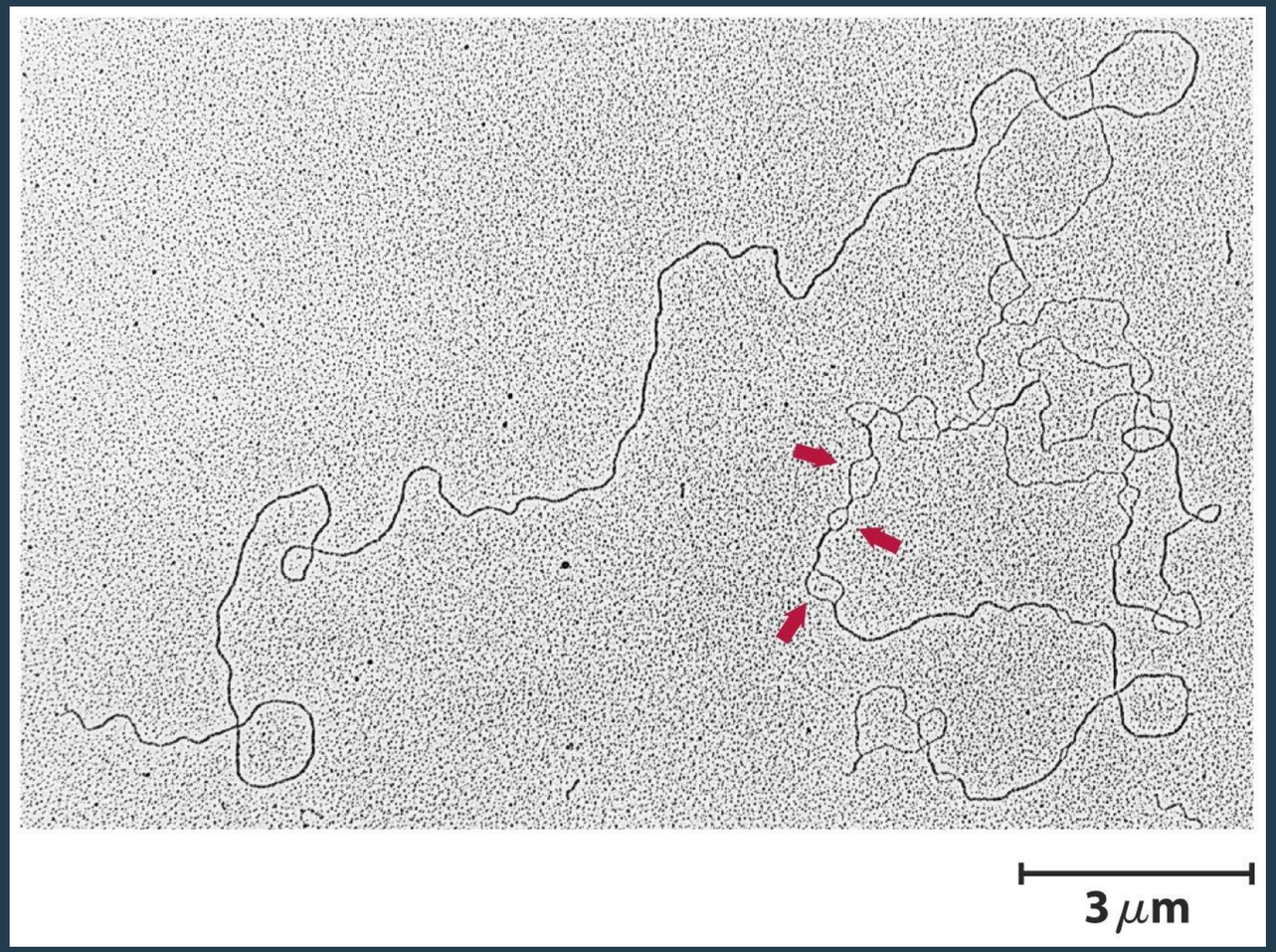
Polimerasas en eucariotas α, β,γ, δ y ϵ. 50 a 250 sitios, conocidos como **lugares de replicación.**

CUADRO 13-1 Algunas proteínas requeridas para la replicación

Proteína en *E. coli*	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 *E. coli* 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 *E. coli* 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). Exonucleasa 3 - 5**
- **La DNA POL β (Betha)** → **Procesos de reparación.**
- **La DNA POL γ (Gama)** → **Mitocondrias. Exonucleasa 3 - 5**

- **El DNA eucariota contiene múltiples replicones.**
- **La replicación es bidireccional.**



- **La REPLICASA: 1000 nucleótidos / seg.**
- **La DNA POL I: 10 Nucleótidos / seg.**

Condición	Errores aproximados	Significado
Sin proofreading	1 error cada **100.000** nucleótidos	Solo selección del nucleótido en el sitio activo
Con proofreading (3’→5’)	1 error cada **10.000.000** nucleótidos	La polimerasa corrige el nucleótido mal incorporado
Con MMR (Mismatch Repair)	1 error cada **1.000.000.000 – 10.000.000.000** nucleótidos	Corrección adicional después de la replicación

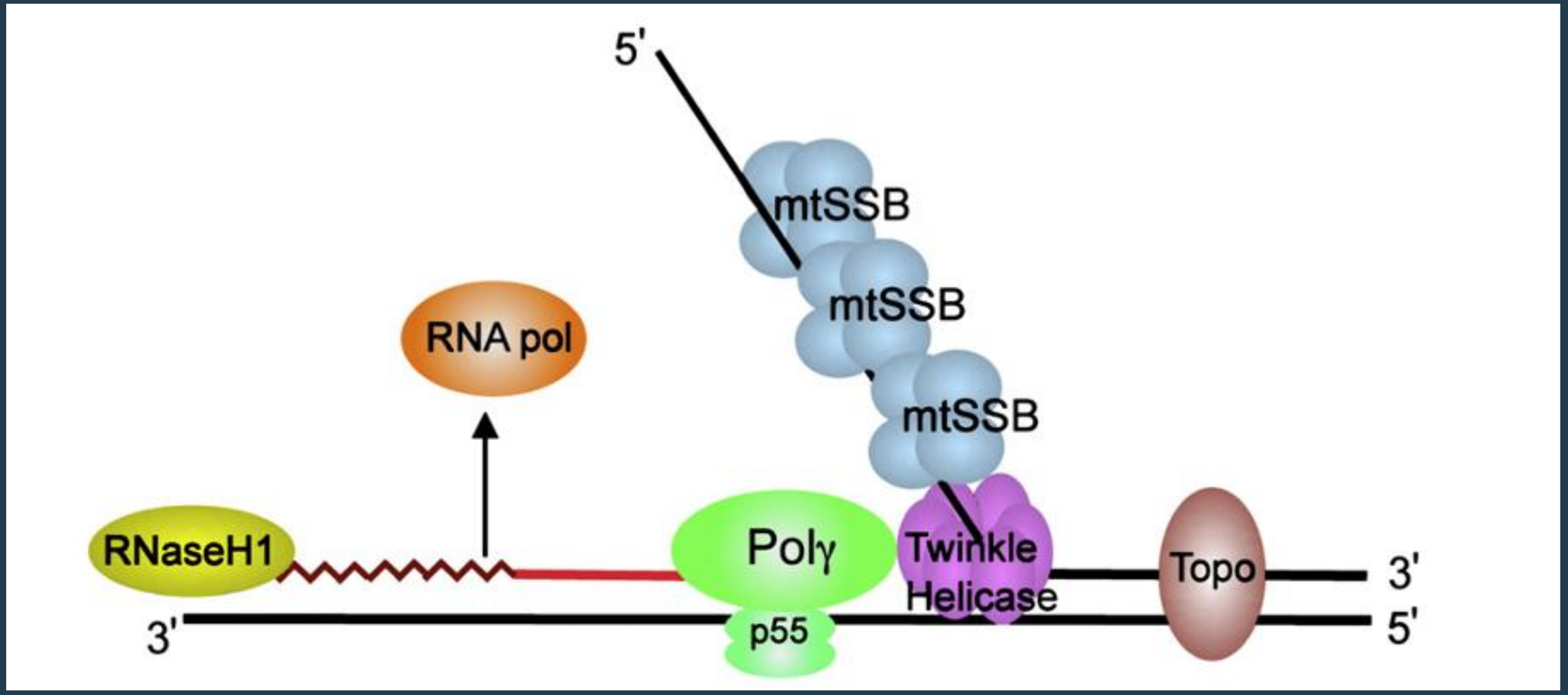
Replicación de las mitocondrias

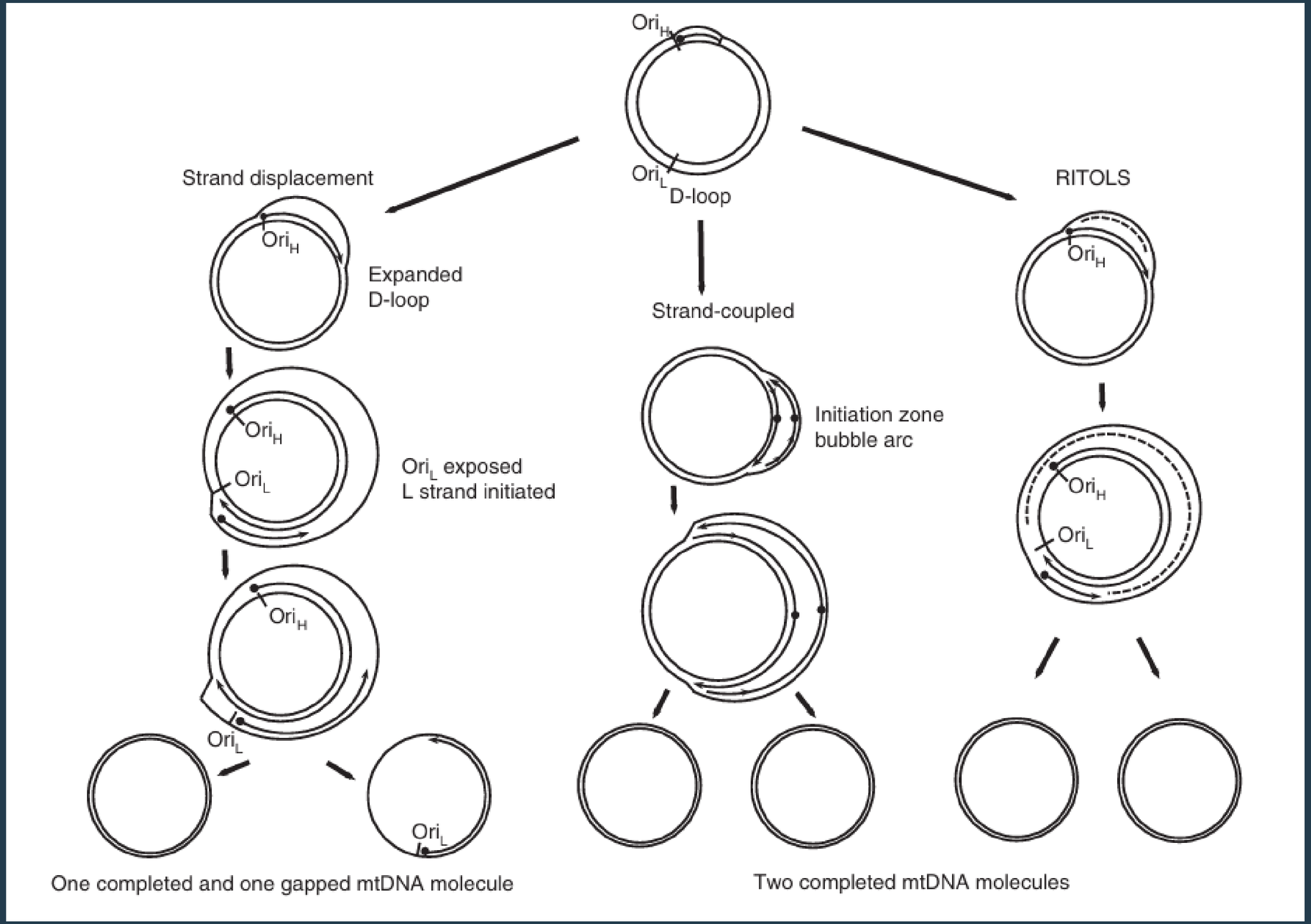
16.569 bp – ARN polimerasa (primasa)

Human mitochondrial DNA replication proteins.

Enzyme	Size	Human chromosome
DNA polymerase γ		
POLG	140 kDa	15q25
POLG2	55 kDa	17q23-24
Single-stranded DNA binding protein (mtSSB)	15 kDa	7q34
Helicase		
C10orf2 (Twinkle)	77 kDa	10q24
Topoisomerases		
Topo Imt	67 kDa	8q24.3
Topo IIIα	112 kDa	17p12-11.2
RNase H1	32 kDa	19p13.2

Causan enfermedades mitocondriales (miopatías, neuropatías, CPEO).


5'
mtSSB
mtSSB
mtSSB
RNA pol
RNaseH1
Polγ
Twinkle
Helicase
Topo
3'
5'
3'
p55

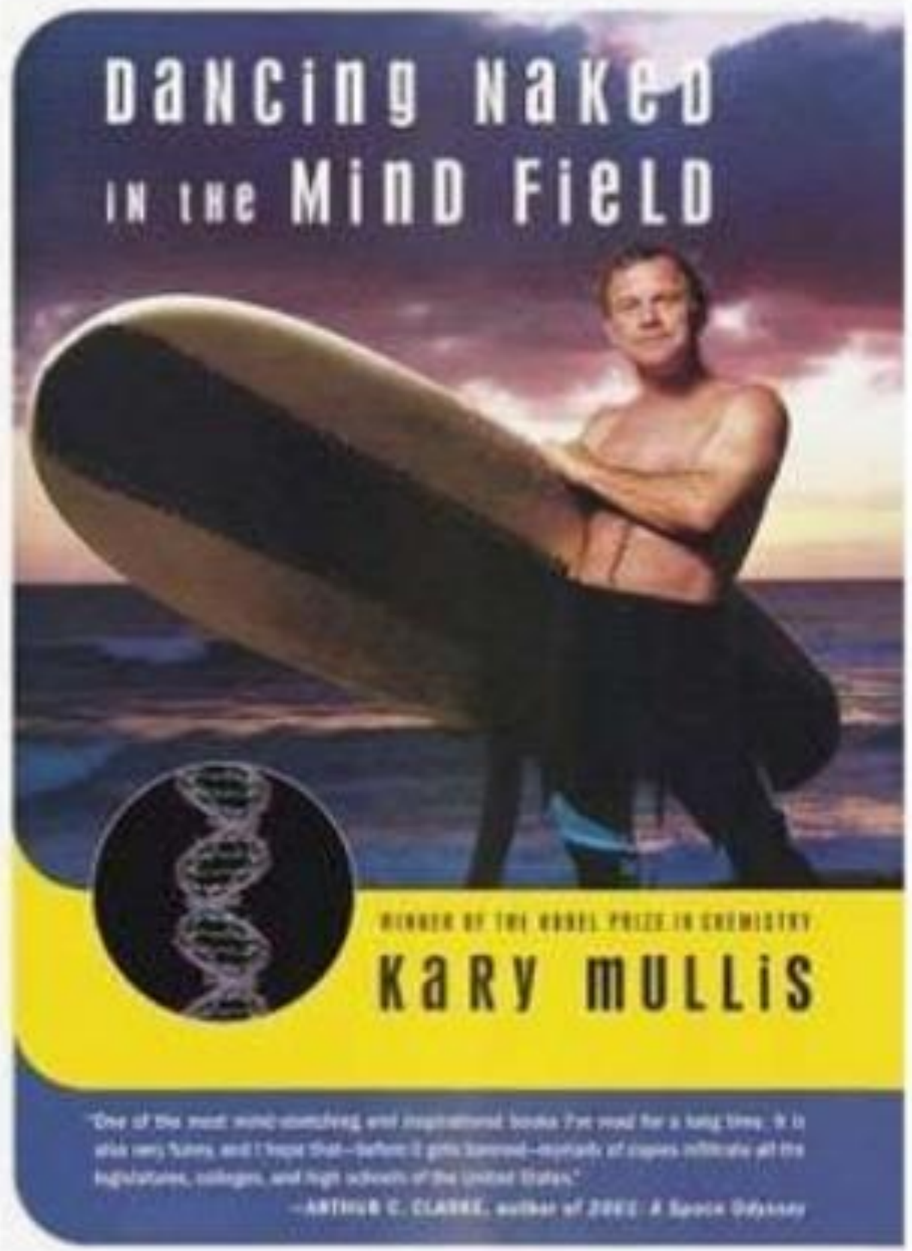


Modelo asimétrico

Modelo de hebra acoplada

ARN incorporado a lo largo de la cadena rezagada

Kary Mullis inventa la Reacción de la Cadena de la Polimerasa *in vitro*



PCR: (Kary Mullis, 1983): Especifico y Aleatorio

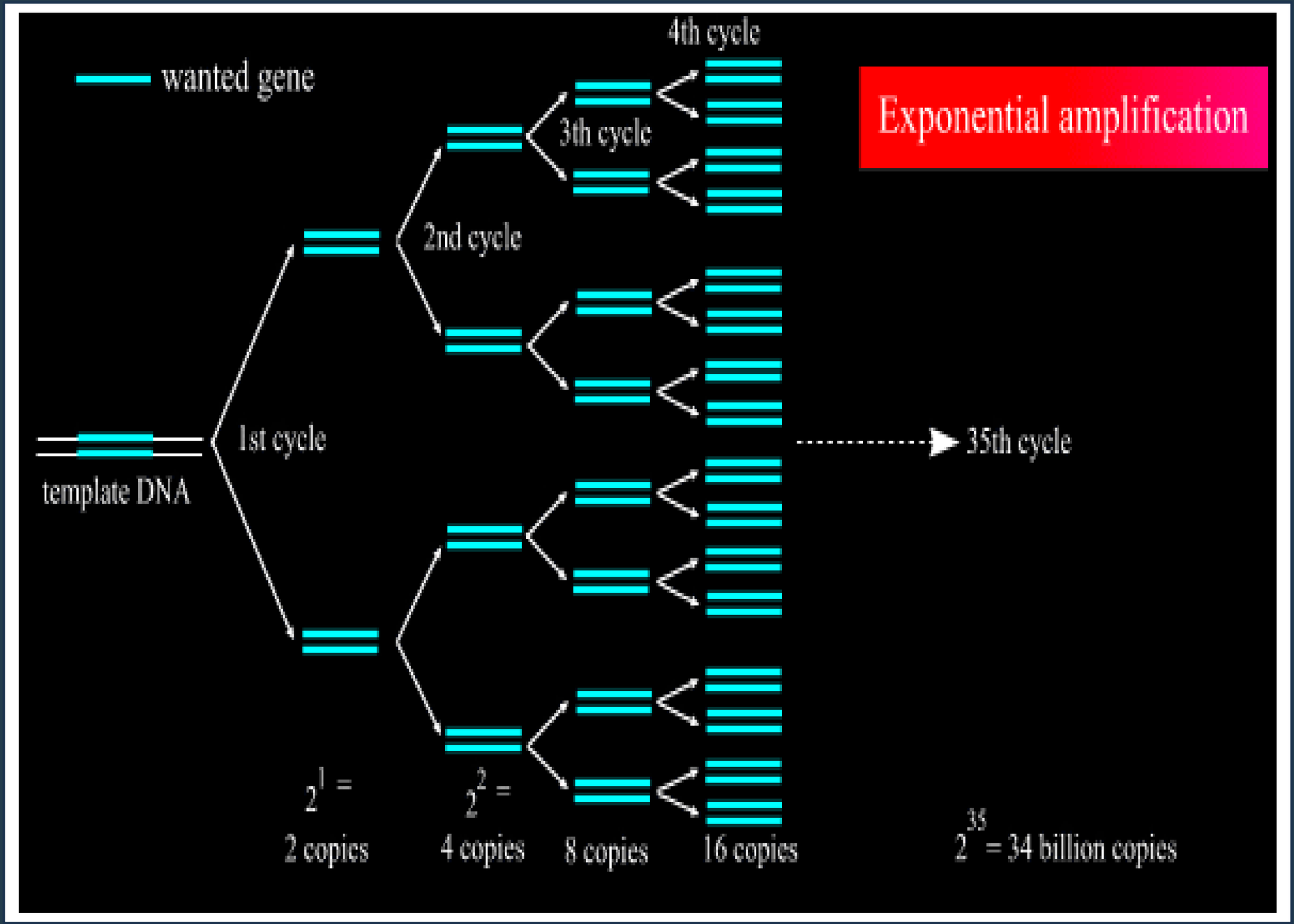
- El PCR es un método enzimático, *in vitro,* para amplificar exponencialmente un fragmento de ADN específico preseleccionado.

- Componentes:

- ADN molde
- Taq DNA POLIMERASA (*Thermus aquaticus)*
- *dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ; Buffer*
- *Primer o cebador 1*
- *Primer o cebador 2*
- *Mg^{++}*

- Los iniciadores o primer's ⟹ complementarios a los extremos de ambas hebras de ADN blanco definiendo (el segmento a ser copiado).

- Primer's ➡ Principales componentes responsables de la especificidad de la reacción.


wanted gene
4th cycle
3th cycle
2nd cycle
1st cycle
template DNA
Exponential amplification
35th cycle
2^1 =
2 copies
2^2 =
4 copies
8 copies
16 copies
2^{35} = 34 billion copies