

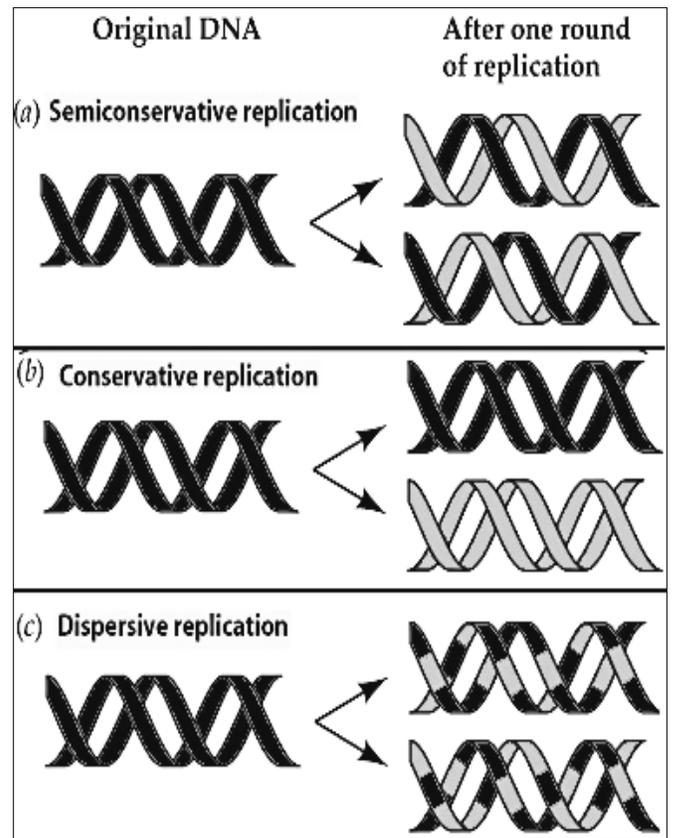


“Replicación del ADN”

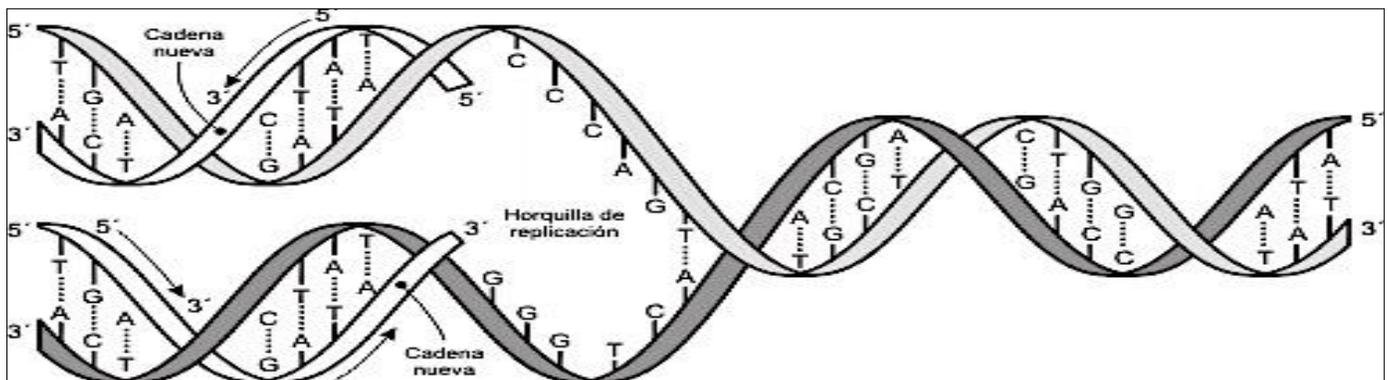
Para el mecanismo de replicación existen 3 hipótesis:

1. **Conservativa:** cuando el ADN doble hélice se replica se producen dos dobles hélices, una tiene las dos hebras viejas (se conserva) y la otra doble hélice posee ambas hebras nuevas.
2. **Semiconservativa:** las dos dobles hélices recién sintetizadas poseen una hebra vieja (una mitad vieja) y otra hebra nueva (mitad nueva).
3. **Dispersiva:** el ADN doble hélice se rompe y origina dos dobles hélices, cada una de ellas con hebras que poseen precursores viejos y nuevos en diferentes proporciones.

El proceso de replicación semiconservativa se basa en las confirmaciones de Watson y Crick, que el material genético tenía una capacidad para hacer copias exactas de sí mismo. Este proceso consiste en que la molécula de ADN abre sus cadenas separando las bases nitrogenadas a nivel de los puentes de hidrógeno, de esta forma las cadenas actúan como moldes dirigiendo la síntesis de una nueva cadena complementaria a lo largo de toda su extensión.



Si hay una timina (T) en la cadena antigua, debe encontrarse una adenina (A) en la cadena nueva, es decir, una base púrica con una pirimidica. De este modo, cada cadena forma una copia de su cadena complementaria original, produciendo dos replicas exactas de la molécula.

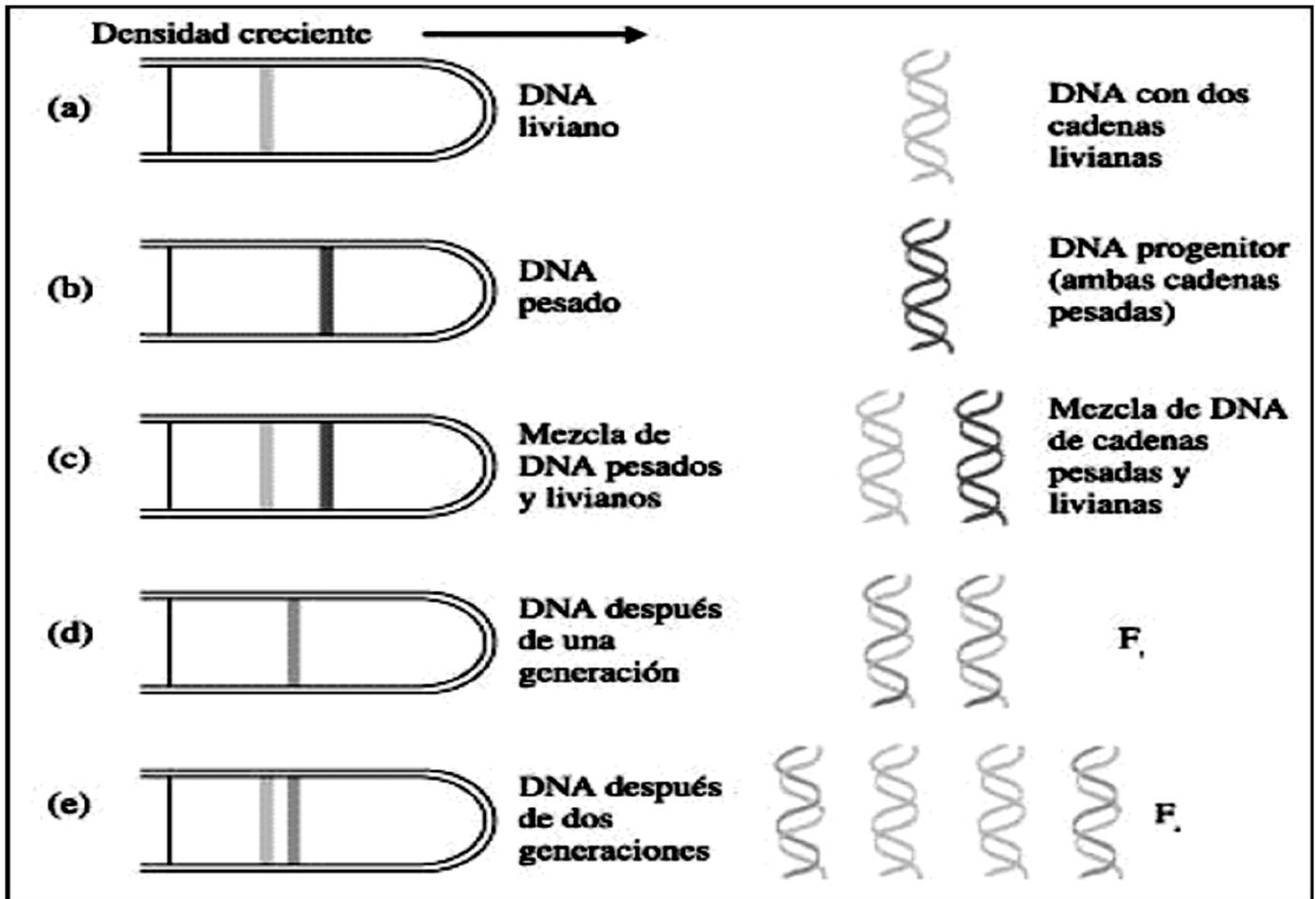




EXPERIMENTO DE MESELSON Y STAHL: HORQUILLA DE REPLICACIÓN

Meselson y Stahl quisieron comprobar el modelo de replicación semiconservativa, para ello utilizaron isótopos de nitrógeno. Cultivaron *E. coli* durante varias generaciones en un medio sólo con ^{15}N , de este modo el ADN de las bacterias contenía una gran proporción de nitrógeno pesado, luego tomaron una muestra y lo colocaron con nitrógeno liviano ^{14}N y luego de replicarse se centrifugó la muestra del ADN de éstas células.

Cada nueva muestra de ADN contenía más ADN liviano que el anterior, ya que el ADN recién formado tenía que incorporar el ^{14}N disponible. Además la densidad del ADN de la primera generación era exactamente intermedia entre la densidad del ADN progenitor pesado y la del ADN liviano común, como resultaría si cada molécula estuviera formada por una cadena vieja (pesada) y una cadena nueva (liviana), lo que confirma la hipótesis de la **replicación semiconservativa**.

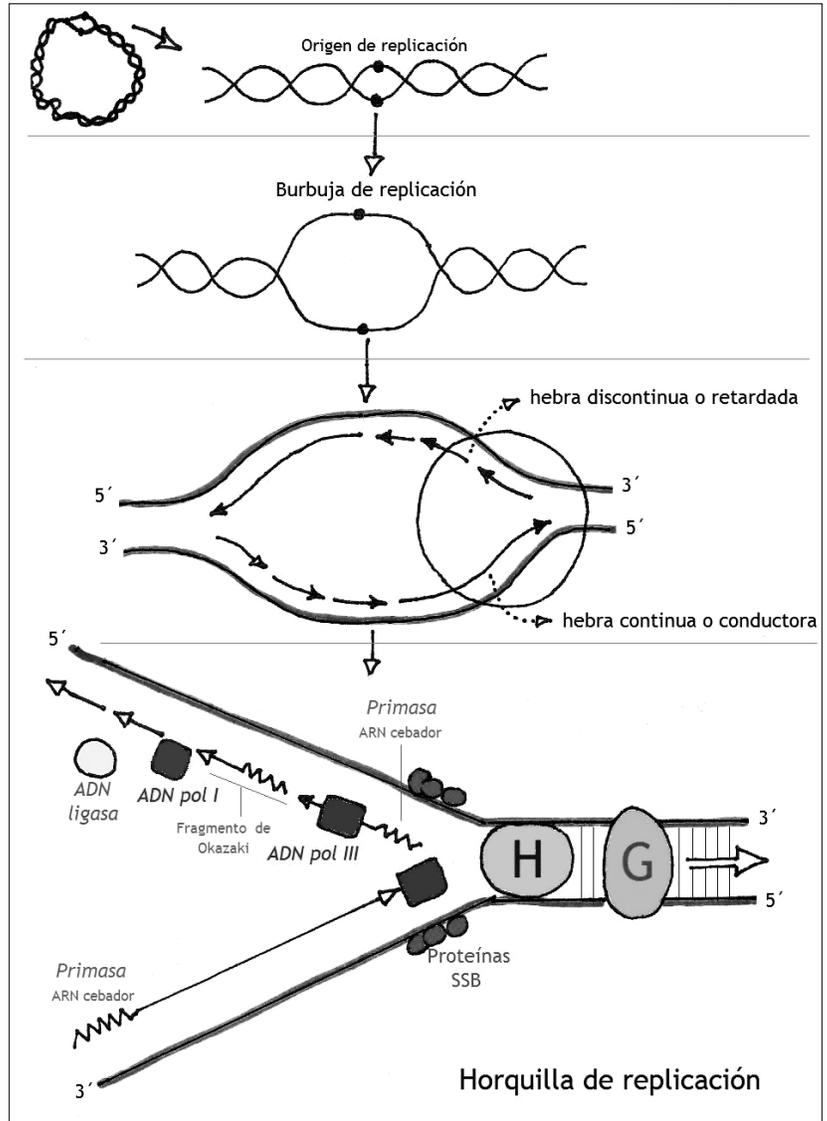


MECANISMO DE REPLICACIÓN

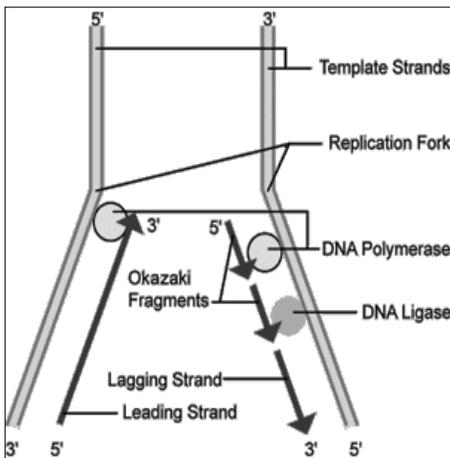
La replicación es el proceso que permite la formación de nuevas copias de la información genética a partir de una molécula patrón, ocurre en la fase S del ciclo celular y la velocidad de replicación es mayor en procariontes que en eucariontes.

Los cromosomas eucariontes tienen una gran cantidad de ADN, el cual se halla contenido en dos moléculas lineales, una para cada cromátida. Si estas moléculas se replicasen a partir de un sitio único de origen, la etapa "S" de la Interfase sería extremadamente larga.

La replicación del ADN se inicia en numerosas secuencias de nucleótidos llamadas **origen de replicación**, los cromosomas procariontes tienen un solo origen de replicación; en los eucariontes, existen entre 20 a 80 orígenes por cada lazo de cromatina. El ADN es sintetizado en dirección 5' a 3' y comienza cuando la topoisomerasa desenrolla el ADN y la helicasa rompe los puentes de hidrógeno abriendo las cadenas del ADN en el origen de replicación formando la **burbuja de replicación** que aumenta de tamaño a medida que se separan las cadenas hasta formar una estructura en Y denominada **horquilla de replicación**, cuyos brazos representan a las cadenas ya separadas de ADN y el tronco la doble hélice en vías de separación. Así cada burbuja tiene dos horquillas de replicación que a partir de un punto de origen común avanzan en direcciones opuestas. Las horquillas desaparecen cuando



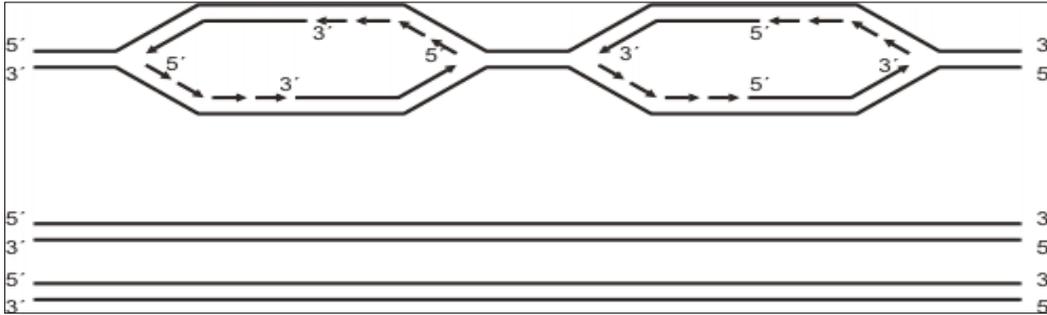
se van integrando a las burbujas contiguas.



La replicación avanza en forma bidireccional, porque la síntesis y las dos horquillas de replicación se producen en direcciones opuestas desde un único origen.



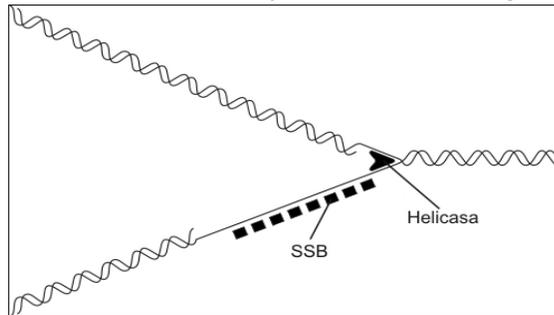
El segmento de ADN que se sintetiza a partir de un origen de replicación (con sus dos horquillas), lo llamamos **replicón**. De este modo la replicación del ADN termina cuando se ensamblan los sucesivos replicones. Esto permite que el ADN se sintetice en un tiempo bastante breve para el ciclo de vida de una célula.



El desenrollamiento es realizado por las enzimas **ADN-helicosas**, las cuales recorren la hélice desenrollando las hebras del ADN a medida que avanzan. Una vez separadas, las cadenas se combinan con las **proteínas SSB**, llamadas también proteínas desestabilizadoras, que evitan que se vuelva a enrollar el ADN.

A medida que la enzima helicasa abre la doble hélice, dos enzimas complementarias: la **topoisomerasa I** y la **topoisomerasa II** o **girasa**, van disminuyendo la torsional acumulada por el superenrollamiento en el replicado de la doble hélice, utilizan energía del ATP y como **nucleasas** (cortando las cadenas de ADN) y **ligasas** (restableciendo las uniones fosfodiéster).

- Topoisomerasa I: corta una de las cadenas y desenrollamientos de corto alcance
- Topoisomerasa II: corta las dos cadenas y abarca de ADN bastante mayor



tensión
sector no
se comportan
luego como

realiza

una extensión

Las ADN-polimerasas sólo pueden actuar en dirección $5' \rightarrow 3'$. A medida que se separan las cadenas progenitoras en la horquilla de replicación, una presenta sus nucleótidos en dirección $5' \rightarrow 3'$ y la otra en dirección $3' \rightarrow 5'$. Entonces la primera al ser copiada debería formar una cadena hija en sentido $3' \rightarrow 5'$, algo que las polimerasas no pueden hacer.

Las células solucionan esta situación de la siguiente forma:

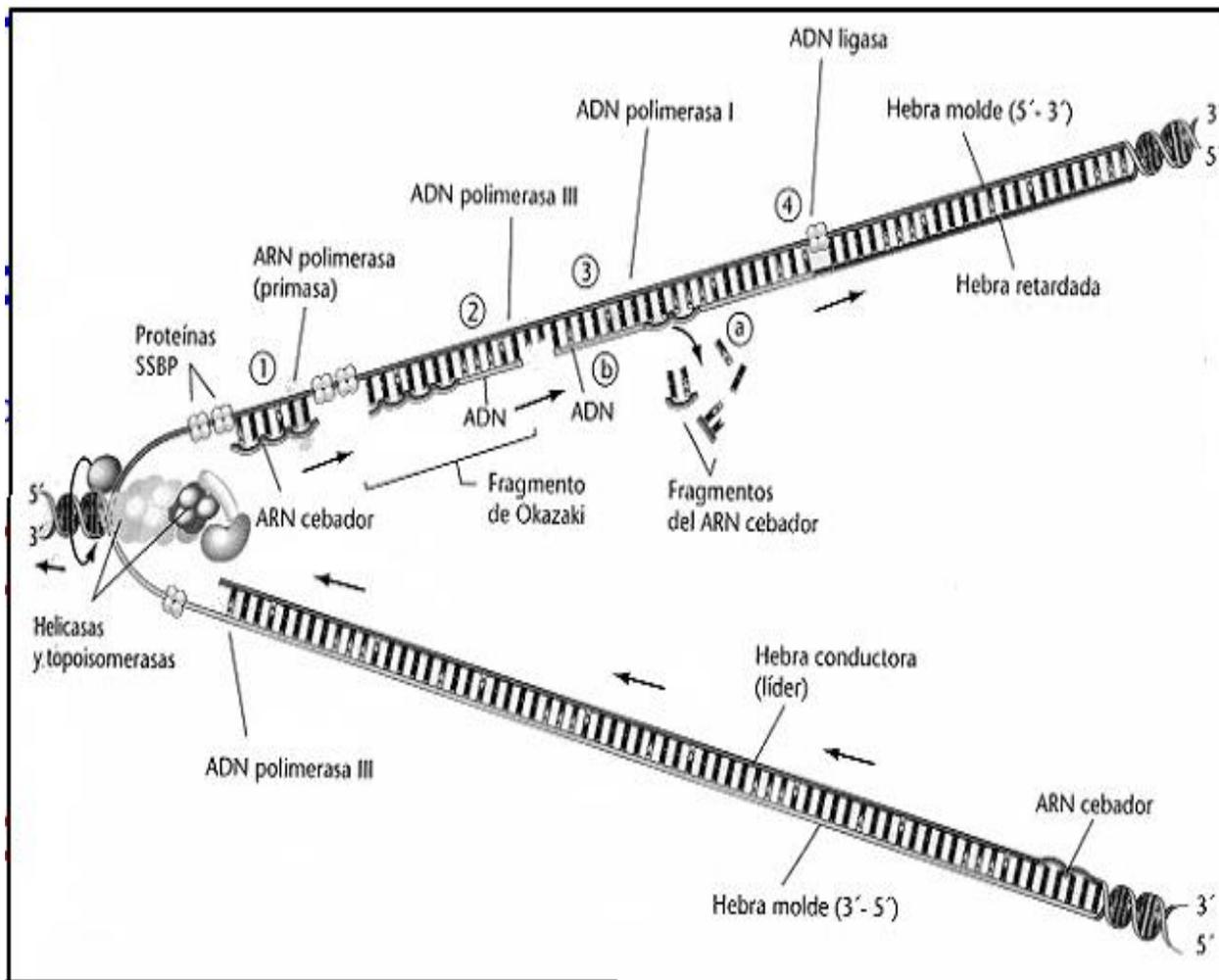
La cadena hija que se formó en dirección $5' \rightarrow 3'$ se construye en forma continua y la otra cadena hija es sintetizada de manera discontinua, en pequeños tramos, llamados fragmentos de Okazaki, los cuales se unen entre sí a medida que se sintetizan, por acción de la enzima **ADN-ligasa**. Entonces la síntesis del ADN es bidireccional, no sólo porque se produce en dos direcciones divergentes a partir de una misma burbuja de replicación, sino también porque las cadenas de la doble hélice son sintetizadas en direcciones opuestas.

La síntesis comienza con el ADN molde y la enzima ARN primasa sintetiza un **cebador o primer** que es una pequeña cadena de ARN de unos diez nucleótidos de largo y es una secuencia de inicio que se ubica en el extremo $3'$ indicando el lugar donde comienza la formación de la nueva cadena mediante la enzima ADN polimerasa. Una vez sintetizado el cebador la síntesis continúa si la ADN-polimerasa tiene disponibles suficientes desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCCP y dTTP). Gran parte de la energía requerida durante la replicación la aportan los desoxirribonucleótidos trifosfatados, que hidrolizan los últimos dos grupos fosfato (liberando energía) cuando se unen entre sí.

La cadena que se sintetiza en dirección $5' \rightarrow 3'$ lo hace en forma continua, en cambio la cadena que se sintetiza en dirección $3' \rightarrow 5'$ lo hace en forma discontinua, sintetizándose cortos fragmentos de ADN en sentido opuesto, siempre en dirección $5' \rightarrow 3'$, que después son unidos por una ADN ligasa posteriormente el cebador es removido por la ADN pol I y es reemplazado por ADN. La cadena que se sintetiza en forma continua se denomina **cadena adelantada** y la cadena sintetizada en forma discontinua se llama **cadena rezagada**.

Al iniciarse la síntesis continua del ADN, en cada origen se forman dos **cebadores** orientados divergentemente uno en cada cadena de la doble hélice y a continuación la **ADN-polimerasa** cataliza la síntesis de la cadena continua

agregando nucleótidos en el extremo 3' de la hebra en formación. Mientras tanto los cebadores son removidos por una **nucleasa reparadora** y su lugar es reemplazado por un fragmento de ADN equivalente sintetizado por la **ADN-polimerasa β** . Así la cadena continua requiere un solo cebador que se forma a comienzo de la replicación, en cambio la cadena discontinua necesita muchos cebadores, uno para cada fragmento de Okazaki.



CORRECCION DE ERRORES

Los errores en la síntesis de proteínas pueden favorecer a la supervivencia de la especie, sin embargo, a corto plazo es necesario reparar y conservar esta información. Cuando se comete un error, la ADN polimerasa III retrocede y elimina los nucleótidos hasta encontrar aquel que esté correctamente apareado (cuando la enzima realiza esta función se dice que tiene actividad de exonucleasa 3' a 5'). Al alcanzar el último nucleótido bien apareado, detiene su movimiento de retroceso y reinicia el movimiento agregando nucleótidos en dirección 5' a 3' a la cadena en crecimiento. Si este control falla, queda un nucleótido mal apareado, lo que se denomina **mutación** que al no ser corregidas por la maquinaria de reparación, se acumulan a lo largo de la vida del individuo lo que puede convertirse en un cáncer.

Corrección mediante nucleasa reparadora

Consiste en remover los nucleótidos erróneos mediante una **nucleasa reparadora**, la cual corta la unión fosfodiéster que conecta al nucleótido incorrecto con el nucleótido contiguo, después la **ADN pol II** sintetiza el fragmento faltante y en la **ADN ligasa** une a esa pieza al ADN cortado. Debe existir alguna señal que le permita a la nucleasa reparadora distinguir cual de las dos cadenas del ADN se encuentra el nucleótido incorrecto.



Síntesis de histonas

El ADN se replica en forma semiconservativa, las cadenas de la doble hélice progenitora, al separarse para su replicación, se comparten por igual en ambos cromosomas hijos. En cambio no se sabe como se segregan las histonas, puede ser que al cabo de la replicación sean heredadas totalmente por uno de los cromosomas hijos, en este caso el otro cromosoma hijo debe procurarse de la totalidad de histonas nuevas. Las histonas se sintetizan en su mayor parte durante la fase "S" de la interfase y se incorporan al cromosoma apenas es duplicado el ADN.

Replicación en Procariontes

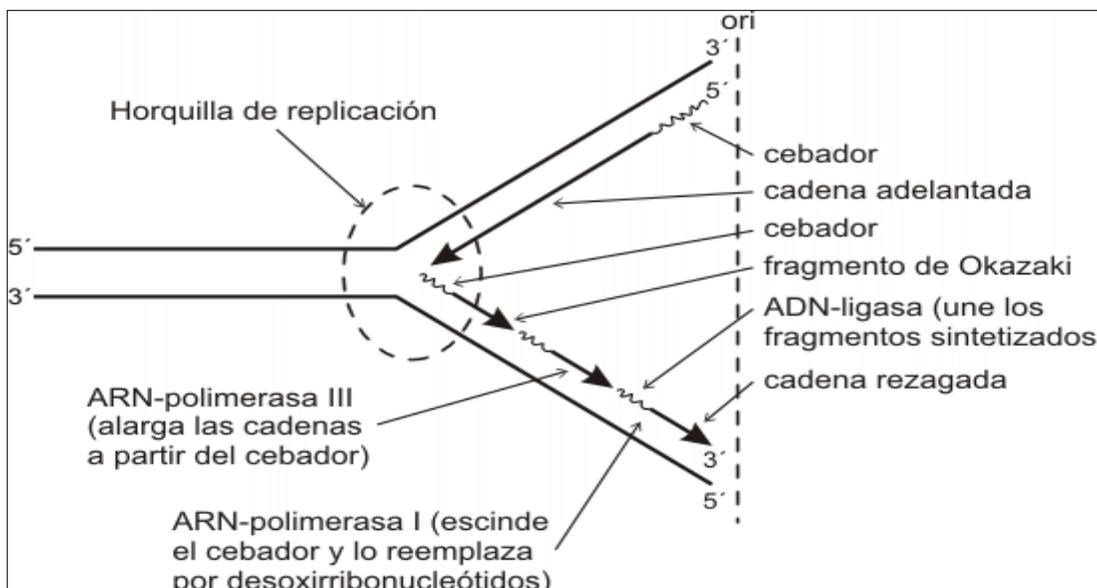
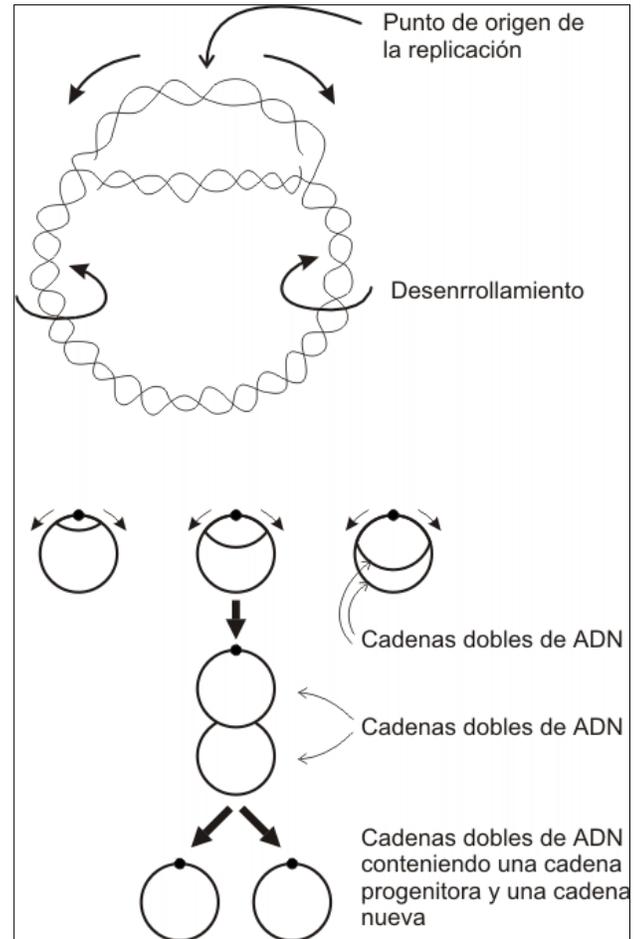
En las bacterias casi todo el ADN se encuentra formando una cadena circular, en cambio en los eucariontes cada cromosoma no duplicado contiene una cadena lineal asociada a una gran cantidad de proteínas y algo de ARN.

En procariontes al existir un **único punto de origen** se forma sólo un origen de replicación. Aquí actúan tres ADN-polimerasas:

ADN-polimerasa I, es la que elimina el cebador y reemplaza los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos, rellenando los espacios dejados por la ADN-polimerasa II. Adiciona 10 nucleótidos/seg.

ADN-polimerasa II, tiene actividad de nucleasa, retira nucleótidos de la cadena de ADN en los sitios donde se produjeron errores o desemparejamientos.

ADN-polimerasa III, es la enzima responsable de alargar las cadenas en el proceso de replicación. Adiciona 500 nucleótidos/seg.



FUNCIONES DE LAS ADN-POLIMERASA EN E. COLI	
Poli. I y Poli. III	- Síntesis de ADN en sentido 5' → 3' - Exonucleasa en sentido 3' → 5' - Corrección de errores, removiendo nucleótidos en sentido 5' → 3'
Poli. I	- Exonucleasa en sentido 5' → 3'
PRINCIPALES ENZIMAS QUE ACTUAN EN LA REPLICACIÓN	
Enzimas	Reacciones que catalizan
ADN-polimerasa I (procariontes)	Elimina el cebador, reemplazando los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos. Rellena los huecos del ADN.
ADN-polimerasa II (procariontes)	Nucleasa, corrige errores.
ADN-polimerasa III (procariontes)	Principal enzima de la replicación. Sintetiza la cadena nueva a partir del cebador. Realiza corrección de pruebas.
ADN-polimerasa α (eucariontes)	Sintetiza los fragmentos de ADN discontinuos a partir del cebador.
ADN-polimerasa β (eucariontes)	Rellena los huecos dejados por el cebador y repara errores como un segundo sistema de reparación.
ADN-polimerasa δ (eucariontes)	Sintetiza la hebra continua a partir del cebador y realiza lecturas de prueba.
Helicasas	Rompen los puentes de hidrógeno, separando las cadenas del ADN.
Primasas	Sintetizan el primer o cebador.
Proteínas SSB	Se extienden sobre las hebras del ADN evitando autoapareamientos entre las bases libremente expuestas
Topoisomerasas I y II	Corrigen el superenrollamiento

ACTIVIDADES

A partir de la información entregada en la guía y con el material de apoyo investigado por usted responda:

1. ¿Cuál es el aporte del experimento realizado por Meselson y Stahl con respecto a la replicación del ADN?
2. Describa la propuesta sobre el mecanismo de replicación del ADN de Watson y Crick
3. ¿Por qué es una replicación semiconservativa?



4. Complete el cuadro, indicando la función de cada enzima

Enzimas	Función
HELICASA	
TOPOISOMERASA	
Proteína SSB	
ADN polimerasas	ADN pol I : ADN pol II : ADN pol III:
ARN primasa	
ADN ligasa	

5. ¿Cuál es la importancia de la replicación de ADN?
6. ¿Por qué se dice que las dos cadenas de DNA son antiparalelas?
7. ¿A qué se denomina cebador o "primer" y cómo funciona?
8. ¿A qué se refieren las expresiones 5' y 3'?
9. Describa las características de los fragmentos de Okazaki
10. ¿A qué estructuras se denomina burbuja y horquilla de replicación?
11. Tanto en procariontes como en eucariontes la iniciación de la replicación del DNA requiere ciertos componentes. ¿Cuáles son?
12. Nombre y caracterice la función de las enzimas participantes de la reparación de errores
13. Realice un cuadro comparativo con 4 diferencias entre replicación en procariontes y eucariontes
14. indique la función de los desoxirribonucleótidos trifosfatados