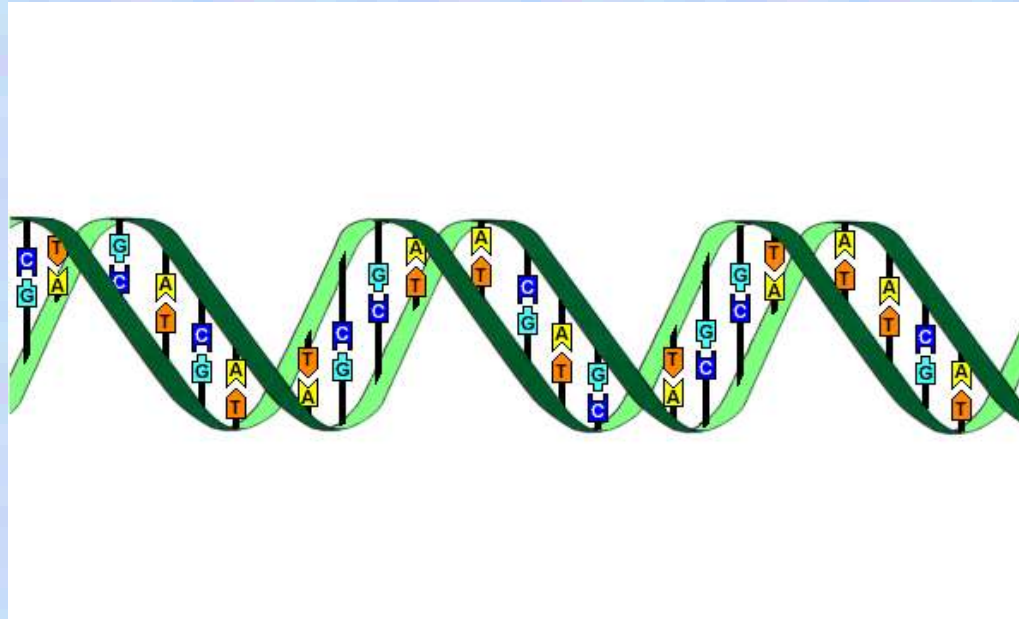


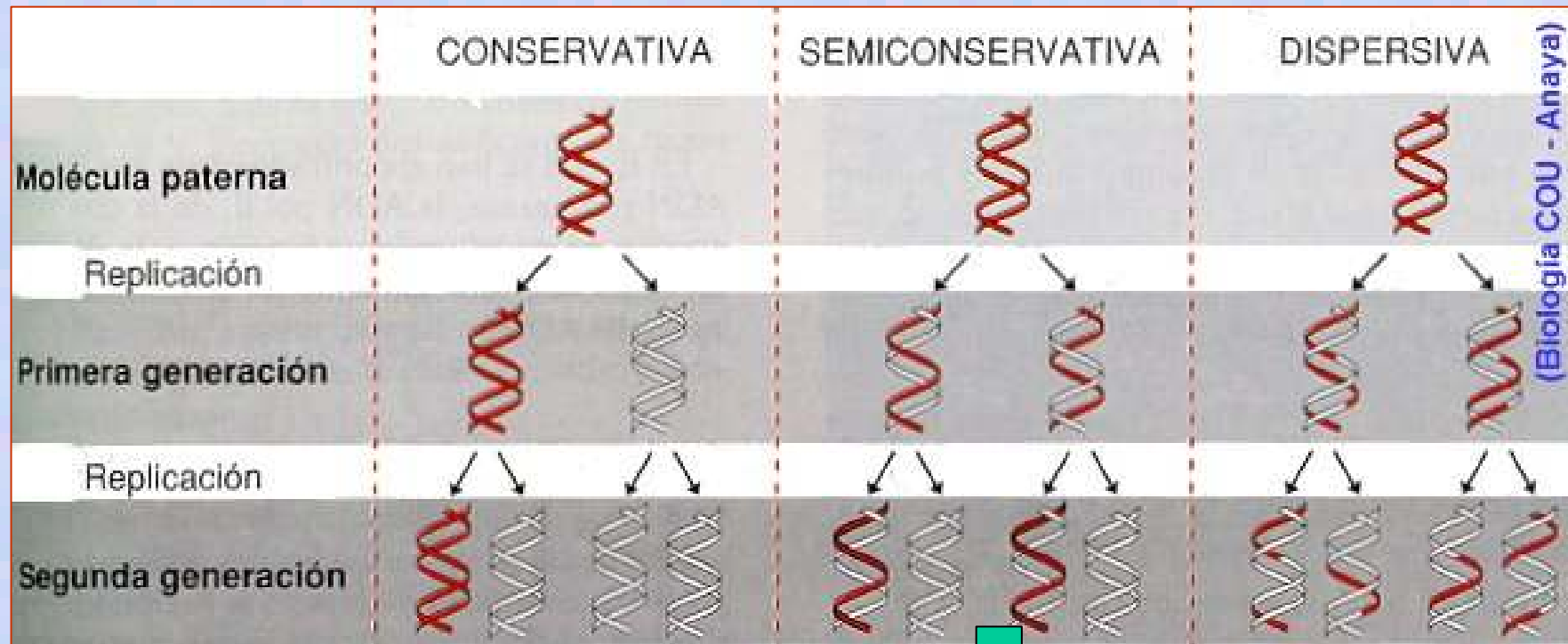
REPLICACIÓN DO ADN



Carmen Cid Manzano

I.E.S. Otero Pedrayo. Ourense. Departamento Bioloxía e Xeoloxía.

Modelos de replicación do ADN



(Biología COU - Anaya)



Watson e Crick



Meselson e Stahl demostraron experimentalmente en 1958 o modelo que era válido, para explicar a replicación do ADN.



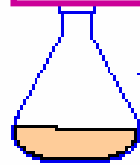
Meselson y Stahl

Cultivaron a bacteria *Escherichia coli* nun medio con nitróxeno pesado (^{15}N nitróxeno) que é máis pesado que o isótopo máis común: o ^{14}N nitróxeno).

As bacterias transferíronse logo a un medio con ^{14}N .

Experimento

Cultivo bacteriano con DNA N¹⁵



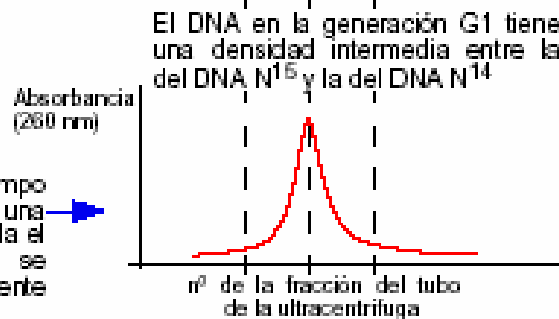
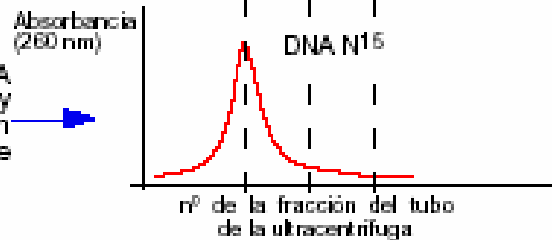
Aislamiento de DNA (fragmentado) y ultracentrifugación en gradiente de densidad de CICs

incubación en medio normal (N¹⁴)

Primera generación (G1)

Transcurrido el tiempo correspondiente a una generación (G1), se aísla el DNA (fragmentado) y se ultracentrifuga en gradiente de densidad de CICs

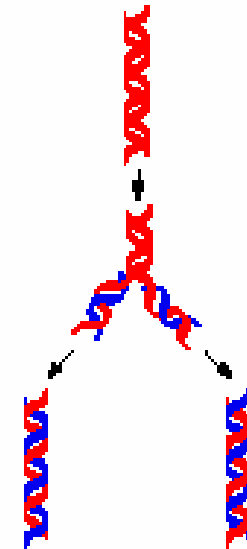
Resultados

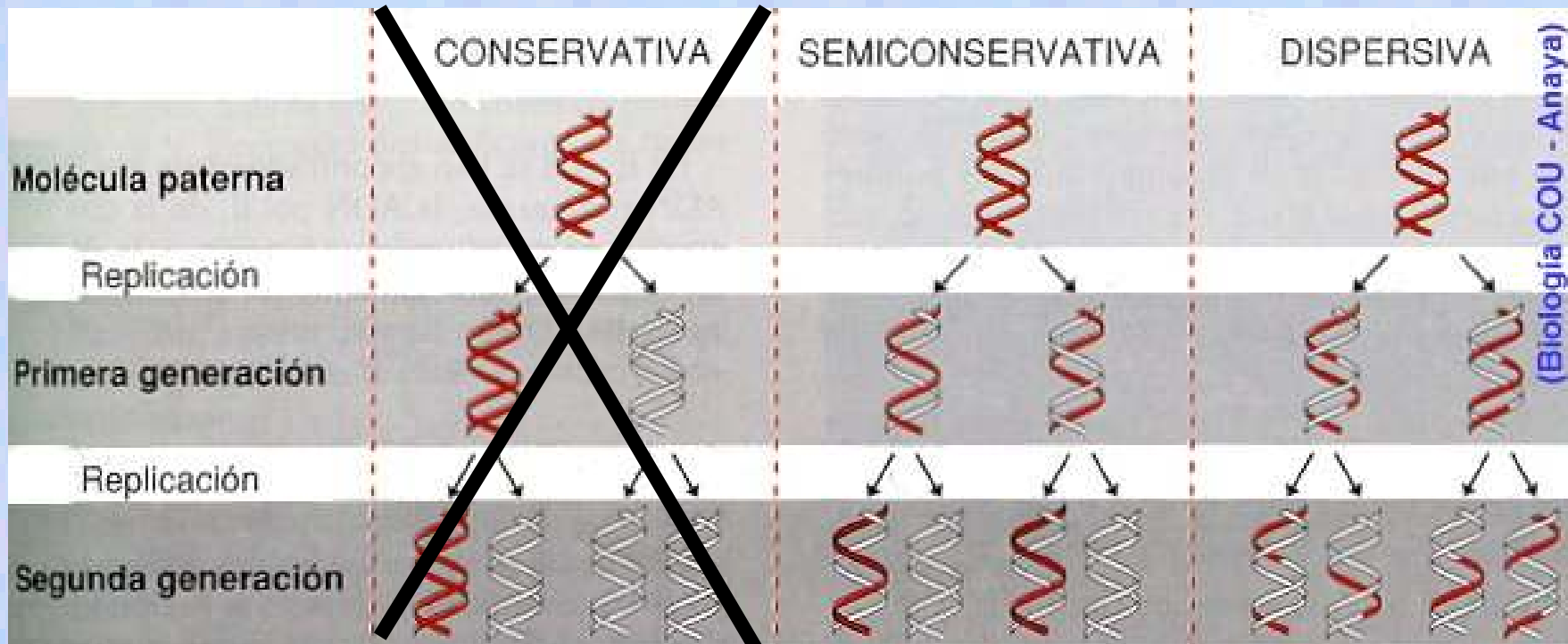


Interpretación

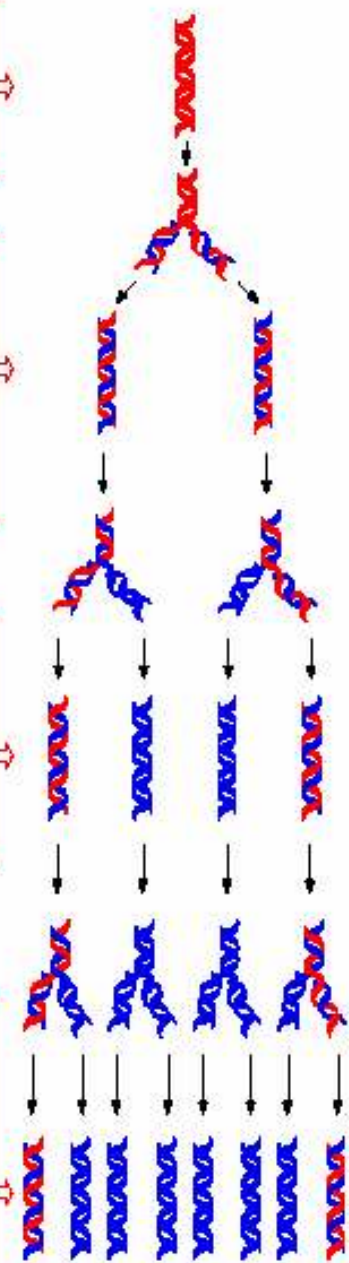
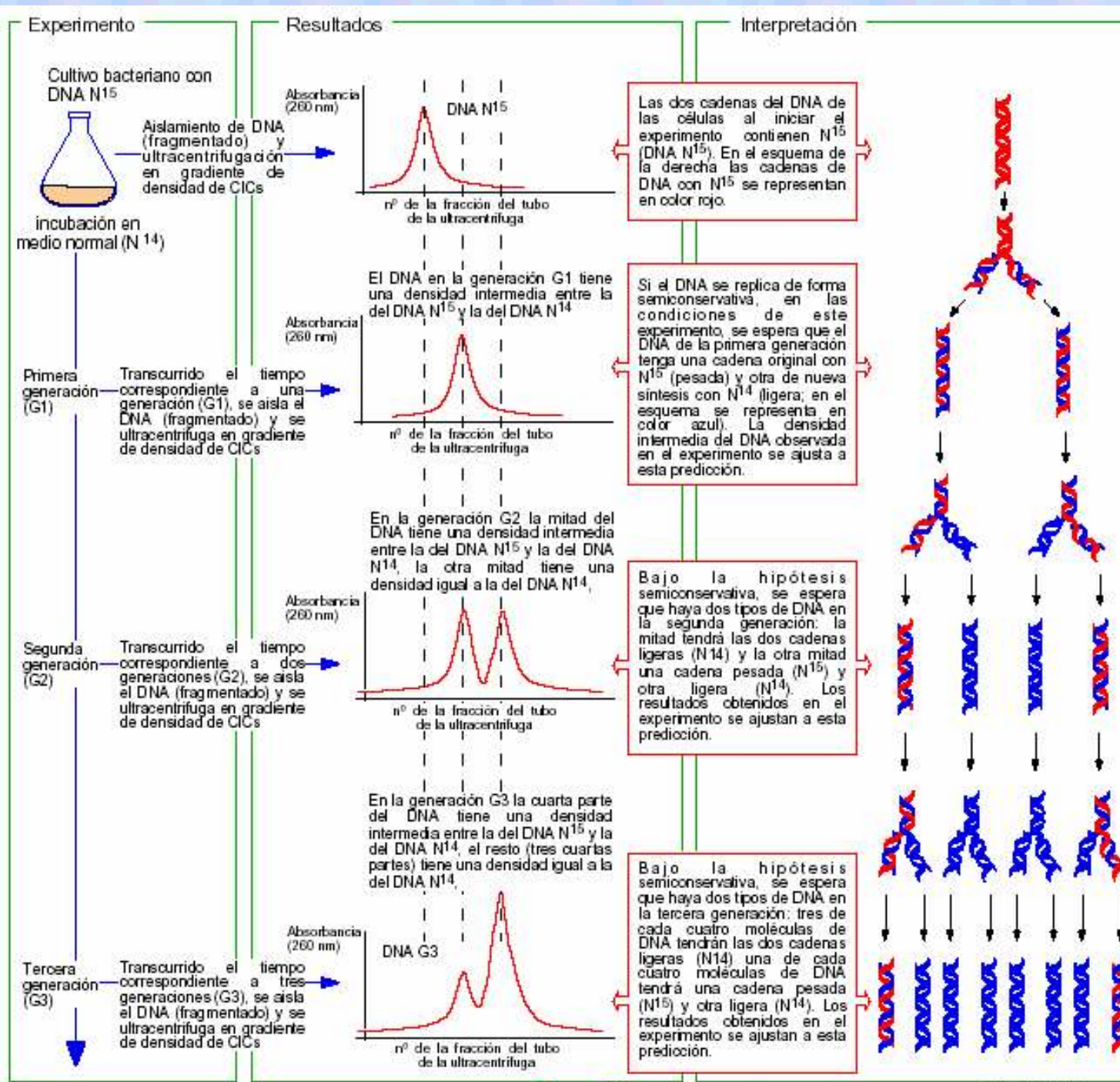
Las dos cadenas del DNA de las células al iniciar el experimento contienen N¹⁵ (DNA N¹⁵). En el esquema de la derecha las cadenas de DNA con N¹⁵ se representan en color rojo.

Si el DNA se replica de forma semiconservativa, en las condiciones de este experimento, se espera que el DNA de la primera generación tenga una cadena original con N¹⁵ (pesada) y otra de nueva síntesis con N¹⁴ (ligera; en el esquema se representa en color azul). La densidad intermedia del DNA observada en el experimento se ajusta a esta predicción.





Segundo o 1º Experimento **Meselson e Stahl** queda rexeitado o modelo de replicación conservativa

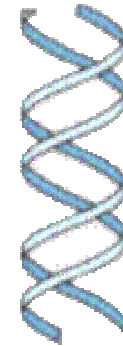


A duplicación do ADN prodúcese de acordo coas seguintes características:

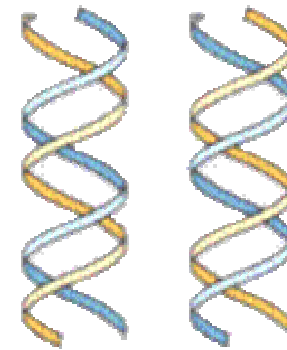
- É semiconservativa segundo quedou confirmado cos experimentos de **Meselson y Stahl**.

Replicación semiconservativa

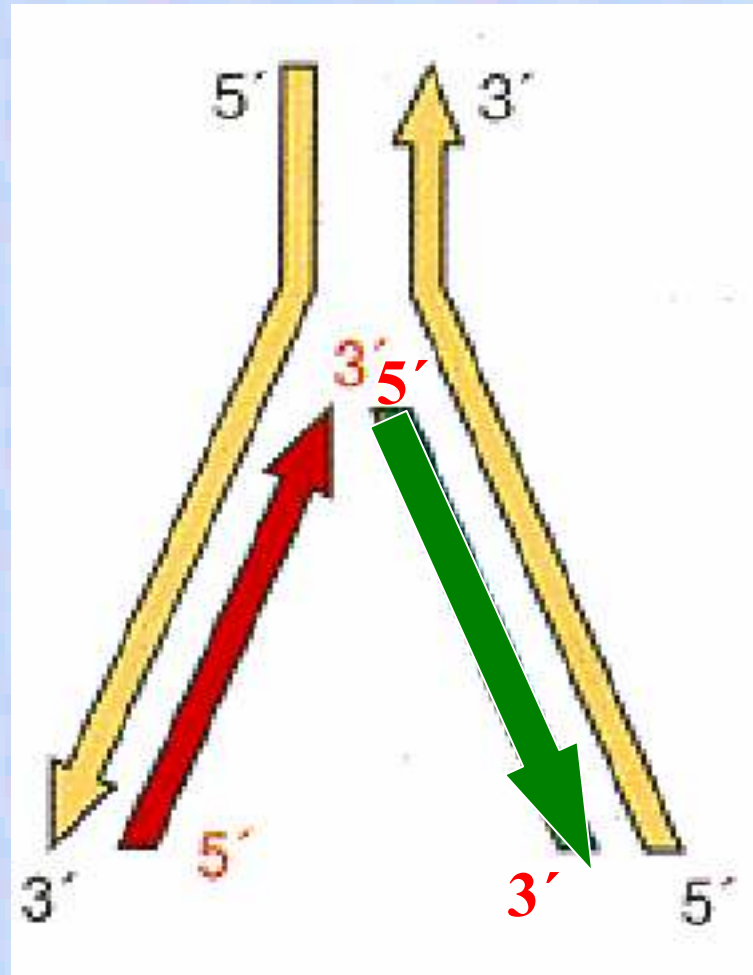
Hélice orixinal de ADN



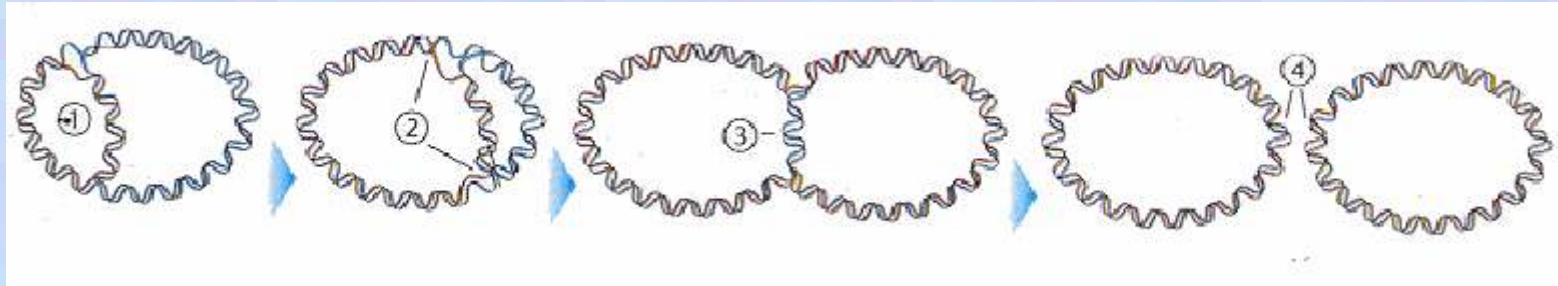
Hélices de ADN logo dun ciclo de replicación



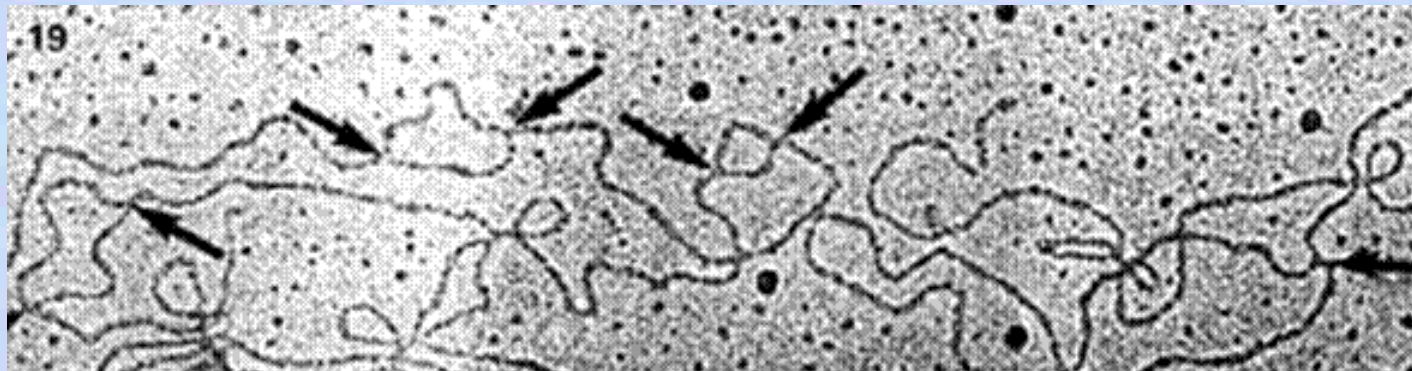
□ **Bidireccional:** a partir dun punto dado do cromosoma, a replicación progresa en dúas direccións.



□ En virus e bacterias existe un único punto de inicio da replicación, mentres que en eucariotas hai varios.

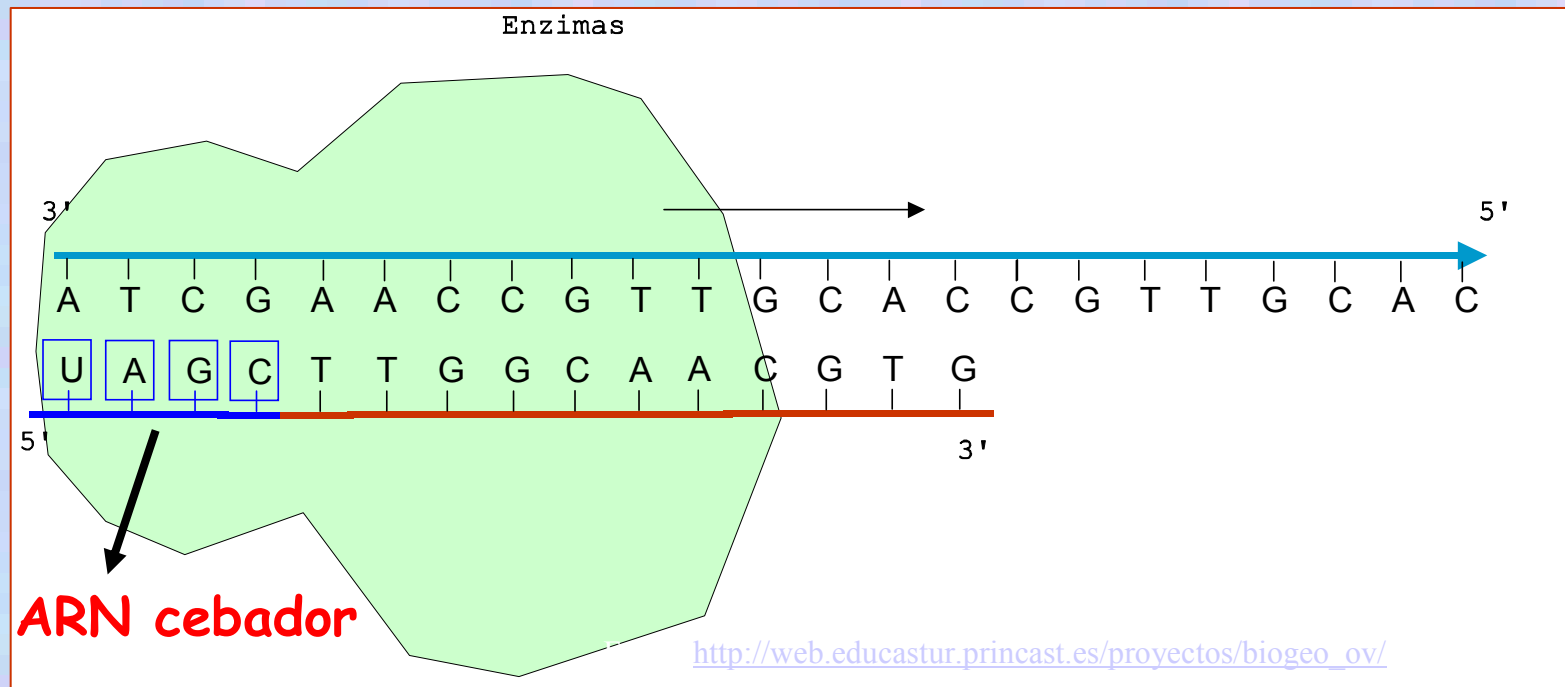


Replicación en procariotas.

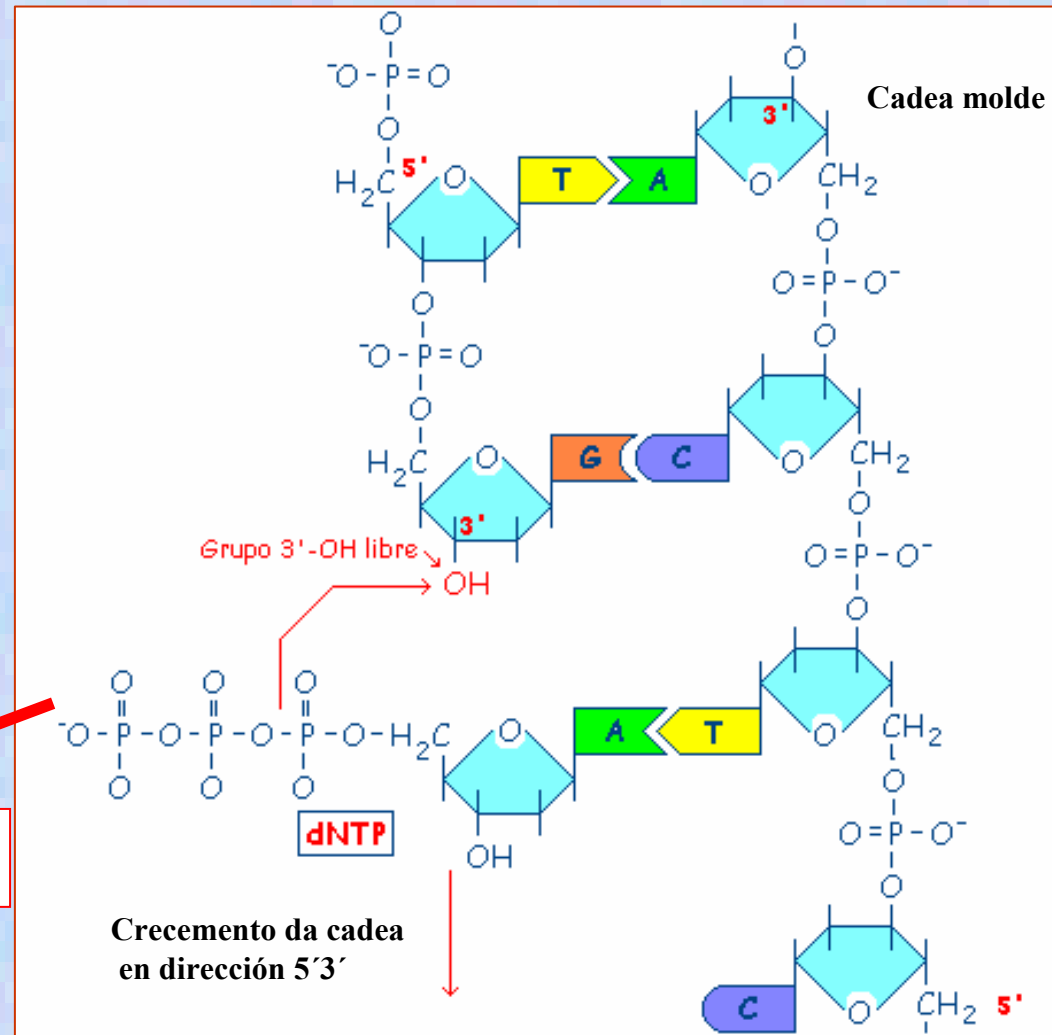


Replicación en eucariotas. As frechas indican os extremos dos ollos de replicación.

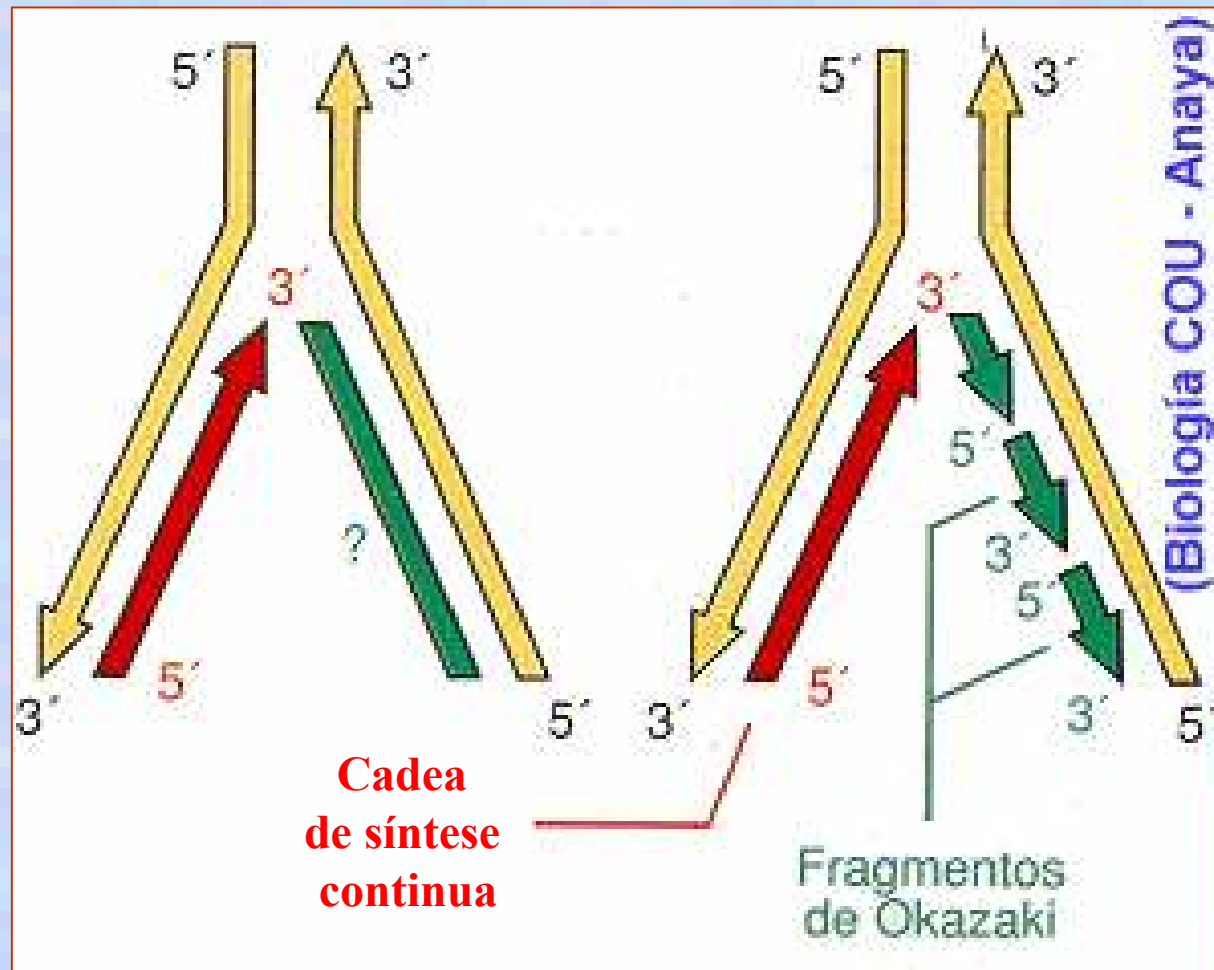
- A iniciación da síntese de cada cadea e de cada fragmento require dun cebador ou primer (ARN).



- A replicación avanza por adición de desoxirribonucleótidos-monofosfato no **sentido 5'→3'**.
Utilízanse desoxirribonucleótidos-trifosfato que aportan a enerxía necesaria para a reacción e elimínanse dous fofatos.



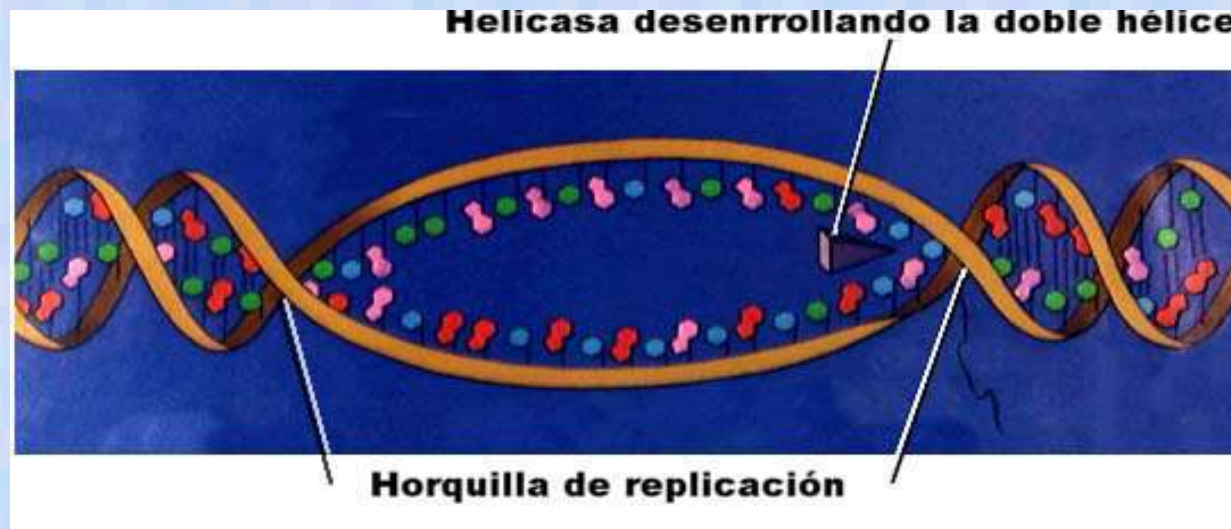
- **Semidiscontinua:** unha cadea replícase de forma continua e a complementaria de modo discontinuo (fragmentos de Okazaki).



Elementos que interveen na replicación do ADN

Para que se leve a cabo a replicación do DNA nas células requírense os seguintes elementos:

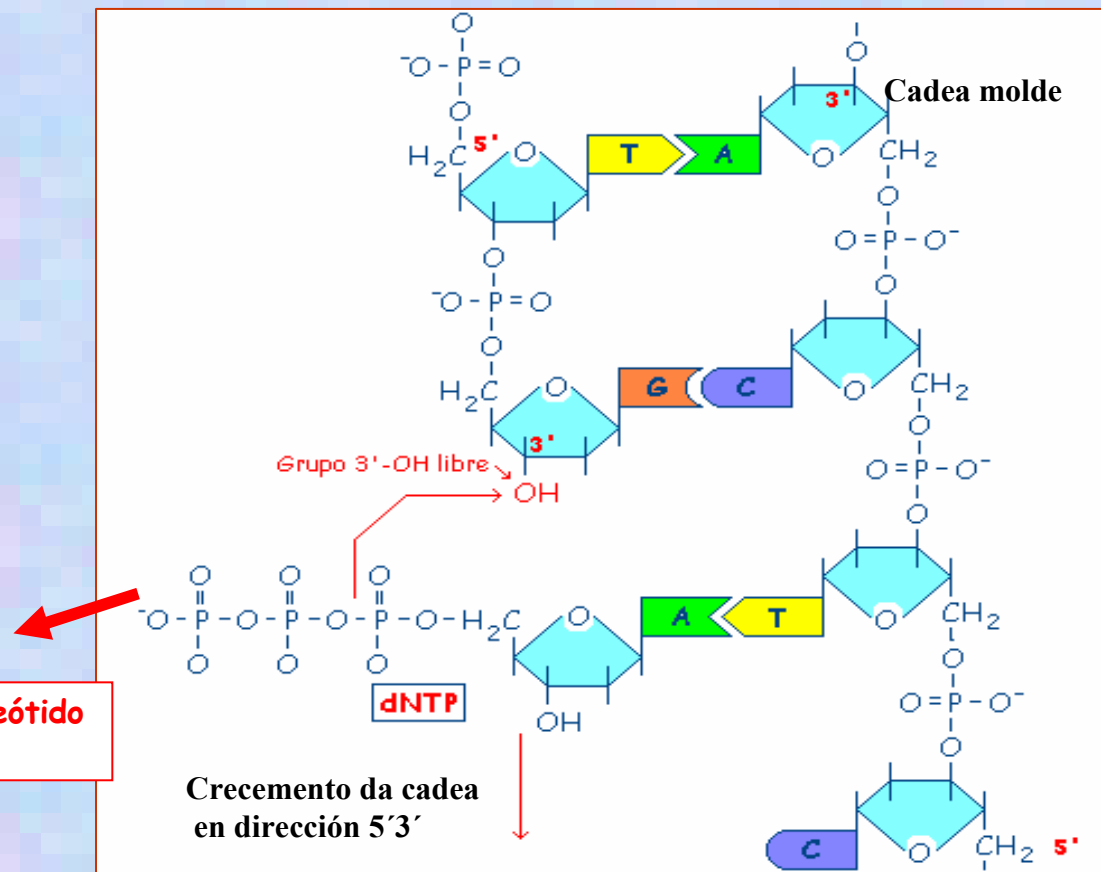
- **ADN orixinal** que servirá de molde para ser copiado.
- **Helicasas:** encimas que desenrolan a cadea de ADN.
- **Topoisomerasas,** separan as cadeas de ADN.
- **Proteínas SSB,** (*single strand-binding*) (estabilizadoras) manteñen as dúas cadeas do ADN separadas.



- **ADN polimerasas**
- **Desoxirribonucleótidos trifosfato**, que se utilizan como fonte de nucleótidos e ademais aportan enerxía.
- **ARN-polimerasa ou primasa**: fabrica os cebadores, pequenos fragmentos de RNA que serven para iniciar a síntese de DNA.
- **Ribonucleótidos trifosfato** para a fabricación dos cebadores
- **DNA-ligasa**: une fragmentos de DNA.

** O conxunto de encimas e proteínas que intervén na replicación do ADN, denomínase **replisoma**.*

- **ADNs-polimerasa:** catalizan a formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos e van engadindo o nucleótido complementario ó da cadea molde.
- Repara erros da síntese do ADN.
- Completa con desoxirribonucleótidos o oco resultante ó eliminar o ARN cebador.

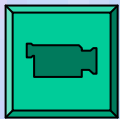


**Desoxirribonucleótido
-trifosfato**

Proteínas de replicación de *E. coli*

<i>Proteína</i>	<i>Función</i>	<i>Tamaño (kd)</i>	<i>Moléculas por célula</i>
Helicasa	Desenrolla la doble hélice	300	20
Primasa	Sintetiza el RNA cebador	60	50
SSB	Estabiliza las regiones de hebra sencilla	74	• 300
Topoisomerasa (DNA girasa)	Introduce superenrollamientos negativos	400	250
Holoenzima DNA polimerasa III	Sintetiza DNA	~ 900	20
DNA polimerasa I	Elimina el cebador y rellena huecos	103	300
DNA ligasa	Une los extremos del DNA	74	300

Formación do enlace de unión entre nucleótidos



MECANISMO DE DUPLICACIÓN DO ADN EN PROCARIONTES

O ADN en procariotas é bicatenario e circular e a súa replicación ocorre en tres etapas:

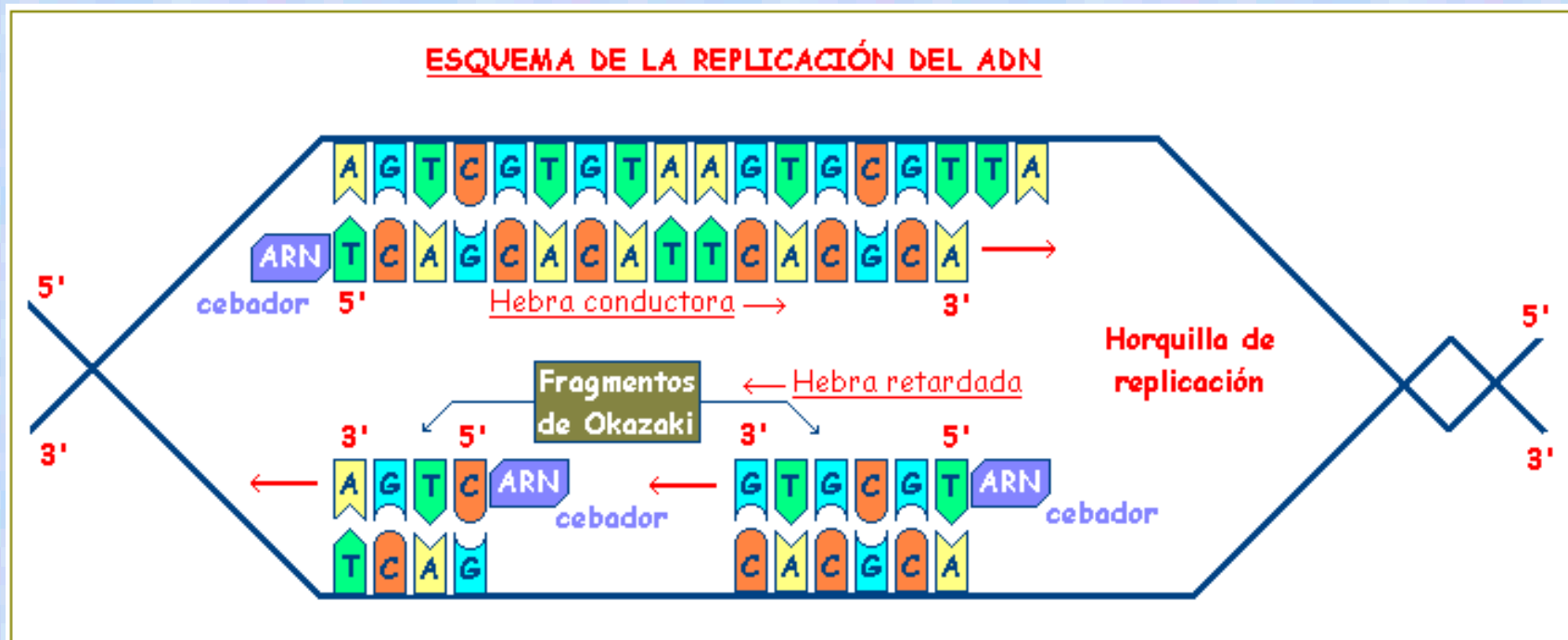
1ª etapa: a dobre hélice desenrólase e ábrese, no punto ori-c (orixe da replicación).

- Por acción das helicasa, topoisomérasas e as proteínas SSB, o ADN desenrólase e separa as dúas cadeas da dobre hélice, rompendo as pontes de hidróxeno entre bases complementarias. Fórmase o furco ou burbulla de replicación

2ª etapa: síntese de dúas novas cadeas de ADN.

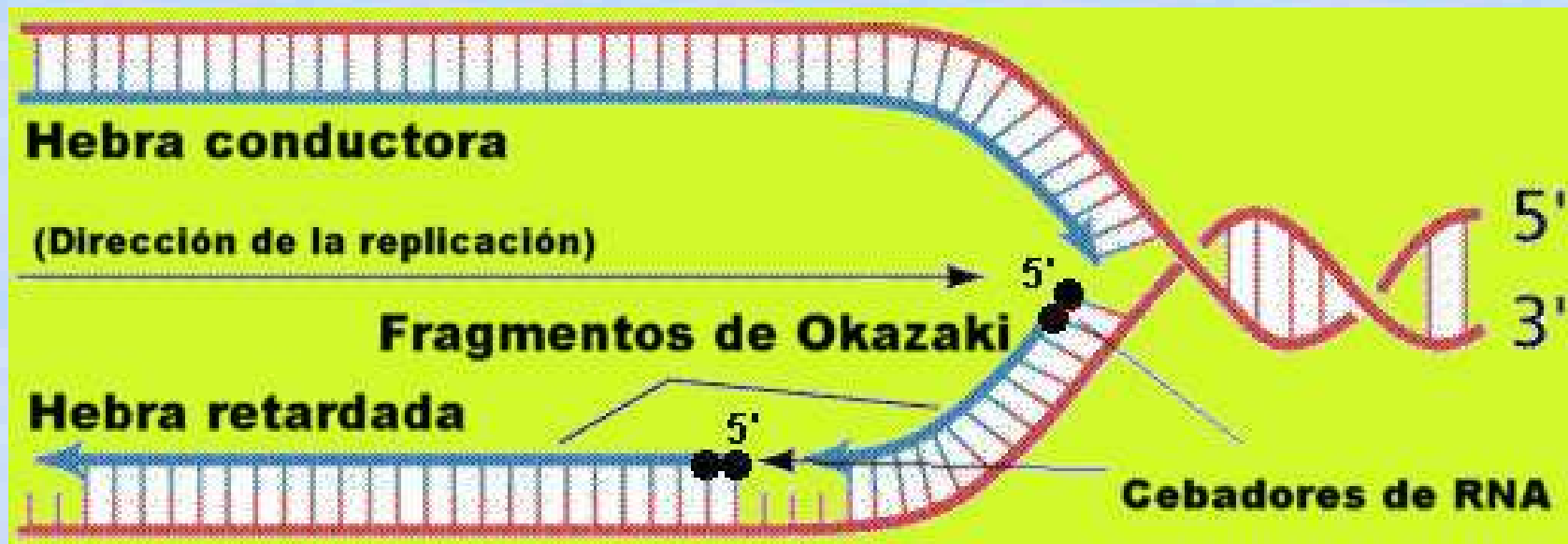
- A ADN polimerasa é incapaz de iniciar a síntese de ADN, necesita un cebador (ARN) que é sintetizado por un ARN polimerasa (primasa). A ARN-polimerasa fabrica pequenos fragmentos de RNA complementarios do ADN orixinal. Son os chamados "primers" ou cebadores, duns 10 nucleótidos, ós que se engadirán desoxirribonucleótidos. Este cebador é eliminado posteriormente.

- Actúan as ADN polimerasas para sintetizar as novas cadeas en sentido 5'-3'.
- A cadea 3'-5' é copiada por unha ADN polimerasa sen ningún tipo de problemas (**cadea conductora**).
- A cadea 5'-3' non pode ser copiada directamente, isto soluciónase lendo pequenos fragmentos (fragmentos de Okazaki), que posúen entre 1000-2000 nucleótidos) que crecen no sentido 5'-3' e que máis tarde se unen . Esta é a **cadea retardada**, chamada desta forma porque a súa síntese é máis lenta.
- Posteriormente, una ADN pol actúa como exonucleasa eliminando o cebador e ó mesmo tempo actúa como polimerasa completando o oco con novos dNTP.



3ª etapa: corrección de erros e unión dos fragmentos de Okazaki pola ADN-ligasa.

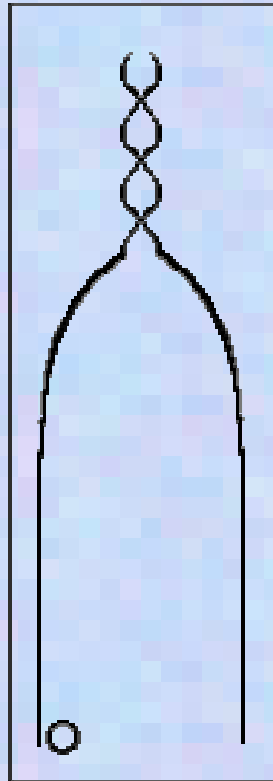
- A medida que se van sintetizando as cadeas e unindo os fragmentos orixínase a dobre hélice, de forma que ó finalizar o proceso libéranse dous moléculas idénticas de DNA, cunha cadea vella e outra nova.



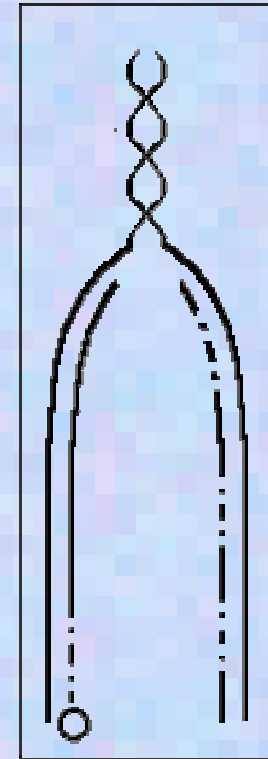
O mecanismo de replicación confirma que o ADN molde autoduplicase exactamente, formando dúas novas moléculas con idéntica información xenética.



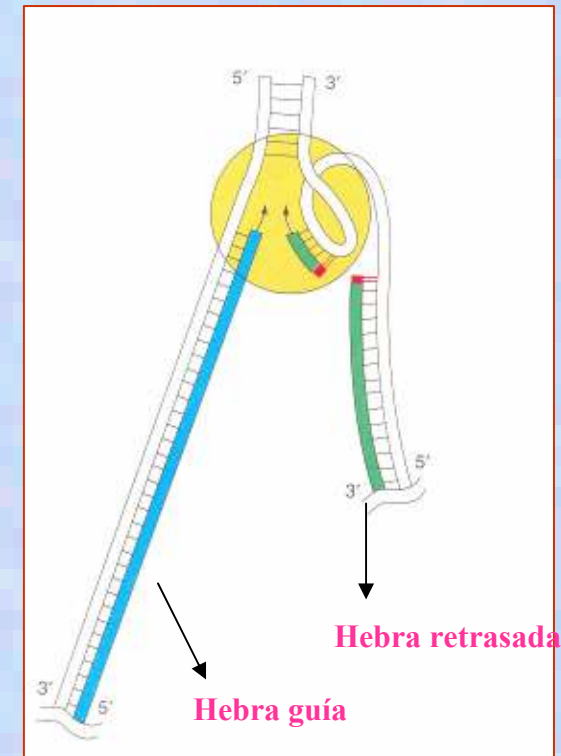
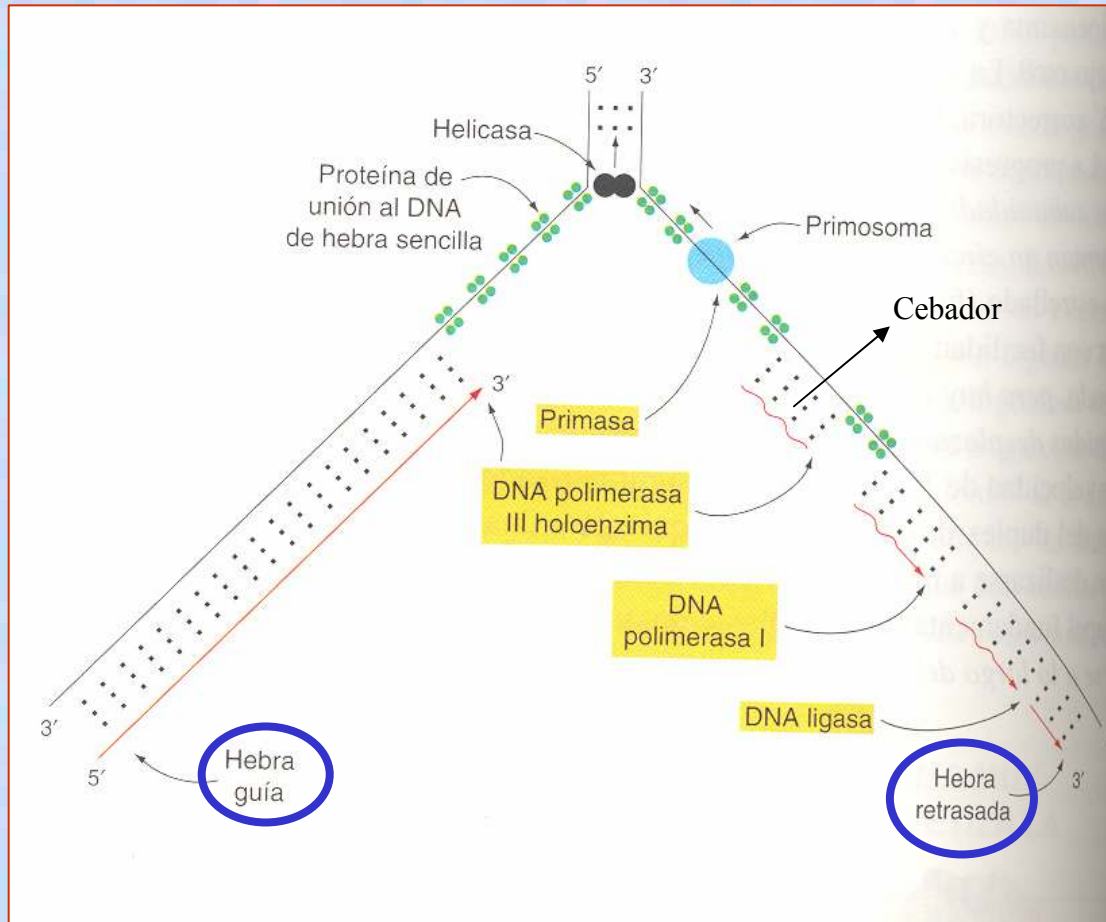
Formación dunha horquilla de replicación



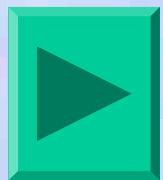
Síntese pola DNA-polimerasa da cadea condutora (esquerda) e da cadea retardada en fragmentos de Okazaki (dereita)



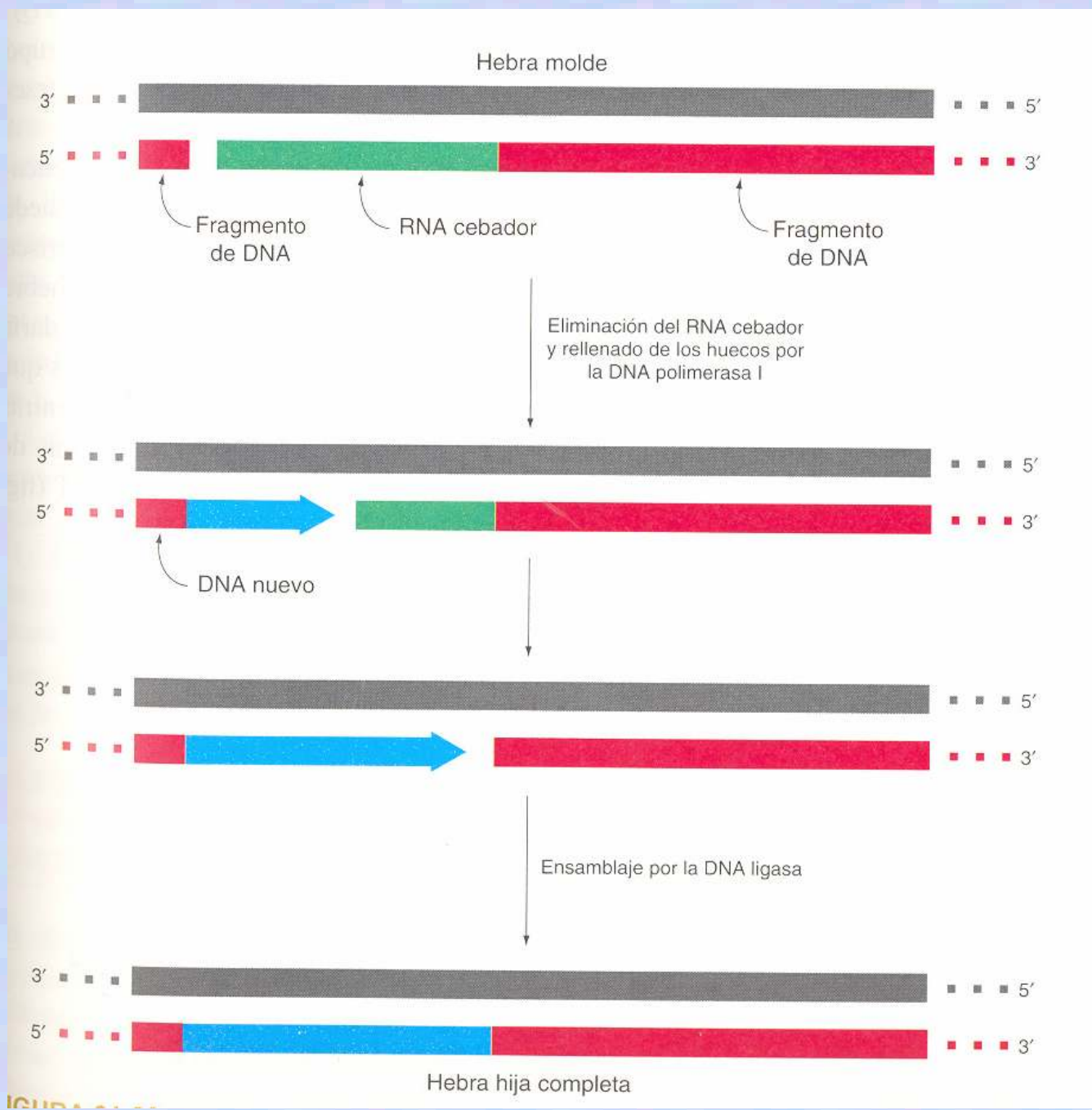
Unión de todos os fragmentos pola DNA-ligasa

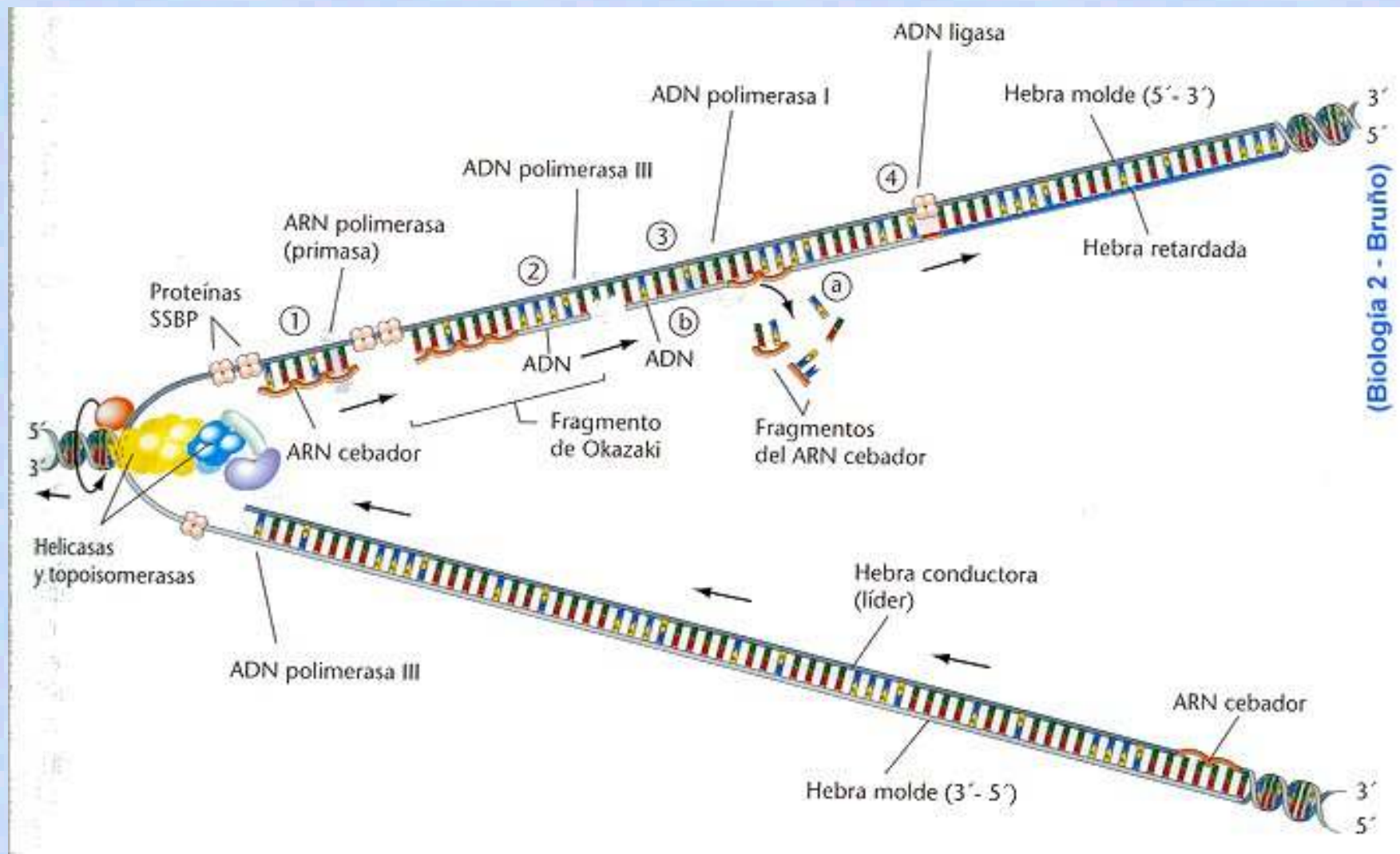


Horquilla de replicación en *E. coli*



A formação dun bucle no molde da cadea retardada permite que a ADN polimerasa sintetice os fragmentos de ADN



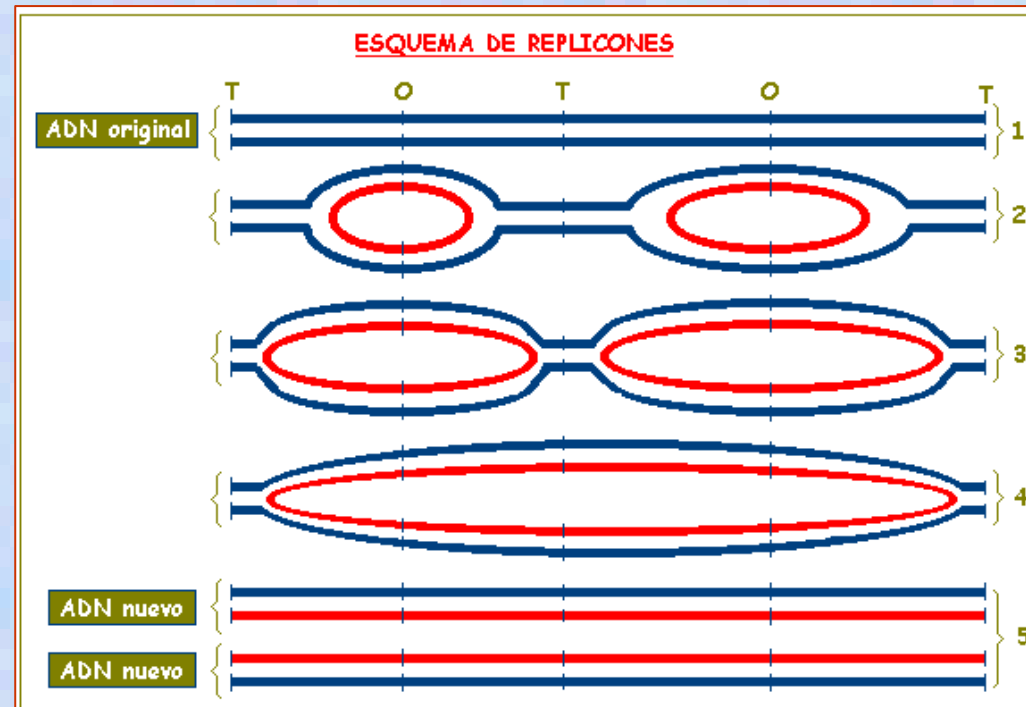


(Biología 2 - Bruño)

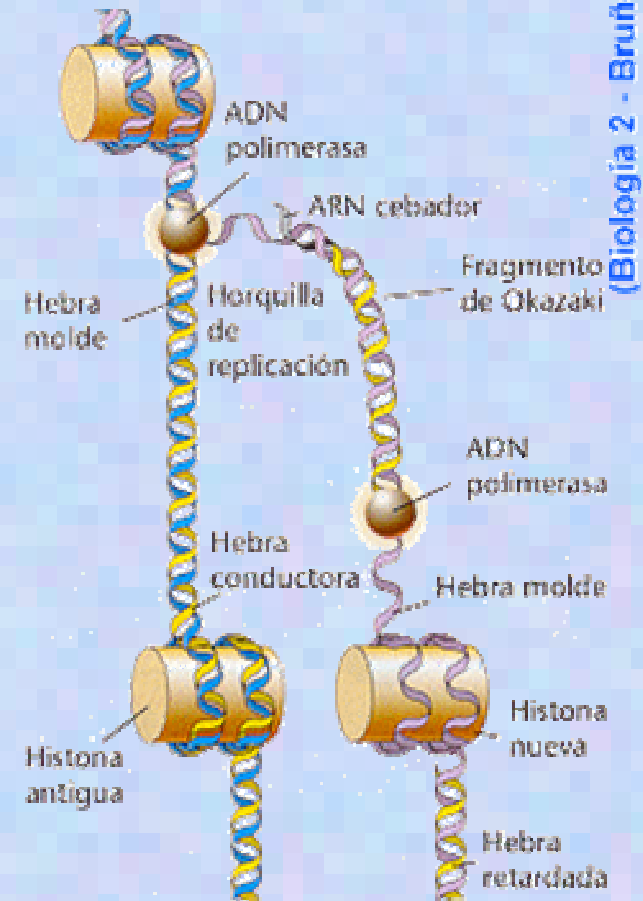
DUPLICACIÓN DO ADN EN EUKARIOTES

Segue o mesmo esquema básico para o mecanismo, aínda que ofrece algunhas diferencias destacables:

A célula eucariota contén **máis ADN** e as súas moléculas teñen maior lonxitude, debido a isto, a replicación comeza simultaneamente en **varios 'puntos de orixe'**, co que se acurta o tempo do proceso, formándose **numerosas horquillas de replicación**. O ADN de eucariotas consta de replicóns (unidades de replicación) aliñados un tras outro (ó redor de 100 replicóns por cromosoma).



- Intervenien encimas similares ós que actúan nas células procariontes e outros encimas que duplican as histonas que forman parte dos nucleosomas. As histonas vellas permanecen na cadea conductora.



- Os fragmentos de Okazaki son máis pequenos que en procariontes (ó redor de 100-200 nucleótidos).

MECANISMOS DE REPARACIÓN

O nivel de fidelidade das copias de ADN é moi alto debido a:

- A especificidade encimática da maquinaria replicativa.
- A corrección de erros das ADN-polimerasas. Teñen actividade exonucleasa. Detectan nucleótidos incorrectos e os eliminan.
- Mecanismos de reparación-postreplicativos.



*Departamento Bioloxía e Xeoloxía
I.E.S. Otero Pedrayo. Ourense.*