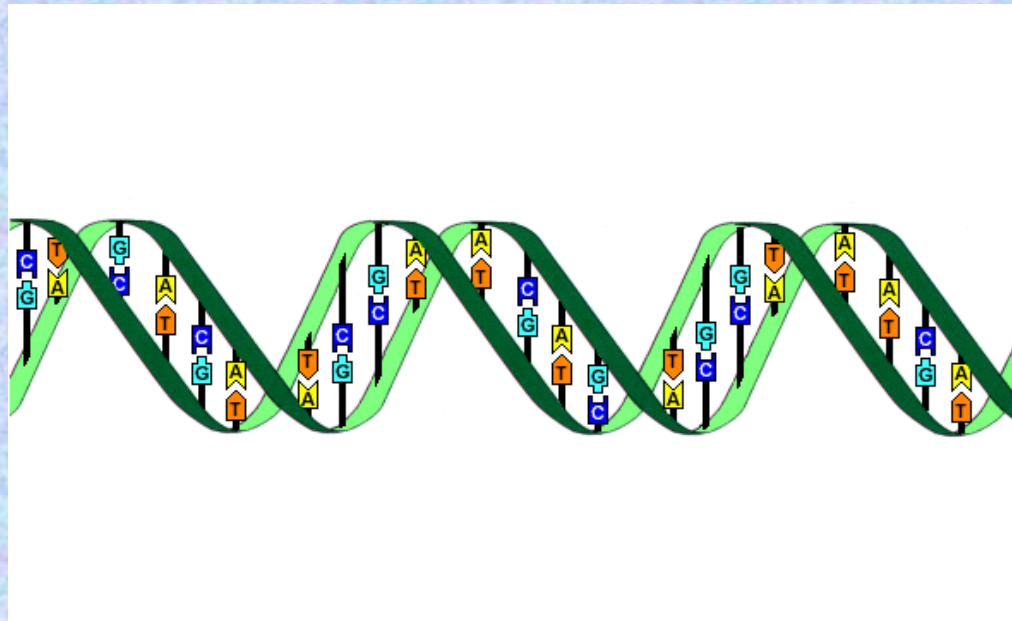


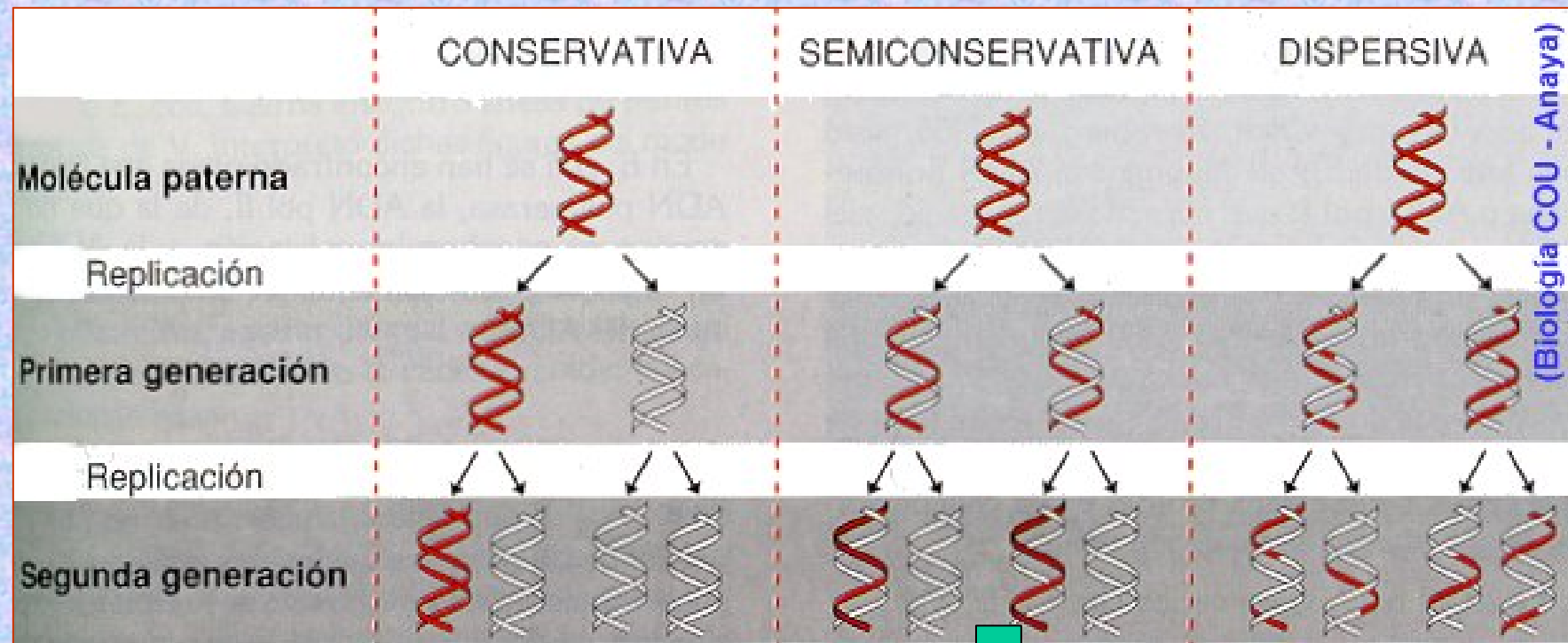
REPLICACION DO ADN



Carmen Cid Manzano

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

Modelos de replicación do ADN



(Biología COU - Anaya)



Watson e Crick



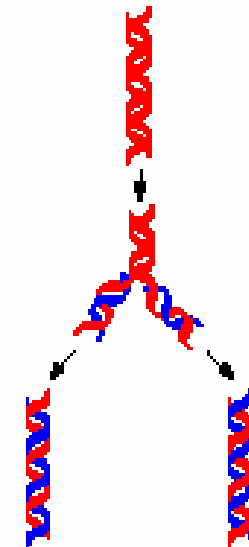
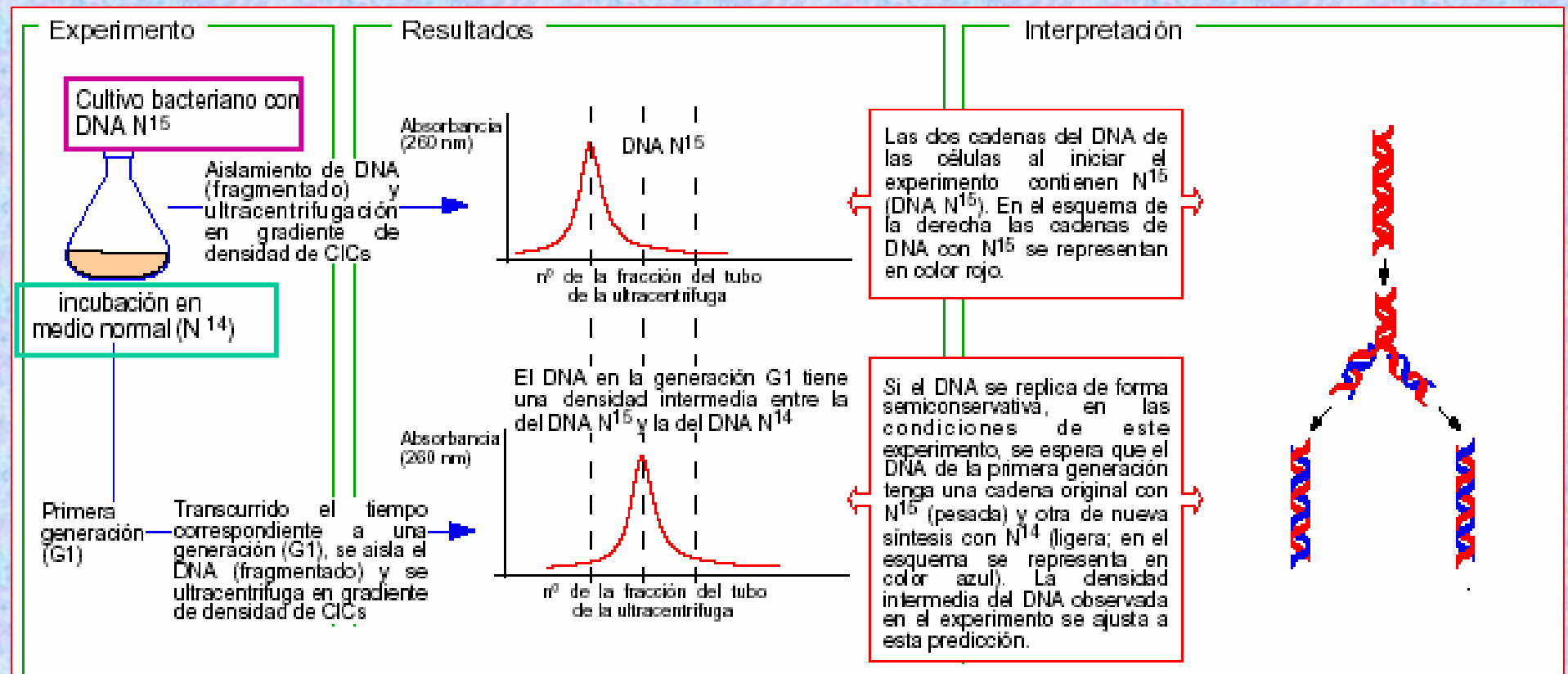
Meselson e Stahl demostraron experimentalmente en 1958 o modelo que era válido, para explicar a replicación do ADN.

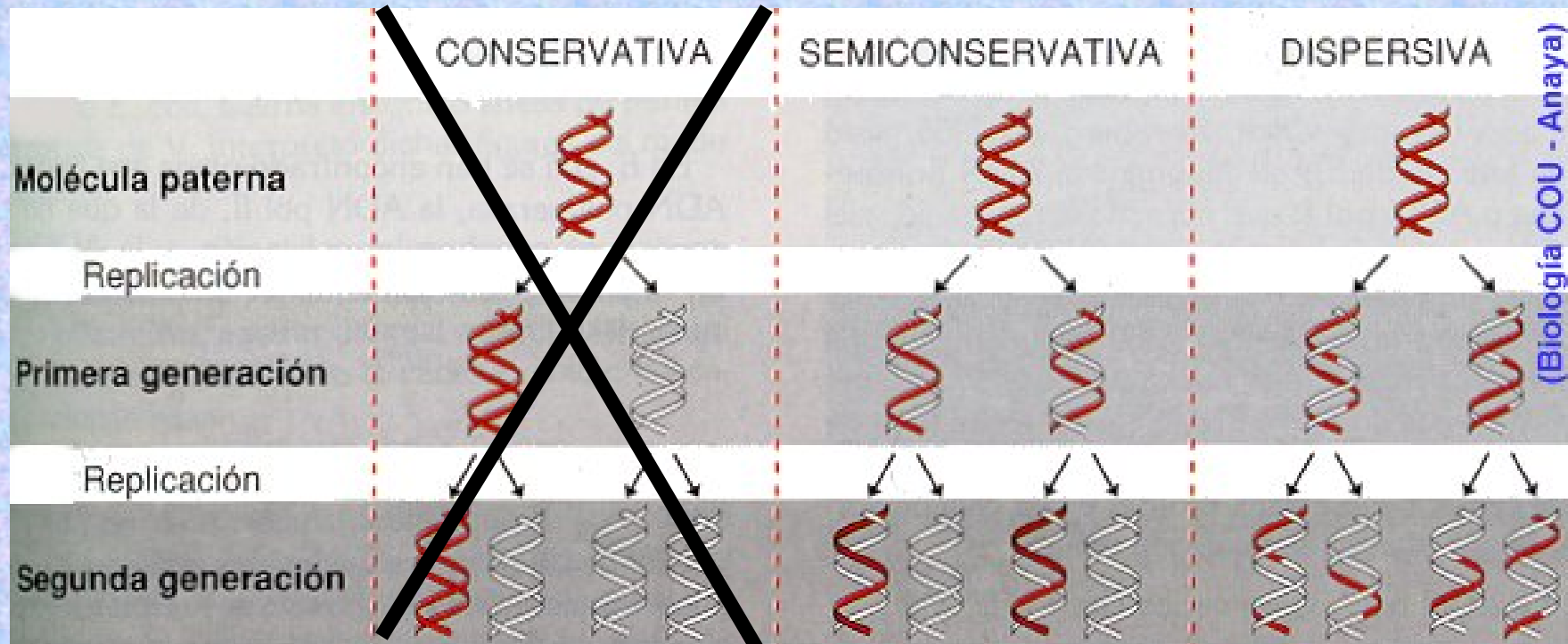


Meselson y Stahl

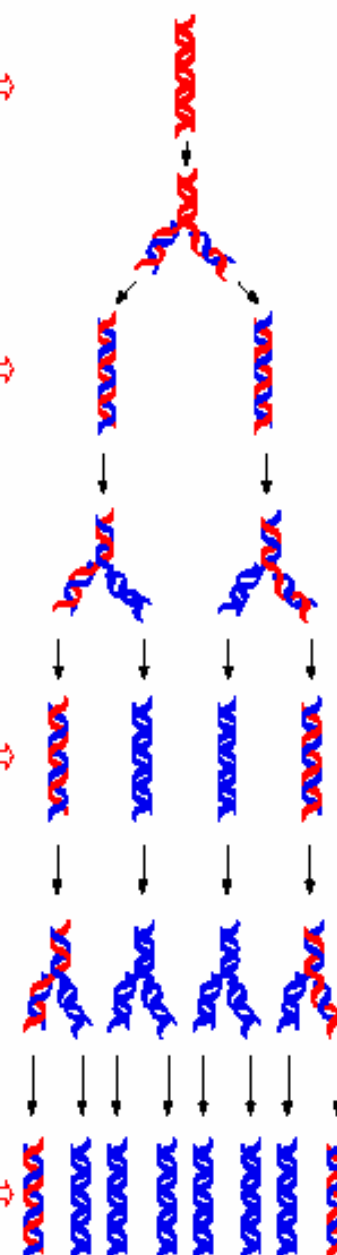
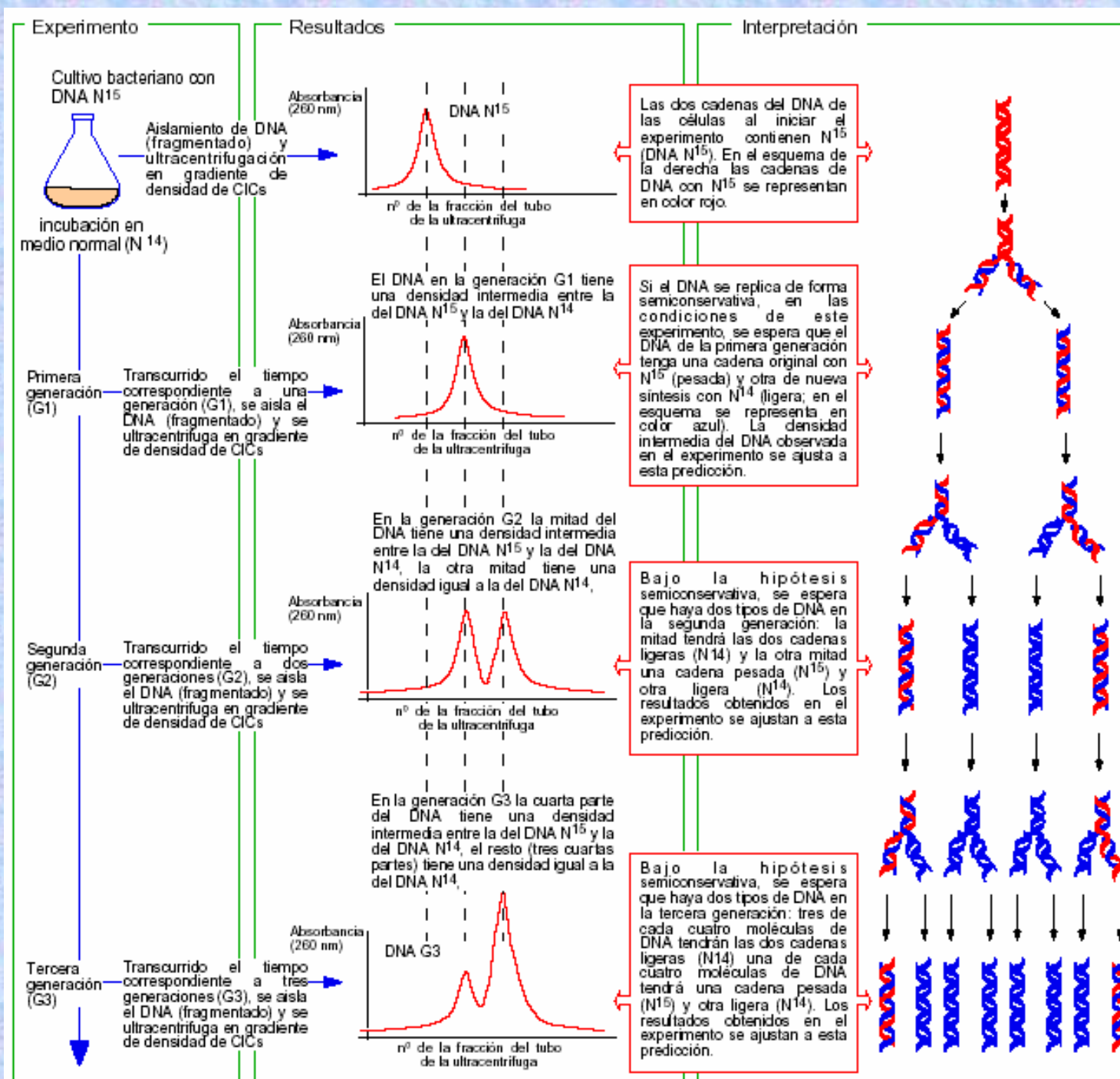
Cultivaron a bacteria *Escherichia coli* nun medio con nitróxeno pesado (^{15}N nitróxeno) que é máis pesado que o isótopo máis común: o ^{14}N nitróxeno).

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





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

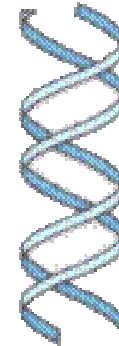


A duplicación do ADN prodúcese de acordo coas seguintes características:

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

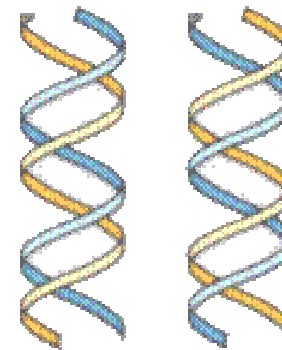
Replicación semiconservativa

Hélice orixinal
de ADN

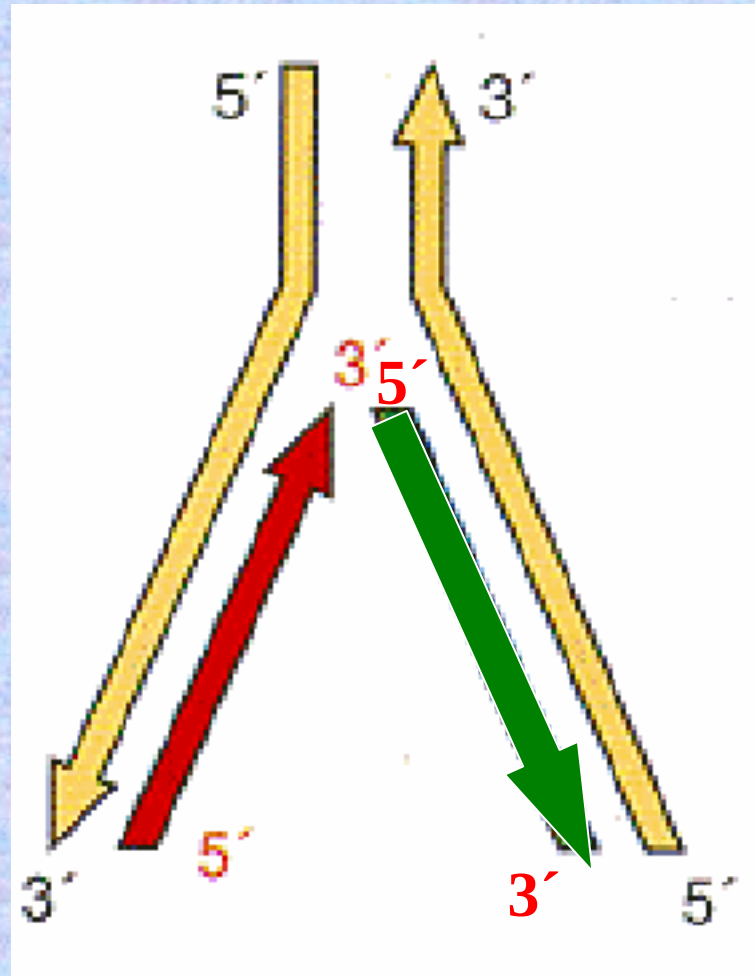


Hélices de ADN logo dun
ciclo de replicación

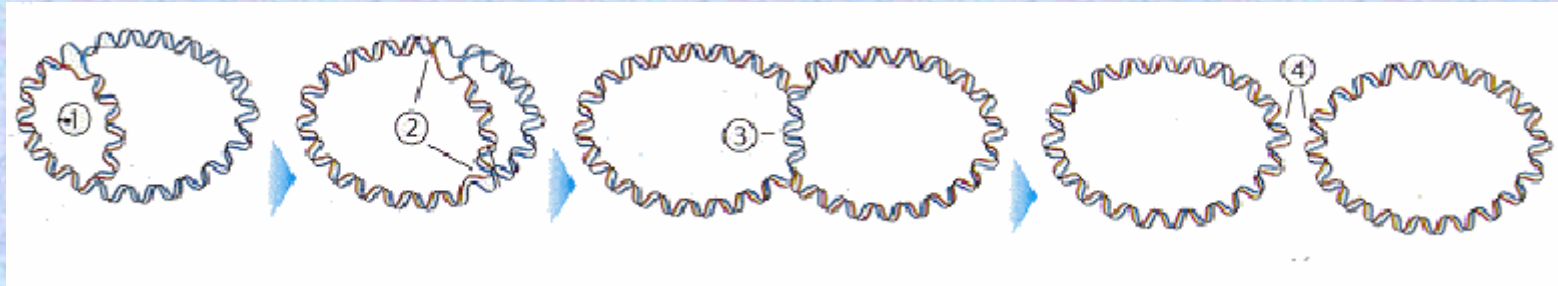
1



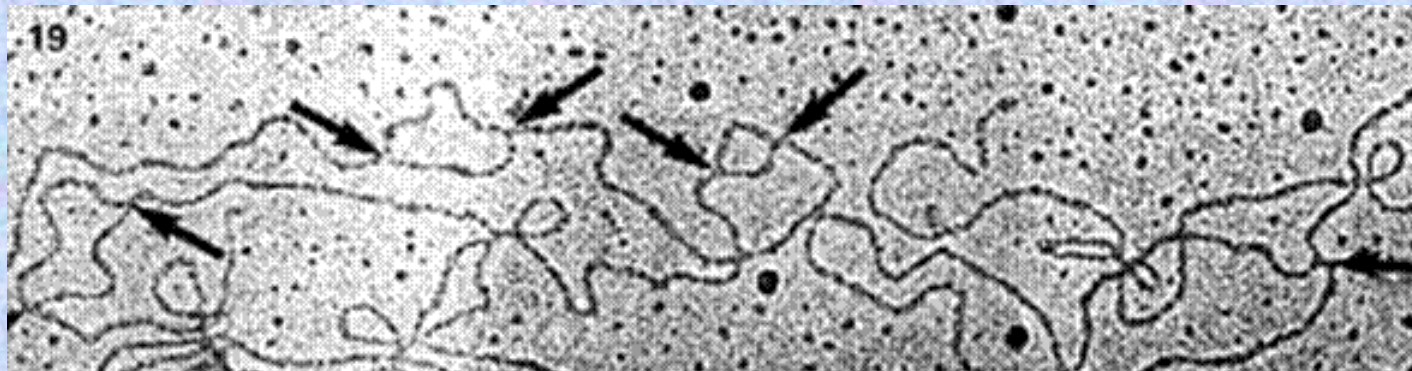
❑ **Bidireccional:** a partir dun punto dado do cromosoma, a replicación progresa en dúas direccións.



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

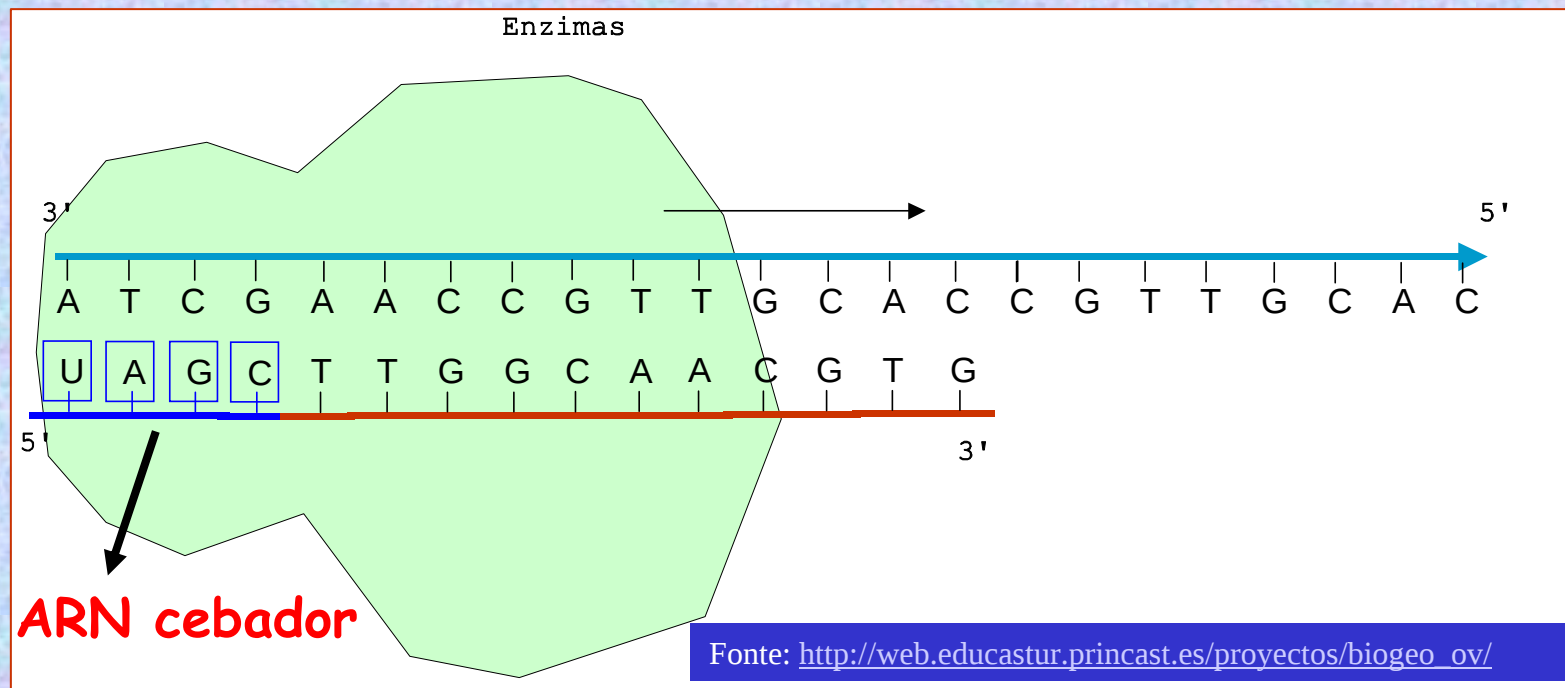


Replicación en procariotas.



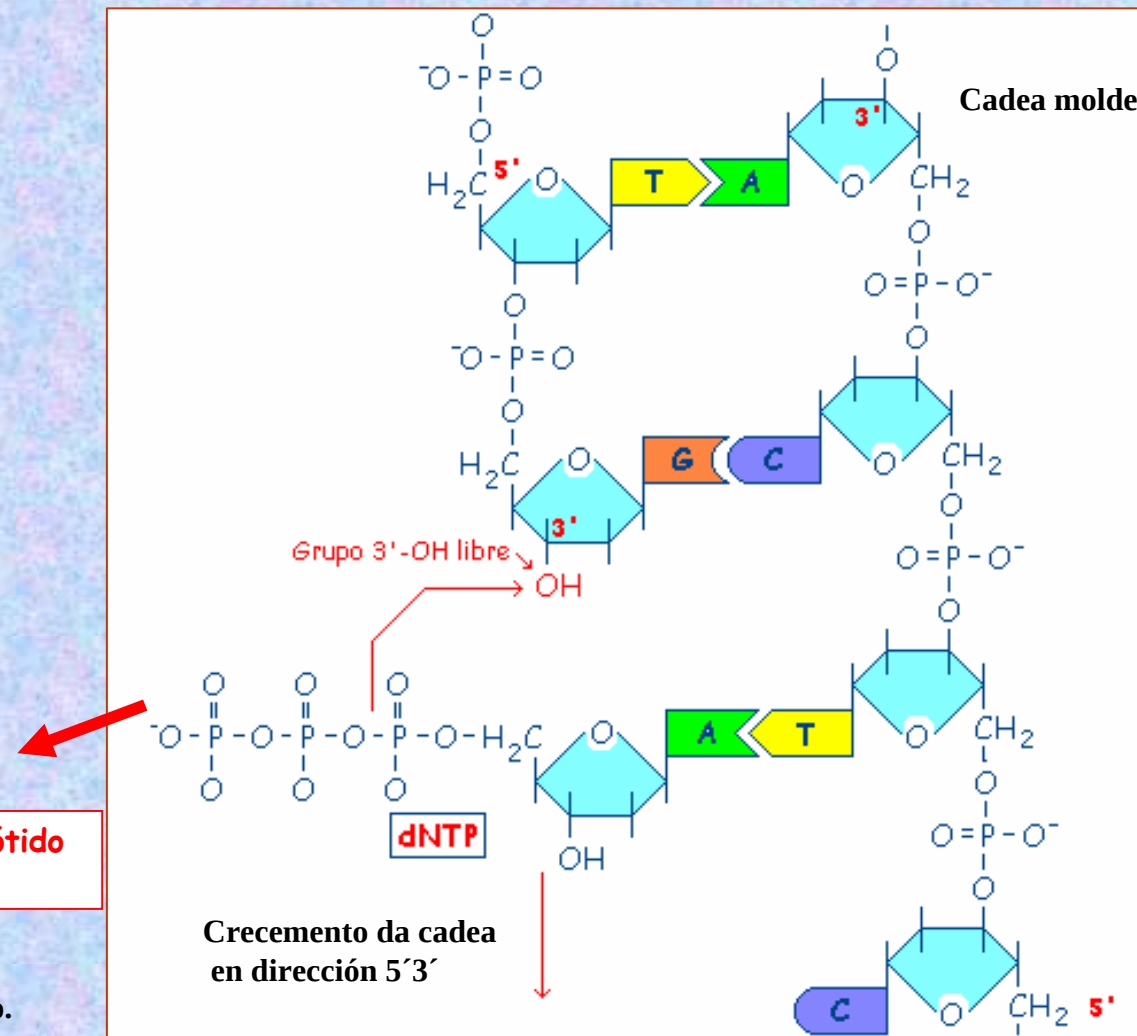
Replicación en eucariotas. As frechas indican os extremos dos ollos de replicación.

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

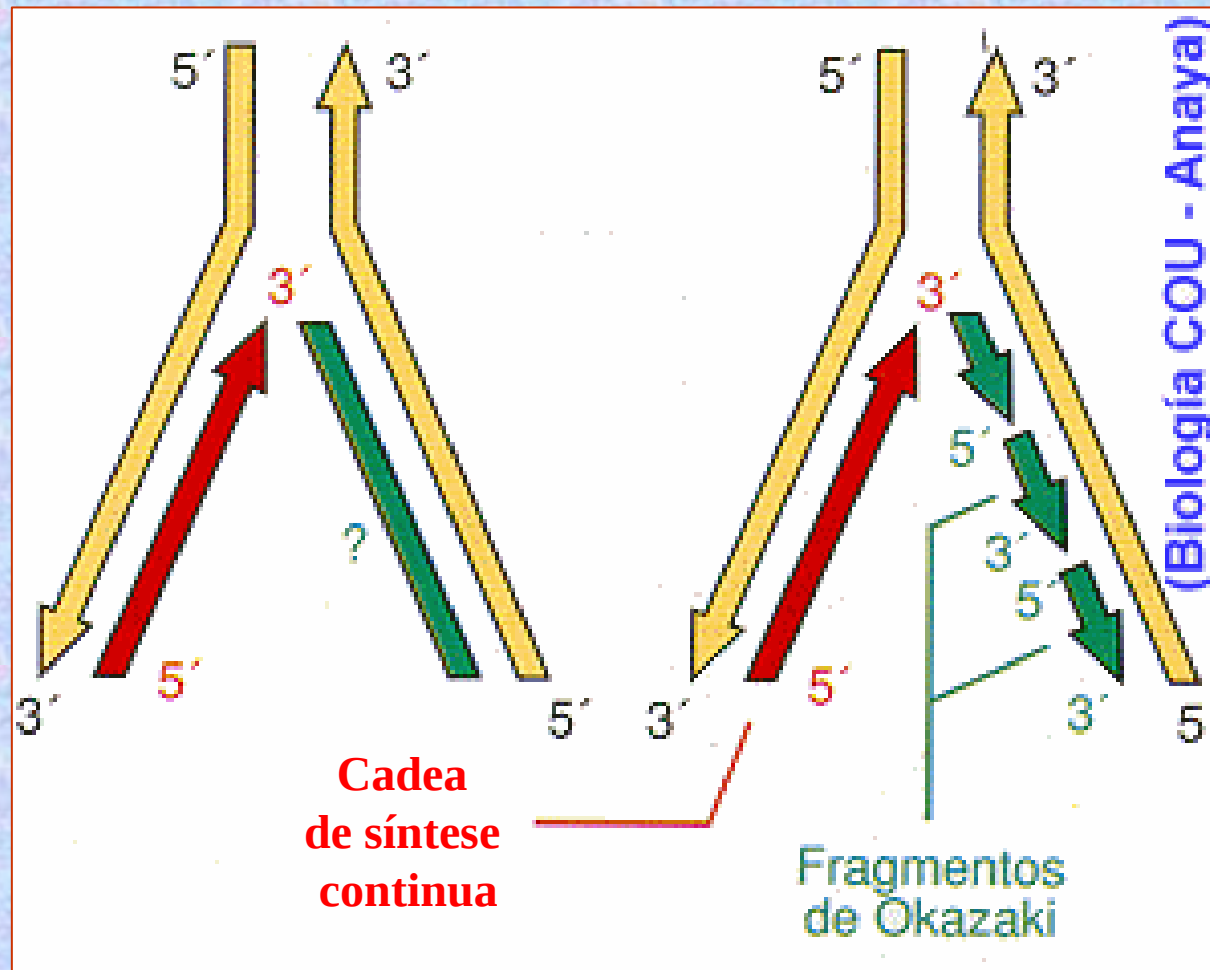


□ A replicación avanza por adición de desoxirribonucleótidos-monofosfato no **sentido 5'→3'**.

Utilízanse desoxirribonucleótidos-trifosfato que aportan a enerxía necesaria para a reacción e elimínanse dous fofatos.



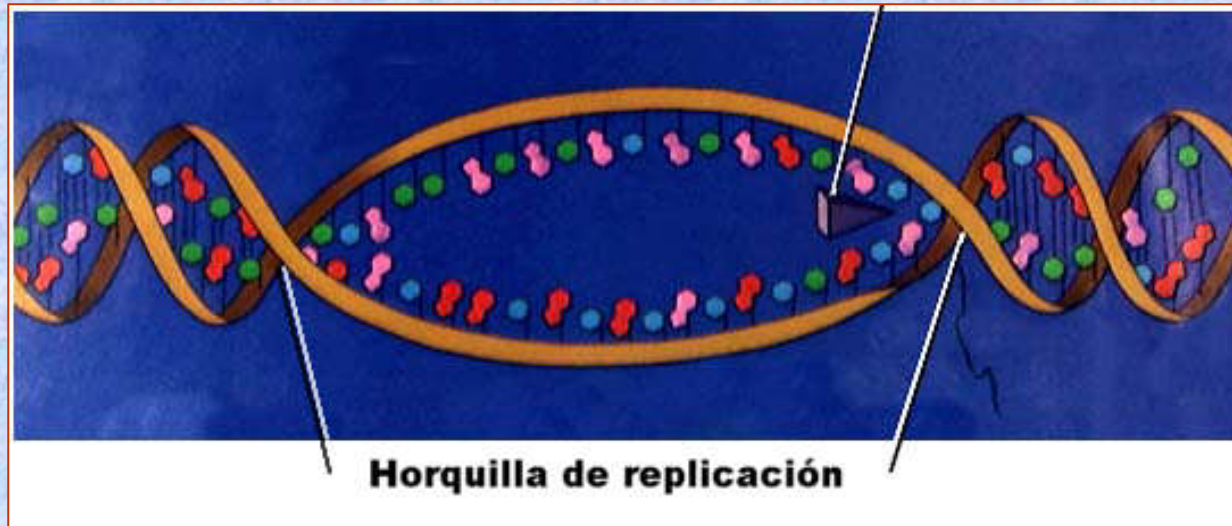
- **Semidiscontinua:** unha cadea replícase de forma continua e a complementaria de modo discontinuo (fragmentos de *Okazaki*).



Elementos que interveñen na replicación do ADN

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

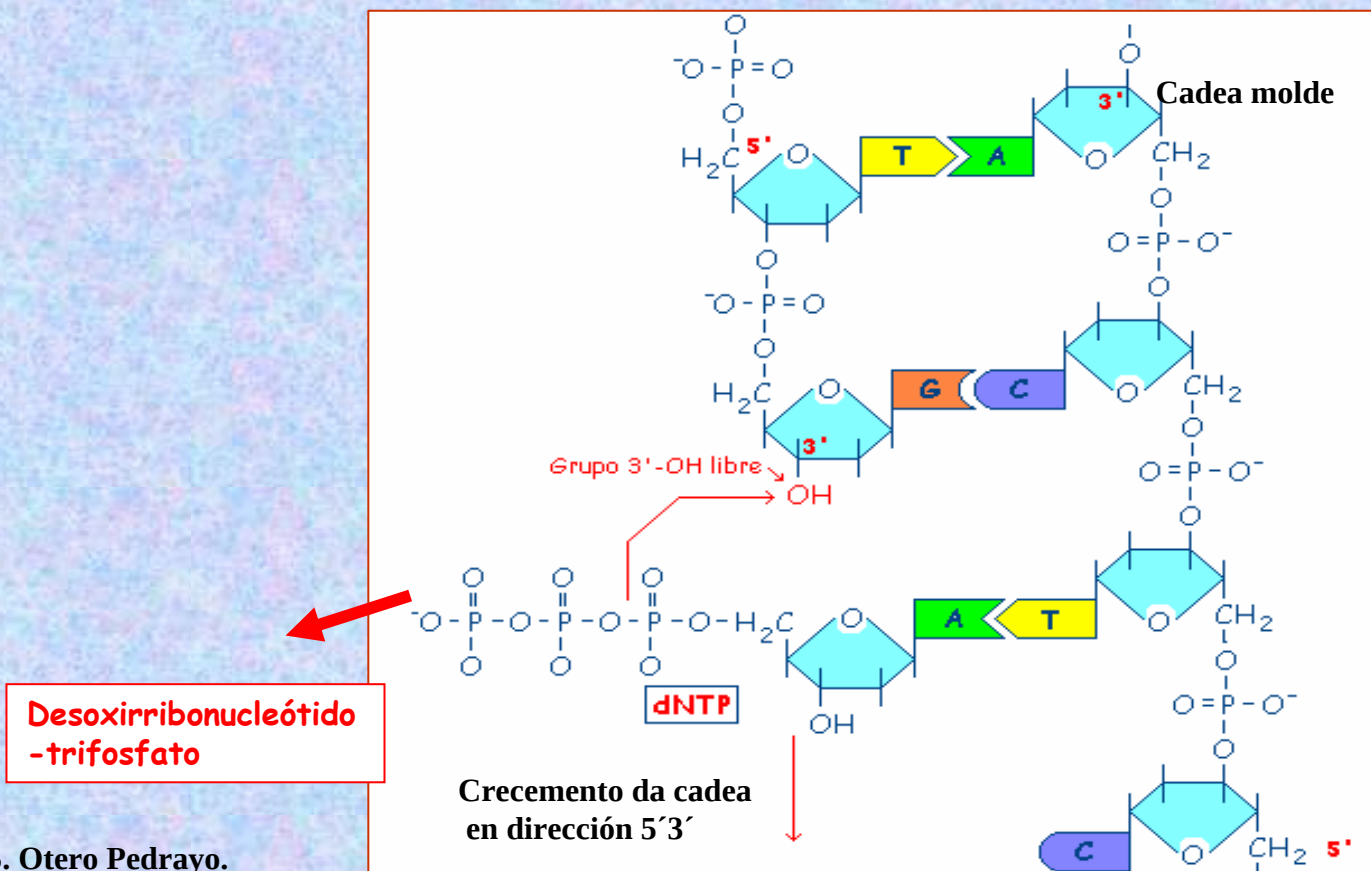
- **ADN orixinal** que servirá de molde para ser copiado.
- **Helicasas**: encimas que desenrolan a cadea de ADN.
- **Topoisomerasas**, separan as cadeas de ADN.
- **Proteínas SSB**, (*single strand-binding*) (estabilizadoras) manteñen as dúas cadeas do ADN separadas.



- **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
- **ADN polimerasas**
- **Desoxirribonucleótidos trifosfato**, que se utilizan como fonte de nucleótidos e ademais aportan enerxía.
- **DNA-ligasa:** une fragmentos de DNA.

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

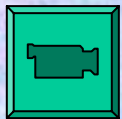
- **ADNs-polimerasa:** catalizan a formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos e van engadindo o nucleótido complementario ó da cadea molde.
- Repara erros da síntese do ADN.
- Completa con desoxirribonucleótidos o oco resultante ó eliminar o ARN cebador.



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:

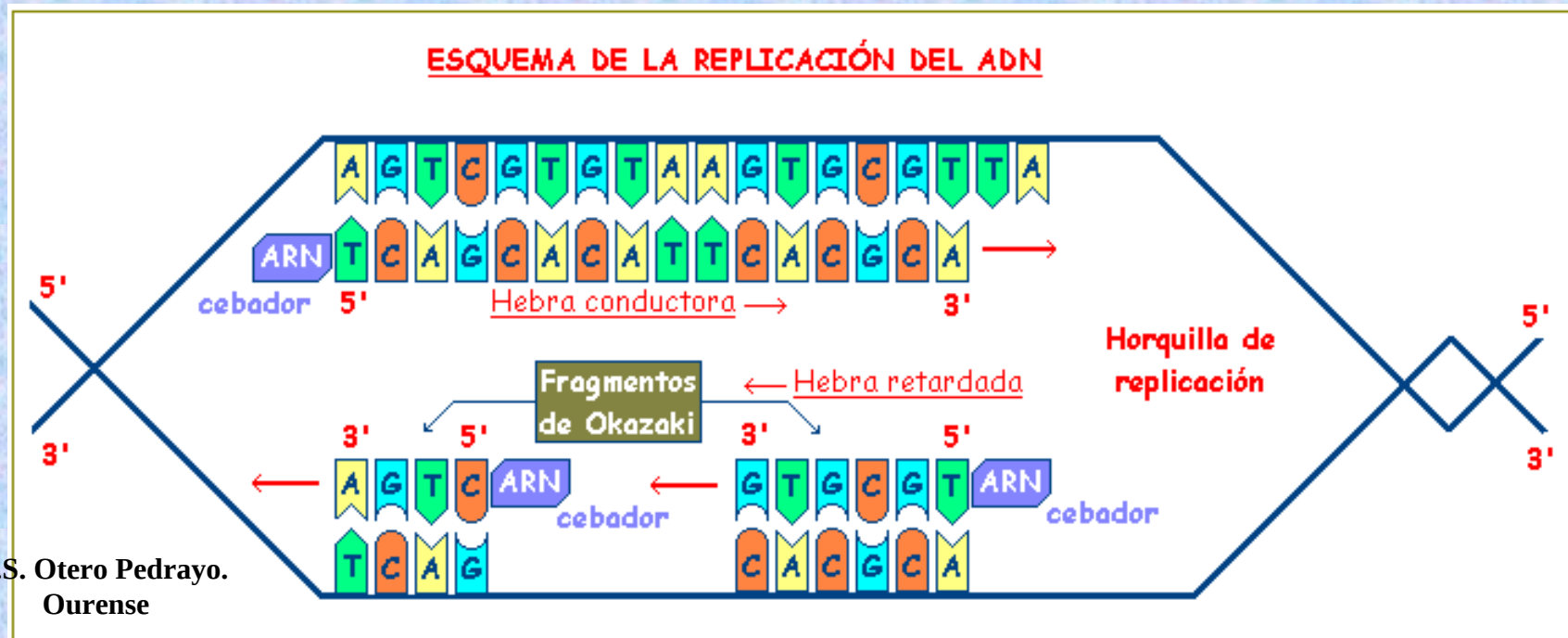
1ª etapa: a dobre hélice desenrólese e ábrese, no punto ori-c (orixe da replicación).

- Por acción das helicasa, topoisomérasas e as proteínas SSB, o ADN desenrólese 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.

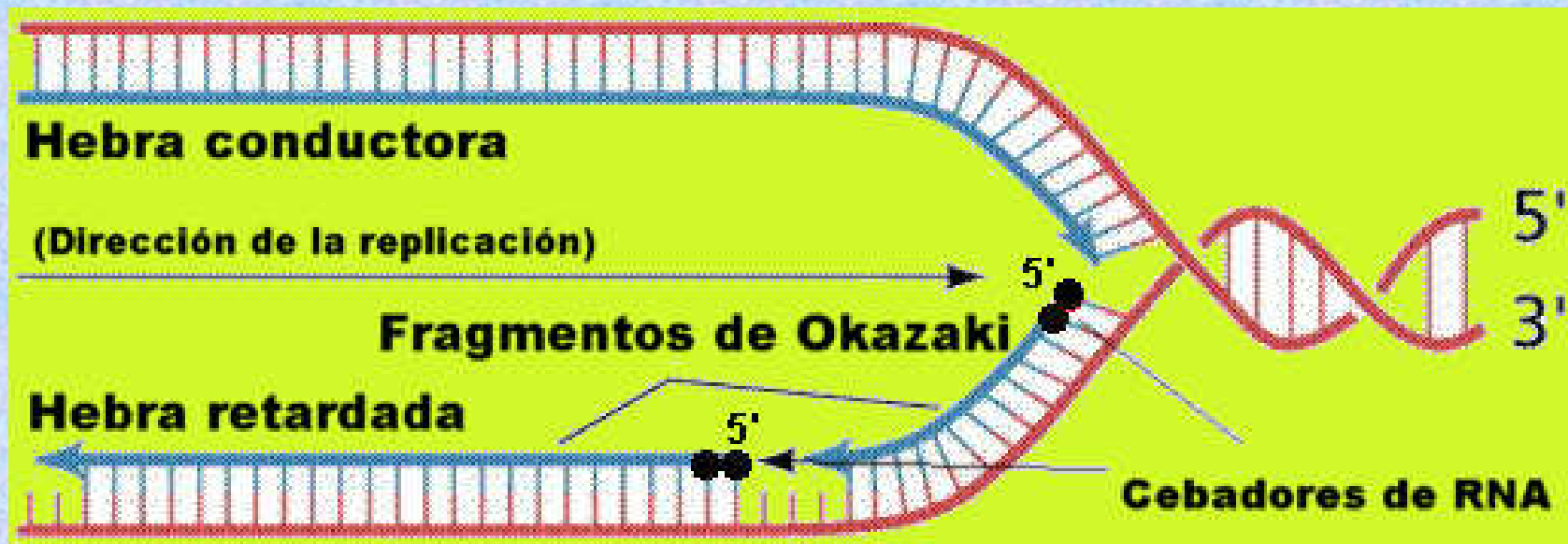
- A ADN polimerasa é incapaz de iniciar a síntese de ADN, necesita un cebador (ARN) que é sintetizado por un ARN polimerasa (primasa). A ARN-polimerasa fabrica pequenos fragmentos de RNA complementarios do ADN orixinal. Son os chamados "primers" ou cebadores, duns 10 nucleótidos, ós que se engadirán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

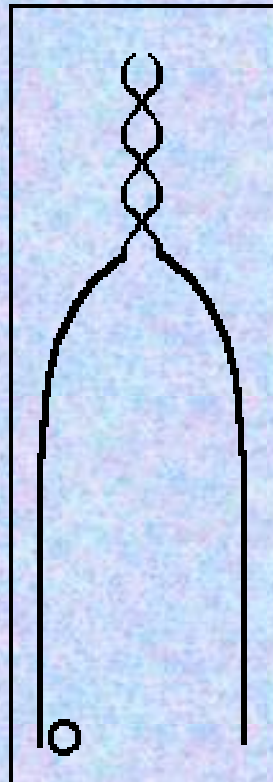
- A medida que se van sintetizando as cadeas e unindo os fragmentos orixínase a dobre hélice, de forma que ó finalizar o proceso libéranse dous moléculas idénticas de DNA, cunha cadea vella e outra nova.



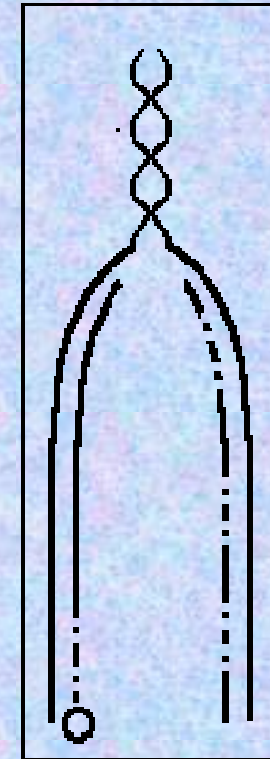
O mecanismo de replicación confirma que o ADN molde autoduplícase exactamente, formando dúas novas moléculas con idéntica información xenética.



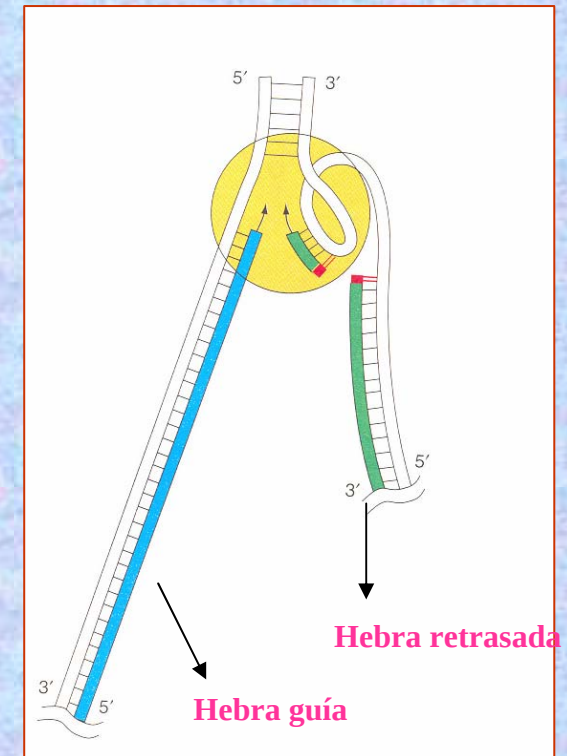
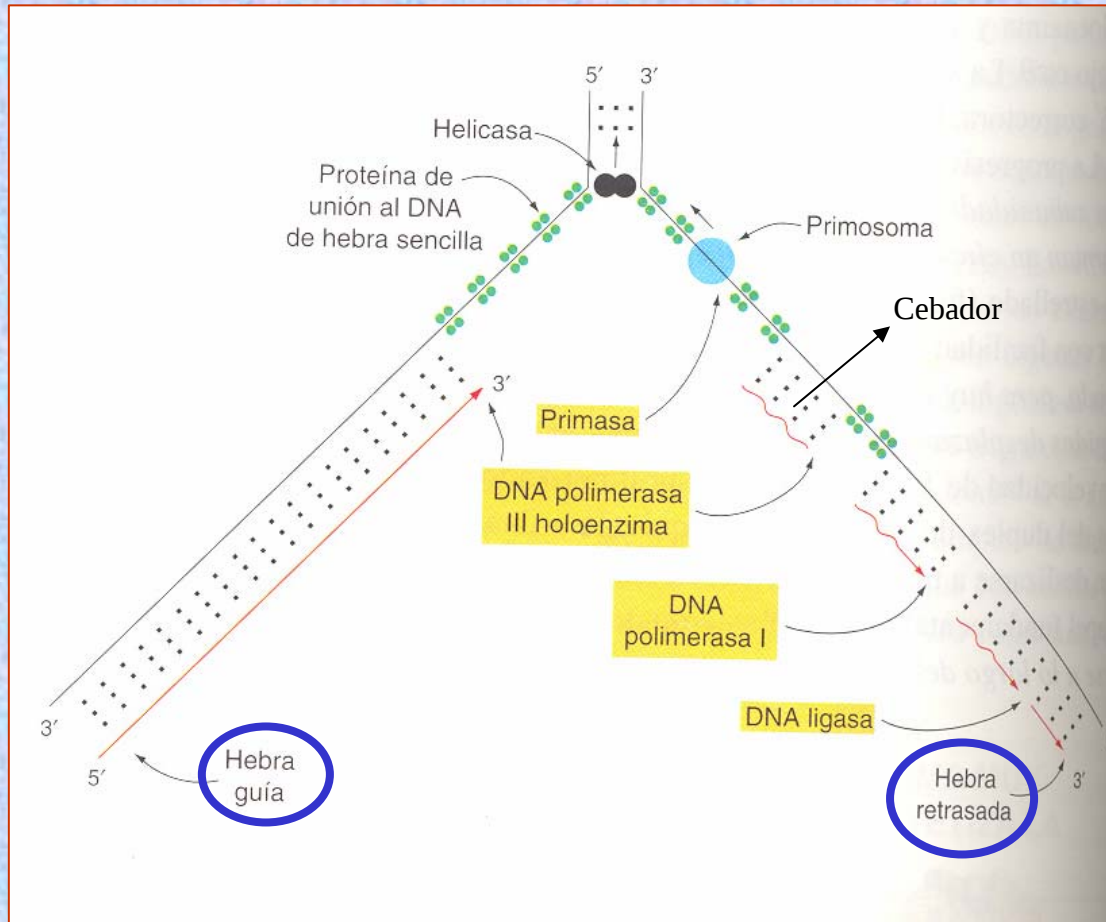
**Formación dunha
horquilla de
replicación**



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



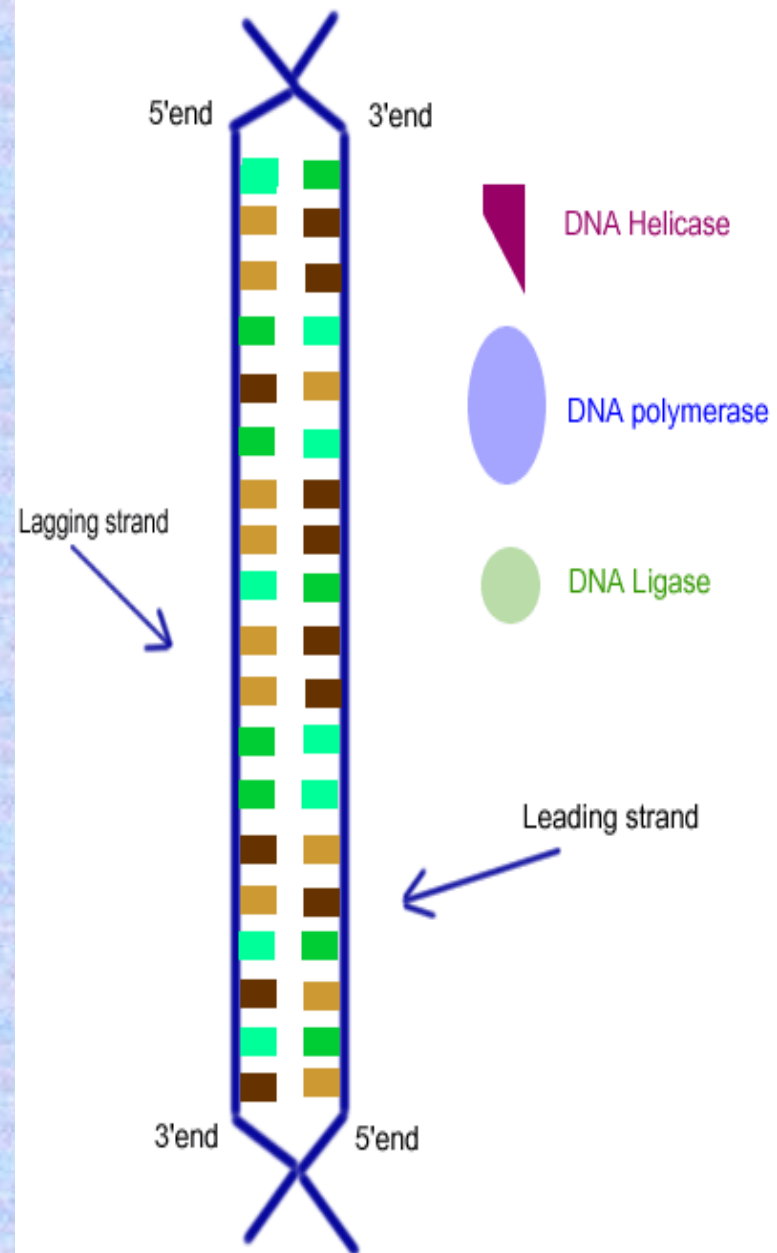
**Unión de todos os
fragmentos pola
DNA-ligasa**

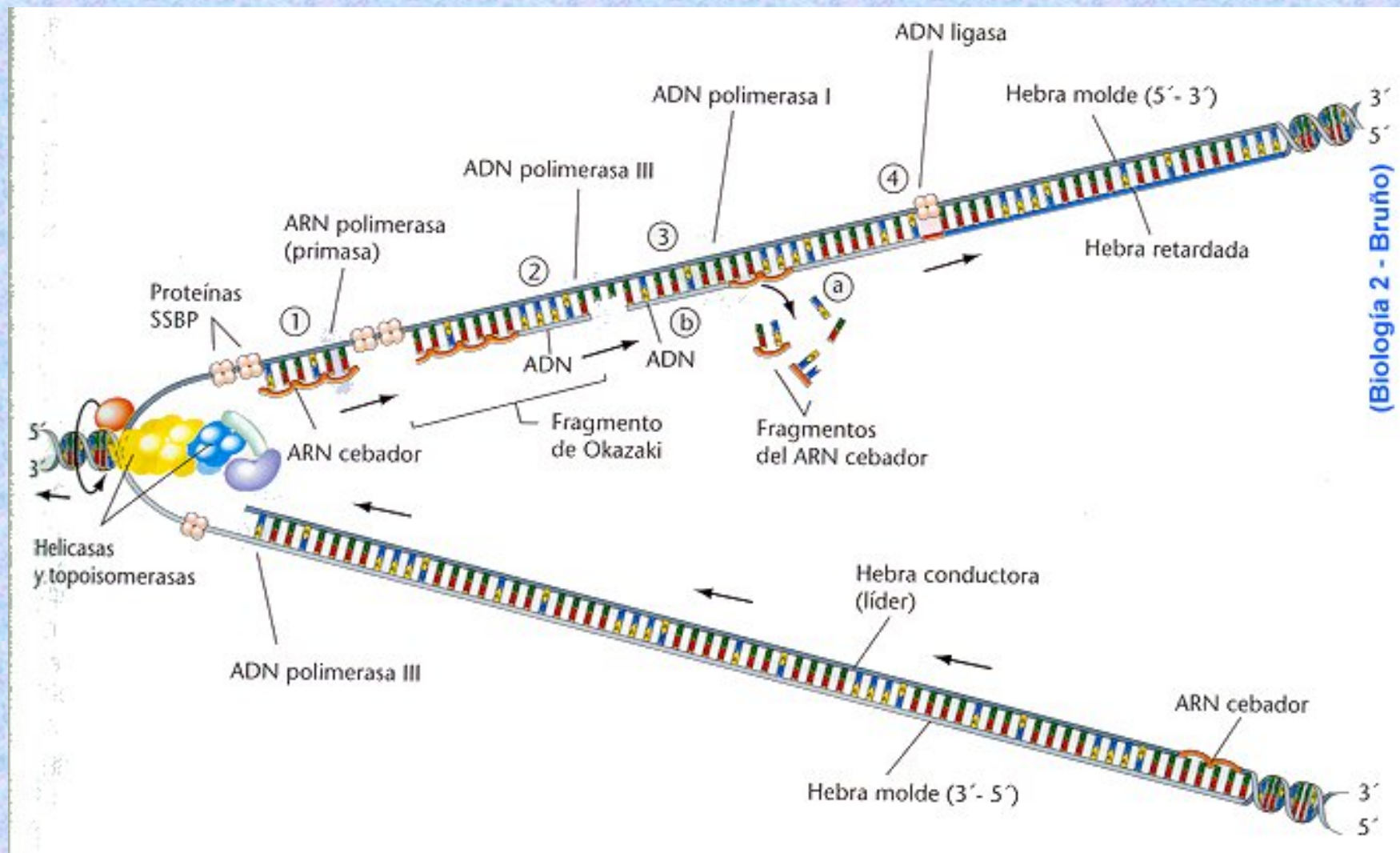


Horquilla de replicación en *E. coli*



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



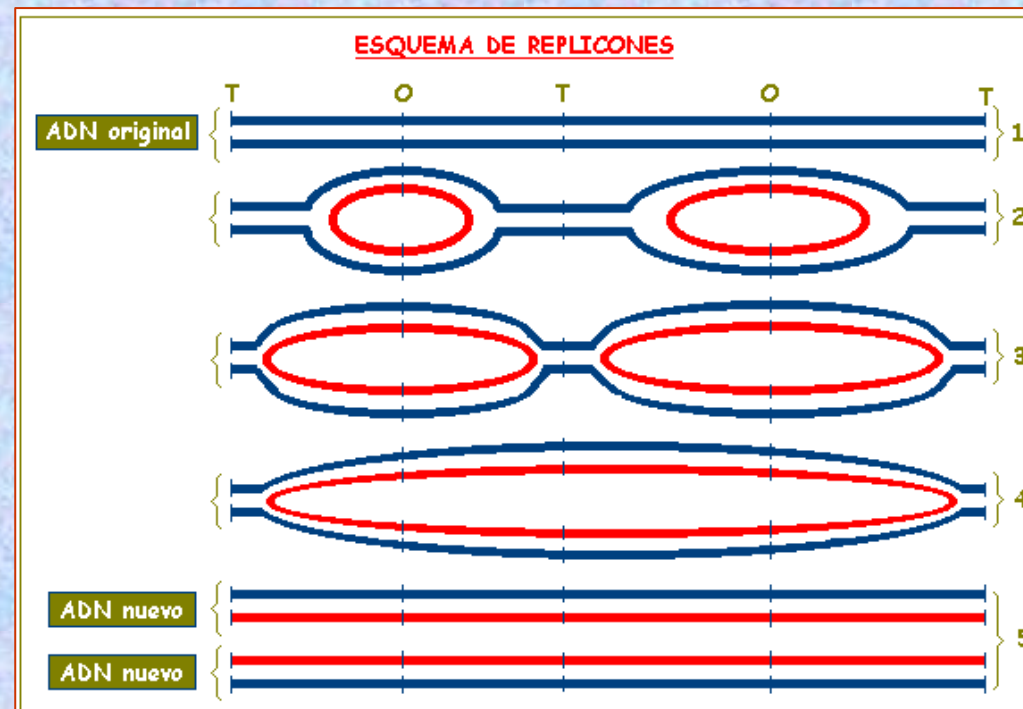


(Biología 2 - Bruño)

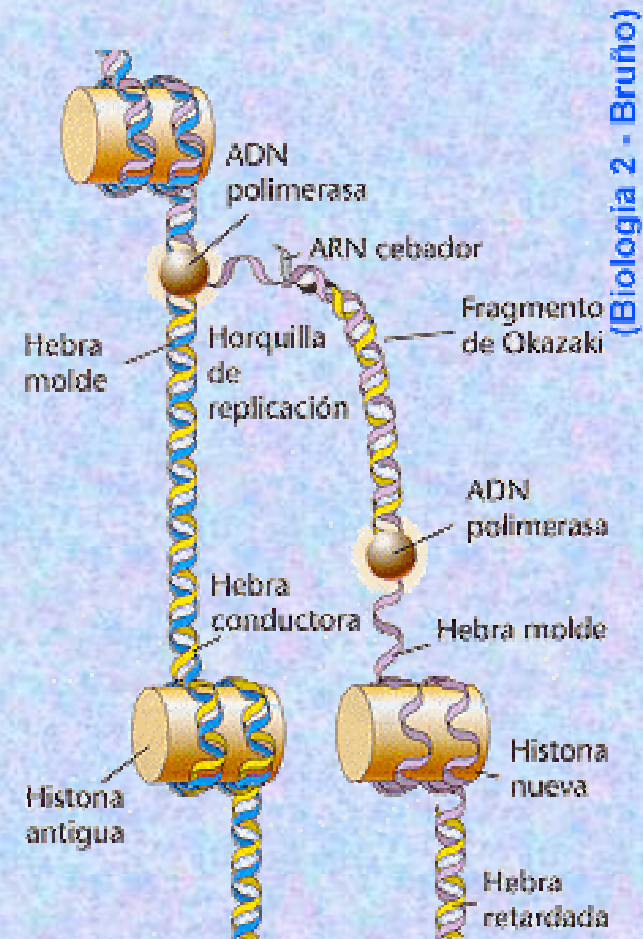
DUPLICACIÓN DO ADN EN EUKARIOTES

Segue o mesmo esquema básico para o mecanismo, aínda que ofrece algunhas diferenzas 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).



- Interven en 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.

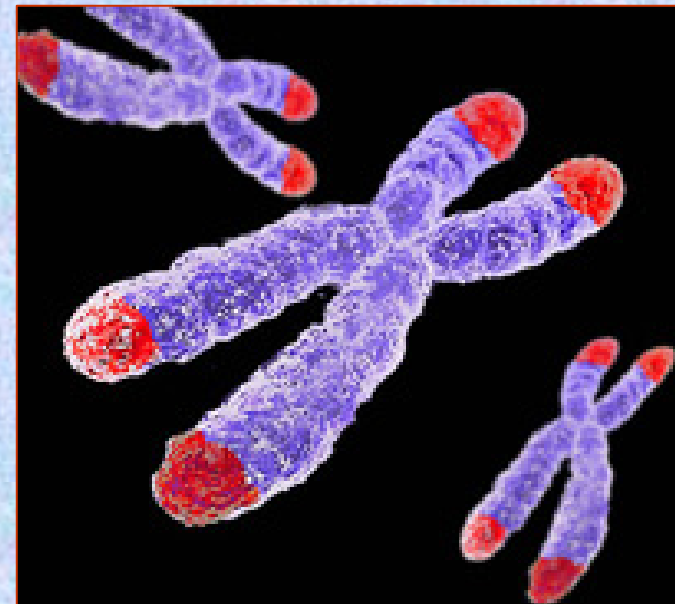


(Biología 2 - Bruño)

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

5 '... ..TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG..... 3 '
3 '... ..AATCCC AATCCC AATCCC AATCCC A..... 5 '

Nos eucariotas a replicación nos telómeros non poden completarse porque despois de eliminar o último ARN cebador da cadea retardada, a ADN polimerasa non pode encher o oco, xa que é incapaz de sintetizar en sentido 3'5'. Por iso o telómero vaise acortando a medida que as células se dividen. Este fenómeno está asociado ao envellecemento e morte celular.



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.*