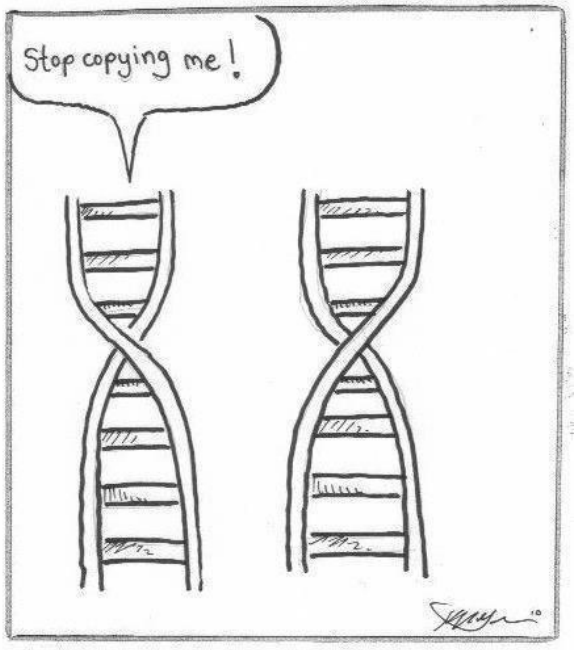
Colegio de
San Francisco de Paula

Tema 2. Ácido nucleicos

2.1 Replicación del ADN DP/PAU

Germán Tenorio
Biología NS-Diploma BI

International Baccalaureate



Idea Fundamental: La estructura del ADN se adapta de forma ideal a su función, permitiendo que la información genética que contiene sea copiada de forma precisa.

Programación DP/PAU

2.7 Replicación, transcripción y traducción del ADN

Naturaleza de las ciencias:

Obtención de pruebas a favor de las teorías científicas: Meselson y Stahl lograron pruebas a favor de la replicación semiconservativa del ADN. (1.8)

Comprensión:

- La replicación del ADN es semiconservativa y depende del apareamiento de bases complementarias.
- La helicasa desenrolla la doble hélice y separada las dos cadenas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno.
- La ADN polimerasa une entre sí los nucleótidos para formar una nueva cadena, usando para ello la cadena preexistente como una plantilla.
- Las ADN polimerasas solo pueden añadir nucleótidos al extremo 3′ de un cebador.

Aplicaciones y habilidades:

- Aplicación: Uso de Taq ADN polimerasa para producir múltiples copias de ADN rápidamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Habilidad: Análisis de los resultados de Meselson y Stahl para obtener respaldo a favor de la teoría de la replicación semiconservativa del ADN.
- Aplicación: Uso de nucleótidos que contienen ácido didesoxiribonucleico con el fin de detener la replicación del ADN en la preparación de muestras para la secuenciación de bases.
- Aplicación: En el análisis de ADN se usan repeticiones en tándem.
- Habilidad: Análisis de los resultados del experimento de Hershey y Chase que proporciona pruebas de que el ADN es el material genético.

Comprensión:

- La estructura del ADN sugería un mecanismo para la replicación de ADN.
- La replicación del ADN es continua en la cadena conductora o adelantada y discontinua en la cadena discontinua o retardada.
- La replicación del ADN es llevada a cabo por un complejo sistema de enzimas.
- Algunas regiones del ADN no codifican para la síntesis de proteínas pero tienen otras importantes funciones.

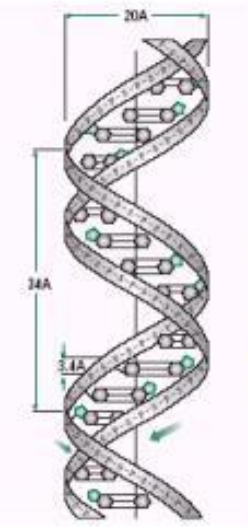
1. Se recomienda que los procesos de replicación del ADN, transcripción y traducción se expliquen tomando como referencia lo que acontece en una célula procariótica sin dejar de resaltar la compartimentación asociada a estos procesos en las células eucarióticas.
2. En el proceso de replicación del ADN se sugiere, al menos, la mención de: las etapas de iniciación, elongación y terminación, origen de replicación, sentido 5´- 3´, cadenas adelantada (conductora) y retrasada (retardada), cebador, fragmento de Okazaki, ADN y ARN polimerasas y ADN ligasa.

Base química de la herencia DP/PAU

- El **ADN** es la **molécula portadora de la información genética** gracias a que **cumple cuatro condiciones imprescindibles**:

  1. Debe poder contener cualquier tipo de información biológica. Al ser una macromolécula formada por cuatro tipos de nucleótidos y al tener un gen miles de pares de nucleótidos, las combinaciones son casi infinitas.

IMAGEN: www.livescience.com



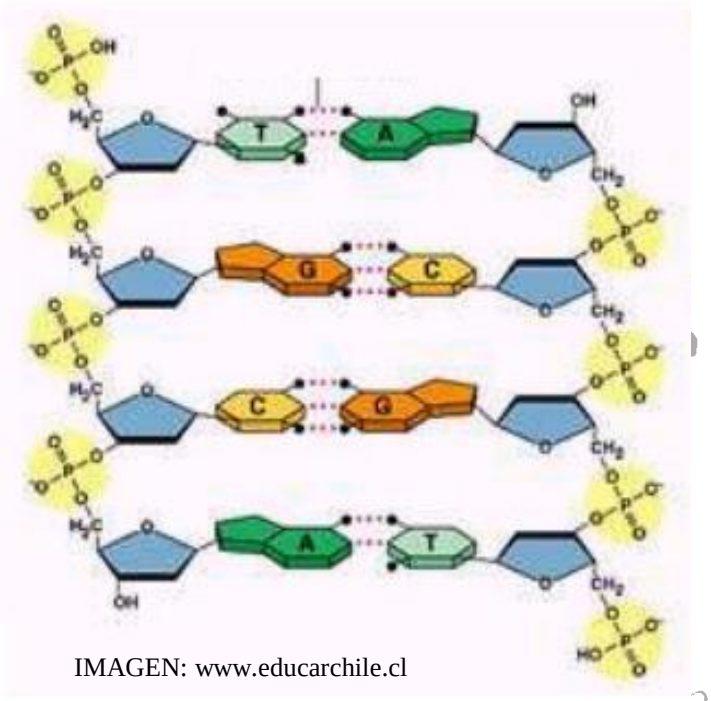


IMAGEN: www.educarchile.cl

Base química de la herencia DP/PAU

2. Debe ser resistente a las alteraciones (mutaciones). Si por cualquier razón se coloca un nucleótido incorrecto, se aparea inadecuadamente con el complementario, por lo que la doble hélice queda alterda. La célula posee mecanismos para reconocer el error, eliminar el nucleótido incorrecto y sustituirlo por el correcto. No obstante, la posibilidad de mutación no debe ser nula con objeto de promover la evolución.

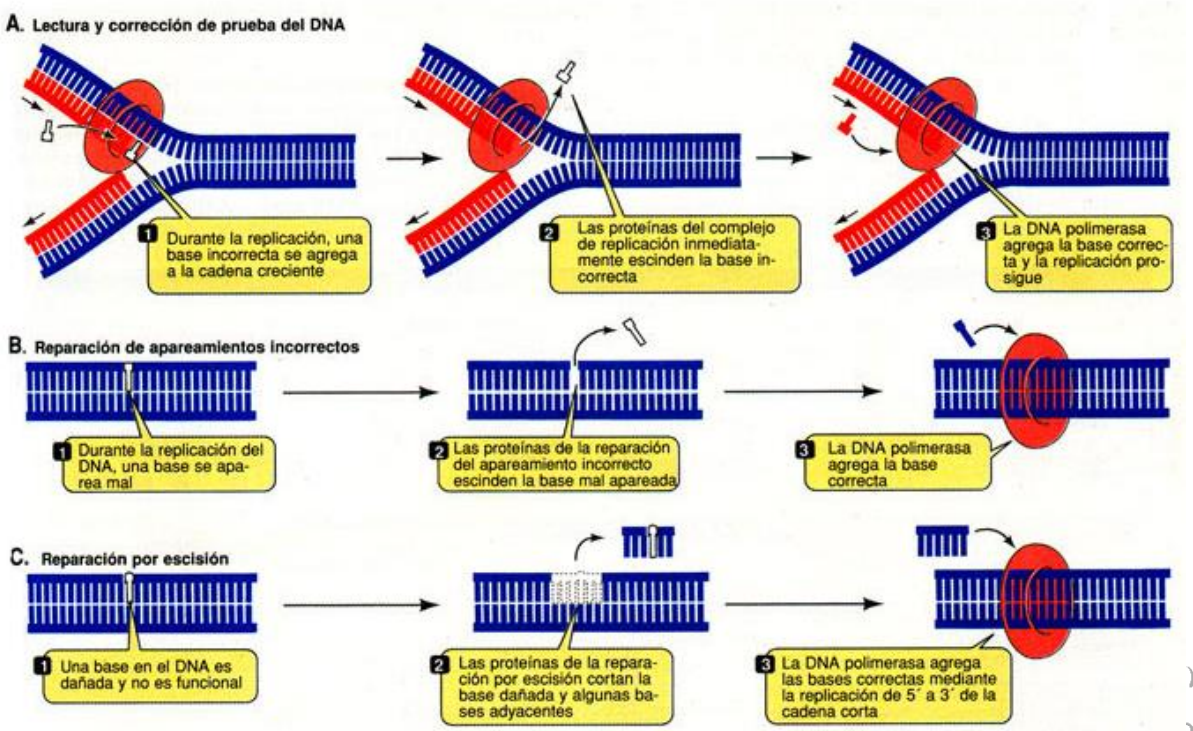


IMAGEN: cuadernodeanamartinezcollado.blogspot.com

Base química de la herencia DP/PAU

3. Duplicación. Las células hijas reciben la misma información que la progenitora. Para esto, basta con que se separen las dos cadenas de la hélice y se sintetice, junto a cada una, la complementaria.

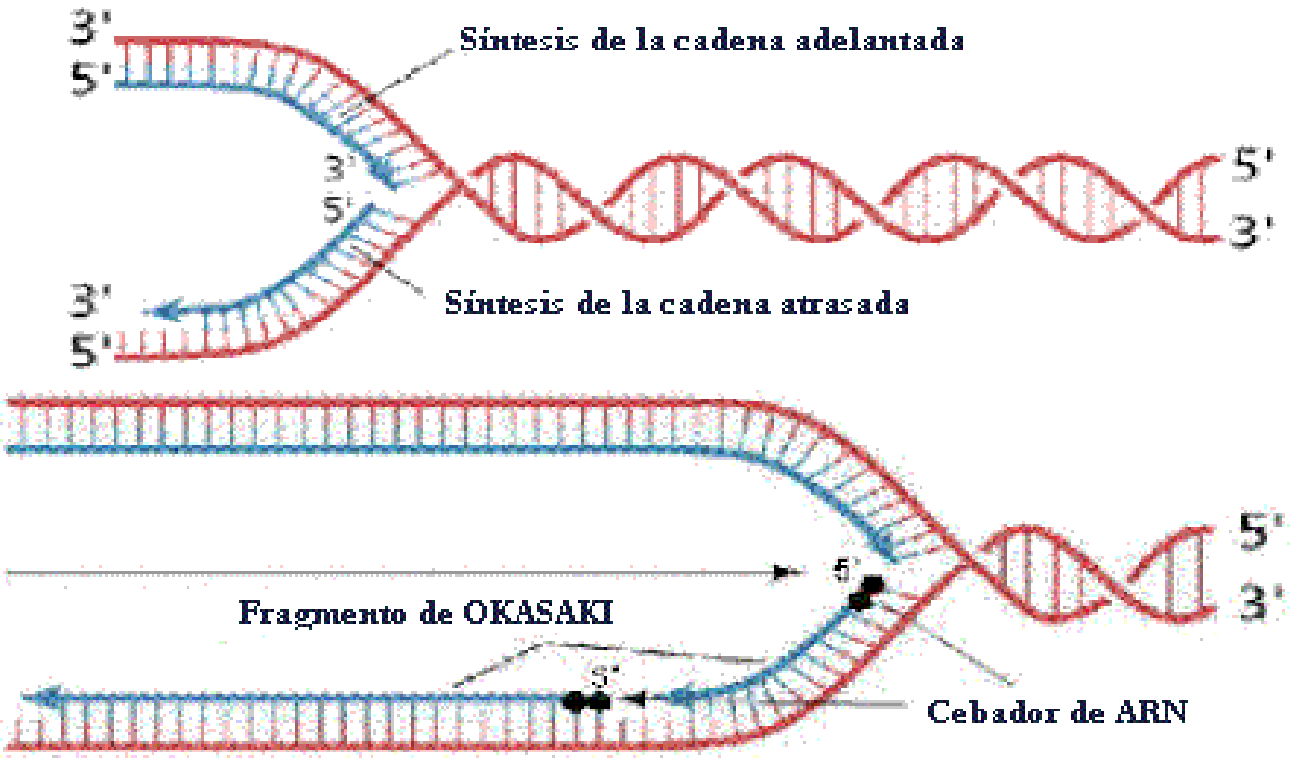
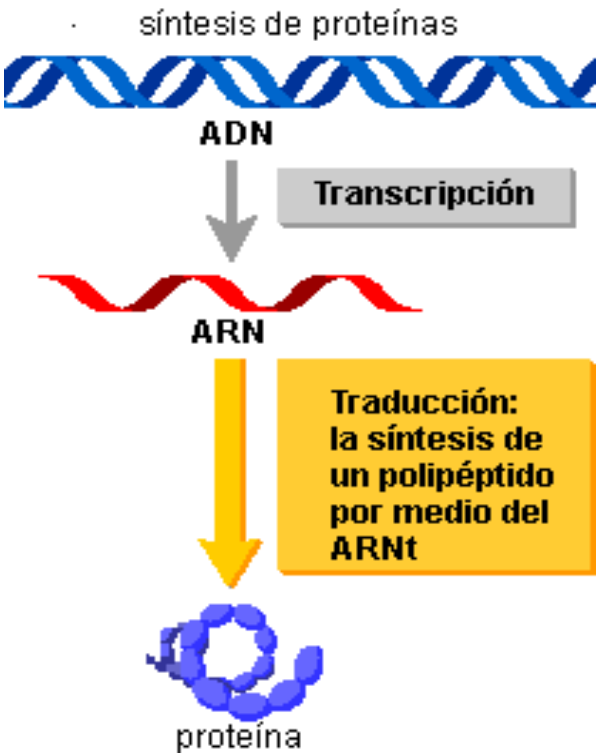


IMAGEN: www.lookfordiagnosis.com

Base química de la herencia DP/PAU

4. Transcripción de la información. El obligado emparejamiento de nucleótidos complementarios permite a la célula copiar en un ARN mensajero la secuencia complementaria de una de las hebras. Esta secuencia complementaria puede ser luego **traducida** en forma de proteína, según las normas del código genético.



Primera base	Segunda base: U	Segunda base: C	Segunda base: A	Segunda base: G	Tercera base
U	UUU, UUC — Fen UUA, UUG — Leu	UCU, UCC, UCA, UCG — Ser	UAU, UAC — Tir UAA — Alto UAG — Alto	UGU, UGC — Cis UGA — Alto UGG — Trp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG — Leu	CCU, CCC, CCA, CCG — Pro	CAU, CAC — His CAA, CAG — Glu	CGU, CGC, CGA, CGG — Arg	U C A G
A	AUU, AUC, AUA — Ile AUG — Met inicio	ACU, ACC, ACA, ACG — Tre	AAU, AAC — Asn AAA, AAG — Lys	AGU, AGC — Ser AGA, AGG — Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG — Val	GCU, GCC, GCA, GCG — Ala	GAU, GAC — Asp GAA, GAG — Glu	GGU, GGC, GGA, GGG — Gli	U C A G

Flujo de la información genética DP/PAU

- El ADN porta la información genética, es decir, **nuestros genes proporcionan la información**, pero son **las proteínas las que realizan el trabajo**.
- ¿Cómo se expresa la información genética contenida en el ADN? ¿Cómo pasa la información desde el ADN hasta las proteínas que la ejecutan?

IMAGEN: www.biogeo.iespedrojimenezmontoya.es

Este esquema fue considerado durante muchos años el "**dogma central de la biología molecular**".

Redefinición del dogma central de la Biología Molecular[DP/PAU]

- Ciertos virus (retrovirus) pueden realizar la transcripción al revés (**retrotranscripción**) ya que poseen una enzima llamada **transcriptasa inversa** o **retrotranscriptasa**, que fabrica ADN complementario a un ARN molde.

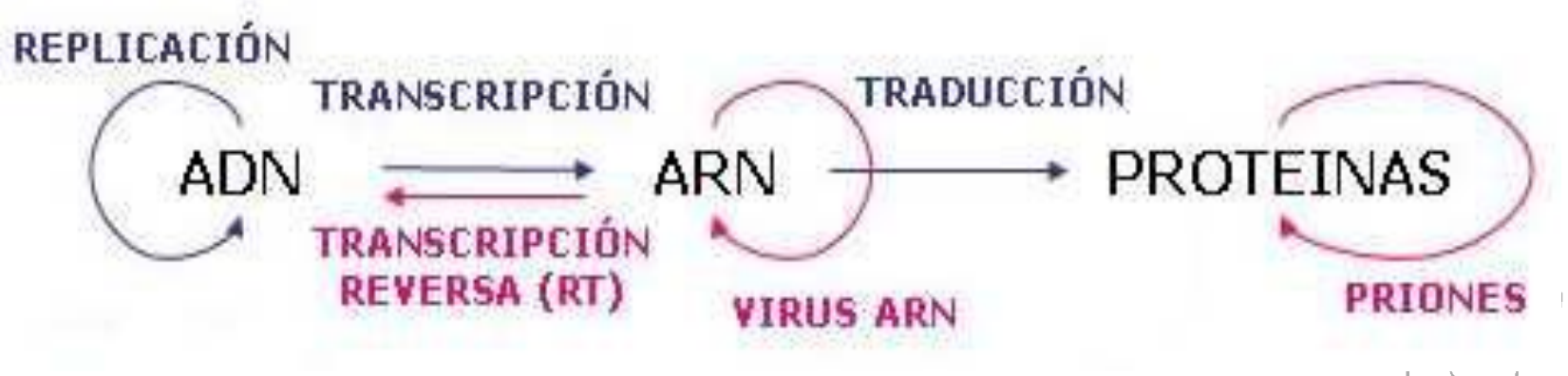


IMAGEN: www.aportes.educ.ar

- Otros virus (virus de ARN) son capaces de **replicar el ARN**.
- Ciertas proteínas (**priones**) tienen la capacidad de autoperpetuarse convirtiendo las normales en defectuosas.

Demostración del ADN como material genético DP/PAU

- Aunque actualmente se sabe con certeza que el ADN porta la información genética, esto no pudo demostrarse hasta la segunda mitad del siglo XX.
- A finales del siglo XIX los científicos estaban convencidos de que los cromosomas jugaban un papel clave en la herencia, y de que el material hereditario tenía una naturaleza química.
- Como se sabía que los cromosomas estaban formados de tanto proteínas como de ácidos nucleicos, ambos eran firmes candidatos a ser el **material genético**.
- Durante la primera mitad del siglo XX se suponía que eran las proteínas las que portaban la información que determina la herencia, dada la gran variedad de funciones que llevaban a cabo, así como a su especificidad.
- Variedad y especificidad de funciones eran dos requerimientos que se creían indispensables en el material genético.

Timeline of events:

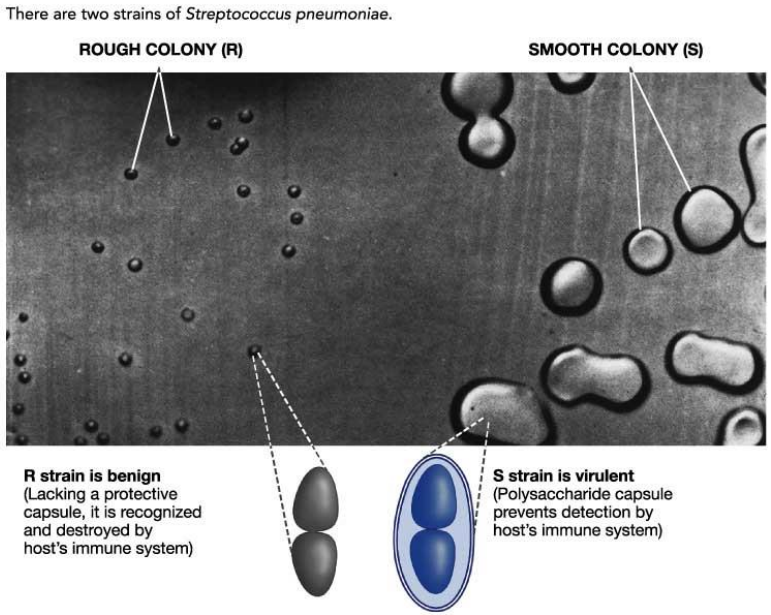
- 1890: Weismann - substance in the cell nuclei controls development.
- 1900: Chromosomes shown to contain hereditary information, later shown to be composed of protein & nucleic acids.
- 1928: Griffith's Transformation Experiment.
- 1944: Avery's Transformation Experiment.
- 1953: Hershey-Chase Bacteriophage Experiment.
- 1956: First demonstration that RNA is viral genetic material.

11

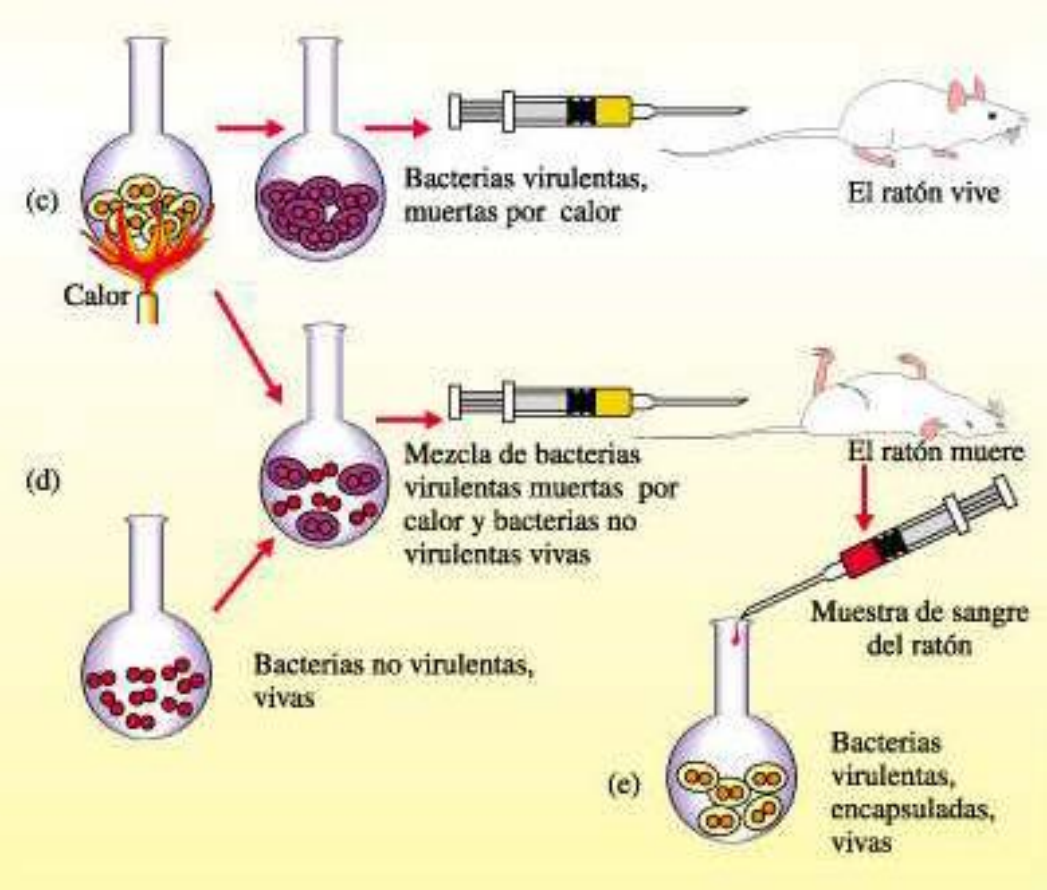
IMAGEN: http://slideplayer.com/slide/6134255/

Demostración del ADN como material genético DP/PAU

- La primera prueba de que los genes estaban formados por ADN procede de los **experimentos de transformación bacteriana** realizados por **Fred Griffit** en 1928.
- Existían dos cepas de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*: Una patogénica encapsulada, denominada S porque que al sembrarla en placa producían colonias lisas, y otra no patogénica sin cápsula, denominada cepa R sin cápsula, que producían colonia rugosas.



Demostración del ADN como material genético DP/PAU

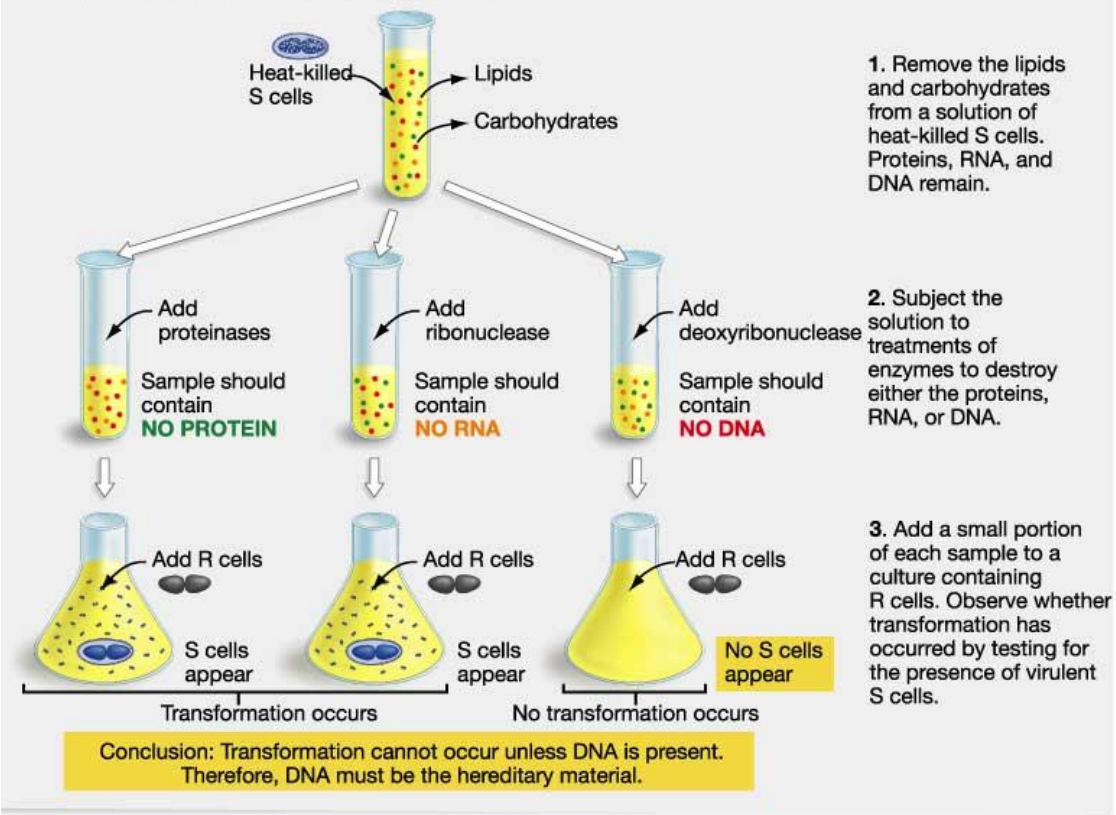


- F. Griffit descubrió que al mezclar bacterias virulentas muertas (S) con no virulentas vivas (R), las últimas se habían **transformado** en S, podían formar cápsula y adquirían patogenicidad.
- La sustancia que pasaba de las bacterias L muertas a las R vivas, y transformaba a ésta última en S, el "**principio transformante**", no pudo aislarse.

Animación 1

Demostración del ADN como material genético DP/PAU

- En **1944 Avery, McLeod y McCarty** identificaron dicho "principio transformante" como ADN.
- El lisado de bacterias S (el contenido bacteriano tras su rotura) lo mezclaron con bacterias R vivas, las cuáles se transformaban en S y mataban a las ratas.
- Comprobaron que de todas las sustancias presentes en el lisado bacteriano (proteínas, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos) sólo el ADN producía dicha transformación.



Web1

IMAGEN: biology.kenyon.edu

HABILIDAD: Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético DP/PAU

- En 1952 **Hershey y Chase realizaron un experimento que proporcionaba pruebas de que el ADN es el material genético.**
- En ese momento se sabía que los fagos (virus que infectan bacterias, como el fago T2) introducían su material genético dentro de las bacterias que infectaban, utilizando su maquinaria molecular para obtener nuevas partículas víricas que eran liberadas al medio.

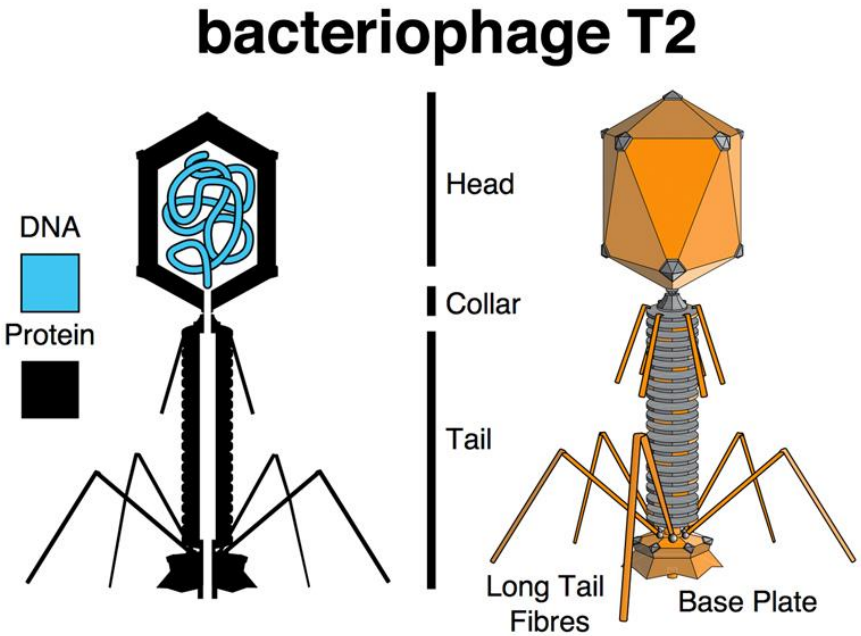


IMAGEN: discoveryandinnovation.com

- Los fagos están formados solo de ADN y proteínas, por lo que el objetivo Hershey y Chase era determinar cuál de estas moléculas era el material genético que los fagos inyectaban en las células hospedadoras.

HABILIDAD: Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético[DP/PAU]

- En un primer experimento, marcaron el ADN de los fagos con el isótopo radiactivo del fósforo (P^{32}), dado que los aminoácidos que forman las proteínas carecen de él.
- Dejaron que los fagos del cultivo infectaran a las bacterias *E. coli* y posteriormente retiraron las cubiertas proteicas de las células infectadas mediante una licuadora y una centrífuga, quedando las bacterias en el fondo del tubo y las cubiertas proteicas en el sobrenadante.

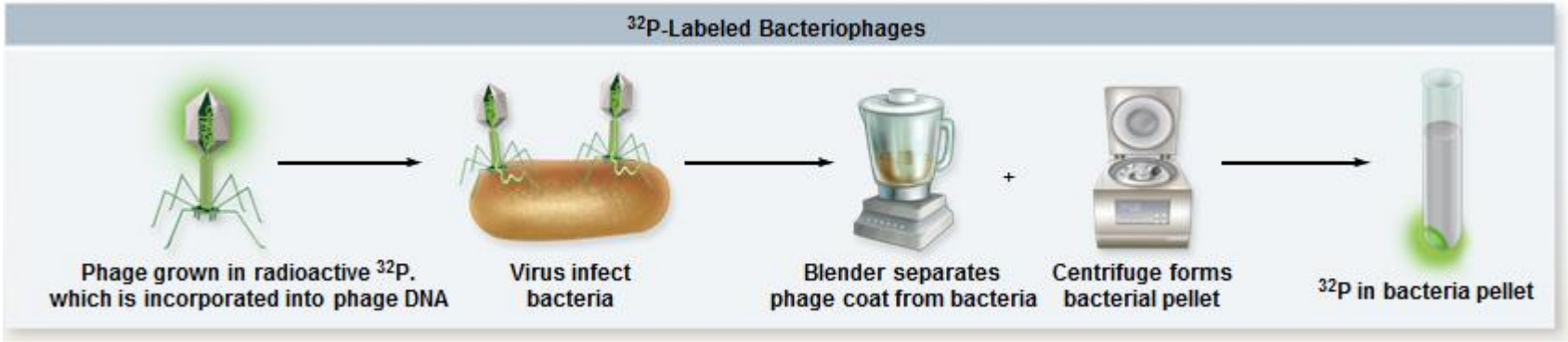


IMAGEN: http://biology-irsc.weebly.com

- Encontraron que el indicador radiactivo era visible sólo en las células bacterianas, y no en las cubiertas proteicas.

HABILIDAD: Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético[DP/PAU]

- En un segundo experimento, marcaron los fagos con el isótopo radiactivo del azufre (S^{35}), que contienen los aminoácidos cisteína y metionina, a diferencia del ADN.
- Tras la separación, encontraron que el indicador estaba presente en las cubiertas proteicas, pero no en las bacterias infectadas.

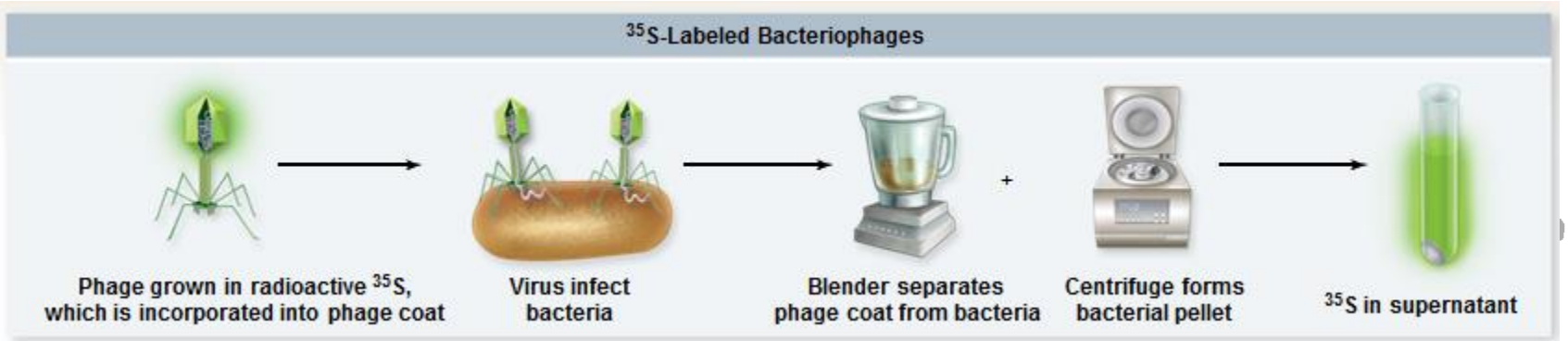


IMAGEN: http://biology-irsc.weebly.com

- Dado que solo el ADN del bacteriófago era introducido en la bacteria y era usado para producir más bacteriófagos, se confirmó que el ADN es el material genético.

Animación2

Conservación de la información genética DP/PAU

- Como ya se ha indicado, la información genética fluye desde el ADN hasta el ARN **(transcripción)** y desde éste a las proteínas **(traducción).**
- Sin embargo, la información genética también debe conservarse, de manera que se transmita de una célula progenitora a la descendencia **(replicación).**
- La **replicación** del ADN consiste en duplicarlo, ya que se hace una copia idéntica de un molde.
- Si una célula va a dividirse por mitosis, cada célula hija debe recibir la misma información genética. Por tanto, la replicación por la que la célula madre duplica su ADN ocurre durante la **fase S**.

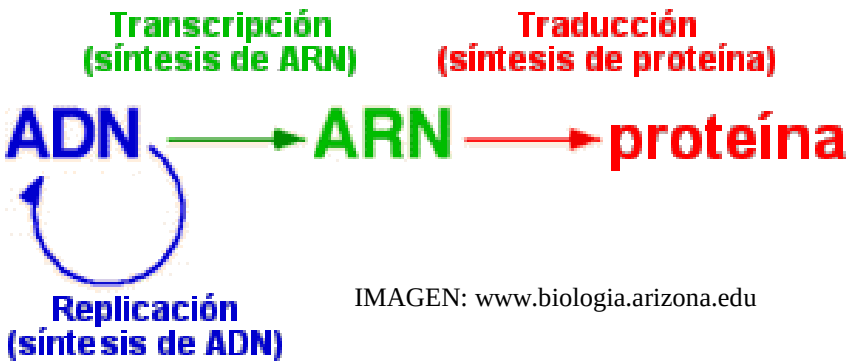


IMAGEN: www.biologia.arizona.edu

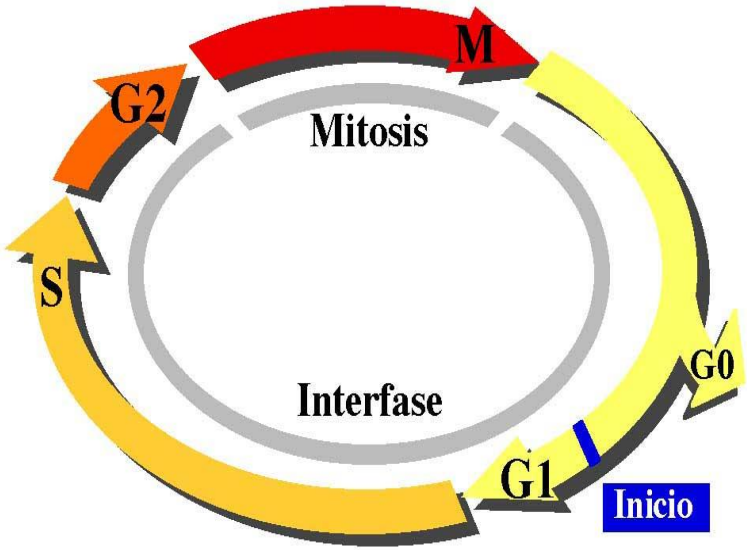
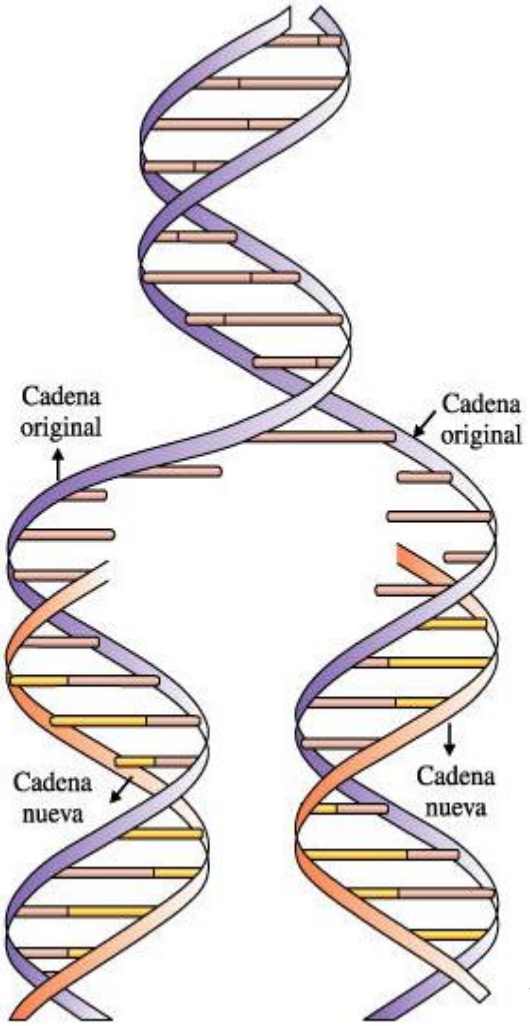


IMAGEN: ciencia.cl

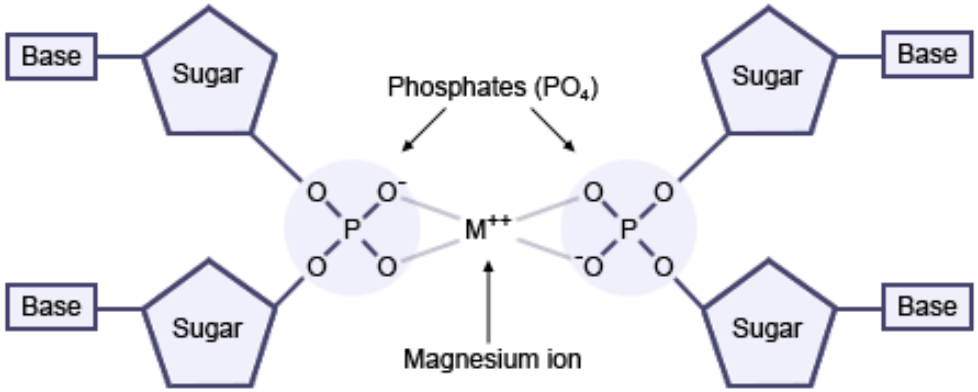
Conservación de la información genética DP/PAU

- Durante la replicación, las dos hebras o filamentos de la doble hélice se separan, sirviendo cada uno de ellos como guía o molde para la creación de una nueva cadena por adición de nucleótidos.
- El resultado es que en la doble hélice de la molécula de ADN de cada célula hija se conserva una cadena original de la célula madre (la cadena molde) mientras que la otra cadena se sintetiza de nuevo.
- La secuencia de bases en una cadena determina la secuencia de bases en la otra cadena, al solo establecerse puentes de hidrógeno entre las bases que son complementarias.
- Por esta razón, se dice que **la replicación del ADN es semiconservativa y depende del apareamiento de bases complementarias**.



Replicación semiconservativa DP/PAU

- Varias fueron las evidencias experimentales que permitieron concluir la estructura del ADN: el uso de modelos moleculares, cuyo pionero fue Linus Pauling, el patrón de difracción de rayos X de Rosalind Franklin y los estudios sobre la composición de bases de Erwin Chargaff.
- Uno de los primeros modelos del ADN pensados por Watson y Crick, tenía las bases nitrogenadas orientadas hacia el exterior de la molécula. Franklin contrargumentó este modelo sobre la base de que las bases nitrogenadas son hidrofóbicas y por tanto, deberían estar orientadas hacia el interior de la hélice.



Watson and Crick's model erroneously placed the bases on the outside of the DNA molecule with the phosphates, bound by magnesium or calcium ions, inside.

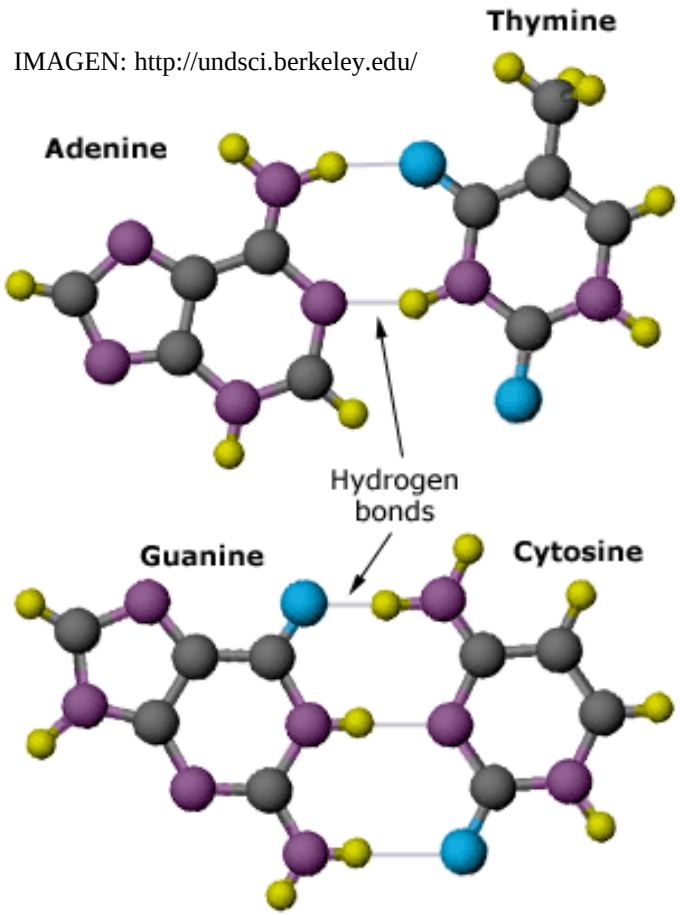
IMAGEN: http://undsci.berkeley.edu/

- Los estudios de difracción de Franklin mostraban que la hélice estaba fuertemente compactada, por lo que las bases debían estar muy juntas en los modelos que estaban desarrollando Watson y Crick.

Replicación semiconservativa DP/PAU

- Como hicieron varias pruebas, comprobaron que las bases se ajustaban mejor cuando las purinas se enfrentaban a pirimidinas, y además, cuando lo hacían en una orientación inversa.
- Además de la similitud estructural, la adenina tiene una carga negativa, compatible con la carga positiva mostrada por la timina. Por otro lado, el apareamiento entre guanina y citosina require de 3 enlaces de hidrógeno, añadiendo estabilidad a la molécula.
- Una vez que el modelo fue propuesto en base a la complementariedad de bases, **la estructura del ADN sugería una mecanismo para la relicación del ADN**, sugiriendo la hipótesis de una replicación semiconservativa.

IMAGEN: http://undsci.berkeley.edu/

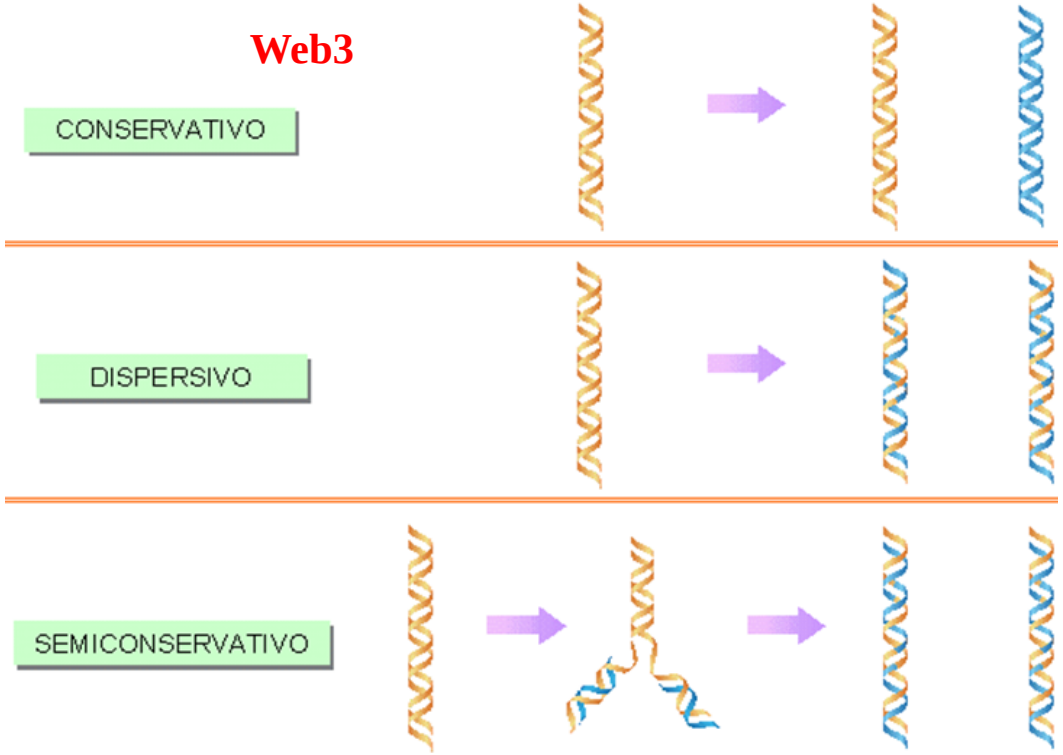


Given the correct forms for the bases, Watson was able to figure out how adenine-thymine and guanine-cytosine pairs matched up, and formed weak hydrogen bonds with one another. Watson and Crick originally suggested that there were two bonds between guanine and cytosine but later it was found that a third existed.

NATURALEZA CIENCIAS: Obtención de pruebas a favor de teorías científicas DP/PAU

- Mediante este **modelo semiconservativo**, las dos cadenas de la doble hélice se pueden separar y cada cadena polinucleotídica sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena de ADN, siguiendo la regla de la complementariedad de bases.

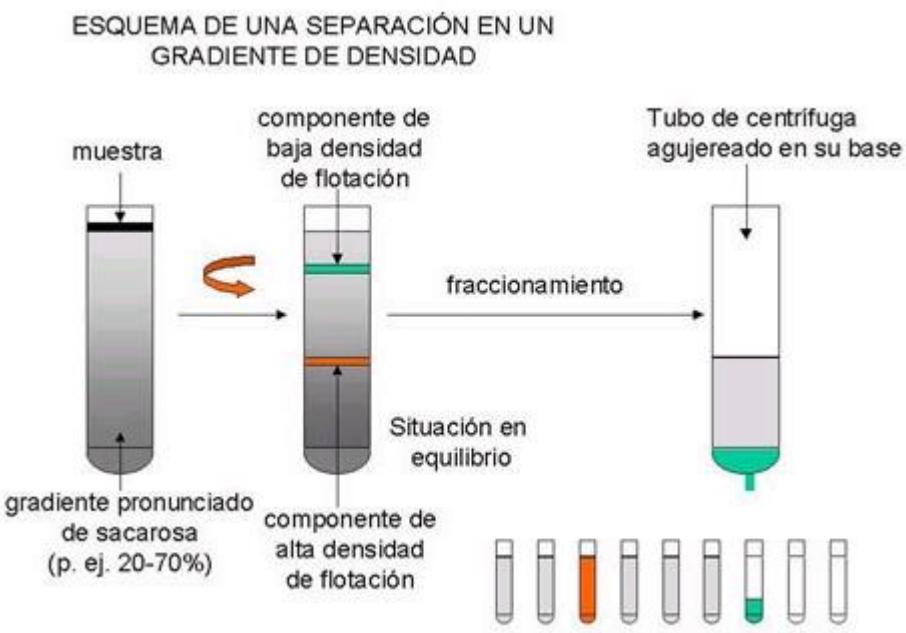
Web3



- Cada nueva molécula de ADN resultante presenta un filamento antiguo y otro nuevo complementario.
- Otra posibilidad que se barajaba es que la replicación fuera **conservativa**, donde se forma una nueva hélice y se conserva entera la doble hélice primitiva, o bien **dispersiva**, donde ambos filamentos están formados por una mezcla de nuvo y antiguo.

NATURALEZA CIENCIAS: Obtención de pruebas a favor de teorías científicas DP/PAU

- En 1958 **Meselson y Stahl lograron pruebas a favor de la replicación semiconservativa del ADN** usando isótopos radiactivos.
- El isótopo de nitrógeno normal es N^{14}, mientras que el isótopo radiactivo (N^{15}), es más denso al tener un neutrón más.
- Meselson y Stahl desarrollaron un nuevo método para separar moléculas de ADN conteniendo N^{14} de aquellas que contienen N^{15}. Esta técnica, denominada **ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio**, permite separar moléculas en función de su densidad de flotación, es decir, que las moléculas se concentran como bandas donde la densidad de las moléculas iguala a la de la solución a su alrededor.



Web4

IMAGEN: www.javeriana.edu.co

NATURALEZA CIENCIAS: Obtención de pruebas a favor de teorías científicas[DP/PAU]

- Cuando se cultivan bacterias de *E. coli* con nucleótidos radiactivos del isótopo N^{15}, todo su ADN esta formado por dicho isótopo pesado. Por otro lado, cuando se hace lo mismo pero con el isótopo N^{14}, todo su ADN esta formado por dicho isótopo más ligero.
- Así, cuando se centrifuga una muestra formada por moléculas de ADN fabricadas con N^{14} y otras fabricadas con N^{15}, éstas últimas, al tener una mayor densidad se colocan en el fondo del tubo de ensayo tras ser centrifugada la mezcla.

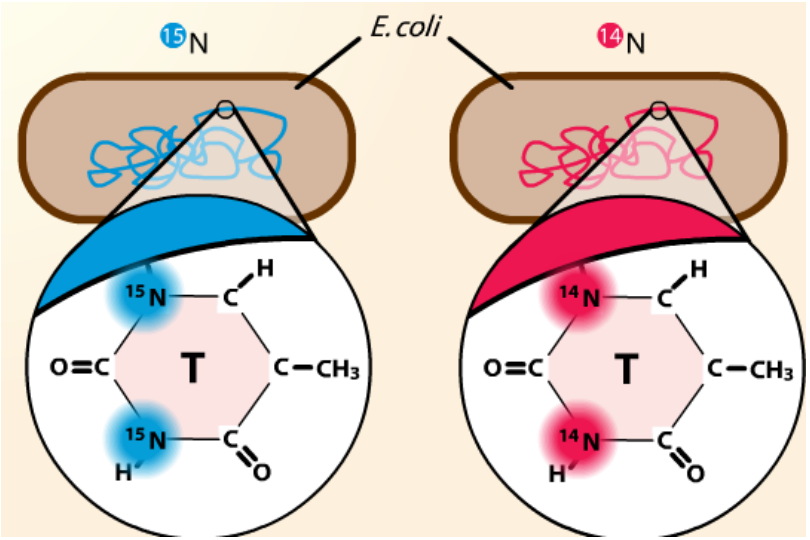
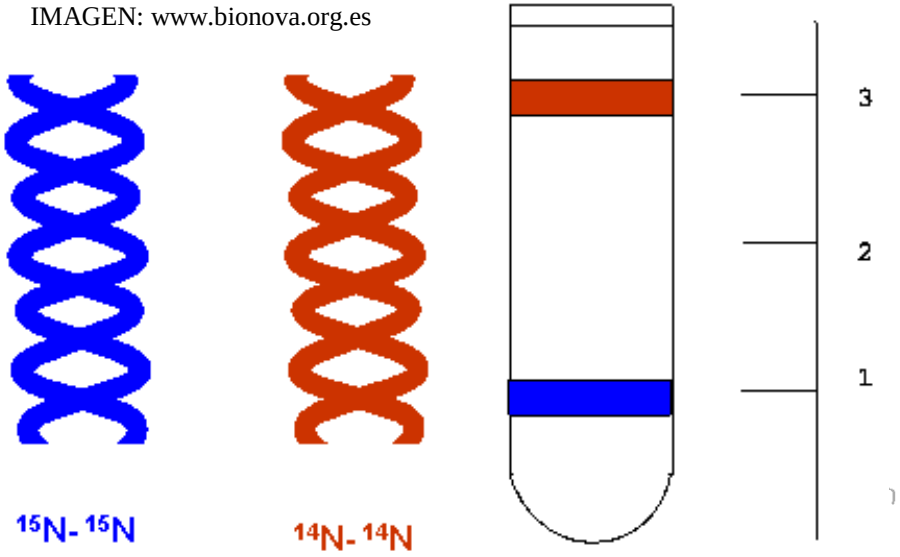


IMAGEN: www.bionova.org.es



HABILIDAD: Análisis de los resultados de Meselson y Stahl[DP/PAU]

- Meselson y Stahl cultivaron bacterias de *E. coli* durante 14 generaciones con nucleótidos radiactivos del isótopo N^{15}, de manera que todo su ADN estaba formado por dicho isótopo pesado.
- Pasaron dichas bacterias a un medio con nucleótidos más ligeros con el isótopo N^{14}, y extrajeron ADN después de cada generación.

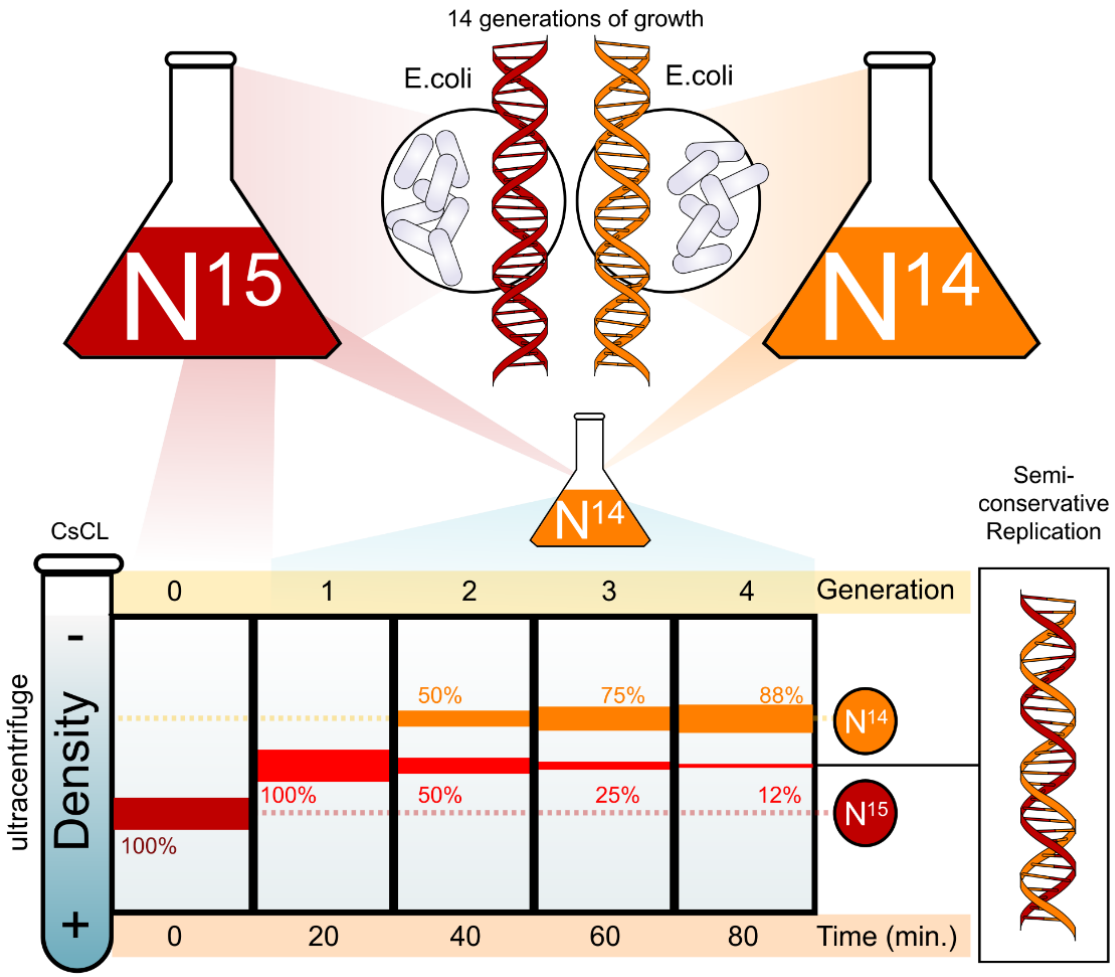
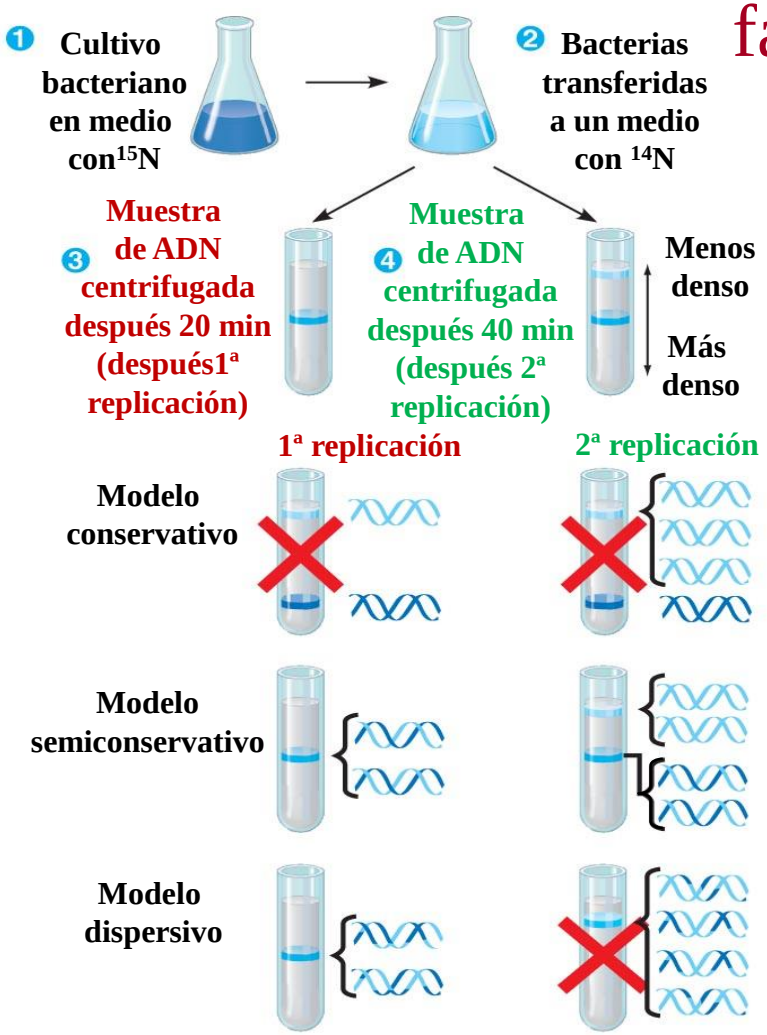


IMAGEN: commons.wikimedia.org

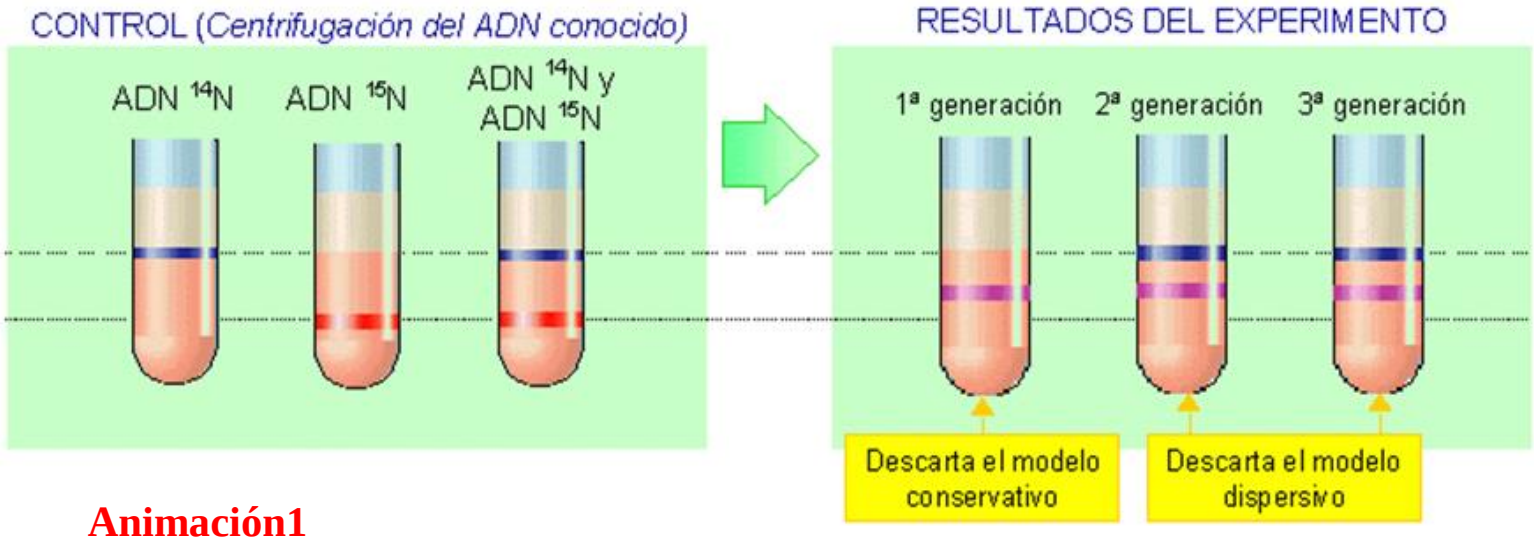
NATURALEZA CIENCIAS: Obtención de pruebas a favor de teorías científicas DP/PAU



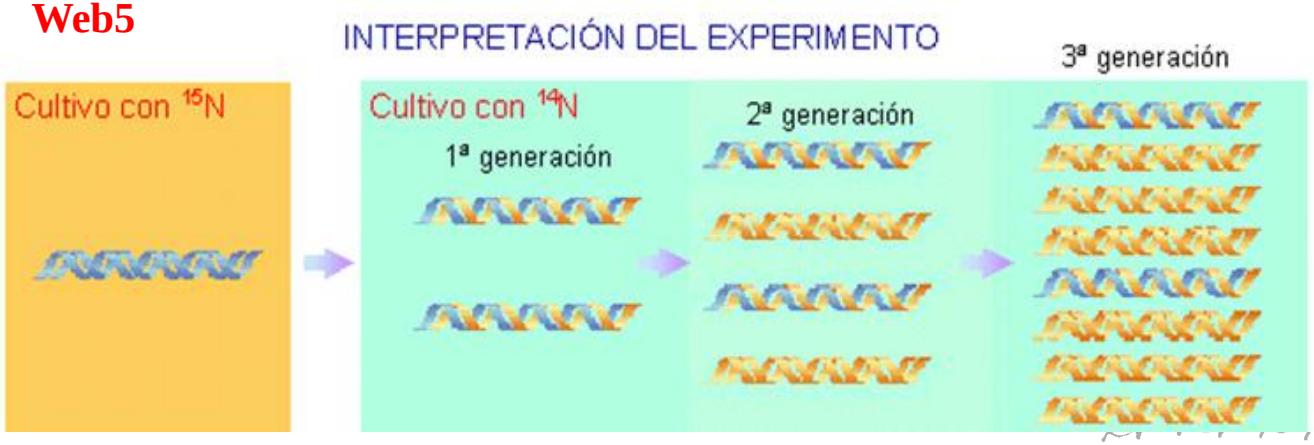
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

- Como se ha indicado, Meselson y Stahl pasaron bacterias de *E. coli* a un medio con nucleótidos con el isótopo N^{14} tras haber sido cultivadas durante 14 generaciones con nucleótidos del isótopo N^{15}.
- Extrajeron ADN después de la 1ª y 2ª generación.
- La **primera replicación** produjo una banda híbrida de ADN, lo que invalidaba el modelo conservativo.
- La **segunda replicación** produjo tanto una banda híbrida como una más ligera, invalidando el modelo dispersivo y apoyando el modelo semiconservativo.

HABILIDAD: Análisis de los resultados de Meselson y Stahl[DP/PAU]



Animación1
Web5



Proceso de replicación[DP/PAU]

- Para que un ser humano se desarrolle a partir de un cigoto, se calcula que deben producirse unas mil billones de divisiones celulares, con otras tantas replicaciones previas de ADN.
- La replicación del ADN se produce durante la **fase S (interfase)** del ciclo cellular.

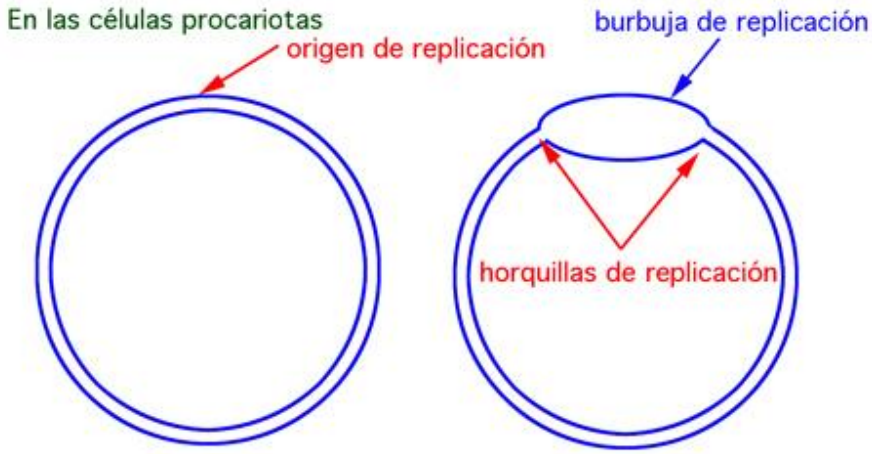
Proceso de replicación DP/PAU

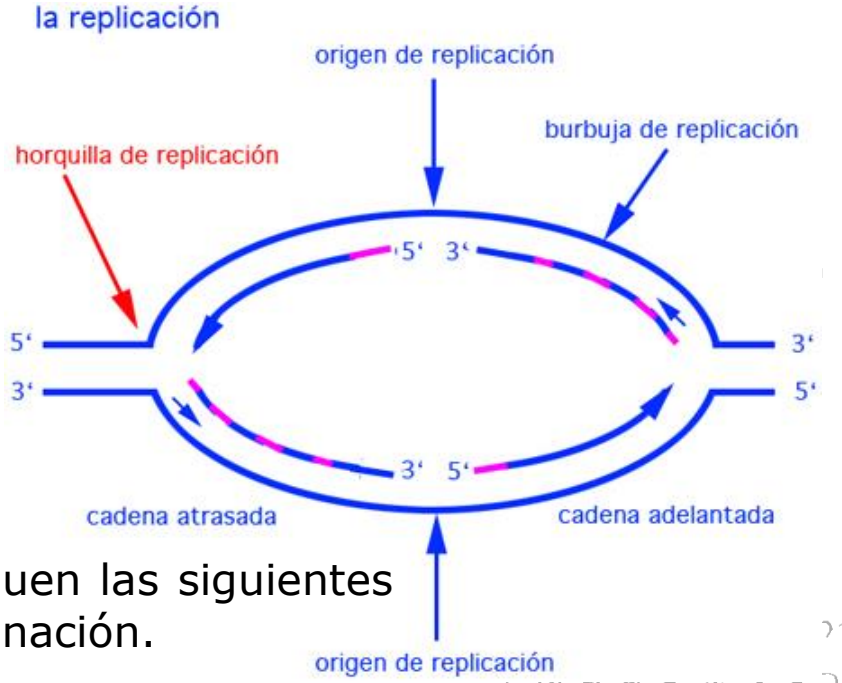
- **La replicación del ADN es llevada a cabo por un complejo sistema de enzimas que constituye todo un aparato molecular de replicación llamado replisoma.**

Enzima	Función
Helicasa	Desenrolla la doble hélice y separa las dos cadenas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas.
Topoisomerasa (ADN girasa)	Elimina las tensiones originadas al desenrollar las dos cadenas.
Proteínas de unión de cadena simple (SSB)	Se unen a las hebras molde del ADN para que no se vuelvan a enrollar.
ADN primase	Fabrica un corto fragmento de ARN en dirección 5'-3' que proporcione el extremo 3' hidroxilo sobre el que adicionar los nuevos nucleótidos la ADN polimerasa.
ADN polimerasa	Añade y une entre sí los nucleótidos para formar una nueva cadena.
ADN ligasa	Une entre sí los distintos fragmentos de Okasaki hasta formar por completo la hebra retardada.

Replicación en procariotas DP/PAU

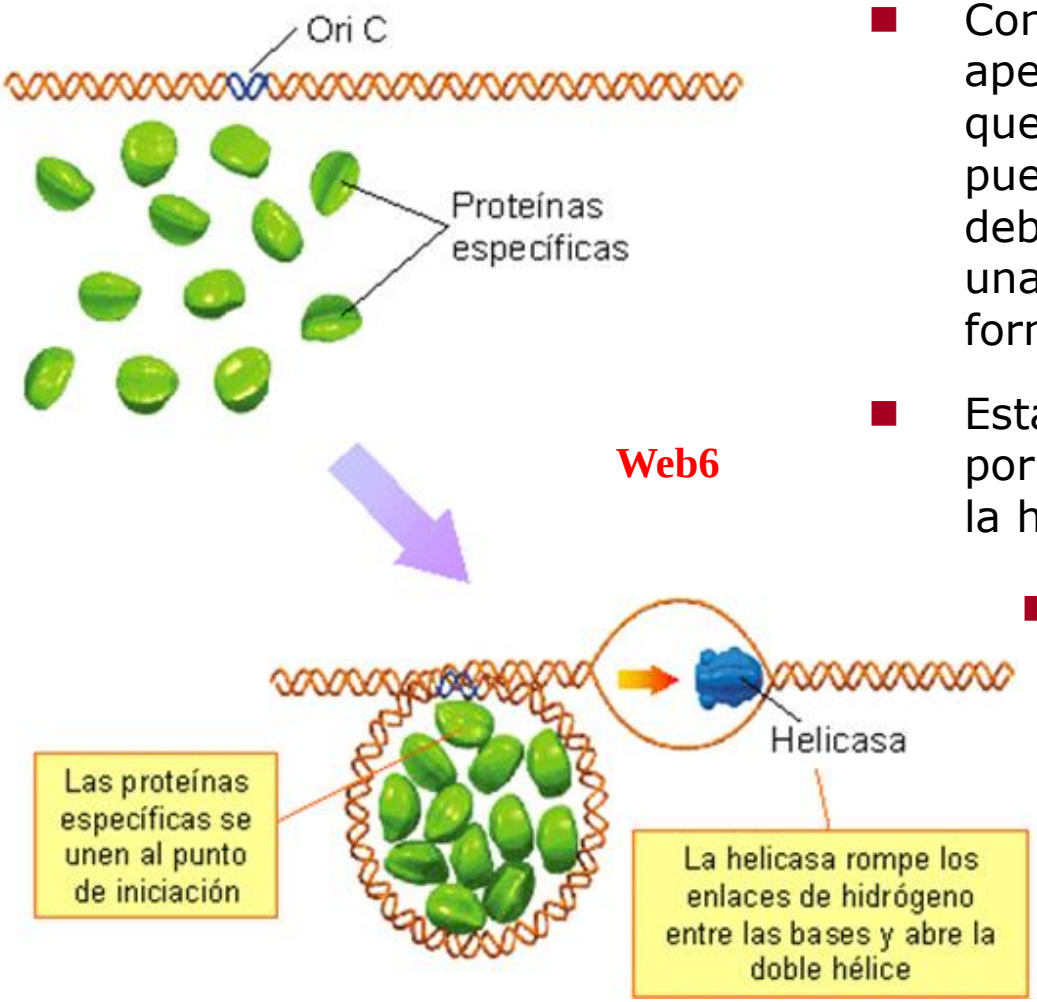
- La replicación comienza en un punto concreto del cromosoma bacteriano denominado **origen de replicación** (**oriC**), a partir del cual se forman unas estructuras conocidas como **burbujas de replicación**, que se extienden, en sentido contrario, a lo largo del cromosoma dando lugar a dos **horquillas de replicación**, en las cuales las dos hebras de ADN **parental** están separadas y actúan como moldes para la síntesis de dos nuevas cadenas de ADN (**replicación bidireccional**).





- En la replicación del ADN se distinguen las siguientes fases: Iniciación, elongación y terminación.

Replicación en procariotas: Iniciación[DP/PAU]



Web6

- Consiste en el desenrollamiento y apertura de la doble hélice, dado que antes de que la replicación pueda ocurrir, la doble cadena debe separarse para que cada una actúe como molde para la formación de la nueva hebra.
- Esta separación es llevada a cabo por la enzima **helicasa** mediante la hidrólisis del ATP.
- **La enzima helicasa desenrolla la doble hélice y separa las dos cadenas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas.**

Replicación en procariotas: Iniciación[DP/PAU]

- Una de las enzimas **helicasas** más estudiadas es una proteína con estructura cuaternaria formada de seis polipéptidos, si bien hay otras helicasas más simples, de tal modo que conforma una estructura en forma de anillo que desenrrolla el ADN.

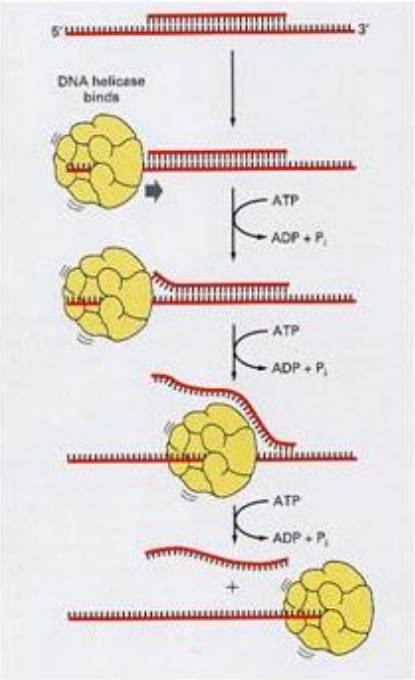


Fig 5-15. Molecular Biology of the Cell. 4ª Ed. Alberts, B. et al.

IMAGEN: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

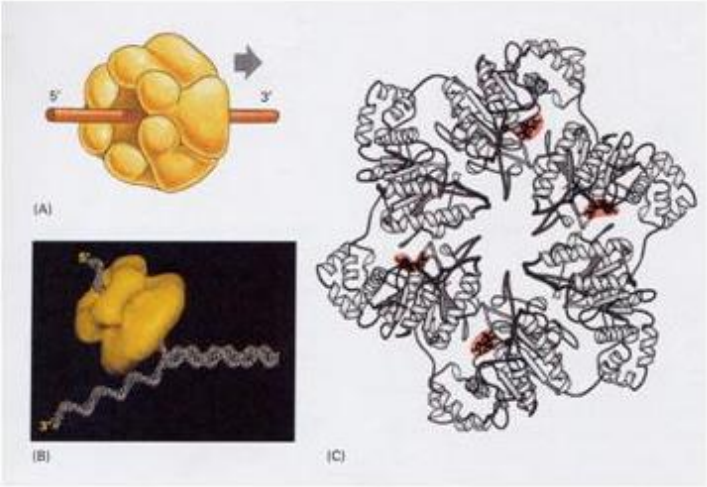
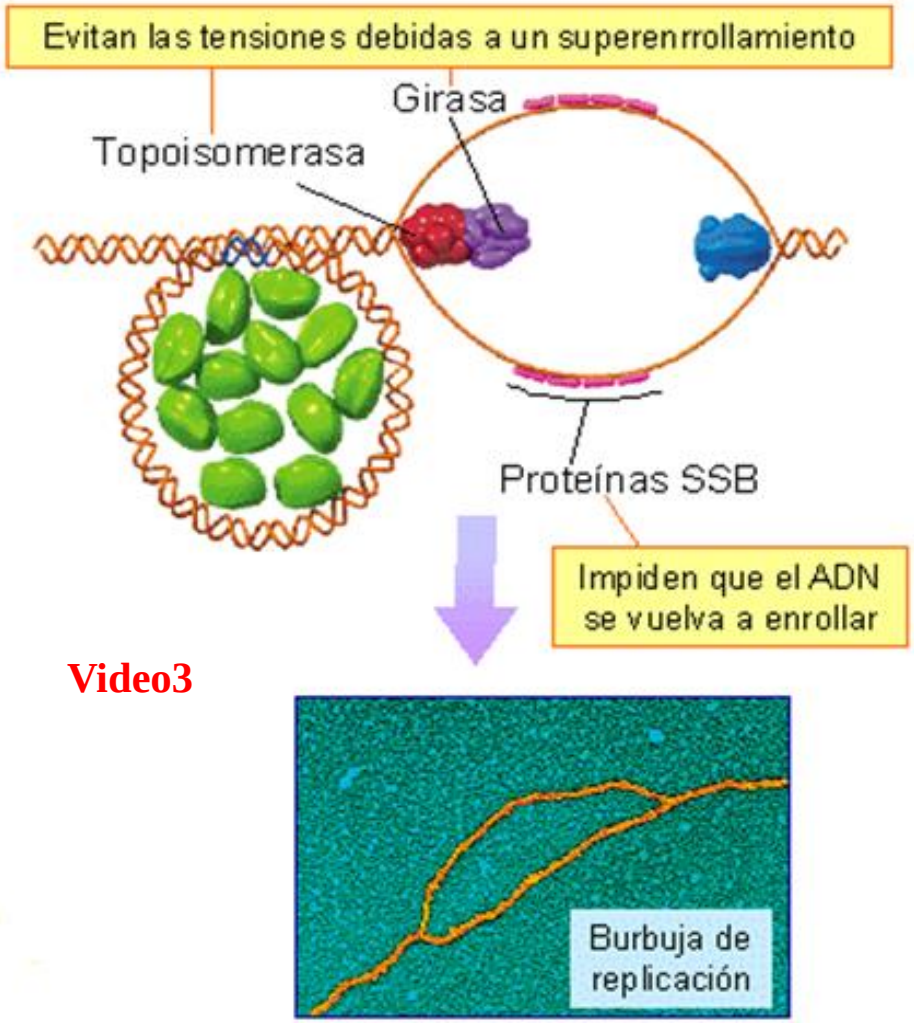


Fig 5-16. Molecular Biology of the Cell. 4ª Ed. Alberts, B. et al.

Video2

- Esta estructura se desplaza por una de las hebras y fuerza su paso a través de los pares de bases de la molécula de ADN doble. Las esferas rojas representan las moléculas de ATP que proporcionan la energía para que la enzima se desplace a lo largo de la molécula de ADN y rompa los enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas.

Replicación en procariotas: Iniciación DP/PAU



Video3

- Además intervienen las **topoisomerasas** (como la **girasa**) que eliminan las tensiones originadas al desenrollar las dos cadenas.
- Luego las **proteínas de union de cadena simple (SSB)** se unen a las hebras molde del ADN para que no se vuelvan a enrollar. Ahora ya pueden actuar las **ADN-polimerasas** que leen la secuencia de cada una de las cadenas y elaboran dos réplicas con secuencias complementarias.

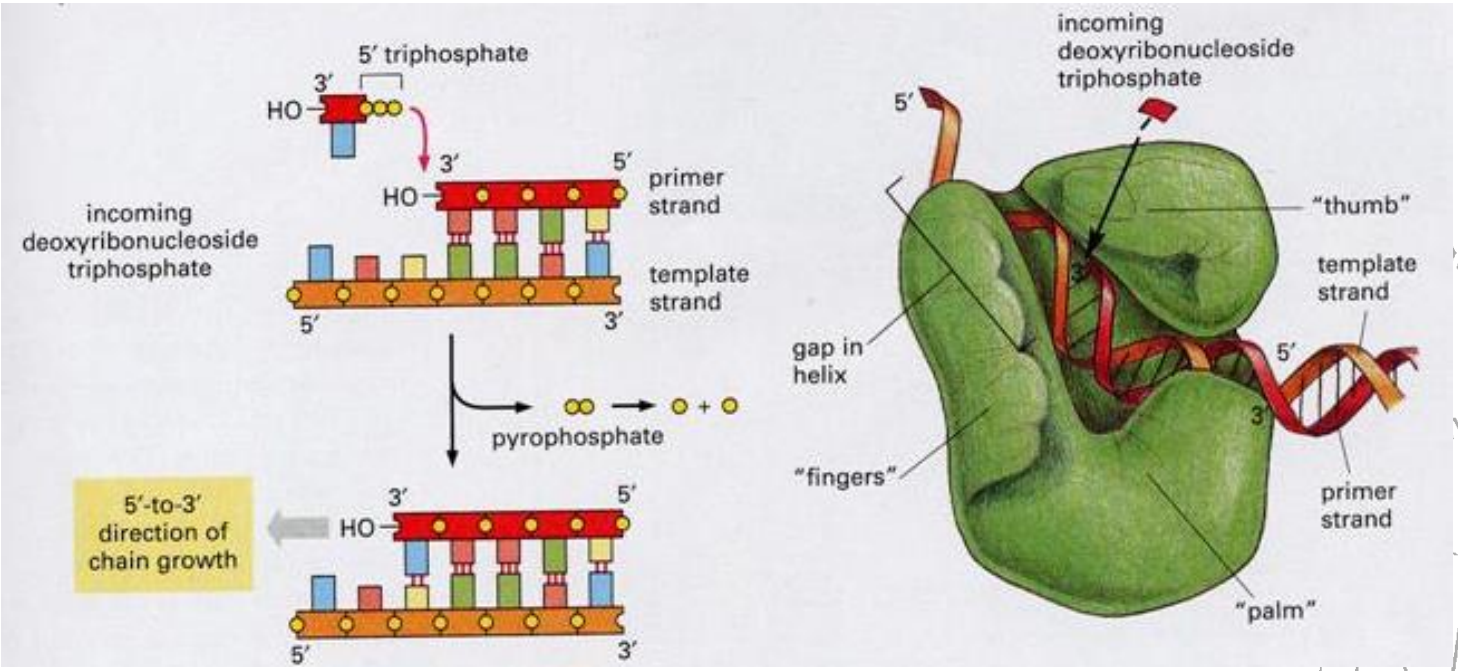
Replicación en procariotas: Elongación[PAU]

- En *E.coli* hay **tres ADN polimerasas**, la **I** y la **III** que se encargan de la replicación y corrección de errores, y la **II**, que sólo lleva a cabo la replicación del ADN dañado por determinados agentes físicos.

POLIMERASA	EXONUCLEASA		POLIMERIZACIÓN		INICIACIÓN
	dirección	función	dirección	función	
I	5'→3' 3'→5'	elimina cebador reparación	5'→3'	síntesis	no
II	3'→5'	reparación	5'→3'	síntesis	no
III	3'→5'	reparación	5'→3'	síntesis	no

Replicación en procariotas: Elongación[DP/PAU]

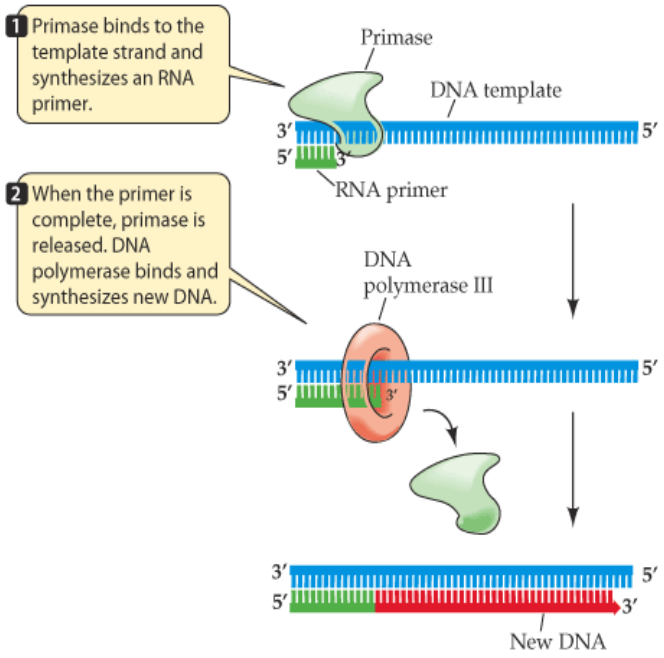
- La que desempeña el papel principal es la **ADN polimerasa III**, que tiene como sustrato los desoxirribonucleótidos trifosfato (ATP, TTP, GTP y CTP), que los hidroliza en pirosfato (PP) y **nucleótido monofasfato**, el cuál une a la cadena de ADN en formación mediante **enlace fosfodiéster**.

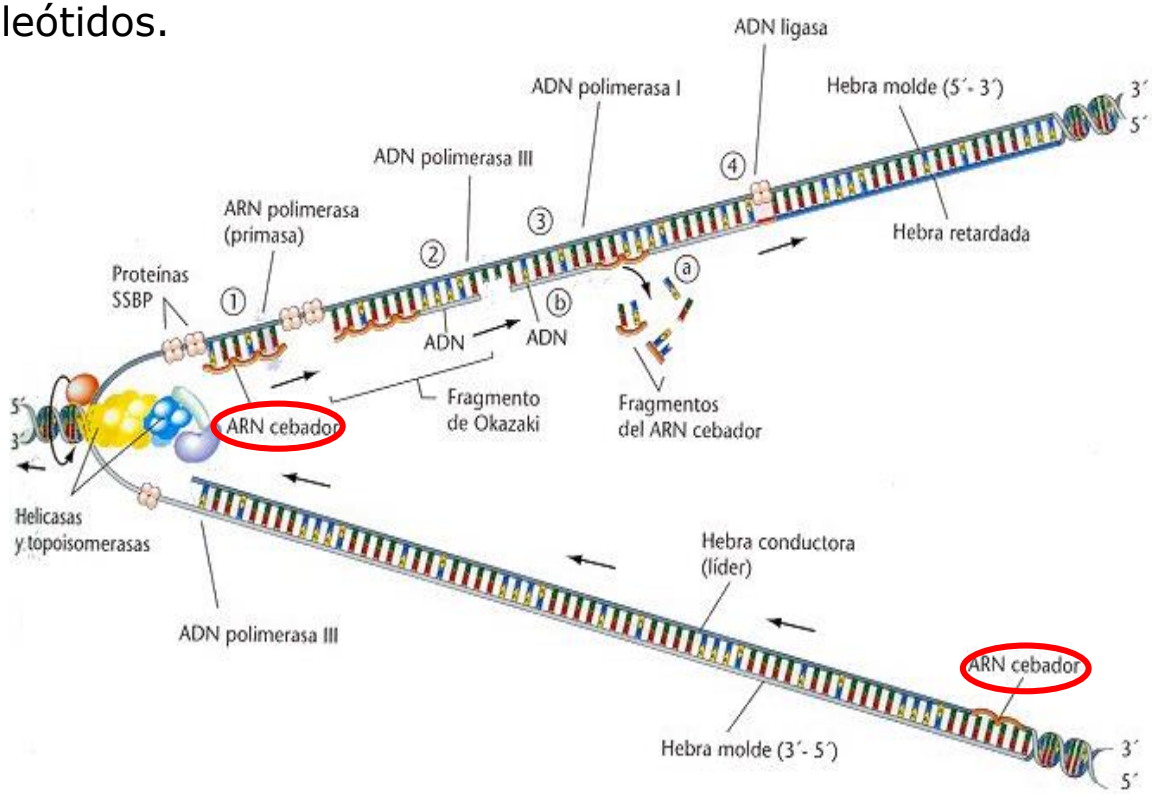


- **La ADN polimerasa une entre sí los nucleótidos para formar una nueva cadena, usando para ello la cadena preexistente como una plantilla.**

Replicación en procariotas: Elongación[DP/PAU]

- La ADN polimerasa III es incapaz de iniciar por sí sola la síntesis de una nueva cadena de ADN, por lo que necesita un corto fragmento de ARN llamado **ARN cebador (primer)** que proporcione el extremo 3′ hidroxilo sobre el que adicionar los nuevos nucleótidos.

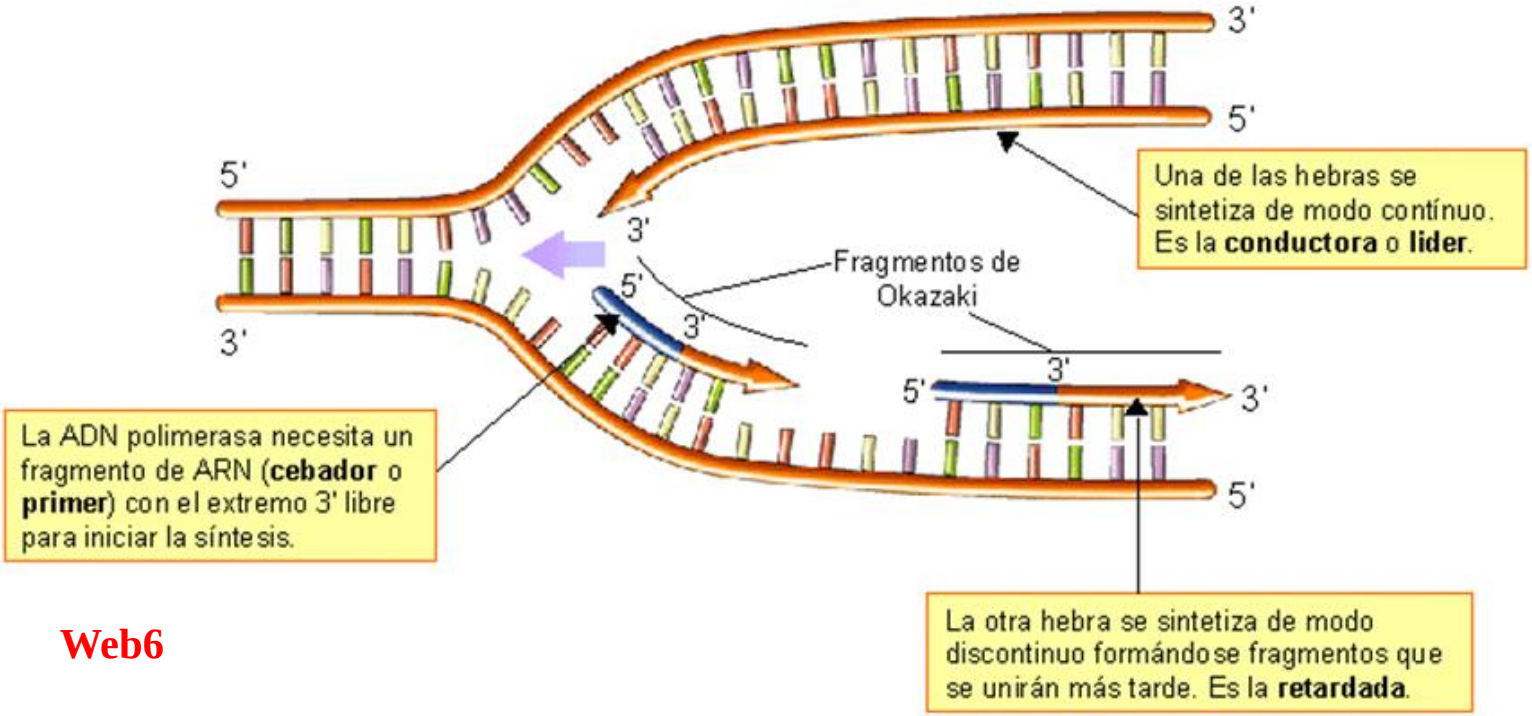




- Este ARN cebador es sintetizado por una **ARN polimerasa** denominada **primasa**, que fabrica un corto fragmento de ARN en dirección 5′-3′.

Replicación en procariotas: Elongación[DP/PAU]

- La ADN polimerasa III **sólo puede adicionar nucleótidos al extremo 3'**, por lo que el **crecimiento de la nueva hebra siempre será en dirección 5'-3'**.



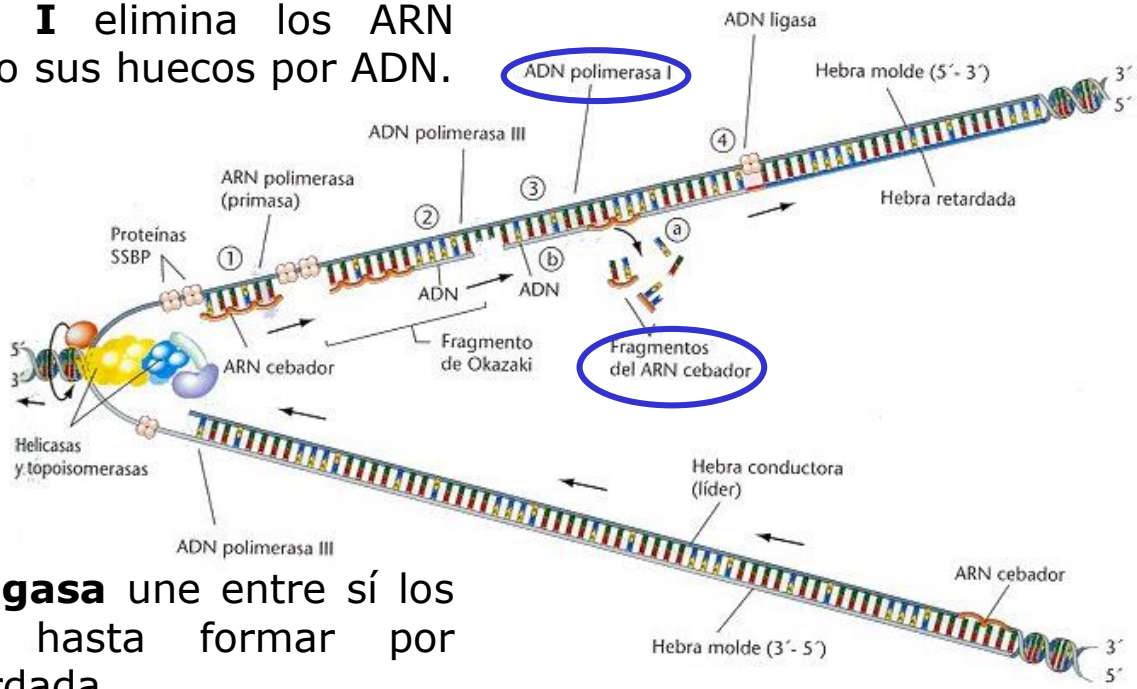
Web6

- Esto hace que **el molde que va de 3'-5' (denominado cadena conductora o adelantada) sea copiado de manera continua, pero que la otra cadena (retardada), al ir de 5'-3', sea copiada de forma discontinua, a trozos que sí van de 5'-3', denominados fragmentos de Okasaki**.

Replicación en procariotas: Terminación DP/PAU

- El final de la replicación se produce cuando la ADN polimerasa III se encuentra con una secuencia de terminación.
- La **ADN polimerasa I** elimina los ARN cebadores, sustituyendo sus huecos por ADN.

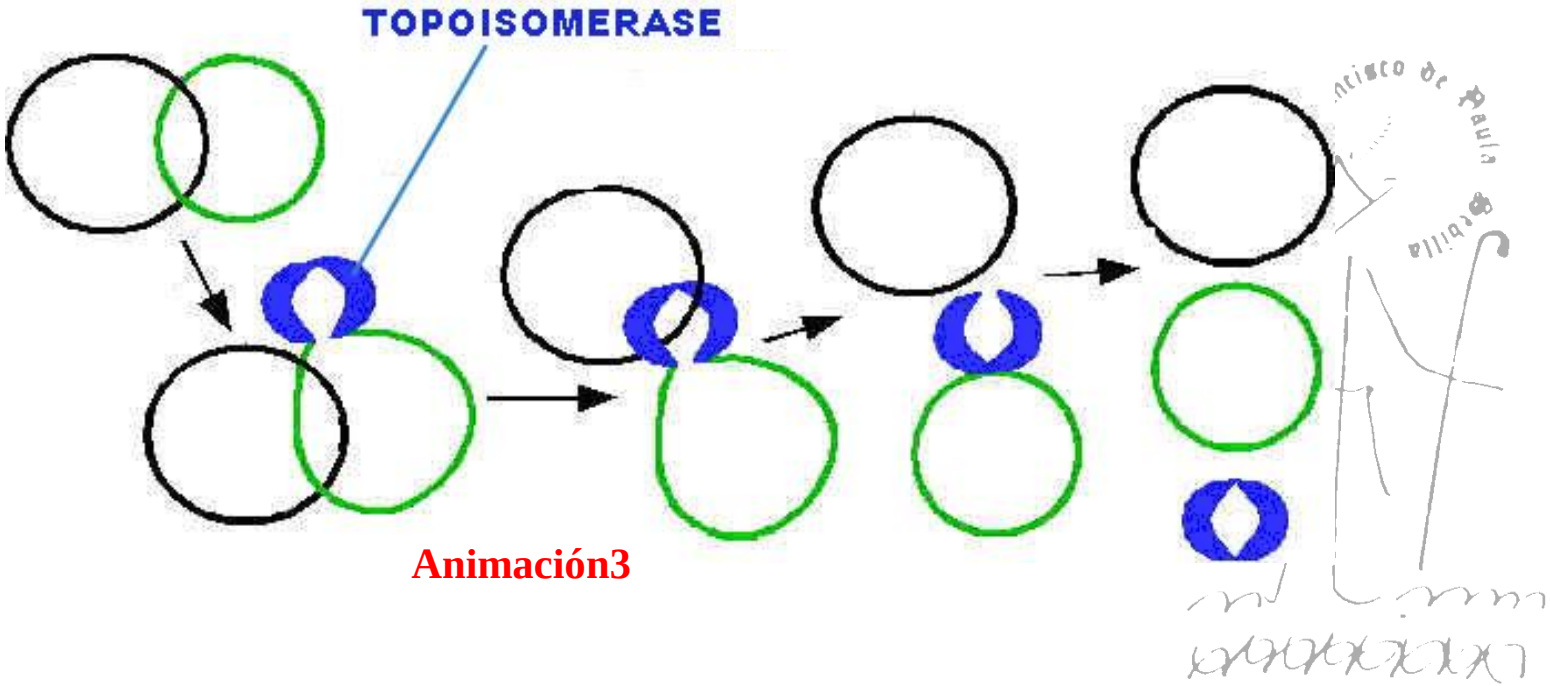
Animación2



- Por último una **ADN ligasa** une entre sí los distintos frgamentos hasta formar por completo la hebra retardada.
- La cadena líder se forma más rápidamente, ya que sólo se necesita un cebador de ARN al principio, y por tanto solo actúa una vez la ADN polimerasa I y la ligasa.

Replicación en procariotas: Terminación DP/PAU

- Una vez duplicado el ADN circular, las moléculas hijas resultantes están vinculadas entre sí, por lo que deben ser desencadenadas para segregarlas en células hijas separadas.
- Esta separación las realizan otras enzimas **topoisomerasas**, que tienen capacidad para romper una molécula de ADN bicatenario y hacer pasar una segunda molécula de ADN bicatenario a través de la rotura.



Replicación en eucariotas DP/PAU

- Es similar a la de procariotas, es decir, **semiconservativa** y **bidireccional**, existiendo una hebra conductora que se sintetiza de manera continua y una retardada de forma discontinua con fragmentos de Okazaki.

- Sin embargo, existen **cuatro grandes diferencias**:

  1. Existen **cinco tipos de ADN polimerasas**.

  2. El ADN de los eucariontes está fuertemente asociado a los octámeros de histonas, en forma de **nucleosomas**, por lo que además de replicarse el ADN, deben duplicarse también las histonas. Al parecer, tanto los nuevos nucleosomas como los antiguos se reparten entre las dos nuevas hebras hijas, en la retardada y en la conductora.

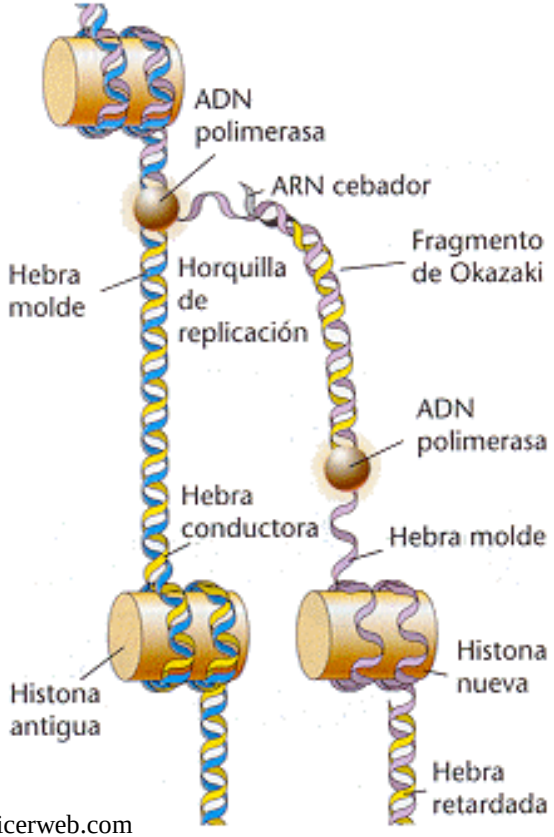
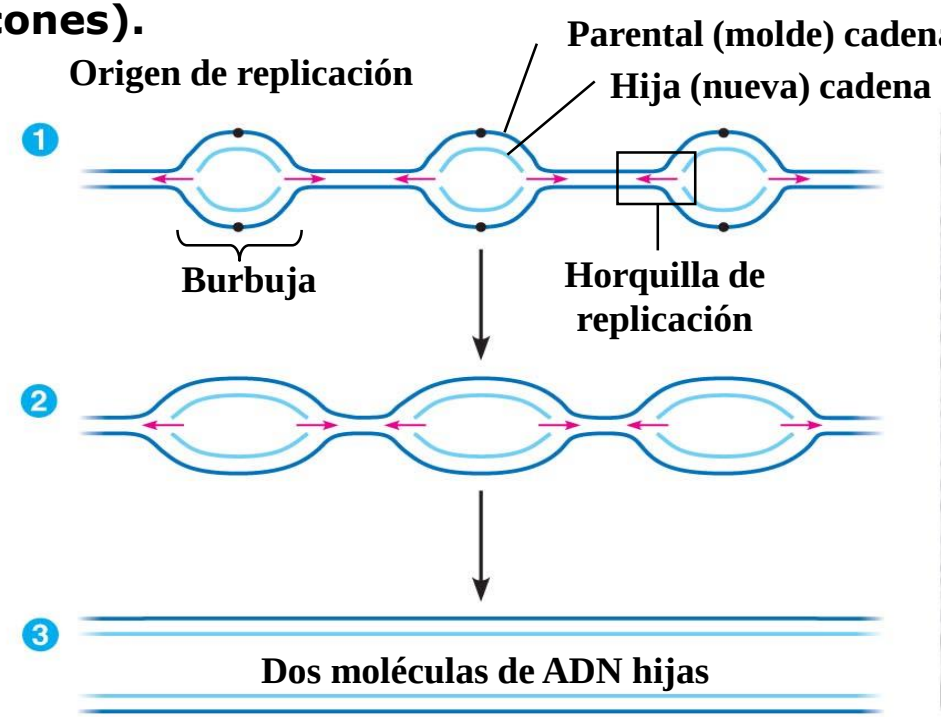


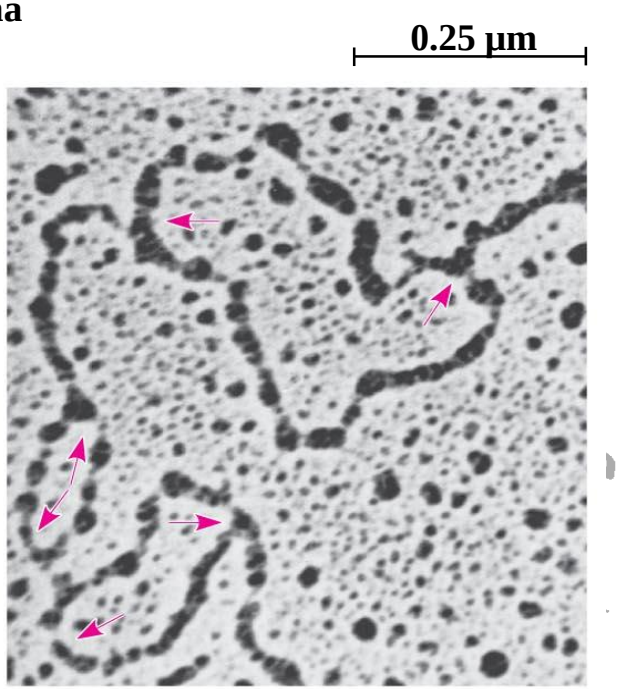
IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com

Replicación en eucariotas DP/PAU

3. La longitud del ADN de un cromosoma eucariótico es mucho mayor que el ADN bacteriano, por lo que no hay un único origen de replicación y en los cromosomas eucarióticos **la replicación del ADN se inicia en muchos puntos diferentes (replicones).**



(a) En eucariotas, la replicación comienza en muchos sitios distintos del ADN de cada cromosoma.

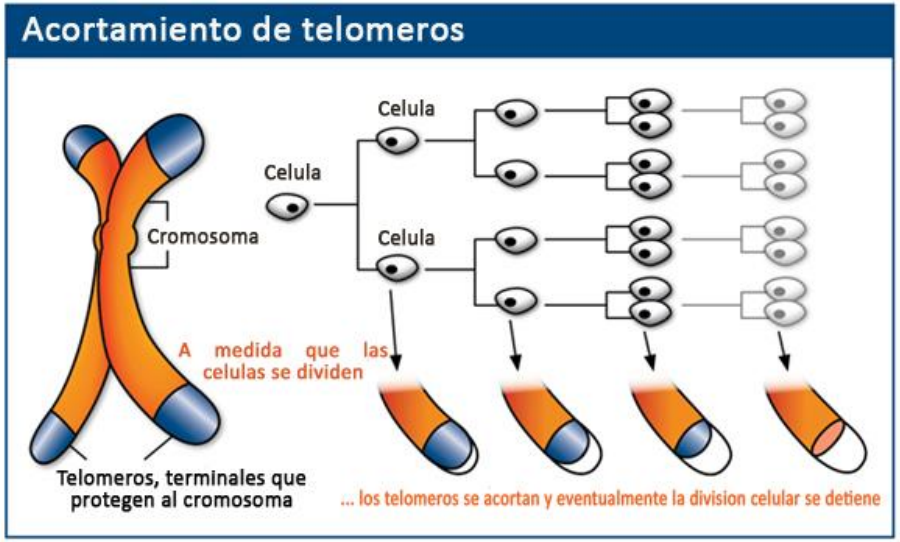


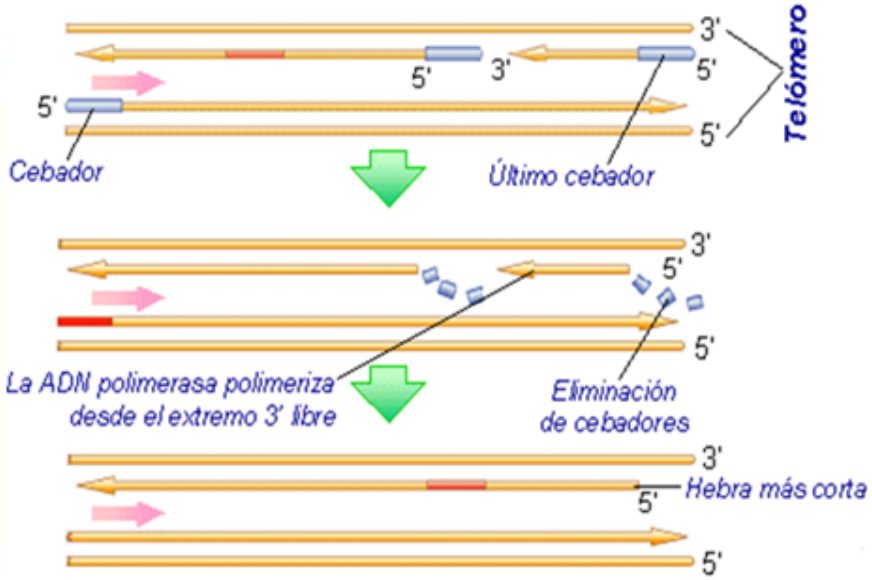
(b) Micrografía donde se observan tres burbujas de replicación en el ADN de un cultivo de células de hamster.

Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

Replicación en eucariotas DP/PAU

4. Los cromosomas eucariotas son lineales y presentan en sus extremos unas regiones, denominadas **telómeros**, constituidas por secuencias repetitivas. Cuando se replica el ADN lineal, los extremos 5’ de los telómeros, no pueden ser replicados, ya que cuando se elimina el último cebador, la ADN polimerasa no podrá rellenar el hueco al no encontrar extremos hidroxilo libres. Debido a esto, el extremo del cromosoma se va acortando cada vez que la célula se divide, lo que ha sido asociado al envejecimiento y muerte celular.

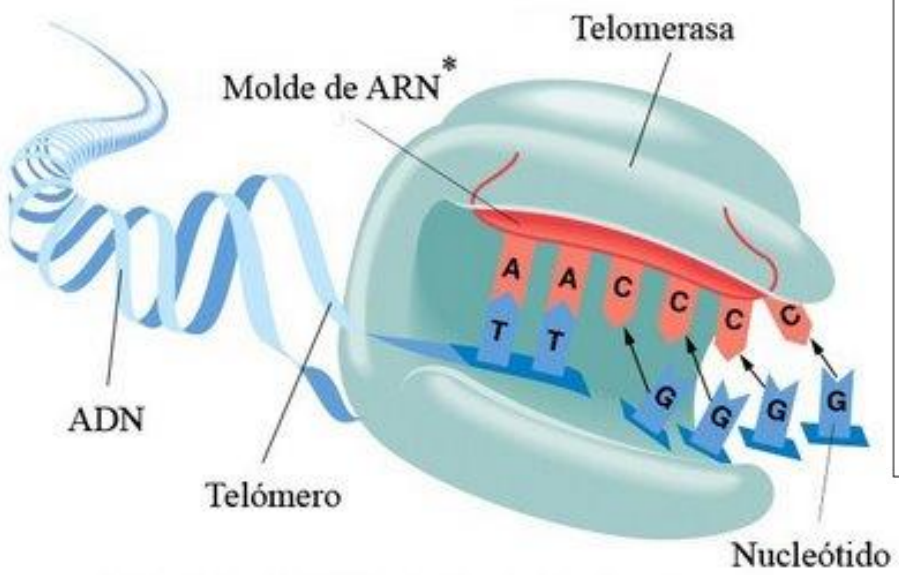




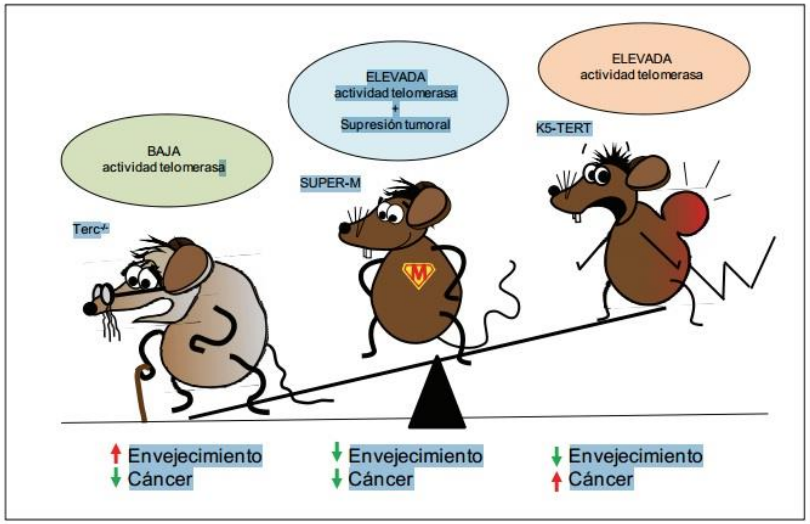
Replicación en eucariotas DP/PAU

El acortamiento de los telómeros, puede ser remediado mediante una enzima, la **telomerasa**, que repara el daño y hace a las **células inmortales**, es el caso de las **células embrionarias** y **tumorales**.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que actúa como transcriptasa inversa, ya que tienen una hebra de ARN con la secuencia apropiada para actuar como molde para la síntesis de la secuencia telomérica de ADN que se añade en los extremos 3’ de cada cromosoma para evitar su acortamiento en cada proceso de duplicación.



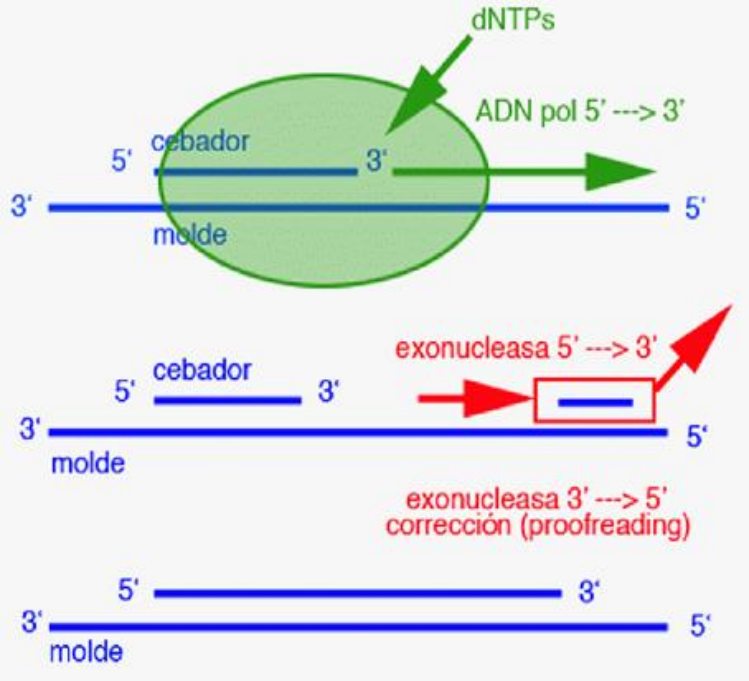
* La secuencia de la molécula molde de ARN puede variar en las diferentes especies



Animación4

Replicación en procariotas: Corrección de errores[PAU]

- En *E. coli* la actividad polimerasa de estos enzimas comete un error de apareamiento por cada millón de nucleótidos adicionados (10^6).
- La **actividad exonucleasa autocorrectora de las ADN polimerasa I y III** consituye el principal mecanismo de corrección de errores, reduciendo el error a uno de cada cien millones de nucleótidos adicionados (10^8).



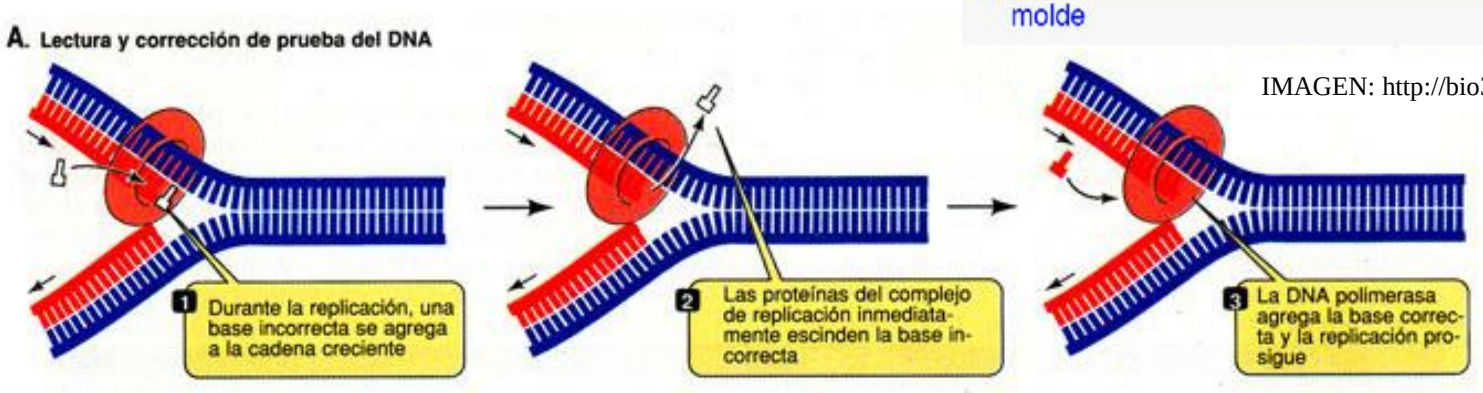
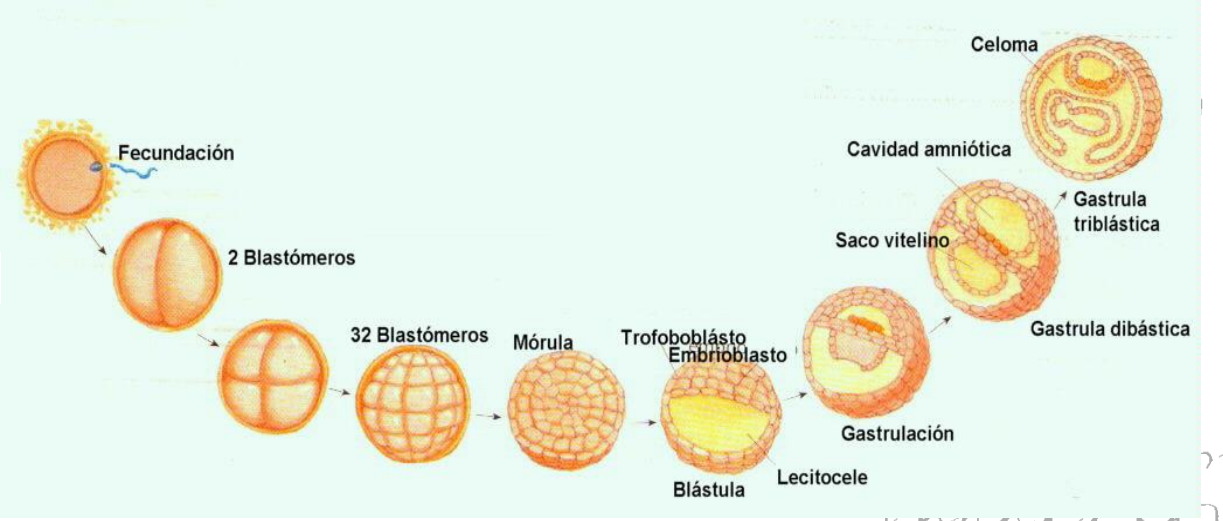


IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com

Replicación en procariotas: Corrección postreplicativa[PAU]

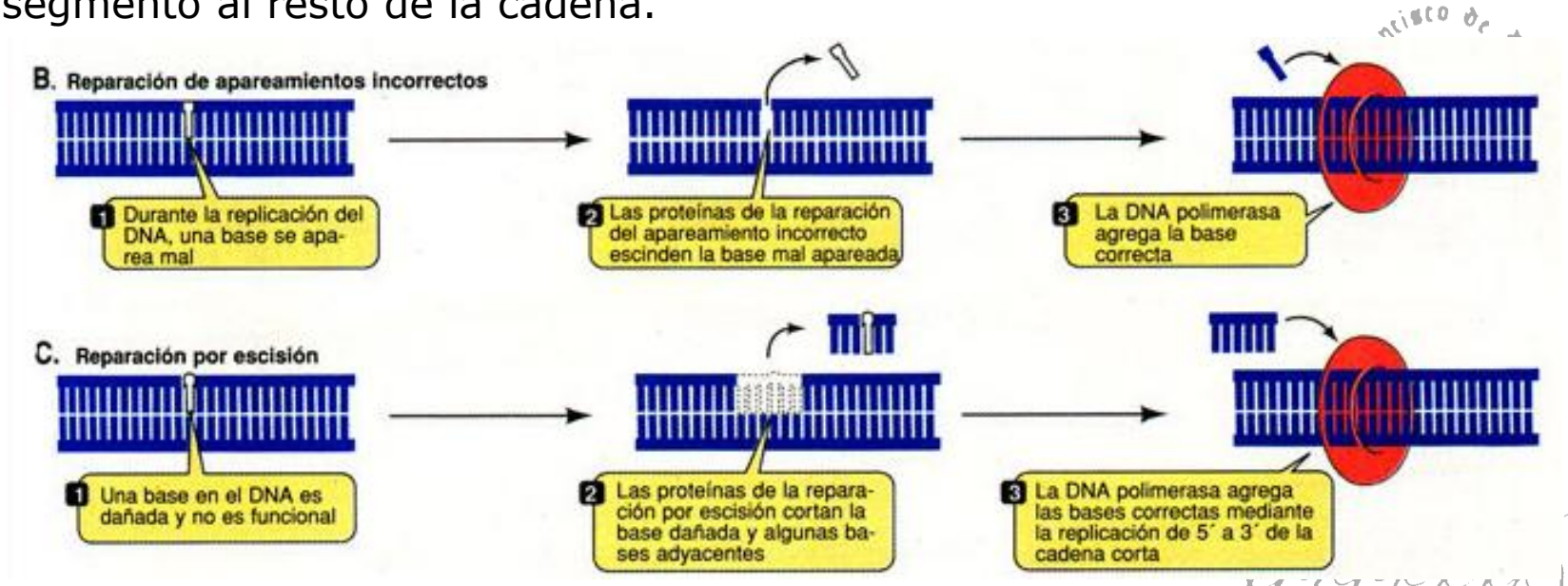
- Esta precisión podría resultar suficiente para una bacteria, cuyo genoma contiene $3 \cdot 10^6$ pares de bases, pero resulta insuficiente para el genoma humano que contiene $3 \cdot 10^9$ pares de bases.
- Un error por cada 10 millones de bases supondría 300 equivocaciones en cada duplicación del ADN humano, y teniendo en cuenta que durante el **desarrollo embrionario a partir del cigoto el genoma humano se duplica casi mil millones de veces**, se produciría una acumulación del trescientos mil billones de errores, lo que evidentemente, es incompatible con la vida, ya que la formación inicial se perdería pronto como consecuencia de las divisiones celulares.

IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com



Replicación en procariotas: Corrección postreplicativa[PAU]

- Por ello, para aumentar la precisión de la replicación, existe una maquinaria enzimática que corrige posibles errores cometidos por las polimerasas en el ADN recien sintetizado (adeninas no metiladas), que se denomina **corrección postreplicativa**, con lo que la exactitud de la réplica alcanza la increíble perfección de 1 error por cada 10^{10} nucleótidos.
- Participan **endonucleasas**, que cortan la cadena donde se detecta el error, **exonucleasas**, que eliminan el fragmento incorrecto, **ADN polimerasa** que sintetiza el segmento correcto y **ADN ligasa** para unir el nuevo segmento al resto de la cadena.



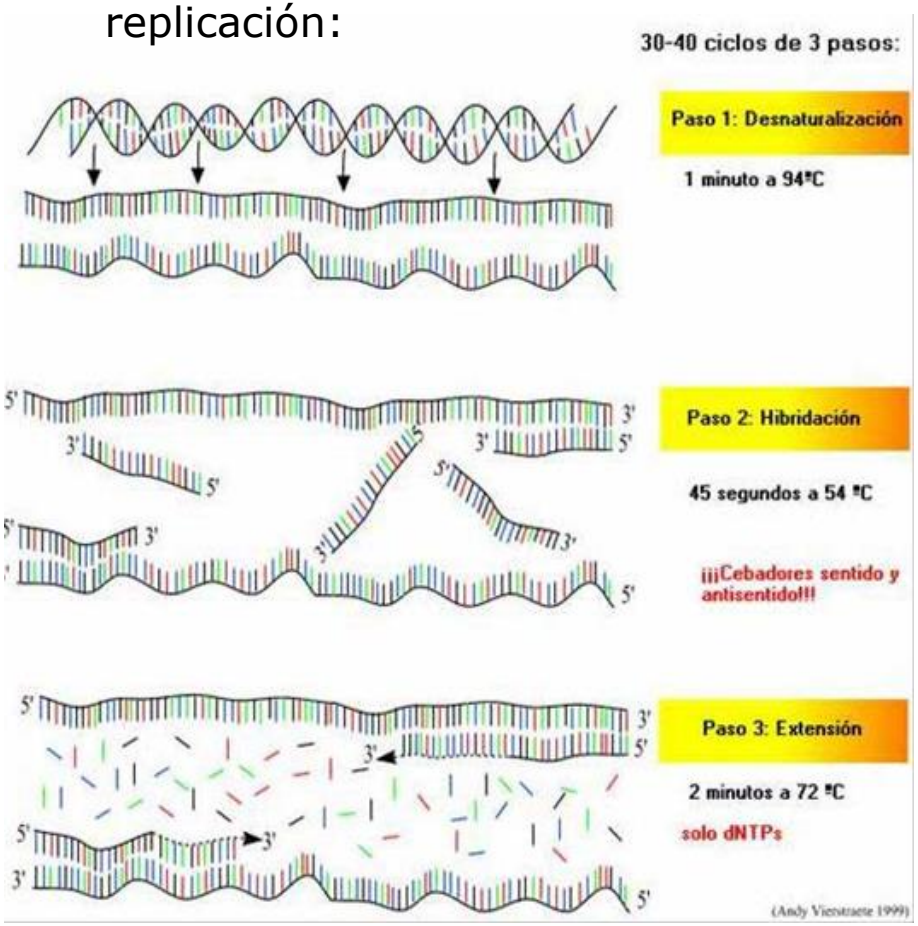
APLICACIÓN: Uso de la Taq polimerasa en la PCR^{DP}

- La **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** es una técnica de ingeniería genética desarrollada por Kary Mullis (Premio Nobel en 1993) y consistente en la **obtención de múltiples copias de una secuencia de ADN** concreta.

- **Se puede usar la técnica de la PCR para amplificar pequeñas cantidades de ADN**, ya que utiliza la enzima ADN polimerasa para hacer más copias del ADN molde.

APLICACIÓN: Uso de la Taq polimerasa en la PCR^{DP}

- La PCR consta de un ciclo de **tres fases**: calentamiento, enfriamiento y replicación:

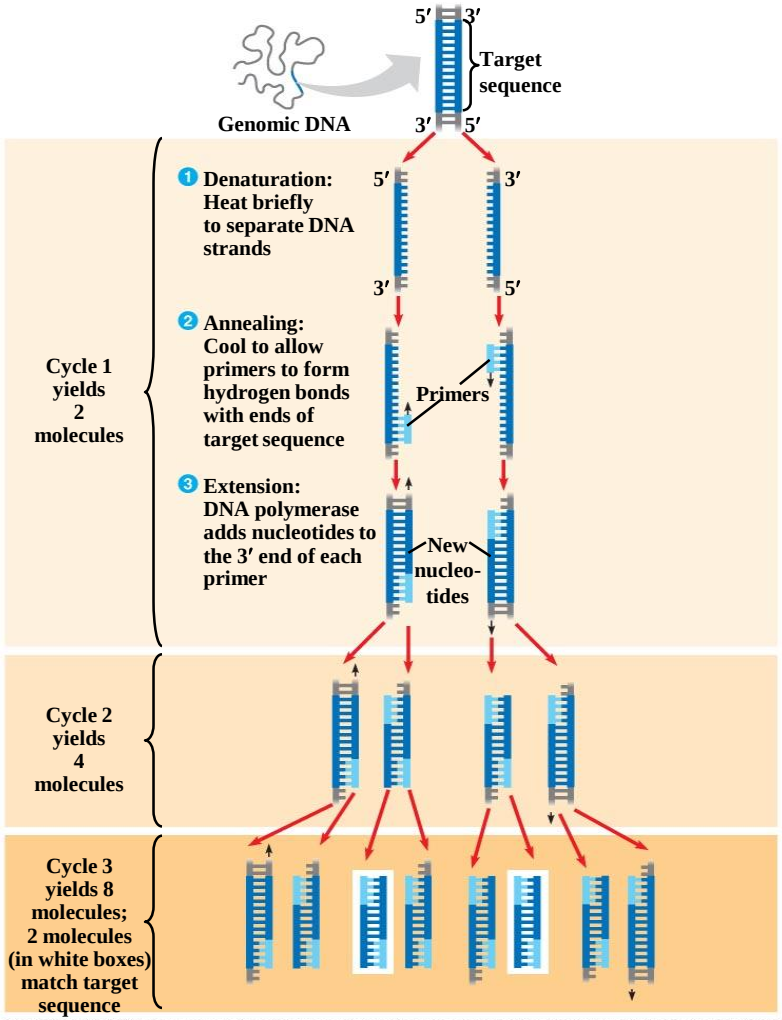


1. Elevando la temperatura a 94ºC durante 1 minuto, se **desnaturaliza** el ADN mediante la rotura de los puentes de hidrógeno.

2. Disminuyendo la temperatura a 54ºC durante menos de 1 minuto, se promueve que se unan (**hibriden**) **primers/cebadores** al comienzo y final de la sección de ADN que se quiere amplificar.

3. Elevando la temperatura a 72ºC durante 2 minutos, las cadenas de ADN se mantienen desnaturalizadas de manera que la **ADN polimerasa** añade nucleótidos complementarios a razón de 1 000/minuto amplificando la secuencia del ADN específico.

APLICACIÓN: Uso de la Taq polimerasa en la PCR^{DP}



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

- La ADN polimerasa utilizada debe ser termoestable y no desnaturalizarse a altas temperaturas, por lo que se usa la enzima de la bacteria *Thermus aqueaticus* (**taq ADN polimerasa**) encantrada en fuentes termales (50-80 ºC), como las del Parque Nacional de Yellowstone.

Web9 & Animación7

- Repitiendo este ciclo, **la Taq ADN polimerasa puede usarse para producir múltiples copias de ADN rápidamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

APLICACIÓN: Secuenciación del ADN^{DP}

- En la actualidad se han secuenciado los genomas de muchos seres vivos, tanto animales, como platas, hongos, algas, protozoos y bacterias.
- En el proceso de secuenciación, **se usan nucleótidos que contienen acido didesoxirribonucleico con el fin de detener la replicación del ADN en la preparación de muestras para la secuenciación de bases**.
- Muchas copias del fragmento de ADN que quiere secuenciarse son colocadas en un tubo de ensayo junto con todo lo necesario para que puede replicarse, es decir, la enzima ADN polimerasa, los desoxirribonucleótidos trifosfato y un primer/cebador que marca el punto de inicio de la replicación.

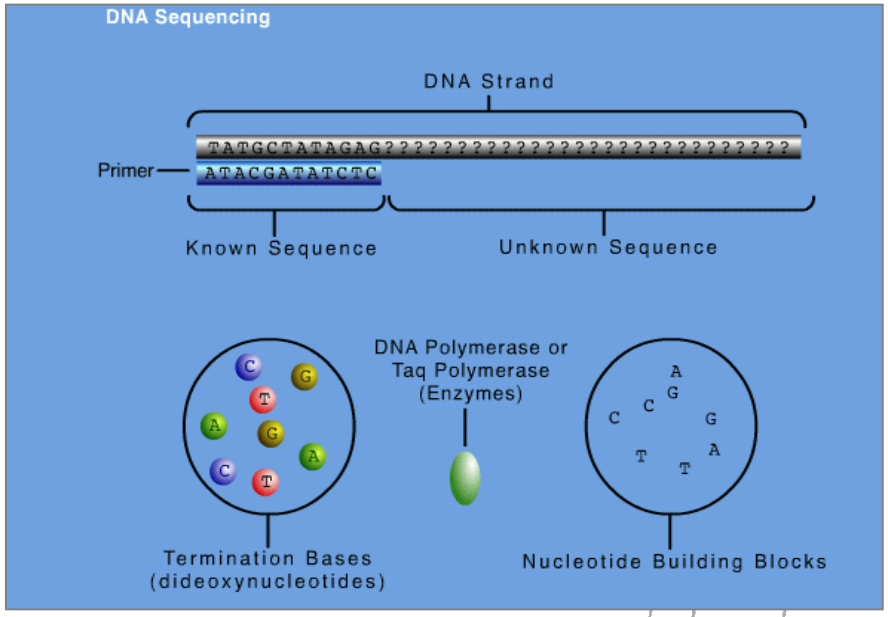


IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com

APLICACIÓN: Secuenciación del ADN^{DP}

- Además, se coloca una menor concentración de **didesoxirribonucleótidos** que carecen de grupo hidroxilo en el C3 de la pentosa (por lo que no pueden unirse al fosfato del C5 de otro nucleótido) y que llevan incorporados un marcador fluorescente que emite luz de distinto color cuando son irradiados.

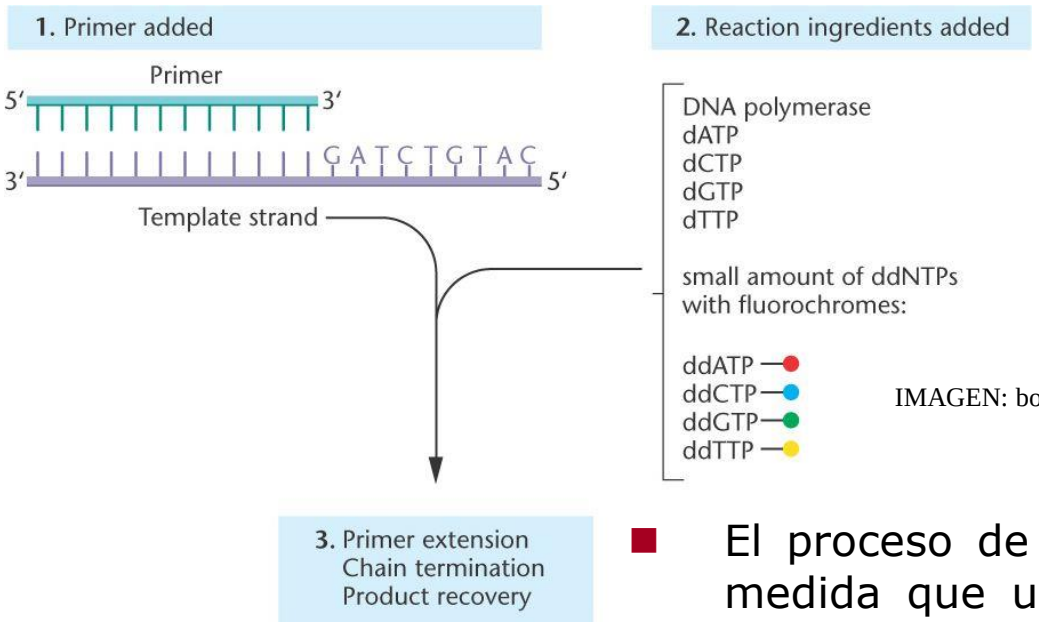
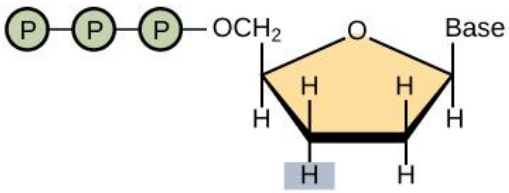


IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com



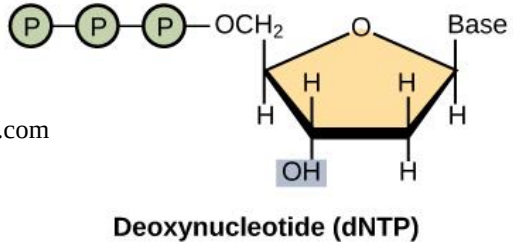
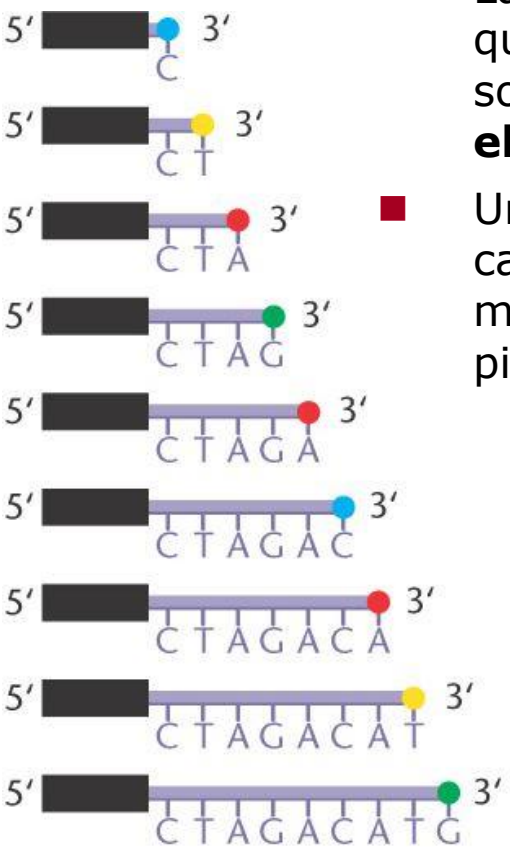


IMAGEN: boundless.com

- El proceso de replicación tiene lugar, pero a medida que uno de los ddNTP se añade, la cadena en construcción se detiene en ese punto, teniendo un tamaño específico y un color de fluorescencia determinado.

APLICACIÓN: Secuenciación del ADN^{DP}

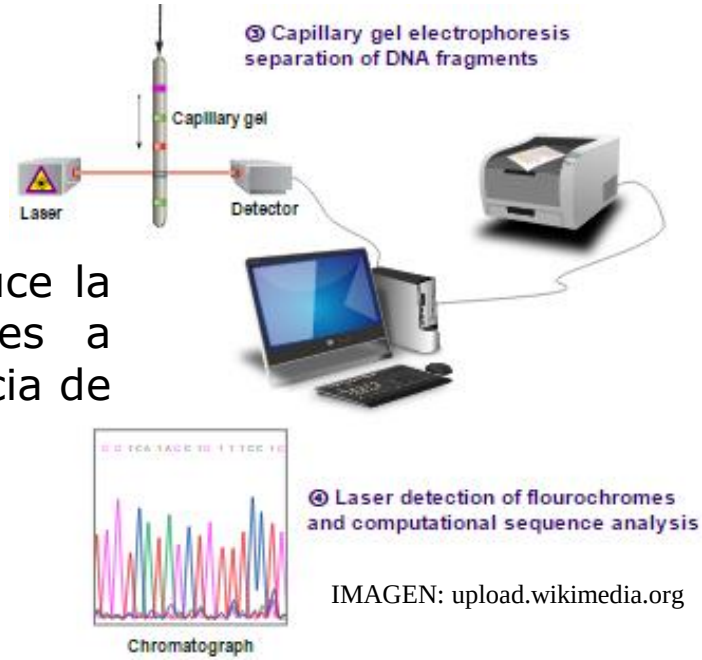


4. Electrophoresis, imaging, data analysis

IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com

- Las distintas cadenas de diferente tamaño sintetizadas y que terminan en un nucleótido de fluorescencia concreta, son separados en función de su tamaño mediante **electroforesis en un gel de agarosa**.
- Un láser estimula a los dideoxinucleótidos de manera que cada fragmento emita fluorescencia, que es detectada mediante un detector óptico, registrando una serie de picos de fluorescencia.

Animación8 & Video4



- Un ordenador deduce la secuencia de bases a partir de la secuencia de colores detectada.

IMAGEN: upload.wikimedia.org