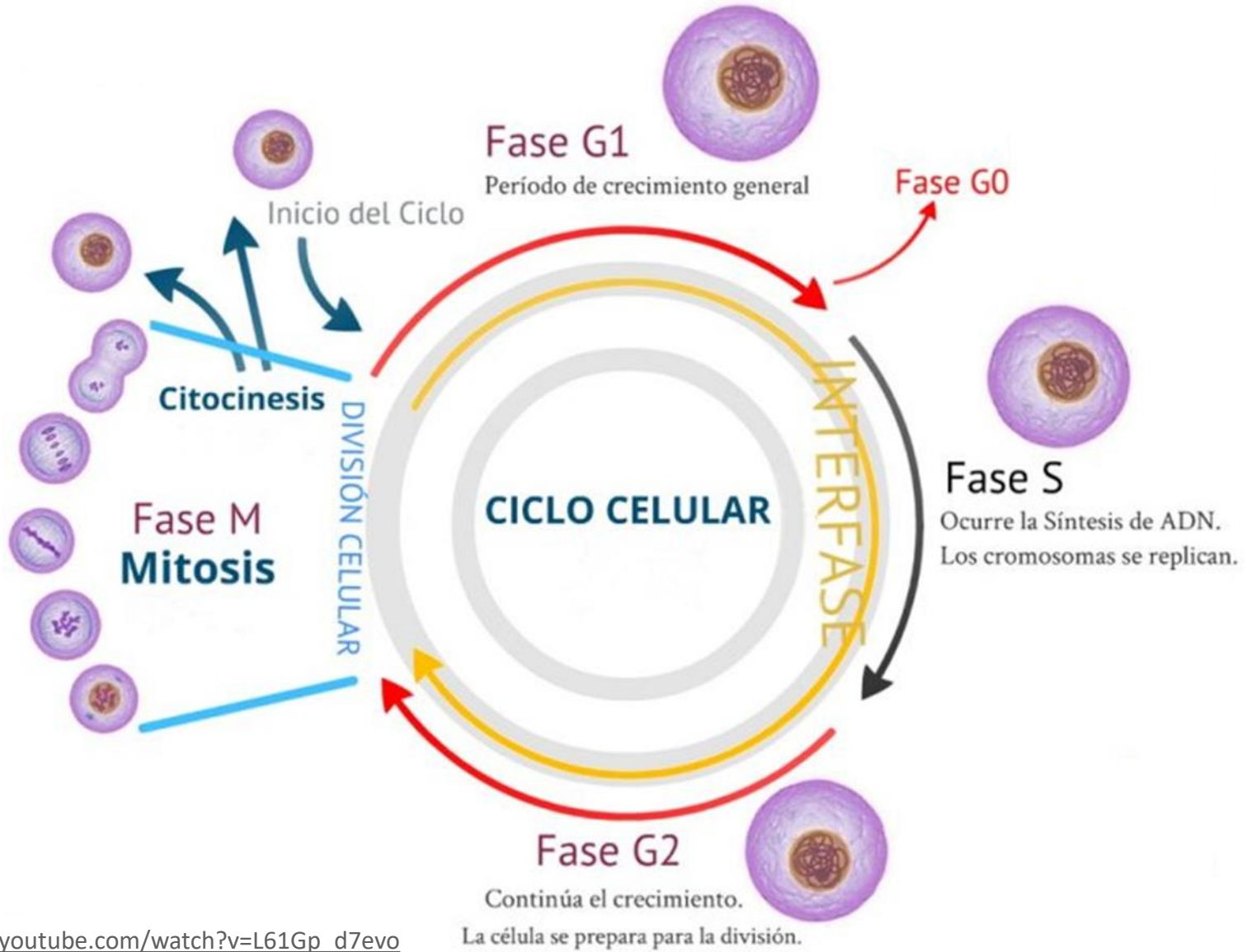


REPLICACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Bibliografía:

- De Robertis, E. y Hib, José. **Fundamentos de Biología Celular y Molecular de De Robertis. 4ta edición (y todas las posteriores).** Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 2004. Capítulo 17.
- Alberts, Bruce y col. **Introducción a la biología celular. 3ra edición (y todas las posteriores).** Ed Médica Panamericana, 2010. Capítulo 6.

Importancia de proceso de replicación del ADN



https://www.youtube.com/watch?v=L61Gp_d7evo

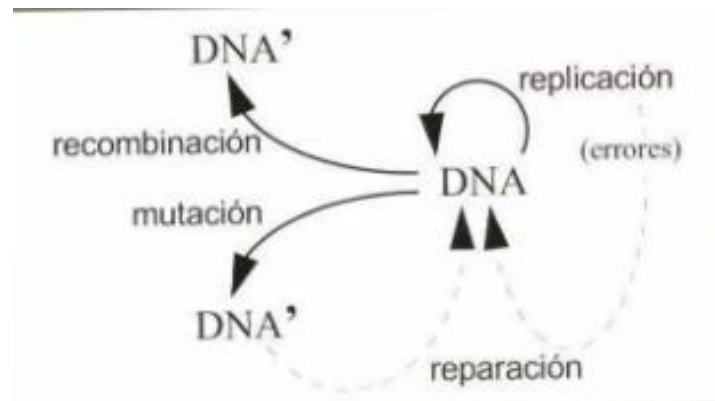
El modelo de doble hélice y la replicación del ADN

- ✓ Antes de la **fase S**, el ADN eucariótico junto con las histonas forman la cromatina.
- ✓ Mientras el ADN está **condensado**, **no se replica**.
- ✓ Por lo tanto, el ADN se debe **separar de las histonas para iniciar la descondensación de la cromatina**.
- ✓ **Una vez libre de las histonas, comienza el proceso de replicación.**

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REPLICACIÓN

¿Qué es la replicación del ADN?

Es el proceso por el que las células sintetizan una copia idéntica de una molécula de ADN, usando el ADN existente como molde de nuevas hebras de ADN; originándose así dos moléculas de DNA hijas, de secuencia idéntica a la del DNA original. Esto permite el paso de la información genética a la descendencia (tanto la de una célula como la del individuo).

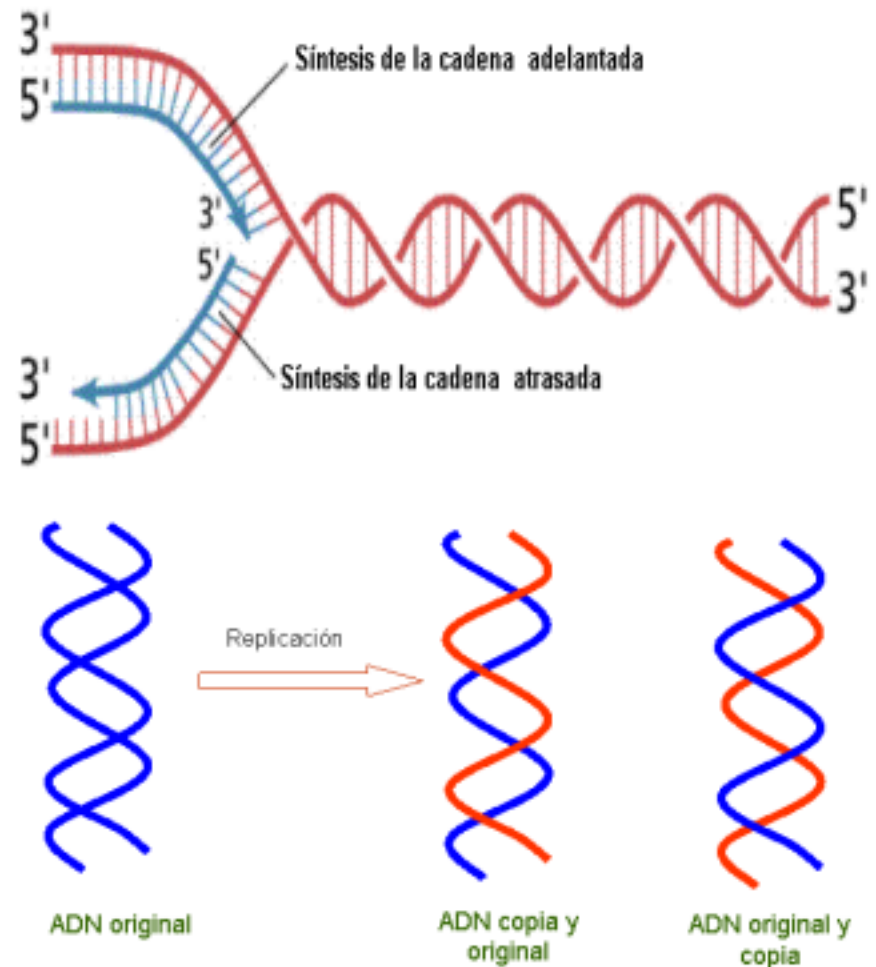


¿Cuándo ocurre la replicación del ADN en los eucariotas?

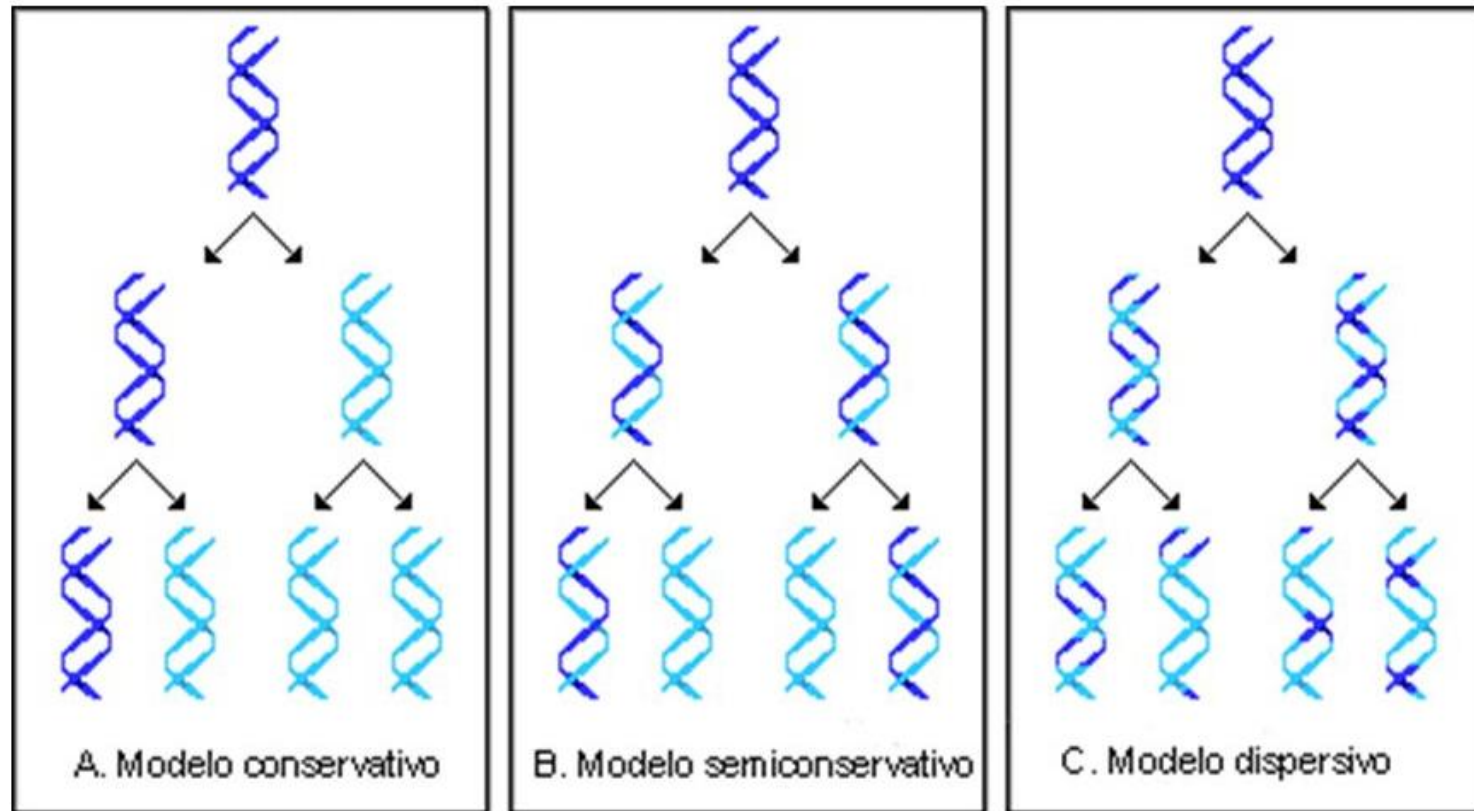
El ADN se replica antes de la división celular (tanto en la mitosis como en la meiosis I), en el período S de la interfase del ciclo celular.

La duplicación o replicación del ADN se caracteriza por ser:

- ❑ **Bidireccional**, la síntesis es en dos direcciones, pero siempre en sentido 5' a 3'.
- ❑ **Semiconservativa**, a partir de una hebra original (templada), se copia una nueva.
- ❑ **Semidiscontinua**, se replica una hebra adelantada y otra retrasada (compuesta por fragmentos de Okazaki).



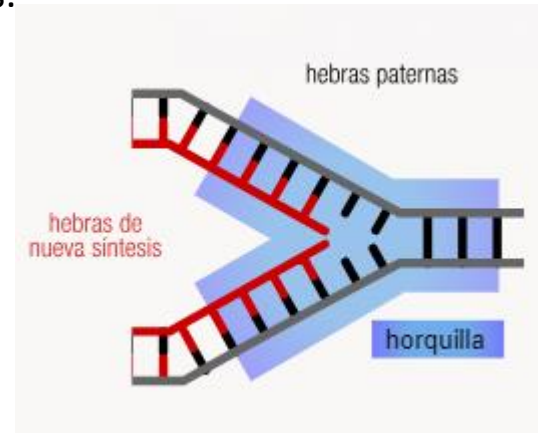
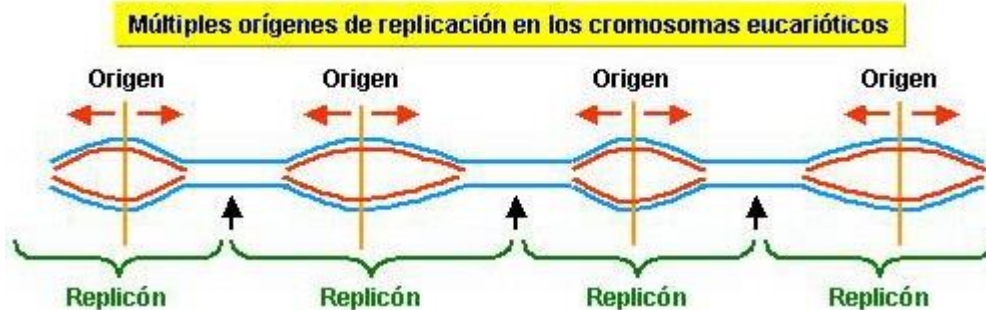
❑ Carácter semiconservador



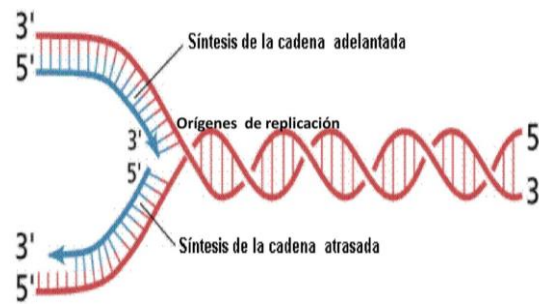
En el modelo semiconservador las dos hebras del DNA progenitor sirven de molde para la síntesis de sus respectivas hebras complementarias. Cada molécula hija de DNA está formada por una hebra progenitora y otra hija (recién sintetizada).

❑ Síntesis simultánea, secuencial y bidireccional

- La síntesis comienza en los orígenes de replicación (un único origen en procariontas, múltiples y orígenes en eucariotas), en **forma simultánea**. La separación de las hebras progenitoras, que comienza en cada origen, progresa en ambas direcciones.



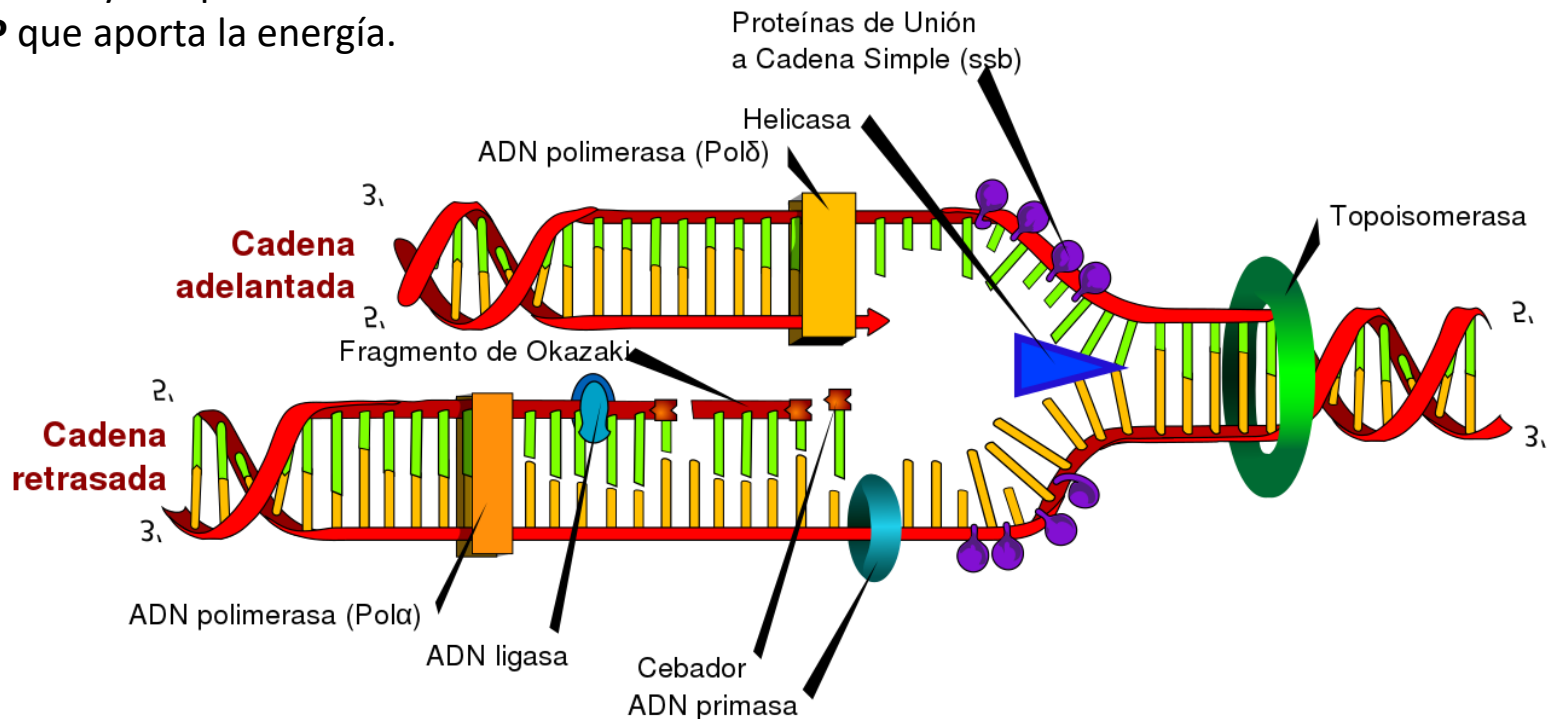
- Alargamiento de las hebras de forma **progresiva** por adición **secuencial** de nucleótidos.
- La síntesis es en dos direcciones, pero siempre en sentido 5' a 3'



Al separarse las cadenas, se forma la horquilla de replicación, estructura en forma de "Y", por la que se desplazan las enzimas que catalizan la replicación del ADN.

Requerimientos de la reacción de síntesis de DNA

- **Molde o plantilla**
- **Sustratos:** El conjunto de los cuatro desoxinucleósidos-trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP.
- **Cebador:** fragmento monocatenario iniciador, que aporte un grupo 3'-OH libre. Se trata de un oligonucleótido, por lo común RNA, que debe estar emparejado con la hebra progenitora de DNA, de forma complementaria y antiparalela.
- **Enzimas:** aceleran y regulan el proceso.
- **Cofactores:** para una actividad óptima se requiere un ion metálico divalente como cofactor, asociado a los dNTP y a la polimerasa.
- **ATP** que aporta la energía.



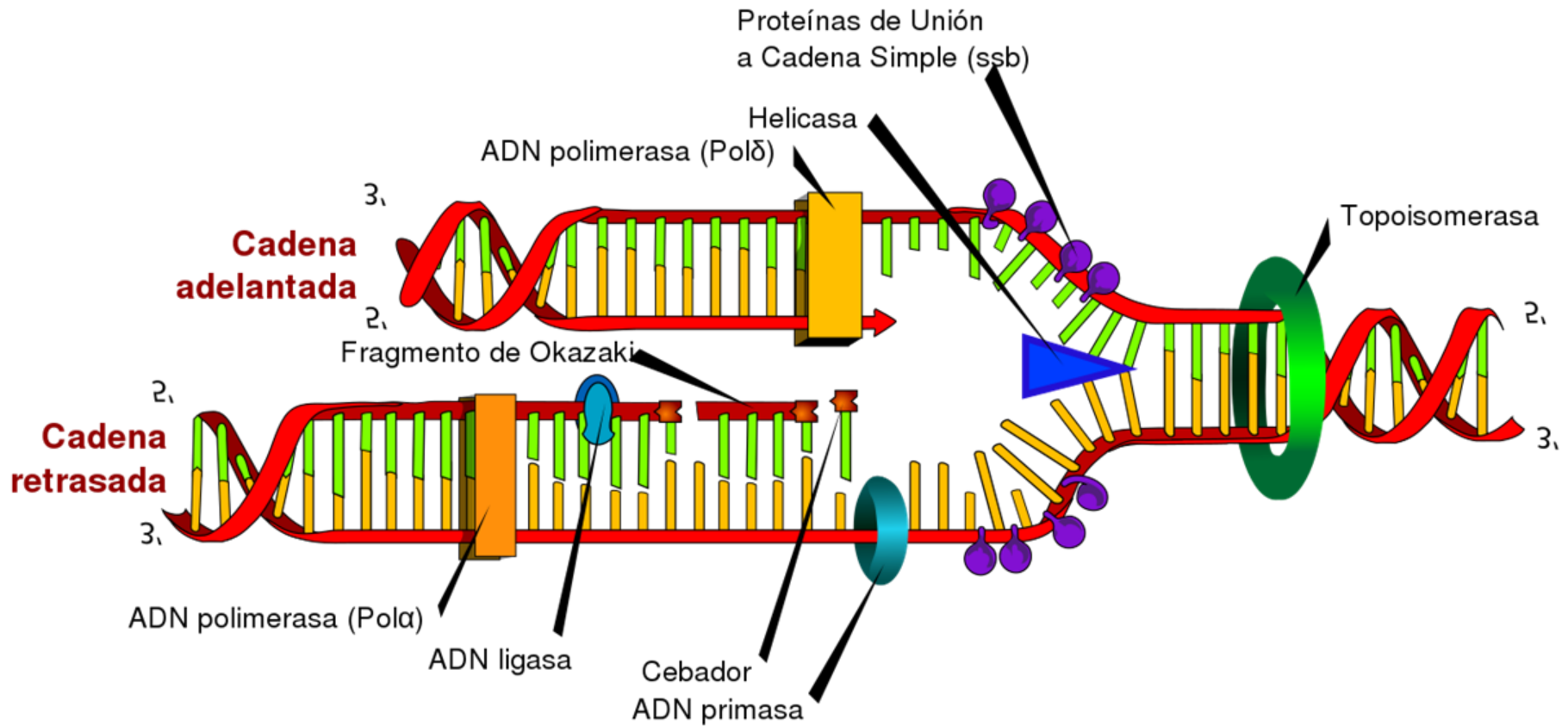
Las enzimas del proceso de replicación del ADN

Enzima	Función
Topoisomerasa	Encargada de disipar la tensión de sobrenrollamiento del ADN.
Helicasa	Encargada de separar las dos hebras de ADN por ruptura de puentes de hidrógeno.
Proteínas de unión a cadena simple (SSB)	Mantiene la estabilidad de la horquilla de replicación evitando que las dos hebras se vuelvan a unir.
ADN polimerasa	Incorpora los nucleótidos correspondientes para las nuevas hebras de ADN (la adelantada y la retrasada).
ADN ligasa	Une los espacios que se generan entre un nucleótido y otro dentro de una misma hebra.
Primasa	Agrega los ribonucleótidos que forman parte de los primer o cebadores (tiene una actividad de ARN polimerasa).

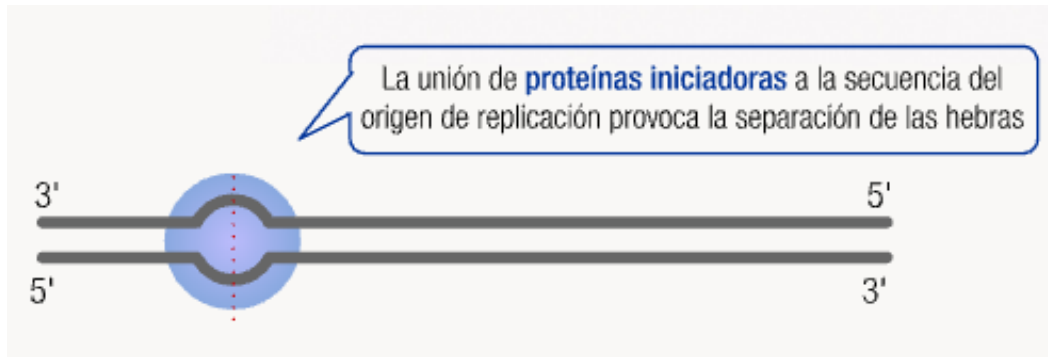
Las DNA polimerasas eucarióticas

Polimerasa:	Procariotas			Eucariotas				
	I	II	III	α	β	γ	δ	ϵ
Ubicación subcelular				Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Actividades enzimáticas:								
Primasa (inicio)	No	No	No	Sí	No	No	No	No
Polimerasa 5' → 3' (elongación)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3'-Exonucleasa (o 3' → 5') (corrección de pruebas)	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí
5'-Exonucleasa (o 5' → 3') (eliminación de cebadores)	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Función en la célula:								
Replicación (síntesis continuada de hebras nuevas, adelantada y retardada)	No	No	Sí	Sólo inicialmente	No	Sí	Sí	Sí
Empalme de fragmentos de Okazaki	Sí	No	No	No	No		Sí (con nucleasas)	
Velocidad de replicación:								
Velocidad de polimerización (nucleótidos/segundo)	16-20	2-7	250-1.000					
Procesividad (nucleótidos añadidos antes de su disociación)	Baja 3-200	Media ≥ 10.000	Muy alta $\geq 5 \times 10^5$	Baja 100-200	Baja	Elevada	Elevada con PCNA ≥ 5.000	Elevada con/sin PCNA

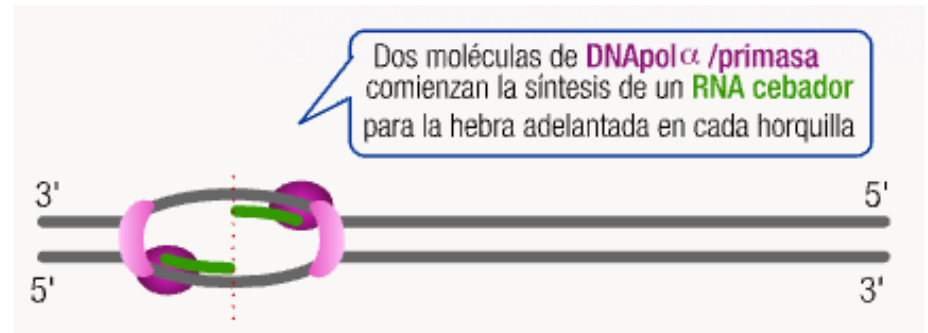
ETAPAS EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN



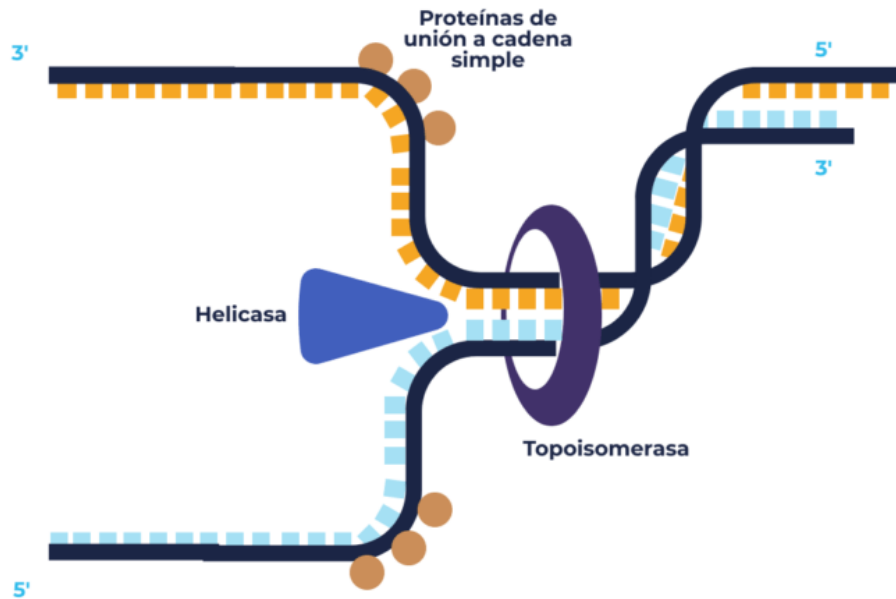
INICIACIÓN



- Apertura de la doble hélice en el origen de replicación.
- Creación de dos horquillas de replicación y síntesis de cebadores.



Conexión entre la iniciación y la elongación



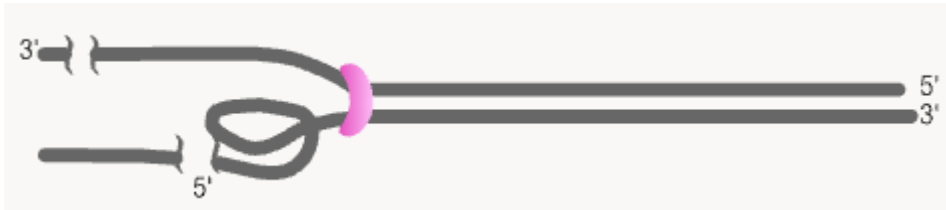
Una vez separadas las hebras por la helicasa, intervienen las “**proteínas ligantes de DNA monocatenario**”, que evitan el reemparejamiento de las hebras.

La apertura de la doble hélice ocasionada por la progresión de la **helicasa** (en un proceso que requiere la hidrólisis simultánea de ATP) a lo largo del DNA bicatenario conlleva la aparición de superenrollamientos positivos por delante de la horquilla.

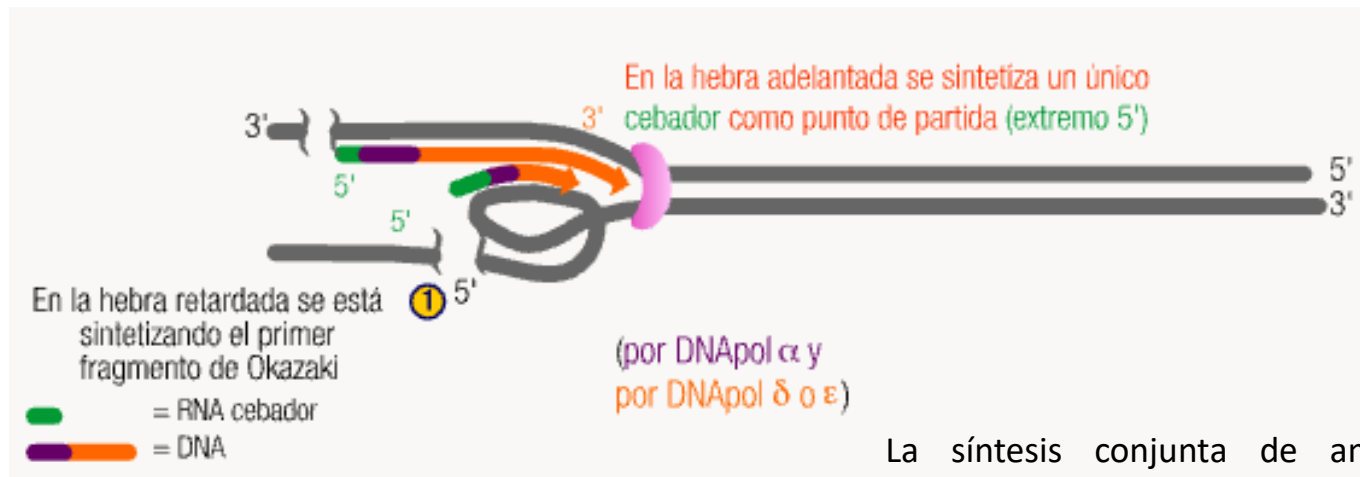
Esta tensión deben liberarse para permitir el progreso de la replicación. De esta tarea se encargan las **topoisomerasas**.

Asimetría de la replicación en ambas hebras

Mecanismo de replicación de la hebra retrasada: Síntesis discontinua en “**fragmentos de Okasaki**” → **Porción de hebra**



cada fragmento de Okazaki corresponde a una porción de dicha hebra. Su síntesis comienza cuando la hebra molde sencilla forma un bucle para permitir la síntesis en el sentido 5' → 3' propio de la polimerasa.



La síntesis conjunta de ambas hebras (la adelantada, de forma continua, y la retardada, de forma discontinua), se dice que es **semidiscontinua**.

MECANISMO DE LA ELONGACIÓN

La horquilla de replicación se desplaza continuamente, y a la vez se van sintetizando ambas hebras

La hebra adelantada se va elongando de forma continua (▶ = extremo 3' en crecimiento)

Gracias a que la hebra retardada forma un bucle, la síntesis se puede hacer 5' → 3' a la vez que avanza la horquilla

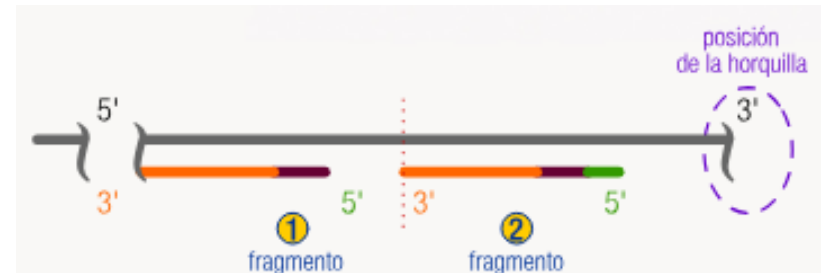
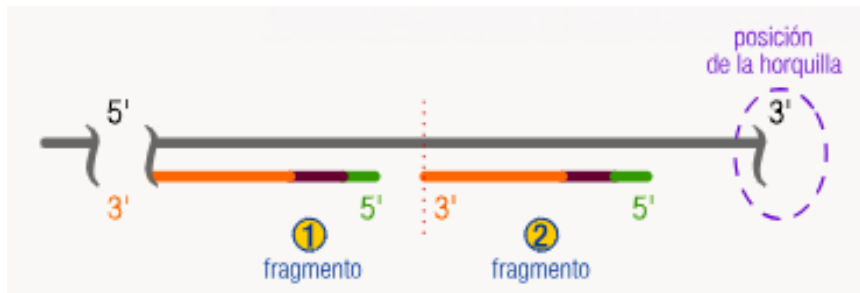


una vez terminado el primer fragmento de Okazaki y situado fuera de la horquilla, se está sintetizando el segundo

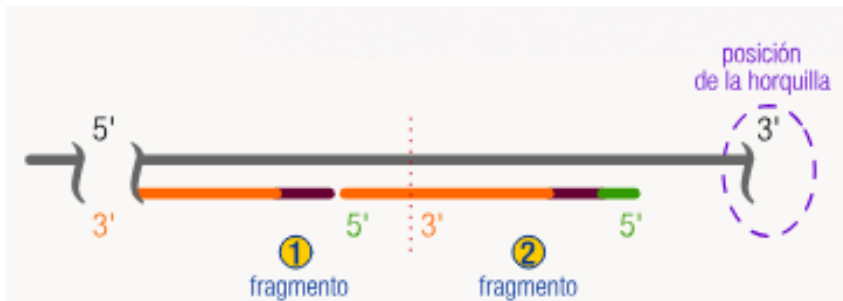


En esta etapa ya se está sintetizando el tercer fragmento de Okazaki

Maduración de los fragmentos de Okazaki



Un sistema de nucleasas (**FEN1 + RNasa H1**) elimina el RNA cebador del fragmento nº 1

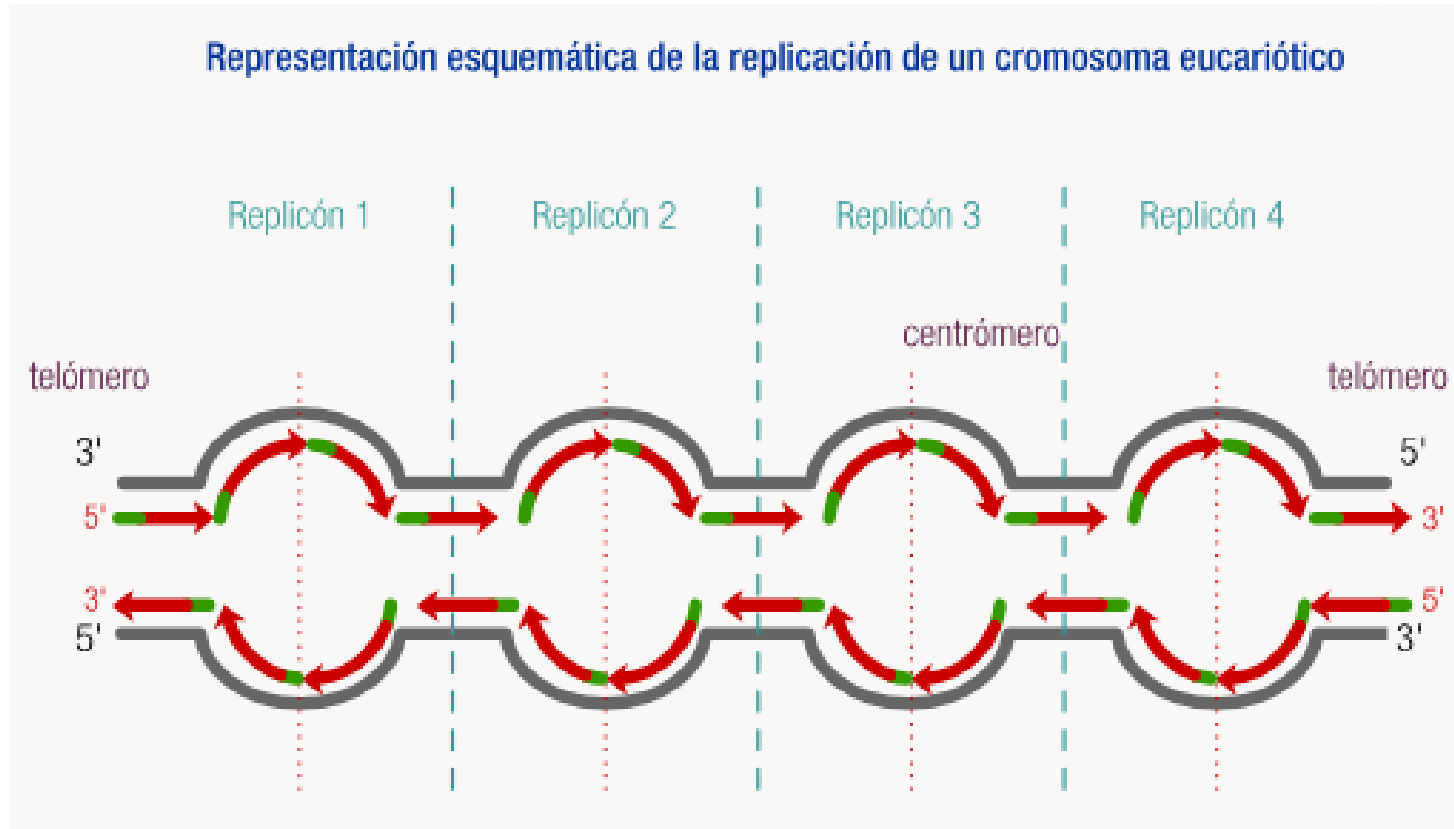


La **DNApol δ** o **DNApol ϵ** elonga el extremo 3' del fragmento nº 2, rellenando el lugar que antes ocupaba el cebador, hasta alcanzar el extremo 5' del fragmento nº 1



La **DNA ligasa I** sella la mella resultante, uniendo el 5'-P del fragmento nº 1 con el 3'-OH del nº 2

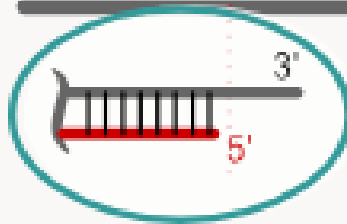
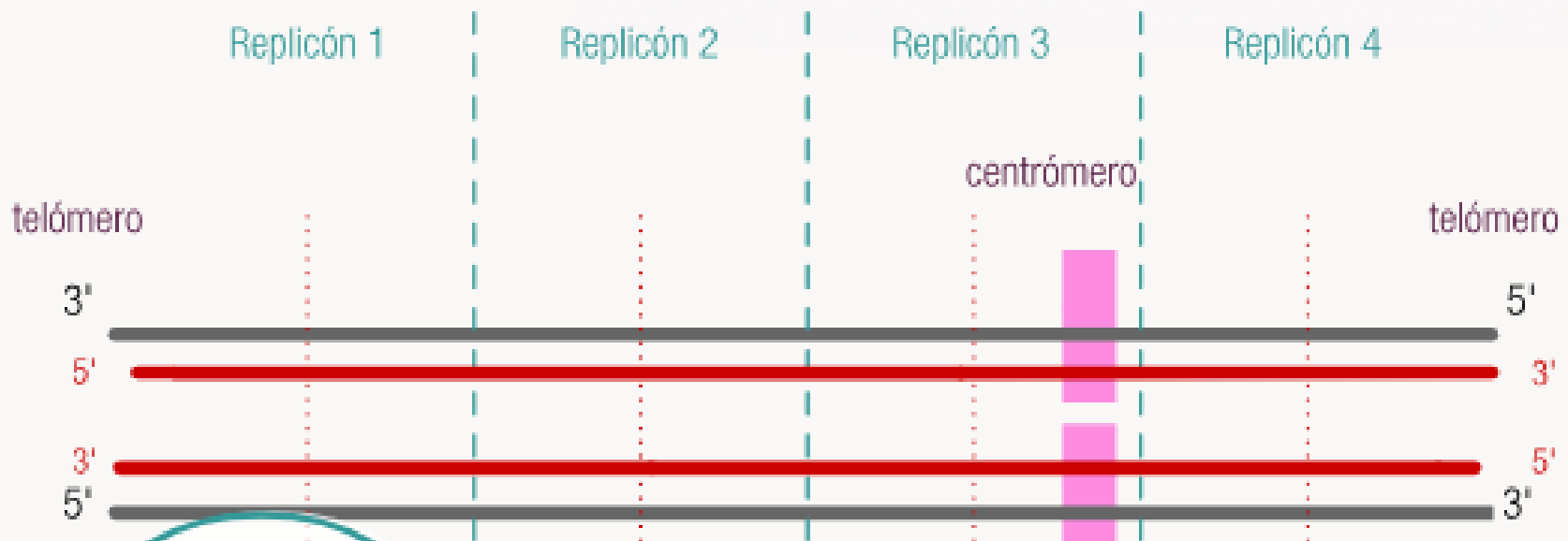
TERMINACIÓN



La finalización propiamente dicha de la elongación por la DNA polimerasa, que se verifica en las dos horquillas de replicación de cada replicón, previsiblemente cuando en su avance alcancen a las horquillas respectivas de replicones adyacentes.

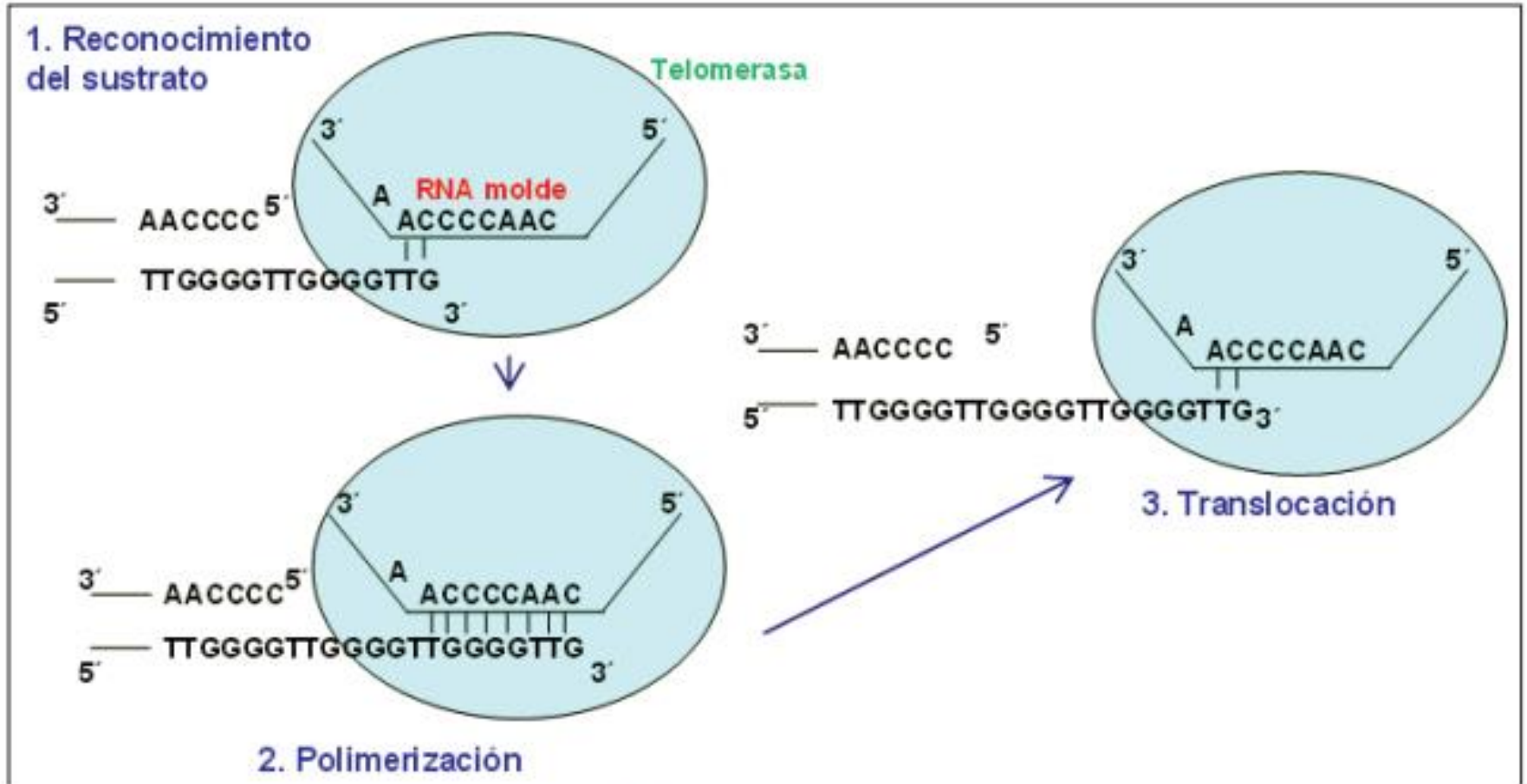
El relleno de huecos y la unión de los dos tramos de nueva hebra pueden resolverse de la misma forma que la maduración y unión de los fragmentos de Okazaki.

Representación esquemática de la replicación de un cromosoma eucariótico

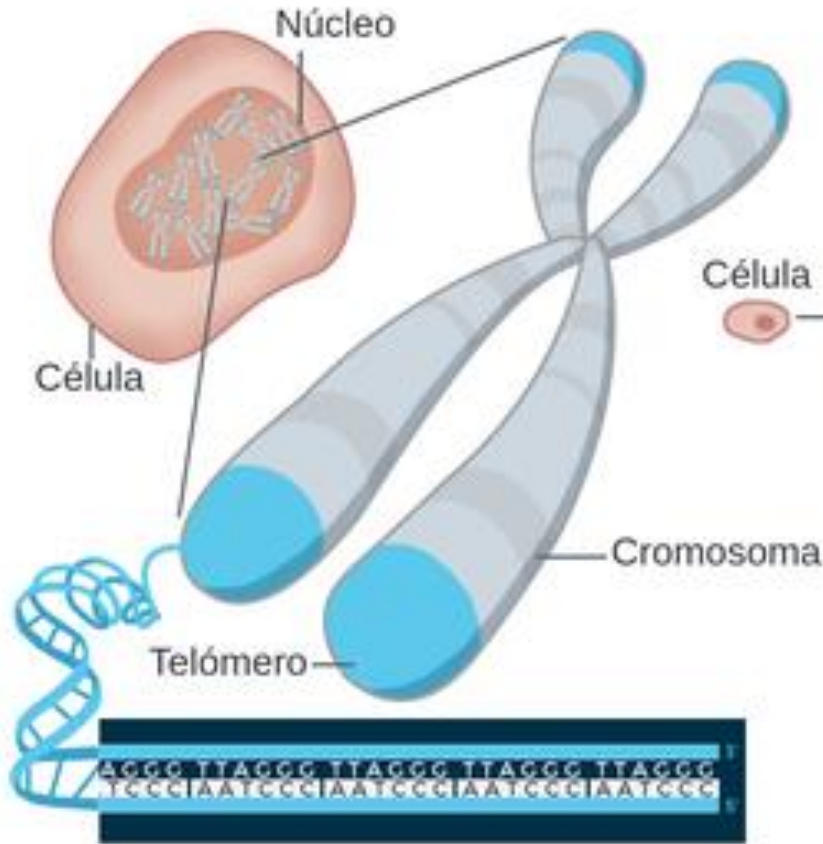


Todos los cebadores intermedios son eliminados por las nucleasas (FEN1 y RNasa H1) y sustituidos mediante la elongación del fragmento de Okazaki adyacente. Los cebadores de los extremos 5' de las hebras nuevas también pueden ser eliminados, pero no sustituidos; por ello, las hebras nuevas quedan más cortas en 5' que su molde.

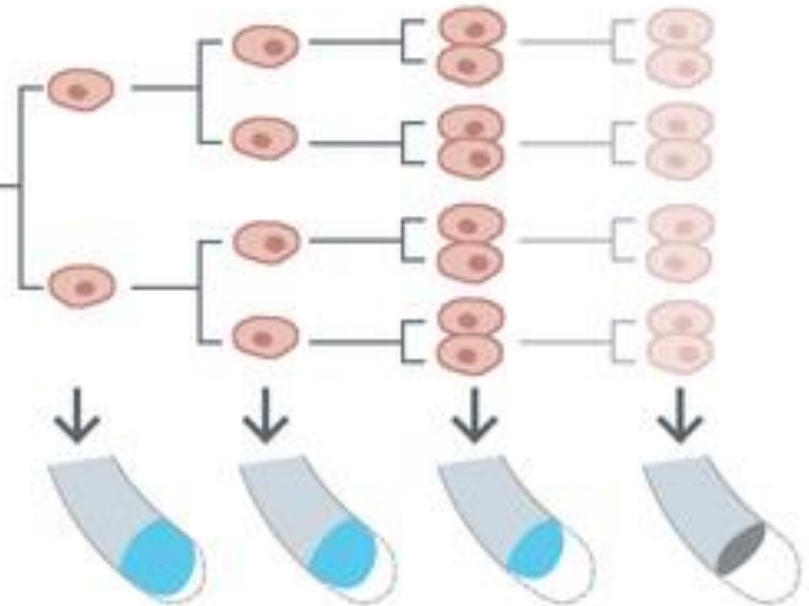
REPLICACIÓN DE LOS TELÓMEROS



Acortamiento telomérico



A medida que la célula (sana) se divide...



...los telómeros se acortan hasta que envían a la célula la señal para que deje de dividirse (senescencia).