

# Clase 4: Replicación del DNA

Dra. Silvina M Richard  
Genética Molecular 2018

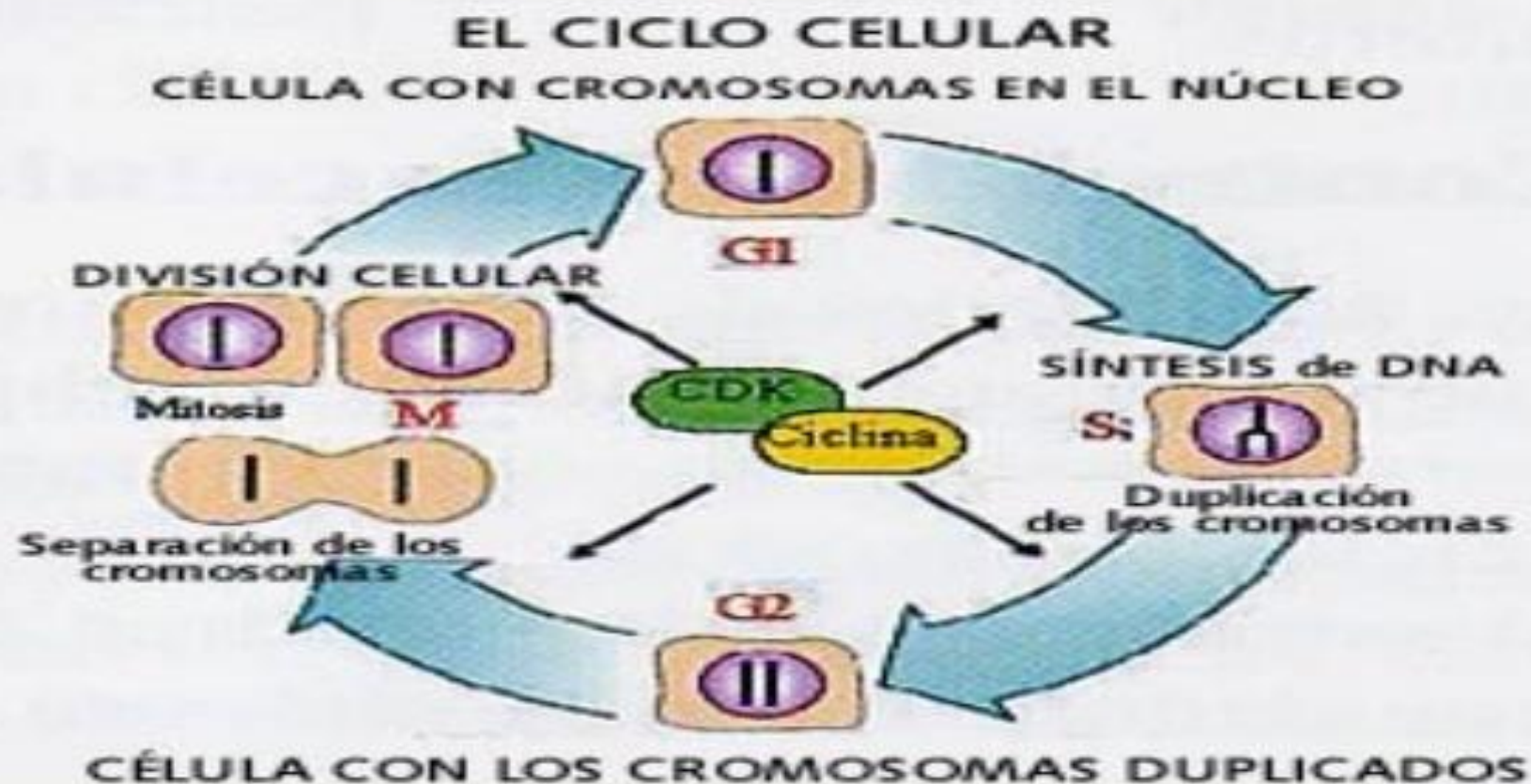
# Replicación del ADN

[HTTPS://YOUTU.BE/WTRA-NSERKY](https://youtu.be/wtra-nserry)  
[HTTPS://YOUTU.BE/CAIERTUB2HU](https://youtu.be/caiertub2hu)

# Contenidos

- Replicación del ADN en células procarióticas y eucarióticas.
- Etapas.
- Enzimas que participan.
- Inhibidores

# ¿En que momento ocurre?

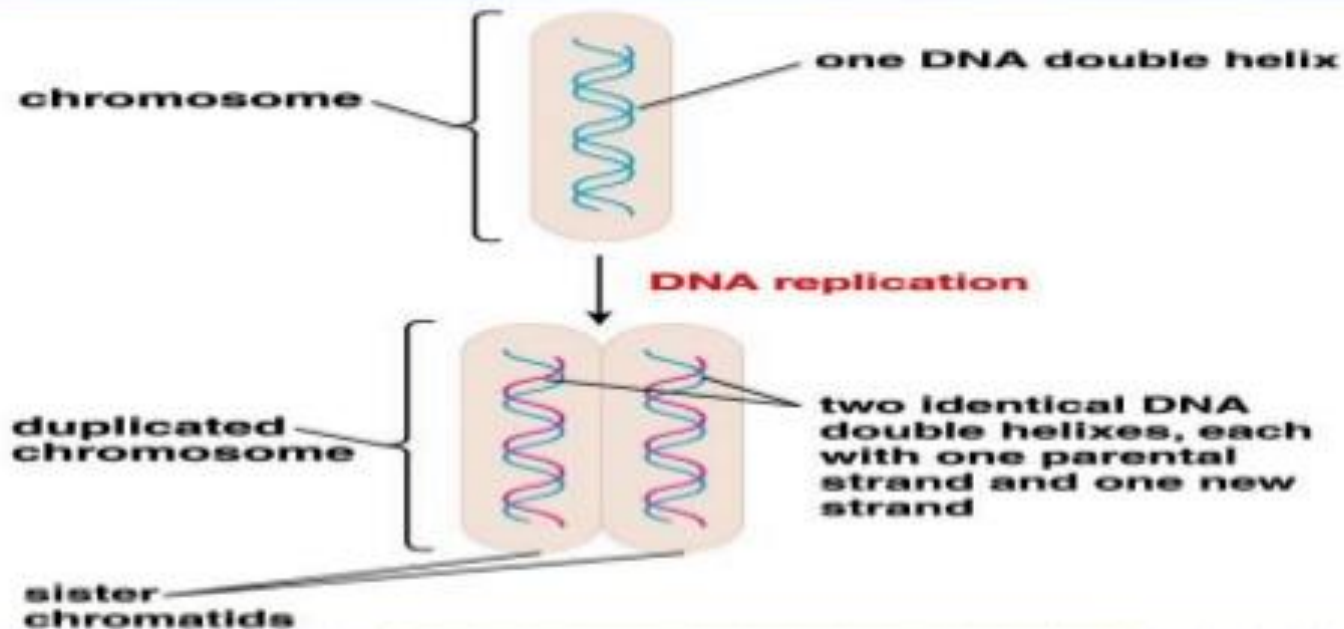


En células procarióticas la duplicación del ADN toma aproximadamente 40 minutos, mientras que la división celular toma 20 minutos, por este motivo estas células comienzan rondas replicación del ADN anticipadas a la división.

# Características de la Replicación del ADN

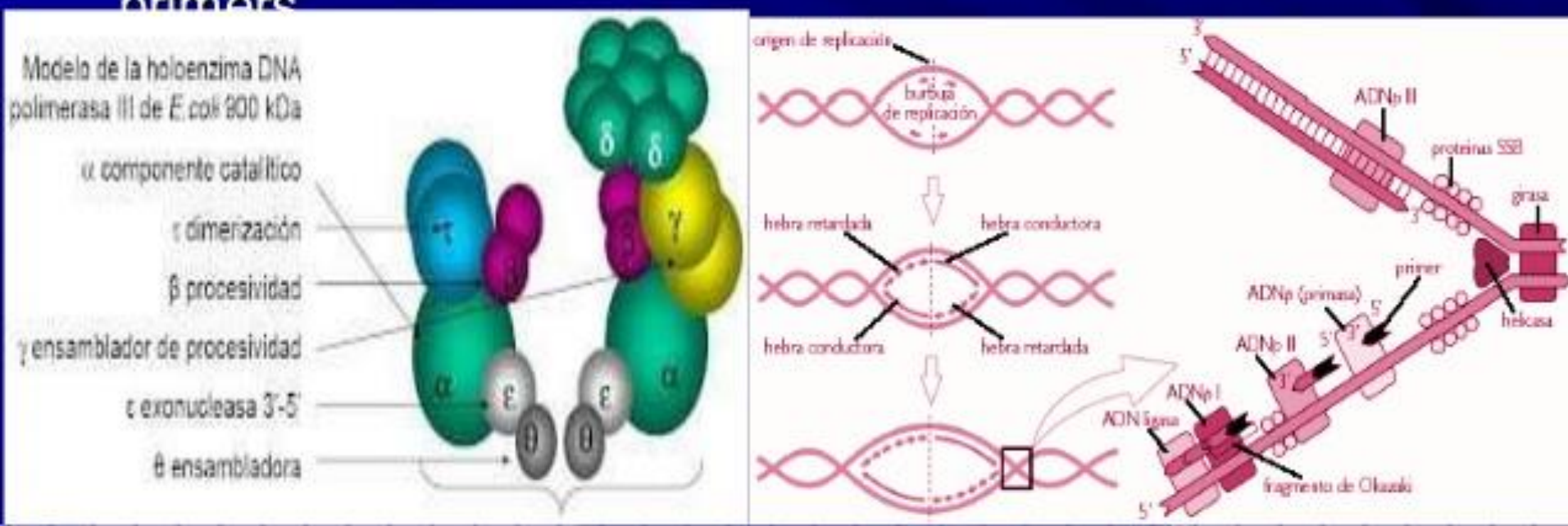
# Replicación del ADN

- Es el proceso mediante el cual la molécula de ADN hace copias de sí misma (y, por tanto del cromosoma).
- El resultado son dos cadenas ADN en las cuales se conserva una molécula parental y hay otra nueva = **semiconservativo** (Meselson-Stahl 1957) <https://youtu.be/sXlguPW5Ctg>
- En el núcleo hay muchos nucleótidos libres que son los bloques de construcción del nuevo ADN .



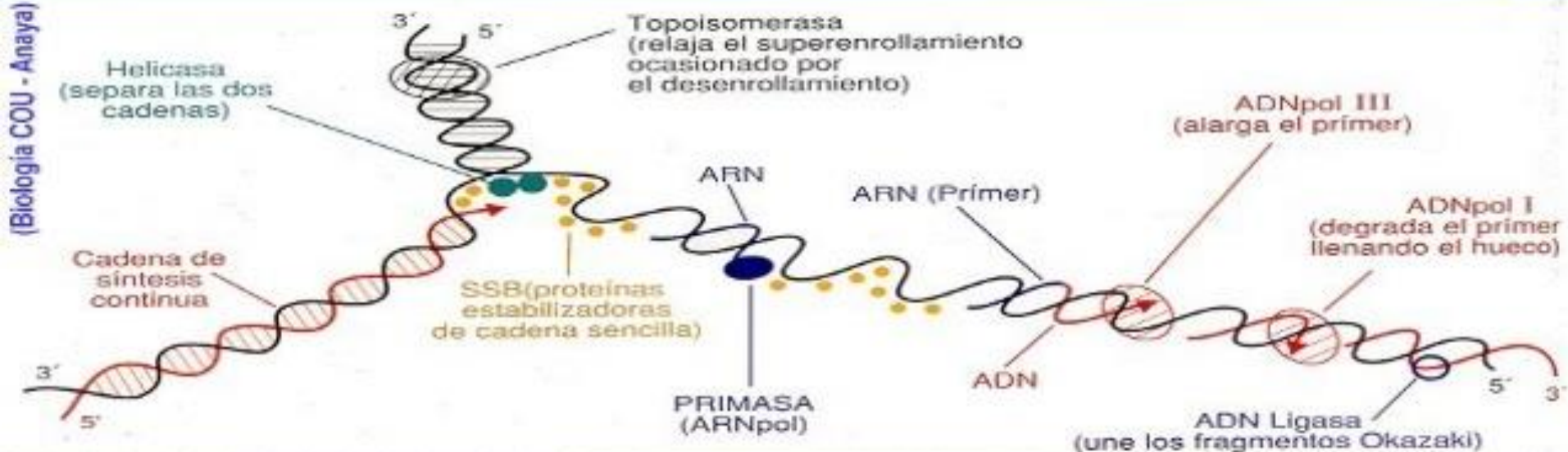
# Replicación del ADN

- La síntesis de la nueva molécula de ADN es siempre en **sentido 5' a 3'**.
- Las **DNA polimerasas** son las enzimas que participan de la polimerización, para ello necesitan de un extremo OH 3' libre.
- Para que trabaje la ADN polimerasa es necesario la presencia, en el inicio de cada nuevo fragmento, de pequeñas unidades de ARN conocidas como cebadores o **primers**.



# Replicación del ADN

- Se requieren de otras enzimas como las **helicadas, primasas o cebadoras, topoisomerasas (girasas), proteínas de unión al DNA de simple cadena y ligasas.**
- Como las cadenas del ADN son antiparalelas, y la replicación procede solo en la dirección 5' a 3' en ambas cadenas, numerosos experimentos mostraron que, una cadena se formará una copia continua, mientras que en la otra se formarán una serie de fragmentos cortos conocidos como fragmentos de Okazaki . . .

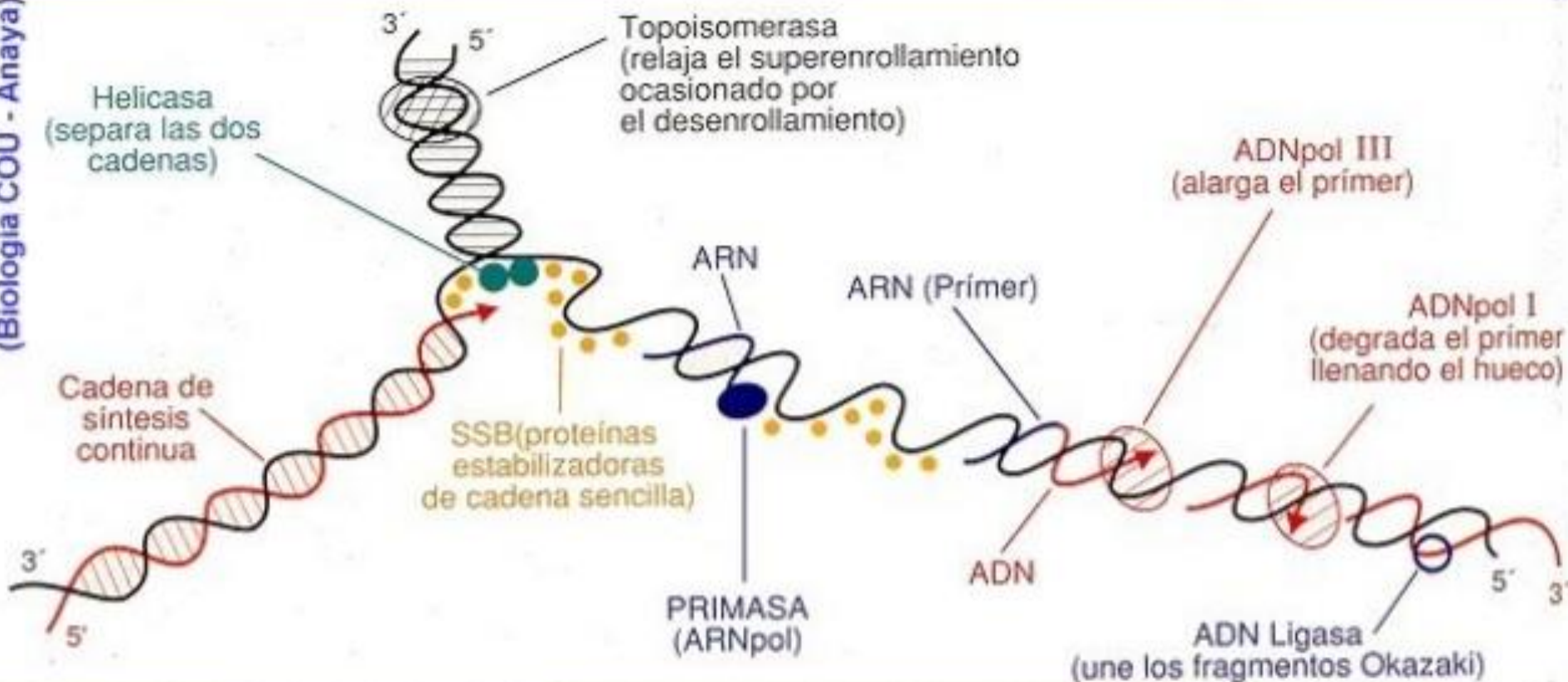




# Replicación del ADN

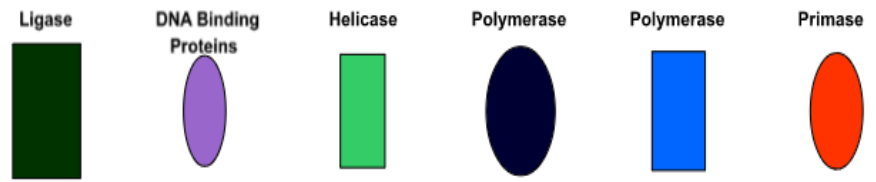
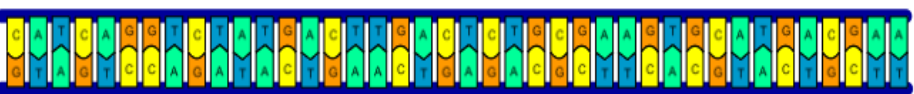
- La cadena que se sintetiza de manera **continua** se conoce como cadena **adelantada** y, la que se sintetiza en fragmentos, cadena **atrasada o retardada (discontinua)**

(Biología COU - Anaya)





# DNA Replication

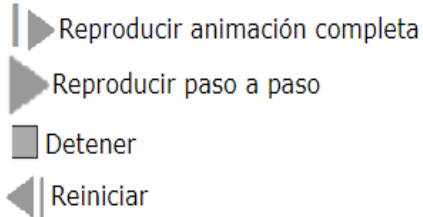


## Replicación del DNA - animación nº7

En primer lugar, las **topoisomerasas** van facilitando la tarea de la **helicasa**, que separa las hebras para que la **polimerasa** (DNApol-III en procarionotas<sup>\*\*</sup>) pueda acceder al molde. La **primasa** (<sup>\*\*</sup>) comienza la síntesis de la nueva hebra adelantada y de cada uno de los fragmentos de Okazaki de la nueva hebra retardada.

Transcurrida la síntesis, otra **polimerasa** (DNApol-I en procarionotas<sup>\*\*\*</sup>) degrada los cebadores sintetizados anteriormente por la **primasa** y los sustituye por DNA alargando el fragmento vecino.

Finalmente, la **ligasa** recorre el DNA formando los enlaces covalentes que faltan para que los fragmentos de Okazaki queden unidos ("sellando las mellas").



<http://biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/replic/replic7.html>

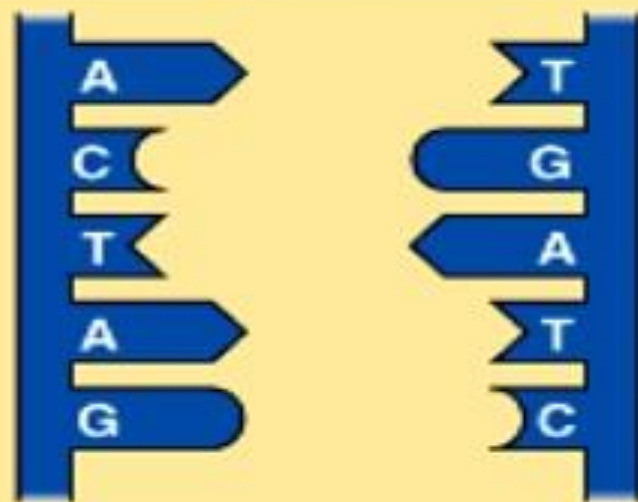
*Notas:*

- \* El papel de la DNApol-III procarionótica lo realiza en eucariotas DNApol- $\alpha$  inicialmente, luego DNApol- $\delta$  o DNApol- $\epsilon$ .
- \*\* El papel de la **primasa** procarionótica lo realiza en eucariotas DNApol- $\alpha$  (con su actividad primasa).
- \*\*\* El papel de la DNApol-I procarionótica lo realiza en eucariotas una combinación de nucleasas y DNA-polimerasa (posiblemente  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ ).

# Pasos de la replicación

# Replicación

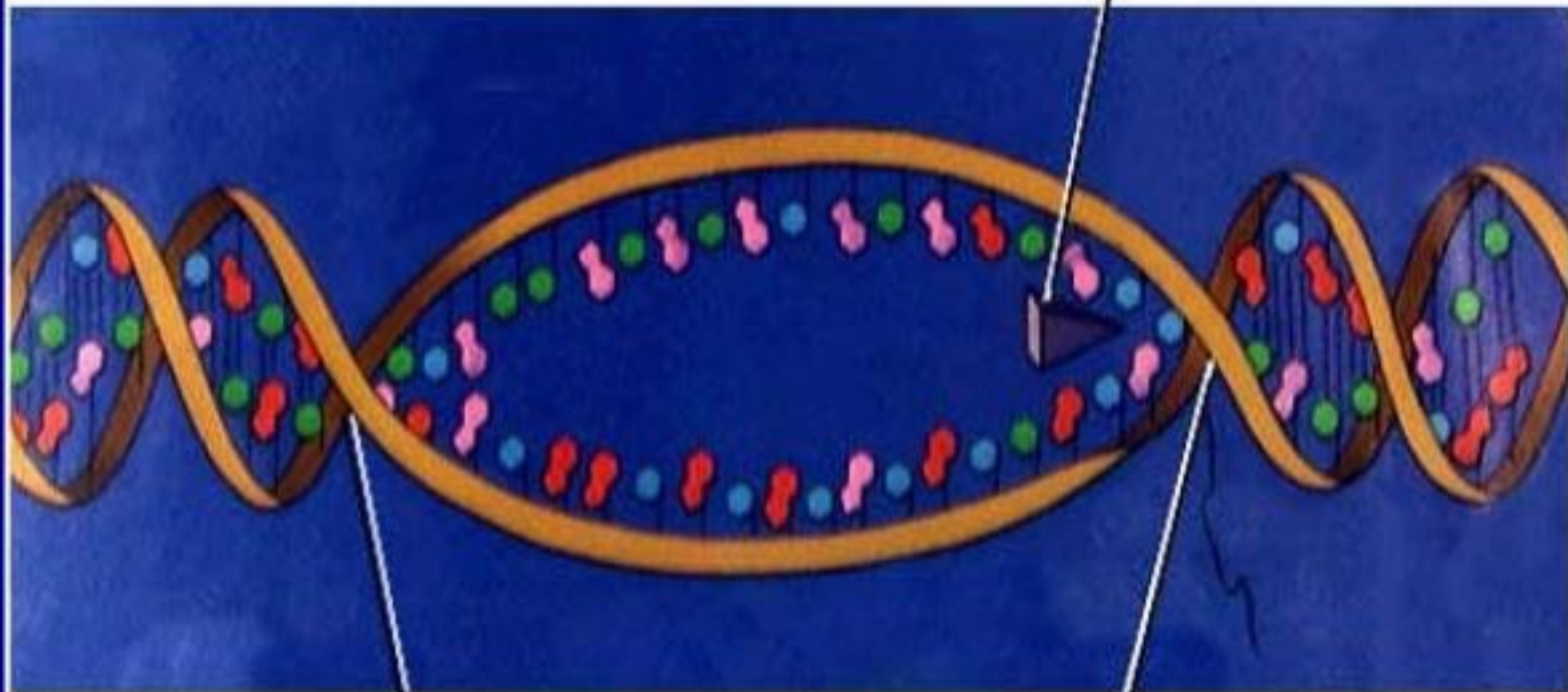
- El primer paso durante la replicación del DNA es el desenrollamiento del ADN de la doble hélice y la separación de las dos hebras
- Participan las enzimas topoisomerasas y helicasas



**(b) The first step in replication is separation of the two DNA strands.**

# Replicación del DNA

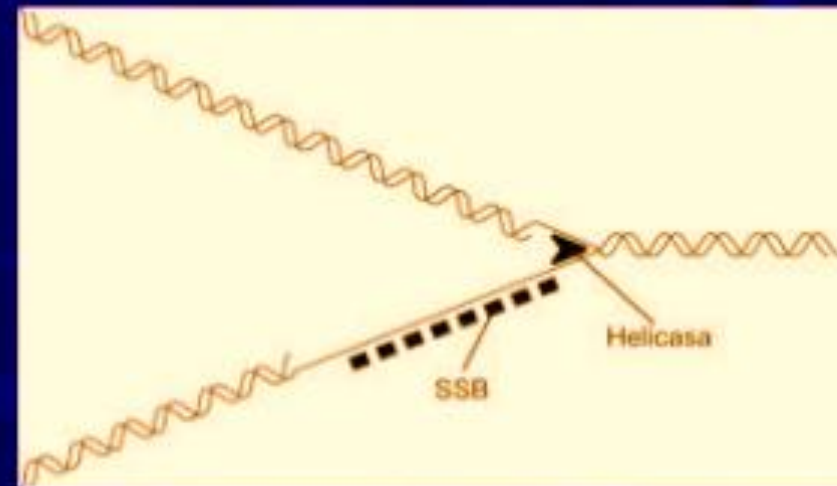
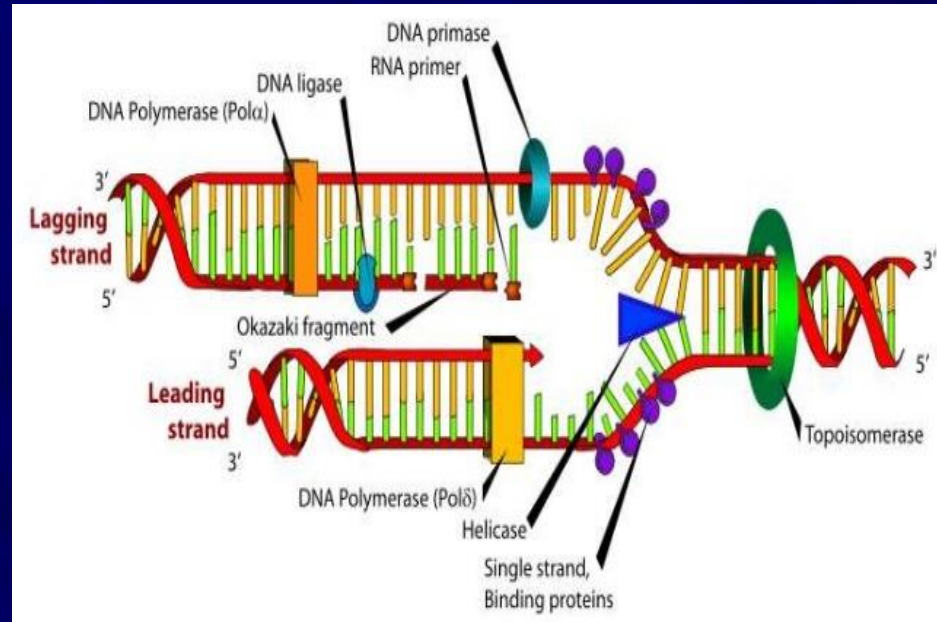
**Helicasa desenrollando la doble hélice**



**Horquilla de replicación**

# Replicación de DNA

- Las topoisomerasas desenrollan el ADN
- La helicasa separa la doble hélice del DNA
- Las proteínas de unión al ADN de una sola cadena, estabilizan la hebra parental desenrollada del DNA



# Replicación del ADN

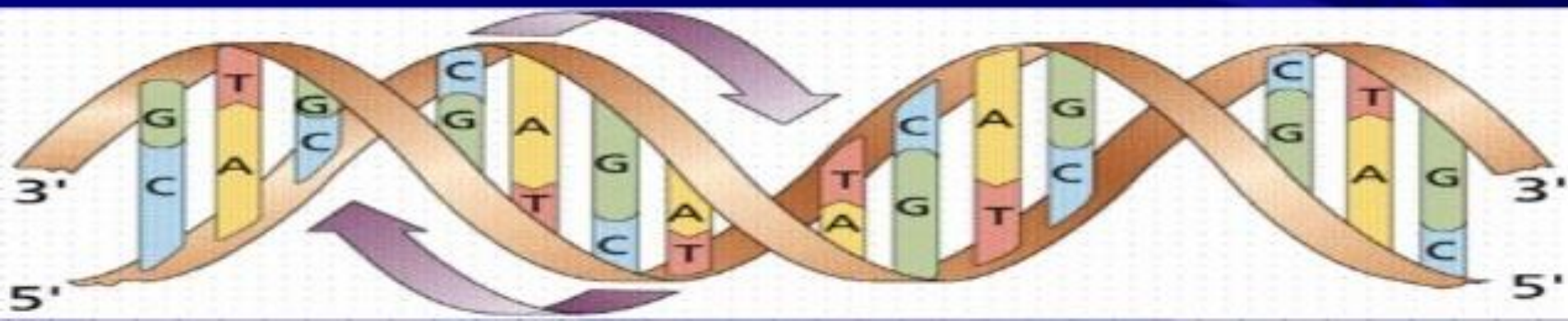
- Cada hebra parental ahora sirve como templado (molde) que determina el orden de nucleótidos a lo largo de la nueva hebra complementaria.



**(c) Each parental strand now serves as a template that determines the order of nucleotides along a new complementary strand.**

# Replicación del ADN

- Las cadenas del ADN son antiparalelas, y la replicación procede solo en la dirección 5' a 3' en ambas cadenas, numerosos experimentos mostraron que, una cadena se formará una copia continua, mientras que en la otra se formarán una serie de fragmentos cortos conocidos como fragmentos de Okazaki .
- La cadena que se sintetiza de manera continua se conoce como cadena **adelantada** y, la que se sintetiza en fragmentos, cadena **atrasada o retardada**.

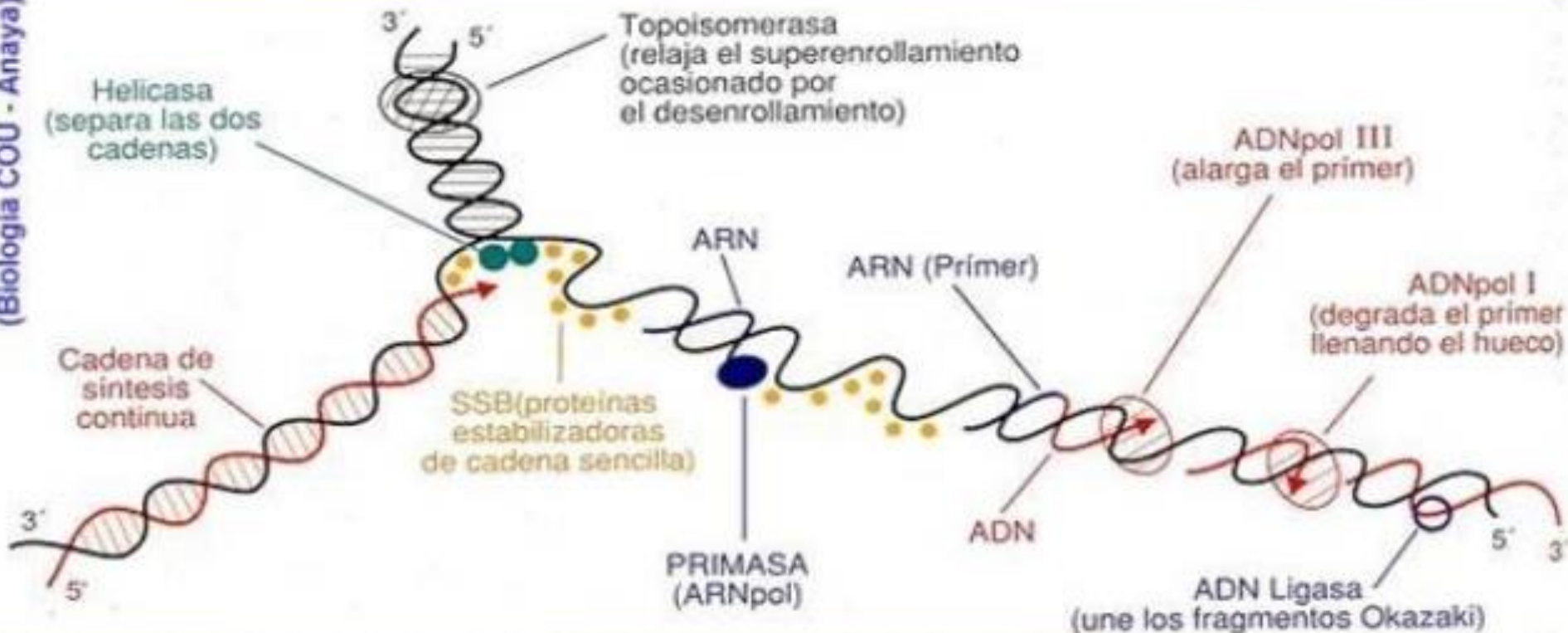




# Replicación de DNA

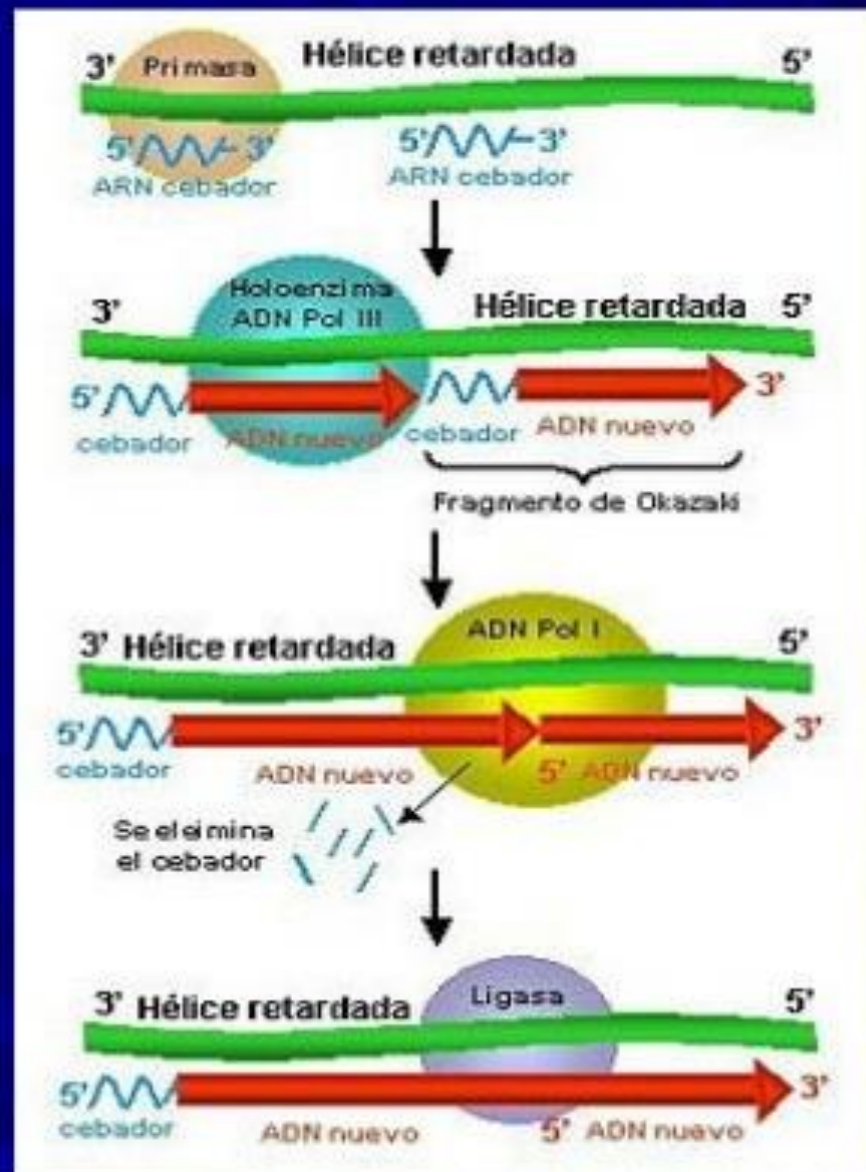
- La hebra continua o “leading strand” es sintetizada en dirección de 5'a 3' por la DNA polimerasa

(Biología COU - Anaya)



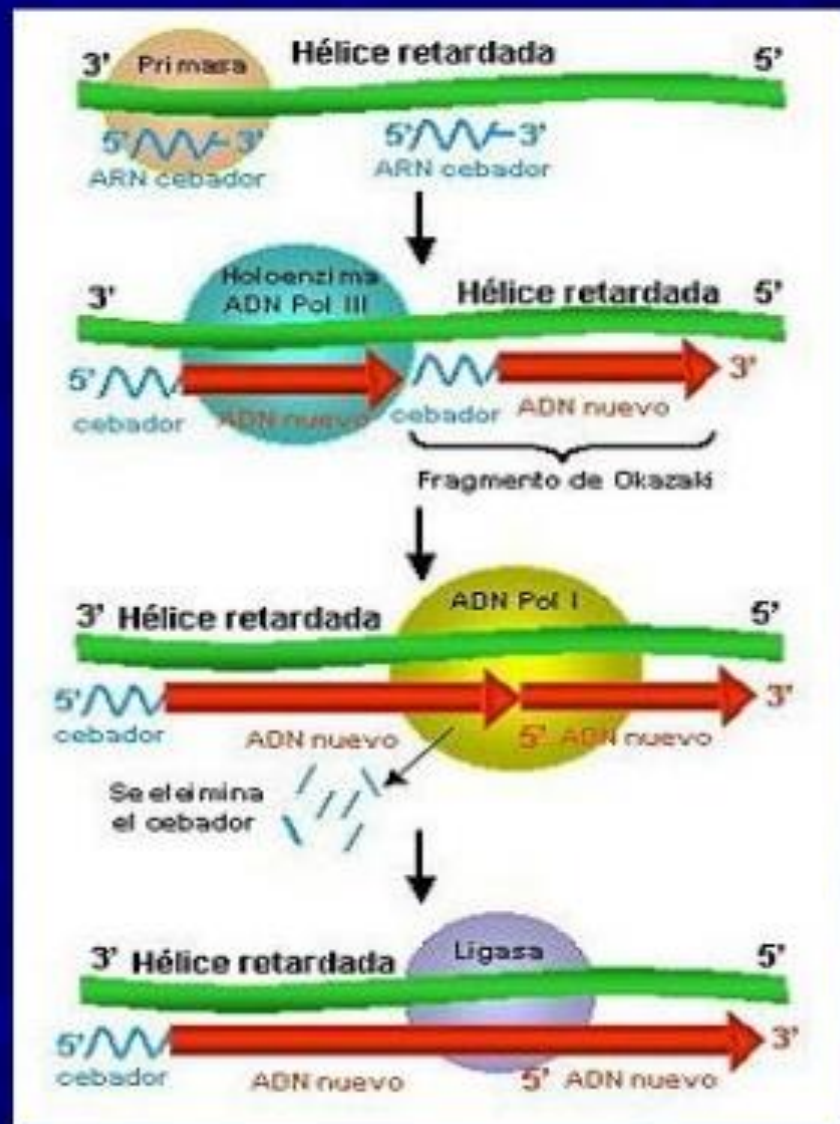
# Replicación de DNA

- La hebra discontinua o “lagging strand” es sintetizada de 5´a 3´, a partir de una hebra molde que va de 5´a 3´, por lo tanto, la primasa coloca pequeñas secuencias de RNA (cebadores) que son extendidos por la DNA polimerasa formando fragmentos de Okazaki



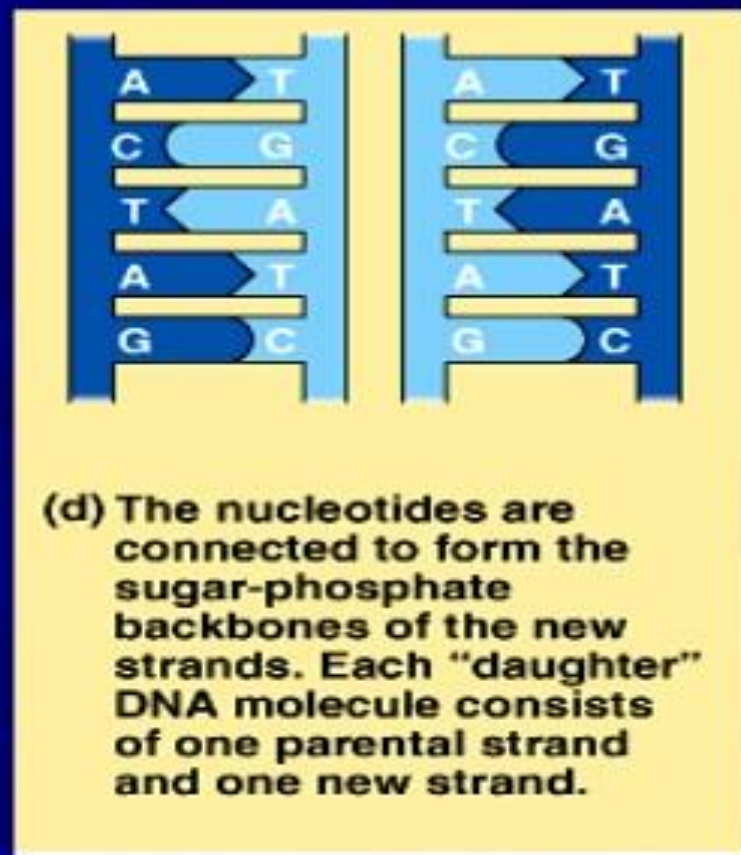
# Replicación de DNA

- Otra DNA polimerasa reemplaza los cebos o “primers” de RNA por DNA
- La DNA ligasa une los fragmentos de Okazaki



# Replicación de DNA

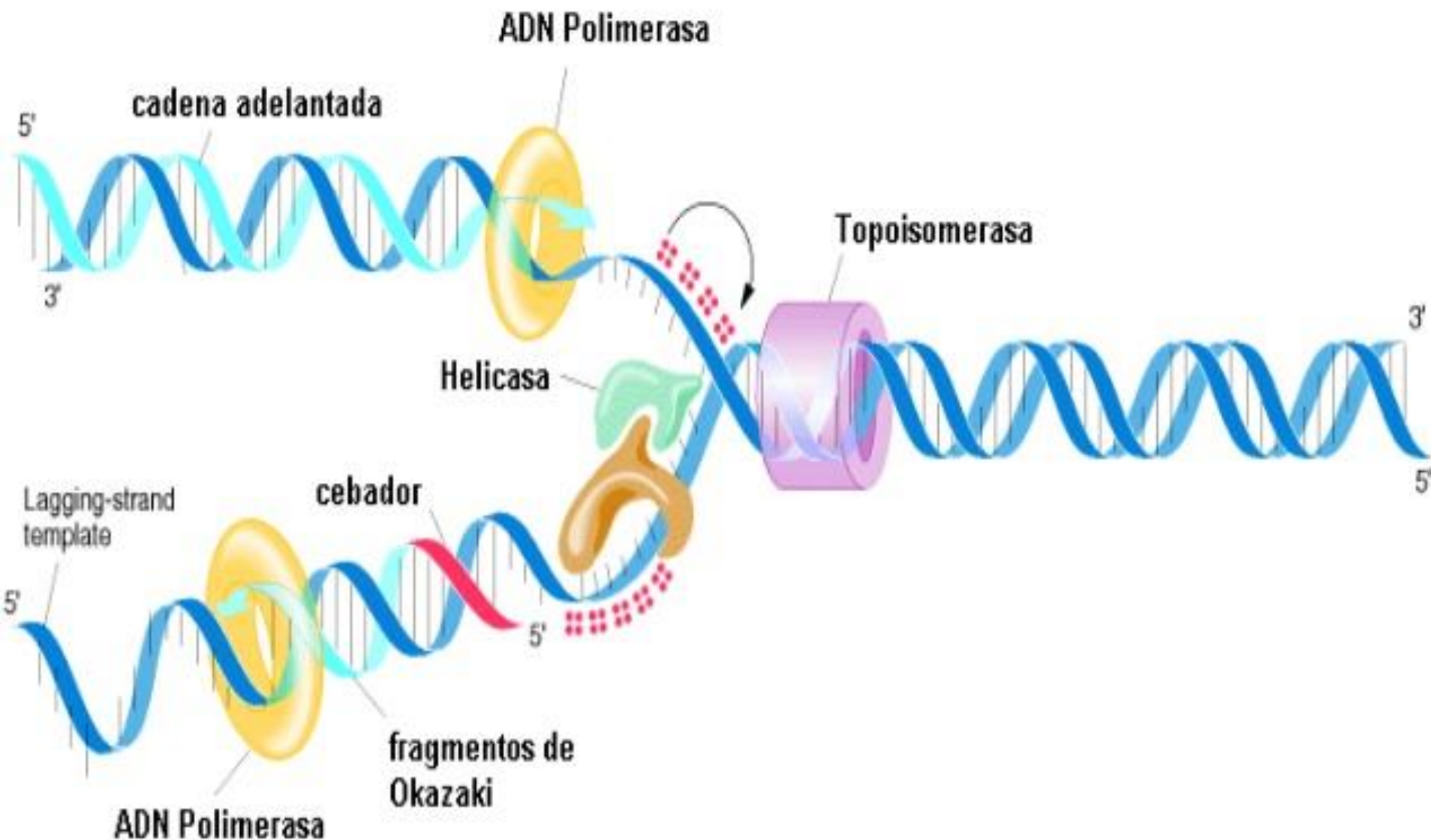
- Los nucleótidos están conectados para formar los enlaces entre los fosfatos y azúcares de la nueva hebra
- Cada molécula “hija” de DNA consiste de una hebra parental y una hebra nueva  
(semiconservativa)



# Replicación del ADN

- La unión específica de A con T y de C con G, asegura que las copias nuevas de ADN sean copias exactas del original.
- Se forman dos copias idénticas de la molécula original de ADN.
- Las dos nuevas moléculas de ADN se enroscan y de nuevo toman la forma de una doble hélice.

# Pasos de la replicación del ADN

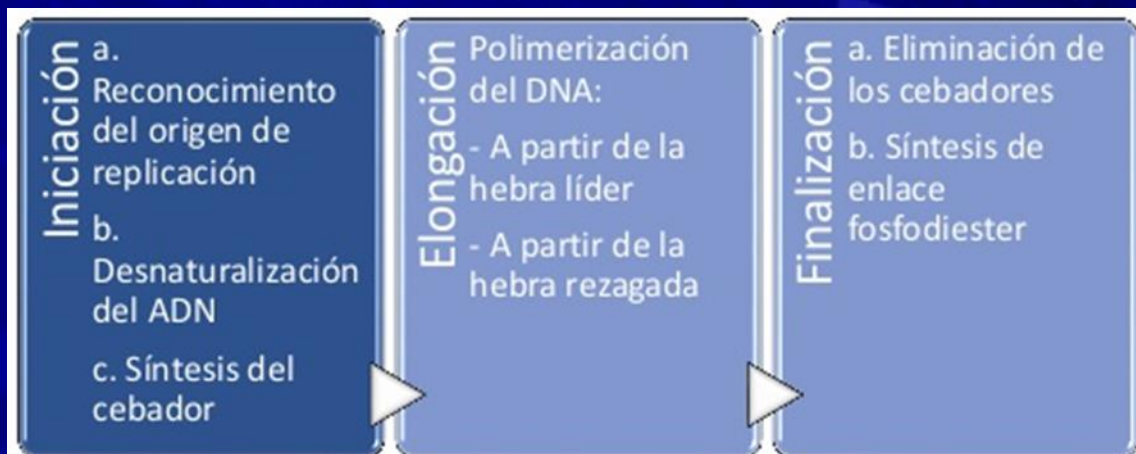


# Etapas de la Replicación

- Eventos previos a la iniciación.
- Iniciación
- Elongación
- Terminación

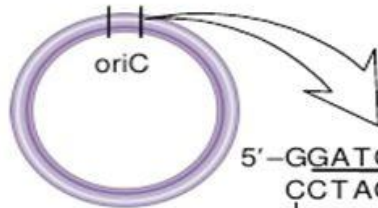
# Etapas de la Replicación

## CELULA PROCARIÓTICA





E. coli  
chromosome



## Secuencia del origen de Replicación bacteriano

AT-rich region

5' - GGATCCTGGGTATTA AAAAAGAA GATCTATTTATTTAGAGATCTGTTCTAT  
CCTAGGACCCATAAATTTTCTTCTAGATAAATAAATCTCTAGACAAGATA  
1 50

DnaA box

TGTGATCTCTTATTAGGATCGCACTGCCCTGTGGATAACAAGGATCGGCT  
ACACTAGAGAATAATCCTAGCGTGACGGGACACCTATTGTTCTAGCCGA  
51 100

DnaA box

TTTAAGATCAACAACCTGGAAAGGATCATTAACTGTGAATGATCGGTGAT  
AAATTCTAGTTGTTGGACCTTTCCTAGTAATTGACACTTACTAGCCACTA  
101 150

DnaA box

CCTGGACCGTATAAGCTGGGATCAGAATGAGGGTTATACACAGCTCAAAA  
GGACCTGGCATATTCGACCCTAGTCTTACTCCCAATATGTGTCGAGTTTT  
151 200

DnaA box

ACTGAACAACGGTTGTTCTTTGGATAACTACCGGTTGATCCAAGCTTCCT  
TGACTTGTGCCAACAAGAAACCTATTGATGGCCAAGTTCGAAGGA  
201 250

DnaA box

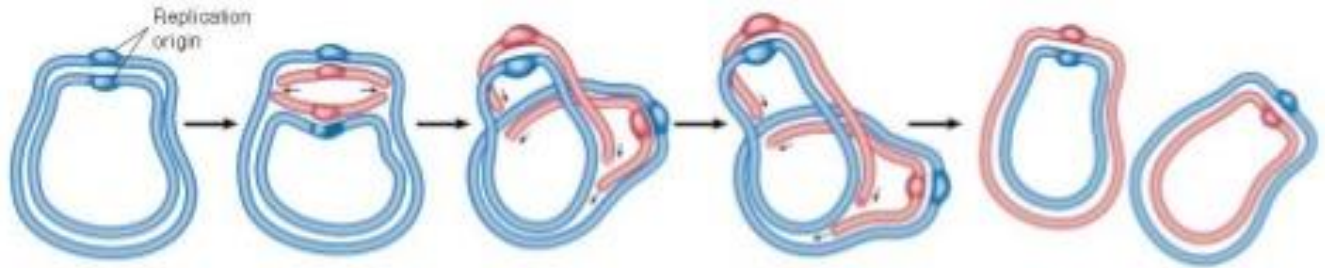
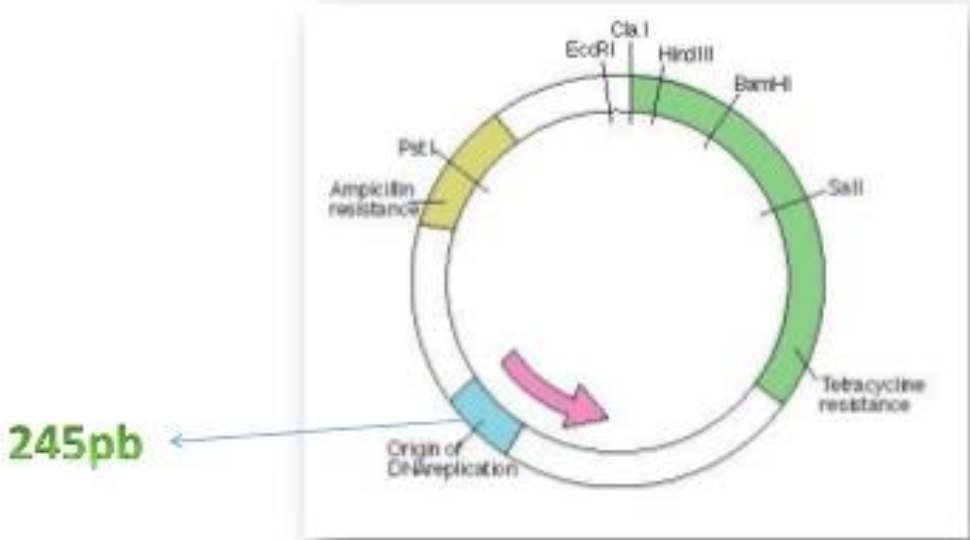
GACAGAGTTATCCACAGTAGATCGC -3'  
CTGTCTCAATAGGTGTCATCTAGCG  
251 275

Región de los treceámeros (tres repeticiones de 13 nucleótidos), 70% AT

5 Nonámeros o cajas DnaA

once sitios GATC en la secuencia de 245pb

# REPLICÓN



## Función de las tres polimerasas *in vivo*

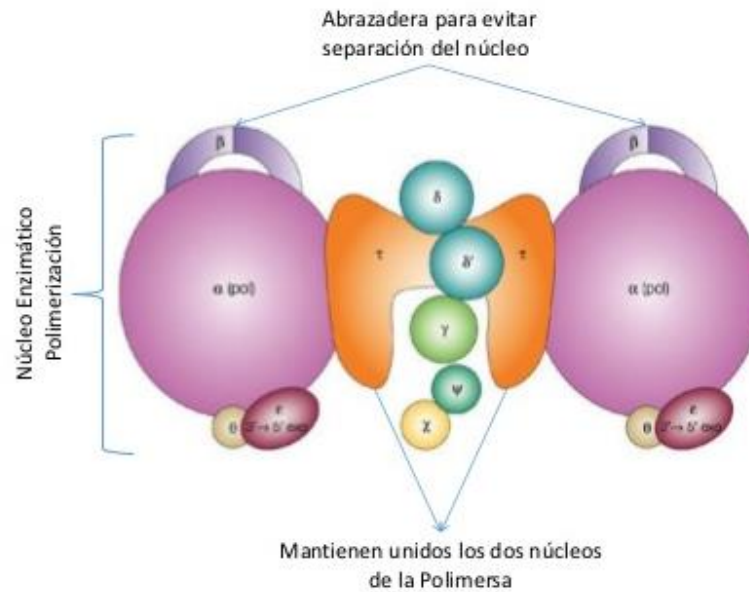
- **TIPO I:** responsable de eliminar el cebador y de la síntesis que rellena los huecos que se producen después de esa eliminación. Su actividad exonucleasa también le permite participar en la reparación del ADN.
- **TIPO II (IV y V):** reparación del ADN que ha sido dañado por agentes externos, como la luz ultravioleta.
- **TIPO III:** polimerización 5'-3' esencial para la replicación *in vivo*. Su actividad exonucleasa 3'-5' también proporciona la función de corrección de errores, que se activa cuando se inserta un nucleótido incorrecto.

**TABLE 11.2**

**Properties Of Bacterial DNA Polymerases I, II, and III**

Properties	I	II	III
Initiation of chain synthesis	–	–	–
5'–3' polymerization	+	+	+
3'–5' exonuclease activity	+	+	+
5'–3' exonuclease activity	+	–	–
Molecules of polymerase per cell	400	?	15

Las tres poseen actividad exonucleasa 3'-5': tienen el potencial de polimerizar en una dirección, pararse, invertir su dirección y escindir los nucleótidos que acaban de añadir.

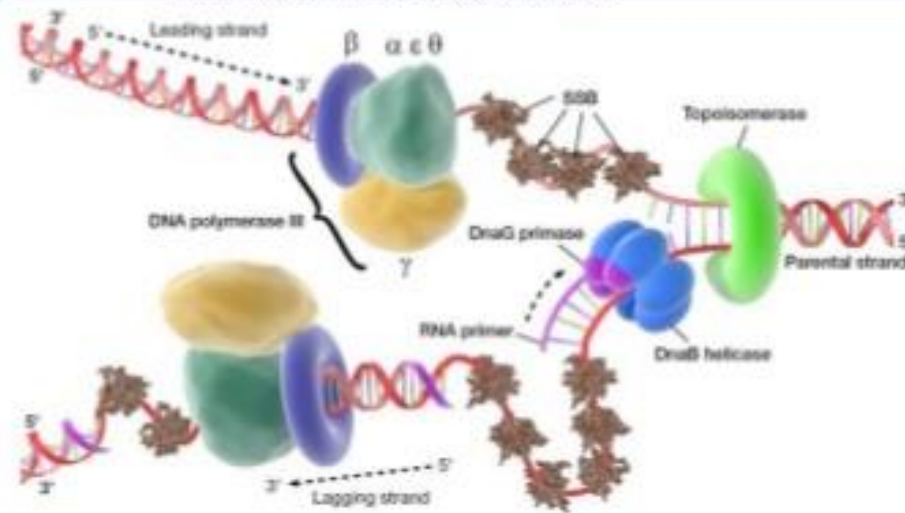


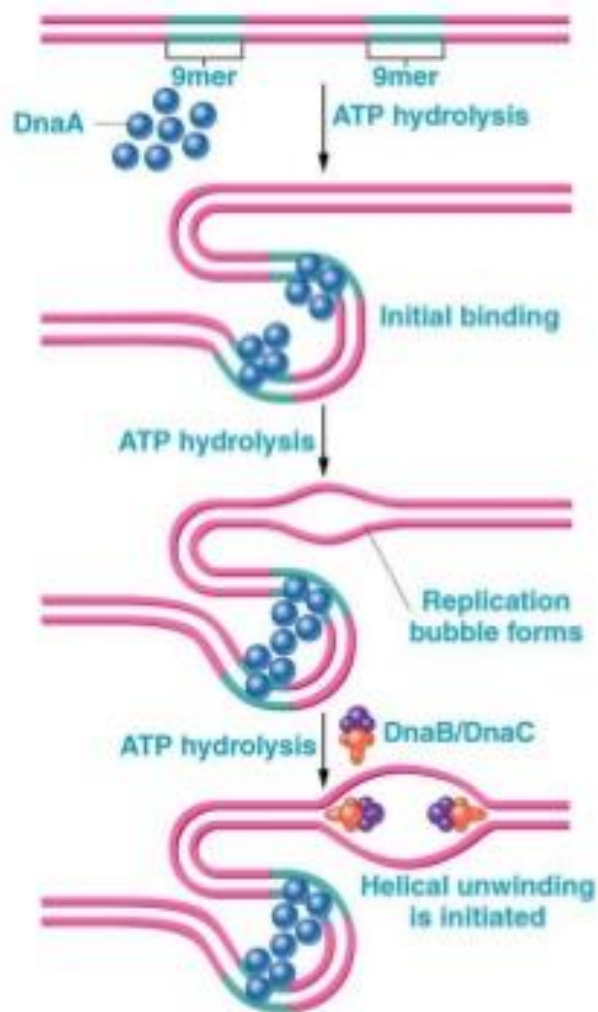
**TABLE 11.3**

**Subunits of the DNA Polymerase III Holoenzyme**

Subunit	Function	Groupings
$\alpha$	5'–3' polymerization	Core enzyme: elongates polynucleotide chain and proofreads
$\epsilon$	3'–5' exonuclease	
$\theta$	Core assembly	
$\gamma$	Loads enzyme on template (serves as clamp loader)	$\gamma$ complex
$\delta$		
$\delta'$		
$\chi$		
$\psi$		
$\beta$	Sliding clamp structure (processivity factor)	
$\tau$	Dimerizes core complex	

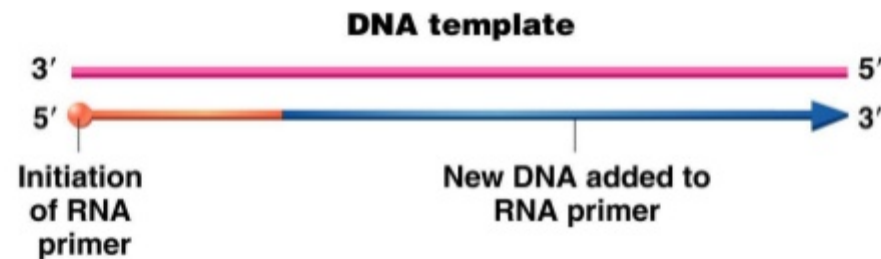
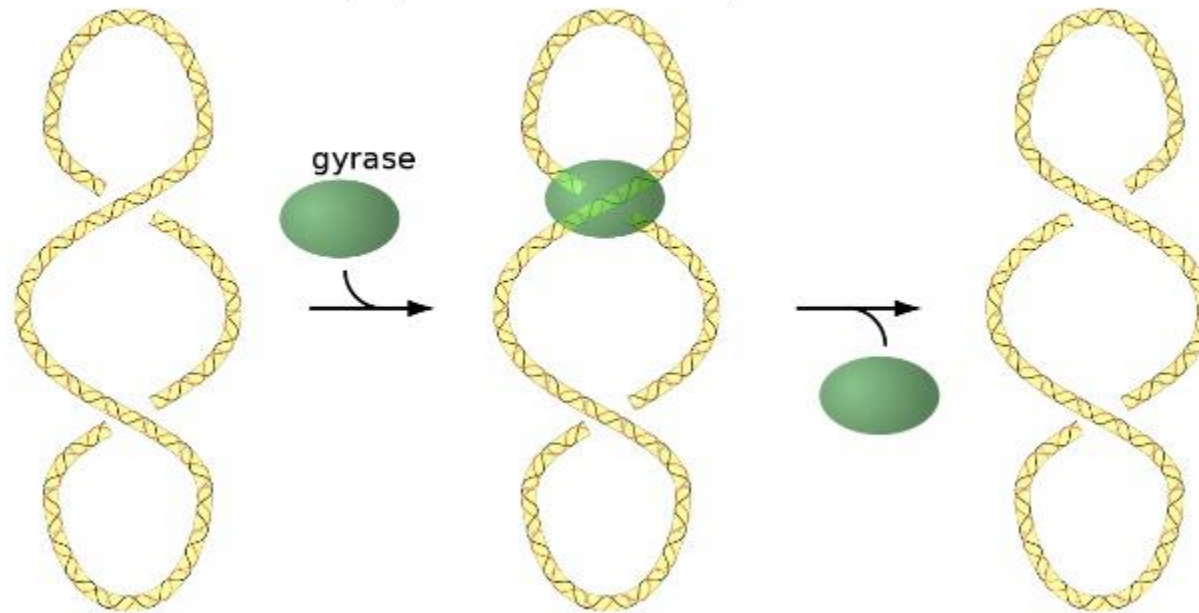
Proteína	Función
Helicasa	Separa la doble hélice, rompe los puentes de hidrógeno de la doble hélice permitiendo el avance de la horquilla de replicación.
Primasa	Síntesis de primers RNA
SSB Proteínas de unión de cadena sencilla	Estabiliza las regiones de cadena sencilla
DNA girasa (Topoisomerasa)	Alivia la torsión. Impide que el ADN se enrede por superenrollamiento producido por la separación de la doble hélice
DNApol III	Síntesis ADN. Continúa hebra líder y discontinua hebra rezagada
DNApol I	Borra primer y llena espacios
DNA ligasa	Une los finales de los segmentos ADN



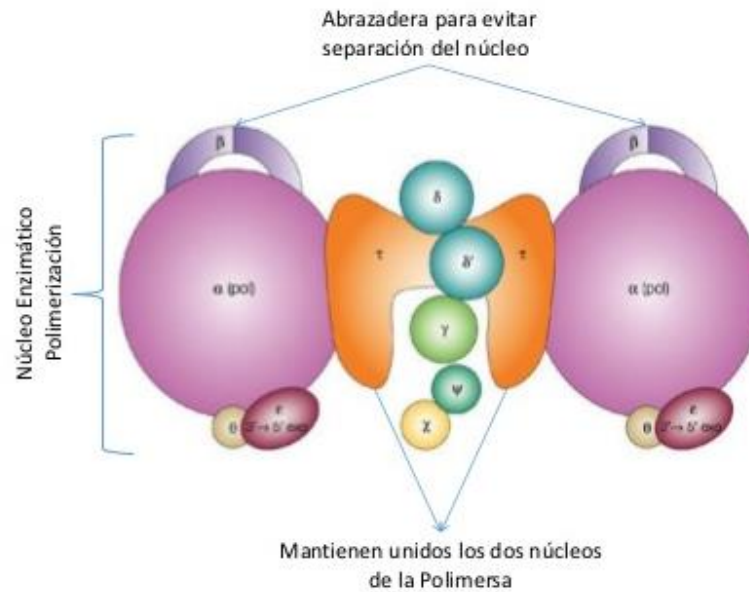


- El origen de replicación, denominado ***oriC***, está formado por 245 pares de nucleótidos y se caracteriza por la presencia de secuencias repetitivas de 9 y 13 bases
- DnaA (proteína) se unen a cada uno de los diversos 9meros
- Proteínas DnaB y DnaC, abren y desestabilizan más la hélice.
- Otras proteínas, denominadas proteínas de unión a cadena sencilla (SSBP, *single-stranded binding proteins*), estabilizan esta conformación abierta.

El superenrollamiento puede relajarse mediante la acción de la ADN girasa, enzima del grupo de enzimas ADN topoisomerasas.



- La ADN polimerasa III necesita un cebador con un grupo 3'-hidroxil libre para alargar una cadena polinucleotídica.
- ARN sirve de cebador para iniciar la síntesis de ADN.
- Se sintetiza, sobre el molde de ADN, un segmento corto de ARN (10 a 12 nt) complementario al ADN.
- Enzima: **primasa**



**TABLE 11.3**

**Subunits of the DNA Polymerase III Holoenzyme**

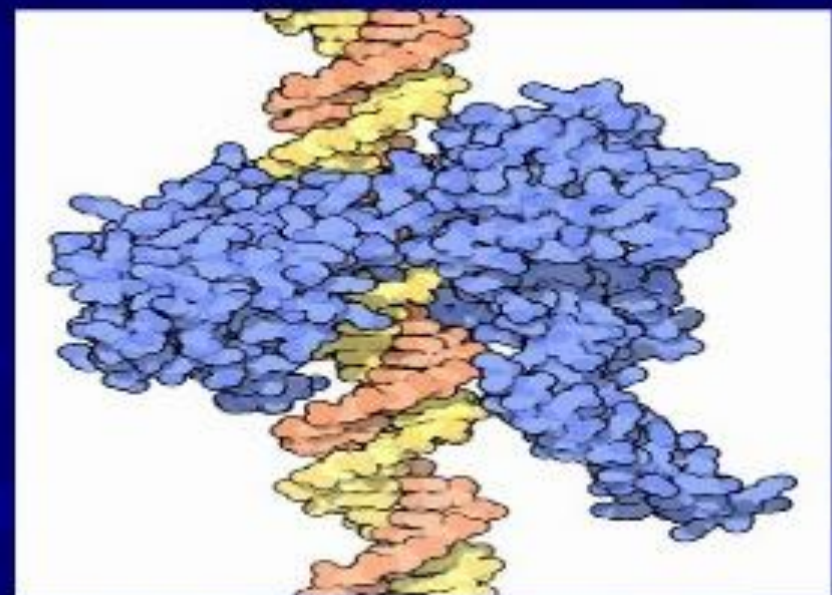
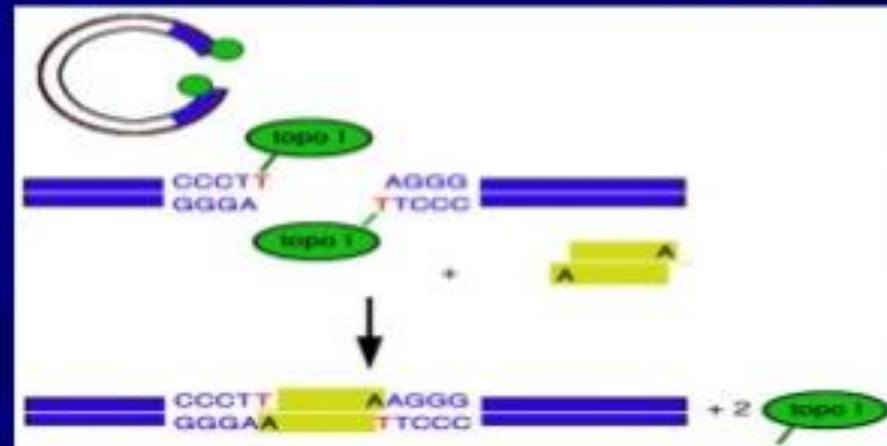
Subunit	Function	Groupings
$\alpha$	5'–3' polymerization	Core enzyme: elongates polynucleotide chain and proofreads
$\epsilon$	3'–5' exonuclease	
$\theta$	Core assembly	
$\gamma$	Loads enzyme on template (serves as clamp loader)	$\gamma$ complex
$\delta$		
$\delta'$		
$\chi$		
$\psi$		
$\beta$	Sliding clamp structure (processivity factor)	
$\tau$	Dimerizes core complex	



# Replicación del ADN. Célula Procariota

Eventos previos a la iniciación:

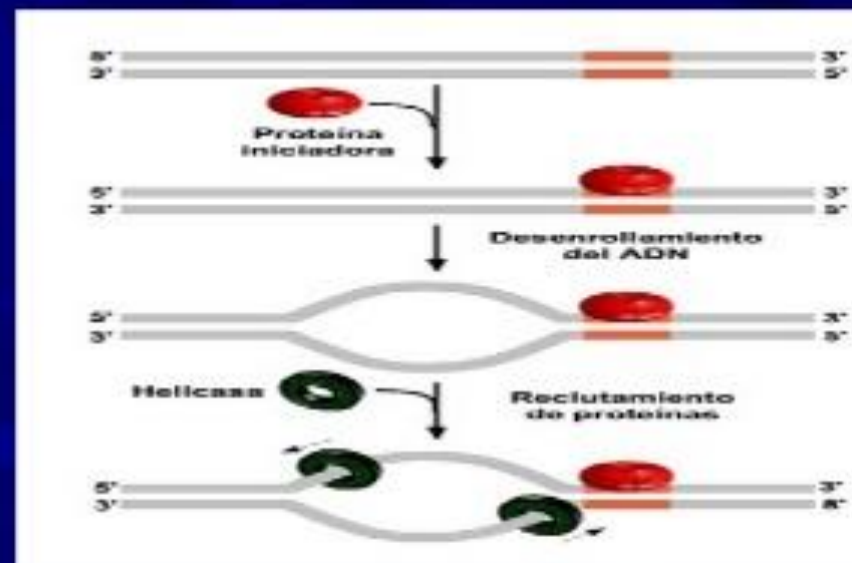
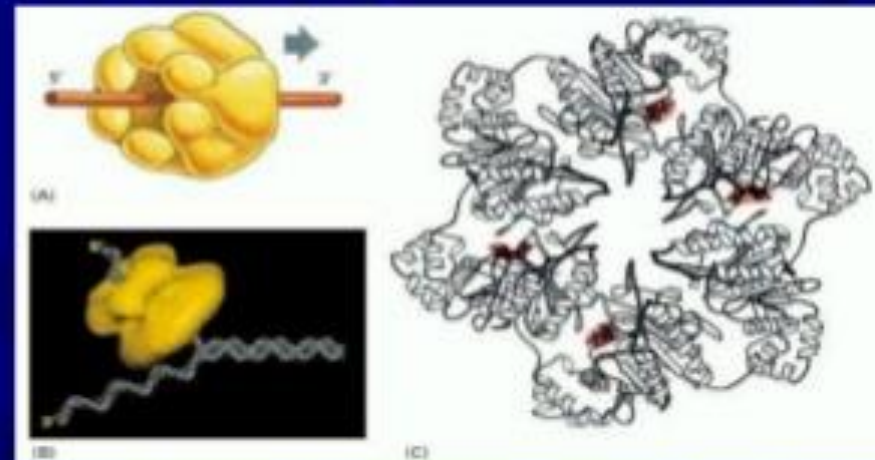
- ADN de E.Coli, circular con superenrollamiento positivo.
- Formación del topoisomero negativo, con cadenas de ADN separadas.
- Participan la topoisomerasa II (girasa), esta última es una enzima formada por 4 subunidades, 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ , utiliza ATP.

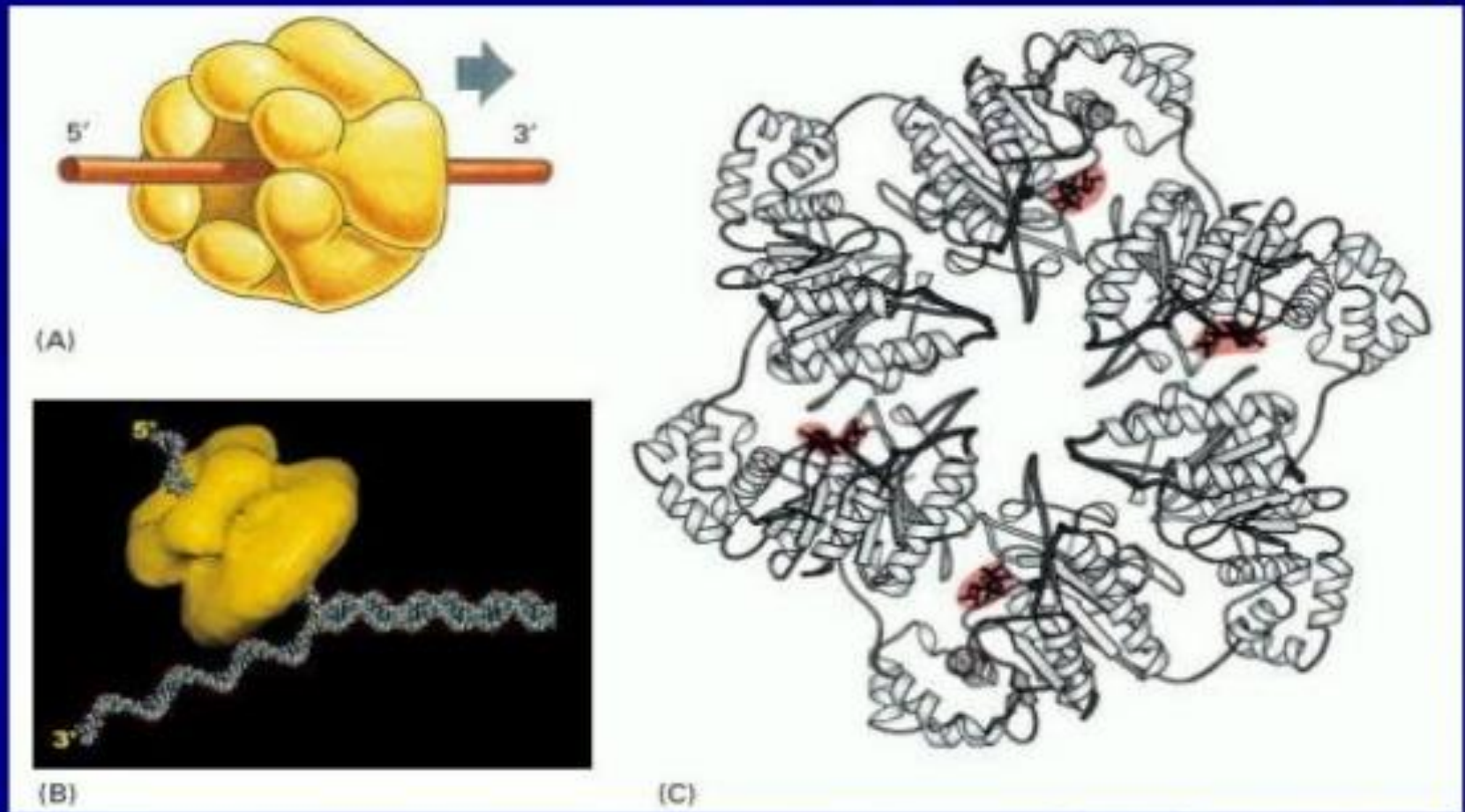


# Replicación del ADN. Célula Procariota

Eventos previos a la iniciación:

- Las helicasas separan las cadenas de ADN, consumen 2 ATP, por cada par de bases separados. Tiene 6 sitios para unión del ATP.
- Se han descrito 12 helicasas en célula procariótica.

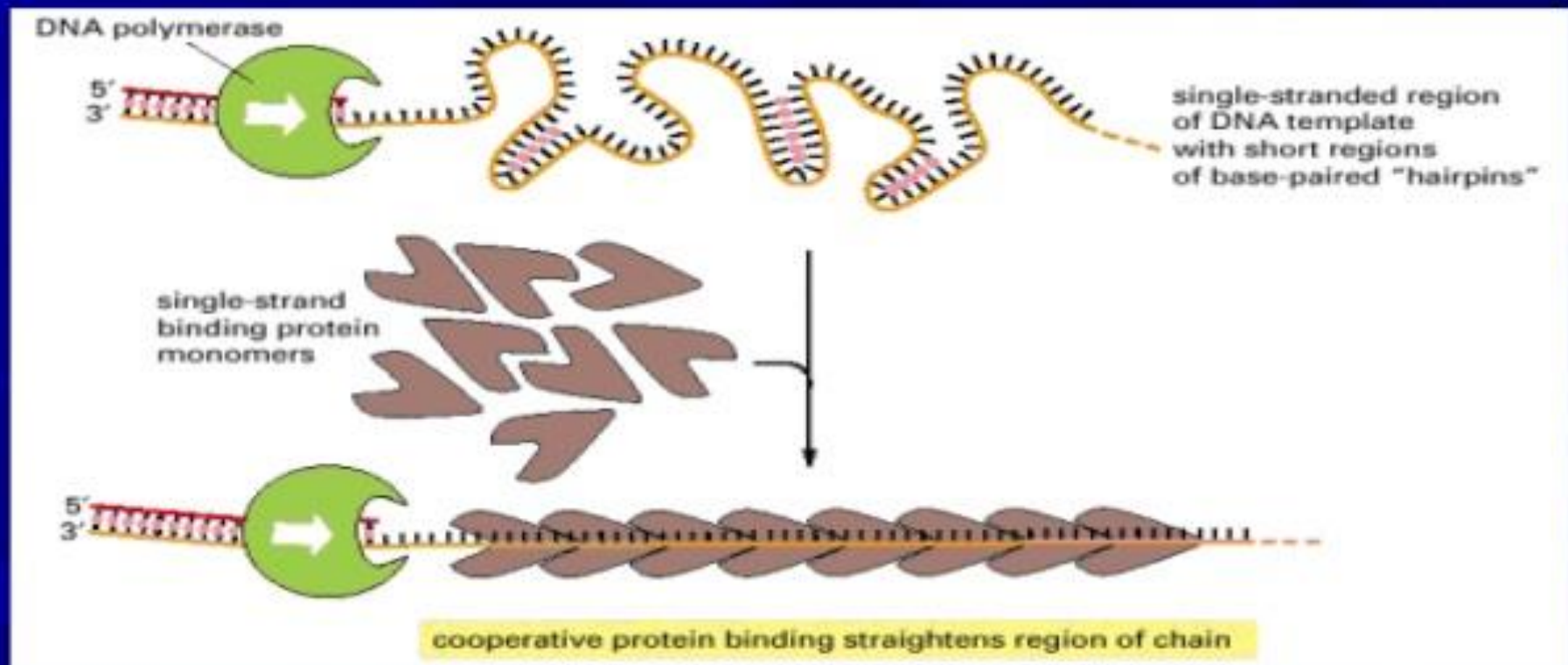




Estructura tridimensional de una helicasa (DnaB): un hexámero con seis sitios de enlace al ATP, necesita de la proteína DnaC para unirse al ADN. La hidrólisis secuencial de estos ATPs permite el desenrollamiento de la doble hélice.

# Replicación del ADN. Célula Procariota

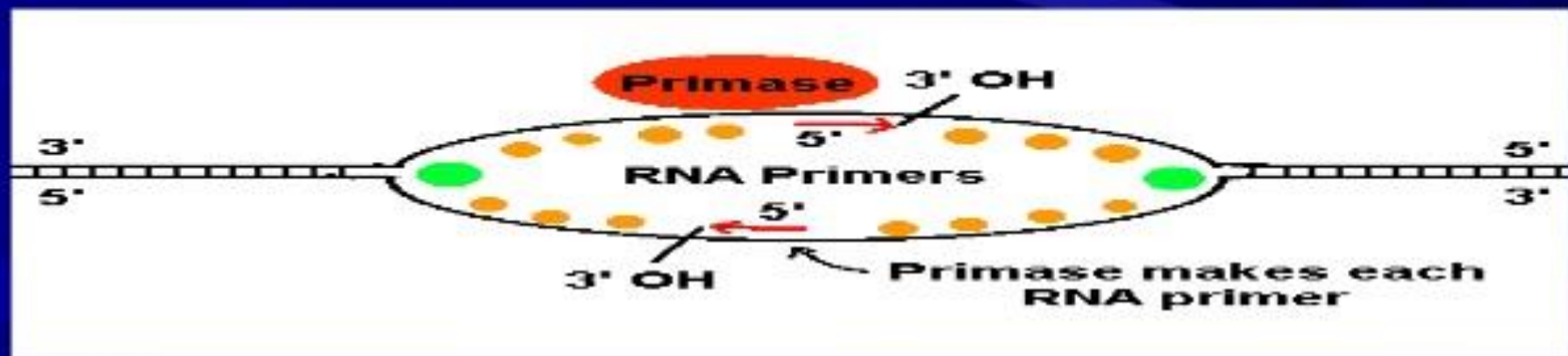
- Estabilización del ADN de una sola banda por las proteínas estabilizadoras del ADN de una sola banda (ssb) y topoisomerasas.



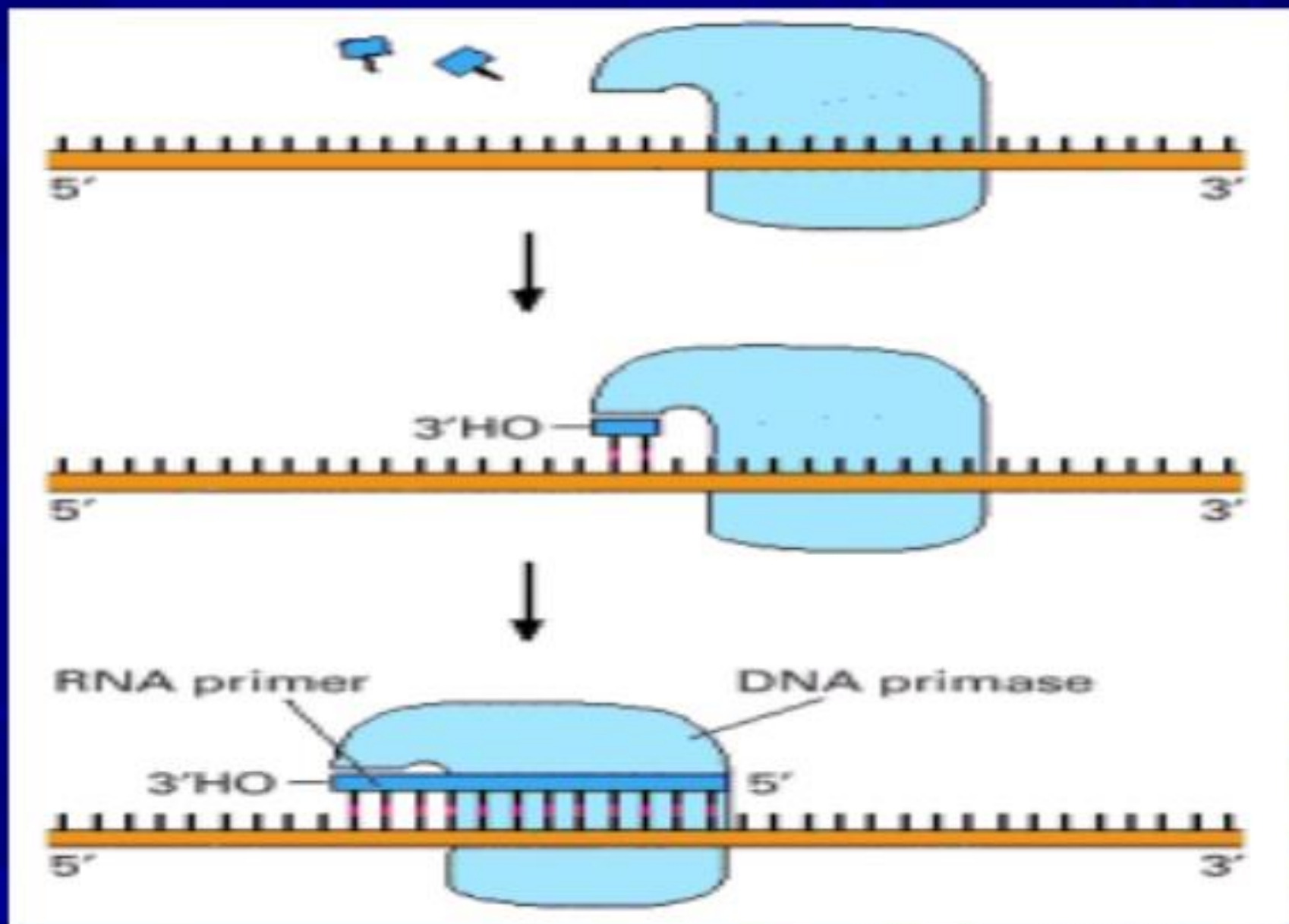
# Replicación del ADN. Célula Procariota

## Iniciación:

- Síntesis del primer o cebador de ARN por una ARN polimerasa. (Primasa o Dna G)
- El híbrido ARN-ADN proporciona el 3' OH requerido para que actúe la ADN polimerasa III, que une el primer oligonucleotido.



# Síntesis del primer de ARN por una primasa

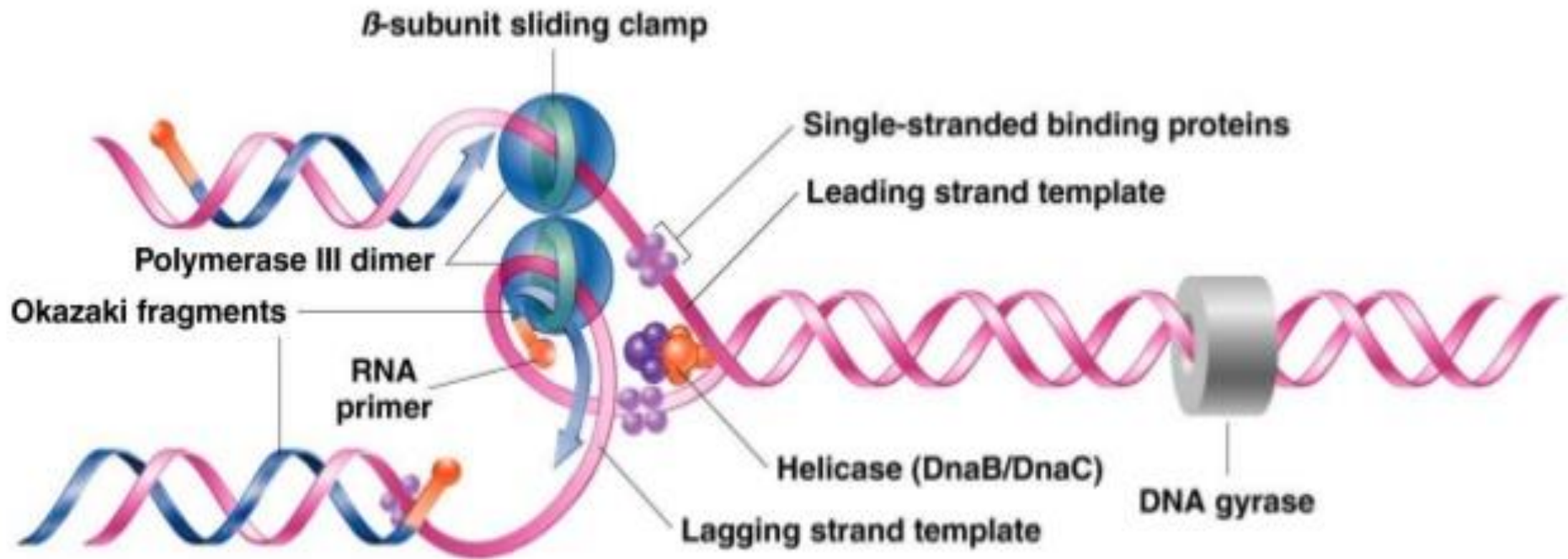


# ADN polimerasa. Procariotas

	ADN Pol I	ADN Pol II	ADN Pol III
Estructura	Monómero 109 000 Kd	Monómero 90 000 Kd	Multímero 900 000 Kd
Función	Polimerasa 5'-3' = elongación Exonucleasa 3'-5', 5'-3' = corrección y reparación	Polimerasa 5'-3' = elongación Exonucleasa 3'-5' = corrección	Polimerasa 5'-3' = elongación Exonucleasa 3'-5' = corrección
Ausencia	Afecta la reparación del ADN	Ninguna alteración conocida	Incompatible con la vida

Arthur Kornberg encontró tres ADN polimerasas diferentes, la ADN Pol I, ADN Pol II y ADN Pol III. Premio Nobel en 1959.

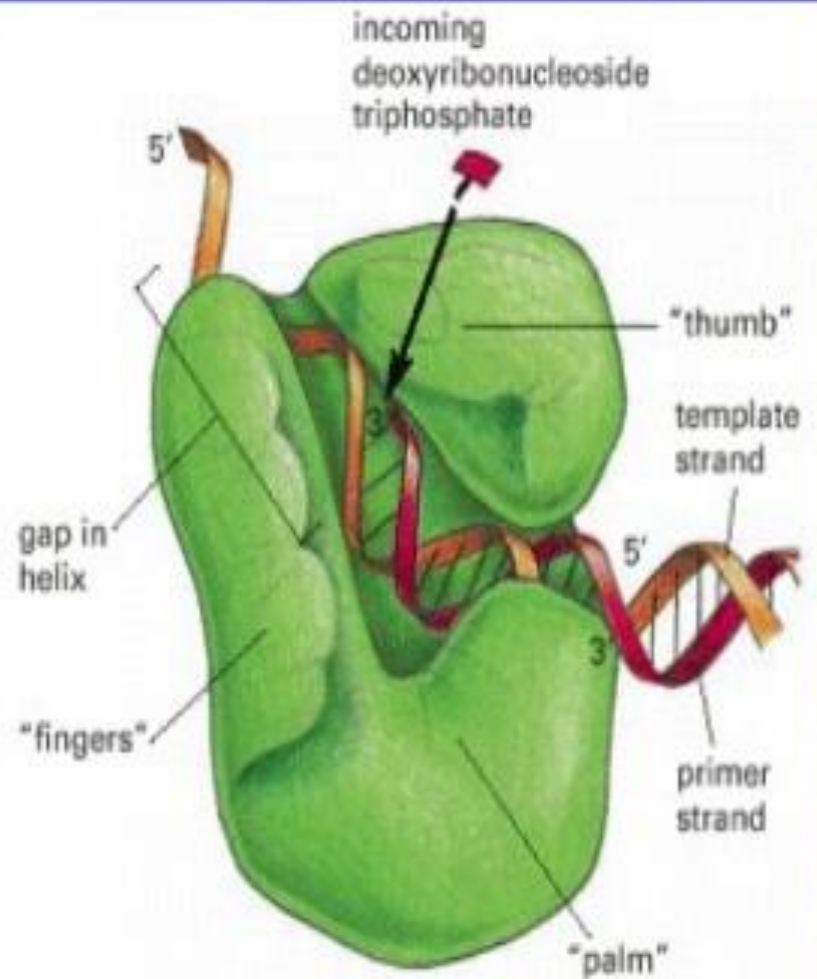
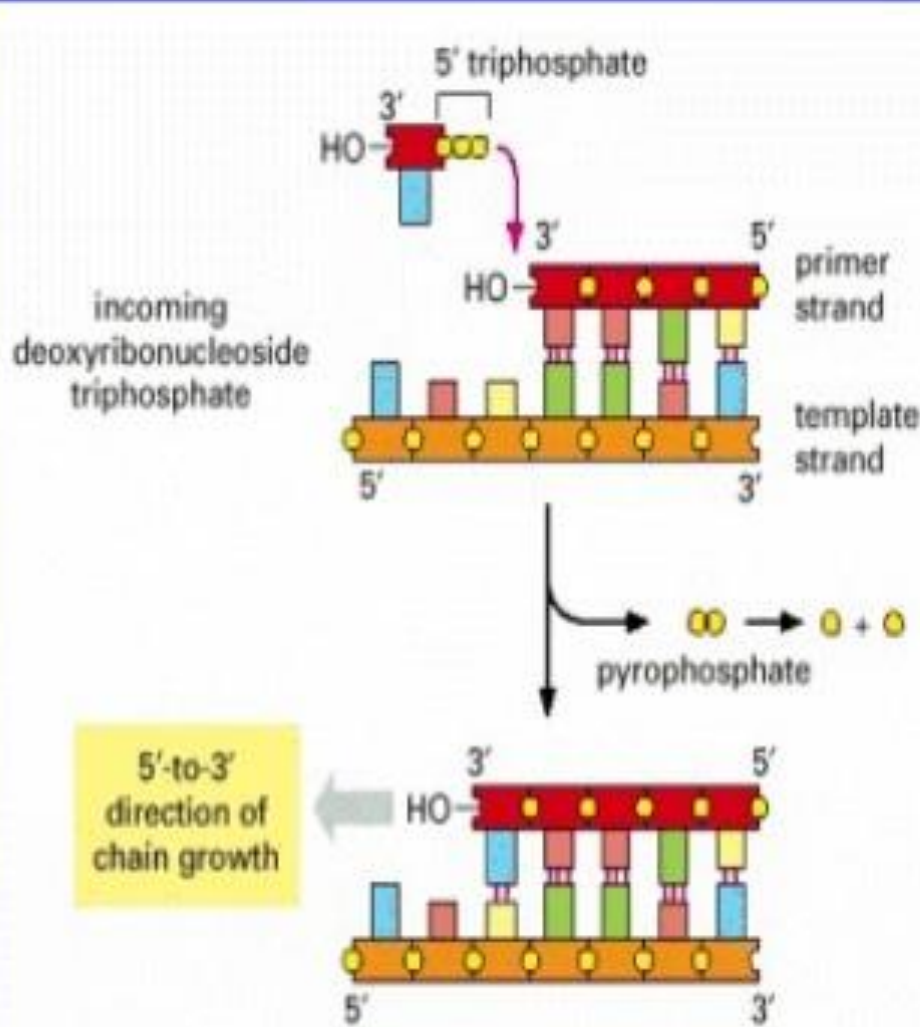
# ADN polimerasa III



Las ADN Polimerasas de *E. coli* solamente saben sintetizar (polimerizar) ADN en la dirección 5'P - 3'OH. La subunidad  $\beta$  actúa como una pinza que une la ADN pol a la hebra molde



# La ADN polimerasa



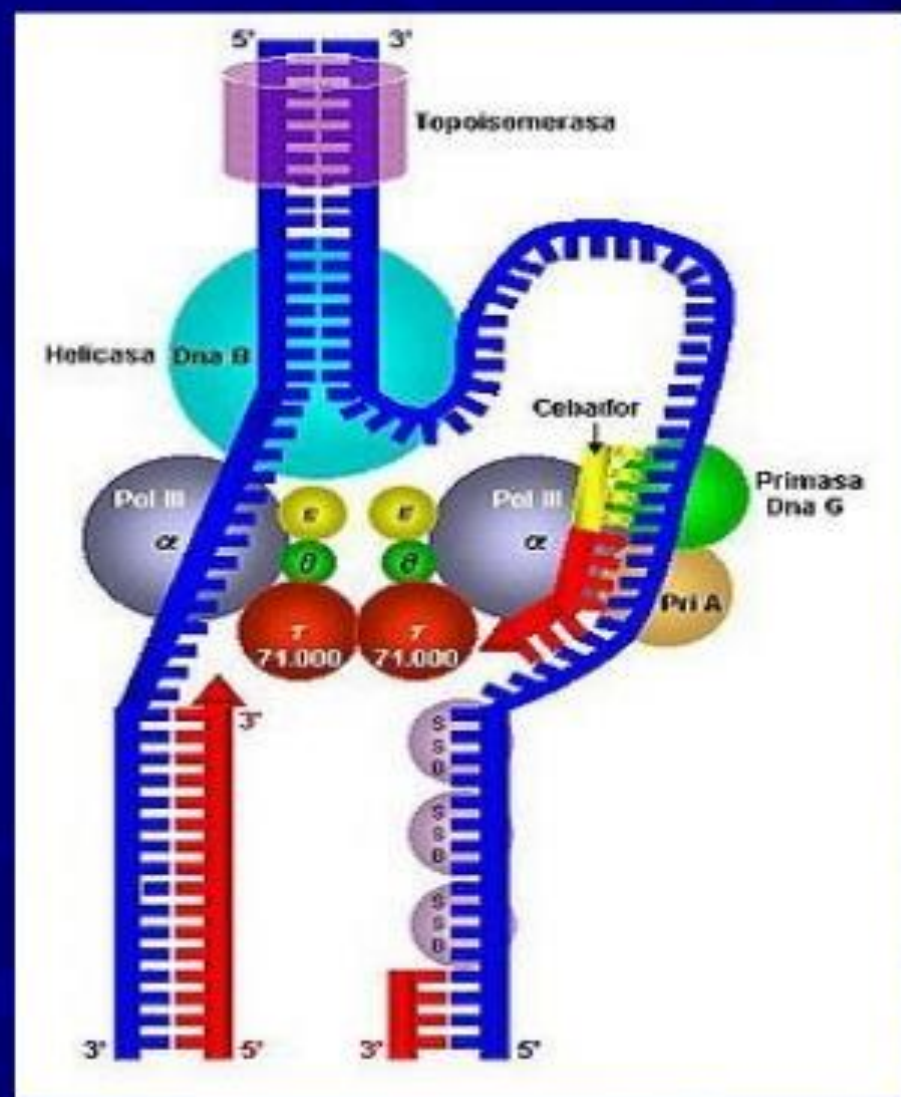
(A)

(B)

# Replicación del ADN. Célula Procariota

## Elongación:

- Síntesis continua 5' a 3' (ADN pol III).
- Síntesis discontinua del fragmento que se sintetiza a partir de la hebra molde que va de 5' a 3' (fragmentos de Okasaki), cada cierto tramo de la molécula de ADN hay un ARN iniciador, pol III, pol I, y ADN ligasa



# Replicación del ADN. Célula Procariota

## Terminación:

- Fusión de las dos horquillas.
- Formación del ADN circular.
- Modificaciones post-terminación: Metilación.

- El fin de la replicación es mediada por secuencias TerC ricas en A y T que pueden retrasar el avance los replisomas debido a la unión de proteínas **Ter y Tus** que muestran una unión cooperativa al DNA.
- La **metilación-desmetilación** del OriC permite controlar los ciclos de inicio de cada replicación del DNA procarionte.
- La disponibilidad de las DnaA y los demás factores que forman el pre-primosoma constituyen un mecanismo de regulación.

## Semejanzas entre células eucariotas y procarióticas

- Semiconservativa.
- Bidireccional.
- Semidiscontinua (hebra líder y hebra retardada).
- Participan enzimas helicadas, topoisomerasas, polimerasas, ligasas, etc.

# Diferencias entre células eucariotas y procarióticas

## Diferencias

- Mayor tamaño del ADN.
- Menor velocidad de síntesis.
- Múltiples puntos de iniciación en un mismo cromosoma (hasta 60 000 en células de mamífero)

# Diferencias entre células eucariotas y procarióticas

## Diferencias:

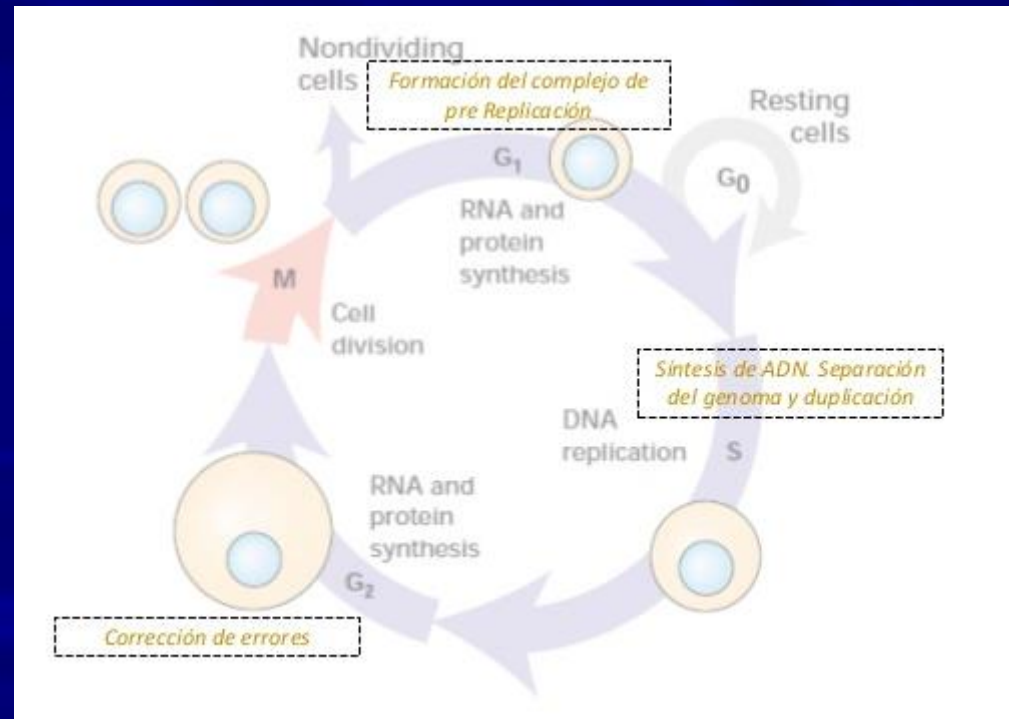
- La estructura nucleosómica debe disociarse para dar inicio a la replicación
- Deben replicarse las Histonas (nucleosomas nuevos) se incorporan a la hebra retardada.
- Problemas con los telómeros por ser lineal (no extremos 3' libres).
- Coincide con el ciclo celular.

# Diferencias entre células eucariotas y procarióticas

- En células eucarióticas ocurre en el núcleo y en procarióticas en el citoplasma.
- Hay 5 tipos de ADN polimerasas, la ADN pol  $\alpha$  actúa como cebador.
- Menor velocidad de replicación en células eucarióticas ( $10^2$  nucleótidos/seg vs  $10^3$  nuc/seg)
- Menor tamaño de los fragmentos de Okasaki en células eucarióticas (200 pb vs 2000 pb)

# Etapas de la Replicación

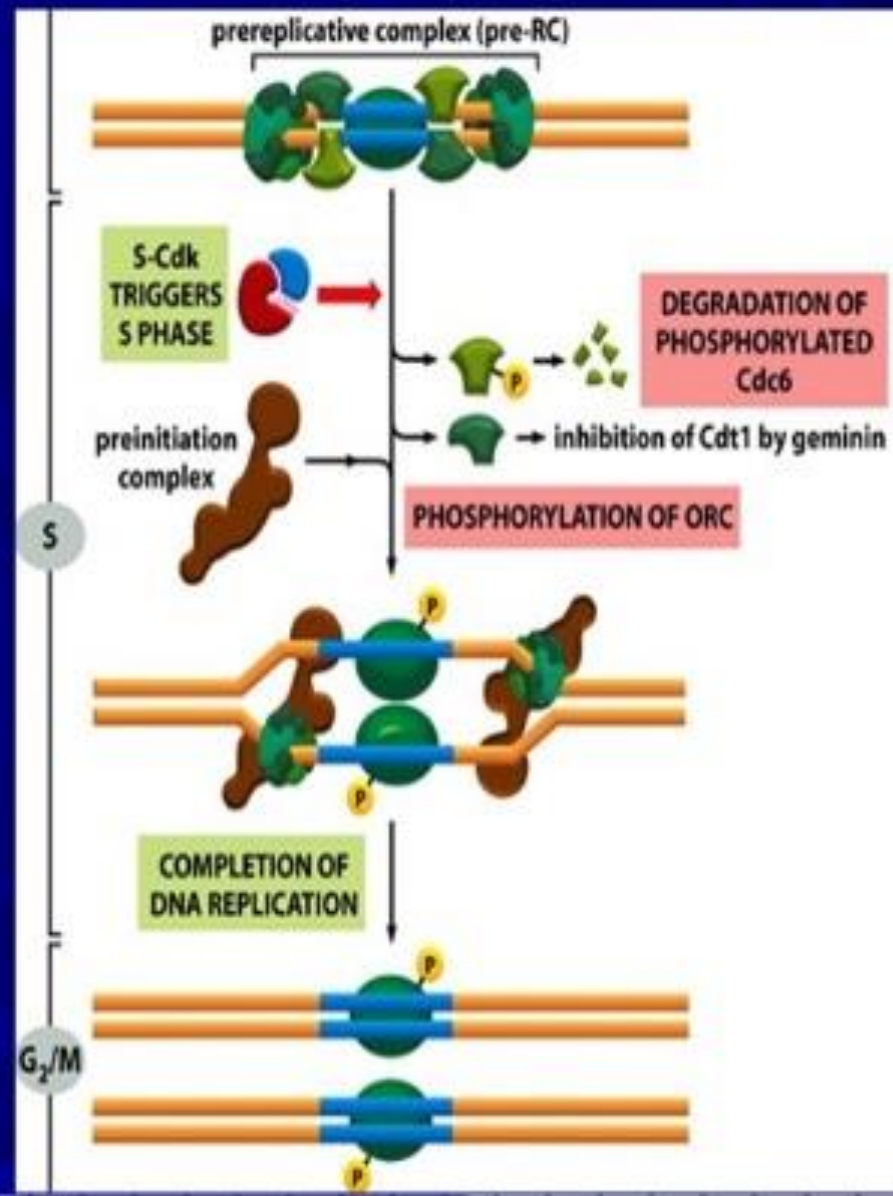
- Eventos previos a la iniciación.
- Iniciación
- Elongación
- Terminación





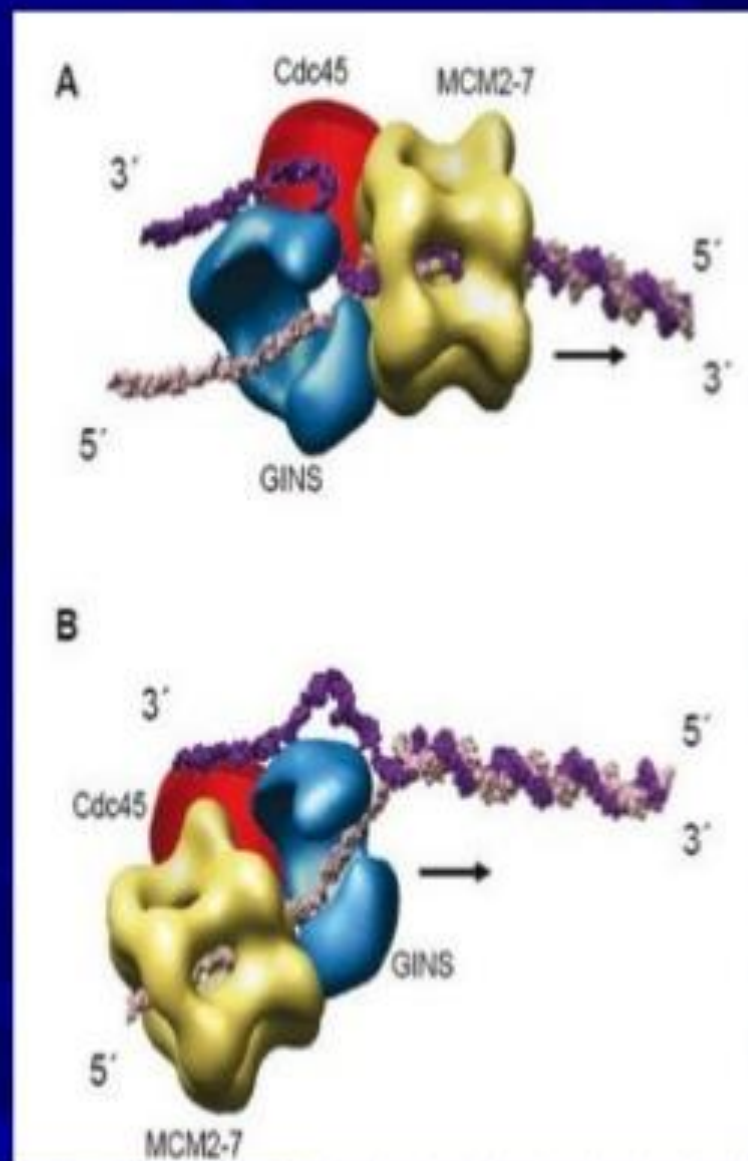
# Eventos previos a la iniciación

- Al origen de la replicación se une un complejo llamado ORC (complejo de reconocimiento de origen).
- Al ORC se unen unos factores permisivos (Mcm2-Mcm-7), para iniciar la replicación.
- Activación de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), antes del inicio de la fase S = iniciar la replicación.



# Eventos previos a la iniciación

- Los factores permisivos Mcm actúan como helicastas para separar la doble hélice de ADN.
- Las topoisomerasas I y II desenrollan la molécula de ADN
- Las RPA (proteína de replicación A) son las proteínas de unión al ADN de una sola cadena que mantiene la hebra molde estirada

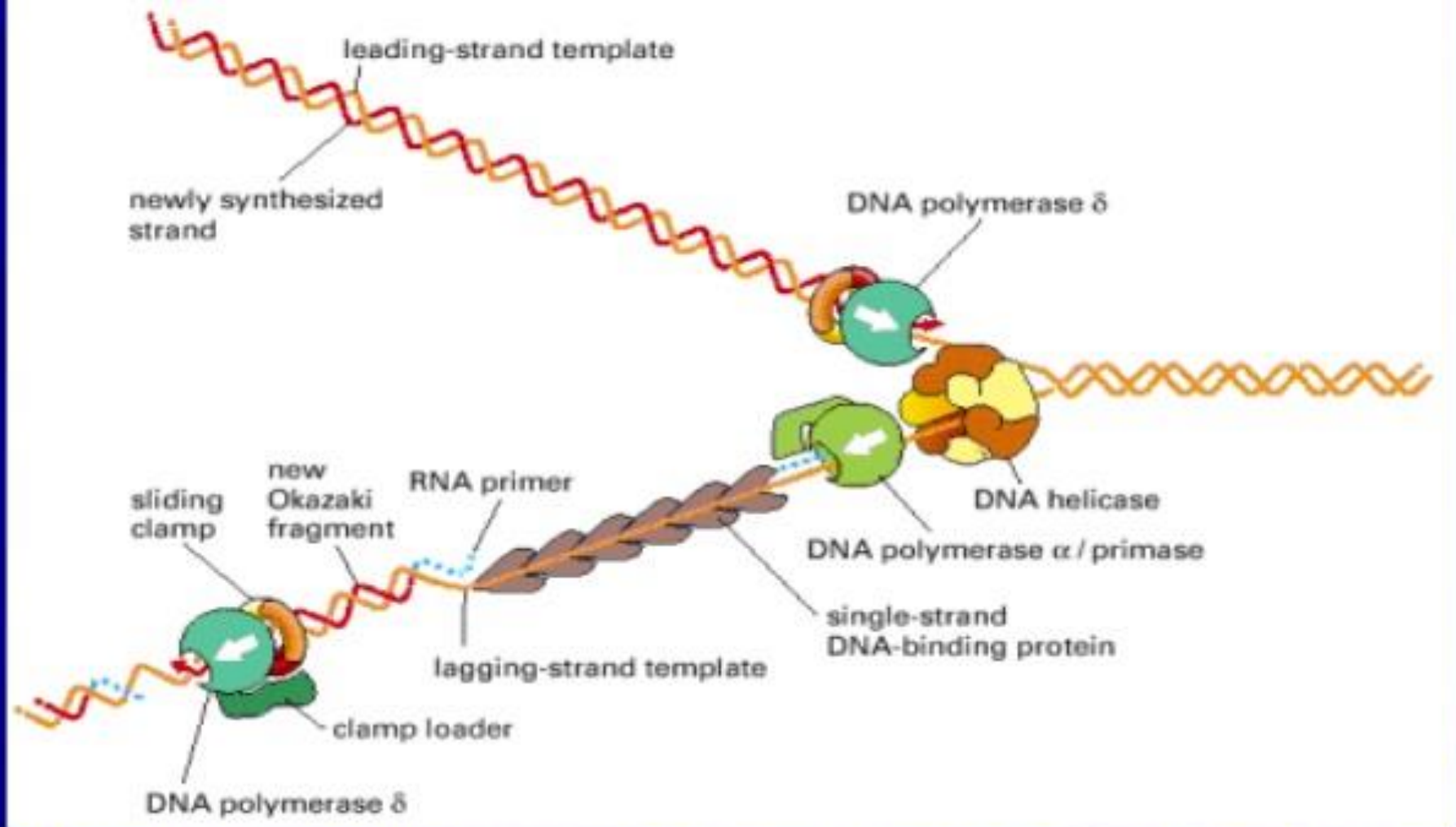


# Iniciación

- Participan las ADN polimerasas
  - $\alpha$  hebra retrasada
  - $\delta$  hebra lider
  - $\beta$
  - $\epsilon$
  - $\gamma$  ADN mitocondrial
- Diagram illustrating the roles of DNA polymerases in DNA replication:
- $\alpha$  hebra retrasada and  $\delta$  hebra lider are associated with **replicación** (replication).
  - $\beta$  and  $\epsilon$  are associated with **reparan** (repair).

# Iniciación. Elongación

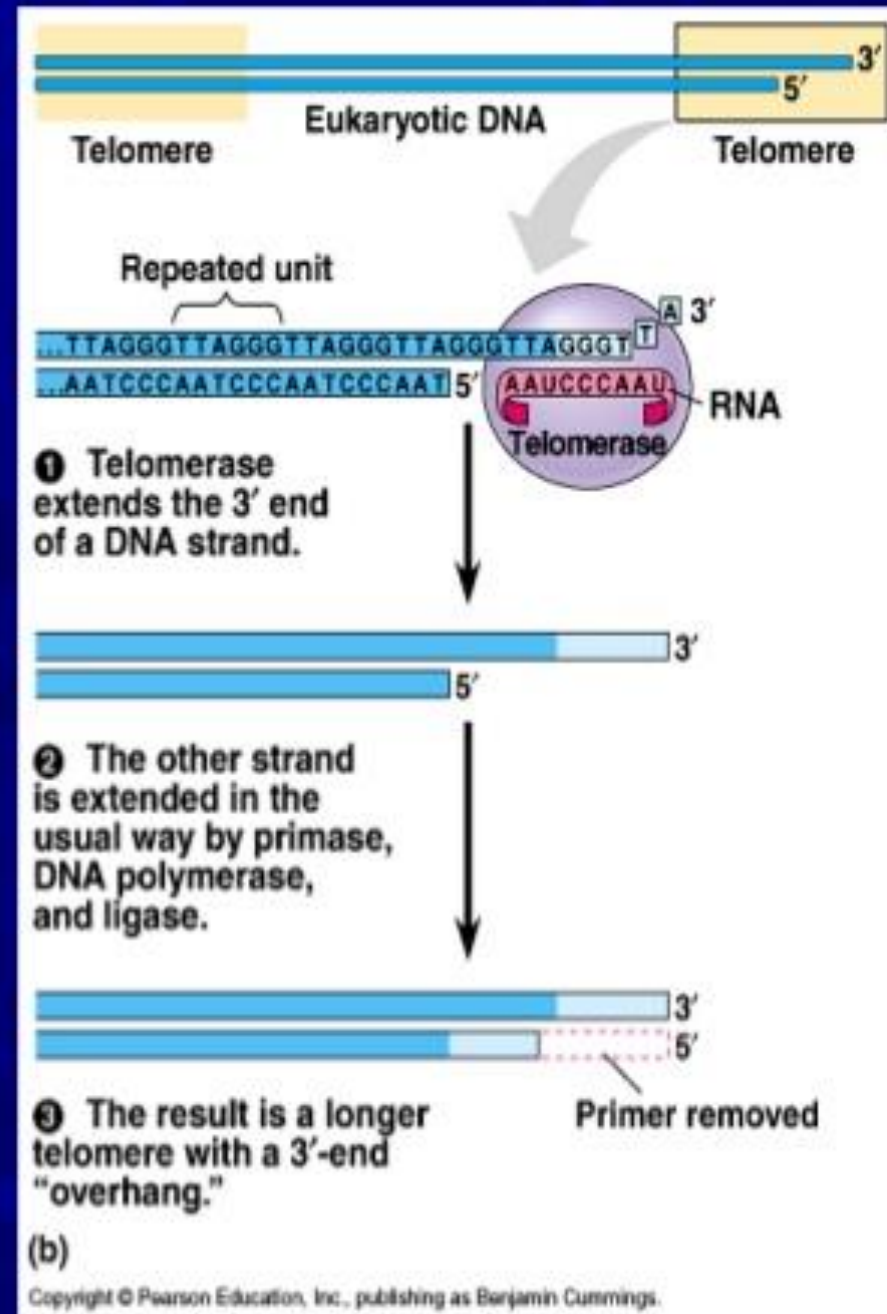
- Las primasas sintetizan los primers de ARN que brindan el 3'OH para iniciar la síntesis de las hebras líder y retardada.
- Continúa la síntesis del cebador por la polimerasa  $\alpha$ .
- La polimerasa  $\delta$  sintetiza la hebra líder y los fragmentos de Okasaki de la hebra retardada, se une al ADN por una pinza denominada PCNA (Antígeno de proliferación nuclear celular)



Horquilla de replicación en los mamíferos: Dos polimerasas diferentes en la hebra retardada, primero empieza la primasa sintetizando el *primer* de ARN, sigue pol  $\alpha$  sintetiza un corto fragmento de ADN, luego sigue trabajando la pol  $\delta$  en la elongación del fragmento

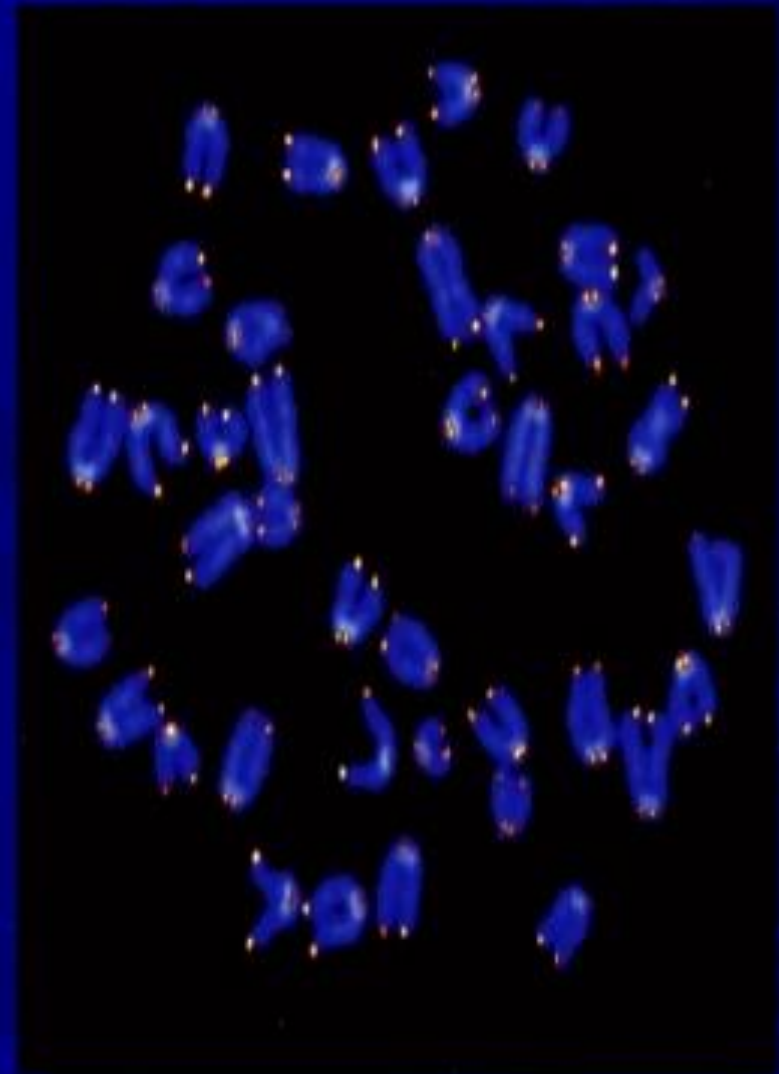
# Telómeros

- Son secuencias especiales de nucleótidos al final del DNA de cromosomas eucariótico
- Estos no contienen genes, pero si secuencias cortas repetidas de nucleótidos (TTAGGG en humanos)
- Protegen el genoma de errores durante las rondas de replicación
- Previenen el envejecimiento y muerte celular



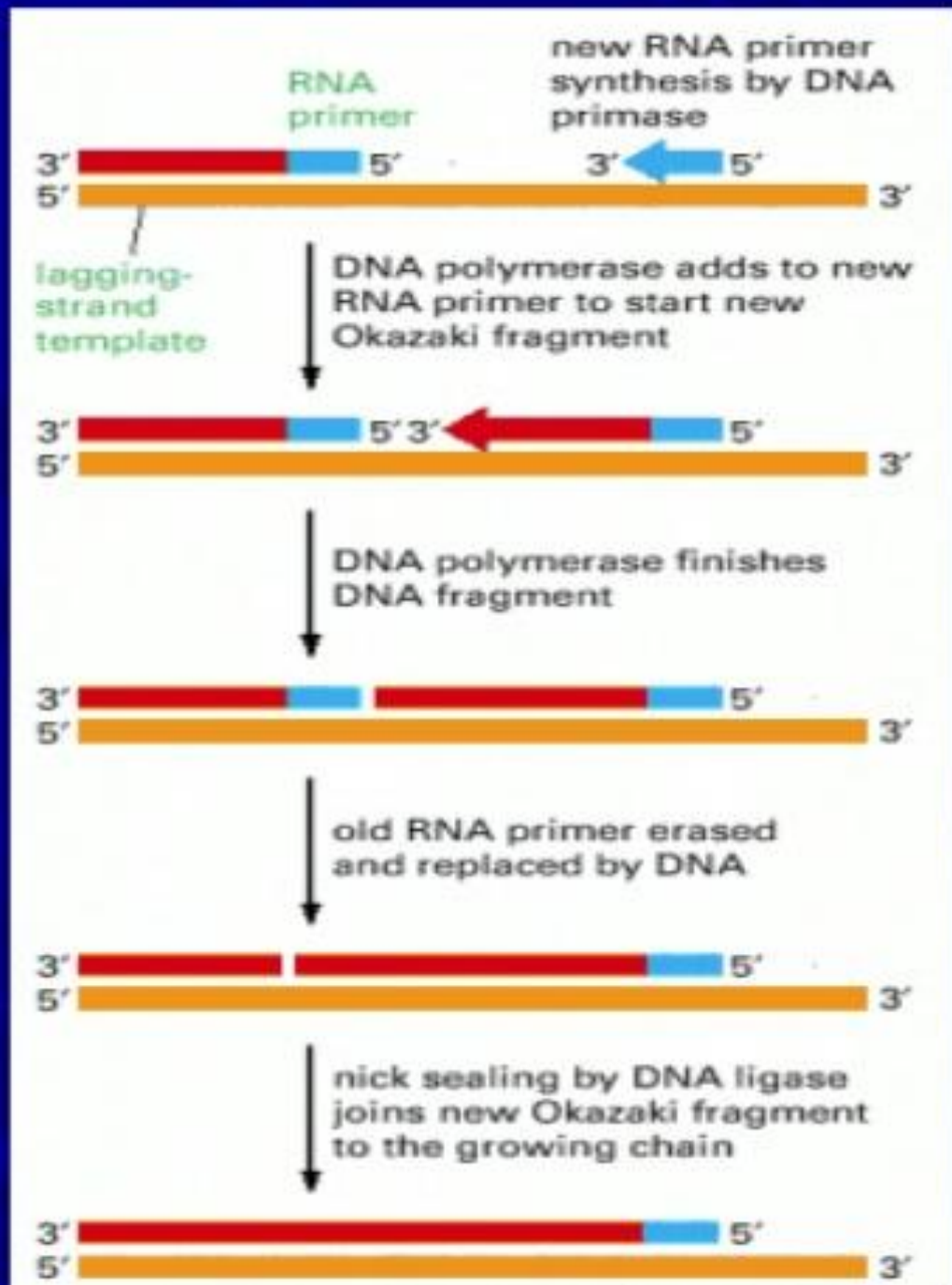
# Telomeros y Telomerasas

- Los telomeros se van acortando según van ocurriendo las replicaciones DNA
- Las telomerasas son enzimas que alargan los telómeros
- Tienen una secuencia corta de RNA unido a su proteína
- La secuencia de RNA sirve como molde ("template") para extender el telómero hasta el terminal 3'
- No están activas en las células somáticas, pero si en células embrionarias.
- Están activas en las células cancerosas



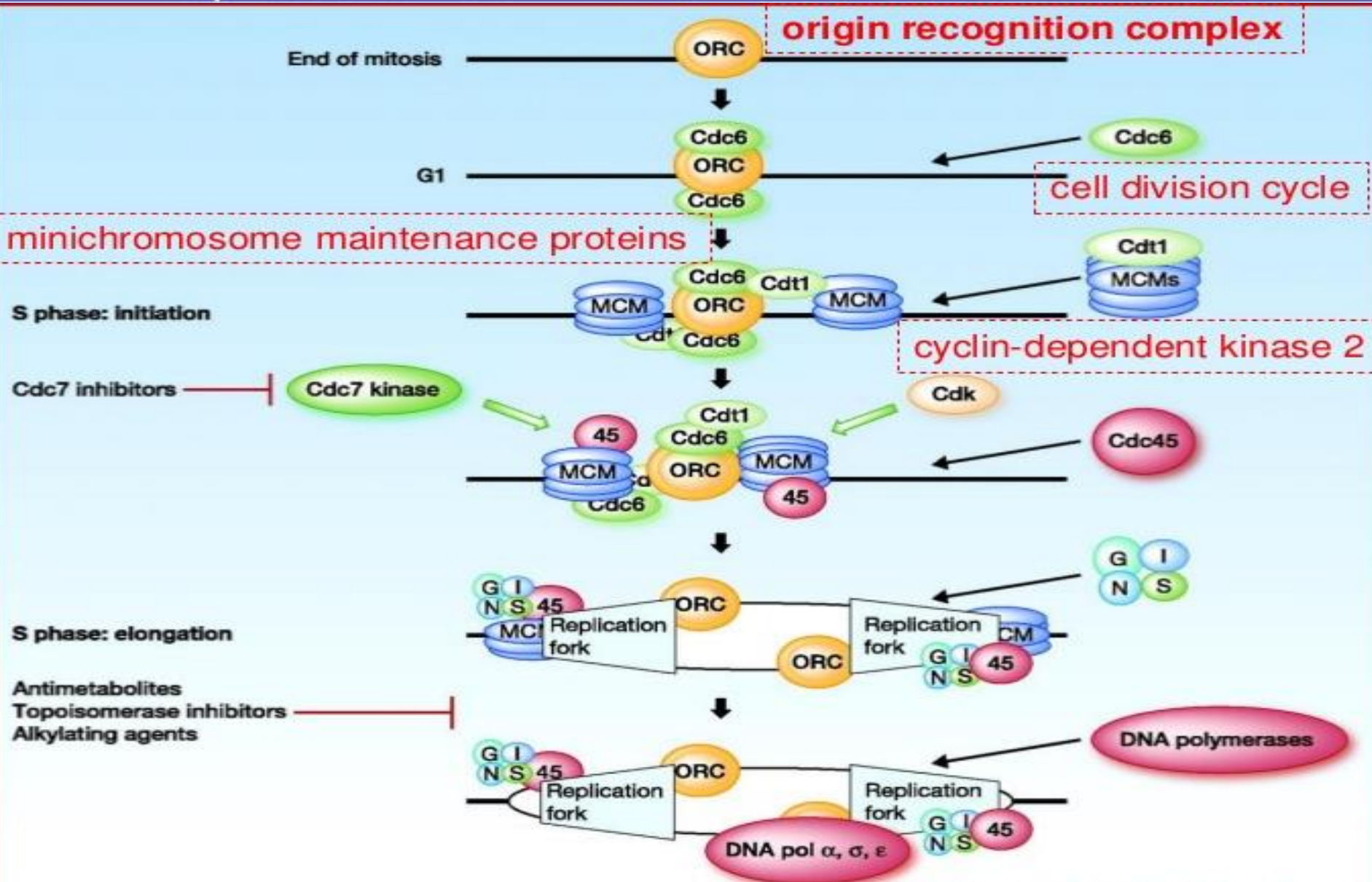
Los punto anaranjados marcan los telómeros en cromosomas de ratón

- En eucariontes los fragmentos de Okasaki tienen 200 nucleótidos, los primers unos 10.
- Los iniciadores de ARN se eliminan mediante una ARNasa específica que reconoce dobles hélices híbridas ARN-ADN.
- La laguna es llenada por una polimerasa y la unión finalmente es realizada por una ligasa





# Replicación de ADN en células eucarióticas



# Enzimas y proteínas que participan en el proceso de replicación del ADN

**TABLA 11.5** Propiedades de las ADN polimerasas eucarióticas

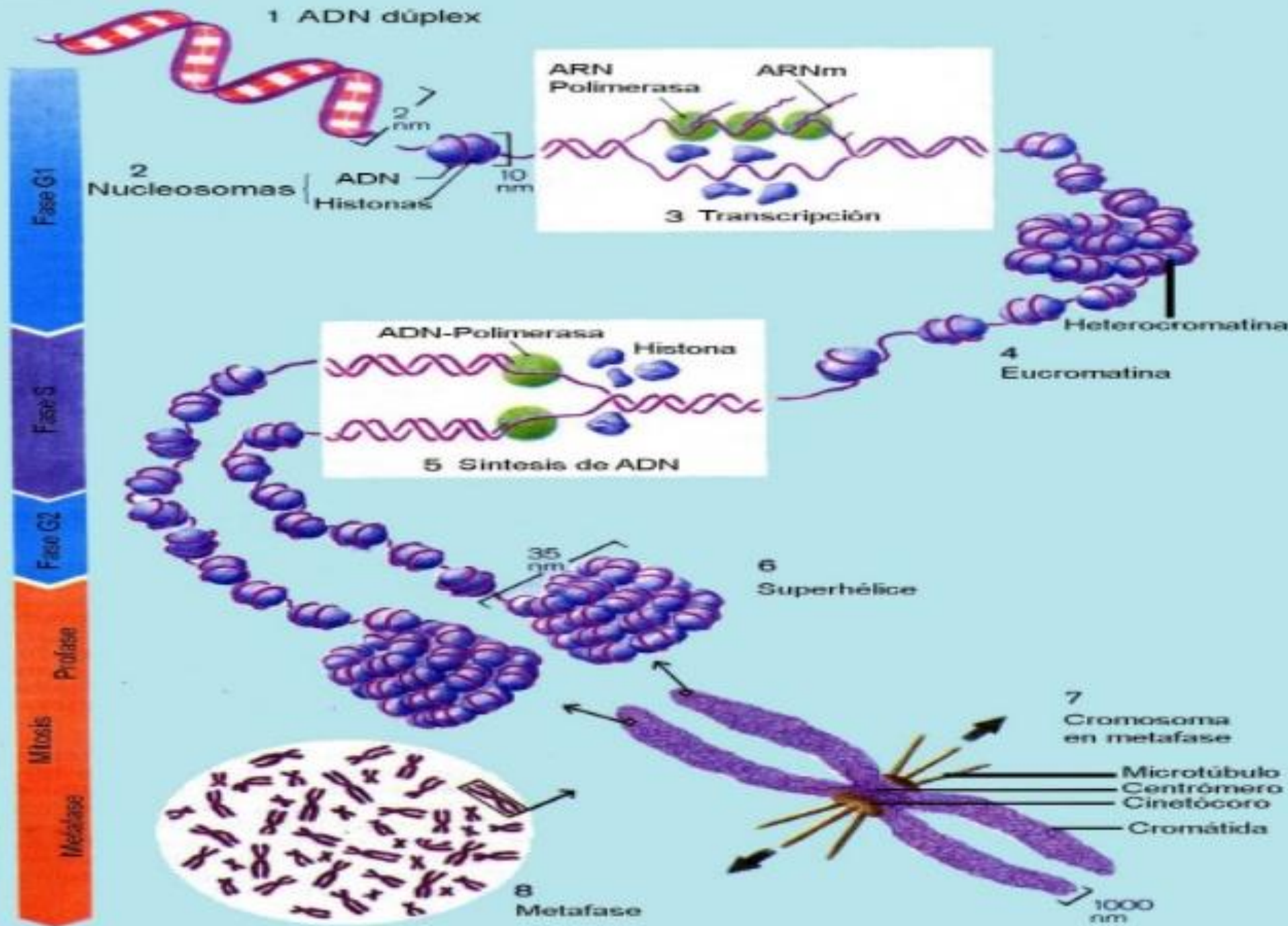
ADN polimerasa	Subunidades	3'-5' Exonucleasa	Función
$\alpha$ (alpha)	4	No	Cebadores de ARN/ADN, iniciación de la síntesis del ADN.
$\delta$ (delta)	4	Sí	Síntesis de la cadena retrasada, reparación del ADN, corrección de errores.
$\epsilon$ (épsilon)	4	Sí	Síntesis de la cadena adelantada, corrección de errores.
$\gamma$ (gamma)	2	Sí	Replicación y reparación del ADN mitocondrial.
$\beta$ (beta)	1	No	Reparación del ADN por escisión de bases.
$\eta$ (eta)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
$\zeta$ (zeta)	2	No	Síntesis de ADN por translesión.
$\kappa$ (kappa)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
$\iota$ (iota)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
$\theta$ (theta)	1	No	Reparación del ADN.
$\lambda$ (lambda)	1	No	Reparación del ADN.
$\mu$ (mu)	1	No	Reparación del ADN.
$\nu$ (nu)	1	No	Desconocida.
Rev 1	1	No	Reparación del ADN.

# Enzimas y proteínas que participan en el proceso de replicación del ADN

<b>Procariota</b>	<b>Eucariota</b>	<b>Función</b>
Polimerasa III	Polimerasa $\delta$ y $\alpha$	<b>Añadir nuevos nucleótidos</b>
Pinza $\beta$	PCNA	<b>Pinza la polimerasa sobre el ADN</b>
Ligasa de ADN	Ligasa de ADN	<b>Une los fragmentos de Okasaki</b>

# Enzimas y proteínas que participan en el proceso de replicación del ADN

<b>Procariota</b>	<b>Eucariota</b>	<b>Función</b>
DnaA	ORC	<b>Origen de la replicación</b>
Girasa	Topoisomerasa I/II	<b>Desenrolla el ADN</b>
DnaB	Mcm	<b>Helicasa</b>
SSB	RPA	<b>Estabiliza la cadena de ADN simple</b>
Primasa	Primasa	<b>Síntesis del primer de ARN</b>



**Estructura cromosómica**

# Inhibidores de la replicación

Sustancia	Efecto
Novobiocina	Actúa sobre la ADN girasa
Actinomicina D	Impide el desenrollamiento y separación del ADN