

La replicación del ADN...



Qué es???

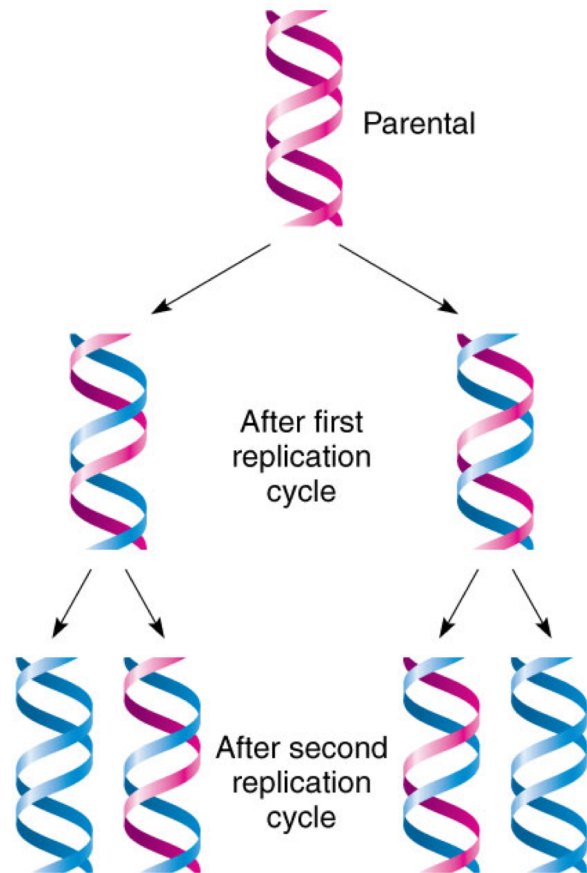
La replicación del ADN es bidireccional y semi-conservativa

¿Cómo lo demostraron?

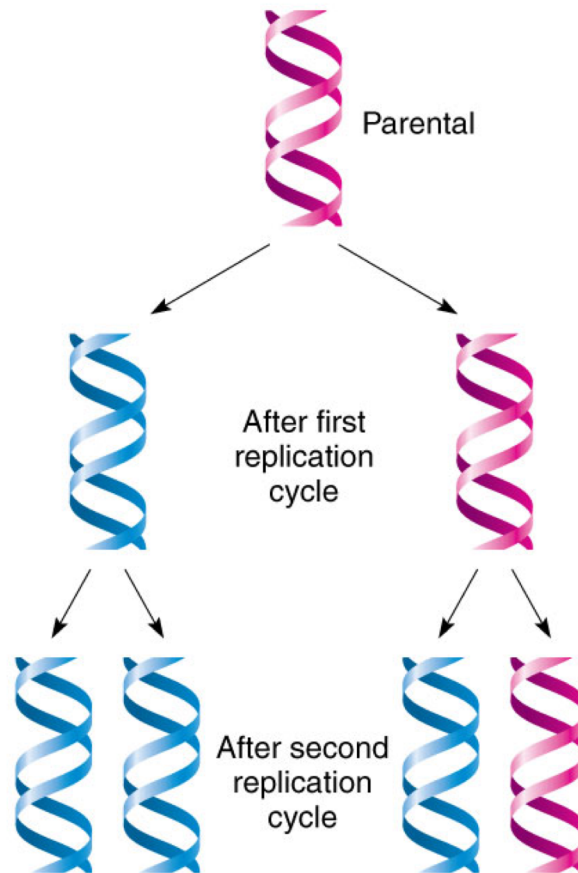


Semiconservativa???

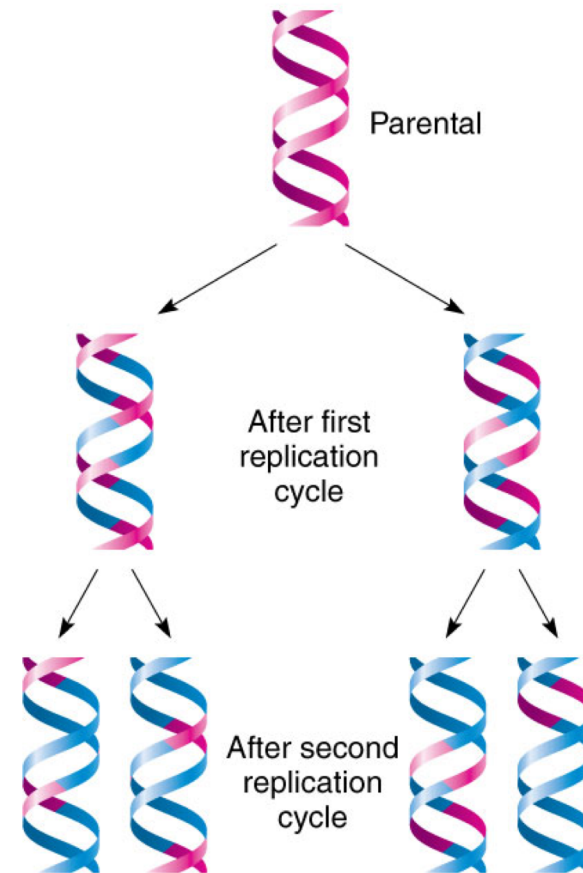
a) Semiconservative model



b) Conservative model



c) Dispersive model



La replicación del ADN...



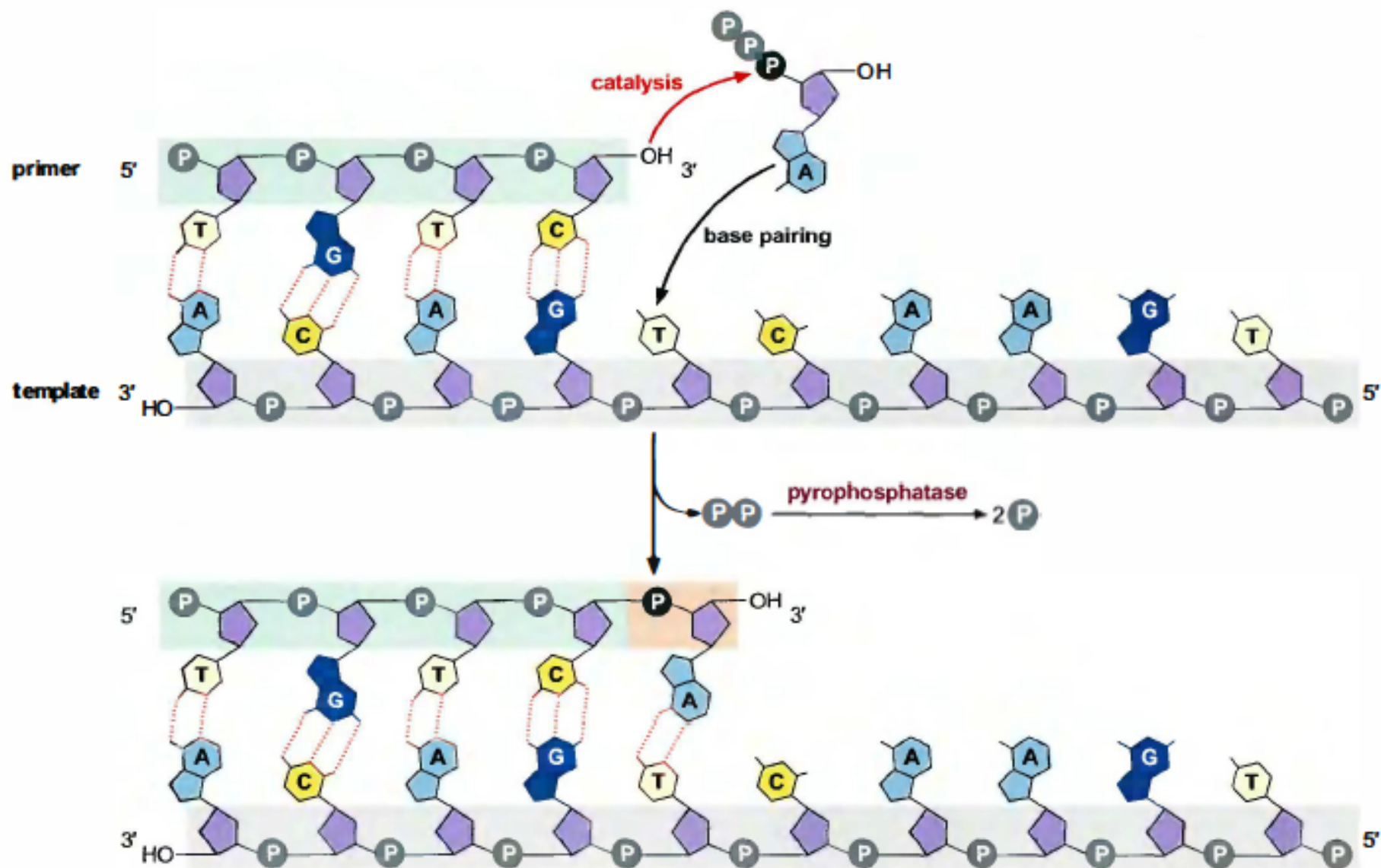
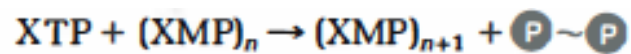
Como toda polimerización

3 etapas

iniciación

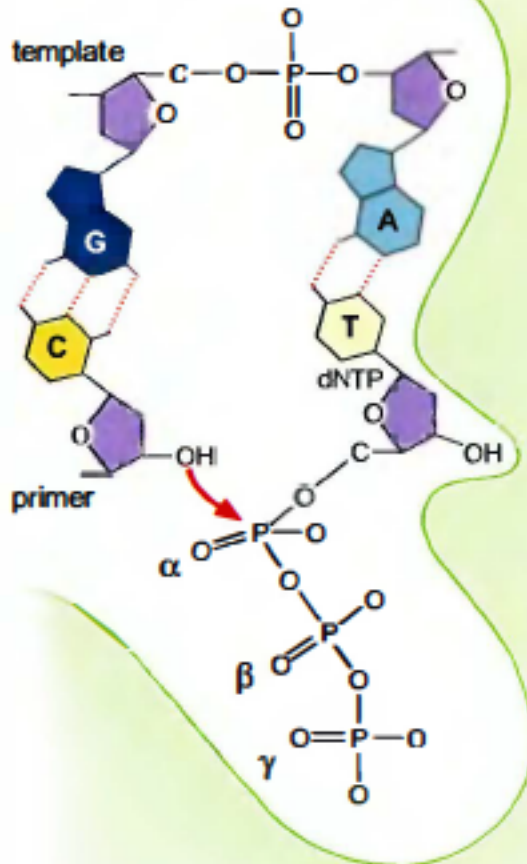
elongación

Terminación

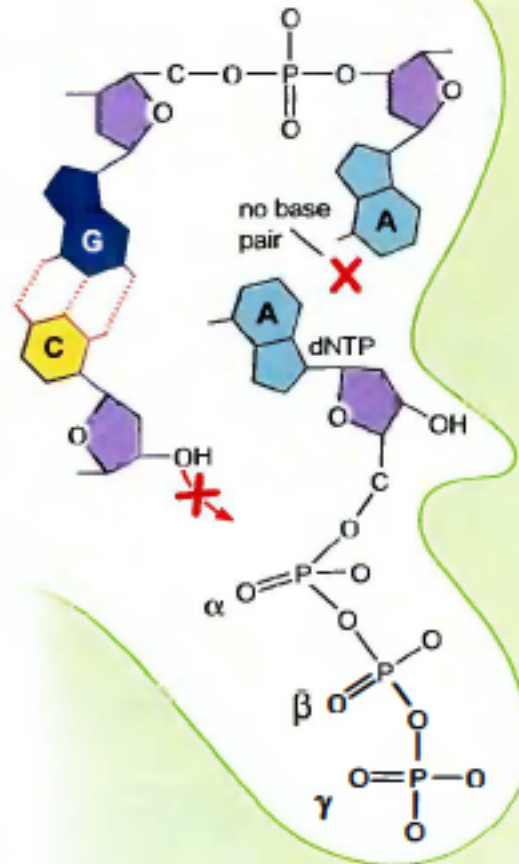


DNA Polymerases Use a Single Active Site to Catalyze DNA Synthesis

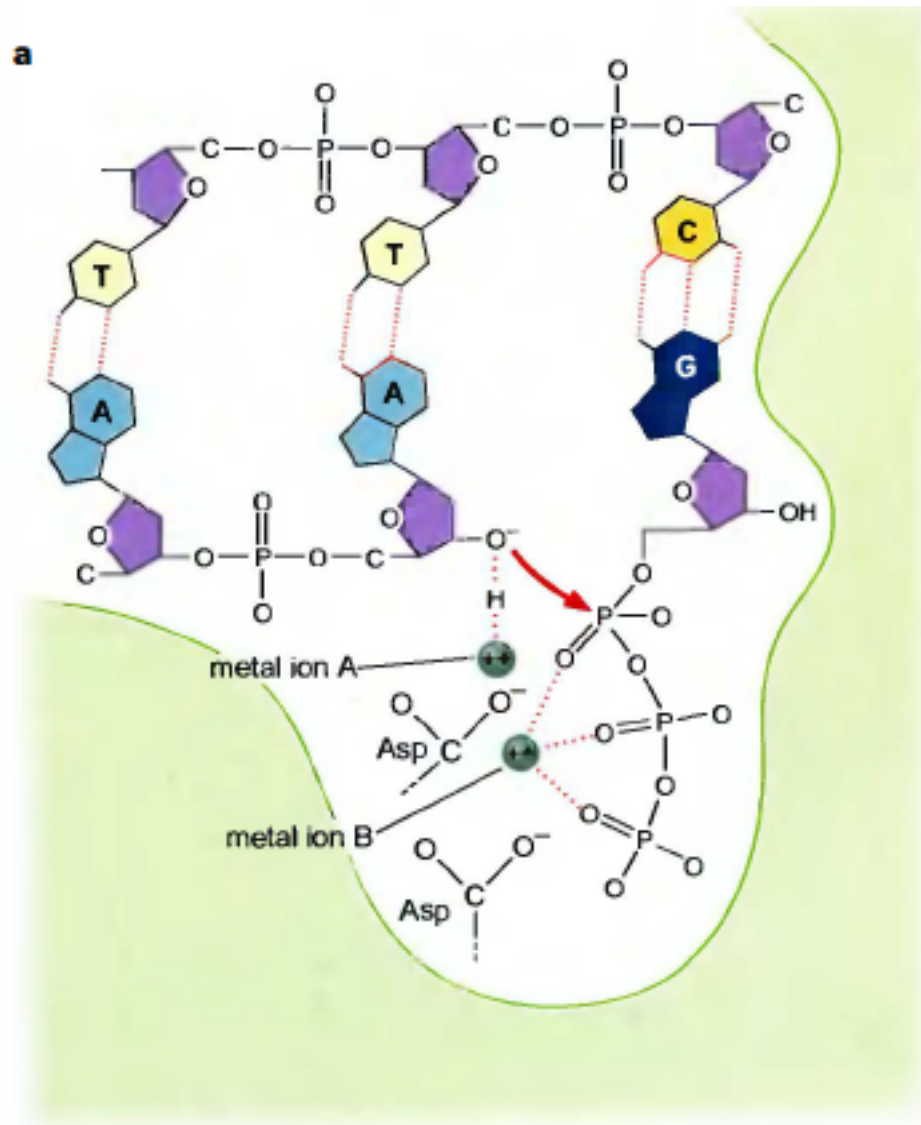
a correct base pair

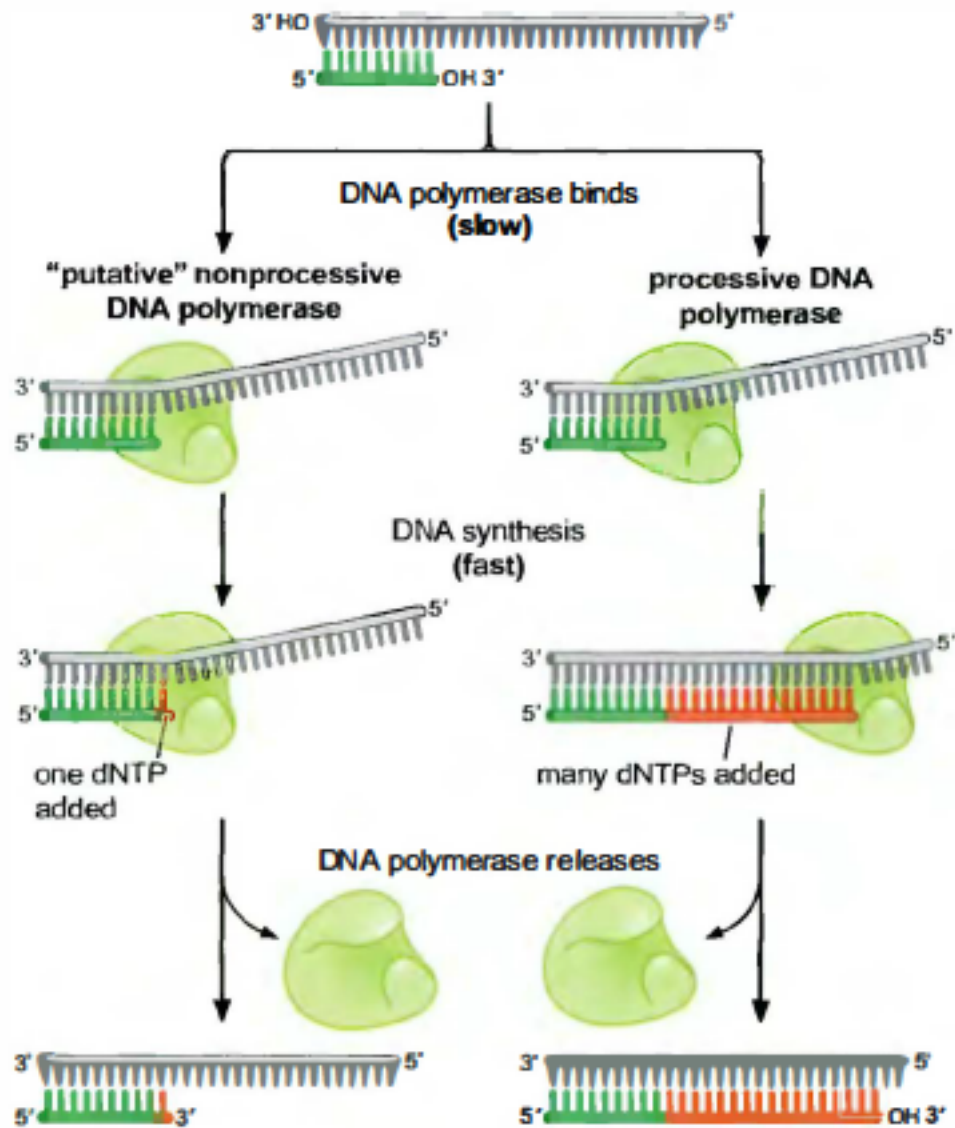


b incorrect base pair

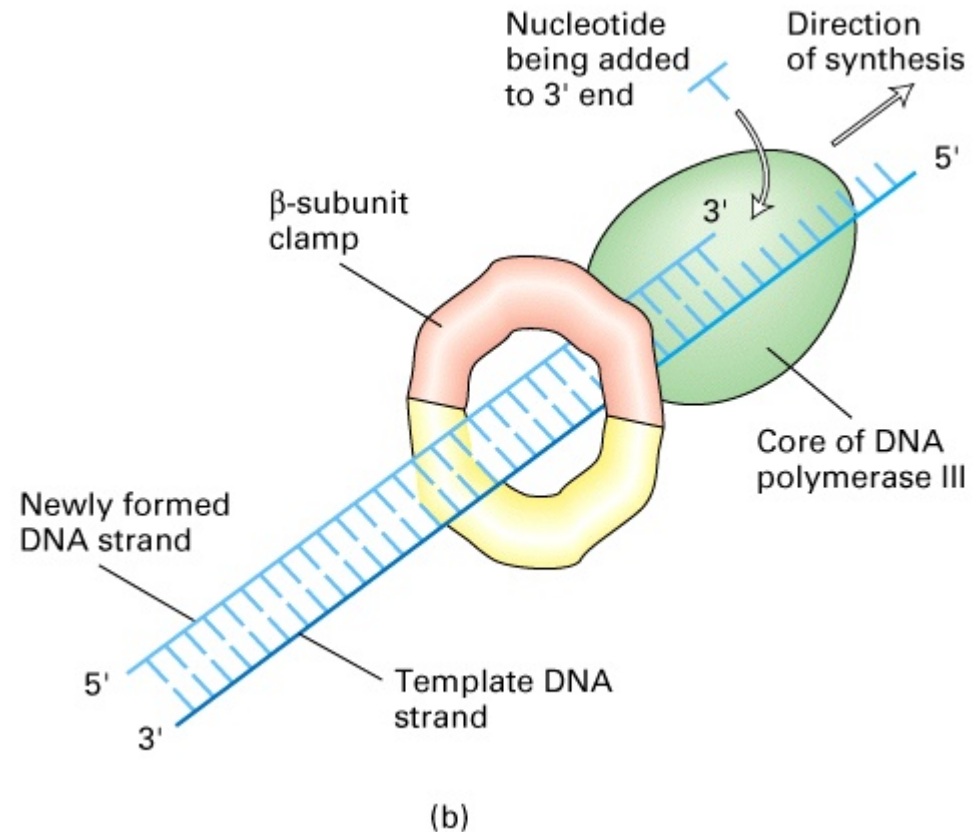
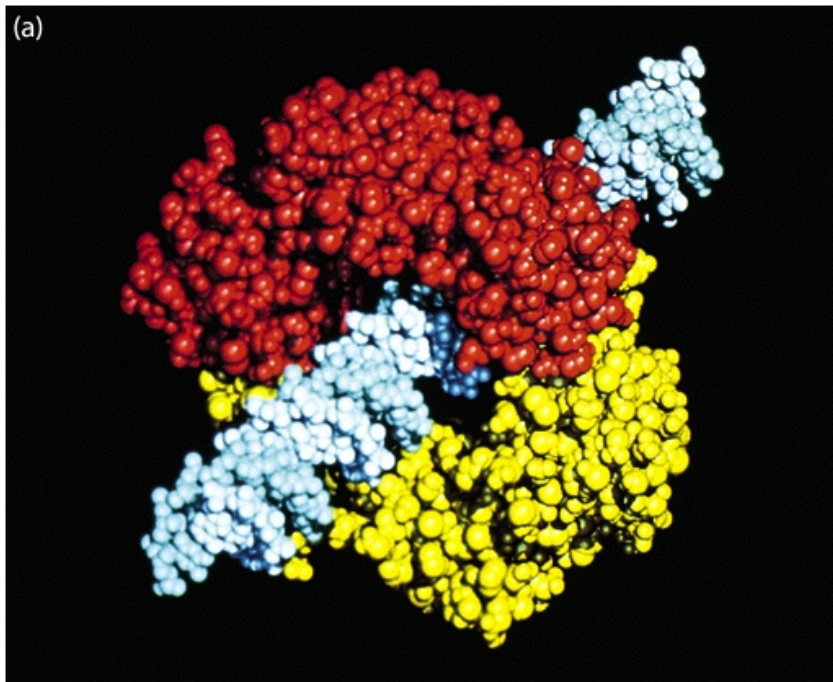


La síntesis requiere de iones metálicos

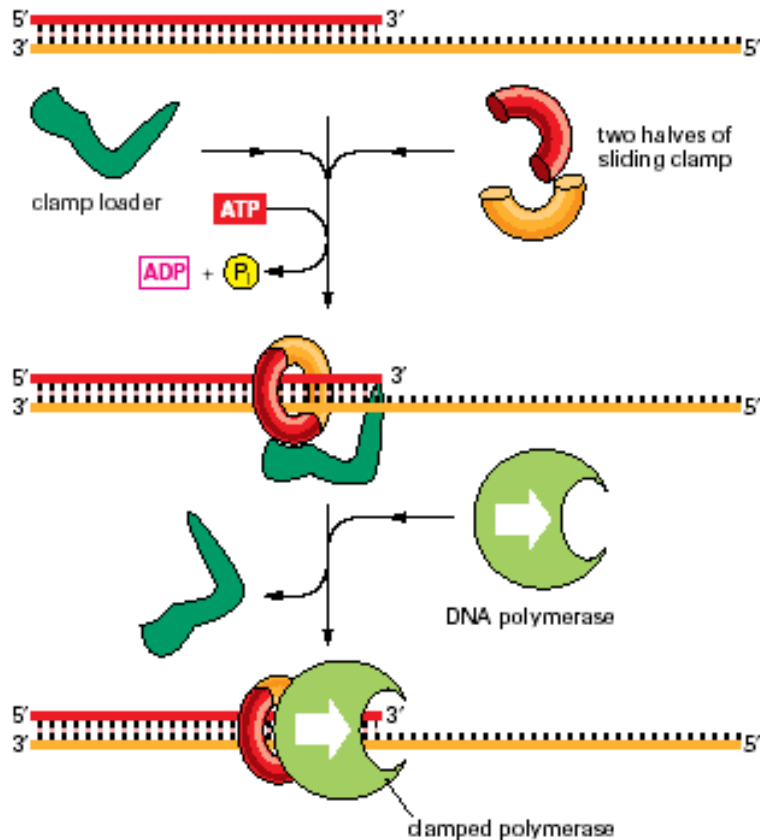




La procesividad de la DNA polimerasa es incrementada por un “clamp” del dímero de la subunidad β



Se requiere de una proteína para “cargar” el clamp



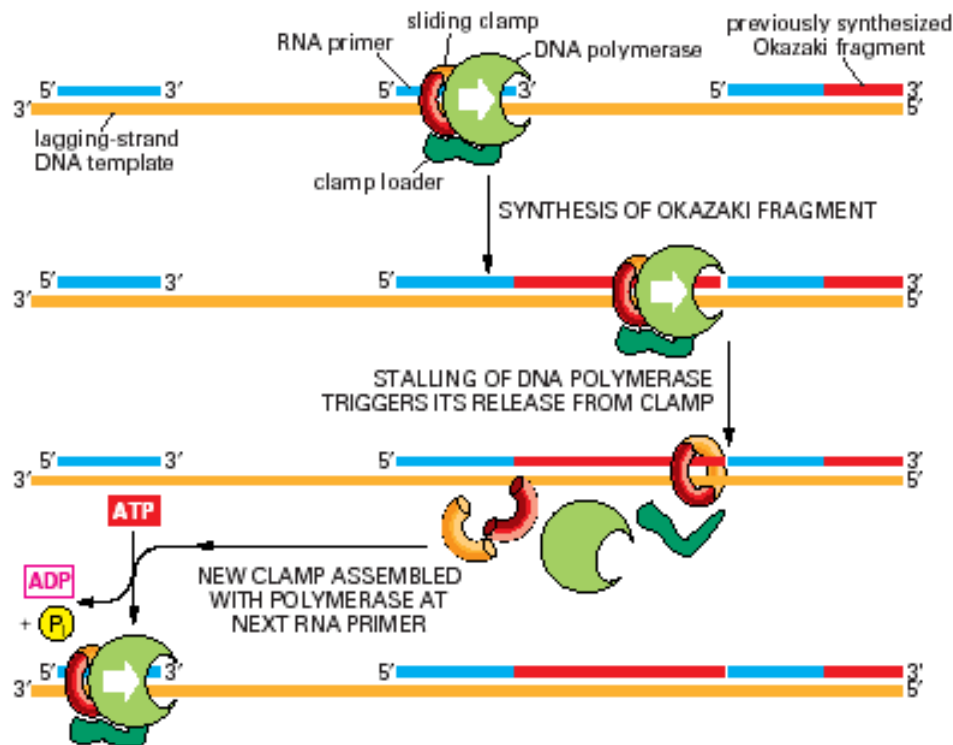
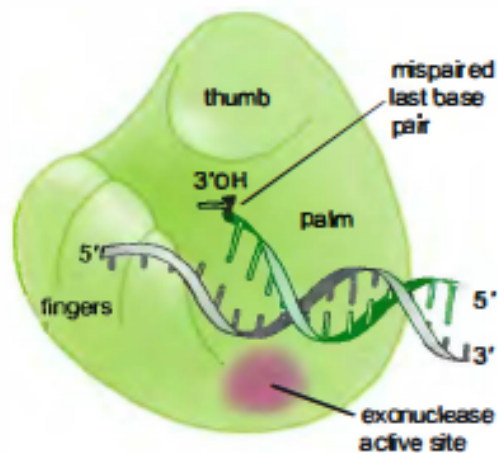


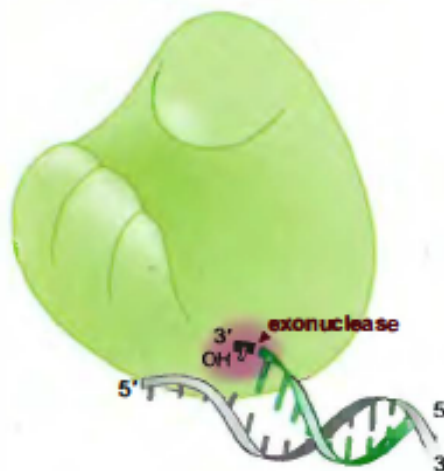
Figure 5-20 A cycle of loading and unloading of DNA polymerase and the clamp protein on the lagging strand. The association of the clamp loader with the lagging-strand polymerase shown here is for illustrative purposes only; in reality, the clamp loader is carried along with the replication fork in a complex that includes both the leading-strand and lagging-strand DNA polymerases (see Figure 5-22).

Exonucleases Proofread Newly Synthesized DNA

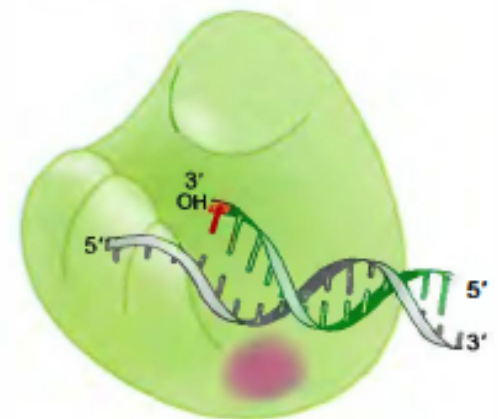
a slow or no DNA synthesis



b removal of mismatched nucleotides



c resume DNA synthesis



Para copiar el ADN la DNA polimerasa debe superar varios “problemas”

- Las DNA polimerasas son incapaces de separar las cadenas de la doble hebra de ADN para exponer las cadenas a ser copiadas
- Todas las DNA polimerasas conocidas ***sólo pueden elongar*** una cadena preexistente de ADN o ARN, ***son incapaces de iniciar*** cadenas
- Las dos cadenas son antiparalelas, pero todas las DNA polimerasas catalizan la incorporación de nucleótidos al extremo 3'-hidroxilo de la cadena en crecimiento, por lo tanto sólo pueden crecer en la dirección 5'---->3'

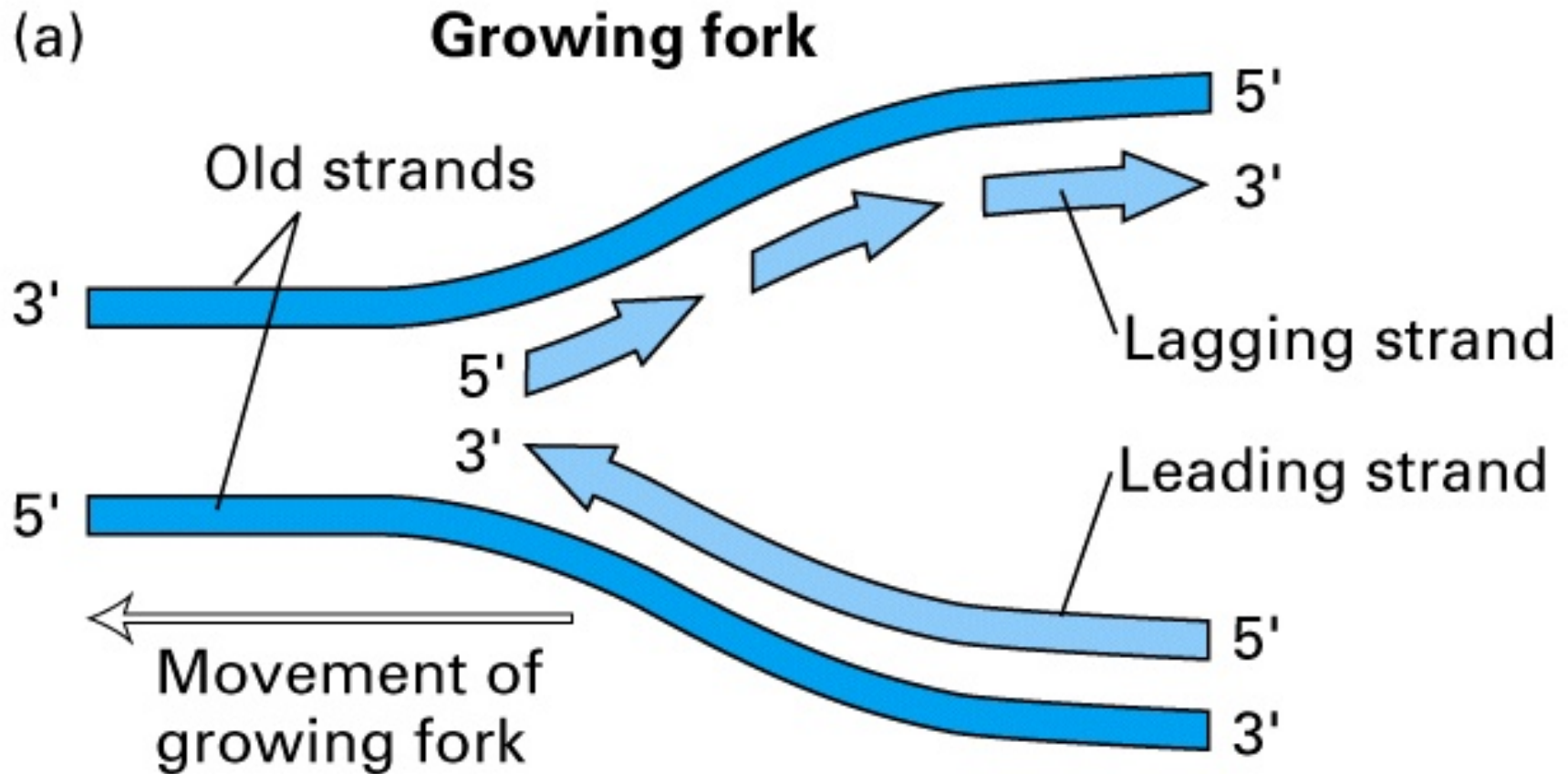
*MECHANISM OF DNA CHAIN GROWTH, I. POSSIBLE
DISCONTINUITY AND UNUSUAL SECONDARY STRUCTURE OF
NEWLY SYNTHESIZED CHAINS*

BY REIJI OKAZAKI, TUNeko OKAZAKI, KIWAKO SAKABE, KAZUNORI SUGIMOTO,
AND AKIO SUGINO

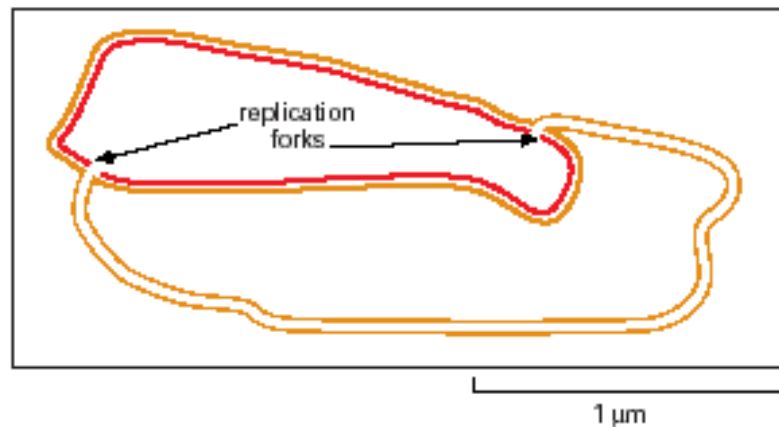
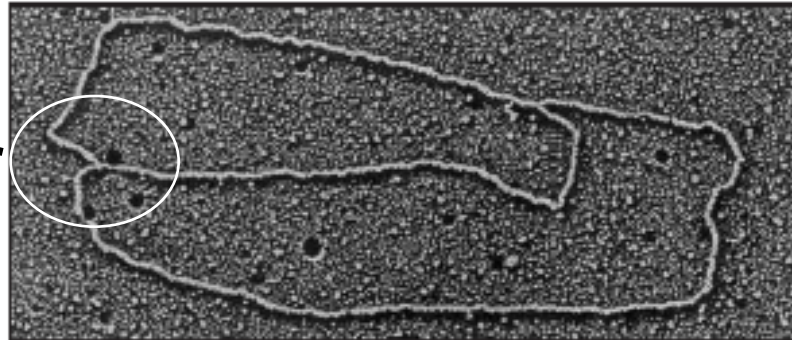
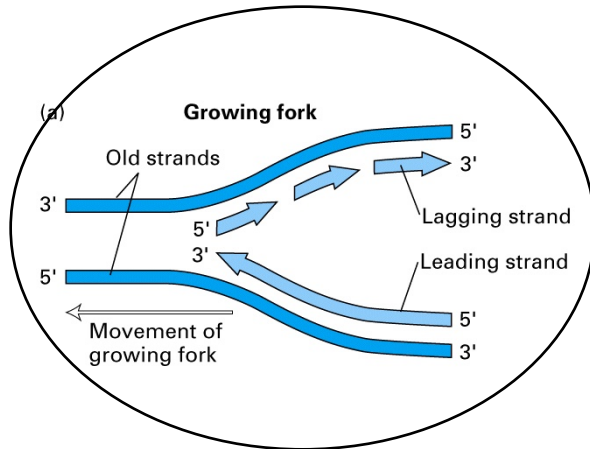
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND DEPARTMENT OF CHEMISTRY,
FACULTY OF SCIENCE, NAGOYA UNIVERSITY, NAGOYA, JAPAN

Communicated by Rollin D. Hotchkiss, December 14, 1967

En la horquilla, una cadena es sintetizada en forma discontinua a partir de múltiples cebadores



Dos horquillas de replicación moviéndose en dirección opuesta



Síntesis de la cadena retrasada ("lagging strand")

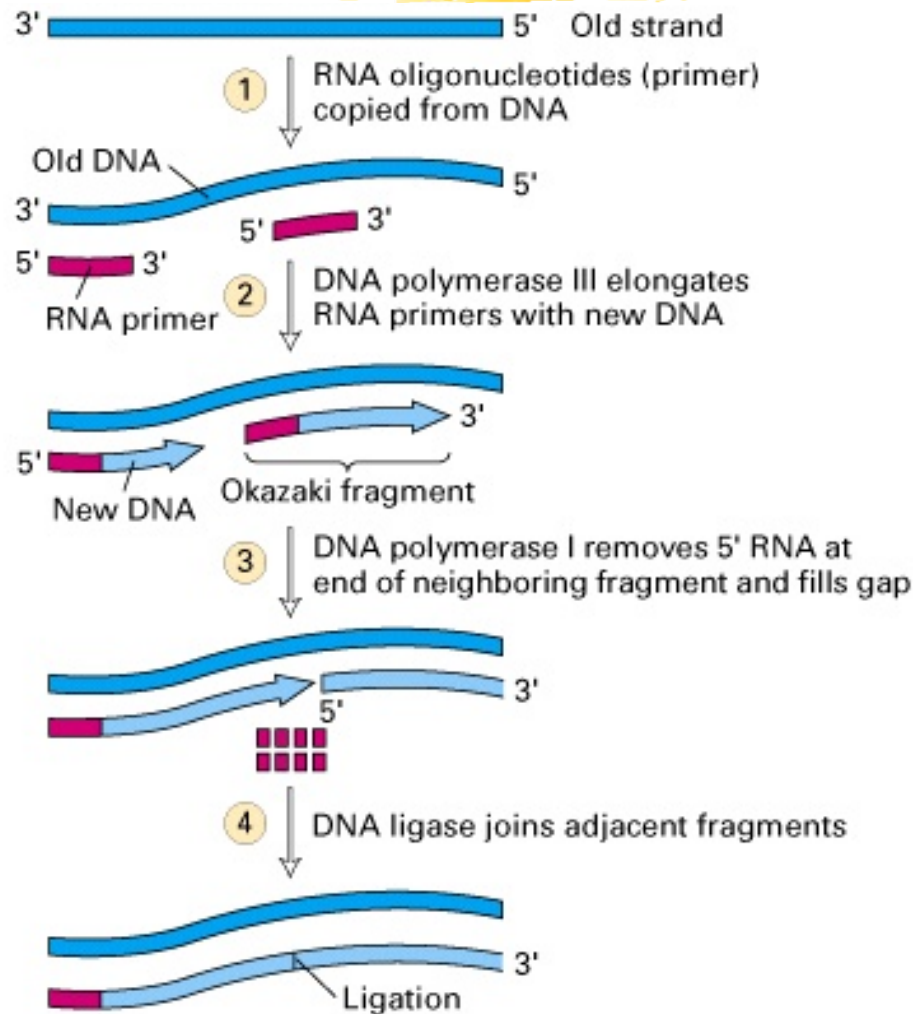


Figure 12-9b

La primasa es una RNA polimerasa

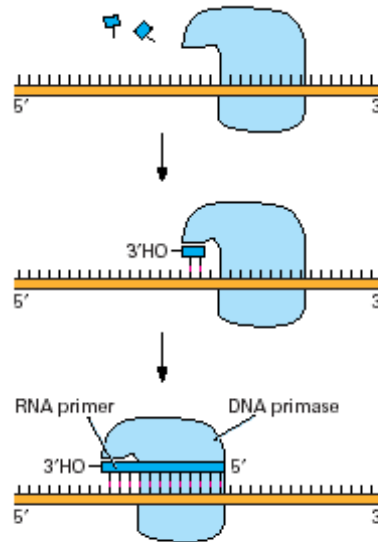
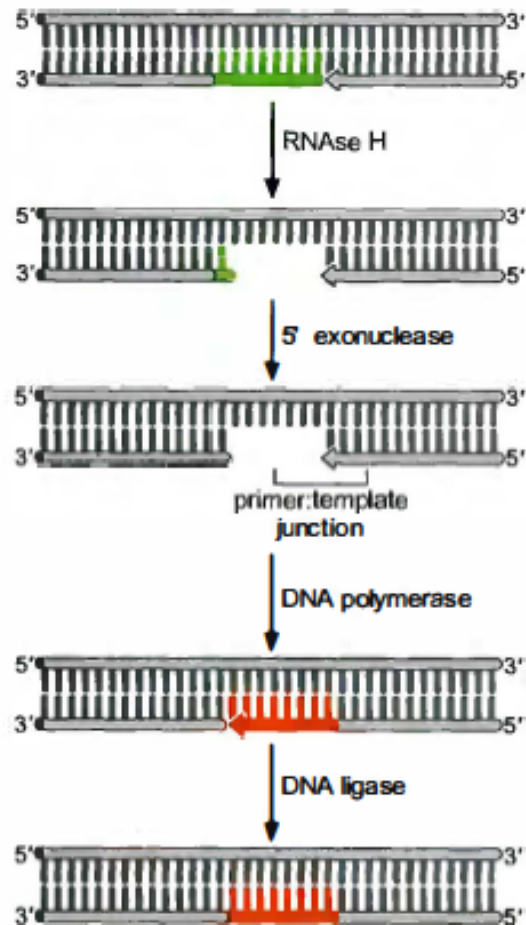
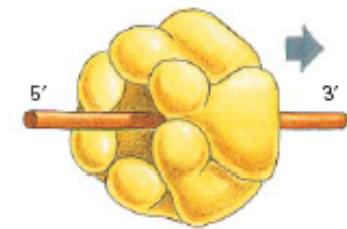


Figure 5-12 RNA primer synthesis.
A schematic view of the reaction catalyzed by *DNA primase*, the enzyme that synthesizes the short RNA primers made on the lagging strand using DNA as a template. Unlike DNA polymerase, this enzyme can start a new polynucleotide chain by joining two nucleoside triphosphates together. The primase synthesizes a short polynucleotide in the 5'-to-3' direction and then stops, making the 3' end of this primer available for the DNA polymerase.

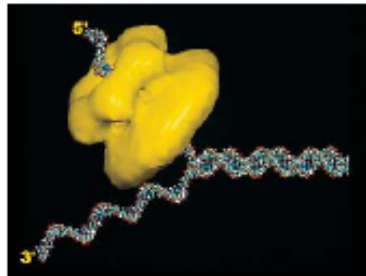


**RNA Primers Must Be Removed
to Complete DNA Replication**

La helicasa



(A)



(B)

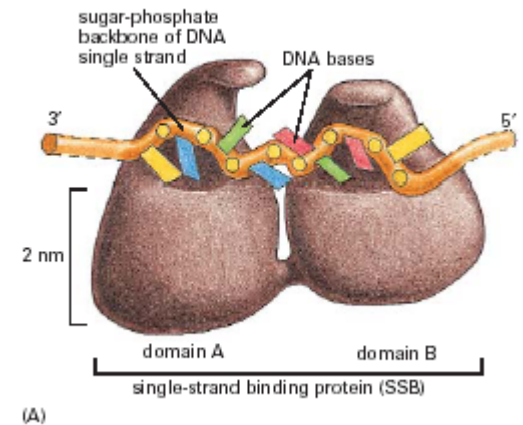
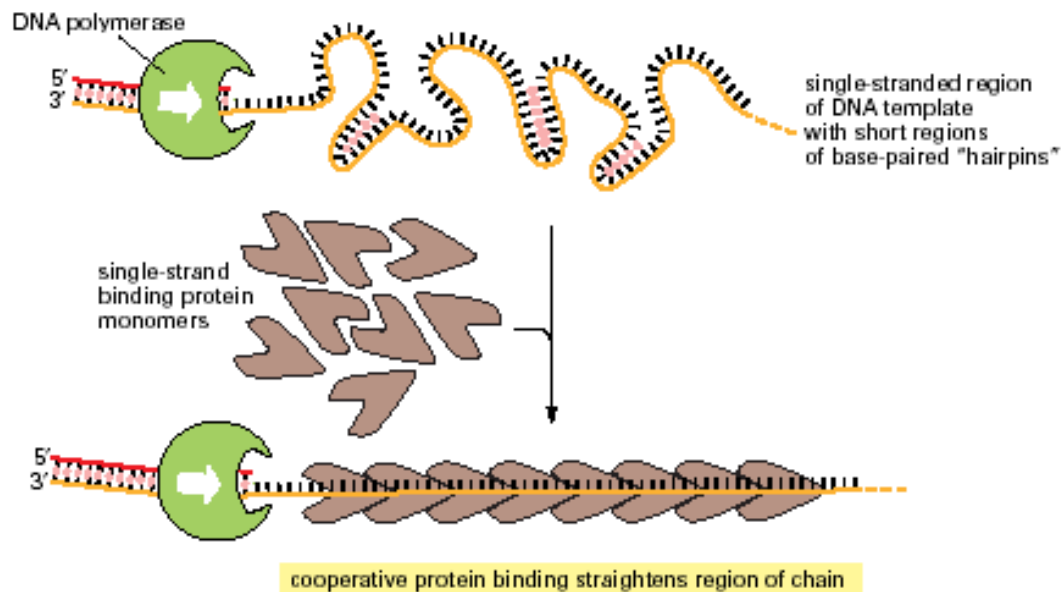


(C)

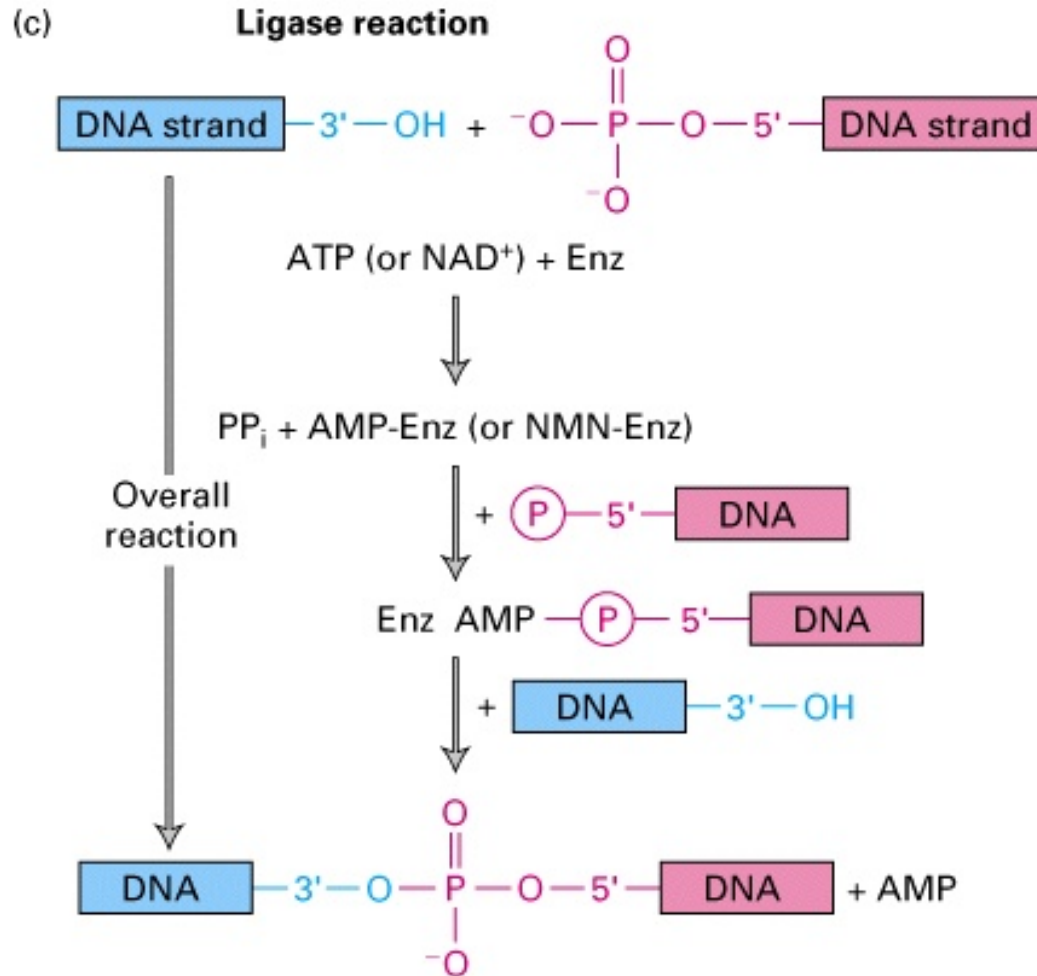
DNA Helicases Unwind the Double Helix in Advance of the Replication Fork



SSB proteins



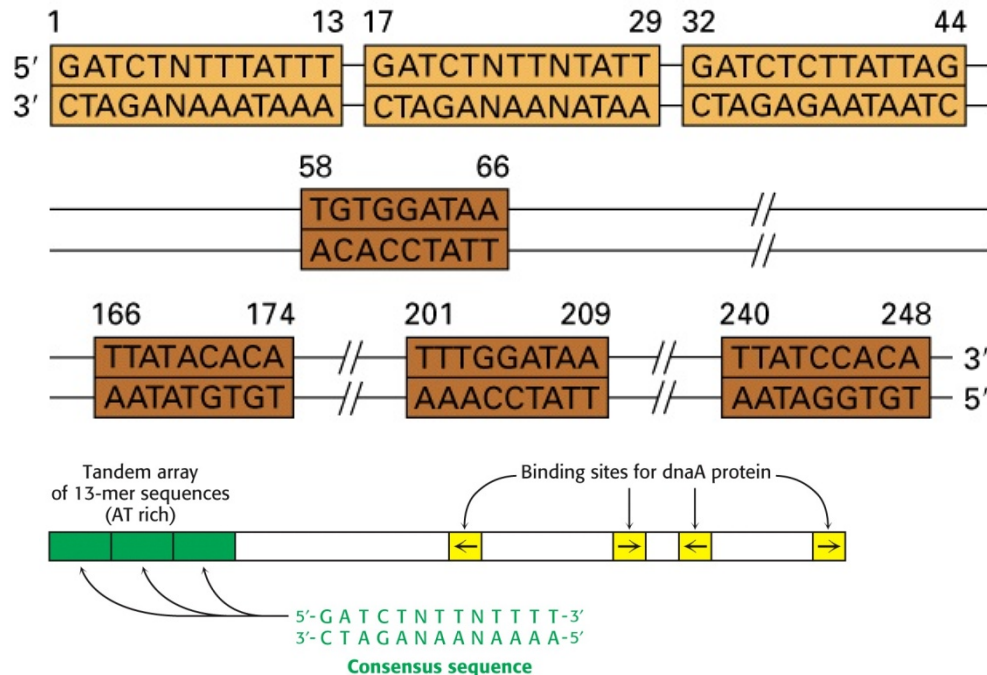
Los fragmentos de la cadena retrasada deben ser ligados para crear una cadena continua de DNA



La replicación comienza en sitios específicos del cromosoma denominados

Orígen de replicación

Secuencia consenso mínima del origen de replicación bacteriano



Los orígenes de replicación son: (1) segmentos únicos de ADN con múltiples repeticiones cortas, (2) reconocidas por proteínas de unión al origen multiméricas, y (3) usualmente contienen una secuencia rica en A-T

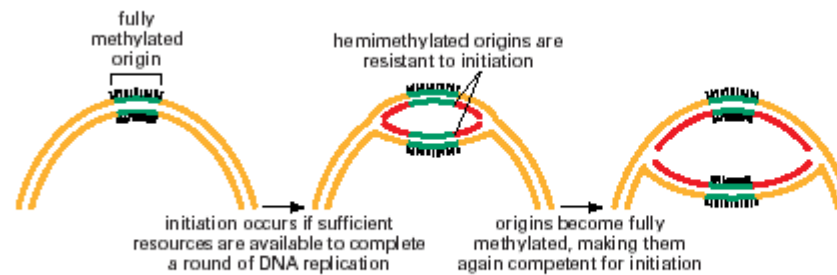
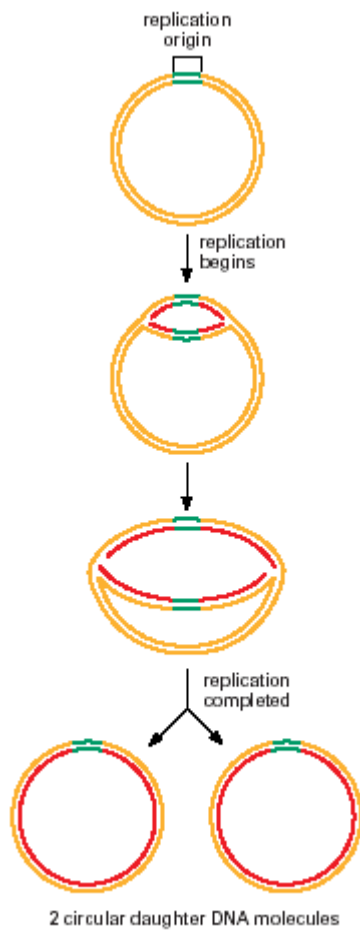
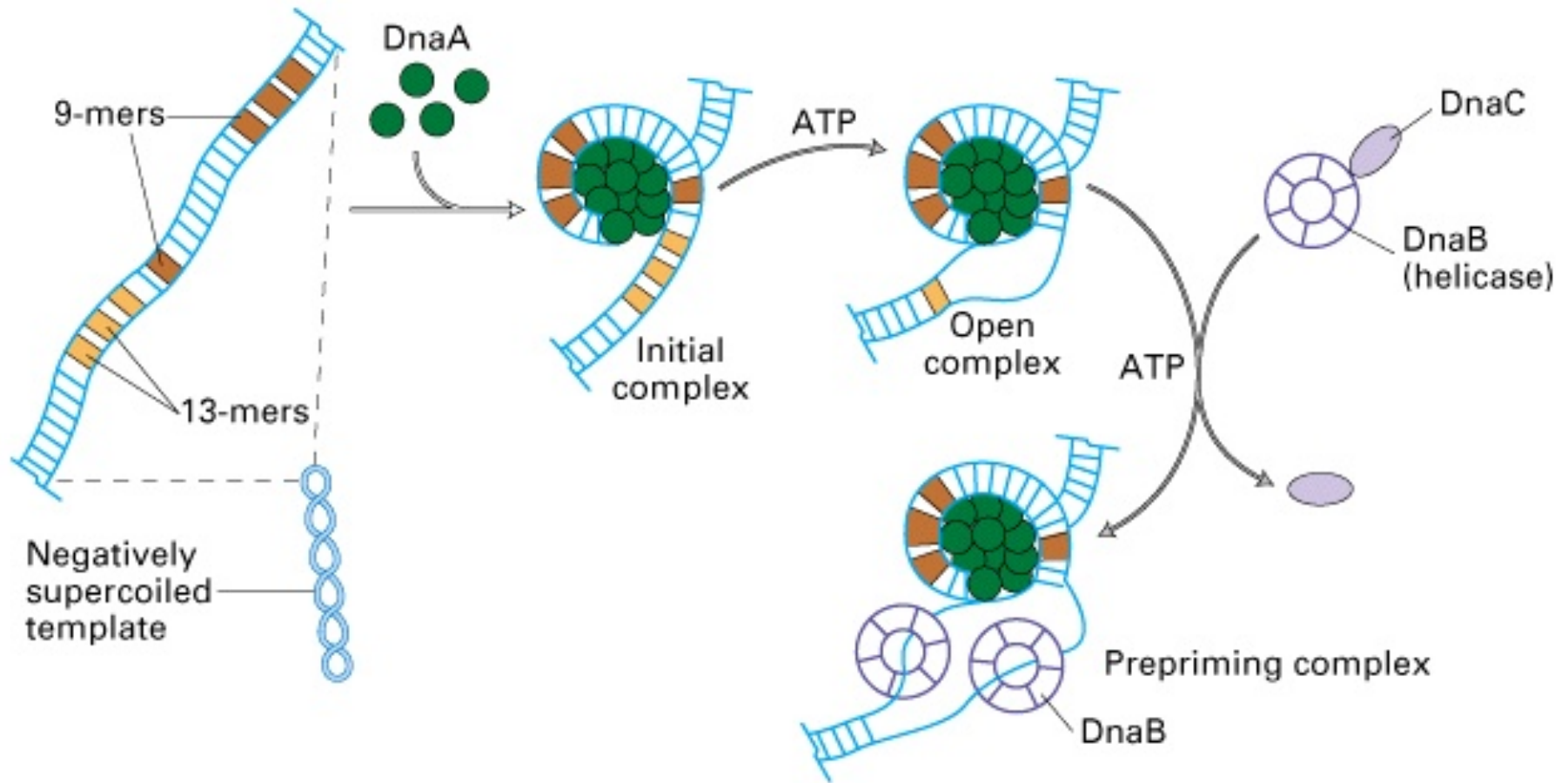


Figure 5-32 Methylation of the *E. coli* replication origin creates a refractory period for DNA initiation. DNA methylation occurs at GATC sequences, 11 of which are found in the origin of replication (spanning about 250 nucleotide pairs). About 10 minutes after replication is initiated, the hemimethylated origins become fully methylated by a DNA methylase enzyme. As discussed earlier, the lag in methylation after the replication of GATC sequences

La proteína DnaA inicia la replicación en *E. coli*

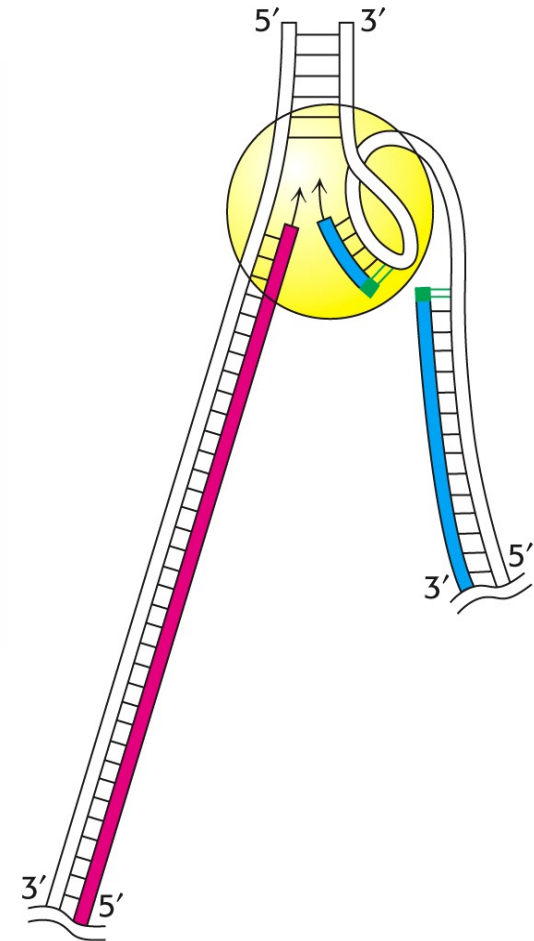
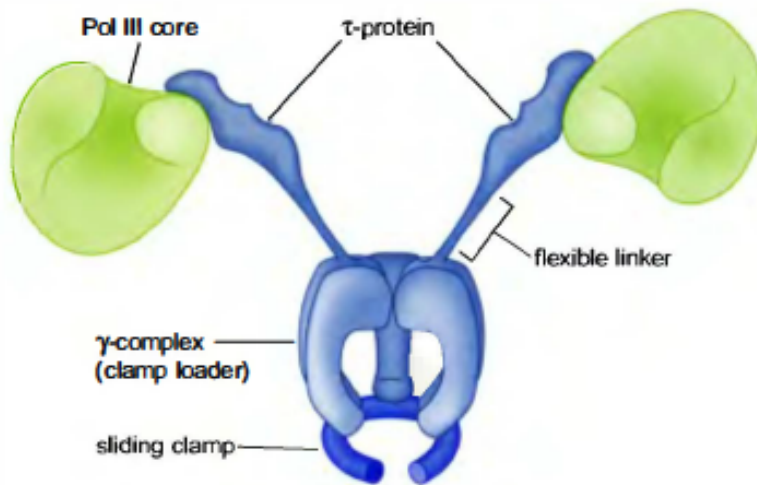


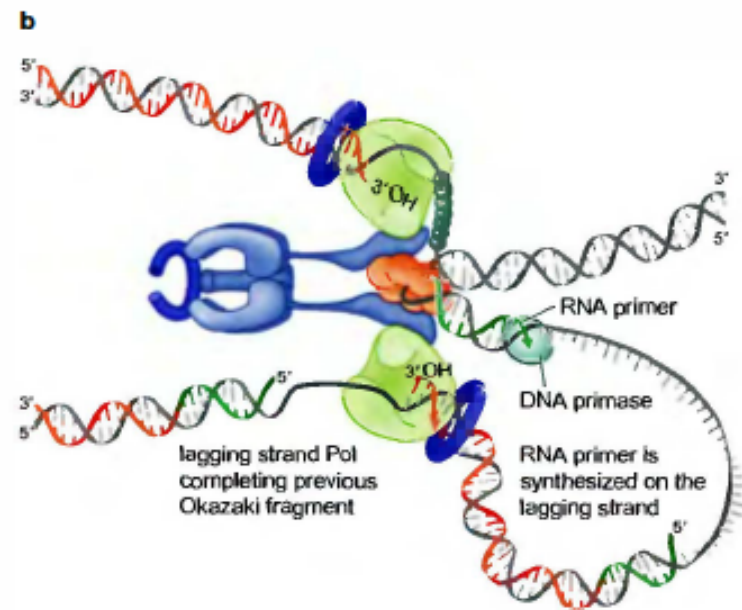
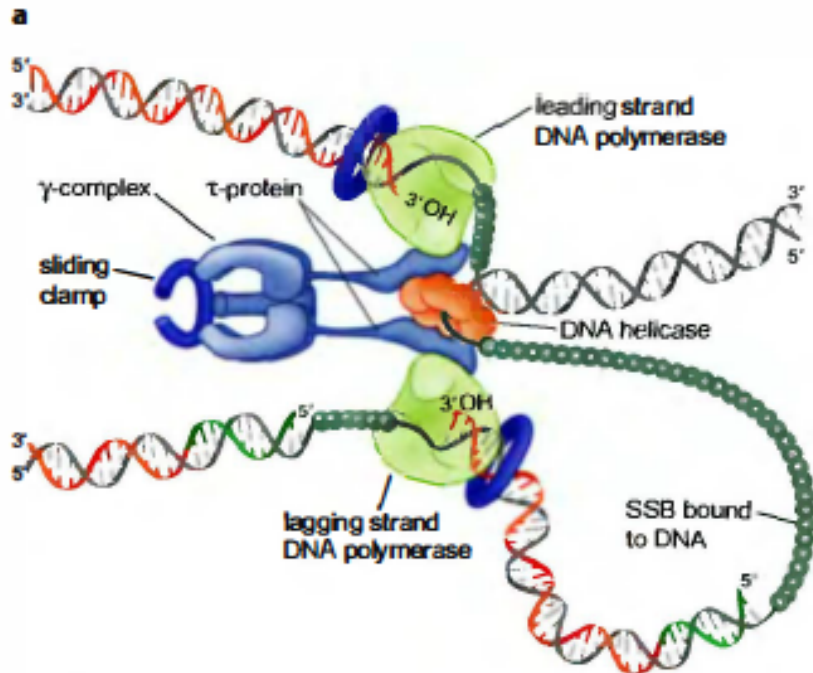
DNA polimerasas de *E. coli*

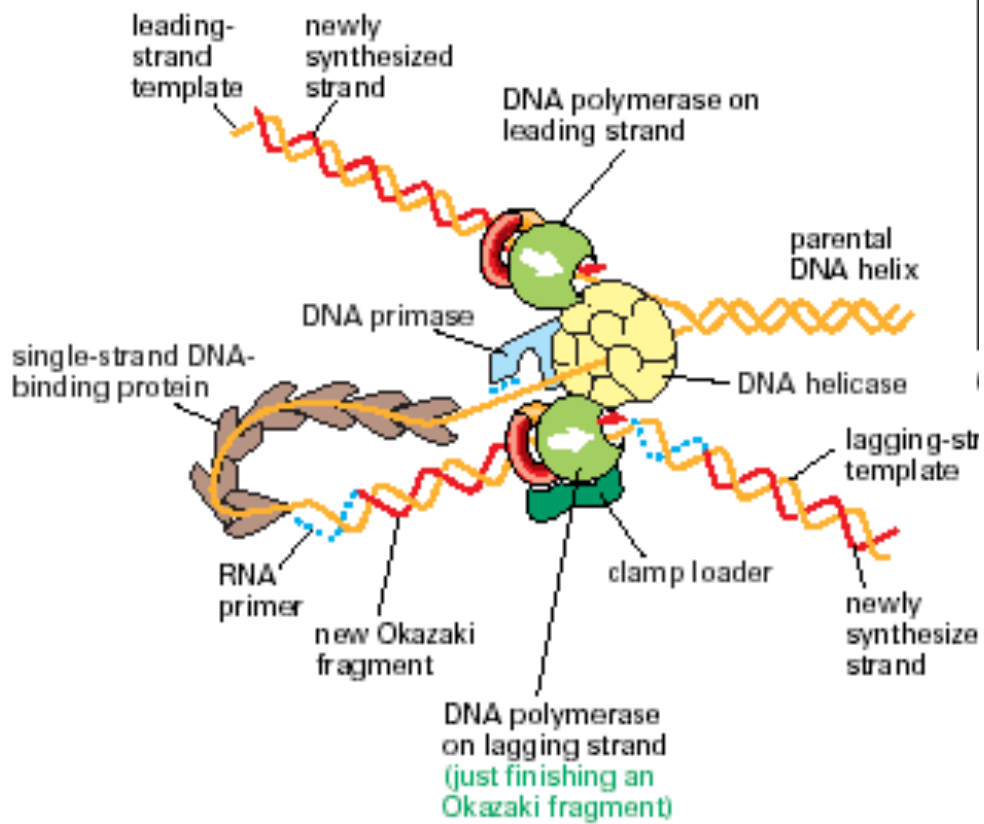
TABLE 12-1 Properties of DNA Polymerases

<i>E. coli</i>	I	II	III
Polymerization: $5' \rightarrow 3'$	+	+	+
Exonuclease activity:			
$3' \rightarrow 5'$	+	+	+
$5' \rightarrow 3'$	+	—	—
Synthesis from:			
Intact DNA	—	—	—
Primed single strands	+	—	—
Primed single strands plus single-strand-binding protein	+	—	+
In vitro chain elongation rate (nucleotides per minute)	600	?	30,000
Molecules present per cell	400	?	10–20
Mutation lethal?	+	—	+

Ambas cadenas son sintetizadas en forma concurrente







(A)



El cromosoma bacteriano es replicado **bidireccionalmente** como una unidad a partir del *oriC*

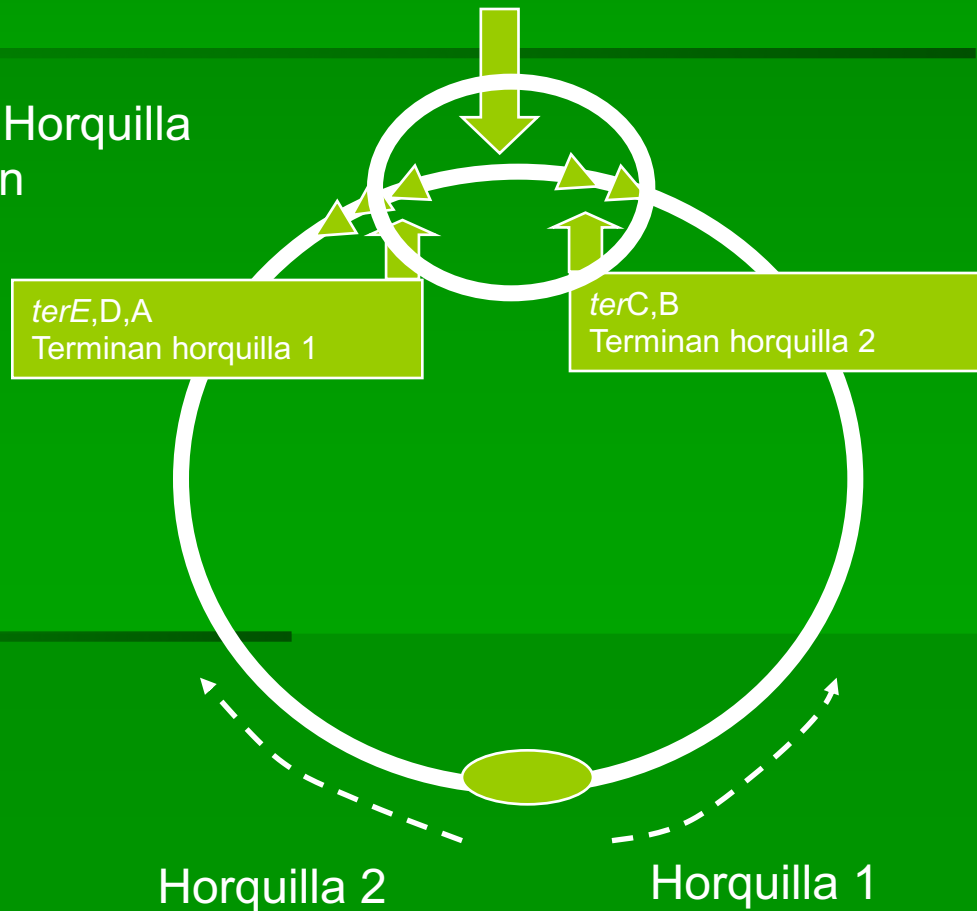
Las dos horquillas de replicación se mueven a lo largo del genoma (a aprox. la misma velocidad) hasta un punto de encuentro

- Las secuencias involucradas en la terminación se denominan “sitios *ter*”
- Son secuencias cortas (23 bp)
- Funcionan en una única orientación
- El sitio *ter* es reconocido por la proteína Tus (en *E.coli*) o RTF (en *B.subtilis*)

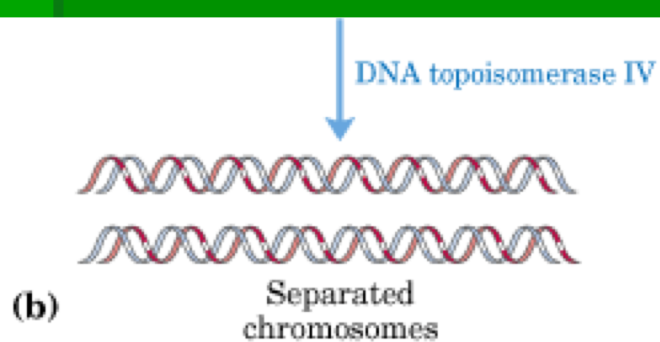
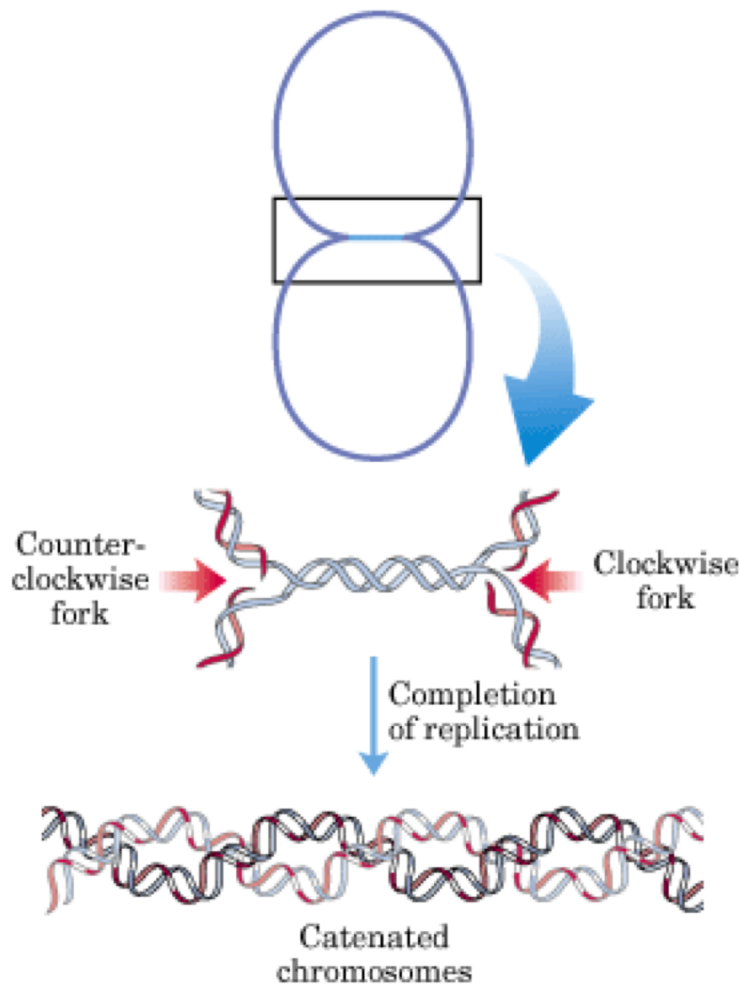
Punto de encuentro de las horquillas

TRAMPA de Horquilla
de replicación

Si una horquilla se retrasa,
la más rápida es
“atrapada” en la región *ter*
para esperar el arribo de la
horquilla retrasada

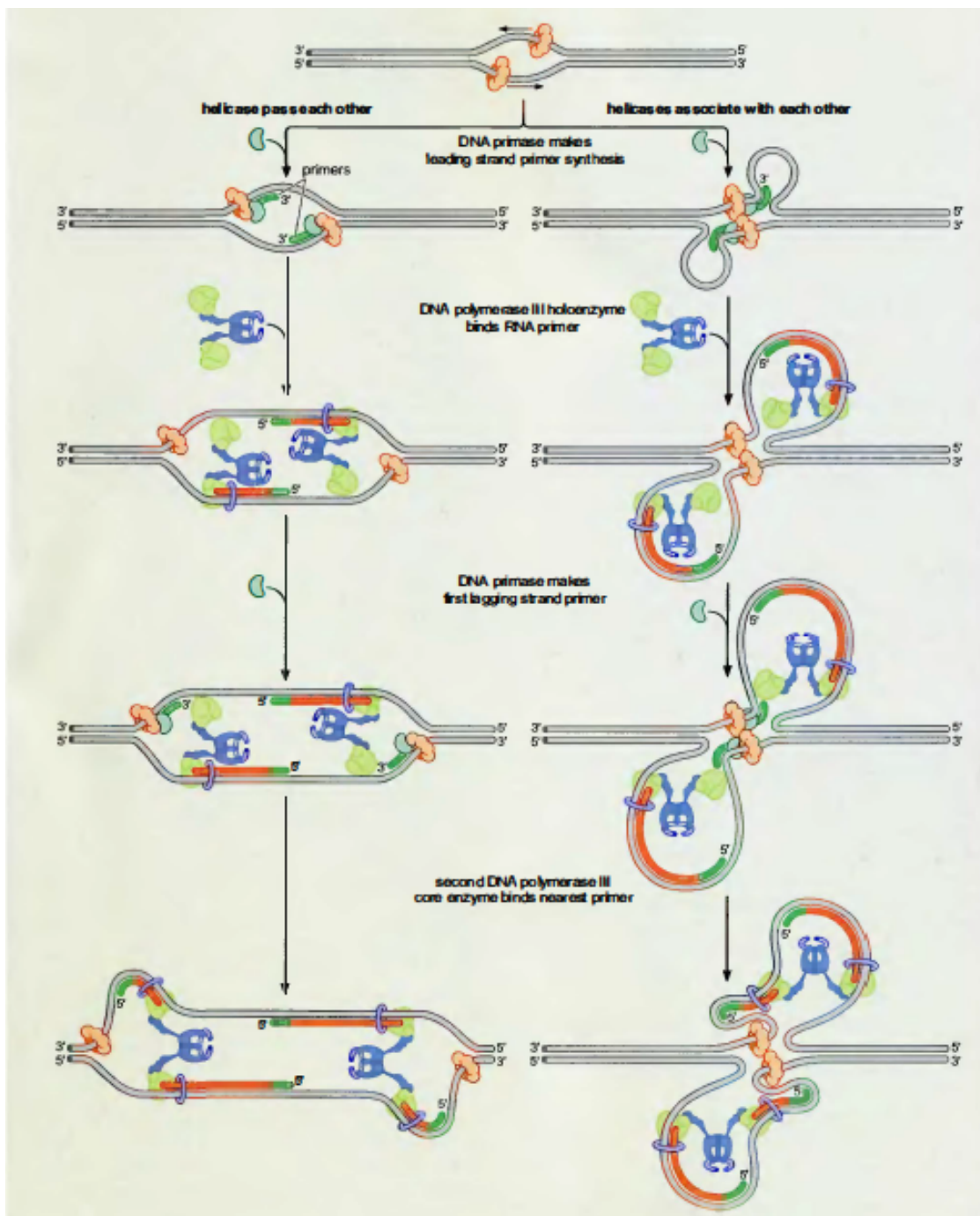


Los últimos cientos de bases de ADN entre estos complejos son replicados completando 2 cromosomas topológicamente unidos

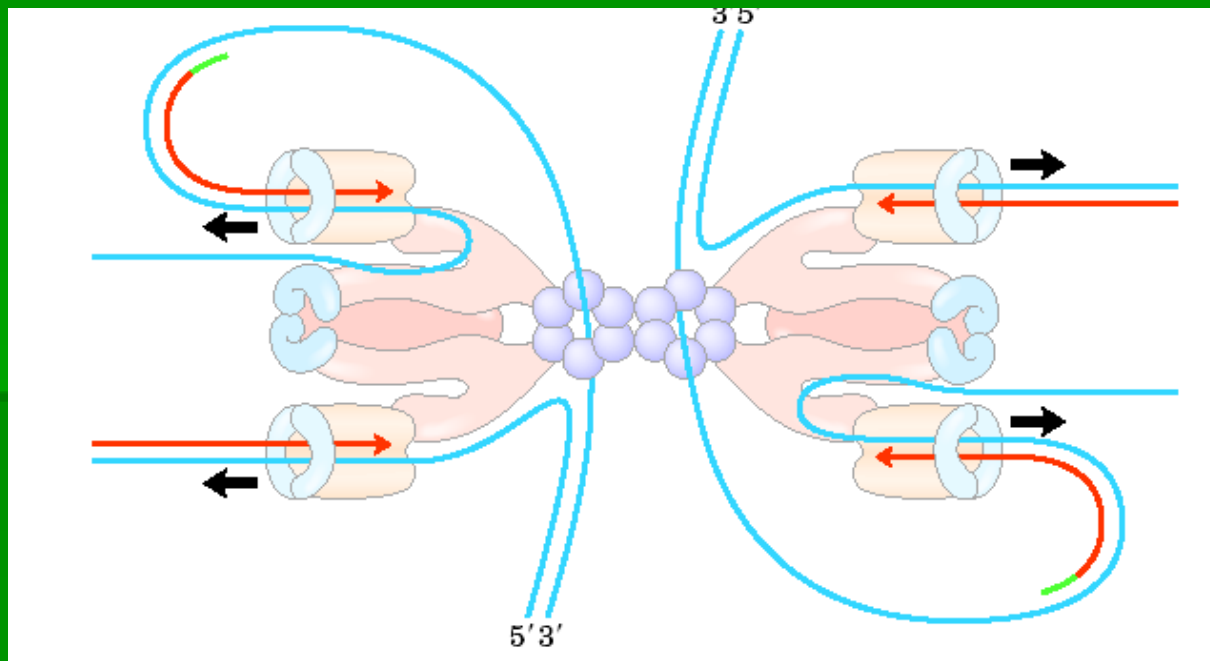


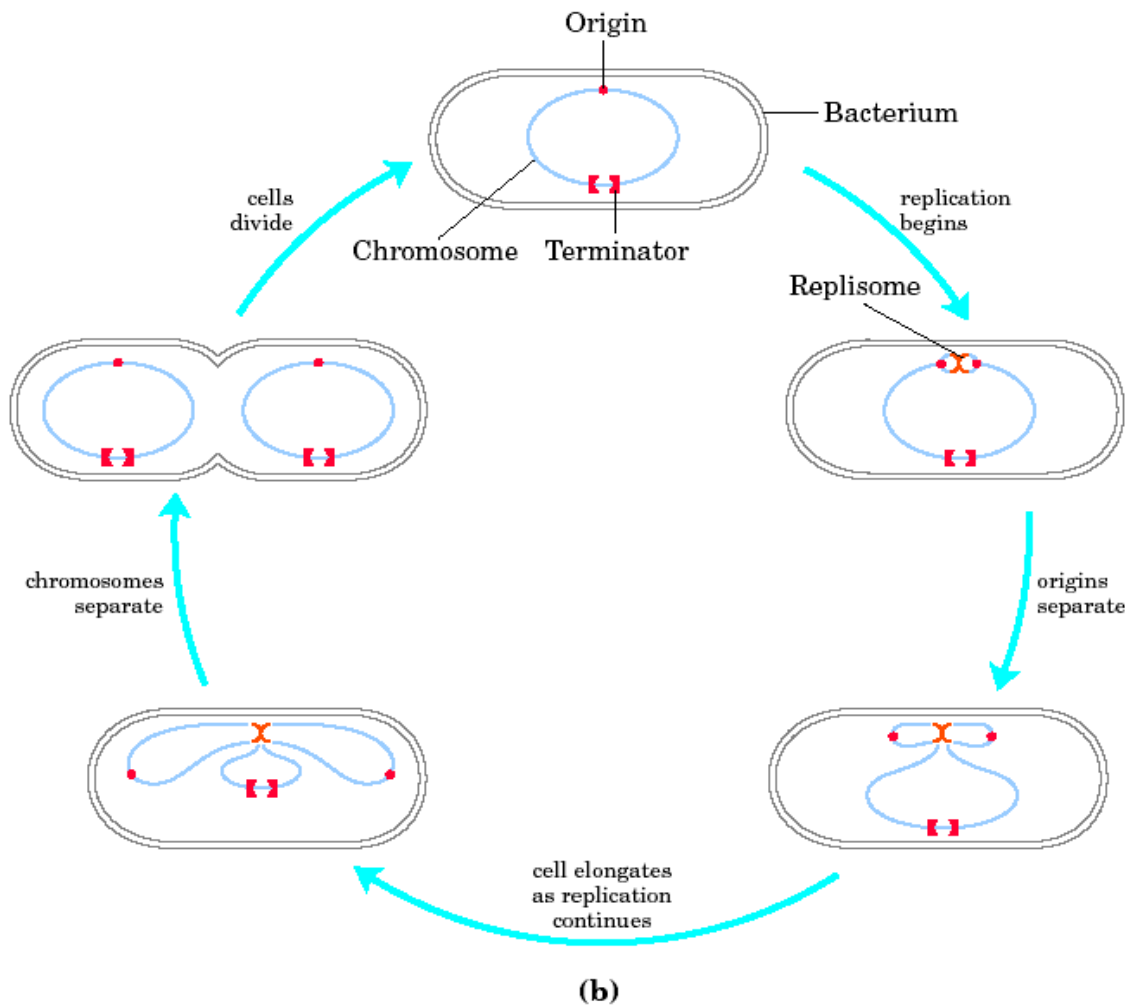
La separación de los círculos (catenanos) se realiza por acción de la Topoisomerasa IV

right (c) by W. H. Freeman and Company



Los replisomas de ambas horquillas se encuentran ligados entre sí y asociados a la membrana en un punto

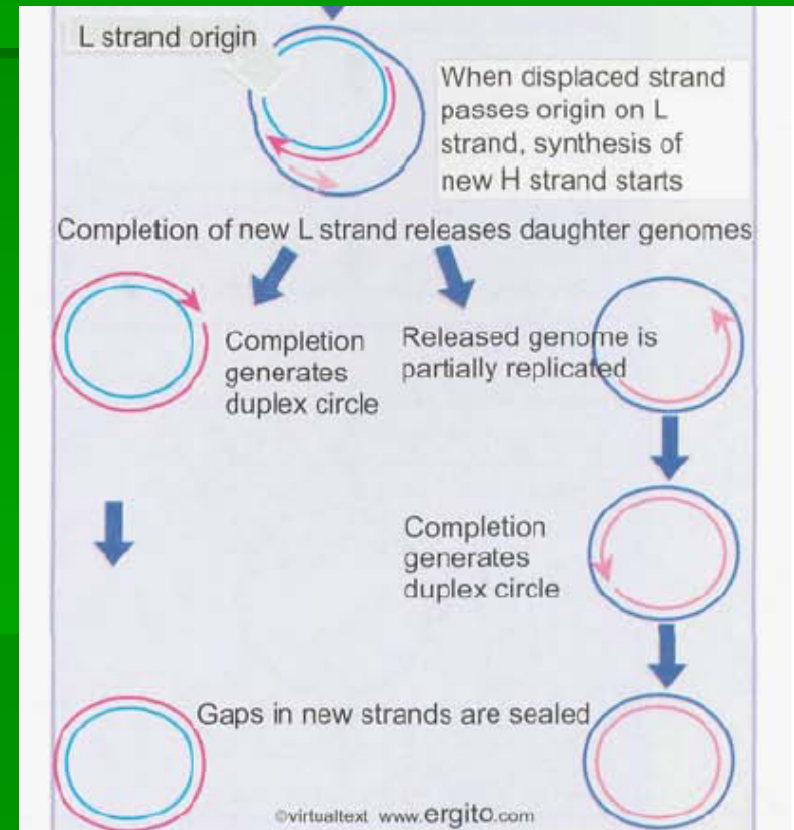
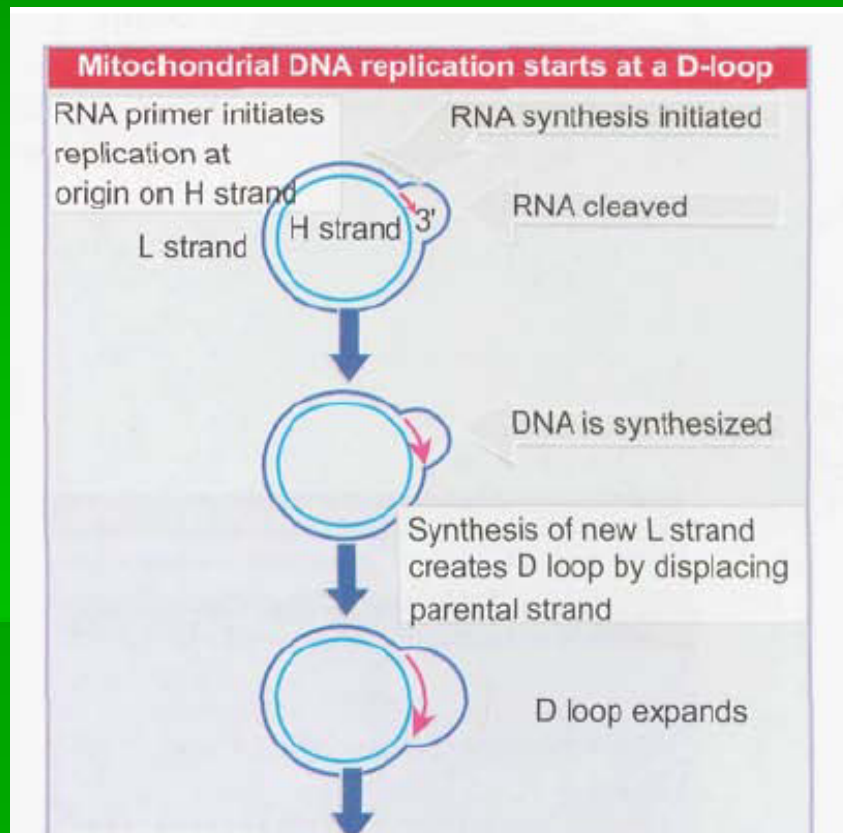




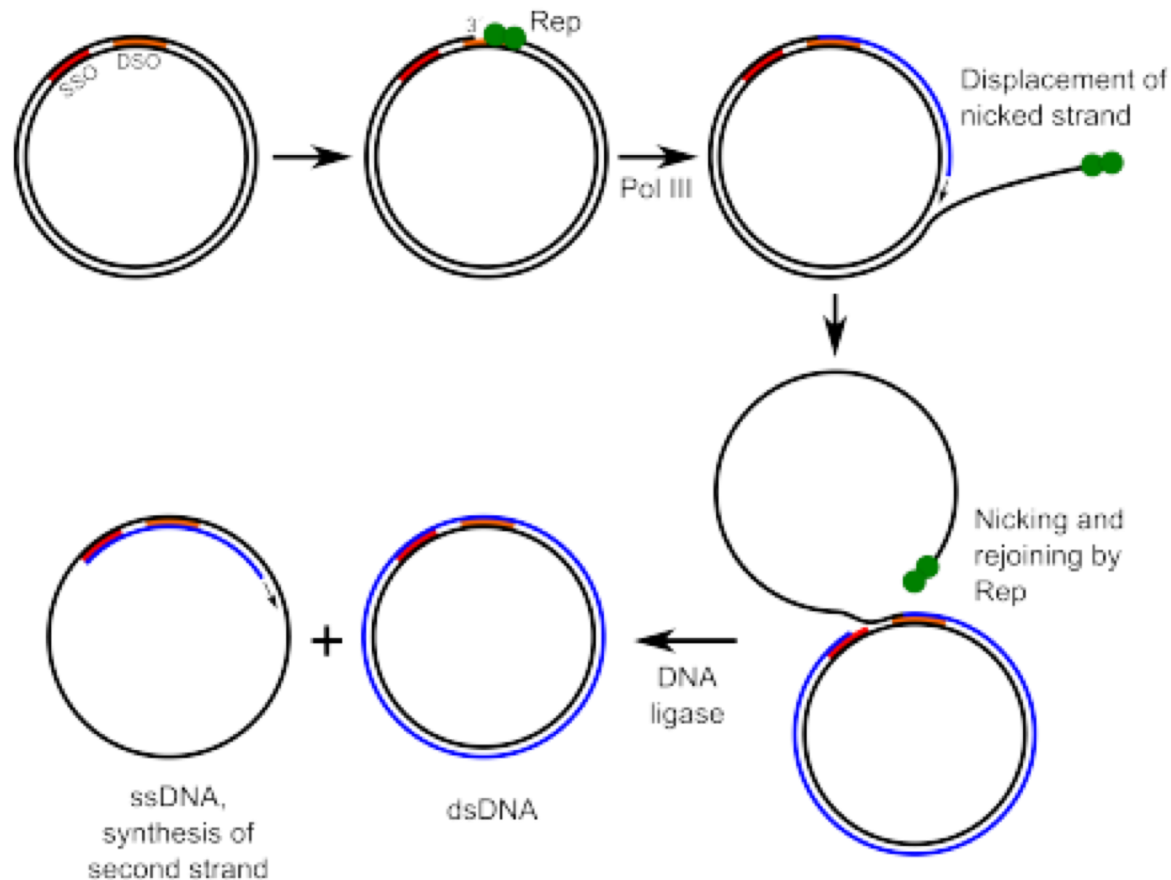
Después de la iniciación, cada uno de los orígenes replicados es particionado a una mitad de la célula

El proceso de replicación es la fuerza motriz que empuja los cromosomas replicados a los polos opuestos celulares

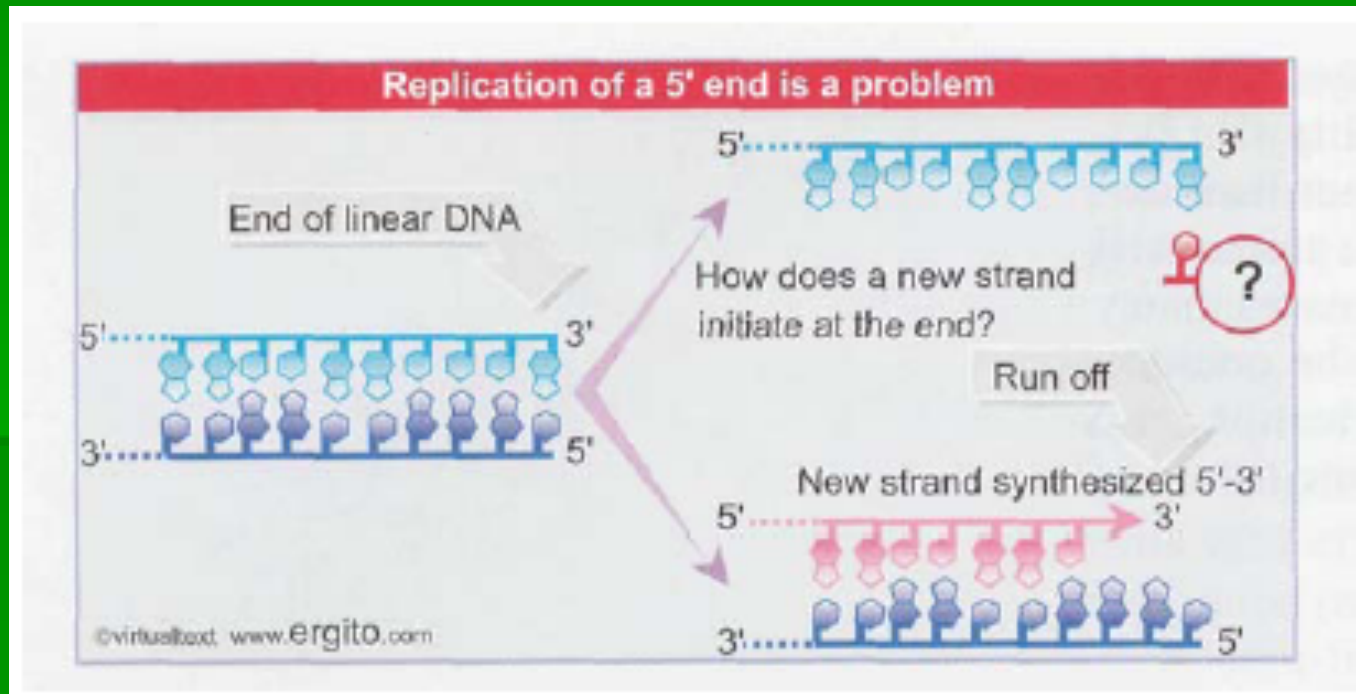
D loops maintain mitochondrial origins



El mecanismo de Rolling circle puede generar multímeros de un replicón



Los extremos de un ADN lineal son un problema para la replicación



Ciertos genomas virales lineales utilizan proteínas terminales para la iniciación

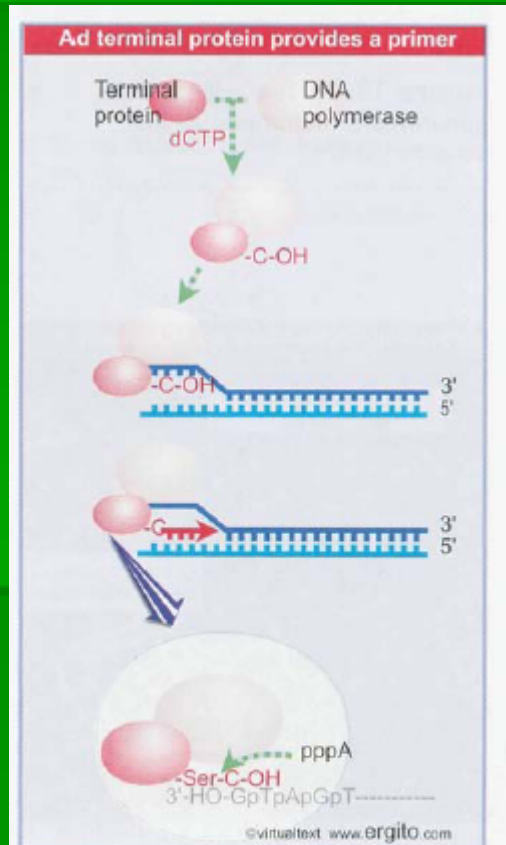


Figure 13.15 Adenovirus terminal protein binds to the 5' end of DNA and provides a C-OH end to prime synthesis of a new DNA strand.

ght (c) by W. H.
and Company

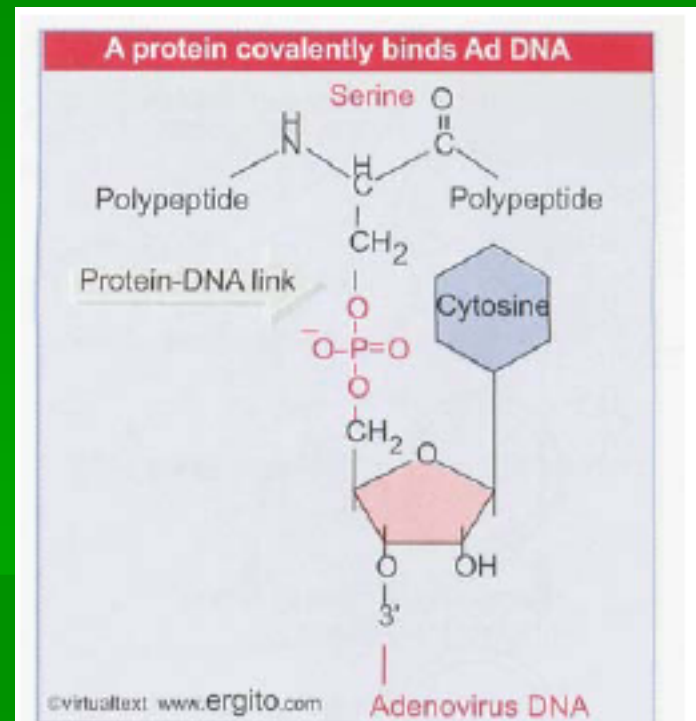


Figure 13.14 The 5' terminal phosphate at each end of adenovirus DNA is covalently linked to serine in the 55 kD Ad-binding protein.