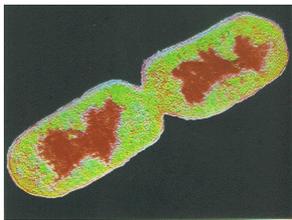
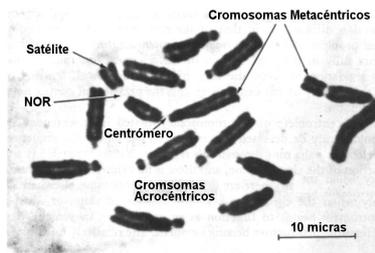


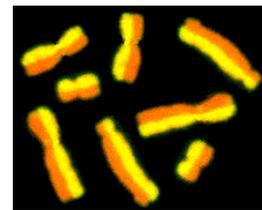
# LA REPLICACIÓN



*Escherichia coli* dividiéndose



Metafase mitótica de *Vicia faba*

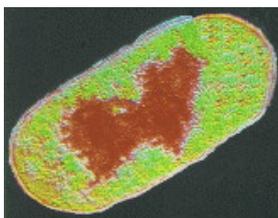


Replicación semiconservativa

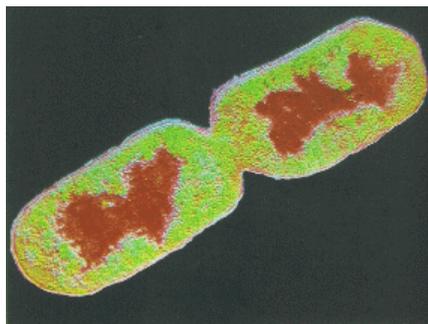
- [Funciones que debe cumplir el cromosoma: Significado genético de la Replicación.](#)
- [Modelos de Replicación Propuestos: Semiconservativo, Conservativo y Dispersivo.](#)
- [La replicación del ADN bacteriano se ajusta al modelo Semiconservativo: Experimentos de Meselson y Stahl \(1958\).](#)
- [El ADN bacteriano es circular: Experimento de Cairns \(1963\).](#)
- [La división celular en eucariontes: mitosis y citocinesis.](#)
- [La reproducción cromatídica en eucariontes se ajusta al modelo semiconservativo: Experimento de Taylor y col. \(1957\).](#)
- [Alteraciones del ciclo celular.](#)
- [Características de la Replicación en Bacterias: único punto de origen, replicón.](#)
- [Eucariontes: Muchos orígenes de replicación, múltiples replicones.](#)
- [Dirección de síntesis 5' - 3', Bidireccional.](#)
- [Semidiscontinua. Fragmentos de Okazaki.](#)
- [Iniciación mediante ARN cebador.](#)
- [El círculo rodador.](#)
- [Replicación de los telómeros.](#)
- [Las ADN polimerasas de \*E. coli\*.](#)
- [Las ADN polimerasas eucarióticas.](#)
- [Replicación del ADN mitocondrial: Lazos D.](#)
- [Otras enzimas que intervienen en la replicación: ligasas, girasas, topoisomerasas, etc.](#)

## FUNCIONES QUE DEBE CUMPLIR EL CROMOSOMA: SIGNIFICADO GENÉTICO DE LA REPLICACIÓN

Las principales funciones que debe cumplir un cromosoma son la de **replicarse** (producir copias de si mismo), la de **transmitirse** de una célula a otra y de una generación a la siguiente y la de **expresar** la información que contiene.



Bacteria



Bacteria dividiéndose



Bacterias descendientes

El significado genético de la replicación es el de conservar la información genética, de manera que cuando una bacteria se divide, de lugar a una bacteria hija que contenga la misma información genética.

En organismos eucariontes el significado de la división celular es el mismo, una célula cuando se divide origina dos células hijas idénticas con la misma información genética.

↑ Inicio

### MODELOS DE REPLICACIÓN PROPUESTOS: SEMICONSERVATIVO, CONSERVATIVO Y DISPERSIVO

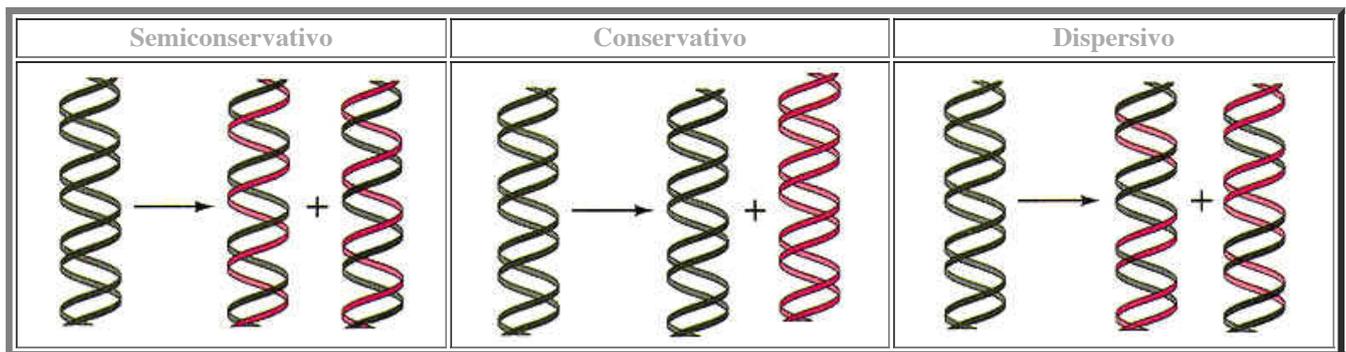
**Modelo Semiconservativo:** Cuando Watson y Crick (1953) propusieron el modelo de la Doble Hélice indicaron que dicho modelo sugería una forma sencilla de replicación. El modelo de replicación propuesto por Watson y Crick suponía que el ADN doble hélice separa sus dos hebras y cada una sirve de molde para sintetizar una nueva hebra siguiendo las reglas de complementariadad de las bases nitrogenadas. Dicho modelo recibió el nombre de Semiconservativo, ya que las dos dobles hélices recién sintetizadas poseen una hebra vieja (una mitad vieja) y otra hebra nueva (mitad nueva).

Frente al modelo Semiconservativo propuesto por Watson y Crick (1953) se postularon otros posibles modelos de replicación del ADN, uno de ellos se denominó Modelo Conservativo y otro Modelo Dispersivo.

**Modelo Conservativo:** cuando el ADN doble hélice se replica se producen dos dobles hélices, una de ellas tienen las dos hebras viejas (esta intacta, se conserva) y la otra doble hélice posee ambas hebras de nueva síntesis.

**Modelo Dispersivo:** Cuando el ADN doble hélice se replica se originan dos dobles hélices, cada una de ellas con hebras que poseen tramos viejos y tramos de nueva síntesis en diferentes proporciones.

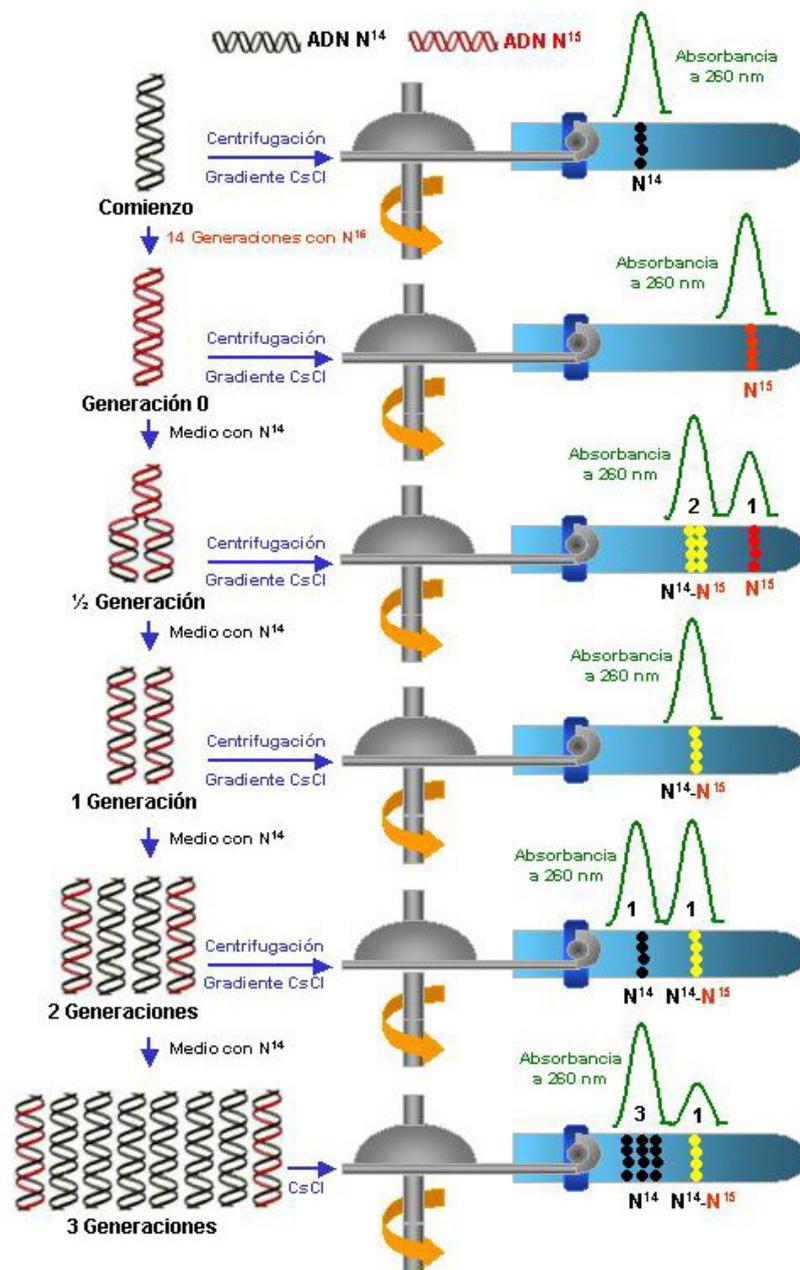
Los siguientes esquemas representan los tres Modelos de Replicación:



↑ Inicio

### LA REPLICACIÓN DEL ADN BACTERIANO SE AJUSTA AL MODELO SEMICONSERVATIVO: EXPERIMENTOS DE MESELSON Y STAHL (1958)

Meselson y Stahl (1957) diseñaron un experimento para tratar de averiguar la forma en la que se realiza la replicación del ADN en *E. coli*, es decir, la pregunta que se plantearon fue: ¿Qué modelo de replicación del ADN sigue *E. coli*, semiconservativo, conservativo o dispersivo?. Para contestar a esta pregunta, diseñaron un experimento en el que marcaban el ADN de la bacteria *E. coli* con Nitrógeno pesado  $N^{15}$ , para ello hicieron crecer las bacterias durante 14 generaciones sucesivas en un medio que contenía como única fuente de Nitrógeno  $N^{15}$ . Durante estas 14 generaciones el ADN de las bacterias se había sintetizado con bases nitrogenadas con Nitrógeno pesado ( $N^{15}$ ). Posteriormente, comprobaron que podían distinguir el ADN de las bacterias que crecían en un medio normal (con  $N^{14}$ ) del ADN de las bacterias que habían crecido durante 14 generaciones en  $N^{15}$ . Para ello extrajeron el ADN de ambos tipos de bacterias y lo centrifugaron en un gradiente de densidad de CsCl. El resultado fue que la densidad del ADN de las bacterias que habían crecido en presencia de  $N^{15}$  era mayor que el ADN de las bacterias que habían crecido con  $N^{14}$ . Una vez comprobado que eran capaces de distinguir el ADN de ambos tipos de bacterias, continuaron el experimento de la siguiente forma: Las bacterias que habían estado creciendo en Nitrógeno pesado ( $N^{15}$ ) las pasaron a un medio de cultivo que contenía  $N^{14}$  (Nitrógeno normal) y a distintos tiempos, media generación, una generación, dos generaciones, tres generaciones de replicación, tomaban una muestra del cultivo bacteriano, extraían el ADN y centrifugaban en gradiente de densidad de CsCl.



**Esquema Experimentos Meselson y Stahl (1958)**

Cuando extraían el ADN de la bacterias que llevaban una generación creciendo en  $N^{14}$  y centrifugaban en CsCl, obtenían una sola banda de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ) entre la del ADN  $N^{14}$  y el ADN  $N^{15}$ . Si extraían el ADN de las bacterias que llevaban dos generaciones creciendo en  $N^{14}$  y centrifugaban en gradiente de CsCl obtenían dos bandas, una correspondiente al ADN  $N^{14}$  y otra de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ) entre la del ADN  $N^{14}$  y el ADN  $N^{15}$ . La absorbancia a 260 nm es directamente proporcional a la cantidad de ADN que contiene una banda, de manera que al medir la absorbancia de las dos bandas obtenidas en la segunda generación, obtenían que ambas contenían igual cantidad de ADN (1:1). Al extraer y centrifugar en CsCl el ADN de las bacterias que llevaban tres generaciones creciendo en  $N^{14}$ , obtenían dos bandas, una correspondiente al ADN  $N^{14}$  y otra de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ) entre la del ADN  $N^{14}$  y el ADN  $N^{15}$ . La cantidad de ADN que contenía la banda correspondiente al ADN  $N^{14}$  era tres veces mayor que la encontrada en la banda de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ), proporción (3:1).

Los resultados obtenidos por Meselson y Stahl (1958) se ajustaban a un modelo de replicación semiconservativo. Para asegurarse, aislaron la banda de ADN de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ) obtenida a partir de las bacterias que llevaban una generación en  $N^{14}$ , desnaturalizaron el ADN de la banda mediante calor para separar sus dos hélices y, manteniéndolas desnaturalizadas, centrifugaron en CsCl. Si la replicación de *E. coli* se ajustaba al modelo semiconservativo, una de las hélices debería estar construida con  $N^{15}$  (la vieja) y la otra hélice con  $N^{14}$  (la nueva) y, al centrifugar en gradiente de densidad esperaríamos obtener dos bandas una más densa correspondiente a la hélice construida con  $N^{15}$  y otra menos densa sintetizada con  $N^{14}$ . El resultado obtenido por Meselson y Stahl (1958) fue precisamente el esperado para una replicación semiconservativa.

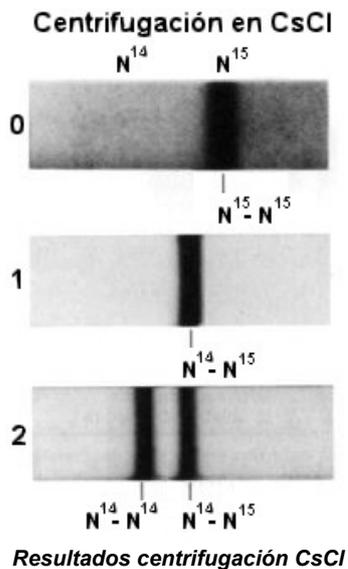


FIGURE 9-3. (Left) Matthew Meselson (b. 1930). (Right) Franklin W. Stahl (b. 1929). [Courtesy of M. Meselson.]

**Matthew Meselson y Franklin W. Stahl**

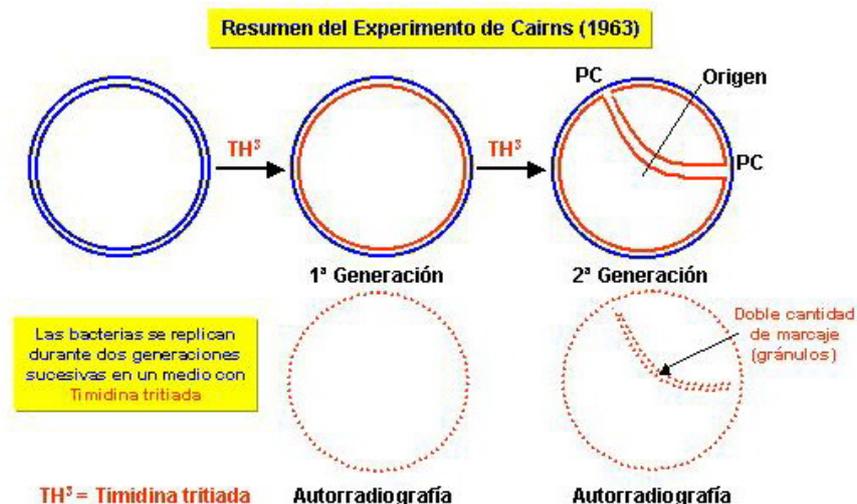
Si la replicación del ADN de *E. coli* se ajustará al modelo Conservativo al centrifugar el ADN de las bacterias después de un generación en medio con  $N^{14}$ , hubieran obtenido dos bandas una de densidad correspondiente al  $N^{14}$  y otra de densidad correspondiente al  $N^{15}$ . Nunca habrían observado, en este caso, una banda de ADN de densidad intermedia ( $N^{14-15}$ ).



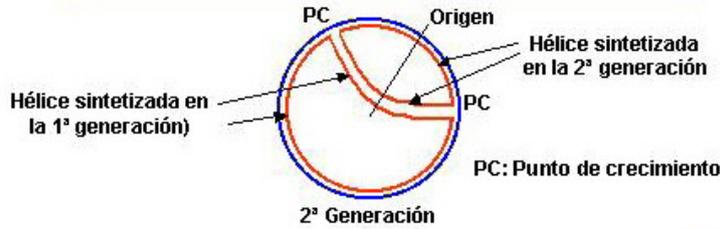
### EL ADN BACTERIANO ES CIRCULAR: EXPERIMENTO DE CAIRNS (1963)

Cairns en 1963, llevó a cabo otro experimento en la bacteria *E. coli* que además de demostrar que la replicación de su ADN se ajustaba al modelo Semiconservativo propuesto por Watson y Crick (1953), también demostraba que el ADN de *E. coli* es circular. Se trata de la primera evidencia citológica (mediante observación al microscopio) de la circularidad del cromosoma bacteriano, ya que mediante técnicas de construcción de mapas de conjugación, ya se había demostrado previamente por Jacob y Wollman (1958) que el ADN bacteriano tenía un mapa circular.

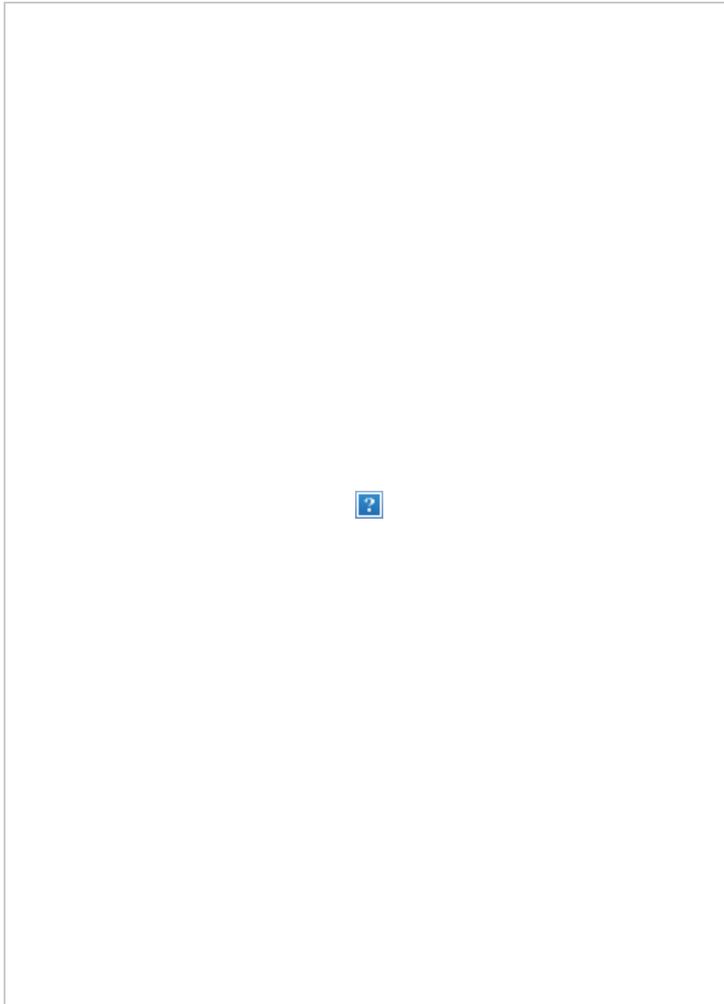
El experimento que realizó Cairns (1963) consistió en mantener un cultivo de *E. coli* creciendo durante dos generaciones sucesivas en un medio que contenía Timidina tritiada ( $TH^3$ ), es decir, utilizaron un nucleótido (la Timina) marcado con un isótopo radiactivo (tritio,  $H^3$ ). Por tanto, cuando las bacterias sintetizaban su ADN empleaban dicho nucleótido marcado. Además, Cairns (1963) desarrolló un sistema para extraer el ADN de *E. coli* sin romperlo (intacto) y extenderlo sobre un portaobjetos para posteriormente realizar una autorradiografía, revelarla y observar los resultados al microscopio. Para realizar la autorradiografía, empleaba una emulsión fotográfica que colocaba en contacto directo con la preparación, de forma que en aquel lugar de la preparación en que existía  $TH^3$ , las partículas  $\beta$  del tritio impresionaban la emulsión fotográfica y al revelarla aparecía una macha o punto en ese lugar. Las autorradiografías correspondientes a la primera generación de replicación presentaban imágenes de puntos formando un círculo. En las autorradiografías correspondientes a la segunda generación de replicación se observaban imágenes de puntos en forma de la letra griega  $q$  pero que mostraban una región del interior con doble cantidad de puntos.



### Explicación del intermediario de replicación de la 2ª generación



Cairns (1963) interpretó que el cromosoma de *E. coli* era circular, que se replicaba de modo semiconservativo, que existía un punto de inicio de la replicación, un origen, y un punto de crecimiento (PC). Sin embargo, esta interpretación fue errónea, ya que en *E. coli* existe un solo punto de iniciación de la Replicación (Ori C) pero existen dos puntos de crecimiento (PC), ya que la replicación en *E. coli*, como veremos más adelante es bidireccional.



Autorradiografía de la 2ª generación de Replicación con TH3



J. Cairns

↑ Inicio

### LA DIVISIÓN CELULAR EN EUKARIOTES: MITOSIS Y CITOCINESIS.

El ciclo celular consta esencialmente de dos fases que habitualmente se alternan, La interfase y la división celular. A su vez la Interfase se subdivide en periodo  $G_1$ , periodo de síntesis S y periodo  $G_2$ . La duración relativa de  $G_1$ , S y  $G_2$  varía de un organismo a otro y dentro del mismo organismo según el tejido. La división celular comprende a su vez dos fenómenos diferentes e independientes que son la mitosis o cariocinesis (reparto del material nuclear) y la citocinesis (reparto del citoplasma). Habitualmente, después de una mitosis se produce una citocinesis. En  $G_1$  los cromosomas están constituidos por un solo cromatidio procedente de la segregación anafásica anterior. Para que una célula somática vuelva a entrar en división es necesario que antes se replique el material hereditario, por tanto, las células que entran en mitosis han pasado previamente por un período S de síntesis de ADN. De forma que cuando las células entran en mitosis, los cromosomas están en estado de dos cromatidios.

La Mitosis o Cariocinesis (reparto del material nuclear) consta de las siguientes fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase. Cuando una célula somática con  $2n$  cromosomas entra en mitosis, todos sus cromosomas están en estado de dos cromatidios. Los dos cromatidios hermanos de cada cromosoma son idénticos, contienen la misma información

genética ya que se han originado a partir de doble hélice de ADN mediante replicación semiconservativa.

En la Interfase el material nuclear, la cromatina, se encuentra descondensada y se observa el nucleolo.

- Profase: la cromatina se va contrayendo gradualmente y al final de la profase desaparece la membrana nuclear y el nucleolo y los cromosomas comienzan a dirigirse al centro de la célula al ecuador.
- Metafase: los cromosoma alcanzan su máximo grado de condensación presentando sus bordes nítidos y se sitúan en la placa ecuatorial (centro de la célula). Tiene lugar la inserción de los microtúbulos (fibras) del huso acromático en los cinetocoros centroméricos. En la placa ecuatorial hay  $2n$  cromosomas constituidos por dos cromatidios.
- Anafase: segregación o separación de los cromatidios hermanos de cada cromosoma y emigración a polos opuestos. Este tipo de segregación se denomina Anitélica, los dos cromatidios de un cromosoma se separan y viajan a polos anafásicos opuestos. A cada polo viajan  $2n$  cromatidios.
- Telofase: Termina la emigración a polos opuestos se descondensan los cromatidios se reconstruye la membrana nuclear y se reorganiza el nucleolo. Finalmente aparecen dos núcleos hijos idénticos que cada uno contiene  $2n$  cromatidios.

Después la citocinesis reparte el material citoplasmático y aparecen dos células hijas idénticas. La citocinesis en células vegetales se produce por coalescencia de vesículas del aparato de Golgi que dan lugar al fragmoplasto figura en forma de tonel que adquiere el huso acromático, al ser empujadas sus fibras hacia fuera, el crecimiento de dicho tabique se produce del interior hacia el exterior de la célula. En las células animales la citocinesis tiene lugar por estrangulamiento de fuera hacia dentro.

Fases del ciclo celular : meristemo radicular de cebolla			
Interfase	Profase	Metafase	Anafase Temprana
?	?	?	?
Anafase Tardía	Telofase temprana	Telofase tardía	Dos células
?	?	?	?

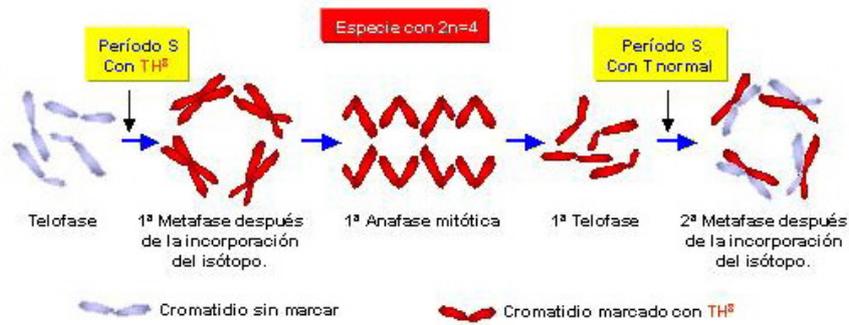
 Inicio

### LA REPRODUCCIÓN CROMATÍDICA SE AJUSTA AL MODELO SEMICONSERVATIVO: EXPERIMENTO DE TAYLOR Y Col. (1957).

Taylor y colaboradores (1957) realizaron un experimento con células del meristemo radicular de Vicia faba (judía) para tratar de averiguar como tiene lugar la replicación de los cromatidios en esta especie eucarionte. El experimento consistió en someter a las raíces durante un periodo de Síntesis (periodo S) a la acción de la Timidina tritiada ( $TH^3$ ) y, posteriormente observar el patrón de marcaje radiactivo de los cromosomas en la primera metafase mitótica después de la incorporación del isótopo y en la segunda metafase mitótica. Para ello, después de la incorporación del isótopo cortaron las raíces las aplastaron sobre un portaobjetos y después realizaron una autorradiografía.

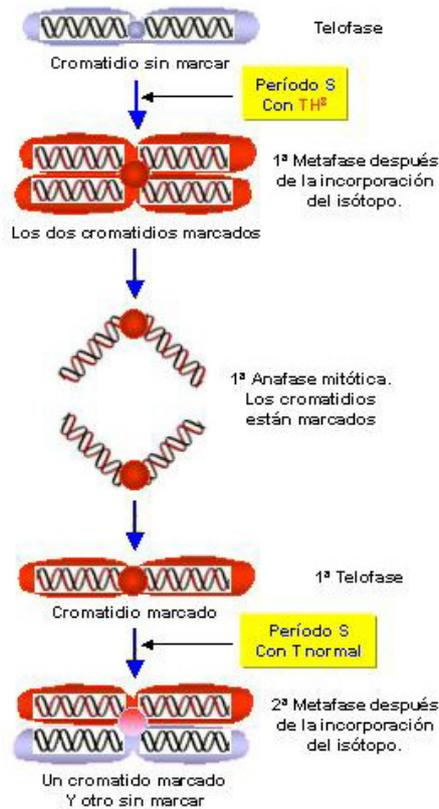
Las autorradiografías obtenidas ponían de manifiesto que las células de la primera metafase mitótica después de la incorporación del isótopo tenían todos sus cromosomas marcados en sus dos cromatidios con timidina tritiada ( $TH^3$ ). Sin embargo, las células de la segunda metafase mitótica después de la incorporación del isótopo tenían todos sus cromosomas marcados pero solamente en uno de sus dos cromatidios.

### Esquema de los resultados obtenidos por Taylor y colaboradores (1957)

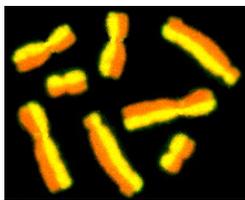


La explicación que dieron a estos resultados fue que el cromatidio se comportaba como si fuera una doble hélice de ADN y que se replicaba de forma semiconservativa. Para poder distinguir las células del meristemo radicular de *Vicia faba* de la 1ª Metafase mitótica de las células de la 2ª Metafase mitótica, trataron las raíces con colchicina durante la primera división mitótica. La colchicina inhibe la formación de las fibras del huso acromático y, como consecuencia, se impide la anafase o separación de los cromatidos hermanos a polos opuestos apareciendo células con doble cantidad de cromosoma (poliploides). Por tanto, las células de la 2ª Metafase tenían doble número de cromosomas que las células de la 1ª Metafase.

El siguiente esquema pone de manifiesto que si se supone que el cromatidio es una doble hélice de ADN que se replica de forma semiconservativa, se obtienen los resultados observados por Taylor y colaboradores, es decir, todos los cromosomas de la célula están marcados en sus dos cromatidios en la 1ª Metafase y todos los cromosomas de la célula están marcados en un solo cromatidio en la 2ª Metafase.



Existen métodos de tinción más recientes que permiten comprobar sin necesidad de realizar un marcaje radiactivo que la replicación de los cromatidios se ajusta al modelo semiconservativo. Las células pasan por dos periodos de síntesis sucesivos en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR). Posteriormente se tiñen los cromosomas con Giemsa y con un colorante fluorescente. La bromodesoxiuridina es un análogo de la Timina y la sustituye durante la replicación. Los cromatidios constituidos por dos cadenas con BUdR se tiñen de color más claro que los cromatidios que tienen una hélice original y otra con BUdR que se tiñen de color oscuro. Este tipo de tinción origina los que se denominan cromosomas en arlequín, y es especialmente adecuado para distinguir intercambios entre cromátidas hermanas.



2ª Metafase (cromosomas en arlequín)



### ALTERACIONES DEL CICLO CELULAR

Lo habitual es que después de un período S de síntesis se produzca una mitosis o cariocinesis seguida de una citocinesis. Sin embargo, en ocasiones en algunos tipos de células animales o vegetales de forma natural o bien mediante tratamientos con determinados compuestos, es posible obtener variaciones en el ciclo de división.

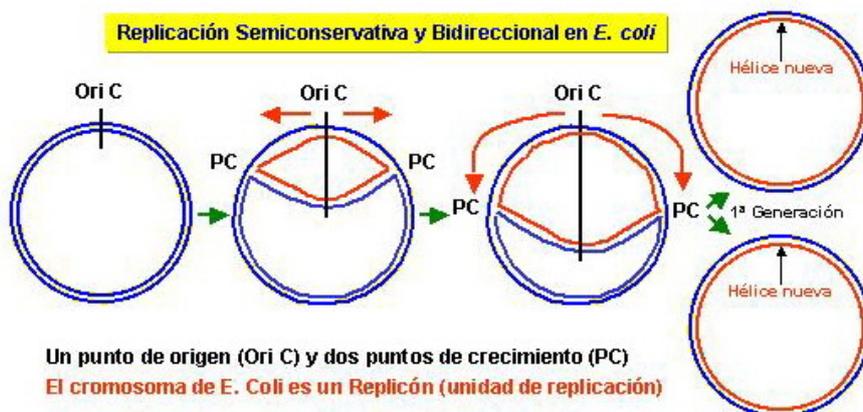
Las principales variaciones en el proceso de división celular se han resumido en la siguiente tabla:

VARIACIONES EN EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	
Variaciones en la Replicación y reparto del material hereditario	<b>Endorreduplicación:</b> Varios períodos S sucesivos sin entrar en mitosis. Cuadрупlocromosomas. Politenia (cromosomas gigantes de <i>Drosophila melanogaster</i> ).
	<b>Haplocromosomas:</b> Dos mitosis sucesivas sin período S entre ambas.
Variaciones que afectan a los estadios mitóticos	<b>Endomitosis:</b> No desaparece la membrana nuclear, mitosis dentro del núcleo. Aparecen células poliploides.
	<b>Variaciones en la anafase:</b> inhibición de la formación del huso acromático. Con colchicina (c-mitosis) mediante anoxia (a-mitosis). Se duplica el número de cromosomas y aparece una célula poliploide.
	<b>No reorganización del nucleolo:</b> por mutaciones en la ARN Polimerasa I
Variaciones que afectan a la citocinesis en relación con la cariocinesis	<b>Cariocinesis sin Citocinesis:</b> La cafeína inhibe la citocinesis, aparecen células binucleadas (con dos núcleos)
	<b>Citocinesis sin Cariocinesis:</b> el bromuro de etidio provoca que las células se paren en profase y se reparta el citoplasma (citocinesis) sin haberse repartido el material del núcleo.
	<b>Citocinesis en células anucleadas:</b> en algunos organismos en determinados momentos se observa que células sin núcleo reparten su citoplasma.

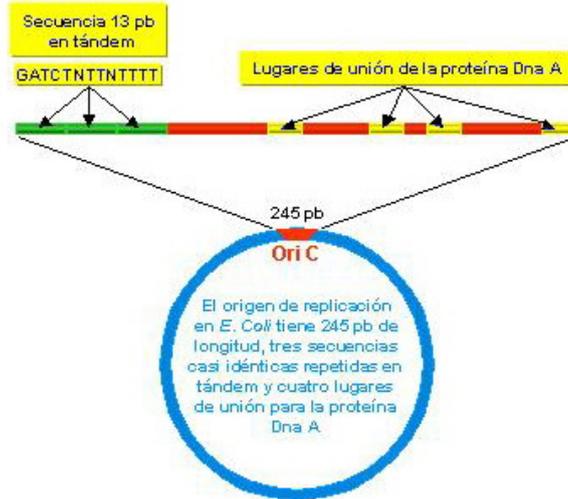


### CARACTERÍSTICAS DE LA REPLICACIÓN EN BACTERIAS: ÚNICO PUNTO DE ORIGEN, REPLICÓN

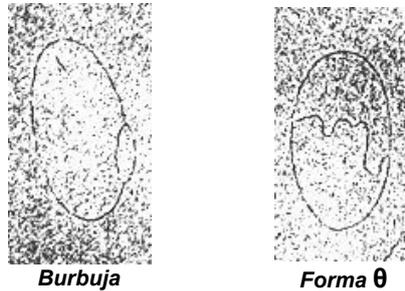
Como ya hemos visto la replicación en bacterias se ajusta al modelo semiconservativo. En las bacterias existe un solo origen de replicación, denominado Ori C y, a partir de este único punto de origen, la replicación progresa en dos direcciones, de manera que existen dos puntos de crecimiento (PC) u horquillas de replicación. El cromosoma bacteriano ser una unidad de replicación se le denomina replicón.



El origen de replicación en *E. coli* es una secuencia de 245 pb que contiene una secuencia de 13 pb repetida tres veces en tándem. Además esta región contiene cuatro zonas de unión a la proteína Dna A que se encarga de separar las hélices para comenzar la replicación.



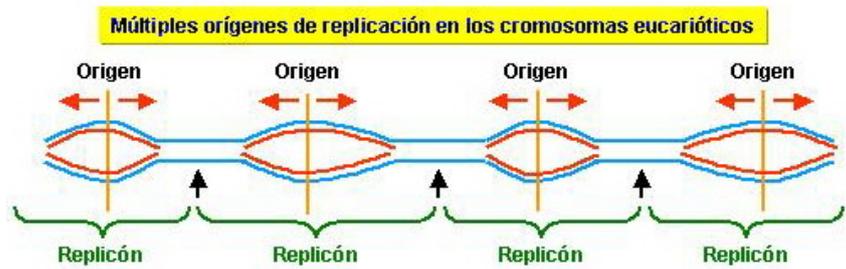
Cuando las moléculas de ADN circular se replican se observan lo que se denominan "ojos o burbujas" de replicación. La forma que adoptan los intermediarios de la replicación se parece a de la letra griega  $\theta$ .



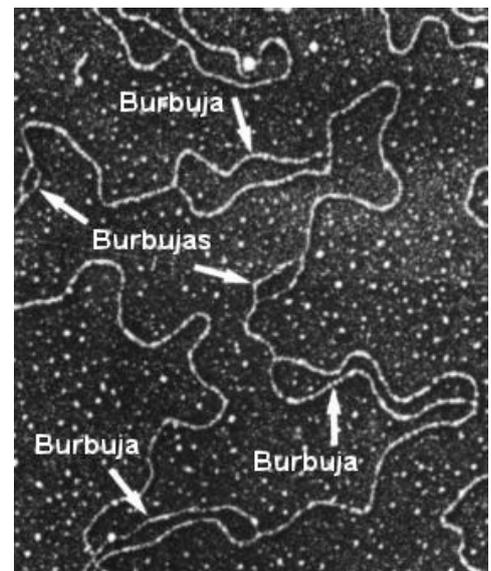
↑ Inicio

**EUCARIONTES: MUCHOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN. MÚLTIPLES REPLICONES.**

La principal diferencia de la replicación de virus y bacterias con la replicación de eucariontes radica en que los eucariontes poseen muchos orígenes de replicación, probablemente debido a la enorme cantidad de ADN que poseen y a que su material hereditario en la inmensa mayoría de los casos esta repartido en varias moléculas de ADN distintas o varios cromosomas. Por tanto, los eucariontes tienen en cada cromosoma muchos orígenes de replicación, y como consecuencia, muchos replicones (unidades de replicación).



Esquema con múltiples orígenes de replicación

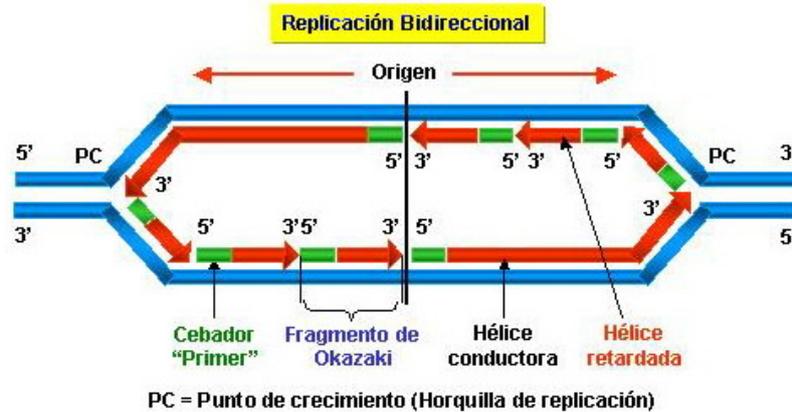


Muchos orígenes de replicación en *D. melanogaster*

## DIRECCIÓN DE SÍNTESIS 5' - 3', BIDIRECCIONAL

Las ADN polimerasas de *E.coli* (las enzimas encargadas de sintetizar ADN) solamente saben sintetizar ADN en la dirección 5' - 3'. Es decir, solamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' OH de otro nucleótido trifosfato. Las ADN polimerasas necesitan un extremo 3' OH al que añadir nucleótidos trifosfato para comenzar la síntesis de ADN.

La replicación del ADN en *E. coli* es bidireccional, ya que a partir de un punto de origen progresa en dos direcciones opuestas, existiendo dos puntos de crecimiento (PC) u horquillas de replicación. Cuando se mira solamente una de las horquillas de replicación, una de las hélices se sintetiza de forma continua, la hélice conductora (también llamada hélice líder), mientras que la otra hélice se sintetiza de manera discontinua, hélice retardada (también llamada hélice retrasada), a base de fragmentos cortos. Si se observan simultáneamente las dos horquillas de replicación, a un lado del origen la hélice de nueva síntesis se polimeriza de forma continua, mientras que al otro lado del origen se polimeriza de forma discontinua.



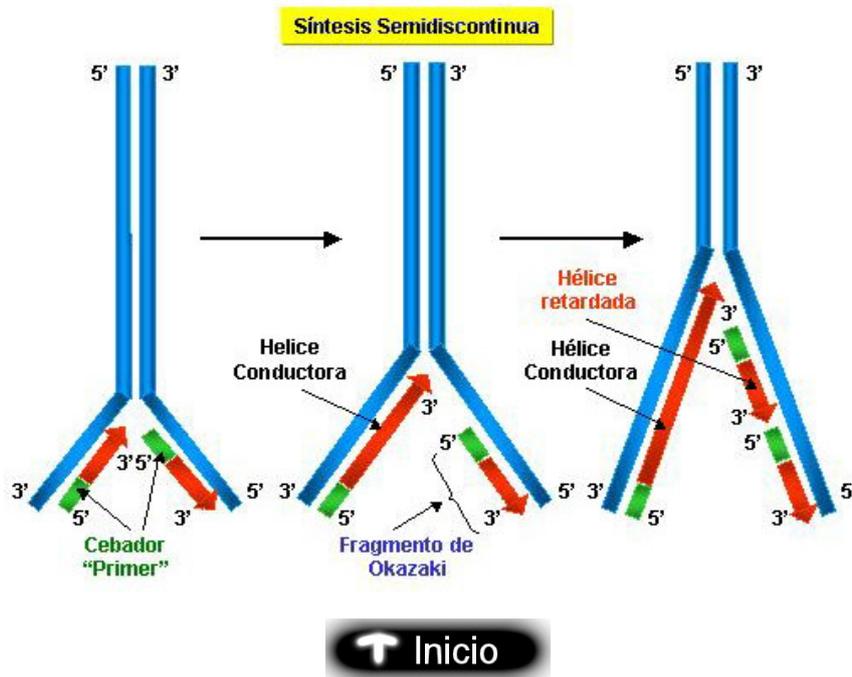
Para demostrar que la replicación es bidireccional se pueden realizar experimentos que se denominan de pulso y caza, en los que la célula es expuesta durante un breve periodo de tiempo en un medio con timidina tritiada  $TH^3$  (pulso) y después se pasa a un medio con timidina no radiactiva (fría) en exceso (caza). Posteriormente se extiende el ADN se un portaobjetos y después se realiza una autorradiografía.



Replicación bidireccional: Experimento de pulso y caza

## SEMIDISCONTINUA, FRAGMENTOS DE OKAZAKI

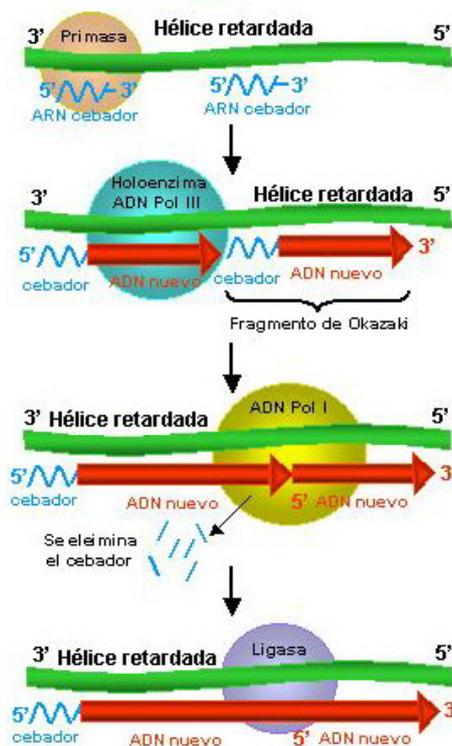
Debido al antiparalelismo de las dos hélices del ADN y a que las ADN polimerasas solamente saben sintetizar ADN en la dirección 5'P - 3'OH, la síntesis de una de las hebras se puede realizar de forma continua, mientras que la otra hélice para poder sintetizarla al mismo tiempo se necesita polimerizarla a base de ir añadiendo pequeños fragmentos (fragmentos o piezas de Okazaki). Como una hélice se sintetiza de forma continua y la otra lo hace de forma discontinua, se dice que la Replicación es Semidiscontinua.



### INICIACIÓN MEDIANTE ARN CEBADOR

Como ya hemos dicho anteriormente, las ADN polimerasas solamente saben sintetizar ADN en la dirección 5' - 3' añadiendo nucleótidos al extremo 3' OH de otro nucleótido. Para que puedan iniciar la síntesis de ADN necesitan un extremo 3' OH al que ir añadiendo nucleótidos, y ese extremo 3' OH lo suministra un ARN de pequeño tamaño alrededor de 25 a 30 ribonucleótidos que se denomina ARN cebador o "primer".

La síntesis de ADN comienza, por tanto, sintetizando un corto segmento de ARN denominado cebador, dicho cebador lo sintetiza un enzima denominado Primasa. La Primasa es una ARN polimerasa que utiliza como molde ADN. Todos los fragmentos de Okazaki comienzan por un Cebador. Posteriormente, la Holoenzima de ADN polimerasa III lleva a cabo la síntesis del fragmento de ADN correspondiente hasta llegar al siguiente cebador. En ese momento, la ADN polimerasa I sustituye a la Holoenzima de ADN polimerasa III. La ADN polimerasa I se encarga de retirar el ARN cebador mediante su actividad exonucleotídica 5'P - 3' OH y al mismo tiempo rellena el hueco sintetizando ADN.

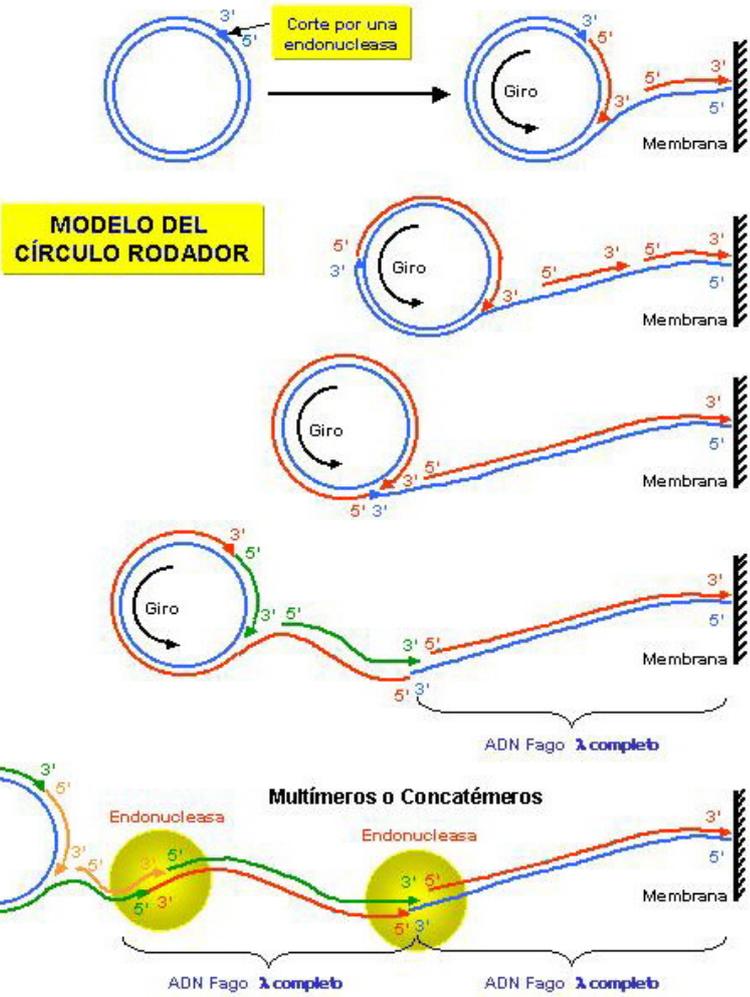


Por último, los dos fragmentos de Okazaki tienen que unirse, es necesario enlazar el extremo 3'OH de un fragmento con el 5'P del siguiente fragmento. Dicha labor de sellado y unión de los sucesivos fragmentos la realiza la Ligasa.

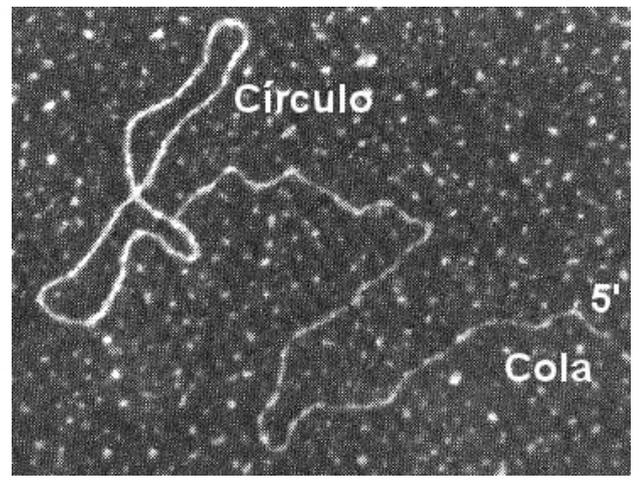
### CÍRCULO RODADOR

Los mecanismos de replicación en virus y bacterias dependen de la propia estructura del material hereditario o cromosoma de la especie procarionte estudiada. Por tanto, el mecanismo de replicación varía según se trata de moléculas de ADN circulares doble hélice (*E. coli*, papovavirus), ADN circular de una hélice (φX174), ADN doble hélice lineal con redundancia terminal (fago T7) o ADN doble hélice lineal con extremos cohesivos (fago λ). El mecanismo de replicación puede adoptar la forma θ (*E. coli*, plasmidios), el modelo del círculo rodador (φX174, Fago λ) o el Lazo de desplazamiento o lazo D (ADN mitocondrial).

En el modelo del círculo rodador una endonucleasa corta una de las hélices (hélice externa en el esquema) y el extremo 5' se fija a la membrana. El extremo 3'OH producido por el corte lo utiliza la ADN polimerasa como cebador para ir añadiendo nucleótidos y copiando la otra hélice (hélice interna en el esquema). Por el otro extremo de la hélice cortada (el extremo 5') también se va sintetizando una nueva hebra. Lo que se supone que sucede es que la hélice interna giraría de forma continua en el sentido indicado haciendo que cada vez saliera más cantidad de la hélice inicialmente cortada por la endonucleasa. La hélice interna seguiría dando vueltas de forma que sería copiada varias veces al igual que la hélice que emerge por el lado derecho, formándose una molécula ADN doble hélice muy larga que contienen varias copias sucesivas del ADN del fago. Estas moléculas reciben el nombre de multímeros o concatémeros. El caso del fago λ, posteriormente una endonucleasa denominada *ter* reconoce la secuencia de doce pares de bases de los extremos cohesivos del fago y produce un corte asimétrico para liberar copias independientes del ADN doble hélice lineal del fago.



Esquema Círculo rodador

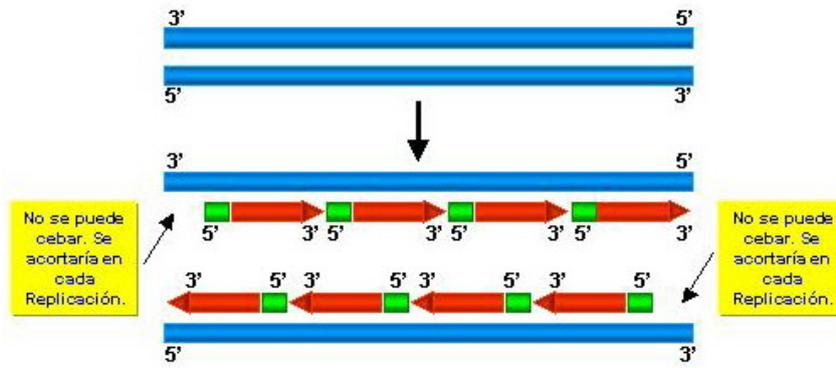


Círculo rodador

### REPLICACIÓN DE LOS TELÓMEROS

Las moléculas ADN doble hélice lineal tienen problemas para replicar sus extremos, ya que las ADN polimerasas necesitan un extremo 3' OH al que ir añadiendo nucleótidos. Uno de los extremos de cada hélice (el extremo 5') se puede copiar sin problemas debido a que viene cebado desde atrás, sin embargo, el extremo contrario (extremo 3') no podría replicarse ya que no puede ser cebado desde atrás. Como consecuencia quedaría un corto segmento al final sin copiarse

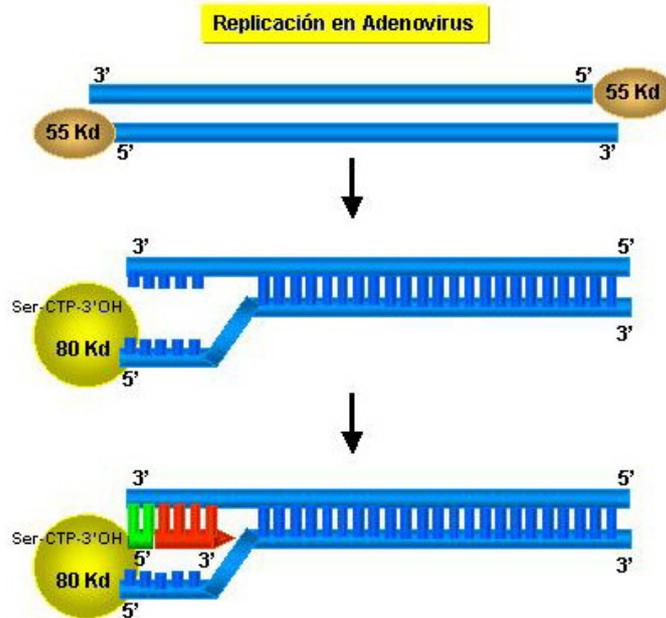
y se iría acortando el ADN por ese extremo en cada ronda de replicación.



**Problemas de replicación de los extremos**

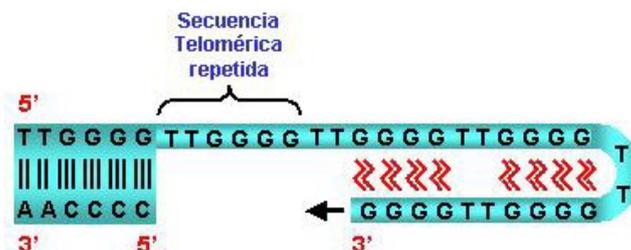
Algunos virus resuelven este problema de una manera sencilla. Por ejemplo, el fago I cuyo material hereditario es ADN doble hélice lineal con extremos cohesivos, lo primero que hace cuando infecta a *E. coli* y va a replicar su ADN es convertirse en ADN doble hélice circular a través de los extremos cohesivos. De este manera, ya han desaparecido los problemas de replicación de los extremos lineales.

Otros virus, como los Adenovirus resuelven el problema gracias a la existencia de una proteína que se une al extremo 5' y que contiene un residuo de serina unido a un nucleótido CTP que suministra el extremo 3' necesario para que la ADN polimerasa pueda cebarse y copiar el extremo. La proteína que forma un complejo con la ADN polimerasa tiene 80 Kd, sin embargo, la proteína que aparece en el interior de las partículas virales maduras tiene solamente 55 Kd. Por tanto, durante la maduración del virus debe ser procesada y pasar de 80 Kd a 55 Kd. El virus f29 también tiene proteínas unidas al extremo 5' implicadas en la replicación y algunos virus ARN como el virus de la polio poseen proteínas de bajo peso molecular (Vpg) con solo 22 aminoácidos están unidas al extremo 5'.

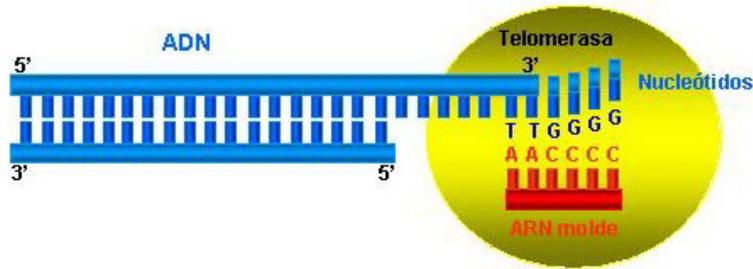


**Replicación de los extremos en Adenovirus**

La replicación de los extremos de los cromosomas eucarióticos también supone un problema, ya que los cromatidios son moléculas de ADN doble hélice lineal y se irían acortando en las sucesivas replications. La manera de solventar este problema consiste en disponer de secuencias repetidas en los extremos, los telómeros eucarióticos contienen una secuencia corta rica en Guanina repetida cientos de veces ( por ejemplo la secuencia 5' TTGGGG 3' en el ciliado *Tetrahymena*). Además, los telómeros poseen extremos 3' monocatenarios que pueden autoaparearse y suministrar un extremo 3' para replicar los extremos cromosómicos.



Un enzima denominado Telomerasa añade estas secuencias a los extremos cromosómicos. La Telomerasa lleva una corta secuencia de ARN (por ejemplo AACCCC) que sirve de molde para sintetizar la secuencia repetida de los extremos (TTGGGG). La telomerasa, es una transcriptasa inversa, ya que tomando como molde ARN sintetiza ADN. La adición de estas secuencias cortas que lleva a cabo la Telomerasa contrarresta la tendencia al acortamiento de los telómeros durante la replicación normal.



La telomerasa tiene un pequeño fragmento de ARN



### LAS ADN POLIMERASAS DE *E. Coli*.

En la bacteria *E. coli* Arthur Kornberg encontró tres ADN polimerasas diferentes, la ADN Pol I, ADN Pol II y ADN Pol III. Por sus estudios sobre la replicación del ADN y las polimerasas le concedieron el Premio Nobel en 1959.

Las principales etapas de la síntesis de ADN son:

- Síntesis de los desoxirribonucleótidos monofosfato (dNMPs): dAMP, dTMP, dGMP y dCMP.
- Fosforilación mediante Quinasas de los dNMP, para convertirlos en desorribonucleótidostrifosfato dNTPs: dATP, dTTP, dGTP y dCTP.
- Polimerización o síntesis del ADN: selección de los dNTPs complementarios a las de la cadena molde y formación del enlace fosfodiéster entre el extremo 3' del nucleótido (dNTP) anteriormente incorporado y el extremo 5'P del siguiente dNTP.

Las ADN Polimerasas de *E. coli* solamente saben sintetizar (polimerizar) ADN en la dirección 5'P - 3'OH.

Las principales características de las ADN Polimerasas de *E.coli*, se pueden resumir en la siguiente tabla:

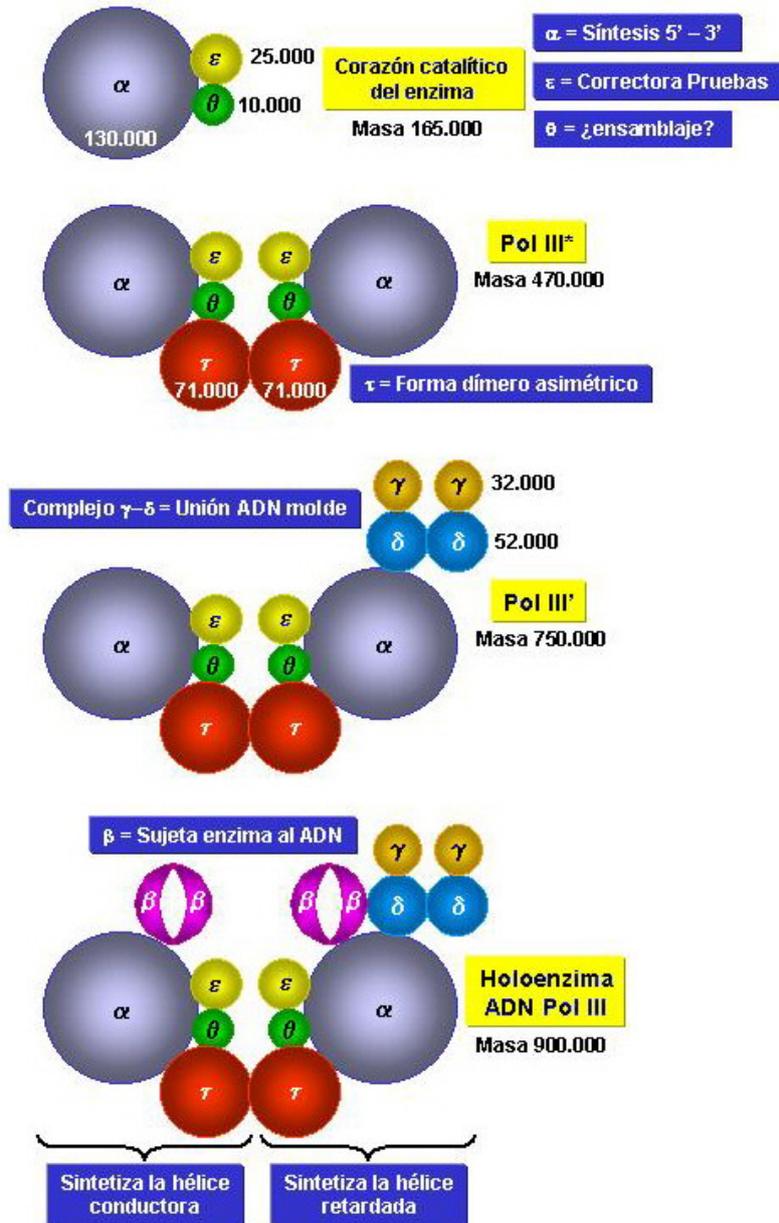
	ADN Pol I	ADN Pol II	ADN Pol III
<b>Estructura</b>			
<b>PM (dalton)</b>	<b>109.000</b>	<b>90.000</b>	<b>900.000</b>
<b>Constitución</b>	<b>Monómero</b>	<b>Monómero</b>	<b>Multímero asimétrico</b>
<b>Nº Polimerasas/célula</b>	<b>400</b>	<b>Desconocido</b>	<b>10-20</b>
<b>Actividad/Función</b>			
<b>Polimeras 5'-3' /Elongación</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Exonucleasa 3'-5'/Correctora</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Exonucleasa 5'-3'/Reparación</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>

La ADN Pol III y la ADN Pol I son las enzimas que intervienen directamente en la replicación del ADN de *E. coli*. La ADN Pol I tiene un papel reparador, retira los cebadores con su actividad exonucleasa 5'- 3' y rellena el hueco con su actividad polimerasa 5'- 3'.

A la ADN Pol II se la asigna exclusivamente una función reparadora, pero la muchas de sus características y el papel que juega en la replicación del ADN, si es que juega alguno, son desconocidas.

La ADN Pol III es la enzima que realiza la mayoría de la replicación del ADN, el corazón catalítico del enzima lo constituyen las subunidades  $\alpha$  (encargada de la polimerización),  $\beta$  (realiza la función correctora de pruebas) y  $\gamma$

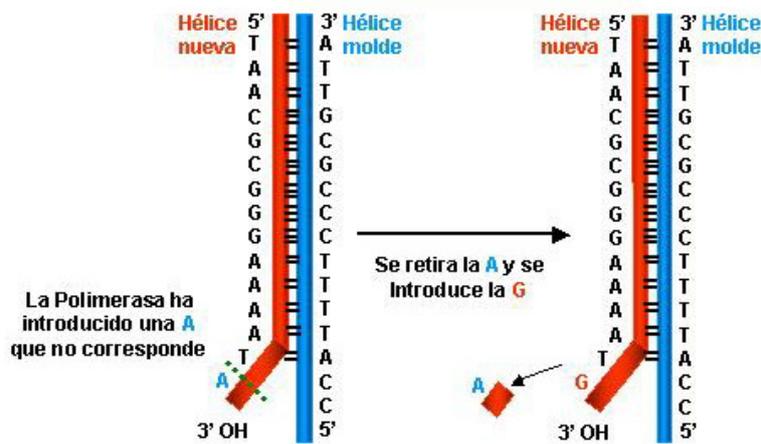
(¿ensamblaje de las subunidades?). Realmente, el complejo enzimático que lleva a cabo la replicación es un multímero denominado **Holoenzima de ADN Pol III** que posee muchas cadenas o subunidades polipeptídicas. Este multímero es realmente un dímero asimétrico, una mitad del dímero se encarga de sintetizar la hélice retardada y la otra mitad sintetiza la hélice conductora. La subunidad  $\tau$  interviene en la unión del dímero, el complejo  $\gamma$ - $\delta$  produce la unión al ADN molde y la subunidad  $\beta$  sujeta el enzima al ADN.



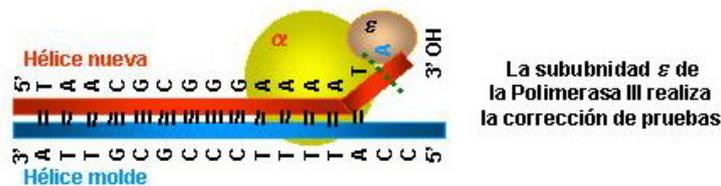
*Esquema de la formación y composición del Holoenzima de ADN Pol III*

El proceso de síntesis de ADN tiene que producir dos moléculas exactamente iguales, ya que cualquier error que se cometa durante la replicación, si no se repara, se convertirá en una mutación. Por tanto, Las ADN polimerasas deben ser bastante fieles copiando el ADN. Para ello poseen una función correctora de pruebas que retira el último nucleótido que la polimerasa haya introducido de forma incorrecta, dicha función, se denomina función exonucleasa 3' - 5' y la lleva a cabo la subunidad  $\epsilon$  de la ADN Pol III.

**Función Correctora de Pruebas Exonucleotídica 3' - 5'**



En el siguiente esquema se indica como la subunidad  $\epsilon$  de la ADN Pol III retira la Adenina introducida de forma incorrecta mediante la función exonucleasa 3' - 5'.



**↑ Inicio**

**LAS ADN POLIMERASAS EUCARIÓTICAS**

Las ADN polimerasas eucarióticas tienen una diferencia interesante con las ADN polimerasas de *E. coli*, ya que se utilizan dos polimerasas diferentes una para sintetizar la hélice conductora y otra para producir la hélice retardada. La ADN polimerasa  $\alpha$  sintetiza la hélice retardada mientras que la ADN polimerasa  $\delta$  sintetiza la hélice conductora. En la siguiente tabla se resumen las polimerasas de mamíferos:

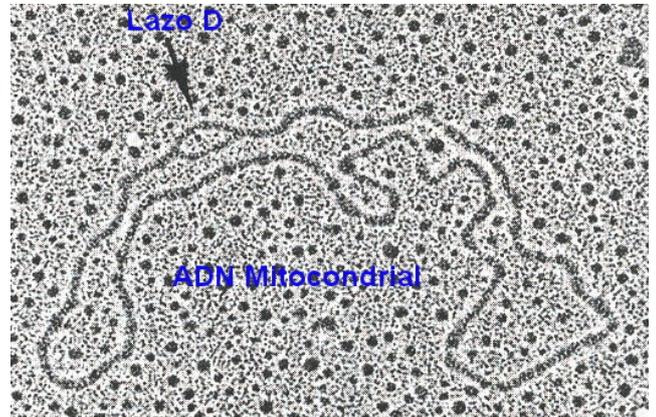
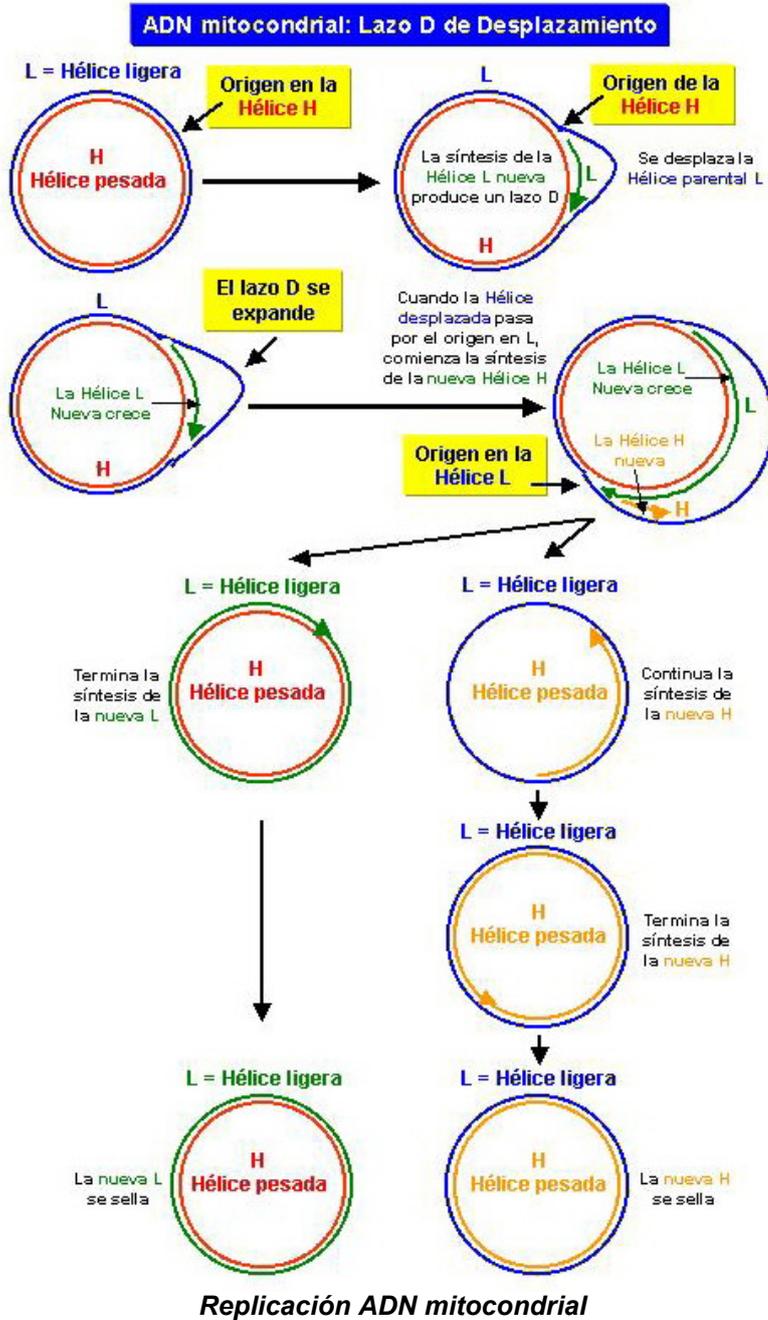
ENZIMA	FUNCIÓN
ADN Pol $\alpha$	Síntesis Hélice retardada. Síntesis del cebador: 10 bases de ADN y 25 de ARN.
ADN Pol $\delta$	Síntesis de la Hélice conductora.
ADN Pol $\epsilon$	Polimerización de las Piezas de Okazaki.
ADN Pol $\beta$	Unión de los fragmentos de Okazaki ( de aproximadamente 250 pb).
ADN Pol $\gamma$	Síntesis ADN mitocondrial.

**↑ Inicio**

**REPLICACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL: LAZOS D**

La replicación del ADN mitocondrial en mamíferos se ajusta al modelo del Lazo de Desplazamiento o lazo D. Las dos hélices del ADN mitocondrial se pueden diferenciar en base a su densidad, existiendo una hélice Ligera (L) y otra hélice pesada (H). En primer lugar, se inicia la replicación o síntesis de la nueva Hélice Ligera (L), sin que se comience la replicación de la nueva hélice pesada. El origen de replicación de la hélice ligera (L) es diferente al de la hélice pesada (H), de forma que existen dos orígenes de replicación diferentes para cada una. Además, una vez iniciada la replicación de la nueva hélice ligera (L), la síntesis es unidireccional, tienen lugar en una sola dirección y avanza desplazando a la otra hebra. Cuando se ha sintetizado, aproximadamente, 2/3 de la nueva hélice ligera, comienza la síntesis de la nueva hélice pesada (H), en una sola dirección opuesta a la de síntesis de la hélice ligera L. Por consiguiente, la síntesis de la nueva hélice L termina antes que la de la nueva hélice H. Como se puede ver, la replicación del ADN mitocondrial es diferente a la del cromosoma de *E. coli*, existen dos orígenes de replicación diferentes para cada hélice y la replicación es

unidireccional.



**ADN mitocondrial**



**OTRAS ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA REPLICACIÓN: LIGASAS, GIRASAS, TOPOISOMERASAS, ETC.**

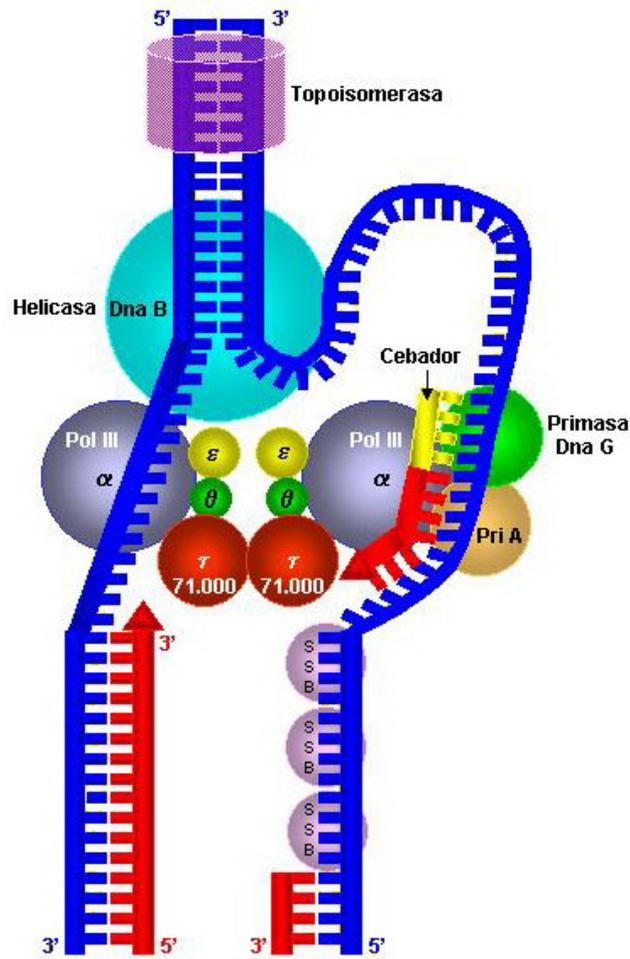
Además de las ADN polimerasas I y III, de la ARN-Polimerasa o Primasa que sintetiza el cebador y de las Ligasas que unen las piezas de Okazaki, en la replicación del ADN intervienen otras enzimas. Algunas de estas enzimas son las siguientes:

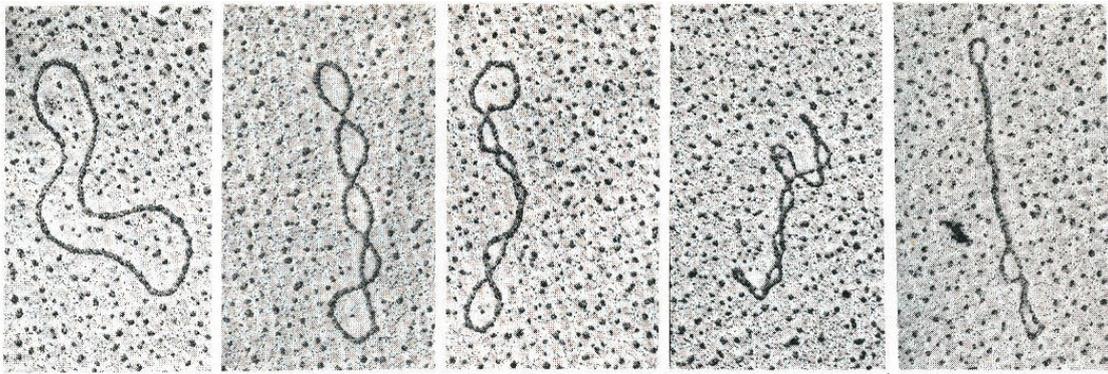
- **Helicasas:** son enzimas que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas de la doble hélice. Entre las helicasas de *E. coli* se encuentran las proteínas Dna B y Rep. La proteína Rep parece ayudar a desenrollar la doble hélice por delante de la polimerasa.
- **La proteína SSB:** se une al ADN de hélice sencilla y lo estabiliza retrasando la regeneración de la doble hélice.

La acción de las Helicasas durante la replicación genera retorcimientos que deben ser eliminados. El ADN circular puede sufrir enrollamientos y retorcimientos, dichos superenrollamientos se generan y eliminan por enzimas denominadas Topoisomerasas.

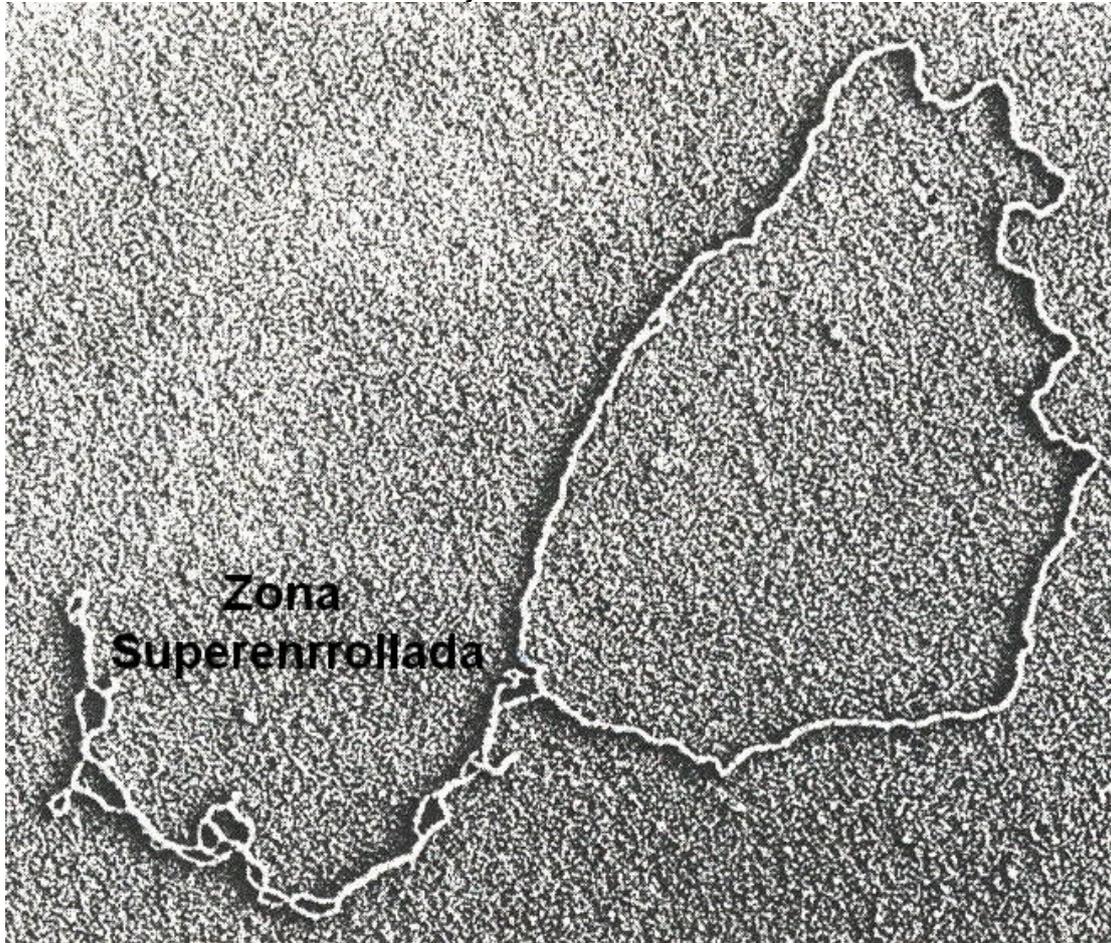
- **Topoisomerasas:** pueden producir o eliminar nudos o enlaces en una hélice. existen topoisomerasas de la clase I que cortan solamente una de las dos hélices y topoisomerasas de la clase II que cortan ambas cadenas. En *E. coli*, las enzimas Topo I y Topo III pertenecen a la clase I, mientras que la la Girasa es de la clase II. Cuando se separan

las dos hélices durante el avance de la horquilla de replicación se producen superenrollamientos positivos en otras regiones que relajan la tensión. La Girasase necesita para eliminar los superenrollamientos positivos que se generan por delante de la horquilla de replicación.





*Retorcimientos y enrollamientos del ADN circular*



*Superenrollamiento en ADN doble hélice circular.*

**↑ Inicio**

Autor: César Benito Jiménez, Profesor Titular de Genética, Departamento de Genética, U.C.M.

