

Características generales de la replicación del ADN

⇒ **Semiconservativa**: tras la replicación, en la hebra replicada, habrá una hebra antigua y otra de nueva síntesis.
Punto de origen:

⇒ **Procariotas**: punto de origen único (En *E. Coli* → **OriC**)

⇒ **Eucariotas**: múltiples orígenes

⇒ **REPLICÓN**: ADN que se replica a partir de un origen de replicación.

⇒ **Ligada al ciclo celular**: normalmente. Sólo se replica cuando se tiene que dividir. Existen excepciones.

⇒ **Bidireccional**: Dirección 5' → 3' en cada una de las dos hebras (**antiparalelas**)

⇒ **Completa**: se replica todo el ADN

⇒ **Compleja**:

⇒ Mecanismos que proporcionarán **velocidad** y **fidelidad** para no cometer errores.

⇒ Gran número de proteínas implicadas (ADN polimerasa III es la responsable de la síntesis del ADN en **procariotas**)

⇒ **Gran gasto energético**

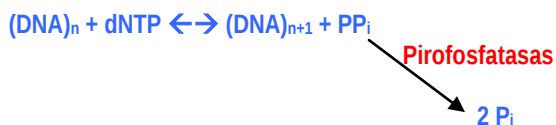
Características de las DNA polimerasas

⇒ Síntesis de ADN dirigida por un molde de ADN (hebra conductora)

⇒ Requieren un **cebador** de ARN con un extremo 3'-OH libre

⇒ La elongación se produce **5' → 3'**

⇒ Reacción



⇒ Se añade un nucleótido a la cadena de ADN y se libera pirofosfato.

⇒ Actividad **exonucleásica 3' → 5'**

⇒ La **ADN polimerasa I** también posee actividad enzimática exonucleásica en dirección 5' → 3'

⇒ Polimerasas:

⇒ **ADN polimerasa I**: reparación y replicación

⇒ **ADN polimerasa II**: desconocida, puede estar relacionada con la reparación del ADN

⇒ **ADN polimerasa III**: síntesis de ADN en la replicación.

⇒ **HOLOENZIMA** (enzima funcional): es un **dímero asimétrico** (PM = 800KDa)

⇒ Partícula central (2x (αεθ)): se encargan de la síntesis del ADN

⇒ El resto de las subunidades (aprox. 7): se encargan de la unión al ADN (β) y la **procesividad**: el enzima no se separa del ADN hasta no terminar la replicación.

⇒ **DÍMERO ASIMÉTRICO**: Enzima formada por dos agregados de varias subunidades distintas.

⇒ **ELONGACIÓN 5' → 3'**

⇒ Requiere un molde, cebador, dNTP y Mg²⁺

⇒ No se disocia durante la elongación: PROCESIVIDAD

⇒ **OPERATIVIDAD y FIDELIDAD**

⇒ **Velocidad alta**: 1000 nucleótidos/segundo (eucariotas 100 nucleótidos/segundo)

⇒ **Tasa de error baja** (10⁻⁸ – 10⁻⁹)

⇒ **Autocorrección** 3' → 5' (capacidad exonucleásica, corrige un nucleótido si se detecta un error.

Proteínas de la replicación

⇒ **ADN polimerasas II y III**

⇒ Proteínas para localizar el origen de replicación (**DnaA**)

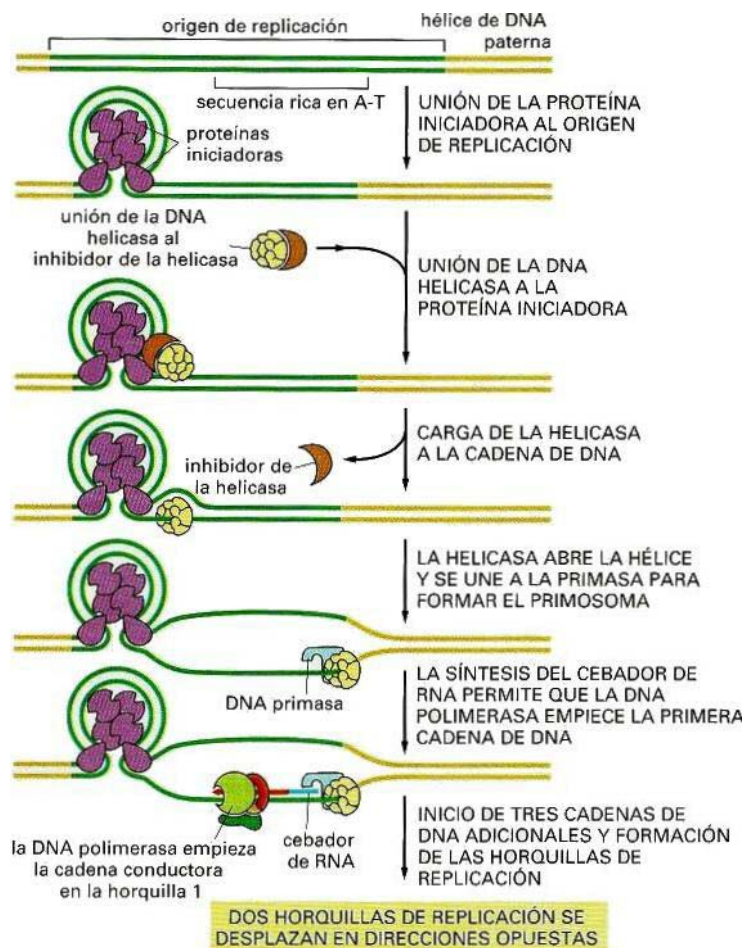
⇒ **Helicasas** (**DNA B**, **DNA C**, **proteína Rep**)

⇒ Proteínas estabilizadoras de ADN monocatenario (**SSB**)

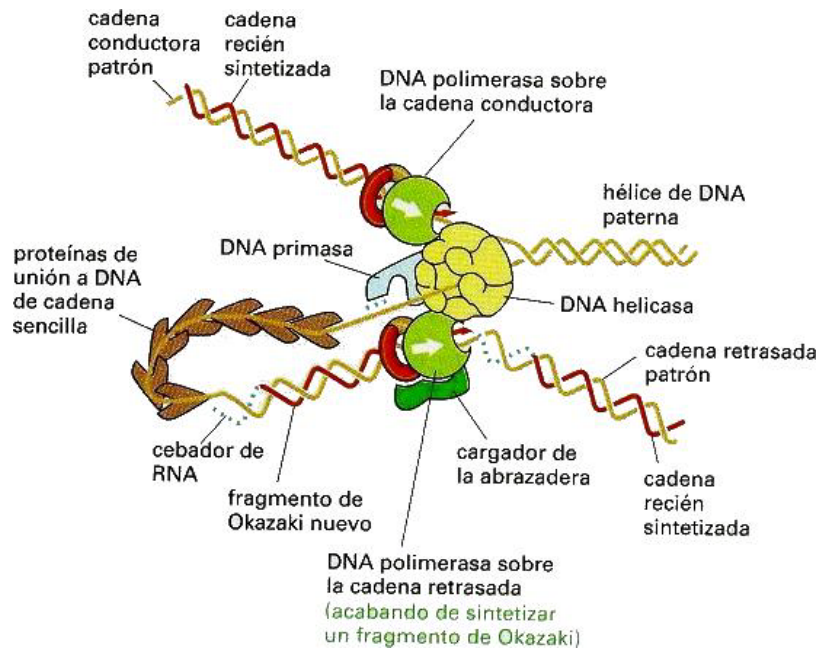
⇒ **Primasa** (ARN polimerasa – ADN dependiente) (**DnaG**)

⇒ **Ligasas** (ADN ligasas)

- ⇒ **ADN Topoisomerasa II** (ADN girasa)
- ⇒ Proteínas para determinar el final de la replicación (**Tus**) (localiza genes de terminación; **ter**)
 - ⇒ La replicación se acaba mediada por genes y no por cruce de las horquillas.
- ⇒ Para comenzar la replicación del OriC debe estar **no metilado** y **súperenrollado negativamente**.
 - ⇒ Las **DnaA** localizan el punto de iniciación (Las **DnaA** son tetrámeros)
 - ⇒ Reconocen secuencias determinadas
 - ⇒ Se unen al gen OriC, la unión es cooperativa: cada vez se unen más proteínas.
 - ⇒ Se forma un agregado que pensiona el OriC y se abre la molécula en un punto concreto dentro del OriC.
 - ⇒ Al ser una replicación **completa** la regulación se da en el inicio. En la zona de apertura hay secuencias A=T repetitivas que facilitan la apertura del ADN.
- ⇒ Las **helicases**:
 - ⇒ Abren poco a poco las hebras rompiendo puentes de hidrógeno y haciendo más grande la apertura inicial.
 - ⇒ A medida que las helicases progresan las **DnaA** se disocian del ADN.
- ⇒ Las **proteínas SSB** estabilizan el ADN monocatenario abierto por las helicases
- ⇒ Las **girasas** eliminan los súperenrollamientos positivos del ADN
- ⇒ La **primasa** fabrica los cebadores para que la ADN polimerasa III empiece la replicación
- ⇒ La **ADN polimerasa III** comienza la síntesis

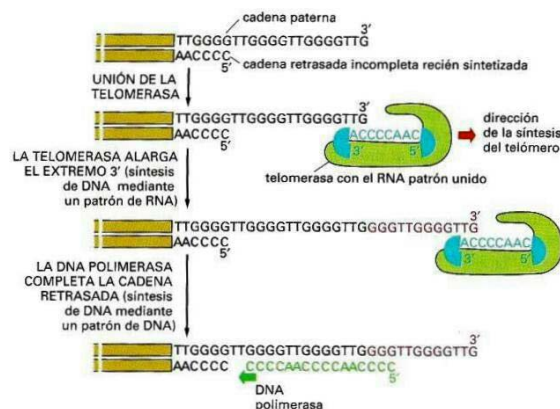


- ⇒ En la síntesis de la **hebra retardada**:
 - ⇒ La maquinaria de replicación pasa el ADN sin copiarlo. La **primasa** hace un ARN cebador cada 1000 – 2000 nucleótidos y se estabiliza con **proteínas SSB**
 - ⇒ Se invierte el ADN en un "bucle" y el ADN se orienta en la maquinaria de replicación



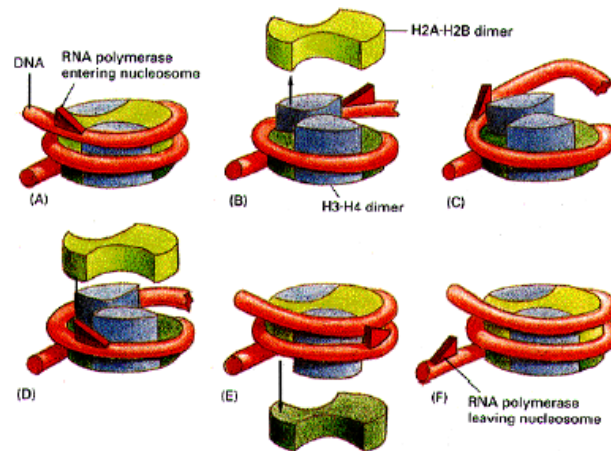
Replicación en eucariotas

- ⇒ Grandes similitudes, pero mucho más compleja y menos conocida.
- ⇒ **Múltiples orígenes de replicación** ($10^3 - 10^4$)
 - ⇒ No se activan todos los orígenes al mismo tiempo (existe una secuencia establecida) unos empiezan antes, en la fase S, y luego se activan los otros progresivamente. Se activan antes los que están en forma de **euromatina** (cromatina activa)
- ⇒ **Velocidad menor** que en los procariotas (50 nucleótidos/segundo)
- ⇒ **Fragmentos de Okazaki** más cortos (cada 100 nucleótidos)
- ⇒ DNA polimerasas específicas
 - ⇒ **ADN polimerasa α** : replicación de la hebra retardada
 - ⇒ **ADN polimerasa β** : reparación del ADN
 - ⇒ **ADN polimerasa γ** : replicación del ADN mitocondrial
 - ⇒ **ADN polimerasa δ** : Replicación de la hebra continua (complejo-PCNA)
 - ⇒ **PCNA**: antígeno nuclear de las células en proliferación equivalente a la subunidad β en la ADN polimerasa III de *E. Coli*.
 - ⇒ **ADN polimerasa ϵ** : replicación y reparación del ADN
- ⇒ **Telomerasas**:
 - ⇒ Replicación de los extremos de los cromosomas



- ⇒ Están formadas por una **parte proteica** y **ARN** formando una **riboproteína**.
- ⇒ La secuencia de ARN de la telomerasa es la copia de la secuencia terminal del telómero.

- ⇒ Como una transcriptasa reversa, la telomerasa hace copias de su ARN en ADN y lo añade al ADN, así se originaría un nuevo origen de replicación y de nuevo se sintetizaría el ADN que faltaba.
- ⇒ En el **cáncer**, la expresión de la telomerasa aumenta, se busca inhibir su actividad para frenar los tumores.
- ⇒ **Unión a histonas** para formar nucleosomas



- ⇒ **Control a nivel de inicio** de la replicación (IGUAL QUE EN PROCARIOTAS)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- ⇒ DESARROLLO DE LA TÉCNICA
 - ⇒ Se calienta una solución de ADN, con una ADN polimerasa termorresistente, para su replicación a 95°C durante 15 segundos.
 - ⇒ Se añaden los cebadores
 - ⇒ Bajamos la temperatura a 55°C durante 1 minuto
 - ⇒ Se produce la hibridación del ADN
 - ⇒ Se calienta a 72°C durante 30 segundos
- ⇒ APLICACIONES
 - ⇒ Ilimitadas (sobre todo para el diagnóstico)
- ⇒ PROBLEMAS
 - ⇒ La contaminación de la muestra