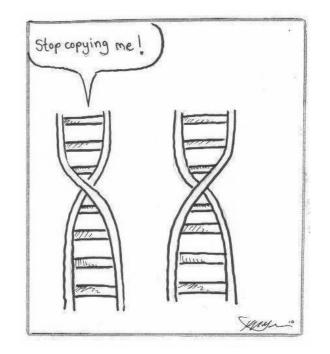


BLOQUE 3. GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

3.1 Replicación del ADN

Germán Tenorio Biología 12º



Idea Fundamental: La estructura del ADN se adapta de forma ideal a su función, permitiendo que la información genética que contiene sea copiada de forma precisa:

EVHYXXXXX



- El ADN es la molécula portadora de la información genética gracias a que cumple cuatro condiciones imprescindibles:
 - 1. Debe poder contener cualquier tipo de información biológica. Al ser una macromolécula formada por cuatro tipos de nucleótidos y al tener un gen miles de pares de nucleótidos, las combinaciones son casi infinitas.

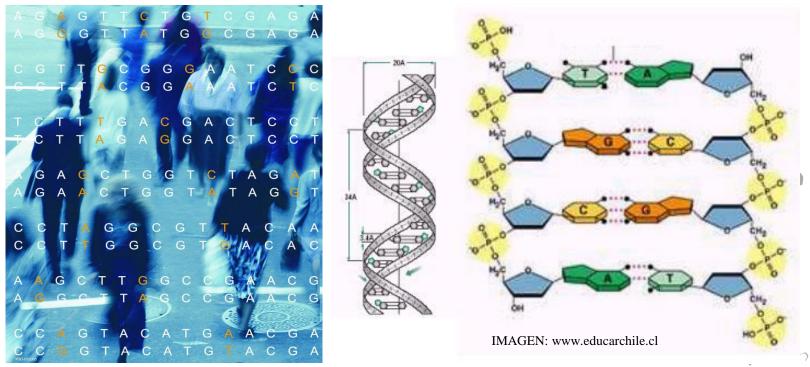
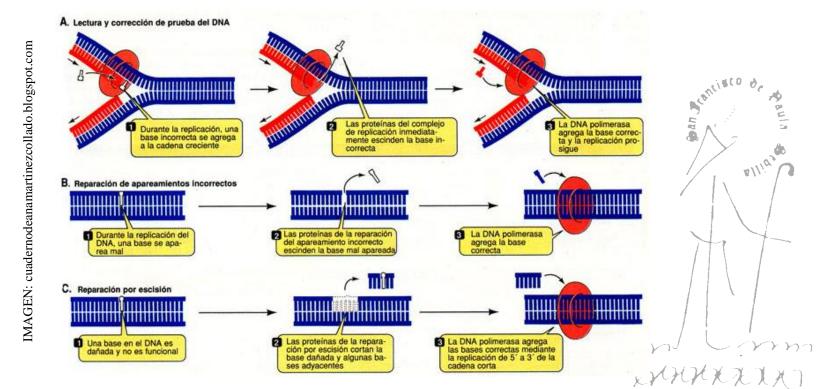


IMAGEN: www.livescience.com

EXHYXXXXXX

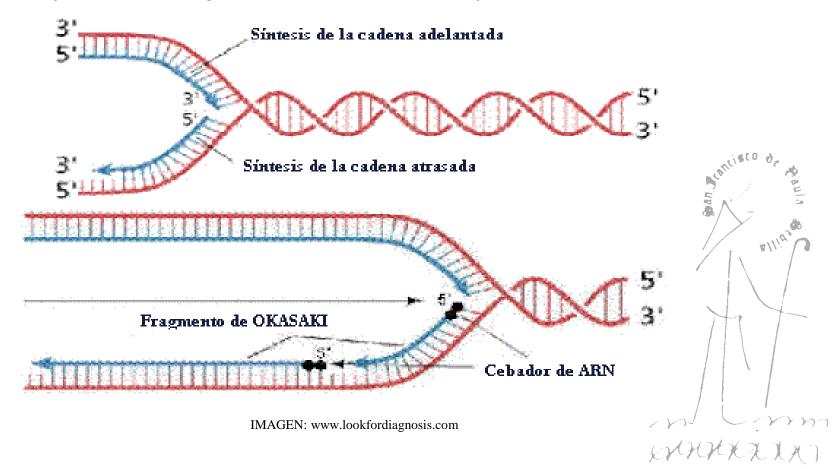


2. Debe ser resistente a las alteraciones (mutaciones). Si por cualquier razón se coloca un nucleótido incorrecto, se aparea inadecuadamente con el complementario, por lo que la doble hélice queda alterada. La célula posee mecanismos para reconocer el error, eliminar el nucleótido incorrecto y sustituirlo por el correcto. No obstante, la posibilidad de mutación no debe ser nula con objeto de promover la evolución.



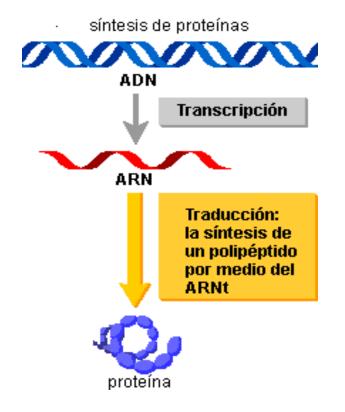


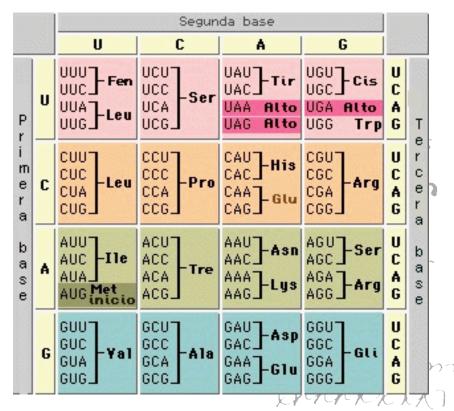
3. Duplicación. Las células hijas reciben la misma información que la progenitora. Para esto, basta con que se separen las dos cadenas de la hélice y se sintetice, junto a cada una, la complementaria.





4. Transcripción de la información. El obligado emparejamiento de nucleótidos complementarios permite a la célula copiar en un ARN mensajero la secuencia complementaria de una de las hebras. Esta secuencia complementaria puede ser luego **traducida** en forma de proteína, según las normas del código genético.







Flujo de la información genética

- El ADN porta la información genética, es decir, nuestros genes proporcionan la información, pero son las proteínas las que realizan el trabajo.
- ¿Cómo se expresa la información genética contenida en el ADN? ¿Cómo pasa la información desde el ADN hasta las proteínas que la ejecutan?

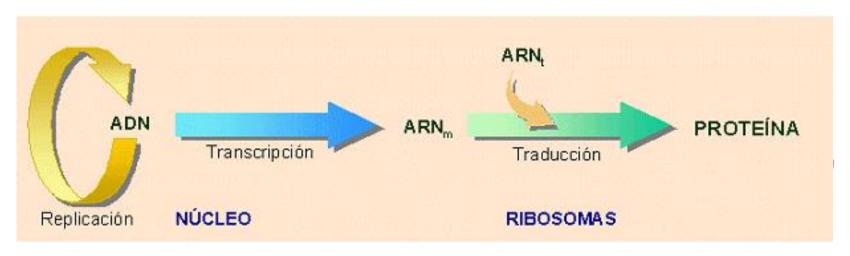


IMAGEN: www.biogeo.iespedrojimenezmontoya.es

Este esquema fue considerado durante muchos años el "dogma central de la biología molecular".

EXHYXXXXXX



Redefinición del dogma central de la Biología Molecular

Ciertos virus (retrovirus) pueden realizar la transcripción al revés (retrotranscripción) ya que poseen una enzima llamada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, que fabrica ADN complementario a un ARN molde.

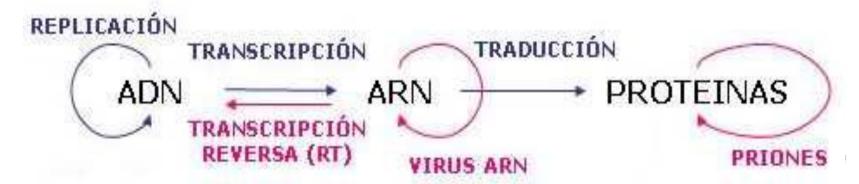


IMAGEN: www.aportes.educ.ar

Otros virus (virus de ARN) son capaces de replicar el ARN.

 Ciertas proteínas (priones) tienen la capacidad de autoperpetuarse convirtiendo las normales en defectuosas.

EXHXXXXXX



- Aunque actualmente se sabe con certeza que el ADN porta la información genética, esto no pudo demostrarse hasta la segunda mitad del siglo XX.
- A finales del siglo XIX los científicos estaban convencidos de que los cromosomas jugaban un papel clave en la herencia, y de que el material hereditario tenía una naturaleza química.
- Como se sabía que los cromosomas estaban formados de tanto proteínas como de ácidos nucleicos, ambos eran firmes candidatos a ser el material genético.
- Durante la primera mitad del siglo XX se suponía que eran las proteínas las que portaban la información que determina la herencia, dada la gran variedad de funciones que llevaban a cabo, así como a su especificidad.
- Variedad y especificidad de funciones eran dos requerimientos que se creían indispensables en el material genético.

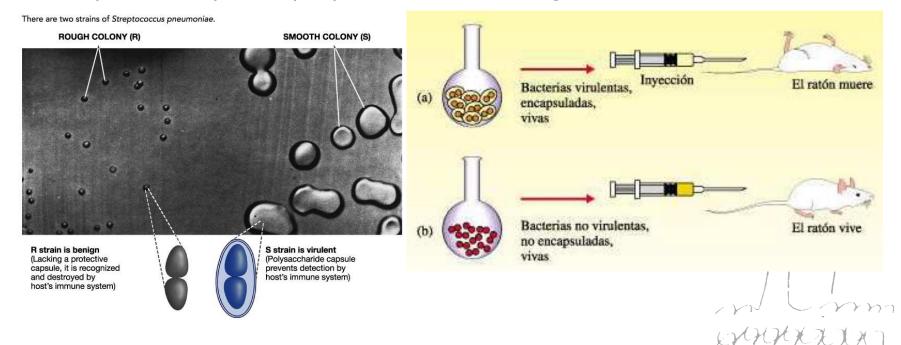
Timeline of events:

- 1890: Weismann substance in the <u>cell nuclei</u> controls development.
- 1900: Chromosomes shown to contain hereditary information, later shown to be composed of <u>protein</u> & <u>nucleic acids</u>.
- 1928: Griffith's Transformation Experiment.
- 1944: Avery's Transformation Experiment.
- 1953: Hershey-Chase Bacteriophage Experiment.
- 1956: First demonstration that RNA is viral genetic material.

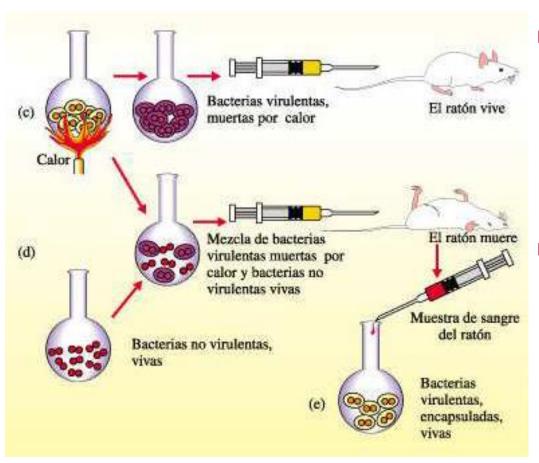
EXCHANGERA



- La primera prueba de que los genes estaban formados por ADN procede de los experimentos de transformación bacteriana realizados por Fred Griffit en 1928.
- Existían dos cepas de la bacteria Streptococcus pneumoniae: Una patogénica encapsulada, denominada S porque que al sembrarla en placa producían colonias lisas, y otra no patogénica sin cápsula, denominada cepa R sin cápsula, que producían colonia rugosas.







- F. Griffit descubrió que al mezclar bacterias virulentas muertas (S) con no virulentas vivas (R), las últimas se habían **transformado** en S, podían formar cápsula y adquirían patogenicidad.
- La sustancia que pasaba de las bacterias L muertas a las R vivas, y transformaba a ésta última en S, el "principio transformante", no pudo aislarse.





- En **1944 Avery, McLeod y McCarty** identificaron dicho "principio transformante" como ADN.
- El lisado de bacterias S (el contenido bacteriano tras su rotura) lo mezclaron con bacterias R vivas, las cuáles se transformaban en S y mataban a las ratas.
- Comprobaron que de todas las sustancias presentes en el lisado bacteriano (proteínas, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos) sólo el ADN producía dicha transformación.

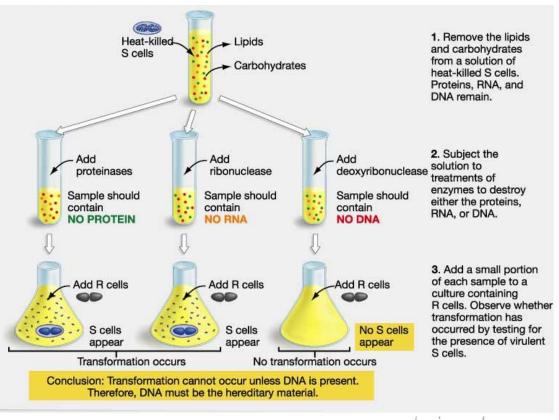


IMAGEN: biology.kenyon.edu

EXHEXXXXX

Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético

- En 1952 Hershey y Chase realizaron un experimento que proporcionaba pruebas de que el ADN es el material genético.
- En ese momento se sabía que los fagos (virus que infectan bacterias, como el fago T2) introducían su material genético dentro de las bacterias que infectaban, utilizando su maquinaria molecular para obtener nuevas partículas víricas que eran liberadas al medio.

bacteriophage T2

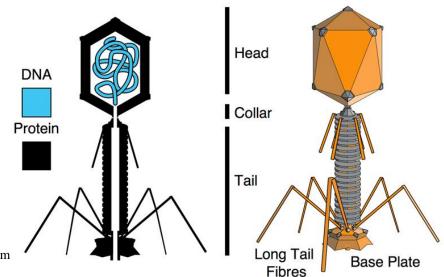


IMAGEN: discoveryandinnovation.com

Los fagos están formados solo de ADN y proteínas, por lo que el objetivo Hershey y Chase era determinar cuál de estas moléculas era el material genético que los fagos inyectaban en las células hospedadoras.

EXHYXXXXXX

Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético

- En un primer experimento, marcaron el ADN de los fagos con el isótopo radiactivo del fósforo (P³²), dado que los aminoácidos que forman las proteínas carecen de él.
- Dejaron que los fagos del cultivo infectaran a las bacterias E. coli y posteriormente retiraron las cubiertas proteicas de las células infectadas mediante una licuadora y una centrífuga, quedando las bacterias en el fondo del tubo y las cubiertas proteicas en el sobrenadante.

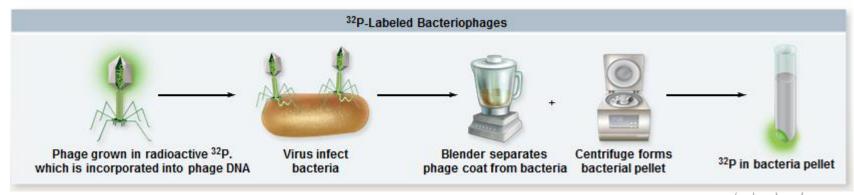


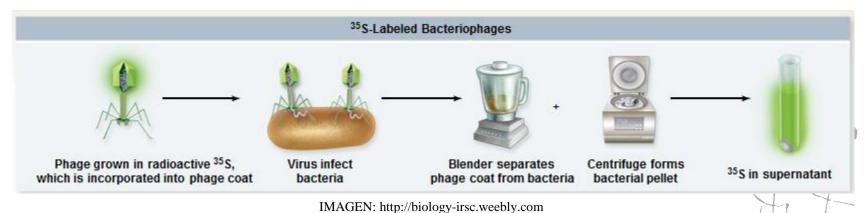
IMAGEN: http://biology-irsc.weebly.com

Encontraron que el indicador radiactivo era visible sólo en las células bacterianas, y no en las cubiertas proteicas.



Experimento de Hershey y Chase que probaba que el ADN es el material genético

- En un segundo experimento, marcaron los fagos con el isótopo radiactivo del azufre (S³⁵), que contienen los aminoácidos cisteína y metionina, a diferencia del ADN.
- Tras la separación, encontraron que el indicador estaba presente en las cubiertas proteicas, pero no en las bacterias infectadas.



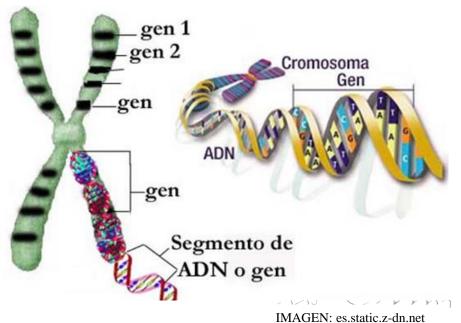
Dado que solo el ADN del bacteriófago era introducido en la bacteria y era usado para producir más bacteriófagos, se confirmó que el ADN es el material genético.
Web2

EXXXXXXXXX



Concepto de gen

- Diversos experimentos en el siglo XIX mostraron la existencia de factores en los seres vivos que influenciaban en sus características específicas y que además eran heredables.
- Fue ya en el siglo XX cuando se inventó la palabra gen para designar un factor hereditario que abarca una longitud determinada de ADN y que influye en una característica hereditaria específica, habitualmente correspondiente a una sola proteína o un solo ARN
- La función primaria del genoma es codificar moléculas de ARN. Regiones seleccionadas de la secuencia de nucleótidos de ADN son copiadas en forma de secuencias complementarias de ARN, el cual o bien codifica una proteína (si es ARNm), o forma ARNr o ARNt.
- Cada región de la hélice de ADN que produce una molécula de ARN funcional constituye un gen.



ととけいてんとしまれ



Concepto de gen

En los eucariotas superiores son habituales los genes de más de 100 000 pares de nucleótidos, y algunos contienen más de 2 millones de pares de nucleótidos.

Sin embargo, para codificar una proteína de tamaño medio (300 Aa) solamente son necesarios unos 1000 pares de bases. Ocurre, por lo tanto, que la mayor parte del ADN está formado por largas secuencias de ADN no codificante (intrones) interrumpidas por fragmentos relativamente

cortos de ADN codificante (exones).

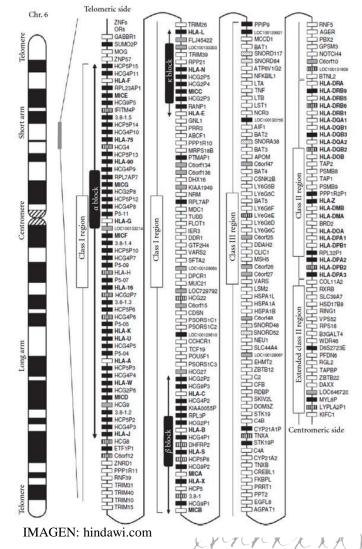
Durante el proceso de conversión de las moléculas de ARN (transcritas desde un gen y por ello denominadas transcritos primarios de ARN), a moléculas de ARNm, se eliminan las secuencias intrónicas. Este proceso se llama maduración del ARN (ARN splicing). La mayor parte del gen son intrones. Además, cada gen contiene secuencias reguladoras responsables de regular su transcripción.

esde un minadas (ARN), a nan las (CESO SE (ARN) (ARN)



Concepto de locus

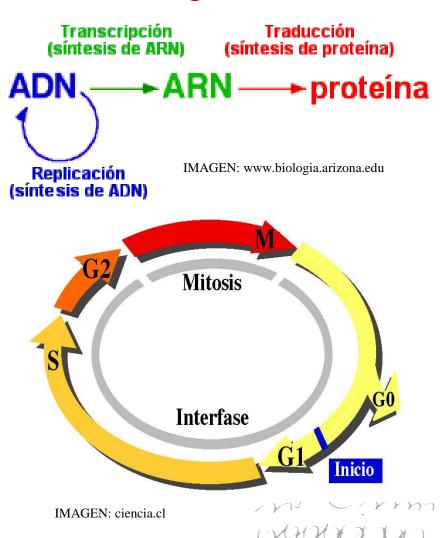
- Durante el ciclo celular, el ADN eucariota siempre se encuentra en forma de cromatina excepto el momento en el que se divide, que se condensa pra formar los cromosomas, perfectamente visibles al microscopio durante la metafase mitótica.
- Los genes se localizan, por tanto, en los cromosomas, y más concretamente, la posición específica que ocupa un gen en un cromosoma se denomina locus.
- Dentro de una misma especie, un gen concreto siempre ocupa el mismo locus de un determinado cromosoma, como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6 humano.





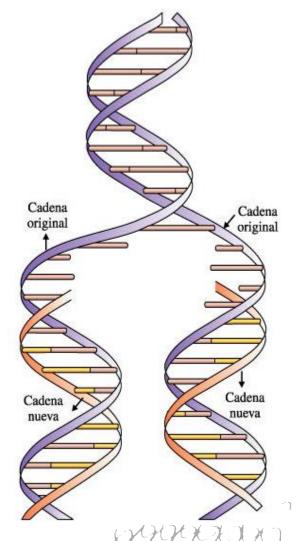
Conservación de la información genética

- Como ya se ha indicado, la tran información genética fluye desde el ADN hasta el ARN (transcripción) ADN y desde éste a las proteínas (traducción).
- Sin embargo, la información genética también debe conservarse, de manera que se transmita de una célula progenitora a la descendencia (replicación).
- La **replicación** del ADN consiste en duplicarlo, ya que se hace una copia idéntica de un molde.
- Si una célula va a dividirse por mitosis, cada célula hija debe recibir la misma información genética. Por tanto, la replicación por la que la célula madre duplica su ADN ocurre durante la fase S.



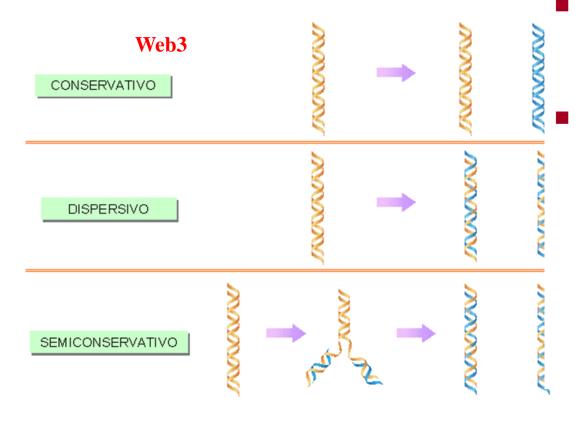


- Durante la replicación, las dos hebras o filamentos de la doble hélice se separan, sirviendo cada uno de ellos como guía o molde para la creación de una nueva cadena por adición de nucleótidos.
- El resultado es que en la doble hélice de la molécula de ADN de cada célula hija se conserva una cadena original de la célula madre (la cadena molde) mientras que la otra cadena se sintetiza de nuevo.
- La secuencia de bases en una cadena determina la secuencia de bases en la otra cadena, al solo establecerse puentes de hidrógeno entre las bases que son complementarias.
- Por esta razón, se dice que la replicación del ADN es semiconservativa y depende del apareamiento de bases complementarias.





Mediante este modelo semiconservativo, las dos cadenas de la doble hélice se pueden separar y cada cadena polinucleotídica sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena de ADN, siguiendo la regla de la complementariedad de bases.



Cada nueva molécula de ADN resultante presenta un filamento antiguo y otro nuevo complementario.

Otra posibilidad que se barajaba es que la replicación fuera conservativa, donde se forma una nueva hélice y se conserva entera la doble hélice primitiva, o bien dispersiva, donde ambos filamentos están formados por una mezcla de nuvo y antiquo.

EXHYXXXXXX

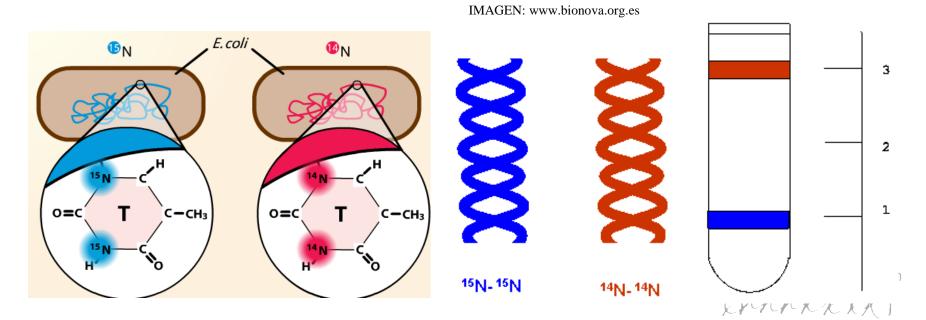


- En 1958 Meselson y Stahl lograron pruebas a favor de la replicación semiconservativa del ADN usando isótopos radiactivos.
- El isótopo de nitrógeno normal es N^{14} , mientras que el isótopo radiactivo (N^{15}) , es más denso al tener un neutrón más.
- Meselson y Stahl desarrollaron un nuevo método para separar moléculas de ADN conteniendo N¹⁴ de aquellas que contienen N¹⁵. Esta técnica, denominada ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, permite separar moléculas en función de su densidad de flotación, es decir, que las moléculas se concentran como bandas donde la densidad de las moléculas iguala a la de la solución a su alrededor.

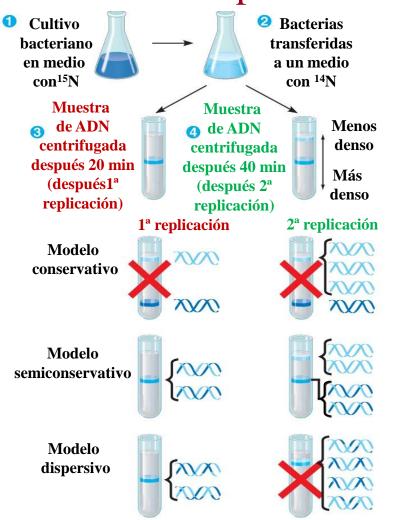




- Cuando se cultivan bacterias de E. coli con nucleótidos radiactivos del isótopo N¹⁵, todo su ADN esta formado por dicho isótopo pesado. Por otro lado, cuando se hace lo mismo pero con el isótopo N¹⁴, todo su ADN esta formado por dicho isótopo más ligero.
- Así, cuando se centrifuga una muestra formada por moléculas de ADN fabricadas con N¹⁴ y otras fabricadas con N¹⁵, éstas últimas, al tener una mayor densidad se colocan en el fondo del tubo de ensayo tras ser centrifugada la mezcla.



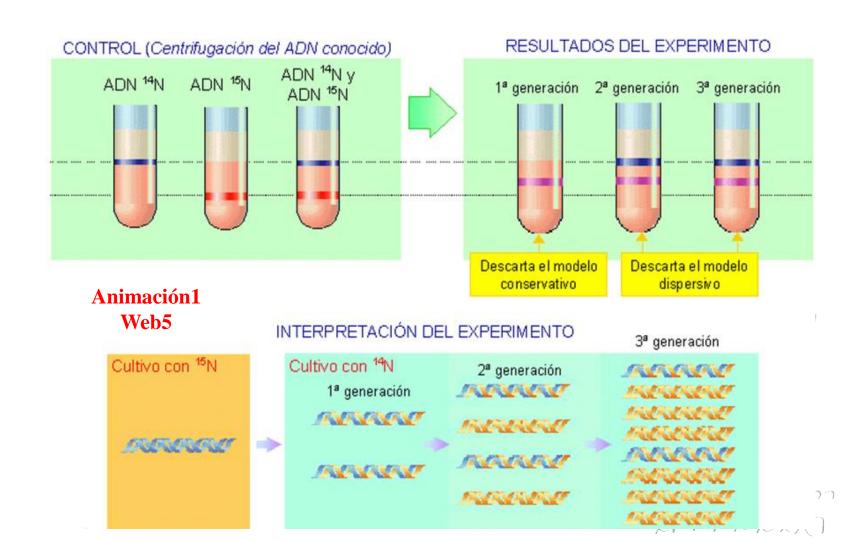




- Meselson y Stahl cultivaron bacterias de *E. coli* durante 14 generaciones con nucleótidos radiactivos del isótopo N¹⁵, de manera que todo su ADN estaba formado por dicho isótopo pesado.
- Pasaron dichas bacterias a un medio con nucleótidos más ligeros con el isótopo N¹⁴, y extrajeron ADN después de cada generación.
- Extrajeron ADN después de la 1^a y 2^a generación.
- La primera replicación produjo una banda híbrida de ADN, lo que invalidaba el modelo conservativo.
 - La **segunda replicación** produjo tanto una banda híbrida como una más ligera, invalidando el modelo dispersivo y apoyando el modelo semiconservativo.

EXHXXXXXXX







Proceso de replicación

- Para que un ser humano se desarrolle a partir de un cigoto, se calcula que deben producirse unas mil billones de divisiones celulares, con otras tantas replicaciones previas de ADN.
- La replicación del ADN se produce durante la fase S (interfase) del ciclo cellular.





Proceso de replicación

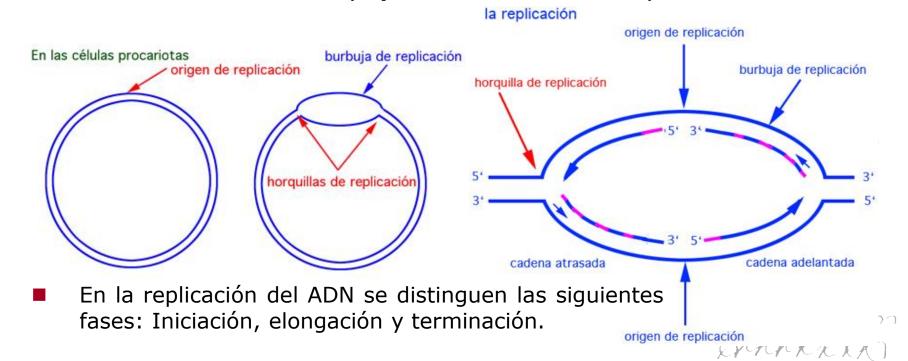
La replicación del ADN es llevada a cabo por un complejo sistema de enzimas que constituye todo un aparato molecular de replicación llamado replisoma.

Enzima	Función			
Helicasa	Desenrolla la doble hélice y separa las dos cadenas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas.			
Topoisomerasa (girasa)	Elimina las tensiones originadas al desenrollar las dos cadenas.			
Proteínas de unión de cadena simple (SSB)	Se unen a las hebras molde del ADN para que no se vuelvan a enrollar.			
Primasa	Fabrica un corto fragmento de ARN en dirección 5'-3' que proporcione el extremo 3' hidroxilo sobre el que adicionar los nuevos nucleótidos la ADN polimerasa.			
ADN polimerasa	Añade y une entre sí los nucleótidos para formar una nueva cadena.			
ADN ligasa	Une entre sí los distintos fragmentos de Okasaki hasta formar por completo la hebra retardada.			

KITHINKKI

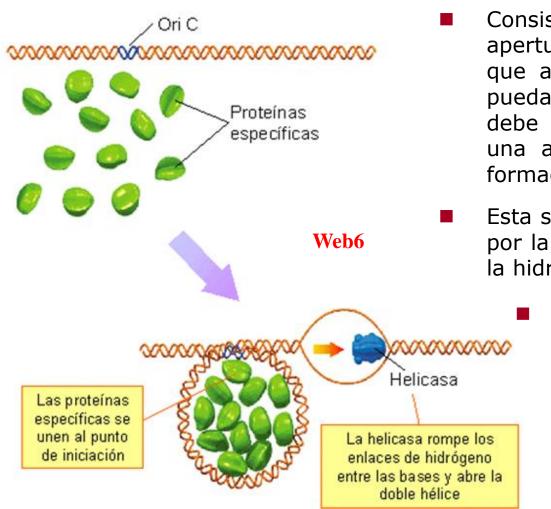


La replicación comienza en un punto concreto del cromosoma bacteriano denominado origen de replicación (oriC), a partir del cual se forman unas estructuras conocidas como burbujas de replicación, que se extienden, en sentido contrario, a lo largo del cromosoma dando lugar a dos horquillas de replicación, en las cuales las dos hebras de ADN parental están separadas y actúan como moldes para la síntesis de dos nuevas cadenas de ADN (replicación bidireccional).





Replicación en procariotas: Iniciación



Consiste en el desenrollamiento y apertura de la doble hélice, dado que antes de que la replicación pueda ocurrir, la doble cadena debe separarse para que cada una actúe como molde para la formación de la nueva hebra.

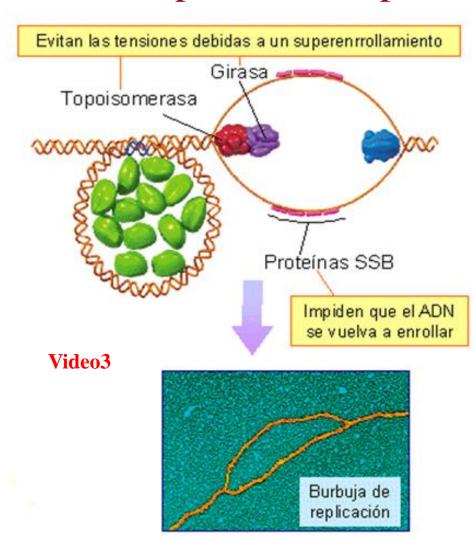
Esta separación es llevada a cabo por la enzima **helicasa** mediante la hidrólisis del ATP.

La enzima helicasa desenrolla la doble hélice y separa las dos cadenas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas.

EXHITEXTEXT



Replicación en procariotas: Iniciación



- Además intervienen las topoisomerasas (como la girasa) que eliminan las tensiones originadas al desenrollar las dos cadenas.
- Luego las proteínas de union de cadena simple (SSB) se unen a las hebras molde del ADN para que no se vuelvan a enrollar. Ahora ya pueden actuar las ADN-polimerasas que leen la secuencia de cada una de las cadenas y elaboran dos réplicas con secuencias complementarias.



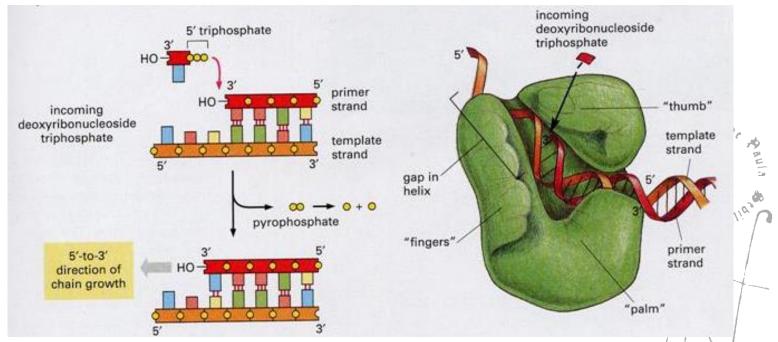
En E.coli hay tres ADN polimerasas, la I y la III que se encargan de la replicación y corrección de errores, y la II, que sólo lleva a cabo la replicación del ADN dañado por determinados agentes físicos.

POLIMERASA	EXONUCLEASA		POLIMERIZACIÓN		INICIA CIÓN
	dirección	función	dirección	función	II (I O II TO I O I O
I	5'→3' 3'→5'	elimina cebador reparación	5'→3'	síntesis	no
II	3'→5'	reparación	5'→3'	síntesis	no
III	3'→5'	reparación	5'→3'	síntesis	no

ENTHERETAIN



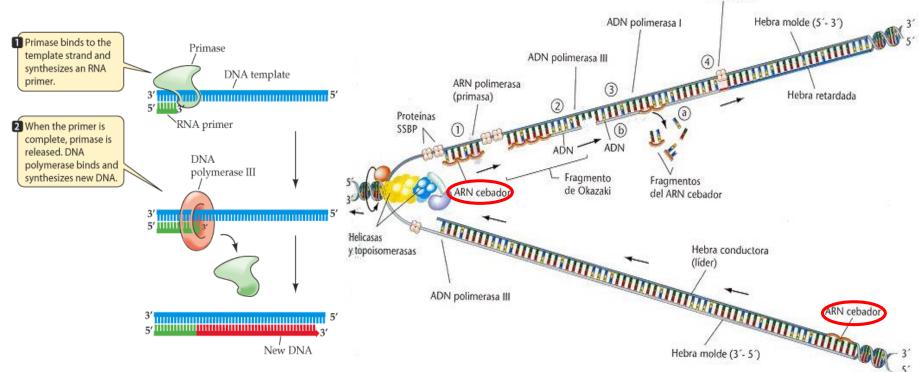
La que desempeña el papel principal es la ADN polimerasa III, que tiene como sustrato los desoxirribonucleótidos trifosfato (ATP, TTP, GTP y CTP), que los hidroliza en pirosfato (PP) y nucleótido monofasfato, el cuál une a la cadena de ADN en formación mediante enlace fosfodiéster.



La ADN polimerasa une entre sí los nucleótidos para formar una nueva cadena, usando para ello la cadena preexistente como una plantilla.



La ADN polimerasa III es incapaz de iniciar por sí sola la síntesis de una nueva cadena de ADN, por lo que necesita un corto fragmento de ARN llamado ARN cebador (primer) que proporcione el extremo 3' hidroxilo sobre el que adicionar los nuevos nucleótidos.
ADN ligasa

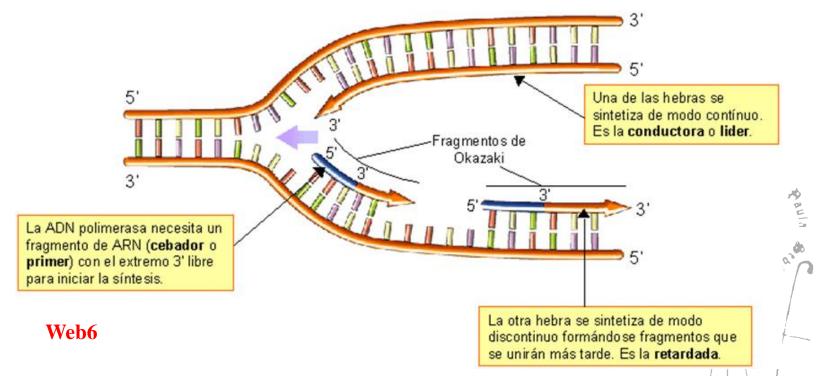


Este ARN cebador es sintetizado por una **ARN polimerasa** denominada **primasa**, que fabrica un corto fragmento de ARN en dirección 5'23'.

EXHYXXXXXX



La ADN polimerasa III sólo puede adicionar nucleótidos al extremo 3', por lo que el crecimiento de la nueva hebra siempre será en dirección 5'-3'.



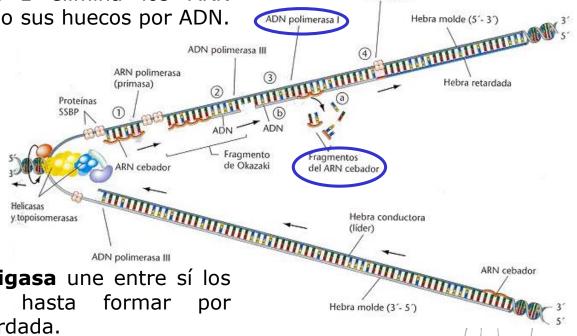
Esto hace que el molde que va de 3'-5' (denominado cadena conductora o adelantada) sea copiado de manera continua, pero que la otra cadena (retardada), al ir de 5'-3', sea copiada de forma discontinua, a trozos que sí van de 5'-3', denominados fragmentos de Okasaki.



Replicación en procariotas: Terminación

■ El final de la replicación se produce cuando la ADN polimerasa III se encuentra con una secuencia de terminación.

La ADN polimerasa I elimina los ARN cebadores, sustituyendo sus huecos por ADN.



ADN ligasa

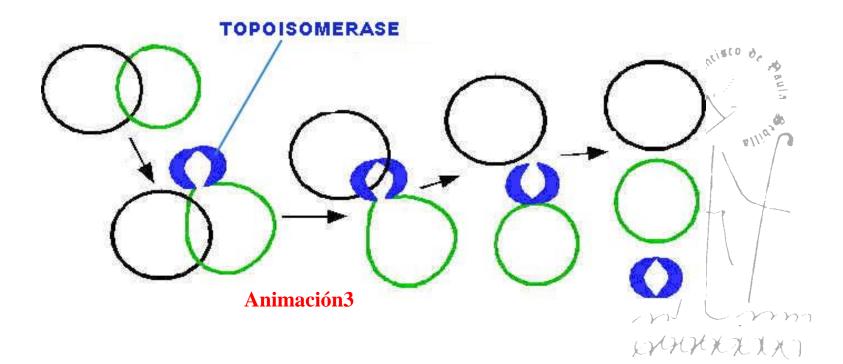
Animación2

- Por último una ADN ligasa une entre sí los distintos frgamentos hasta formar por completo la hebra retardada.
- La cadena líder se forma más rápidamente, ya que sólo se necesita un cebador de ARN al principio, y por tanto solo actúa una vez la ADN polimerasa I y la ligasa.



Replicación en procariotas: Terminación

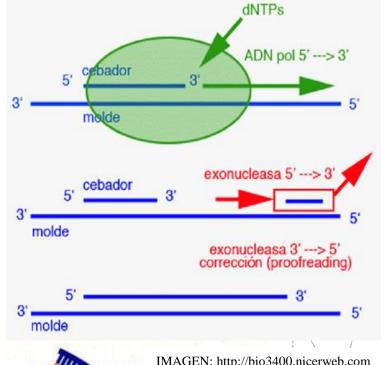
- Una vez duplicado el ADN circular, las moléculas hijas resultantes están vinculadas entre sí, por lo que deben ser desencadenadas para segregarlas en células hijas separadas.
- Esta separación las realizan otras enzimas **topoisomerasas**, que tienen capacidad para romper una molécula de ADN bicatenario y hacer pasar una segunda molécula de ADN bicatenario a través de la rotura.

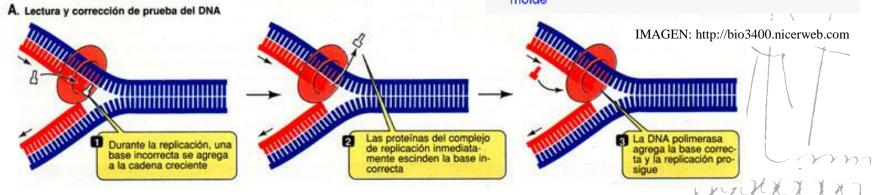




Replicación en procariotas: Corrección de errores

- En E. coli la actividad polimerasa de estos enzimas comete un error de apareamiento por cada millón de nucleótidos adicionados (106).
- La actividad exonucleasa autocorrectora de las ADN polimerasa I y III consituye el principal mecanismo de corrección de errores, reduciendo el error a uno de cada cien millones de nucleótidos adicionados (108).







Replicación en procariotas: Corrección postreplicativa

- Esta precisión podría resultar suficiente para una bacteria, cuyo genoma contiene 3·10⁶ pares de bases, pero resulta insuficiente para el genoma humano que contiene 3·10⁹ pares de bases.
- Un error por cada 10 millones de bases supondría 300 equivocaciones en cada duplicación del ADN humano, y teniendo en cuenta que durante el desarrollo embrionario a partir del cigoto el genoma humano se duplica casi mil millones de veces, se produciría una acumulación del trescientos mil billones de errores, lo que evidentemente, es incompatible con la vida, ya que la formación inicial se perdería pronto como consecuencia de las divisiones celulares.

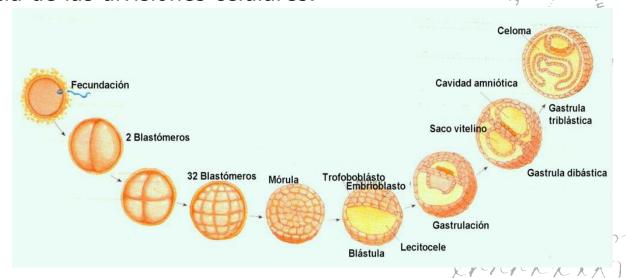
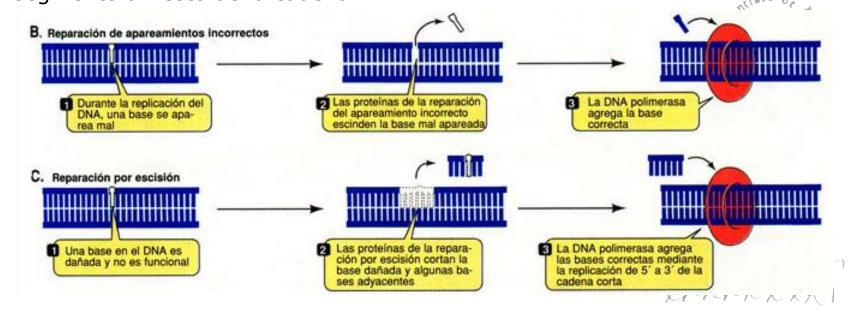


IMAGEN: http://bio3400.nicerweb.com



Replicación en procariotas: Corrección postreplicativa

- Por ello, para aumentar la precisión de la replicación, existe una maquinaria enzimática que corrige posibles errores cometidos por las polimerasas en el ADN recien sintetizado (adeninas no metiladas), que se denomina corrección postreplicativa, con lo que la exactitud de la réplica alcanza la increíble perfección de 1 error por cada 1010 nucleótidos.
- Participan **endonucleasas**, que cortan la cadena donde se detecta el error, **exonucleasas**, que eliminan el fragmento incorrecto, **ADN polimerasa** que sintetiza el segmento correcto y **ADN ligasa** para unir el nuevo segmento al resto de la cadena.

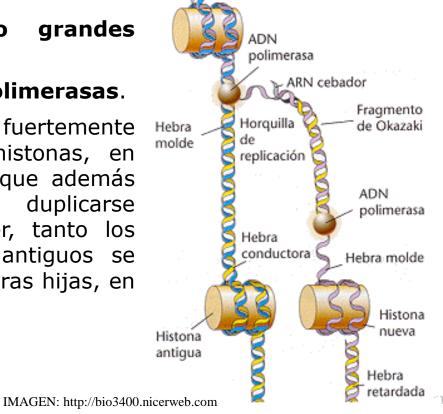




Es similar a la de procariotas, es decir, semiconservativa y bidireccional, existiendo una hebra conductora que se sintetiza de manera continua y una retardada de forma discontinua con fragmentos de Okazaki.

Sin embargo, existen cuatro grandes diferencias:

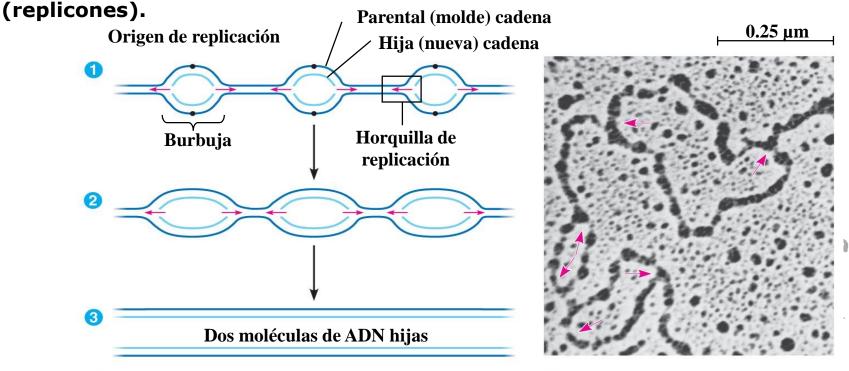
- 1. Existen cinco tipos de ADN polimerasas.
- 2. El ADN de los eucariontes está fuertemente asociado a los octámeros de histonas, en forma de **nucleosomas**, por lo que además de replicarse el ADN, deben duplicarse también las histonas. Al parecer, tanto los nuevos nucleosomas como los antiguos se reparten entre las dos nuevas hebras hijas, en la retardada y en la conductora.



EXTEXTANCE



3. La longitud del ADN de un cromosoma eucariótico es mucho mayor que el ADN bacteriano, por lo que no hay un único origen de replicación y en los cromosomas eucarióticos la replicación del ADN se inicia en muchos puntos diferentes



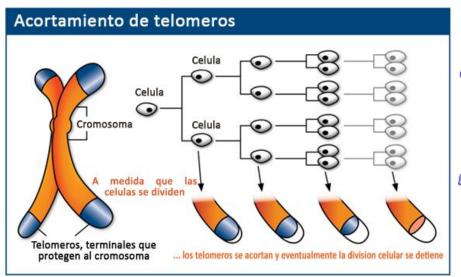
(a) En eucariotas, la replicación comienza en muchos sitios distintos del ADN de cada cromosoma.

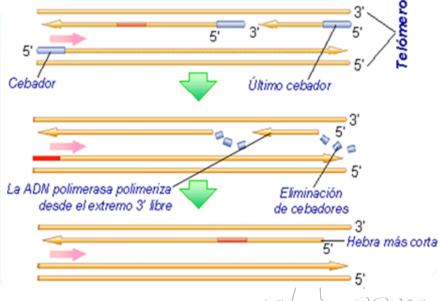
(b) Micrografía donde se observan tres burbujas de replicación en el ADN de un cultivo de células de hamster.

XIMM NO XX



4. Los cromosomas eucariotas son lineales y presentan en sus extremos unas regiones, denominadas **telómeros**, constituidas por secuencias repetitivas. Cuando se replica el ADN lineal, los extremos 5' de los telómeros, no pueden ser replicados, ya que cuando se elimina el último cebador, la ADN polimerasa no podrá rellenar el hueco al no encontrar extremos hidroxilo libres. Debido a esto, el extremo del cromosoma se va acortando cada vez que la célula se divide, lo que ha sido asociado al envejecimiento y muerte celular.



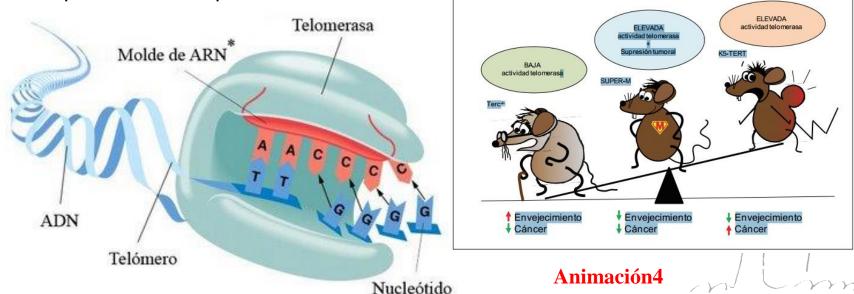




El acortamiento de los telómeros, puede ser remediado mediante una enzima, la **telomerasa**, que repara el daño y hace a las **células inmortales**, es el caso de las **células embrionarias** y **tumorales**.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que actúa como transcriptasa inversa, ya que tienen una hebra de ARN con la secuencia apropiada para actuar como molde para la síntesis de la secuencia telomérica de ADN que se añade en los extremos 3' de cada cromosoma para evitar su acortamiento en

cada proceso de duplicación.



^{*} La secuencia de la molécula molde de ARN puede variar en las diferentes especies