

LA DUPLICACIÓN DEL ADN

1. LA DUPLICACIÓN DEL ADN. NECESIDAD Y EXPLICACIÓN

1. Necesidad de la duplicación del ADN

Es necesario hacer copias de ADN para **originar nuevos individuos**.

2. Primeras hipótesis sobre la duplicación del ADN

- **Hipótesis semiconservativa** : propuesta por Watson y Crick, sostiene que en las dos moléculas de ADN obtenidas a partir de la antigua, hay una hebra nueva y otra antigua.
- **Hipótesis conservativa** : tras la duplicación quedarían, por un lado, las dos hebras antiguas juntas, y por el otro, las dos nuevas.
- **Hipótesis dispersiva** : las nuevas moléculas estarían compuestas por fragmentos de ADN nuevo y fragmentos de ADN antiguo.

3. Experimento de Melselson y Stahl

Demostró que la hipótesis cierta era la semiconservativa. Ver libro p. 114.

2. EL SENTIDO DEL CRECIMIENTO DE LAS NUEVAS HEBRAS

1. La síntesis de ADN *in vitro*

La enzima **ADN-polimerasa** es capaz de sintetizar ADN *in vitro*. Para ello, necesita la presencia de desoxirribonucleótidos-5-trifosfatos, de iones magnesio, y de un ADN en el que una de las hebras actúa como hebra patrón, y un extremo de la otra, que se ha retirado en parte, como cebador.

La ADN-polimerasa está constituida por unos 1000 aminoácidos. Permite la síntesis *in vitro* de ADN a partir de ADN natural. Es incapaz de iniciar una cadena *de novo*. Su papel se limita a añadir nucleótidos al extremo 3' de una cadena preexistente ; es incapaz de añadirlos al extremo 5'. Por lo tanto, el ADN cebador sólo puede crecer en sentido 3' → 5'. La nueva hebra sintetizada es antiparalela y complementaria.

2. El problema de la dirección en la duplicación del ADN *in vivo*

Cairns realizó un experimento para observar la duplicación de ADN *in vivo*. Consistió en mantener bacterias en un medio con timina marcada con tritio (H^3). Cada 2-3 minutos se fotografiaba el proceso de duplicación del ADN en esas bacterias. Así se obtuvo el proceso completo a la media hora.

- Las imágenes iniciales tenían forma de V (**horquillas** de replicación), las posteriores de medias lunas (**burbujas** de replicación) y las finales de círculos aplastados (ADN bacteriano).

Este experimento volvió a confirmar la hipótesis semiconservativa y descubrió la existencia de un punto concreto como origen de la replicación del ADN bacteriano. Erróneamente se dedujo que la replicación era unidireccional, cuando se ha comprobado que es **bidireccional**.

Este hecho planteó dos dilemas : el primero, cómo la ADN-polimerasa podía sintetizar sin necesidad de cebador ; y el segundo, cómo las dos nuevas hebras de la horquilla crecían en paralelo : una de las dos debía hacerlo en sentido 3' → 5', lo cual era imposible para la ADN-polimerasa.

La solución al problema la dio el descubrimiento de los **fragmentos de Okazaki**, constituidos

por unos 50 nucleótidos de ARN y unos 1000 o 2000 de ADN. Son sintetizados por la ARN-polimerasa (tomando como molde el ADN), que no precisa cebador para empezar, y luego por la ADN-polimerasa. Luego, in moverse, tras perder su porción de ARN, pueden ser fusionados entre sí, pudiendo dar la sensación de que la nueva hebra crece en sentido $3' \rightarrow 5'$.

3. MECANISMO DE LA DUPLICACIÓN DEL ADN

• En bacterias

1. Existe una secuencia de nucleótidos en el ADN llamada "origen de la replicación", que actúa como **señal de iniciación**.
2. El proceso se inicia con la enzima **helicasa**, que rompe los puentes de hidrógeno entre las dos hebras y las separa. Luego las **topoisomerasas** eliminan las tensiones que se crean al desenrollar la doble hélice. Actúan cortando una o las dos fibras, y luego empalmándolas. También se llama **girasa**.
3. Las **proteínas estabilizadoras** (SSB) se enlazan sobre el ADN de hebra única para mantener separadas las dos hebras. Así se forma la **horquilla de replicación**.
4. El proceso es **bidireccional**, hay una helicasa actuando en un sentido y otra en el opuesto. Las dos horquillas forman las **burbujas u ojos de replicación**.
5. Interviene una ARN-polimerasa (**primasa**) que sintetiza un corto fragmento de ARN de unos diez nucleótidos (**primer**) que actúa como cebador.
6. La ADN-polimerasa III, partiendo del primer, comienza a sintetizar en sentido $5' \rightarrow 3'$ una hebra de ADN a partir de nucleótidos trifosfato. La energía necesaria para el proceso es aportada por los propios nucleótidos, que pierden dos de sus grupos fosfato. Esta hebra es de **crecimiento continuo**, ya que la helicasa no se detiene, y se llama **hebra conductora**.
7. Sobre la otra hebra, la ARN-polimerasa sintetiza unos 40 nucleótidos de ARN a unos 1000 nucleótidos de la señal de iniciación. A partir de ellos, la ADN-polimerasa III sintetiza unos 1000 nucleótidos de ADN, formándose un **fragmento de Okazaki**. Esto se va repitiendo a medida que se van separando las dos hebras patrón. Luego interviene la **ADN-polimerasa I** que retira los fragmentos de ARN y rellena los huecos con nucleótidos de ADN.
Finalmente, la **ADN-ligasa** empalma entre sí los diferentes fragmentos. Esta hebra es, pues, de crecimiento discontinuo. Como precisa que se desespiralice un segmento de unos 1000 nucleótidos, tarda más en crecer que la otra y, por ello, se la llama hebra retardada.
8. El proceso continúa así hasta la duplicación total del ADN. El crecimiento es bidireccional.

• En eucariontes

El proceso es similar al de las bacterias, pero hay alguna **diferencia** :

1. El ADN de eucariontes está fuertemente asociado a **histonas**. La hebra que sirve de patrón a la hebra conductora se queda con las histonas y ambas se enrollan sobre los octámeros antiguos. La hebra que sirve de patrón a la retardada y la retardada se enrollan sobre nuevos octámeros.
2. La **longitud** del ADN de un cromosoma eucariótico es mucho mayor que la de uno bacteriano, y dado que tiene histonas, el proceso es mucho más lento, por lo que en cada ADN de un cromosoma hay unos **100 orígenes de replicación**. Se forman unas cien burbujas de replicación y su distribución es irregular. Se activan de forma coordinada y constituyen las unidades de replicación o replicones.

3. Los fragmentos de Okazaki son más pequeños (100-200 nucleótidos) y el proceso de replicación dura unas 8 horas (en lugar de media hora).

Eduardo Montoya Marín [cc-by-nc-sa]