



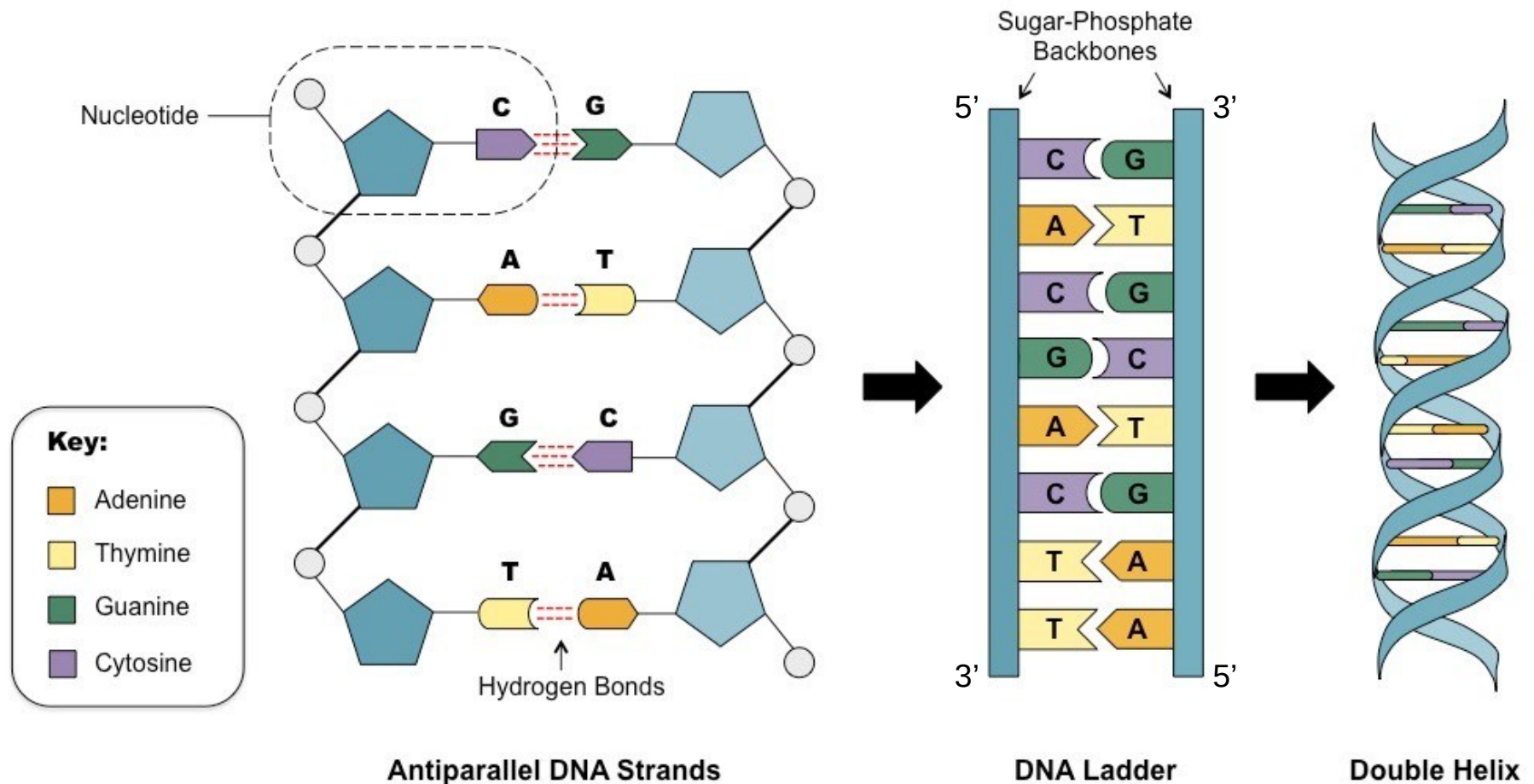
# La duplicació del DNA i la biosíntesi de les proteïnes

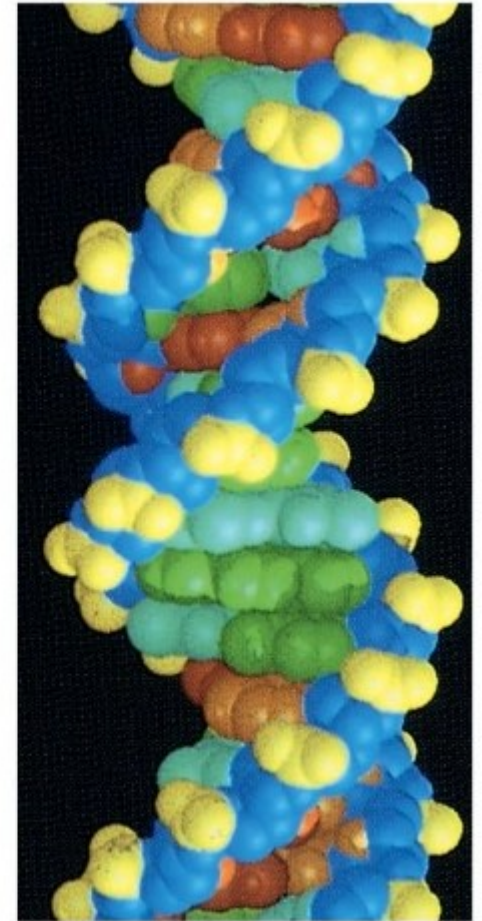
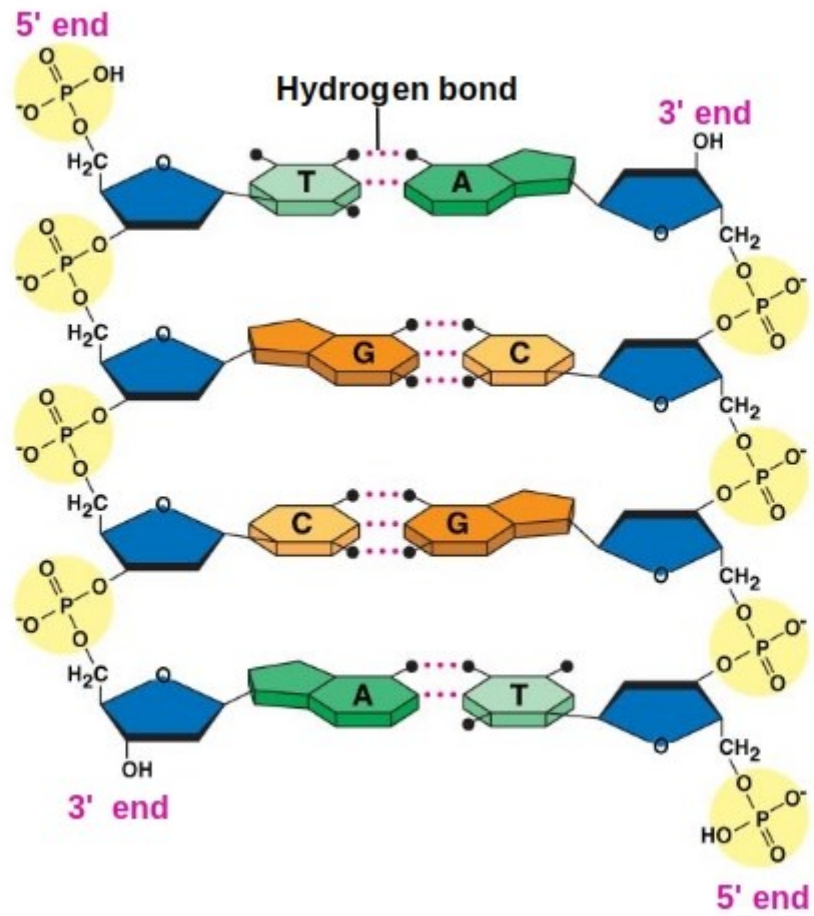
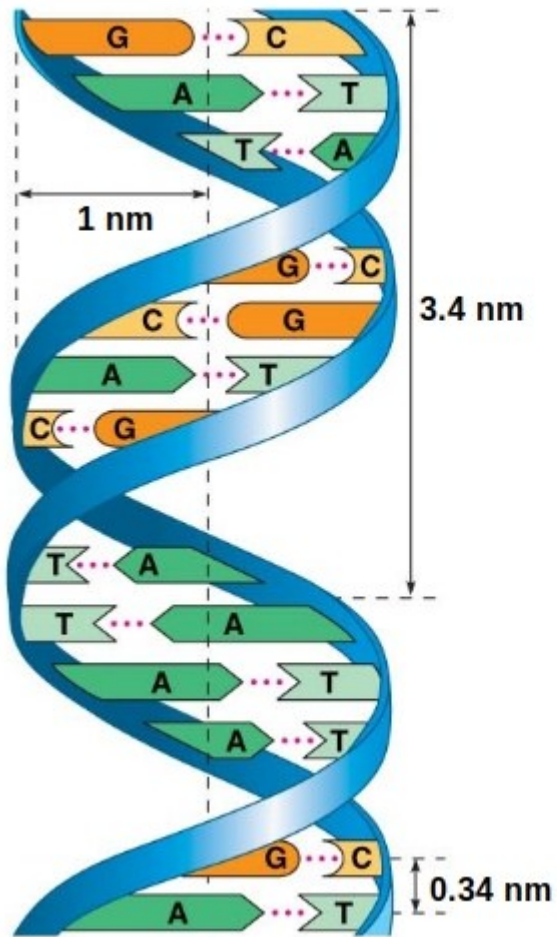
- **Introducció**
- **La duplicació del DNA.**
  - **El sentit de creixement dels nous filaments.**
  - El mecanisme de la duplicació
- La transcripció del DNA.
- La traducció o biosíntesi de proteïnes

# Introducció

El DNA és una molècula **bicatenària** en forma de **doble hèlix**.

Les dues cadenes que el formen són **antiparal·leles**, **complementàries** i es troben enrotllades de forma **plectonímica**.

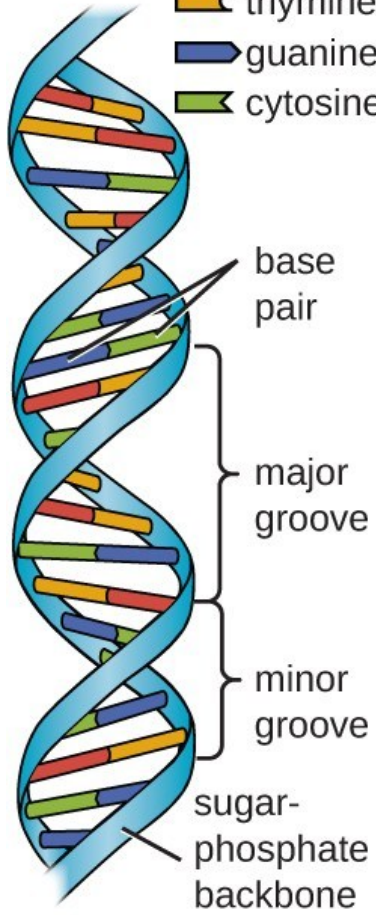




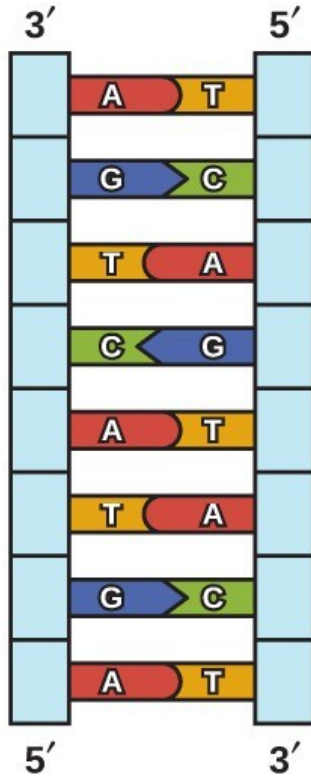


nitrogenous bases:

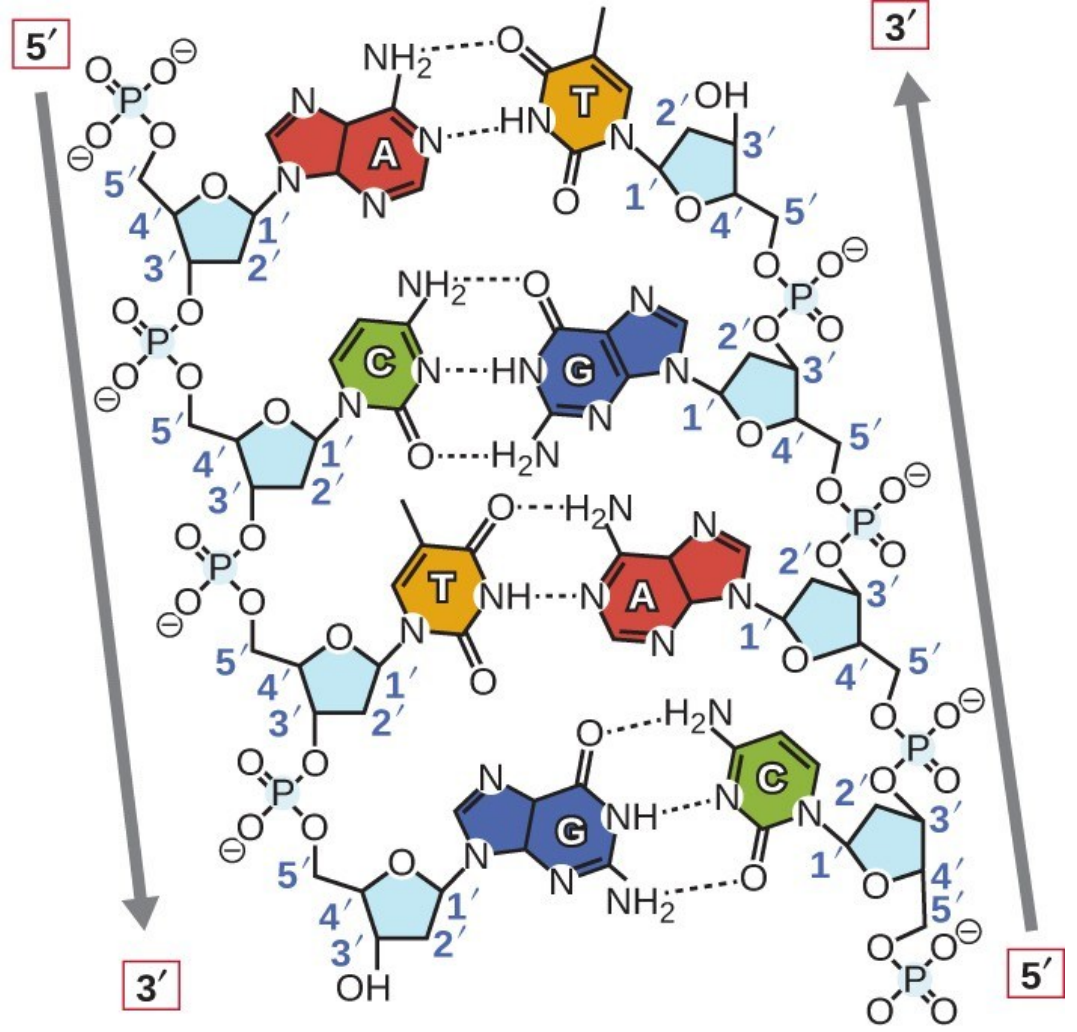
- adenine
- thymine
- guanine
- cytosine



(a)



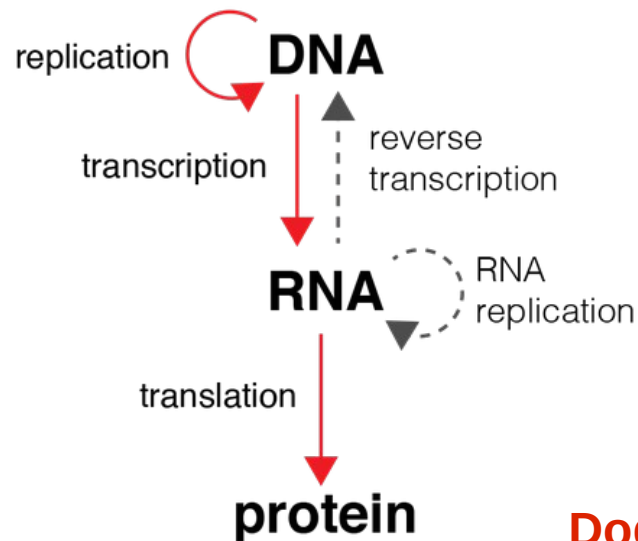
(b)



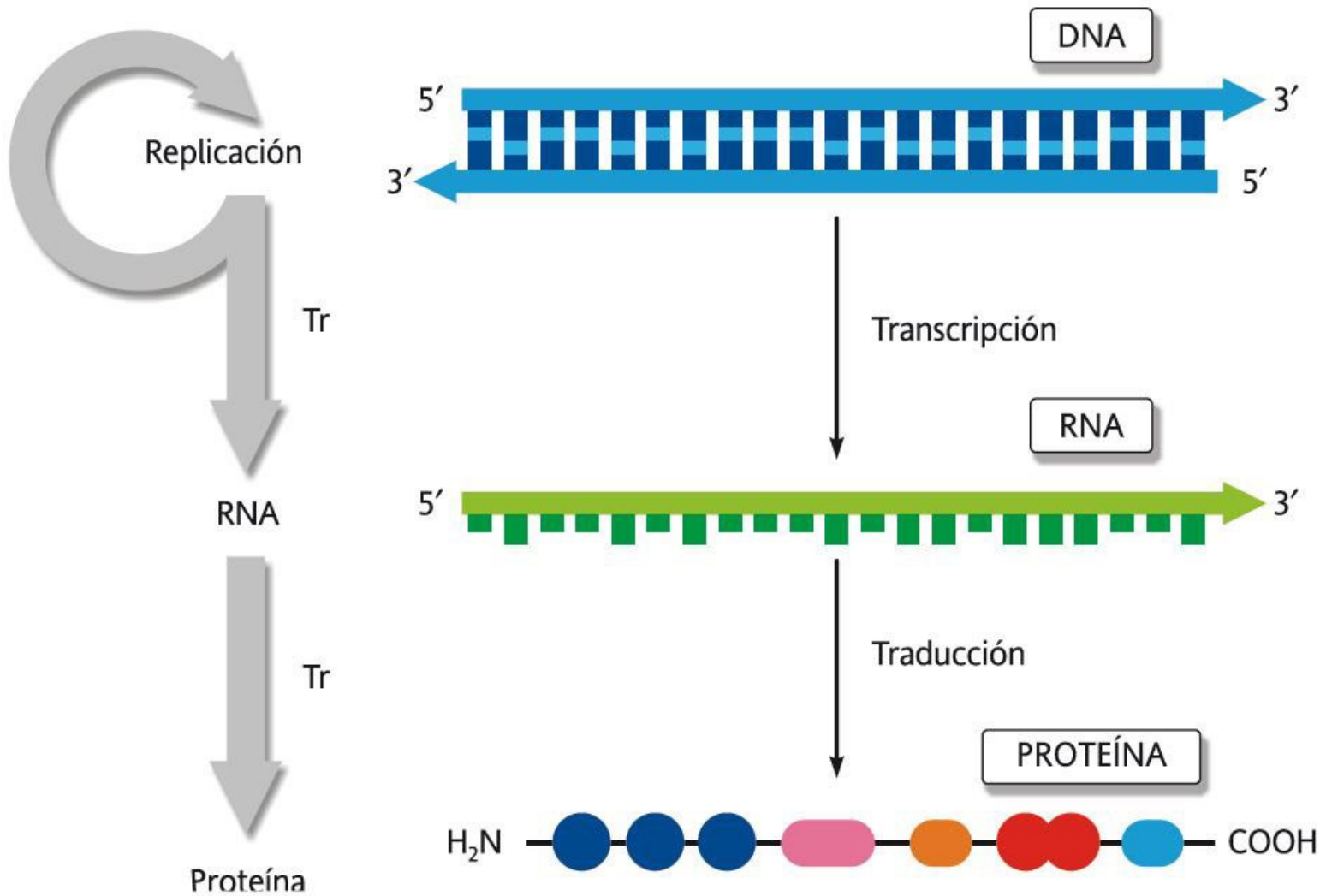
(c)

## Funcions del DNA:

- Emmagatzemar la informació genètica.
- Transmetre la informació a la descendència.  
(Replicació o duplicació)
- Expressar la informació en forma de proteïnes.  
(Transcripció i traducció)



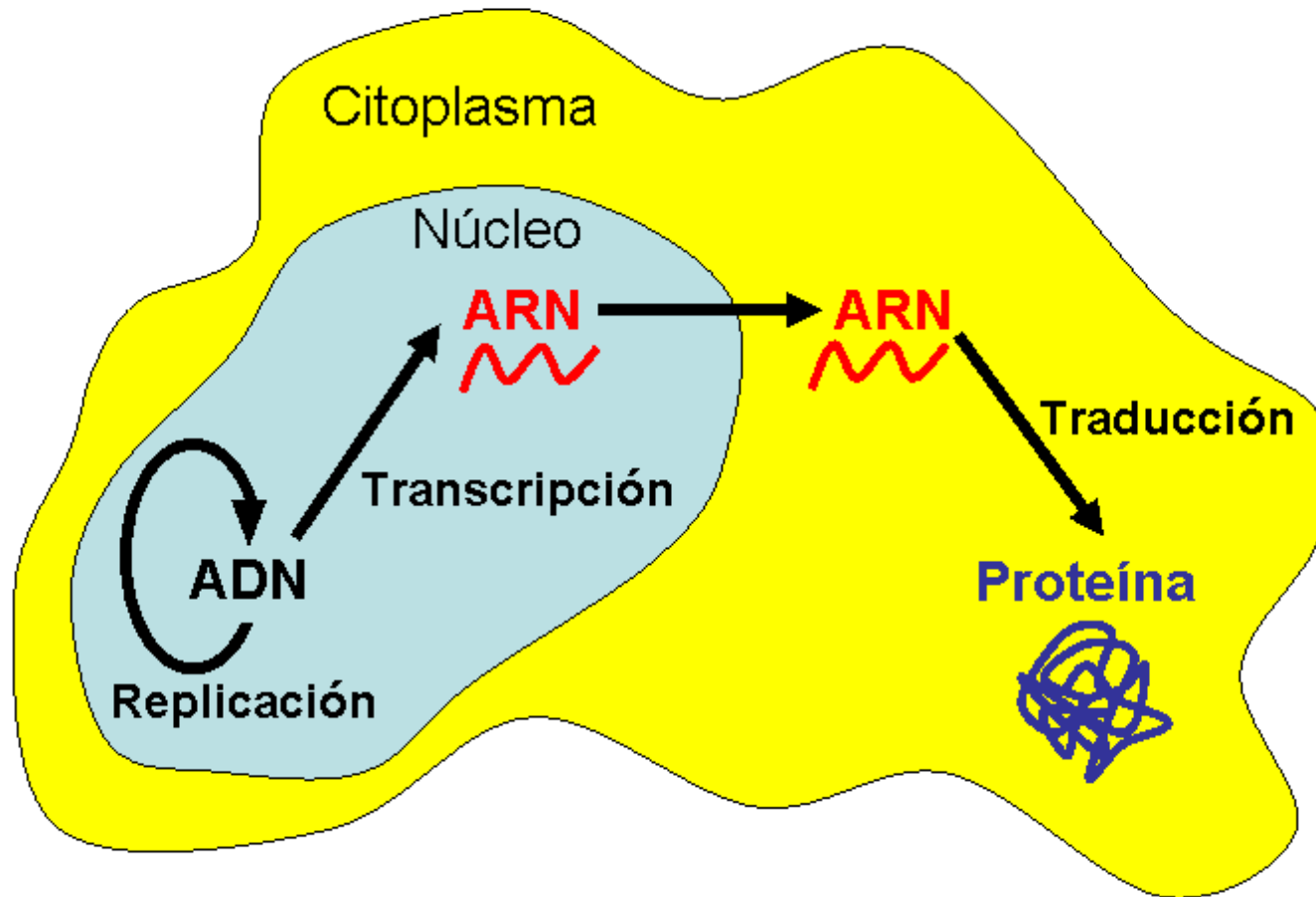
**Dogma central de la biologia molecular**



Bioquímica. Conceptos Esenciales  
 Feduchi / Romero / Yáñez / Castiñeyra / García-Hoz.  
 Editorial Médica Panamericana © 2015

**Flux de la informació genètica.** Segons el **dogma de la biologia molecular**, la informació genètica es perpetua mitjançant el procés de la replicació i s'expressa pel procés de transcripció, que produeix un RNA que serveix de motlle per sintetitzar la proteïna, que, finalment, executa la funció.

# Flux de la informació genètica en eucariotes

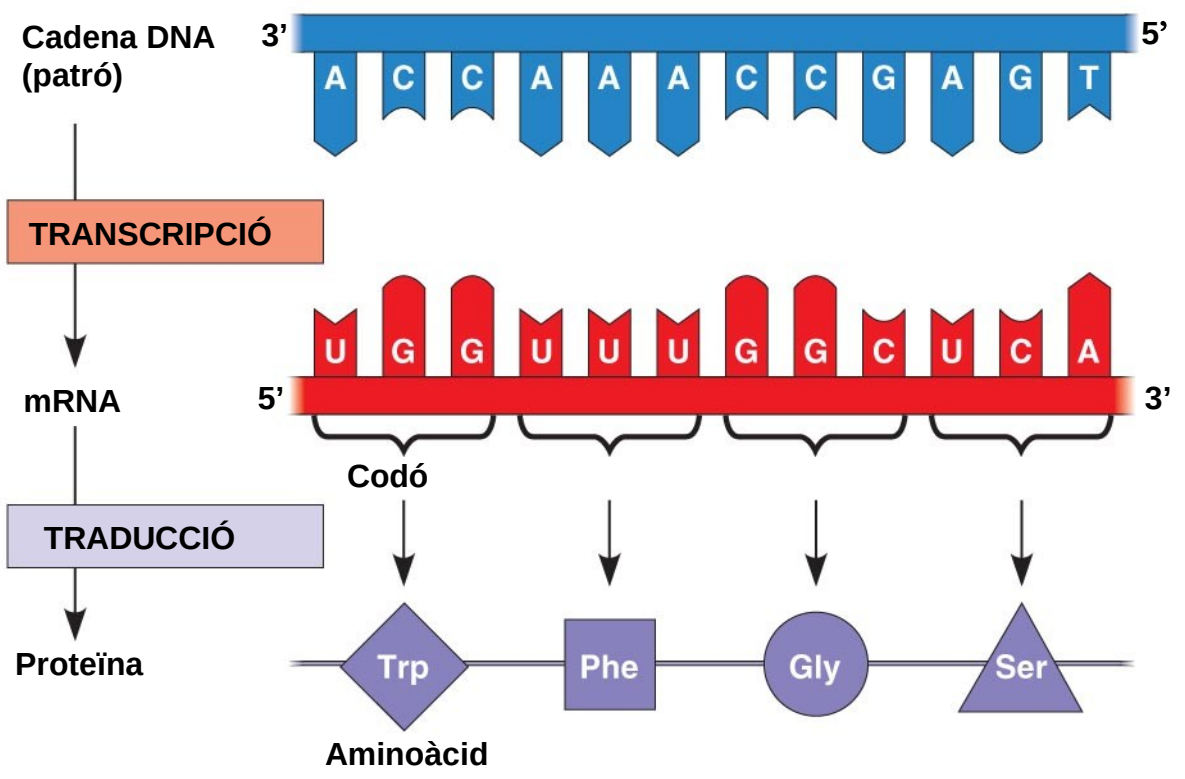
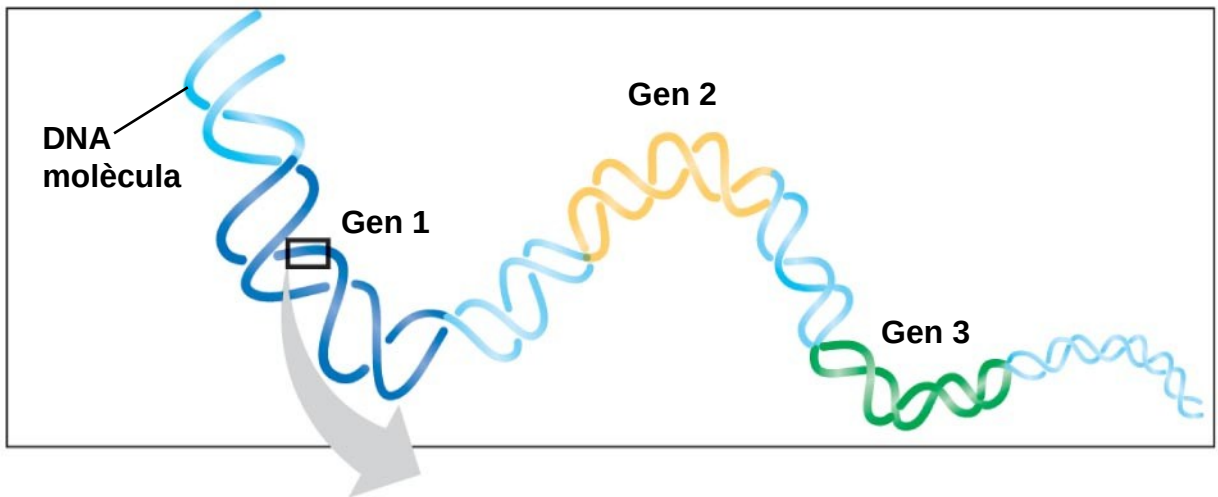


**Replicació**: Procés mitjançant el qual a partir d'una molècula de DNA se'n sintetitzen dues d'identiques.

**Transcripció**: Procés mitjançant el qual, a partir d'una molècula de DNA es sintetitza una molècula de RNA complementària d'una de les cadenes del DNA

**Traducció**: Procés mitjançant el qual, a partir d'una molècula de mRNA es sintetitza una proteïna.



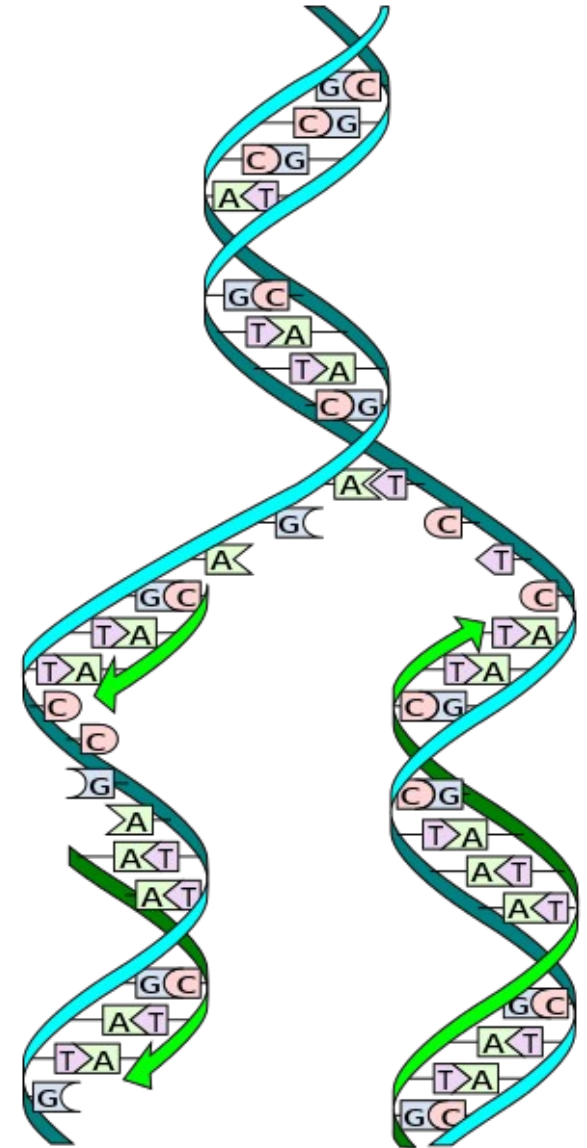


# La duplicació o replicació del DNA

Procés mitjançant el qual a partir d'una molècula de DNA de doble hèlix se'n sintetitzen dues de idèntiques.

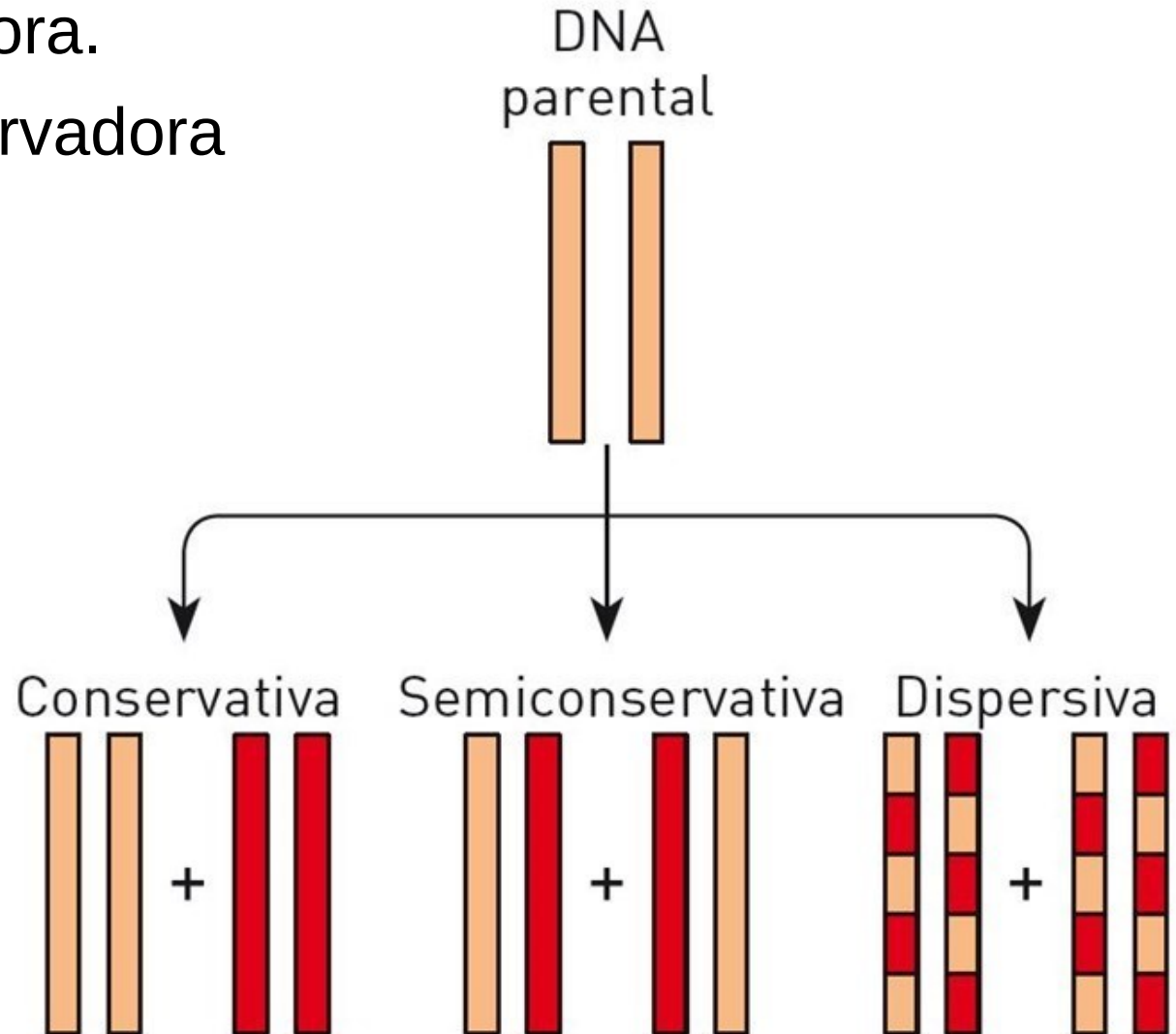
La molècula “progenitora” serveix de “motlle” per a la síntesi de la seva còpia.

La replicació té lloc necessàriament cada cop que es divideix una cèl·lula i constitueix una etapa del seu cicle de vida.



# Primeres hipòtesis sobre la duplicació del DNA

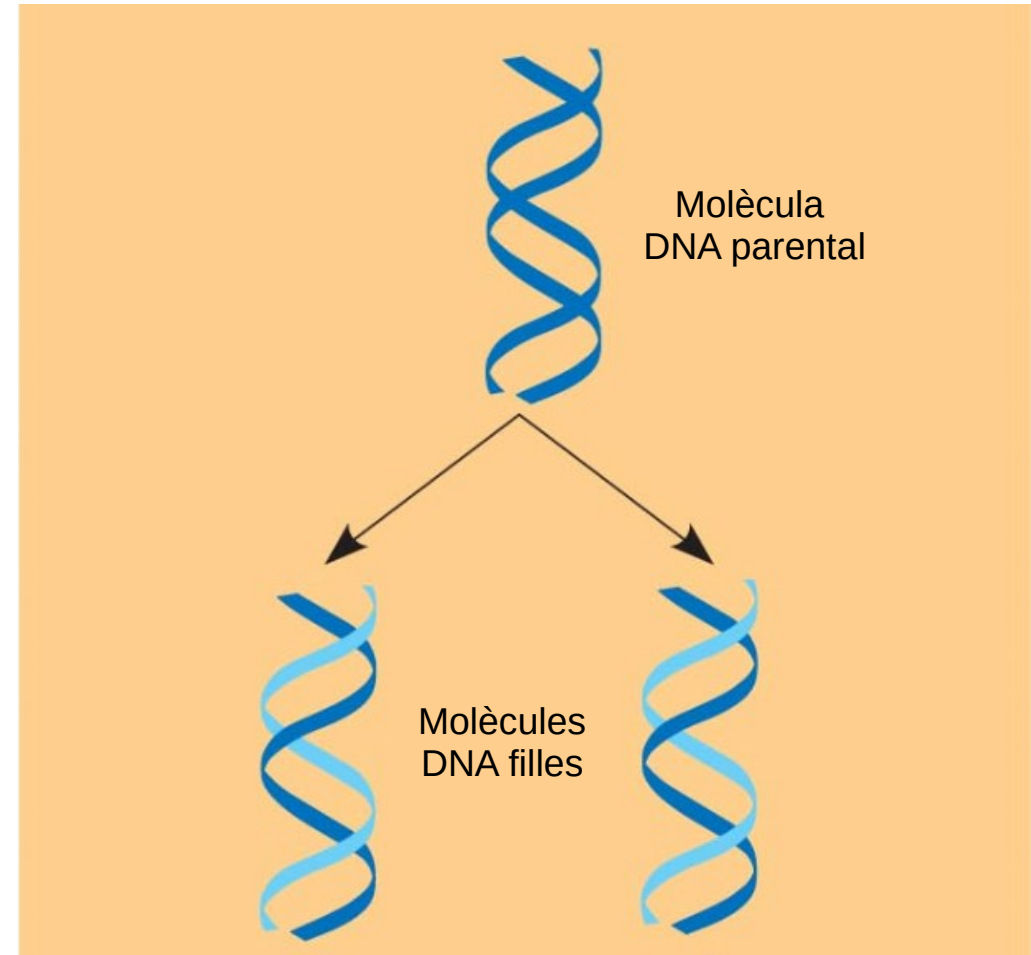
- Hipòtesi conservadora.
- Hipòtesi semiconservadora (Watson i Crick)
- Hipòtesi dispersiva.



# Hipòtesi replicació **semiconservadora**

Proposa que les dues cadenes del DNA inicial se separen i cadascuna serveix de motlle per a la síntesi d'una nova cadena.

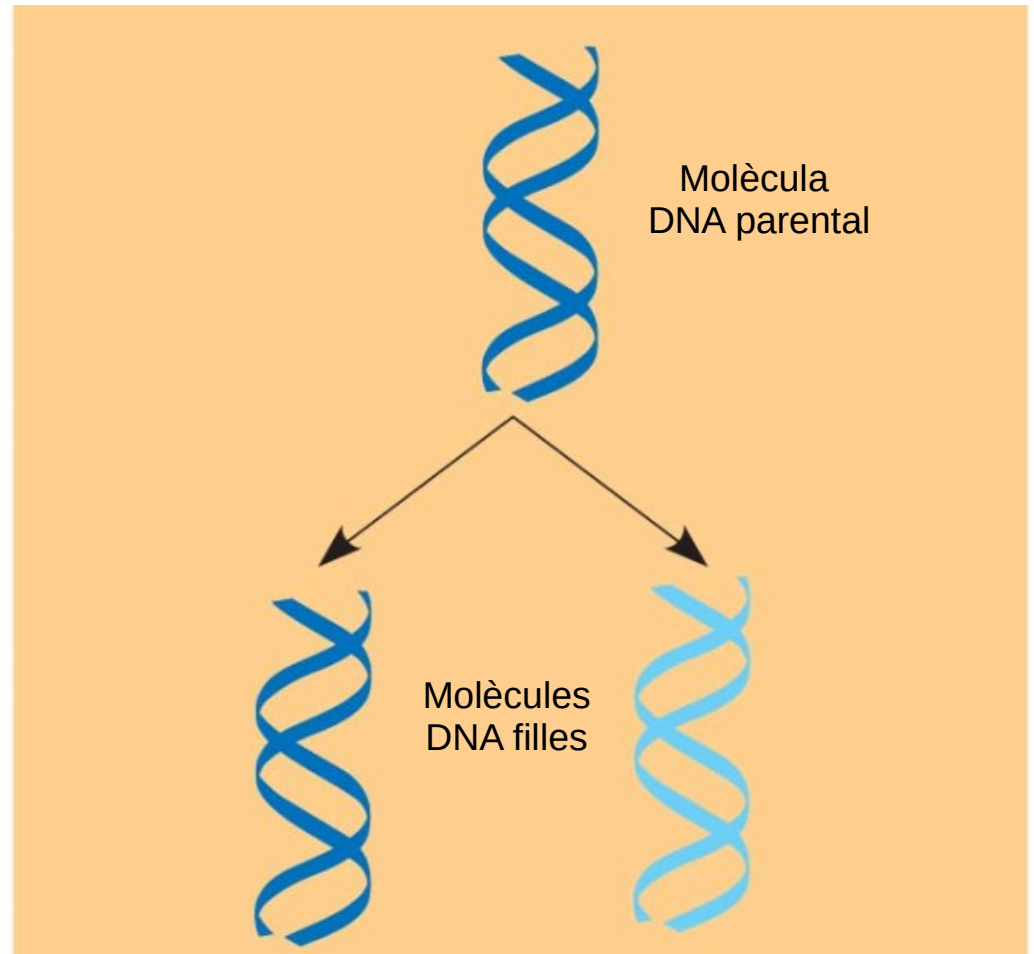
Aquesta hipòtesi es deguda als científics Watson i Crick.



Cadascuna de les molècules filles conté un filament parental i un filament de nova síntesi.

# Hipòtesi replicació **conservadora**

Proposa que després de la duplicació queden, d'una banda, els dos filaments antics junts i, de l'altra, els dos filaments nous.

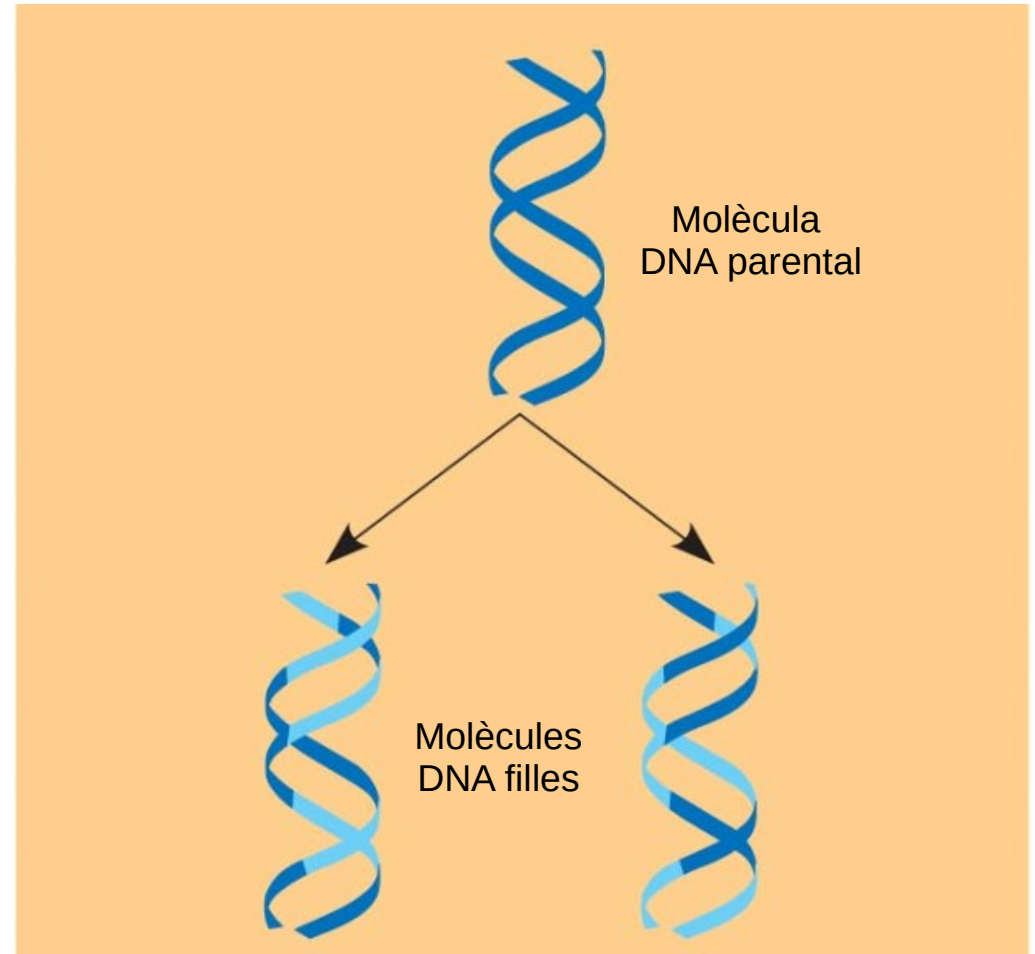


Molècula amb els dos filaments parentals. La molècula parental es conserva.

Molècula amb els dos filaments de nova síntesi

# Hipòtesi replicació **dispersiva**

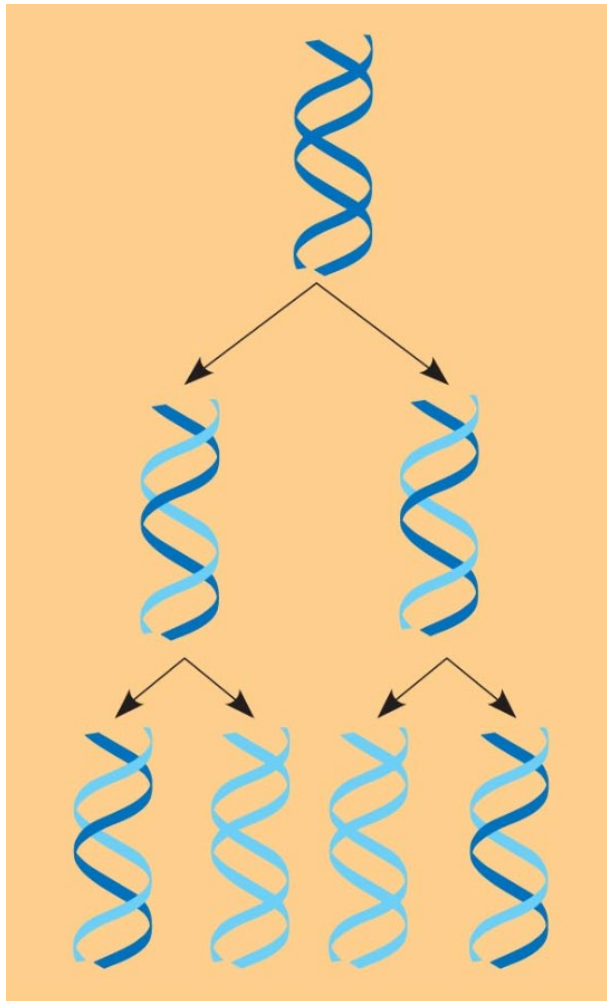
Proposa que els filaments, al final, estan constituïts per una mescla de fragments de DNA antic i de DNA acabat de sintetitzar.



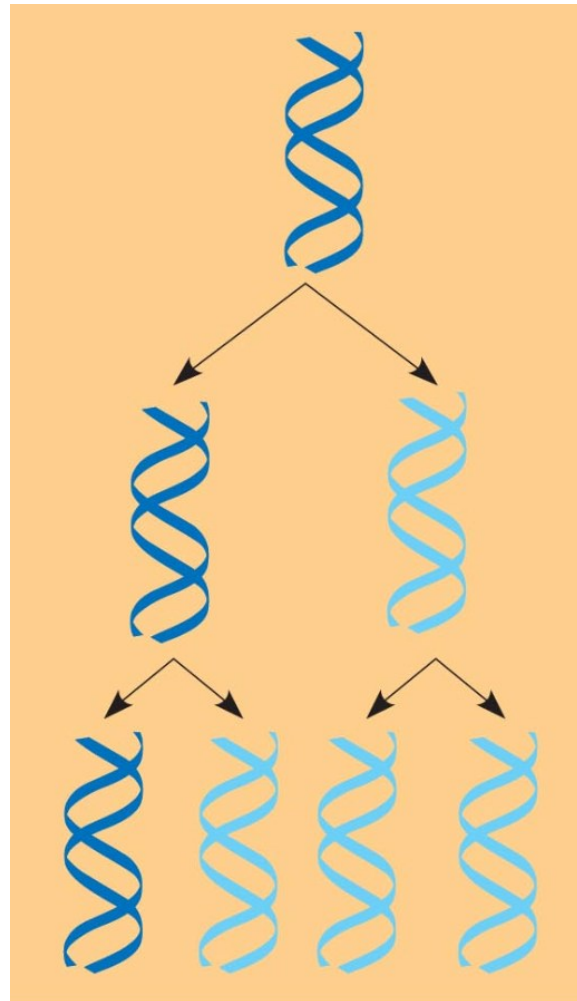
Les molècules filles estan formades per dos filaments cadascun dels quals conté segments parentals i segments de nova síntesi.



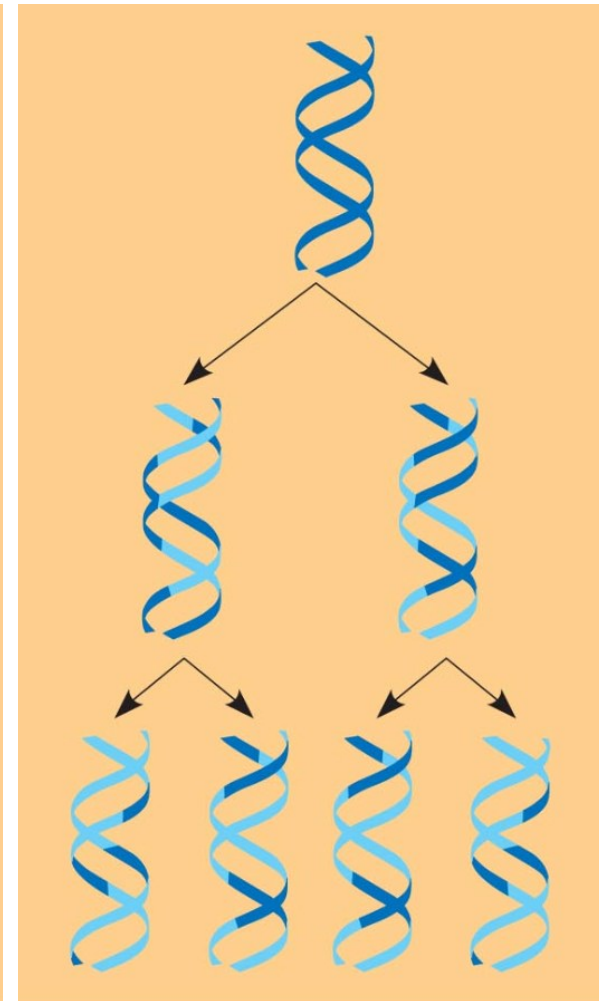
Hipòtesi semiconservadora



Hipòtesi conservadora



Hipòtesi dispersiva

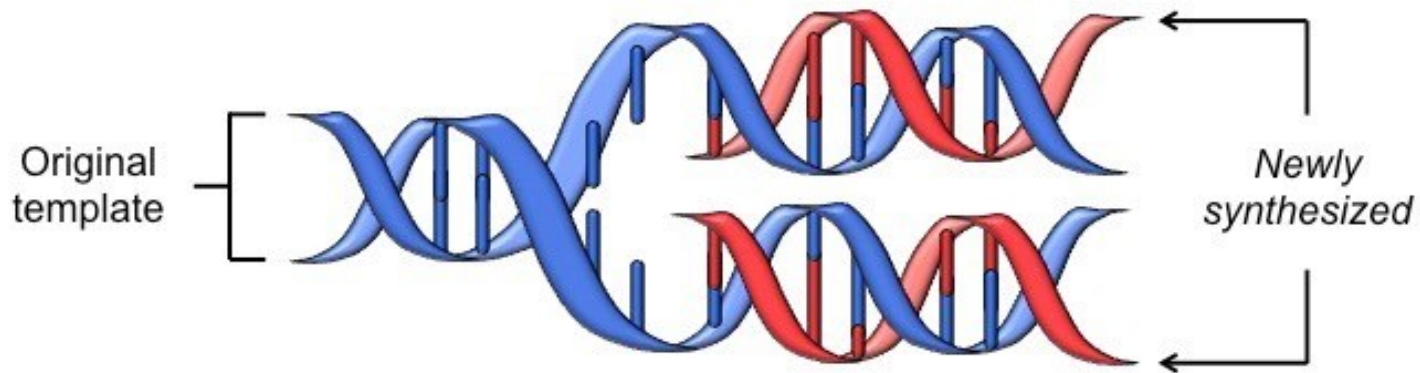


DNA parental

Molècules filles després d'un cycle de replicació

Molècules filles després de dos cycle de replicació

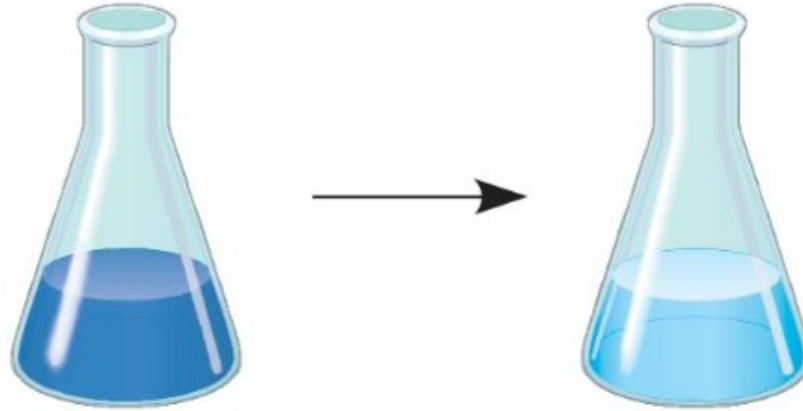
Meselson i Stahl, l'any 1957, demostren que la **hipòtesi correcta** sobre la duplicació del DNA és la **hipòtesi semiconservadora**.



**Quins experiments van fer per comprovar-ho?**

## Experiment de Meselson i Stahl

- 1** Cultiu de bacteris de *Escherichia coli* en un medi amb  $^{15}\text{N}$  (isòtop pesat del  $^{14}\text{N}$ ). Els bacteris al reproduir-se incorporen  $^{15}\text{N}$  al se DNA.



- 2** Bacteris transferits a un medi amb  $^{14}\text{N}$  (isòtop normal del nitrogen). A partir d'aquest moment el DNA nou que sintetitzen els bacteris incorpora  $^{14}\text{N}$  i per tan serà DNA més lleuger que el parental.

Cada 20 minuts, extracció de bacteris del medi que conté  $\text{N}^{14}$ , i separació del DNA que contenen per un procés de *centrifugació en un gradient de densitat*.

## Resultats

**3**



Mostra de DNA centrifugat després de 20 minuts (després d'una replicació)

**4**

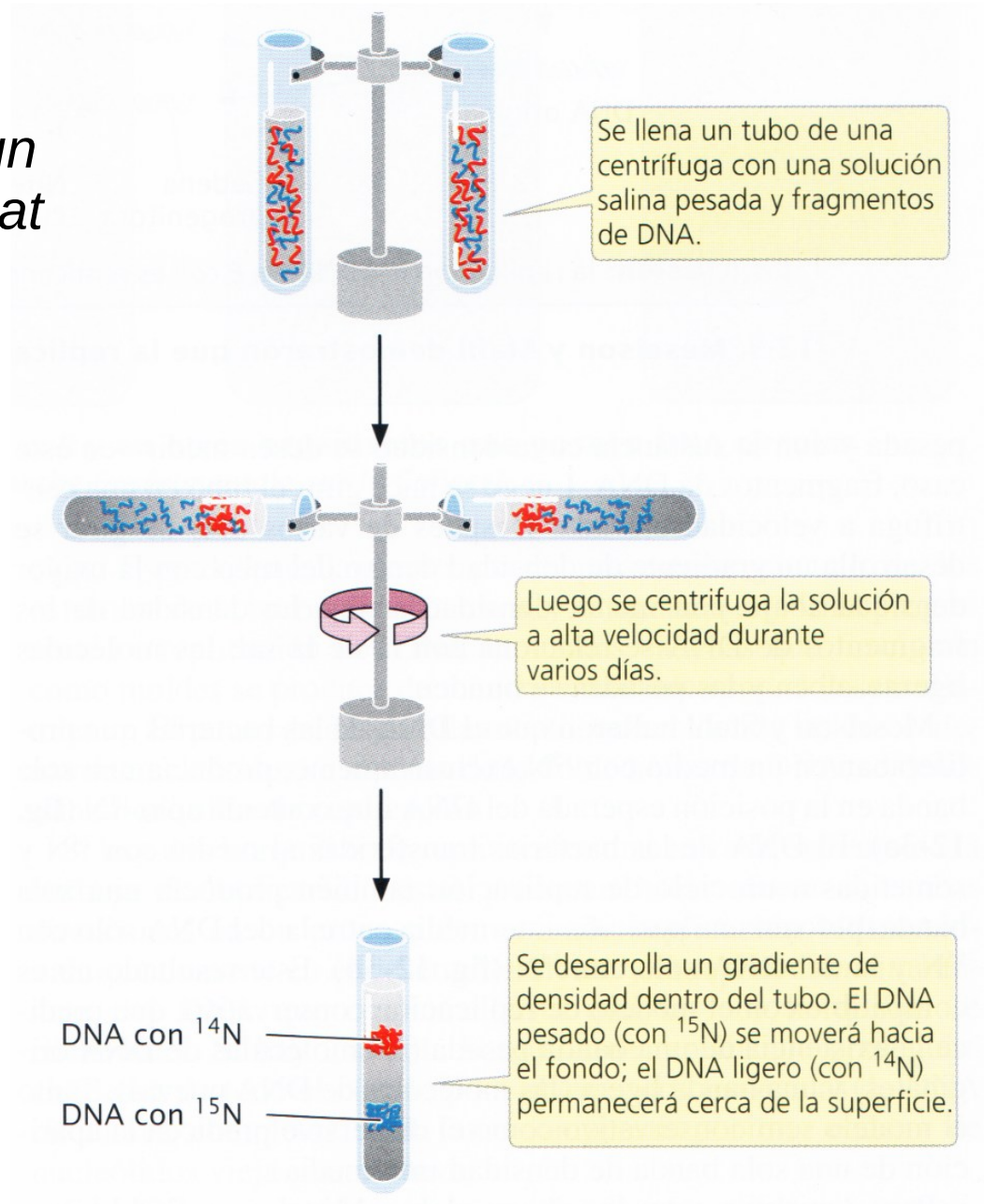


Mostra de DNA centrifugat després de 40 minuts (després de dues replicacions)

Més lleuger

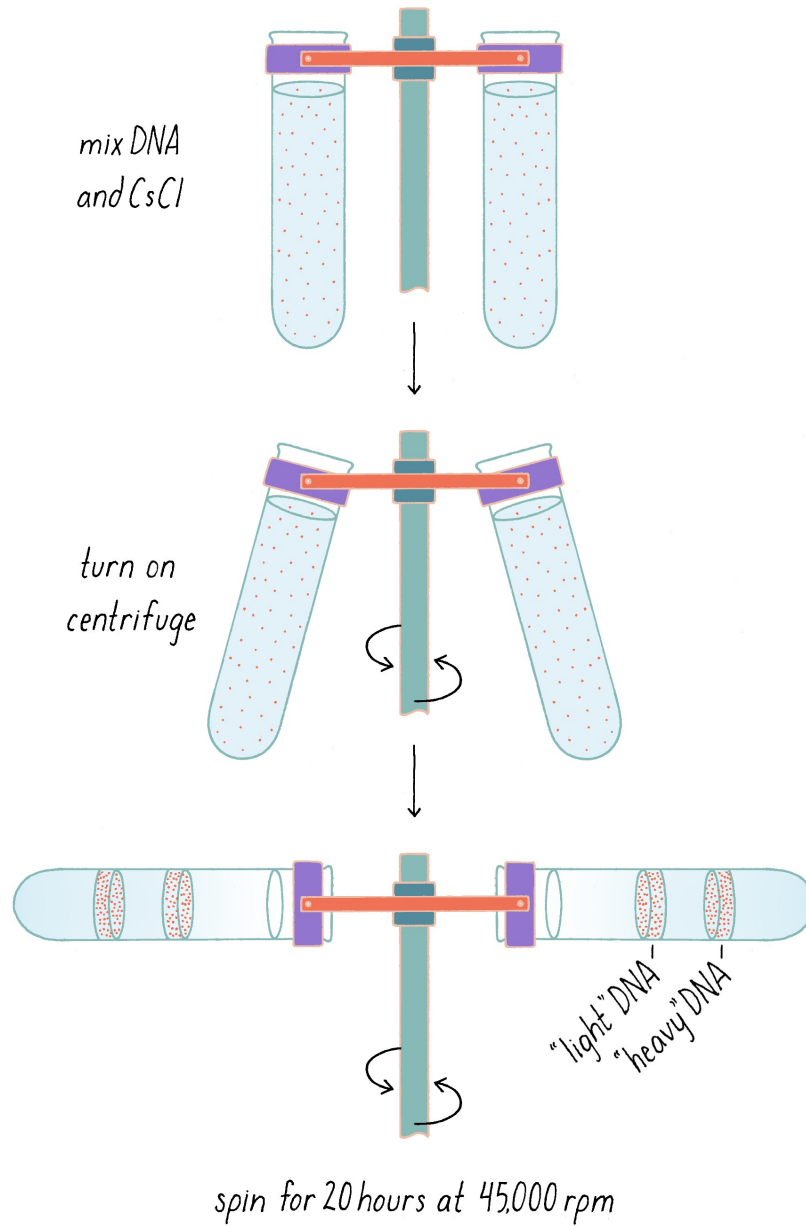
Més dens

## Centrifugació en un gradient de densitat



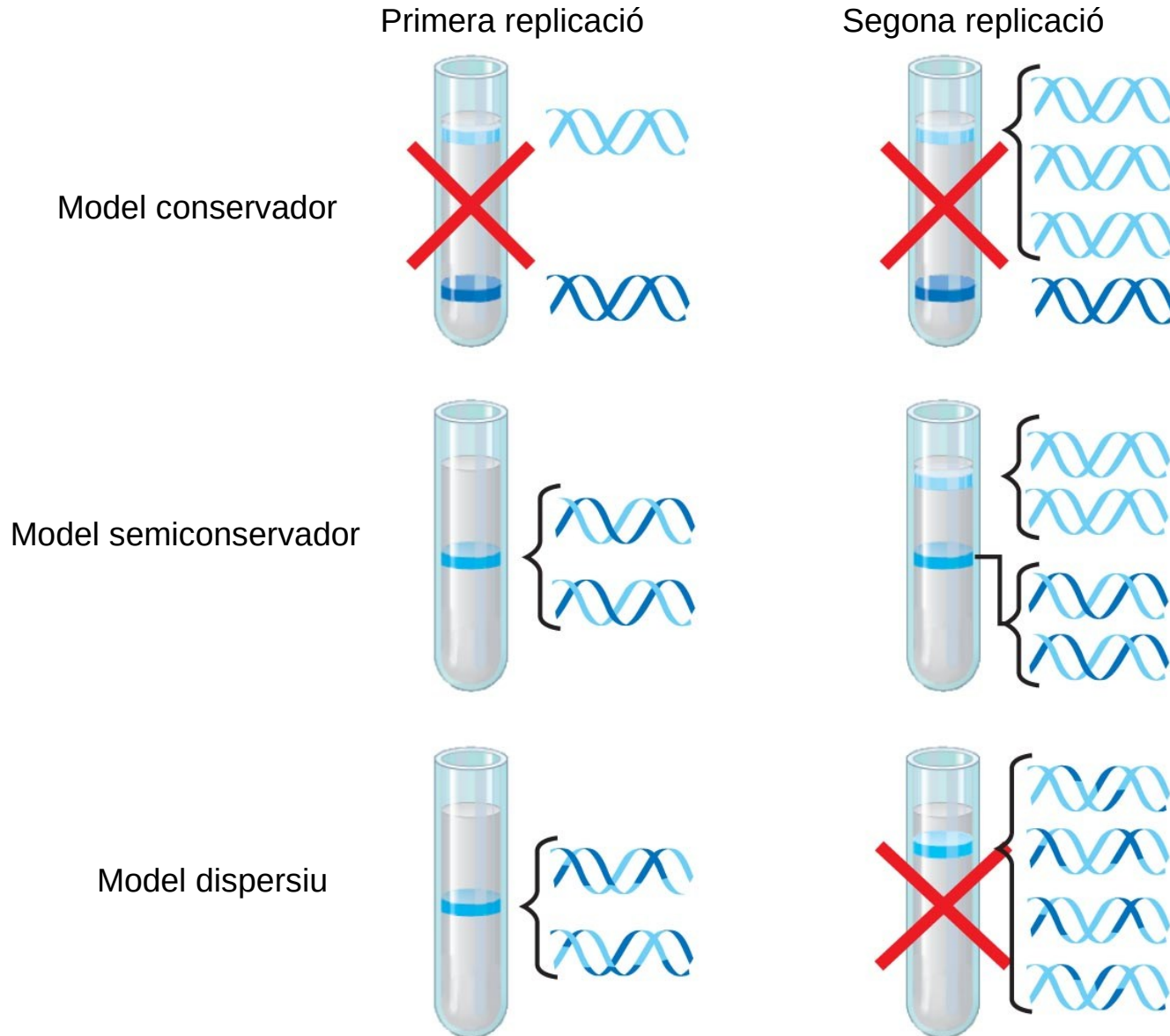
Meselson i Sthal van utilitzar la centrifugació en un gradient de densitat per distingir entre el DNA pesat carregat amb  $^{15}\text{N}$  del DNA lleuger carregat amb  $^{14}\text{N}$ .

# EQUILIBRIUM DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION



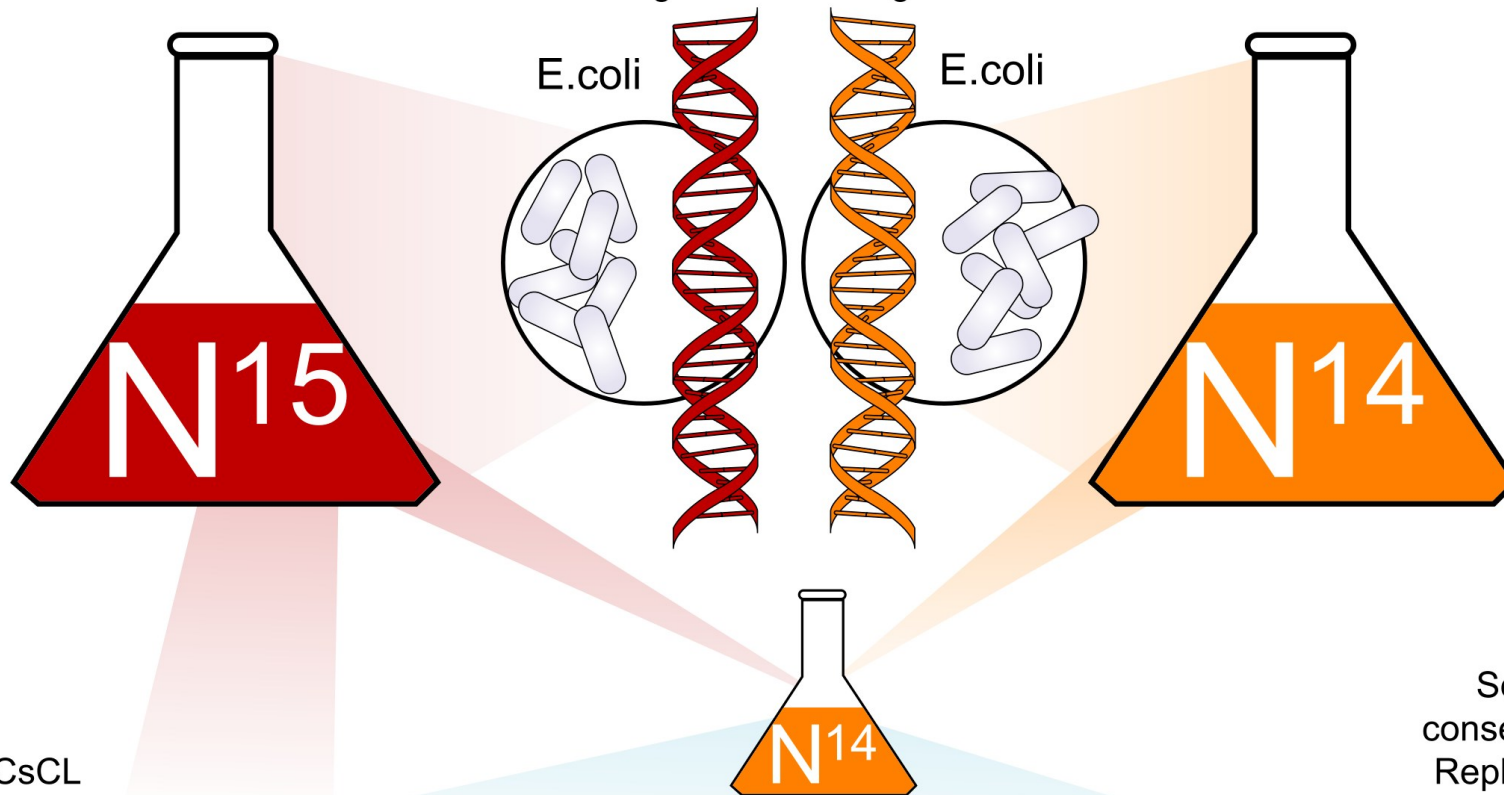
## Conclusió

Meselson i Stahl conclouen que la replicació del DNA segueix el model semiconservador al comparar els seus resultats amb les prediccions per a cadascun dels tres models.

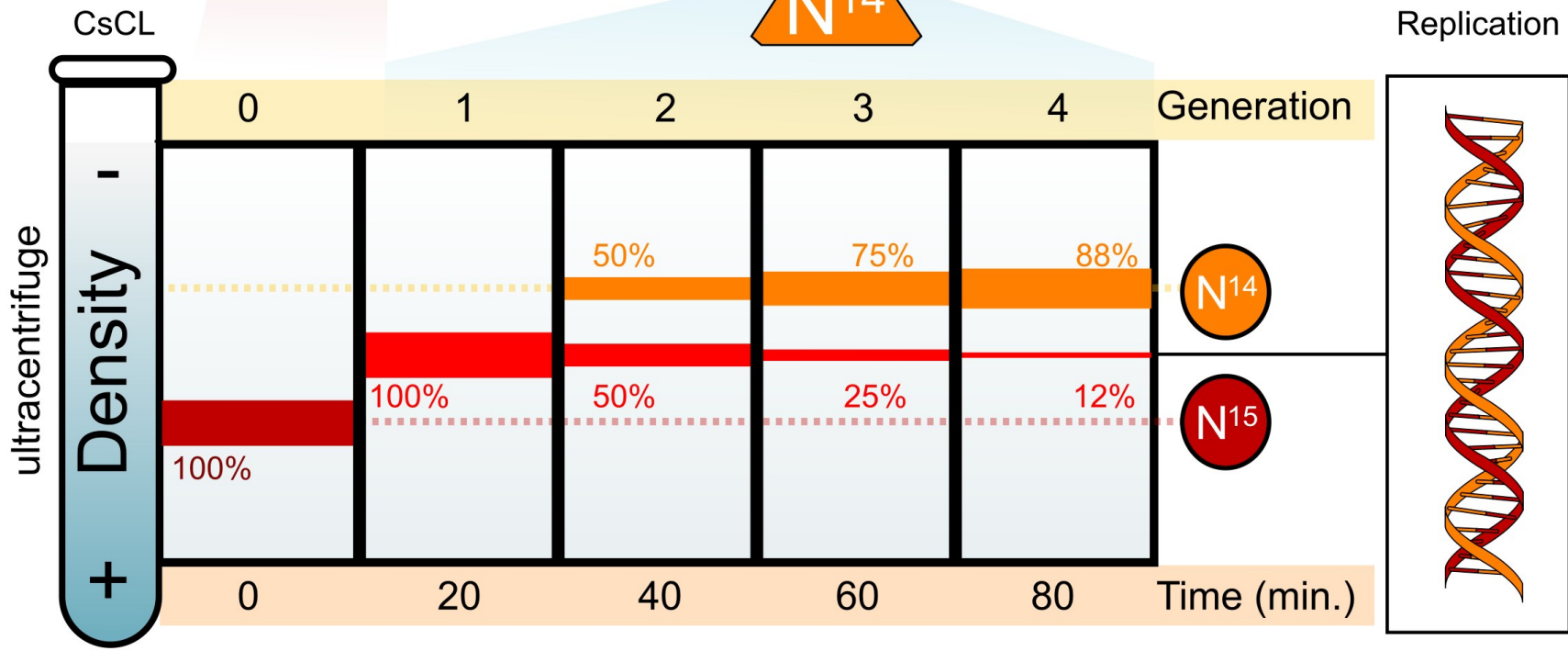




4 generations of growth



Semi-conservative Replication

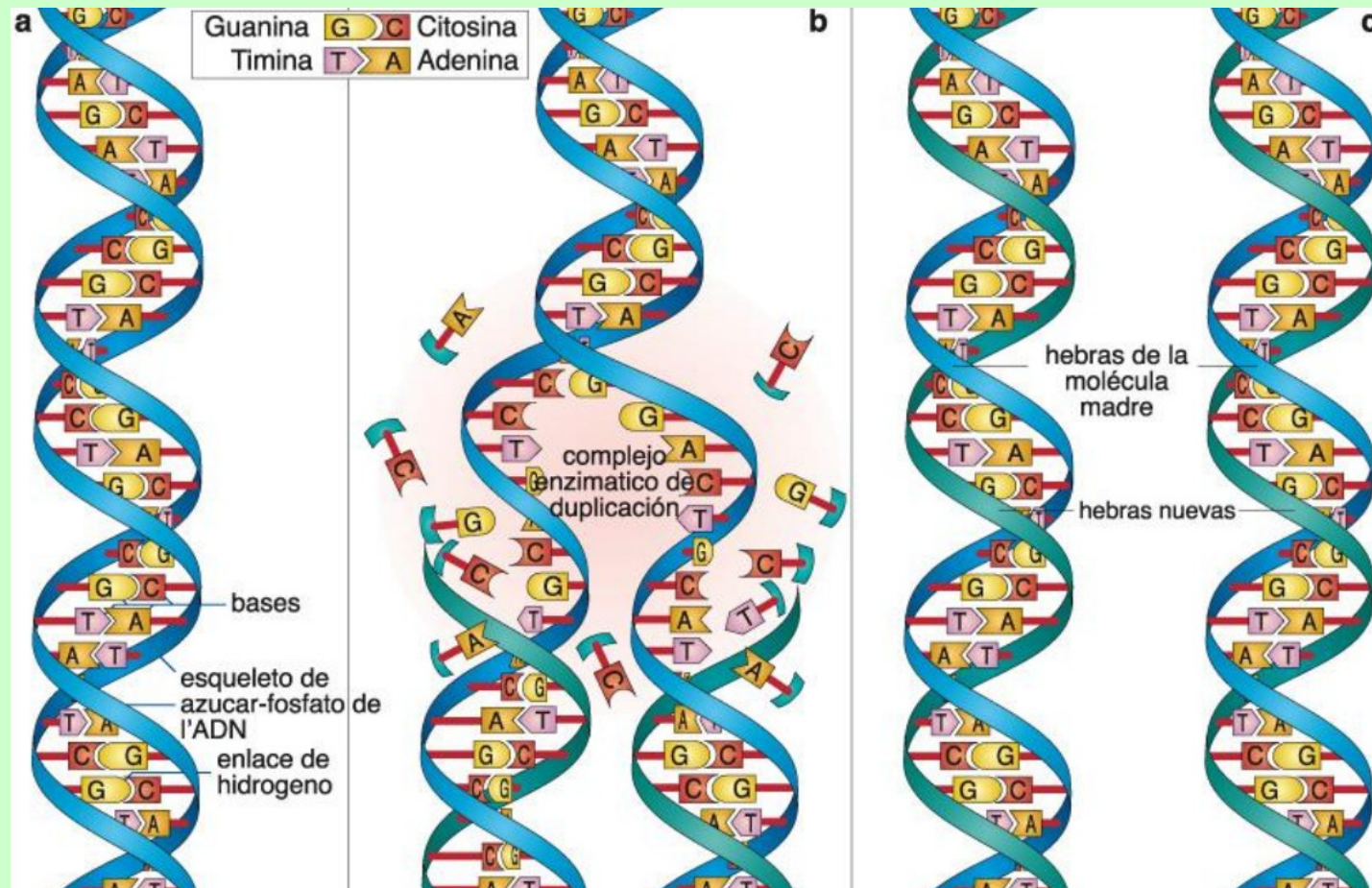


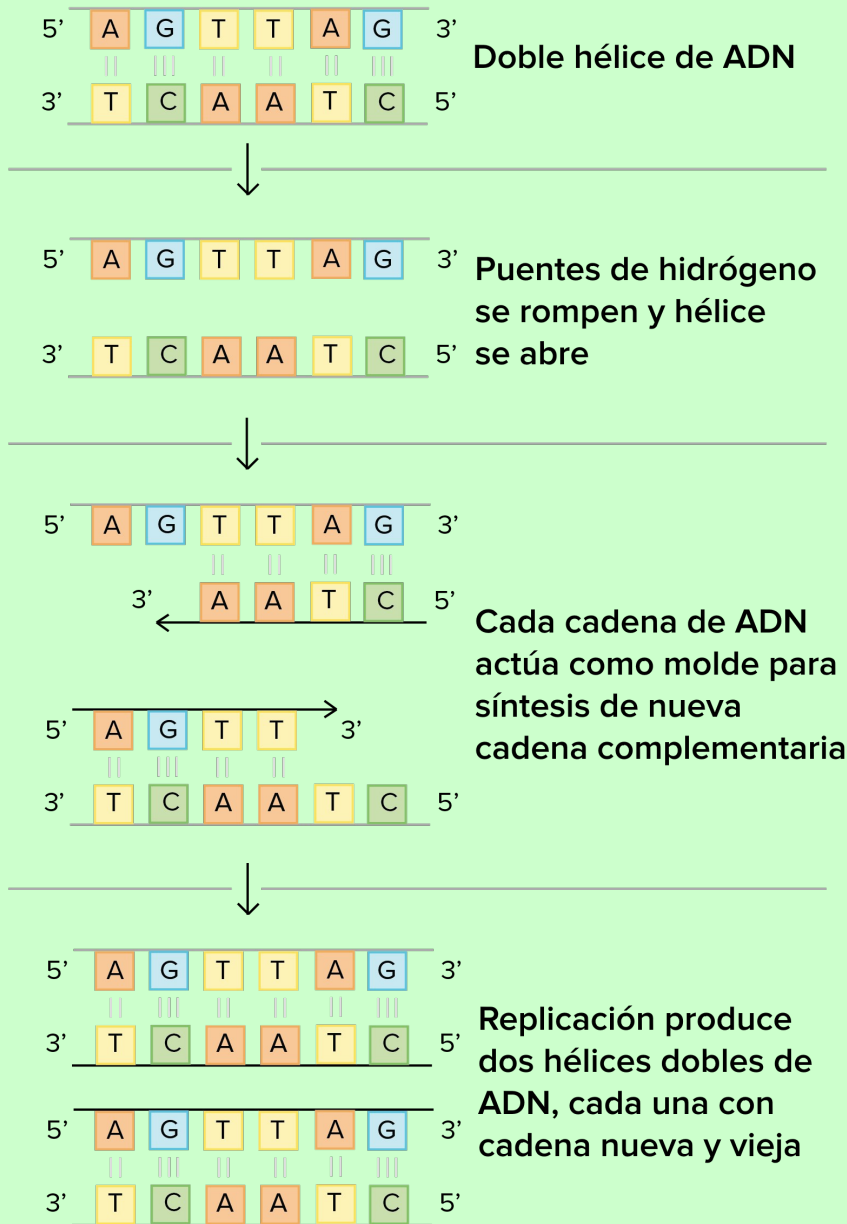
# Propietats de la replicació

- És **semiconservadora**
- Sempre comença en uns punts especials anomenats **orígens de replicació**
- És **bidireccional**
- Té lloc en **sentit 5' → 3'**
- És **semidiscontínua**

- La replicació és **semiconservadora**.

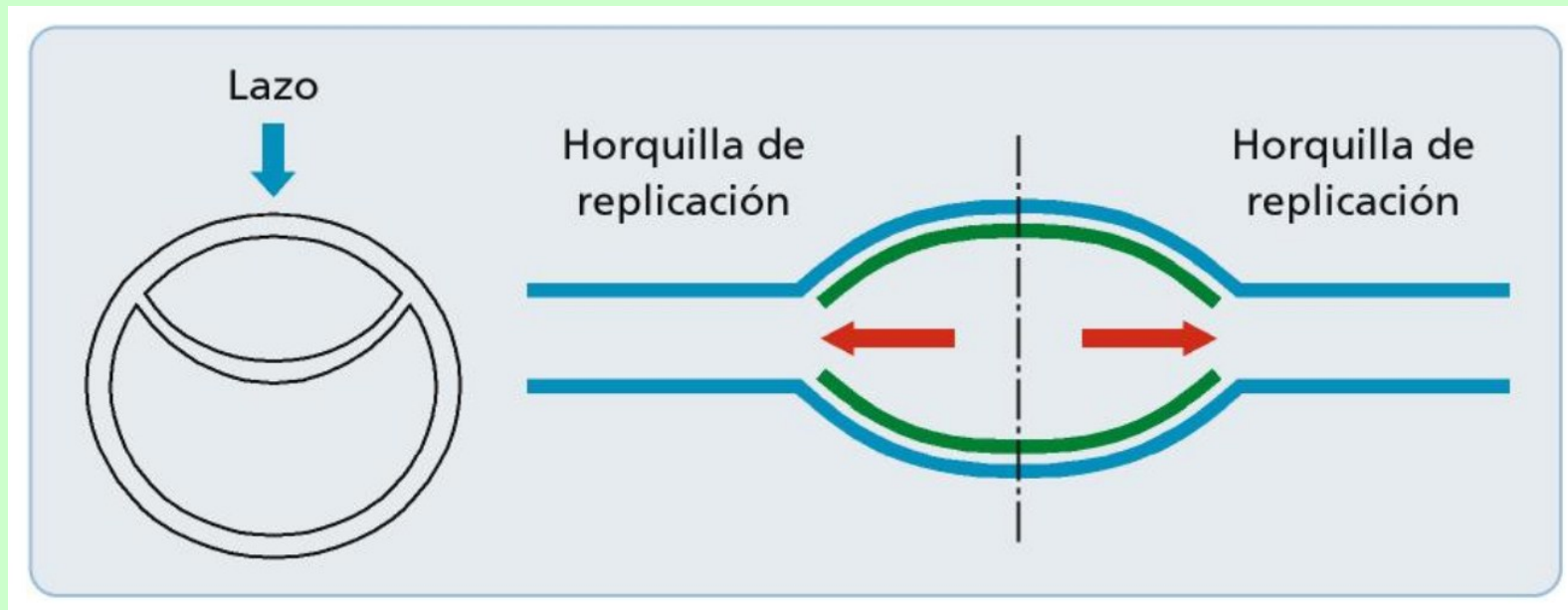
En la duplicació del DNA, les dues cadenes inicials se separen i cadascuna serveix de motlle per a la síntesi, segons la complementarietat de bases nitrogenades, d'una nova cadena.





La replicación del ADN es semiconservativa, lo que significa que cada cadena de la doble hélice del ADN funciona como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

- La replicació comença en uns llocs concrets anomenats **orígens de replicació**. *En bacteris*, hi ha *un únic origen* de replicació. *En eucariotes*, hi ha *molts orígens* de replicació. L'origen de replicació presenta una seqüència de nucleòtids específica. Els enzims que inicien la replicació reconeixen aquesta seqüència, es fixen al DNA i separen les dues cadenes obrint una bombolla de replicació.
- La replicació és **bidireccional**. A partir de l'origen de replicació, la duplicació avança en els dos sentits fins a completar-se la còpia de tot el DNA.

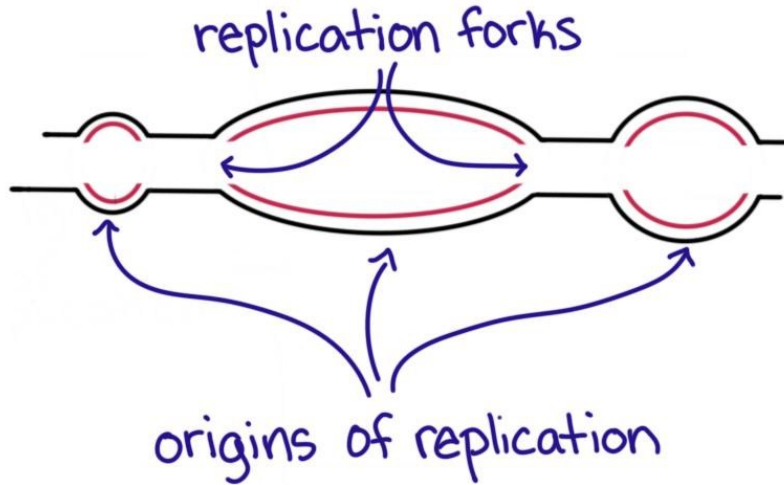


Les dues cadenes de DNA es repliquen al mateix temps a partir de l'origen de replicació. En aquest punt els filaments se separen i es forma una estructura anomenada bombolla de replicació ("lazo" en la imatge) els extrems de les qual s'anomenen forquetes de replicació ("horquilla de replicación" en la imatge).



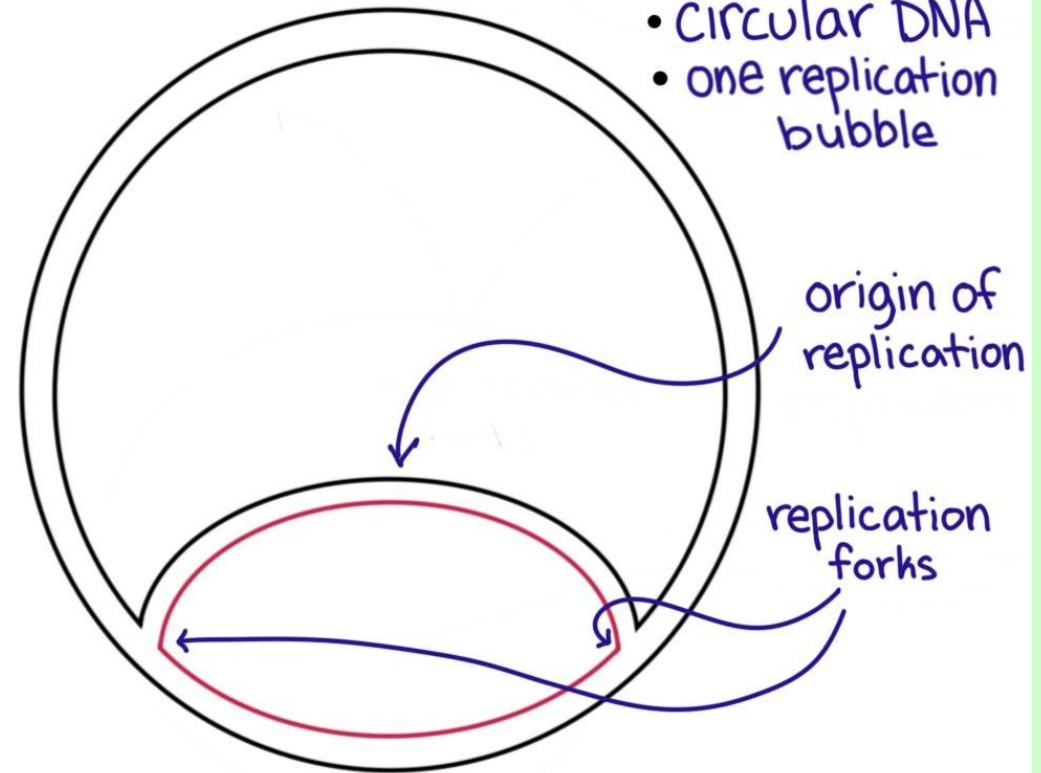
# eukaryotic

- linear DNA
- multiple replication bubbles



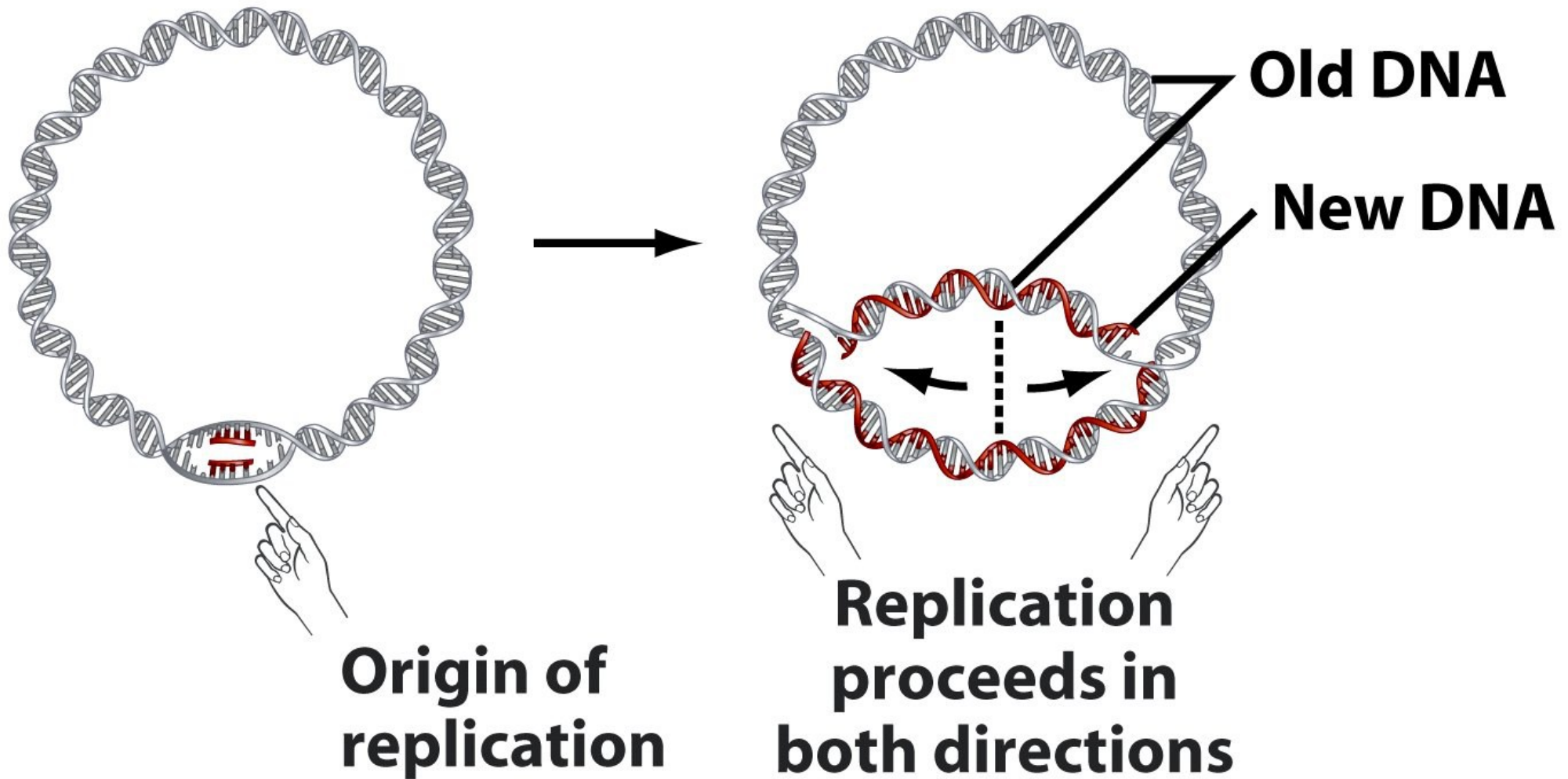
# prokaryotic

- circular DNA
- one replication bubble





# Bacterial chromosomes have a single point of origin.



## (a) Origin of replication in an *E. coli* cell

Origin of replication

Double-stranded DNA molecule

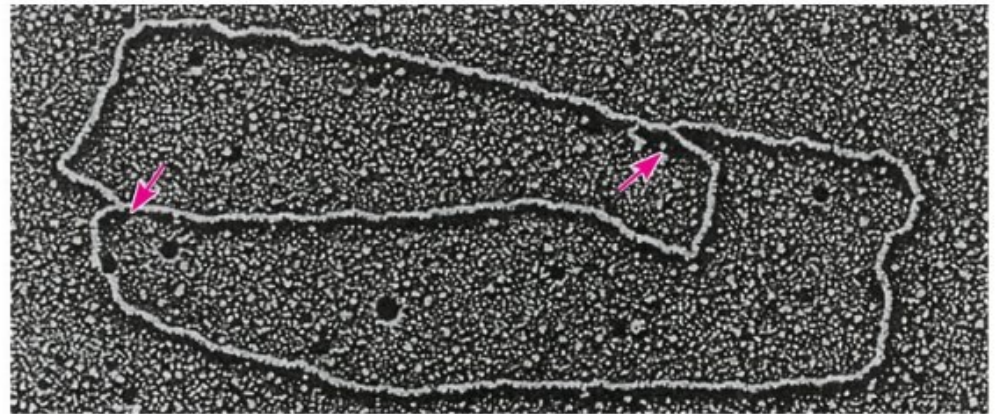
Parental (template) strand

Daughter (new) strand

Replication bubble

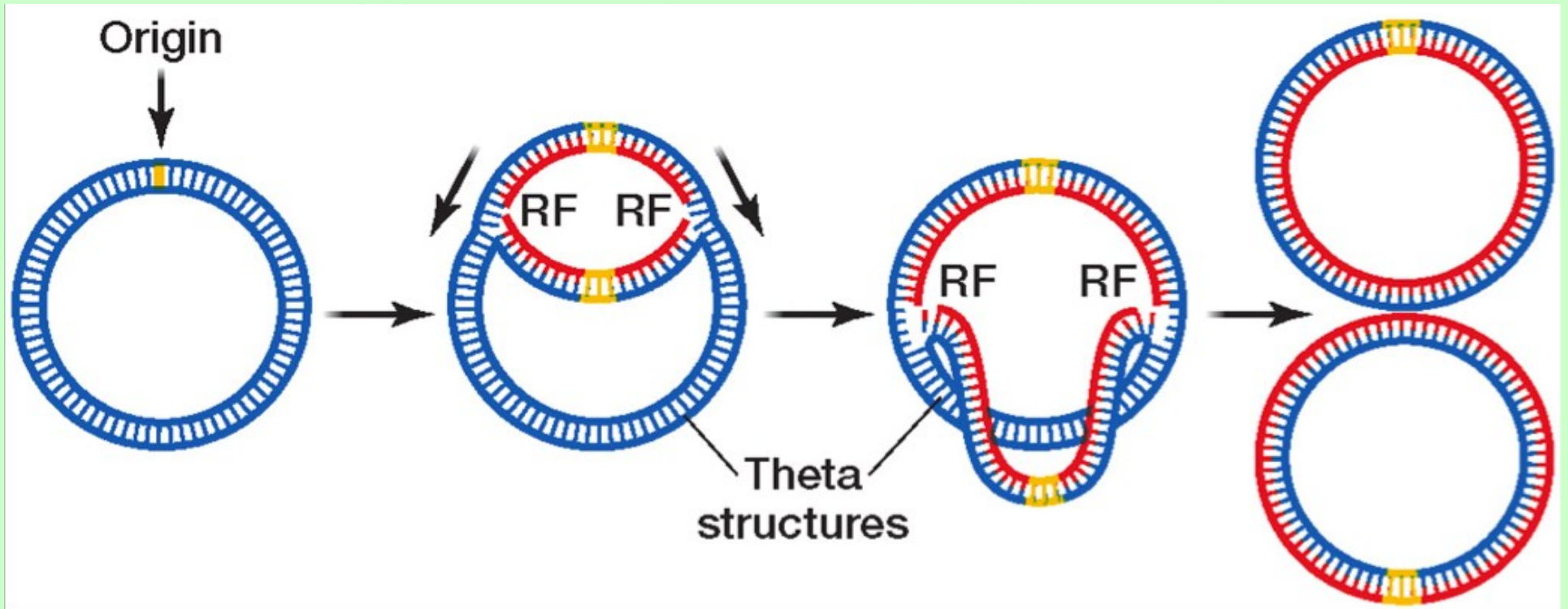
Replication fork

Two daughter DNA molecules

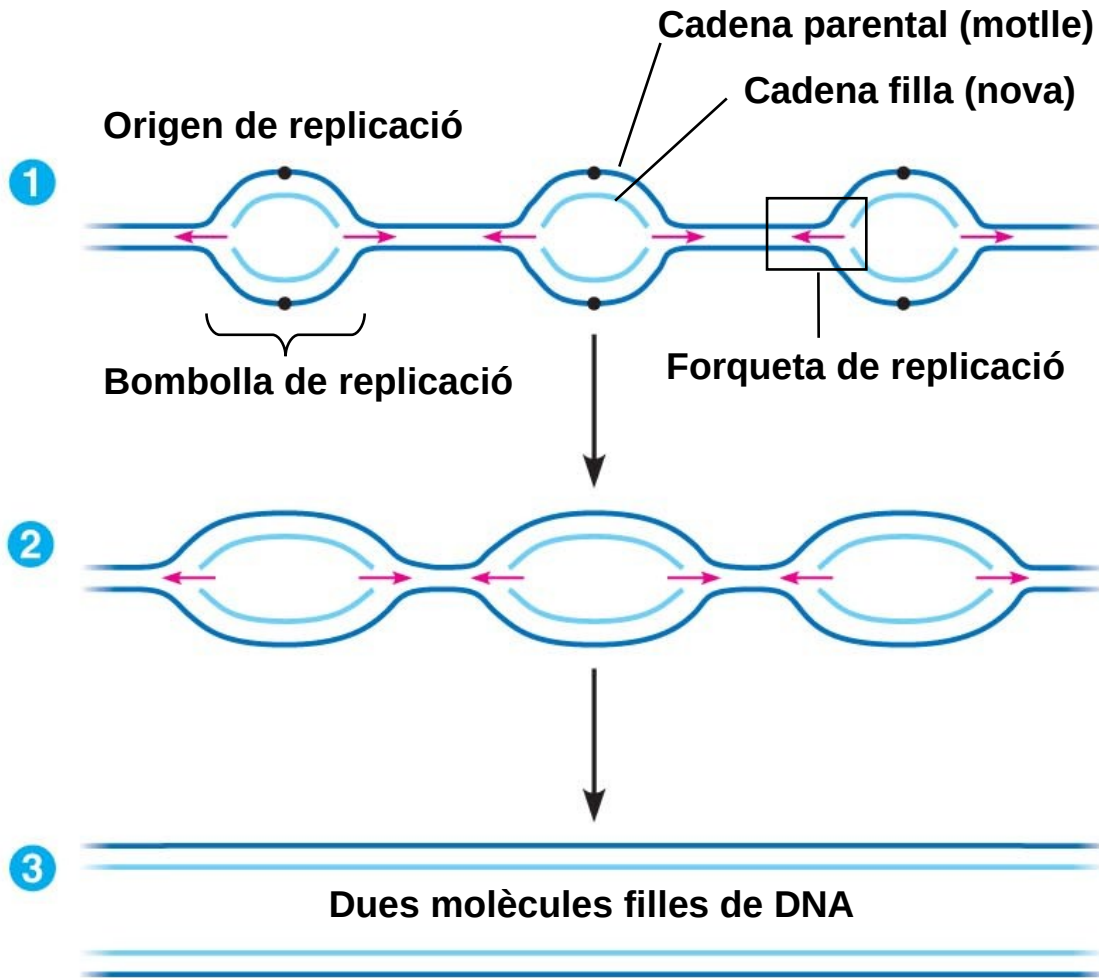


0.5  $\mu\text{m}$

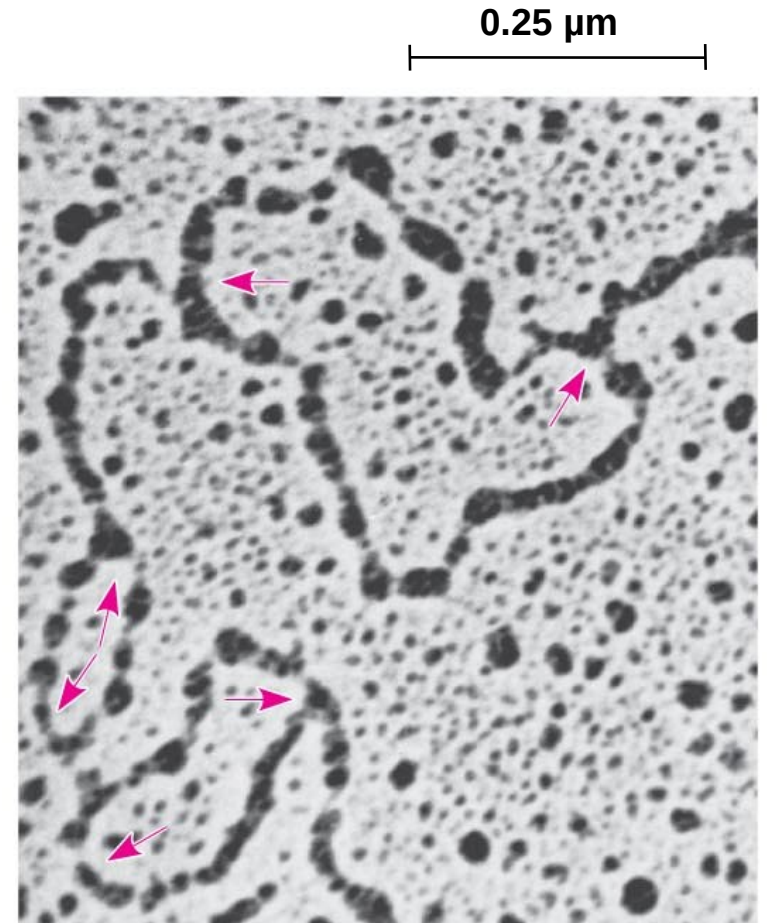
En cèl·lules procarïotes la replicació té lloc de forma bidireccional a partir d'un únic origen de replicació. El DNA procarïota és circular.





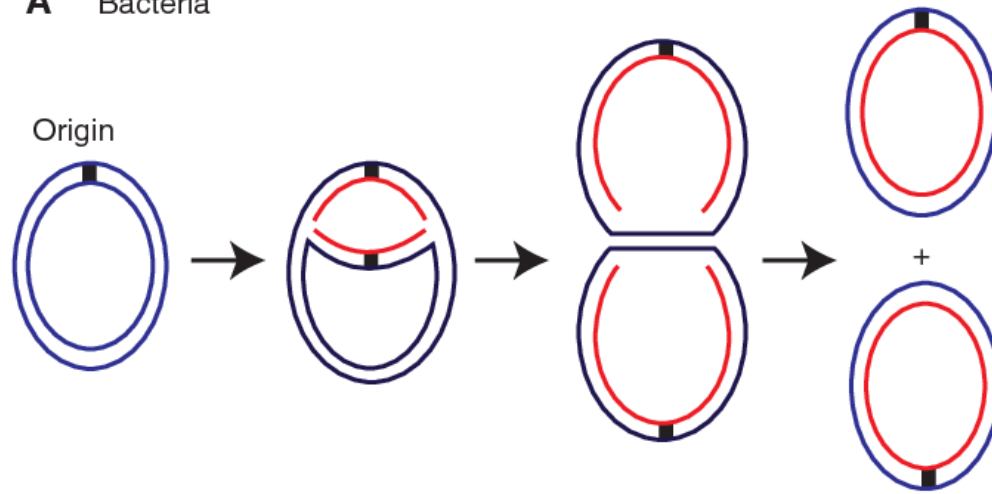


**(a)** Els eucariotes presenten centenars o milers d'òrgens de replicació. Les cadenes parentals s'obren i formen les bombolles de replicació. Aquestes s'estenen lateralment a mesura que progressa la replicació en totes dues direccions. Les bombolles acaben fusionant-se i es completa la replicació. El DNA eucariota és lineal.

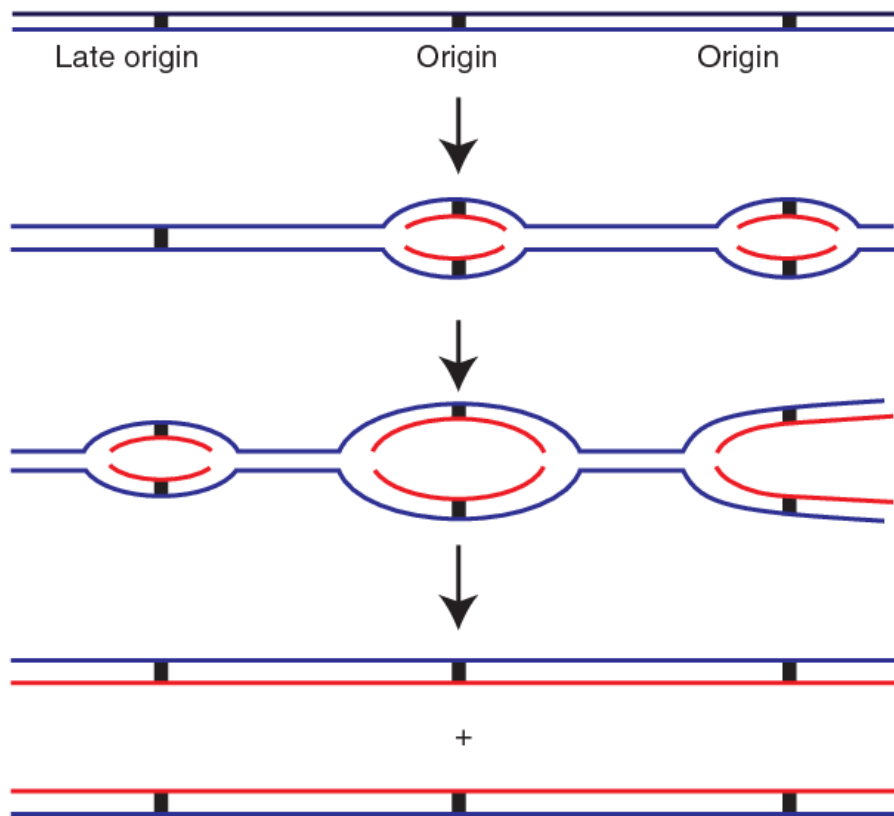


**(b)** Cèl·lula de hámster. S'observen tres bombolles de replicació (MET).

**A** Bacteria



**B** Eukaryotes

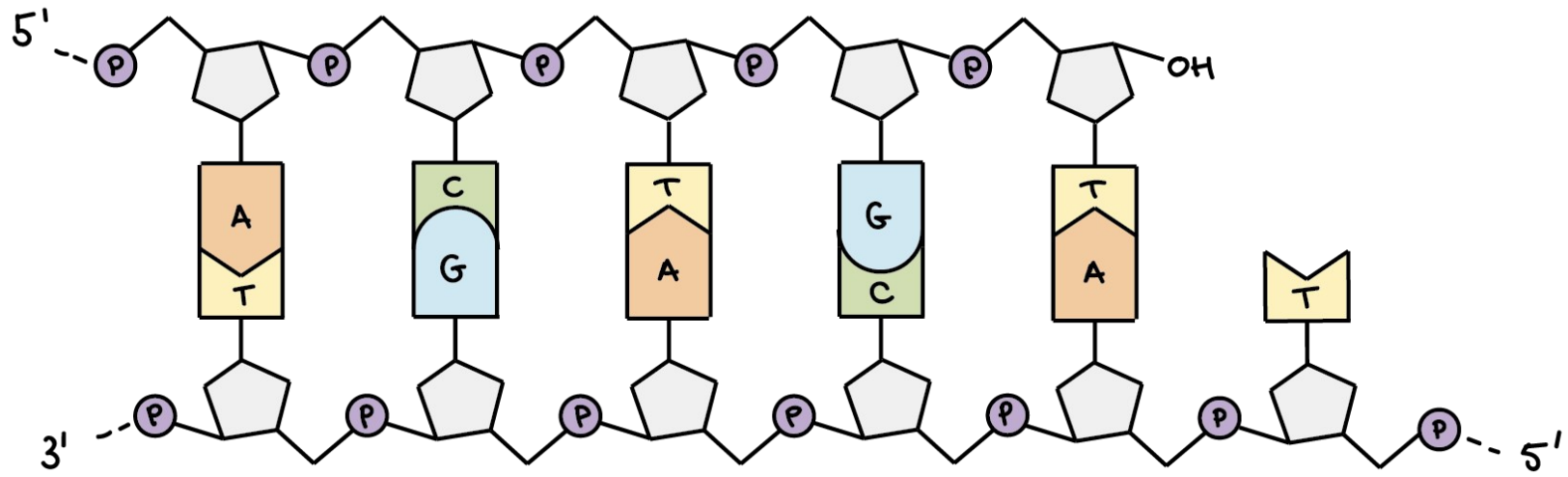
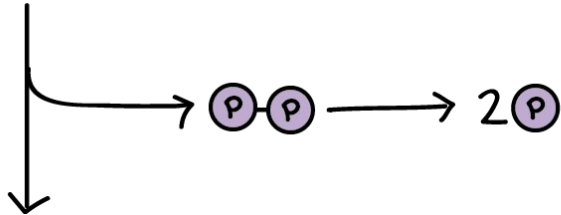
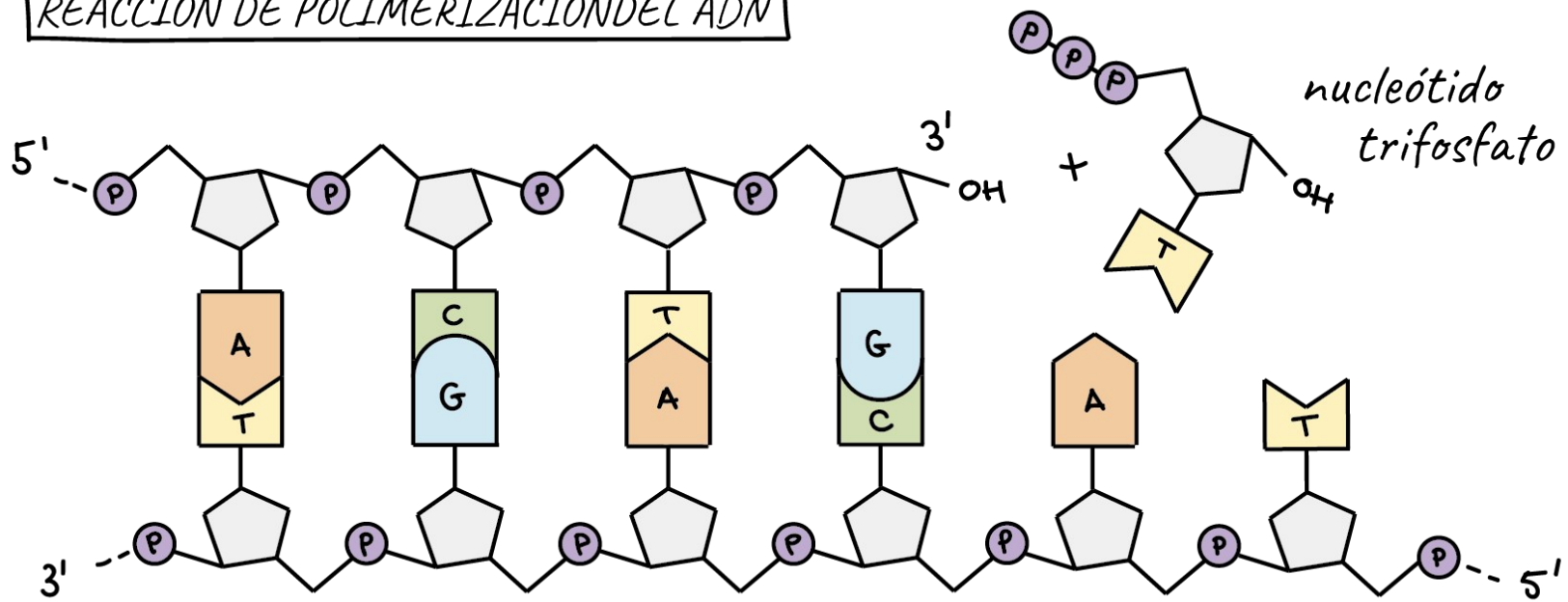


Replication initiation in bacteria and eukaryotes. (A) Most bacteria have a circular chromosome with one origin, although there are exceptions to this. Illustrated here is the *E. coli* chromosome that has one origin from which two replication forks proceed in opposite directions. (B) Eukaryotes have long linear chromosomes. Bidirectional replication is initiated at multiple origins along each chromosome

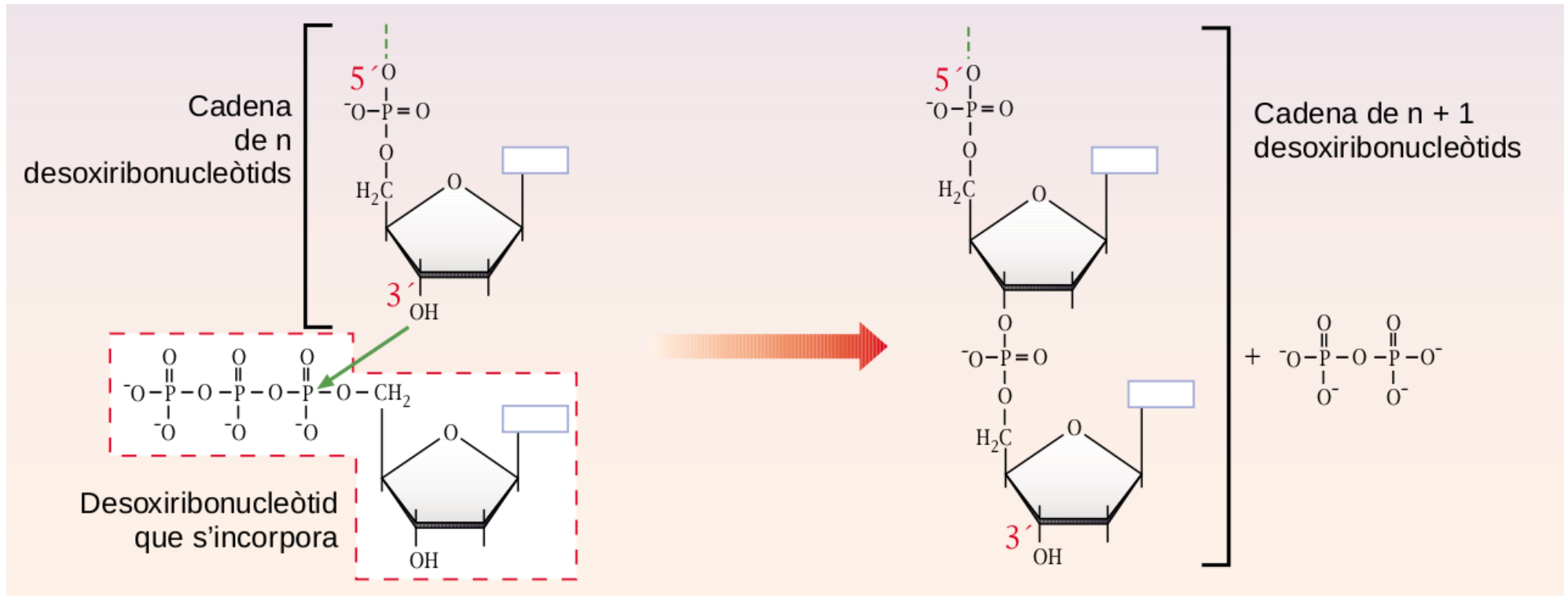
El sentit de creixement dels nous filaments



# REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN DEL ADN



La replicació del DNA s'esdevé mitjançant una reacció de síntesi:



A l'extrem 3' de la cadena en formació (de  $n$  nucleòtids), es produeix la incorporació d'un desoxiribonucleòtid trifosfat (dNTP). D'aquesta unió se'n desprèn pirofosfat inorgànic (PPi) i se n'obté una cadena amb un desoxiribonucleòtid més, incorporat al fragment inicial ( $n + 1$ ).

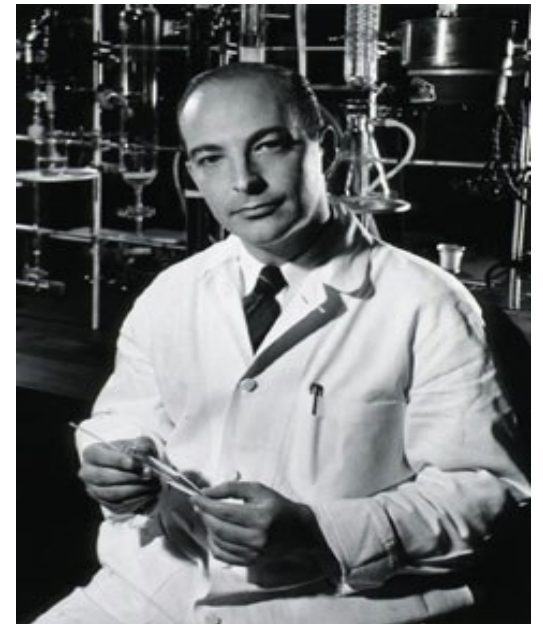
# La DNA polimerasa

La DNA polimerasa és l'enzim encarregat de sintetitzar el DNA

1956, Kornberg

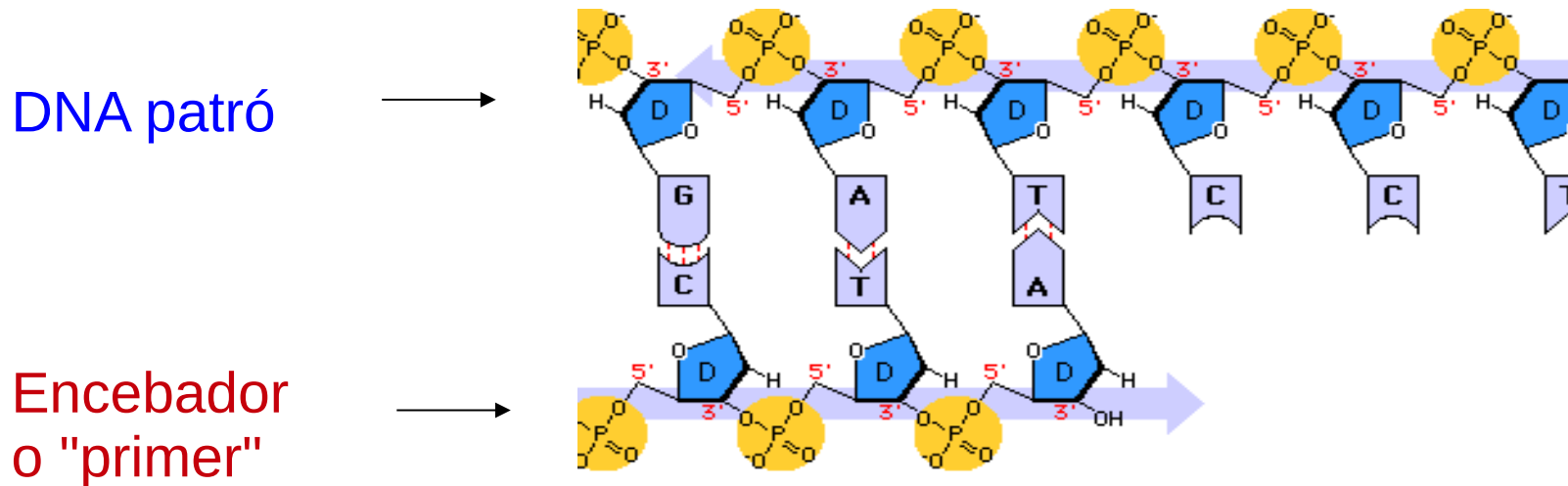
Comença l'estudi sobre els mecanismes pels quals es produeix la duplicació del DNA.

Aïlla l'enzim **DNA-polimerasa** del bacteri *Escherichia coli*. Amb aquest enzim va ser capaç de sintetitzar DNA *in vitro*.

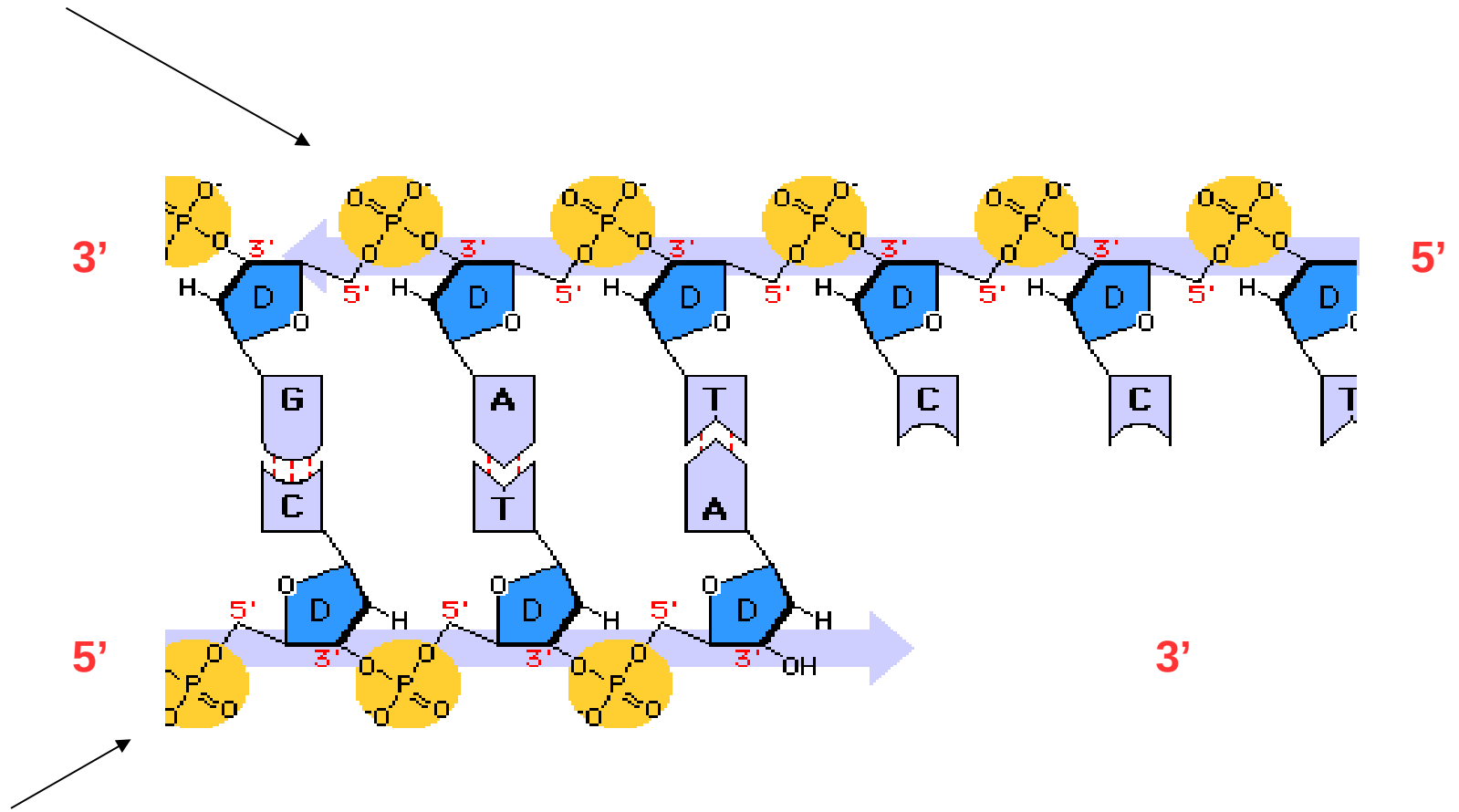


## Quines particularitats te la DNA-polimerasa?

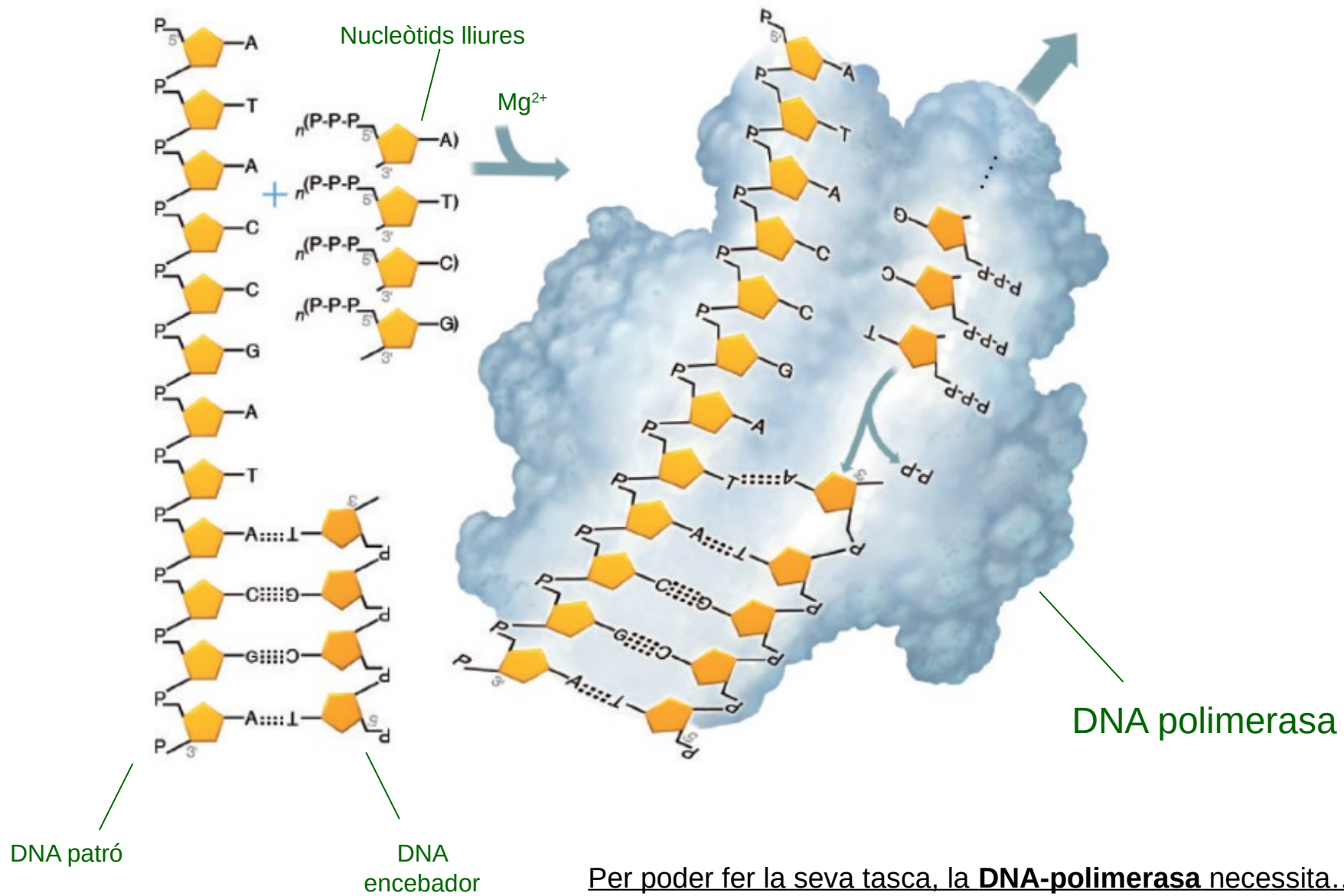
- És incapaç de sintetitzar una cadena de DNA *de novo*.
- Només pot afegir nucleòtids a l'extrem 3' lliure d'una cadena ja començada (anomenada encebador o "primer").
- Necessita una cadena patró (motlle) a la que copiar de forma complementària.



DNA patr6



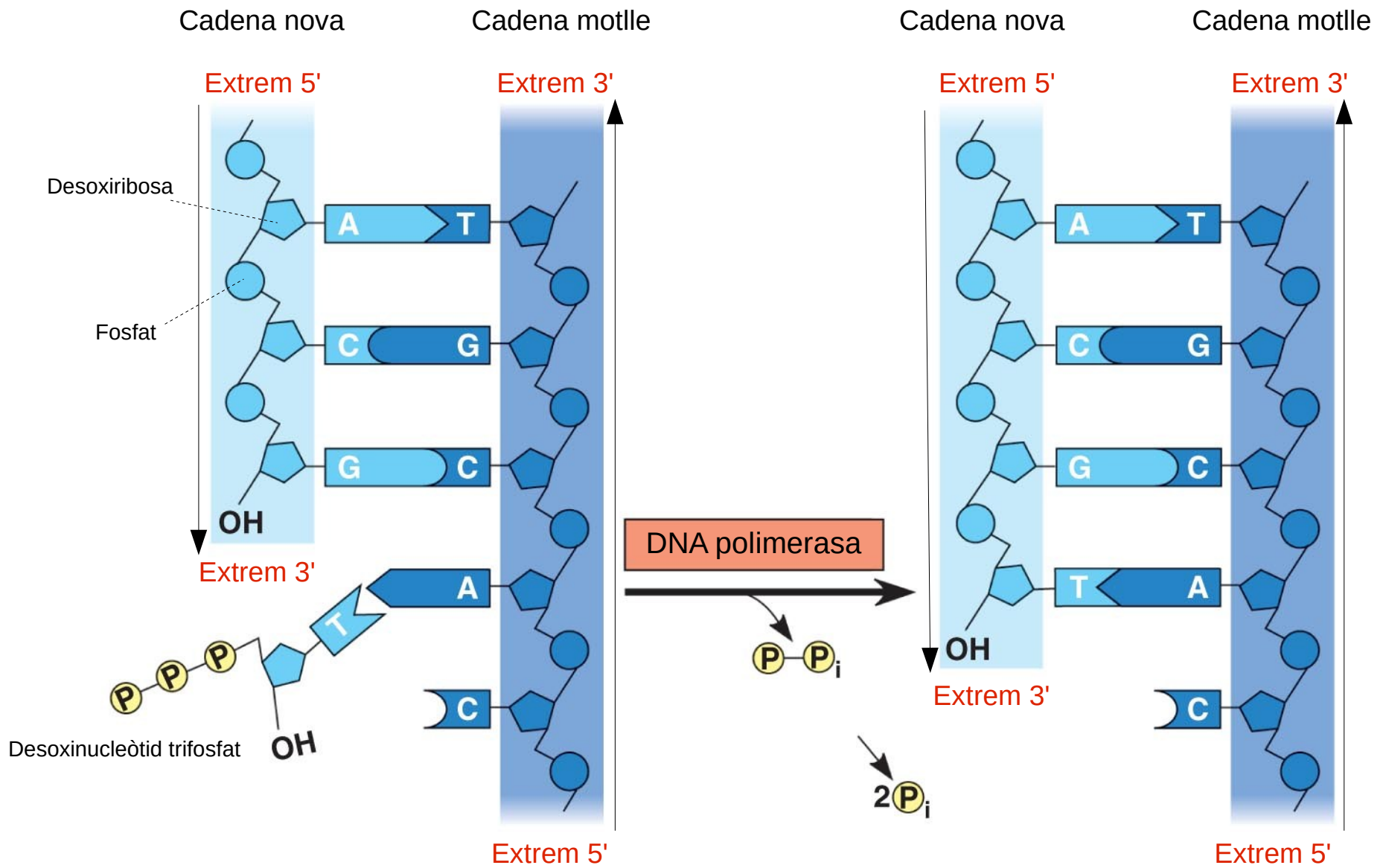
Encebador  
o "primer"



Per poder fer la seva tasca, la **DNA-polimerasa** necessita...

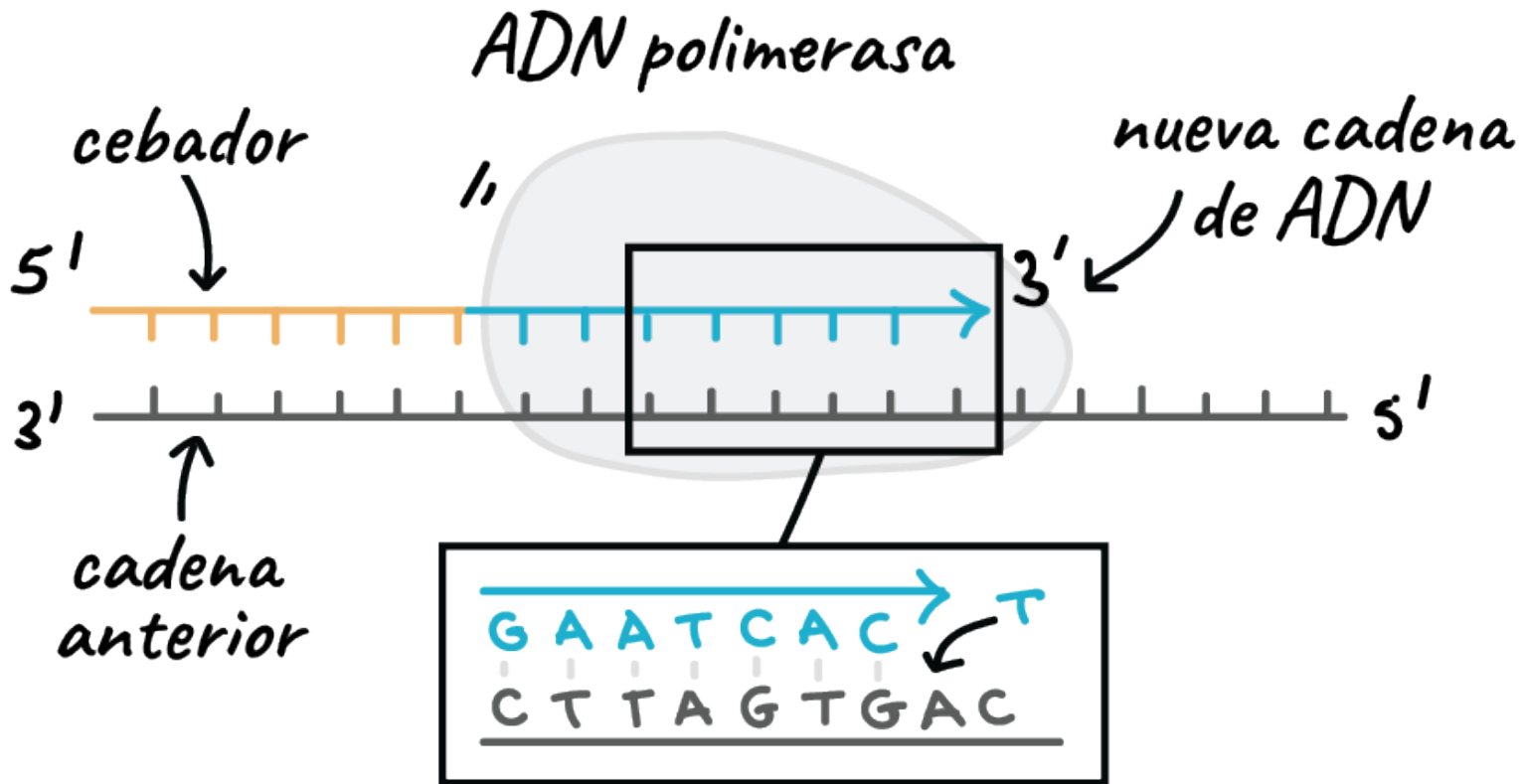
- Desoxiribonucleòtids 5'-trifosfat lliures (dATP, dGTP, dCTP i dTTP)
- Un encebador o "primer" (és a dir una cadena ja començada).
- Una cadena de DNA patró o motlle.





La DNA-polimerasa **només pot unir els nucleòtids a l'OH del carboni 3'** lliure del "primer". La nova cadena sintetitzada creix en sentit 5'→3'.

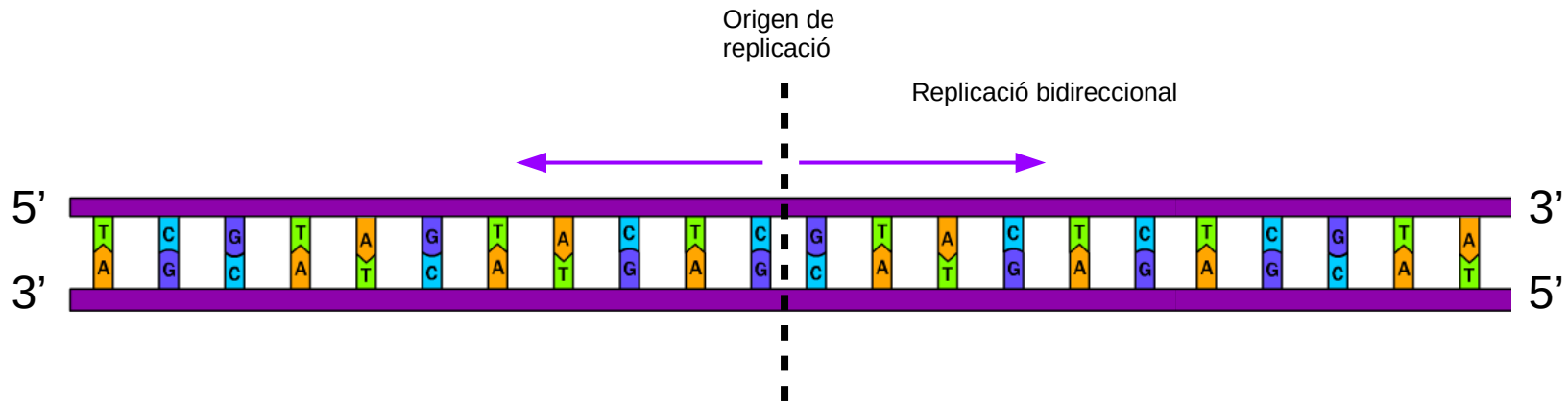
Tot clar de moment ?  
Fes memòria...



Un cop descoberta la DNA polimerasa i coneguda la seva forma d'actuar, als investigadors els sorgeixen dos problemes ...

- Dilema 1: Si la DNA-polimerasa necessita un encebador, qui sintetitza aquest encebador i com ho fa?
- Dilema 2: Si la DNA polimerasa només pot unir nucleòtids a l'extrem 3', de quina manera és pot sintetitzar la cadena 3' → 5' ?

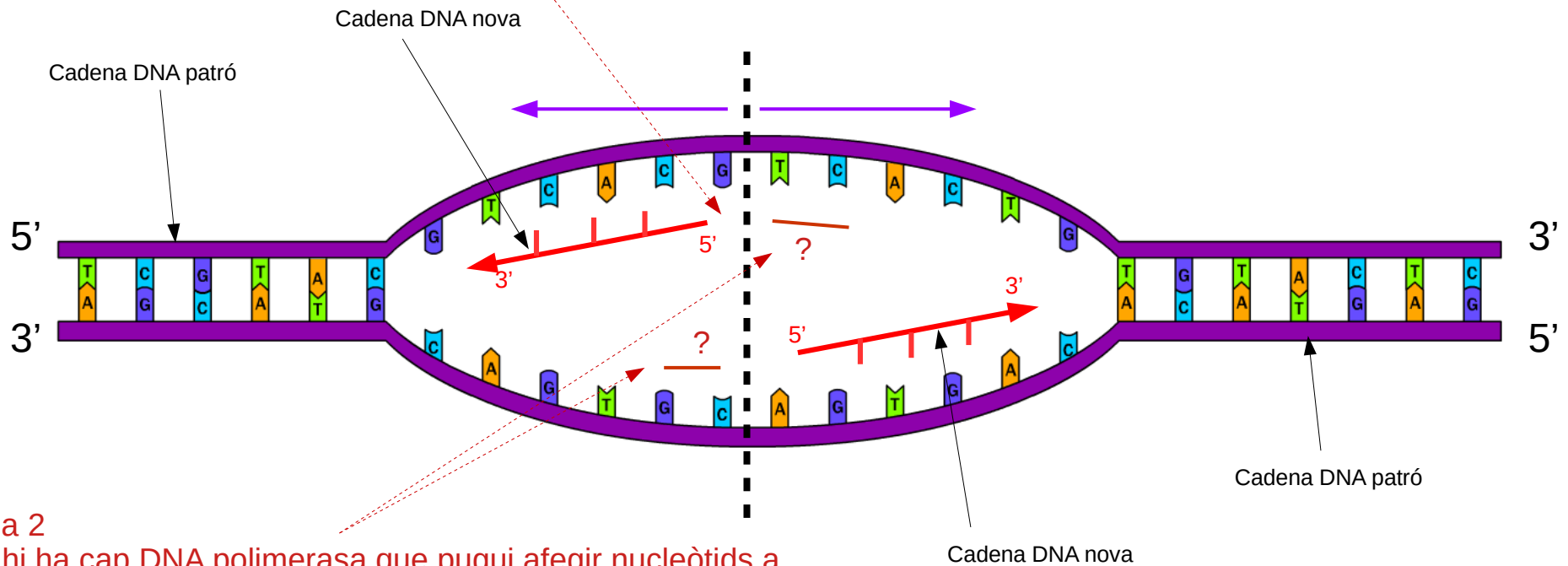




### Dilema 1

Si la DNA polimerasa no pot començar la síntesi des de zero, qui sintetitza l'encebador?

A l'origen de replicació, la doble helix s'obre i es forma una bombolla de replicació amb dues forquetes a partir de les quals la duplicació avançarà en els dos sentits



### Dilema 2

Si no hi ha cap DNA polimerasa que pugui afegir nucleòtids a l'extrem 5' .. Com pot créixer la nova cadena en aquesta direcció? Com es formen aquestes cadenes?

# Com es van resoldre els dos dilemes?

## Els fragments d'Okazaki

### 1968 Okazaki.

Descobreix uns fragments (anomenats **fragments d'Okazaki**) constituïts per uns 50 nucleòtids de RNA i entre 1000 i 2000 nucleòtids de DNA que van donar solució als dilemes plantejats.



Els fragments d'Okazaki són sintetitzats per una **RNApolimerasa** (també anomenada **primasa**), que no necessita encebador, i després per una **DNA-polimerasa**, en direcció 5' → 3' sobre diferents regions del filament patró.

El fragment de **RNA** el sintetitza la **RNApolimerasa**, que pot començar la síntesi des de zero i ho fa en sentit 5' → 3'

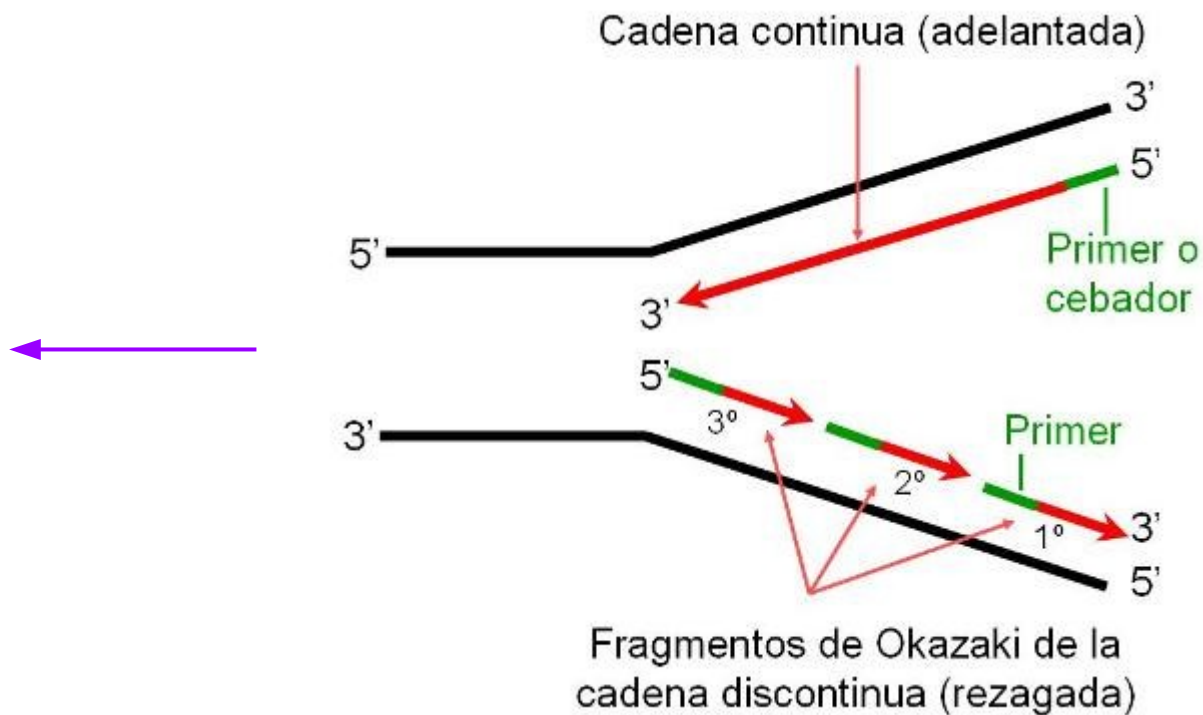
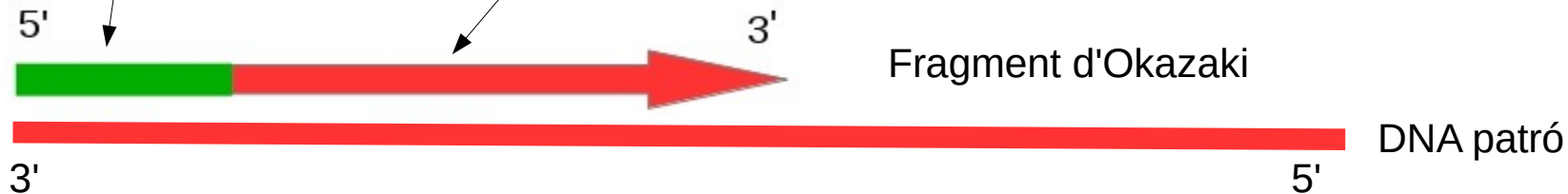
El **DNA** següent el sintetitza la **DNApolimerasa**



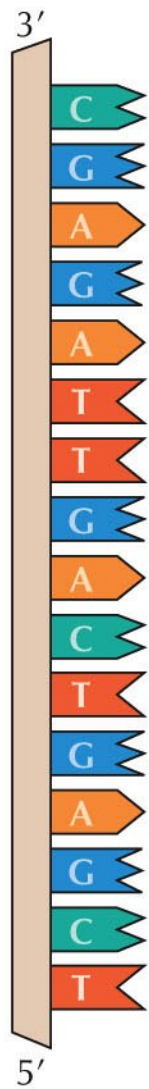


El fragment de **RNA** el sintetitza la **RNAPolimerasa**, ja que pot començar la síntesi des de zero i ho fa en sentit 5' → 3'

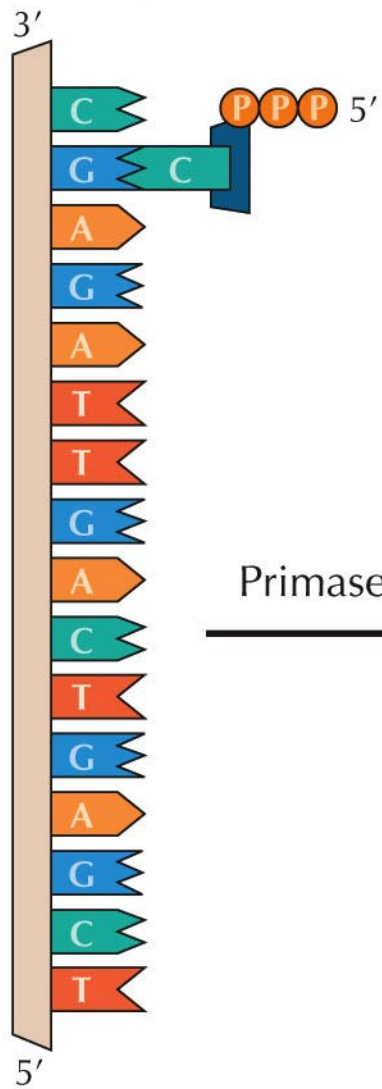
El **DNA** el sintetitza la **DNAPolimerasa**



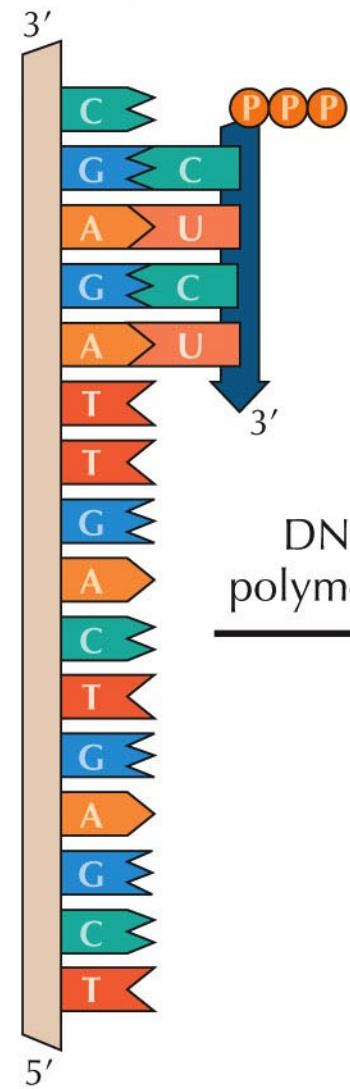
DNA patró



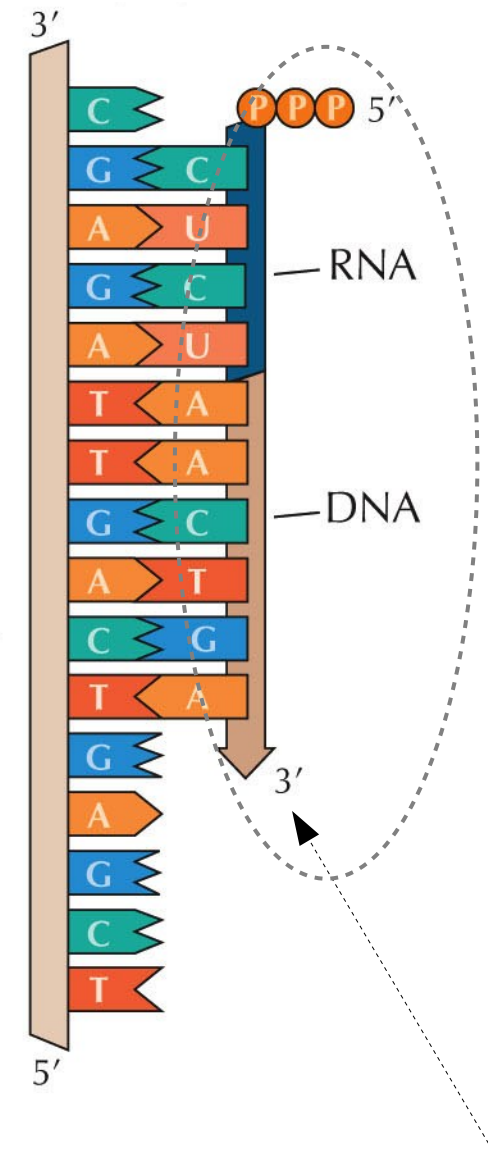
Inici síntesi RNA



Síntesi RNA «primer»



Allargament del RNA «primer» per una DNA polimerasa



Fragment d'Okazaki

Solució al dilema 1:

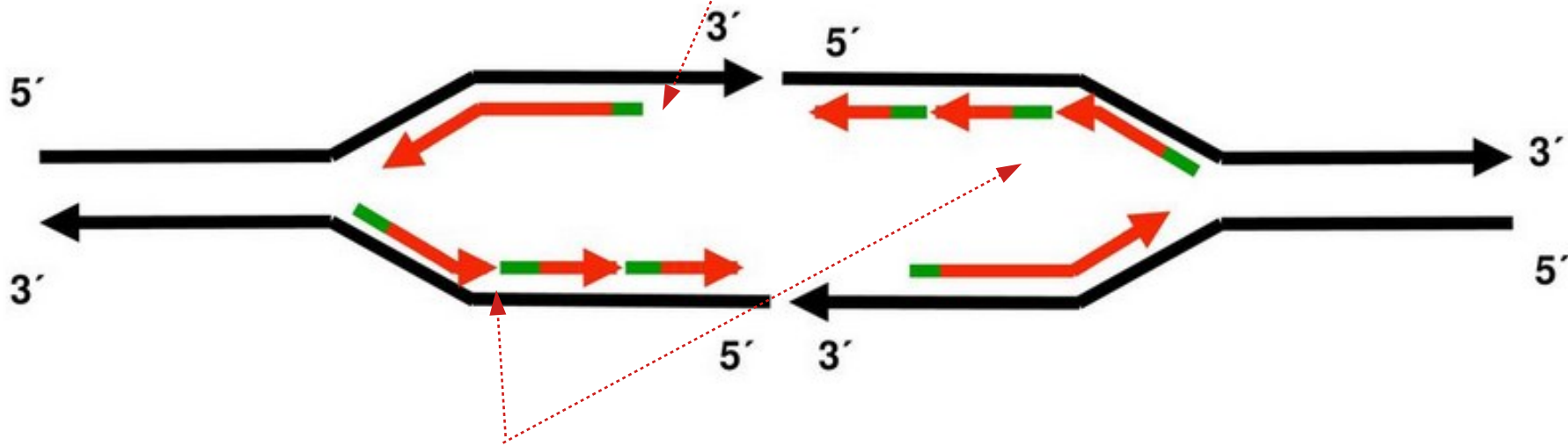
El “primer” o encebador de RNA és sintetitzat per la RNA-polimerasa la qual no necessita cap encebador per poder sintetitzar fragments de RNA.

Solució al dilema 2:

Els fragments d'Okazaki.

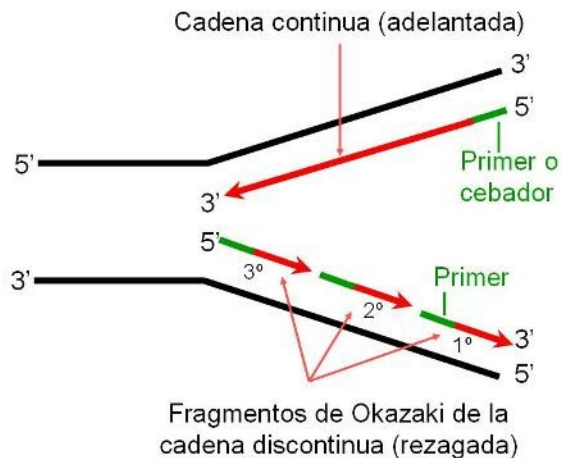
Solució al dilema 1.

El “**primer**” o **encebador de RNA** serà sintetitzat per la RNA-polimerasa la qual no necessita cap encebador per poder sintetitzar fragments de RNA.



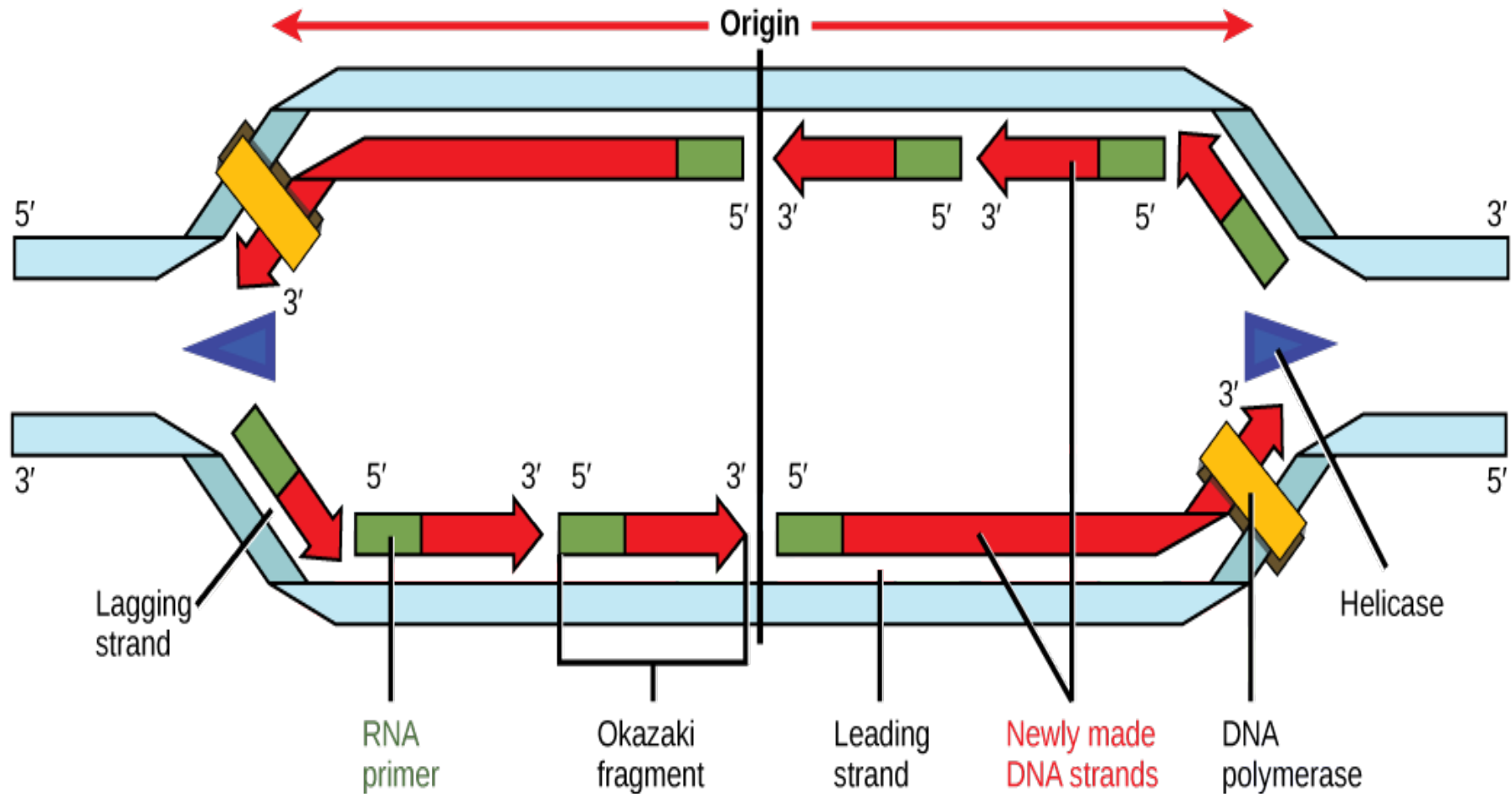
Solució al dilema 2: els fragments d'Okazaki.

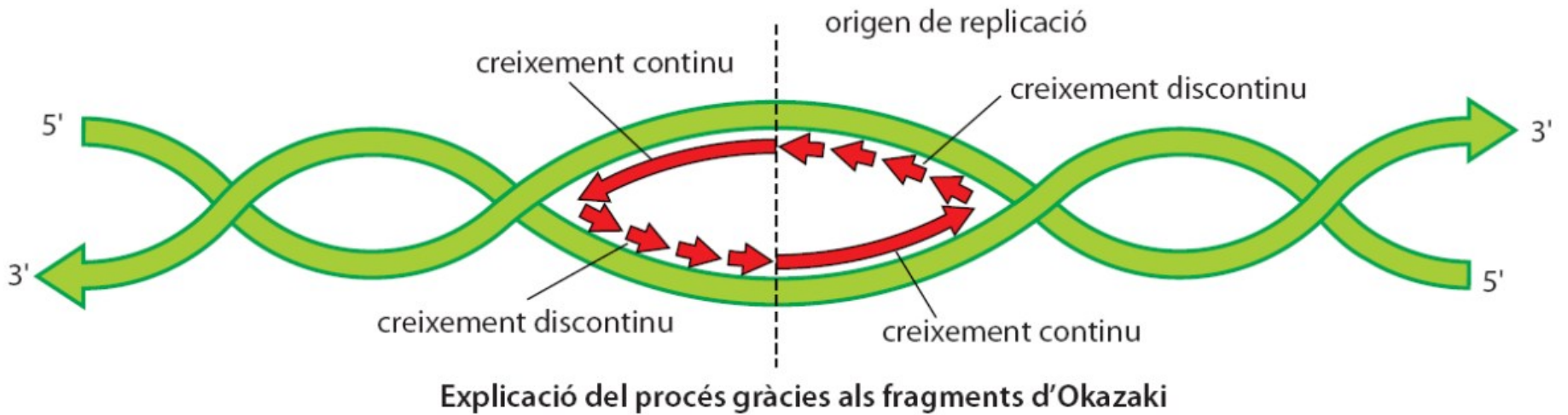
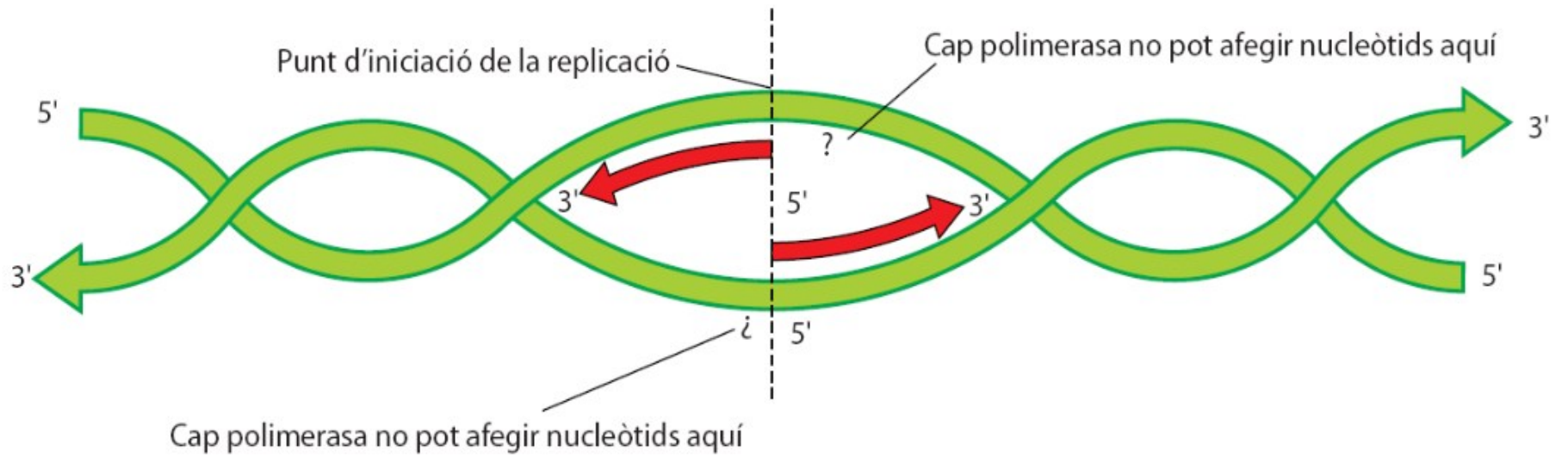
La nova cadena en aquesta direcció es sintetitzarà de forma discontinua mitjançant successius fragments d'Okazaki que s'aniran formant a mesura que la bombolla de replicació és vagi obrint



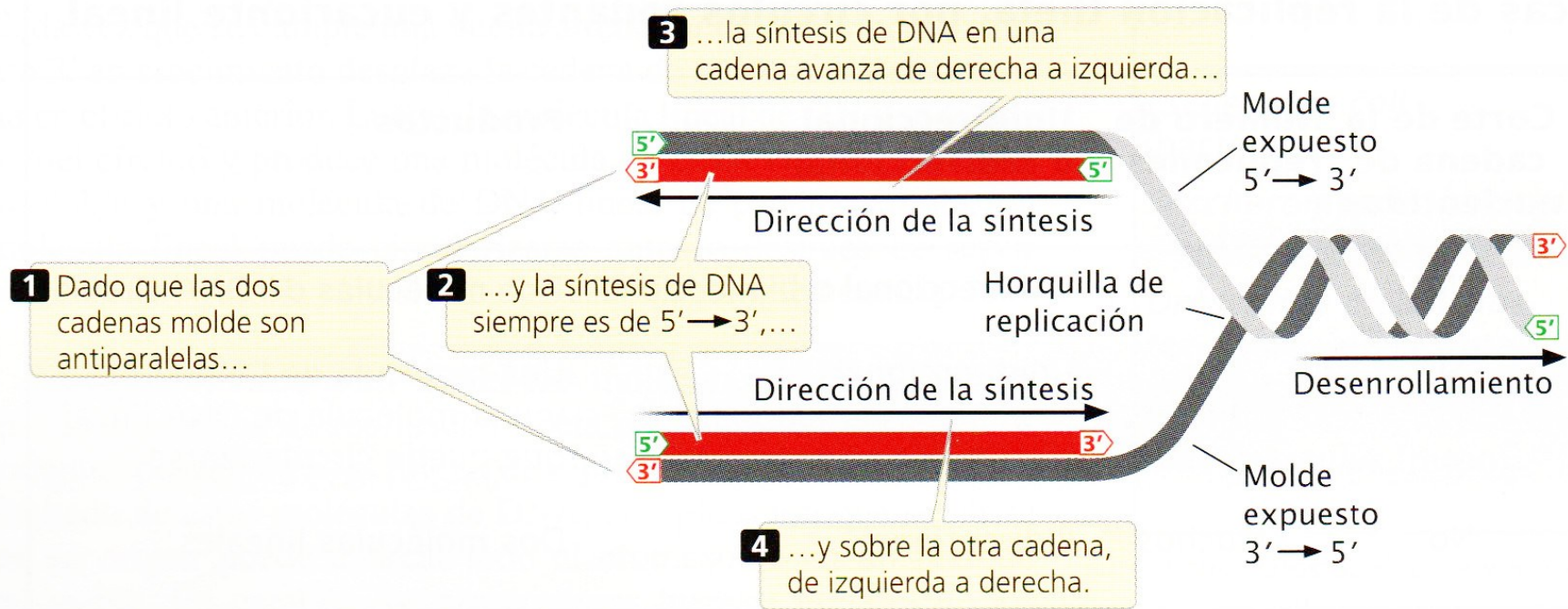
Els fragments de RNA després seran eliminats i substituïts per DNA.

# Bombolla de replicació (2 forquetes de replicació)

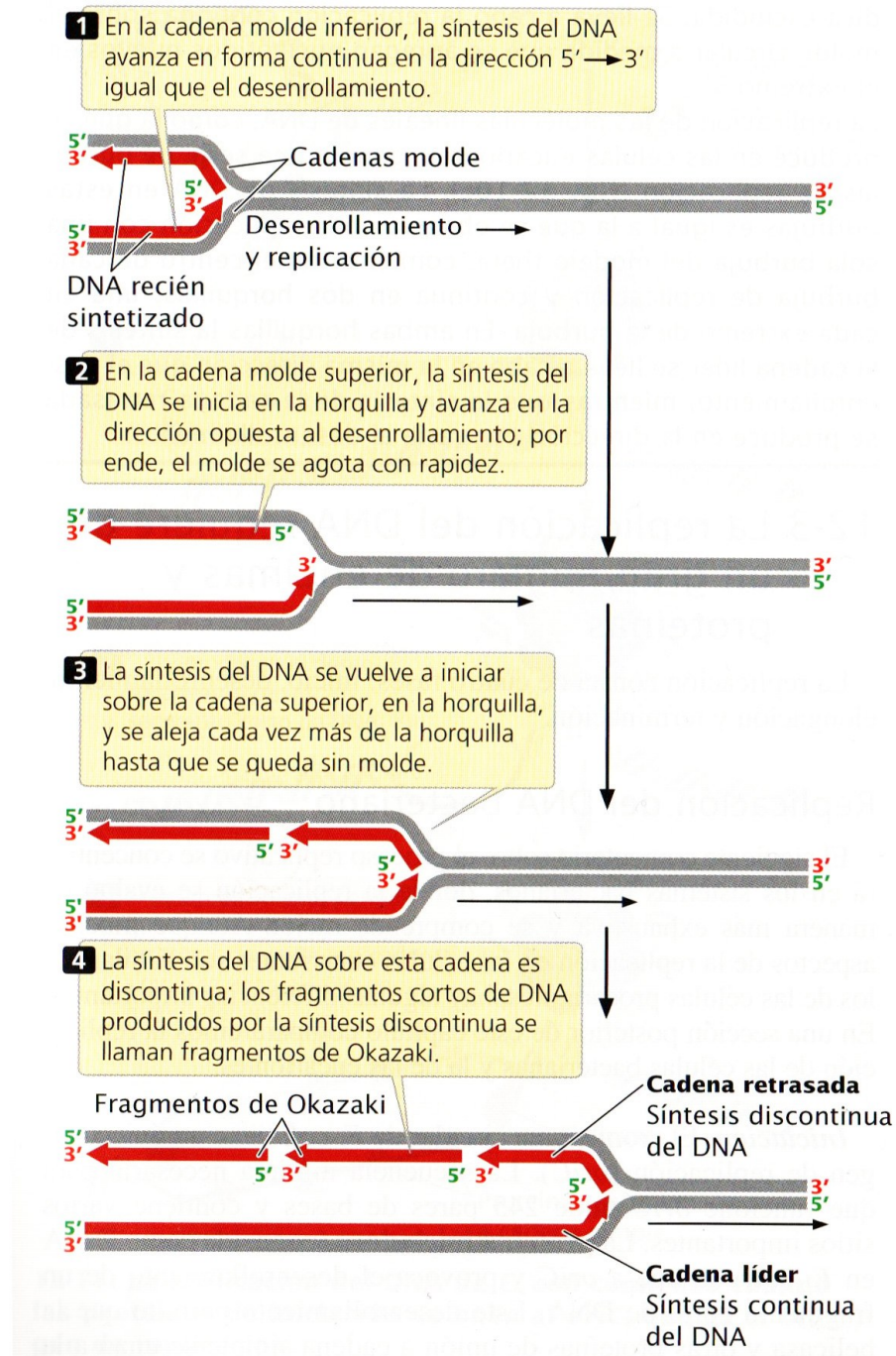




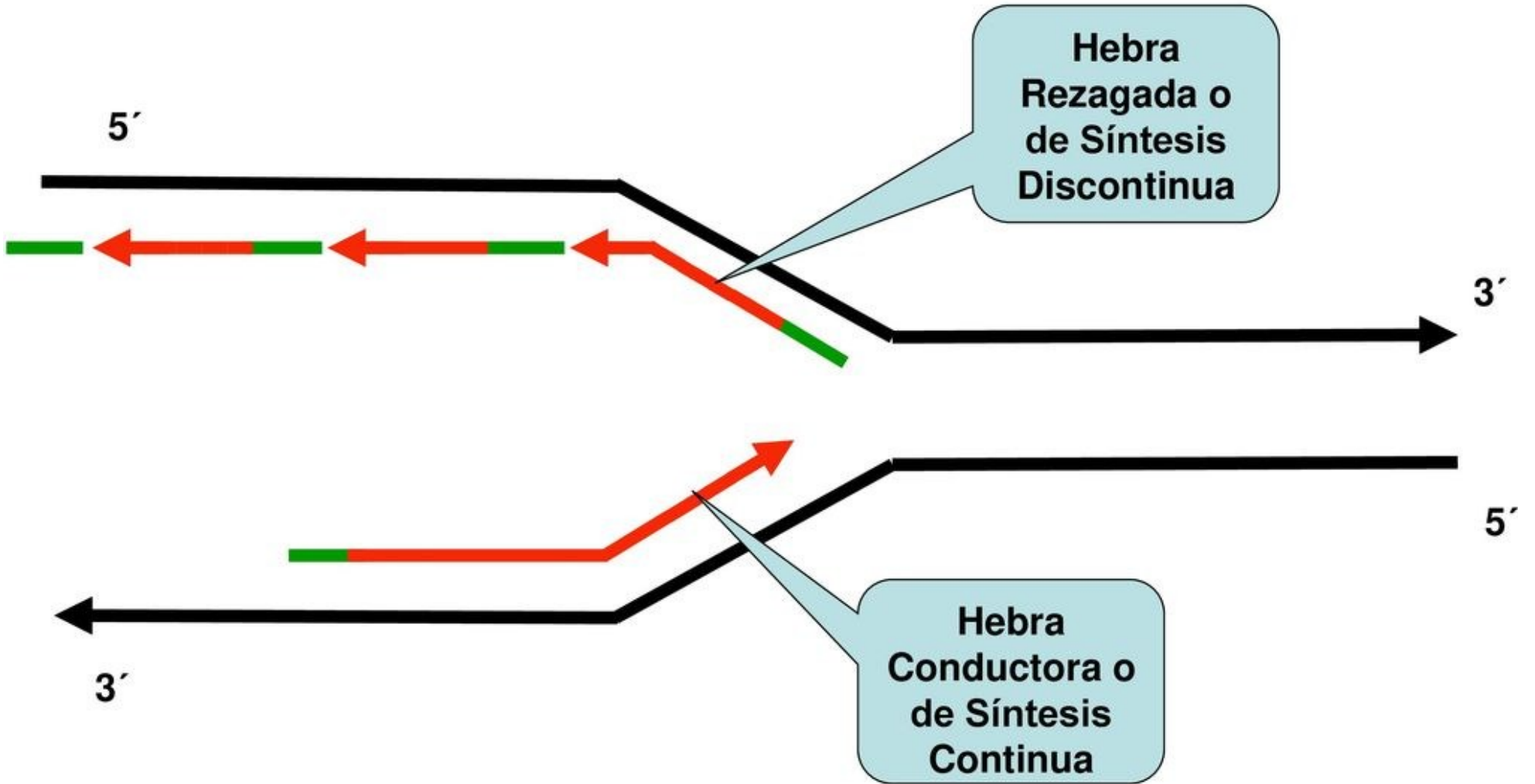


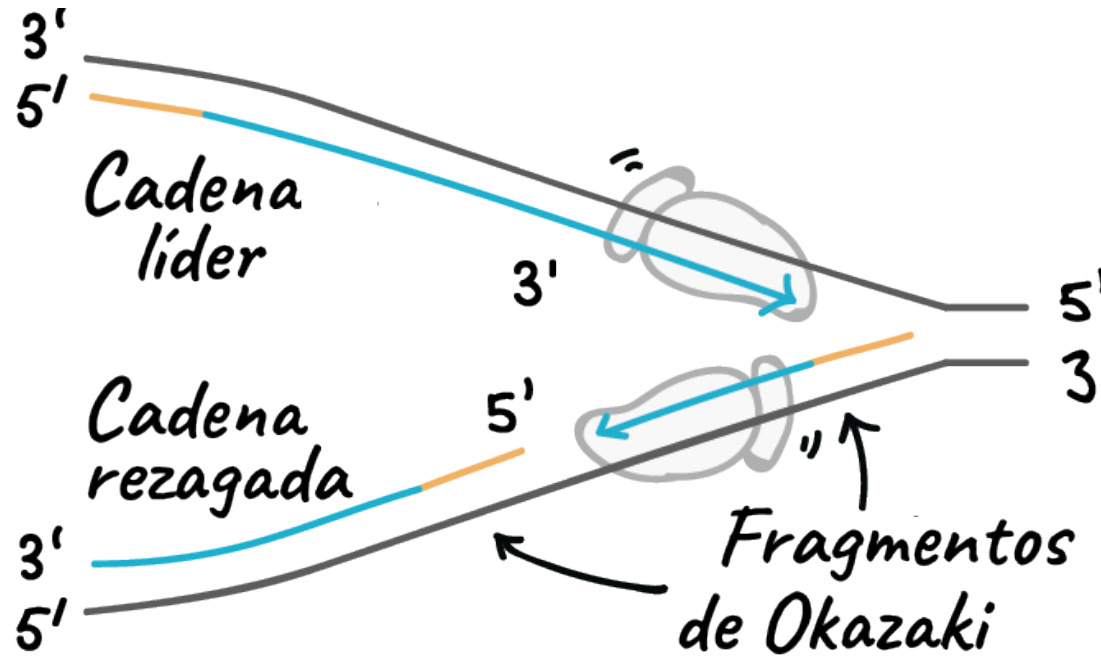
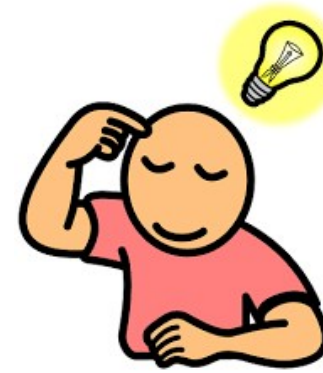


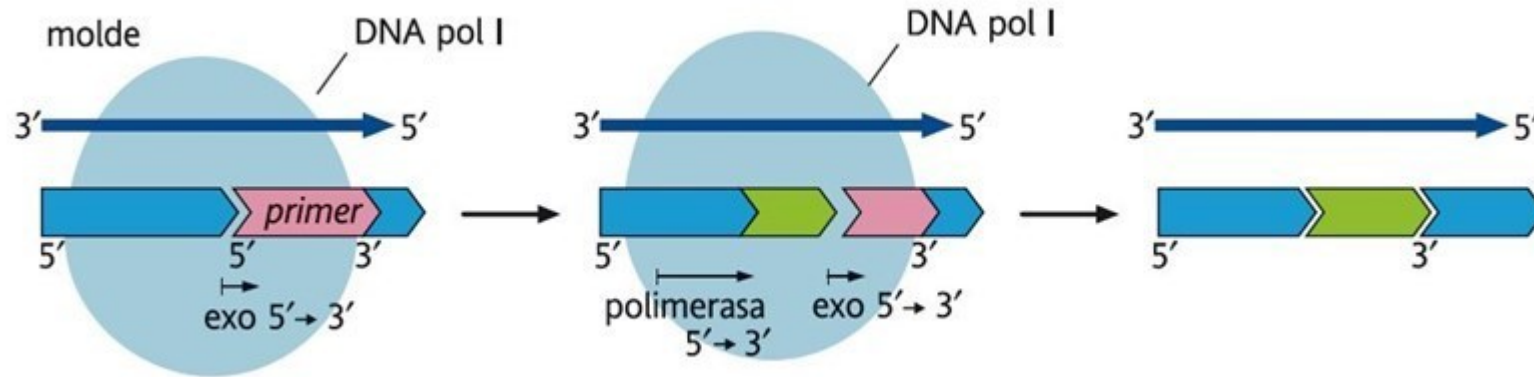
**La síntesi de DNA es produeix en les dues cadenes simultàniament, però en direccions oposades. La replicació del DNA en una forqueta de replicació comença quan la molecula de DNA de cadena doble es desenrotlla per proporcionar dos motlles de cadena simple.**



La síntesi de DNA es continua en una cadena motlle i discontinua en l'altra.

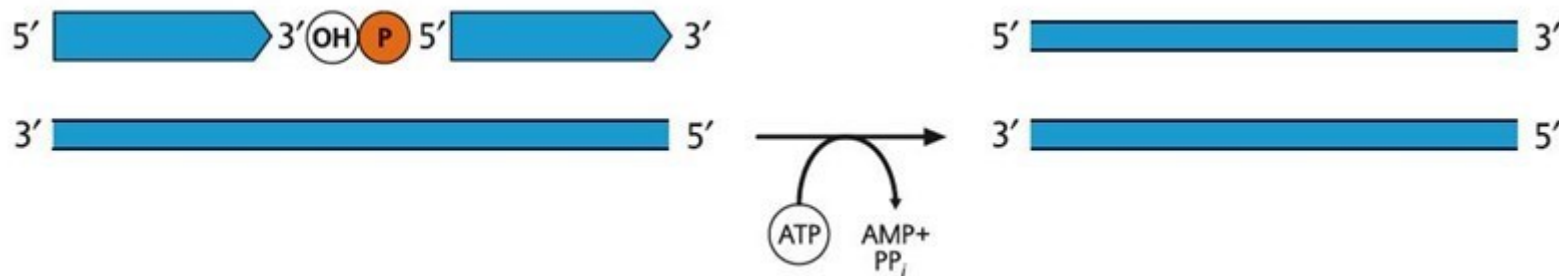






### Activitat exonucleasa 5' → 3' de la DNA polimerasa.

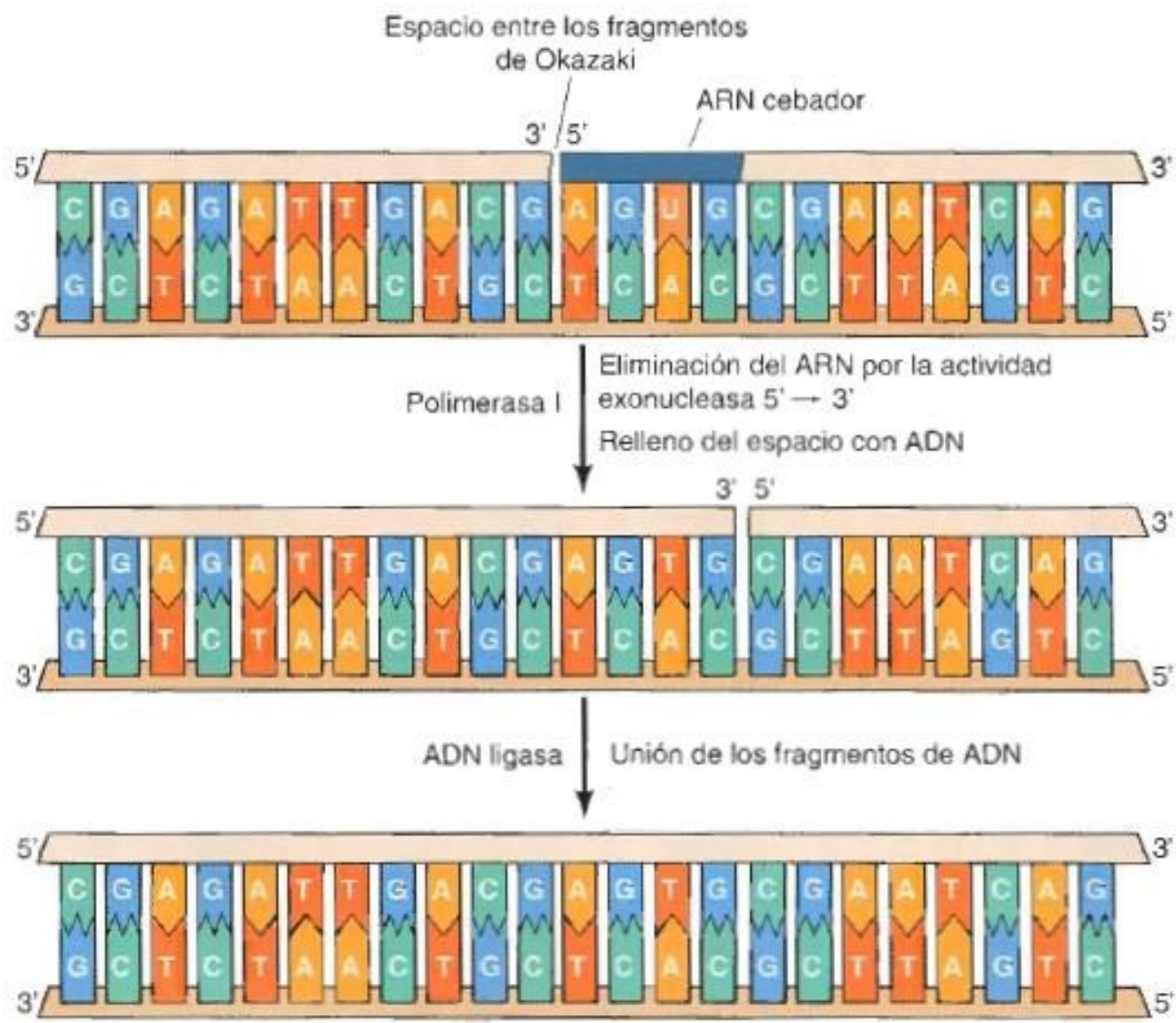
La DNA polimerasa elimina el «primer» en direcció 5' → 3' i omple el buit deixat amb nucleòtids nous complementaris mitjançant la seva activitat polimerasa 5' → 3'



### Activitat de la DNA ligasa.

L'enzim estableix un enllaç covalent entre el 3'-OH de l'últim nucleòtid afegit per la DNA polimerasa i el 5'-P del fragment d'Okazaki següent. L'ATP aporta l'energia necessària per aquesta unió.

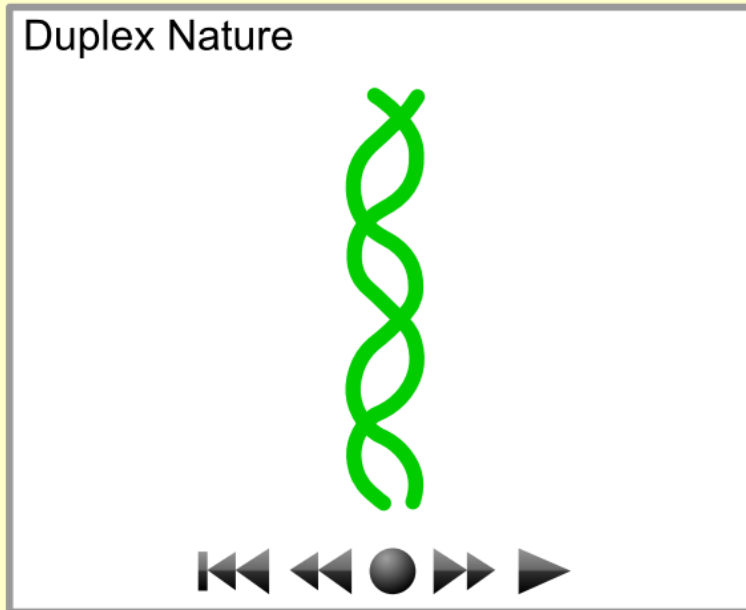






# DNA Replication

**Introduction** Heredity Duplex Nature Mutations



The duplex structure of DNA, discovered by Watson and Crick in 1953, is a double helix. Each of the two strands of the double helix is comprised of the nucleic acid bases adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T) attached to a backbone of sugar and phosphate molecules. Each purine base (A or G) on one strand will pair up with a pyrimidine base (C or T) on the other strand in a specific manner - A:T and G:C. Because the bases match up in this complementary fashion, if the two strands are separated each can act as a template for the copying, or replication, of the other.

Introduction

Basics

Replication  
Forks

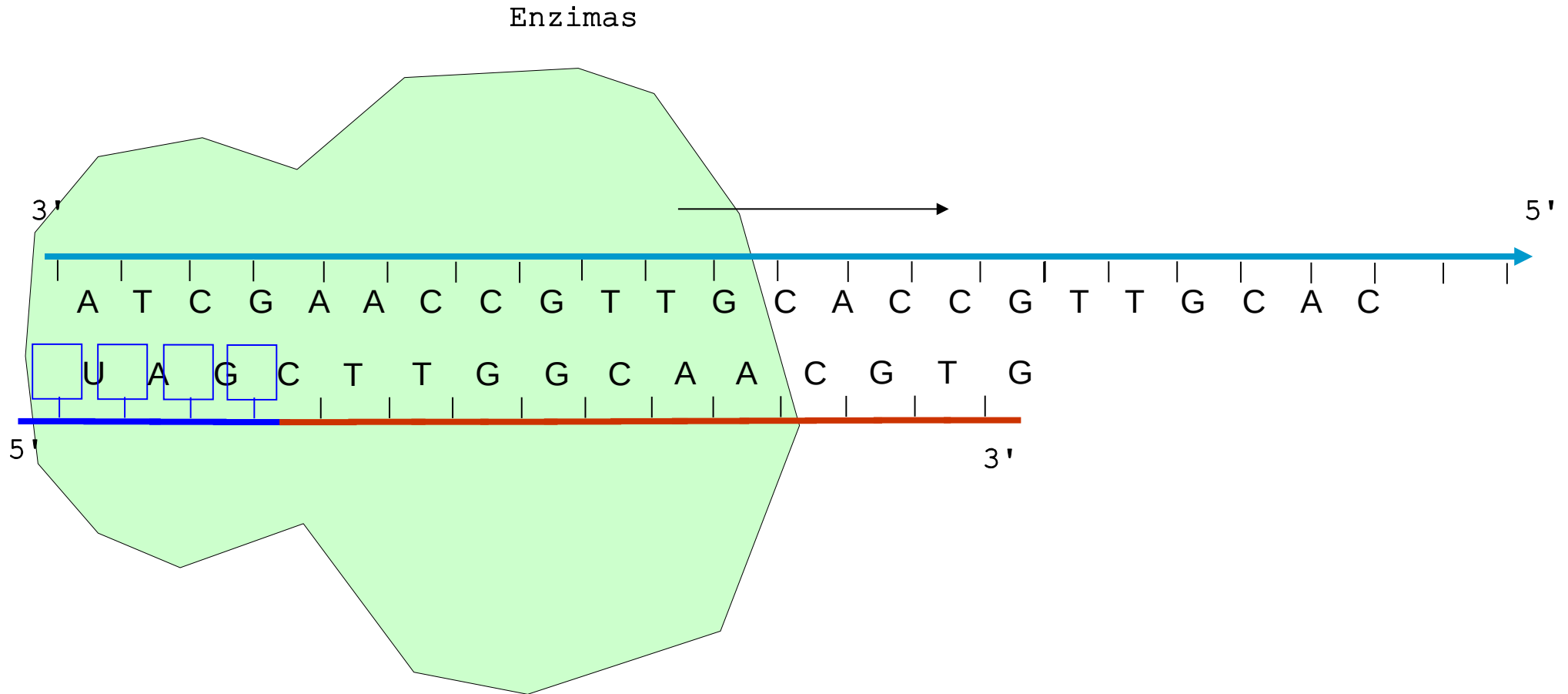
DNA  
Polymerase

Okazaki  
Fragments

The Whole  
Picture

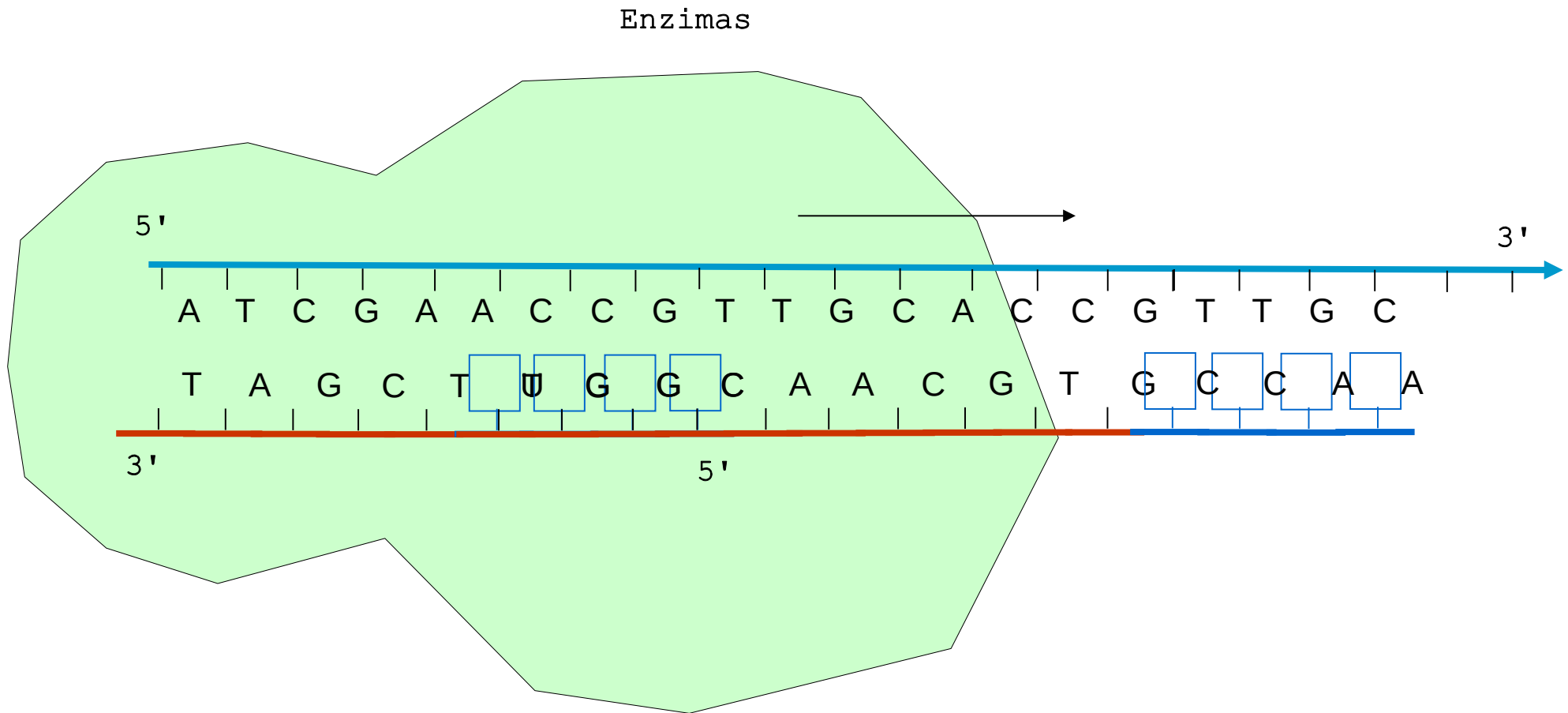
Clica damunt la imatge per accedir

## Síntesis continua de la cadena 5' → 3'

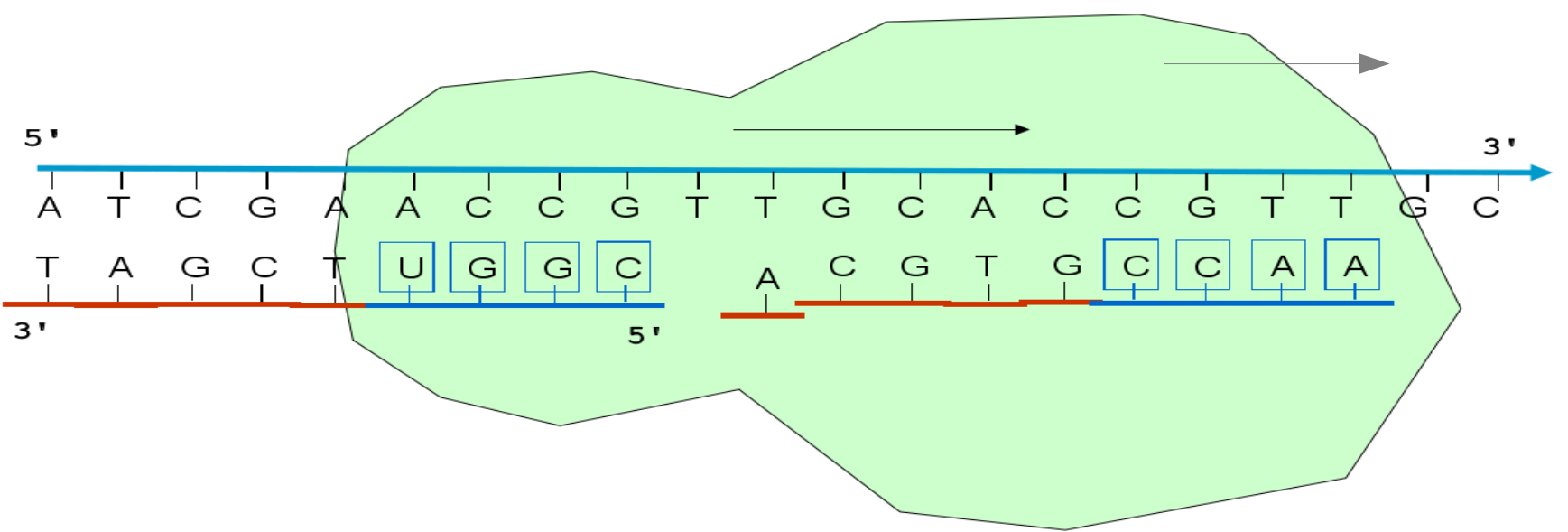
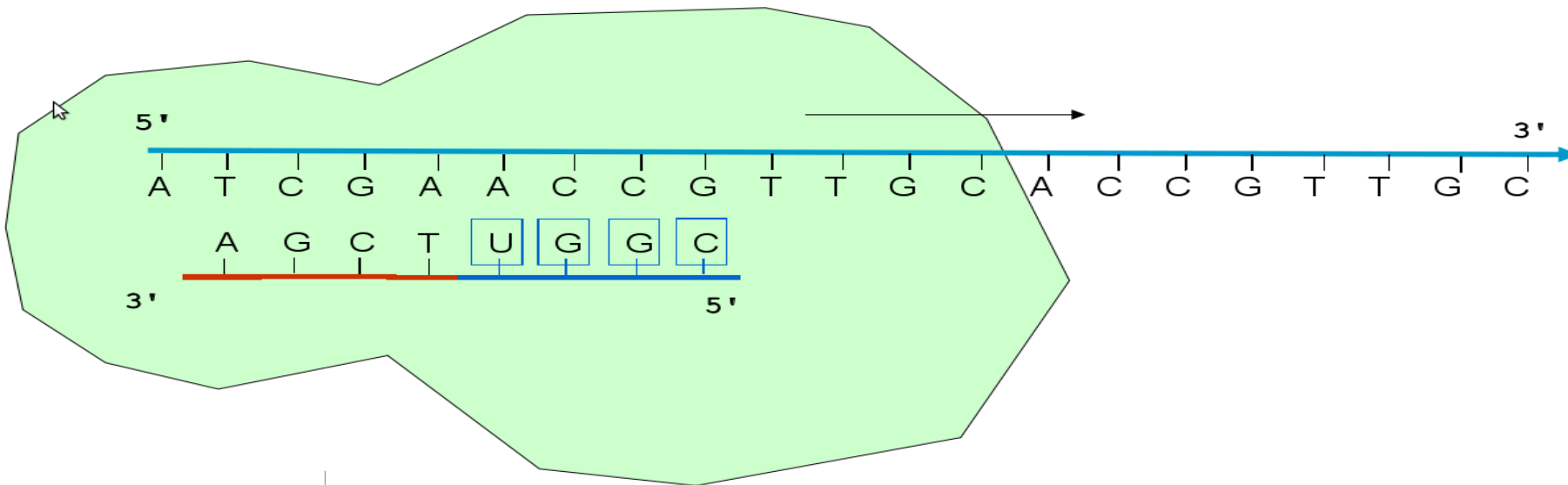


**Síntesis continua de la cadena en dirección 5'→3'.** La síntesis de esta cadena no plantea ningún problema. Así, una vez separadas ambas cadenas, se sintetiza el *primer* y la ADN pol. III (una de las enzimas que unen los nucleótidos) va a elongar la cadena en dirección 5'→3'.

## Síntesis discontinua de la cadena 3' → 5'



**Síntesis discontinua.** La cadena complementaria no se va a replicar en sentido 3'→5' sino que se replica **discontinua**mente en dirección 5'→3'. Primero se sintetiza el *primer* (ARN) y posteriormente este se elonga con ADN. El ARN es posteriormente eliminado y los diferentes fragmentos sintetizados, llamados fragmentos de **Okazaki**, son unidos entre sí.



- La replicació té lloc en **sentit 5' → 3'**. La direcció en que actuen els enzims és única, de 5' a 3', la qual cosa determina que el filament que fa de motlle hagi de tenir la direcció 3' → 5' per tal que la nova cadena en formació, complementària i antiparal·lela tingui la direcció 5' → 3'.
- La síntesi del DNA és **semidiscontínua**. Per a la mateixa forqueta de replicació, en una cadena, la replicació és contínua i en l'altra és discontinua. Tal com va proposar Okazaki en el procés de duplicació de les dues cadenes parentals, una de les cadenes es sintetitza de forma contínua (cadena conductora) en la que la síntesi es desenvolupa en la mateixa direcció de l'enzim o de la forqueta de replicació; mentre que l'altra cadena es sintetitza de forma discontinua (cadena retardada) ja que la seva síntesi es realitza en contra de la forqueta de replicació mitjançant fragments, els fragments d'Okazaki.

