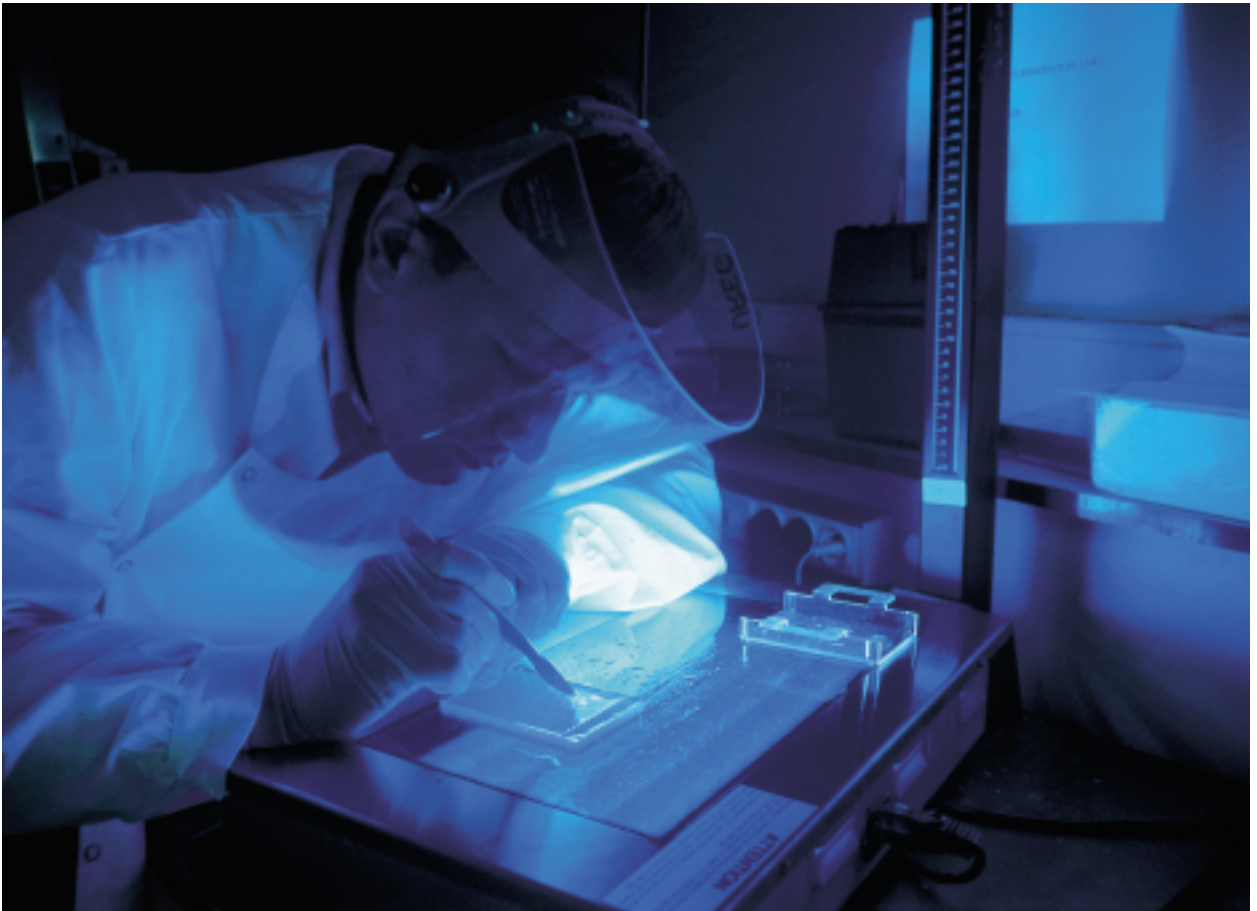


# 7 Genètica molecular



## Objectius previstos

- Comprendre els mecanismes moleculars que possibiliten el flux d'informació a partir del DNA. Per a aconseguir-ho cal:
  - Conèixer quins enzims intervenen en aquests processos i com hi actuen.
  - Observar les transformacions que comporten les diverses reaccions.
  - Comprovar la fidelitat de la reproducció del missatge que permeten, d'una banda, el codi genètic i, de l'altra, els mecanismes de replicació, transcripció i traducció.
- Conèixer les possibilitats de l'enginyeria genètica i algunes de les seves aplicacions, a partir del desenvolupament d'un projecte senzill.
- Reflexionar sobre les implicacions ètiques de l'enginyeria genètica i formar-se un criteri propi basat en raons objectives.

# Organització dels continguts

## 1. El DNA

## 2. Flux d'informació a partir del DNA

## 3. Les mutacions

## 4. L'enginyeria genètica

### 2.1. La replicació

### 2.2. La transcripció

### 2.3. La traducció

### 2.4. Control de l'expressió gènica

### 4.1. Instruments i tècniques utilitzats en enginyeria genètica

### 4.2. Disseny d'un projecte d'enginyeria genètica

## Abans de començar...

Fins fa algunes dècades, a causa de la seva complexa organització, el DNA era una molècula gairebé inaccessible; la informació que es tenia de la seva activitat i de les seves propietats es deduïa d'una manera indirecta, analitzant les proteïnes que se sintetitzen a partir del DNA.

Tanmateix, en els darrers quaranta anys s'ha progressat extraordinàriament en el desenvolupament de tècniques bioquímiques i microbiològiques que han permès d'estudiar el DNA i que han obert el camí a la genètica molecular com a disciplina científica d'un enorme interès per a la humanitat.

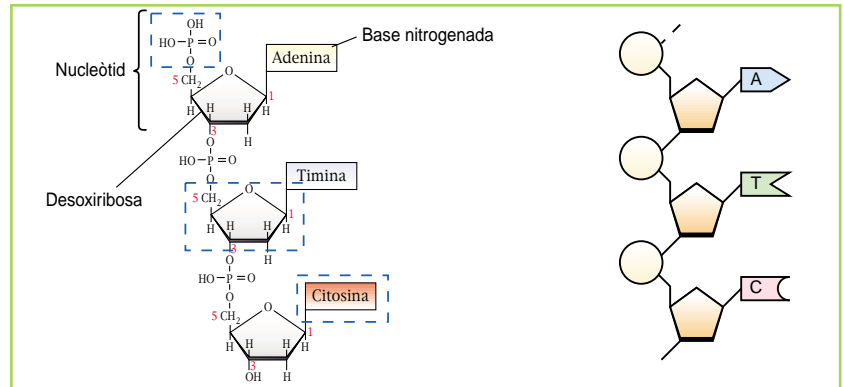
El futur es presenta apassionant però incert, ja que en el segle XXI els especialistes s'enfronten a una colla de reptes molt importants, sense oblidar els dilemes ètics i morals que l'aplicació d'aquestes tècniques desenvolupades genera tant en l'aspecte científic com en el social.

### Recorda

- El DNA i l'RNA són àcids nucleics d'estructura lineal formats per **desoxiribonucleòtids** i **ribonucleòtids**, respectivament. L'ur paper biològic com a molècules informatives és fonamental per als processos vitals.
- En tots dos tipus de substàncies s'hi distingeixen un **extrem 5'**, on es localitza un grup fosfat, i un **extrem 3'**, on hi ha un grup hidroxil.
- La manipulació del DNA pot modificar l'estructura i l'activitat dels organismes vius.

# 1. EI DNA

El DNA té una composició i una estructura que fan possible la seva funció informativa, que té com a finalitat la síntesi de proteïnes.

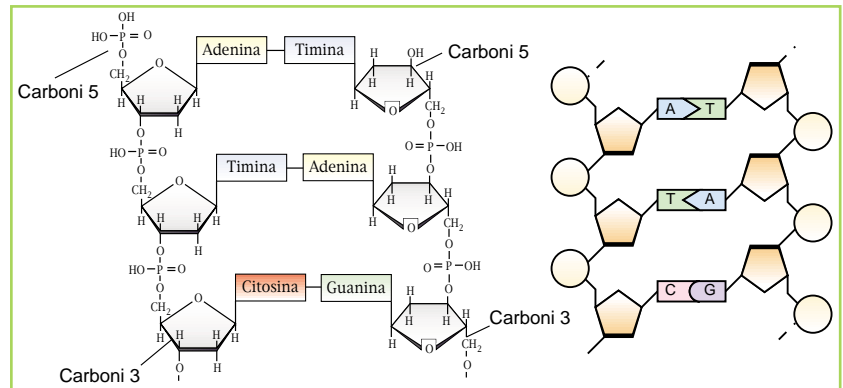


És una gran molècula composta per les subunitats següents: **desoxiribosa, àcid fosfòric i bases nitrogenades.**

Les molècules de desoxiribosa s'uneixen a les molècules d'àcid fosfòric, de manera que s'alternen i formen una cadena. En un extrem de la cadena queda lliure un grup fosfat que està unit al carboni 5 de la desoxiribosa. En l'altre extrem, queda lliure un grup hidroxil unit al carboni 3 de la desoxiribosa.

Al carboni 1 de la desoxiribosa s'uneix una base nitrogenada. Aquesta subunitat és el component variable de la cadena de DNA, ja que hi ha quatre bases nitrogenades.

El conjunt format per una molècula de desoxiribosa, una d'àcid fosfòric i una base nitrogenada és un **nucleòtid.**



Al costat de la cadena anterior se'n situa una altra que està formada per subunitats d'àcid fosfòric i de desoxiribosa, amb les bases corresponents, però en posició **antiparalela**. Això vol dir que queden confrontats l'extrem del carboni 5 d'una cadena amb l'extrem corresponent al carboni 3 de l'altra cadena.

Totes dues cadenes s'uneixen formant una **dobla cadena**, mitjançant els ponts d'hidrogen que estableixen entre elles les bases adenina amb timina i citosina amb guanina. Aquestes parelles de bases són **complementàries.**

Finalment, tot el conjunt està enrotllat en espiral i constitueix la **dobla hèlice.**

## 2. Flux d'informació a partir del DNA

La informació del DNA està codificada en la seqüència de les seves bases nitrogenades. Aquesta informació flueix i es transmet en dos sentits diferents:

- A partir del DNA s'obtenen noves molècules de DNA per **replicació**. Aquest procés s'esdevé durant l'etapa S del cicle cel·lular i permet la transmissió de la informació de cèl·lula a cèl·lula, mitjançant la mitosi, i d'individu a individu, per mitjà de la reproducció.
- Per **transcripció**, s'obtenen molècules de mRNA que contenen informació del DNA. Mitjançant la **traducció** de l'mRNA, aquesta informació determina la síntesi de les proteïnes.

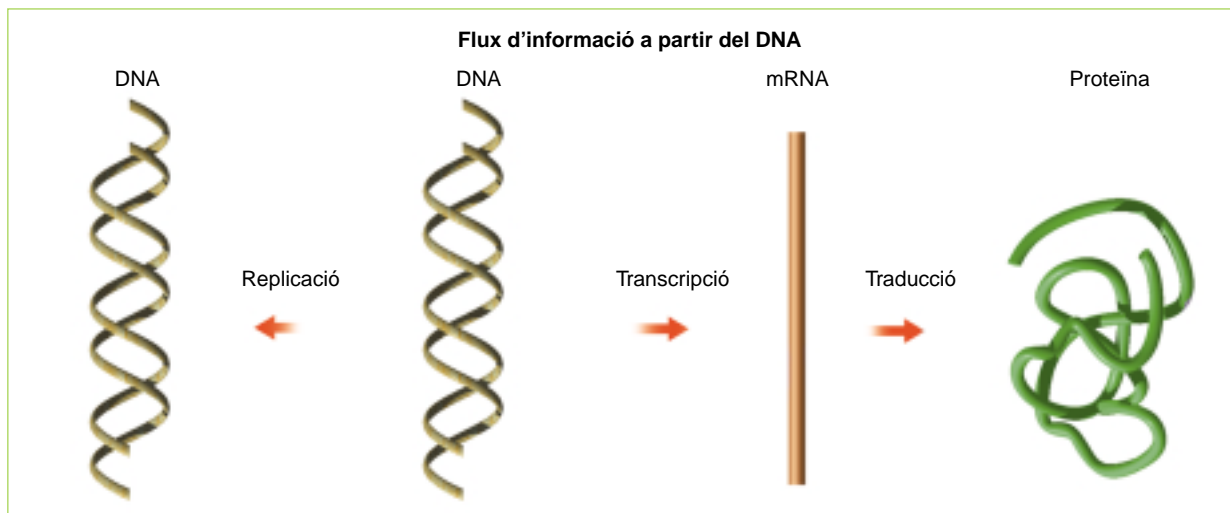
Aquest flux d'informació constitueix **el dogma central de la biologia molecular**. Va ser enunciat l'any 1958 per Francis Crick i ha estat la base que ha permès els grans avenços en el coneixement de la genètica molecular que s'han realitzat des d'aleshores.

Aquest dogma central ha estat ampliat en els darrers anys, amb dos punts referents als virus:

- La *transcripció inversa*. Alguns virus, anomenats retrovirus, poden sintetitzar DNA a partir de l'RNA víric, mitjançant l'enzim transcriptasa inversa. Aquest és el cas del virus de la sida.
- La *replicació de l'RNA víric*, que duen a terme els enzims replicases.

En aquesta unitat es tractarà únicament el flux d'informació que procedeix del DNA en les cèl·lules eucariotes i procariotes.

L'esquema següent mostra, de manera general, la replicació, transcripció i traducció en una cèl·lula eucariota.



Dins del nucli cel·lular es produeix la replicació del DNA i la transcripció per a obtenir molècules d'mRNA a partir del DNA.

La traducció té lloc als ribosomes del citoplasma. Un cop sintetitzades, les proteïnes inicien la seva activitat dins de la cèl·lula.

La replicació, la transcripció i la traducció estan controlades per un conjunt d'enzims molt específics que duen a terme una funció extraordinàriament precisa.

Ara ens introduïrem detalladament en els mecanismes que fan possible aquest flux d'informació.

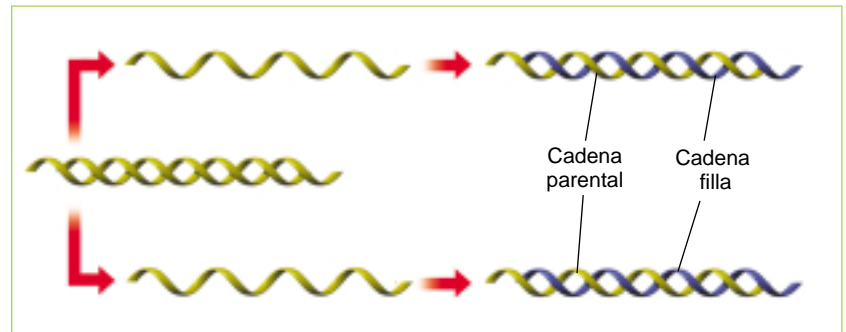


James D. Watson i Francis S. Crick van rebre el premi Nobel de fisiologia i medicina l'any 1962.

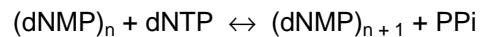
## 2.1. La replicació

Mitjançant la **replicació**, s'obtenen dues còpies idèntiques a partir d'una doble cadena inicial de DNA.

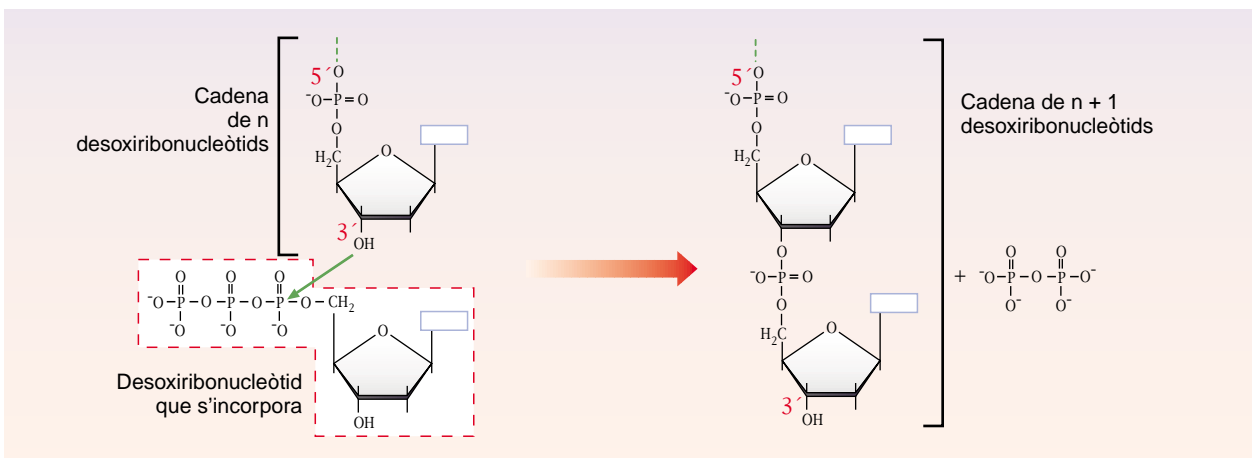
Francis Crick i James Watson, alhora que van deduir l'estructura del DNA, proposaren un mecanisme per a la replicació d'aquesta molècula. Tenint en compte la importància de la conservació de la seqüència de bases original, van considerar possible que les dues cadenes de la doble hèlix se separessin i cadascuna servís de motlle per a la síntesi d'una altra de complementària. D'aquesta manera s'obtindrien dues dobles hèlixs, cadascuna amb una cadena vella o parental i una altra cadena nova o filla. Els treballs experimentals posteriors van confirmar aquesta hipòtesi, anomenada **semiconservativa**.



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



- A partir d'un o diversos (n) desoxiribonucleòtids monofosfat (dNMP) de la cadena en formació, 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 reacció d'unió dels nucleòtids és reversible, però és afavorida en el sentit de la síntesi, ja que el PPi és ràpidament degradat.

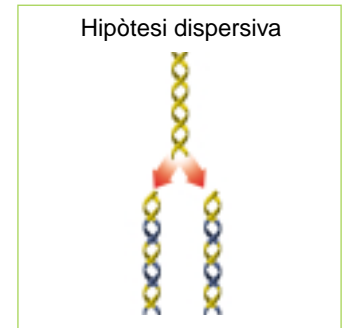
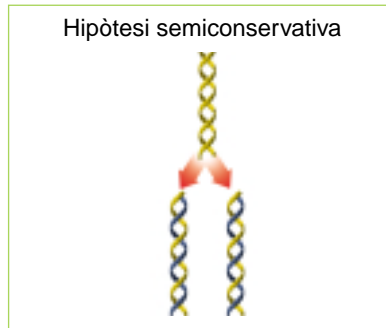
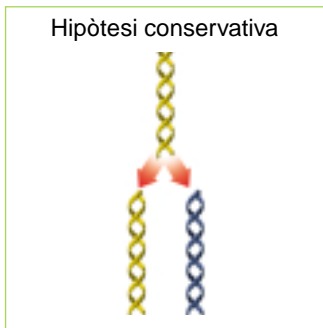
En la replicació del DNA hi intervenen els enzims següents:

- **DNA polimerases (DNA pol)**, enzims amb dues funcions diferents:
  - Tenen **activitat polimerasa**, és a dir, catalitzen la unió de nucleòtids en la cadena de DNA.
  - Tenen **activitat exonucleasa**, és a dir, catalitzen el trencament dels enllaços entre els nucleòtids quan les molècules tenen un extrem lliure.
- **RNA polimerases (RNA pol)**, enzims que catalitzen la formació de cadenes de RNA.
- **Topoisomerases i girases**, enzims que adapten l'estructura espacial de la doble hèlix a les necessitats del procés de síntesi.
- **Ligases**, que segellen les unions entre fragments de cadenes.

El procés de replicació es coneix detalladament en procariotes, en especial en el cas del bacteri *Escherichia coli*. En la pàgina següent iniciem una descripció detallada d'aquest procés.

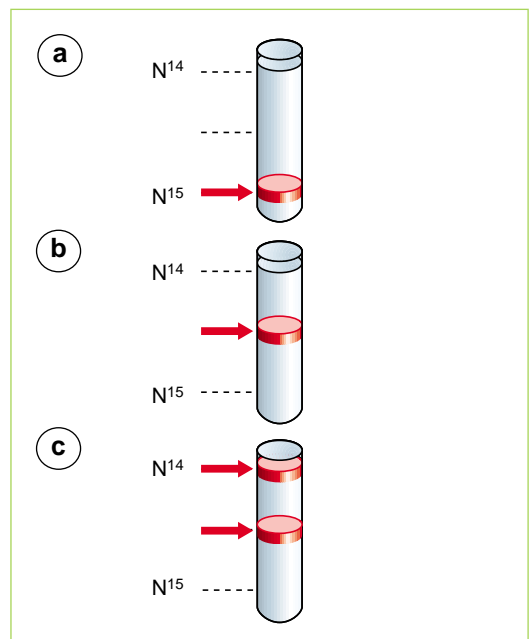
## Exercicis

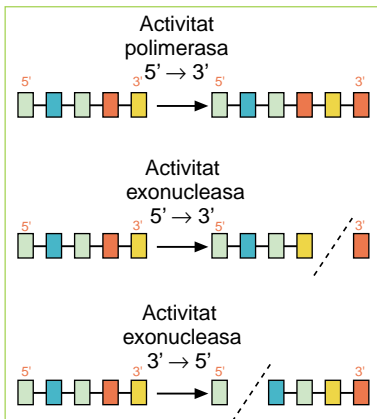
1. Messelson i Stahl, l'any 1958, investigaven de quina manera es duia a terme la replicació del DNA. Contemplaven tres possibilitats:



Van treballar amb *E. coli* i medis de cultiu rics en  $N^{14}$  o en  $N^{15}$ , per tal de poder «marcar» diferents tipus de cadenes. Van aplicar la tècnica de la ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi per a distingir molècules que contenen  $N^{14}$  i  $N^{15}$ , és a dir, lleugeres o pesants.

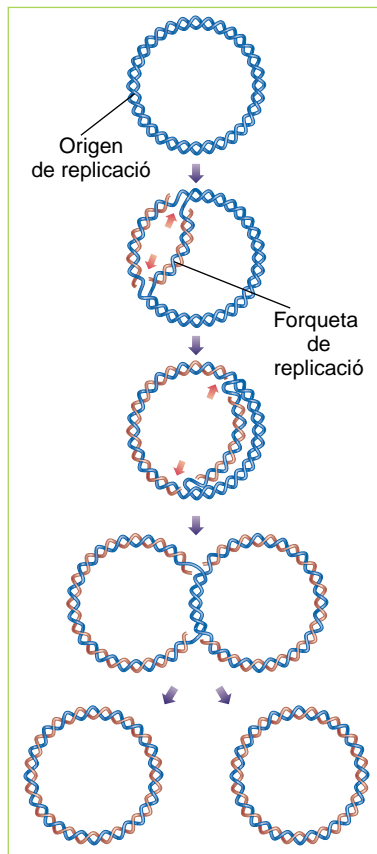
- Van cultivar els bacteris en  $N^{15}$  i els van incubar perquè en successives divisions cel·lulars incorporessin aquest marcatge en el seu DNA. Així van obtenir una població que contenia cadenes de DNA pesants, per la incorporació del  $N^{15}$ . En extreure i ultracentrifugar el DNA s'hi observava una banda característica (a).
  - Van transferir els bacteris a un medi amb  $N^{14}$  i, per tant, menys pesant. Els van incubar el temps suficient perquè es dividissin un sol cop. La ultracentrifugació del DNA va donar un nou patró de bandes (b).
  - Van deixar que es dividissin diverses generacions i van repetir la ultracentrifugació. El patró obtingut s'observa a la dreta (c).
- A la vista dels resultats obtinguts, justifica les raons que els van dur a confirmar la hipòtesi semiconservativa de la replicació.





Quan es parla de modificacions en les cadenes de DNA (allargament o escurçament) en sentit  $5' \rightarrow 3'$  (des de  $5'$  fins a  $3'$ ), significa que l'extrem  $5'$  no s'altera i que la modificació té lloc en l'extrem  $3'$ .

Si la modificació és en sentit  $3' \rightarrow 5'$ , l'extrem  $3'$  no s'altera i la modificació té lloc en l'extrem  $5'$ .



## La replicació en procarïotes

S'han identificat tres tipus de DNA polimerases:

- **DNA pol I**, que actua amb:
  - Activitat polimerasa, catalitzant la unió de nucleòtids en sentit  $5' \rightarrow 3'$ .
  - Activitat exonucleasa en sentit  $5' \rightarrow 3'$  i en sentit  $3' \rightarrow 5'$ .
- **DNA pol II**, que presenta:
  - Activitat polimerasa en sentit  $5' \rightarrow 3'$ .
  - Activitat exonucleasa en sentit  $3' \rightarrow 5'$ .
- **DNA pol III**, que actua amb:
  - Activitat polimerasa en sentit  $5' \rightarrow 3'$ .
  - Activitat exonucleasa en sentit  $3' \rightarrow 5'$ .

Cada enzim intervé en diverses fases del procés, el qual s'inicia de la manera següent:

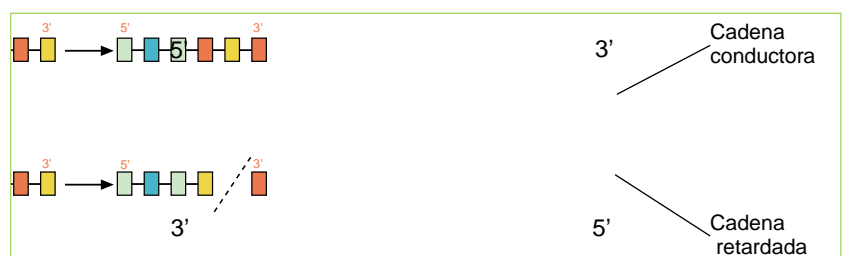
- Existeix un punt de la doble hèlix en el qual s'ha d'iniciar la replicació. Aquest punt es coneix com a **origen de replicació**.

A partir de l'origen de replicació es formarà una **forqueta de replicació** en la qual el DNA modifica la seva estructura espacial. En la formació de la forqueta hi intervenen:

- Els enzims **topoisomereses**, com ara la **girasa**, que desespiralitzen el DNA.
  - Les **helicases**, que separen les dues cadenes de la doble hèlix.
  - Un grup de proteïnes, anomenades SSB (*single strand-binding*), que estableixen cadascuna de les cadenes senzilles.
- S'inicia la síntesi de nou DNA i la forqueta va progressant i s'eixampla cap als costats. El procés es desenvolupa venent dues dificultats:

- Les DNA pol no poden iniciar la síntesi de DNA sense un fragment preexistent de cadena.
- Les DNA pol només poden incorporar nucleòtids a la cadena en sentit  $5' \rightarrow 3'$ , ja que la reacció necessita extrems  $3'$  lliures.

Aquestes limitacions fan que la síntesi de les dues cadenes filles es dugui a terme de manera diferent segons que es tracti de la cadena **conductora** o bé de la cadena **retardada**.

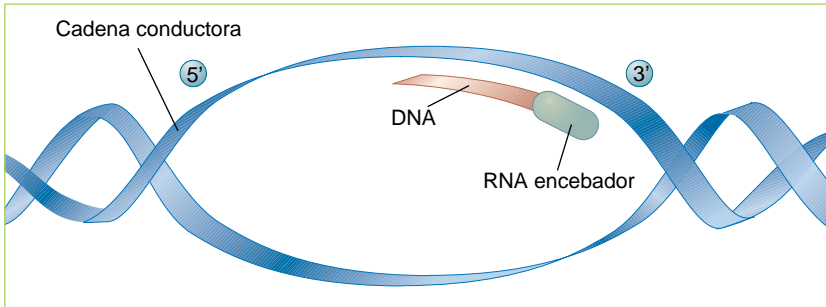


Vegem a continuació el procés distingint-hi la síntesi del DNA a partir de la cadena conductora i a partir de la cadena retardada.

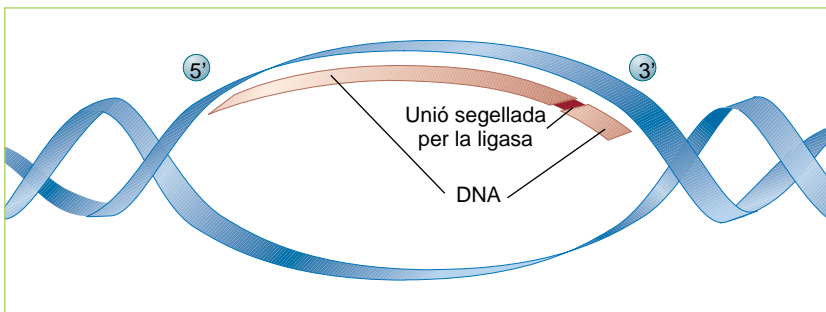
- **Síntesi a partir de la cadena conductora.** El primer pas és la formació d'un segment de cadena que permeti l'activitat de la DNA pol.

- La **RNA pol** és capaç de catalitzar la unió de ribonucleòtids sense necessitat de l'existència de cadenes ja iniciades. Per això, aquest enzim, anomenat també **primasa**, sintetitza un fragment de molècula de RNA que es coneix com a **encebador**.

- A continuació, la DNA pol III allarga aquest fragment inicial polimeritzant la unió de desoxiribonucleòtids, segons la llei de complementarietat de bases: l'adenina és complementària de la timina, i la citosina de la guanina.



- Posteriorment, la DNA pol I actua com a exonucleasa en sentit 5' → 3' i elimina l'encebador, ara que actua com a polimerasa i omple el buit amb desoxiribonucleòtids.



- A continuació, la ligasa segella la unió entre els dos fragments de DNA.

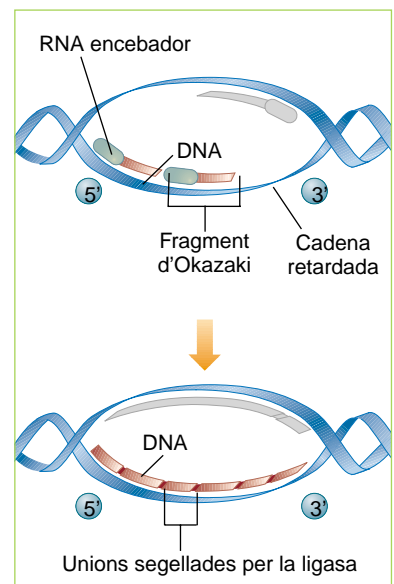
- **Síntesi a partir de la cadena retardada.** Paral·lelament al procés anterior, la cadena retardada serveix de motlle per a la síntesi de la seva complementària. Però, en aquest cas, la necessitat d'extrems 3' lliures de la DNA pol III origina un mecanisme diferent:

- La **primasa** sintetitza diversos encebadors.

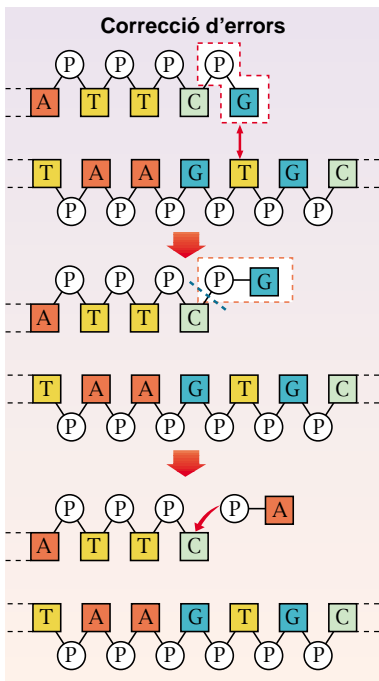
- La **DNA pol III** allarga els fragments d'encebador incorporant-hi nucleòtids en sentit 5' → 3'. Aquests petits fragments tenen entre 1 000 i 2 000 nucleòtids de llargària i s'anomenen **fragments d'Okazaki**, el nom del seu descobridor.

- Posteriorment, la **DNA pol I** substitueix els encebadors per desoxiribonucleòtids.

- Finalment, la **ligasa** segella les unions entre els fragments independents per tal de constituir una cadena sense discontinuïtats.







La síntesi a partir de la cadena conductora es produeix amb **un sol encebador** i s'esdevé de manera **contínua**.

En canvi, la síntesi a partir de la cadena retardada es produeix amb **nombrosos encebadors** i, a més, és **discontínua**.

Mentre es van incorporant els nucleòtids a les cadenes en formació, la DNA pol I recorre les cadenes per tal de comprovar que els nous nucleòtids s'aparellen correctament amb els seus complementaris.

En el cas que es produeixi un aparellament erroni, la DNA pol I atura la síntesi i, amb la seva activitat exonucleàsica 3' → 5', talla l'enllaç del nucleòtid erroni a la cadena i hi col·loca el nucleòtid adequat.

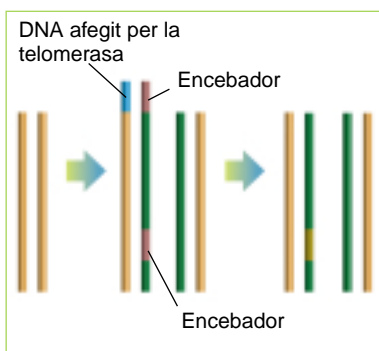
### **Algunes característiques pròpies de la replicació en eucariotes**

En els organismes eucariotes, la replicació del DNA presenta nombroses coincidències respecte de la replicació en els procariotes. Tanmateix, hi ha diferències destacables:

- El procés previ a l'inici de la replicació requereix el desempaquetament d'estructures espacials més complexes que en el cas dels procariotes.
- S'han identificat quatre tipus de polimerases diferents:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ .

Les polimerases  $\alpha$  i  $\delta$  intervenen en la replicació del DNA cromosòmic. La polimerasa  $\beta$  s'encarrega de la reparació d'errors i la  $\gamma$  és la responsable de la replicació del DNA mitocondrial i cloroplàstic.

- Les cèl·lules eucariotes contenen molt més DNA que les procariotes. Per aquest motiu, hi ha nombrosos punts d'inici de la replicació al llarg de cada cromosoma, la qual cosa permet d'accelerar el procés. Per això es formen nombroses forquetes de replicació.
- Els fragments d'Okazaki tenen una extensió menor que en les cèl·lules procariotes, aproximadament entre 100 i 200 nucleòtids.
- El DNA de les cèl·lules eucariotes no està tancat sobre si mateix com el de les cèl·lules procariotes, sinó que és lineal. Tal com hem indicat en la unitat anterior, en eliminar els RNA encebadors dels extrems de les cadenes quedaria una cadena incompleta. L'enzim **telomerasa** allarga els extrems dels cromosomes per tal d'evitar la pèrdua de material genètic durant la replicació.



### **Exercicis**

2. A partir del procés de replicació del DNA en procariotes i de les característiques pròpies de la replicació en eucariotes:

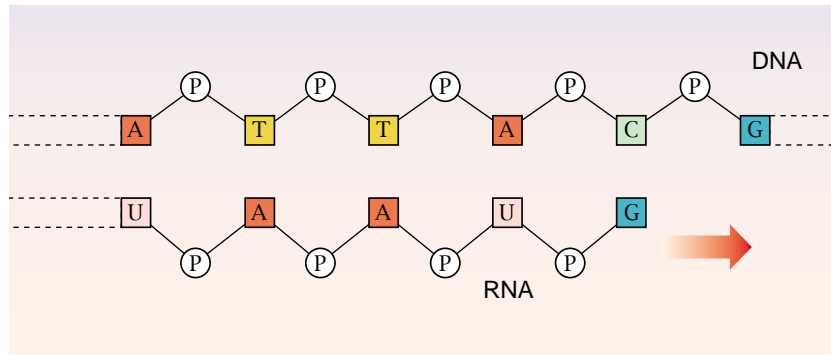
- Descriu detalladament els diversos processos que es donen durant la replicació en els eucariotes. Segueix aquest esquema:
  - Enzims que hi intervenen.
  - Inici de la replicació.
  - Diferències entre cadena conductora i cadena retardada.
  - Acció de l'enzim telomerasa.
- Acompanya la descripció amb dibuixos esquemàtics.

## 2.2. La transcripció

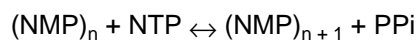
La **transcripció** és el procés pel qual se sintetitzen molècules de RNA complementàries a una de les dues cadenes d'una doble hèlix de DNA.

Durant la transcripció, la seqüència de bases del DNA determina la incorporació dels ribonucleòtids.

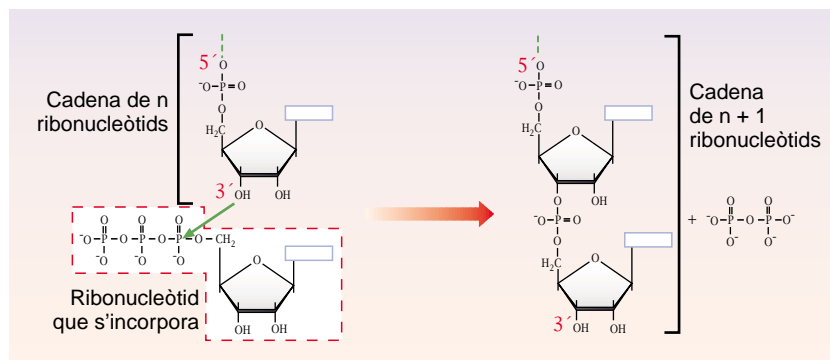
Totes les reaccions de transcripció s'acompleixen a partir de DNA de doble cadena. Fins i tot els virus amb DNA de cadena senzilla sintetitzen una cadena complementària de DNA abans d'iniciar la transcripció.



La transcripció de DNA a RNA és una reacció de síntesi:



- A partir d'un o diversos (n) ribonucleòtids monofosfat (NMP) de la cadena en formació, es produeix la incorporació d'un ribonucleòtid trifosfat (dNTP).
- D'aquesta unió se'n desprèn pirofosfat inorgànic (PPI) i se n'obté una cadena amb un ribonucleòtid més, incorporat al fragment inicial (n + 1).



Els ribonucleòtids que intervenen en la reacció són els corresponents a les bases adenina, citosina, guanina i uracil. L'adenina del DNA és complementària de la base uracil, en l'RNA.

El principal enzim responsable de la transcripció és la **RNA polimerasa (RNA pol)**, que afavoreix dos processos diferents:

- La separació de les dues cadenes de la doble hèlix.
- La incorporació de ribonucleòtids en sentit 5' → 3'. Tal com ja hem vist, a diferència de la DNA pol, aquest enzim catalitza la unió dels ribonucleòtids sense necessitat d'encebador.

S'han analitzat nombroses seqüències promotores de gens de bacteris i de virus.

Per a la seqüència -35, s'han trobat diverses possibilitats, com ara TTGCA, TTGCAT, TTGTAA o TTGACT. Però la que es troba més sovint és TTGACA.

Per a la seqüència -10, també hi ha una certa varietat: TAGATT, TATAAT, TAGCTT o TAAAAT, però la més freqüent és TATATT.

Les semblances en aquest tipus de seqüències reforcen la teoria d'un origen comú per a tots els éssers vius.

## La transcripció en procarïotes

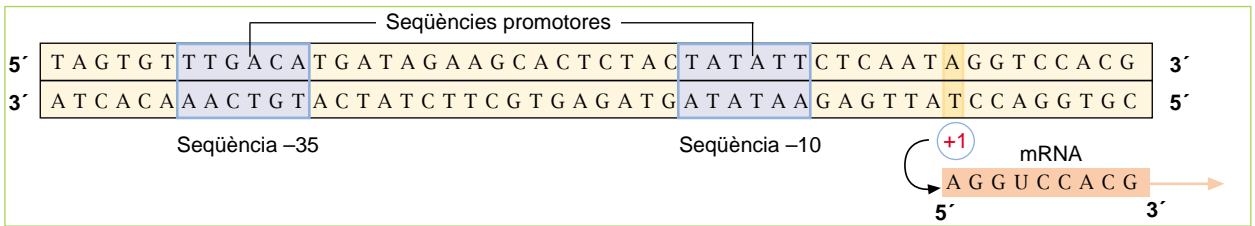
En procarïotes, la transcripció es duu a terme sota el control d'una sola RNA pol. En aquest procés se solen distingir tres fases: *inici*, *elongació* i *acabament*.

### Inici

En la cadena de DNA hi ha unes seqüències especials que reben el nom de **seqüències promotores** o **promotors**.

Aquestes seqüències se situen abans del primer nucleòtid que ha de ser transcrit i que identificarem com a nucleòtid +1. Les seqüències promotores se solen situar, aproximadament, centrades en la posició -35 i -10, anteriors al nucleòtid +1.

La seqüència de nucleòtids dels promotors depèn de cada organisme, però en *Escherichia coli* s'hi han observat coincidències importants: en general, la seqüència -35 correspon a una combinació de nucleòtids similar a **TTGACA**, i la seqüència -10 es correspon habitualment amb la seqüència **TATATT**.

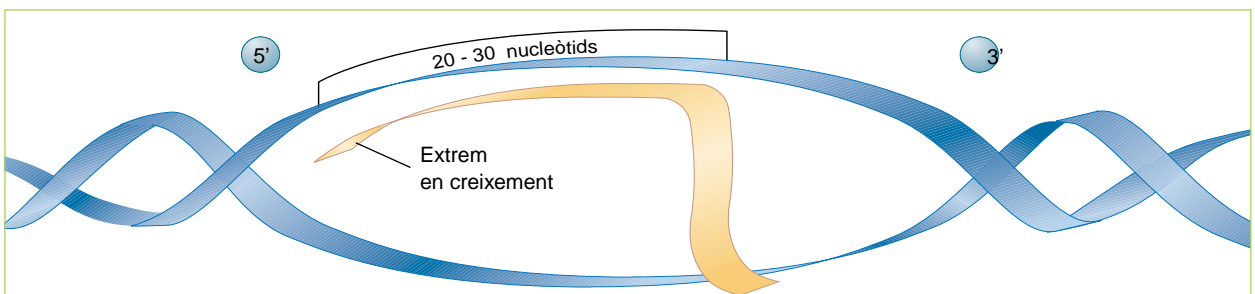


- La RNA pol s'associa a una subunitat proteica coneguda com a subunitat sigma i reconeix la seqüència -35, a la qual s'uneix.
- Aquesta unió facilita la posterior unió de l'enzim a la seqüència -10, molt més propera a l'inici de la transcripció.
- A continuació es desprèn la subunitat sigma. En aquest moment, la RNA pol es troba en la posició correcta per a separar les dues cadenes de DNA i iniciar la transcripció a partir del nucleòtid +1.

### Elongació

A partir de la unió correcta de la RNA pol, aquest enzim inicia la síntesi amb la incorporació del primer ribonucleòtid, segons la llei de complementarietat de bases.

La síntesi progressa en sentit 5' → 3' i l'RNA es manté unit al DNA en un petit fragment d'uns 20 a 30 nucleòtids a partir de l'extrem en creixement.



La resta de la cadena en creixement es dissocia tant de l'enzim com del DNA.

La transcripció es desenvolupa de manera contínua, però amb velocitat variable, ja que de vegades la formació d'estructures espacials, tant en el DNA com en l'RNA, pot dificultar l'avançament de la RNA pol. Se solen transcriure entre 20 i 50 nucleòtids cada segon.

### Acabament

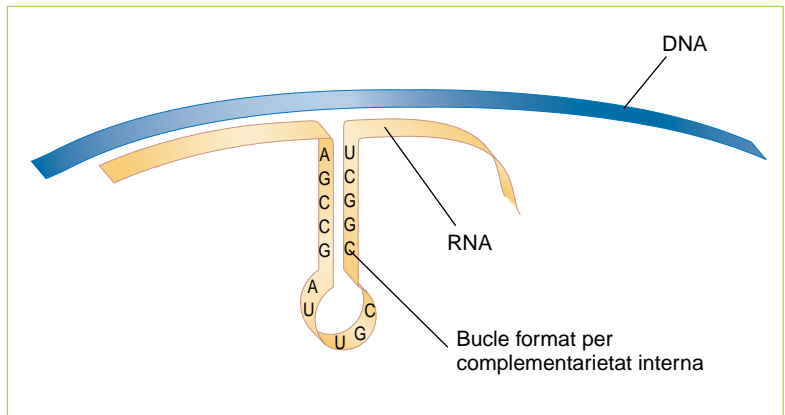
És possible que existeixin diversos mecanismes per a indicar la fi de la transcripció. Alguns d'aquests mecanismes es relacionen amb la formació de bucles en la molècula de RNA que impedeixen l'avançament de la RNA pol i que provoquen el seu despreniment del DNA.

És el cas de les seqüències d'acabament formades per dos fragments de DNA propers, que contenen seqüències que són complementàries entre elles.

En transcriure's aquestes seqüències, es produeix complementarietat interna en la molècula de RNA en formació i, per tant, apareixen bucles que obligarien a finalitzar la síntesi de RNA.

Durant la transcripció, només es transcriu una cadena senzilla del DNA, la cadena **motlle**. L'altra s'anomena **codificadora**.

No totes les seqüències motlle són a la mateixa cadena. Per això, hi ha gens que es transcriuen a partir d'una cadena, mentre que d'altres tenen el motlle en la cadena contrària.



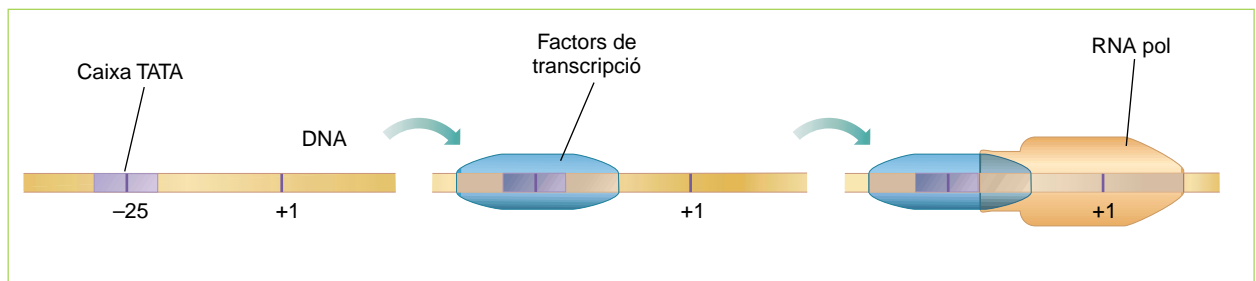
### La transcripció en cèl·lules eucariotes

Durant el procés s'hi poden distingir les mateixes fases que en procarotes, però amb algunes particularitats.

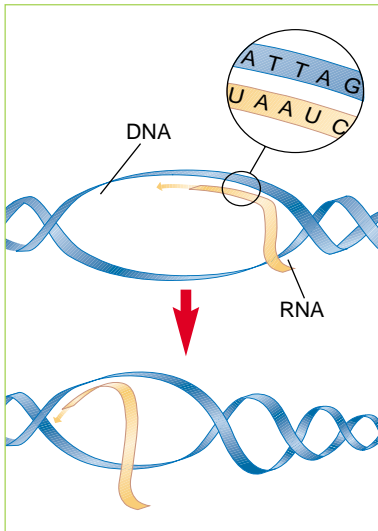
#### Inici

En eucariotes, les **seqüències promotores** o **promotors** se situen, aproximadament, en la posició  $-25$ , és a dir, a uns 25 nucleòtids del lloc d'inici de la síntesi de RNA.

Aquesta seqüència ha estat identificada per a nombrosos gens i en nombroses espècies i s'hi observa una elevada coincidència en la seqüència TATA; per aquest motiu s'anomena **caixa TATA (TATA box)**.



— Les proteïnes anomenades **factors de transcripció (TF)**, de l'anglès *transcription factors*) identifiquen les caixes TATA i s'hi uneixen per a facilitar la ubicació correcta de la RNA pol sobre la cadena de DNA. A continuació s'inicia la síntesi de RNA a partir del nucleòtid  $+1$ .



En les cèl·lules eucariotes hi ha tres tipus de RNA polimerases especialitzades en la síntesi de diferents tipus de RNA:

- La **RNA pol I** intervé en la síntesi de les subunitats grans dels ribosomes.
- La **RNA pol II** és la responsable de la síntesi dels precursors dels RNA missatgers (mRNA), que es traduiran a proteïnes.
- La **RNA pol III** controla la síntesi dels RNA de transferència (tRNA) i de les subunitats petites dels ribosomes.

Generalment, cada RNA pol identifica uns factors de transcripció específics.

Ara seguirem la descripció del procés en el cas de la síntesi d'un mRNA.

Tot i que els detalls del procés no són del tot coneguts, possiblement la mateixa RNA pol II provoca un canvi de conformació en el DNA que permet l'accés a una de les dues cadenes per a copiar-la, i s'inicia la síntesi de RNA.

### Elongació

La RNA pol II va recorrent la doble hèlix i utilitza com a motlle una de les dues cadenes. Aquesta cadena es va llegint des de l'extrem 3' cap al 5'. Alhora, es van unint els ribonucleòtids, l'un darrere l'altre, i la cadena va creixent en sentit 5' → 3'.

Els ribonucleòtids se situen segons la llei de complementarietat de bases, tenint en compte que el ribonucleòtid complementari de l'adenina és l'uracil.

A mesura que es va desprenent la cadena de mRNA acabada de sintetitzar, el DNA recupera la seva estructura espacial normal.

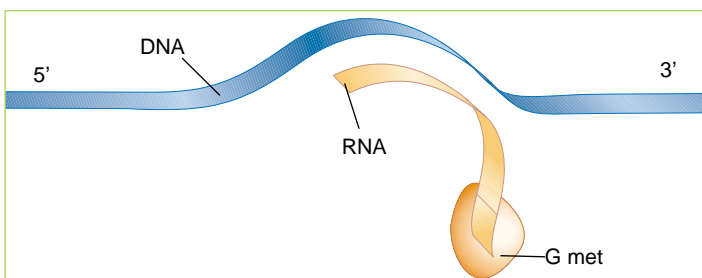
### Acabament

L'acabament es produeix d'una manera similar al mecanisme que hem descrit per a les cèl·lules procariotes.

El procés de síntesi dels altres RNA també es duu a terme d'una manera semblant. Tanmateix, l'mRNA pateix una sèrie de modificacions que descrivim a continuació.

### Modificacions posttranscripcionals de l'mRNA

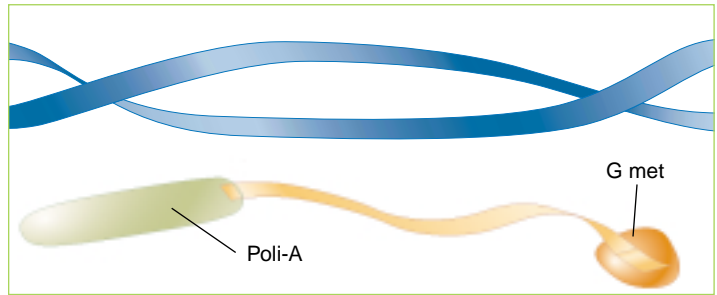
Les principals modificacions que s'esdevenen en l'mRNA eucariota després de la seva síntesi són:



- **Incorporació d'una caputxa.** Per l'extrem 5', l'mRNA incorpora un nucleòtid de guanina metilat que actua com a protecció per tal d'evitar que l'RNA sigui degradat per enzims especialitzats en la destrucció d'aquestes molècules.
- Aquesta *caputxa* s'afegeix poc després de la síntesi de l'extrem 5' i molt abans de finalitzar la síntesi de l'mRNA complet.

- **Incorporació d'una cua.** En l'extrem 3' s'afegeix una cadena d'entre 100 i 200 nucleòtids d'adenina que s'anomena **cua de poli-A**.

Aquesta *cua* pot tenir com a finalitat protegir també aquest extrem de la molècula de la degradació enzimàtica. A més, és possible que intervingui en el pas de l'RNA cap al citoplasma.



La *cua* de poli-A s'afegeix després que l'mRNA s'ha transcrit completament i s'ha després del DNA i de la RNA pol II. Només els RNA transcrits a partir de la RNA pol II tenen *caputxa* i *cua*.

- **Eliminació dels introns.** Els gens eucariotes per a mRNA contenen dos tipus de seqüències:

— **Exons:** seqüències codificadores que donaran lloc a la incorporació d'aminoàcids durant la síntesi de proteïnes.

— **Introns:** seqüències no codificadores que no arriben a traduir-se en aminoàcids.

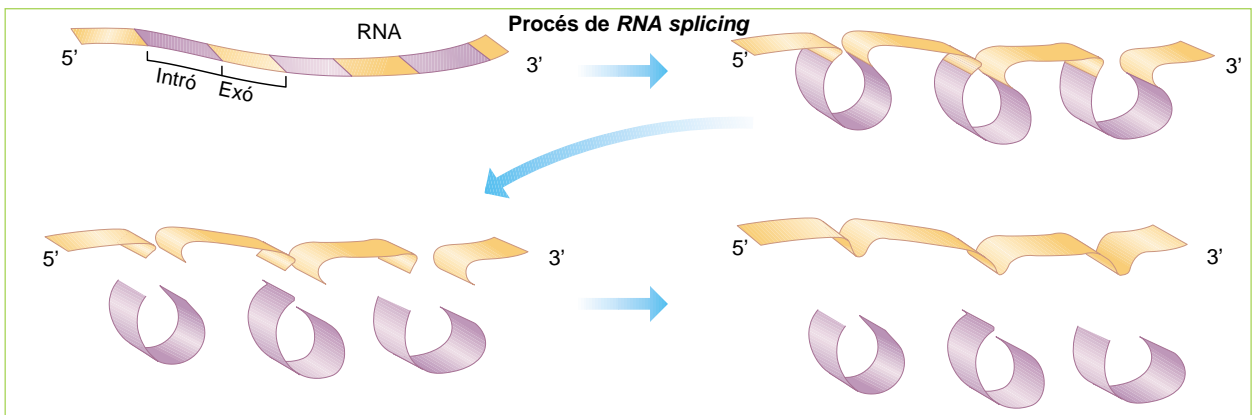
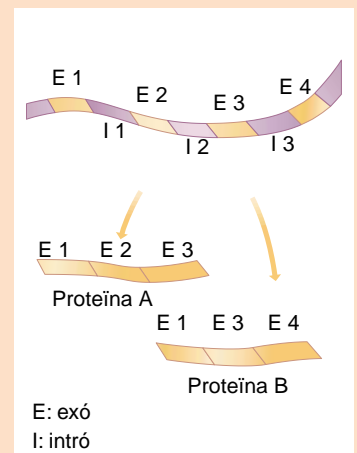
L'mRNA acabat de transcriure conté les seqüències dels exons i les dels introns. Perquè el missatge que conté l'mRNA es pugui transformar en la proteïna correcta, cal que se n'eliminin les seqüències corresponents als introns.

Aquest procés de **maduració** té lloc mitjançant una reacció de **tall i unió** (*RNA splicing*).

— Al llarg de la cadena de RNA transcrit es formen bucles corresponents als introns.

— Diversos enzims produeixen el tall d'aquestes seqüències i la unió entre els exons.

L'existència d'introns i exons permet a les cèl·lules la síntesi de més d'una proteïna a partir d'una única seqüència de DNA.

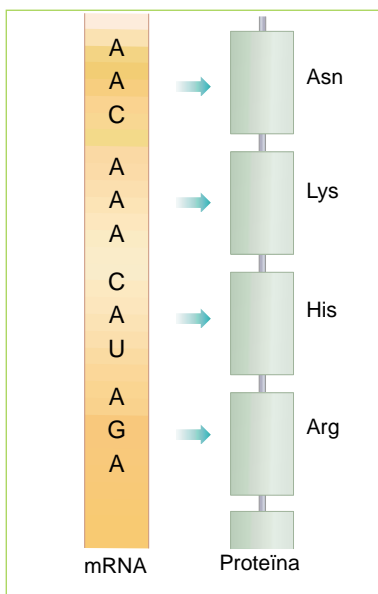


A continuació, l'mRNA es desplaça cap al citoplasma per a la síntesi de proteïnes. Aquest transport es produeix gràcies al reconeixement específic per part de proteïnes situades en els porus de l'embolcall nuclear que, mitjançant transport actiu, permeten el pas de l'mRNA.

L'rRNA i el tRNA, transcrits mitjançant els enzims RNA pol I i RNA pol III, experimenten un procés de maduració una mica diferent, que inclou l'adquisició de la seva configuració espacial correcta. Posteriorment, surten al citoplasma i intervien, també, en la síntesi de proteïnes.

La diferència més destacable entre el procés de síntesi de proteïnes en procarïotes i en eucariotes es deu al fet que, en els organismes procarïotes, tant la transcripció com la traducció tenen lloc en l'únic compartiment que conté la cèl·lula: el **citoplasma**. A més, tots dos processos s'esdevenen de manera gairebé **simultània**.

En els organismes eucariotes el procés té lloc en dos compartiments diferents i no són simultanis: la transcripció es produeix a l'interior del **nucli**; la traducció és posterior i es produeix en el **citoplasma**.



**Símbols emprats per a la representació dels aminoàcids, i el seu significat**

<b>Ala</b> — Alanina	<b>Leu</b> — Leucina
<b>Arg</b> — Arginina	<b>Lys</b> — Lisina
<b>Asn</b> — Asparagina	<b>Met</b> — Metionina
<b>Asp</b> — Aspartat	<b>Phe</b> — Fenilalanina
<b>Cys</b> — Cisteïna	<b>Pro</b> — Prolina
<b>Gln</b> — Glutamina	<b>Ser</b> — Serina
<b>Glu</b> — Glutamat	<b>Thr</b> — Treonina
<b>Gly</b> — Glicina	<b>Trp</b> — Triptòfan
<b>His</b> — Histidina	<b>Tyr</b> — Tirosina
<b>Ile</b> — Isoleucina	<b>Val</b> — Valina

### 2.3. La traducció

És el procés mitjançant el qual a partir de l'mRNA se sintetitza una proteïna. S'esdevé de manera similar en procarïotes i en eucariotes.

Descriurem la traducció prenent com a exemple una cèl·lula eucariota. El procés s'inicia a partir de:

- Un **mRNA** convenientment **modificat**.
- **Ribosomes** lliures en el citoplasma amb la seva configuració correcta.
- **tRNA** units als diferents **aminoàcids**.

Aquest procés es considera una veritable traducció, ja que el missatge, escrit en l'RNA a partir d'una còpia del DNA, es **tradueix** en una seqüència d'aminoàcids. El **codi genètic** és la clau que permet d'interpretar el missatge.

#### El codi genètic

El **codi genètic** estableix una correspondència entre cada grup de tres nucleòtids consecutius de la cadena de mRNA i un aminoàcid.

Aquests grups de tres nucleòtids o triplets s'anomenen **codons**.

El codi genètic és **universal**, és a dir, en tots els éssers vius cada triplet codifica per al mateix aminoàcid.

#### Taula de correspondències entre codons i aminoàcids

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

A més, es diu que està **degenerat**, ja que hi ha 64 possibles triplets i només 20 aminoàcids diferents, és a dir, hi ha aminoàcids que estan codificats per més d'un triplet. Existeixen uns triplets especials:

- **AUG**, que codifica per a metionina i que correspon a l'inici de la síntesi.
- **UAA**, **UGA** i **UAG**, que determinen la fi de la síntesi.

A continuació descriuem les diverses fases del procés de traducció i síntesi d'una proteïna a partir de l'mRNA corresponent.

### Unió dels aminoàcids als tRNA

La figura de l'esquerra representa la forma habitual que adquireixen les molècules de tRNA. En aquesta estructura es distingeix una regió especial que conté un triplet anomenat **anticodó**. Aquesta seqüència és específica per a cada aminoàcid i determina la unió entre cada tRNA i un aminoàcid, per tal de formar un aminoacil-tRNA.

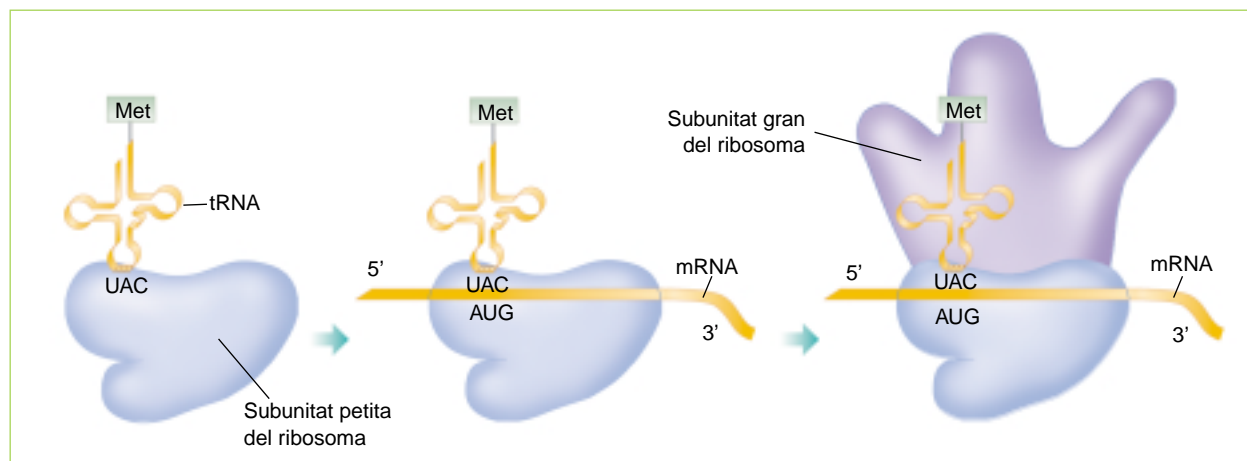
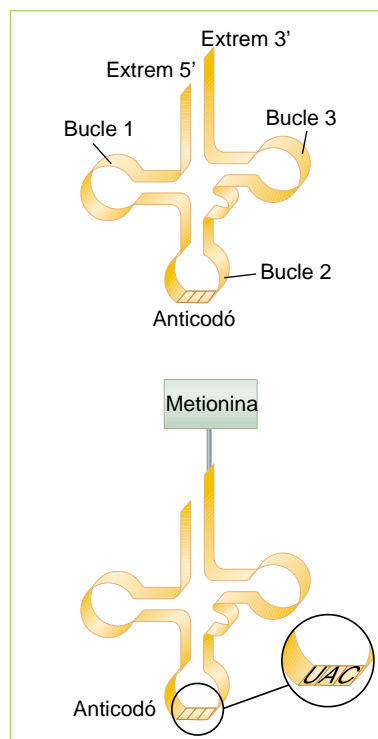
La unió està catalitzada per un conjunt d'enzims anomenats **aminoacil-tRNA sintetases**.

Existeix un enzim aminoacil-tRNA sintetasa per a cada aminoàcid; són, per tant, enzims amb una funció molt especialitzada, ja que reconeixen cada aminoàcid i l'uneixen específicament a l'extrem 3' del tRNA que conté l'anticodó corresponent.

### Acoblament del complex d'iniciació

El complex d'iniciació està format per un ribosoma, el tRNA corresponent al primer aminoàcid i l'mRNA que s'ha de traduir.

La unió dels diferents components s'esdevé de la manera següent:



— El tRNA que transporta l'aminoàcid metionina s'uneix a la subunitat petita del ribosoma.

— L'extrem 5' de l'mRNA que conté el codó corresponent a metionina (AUG) s'uneix també a la subunitat petita del ribosoma. L'mRNA es «llegirà» en sentit 5' → 3'.

En aquesta posició queden enfrontats l'anticodó de l'aminoacil-tRNA i el codó de l'mRNA. Per tal que el procés s'iniciï correctament, els dos triplets han de ser complementaris: UAC en l'anticodó del tRNA i AUG en el codó de l'mRNA.

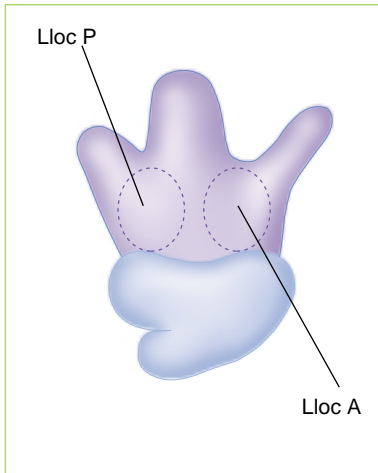
— Al complex acabat de formar s'hi uneix la subunitat gran del ribosoma. En aquest moment queda constituït el complex d'iniciació.

Totes les interaccions moleculars que fan possible la formació d'aquest complex són afavorides per l'acció d'un conjunt de proteïnes anomenades **factors d'iniciació**.

Hi ha una gran especificitat entre cada tRNA i l'aminoàcid al qual s'ha d'unir; també hi ha especificitat entre el codó de l'mRNA i l'anticodó de l'aminoacil-tRNA.

En canvi, no hi ha cap especificitat entre l'mRNA i els ribosomes. Qualsevol mRNA pot ser traduït en qualsevol ribosoma.





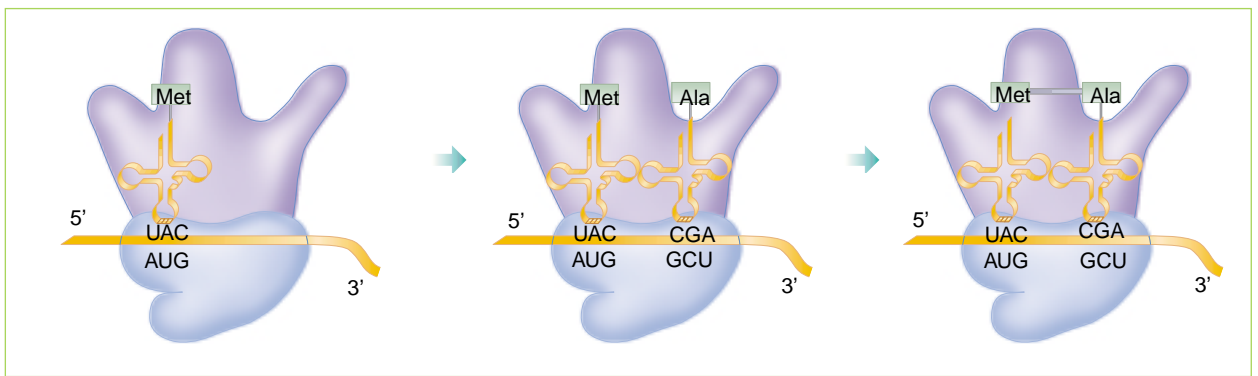
### Elongació de la cadena d'aminoàcids

A partir de la formació del complex d'iniciació, es distingeixen en el ribosoma dos **llocs actius**: el lloc P o lloc d'unió del peptidil-tRNA (el tRNA unit al pèptid en creixement) i el lloc A o lloc d'unió de l'aminoacil-tRNA.

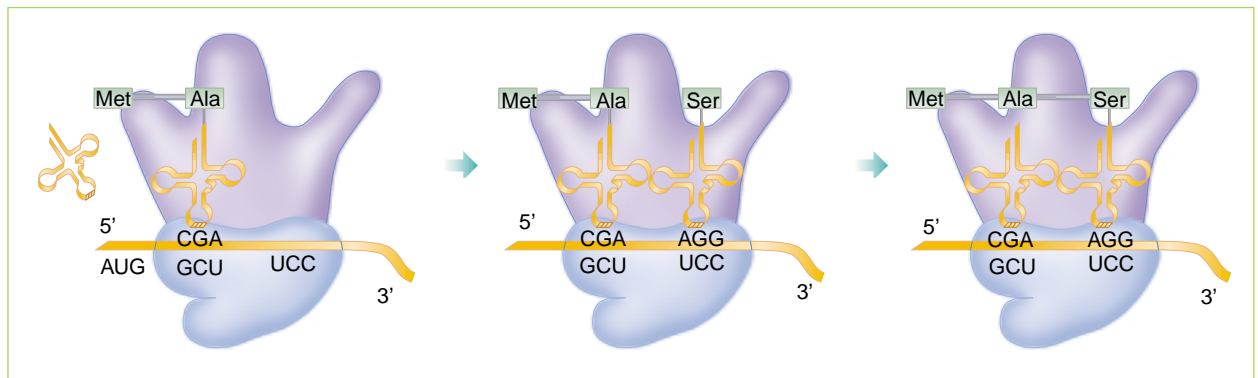
A l'inici de la síntesi, el **lloc P** està ocupat pel primer aminoacil-tRNA i el primer codó de l'mRNA; s'hi produeix la unió entre les bases complementàries de totes dues molècules.

A continuació, en el **lloc A**, s'hi situa l'aminoacil-tRNA següent; en aquesta posició el seu anticodó queda enfrontat al segon codó de l'mRNA.

Tot seguit, es produeix l'enllaç peptídic entre el primer i el segon aminoàcids.



Un cop units els dos aminoàcids, el ribosoma es desplaça al codó següent; d'aquesta manera:



Les **mutacions** són canvis en la composició química del DNA que afecten la seqüència de bases nitrogenades.

Els canvis en la seqüència afecten els triplets i, per tant, la incorporació dels aminoàcids, de manera que originen proteïnes amb l'estructura i la funció alterades.

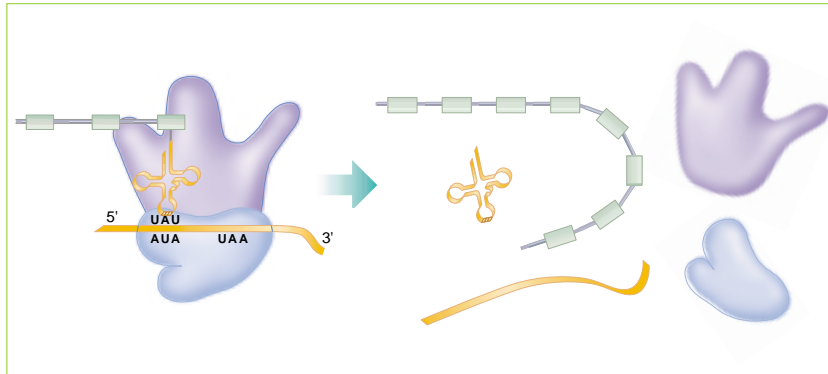
- Es desprèn el tRNA que transportava metionina i el primer codó de l'mRNA queda fora del ribosoma.
- El complex tRNA-mRNA que era en el lloc A queda situat en el lloc P.
- En el lloc A hi queda el tercer codó de l'mRNA accessible a l'aminoacil-tRNA que transporti l'anticodó corresponent.
- A continuació es produeix l'enllaç peptídic entre el segon i el tercer aminoàcids i es repeteix tot el procés.

## Acabament de la síntesi

Quan el lloc A del ribosoma se situa enfront d'un codó de fi de síntesi (UAA, UGA, UAG), no es troba cap tRNA específic per a aquest codó.

En aquest moment es produeix la unió de proteïnes específiques que afavoreixen la dissociació del complex d'iniciació:

- La proteïna acabada de sintetitzar se separa del darrer tRNA.
- L'mRNA es desprèn del ribosoma.
- Les dues subunitats del ribosoma se separen.



És molt freqüent que un mateix mRNA pugui ser traduït alhora per diversos ribosomes, situats en diferents posicions al llarg de la cadena. Aquestes estructures s'anomenen **poliribosomes** o **polisomes**.

## Exercicis

3. Formeu parelles i elaboreu un resum sobre la manera com es duen a terme la transcripció i la traducció. Podeu seguir l'esquema següent:
  - Definició del procés.
  - Fases que s'hi distingeixen.
  - Molècules que hi intervenen.
  - Interaccions entre les diverses molècules.
  - Característiques específiques de les cèl·lules procariotes i de les cèl·lules eucariotes respecte d'aquests processos.— Prepareu una exposició oral i acompanyeu-la d'esquemes per tal de mostrar-ne els aspectes més rellevants.  
— Elaboreu un qüestionari amb deu preguntes clau perquè els vostres companys comprovin els seus coneixements sobre el tema.
4. Fixa't en les seqüències següents:

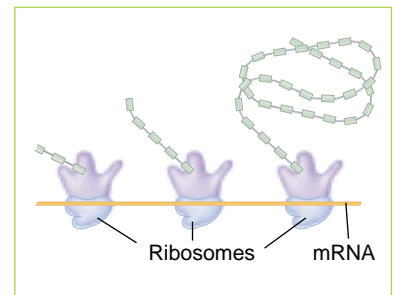
UGA – TATA – AUG – TTGACA

— Digues si corresponen a DNA o a RNA i explica quin tipus de senyal representen durant el flux d'informació del DNA.
5. Observa la seqüència següent:

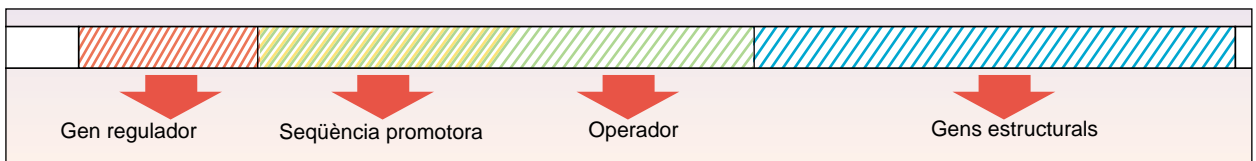
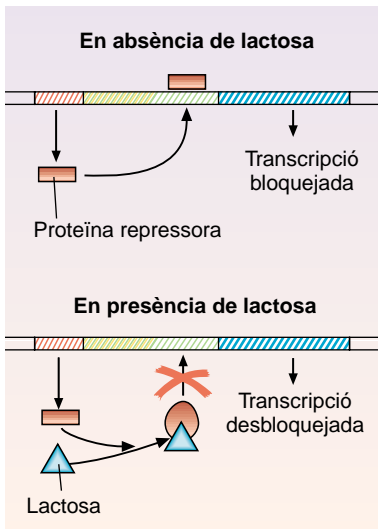
AAGCGAAAATCTCGAAACGAGATTTTCGCTT

  - Quina característica hi destaca?
  - Formula una hipòtesi sobre la possible funció d'aquesta seqüència.

Malgrat que la incorporació d'aminoàcids s'inicia sempre amb metionina, no totes les proteïnes comencen amb aquest aminoàcid, ja que després de la seva síntesi experimenten un procés de maduració en el qual s'acostumen a perdre alguns aminoàcids de l'extrem N-terminal.



*En els poliribosomes se sintetitzen diverses còpies de la mateixa proteïna a partir d'una molècula d'mRNA i diversos ribosomes.*



## 2.4. Control de l'expressió gènica

Els eficaços processos que acabem de descriure adquireixen la seva total importància fisiològica quan les cèl·lules els poden activar o reprimir segons les necessitats biològiques que presenten.

Amb aquesta finalitat existeixen mecanismes de control que permeten de regular l'expressió dels gens; per mitjà d'aquests mecanismes se sintetitzen unes proteïnes quan la cèl·lula les necessita i es deixen de sintetitzar quan no calen.

A mitjan segle XX, François Jacob i Jacques Monod van descriure un mecanisme de control en els procarïotes: l'operó.

Un **operó** és un conjunt de gens estructurals que s'expressen de manera coordinada; solen correspondre a gens que codifiquen per a diferents enzims d'una mateixa via metabòlica. Les seqüències de DNA que trobem en l'operó i associades a l'operó són les següents:

- Una **seqüència promotora**, o **promotor**, com les que ja hem descrit en parlar de la transcripció, que se situa uns quants nucleòtids abans del punt d'inici de la síntesi de mRNA.
- Un **operador**, una seqüència que pot ser bloquejada per una proteïna repressora.
- Els **gens estructurals**, que codifiquen la síntesi de les proteïnes que actuen coordinadament.
- Un **gen regulador**, que determina la síntesi de la proteïna repressora.

El primer operó que es va estudiar exhaustivament fou l'**operó lac** d'*Escherichia coli*. Aquest operó regula la síntesi dels enzims que controlen la **degradació de la lactosa**.

*E. coli* utilitza, preferentment, la glucosa com a font de carboni i d'energia; tanmateix, també pot usar lactosa. Per tant, i pel fet que aquesta utilització és ocasional, constitueix un important estalvi biològic per a la cèl·lula que la maquinària degradativa de la lactosa només es posi en marxa quan calgui.

D'aquesta manera, la cèl·lula controla l'expressió dels gens de l'operó:

- **En absència de lactosa:**
  - El gen regulador es transcriu i se sintetitza la proteïna repressora.
  - La proteïna repressora s'uneix a l'operador. Com que l'operador està superposat amb el promotor, la RNA pol no pot accedir al promotor i la transcripció dels gens estructurals queda bloquejada.
- **En presència de lactosa:**
  - La lactosa s'uneix a la proteïna repressora, la qual cosa provoca un canvi en la seva conformació que li impedeix d'unir-se a l'operador.
  - L'operador no està bloquejat i s'inicia la síntesi de mRNA a partir dels gens estructurals.

A més dels operons, hi ha altres sistemes de regulació que afecten el posterior processament de l'mRNA i, fins i tot, modificacions en la síntesi de proteïnes.

Queden moltes qüestions per resoldre pel que fa als mecanismes de regulació gènica en els **organismes eucaariotes**. En general, són sistemes molt diversificats i progressivament més complexos com més especialització adquireixen les cèl·lules de l'organisme.

Aquests sistemes es basen en l'activació o repressió de diversos processos, com ara la síntesi de mRNA, les modificacions de l'mRNA transcrit, el seu transport al citoplasma, la traducció a proteïna i les modificacions sobre les proteïnes.

### 3. Les mutacions

Les **mutacions** són canvis en la composició química del DNA. Les mutacions es produeixen de manera espontània en tots els genomes i per l'acció de diverses substàncies o fenòmens que interaccionen amb el DNA. També es poden produir per errors durant els processos de replicació.

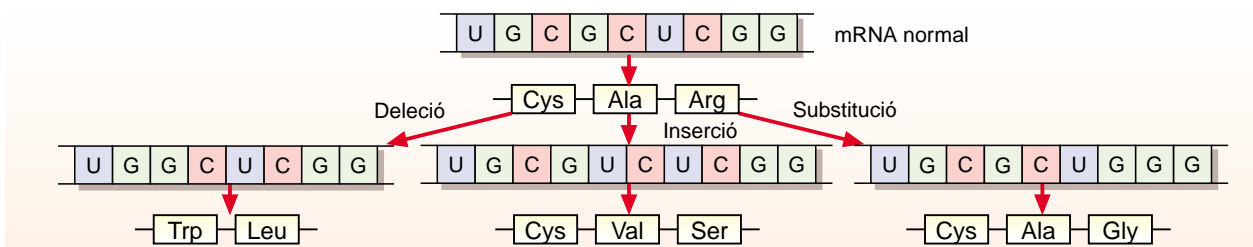
Existeixen diversos tipus de mutacions.

**Puntuals.** Afecten un sol parell de bases, i poden ser:

Delecions	Insercions	Substitucions
Es perd un parell de bases.	A la seqüència normal s'hi afegeix un parell de bases.	Un parell de bases és substituït per un altre.

Poden alterar la seqüència d'aminoàcids de la proteïna corresponent i modificar el fenotip de l'individu.

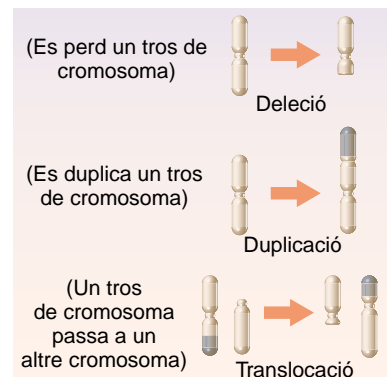
- Les **delecions** i les **insercions** modifiquen la **pauta de lectura**, és a dir, provoquen una alteració de tots els triplets, des del punt on es produeix la mutació cap endavant. Solen tenir conseqüències negatives per a l'activitat de l'organisme.
- Les **substitucions** alteren **un únic aminoàcid**. Aquesta modificació pot millorar o bé perjudicar la supervivència, segons les característiques de la proteïna obtinguda. També pot passar que no tinguin cap efecte, si el canvi origina un triplet que codifica el mateix aminoàcid que el DNA anterior a la mutació. En aquest cas reben el nom de mutacions **silencioses**.



**Cromosòmiques.** Afecten fragments d'un cromosoma, i poden ser:

- **Delecions**, si es perd un tros de cromosoma.
- **Duplicacions**, quan es repeteix un fragment de cromosoma.
- **Translocacions**, si un fragment de cromosoma es desprèn de la seva posició normal i s'uneix a un altre cromosoma.

En aquests casos, les delecions són les mutacions amb conseqüències més negatives, ja que poden implicar la pèrdua de gens imprescindibles per a l'activitat de l'organisme.



**Aneuploïdies.** Alteracions en el nombre de cromosomes, normalment per excés o defecte d'un cromosoma sencer.

Aquest tipus de mutacions acostumen a originar un conjunt de trastorns, o *síndrome*, que alteren el funcionament de l'organisme, i que fins i tot poden impedir-ne la supervivència.

En l'ésser humà, se'n coneixen alguns casos, principalment **trisomies**, és a dir, presència de tres cromosomes en comptes de dos per a una parella. També es dona un cas de **monosomia** del cromosoma X, la qual cosa significa que hi ha un únic cromosoma X en la parella corresponent als cromosomes sexuals.

Trisomies de les parelles de cromosomes autosòmics	Dotacions cromosòmiques sexuals alterades
De la parella 13 o síndrome de Patau	X0 Síndrome de Turner
De la parella 18 o síndrome d'Edwards	XXX Síndrome de triple X
De la parella 21 o síndrome de Down	XXY Síndrome de Klinefelter
	XYY Síndrome de doble Y

Poden produir-se altres aneuploïdies, però llurs conseqüències són tan greus que els individus no arriben a néixer, ja que es produeixen avortaments espontanis.

**Poliploïdies.** Dotacions cromosòmiques superiors a la diploide i múltiples de  $n$ :  $3n$ ,  $4n$ ...

Poden produir-se per diverses causes, com ara per un error durant la meiosi o per la fecundació d'un òvul per més d'un espermatozoide. Aquest tipus de mutacions es toleren millor en espècies de plantes que d'animals, i solen originar individus de dimensions superiors a les normals.

Si la poliploïdia és parella ( $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$ ...), els individus solen ser fèrtils i la mutació es transmet als descendents.

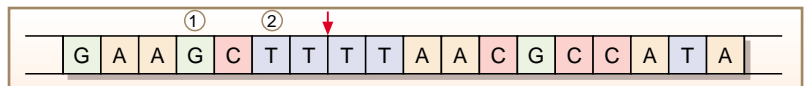
Si la poliploïdia és imparella ( $3n$ ,  $5n$ ...), els individus solen ser estèrils, per dificultats en l'aparellament dels cromosomes durant la meiosi. Algunes tècniques de cultiu de vegetals afavoreixen les poliploïdies imparelles, ja que, com que són estèrils, els fruits d'aquestes plantes tenen llavors molt petites o fins i tot absents, la qual cosa augmenta el valor comercial d'aquests productes.

El 70% de les plantes gramínies són poliploides.

El blat actual és un dels millors exemples de poliploïdia. Té 21 parelles de cromosomes que procedeixen de tres espècies ancestrals, cadascuna de les quals tenia una dotació de set parelles de cromosomes.

## Exercicis

6. Observa l'esquema de la transcripció de la pàgina 128 i transforma aquest fragment de DNA en mRNA.

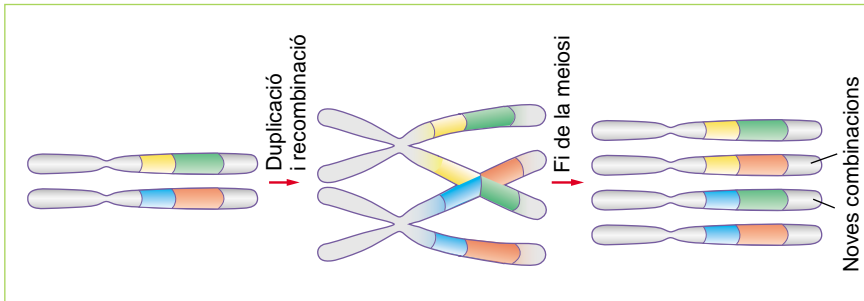


- Amb la clau genètica de la pàgina 130, passa l'mRNA a proteïna.
- Suposa que es produeixen les mutacions següents:
  - 1 se substitueix per A.
  - Desapareix la base 2.
  - S'afegeix una base T en el punt indicat amb una fletxa.
- Transforma els fragments de DNA que resulten de les diverses mutacions en mRNA i aquest darrer en proteïna. Descriu els efectes de cada mutació.

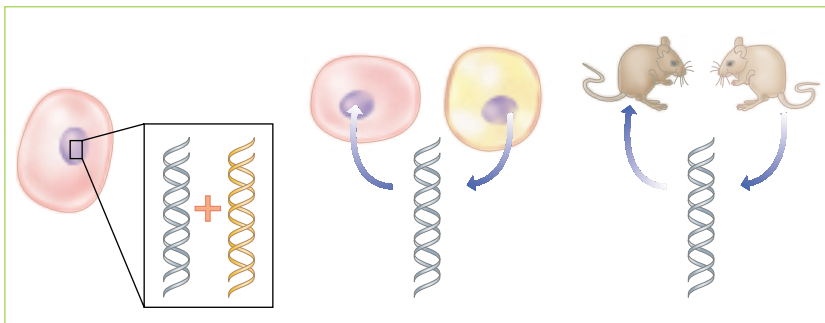
## 4. L'enginyeria genètica

Es coneix com a **enginyeria genètica** el conjunt de tècniques basades en la manipulació del DNA. De vegades també s'utilitza l'expressió **tecnologia del DNA recombinant**, ja que moltes tècniques es basen en la recombinació de fragments de DNA.

Recordem que durant el paquetè de la profase I de la meiosi es produeix una recombinació entre els cromosomes duplicats. La recombinació té com a conseqüència la reorganització dels al·lels. Per aquest motiu, al final de la meiosi apareixen combinacions gèniques diferents de les dels cromosomes originals.



La recombinació gènica al laboratori es realitza mitjançant la unió de fragments de DNA que originalment estan separats perquè corresponen a cromosomes diferents de la mateixa cèl·lula, a cèl·lules diferents o, fins i tot, a organismes diferents.



L'enginyeria genètica s'aplica amb finalitats molt diverses: per exemple, tots els fenòmens que hem descrit fins ara en aquesta unitat s'han desxifrat mitjançant l'aplicació de tècniques d'enginyeria genètica.

D'altra banda, la tecnologia del DNA recombinant obre tot un univers de possibilitats, algunes de les quals són prou controvertides. Mitjançant la manipulació del DNA és possible que un bacteri sintetitzi una proteïna humana, o bé, que per tal de fabricar una vacuna un virus redueixi la seva capacitat infecciosa. Així, en el futur, també es podria modificar la dotació genètica d'una persona per tal de corregir una malaltia hereditària.

Però també seria possible que, com qualsevol altre avenç científic, s'apliqués en situacions en què l'objectiu primordial no fos el benestar de tota la humanitat i la millora de les condicions del medi ambient per a tots els éssers vius. Per aquesta raó, diverses organitzacions internacionals estudien la manera de regular l'aplicació d'aquestes tècniques.

A continuació descriurem de manera senzilla algunes tècniques emprades en els projectes d'enginyeria genètica i la manera com s'apliquen.

## 4.1. Instruments i tècniques utilitzats en enginyeria genètica

Per tal d'obtenir noves combinacions de gens s'han de dur a terme un seguit d'operacions en les quals se solen utilitzar enzims, microorganismes i virus com a «instruments» imprescindibles.

### Enzims

A partir de diverses espècies de bacteris, llevats i animals, i també de virus, s'han aïllat i catalogat nombrosos enzims que es poden utilitzar en el laboratori a l'hora de manipular el DNA. Aquests enzims permeten de dur a terme moltes operacions (tallar, copiar, enganxar...) per tal d'obtenir noves combinacions de gens dins d'un organisme o bé transferir DNA d'un organisme a un altre.

A continuació descriurem alguns grups d'enzims, la seva activitat i diversos exemples, i concretarem de quin organisme o virus s'acostumen a extreure.

Alguns d'aquests enzims són grans polipèptids, formats per diverses subunitats amb funcions diferents. Per aquest motiu tenen més d'un tipus d'activitat, com en el cas de la DNA pol I d'*E. coli*.

Grups d'enzims	Activitat	Exemple
<b>DNA polimerases</b>	Afegeixen nucleòtids a petits fragments pre-existents o encebadors.	DNA polimerasa I d' <i>Escherichia coli</i>
<b>Exonucleases i endonucleases</b>	Trenquen els enllaços fosfodièster entre els nucleòtids. Les exonucleases trenquen pels extrems de les cadenes i les endonucleases, per l'interior.	DNA polimerasa I d' <i>Escherichia coli</i>
<b>Endonucleases de restricció o restrictases</b>	Reconeixen una seqüència de nucleòtids específica i trenquen els enllaços entre ells.	Eco R I d' <i>Escherichia coli</i>
<b>Desoxiribonucleases</b>	Fan talls en una de les dues cadenes de la doble hèlix.	Desoxiribonucleasa I del pàncrees de vaca
<b>Ligases</b>	Formen enllaços fosfodièster entre un fosfat 5' i un hidroxil 3'.	Ligasa del fag T4
<b>Transcriptases inverses</b>	Sintetitzen DNA a partir de RNA.	Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosi aviària
<b>Transferases terminals</b>	Afegeixen nucleòtids a l'extrem 3'.	Transferasa terminal del tim de vedella

### Microorganismes i virus

S'utilitzen com a receptors de fragments de DNA, la qual cosa permet:

- Obtenir, en poc temps, **nombroses còpies** del DNA que els ha estat transferit, gràcies a la seva elevada taxa de divisió.
- Afavorir la transferència de DNA a altres organismes, ja que de manera natural els microorganismes i els virus participen en molts intercanvis de material genètic. Els més habituals són la *transducció*, la *conjugació* i la *transformació*.

La **transducció** és un mecanisme de transferència de gens entre bacteris que té un virus com a vehicle.

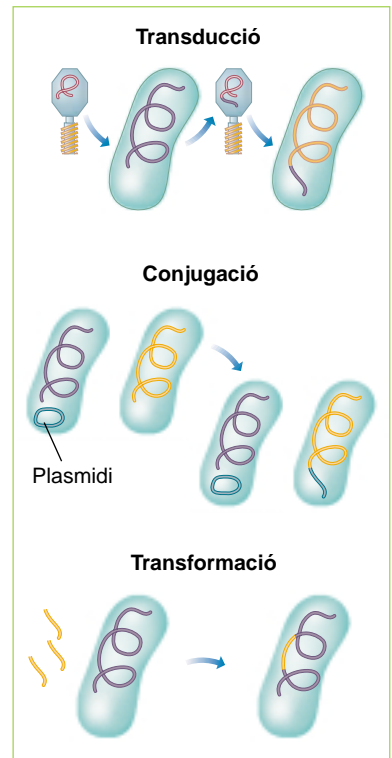
Es pot produir a l'interior de bacteris infectats per un virus, si durant la formació de les noves partícules víriques s'obté un virus que conté un fragment del cromosoma bacterià.

Quan aquest virus infecta una altra cèl·lula bacteriana, li transfereix el DNA procedent del bacteri inicial.

La **conjugació** és un procés d'intercanvi de material genètic entre bacteris que s'esdevé mitjançant plasmidis.

Un plasmidi és un fragment de DNA, tancat sobre si mateix i de petites dimensions, que té capacitat per a passar d'una cèl·lula a una altra. En incorporar-se a la cèl·lula receptora, els plasmidis es poden recombinar amb el cromosoma bacterià.

Finalment, la **transformació** és la incorporació a les cèl·lules bacterianes de fragments de DNA lliures en el medi de cultiu.



## 4.2. Disseny d'un projecte d'enginyeria genètica

Per tal de mostrar un exemple d'utilització de les tècniques d'enginyeria genètica proposem de seguir, d'una manera senzilla, el desenvolupament d'un projecte de clonatge.

El **clonatge** és un procés d'obtenció de còpies idèntiques que es pot aplicar en àmbits molt diversos: es poden clonar fragments de DNA, cèl·lules o individus.

En el nostre cas descriurem un mètode de clonatge de fragments de DNA, que es desenvoluparà en les fases següents:

- Obtenció de **fragments** de DNA.
- **Unió** dels fragments obtinguts a un DNA **vector**, normalment un plasmidi, mitjançant recombinació.
- **Introducció** del DNA recombinant en la **cèl·lula receptora**.
- **Identificació** del DNA clonat.

### Obtenció de fragments de DNA

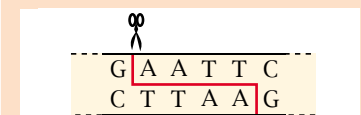
Es produeix mitjançant la utilització d'**endonucleases de restricció**. Aquests enzims trenquen els enllaços fosfodièster d'una doble hèlix de DNA per una seqüència específica, anomenada **diana de restricció**.

Les dianes de restricció corresponen, en general, a seqüències de pocs nucleòtids, normalment entre quatre i vuit, i poden ser de dos tipus:

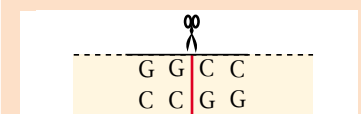
- Dianes que originen un tall situat en una posició diferent de cada cadena; en aquest cas s'obtenen uns extrems monocatènaris. L'enzim Eco R I efectua aquest tipus de talls.
- Dianes que originen un tall situat en el mateix punt de les dues cadenes de la doble hèlix, com en el cas de l'enzim de restricció Hae III.

El tractament amb endonucleases de restricció origina fragments de DNA amb característiques diverses segons l'enzim emprat.

**Eco R I** és una endonucleasa de restricció d'*Escherichia coli*. La seva diana de restricció i el tall que origina es representen a continuació.



**Hae III** és una endonucleasa de restricció d'*Haemophilus aegyptius*, que origina talls en la diana de restricció següent.





Els enzims de restricció es troben de forma natural en nombrosos grups de microorganismes, en els quals acompleixen una funció defensiva: destrueixen molècules de DNA estranyes que s'incorporen a la cèl·lula per mecanismes diversos.

Les seqüències del genoma bacterià que podrien ser reconegudes com a dianes per un enzim de restricció del mateix bacteri estan modificades perquè l'enzim no les reconegui i, per tant, el DNA del bacteri no és atacat.

Les característiques electroquímiques del DNA permeten de fer-lo migrar en un camp elèctric. Aquesta propietat s'aplica en l'**electroforesi**, la qual permet de separar diverses molècules segons les seves dimensions.

Es pot arribar a distingir entre molècules que difereixen només en un nucleòtid de llargària.

Les molècules de DNA, o els fragments de molècula, es poden marcar.

El **marcatge** se sol dur a terme amb elements radioactius; un dels més habituals és el  $P^{32}$ , el qual, inclòs en el medi de cultiu en les condicions adequades, s'incorpora a les cadenes en síntesi.

L'exposició sobre una placa fotogràfica permet de seguir la pista de les molècules marcades, en situacions molt diverses: en l'interior d'una cèl·lula, en una colònia de bacteris o en un gel d'electroforesi.

Es coneixen més de 100 enzims de restricció, els quals es comercialitzen per a utilitzar-los en enginyeria genètica.

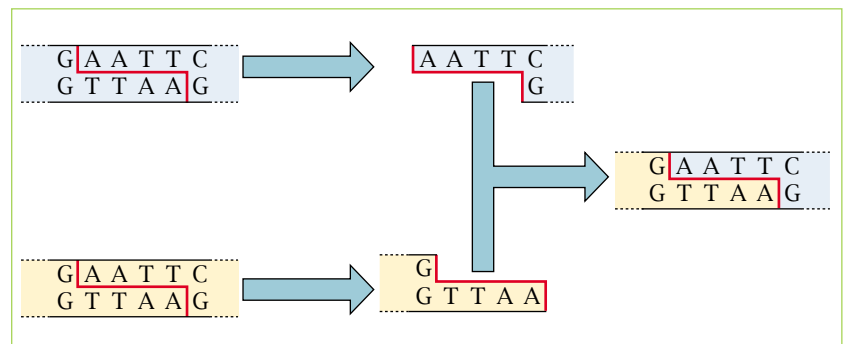
### Unió dels fragments a un plasmidi

Després del tractament amb enzims de restricció incorporarem els fragments obtinguts a un plasmidi, el qual ha d'haver estat seleccionat prèviament, ja que és important que tingui les característiques següents:

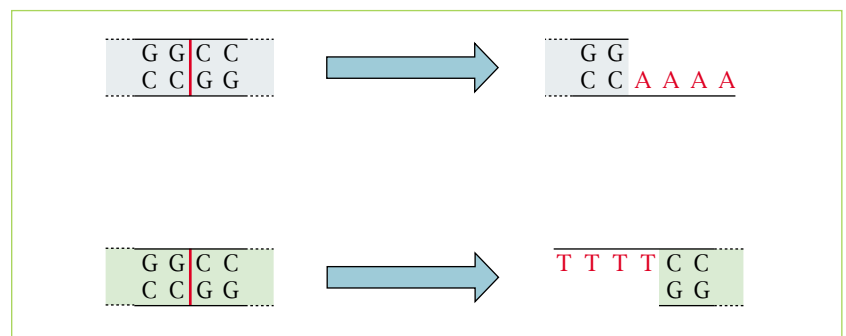
- Ha de tenir **una sola diana de restricció** per a l'enzim utilitzat. Si en presentés més d'una, el plasmidi es tallaria en diversos trossos, la qual cosa dificultaria la unió posterior de tots els fragments de DNA.
- **No ha de contenir gens** que puguin tenir **efectes virulents** sobre la cèl·lula receptora.
- És important que contingui **dos gens** que li confereixin **resistència a dos antibiòtics** diferents. Un d'aquests dos gens ha d'incloure en la seva seqüència la diana de restricció. Aquesta condició és imprescindible per a poder identificar, posteriorment, les cèl·lules que hagin incorporat el fragment de DNA.

Per tal de facilitar la unió entre el fragment de DNA i el plasmidi convé que tots dos hagin estat tallats pel mateix enzim de restricció:

- Si es tracta d'un enzim com ara **Eco R I**, els extrems monocatenaris que s'obtenen són cohesius, ja que presenten seqüències de nucleòtids complementàries.

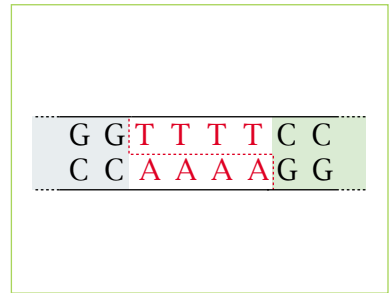


- Si es tracta d'un enzim com ara **Hae III**, podem afegir als extrems dels fragments de DNA un tros de cadena senzilla format per un sol tipus de nucleòtid, mitjançant la **transferasa terminal**. Als extrems del plasmidi hi afegirem un fragment format per la repetició del nucleòtid complementari de l'anterior.



Els extrems afegits són complementaris entre ells, per la qual cosa tendeixen a unir-se.

Independentment de l'enzim de restricció emprat, un cop s'han produït les unions corresponents per complementarietat de bases, la **DNA ligasa** segella les discontinuïtats entre els diversos fragments.



### Introducció del DNA recombinant en la cèl·lula receptora

A continuació s'incuba el plasmidi obtingut de la recombinació juntament amb el cultiu de bacteris específicament seleccionats. En les condicions adequades, el plasmidi s'incorpora a les cèl·lules bacterianes.

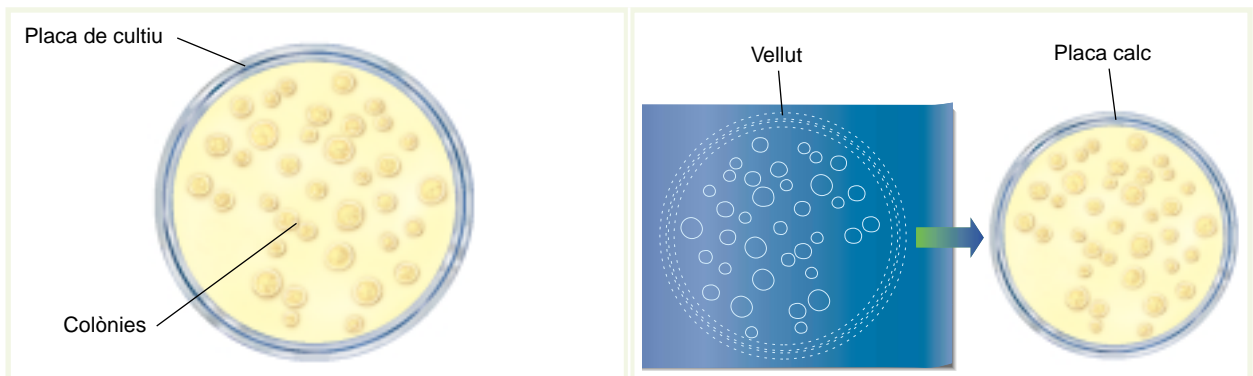
### Identificació del DNA clonat

Encara que tots els tractaments anteriors es duiguin a terme en les condicions més favorables per a obtenir els resultats esperats, en cada fase es produeix un percentatge d'errades que afecten tant la unió entre el plasmidi i el DNA que s'ha de clonar com la incorporació del plasmidi a les cèl·lules bacterianes. Per aquest motiu, en el cultiu es troben:

- Cèl·lules que han incorporat el plasmidi, el qual, al seu torn, conté el fragment de DNA que es vol clonar.
- Cèl·lules que han incorporat un plasmidi que no conté el fragment de DNA.
- Cèl·lules que no han incorporat el plasmidi.

Per tal de poder distingir i seleccionar les colònies bacterianes del primer grup, s'apliquen tractaments basats en els antibiòtics per als quals el plasmidi conferia resistència. El procés és el següent:

Si es tracta de cèl·lules grans, es pot injectar el fragment de DNA directament al nucli. Si la cèl·lula a la qual s'incorpora és un oòcit fecundat, s'obtindrà un individu **transgènic**, és a dir, un individu que des de les primeres divisions del desenvolupament embrionari presenta un gen diferent dels de la seva dotació gènica original.



Diluint i estenent sobre plaques el medi de cultiu amb els bacteris, les cèl·lules queden prou separades com perquè, en reproduir-se, cadascuna origini una colònia. Cada colònia correspon a un conjunt de cèl·lules amb la mateixa dotació gènica.

Per a seguir el procediment d'identificació necessitem una placa **calc**, en la qual hi hagi les mateixes colònies i en la mateixa posició.

Per a obtenir la placa calc es diposita un tros de vellut damunt la superfície de la placa anterior. D'aquesta manera, bacteris de les diferents colònies queden adherits a la superfície del teixit en la mateixa posició relativa que ocupaven.

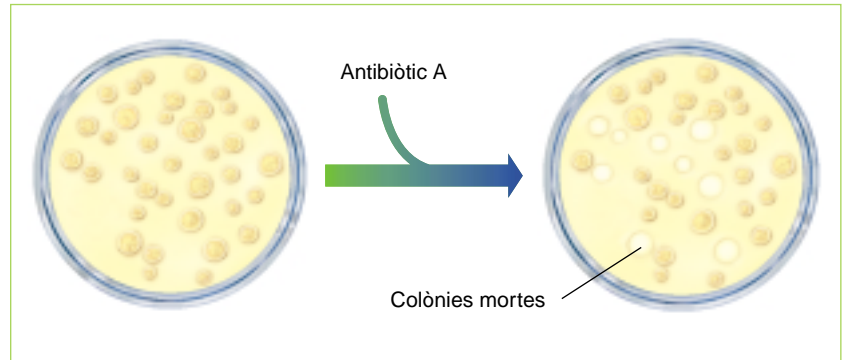
El tros de vellut es col·loca damunt una altra placa, en la qual creixeran colònies idèntiques a les originals i en la mateixa posició.

A continuació s'apliquen els antibiòtics a una de les plaques, mentre l'altra queda com a *testimoni* per a identificar les diverses colònies.

Anomenarem A i B els antibiòtics per als quals el plasmidi conferia resistència. El gen que codifica la resistència enfront de B és el que conté la diana de restricció.

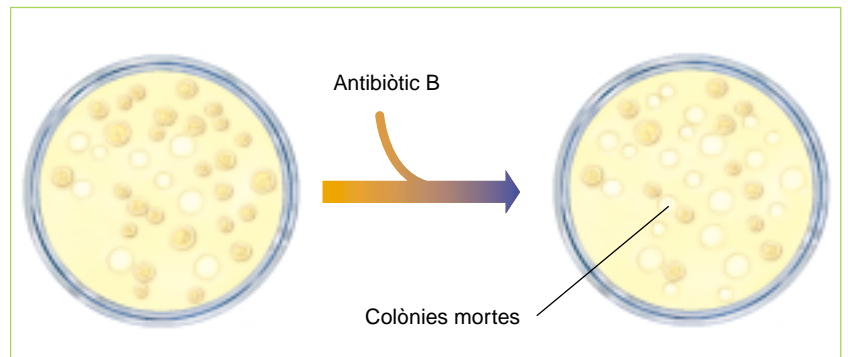
El procés d'identificació és el següent:

— S'inclou l'antibiòtic A en la placa calc.



Moriran tots els bacteris que **no siguin resistents** a aquest antibiòtic, és a dir, els que **no hagin incorporat el plasmidi**. D'aquesta manera desapareixen les colònies d'aquest tipus de bacteris.

— S'hi aplica l'antibiòtic B.



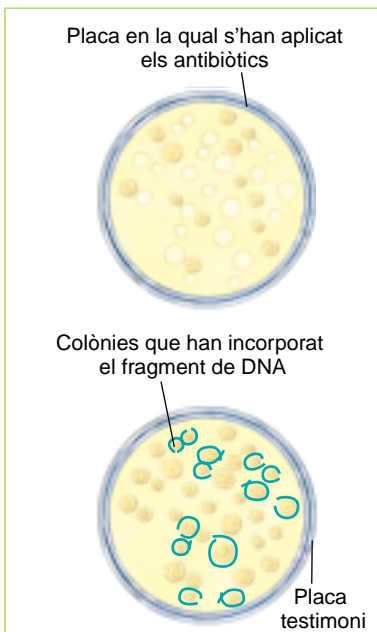
L'antibiòtic destrueix les colònies de cèl·lules que **no hi són resistents**. Es tracta de les cèl·lules que **contenen**, interrompent la seqüència del gen per a la resistència a l'antibiòtic B, **el fragment de DNA clonat**.

Encara que la població sigui destruïda, la seva posició queda clarament destacada i, per tant, pot ser identificada en la placa testimoni.

A partir d'aquest moment, es disposa d'una colònia de bacteris que contenen un fragment de DNA procedent d'un altre organisme. En les condicions adequades s'obindrà un gran nombre de còpies d'aquest fragment.

Amb aquest mètode es pot fragmentar tot el DNA d'un organisme i incloure'n els fragments en diverses colònies de bacteris, de manera que cada colònia contingui un fragment del genoma i entre totes les colònies s'emmagatzemi el genoma complet.

Així es constitueixen les **genoteques**, que permeten d'estudiar el genoma dels organismes identificant els gens que contenen i desxifrant-ne l'activitat.



La identificació del gen de la insulina humana i la seva incorporació a colònies de bacteris que es cultiven industrialment han permès que, des de 1984, es disposi de grans quantitats d'insulina humana per al tractament de la diabetis.

Pel mateix mètode se sintetitzen altres proteïnes emprades en medicina, com ara els factors de coagulació VIII i IX, l'hormona del creixement o els antígens necessaris per a obtenir diverses vacunes.

# Activitats de síntesi

1. Defineix les següents activitats enzimàtiques: *polimerasa*, *exonucleasa*, *endonucleasa*.

2. Observa el següent fragment de DNA:

3' CGGTATCCATCGATGCTGGAAGCTT 5'

Tenint en compte la posició dels extrems 3' i 5', consulta el codi genètic.

— Dedueix la seqüència corresponent a la seva transcripció en mRNA.

— Dedueix la seqüència d'aminoàcids que s'obtéindrà a partir de l'mRNA transcrit.

3. Tal com vam descriure en el llibre de primer de Batxillerat *Biologia I*, una mutació en el DNA altera la seqüència de bases i, per tant, la seqüència d'aminoàcids de la proteïna corresponent.

Suposa que el fragment de l'activitat 2 pateix una mutació d'un sol nucleòtid que provoca que la síntesi de proteïnes s'aturi anticipadament.

— Localitza el punt en què s'ha produït la mutació i proposa quina base s'ha alterat.

4. Compara el procés de síntesi de mRNA en un quadre com el següent:

	Procariotes	Eucariotes
Inici	.....	.....
Elongació	.....	.....
Acabament	.....	.....

— Especifica també les modificacions que experimenta l'mRNA després de la transcripció.

5. Tria i descriu les idees clau que permeten distingir clarament la replicació del DNA de la síntesi de proteïnes.

6. Relaciona els enzims que s'especifiquen a continuació amb els processos de replicació, transcripció i traducció: helicasa, RNA pol, DNA pol, ligasa, girasa, aminoacil-tRNA sintetasa.

— Especifica en cada cas la funció de l'enzim.

7. Digues si són vertaderes o falses les afirmacions següents:

- La histona H3 acosta els nucleosomes entre ells, per tal d'afavorir l'empaquetament del DNA.

- En els éssers procariotes, la replicació, la transcripció i la traducció s'esdevenen en el mateix compartiment cel·lular.

- La síntesi de DNA es dona en sentit 5' → 3' en la cadena conductora i en sentit invers en la cadena retardada.

- Els encebadors són petits fragments de DNA que se sintetitzen prèviament a la cadena definitiva.

- Els fragments d'Okazaki tenen una extensió més gran en les cèl·lules procariotes que en les eucariotes.

- La DNA pol I d'*E. coli* té activitat polimerasa 5' → 3' i exonucleasa 5' → 3' i 3' → 5'.

- Durant la transcripció no se sintetitzen encebadors.

- Les seqüències promotores faciliten la terminació de la síntesi de RNA.

- L'acoblament del complex d'iniciació per a la síntesi de proteïnes s'inicia amb la unió de la subunitat gran del ribosoma al tRNA.

- L'operó és un mecanisme de regulació de l'expressió gènica molt freqüent en les cèl·lules eucariotes.

— Rectifica les afirmacions falses perquè siguin vertaderes.

8. Explica, mitjançant exemples, en què consisteixen una mutació puntual per inserció, una deleció cromosòmica, una trisomia i una hexaploïdia.

9. Disseny un projecte d'enginyeria genètica per aconseguir la inserció del gen de l' $\alpha_1$ -antitripsina, una proteïna que s'utilitza per al tractament de l'emfisema pulmonar, en una colònia de bacteris que pugui produir-la de manera industrial. Descriu detalladament les diverses fases del procés i els instruments i tècniques que utilitzaries.

10. Suposa que un científic es troba davant el dilema següent: un poderós laboratori d'investigació li proposa de finançar generosament un projecte perquè es puguin manipular els òvuls i els espermatozoides, de manera que els pares puguin escollir les característiques físiques dels fills, com ara el color dels cabells i de la pell, l'alçada, etc.

— Justifica, amb raonaments objectius, les posicions a favor i en contra del projecte.

— Compareu els raonaments elaborats per tota la classe i organitzeu un debat sobre aquest tipus de manipulacions.