

Prof. M. Carmen Cerdà

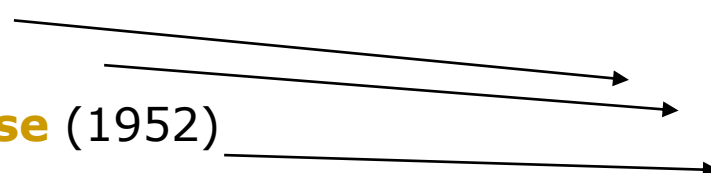
T- 15 : LA BASE MOLECULAR DE L'HERÈNCIA. DUPLICACIÓ DE L'ADN



INDEX

- 1. Context històric de la genètica
- 2. Experiment de Griffith (1928)
- 3. Experiments Avery et col. en *Streptococcus pneumoniae*
- 4. Material genètic procariotes i eucariotes.
- 5. Replicació o duplicació de l'ADN
 - 5.1. Experiment Meselson i Stahl (1957)
 - 5.2. Mecanisme de la replicació
 - 5.3 .Diferències en la replicació procariotes i eucariotes

1. Context històric de la genètica

- **Mendel** (1855-1864): experiments que desvelen els fonaments bàsics de transmissió dels caràcters.
 - **Miescher** (1869): descobreix la molècula d'ADN encara que es consideren a les proteïnes les portadores de la informació genètica
 - **Griffith** (1928)
 - **Avery** (1944)
 - **Hershey i Chase** (1952)
- És l'ADN la molècula portadora de l'herència.
- 

Sobre la molècula portadora de la informació genètica se sabia (primera meitat del s. XX):

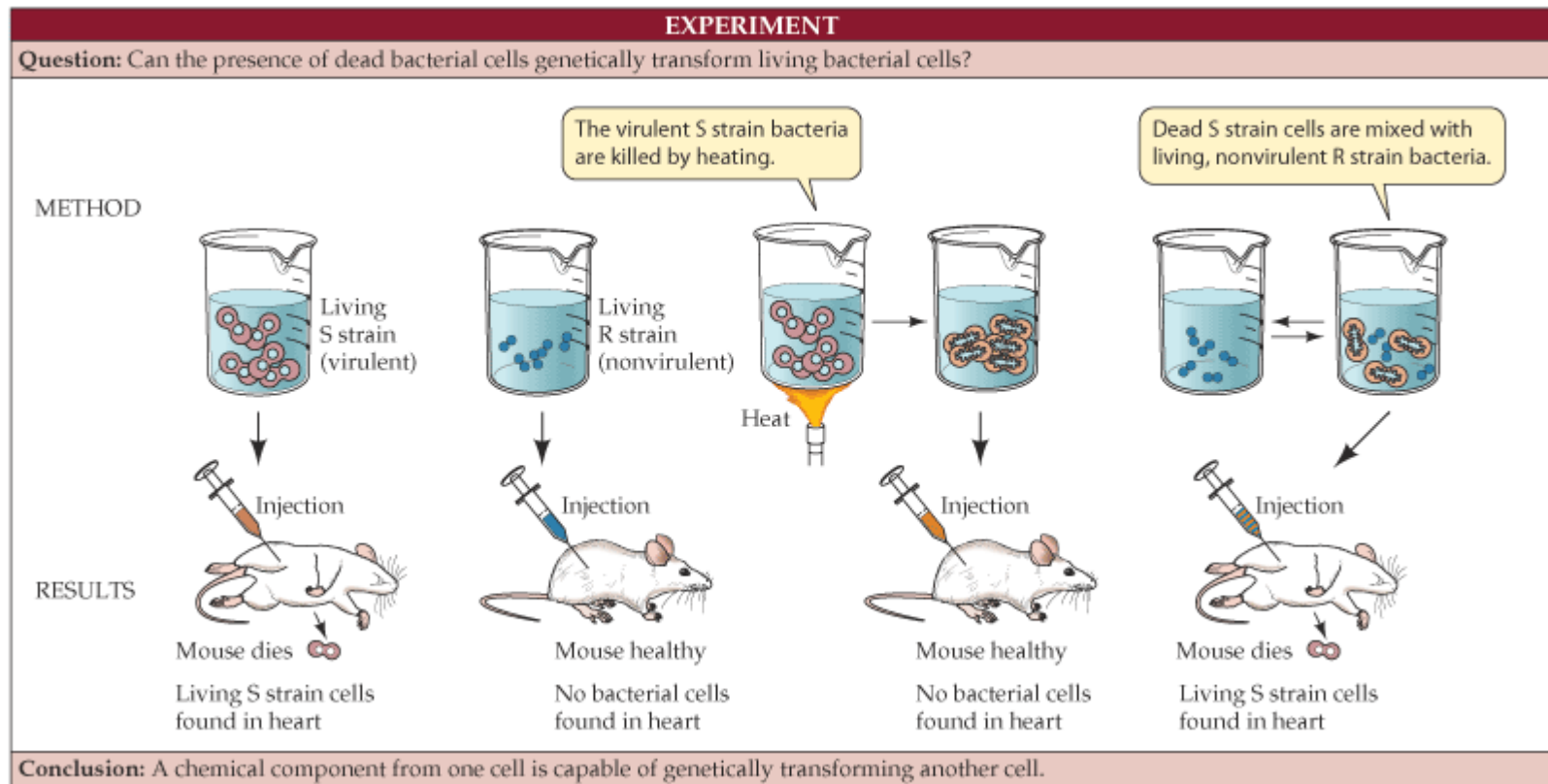
- És químicament estable, encara que pot sofrir canvis susceptibles que possibiliten la variabilitat
- És capaç de replicar-se i fer còpies d'ella mateixa
- És transmetia d'una generació a una altra

2. Experiment de Griffith (1928)

- Va investigar amb el bacteri *Streptococcus pneumoniae*. Va veure que hi havien dos tipus de soques:
 - S**, virulentes, tenen una capa mucosa de polisacàrids
 - R**, sense capa mucosa, sols la paret.
- Si injectava bacteris S vius als ratolins, morien però si els injectava morts, no morien. Si injectava una mescla de bacteris R vius i S morts, els ratolins morien i contenien bacteris S vius.

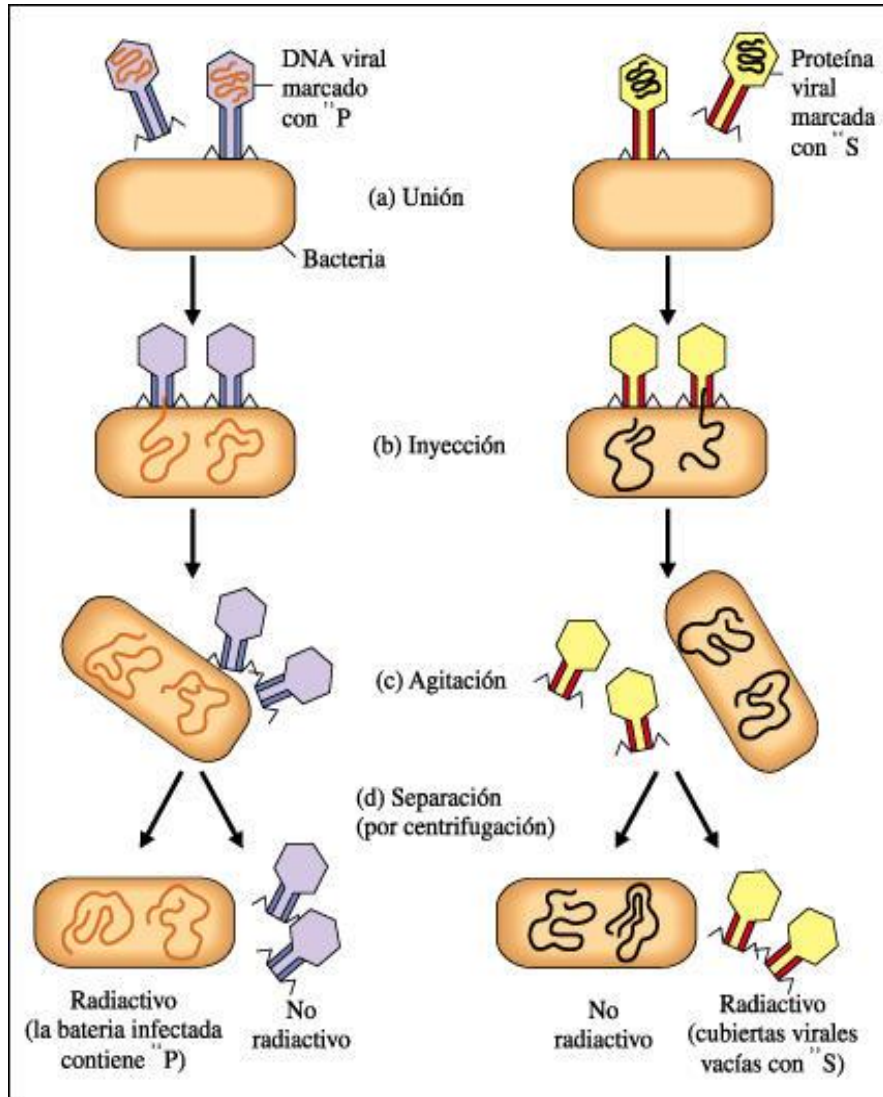
Conclusions experiment de Griffith et col.

- La informació genètica està continguda en un component cel·lular, un factor transformant.
- El material genètic és un portador actiu de la informació genètica encara que la cèl·lula no estiga viva.



3. Experiments Avery et col. en *Streptococcus pneumoniae*

- Avery et col. comproven que si agreguen enzims que destrueixen l'ADN les soques virulentes perden la seua capacitat virulenta i els ratolins sobreviuen.
- Van deduir que el factor transformant del qual parlaven Griffith et col. era la molècula d'ADN.



➤ **Hershey i Chase** demostren que és l'ADN i no les proteïnes el material genètic que es transmet.

➤ Treballen amb un **bacteriòfag** (virus de bacteris). Fan dos cultius d'aquest:

- en un cultiu marquen l'**ADN** dels virus amb ^{32}P

- en l'altre cultiu marquen les **proteïnes** virals amb ^{35}S .

➤ Inoculen els virus en bacteris *E. coli*

➤ Observen que els virus procedents del cultiu marcat amb ^{32}P estaven marcats però cap dels virus obtinguts amb el cultiu ^{35}S estaven marcats.

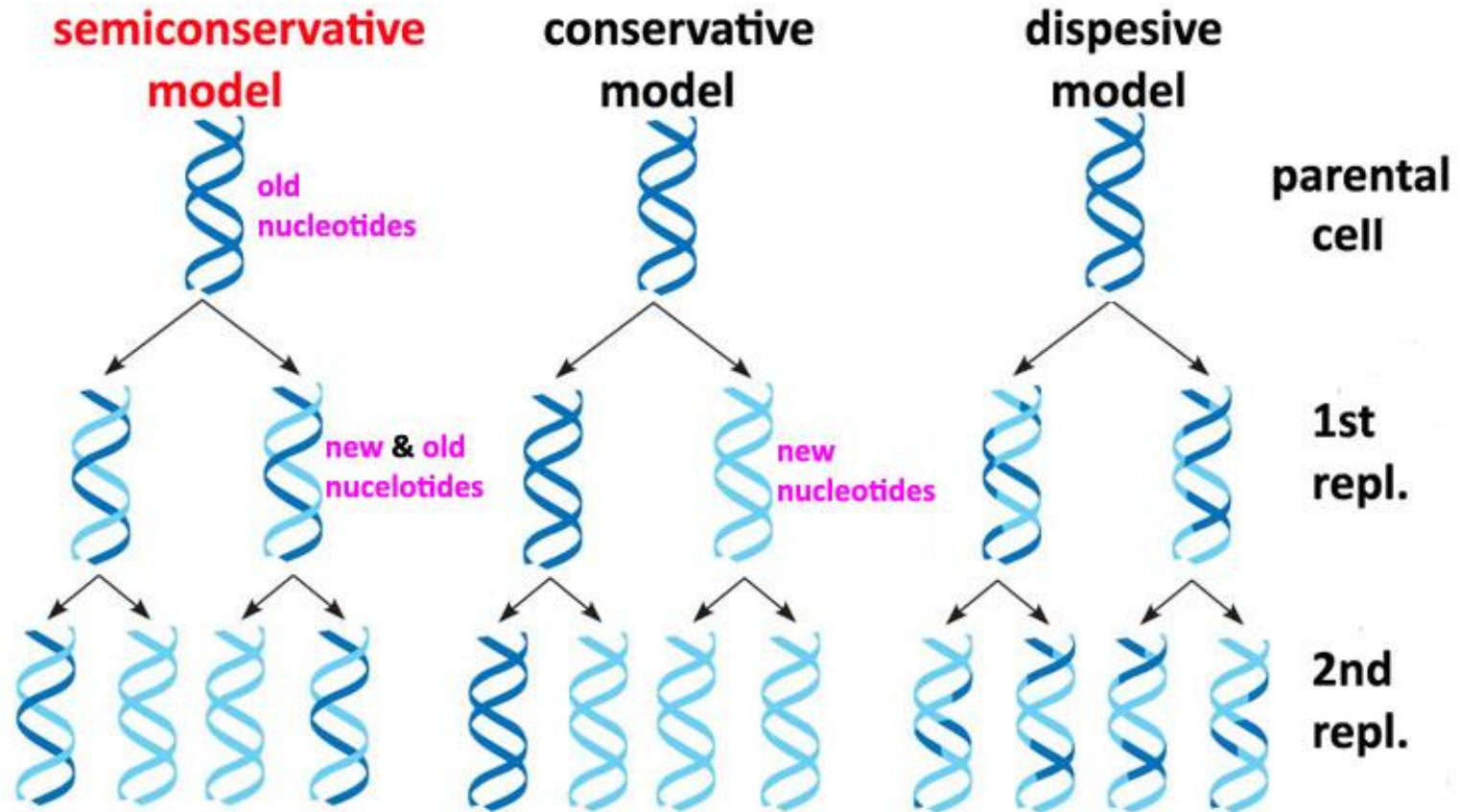
4. Material genètic procariotes i eucariotes.

Procariotes	Eucariotes
Tot l'ADN s'empra per a la síntesi de proteïnes	-Només un 10% (eucromatina) s'empra per a codificar proteïnes -Molt d'ADN repetitiu que no codifica per proteïnes
Els gens que codifiquen per a cada proteïna són una seqüència continua	Els gens que codifiquen per a cada proteïna no són una seqüència continua , hi ha seqüències no codificadores intercalades, INTRONS i fragments codificadors, EXONS

5. Replicació o duplicació de l'ADN

- Consisteix en fer rèpliques exactes de si mateix per a disposar de dues còpies iguals
- Implica la separació de les dues cadenes i la síntesi de dues cadenes complementàries a cadascuna de les cadenes originals.
- Es plantejaren 3 hipòtesis per a la replicació:
 - **Conservativa**: la molècula d'ADN vella es conserva igual i l'altra còpia que es forma es de nucleòtids nous.
 - **Semiconservativa**: les dues còpies d'ADN mantenen un bri de la cadena original i l'altre de nova formació
 - **Dispersiva**: les dues molècules d'ADN que es formen tenen fragment de la molècula original i d'altres de nova formació.

Replicació: 3 hipòtesis

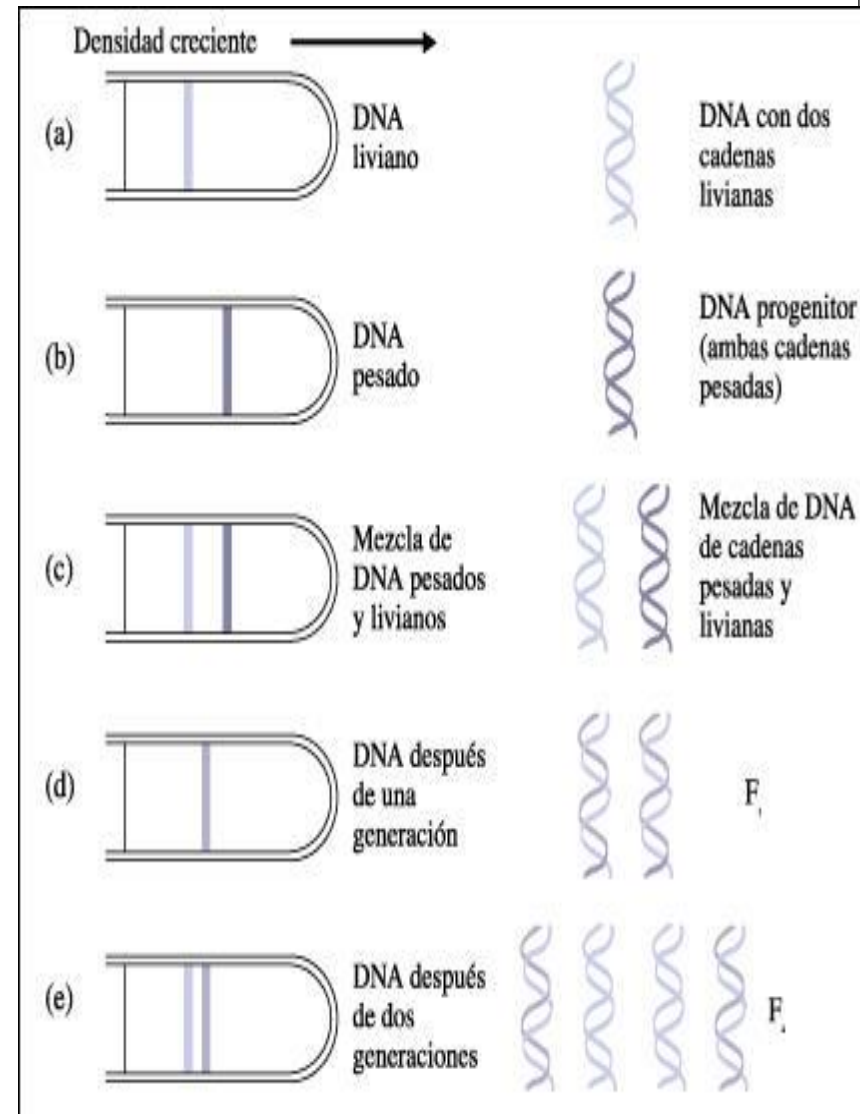


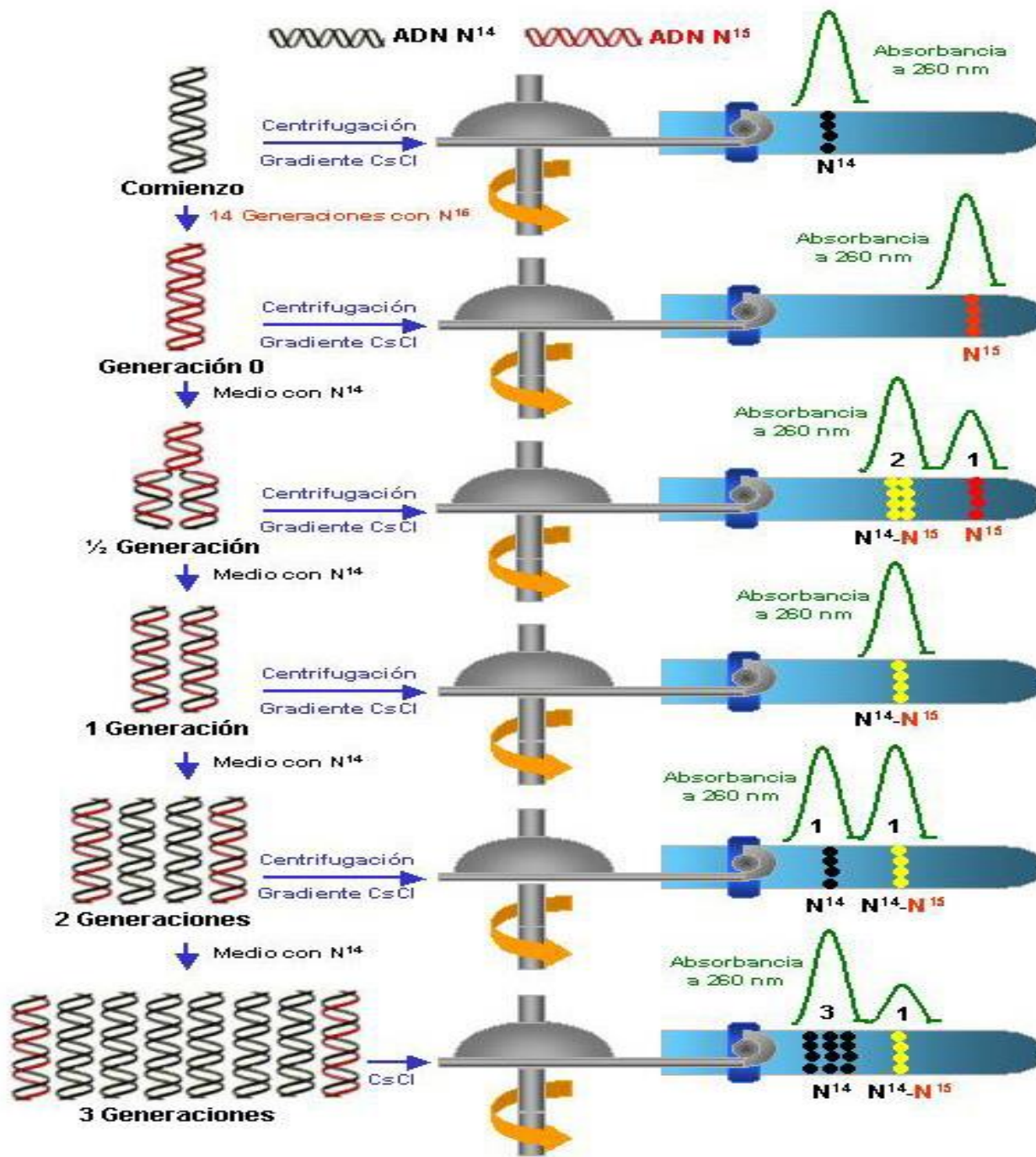


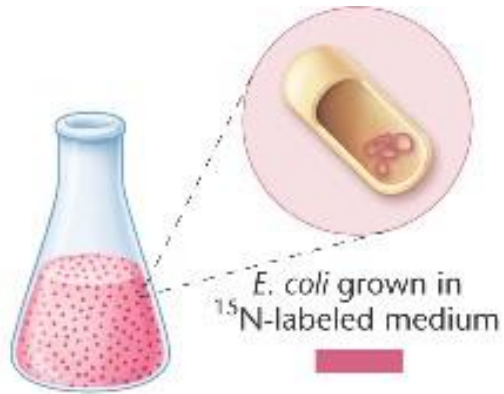
Replicación del DNA:
Aspectos generales

5.1. Experiment Meselson i Stahl (1957)

- Van cultivar bacteris *Escherichia coli* en un medi amb N^{15} , pesant i en un medi amb N^{14} , lleuger. Se separen per centrifugació i l'ADN amb N^{15} queda més avall en els tubs i l'ADN amb N^{14} més amunt.
- Van passar els **bacteris cultivats amb N^{15} a un medi amb N^{14}** i van esperar que es duplicara i van centrifugar. I van vore que l'ADN acabat de sintetitzar ocupava una posició intermèdia entre l'ADN amb N^{15} i l'ADN amb N^{14}
- Si deixaven als bacteris que tornaren a duplicar l'ADN, apareixia en el tub un ADN "híbrid" i un altre de lleuger.
- Es va deduir que es tractava d'un ADN "híbrid" i es va descartar **la hipòtesi conservativa**.







E. coli DNA becomes uniformly labeled with ^{15}N in nitrogenous bases

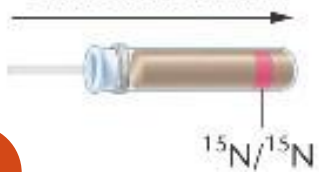
Generation 0



^{15}N -labeled *E. coli* added to ^{14}N medium



Gravitational force



Generation I



Cells replicate once in ^{14}N



Generation II



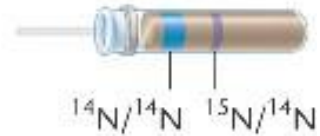
Cells replicate a second time in ^{14}N



Generation III



Cells replicate a third time in ^{14}N

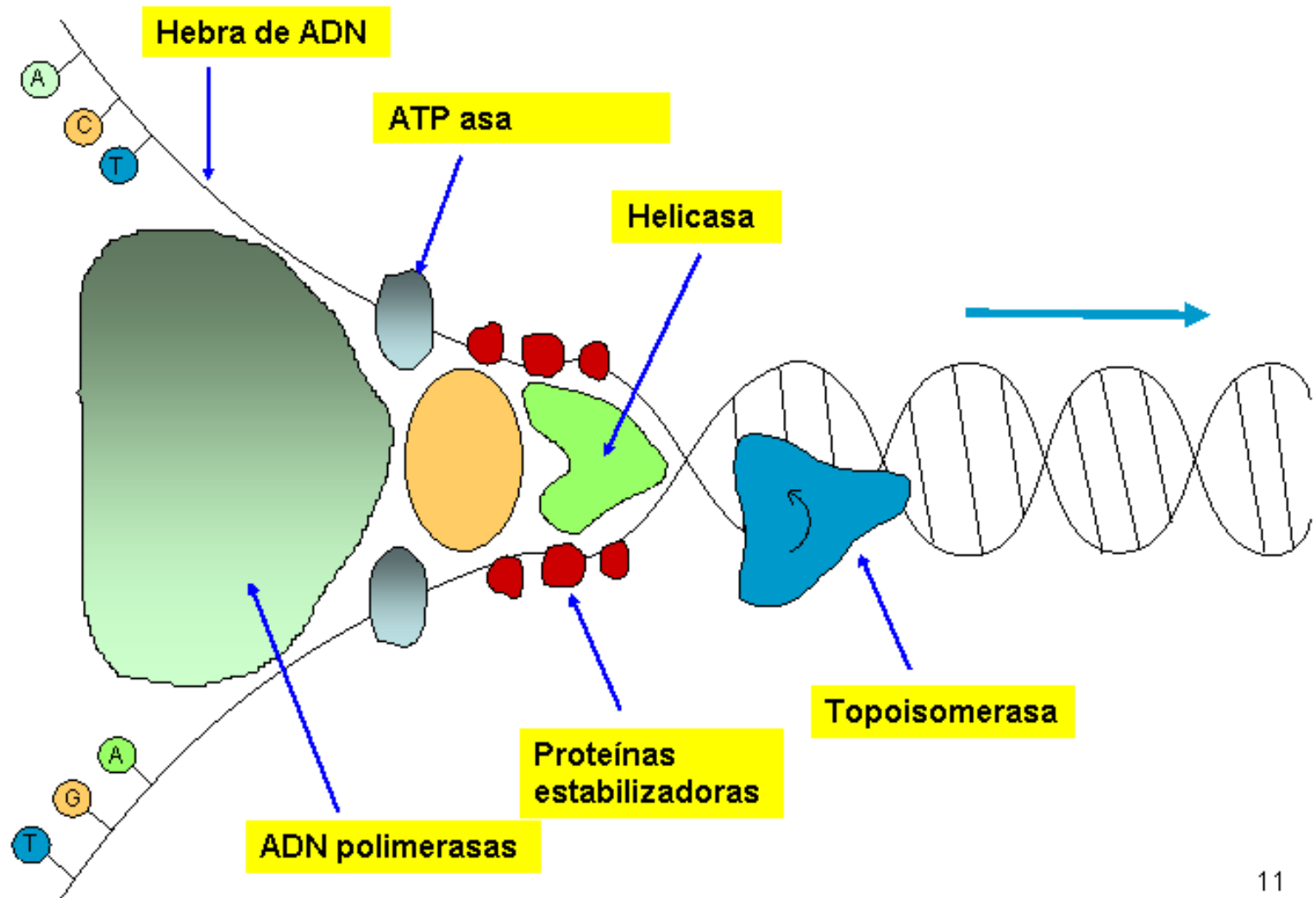


DNA extracted and centrifuged in gradient

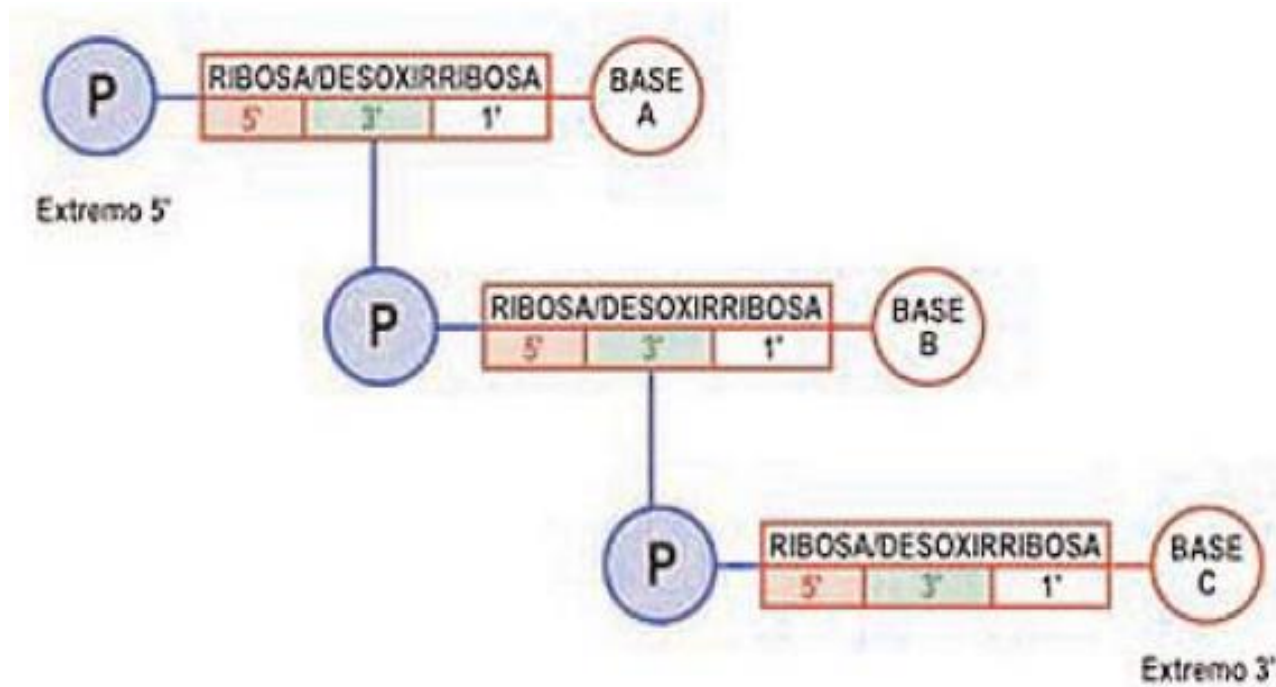
5.2. MECANISME DE LA REPLICACIÓ

- Enzims més importants que participen:
 - **Helicasa**: trenca ponts d'hidrogen i separa les dues cadenes complementàries d'ADN.
 - **Topoisomereses**: redueixen tensions entre les cadenes desenrotllant l'ADN
 - **Pr SSB**: mantenen separades les cadenes complementàries.
 - **Primasa**: sintetitza l'ARN encebador o primer (cap ADN pol pot actuar sense encebador.
 - **ADN pol III**: uneix nucleòtids d'ADN en sentit 5' → 3' partint del encebador.
 - **ADN pol I**: elimina els primers i sintetitza els nucleòtids que falten
 - **Ligasa**: uneix els nous fragments sintetitzats per ADN pol I

Replisoma: Enzimas y proteínas que son responsables de la replicación

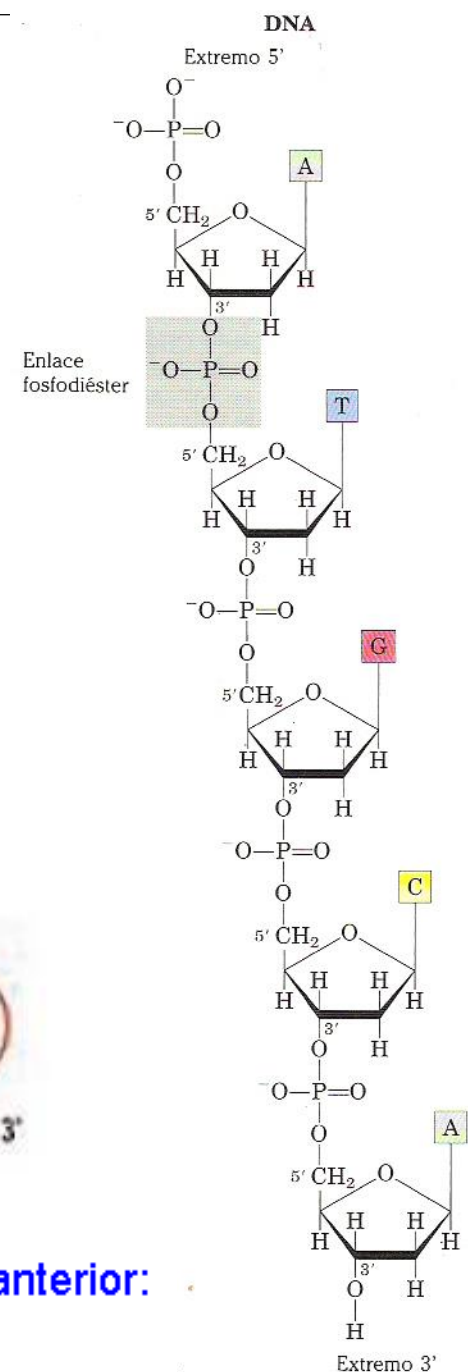


ÀCIDS NUCLEICS: unió de nucleòtids



Representación simplificada de la secuencia de la cadena anterior:

5'-ATGCA-3'



MECANISME DE LA REPLICACIÓ en procariotes

- Mecanisme complex que ocorre en la fase S del cicle cel.lular.

- **Inici de la replicació**

En zones determinades de l'ADN on hi ha una seqüència determinada de nucleòtids (**origen de replicació**)

Una **helicasa** trenca els ponts d'H entre les bases i separa les dues cadenes. Les tensions de separació són eliminades per les **topoisomerases** i es mantenen separades les dues cadenes gràcies a les proteïnes estabilitzadores **SSB**.

Es forma la **bambolla de replicació** amb dues **forquetes de replicació**.

Replicación del DNA

parte 2: Inicio de la replicación

En primer lugar, el **DNA** se desenrolla, y se rompen los **puentes de hidrógeno** entre las dos cadenas



MECANISME DE LA REPLICACIÓ en procariotes

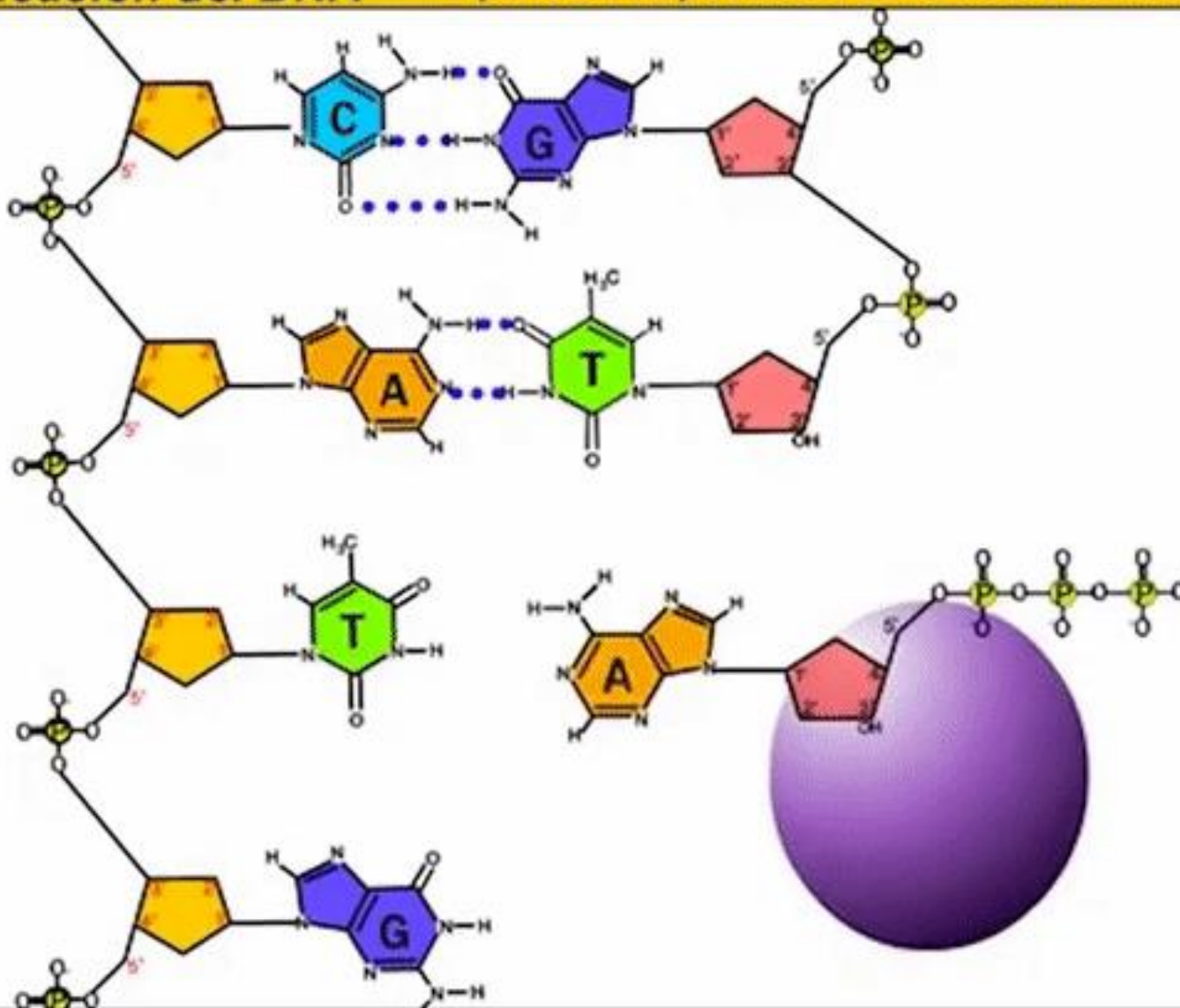
- **Formació de les noves cadenes**

Intervé l'enzim **ADN pol III**

- ✓ necessita una cadena motle d'ADN que llig en sentit $3' \rightarrow 5'$, sintetitzant en sentit $5' \rightarrow 3'$.
- ✓ A partir de nucleòtids trifosfat que aporten l'energia necessària al perdre 2 fosfats.
- ✓ necessita una cadena curta d'ARN anomenat primer o encebador (10 nucleòtids) sintetizat per una **primasa** a partir de la qual afig nucleòtids d'ADN
- El procés és **BIDIRECCIONAL** (hi ha una helicasa actuant en un sentit i una altra en sentit contrari. Avança en els 2 sentits
- **L'ADN pol III** recorre les 2 cadenes de l'ADN motle en sentit $3' \rightarrow 5'$ i va afegint nous nucleòtids i formant el **bri conductor** en sentit $5' \rightarrow 3'$.

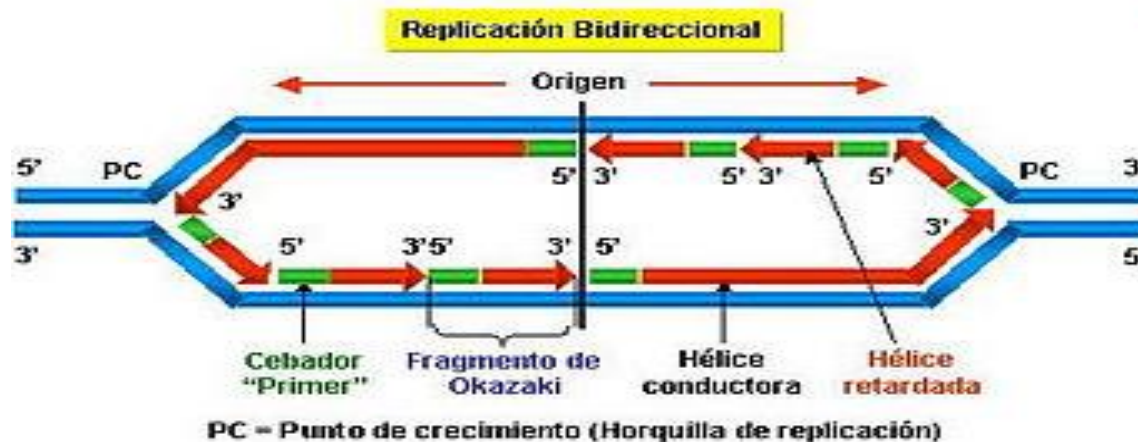
Replicación del DNA

parte 3: Replicación de la hebra conductora

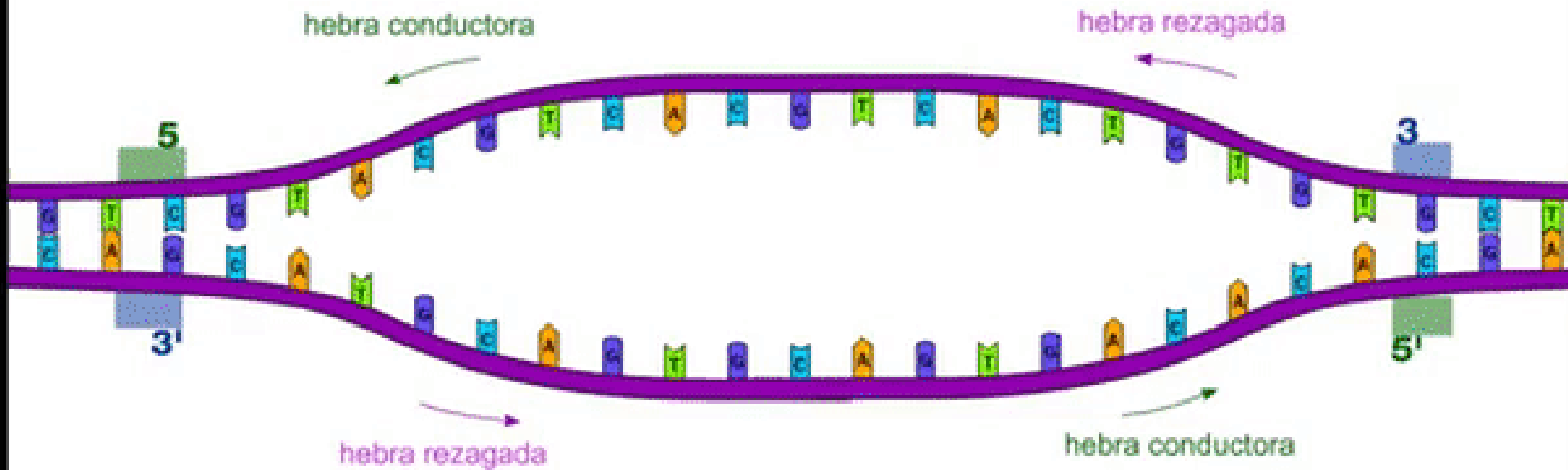


MECANISME DE LA REPLICACIÓ en procariotes

- L'altra cadena d'ADN que cal copiar és complementària i l'ADN pol III hauria d'afegir nucleòtids llegint el motle en sentit 5' → 3' i no pot fer-ho. Es fa sintetitzant xicotets fragments anomenats d'Okazaki (de uns 1000 nucleòtids) de forma discontinua i més lentament. Aquest bri s'anomena **retardat** i cada fragment necessita un primer.
- **L'ADN pol I** elimina els ARN encebadors o primers i afig els nucleòtids d'ADN que falten.
- Després una **ligasa** uneix tots els fragments d'ADN.
- S'enrotllen les noves molècules i s'originen dues hèlixs d'ADN
- És un procés ràpid, 45000 nucleòtids units/minut.



Ahora, veamos a la burbuja de replicación completa en acción



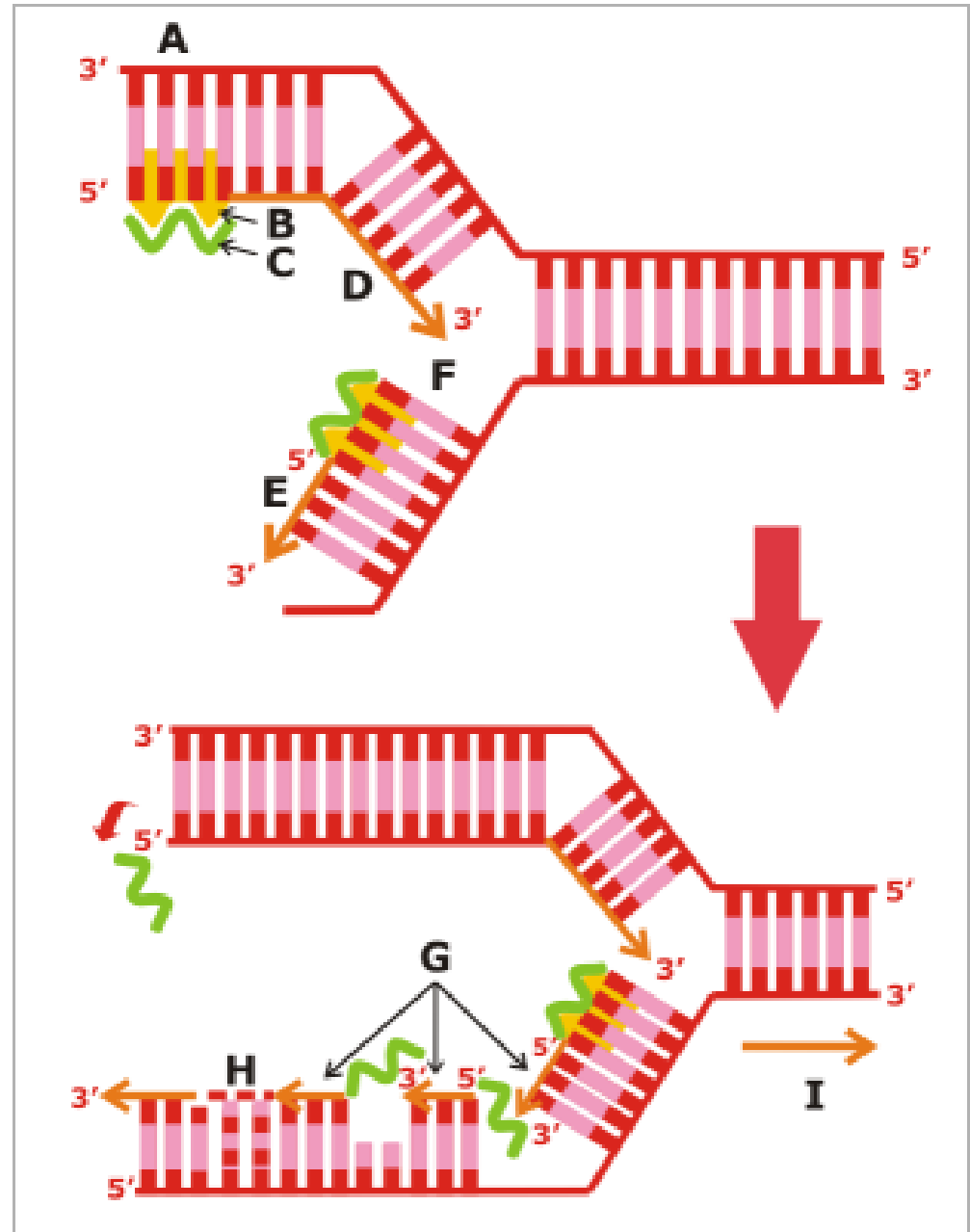
Los personajes

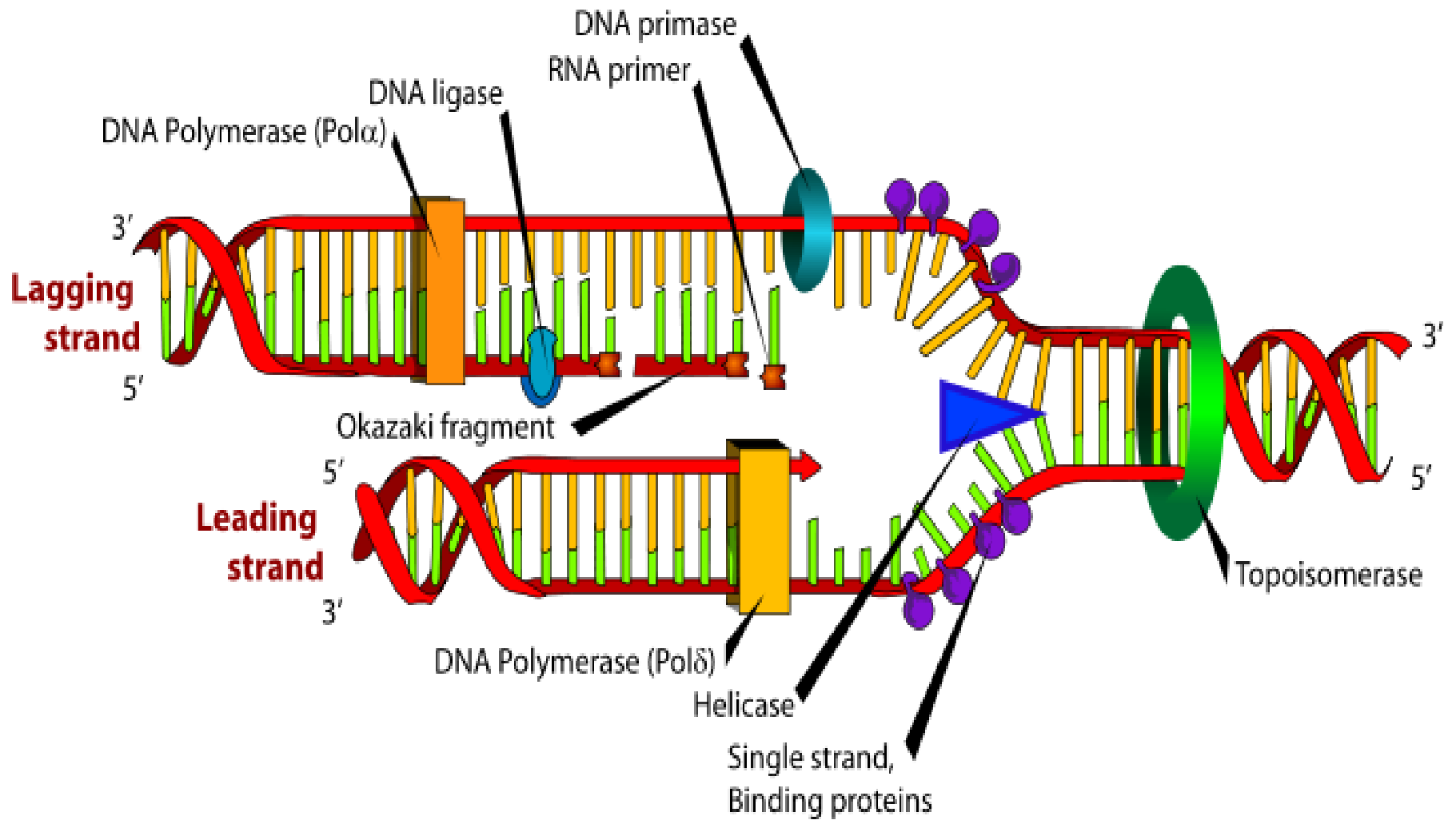
- RNA primasa
- DNA polimerasa III
- ◆ DNA polimerasa I
- ligasa

MECANISME DE LA REPLICACIÓ en procariotes

- La replicació conclou quan es comprova que les còpies de les seqüències de nucleòtids són correctes. **Procés de correcció:**
- Participen els següents enzims:
 - **Endonucleases** detecten els errors i tallen la cadena
 - **ADN pol I:** elimina el nucleòtid o fragment erroni i afig els nucleòtids correctes
 - **ADN ligases:** uneixen els nous segments corregits.

- A) Origen de la replicació
- B) Complex de replicació
- C) Motlle d'ARN
- D) Cadena conductora
- E) Cadena retardada
- F) Forquilla de replicació
- G) Fragments d'Okazaki
- H) ADN-ligasa
- I) Sentit de la replicació.





5.3 .Diferències en la replicació procariotes i eucariotes

Procariotes	Eucariotes
No hi ha histones	L'ADN conté histones. Les histones originals es queden en el braç conductor i se sintetitzen noves per al braç retardat
Fragments d'Okazaki més grans (1000-2000 nucleòtids)	Fragments d'Okazaki més menuts (100-200 nucleòtids)
3 tipus d'ADN polimerases	5 tipus d'ADN polimerases
Un únic origen de replicació (una bombolla sols). ADN més menut	Molts orígens de replicació anomenats replicadors. Replicació lenta en cada replicador però com que hi ha molts la velocitat final és major.