

CAPÍTOL 5 – MECANISMES D'EMMAGATZEMATGE I UTILITZACIÓ DE LA INFORMACIÓ GENÈTICA

El **DNA** és un àcid nucleic que conté les instruccions genètiques utilitzades pel desenvolupament i funcionament dels tots els organismes vius. La seva principal funció és l'emmagatzematge permanent d'informació genètica que posteriorment s'ha d'expressar (com a proteïnes, per exemple) i passar a les cèl·lules filles. El DNA es conserva gràcies a la seva replicació i s'expressa gràcies a la transcripció.

L'estructura del DNA és flexible i està formada per una doble cadena que rep el nom de **doblet hèlix**, que pot ser lineal, com el que forma part dels cromosomes de les cèl·lules eucariotes, o circular, com el dels organismes procariotes, mitocondries o cloroplasts.

1. METABOLISME DEL DNA

El **metabolisme del DNA** és el conjunt de processos altament regulats i catalitzats per enzims que intervenen en:

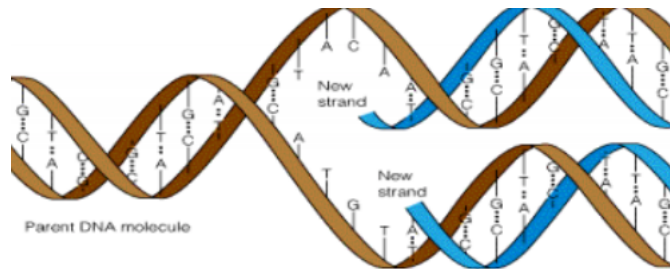
- **Replicació:** és la síntesi del DNA. Abans que comenci la divisió cel·lular la cèl·lula mare crea una còpia del DNA.
- **Reparació:** és la detecció i reparació dels errors que s'hagin pogut produir durant o després de la síntesi del DNA.
- **Recombinació:** és el procés mitjançant el qual diferents fragments de DNA es poden reordenar dins una mateixa molècula o entre varies.



És la mateixa molècula del DNA qui codifica el seu propi metabolisme.

2. REPLICACIÓ DEL DNA

La **replicació del DNA** és el mecanisme que permet que el DNA creï còpies idèntiques de si mateix. Segueix un mecanisme **semiconservatiu**, és a dir, cada una de les dues molècules filles conserva una de les cadenes de la molècula mare i s'utilitza com a motlle per poder generar la cadena restant.

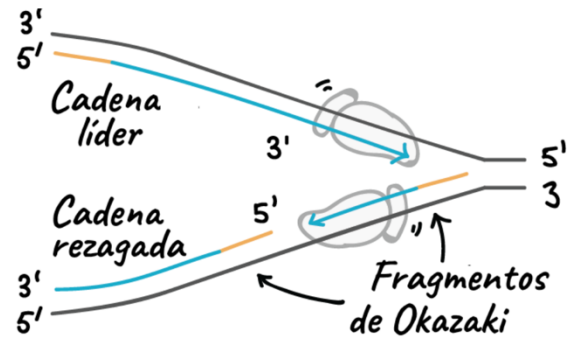
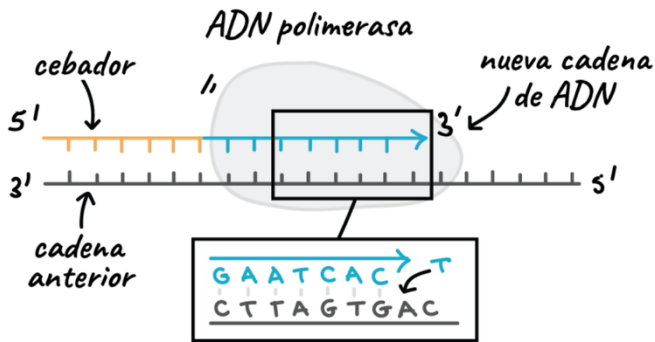


La replicació del DNA és **bidireccional**, és a dir, es parteix d'un punt d'origen i es comença a copiar el DNA per l'esquerra i per la dreta, i **sincrònica**, és a dir, les dues cadenes es copien alhora.

Les **DNA polimerases** són els enzims que catalitzen la síntesi d'una cadena nova de DNA a partir de la cadena de la molècula mare. Pot afegir fins a 1000 nucleòtids per segon i sintetitzen el DNA en la direcció 5'-->3':

- Necessiten la cadena patró (la cadena mare) que servirà de motlle per la col·locació de les bases nitrogenades, una cadena d'àcid ribonucleic (*primer*) per començar a afegir nucleòtids i trifosfats dels 4 desoxinucleòtids (dATP, dGTP, dTTP i dCTP), que és d'on provindran els nucleòtids.
- L'energia que es requereix per sintetitzar el DNA sorgeix dels nucleòtids trifosfats. El trencament dels enllaços que uneixen els fosfats allibera l'energia necessària per formar l'enllaç entre el nucleòtid i la cadena.
- L'enllaç fosfodièster es forma per l'atac nucleofílic del grup -OH del C-3' de la desoxiribosa sobre el fosfat- α del trifosfat.
- Cada forca de replicació és asimètrica ja que partim de dues cadenes antiparal·leles procedents de la molècula mare i hem de copiar les complementàries.

- Es segueix sempre el següent procediment: s'afegeix el trifosfat nucleòtid a la posició 3'-OH de la pentosa, allibera un grup pirofosfat i, per tant, també energia, en formar l'enllaç fosfodièster amb el següent nucleòtid.



Es copien les dues cadenes alhora, però una té sentit 5'→3', el de la replicació, i una altra el sentit 3'→5', contrari al de la replicació. A mesura que se separen les dues cadenes de la molècula de DNA mare la DNA polimerasa s'allunya més dels extrems 5' d'una cadena i 3' de l'altra. Aleshores, com pot replicar la cadena 3'→5' si l'enzim circula en sentit contrari? Okazaki que demostrar que aquesta cadena creixia en la direcció 5'→3' però ho feia de mica en mica: a mesura que se separen les dues cadenes de DNA de la molècula mare s'omplen els "forats" marxa enrere. Aquests segments que es produeixen poc a poc reben el nom de **fragments d'Okazaki**.

Aquesta cadena rep el nom de **cadena retardada** ja que la seva síntesi és discontinua mentre que l'altra és la **cadena conductora** i la seva síntesi és contínua.

Un **primer** o **iniciador** és una cadena d'àcid ribonucleic que serveix com a punt de partida de la replicació del DNA. És una seqüència curta d'àcid ribonucleic que conté un grup 3'-OH lliure que forma parells de bases complementàries amb la cadena que serveix com a motlle. És el punt d'inici de l'addició de nucleòtids. Als procariotes, la DNApol I elimina els primers i uneix els fragments d'Okazaki. En eucariotes són la RNAsa H i el DNApol els enzims que tenen aquesta funció.

L'enzim **ligasa** és l'encarregat de catalitzar la formació d'enllaços fosfodièster entre el 3'-OH i el 5'-fosfat. Utilitza ATP o NAD per activar l'extrem 5'-fosfat.

L'enzim DNA polimerasa té activitat autocorrectora ja que disposa de 2 centres actius: al que s'uneixen nucleòtids per dur a terme la replicació (activitat 5'→3') i el corregeix els errors (activitat 3'→5'). Quan catalitza la síntesi del DNA té una taxa d'error de 10^{-4} i quan repara errors, és de 10^{-3} .

Totes les cèl·lules tenen múltiples mecanismes de reparació del DNA. Detecten i reparen les lesions ocasionades per:

- Defectes de síntesi.
- Mutacions espontànies.
- Reaccions sobre les bases en el medi cel·lular.
- Reaccions per agents químics exògens.
- Reaccions per agents físics (UV, RX...)

3. RNA

El **RNA** és un àcid nucleic format per una cadena de ribonucleòtids. El RNA cel·lular és lineal, en forma d'hèlix i monocatenari, tot i que en alguns virus, el RNA, que pot ser el seu únic material genètic, pot ser bicatenari. Podem diferenciar tres tipus de RNA:

- **mRNA** o RNA missatger: és el tipus de RNA menys abundant, la funció del qual és transportar la informació genètica d'un segment del DNA als ribosomes. La seva seqüència de nucleòtids és complementària a la del DNA.
- **tRNA** o RNA de transferència: és l'encarregat de traduir el codi genètic.

- **rRNA** o RNA ribosòmic: és el component principal dels ribosomes. Tenen una funció catalítica i estructural durant la síntesi de proteïnes.

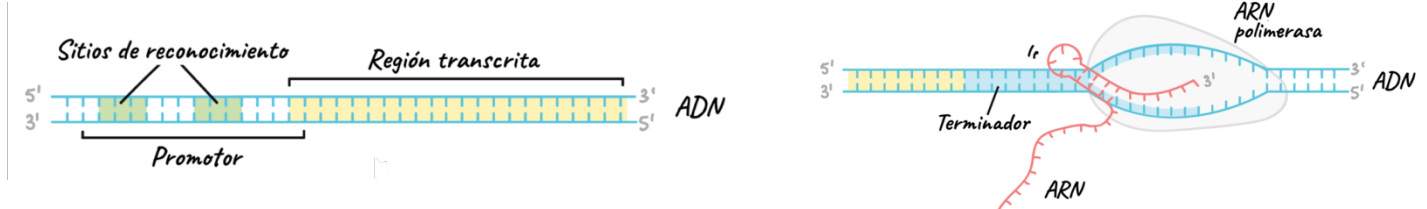
Entre les bases del RNA es poden formar ponts d'hidrogen i entre el grup OH del C-2' de la ribosa i els fosfats també. El RNA no conté nucleòtids de Timina i, en comptes, té Uracil.

La **transcripció** és el procés a partir del es copia un segment d'una molècula de DNA, que rebrà el nom d'**unitat de transcripció**, i es sintetitza en una molècula monocatenària de RNA. És la primera etapa de l'expressió de la informació genètica.

- La síntesi del RNA va en el sentit 5'-->3'.
- L'enzim que ho catalitza és la RNA polimerasa dependent de DNA.

Els **promotors** són regions del DNA que indiquen a la RNA polimerasa on s'ha de posar i on s'iniciarà la transcripció. La **regió promotora central** és el conjunt mínim de seqüències imprescindibles per començar la transcripció de forma precisa. Els **terminadors** són una regió del DNA que determinen on de la cadena de DNA acabarà la transcripció.

Els **factores de transcripció** són proteïnes que reconeixen les seqüències promotores del DNA i situen les RNA polimerases per iniciar la transcripció.



La cadena del DNA que no s'utilitza per la síntesi del RNA rep el nom de **cadena codificadora** o **sens** i presenta la mateixa seqüència que el RNA (canviant la timina per uracil). La cadena copiada s'anomena **cadena patró** o **antisens** i presenta la seqüència complementària a la del RNA.

A diferència del DNA, el RNA no necessita cap primer per començar-se a sintetitzar. Tal com succeeix al DNA la hidròlisi dels fosfats dels trinucleòtids aporta energia per continuar duent a terme la síntesi de DNA. La taxa d'error d'aquest procés és de 10^{-5} .

La **RNA polimerasa**, l'enzim que catalitza la síntesi de RNA, és diferent en eucariotes i procariotes.

Procariotes:

- Té un factor σ : una proteïna que reconeix el promotor dels gens procariotes i hi uneix la RNA pol.
- L'enzim és una proteïna polimèrica que conté un únic centre actiu.

Eucariotes:

- Requereixen la presència d'altres proteïnes: factors de transcripció.
- Hi ha diferents tipus de RNA pol en funció del gent que es transcriu.
- No s'uneixen directament als promotors.

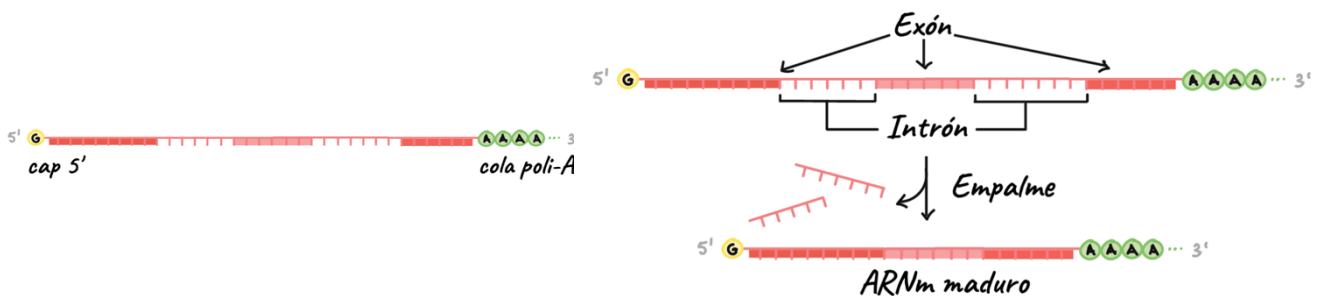
En eucariotes, la RNA polimerasa necessita proteïnes auxiliars per unir-se al DNA i iniciar la transcripció. Aquestes proteïnes auxiliars acostumen a ser factors de transcripció que s'uneixen directament al DNA o proteïnes que no tenen dominis d'unió amb aquest i necessiten altres mediadors.

Totes les cèl·lules d'un organisme contenen el mateix tipus de genoma. Cada tipus cel·lular presenta un nivell d'expressió genètica determinat. La **regulació gènica** és un procés que controla quins gens del DNA d'una cèl·lula s'expressen, és a dir, són utilitzats o no per la posterior síntesi d'una proteïna. Cada tipus de cèl·lula expressa un conjunt de proteïnes.

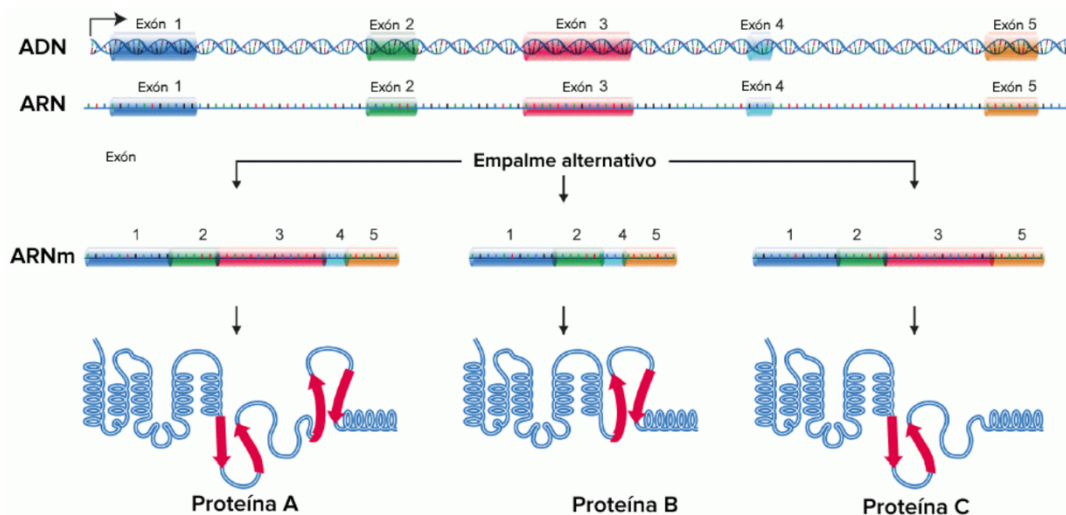
El RNA transcrit a partir del DNA pateix modificacions abans de ser traduït per formar proteïnes. Aquest procés es coneix com a **maduració del RNA** i només té lloc en cèl·lules eucariotes.

Modificació del pre-mRNA: catalitzades per enzims.

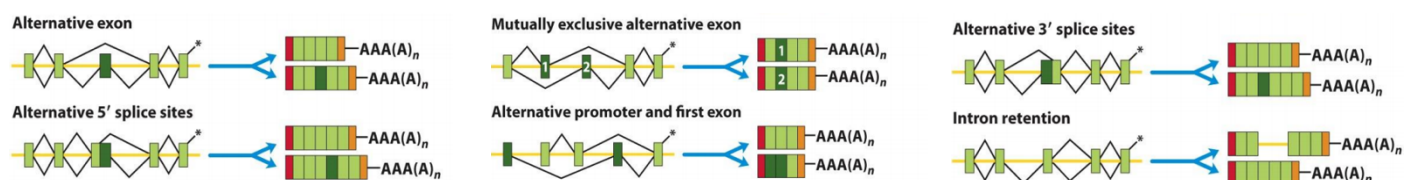
- Addició del *cap*: és la primera modificació que pateix i té lloc de manera simultània a la transcripció. Consisteix en l'addició d'un nucleòtid de guanina modificat a l'extrem 5' la funció del qual és protegir el RNA de la degradació, facilitar el transport al citoplasma i ajudar al ribosoma a unir-se al mRNA. És un procés catalitzat per enzims.
- Poliadenilació: consisteix en l'addició d'una cua de nucleòtids d'adenina (poly-A) a l'extrem 3' del RNA. Durant la transcripció apareix una seqüència al RNA que rep el nom de senyal de poliadenilació que permet a un enzim tallar el RNA en dos. Un segon enzim afegeix entre 100 i 200 nucleòtids d'adenina a l'extrem tallat, que proporciona major estabilitat.
- Eliminació d'introns o **splicing**: un **intró** és un segment de la seqüència del pre-mRNA que interromp les seqüències codificants del gen. Un **exó** en canvi, és la seqüència codificant d'aquest gen. El procés que elimina els introns del RNA està catalitzat per una altra molècula de RNA catalítica, el sn RNA i snRNP, que s'adhereix a part de la seqüència del RNA en qüestió, reconeix els trams que s'han d'eliminar: a l'inici d'un intró hi ha la seqüència GU i al final AG.



El mecanisme del splicing és el següent: primer es produeix un atac nucleofílic de l'OH del C-2' de l'adenosina de ramificació sobre l'enllaç fosfodièster de la frontera 5' de l'intró, que queda ciclat (*lariat*) i un OH-3' queda lliure a l'extrem 3' de l'exó 1. Després es torna a produir un atac nucleòfil però aquest cop de l'OH 3' de l'exó 1 sobre l'enllaç fosfodièster de la frontera 3' de l'intró. D'aquesta manera s'allibera l'intró i queden units els dos exons.



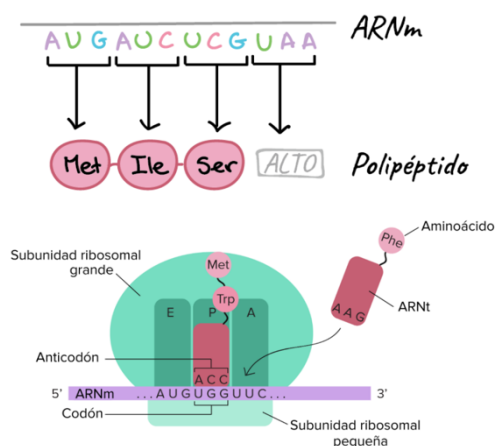
El *slipicing* es produeix de manera diferent en cèl·lules diferents i, per tant, una mateixa seqüència de DNA pot servir per sintetitzar dues proteïnes diferents. Això es deu a que hi ha diferents patrons de *splicing*.



4. SÍNTESI DE PROTEÏNES

La **traducció** és el procés a partir del qual el mRNA es descodifica per generar una cadena d'aminoàcids. Aquest procés està catalitzat per un ribozim, el rRNA 23s, i els substrats són aminoacil-tRNAs.

El **codi genètic** és el conjunt de regles que defineix com es tradueix una seqüència de nucleòtids del RNA a una seqüència d'aminoàcids d'una proteïna. Ens indica quins **codons**, que són triplets de nucleòtids, corresponen a un aminoàcid en concret. És un codi universal, comú per tots els éssers vius i **degenerat**, ja que un únic aminoàcid correspon a més d'un codó (hi ha moltes combinacions de codons i aproximadament 20 aminoàcids que apareguin a les nostres proteïnes). Consta de 61 codons diferents, tres d'ells (UAA, UAG i UGA) són de parada i, per tant, quan es van a traduir el procés s'atura. El codó AUG indica on ha de començar la traducció i també correspon a l'aminoàcid metionina. Un **anticodó** té una seqüència complementària a la d'un codó.



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

Els codons del mRNA es llegeixen en sentit 5'→3' gràcies al tRNA i el polipèptid es codifica des de l'extrem N-terminal fins al C-terminal. Cada tRNA té un anticodó que s'uneix al codó de mRNA corresponent a través de l'aparellament de bases complementàries, que s'uneixen per mitjà de ponts d'hidrogen. L'altre extrem del tRNA conté l'aminoàcid que especifica aquell codó.

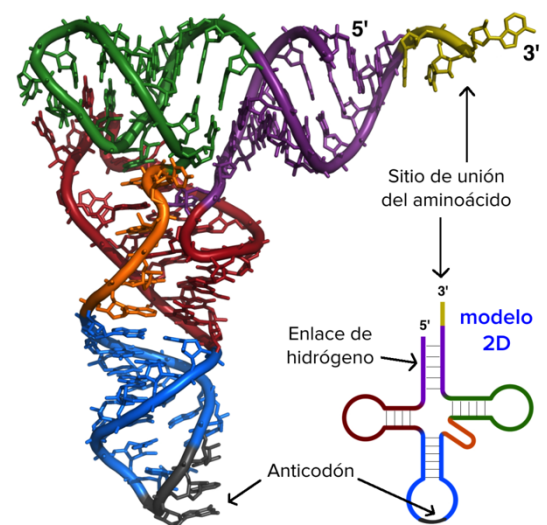
Una seqüència a l'atzar queda interrompuda per un codó de parada aproximadament cada 21 aminoàcids. Si una seqüència no es veu interrompuda rep el nom de **pauta de lectura oberta** (*open reading frame ORF*) i si sí que ha estat interrompuda, **pauta de lectura bloquejada** (*blocked reading frame*).

El **tRNA** és un tipus d'àcid ribonucleic de vital importància per la síntesi proteica. És l'encarregat de traduir la seqüència del mRNA i atribuir-li un aminoàcid a cada tres codons.

A l'extrem 3'-OH s'uneix l'aminoàcid corresponent al codó complementari de l'anticodó. L'anticodó s'aparella amb els codons que codifiquen l'aminoàcid unit. L'estructura terciària del tRNA està estabilitzada gràcies als enllaços per ponts d'hidrogen entre les bases i també els OH dels C-2' de les riboses.

L'aparellament entre codons i anticodons es dona a la posició 5' de l'anticodó i la 3' del codó.

Alguns tRNAs poden reconèixer més d'un dels codons que codifiquen un aminoàcid determinat. En general, els procariotes tenen 31 tipus de tRNA diferents que poden acoblar 20 aminoàcids dels 61 codons possibles.



Les **aminoacil-tRNA sintetases** són els enzims que uneixen l'aminoàcid al tRNA. Són molt específiques ja que existeix un enzim per a cada aminoàcid. Té dos substrats: l'aminoàcid i els tRNAs isoacceptors, que són els tRNAs que reconeixen els codons que codifiquen l'aminoàcid. Són capaces de reconèixer l'anticodó del tRNA a més d'altres característiques d'aquest. A més, presenten un centre autocorrector on es detecta i s'hidrolitza l'enllaç amb un aminoàcid incorrecte, amb una taxa d'error de 10^{-4} . El seu mecanisme d'actuació consta de dues etapes:

- Activació de l'aminoàcid amb ATP gràcies a la hidròlisi de l'ATP.
- Transferència de l'aminoàcid al grup 3'-OH del braç acceptor del tRNA: l'energia es conserva a l'enllaç èster entre un extrem C-terminal de l'aa i 3' del tRNA, i servirà més tard per formar l'enllaç peptídic que unirà els aminoàcids per formar la proteïna.

5. RIBOSOMES

Els **ribosomes** són complexos supramoleculars formats per RNA i proteïnes ribosòmiques. És on té lloc la traducció del RNA a proteïnes. Està format per dues subunitats:

- Subunitat gran: és un ribozim i és el centre de la peptidil transferasa.
- Subunitat petita: és el centre descodificador, s'associa amb el mRNA i és on té lloc la interacció codó/anticodó.

Tenen un lloc d'unió al mRNA i tres llocs d'unió al tRNA: un per l'aminoacil-tRNA sintetasa, un altre pel peptidil-tRNA i un tercer per la sortida del tRNA.

TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANT

El **DNA recombinant** és una molècula creada artificialment que combina seqüències de DNA que no es troben juntes a la natura.

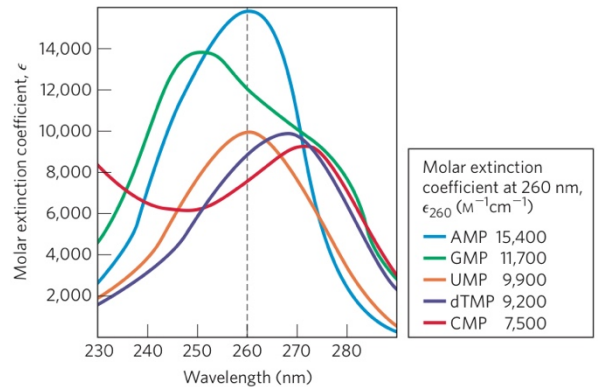
1. ESPECTRES D'ABSORCIÓ DELS NUCLEÒTIDS A LA LLUM UV

Els nucleòtids són capaços d'absorbir la llum ultraviolada ja que contenen bases aromàtiques nitrogenades (purines i pirimidines).

L'espectre d'absorció de desoxiribonucleòtids, ribonucleòtids i nucleòsids és molt similar.

Per la majoria dels nucleòtids el pic d'aquesta absorció es troba a una longitud d'ona de 260nm, mesurada a ph 7.

Una única cadena de DNA presenta una major absorció UV que una doble hèlix perquè en aquesta última els nucleòtids estan menys exposats.



2. DESNATURALITZACIÓ – RENATURALITZACIÓ

El DNA, davant de canvis de temperatura o de pH, pot desnaturalitzar-se. Una de les conseqüències que pot comportar la desnaturalització de la doble hèlix és l'augment en l'absorció UV, deguda a l'**efecte hiporcròmic**. L'absorbància del DNA augmenta de sobte perquè en desnaturalitzar la doble hèlix aquesta se separa en dues cadenes diferents i, com s'ha comentat abans, aquestes presenten una major absorbància per separat que estan juntes formant la doble hèlix. Gràcies a aquest increment, podem seguir l'avenç de la desnaturalització del DNA si observem com varia la seva absorbància per una mateixa longitud d'ona aplicada.

Què passa quan el DNA es desnaturalitza?

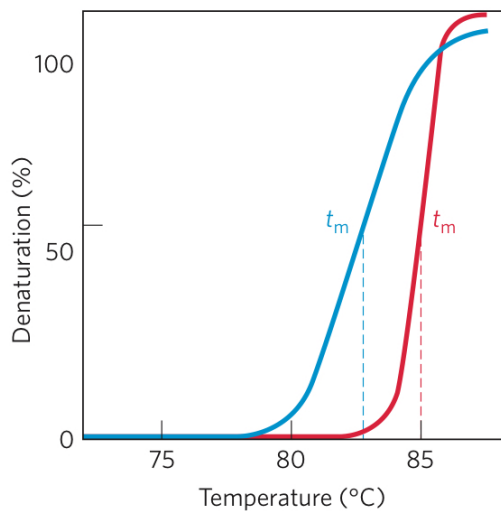
- Els enllaços covalents no es trenquen, ja que la temperatura no es prou elevada i, per tant, tampoc ho fa la seva seqüència.
- Els ponts d'hidrogen sí que es trenquen ja que no són tan forts com els enllaços covalents i això comporta el desenrotllament de la doble hèlix i, per tant, la seva separació en dues cadenes diferents.
- L'apilament de bases es perd.

A diferència de les proteïnes, la desnaturalització del DNA sempre és reversible. La seva renaturalització rep el nom d'**hibridació** i s'aconsegueix revertint els efectes que han comportat la desnaturalització (per exemple, si prèviament s'ha augmentat la temperatura, ara l'haurem de disminuir)

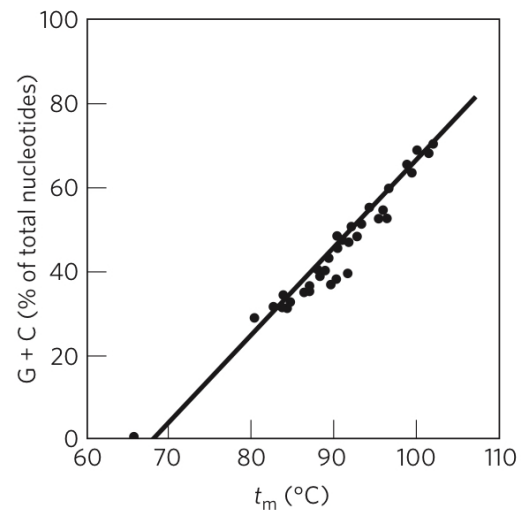
3. TEMPERATURA DE FUSIÓ

La temperatura de fusió del DNA és la temperatura en què s'ha desnaturalitzat un 50% del DNA i, per tant, el 50% del DNA es troba com a dues cadenes separades. El seu valor depèn de diferents paràmetres:

- La composició del DNA: com major sigui el contingut en nucleòtids de Guanina i Citosina més alt serà el punt de fusió, ja que estan units per tres ponts d'hidrogen mentre que l'Adenina i la Timina només ho estan per dos. Això implica que es necessita més energia i, per tant, més temperatura, per separar C i G que A i T.
- El pH
- La força iònica: afecta a l'estructura secundària del DNA. Si aquesta disminueix, també ho fa la temperatura de fusió.

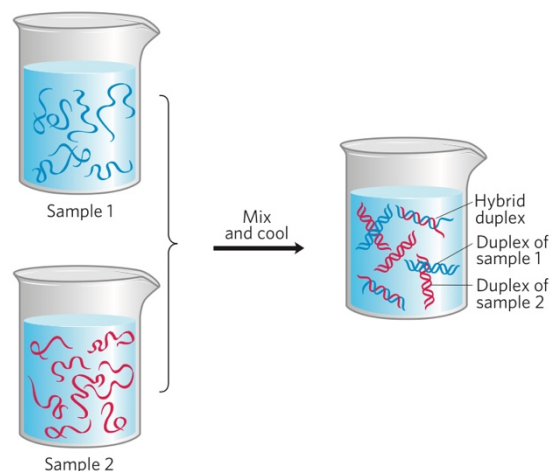


Comparació de la temperatura de fusió de dos mostres de DNA diferents



Relació entre la temperatura de fusió i el contingut de G i C al DNA.

Quan desnaturalitzem dues mostres de DNA procedents d'organismes diferents esperaríem que, en revertir les condicions que han portat a la desnaturalització, cada cadena es retrobaria amb la seva parella original i es tornarien a formar, per complet, les dues hèlix originals. Si les mostres de DNA són similars, alguns segments poden no ajuntar-se amb la seva cadena complementària original sinó amb la de l'altre organisme. Aquest procés es coneix com a **hibridació** ja que el resultat de la unió d'aquests dos segments de DNA es coneix com a **híbrid**. Com més semblants siguin les seqüències de DNA dels dos organismes – i, per tant, com més propers siguin genèticament – més híbrids es formaran.



La hibridació es pot utilitzar per detectar seqüències de DNA similars entre dues espècies o determinar el genoma d'una altra:

- Una seqüència de DNA o un gen es pot detectar en presència d'una similar ja que formaran híbrids.
- També és útil per identificar el RNA.

Aquesta tècnica és la que ens permet identificar un individu gràcies a un cabell o detectar malalties molt abans que es mostrin símptomes.

Les proteïnes es poden separar per **electroforesi**, un procés que aprofita la seva diferent mobilitat a través d'un gel en funció de la seva càrrega. Les molècules de DNA són massa grans com per avançar a través del gel que s'utilitza amb les proteïnes i, per tant, s'utilitzen altres (d'agarosa, per exemple). En aquest cas el que determina la velocitat de les molècules no és la seva càrrega sinó la seva llargada: com més curta és la cadena més ràpidament avançarà.

4. CLONATGE DEL DNA

Clonar un organisme implica fer-ne una còpia idèntica. Clonar el DNA vol dir, també, crear còpies idèntiques de la seva seqüència. Aquest procés té lloc en les següents quatre etapes:

- Tallar el DNA en punts concrets gràcies a l'acció d'endonucleases.
- Triar una molècula de DNA que farà de portador del DNA que s'ha de clonar. Aquests portadors s'anomenen vectors de clonatge i acostumen a ser plasmidis o DNA víric.
- Unir el vector i el DNA a clonar per formar el **vector recombinant**.
- Transferir el vector recombinant a la cèl·lula hoste que proporciona la maquinària enzimàtica necessària perquè la replicació del DNA tingui lloc.

Les **endonucleases de restricció** són enzims que reconeixen i tallen el DNA en punts concrets i en generen segments més petits. Les podem trobar en moltes espècies de bacteris on s'utilitzen per reconèixer i tallar fragments de DNA exògens. En un principi podríem pensar que això suposa un problema perquè quan introduïm el vector recombinant a la cèl·lula hoste, aquest podria ser reconegut com a estranger, però això es soluciona metilant el DNA.

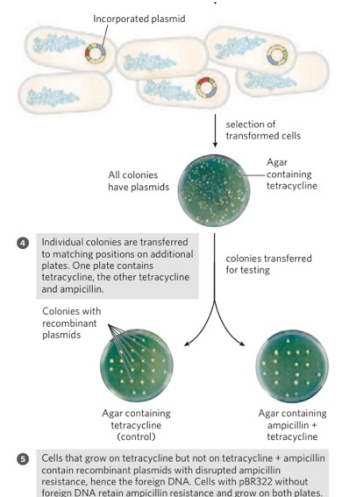
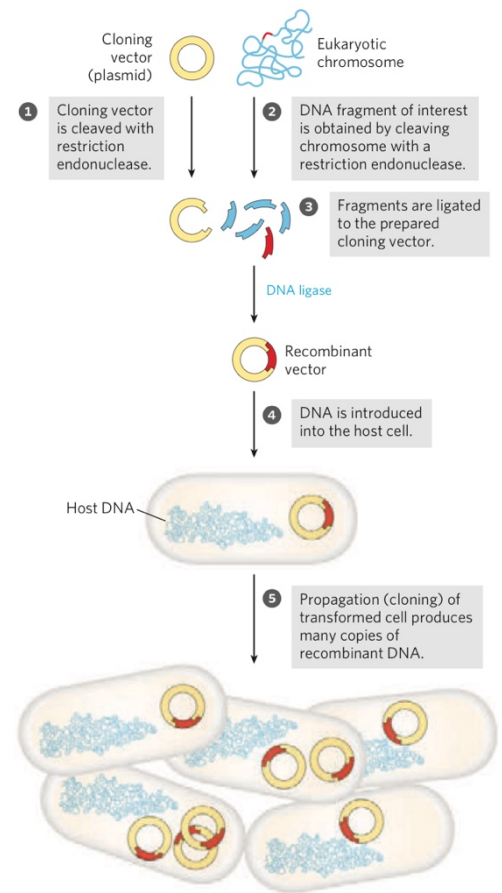
La **DNA ligases** és un enzim capaç d'ajuntar dues molècules o segments de DNA ja que forma enllaços de tipus fosfodièster entre un extrem 5' d'una cadena o segment i el 3' de l'altra.

Els **vectors de clonatge** són molècules de DNA que transfereixen el DNA que es vol clonar a la cèl·lula hoste. Per transportar-lo, les dues molècules s'uneixen per recombinació. Hi ha diferents tipus de vectors de clonatge:

- **Plasmidis**, és una molècula de DNA circular que s'acostuma a trobar als bacteris i no forma part del genoma d'aquests. Poden presentar gens que els confereixen resistència als antibiòtics i poden replicar-se de manera independent al DNA genòmic.
- **Cromosomes bacterians artificials**, s'utilitzen quan el fragment de DNA que volem copiar és massa gran com per incorporar-se en un plasmidi ordinari. Aquests cromosomes artificials són plasmidis modificats que permeten el clonatge de segments llargs de DNA i, com per la seva mida recorden als cromosomes, reben aquest nom.
- **Cromosomes artificials del llevat**.

La **transformació** és el nom que rep el procés que consisteix en la introducció dels plasmidis a la cèl·lula bacteriana. Sovint les cèl·lules i el plasmidi s'incuben a 0°C a una solució de CaCl_2 i s'augmenta sobtadament la temperatura fins als 37°C. Després d'aquest procés les cèl·lules bacterianes incorporen el DNA del plasmidi.

El **bacteri transformant** és el bacteri al que s'ha introduït el vector recombinant i gràcies al qual aquest es replica. La majoria de les bacteris però, no són capaços d'incorporar-lo i, per tant, també necessitem mecanismes que ens permetin descartar els que ens són útils i els que no.

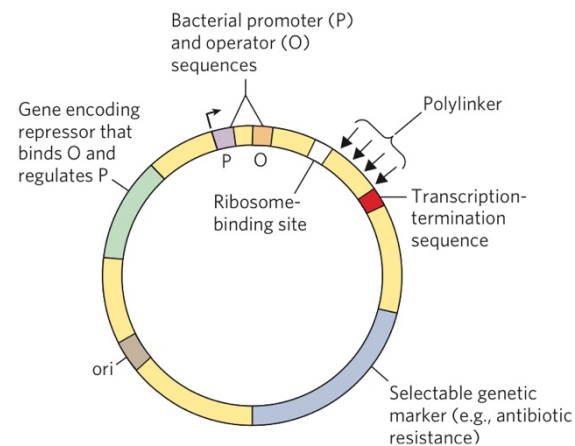


Els gens clonats es poden expressar i provocar una major producció de proteïnes. Això ens és molt útil per estudiar el funcionament d'una proteïna, els seus mecanismes de reacció...

Els gens procedents de cèl·lules eucariotes contenen, en el seu propi DNA, seqüències necessàries per dur a terme la seva pròpia transcripció i posterior traducció. Aquestes seqüències no són útils en bacteris i, per tant, al vector recombinant li hem d'afegir una seqüència de DNA que permeti la seva adequada transcripció i traducció una vegada es trobi dins la cèl·lula hoste. Els **vectors d'expressió** són aquells que presenten les regions de control per la transcripció i traducció del gen clonat.

Un **promotor** és una regió del DNA que controla l'inici de la transcripció d'aquest. Als vectors recombinants es col·loca a prop del fragment de DNA que s'ha de clonar i assegura la seva transcripció eficient. Un **operador** regula l'expressió del gen que s'està transcrivint. El **polylinker** és una seqüència de DNA amb diversos llocs de reconeixement d'enzims de restricció. És on s'ha d'inserir el gen amb l'extrem N-terminal. Els bacteris no són capaços d'eliminar els introns dels gens eucariotes i, per això, utilitzem el cDNA als vectors d'expressió. El **cDNA**, o DNA complementari, és una molècula de DNA bicatenària sintetitzada a partir d'un mRNA i, per tant, amb una seqüència complementària i sense introns.

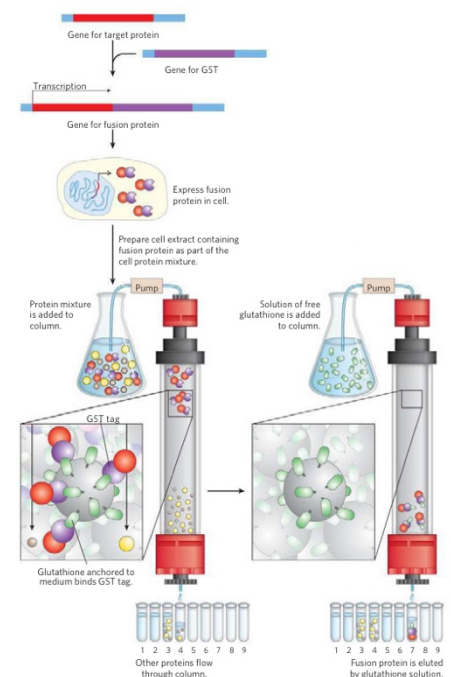
El cDNA s'obté a partir del mRNA d'una cèl·lula eucariota i amb l'ajuda de la **transcriptasa inversa**, un enzim capaç de sintetitzar DNA a partir de mRNA. Quan ja s'ha generat una cadena, la DNA polimerasa I la copia per generar-ne la complementària. Tant les cadenes de cDNA com la de mRNA tenen una cua de poli-A (timina en el cas d'una de les cadenes complementàries) ja que purifica el mRNA i l'estabilitza.



5. PURIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS

Podem purificar les proteïnes que obtenim a partir de l'expressió dels gens clonats per **cromatografia d'afinitat**. Les proteïnes es marquen amb altres proteïnes o pèptids que reben el nom de **tag** i es col·loquen als extrems C-terminals. Hi ha diferents tipus de proteïnes que són **tags**: (His)₆, GST, proteïna A... La combinació de la proteïna recombinant i el **tag** forma una **proteïna de fusió**, que per cromatografia d'afinitat es separa de les altres proteïnes. Per acabar la purificació només s'ha de separar el tag de la proteïna recombinant amb una proteasa que talli l'enllaç que els uneix.

Un exemple d'aquest procés s'il·lustra a la imatge de la dreta, en què el **tag** és l'enzim GST (un enzim que pot enllaçar-se amb el glucatió), que s'uneix a l'extrem C-terminal de la proteïna recombinant. Posteriorment, la cèl·lula es lisa i s'obté un extracte de les proteïnes, que es sotmet a cromatografia d'afinitat en una matriu de glucatió immobilitzat. Com que la GST s'enllaça amb el glucatió avança més lentament per la columna mentre que totes les altres ho fan molt més ràpidament. Finalment, s'elueix la proteïna recombinant amb el **tag** amb una solució de GSH lliure.



6. AMPLIFICACIÓ DEL DNA

L'**amplificació del DNA** consisteix en augmentar el nombre de còpies d'un fragment de DNA en particular. És un procés que normalment té lloc mitjançant reaccions en cadena mediades per la DNA polimerasa i es coneixen com a **PCR**.

- Escalfar el DNA per separar les cadenes (trencament de ponts d'hidrogen entre nucleòtids).

- ii. Refredar la mostra i afegir oligonucleòtids sintètics que actuen com a *primers*.
- iii. Afegir nucleòtids trifosfats i DNA polimerasa termostable, que catalitzarà la síntesi de DNA en el sentit 5'-->3'.

Cada cicle amplifica el segment en un factor de 2, després de repetir 20 vegades aquest procés el segment de DNA s'ha amplificat 10^6 vegades.

El DNA amplificat també es pot clonar si els *primers* contenen extrems no complementaris amb la seqüència diana per les endonucleases de restricció.

7. ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA DEL DNA

Un dels mètodes que a finals dels anys 70 va permetre determinar la seqüència de nucleòtids del DNA és el **Mètode de Sanger o dels dideoxinucleòtids**. La seqüenciació se Sanger consisteix en fer moltes còpies d'una cadena de DNA en presència de la DNA polimerasa i trifosfats de dideoxinucleòtids. Els nucleòtids es poden enllaçar amb molècules que tenen un color diferenciador. Podem saber en quin nucleòtid acaba un fragment de DNA ja que aquest tindrà el color corresponent a la molècula que s'associa a aquell nucleòtid.

Els fragments de DNA que tenen color es separen i es sotmeten a electroforesi. Obtindrem un gràfic amb diferents pics i colors que podrem associar a cada nucleòtid i determinar així la seqüència de DNA.

Actualment hi ha diferents bancs de dades online que emmagatzemen la seqüenciació de molts tipus de genomes.

Cada ésser humà té una seqüència de DNA única. Els **polimorfismes** són les petites diferències existents entre les seqüències de DNA de diferents individus. Un exemple de polimorfisme és el STR (*short tandem repeats*). Cada individu es caracteritza pel nombre de repeticions d'una mateixa seqüència curta que es presenta a un lloc del genoma.

Cada cèl·lula del nostre cos té un **patró d'expressió** que indica quins gens expressa i el nivell d'expressió d'aquests.