



REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN E TRADUCCIÓN

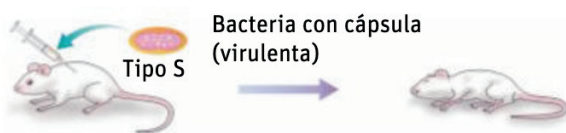
1. O ADN como portador da información xenética
2. Dogma central da bioloxía molecular
3. Replicación do ADN
 - 3.1. Modelos de replicación do ADN
 - 3.2. Experimento de Meselson e Stahl
 - 3.3. Replicación en procariotas
 - 3.4. Replicación en eucariotas
4. Transcripción
 - 4.1. Transcrición en procariotas
 - 4.2. Transcrición en eucariotas
 - 4.3. A transcrición inversa
5. Tradución ou biosíntese de proteínas
 - 5.1. O código xenético
 - 5.2. Características do código xenético
 - 5.3. Mecanismo de tradución
6. Regulación da expresión xénica
 - 6.1. Regulación da expresión xénica en procariotas
 - 6.2. Regulación da expresión xénica en eucariotas
- Repaso PAU

1. O ADN COMO PORTADOR DA INFORMACIÓN XENÉTICA

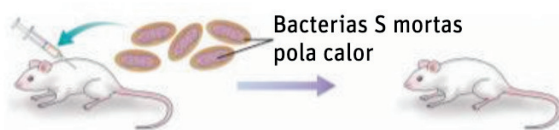
A primeira evidencia de que o ADN é o material hereditario obtívola en 1928 Frederick Griffith cando buscaba unha vacina contra a pneumonía provocada polo *Streptococcus pneumoniae*. Griffith descubriu que existían dúas cepas da bacteria distintas:

- Cepa S (do inglés smooth, 'liso'): teñen unha cápsula xelatinosa de polisacáridos que lles dá un aspecto liso e as protexe dos fagocitos; por iso, son capaces de provocar a enfermidade e morte cando se inoculan a un animal san.
- Cepas R (do inglés rough, 'rugoso'): carecen de cápsula xelatinosa, polo que as súas colonias teñen un aspecto máis rugoso que o S. Ó non estar protexidas fronte ós sistemas de defensa, non provocan a enfermidade cando se inoculan a un animal san.

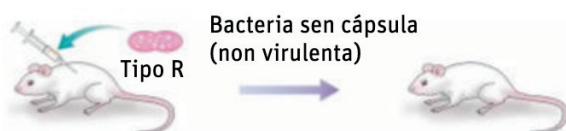
Griffith pensou que se podía inmunizar ratos inxectándolles bacterias virulentas (S) mortas pola calor, ou ben facéndoo con bacterias non virulentas (R) vivas. Pero nos seus experimentos obtivo algún resultado inesperado.



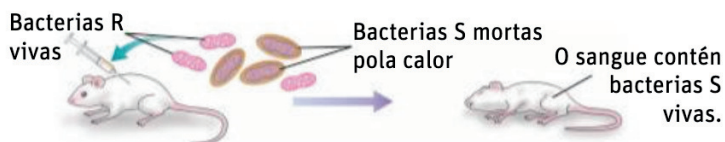
1. Os ratos inoculados con cepas S contraen a enfermidade e morren. Deles extraense bacterias vivas da cepa S.



2. Os ratos inoculados con cepas S mortas pola calor non contraen a enfermidade. Deles, polo tanto, non se extraen bacterias vivas.



3. Os ratos inoculados con cepas R non contraen a enfermidade. Deles non se extraen bacterias vivas, posto que non medran no animal.



4. Os ratos inoculados simultaneamente con cepas S mortas pola calor e cepas R vivas contraen a enfermidade e morren. Deles extraense bacterias vivas da cepa S.

Figura 1. Experimento de Griffith. O experimento 4 permitiulle deducir que nas bacterias da cepa S mortas por calor existía “algo” que chamou ‘principio transformante’ que era captado polas bacterias da cepa R vivas non virulentas e transformábasas en bacterias capaces de provocar a enfermidade.

En 1944 Avery, MacLeod e McCarthy demostraron que o principio transformante de Griffith era o ADN. A demostración obtivérona cando ó inocular ratos con bacterias da cepa R e bacterias da cepas S xunto con encimas que destruían diferentes biomoléculas das bacterias virulentas, observaron que os ratos só sobrevivían cando se destruíu o ADN.

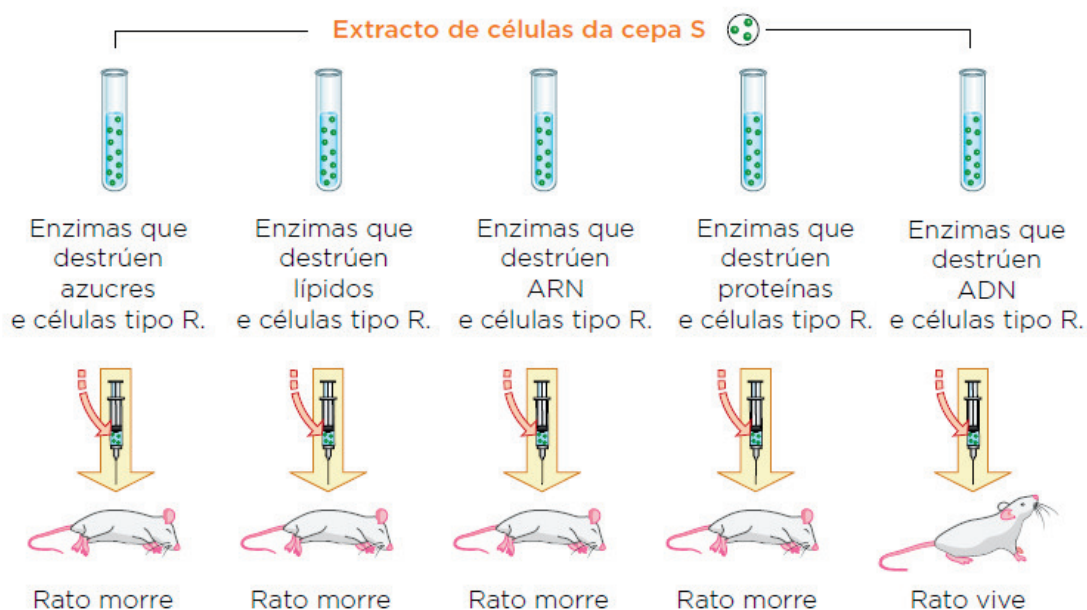


Figura 2. Experimentos de Avery, MacLeod e McCarty. Estes investigadores observaron que as bacterias R transformábanse en bacterias virulentas cando o ADN estaba presente, xa que cando se destruían outras biomoléculas os ratos enfermaban e morrían, mentres que ó destruír o ADN, os ratos sobrevivían, o que significaba que non se producía a transformación e, polo tanto, ningunha das outras biomoléculas eran as responsables da mesma.

A proba definitiva aportárona Alfred Hershey (premio Nobel en 1969) e Martha Chase en 1952. Eles traballaron co virus bacteriófago T2, un virus que infecta a *E. coli* e que está formado unicamente por ADN e proteínas. Estes científicos sabían que os fagos se unían á superficie da bacteria e inxectaban algunha substancia (ADN ou proteína) no seu interior. Esta substancia daba 'instrucións' que facían que a bacteria comezara a producir moreas de fagos; é dicir, esta substancia era o material xenético do fago.

Para determinar se o fago inxectaba ADN ou proteína nas bacterias, Hershey e Chase prepararon dous lotes diferentes de virus. En cada lote, o fago producíuse en presenza dun elemento radioactivo específico:

- Unha mostra produciuse en presenza de ^{35}S , un isótopo radioactivo de xofre, bioelemento presente en moitas proteínas pero ausente no ADN, polo que este tratamento só marcaba radiactivamente as proteínas do fago.
- A outro mostra produciuse en presenza de ^{32}P , un isótopo radioactivo do fósforo, bioelemento que se aopa no ADN pero non nas proteínas, polo que este tratamento só marcaba radiactivamente o ADN do fago.

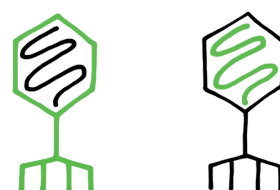


Figura 3. (esquerda) Fago coas proteínas marcadas con ^{35}S (verde). **(dereita)** Fago co ADN marcado con ^{32}P (verde).

Cada lote de fagos marcados radiactivamente empregouse para infectar un cultivo diferente de bacterias. Despois de que ocorrera a infección, cada cultivo axitábase para separar os fagos das bacterias, e posteriormente, centrifugábase de forma que as bacterias, máis pesadas, precipitaban no fondo do tubo, mentres que os virus quedaban no líquido sobrenadante.

Cando Hershey e Chase mediron a radioactividade, atoparon grandes cantidades de ^{32}P no precipitado no que se atopaban as bacterias, mentres que case todo o ^{35}S permanecía no sobrenadante onde se atopaban os restos de fagos.

Con estes resultados, Hershey e Chase concluíron que o ADN, e non a proteína, era o que se inxectaba nas células e constituía o material xenético dos fagos.

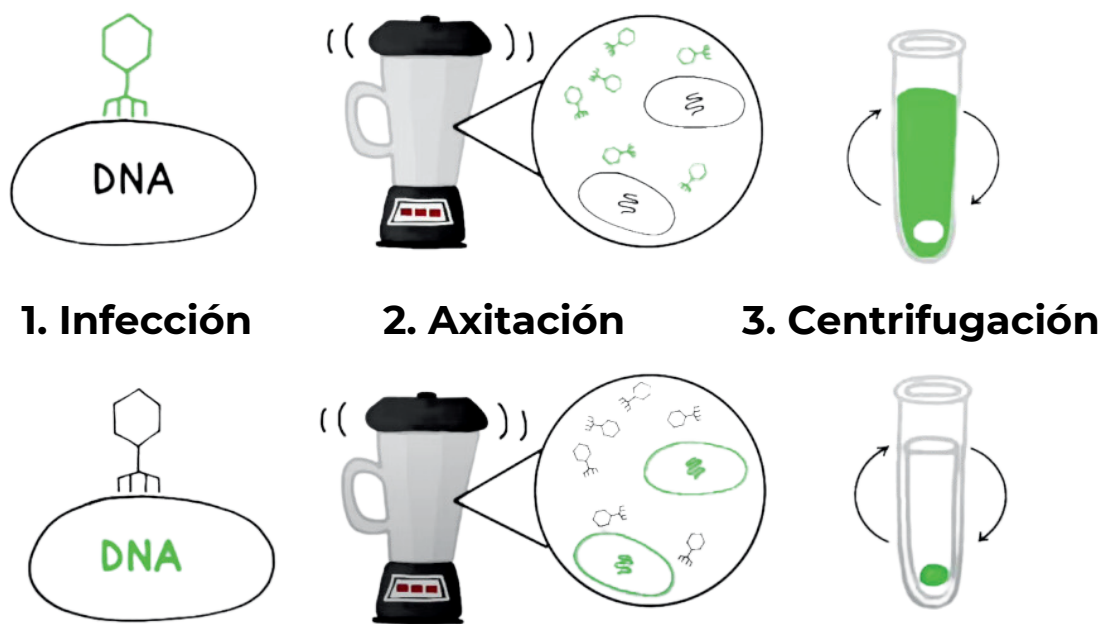


Figura 4. (arriba) Infección das bacterias cos fagos marcados con ^{35}S (proteínas víricas). Despois do proceso, toda a radioactividade detectouse no sobrenadante, onde se atopaban as cápsides dos virus; é dicir, as proteínas non eran inxectadas nas bacterias infectadas. **(abaixo)** Infección das bacterias cos fagos marcados con ^{32}P (ADN vírico). Despois do proceso, toda a radioactividade era detectada no precipitado onde se atopaban as bacterias infectadas; é dicir, o ADN vírico inxectárase durante a infección e permanecía no interior das bacterias.

2. DOGMA CENTRAL DA BIOLOXÍA MOLECULAR

O dogma central da bioloxía molecular describe como se produce o fluxo da información xenética que se atopa no ADN.

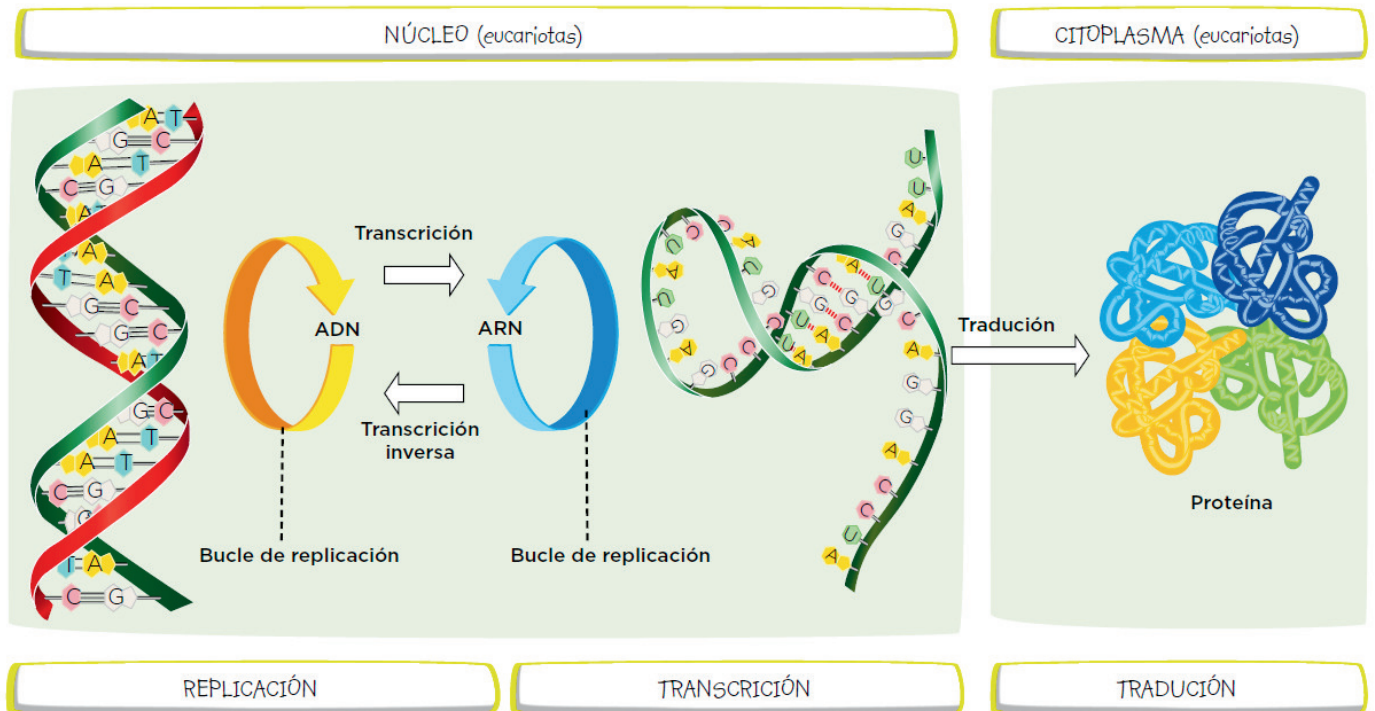


Figura 5. Dogma central da bioloxía molecular

A explicación do esquema actual é a seguinte:

- Para transmitir a información xenética de xeneración en xeneración, é necesario que o ADN se duplique, é dicir, que faga copias de si mesmo. Este proceso denomínase replicación.
- Debido a que o ADN se atopa no núcleo (e non sae) e a síntese de proteínas se realiza nos ribosomas, que están no citoplasma, necesítase unha molécula intermediaria entre ambos. Esta molécula é o ARN mensaxeiro (ARNm). A formación dunha molécula de ARNm, copia dun fragmento de ADN, denomínase transcrición.
- A información que contén o ARNm debe traducirse a unha secuencia de aminoácidos, mecanismo no que interveñen o ARN transferente (ARNt) e ARN ribosómico (ARNr). Este proceso chámase tradución.
- O ARN tamén pode servir de molde para a síntese de ADN. Moitos virus, como por exemplo o da gripe, poden sintetizar unha encima chamada transcriptasa inversa ou retrotranscriptasa, que sintetiza unha cadea de ADN complementaria ó ARN vírico. Este proceso chámase transcrición inversa.
- O ARN tamén pode actuar como molde para a súa propia replicación nalgúns virus que posúen unha encima, a ARN replicase, capaz de fabricar copias dese ARN.

3. REPLICACIÓN DO ADN

3.1. MODELOS DE REPLICACIÓN DO ADN

A replicación do ADN é o proceso mediante o cal a partir dunha molécula de ADN proxenitora ou parental se sintetizan dúas moléculas idénticas, coa mesma secuencia nucleotídica que o ADN orixinal. Este proceso ocorre na fase S da interfase; deste xeito permítese que tras a división celular as células fillas teñan a mesma información xenética que a célula nai.

Para explicar o modo polo cal se produce a replicación, inicialmente, propuxéronse tres hipóteses:

- Modelo conservativo: neste modelo, as dúas cadeas de ADN parentais volven xuntarse tras a replicación, de forma que unha molécula filla contén ambas cadeas parentais antigas, e a outra molécula filla contén as dúas cadeas do novo material sintetizado.
- Modelo semiconservativo: foi proposto por Watson e Crick. Neste caso, as dúas cadeas parentais do ADN sepáranse e serven de molde para a síntese dunha nova cadea de ADN complementaria, coa que queda unida. O resultado son dúas dobres hélices de ADN constituídas cada unha por unha cadea parental e unha cadea de nova síntese.
- Modelo dispersivo: segundo este modelo, a molécula de ADN parental rómpese en segmentos de dobre cadea que actúan como moldes para a síntese de novas moléculas. Os segmentos recompóñense ó azar dando lugar a moléculas de ADN con segmentos parentais e de nova síntese intercalados.

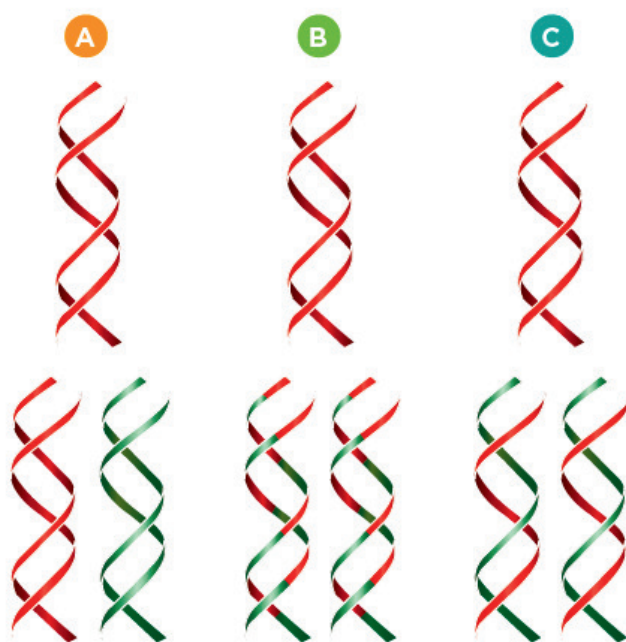


Figura 6. Hipotéticos posibles modelos de replicación do ADN: conservativo (A), dispersivo (B) y semiconservativo (C)

3.2. EXPERIMENTO DE MESELSON E STAHL

En 1957, Meselson e Stahl realizaron un experimento para determinar cal dos tres modelos de replicación do ADN propostos era o correcto. O seu traballo estaba baseado na existencia de dous isótopos do nitróxeno, un dos principais bioelementos que forman o ADN (está presente nas súas bases nitroxenadas): o ^{14}N (variante 'normal', máis lixeira), e o ^{15}N (máis pesado).

Cando se cultivan bacterias en cadanseu medio con cadanseu isótopo, as bacterias incorporan o isótopo correspondente ás súas moléculas de ADN durante o proceso de

replicación. Pasado un tempo, este ADN pode extraerse e centrifugarse nun medio cun gradiente de densidade (máis denso ó fondo, menos denso na parte superior), de modo que o ADN quedará situado a unha altura correspondente coa súa densidade: o ADN con ^{14}N quedará situado máis arriba no tubo que o ADN con ^{15}N , que se irá máis ó fondo. Messelson e Stahl cultivaron primeiro as bacterias en medio con ^{15}N e despois pasáronas a un medio con ^{14}N durante varias xeracións, extraendo o ADN despois de cada unha delas. Os resultados obtidos eran unicamente compatibles co modelo semiconservativo.

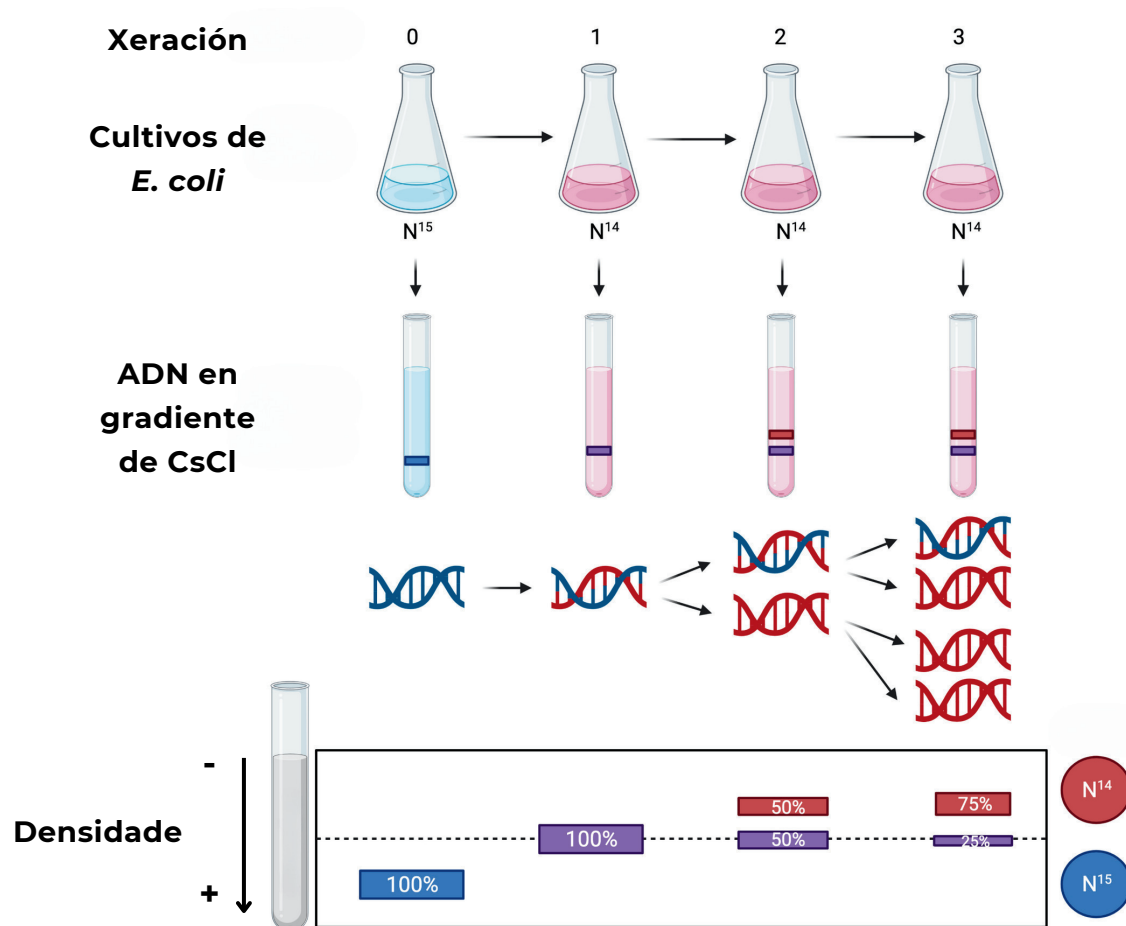


Figura 7. Ó centrifugar o ADN das células antes de ser transferidas ó medio con ^{14}N , obtiveron unha única banda pesada, tal e como era de esperar. Na primeira xeración obtiveron tamén unha única banda, pero de densidade intermedia. Deste resultado deduciron que as moléculas de ADN de nova síntese estaban formadas por ADN con ^{14}N e ^{15}N en proporcións semellantes. Polo tanto, descartaron o modelo conservativo (neste caso terían que ter obtido dúas bandas, unha máis densa correspondente ó ADN parental cultivado en ^{15}N , e outra máis lixeira correspondente ó ADN de nova síntese formado en medio con ^{14}N). Na segunda e terceira xeracións mantíñase a banda intermedia e aparecía unha banda lixeira correspondente a ADN con ^{14}N exclusivamente. Con este resultado descartábase o modelo dispersivo xa que nestas xeracións as bacterias incorporaban só ^{14}N ás cadeas de ADN de nova síntese, demostrándose que non era unha mestura ó azar de fragmentos parentais e de nova síntese.

3.3. REPLICACIÓN EN PROCARIOTAS

FASE DE INICIACIÓN

Consiste no desenrolamento e apertura da dobre hélice.

- No cromosoma bacteriano existe unha secuencia de nucleótidos chamada orixe de replicación (oriC en *E. coli*) que actúa como sinal de iniciación.
- O proceso iníciase cunha encima denominada helicase, que rompe as pontes de hidróxeno entre as dúas febras complementarias e sepáraas.
- Cando a dobre hélice se abre prodúcese o desenrolamento desa zona, o que crea superenrolamentos nas zonas circundantes. As encimas topoisomerasas e xirases eliminan as tensións cortando e soldando a hélice de ADN nestes puntos para aliviar a tensión de torsión.
- A continuación interveñen as proteínas de unión á cadea sinxela (proteínas SSB), que se unen ás febras molde e impiden que se volvan unir e enrolar.
- Na orixe de replicación formouse unha burbulla de replicación na que hai dúas zonas con forma de “Y”, denominadas forquitas de replicación, onde se van a sintetizar as novas febras de ADN. A burbulla de replicación vaise extendendo ao longo do ADN bacteriano nos dous sentidos, por iso é polo que se di que a replicación é bidireccional.

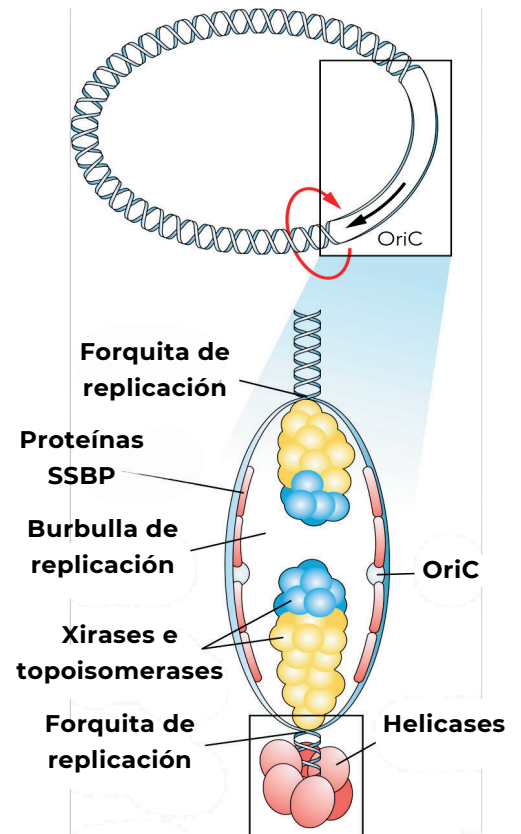


Figura 8. Iniciación da replicación do ADN en procariotas

FASE DE ELONGACIÓN

Consiste na síntese de dúas novas febras de ADN empregando como molde cada unha das febras parentais. Ademais das encimas que actúan na fase de iniciación, na elongación interveñen ADN-polimerases de varios tipos: I, II e III.

- Ningunha ADN-polimerase pode iniciar de cero a síntese dunha nova cadea de ADN, polo que é necesaria a intervención inicial dunha ARN-polimerase chamada primase, que sintetiza un curto fragmento de ARN (10 nucleótidos), denominado cebador ou primer. O cebador proporciona o grupo 3'-OH que necesita a ADN-polimerase III para engadir novos desoxirribonucleótidos á cadea de nova síntese.
- A ADN-polimerasa III engade nucleótidos en dirección 5' → 3' a continuación do cebador de ARN. Para iso necesítanse nucleótidos trifosfato e enerxía, proporcionada pola propia hidrólise do nucleótidos trifosfato ó transformase nos nucleótidos monofosfato que formarán parte da molécula de ADN.

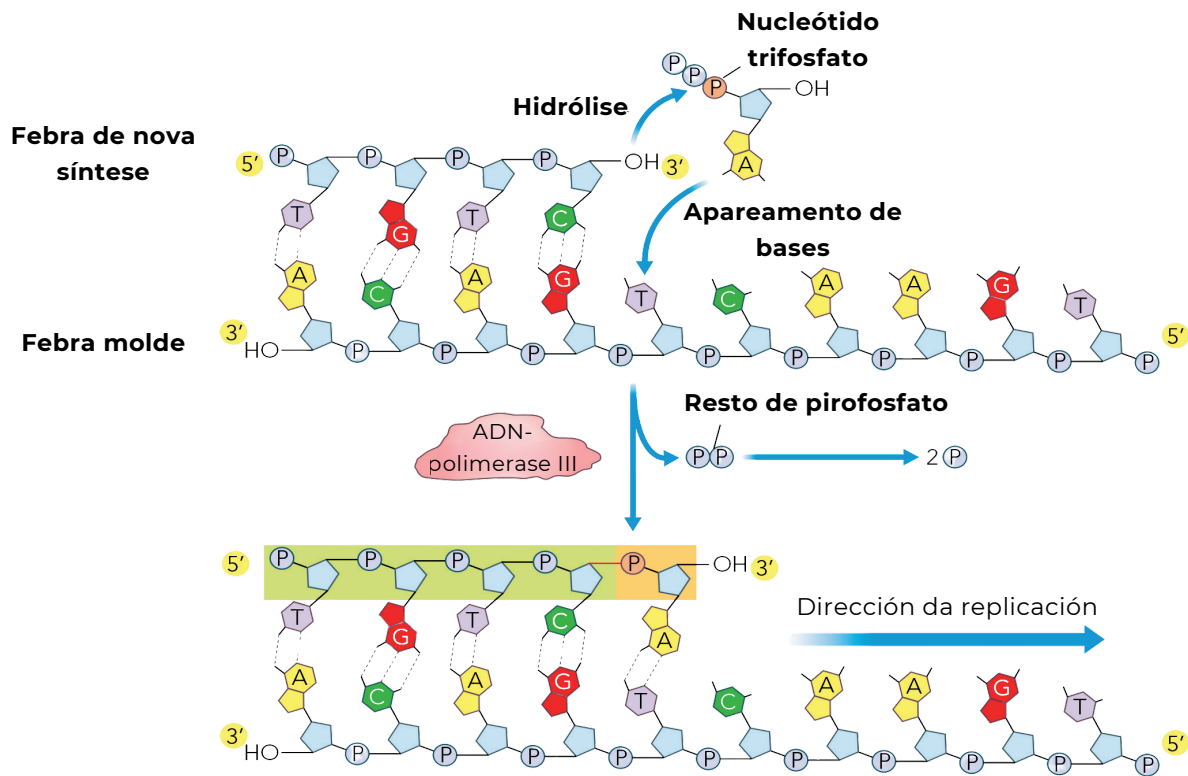


Figura 9. Actividade da encima ADN-polimerase III

- Unha das febras sintetízase de forma continua xa que a helicase non se detén e continúa separando a dobre hélice e ampliando a burbulla de replicación. Esta febra denomínase febra condutora.
- A febra antiparalela á condutora chámase febra retardada, e sintetízase de forma descontinua. Conforme o movemento da forquita expón unha nova zona da cadea molde da febra retardada, a primase sintetiza un cebador e a continuación a ADN-polimerase engade os desoxirribonucleótidos ao seu extremo 3', ata que é detida polo fragmento sintetizado anteriormente. Fórmase así varios fragmentos consecutivos de ADN precedidos por cadanseu cebador. Estes fragmentos chámanse fragmentos de Okazaki.
- Dado que a replicación é bidireccional desde o punto de orixe, unha mesma febra de ADN compórtase simultaneamente como cadea condutora desde o punto de orixe cara o extremo 3', e como cadea retardada cara o extremo 5'.
- A continuación, intervén a ADN-polimerase I que, grazas á súa función exonuclease, primeiro retira os fragmentos de ARN que forman os cebadores; despois, grazas á súa función polimerase, enche os ocos con nucleótidos de ADN.
- Finalmente a ADN-ligase une entre si os diferentes fragmentos.

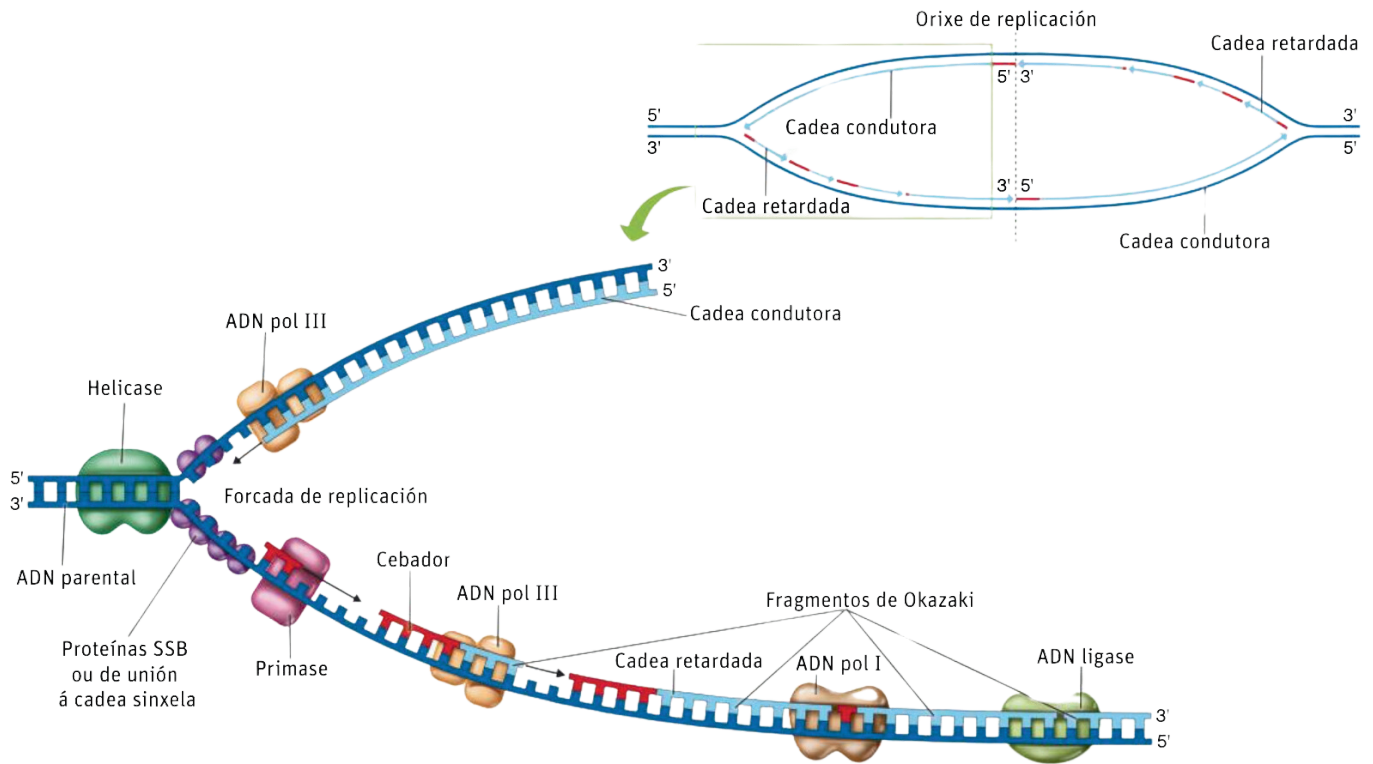


Figura 10. Fase de elongación da replicación do ADN. Arriba represéntase unha burbulla de replicación con dúas forquitas de replicación que avanzan en sentidos opostos (replicación bidireccional). Obsérvase como cada unha das febras do ADN é cadea condutora e retardada simultaneamente segundo o sentido de avance de cada unha das forquitas de replicación.

FASE DE TERMINACIÓN

As dúas forquitas de replicación van avanzando en sentidos opostos ata chegar a un punto do cromosoma bacteriano (circular), denominado *Ter* e situado diametralmente oposto ó punto de orixe. O punto *Ter* está formado por unha secuencia de nucleótidos á que se fixa un complexo de proteínas chamado *Tus*. Esta unión bloquea o avance das helicases e desencadea a finalización do proceso de replicación. O resultado final son dous cromosomas circulares concatenados que se separan pola acción dunha topoisomerase.

Durante a replicación incorpóranse nucleótidos que non teñen correctamente apareadas a súas bases. A taxa de erro da ADN-polimerase é de 1 nucleótido mal apareado por cada 10^6 pares de bases. Para incrementar a fidelidade do proceso de replicación, nas células existen mecanismos de reparación de erros:

- Corrección de probas. Levada a cabo polas propias ADN polimerases, que teñen tamén función exonuclease, de forma que tras cada polimerización revisan o nucleótido anterior e se é incorrecto substitúeno polo adecuado. Desta forma redúcese a taxa de erro ata un nucleótido mal colocado por cada 10^8 nucleótidos engadidos.

- Corrección posreplicativa. Para aumentar aínda máis a precisión da replicación existe unha maquinaria encimática que corrixe os posibles erros cometidos pola ADN-polimerase. As encimas correctoras detectan o nucleótido mal apareado, elimínano e rexeneran a secuencia correcta do mesmo modo. Para detectar o nucleótido mal emparellado o aparato de corrección debe recoñecer a cadea recién sintetizada, onde se atopa o erro, e diferenciala da cadea molde. Isto é posible porque a febra molde ten metiladas as adeninas das secuencias GATC, mentres que a cadea de nova síntese permanece durante un lapso de tempo sen esta metilación. Unha vez recoñecido o nucleótido mal emparellado na cadea de nova síntese, elimínase gracias a unha encima endonuclease que corta un segmento de ADN no que se atopa o erro. A continuación a ADN-polimerase I encárgase de encher o oco e, finalmente, unha ADN-ligase une os extremos do fragmento corrixido ós extremos da cadea polinucleotídica de nova síntese.

A pesares de todos estes sistemas de corrección, durante a replicación prodúcese 1 erro na incorporación de nucleótidos cada 10^9 nucleótidos. Estes erros constitúen as mutacións xénicas ou puntuais que resultan de vital importancia na evolución das especies, xa que constitúen unha das principais fontes de variabilidade nas poboacións.

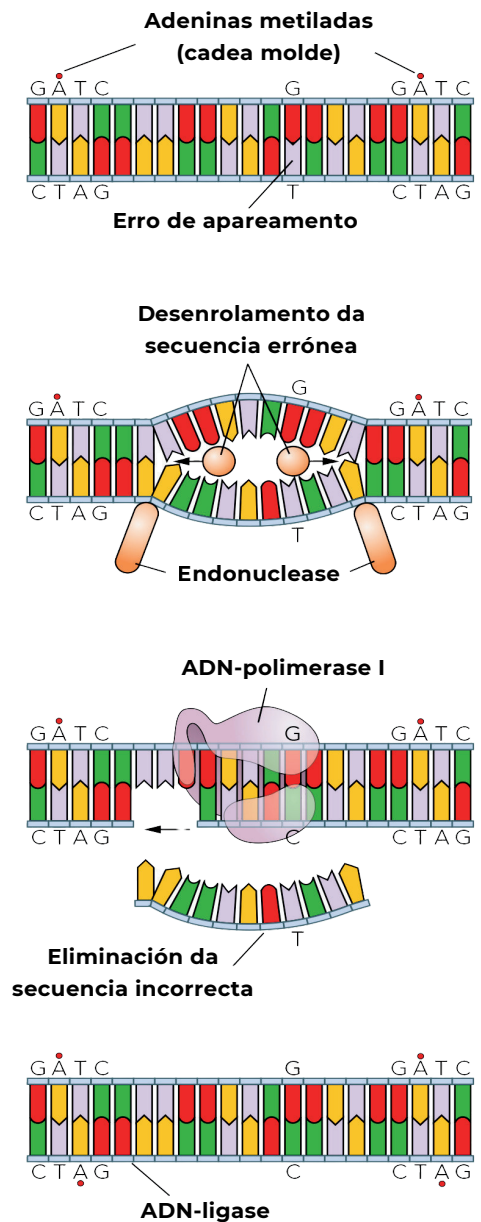


Figura 11. Mecanismo de corrección posreplicativa

3.4. REPLICACIÓN EN EUKARIOTAS

O proceso é similar ó mecanismo de replicación en procariotas, pero con algunhas diferencias:

- O ADN das eucariotas está fortemente asociado a histonas. Isto fai que o proceso sexa máis lento porque primeiro teñen que desmontar os octámeros de histonas para permitir o avance das forquitas de replicación. Por outra banda, ó finalizar a replicación, as novas moléculas de ADN deben volver formar os nucleosomas e, aínda que se aproveitan as histonas preexistentes, é necesario sintetizar outras novas para dar cobertura ás dúas moléculas resultantes do proceso. Isto ten lugar durante a fase G2 da interfase do ciclo celular.
- Ademais, o ADN eucariota é de lonxitude moito maior que o de procariotas. Para compensar a maior lonxitude e menor velocidade, nos cromosomas eucarióticos hai múltiples orixes de replicación que se activan de forma coordinada e forman unidades de replicación chamadas replicóns.

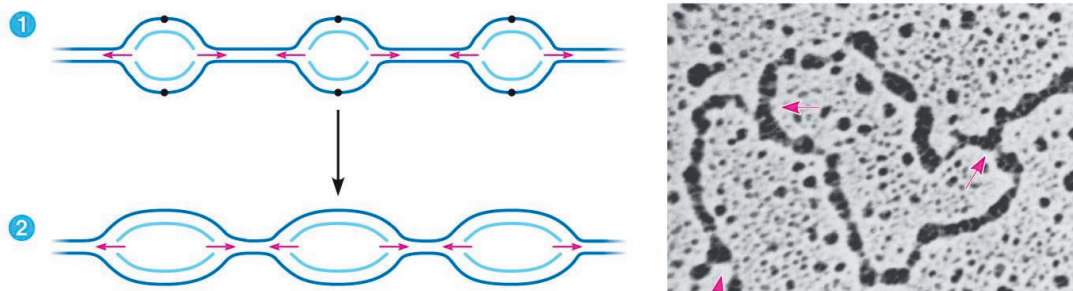


Figura 12. Formación de replicóns nos cromosomas eucariotas. Á dereita pode observarse unha burbulla de replicación vista co microscopio electrónico de transmisión

- Os fragmentos de Okazaki son máis pequenos.
- Existen 5 tipos de ADN-polimerases.
- As cadeas de ADN dos cromosomas son liñais, non circulares como o ADN bacteriano, o que ocasiona un problema máis: a replicación ocorre deseguido ata chegar ós telómeros (extremos dos cromosomas). Aquí, ó eliminar o último cebador da cadea retardada a ADN-polimerase será incapaz de encher o oco xerado porque non pode engadir nucleótidos en dirección 3'→5'. Este feito fai que o telómero se vaia acurtando pouco a pouco cada vez que a célula se divide. Os telómeros están formados por secuencias curtas repetidas que non aportan información xenética; isto permite que o acurtamento de telómeros poida producirse sen consecuencias para a vida durante varias xeracións. Polo tanto, as células poden dividirse un número limitado de veces. Cando os telómeros son demasiado curtos, máis alá dun punto crítico, os cromosomas vólvense inestable e prodúcese a morte celular. Por iso o acurtamento dos telómeros relacionouse co envellecemento ou senescencia celular.

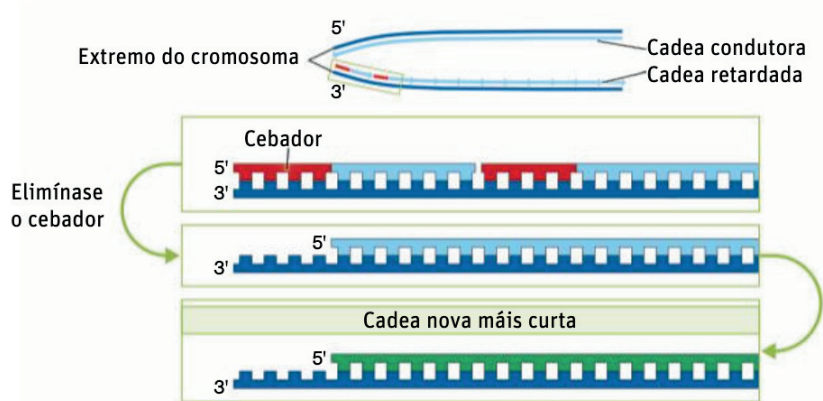


Figura 12. Mecanismo de acurtamento dos telómeros por non poder completar a replicación dos extremos dos cromosomas liñais

Certas liñaxes celulares como as células hematopoiéticas ou as cancerixenas posúen unha encima, a telomerase, que evita o acurtamento dos telómeros; por iso estes tipos celulares poden dividirse moitas veces, como se fosen inmortais.

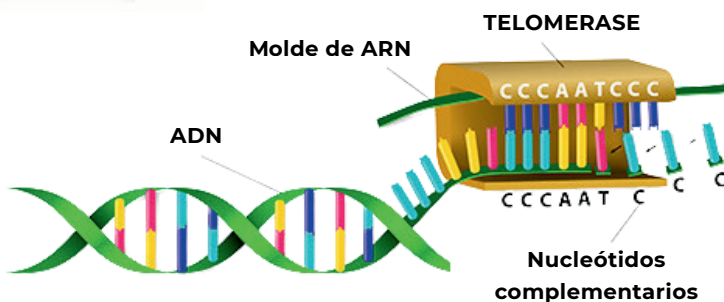


Figura 13. Mecanismo de acción da telomerase

4. TRANSCRIPCIÓN

A transcripción é o paso dunha secuencia de ADN a unha secuencia de ARN. Para que poda levarse a cabo son necesarios os seguintes requisitos:

- Unha cadea de ADN que actúe como molde: das dúas cadeas que forman o xen, só unha se vai transcribir; chámase cadea molde. A cadea complementaria a ela chámase cadea informativa ou codificante (ten unha secuencia de bases idéntica á do ARNm).
- ARN-polimerases, que son as encimas que sintetizan o ARN.
- Ribonucleótidos trifosfato, que aportan, ademais, a enerxía necesaria para a formación dos enlaces fosfodiéster cando se hidrolizan para formar os ribonucleótidos monofosfato que forman parte da molécula de ARN.

4.1. TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS

INICIACIÓN

No ADN existen dúas rexións de secuencias curtas situadas 35 e 10 pb antes do lugar onde se inicia a transcripción (de aí que se denominen rexións -35 e -10, respectivamente); estas secuencias forman a rexión promotora, que é recoñecida polo factor *sigma*, un compoñente da ARN polimerasa. O recoñecemento da rexión promotora permite a unión da ARN-polimerase á febra molde no sentido correcto no que se vai transcribir o xee. O primeiro nucleótido que se transcribe denomínase +1 e sempre leva unha purina como base nitroxenada.

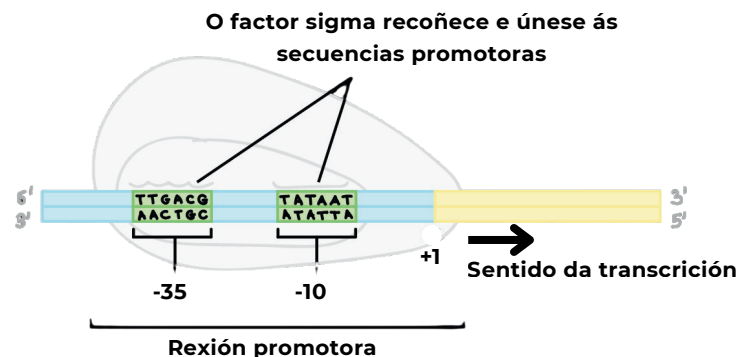


Figura 14. Inicio da transcripción en procariotas. As rexións promotoras están formadas por secuencias consenso que non varían ou varían pouco entre diferentes organismos. A que está situada na posición -35 adoita ter a secuencia TTGACA, mentres que a que está situada na posición -10 posúen a secuencia TATAAT (por iso tamén se denomina caixa TATA)

A ARN-polimerase provoca o desenrolamento da dobre hélice e a separación das dúas febras complementarias no lugar que se vai transcribir. Fórmase así unha burbulla de transcripción que permite a incorporación dos ribonucleótidos que formarán o ARN de nova síntese.

A ARN-polimerase provoca o desenrolamento da dobre hélice e a separación das dúas febras complementarias no lugar que se vai transcribir. Fórmase así unha burbulla de transcripción que permite a incorporación dos ribonucleótidos que formarán o ARN mensaxeiro.

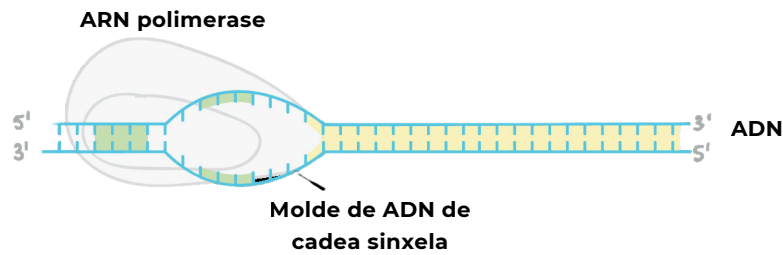


Figura 15. Apertura da burbulla de replicación por parte da ARN polimerase

ELONGACIÓN

Consiste na incorporación e unión de ribonucleótidos en sentido 5' → 3' por parte da ARN-polimerase, que vai lendo a mensaxe da febra molde en dirección 3' → 5'. Esta encima incorpora os nucleótidos dacordo coas normas de emparellamento da complementariedade de bases, catalizando a formación de enlaces fosfodiéster entre eles.

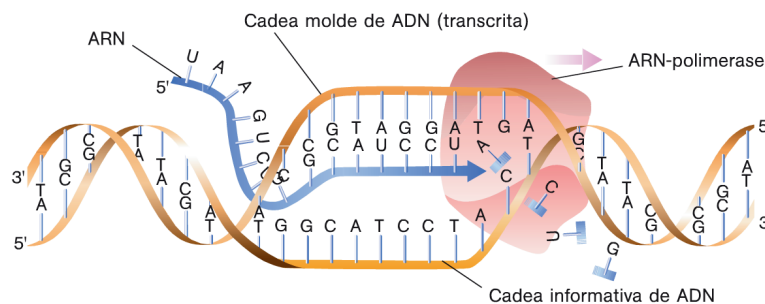


Figura 16. Fase de elongación da molécula de ARN en formación. A enerxía necesaria para a formación dos enlaces fosfodiéster procede da hidrólise dos ribonucleótidos trifosfato para transformarse nos ribonucleótidos monofosfato que se incorporan á cadea de ARN.

TERMINACIÓN OU FINALIZACIÓN

A ARN-polimerase realiza a transcripción ata que atopa uns sinais de terminación que indican o final proceso. Isto implica o peche da burbulla formada no ADN e a separación da ARN-polimerase do ARN transcrito. Nas bacterias existen dúas estratexias para levar a cabo este proceso de terminación, que sucede cando a ARN-polimerase transcribe unha secuencia de ADN chamada terminador.

- Terminación dependiente de *rho*: o ARN contén un sitio de unión para unha proteína chamada factor *rho*. Este factor únese a esa secuencia e comeza a desprazarse cara a ARN-polimerase ata alcanzala. Cando isto ocorre, o factor *rho* provoca a separación do ARN transcrito e do molde de ADN.
- Terminación independente de *rho*: depende de secuencias específicas na febra molde de ADN. Cando a ARN-polimerase chega a esta rexión rica en nucleótidos de G e C, dá lugar a unha rexión rica nestes mesmos nucleótidos no ARN transcrito. As bases de G e C únense entre si formando unha forquita estable por plegamento da cadea de ARN que provoca a detención da ARN-polimerase.

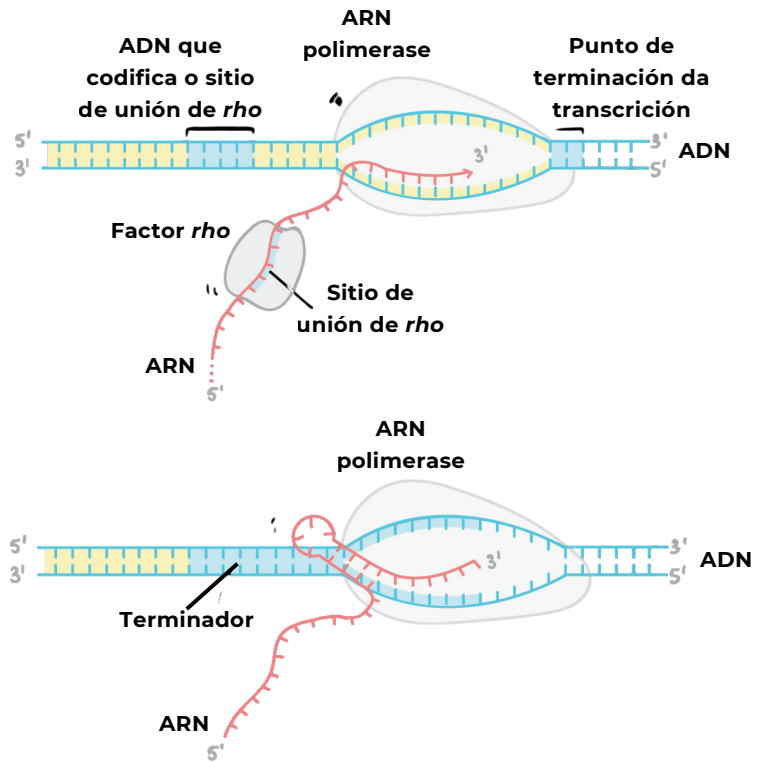


Figura 16. Mecanismos de terminación da transcripción: dependente de *rho* (arriba) ou independente de *rho* (abaixo)

MADURACIÓN DO ARN TRANSCRITO

Nos procariotas, os transcritos de ARNm están listos para a súa tradución inmediata; incluso o proceso de tradución pode comezar cando aínda non se completou a transcripción. Isto é posible porque nas bacterias non hai compartimentos membranosos internos que separen ambos procesos.

Por outra banda, o ARNm das células procariotas contén información para a síntese de varias proteínas diferentes (é policistrónico), de modo que os ribosomas poderán comezar a tradución en diferentes puntos do transcrito correspondentes ó inicio de diferentes xenes con información para diferentes proteínas.



Figura 17. O ARNm das células procariotas non necesita procesamento postranscricional e xa pode traducirse inmediatamente

Pola contra, o ARNr e ARNt fórmanse a partir da maduración dun transcrito primario, que sofre un proceso de corte e empalme para dar lugar aos diferentes ARNt e ARNr.

4.2. TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

A diferenza dos organismos procariotas:

- Nas células eucariotas a transcripción sucede no núcleo.
- Existen tres tipos de ARN-polimerases segundo o tipo de ARN que se vaia a sintetizar:
 - ARN-polimerase I: encárgase da formación dos ARNr.
 - ARN-polimerase II: sintetiza un ARN heteroxéneo nuclear que, tras o seu processamento, dá lugar ó ARNm.
 - ARN-polimerase III: transcribe os precursores dos ARNt e dun ARNr de pequeno tamaño.
- Os xenes que codifican as proteínas están fragmentados, de forma que sempre é necesario un proceso de maduración no que se eliminan as secuencias sen sentido ou intróns e se empalmen as secuencias con sentido ou exóns.

INICIACIÓN

No ADN eucariótico tamén existen centros promotores que son recoñecidos por factores de inicio da transcripción para permitir a unión da ARN-polimerase. O promotor máis frecuente nos xenes eucariotas é a coñecida como caixa TATA, situada uns 25 nucleótidos antes do inicio da transcripción. Esta rexión é recoñecida primeiro por un dos factores de inicio da transcripción, o que desencadena a unión doutros similares e, finalmente, da ARN-polimerase.

ELONGACIÓN

Este proceso ocorre de forma similar que nas células procariotas. A única diferenza é que trala transcripción dos primeiros 30 ribonucleótidos engádese no extremo 5' unha 'carapucha' formado por 7-metilguanossin-trifosfato que, ademais de protexelo da súa degradación, servirá de sinal para o recoñecemento do ribosoma no momento da tradución.

TERMINACIÓN

O sinal de terminación parece estar relacionado coa secuencia TTATTT, transcrita como AAUAAA e que, de forma similar ó que ocorre en procariotas, forma unha forquita no ARN transcrito que fai que este se libere do ADN molde e tamén da ARN-polimerase, finalizando así, o proceso de transcripción. En canto se produce a separación do ARN transcrito, a encima poli-A-polimerase engade ao extremo 3' unha secuencia formada por uns 200 nucleótidos de adenina, chamada cola poli-A (esta cola evita a degradación do ARN e está relacionada coa súa saída ao citoplasma).

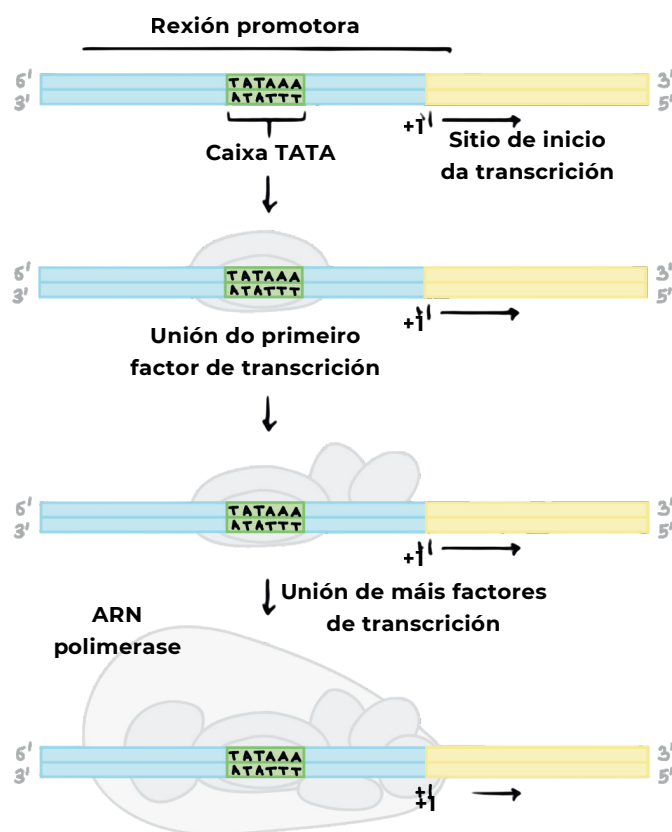


Figura 18. Iniciación da transcripción en células eucariotas

A molécula resultante do proceso de transcripción, que presenta secuencias intrónicas e exónicas alternantes, e posúe unha “carapucha” e unha “cola poli-A”, chámase transcrito primario ou preARNm ou ARN heteroxéneo nuclear (ARNhn).

MADURACIÓN OU PROCESAMENTO POSTRANSCRICIONAL

A maduración do transcrito primario consiste na eliminación dos intróns e a unión dos exóns mediante un mecanismo que se coñece como *splicing*. Este proceso ocorre no núcleo e é levado a cabo por unhas encimas denominadas ribonucleoproteínas pequenas nucleares (RNPpn) e que, en conxunto, forman o espliceosoma. As RNPpn recoñecen as rexións intrónicas, únense a elas e fan que adopten forma de bucle, o que provoca o achegamento dos extremos dos exóns. A continuación, o espliceosoma procede ó corte dos intróns e ó empalme dos exóns grazas a ARN-ligases específicas que tamén forman parte do complexo encimático.

O ARNm xa maduro sae ao citoplasma coa información necesaria para a síntese dunha única proteína, polo que se denomina monocistrónico.

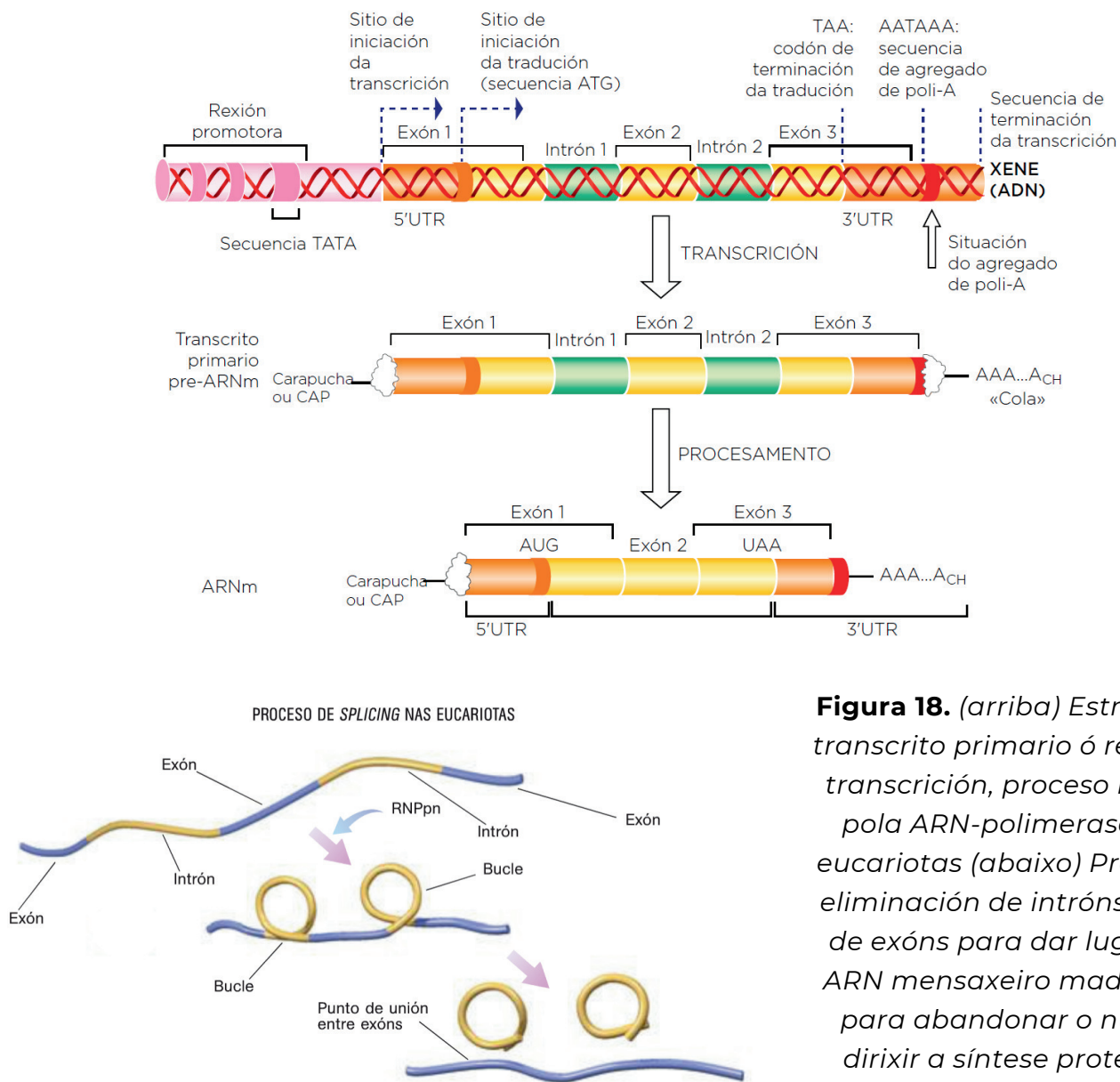


Figura 18. (arriba) Estrutura do transcrito primario ó rematar a transcripción, proceso liderado pola ARN-polimerase II nos eucariotas (abaixo) Proceso de eliminación de intróns e unión de exóns para dar lugar a un ARN mensaxeiro maduro listo para abandonar o núcleo e dirixir a síntese proteica no citoplasma.

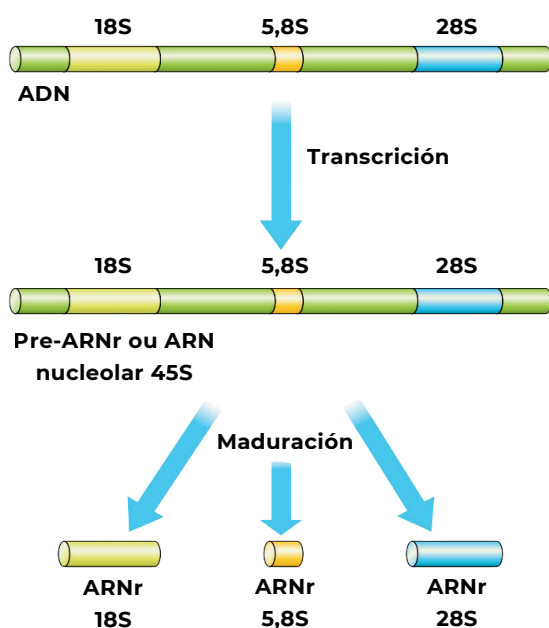


Figura 19. A ARN polimerase I é a responsable da transcripción dos xenes que dan lugar ós ARN ribosómicos. Despois do proceso de transcripción obtense un transcrito primario chamado ARN nucleolar. Tras un proceso de maduración no sofre varios cortes, orixina 3 tipos de ARN ribosómicos: 28S, 18S e 5,8S

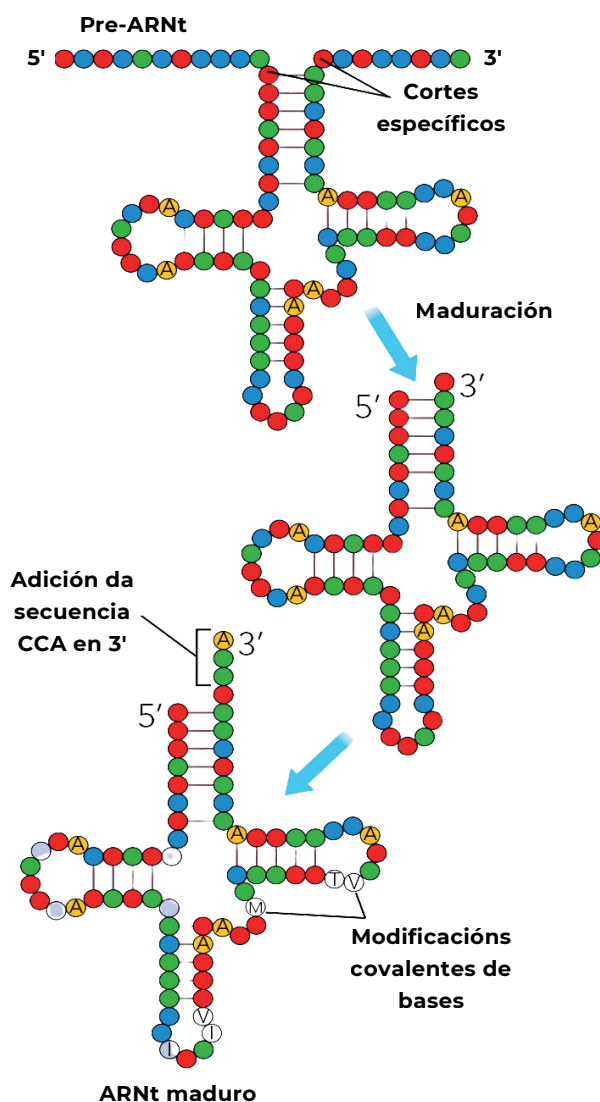


Figura 20. Os pre-ARNt sintetizados pola ARN-polimerase III sofren cortes específicos en diferentes lugares da cadea xunto con outras transformacións, como a modificación covalente dalgunhas bases nitroxenadas (formación de ribotimidina, seudouracilo, etc.) ou a adición da secuencia CCA no extremo 3'

Diferenzas entre a transcrición de procariotas e eucariotas

PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
Ten lugar no citoplasma	Ten lugar no núcleo
Rexións promotoras a -35 (TTGCA) e a -10 (TATAAT)	Rexión promotora a -25 (caixa TATA)
Xenes contínuos (só posúen secuencias codificadoras de proteínas)	A maioría dos xenes son descontínuos (teñen intróns non codificantes e exóns codificantes)
Un só tipo de ARN-polimerase	3 tipos de ARN-polimerases: ARN-polimerase I sintetiza ARNr ARN-polimerase II sintetiza ARNh _n --> ARNm ARN-polimerase III sintetiza ARNt e ARNr de pequeno tamaño
Terminación dependente de rho ou independente de rho a través de secuencias ricas en C e G	Terminación a través da secuencia TTATTT, que se transcribe como AAUAAA
ARNm non sofre modificacións postranscripcionais (só o ARNr e os ARNt se procesan despois da transcrición)	ARNm son produto de modificacións postranscripcionais nas que se eliminan intróns e se unen exóns. Tamén os ARNr e os ARNt son procesados despois da transcrición
ARNm policistrónico	ARNm monocistrónico

4.3. A TRANSCRICIÓN INVERSA

A transcrición inversa ou retrotranscrición é o proceso polo que a partir de ARN se sintetiza ADN, utilizando a molécula de ARN como molde.

Este proceso dáse nos retrovirus (virus ARN), como o VIH, cuxa información xenética está contida no ARN. O ADN constitúe un intermediario no proceso da replicación do virus. Para iso, teñen un encima que se denomina retrotranscritase ou transcritase inversa, capaz de sintetizar ADN usando como molde unha cadea de ARN.

A transcrición inversa non ten lugar nin nas células procariotas nin nas eucariotas, e constitúe unha excepción no dogma central da bioloxía molecular proposto por Crick.

5.3. MECANISMO DA TRADUCIÓN

A tradución realízase nos ribosomas, orgánulos citoplasmáticos que poden atoparse libres no citosol ou ancorados ao RER. Están formados por dúas subunidades, unha pequena e outra grande, formadas por ARNr e proteínas.

Excepto con pequenas diferenzas, a síntese proteica transcorre de igual forma en procariotas que en eucariotas, e nela distínguense varias etapas:

- Activación dos aminoácidos.
- Tradución.
- Iniciación da síntese.
- Elongación da cadea polipeptídica.
- Terminación da síntese.
- Pregamento da proteína.

ACTIVACIÓN DOS AMINOÁCIDOS

Cada ARNt únese a un aminoácido específico segundo o triplete do seu anticodón coa intervención dunha encima chamada aminoacil-ARNt-sintetase, dando lugar a un complexo denominado aminoacil-ARNt. A reacción require enerxía, que é achegada pola molécula de ATP.

A unión do aminoácido ao seu ARNt específico prodúcese a través do grupo carboxilo do aminoácido e o grupo –OH do extremo 3' do ARNt

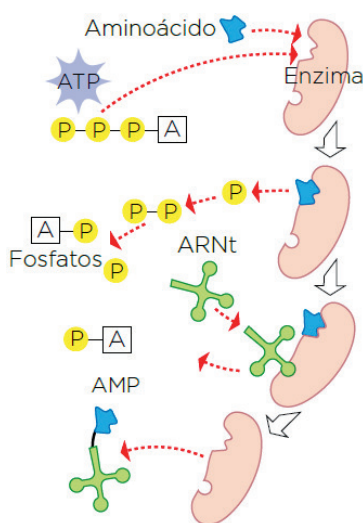


Figura 21. *Reacción de formación dun aminoacil-ARNt calquera. Existen 20 diferentes na célula, cada un formado por ARNt e un dos 20 aminoácidos que forman as proteínas. A formación de cada un deles está catalizada por una aminoacil-ARNt-sintetase específica*

TRADUCIÓN

• Iniciación

A síntese proteica iníciase cando a subunidade menor do ribosoma e o ARNm se unen nun punto localizado preto do codón iniciador AUG, que marca o inicio da biosíntese. A continuación entra no ribosoma o aminoacil-ARNt complementario ao codón de iniciación. Este primeiro ARNt leva unido o aminoácido N-formilmetionina (f-Met) nas bacterias, ou metionina (Met) en eucariotas.

A subunidade menor do ribosoma, o ARNm e o primeiro aminoacil-ARNt forman o complexo de iniciación da tradución. Ao final desta etapa, a subunidade maior do ribosoma únese ao complexo de iniciación para formar un ribosoma completo dotado de tres sitios

de fixación: o sitio P (peptidil), que queda ocupado polo ARNt-Met; o sitio A (aminoacil), onde se situará o seguinte aminoacil-ARNt; e o sitio E ou sitio de saída, no que se sitúa o ARNt sen aminoácido que está a piques de saír do ribosoma. Este proceso require enerxía en forma de GTP e proteínas citosólicas específicas denominadas factores de iniciación.

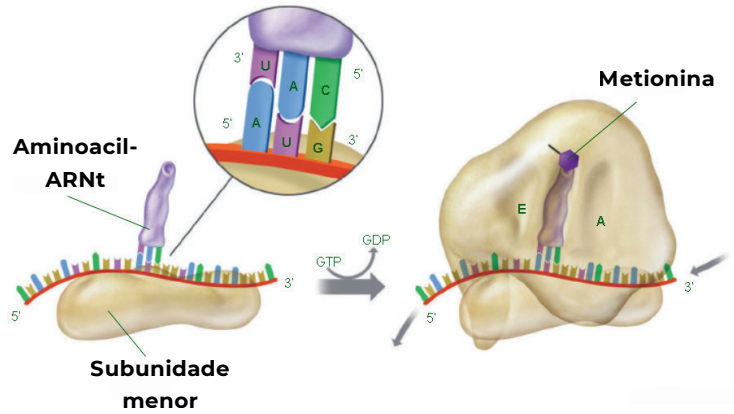


Figura 22. Complexo de iniciación da tradución

- Elongación

A elongación consiste no alongamento da cadea polipeptídica mediante a adición de aminoácidos ó extremo carboxilo da cadea.

Iníciase cando un segundo aminoacil-ARNt, cuxo anticodón é complementario ao codón situado a continuación do iniciador, chega ao ribosoma e ocupa o sitio A que se acha libre. O seguinte paso é a formación dun enlace peptídico entre o aminoácido que ocupa o sitio P (metionina) e o novo aminoácido que ocupa o sitio A. A metionina, que está unida polo seu grupo carboxilo ó ARNt, rompe este enlace e únese, mediante un enlace peptídico, ó grupo amino do aminoácido recién chegado. Esta unión está catalizada pola encima peptidil-transferase. O resultado é a formación dun dipéptido aloxado no sitio A. O centro P queda, pois, ocupado por un ARNt sen aminoácido.

A continuación prodúcese a translocación ribosomal que implica o desprazamento do ribosoma 3 nucleótidos ao longo do ARNm en sentido 5' → 3'. O primeiro ARNt abandona o ribosoma polo sitio E e o dipeptidil ARNt queda agora no centro P, quedando o sitio A libre. Nestas condicións, outro aminoacil-ARNt pódese incorporar ao sitio A, de maneira que o proceso de alongamento da cadea proteica pode continuar, repetíndose o ciclo.

Todo este proceso necesita enerxía, que proporciona o GTP, e a intervención de proteínas específicas denominadas factores de elongación.

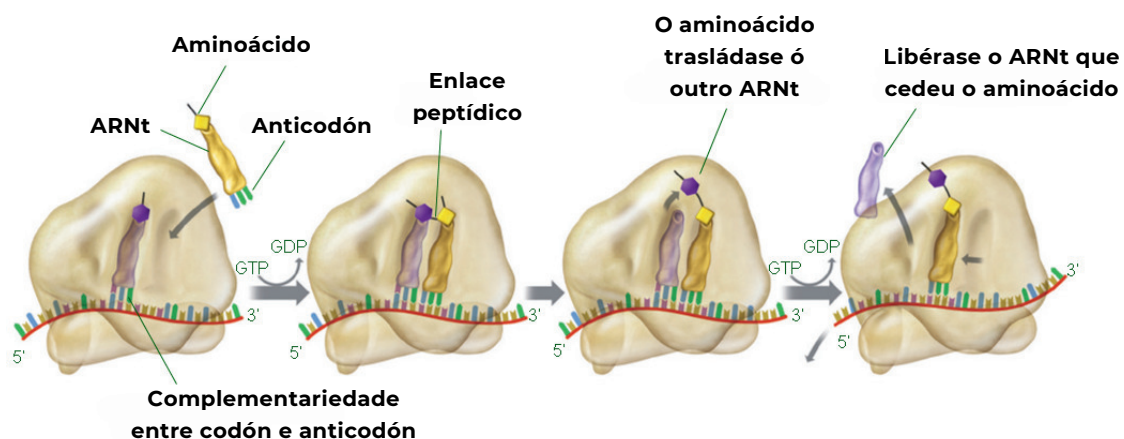


Figura 23. Elongación da cadea polipeptídica en formación. A ricina é unha proteína do grupo das lectinas que se extrae das sementes do ricino. É un dos venenos máis potentes xa que rompe os enlaces N-glicosídicos das bases de adenina do ARNr 28S da subunidade grande dos ribosomas eucariotas, inhibindo así a actividade da peptidil-transferase

- Terminación

O final da síntese ten lugar cando o ribosoma chega a un lugar do ARNm onde se atopa un codón de terminación (UAA, UAG, UGA) que non é recoñecido por ningún ARNt pero si por uns factores de liberación (RF) de natureza proteica que se sitúan no sitio A e fan que a peptidil-transferase separe, por hidrólise, a cadea polipeptídica do ARNt. Estes factores necesitan consumir GTP para actuar.

Unha vez completada a tradución, a proteína formada, o ARNm e o ARNt abandonan o ribosoma, que se disocia nas súas dúas subunidades ata o momento en que se inicie unha nova síntese.

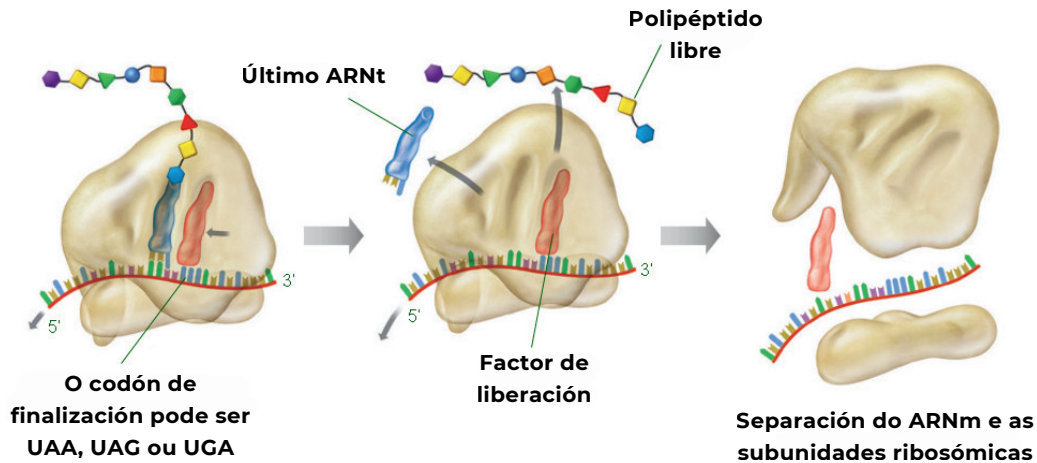


Figura 24. Finalización da síntese da cadea polipeptídica

Un mesmo ARNm, se é o suficientemente longo, pode ser traducido por varios ribosomas á vez, un detrás doutro, formando un polirribosoma ou polisoma, que é observable con axuda do microscopio electrónico.

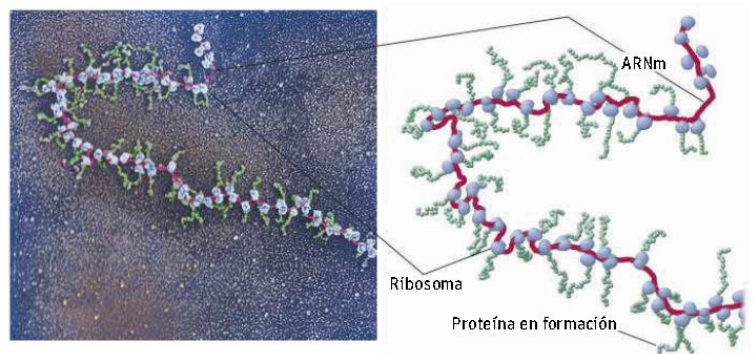


Figura 25. Estrutura dun polisoma. Á esquerda imaxe obtida cun microscopio electrónico de varrido.

MADURACIÓN POSTRADUCIONAL DO POLIPÉPTIDO

A maior parte dos polipéptidos recién sintetizado non son funcionais polo que deben experimentar diferentes modificacións para transformarse en proteínas funcionamente activas. Entre estas modificacións atópanse as seguintes:

- Formación de interaccións intra e intercatenarias que permiten o pregamento tridimensional da proteína ata acadar a súa estrutura nativa.
- Adición de grupos postéticos.
- Modificación covalente dalgúns aminoácidos mediante fosforilacións, acetilacións, metilacións, etc.
- Cortes proteolíticos que acurtan o péptido: separación da secuencia sinal, perda da metionina inicial, eliminación dun péptido intermedio, etc.

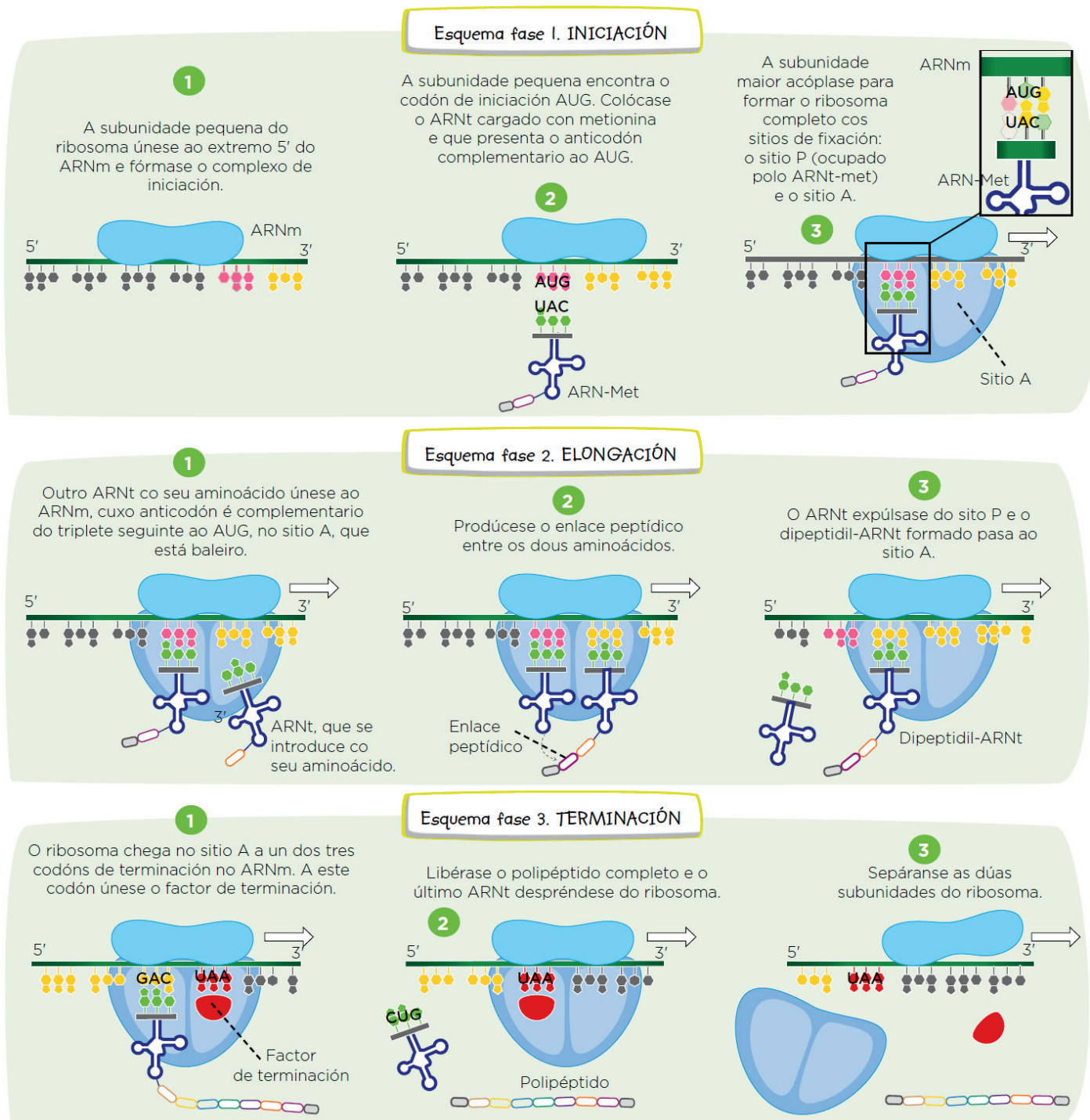


Figura 26. Esquema-resumo do proceso completo da tradución. Este proceso é diana de moitos antibióticos xa que o seu bloqueo é clave para a supervivencia das células. Así por exemplo, a estreptomicina é un trisacárido que se une á subunidade 30S do ribosoma das procariotas e interfere no inicio da síntese proteica. A eritromicina bloquea a traslocación do ribosoma procariota e inhibe a elongación da cadea polipeptídica. A tetraciclina únese á subunidade 30S do ribosoma e bloquea o sitio A, o que impide a entrada do aminoacil-ARNt. O cloranfenicol únese á subunidade 50S dos ribosomas procariotas e mitocondriais e bloquea a actividade do complexo peptidil-transferase. A cicloheximida ten o mesmo mecanismo de acción pero nos ribosomas eucariotas. A puromicina ten unha forma similar a un aminoacil-ARNt, o que lle permite colocarse no sitio A dos ribosomas provocando a interrupción prematura da síntese proteica.

6. REGULACIÓN DA EXPRESIÓN XÉNICA

Un dos principios básicos de funcionamento do metabolismo celular é o da economía. Así, unha célula non sintetiza todas as proteínas que pode, senón as que necesita nun momento determinado. A regulación da expresión xénica pode levarse a cabo en diferentes momentos, pero o frecuente é que ocorra durante a transcripción.

6.1. REGULACIÓN DA EXPRESIÓN XÉNICA NAS PROCARIOTAS

Unha célula procariota debe adaptarse en todo momento ás condicións do medio ambiente, é dicir, dispoñibilidade de nutrientes, luz, temperatura, etc. Un dos modelos de regulación da expresión xénica mellor coñecidos en procariotas é o modelo do operón, descrito no ano 1961 por Jacob e Monod en *E. coli*.

Un operón é un grupo de xenes estruturais cuxa expresión está regulada por distintos elementos de control e por xenes reguladores. Componse dos seguintes elementos:

- Xenes estruturais. Codifican a síntese das proteínas encimáticas que participan nun determinado proceso bioquímico.
- Xene regulador. Pode estar situado en calquera lugar do cromosoma bacteriano, e codifica a proteína que actúa como represor.
- Promotor. É unha secuencia de nucleótidos do ADN, á que se une a ARN-polimerase para a iniciar a transcripción dun xene ou un conxunto de xenes.
- Operador. É unha secuencia de ARN recoñecida polo represor; cando isto ocorre impídese o avance da ARN-polimerase, co que a transcripción se interrompe e se produce unha represión xénica (os xenes non se expresan). Cando o represor se separa, a transcripción xa é posible.
- Indutor. Substrato ou composto cuxa presenza induce á expresión dos xenes.

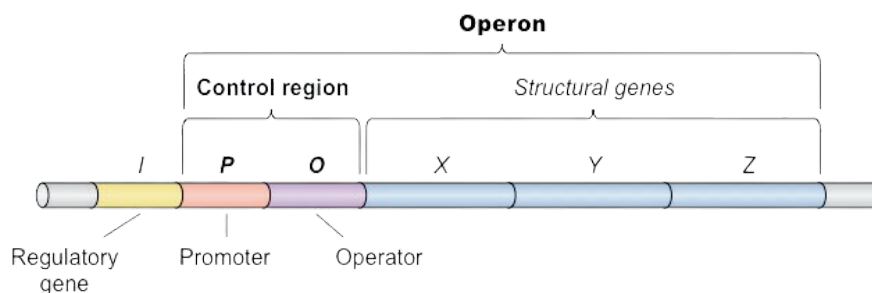


Figura 27. Estrutura xeral dun operón procariota

Os operóns poden ser inducibles ou reprimibles. No primeiro caso, o operón está normalmente 'apagado', pero poden activarse en presenza dunha pequena molécula chamada inductor. O operón lactosa ou operón lac, é un exemplo de operón inducible xa que se activa so cando hai lactosa no medio. Un operón reprimible, pola contra, atópase normalmente 'encendido', pero a presenza dun correpresor fai que se inactive. O operón triptófano ou operón trp é un operón reprimible que se expresa continuamente pero pode inactivarse cando hai altos niveis do aminoácido triptófano.

OPERÓN LACTOSA (OPERÓN LAC).

A bacteria *Escherichia coli* utiliza 3 encimas para metabolizar a lactosa, cuxa síntese depende de tres xenes que se agrupan no operón lac:

- Xene lacZ: codifica a β -galactosidase, que hidroliza a lactosa en glicosa e galactosa.
- Xene lacY: codifica unha permease, a proteína que facilita o transporte de lactosa cara a célula.
- Xene lacA: codifica a encima transacetilase, cuxa función no metabolismo da lactosa non está clara.

Cando non hai lactosa no medio, unha proteína chamada represor lac (sintetizada a partires do xene regulador do operón) atópase unida ó operador, o que bloquea o avance da ARN-polimerase e impide a transcrición. Cando a lactosa está presente, fórmase un derivado da mesma, a alolactosa, que se une ó represor, impedindo que se acople ó ADN. Desta forma, a ARN-polimerase pode avanzar e transcribir os xenes estruturais que formarán a tres encimas implicada no metabolismo de degradación da lactosa. A alolactosa actúa como indutor, activando a expresión das encimas implicadas no metabolismo da lactosa.

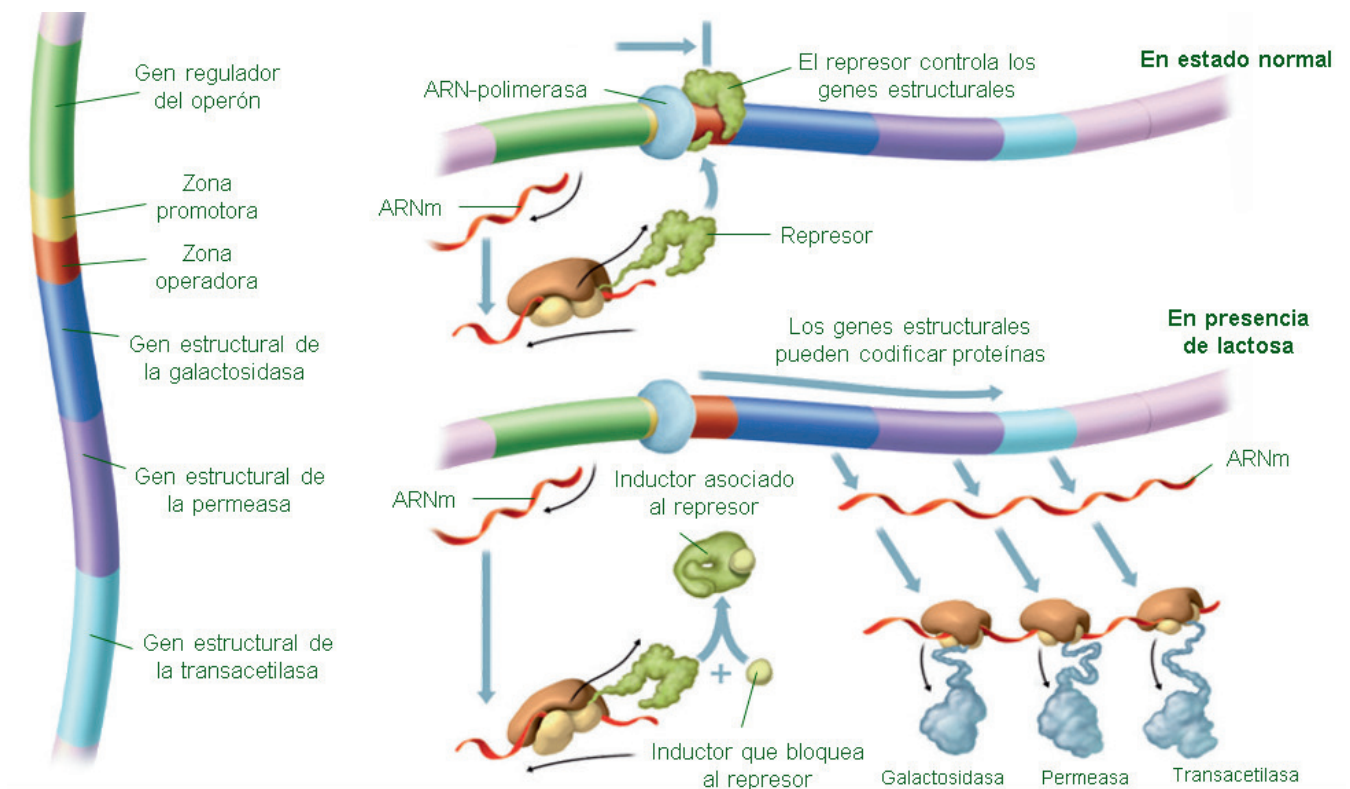


Figura 28. Estrutura e funcionamento do Operón Lac. Este sistema emprégase de forma habitual nos laboratorios de bioloxía molecular para detectar a presenza ou ausencia dun determinado xene introducido de forma artificial nalgún plásmido bacteriano.

6.2. REGULACIÓN DA EXPRESIÓN XÉNICA NAS EUCARIOTAS

A regulación xénica é a forma na que unha célula controla que xenes, de todos os que forman o seu xenoma, se expresan e cales están reprimidos. Gracias a este mecanismo, cada tipo celular dun organismo pluricelular como é o ser humano, ten un conxunto diferente de xenes activos, a pesares de que case todas as células do corpo conteñen exactamente o mesmo ADN. Estes diferentes patróns de expresión xénica causan que os diversos tipos celulares teñan diferentes conxuntos de proteínas, o que fai que cada tipo de célula estea exclusivamente especializada para facer o seu traballo.

A expresión xénica en eucariotas implica moitos pasos e case todos poden regularse:

- Accesibilidade da cromatina. A cromatina cun empaquetamento máis compacto impide o acceso da maquinaria de transcrición ós xenes; en cambio, unha cromatina cun empaquetamento máis laxo fai que un xen se atope máis disponible para a transcrición. Por outra banda, observouse que algúns encimas engaden grupos acetilos ás histonas (acetilación de histonas), de forma que os nucleosomas non poden unirse entre si, a cromatina descondénsase e favorécese a transcrición.
- Transcrición. A presenza de factores de transcrición é esencial para promover ou reprimir a formación de ARN. Algunhas modificacións como a metilación do ADN (unión covalente dun grupo metilo a unha citosina) impiden a unión de factores de transcrición ó ADN, o cal provoca a inhibición da expresión xénica dos xenes que as conteñen. Estes procesos coñécense como mecanismos epixenéticos e poden ser herdados pola descendencia celular da célula que os contén.
- Procesamento do ARN. O proceso de splicing, a adición da caperuza CAP no extremo 5', ou a adición da cola poli-A no extremo 3', son procesos que poden regularse. Tamén a saída do núcleo cara os ribosomas é un proceso regulado.
- Estabilidade do ARN. A duración dunha molécula de ARNm no citosol afecta ó número de proteínas que poden sintetizarse a partires del. Existen pequenos ARN reguladores, chamados miARN, que poden unirse a ARNm obxectivos e facer que se degraden.
- Tradución. Este paso de síntese proteica pode verse acelerado ou inhibido ante a presenza de reguladores. Por exemplo, hai miARN que bloquean a tradución dos seus ARNm diana.
- Actividade da proteína. As modificacións postraducionais que sofren as proteínas para resultar en moléculas funcionais tamén son procesos regulados que poden afectar á súa actividade ou comportamento.