

BIOLOGIA MOLECULAR

TERCER CURS

GRAU DE BIOTECNOLOGIA

Professorat

Marcel·lí del Olmo Muñoz

Horari d'atenció a l'estudiantat:

Divendres 11.00-13.00

En les classes pràctiques: Josefa Castillo,
Paola Corbín i Daniel Roldán

PROGRAMA DE CLASSES TEÒRIQUES

- I. La transcripció: mecanisme i regulació**
- II. Traducció de la informació genètica i processos postraduccionals**
- III. Perpetuació i dinàmica de la informació genètica**

PROGRAMA DE CLASSES TEÒRIQUES

I. La transcripció: mecanisme i regulació

TEMA 1. INTRODUCCIÓ A LA BIOLOGIA MOLECULAR

TEMA 2. INTRODUCCIÓ A LA TRANSCRIPCIÓ

TEMA 3. LA TRANSCRIPCIÓ EN PROCARIOTES

TEMA 4. REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ EN PROCARIOTES

TEMA 5. LA TRANSCRIPCIÓ EN EUCARIOTES

TEMA 6. REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ EN EUCARIOTES

TEMA 7. MODIFICACIÓ POSTRANSCRIPCIONAL DE L'RNA

PROGRAMA DE CLASSES TEÒRIQUES

II. Traducció de la informació genètica. Processos postraduccionals de les proteïnes

TEMA 8. INTRODUCCIÓ

TEMA 9. EL PROCÉS DE LA TRADUCCIÓ

TEMA 10. REGULACIÓ DE LA TRADUCCIÓ

TEMA 11. PLEGAMENT DE LES PROTEÏNES I MODIFICACIONS
QUÍMIQUES DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES

TEMA 12. DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES

PROGRAMA DE CLASSES TEÒRIQUES

III. Perpetuació i dinàmica de la informació genètica

TEMA 13. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LA REPLICACIÓ

TEMA 14. DNA POLIMERASES

TEMA 15. REPLICACIÓ SEMIDISCONTÍNUA: ELEMENTS

PARTICIPANTS

TEMA 16. EL COMPLEX DE REPLICACIÓ

TEMA 17. CARACTERÍSTIQUES ESPECÍFIQUES DE LA REPLICACIÓ EN
EUCARIOTES

QÜESTIONS A RESOLDRE EN CLASSE

- Hi ha una col·lecció de qüestions proposades per a resoldre en classe.
- El professor avisarà prèviament quin dia es comentaran algunes de les qüestions per tal que l'estudiantat pugui preparar-les i participar activament durant la classe.

PROGRAMA DE CLASSES PRÀCTIQUES

- Pràctica 1. Regulació de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa en *Escherichia coli*
- Pràctica 2. Comprovació de la presència d'un intró en el gen *ACT1* del llevat *Saccharomyces cerevisiae*
- Pràctica 3. Demostració de la unió del factor de transcripció Yap8 de llevat a la seua seqüència de reconeixement en el DNA
- Pràctica 4. Regulació de l'expressió dels gens *GAL* en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*

BIBLIOGRAFIA: TEXTOS PRINCIPALS

- CLARK, D.P. PAZDERNIK, N.J., MCGEHEE M.R. (2019). *Molecular Biology*. Academic Press.
- KREBS, J.E., GOLDSTEIN, E.S., KILPATRICK, S.T. (2017). "Lewin's *Genes XII*". Jones and Bartlett Publishers.
- KREBS, J.E., GOLDSTEIN, E.S., KILPATRICK, S.T. (2020). "Lewin's *Essential Genes*". 4a edició. Jones and Bartlett Learning.
- LUQUE, J., HERRAEZ, A. (2001) "Texto ilustrado de *Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud*". Ediciones Harcourt S.A.
- TORDERA, V., DEL OLMO, M., MATALLANA, E., PÉREZ ORTÍN, J.E. (2007). "Qüestions en *Biologia Molecular*". Col·lecció *Educació Laboratori de Materials*. Universitat de València
- WATSON, J.D. i altres (2013): "Molecular Biology of the *Gene*", 7a edició. Pearson International Education.

BIBLIOGRAFIA: TEXTOS COMPLEMENTARIS

Títol	Autors	Editorial	ISBN	Edició	Any	Exemplars
Molecular Biology: principles of Genome Function	Nancy Craig, Rachel Green, Carol Greider, Gisela Storz, Cynthia Wolberger	Oxford University Press	9780192522795, 0192522795	3	2021	EBOOK
An introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications	Michael Wink (Editor)	Wiley	978-3-527-81288-2	3	2020	EBOOK
Molecular Biology	David Clark, Nanette Pazdernik, Michelle McGehee	Academic Cell	9780128132890	3	2018	EBOOK

- **TEXTOS GENERALS DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**
- **TEXTOS GENERALS DE BIOLOGIA CEL·LULAR**

CRITERIS D'AVALUACIÓ

- Contingut teòric: 7,5 punts
- Contingut pràctic: 1,5 punts
- Realització d'activitats: 1 punt (+ 1 punt extra)
- Es realitzarà un **examen parcial sobre els apartats de transcripció**. Tindrà caràcter eliminatori si la nota és igual o superior a 5.
- Per a aprovar l'assignatura és imprescindible la realització de les pràctiques així com obtenir una puntuació mínima de 5 sobre 10 en la qualificació final, **aprovar els exàmens de teoria** i aconseguir en cadascun dels blocs de l'assignatura (incloses les pràctiques) almenys el 25% de la nota total corresponent.
- En cas de suspendre l'assignatura en la primera convocatòria i tenir les pràctiques aprovades, es guardarà la nota d'aquestes per a la segona convocatòria.
- En cas d'aprovar l'assignatura no es permet renunciar a la nota obtinguda per a intentar millorar-la en una altra convocatòria (norma aprovada en *Consell de Govern* el 2018).

QÜESTIONS A RESOLDRE EN GRUP

- Tindran una valoració de 0,5 punts en la qualificació final més 0,25 punts extra.
- L'estudiantat s'ha d'organitzar en grups de 4 per a resoldre-les. S'ha de comunicar al professor la composició dels grups durant la primera setmana del curs. El professor confeccionarà els grups amb els i les estudiants que no hagen comunicat aquesta informació.
- El professor assignarà a cada grup una qüestió i comunicarà la data límit en la qual s'haurà d'enviar la qüestió resolta per correu electrònic en format Word (no pdf).
- La resolució de la qüestió haurà d'incloure almenys dues referències bibliogràfiques utilitzades per a la seua resolució o relacionades amb el tema i escrites segons les normes indicades en el document corresponent disponible en aula virtual.
- El professor revisarà la solució proposada i podrà plantejar als grups correccions d'aquesta. Quan la pregunta estiga resolta adequadament, la penjarà en aula virtual per tal que tot l'estudiantat pugui contrastar amb la solució que haguera pensat.

ACTIVITAT DE CERCA BIBLIOGRÀFICA

- Valdrà 0,5 punts en la nota final de l'assignatura més 0,25 punts extra.
- Es tracta de comentar i valorar la rellevància d'algun descobriment recent de l'àrea de la biologia molecular publicat en revistes científiques.
- El comentari ha de tenir una extensió aproximada de 20-30 línies amb tipus de lletra *Times New Roman* 11-12 o similar.
- S'haurà de penjar en "tasques" d'"aula virtual" fins el 15 de desembre del 2023.

El professor introduirà amb certa freqüència *links* a alguns descobriments que tinguin lloc en l'àmbit de la biologia molecular. Evidentment no podrien servir per a aquesta activitat.

ACTIVITAT DE CERCA BIBLIOGRÀFICA: EXEMPLE

nature communications

[Explore content](#) ▾ [About the journal](#) ▾ [Publish with us](#) ▾

[nature](#) > [nature communications](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open Access](#) | [Published: 23 August 2022](#)

Rhythmic transcription of *Bmal1* stabilizes the circadian timekeeping system in mammals

[Yasuko O. Abe](#), [Hikari Yoshitane](#) , [Dae Wook Kim](#), [Satoshi Kawakami](#), [Michinori Koebis](#), [Kazuki Nakao](#), [Atsu Aiba](#), [Jae Kyoung Kim](#)  & [Yoshitaka Fukada](#) 

[Nature Communications](#) **13**, Article number: 4652 (2022) | [Cite this article](#)

[Metrics](#)

ACTIVITAT DE CERCA BIBLIOGRÀFICA: EXEMPLE

Abstract

In mammals, the circadian clock consists of transcriptional and translational feedback loops through DNA *cis*-elements such as E-box and RRE. The E-box-mediated core feedback loop is interlocked with the RRE-mediated feedback loop, but biological significance of the RRE-mediated loop has been elusive. In this study, we established mutant cells and mice deficient for rhythmic transcription of *Bmal1* gene by deleting its upstream RRE elements and hence disrupted the RRE-mediated feedback loop. We observed apparently normal circadian rhythms in the mutant cells and mice, but a combination of mathematical modeling and experiments revealed that the circadian period and amplitude of the mutants were more susceptible to disturbance of CRY1 protein rhythm. Our findings demonstrate that the RRE-mediated feedback regulation of *Bmal1* underpins the E-box-mediated rhythm in cooperation with CRY1-dependent posttranslational regulation of BMAL1 protein, thereby conferring the perturbation-resistant oscillation and chronologically-organized output of the circadian clock.

ACTIVITAT EXTRA: MOTS ENCREUATS

- **Consisteix en l'elaboració d'uns mots encreuats en grups d'estudiants.**
- **Podrà suposar fins a 0,5 punts extra en la qualificació de l'assignatura.**
- **Es podrà penjar en aula virtual fins el 6 de gener del 2024.**
- **Es valorarà el nombre de paraules i la precisió de les definicions.**
- **Ha d'incloure termes de tots els apartats del programa de teoria en proporcions similars.**

DATES D'EXÀMENS

- **Examen parcial: 4 de desembre del 2023 de 9.00 a 11.00 h**
- **Primera convocatòria: 12 de gener del 2024 a la vesprada**
- **Segona convocatòria: 17 de juny del 2024 al matí**

Introducció. El dogma central de la biologia molecular.

**Aspectes històrics i prediccions del dogma. Anomalies i
excepcions al dogma**

Concepte i objecte de la biologia molecular

La biología molecular es una ciencia joven que surge del desenvolvament de la bioquímica, la genética, la microbiología, la biología celular i la química.

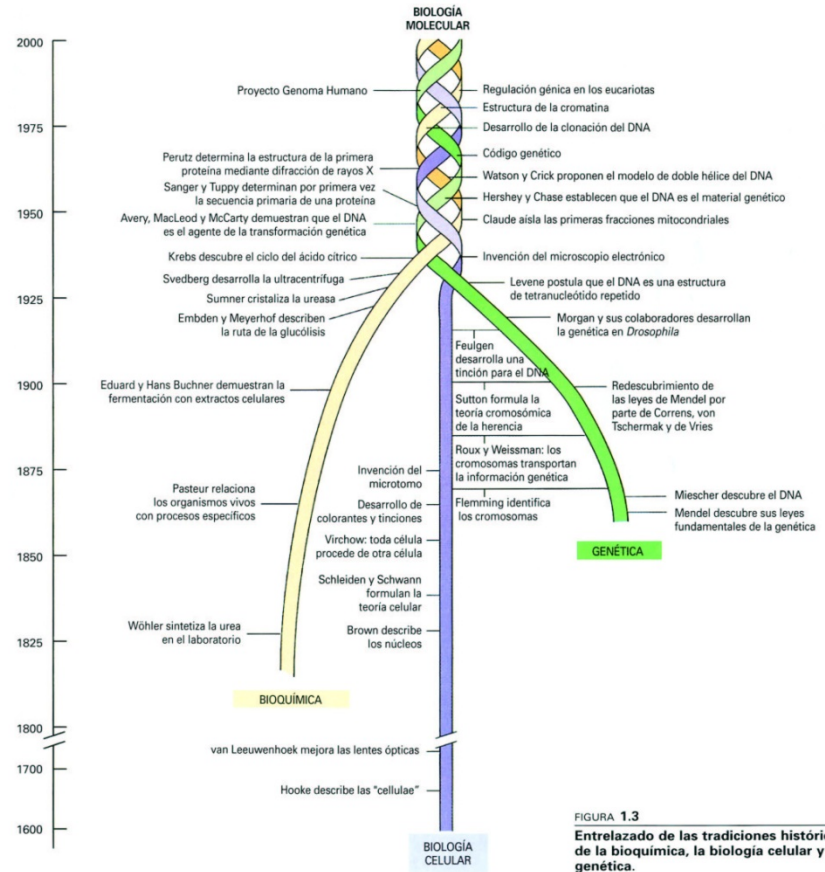


FIGURA 1.3 Entrelazado de las tradiciones históricas de la bioquímica, la biología celular y la genética.

Antecedents

- **Descobriments dels àcids nucleics (Miescher, 1869)**
- **Demostració del seu paper com a material genètic (Griffith, 1928; Avery, MacLeod i McCarty, 1944; Hersey i Chase, 1951)**
- **Descobriments de l'estructura secundària del DNA (Watson i Crick, 1953)**
- **Primer ús del terme "biologia molecular": Warren Weaver, 1938**

Etapes històriques

- **Etapa romàntica: 1935-1953**

Reflexions sobre el nou paper de la genètica

- **Etapa dogmàtica: 1953-1963**

Establiment del dogma central de la biologia molecular

- **Etapa acadèmica: des del 1963**

Desenvolupament de diversos camps d'estudi

Aparició de revistes científiques

Contribucions al desenvolupament inicial de la biologia molecular

- Escola estructuralista
- Escola informacionista
- Diverses aportacions d'estudis sobre fags, biosíntesi de proteïnes, regulació gènica i detecció d'RNAs mitjançant tècniques bioquímiques (p. ex., Chargaff)

Escola informacionista

- **Iniciadors: Max Delbrück i Salvador Luria**
- **Institut de Tecnologia de Califòrnia**
- **Grup del fag: grau important de comunicació interna**
- **Punt de partida de nus posteriors en: Institut Pasteur (Lwoff, Wollman, Jacob), Universitat de Ginebra (Kellenberger, Weigle), Universitat d'Indiana (Luria, Delbucco, Watson)**
- **Mètodes i enfocaments bacteriològics i genètics**
- **"La biologia molecular té com a objecte determinar la naturalesa i el mecanisme de transmissió de la informació genètica"**



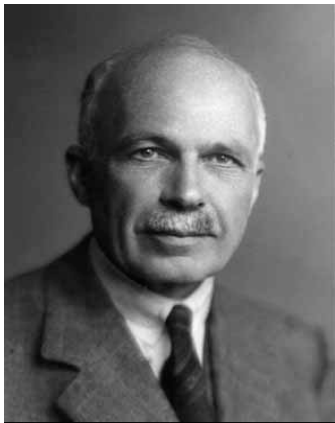
Delbrück



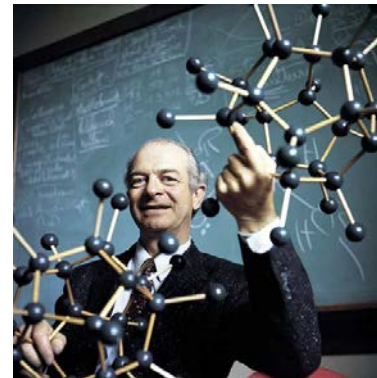
Luria

Escola estructuralista

- Iniciador: Bragg junt amb Atsbury, Bernal, Kendrew, Perutz
 - Cambridge
- Químics i quimicofísics interessats en l'estudi de l'estructura de les molècules biològiques
 - Anàlisis cristal·logràfiques
- “La biologia molecular s'ocupa particularment de la forma de les molècules biològiques, així com de l'evolució (...) i de la diversificació d'aquestes formes quan es passa a nivells d'organització superiors. És sobretot tridimensional i estructural”



Lawrence Bragg



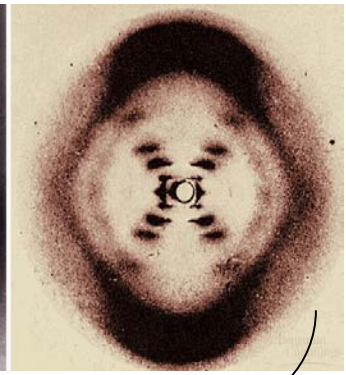
Linus Pauling

Descobriments de l'estructura secundària del DNA

Francis Crick
Maurice Wilkins



Rosalind Franklin

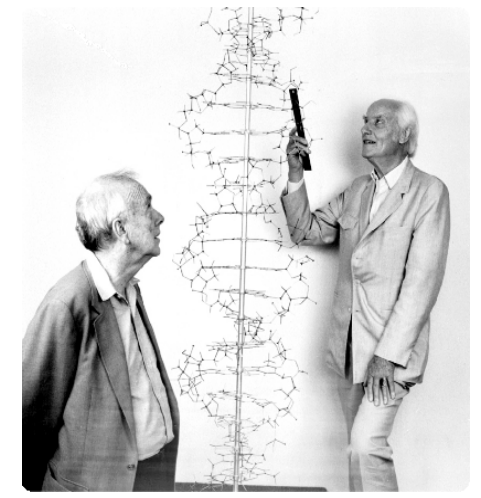
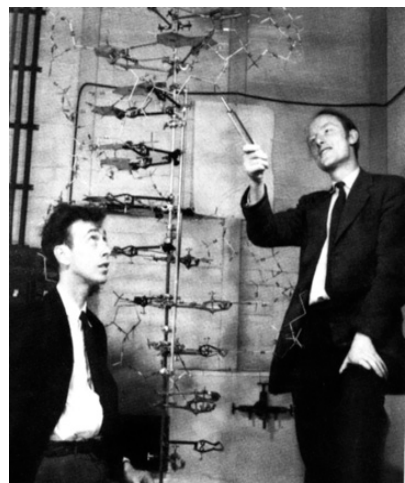
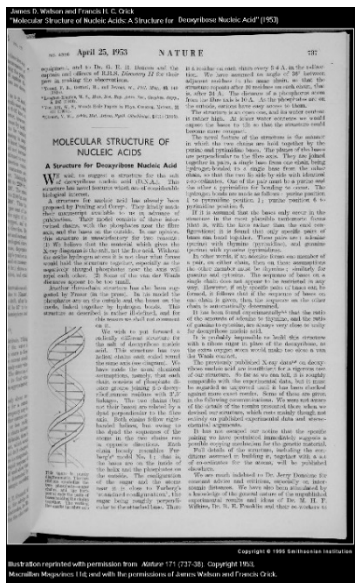


James Watson

Regles de Chargaff

Escola estructuralista

Escola informacionista



Watson i Crick 1953, 1993

Desenvolupament posterior de la biologia molecular

- **Enzims de restricció (Bertani, Weigle i Arber, anys 70)**
- **Reacció en cadena de la polimerasa (Mullis, anys 80)**
- **Seqüenciació de genomes complets d'organismes (final dels 90)**
- **Desenvolupament de la transcriptòmica, la proteòmica, la metabolòmica i la NGS ("Next Generation Sequencing") (dècada dels 2000)**

Una bona definició de la biologia molecular

Olby (1982)

“La biologia molecular és un estudi interdisciplinari que fa servir la bioquímica, la genètica i la química estructural en la cerca de les bases moleculars de la forma, la funció i l'origen evolutiu dels éssers vius”

Altres definicions de biologia molecular

- “Els biòlegs moleculars no són en absolut unànimes sobre la naturalesa del seu tema d'estudi” (Kendrew)
- “La biologia molecular és la pràctica de la bioquímica sense llicència” (Chargaff)
- “Em vaig veure forçat a presentar-me com a biòleg molecular perquè estava cansat d'explicar que era un cristal·lògraf, un bioquímic, un biofísic i un genetista alhora” (Watson)
- “La biologia molecular pot definir-se como allò que interessa als biòlegs moleculars” (Crick)

Conceptes actuals de la biologia molecular

- ▶ En sentit estricte s'ocuparia de l'anàlisi de l'expressió i la transmissió a futures generacions de la informació genètica
- ▶ Considerada en sentit ample tractaria aspectes relacionats també amb la biologia cel·lular: estructures d'agregats de macromolècules i processos fisiològics com ara les funcions nerviosa i muscular, el sistema immunitari, l'acció hormonal, les bases genètiques del càncer, l'origen de la vida...

Relació de la biologia molecular amb altres ciències

- **Cristal·lografia**
- **Química orgànica**
- **Química física**
- **Microbiologia**
- **Genètica**
- **Agricultura**
- **Biologia ambiental**
- **Biologia cel·lular**
- **Biotecnologia**

Descobriments i optimització dels processos biològics i bioquímics necessaris per a explotar la font de material natural

APÈNDIX 1:

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

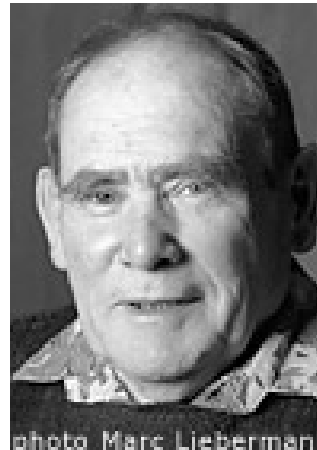
1993

- Richard J. Roberts i Phillip A. Sharp: **Processament de l'RNA**
- Kary Mullis: **Desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa**
- Michael Smith: **Desenvolupament de la mutagènesi dirigida mitjançant oligonucleòtids**



Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

- 2001: Leland A. Hartwell, Timothy Hunt, Paul M. Nurse: **Estudis sobre ciclins**
- 2002: Sydney Brenner, John E. Sulston, H. Robert Horvitz: **Regulació genètica del desenvolupament dels òrgans i mort cel·lular programada**

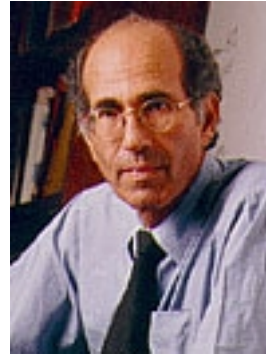


Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

Fisiologia i Medicina (2004):

Richard Axel, Linda Buck:

Estudis sobre el sistema olfatiu: descobriment de gens implicats en la producció de receptors especialitzats



Química (2004): Aaron Ciechanover, Avram Hershko,

Irwin Rose: Estudis sobre degradació proteica mitjançant ubiquitinació



Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

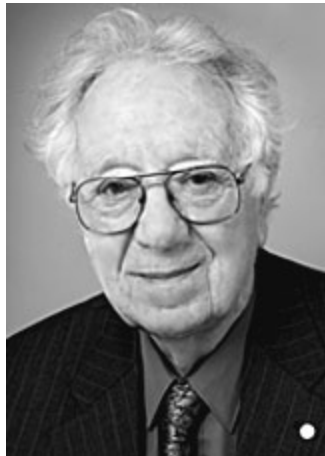


Andrew Z. Fire i Craig C. Mello reberen el premi Nobel de Medicina el 2006 pel descobriment del mecanisme d'interferència d'RNA, fonamental en el control del flux de la informació genètica.



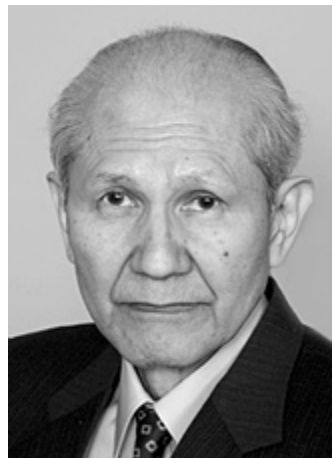
Robert D. Kornberg obtingué el Premi Nobel de Química el 2006 pels seus estudis sobre la base molecular de la transcripció eucariota.

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular



Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans, Oliver Smithies

Premis Nobel de Medicina el 2007 pels seus descobriments sobre els principis de la introducció de modificacions gèniques específiques en ratolí mitjançant l'ús de cèl·lules embrionàries



Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

Premis Nobel de Química el 2008 pel descobriment i desenvolupament de la proteïna verd fluorescent (GFP)

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

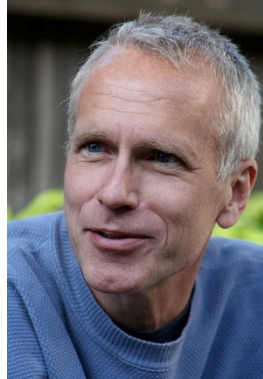
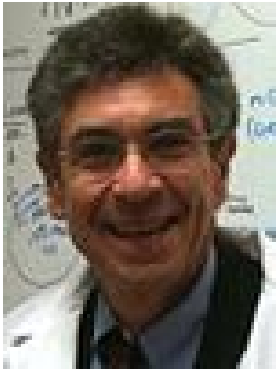


Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider i Jack W. Szostak. Premis Nobel de Medicina el 2009 pels seus estudis sobre els telòmers i la telomerasa

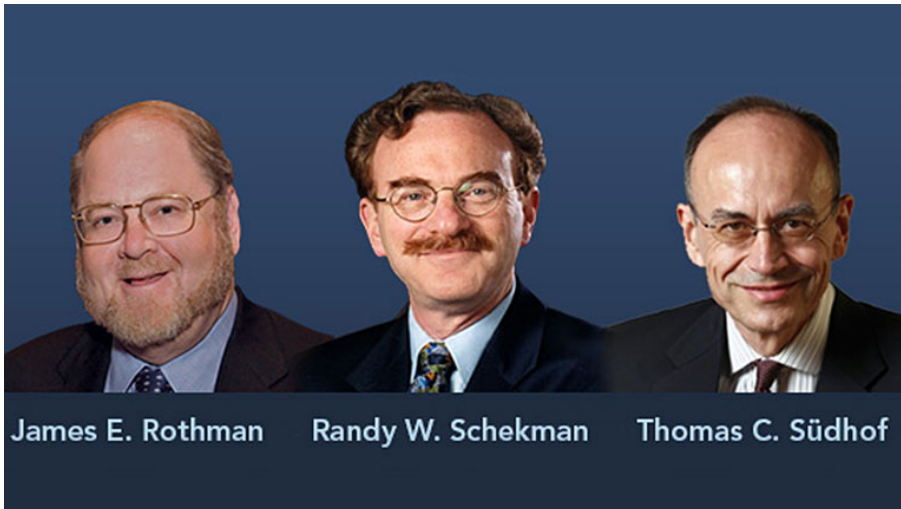


Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz i Ada E. Yonath Premis Nobel de Química el 2009 pels seus estudis sobre l'estructura i la funció dels ribosomes

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular



Robert Lefkowitz i Brian Kobilka. Premis Nobel de Química el 2012 pels seus descobriments sobre els receptors acoblats a proteïnes G



James E. Rothman, Randy W. Schekman i Thomas C. Südhof. Premis Nobel de Medicina i Fisiologia el 2013 pels seus descobriments sobre la maquinària cel·lular que regula el transport a través de vesícules

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular



Premio Nobel de Química 2015

El sueco Tomas Lindahl, el estadounidense Paul Modrich y el turcoestadounidense Aziz Sancar han ganado el Nobel de Química de 2015 por haber mapeado a nivel molecular cómo las células reparan el ADN dañado para salvaguardar la información genética



 **Tomas Lindahl**

Nació en 1938 en Estocolmo (Suecia). Doctorado en 1967 por el Instituto Karolinska; jefe de grupo emérito del Instituto Francis Crick de investigación biomédica y director emérito de investigación sobre el cáncer en el Laboratorio Clare Hall (Reino Unido)

Descubrió una maquinaria molecular que de forma constante repara el ADN y evita su deterioro



 **Paul Modrich**

Nacido en 1946, se doctoró en 1973 por la Universidad de Stanford. Es investigador en el Instituto Médico Howard Hughes y catedrático de bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad Duke (EE.UU.)

Ha demostrado cómo las células corrigen errores que ocurren cuando el ADN se replica durante la división celular



 **Aziz Sancar**


Sancar, turcoestadounidense, nació en 1946 en Savur (Turquía), se doctoró en 1977 por la Universidad de Texas, y es catedrático de bioquímica y biofísica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte

Halló un mecanismo que subsana los daños causados por las radiaciones ultravioletas




Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

PREMIO NOBEL



2016



GALARDONADO
Yoshinori Ohsumi
Instituto de Tecnología de Tokio, Japón

FISIOLOGÍA O MEDICINA

Mecanismos de la autoalimentación celular

AUTOFAGIA *

La autofagia es un proceso fundamental de las células para degradarse y reciclarse por sí mismas. El laureado identificó los genes esenciales para este proceso utilizando levadura.


IMPORTANCIA


Se genera una nueva visión para comprender las células y la forma de reciclar su contenido, proceso involucrado con enfermedades neurológicas y el cáncer.

*Palabra de origen griego que significa autoalimentación.

PREMIO

8 millones de coronas suecas, es decir, 931 mil dólares
Medalla y diploma
Serán entregados el 10 de diciembre de 2016 en Estocolmo, Suecia





Investigación y redacción: Jennifer Rosado Martínez Fuentes: NTX Salud y ciencia, nobelprize.org Arte y Diseño: Alberto Nava Consultoria

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018
was awarded jointly to
Tasuku Honjo and James P. Allison
“for their discovery of cancer therapy by inhibition of
negative immune regulation”

Immunotherapy: Durable activity on “incurable” cancers



PREMIO NOBEL

Dos científicos estadounidenses y un británico merecieron este máximo galardón de las ciencias por entender la evolución y ponerla al servicio de la humanidad. Conoce más de los ganadores y su aportación.

QUÍMICA 2018



FRANCES H. ARNOLD

Ingeniera mecánica y aeroespacial
62 años
Pittsburgh, EUA

Adscrita al Instituto de Tecnología de California (Caltech), Pasadena, CA, EUA.

Motivo

Por inventar “la evolución dirigida de enzimas”.

Comprime el tiempo de evolución natural de enzimas de millones de años en semanas o días.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA
Los métodos desarrollados por estos expertos se emplean a nivel mundial para promover una industria química más ecológica, fabricar biocombustibles sostenibles, mitigar enfermedades y salvar vidas.



GEORGE P. SMITH

Químico y bacteriólogo
77 años
Norwalk, EUA

Adscrito a la Universidad de Misuri (Mizzou), Columbia, EUA.

Motivo

Por la “presentación de péptidos y anticuerpos en la superficie de bacteriógrafos”.

Inventó una manera de domesticar a las bacterias: las infectó con virus para modificarlas genéticamente y desarrollar nuevas proteínas.

PREMIO
1.1 millones de dólares (9 millones de coronas suecas), medalla y diploma.



SIR GREGORY P. WINTER

Biólogo molecular
67 años
Leicester, Reino Unido

Adscrito al Laboratorio Molecular de Biología (MRC) de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

Motivo
Por la “presentación de péptidos y anticuerpos en la superficie de bacteriógrafos”.
Usó la exhibición de bacteriógrafo para crear nuevos fármacos. Los anticuerpos producidos neutralizan toxinas que contrarrestan enfermedades autoinmunes y curan el cáncer metastásico.

ENTREGA
10 de diciembre de 2018 en Estocolmo, Suecia.

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019

Premis Nobel relacionats amb la biologia molecular



Ill. Niklas Elmehed. © Nobel Media.

William G. Kaelin Jr



Ill. Niklas Elmehed. © Nobel Media.

Sir Peter J. Ratcliffe



Ill. Niklas Elmehed. © Nobel Media.

Gregg L. Semenza

Aquest premi va ser concedit a William G. Kaelin Jr, Sir Peter J. Ratcliffe i Gregg L. Semenza pels seus descobriments sobre com les cèl·lules detecten i s'adapten a la disponibilitat d'oxigen.

**Premis Nobel
relacionats amb la
biologia molecular**

Illustrations: Niklas Elmehed

THE NOBEL PRIZE
IN CHEMISTRY 2020



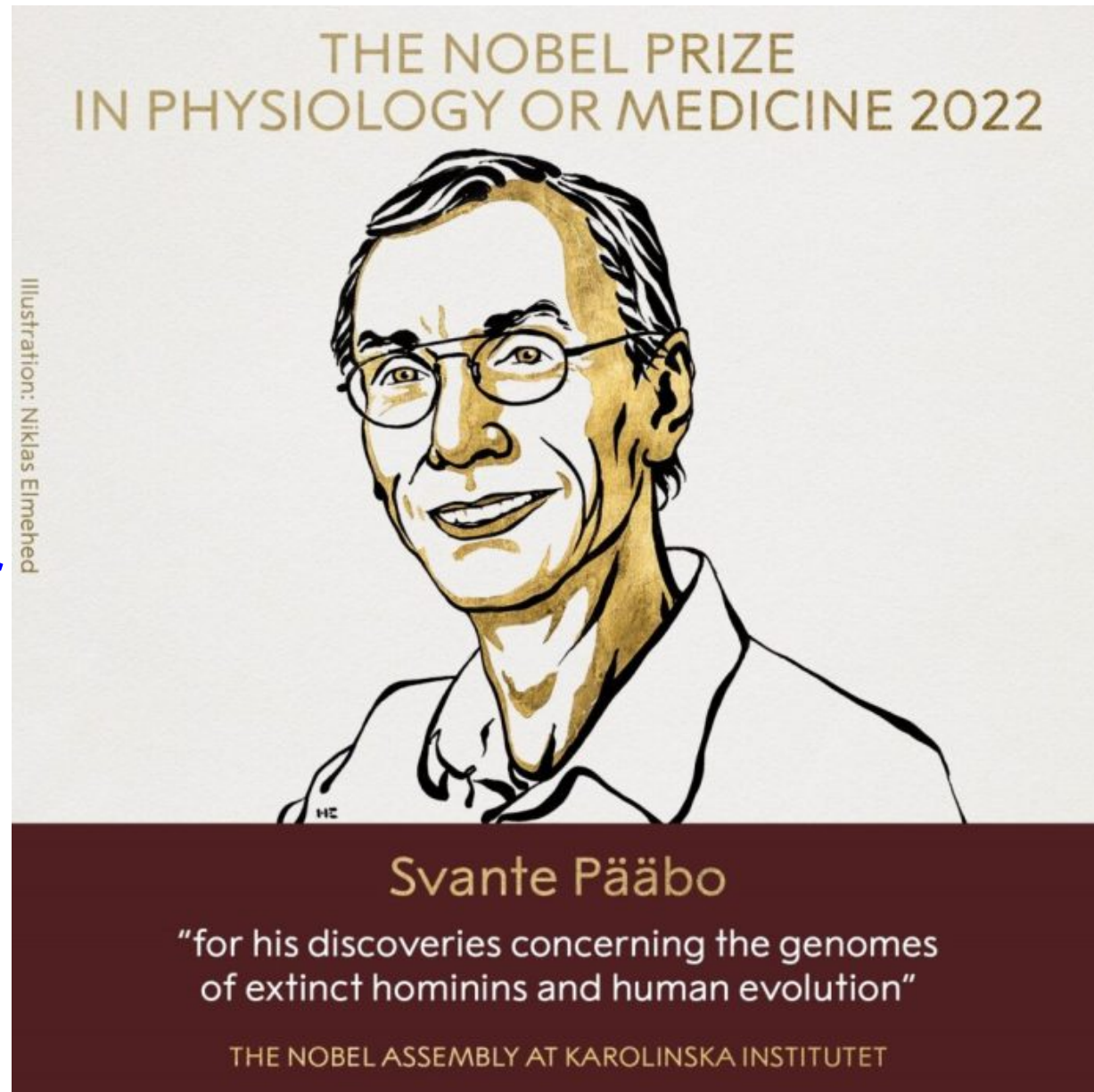
Emmanuelle
Charpentier

Jennifer A.
Doudna

“for the development of a method
for genome editing”

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

**Premis Nobel
relacionats amb la
biologia molecular**



APÈNDIX 2:

Fonts d'informació en biologia molecular

Fonts d'informació en biologia molecular

- Llibres de text
- Revistes i llibres de divulgació
 - Revistes científiques
 - Pàgines web

Alguns llibres de text de biologia molecular d'ús molt estés

LEWIN, B. (2017). "Genes XII". Jones and Bartlett Publishers.

LODISH, H., BERK, A., KAISER, C., KRIEGER, M., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MARTIN, K., YAFFE, M., AMON, A. (2021). "Molecular Cell Biology". 9a ed. MACMILLAN PRESS.

WATSON, J.D. i altres (2013): "Molecular Biology of the Gene", 7a edició. Pearson International Education.

Alguns textos divulgatius sobre la biologia molecular i el seu desenvolupament

¿Qué es la vida? Erwin Schrödinger. 7a edició. 1983.
Tusquets Editores.

El azar y la necesidad. Jacques Monod. 1981
Tusquets Editores.

Qué loco propósito. Francis Crick. 1989
Tusquets Editores.

La estatua interior. Francis Jacob. 1989
Tusquets Editores. Colección Andanzas

La doble hélice. James D. Watson. 1970
Plaza y Janés. Barcelona

La lógica de lo viviente. Una historia de la herencia. Francis Jacob. 1999. Tusquets Editores.

**Pasión por las enzimas. Arthur Kornberg. 1992.
Editorial Pirámide**

**Biología Molecular. Selecciones de La Recherche. 1975
Blume Ediciones**

**Biología Molecular. Enfoque estructural. C.U.M. Smith. 1971
Alianza Universidad 7. Alianza Editorial**

**The secret of life. Joseph Levine & David Suzuki. 1993
WOBH. Boston**

**ADN. El secreto de la vida. James D. Watson. 2003
Taurus**

**A la búsqueda del secreto de la vida: una breve historia de la
biología molecular. José María Valpuesta. 2008. Editorial CSIC**

**Nobel Prizes and Notable Discoveries. Erling Norrby. 2016.
World Scientific**

**Emperor of enzymes: a biography of Arthur Kornberg,
biochemist and Nobel laureate. Errol C. Friedberg. 2016.
World Scientific**

**Meaning of life and the universe. Peter T. Saunders. 2017.
World Scientific**

**Learning about your genes. Errol C. Friedberg. 2018. World
Scientific**

Understand your DNA. Lasse Folkersen. 2018. Word Scientific

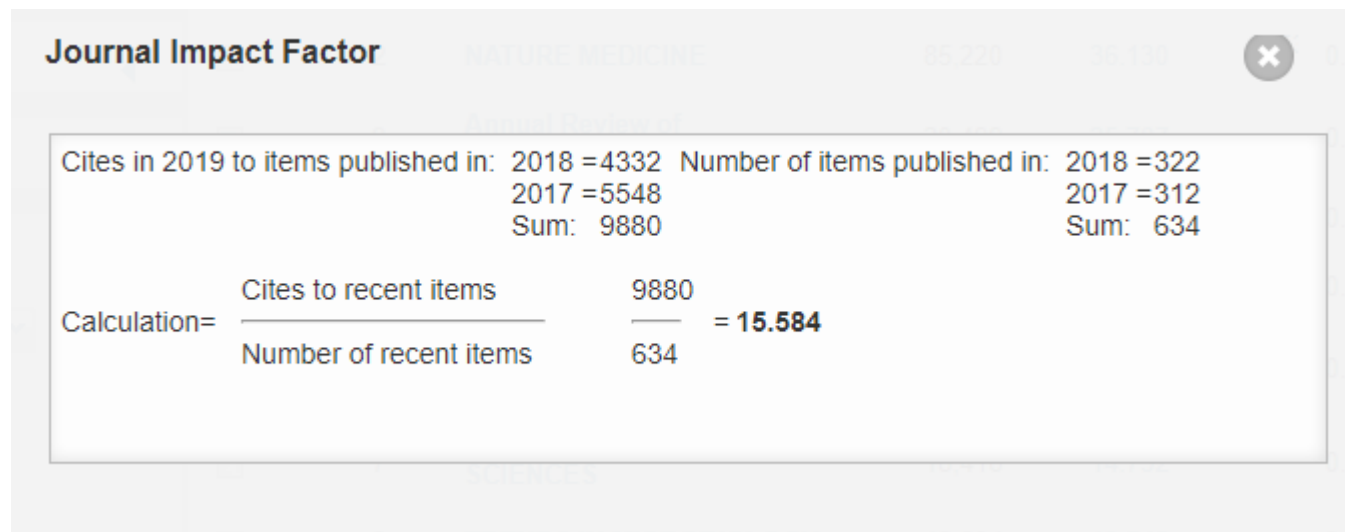
**The tangled tree. A radical new history of life. David
Quammen. 2018. Simon and Schuster**

Algunes revistes científiques on es publiquen treballs sobre biologia molecular

- **Nature / Science**
- **Cell / Molecular Cell / Molecular Plant / Nucleic Acids Research / Genome Research / Molecular Biology and Evolution / EMBO Journal / Cell Chemical Biology / BBA / Cellular and Molecular Life Sciences / Antioxidants and redox signalling / Biomacromolecules / RNA Biology**

Índex d'impacte de revistes científiques

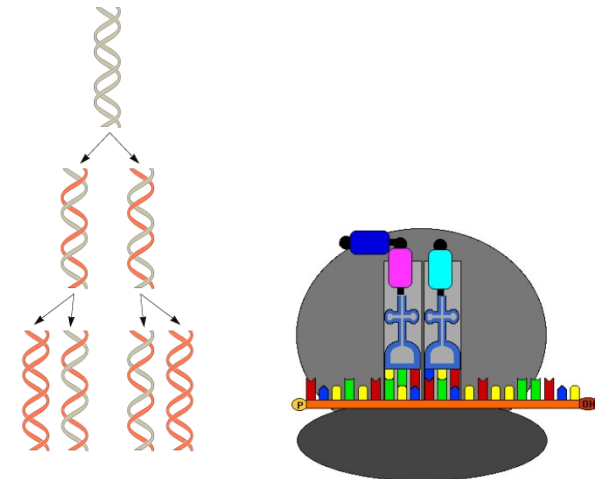
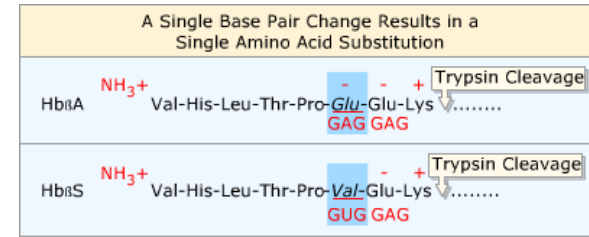
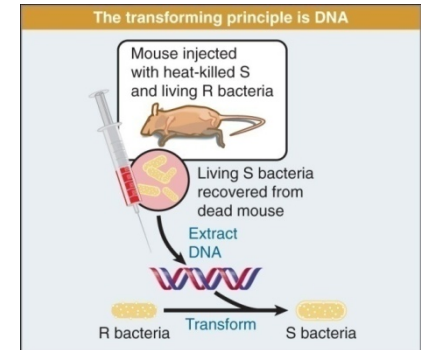
• Molecular Cell



**El dogma central de la
biologia molecular:
aspectes històrics,
prediccions, anomalies i
excepcions**

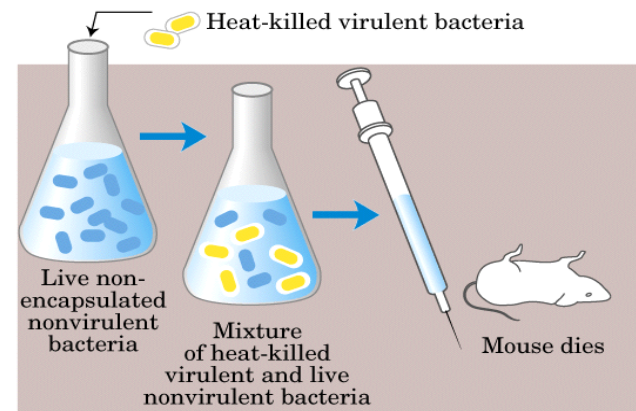
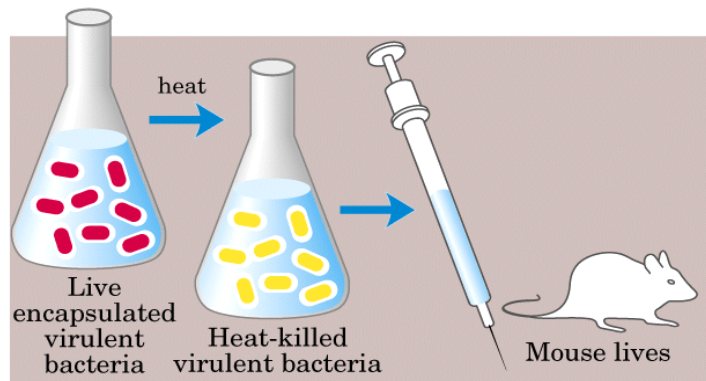
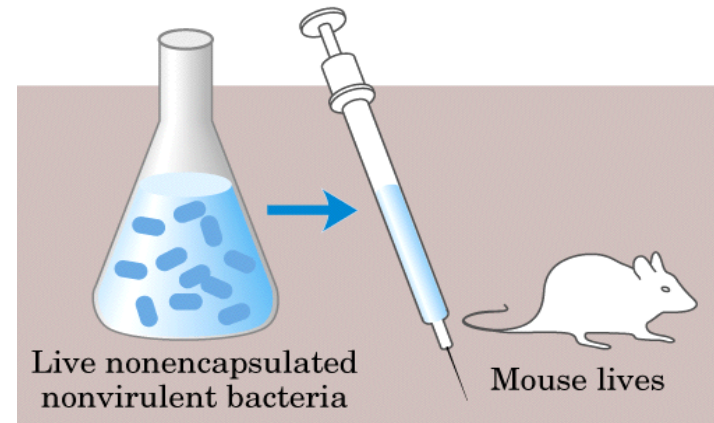
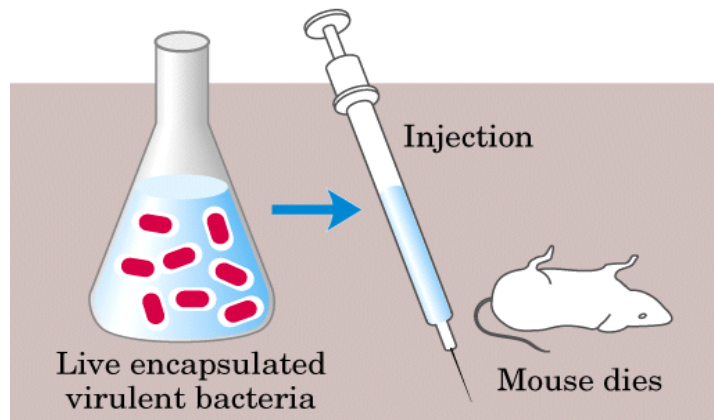
En base a quines dades es va formular el dogma central?

Dada	Període històric	Investigadors
El DNA és el material genètic	1928-1952	Griffith, Avery, Macleod, McCarty, Hersey, Chase
Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes	1957	Ingram
Estructura secundària del DNA en doble hèlix	1953	Watson, Crick
Avançaments en el coneixement de la replicació del DNA	1956-1958	Kornberg, Meselson, Stahl
Avançaments en el coneixement de la síntesi de proteïnes: paper del ribosoma i del tRNA	1950-1957	Brachet, Zamecnik, Hoagland



El DNA és el material genètic

1928: F. Griffith: soques no virulentes de bacteris esdevenen virulentes quan es mesclen amb soques patogèniques mortes per calor. El DNA és el principi transformant



El DNA és el material genètic

Transformation of bacteria

Pneumococcus types

Capsule
smooth (S)
appearance

No capsule
rough (R)
appearance



Injection of cells

Result

Living S



Dies



Heat-killed S



Lives



Living R



Lives



Heat-killed S
Living R

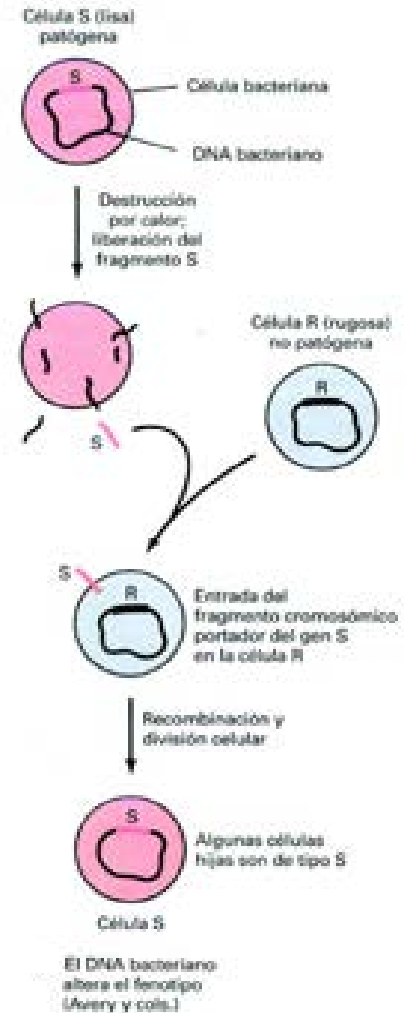
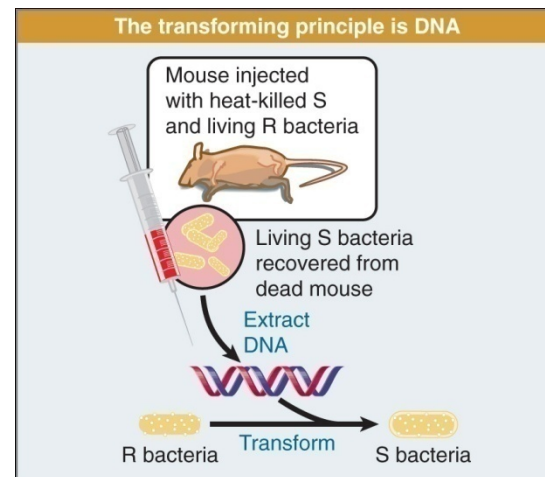
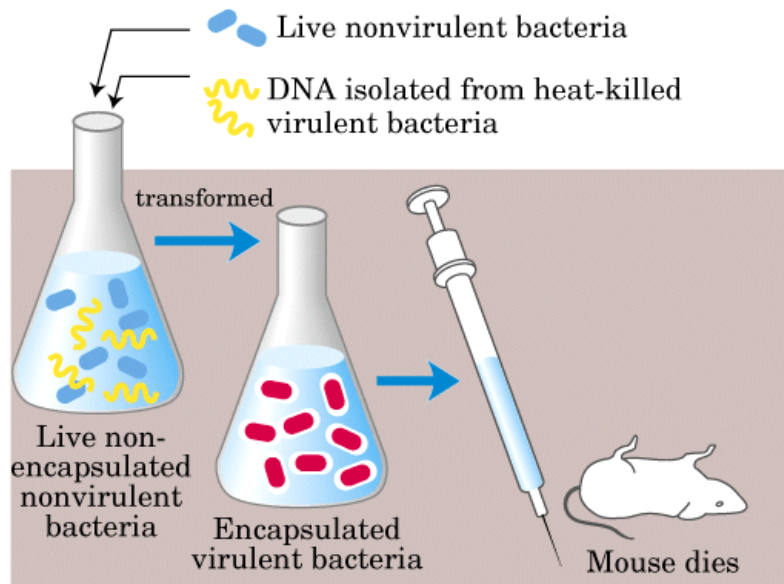


Dies



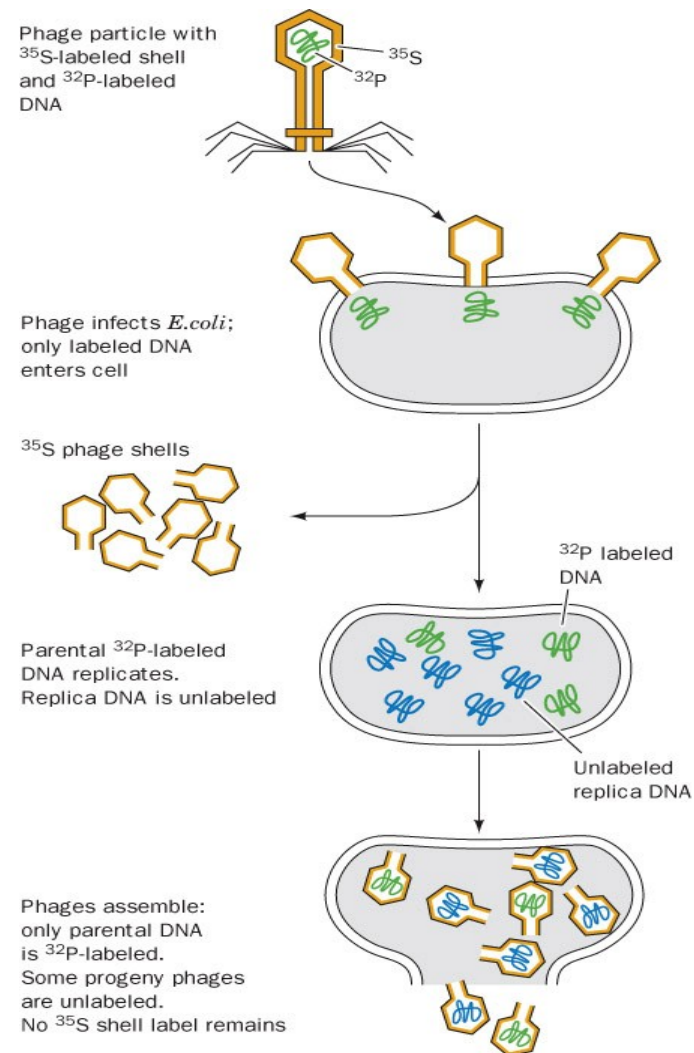
El DNA és el material genètic

1944: O.T. Avery, C.M. Macleod, M. McCarty: el DNA és el principi genètic.

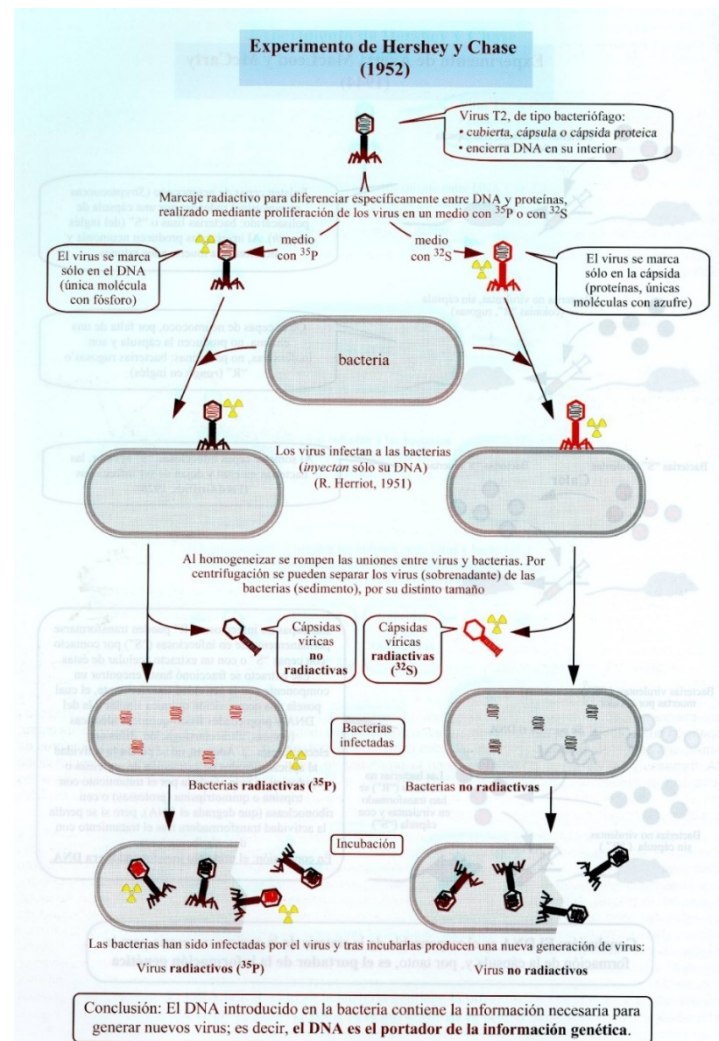
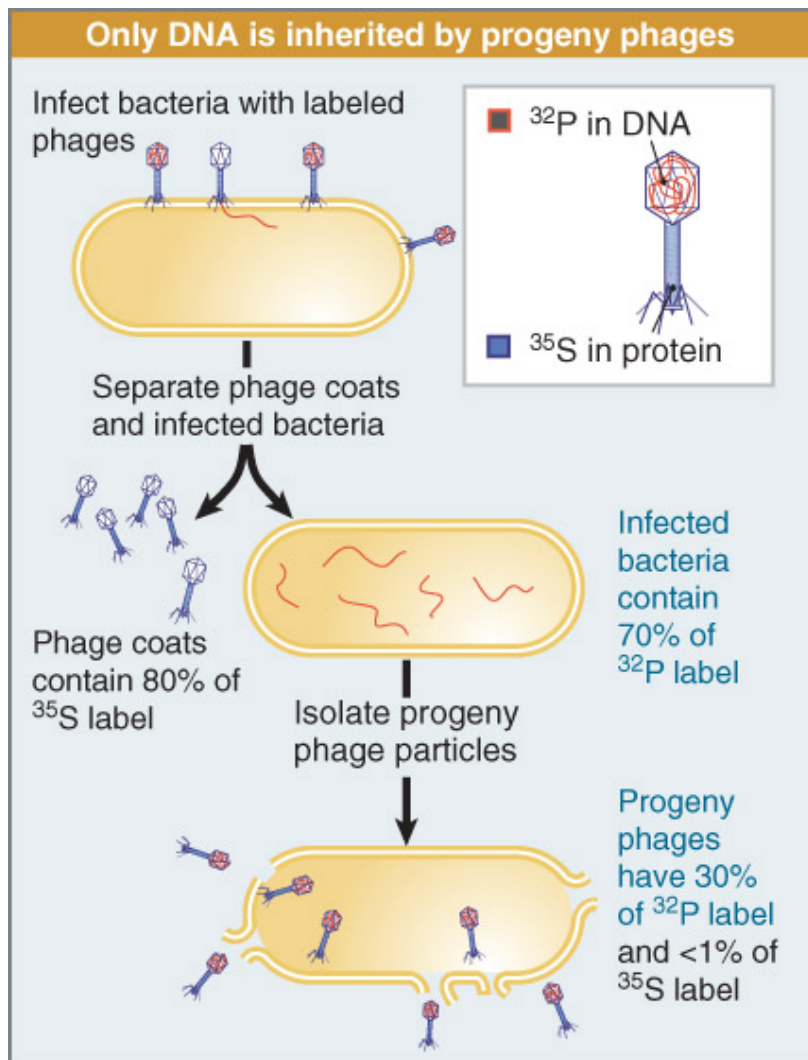


El DNA és el material genètic

1952: A.D. Hershey, M. Chase: confirmació mitjançant estudis isotòpics sobre la multiplicació del fag T2: el DNA entra en la cèl·lula i les proteïnes no; alguns dels fags resultants tenen àcids nucleics parentals però cap té proteïnes parentals.

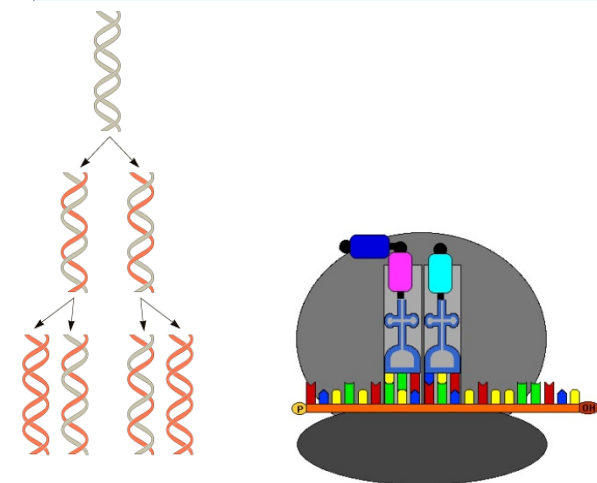
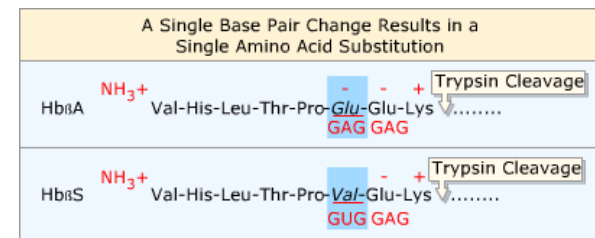
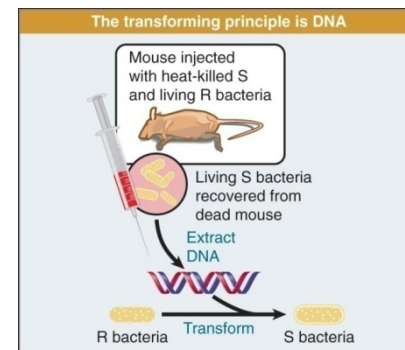


El DNA és el material genètic



En base a quines dades es va formular el dogma central?

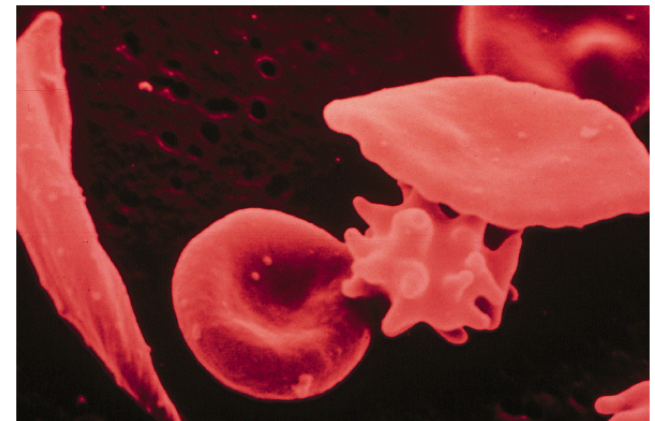
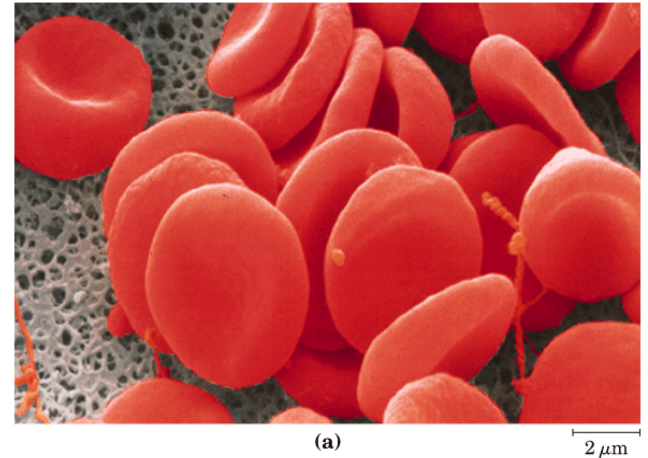
Dada	Període històric	Investigadors
El DNA és el material genètic	1928-1952	Griffith, Avery, Macleod, McCarty, Hersey, Chase
Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes	1957	Ingram
Estructura secundària del DNA en doble hèlix	1953	Watson, Crick
Avançaments en el coneixement de la replicació del DNA	1956-1958	Kornberg, Meselson, Stahl
Avançaments en el coneixement de la síntesi de proteïnes: paper del ribosoma i del tRNA	1950-1957	Brachet, Zamecnik, Hoagland



Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes

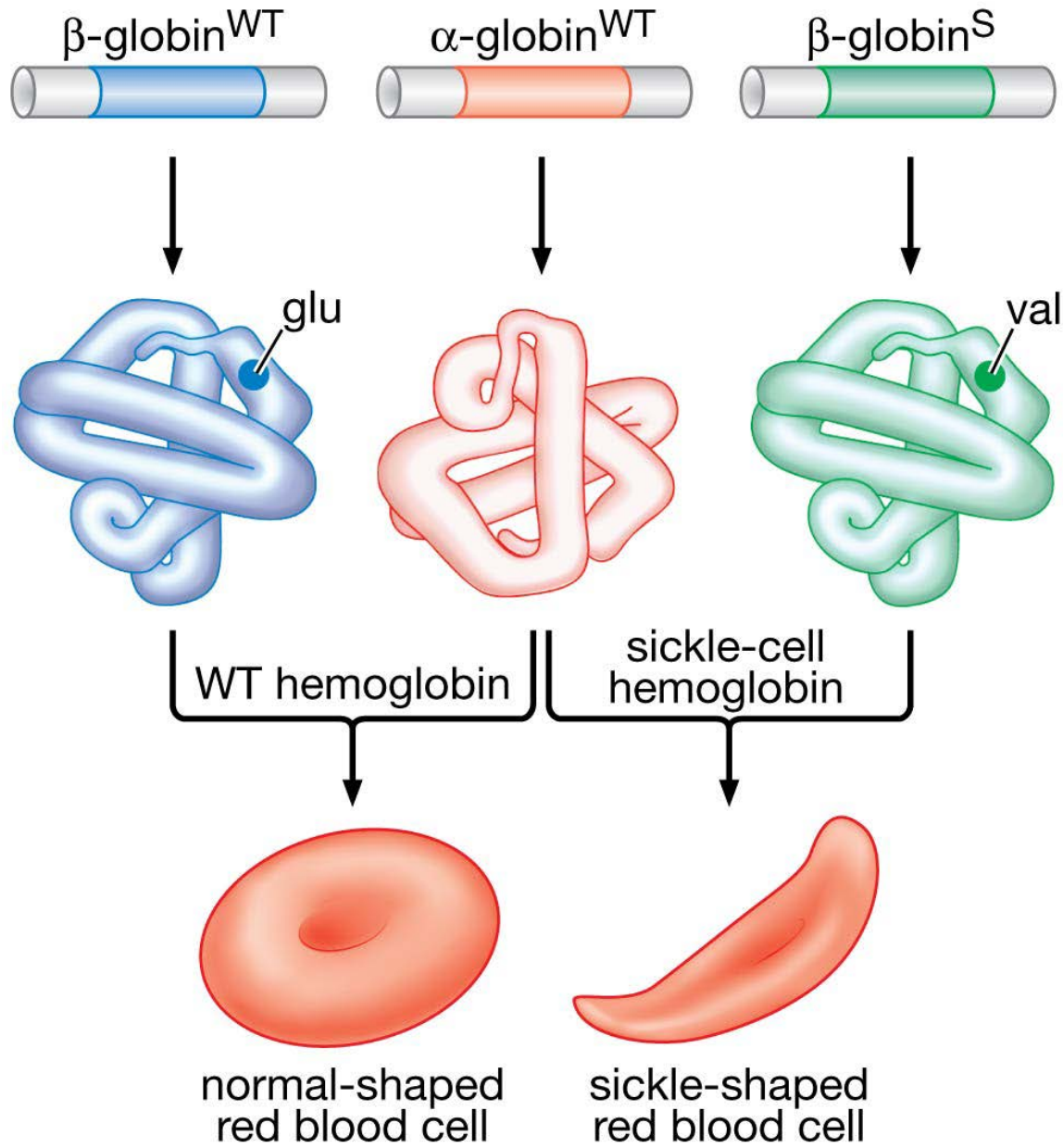
▪ Estudis sobre l'hemoglobina en humans que pateixen l'anèmia "sickle-cell", drepanocítica o falciforme: si el gen *sickle* està en els dos cromosomes homòlegs hi ha anèmia severa, amb glòbuls rojos en forma de falç; si només està en un, l'anèmia és menys severa i els glòbuls rojos són pràcticament normals.

▪ 1957: V.M. Ingram: hemoglobina *sickle* es diferencia de la normal per un aminoàcid en una cadena β : Glu 6 (normal) és substituït per Val.



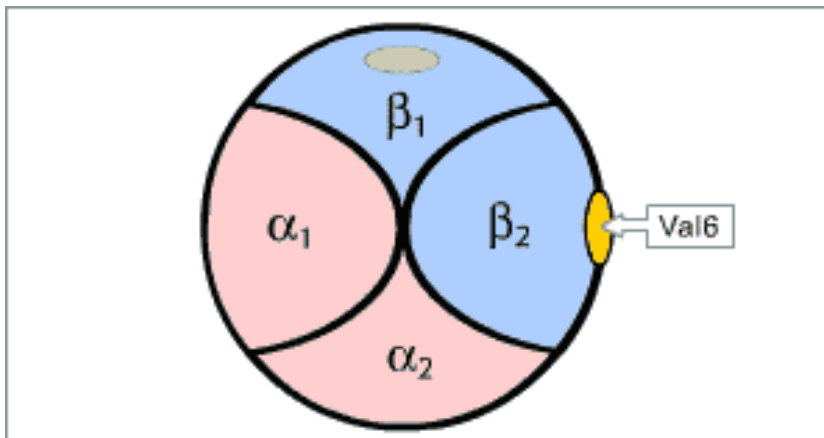
(b)

Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes



Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes

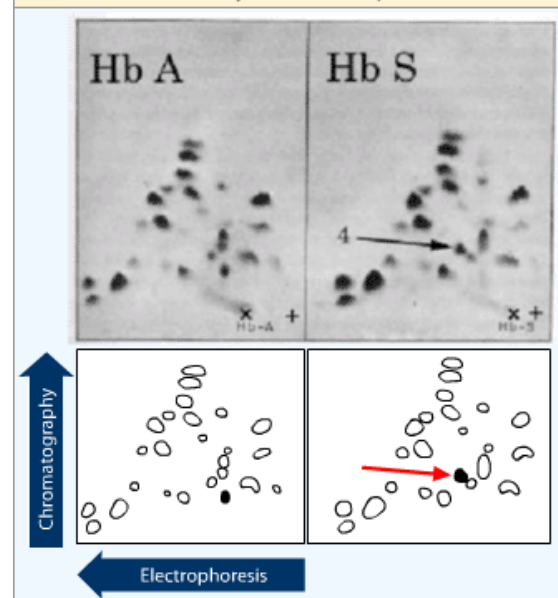
Hemoglobina present en l'anèmia drepanocítica (drepanocitosi)



1. The Replacement of Glutamic Acid with Valine Creates a Hydrophobic Patch on the Surface of the Hemoglobin Molecule

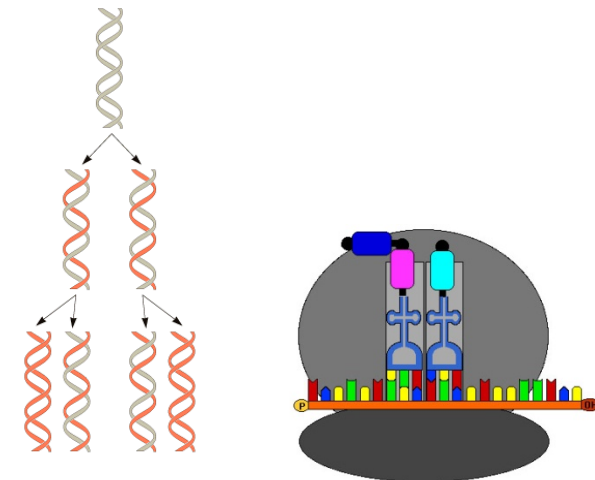
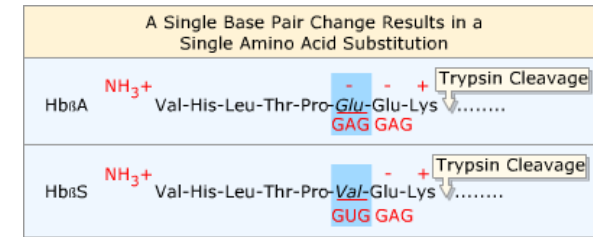
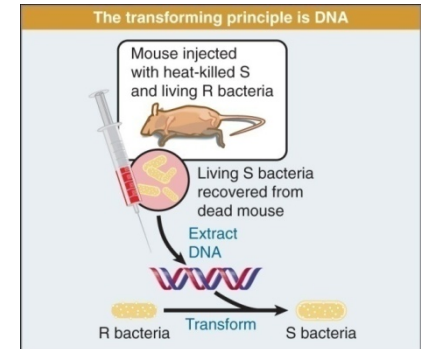
A Single Base Pair Change Results in a Single Amino Acid Substitution	
HbβA	NH ₃ ⁺ Val-His-Leu-Thr-Pro- <u>Glu</u> -Glu-Lys GAG GAG
HbβS	NH ₃ ⁺ Val-His-Leu-Thr-Pro- <u>Val</u> -Glu-Lys GUG GAG
HbβC	NH ₃ ⁺ Val-His-Leu-Thr-Pro- <u>Lys</u> -Glu-Lys AAG GAG

Fingerprints of Trypsin Digests of Hemoglobin A and S Reveal That They Differ in one Peptide



En base a quines dades es va formular el dogma central?

Dada	Període històric	Investigadors
El DNA és el material genètic	1928-1952	Griffith, Avery, Macleod, McCarty, Hersey, Chase
Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes	1957	Ingram
Estructura secundària del DNA en doble hèlix	1953	Watson, Crick
Avançaments en el coneixement de la replicació del DNA	1956-1958	Kornberg, Meselson, Stahl
Avançaments en el coneixement de la síntesi de proteïnes: paper del ribosoma i del tRNA	1950-1957	Brachet, Zamecnik, Hoagland



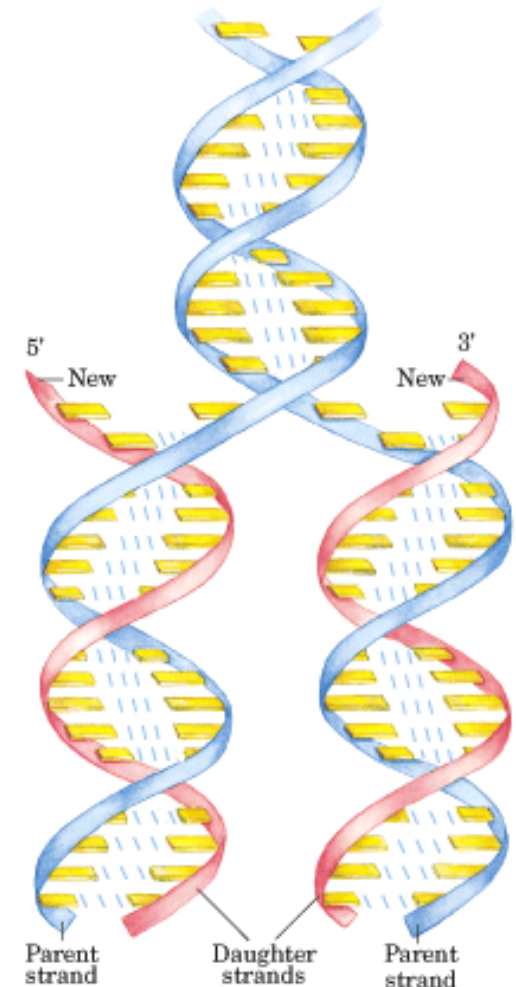
L'estructura secundària del DNA

1953: Watson i Crick proposen el model de la doble hèlix i suggereixen com podria donar-se la replicació per separació de cadenes de forma autocatalítica.

En la seua publicació original (*) Watson i Crick ja ho suggerien: *"L'aparellament específic que proposem suggereix immediatament un possible mecanisme per a copiar el material genètic"*

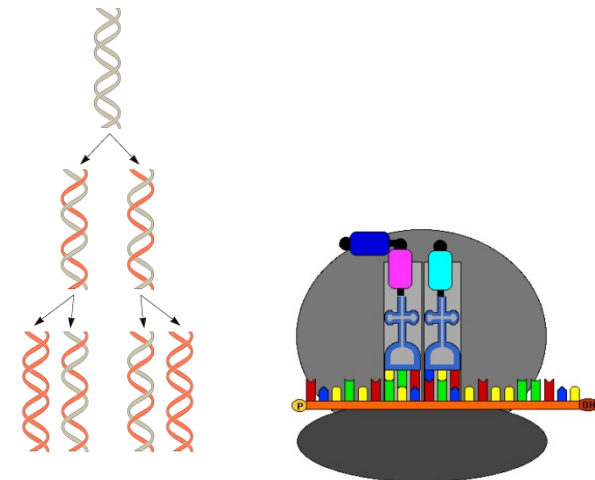
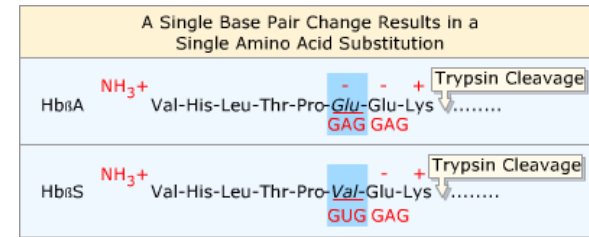
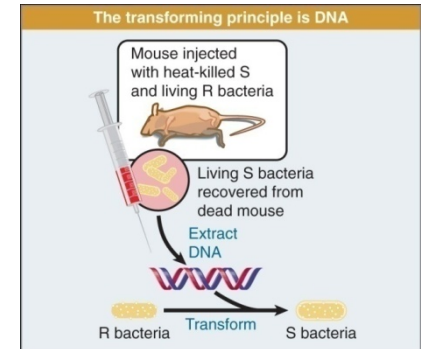
(*) Watson JD, Crick FHC (1953).

Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738



En base a quines dades es va formular el dogma central?

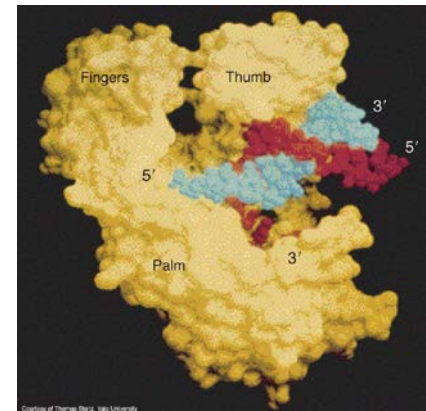
Dada	Període històric	Investigadors
El DNA és el material genètic	1928-1952	Griffith, Avery, Macleod, McCarty, Hersey, Chase
Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes	1957	Ingram
Estructura secundària del DNA en doble hèlix	1953	Watson, Crick
Avançaments en el coneixement de la replicació del DNA	1956-1958	Kornberg, Meselson, Stahl
Avançaments en el coneixement de la síntesi de proteïnes: paper del ribosoma i del tRNA	1950-1957	Brachet, Zamecnik, Hoagland



Primeres dades sobre la replicació del DNA

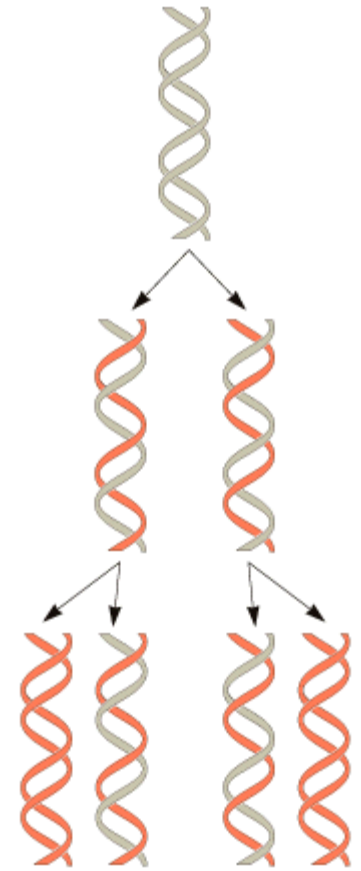
- 1956: A. Kornberg demostra la síntesi de DNA en extractes de bacteris lliures de cèl·lules.
- 1958: A. Kornberg identifica el primer enzim implicat en la síntesi de polidesoxiribonucleòtids: la DNA polimerasa I.

Estructura de raigs X del fragment Klenow de la DNA polimerasa I d'*E. coli* en complex amb un DNA de doble cadena.



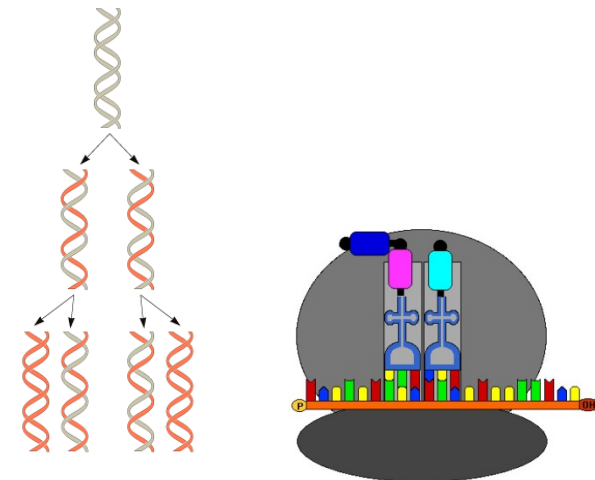
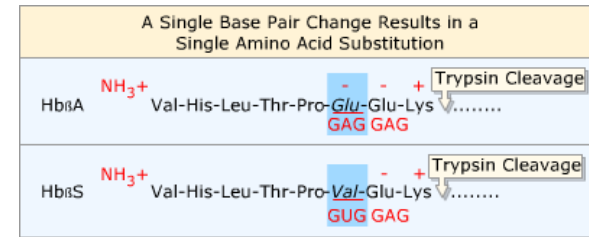
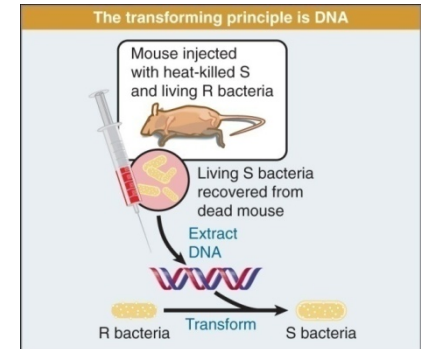
Primeres dades sobre el mecanisme i l'enzimologia de la replicació del DNA

1958: M. Meselson, F. Stahl. La replicació és semiconservativa: una cadena parental del DNA és distribuïda en cadascuna de les molècules filles.



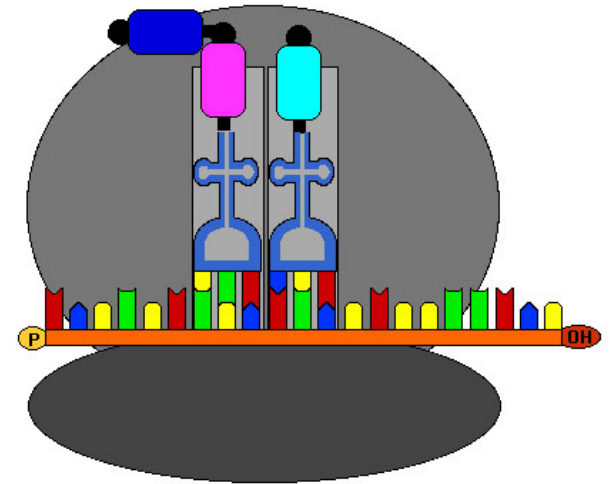
En base a quines dades es va formular el dogma central?

Dada	Període històric	Investigadors
El DNA és el material genètic	1928-1952	Griffith, Avery, Macleod, McCarty, Hersey, Chase
Els gens controlen les seqüències d'aminoàcids en les proteïnes	1957	Ingram
Estructura secundària del DNA en doble hèlix	1953	Watson, Crick
Avançaments en el coneixement de la replicació del DNA	1956-1958	Kornberg, Meselson, Stahl
Avançaments en el coneixement de la síntesi de proteïnes: paper del ribosoma i del tRNA	1950-1957	Brachet, Zamecnik, Hoagland



Com arriba la informació de les proteïnes al DNA

- El DNA no pot ser el motle directe per a la síntesi de proteïnes.
- Caspersson i Brachet (final dels anys 30): l'RNA resideix majoritàriament en el citoplasma (encara és un àcid nucleic molt desconegut).
- 1950: Brachet aïlla ribosomes i troba que estan constituïts per rRNA i proteïnes.

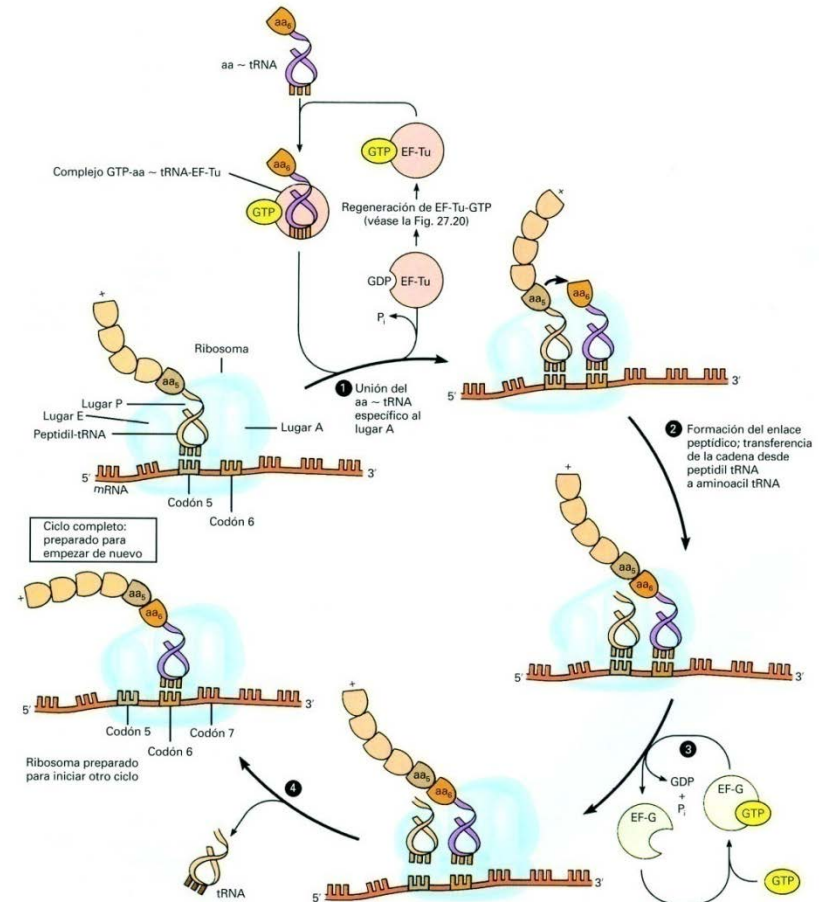


Avançaments en els coneixements del procés de síntesi de proteïnes

▪ Síntesi de proteïnes en tubs d'assaig

1953: P.C. Zamecnik obté extractes capaços de dur a terme la síntesi de proteïnes.

1955: P.C. Zamecnik demostra que el lloc de síntesi de proteïnes és el ribosoma.

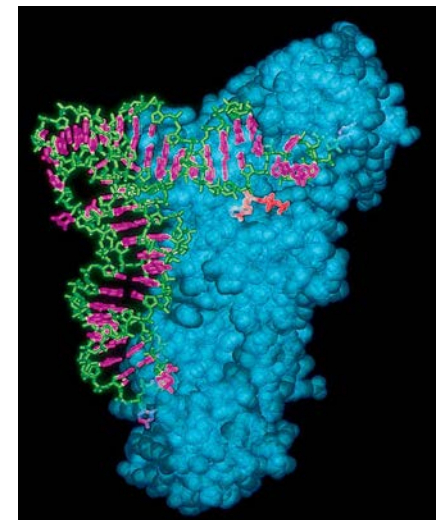
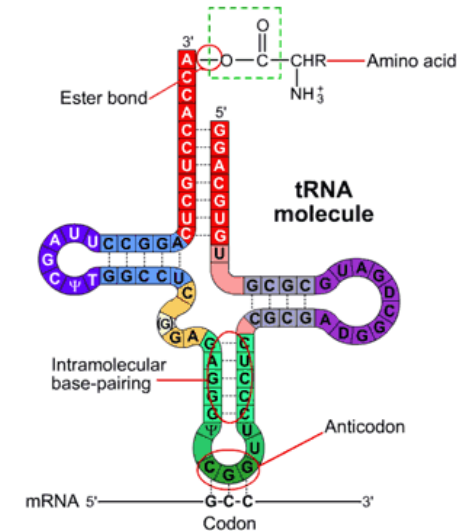


Avançaments en els coneixements del procés de síntesi de proteïnes

▪ **Hipòtesi de l'adaptador (1955):** Crick proposa que abans de la incorporació dels aminoàcids a les proteïnes han d'unir-se a molècules adaptadores específiques.

Zamecnik i M.B. Hoagland (1957): els aminoàcids s'uneixen a tRNAs per una classe d'enzims anomenats aminoacil-tRNA sintetases.

Model de la glutaminil-tRNA sintetasa d'E. coli acoblada el seu tRNA i l'ATP. Esquelet sucre-fosfat del tRNA en verd, bases en rosa i ATP en roig



El dogma central de la biologia molecular: Francis Crick, 1958

RUTA PEL FLUX DE LA INFORMACIÓ GENÈTICA
(és un postulat, no està basat en cap experiment)

ÀCIDS NUCLEICS  PROTEÏNES

“El dogma central estableix que, una vegada que la informació ha passat a la forma de proteïna, no pot canviar de forma. La transferència d'informació des d'àcid nucleic a àcid nucleic o d'àcid nucleic a proteïna és possible, però la transferència de proteïna a proteïna o de proteïna a àcid nucleic és impossible. Informació significa la determinació precisa de la seqüència, de bases en els àcids nucleics o d'aminoàcids en les proteïnes”.

Avançaments en els coneixements del procés de síntesi de proteïnes

▪ Descobriments de l'mRNA

1961: F. Jacob i J. Monod proposen la necessitat d'un intermediari entre el DNA i les proteïnes. L'RNA ribosòmic no pot ser el motle per a la síntesi de proteïnes.

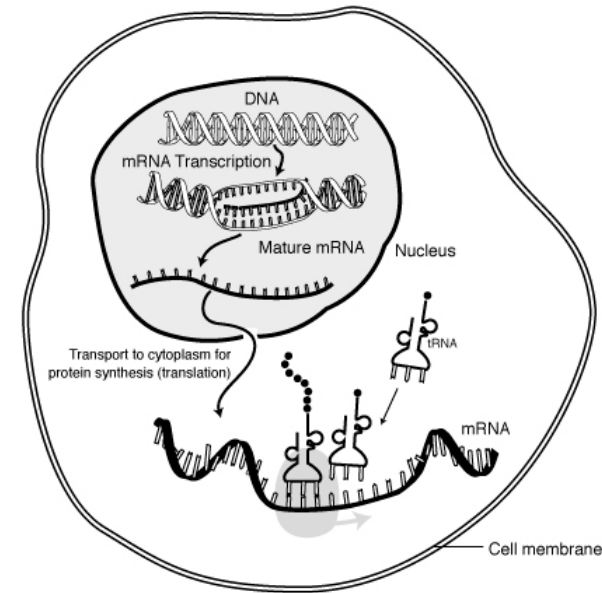


Avançaments en els coneixements del procés de síntesi de proteïnes

▪ Descobriments de l'mRNA

1961: S. Brenner, F. Jacob i M. Meselson. Estudis en cèl·lules bacterianes infectades pel fag T2. Després de la infecció s'atura la síntesi de l'RNA del bacteri, però s'hi detecta RNA de nova síntesi que no s'associa a proteïnes ribosomals, s'uneix a ribosomes existents prèviament i es destrueix ràpidament.

1961: S. Spiegelman. Aquest RNA és complementari al DNA del fag.



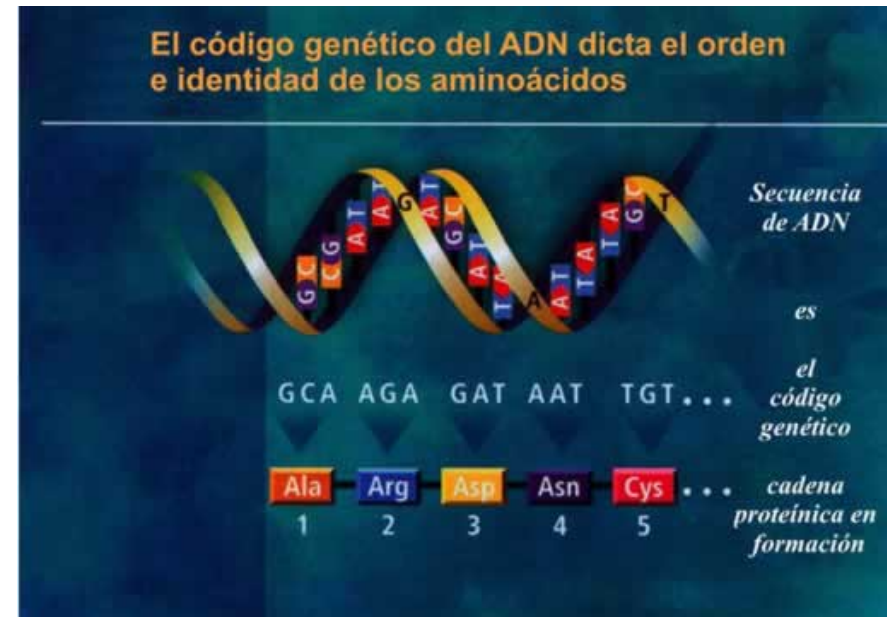
Avançaments en els coneixements del procés de síntesi de proteïnes

▪ Descobriment de les RNA polimerases

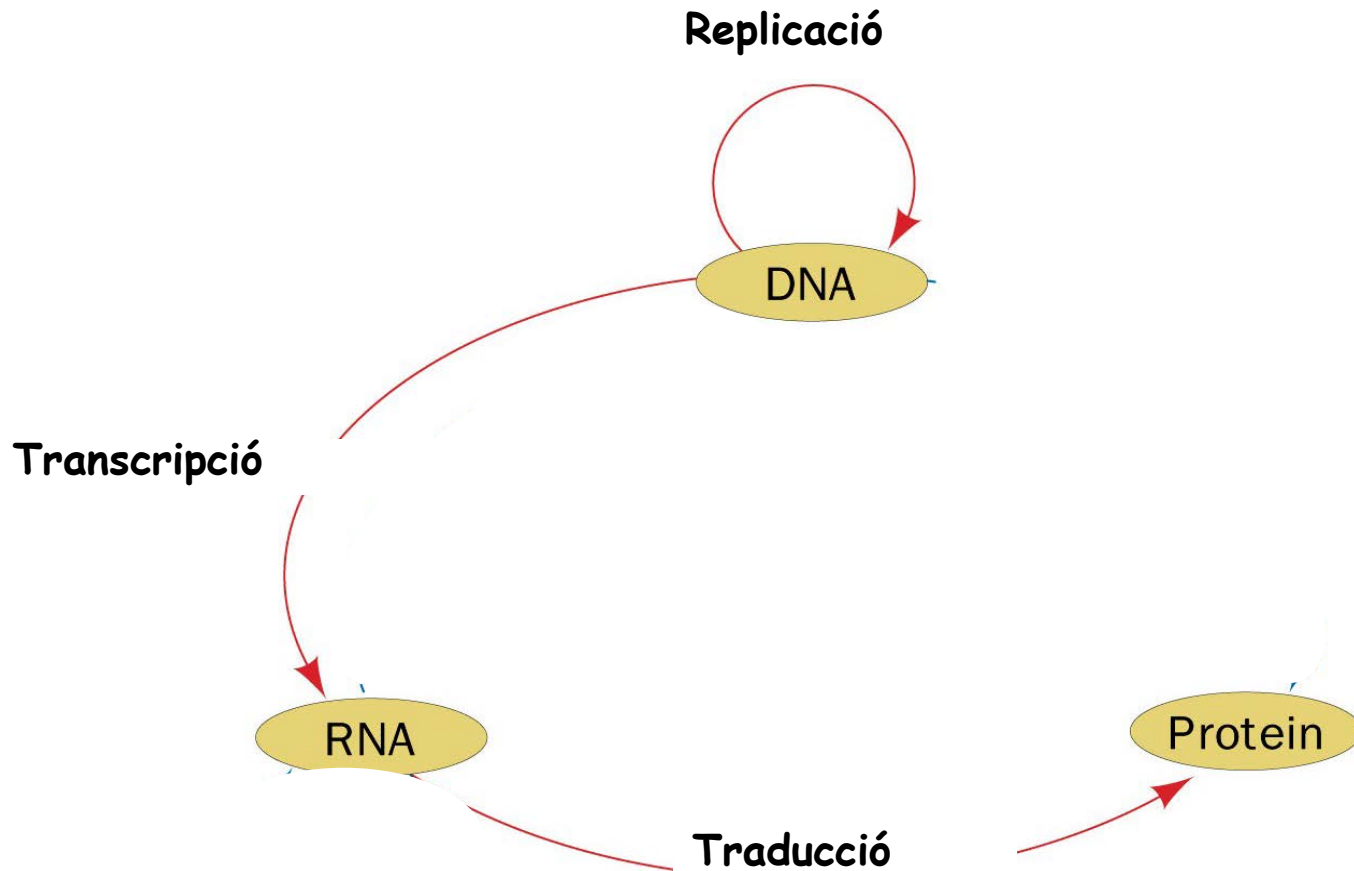
1960: J. Hurwitz, A. Stevens i S.B. Weiss.

▪ Establiment del codi genètic:

1954-1966: C. Yanofsky, A. Brenner, M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei.



El dogma central de la biologia molecular revisat



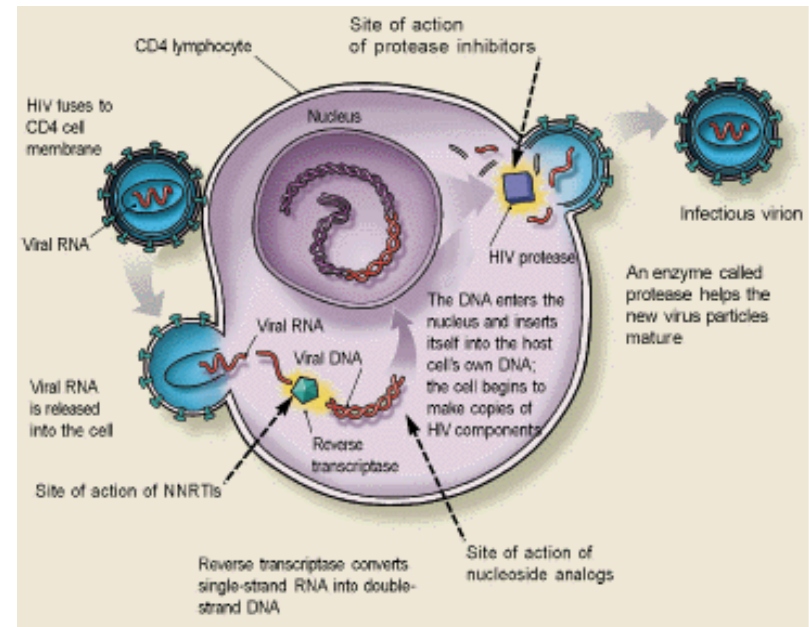
L'RNA com a material genètic

- 1930s: Alguns virus de plantes contenen RNA però no DNA
- 1956: A. Gierer. L'RNA del virus del mosaic del tabac és infecciós

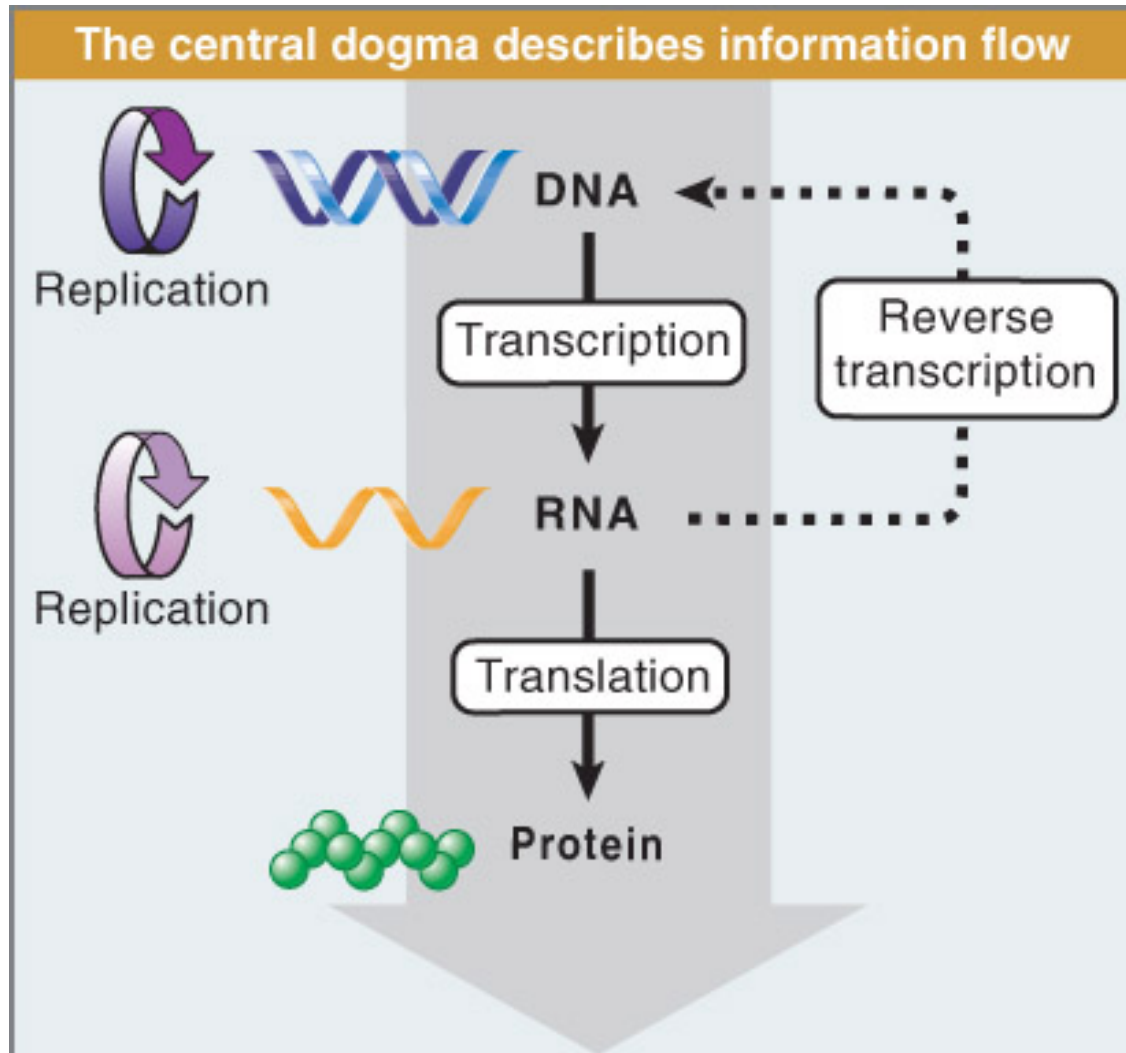


- 1965: I. Haruna i S. Spiegelman aïllen un enzim que catalitza la formació de noves molècules d'RNA virals.
- 1968: C. Weissmann i J. August descobreixen que, en el procés de replicació d'alguns RNA virals, es forma un intermediari de doble cadena.
- 1970: S. Mizutani, H.M. Temin, D. Baltimore descobreixen la transcriptasa inversa.

L'RNA com a material genètic

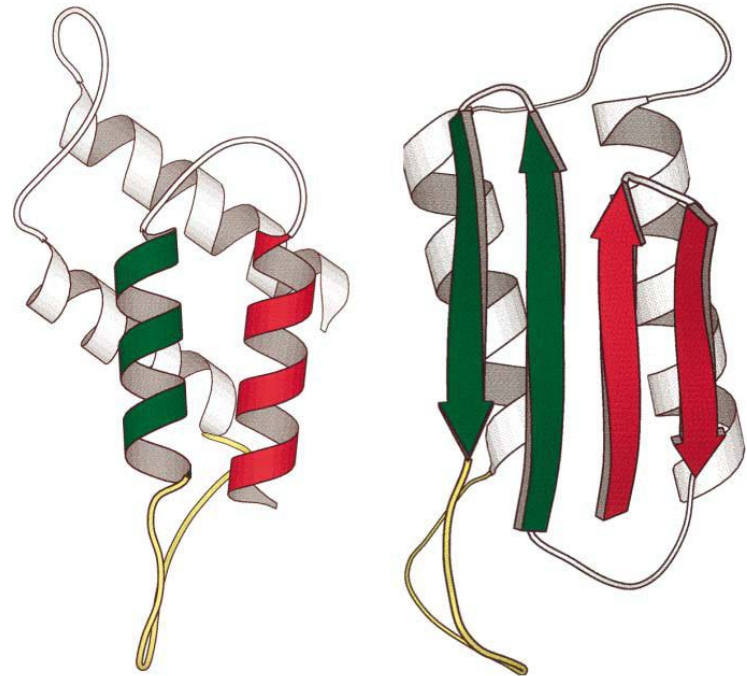


El dogma central de la biología molecular. Modificaciones posteriores



Un aspecte no contemplat en el dogma central: els prions

- La proteïna responsable del "scrapie" existeix en dues formes (conformacions):
 - Forma no infecciosa (PrP^{C}), susceptible a proteases
 - Forma causant de malaltia (PrP^{Sc}), resistent a proteases



PrP^{C}

Conformació

"normal"

PrP^{Sc}

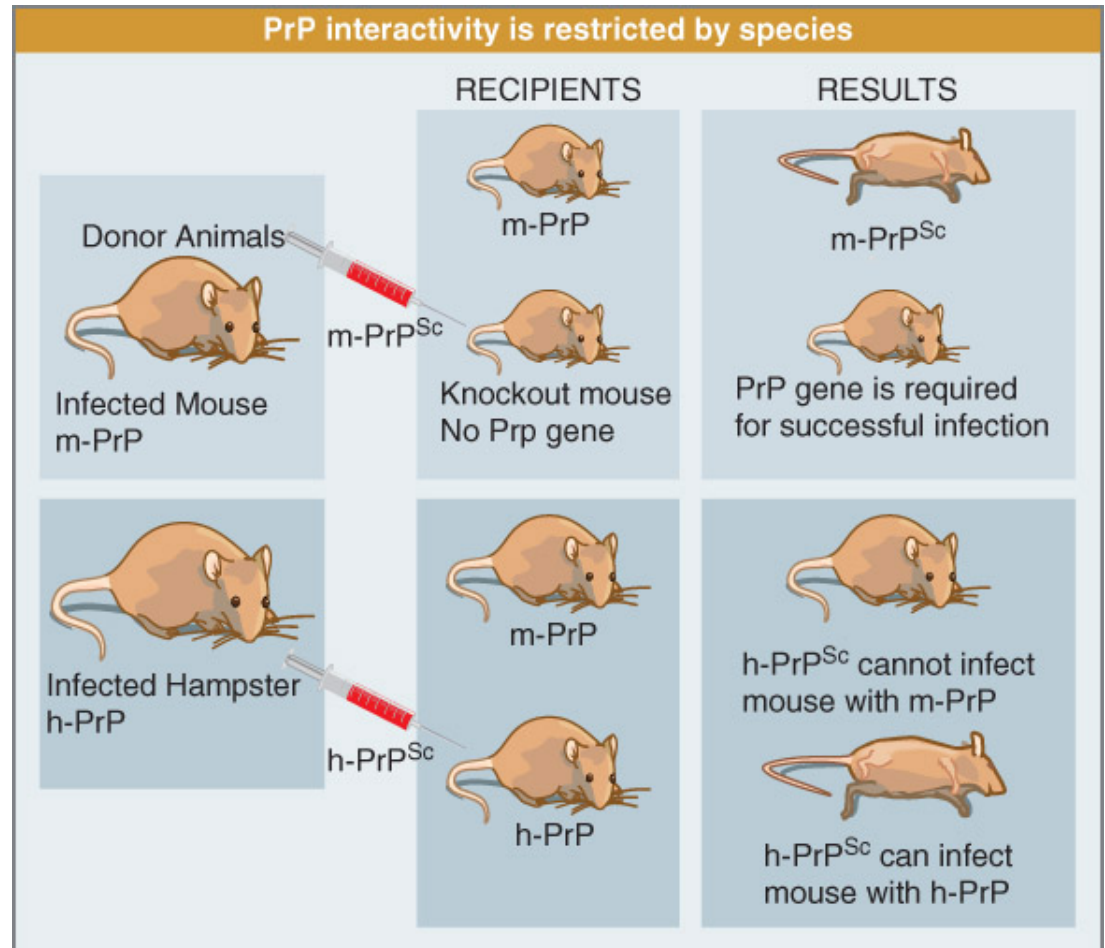
Conformació

"nociva"

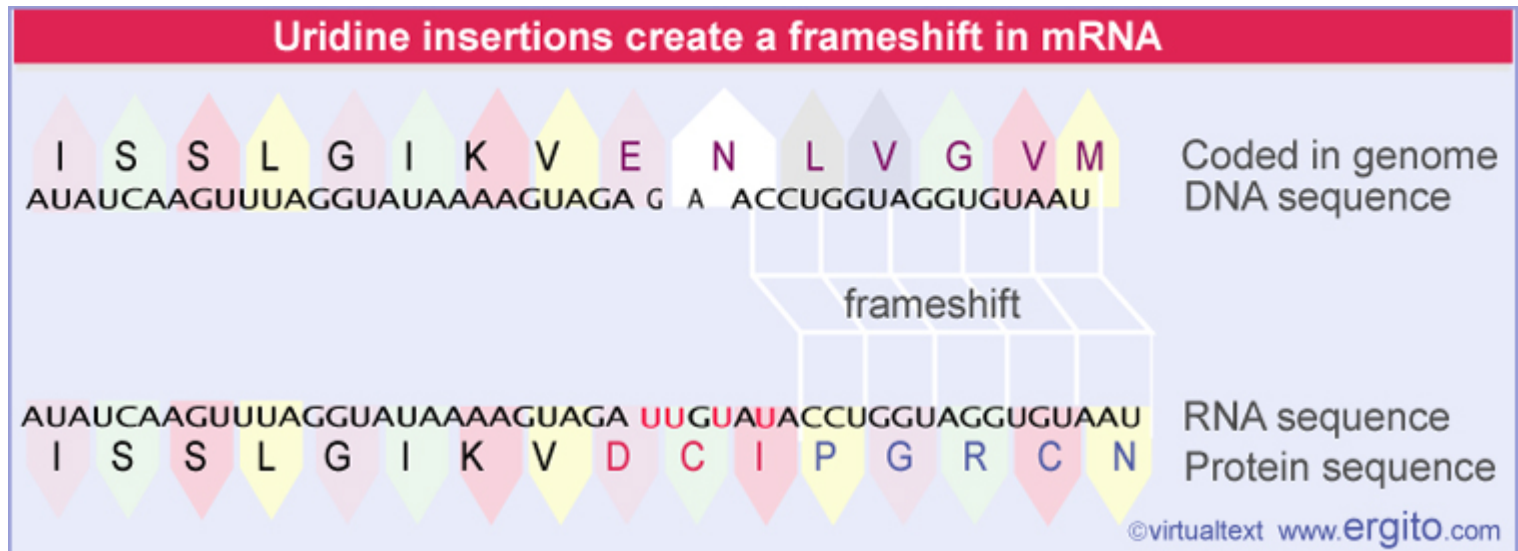
Un aspecte no contemplat en el dogma central: els prions

▪ La malaltia neurològica es pot transmetre si s'injecta proteïna purificada PrP^{Sc} a organismes que tinguen PrP

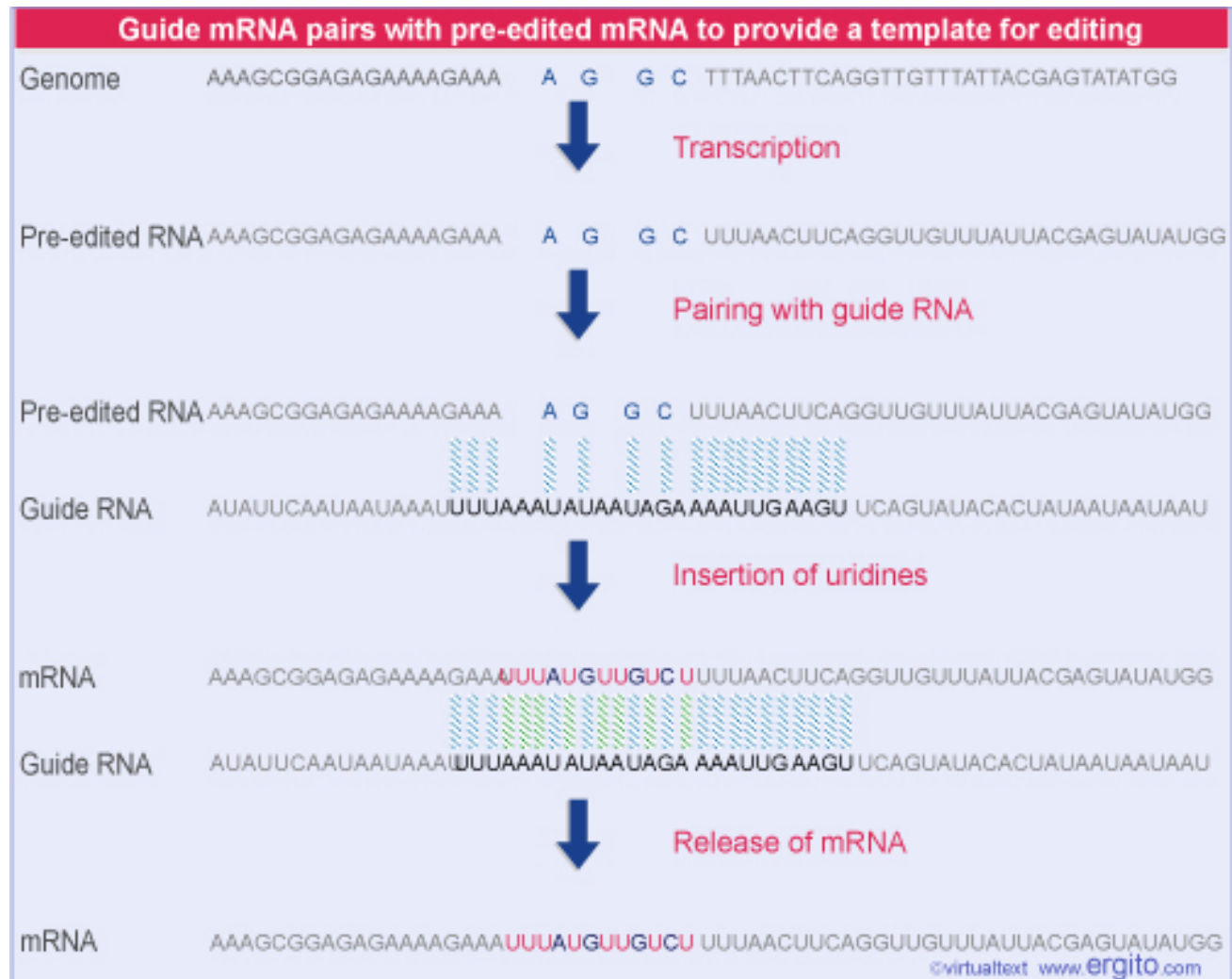
▪ La proteïna PrP^{Sc} es pot perpetuar tot i provocant que proteïnes PrP de nova síntesi adopten la forma PrP^{Sc} i no la PrP^C



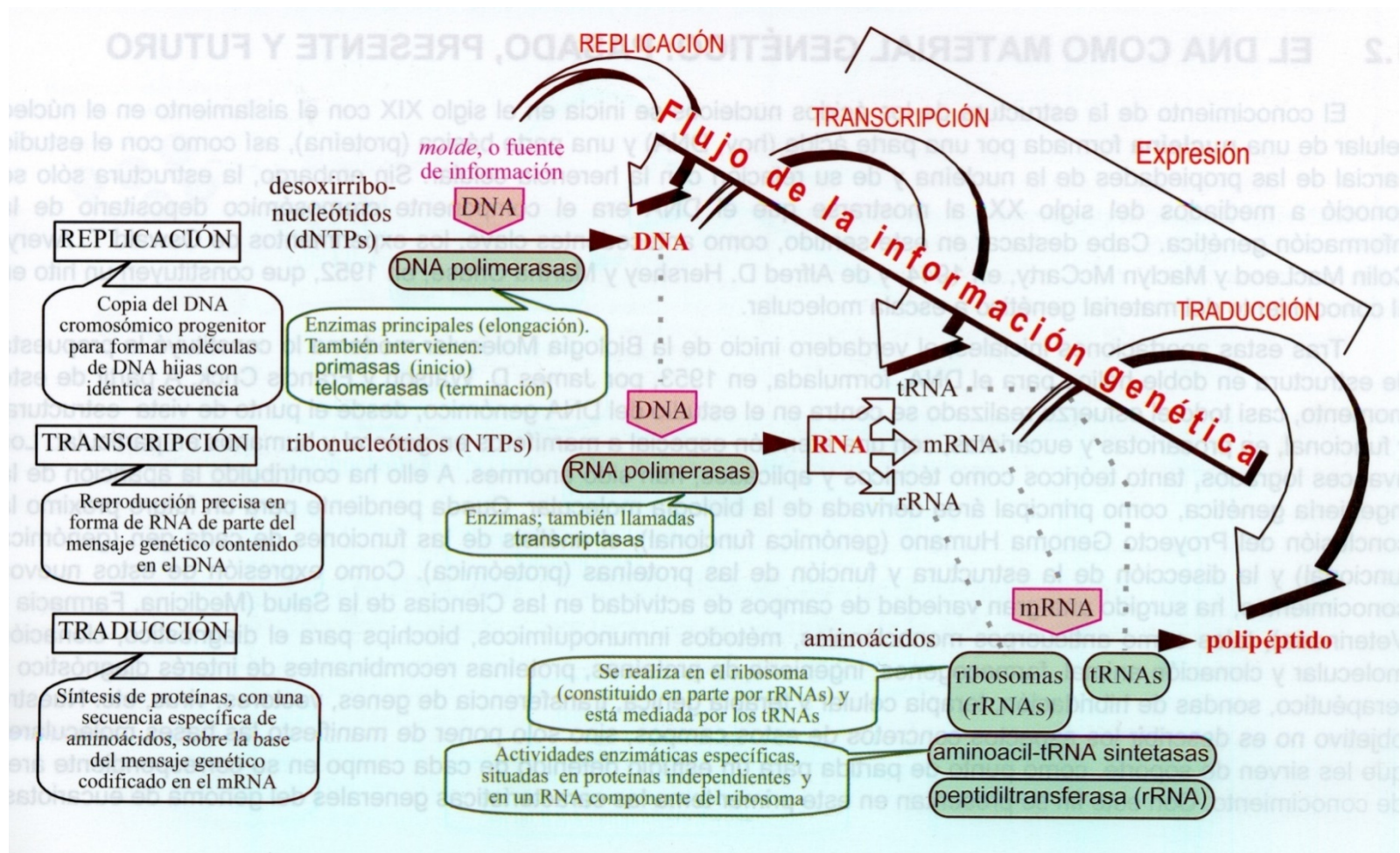
Un aspecte no contemplat en el dogma central: la correcció de l'RNA



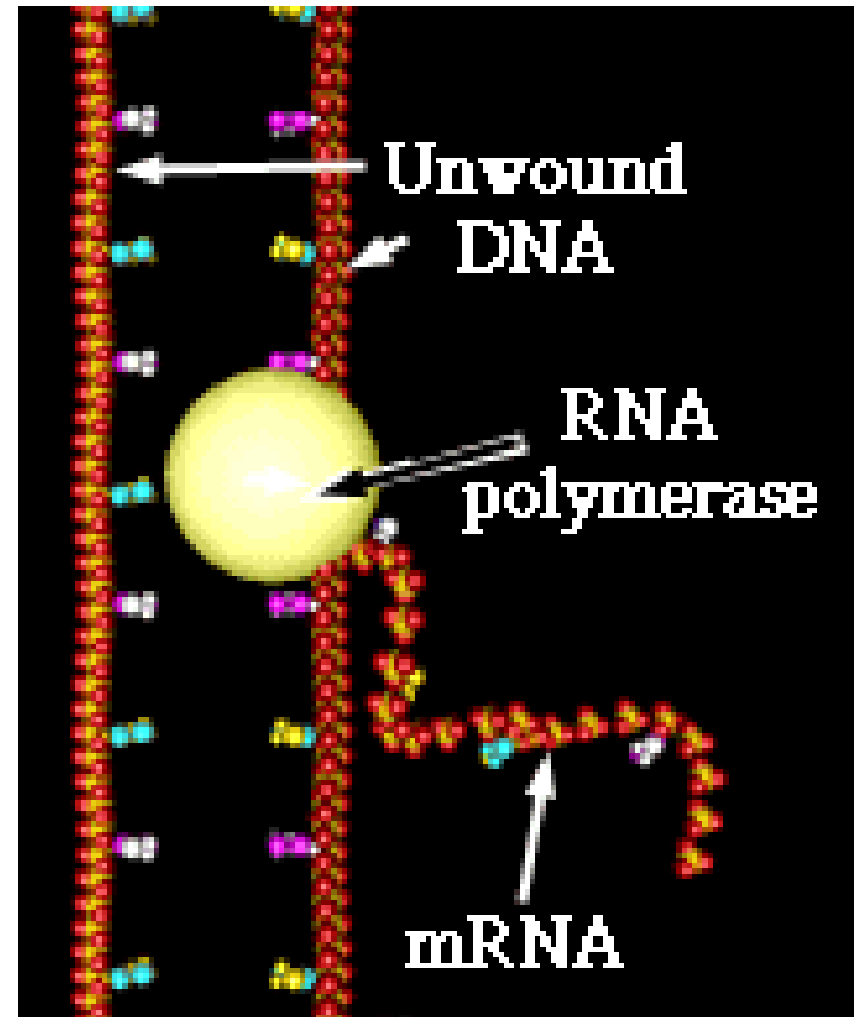
Un aspecte no contemplat en el dogma central: la correcció de l'RNA



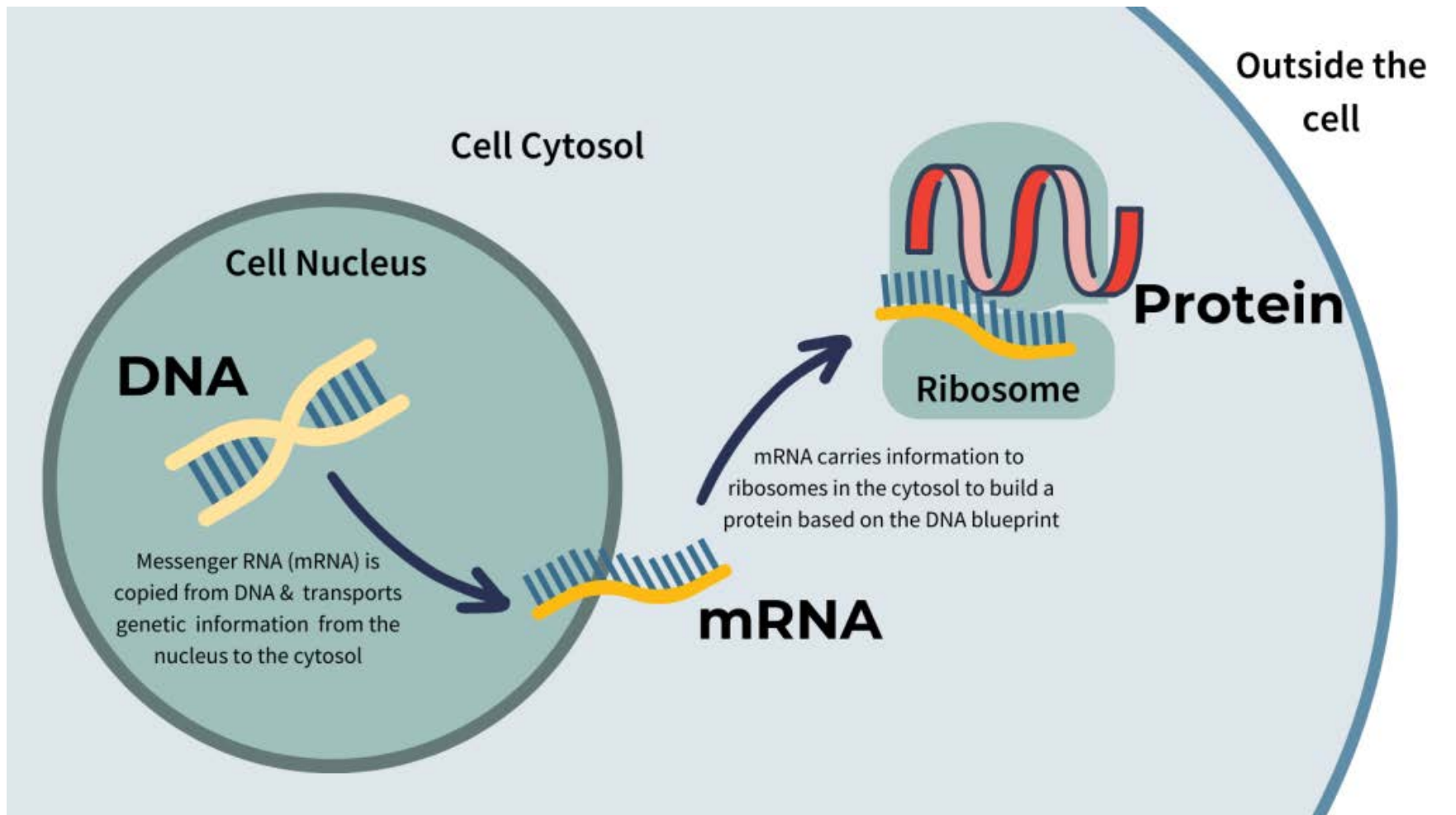
El dogma central de la biología molecular



Hipòtesi de la molècula pont.
Demostració de l'existència
de l'mRNA. Característiques
de l'mRNA. Interaccions
entre àcids nucleics i
proteïnes

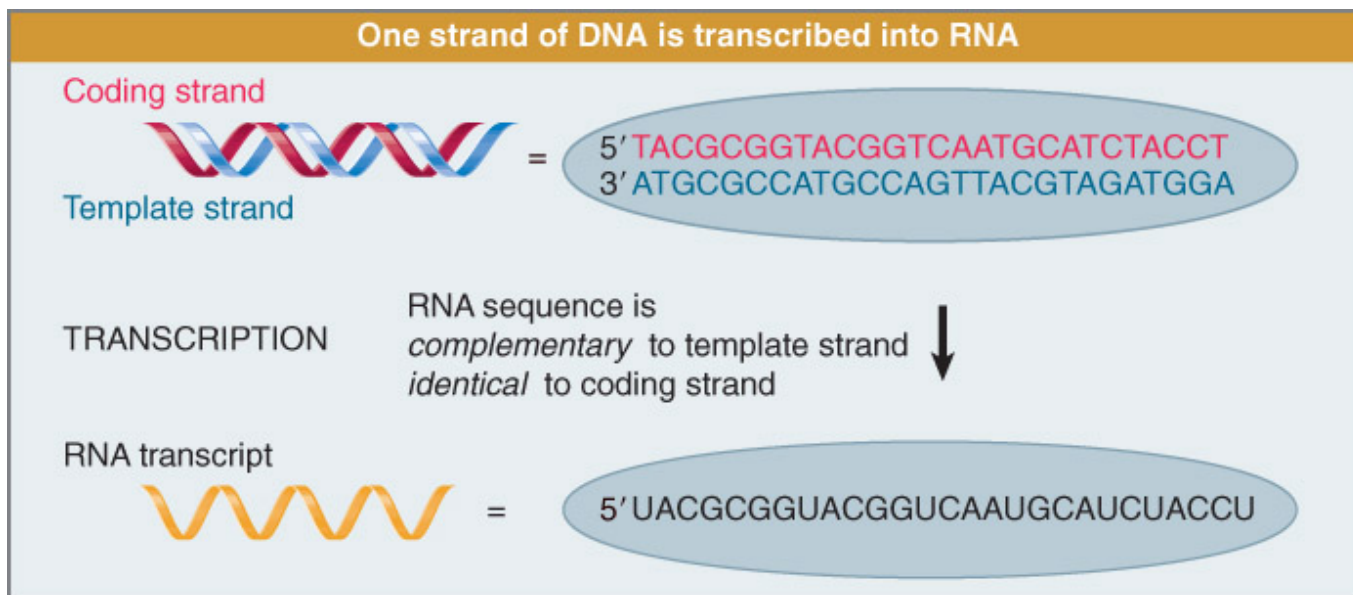


1. La transcripció i l'RNA missatger



Característiques de la transcripció

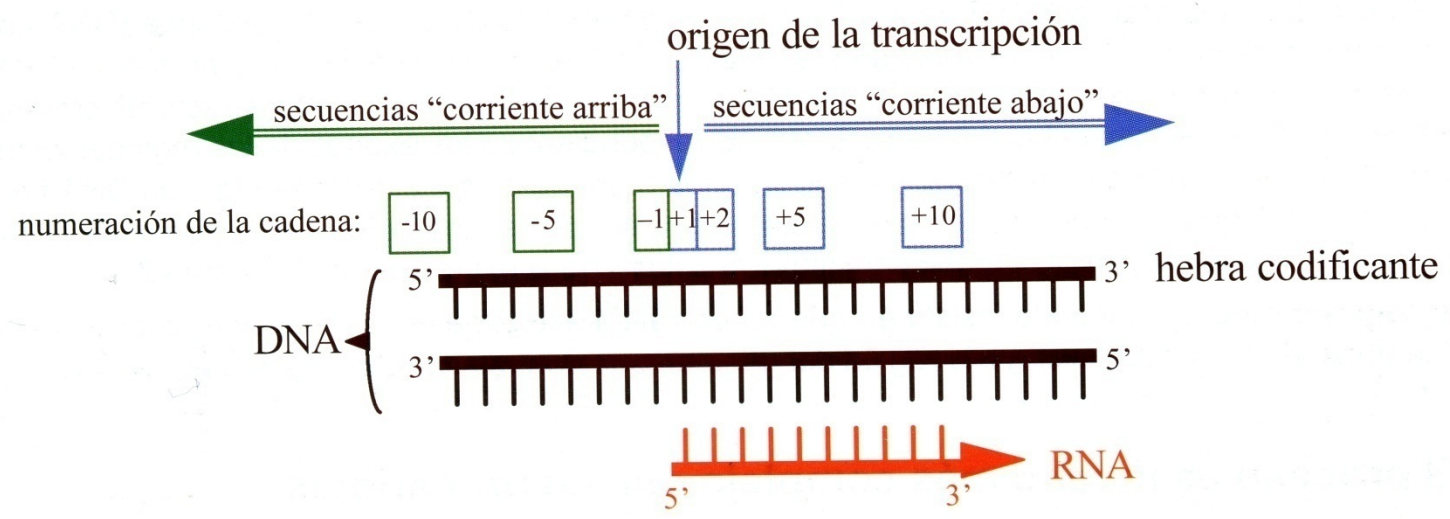
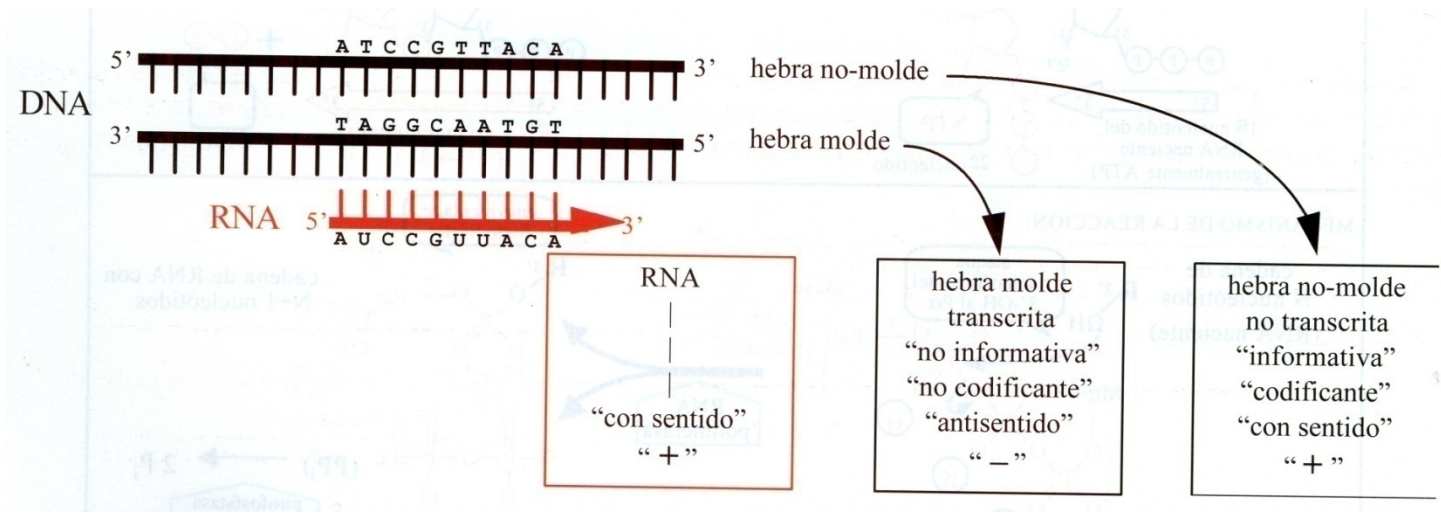
- La nova cadena sintetitzada conté ribonucleòtids
- Es copien selectivament certes parts del genoma en un nombre de còpies que pot oscil·lar entre 1 i 100-1000
- Només es copia una cadena del DNA



Característiques de la transcripció

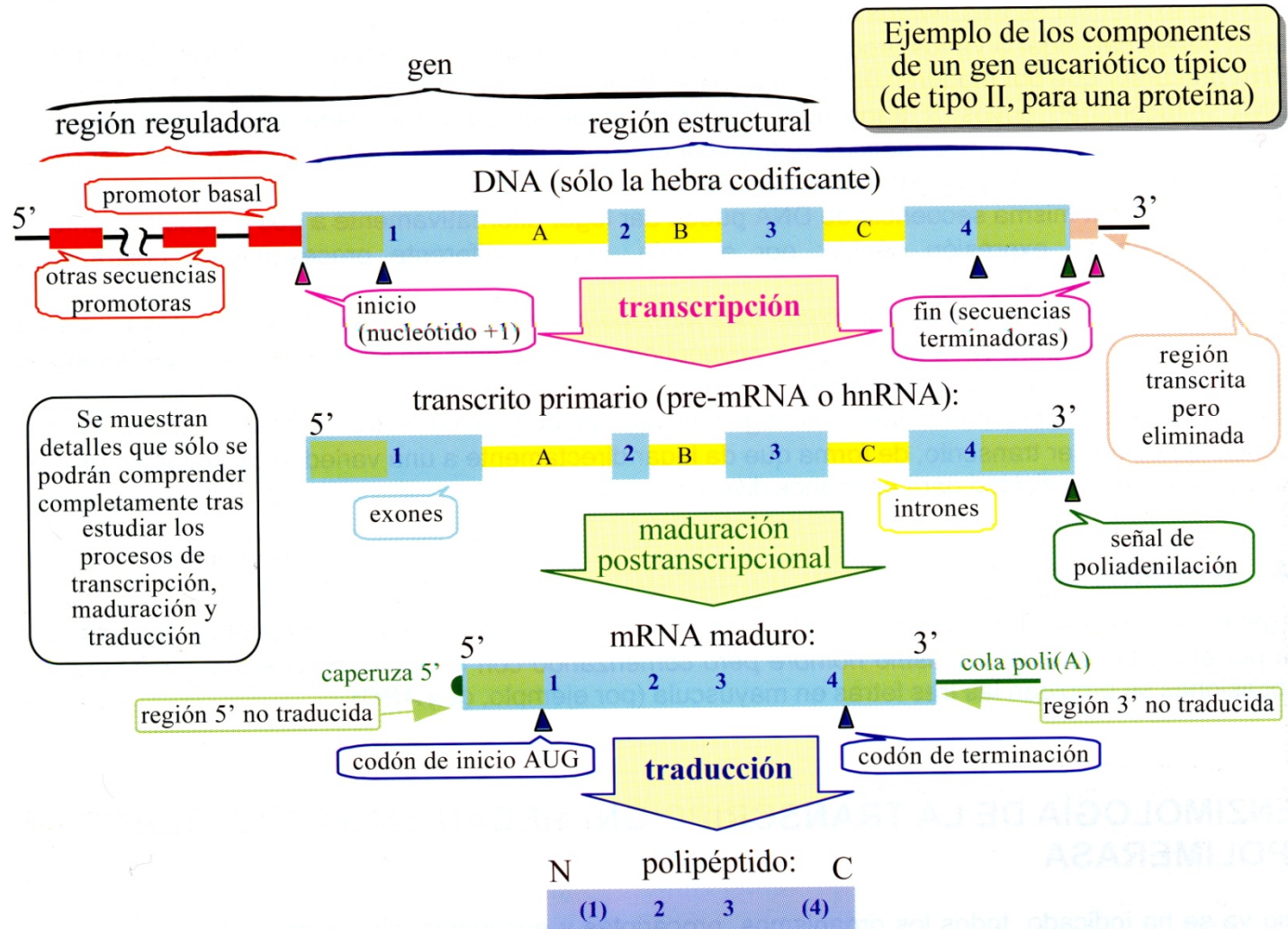
- L'enzim que catalitza la síntesi, l'RNA polimerasa, és capaç d'autoiniciar-la tot i unint els dos primers nucleòtids
- El producte de RNA no roman aparellat permanentment al motle de DNA. L'enzim desplaça la cadena en creixement després d'incorporar uns pocs nucleòtids
- La fidelitat de còpia (1 error en 10000 nt) és menor que en la replicació

Terminología



Definició de gen

Conjunt de seqüències de DNA de tot tipus, estructurals (introns i exons) i reguladores, necessàries per a codificar un producte gènic, siga aquest un RNA madur de qualsevol tipus o una proteïna funcional.



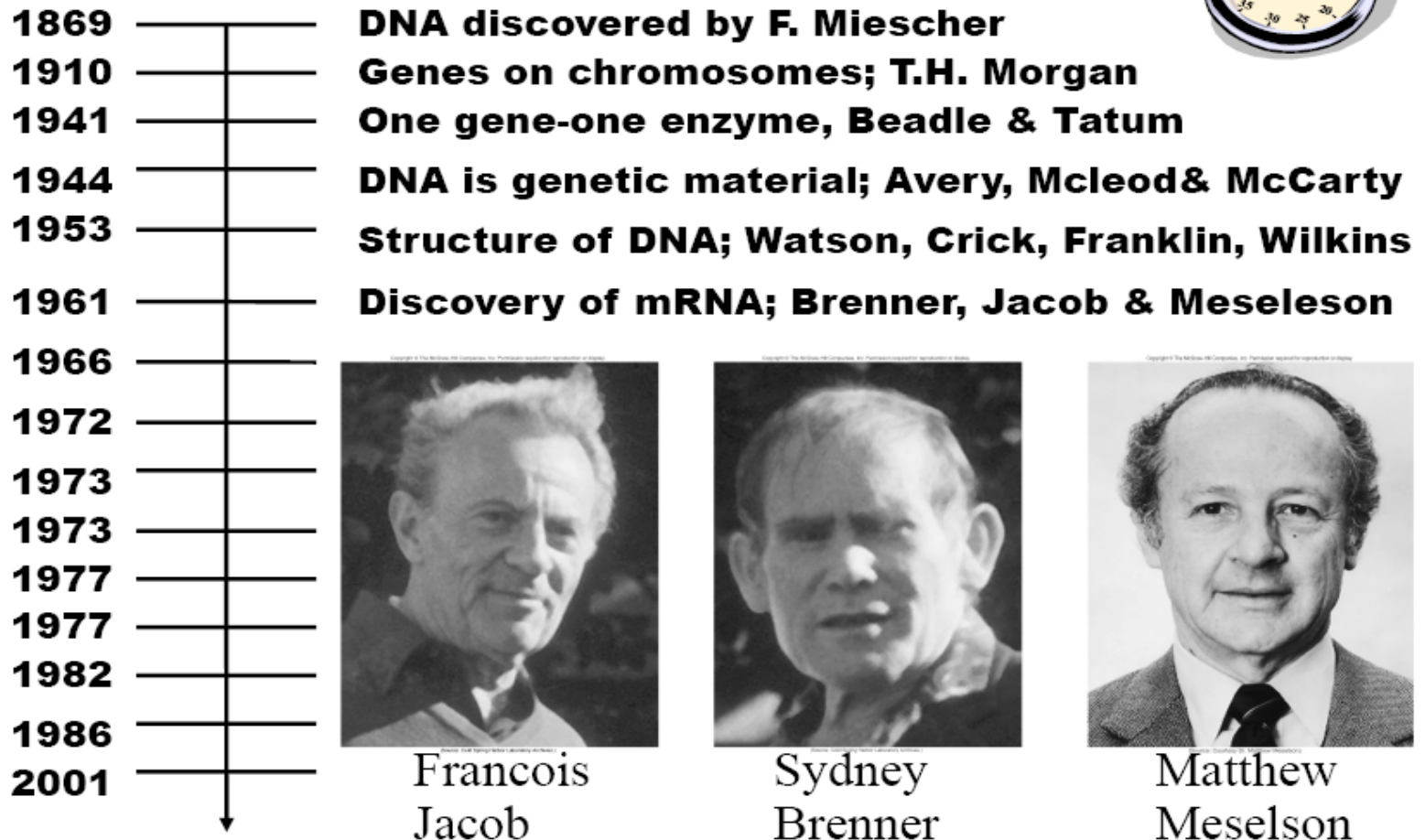
Hipòtesi de la "molècula pont" (F. Jacob i J. Monod, 1961)

El "mitjancer estructural" entre nucli i citosol hauria de tenir les propietats següents :

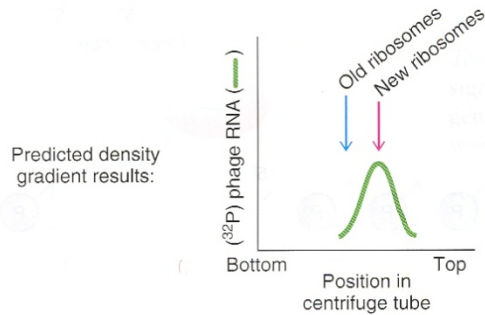
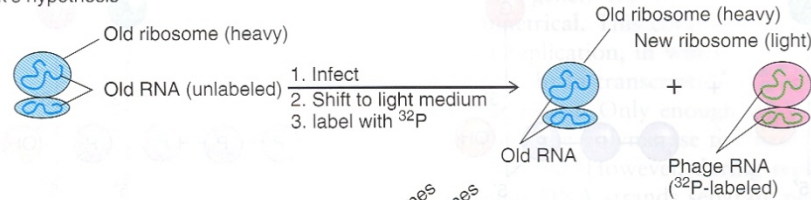
- Naturalesa polinucleotídica
- Composició en bases reflex de la del DNA
- Grandària heterogènia
- Associació transitòria amb els ribosomes
- Síntesi i degradació ràpides

Demostració de l'existència de l'mRNA (Brenner, Jacob i Messelson, 1961)

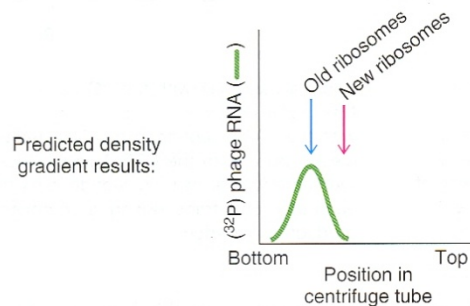
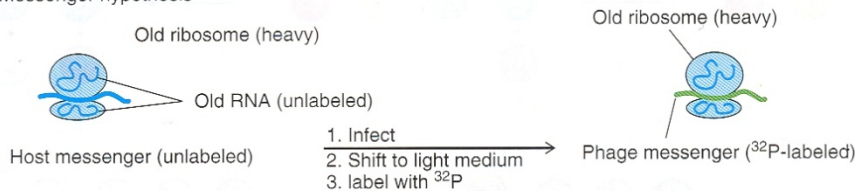
Molecular Biology Timeline



(a) Crick's hypothesis



(b) Messenger hypothesis



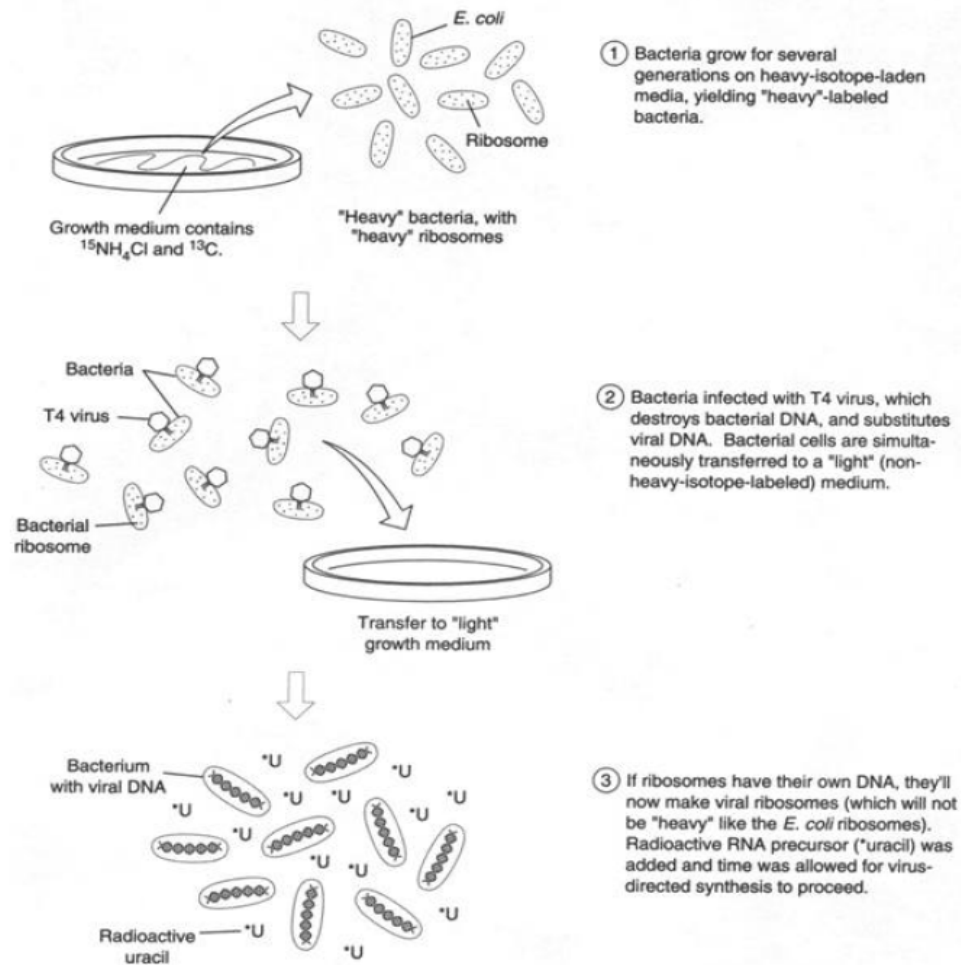
Demostració de l'existència de l'mRNA (Brenner, Jacob i Messelson, 1961)

Figure 3.12 Experimental test of the messenger hypothesis.

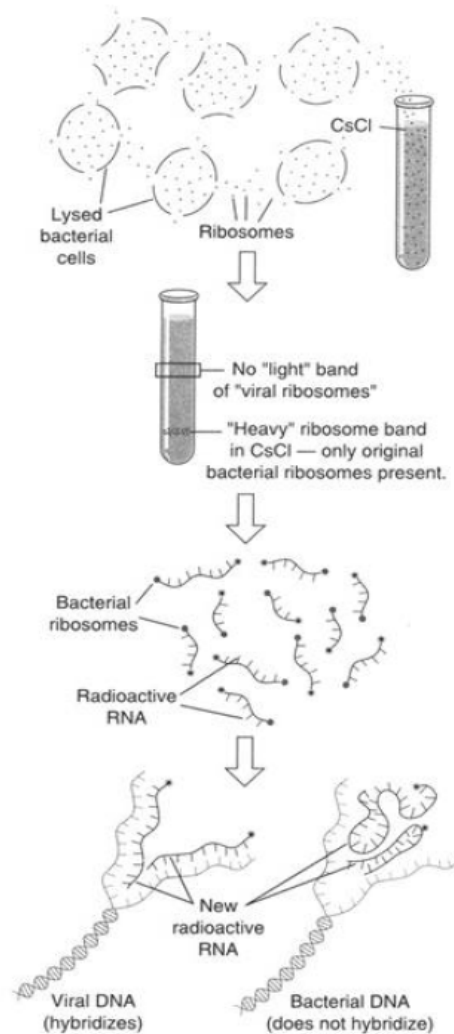
Heavy *E. coli* ribosomes were made by labeling the bacterial cells with heavy isotopes of carbon and nitrogen. The bacteria were then infected with phage T2 and simultaneously shifted to "light" medium containing the normal isotopes of carbon and nitrogen, plus some ^{32}P to make the phage RNA radioactive. **(a)** Crick had proposed that ribosomal RNA carried the message for making proteins. If this were so, then whole new ribosomes with phage-specific ribosomal RNA would have been made after phage infection. In that case, the

new ^{32}P -labeled RNA (green) should have moved together with the new, light ribosomes (pink). **(b)** Jacob and colleagues had proposed that a messenger RNA carried genetic information to the ribosomes. According to this hypothesis, phage infection would cause the synthesis of new, phage-specific messenger RNAs that would be ^{32}P -labeled (green). These would associate with old, heavy ribosomes (blue). The radioactive label would therefore move together with the old, heavy ribosomes in the density gradient. This was indeed what happened.

Demostració de l'existència de l'mRNA (Brenner, Jacob i Messelson, 1961)



Demostració de l'existència de l'mRNA (Brenner, Jacob i Messelson, 1961)



④ Bacteria lysed and ribosomes centrifuged on a CsCl gradient.

⑤ Only heavy ribosomes were present after centrifugation.

⑥ Any newly synthesized RNA is detected because it is radioactive. New radioactive RNA is associated with *old* bacterial ribosomes.

⑦ New radioactive RNA is removed from ribosomes. It hybridizes with viral single-stranded DNA and not bacterial single-stranded DNA.

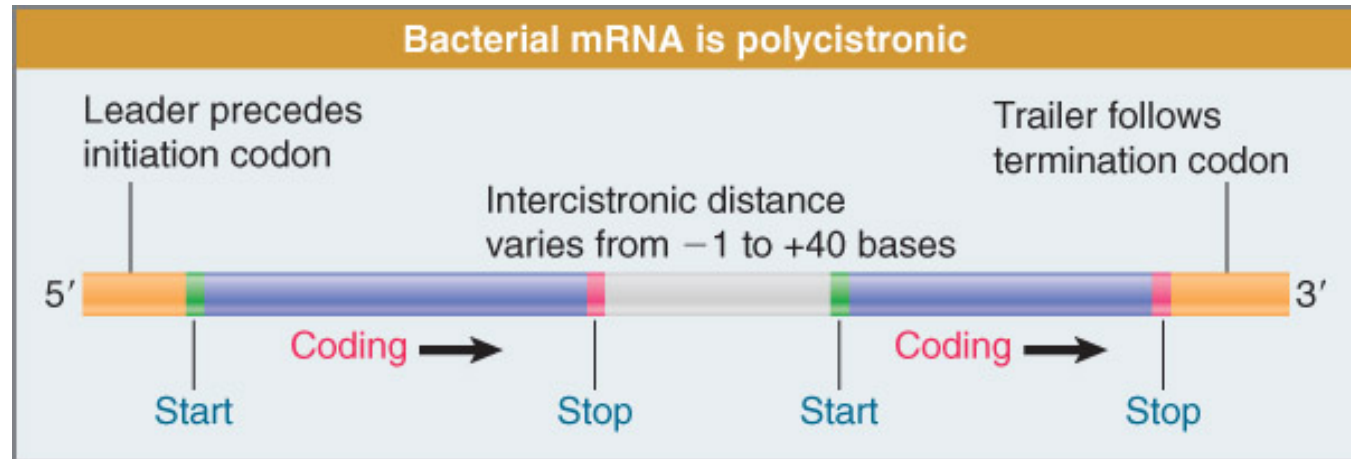
Característiques dels mRNAs

- Representen tan sols un 4% de l'RNA cel·lular total
- Heterogeneïtat en grandària
- Estabilitat baixa
- Seqüència complementària a la del DNA
- Són molècules monocatenàries amb escassa estructura secundària
- Diferències importants entre procariotes i eucariotes

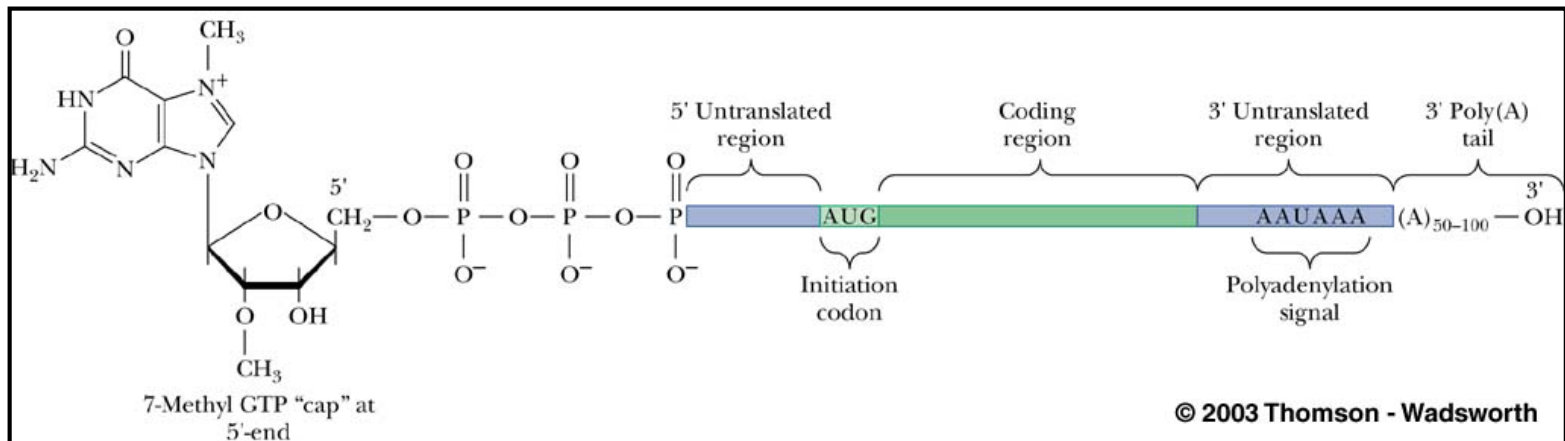
Comparació de les característiques dels mRNAs i de la transcripció entre procariotes i eucariotes

	bacteris	cèl·lules animals
Unitat de transcripció	Policistrònica	Monocistrònica
Inici (5')	Unió RNAPol-DNA	Unió RNAPol-DNA
Velocitat de l'elongació	40 nt/s	40 nt/s
Extrem 5'	Trifosfat	Caputxa, Metilat
Extrem 3'	Últimes bases de l'mRNA	Cua poliA
Generació extrem 3'	Acabament per RNAPol	Tall i poliadenilació
Transport	No	Necessari
Velocitat de la traducció	45 nt/s	20 nt/s
Vida mitjana	<5 min	>4 hores
Nre. de ribosomes/mRNA	>20	>10

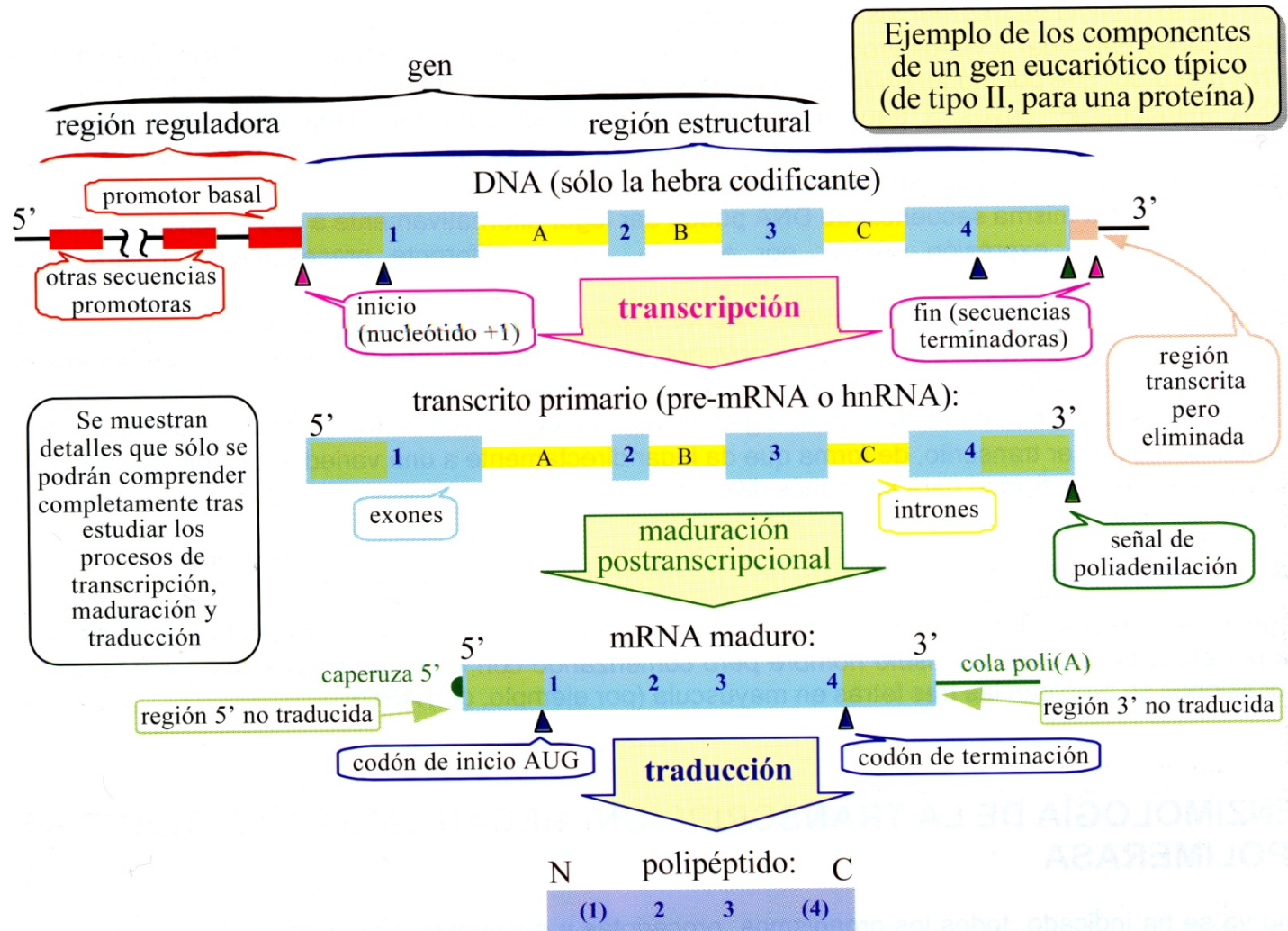
Comparació de les característiques dels mRNAs entre procariotes i eucariotes



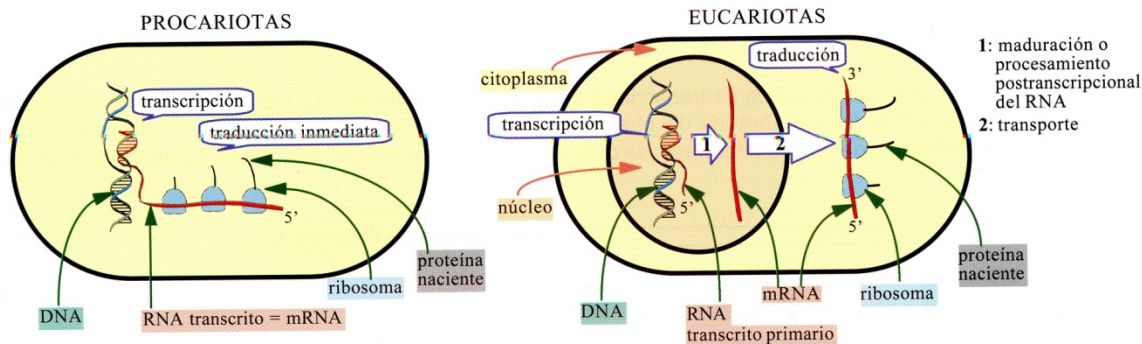
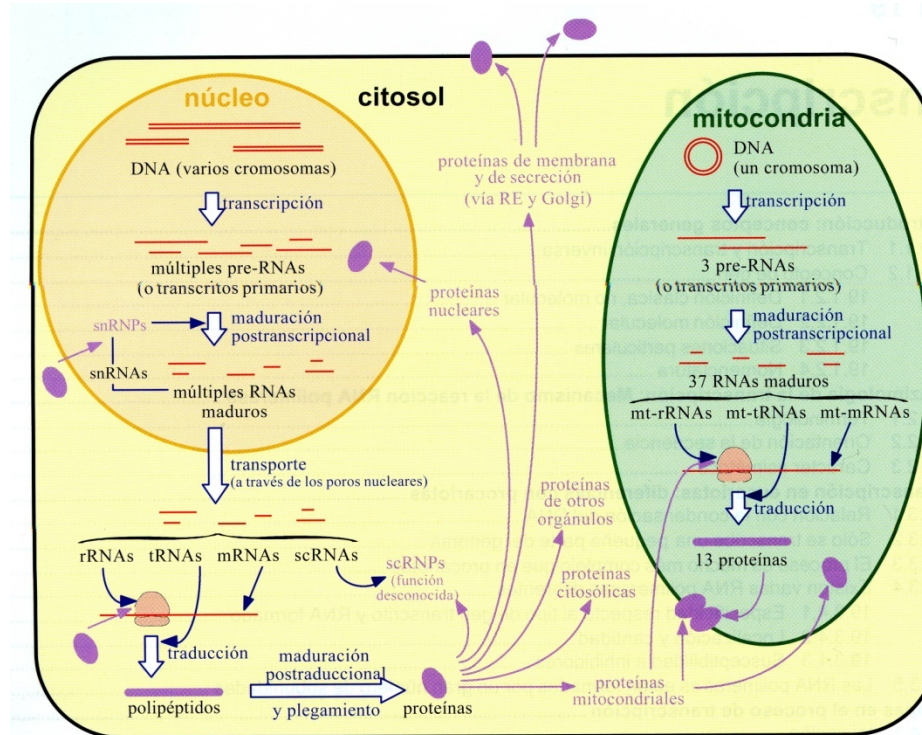
L'mRNA eucariota és monocistrònic i presenta modificacions en 5' i 3'



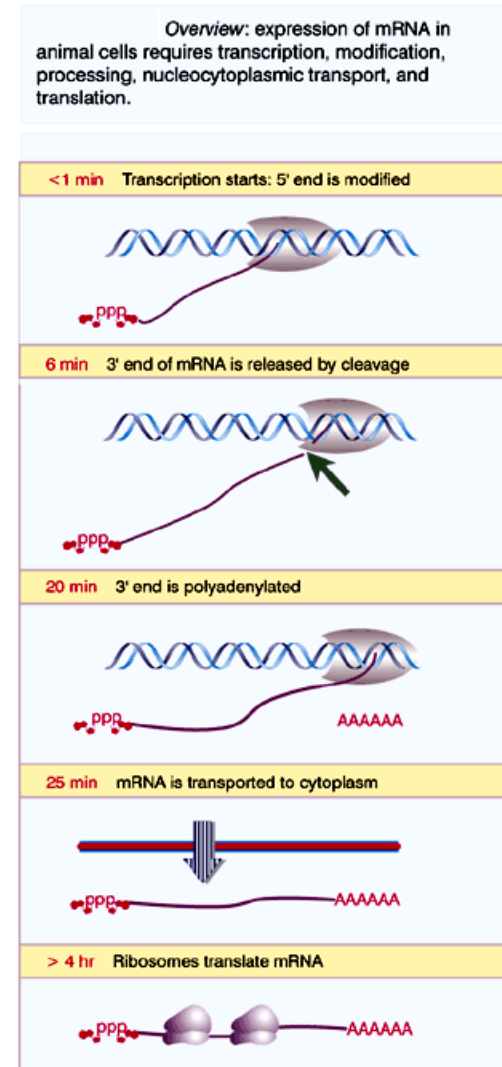
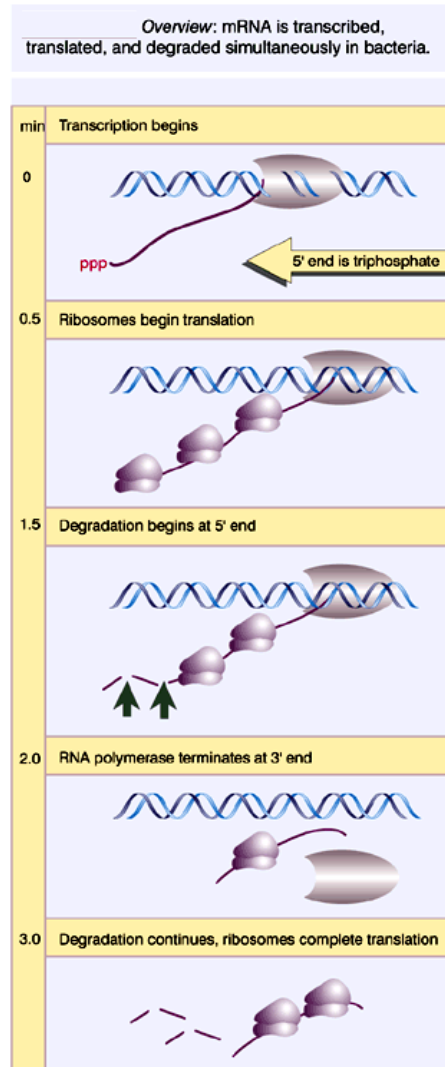
Características diferenciales dels mRNAs entre procariontes i eucariotes



Comparació de la transcripció i la traducció entre procariotes i eucariotes



Comparació de la transcripció i la traducció entre procariotes i eucariotes



Tipus d'RNAs cel·lulars

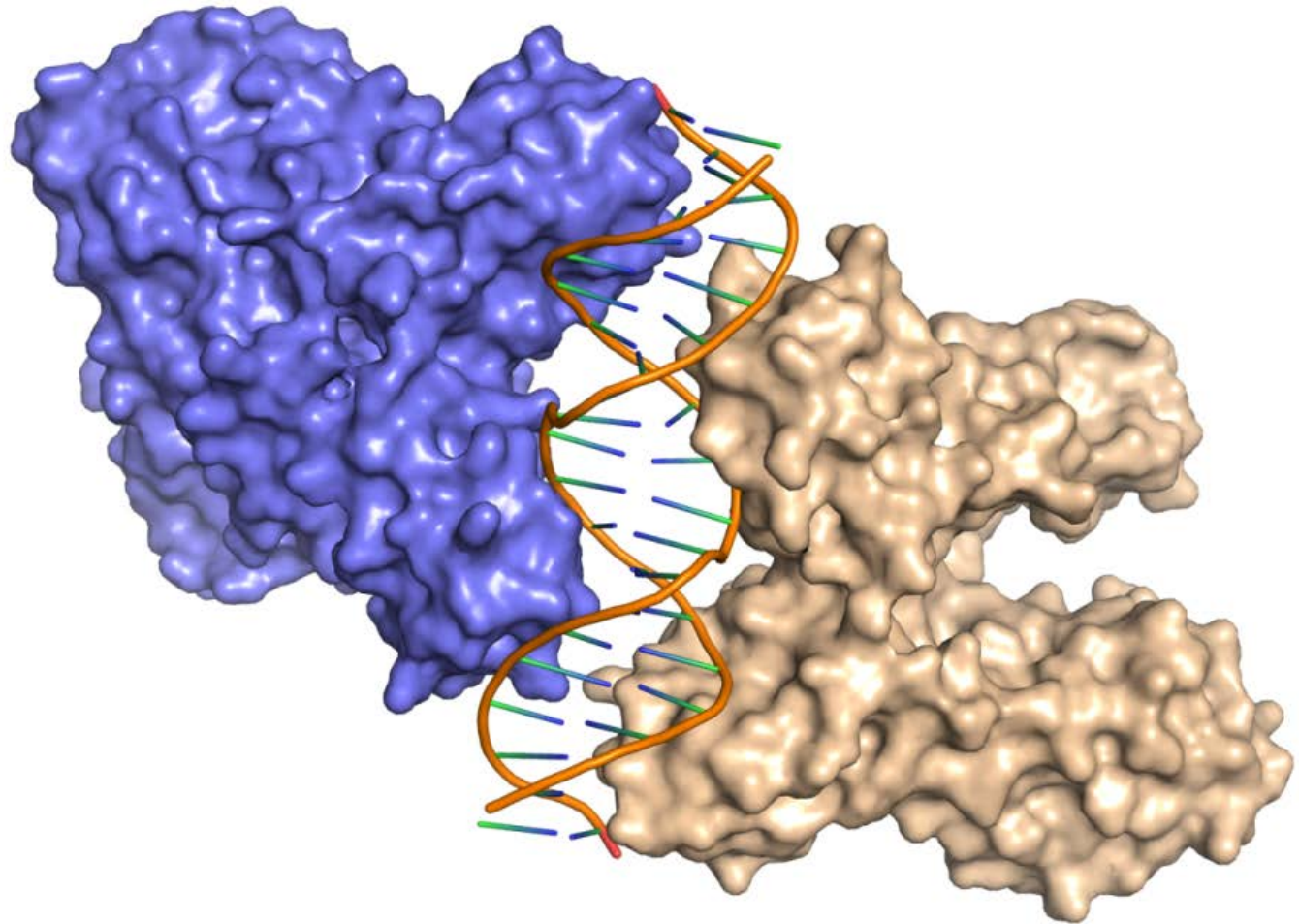
Tipus	Percentatge	Nucleòtids (aprox.)	Distribució
tRNA	15-20%	75-90	Pro., Eu. (cit.)
rRNA	75-80%	120 (5S)-5000 (28S)	Pro., Eu. (cit.)
Hi ha 3 tipus en procariotes: 16S, 23S i 5S			
Hi ha 4 tipus en eucariotes: 18S, 28S, 5.8S, 5S			
mRNA	5%	600-3000	Pro., Eu. (cit.)
hnRNA	minoritari	200-30000	Eu. (nucli)
scRNA	minoritari	90-330	Eu. (cit.)
snRNA	minoritari	58-220	Eu. (nucli)
snoRNA	minoritari		Eu. (nucli)
mtRNA	minoritari		Eu. (mit.)

Caractéristiques d'alguns RNAs naturals

TABLE 4.5 Properties of some naturally occurring RNA molecules

Source (Organism)	Designation	Function	Size (b or bp)
tRNA (transfer RNA)			
<i>E. coli</i>	tRNA ^{Leu}	Transfers leucine in protein synthesis	87 b
Yeast	tRNA ^{Phe}	Transfers phenylalanine in protein synthesis	76 b
Rat	tRNA ^{Ser}	Transfers serine in protein synthesis	85 b
rRNA (ribosomal RNA)			
<i>E. coli</i>	5S RNA	Part of ribosome structure	120 b
	16S RNA	Part of ribosome structure	1542 b
	23S RNA	Part of ribosome structure	2904 b
mRNA (messenger RNA)			
Chicken	mRNA _{LYS}	Messenger RNA for protein lysozyme	584 b
Rat	mRNA _{SA}	Messenger RNA for protein serum albumin	~2030 b
vRNA (viral RNA)			
Polio virus	Polio RNA	Genome of the virus	7440 b
Cytoplasmic polyhedrosis virus of tussock moth	CPV RNA	Genome of the virus	Ten double-stranded molecules, ~890 to ~5150 bp
miRNA (microRNA), siRNA (small interfering RNA)			
All or most eukaryotes	miRNA, siRNA	Control of gene expression	21–24 b

2. Interaccions entre àcids nucleics i proteïnes



Interaccions entre àcids nucleics i proteïnes: tipus

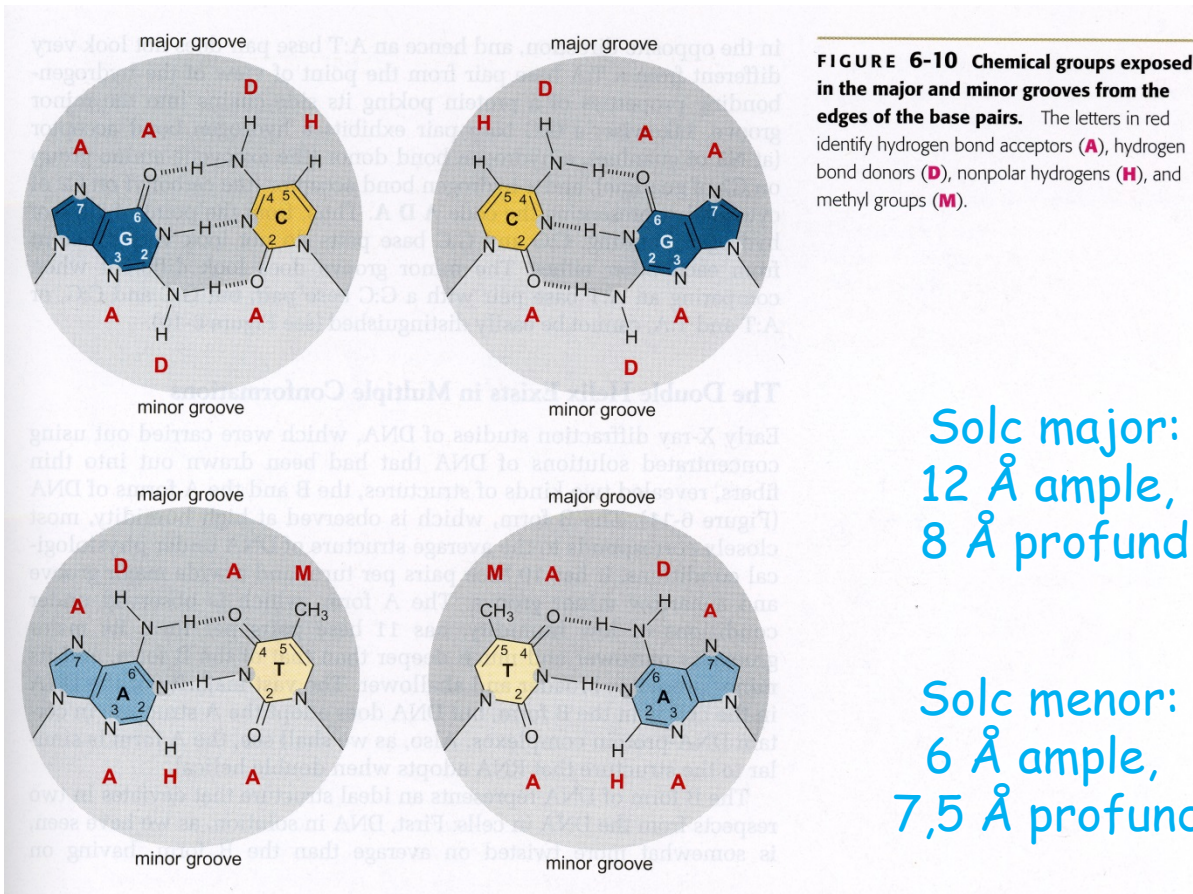
Inespecífiques: entre aminoàcids de les proteïnes i l'esquelet sucre-fosfat dels àcids nucleics. Poden implicar interaccions iòniques, mitjançant ponts d'hidrogen i/o de van der Waals i d'apilament. Exemple: interaccions entre histones i DNA en l'estructura de la cromatina

Específiques: entre aminoàcids de les proteïnes i bases nitrogenades dels àcids nucleics. Es basen en interaccions mitjançant ponts d'hidrogen principalment. Són fonamentals en el context de la transcripció (interaccions proteïna-DNA) i de processos post-transcripcionals (interaccions proteïna-RNA).

Interaccions específiques entre àcids nucleics i proteïnes

Impliquen el reconeixement entre elements estructurals d'ambdós tipus de macromolècules.

Per part del DNA: solcs

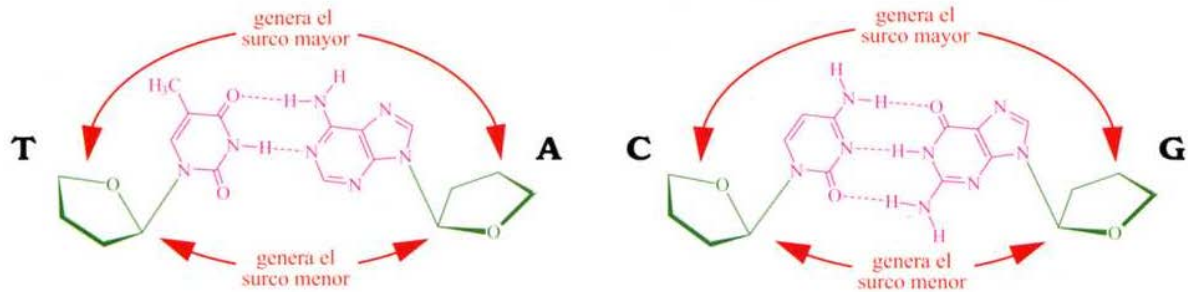


Per part de l'RNA:
elements
característics de
l'estructura
secundària

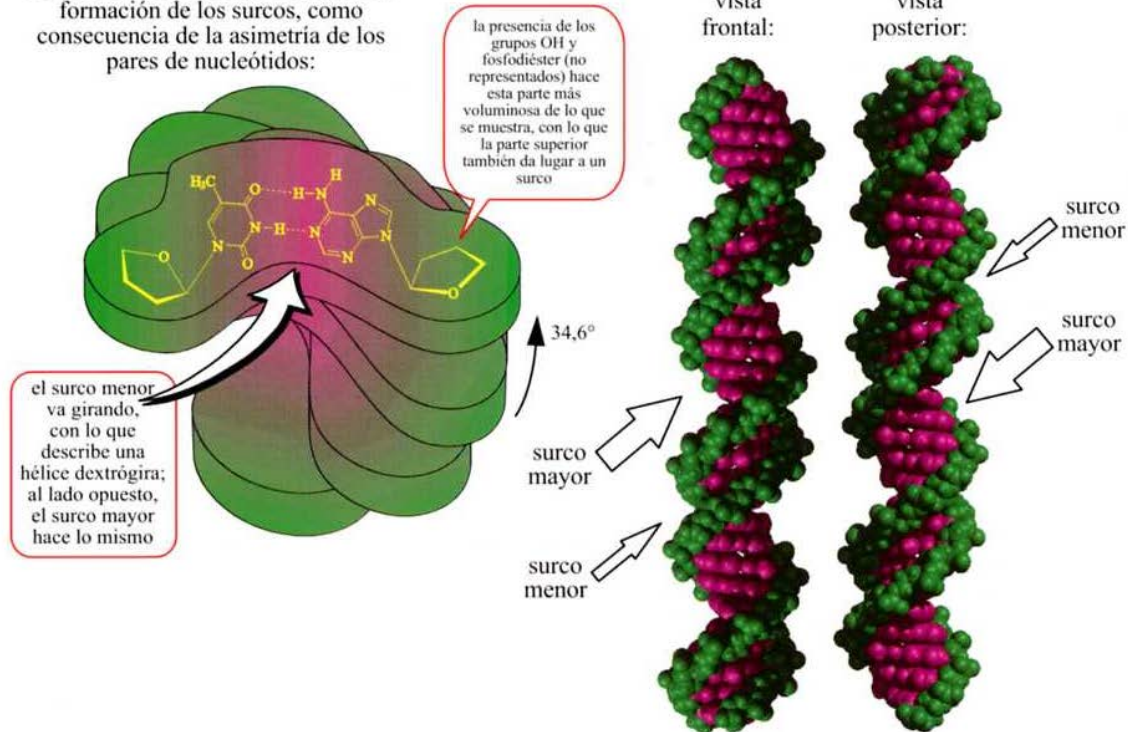
Solc major:
12 Å ample,
8 Å profund

Solc menor:
6 Å ample,
7,5 Å profund

Estructura del DNA-B: solcs



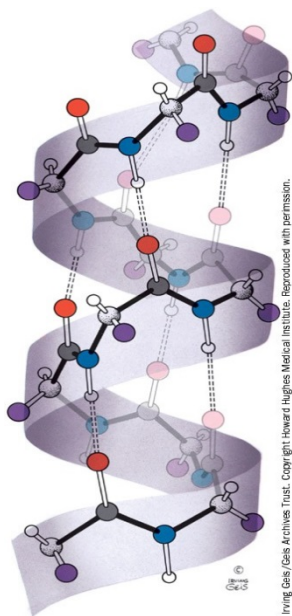
Modelo simplificado para apreciar la formación de los solcos, como consecuencia de la asimetría de los pares de nucleótidos:



Interaccions específiques entre àcids nucleics i proteïnes

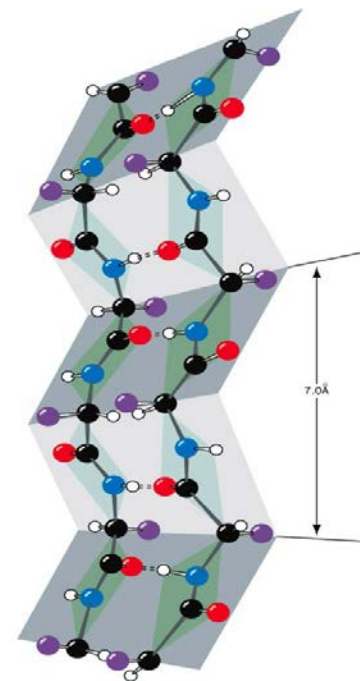
Impliquen el reconeixement entre elements estructurals d'ambdós tipus de macromolècules.

Per part de les proteïnes: cadenes laterals d'aminoàcids que resten disposades cap a l'exterior en el context de les estructures secundàries que adopten



Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

hèlix α



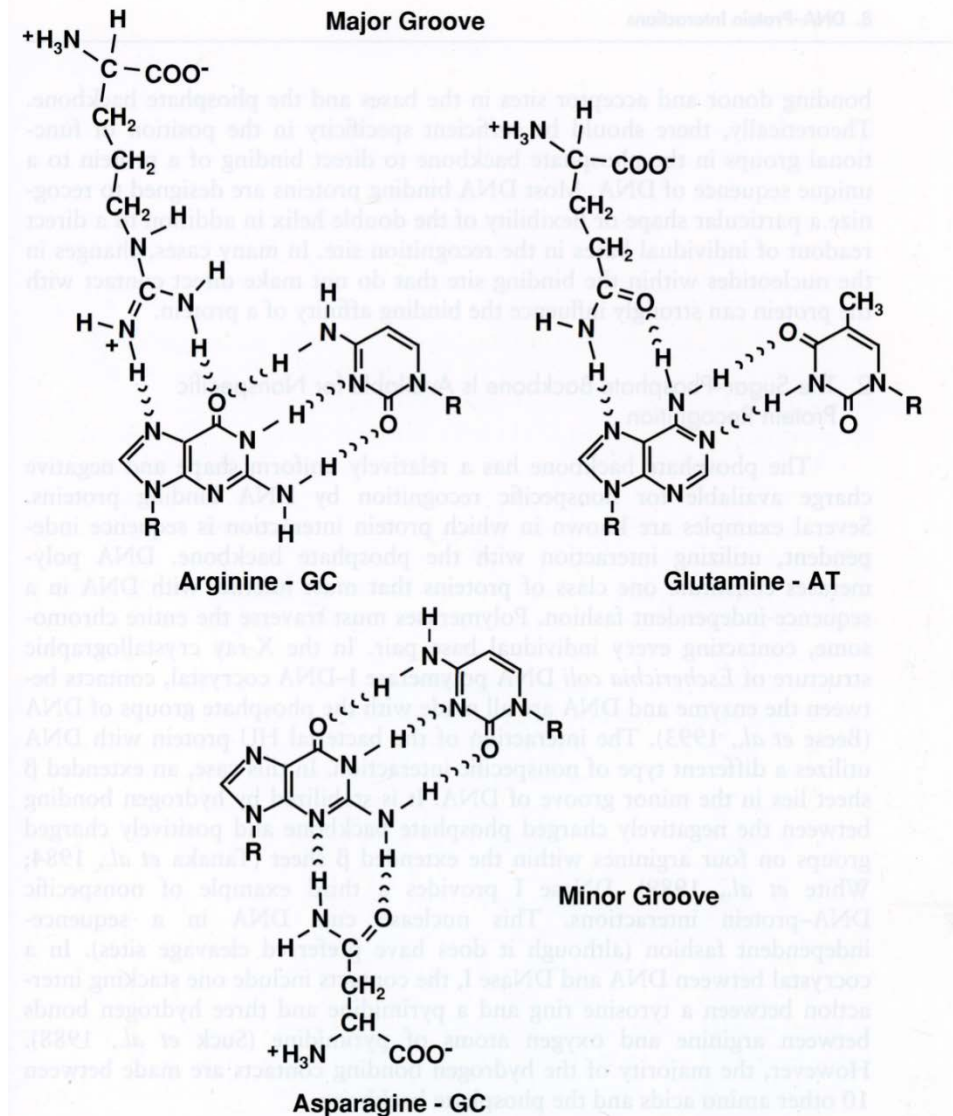
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

full β

Interaccions específiques entre àcids nucleics i proteïnes

Impliquen el reconeixement entre elements estructurals d'ambdós tipus de macromolècules.

Exemple:



Interaccions específiques entre proteïnes i DNA

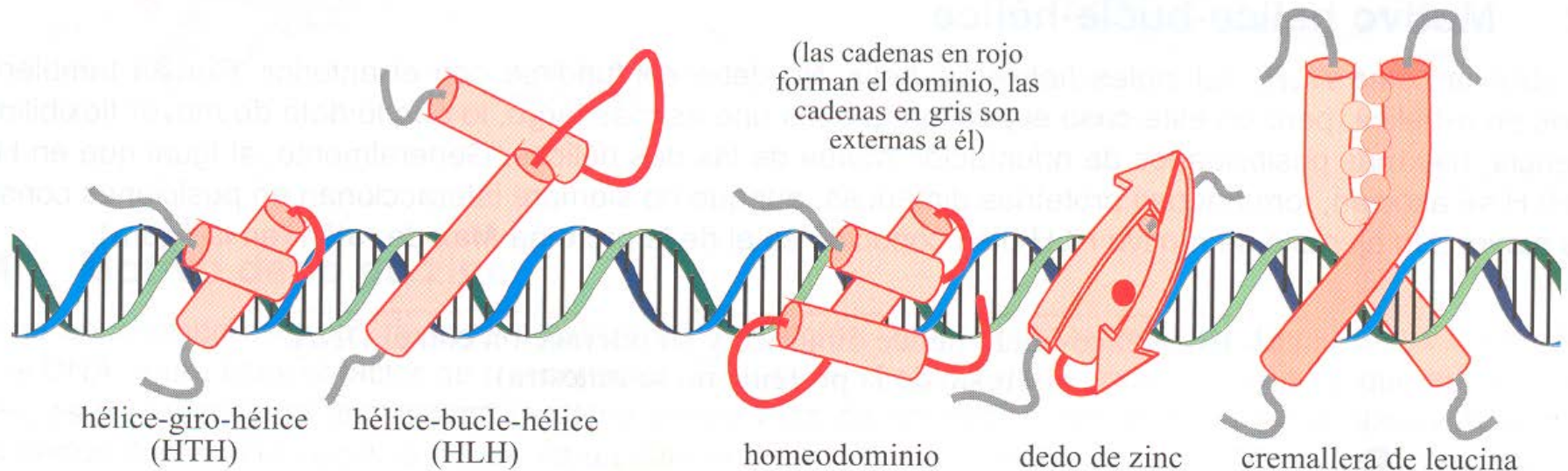
Per tal d'assolir una alta estabilitat en els complexos proteïna-DNA sovint:

- en el DNA existeixen repeticions directes o invertides de la seqüència de reconeixement
- hi ha repeticions dels motius estructurals en les proteïnes o aquestes actuen en forma de dímer
- junt amb interaccions de naturalesa específica existeixen d'altres inespecífiques

Cal diferenciar en les proteïnes entre dominis de reconeixement i dominis de dimerització

Motius estructurals en les proteïnes que interaccionen específicament amb el DNA

Descripció de los motivos estructurals més freqüents



Domini hèlix-volta-hèlix

Domini de reconeixement habitual en activadors i repressors transcripcionals procariòtics

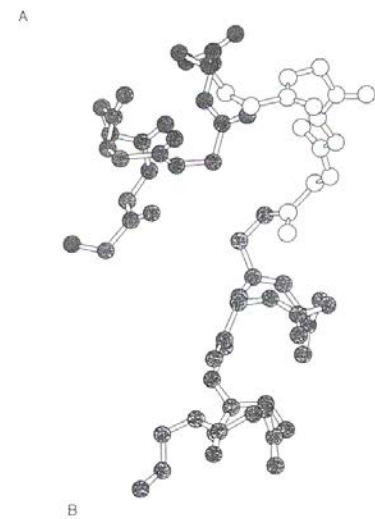
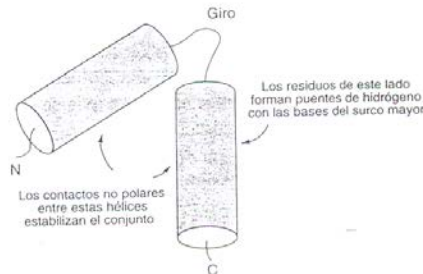
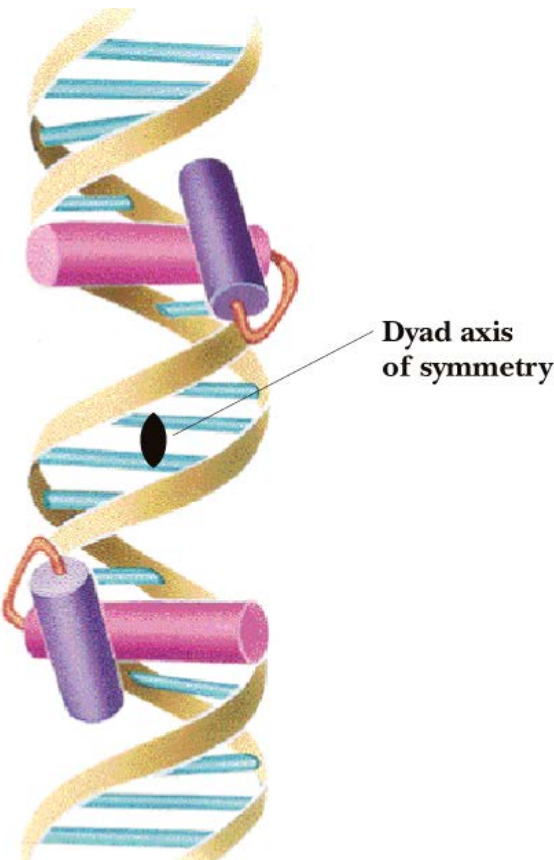
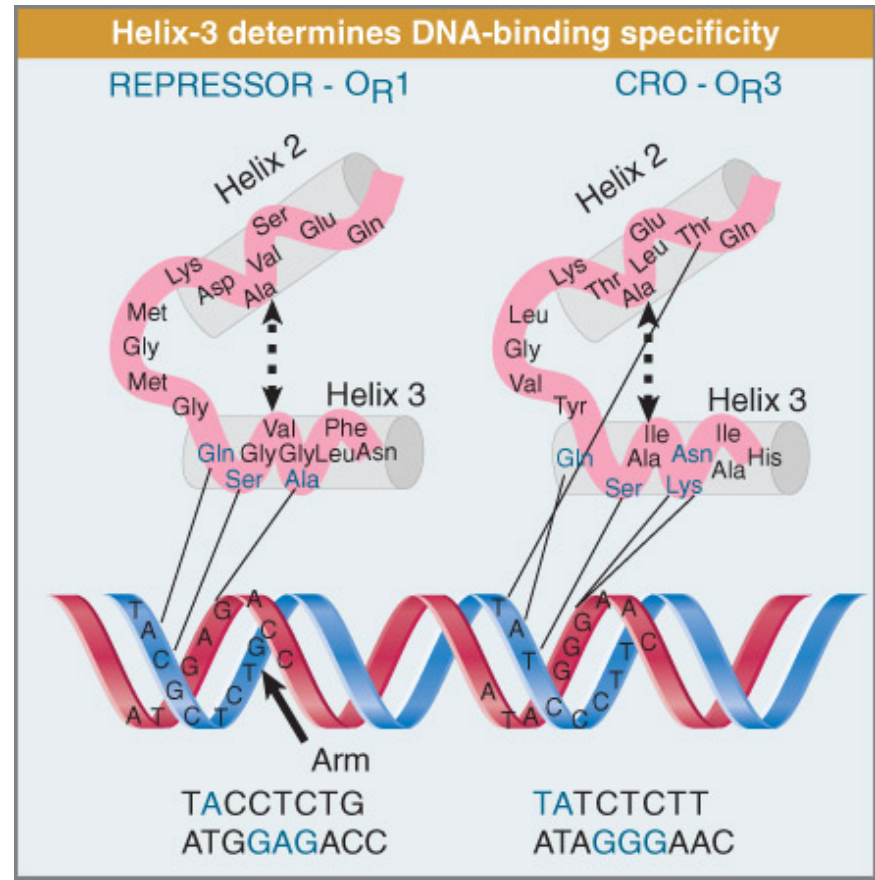
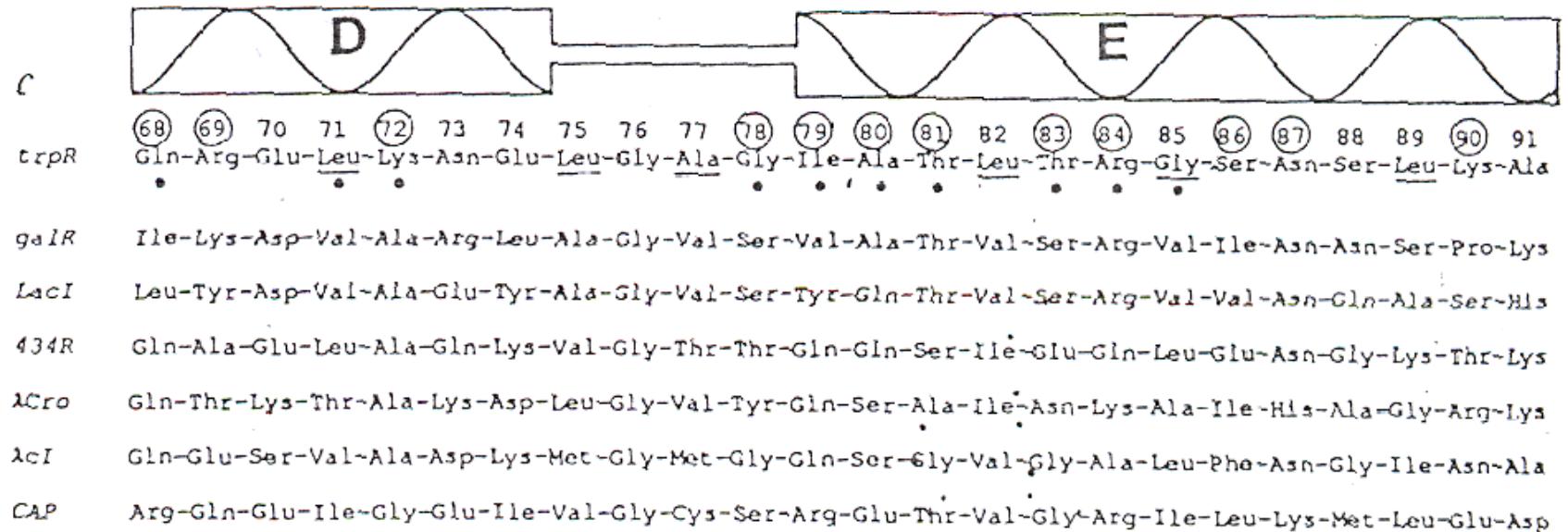


FIGURA 36-29 Motivo hèlice-giro-hèlice de las proteínas que se unen al DNA. (A) Diagrama esquemàtico. (B) Modelo de bolas y varillas del motivo HTH del repressor λ . La hèlice N-terminal se muestra en rojo, el giro en amarillo y la hèlice C-terminal en verde. [La parte B se ha dibujado a partir de 1mb.pdb. L.J. Beamer y C.O. Pabo. *J. Mol. Biol.* 227(1992):177.]

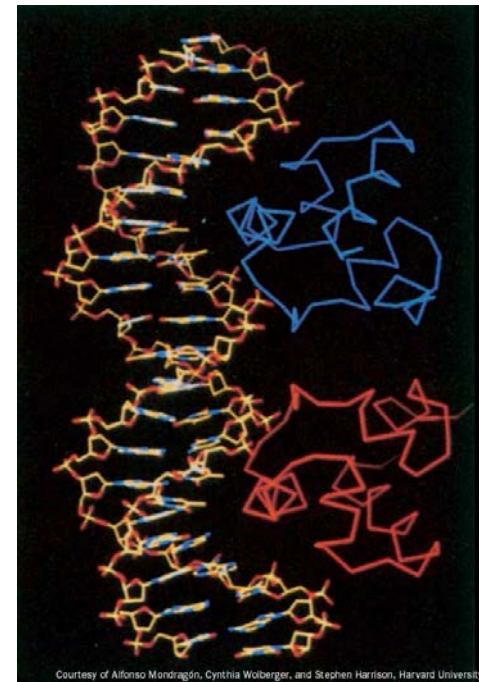
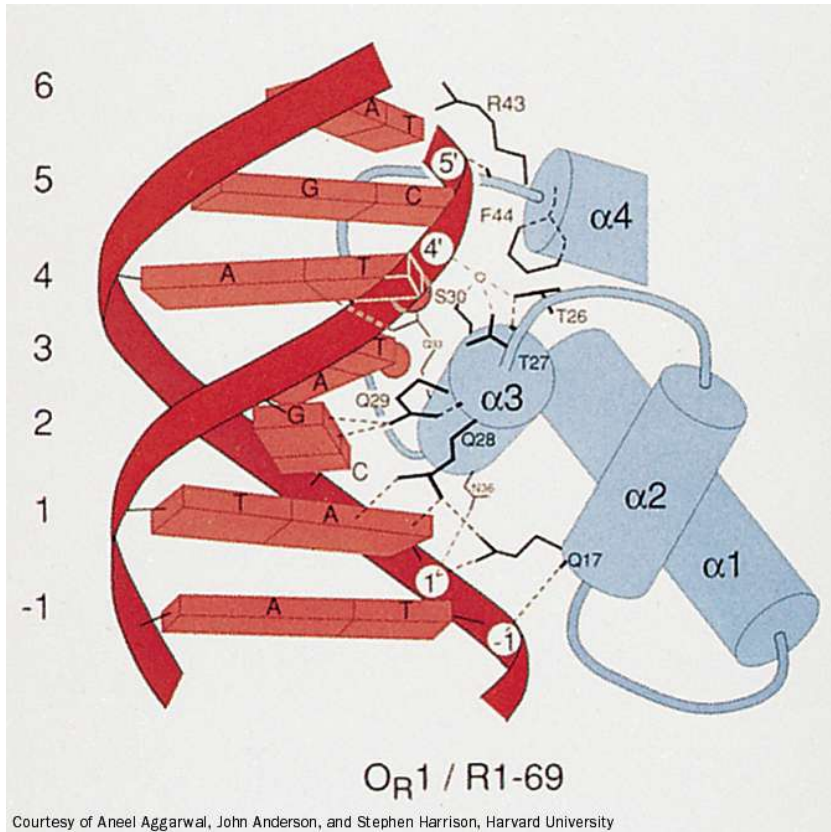


Domini hèlix-volta-hèlix



20-24 aminoàcids: 1-7 formen la primera hèlix, 12 al 20-24 la segona i 8-11 el gir

Domini hèlix-volta-hèlix



Estructura de raigs X del complex format pel domini N-terminal del repressor del fag 434 i el DNA diana.

Homeodomini

Es tracta d'un mòdul que presenta certes semblances amb el domini hèlix-volta-hèlix i s'ha trobat en proteïnes d'eucariotes

The homeodomain is a module of 60 amino acids

	1	N-terminal arm									10	Helix 1									20	
En	Glu	Lys	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	Phe	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Arg	Glu	Phe	Asn	Glu
Antp	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe	His	Phe
Oct-2	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	Ser	Ile	Glu	Thr	Asn	Val	Arg	Phe	Ala	Leu	Glu	Lys	Ser	Phe	Leu	Ala
											30	Helix 2									40	
En		Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Arg	Arg	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Leu	Gly	Leu			
Antp		Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu			
Oct-2		Asn	Glu	Lys	Pro	Thr	Ser	Glu	Glu	Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln	Leu	His	Met			
	41										50	Helix 3									60	
En	Asn	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Lys	Arg	Ala	Lys	Ile	Lys	Lys	Ser	Asn		
Antp	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn		
Oct-2	Glu	Lys	Glu	Val	Ile	Arg	Val	Trp	Phe	Cys	Asn	Arg	Arg	Gln	Lys	Glu	Lys	Arg	Ile	Asn		

Homeodomini

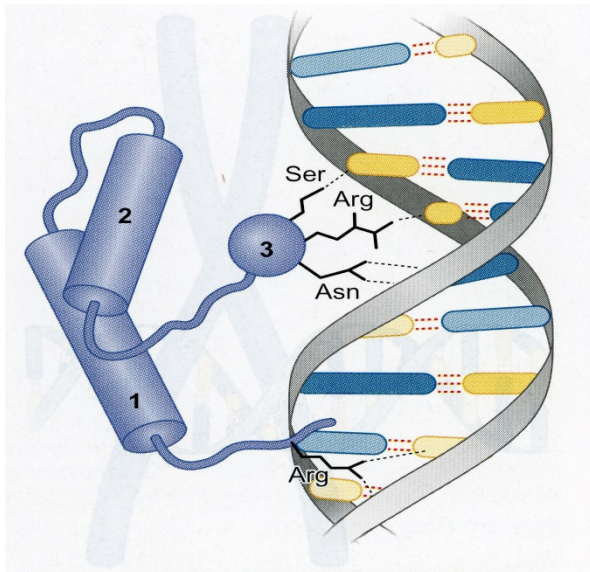
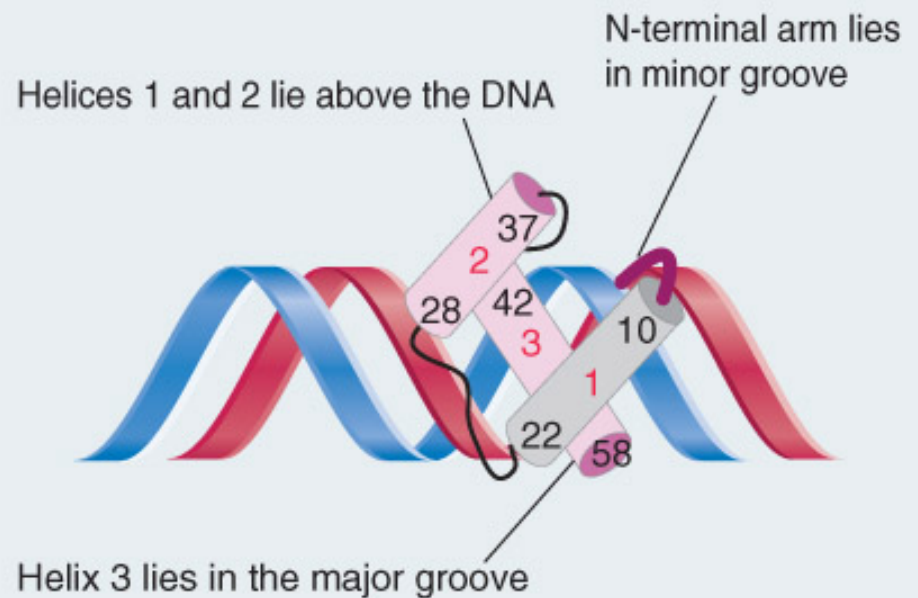


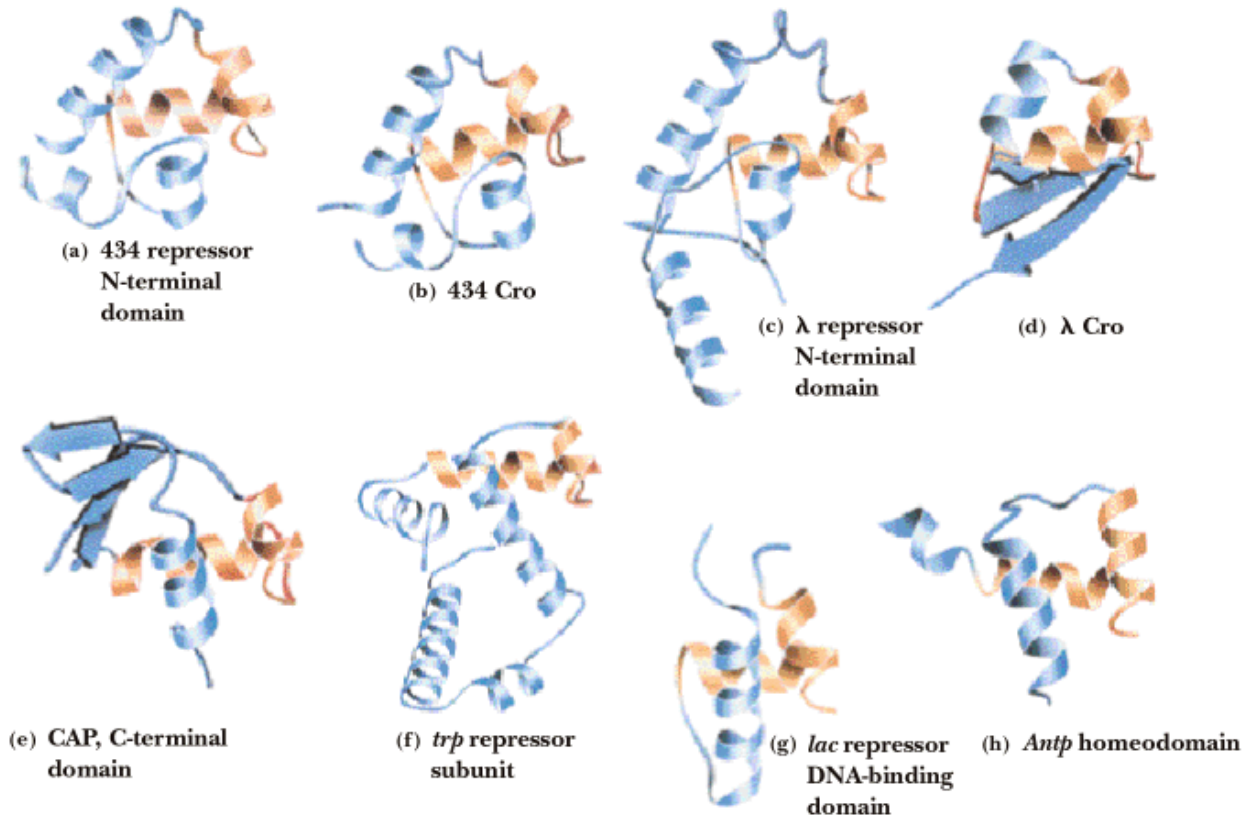
FIGURE 17-5 DNA recognition by a homeodomain. The homeodomain consists of three α helices, of which two (helices 2 and 3 in the figure) form the structure resembling the helix-turn-helix motif (compare this figure with Figure 16-12, for example). Thus, helix 3 is the recognition helix and, as shown, it is inserted into the major groove of DNA. Amino acid residues along its outer edge make specific contacts with base pairs. In the case shown, the yeast $\alpha 2$ transcriptional repressor, an arm extending from helix 1 makes additional contacts with base pairs in the minor groove. (Source: Adapted from Wolberger C. et al. 1991. *Cell* 67: 517–528. Copyright © 1991. Used with permission from Elsevier.)

The homeodomain has three α helices

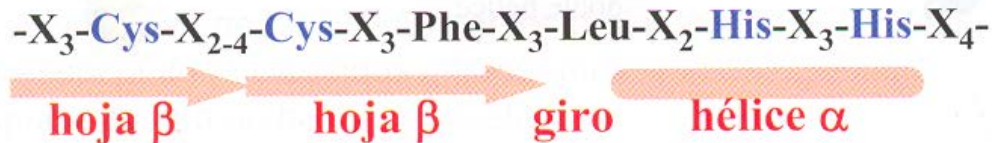


Domini hèlix-volta-hèlix i homeodomini: exemples

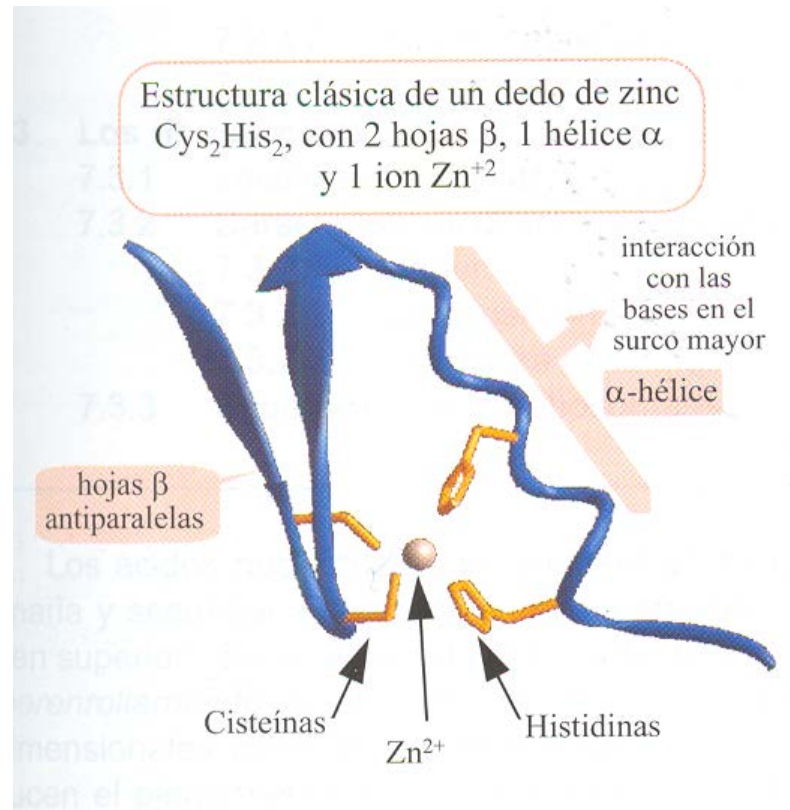
Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 31.34



Dits de Zn



És un domini de reconeixement característic de factors transcripcionals eucariòtics



Dits de Zn

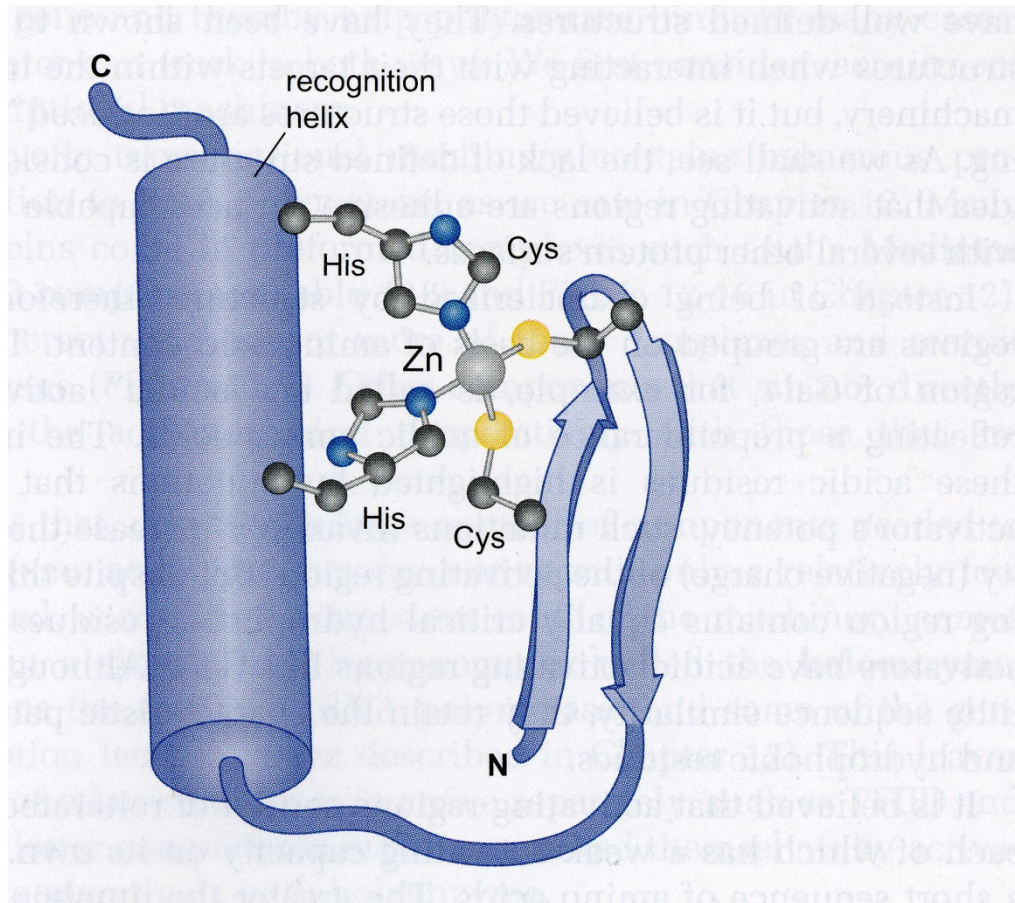
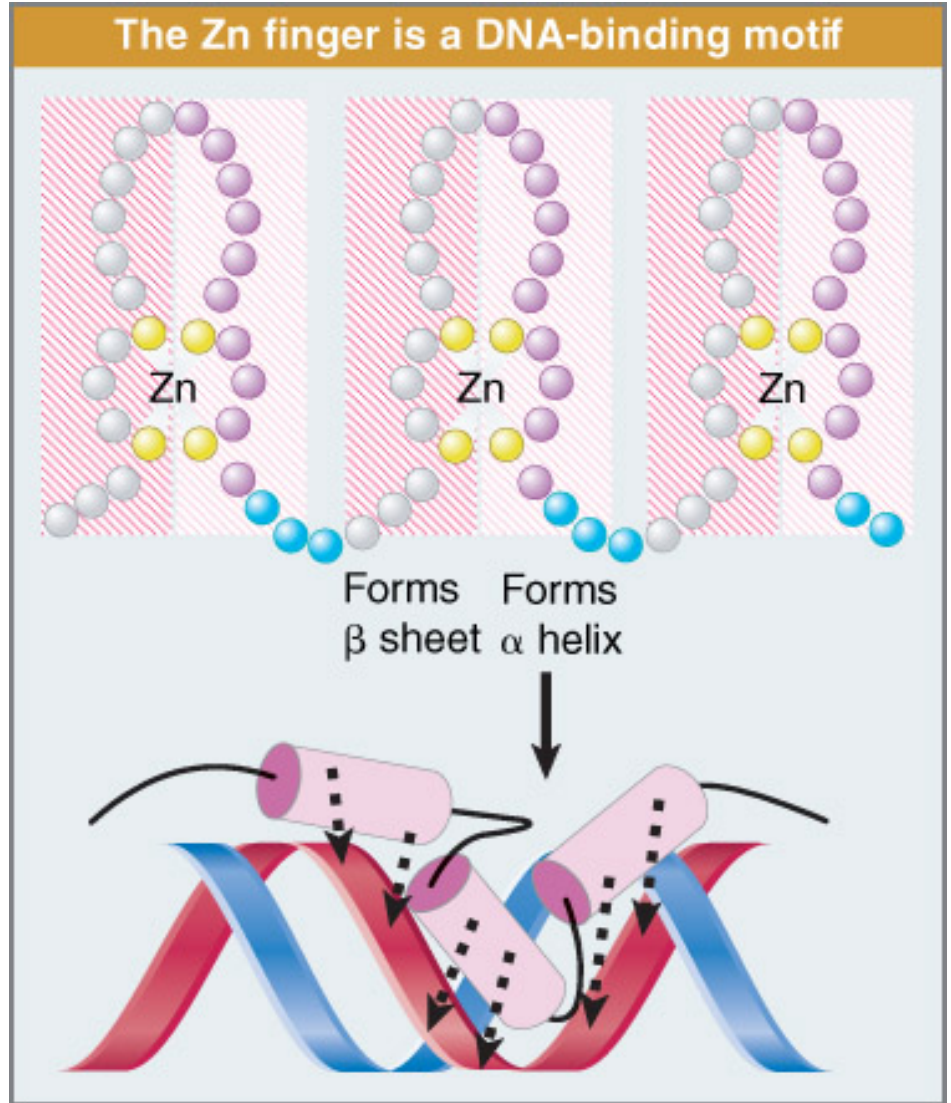


FIGURE 17-6 Zinc finger domain.

The α helix on the left of the structure is the recognition helix, and it is presented to the DNA by the β sheet on the right. The zinc is coordinated by the two His residues in the α helix and two Cys residues in the β sheet as shown. This arrangement stabilizes the structure and is essential for DNA binding. (Source: Adapted from Lee M. S. et al. 1989. *Science* 254: 635–637.)

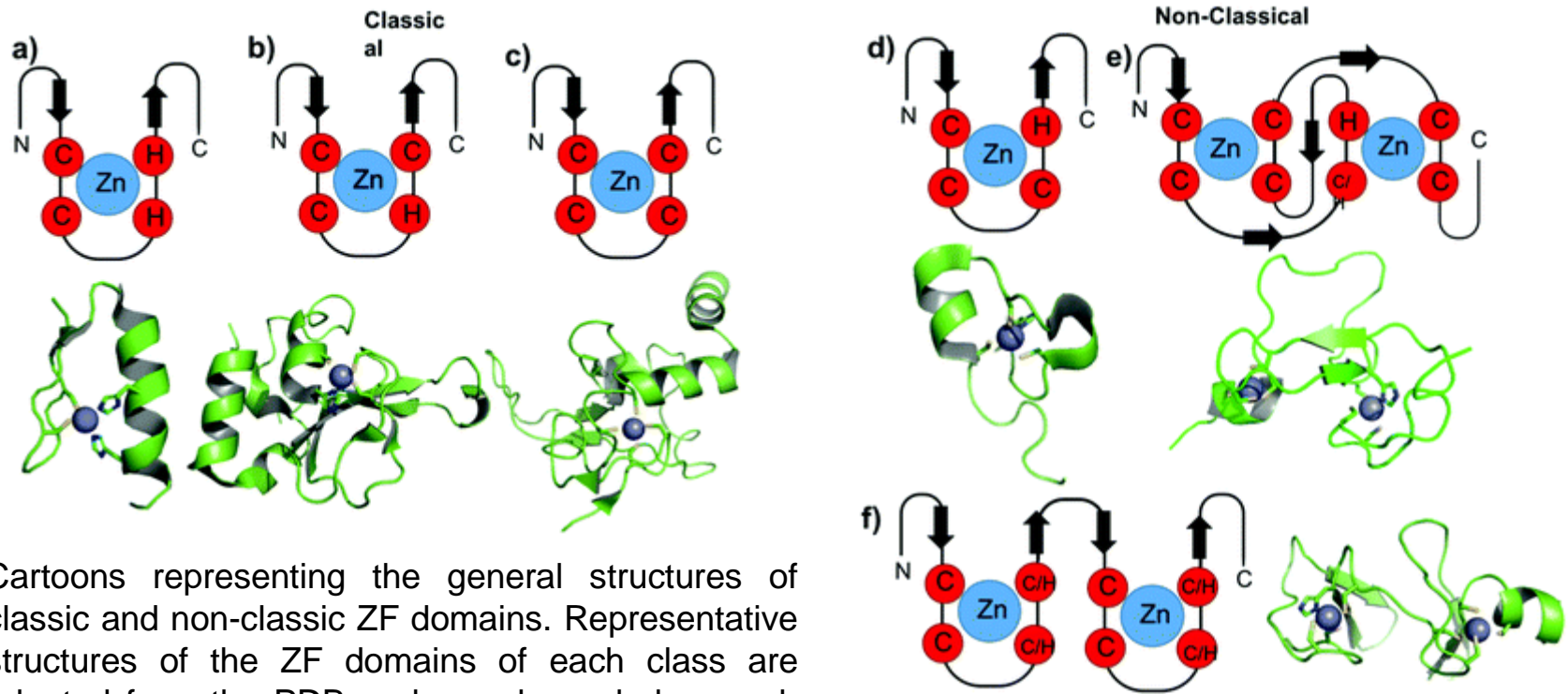
Dits de Zn

En una mateixa proteïna se solen trobar uns quants dits de Zn, cadascun dels quals interacciona amb alguns parells de bases del DNA



Dits de Zn

Pertanyen a una família més complexa coneguda com "dominis d'unió de Zn"



Cartoons representing the general structures of classic and non-classic ZF domains. Representative structures of the ZF domains of each class are adapted from the PDB and are shown below each general representation. (a) TFIIIA from *Drosophila*, (b) PARP-1 ZF domain 1, (c) XPA, (d) TTP ZF domain, (e) RING and PHD domain, PHD domain, (f) LIM and MYND domain, LIM domain from the CRP family.

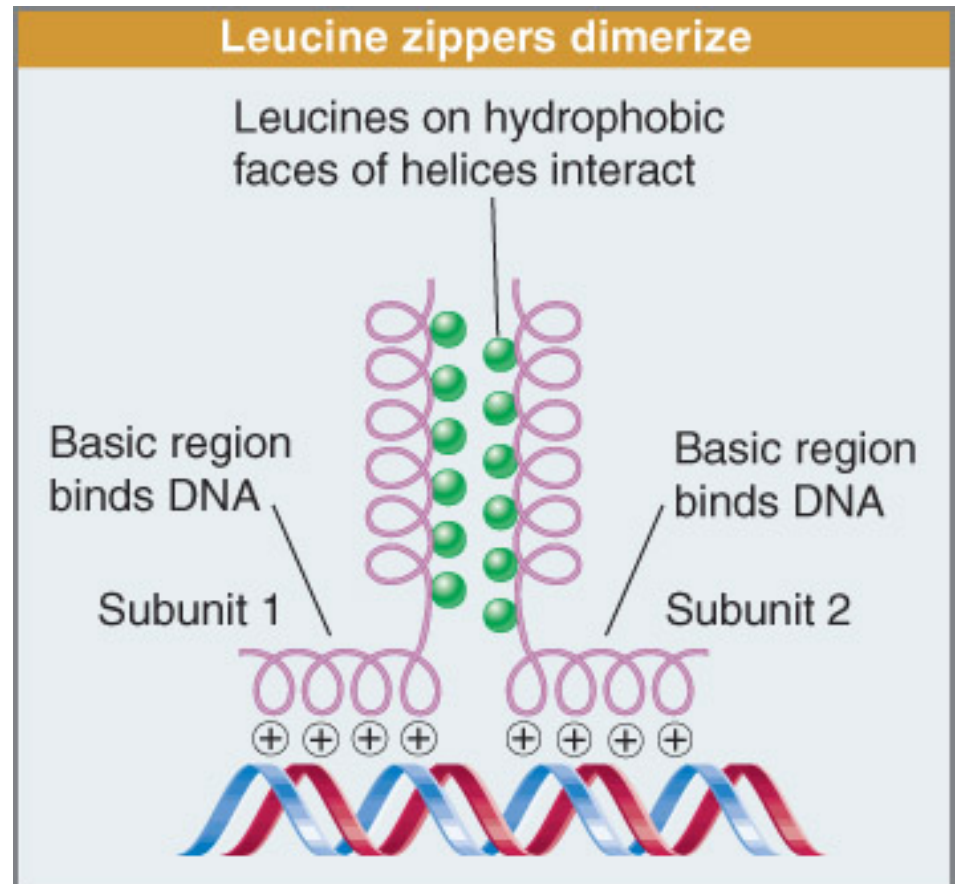
C Abbehausen, Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds – an update, *Metallomics*, Volume 11, Issue 1, January 2019, Pages 15–28, <https://doi.org/10.1039/c8mt00262b>

Cremallera de leucina

Es tracta d'un domini de dimerització trobat en nombrosos factors transcripcionals eucariòtics



FIGURE 17-7 Leucine zipper bound to DNA. Two large α helices, one from each monomer, form both the dimerization and DNA-binding domain at different sections along their length. Thus, as shown, toward the top the two helices interact to form a coiled-coil that holds the monomers together; further down, the helices separate enough to embrace the DNA, inserting into the major groove on opposite sides of the DNA-helix. Once again, specificity is provided by contacts made between amino acid side chains on the α helices and the edge of base pairs in the major groove. An example of this is found in the yeast transcriptional activator, GCN4 (Figure 5-15). (Source: Adapted from Ellenberger T.G. et al. 1992. *Cell* 71: 1223. Copyright © 1992. Used with permission from Elsevier.)



Cremallera de leucina

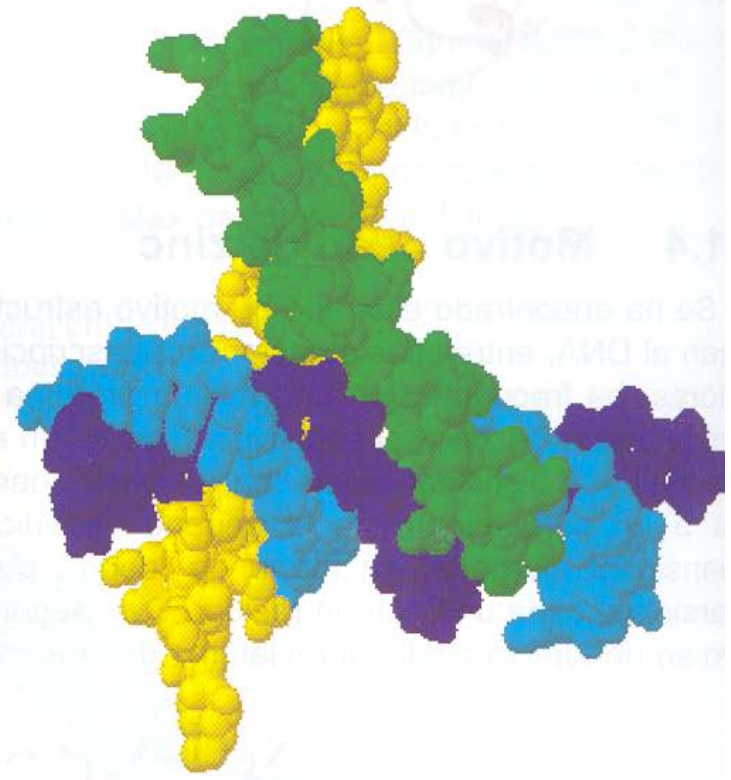
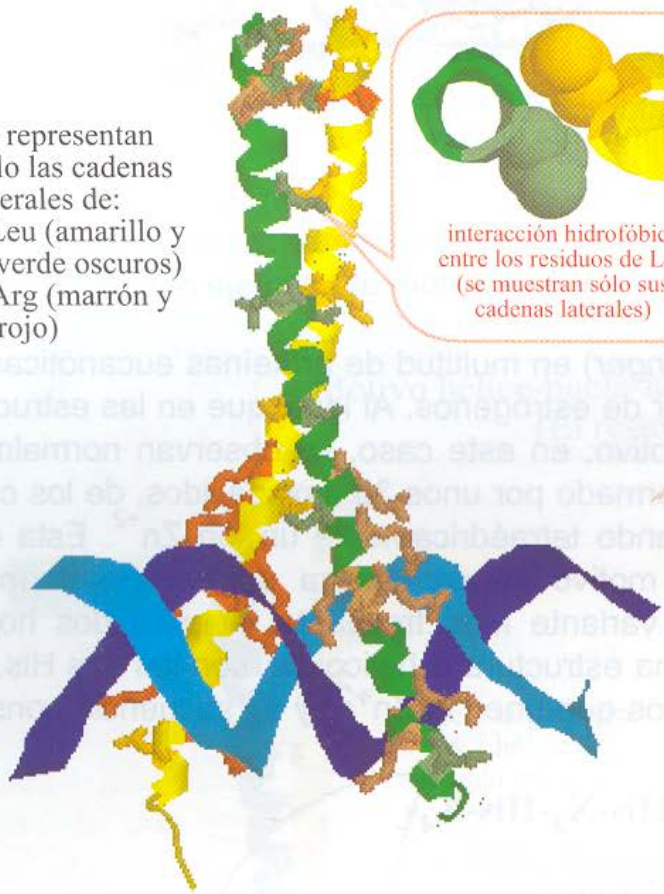
Motivo cremallera de leucina y su interacción con el DNA

Se representan sólo las cadenas laterales de:

- Leu (amarillo y verde oscuros)
- Arg (marrón y rojo)



Por un extremo, las dos α -hélices peptídicas interaccionan entre sí, formando un helicoide, y por el otro encajan en el surco mayor del DNA, "abrazando" a la doble hélice



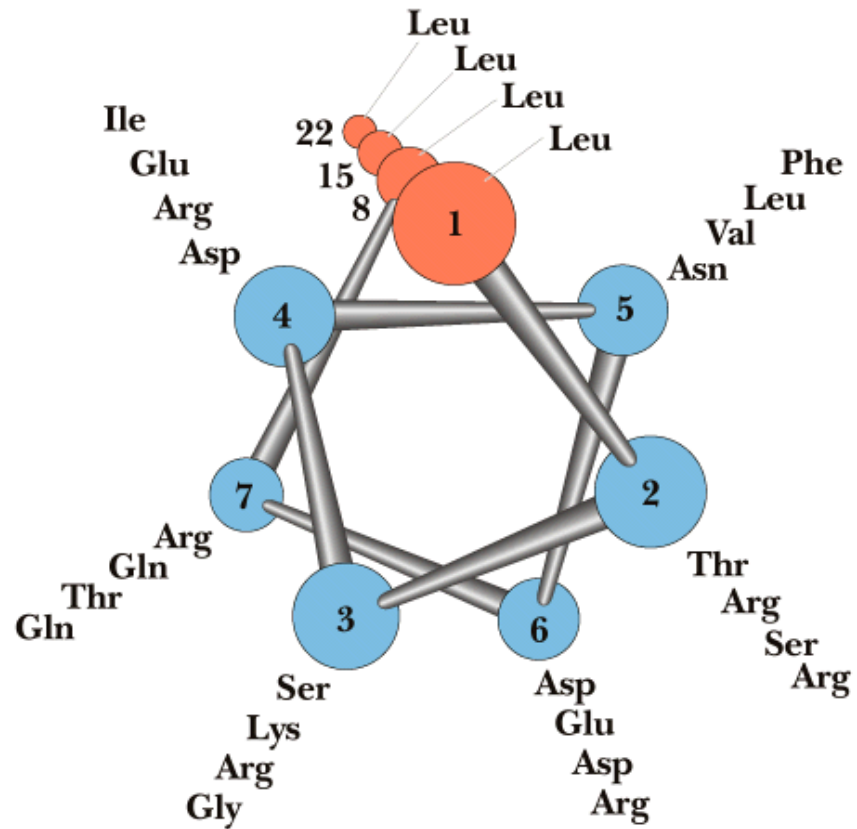
Cremallera de leucina

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 31.42

Protein	Basic region A	Basic region B	Leucine zipper
C/EBP	278-DKNSNEYRVR	RRERNNI	AVRKS
Jun	257-SQERIKAE	RKRMRNRI	AA
Fos	233-EERRRIRRI	RRERNKMAA	AKCRNRRR
GCN4	221-PES	SDPAALKR	ARNTAAARRSR
YAP1	60-DLDPETKQ	KRTAQNRAA	QRAFHERKER
CREB	279-EEAARKRE	VRLMKNREAA	REGRRKKKEY
Cys-3	95-ASRLAAE	EDKRKRNTAA	SARFR
CPC1	211-EDP	SDVAMKRARNT	LAARKSBERKA
HBP1	176-WDEREL	KKQKRLSNRES	SARRSRLR
TGA1	68-SKPVEK	VLRRLAQRNEA	ARKSRLR
Opaque2	223-MPTEER	VRKRKESNRES	SARRSRYR
Consensus	-----	BB-BN--	AA-B-R-BB-----
			L ^E _Q -----L-----L-----L-----L---

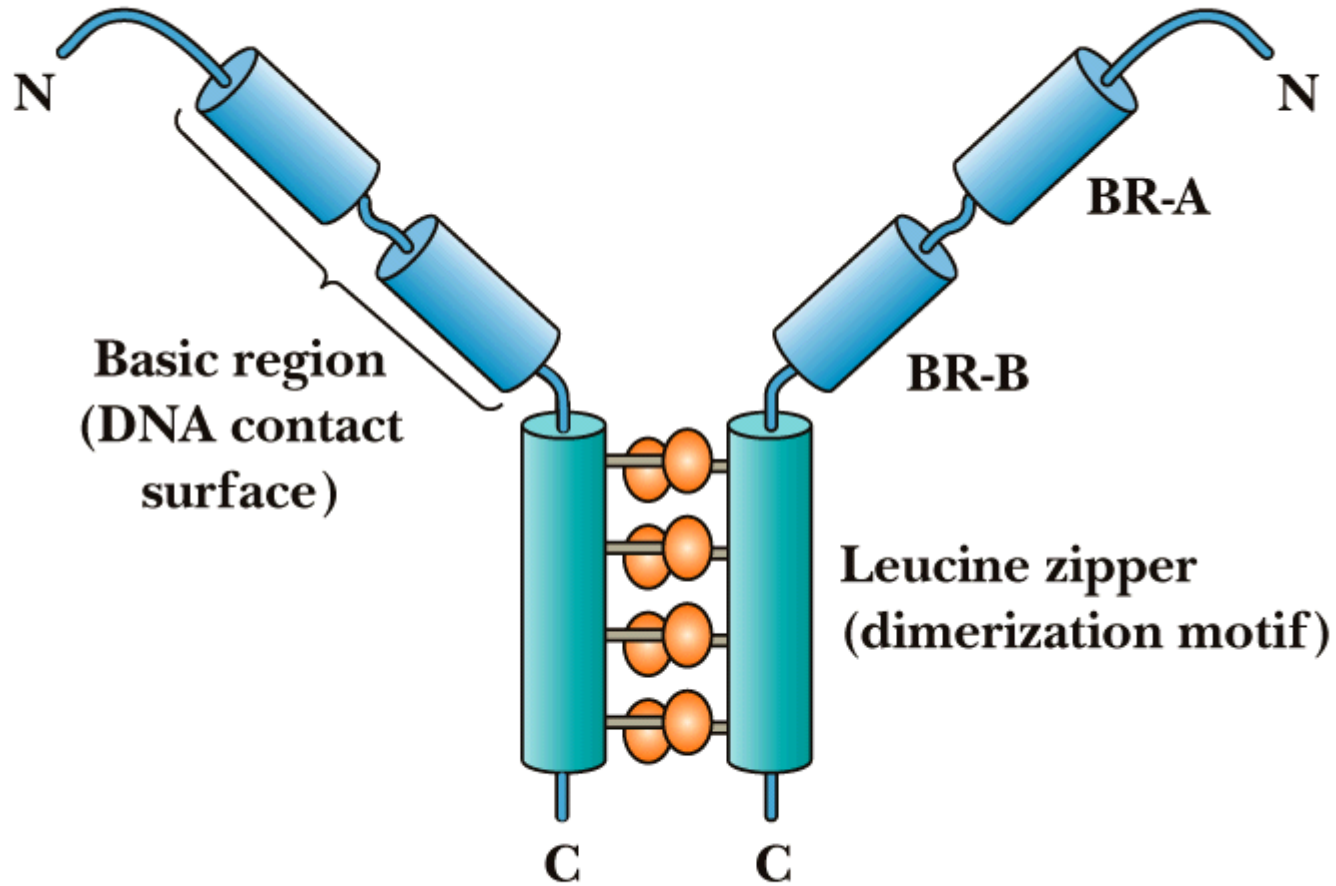
Cremallera de leucina

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 31.41



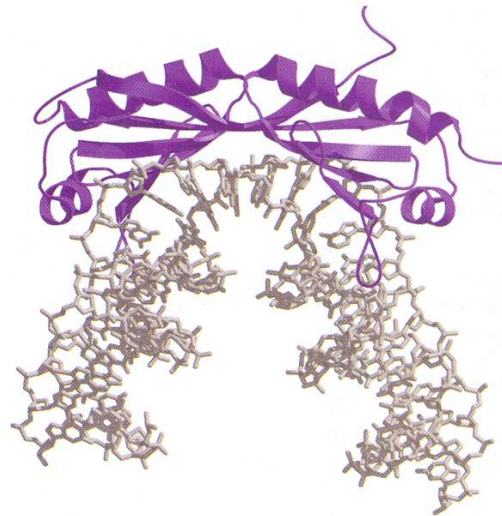
Cremallera de leucina

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 31.43



Fulls β

Solen establir interaccions amb el DNA a través del solc menor



Anabaena HU-DNA
cocrystal structure (AHU6)

FIGURE 5-22 Structure of the TBP-TATA box complex. The backbone of TBP is shown in purple at the top of the figure; the DNA helix below is shown in gray and rose. (Nikolov D.B., Chen H., Halay E.D., Usheva A.A., Hisatake K., Lee D.K., Roeder R.G., and Burley S.K. 1995. *Nature* 377: 119.) Image prepared with MolScript, BobScript, and Raster 3D. Extended DNA on either side of image modeled by Leemor Joshua-Tor.

Un tipus de domini d'interacció proteïna-RNA: RRM

*RNA Recognition Motif (RRM), RNA-Binding Domain (RBD) o
RiboNucleoProtein Domain (RNP)*

90 aminoàcids de longitud aproximadament

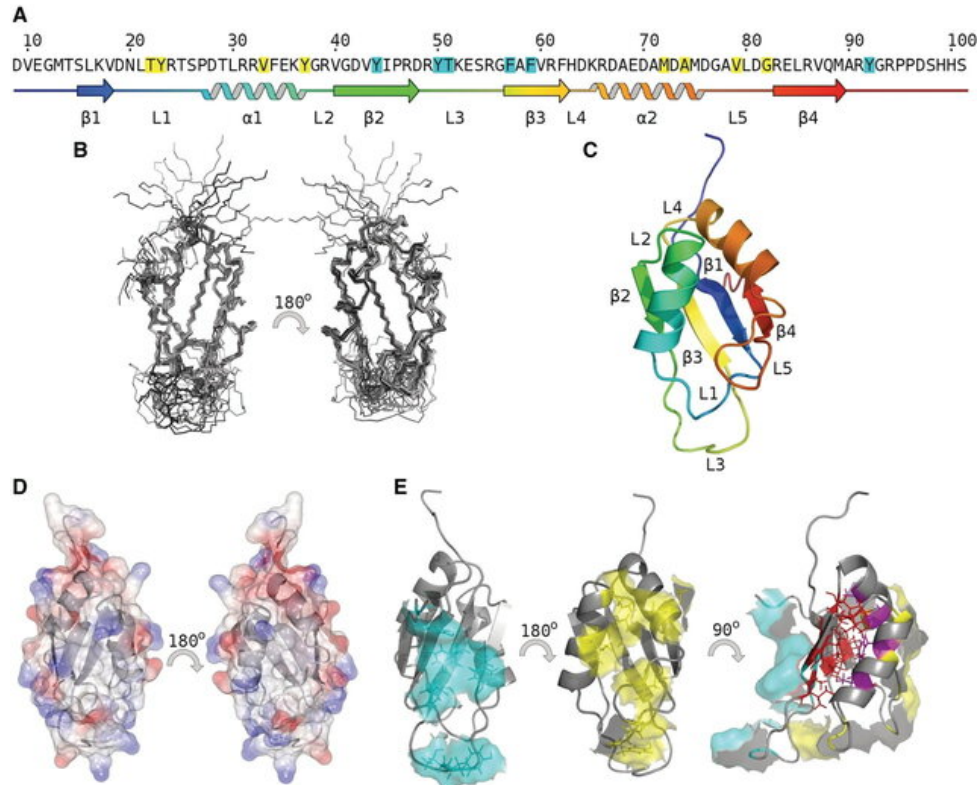
És el domini d'unió a RNA més abundant en vertebrats superiors

Es troba en tots els dominis de la vida

El contenen nombroses proteïnes implicades en processos com ara:

- Processament d'mRNAs i rRNAs
- Exportació, localització, estabilitat i recanvi d'RNAs
- Traducció
- Localització
- Interacció amb ssRNAs, proteïnes i lípids

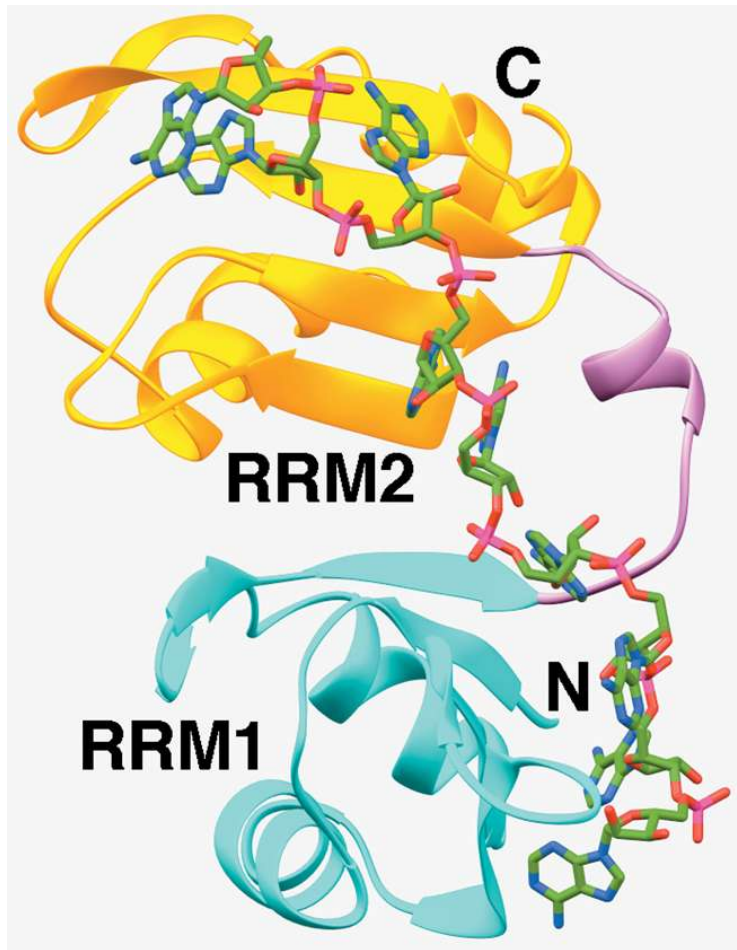
Un tipus de domini d'interacció proteïna-RNA: RRM



(A) SRSF2 RRM sequence and secondary structure. (B–E) Structure of SRSF2 RRM: (B) ensemble structures. (C) cartoon representation and schematic colored blue to red N-terminus to C-terminus, loops, strands and helices labeled according to RRM consensus (1). (D) electrostatic surface (red -5, blue +5). (E) hydrophobic residue analysis of SRSF2 identified two surface exposed patches, one on the helical face (yellow) the other on the β -sheet face (cyan); the hydrophobic core of the molecule comprises residues from both helices (magenta) and strands (red), for clarity flexible C-terminus residues 94–101 are omitted.

	RNP-2	RNP-1
RNP CONSENSUS	L ₄₇ F ₅₈ V ₄₄ G ₃₀ N ₅₉ L ₆₉	R ₃₀ G ₈₃ F ₅₃ A ₃₉ F ₈₃ V ₇₀
	I ₃₀ I ₃₃ K ₂₂ G ₂₅	K ₄₂ G ₄₄ I ₂₅

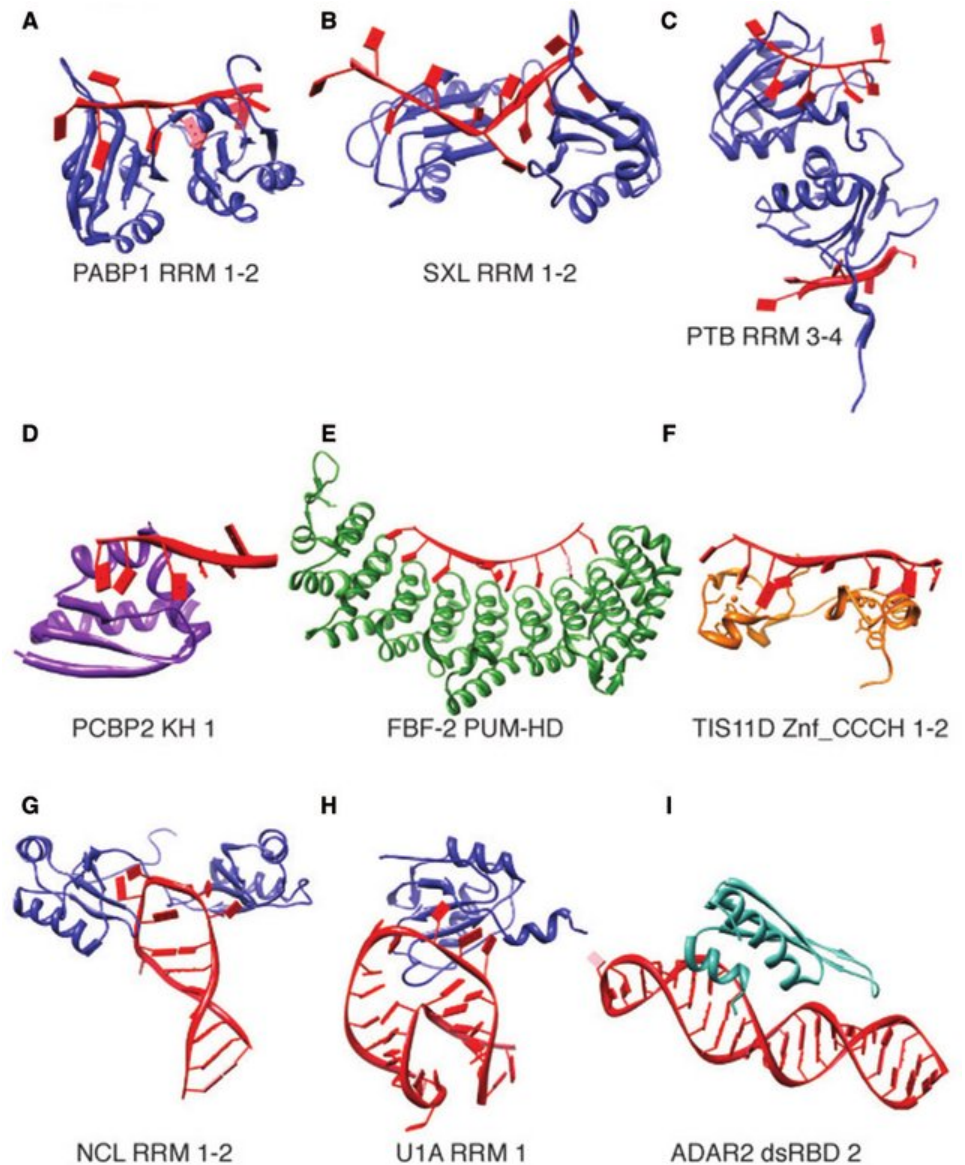
Un tipus de domini d'interacció proteïna-RNA: RRM



Estructura de raigs X de dos dominis de reconeixement d'RNA (RRMs) localitzats en la regió N-terminal formant complex amb A_{11} .

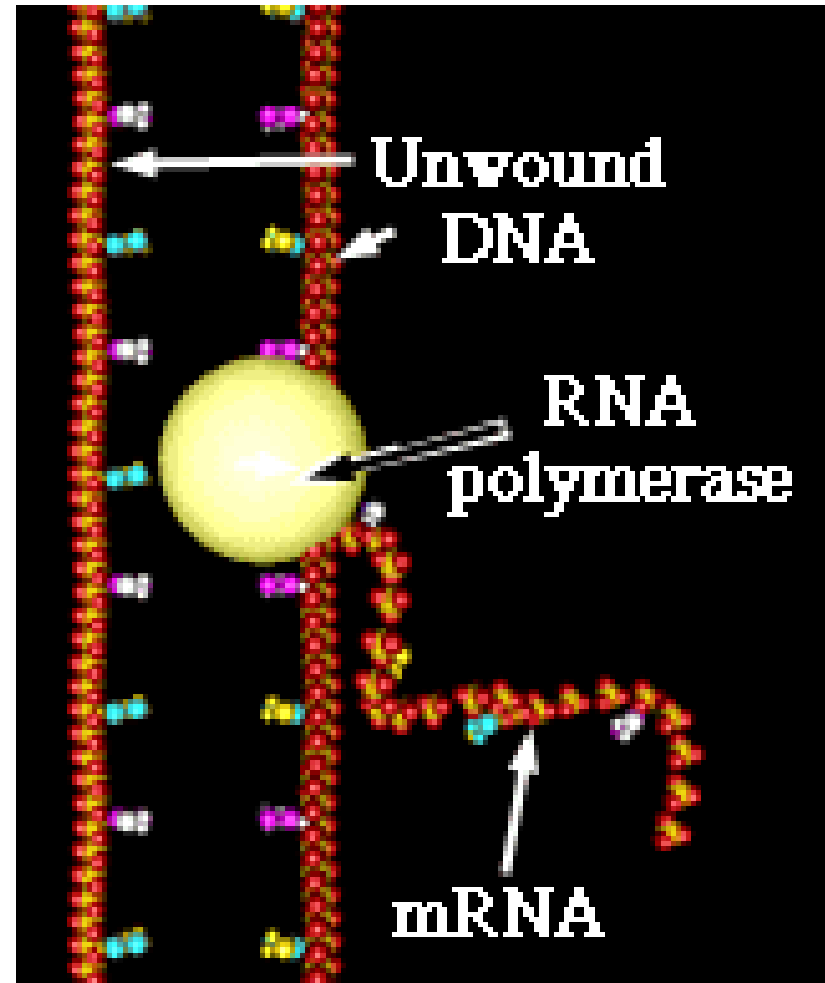
Existeixen altres tipus de dominis d'interacció proteïna-RNA

RNA-binding domains use a variety of strategies for binding RNA. (A-C), Different arrangements of two RRM domains. (A) RRM1-2 of PABP1 are arranged to form a flat RNA-binding surface (PDB ID: 1CVJ). (B) RRM1-2 of SXL form an RNA-binding cleft (1B7F). (C) RRM3-4 of PTB are arranged back to back (2ADC). (D-F) Examples of other RNA-binding domains. (D) KH domain 1 of PCBP2 forms an RNA-binding cleft (2PY9). (E) The Puf repeats of the FBF-2 PUM-HD form a concave RNA-binding surface (3K62). (F) The two CCCH zinc fingers of TIS11D/ZFP36L2 (1RGO). (G-I) RBPs binding to structured RNA. (G) Hairpin loop recognition by RRM1-2 of Nucleolin (1RKJ). (H) Bulge loop recognition by RRM1 of U1A/SNRPA (1AUD). (I) dsRNA binding by the dsRBD domain of ADAR2 (2L2K).



Tema 3

Transcripció en procariotes. L'RNA polimerasa dependent de DNA: activitats enzimàtiques i característiques. Subunitats de l'RNA polimerasa bacteriana. Regió promotora de procariotes. Inici de la transcripció. El cicle del factor sigma. Elongació de cadenes. Acabat de les cadenes: terminadors rho-dependents i rho-independents.



Aspectes universals sobre el procés de transcripció

- Els enzims que hi participen s'anomenen RNA polimerases:

Formades per una o més subunitats

Catàlisi i organització global conservades

Forma conservada de pinça de cranc

- Transcorre en tres etapes: inici, elongació i acabament

Les RNA polymerases

FIGURE 12-2 Comparison of the crystal structures of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. (a) Structure of RNA polymerase core enzyme from *T. aquaticus*. The subunits are colored as follows: β is shown in purple, β' in blue, the two α subunits in yellow and green, and ω in red. The Mg atom, represented as a red ball, marks the active site, here, and in part (b) (Seth Darst, The Rockefeller University, personal communication.) (b) Structure of RNA Polymerase II from yeast *S. cerevisiae*. The subunits are colored to show their relatedness to those in the bacterial enzyme (see Table 12-1). Thus, RPB 1 and 2 are shown in purple and blue respectively; RPB3 and 11 are shown in yellow and green; and RPB6 in red. (Cramer P, Bushnell D.A., and Kornberg R.D. 2001. *Science*. 292: 1863). Images prepared with MolScript,

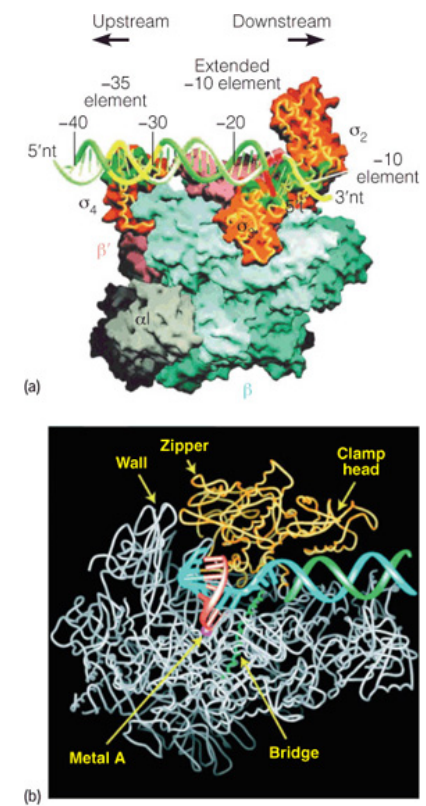
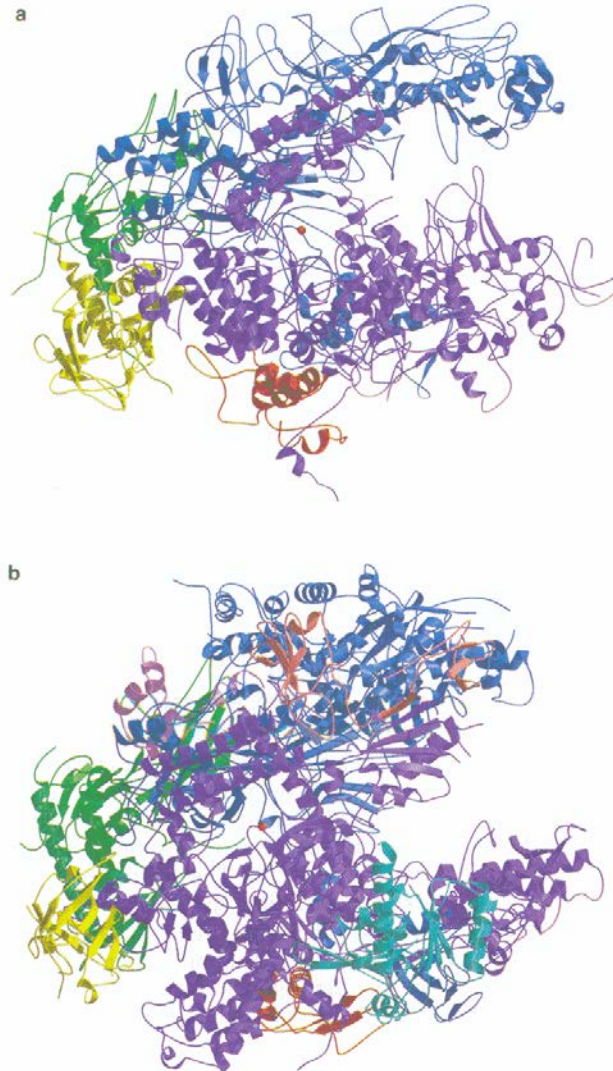


FIGURE 27.6

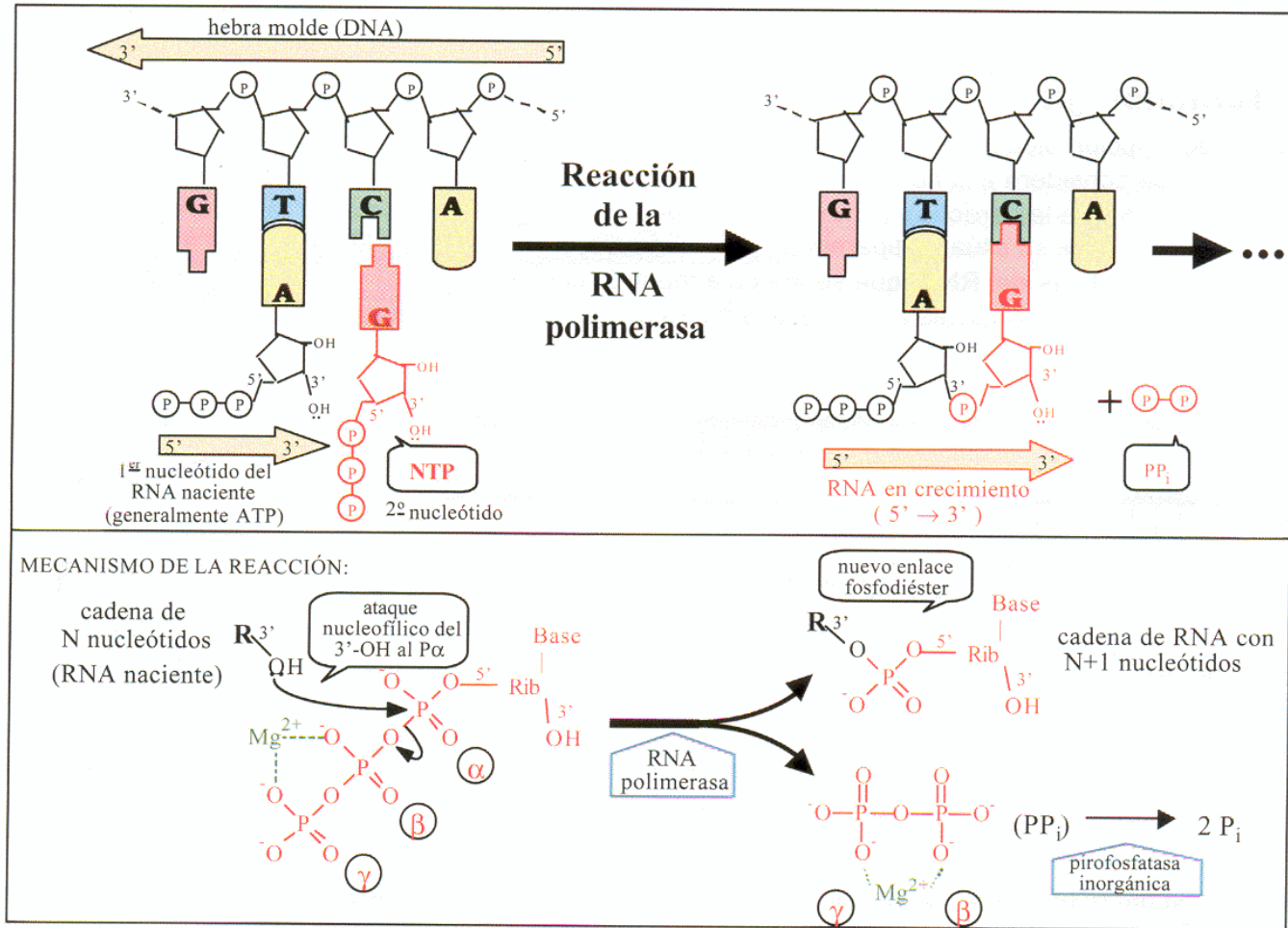
Crystal structures of RNA polymerases. (a) *Taq* RNA polymerase complexed with DNA. Both α subunits and ω are shown in gray; β , cyan; β' , pink; σ , orange. The molecular surface of σ is partially transparent, showing the α -carbon backbone inside. The numbers next to the σ designations refer to domains on the protein molecule. Template DNA strand is green, except for promoter elements at -10 and -35 (see page 1139), with respect to position $+1$, where transcription will initiate. PDB ID, 1L9U. (b) Yeast RNA polymerase II. Parts of Rbp2 (counterpart to β) are removed to reveal bound nucleic acids. Bases of ordered nucleotides are shown as cylinders protruding from the backbone regions. Shown also are an active-site metal and several functional regions of the protein, which are described later. PDB ID, 116H.

From *Science* 296:1285–1290, K. S. Murakami, S. Masuda, E. A. Campllee, O. Muzzin, and S. A. Darst, *Taq* RNA polymerase; and *Science* 292:1876–1882, A. L. Gnatt, P. Cramer, F. Fu, D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg, RNA polymerase II. © 2002 and 2001. Reprinted with permission from AAAS.

Les RNA polimerases

- Fan servir com a substrats rNTPs
- Direcció de síntesi 5'-3'
- Són capaces d'iniciar i acabar cadenes
- Reconeixen seqüències d'inici i d'acabament i diferencien la cadena motle de la codificant
- Poden utilitzar un DNA dúplex intacte com a motle
- El seu centre actiu acull la bombolla de transcripció
- Nombre elevat de còpies per cèl·lula (aprox. 7000)
- Taxa d'error al voltant de 10^{-3}
- Velocitat de polimerització de 50 nt/s

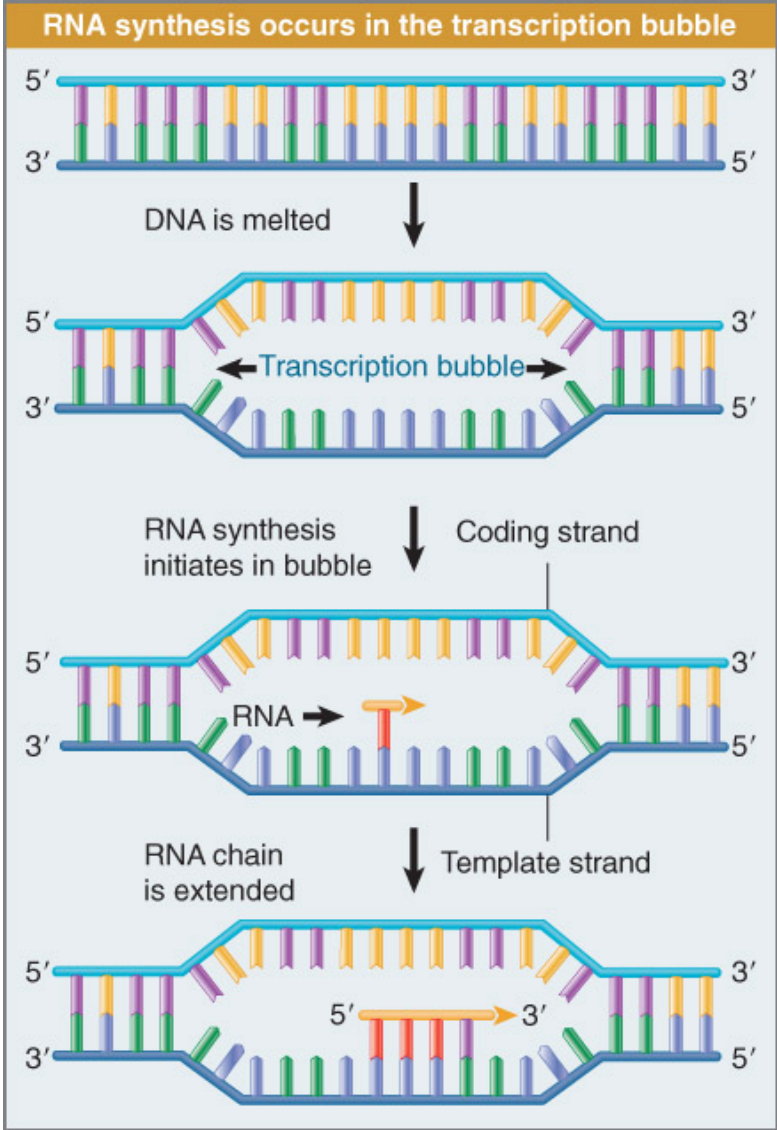
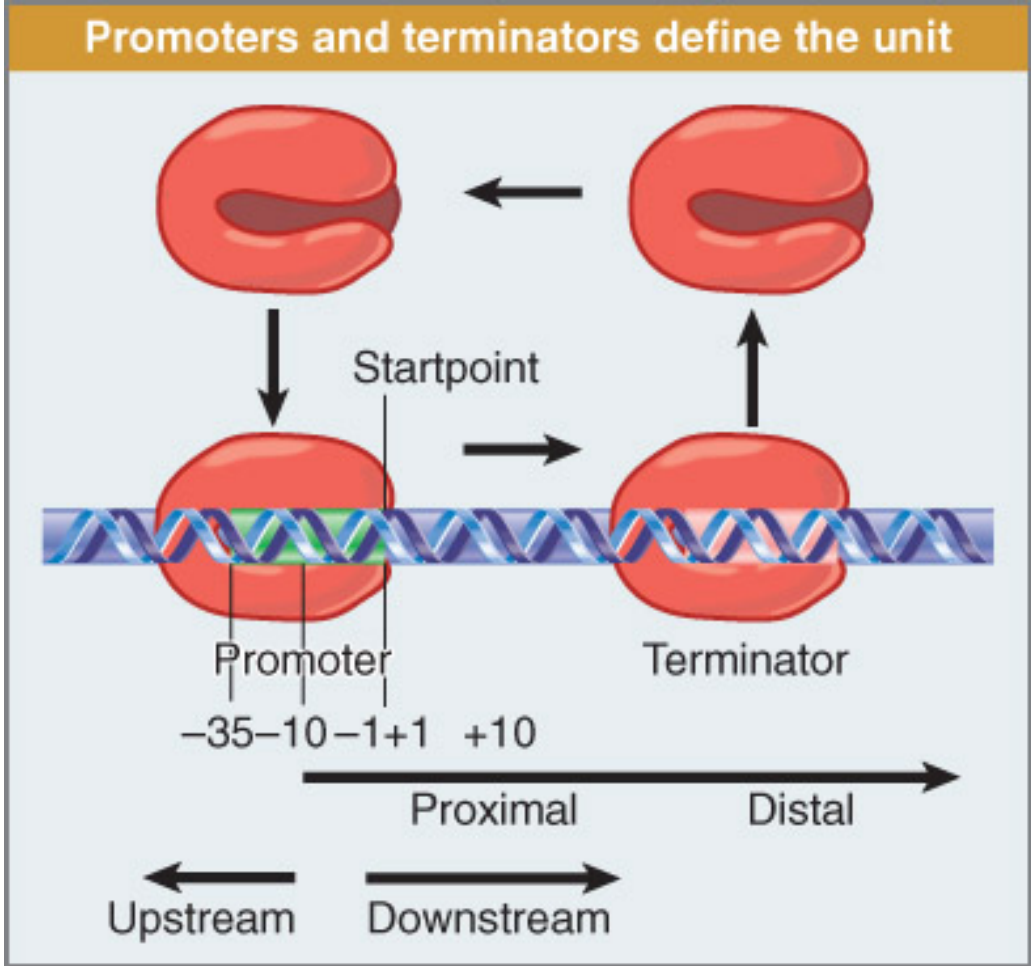
Les RNA polimerases: mecanisme catalític



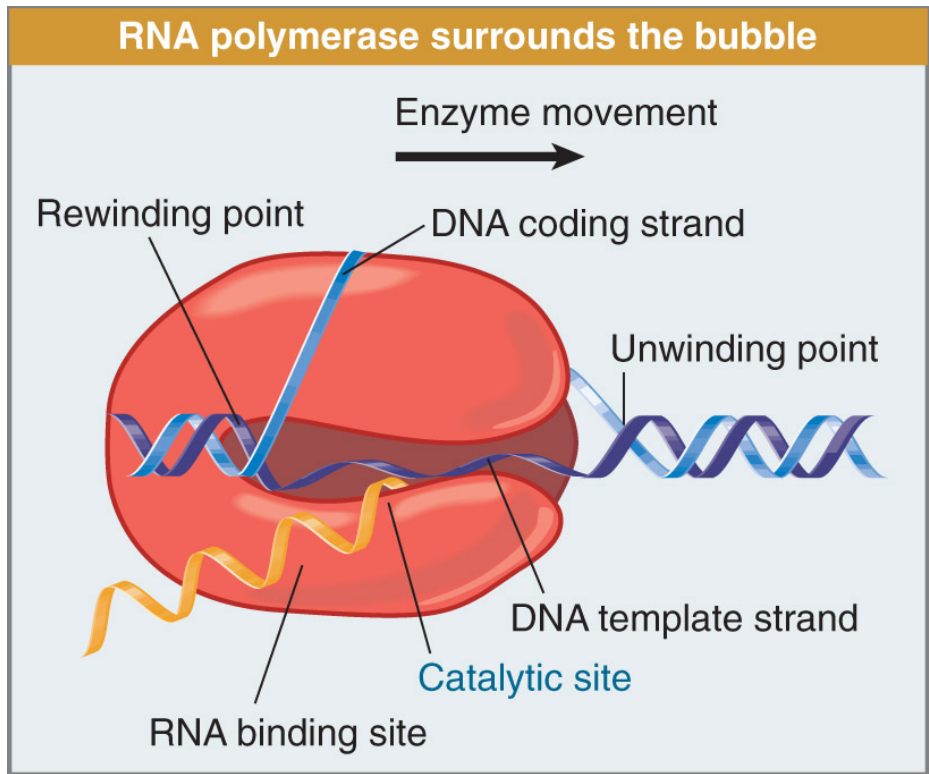
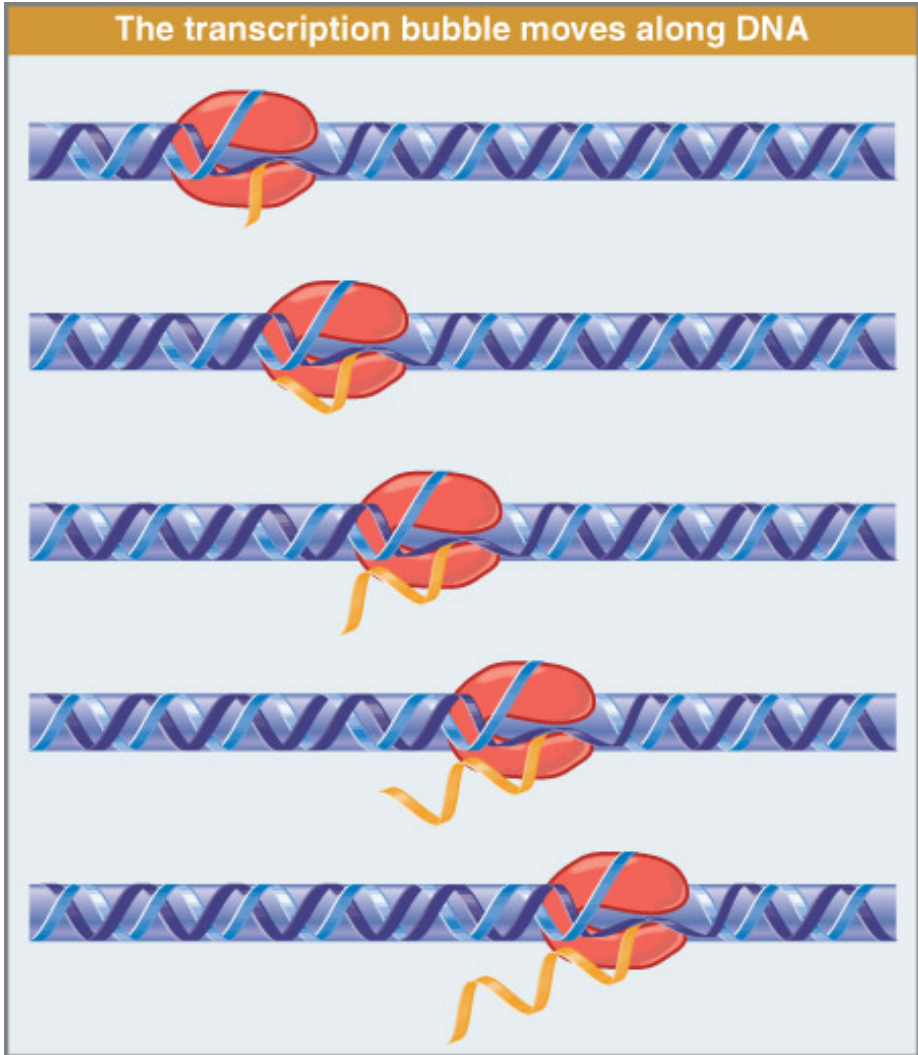
Les RNA polimerases

- Fan servir com a substrats rNTPs
- Direcció de síntesi 5'-3'
- **Són capaces d'iniciar i acabar cadenes**
- **Reconeixen seqüències d'inici i d'acabament i diferencien la cadena motle de la codificant**
- **Poden utilitzar un DNA dúplex intacte com a motle**
- **El seu centre actiu acull la bombolla de transcripció**
- Nombre elevat de còpies per cèl·lula (aprox. 7000)
- Taxa d'error al voltant de 10^{-3}
- Velocitat de polimerització de 50 nt/s

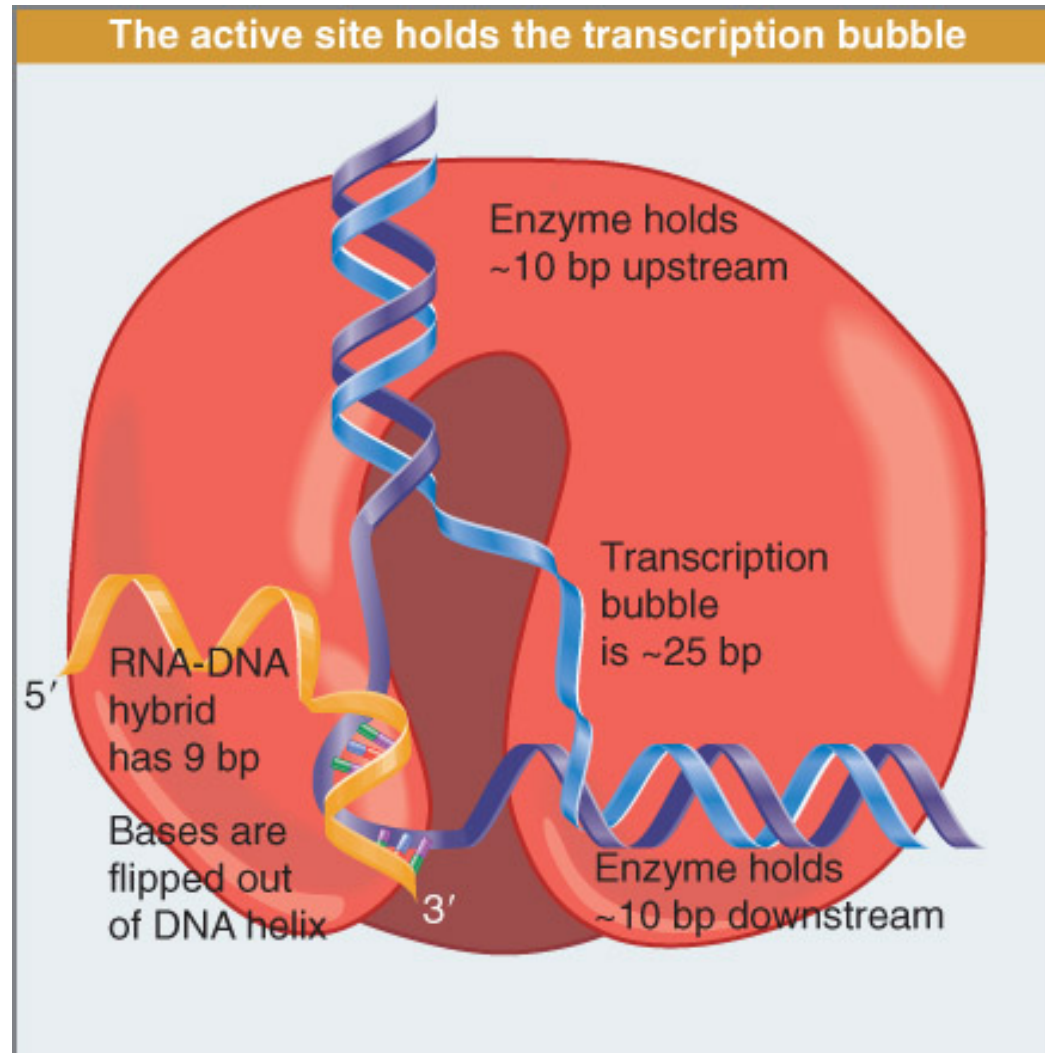
Les RNA polymerases



Les RNA polimerases



Les RNA polimerases



Les RNA polimerases

- Fan servir com a substrats rNTPs
- Direcció de síntesi 5'-3'
- Són capaces d'iniciar i acabar cadenes
- Reconeixen seqüències d'inici i d'acabament i diferencien la cadena motle de la codificant
- Poden utilitzar un DNA dúplex intacte com a motle
- El seu centre actiu acull la bombolla de transcripció
- Nombre elevat de còpies per cèl·lula (aprox. 7000)
- Taxa d'error al voltant de 10^{-3}
- Velocitat de polimerització de 50 nt/s

Aspectes universals sobre el procés de transcripció

- Els enzims que hi participen s'anomenen RNA polimerases:

Formades per una o més subunitats

Catàlisi i organització global conservades

Forma conservada de pinça de cranc

- Transcorre en tres etapes: inici, elongació i acabament

Les RNA polimerases

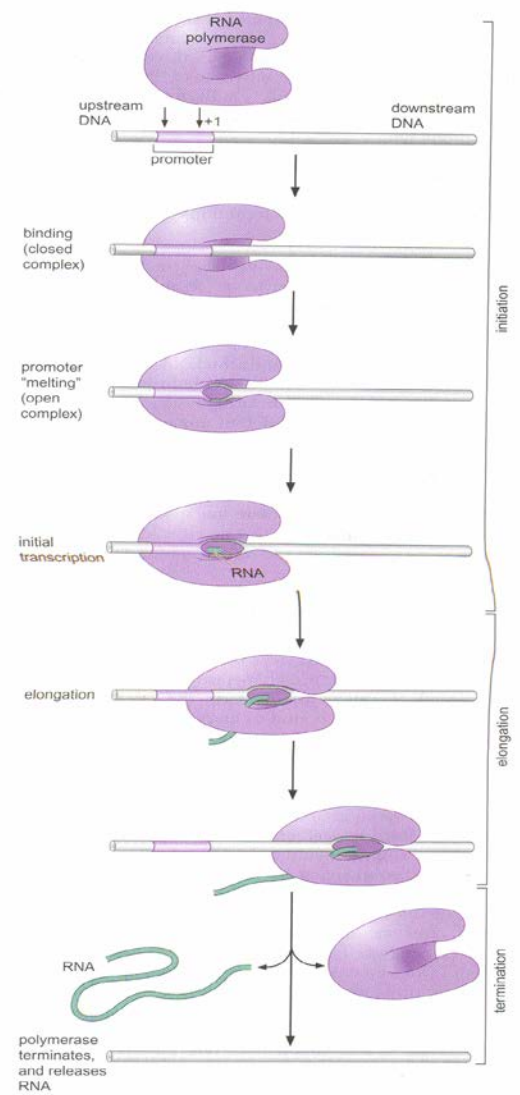
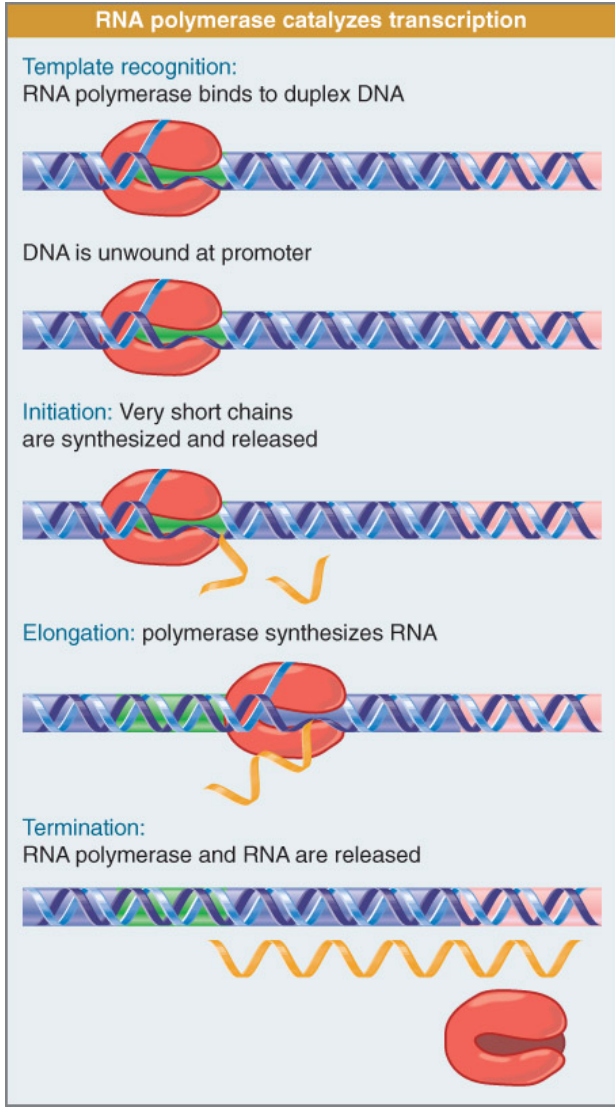
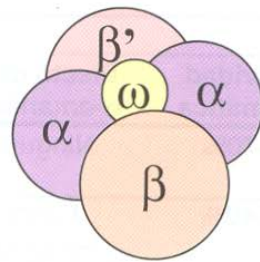


FIGURE 12-3 The phases of the transcription cycle: initiation, elongation, and termination. The figure shows the general scheme for the transcription cycle. The features shown hold for both bacterial and eukaryotic cases. Other factors required for initiation, elongation, and termination are not shown here, but are described later in the text. The DNA nucleotide encoding the beginning of the RNA chain is called the transcription start site and is designated the "+1" position. Sequences in the direction in which transcription proceeds are referred to as downstream of the start site. Likewise, sequences preceding the start site are referred to as upstream sequences. When referring to a specific position in the upstream sequence, this is given a negative value. Downstream sequences are allotted positive values.

RNA polimerasa d'*Escherichia coli*



Estructura de una RNA polimerasa procariótica (*E. coli*)

- α (36.5 kDa) = ensambla la enzima mínima y se une a proteínas reguladoras
 β (151 kDa) = polimerasa (sitio catalítico)
 β' (155 kDa) = se une al DNA molde
 ω (11 kDa) = (posible, no confirmado)
 σ (70 kDa) = especificidad por secuencias de inicio: reconoce al promotor e inicia la síntesis
- } enzima "núcleo" o "mínima" (390 kDa)

TABLE 27.1 Subunit composition of *E. coli* RNA polymerase

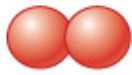
Subunit	M_r	Number per Enzyme Molecule	Function
α	36,500	2	Chain initiation, interaction with regulatory proteins and upstream promoter elements
β	151,000	1	Chain initiation and elongation
β'	155,000	1	DNA binding
σ	70,000 ^a	1	Promoter recognition
ω	11,000	1	Unknown

^aThe 70-kDa σ subunit is one of several alternative σ subunits.

RNA polimerasa d'*Escherichia coli*

RNA polymerase has 4 types of subunit

Gene	product	Functions
<i>rpoA</i>	2 α subunits (40 kD each)	enzyme assembly promoter recognition binds some activators



<i>rpoB</i>	β subunit (155 kD)	catalytic center
<i>rpoC</i>	β' subunit (160 kD)	



<i>rpoD</i>	σ subunit (32–90 kD)	promoter specificity
-------------	--------------------------------	----------------------



E. coli enzyme
= 465 kD

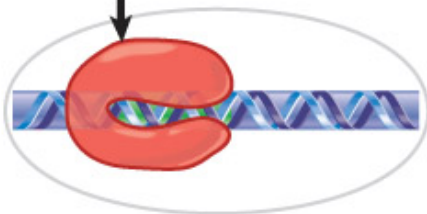


TABLE 12-1 The Subunits of RNA Polymerases

Prokaryotic		Eukaryotic		
Bacterial	Archaeal	RNAP I	RNAP II	RNAP III
Core	Core	(Pol I)	(Pol II)	(Pol III)
β'	A'/A''	RPA1	RPB1	RPC1
β	B	RPA2	RPB2	RPC2
α^I	D	RPC5	RPB3	RPC5
α^{II}	L	RPC9	RPB11	RPC9
ω	K	RPB6	RPB6	RPB6
	[+6 others]	[+9 others]	[+7 others]	[+11 others]

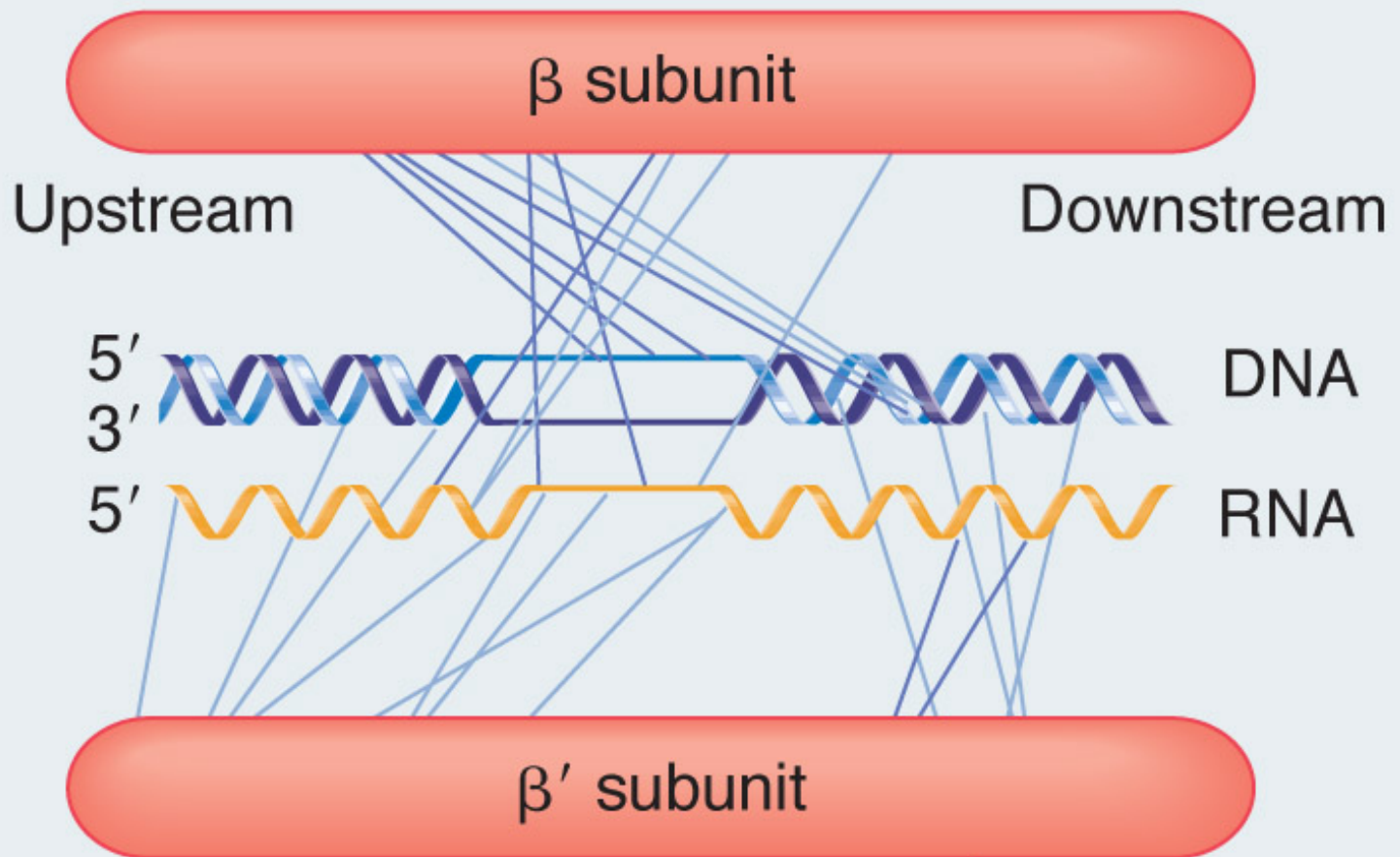
Note: The subunits in each column are listed in order of decreasing molecular weight.

Source: Data adapted from Ebricht R.H. 2000 *J. Mol. Biol.* **304**: 687–698, Fig. 1, p. 688. © 2000 Academic Press.

Omega és la subunitat més menuda de l'RNA polimerasa bacteriana. Encara que va ser identificada aviat, la seua funció ha estat rodejada de controvèrsia durant molt de temps. Més recentment s'ha demostrat que té un paper estructural en el manteniment de la conformació de la subunitat de major grandària, beta, i en el seu reclutament durant l'ensamblatge de l'enzim. La conservació d'aquesta funció a través de totes les formes de vida indica la seua importància. També podria estar implicada en el reclutament de sigma.

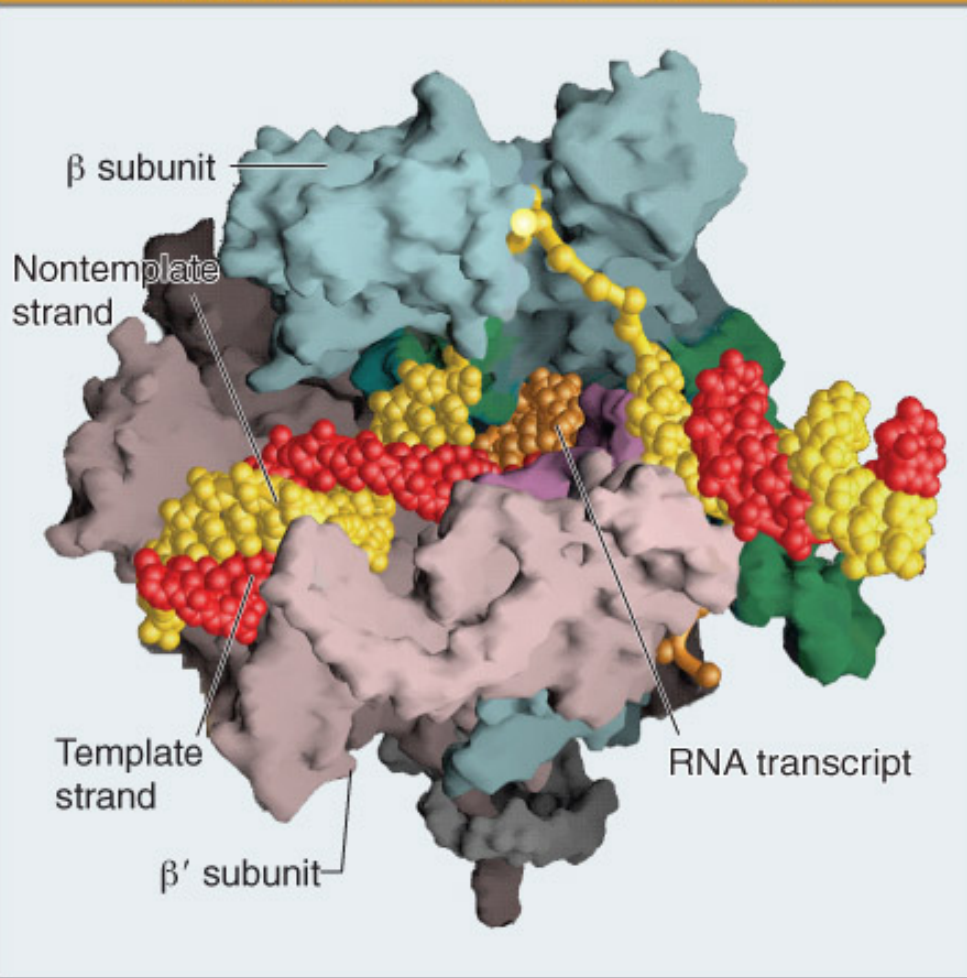
RNA polimerasa d'*Escherichia coli*

β and β' subunits contact DNA and RNA

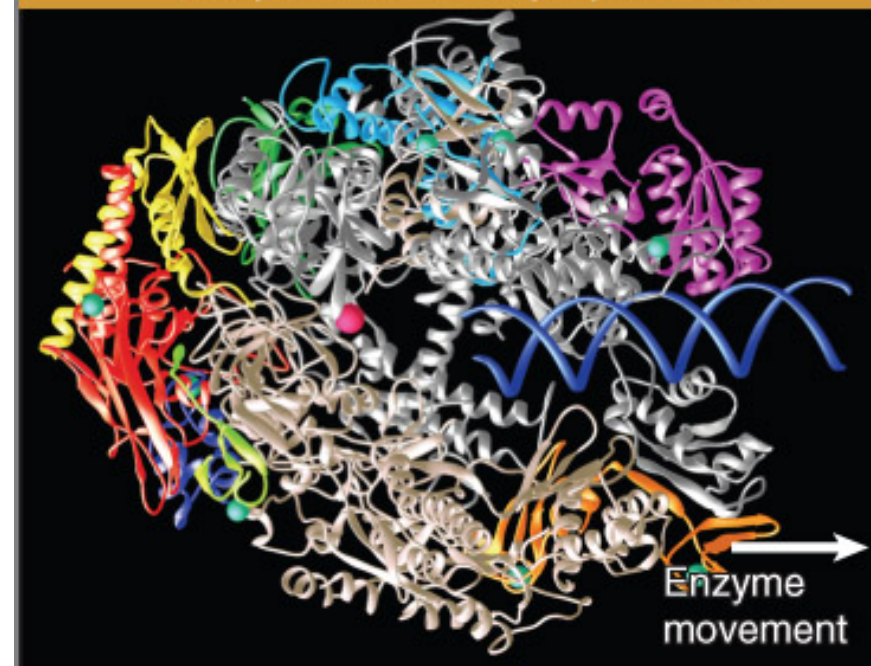


RNA polimerasa d'*Escherichia coli*

RNA polymerase has a channel for DNA

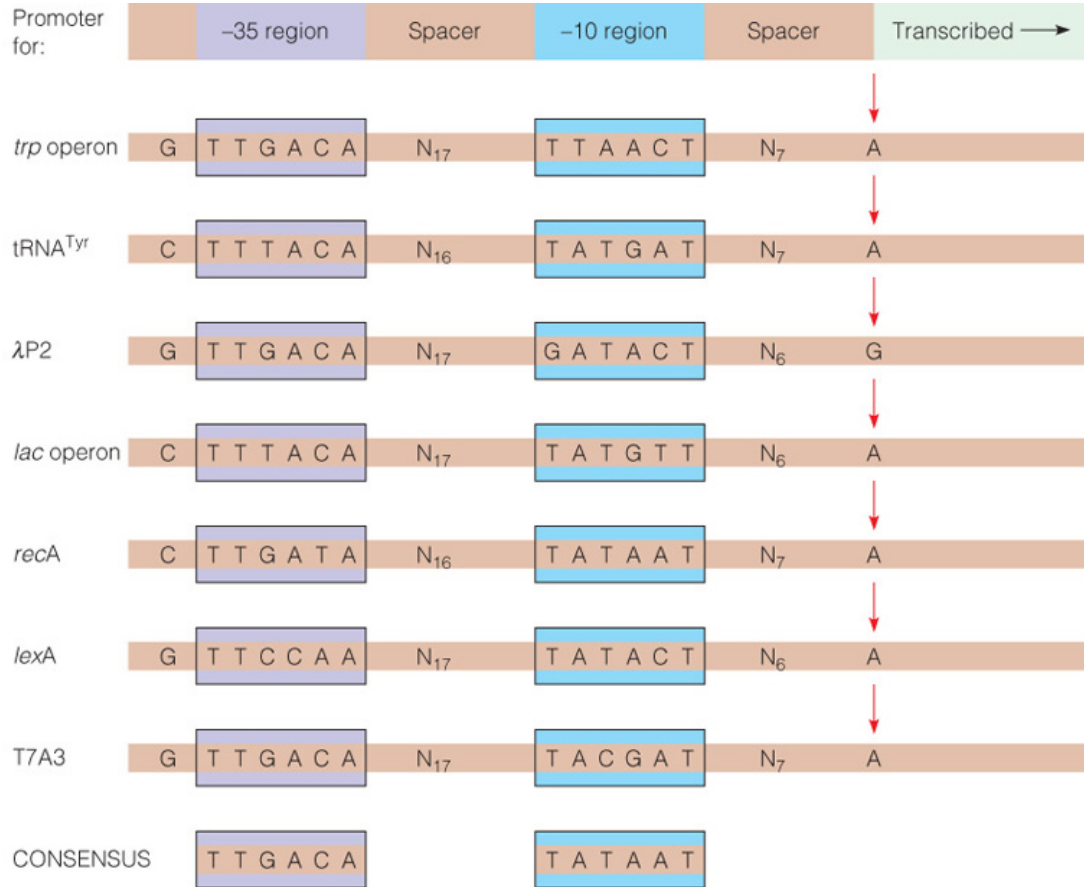


A top view of RNA polymerase II



Els promotors bacterians

FIGURE 27.13
 Conserved sequences in promoters recognized by *E. coli* RNA polymerase. Lengths of spacer sequences are also shown. Red arrows indicate transcription start site.



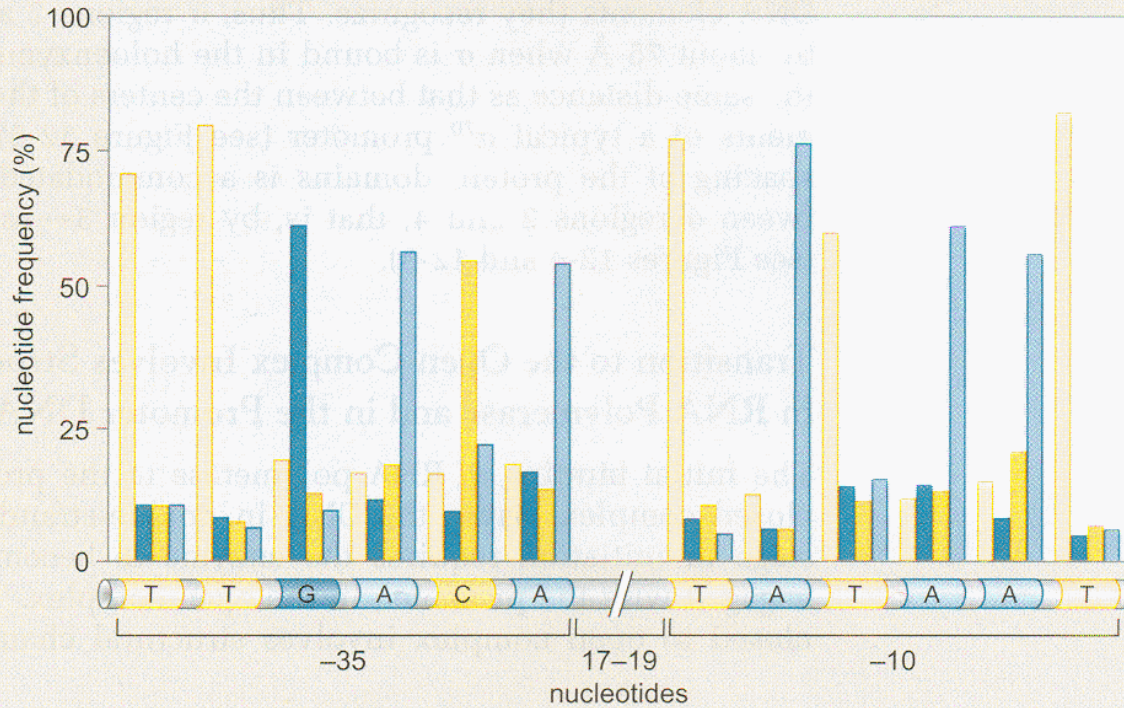
Els promotors bacterians: elements més conservats

- Punt d'inici de la transcripció (un nucleòtid de purina en el 90% dels casos: el més comú en *CAT*)
- Seqüència -10, caixa Pribnow
- Seqüència -35 més relaxada *TTGACA*
- Distància entre aquestes dues seqüències que oscil·la entre 16 i 18 pb en el 90% dels casos

The promoter has three components

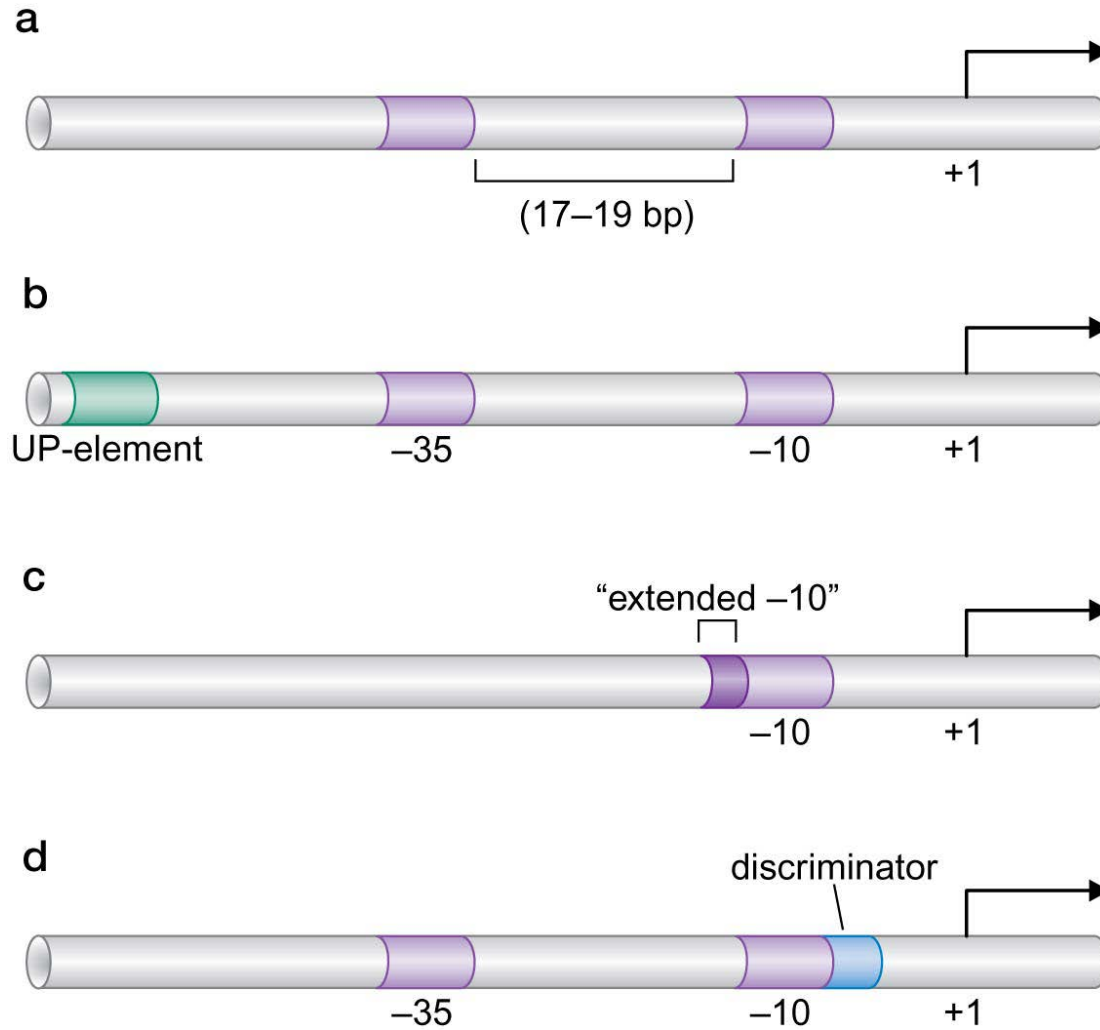


Els promotors bacterians

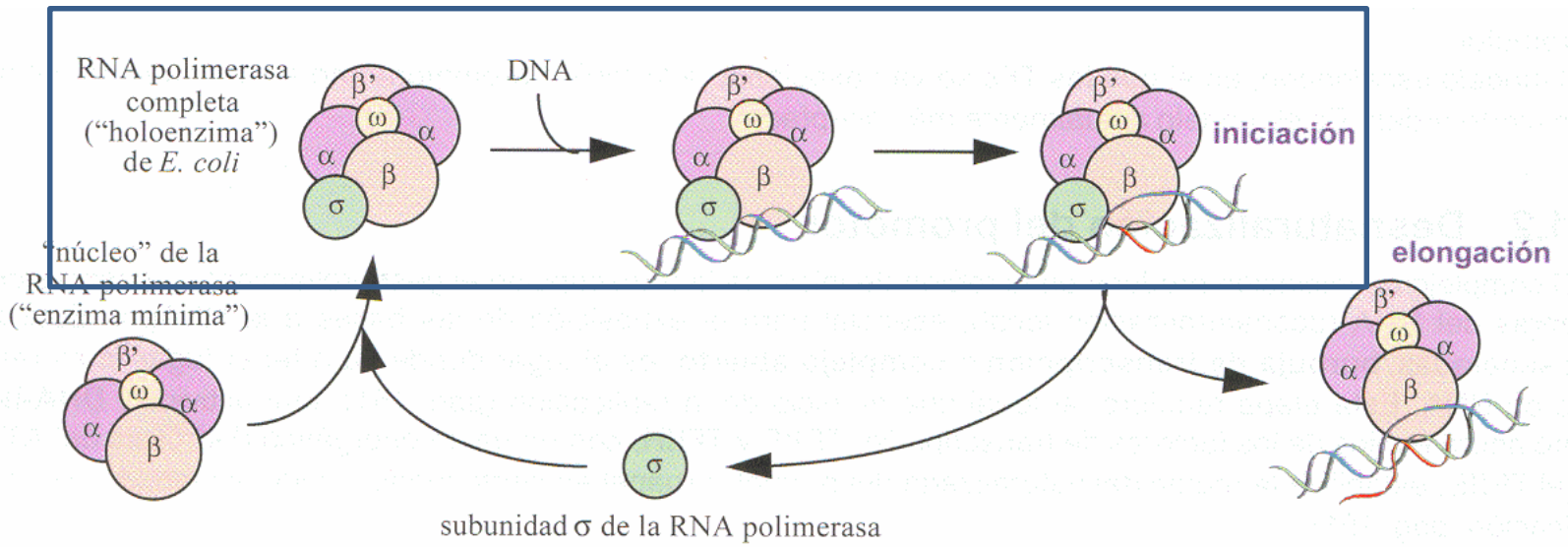


BOX 12-1 FIGURE 1 Promoter consensus sequence and spacing consensus. (Source: Redrawn from Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th edition, p. 308, fig 6.12. Copyright © 2002. Reproduced by permission of Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

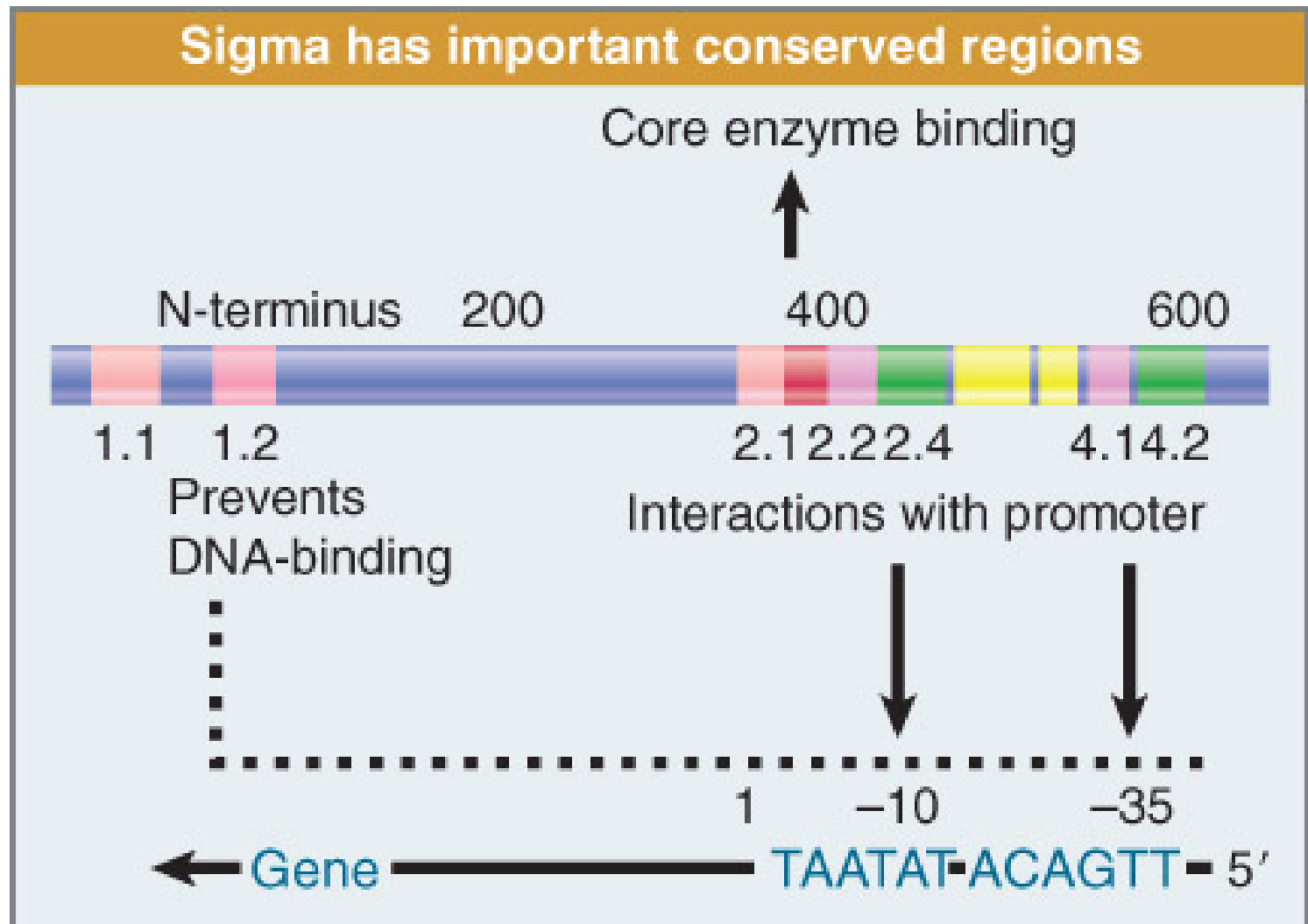
Els promotors bacterians: altres elements



Inici de la transcripció



Inici de la transcripció



Inici de la transcripció

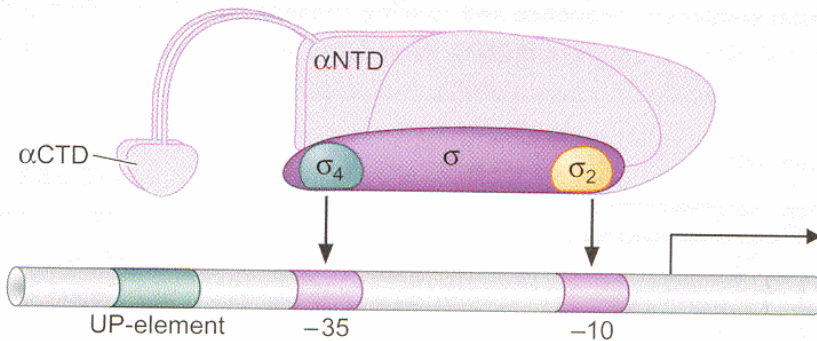
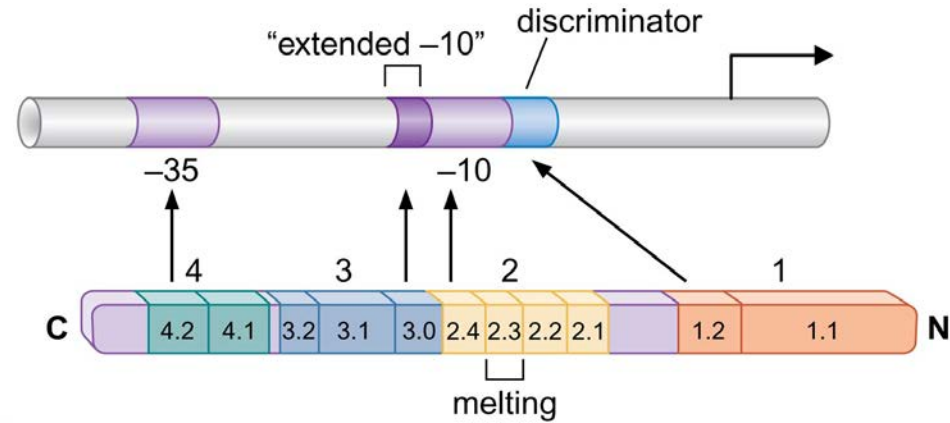
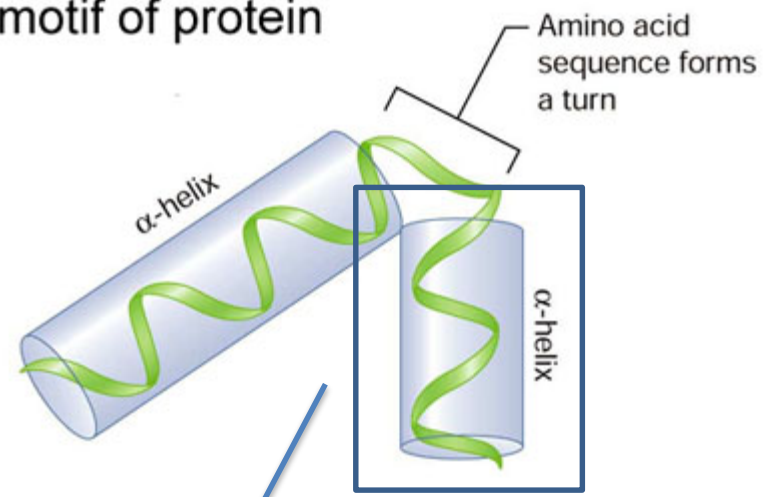


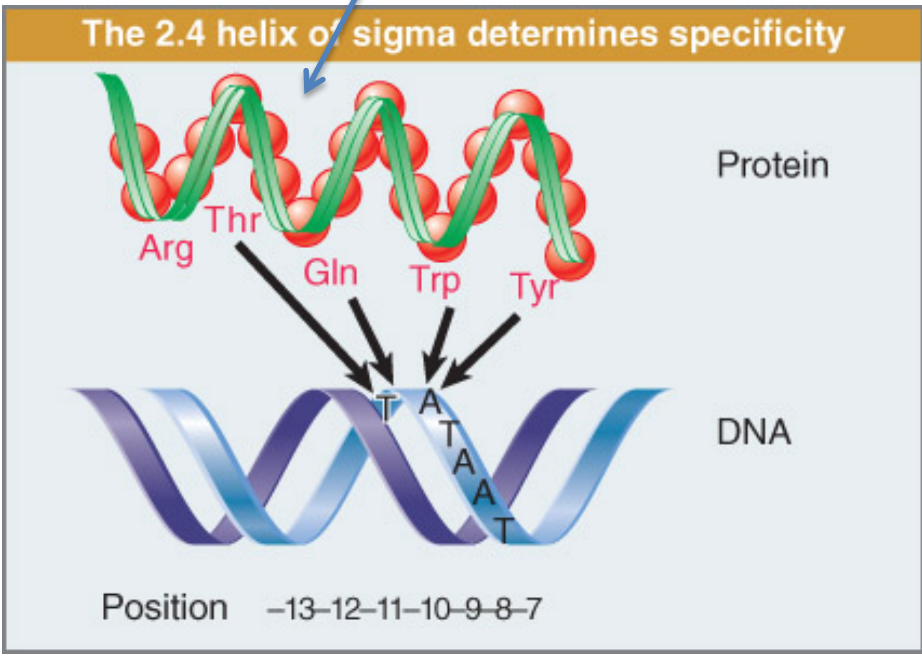
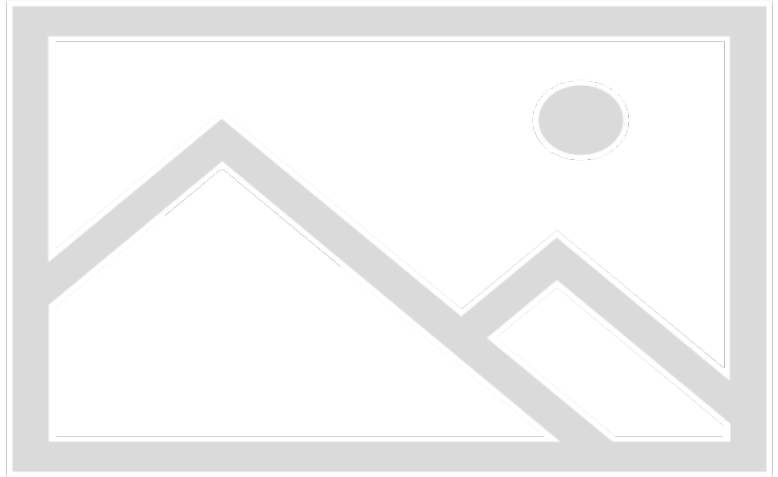
FIGURE 12-7 σ and α subunits recruit RNA polymerase core enzyme to the promoter.

The C-terminal domain of the α subunit (α CTD) recognizes the UP-element (where present), while σ regions 2 and 4 recognize the -10 and -35 regions respectively (see Figure 12-6). In this figure, RNA polymerase is shown in a rather different schematic form than presented in earlier figures. This form is particularly useful for indicating surfaces that touch DNA and regulating proteins and we use it again in some figures in Chapter 16 when we consider regulation of transcription in bacteria.

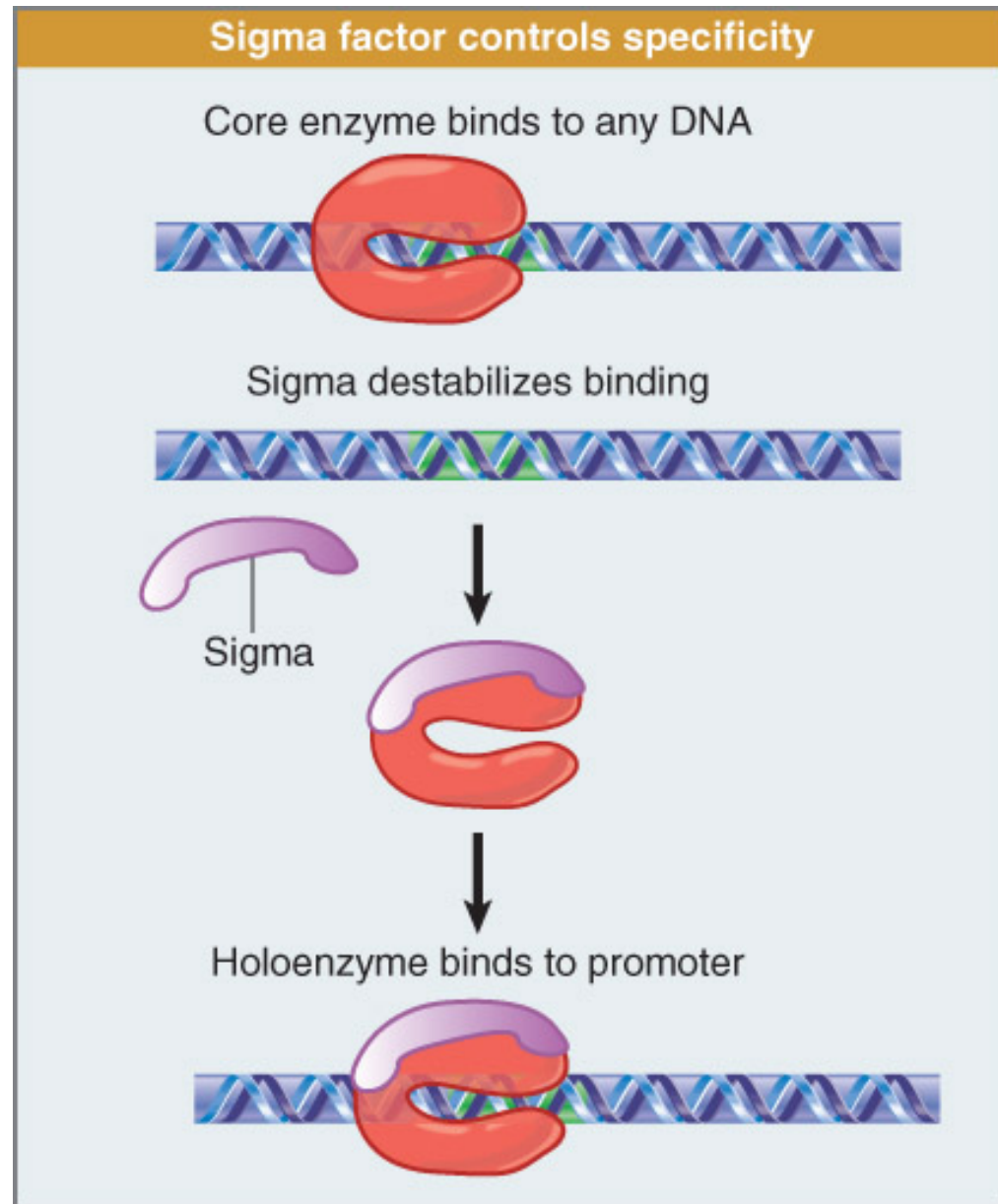
Helix-turn-helix motif of protein



Inici de la transcripció



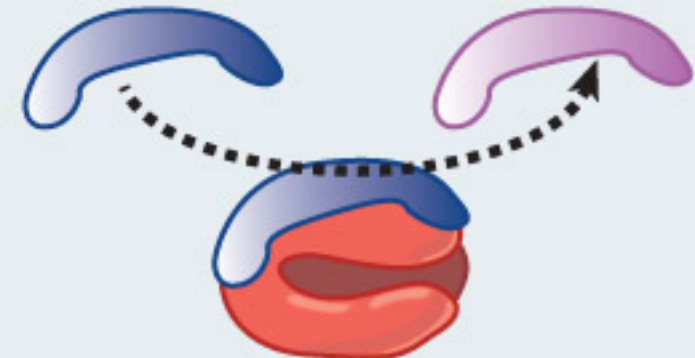
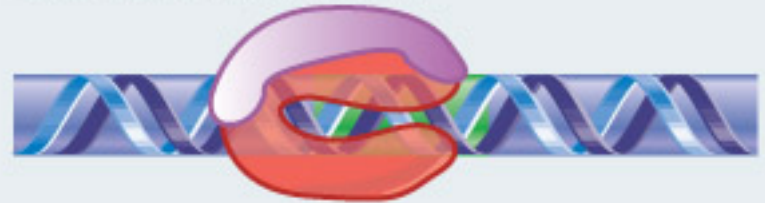
Inici de la transcripció: funció del factor



Inici de la transcripció: funció del factor sigma

Sigma controls promoter recognition

Holoenzyme with σ^{70} recognizes one set of promoters



Substitution of sigma factor causes enzyme to recognize a different set of promoters



Inici de la transcripció: funció del factor sigma

E. coli has several sigma factors

Gene	Factor	Use
<i>rpoD</i>	σ^{70}	general
<i>rpoS</i>	σ^S	stress
<i>rpoH</i>	σ^{32}	heat shock
<i>rpoE</i>	σ^E	heat shock
<i>rpoN</i>	σ^{54}	nitrogen starvation
<i>fliA</i>	σ^{28} (σ^F)	flagellar synthesis

TABLE 27.2 σ Factors in *E. coli*

Name	Structural Gene	Genes Whose Transcription Is Stimulated by Binding to Core Polymerase
σ^{70}	<i>rpoD</i>	“Housekeeping genes” (those involved in central pathways)
σ^N	<i>rpoN</i>	Genes involved in adaptation to nitrogen stress
σ^S	<i>rpoS</i>	Genes involved in adaptation to stationary phase
σ^H	<i>rpoH</i>	Genes involved in adaptation to heat shock
σ^F	<i>rpoF</i>	Genes related to flagella formation and chemotaxis
σ^E	<i>rpoE</i>	Adaptation to extreme heat shock; extracytoplasmic functions
σ^{FecI}	<i>fecI</i>	Ferric citrate transport; extracytoplasmic functions

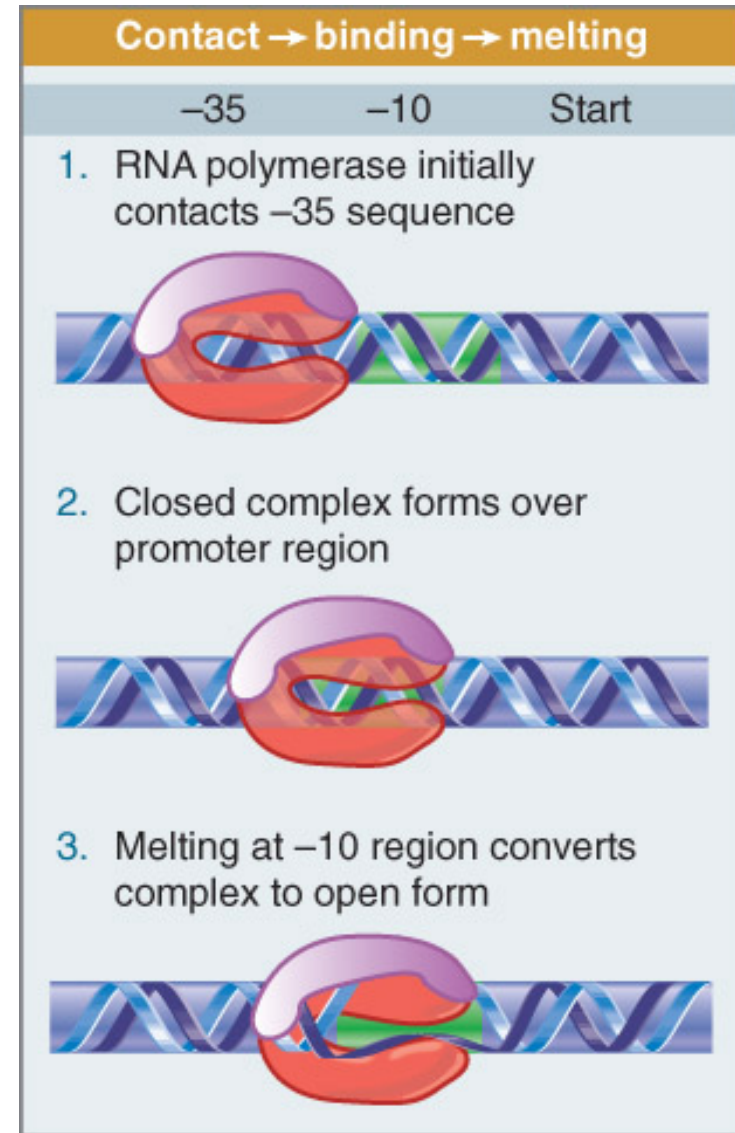
Adapted from *Annual Review of Microbiology* 54:499–518, A. Ishihama, Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. © 2000 Annual Reviews.

Inici de la transcripció: funció del factor sigma

Sigma factors recognize promoters by consensus sequences

Gene	Factor	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
rp σ D	σ^{70}	TTGACA	16–18 bp	TATAAT
rp σ H	σ^{32}	CCCTTGAA	13–15 bp	CCCGATNT
rp σ N	σ^{54}	CTGGNA	6 bp	TTGCA
fliA	σ^{28} (σ^F)	CTAAA	15 bp	GCCGATAA
sigH	σ^H	AGGANPuPu	11–12 bp	GCTGAATCA

Inici de la transcripció



Inici de la transcripció

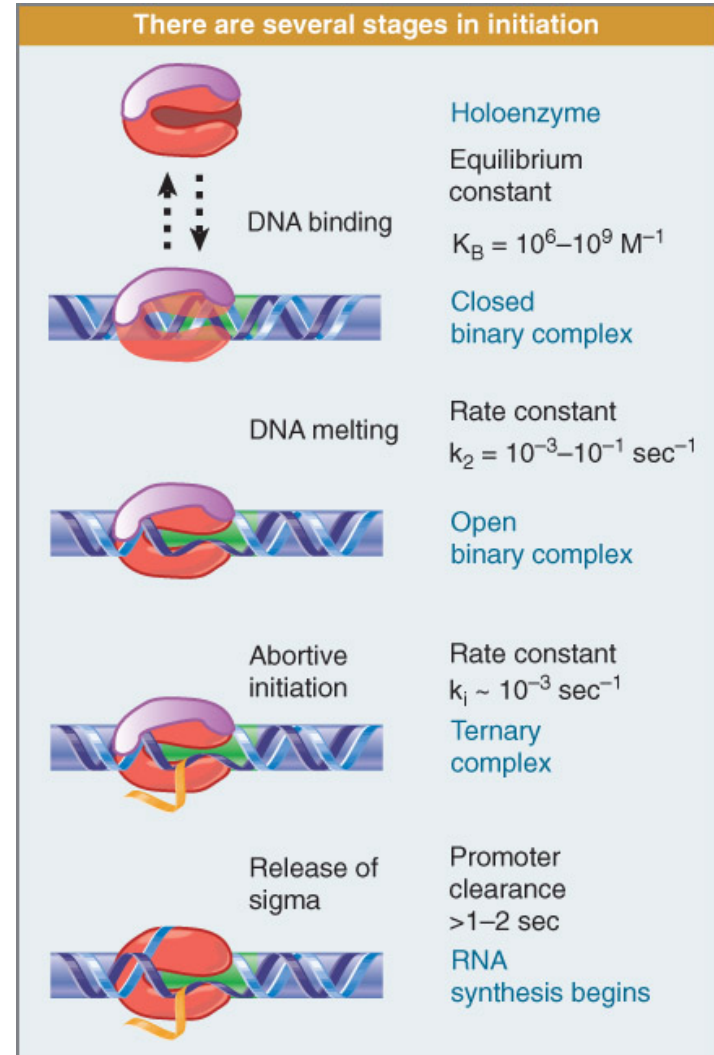
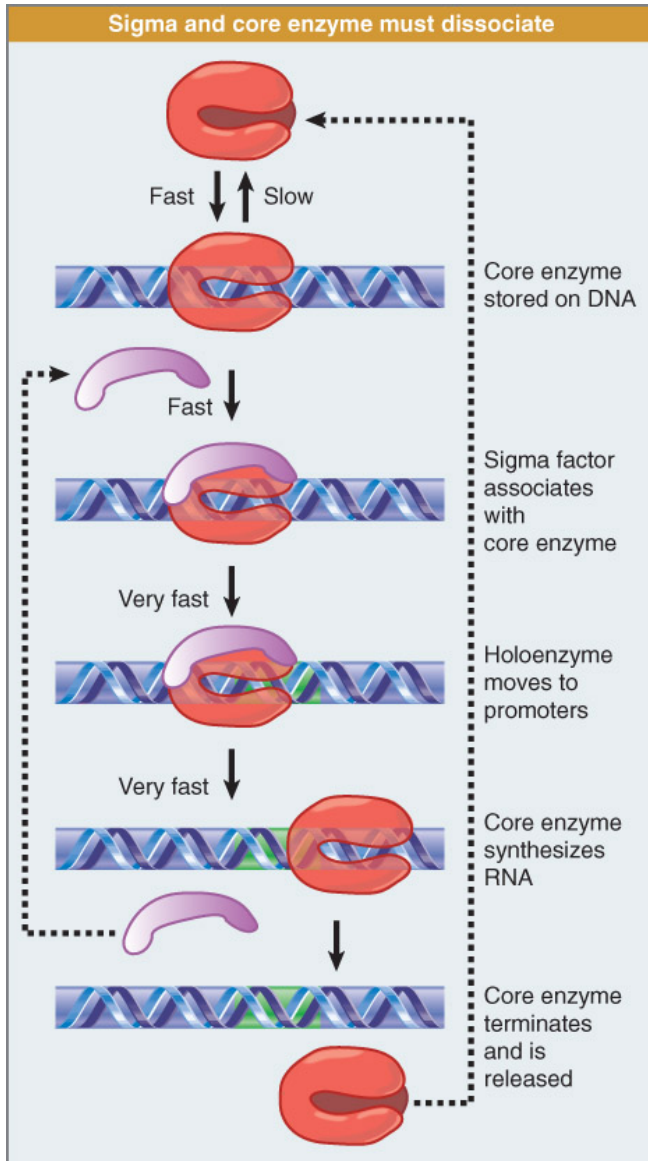
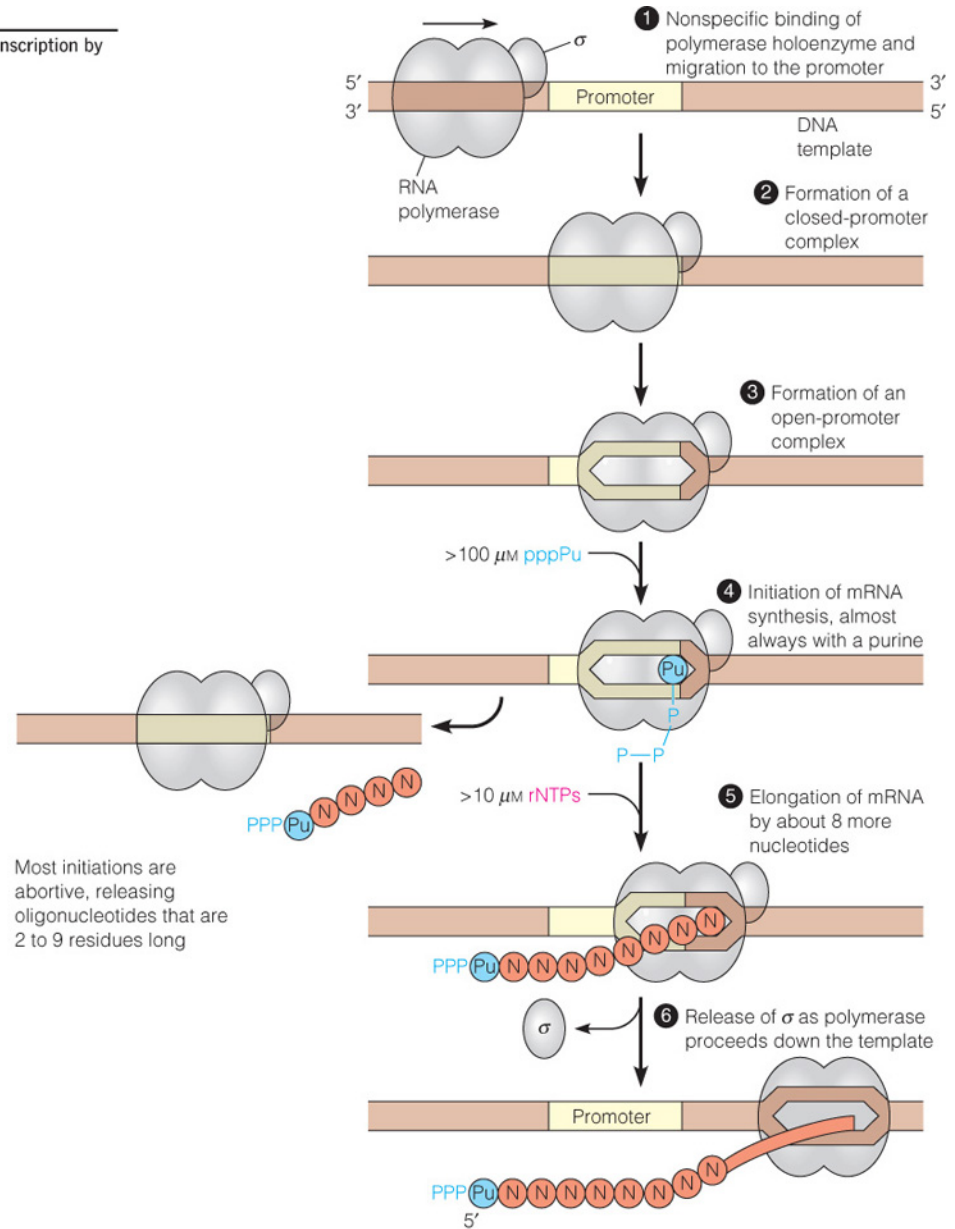


FIGURE 27.7
Initiation and elongation steps of transcription by bacterial RNA polymerase.



Most initiations are abortive, releasing oligonucleotides that are 2 to 9 residues long

Inici de la transcripció

Inici de la transcripció

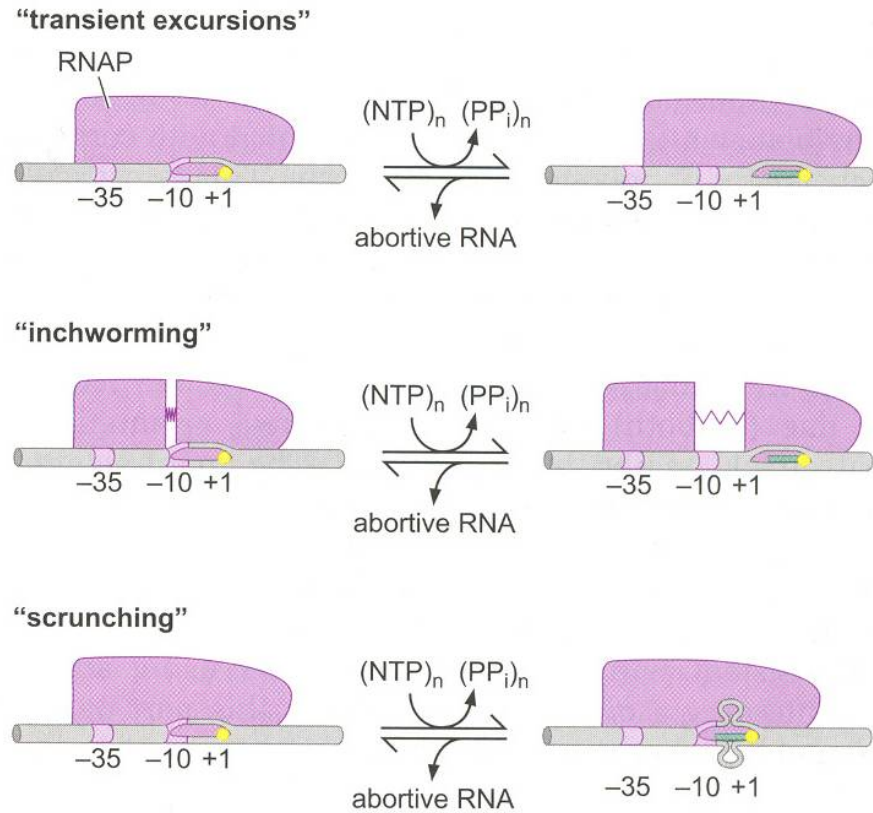
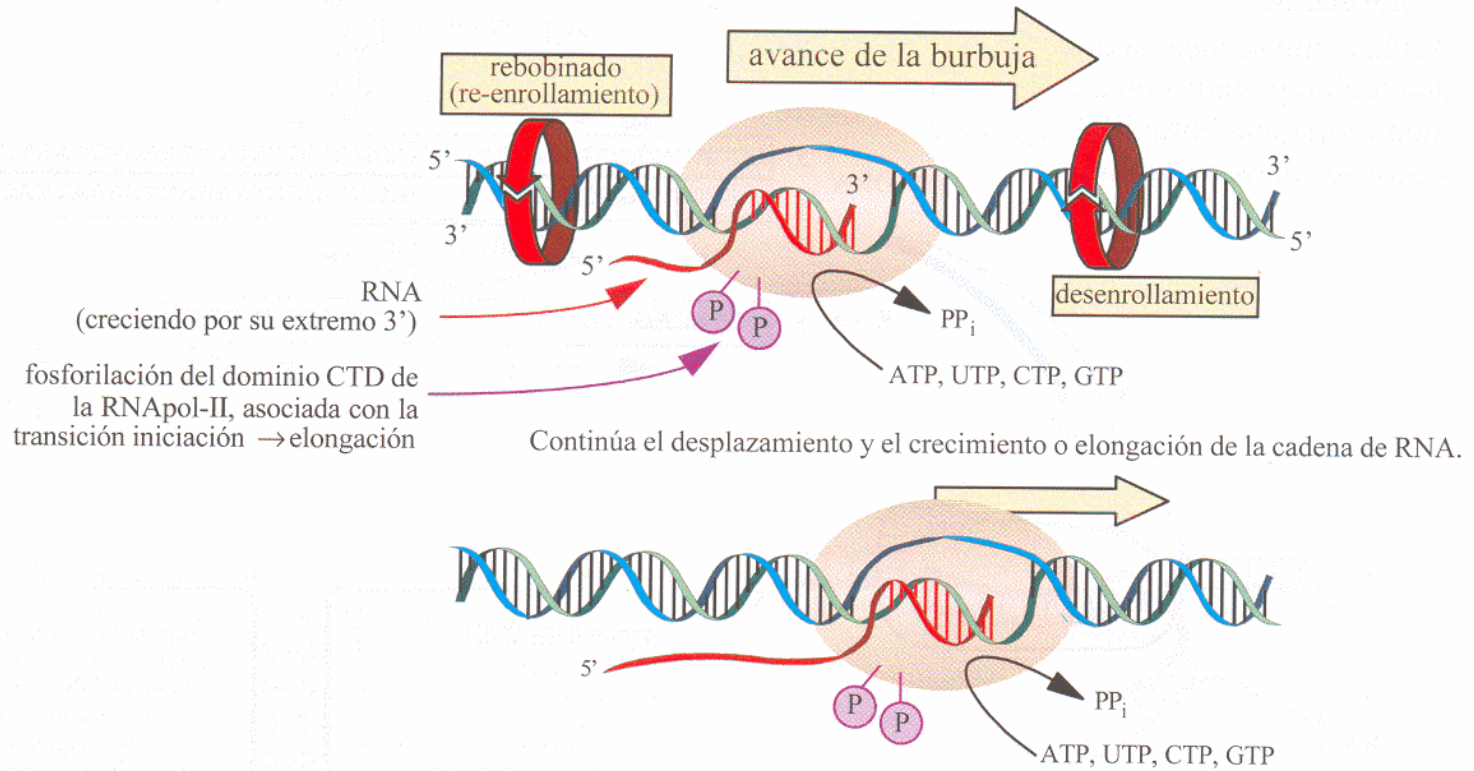


FIGURE 12-9 Mechanism of initial transcription. During initial transcription, the active center of RNA polymerase is translocated forward relative to the DNA template and synthesizes short transcripts before aborting, then repeats this cycle until it escapes the promoter. Three models have been proposed to account for this and are shown in the figure. According to the first of these—transient excursions (shown at the top)—polymerase moves along the DNA. In the second—inchworming (shown in the middle)—the front part of the enzyme moves along the DNA, but because of a flexible region within the enzyme, the back part of the enzyme can remain stationary at the promoter. In the third model—scrunching (shown at the bottom)—the enzyme remains stationary and pulls the DNA into it. The differences between these models are explained in the text, as is the evidence supporting scrunching as the true picture of what goes on. (Modified, with permission, from Kapanidis A.N. et al. 2006. *Science* 314: 1144–1147, Fig. 1a. © AAAS.)

Elongación de la transcripción

E
L
O
N
G
A
C
I
O
N

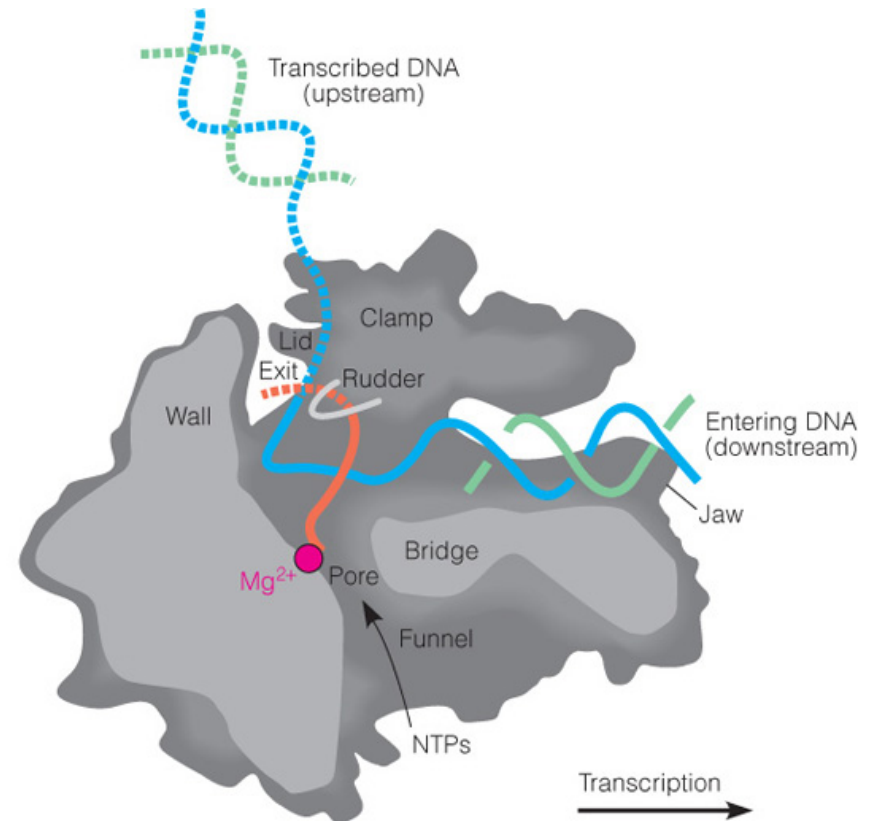


Alguns detalls sobre l'elongació de la transcripció

FIGURE 27.10

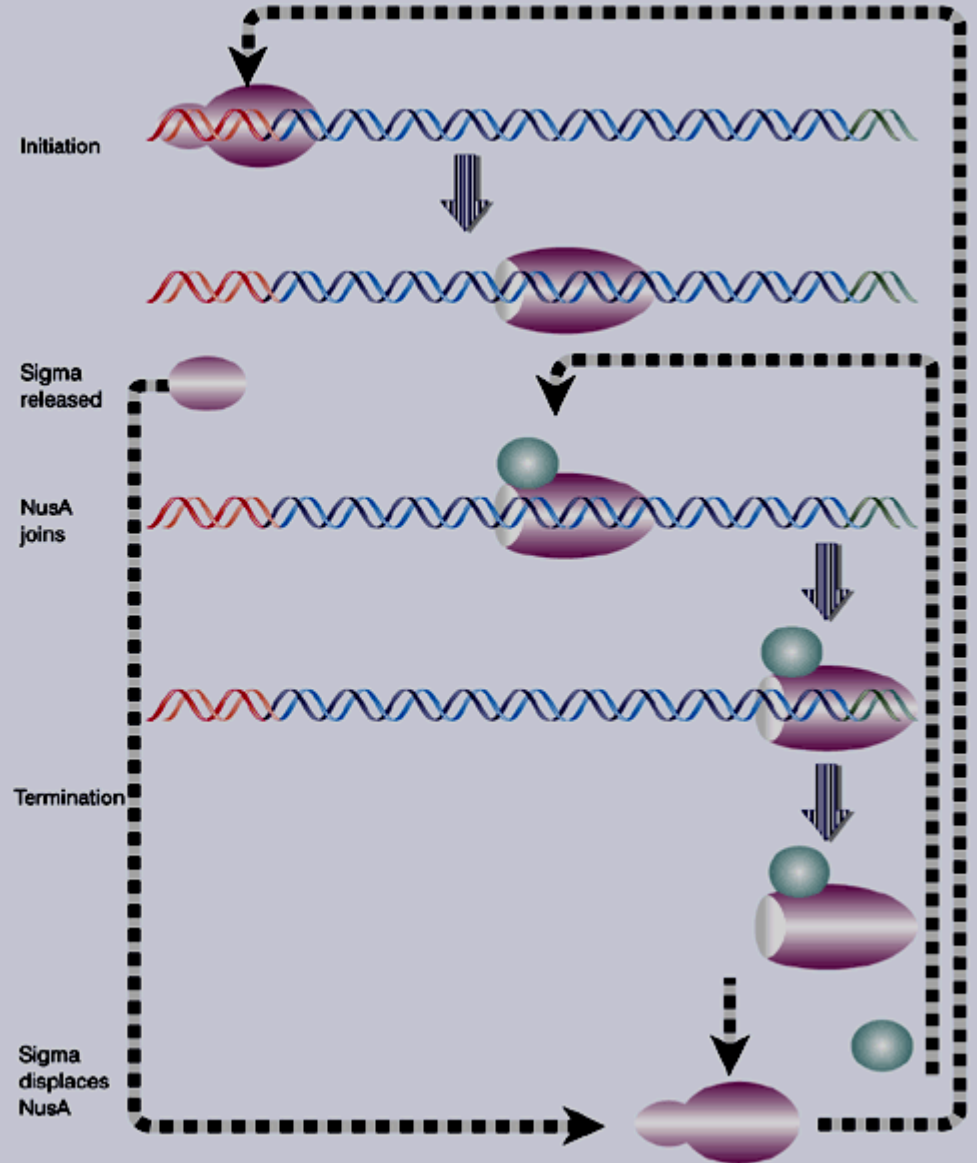
Cutaway view of the RNA polymerase II elongation complex. Cut surfaces of the protein are lightly shaded, and the remainder, at the back, is darkly shaded. Direction of polymerase motion is left to right as shown. The template DNA strand is in blue. The nontemplate strand, in green, is not shown because it is disordered, except when paired with template DNA. RNA that is hybridized to the template DNA strand is in orange. DNA entering the enzyme is gripped by protein "jaws" (upper jaw not shown in this cutaway model). The 3' end of growing RNA is adjacent to one of the catalytically essential Mg^{2+} ions. The wall forces the DNA to turn. rNTPs probably enter the active site, as shown, through a funnel structure and pore. The 5' end of the growing RNA chain is diverted from the DNA template by a protein loop called the rudder, which limits the length of RNA hybridized to template DNA. The rudder and lid, which guide the exit of RNA, emanate from a large clamp that swings from back to front, as shown, over the catalytic site and contribute to the binding of nucleic acids, and hence, to the high processivity of transcription.

Courtesy of Dr. Roger Kornberg.



Els factors Nus
s'associen amb l'RNA
polimerasa
durant
l'elongació

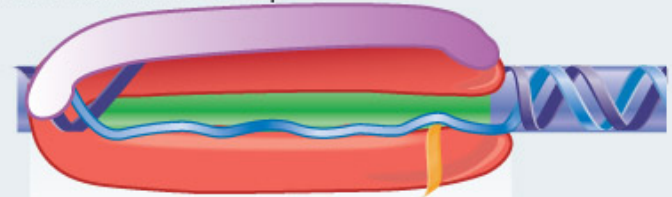
RNA
polymerase may
alternate between
initiation-competent
forms as sigma and Nus
factors alternatively
replace one another on
the core enzyme.



Elongació de la transcripció

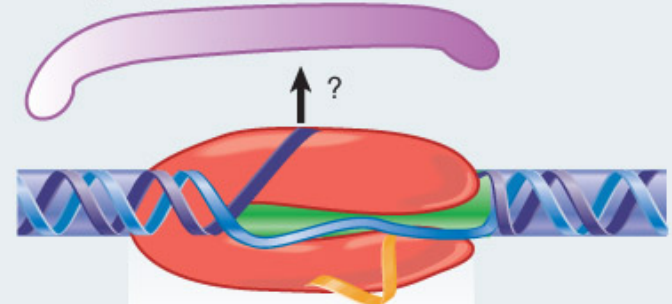
RNA polymerase changes size at initiation

Initiation complex contains sigma and covers 75–80 bp



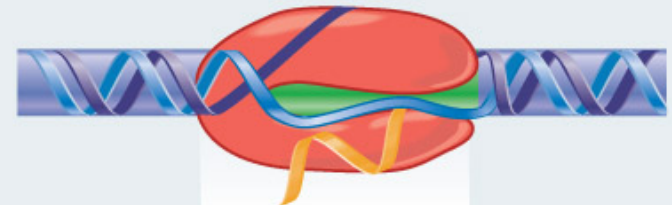
-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

Initial elongation complex forms at 10 bases, may lose sigma, and loses contacts from -35 to -55



-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

General elongation complex forms at 15–20 bases and covers 30–40 bp



-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

Elongació de la transcripció

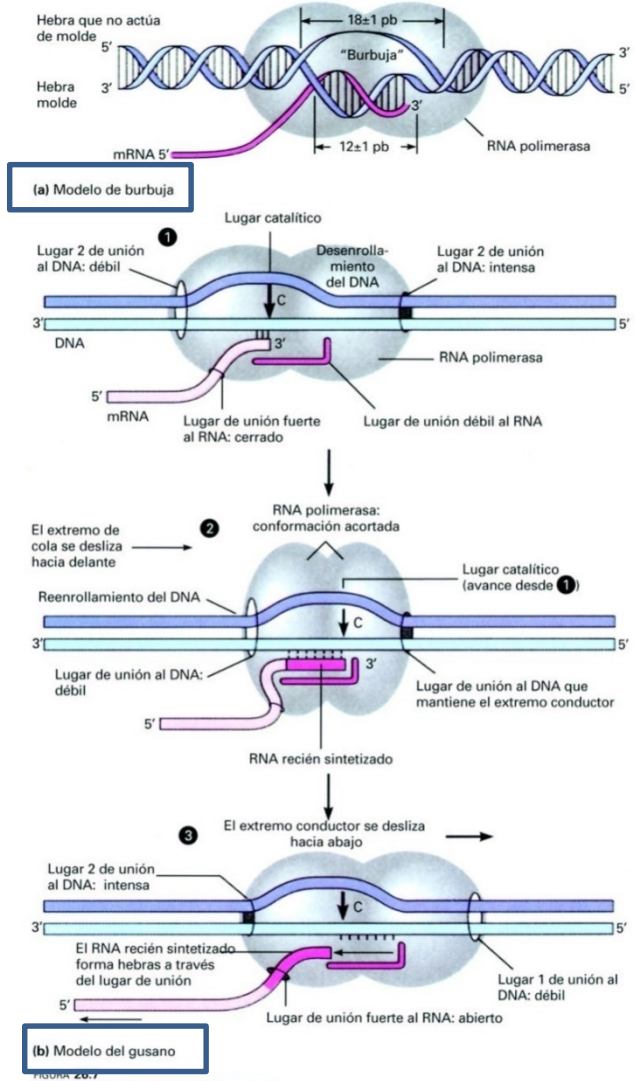
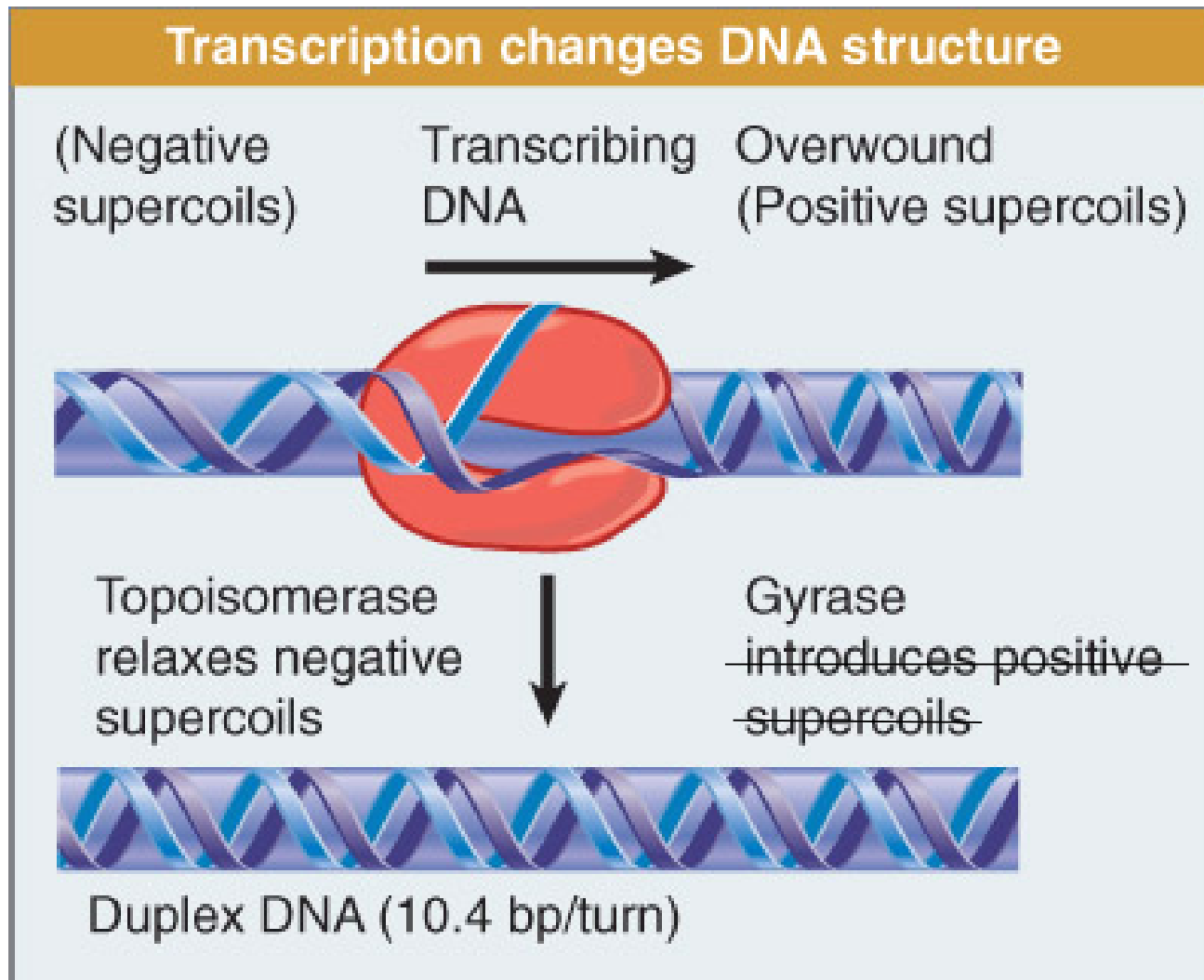


FIGURA 20-7 Modelos de la elongación del transcrito.

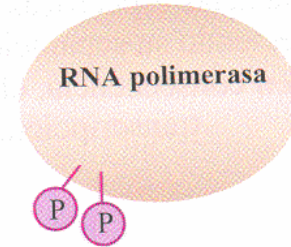
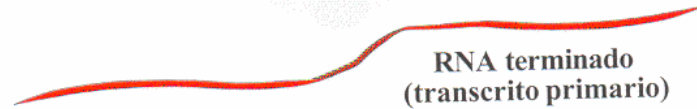
Elongació de la transcripció



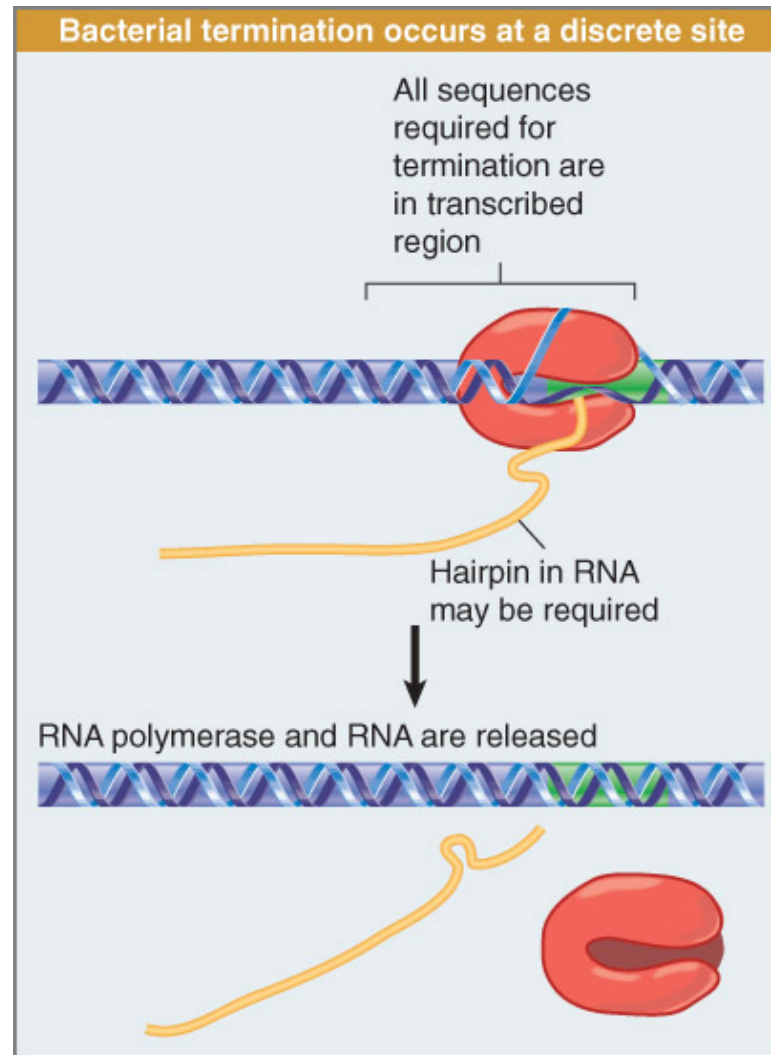
Acabament de la transcripció

TERMINACION

Al alcanzar las secuencias de terminación, la RNA polimerasa interrumpe la síntesis de RNA y se separa del DNA.



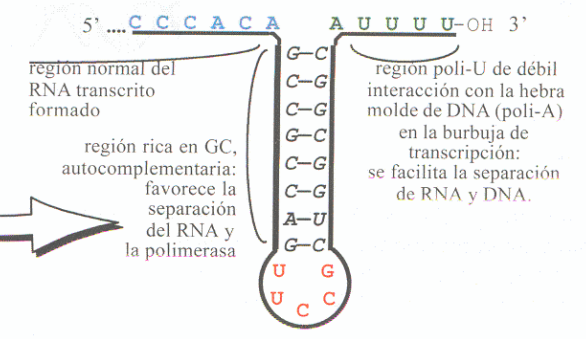
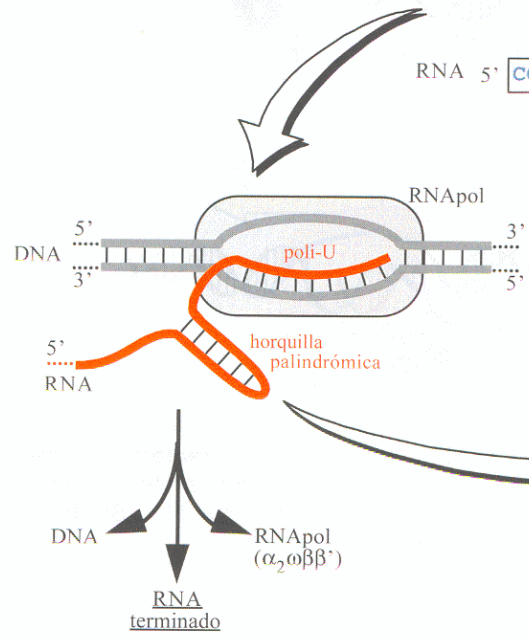
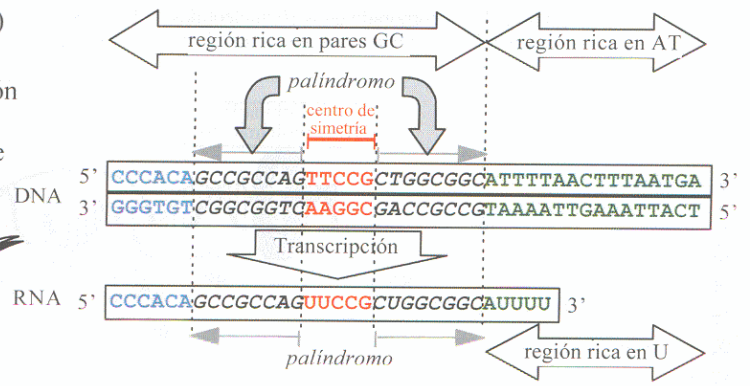
Acabament de la transcripció



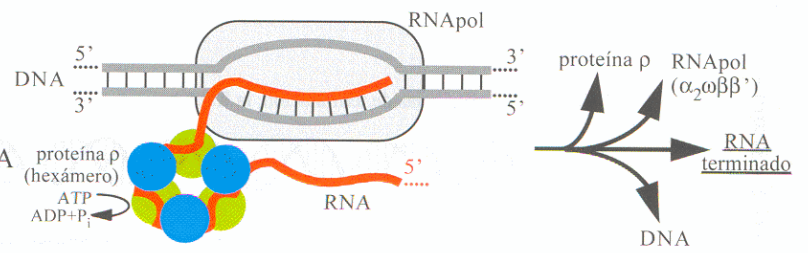
Acabament de la transcripció

Terminación independiente de ρ (ro) o intrínseca

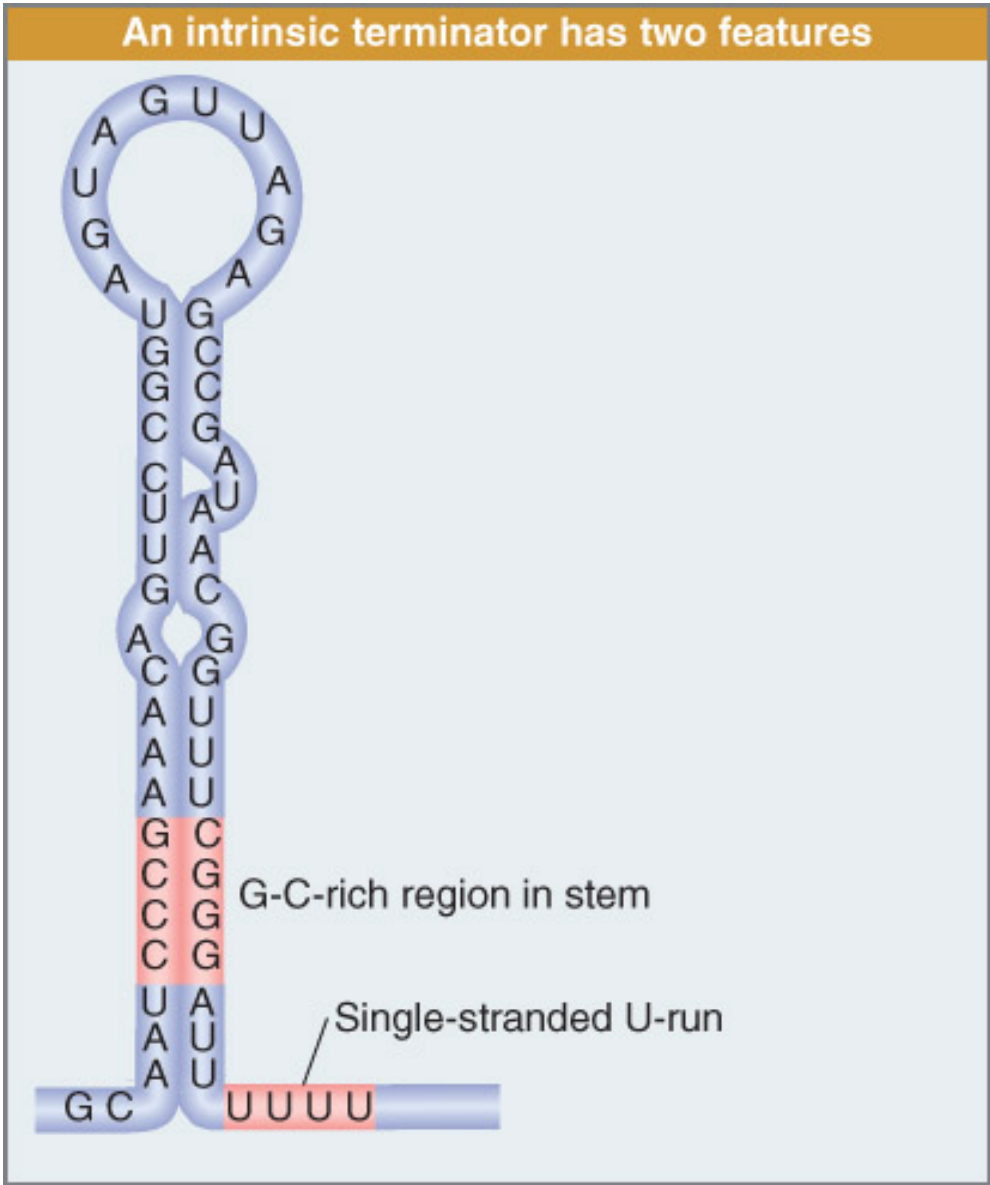
Actúa como secuencia de terminación una región palindrómica en el RNA (que forma una horquilla) seguida de varios residuos de uridina.



Terminación dependiente de ρ (ro)
La proteína ρ se une a secuencias específicas del RNA, favoreciendo su separación del DNA y, en consecuencia, el fin de la transcripción.



Acabament
intrínsec



Acabament intrínsec

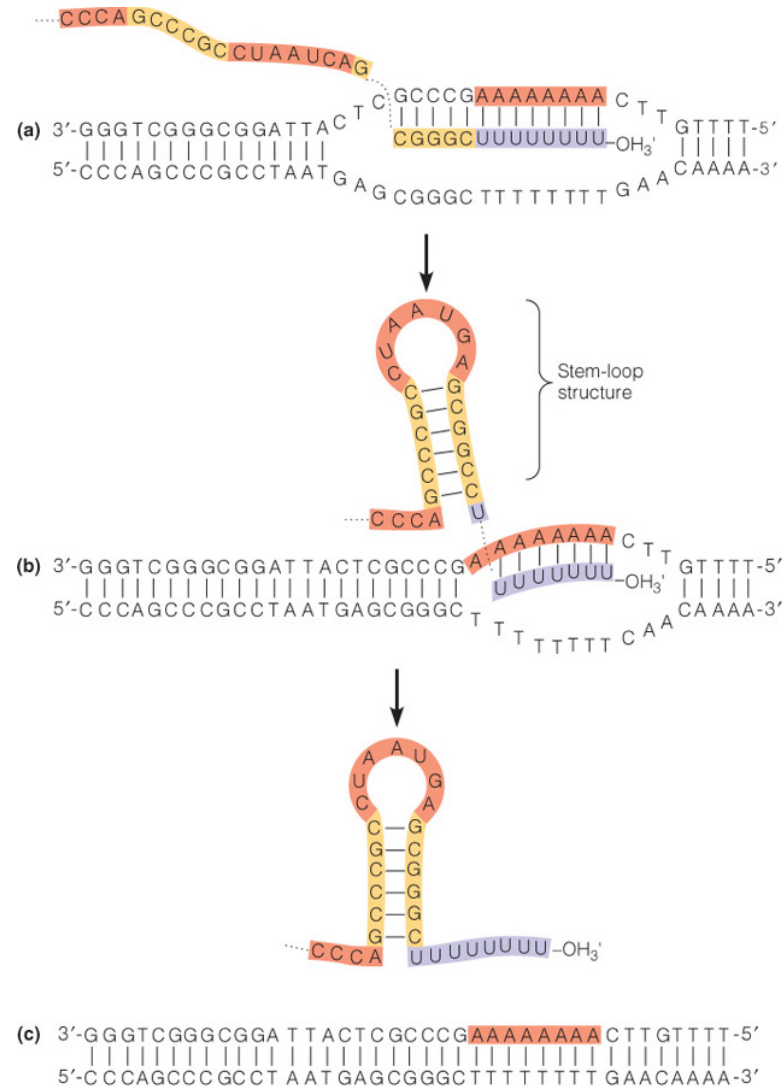


FIGURE 27.16

A model for factor-independent termination of transcription. (a) An A-rich segment of the template (orange segment on right) has just been transcribed into a U-rich mRNA segment. (b) RNA-RNA duplex, stabilized by G-C base pairs (yellow), eliminates some of the base pairing between template and transcript. (c) The unstable A-U bonds linking transcript to template hybrid dissociate, releasing the transcript.

Acabament dependent de rho

A rho hexamer translocates along RNA

Rho monomer has two domains

N-terminal RNA-binding domain

C-terminal ATPase domain

Hexameric ring binds RNA

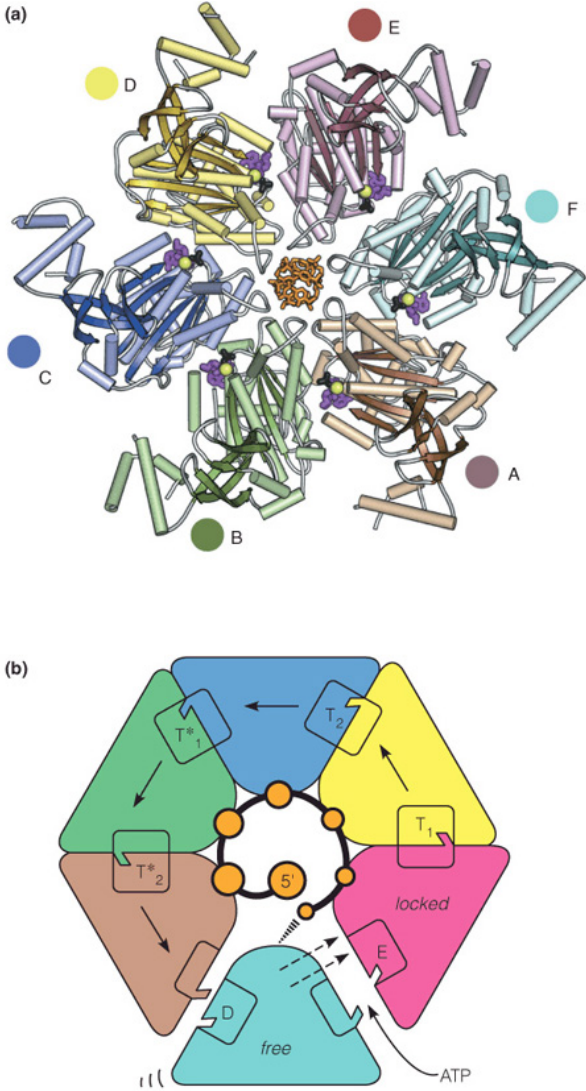


FIGURE 27.18
 Crystal structure of *E. coli* ρ. (a) RNA is shown in the central channel in orange. ADP is in magenta, BeF₃ is in black, and Mg²⁺ is in green. (b) Schematic diagram of the helicase reaction. For details see text. PDB ID, 3ICE.

Reprinted from Cell 139:523–535, N. D. Thomsen and J. M. Berger, Running in reverse: The structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. © 2009, with permission from Elsevier.

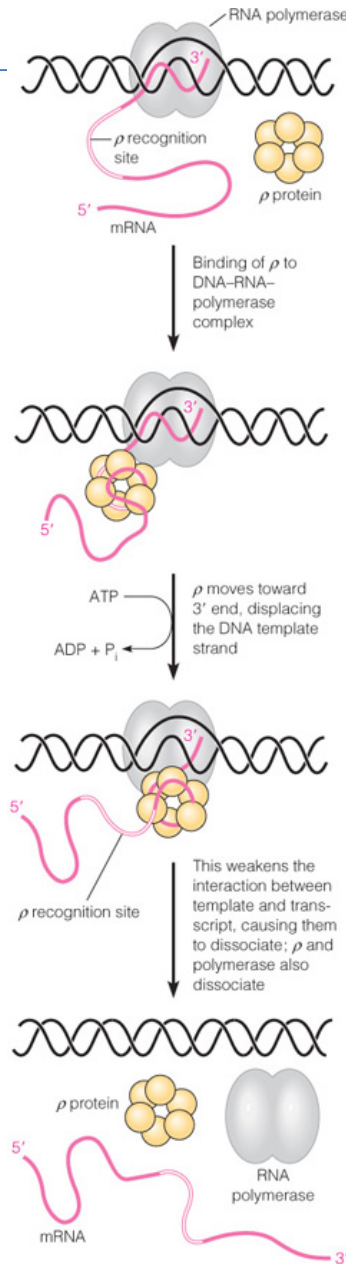
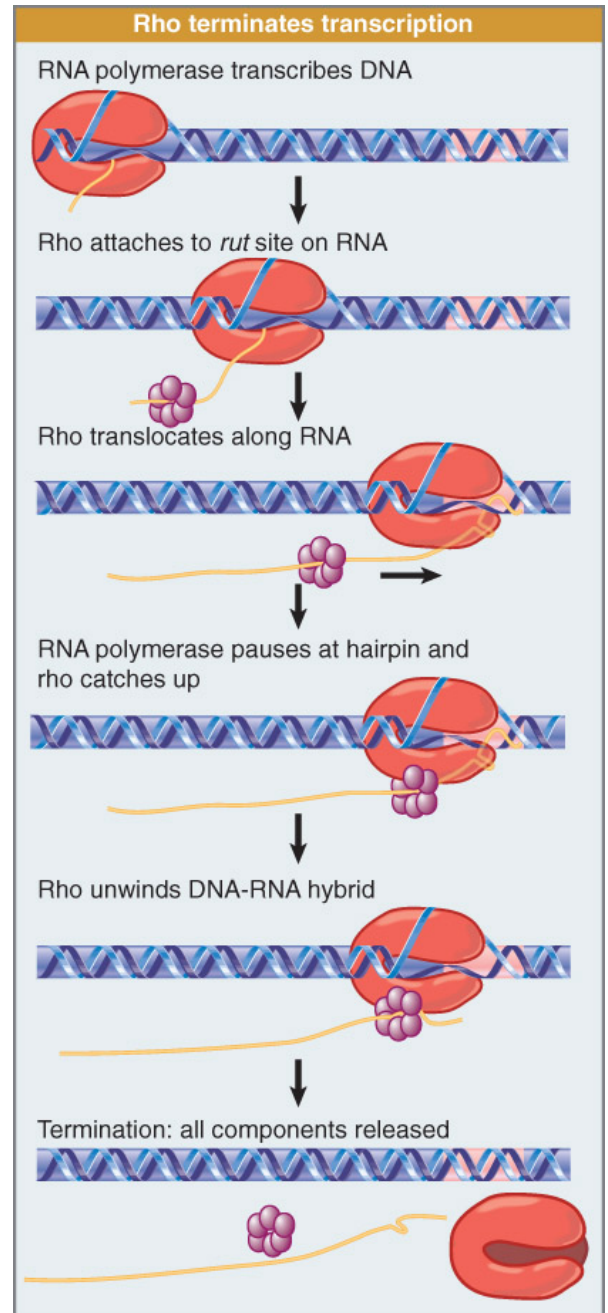


FIGURE 27.17

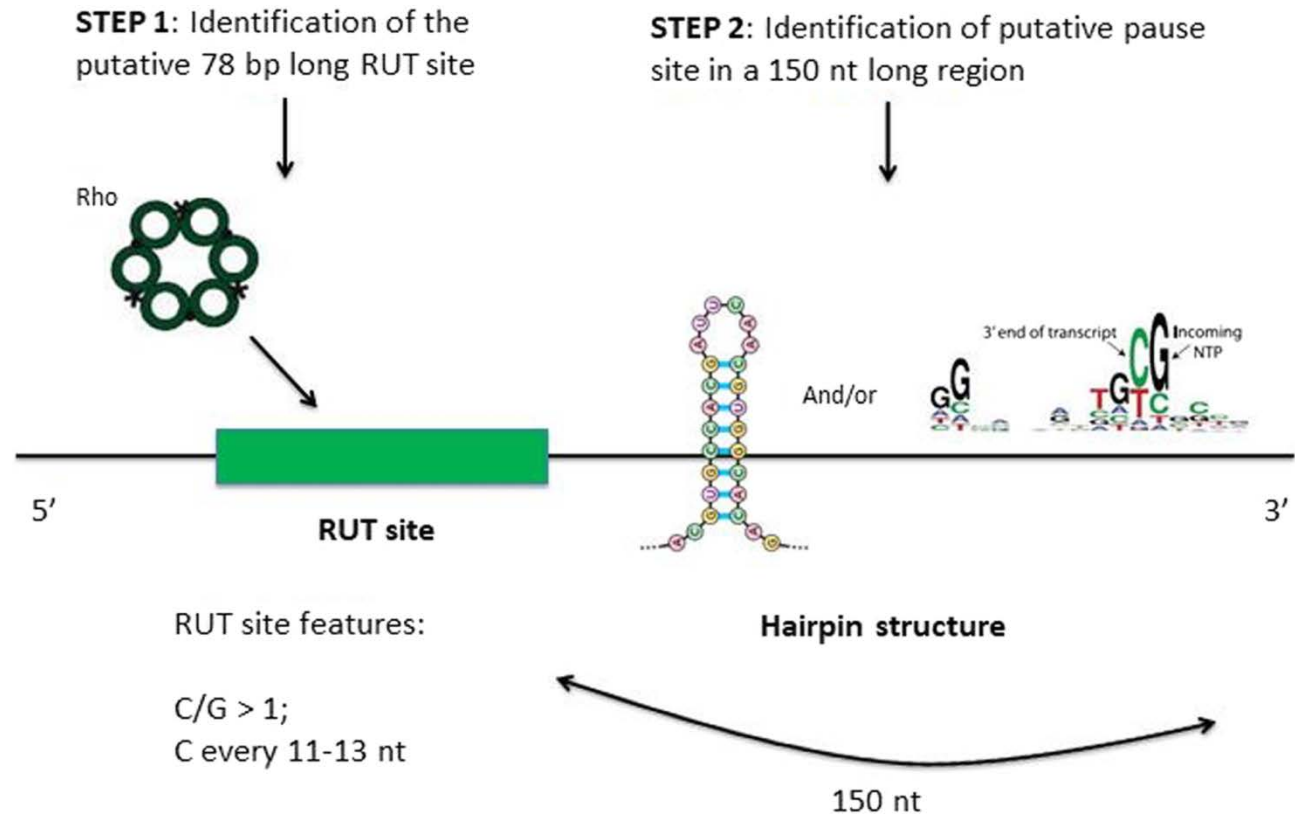
ρ factor–dependent termination. ρ binds to a site on the nascent transcript and unwinds the RNA–DNA duplex. Once ρ reaches RNA polymerase, interaction with bound NusA protein (not shown) leads to termination.



Acabament
dependent de
rho

L'acabament dependent de rho també necessita un element de pausa

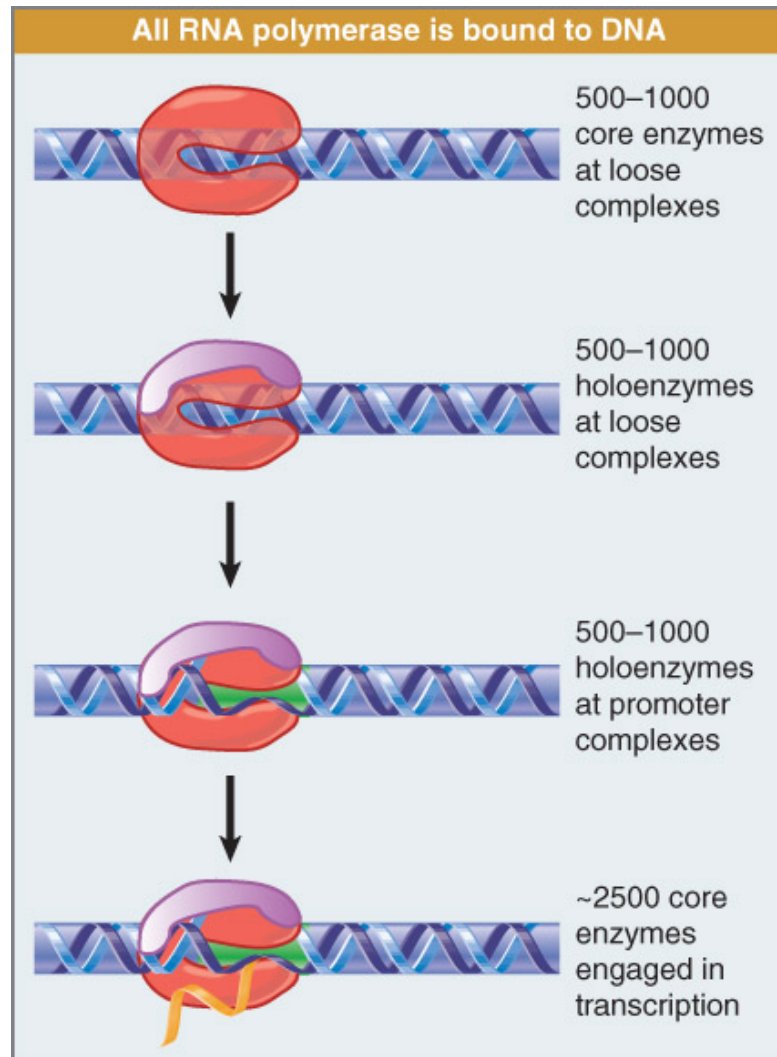
Di Salvo, M., Puccio, S., Peano, C. *et al.* RhoTermPredict: an algorithm for predicting Rho-dependent transcription terminators based on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella enterica* databases. *BMC Bioinformatics* 20, 117 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2704-x>



This consensus motif and its extension (78 nt) fit well with structural and functional properties of Rho hexamer and its interaction with C-rich RNA sequences at the level of its primary RNA binding domain

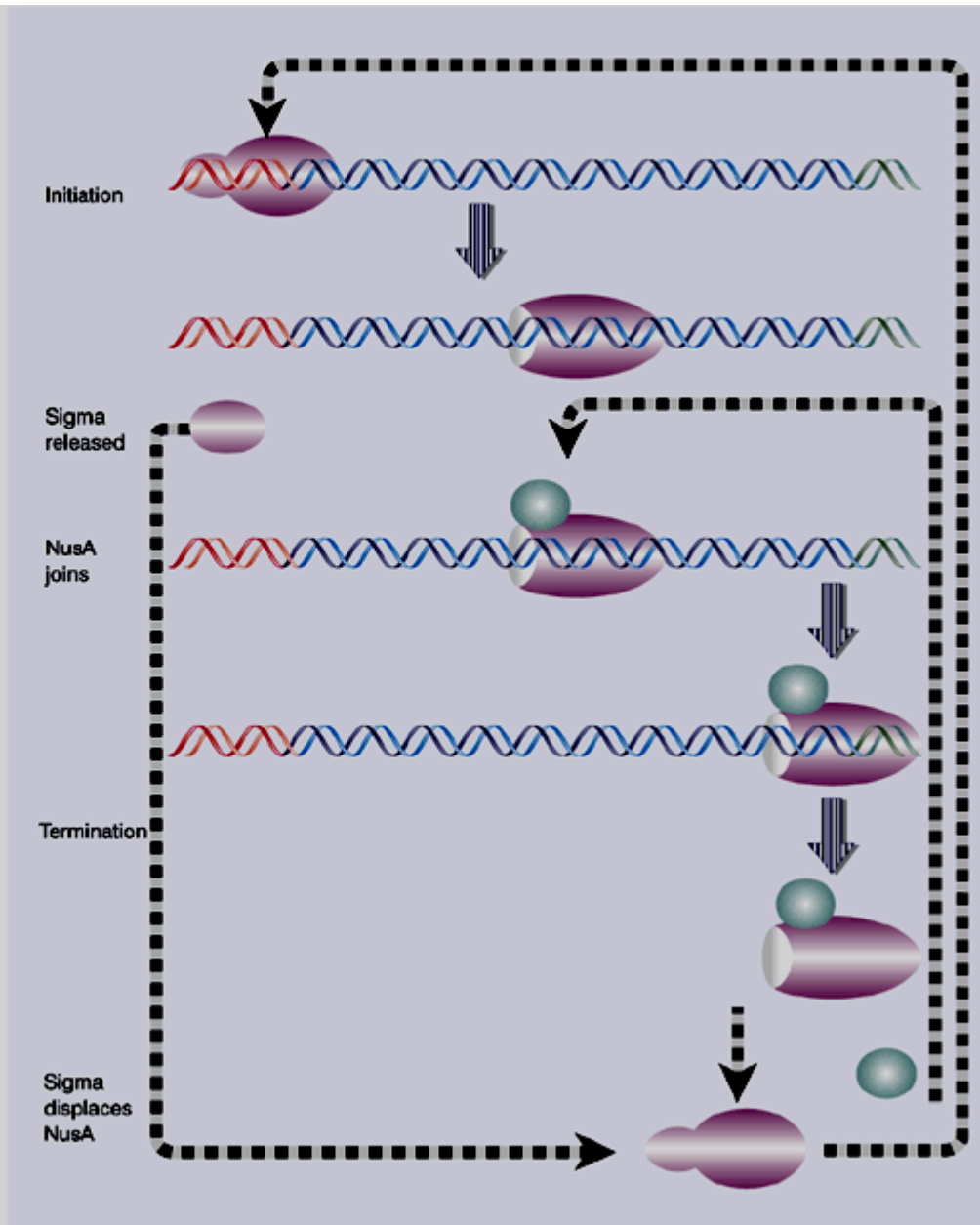
Identification of a putative pause site for RNAP in a region extended up to 150 nt downstream from the 3'-end of the selected RUT site. The RNAP pause sites searched were hairpin structures (with a GC-rich stem and a loop constituted by 4–8 nt). Alternatively, in the same 150 nt long region, we considered as putative RNAP pause site the presence of the consensus pause-inducing sequence element $G_{-11}G_{-10}(C/T)_{-1}G_{+1}$ (where -1 corresponds to the position of the RNA 3' end)

Les RNA polimerases formen diferents associacions amb el DNA



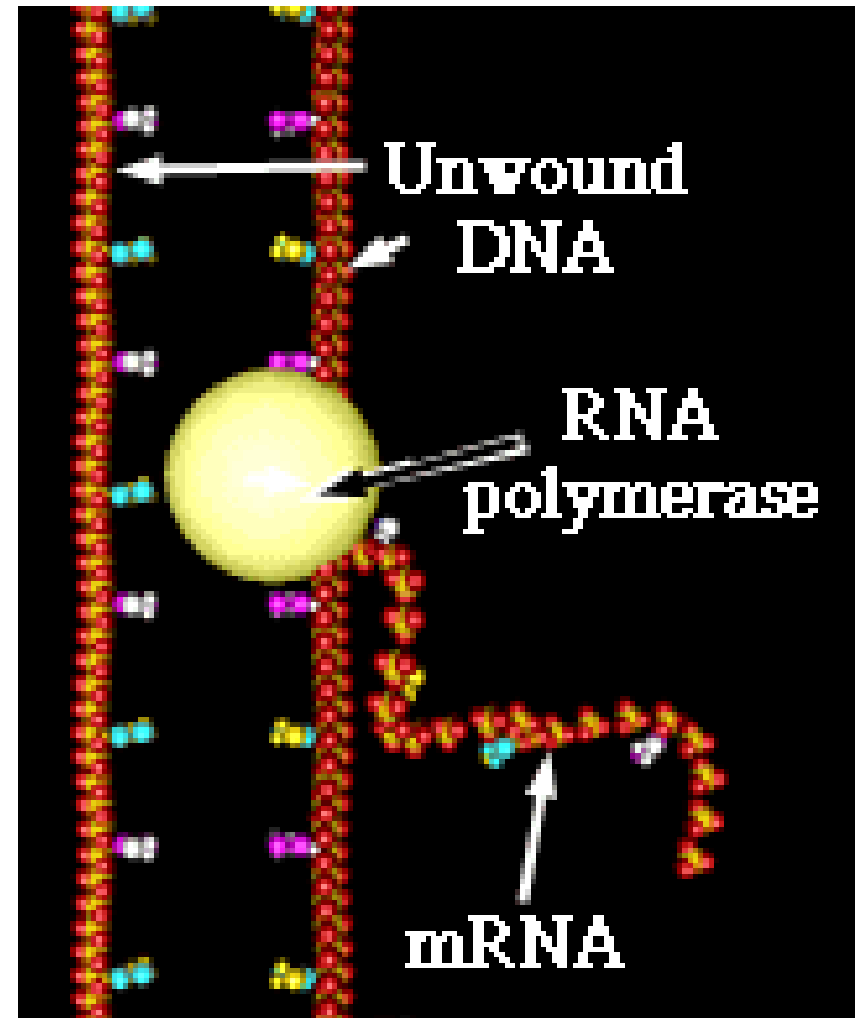
L'RNA
polimerasa
adopta
diferents
formes
durant la
transcripció

RNA
polymerase may
alternate between
initiation-competent
and
termination-competent
forms as sigma and Nus
factors alternatively
replace one another on
the core enzyme.



Tema 4

Regulació de la transcripció en procariotes. Regulació de promotors pel factor σ . Regulació *cis/trans*, control negatiu/positiu, inducció/repressió. Promotors regulats per la proteïna CAP. L'operó lactosa. L'operó triptòfan: atenuació. Antiterminació.



Introducció a la regulació de la transcripció

Regulació transcripcional: aspectes bàsics

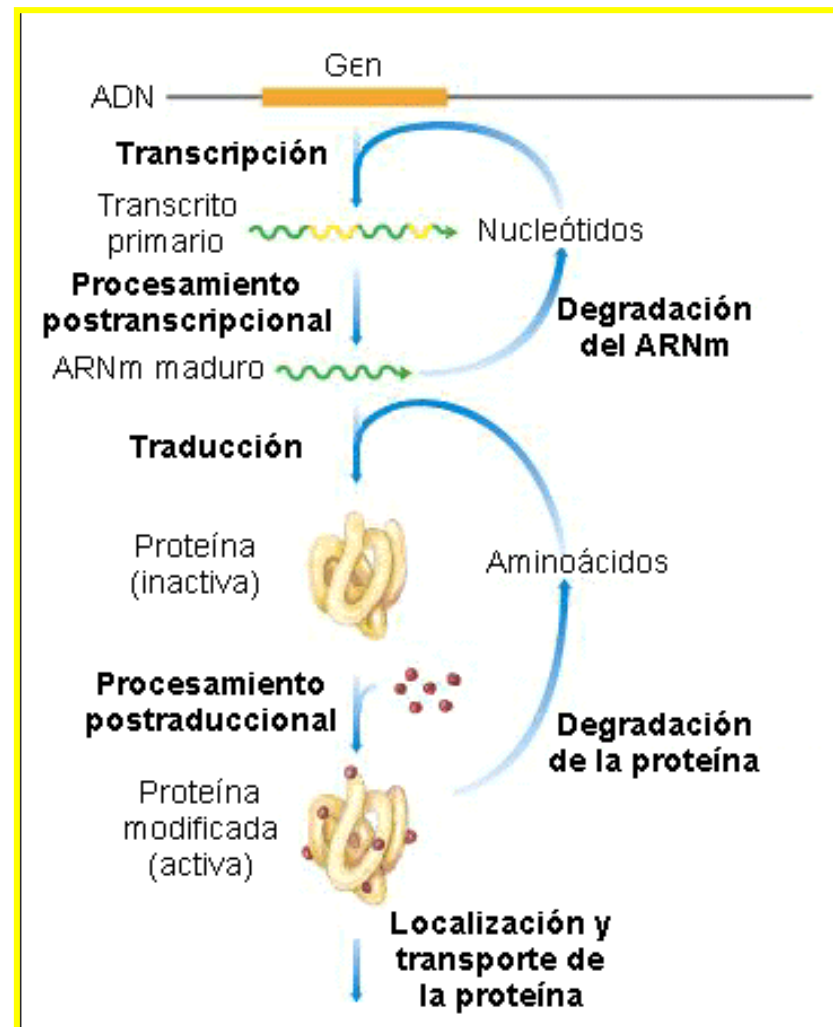
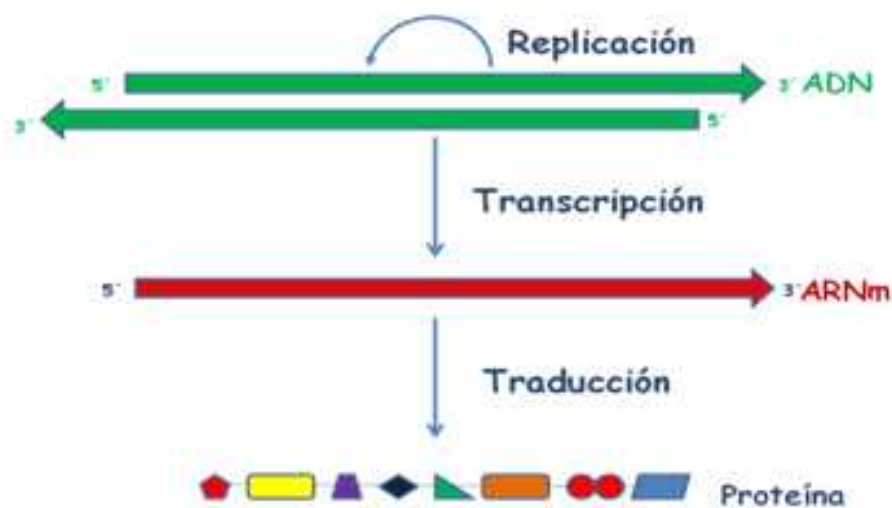
No totes les proteïnes són necessàries en tot moment ni als mateixos nivells

La síntesi de proteïnes és costosa per a la cèl·lula



Són necessaris mecanismes de control de l'expressió gènica, que poden actuar en qualsevol etapa del flux de la informació genètica

Regulació transcripcional: aspectes bàsics



Regulació transcripcional en procariotes: aspectes bàsics

No tots els gens s'expressen alhora ni al mateix nivell

Gens constitutius: s'expressen independentment de les condicions ambientals.

El seu nivell d'expressió depèn de la força del seu promotor

Gens regulats: s'expressen segons les condicions.

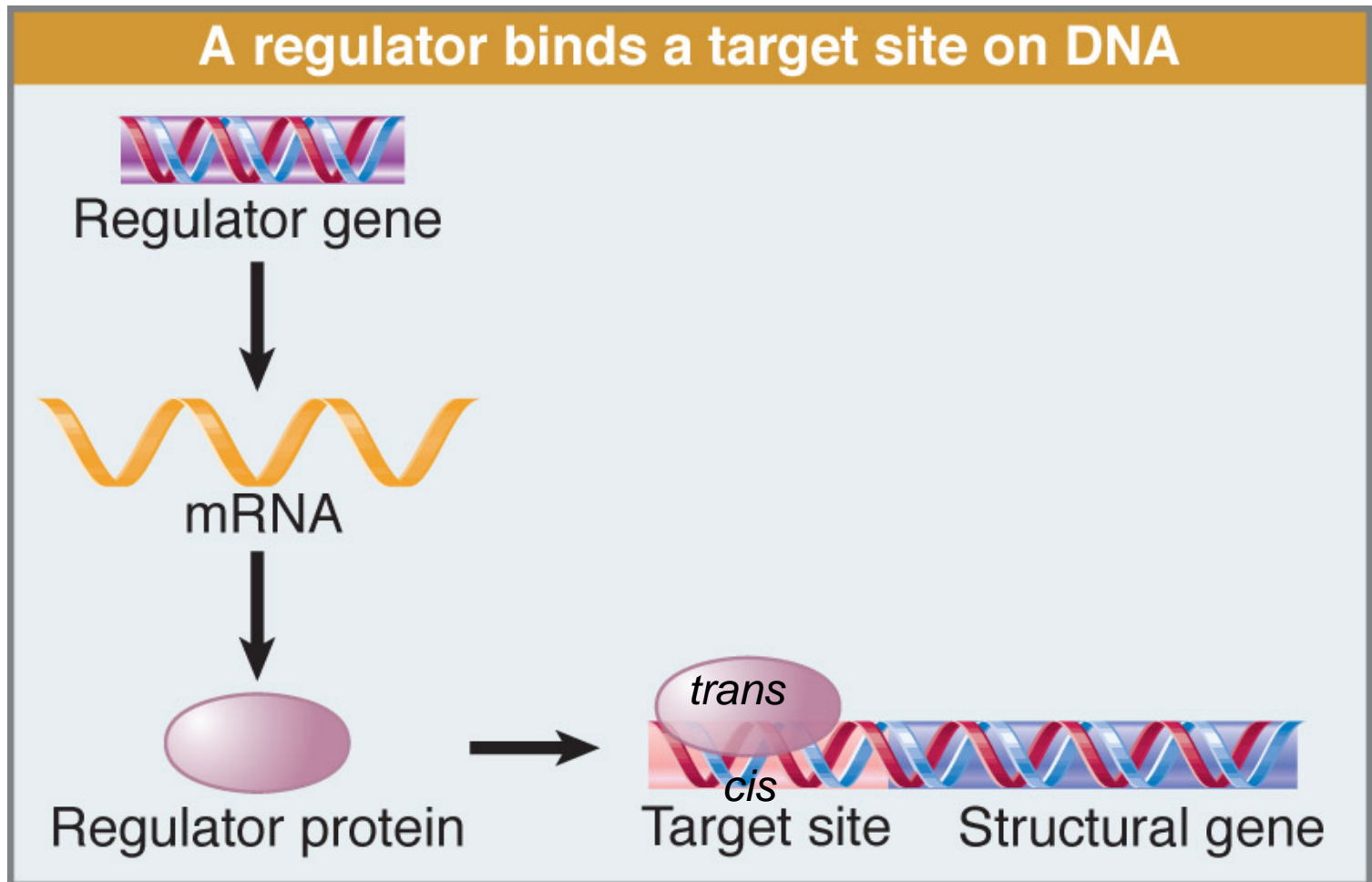
El control de la seua expressió s'exerceix mitjançant dos tipus de mecanismes:

- Factors sigma alternatius
- Regulació *cis-trans*

L'inici de la transcripció és l'etapa de control més freqüent

Regulació *cis-trans* de l'inici de la transcripció

Regulació *cis-trans*



També hi pot haver RNAs reguladors

Regulació positiva-negativa

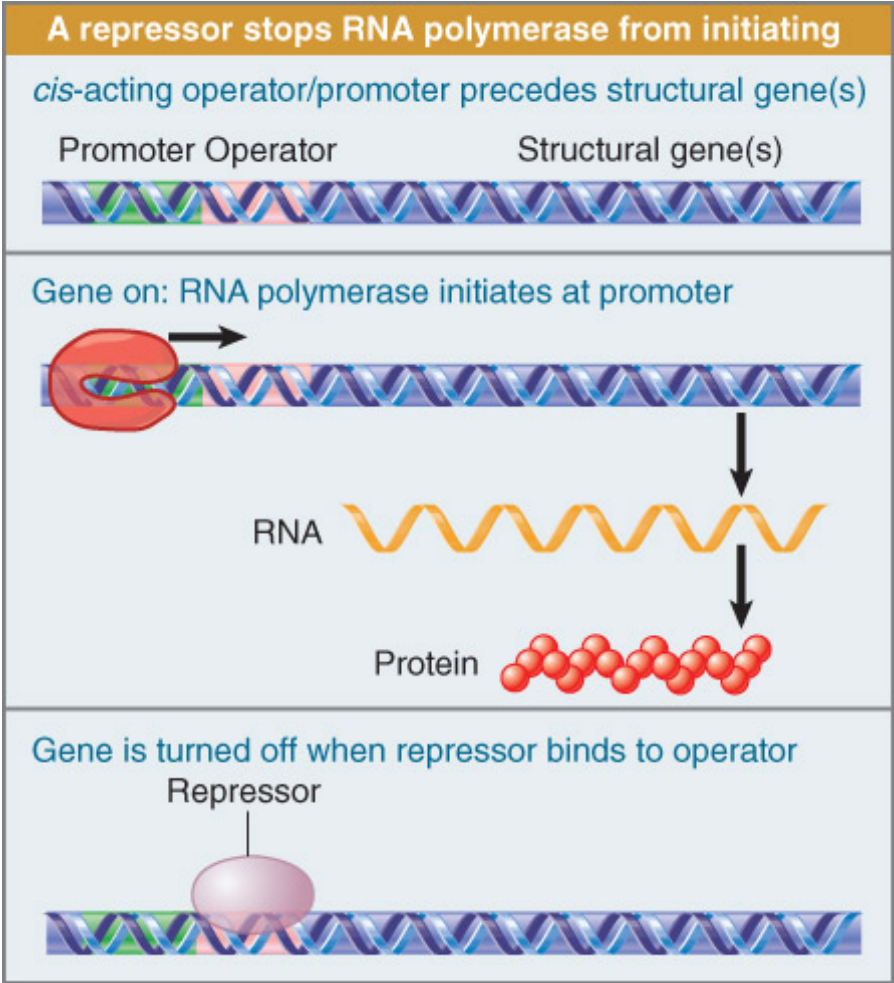
- **Regulació negativa:**

- ✓ una proteïna repressora s'uneix a l'operador i impedeix que el gen s'expressi
- ✓ per defecte el gen s'expressa

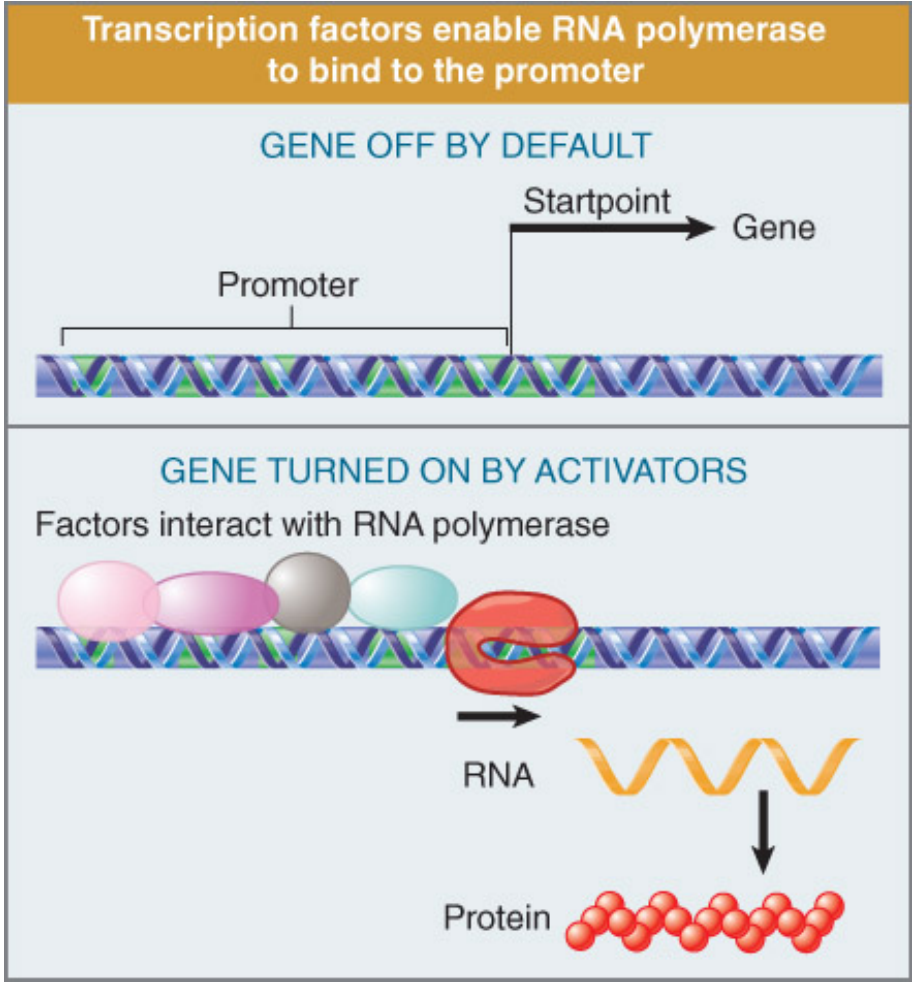
- **Regulació positiva:**

- ✓ els gens s'expressen únicament en presència d'una proteïna activadora unida prop del promotor
- ✓ és el mecanisme més freqüent en eucariotes (en procariotes els dos actuen amb freqüència similar)

Regulació positiva-negativa



Regulació negativa



Regulació positiva

Regulació positiva-negativa

- **Repressors**

- ✓ reconeixen específicament els elements coneguts com a **operadors**
- ✓ impedeixen la unió de la polimerasa al promotor, en molts casos per solapar parcialment operador i promotor

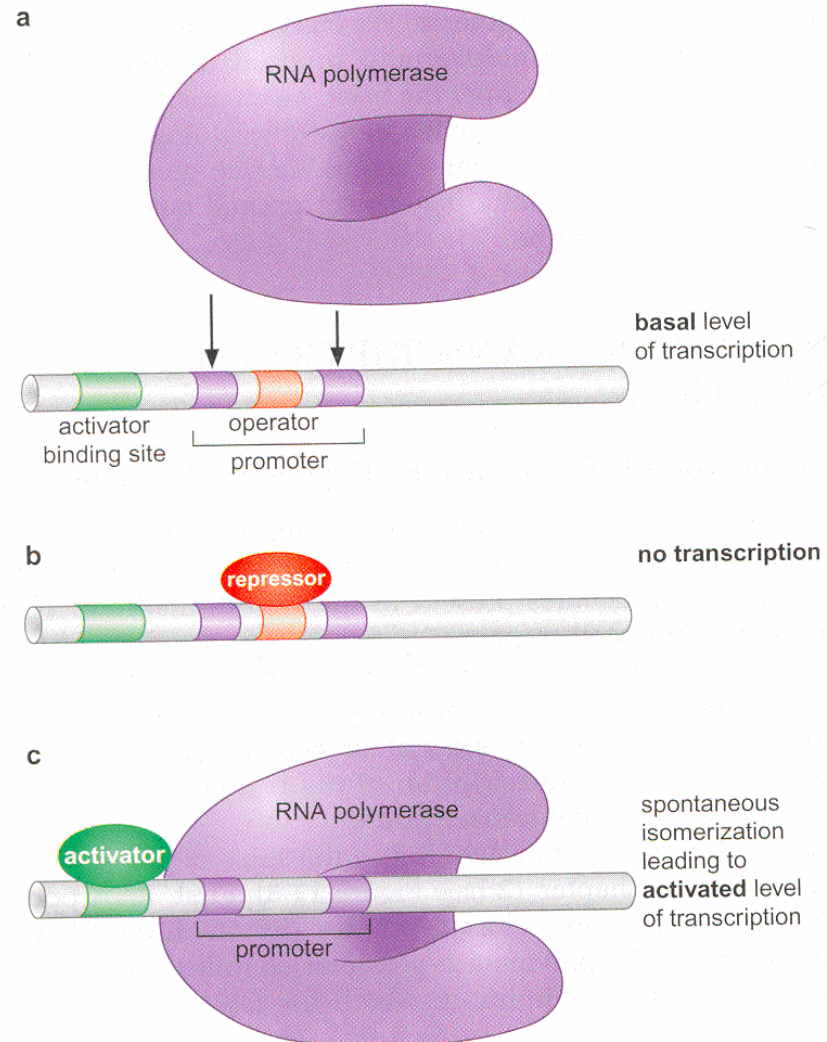
- **Activadors:**

- ✓ en alguns casos faciliten la unió de la polimerasa al promotor (activació per reclutament)
- ✓ en altres faciliten la isomerització o pas de complex tancat a obert (activació al·lostèrica)
- ✓ estableixen interaccions específiques amb seqüències del DNA

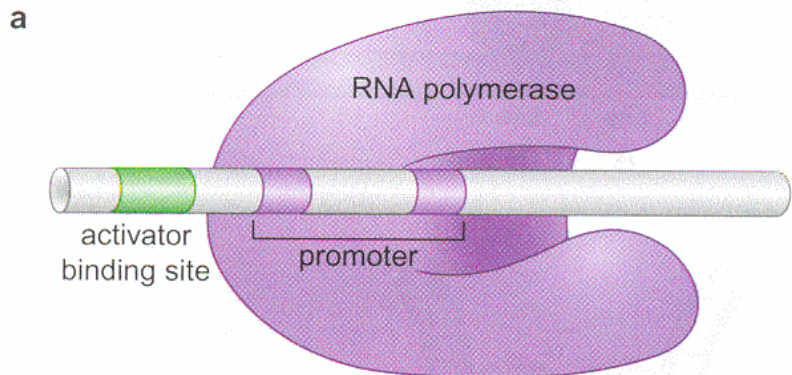
Regulació positiva-negativa

FIGURE 16-1 Activation by recruitment of RNA polymerase.

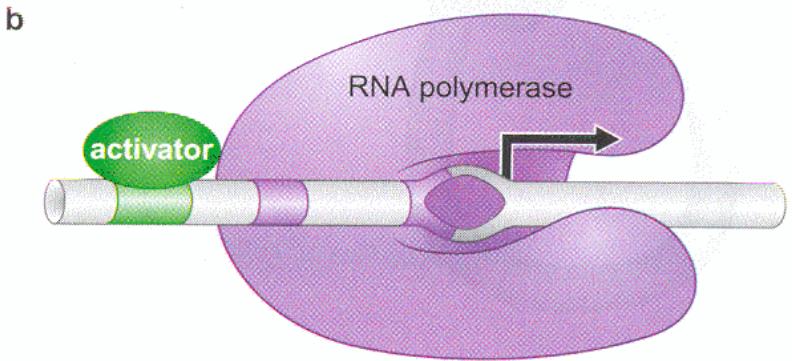
(a) In the absence of both activator and repressor, RNA polymerase occasionally binds the promoter spontaneously and initiates a low level (basal level) of transcription. (b) Binding of the repressor to the operator sequence blocks binding of RNA polymerase and so inhibits transcription. (c) Recruitment of RNA polymerase by the activator gives high levels of transcription. RNA polymerase is shown recruited in the closed complex. It then spontaneously isomerizes to the open complex and initiates transcription. If both the repressor and activator are present and functional, the action of the repressor typically overcomes that of the activator. (This case is not shown in the figure.)



Regulació positiva-negativa



no spontaneous isomerization and thus **no transcription**



activated level of transcription

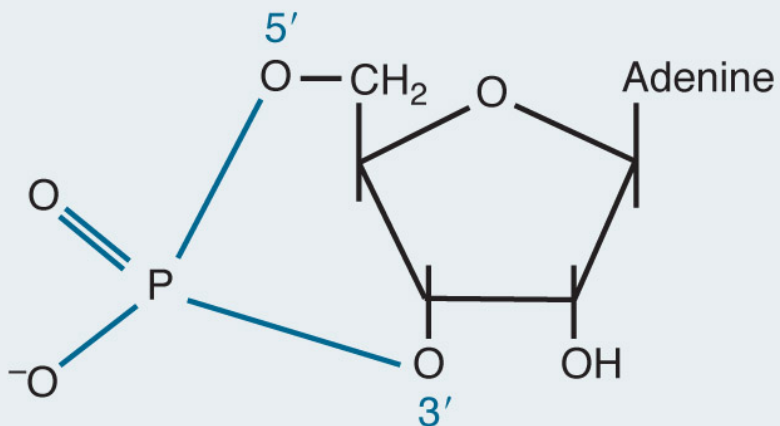
FIGURE 16-2 Allosteric activation of RNA polymerase. (a) Binding of RNA polymerase to the promoter in a stable closed complex. (b) The activator interacts with polymerase to trigger transition to the open complex and high levels of transcription. The representations of the closed and open complexes are shown only diagrammatically; for a more complete description of those states see Chapter 12.

Una proteïna activadora en procariotes: CAP

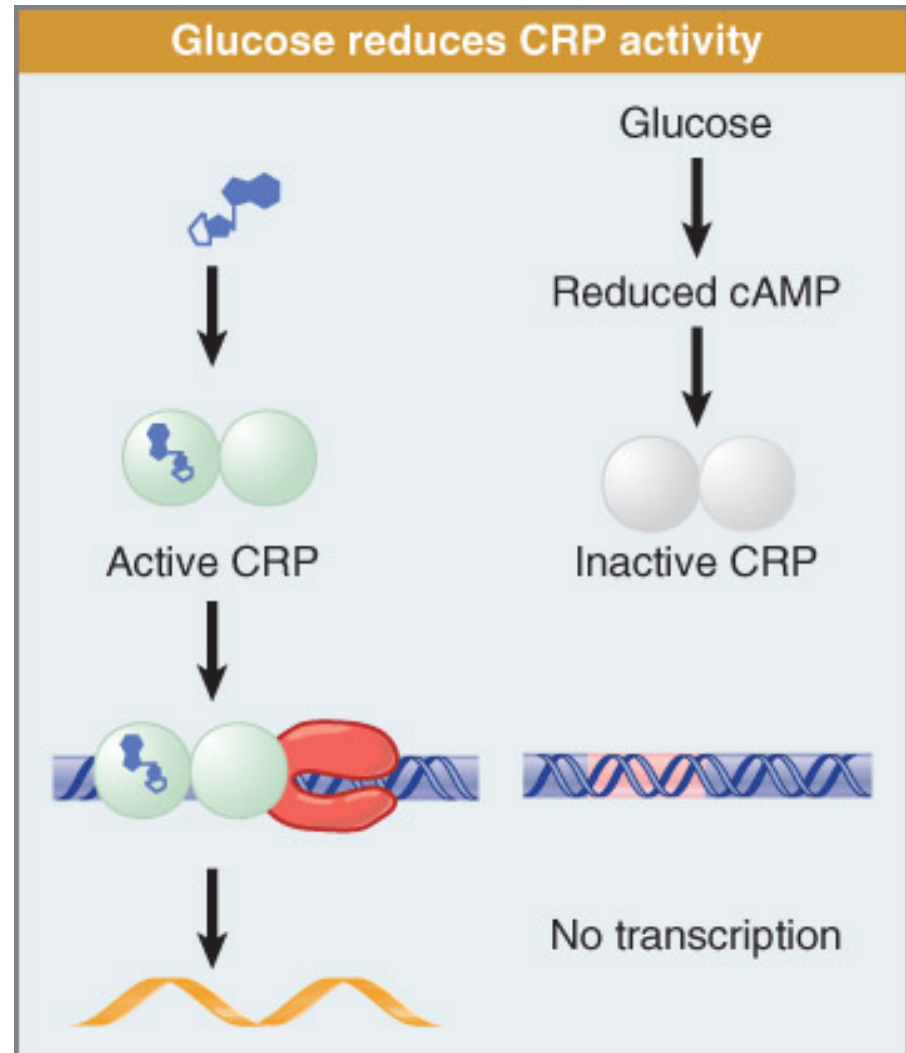
- La proteïna CRP, activada per cAMP (cAMP Receptor Protein), també coneguda com a CAP (Catabolite Activator Protein) és un activador transcripcional procariota
- Està implicada en els mecanismes de repressió per glucosa
- Intervé en la regulació d'operons implicats en la utilització de fonts de carboni alternatives a la glucosa
- Interacciona amb el DNA mitjançant un domini hèlix-volta-hèlix
- Facilita la unió de la polimerasa al promotor (reclutament)

Una proteína activadora en procariotes: CAP

Cyclic AMP has 5'-P-3' bonds



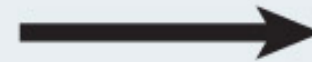
Glucose reduces CRP activity



Una proteína activadora en procariotes: CAP

CAP binds to a consensus sequence

Transcription

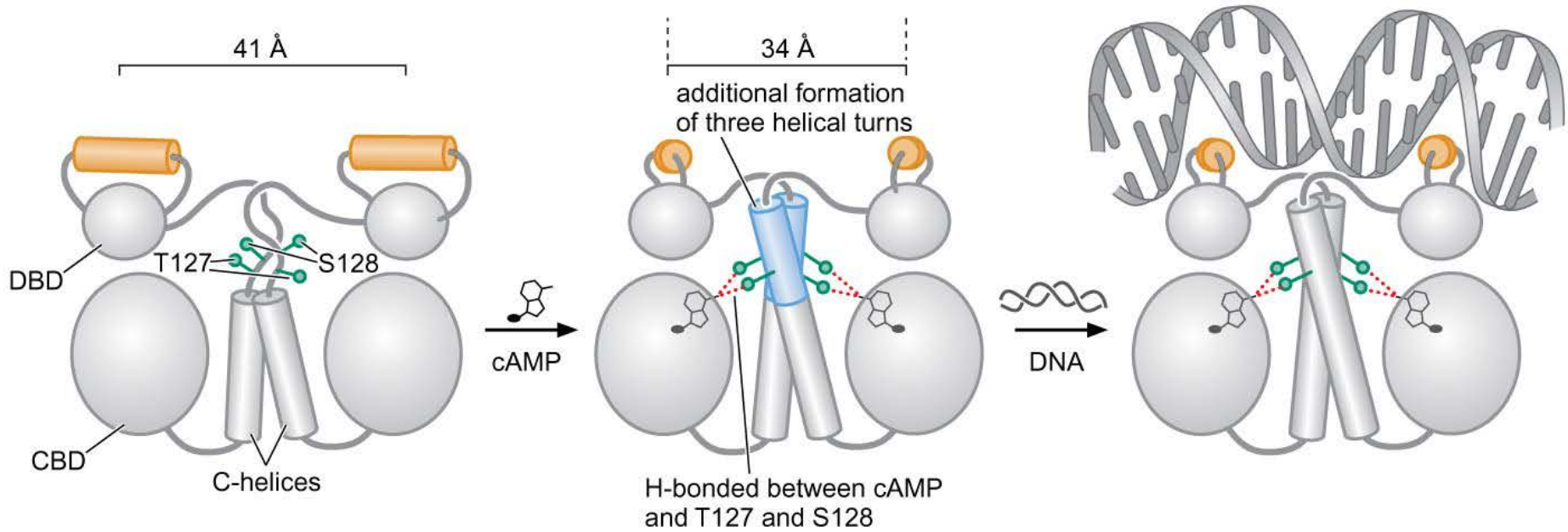


A A N T G T G A N N T N N N T C A N A T T N N
T T N A C A C T N N A N N N A G T N T A A N N

Highly conserved
pentamer

Less conserved
pentamer

Una proteína activadora en procariotes: CAP

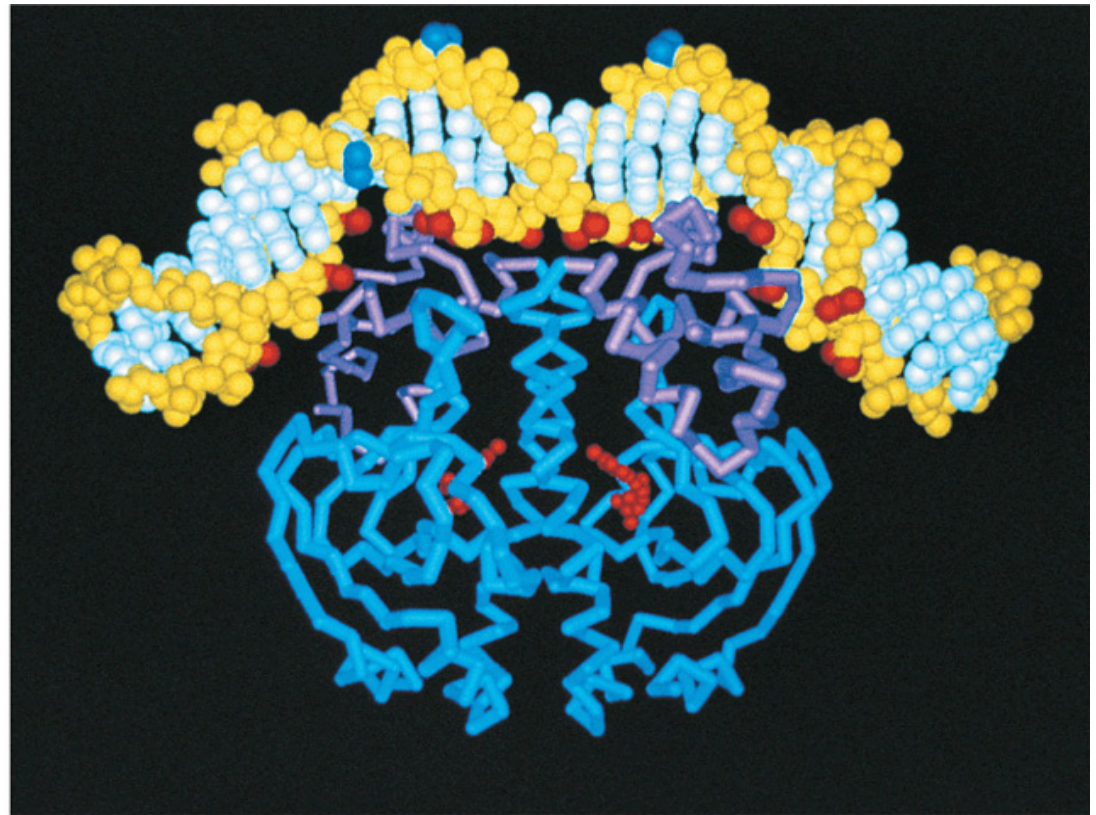


Una proteína activadora en procariotes: CAP

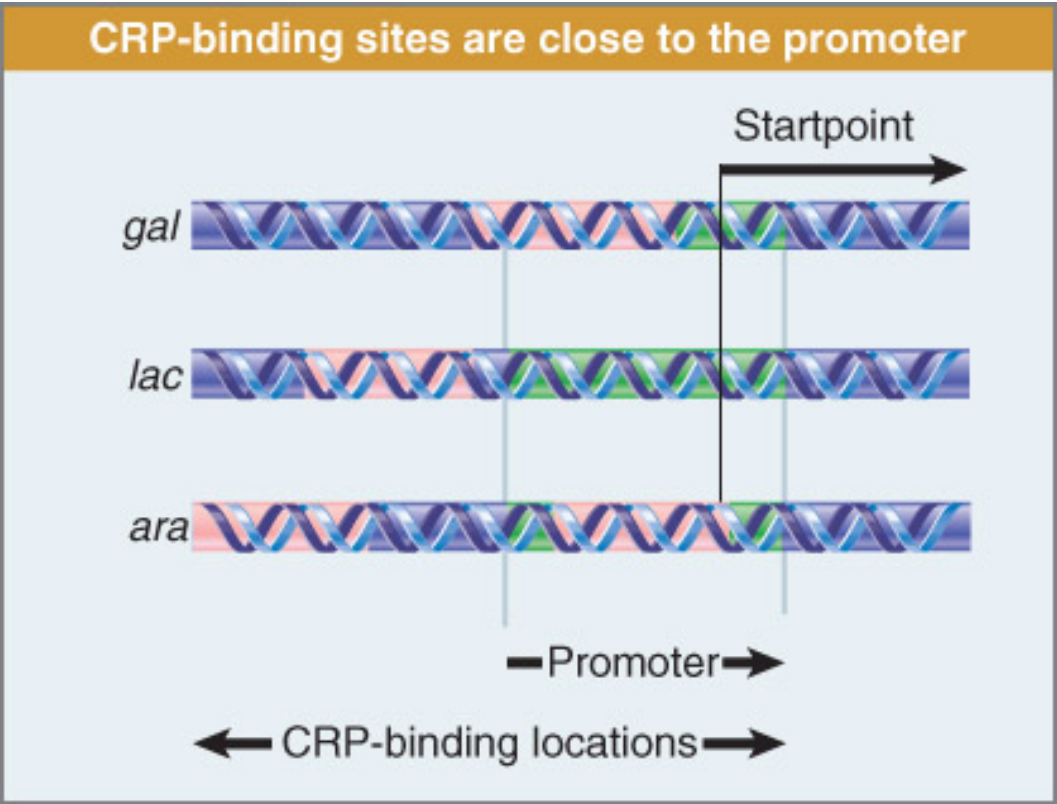
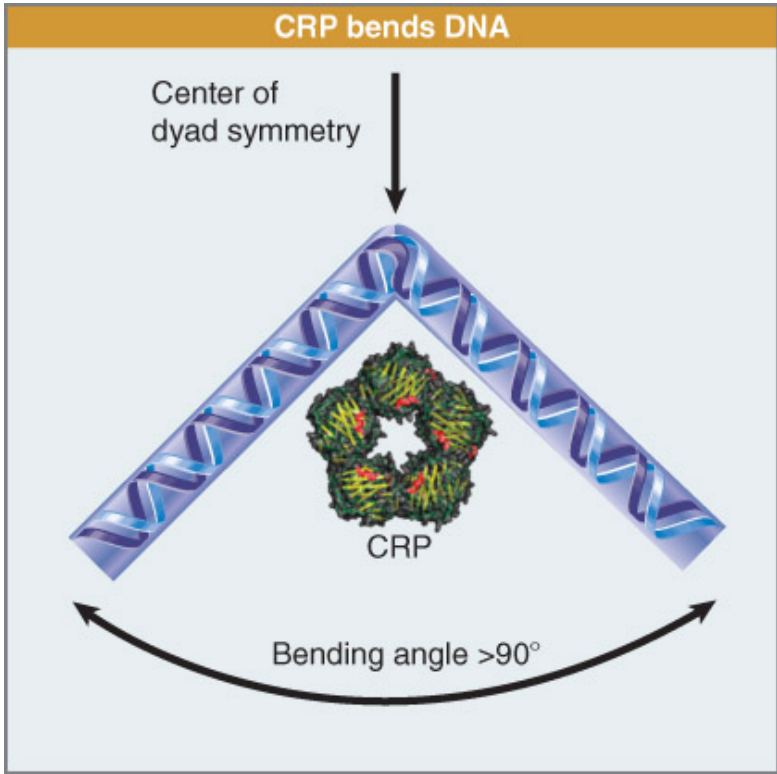
FIGURE 29.6

Bending of DNA by binding to CRP–cAMP. This model was deduced from the crystal structure of the DNA–protein–cAMP complex. The DNA bases are in light blue, and the sugar–phosphate backbone is in yellow. The DNA-binding domains of the protein—two α helices that contact DNA bases in the major groove (see text)—are in purple and are perpendicular to the plane of the page. The cAMP-binding domain is in blue, and two bound cAMP molecules are in red. On the DNA molecules, those phosphates that are in closest contact with the protein and whose ethylation interferes with protein binding are in red. Those phosphates whose reactivity to ethylation is enhanced (on the outer edge of the bend) are in blue. PDB ID 1CGP.

From *Quarterly Reviews of Biophysics* 23:205–280, T. A. Steitz, Structural studies of protein–nucleic acid interaction: The sources of sequence-specific binding. © 1990 Cambridge University Press.



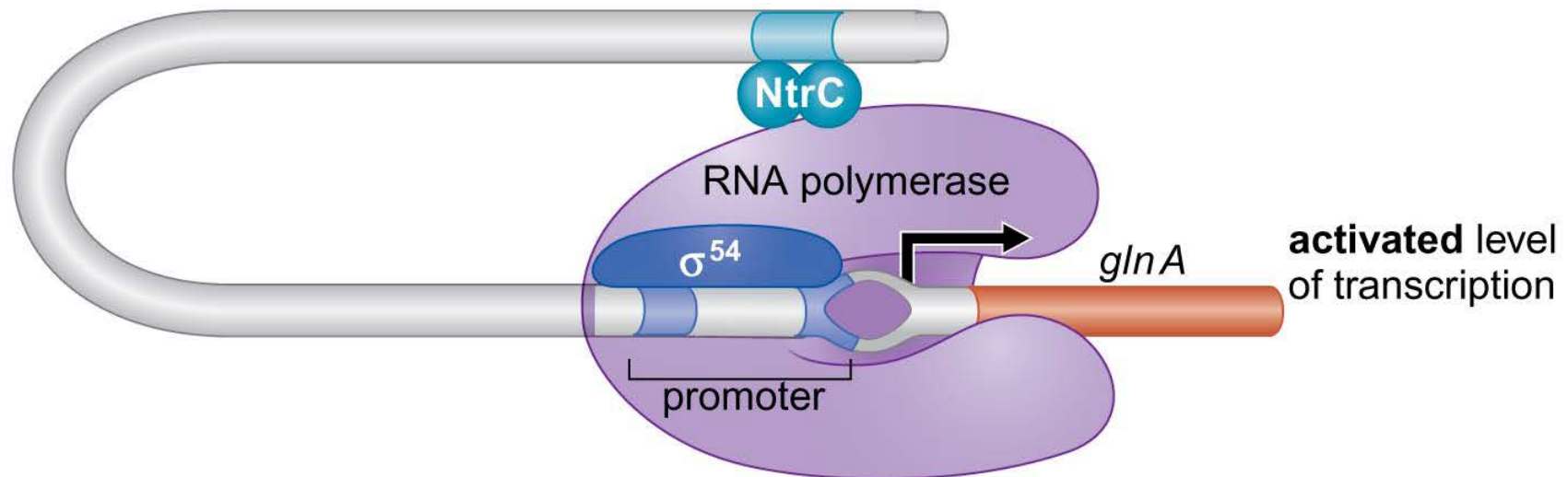
Promotors regulats per la proteïna CAP



Altres proteïnes activadores en procarïotes

- Altres activadors provoquen un canvi estructural en el complex format prèviament entre la polimerasa i el DNA (al·losterisme):

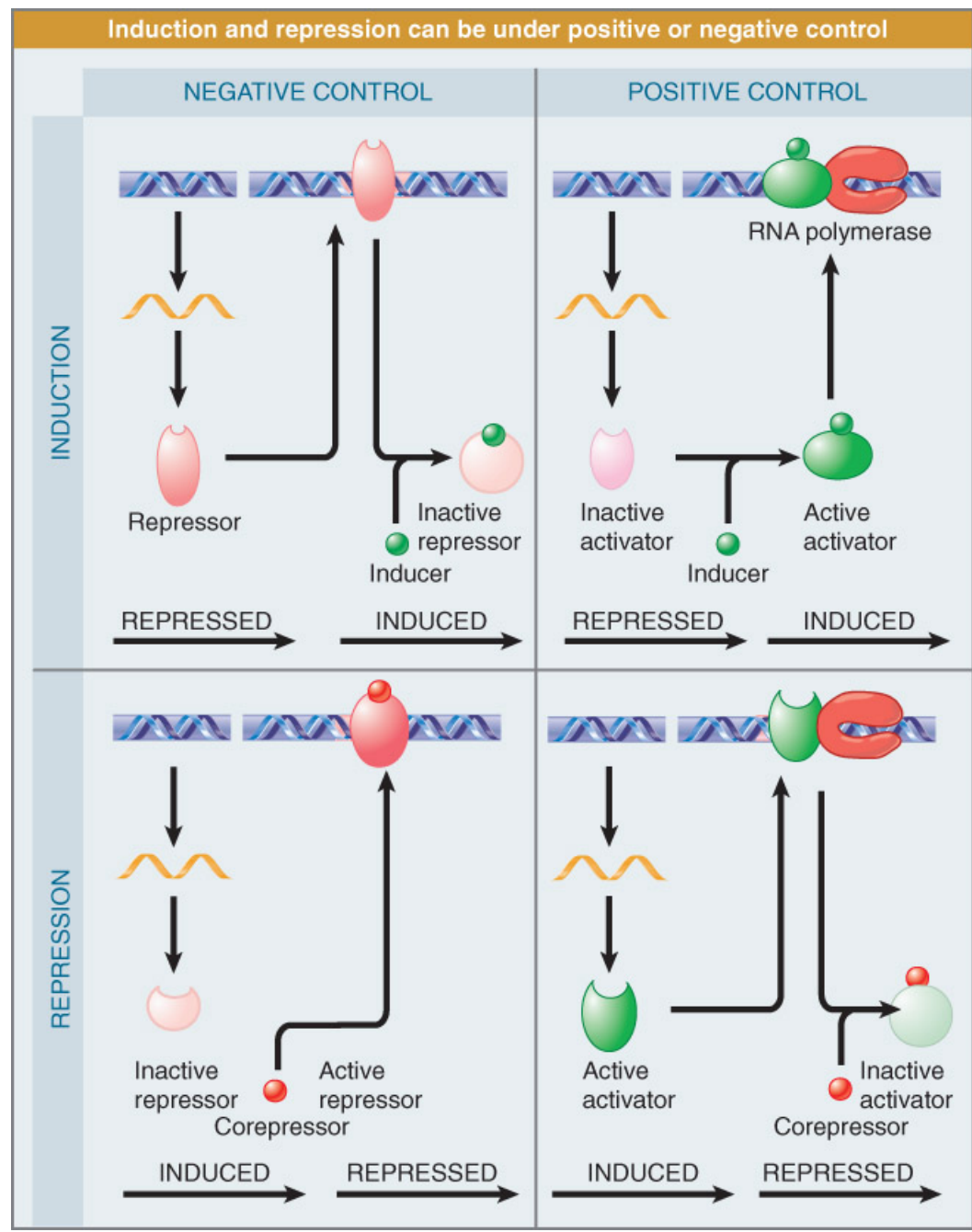
Exemple: NtrC controla l'expressió de gens implicats en el metabolisme del nitrogen



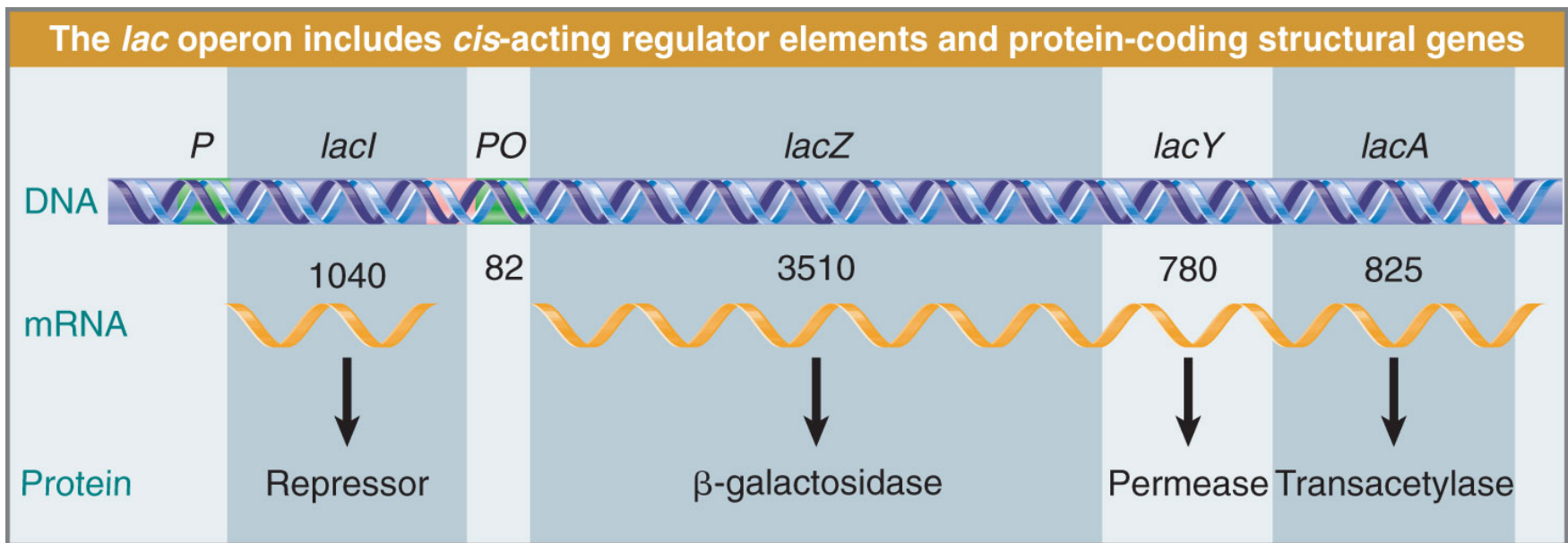
Inducció i repressió

- En gens / operons **induïbles** la transcripció només es produeix en presència d'una molècula menuda anomenada **inductor**
- En gens / operons **reprimibles** la transcripció tan sols és possible en absència d'una molècula menuda anomenada **correpressor**

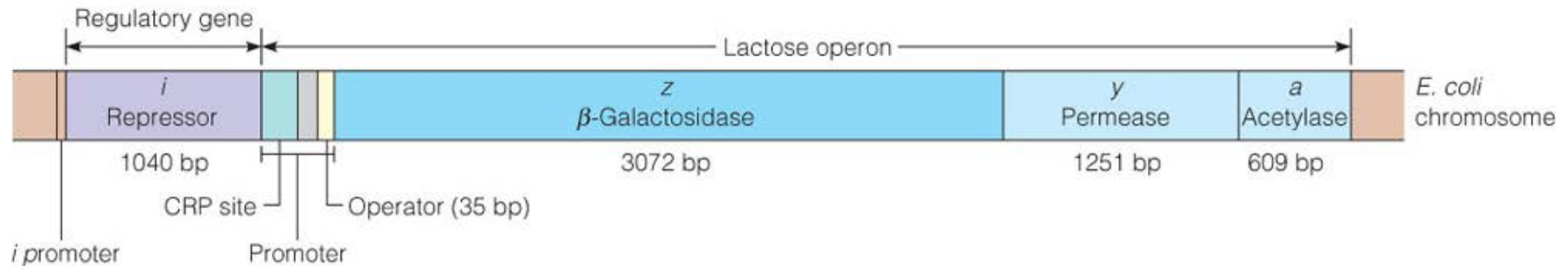
Inducció i repressió, control positiu i negatiu



Operó lac: descripció general



Operó *lac*: descripció general



Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

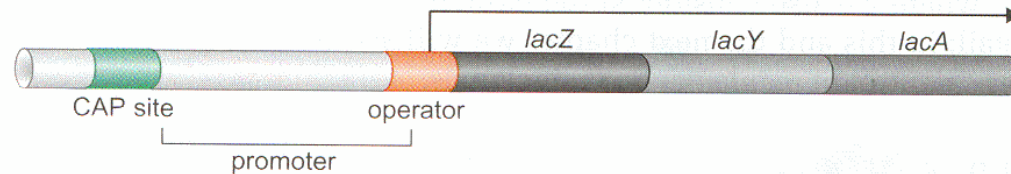


FIGURE 16-5 The *lac* operon. The three genes (*lacZ*, *Y*, and *A*) are transcribed as a single mRNA from the promoter (as indicated by the arrow). The CAP site and the operator are each about 20 bp. The operator lies within the region bound by RNA polymerase at the promoter, and the CAP site lies just upstream of the promoter (see Figure 16-8 for more details of the relative arrangements of these binding sites and the text for a description of the proteins that bind to them). The picture is simplified in that there are two additional, weaker, *lac* operators located nearby (see Figure 16-13), but we do not need to consider those at present.

Operó *lac*: mecanismes de regulació

- Control negatiu mitjançant proteïna repressora i operador
- Operó induïble (inductor = α -lactosa)
- Sotmès a repressió per catabòlit (participació de la proteïna CAP)

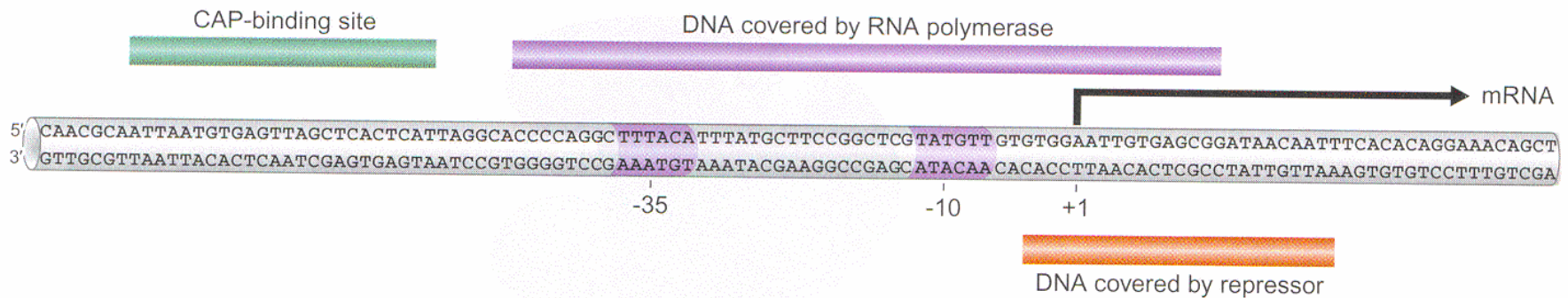
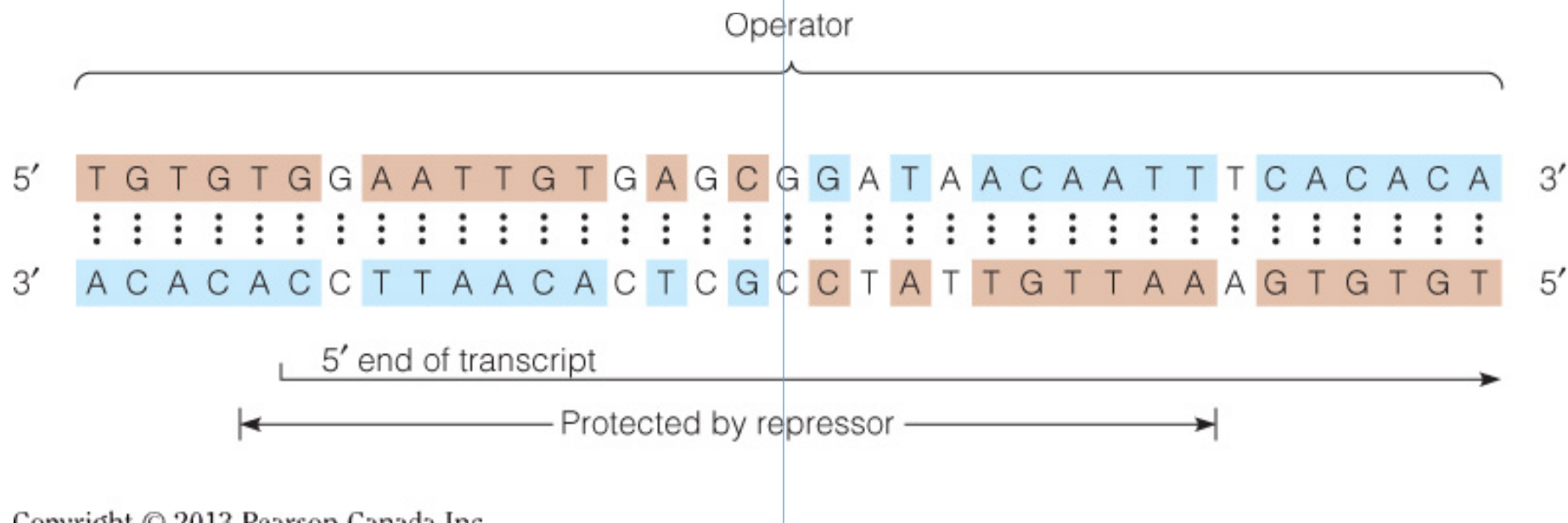


FIGURE 16-8 The control region of the *lac* operon. The nucleotide sequence and organization of the *lac* operon control region are shown. The colored bars above and below the DNA show regions covered by RNA polymerase and the regulatory proteins. Note that Lac repressor covers more DNA than that sequence defined as the minimal operator binding site, and RNA polymerase more than that defined by the sequences that make up the promoter.

Operón *lac*: l'operador

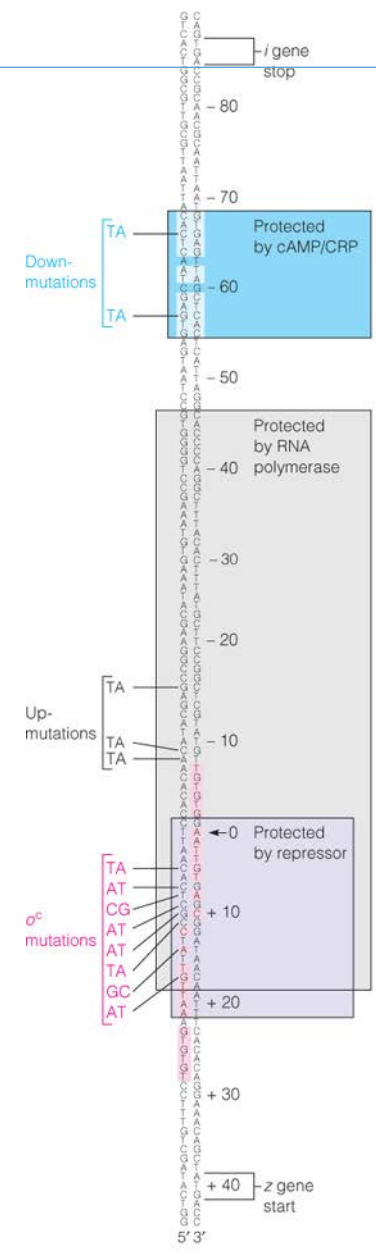
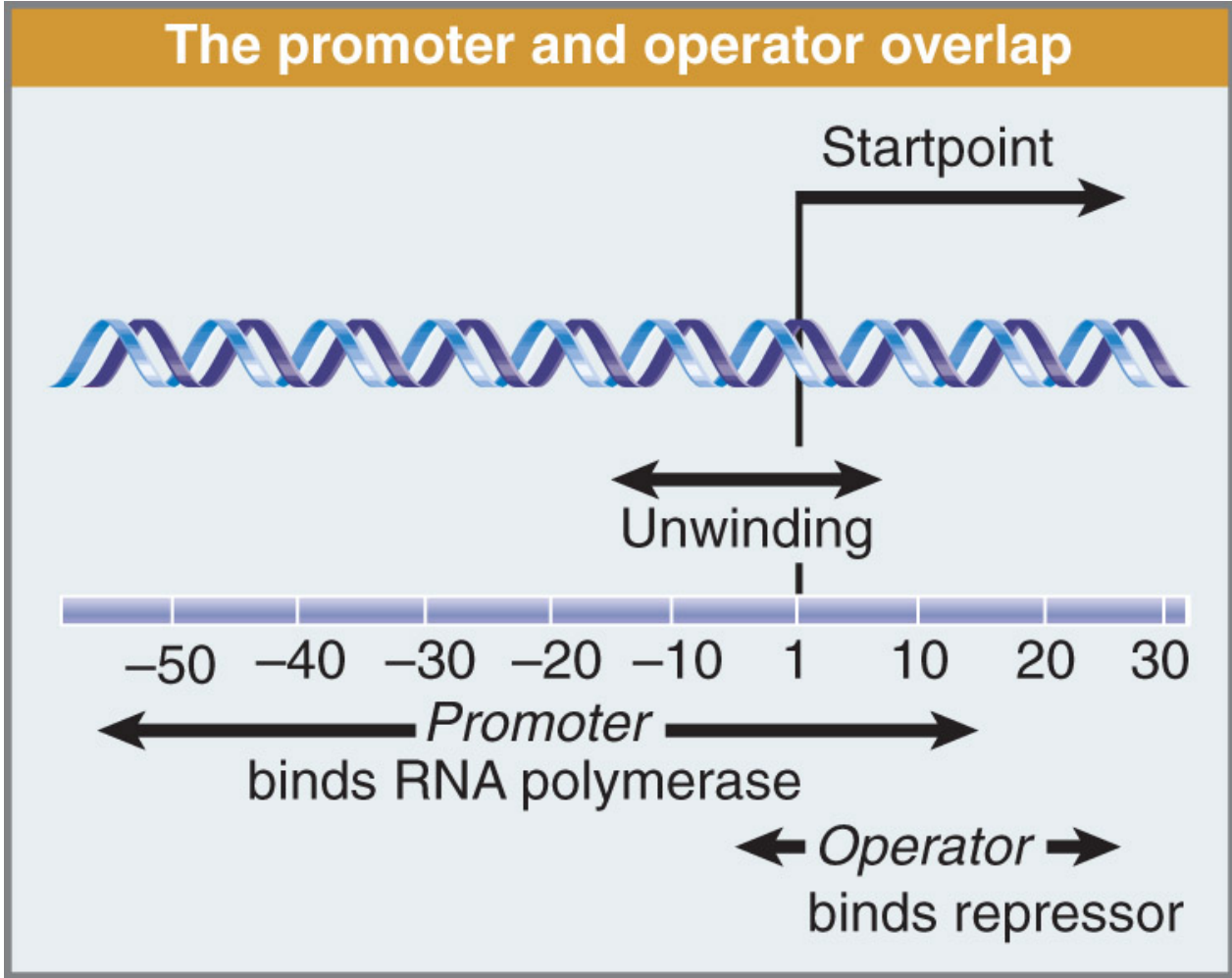


Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

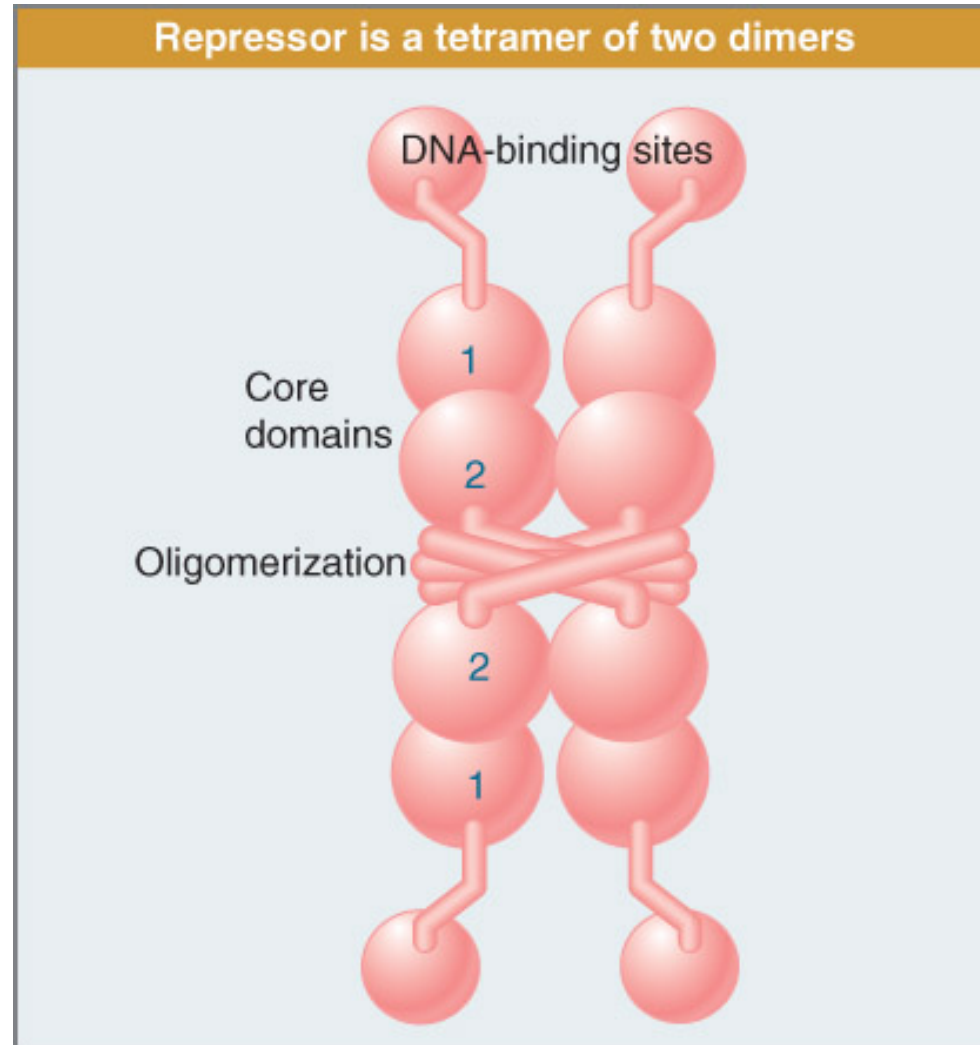
Eix de simetria

Comprèn 35 pb, 28 dels quals (marcats en color en la figura) presenten seqüència simètrica, és a dir, són un palíndrom, encara que imperfecte pels 7 pb que no presenten l'esmentada simetria

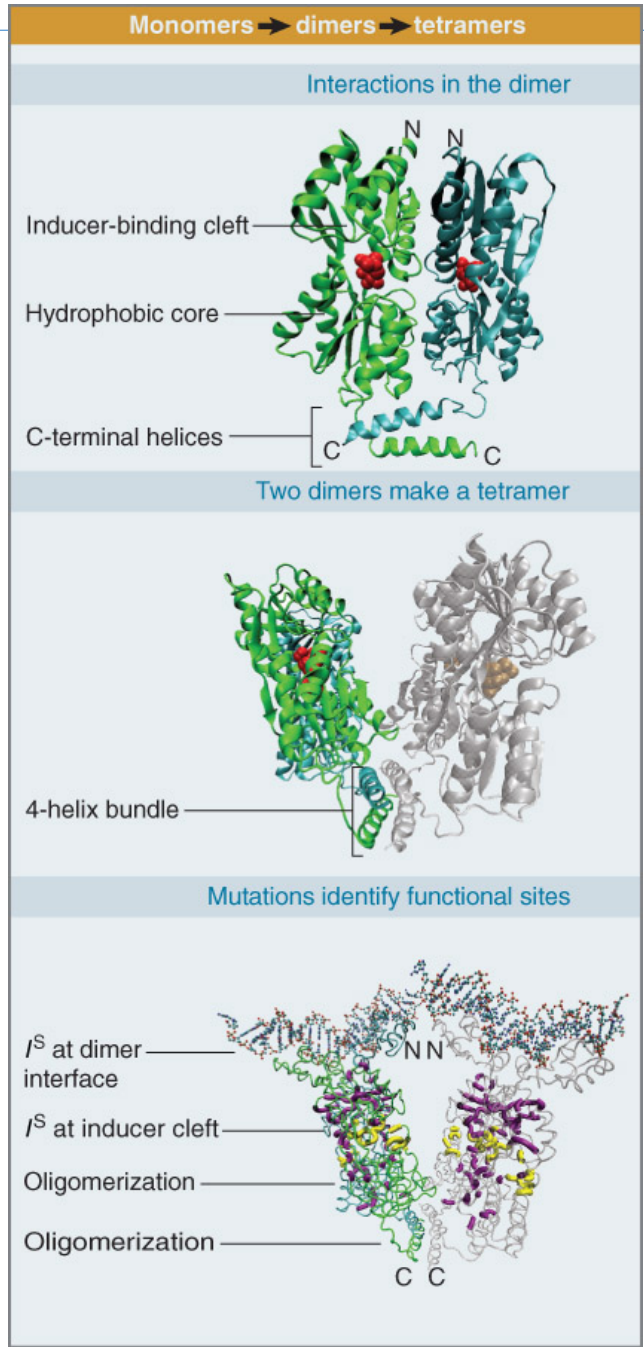
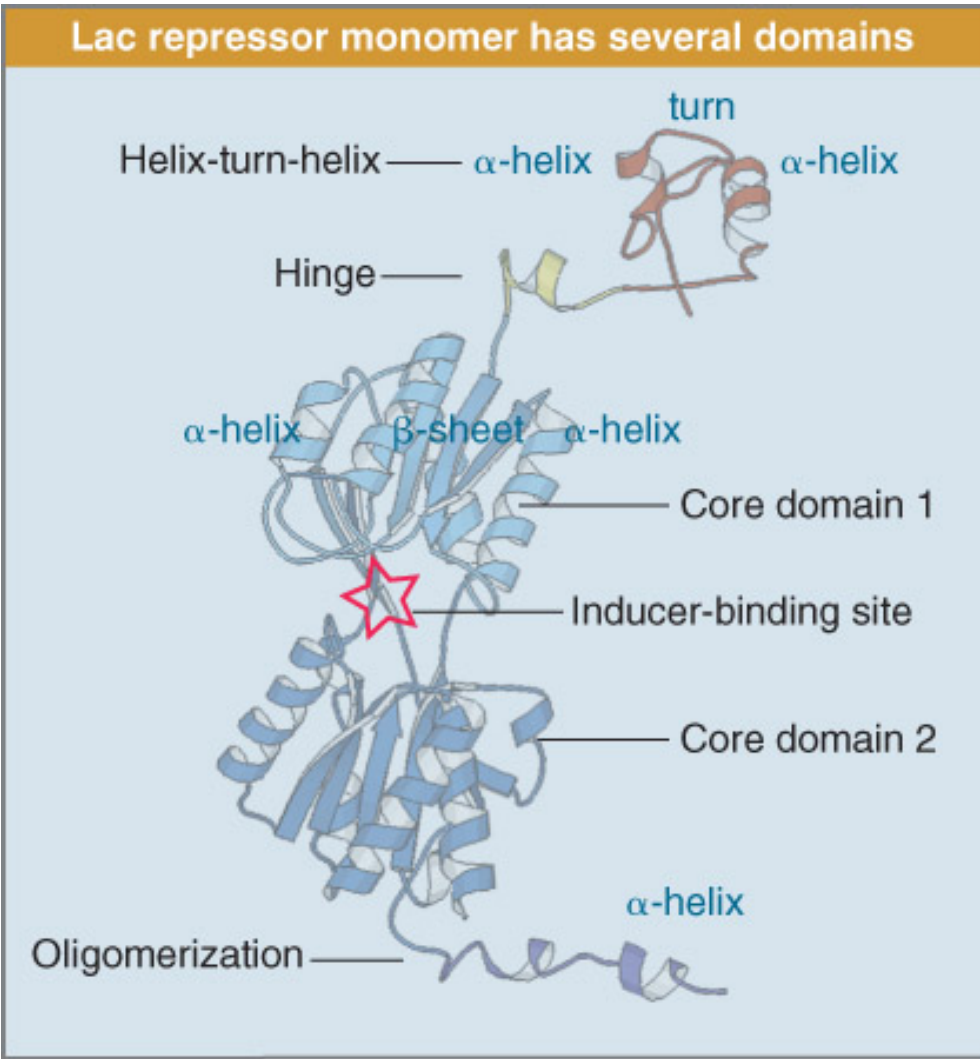
Operó lac: solapament operador-promotor



Operó *lac*: el repressor *lac*



Operó lac: el repressor lac



Operó *lac*: el repressor *lac*

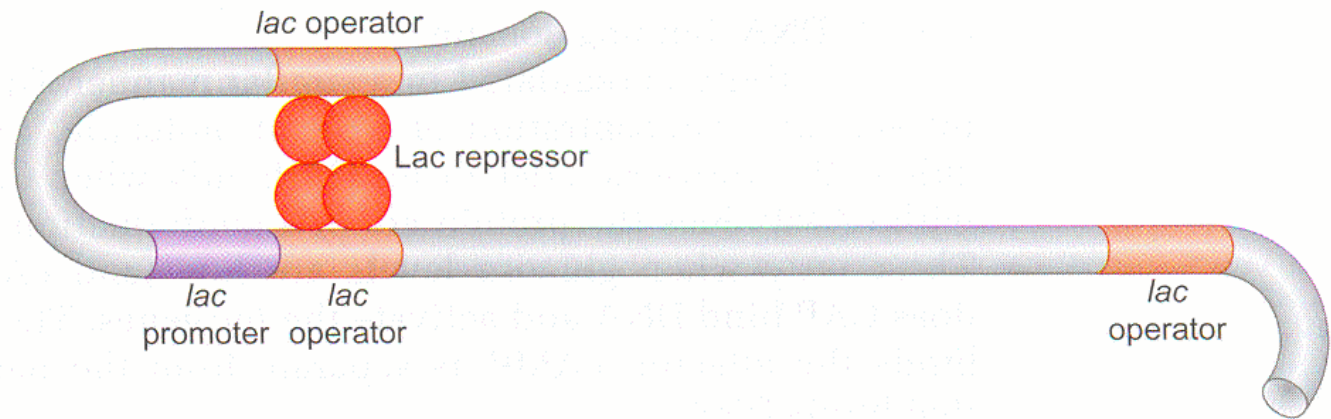
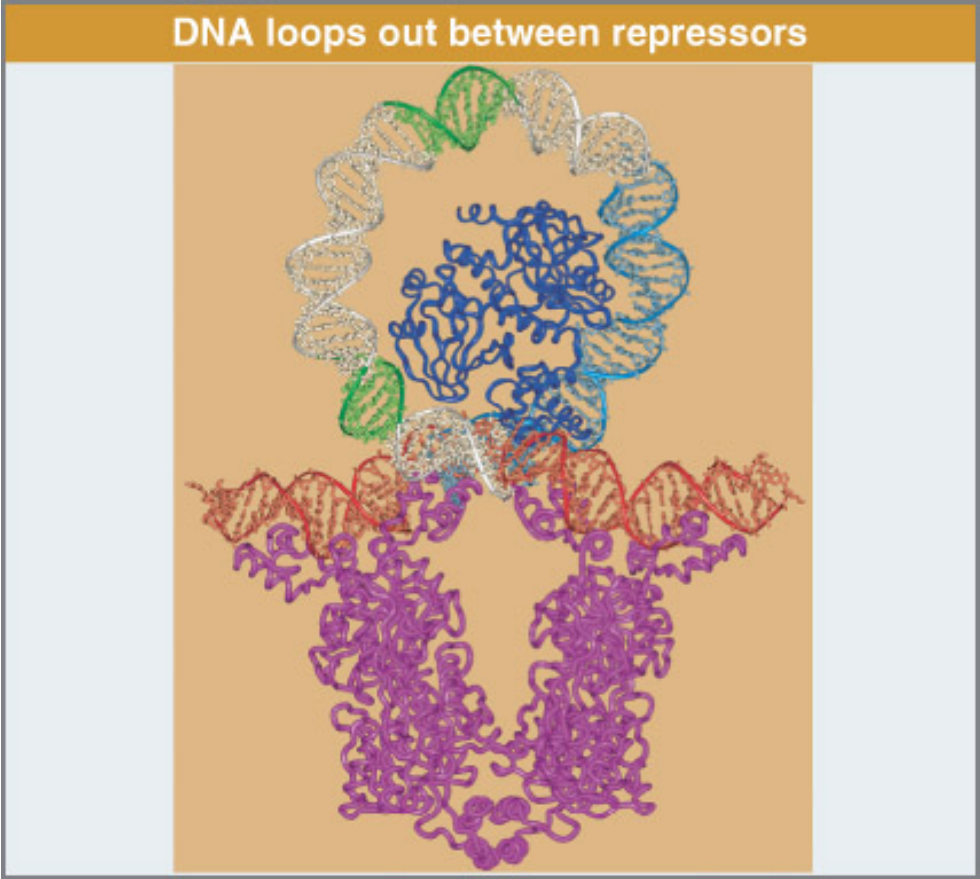
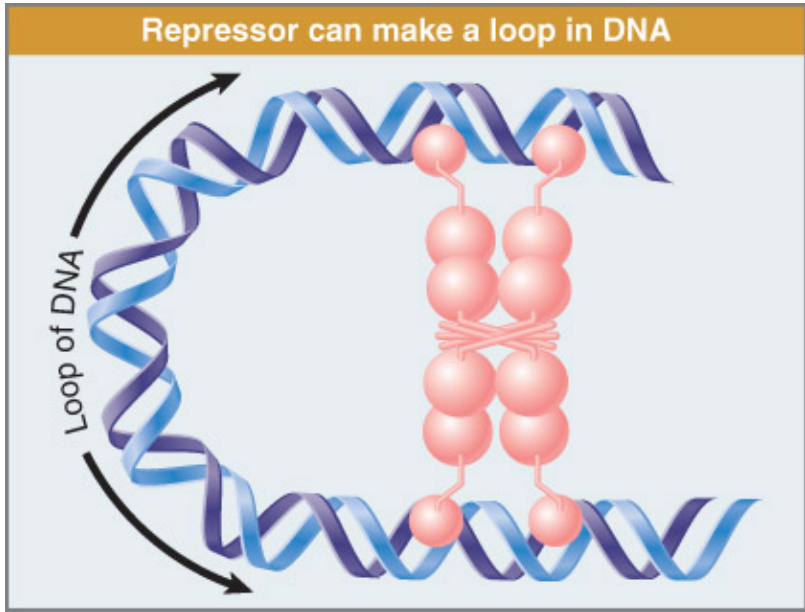


FIGURE 16-13 Lac repressor binds as a tetramer to two operators. The loop shown is between the Lac repressor bound at the primary operator and the upstream auxiliary one. A similar loop can alternatively form with the downstream operator. The primary operator—that one shown against the promoter—is the operator referred to in discussion of regulation of *lac* gene expression. In this figure, each repressor dimer is shown as two circles, rather than as a single oval (as used in earlier figures).

Operó lac: el repressor lac



Operó lac: el repressor lac

Repressor + DNA \rightleftharpoons Repressor-DNA

The equilibrium for repressor binding to (random) DNA is described by the equation:

$$K_A = \frac{[\text{Repressor-DNA}]}{[\text{Free repressor}] [\text{DNA}]}$$

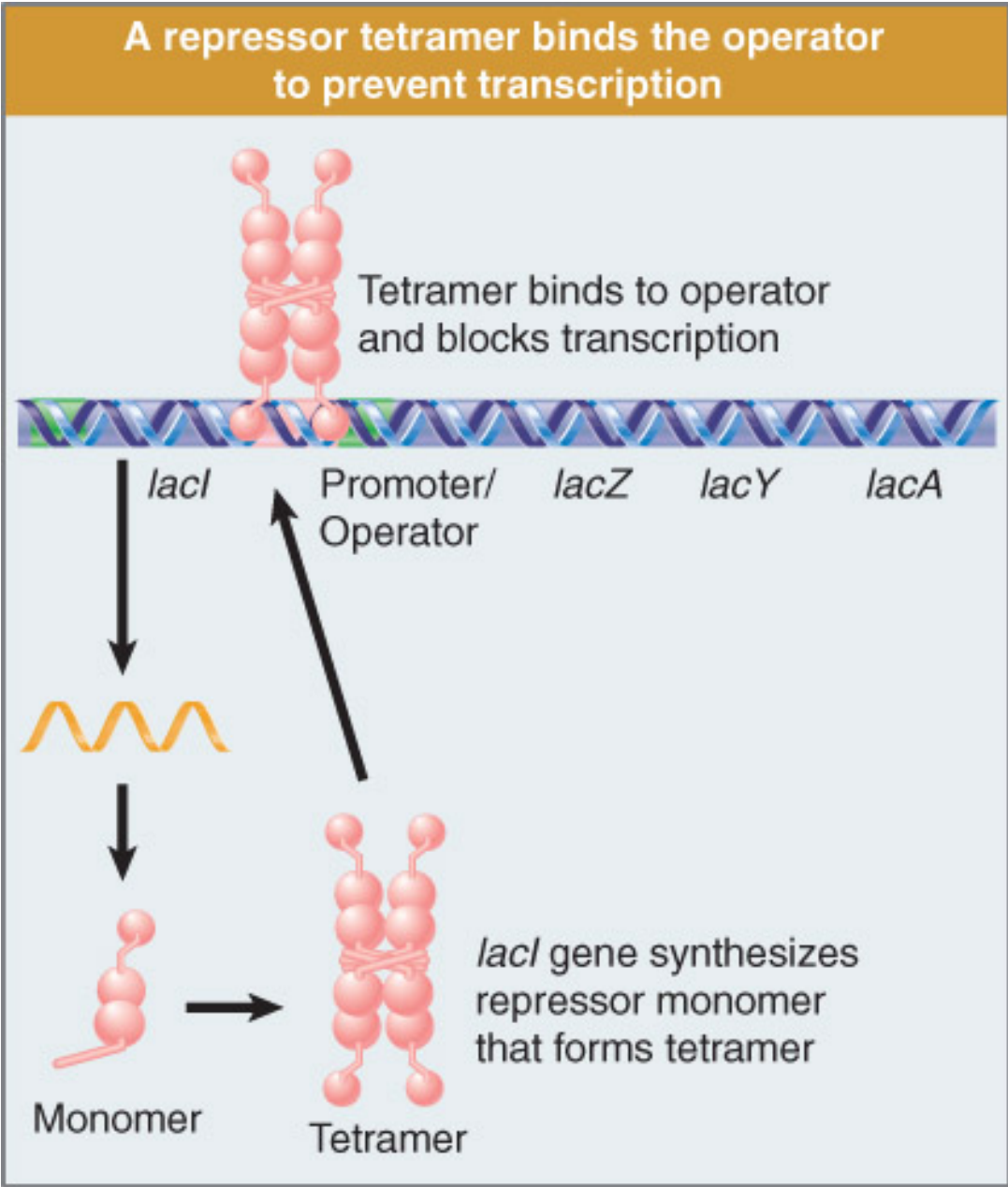
The proportion of free repressor is given by rearranging the equation:

$$\frac{[\text{Free repressor}]}{[\text{Repressor-DNA}]} = \frac{1}{K_A \times [\text{DNA}]}$$

Repressor specifically binds operator DNA

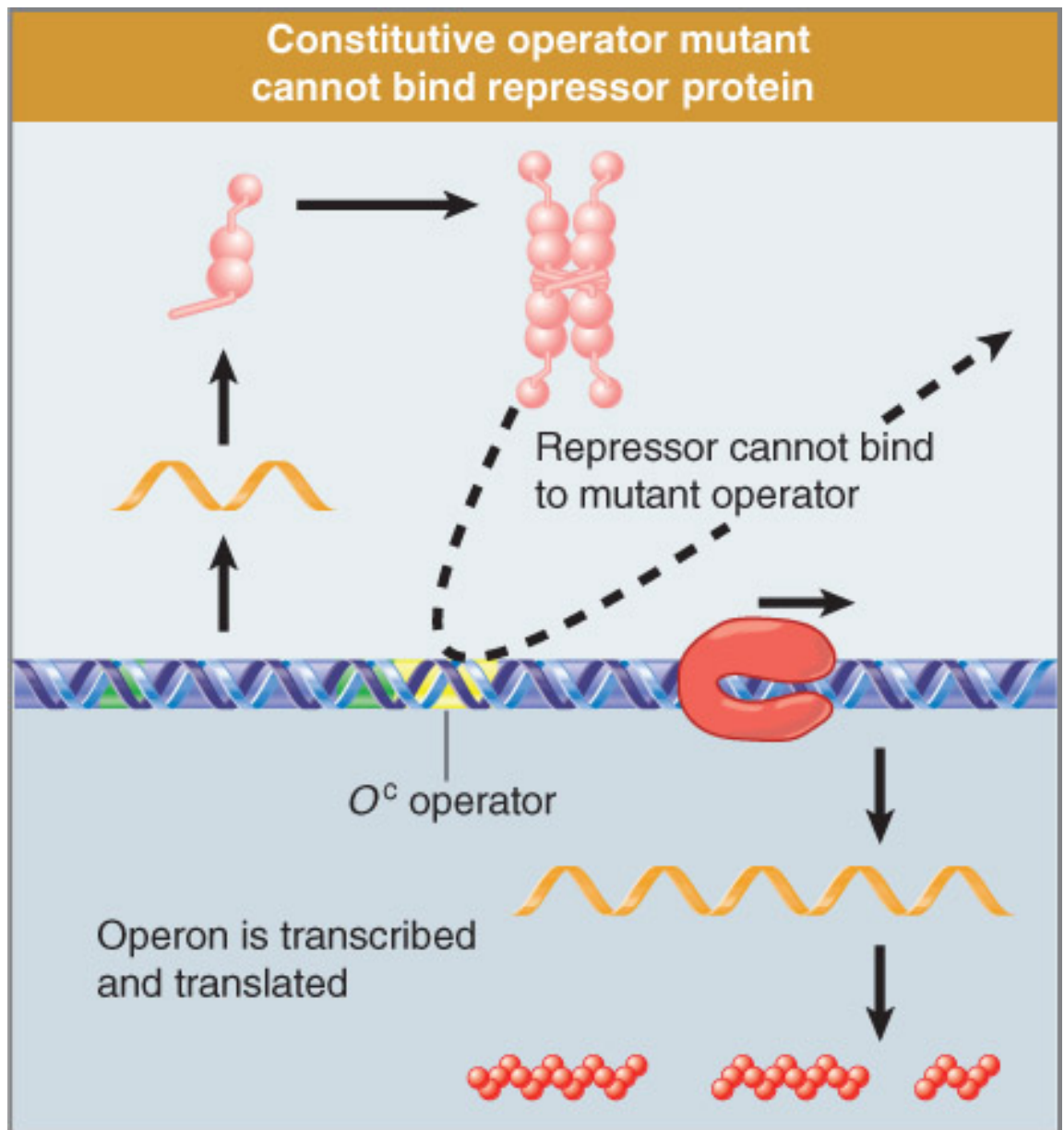
DNA	Repressor	Repressor + inducer
Operator	2×10^{13}	2×10^{10}
Other DNA	2×10^6	2×10^6
Specificity	10^7	10^4
Operators bound	96%	3%
Operon is:	repressed	induced

Operó lac: el repressor lac



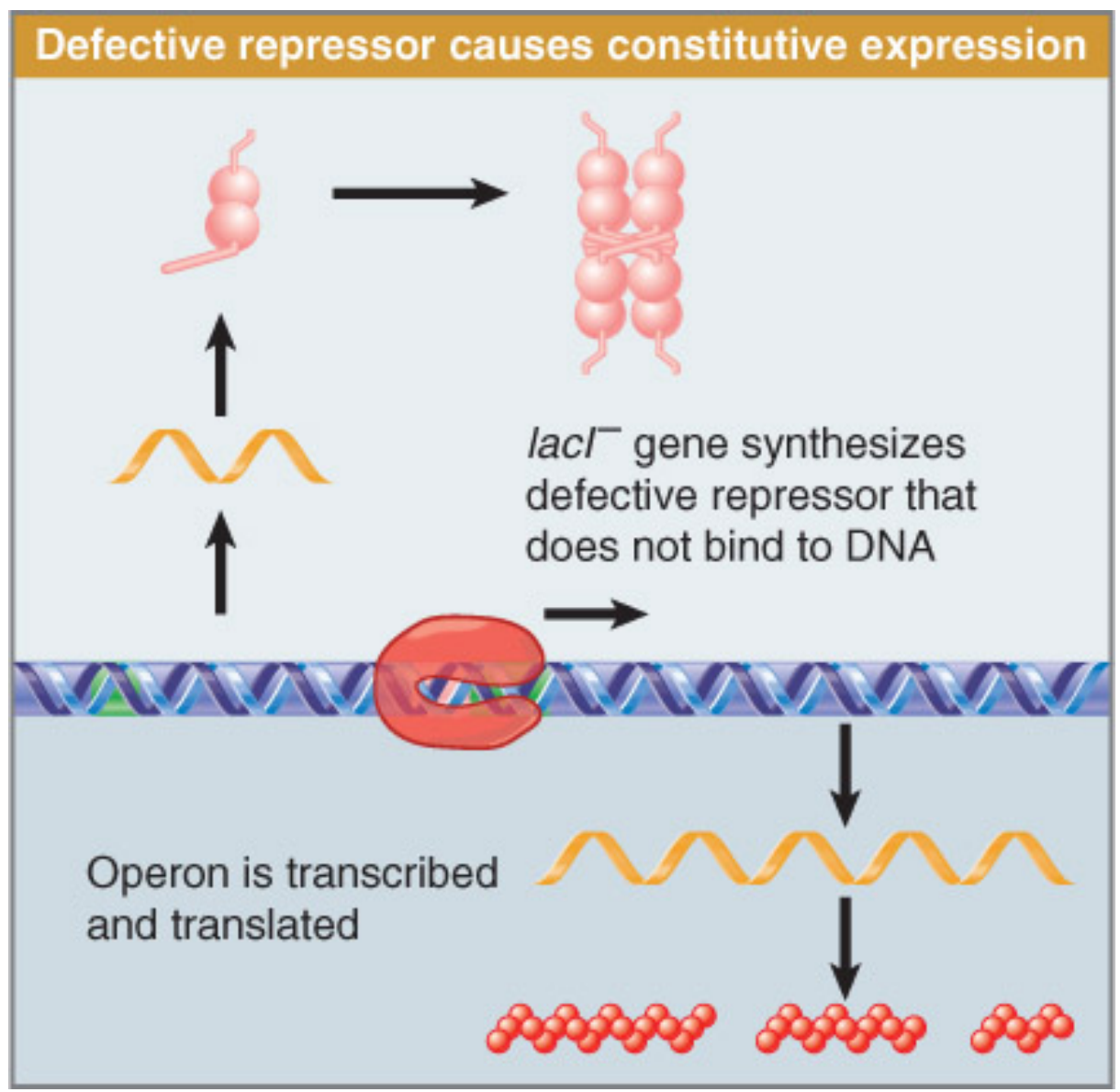
Operó lac: el repressor lac

Mutacions en l'operador que impedisquen la unió del repressor determinen una expressió constitutiva de l'operó.

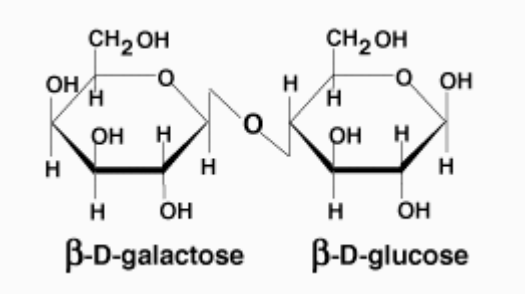


Operón *lac*: el represor *lac*

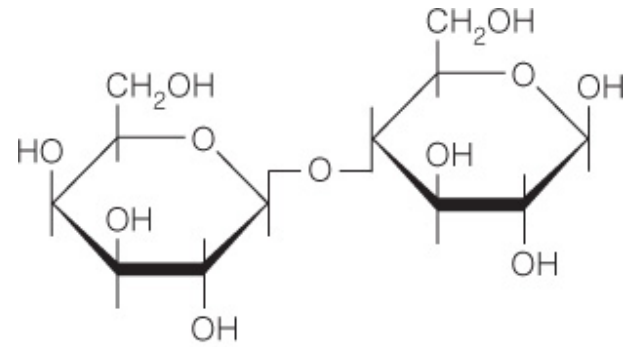
Mutacions en el gen *LacI* que afecten el lloc d'unió del represor a l'operador determinen una expressió constitutiva de l'operó



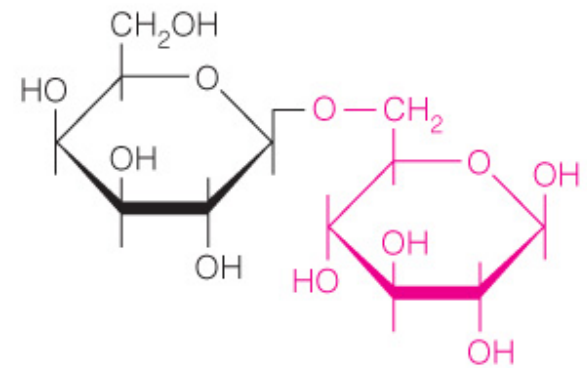
**Operó lac:
inductor**



Lactosa

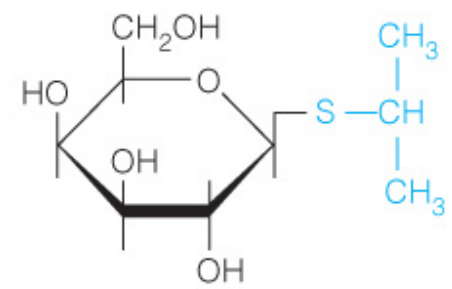


Lactose



Allolactose

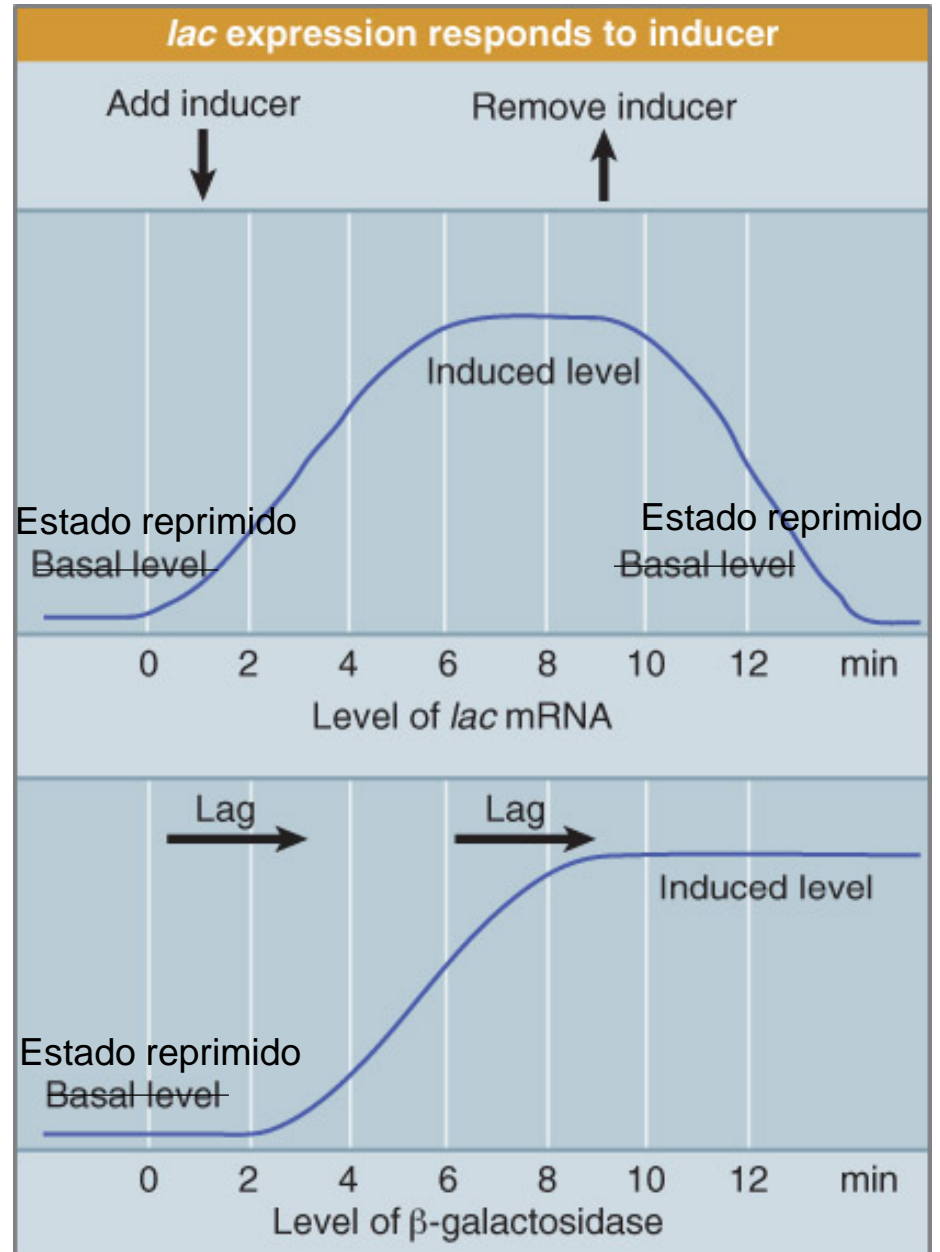
**Inductor
natural**



Isopropyl β -thiogalactoside

**Inductor
gratuit**

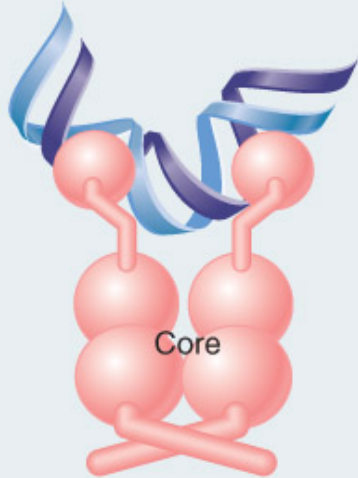
Operó *lac*:
inductor



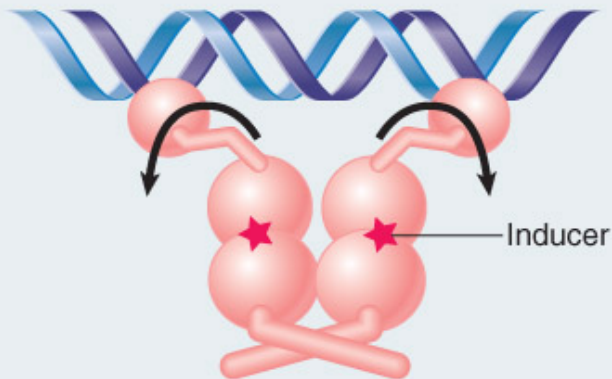
Operó *lac*: inductor

Inducer controls repressor conformation

Headpieces bind successive turns in major groove



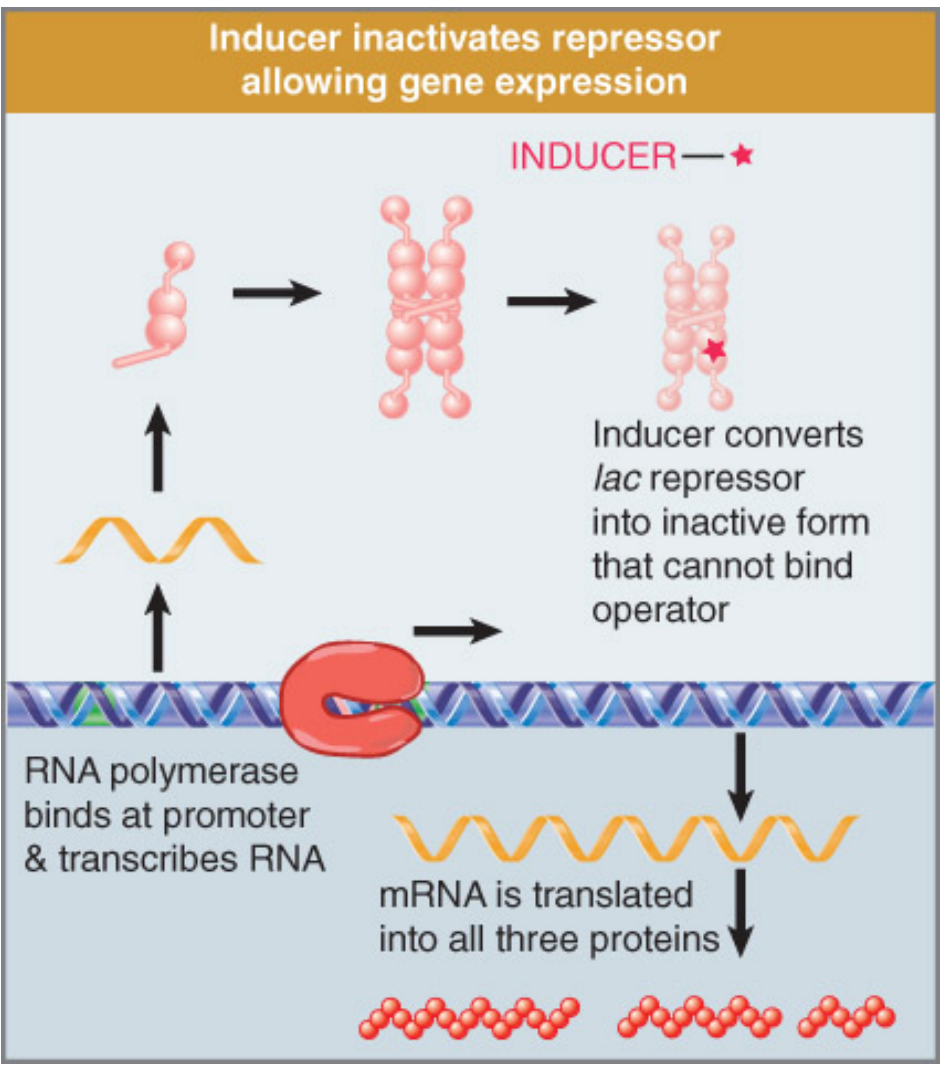
Inducer binding changes conformation at hinge, so that headpieces cannot fit into groove



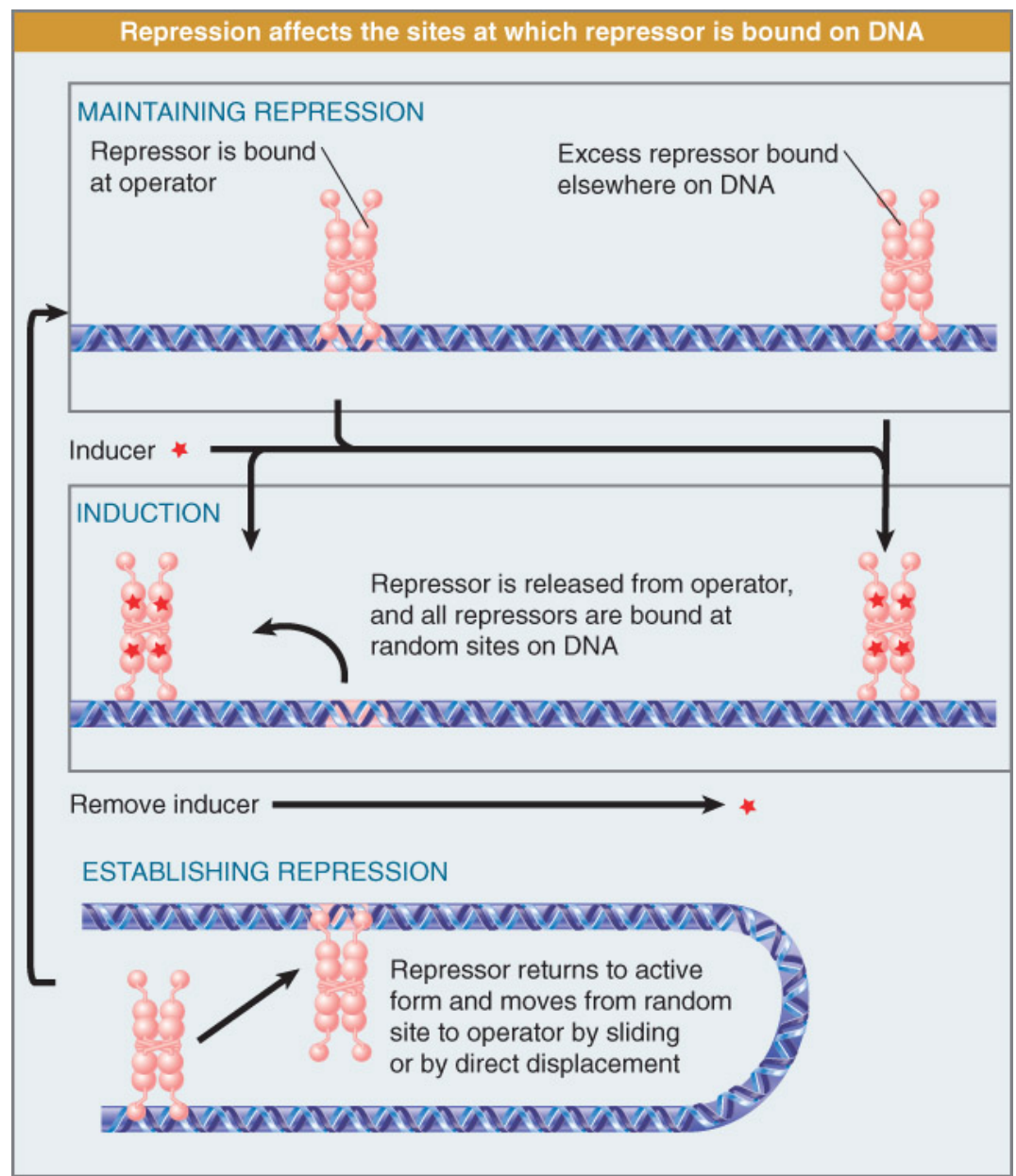
Repressor specifically binds operator DNA

DNA	Repressor	Repressor + inducer
Operator	2×10^{13}	2×10^{10}
Other DNA	2×10^6	2×10^6
Specificity	10^7	10^4
Operators bound	96%	3%
Operon is:	repressed	induced

Operó lac: inductor

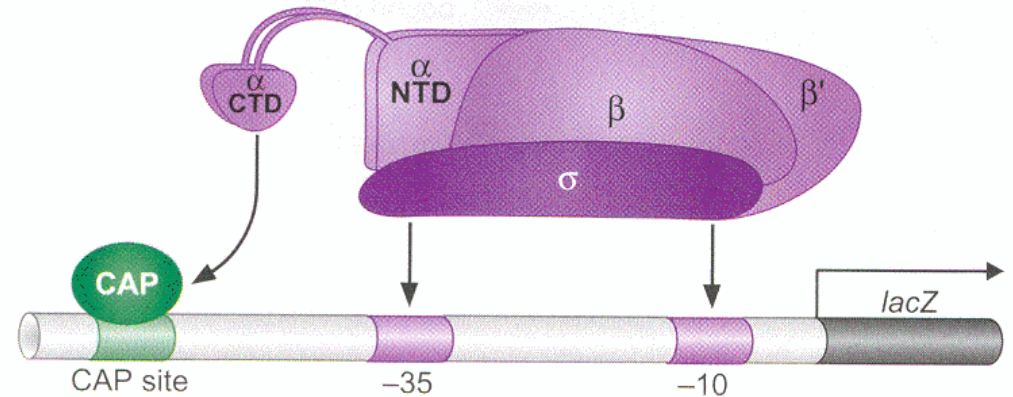


Operó lac

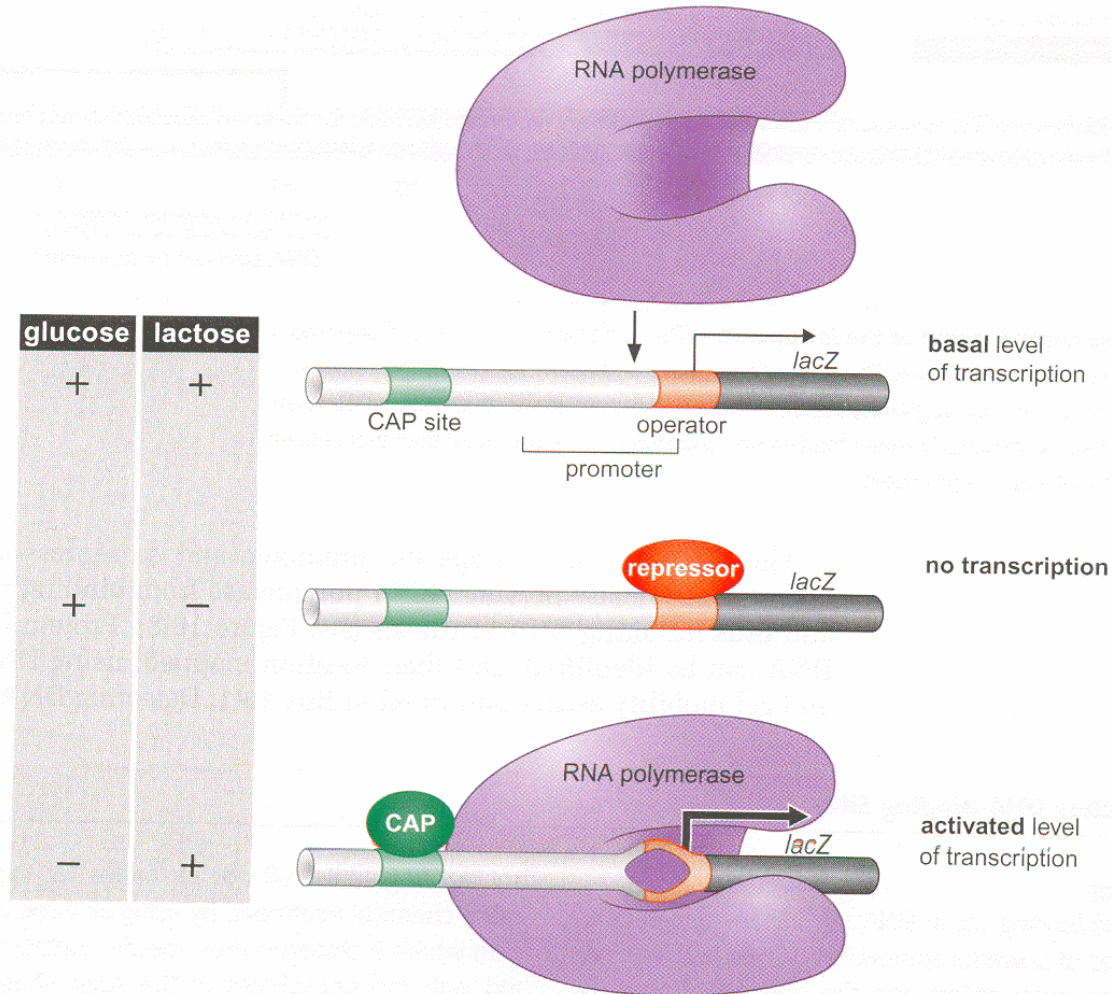


Operó *lac*: activació per CAP

FIGURE 16-9 Activation of the *lac* promoter by CAP. RNA polymerase binding at the *lac* promoter with the help of CAP. CAP is recognized by the CTDs of the α subunits. The α CTDs also contact DNA, adjacent to the CAP site, when interacting with CAP. As in Chapter 12, we use this representation of RNA polymerase when indicating specific points of contact between an activator and its target site on polymerase, or between regions of polymerase and the promoter.



Operó lac: visió global de la regulació



Operó *lac*: visió global de la regulació

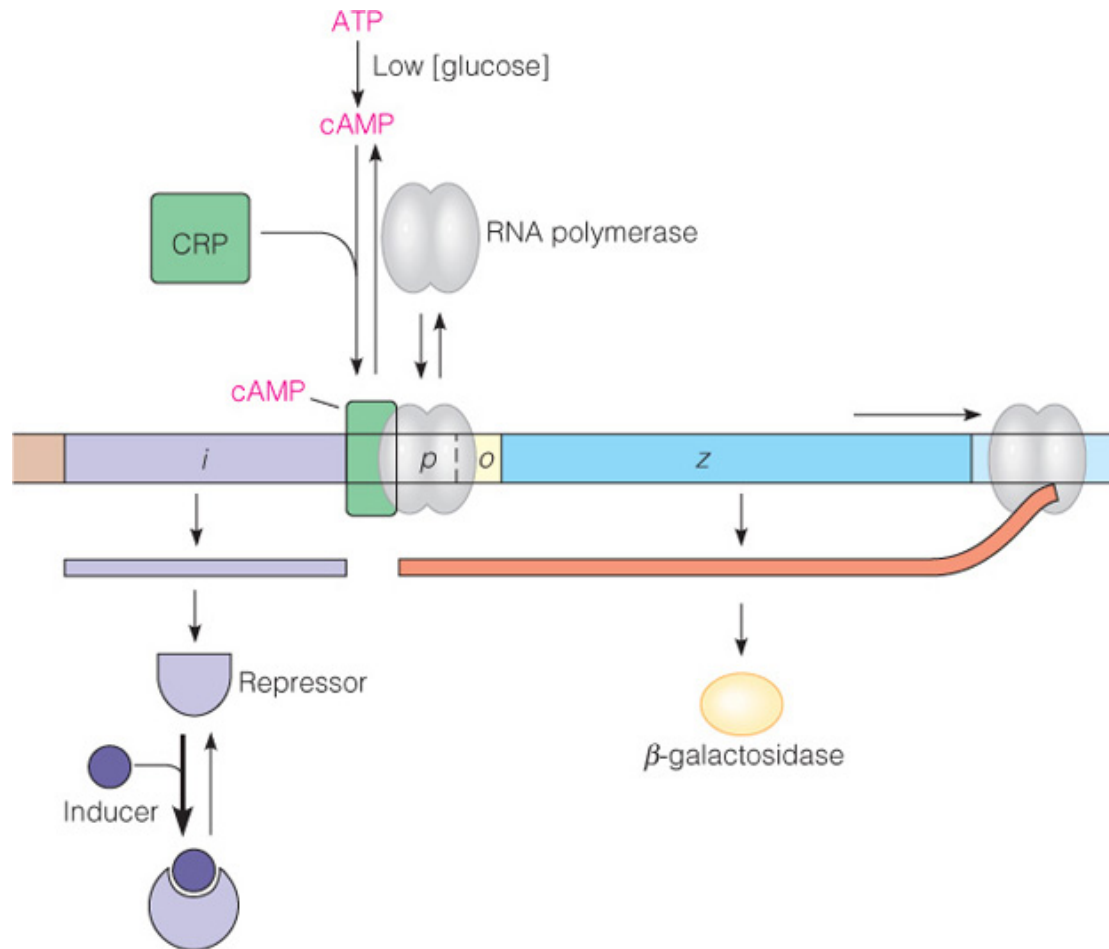
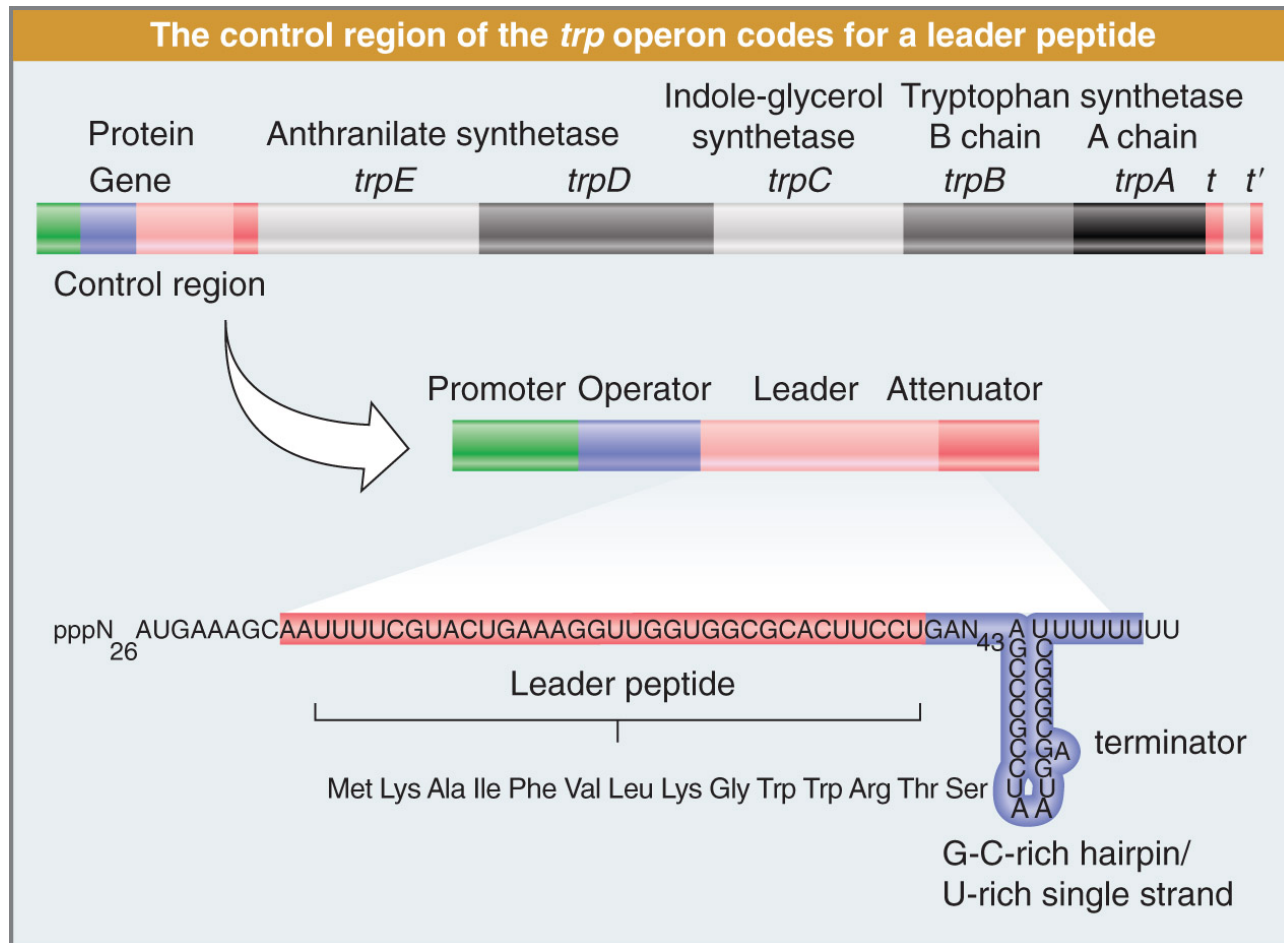


FIGURE 29.5

Activation of the *lac* operon. Repressor is inactivated by binding inducer, and cAMP receptor protein (CRP) is activated by binding cyclic AMP. Binding of the CRP-cAMP complex to DNA facilitates initiation of transcription by RNA polymerase.

Operó *trp* en *E. coli*: mecanismes de regulació

Operó reprimible en un sistema de control negatiu (Trp és el correpressor). A més, regulació per atenuació.



Operó *trp* en *E. coli*: regulació negativa reprimible

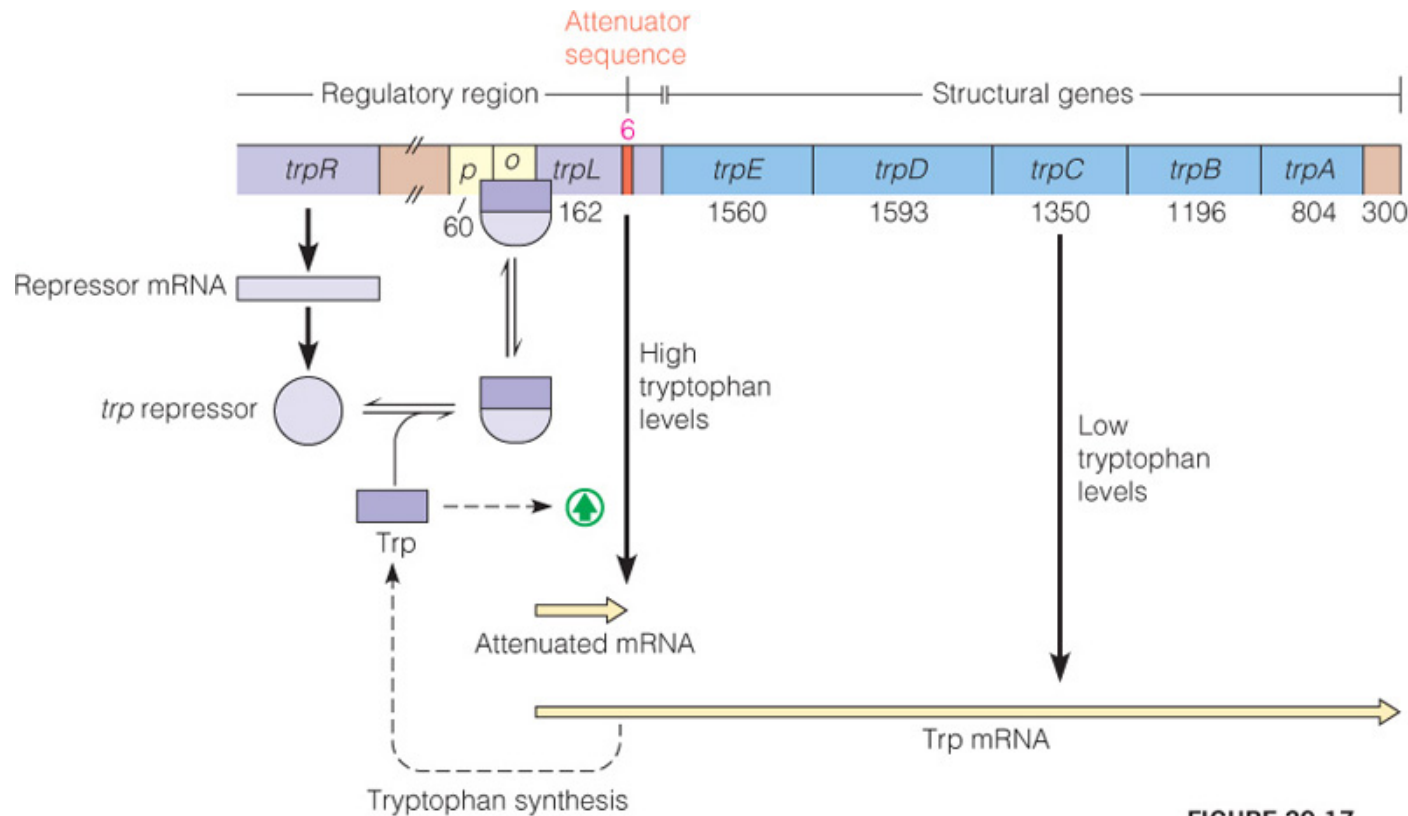


FIGURE 29.17

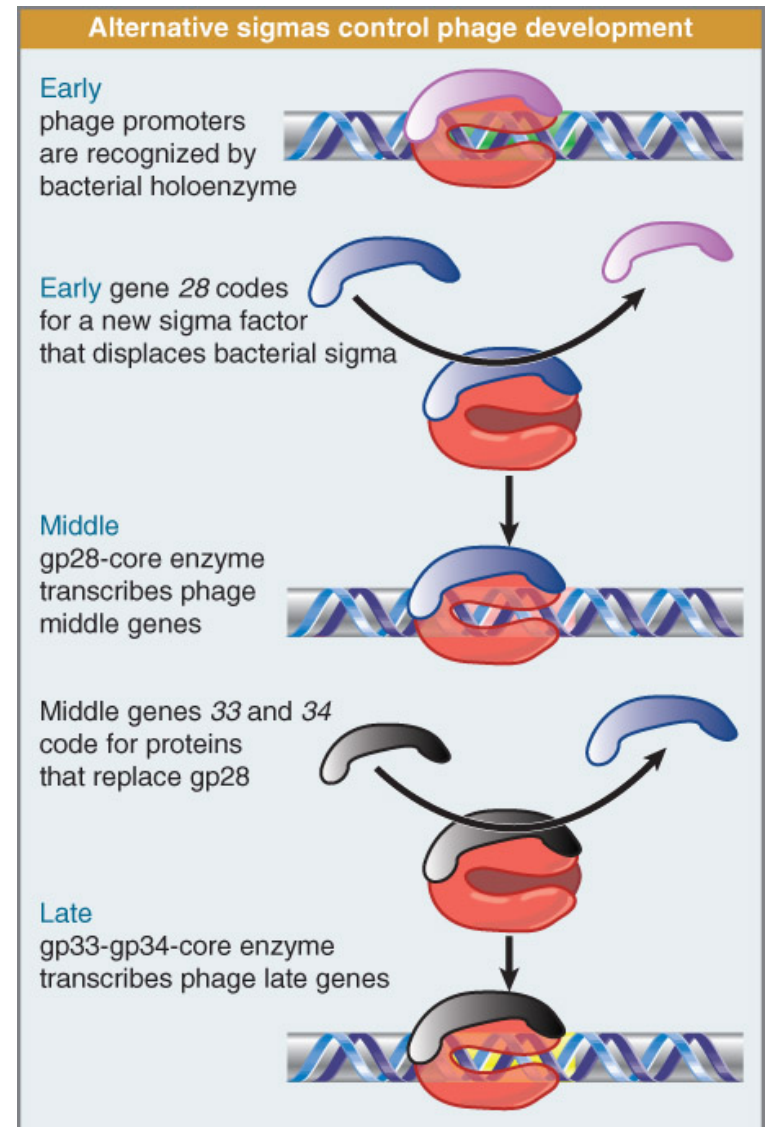
The *trp* operon. The figure shows regulation by *trp* repressor and by attenuation. *trpA*, the attenuator site, is shown in red.

Regulació de l'inici de la transcripció
mitjançant factors sigma alternatius

Regulació de l'expressió gènica mitjançant factors sigma alternatius: exemples

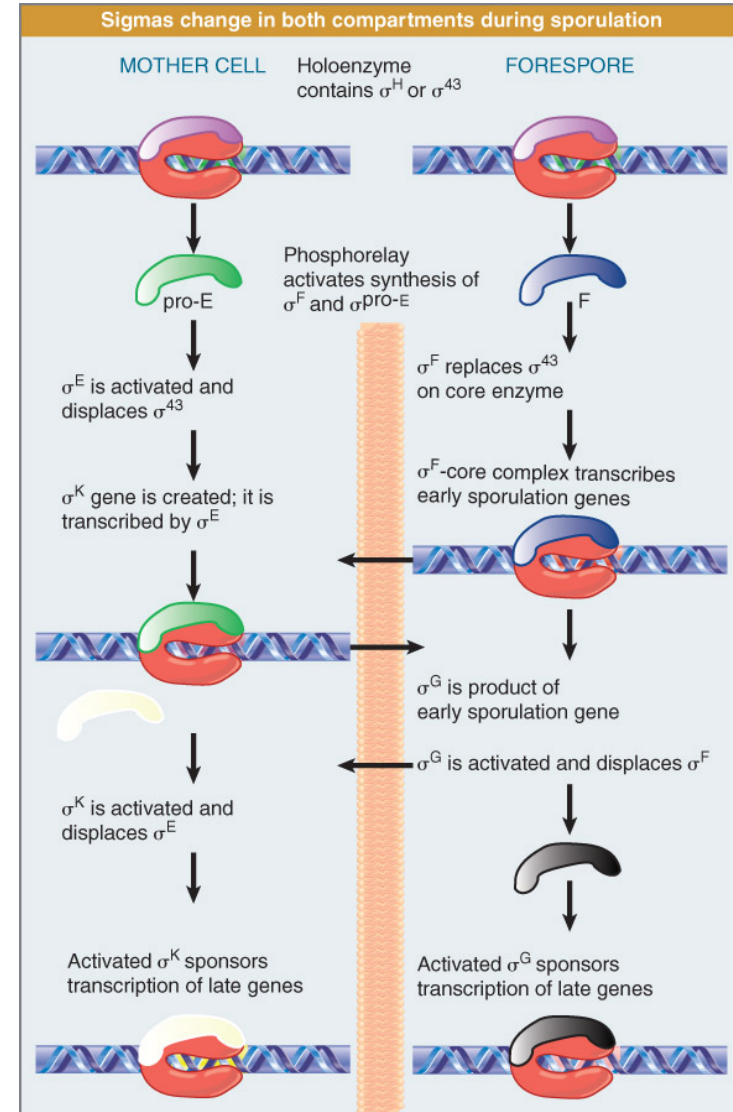
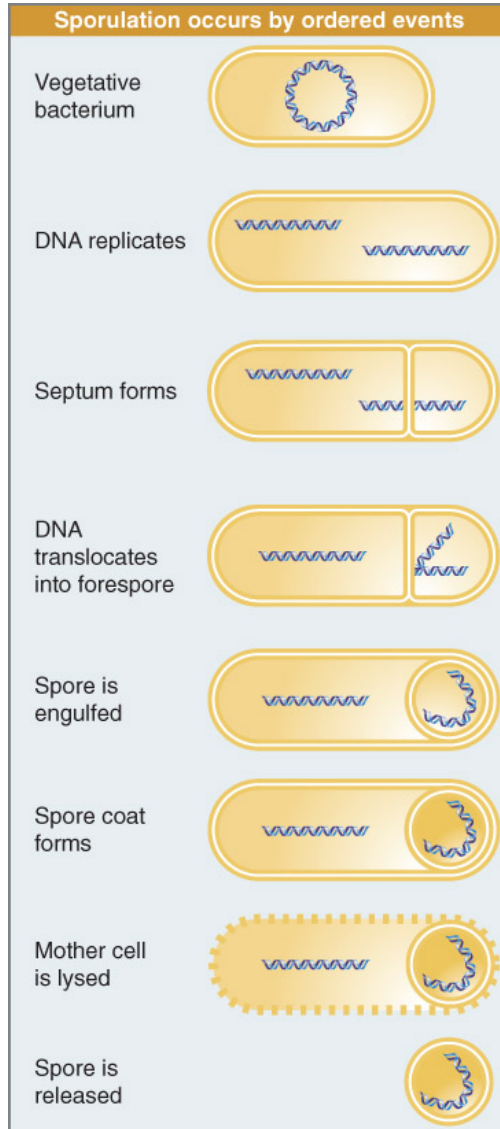
- ✓ Expressió de gens d'*Escherichia coli* implicats en la resposta a condicions adverses (xoc tèrmic, limitació de nitrogen). Descrit en el tema 3
- ✓ Control de les fases del cicle infectiu de certs fags (vegeu diapositiva 47)
- ✓ Regulació de l' esporulació en *Bacillus subtilis* (vegeu diapositiva 48)

Regulació de promotors pel factor sigma: infeccions per fags



Cas de la infecció de *Bacillus subtilis* pel bacteriòfag SPO1

Regulació pel factor sigma: esporulació



Regulació de l'acabament de la transcripció

- L'atenuació com a mecanisme de regulació de la terminació de la transcripció a través de l'acabament o no de la traducció d'una regió anterior
- Existeixen proteïnes que eviten la terminació en alterar les propietats de l'RNA polimerasa

Operó *trp*
en *E. coli*:
regulació
per
atenuació

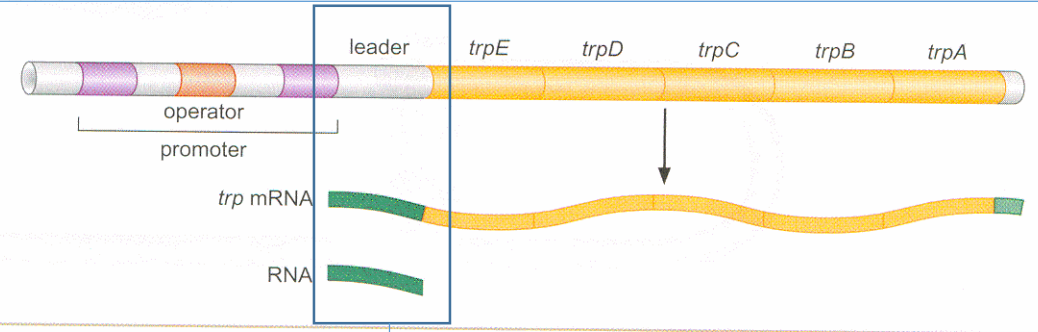


FIGURE 16-19 The *trp* operon. The tryptophan operon of *E. coli*, showing the relation of the leader (see text) to the structural genes that code for the Trp enzymes. The gene products are anthranilate synthetase (product of *trpE*), phosphoribosyl anthranilate transferase (*trpD*), phosphoribosyl anthranilate isomerase-indole glycerol phosphate synthetase (*trpC*), tryptophan synthetase β (*trpB*), and tryptophan synthetase α (*trpA*).

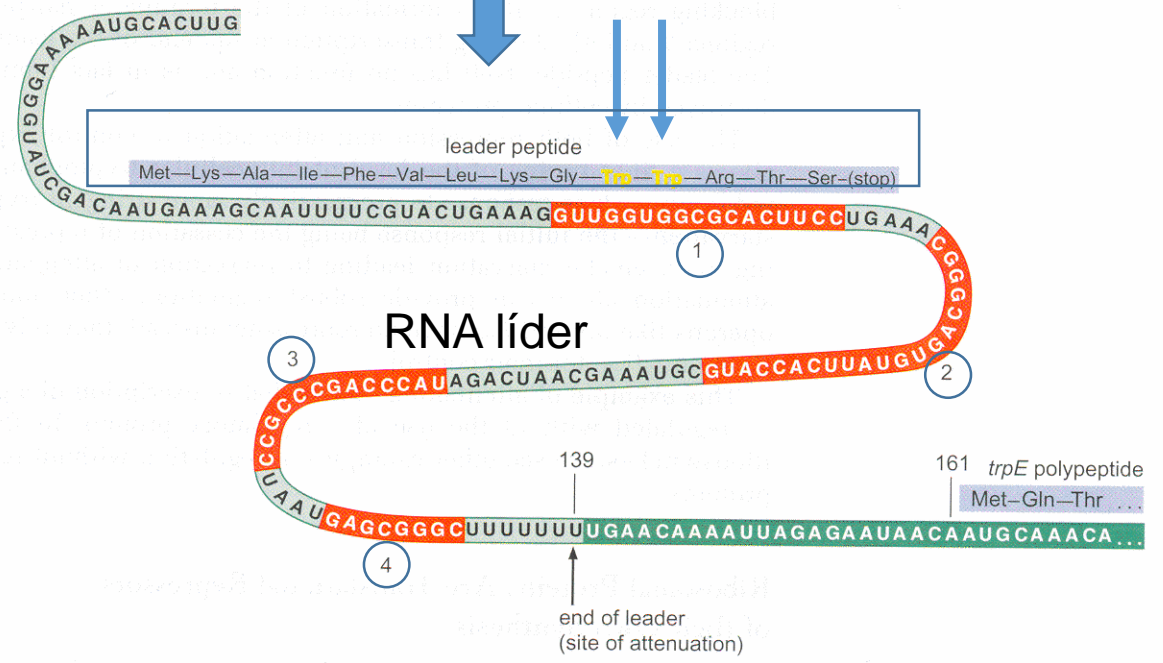


FIGURE 16-20 *Trp* operator leader RNA. Features of the nucleotide sequence of the *trp* operon leader RNA.

Operó *trp* en *E. coli*: atenuació

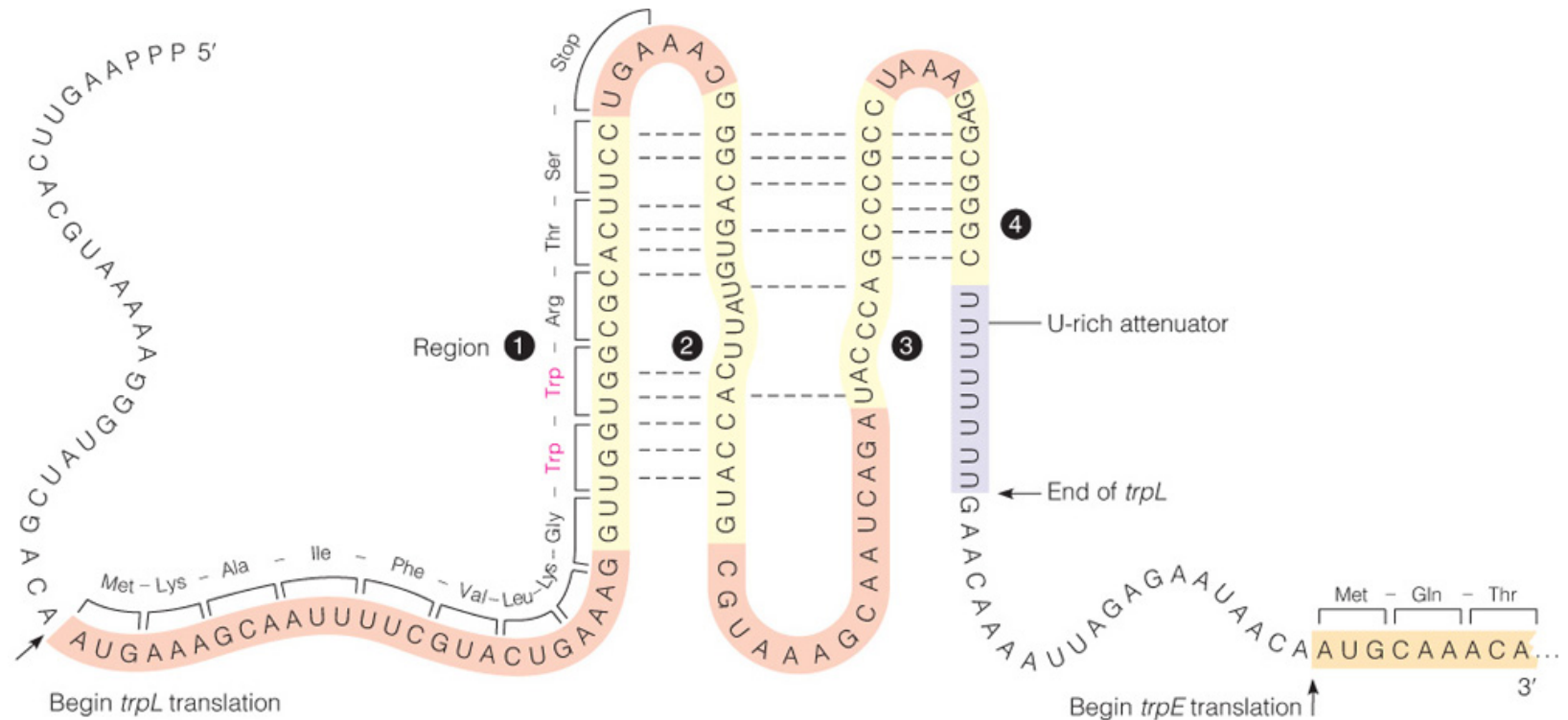


FIGURE 29.18

RNA base sequence of the *trp* leader region. The four internally complementary sequences that participate in attenuation (yellow) are shown, as well as the two *trp* codons (magenta) in region 1 that act as a pause site for RNA polymerase. The translational stop codon after region 1 (see Chapter 28) may serve to prevent needless translation of those few full-length messages that are produced despite attenuation.

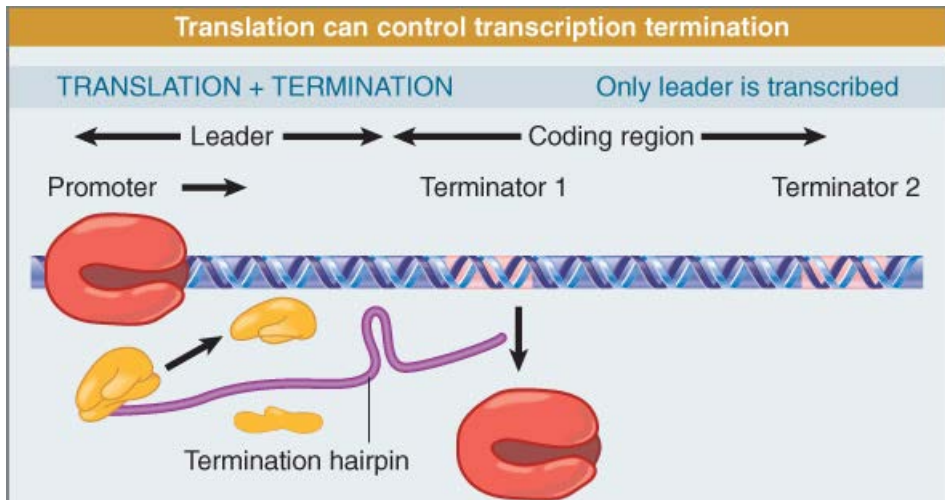
L'RNA líder presenta seqüències capaces d'adoptar estructures en forma de forqueta: 2-3 o 3-4. La segona d'aquestes té les característiques d'una forqueta terminadora de la transcripció

Operó *trp* en *E. coli*: atenuació

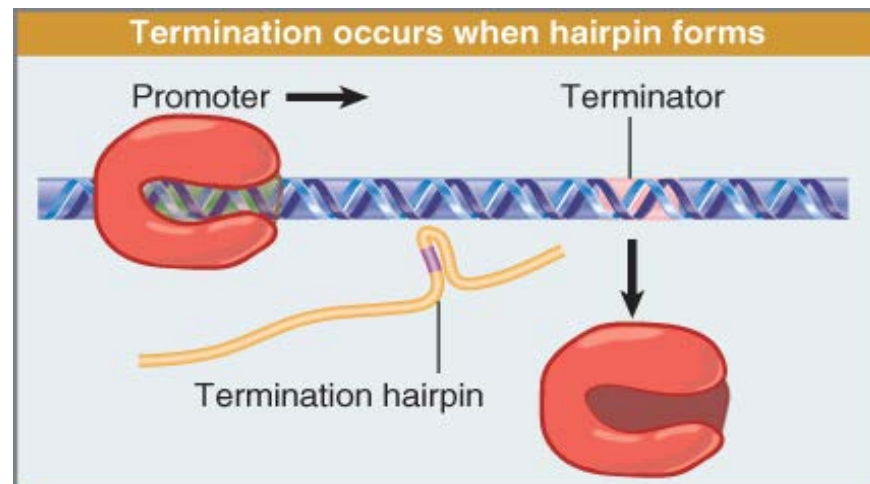
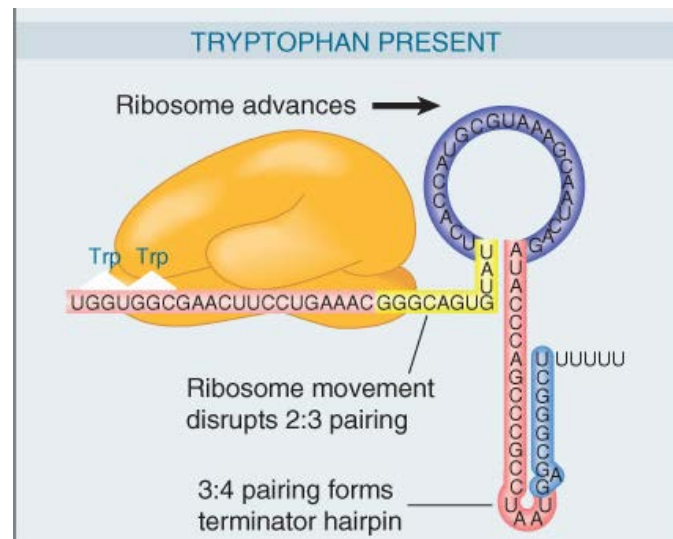
Disponibilitat de Trp

↓
Síntesi completa del pèptid líder a partir dels pocs transcrits que es generen

↓
Formació de forqueta terminadora 3-4



L'RNA polimerasa no continua avançant cap als gens estructurals:
La transcripció de qualsevol transcrit iniciat és avortada



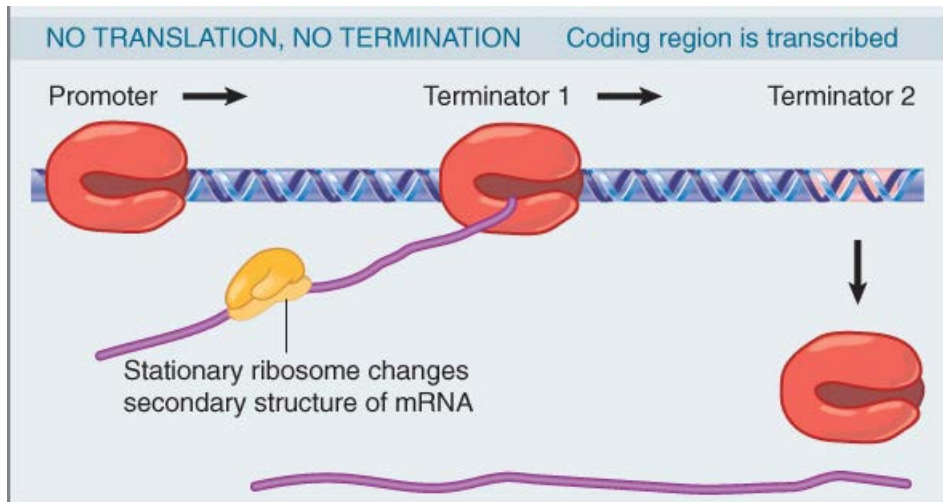
Operón *trp* en *E. coli*: atenuació

Absència de Trp

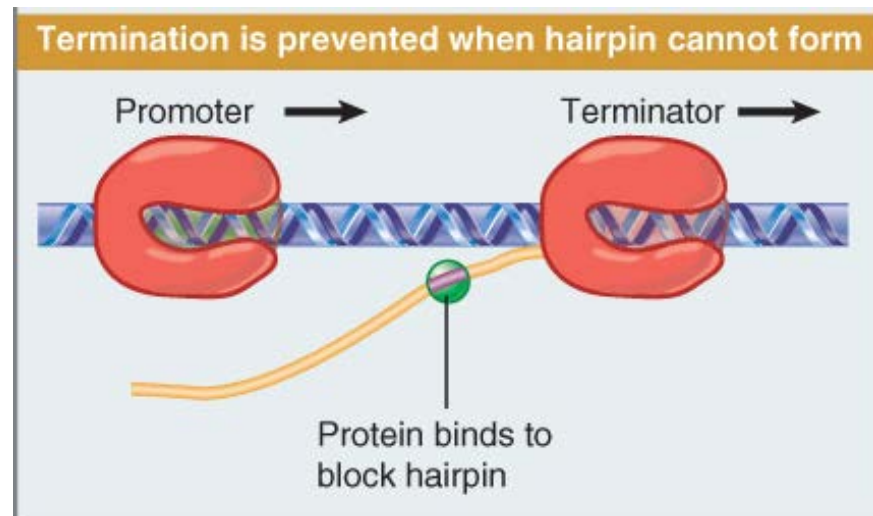
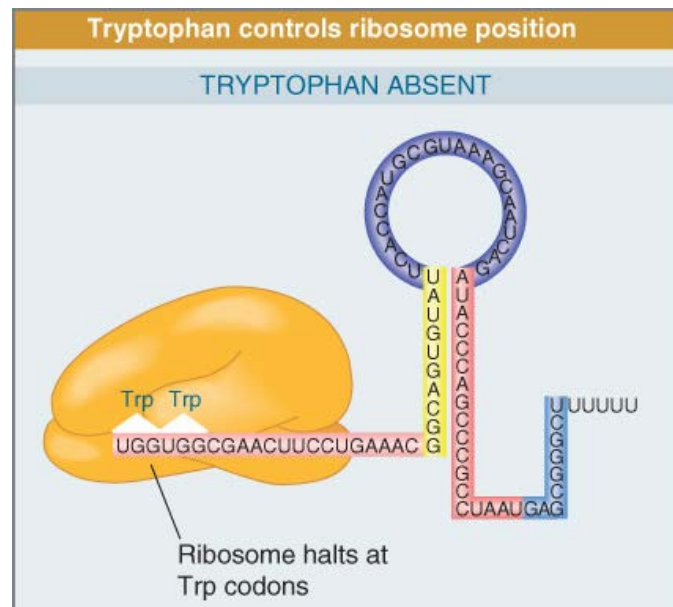
Inici de nombrosos transcrits

Síntesi incompleta del pèptid líder

Formació de la forqueta 2-3 (no terminadora)



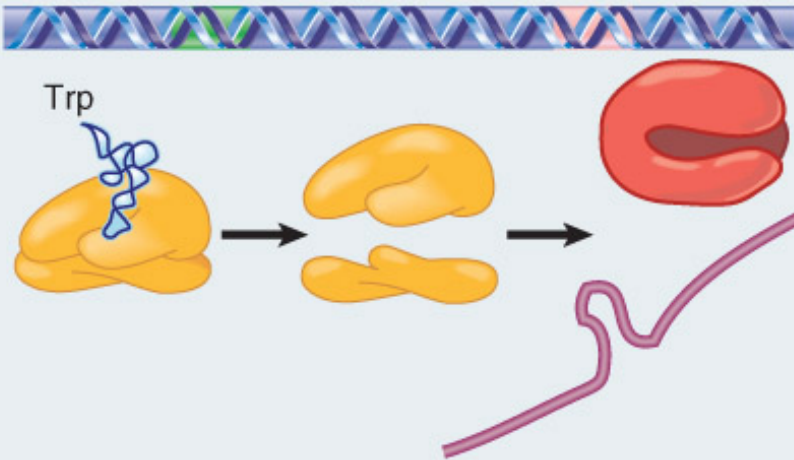
L'RNA polimerasa continua avançant cap als gens estructurals



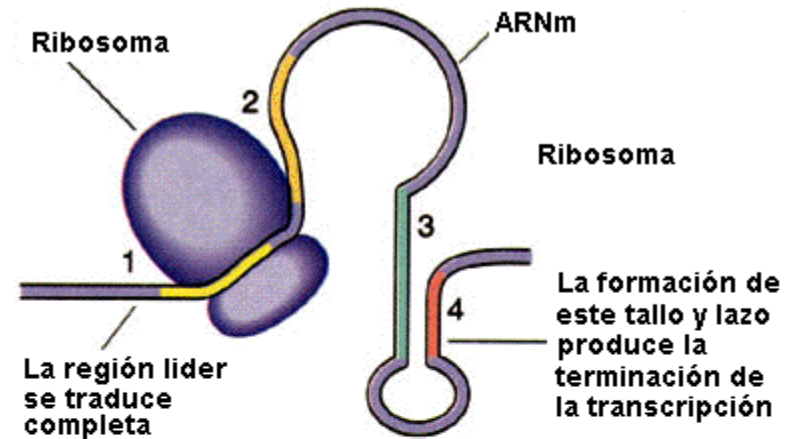
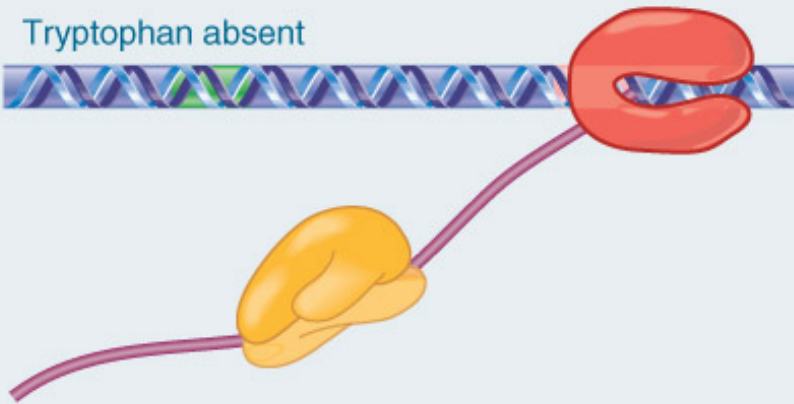
Operó *trp* en *E. coli*: regulació per atenuació

Trp-tRNA controls the *E. coli trp* operon directly

Tryptophan present



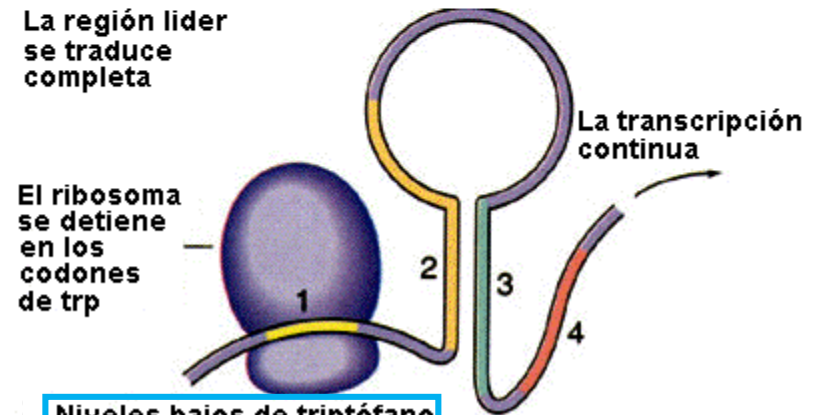
Tryptophan absent



Niveles altos de triptófano

La región líder se traduce completa

El ribosoma se detiene en los codones de trp



Niveles bajos de triptófano

Operó *trp* en *E. coli*: regulació per atenuació

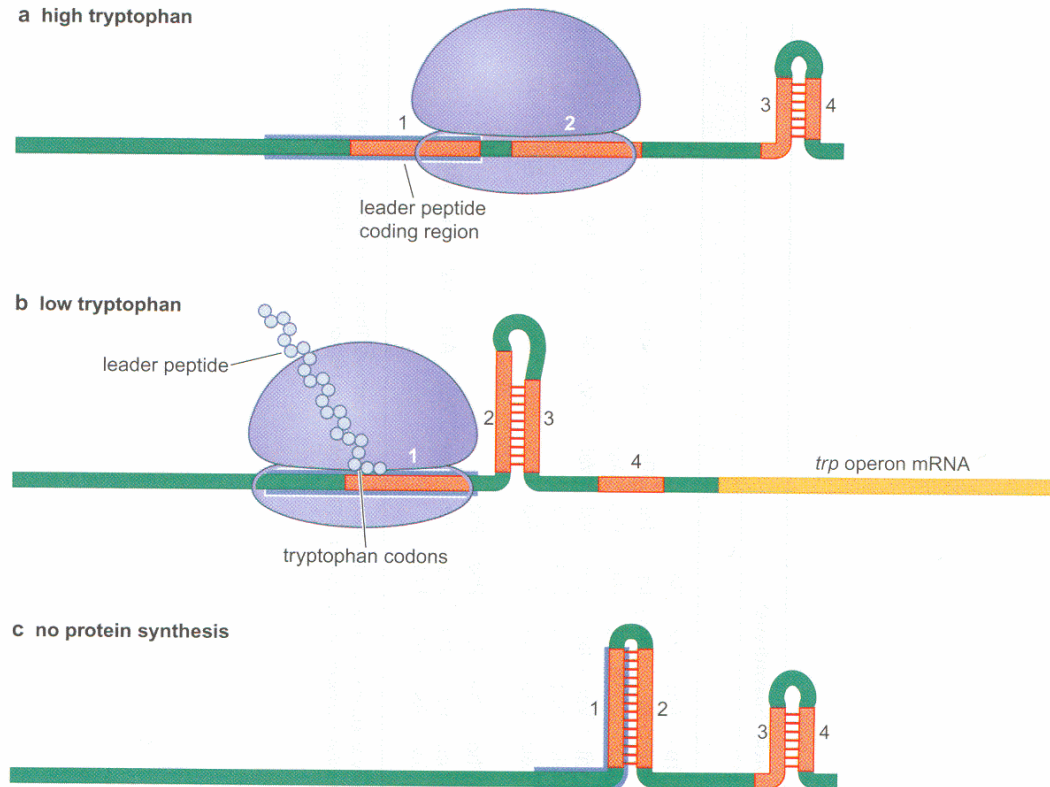
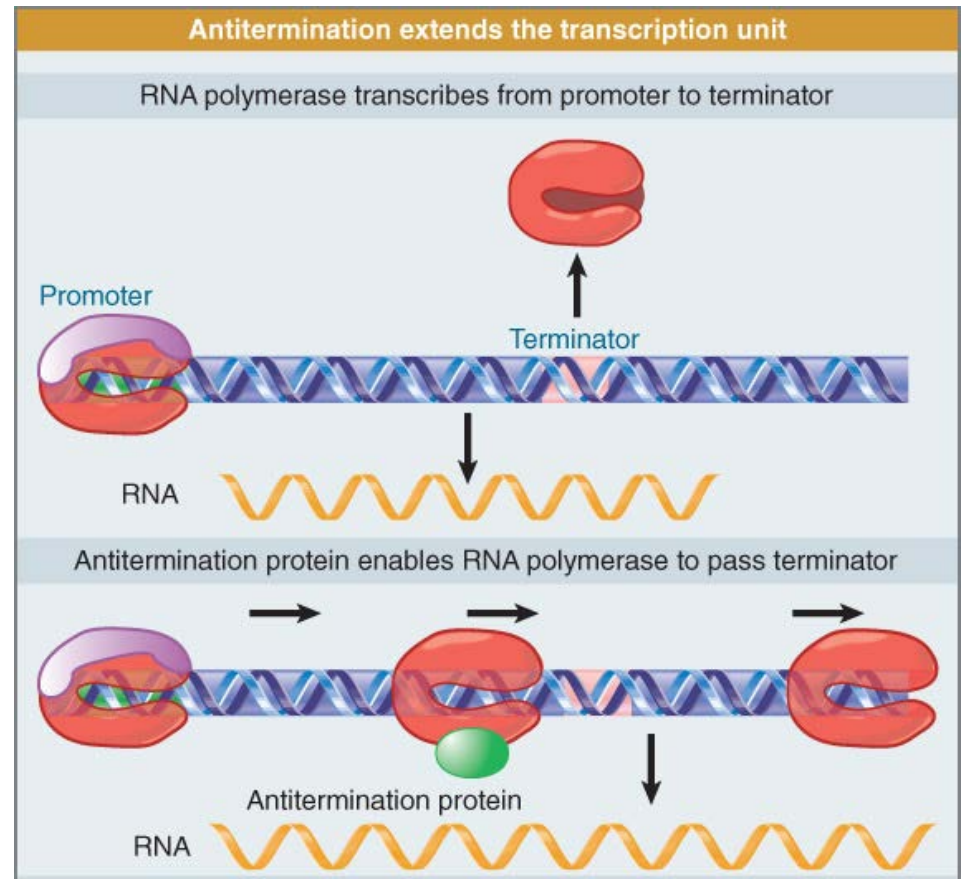
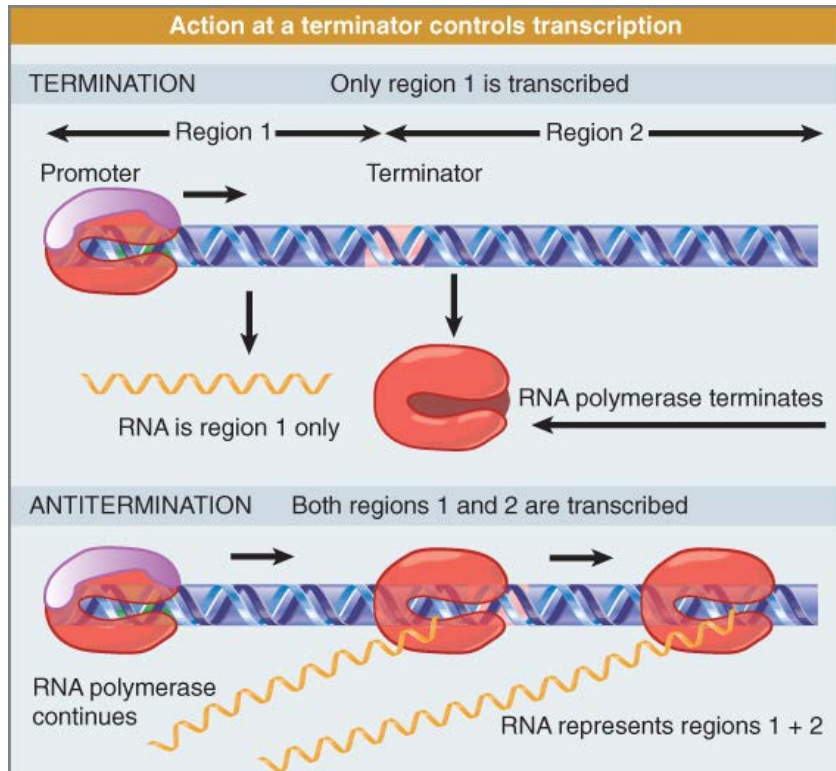


FIGURE 16-21 Transcription termination at the *trp* attenuator. How transcription termination at the *trp* operon attenuator is controlled by the availability of tryptophan. In (a) (conditions of high tryptophan), sequence 3 can pair with sequence 4 to form the transcription termination hairpin. In (b) (conditions of low tryptophan), the ribosome stalls at adjacent tryptophan codons, leaving sequence 2 free to pair with sequence 3, thereby preventing formation of the 3, 4, termination hairpin. In (c) (no protein synthesis), if no ribosome begins translation of the leader peptide AUG, the hairpin forms by pairing of sequences 1 and 2, preventing formation of the 2, 3, hairpin, and allowing formation of the hairpin at sequences 3, 4. The Trp enzymes are not expressed.

L'antiterminació com a mecanisme regulador de la transcripció

El mecanisme d'antiterminació requereix llocs independents del terminador localitzats en 5' o en la unitat de transcripció, en el DNA o en l'RNA, reconeguts per determinades proteïnes.



Antiterminació

Les primeres proteïnes antiterminadores es trobaren en processos d'infecció per fags. Algunes s'uneixen al DNA i d'altres al transcrit

Antitermination proteins act on specific terminators			
Transcription unit	Promoter	Terminator	Antitermination Protein
Immediate early	P_L	t_L	pN
Immediate early	P_{R1}	t_{R1}	pN
Late	$P_{R'}$	$t_{R'}$	pQ

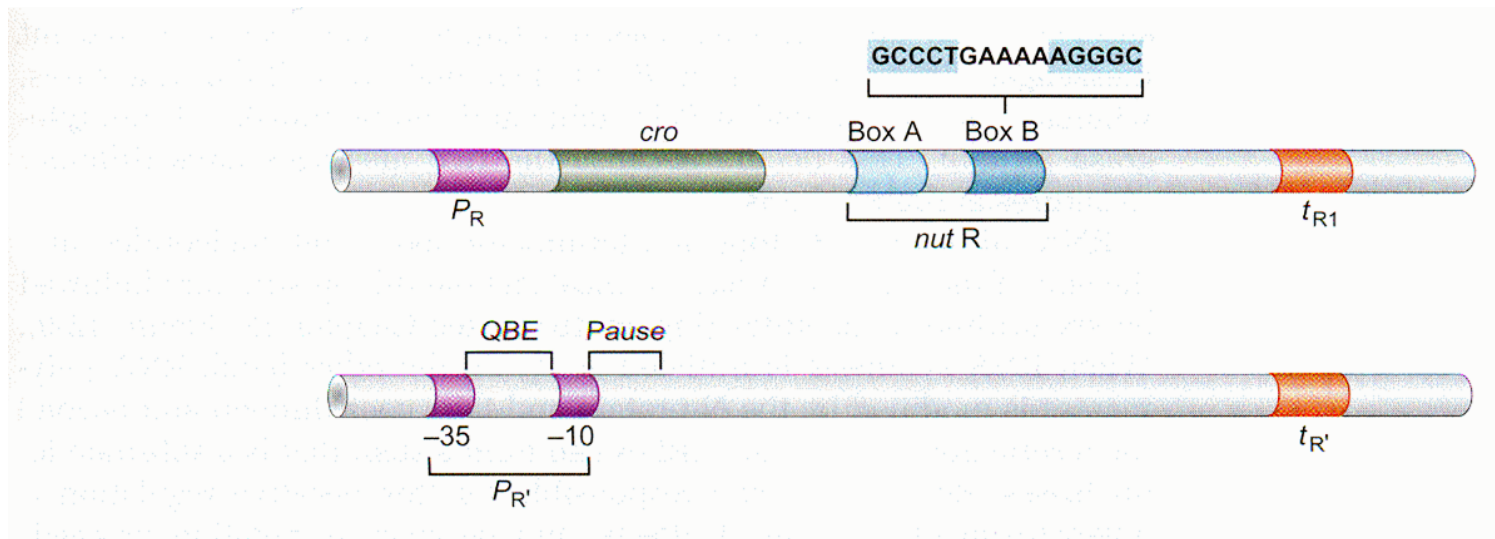


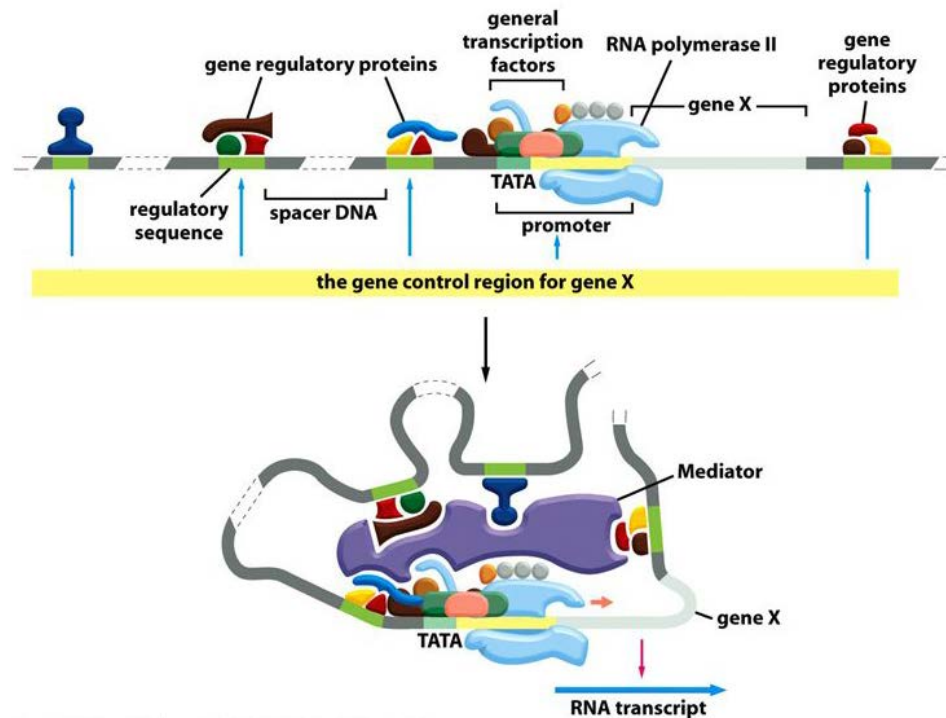
FIGURE 16-36 Recognition sites and sites of action of the λ N and Q transcription antiterminators. The upper line shows the early rightward promoter P_R and its initial terminator, t_{R1} . The *nut* site is divided into two regions, called BoxA (7 bp) and BoxB, separated by a spacer region of 8 bp. The sequence of BoxB has dyad symmetry and forms a stem-loop structure once transcribed into RNA. The sequence of the RNA-like strand of *nutR* is shown above. The lower line shows the promoter $P_{R'}$, the sequences essential for Q protein function, and the terminator at which Q protein acts.

Aspectes fonamentals a recordar

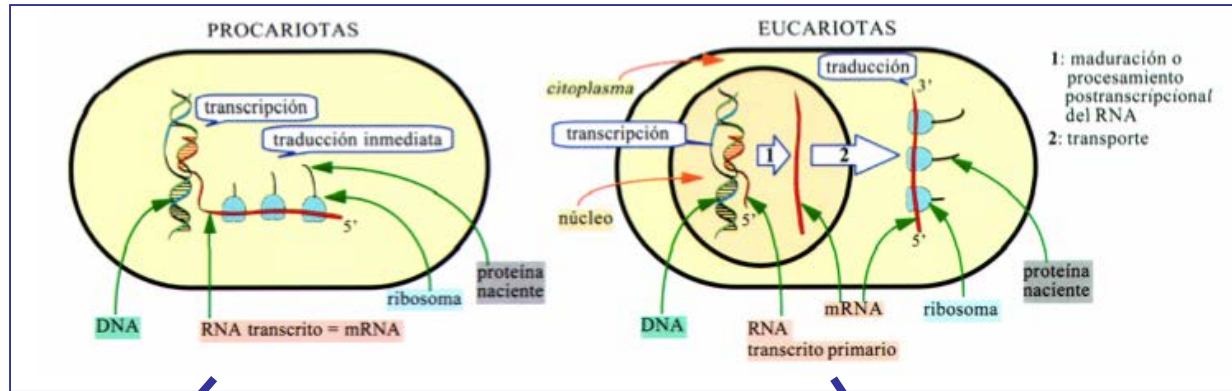
Característica	Procariotes	Eucariotes
Unitat transcripcional típica	Policistrònica	Monocistrònica
Concepte de promotor	Elements necessaris per a la unió de la polimerasa i l'inici de la transcripció	Elements necessaris per a la transcripció i el seu control. Complexitat major
Tipus de regulació	Positiva o negativa	Bàsicament positiva
Com es controla la transcripció de gens que s'han d'expressar conjuntament?	Mitjançant organització en operons	Aquests gens contenen en els seus promotors els mateixos elements reguladors
Possibilitat de regulació per atenuació	Sí	No

Tema 5

Transcripció en eucariotes. RNA polimerases eucariòtiques.
 Cromatina i transcripció.
 Inici de la transcripció: RNA pol I, RNA pol II, RNA pol III.
 Elongació i acabament de la transcripció.



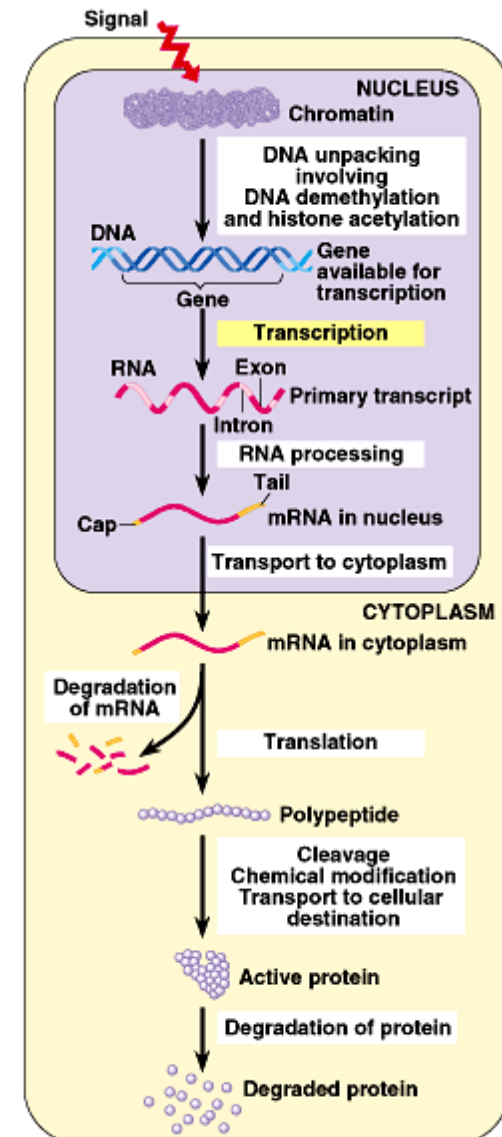
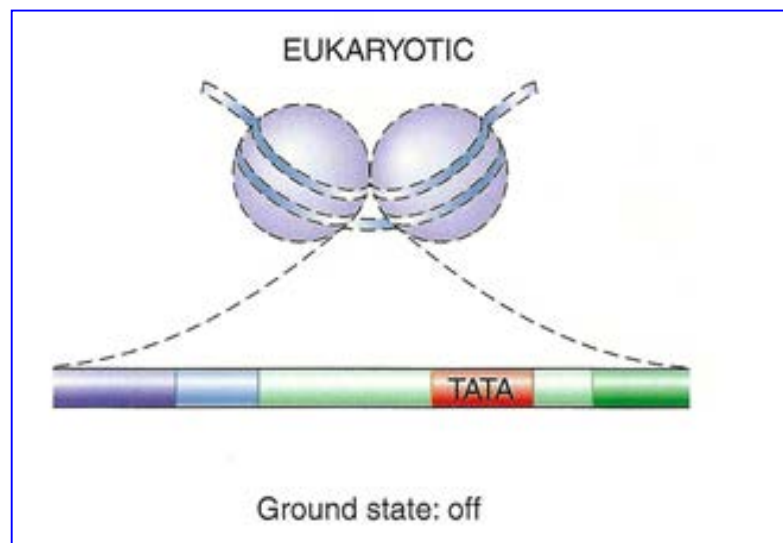
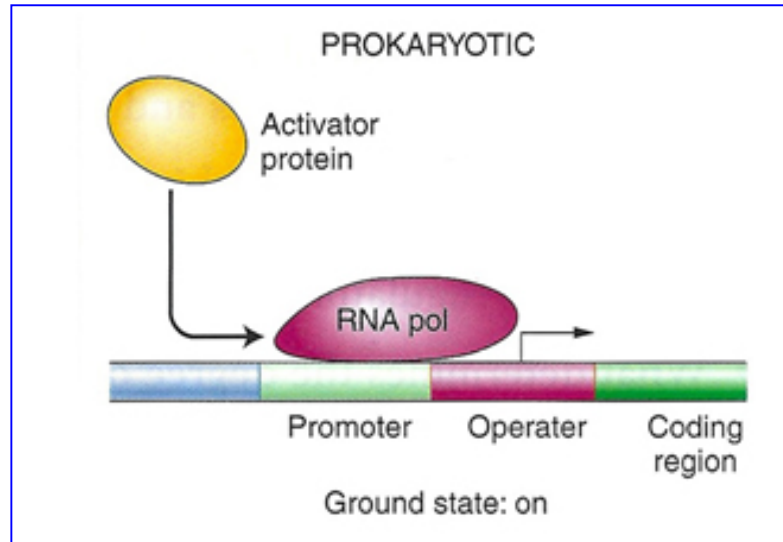
Transcripció en eucariotes: diferències amb procarïotes



- El procés és més simple
- No ocorre en una estructura cromatínica
- El transcrit primari és funcional
- Els mRNAs es tradueixen a mesura que se sintetitzen
- Intervé només una RNA polimerasa
- Els mRNAs són policistrònics

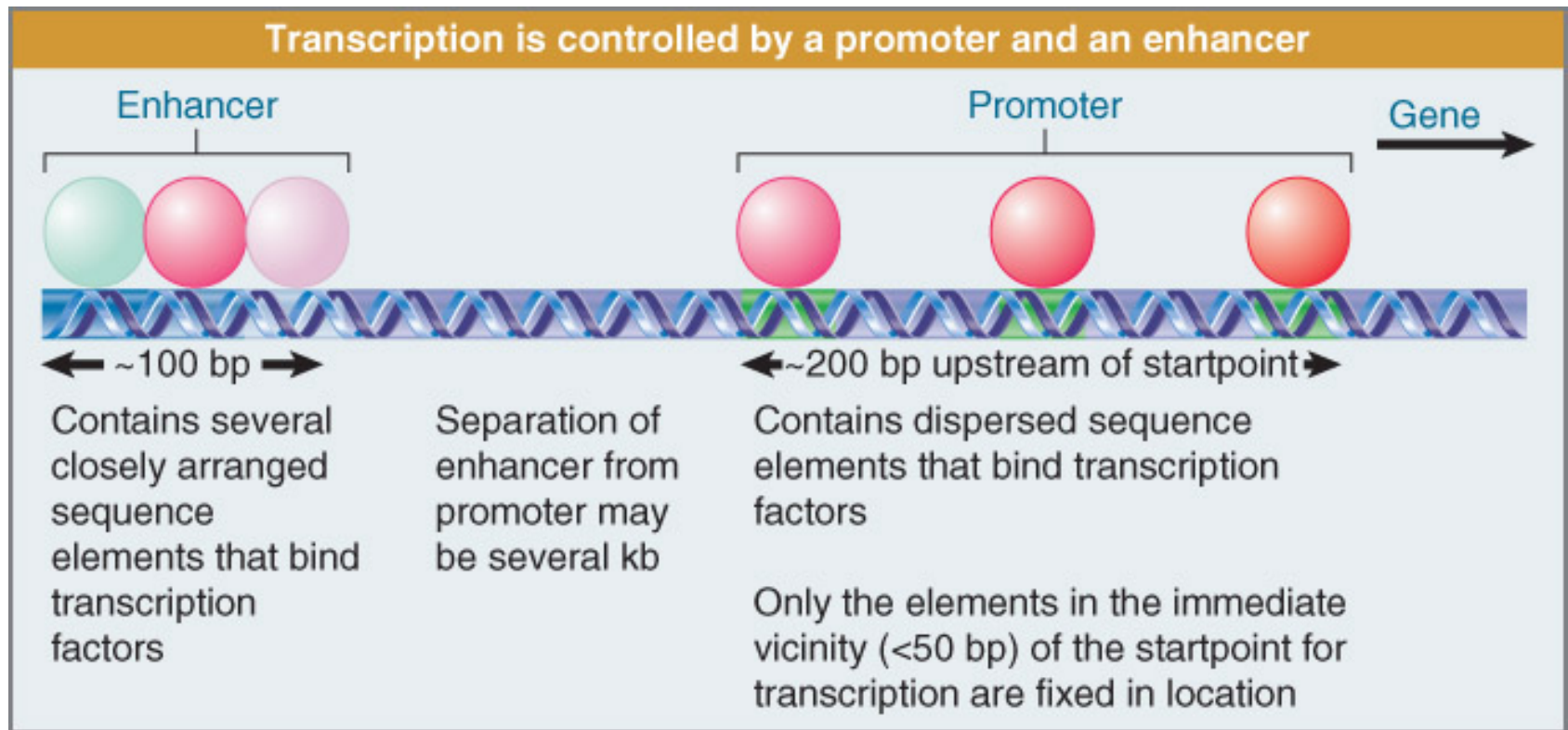
- El procés és més complex
- L'organització de la cromatina afecta la transcripció
- El transcrit experimenta un procés de maduració postranscripcional
- Els mRNAs han de ser transportats al citoplasma per a la seua traducció
- Intervenien tres RNA polimerases diferents
- Els mRNAs solen ser monocistrònics

Transcripció en eucariotes: diferències amb procarïotes



Estructura dels gens eucariòtics

El promotor correspon, generalment, a una regió del gen que sol ser molt extensa



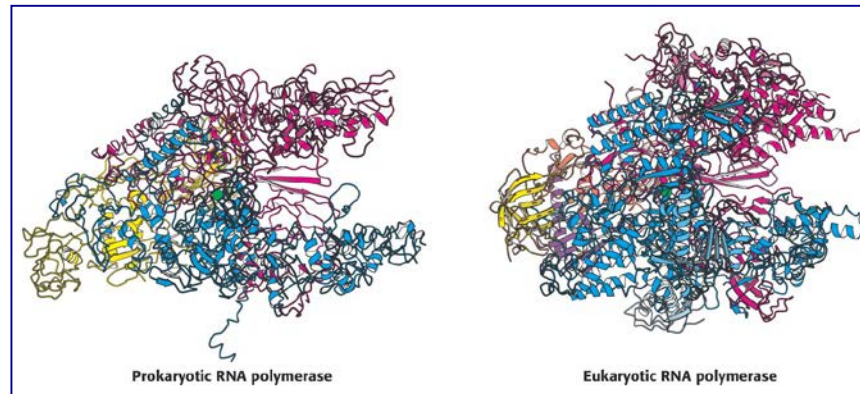
En eucariotes s'entén per promotor la regió de DNA que conté tots els elements que permeten la transcripció i el seu control

RNA polimerases eucariòtiques

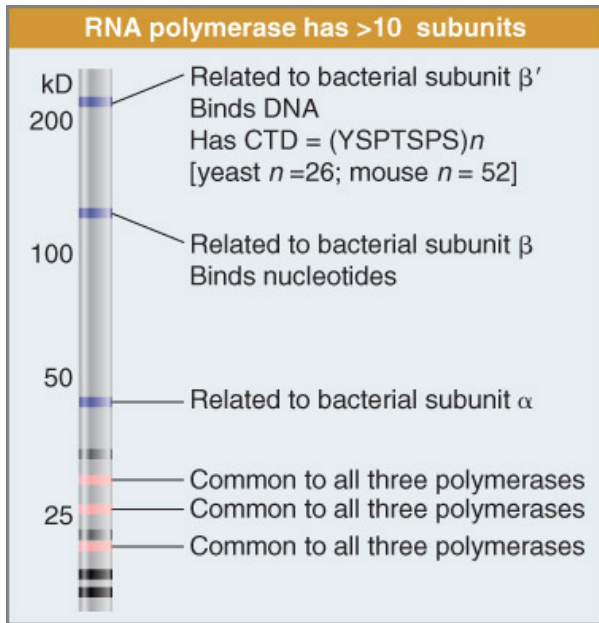
TABLA 28.3. Propiedades comparativas de las RNA polimerasas eucariotas

Polimerasa	Localización	RNA sintetizados
I	Núcleo (nucléolo)	Pre-rRNA (excepto 5S)
II	Núcleo	Pre-mRNA, algunos otros RNA nucleares pequeños
III	Núcleo	Pre-tRNA, rRNA 5S, otros RNA pequeños
Mitocondrial ^a	Mitocondria	Mitocondrial
Cloroplástica ^a	Cloroplasto	Cloroplástico

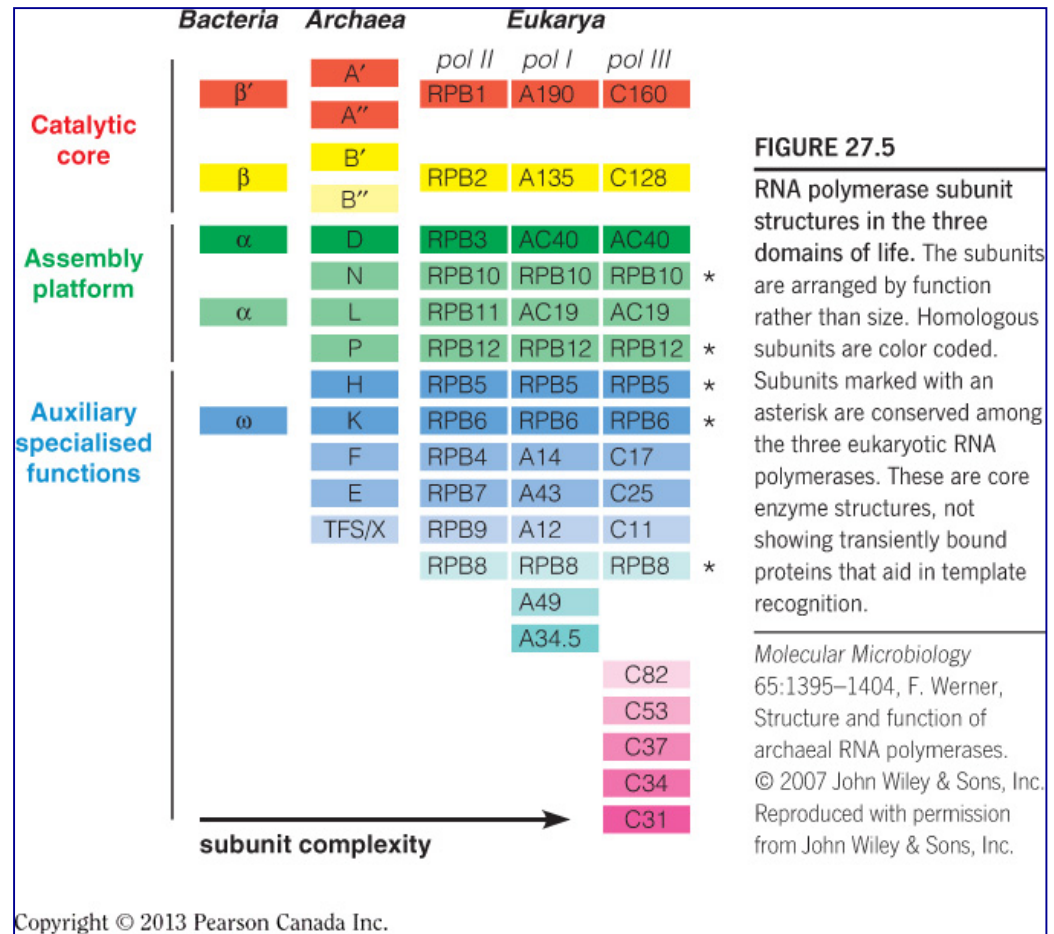
^a Son muy semejantes a la RNA polimerasa procariota.



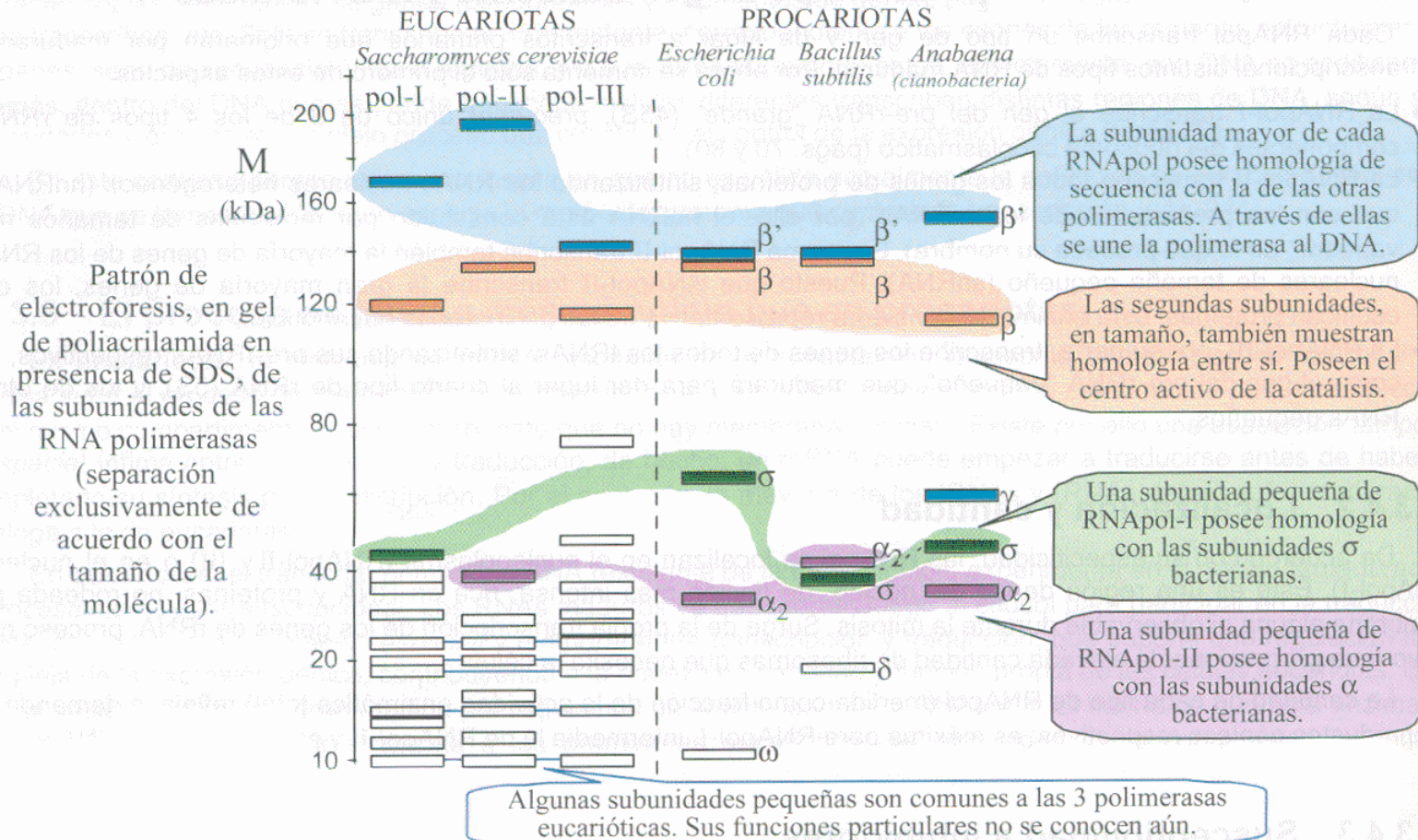
RNA polimerases eucariòtiques



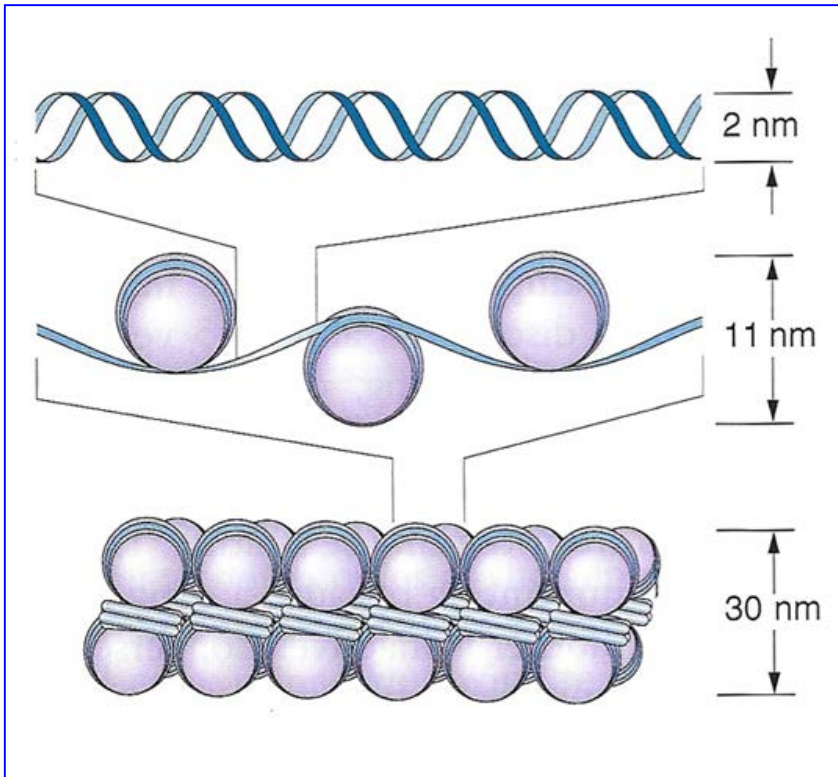
RNAPII



RNA polimerases eucariòtiques

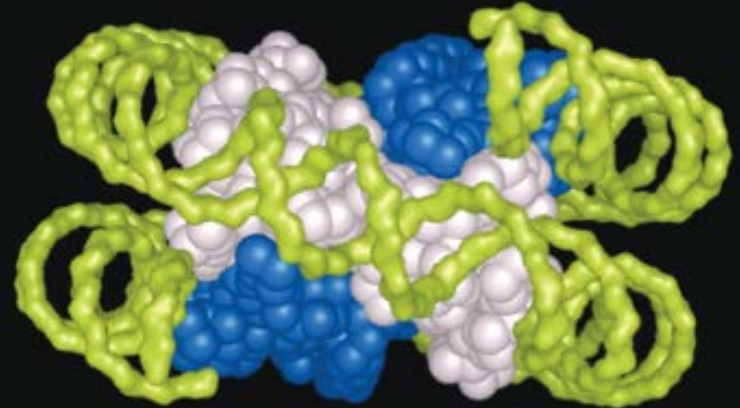


Cromatina i transcripció

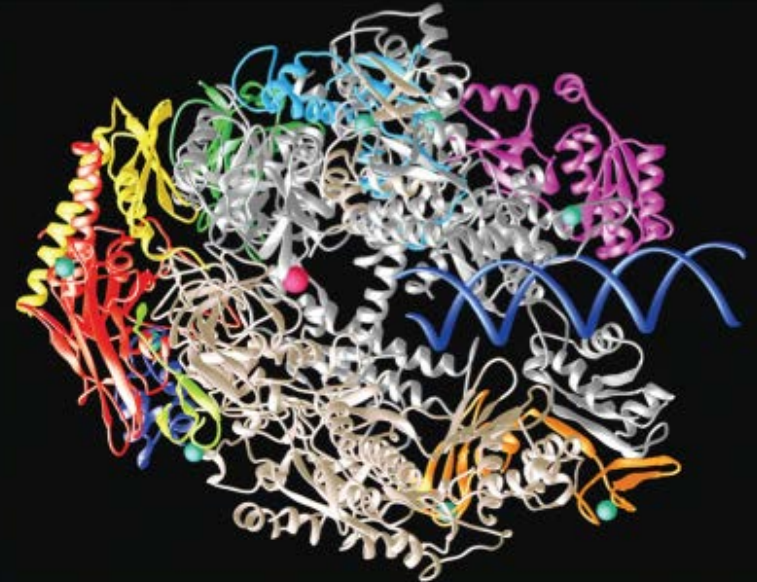


RNA polymerase is larger than the nucleosome

Nucleosome, 300 kD, 6×11 nm

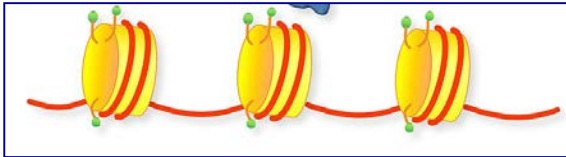


RNA polymerase, 500 kD, 14×13 nm

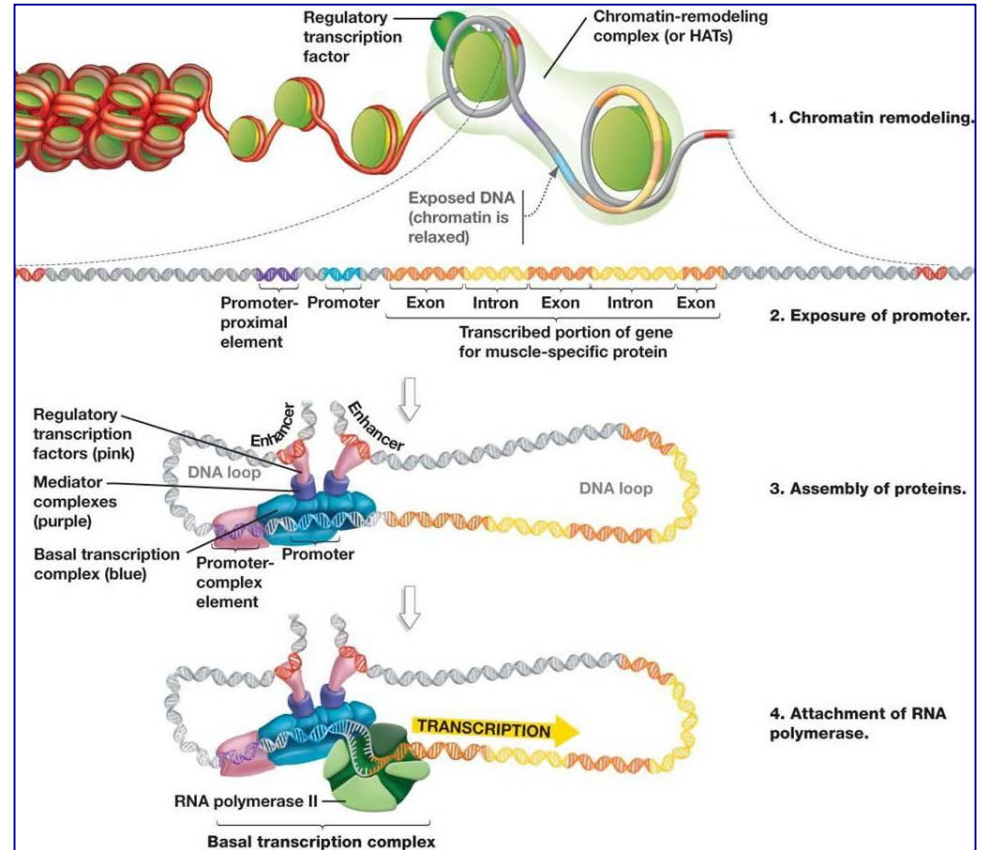
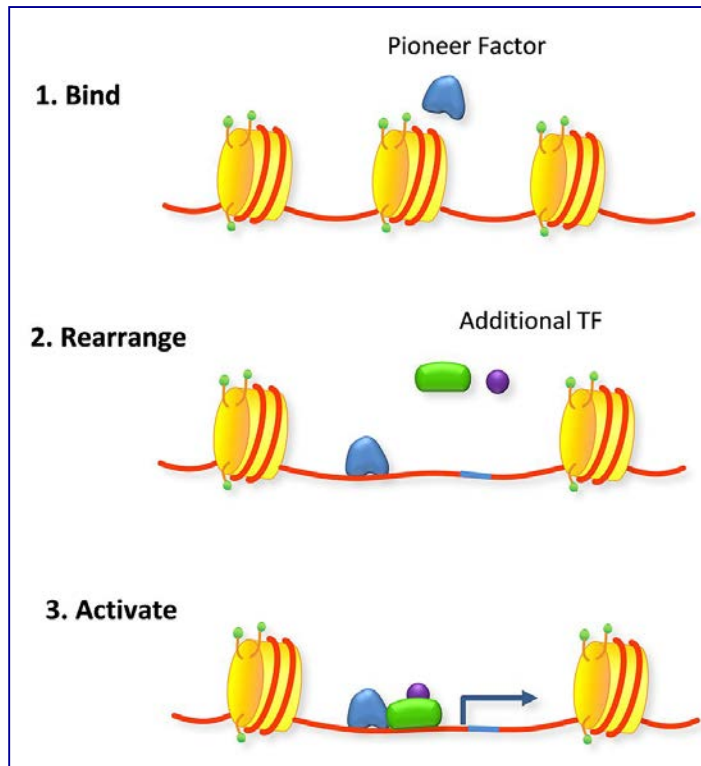


Cromatina i transcripció

1. Pot l'RNA pol accedir a les seqüències del promotor?



Necessita l'ajuda de proteïnes

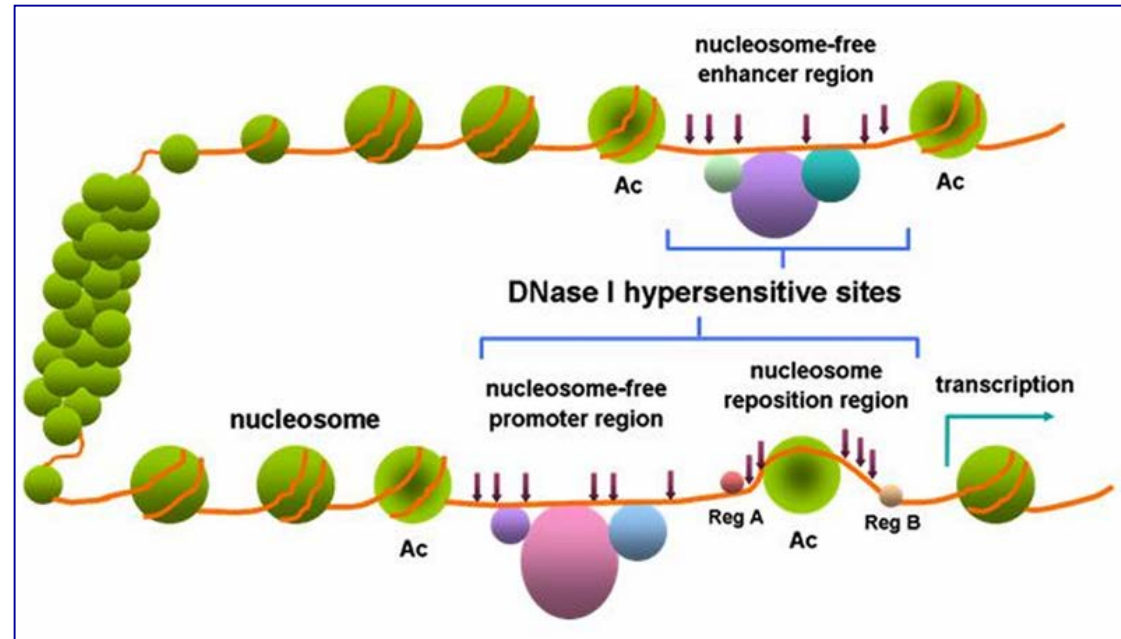
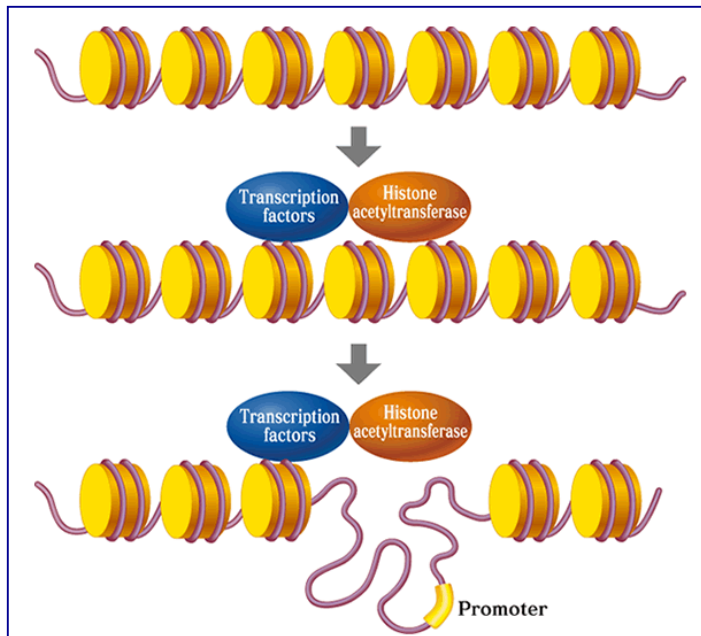


Cromatina i transcripció

1. Pot l'RNA pol accedir a les seqüències del promotor?

Necessita l'ajuda de proteïnes:

- Complexos remodeladors de la cromatina
- Complexos histona-acetiltransferasa
- Altres activadors transcripcionals



Cromatina i transcripció

2. Es pot transcriure un gen amb nucleosomes?

Transcription displaces a histone octamer

Promoter Terminator

Nucleosome assembled at specific location

RNA polymerase binds at promoter

RNA polymerase transcribes up to terminator

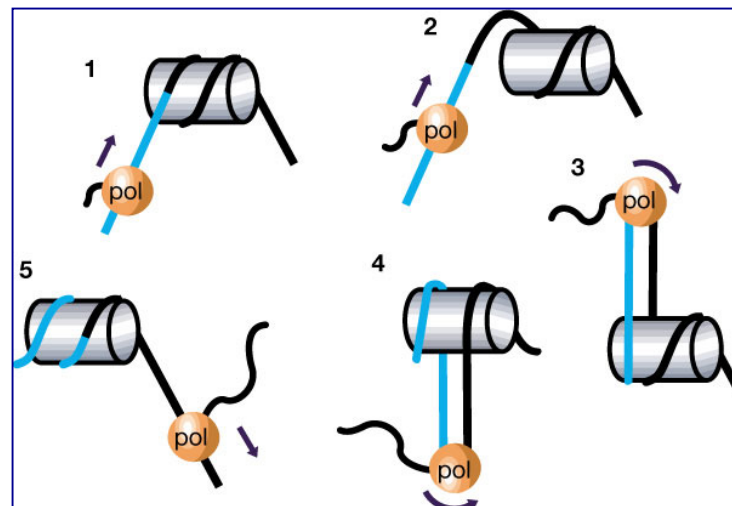
Nucleosome is found at new position

The displaced octamer never leaves DNA

RNA polymerase advances

DNA is displaced from octamer and forms closed loop

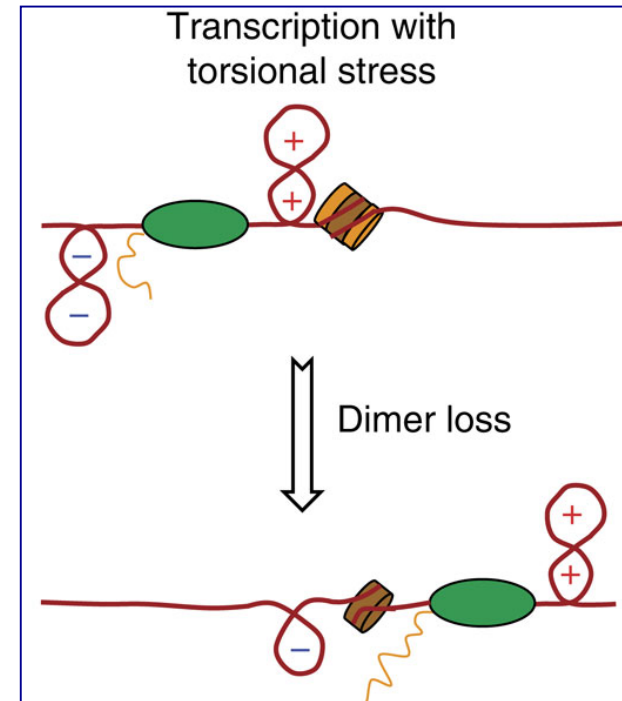
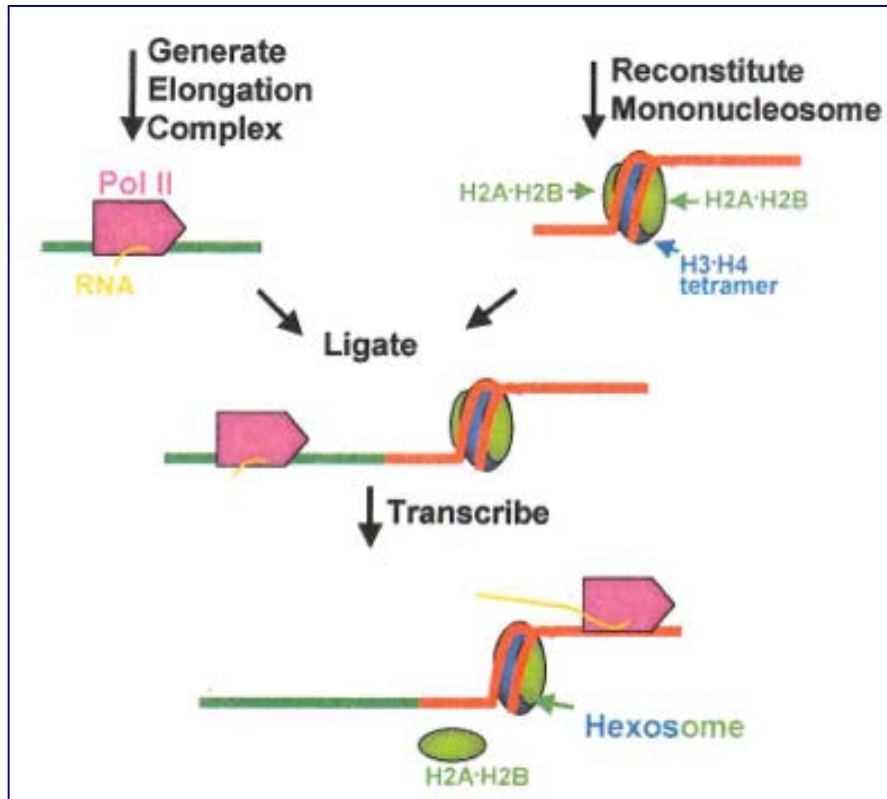
Torsion ahead of RNA polymerase displaces octamer, which reinserts behind polymerase



L'RNA pol III transfereix l'octàmer d'histones i forma un llaç amb el DNA tot permetent la reassociació histones /DNA contínuament

Cromatina i transcripció

2. Es pot transcriure un gen amb nucleosomes?

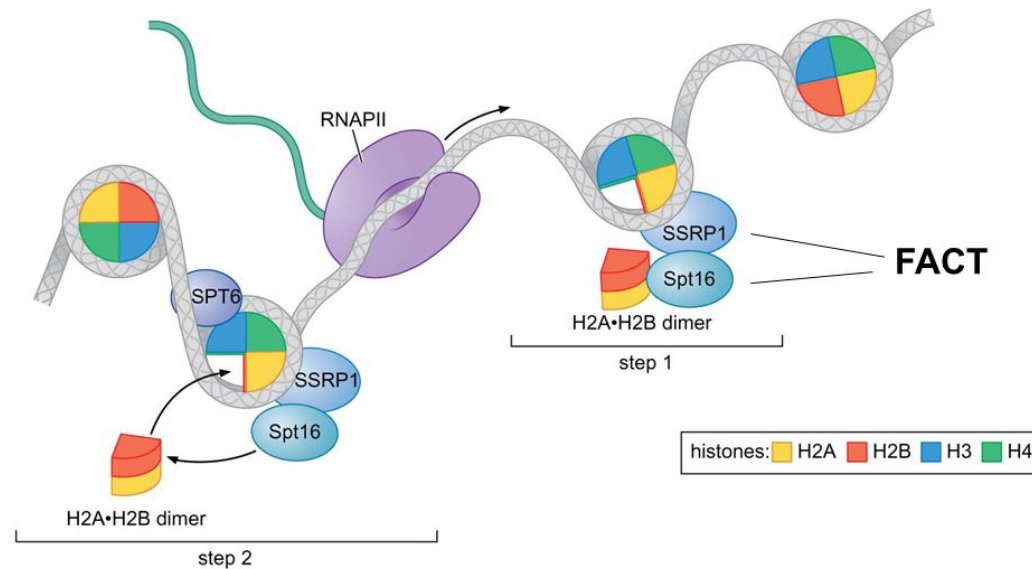


L'RNA Pol II es mou de manera distinta, no desplaça el nucleosoma, però n'altera l'estructura: dissociació almenys del dímer H2A/H2B.

Cromatina i transcripció

2. Es pot transcriure un gen amb nucleosomes?

FACT disassembles and assembles nucleosomes during transcription

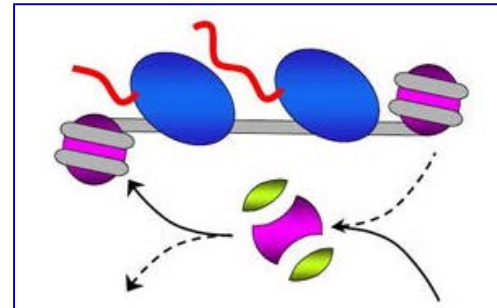
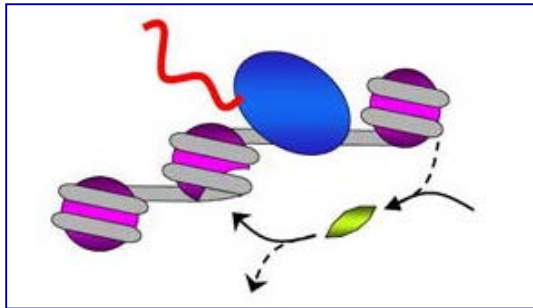


L'RNA Pol II es mou de manera diferent; no desplaça el nucleosoma, però n'altera l'estructura per dissociació almenys del dímer H2A/H2B. Participació de **FACT** (*Facilitates Chromatin Transcription*; dímer de Spt16 i SSRP1). Aquest complex també està implicat en la transcripció per les **RNA pol I i III**.

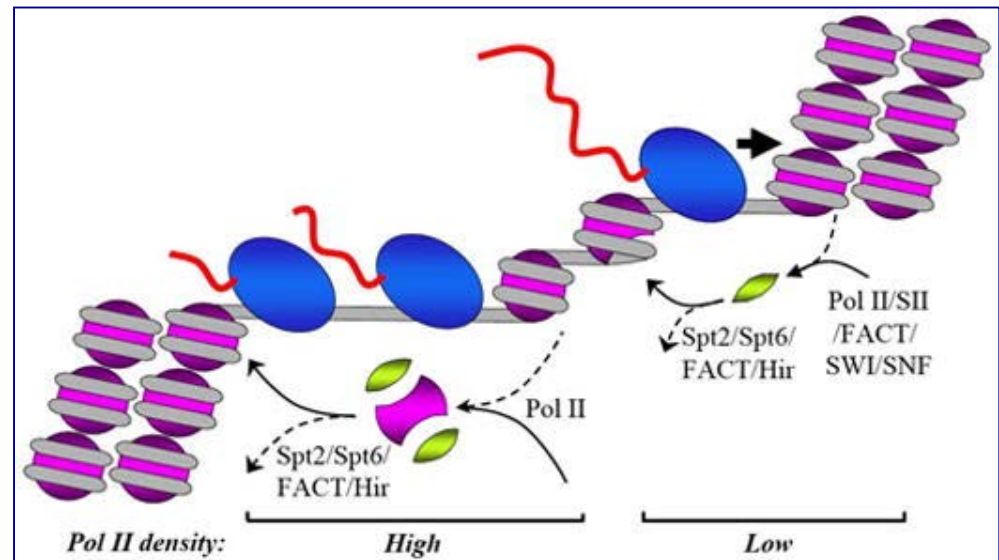
Cromatina i transcripció

2. Es pot transcriure un gen amb nucleosomes?

- Nivell moderat d'RNA Pol II (1 / 500bp) → dissociació del dímer H2A/H2B i transcripció de l'hexasoma
- Major densitat de polimerases (1/150-200bp) → es desplaça l'octàmer

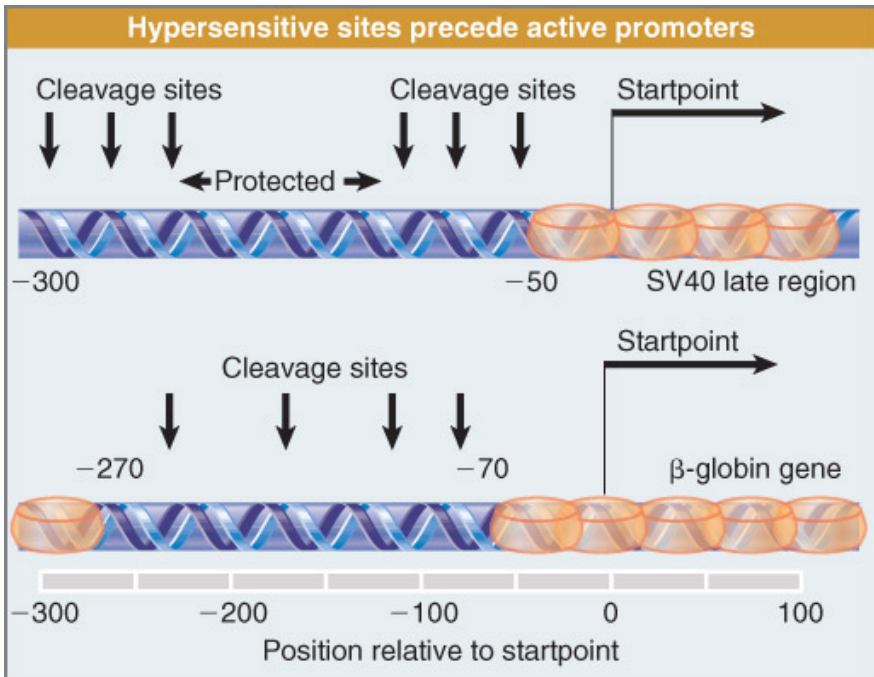
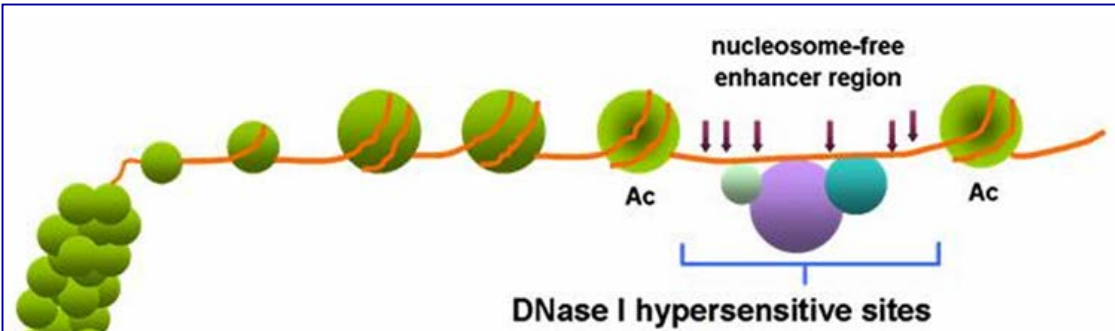
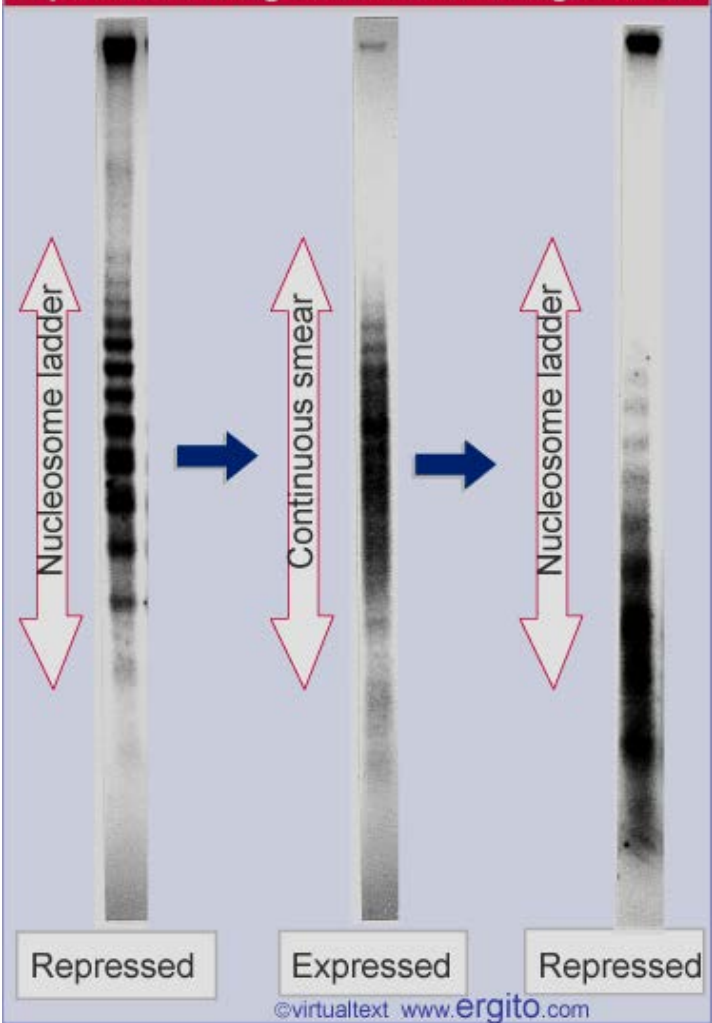


Alguns factors faciliten la progressió de l'RNA pol II. Es tracta de proteïnes reclutades per la cua CTD de la polimerasa



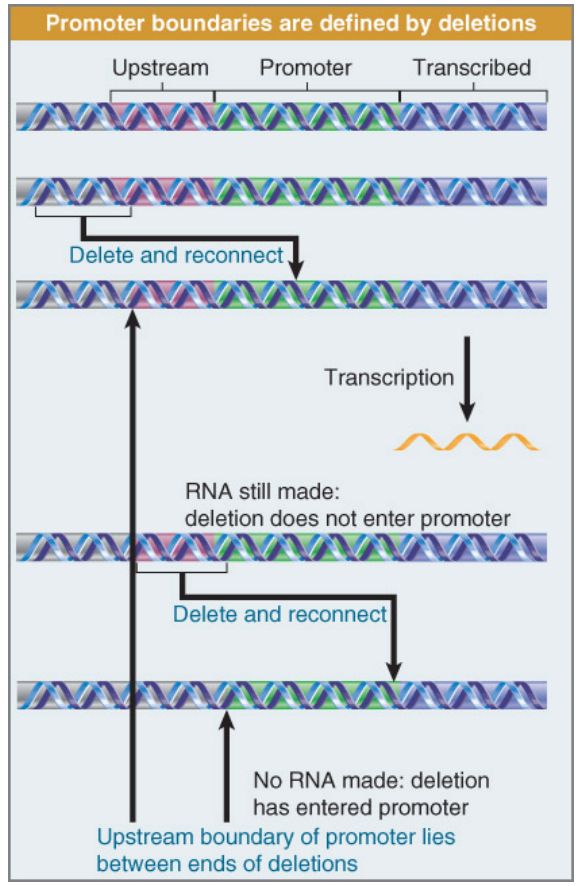
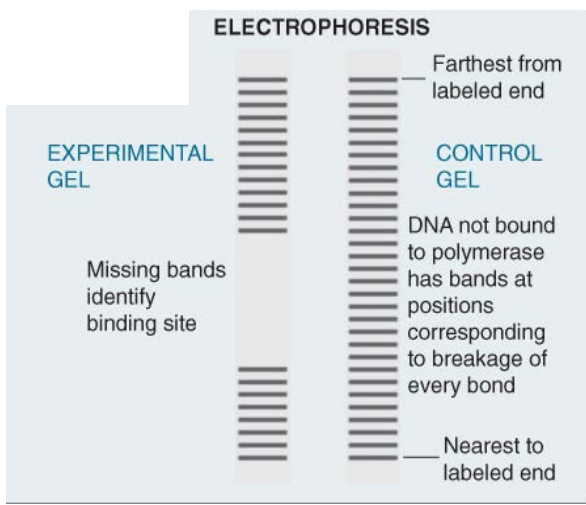
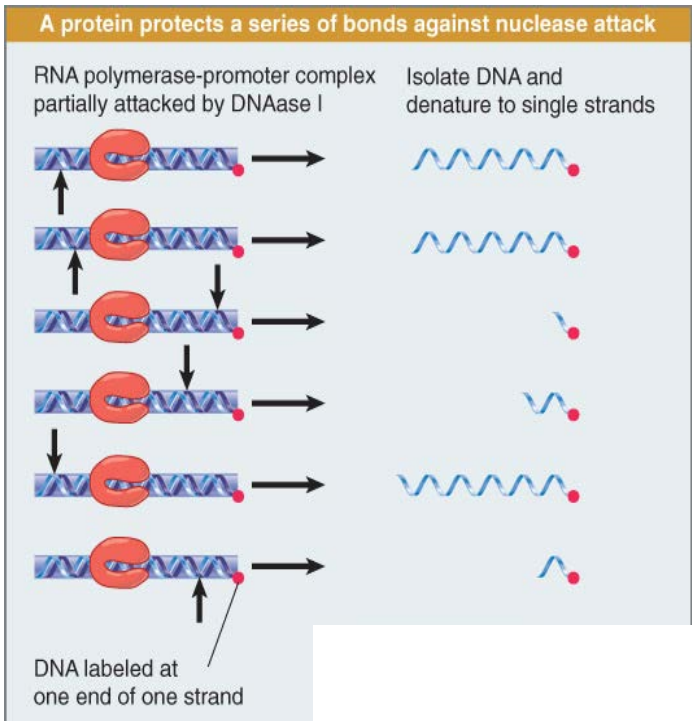
Nucleases com a eina per a l'estudi dels canvis en l'estructura de la cromatina durant la transcripció

Expression changes nucleosome organization



Metodologies per a l'estudi de promotors

- Experiments de petjada ("footprinting") amb nucleases o altres reactius
- Delecions i altres mutacions



Inici de la transcripció

Les RNA pol reconeixen promotors diferents (en els gens que transcriu cadascuna)

Polimerasa	Localización	RNA sintetizados
I	Núcleo (nucléolo)	Pre-rRNA (excepto 5S)
II	Núcleo	Pre-mRNA, algunos otros RNA nucleares pequeños
III	Núcleo	Pre-tRNA, rRNA 5S, otros RNA pequeños

- **Promotor: seqüències** necessàries per tal que l'RNA pol corresponent s'unisca de forma eficient i comence la transcripció (*elements cis*).
- Es necessiten diferents **factors transcripcionals (proteïnes)**, que s'uneixen als diferents elements de seqüència (*elements trans*).

Transcripció per l'RNA polimerasa I

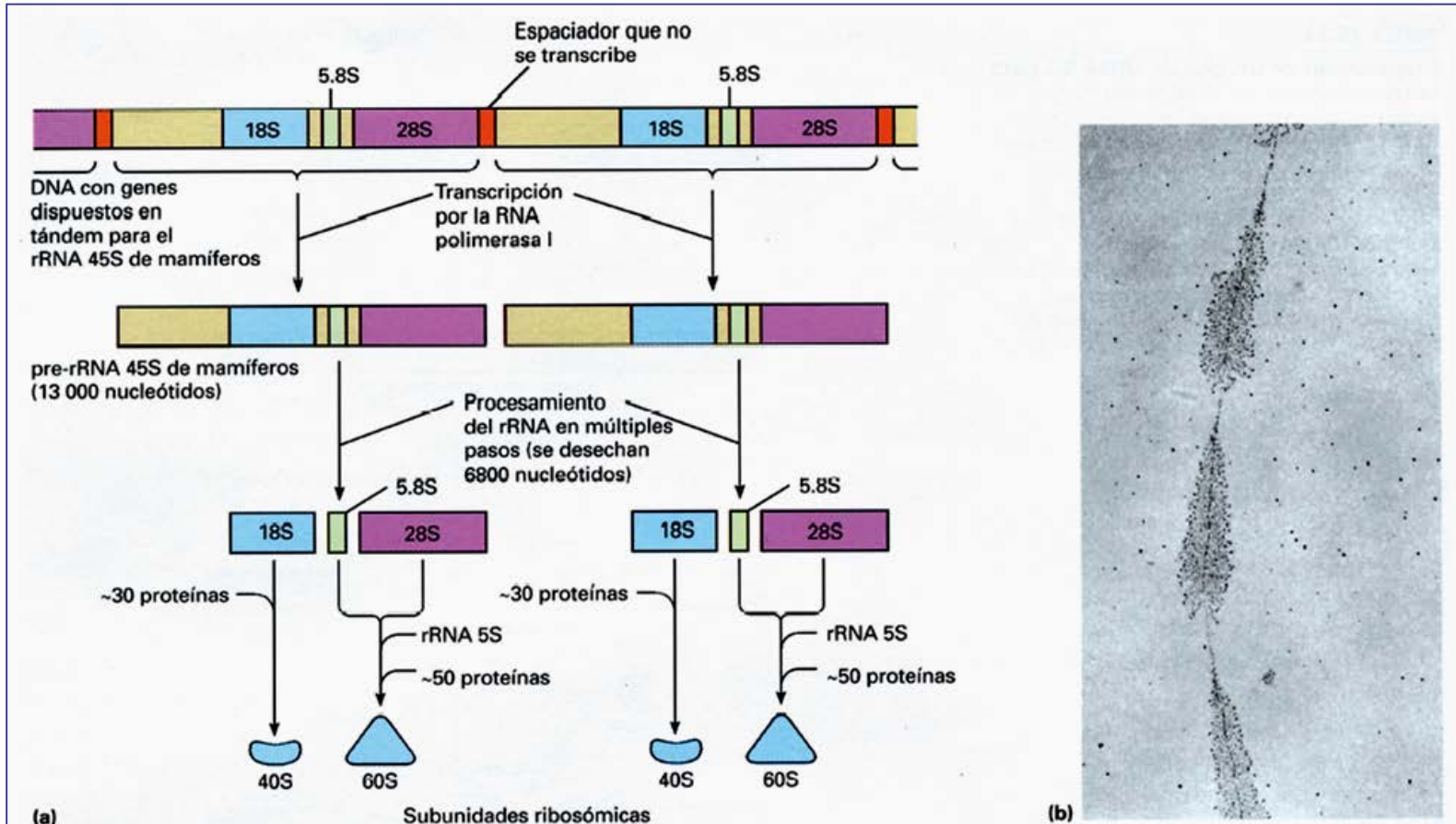
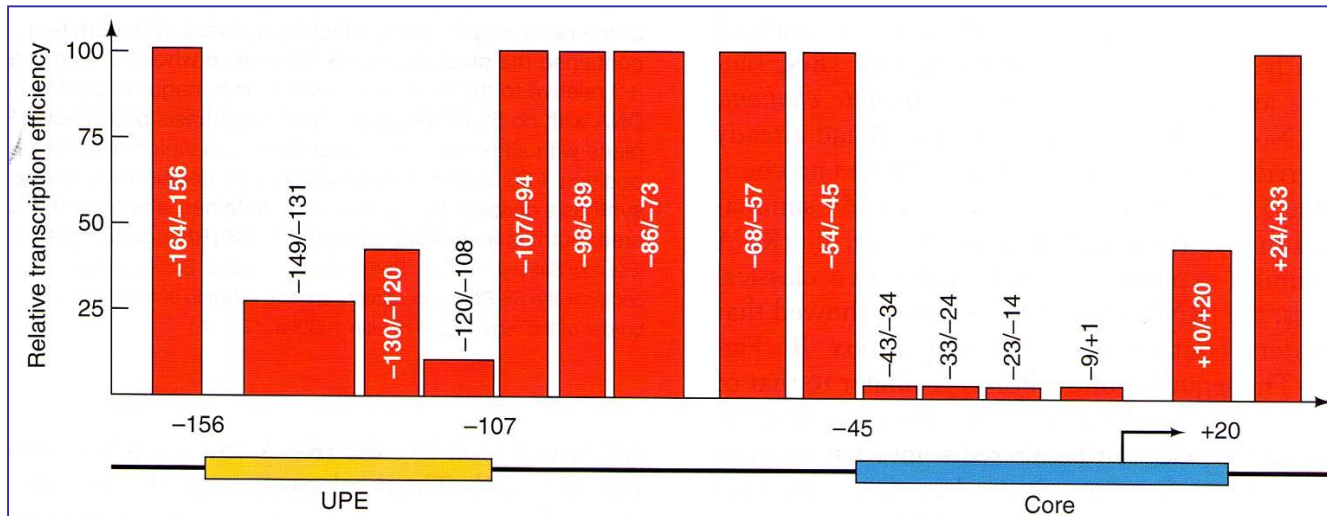
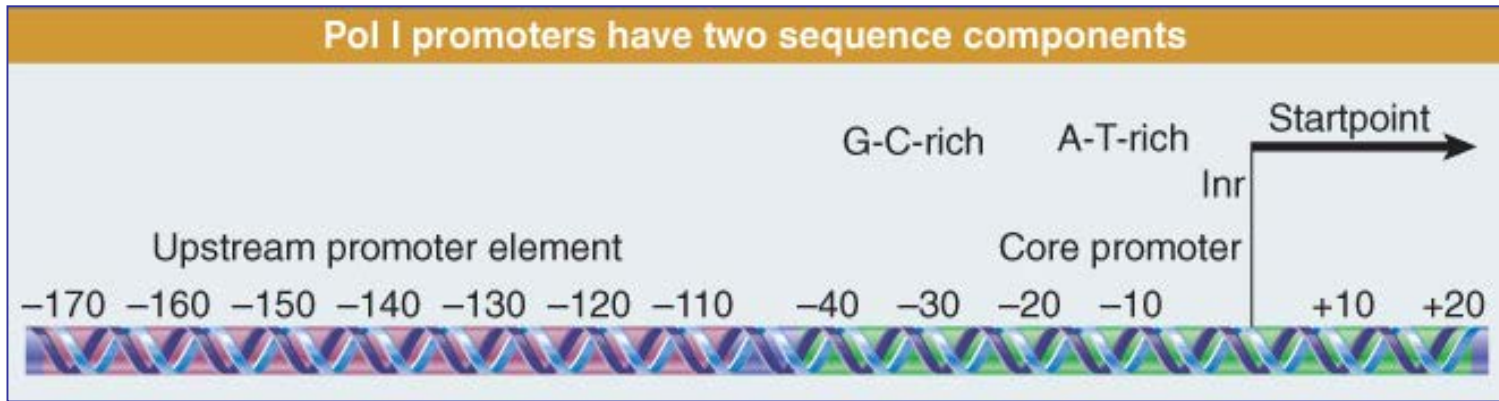


FIGURA 28.20

Transcripció i processament dels RNA ribosòmics principals en els eucariotes.

Transcripció per l'RNA polimerasa I

Elements del promotor (*cis*)



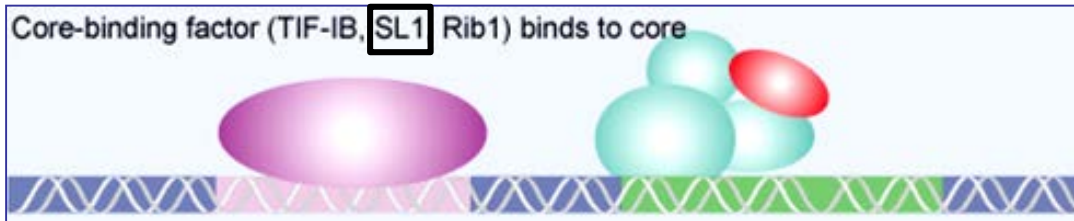
Transcripció per l'RNA polimerasa I

Proteïnes implicades (*trans*)

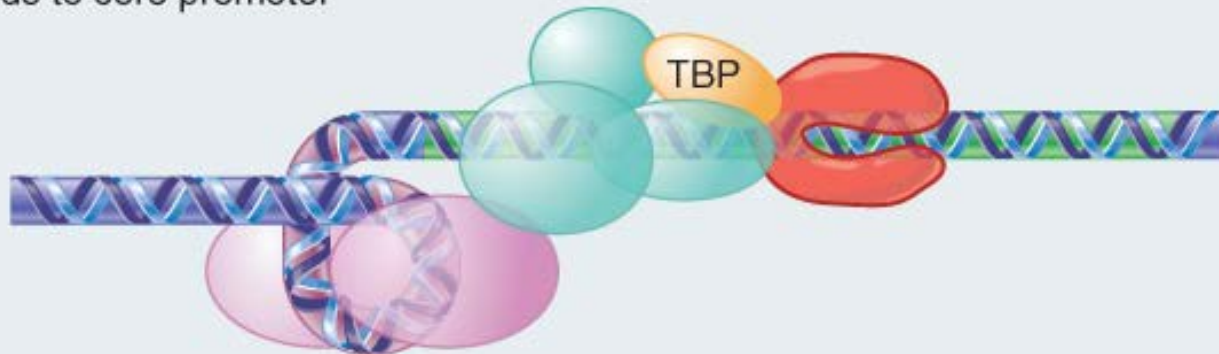
UBF binds to upstream promoter element



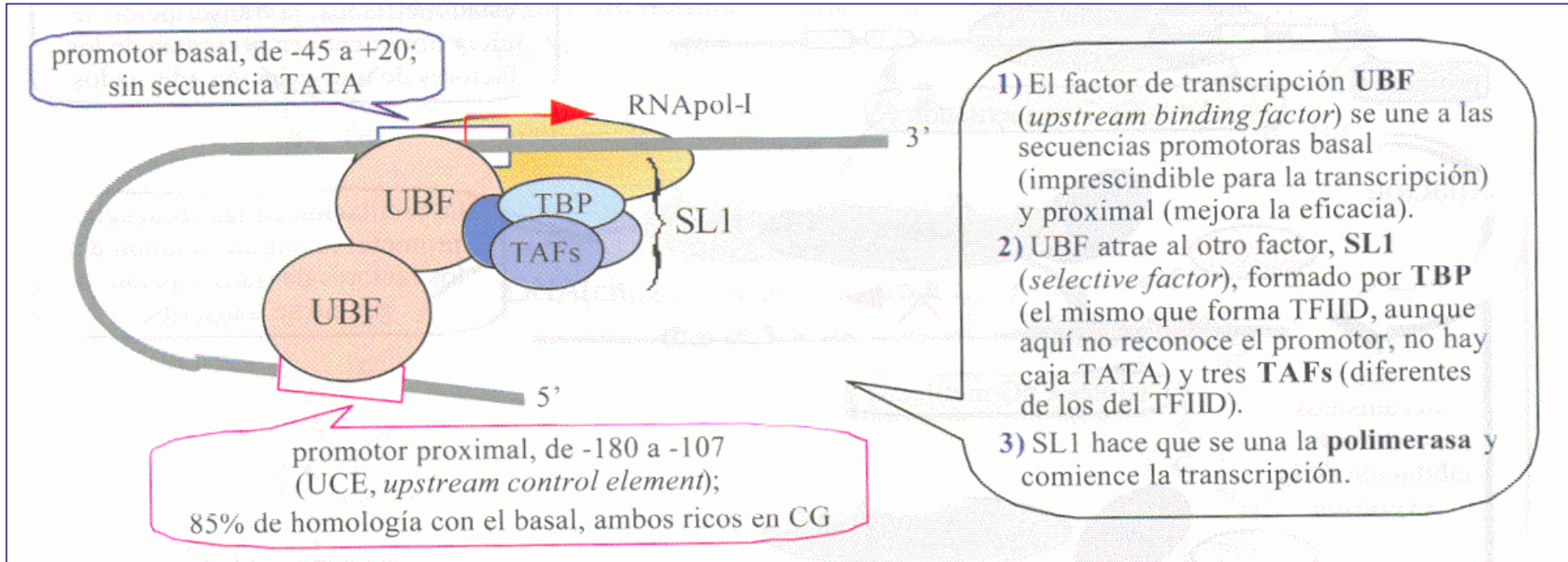
Core-binding factor (TIF-IB, **SL1** Rib1) binds to core



RNA polymerase I holoenzyme includes core binding factor (SL1) that binds to core promoter



Transcripció per l'RNA polimerasa I

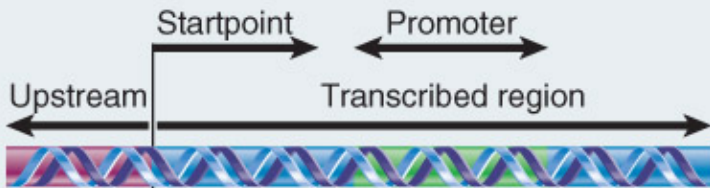


Proteïnes implicades (Factors de transcripció):
UBF i SL1 (TBP + TAFs)

Transcripció per l'RNA polimerasa III

Elements del promotor (*cis*)

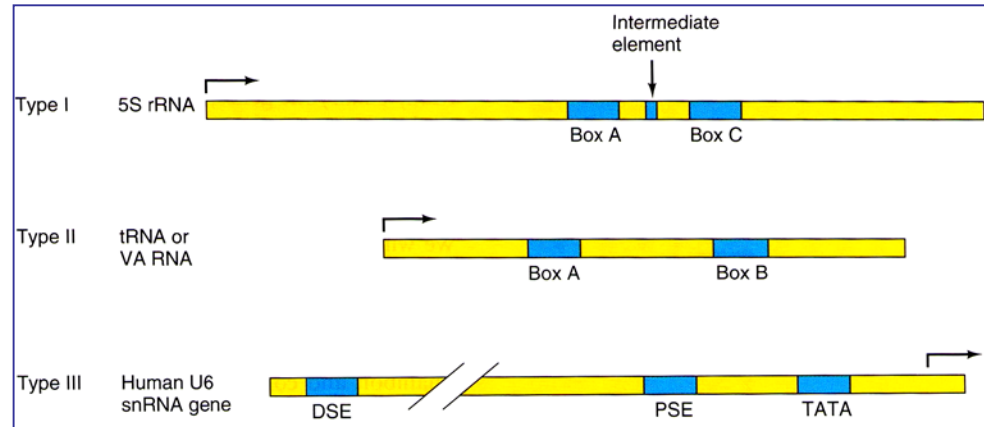
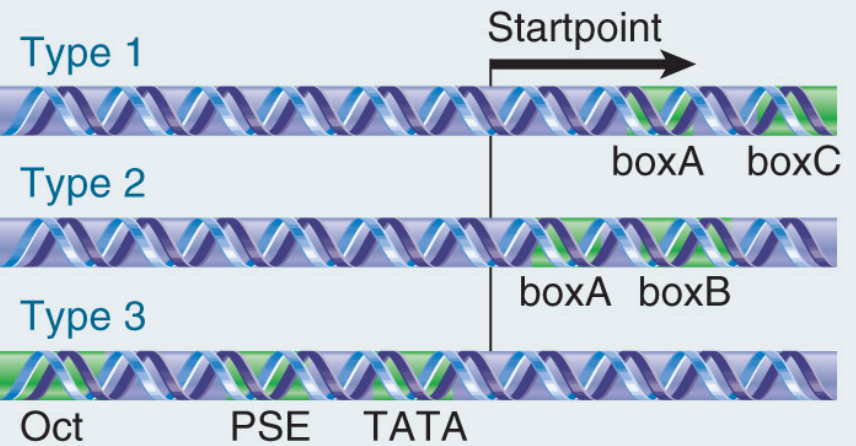
Pol III promoters may be downstream of startpoint



Deletion that removes sequences upstream of promoter allows transcription to initiate from position corresponding to usual startpoint

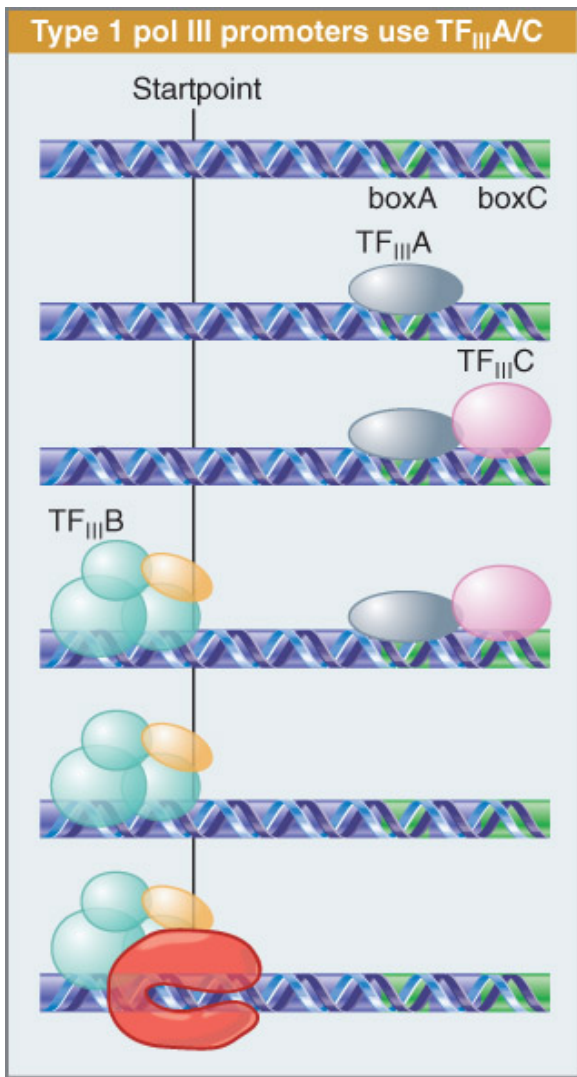


There are three types of pol III promoters

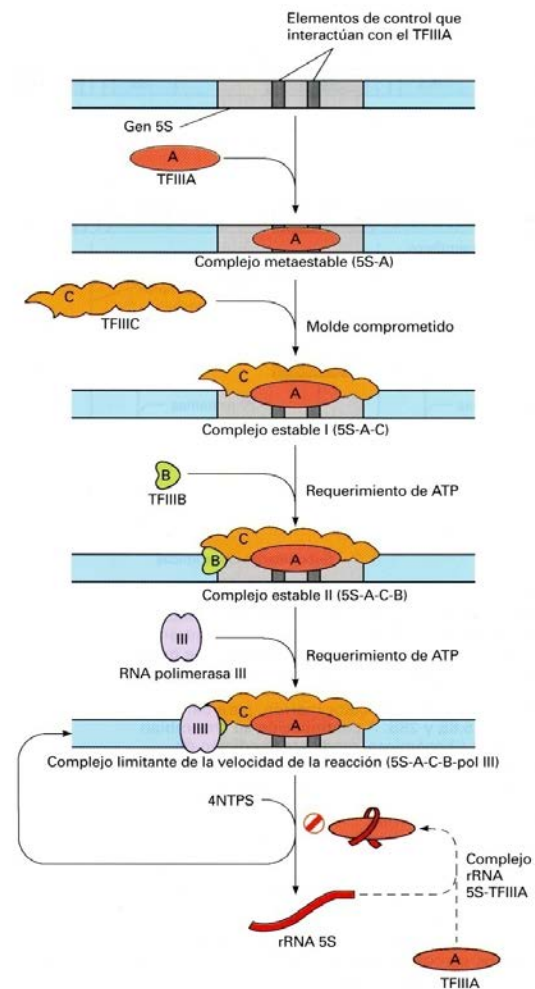


Transcripció per l'RNA polimerasa III

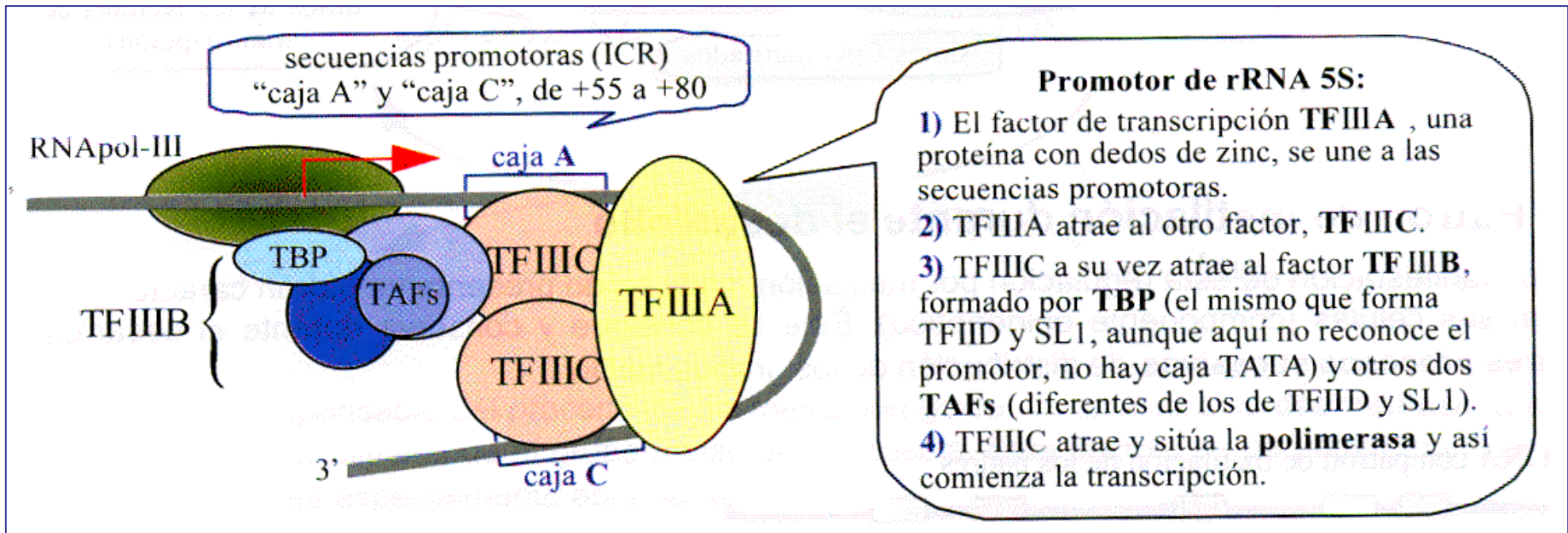
Proteïnes implicades (trans) en promotors de tipus 1



Factors de transcripció TFIIIA, TFIII B (TBP+TAFs) i TFIII C



Transcripció per l'RNA polimerasa III: promotors de tipus 1

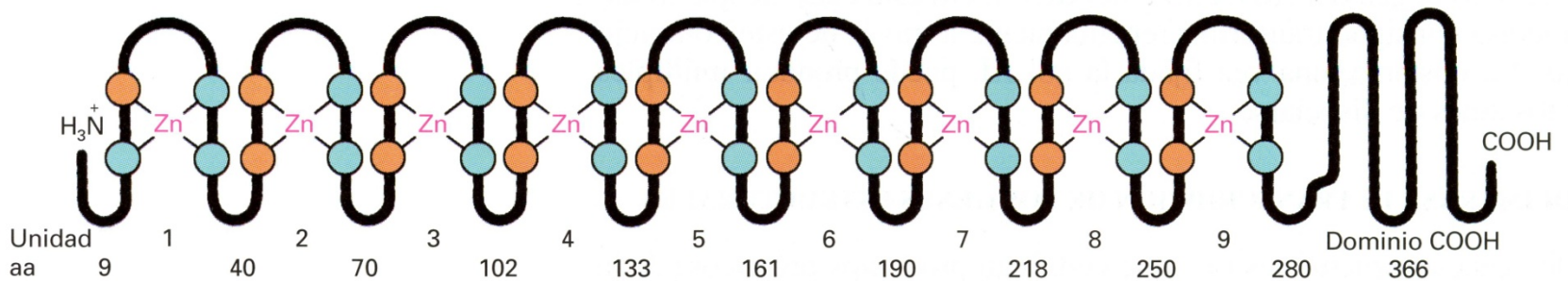
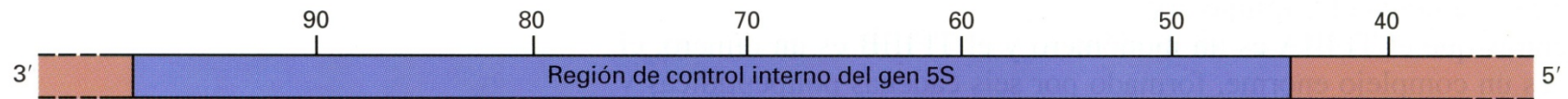
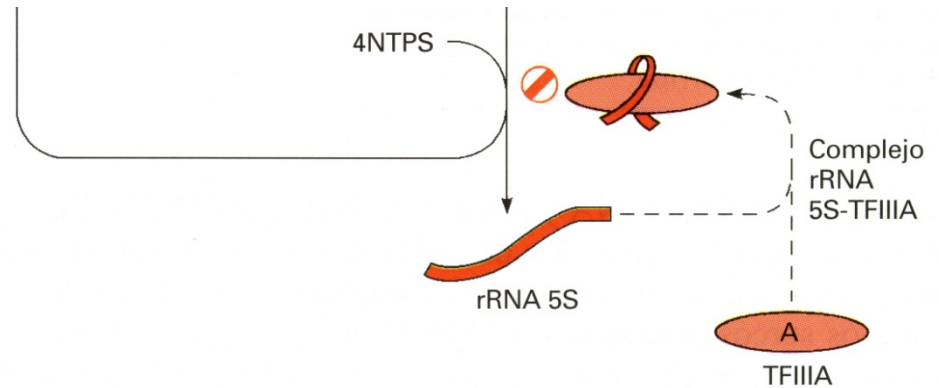


Transcripció per l'RNA polimerasa III: promotors de tipus 1

FIGURA 28.22

Secuencia del factor TFIIIA, en la que se muestran nueve dedos de cinc alineados con la región de control del gen del rRNA 5S. Los dominios de dedos de cinc son casi idénticos, aunque no exactamente. La estructura de los diversos dedos se muestra en la Figura 28.32a.

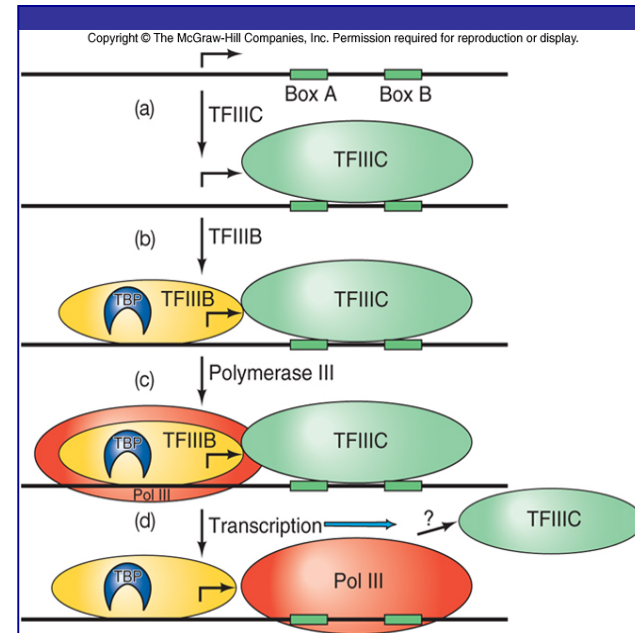
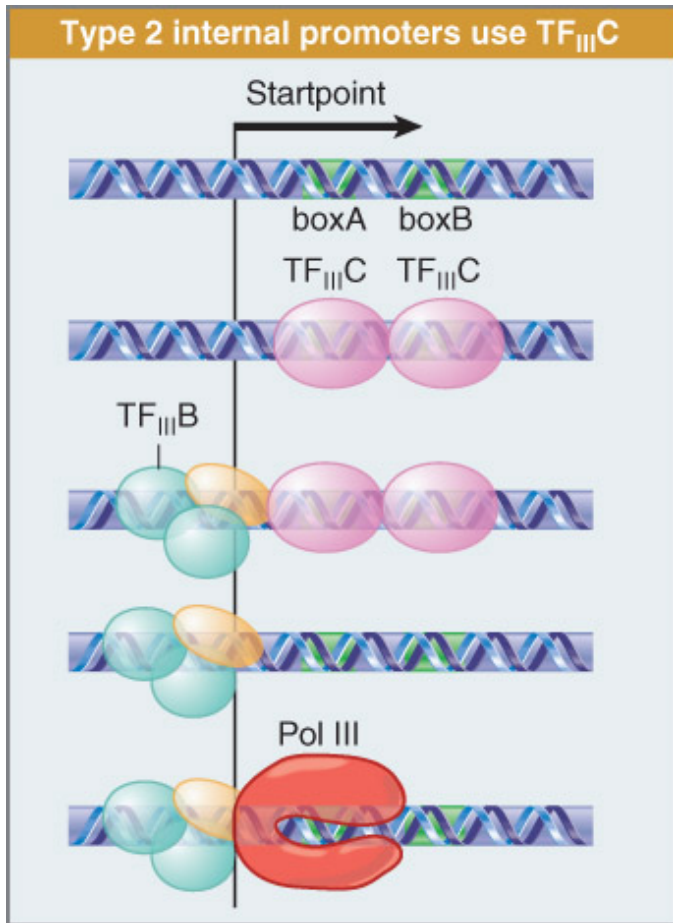
Adaptado de J. Berg, *Proc. Natl. Sci. USA* (1988) 85:99-102.



● Cisteína ● Histidina

Transcripció per l'RNA polimerasa III

Proteïnes implicades (*trans*) en promotors de tipus II



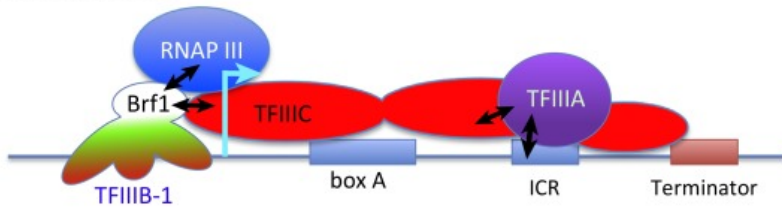
Factors de transcripció
TFIIIB (TBP+TAFs) i
TFIIIC

Transcripció per l'RNA polimerasa III

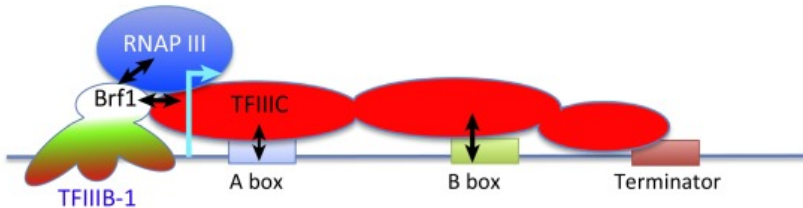
Proteïnes implicades (trans) en promotors de tipus III

Promoters used to direct transcription by RNAP III

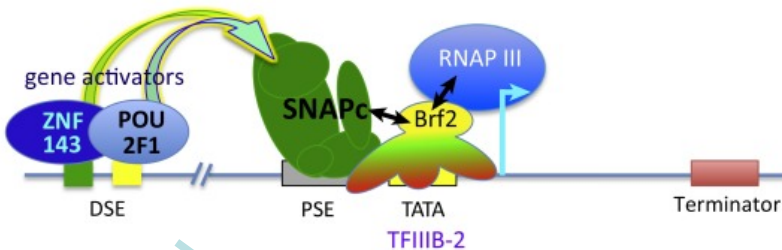
Type 1: 5S rRNA genes



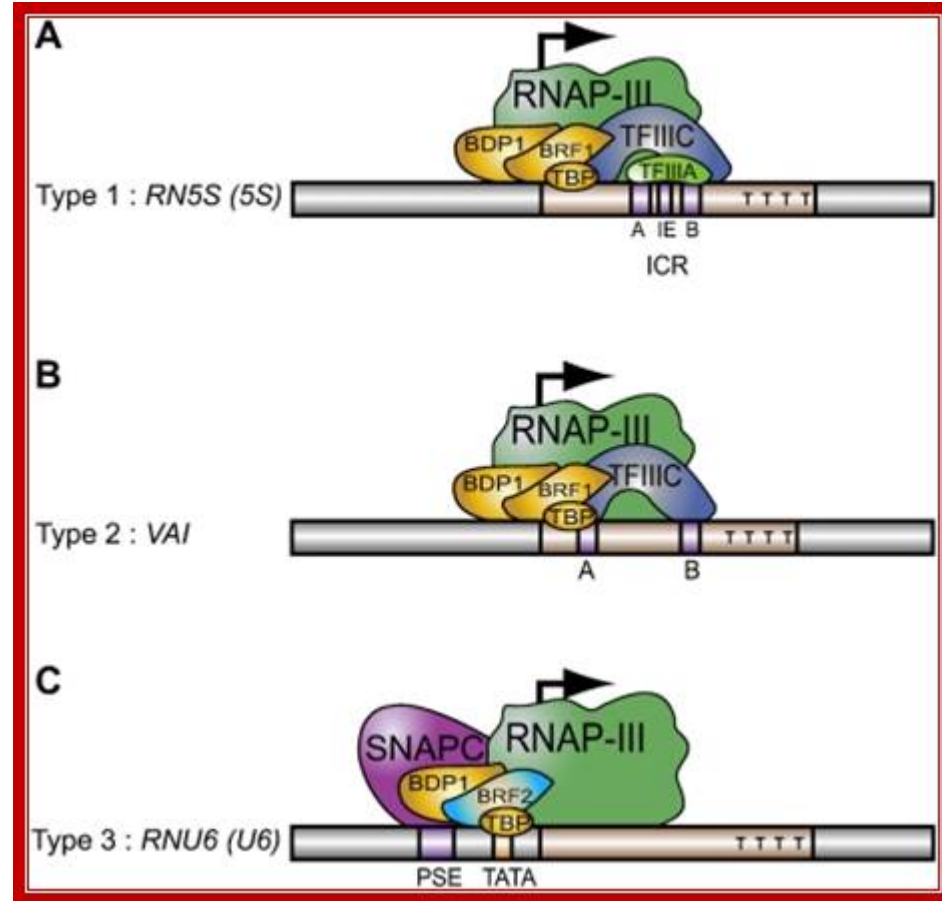
Type 2: tRNA genes, Alu elements



Type 3 (higher eukaryotes): U6 snRNA, MRP RNA, Y RNA, seleno tRNA^{[Ser]^{sec}}



Trends in Biochemical Sciences



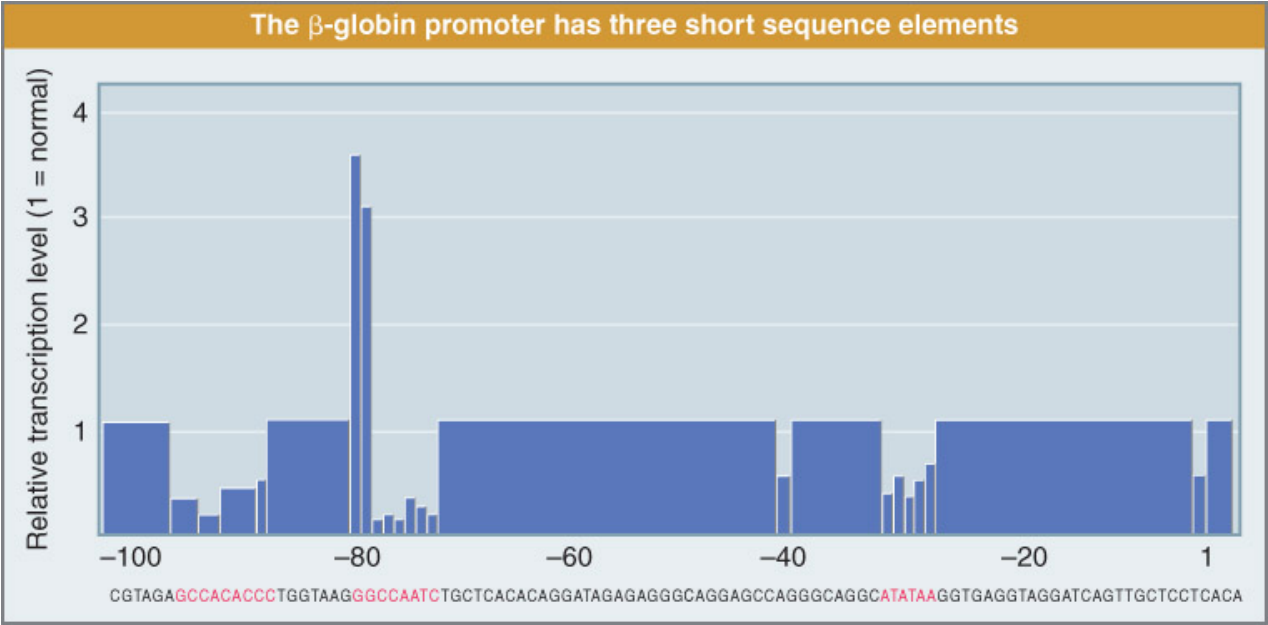
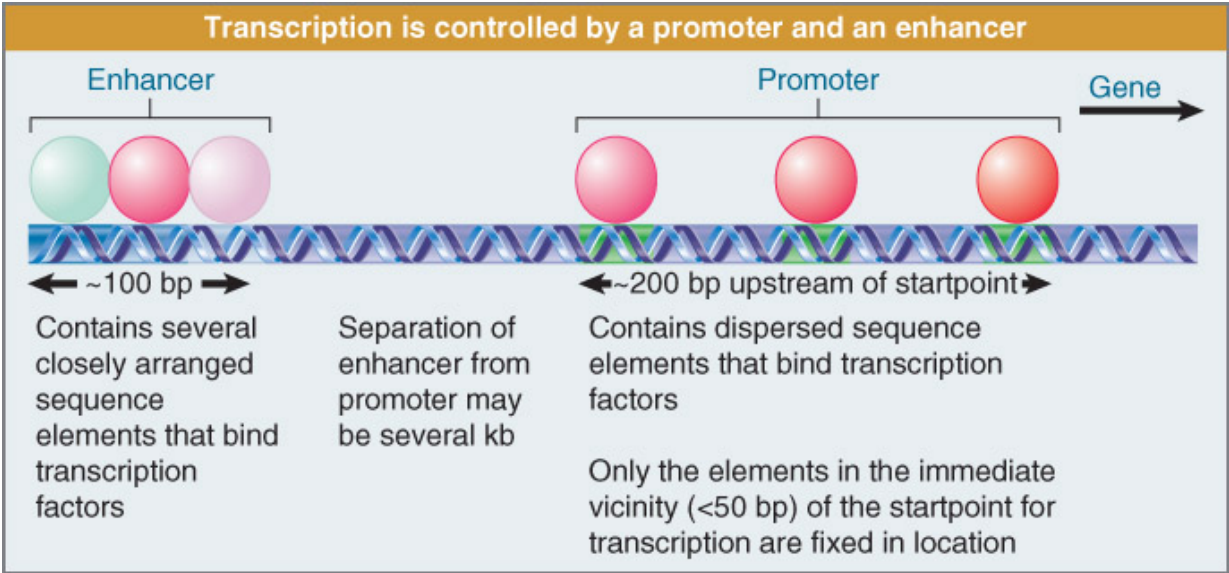
Intervé una variant de TFIIB (TBP+TAFs)

Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors

Elements dels promotors:

- Inici de transcripció: tendència a A flanquejada per pirimidines
- Caixa TATA o Hogness en -25 aprox., que junt amb el lloc d'inici forma el promotor basal. En promotors sense caixa TATA pot trobar-se el DPE ("Downstream Positioning Element").
- Promotor proximal entre -80 i -200. Influeix en eficiència i especificitat. S'hi poden trobar les caixes CAAT o GGGCGG
- Alguns gens poden contenir elements reguladors a gran distància: són les seqüències promotores distals, potenciadors ("enhancers") o silenciadors.

**Transcripció
per l'RNA
polimerasa II:
promotors**

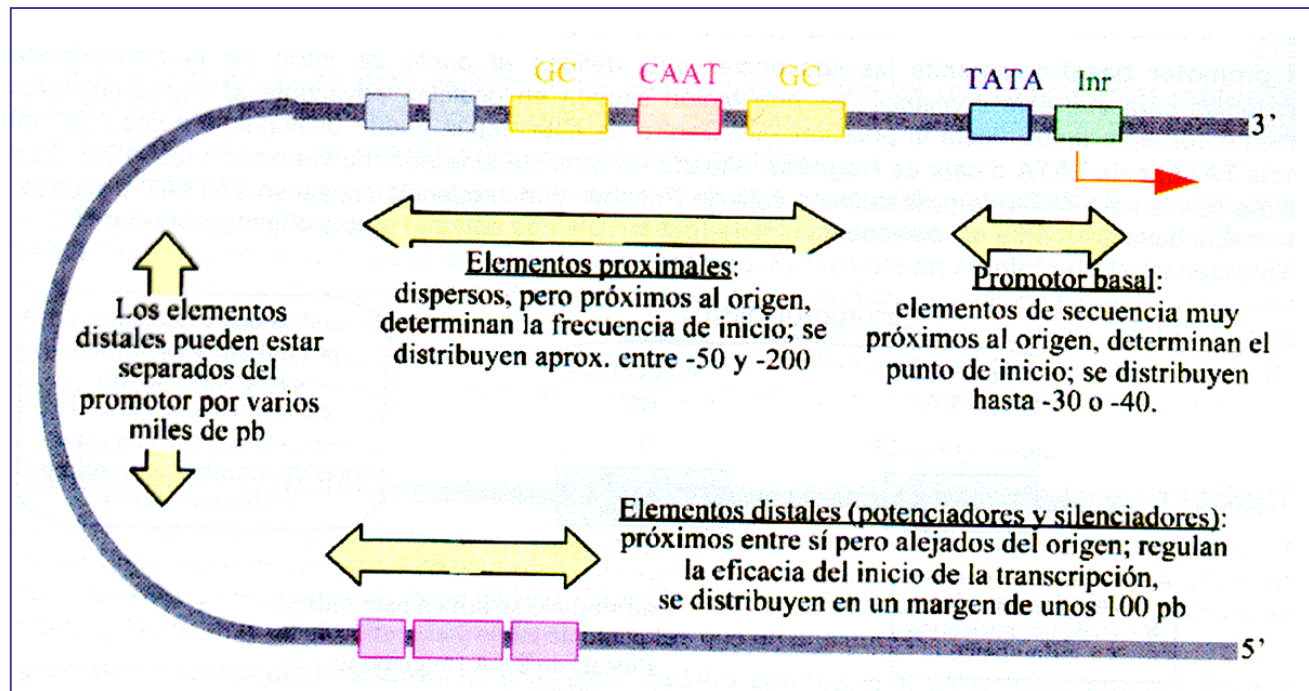


Absolutament dependent de factors transcripcionals auxiliars: TFII

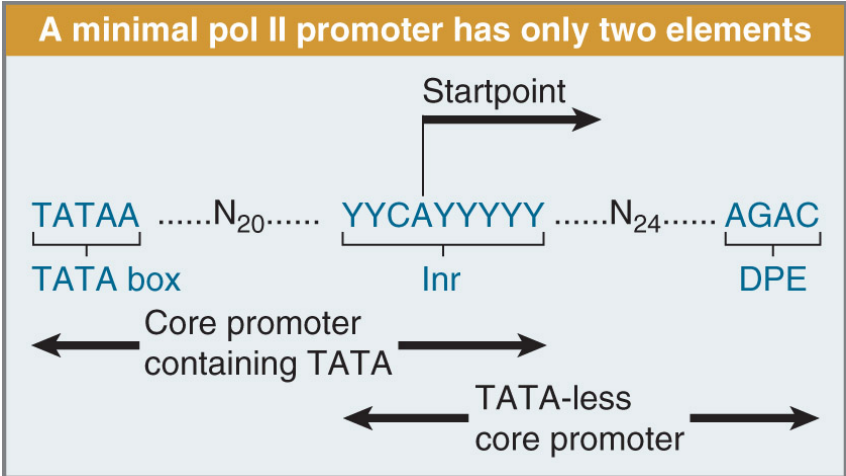
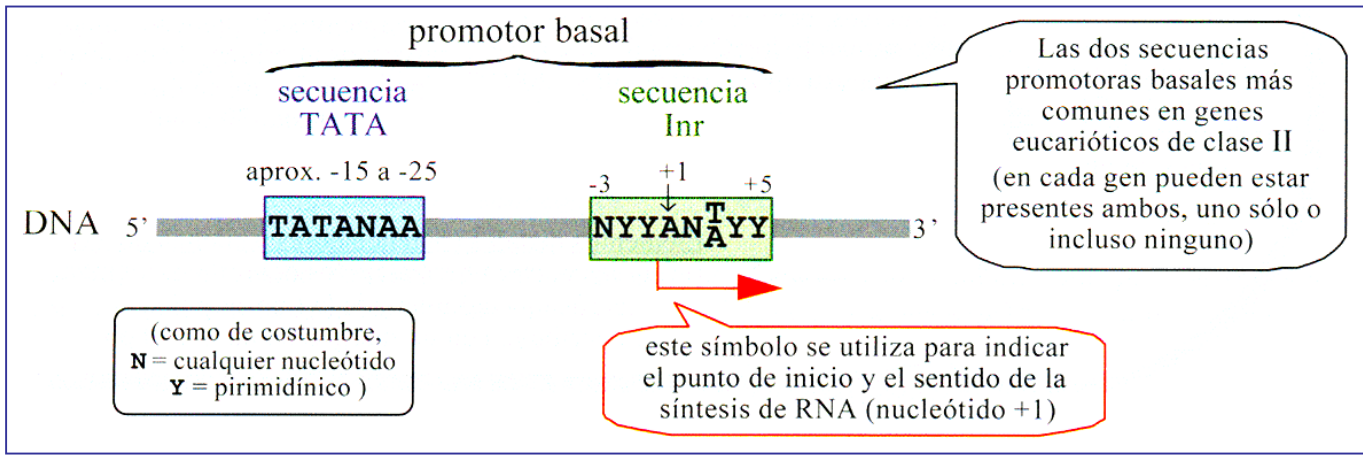
Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors

Elements del promotor

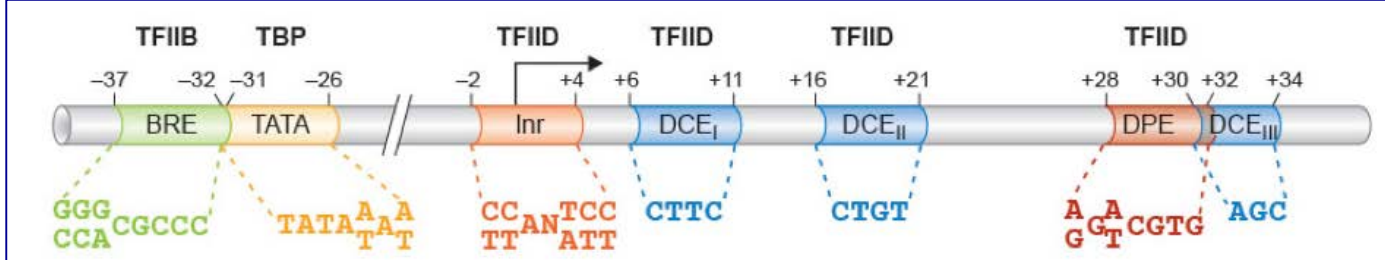
- Tres regions: basal, proximal i distal (altres seqüències a gran distància)



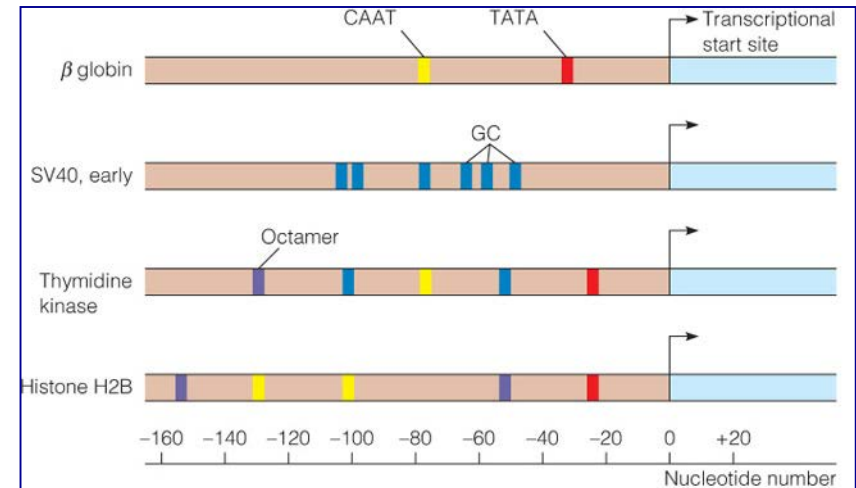
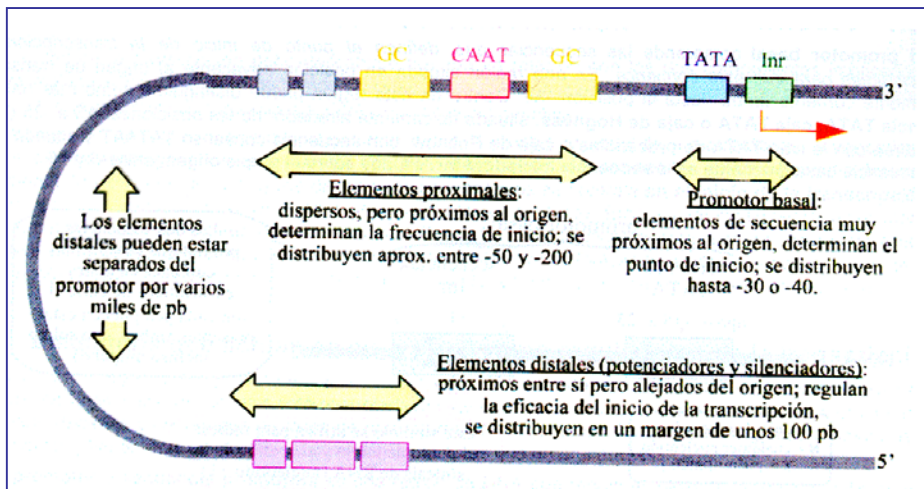
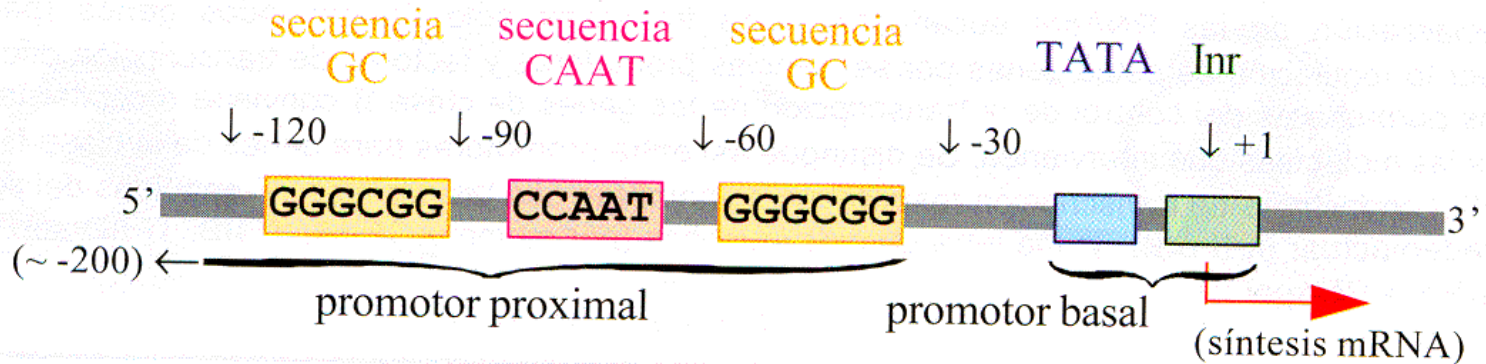
Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors



Promotor basal



Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors



Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

Promotor proximal

Structures of a few typical eukaryotic promoters. The colored boxes represent different regulatory elements: TATA = red, GC = blue, CAAT = yellow, and octamer = purple.

Based in part upon *Genes IV*, B. Lewin, Oxford: Oxford University Press, 1990.

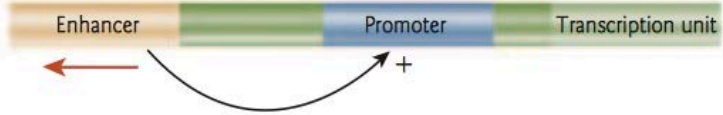
Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors

Promotor distal

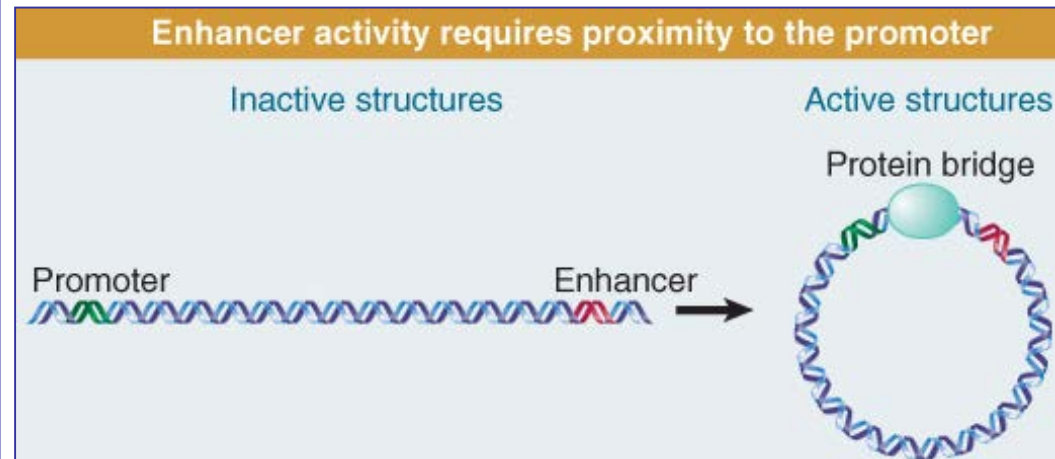
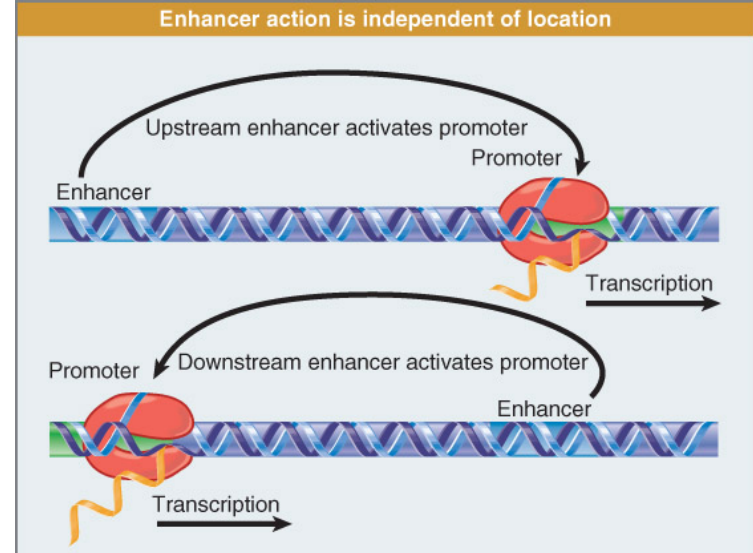
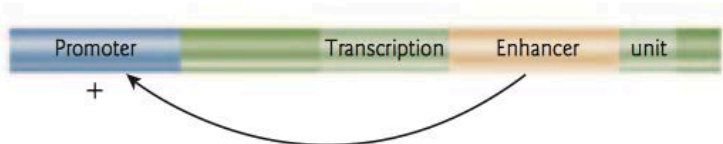
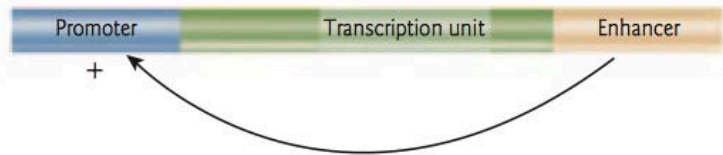
(A) Distance



(B) Orientation



(C) Position



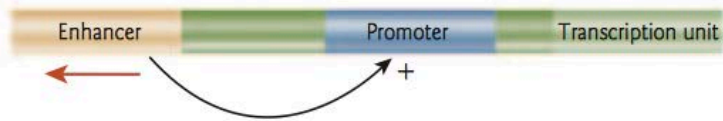
Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors

Promotor distal

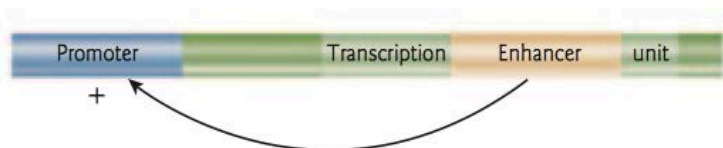
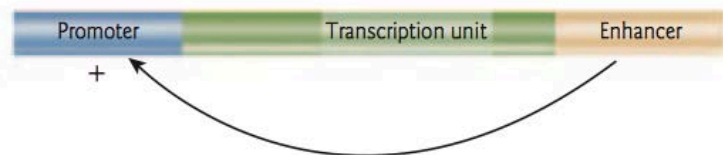
(A) Distance



(B) Orientation



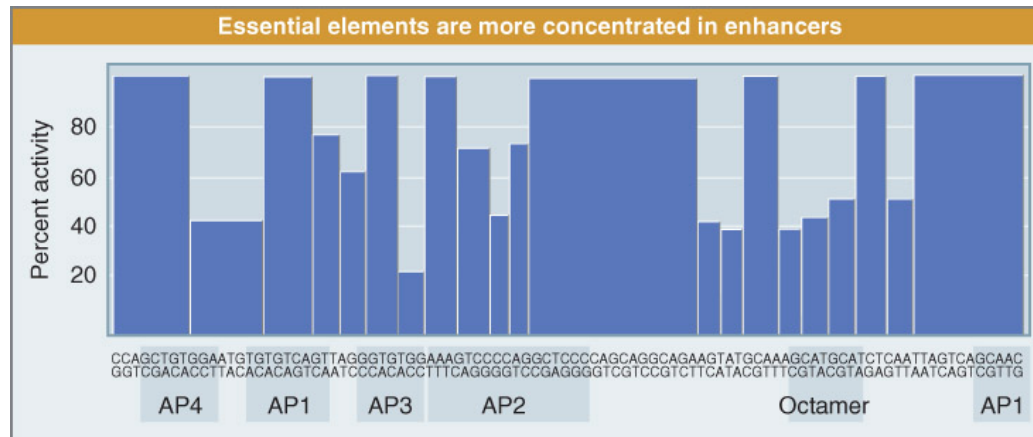
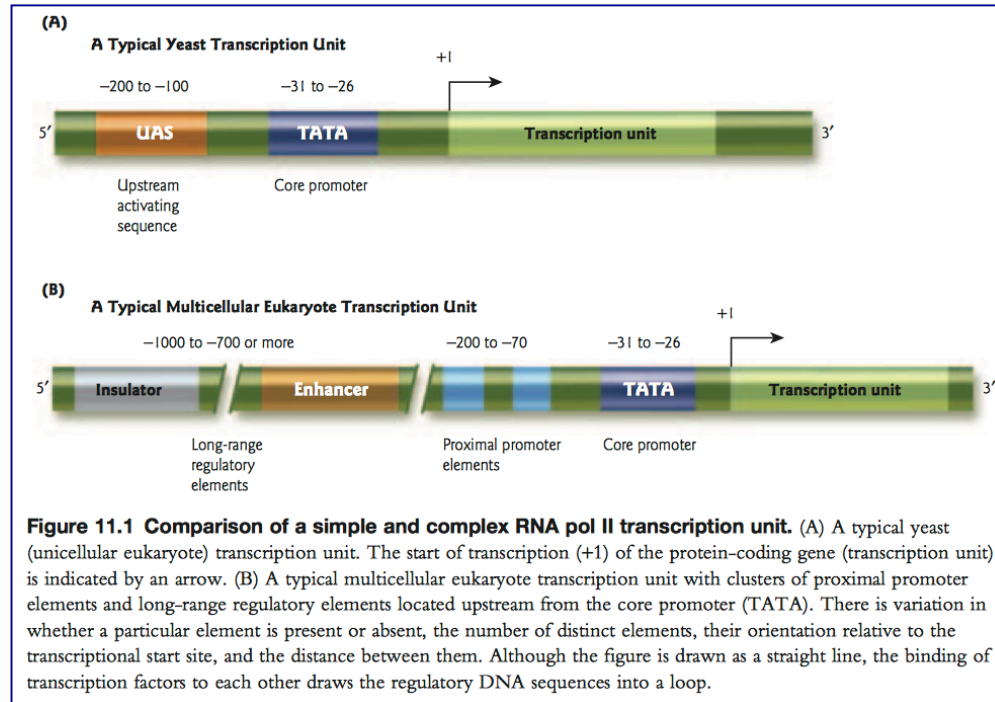
(C) Position



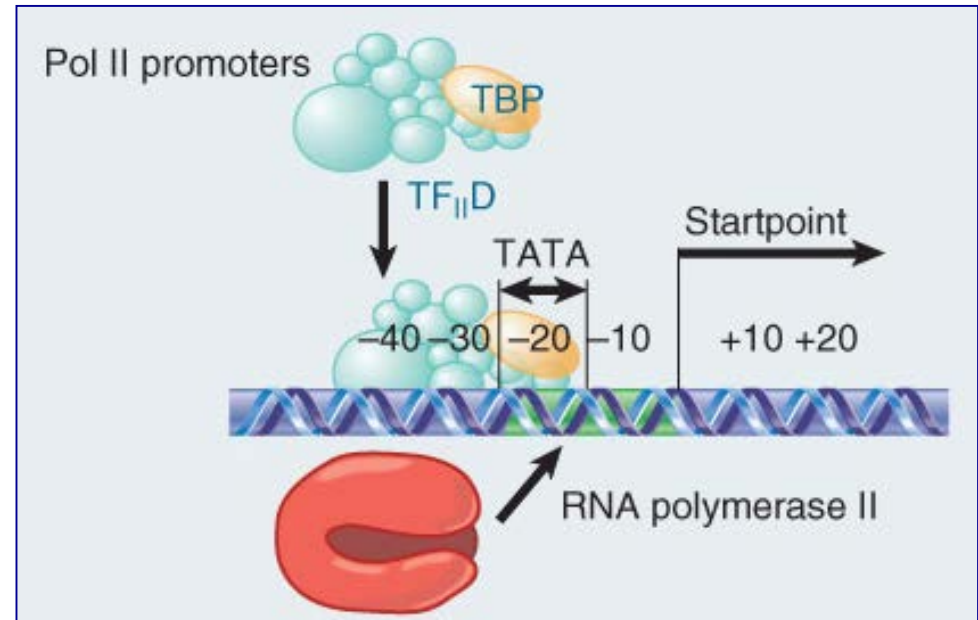
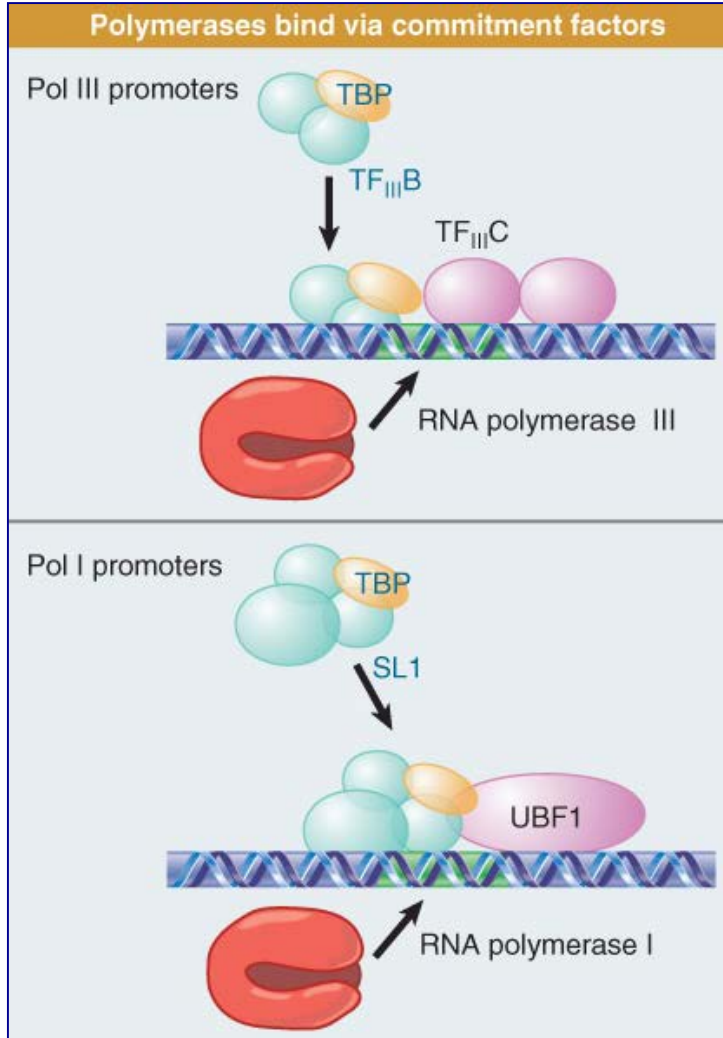
Els activadors que s'uneixen a potenciadors poden:

- Contactar amb la maquinària basal
- Reclutar enzims modificadors d'histones o complexos remodeladors de cromatina
- Afectar l'estructura del DNA (curvatures)

Transcripció per l'RNA polimerasa II: promotors



Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics



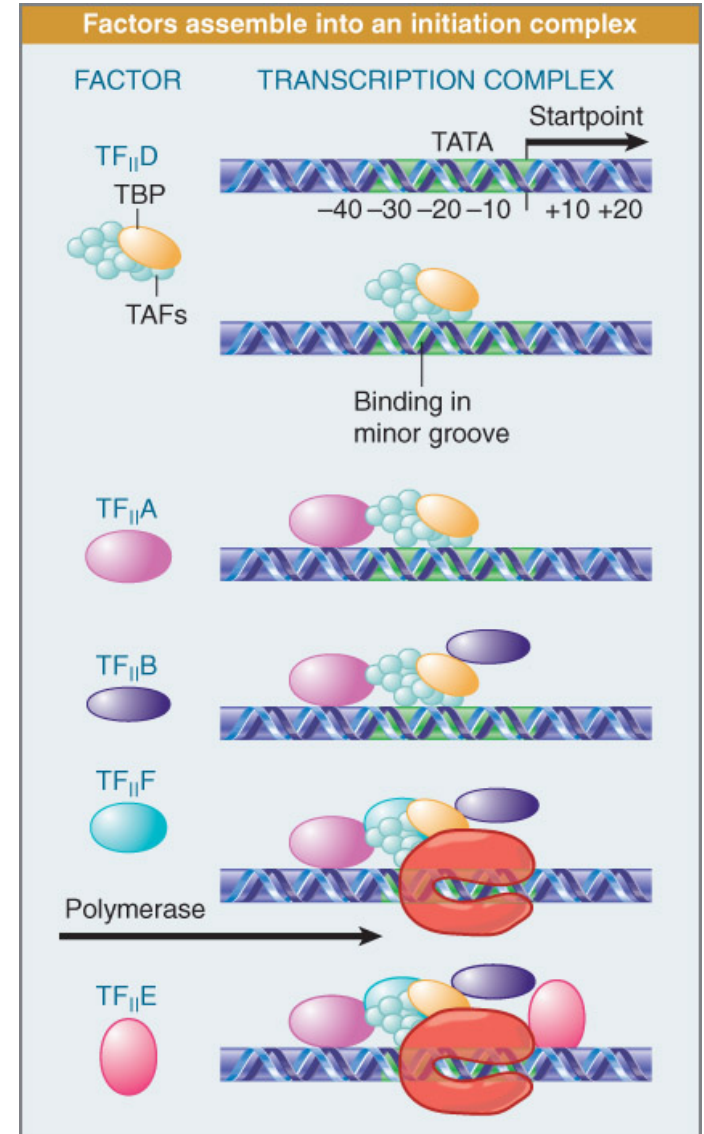
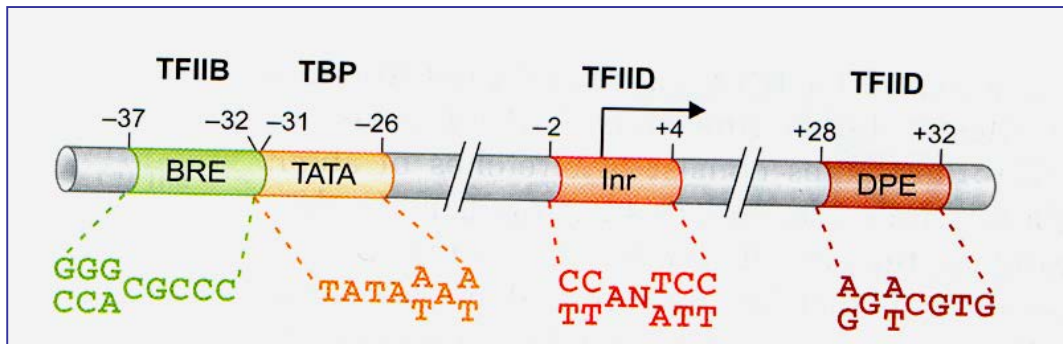
Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics

TABLE 27.4 General transcription initiation factors from human cells^{a,b}

Factor	Number of Subunits	Molecular Weight (kDa)	Function
TFIID	12	38	Core promoter recognition (TATA); TFIIIB recruitment
TFIIB			
TFIIF	12	15–250	Core promoter recognition (non-TATA elements); positive and negative regulation
TFIIF			
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP binding; stabilization of TAF–DNA interactions; antirepression functions
TFIIB	1	35	RNA pol II–TFIIF recruitment; start-site selection by RNA pol II
TFIIF	2	30, 74	Promoter targeting of pol II; destabilization of nonspecific RNA pol II–DNA interactions
RNA pol II	12	10–220	Catalytic functions in RNA synthesis; recruitment of TFIIE
TFIIE	2	34, 57	TFIIH recruitment; modulation of TFIIH helicase, ATPase, and kinase activities; direct enhancement of promoter melting (?)
TFIIH	9	35–89	Promoter melting using helicase activity; promoter clearance (?) by CTD kinase activity

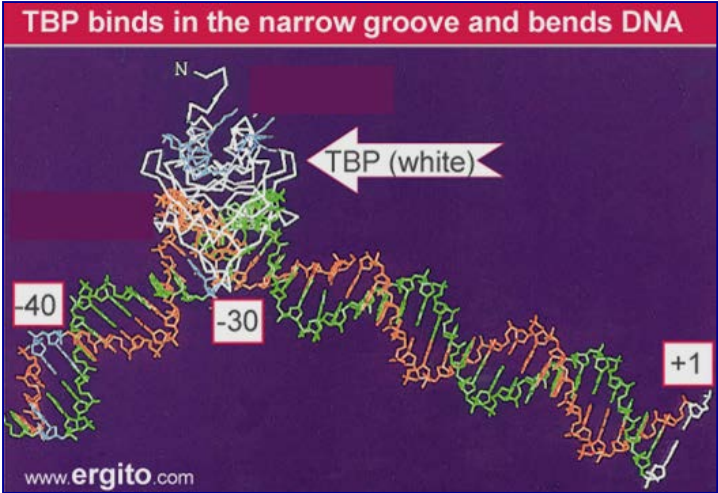
^aThe subunit compositions and polypeptide sizes are those described for the human factors, but homologs for virtually all have also been identified in rat, *Drosophila*, and yeast.
^bAbbreviations used: CTD, carboxy-terminal domain of pol II; RNA pol II, RNA polymerase II; TAFs, TATA-binding protein-associated factors; TBP, TATA-binding protein.
^cTBP, the TATA-binding protein, is also part of TFIIB and of SL1, a pol I transcription factor.
 Adapted from *Trends in Biochemical Sciences* 21:327–335, R. G. Roeder, The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. © 1996, with permission from Elsevier.

Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

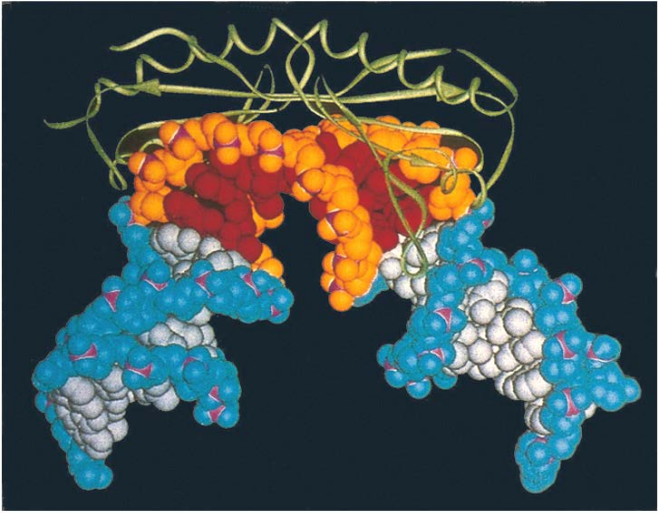
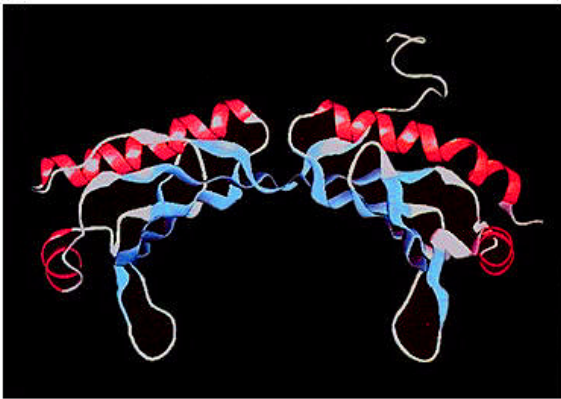
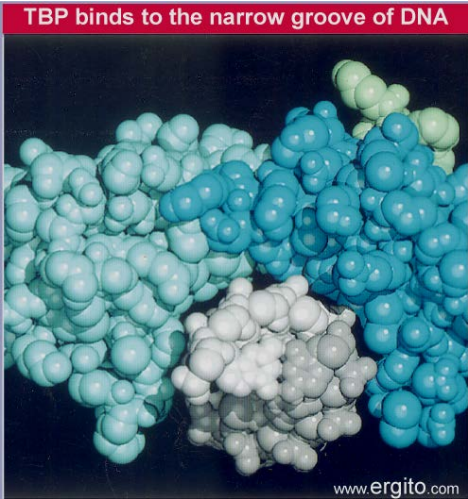


Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID

TFIID



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



© Klug, "Opening the gateway," Nature 365 (7 Oct 1993) p. 487, 1, 2. © Macmillan Magazines Ltd.

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID

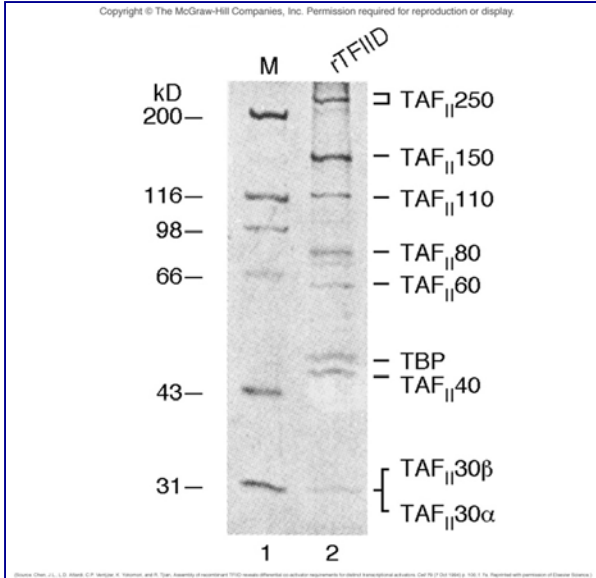
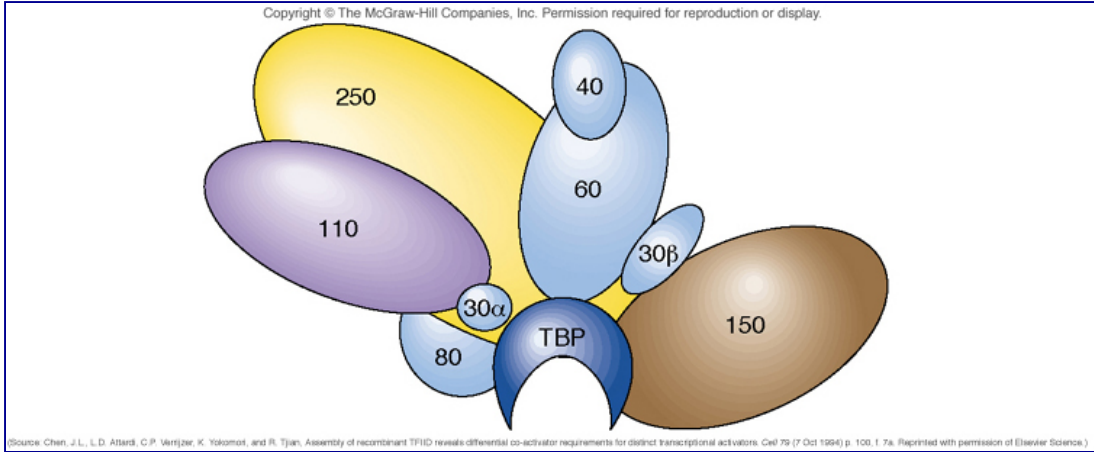
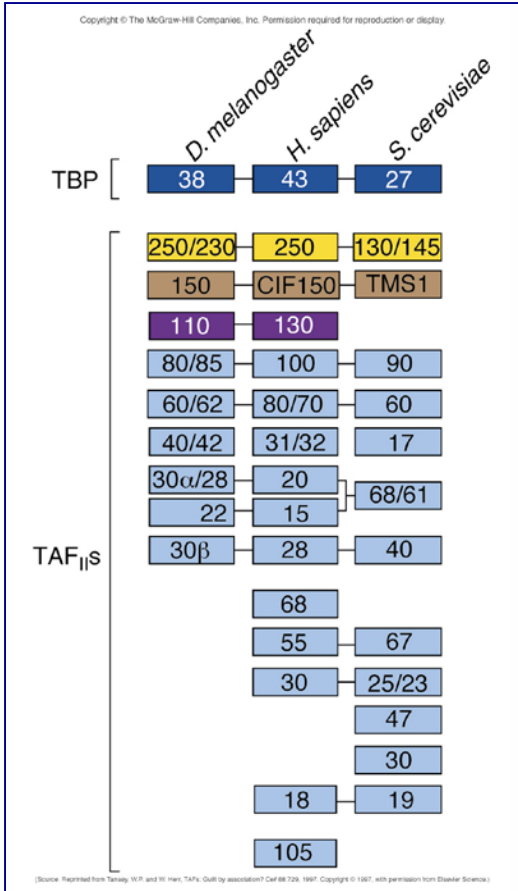
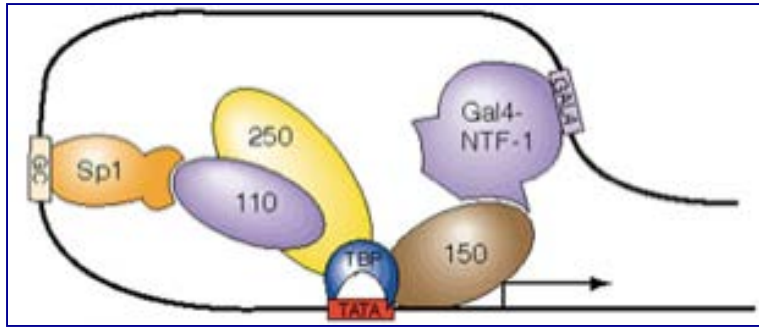


Figure 11.8 Structure of *Drosophila* TFIID assembled in vitro from the products of cloned genes. (a) Gel electrophoresis of the polypeptides. Lane 1 contained molecular mass markers, and lane 2 contained the reconstituted TFIID (rTFIID), with the eight major TAF_{II}s. (b) Hypothetical structure of the reconstituted *Drosophila* TFIID.

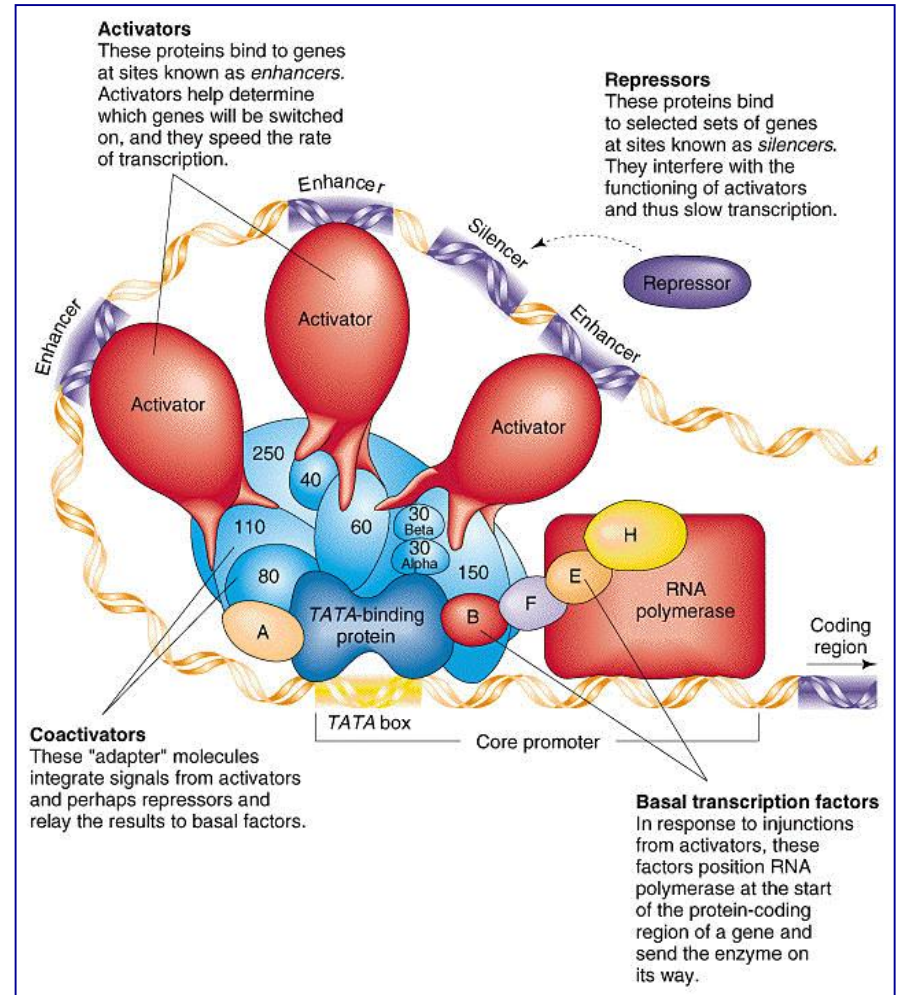
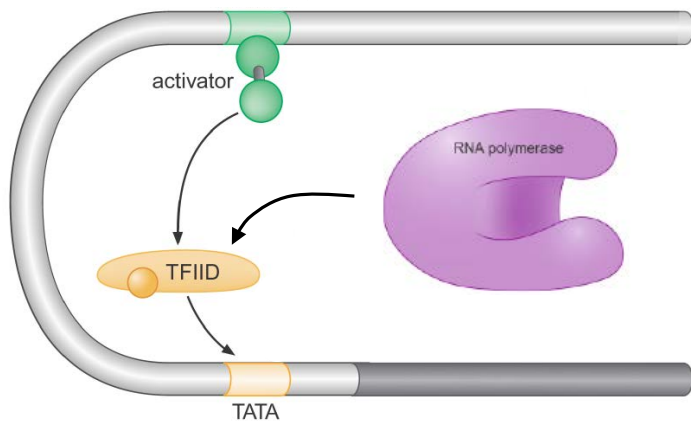


(Source: Chen, J.L., L.D. Attard, C.P. Venizier, K. Yokomizo, and R. Tjian, Assembly of recombinant TFIID reveals differential co-activator requirements for distinct transcriptional activators. Cell 75 (7 Oct 1994) p. 100, 1-7a. Reprinted with permission of Elsevier Science.)

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID



1. TAFs permeten la interacció de TFIID amb activadors



2. TFIID facilita el reclutament de l'RNA polimerasa

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID

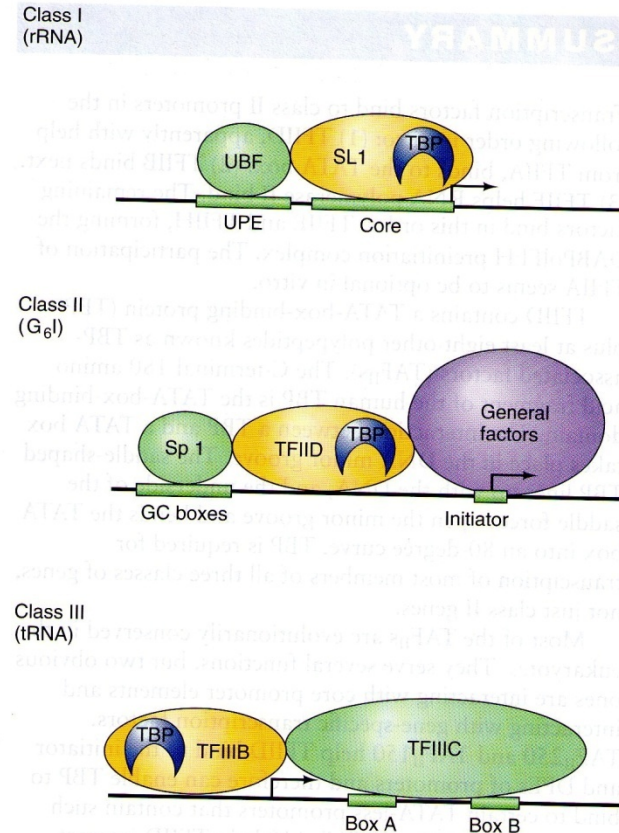
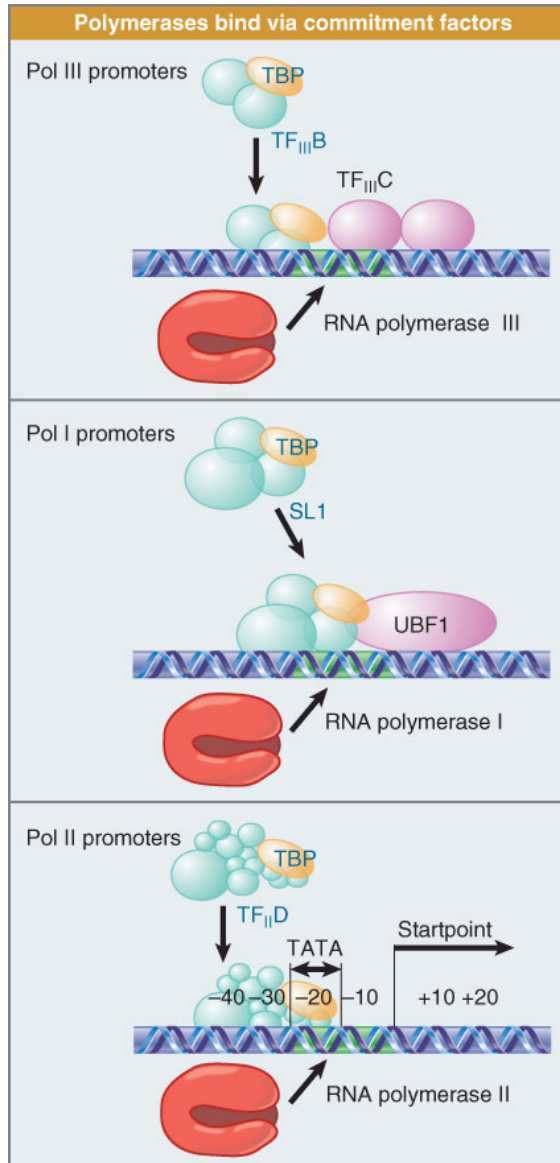


Figure 11.42 Model of preinitiation complexes on TATA-less promoters recognized by all three polymerases. In each case, an assembly factor (green) binds first (UBF, Sp1, and TFIIC in class I, II, and III promoters, respectively). This in turn attracts another factor (yellow), which contains TBP (blue); this second factor is SL1, TFIID, or TFIIB in class I, II, or III promoters, respectively. These complexes are sufficient to recruit polymerase for transcription of class I and III promoters, but in class II promoters more general factors (purple) besides polymerase II must bind before transcription can begin. (Source: Adapted from White, R.J. and S.P. Jackson, Mechanism of TATA-binding protein recruitment to a TATA-less class III promoter. *Cell* 71:1051, 1992.)

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID

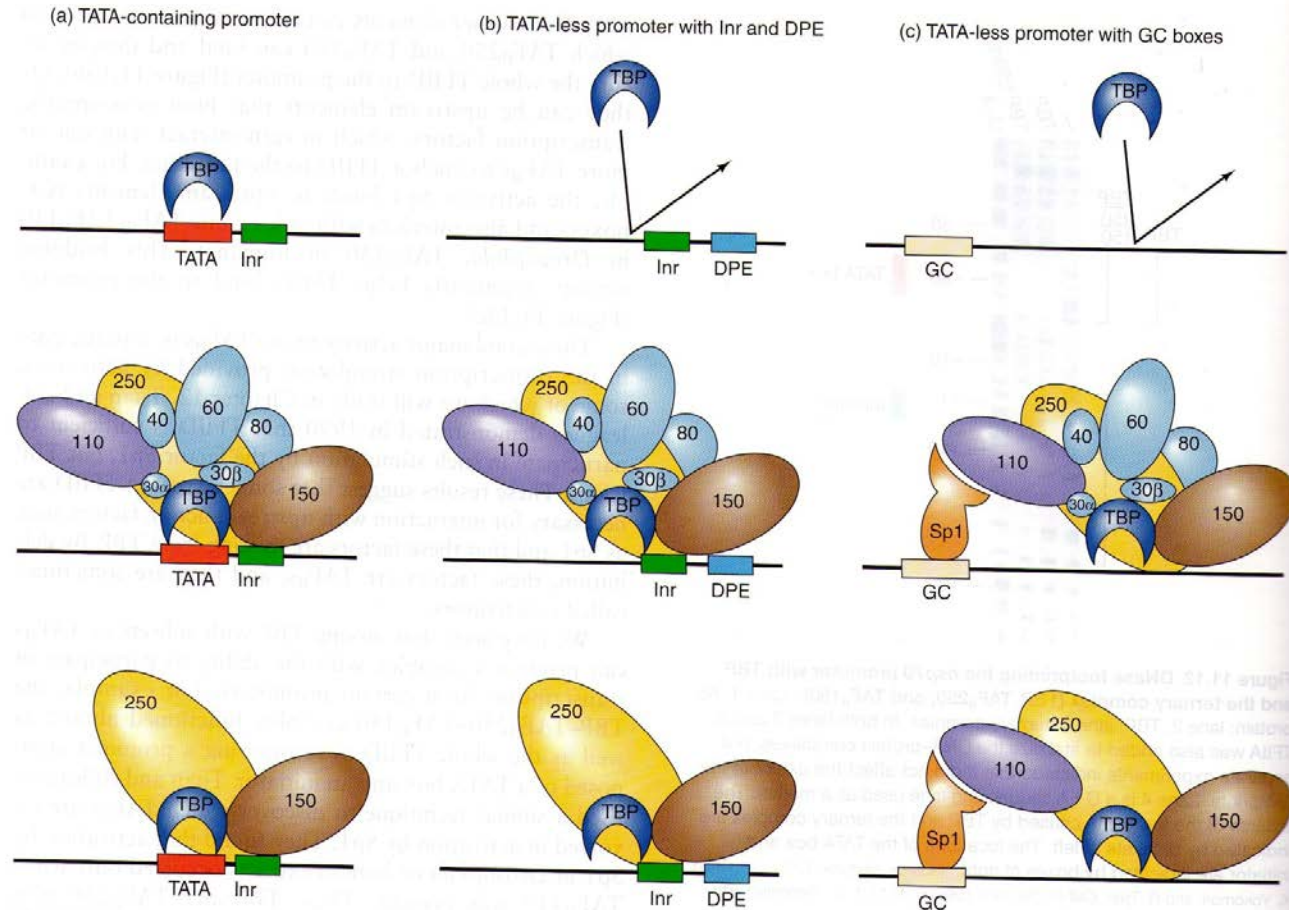


Figure 11.13 Model for the interaction between TBP and TATA-containing or TATA-less promoters. (a) TATA-containing promoter. TBP can bind by itself to the TATA box of this promoter (top). It can also bind in the company of all the TAF_{II}s in TFIID (middle). And it can bind with a subset of TAF_{II}s (bottom). (b) TATA-less promoter with initiator element and DPE. TBP cannot bind by itself to this promoter, which contains no TATA box (top). The whole TFIID is competent to bind to the TATA-less promoter through interactions between TAF_{II}250 (yellow) and TAF_{II}150 (brown, middle). TAF_{II}250 and TAF_{II}150 are

sufficient to tether TBP to the initiator and DPE (bottom). (c) TATA-less promoter with GC boxes. TBP cannot bind to this promoter by itself (top). The whole TFIID can bind to this promoter through interactions with Sp1 bound at the GC boxes (middle). TAF_{II}250, TAF_{II}150, and TAF_{II}110 are sufficient to anchor TBP to the Sp1 bound to the GC boxes. (Source: Adapted from Goodrich, J.A., G. Cutter, and R. Tjian, Contacts in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84:826, 1996.)

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIID

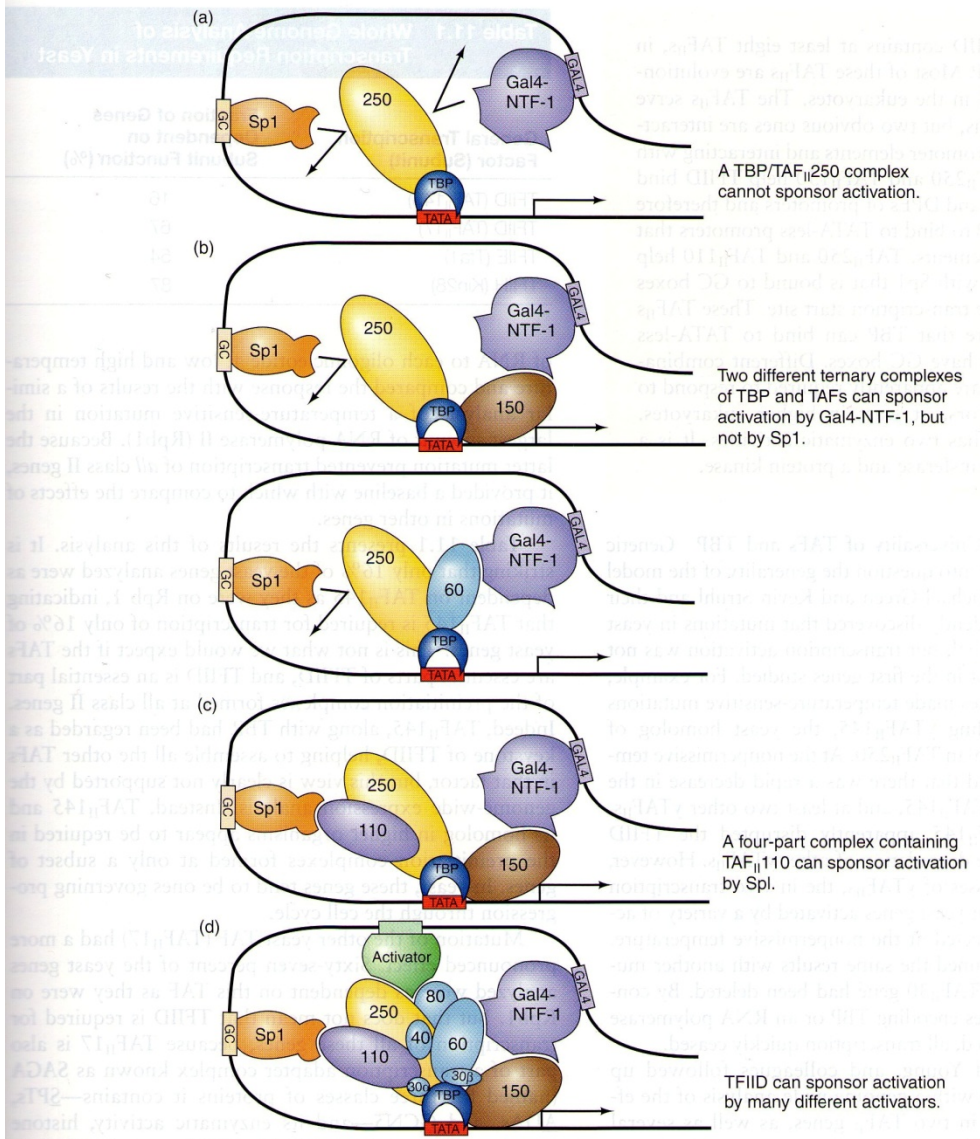
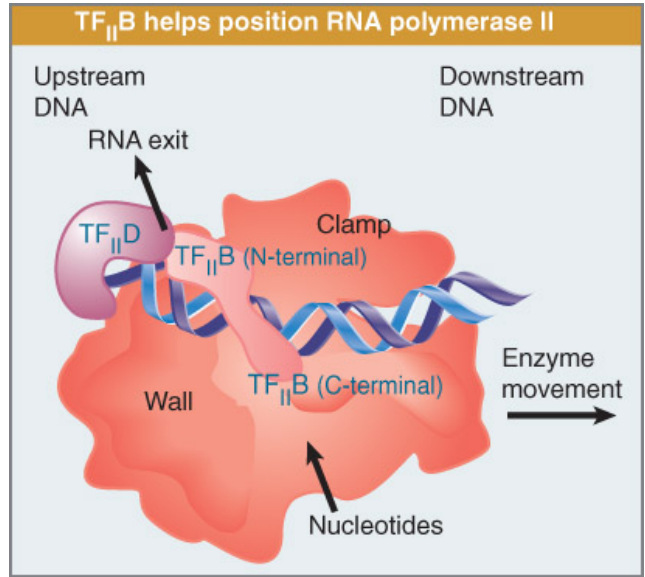


Figure 11.14 A model for transcription enhancement by activators. (a) TAF_{II}250 does not interact with either Sp1 or Gal4-NTF-1 (a hybrid activator with the transcription-activating domain of NTF-1), so no activation takes place. (b) Gal4-NTF-1 can interact with either TAF_{II}150 or TAF_{II}60 and activate transcription; Sp1 cannot interact with either of these TAFs or with TAF_{II}250 and does not activate transcription. (c) Gal4-NTF-1 interacts with TAF_{II}150 and Sp1

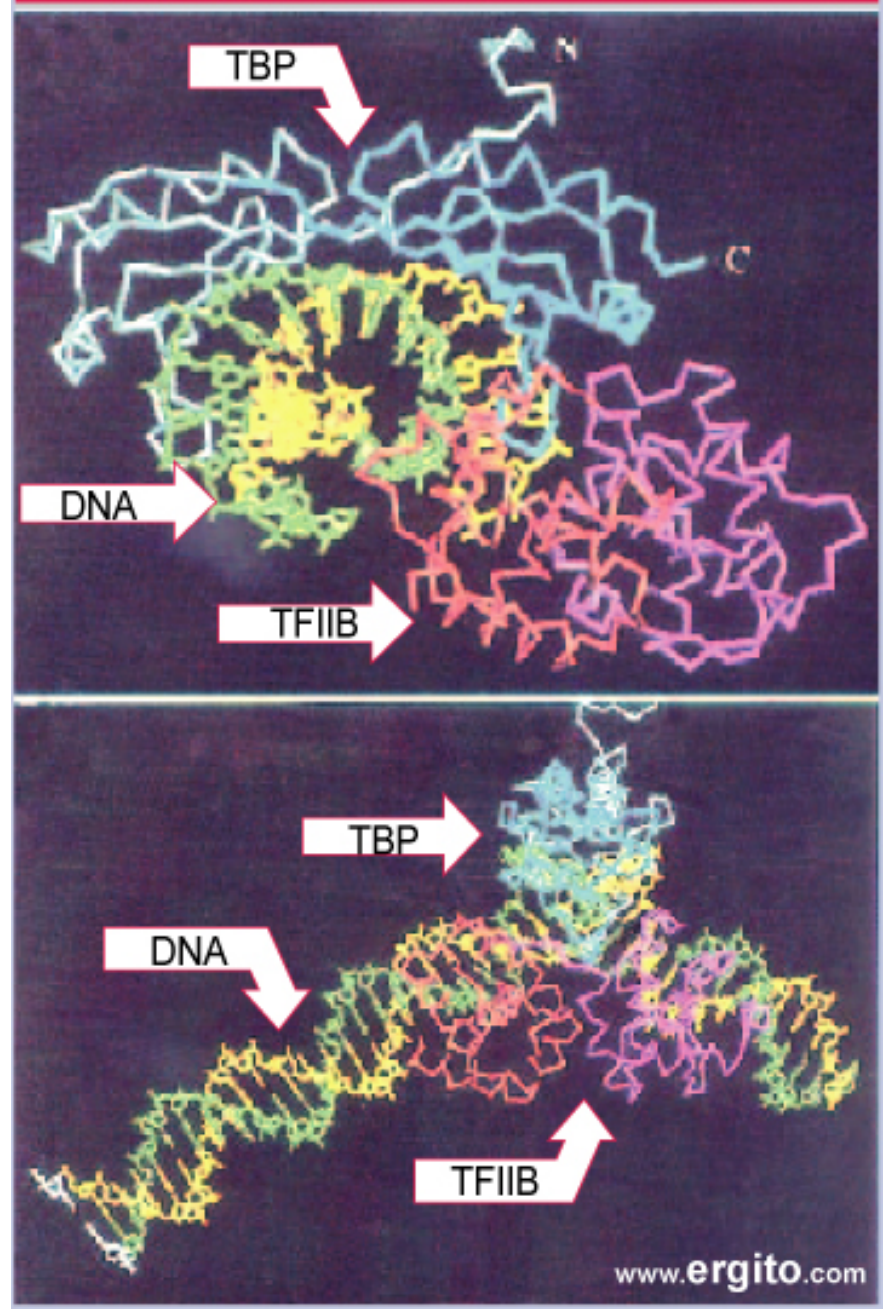
interacts with TAF_{II}110, so both factors activate transcription. (d) TFIID contains the complete assortment of TAF_{II}s, so it can respond to a wide variety of activators, represented here by Sp1, Gal4-NTF-1, and a generic activator (green) at top. (Source: Adapted from Chen, J.L., L.D. Attardi, C.P. Verrijzer, K. Yokomori, and R. Tjian, Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79:101, 1994).

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIIB



TFIIB

TFIIB binds to bent DNA downstream from TBP



Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics

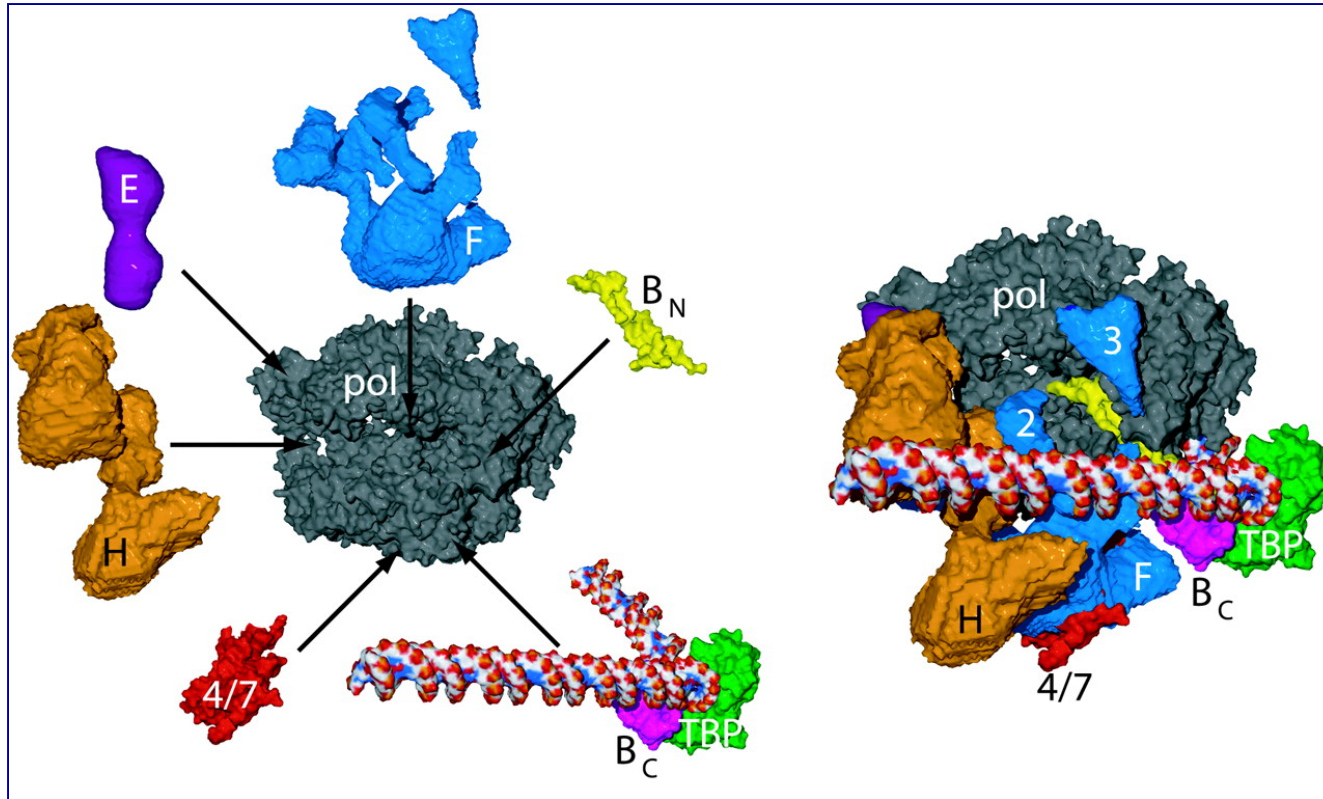


Figure 11.26 A model for the class II preinitiation complex.

Kornberg and colleagues added previous structural information about the positions of promoter DNA, TFIIF, TFIIE, and TFIIH to their crystal structure of the TFIIB-RNA polymerase II complex to generate this composite model. **(a)** A blow-up to show the identities of all the components of the complex. The red component (4/7) represents Rpb4 and Rpb7, and pol (gray) denotes the rest of RNA polymerase II. B_N and B_C denote the N-terminal and C-terminal domains of

TFIIB, respectively. The promoter DNA is represented by a red, white, and blue model, with a pronounced bend caused by binding of TBP. **(b)** Intact structure. Note that the transcription bubble has not yet formed. The direction of transcription is right to left.

Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics

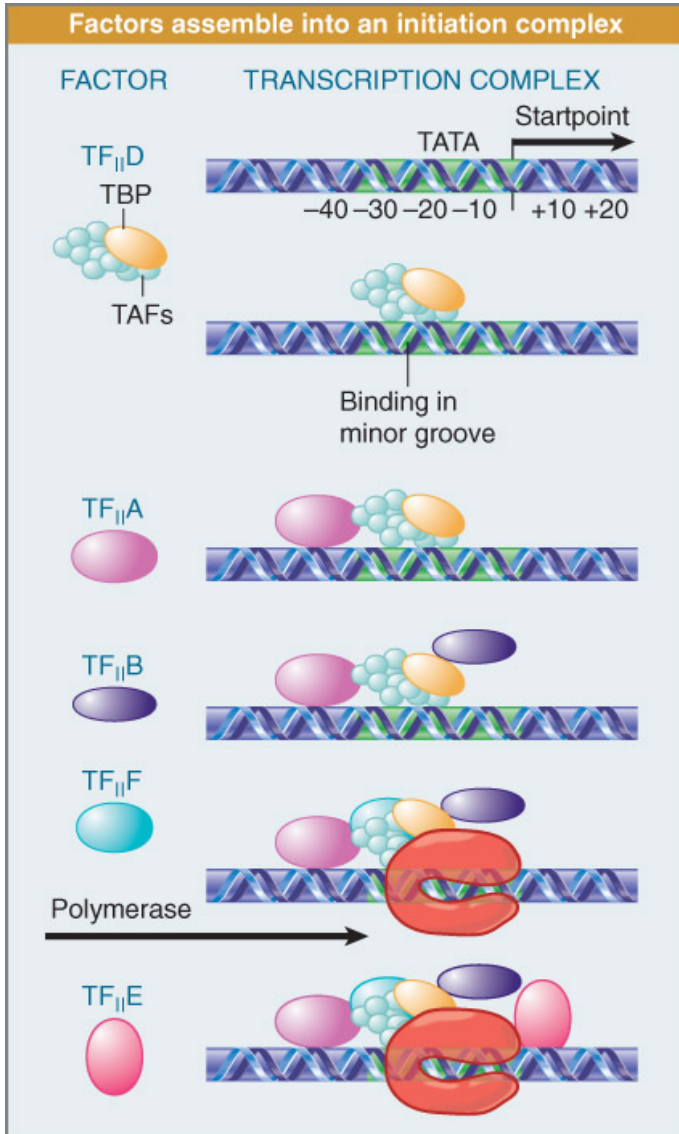


TABLE 27.4 General transcription initiation factors from human cells^{a,b}

Factor	Number of Subunits	Molecular Weight (kDa)	Function
TFIID	TBP ^c 1 TAFs 12	38 15–250	Core promoter recognition (TATA); TFIIB recruitment Core promoter recognition (non-TATA elements); positive and negative regulation
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP binding; stabilization of TAF–DNA interactions; antirepression functions
TFIIB	1	35	RNA pol II–TFIIF recruitment; start-site selection by RNA pol II
TFIIF	2	30, 74	Promoter targeting of pol II; destabilization of nonspecific RNA pol II–DNA interactions
RNA pol II	12	10–220	Catalytic functions in RNA synthesis; recruitment of TFIIE
TFIIE	2	34, 57	TFIIH recruitment; modulation of TFIIH helicase, ATPase, and kinase activities; direct enhancement of promoter melting (?)
TFIIH	9	35–89	Promoter melting using helicase activity; promoter clearance (?) by CTD kinase activity

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIIH

TFIIH

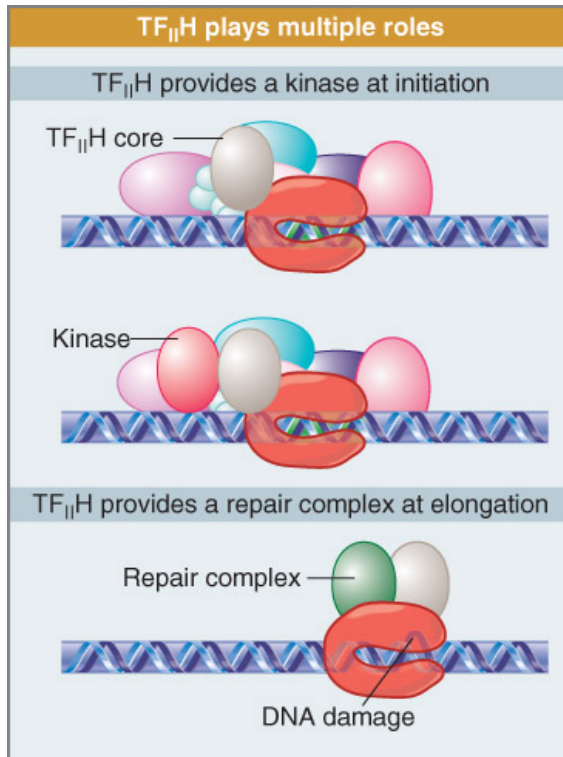
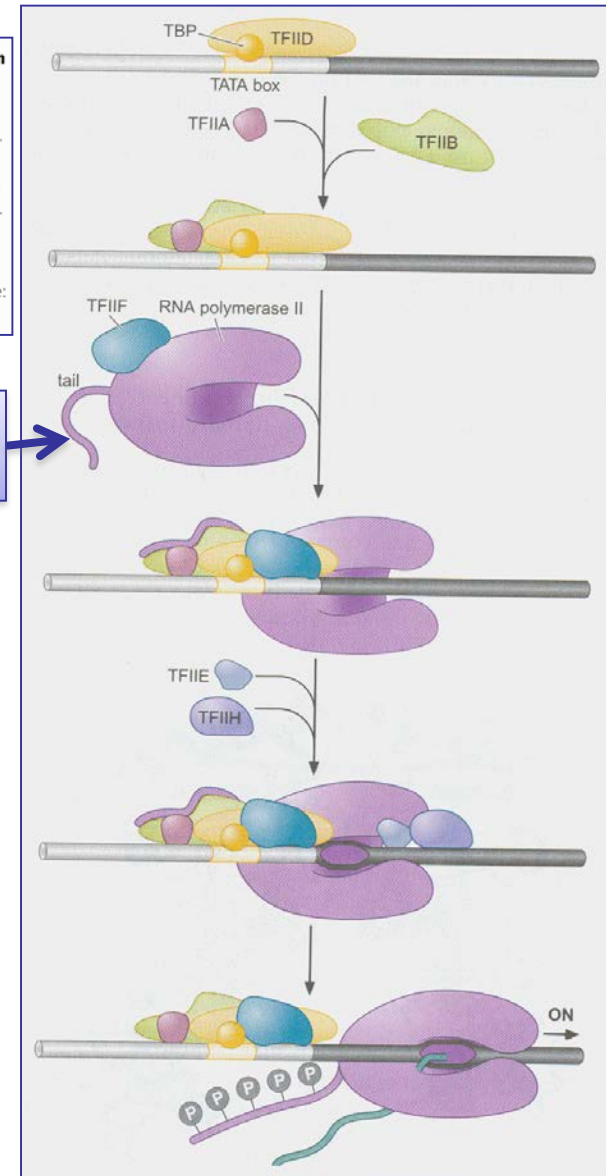


FIGURE 12-13 Transcription initiation by RNA polymerase II. The step-wise assembly of the Pol II pre-initiation complex is shown here, and described in detail in the text. Once assembled at the promoter, Pol II leaves the pre-initiation complex upon addition of the nucleotide precursors required for RNA synthesis, and after phosphorylation of Ser residues within the enzyme's "tail." The tail contains multiple repeats of the heptapeptide sequence: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (see Figure 12-18).

Cua CTD
(YSPTSPS)_n

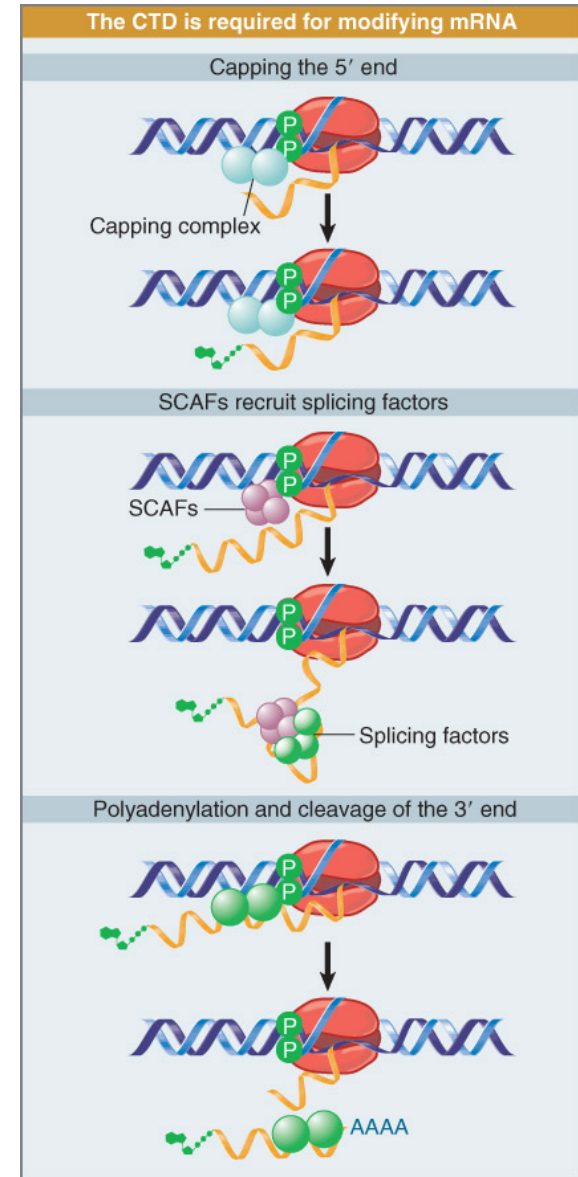
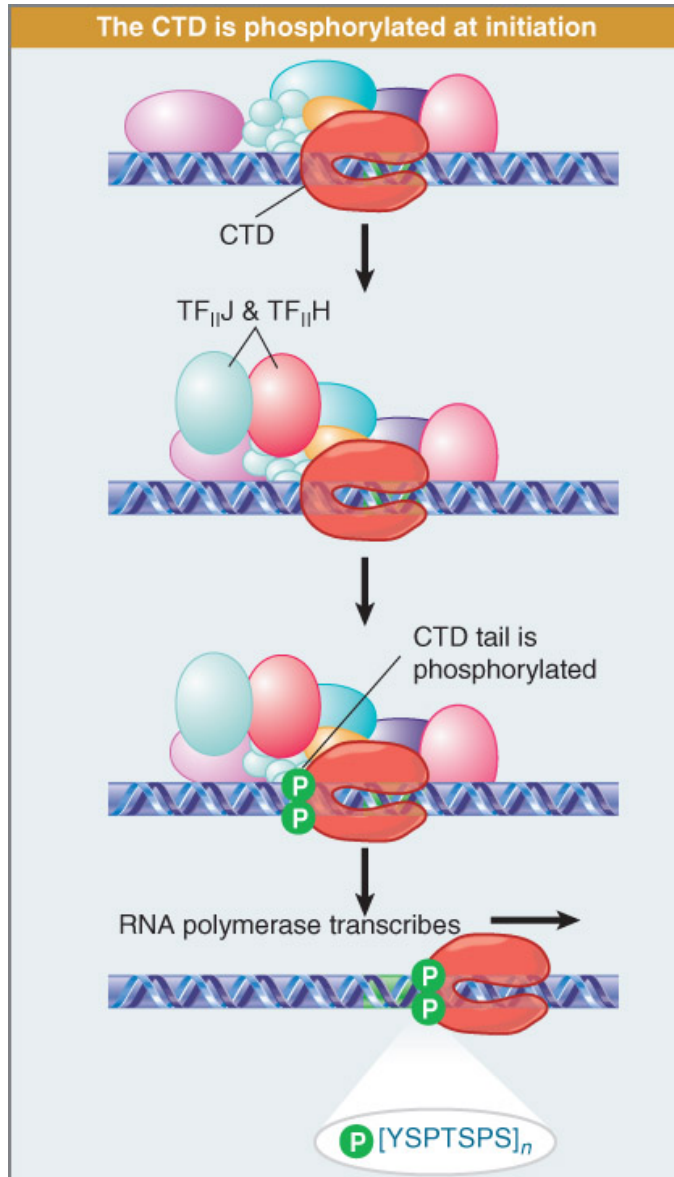


És una proteïna molt complexa. Té 9 subunitats separades en 2 complexos

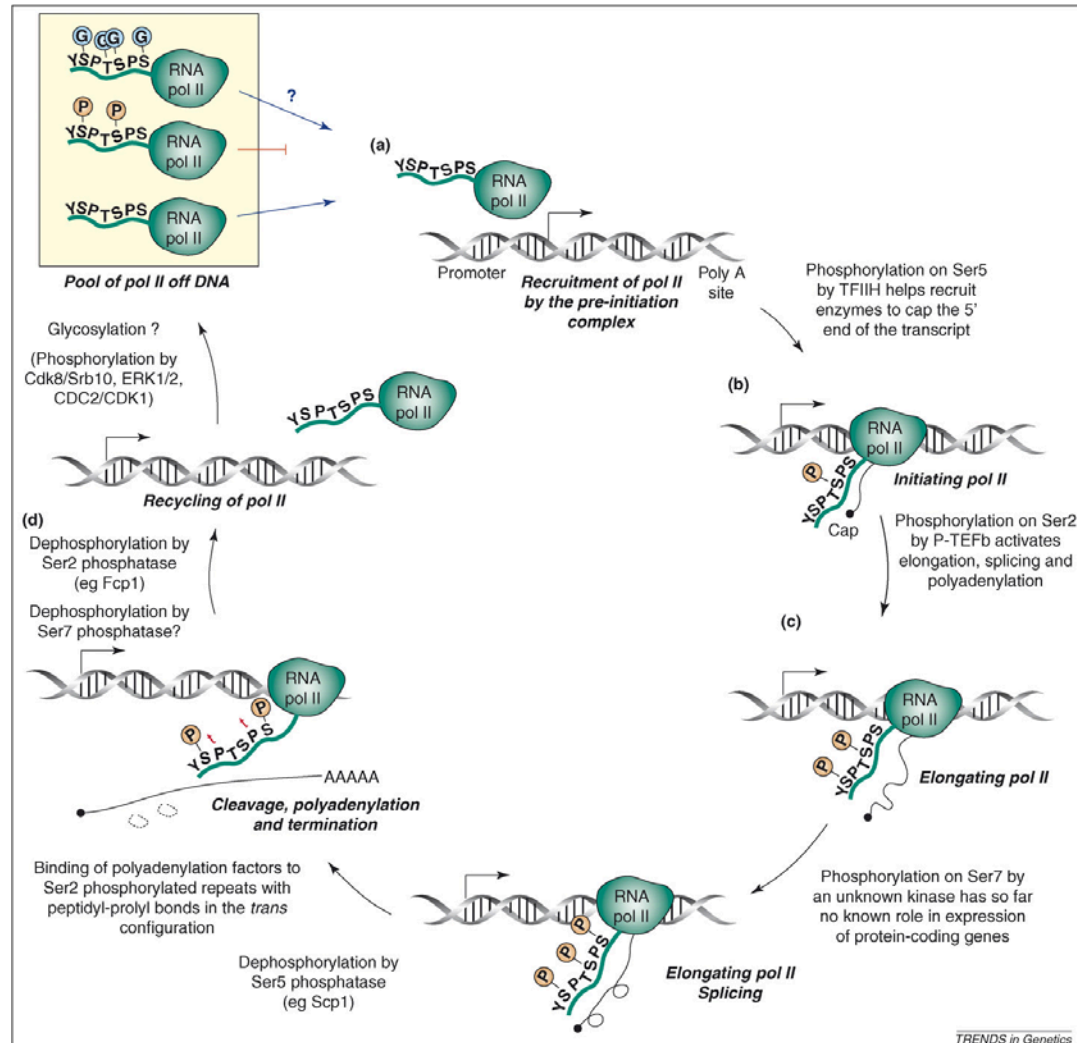
-Complex de 4 subunitats amb activitat quinasa responsable de la fosforilació de la cua CTD

-Nucli del complex (5 subunitats) amb activitat DNA helicasa/ATPasa

Transcripció per l'RNA pol II: factor TFIIF

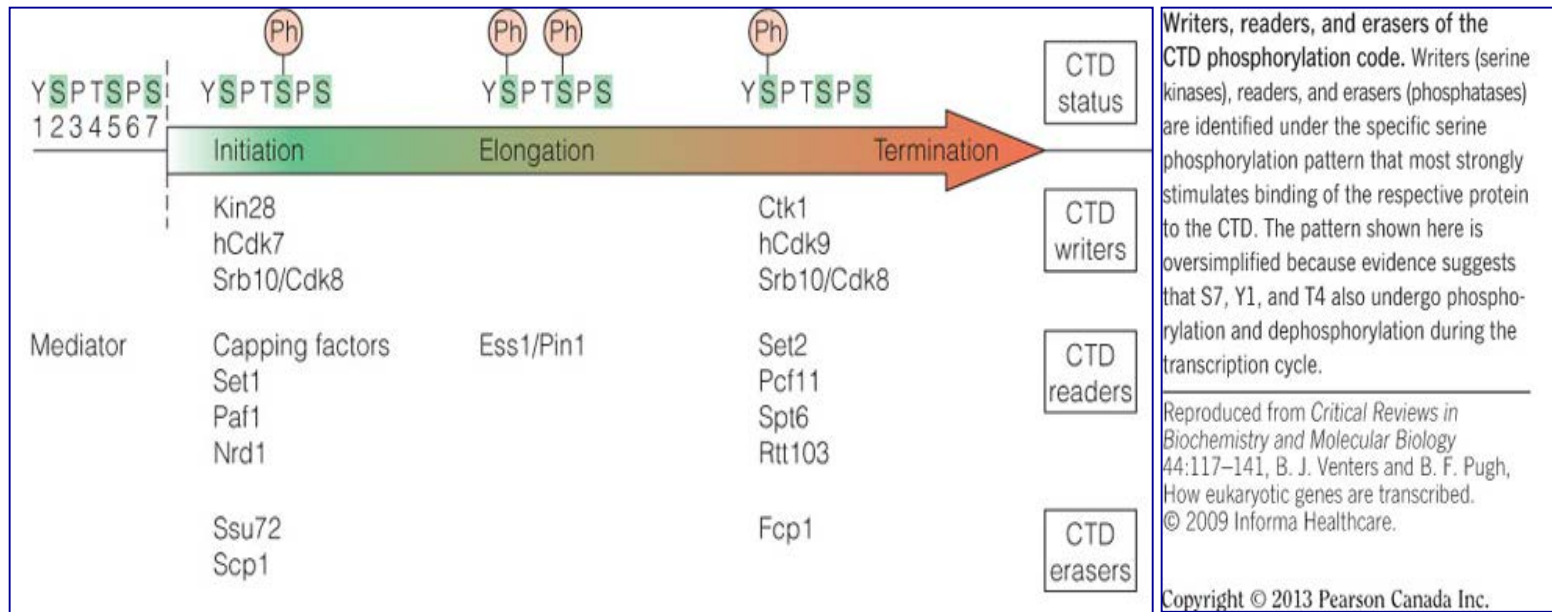


Transcripció per l'RNA pol II: cua CTD

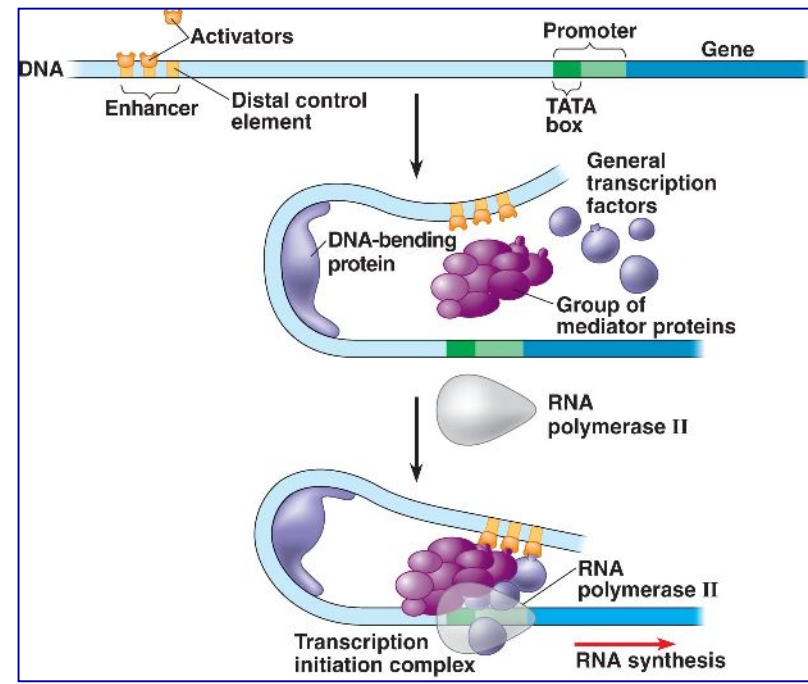
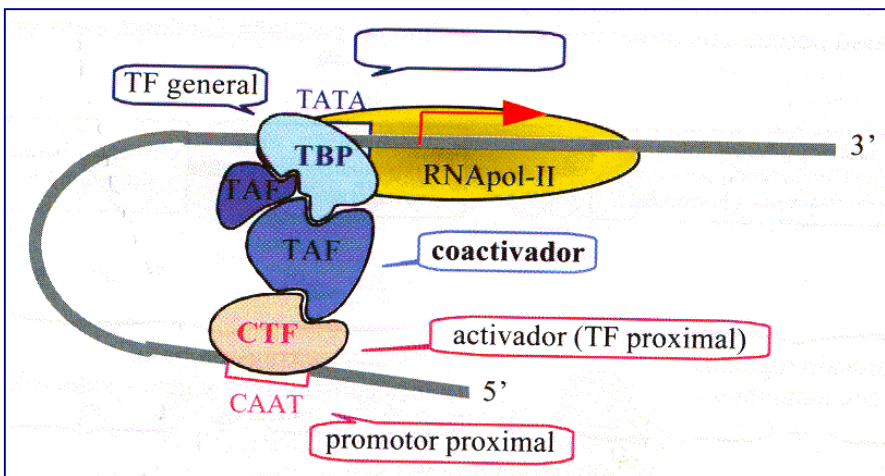
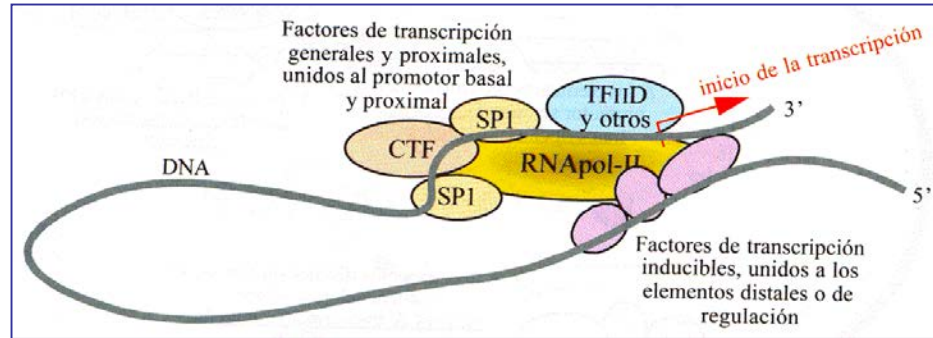
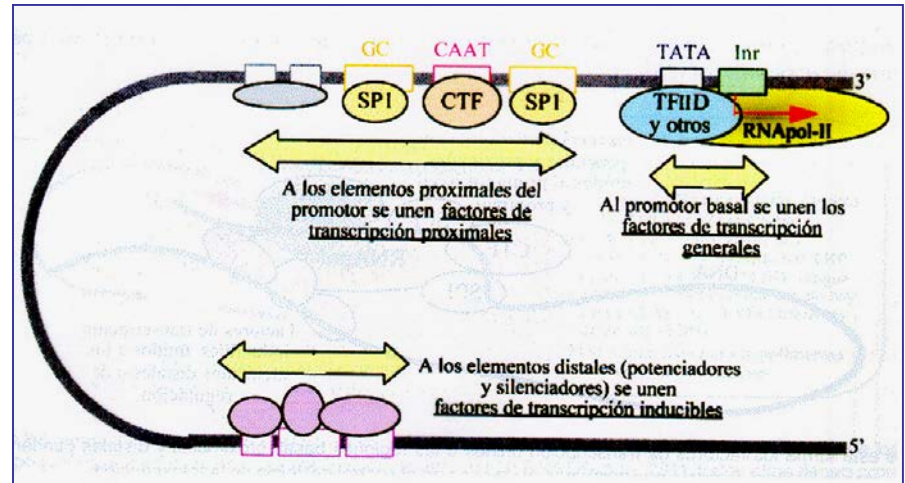


Transcripció per l'RNA pol II: cua CTD

Canvis en la fosforilació de la cua CTD



Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics d'unió al promotor proximal



Transcripció per l'RNA pol II: factors proteics d'unió a promotors proximal o distal

TABLA 28.4. Algunos elementos importantes de control de la pol II y sus correspondientes factores de transcripción

Nombre de la secuencia	Secuencia de consenso	Factor(es) de transcripción	Comentario
Algunos elementos promotores y potenciadores generales			
Caja TATA	TATAAAA	TFIID	El TFIID es un complejo de varios factores
Caja CAAT	GGCCAATCT	CTF/NF1	Elemento común
Caja GC	GGGCGG	SP1	Se encuentra a menudo en los promotores sin TATA
Octámero	ATTTGCAT	Oct1, Oct2	Oct1 y Oct2 contienen homeodominios
Algunos elementos promotores y potenciadores especiales			
HSE	CNNGAANNTCCNNG	Factor del choque térmico	Interviene en la respuesta al choque térmico
GRE	TGGTACAAATGTTCT	Receptor de glucocorticoides	Respuestas proteicas a las hormonas glucocorticoides
TRE	CAGGGACGTGACCGCA	Receptor tiroideo	Respuestas proteicas a las hormonas tiroideas

Transcripció per l'RNA pol II: el mediador

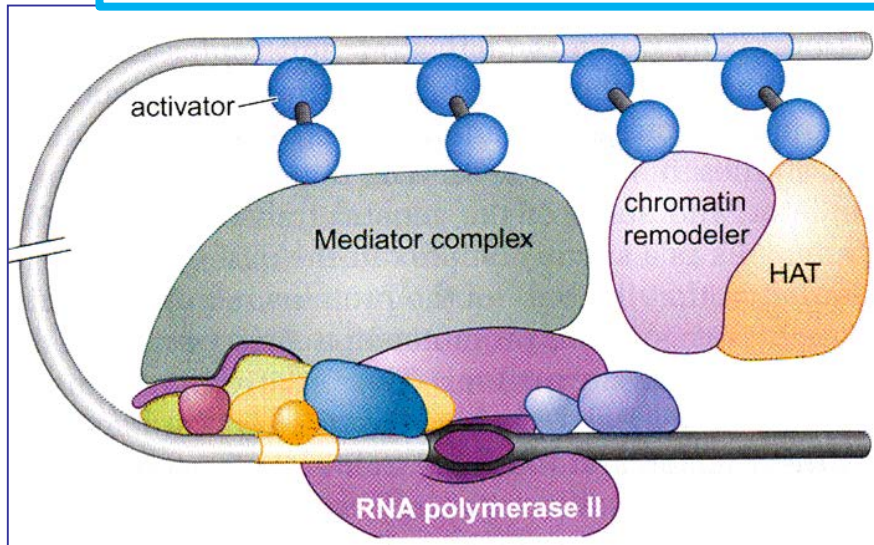
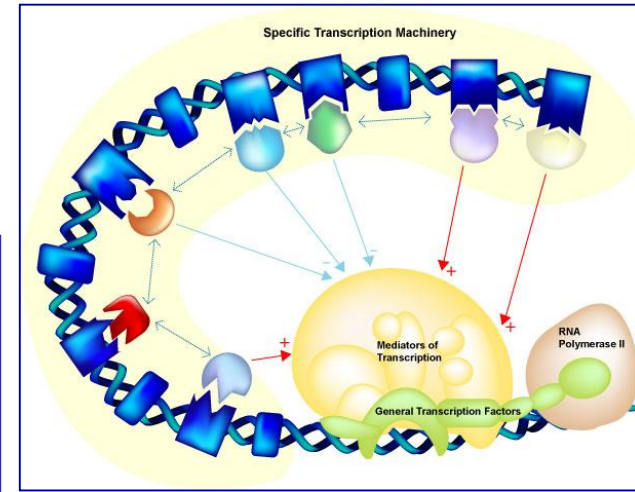
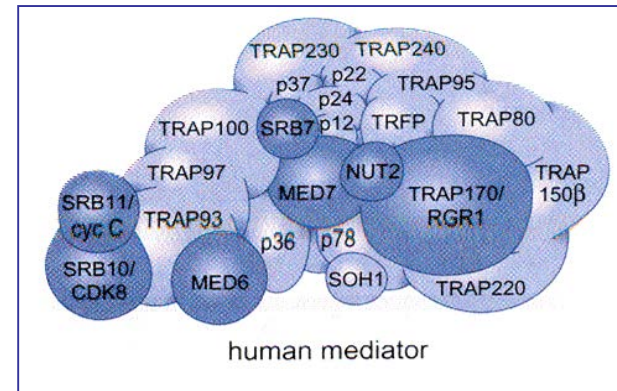
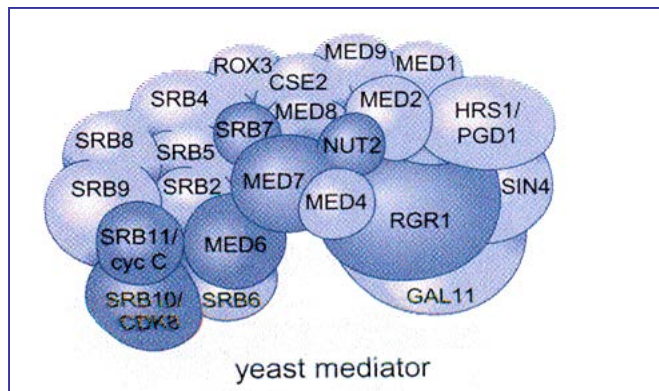


FIGURE 12-16 Assembly of the pre-initiation complex in presence of Mediator, nucleosome modifiers and remodelers, and transcriptional activators. In addition to the general transcription factors shown in Figure 12-13, transcriptional activators bound to sites near the gene recruit nucleosomes modifying and remodeling complexes, and the Mediator Complex, which together help form the pre-initiation complex.

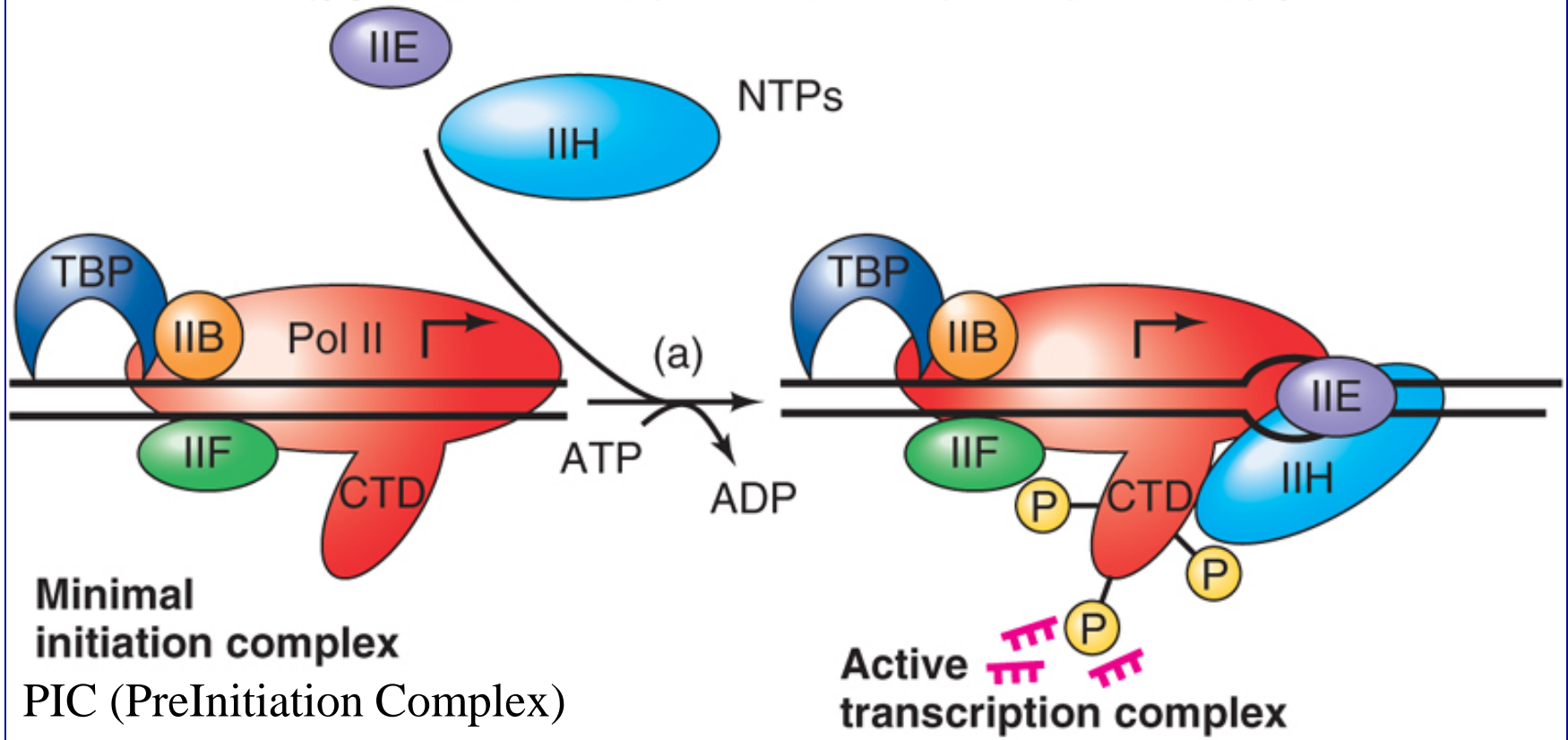


- Mediator: complex de proteïnes considerades també com a factors de transcripció generals en la major part dels complexos d'inici de l'RNA polimerasa II.
- No és necessari per a l'inici però sí per a l'activació de la transcripció.



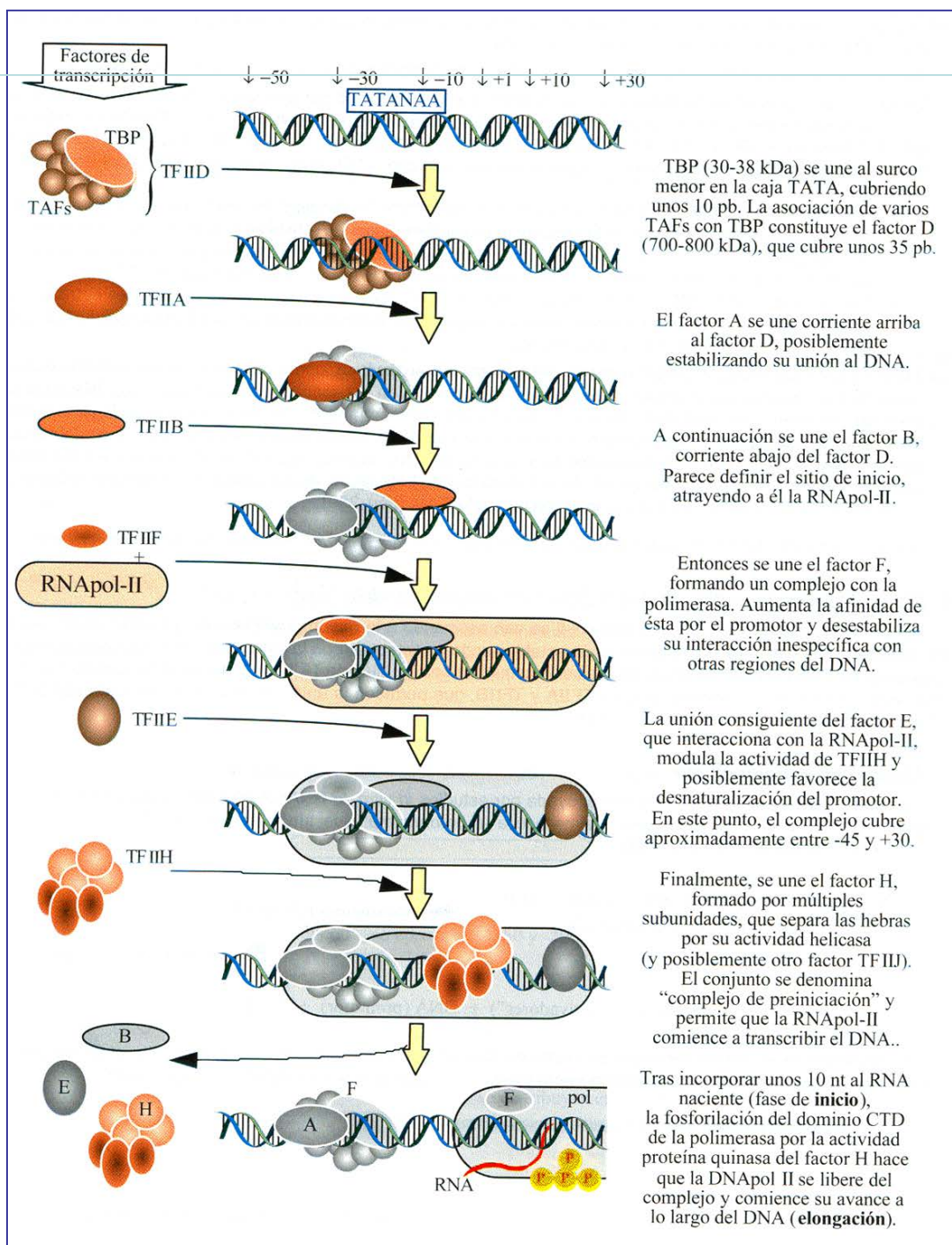
Transcripció per l'RNA polimerasa II: inici

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



1. Formació del complex de preinici
2. Formació del complex actiu obert
3. Incorporació dels primers nucleòtids i eixida del promotor (transició a elongació)

Transcripció per l'RNA polimerasa II: inici



Transcripció per l'RNA polimerasa II: inici

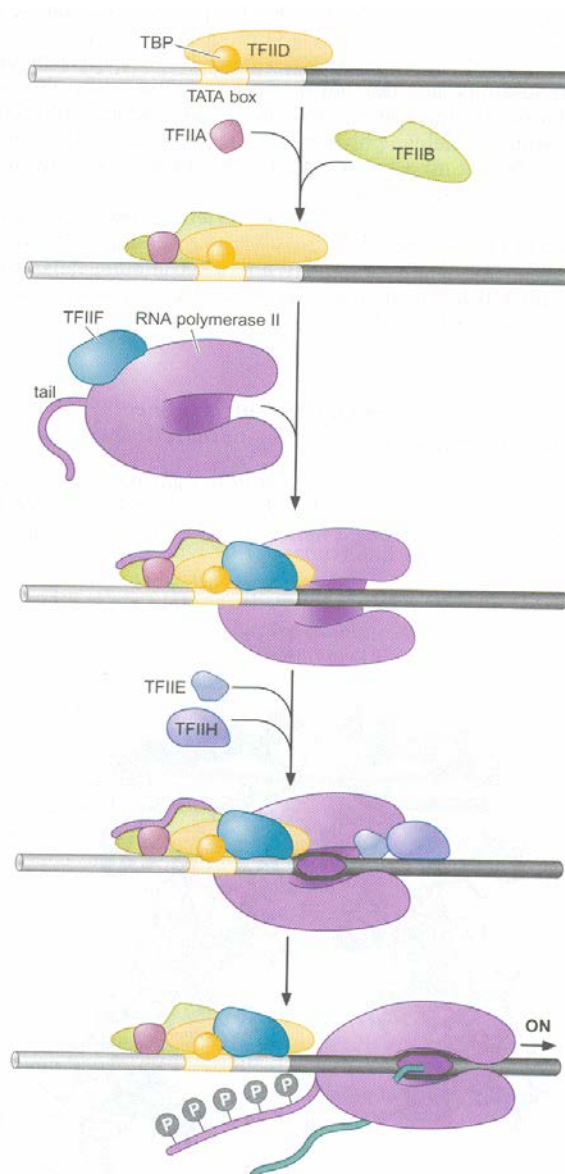


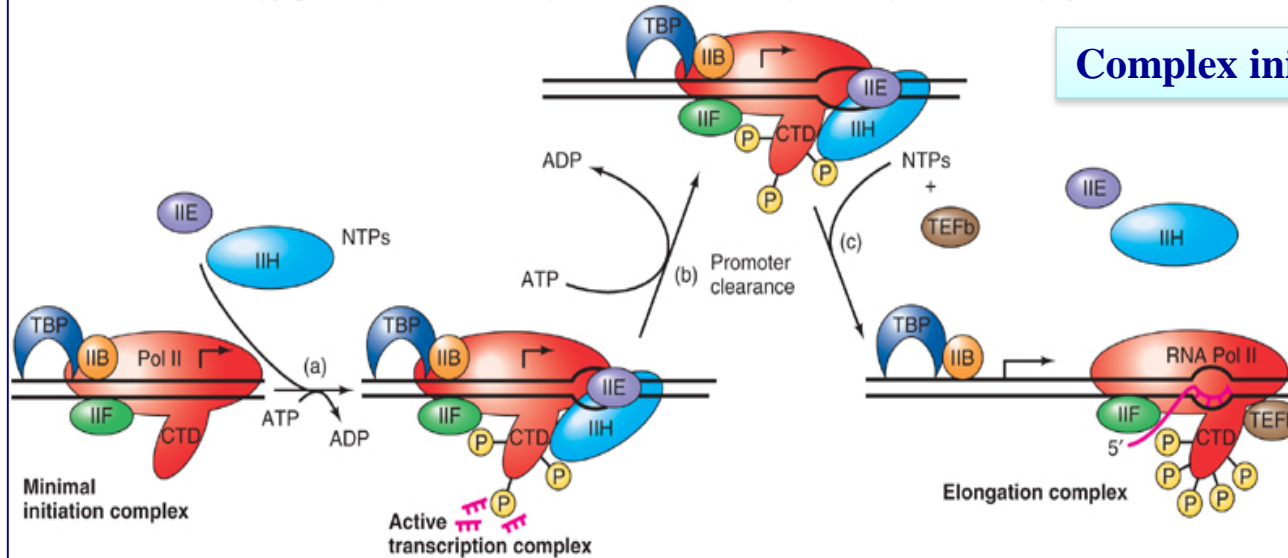
FIGURE 12-13 Transcription initiation by RNA polymerase II. The step-wise assembly of the Pol II pre-initiation complex is shown here, and described in detail in the text. Once assembled at the promoter, Pol II leaves the pre-initiation complex upon addition of the nucleotide precursors required for RNA synthesis, and after phosphorylation of Ser residues within the enzyme's "tail." The tail contains multiple repeats of the heptapeptide sequence: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (see Figure 12-18).

Transcripció per l'RNA polimerasa II: elongació

ELONGACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ:

- Essencialment com a procariotes (excepte per nucleosomes i longitud de transcrit))
- Interacció de l'RNA pol (subunitats grans) semblant per a les tres. Diferències en velocitat del procés: Pol I és la més lenta (20 nt/min) i Pol II la més ràpida (2000 nt/min)

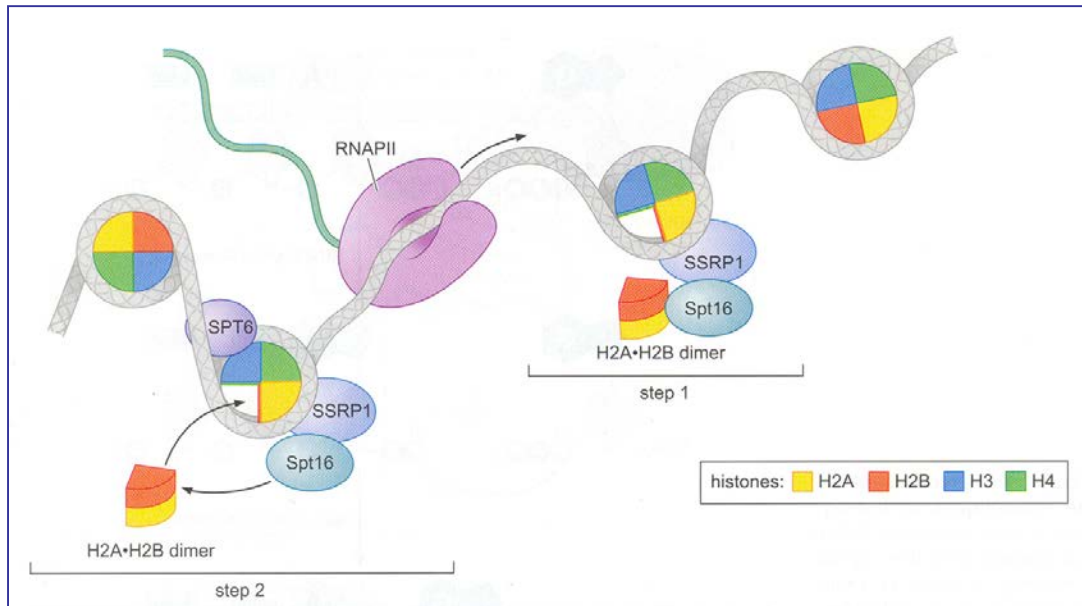
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Complex inicial d'elongació

Figure 11.25 A model for the participation of general transcription factors in initiation, promoter clearance, and elongation. (a) TBP (or TFIID), along with TFIIB, TFIIF, and RNA polymerase II form a minimal initiation complex at the initiator. Addition of TFIIE, TFIIH, and ATP allows DNA melting at the initiator region and partial phosphorylation of the CTD of the largest subunit of RNA polymerase. These events allow production of abortive transcripts (magenta), but the polymerase stalls at position +10 to +12. (b) With energy provided by ATP, the DNA helicase of TFIIH causes further unwinding of the DNA, expanding the transcription bubble. This expansion releases the stalled polymerase and allows it to clear the promoter. (c) With further phosphorylation of the polymerase CTD by TEFb and with continuous addition of NTPs, the elongation complex continues elongating the RNA. TBP and TFIIB remain at the promoter. TFIIE and TFIIH are not needed for elongation and dissociate from the elongation complex. (Source: Adapted from Goodrich, J.A. and T. Tjian, 1994. Transcription factors IIE and IIF and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 77: 145-56.)

Transcripció per l'RNA polimerasa II: elongació



Participació de factors
que actuen sobre la
cromatina

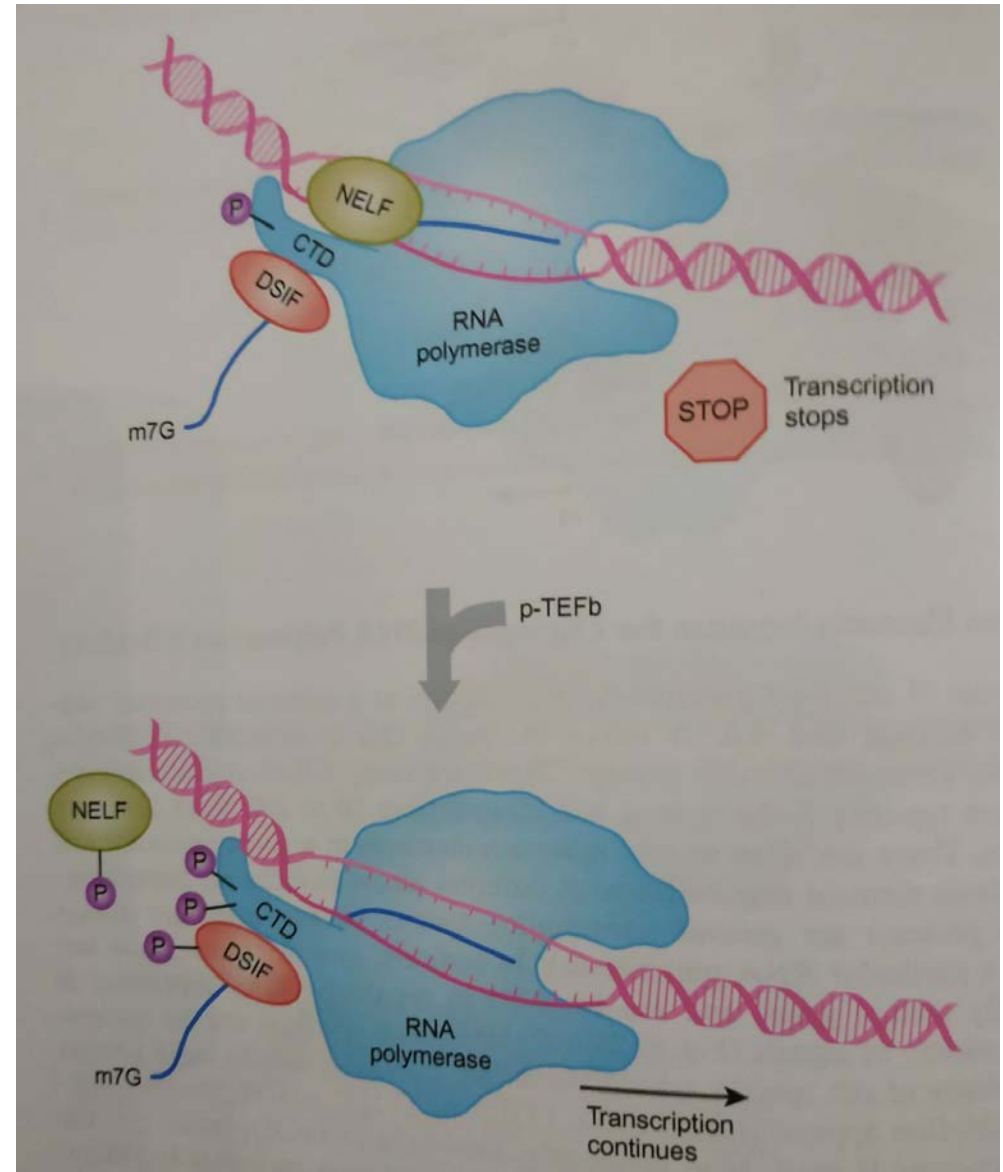
FIGURE 12-22 A model for FACT-aided elongation through nucleosomes. As described in the text, FACT, shown as the heterodimer of Spt 16 and SSRP1, is able to dismantle nucleosomes ahead of the transcribing RNA polymerase (Step 1) and reassemble them behind (Step 2). Specifically, it removes the H2A/H2B dimer. SPT6 binds histone H3 and is believed to aid in nucleosome reassembly. (Adapted, with permission, from Reinberg D. and Sims R. 2006. *J. Biol. Chem.* 281: 23297–23301, Fig. 2b. © American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

També es necessiten altres factors específics de l'elongació, que augmenten la processivitat de l'enzim i eviten les pauses de l'RNA polimerasa durant l'elongació.

Transcripció per l'RNA polimerasa II: elongació

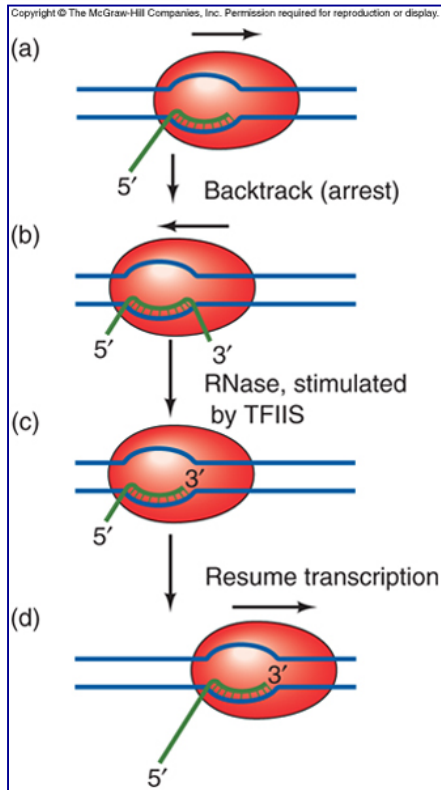
pTEFb

* Estimula l'elongació mitjançant la fosforilació de la cua CTD en Ser2 i la fosforilació de factors d'elongació negatius que provoquen la pausa de la transcripció 30-40 nt després del seu inici



Transcripció per l'RNA polimerasa II: elongació

TFIIS



- * Aïllat a partir de cèl·lules tumorals

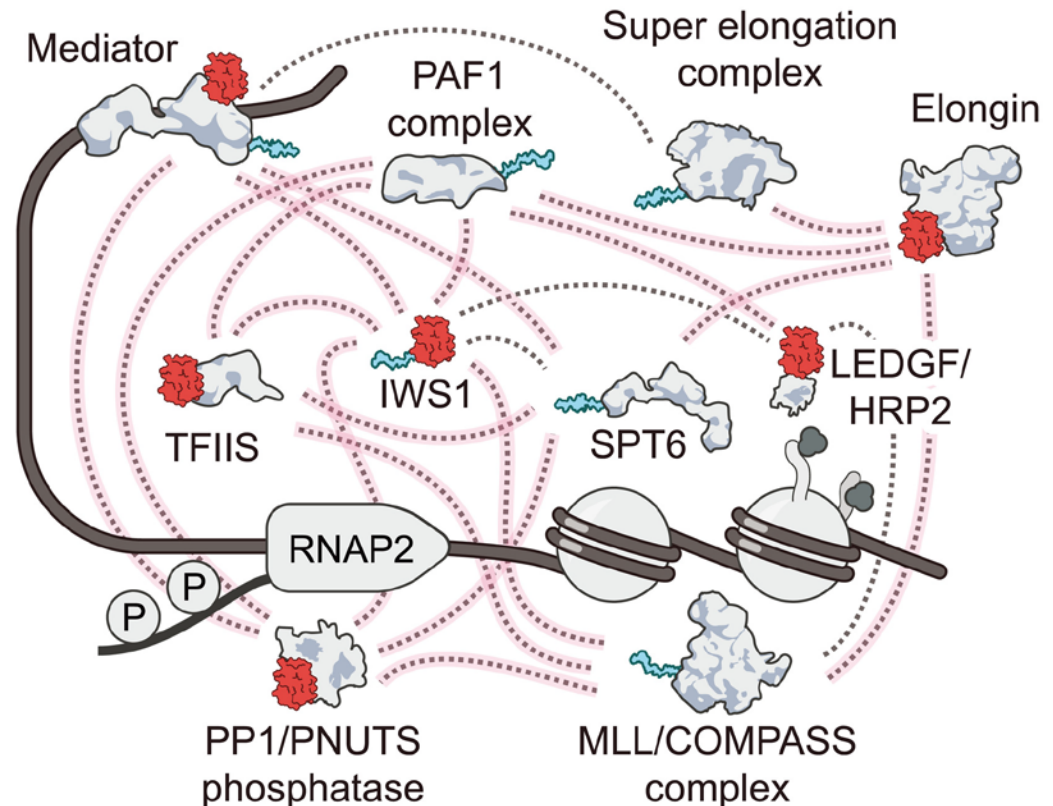
- * Estimula específicament la transcripció

- * És necessari per a eixir de les pauses que fa l'RNA polimerasa en seqüències del DNA que provoquen desestabilització de l'híbrid DNA-RNA i la fan retrocedir

- * Millora l'activitat de correcció d'errors en els transcrits (en estimular l'activitat RNasa de l'RNA polimerasa)

Transcripció per l'RNA polimerasa II: elongació

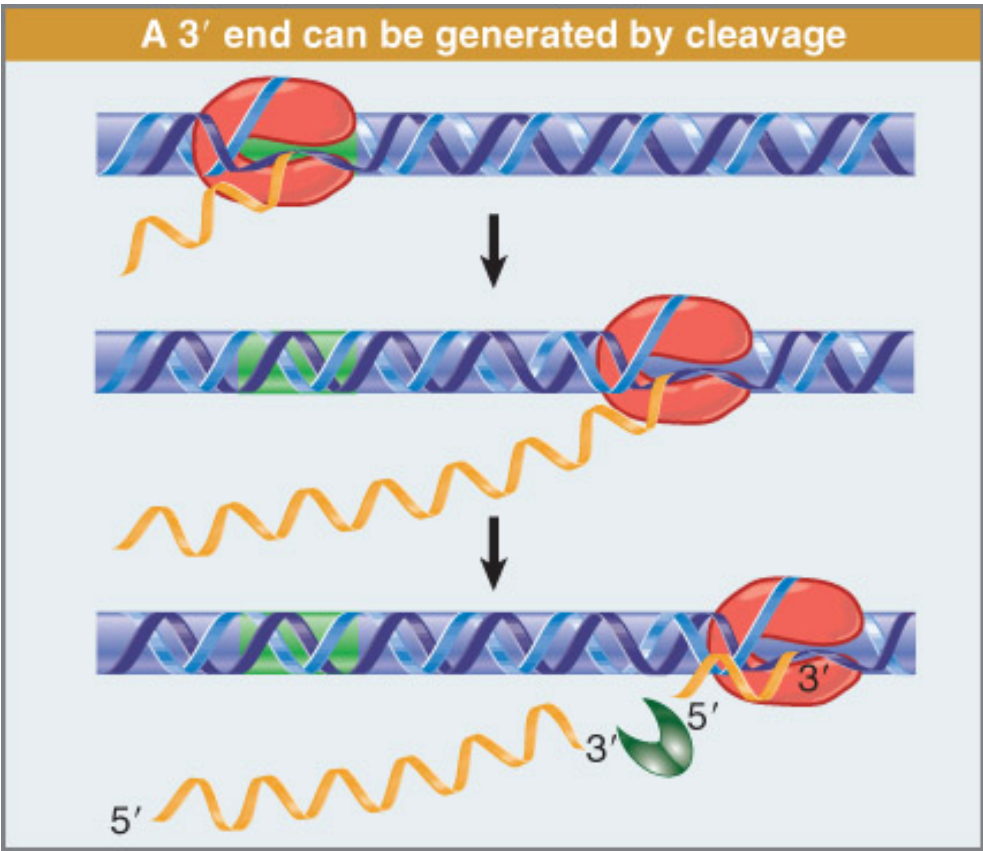
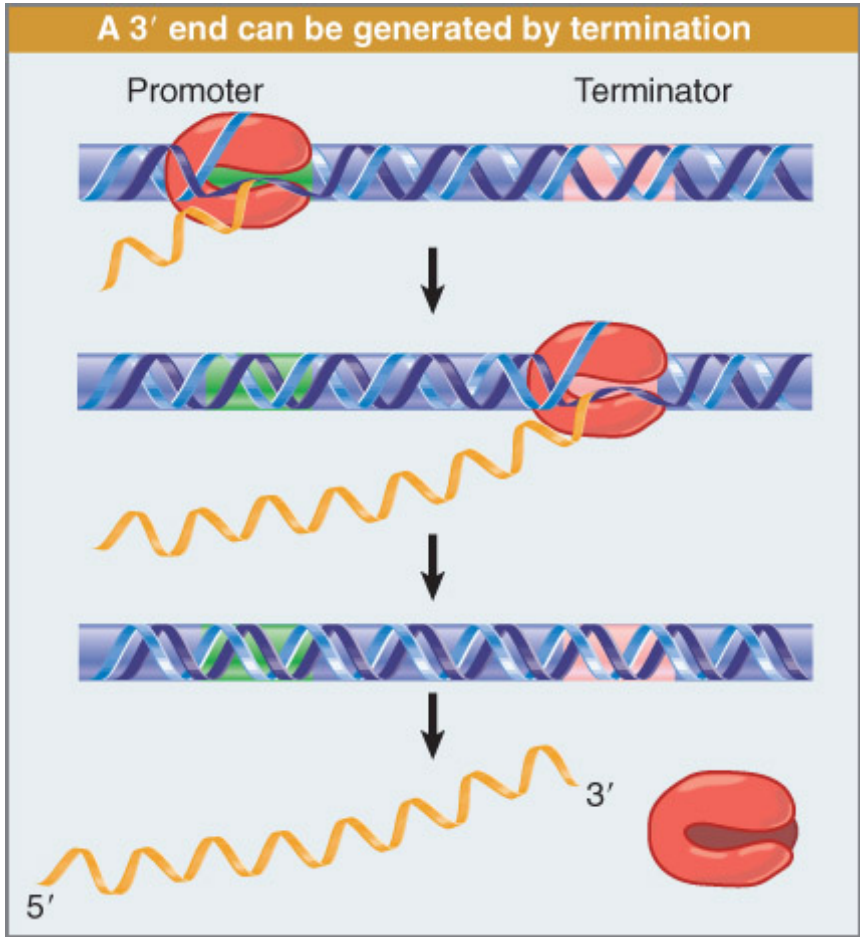
Recentment s'ha identificat un mòdul d'interacció binari format per TNDs (TFIIS N-terminal domains) i TIMs (motius desestructurats d'interacció amb TND). Aquest mòdul està molt conservat en la maquinària d'elongació i els complexos que s'hi associen (TFIIS, mediador, IWS1, SPT6...) i és necessari i suficient per a determinar una colocalització forta i específica en l'entorn nuclear. Aquestes interaccions són tan rellevants que la disrupció d'un TIM en IWS1 provoca canvis molt importants en l'expressió gènica i en la dinàmica d'elongació de l'RNAP2



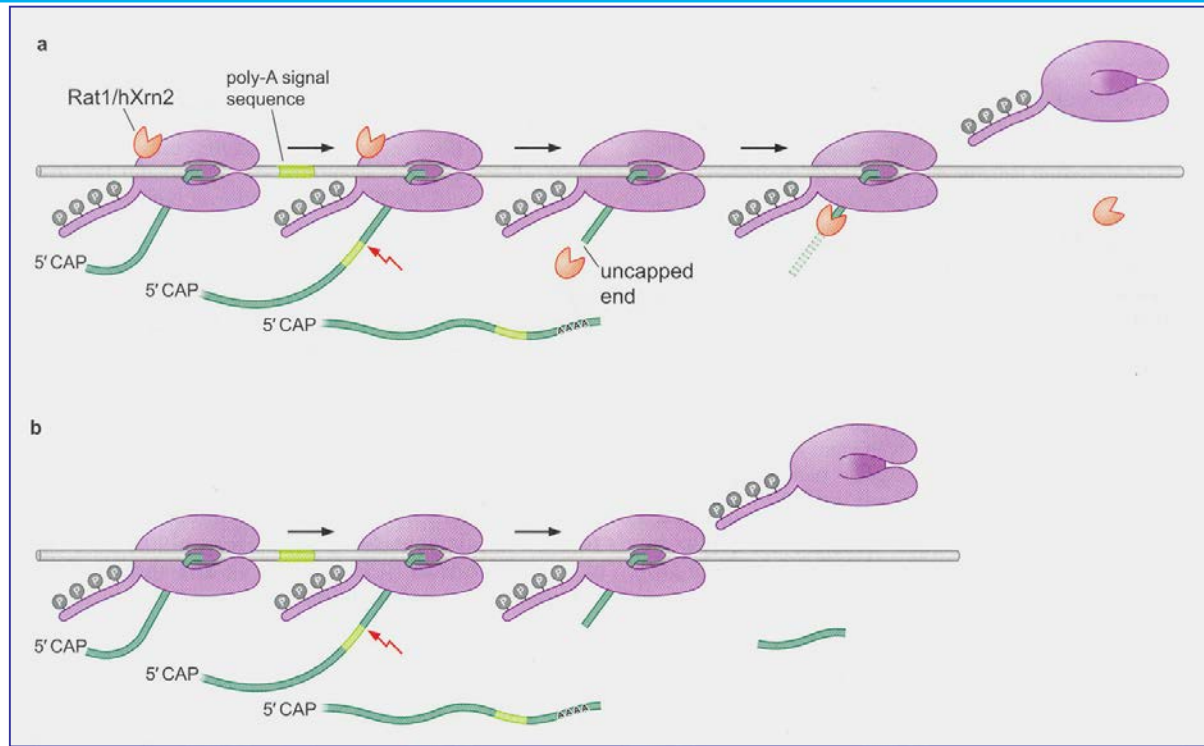
- TFIIS N-terminal domain (TND)
- TND-interacting motif (TIM)
- TND-TIM mediated interaction
- Novel contacts linking elongation complexes

Cermakova i al.,
Science 374, 1113–1121 (2021)

Terminació de la transcripció



Terminació de la transcripció: RNA pol II

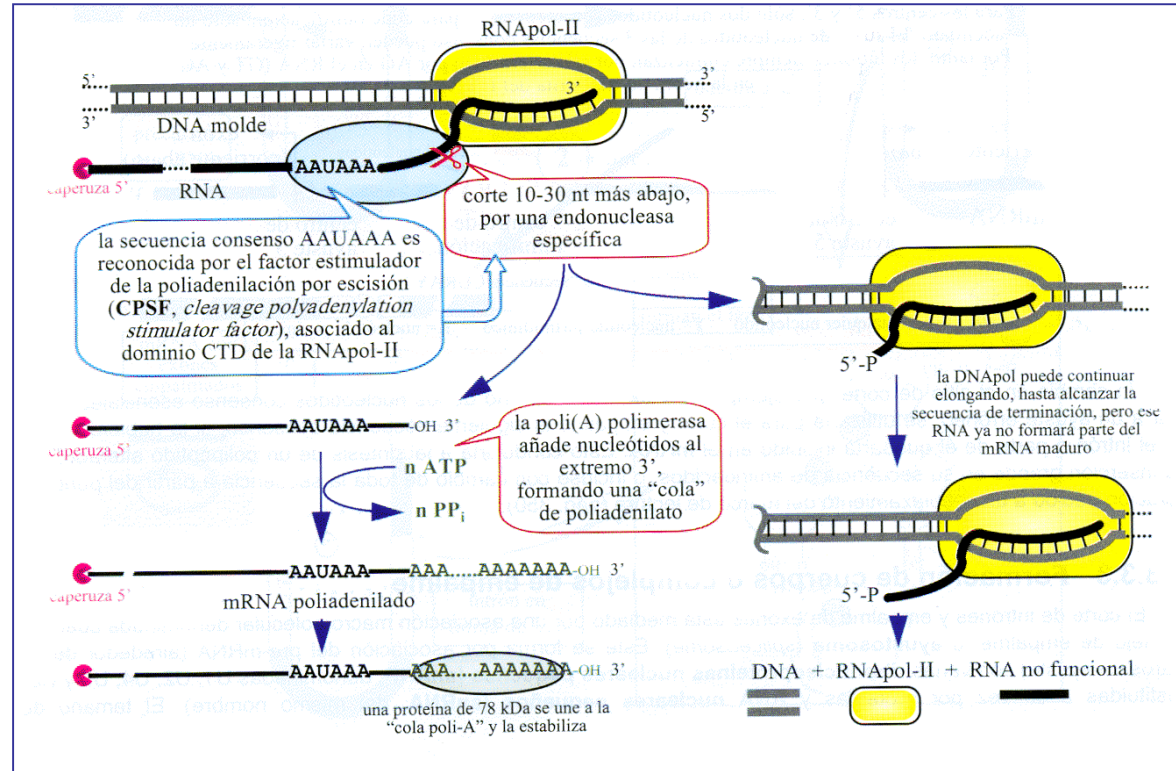
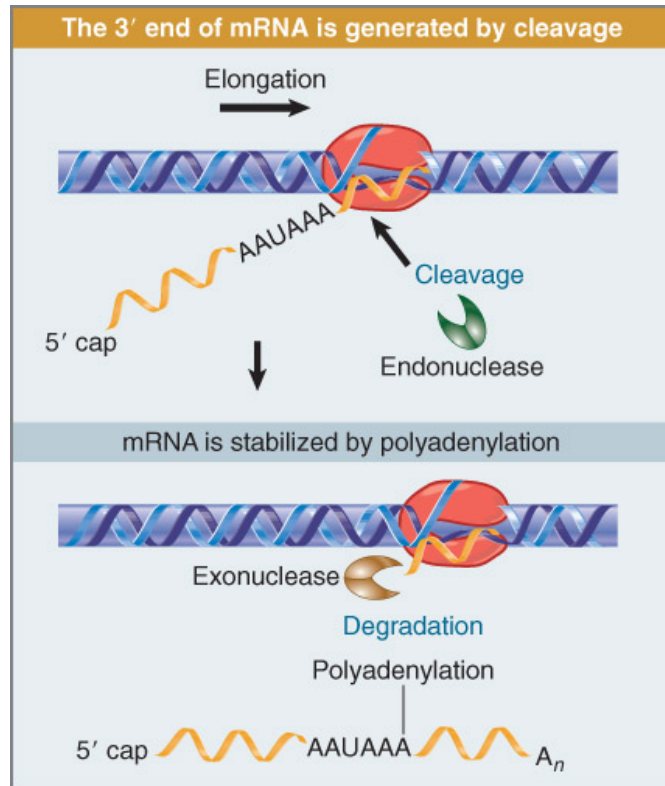


Està associada al procés de tall i poliadenilació. S'han proposat dos models per tal d'explicar aquesta connexió.

FIGURE 12-25 Models of termination: Torpedo and allosteric. As described in the text, there are two proposed models for how transcription by eukaryotic RNA Pol II terminates after transcribing a gene. In the figure, the poly-A site is marked by the light green stretch in the DNA and is located just downstream from the gene. It is also light green in the transcript. The dotted green line indicates degraded transcript. (a) In the torpedo model, RNA transcribed downstream from the poly-A site is attacked by the 5' to 3' RNase (the torpedo), which is loaded onto this transcript from polymerase itself. When this exonuclease catches up with polymerase, it triggers dissociation from the DNA template and termination of transcription. (b) In the allosteric model, the polymerase is highly processive within the gene, and then, once the poly-A signal is passed, becomes less processive. This alteration could be due to a modification or a conformational change. Even in the allosteric model, the second RNA would be degraded by the RNase, but that would not be the cause of termination. In this case, RNA degradation is not shown in the figure to emphasize the different mechanisms of termination in these two models. (Adapted, with permission, from Luo W. and Bentley D. 2004. *Cell* 119: 911–914, Fig. 1. © Elsevier.)

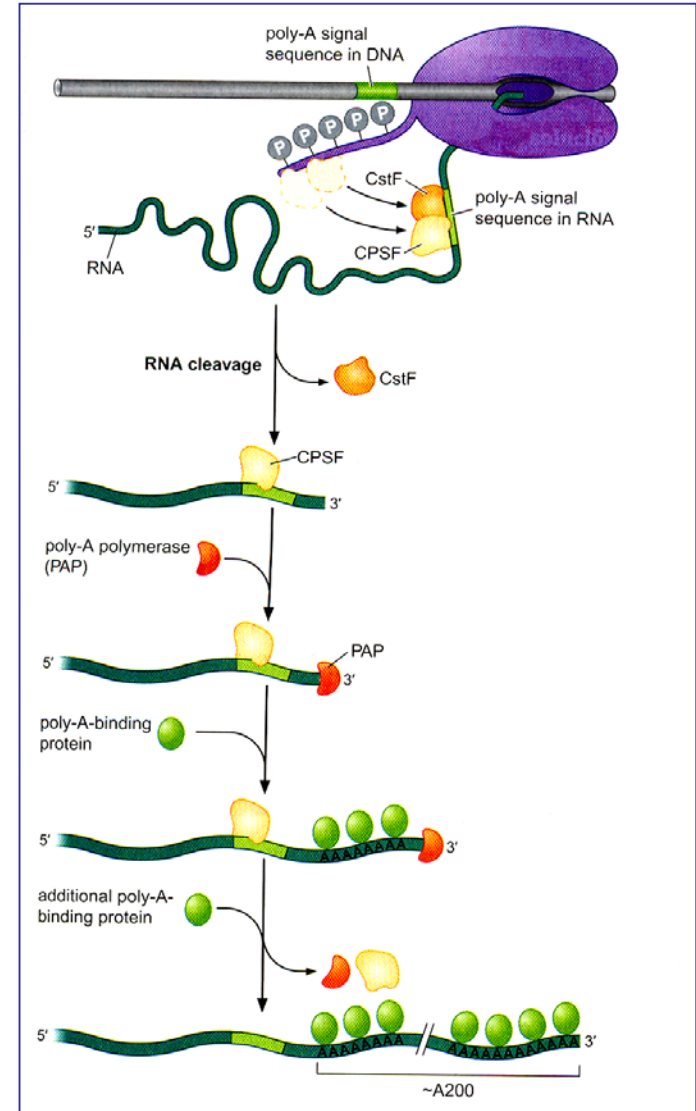
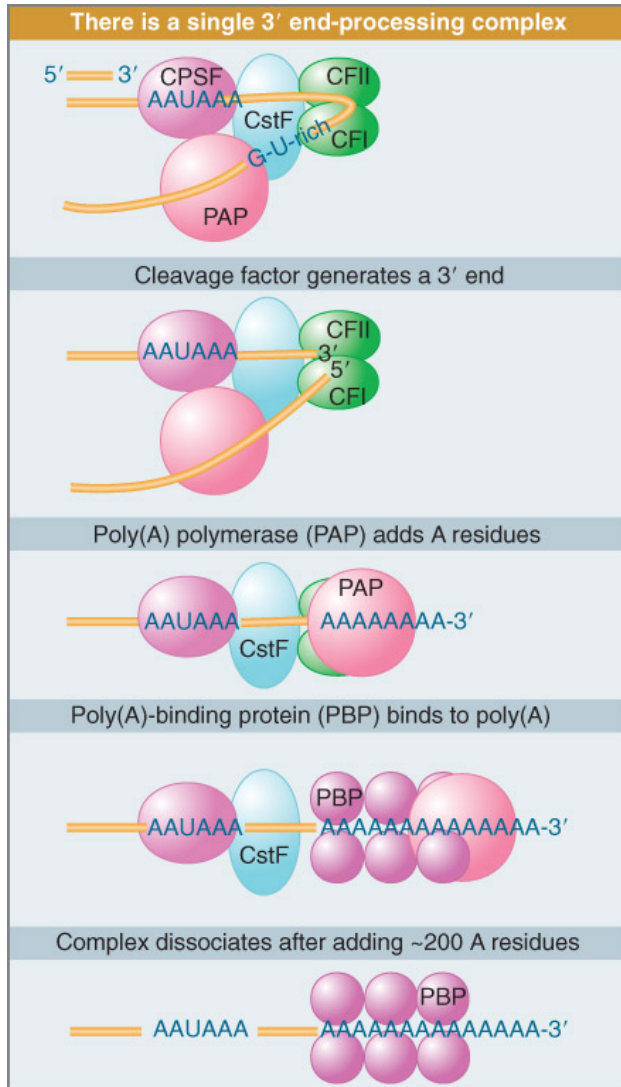
Terminació de la transcripció: RNA pol II

Tall i poliadenilació de l'mRNA

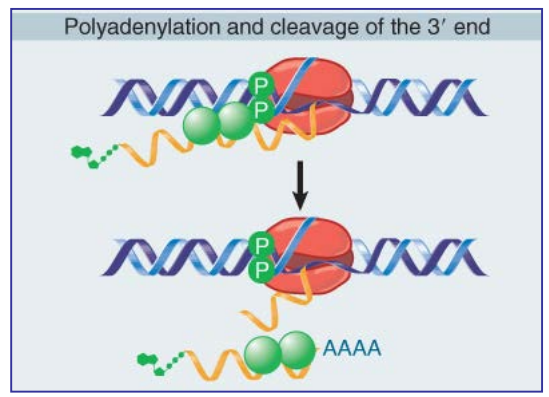
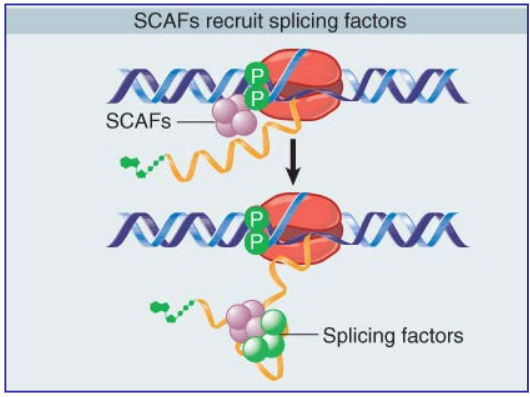
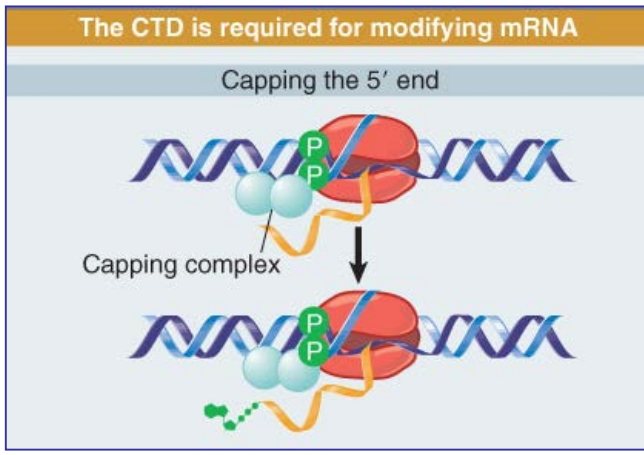
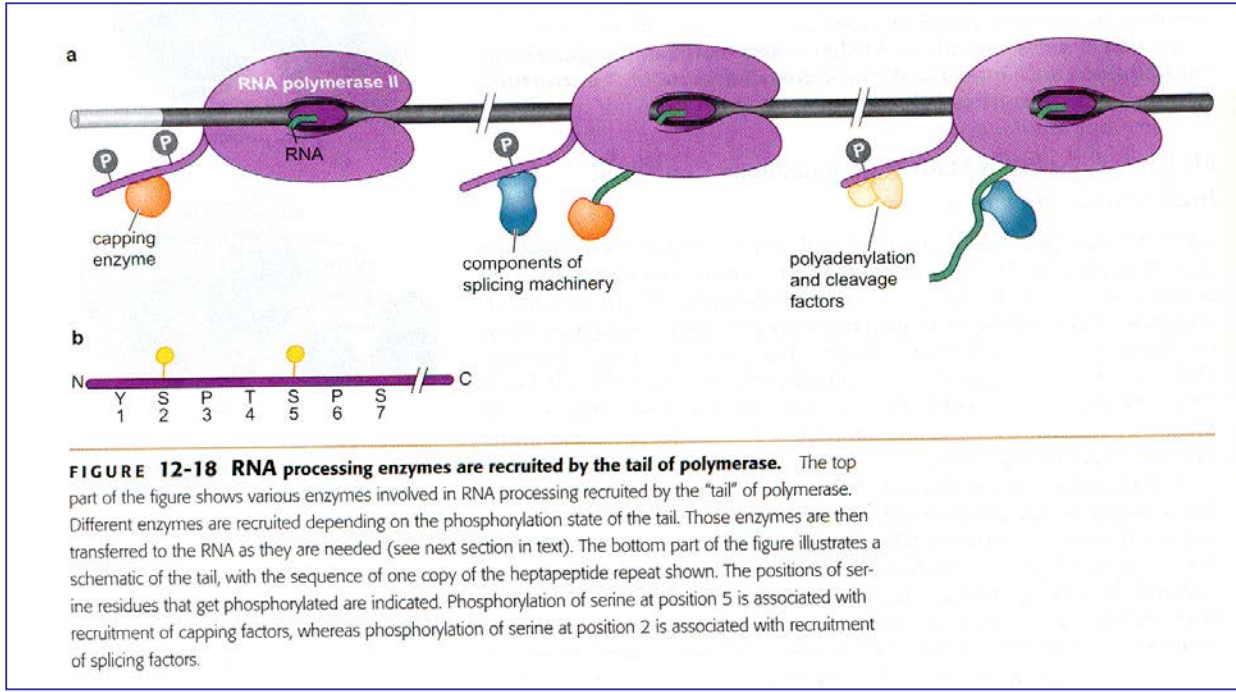


Terminació de la transcripció: RNA pol II

Tall i poliadenilació de l'mRNA

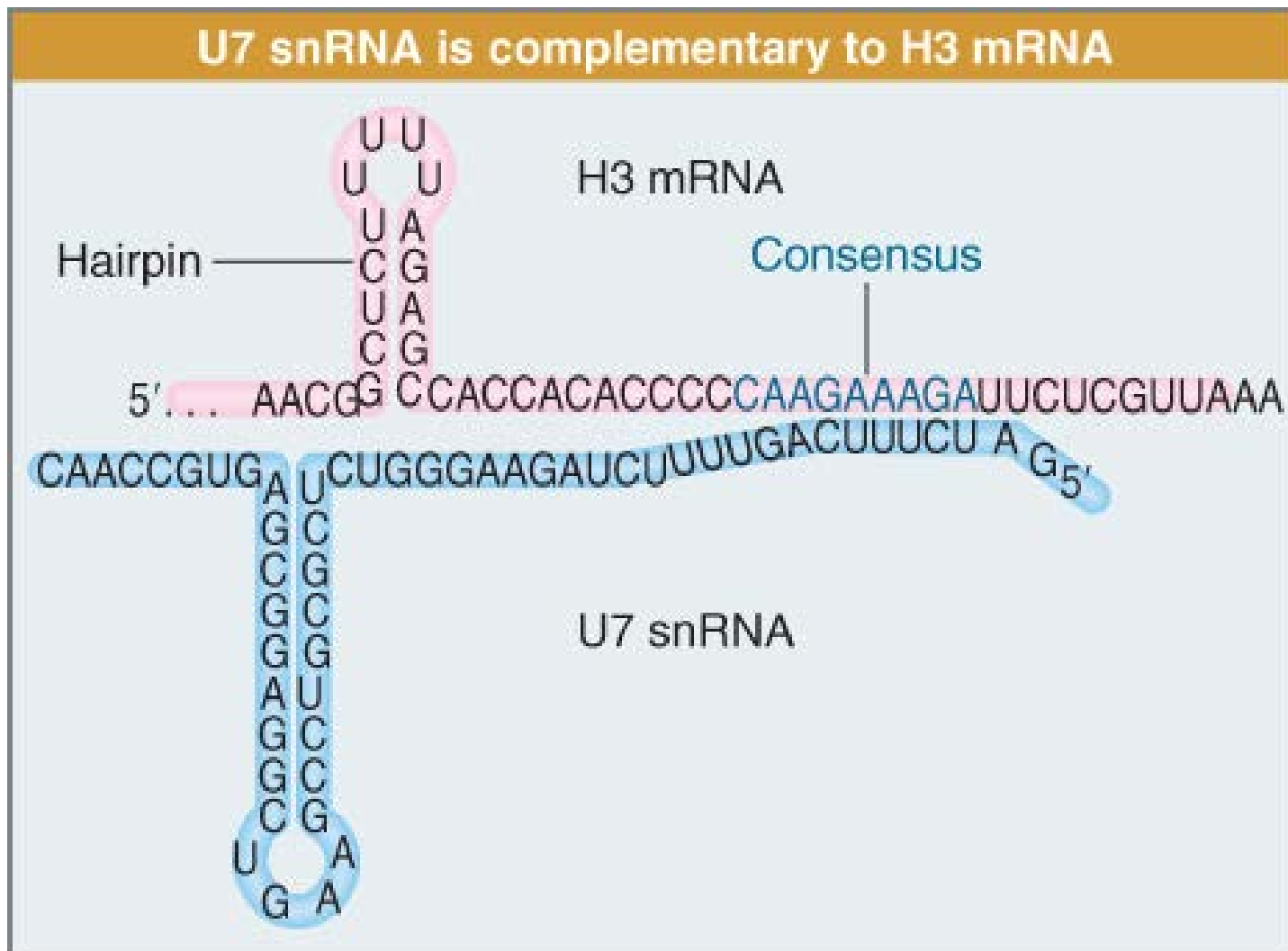


Tall i poliadenilació de l'mRNA



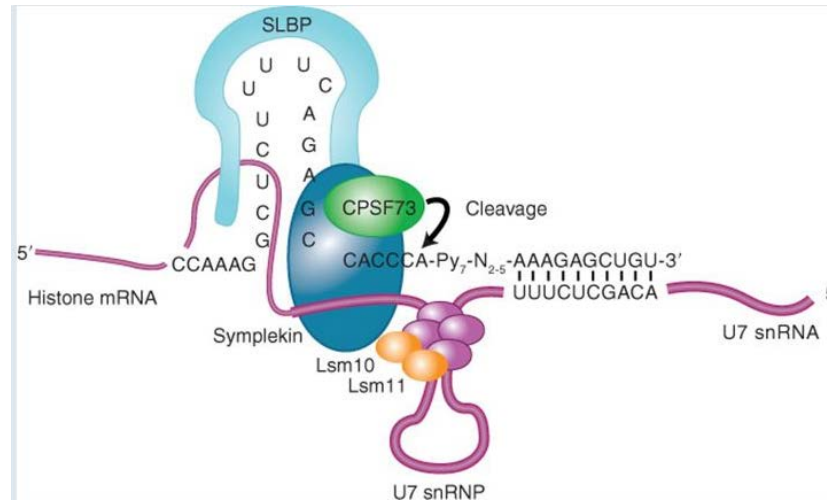
Terminació de la transcripció: RNA pol II

Formació de
l'extrem 3'
dels mRNAs
de les
histones en
eucariotes
superiors

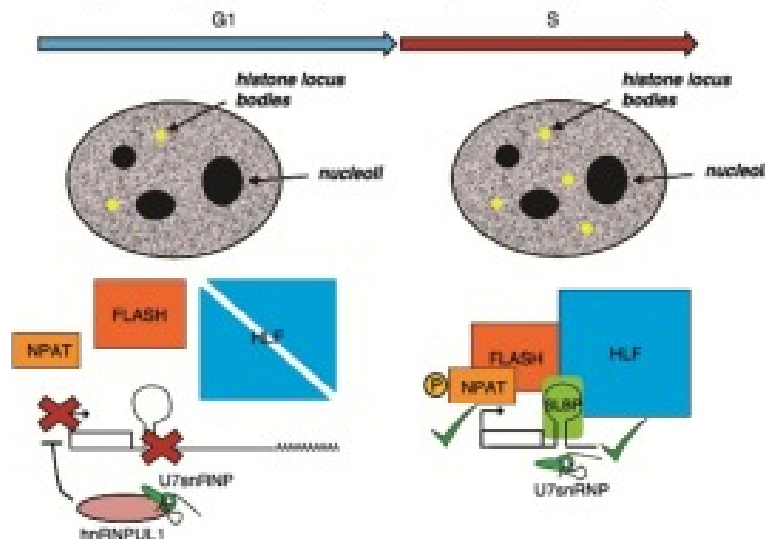


Terminació de la transcripció: RNA pol II

Formació de l'extrem 3' dels mRNAs de les histones en eucariotes superiors



Cell cycle regulation of replication-dependent histone genes

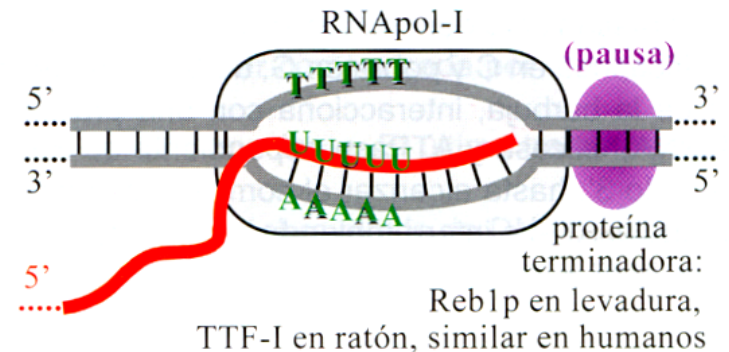


Terminació de la transcripció: RNA pol I

Llevat

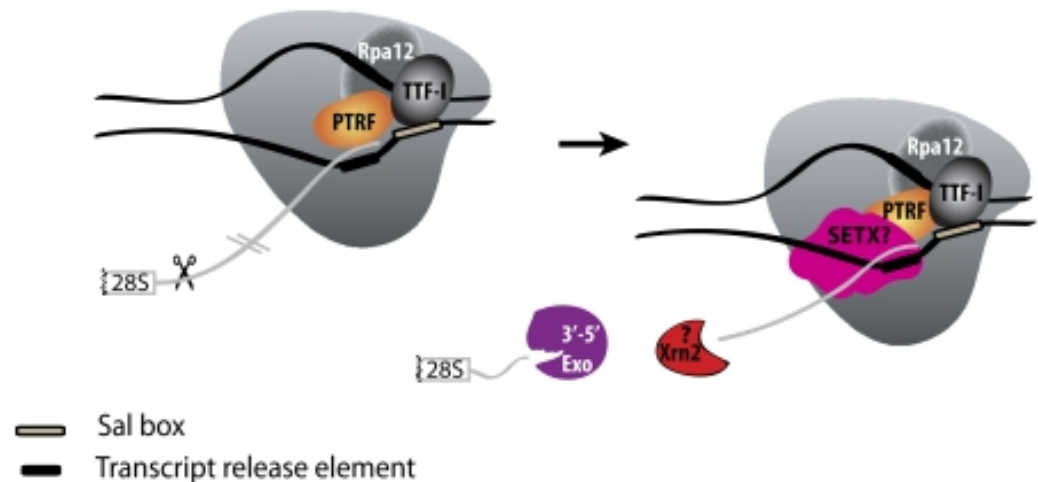
Terminació de RNAPol-I en eucariotes:
mecanismo similar a la terminació intrínseca de procariontes.

- Una “proteína de pausa” o “proteína terminadora” se une a secuencias específicas del DNA y detiene el avance de la RNAPol.
- Una vez detenida la polimerasa, la presencia de una región rica en T en la hebra no-molde facilita la separación del RNA.
- No hay región palindrómica.



Eucariotes superiors

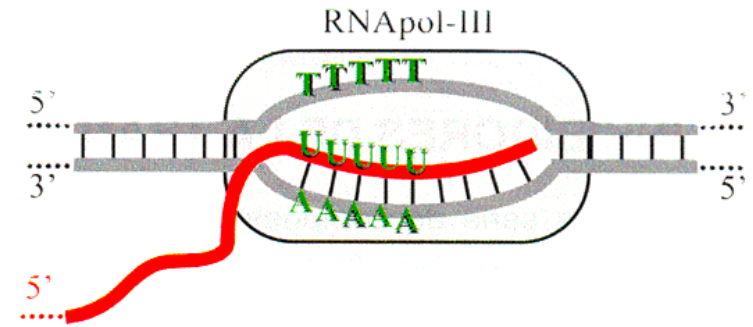
Les caixes Sal, elements terminadors que presenten algunes repeticions, són reconegudes per un factor d'acabament de la transcripció específic de l'RNA polimerasa I (TTF1), la qual cosa determina la terminació de la transcripció.



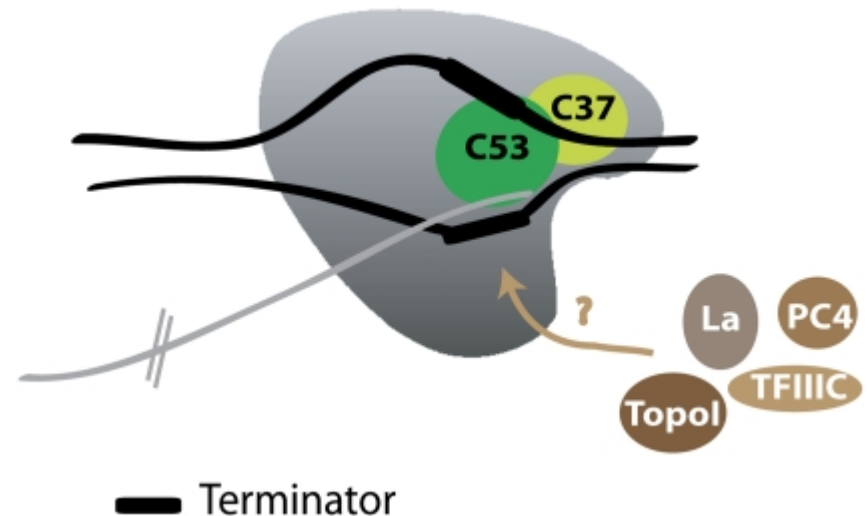
Terminació de la transcripció: RNA pol III

Terminació de RNAPol-III en eucariotes:
mecanisme similar a la terminació intrínseca de procariotes.

- La RNAPol se detiene en secuencias específicas del DNA (no se han encontrado proteínas terminadoras).
- Una vez detenida la polimerasa, la presencia de una región rica en T en la hebra no-molde facilita la separación del RNA.
- No hay región palindrómica



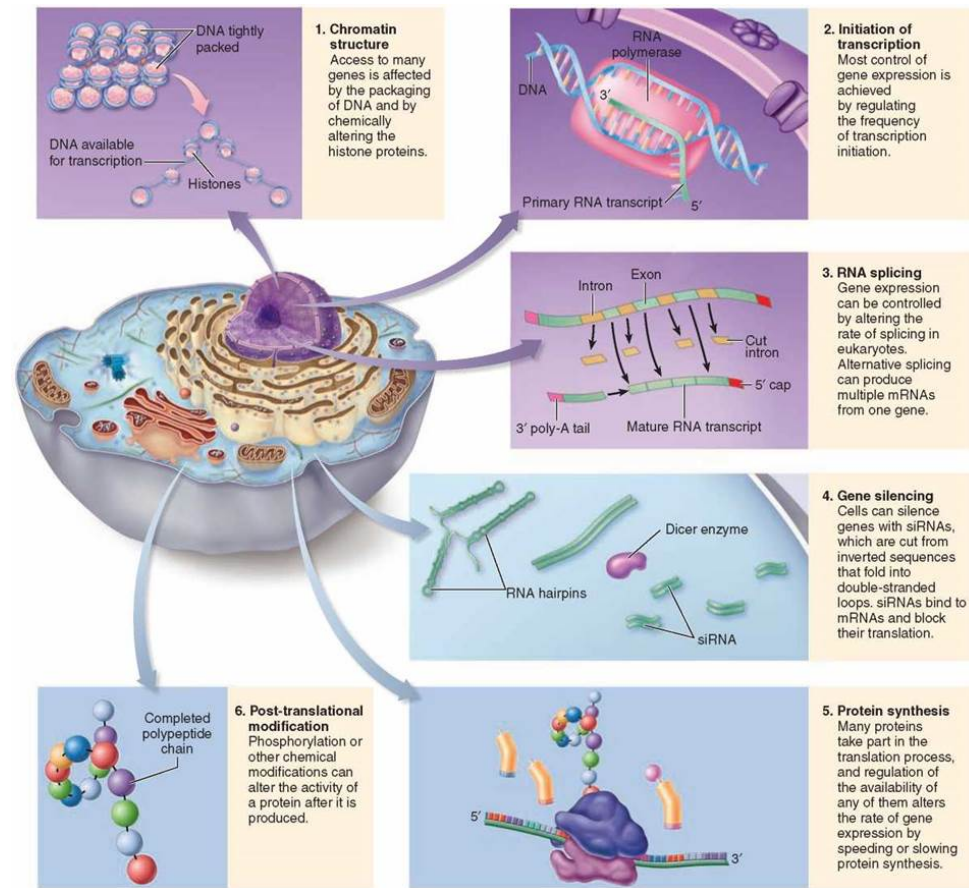
L'eficiència i el lloc d'acabament depenen del senyal format per alguns nucleòtids de timina seguits. La terminació completa requereix un senyal de 6T (Gao i al., 2018).



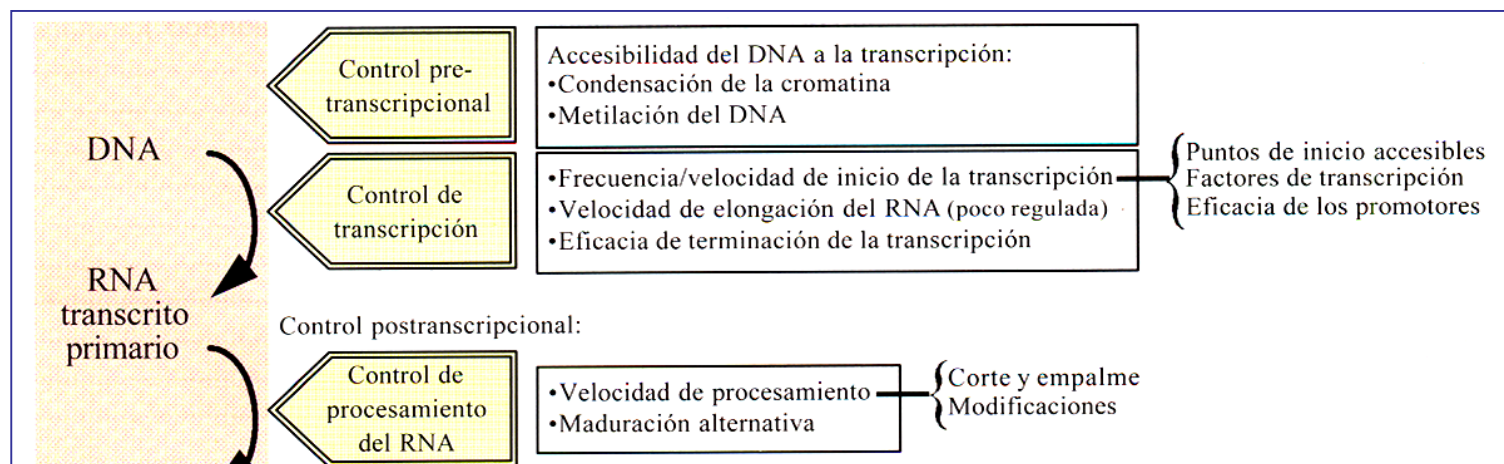
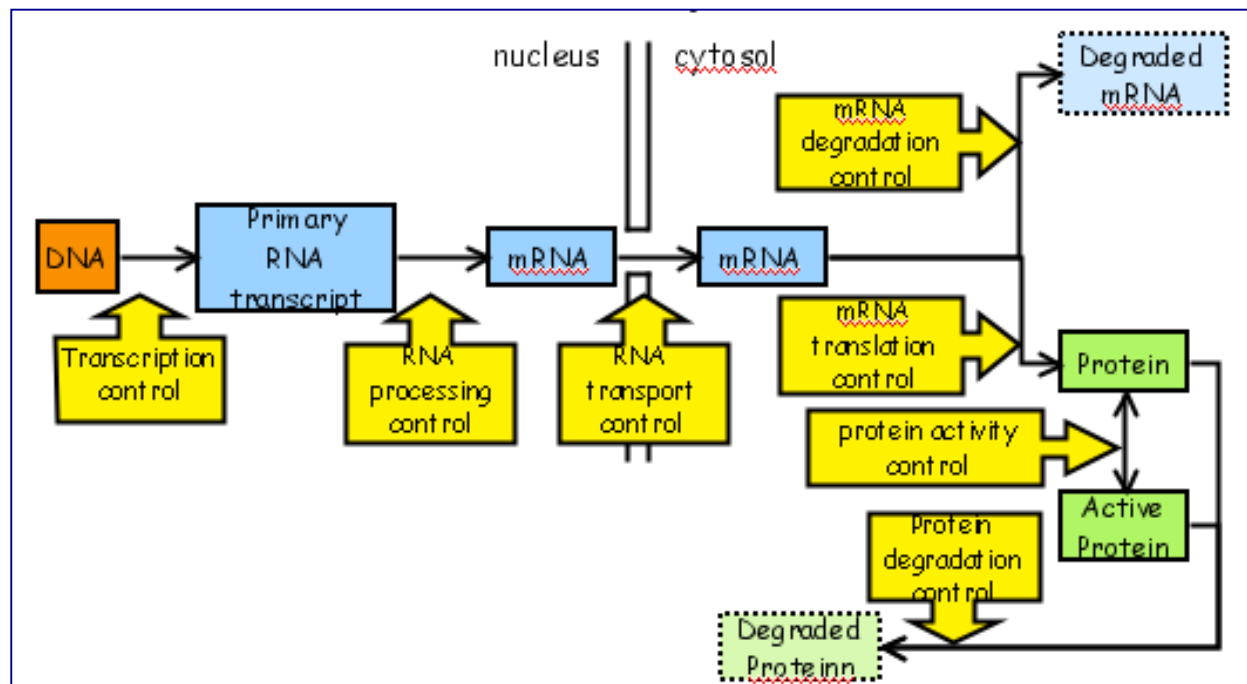
— Terminator

Tema 6

Regulació de la transcripció en eucariotes.
 Nivells de regulació; diferències amb la transcripció en procariotes. Concepte de cromatina activa i inactiva.
 Mecanismes de regulació relacionats amb l'estructura de la cromatina.
 Regulació *cis/trans*: alguns casos particulars.
 Regulació de l'expressió gènica per RNAs.



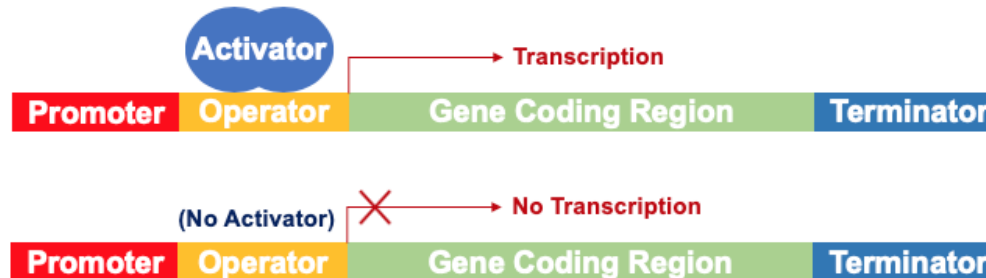
Nivells de regulació de l'expressió gènica en eucariotes



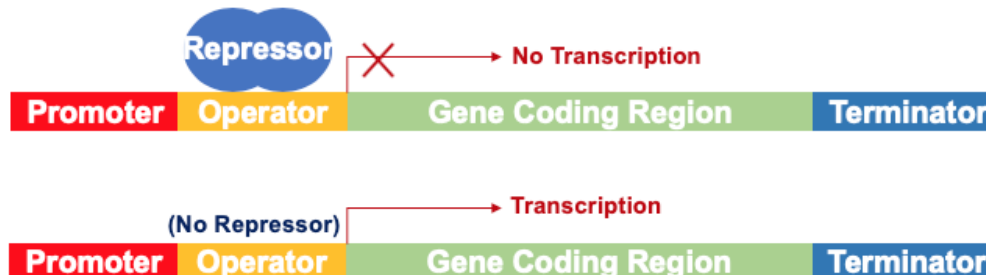
Regulació de la transcripció en procariotes

- Unicel·lulars; creixen i es divideixen ràpidament; han de respondre aviat a canvis en l'entorn.
- Regulació ràpida (flexible i reversible); ajusten els nivells d'enzims (per síntesi o degradació)

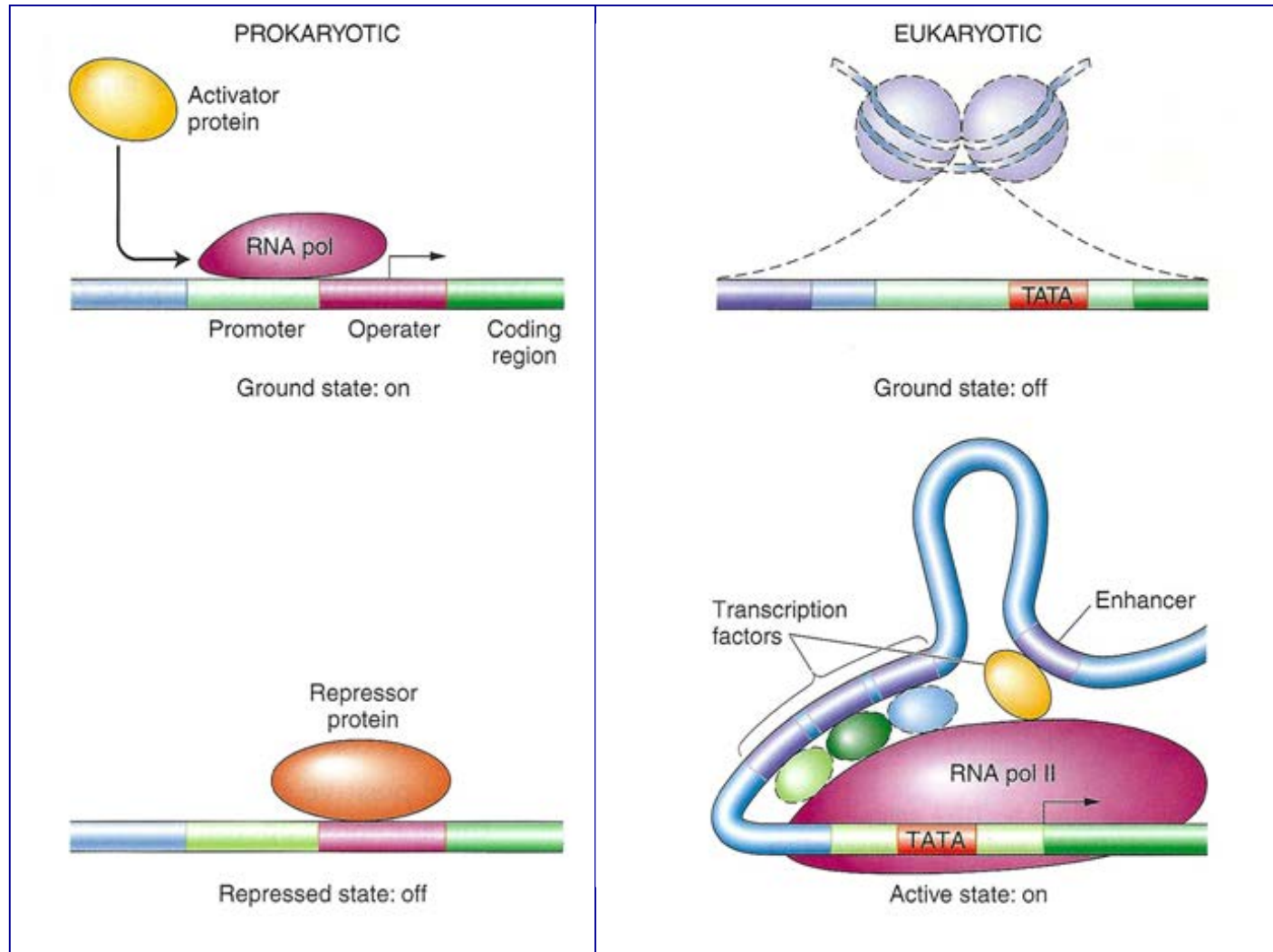
Positive Regulation



Negative Regulation

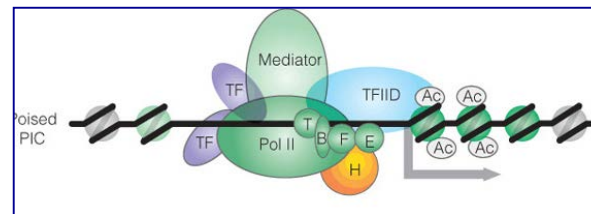
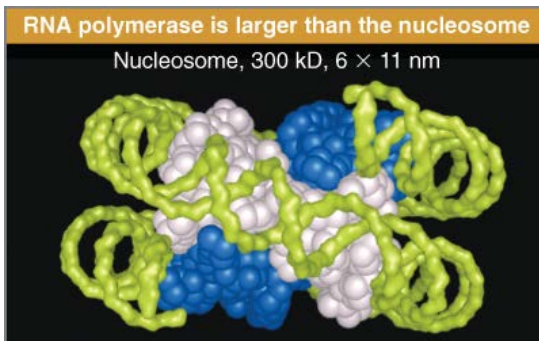
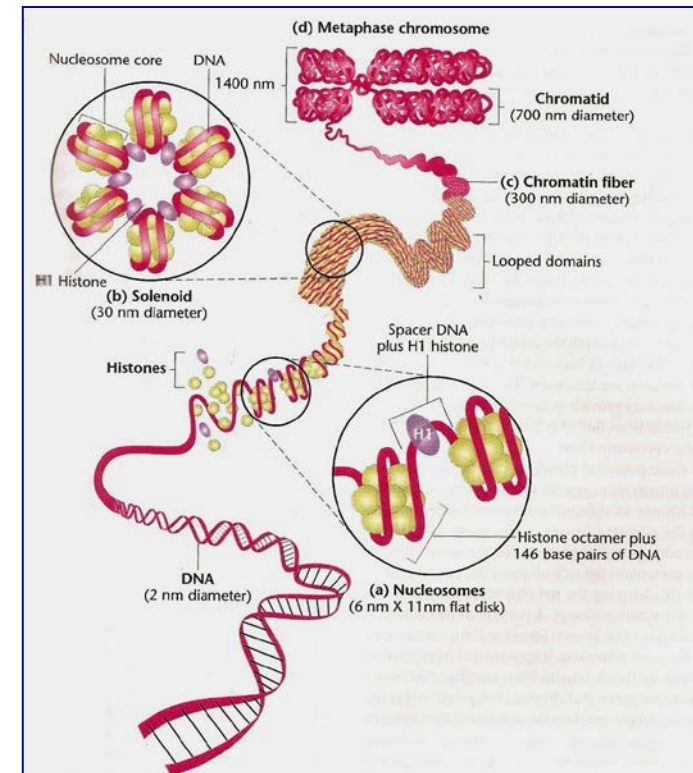


Regulació de la transcripció: Procariotes *vs.* eucariotes



Regulació de la transcripció en eucariotes

- En molts casos es tracta d'organismes multicel·lulars que experimenten processos irreversibles de desenvolupament i especialització que estan curiosament regulats
- Participació de mecanismes relacionats amb l'estructura de la cromatina
- Regulació fonamentalment positiva

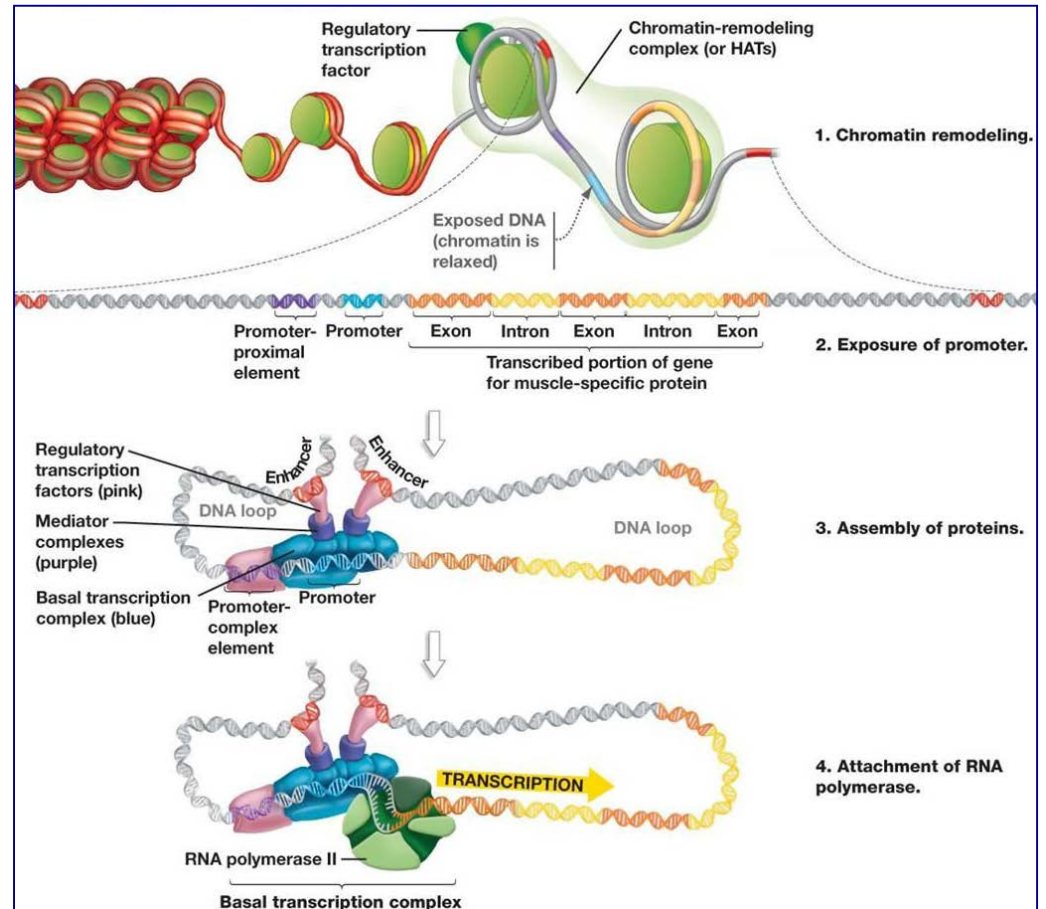
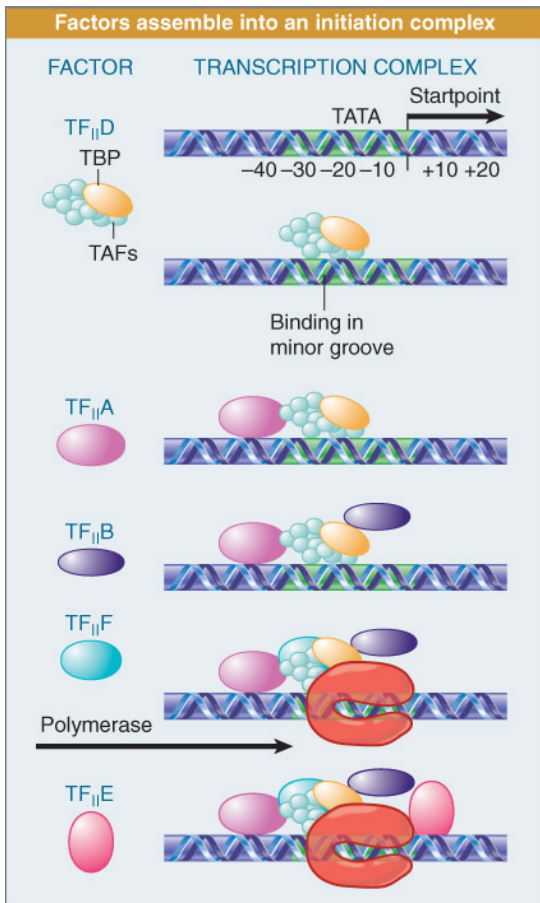


Schematic view of a transcription preinitiation complex.

Reproduced from *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44:117–141, B. J. Venters and B. F. Pugh, How eukaryotic genes are transcribed. © 2009 Informa Healthcare.

Regulació de la transcripció en eucariotes

S'exerceix sobretot a través del control de l'accés de l'RNA polimerasa al promotor (factors trans i estructura de cromatina)



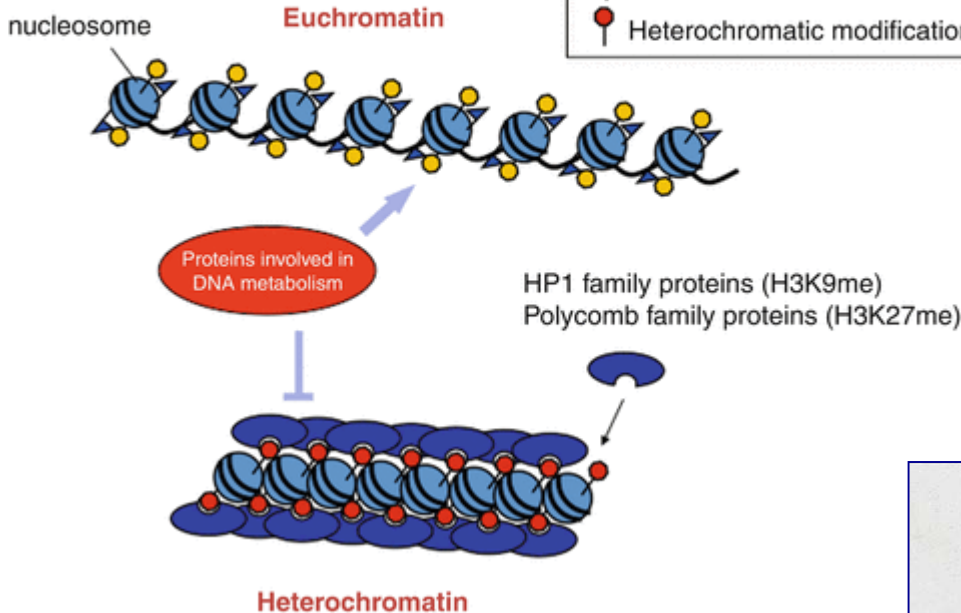
Cromatina activa i inactiva

Histone modifications

▲ Acetyl group

● Euchromatic modifications

● Heterochromatic modifications



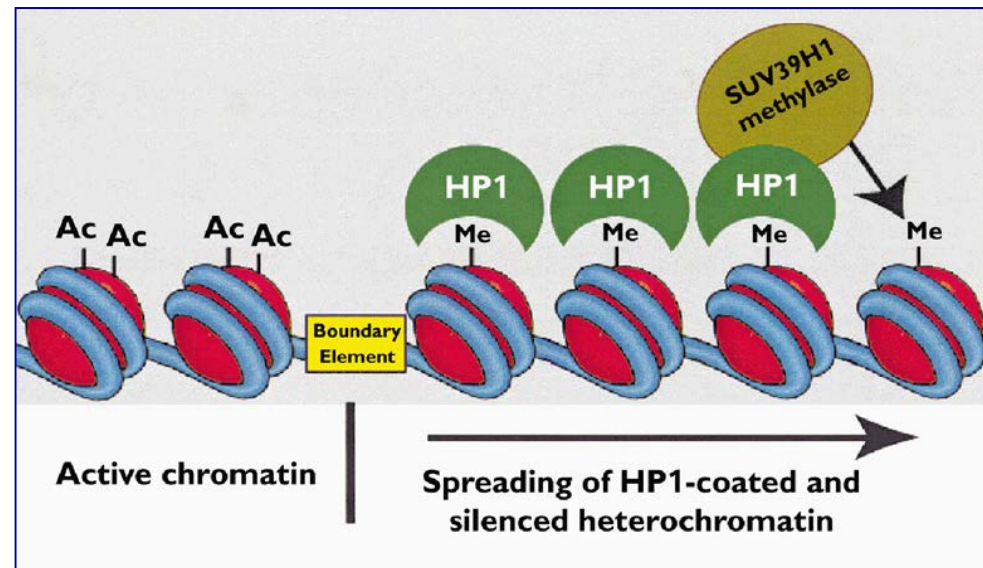
Eucromatina

Menor condensació
Gens que poden expressar-se
Acetilació d'histones*
Hipometilació d'histones i DNA

*segons la posició (vegeu més endavant)

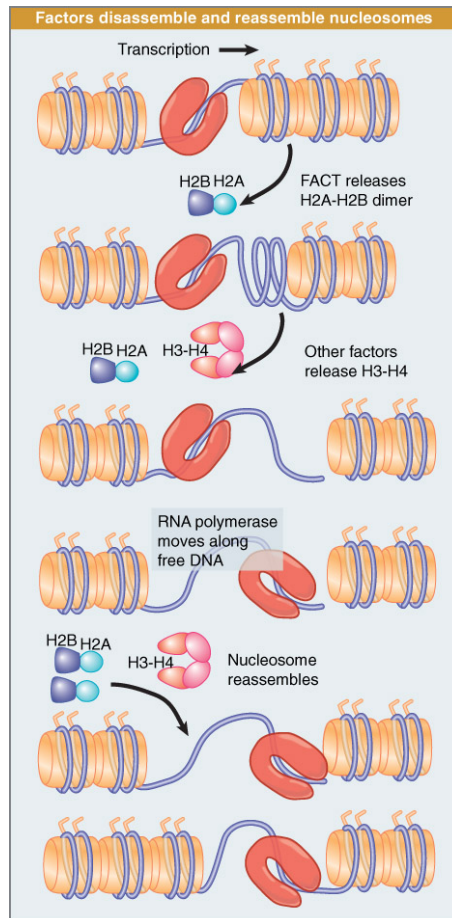
Heterocromatina

Major condensació
Gens no expressats
No acetilació d'histones
Metilació d'histones* i DNA

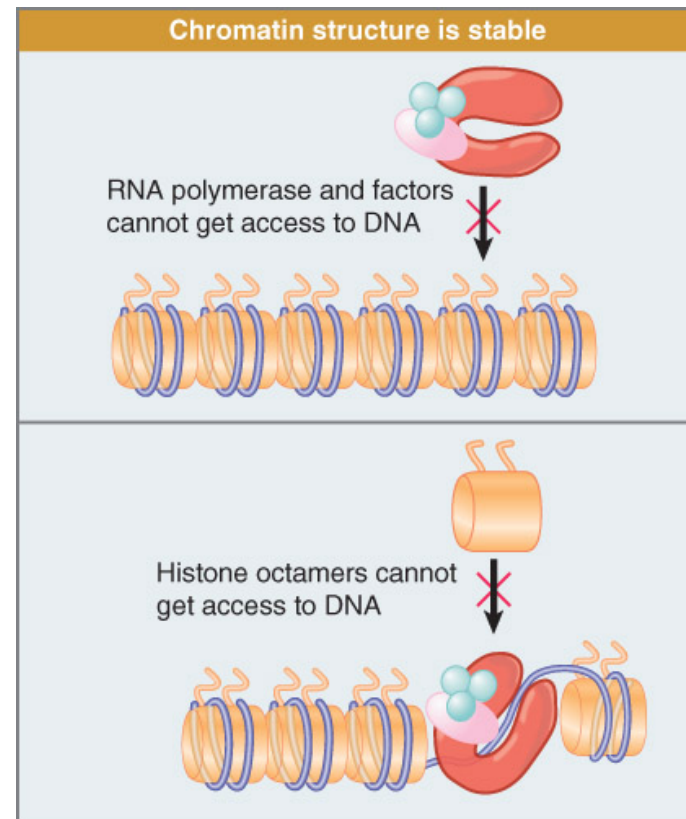


Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

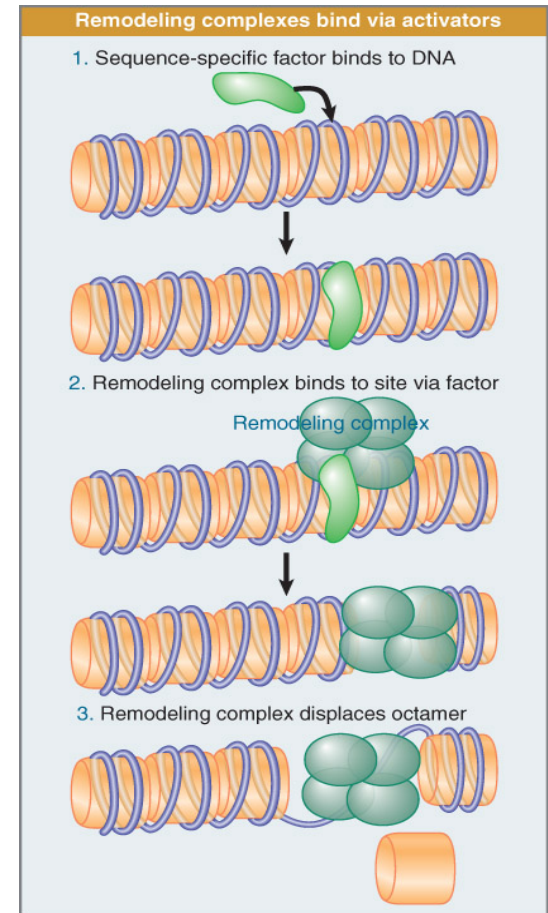
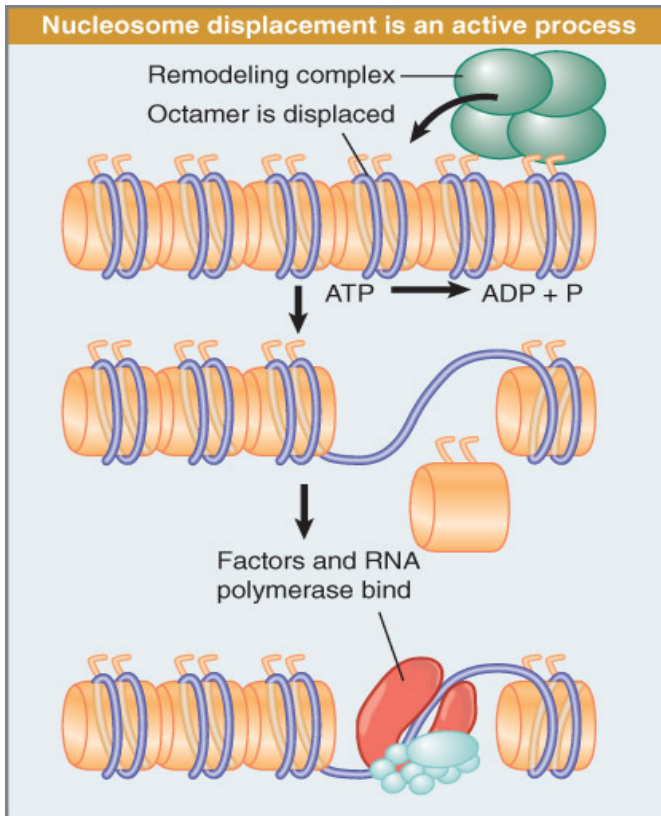
L'expressió d'un gen requereix canvis en l'estructura de la cromatina al llarg de la regió codificant



L'activació d'un gen exigeix canvis en l'estructura de la cromatina al nivell del promotor, que afecten els nucleosomes

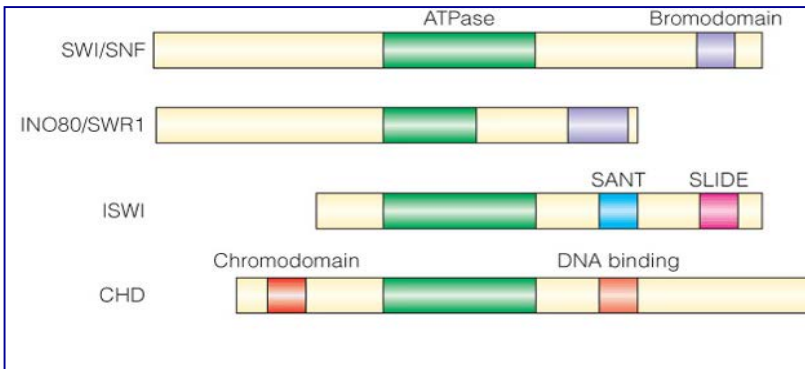


Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: remodelació de la cromatina

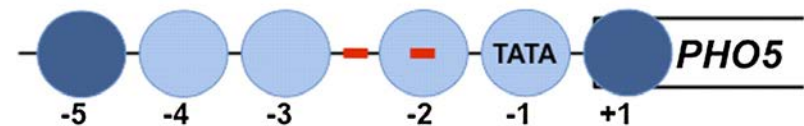


Els activadors de la transcripció alliberen la repressió deguda a l'estructura de la cromatina

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: remodelació de la cromatina



repressed

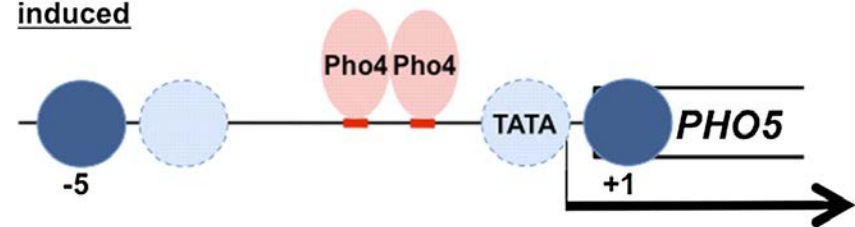


NuA4, Swi/Snf, Ino80,
Gcn5, Rtt109, Asf1

↓

↑ Spt6

induced

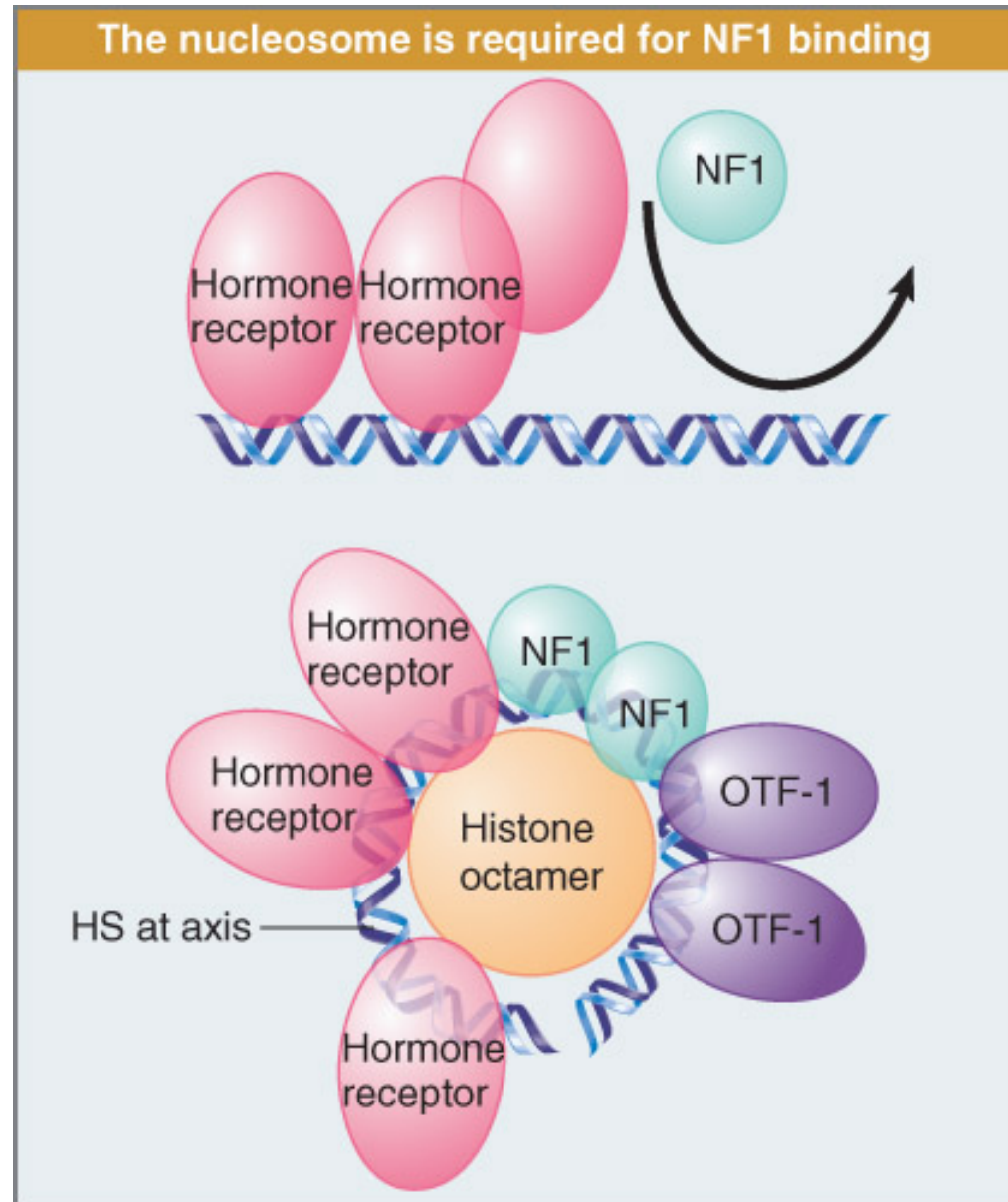


Oliver J Rando, Fred Winston (2012),
Chromatin and Transcription in
Yeast, *Genetics*, 190, 351-387.
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.132266>

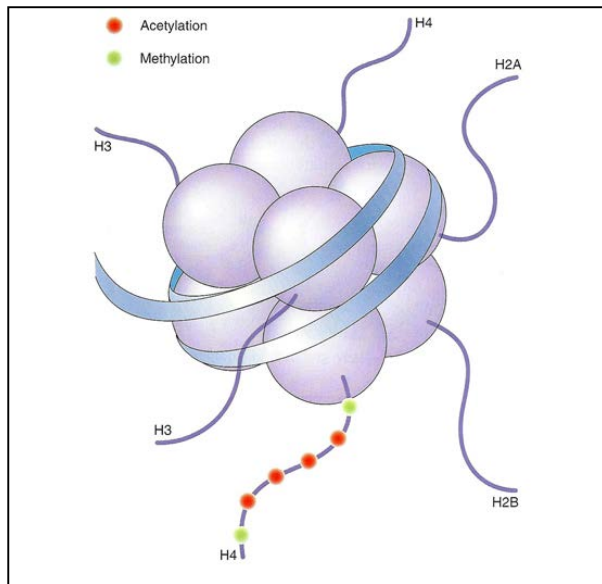
Regulation of the *PHO5* gene. Shown are diagrams of *PHO5* when repressed (top) and induced (bottom). In the repressed state (high phosphate), four nucleosomes (-4 to -1, shown in light blue) span the *PHO5* regulatory region, including nucleosome -2, which blocks one of the Pho4-binding sites (red line). Several factors, shown on the left, are required for *PHO5* induction, which results in loss of nucleosomes over the *PHO5* regulatory region, the binding of Pho4, and activation of transcription. The dotted lines around nucleosomes -4 and -1 indicate a more variable degree of loss. Upon addition of phosphate, the nucleosomes reassemble in the *PHO5* regulatory region in an Spt6-dependent fashion, resulting in transcriptional repression.

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

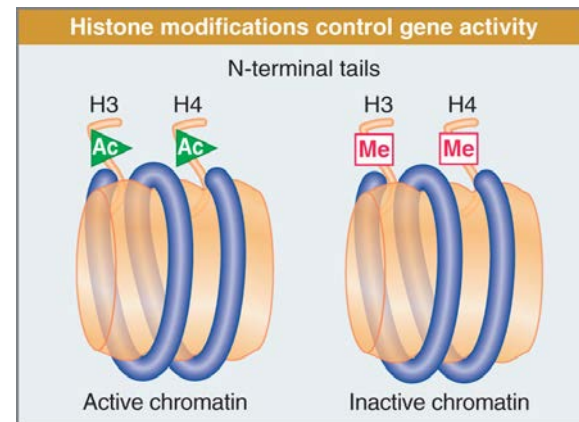
En alguns casos els nucleosomes són necessaris per a la unió de factors transcripcionals



Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones



La cua de les histones es pot modificar

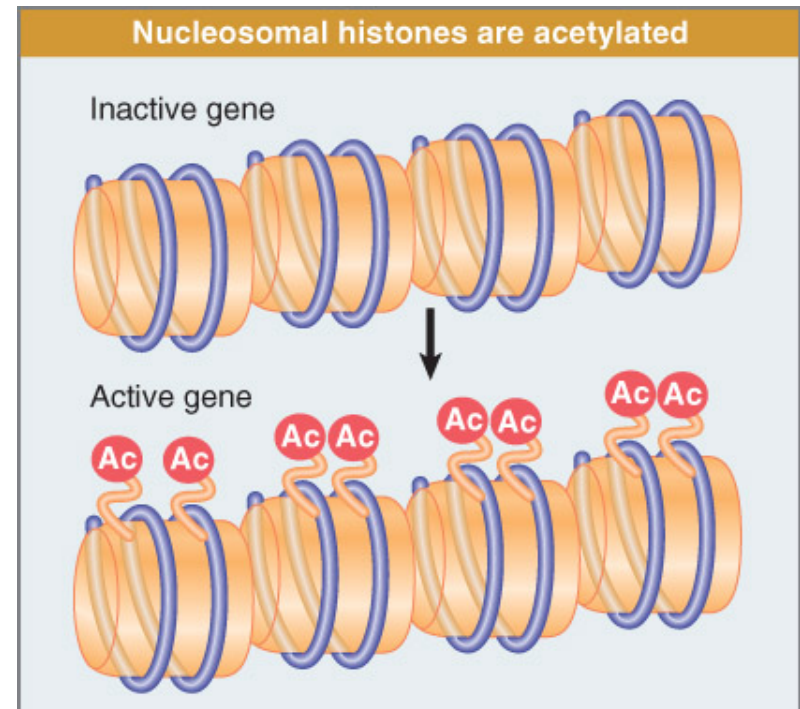


Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

Histone modification affects the structure and function of chromatin

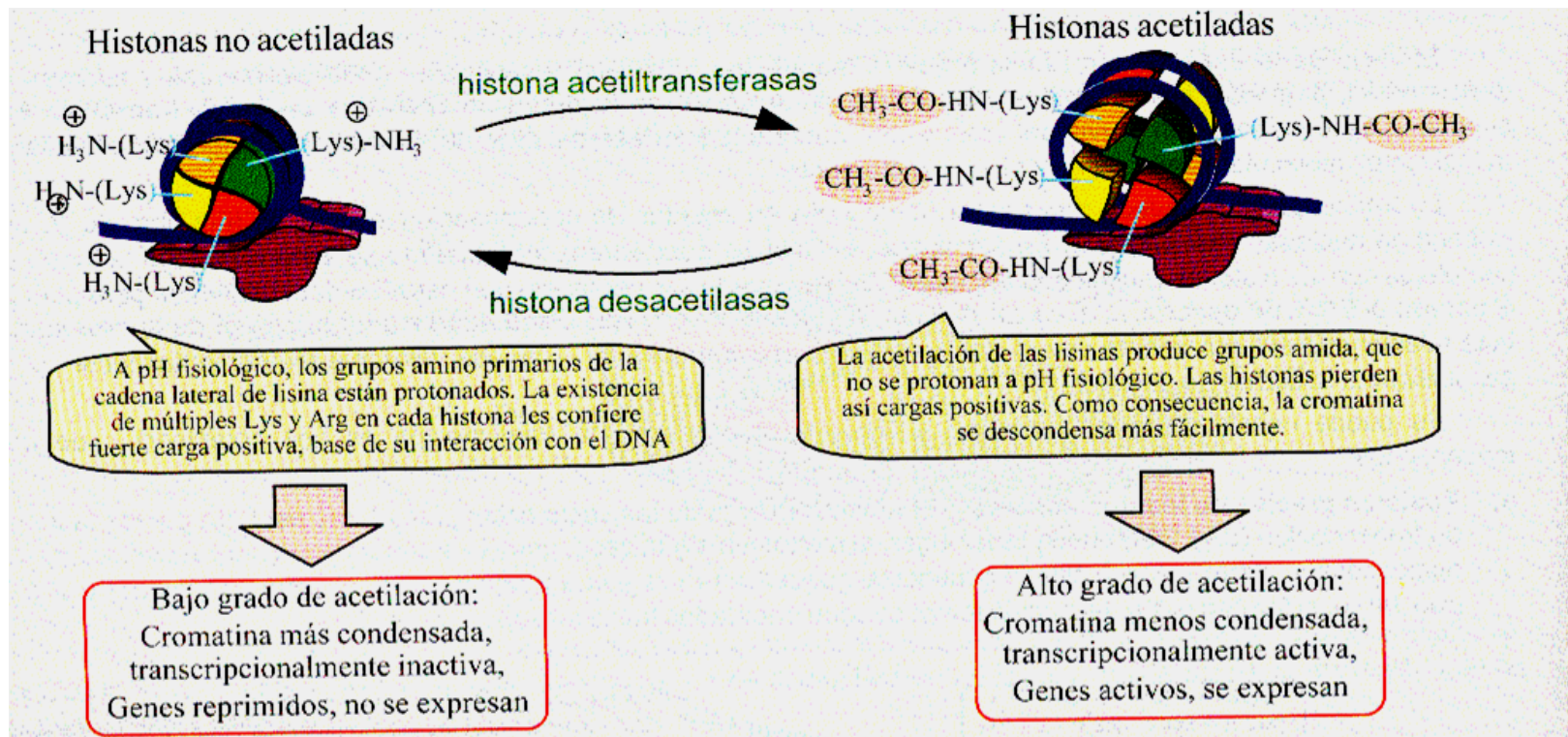
Histone	Site	Modification	Function
H3	Lys-4	Methylation	Activation
H3	Lys-9	Methylation	Chromatin condensation
	Lys-9	Methylation	Required for DNA methylation
	Lys-9	Acetylation	Activation
H3	Ser-10	Phosphorylation	Activation
H3	Lys-14	Acetylation	Prevents methylation at Lys-9
H3	Lys-79	Methylation	Telomeric silencing
H4	Arg-3	Methylation	
H4	Lys-5	Acetylation	Assembly
H4	Lys-12	Acetylation	Assembly
H4	Lys-16	Acetylation	Nucleosome assembly
	Lys-16	Acetylation	Fly X activation

Acetilació



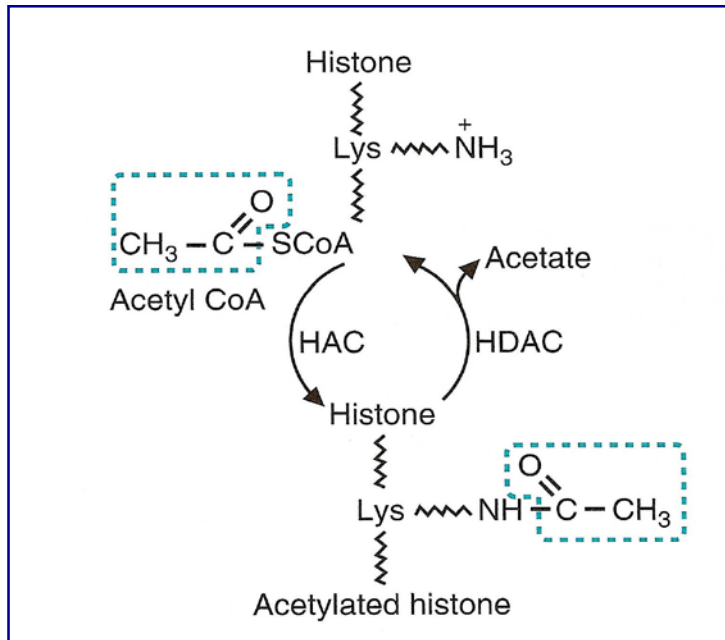
Mecanismos de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

Acetilació

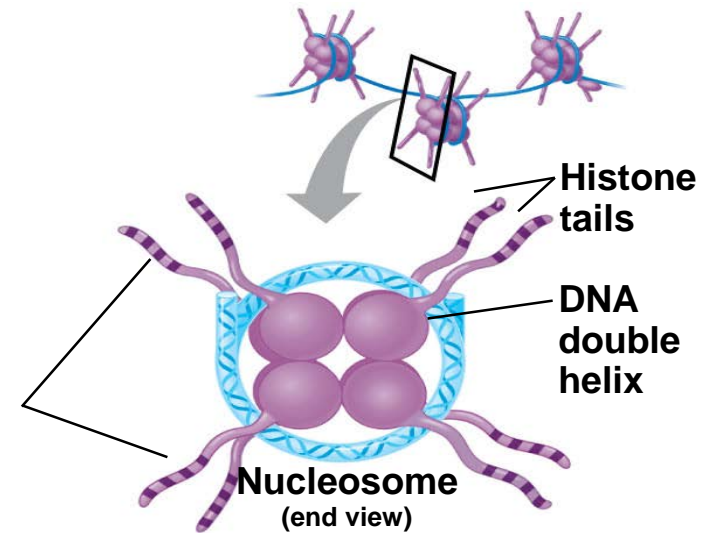


Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

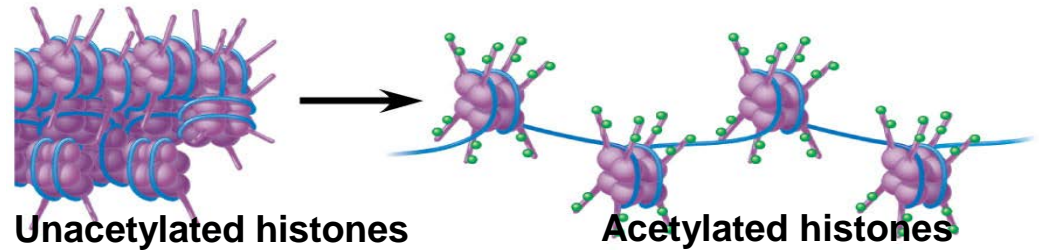
Acetilació



Amino acids available for chemical modification



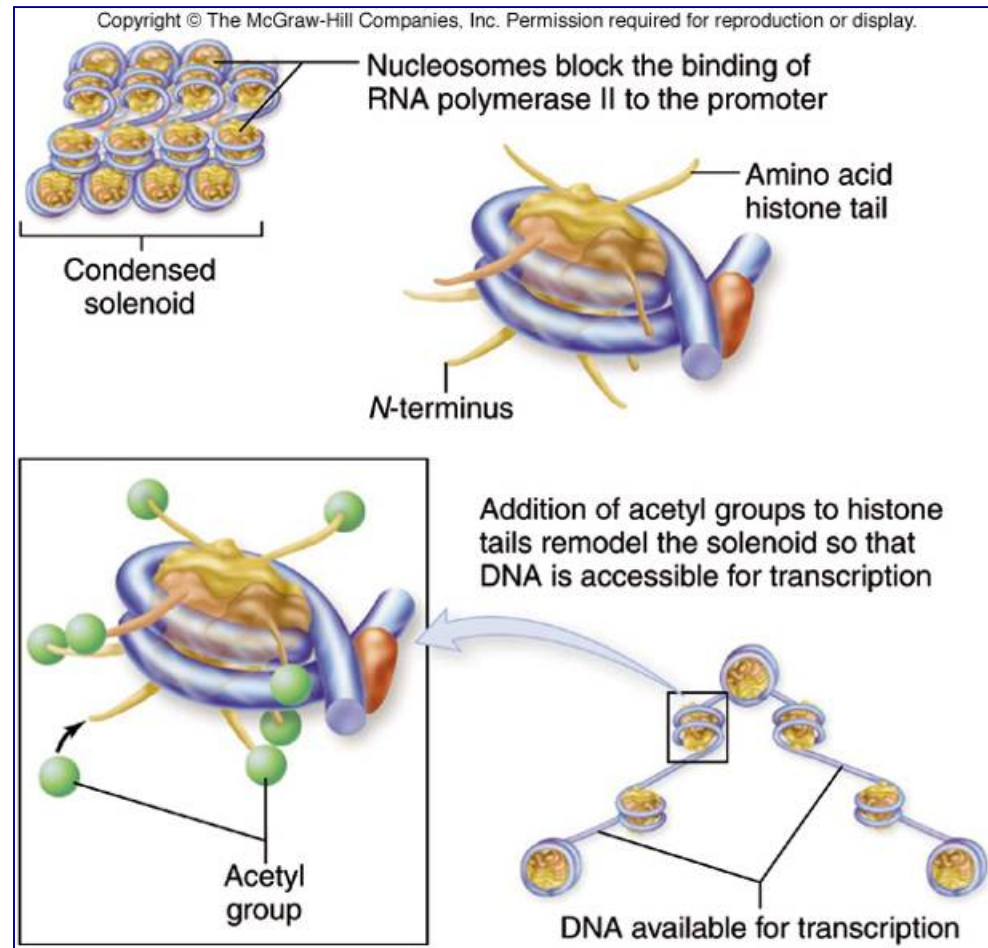
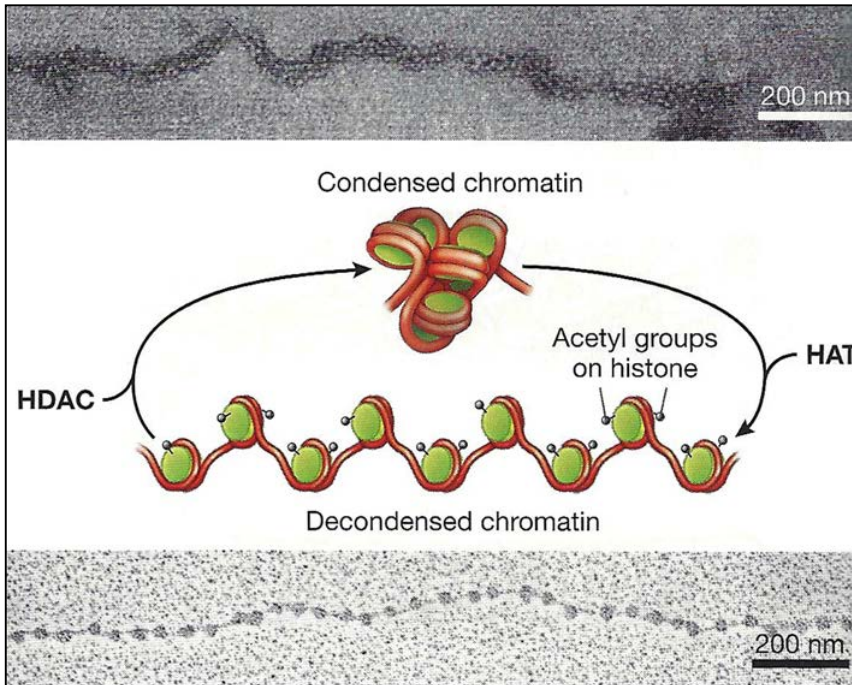
(a) Histone tails protrude outward from a nucleosome



(b) Acetylation of histone tails promotes loose chromatin structure that permits transcription

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

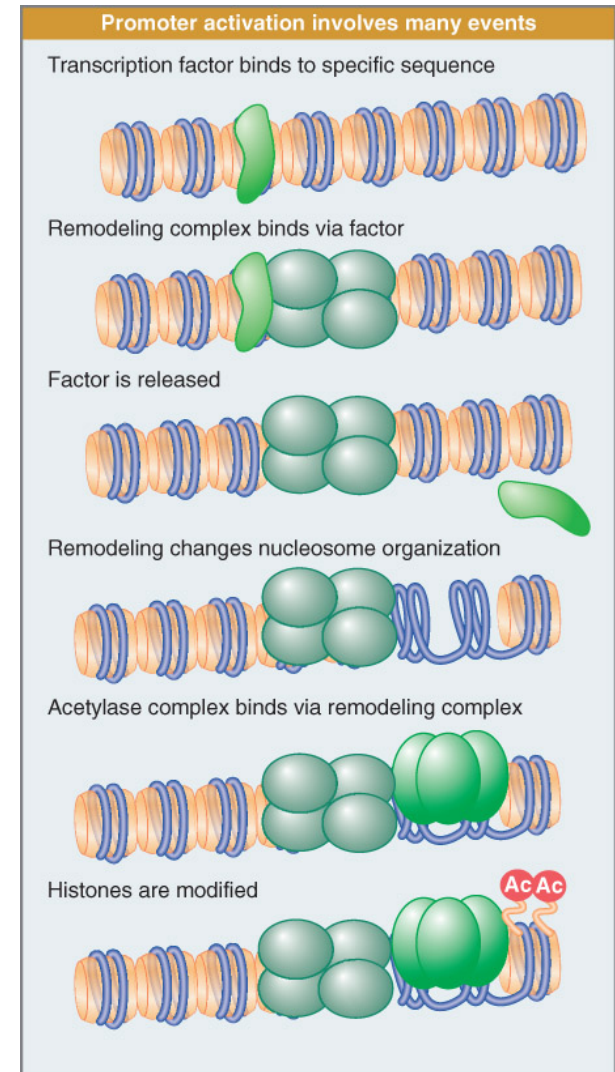
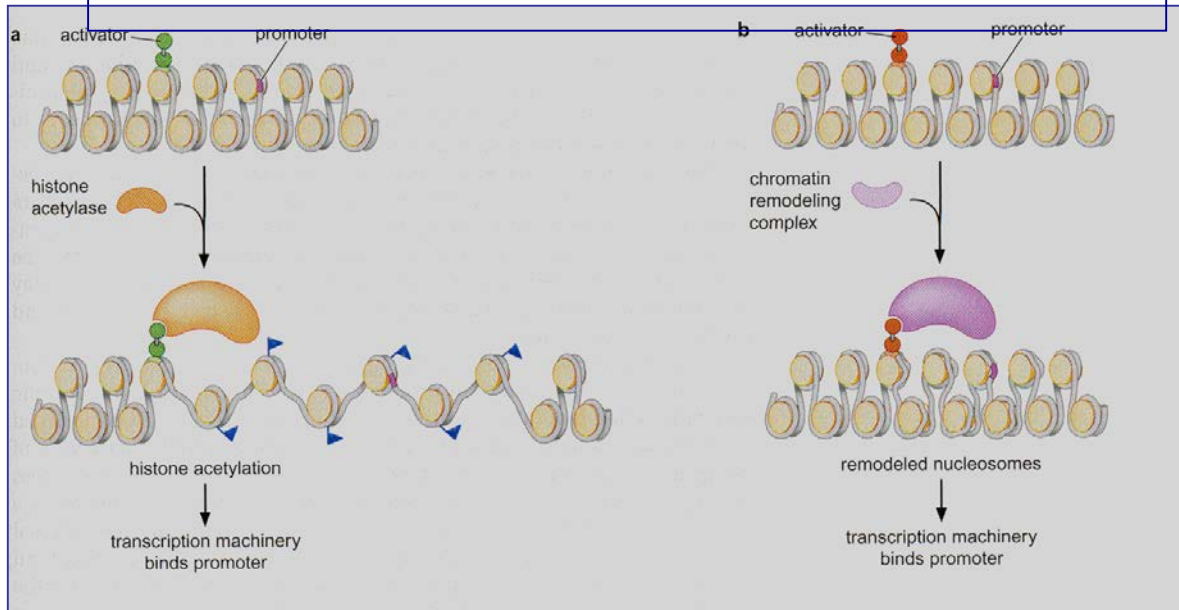
Acetilació



Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

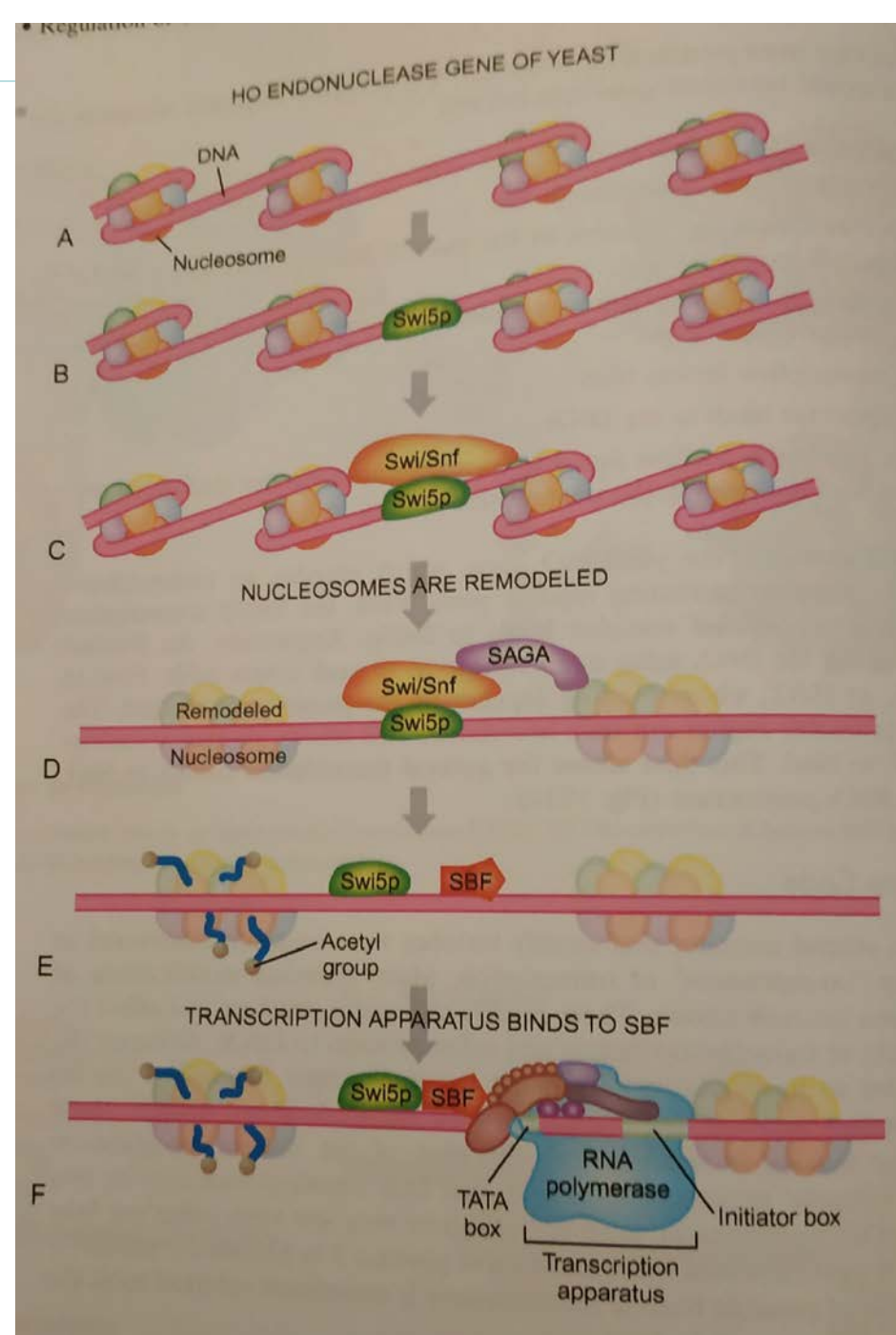
Alteracions locals de la cromatina dirigides per activadors i repressors:

- Activador: facilita la unió de **HAT (Histona acetil transferasa)**
- Repressor: facilita la unió de **HD (Histona desacetilasa)**



Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

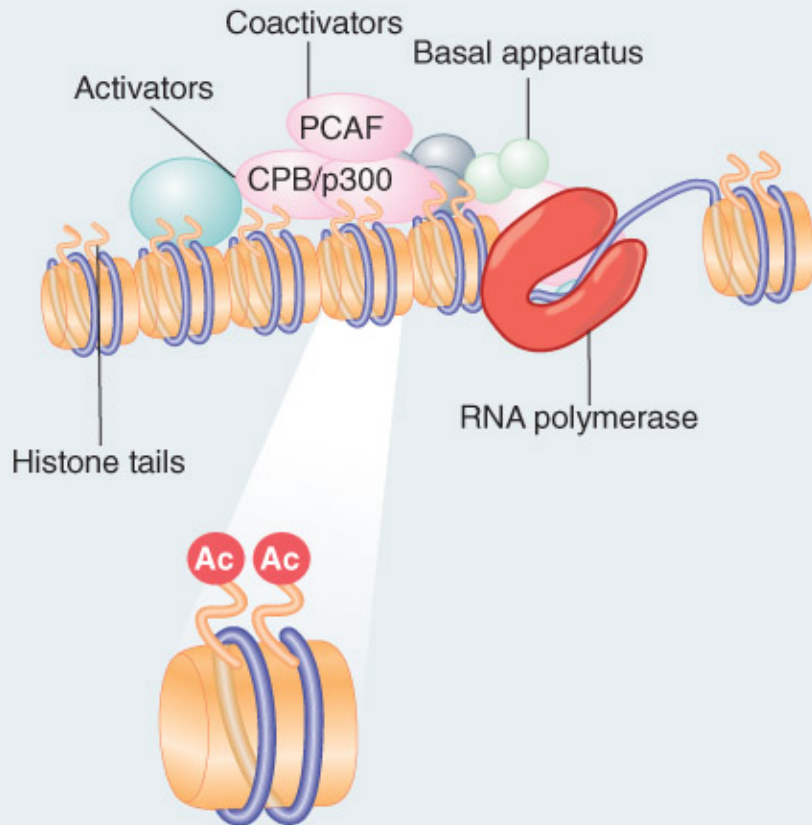
Seqüència d'esdeveniments en l'activació del gen HO del llevat *Saccharomyces cerevisiae*



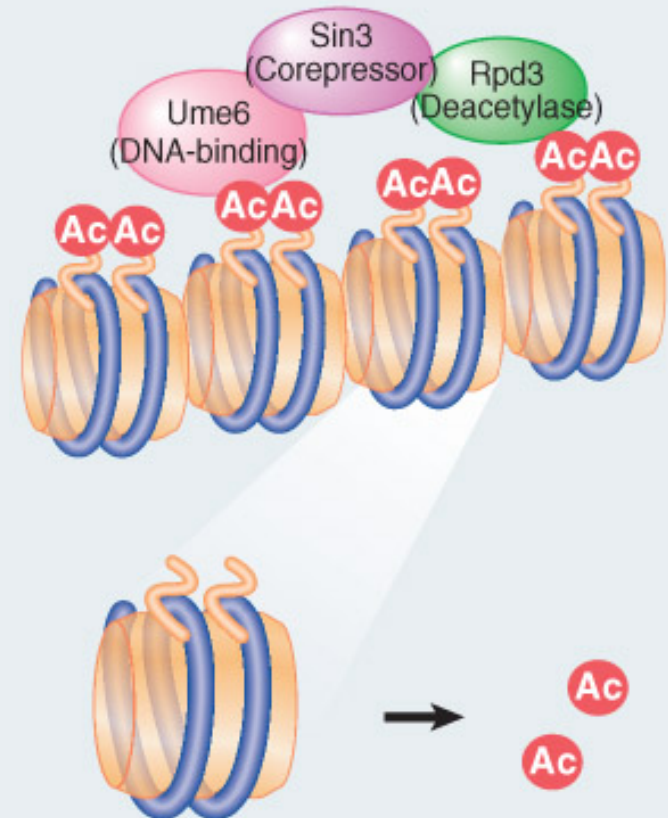
Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina: modificació d'histones

Acetilació

Some coactivators are acetylases

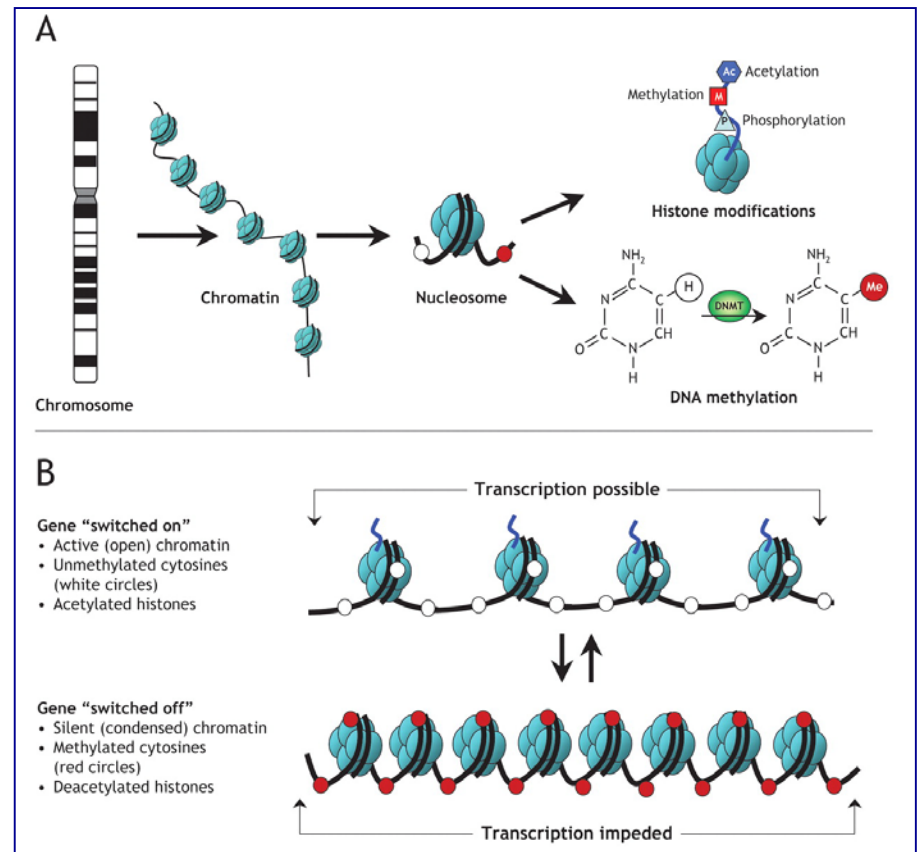
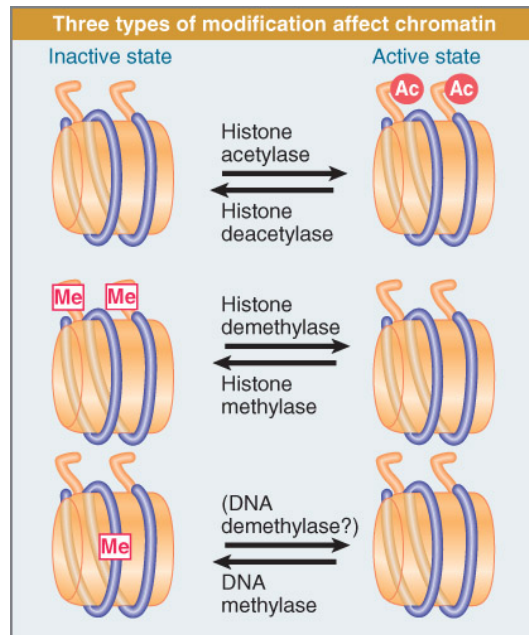
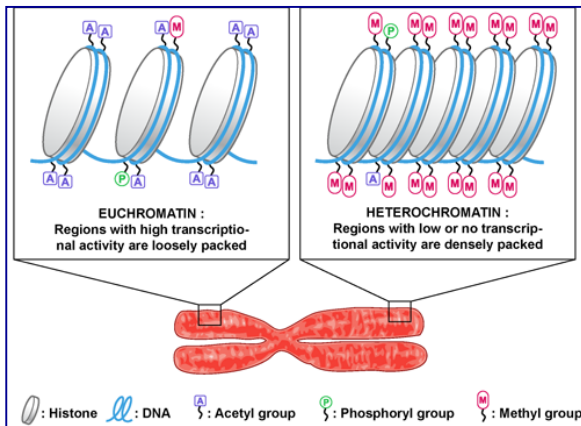


Deacetylation represses transcription



Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

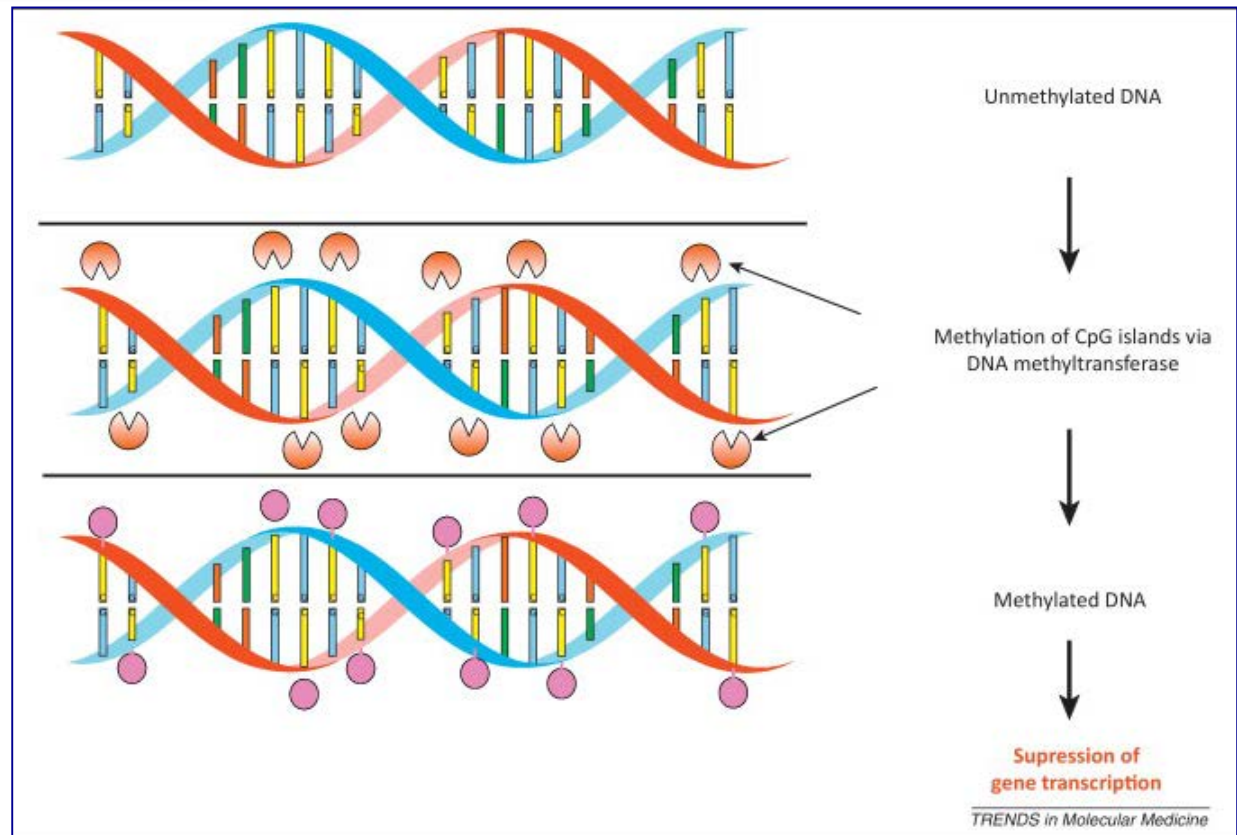
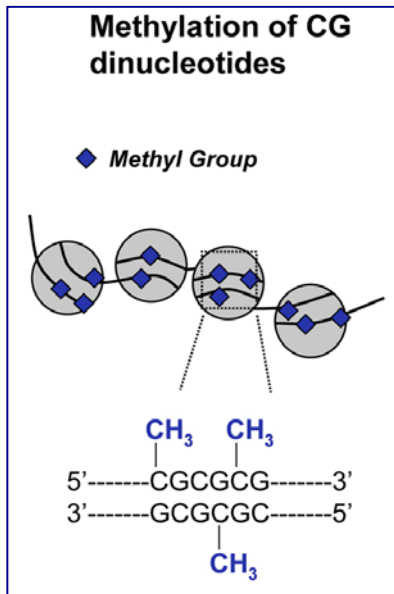
Metilació d'histones i del DNA



En cromatina activa la regió desmetilada sol coincidir amb la de major sensibilitat a DNasaI

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

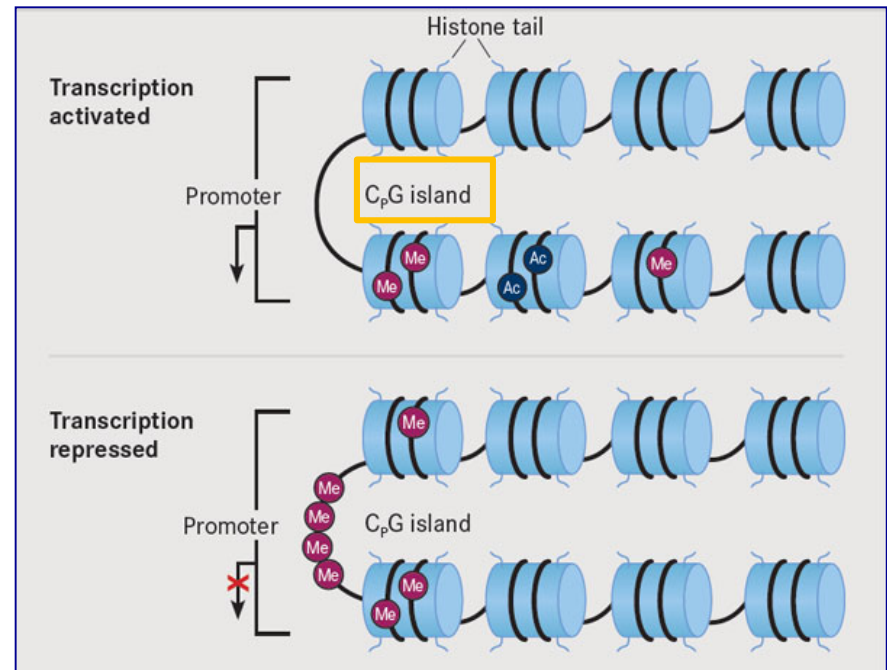
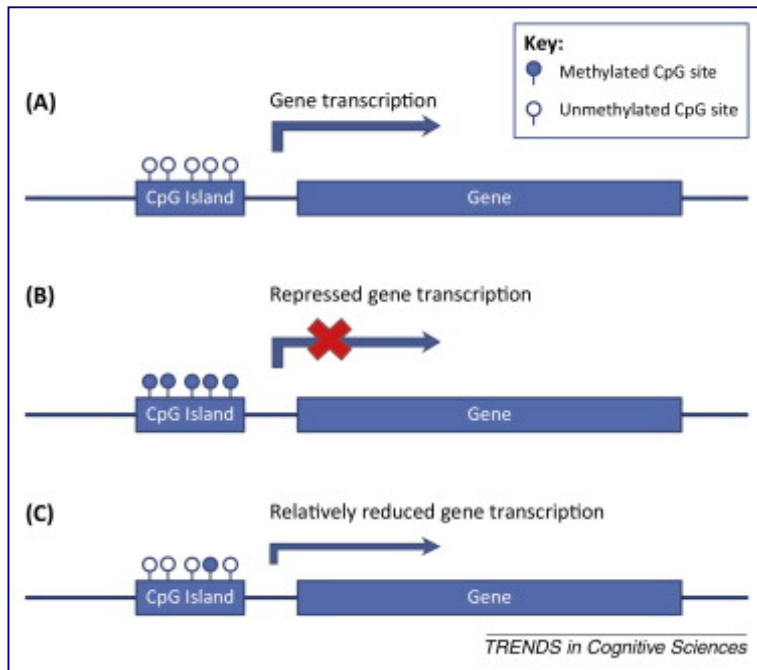
Metilació del DNA



S'han pogut identificar citosines metilades en gens en teixits en els quals no s'expressen i no metilades en altres on sí que s'expressen

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

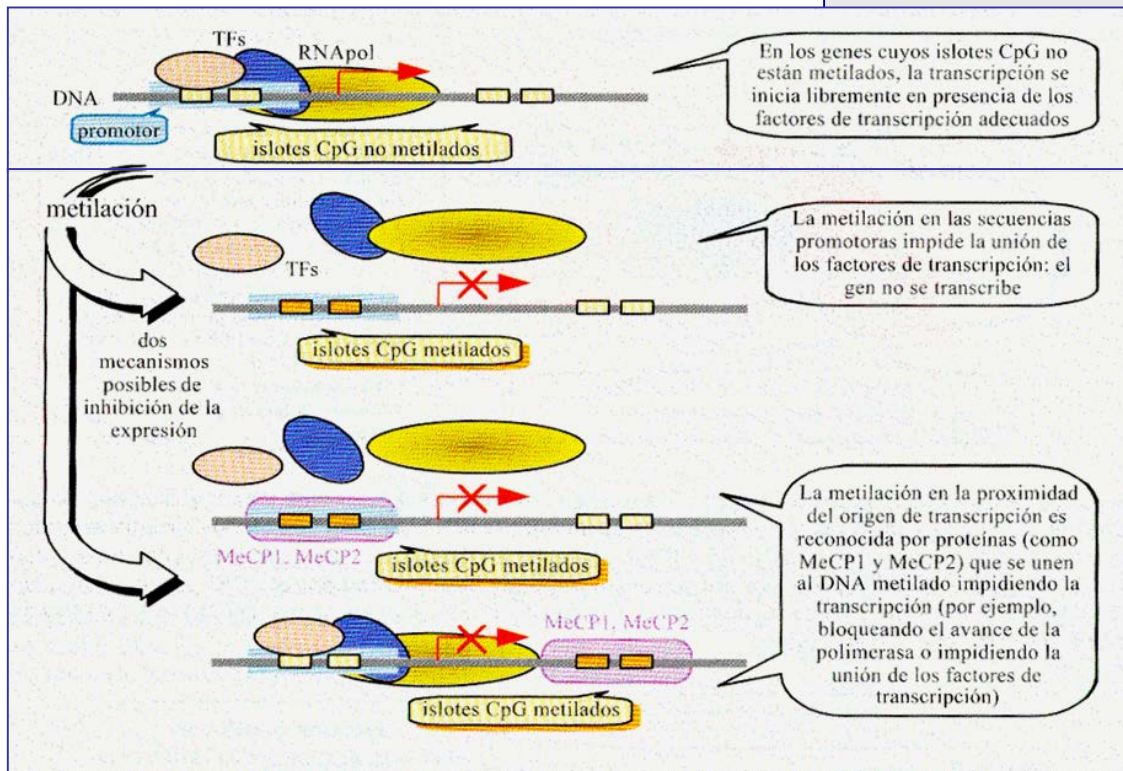
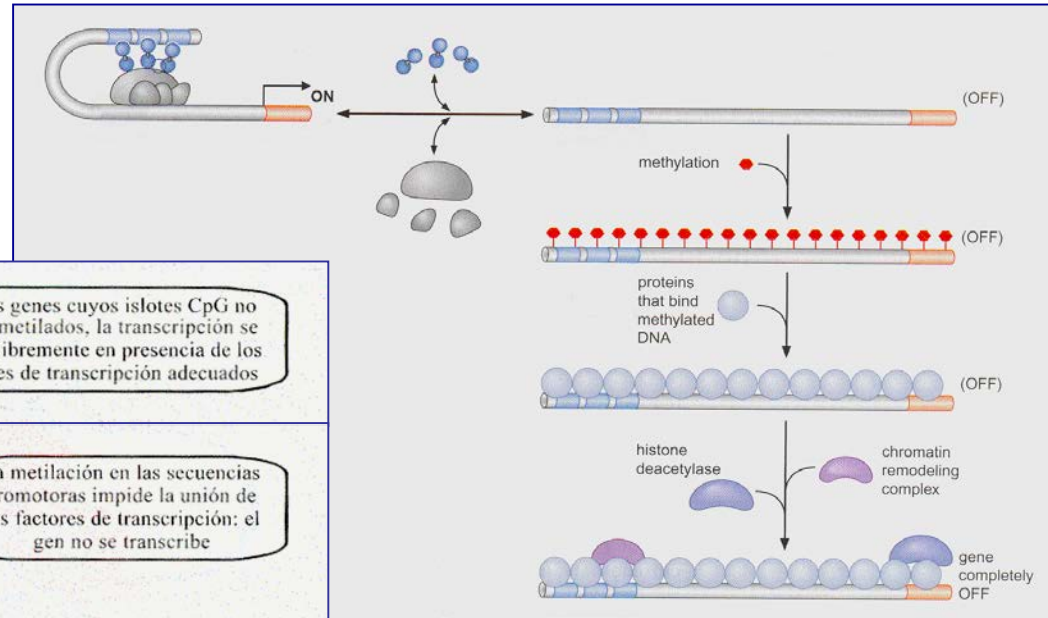
Metilació del DNA



Illes CpG: regions amb una elevada densitat de doblats CpG. Els gens d'expressió constitutiva en contenen el 50%, en els seus promotors. En els d'expressió regulada, la meitat les contenen i la seua hipometilació és necessària, però no suficient, per a la transcripció.

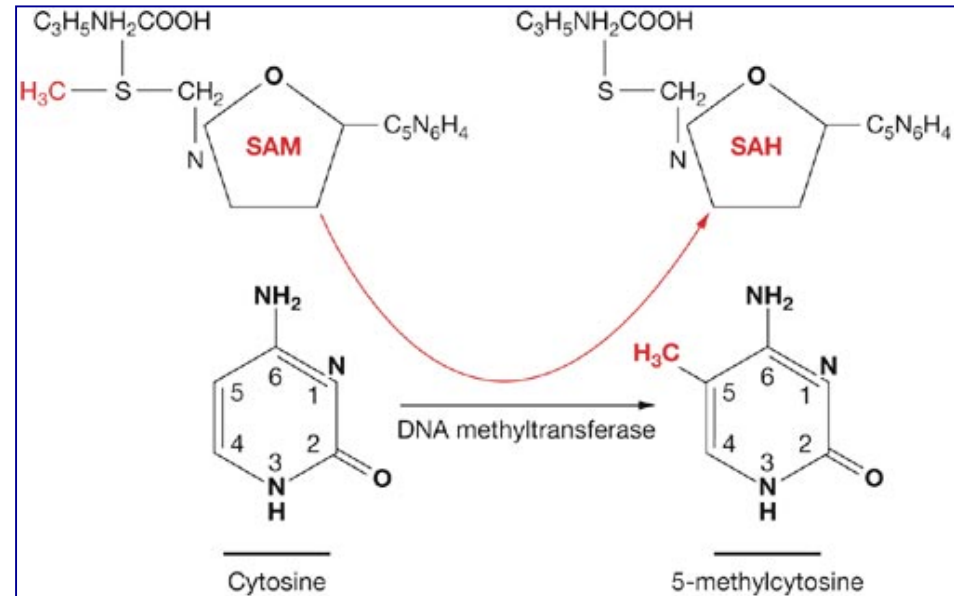
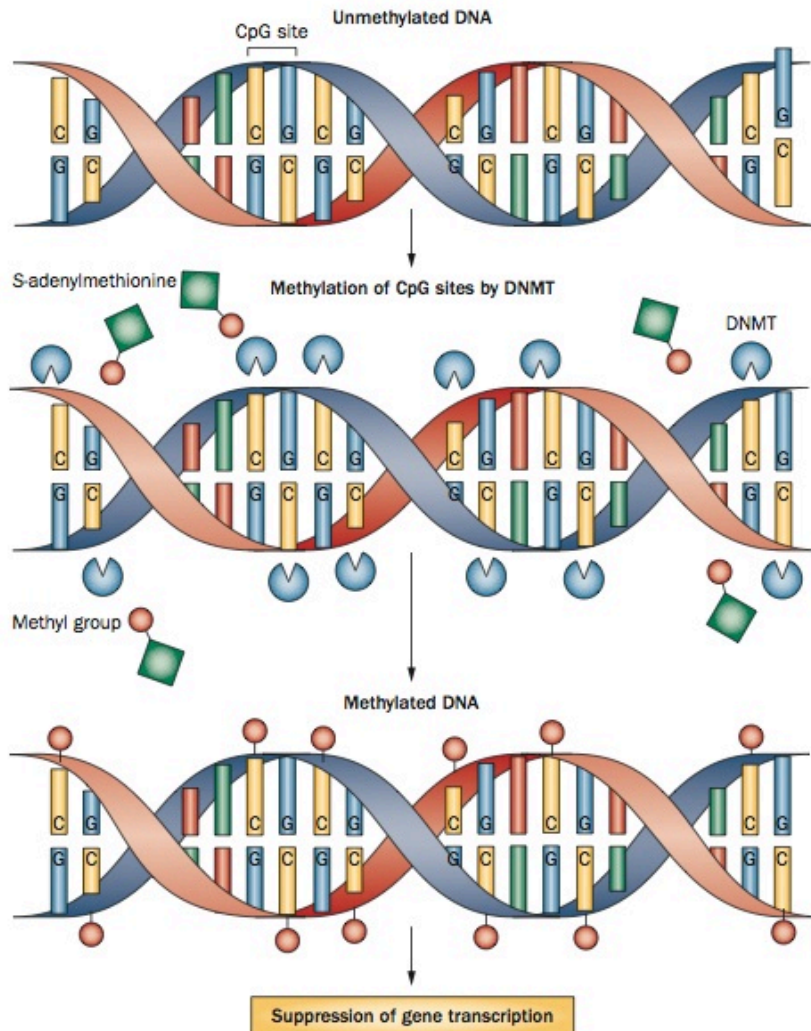
Mecanismos de regulació basats en l'estructura de la cromatina

Metilació del DNA

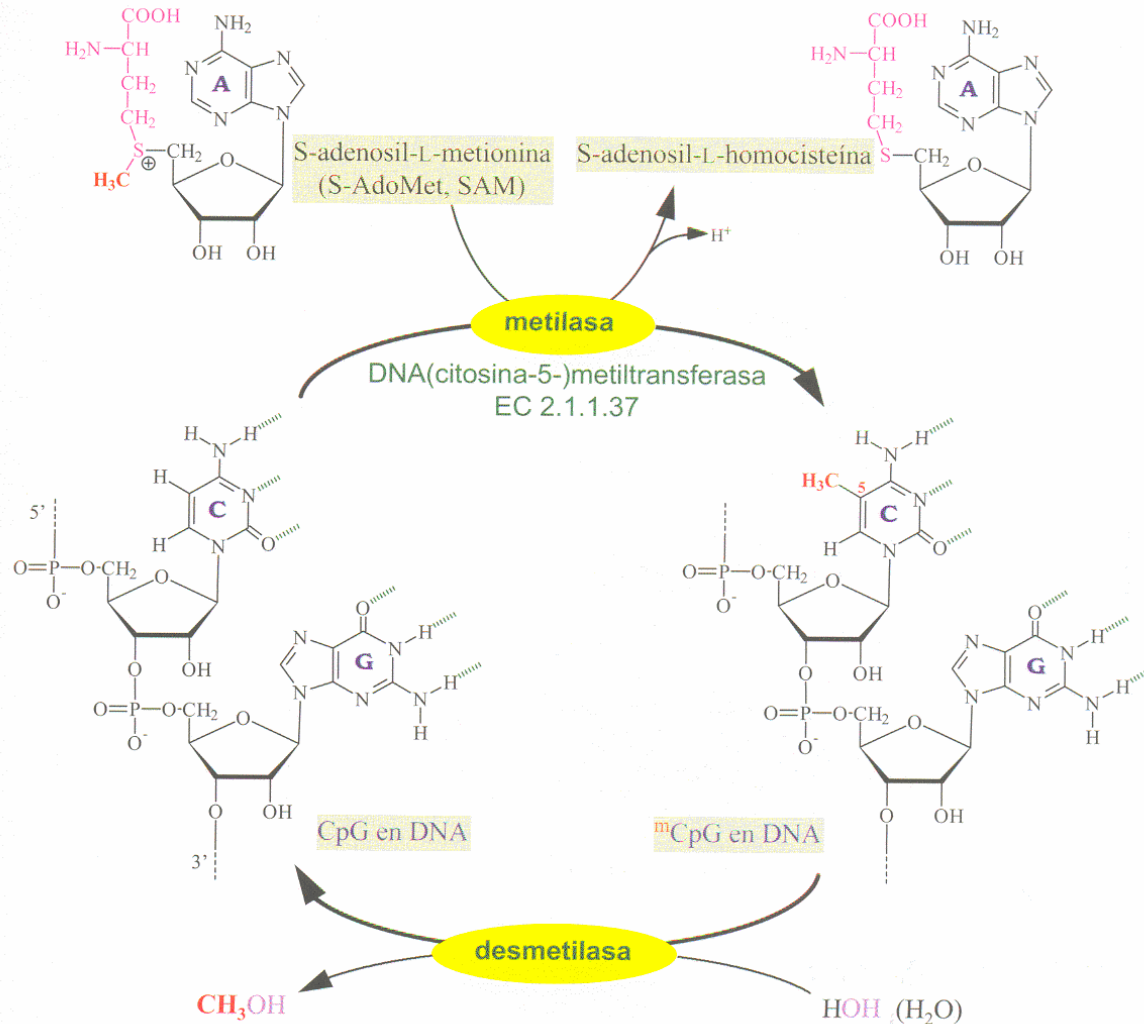


Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

Metilació del DNA



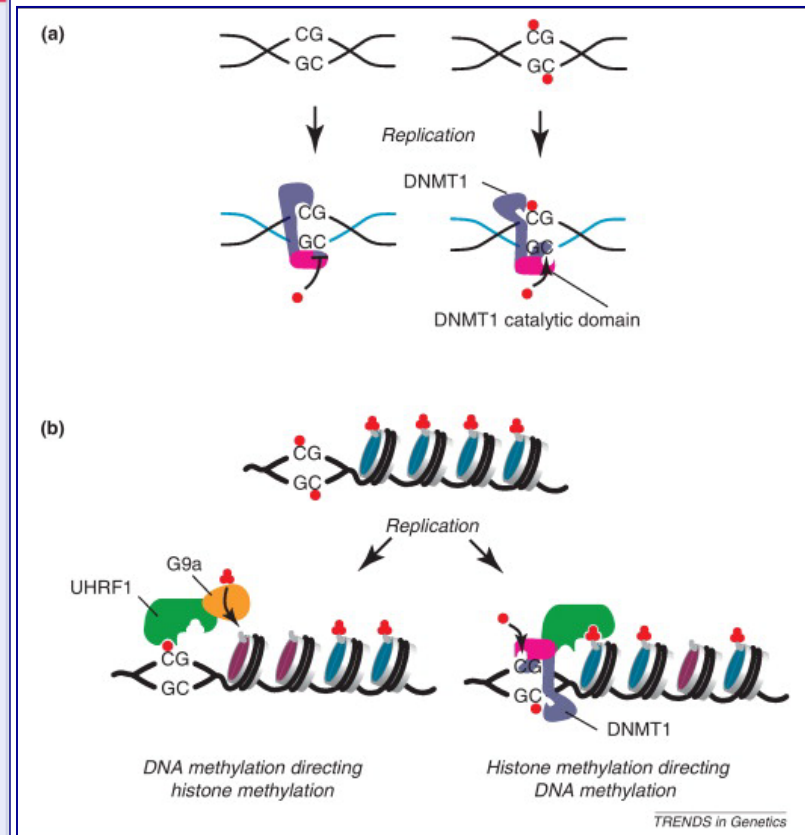
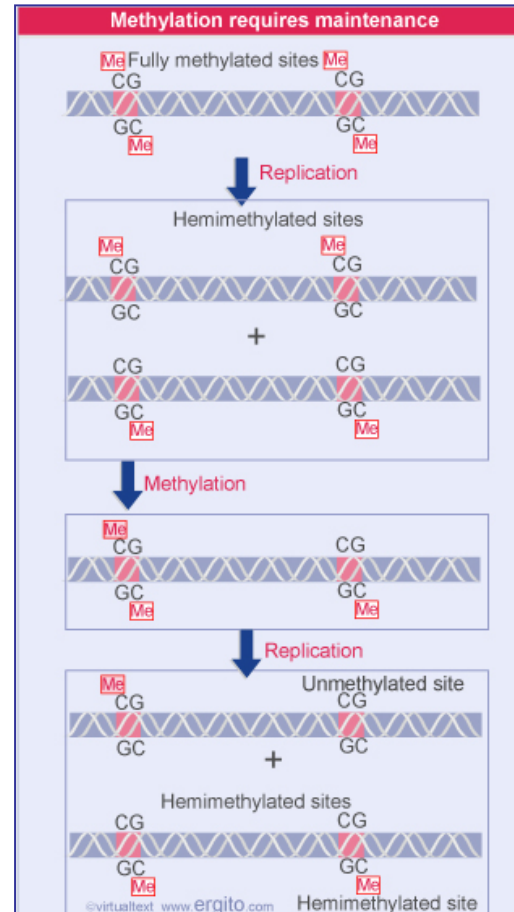
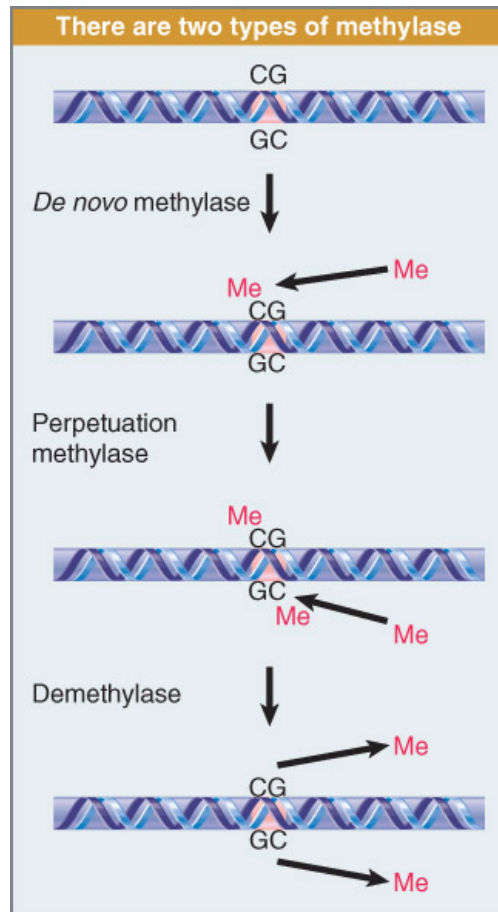
Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina



Metilació del DNA

Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

Metilació del DNA



Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

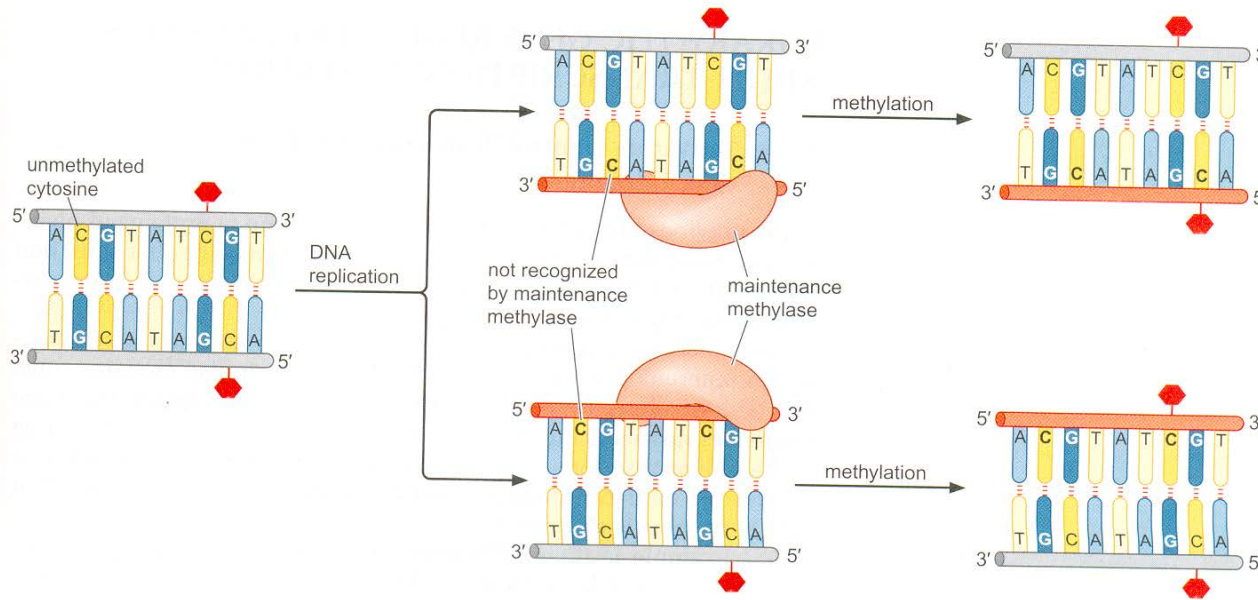
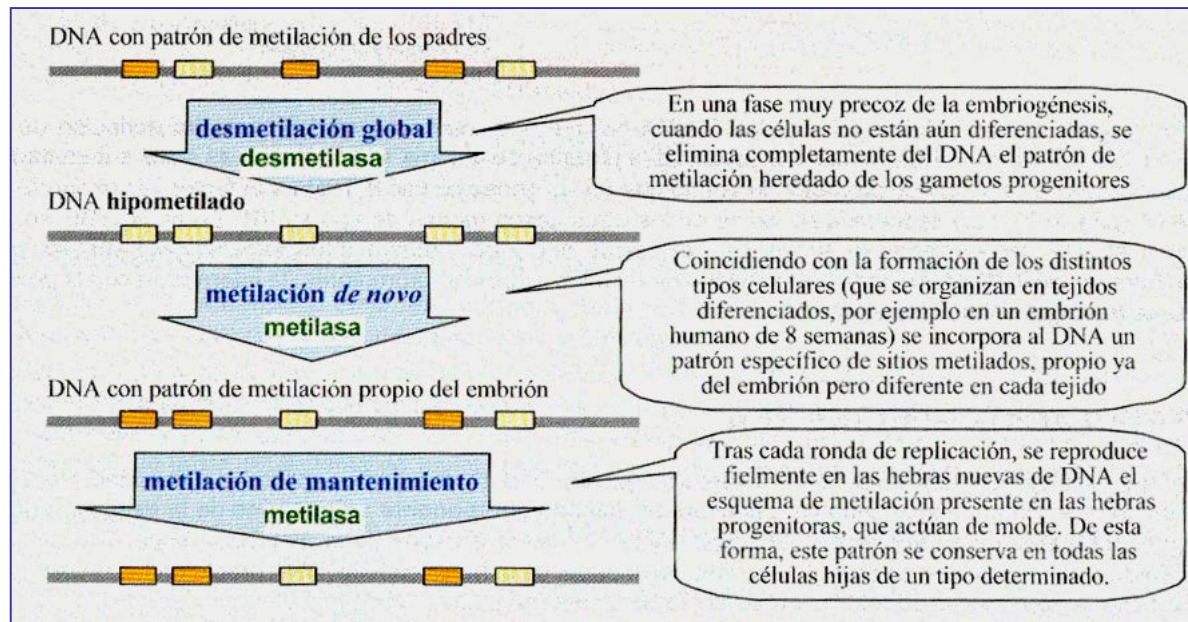


FIGURE 17-26 Patterns of DNA methylation can be maintained through cell division.

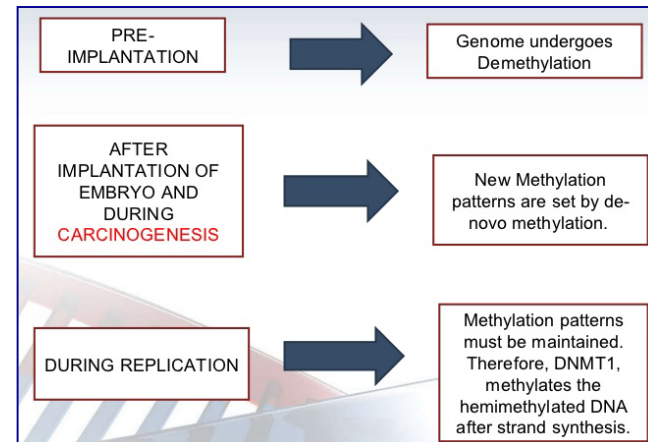
As we saw in Figure 17-24, DNA involved in expression of a vertebrate gene can get methylated, and expression of that gene switched off. This initial methylation is performed by a de novo methylase. For the shutdown state to keep a gene off permanently, the methylation state must be inherited through cell division. This figure shows how that is achieved. A DNA sequence is shown in which two cytosines are present on each strand, one methylated, the other not. This pattern is maintained through cell division, because, upon DNA replication, a maintenance methylase recognizes the hemimethylated DNA, and adds a methyl group to the unmethylated cytosine within it. The completely unmethylated sequence is not recognized by this enzyme, and so remains unmethylated. Thus, both daughter DNA duplexes end up with the same pattern of methylation as the parent. (Source: Adapted from Alberts B. et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th edition, p. 481, fig 7-81. Copyright © 2002. Reproduced by permission of Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

Metilació del DNA

Mecanismos de regulació basats en l'estructura de la cromatina



Metilació del DNA



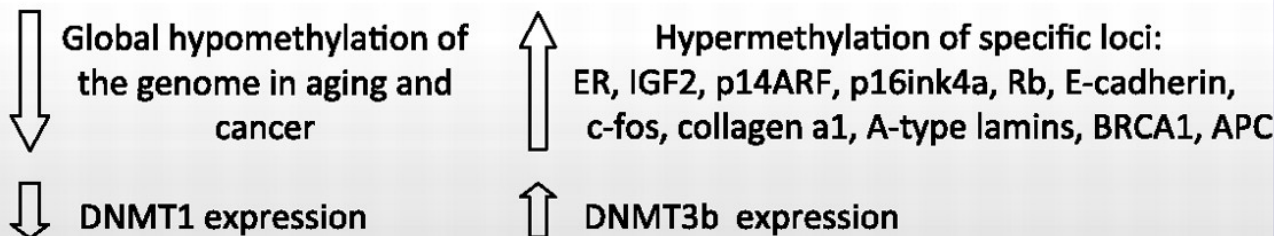
Mecanismes de regulació basats en l'estructura de la cromatina

Metilació del DNA

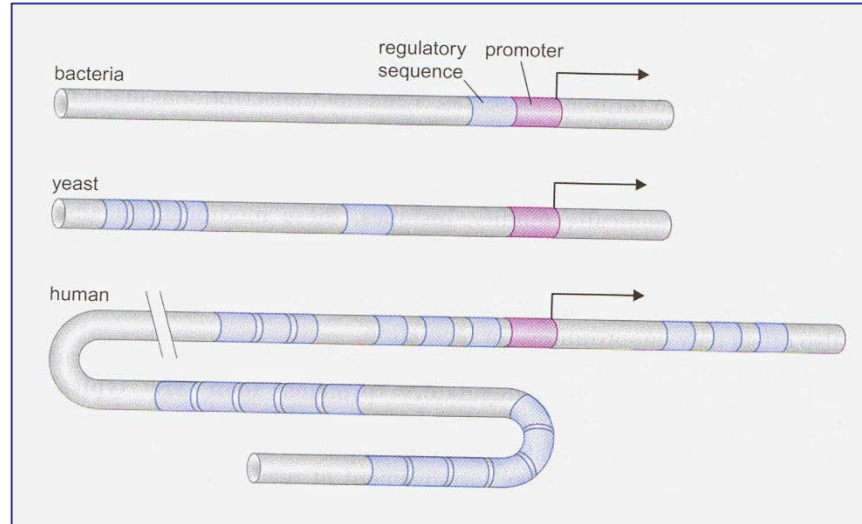
DNA methylation	Activity	Function
DNMT1	DNA methyltransferase maintenance DNA methylation	Heterochromatin formation Gene silencing
DNMT3a, 3b	DNA methyltransferases de novo DNA methylation	Heterochromatin formation Gene silencing
MBDs	Methyl-binding proteins	Recruitment of chromatin-modifying activities Gene silencing

Mutacions en el gen humà que codifica la proteïna d'unió a illes CpG metilades provoca errors en el silenciament normal en el cervell i són responsables de la síndrome de Rett.

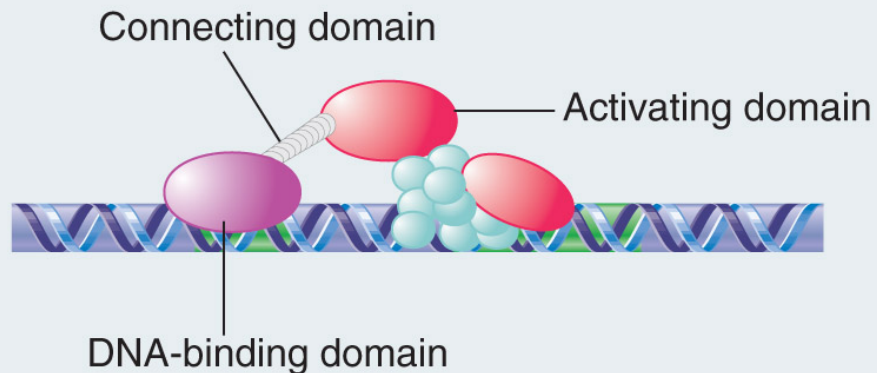
DNA methylation in aging and cancer



Regulació *cis-trans*: Control específic de la transcripció de gens concrets



An activator has independent domains



Regulació *cis-trans*: activadors

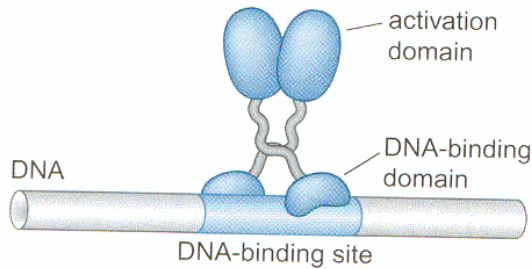


FIGURE 17-2 Gal4 bound to its site on DNA. The yeast activator Gal4 binds as a dimer to a 17 bp site on DNA. The DNA-binding domain of the protein is separate from the region of the protein containing the activating region (the activation domain).

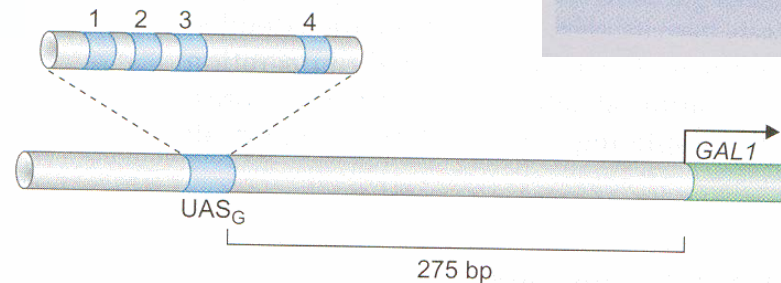
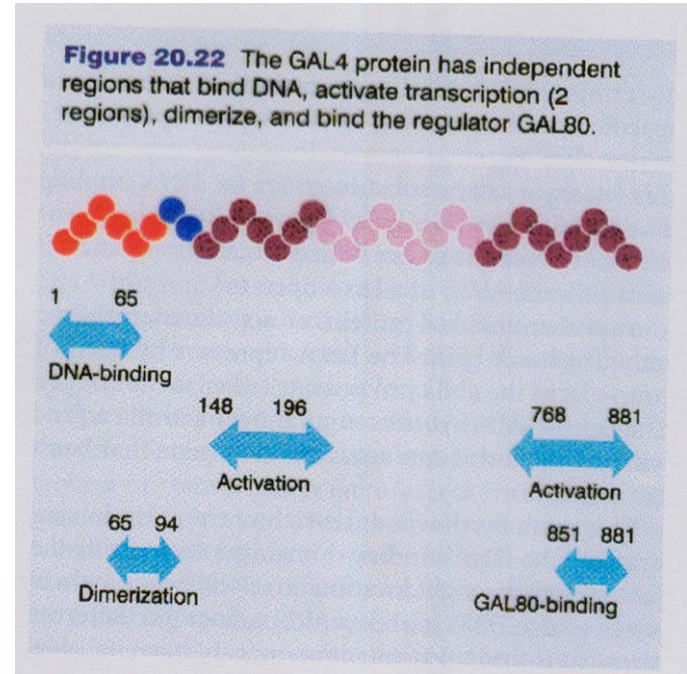
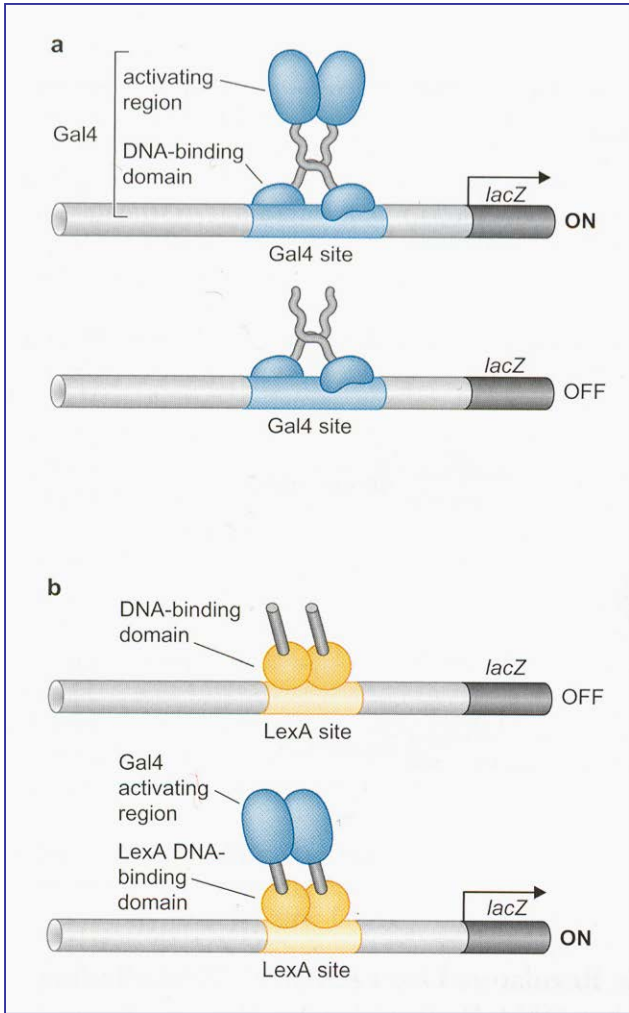


FIGURE 17-3 The regulatory sequences of the yeast *GAL1* gene. The UAS_G (Upstream Activating Sequence for *GAL*) contains 4 binding sites, each of which binds a dimer of Gal4 as shown in Figure 17-2. Though not shown here, there is another site between these and the *GAL1* gene that binds a repressor called Mig1, which we will hear about later in the chapter (see Figure 17-20).

Regulació *cis-trans*: activadors



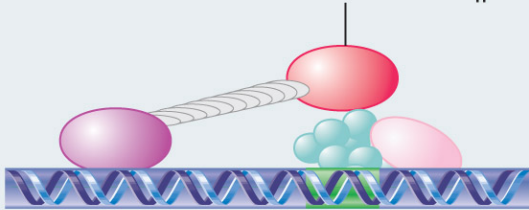
Specificity for activation is determined by the DNA-binding domain				
	UAS _G	Promoter	LexA operator	Promoter
Gal4 activator	Binding and transcription	Binding and transcription	No binding	Binding and transcription
LexA activator	No binding	No binding	No binding	Binding and transcription

Regulació *cis-trans*: activadors

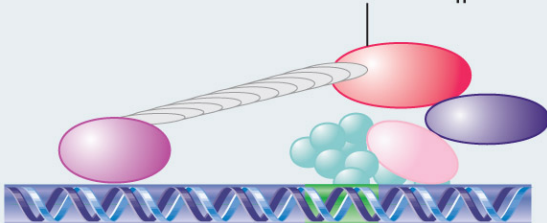
- Reguladors amb estructura dimèrica
- Dominis d'unió al DNA: dits de Zn o HLH; interacció: hèlix α / solc major
- Dominis d'activació: diferent naturalesa, unitats xicotetes repetides (segons el nombre de repeticions, major o menor activitat)
- Motius de dimerització: cremalleres de Leu...

Activators contact the basal apparatus

Activator contacts TAF in TF_{II}D



Activator contacts TF_{II}B



ESTRUCTURA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Dominios estructuralmente diferenciados

Dominio de unión al DNA: se une a la secuencia diana del enhancer

Dominio activador de la transcripción: regiones con residuos ácidos

Interacciones entre TF y PIC mediadas por: interacciones electrostáticas inespecíficas
zonas ricas en Gln ó en Pro

Otros dominios: dimerización

formación de un bucle en el DNA

unión de efectores

No existe ninguna preferencia respecto a la localización (N- ó C-T) de los dominios

N-terminal

C-terminal



Dominio de dimerización

Dominio de unión al DNA

Dominio de unión de efectores

Dominio de activación

Regulació *cis-trans*: activadors

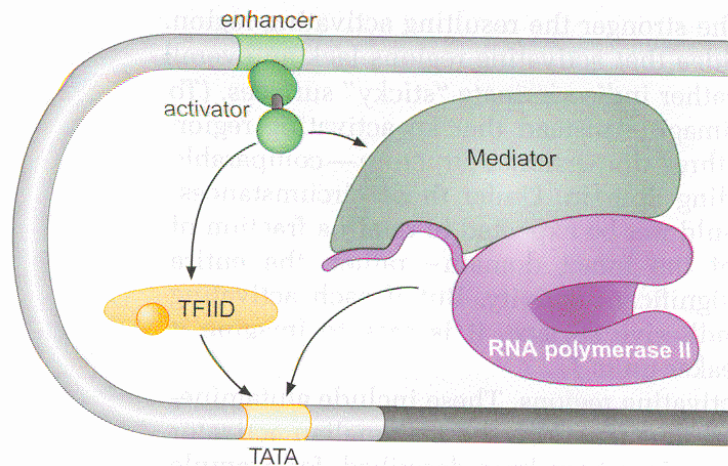
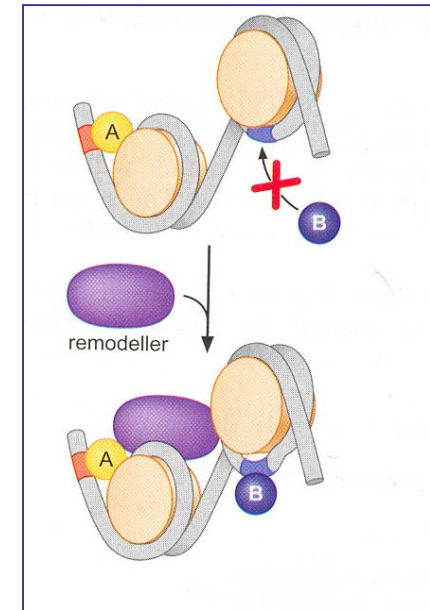
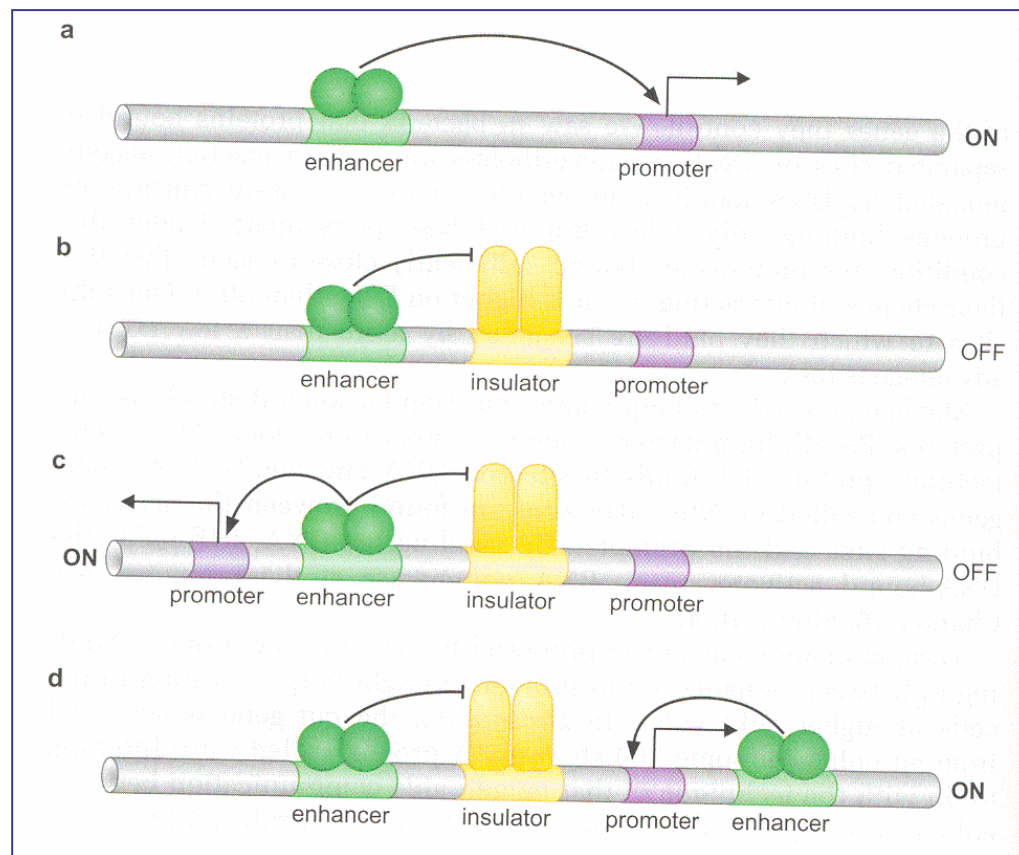
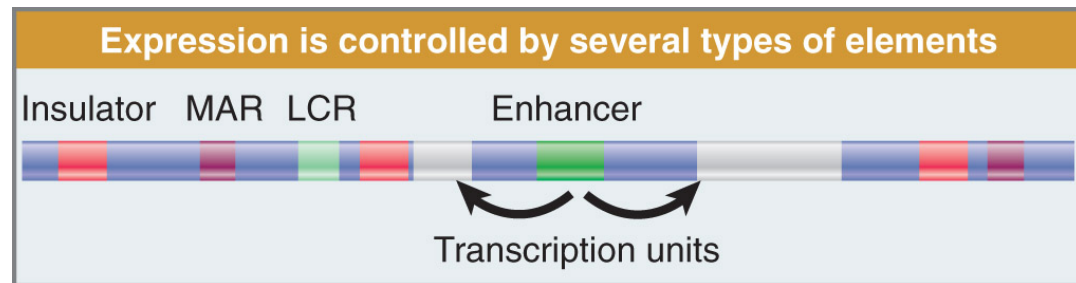


FIGURE 17-9 Activation of transcription initiation in eukaryotes by recruitment of the transcription machinery. A single activator is shown recruiting two possible target complexes: the Mediator; and, through that, RNA polymerase II; and also the general transcription factor TFIID. Other general transcription factors are recruited as part of the Mediator/Pol II complex (holoenzyme); separately, (through direct recruitment by the activator); or bind spontaneously in the presence of the recruited components. These are not shown here. In reality, this recruitment would usually be mediated by more than one activator bound upstream of the gene.

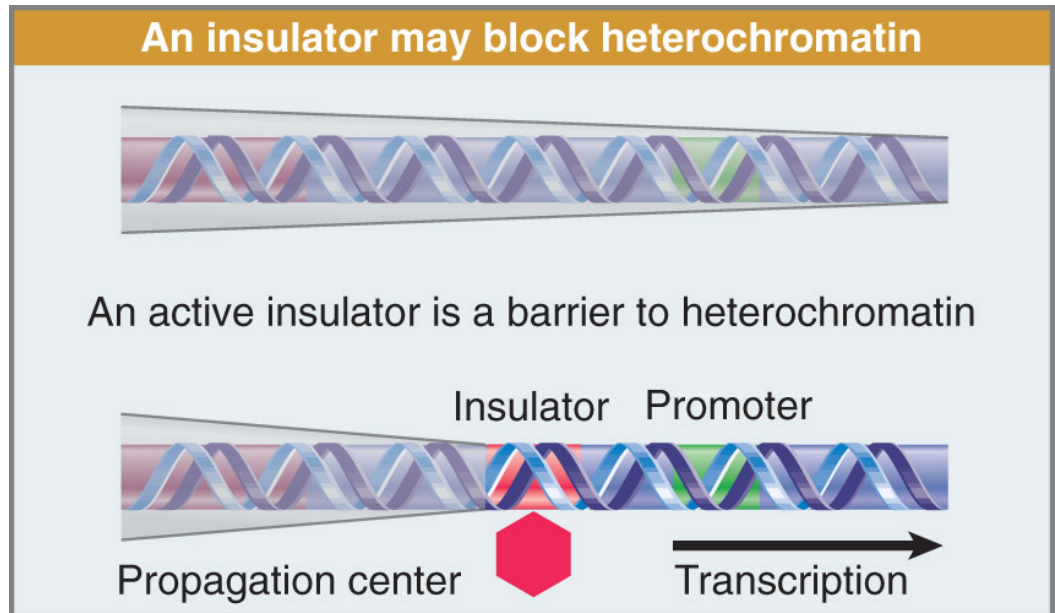
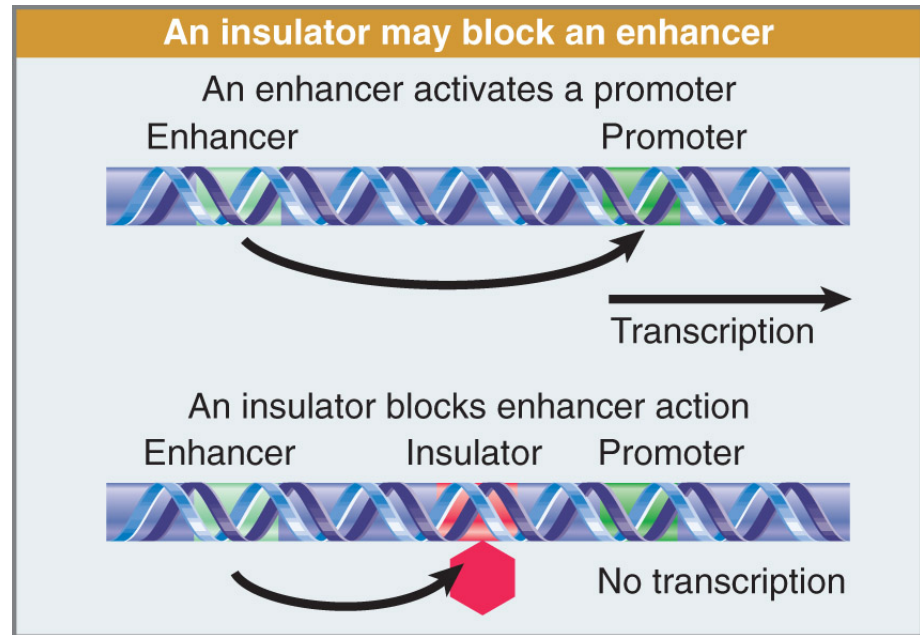


Un activador també pot reclutar el mediador o un complex remodelador per a possibilitar l'accessibilitat d'un altre factor transcripcional al DNA

**Regulació *cis-trans*:
potenciadors
(*enhancers*) i aïllants
(*insulators*)**

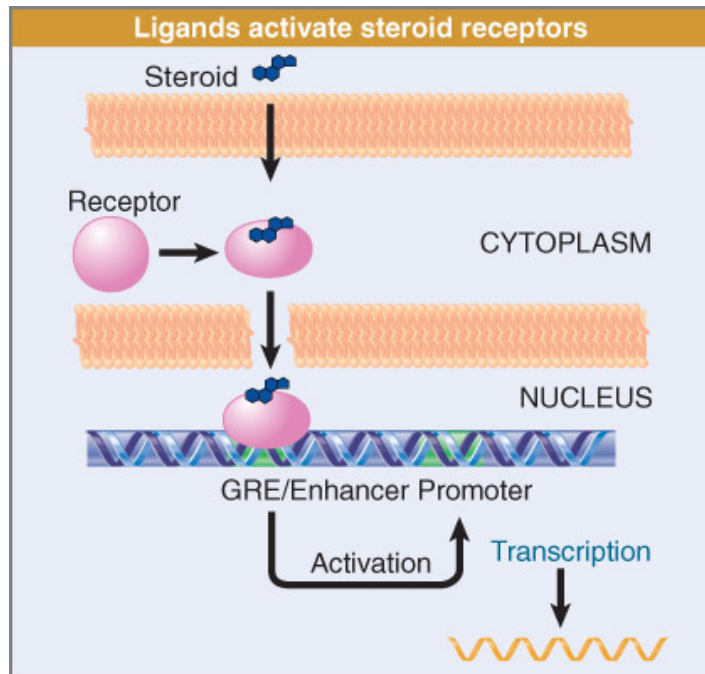


Regulació *cis-trans*:
potenciadors
(*enhancers*) i aïllants
(*insulators*)



Regulació *cis-trans*: activadors

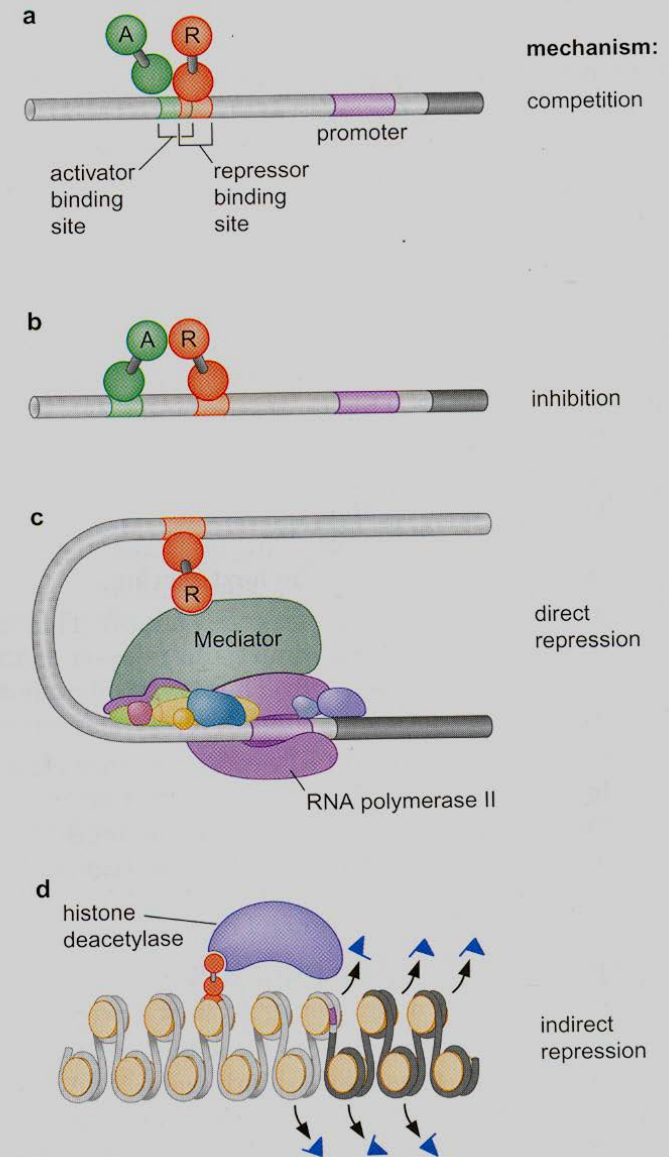
Mecanismes d'activació dels factors de transcripció



Transcription factors are activated in several ways			
Inactive Condition	Activation mechanism	Active Condition	Example
No protein	Protein synthesized →		Homeo-proteins
Inactive protein	Protein phosphorylated →		HSTF
Inactive protein	Protein dephosphorylated →		
Inactive protein Membrane-bound protein	Ligand binding →		Steroid receptors
Inactive protein Inhibitor	Release by inhibitor →		NF-κB
Inactive protein Inactive partner	Change of partner →		HLH (MyoD/ID)
Membrane-bound protein	Cleavage releases active factor →		Sterol response

Regulació *cis-trans*: mecanismes d'acció dels repressors

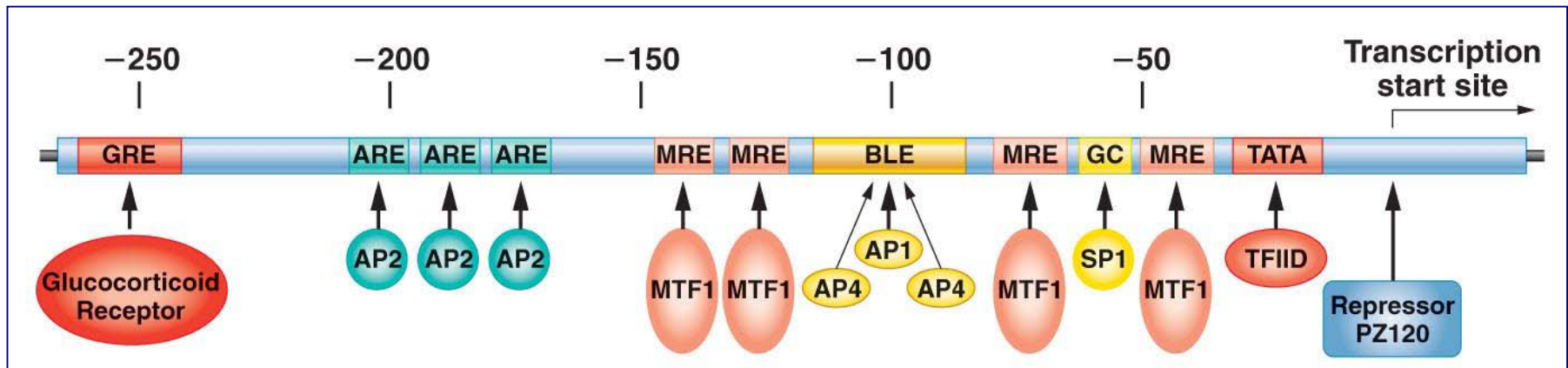
FIGURE 17-19 Ways in which eukaryotic repressors work. Transcription of eukaryotic genes can be repressed in various ways. These include the four mechanisms shown in the figure. Part (a) shows that, by binding to a site on DNA that overlaps the binding site of an activator, a repressor can inhibit binding of the activator to a gene, and thus block activation of that gene. In a variation on this theme, a repressor can be a derivative of the same protein as the activator, but lack the activating region. In another variation, an activator that binds to DNA as a dimer can be inhibited from doing so by a derivative that retains the region of the protein required for dimerization, but lacks the DNA-binding domain. Such a derivative forms inactive heterodimers with the activator. In part (b), a repressor binds to a site on DNA beside an activator and interacts with that activator, occluding its activating region. In part (c), a repressor binds to a site upstream of a gene and, by interacting with the transcriptional machinery at the promoter in some specific way, inhibits transcription initiation. Part (d) shows repression by recruiting histone modifiers that alter nucleosomes in ways that inhibit transcription (for example, deacetylation, as shown here, but also methylation in some cases, or even remodeling at some promoters).



Regulació *cis-trans*: elements de resposta en eucariotes

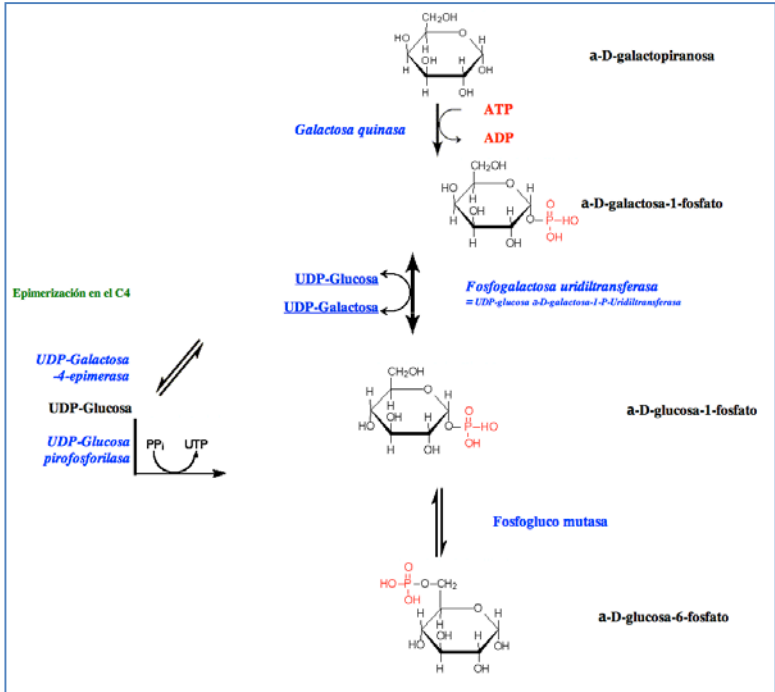
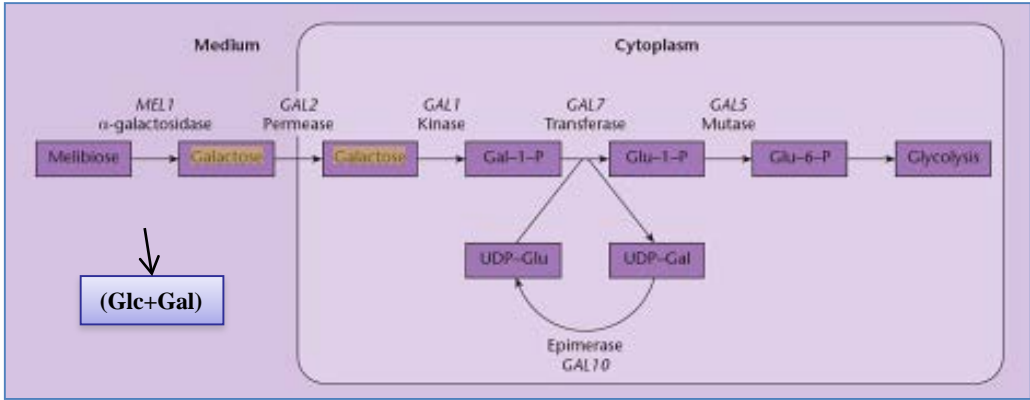
Response Element	Transcription Factor	Consensus Sequence
CRE	CREB	TGACGTCA
ERE	Estrogen receptor	AGGTCANNNTGACCT
GRE	Glucocorticoid receptor	AGAACANNNTGTTCT
HSE	Heat shock factor	GAANN TTCNNGAA
SRE	Serum response factor	CC(A/T) ₆ GG

Exemple: gen de la metal·lotioneïna humana

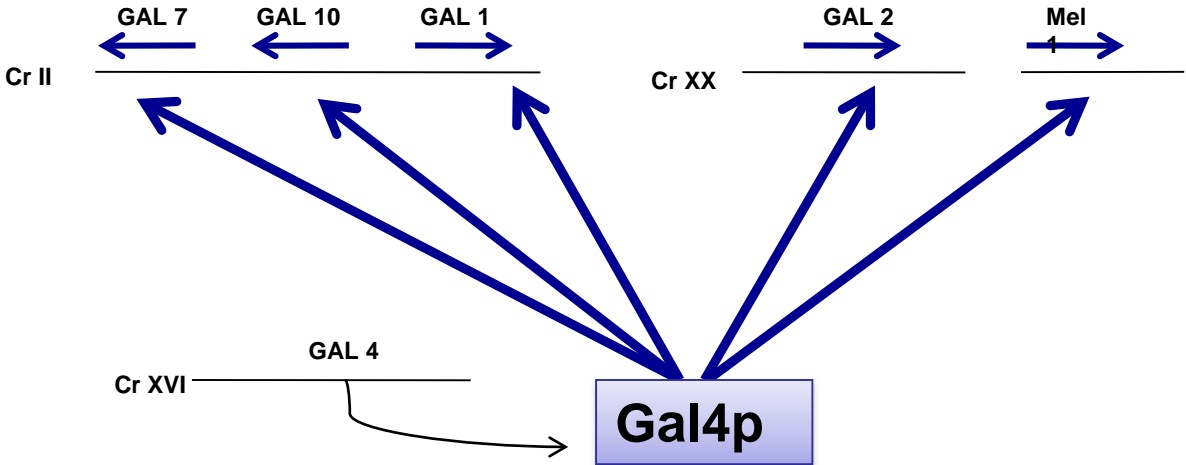


BLE = basal level element
 GRE = glucocorticoid response element
 MRE = metal response element
 TRE = TPA response element

Regulació *cis-trans*: gens *GAL* de llevat



- S'expressen quan en el medi hi ha galactosa
- La seua expressió no és necessària si en el medi hi ha glucosa
- Estan regulats per l'activador Gal4



Regulació *cis-trans*: gens *GAL* de llevat

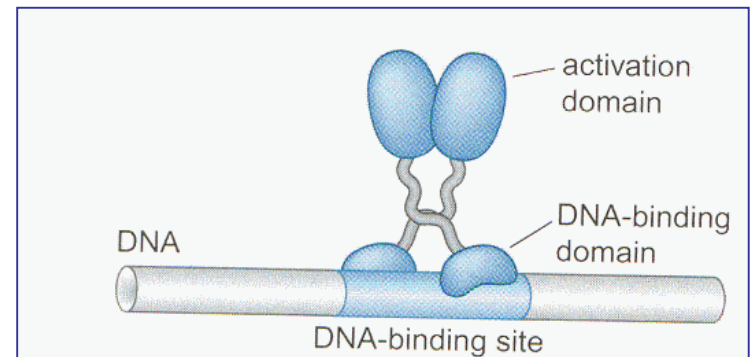
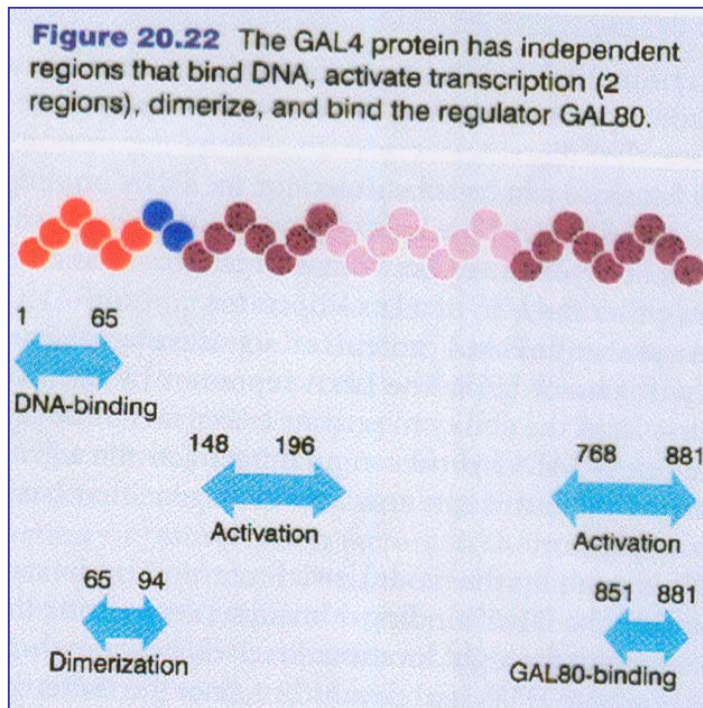
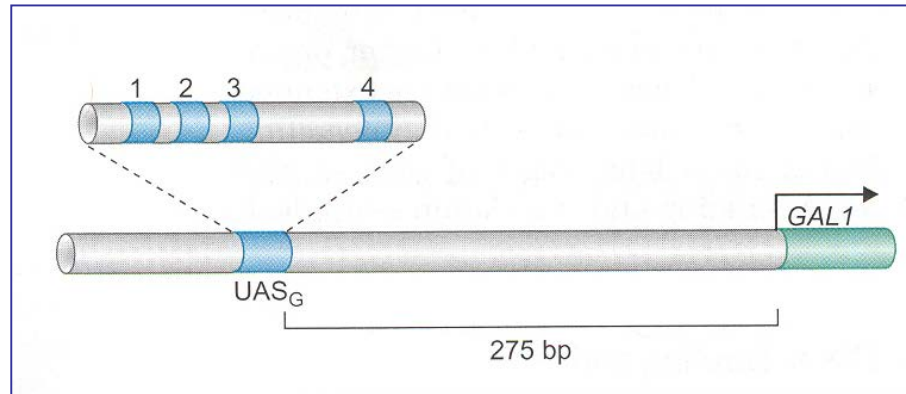
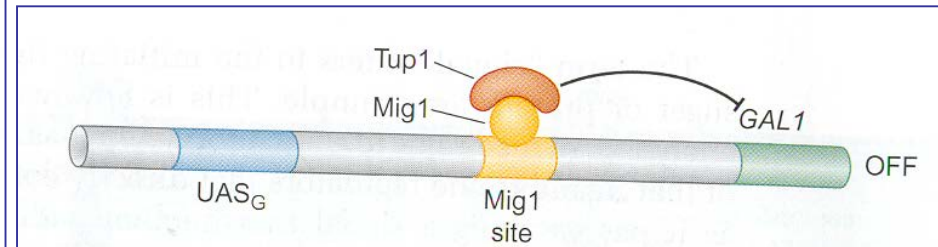
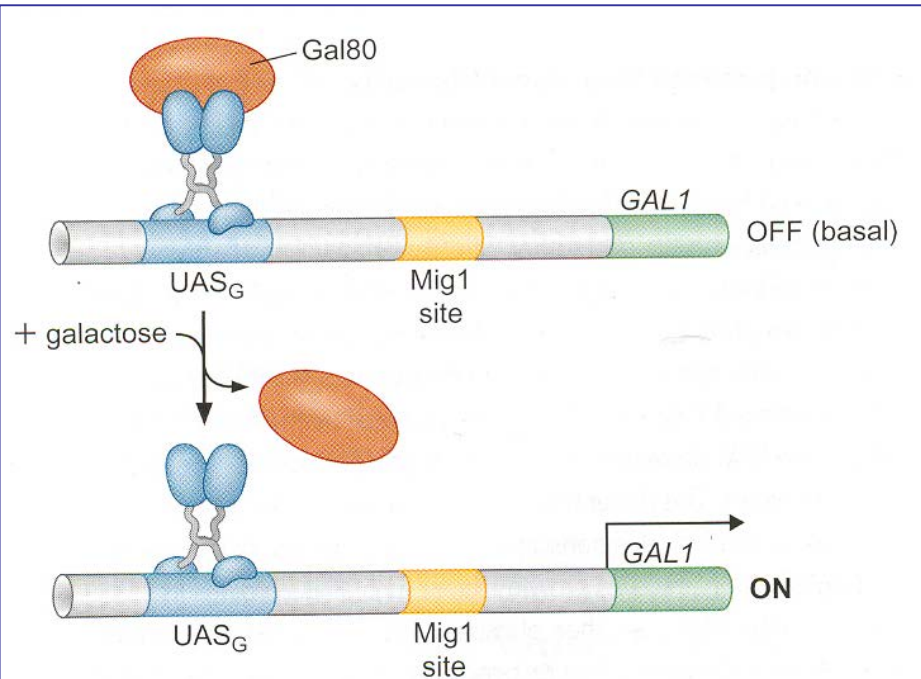
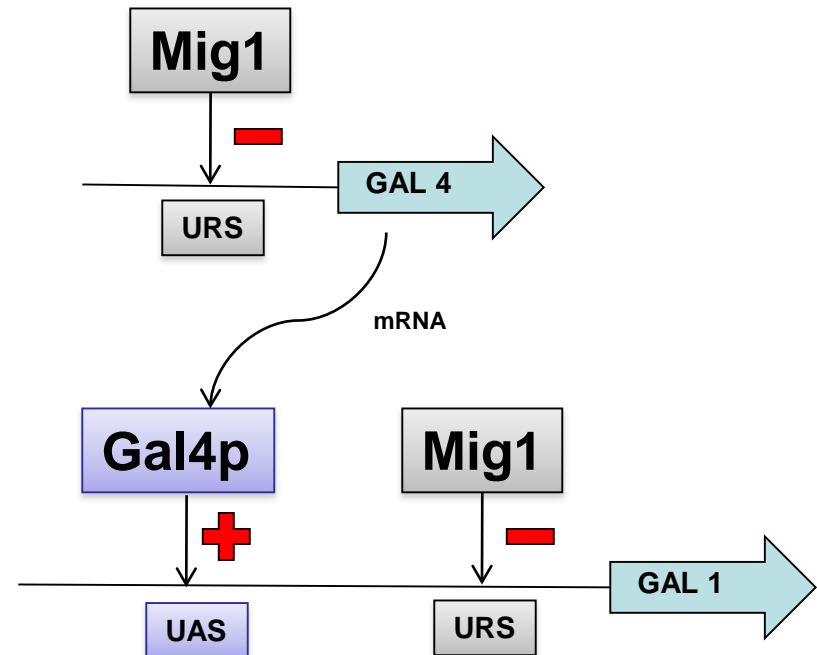


FIGURE 17-2 Gal4 bound to its site on DNA. The yeast activator Gal4 binds as a dimer to a 17 bp site on DNA. The DNA-binding domain of the protein is separate from the region of the protein containing the activating region (the activation domain).

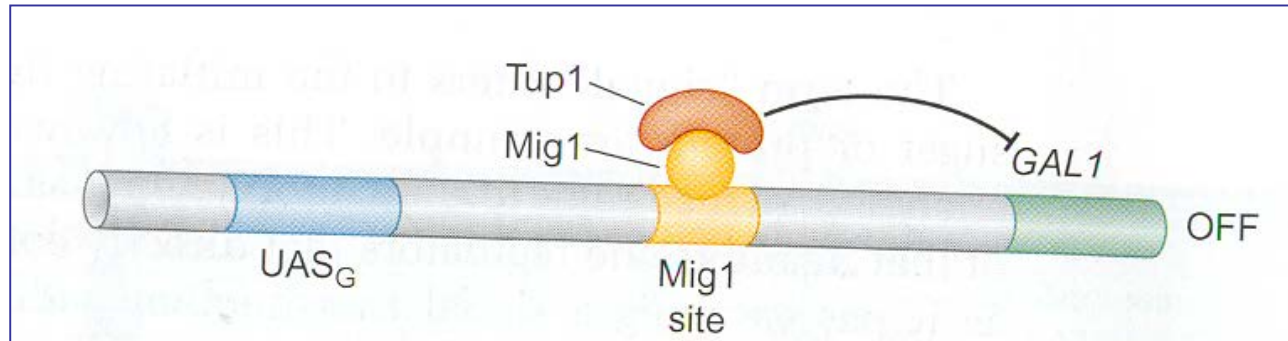
Regulació *cis-trans*: gens *GAL* de llevat



- S'expressen quan en el medi hi ha galactosa
- La seua expressió no és necessària si en el medi hi ha glucosa
- En la regulació també intervé la proteïna Gal80



Regulació *cis-trans*: gens *GAL* de llevat



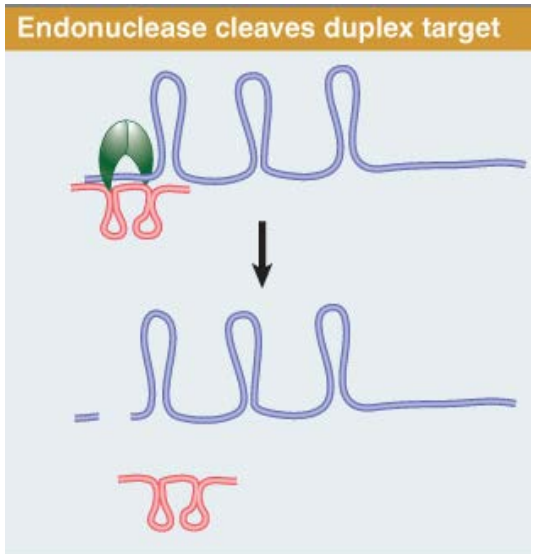
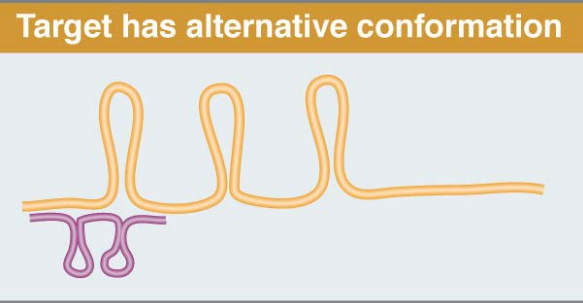
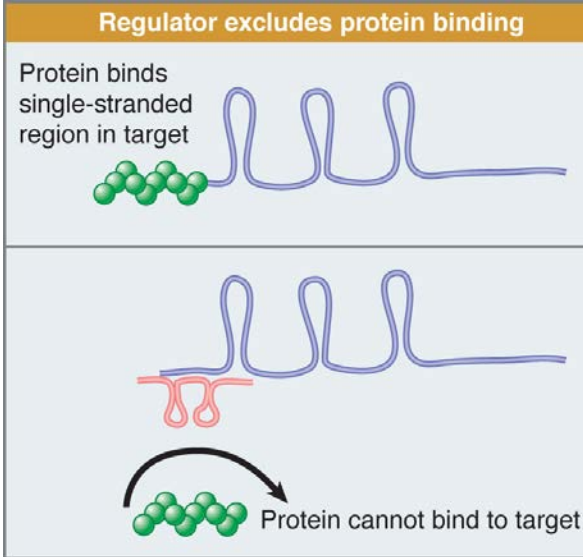
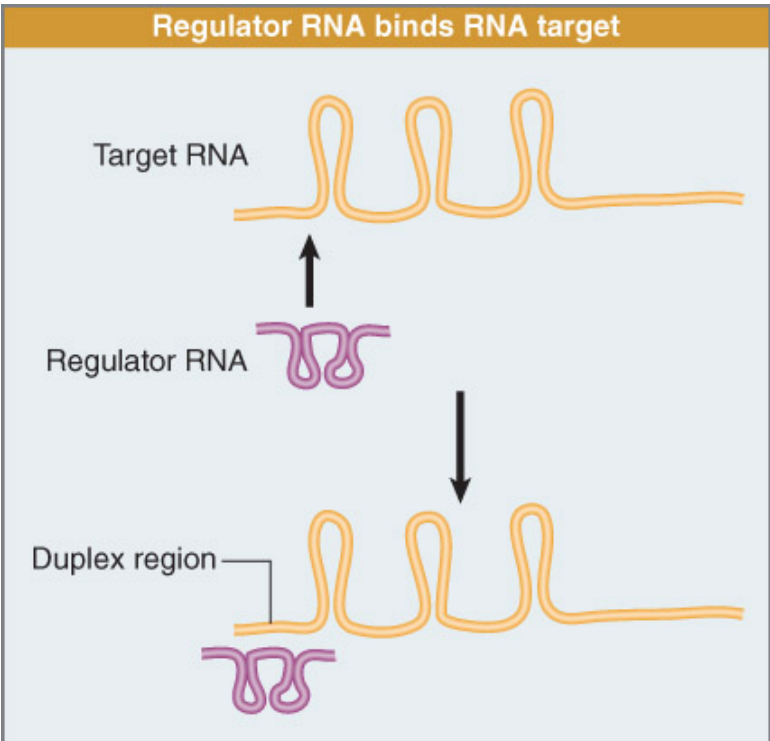
Absència de glucosa

- S'activa la quinasa Snf1
- Fosforila Mig1
- Msn5 s'uneix a Mig1 i l'exporta al citosol
- Mig 1 no està en el nucli → no impedeix la transcripció

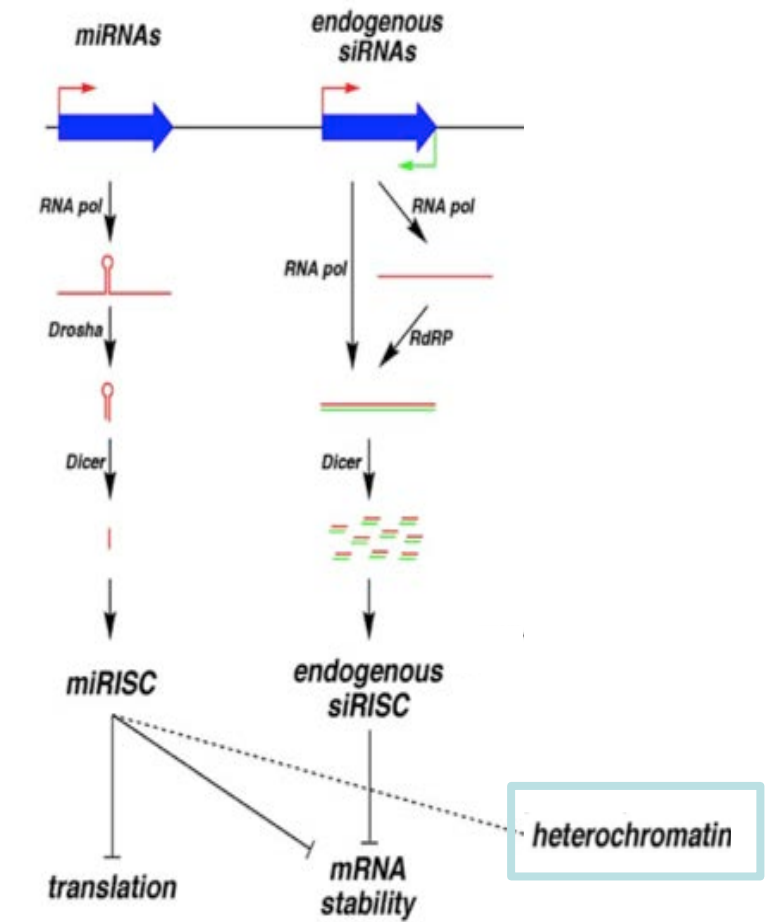
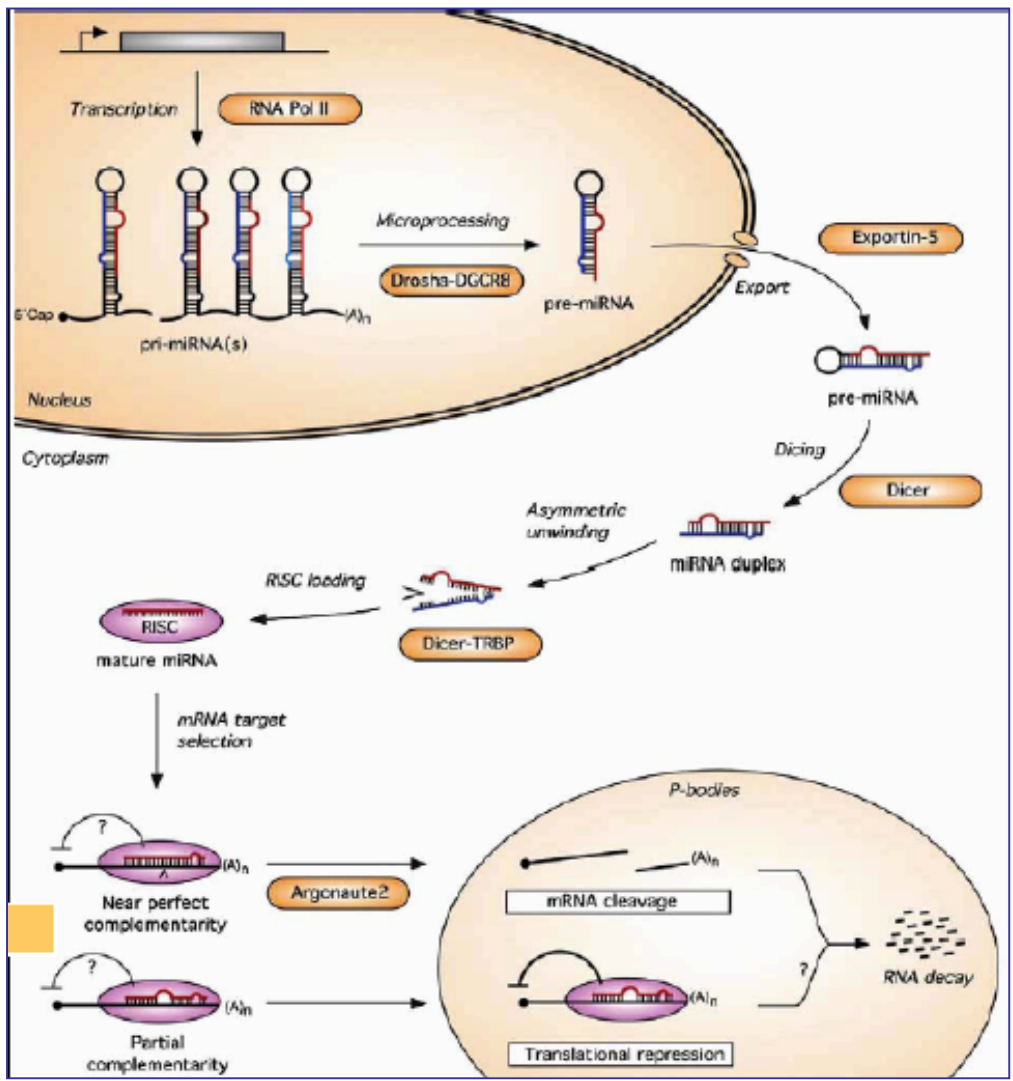
Hi ha glucosa

- Snf1 inactiu
- Mig1 no fosforilada, en el nucli
- S'uneix a URS en gens *GAL* → no transcripció

Regulació de l'expressió gènica per RNAs



Regulació de l'expressió gènica per RNAs



Regulació de l'expressió gènica per RNAs

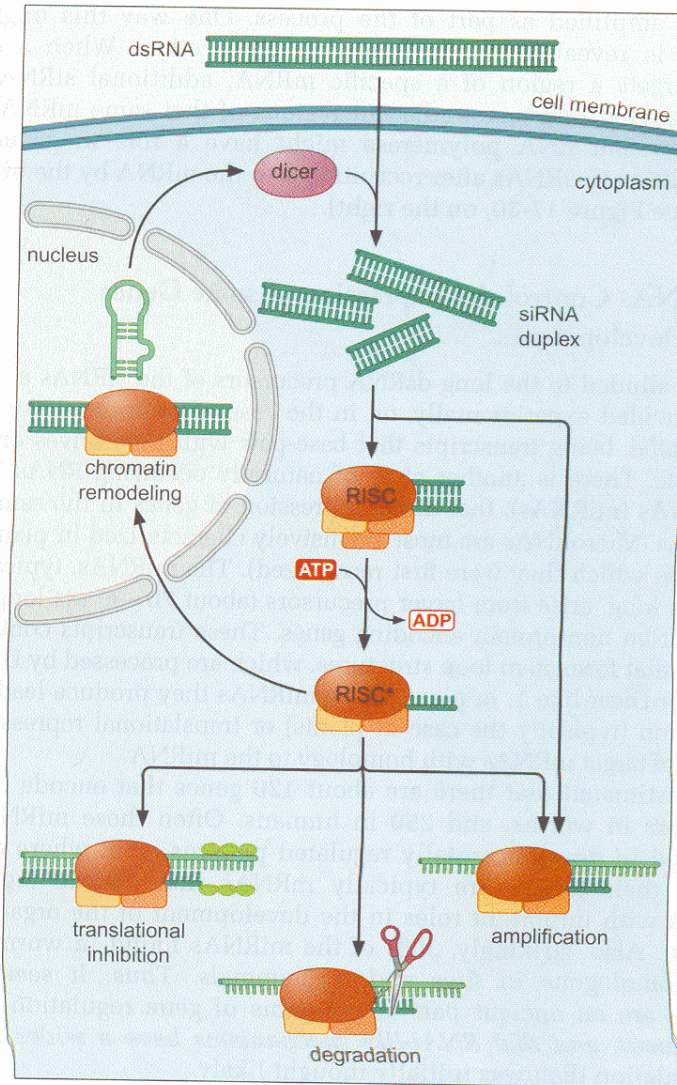


FIGURE 17-30 RNAi silencing. RNAi switches off the expression of a given gene when double-stranded RNA molecules with homology to that gene are introduced, or made, in that cell. This effect involves processing of the dsRNA to make short interfering RNAs by the enzyme Dicer. These siRNAs then direct a complex called RISC (RNA-induced silencing complex) to repress genes in three ways. It attacks and digests mRNA with homology to the siRNA, it interferes with translation of those mRNAs; or it directs chromatin modifying enzymes to the promoters that direct expression of those mRNAs. Although in the figure RISC performs some functions in the cytoplasm and enters the nucleus for another, all could take place in the nucleus. (Source: Adapted from Hannon G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418: 244–251, Fig 5, p. 249. Copyright © 2002 Nature Publishing Group. Used with permission.)

Tema 7

Modificació postranscripcional de l'RNA.

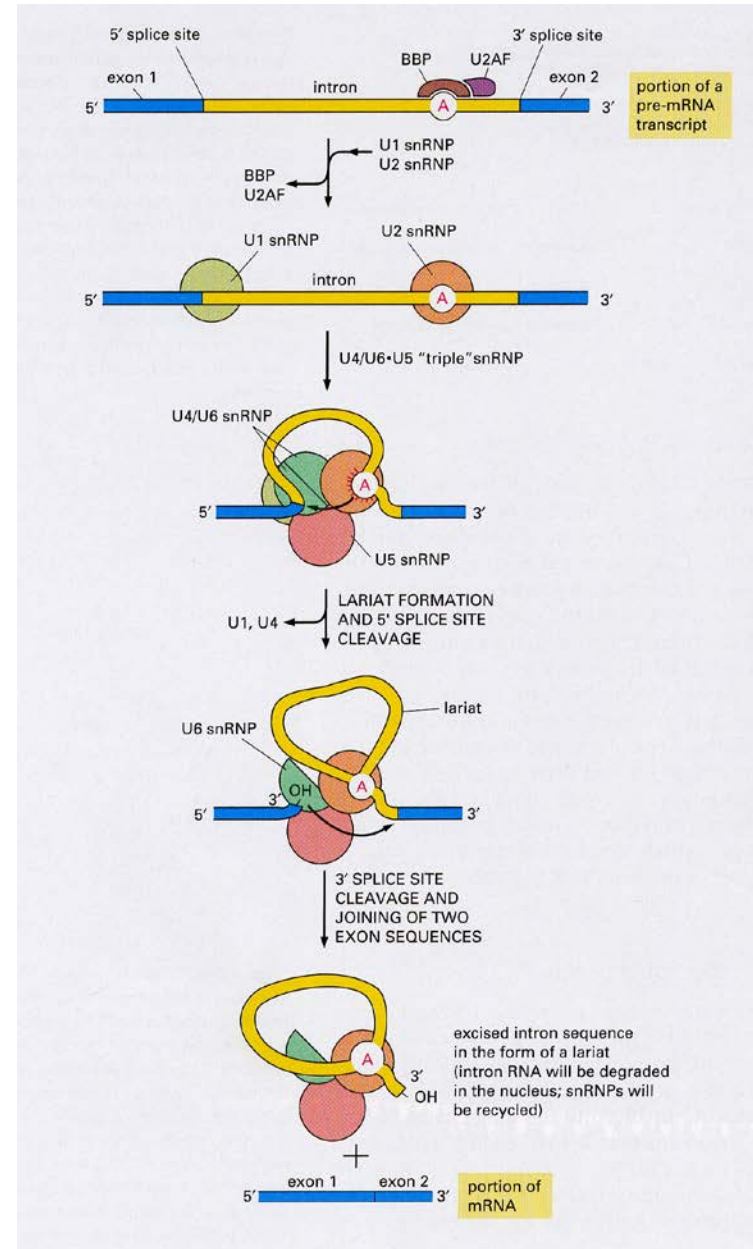
Tipus de processament:

- Modificació dels extrems.
- Eliminació d'introns.
- Tall i retall.
- Modificacions químiques.
- Correcció de la seqüència.

Processament de l'mRNA i de l'RNA no codificant.

Eliminació d'introns.

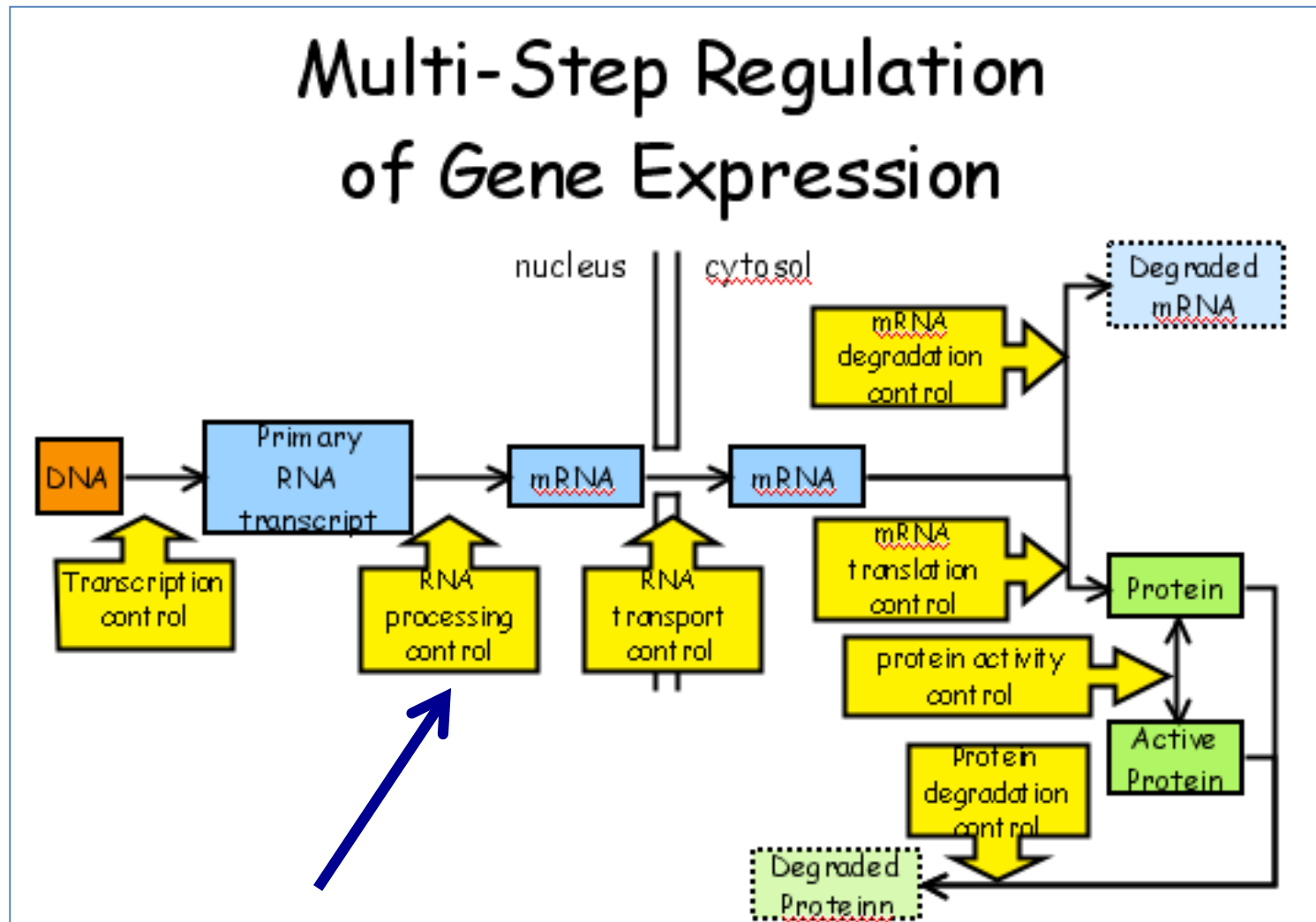
Transport de l'mRNA al citoplasma i degradació.



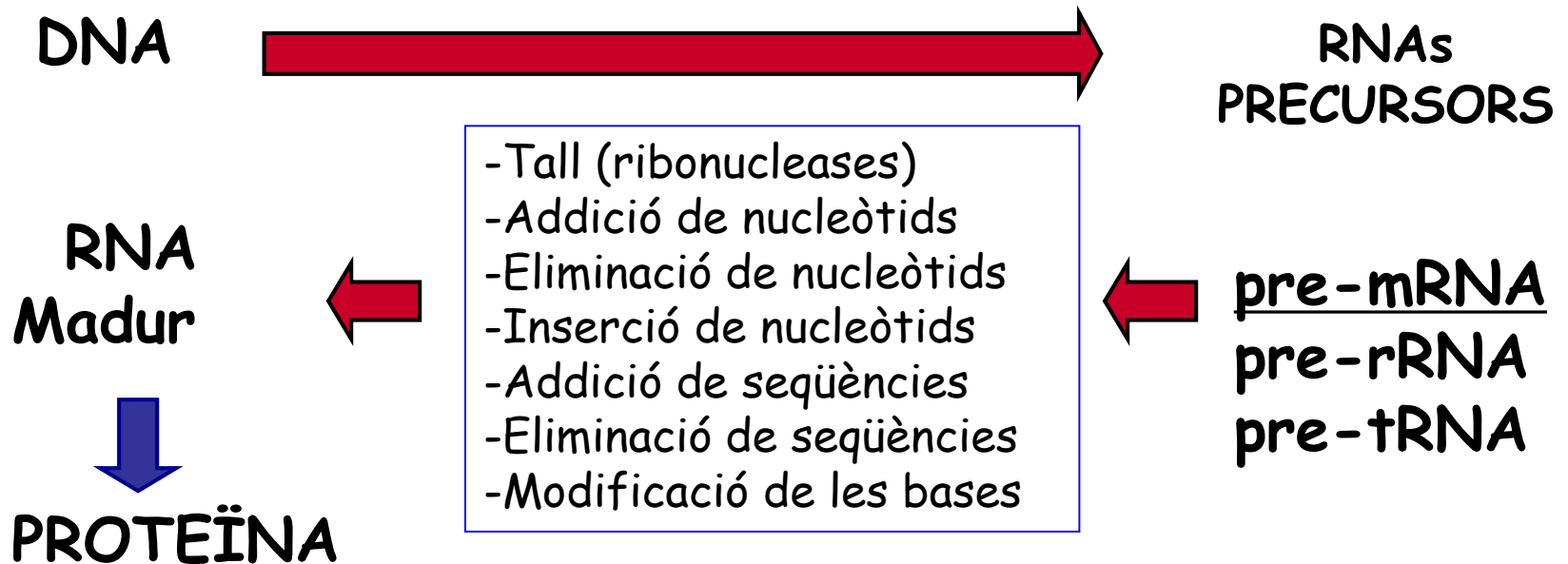
Tema 7

Generalitats sobre el
processament de l'RNA

Nivells de regulació de l'expressió gènica en eucariotes



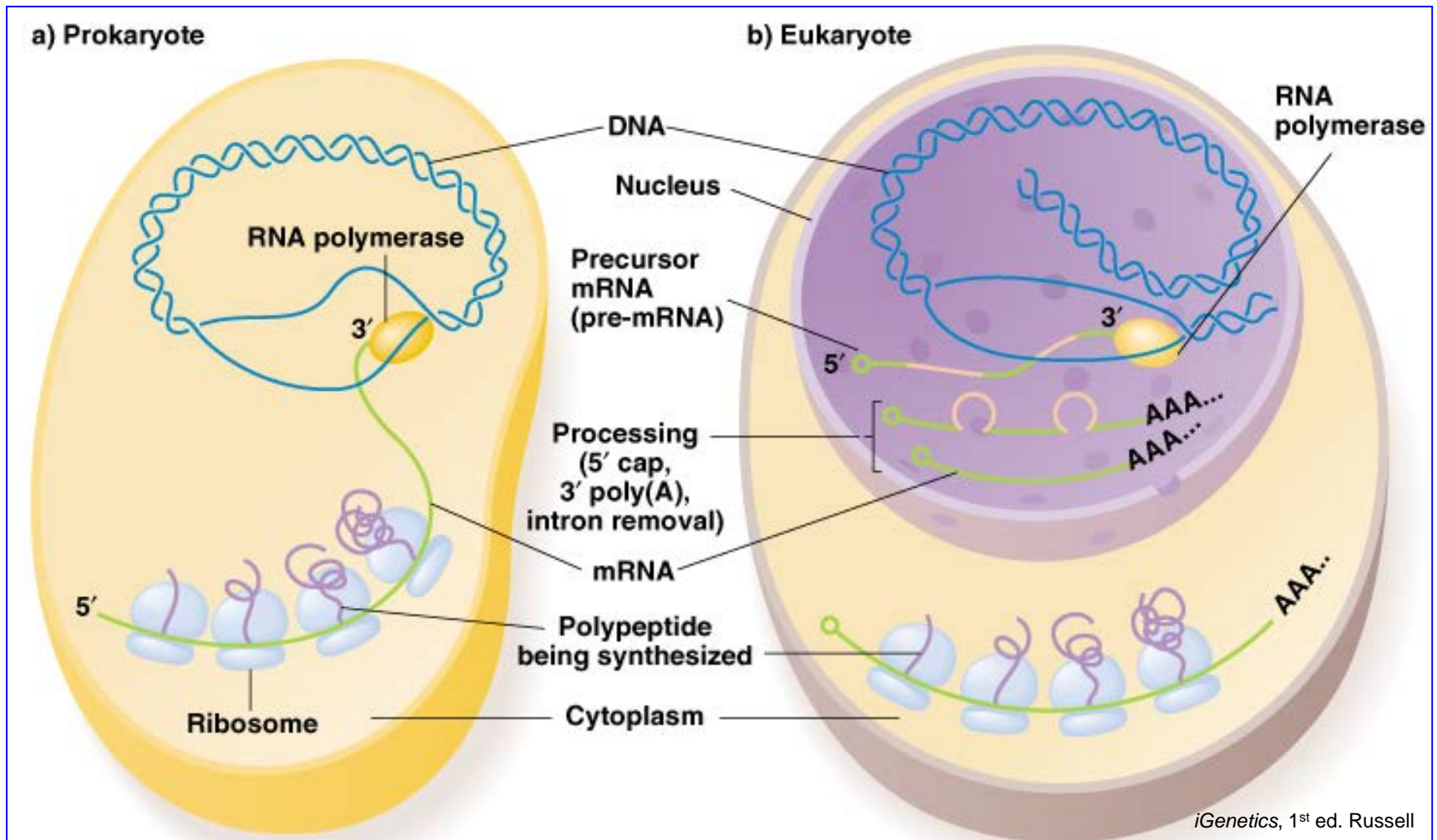
Processament de l'RNA



Processament de l'RNA

En bacteris transcripció i traducció estan acoblades

En eucariotes l'mRNA ha de processar-se i exportar-se al citoplasma



Tipus de processament

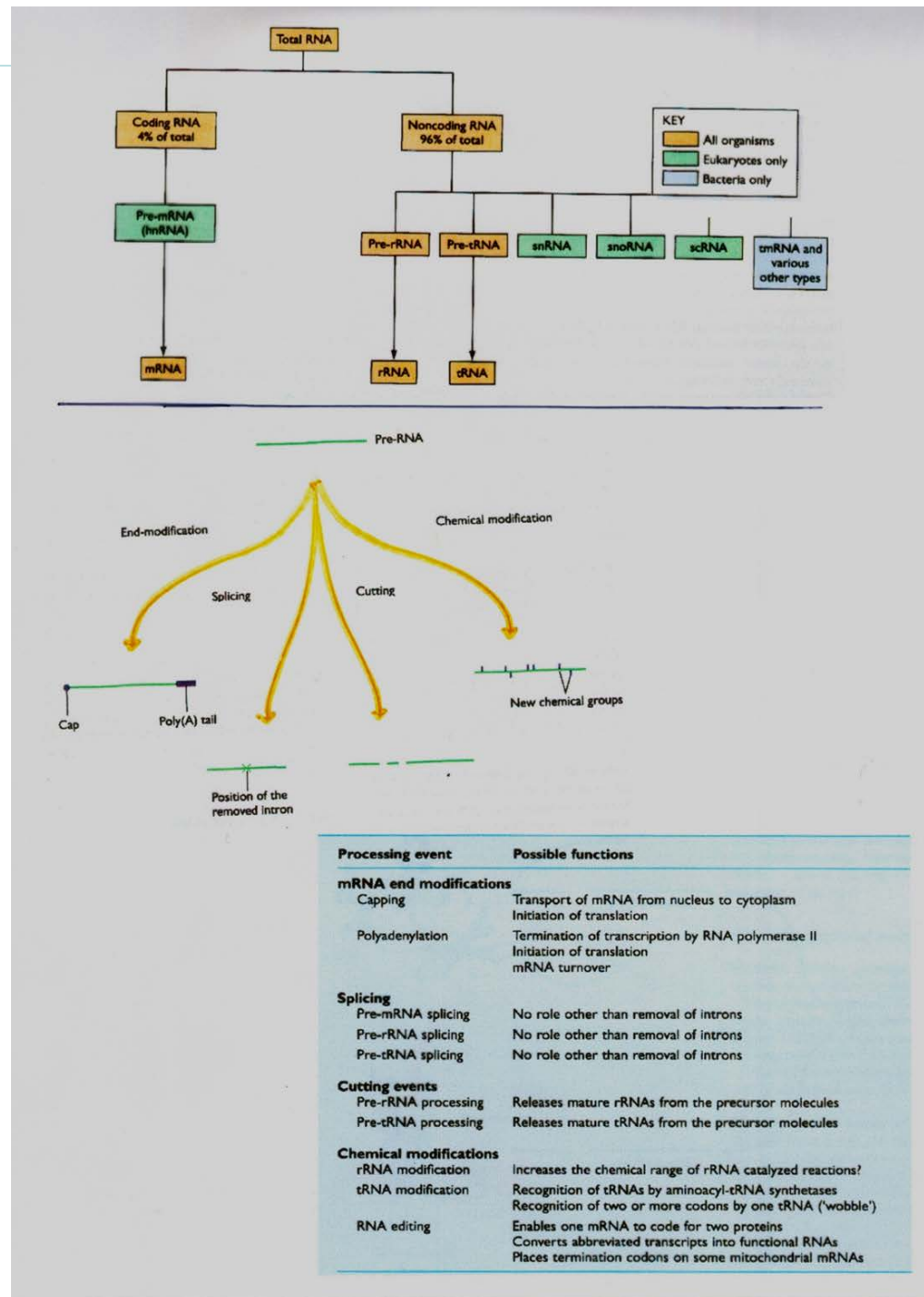
Resum de les modificacions postranscripcionals experimentades pels diferents tipus d'RNA

	precursor	corte por endonucleasas	corte de intrones y empalme de exones	corte por exonucleasas	adición en 3'	modificación en 5'	modificación de nucleósidos
PROCARIOTAS							
mRNA	- - - - - (no sufren procesamiento postranscripcional) - - - - -						
rRNA	de 30S, da lugar a los tres rRNAs (16S, 23S, 5S) y algún tRNA	a ambos lados (RNasa III)	en algunos organismos (autoempalme)	procesamiento en ambos extremos			algunas bases metiladas
tRNA	da lugar a varios tRNAs y en algunos casos también a rRNAs	a ambos lados (RNasa P y RNasa III)		extremo 3' recortado por RNasa D			muchas bases modificadas, gran diversidad
EUCARIOTAS							
mRNA	pre-mRNA (da lugar a un solo mRNA)	sólo en el extremo 3'	sí (con autoempalme en mRNA mitocondrial)		cola de poli(A)	caperuzas 5'	en casos puntuales (ej.: desaminación de C→U)
rRNA	de 35 a 47S, da lugar a tres rRNAs (18S, 5,8S, 28S); otro precursor da el rRNA 5S	(similar a procariotas)	en algunos unicelulares (autoempalme)	(similar a procariotas)			metilación de ribosas
tRNA	da lugar a un solo tRNA		en algunos; distinto mecanismo	en ambos extremos	adición de CCA (tRNA-nucleotidil-transferasa)		muchas bases modificadas, menor diversidad

Tipus de processament

- Modificacions dels extrems 5' i 3' en la majoria dels mRNAs eucariòtics
- Eliminació d'introns en mRNAs i en alguns rRNAs i tRNAs eucariòtics. També hi ha autoeliminació en alguns procariotes
- Talls en rRNAs i tRNAs
- Modificacions químiques en rRNAs, tRNAs i mRNAs

Tipus de processament

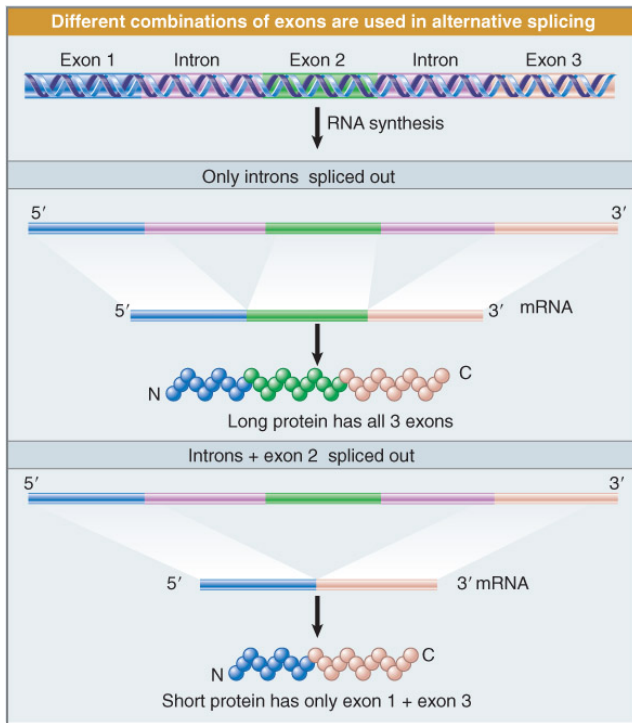


Modificacions postranscripcionals de l'mRNA que regulen l'expressió gènica

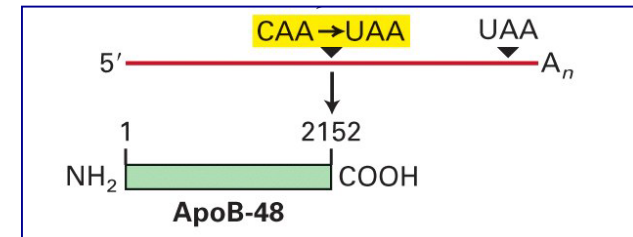
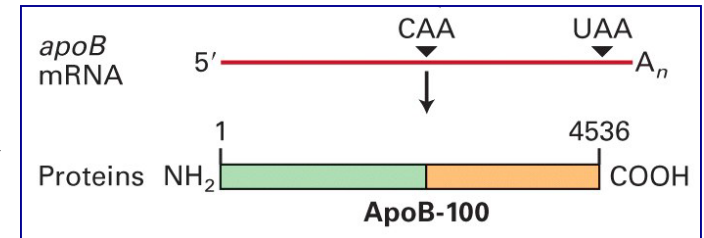
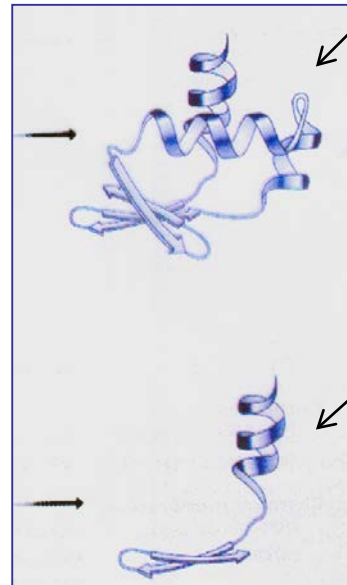
- **Gorra 5'**
 - Estabilitat
 - Eficiència de la traducció
- **Poliadenilació**
 - Estabilitat
 - Eficiència de la traducció
 - Control de traducció/emmagatzematge de l'mRNA
- **Splicing (eliminació d'introns)**
 - Determinació de la seqüència funcional
 - Producció d'algunes proteïnes a partir del mateix gen
 - Regulació durant el desenvolupament específica de teixit, determinació del sexe...

Modificacions postranscripcionals de l'mRNA que augmenten la capacitat codificant

-Splicing alternatiu



-Correcció de l'RNA (editing)



Processament de l'RNA

En el processament dels RNAs participen RNAs
(a més de proteïnes)

rRNA

snoRNAs

formen complexos amb proteïnes, dirigeixen les modificacions de nt

tRNA

RNasa P

snoRNAs

components: RNA i proteïna; activitat enzimàtica
formen complexos amb proteïnes, dirigeixen les modificacions de nt

mRNA

snRNAs

gRNAs

miRNAs

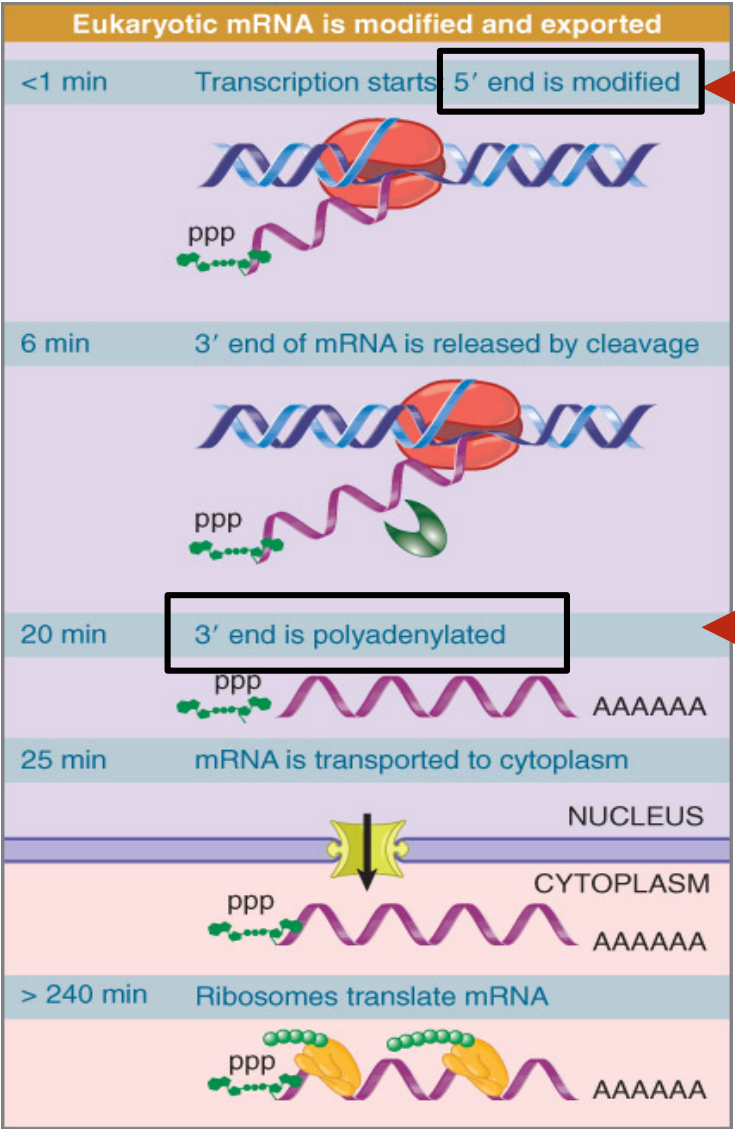
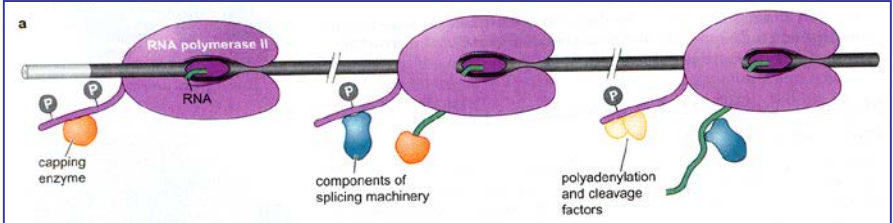
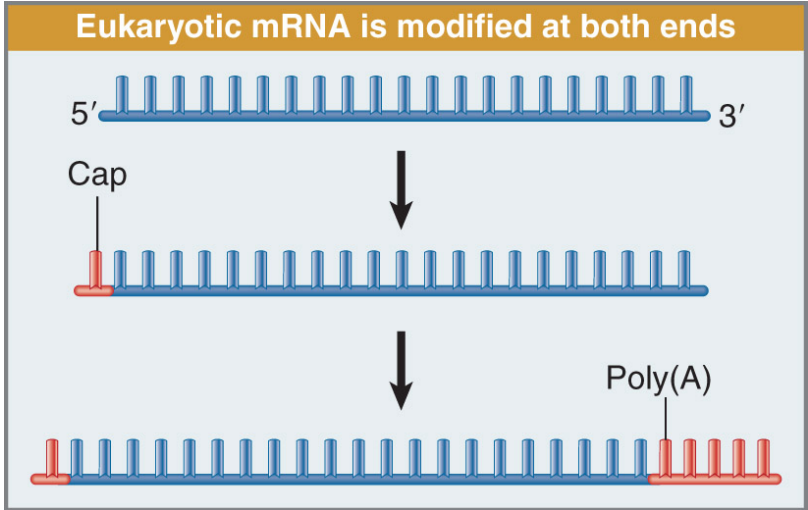
siRNAs

U1,2,4,5,6 formen l'“espliceosoma” junt amb moltes proteïnes
aporten informació de seqüència per a la correcció de l'RNA
importants per a regulació de l'expressió gènica
importants per a regulació de l'expressió gènica

Tema 7

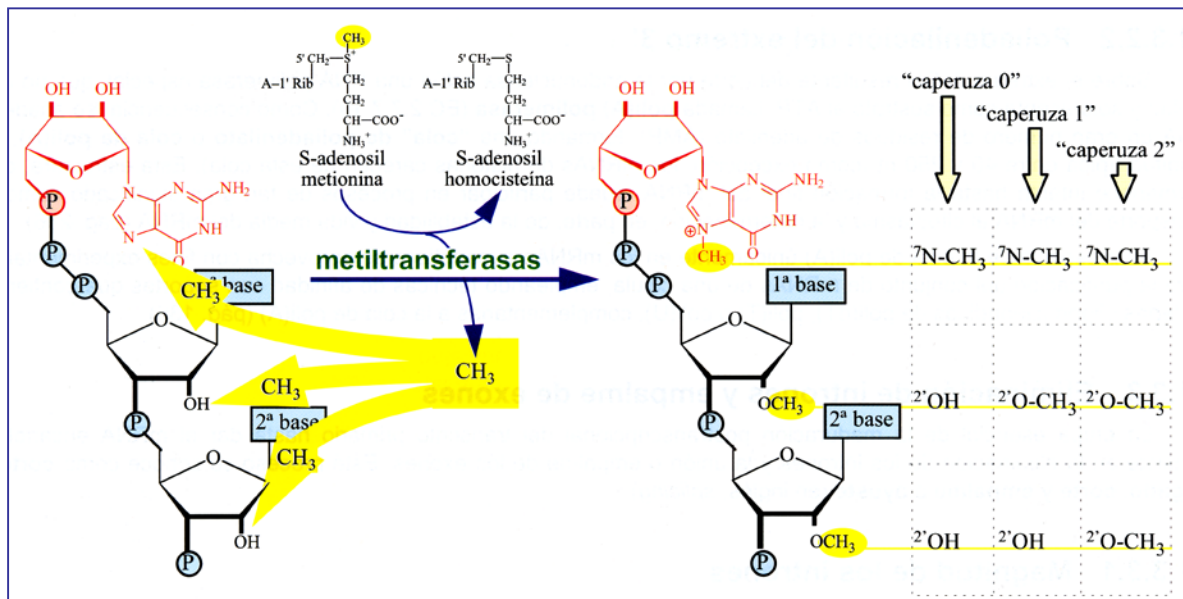
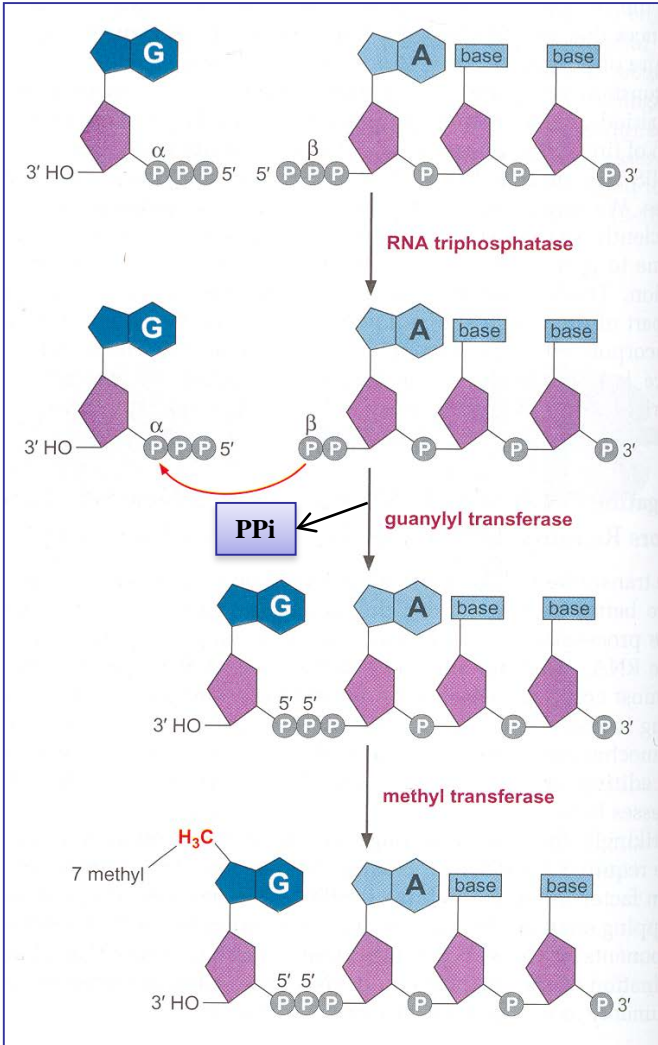
Tipus de processament

Modificació dels extrems de l'mRNA



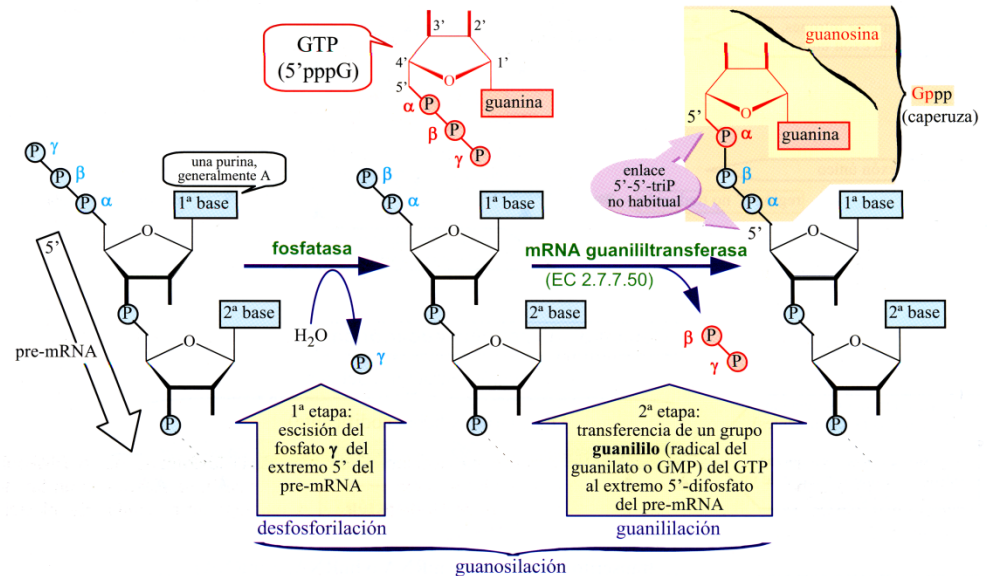
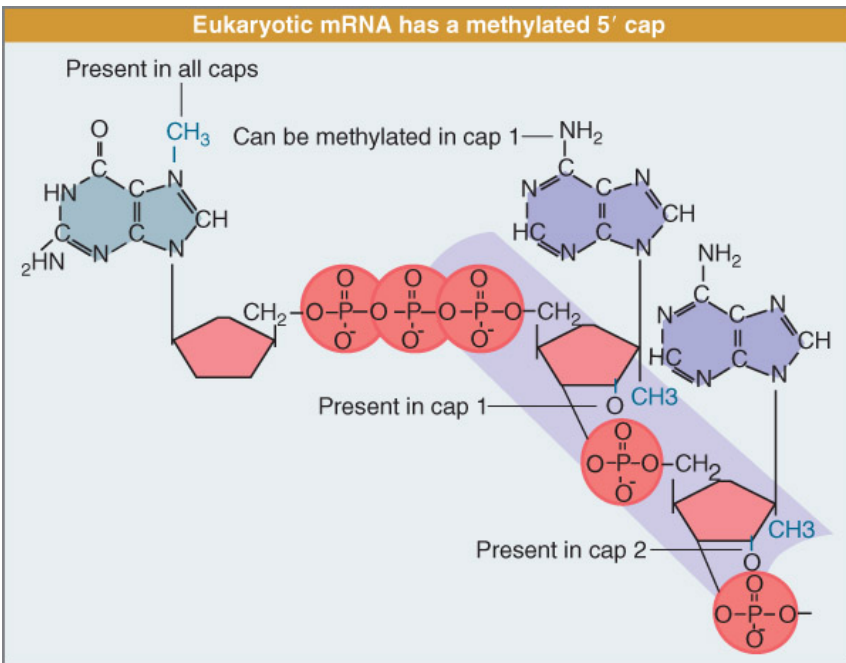
Modificació de l'extrem 5'

Adquisició en l'extrem 5' de Gppp (gorra o caputxa)



Modificació de l'extrem 5'

Adquisició en l'extrem 5' de Gppp (gorra)



base:	nucleósido:	nucleótido:	
molécula:	guanina	guanosina	guanilato (GMP)
radical:	guanilo	guanosilo	guanililo

Eliminació d'introns

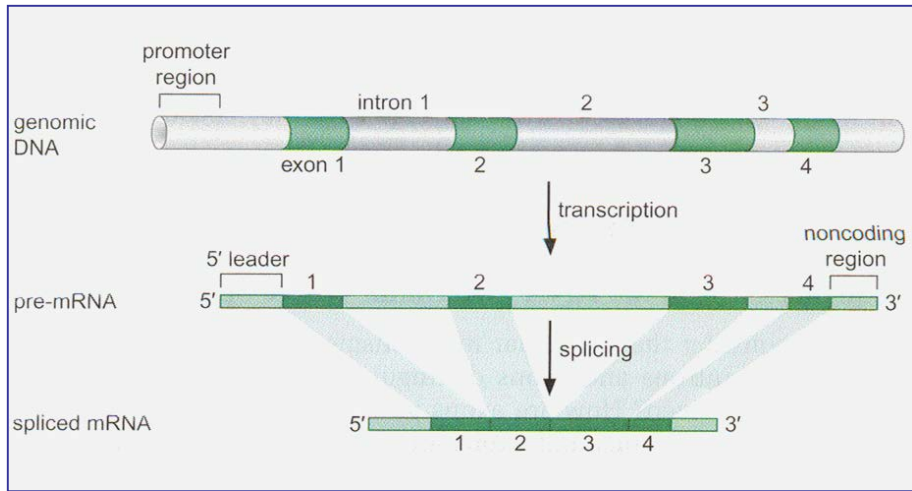
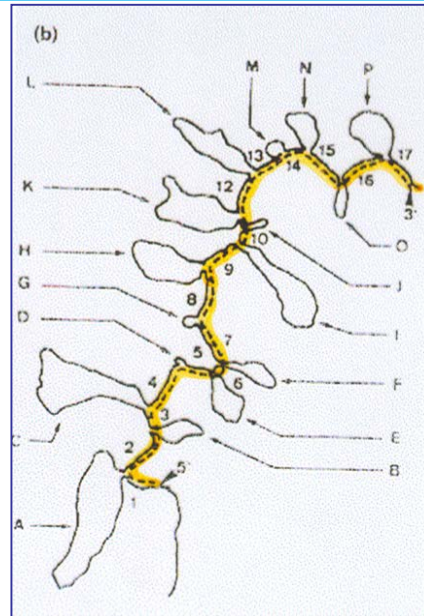
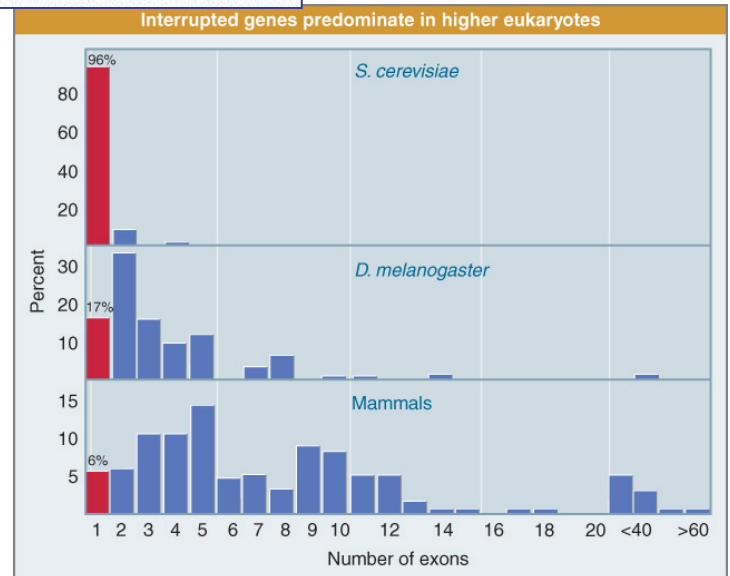


FIGURE 13-1 Typical eukaryotic gene.

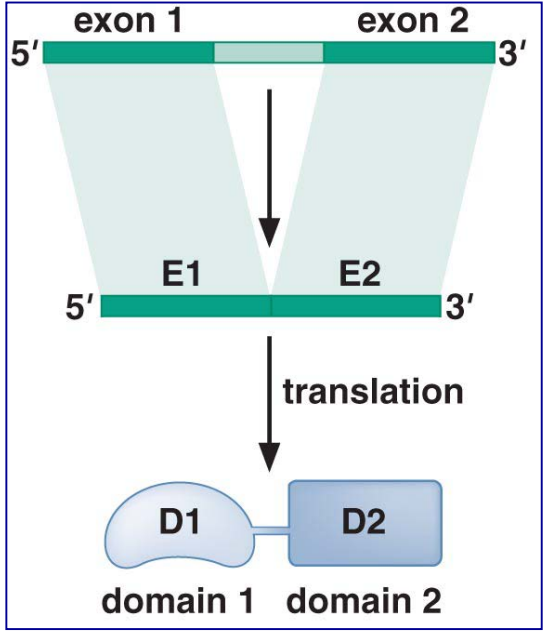
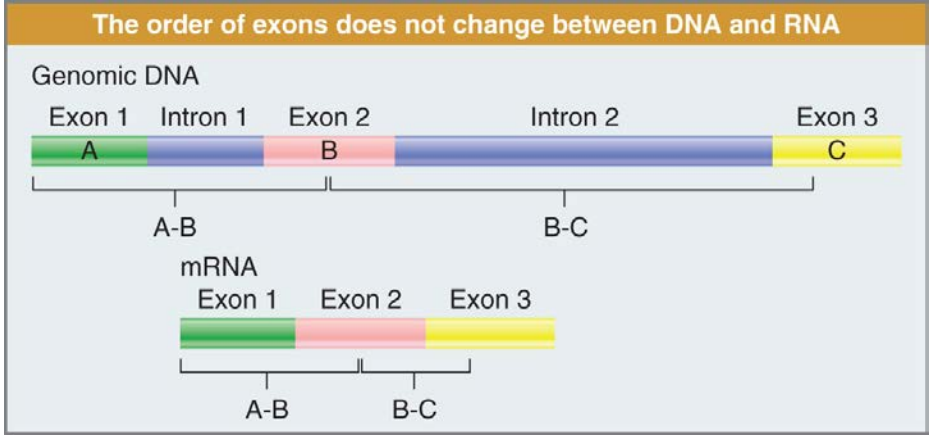
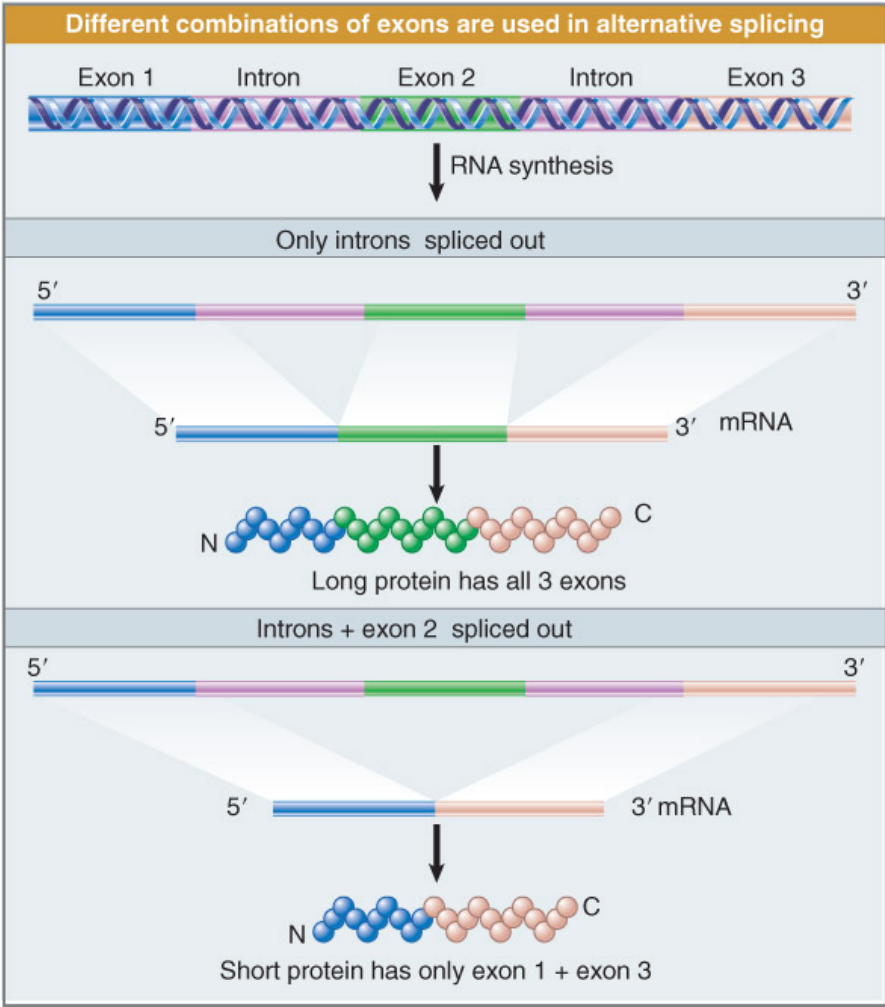


Gen de l'ovotransferrina de pollastre.
La imatge al microscopi de l'híbrid DNA: mRNA revela 17 exons i 16 introns.

Eliminació de blocs de seqüències no codificants
(introns: *intervening sequences*)
i unió de les seqüències codificants que els flanquegen
(exons: *expressed sequences*)



Eliminació d'introns



Principals tipus d'introns

Tipus d'intró	On es troba	Mecanisme de <i>splicing</i>
GU-AG AU-AC	Pre-mRNAs nuclears d'eucariotes	Espliceosomal
Grup I	Pre-rRNAs nuclears d'eucariotes RNAs d'orgànuls	<i>Self-splicing</i>
Grup II	RNAs d'orgànuls Alguns RNAs de procariotes	<i>Self-splicing</i>
Pre-tRNA	Pre-tRNAs nuclears d'eucariotes	Enzimàtic

Tall per endonucleases

rRNAs i tRNAs

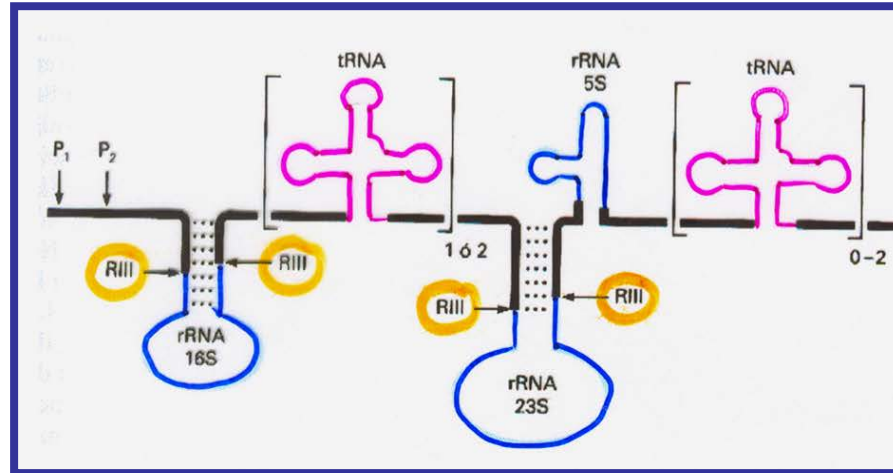


FIGURA 26.37

Estructura del pre-rRNA de 30S de *E. coli*. Se muestran las secuencias complementarias de los dos lugares promotores (P_1 y P_2), los lugares de ruptura de la RNasa III (RIII) que liberan las especies 16S y 23S, y las localizaciones de las secuencias de tRNA incluidas en el transcrito.

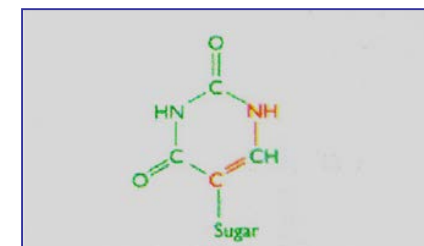
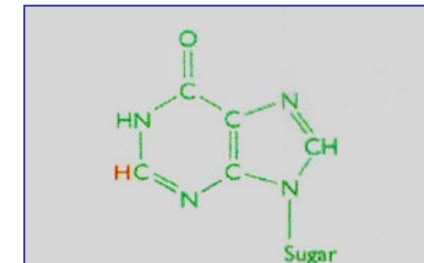
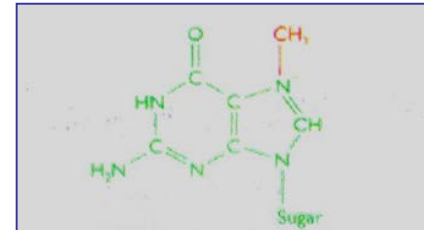
Modificaciones químiques

En tots els casos

Metilació: Guanosina → 7-metil guanosina

Desaminació: Adenosina → Inosina
 Citidina → Uridina
 Guanina → Xantina

Isomerització: uridina → pseudouridina



Correcció de l'RNA (*editing*)

Canvis en la seqüència d'un RNA respecte de la codificada pel DNA, amb producció d'un transcrit funcional.

Se ha descrit en:

- protozous, plantes i mamífers (encara no en fongs i procariotes)
- nucli, mitocondri, cloroplast
- mRNAs, tRNAs, rRNAs i RNAs vírics

Dos tipus generals

Modificació de bases (desaminació)

A → I: en virus i gens humans

C → U; en cloroplastos, mitocondris de plantes, gens humans

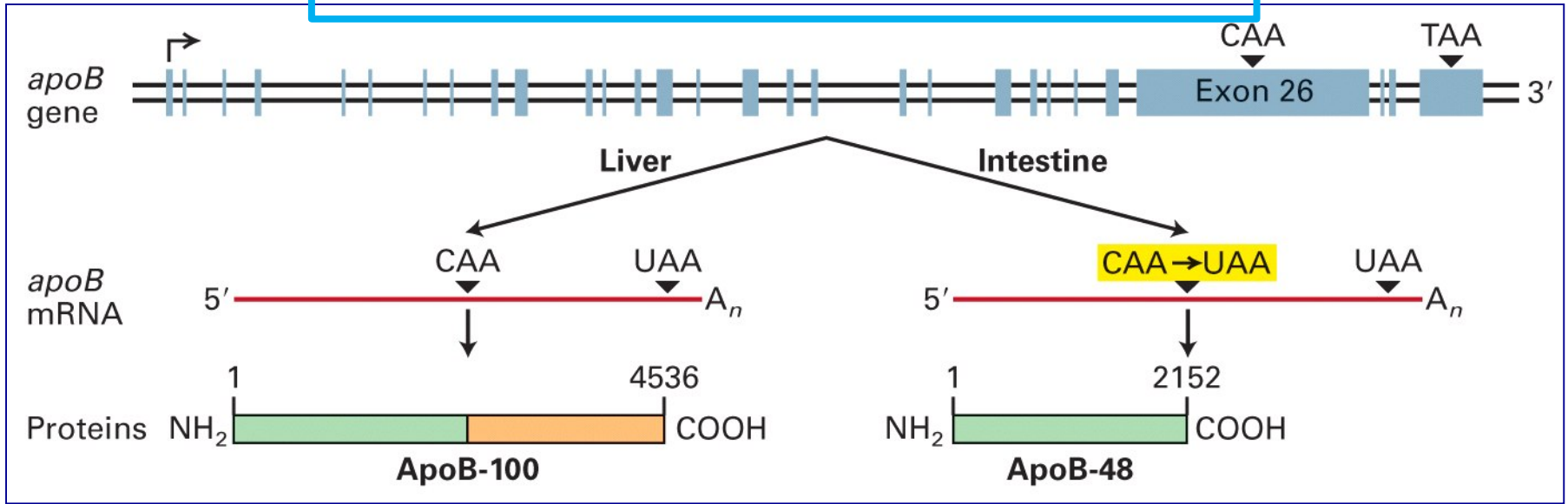
Inserció/deleció

Inserció/deleció U, en cinetoplastos de protozous

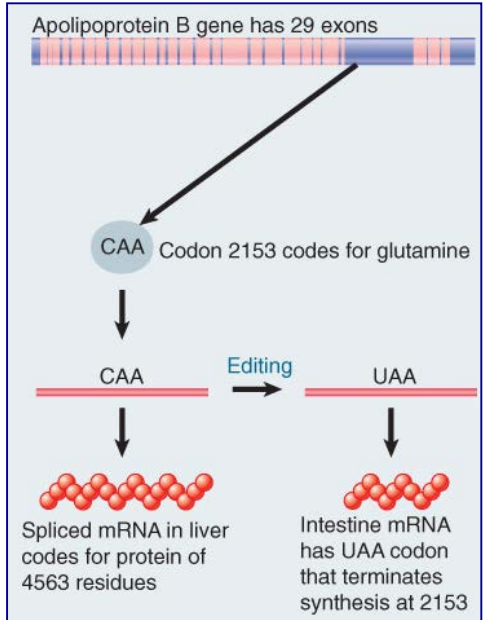
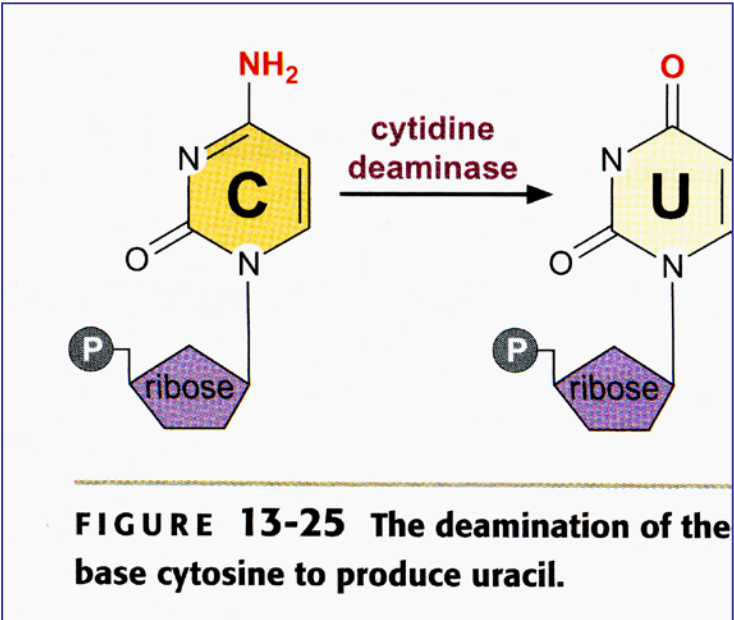
Inserció mono/dinucleòtids, en *Physarum*

Substitució de nucleòtids, en tRNAs de *Acanthamoeba*

Correcció de l'mRNA (*editing*)



1. Per desaminació



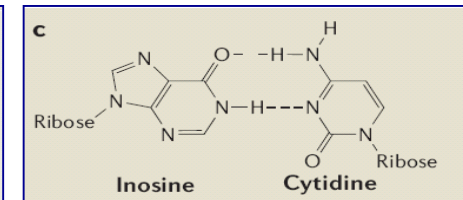
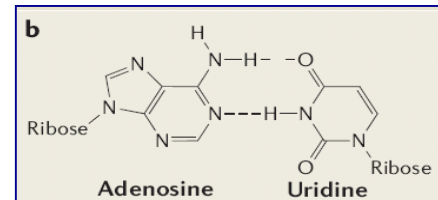
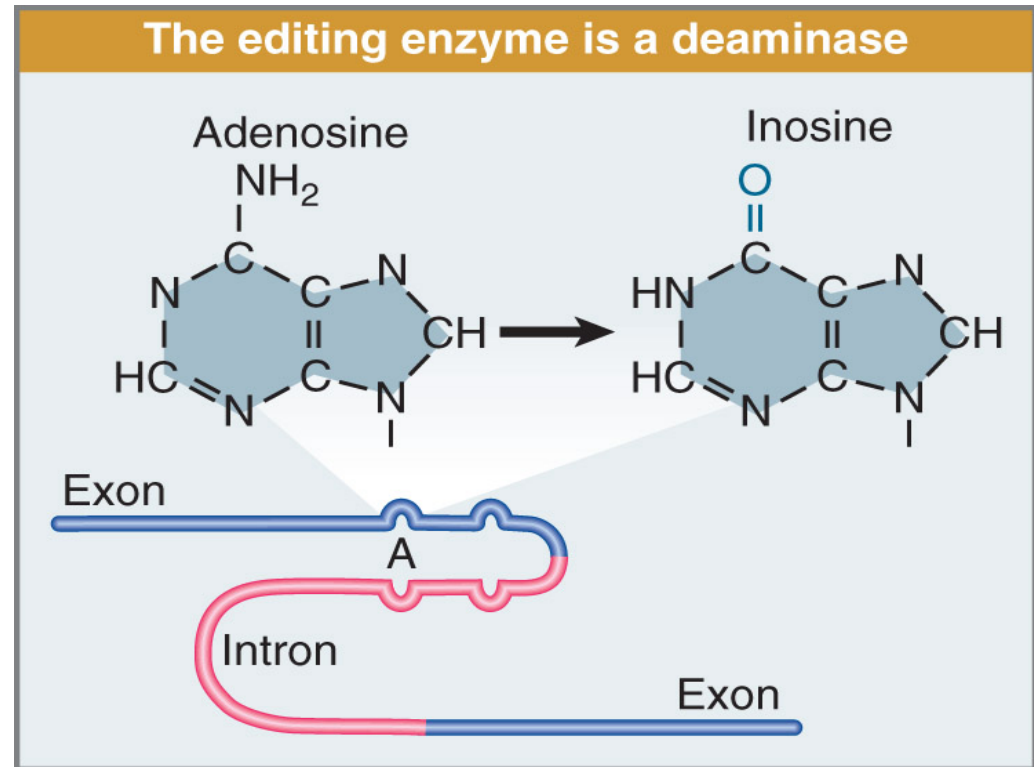
Correcció de l'RNA (*editing*)

1. Per desaminació

Receptor del neurotransmissor glutamat. Alguns condueixen ions Ca^{2+} i Na^+ , altres només Na^+ . Diferència funcional per correcció de l'mRNA

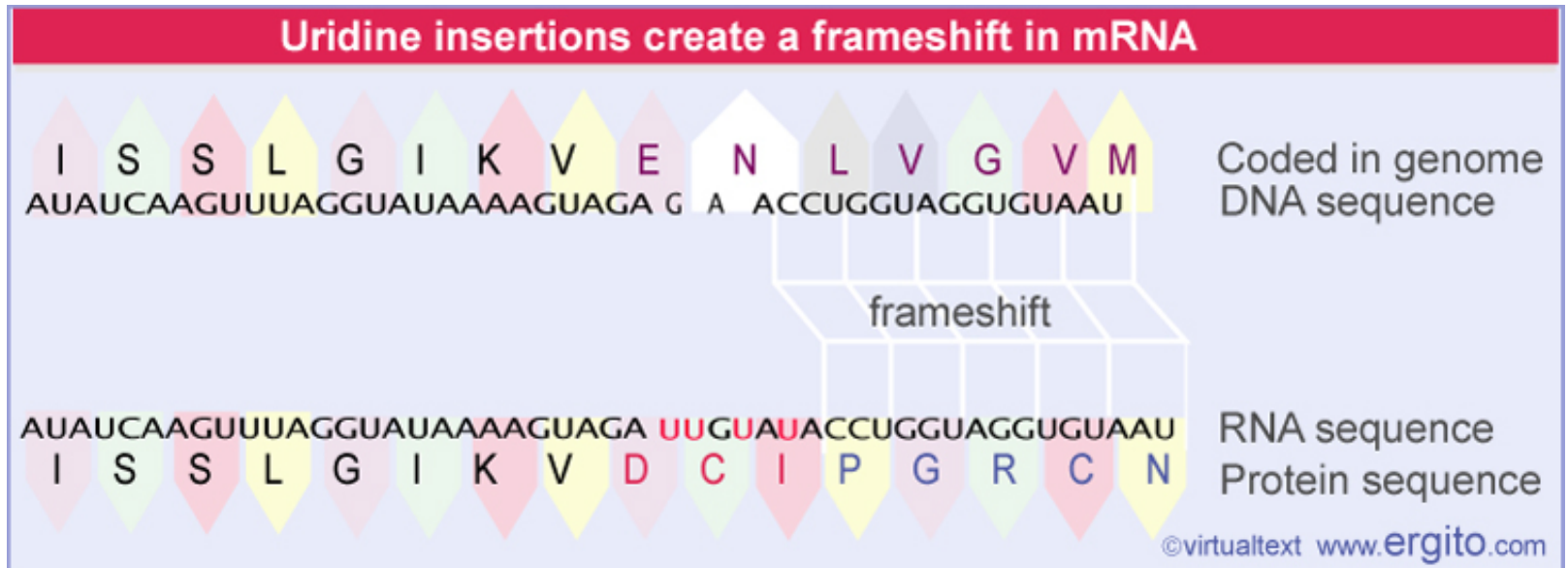
$\text{CAG} \longrightarrow \text{Gln} (\text{Ca}^{2+} \text{ i } \text{Na}^+)$

$\text{CIG} \longrightarrow \text{Arg} (\text{Na}^+)$

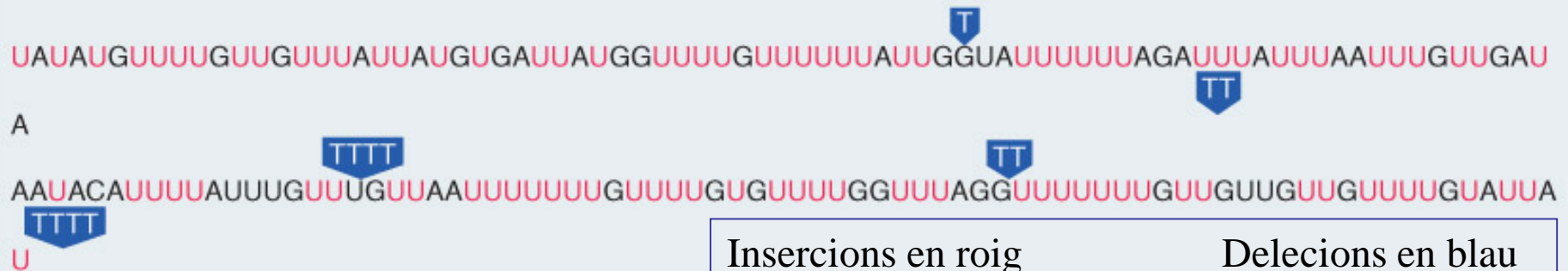


Correcció d'RNAs (*editing*)

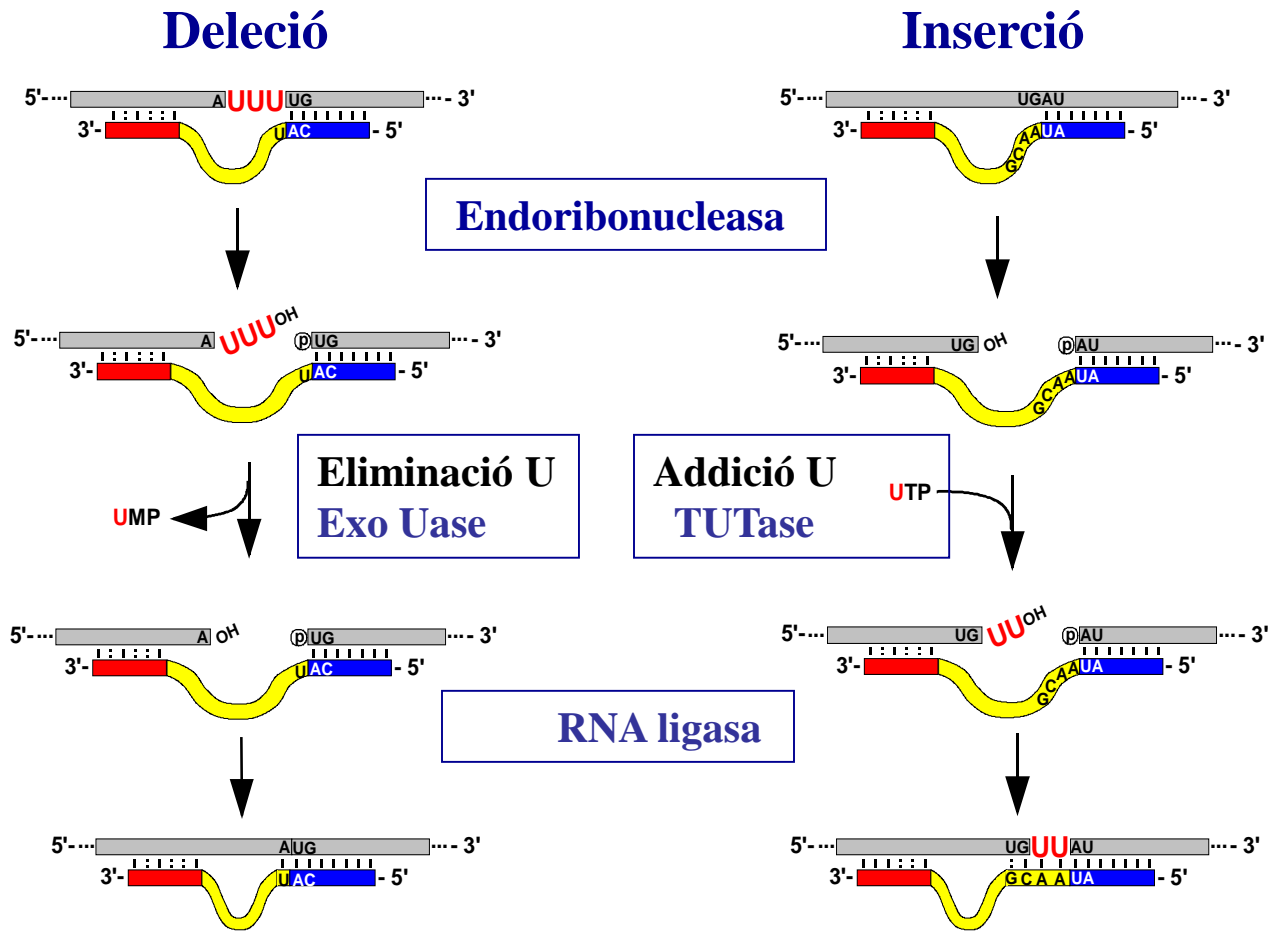
2. Per inserció o eliminació de nucleòtids



CoxIII mRNA has extensive editing by both insertion and deletion of uridine

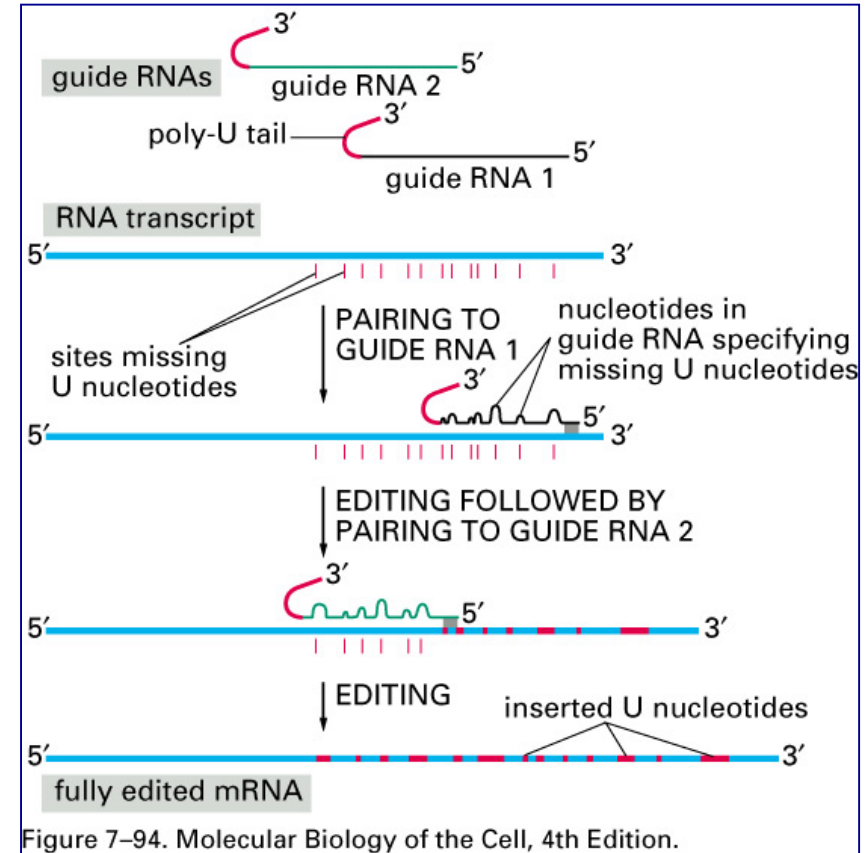


Correcció de l'RNA: mecanisme

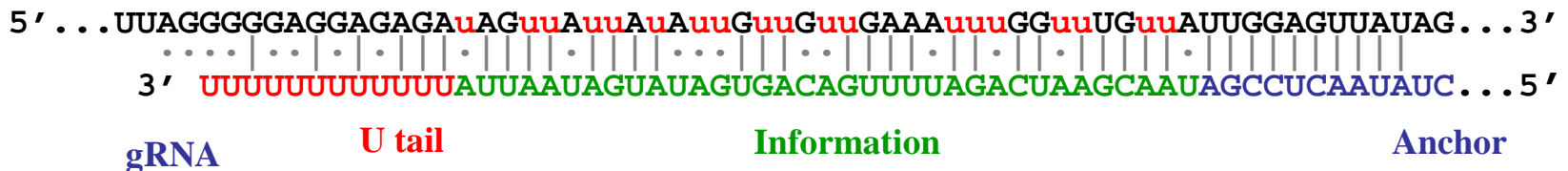


Correcció d'RNAs: mecanisme

- Dirigida per RNAs guia (gRNAs)
RNAs de 60-70 nt amb una cua oligo(U) afegida posttranscripcionalment
- Els nucleòtids s'afigen en direcció 3'-5'

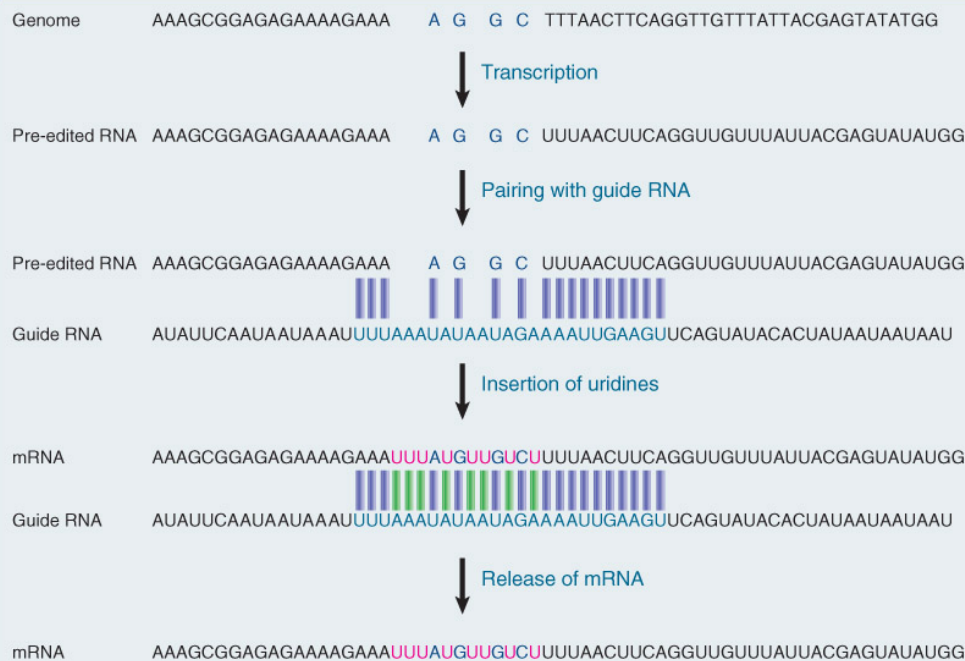


mRNA

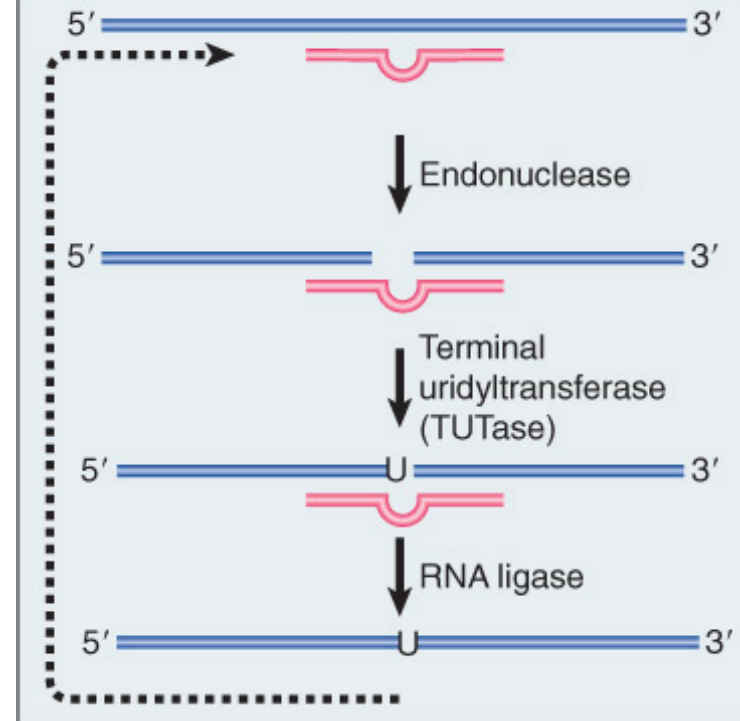


Correcció d'RNAs: mecanisme

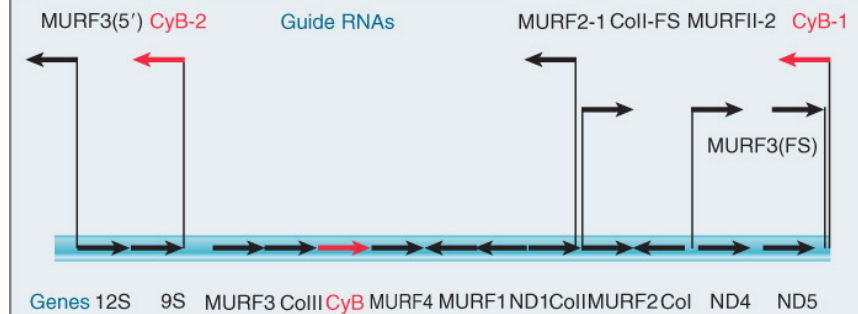
Guide mRNA pairs with pre-edited mRNA to provide a template for editing



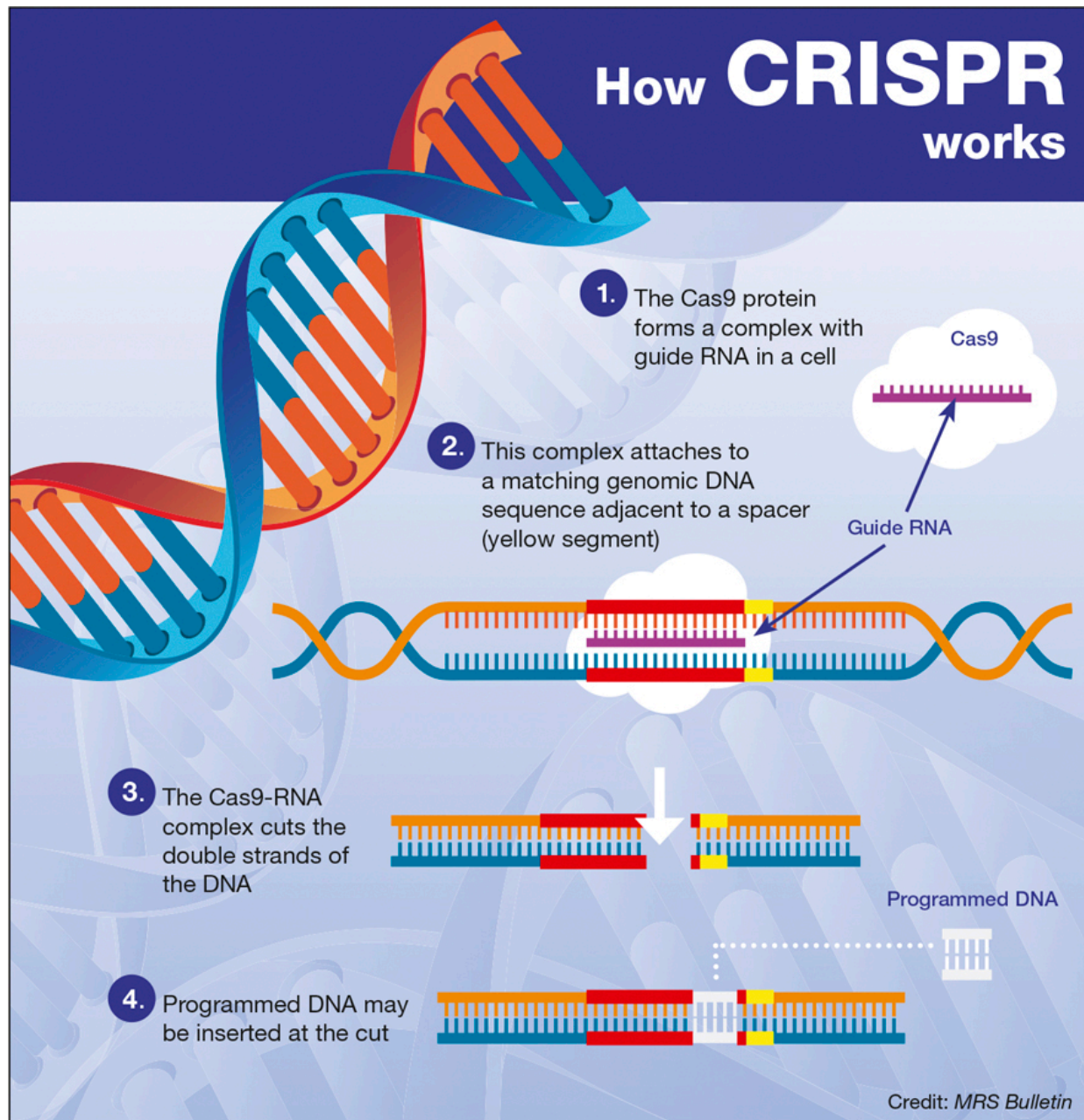
Editing occurs by cleavage and ligation



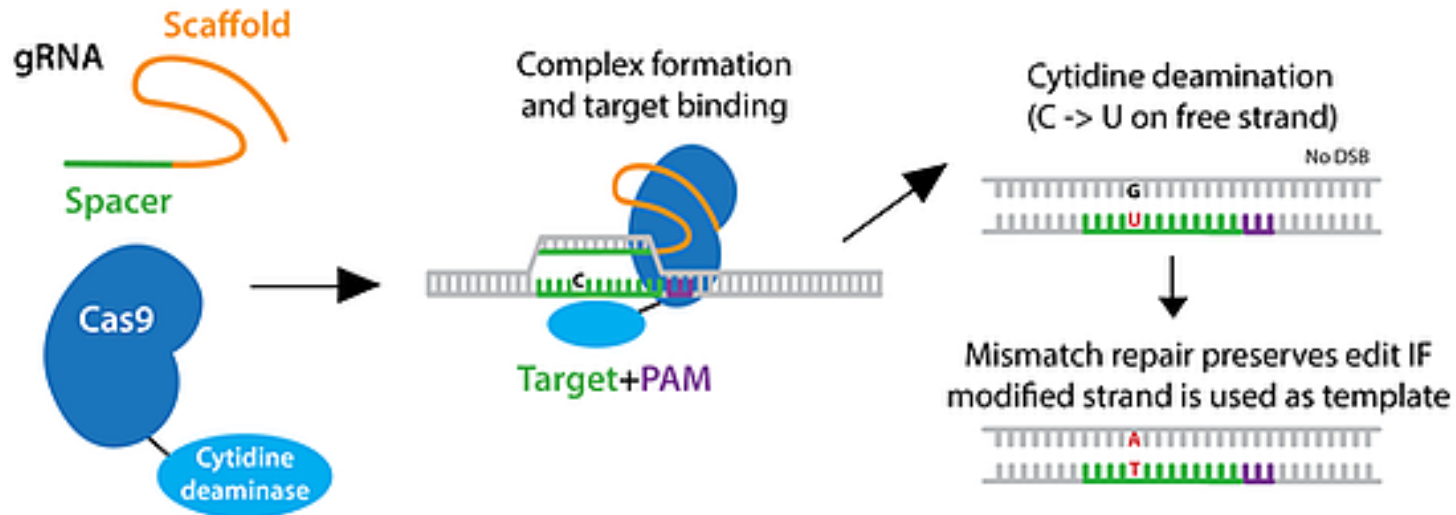
Genes for pre-edited mRNAs are interspersed with guide RNA genes



Correcció
mitjançant
CRISPR



Correcció mitjançant CRISPR



dCas9 or Cas9 nickase
fused to a cytidine deaminase

*Base excision repair inhibitor is
also present in fusion protein*

Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet.* 2018;19:770-788. doi:10.1038/s41576-018-0059-1

Komor created the [first cytosine base editor](#) by coupling a cytidine deaminase with the inactive dCas9 (Komor et al., 2016). These fusions convert cytosine to uracil without cutting DNA. Uracil is then subsequently converted to thymine through DNA replication or repair. Fusing an inhibitor of uracil DNA glycosylase (UGI) to dCas9 prevents base excision repair which changes the U back to a C mutation. To increase base editing efficiency, you'd need a way to force the cell to use the deaminated DNA strand as a template. To do so, the lab used a Cas nickase, instead of dCas9. The resulting editor, BE3, nicks the unmodified DNA strand so that it appears "newly synthesized" to the cell. Thus, the cell repairs the DNA using the U-containing strand as a template, copying the base edit.

Tema 7

Processament d'RNAs no
codificants de proteïnes

Tipus de processament

Resum de les modificacions postranscripcionals experimentades pels diferents tipus d'RNA

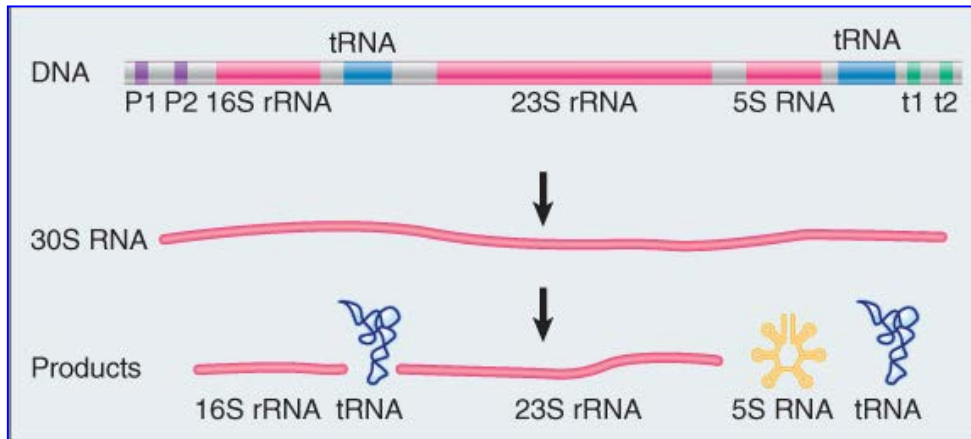


	precursor	corte por endonucleasas	corte de intrones y empalme de exones	corte por exonucleasas	adición en 3'	modificación en 5'	modificación de nucleósidos
PROCARIOTAS							
mRNA	- - - - - (no sufren procesamiento postranscripcional) - - - - -						
rRNA	de 30S, da lugar a los tres rRNAs (16S, 23S, 5S) y algún tRNA	a ambos lados (RNasa III)	en algunos organismos (autoempalme)	procesamiento en ambos extremos			algunas bases metiladas
tRNA	da lugar a varios tRNAs y en algunos casos también a rRNAs	a ambos lados (RNasa P y RNasa III)		extremo 3' recortado por RNasa D			muchas bases modificadas, gran diversidad
EUCARIOTAS							
mRNA	pre-mRNA (da lugar a un solo mRNA)	sólo en el extremo 3'	sí (con autoempalme en mRNA mitocondrial)		cola de poli(A)	caperuzas 5'	en casos puntuales (ej.: desaminación de C→U)
rRNA	de 35 a 47S, da lugar a tres rRNAs (18S, 5,8S, 28S); otro precursor da el rRNA 5S	(similar a procariotas)	en algunos unicelulares (autoempalme)	(similar a procariotas)			metilación de ribosas
tRNA	da lugar a un solo tRNA		en algunos; distinto mecanismo	en ambos extremos	adición de CCA (tRNA-nucleotidil-transferasa)		muchas bases modificadas, menor diversidad

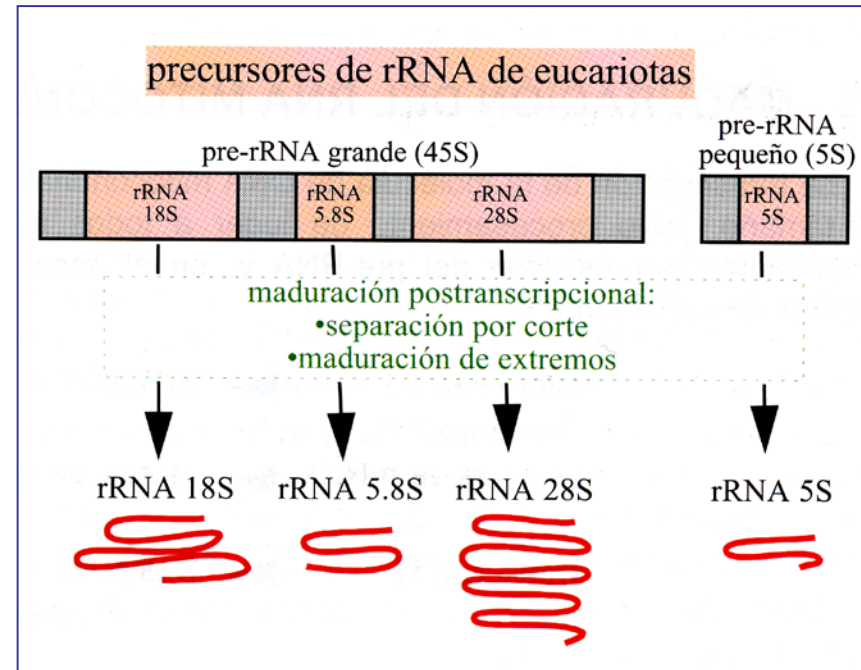
Processament d'rRNAs

- Tall per nucleases
- Modificacions químiques

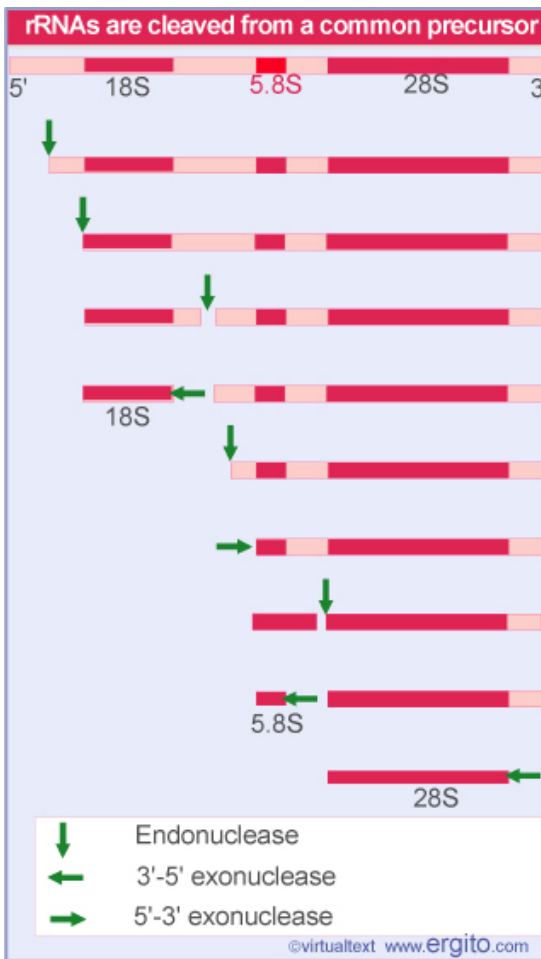
precursor mixto de rRNAs y tRNAs de procariontas



precursores de rRNA de eucariotas



Processament d'rRNAs en eucariotes

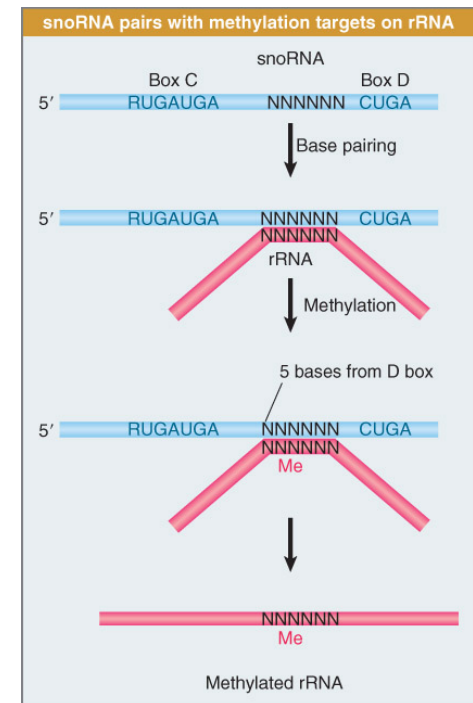
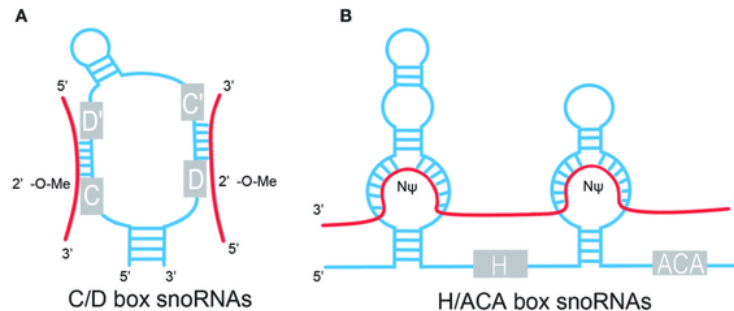
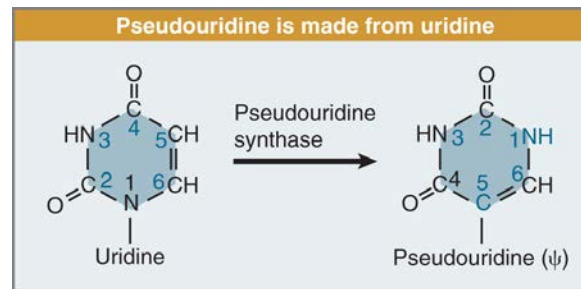


Maduració dels extrems per acció de nucleases

Modificacions químiques

106 metilacions (en OH 2' de ribosa);
 requereixen snoRNAs de tipus C/D

95 pseudouridines;
 requereixen snoRNAs de tipus H/ACA)

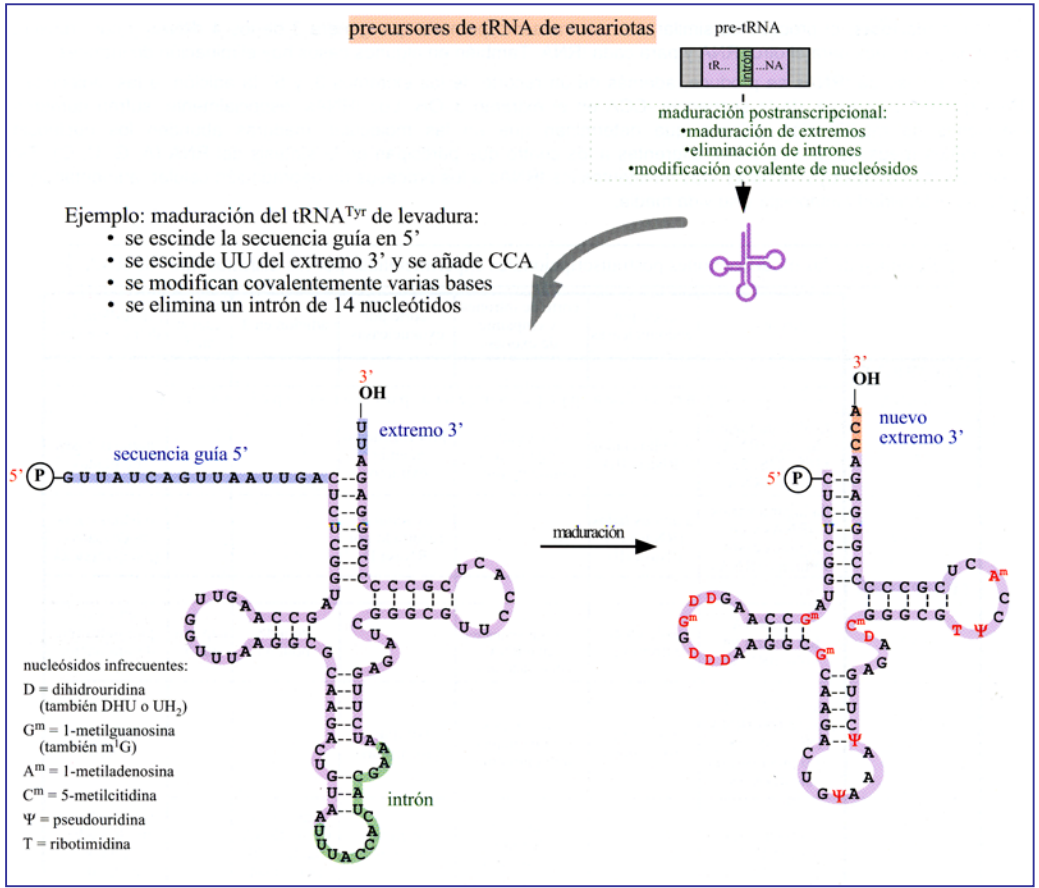
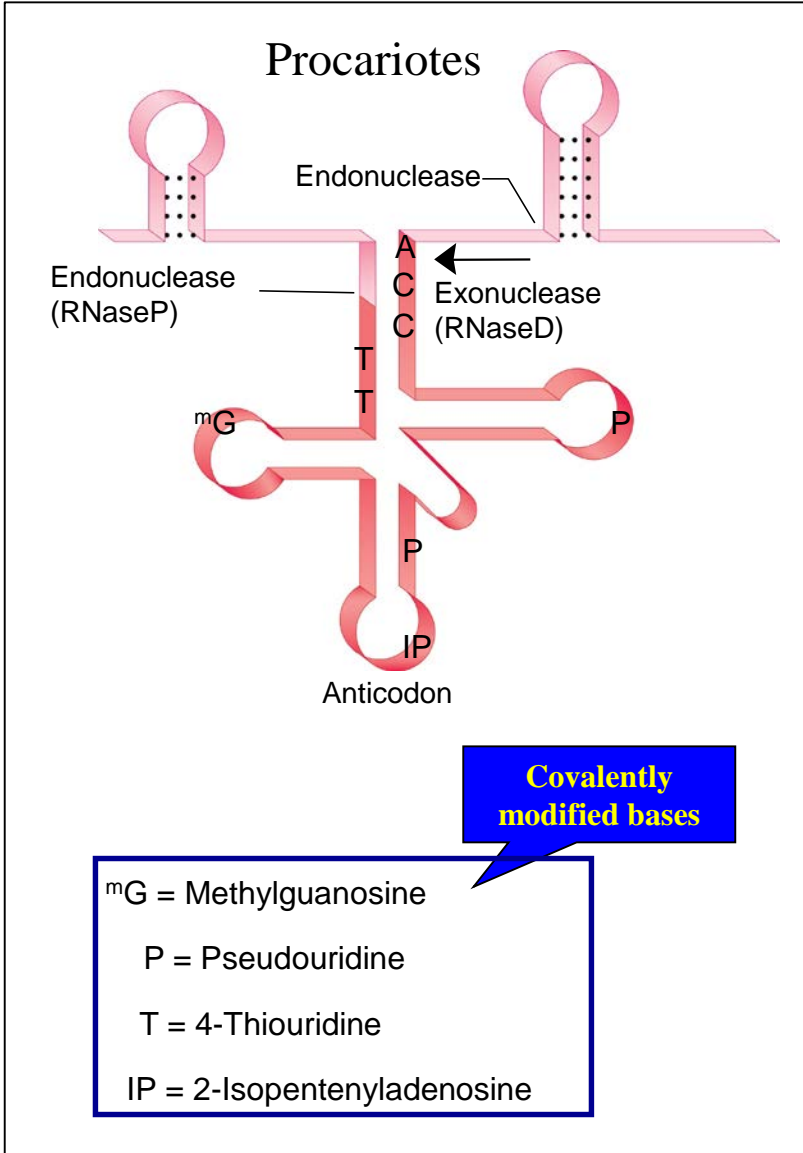


Tipus de processament

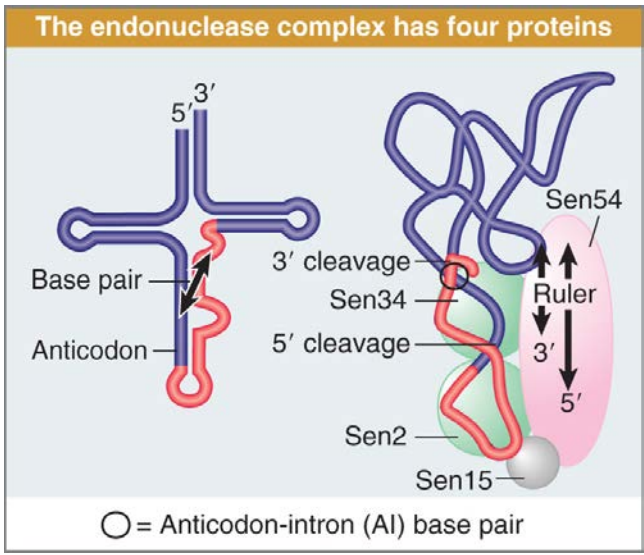
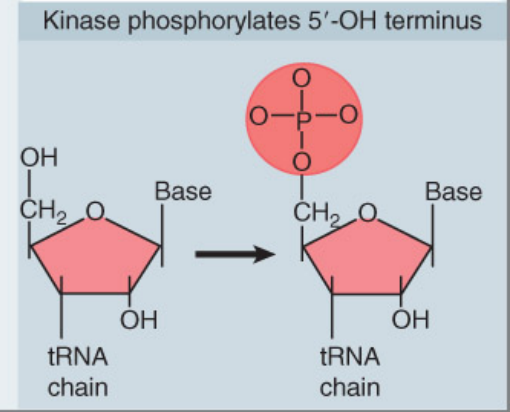
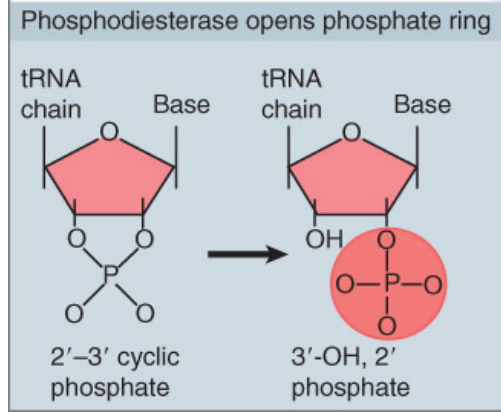
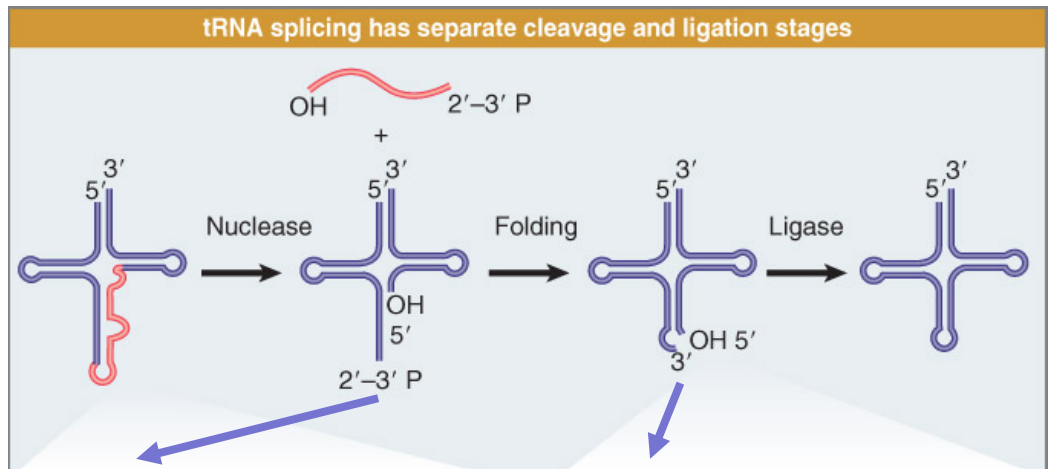
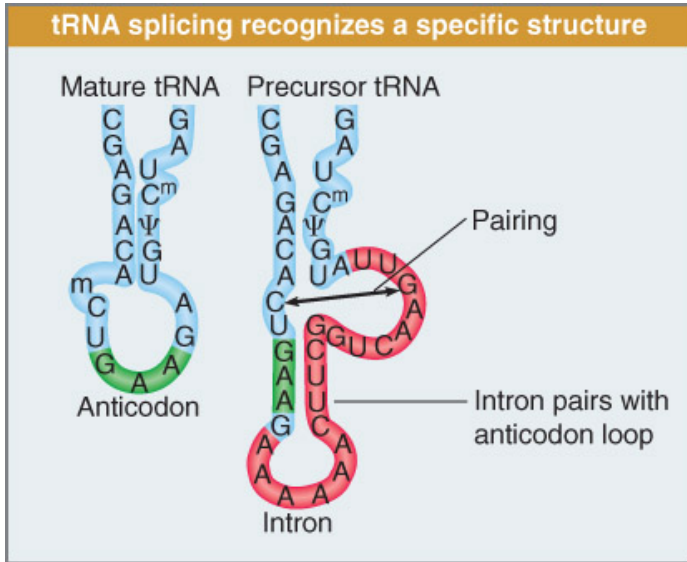
Resum de les modificacions postranscripcionals experimentades pels diferents tipus d'RNA

	precursor	corte por endonucleasas	corte de intrones y empalme de exones	corte por exonucleasas	adición en 3'	modificación en 5'	modificación de nucleósidos
PROCARIOTAS							
mRNA	- - - - - (no sufren procesamiento postranscripcional) - - - - -						
rRNA	de 30S, da lugar a los tres rRNAs (16S, 23S, 5S) y algún tRNA	a ambos lados (RNasa III)	en algunos organismos (autoempalme)	procesamiento en ambos extremos			algunas bases metiladas
tRNA	da lugar a varios tRNAs y en algunos casos también a rRNAs	a ambos lados (RNasa P y RNasa III)		extremo 3' recortado por RNasa D			muchas bases modificadas, gran diversidad
EUCARIOTAS							
mRNA	pre-mRNA (da lugar a un solo mRNA)	sólo en el extremo 3'	sí (con autoempalme en mRNA mitocondrial)		cola de poli(A)	caperuzas 5'	en casos puntuales (ej.: desaminación de C→U)
rRNA	de 35 a 47S, da lugar a tres rRNAs (18S, 5,8S, 28S); otro precursor da el rRNA 5S	(similar a procariotas)	en algunos unicelulares (autoempalme)	(similar a procariotas)			metilación de ribosas
tRNA	da lugar a un solo tRNA		en algunos; distinto mecanismo	en ambos extremos	adición de CCA (tRNA-nucleotidil-transferasa)		muchas bases modificadas, menor diversidad

Processament del tRNA



Eliminació d'introns en pre-tRNAs d'eucariotes



Tema 7

Processament de l'mRNA

Tipus de processament

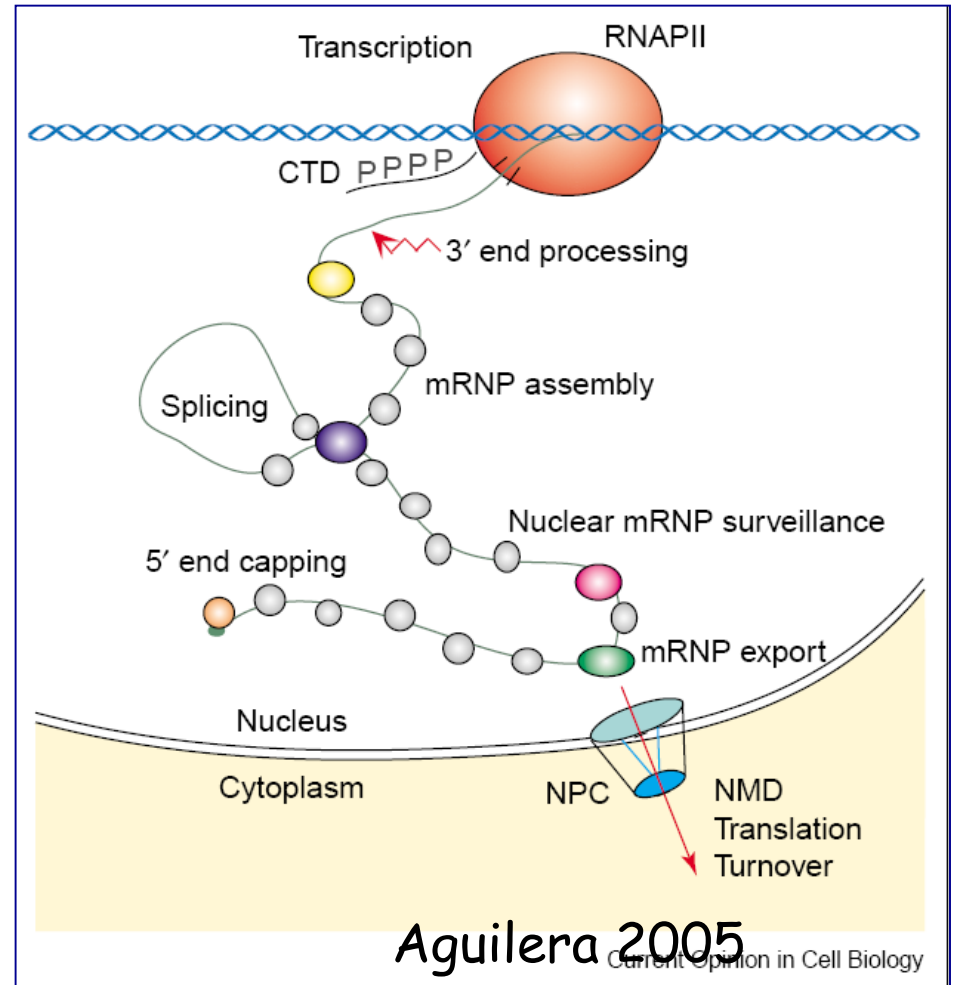
Resum de les modificacions postranscripcionals experimentades pels diferents tipus d'RNA

	precursor	corte por endonucleasas	corte de intrones y empalme de exones	corte por exonucleasas	adición en 3'	modificación en 5'	modificación de nucleósidos
PROCARIOTAS							
mRNA	- - - - - (no sufren procesamiento postranscripcional) - - - - -						
rRNA	de 30S, da lugar a los tres rRNAs (16S, 23S, 5S) y algún tRNA	a ambos lados (RNasa III)	en algunos organismos (autoempalme)	procesamiento en ambos extremos			algunas bases metiladas
tRNA	da lugar a varios tRNAs y en algunos casos también a rRNAs	a ambos lados (RNasa P y RNasa III)		extremo 3' recortado por RNasa D			muchas bases modificadas, gran diversidad
EUCARIOTAS							
mRNA	pre-mRNA (da lugar a un solo mRNA)	sólo en el extremo 3'	sí (con autoempalme en mRNA mitocondrial)		cola de poli(A)	caperuzas 5'	en casos puntuales (ej.: desaminación de C→U)
rRNA	de 35 a 47S, da lugar a tres rRNAs (18S, 5,8S, 28S); otro precursor da el rRNA 5S	(similar a procariotas)	en algunos unicelulares (autoempalme)	(similar a procariotas)			metilación de ribosas
tRNA	da lugar a un solo tRNA		en algunos; distinto mecanismo	en ambos extremos	adición de CCA (tRNA-nucleotidil-transferasa)		muchas bases modificadas, menor diversidad

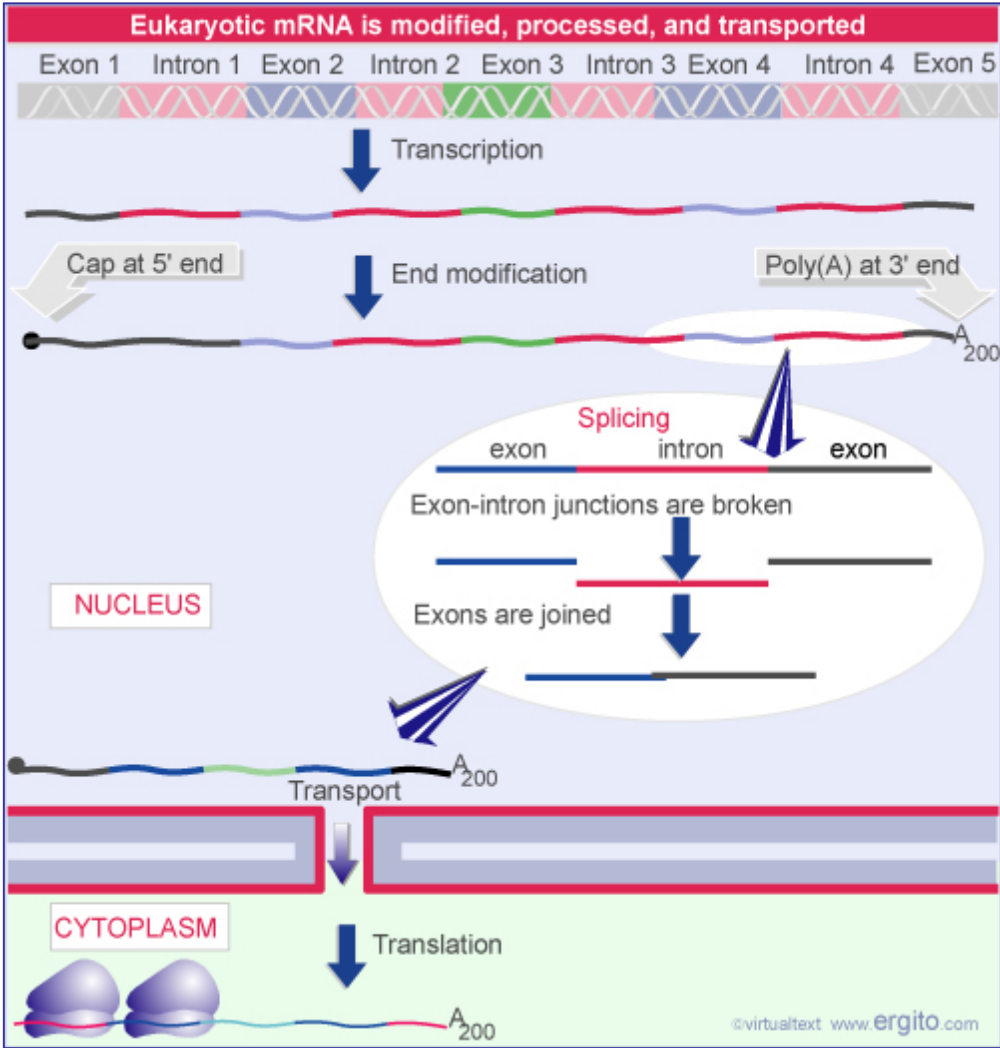
Processament de l'mRNA en eucariotes

Adquisició gorra 5'
Eliminació d'introns
Poliadenilació
Correcció

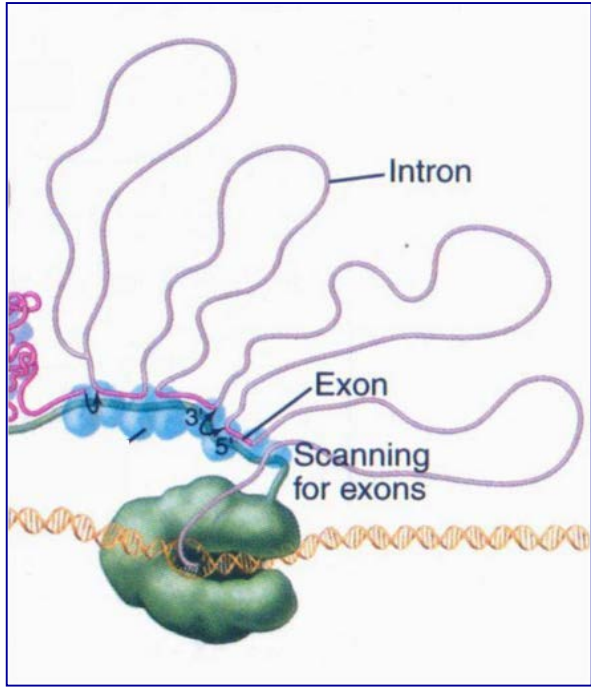
Exportació
Localització
Traducció
Recanvi



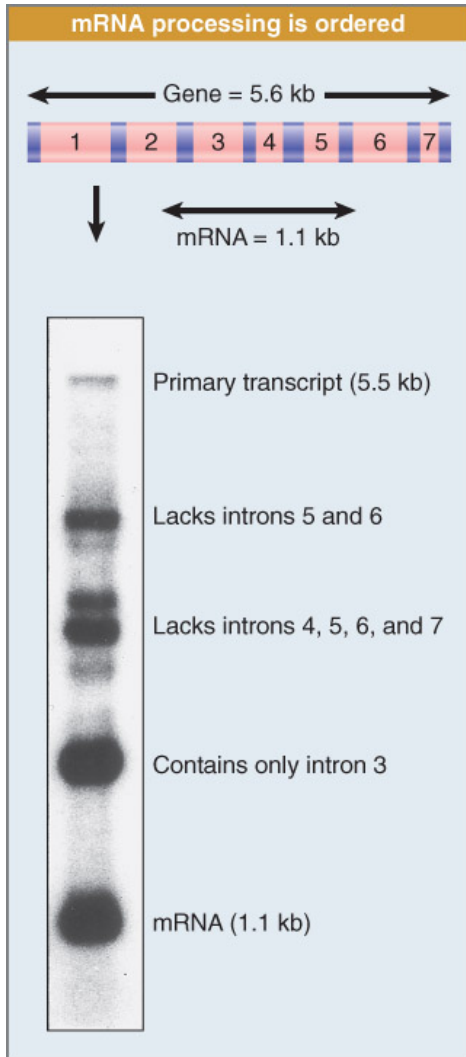
Eliminació d'introns




És un procés cotranscripcional, requereix l'RNA polII

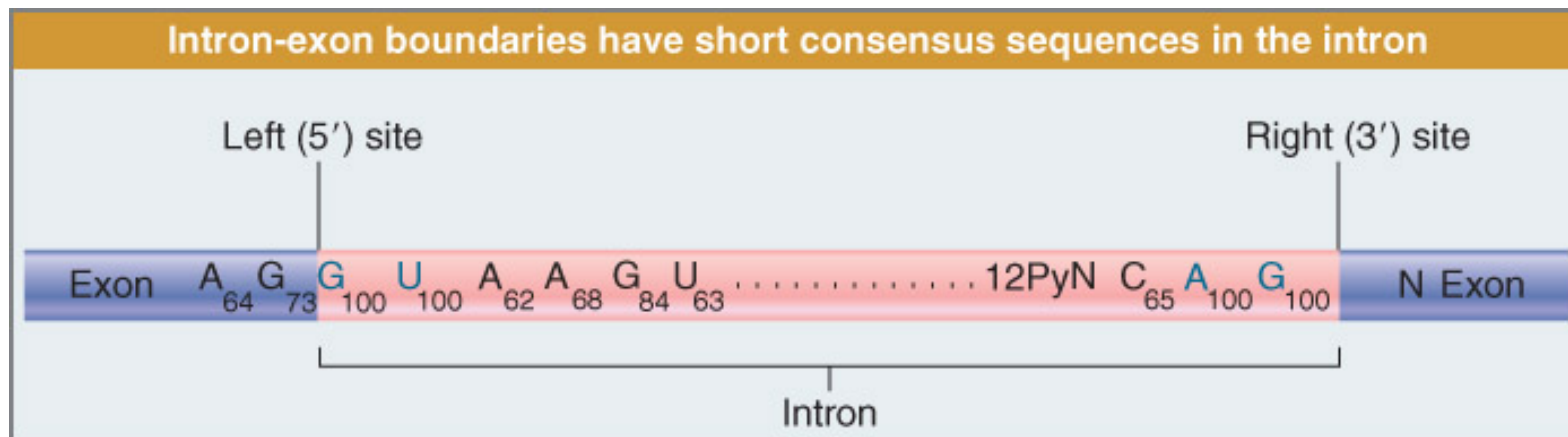


Eliminació d'introns



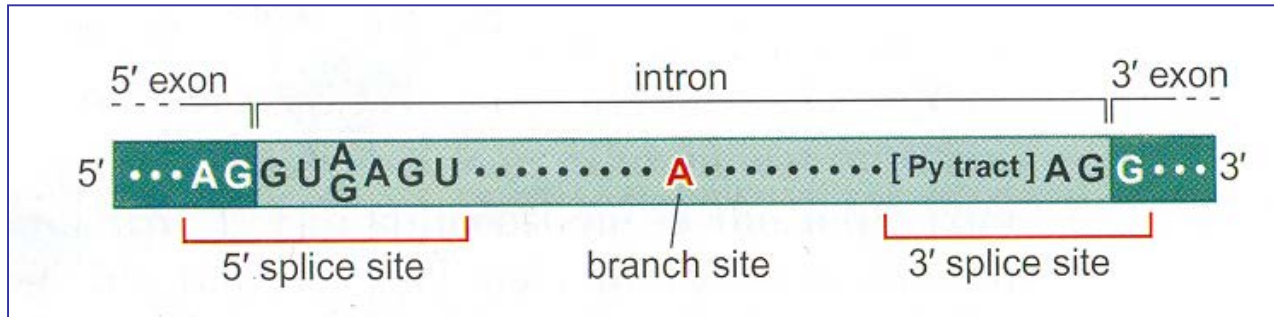
Eliminació d'introns

Tipus d'intró	On es troba
 GU-AG AU-AC	Pre-mRNA nuclears d'eucariotes
Grup I	Pre-rRNA nuclears d'eucariotes RNAs d'orgànuls
Grup II	RNAs d'orgànuls Alguns RNAs de procariotes
Pre-tRNA	Pre-tRNA nuclears d'eucariotes

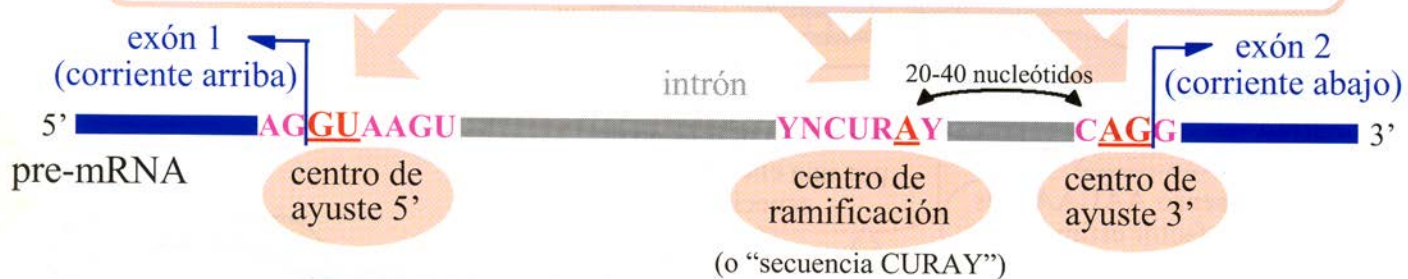


Eliminació d'introns

Introns GU-AG



Tres secuencias cortas, altamente conservadas, definen los **centros de corte y empalme**. Para los centros 5' y 3', sólo dos nucleótidos son **esenciales**; para el de ramificación, sólo un adenilato. El **resto** de nucleótidos de las 3 secuencias consenso pueden variar ligeramente. Por tanto, los intrones siempre comienzan por GU y terminan por AG en el RNA (GT y AG en la hebra no transcrita del DNA).

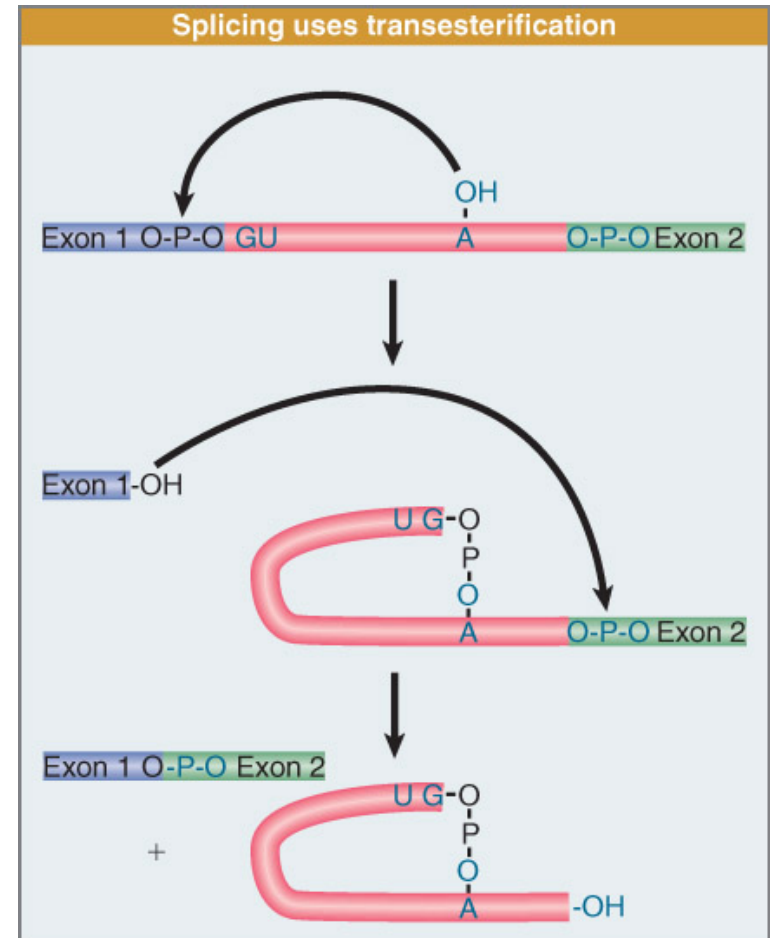
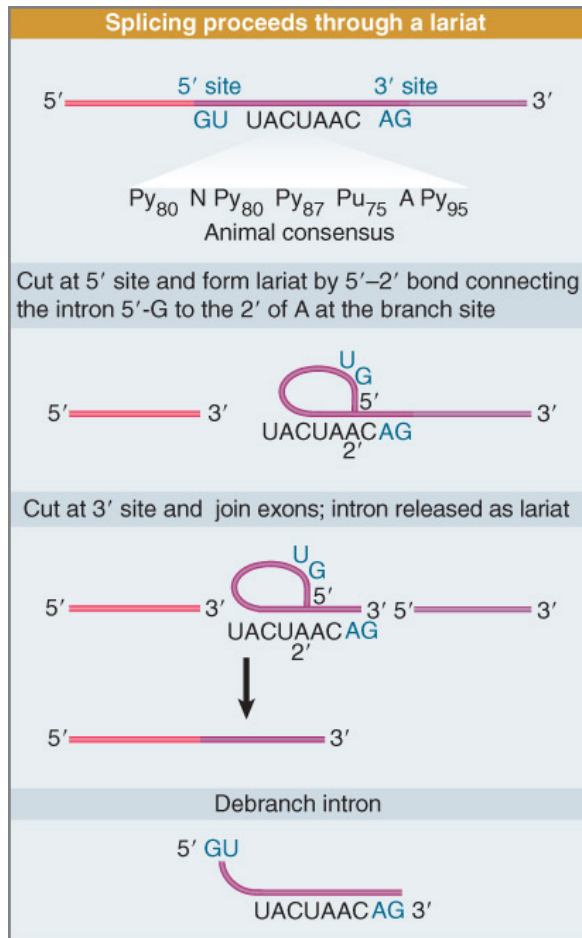


N= cualquier nucleótido Y= nucleótido pirimidínico R= nucleótido purínico

Eliminació d'introns

Introns GU-AG

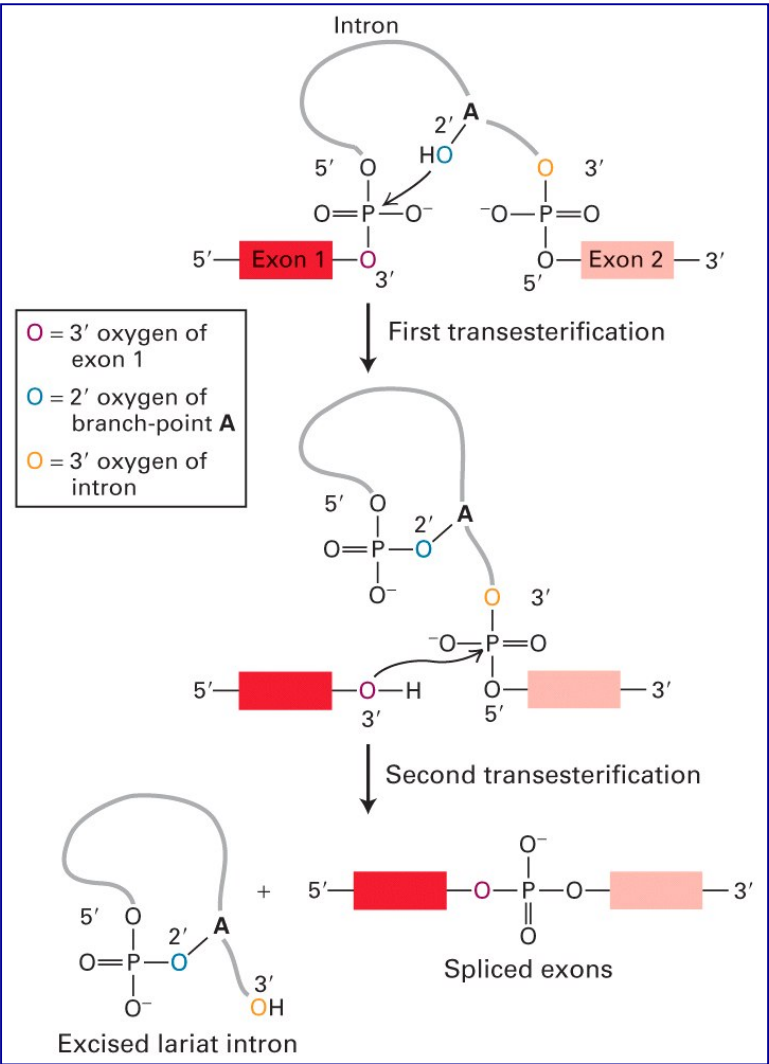
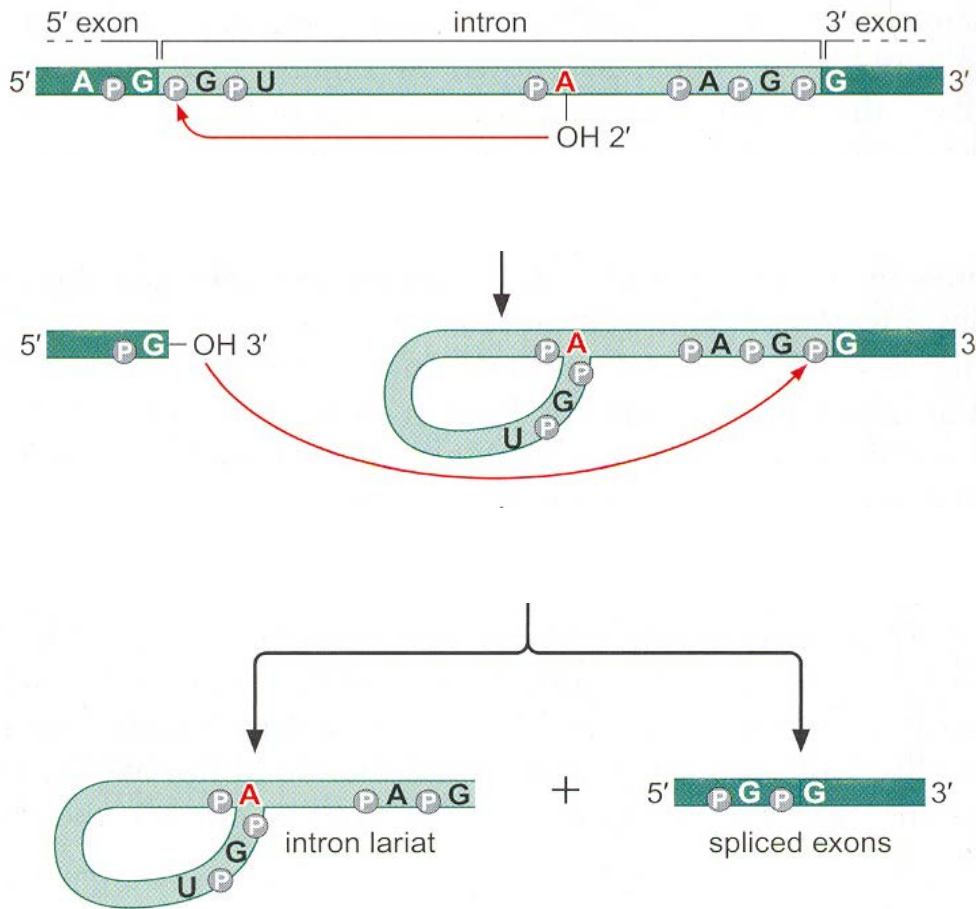
Dues reaccions de transesterificació (no requereixen energia)



Eliminació d'introns

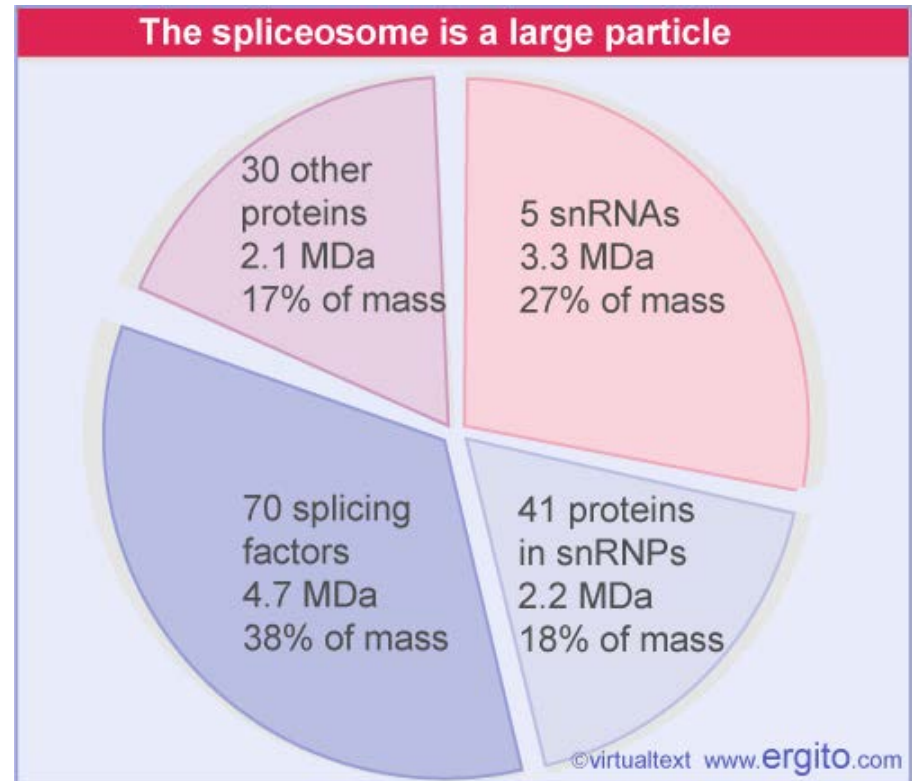
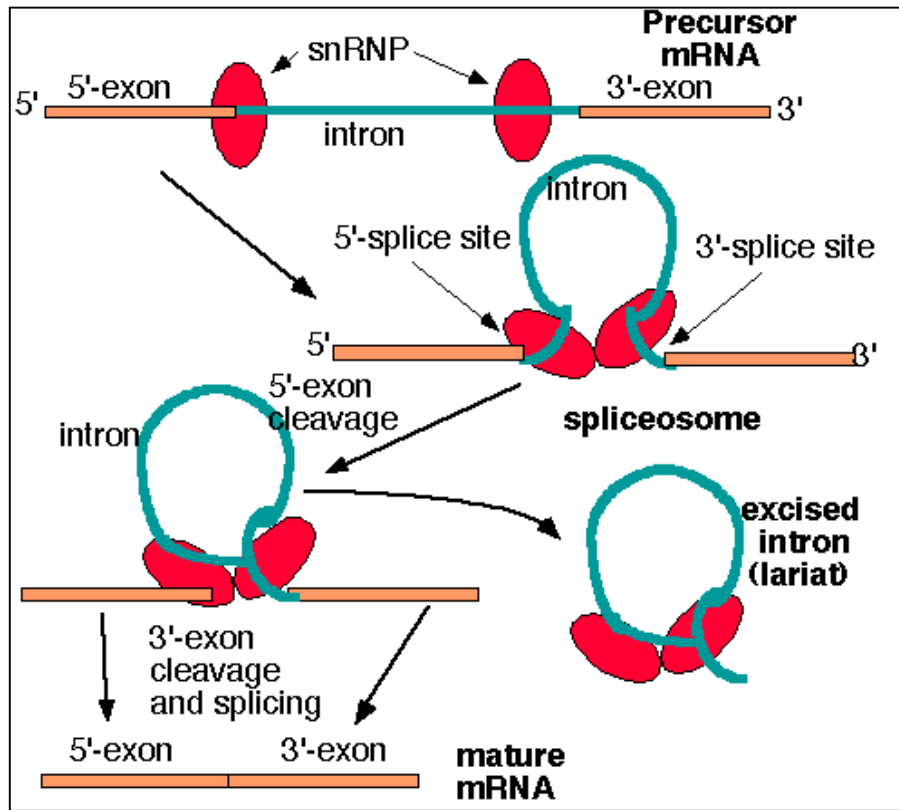
Introns GU-AG

Dues reaccions de transesterificació
(no requereixen energia)



Eliminació d'introns: l'espliceosoma

Introns GU-AG



Eliminació d'introns: l'espliceosoma

Introns GU-AG

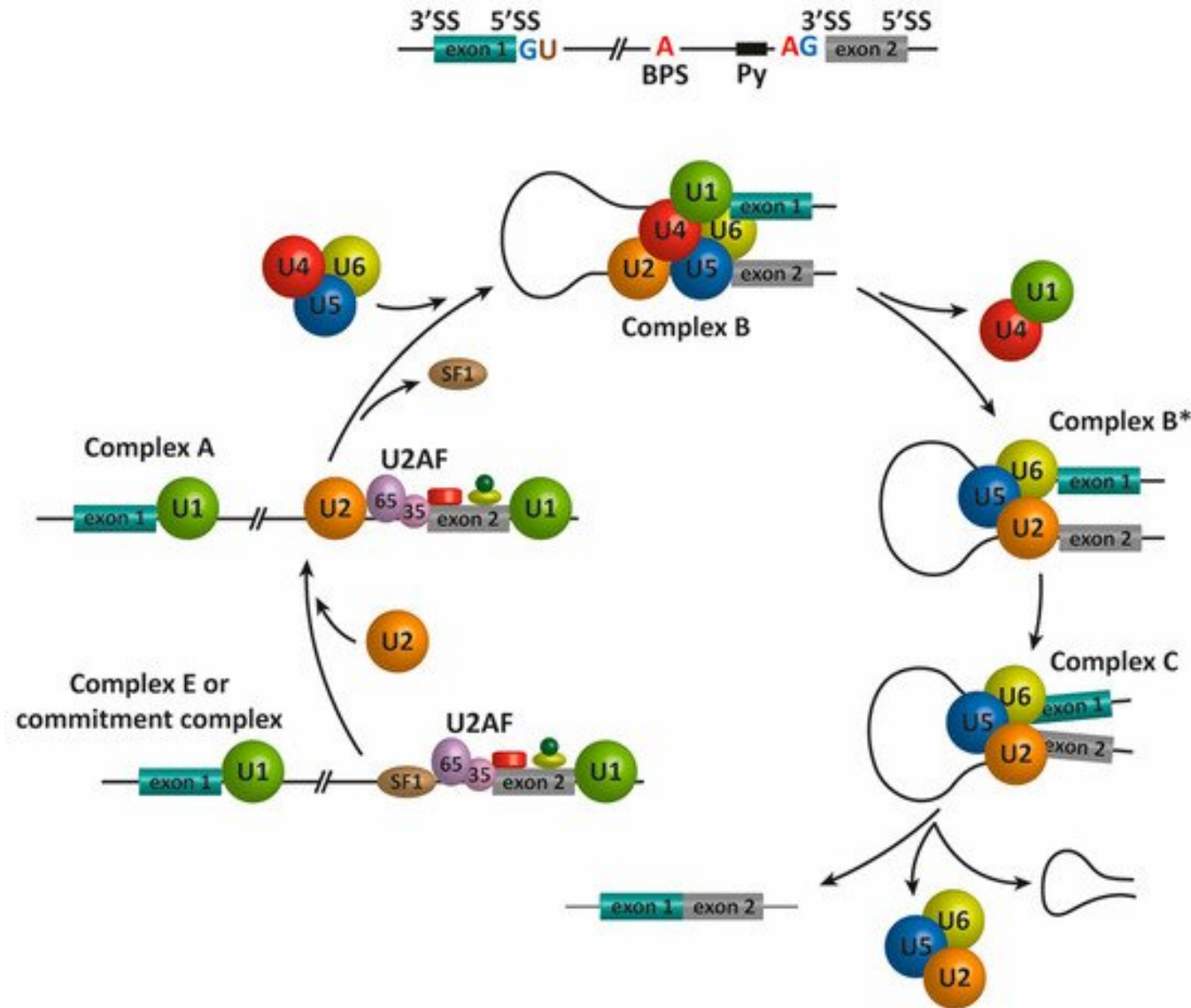
Tipos, tamaño y función de los RNAs nucleares pequeños (snRNAs)

snRNA	Tamaño (nt)*	Función de la snRNP respectiva (U1, U2, U4, U5 y U6 participan en el ensamblado del ayustosoma por interacciones mutuas)
U1	165	corte y empalme: reconoce y se une al extremo 5' del intrón
U2	188	corte y empalme: se une al centro de ramificación, lo acerca al centro 5'
U3	210	procesamiento del pre-rRNA
U4	142	corte y empalme: inicialmente asociado con U5 y U6, acerca U6 al sitio 5'
U5	116	corte y empalme: se asocia inicialmente con U4 y U6; se une a ambos extremos del intrón
U6	107	corte y empalme: asociado inicialmente con U4 y U5; parece que participa en la catálisis
U7	65	procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs de histonas
U11	131	terminación y poliadenilación de pre-mRNAs

(*) corresponden a los snRNAs de mamíferos; en levaduras son de 2 a 10 veces mayores

Eliminació d'introns: l'espliceosoma i les seues etapes

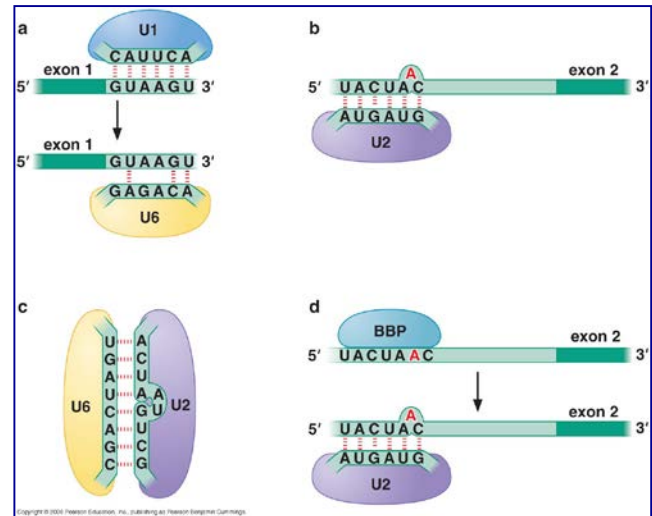
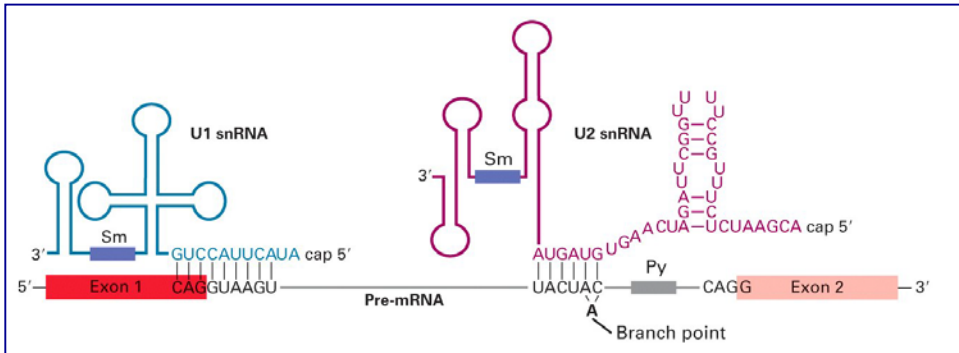
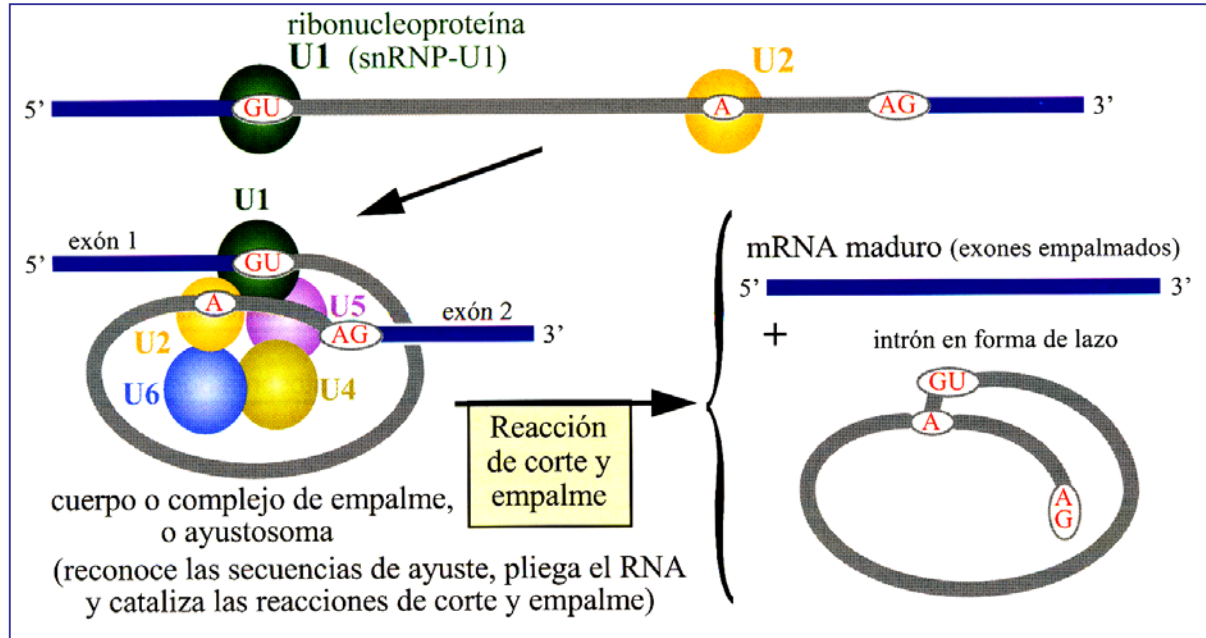
Introns GU-AG



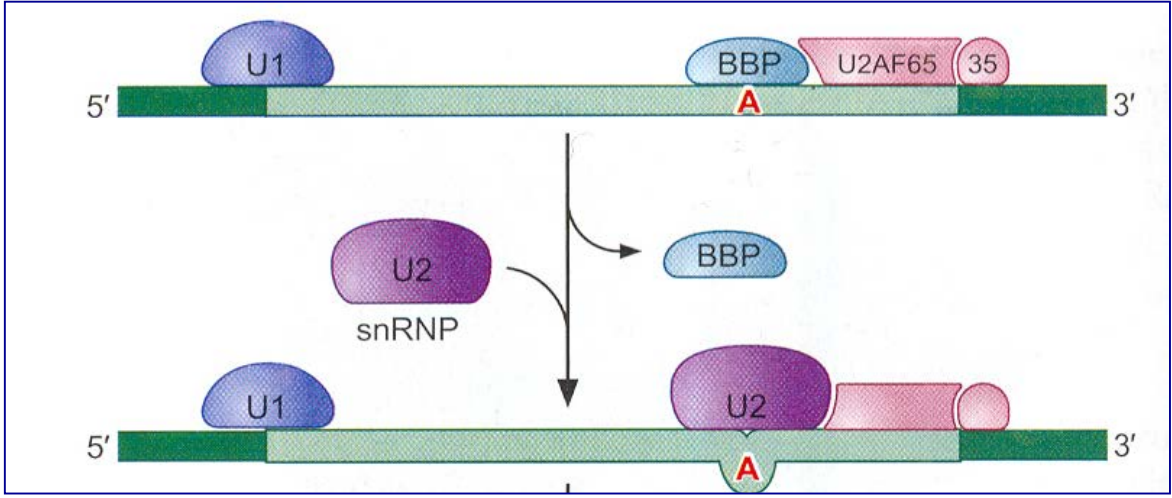
Eliminació d'introns: l'espliceosoma i les seues etapes

Introns GU-AG

Durant el processament es formen híbrids RNA-RNA



Eliminació d'introns: l'espliceosoma i les etapes E i A



Introns GU-AG

U2AF (factor auxiliar d'U2)

BBP: Branch-point Binding Protein
SF1 en mamífers

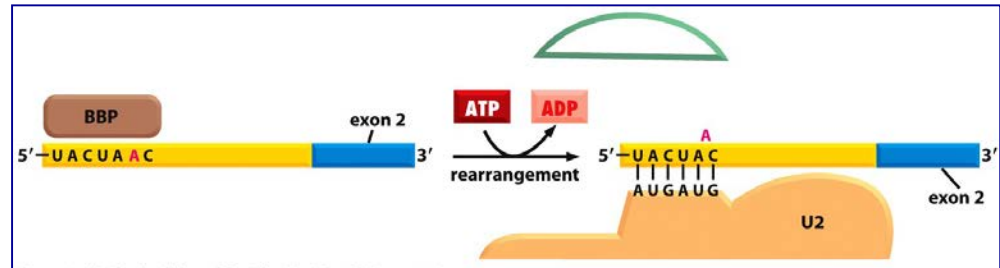
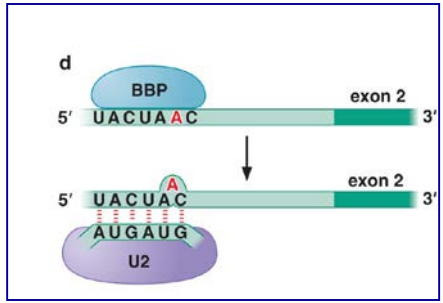
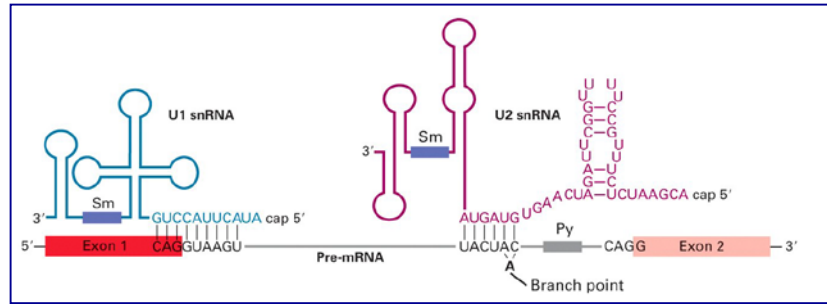
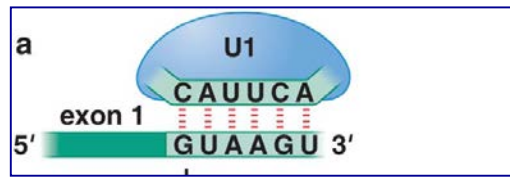
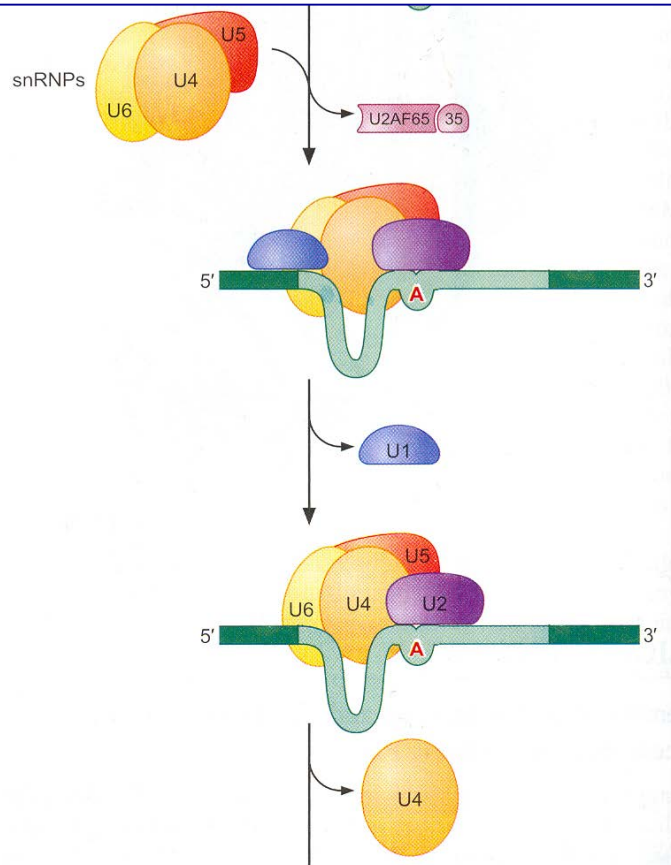
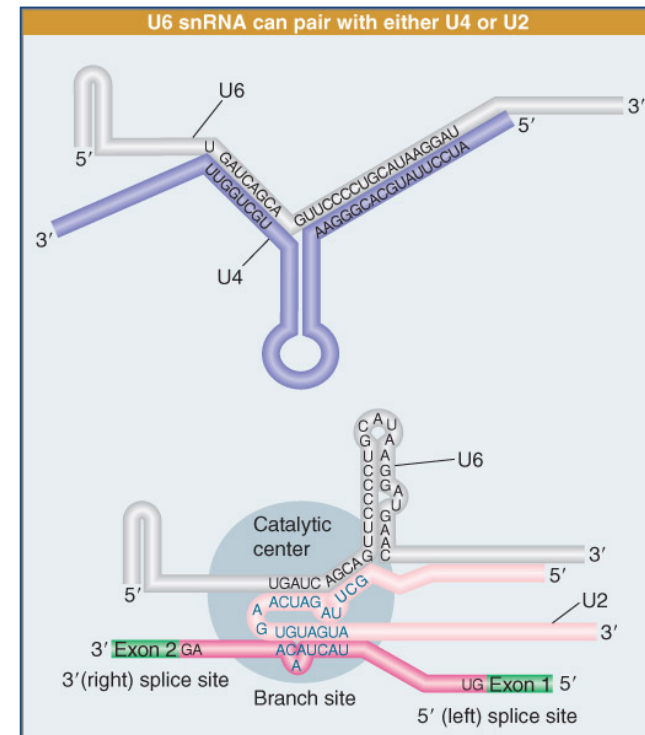
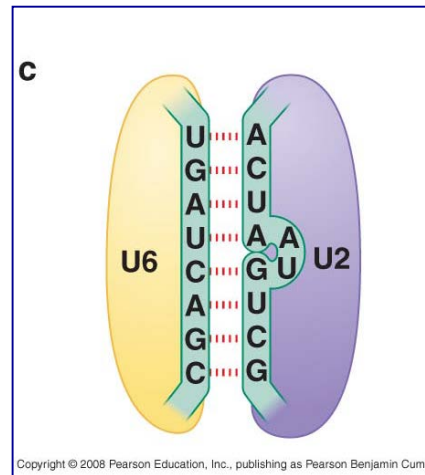
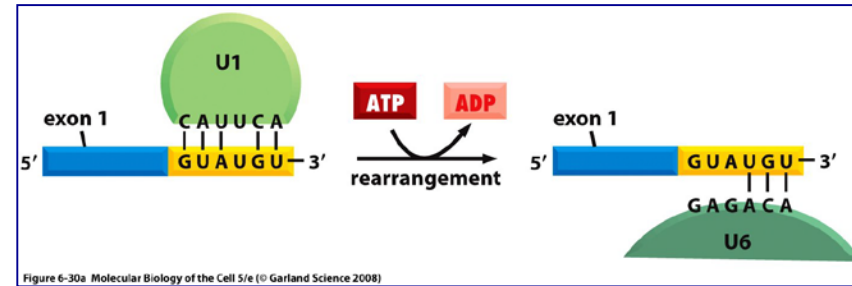
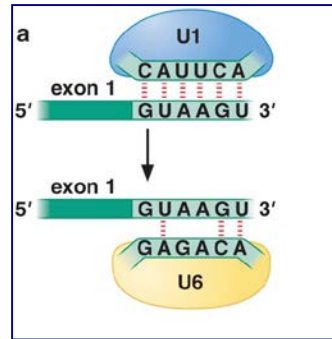


Figure 6-30b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

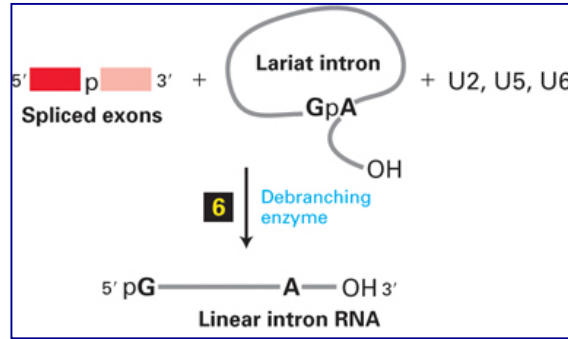
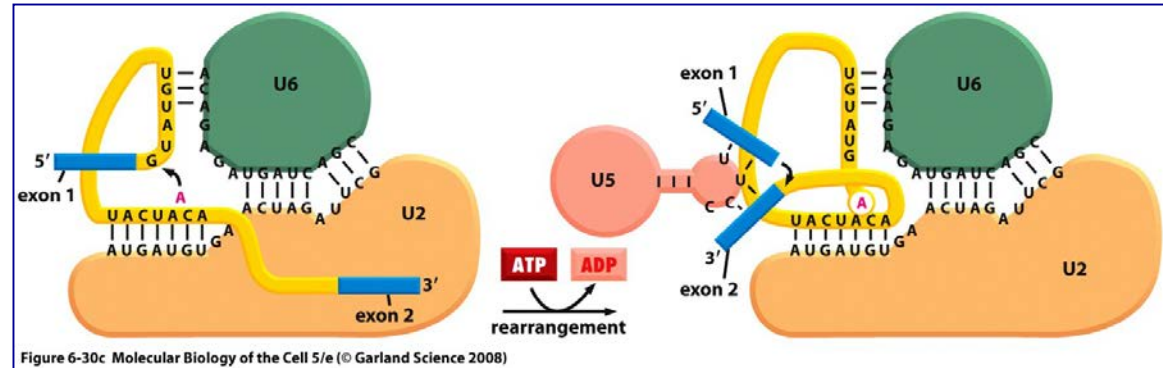
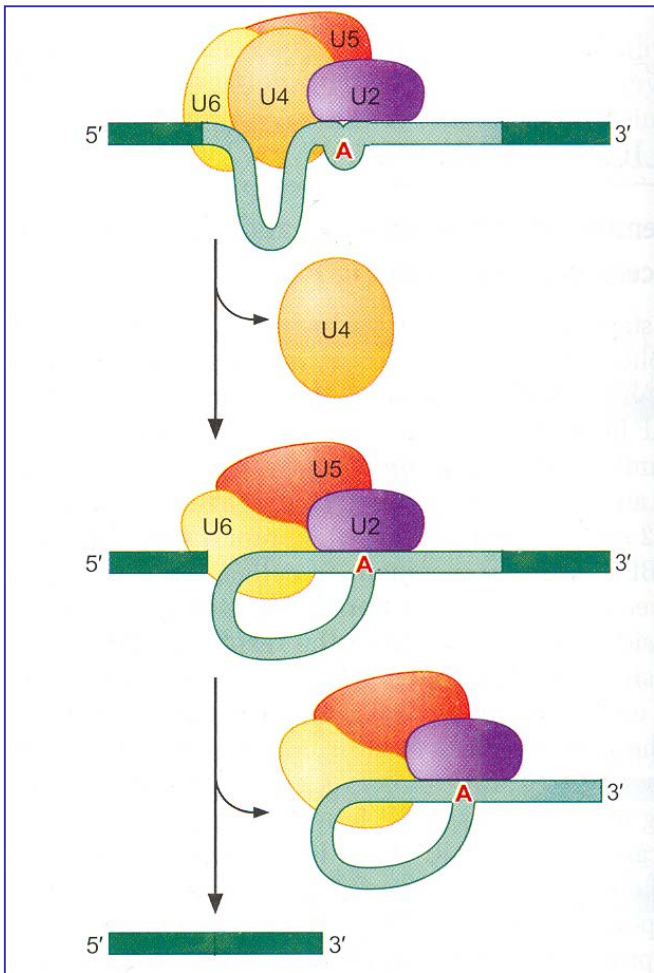
Eliminació d'introns: l'espliceosoma i les etapes B i C

Introns GU-AG



Eliminació d'introns: l'espliceosoma i l'etapa C

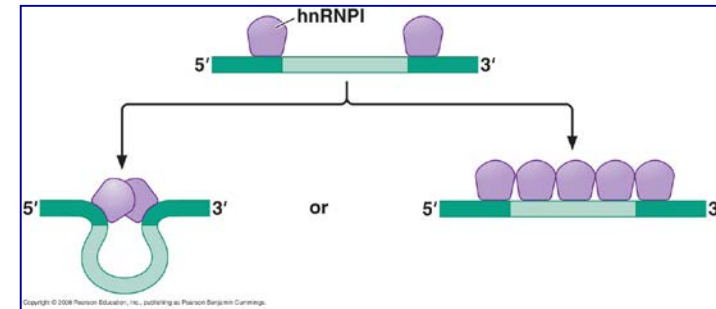
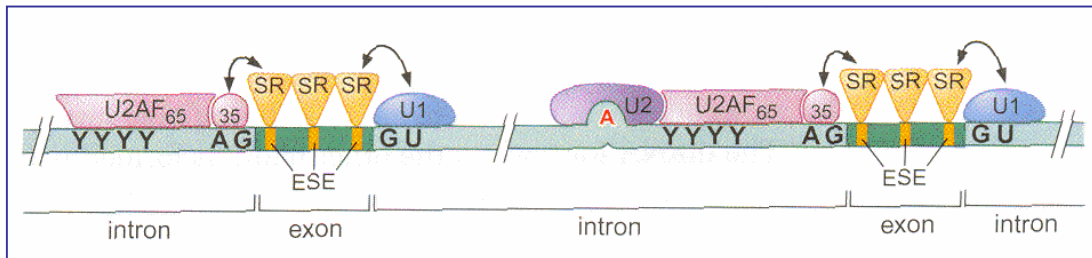
Introns GU-AG



Eliminació d'introns: l'espliceosoma

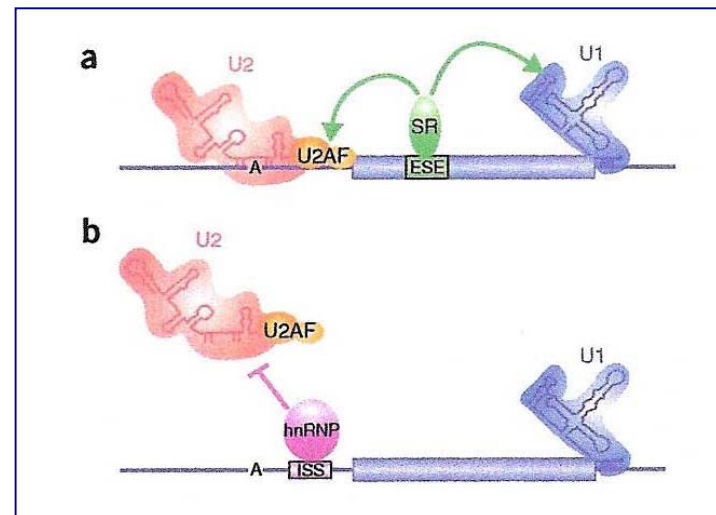
Introns GU-AG

Regulació del *splicing*: Proteïnes activadores i/o inhibidores s'associen amb motius (seqüències) curts en introns i/o exons



Motius:

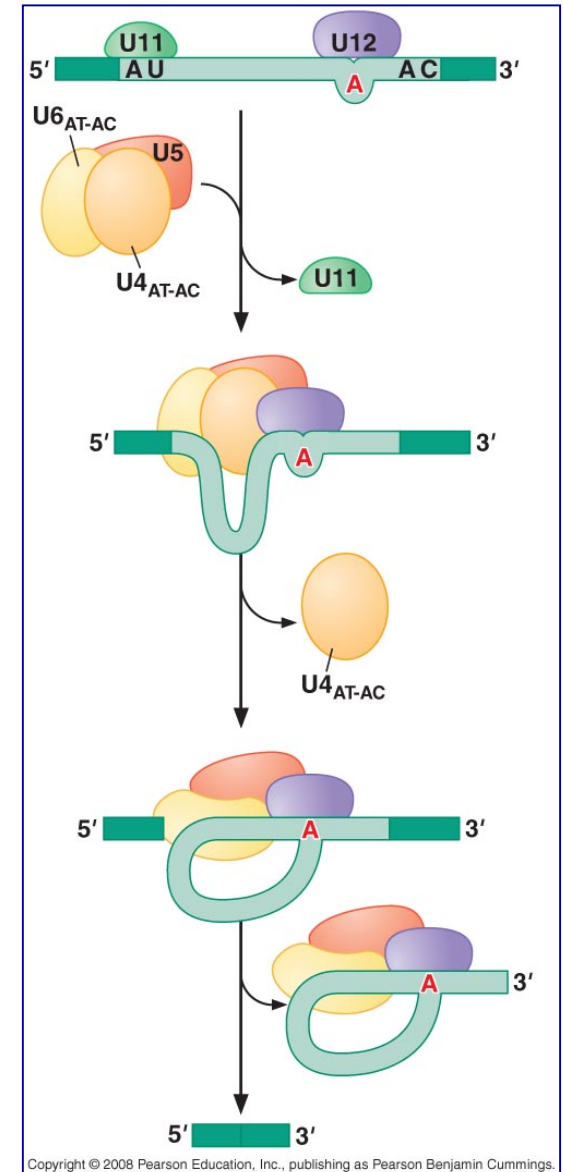
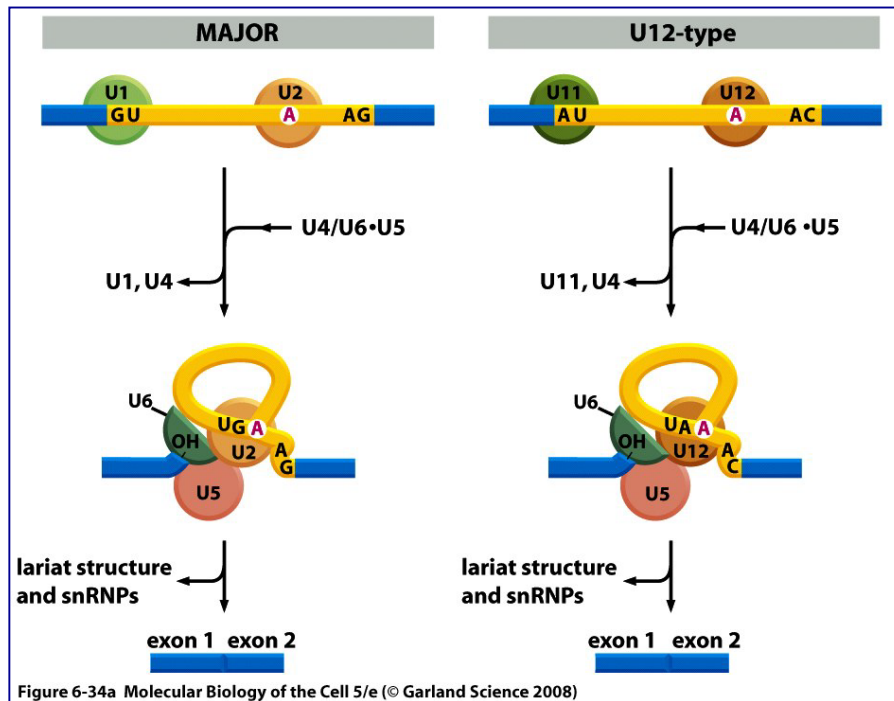
- ESE** Exon Splicing Enhancer
- ESS** Exon Splicing Suppressor
- ISE** Intron Splicing Enhancer
- ISS** Intron Splicing Suppressor



Eliminació d'introns: l'espliceosoma

Introns AU-AC

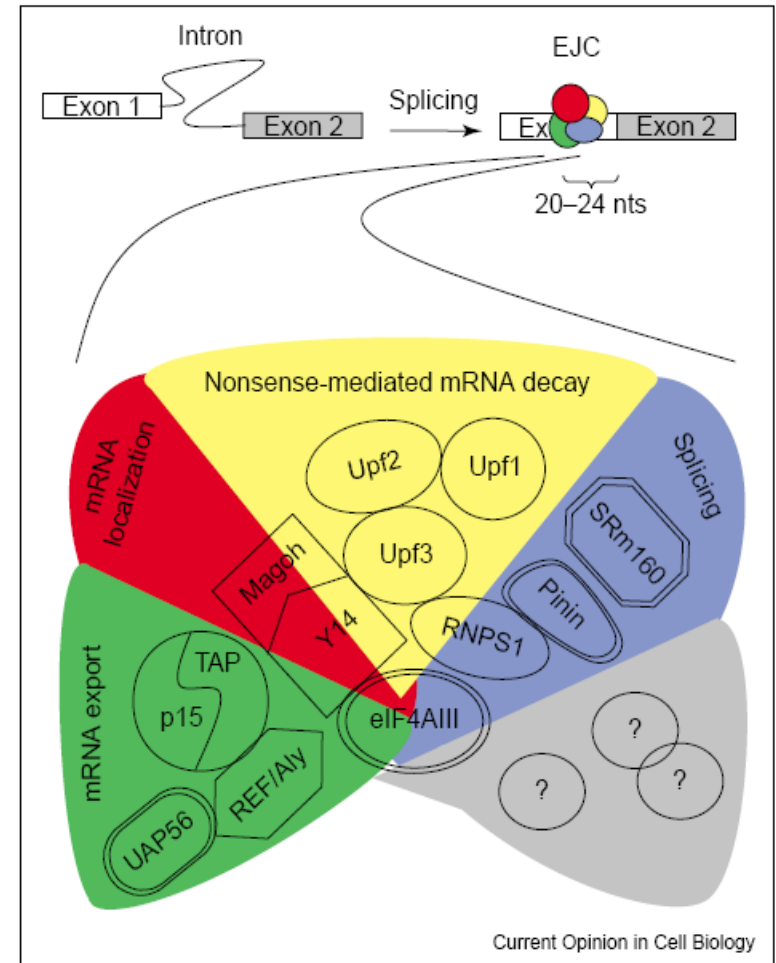
Grup reduït d'introns que s'eliminen amb un espliceosoma alternatiu compost per diferents snRNPs



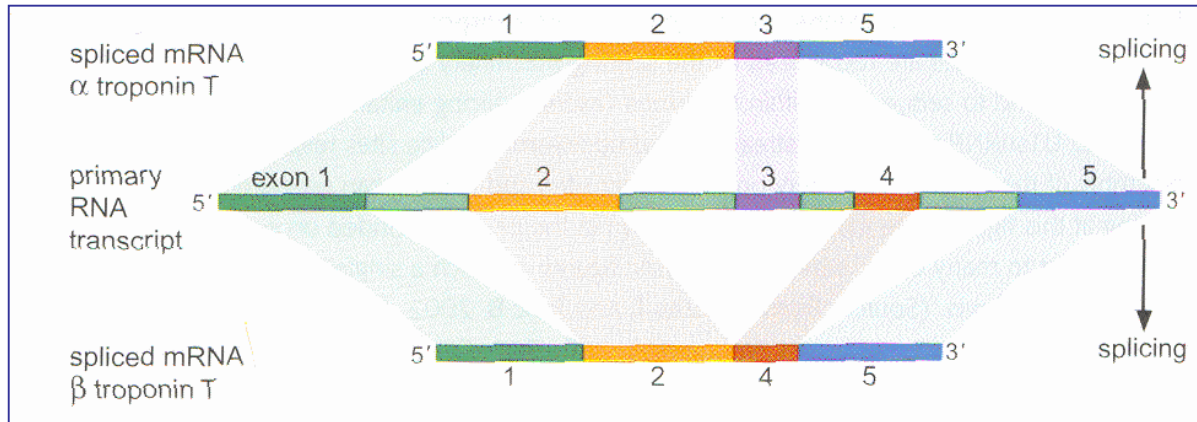
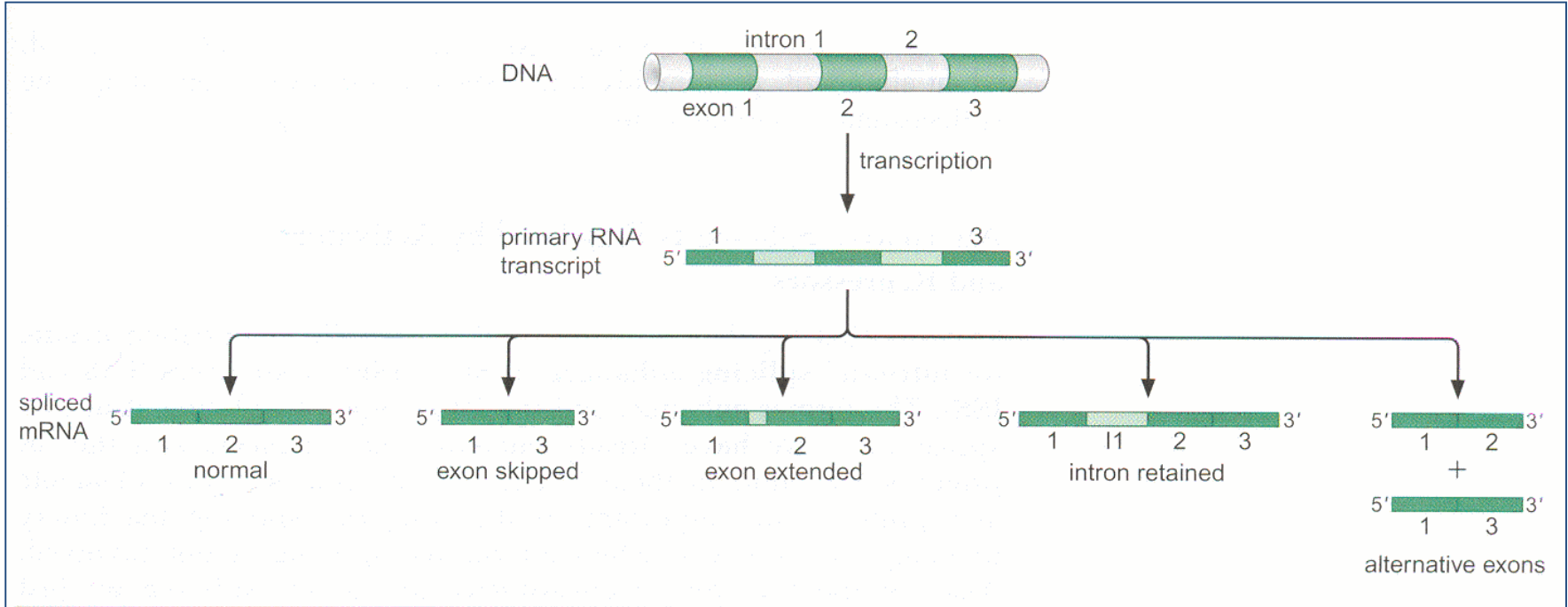
Eliminació d'introns: l'espliceosoma

Complex d'unió d'exons (Exon Junction Complex, EJC)

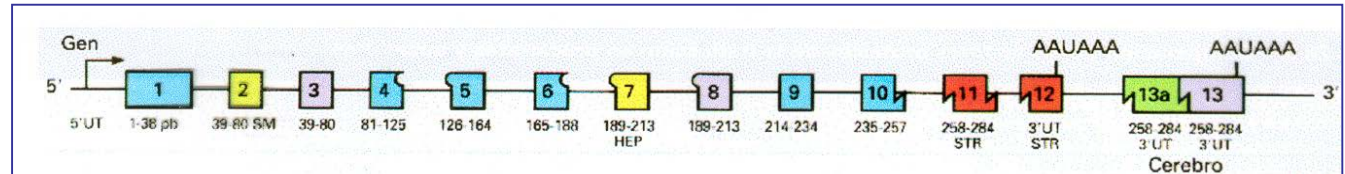
- Grup de proteïnes associat amb l'mRNA 20-25 nt corrent amunt de les unions exó-exó, fins que comença la traducció.
- La seua unió a l'mRNA depèn de la posició i no de la seqüència.
- Afecta exportació, localització, traducció i recanvi.



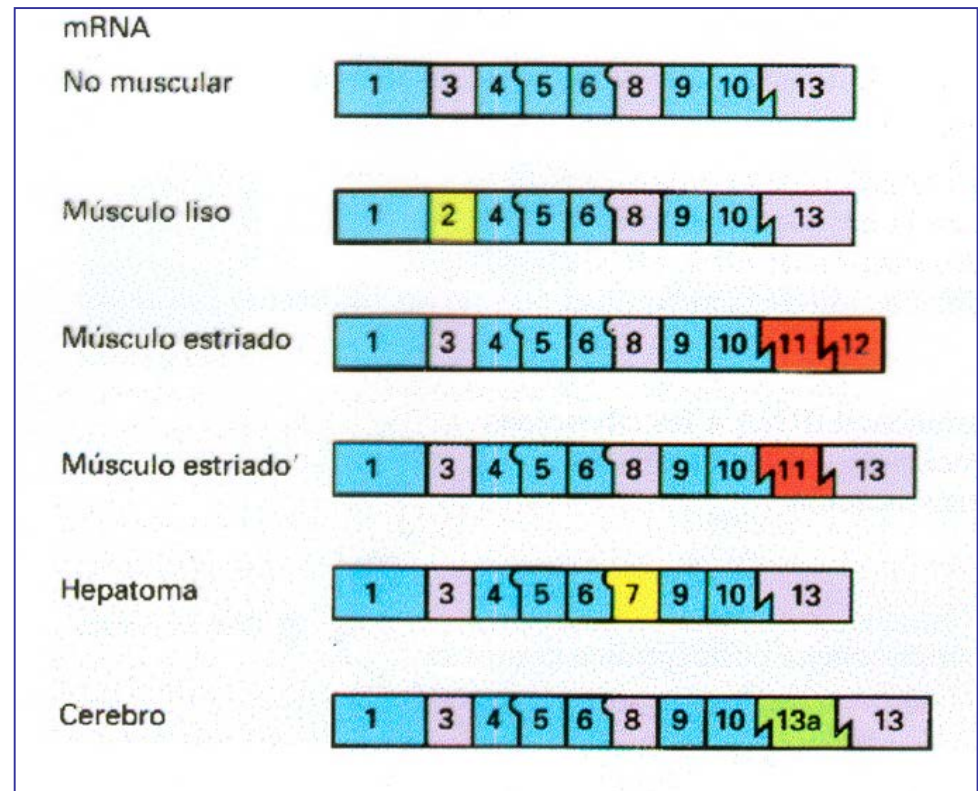
Eliminació d'introns: *splicing* alternatiu



Eliminació d'introns: *splicing* alternatiu

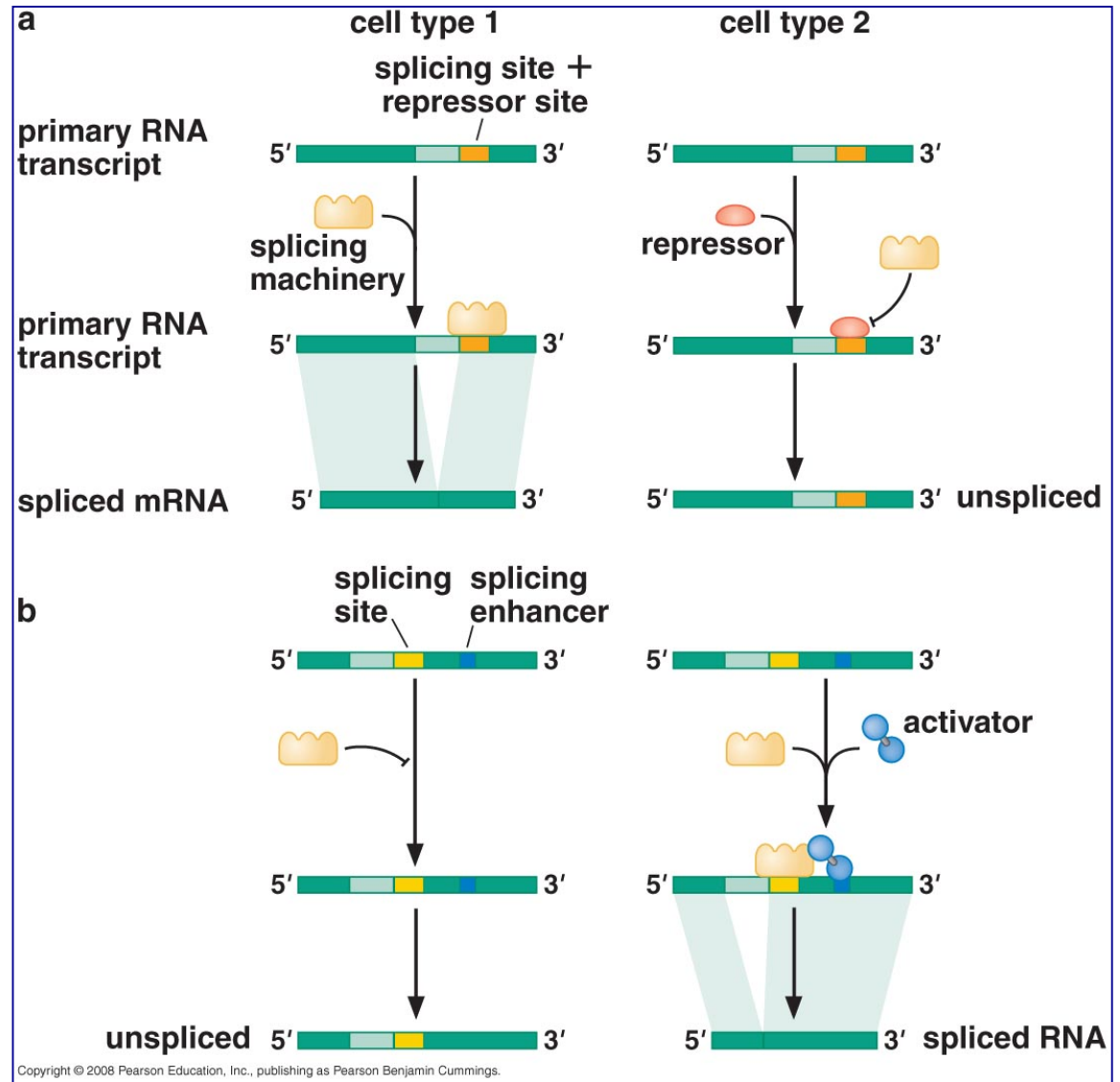


Corte y empalme alternativo del pre-mRNA de la α -tropomiosina. En la parte superior se muestra el gen, con todos los exones e intrones, y en la parte inferior se muestran los productos alternativos en distintas células.



Eliminació d'introns: *splicing* alternatiu

Pot ser
constitutiu o
estar regulat
per
activadors i
repressors



Eliminació d'introns: *splicing* alternatiu

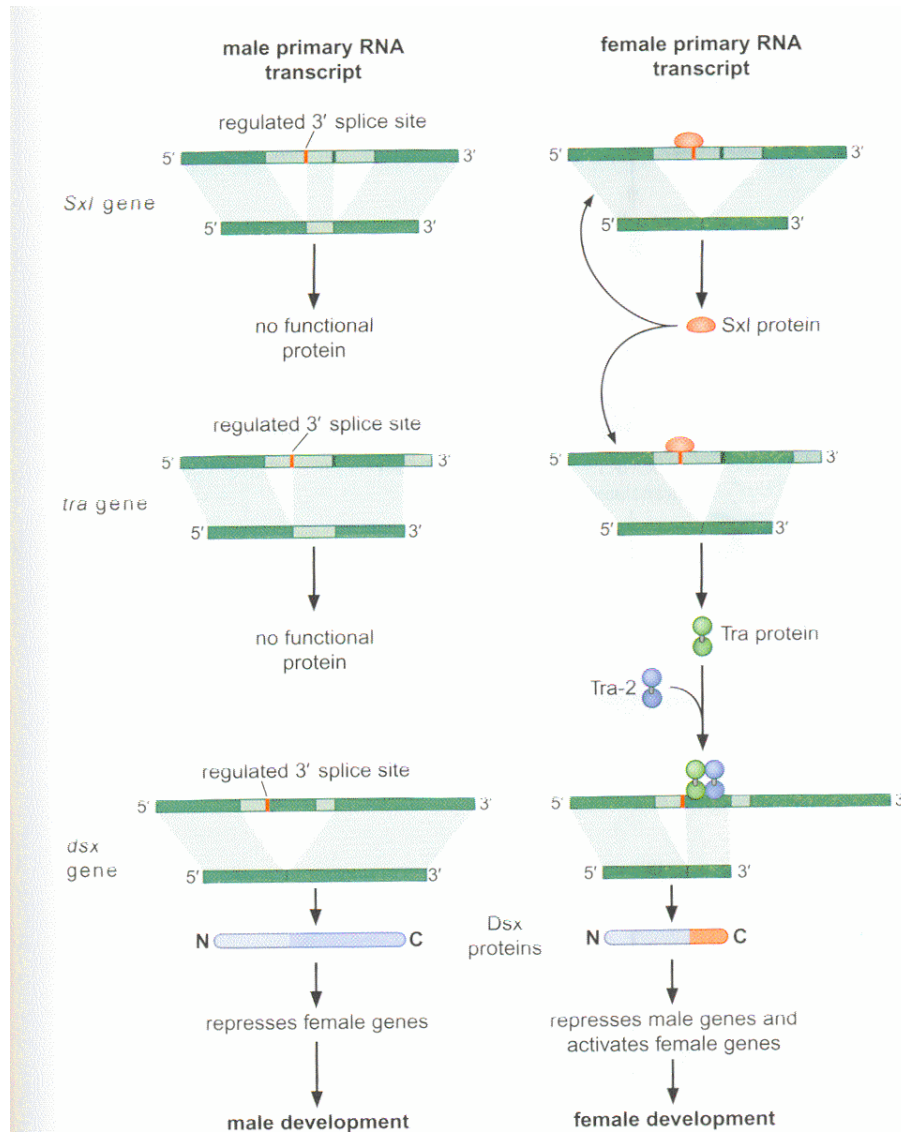
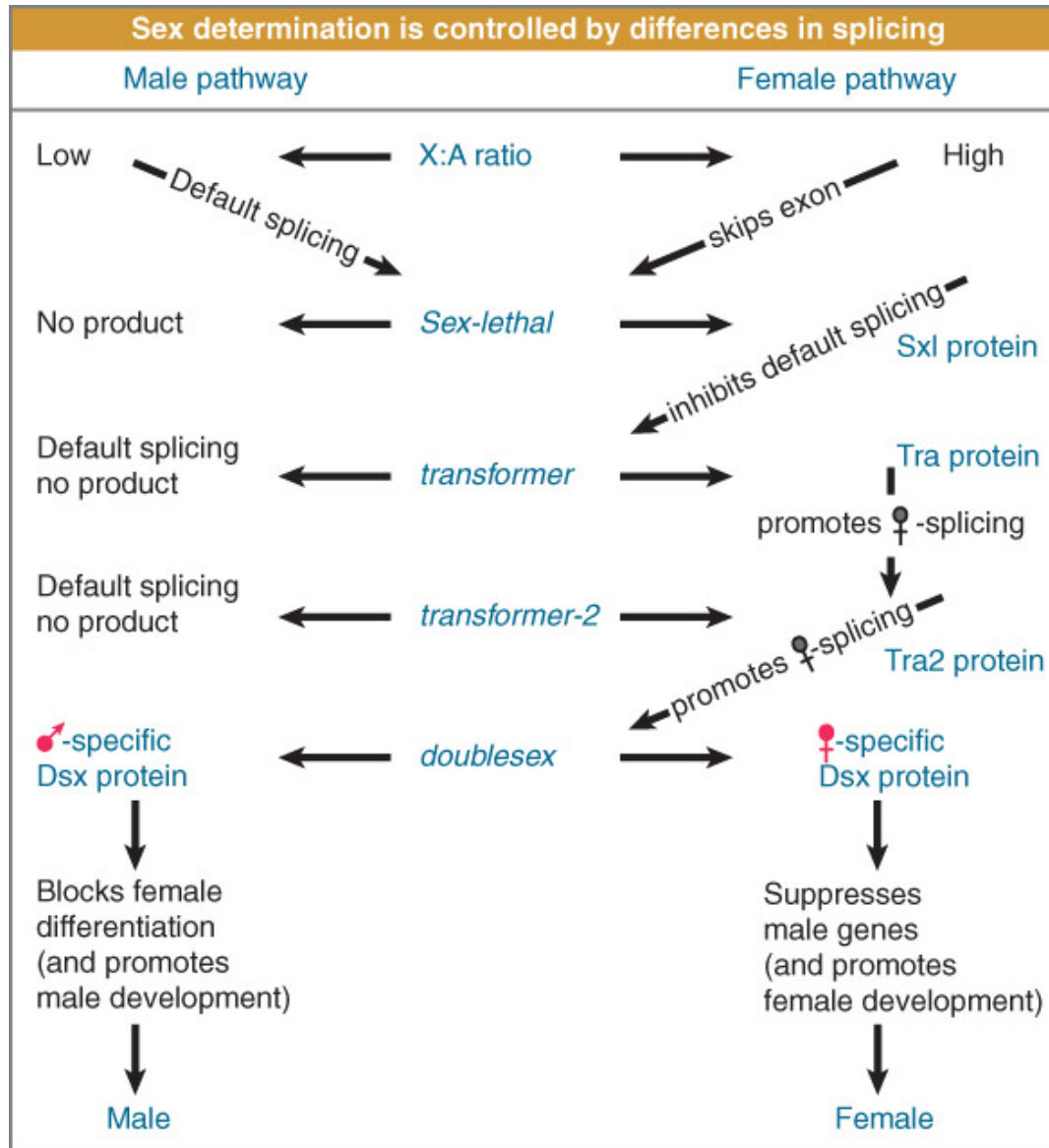


FIGURE 17-28 A cascade of alternative splicing events determines the sex of a fly.

As described in detail in the text, the Sex-lethal protein is produced in flies that will develop into females (shown on the right of the figure) but not those that will develop into males (shown on the left). The presence of that protein is maintained by autoregulation of the splicing of its own message. In the absence of that regulation, no functional protein is produced (in males). Sex-lethal also controls splicing of the *tra* gene, producing functional Tra protein in females (but not males). Tra is itself a splicing regulator. It acts on pre-mRNA from the *doublesex* gene. When the *dsx* mRNA is spliced in response to Tra protein, a version of Doublesex protein is produced (in females) with a stretch of 30 amino acids at its C-terminal end that distinguish it from the form of the protein produced in the absence of the Tra regulator (in males). The female form of Dsx activates genes required for female development and represses those for male development. The male form, which has a stretch of 150 amino acids at the C-terminal end, represses genes that direct female development. Sxl protein acts as a splicing repressor by binding to the pyrimidine tract at the 3' splice site (see Figure 13-2). The Tra protein, in contrast, acts as a splicing activator. It binds to an enhancer sequence in one of the exons of *dsx* RNA (see Figure 13-13).

Eliminació d'introns: *splicing* alternatiu

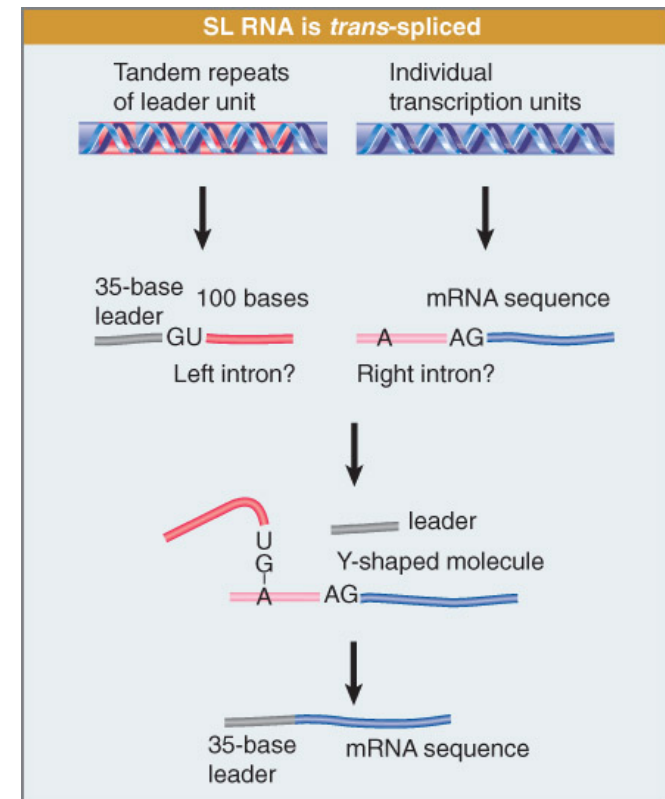
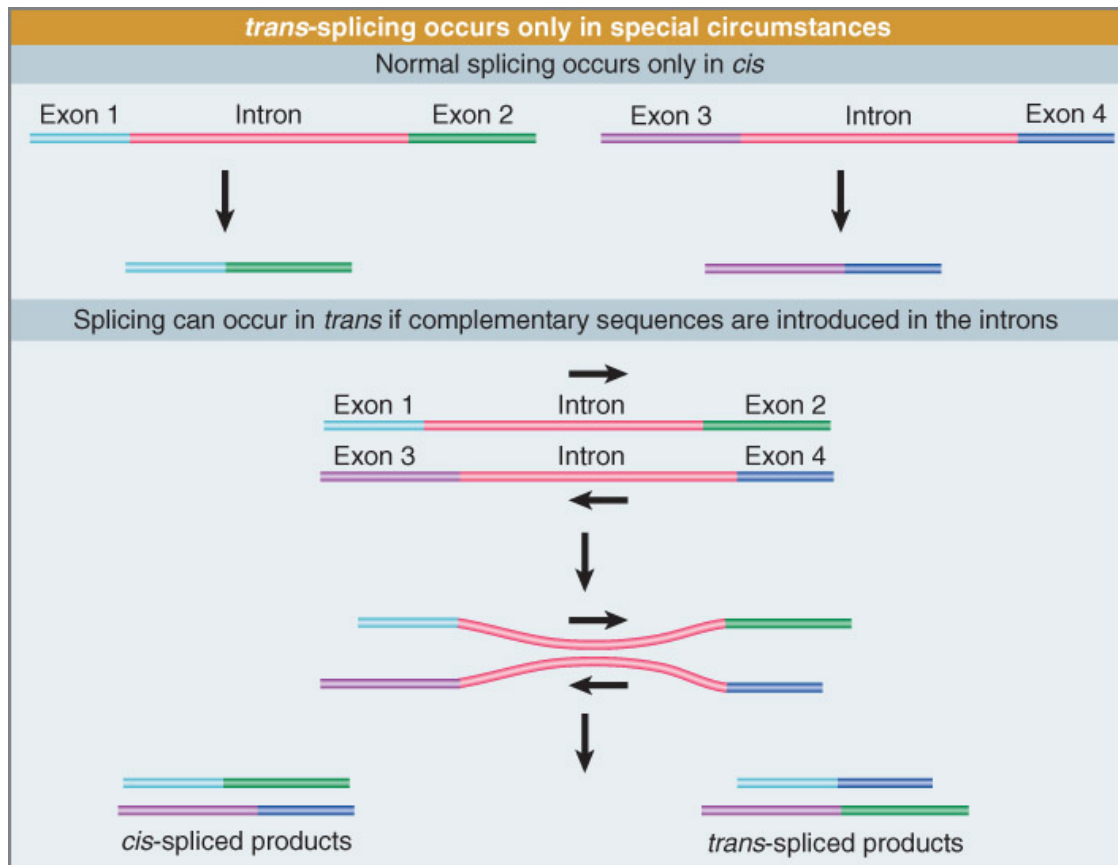


Eliminació d'introns: eliminació d'introns en *trans*

Dues reaccions de transesterificació

cis-splicing: ambdós exons en el mateix RNA

trans-splicing: exons en diferents RNAs



Eliminació d'introns: introns dels grups I i II

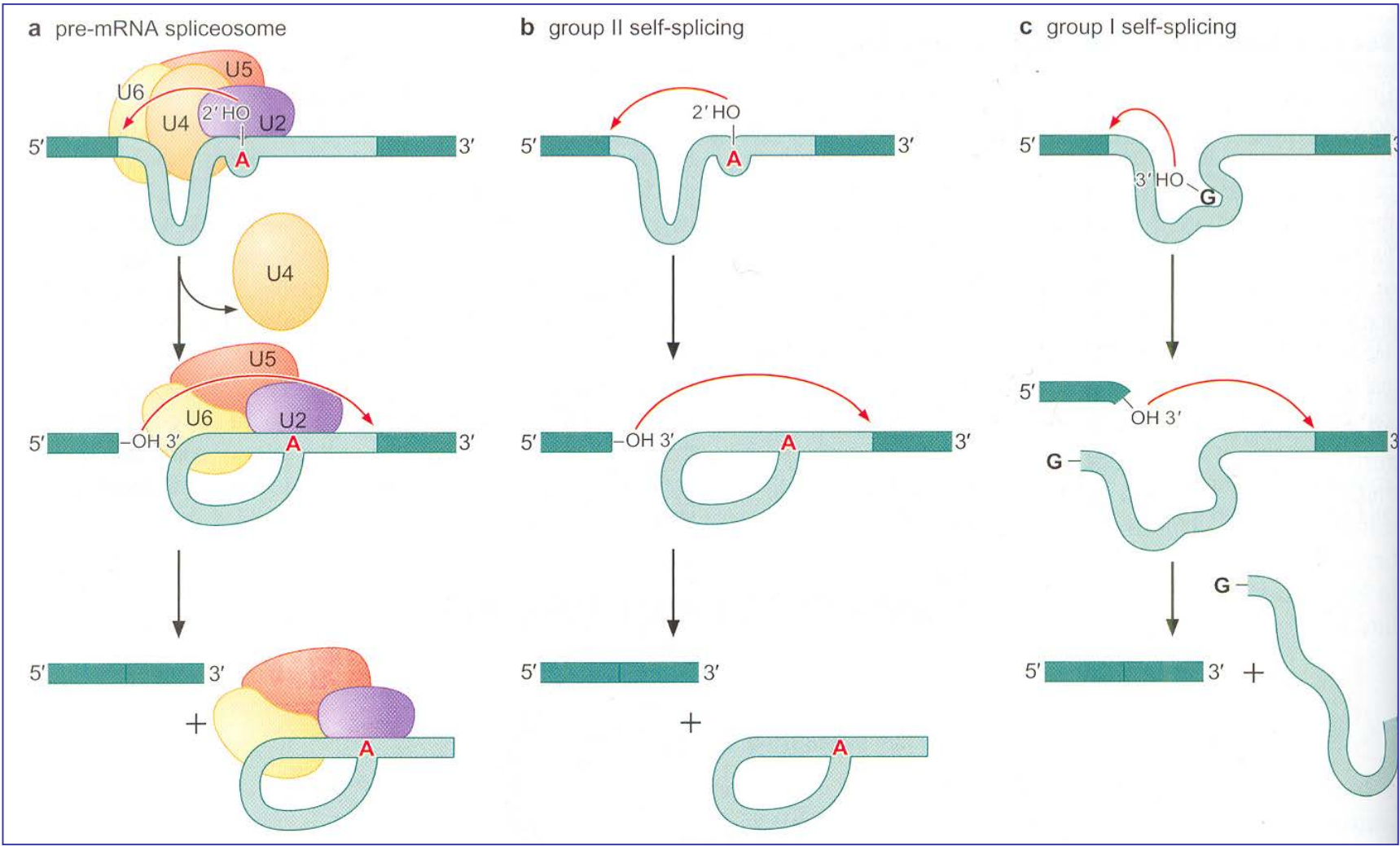
Nuclear pre-mRNA	Very common; used for most eukaryotic genes	Two transesterification reactions; branch site A	Major spliceosome
Group II introns	Rare; some eukaryotic genes from organelles and prokaryotes	Same as pre-mRNA	RNA enzyme encoded by intron (ribozyme)
Group I introns	Rare; nuclear rRNA in some eukaryotes, organelle genes, and a few prokaryotic genes	Two transesterification reactions; branch site G	Same as group II

Table 9.5 Ribozymes

Ribozyme	Description
Self-splicing introns	Some introns of Groups I, II and III splice themselves by an autocatalytic process
Ribonuclease P	The enzyme that creates the 5'-ends of bacterial tRNAs (see Section 9.3.2) consists of an RNA subunit and a protein subunit, with the catalytic activity residing in the RNA
Ribosomal RNA	The peptidyl transferase activity required for peptide bond formation during protein synthesis (Section 10.2.2) is associated with the 23S rRNA of the large subunit of the ribosome (see Research Briefing 10.2, p. 249)
tRNA ^{Phe}	Undergoes self-catalyzed cleavage in the presence of divalent lead ions
Virus genomes	Replication of the RNA genomes of some viruses involves self-catalyzed cleavage of chains of newly-synthesized genomes linked head-to-tail. Examples are the plant viroids and virusoids and the animal hepatitis delta virus. These viruses form a diverse group with the self-cleaving activity specified by a variety of different base-paired structures, including a well-studied one that resembles a hammerhead

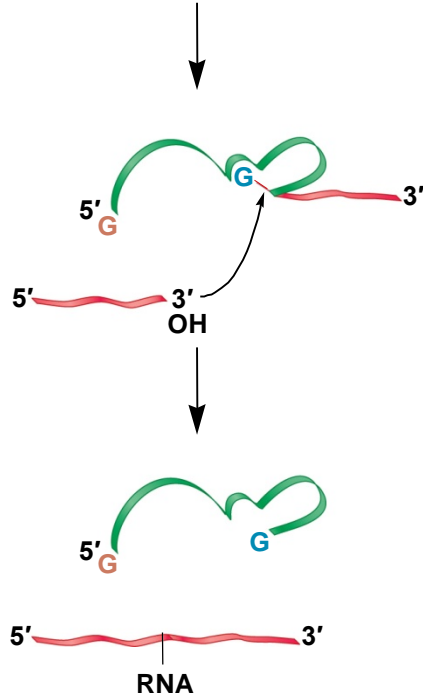
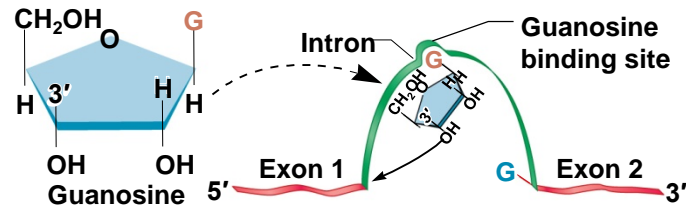
For further details see Scott and Klug (1996) and Nitta *et al.* (1998).

Eliminació d'introns: introns dels grups I i II

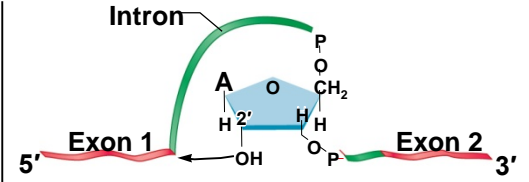


Eliminació d'introns: grups I i II

Introns autocatalítics.
Ribozims (Ribonucleasa P;
 rRNA 23S ...)



(a) Group I



(b) Group II

Eliminació d'introns: grups I i II

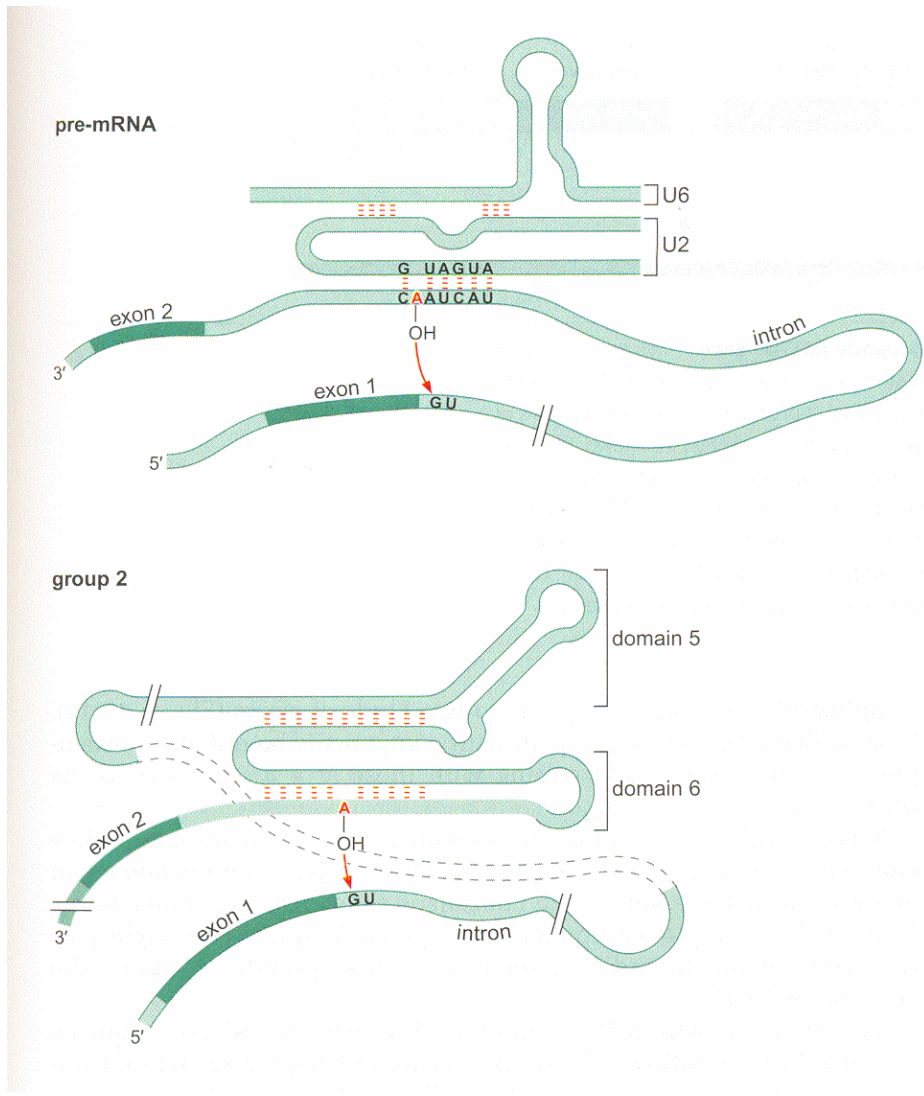
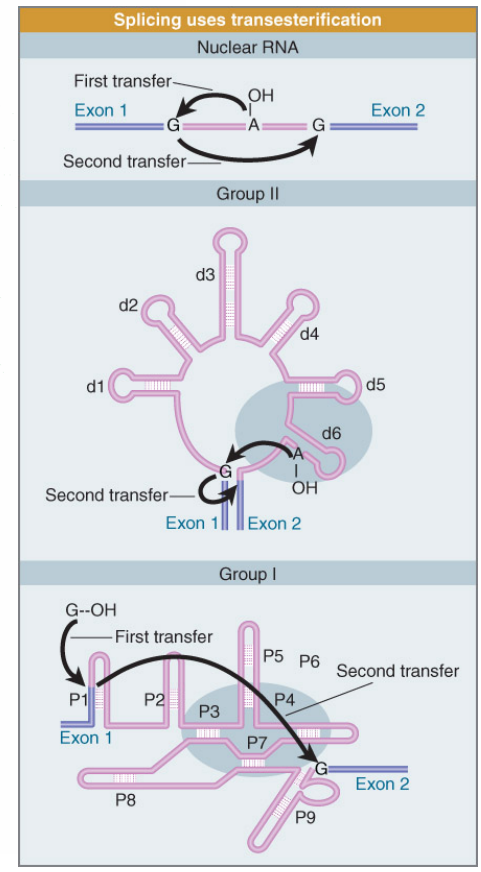
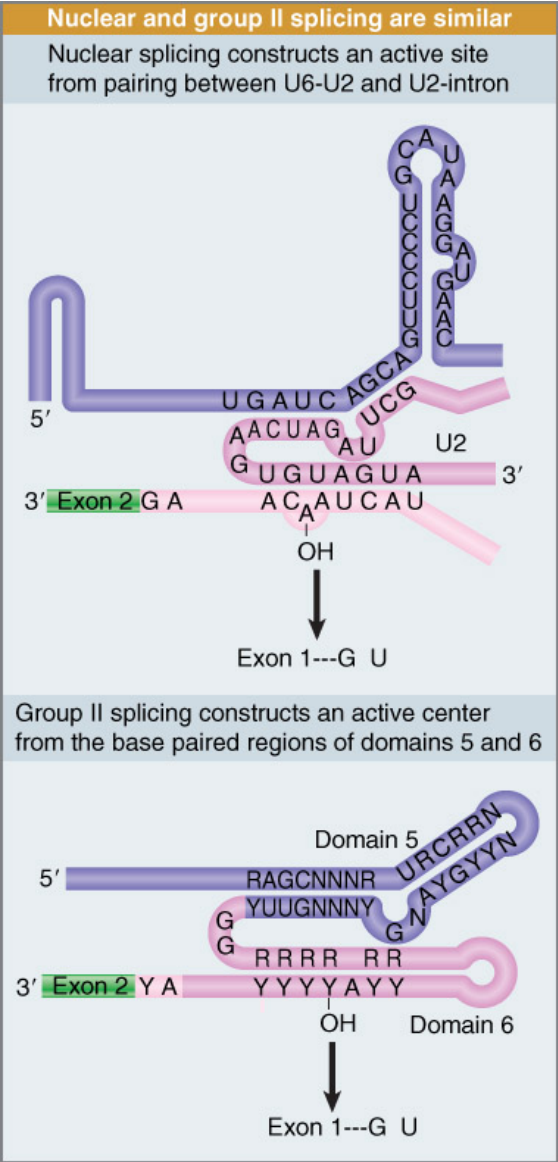
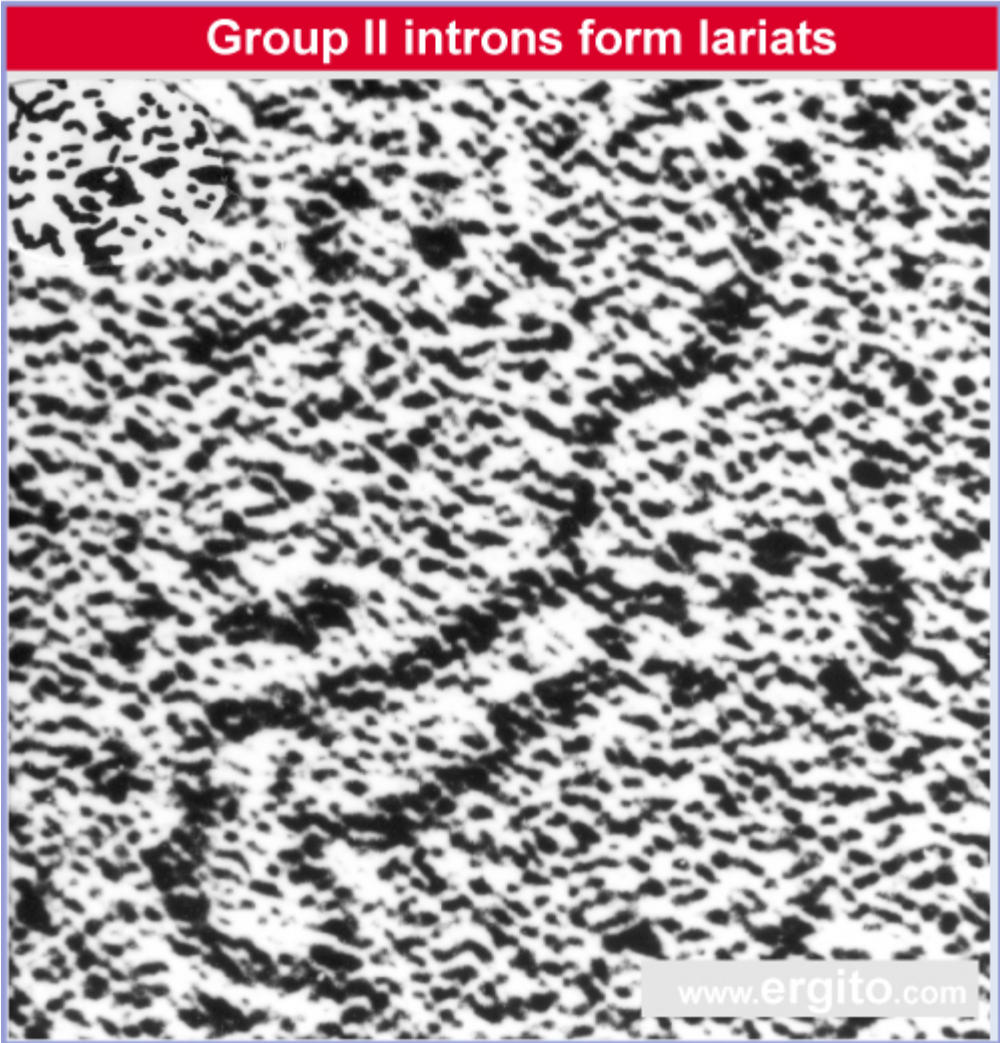


FIGURE 13-10 Proposed folding of the RNA catalytic regions for splicing of group II introns and pre-mRNAs. The dotted regions of the RNA in the group II case replace an additional four folded domains not shown in this depiction.

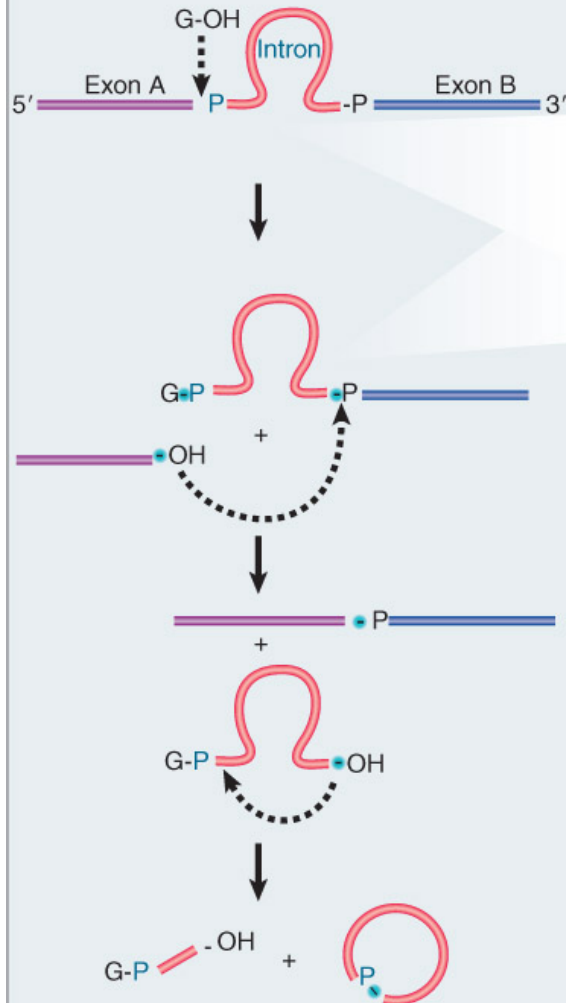


Eliminació d'introns de tipus II



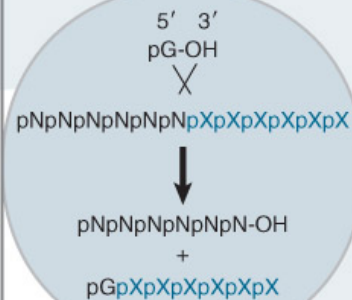
Eliminació d'introns de tipus I

Self-splicing occurs by successive transesterifications



First transfer

3'-OH end of G attacks
5' end of intron



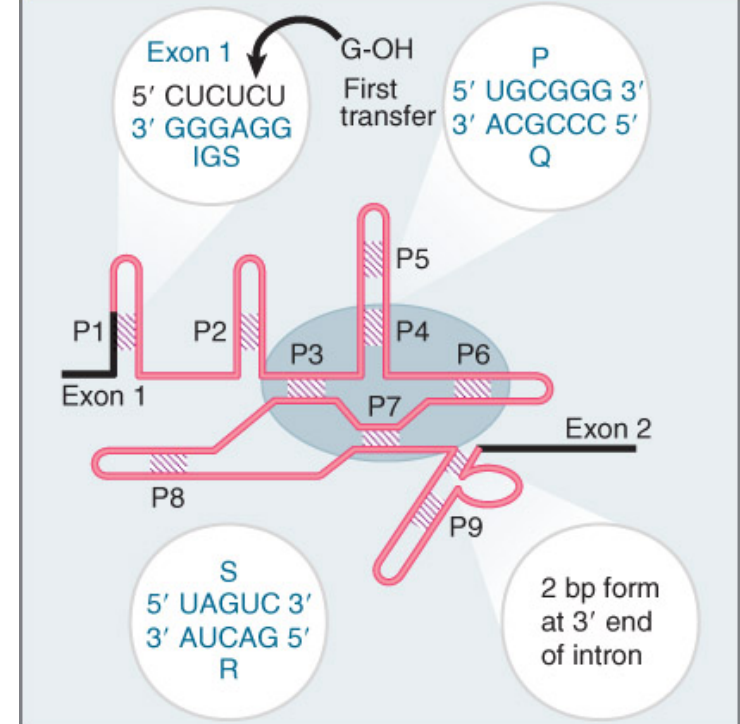
Second transfer

3'-OH of exon A attacks
5' end of exon B

Third transfer

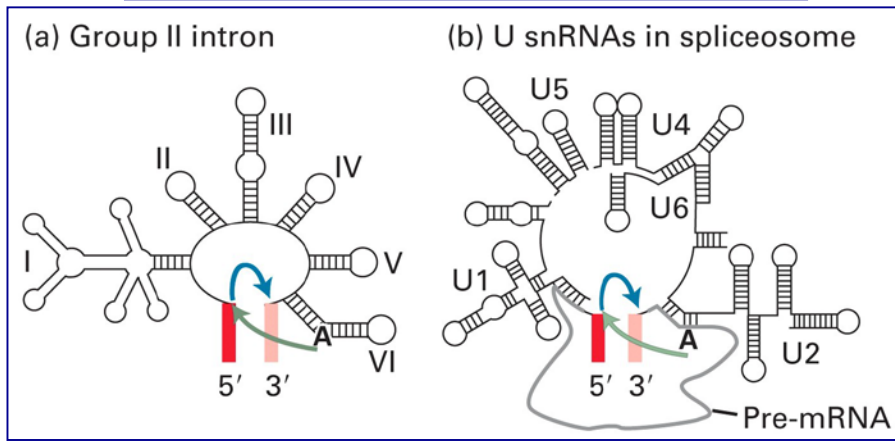
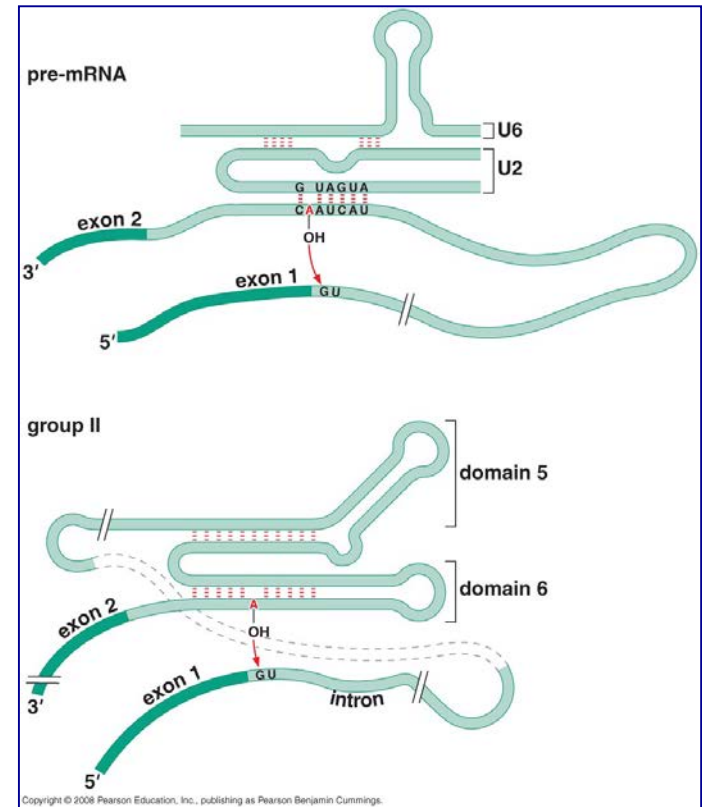
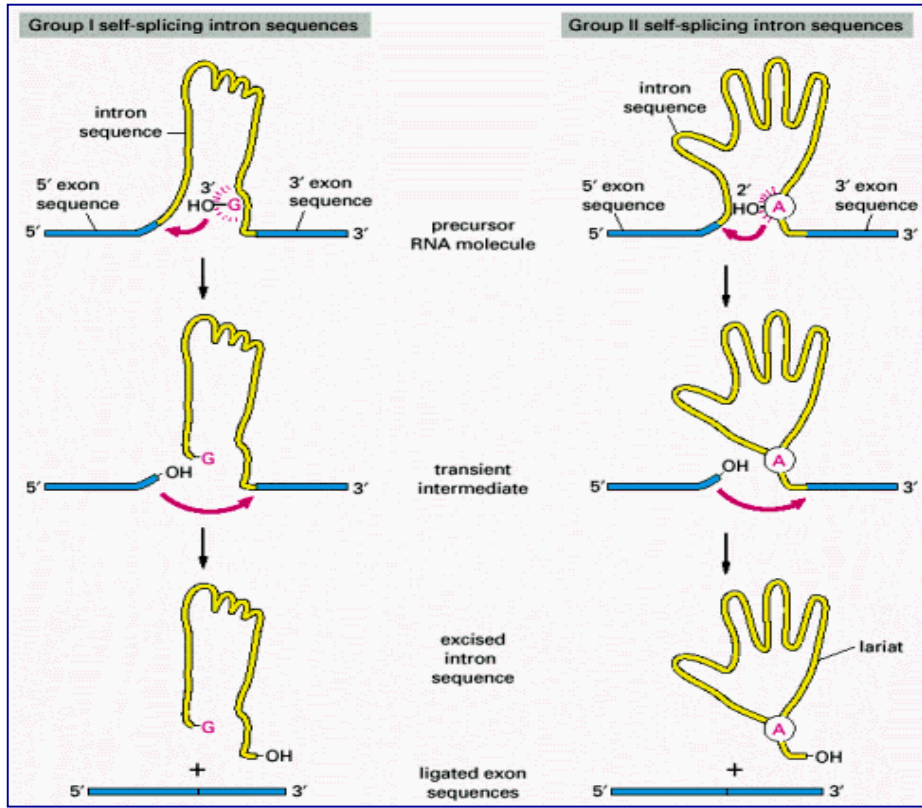
3'-OH end of intron attacks
bond 15 bases from 5' end

Group I intron structure is conserved



- L'autoescissió d'introns ocorre mitjançant reaccions de transesterificació en les quals s'intercanvien directament enllaços
- Aquests introns tenen una estructura secundària molt conservada

Eliminació d'introns



Eliminació d'introns

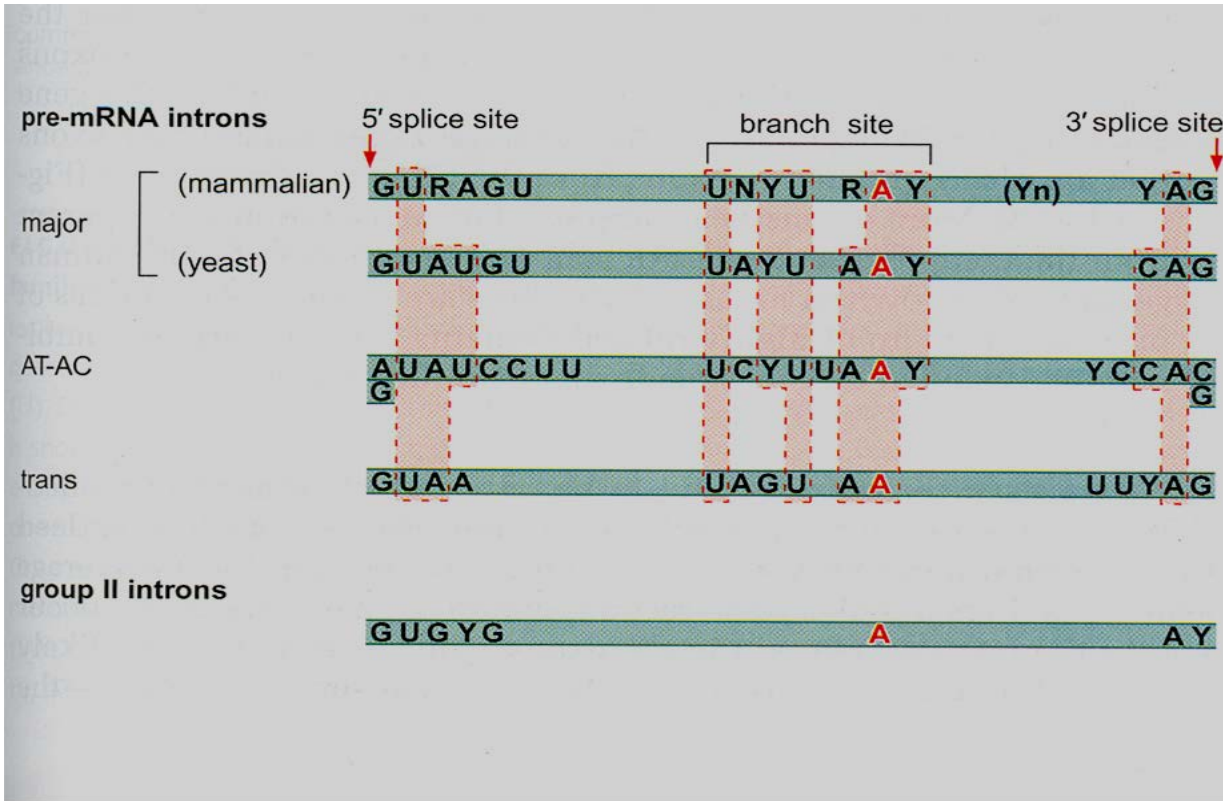
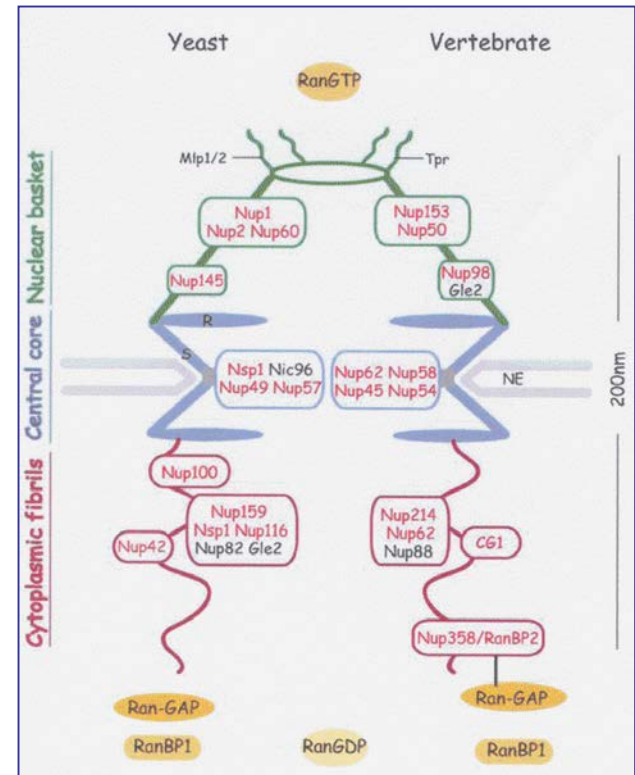
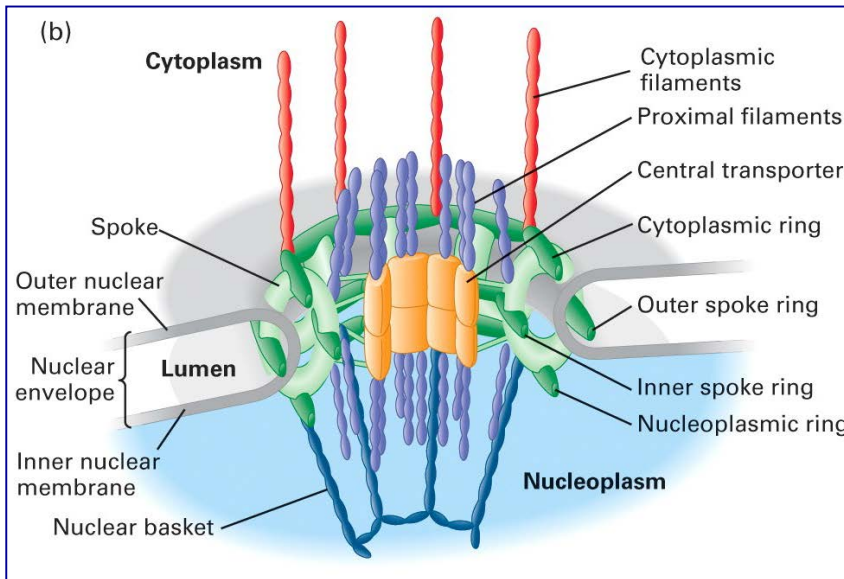


FIGURE 13-20 Sequences conserved in different kinds of introns. Shown are conserved sequences found in the 5' splice site, 3' splice site, and branch site of nuclear pre-mRNA introns—major, AT-AC, and trans-splicing—and group II introns. Shaded regions show nucleotides that are identical in major, AT-AC, and trans-splicing introns. (Source: Adapted from Yu Y.-T., Scharl E.C., Smith C.M., and Steitz J.A. 1999. The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. In *The RNA World*, 2nd edition (ed. Gesteland R.F., Cech T.R., and Atkins J.F.), pp. 487–524, p. 497, Fig. 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)

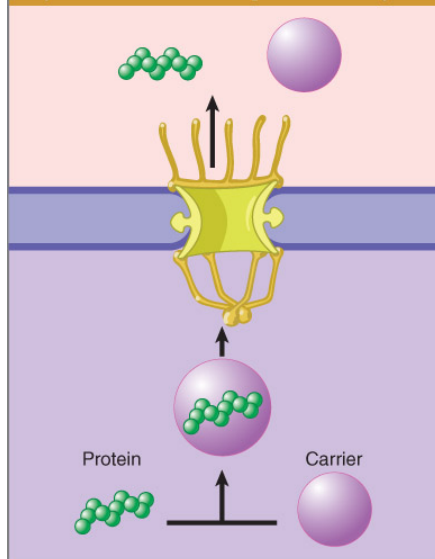
Tema 7

Transport dels RNAs

Transport dels RNAs: complex del porus nuclear (NPC)



A protein is carried through the nuclear pore

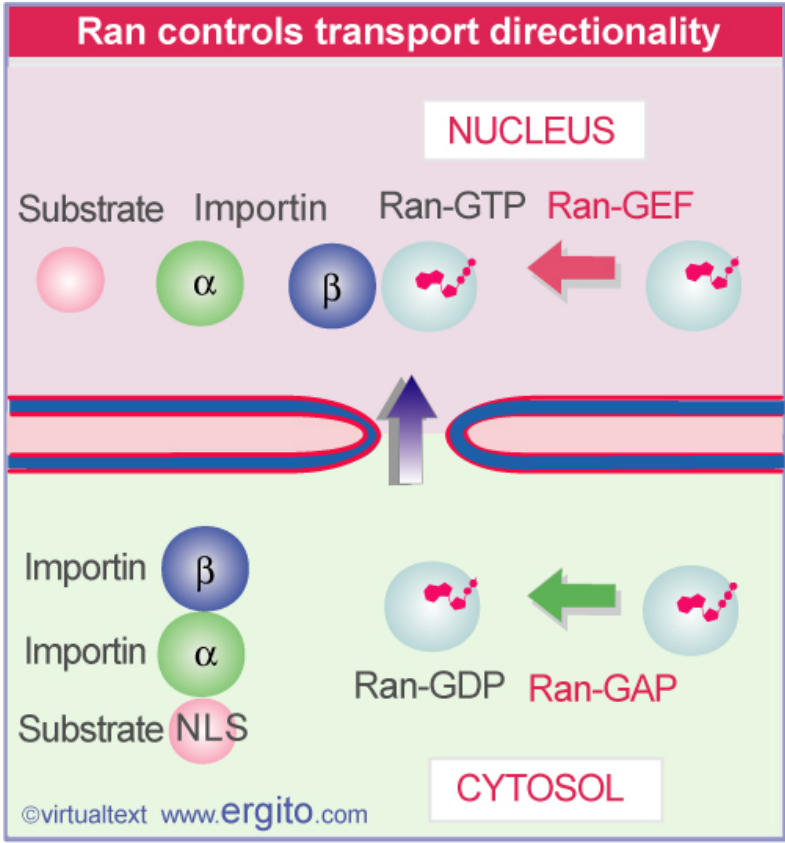
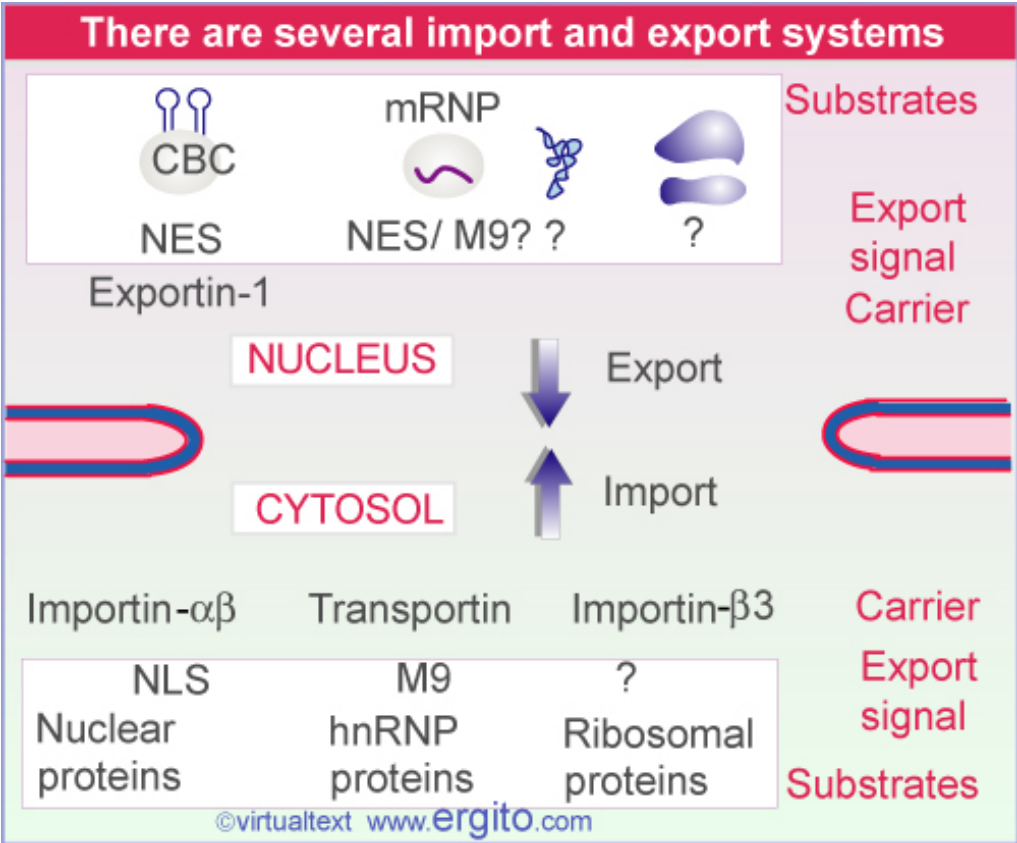


L'exportació d'RNAs i de proteïnes requereix proteïnes

NPC conté 3 tipus de nucleoporines:

- Proteïnes de membrana
- Nucleoporines FG (FG, GLFG, FXFG)
- Components estructurals primaris

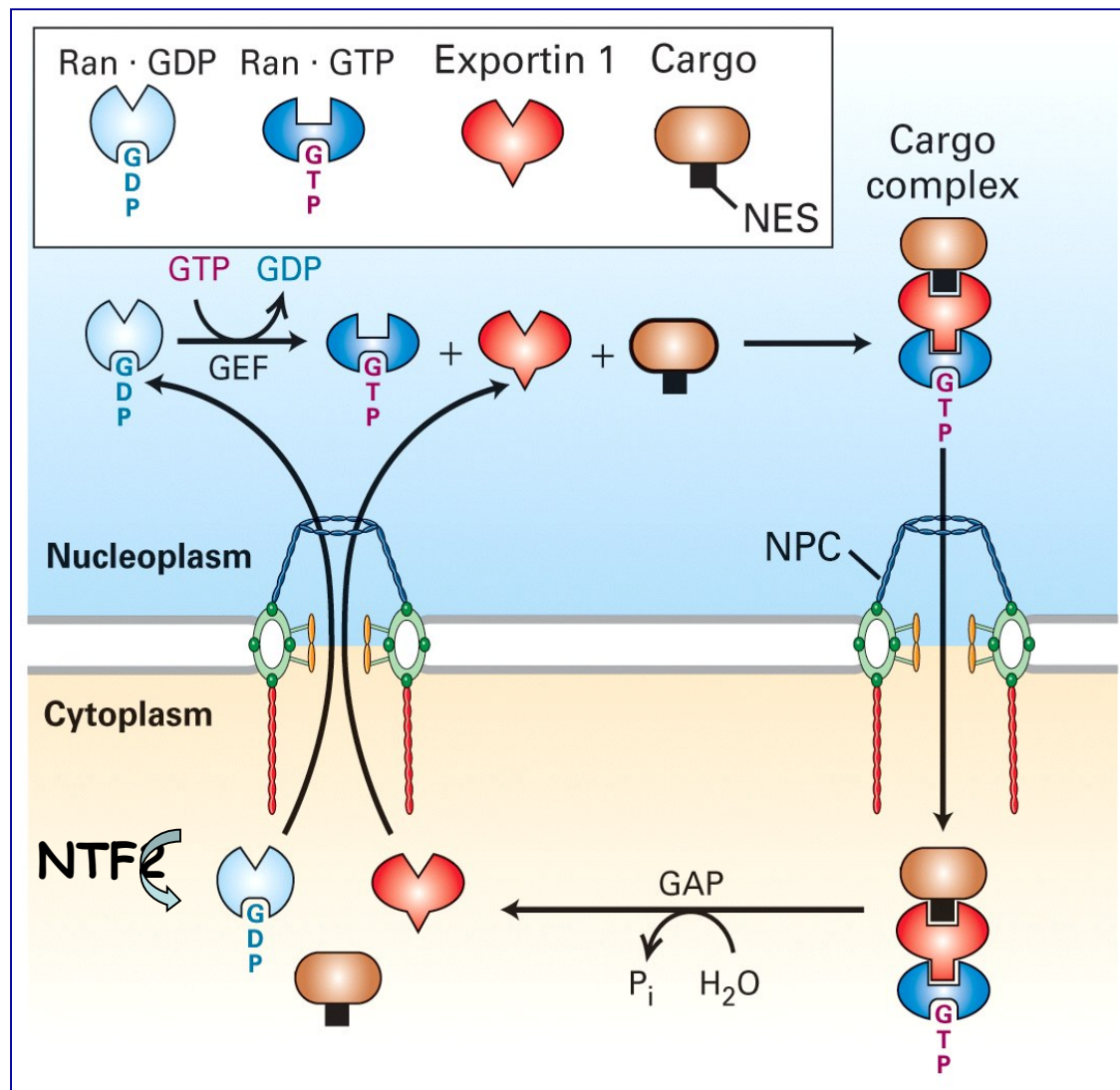
Transport a través del porus nuclear



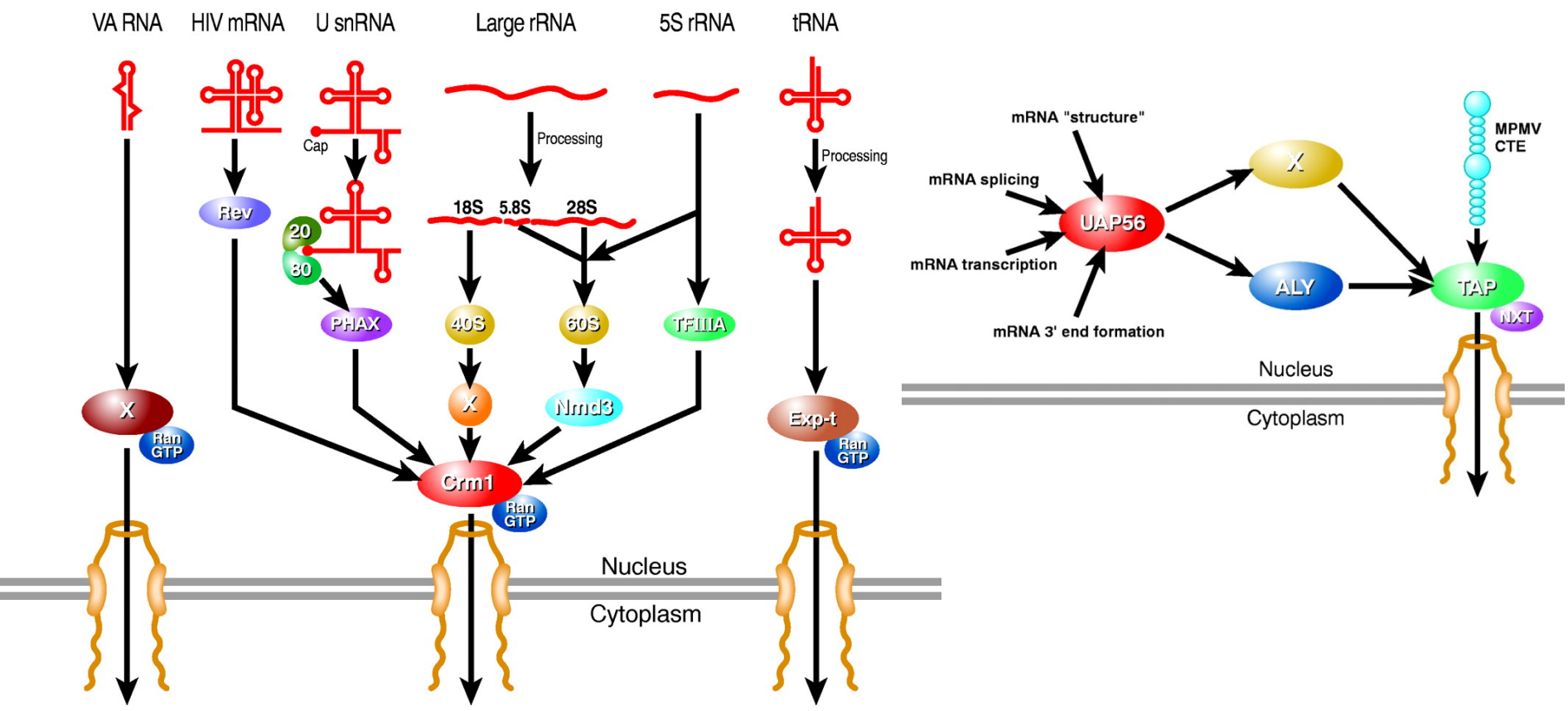
Transport a través del porus nuclear

- *Cargo*
- *Carioferines*
 - Importines
 - Exportines
- *Nucleoporines FG*
- *GTPasa Ran unida a GDP o GTP*

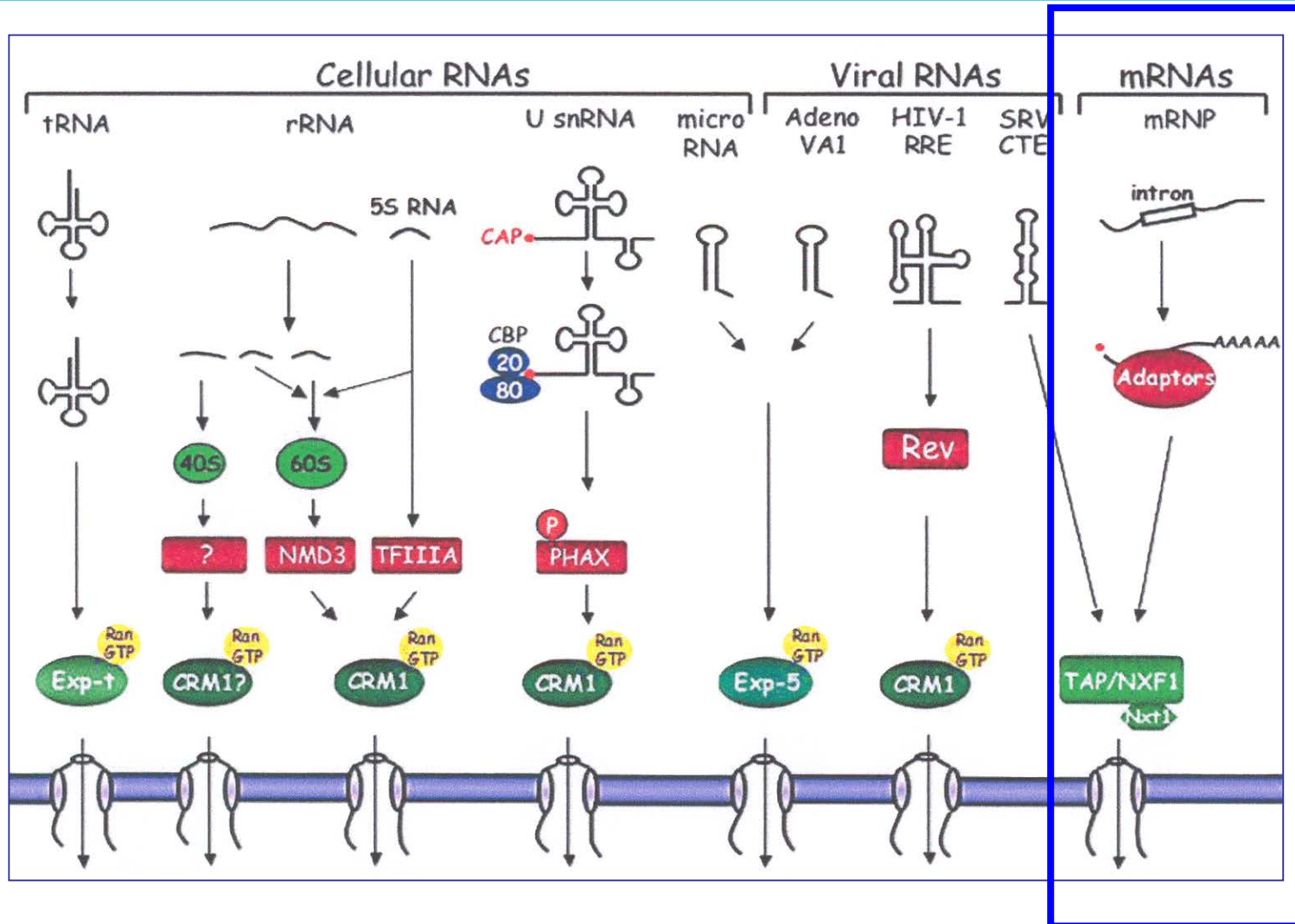
Per exemple:
Transport d'un *Cargo* amb
un senyal NES ric en
leucines



Rutes de transport d'RNAs

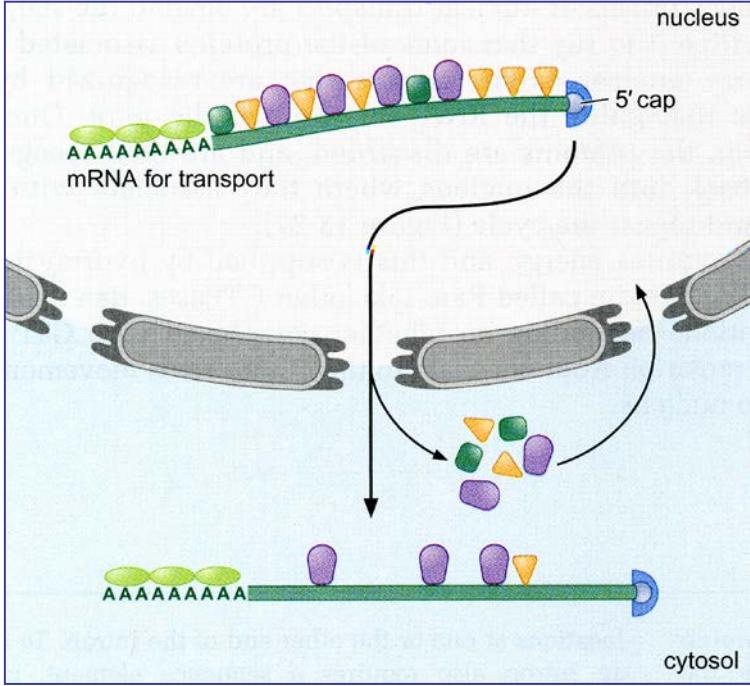


Rutes de transport d'RNAs: el cas dels mRNAs



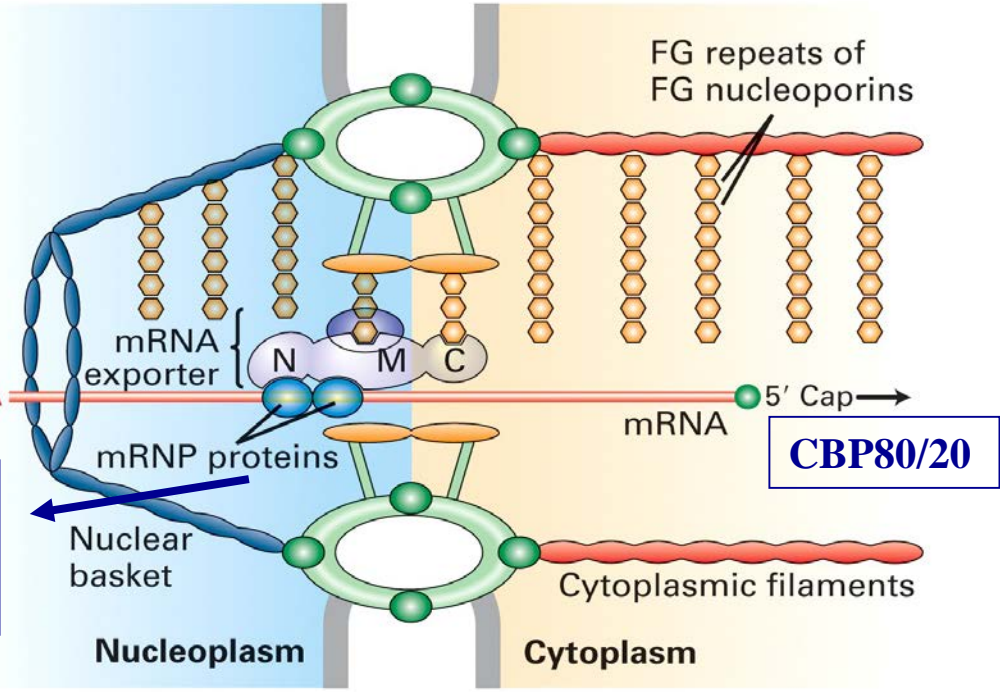
- Mediat per NXF (Nuclear eXport Factor, inclou Tap); no són carioferines.
- No fa servir mecanismes dependents de Ran.

Transport d'mRNAs a través del porus nuclear

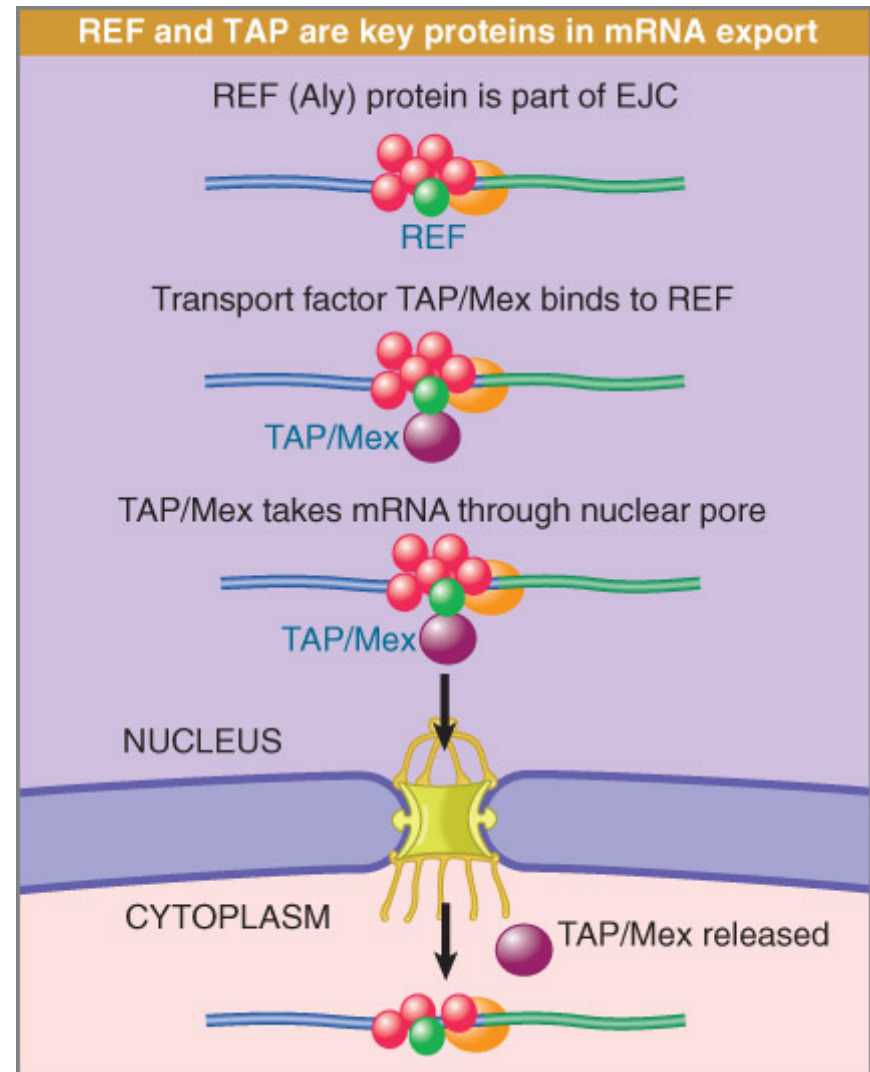
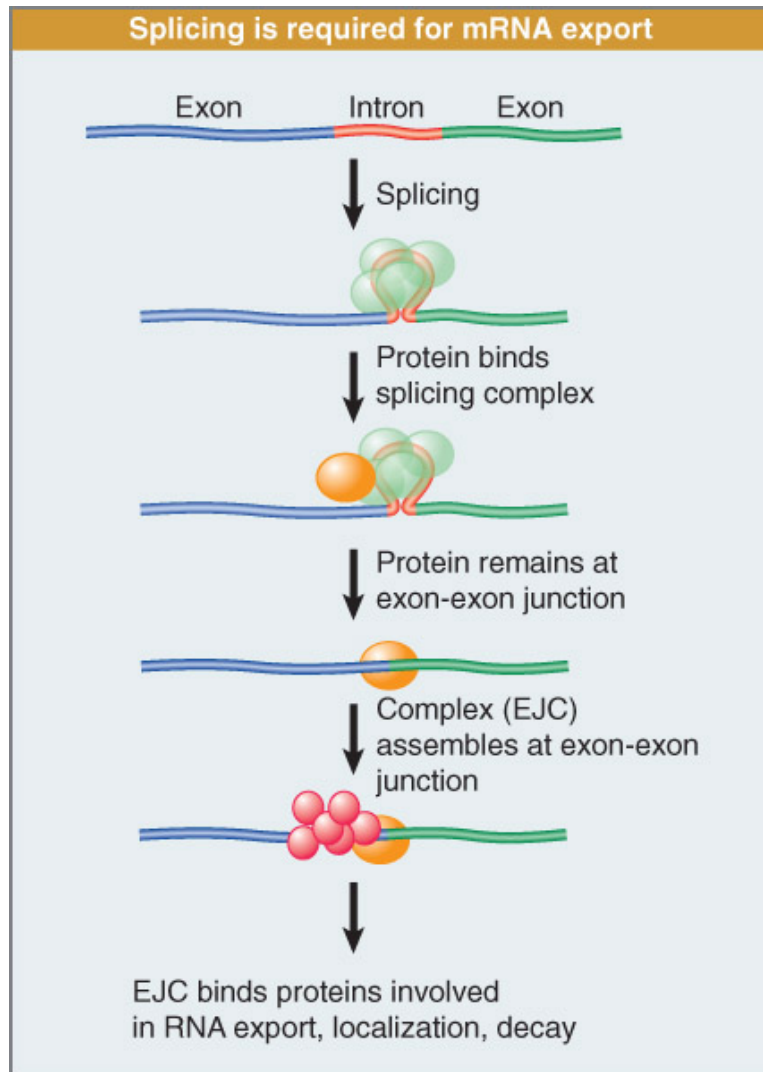


PABPII

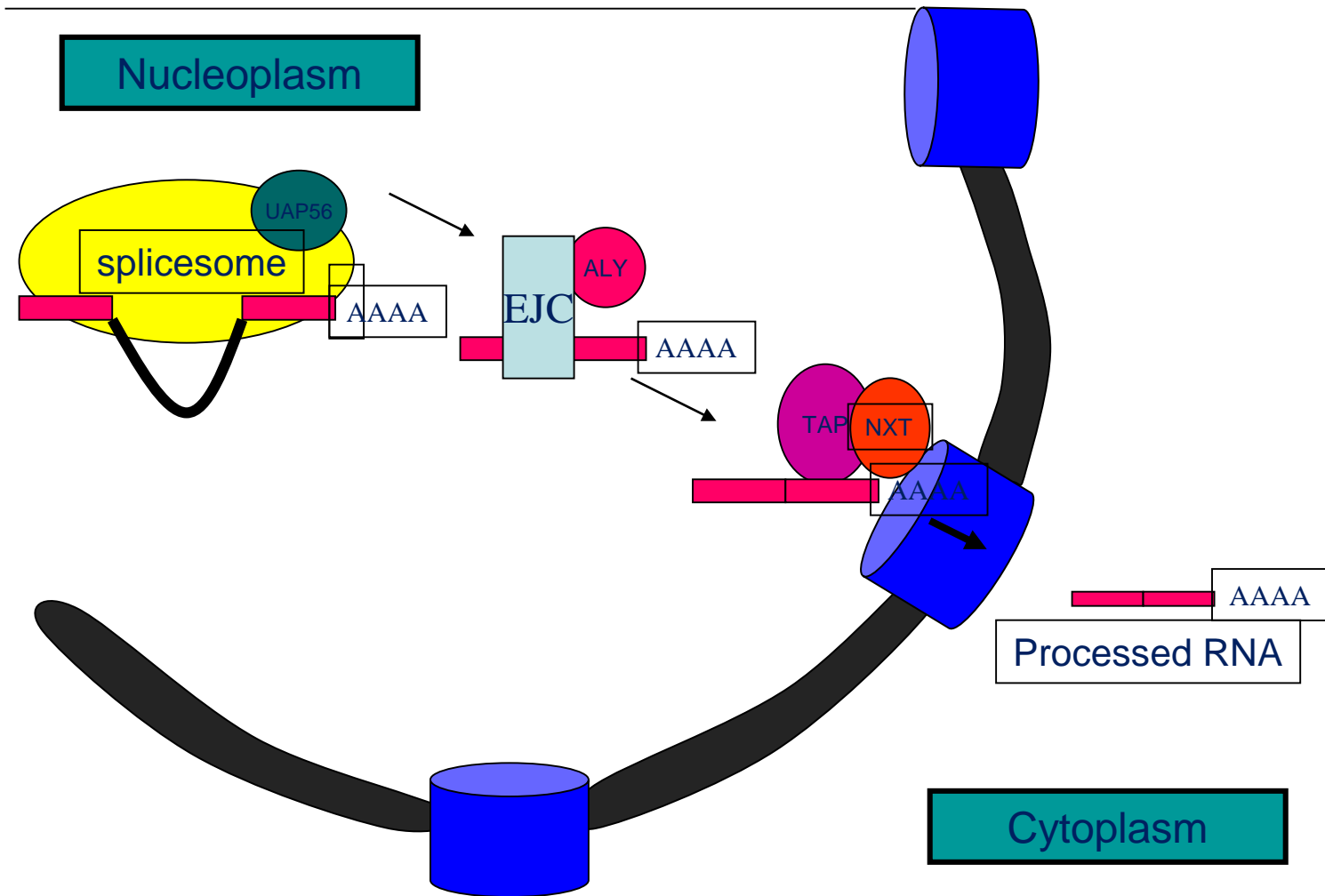
Exon junction complex (EJC)
Proteïnes hnRNP



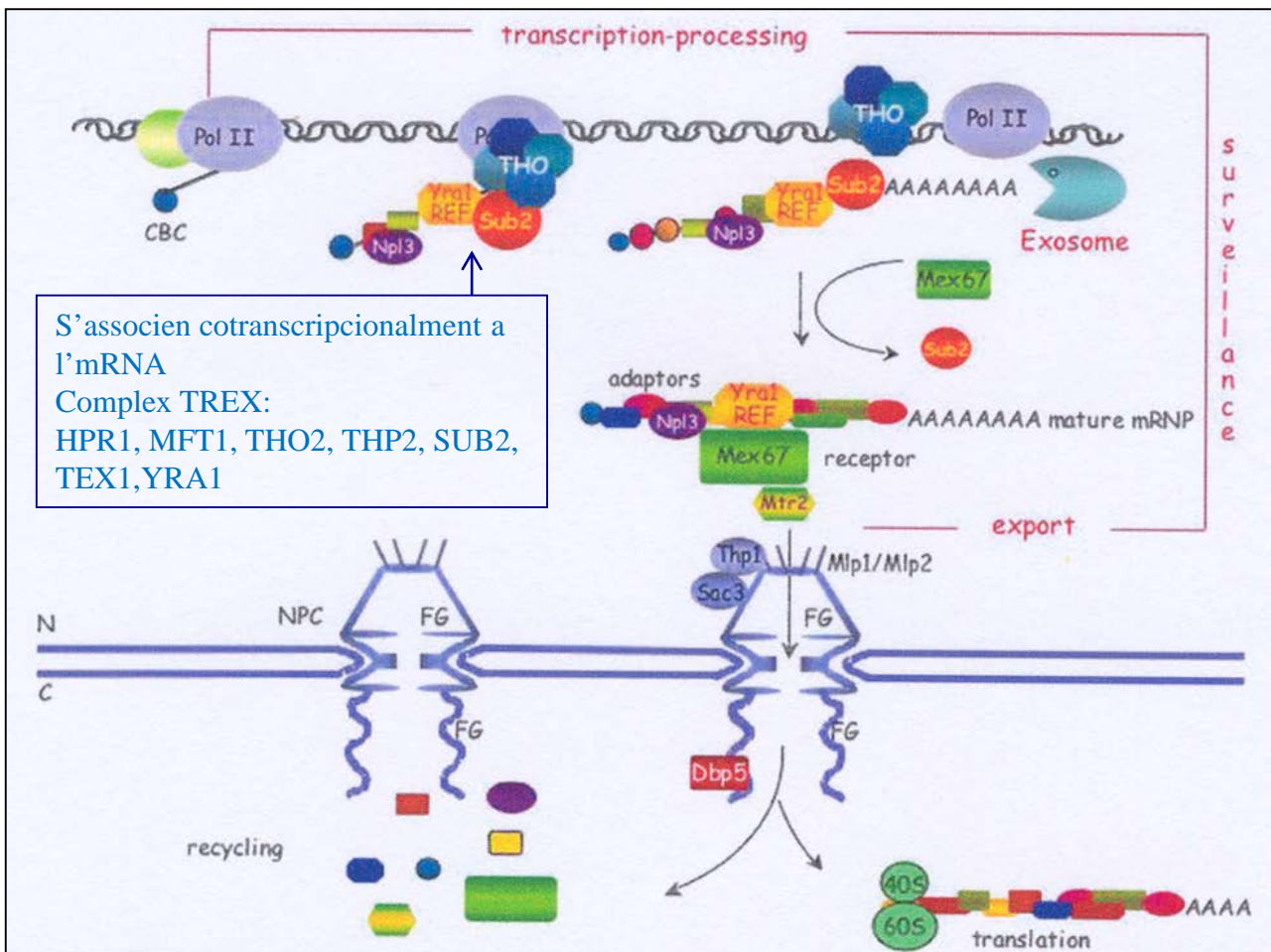
El transport d'mRNAs està acoblat al seu processament



El transport d'mRNAs està acoblat al seu processament



El transport d'mRNAs està acoblat al seu processament



S'associen cotranscripcionalment a l'mRNA
 Complex TREX:
 HPR1, MFT1, THO2, THP2, SUB2, TEX1, YRA1

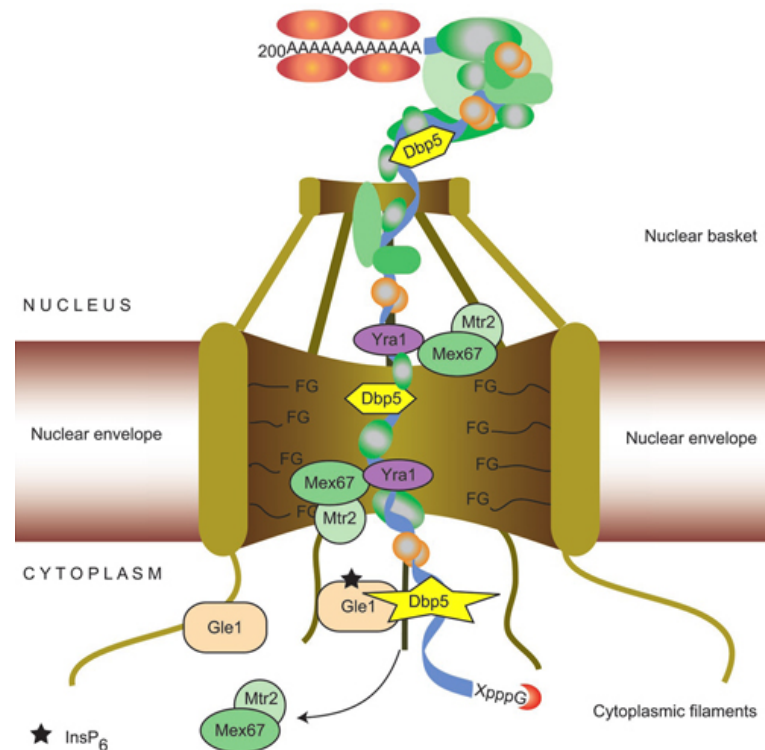
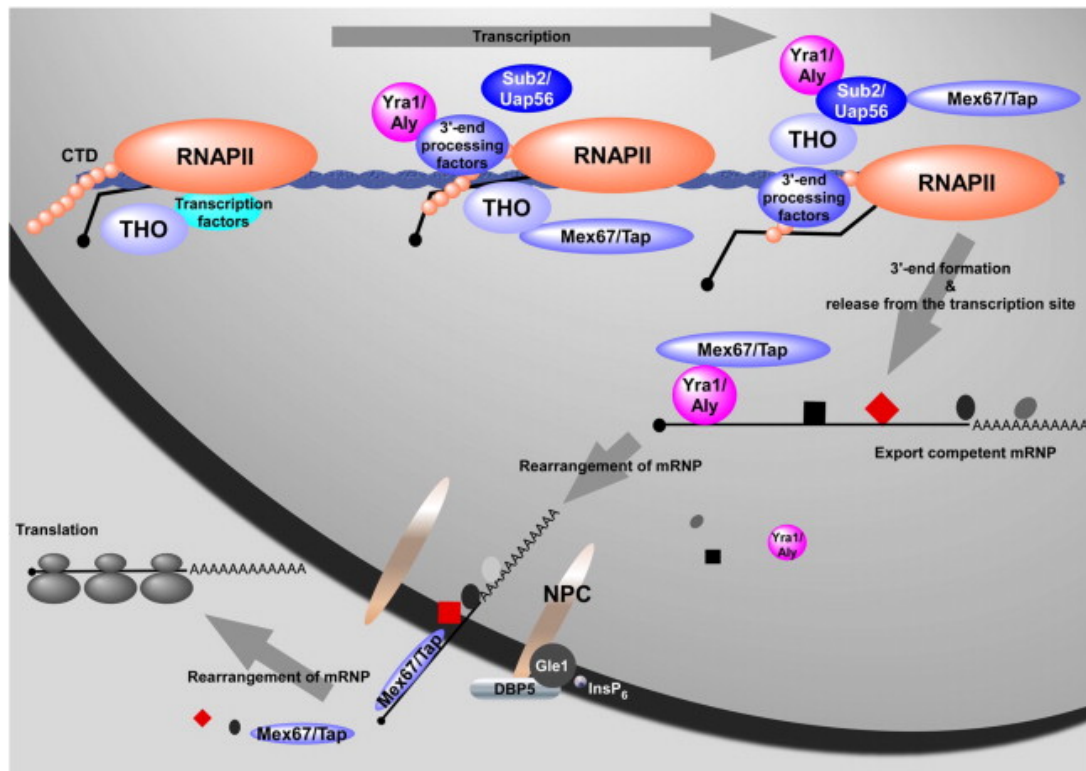
THO:
 elongació i reclutament de factors d'exportació

REF/ALY (Yra1) i Sub2:
 part de l'EJC

TAP15 (Mex67-Mtr2): intervé en interaccions amb components del porus nuclear

Dbp5p: requerida per a l'alliberament al costat citoplasmàtic de l'NPC

El transport d'mRNAs està acoblat al seu processament



El complex de proteïnes de Transcripció-Exportació (THO/TREX) té un paper important en l'acoblament de la transcripció amb l'eliminació d'introns i l'exportació de l'mRNA.

En els metazous, TREX consisteix en el complex central de THO, que inclou THO1/HPR1, THO2, THO3/TEX1, THO5, THO6 i THO7. Les proteïnes que s'associen amb els components bàsics de THO i que formen el complex TREX inclouen l'helicasa d'RNA i el factor d'eliminació d'introns DDX39B (Sub2 al llevat), així com la proteïna adaptadora d'exportació d'mRNA ALY (Yra1 al llevat). TREX es recluta co-transcripcionalment a l'mRNA naixent i regula la unió d'exons, l'elongació de la transcripció i l'exportació.

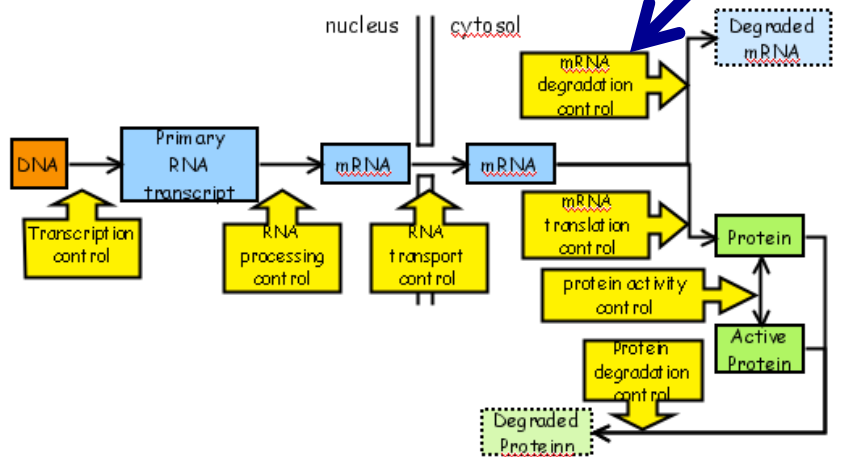
Tema 7

Degradació dels RNAs

Degradació dels RNAs

- La degradació dels mRNAs és un procés important i molt regulat.
- Afecta directament la síntesi de proteïnes, pel seu **impacte en la concentració d'mRNA disponible per a la traducció**.
- Qualsevol mecanisme que afecte el recanvi dels transcrits permet la cèl·lula **controlar l'expressió gènica**.
- Per tal de poder **adaptar la síntesi de proteïnes a les necessitats canviants** (produir la proteïna que es necessita en les quantitats escaients) **es requereix poder degradar l'RNA** i així alterar ràpidament els patrons de síntesi de proteïnes. Els mRNAs són menys estables que els rRNAs i tRNAs.

Multi-Step Regulation of Gene Expression



- La seua influència en l'expressió de gens individuals es reflecteix en la **variabilitat en la vida mitjana dels transcrits** (la $t_{1/2}$ pot variar entre diferents transcrits en una mateixa cèl·lula fins a 2 ordres de magnitud)
- D'altra banda, la $t_{1/2}$ pot **variar en resposta a les necessitats canviants** en la cèl·lula de la proteïna que codifica l'mRNA.

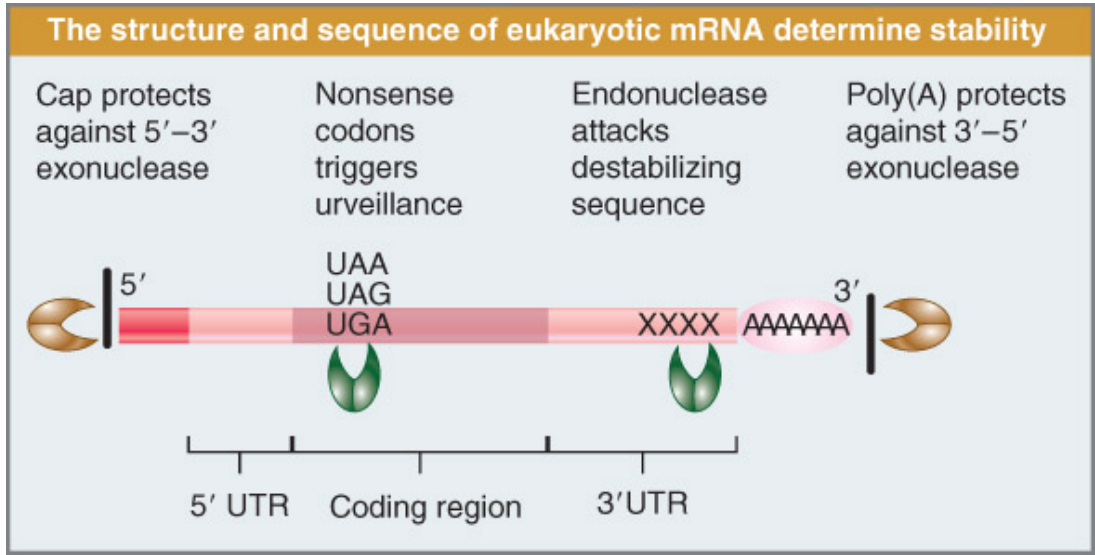
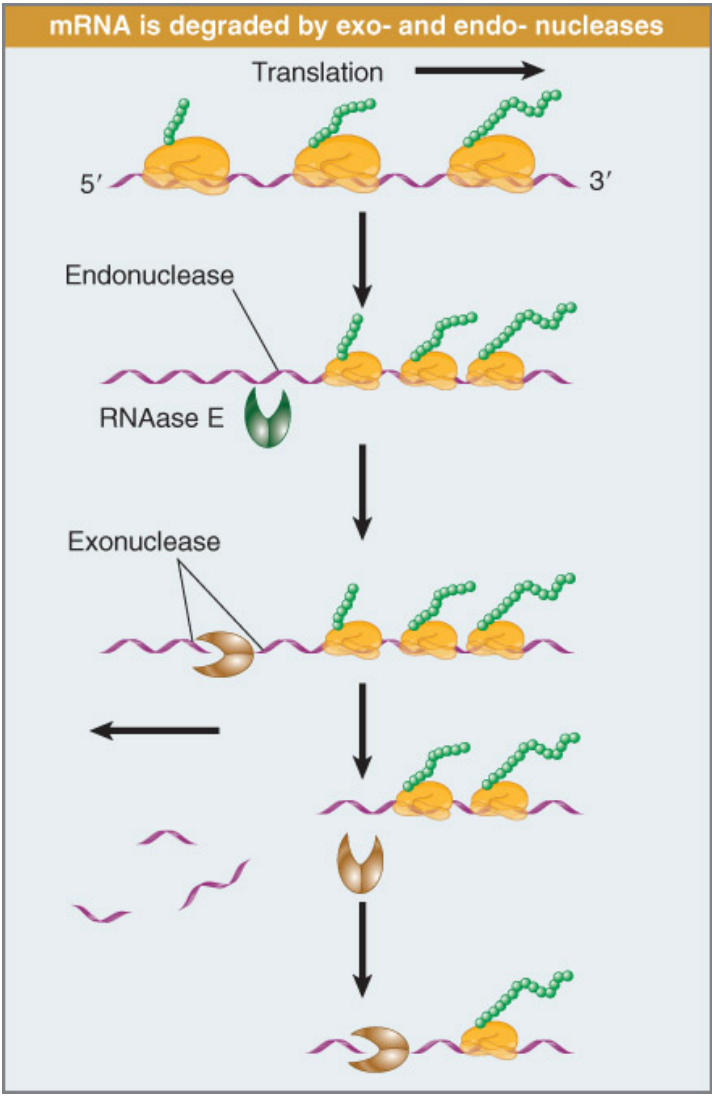
Degradació d'RNAs

Cèl·lula	Temps de generació	Vida mitjana dels mRNAs	
		Mitjana	Rang
<i>Escherichia coli</i>	26-60 min	3-5 min	2 min - 1 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 h	22 min	4-40 min
Cultiu de cèl·lules humanes	16-24 h	10 h	≥ 30 min (histones) 0.3-24 h (mRNAs específics)

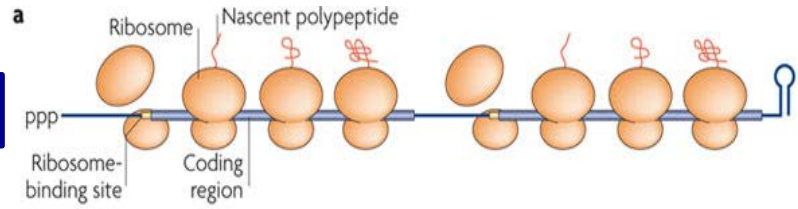
Factors a tenir en consideració:

- Enzims implicats en la degradació: ribonucleases
- Molècula d'RNA: estructura.
- Regulació del procés: senyals, elements *cis* en l'RNA i factors *trans* implicats

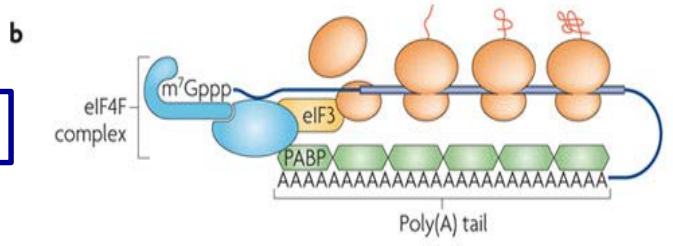
Degradació d'RNAs



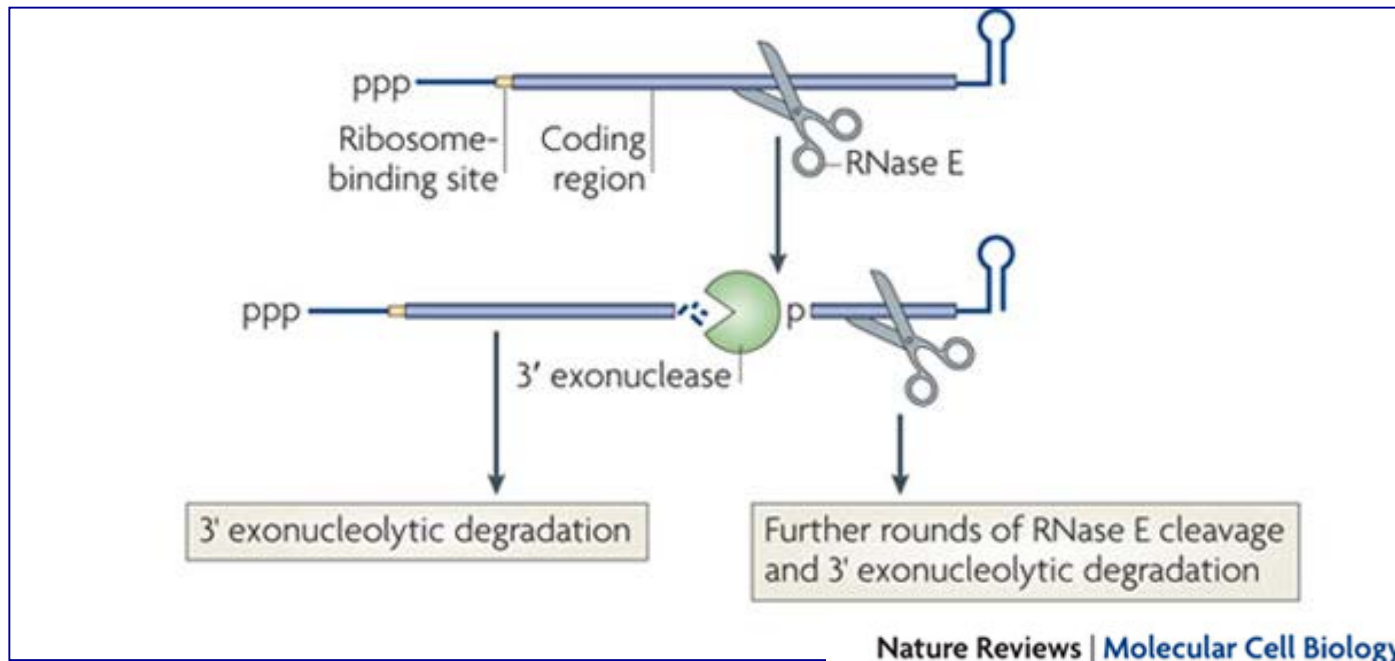
Procarriotes



Eucariotes



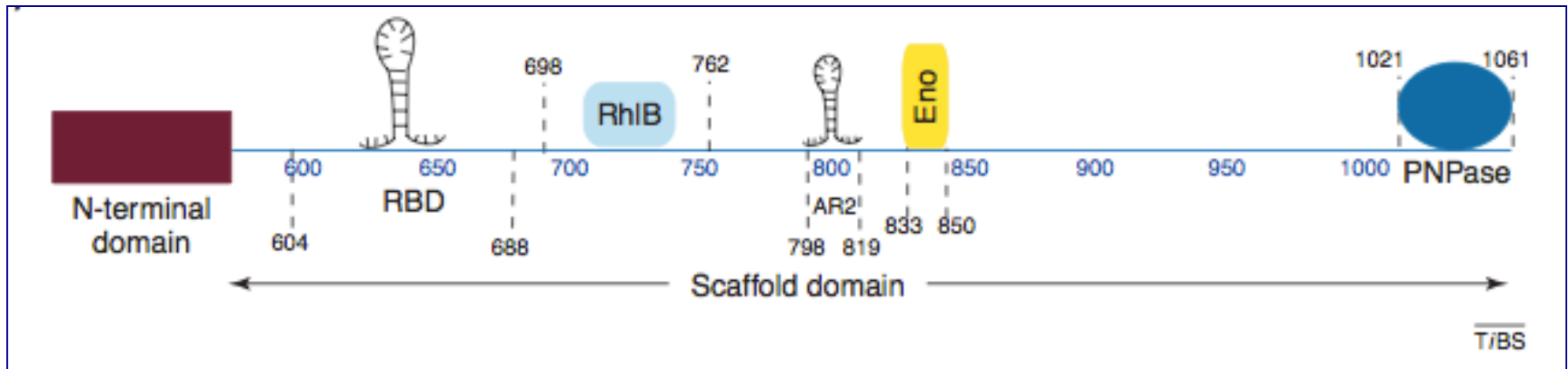
Mecanismes convencionals de degradació de mRNAs en *Escherichia coli*



Model de ruta de degradació: atacs per endonucleases i digestió dels fragments generats per exonucleases.

Degradació dels mRNAs en *E. coli*

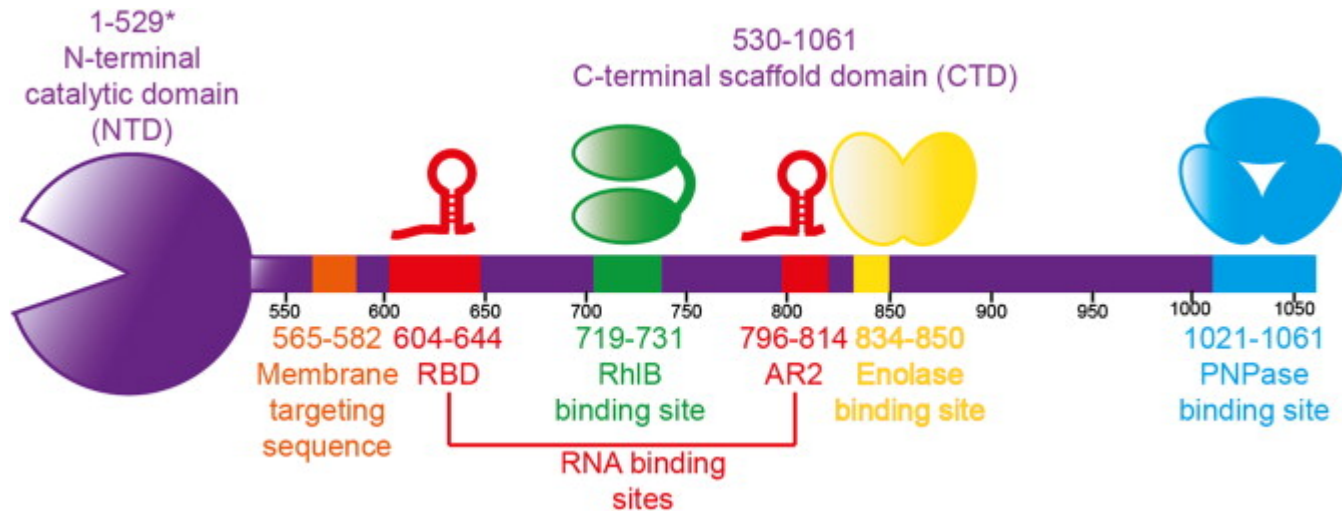
- Participació d'un complex multiproteic (el **degradosoma**), que inclou també helicases



- En formen part exonucleases 3'-5', RNasa II i endonucleases que eliminen estructures secundàries i faciliten l'acció d'exonucleases, p. ex., RNasa III.

Degradació dels mRNAs en *E. coli*

EL DEGRADOSOMA



In many bacteria, one of the key enzymes of the decay pathway is the hydrolytic endoribonuclease RNase E. With the first cleavage by this enzyme, the transcript is destined to a fate of complete destruction. However, RNase E also takes part in RNA maturation processes and cleaves precursors of structured RNAs in a more controlled manner, so that the cleavage products are not marked for destruction but rather processed further to form a functional RNA molecule.

One of the many fascinating facets of RNase E is its preference for substrates having a monophosphate group on the 5' terminus. As bacterial [primary transcripts](#) have a 5' terminal triphosphate group, some are protected from cleavage until they are converted to a 5' monophosphate form by pyrophosphohydrolase activity. RNase E recognises the 5' end of the RNA through contacts made by the [catalytic domain](#), which is at the [N-terminus](#) of the protein and comprises roughly half its mass. In *E. coli* and many other bacteria, the non-catalytic portion of RNase E forms a scaffold for the physical association of other key enzymes of [RNA metabolism](#) into a [multienzyme complex](#), known as the RNA degradosome. Through this interaction, the enzymatic components can cooperate to turn over RNA. The canonical components of the *E. coli* degradosome include RNase E, which recruits the DEAD-box RNA helicase RhIB, the glycolytic enzyme [enolase](#) and the phosphorolytic exoribonuclease [polynucleotide phosphorylase](#) (PNPase). The degradosome scaffolding domain also includes [RNA binding domains](#) (RBD and AR2), and a membrane targeting sequence (MTS)

Bandyra KJ, Bouvier M, Carpousis AJ, Luisi BF. The social fabric of the RNA degradosome. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829:514-522. doi:10.1016/j.bbagr.2013.02.011

Degradació dels mRNAs en eucariotes

Ruta principal:

- Desadenilació per acurtament de la cua poli(A) fins a deixar 10-15 nt (proteïna Ccr4 de llevat)
- Eliminació de la gorra
- Exonucleasa 5'-3' processiva

Ruta minoritària (pot ser el principal mecanisme en alguns transcrits)

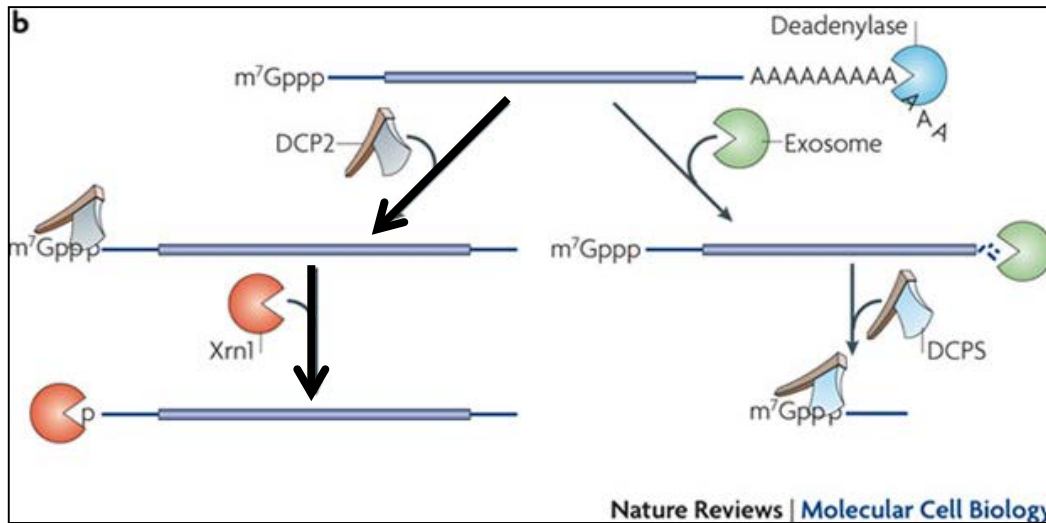
- Desadenilació + participació d'un complex d'exonucleases (l'exosoma) + degradació de la gorra

Ruta alternativa independent de desadenilació

- Eliminació de la gorra (*Decapping*) + exo 5'-3

En plantes i mamífers: endo + exo (3'-5' o 5'-3' primer)

Rutes convencionals de degradació dels mRNAs en eucariotes

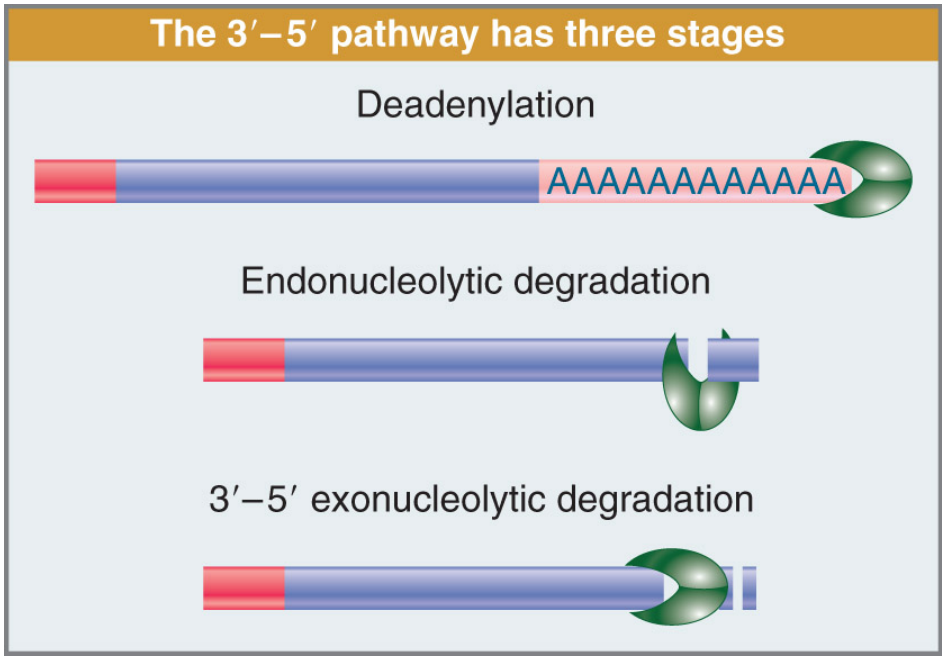
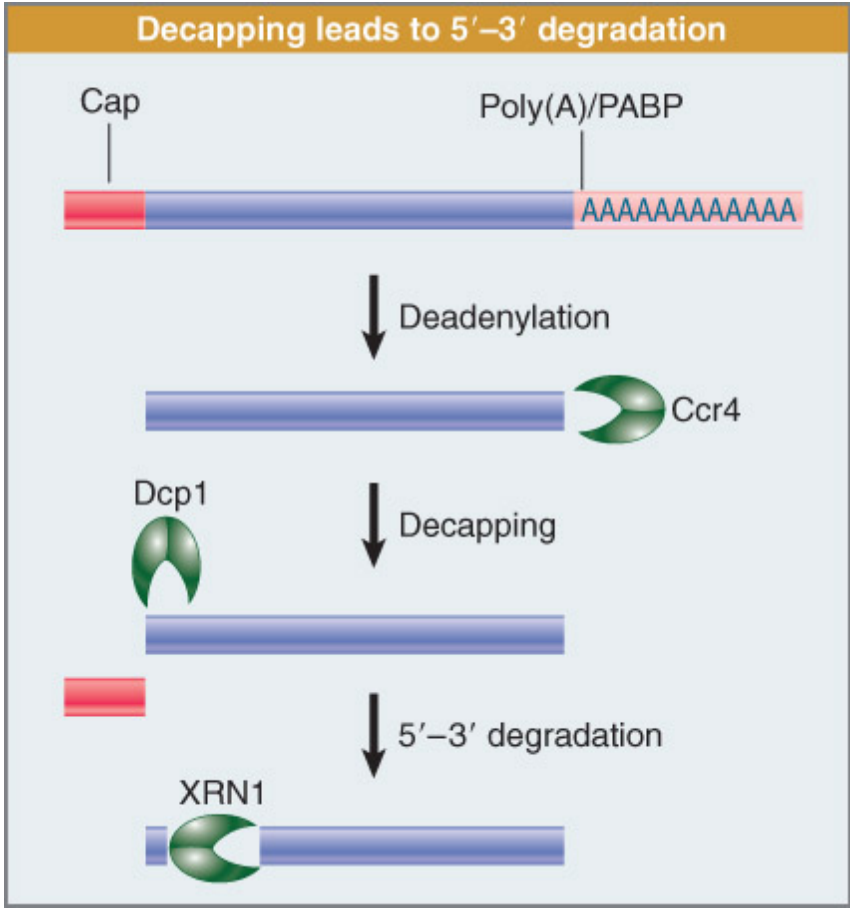


Rutes més habituals

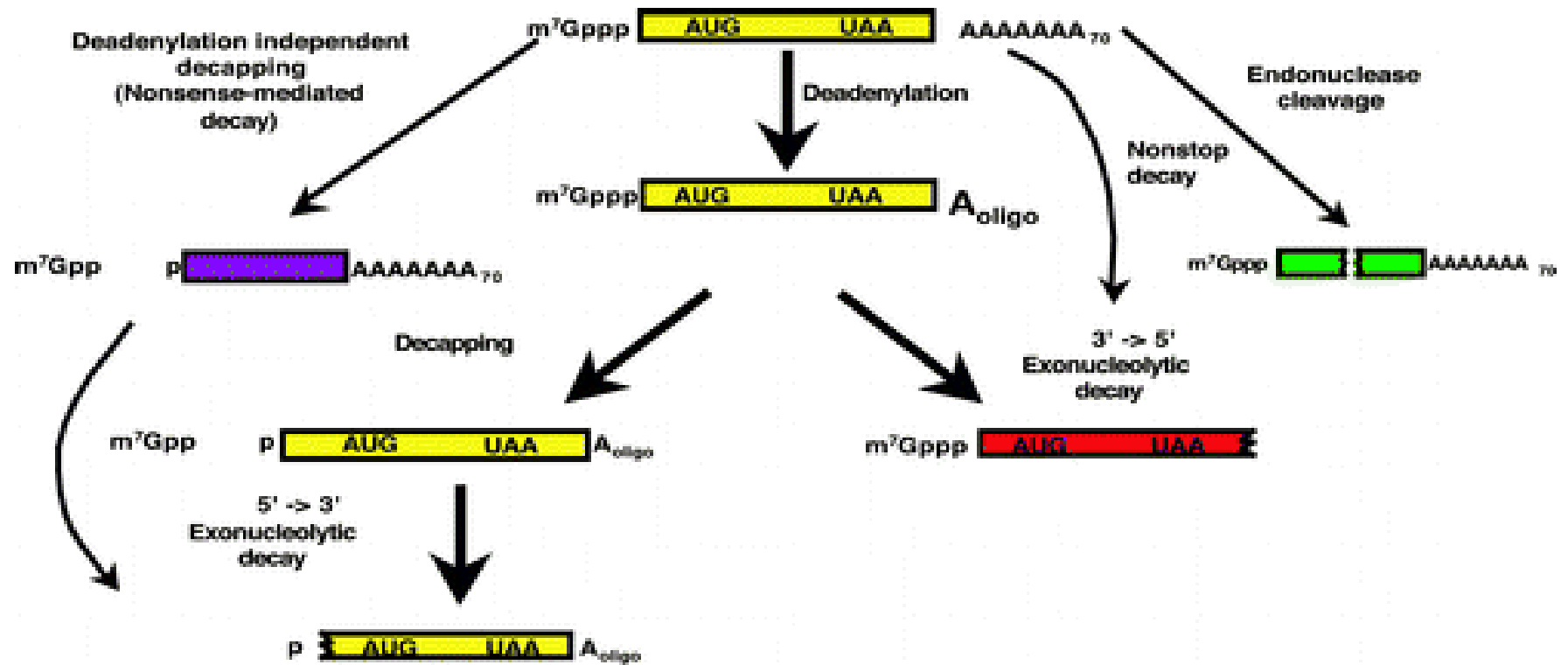
A més

- Ruta alternativa independent de desadenilació (*Nonsense Mediated Decay, NMD*)
- *Decapping + exo 5' → 3.*

Degradació dels mRNAs en eucariotes: rutes principals

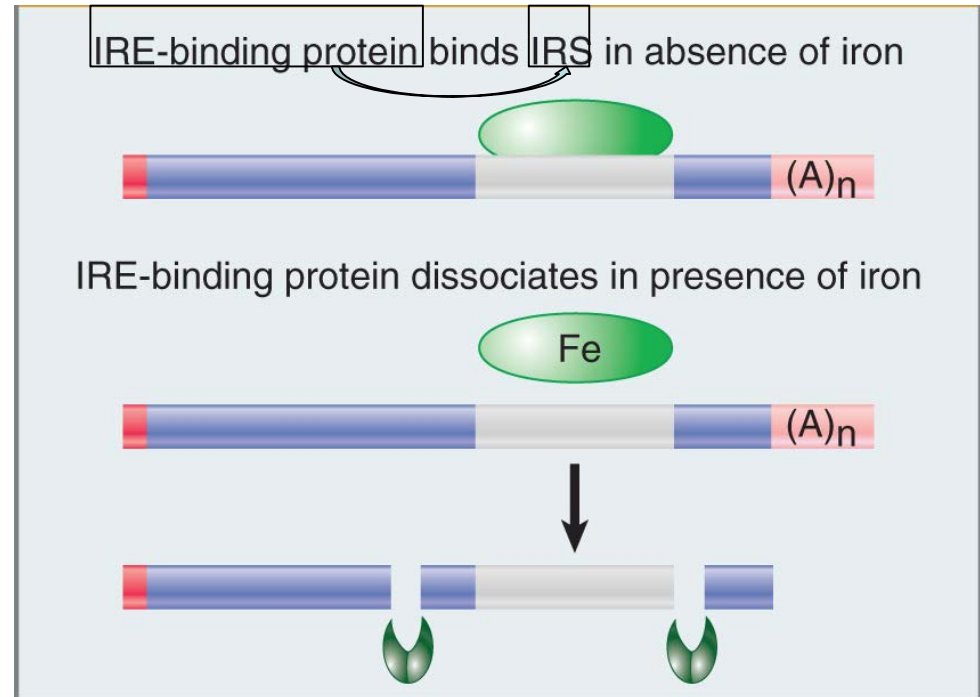
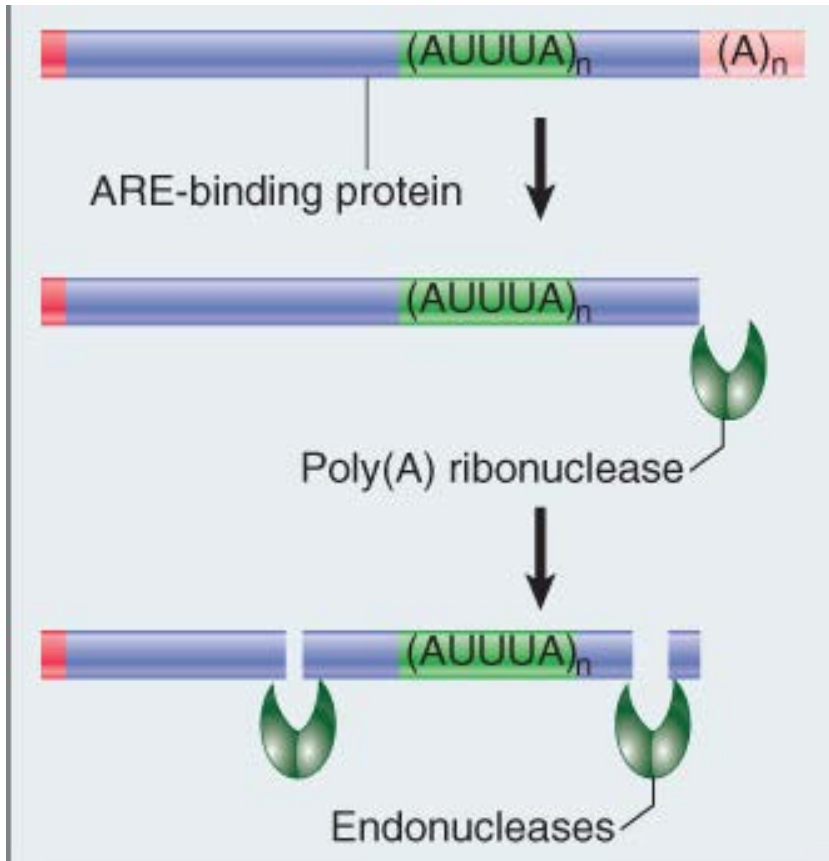


Degradació dels mRNAs en eucariotes



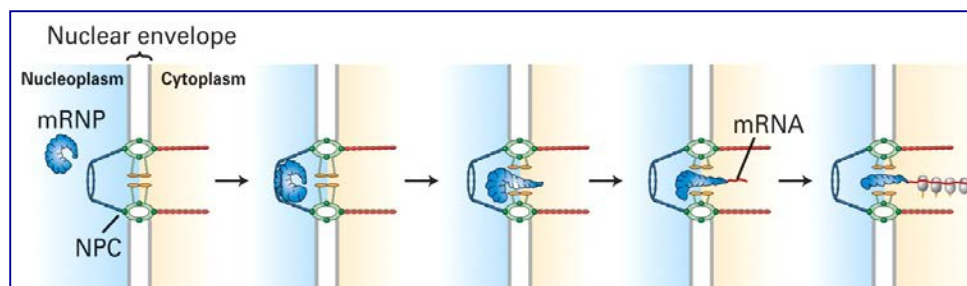
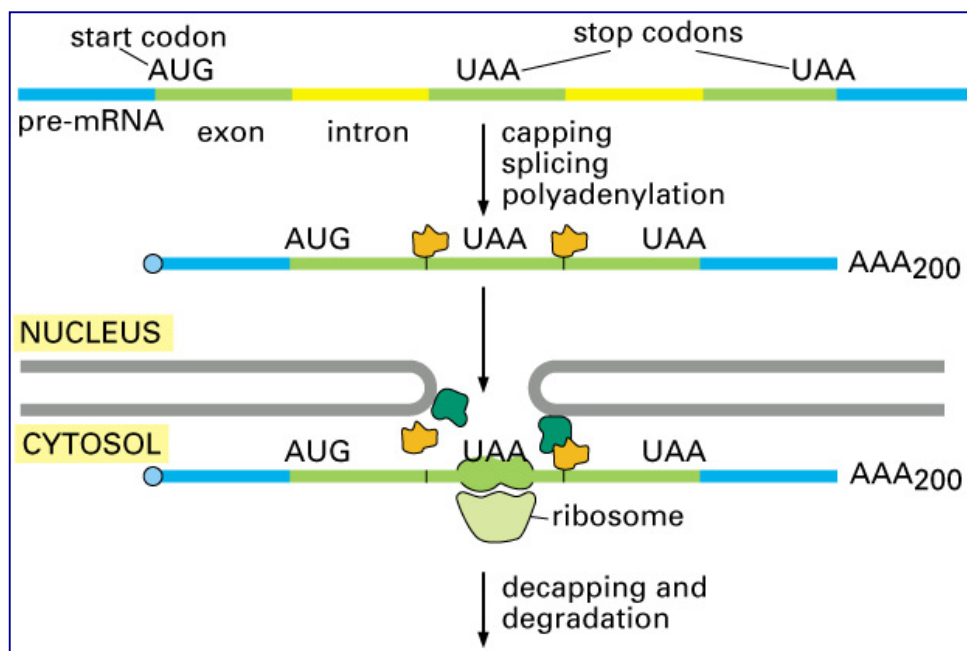
Degradació dels mRNAs en eucariotes

En mRNAs poden existir elements desestabilitzants (DE, com els AREs, *AU-rich elements*) i estabilitzants (SE, com els IREs, *Iron-response elements*) a través del seu reconeixement específic per proteïnes, encara que l'efecte d'aquests elements en l'estabilitat de l'mRNA depèn de la seua localització o de la proteïna que s'hi unisca.



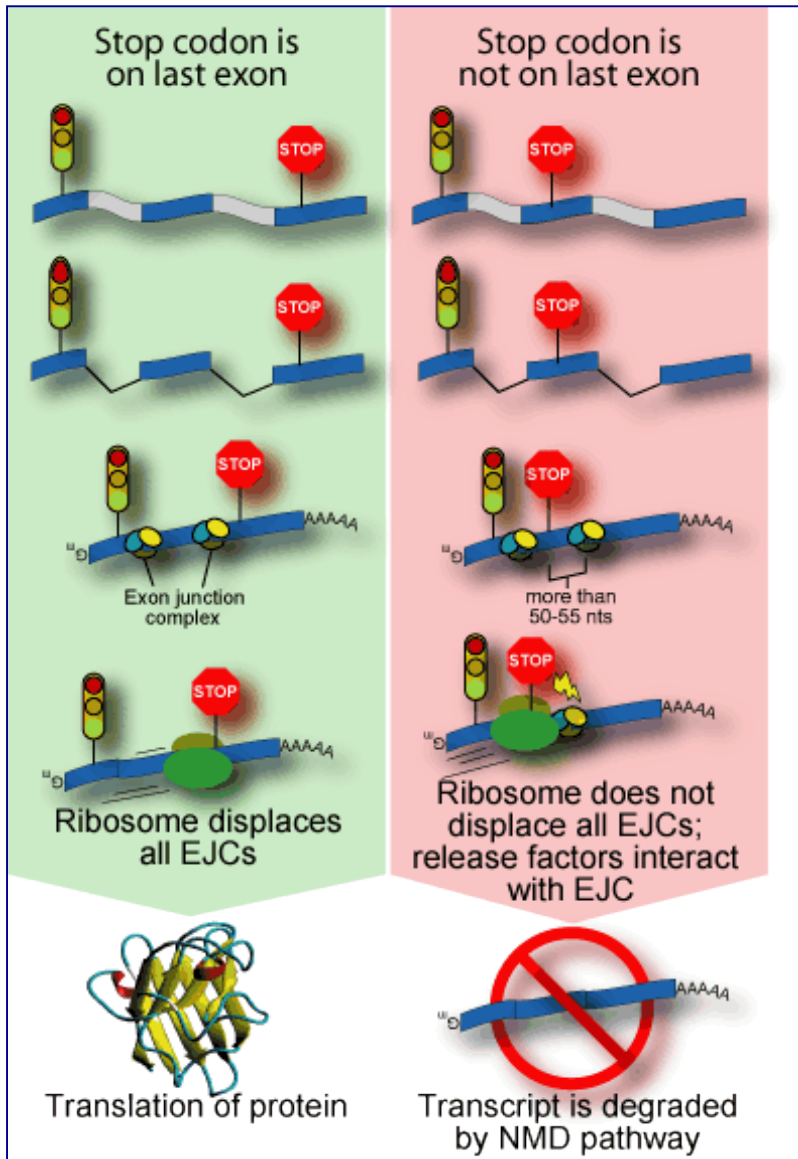
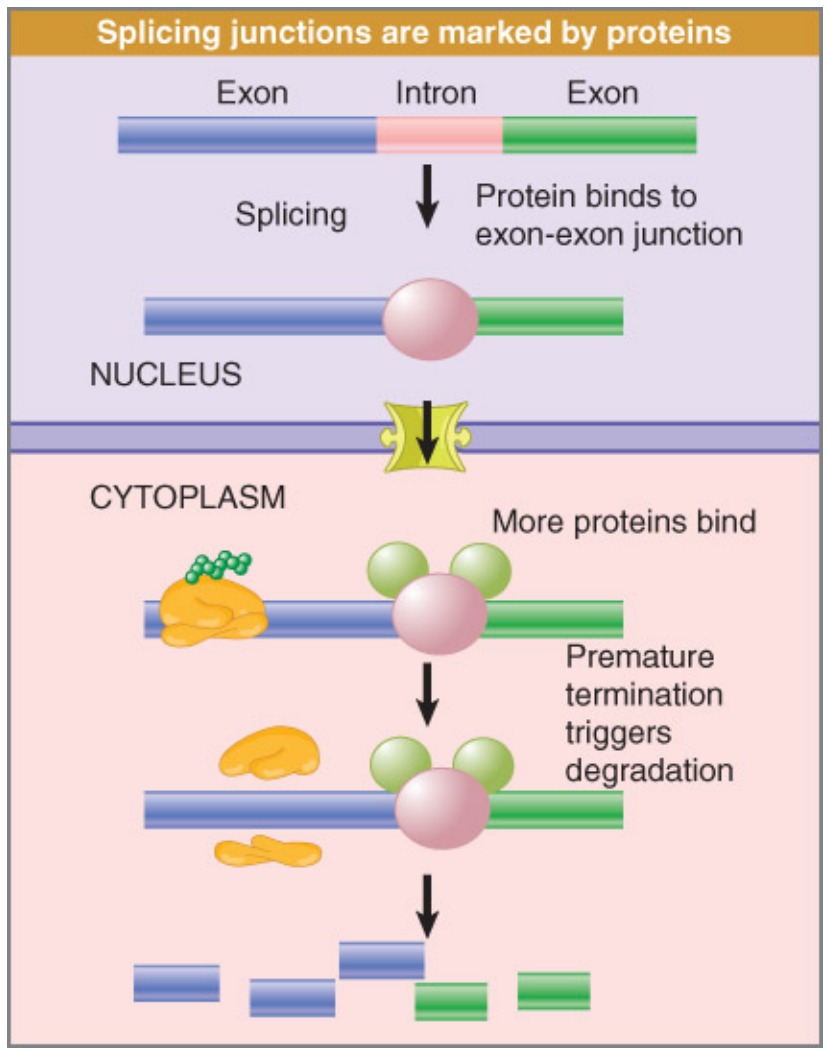
Degradació dels RNAs: NMD

Codons STOP prematurs determinen la degradació dels mRNAs en bacteris i eucariotes (**NMD; nonsense-mediated decay**). És un mecanisme de vigilància.

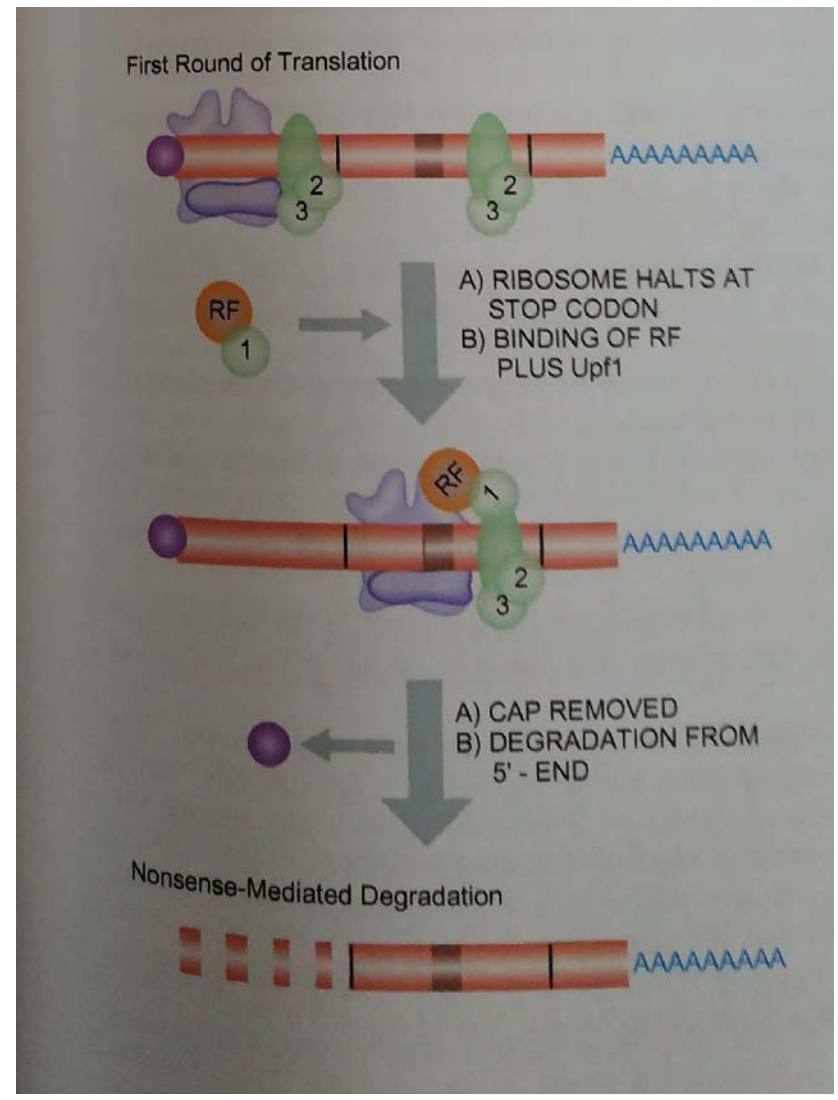
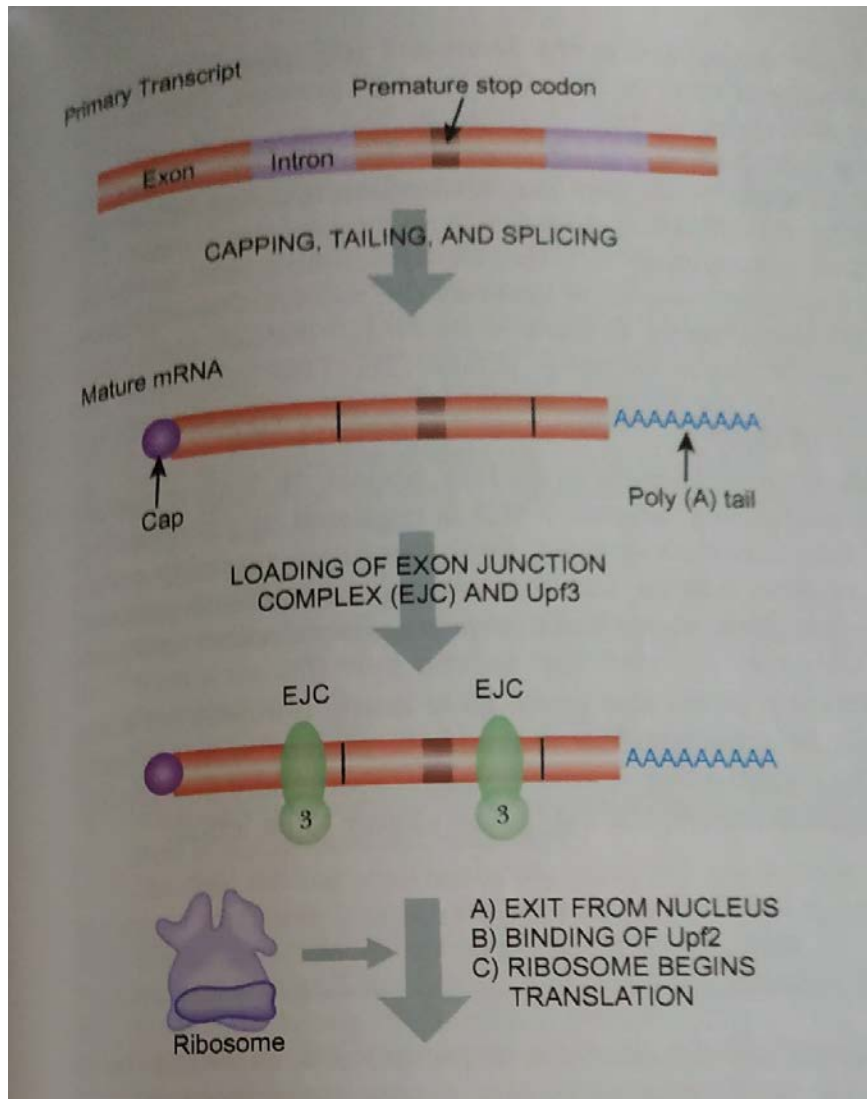


NMD té lloc durant el transport dels mRNPs (en cèl·lules de mamífers), i durant la primera ronda de traducció.

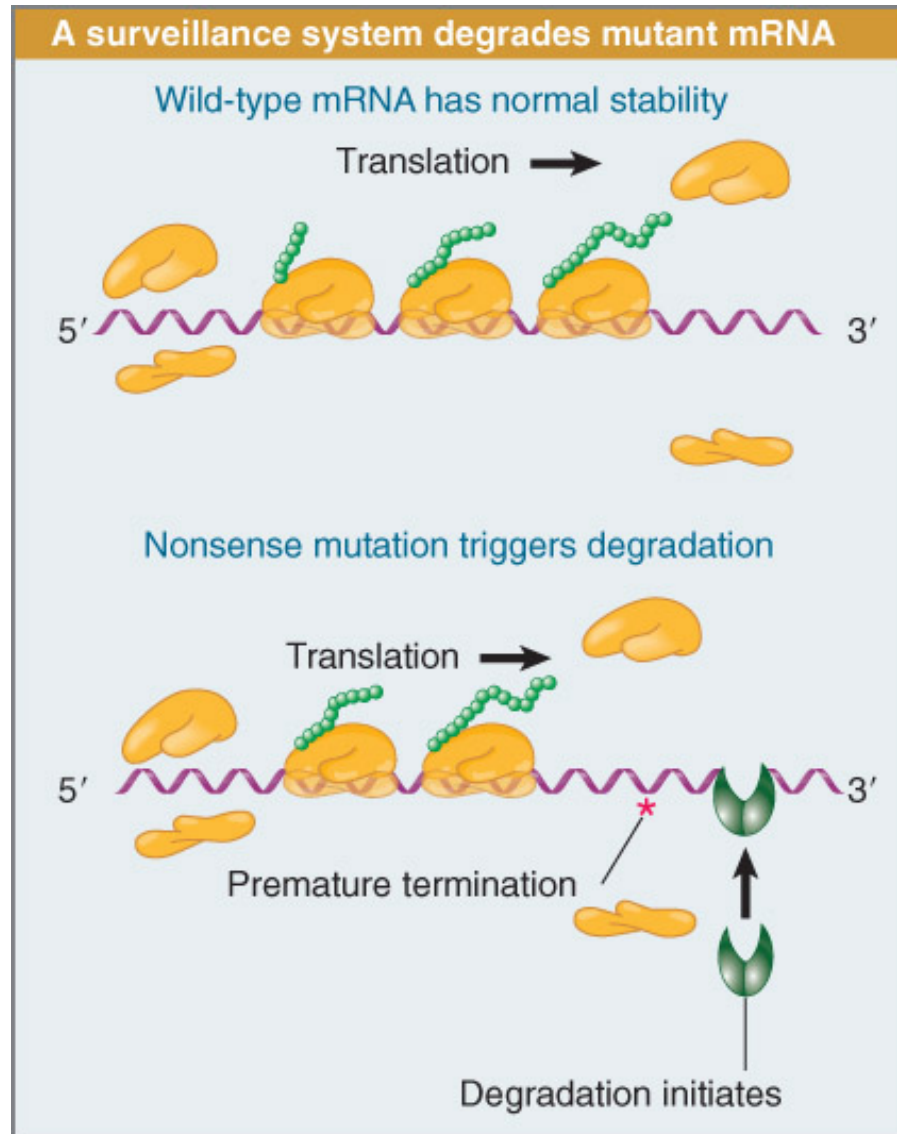
Degradació dels RNAs: NMD



Degradació dels RNAs: NMD

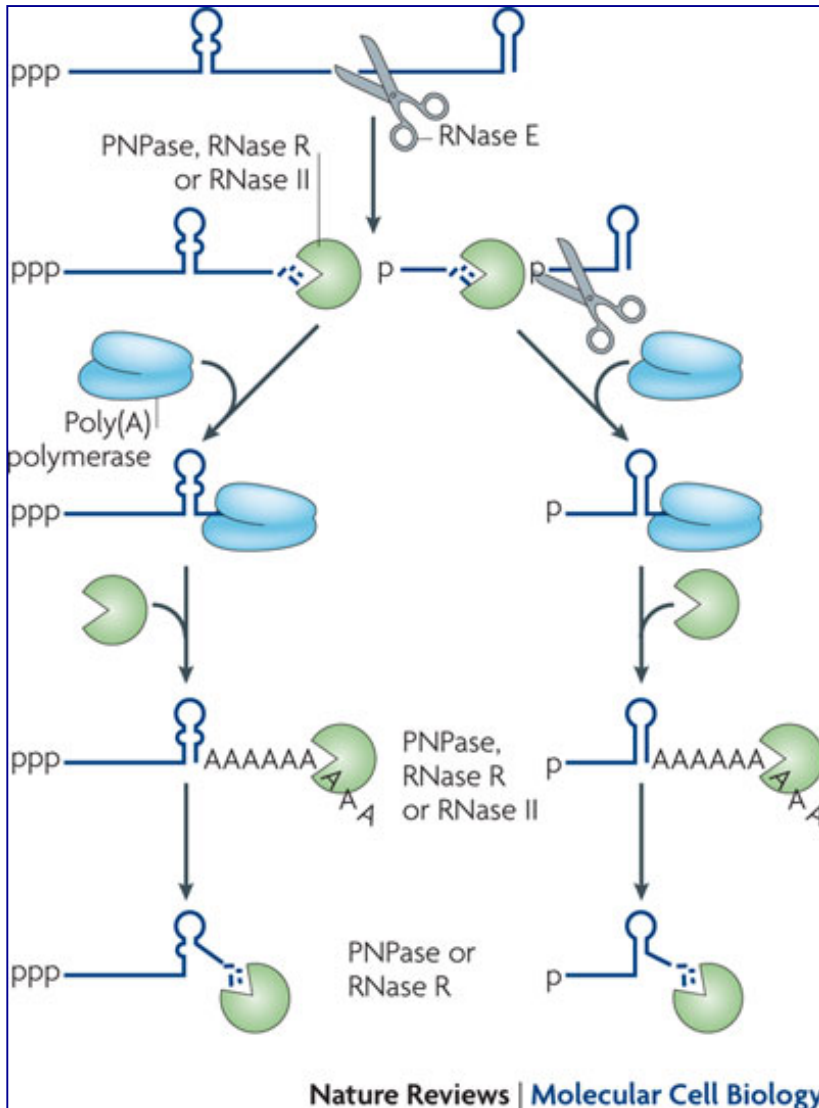


Degradació dels mRNAs en eucariotes: NMD



- Participació de proteïnes Upf
- Estimulen la degradació ràpida

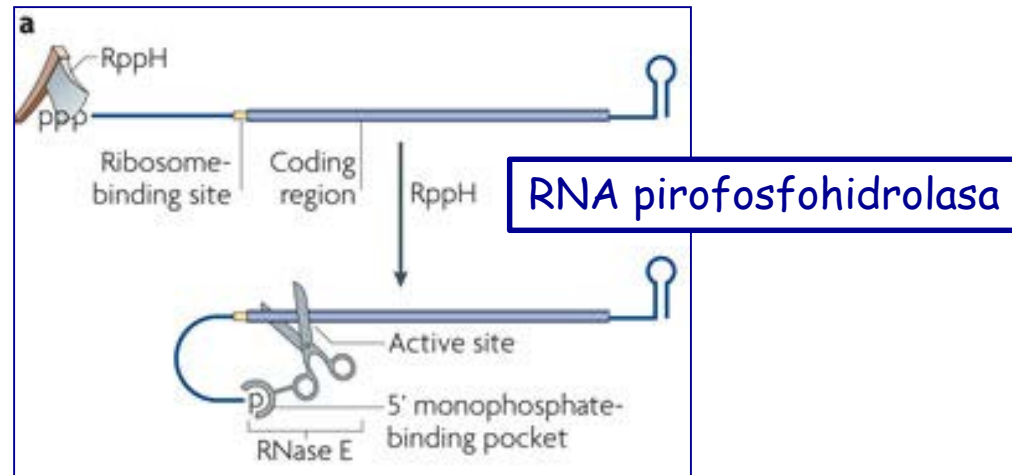
Degradació dels mRNAs: comparació entre procariotes i eucariotes



En bacteris una cua PoliA (curta) facilita la degradació dels intermediaris dels mRNAs per exonucleases.

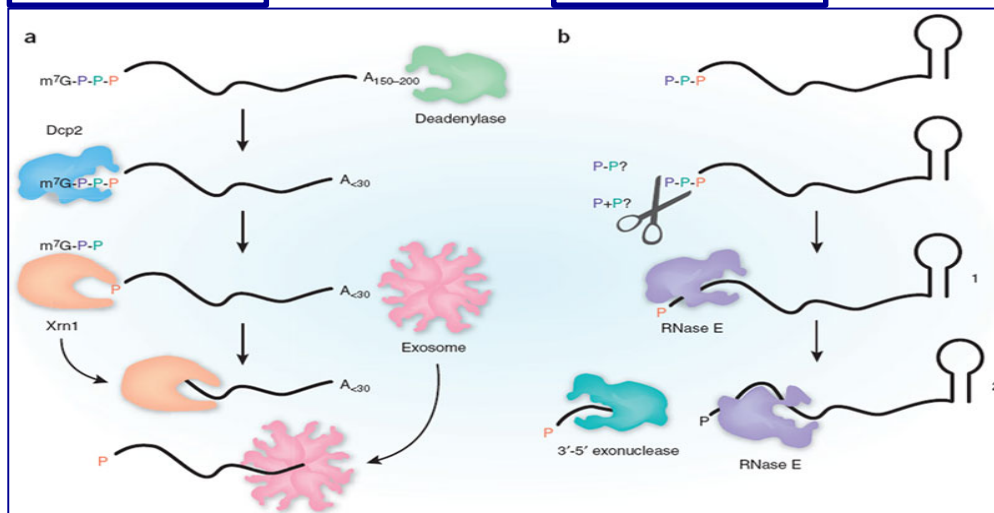
Degradació dels mRNAs: comparació entre procariotes i eucariotes

- La degradació en procariotes implica un tall per la RNasa E, i els seus productes són fàcilment degradats.
- L'RNasa E requereix l'extrem 5' de l'RNA monofosforilat.



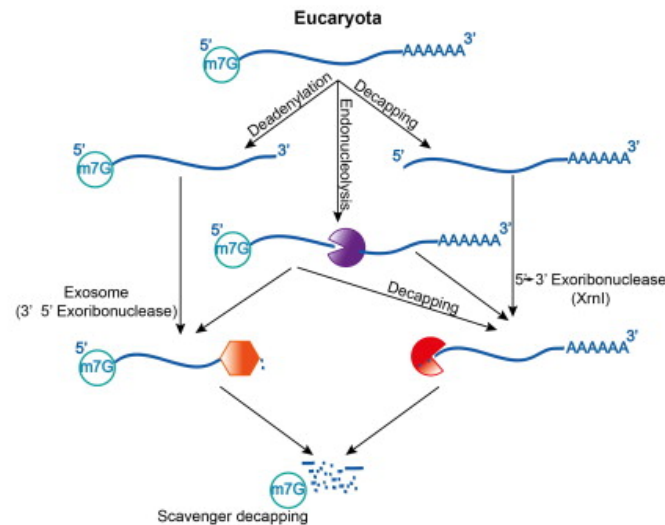
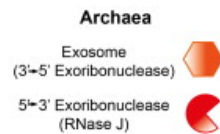
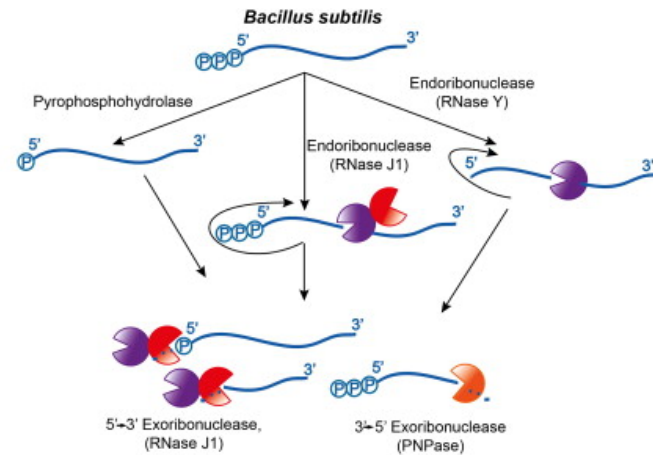
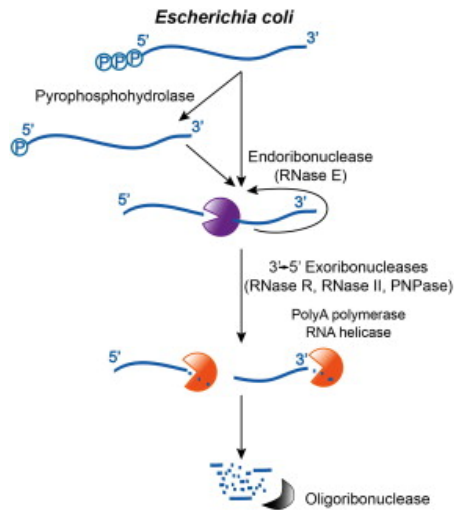
Eucariotes

Procariotes



La degradació en bacteris també és dependent de l'extrem 5'

Degradació dels mRNAs: comparació entre procariotes i eucariotes



Tema 7

RNAi: interferència per RNA

RNAi

- Es tracta d'un tipus de silenciament bàsicament postranscripcional (no s'afecta habitualment la transcripció); es perd l'expressió gènica perquè les molècules d'RNA es tornen inestables.
- Està induït directament per dsRNA. **Unes poques molècules de dsRNA dirigeixen la destrucció d'una gran quantitat de còpies de l'mRNA diana.**
- És una eina molt poderosa; permet silenciar gens específics.

Primeres observacions en plantes (Jorgensen i col., 1990)

Intents dirigits a obtenir flors de petúnia amb color més fosc per sobreexpressió de la xalona sintasa (gen implicat en la producció del pigment antocianina) provocaren la pèrdua de pigmentació.



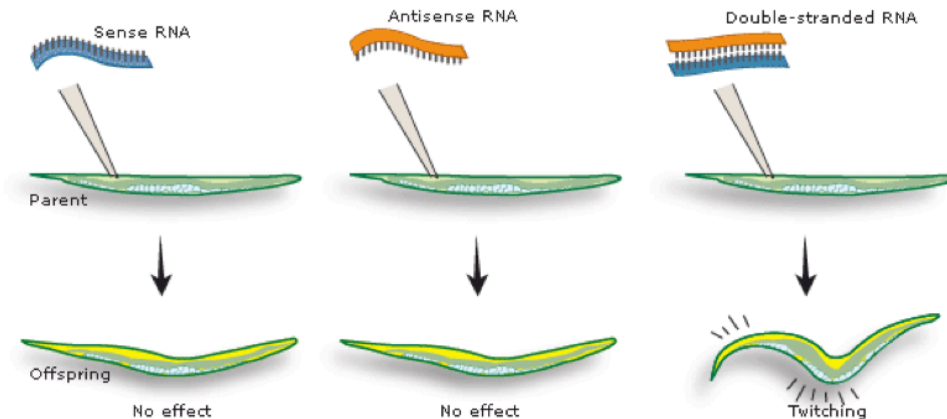
RNAi (Mello i Fire 1998; Premi Nobel de Fisiologia i Medicina 2006)

Key experiments

Gene silencing

Fire and Mello injected RNA corresponding to a gene important for muscle function in the worm *C. elegans*.

Single-stranded RNA (sense or antisense) had no effect. But double-stranded RNA caused the worm to twitch in a similar way to worms that lack a functional gene for the muscle protein.



Efecto fenotípico de la inyección de un gen que codifica una miofilamento (proteína muscular).

La pérdida de expresión de esta proteína en *C. elegans* puede observarse *de visu* por la presencia de movimientos espásticos.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
Andrew Z. Fire, Craig C. Mello

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Nobel Prize Award Ceremony

Andrew Z. Fire

Craig C. Mello



Photo: L. Cicero

Andrew Z. Fire

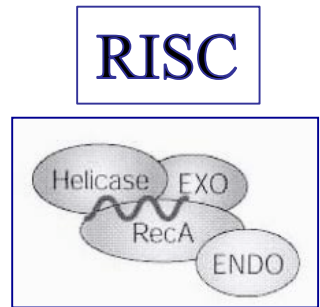
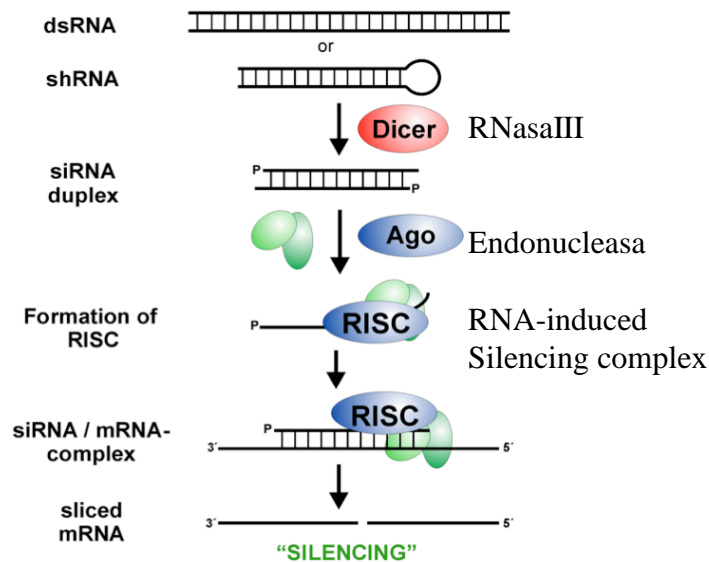
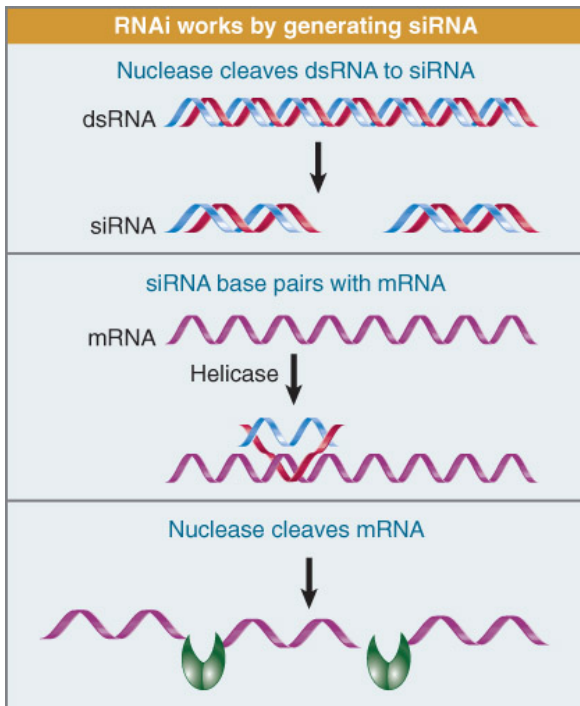


Photo: J. Mottern

Craig C. Mello

Interferència mitjançant RNA: procés mediat per RNA en el qual s'inhibeix l'expressió gènica de forma específica

RNAs d'interferència xicotets (siRNA): dsRNAs de 22nt, procedents de dsRNA més grans o introduïts artificialment, que intervenen en aquest procés



Tema 7

Table 1 Comparison of general properties between siRNA and miRNA

	siRNA	miRNA
Prior to Dicer processing	Double-stranded RNA that contains 30 to over 100 nucleotides	Precursor miRNA (pre-miRNA) that contains 70–100 nucleotides with interspersed mismatches and hairpin structure
Structure	21–23 nucleotide RNA duplex with 2 nucleotides 3' overhang	19–25 nucleotide RNA duplex with 2 nucleotides 3' overhang
Complementary	Fully complementary to mRNA	Partially complementary to mRNA, typically targeting the 3' untranslated region of mRNA
mRNA target	One	Multiple (could be over 100 at the same time)
Mechanism of gene regulation	Endonucleolytic cleavage of mRNA	Translational repression Degradation of mRNA Endonucleolytic cleavage of mRNA (rare, only when there is a high level of complementary between miRNA and mRNA)
Clinical applications	Therapeutic agent	Drug target Therapeutic agent Diagnostic and biomarker tool

Lam i col., 2015

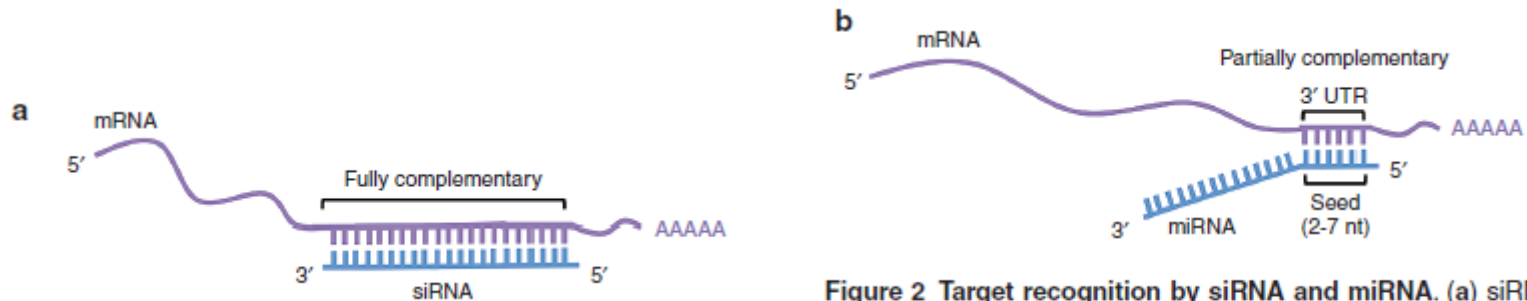
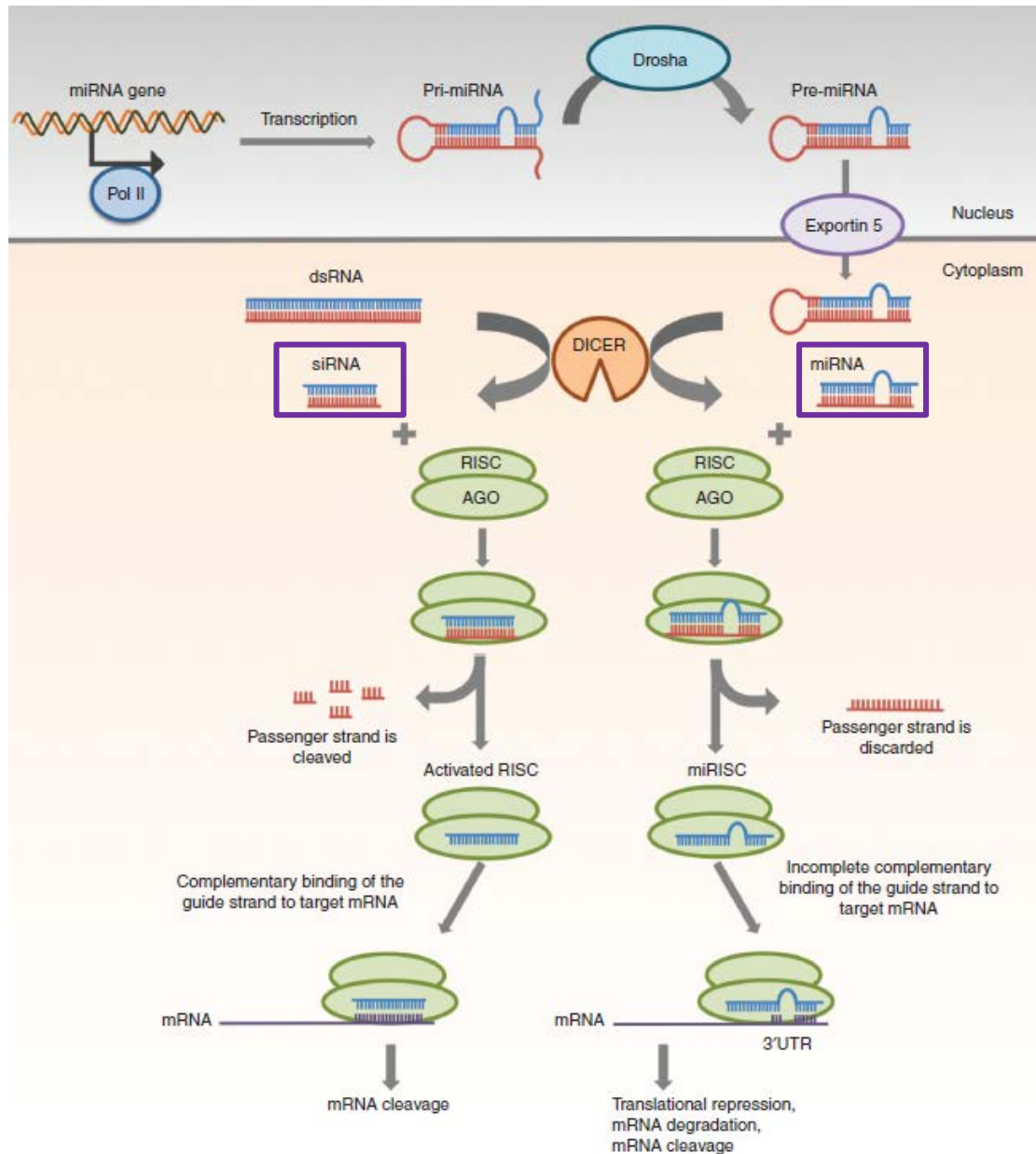


Figure 2 Target recognition by siRNA and miRNA. (a) siRNA is usually fully complementary to the coding region of its target mRNA; (b) miRNA is partially complementary to its target mRNA. Complementary binding usually occurs at the seed region (nucleotides (nt) 2–7 of the 5' end) of miRNA and the 3' UTR of the target mRNA.



Gene silencing mechanisms of siRNA and miRNA. **siRNA:** dsRNA (either transcribed or artificially introduced) is processed by Dicer into siRNA which is loaded into the RISC. AGO2, which is a component of RISC, cleaves the passenger strand of siRNA. The guide strand then guides the active RISC to the target mRNA. The full complementary binding between the guide strand of siRNA and the target mRNA leads to the cleavage of mRNA. **miRNA:** Transcription of miRNA gene is carried out by RNA polymerase II in the nucleus to give pri-miRNA, which is then cleaved by Drosha to form pre-miRNA. The pre-miRNA is transported by Exportin 5 to the cytoplasm where it is processed by Dicer into miRNA. The miRNA is loaded into the RISC where the passenger strand is discarded, and the miRISC is guided by the remaining guide strand to the target mRNA through partially complementary binding. The target mRNA is inhibited via translational repression, degradation or cleavage.

Lam J, Chow M, Zhang Y, Leung S. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular therapy. Nucleic acids.* 4. e252. 10.1038/mtna.2015.23.

Tema 7

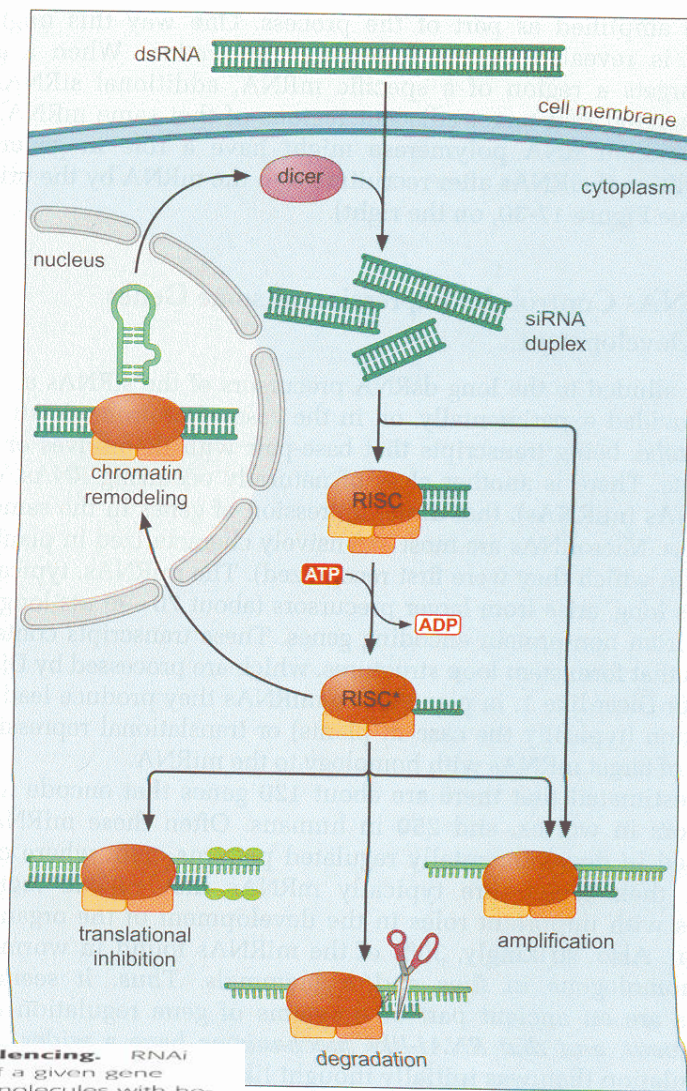
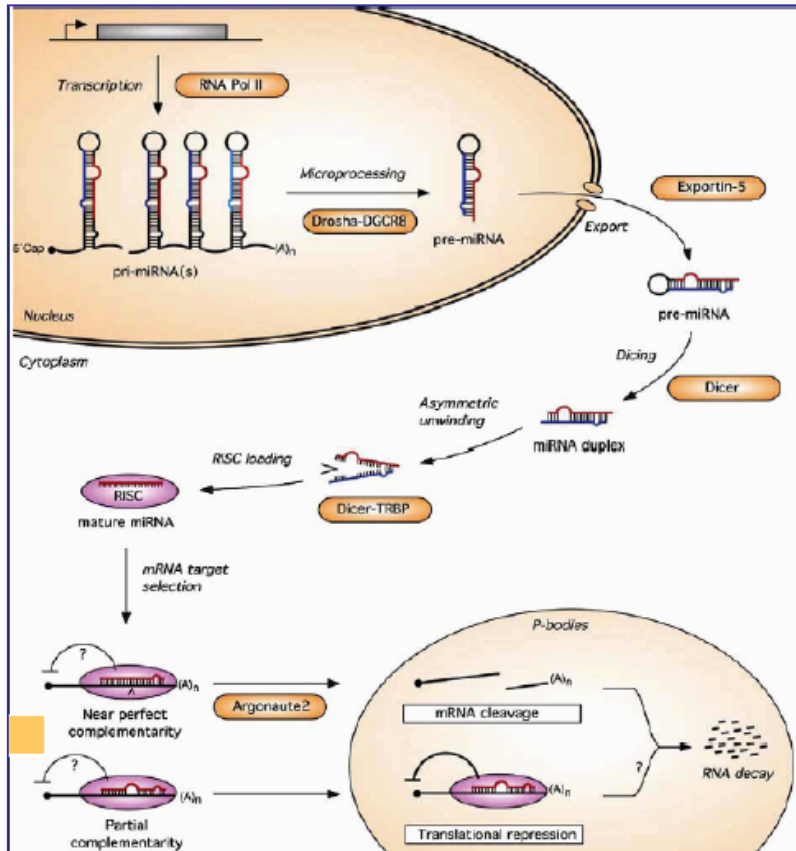
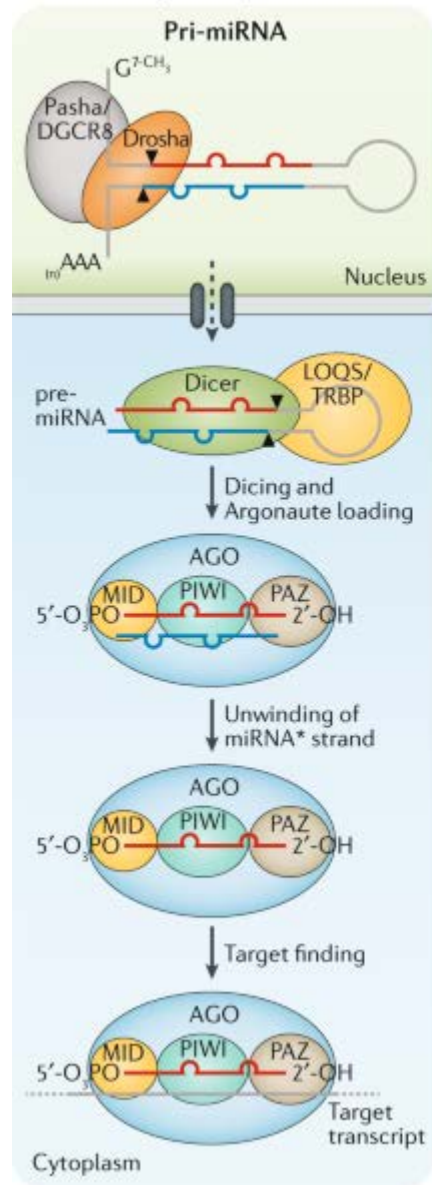
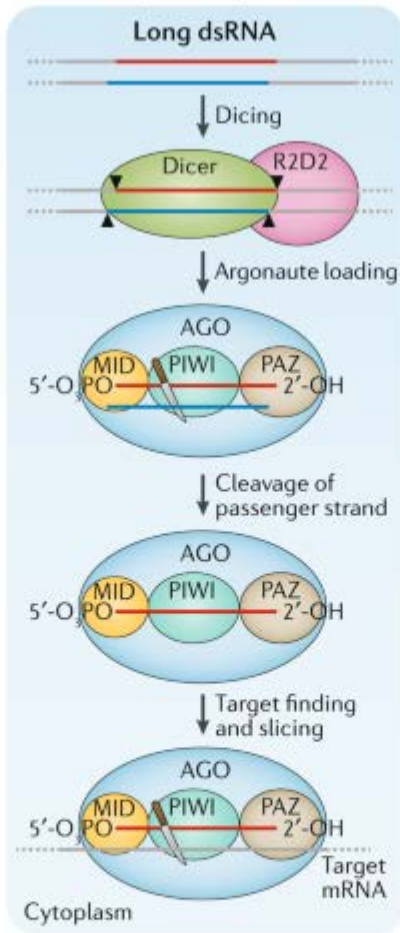


FIGURE 17-30 RNAi silencing. RNAi switches off the expression of a given gene when double-stranded RNA molecules with homology to that gene are introduced, or made, in that cell. This effect involves processing of the dsRNA to make short interfering RNAs by the enzyme Dicer. These siRNAs then direct a complex called RISC (RNA-induced silencing complex) to repress genes in three ways. It attacks and digests mRNA with homology to the siRNA; it interferes with translation of those mRNAs; or it directs chromatin modifying enzymes to the promoters that direct expression of those mRNAs. Although in the figure RISC performs some functions in the cytoplasm and enters the nucleus for another, all could take place in the nucleus. (Source: Adapted from Hannon G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418: 244–251. Fig 5, p. 249. Copyright © 2002 Nature Publishing Group. Used with permission.)

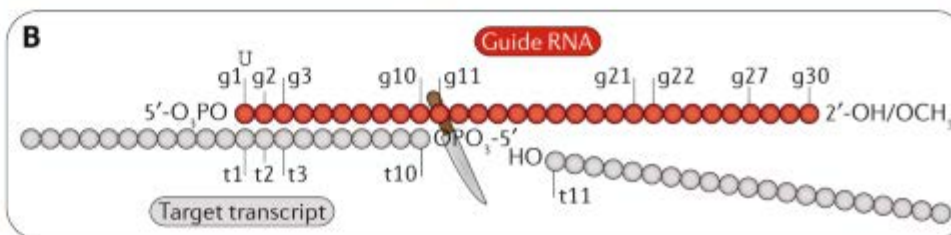
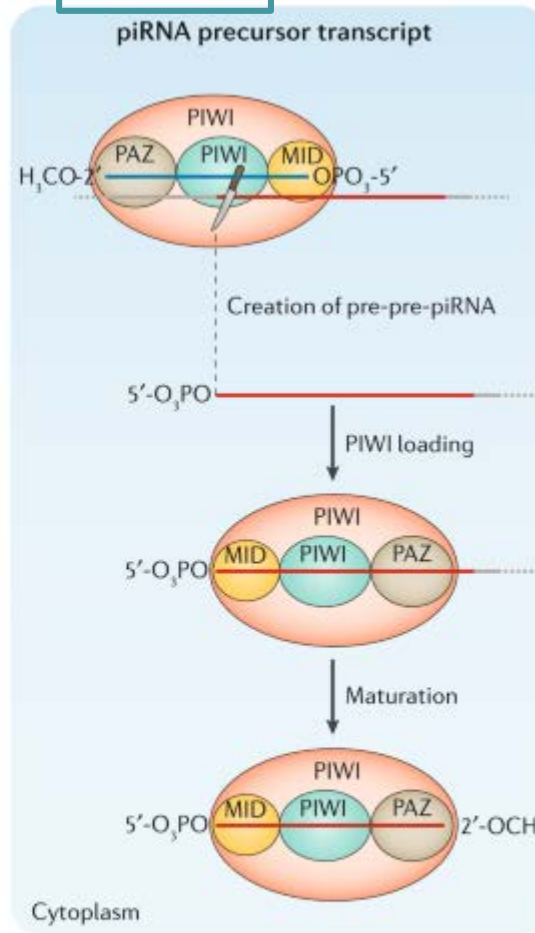
Aa miRNA pathway



Ab siRNA pathway

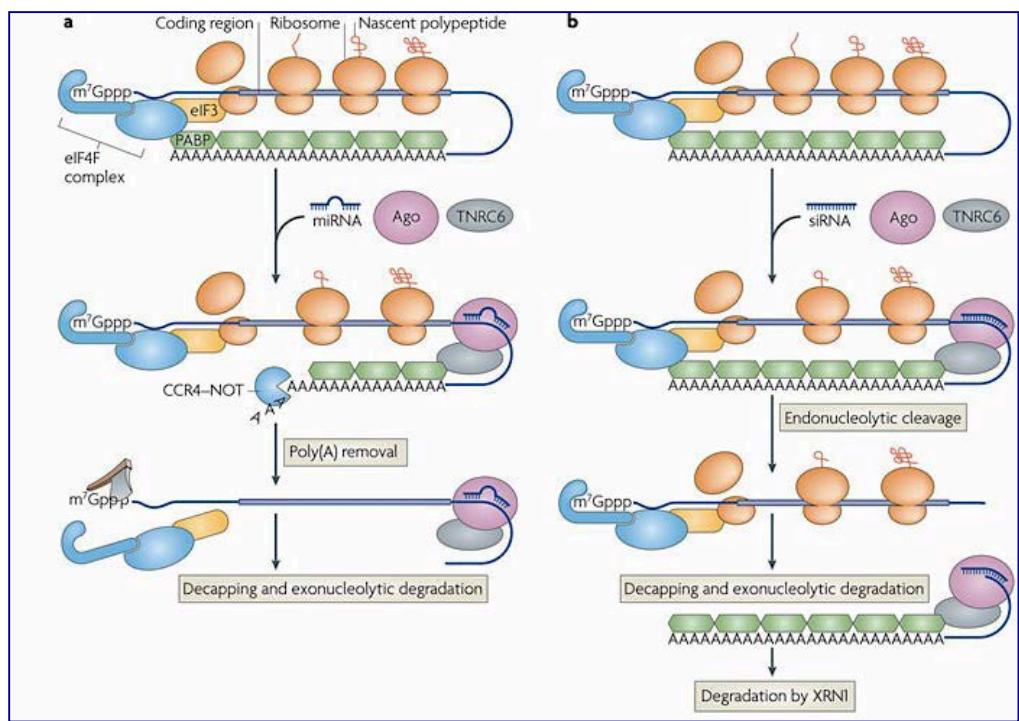


Ac piRNA pathway



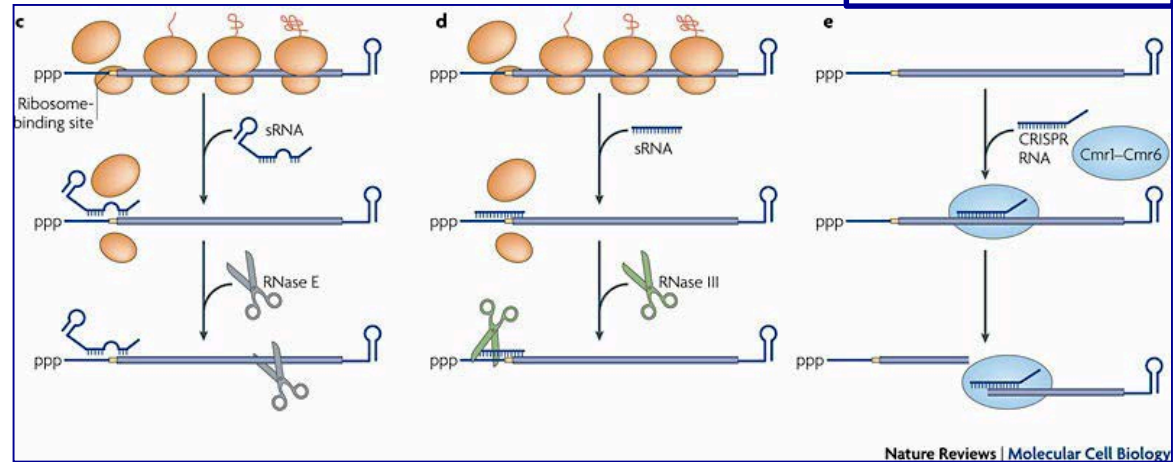
In animals, PIWI-interacting RNAs (piRNAs) of 21–35 nucleotides in length silence transposable elements, regulate gene expression and fight viral infection. piRNAs guide PIWI proteins to cleave target RNA, promote heterochromatin assembly and methylate DNA. The architecture of the piRNA pathway allows it both to provide adaptive, sequence-based immunity to rapidly evolving viruses and transposons and to regulate conserved host genes. piRNAs silence transposons in the germ line of most animals, whereas somatic piRNA functions have been lost, gained and lost again across evolution. Moreover, most piRNA pathway proteins are deeply conserved, but different animals employ remarkably divergent strategies to produce piRNA precursor transcripts.

Regulació postranscripcional per RNAs no codificants



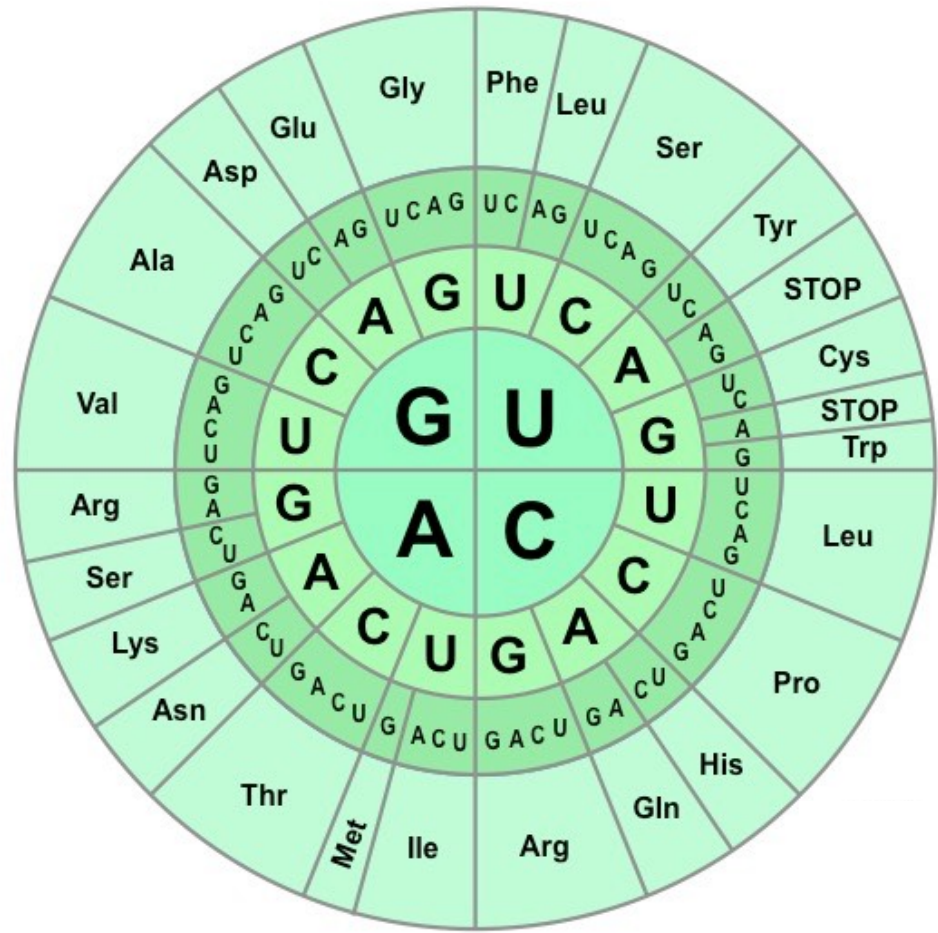
Eucariotes

Procarriotes



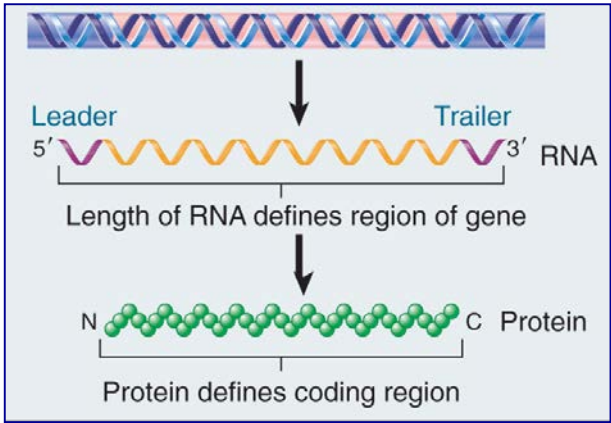
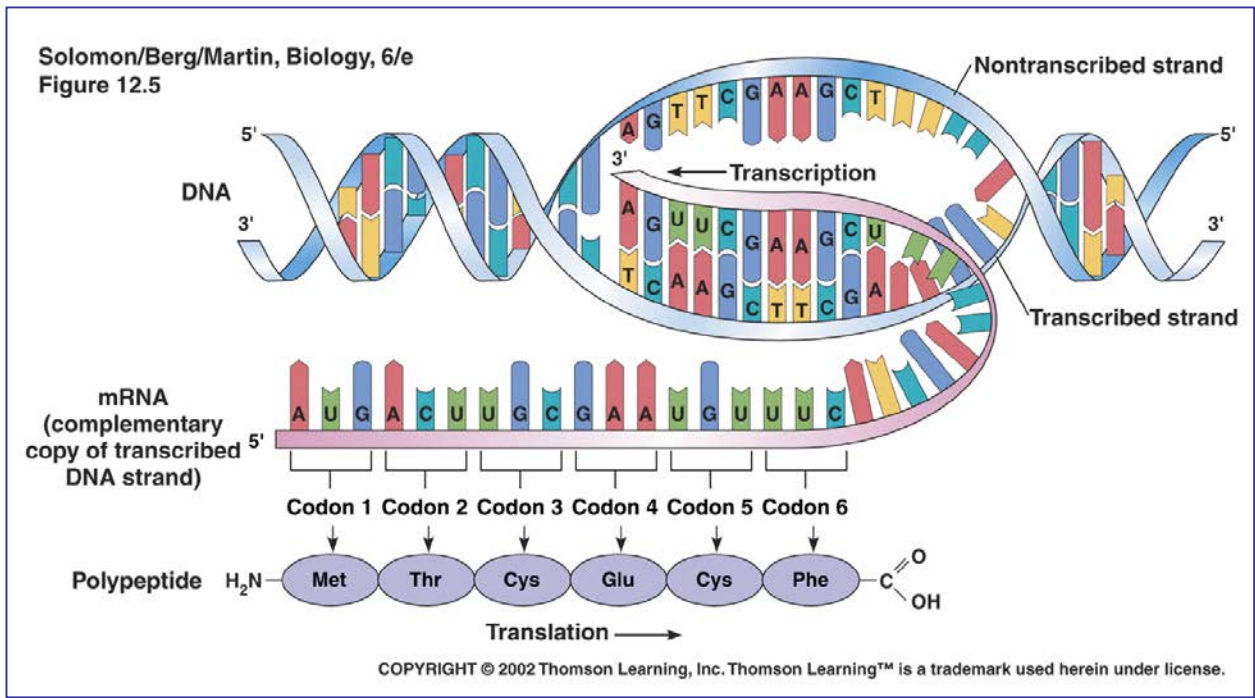
Tema 8

Introducció al
procés de
traducció.
El codi genètic.
Aminoacil tRNA
sintetases



Traducció

- Es converteix la informació codificada en la **seqüència de nucleòtids** (en l'**mRNA**) en una **seqüència d'aminoàcids**.
- Procés costós. Cada aminoàcid → 4 ATPs. Pot consumir el 80% de l'energia de la cèl·lula.



Components de la traducció

Components de la traducció

~30% of bacterial dry mass is concerned with gene expression

Component	Dry cell mass (%)	Molecules /cell	Different types	Copies of each type
Wall	10	1	1	1
Membrane	10	2	2	1
DNA	1.5	1	1	1
mRNA	1	1,500	600	2–3
tRNA	3	200,000	60	>3,000
rRNA	16	38,000	2	19,000
Ribosomal proteins	9	10^6	52	19,000
Soluble proteins	46	2.0×10^6	1,850	>1,000
Small molecules	3	7.5×10^6	800	

La traducció implica una gran massa cel·lular

Components de la traducció

- mRNAs
- tRNAs
- Ribosomes
- Aminoacil tRNA sintetases i altres enzims
- Aminoàcids
- Factors proteics
- ATP, GTP
- Grups reductors
- K^+ , Mg^{+2}
- Quasi totes les estructures cel·lulars (nucli, citoplasma, orgànuls i membranes)

Components de la traducció

Protein synthesis uses three types of RNA

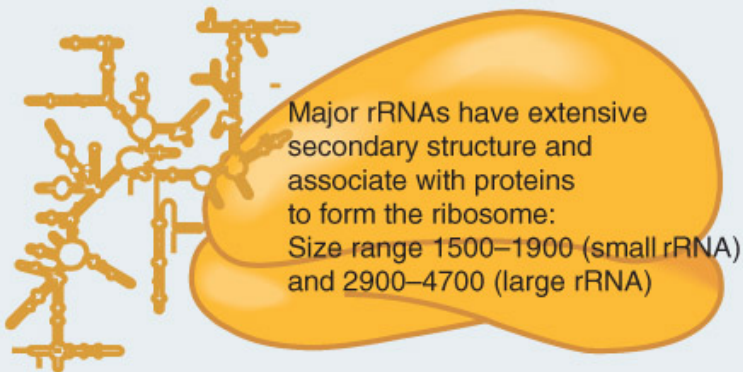
mRNA has a sequence of bases that represent protein



Size range 500–10,000 bases



tRNA is a small RNA with extensive secondary structure:
Size range 74–95 bases



Major rRNAs have extensive secondary structure and associate with proteins to form the ribosome:
Size range 1500–1900 (small rRNA) and 2900–4700 (large rRNA)

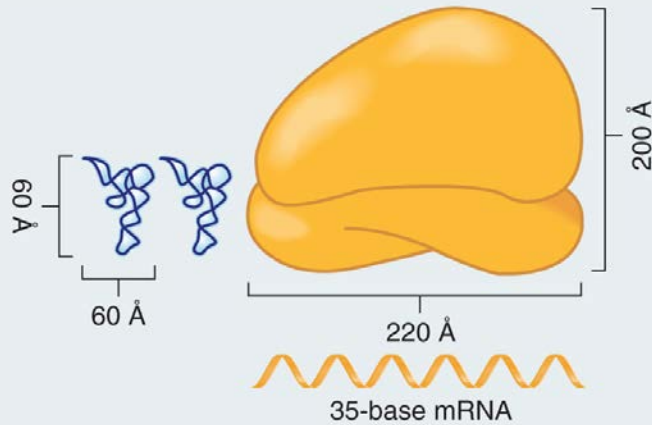
RNA missatger
mRNA

RNA de transferència
tRNA

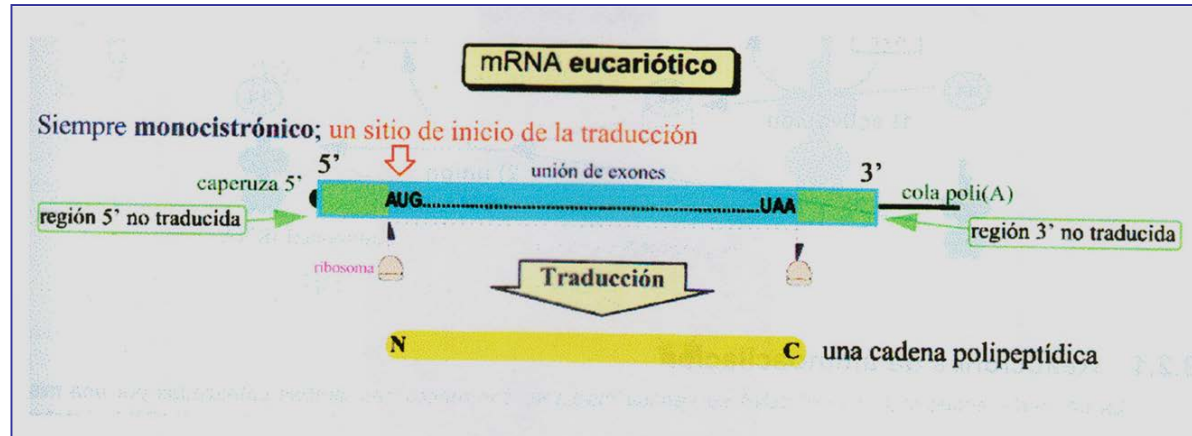
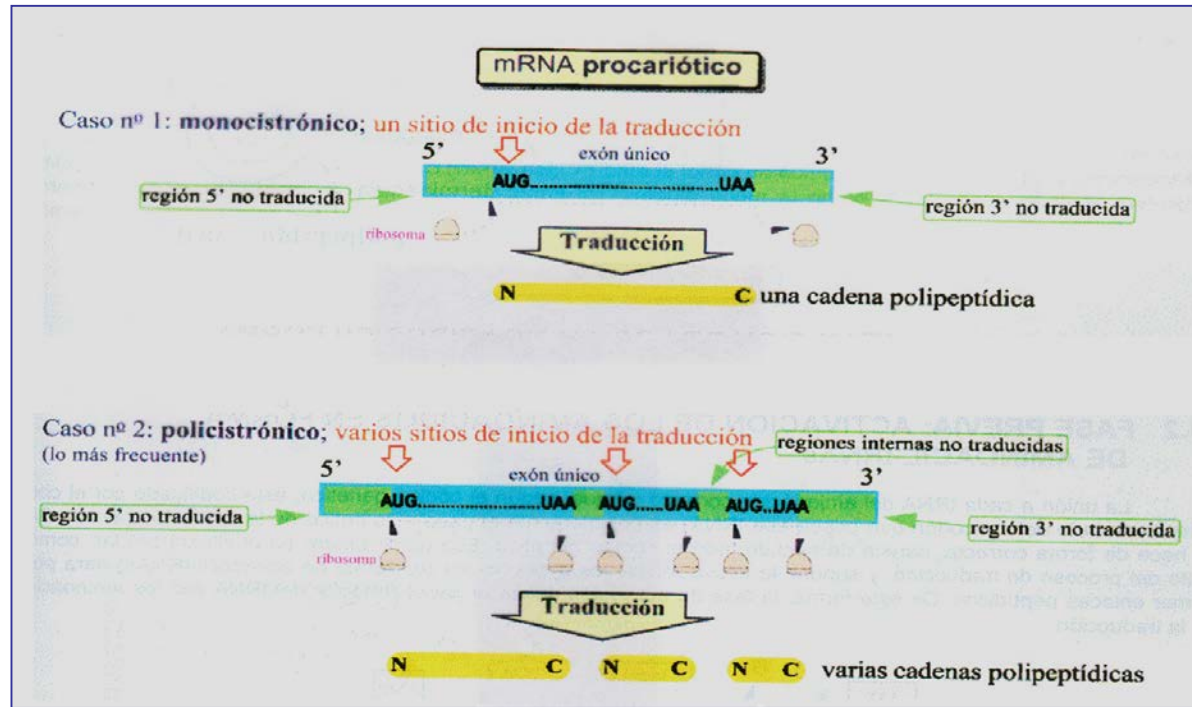
RNA ribosomal
rRNA

Componentes de la traducción

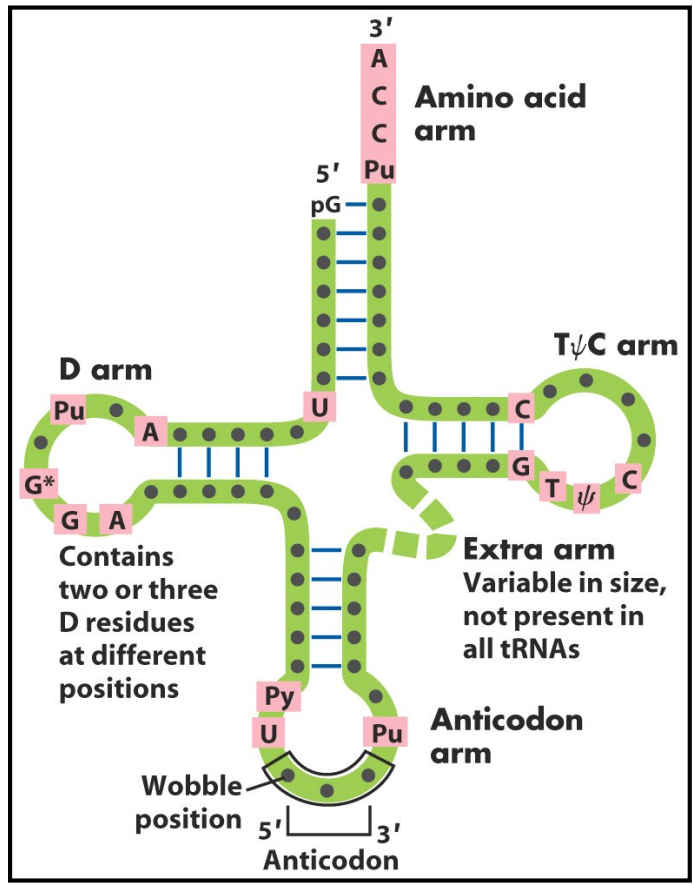
A ribosome binds mRNA and tRNAs



mRNA

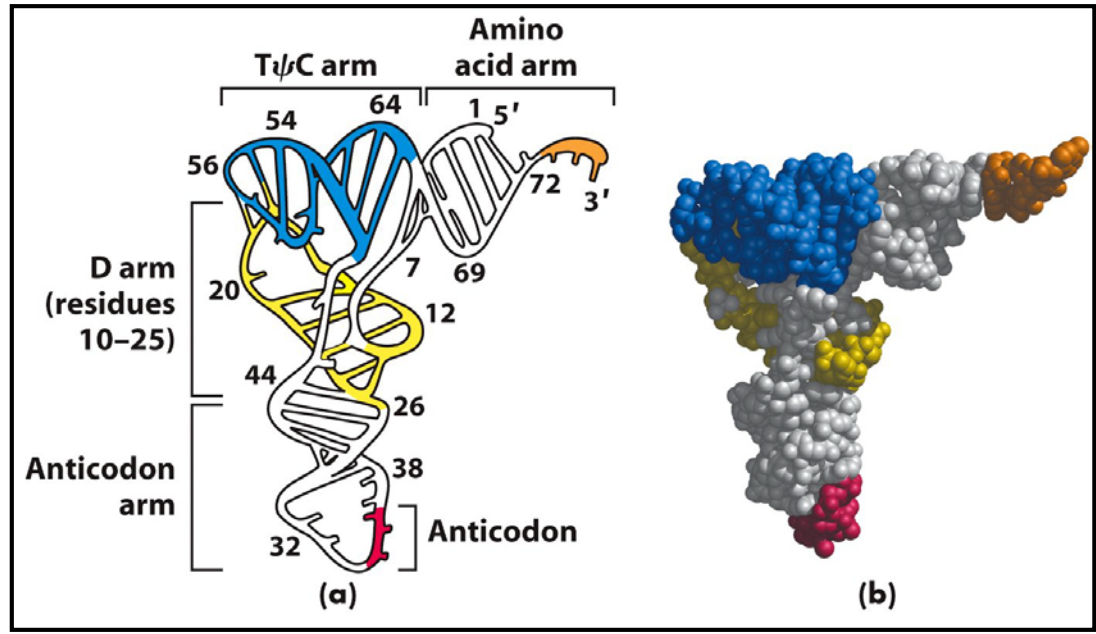


tRNA: Estructura



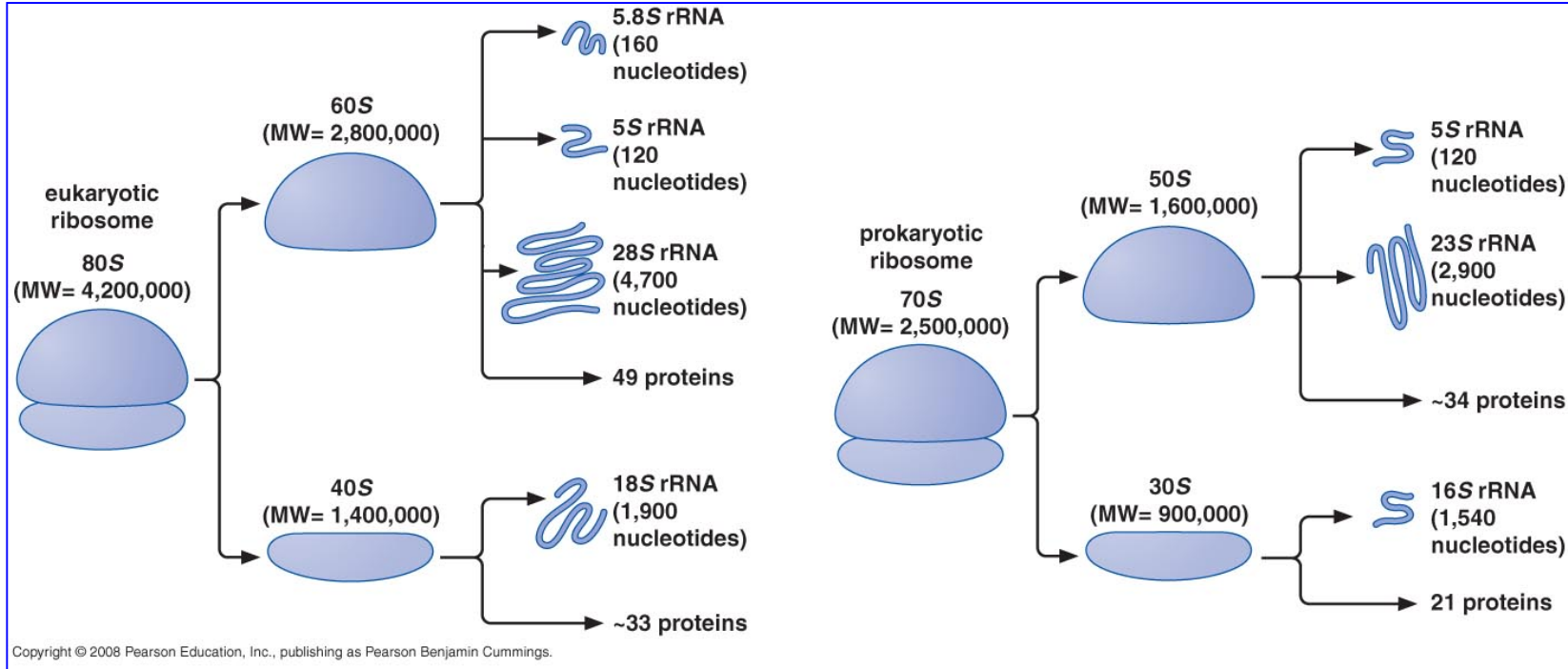
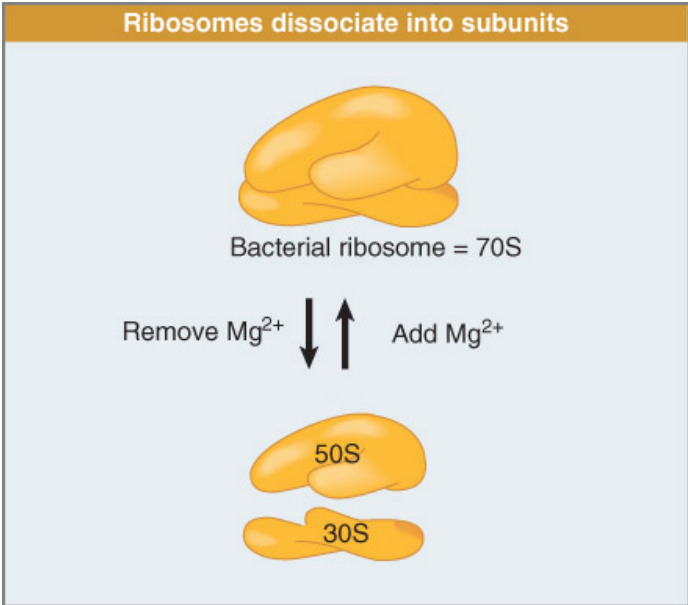
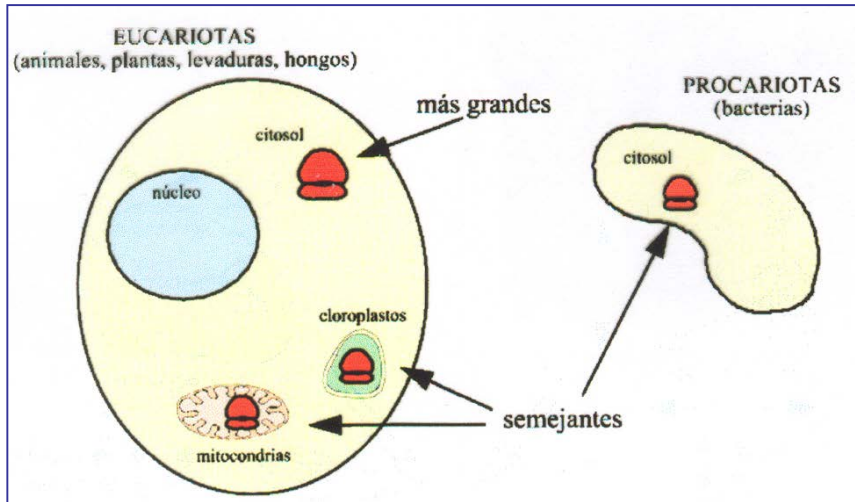
Secundària

tRNA



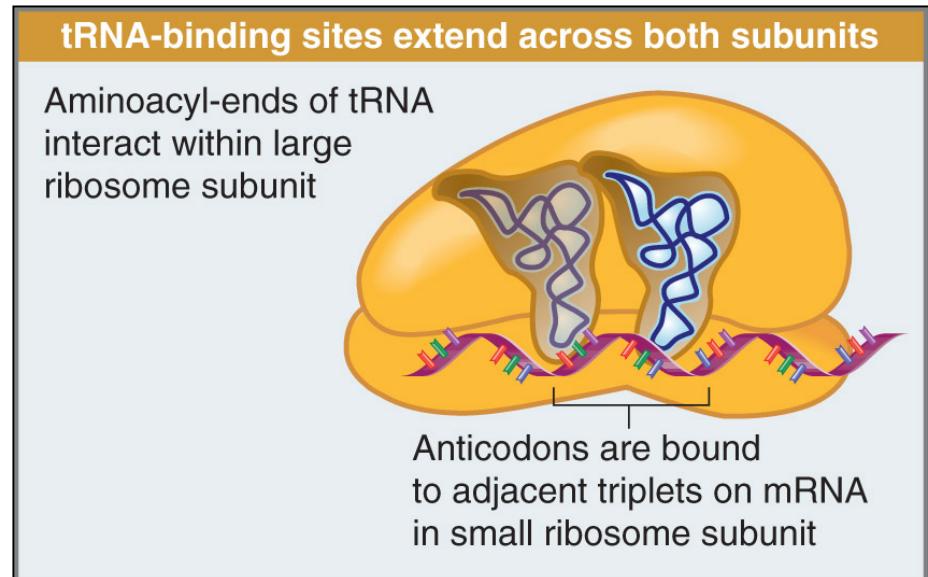
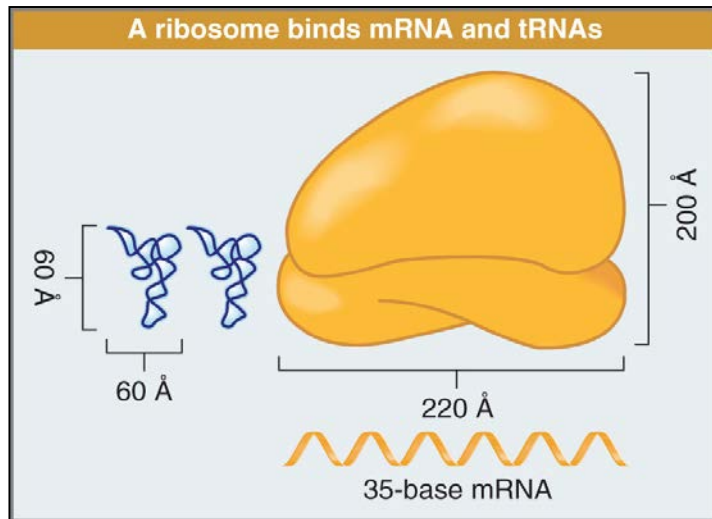
Terciària

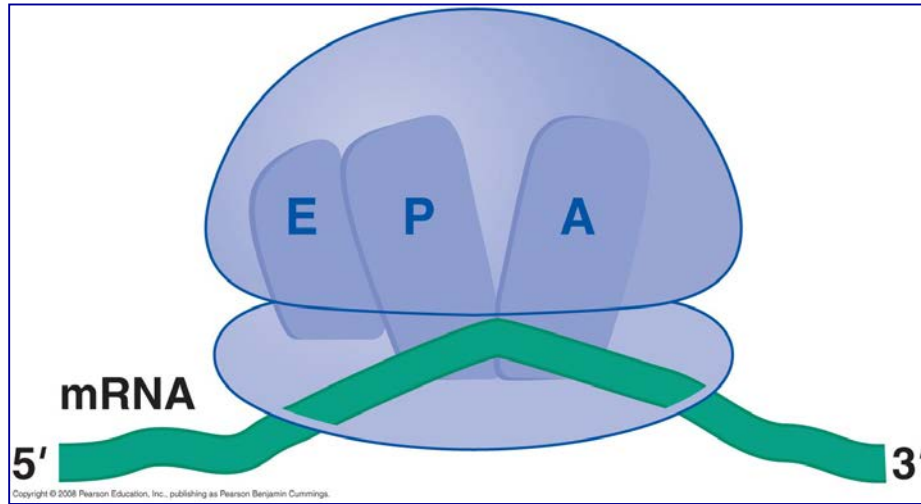
Ribosomes



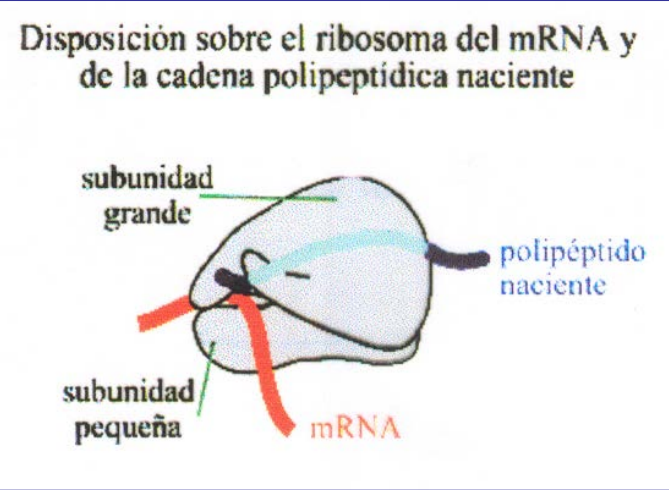
Ribosomes

- Les proteïnes ribosomals desenvolupen funcions estructurals
- Els rRNAs representen entre la meitat i 2/3 de la massa del ribosoma
- Els rRNAs proporcionen els principals contactes entre les subunitats ribosomals
- Els llocs d'unió de tRNAs es localitzen en les dues subunitats: l'anticodó queda en la subunitat menuda i els aminoàcids en la gran

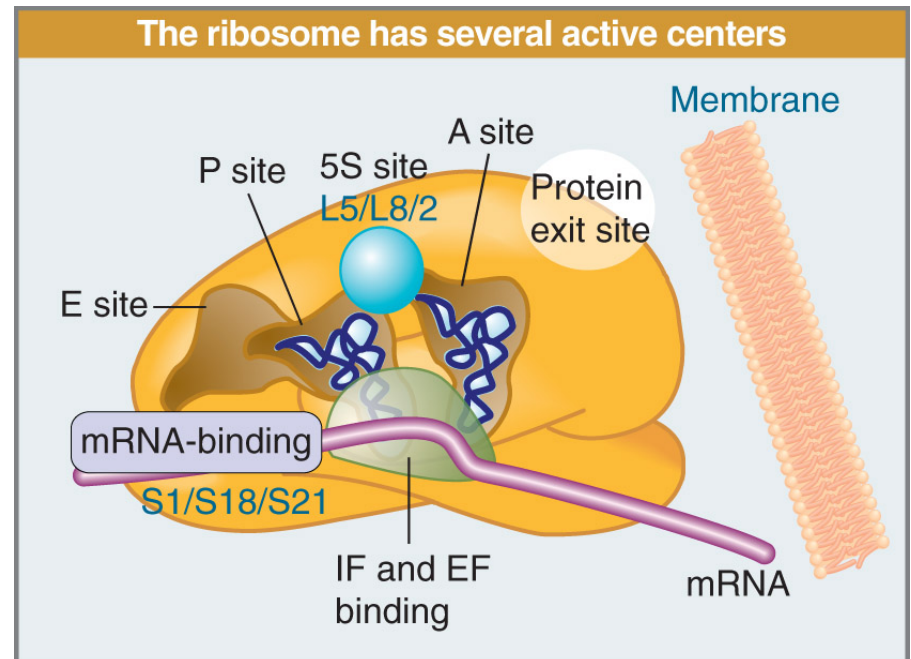
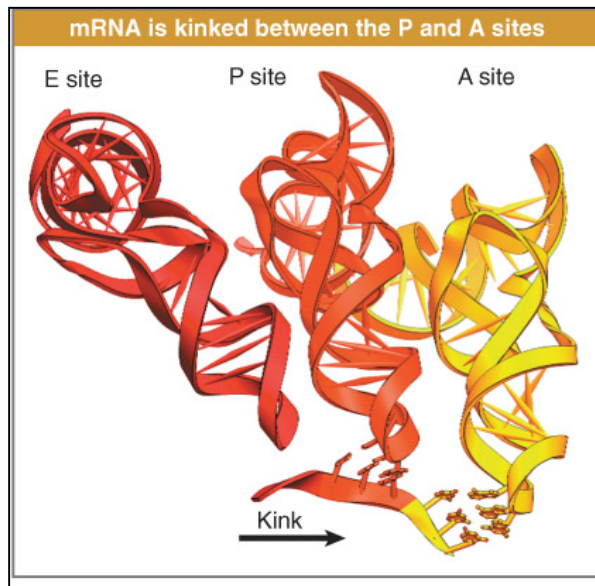




Ribosomes



■ Contenen alguns centres actius



Ribosomes

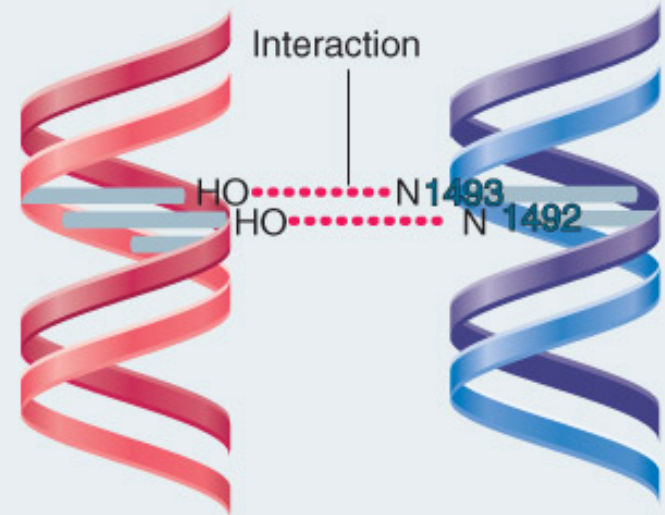
- rRNA 16S interacciona amb mRNA i tRNA
- rRNA 23S reconeix l'extrem 3' del tRNA i presenta l'activitat peptidil transferasa

rRNA interacts with properly paired tRNA

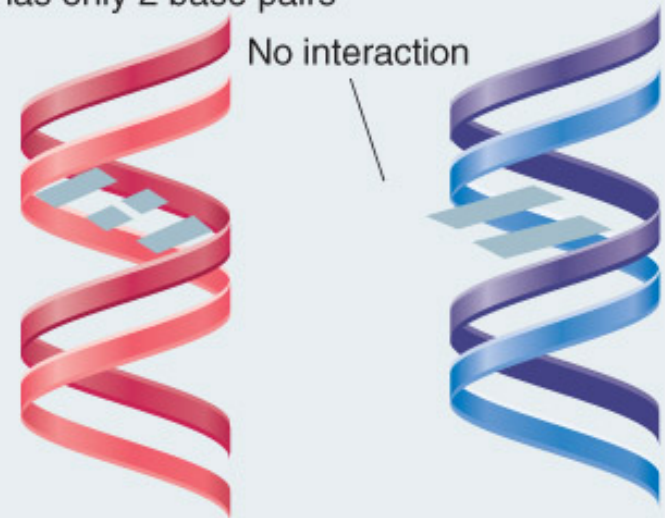
mRNA-tRNA
interaction

16S rRNA
1492-1493

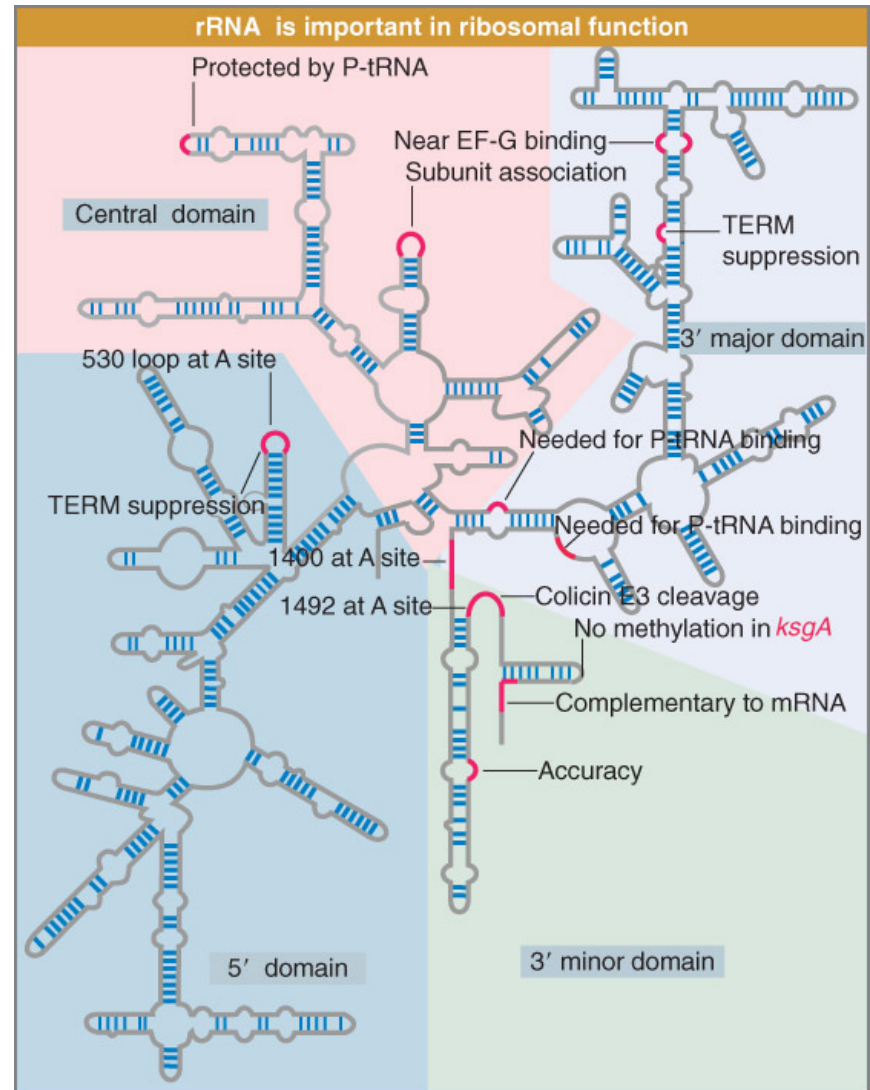
Codon-anticodon
forms 3 base pairs



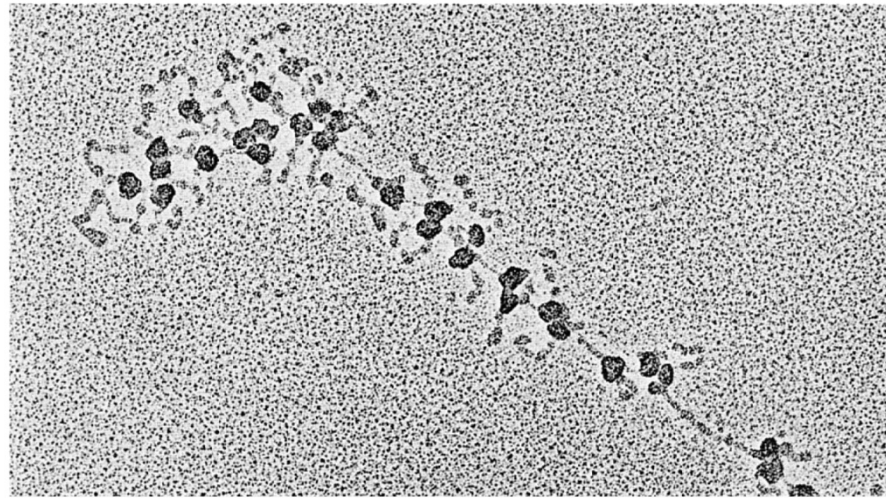
Mispaired combination
has only 2 base pairs



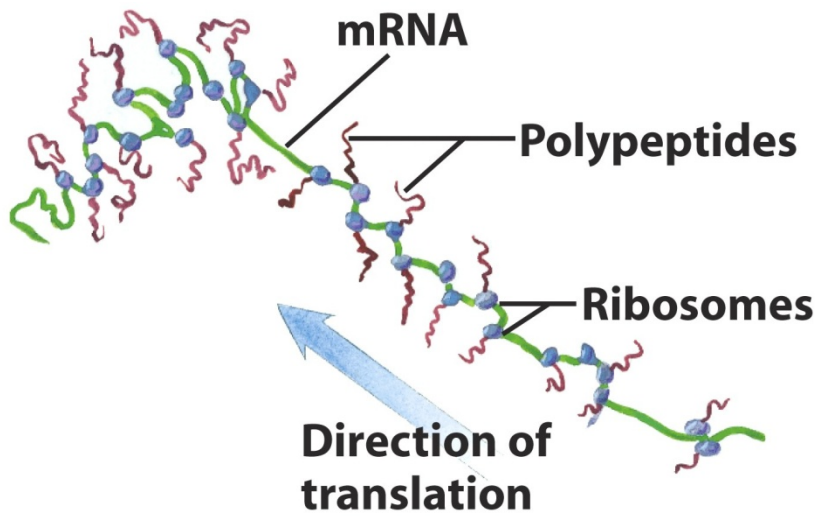
Ribosomes



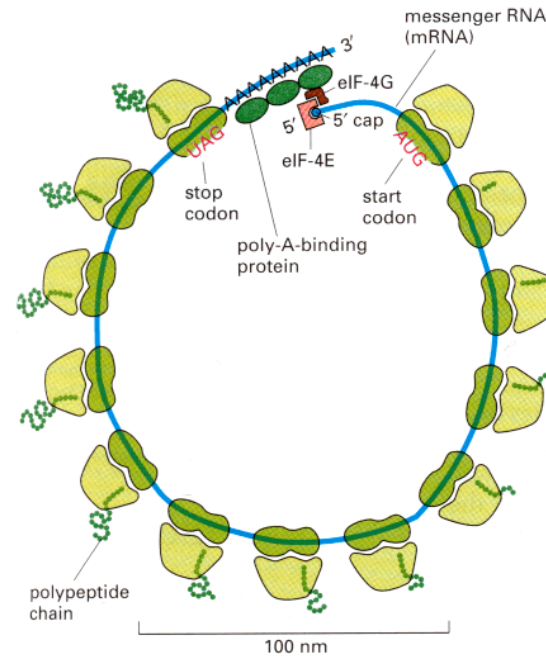
RNA 16S



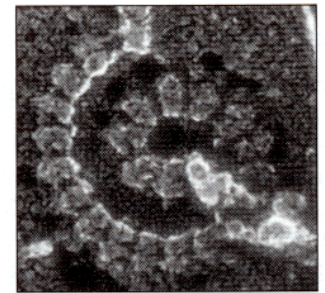
0.25 μm



Poliribosomes

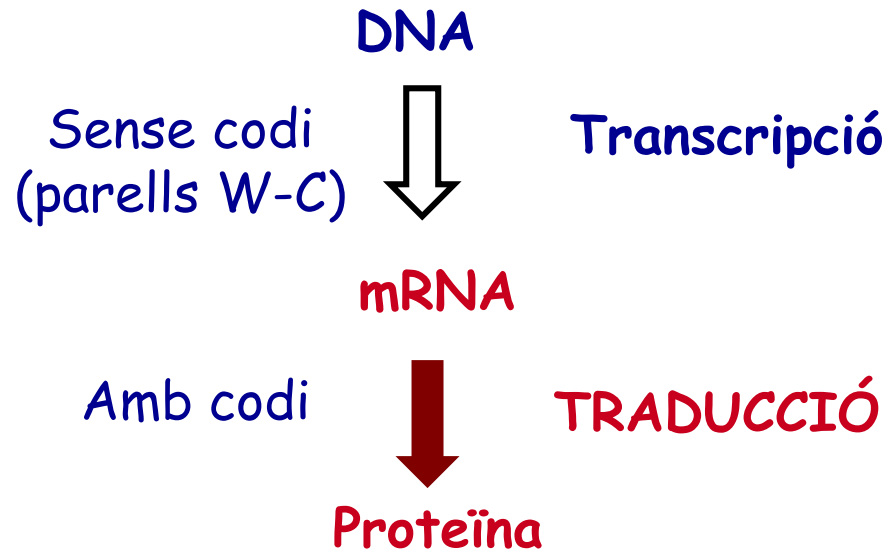


(A)

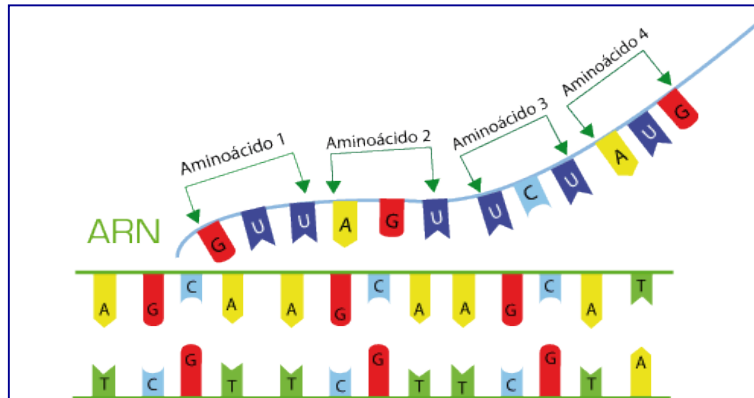


(B)

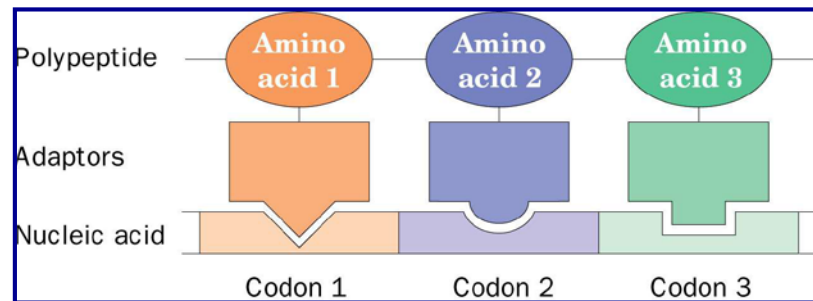
El codi genètic



Codi genètic



Hipòtesi de l'adaptador de Crick: el tRNA



Codi genètic

- **Triplets com a unitats informatives: 1 nt/4 possibilitats; 2nt/16; 3nt/ 64 (demostració genètica: estudis de Crick, Brenner i col·laboradors mitjançant mutacions en el fag T4)**

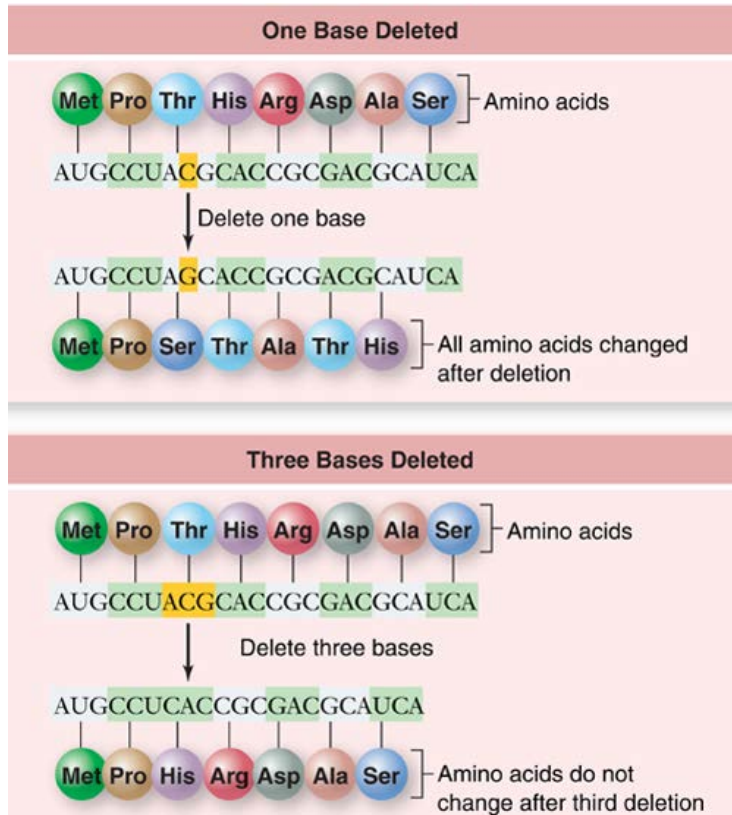


TABLE 13.4
Evidence That the Genetic Code Is Read in Triplets*

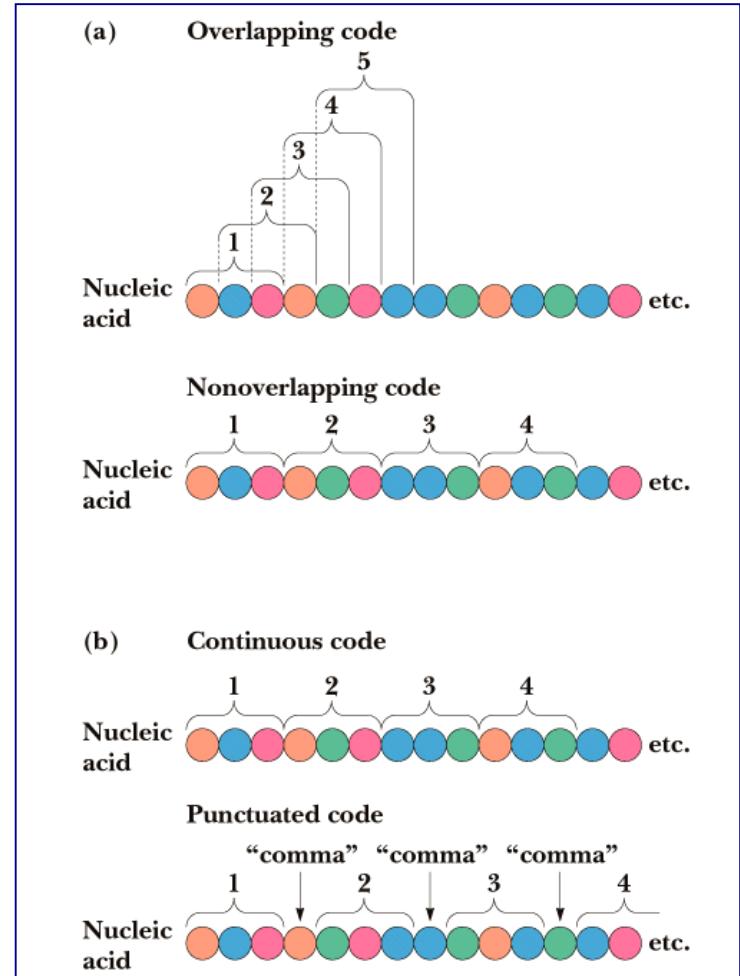
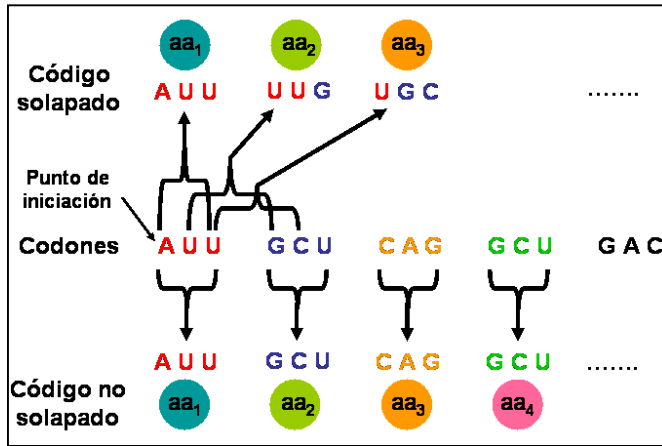
Strain	Plaque Phenotype [†]	DNA Sequence/Polypeptide Sequence	Downstream Sequence*
Wild type	r ⁺	ATG GGG CCC GTC CAT CCG TAC GCC GGA ATT ATA Met Gly Pro Val His Pro Tyr Ala Gly Ile Ile-----	In frame
(+)	r ^{ill}	ATG GGG ACC CGT CCA TCC GTA CGC CGG AAT TAT A Met Gly Thr Arg Pro Ser Val Arg Arg Asn Tyr-----	Out of frame
(+)(-) _a	r ⁺	ATG GGG ACC GTC CAT CCG TAC GCC GGA ATT ATA Met Gly Thr Val His Pro Tyr Ala Gly Ile Ile-----	In frame
(+)(-) _b	r ⁺	ATG GGG ACC CGC CAT CCG TAC GCC GGA ATT ATA Met Gly Thr Arg His Pro Tyr Ala Gly Ile Ile-----	In frame
(+)(-) _c	r ⁺	ATG GGG ACC CTC CAT CCG TAC GCC GGA ATT ATA Met Gly Thr Leu His Pro Tyr Ala Gly Ile Ile-----	In frame
(-) _a	r ^{ill}	ATG GGG CCG TCC ATC CGT ACG CCG GAA TTA TA Met Gly Pro Ser Ile Arg Thr Pro Glu Leu-----	Out of frame
(-) ₂ (-) _b	r ^{ill}	ATG GGG CCG CCA TCC GTA CGC CGG AAT TAT A Met Gly Pro Pro Ser Val Arg Arg Asn Tyr-----	Out of frame
(-) ₂ (-) _b (-) _c	r ⁺	ATG GGG CCC CAT CCG TAC GCC GGA ATT ATA Met Gly Pro His Pro Tyr Ala Gly Ile Ile-----	In frame

*Only Val is missing

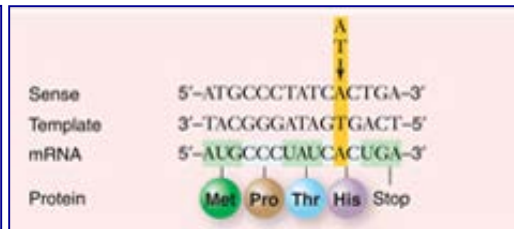
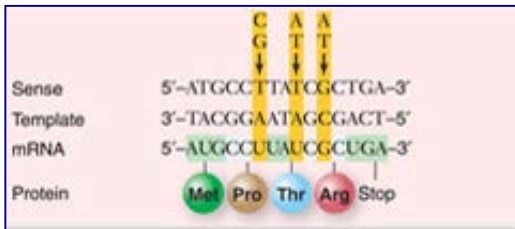
- **Redundant: 64 triplets per a 20 aas**

Codi genètic

- No solapant i continuu (sense comes)

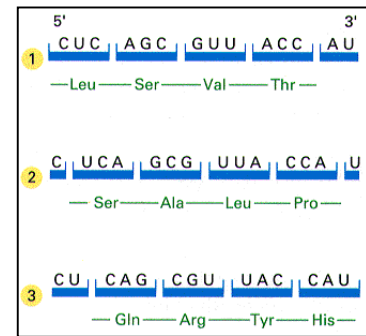
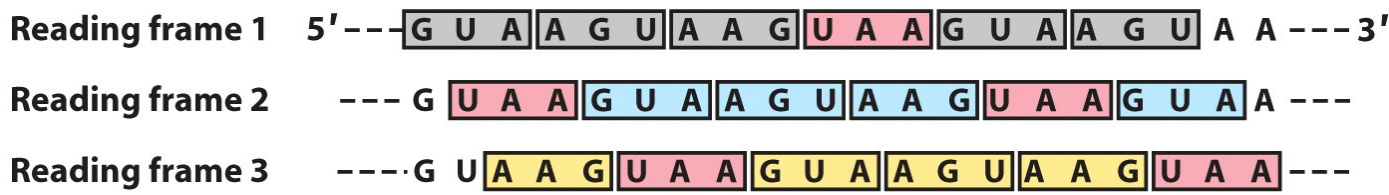


Mutacions conegudes (p. ex., Hb S) només canvien un aa

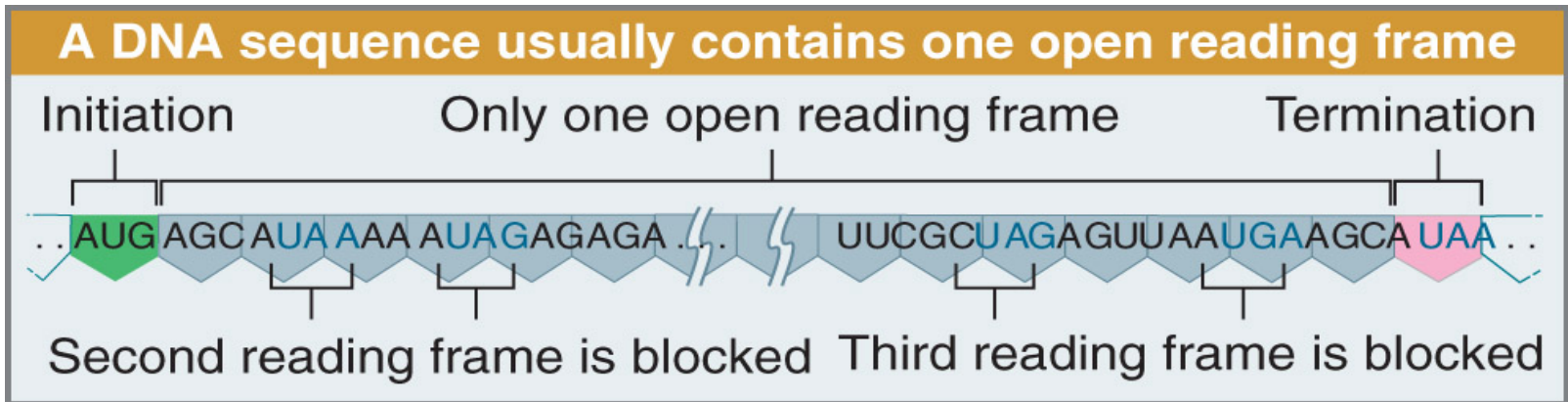


Codi genètic

Cada seqüència té tres possibles pautes de lectura



Només una té significat (dona un missatge traduïble): **pauta oberta de lectura (Open Reading Frame) (ORF)**. Necessita un senyal d'inici i un d'acabament.

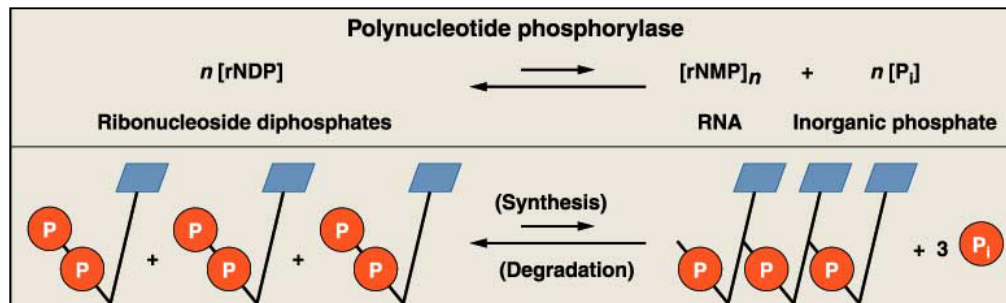


Codi genètic: desxifrat

Primera estratègia:

*Homopolímers d'RNAs sintètics

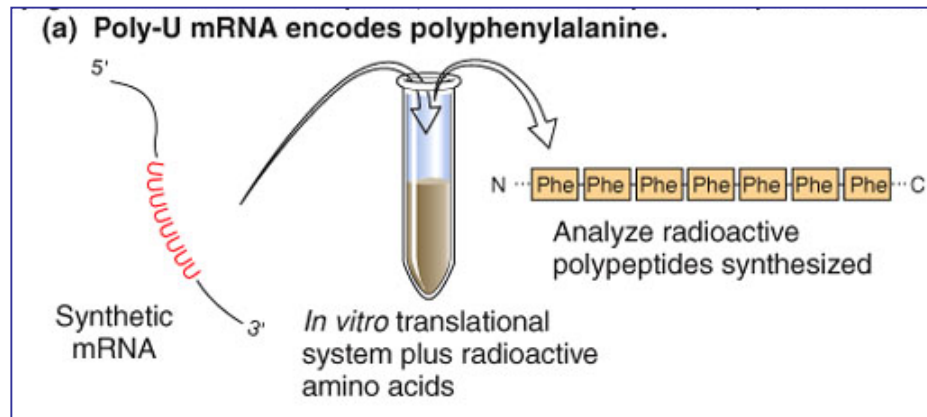
*Traducció *in vitro*



Har Gobind Khorana



Severo Ochoa



■ 4 codons determinats

- UUU = phe
- CCC = pro
- AAA = lys
- GGG = gly

Codi genètic: desxifrat

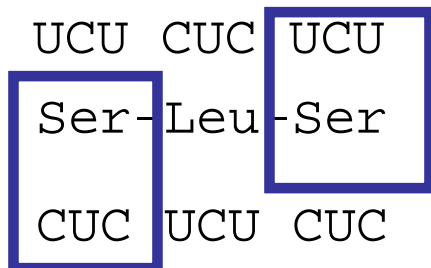
Síntesi i traducció de polímers d'RNA repetitius, di, tri i tetra nucleòtids

Repeating dinucleotides	Polypeptides with alternating amino acids
poly-UC UCUC ... poly-AG AGAG ... poly-UG UGUG ... poly-AC ACAC ...	Ser-Leu-Ser-Leu ... Arg-Glu-Arg-Glu ... Cys-Val-Cys-Val ... Thr-His-Thr-His ...
Repeating trinucleotides	Three polypeptides each with one amino acid
poly-UUC UUCUUCUUC ... poly-AAG AAGAAGAAG ... poly-UUG UUGUUGUUG ... poly-UAC UACUACUAC ...	Phe-Phe... and Ser-Ser... and Leu-Leu... Lys-Lys... and Arg-Arg... and Glu-Glu... Leu-Leu... and Cys-Cys... and Val-Val... Tyr-Tyr... and Thr-Thr... and Leu-Leu...
Repeating tetranucleotides	Polypeptides with repeating units of four amino acids
poly-UAUC UAUCUAUC ... poly-UUAC UUACUUAC ... poly-GUAA GUAAGUAA ... poly-GAUA GAUAGAUA ...	Tyr-Leu-Ser-Ile-Tyr-Leu-Ser-Ile... Leu-Leu-Thr-Tyr-Leu-Leu-Thr-Tyr... none none

TABLE 13.5
Examples of Copolymers That Were Analyzed by Khorana and Colleagues

Synthetic RNA*	Codon Possibilities	Amino Acids Incorporated into Peptides
UC	UCU, CUC	Serine, leucine
AG	AGA, GAG	Arginine, glutamic acid
UG	UGU, GUG	Cysteine, valine
AC	ACA, CAC	Threonine, histidine
UUC	UUC, UCU, CUU	Phenylalanine, serine, leucine
AAG	AAG, AGA, GAA	Lysine, arginine, glutamic acid
UUG	UUG, UGU, GUU	Leucine, cysteine, valine
CAA	CAA, AAC, ACA	Glutamine, asparagine, threonine
UAUC	UAU, AUC, UCU, CUA	Tyrosine, isoleucine, serine, leucine
UUAC	UUA, UAC, ACU, CUU	Leucine, tyrosine, threonine

**Quin codó codifica Ser:
CUC o UCU?**



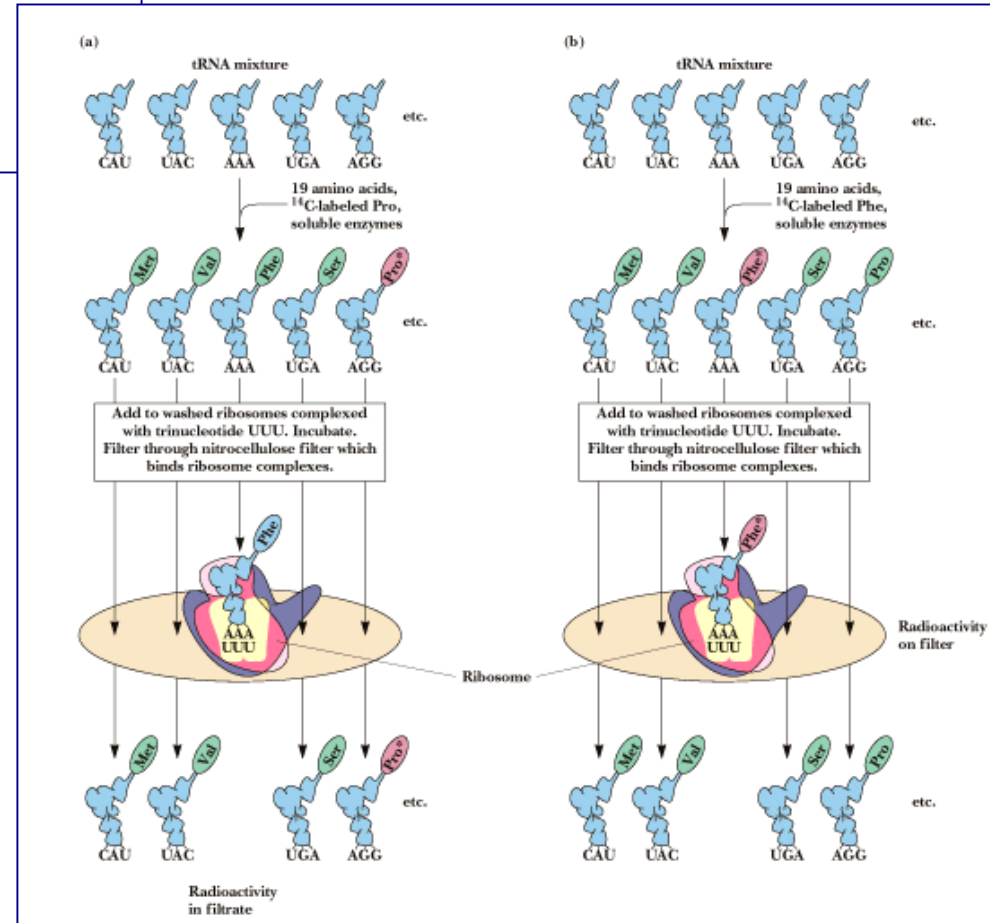
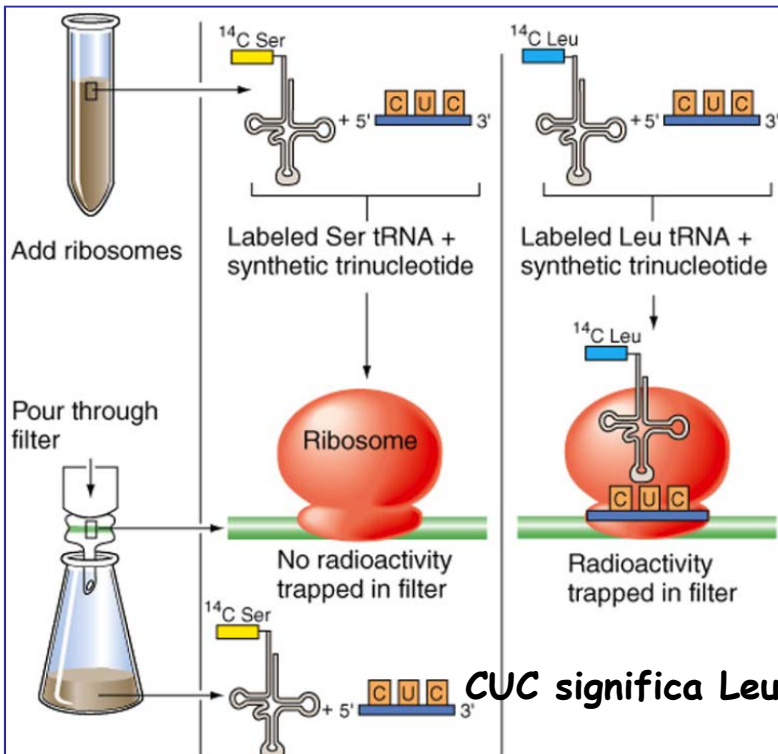
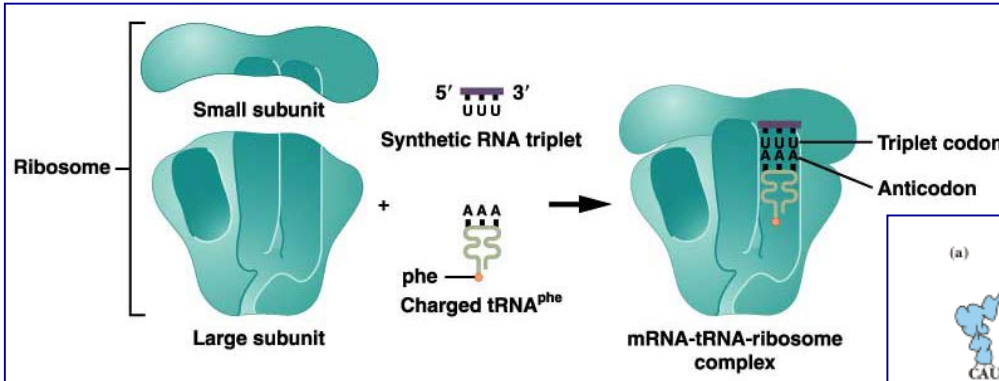
*The synthetic RNAs were linked together to make copolymers.

Codi genètic: desxifrat

Segona estratègia: Assaig d'unió Triplet RNA-tRNA (1964)



Nirenberg



Codi genètic

- 3 codons d'aturada (*stop o termination o nonsense codons*)

UAA: ocre

UAG: àmbar

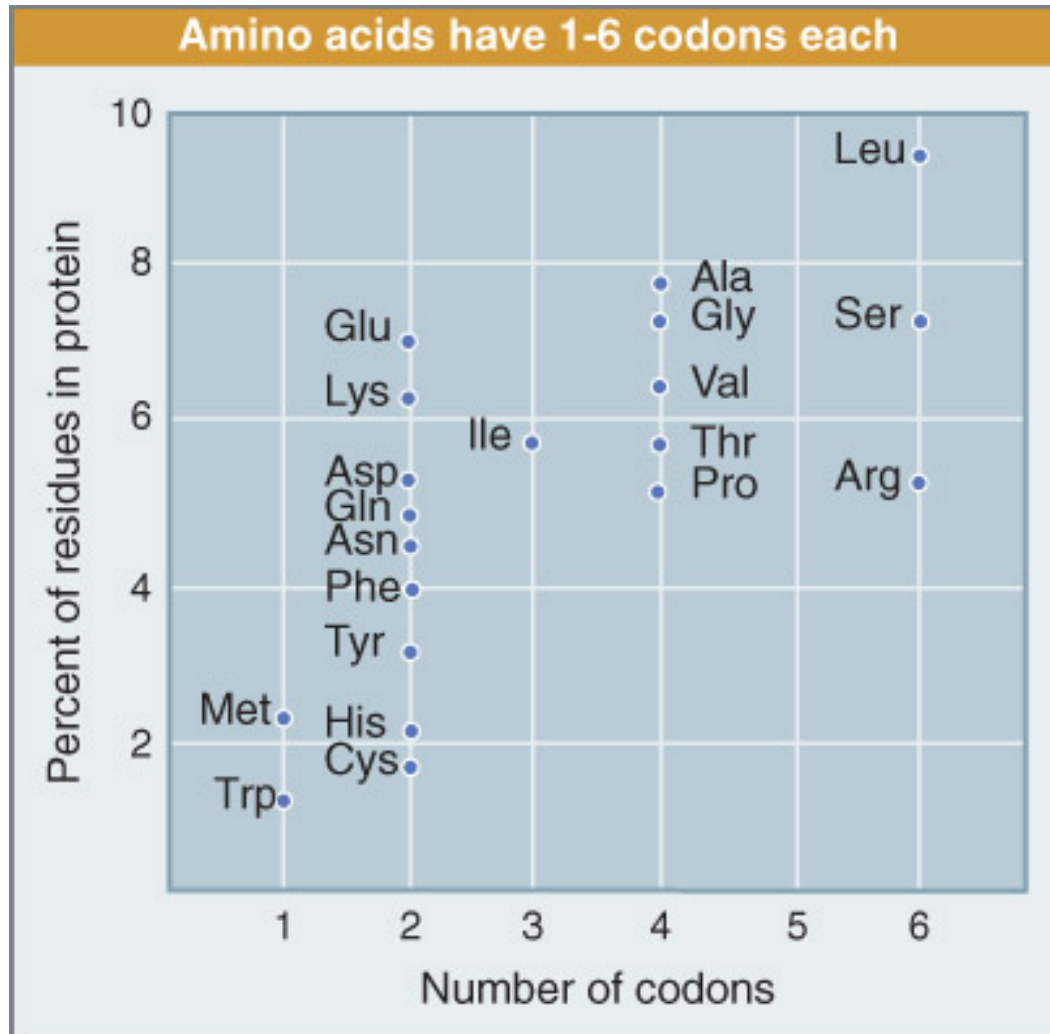
UGA: òpal

61 triplets codificants per a 20 aas

- Triplets
- No solapant
- Sense signes de puntuació
- No ambigu:** cada codó especifica un sol aa
- Redundant**
- Quasi universal
- Es llig en direcció 5'→3'

		Segunda posición				
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Deten- UAG Deten- ción	UGU } Cys UGC } UGA Deten- UGG Trp ción	U C A G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
						Tercera posición (extremo 3')

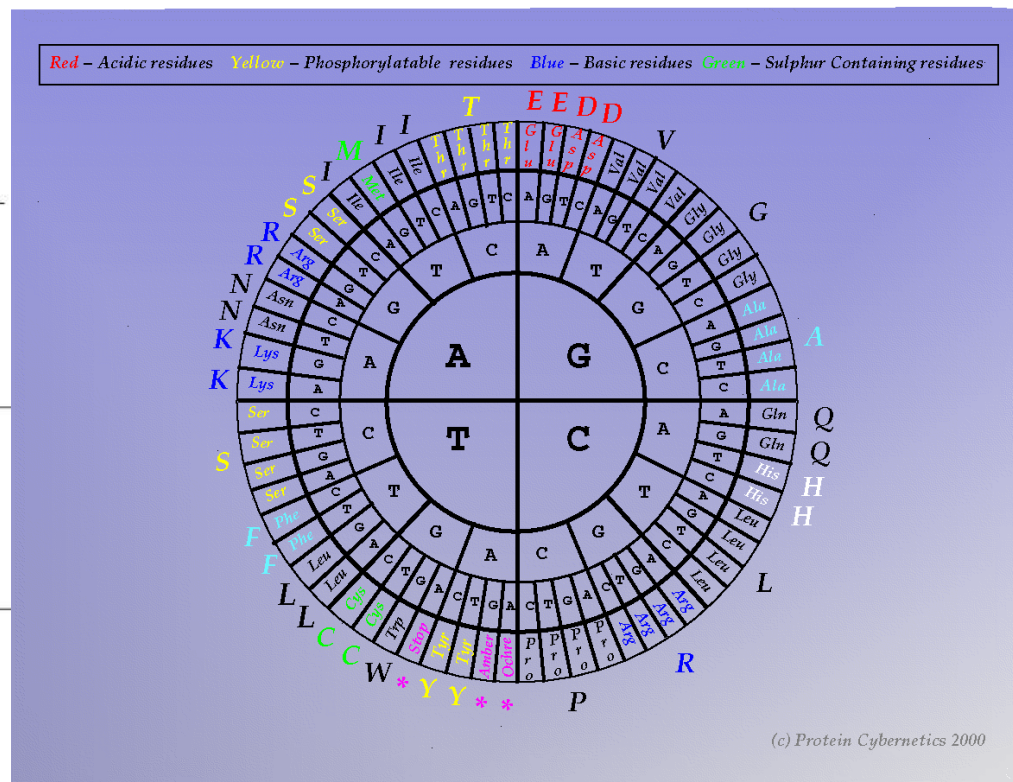
Codi genètic: característiques



Redundant (tret de Trp i Met)

Codi genètic: característiques

First position (5' end)	Second position				Third position (3' end)
	U	C	A	G	
U	UUU ^a Phe	UCU	UAU ^a Tyr	UGU ^a Cys	U
	UUC	UCC ^a Ser	UAC	UGC	C
	UUA ^a Leu	UCA	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG	UCG	UAG Stop	UGG ^a Trp	G
C	CUU	CCU	CAU ^a His	CGU	U
	CUC ^a Leu	CCC ^a Pro	CAC	CGC ^a Arg	C
	CUA	CCA	CAA ^a Gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU ^a Asn	AGU ^a Ser	U
	AUC ^a Ile	ACC ^a Thr	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA ^a Lys	AGA ^a Arg	A
	AUG ^b Met ^b	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU ^a Asp	GGU	U
	GUC ^a Val	GCC ^a Ala	GAC	GGC ^a Gly	C
	GUA	GCA	GAA ^a Glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G








(c) Protein Cybernetics 2000

^aNonpolar amino acid residues are tan, basic residues are blue, acidic residues are red, and nonpolar uncharged residues are purple.

^bAUG forms part of the initiation signal as well as coding for internal Met residues.

Codi genètic: característiques

- Codons que representen el mateix o similars aa tenen seqüència pareguda, de manera que s'evita l'efecte fenotípic de les mutacions
- 2a base és normalment una pirimidina en aa no polars i una purina en els aa polars o carregats. La 3a és irrellevant o poc informativa

Third bases have least meaning			
UUU UUC	UCU UCC	UAU UAC	UGU UGC
UUA UUG	UCA UCG	UAA UAG	UGA UGG
CUU CUC	CCU CCC	CAU CAC	CGU CGC
CUA CUG	CCA CCG	CAA CAG	CGA CGG
AUU AUC	ACU ACC	AAU AAC	AGU AGC
AUA AUG	ACA ACG	AAA AAG	AGA AGG
GUU GUC	GCU GCC	GAU GAC	GGU GGC
GUA GUG	GCA GCG	GAA GAG	GGA GGG
Third-base relationship	Third bases with same meaning	Codon Number	
	Third base	U, C, A, G	32
	irrelevant	U, C, A	3
	Purines differ from pyrimidines	A or G	14
		U or C	10
	Unique	G only	2

Codi genètic: biaix en l'ús de codons sinònims

- Molts organismes fan servir preferentment uns codons sinònims sobre d'altres
- *E. coli* utilitza *GGU* i *GGC* per a *Gly* un 98% de les vegades i *GGA* i *GGG* només un 2% en el cas de proteïnes abundants. Tanmateix només fa servir els primers un 68% en proteïnes poc abundants. *S. cerevisiae* recorre a *GGU* el 98% de les ocasions.

Codon	Human	Drosophila	E. coli
Arginine:			
AGA	22 %	10 %	1 %
AGG	23 %	6 %	1 %
CGA	10 %	8 %	4 %
CGC	22 %	49 %	39 %
CGG	14 %	9 %	4 %
CGU	9 %	18 %	49 %

Codi genètic: característiques

Universalitat

- La immensa majoria d'organismes fan servir el mateix codi
- Mitochondris de mamífers i fongs
 - U en posició 3' de l'anticodó en tRNA pot aparellar amb totes les bases.
 - CUX: leu, no thr; AUA: met, no ile; UGA: trp, no stop

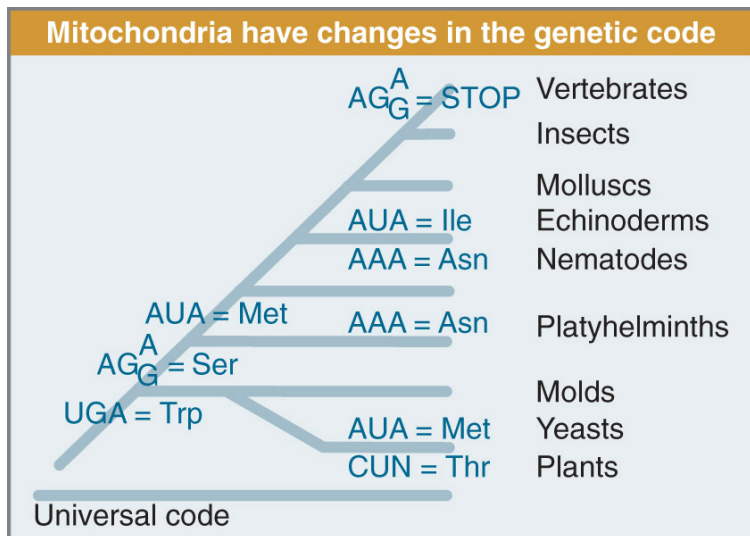


TABLE 1 Known Variant Codon Assignments in Mitochondria

	Codons*				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
Normal code assignment	Stop	Ile	Arg	Leu	Arg
Animals					
Vertebrates	Trp	Met	Stop	+	+
<i>Drosophila</i>	Trp	Met	Ser	+	+
Yeasts					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trp	Met	+	Thr	+
<i>Torulopsis glabrata</i>	Trp	Met	+	Thr	?
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Trp	+	+	+	+
Filamentous fungi	Trp	+	+	+	+
Trypanosomes	Trp	+	+	+	+
Higher plants	+	+	+	+	Trp
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	?	+	+	+	?

*N indicates any nucleotide; +, codon has the same meaning as in the normal code; ?, codon not observed in this mitochondrial genome.

Excepcions al codi genètic

•La major part de les excepcions al codi genètic afecten canvis en els codons d'aturada: **UAA, UAG i UGA**

Quan no codifiquen **STOP** hi ha un tRNA amb un anticodó complementari a codons **STOP**

Mycoplasma caprocolum **UGA: Trp** 2 tRNAs^{Trp}:

anticodó CCA reconeix UGG

anticodó UCA reconeix UGA i UGG

Tetrahymena termophila: 3 tRNAs^{Gln}

CAA i CAG / **UAA i UAG** / **UAG**

Euplotes octacarinatus:

UAA: aturada

UAG no es troba

UGA junt amb UGU i UGC: **Cys**

Changes in the genetic code usually involve Stop/None signals			
UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA STOP→Gln UAG	UGU Cys UGC UGA STOP→Trp, Cys, Sel UGG Trp
CUU Leu CUC CUA CUG Leu→Ser	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU Arg CGC Arg CGA Arg→NONE CGG
AUU Ile AUC Ile→NONE AUA Met AUG	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC Arg→NONE AGA Arg AGG
GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG

Única substitució en triplet codificant: *Candida* **CUG: Ser** en comptes de Leu

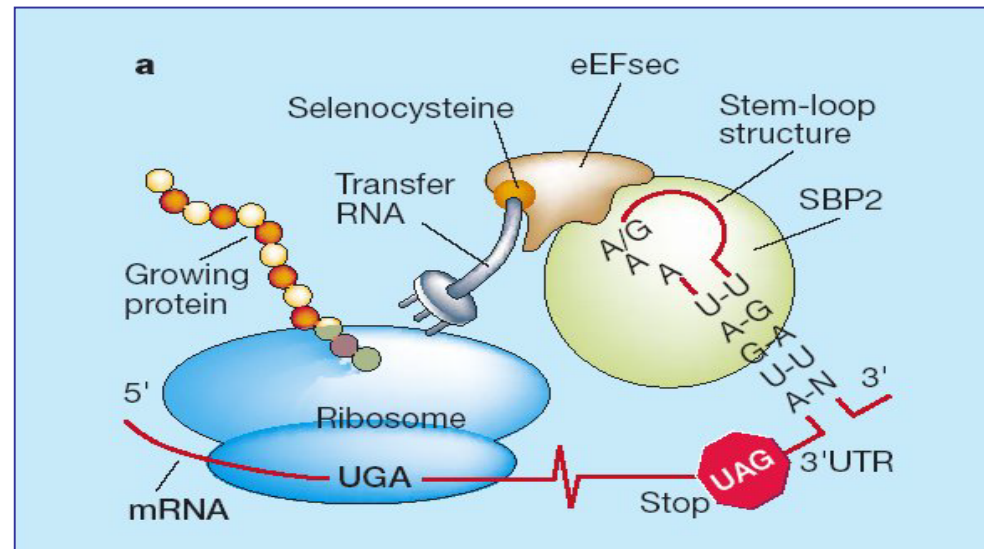
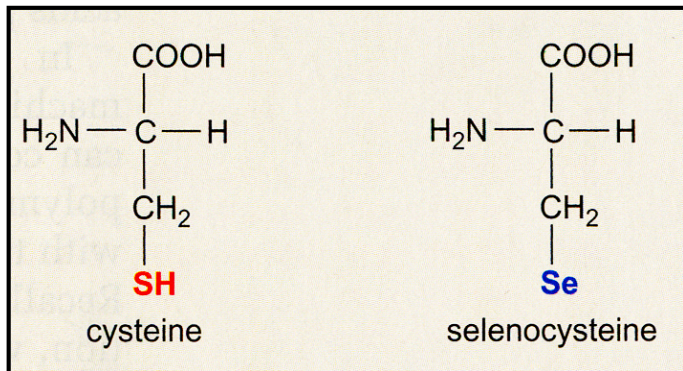
Canvi de significat del codó segons el context

Selenoproteïnes:

Proteïnes que contenen l'aa selenocisteïna (Sec) (l'aa 21). Exemples:
 Glutatió peroxidasa (mamífers)
 Format deshidrogenasa (bacteris)

Selenocisteïna (Sec)

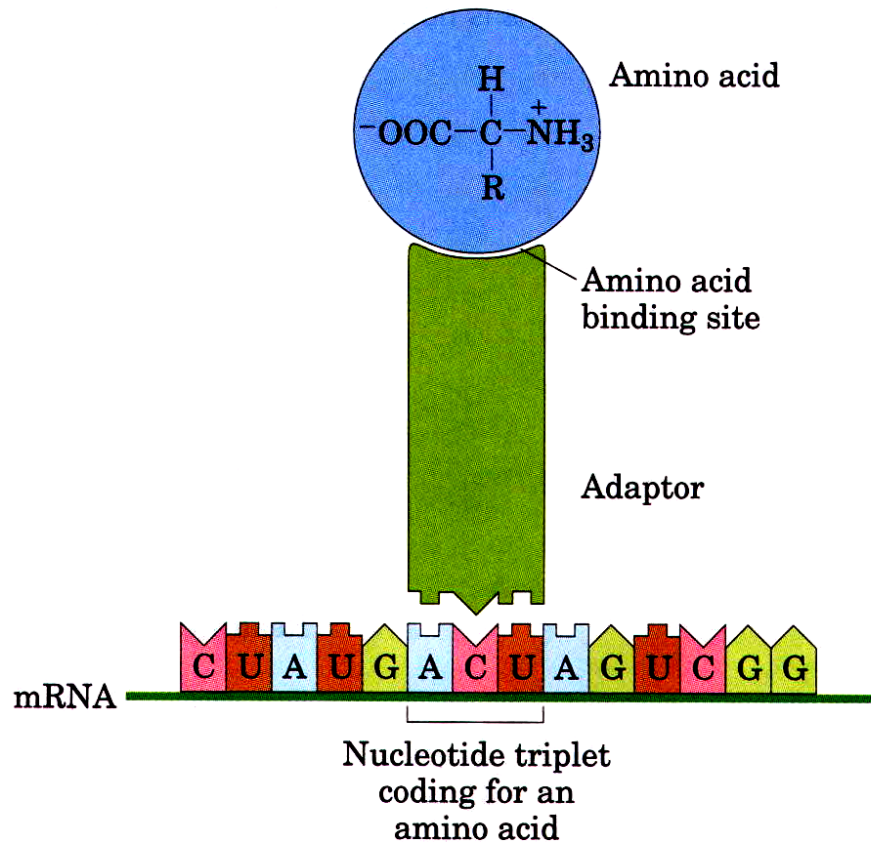
Es troba en tots els tipus d'organismes



Codificada per **UGA**, però depenent del context

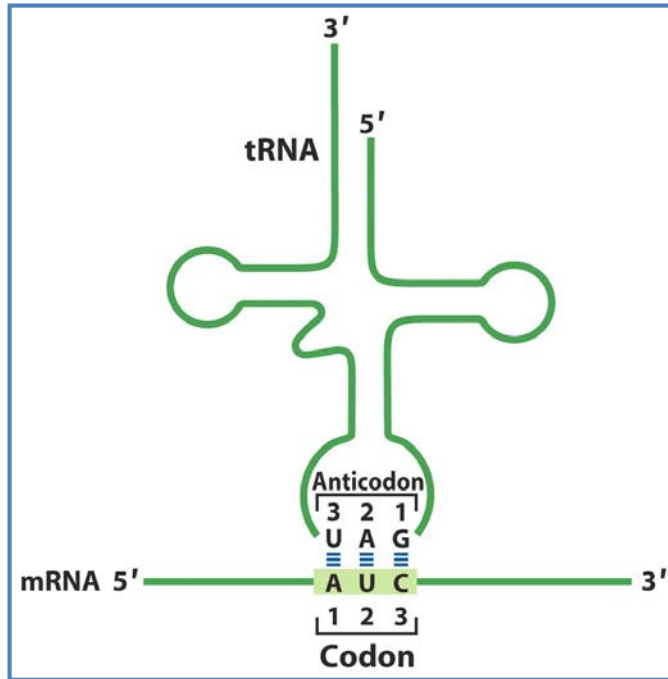
Càrrega de l'aminoàcid al tRNA

El tRNA com a adaptador



- Crick va plantejar la hipòtesi sobre l'existència d'un adaptador
 - Un adaptador per aa, és a dir, ha d'existir una família d'adaptadors
 - Són els tRNAs
- Cada tRNA pot reconèixer seqüències específiques en l'mRNA
- Cadascun està "carregat" amb l'aa especificat per aquesta seqüència

Aparellament codó-anticodó



Nomenclatura

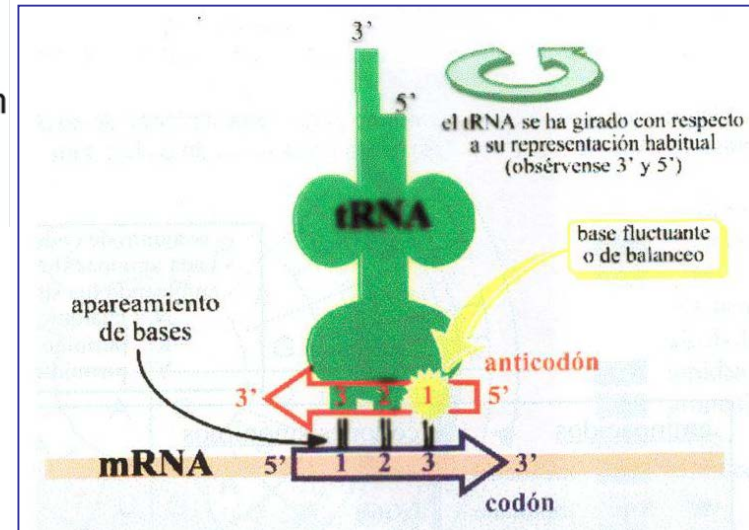
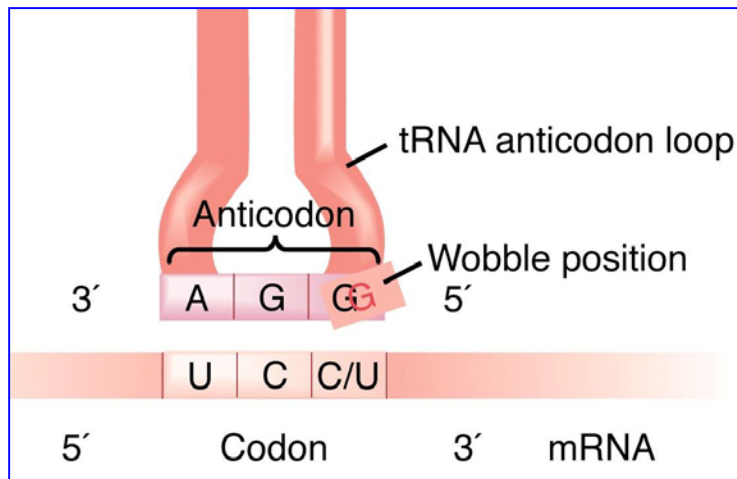
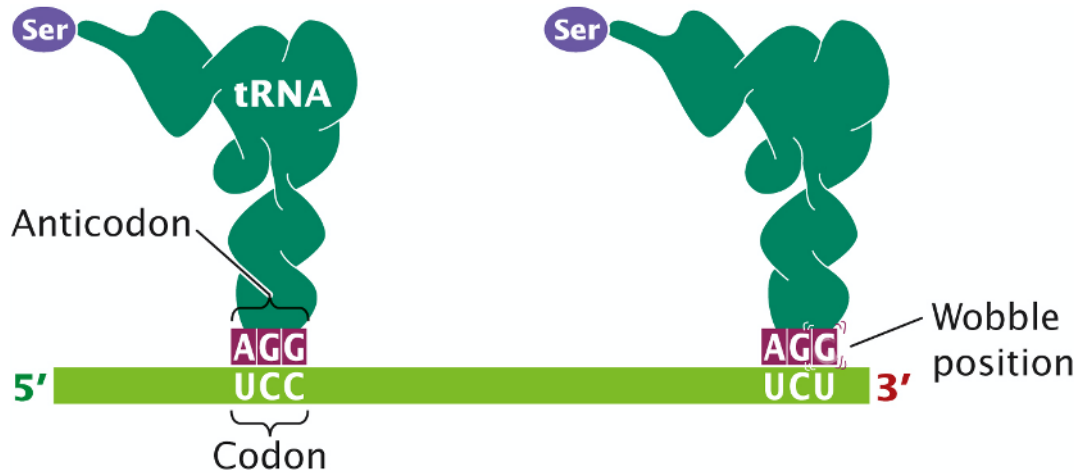
Codó: 5'-AUC-3': *AUC*

Anticodó: 5'-GAU-3': *GAU*

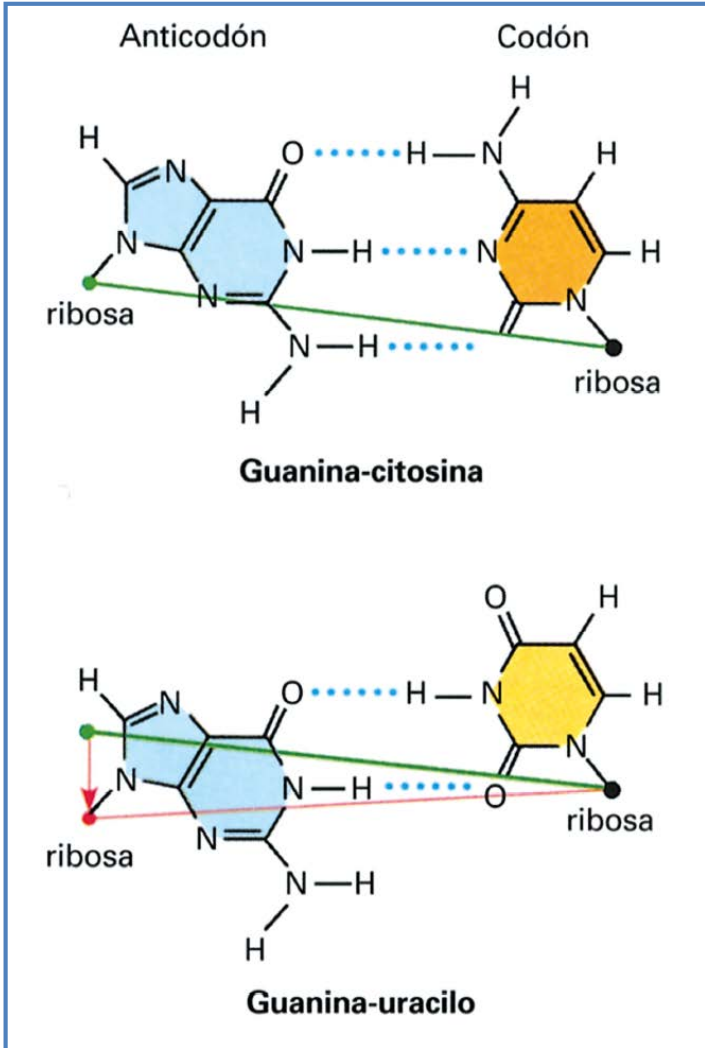
Com que hi ha codons sinònims, hi ha tRNAs isoacceptors: tRNAs diferents que varien en l'anticodó i poden unir el mateix aa

Hipòtesi del balanceig: Crick (1966)

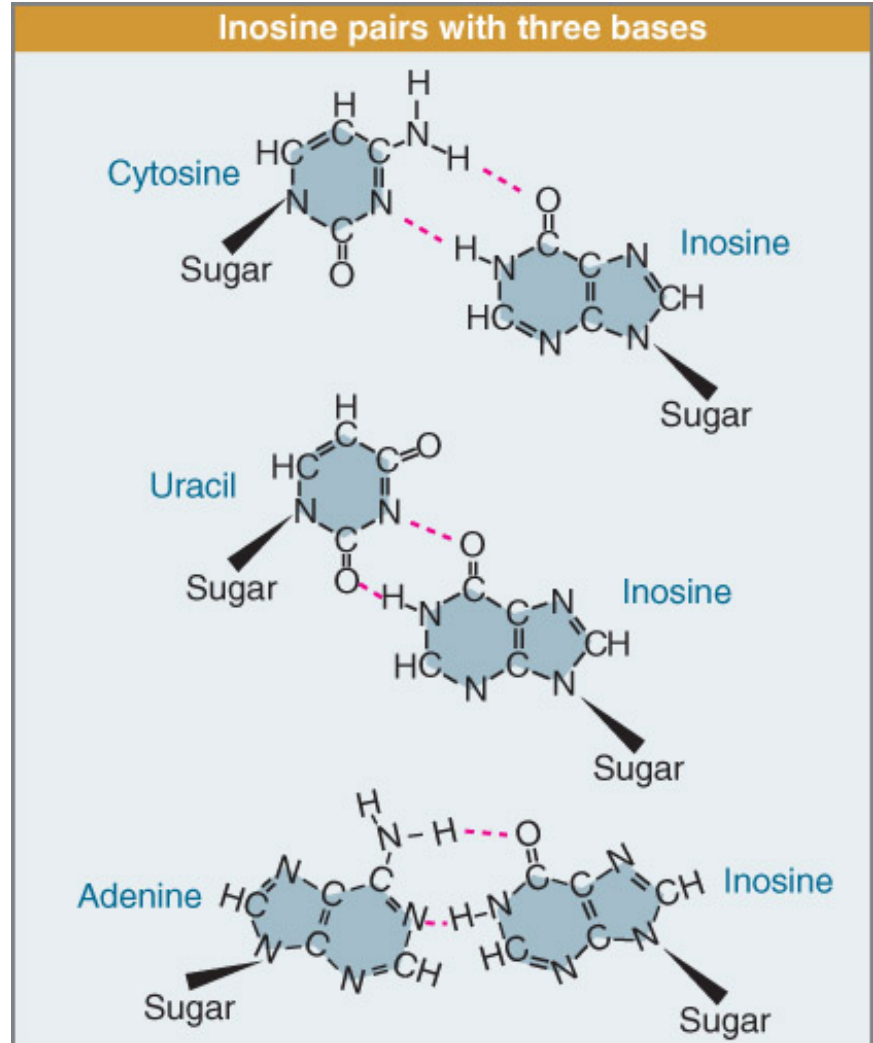
Però, com que la tercera base del codó permet aparellaments no canònics, es redueix el nombre de tRNAs necessaris



Regles del balanceig



G=U

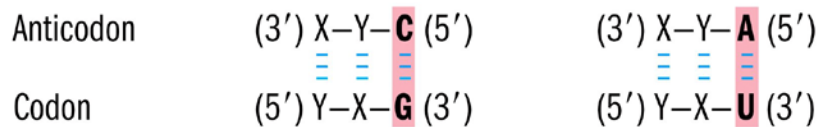


I=A; I=U; I=C

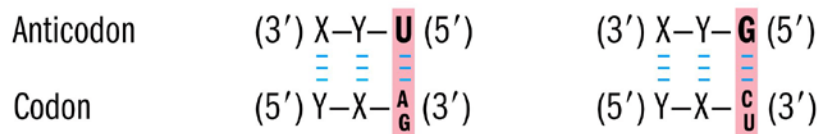
Regles del balanceig

TABLE 27-4 How the Wobble Base of the Anticodon Determines the Number of Codons a tRNA Can Recognize

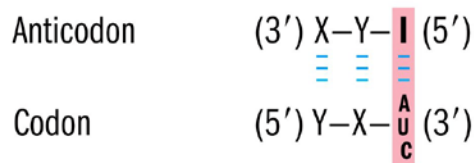
1. One codon recognized:



2. Two codons recognized:



3. Three codons recognized:



Note: X and Y denote bases complementary to and capable of strong Watson-Crick base pairing with X' and Y', respectively. Wobble bases—in the 3' position of codons and 5' position of anticodons—are shaded in pink.

1 ^a posició de l'anticodó (5')	3 ^a posició del codó (3')
G	C o U
U	A o G
I (inosina)	A, U, o C
C	G
A	U

tRNA isoacceptors	Anticodó	Codó
tRNA ^{Ser} ₁	<u>AGG</u>	UCC UCU
tRNA ^{Ser} ₂	AGU	UCA UCG
tRNA ^{Ser} ₃	UCG	AGC AGU

Conseqüència: només fan falta 32 tRNAs per a llegir 20 aminoàcids

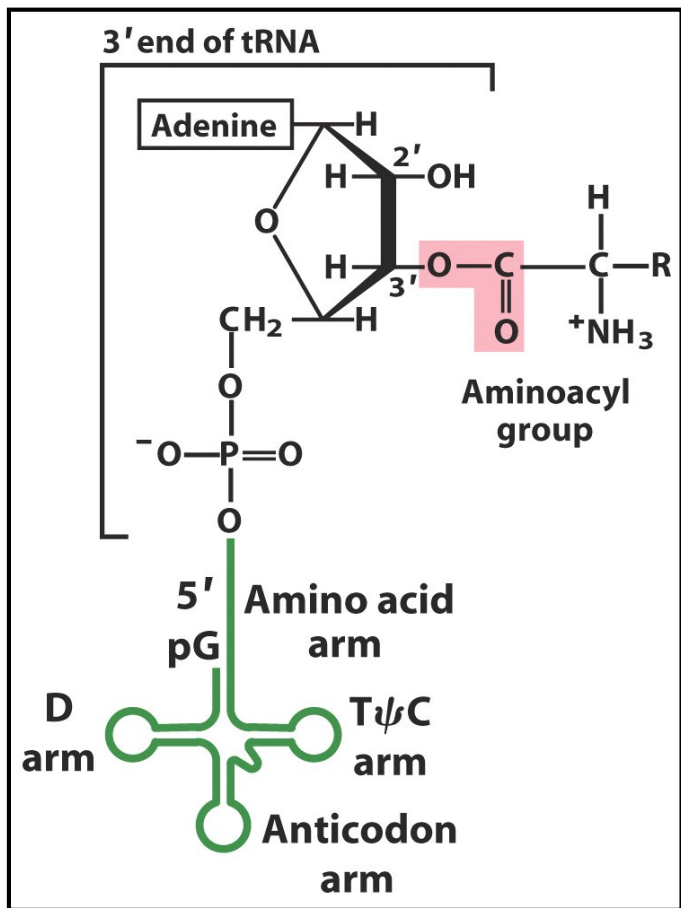
Conseqüències del balanceig

nre. codons per aa	nre. anticodons per aa (nre. tRNAs)	aas d'aquest tipus	nre. total d'anticodons	nre. total de codons
1	1	2	2	2
2	1	9	9	18
3	1	1 [^]	1	3
4	2	5	10	20
6	3	3	9	18
Suma		20	31**	61*

*Més 3 codons stop. **més un tRNA iniciador. ^Ile ha cedit un a l'iniciador

En el codi genètic de mitocondris de mamífers i fongs el fet que U en lloc de balanceig en tRNA pugui aparellar amb totes les bases, determina una reducció del nombre de tRNAs necessaris a 24

Aminoacil tRNA sintetases (ARS): formació de l'aminoacil-tRNA



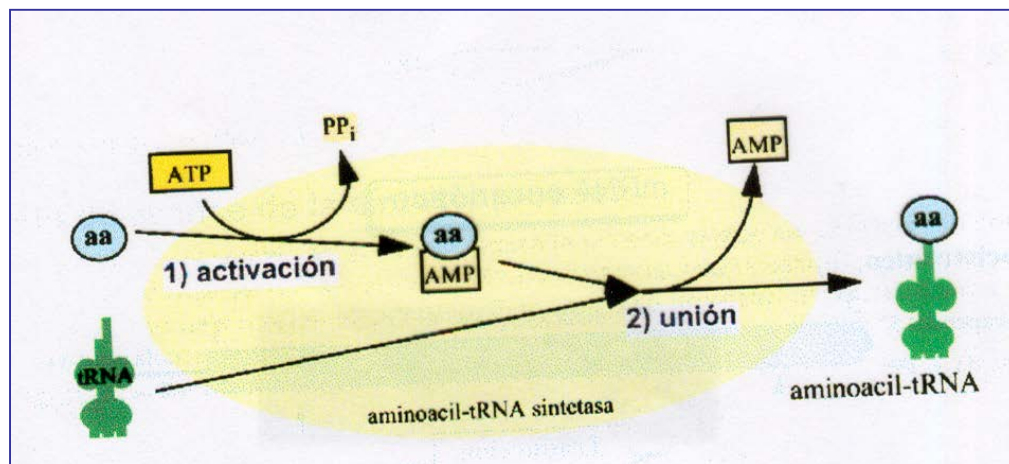
Nomenclatura:

tRNA d'alanina: $tRNA^{Ala}$

Alanina unida al $tRNA^{Ala}$: Ala- $tRNA^{Ala}$

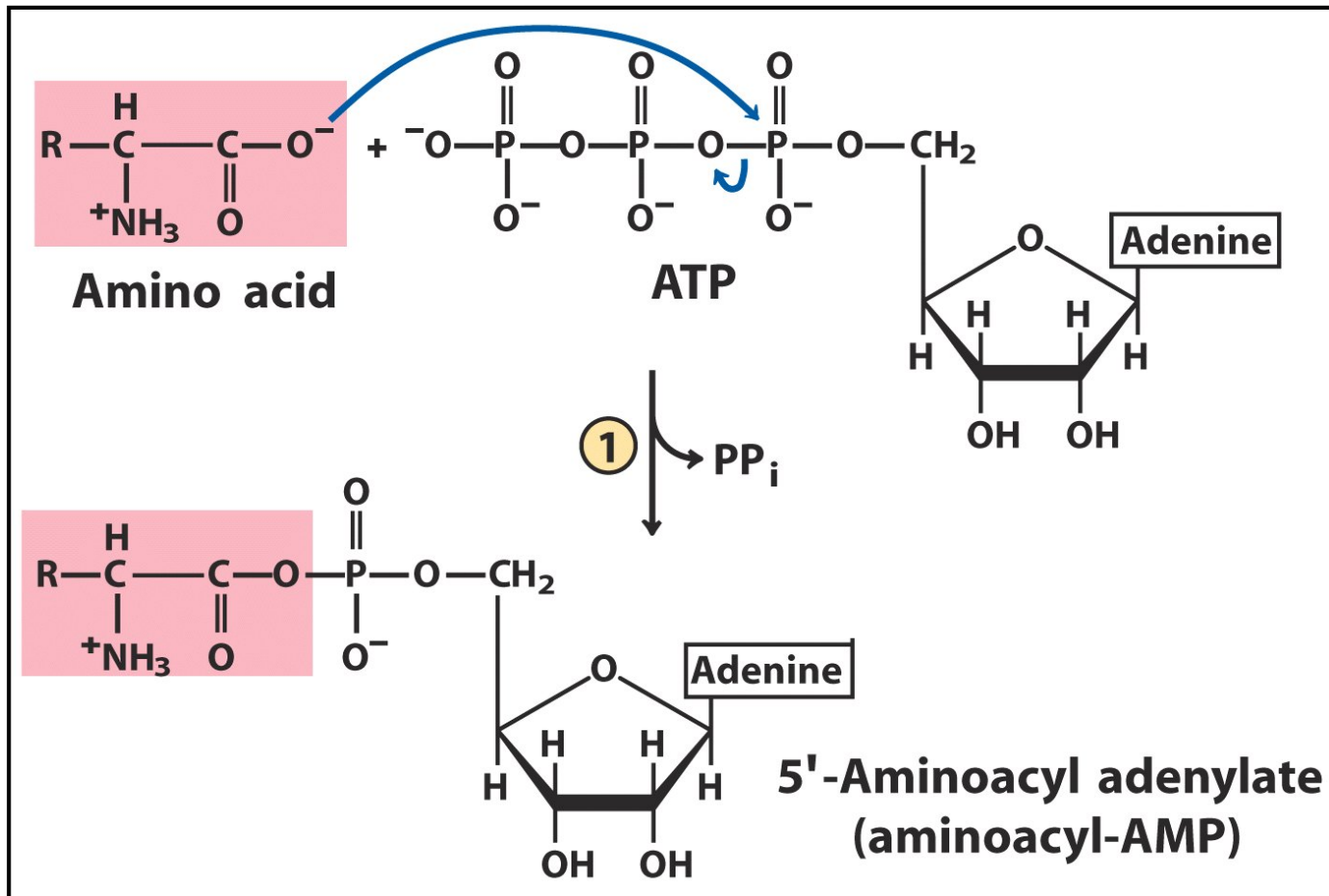
tRNAs isoacceptors

tots els tRNAs que poden unir el mateix aa (anticodó diferent)



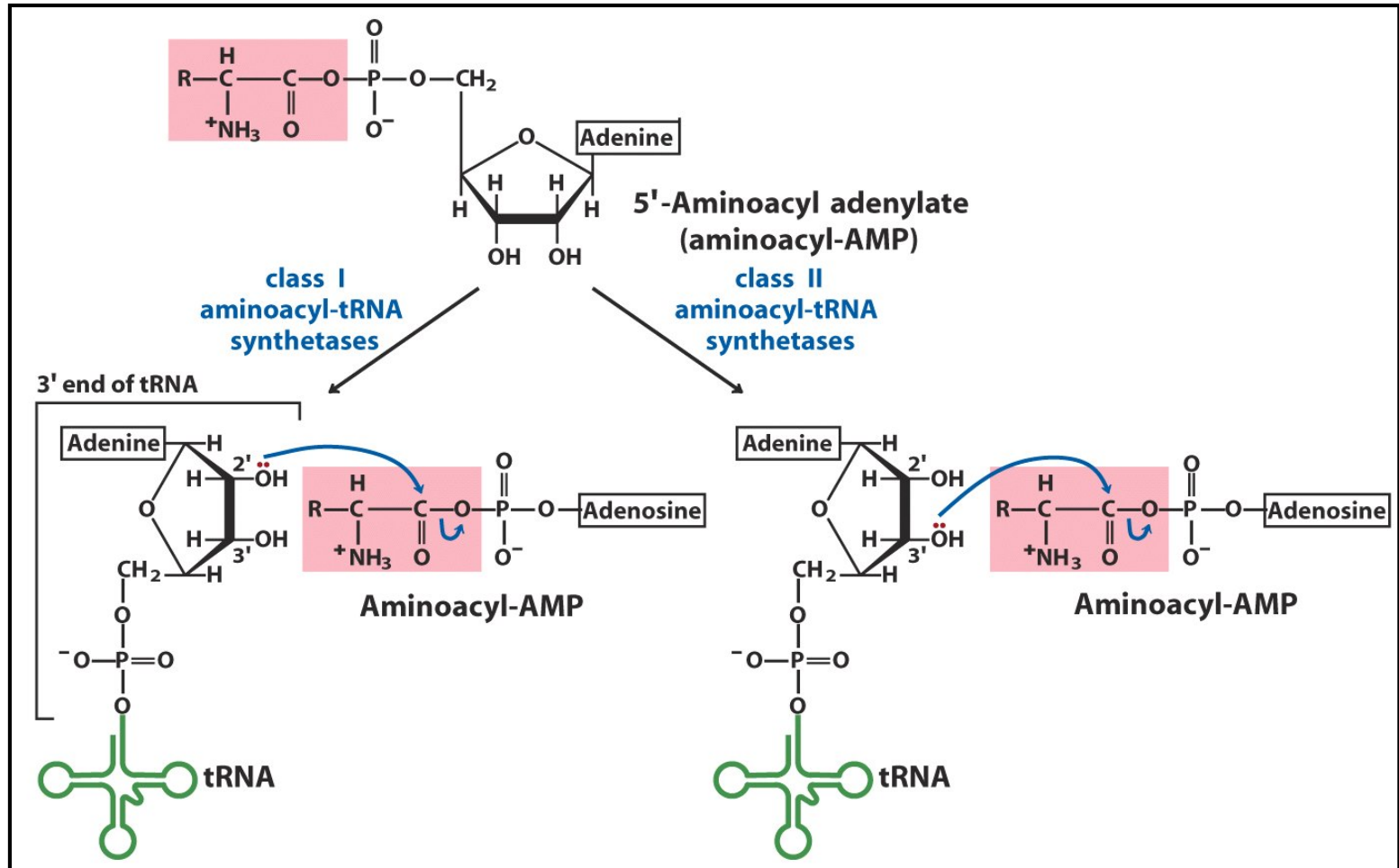
Formació de l'aminoacil tRNA

1) Activació de l'aminoàcid (adenilació)



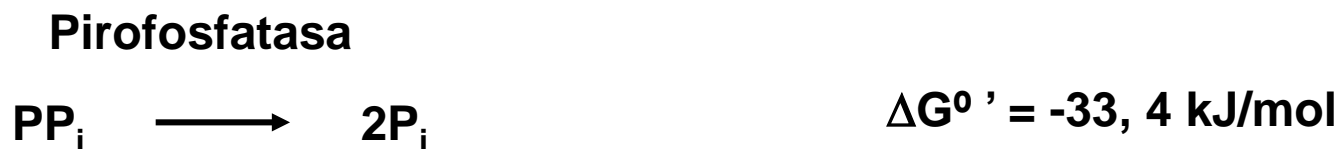
Formació de l'aminoacil tRNA

2) Aminoacilació (càrrega al tRNA)



Formació de l'aminoacil tRNA: energètica

1. Activació



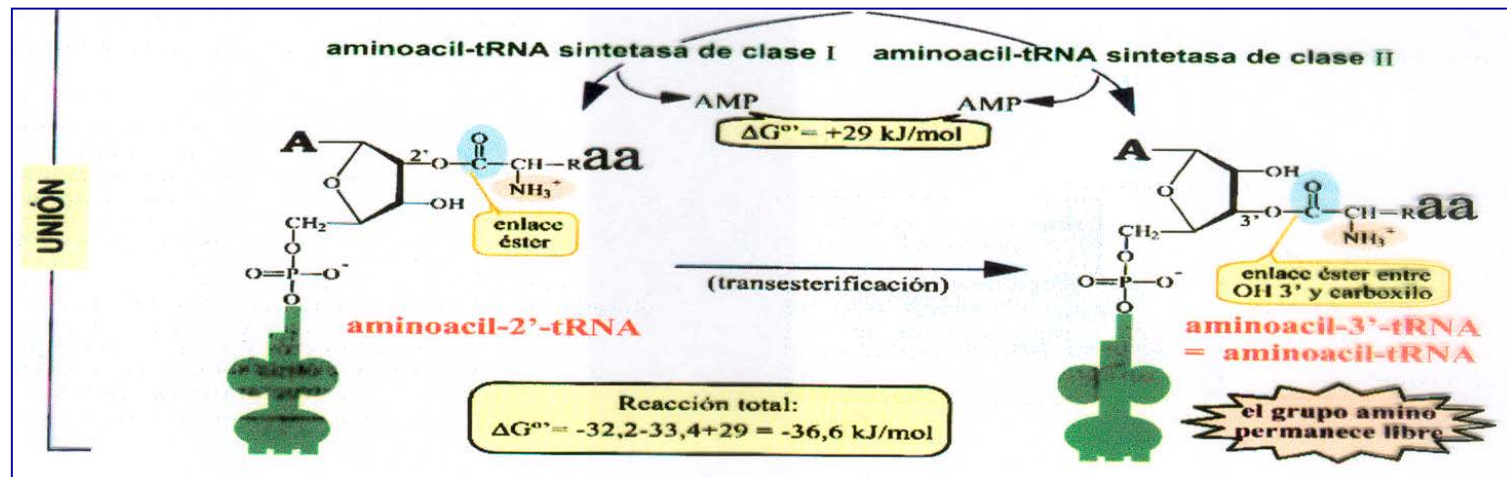
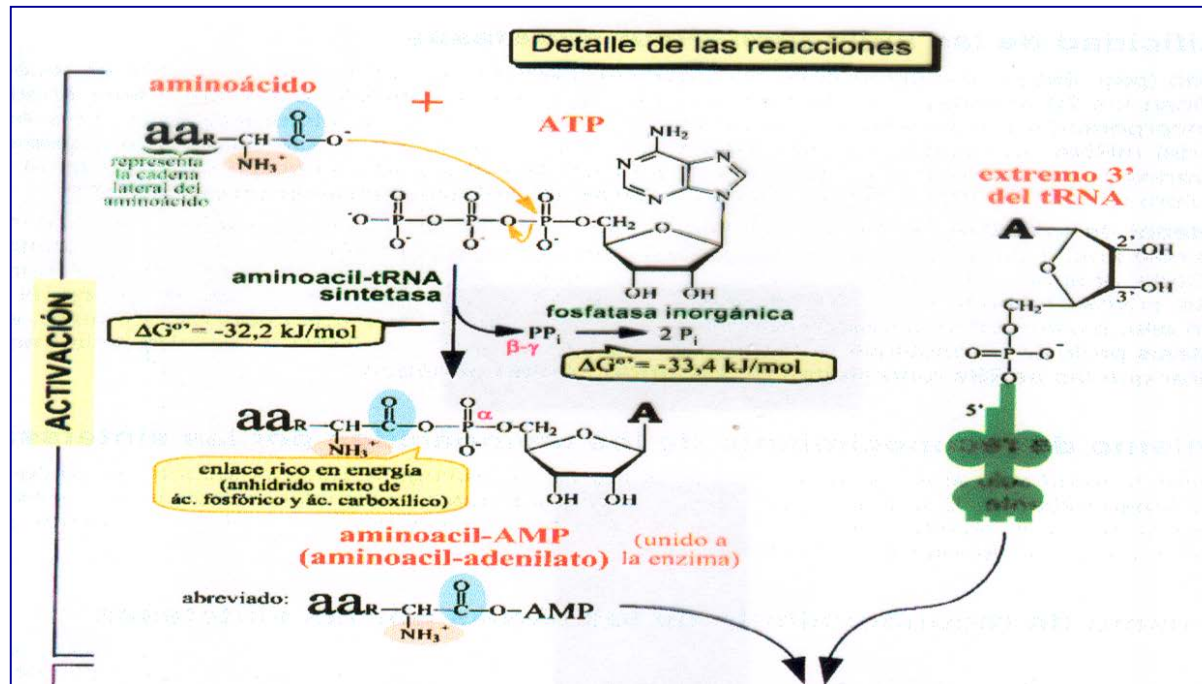
2. Transferència



Total

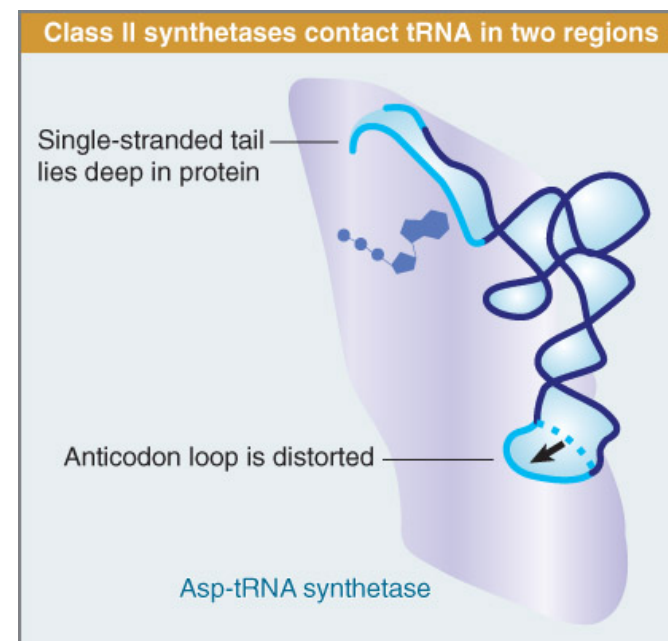
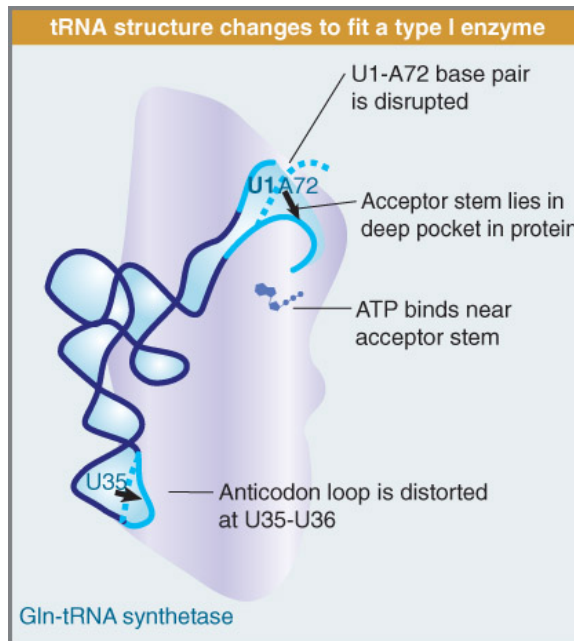


Aminoacil tRNA sintetases



Clases d' aminoacil tRNA sintetases

tipo de aaRS	grupo OH del tRNA	transesterificación posterior	estructura de la enzima	aminoácidos que reconocen
de clase I	2'	es necesaria	la mayoría monoméricas	Arg Cys Gln Glu Ile Leu Met Trp Tyr Val (10, los más grandes y polares)
de clase II	3'	no se requiere	la mayoría diméricas	Ala Asn Asp Gly His Lys Phe Pro Ser Thr (10, los más pequeños e hidrófobos)



Les dues classes interaccionen de forma diferent amb el tRNA, però aquest sempre es distorsiona.

Clases d' aminoacil tRNA sintetases

tipo de aaRS	grupo OH del tRNA	transesterificación posterior	estructura de la enzima	aminoácidos que reconocen
de clase I	2'	es necesaria	la mayoría monoméricas	Arg Cys Gln Glu Ile Leu Met Trp Tyr Val (10, los más grandes y polares)
de clase II	3'	no se requiere	la mayoría diméricas	Ala Asn Asp Gly His Lys Phe Pro Ser Thr (10, los más pequeños e hidrófobos)

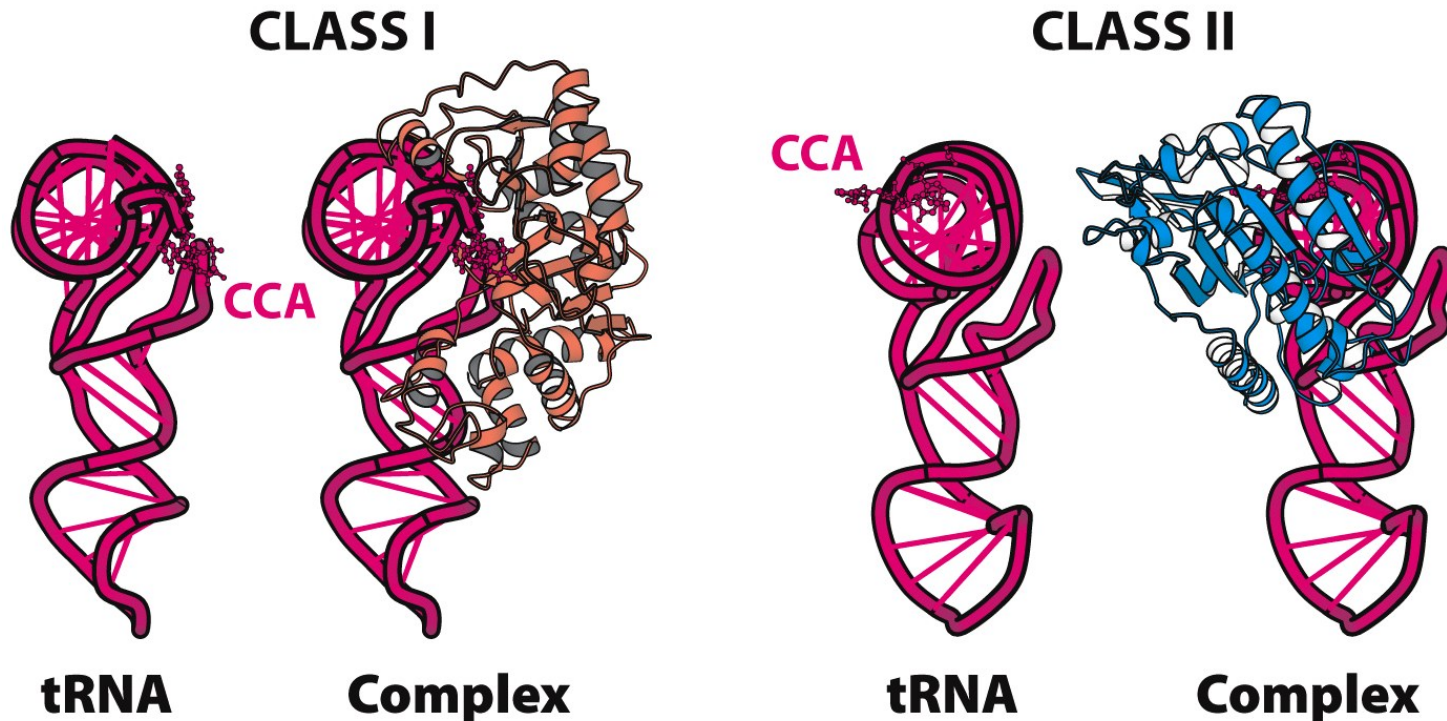
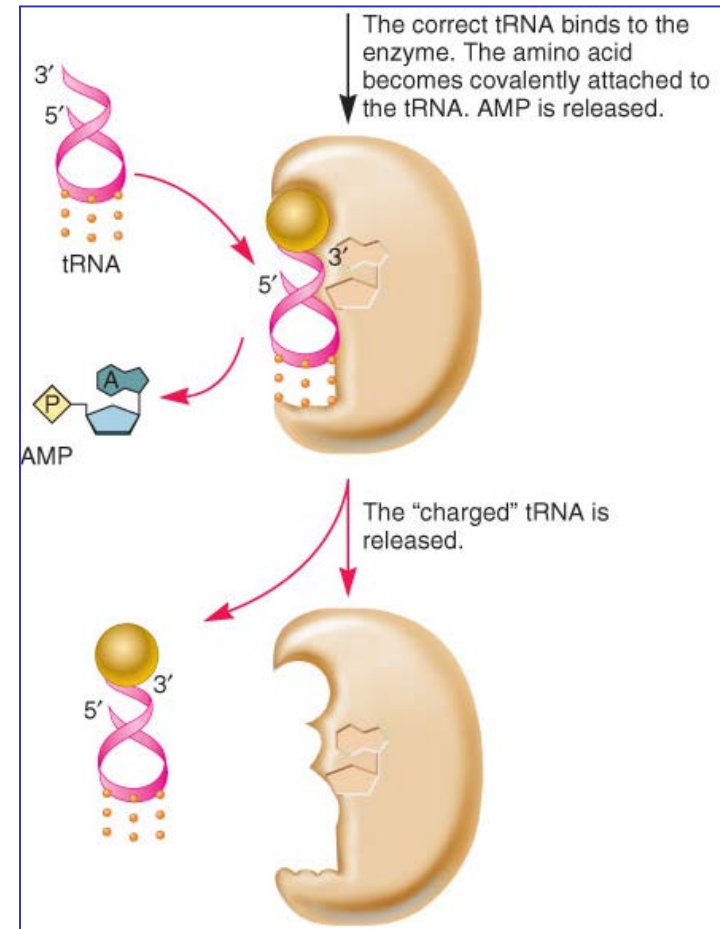
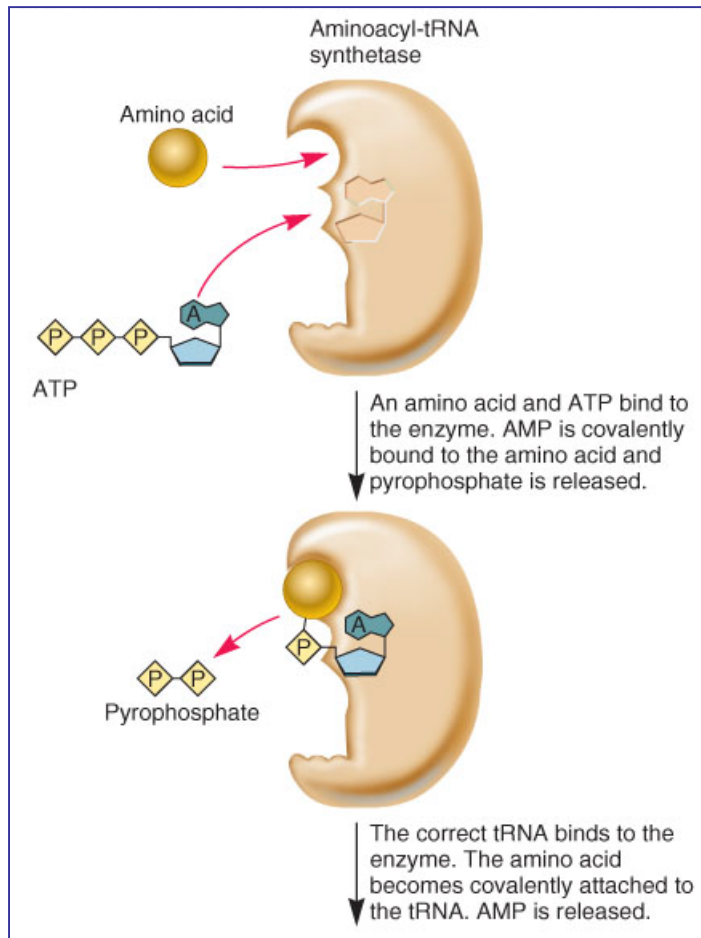


Figure 30.13
 Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

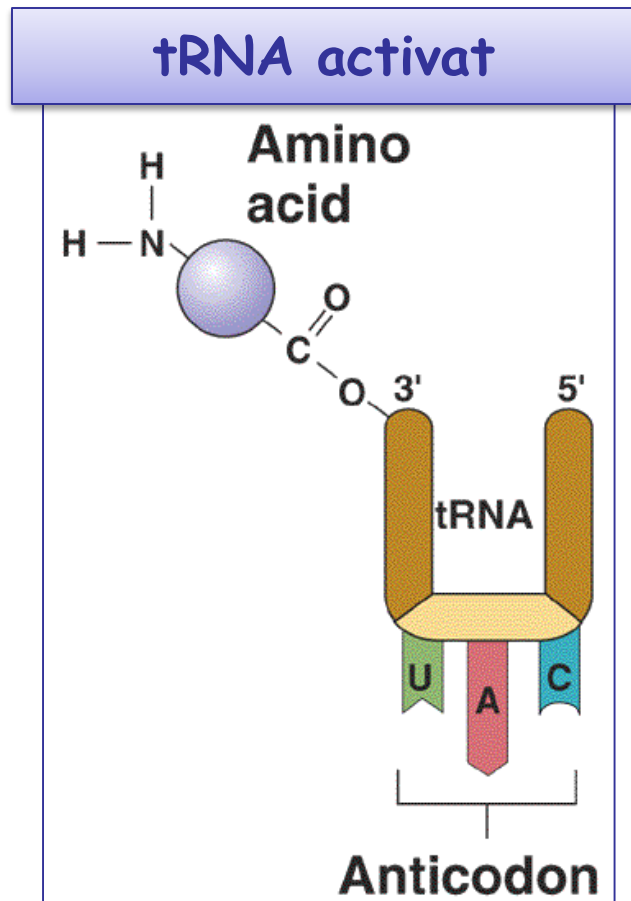
Aminoacil tRNA sintetases

- Hi ha **20 ARS**: Cadascuna reconeix un aminoàcid i tots els tRNAs isoacceptors.
- El segon codi genètic fa referència a les regles per a unió tRNA / aa.
- Les ARS són responsables d'aquesta especificitat.



Aminoacil tRNA sintetases

* Taxa d'error global 1/10.000



Reconeixement per l'ARS:

- L'aminoàcid
- Els tRNAs isoacceptors

Reconeixement del tRNA per l'ARS:

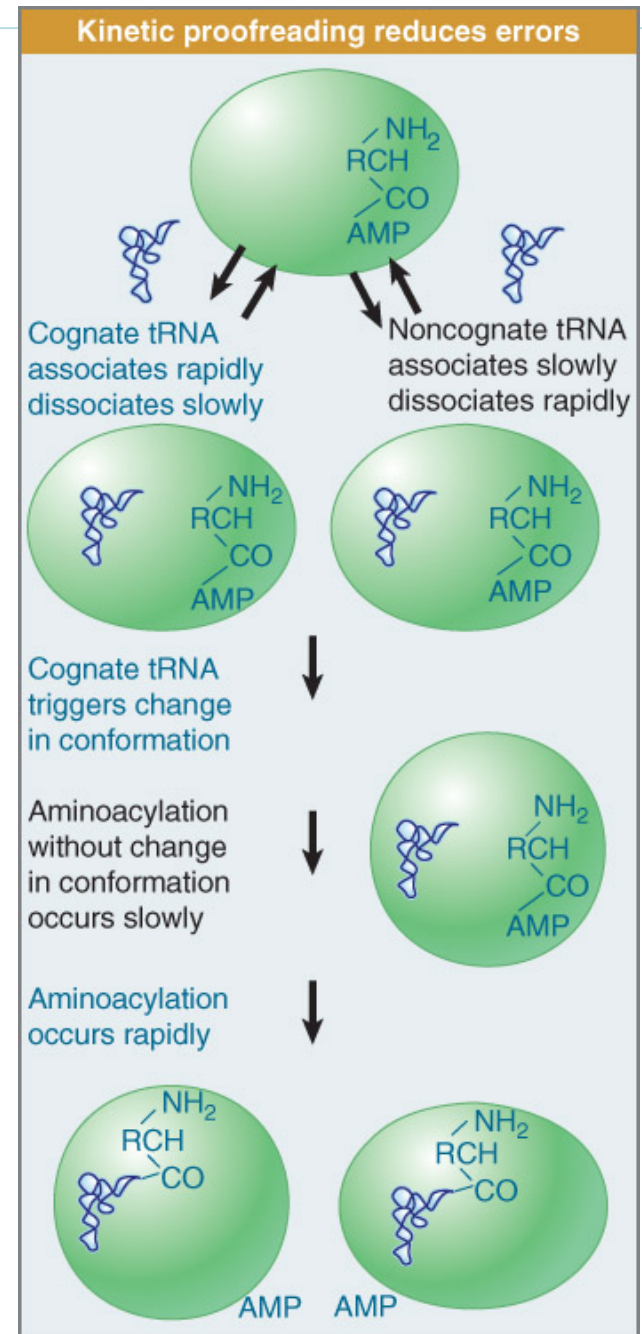
- Cada tRNA té un anticodó únic i només es pot carregar amb un aminoàcid.

Reconeixement dels tRNAs

Els tRNAs són molt semblants estructuralment.

Anàlisis de l'efecte de mutacions, entrecreuaments, estudis de difracció de raigs X... indiquen que les ARS poden fer servir diferents parts de la molècula en el reconeixement:

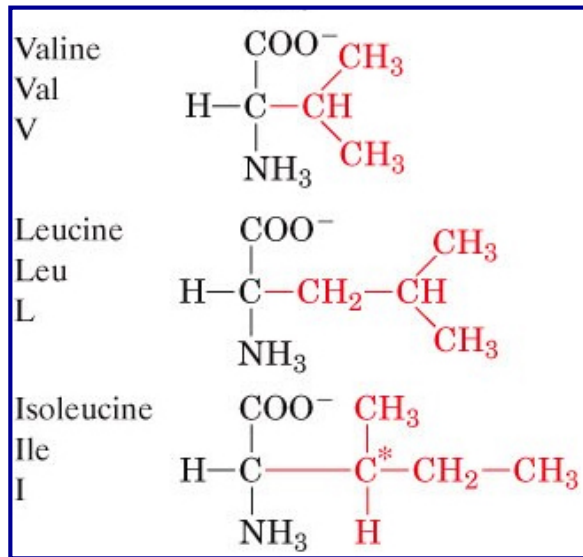
- L'anticodó
- La cara interna de la L
- El braç acceptor
- Més d'una d'aquestes regions



Reconeixement de l'aminoàcid

Exemple: Ile ARS d'*E. coli* (classe I)

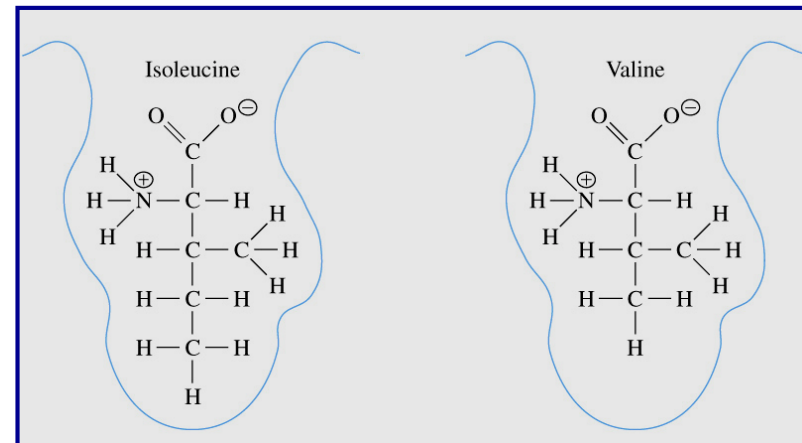
Transfereix al tRNA^{Ile} 40.000-60000 Ile per cada Val



- Grandària del centre actiu:
Leu no cap, Val sí

Errors are controlled at each stage

Step	Frequency of Error
Activation of valine to Val-AMP ^{Ile}	1/225
Release of Val-tRNA	1/270
Overall rate of error	$1/225 \times 1/270 = 1/60,000$



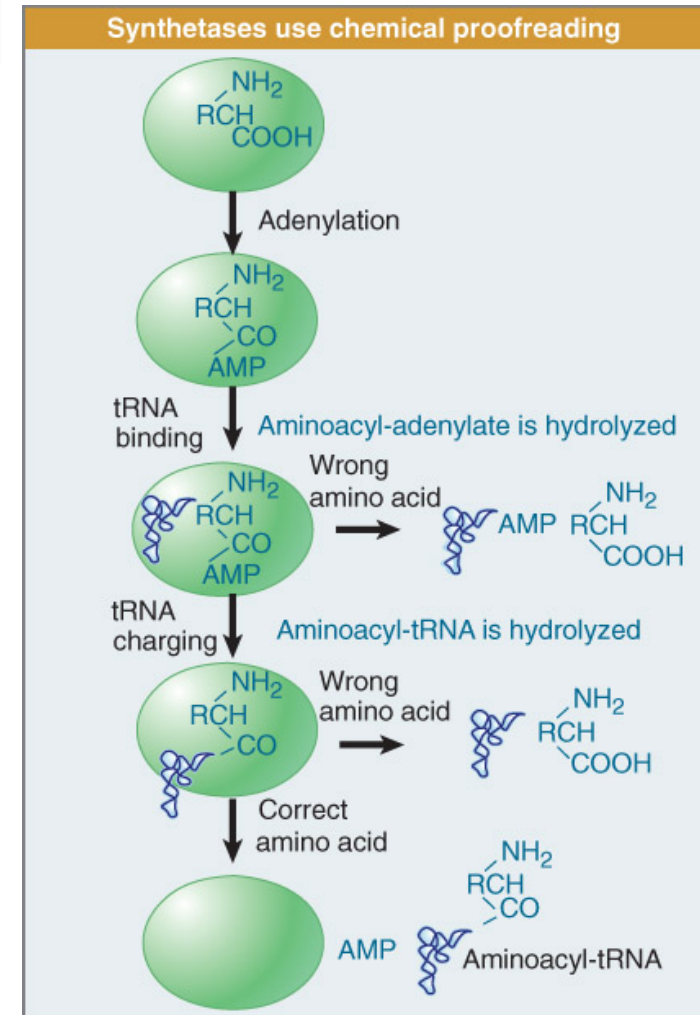
Reconeixement de l'aminoàcid

Exemple: Ile ARS d'*E. coli* (classe I)

- Diferències insuficients per a explicar el grau de discriminació en base a la unió al centre actiu:

Energia lliure d'unió major per a Ile, però discriminació per un factor només de 100.

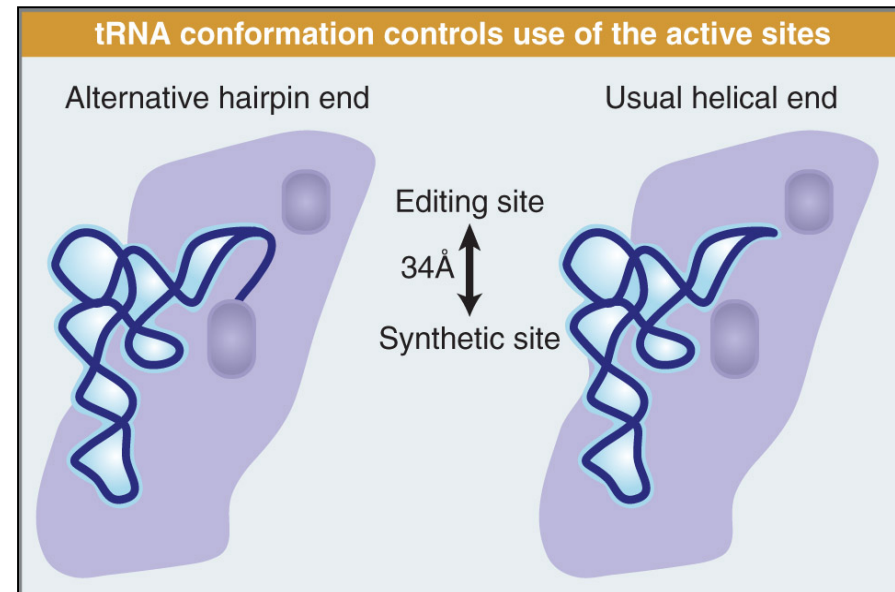
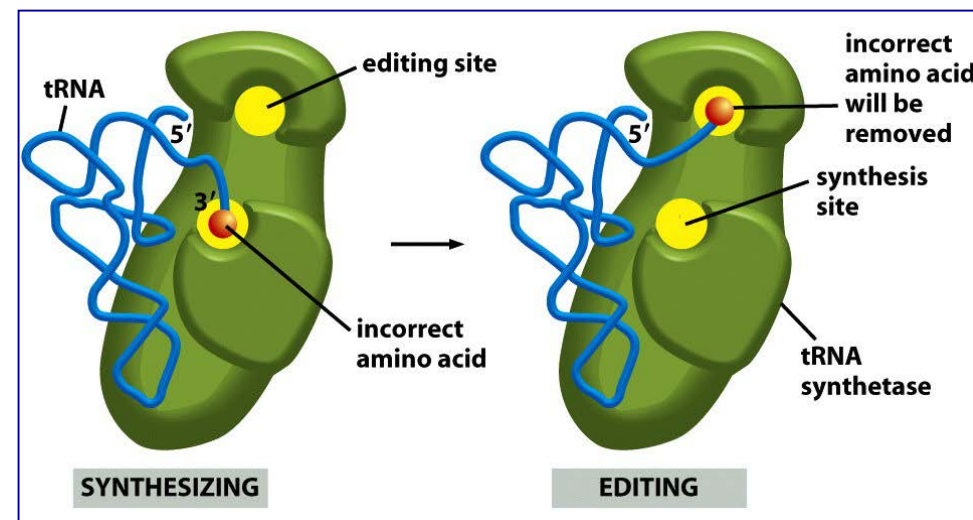
Es demostrà que Ile ARS, en presència de tRNA^{Ile} catalitza la hidròlisi de



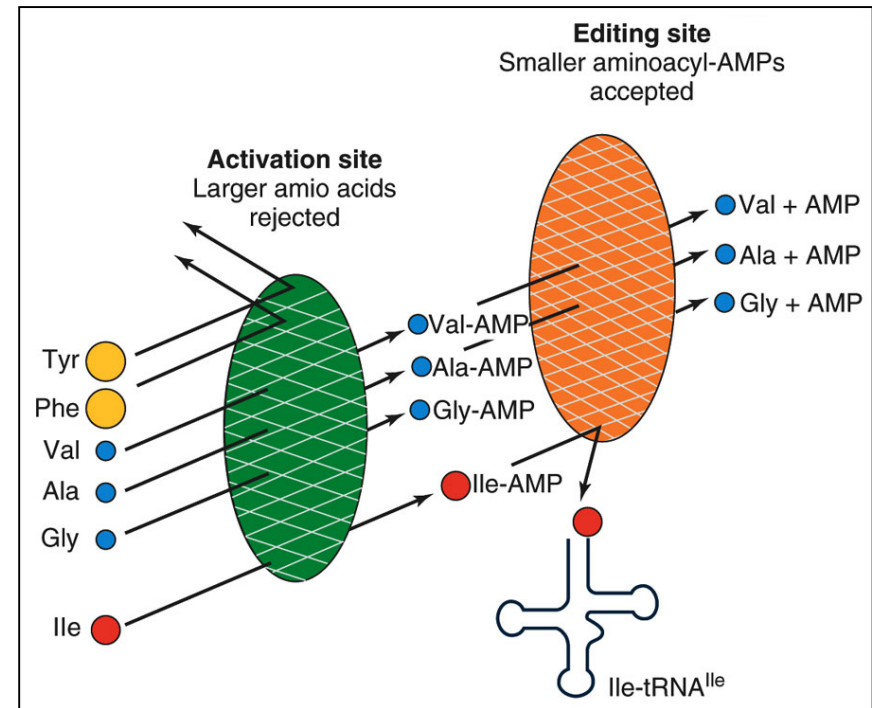
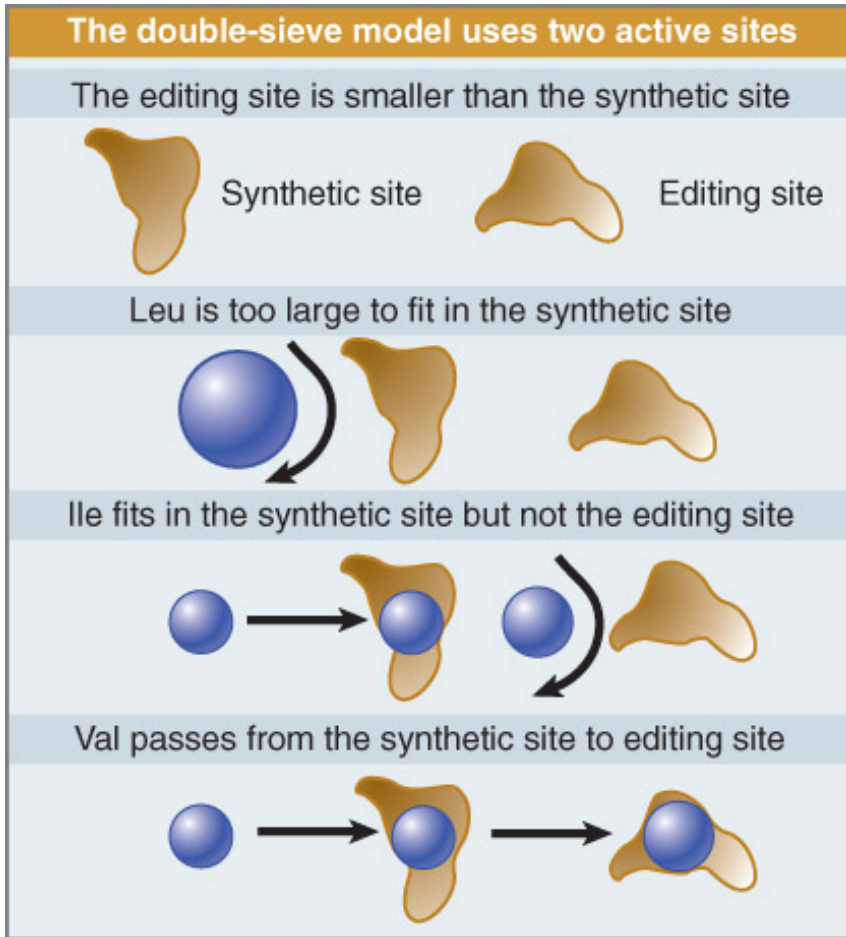
Reconeixement de l'aminoàcid

Exemple: Ile ARS d'*E. coli* (classe I)

- En aquest procés intervé un altre lloc catalític, el lloc de correcció.
- La selectivitat global depèn de selectivitat de la síntesi selectivitat de la correcció
- Preu de l'alta fidelitat: **ATP**

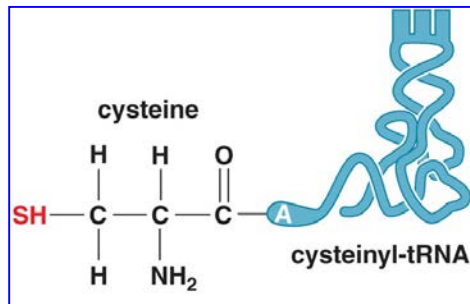


Reconeixement de l'aminoàcid



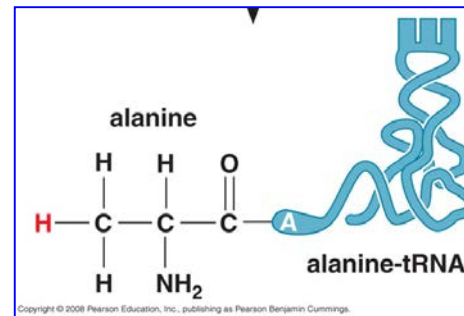
Reconeixement de l'aminoàcid

- Si la selectivitat per l'aminoàcid corresponent es adequada, no té funcions de correcció (p. ex., ARS Gly, ARS Tyr)
- L'aminoàcid no juga cap paper en el reconeixement del codó per l'aa-tRNA: demostració bioquímica del fet que el ribosoma no pot discriminar entre tRNAs carregats correctament o incorrectament



→

**Reducció
química**



**Apareixerà Ala en
resposta al triplet
que especifica Cys**

Excepcions a la regla d'una ARS per aminoàcid

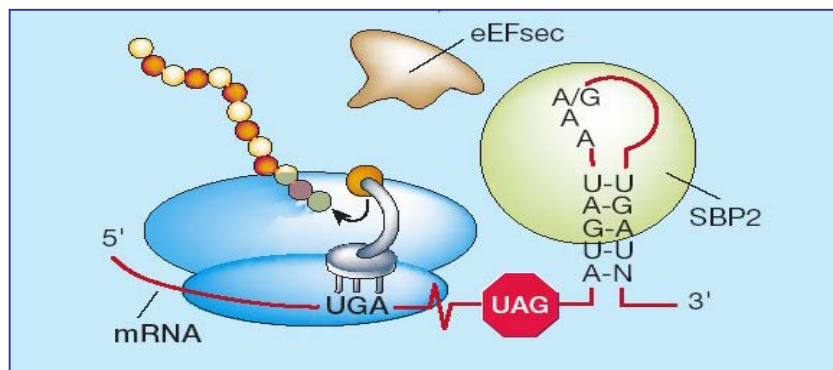
- N-formilmetionina (en bacteris i orgànuls)



- Glutamina (en alguns bacteris, arquees i orgànuls)

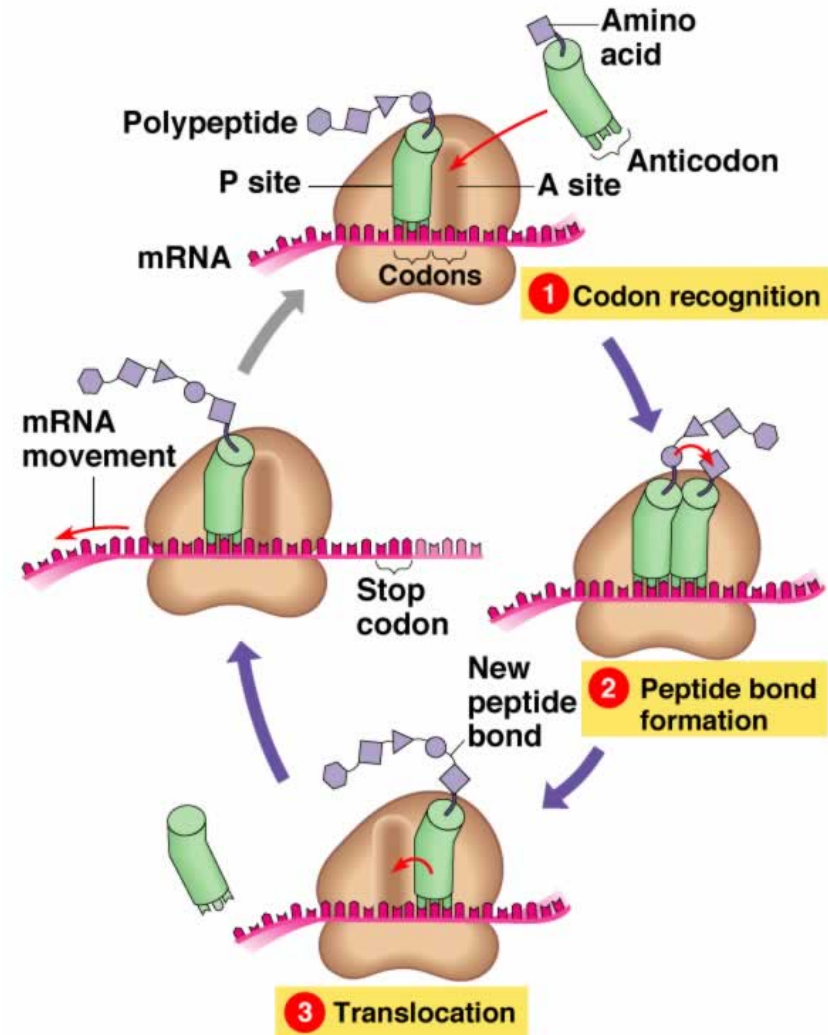


- Selenocisteïna



Tema 9

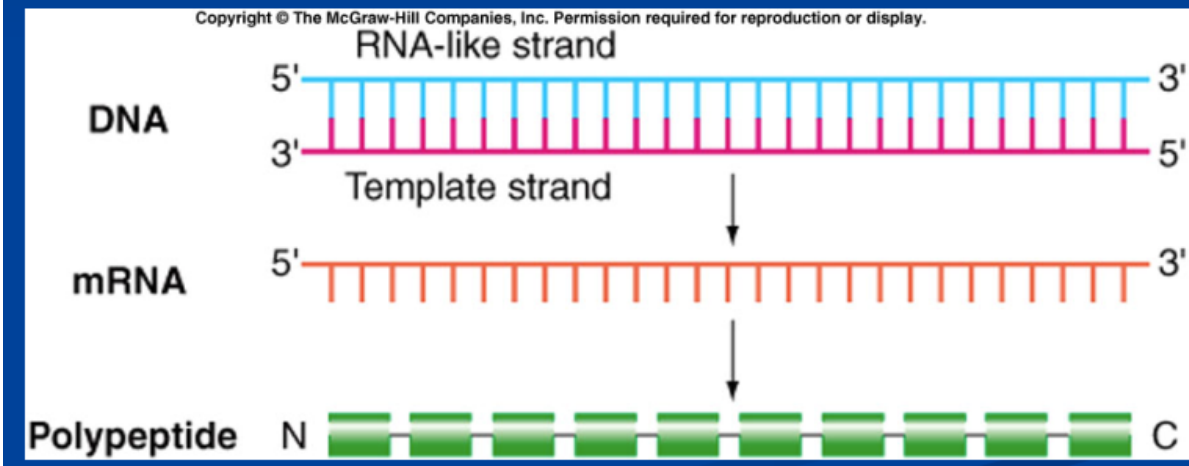
El procés de traducció.
 Cicle del ribosoma.
 Etapes i factors proteics implicats; comparació entre procariotes i eucariotes.
 Supressió de la parada.
 Inhibidors de la traducció



El procés de traducció

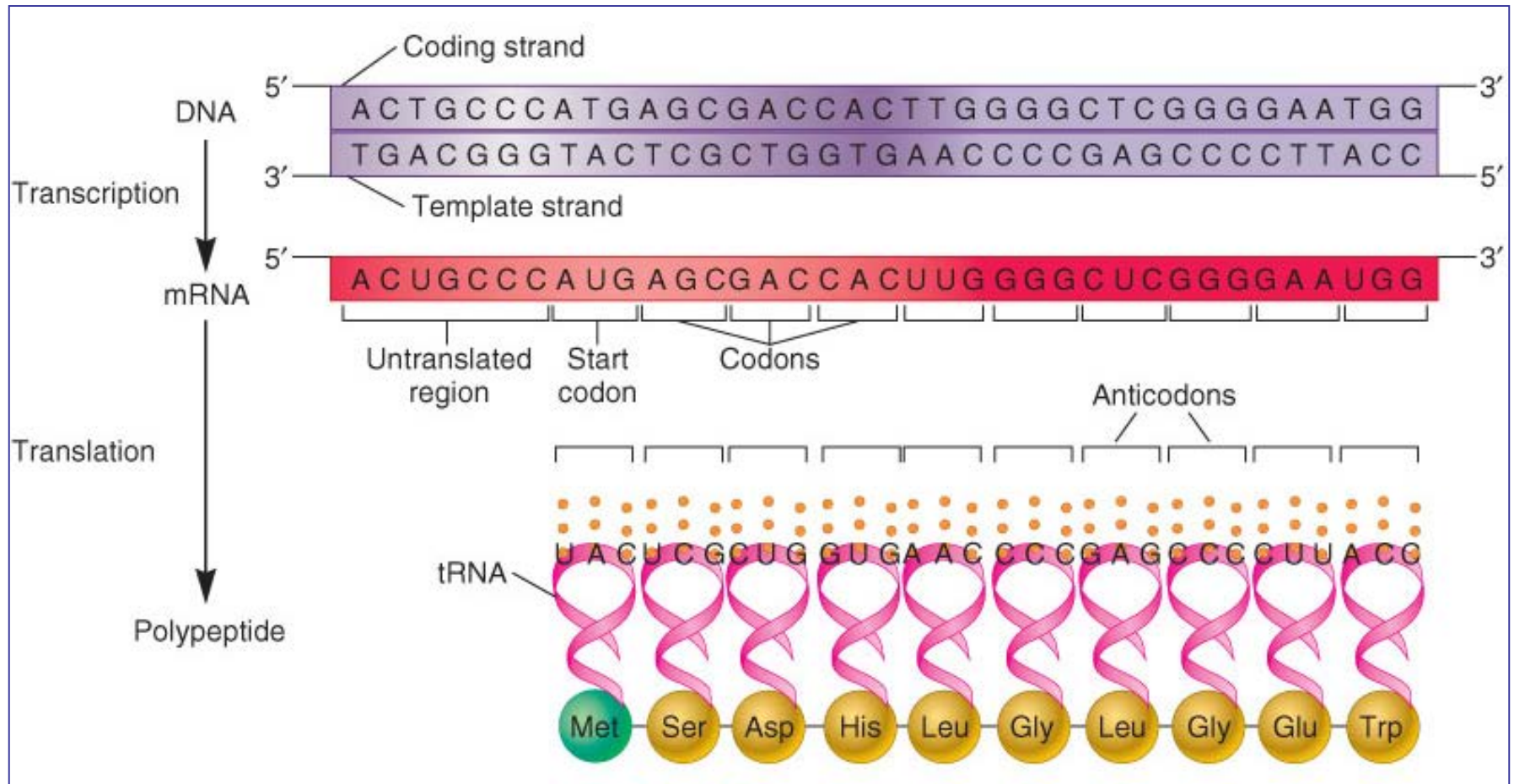
- Direcció 5' -3' de l'mRNA es correspon amb la direcció Nt-Ct del polipèptid.

- **5' to 3' direction of mRNA corresponds to N-terminal-to-C-terminal direction of polypeptide**
 - One strand of DNA is a template
 - The other is an RNA-like strand
- **Nonsense codons cause termination of a polypeptide chain**
– UAA (ocher), UAG (amber), and UGA (opal)



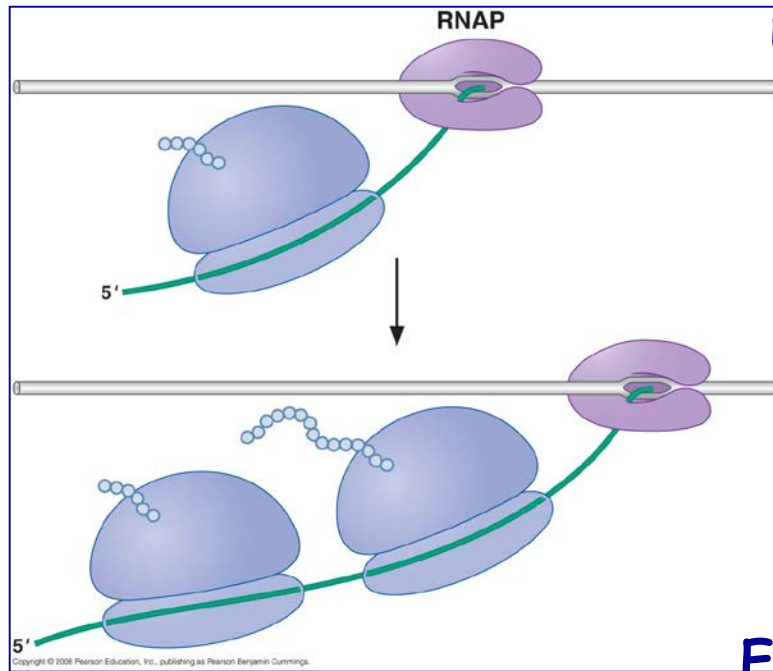
El procés de traducció

▪ **Codons d'aturada (UAA, UAG i UGA) causen la terminació de la cadena polipeptídica.**

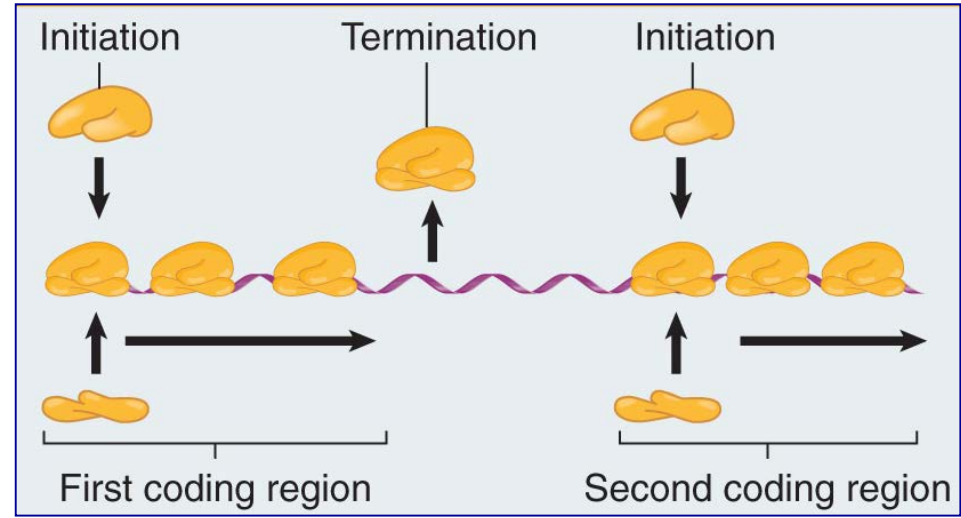


El procés de traducció

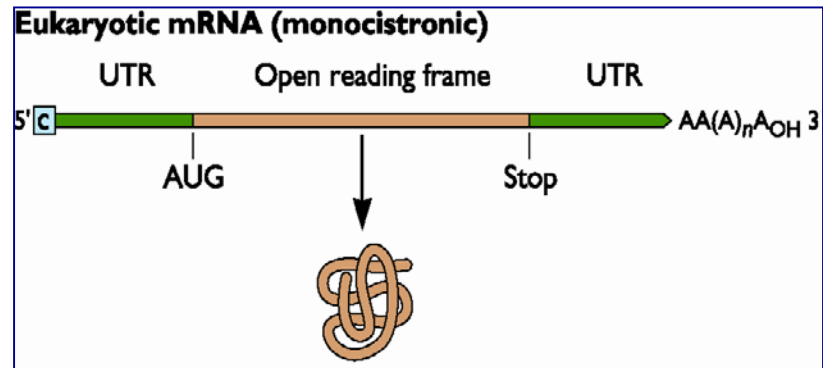
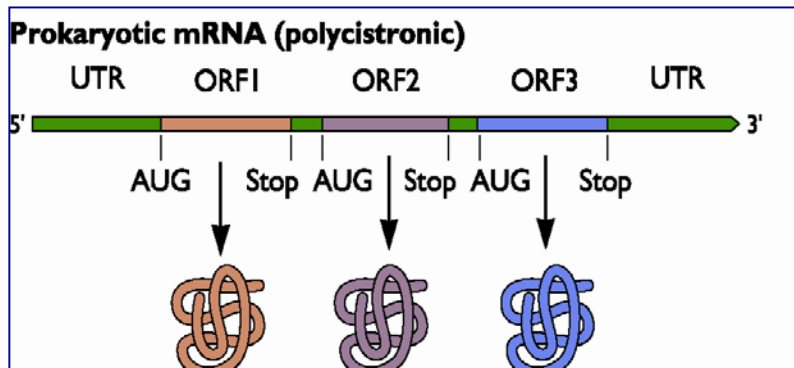
Procariotes



mRNAs policistrònics, Els cistrons inicien la traducció independentment

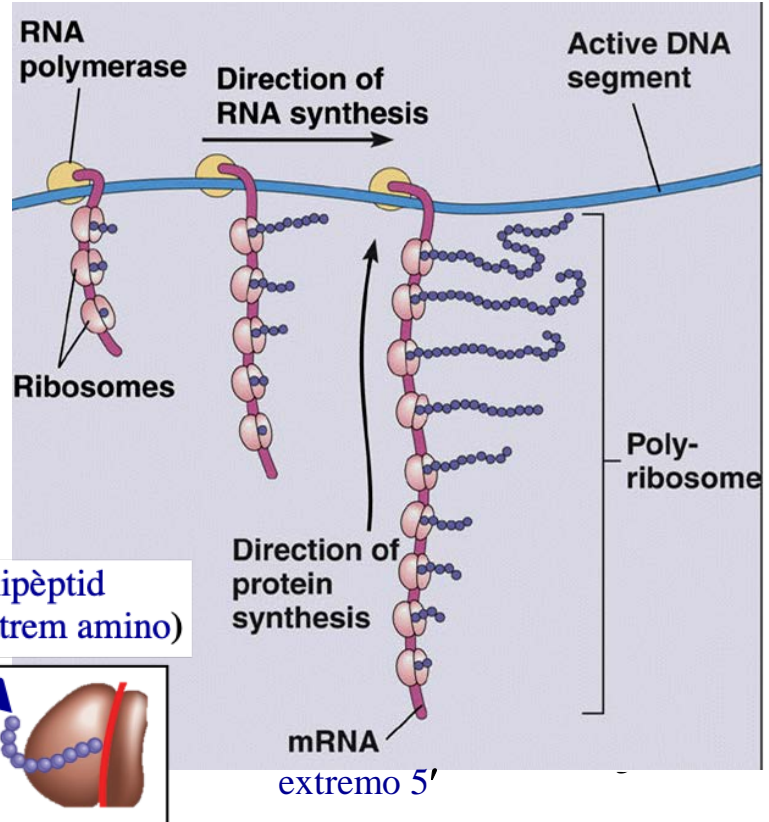
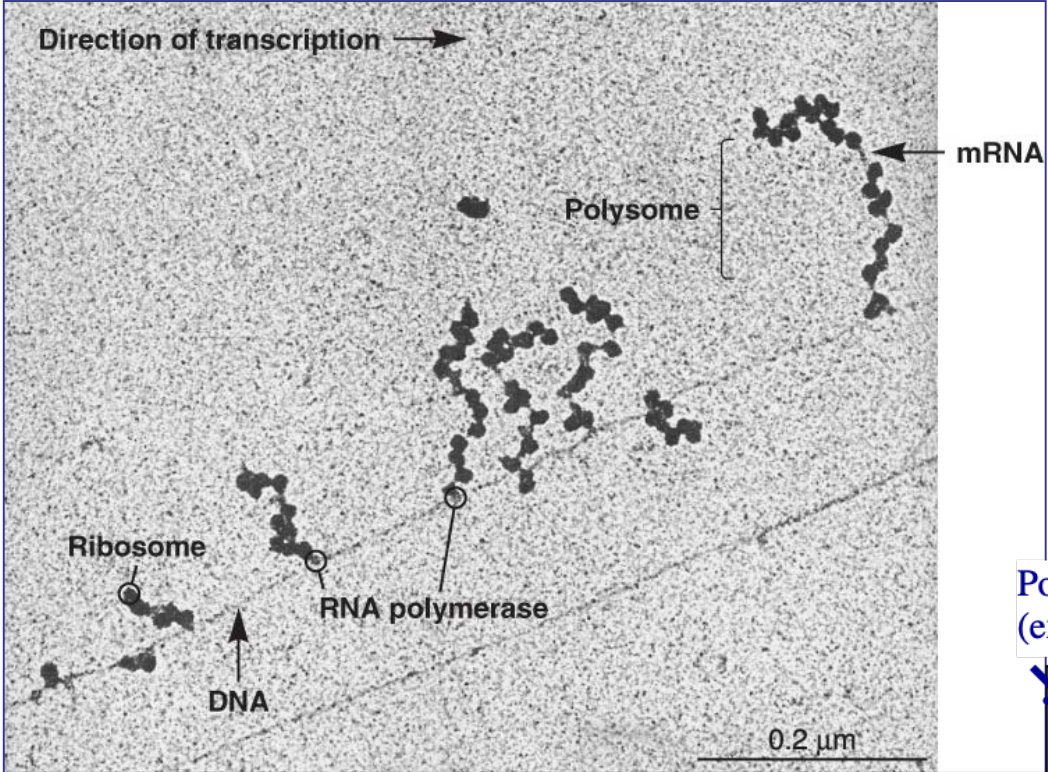
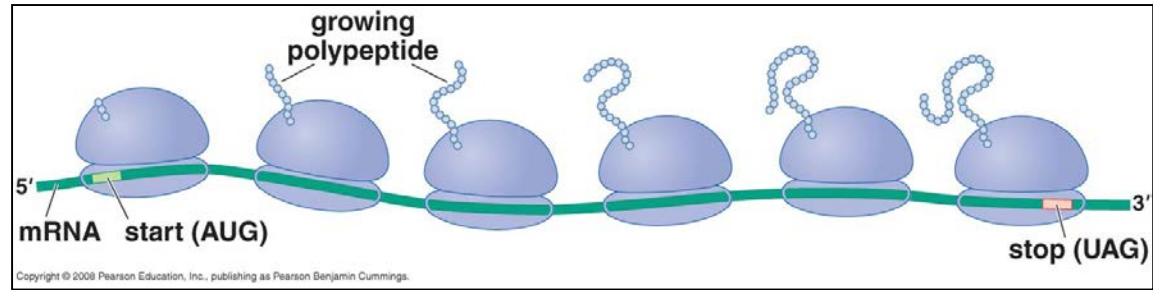


Eucariotes mRNAs normalment monocistrònics

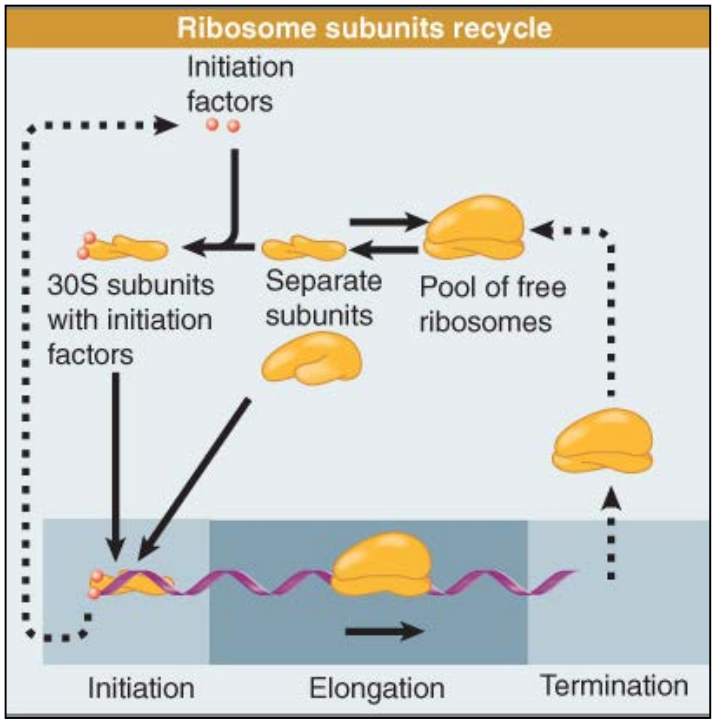
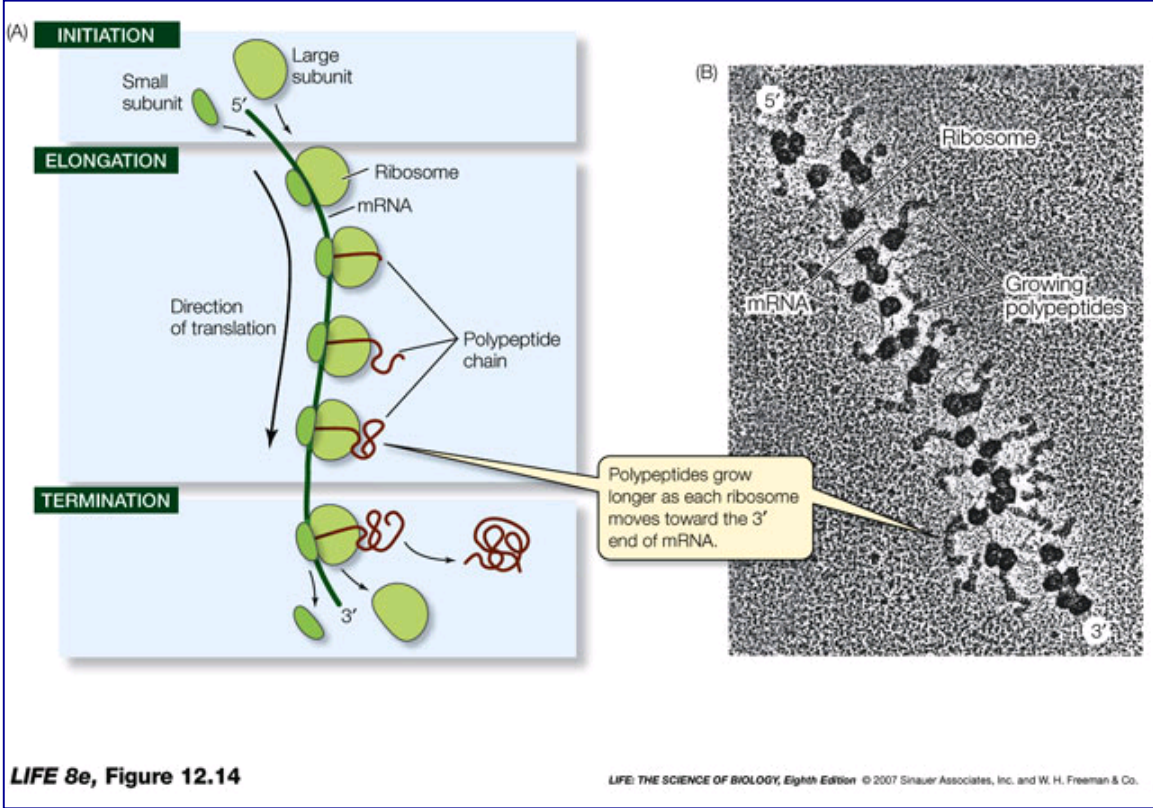


El procés de traducció

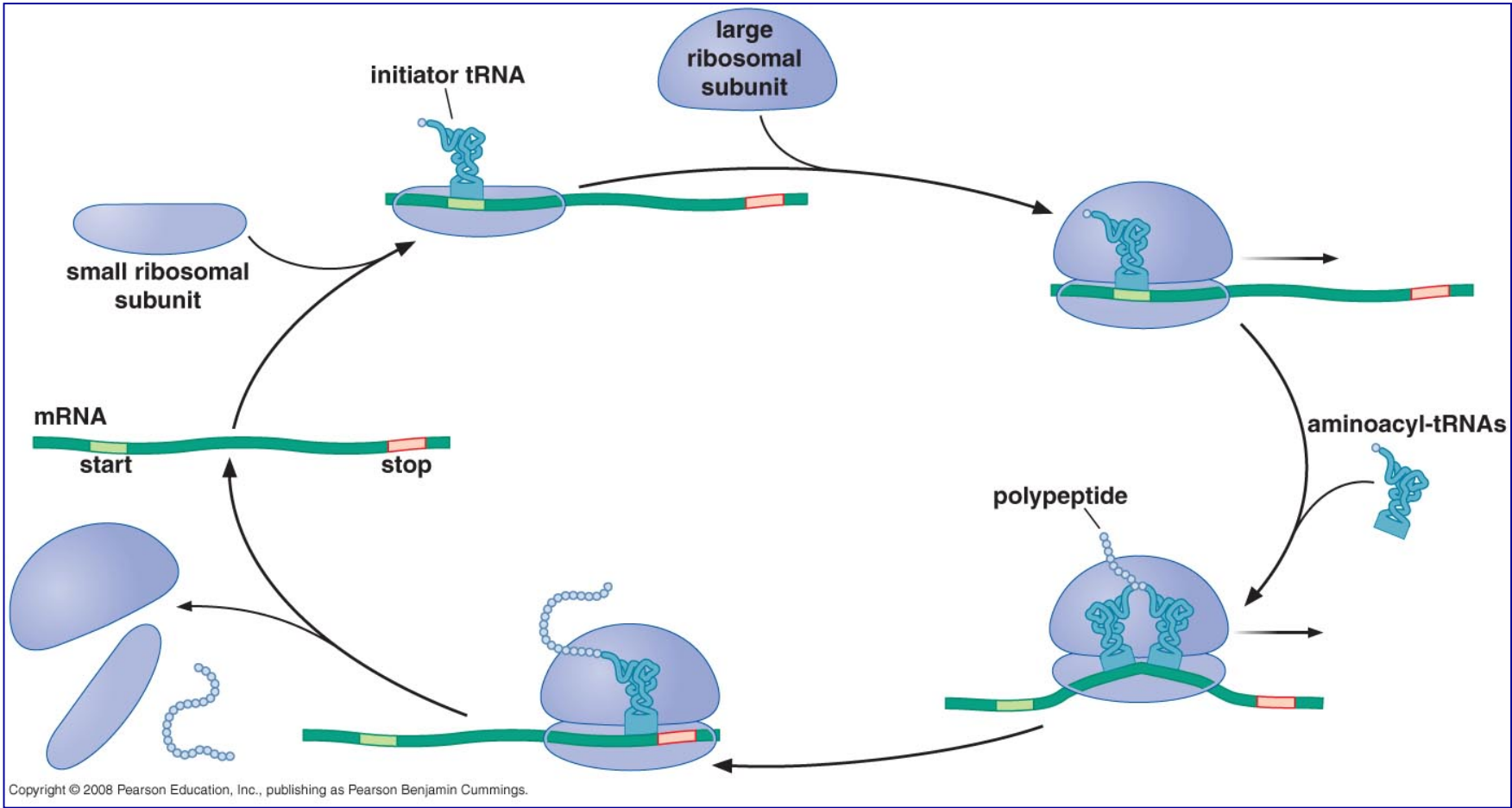
Alguns ribosomes poden traduir simultàniament un mRNA: Polisomes



El ciclo del ribosoma



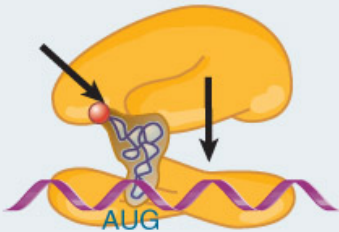
El ciclo del ribosoma



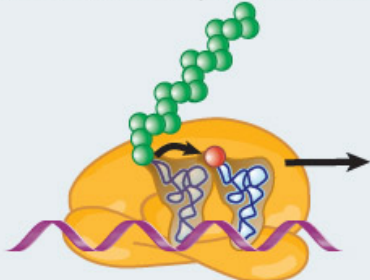
Etapes de la traducció

Protein synthesis has three stages

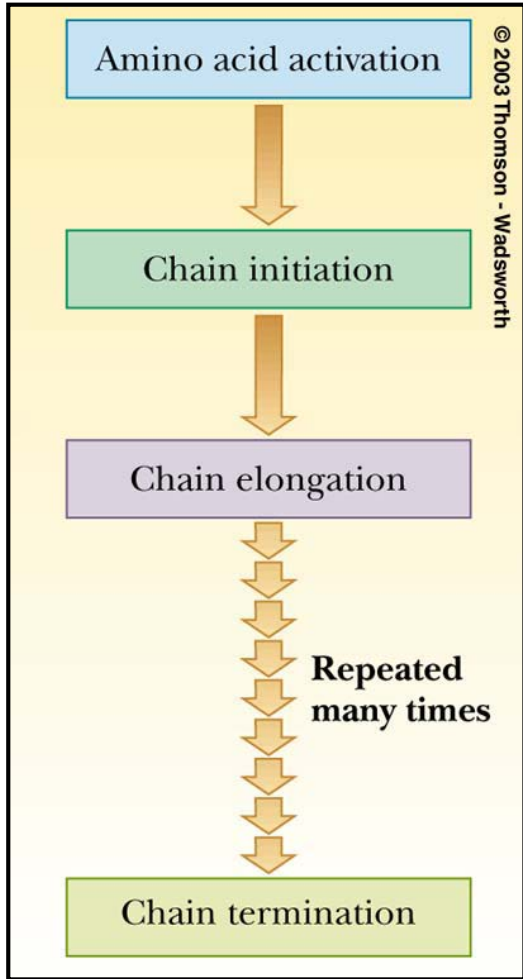
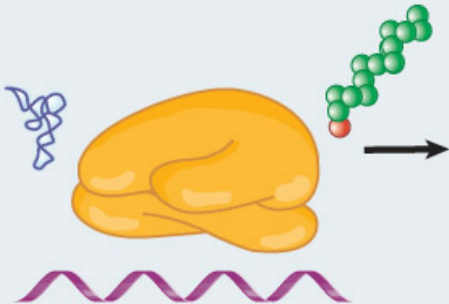
Initiation 30S subunit on mRNA binding site is joined by 50S subunit and aminoacyl-tRNA binds



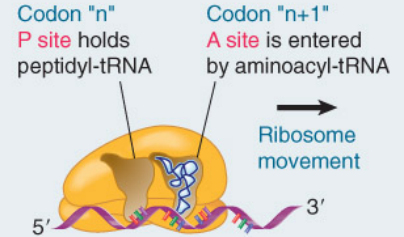
Elongation Ribosome moves along mRNA, extending protein by transfer from peptidyl-tRNA to aminoacyl-tRNA



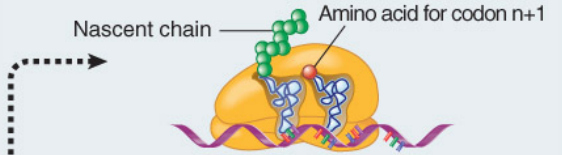
Termination Polypeptide chain is released from tRNA, and ribosome dissociates from mRNA



Aminoacylated tRNAs occupy the P and A sites



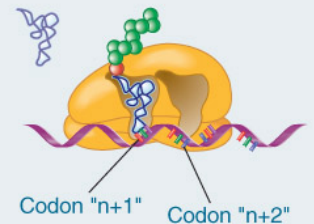
1 Before peptide bond formation peptidyl-tRNA occupies P site; aminoacyl-tRNA occupies A site



2 Peptide bond formation polypeptide is transferred from peptidyl-tRNA in P site to aminoacyl-tRNA in A site

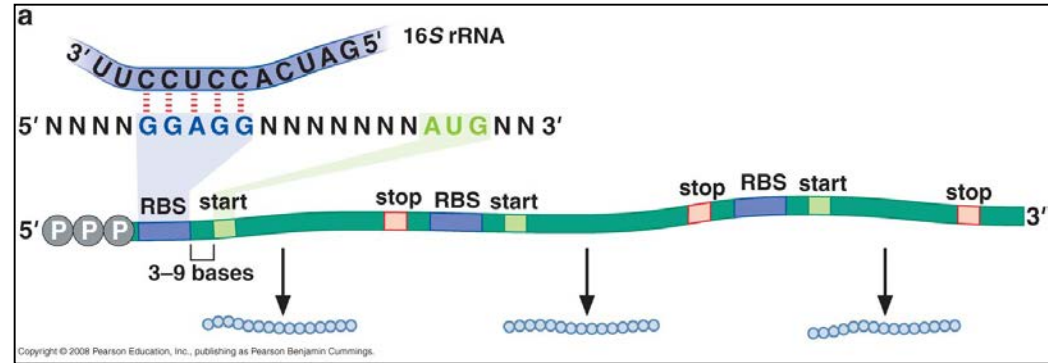
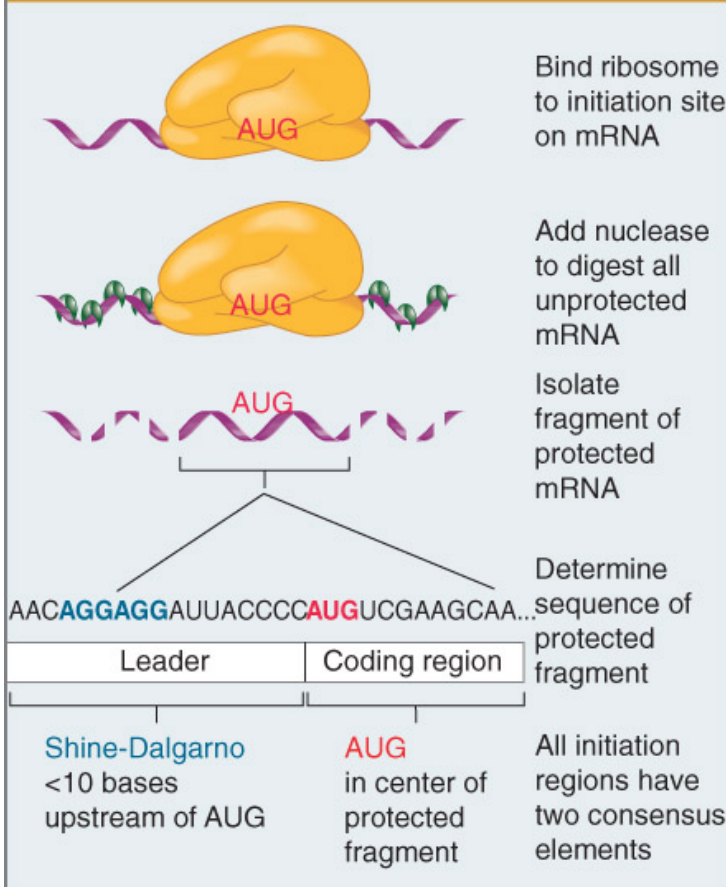


3 Translocation moves ribosome one codon; places peptidyl-tRNA in P site; deacylated tRNA leaves via E site; A site is empty for next aa-tRNA



Començament en procariotes. Lloc d'inici

The AUG is preceded by a Shine-Dalgarno sequence



Seqüència de Shine-Dalgarno

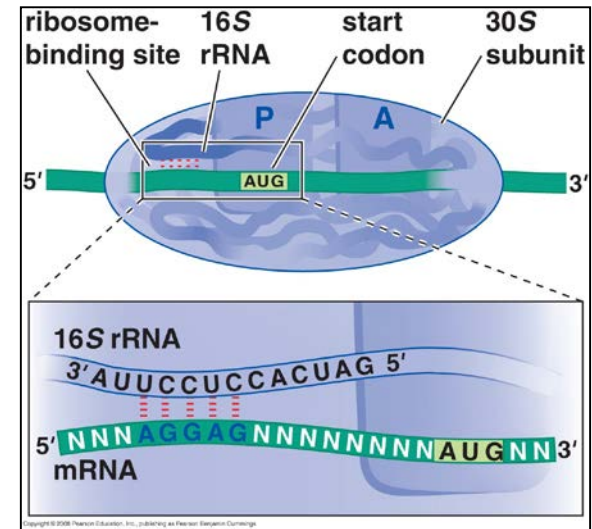
5'	AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC	3'	<i>E. coli trpA</i>
	UUUGGAUGGAGUGAAACGAUGGCGAUUGCA		<i>E. coli araB</i>
	GGUAAC CAGGUAACAACCAUGCGAGUGUUG		<i>E. coli thrA</i>
	CAAUUCAGGGUGGUGAUGUGAAACCA GUA		<i>E. coli lacI</i>
	AAUCUUGGAGGCCUUUUUAUGGUUCGUUCU		φX174 phage A protein
	UAACUAAGGAUGAAUGCAUGUCUAAGACA		Qβ phage replicase
	UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU		R17 phage A protein
	AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC		λ phage <i>cro</i>
			Pairs with 16S rRNA Pairs with initiator tRNA

Els mRNAs de procariotes tenen un lloc d'unió del ribosoma que recluta la maquinària de traducció:
SEQÜÈNCIA DE SHINE-DALGARNO

Començament en procarïotes. Lloc d'inici

Reconeixement de l'AUG d'inici:

Seqüència de Shine-Dalgarno, complementària a l'extrem 3' de l'rRNA 16S



<i>E. coli trpA</i>	(5') A G C A C G A G G G G A A A U C U G A U G G A A C G C U A C (3')
<i>E. coli araB</i>	U U U G G A U G G A G U G A A A C G A U G G C G A U U G C A
<i>E. coli lacI</i>	C A A U U C A G G G U G G U G A A U G U G A A A C C A G U A
ϕ X174 phage A protein	A A U C U U G G A G G C U U U U U U A U G G U U C G U U C U
λ phage <i>cro</i>	A U G U A C U A A G G A G G U U G U A U G G A A C A A C G C

Shine-Dalgarno sequence; pairs with 16S rRNA
Initiation codon; pairs with fMet-tRNA^{fMet}

(a)

3'OH

3'End of 16S rRNA

A U C C U C C A

|||

|||

|||

|||

|||

|||

|||

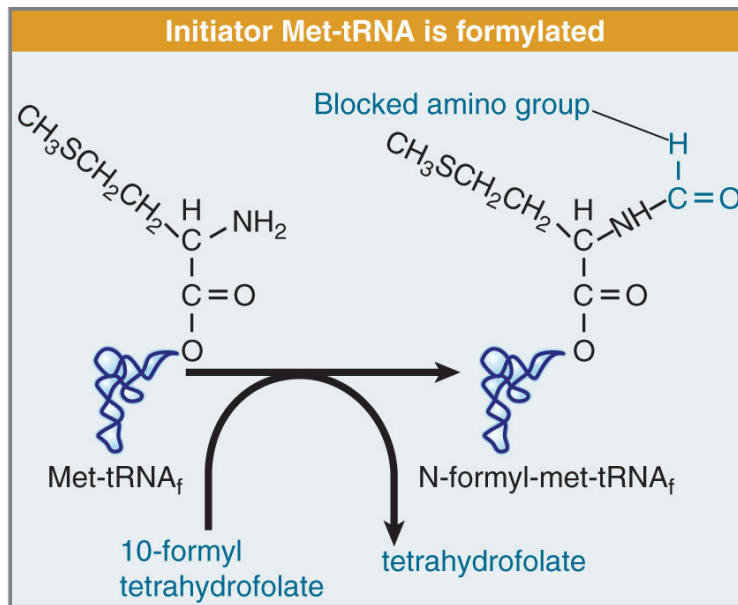
G A U C C U A G G A G G U U U G A C C U A U G C G A G C U U U U A G U (3')

(b)

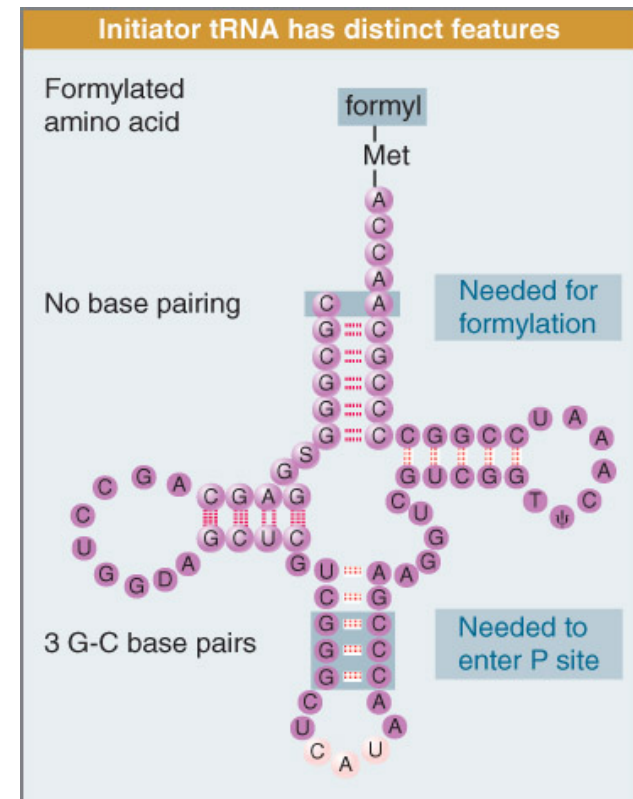
Inici en procariotes

Requereix un tRNA iniciador que reconeix AUG (Met)
que reconeix AUG (Met)

- El tRNA iniciador en procariotes (tRNA_f) es carrega amb Met, que es transforma en N-formil-Met. Presenta característiques estructurals úniques

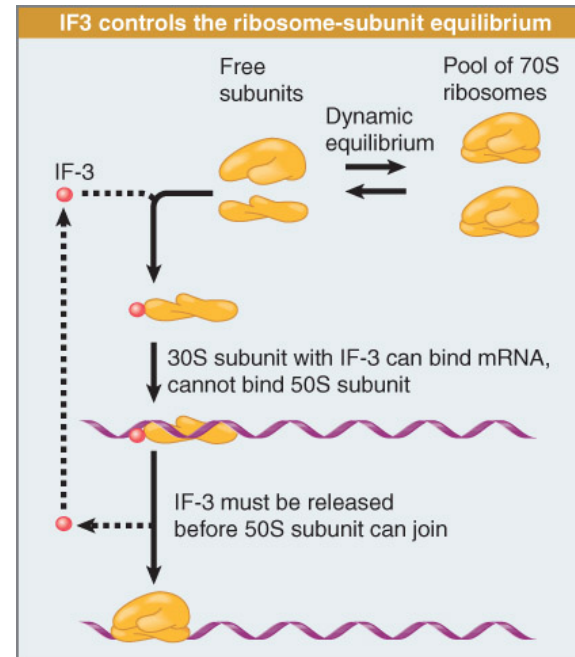
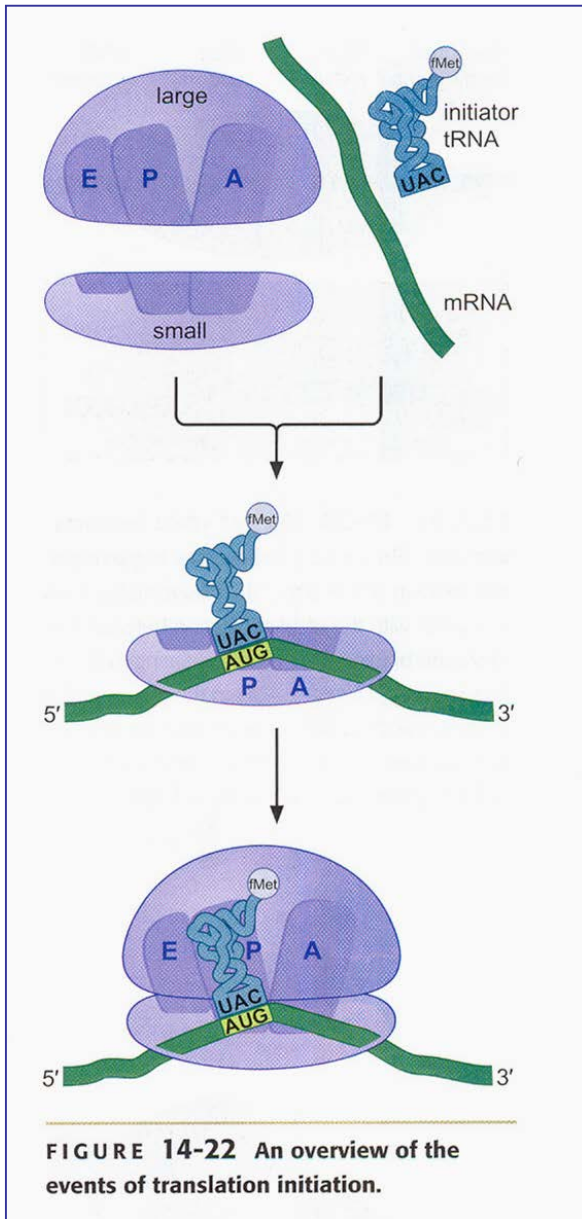


- Un altre tRNA (elongador) reconeix els codons AUG interns: tRNA^{Met} (uneix Met que no és formilada)



- S'uneix al lloc P
- Només a la subunitat menuda

Inici en procariotes



Tres factors proteics: IF1, IF2, IF3
IF-3 estabilitza la subunitat 30S lliure i controla l'equilibri entre els diferents estats del ribosoma.

Inici en procarïotes

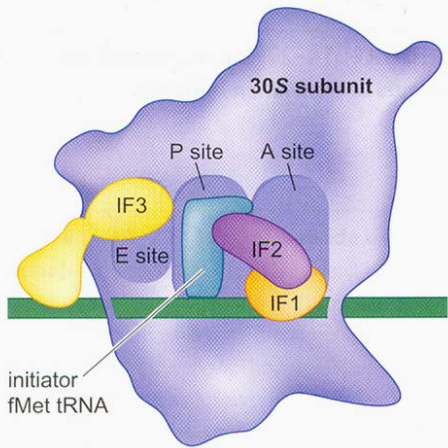
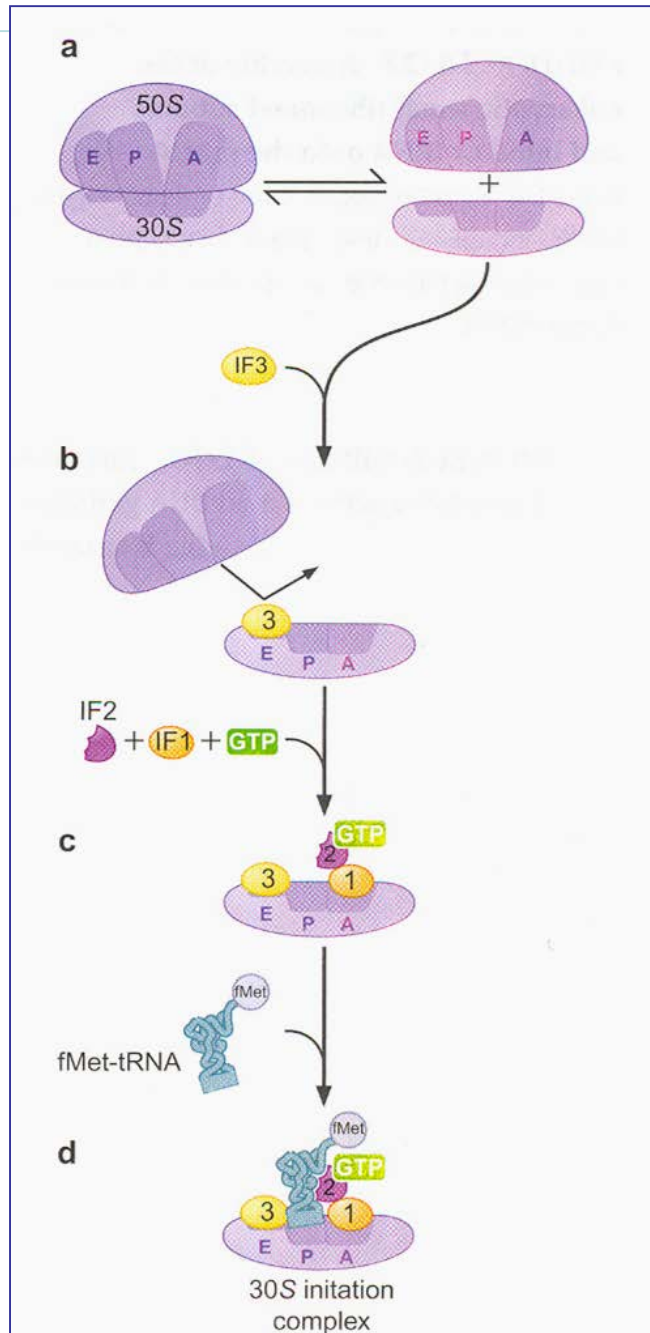
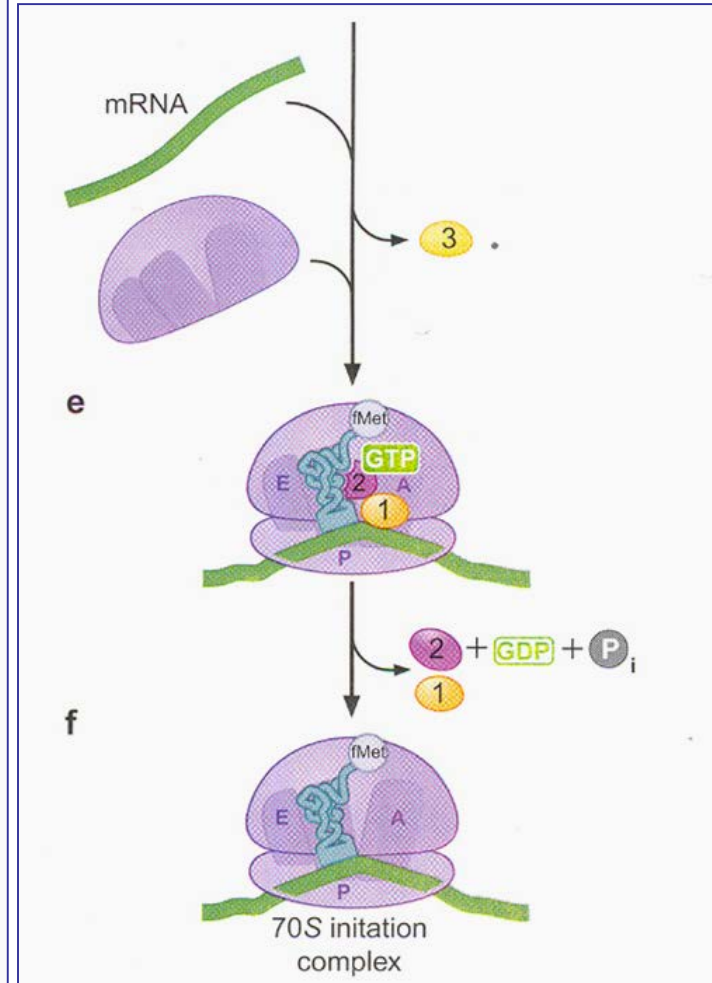


FIGURE 14-25 A model of initiation factor binding to the 30S ribosomal subunit. The estimated location of IF1, IF2,



•**IF-2** s'uneix a un tRNA iniciador especial i controla la seua entrada al lloc P del ribosoma. Uneix GTP



•Els IFs es dissocïen del complex d'inici per tal que s'unisca la subunitat 50S (consum d'una molècula de GTP)

•**IF-1** estabilitza el complex d'inici. Reconeix el lloc A parcial i impedeix la unió prematura de l'aa-tRNA i la unió de 30S a 50S

Inici en procarïotes

El cicle de les proteïnes d'unió a GTP durant la traducció

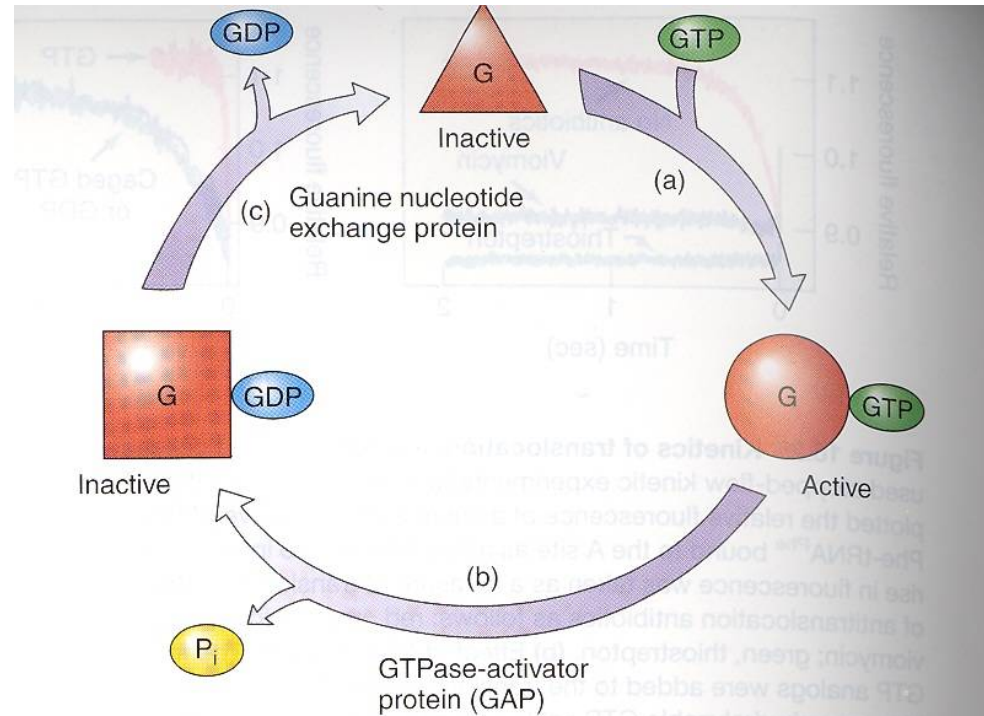


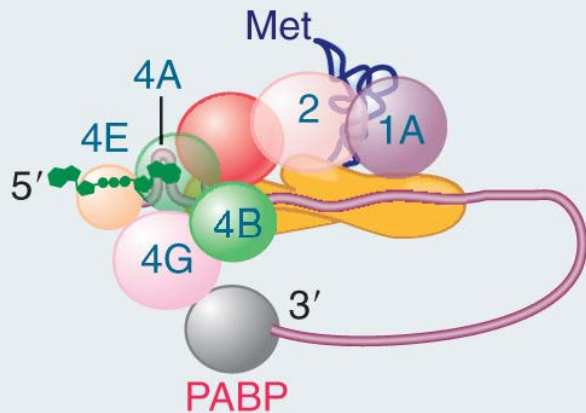
Figure 18.26 Generalized G protein cycle. The G protein at top (red triangle) is in the unbound state with neither GDP nor GTP bound. This state is normally short-lived. **(a)** GTP binds to the unbound G protein, changing its conformation (represented by the change from triangular to circular shape), and thereby activating it. **(b)** A GTPase-activator protein (GAP) stimulates the intrinsic GTPase activity of the G protein, causing it to hydrolyze its GTP to GDP. This results in another conformational change, represented by the change to square shape, which inactivates the G protein. **(c)** A guanine nucleotide exchange protein removes the GDP from the G protein, changing it back to the original unbound state, which is ready to accept another GTP.

Inici en eucariotes

Participació d'un major nombre de factors

- Unió del primer Met-tRNA_i a la subunitat menuda en allò que serà el lloc P
- mRNA seleccionat per reconeixement de la gorra 5'

43S complex binds to mRNA-factor complex



Possible interactions:

eIF4G binds to eIF3

mRNA binds eIF4G, eIF3, and 40S subunit

eIF4F: eIF4G; eIF4E; eIF4A; eIF4B

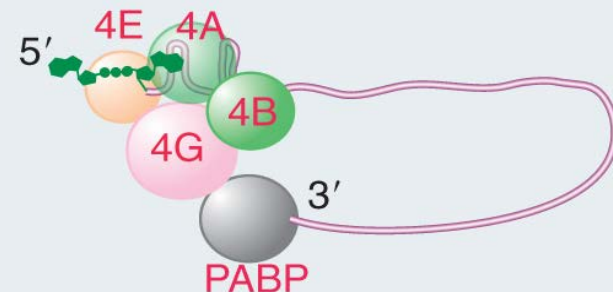
Initiation factors bind the 5' end of mRNA

eIF4F is a heterotrimer consisting of

eIF4G is a scaffold protein

eIF4E binds the 5' methyl cap

eIF4A is a helicase that unwinds the 5' structure

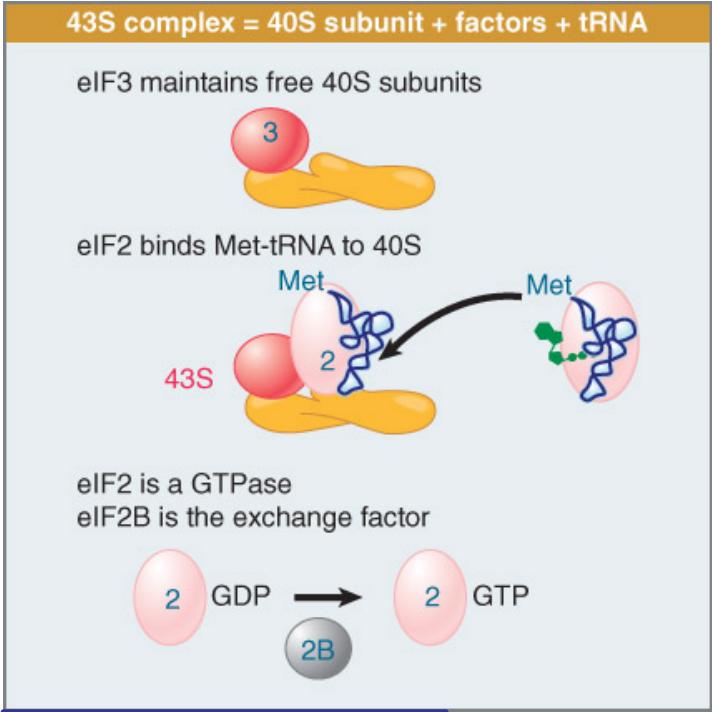
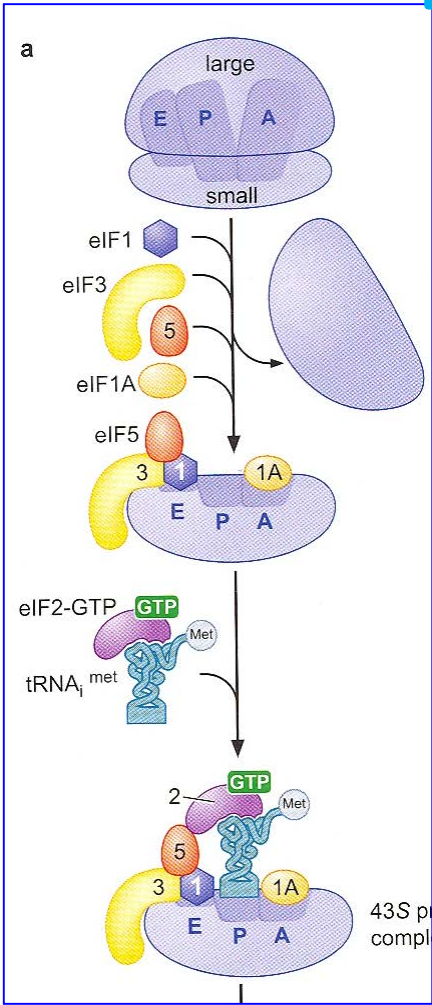


eIF4G binds two further factors

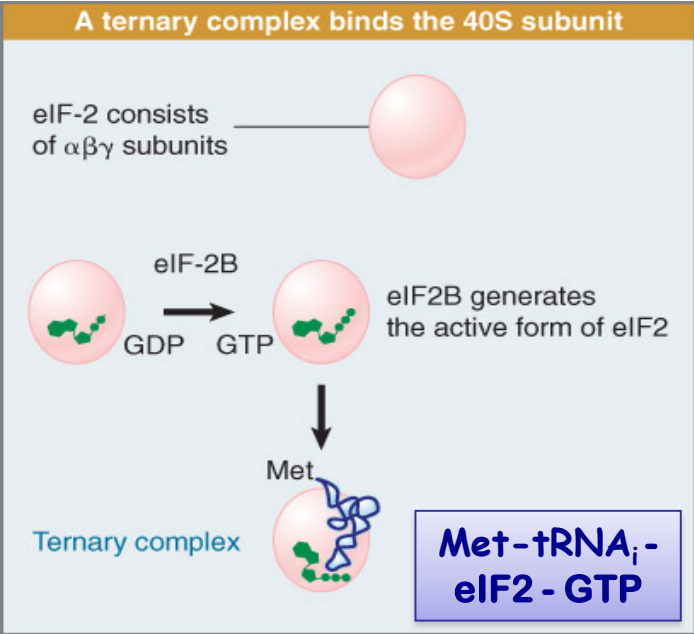
eIF4B stimulates eIF4A helicase

PABP binds 3' poly(A)

Inici en eucariotes: complex 43S

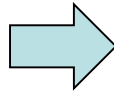


eIF3; eIF2; eIF2B

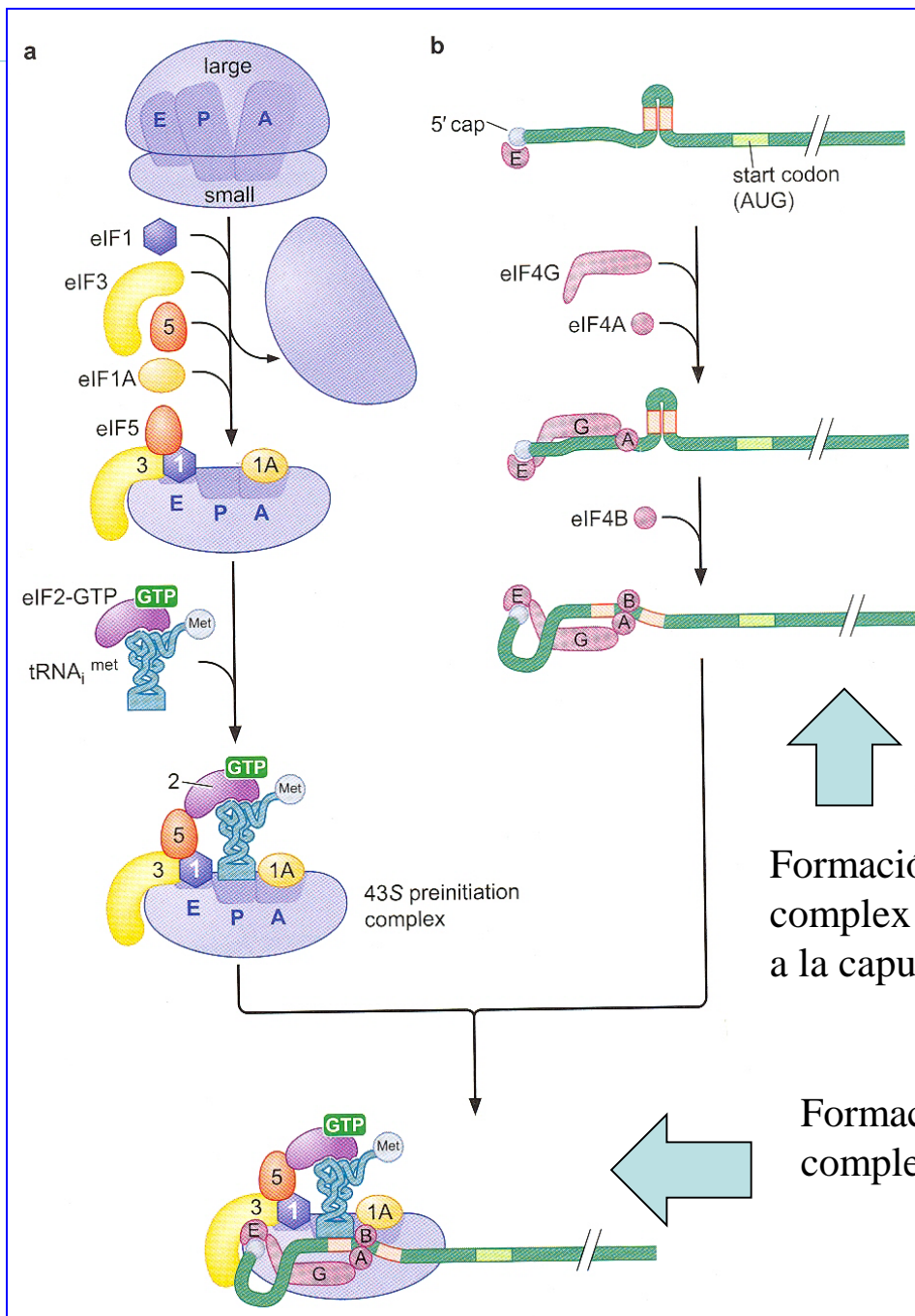
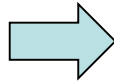


Inici en eucariotes: complex 48s

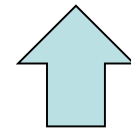
Formació del complex ternari Met-tRNA_i, eIF2, GTP: La unió de GTP a eIF2 augmenta l'afinitat d'aquest pel tRNA_i



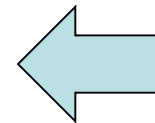
Formació del complex 43S: complex ternari + subunitat 40S + eIF3 (manté aquesta subunitat en estat dissociat)



Formació del complex d'unió a la caputxa

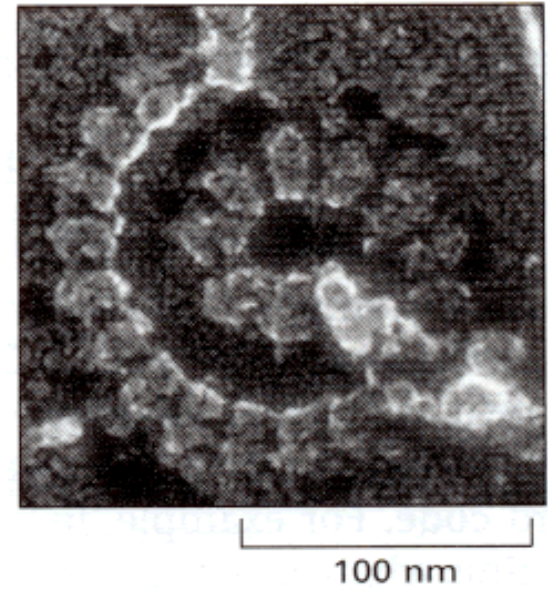
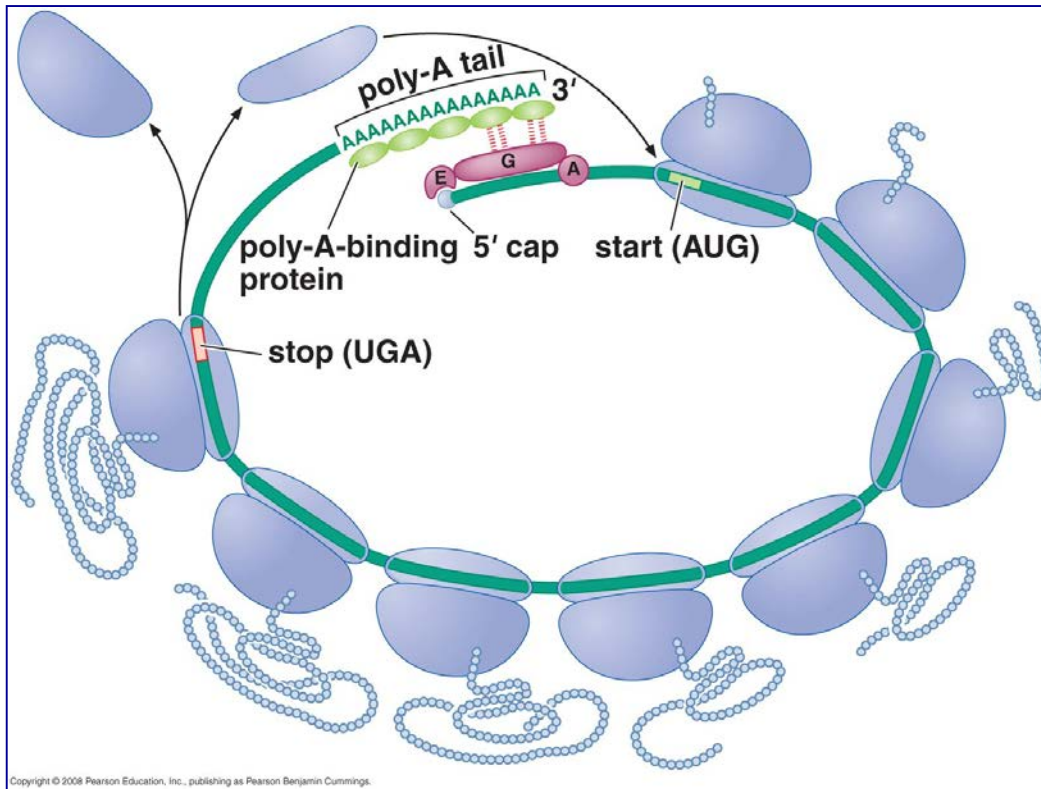


Formació del complex 48S



Inici en eucariotes

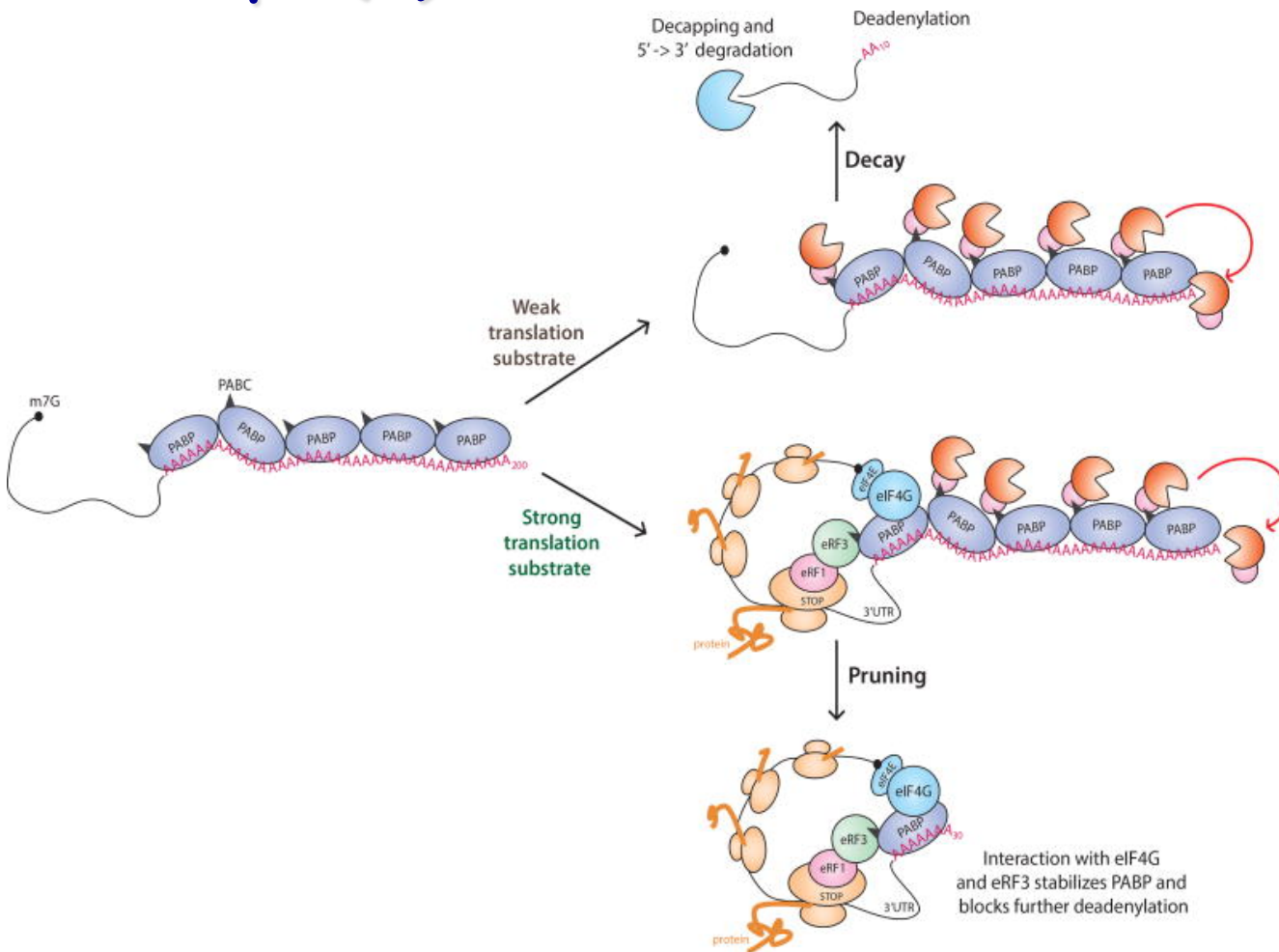
La cua poli(A)



La proteïna d'unió a la cua poli(A) (PABP) s'uneix a eIF4G i permet la formació transitòria d'una organització **circular** en l'mRNA. Tanmateix, la comunicació entre els extrems 5' i 3' sembla no recaure només en això i podria implicar altres factors tot i inclouent-hi el ribosoma

Inici en eucariotes

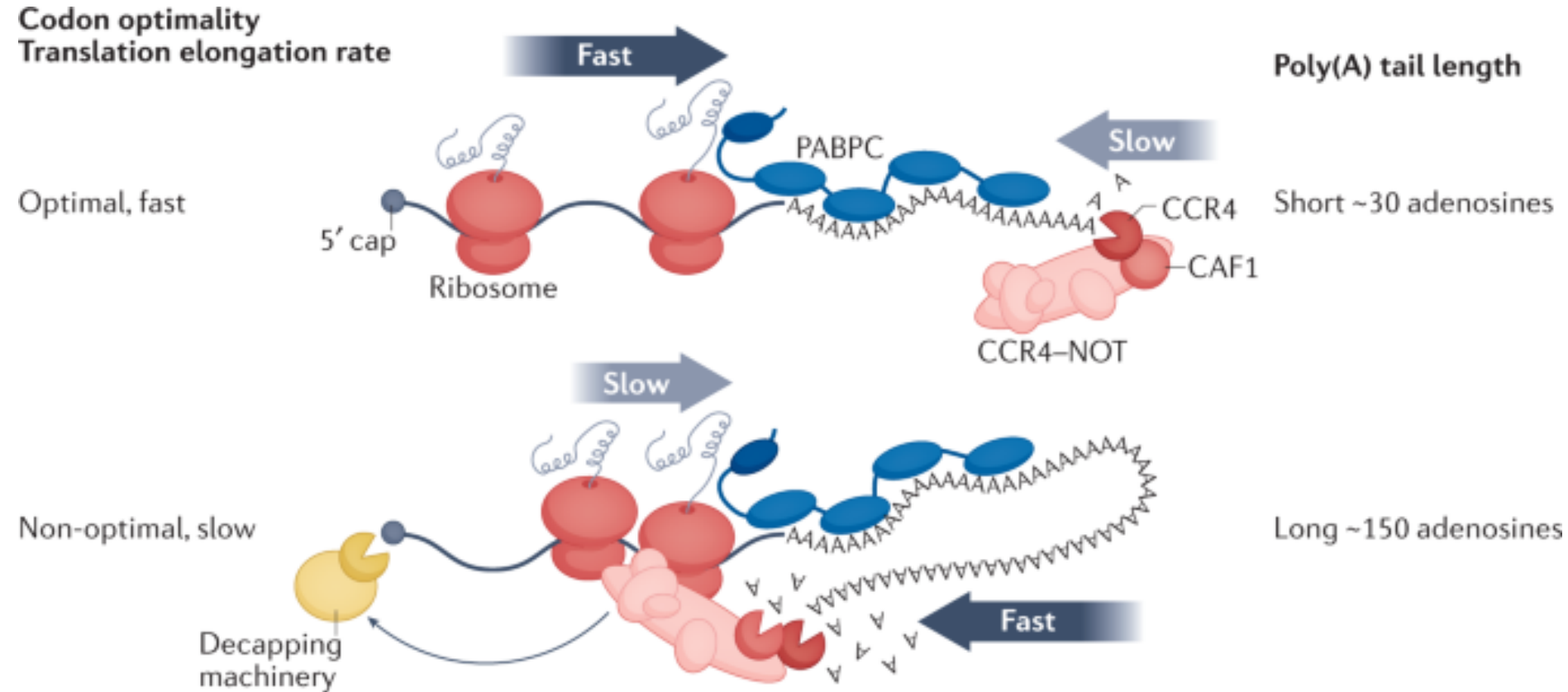
La cua poli(A)



Model for short poly(A) tails on highly expressed mRNAs. Newly transcribed mRNAs receive long (>200 nt) tails, which are coated with PABP¹. The PABP C-terminal domain (PABC, black triangles) binds the CCR4-NOT-Tob and PAN2-3 deadenylation complexes. In strong translation substrates, interactions between a proximal PABP and translation initiation factor eIF4G promote a closed-loop structure and the translation termination factor eRF3 may compete with the deadenylases for binding the PABC domain. These interactions are predicted to stabilize the proximal PABP and prevent processive deadenylation of the transcript, allowing the tail to be pruned to a defined length. Trimming of the poly(A) tail to limit the number of associated PABPs may be important for removing binding sites for factors that catalyze deadenylation and translational repression. For weak translation substrates, the deadenylases recruited to the PABC domain can act processively without the impediment of stabilizing interactions provided by translational activity, resulting in critically short tails that trigger decapping and 5' → 3' degradation of the mRNA.¹⁹

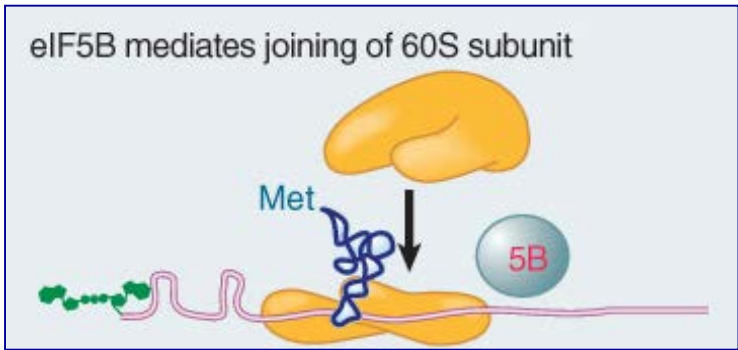
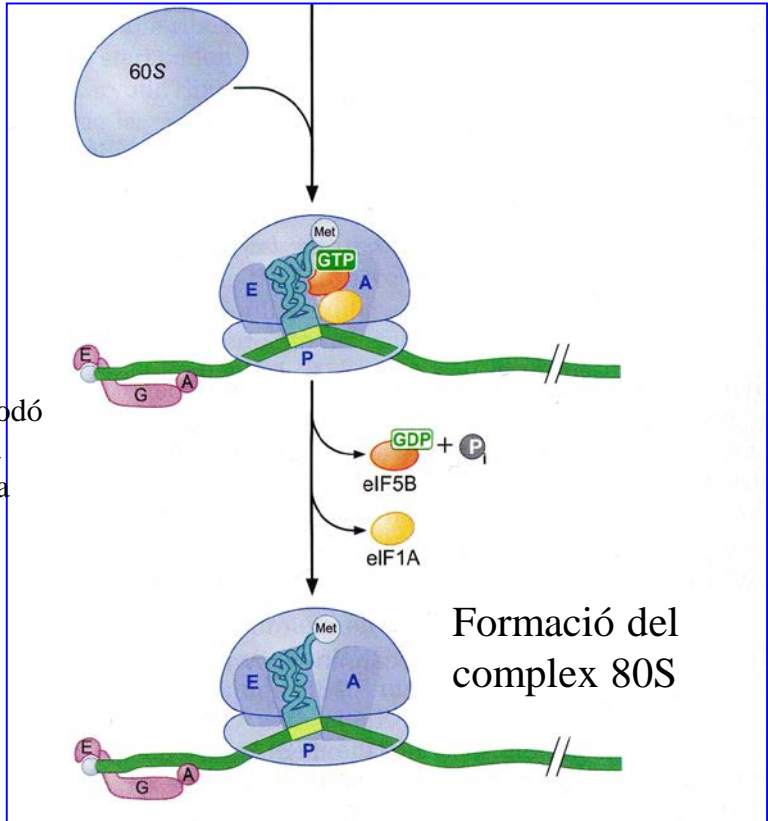
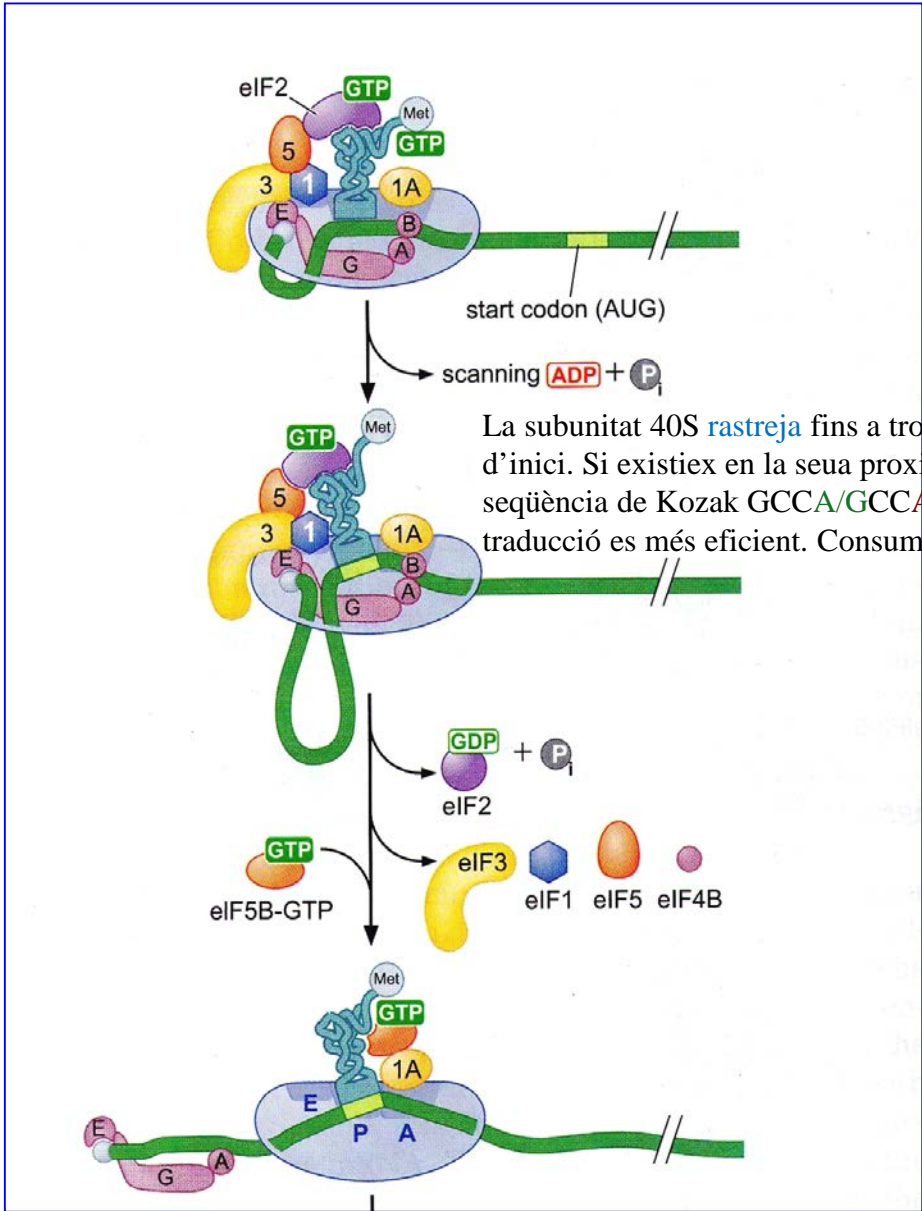
Inici en eucariotes

La cua poli(A)

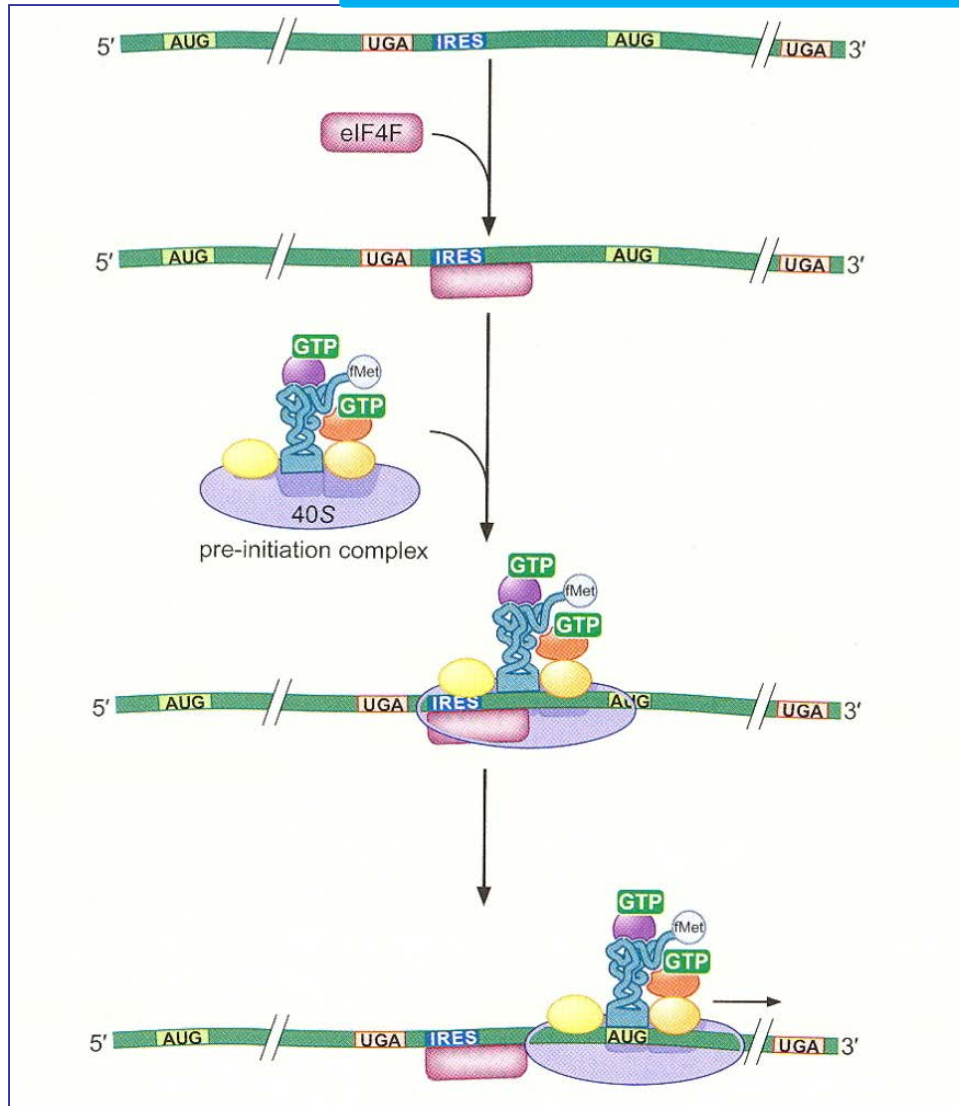


Poly(A) tails can be short (about 30 adenosines) on stable, highly translated mRNAs (top). CCR4-NOT may sense the rate of translation elongation by detecting ribosomes containing empty A and E sites (not shown) and consequently recruit the decapping machinery (bottom). The concentration of cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABPC) may also affect the role of poly(A) tails in gene expression.

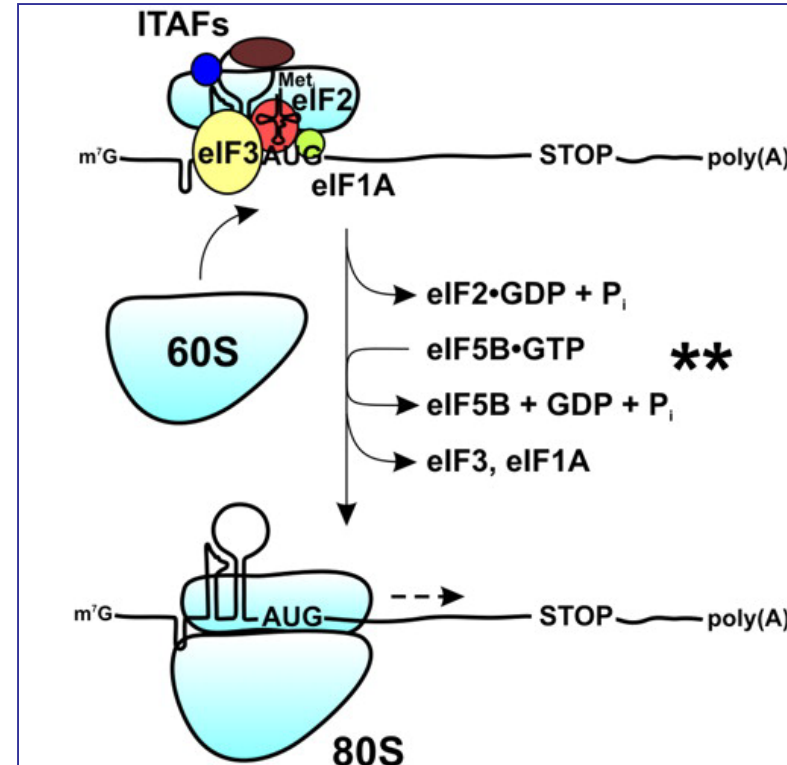
Inici en eucariotes: complex 80S



Inici en AUG interns



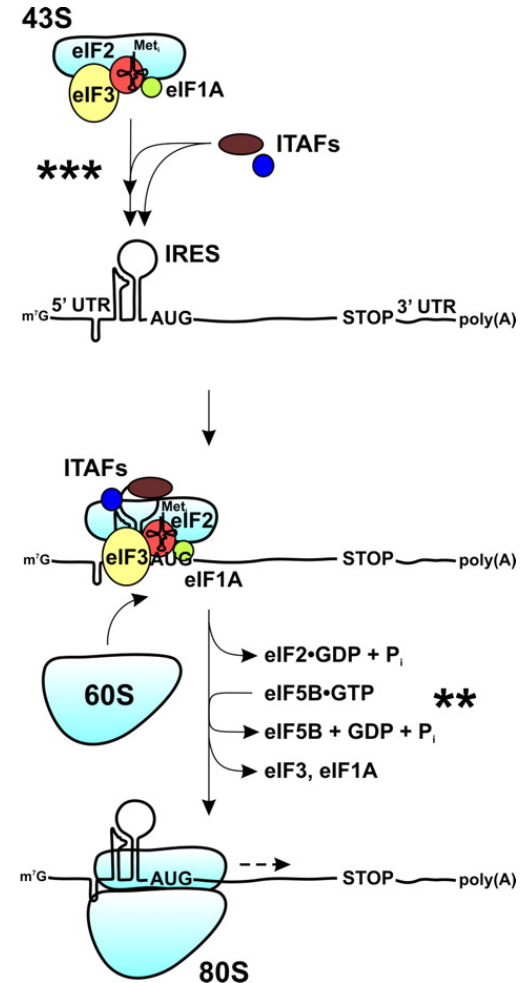
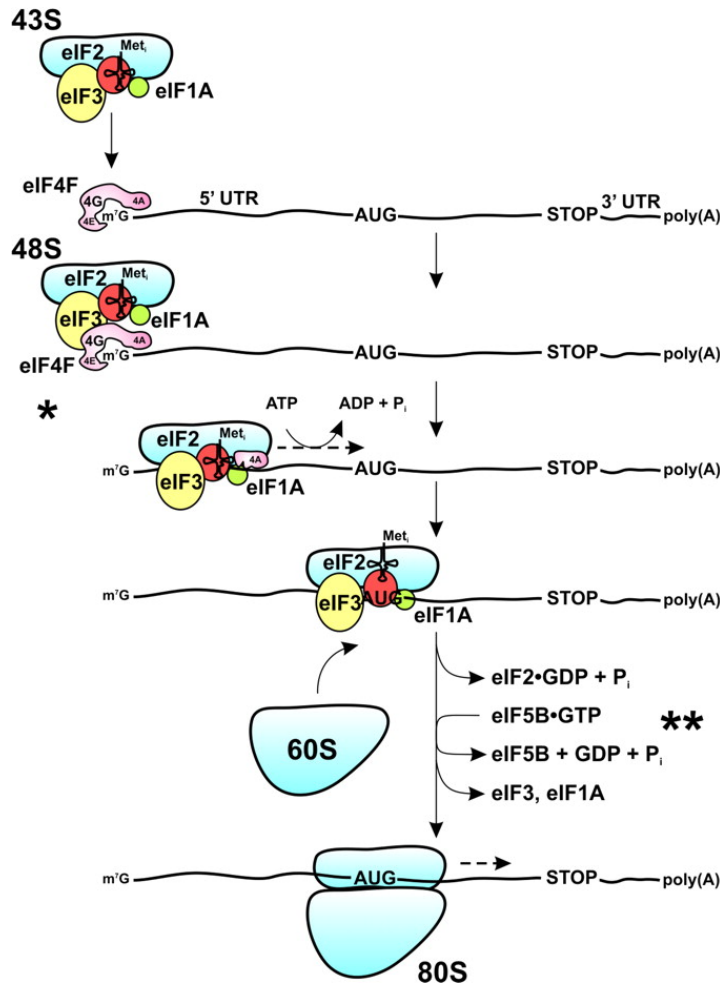
IRES = *Internal Ribosome Entry Site*



ITAFs = *IRES Trans Acting Factors*
(modulen l'activitat de l' IRES)

Inici de la traducció en eucariotes

Representació esquemàtica dels mecanismes de rastreig del ribosoma dependent de CAP (panell de l'esquerra) i d'inici intern (panell de la dreta) per a la formació del complex d'inici 80S.

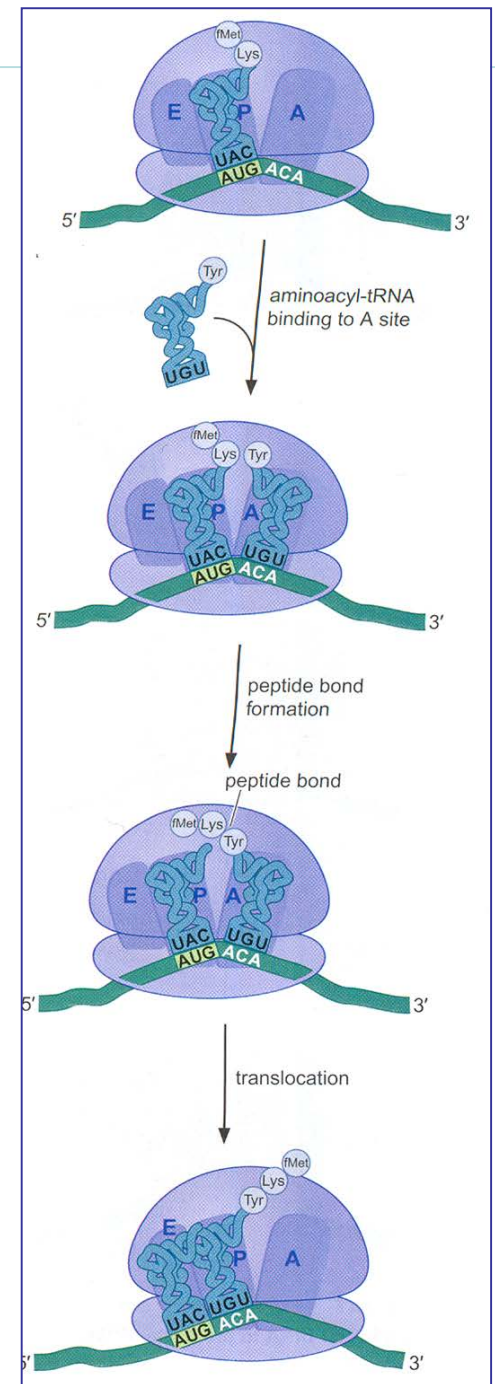


Elongació: Etapes i factors proteics

1. Entrada de l'aa-tRNA al lloc A
2. Formació de l'enllaç peptídic
3. Translocació

Factors proteics

Bacterial Factor	Eukaryotic Factor	Function
Elongation Factors		
EF-Tu	eEF1 α	Binding of tRNAs to the A site
EF-Ts	eEF1 $\beta\gamma$	Recycling factor for eEF1 α
EF-G	eEF2	Required for translocation



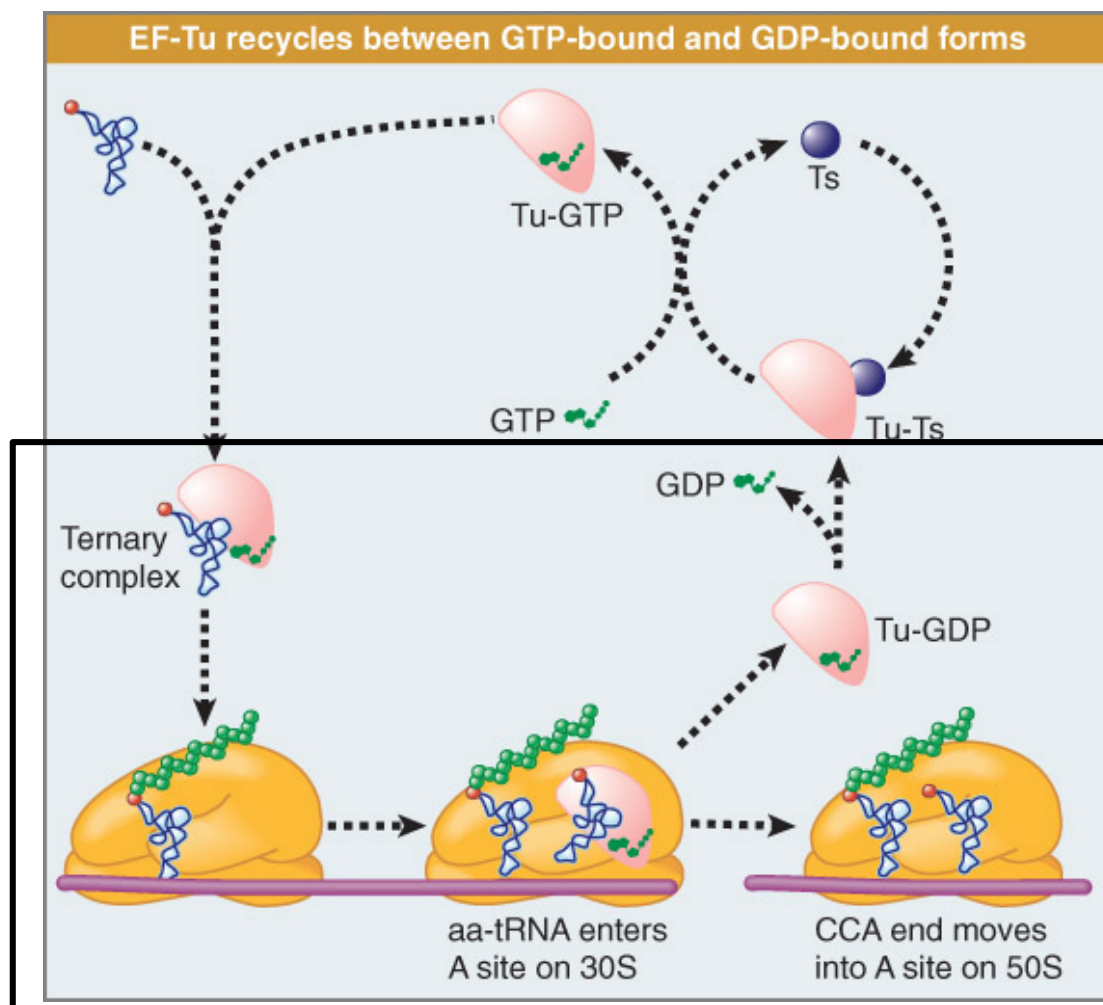
Elongació en procariotes

1a. Entrada de l'aa-tRNA al lloc A

Complex ternari:

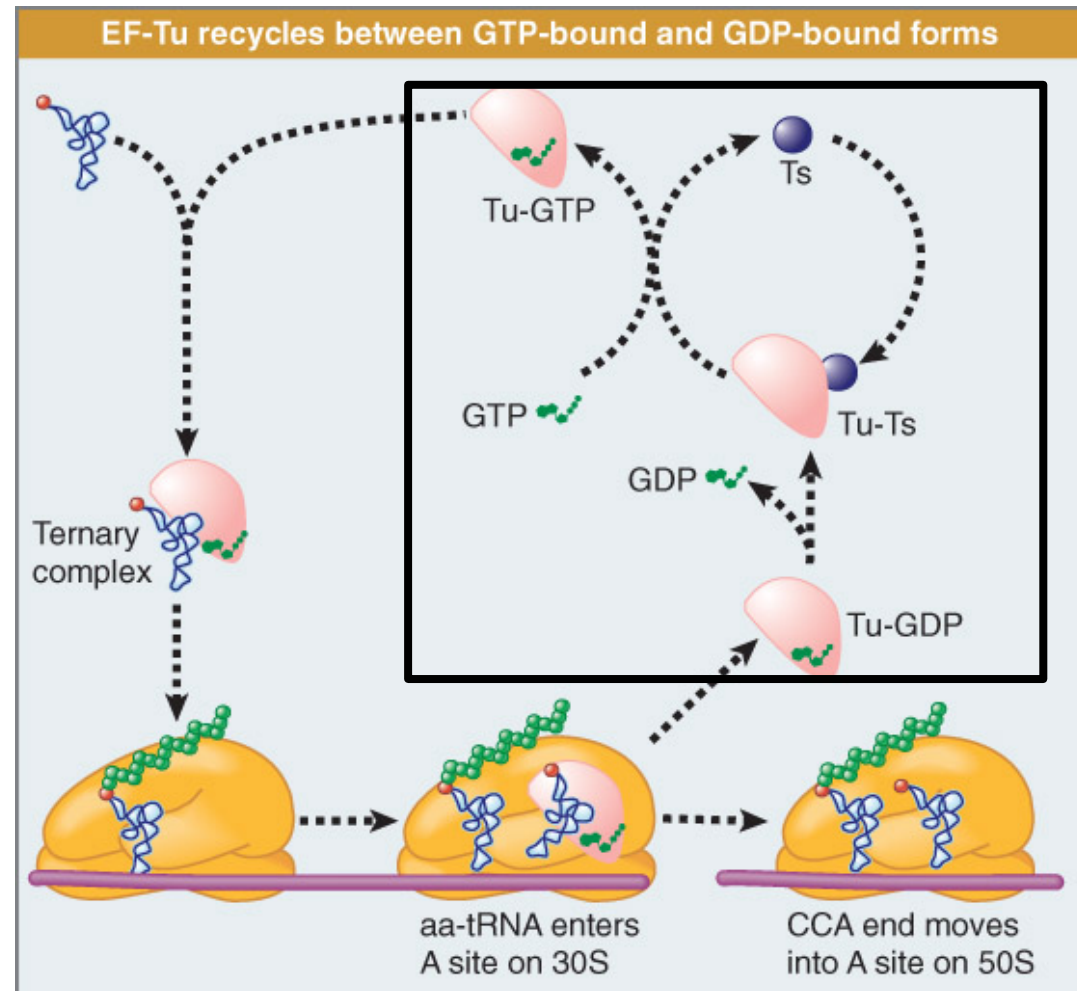
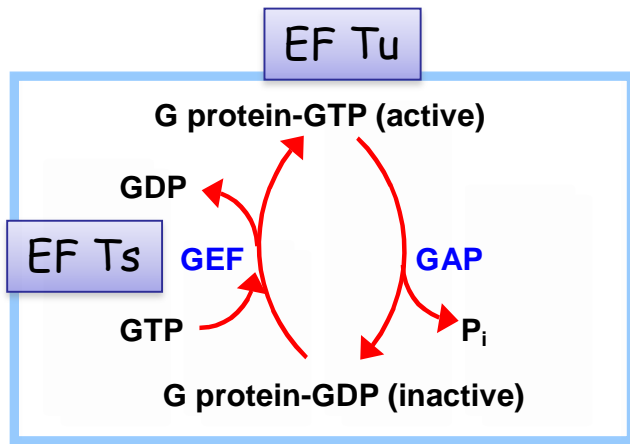
EF-Tu/GTP/aa-tRNA

- Unió per l'anticodó al lloc A de 30S
- La interacció codó-anticodó indueix un canvi conformacional en el ribosoma que estableix la unió del tRNA i provoca que EF-Tu hidrolitzi el GTP unit
- L'extrem CCA de l'aa-tRNA entra en el lloc A de 50S i s'allibera el complex binari EF-Tu/GDP
- EF-Ts regenera el factor EF-Tu actiu (unit a GTP)



Elongació en procariotes

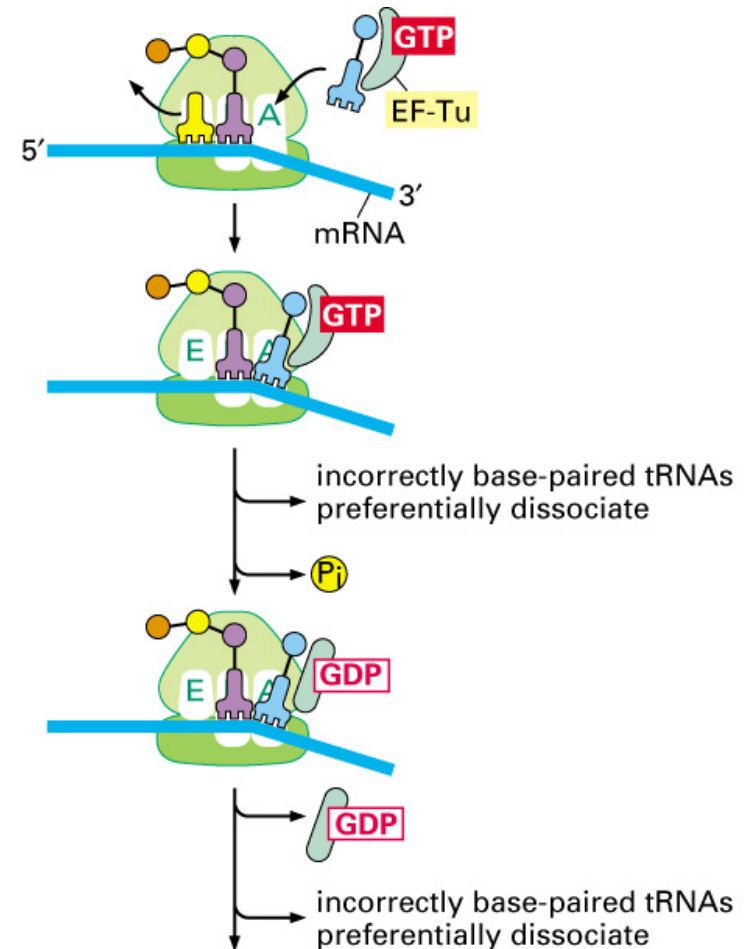
1b. Regeneració del factor EF-Tu



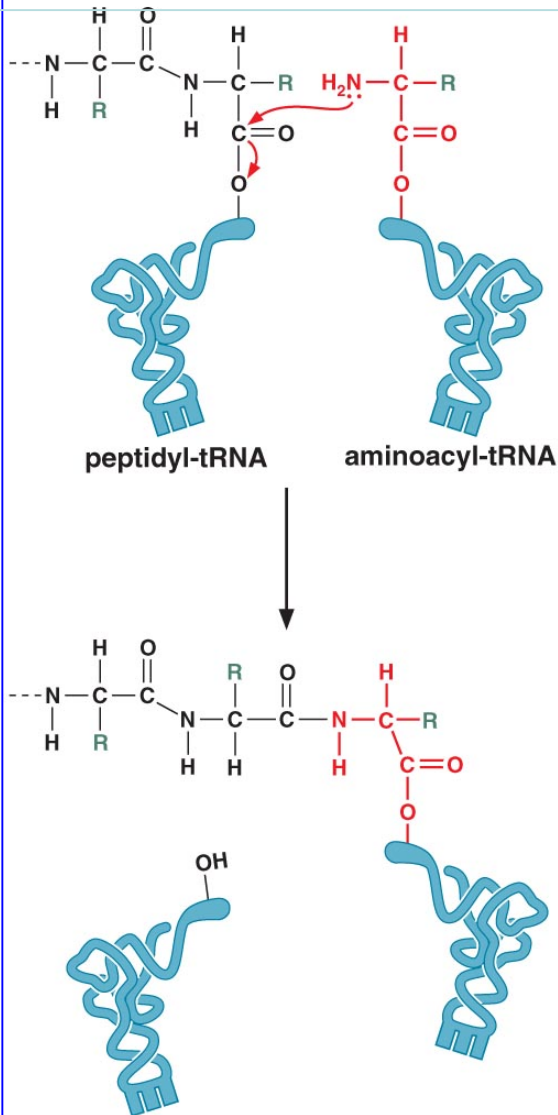
Elongació en procariotes

Entrada de l'aa-tRNA al lloc A: control de qualitat

- Hidròlisi lenta del GTP unit a EF-Tu
- Eixida lenta d'EF-Tu-GDP del lloc A

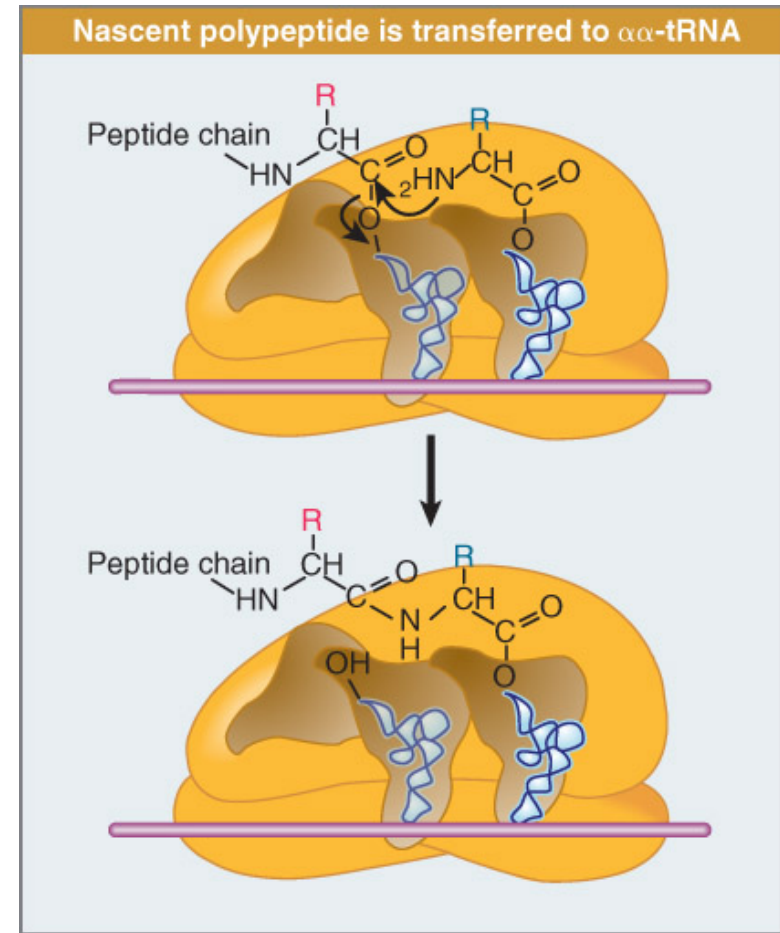


polypeptide chain



Elongació de la traducció

2. Formació de l'enllaç peptídic



- **Transferència de la cadena polipeptídica** unida al tRNA en el lloc P a l'aa-tRNA en el lloc A
- **L'activitat peptidil transferasa** depèn de l'rRNA catalític 23S
- L'entorn de la subunitat gran (50S) del ribosoma permet l'acostament del peptidil-tRNA a l'aa-tRNA

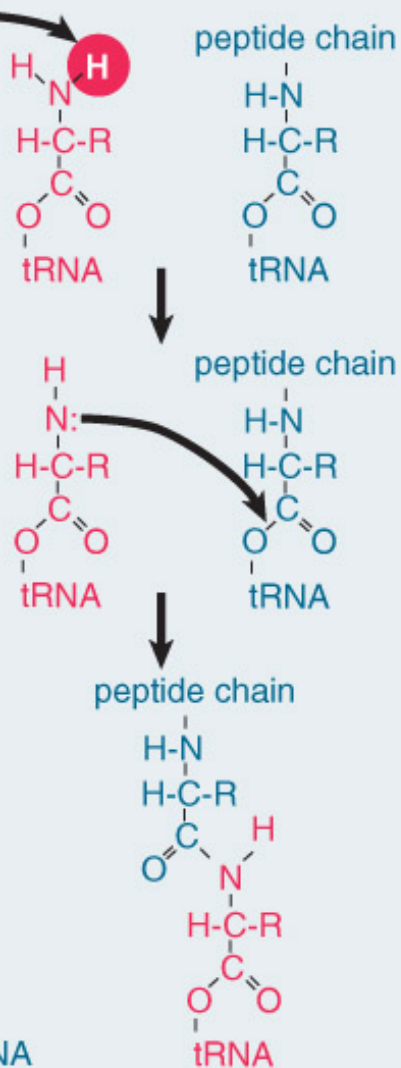
What is the source of the basic catalyst?

Aminoacyl-tRNA Peptidyl-tRNA

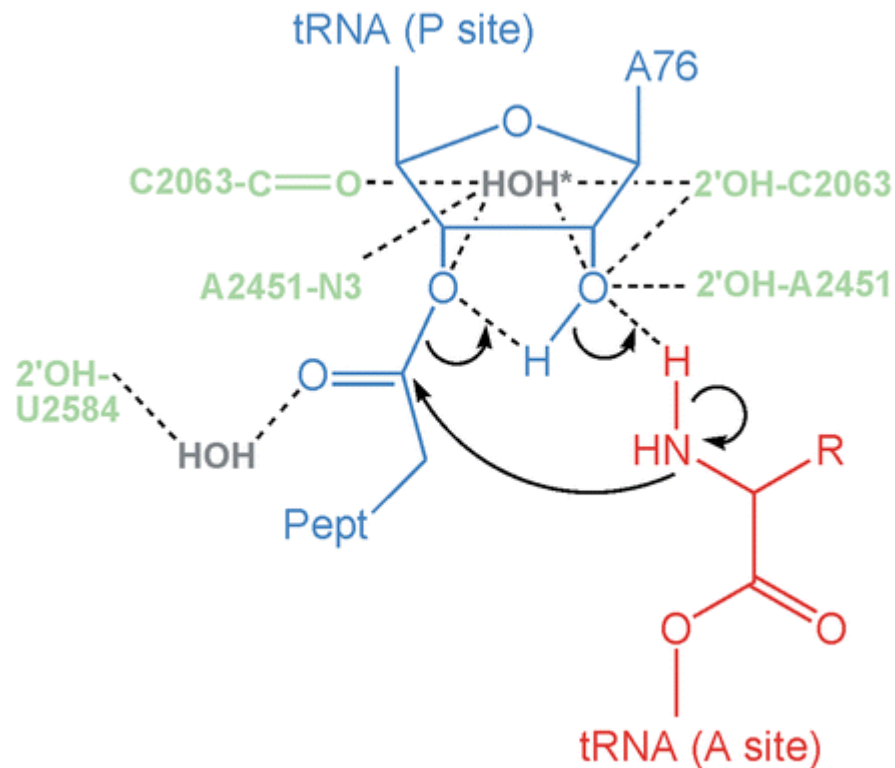
Peptidyl transfer center

Base:

H
Base



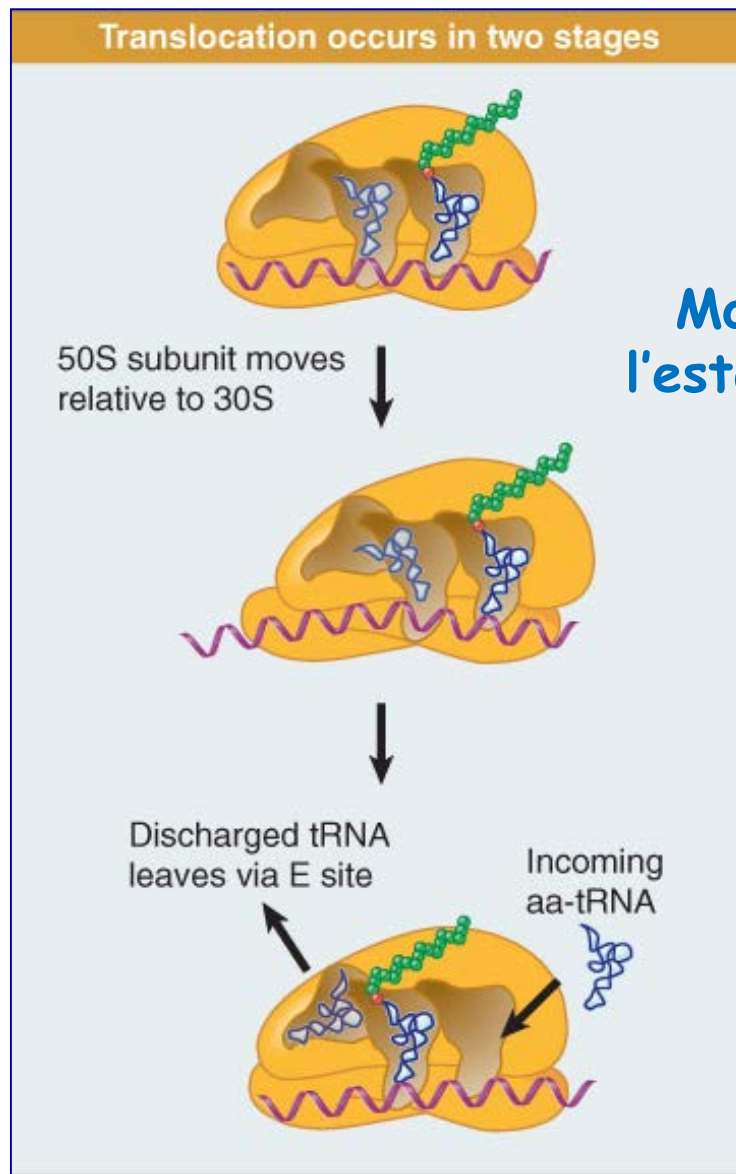
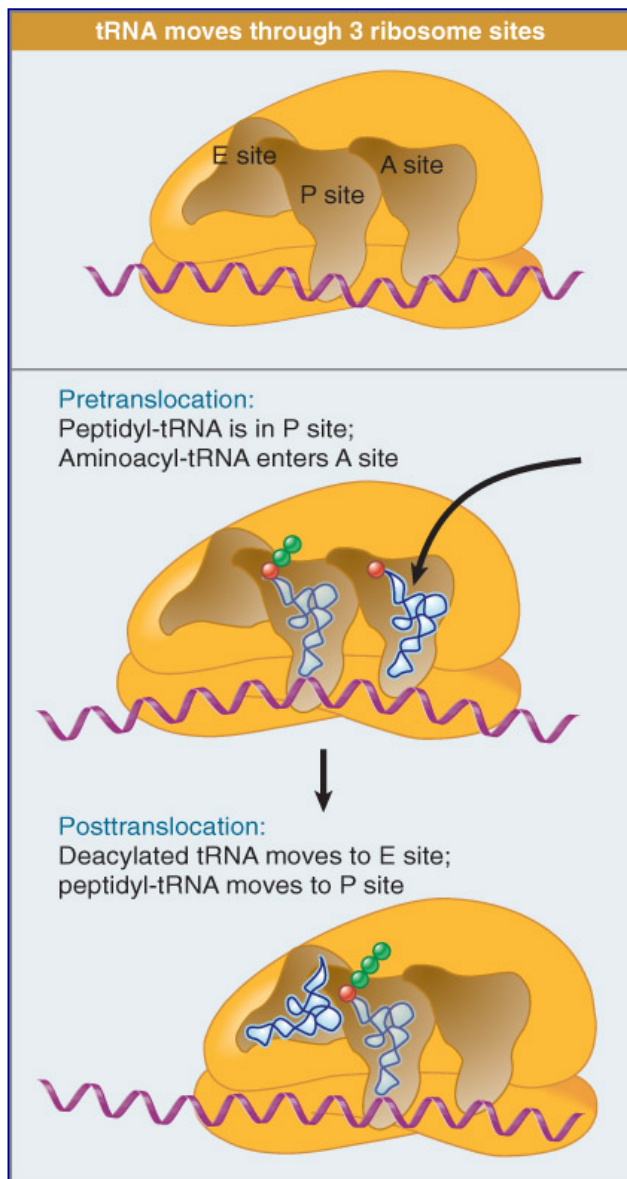
2. Formació de l'enllaç peptídic



El grup 2'-OH de la ribosa unida a A76 rep el protó del grup amino de l'aminoacil-tRNA

Elongació de la traducció

3. Translocació

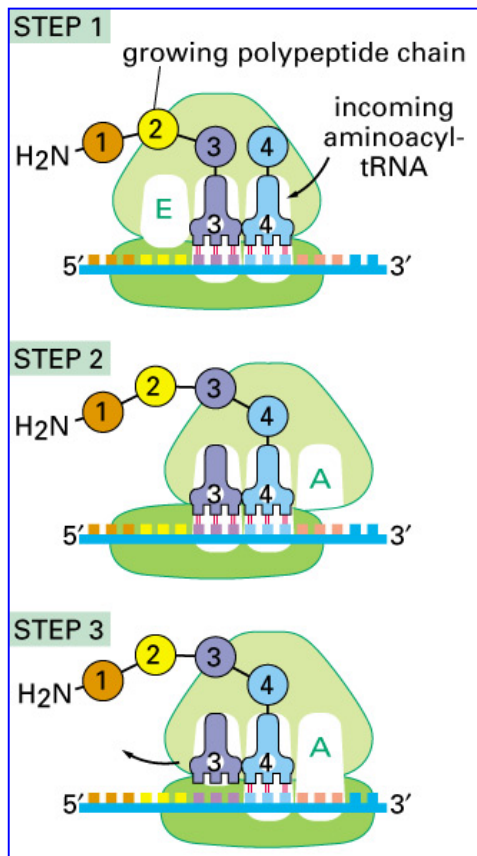


Model de l'estat híbrid

Elongació de la traducció

3. Translocació

Factors proteics de l'elongació



Bacterial Factor

Function

Elongation Factors

EF-Tu

Binding of tRNAs to the A site

EF-Ts

Recycling factor for eEF1a

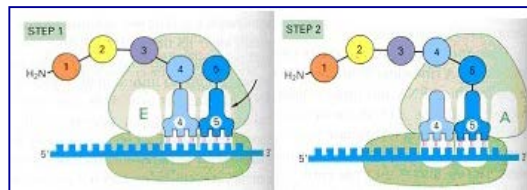
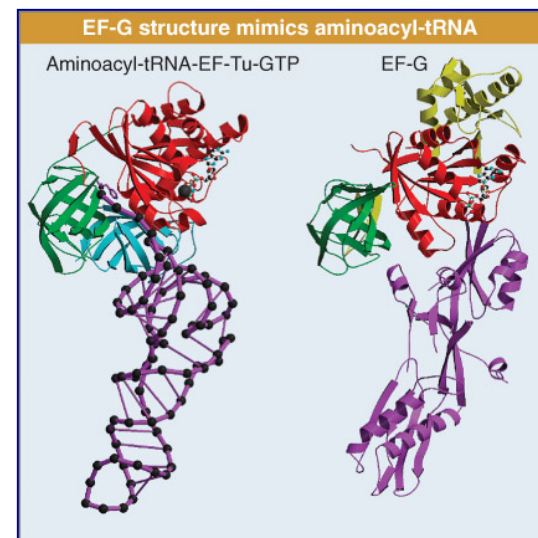
EF-G

Required for translocation

-EF-G entra en el lloc A del ribosoma,
com l'aa-tRNA-EFTu-GTP

-EF-G és una GTPasa.

-Per a unir-se: EF-G-GTP



3. Translocació

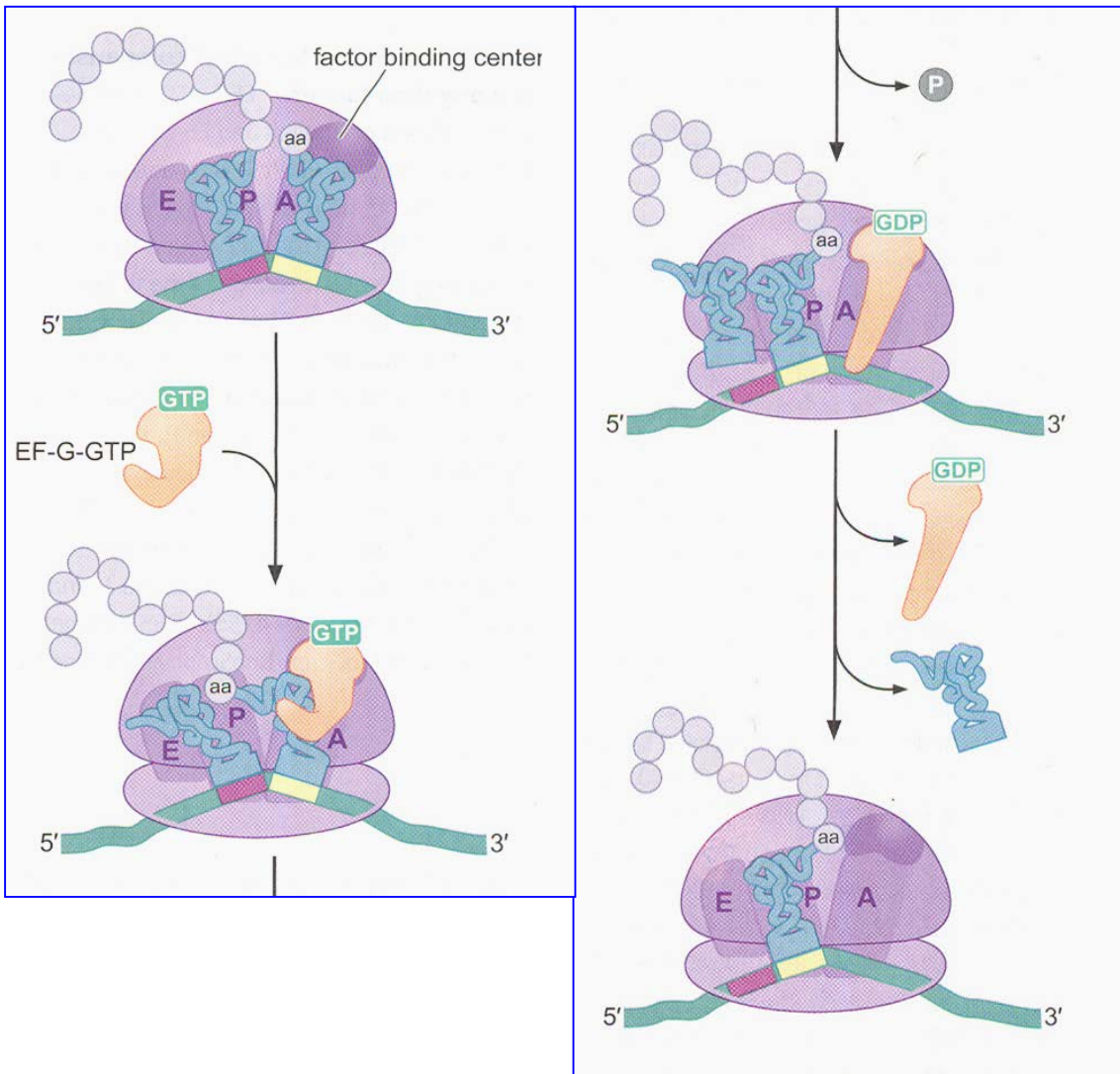
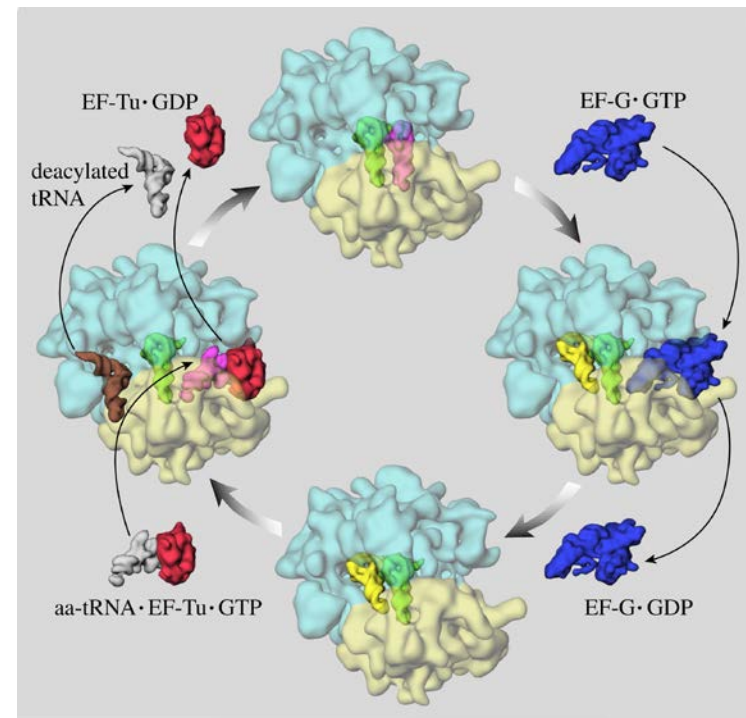


FIGURE 14-34 EF-G stimulation of translocation requires GTP hydrolysis.

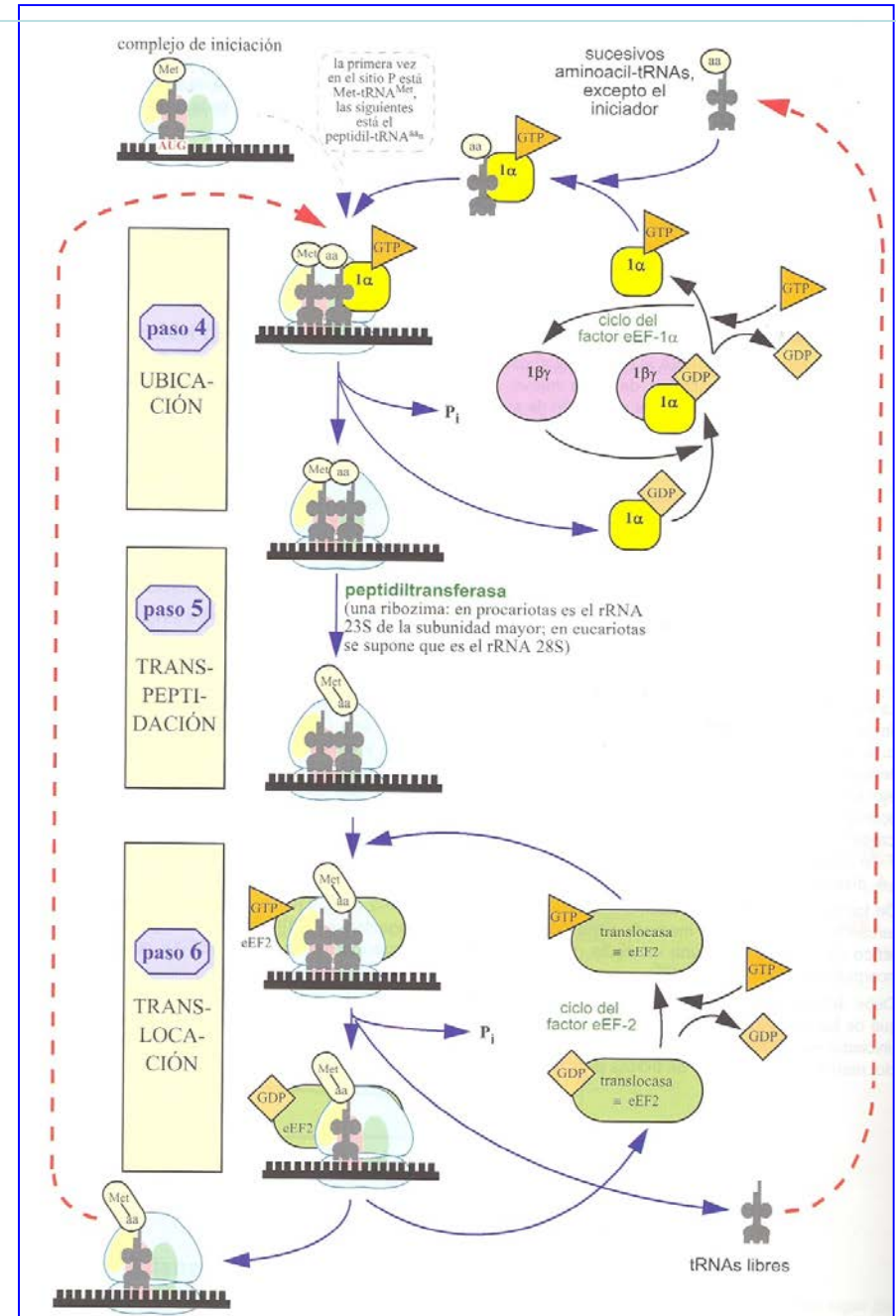
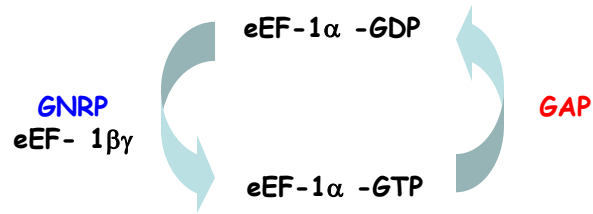


Elongación en eucariotes

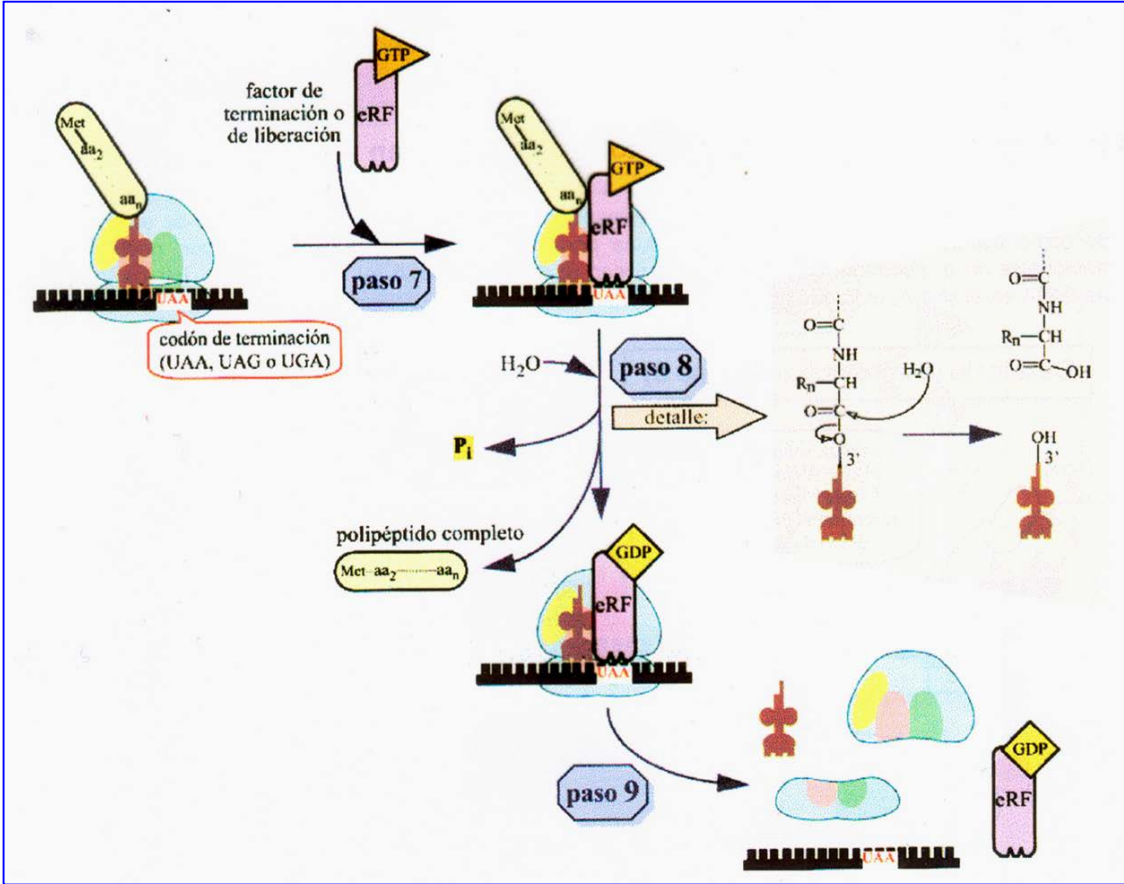
Elongation Factors

EF-Tu	eEF1 α	Binding of tRNAs to the A site
EF-Ts	eEF1 $\beta\gamma$	Recycling factor for eEF1 α
EF-G	eEF2	Required for translocation

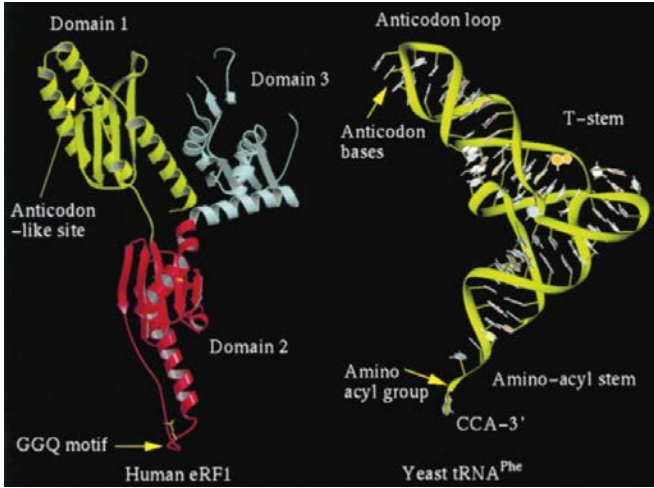
EF-1 α /GTP/Aa-tRNA



Acabament



Release Factor, entra en el lloc A



Acabament

Factors en bacteris:

Classe I

RF1 = reconeix UAA o UAG

RF2 = reconeix UAA o UGA

S'unixen al lloc A quan el P té un peptidil-tRNA i activen el ribosoma per a hidrolitzar la unió peptidil-tRNA

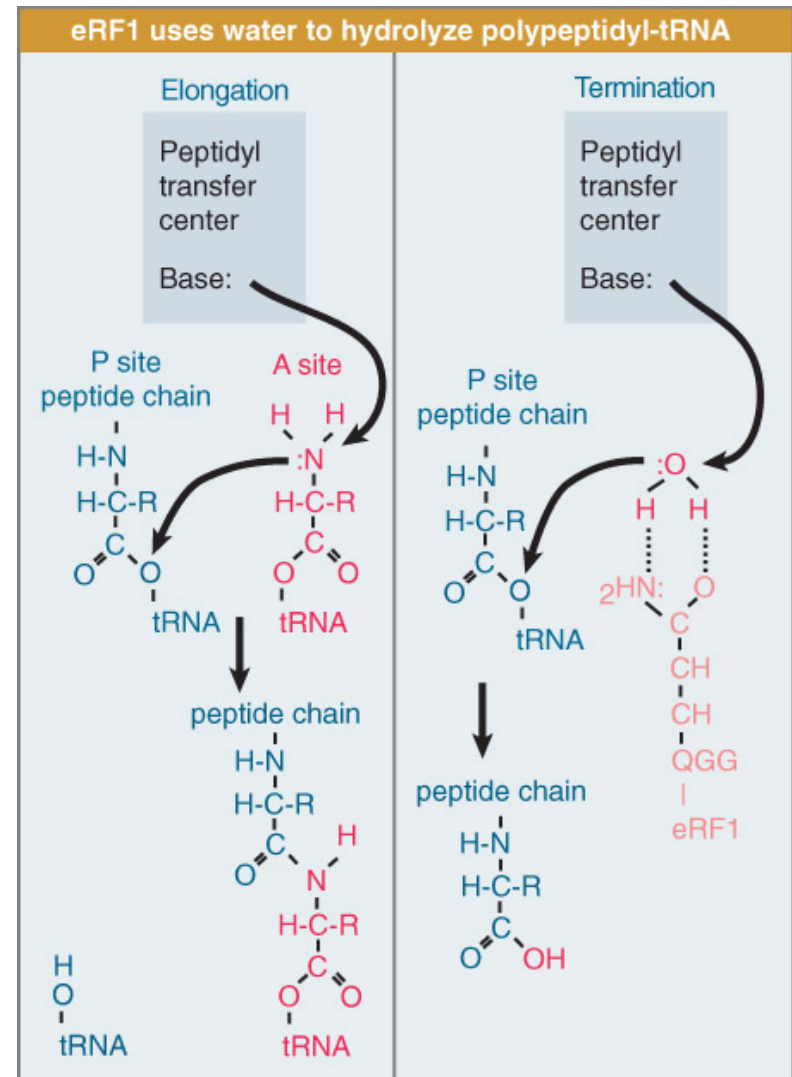
Classe II

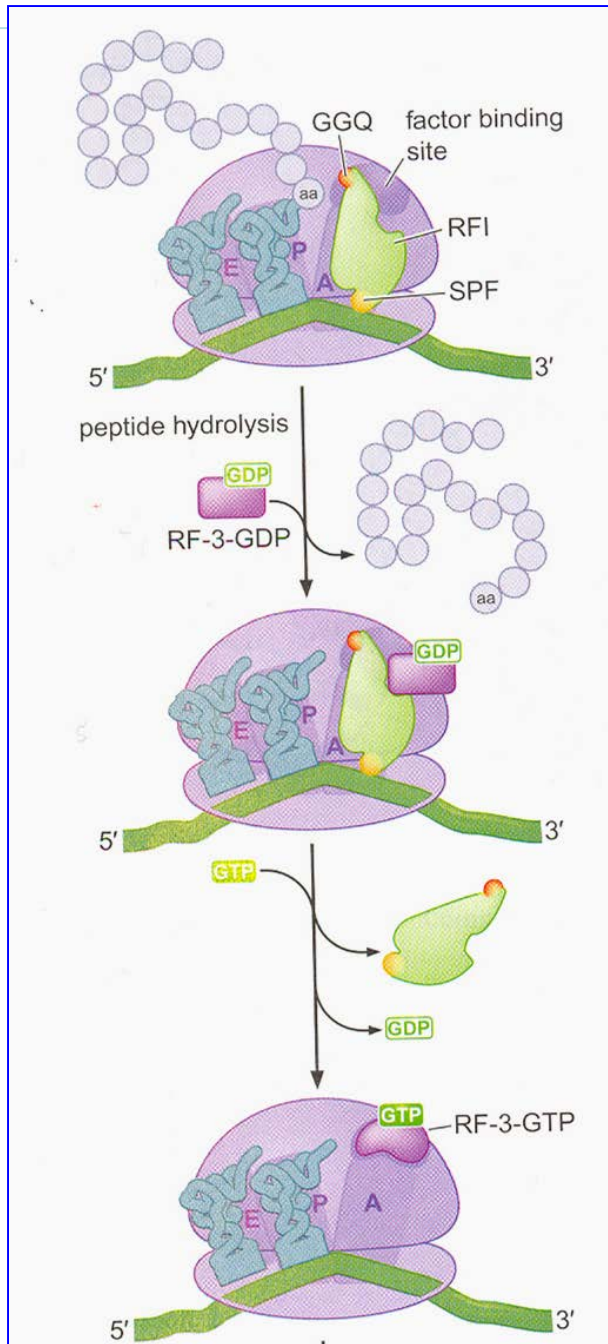
RF3 = estimula l'alliberament d'ambdós amb consum de GTP

RRF = Ribosome Recycling Factor.

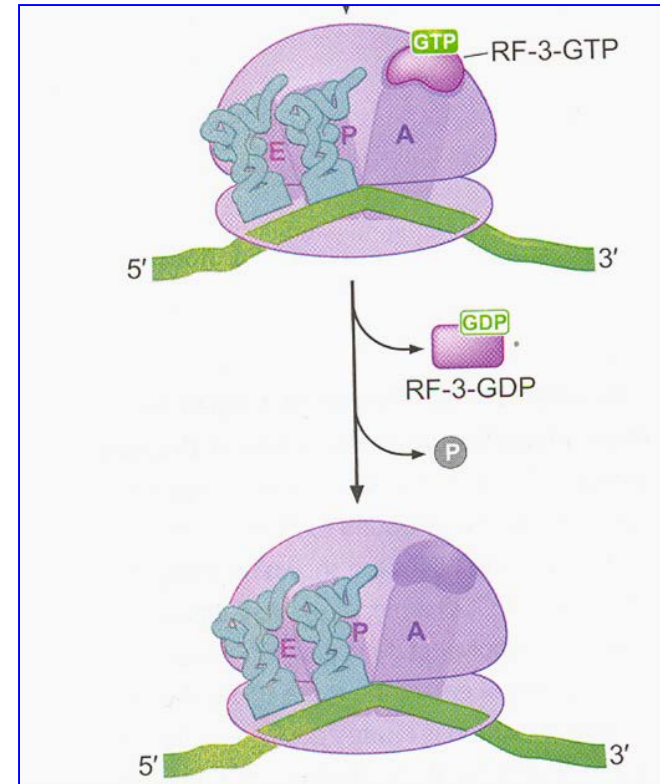
En eucariotes

- Només un factor de la classe I: **eRF1** per als tres codons.
- **eRF3** com a GTPasa.

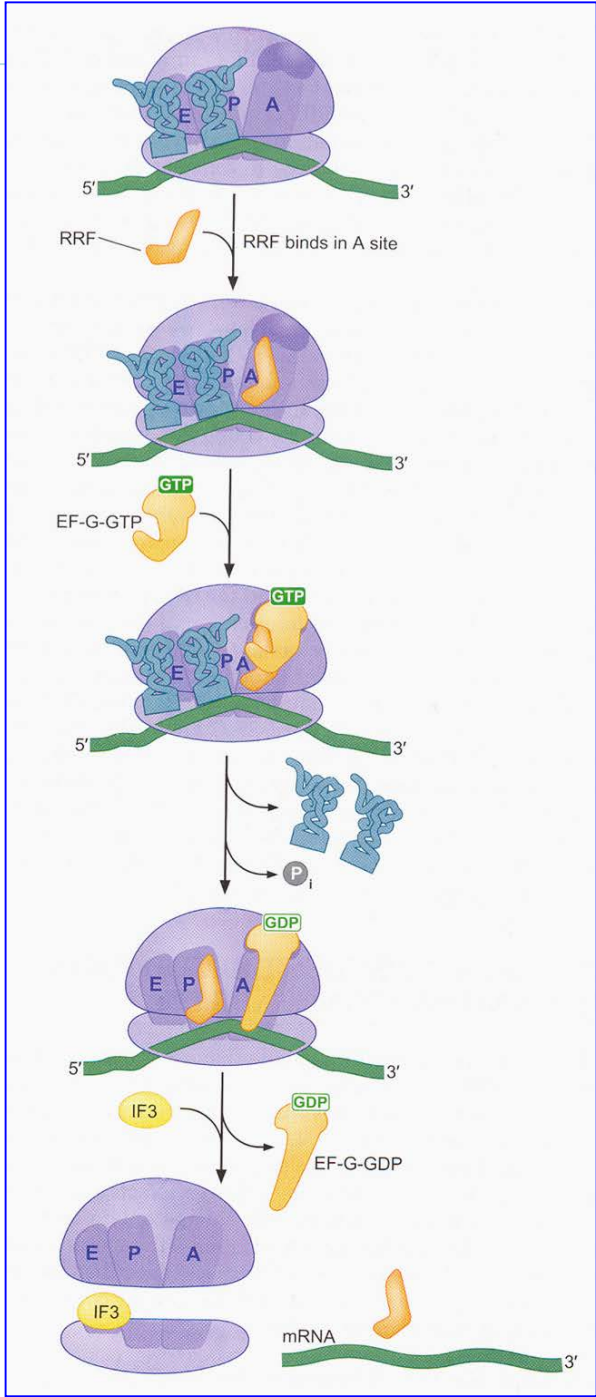
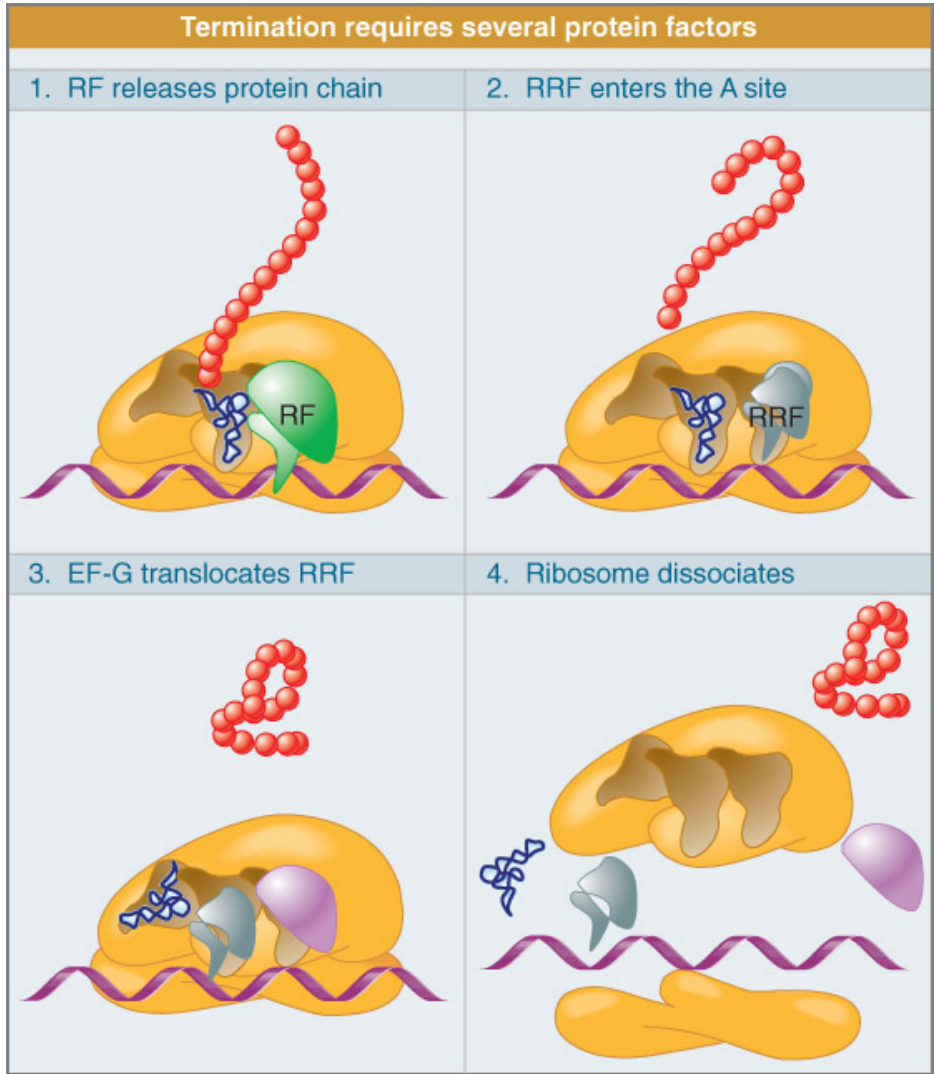




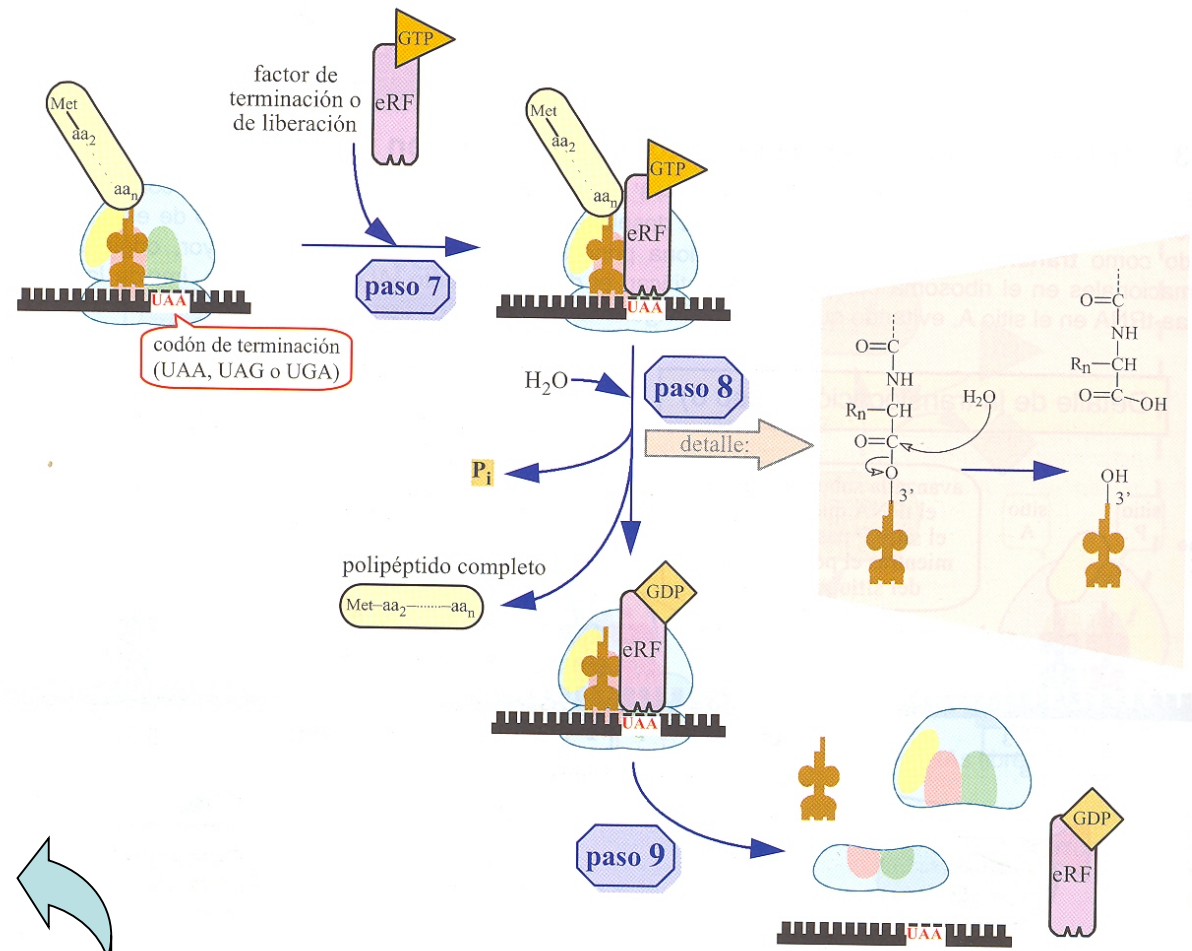
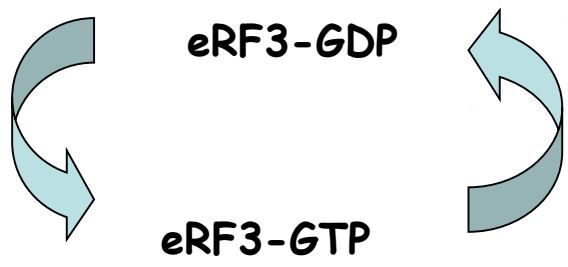
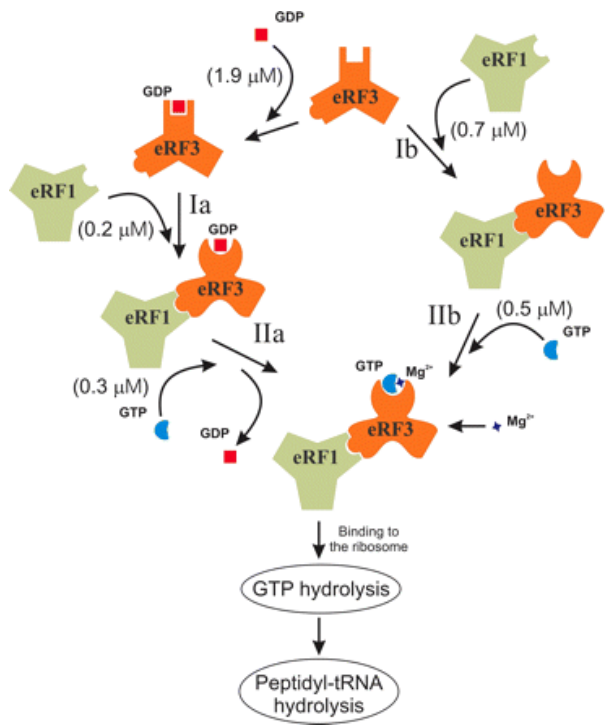
Acabament



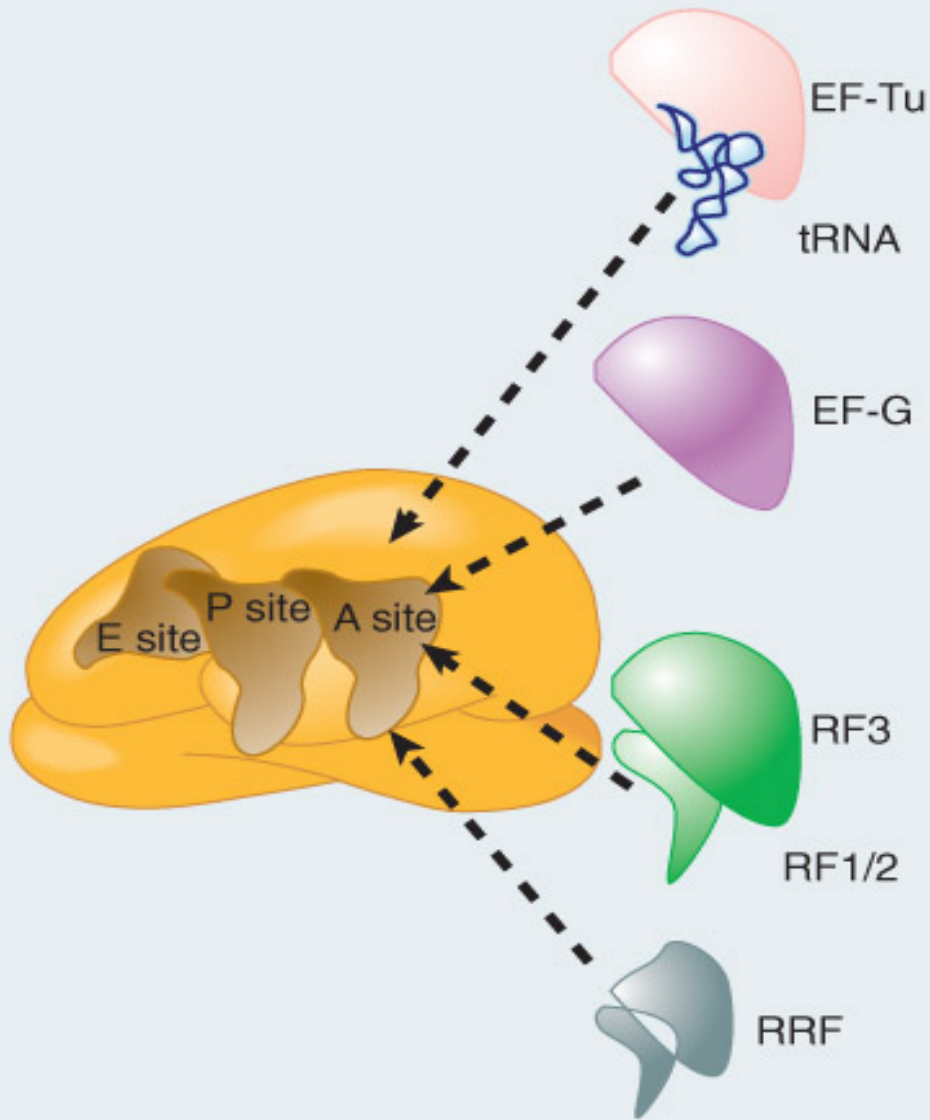
Acabament



Acabament de la traducció en eucariotes



Several factors have similar shapes



Traducció:
Factors proteics

Alguns factors d'unió al lloc A en procariotes tenen formes similars i dominis d'unió a GTP

Comparació de la traducció en Eu i Pro

Procariotes	Eucariotes
mRNA policistrònic	mRNA monocistrònic
Acoblament transcripció-traducció	No acoblament transcripció-traducció en gens nuclears
Poliribosomes lineals	Poliribosomes circulars
El codó d'inici és l'AUG següent al lloc d'unió del ribosoma	No existeix lloc d'unió del ribosoma de manera que es fa servir el primer AUG
El primer aminoàcid és formil-Metionina	El primer aminoàcid és Metionina
3 factors d'inici: IF1, IF2 e IF3	Múltiples factors d'inici: eIF2 (3 sub), eIF3, eIF4 (4 sub), eIF5
Factors d'elongació: EF-Tu (2 sub) i EF-G	Factors d'elongació: eEF1 (3 sub) i eEF2
Factors d'acabament segons codó: RF1 o RF2	eRF1 reconeix tots els codons de terminació. Després s'ha d'unir eRF3-GTP
Aturada de la traducció en condicions de limitació de nutrients o energia per dimerització de ribosomes	Es controla per segrest d'eIF2 (mediat per fosforilació)

Supressió de la parada

Mutacions Puntuals o d'Inserció / Deleció

Missense mutation



Neutral mutation



Silent mutation



Nonsense mutation



Frameshift mutation



Supressió de la parada

Mutacions reverses: Capaces de revertir la primera mutació.

- Reverteix al mateix aminoàcid: es recupera la funció
- Reverteix a un altre aminoàcid: es recupera la funció de forma parcial o completa

Mutacions supressores:

Mutació en un altre lloc del genoma capaç de revertir l'efecte d'una altra mutació. Poden ser intragèniques o intergèniques.

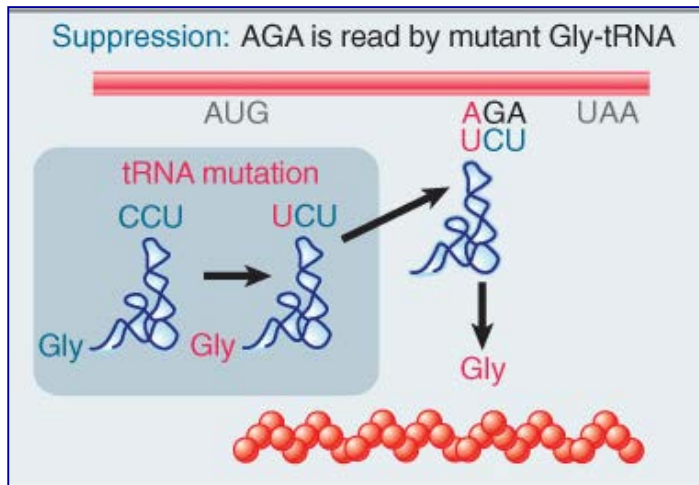
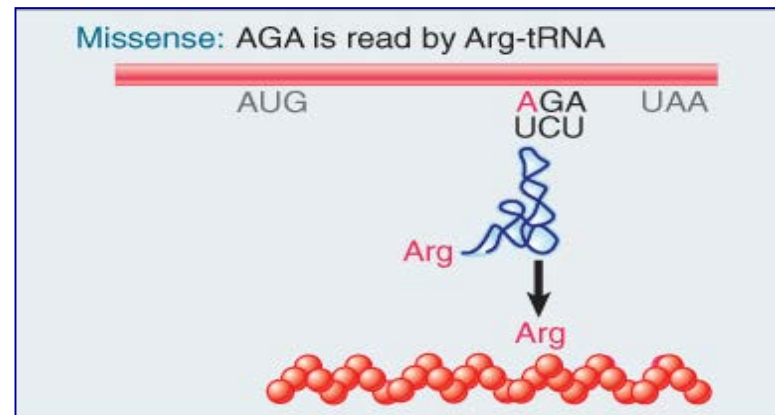
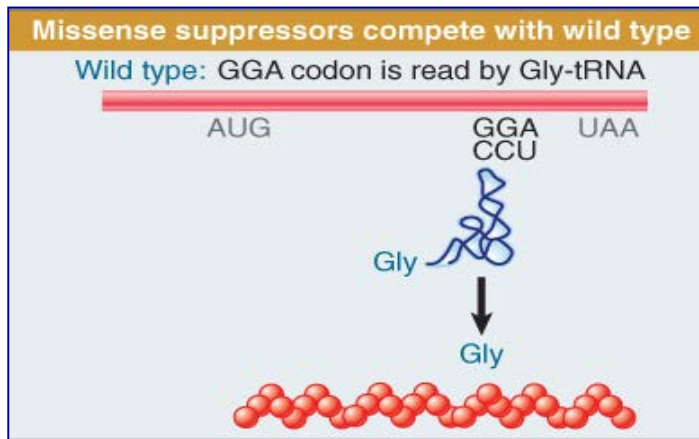
Intergèniques (mutació en un segon gen que elimina el fenotip mutant)

- Moltes n'afecten a la traducció d'mRNAs
- Cada gen supressor serveix només per a un tipus de mutació (*nonsense*, *missense* o *frameshift*).
- Gens supressors solen correspondre a gens codificants de tRNAs, amb una mutació en l'anticodó que els permet reconèixer el nou codó i inserir un aminoàcid.
- tRNA supressors coexisteixen amb els altres tRNAs.

tRNAs supressors de mutacions *missense*

Mutacions *missense* (sentit erroni, un aminoàcid diferent)

Mutació puntual que substitueix un codó per un altre que representa un aminoàcid diferent.



La supressió és parcial:

Tant el tRNA no mutat com el supressor reconeixen el codó.

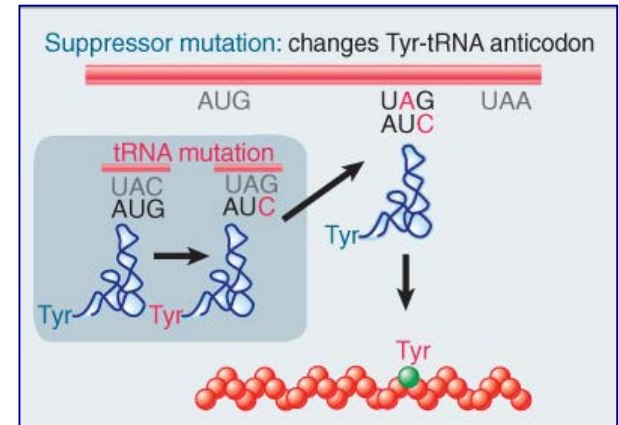
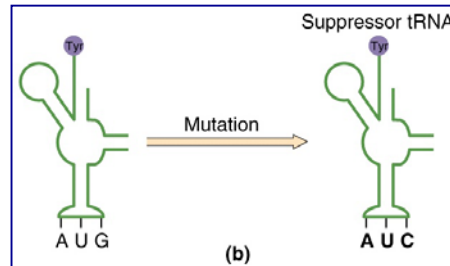
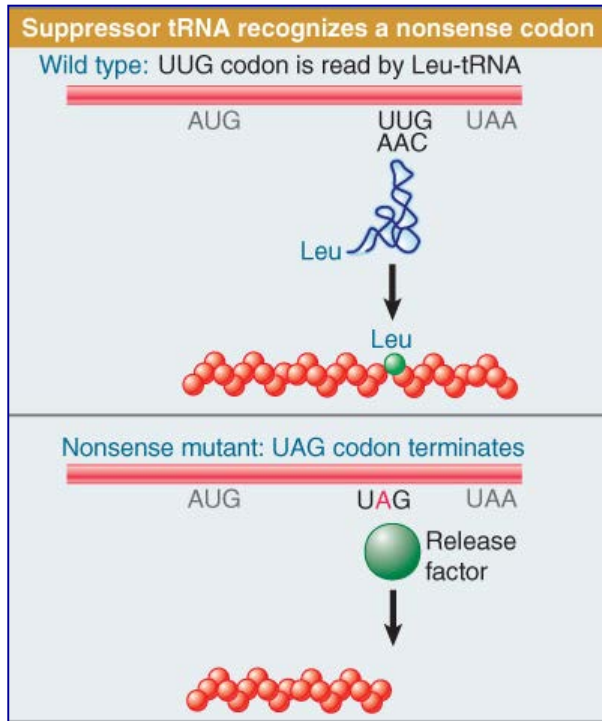
Causa mutacions en altres proteïnes.

tRNAs supressors de mutacions *nonsense*

Mutacions *nonsense* (sense sentit) (STOP): mutació puntual que introdueix un codó d'aturada i causa la terminació prematura de la traducció.

tRNAs supressors *nonsense* (de parada)

Mutacions en l'anticodó → creen un tRNA capaç de reconèixer el codó de parada. Continua la síntesi de la proteïna



Continua la traducció amb un aa incorrecte introduït

tRNAs supressors de parada

Tres classes de tRNA supressors de parada,
un per a cada codó *STOP* (UAG, UAA, UGA).

UAG (supressors àmbar):

Hi ha almenys 6 en *E. coli*.

Tenen l'anticodó CUA per una mutació
puntual en una de les tres bases.

Insereixen l'aa que portava el tRNA original
(Ser, Gln o Tyr).

UAA (supressors ocre):

Tenen l'anticodó UUA.

També reconeixen àmbar per balanceig.

UGA (supressors òpal):

Derivats del tRNA^{Trp}

En alguns casos no hi ha mutació en l'anticodó,
que continua sent CCA i reconeix el codó
original UGG. La mutació d'una G per A en
el braç D estabilitza el tRNA (passa
d'aparellament G:U a A:U) i altera la
conformació de l'anticodó.

Suppressors have anticodon mutations					
Locus	tRNA	Wild Type		Suppressor	
		Codon	Anti	Anti	Codon
supD (su1)	Ser	UCG	CGA	CUA	UAG
supE (su2)	Gln	CAG	CUG	CUA	UAG
supF (su3)	Tyr	UA ^C _U	GUA	CUA	UAG
supC (su4)	Tyr	UA ^C _U	GUA	UUA	UA ^A _G
supG (su5)	Lys	AA ^A _G	UUU	UUA	UA ^A _G
supU (su7)	Trp	UGG	CCA	UCA	UG ^A _G

tRNAs supressors de mutacions *nonsense*

tRNAs supressors de parada: causen problemes a la cèl·lula?

- tRNA supressors coexisteixen amb els altres tRNAs.
- tRNA supressors competeixen amb RF (*Release Factors*) importants per a l'acabament de la traducció.

UAG

Eficiència 10-50%.
UAG es fa servir molt poc.

UAA (10%) i **UGA** (1%)
S'utilitzen més sovint com a codons d'aturada.

UAG. La meitat dels senyals *STOP* es lligen com a aa. *E. coli* ho tolera perquè aquest codó d'aturada no es fa servir freqüentment

UAA. S'utilitza amb major freqüència com a codó d'aturada i els tRNAs són menys eficients; la supressió provoca defectes de creixement, amb moltes proteïnes aberrants.

UGA. Sense problemes; la forma mutant reté la seua capacitat de reconèixer Trp

-Cèl·lules amb mutacions supressores poden estar molt afectades

Energètica de la traducció

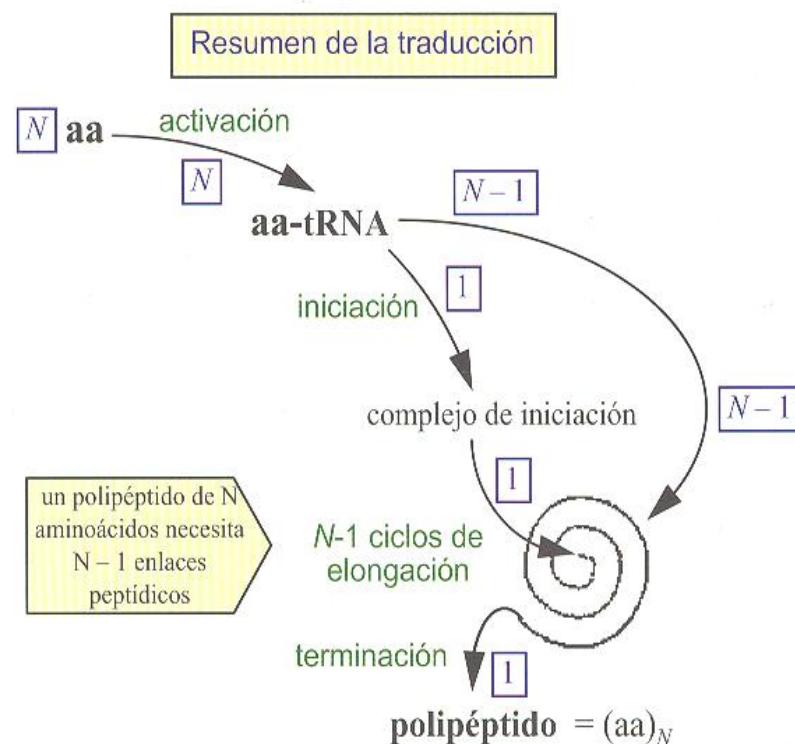
Per cada aa que s'uneix es consumeixen:

- 2 ATP:** formació de l'aa-tRNA per l'aaRS (conversió d'ATP en AMP)
- 1 GTP:** entrada de l'aa-tRNA al lloc A per EF-Tu (a partir del segon aminoàcid)
- 1 GTP:** translocació per EF-G (a partir del segon aminoàcid)

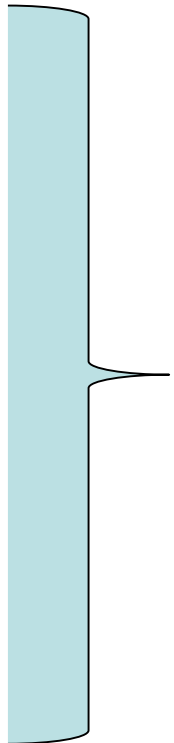
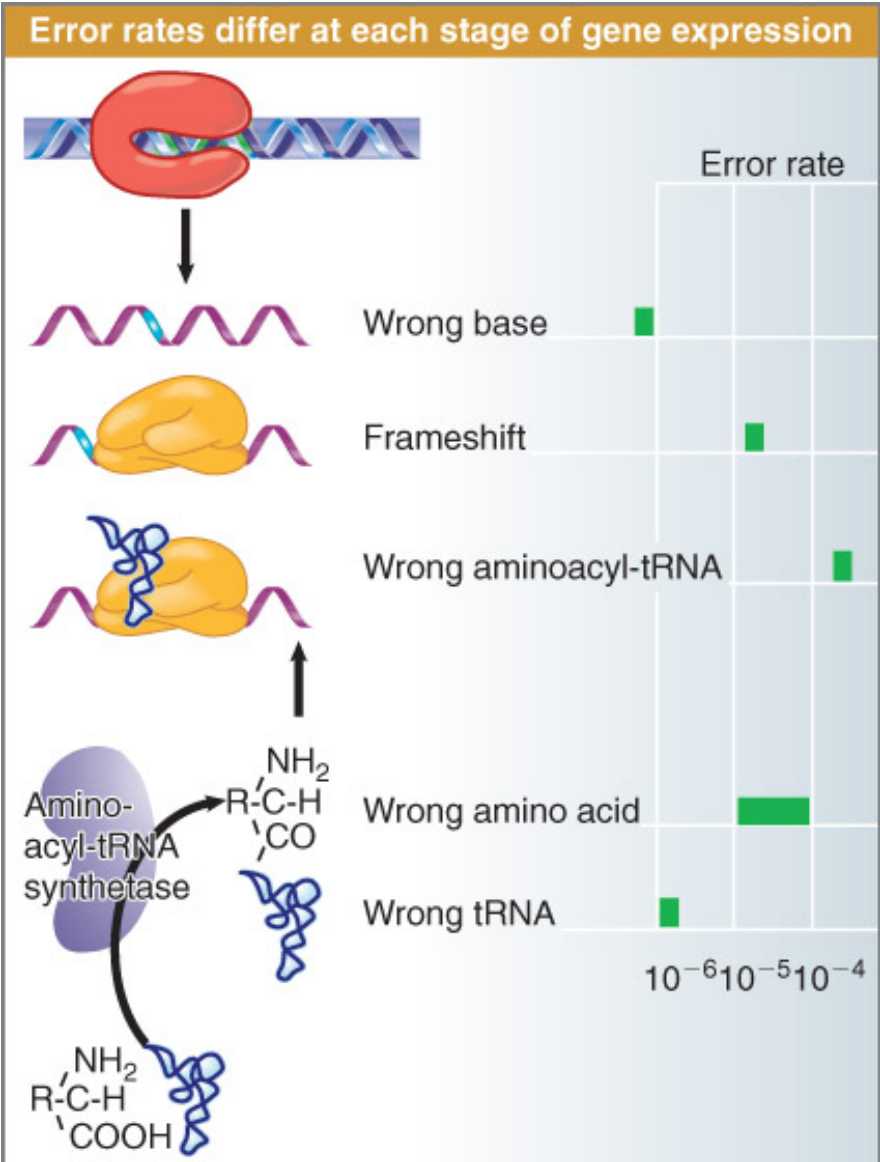
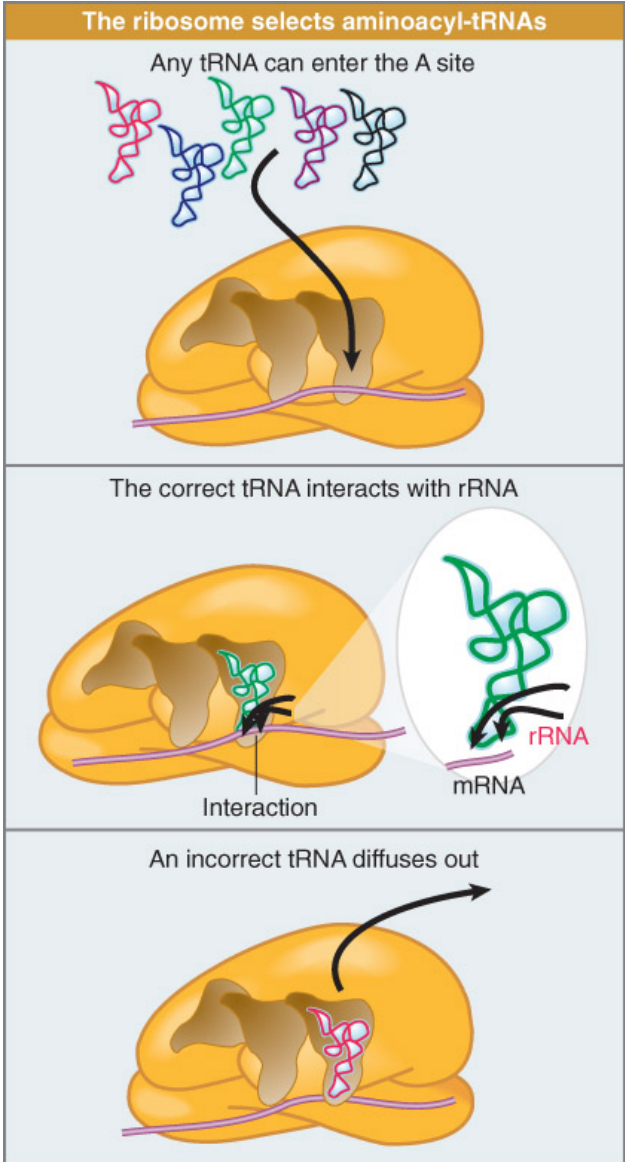
A més, durant la síntesi de **cada polipèptid** es consumeix:

- 1 GTP** (associat a IF-2) quan s'incorpora la subunitat 50S
- Hi podria haver també algun consum d'energia en la incorporació de l'mRNA
- 1 GTP** unit a RF3 durant la terminació
- 1 GTP** unit a EF-G durant la terminació

La síntesi d'una proteïna bacteriana de 300 aas suposa el consum de 1201 enllaços fosfodièster



Errors en la traducció



Errors en la traducció

Hi ha tres mecanismes de control durant la traducció:

- tRNAs aparellats correctament tenen menor taxa de dissociació del ribosoma que els que ho estan incorrectament
- La formació d'aparellaments correctes incrementa la taxa de l'activitat GTPasa d'EF-Tu
- tRNAs incorrectament aparellats solen dissociar-se durant la revisió de lectura posterior a l'alliberament d'EF-Tu

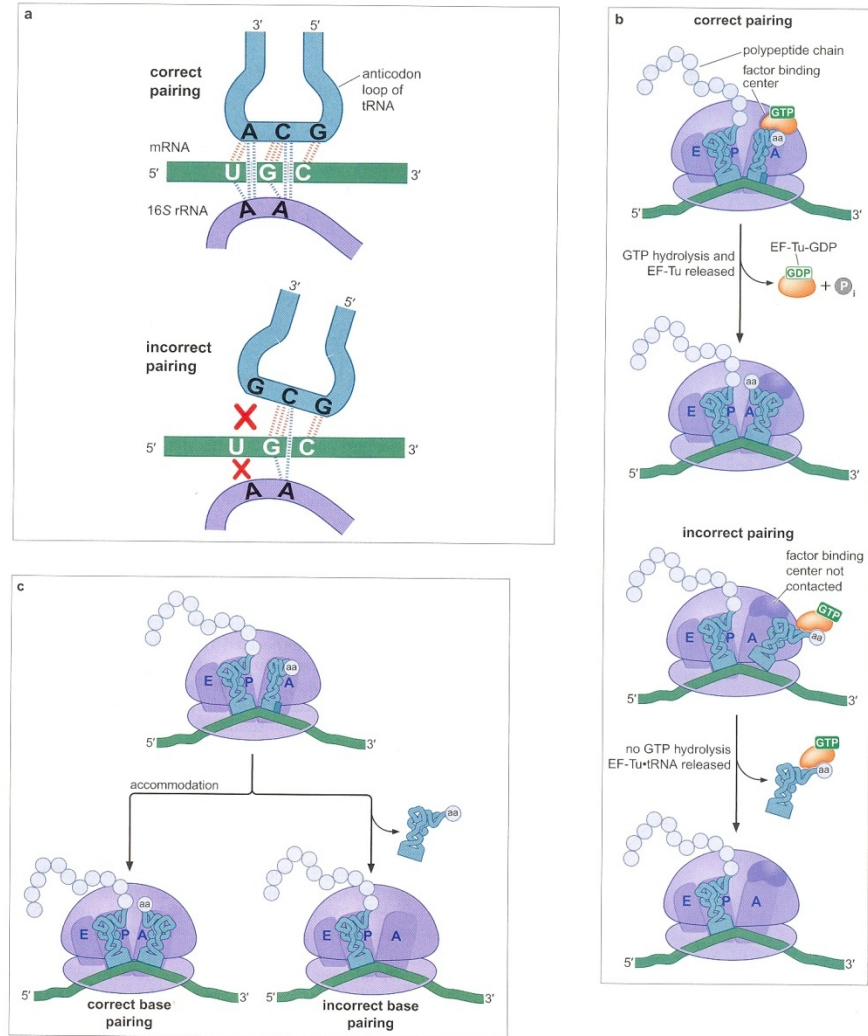


FIGURE 14-32 Three mechanisms to ensure correct pairing between the tRNA and the mRNA. (a) Additional hydrogen bonds are formed between two adenine residues of the 16S rRNA and the minor groove of the anticodon-codon pair only when they are correctly base-paired. (b) Correct base-pairing allows EF-Tu bound to the aminoacyl-tRNA to interact with the factor binding center inducing GTP hydrolysis and EF-Tu release. (c) Only correctly base-paired aminoacyl-tRNAs remain associated with the ribosome as they rotate into the correct position for peptide bond formation. This rotation is referred to as tRNA accommodation.

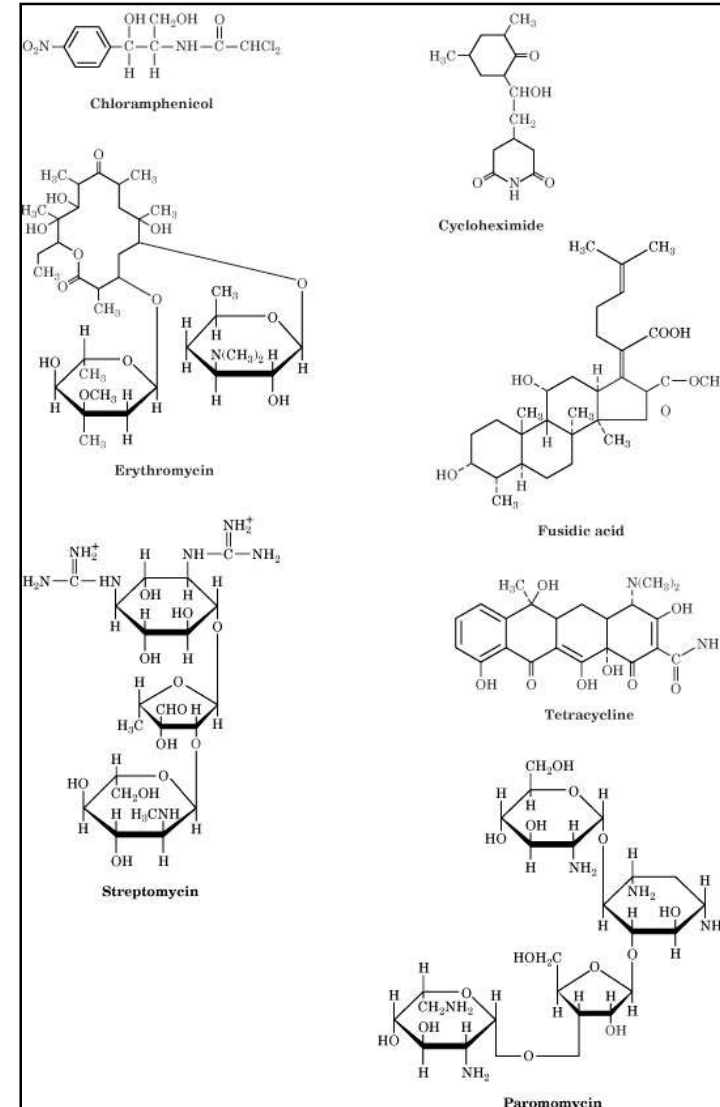
Inhibidors de la traducció

Antibiotic/Toxin	Target Cells	Molecular Target	Consequence
Tetracycline	Prokaryotic cells	A site of 30S subunit	Inhibits aminoacyl-tRNA binding to the A site
Hygromycin B	Prokaryotic and eukaryotic cells	Near the A site of 30S subunit	Prevents translocation of A-site tRNA to P site
Paromycin	Prokaryotic cells	Adjacent to the A site codon-anticodon interaction site in 30S subunit	Increases error rate during translation by decreasing selectivity of codon-anticodon pairing
Chloramphenicol	Prokaryotic cells	Peptidyl transferase center of 50S subunit	Blocks correct positioning of the A site aminoacyl-tRNA for peptidyl transfer reaction
Puromycin	Prokaryotic and eukaryotic cells	Peptidyl transferase center of large ribosomal subunit	Chain terminator; mimics the 3' end of aminoacyl-tRNA in A site and acts as acceptor for the nascent polypeptide chain
Erythromycin	Prokaryotic cells	Peptide exit tunnel of 50S subunit	Blocks exit of the growing polypeptide chain from the ribosome; arrests translation
Fusidic acid	Prokaryotic cells	EF-G	Prevents release of EF-G-GDP from the ribosome
Thiostrepton	Prokaryotic cells	Factor binding center of the 50S subunit	Interferes with the association of IF2 and EF-G with factor binding center
Kirromycin		EF-Tu	Prevents the conformational changes associated with GTP hydrolysis and, therefore, EF-Tu release
Ricin and α -Sarcin (protein toxins)	Prokaryotic and eukaryotic cells	Chemically modifies the RNA in the factor binding center of large ribosomal subunit	Prevents activation of translation factor GTPases
Diphtheria Toxin	Eukaryotic cells	Chemically modifies eEF2	Inhibits eEF2 function
Cycloheximide	Eukaryotic cells	Peptidyl transferase center of the 60S subunit	Inhibits peptidyl transferase activity

Antibiòtics com a inhibidors de la traducció

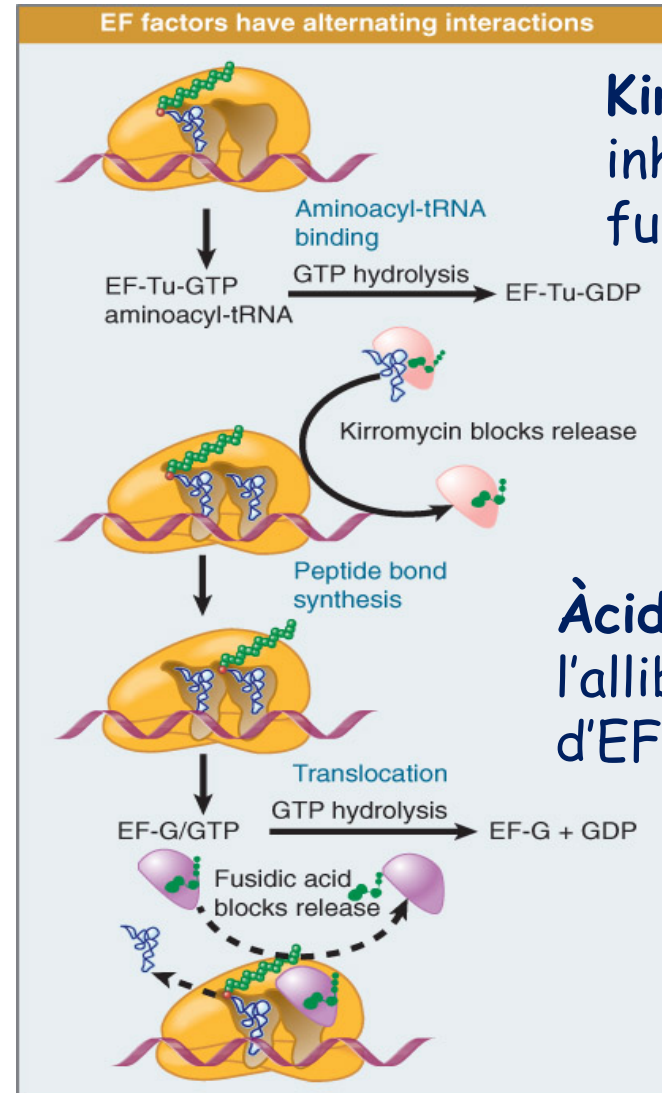
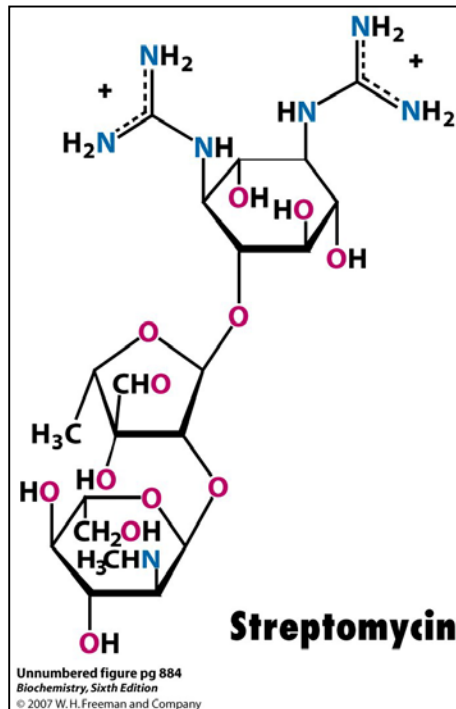
TABLE 29.4 Antibiotic inhibitors of protein synthesis

Antibiotic	Action
Streptomycin and other aminoglycosides	Inhibit initiation and cause misreading of mRNA (prokaryotes)
Tetracycline	Binds to the 30S subunit and inhibits binding of aminoacyl-tRNAs (prokaryotes)
Chloramphenicol	Inhibits the peptidyl transferase activity of the 50S ribosomal subunit (prokaryotes)
Cycloheximide	Inhibits the peptidyl transferase activity of the 60S ribosomal subunit (eukaryotes)
Erythromycin	Binds to the 50S subunit and inhibits translocation (prokaryotes)
Puromycin	Causes premature chain termination by acting as an analog of aminoacyl-tRNA (prokaryotes and eukaryotes)



Exemples d'antibiòtics inhibidors de la traducció

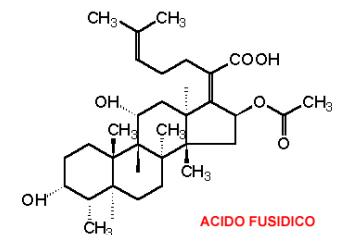
Estreptomicina: interfereix amb la unió de fMet-tRNA al ribosoma → inici



Kirromicina: inhibeix la funció d'EF-Tu

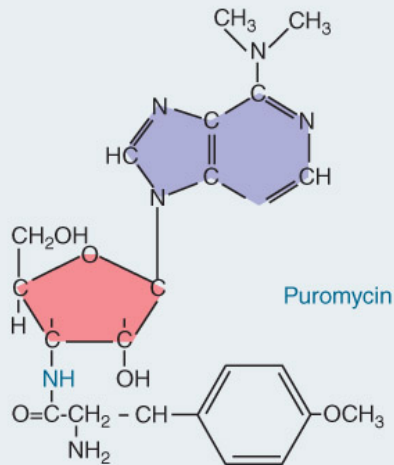
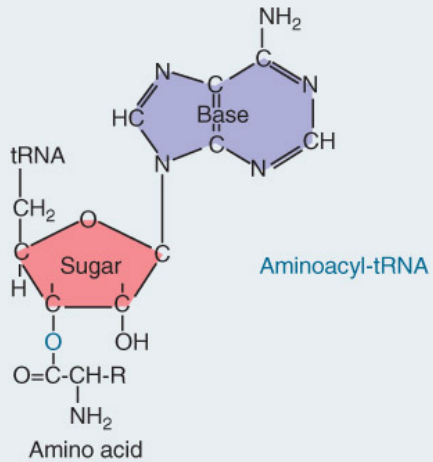
elongació

Àcid fusídic: evita l'alliberament d'EF-G-GDP



Exemples d'antibiòtics inhibidors de la traducció

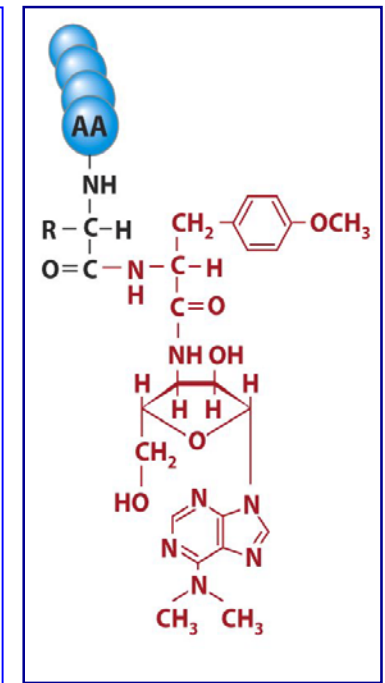
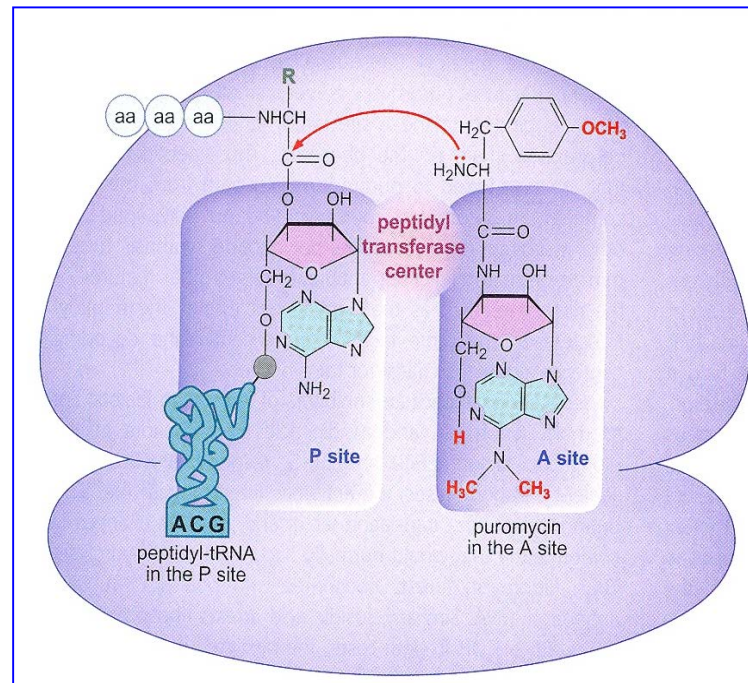
Puromycin resembles aminoacyl-tRNA



Puromicina → **Acabament**

Puromicina:

- Per semblança amb aa-tRNA s'uneix al lloc A en el ribosoma i evita l'entrada de l'aa-tRNA real.
- Forma un enllaç amb el grup carboxil de la cadena polipeptídica en formació i aquesta resta lliure.



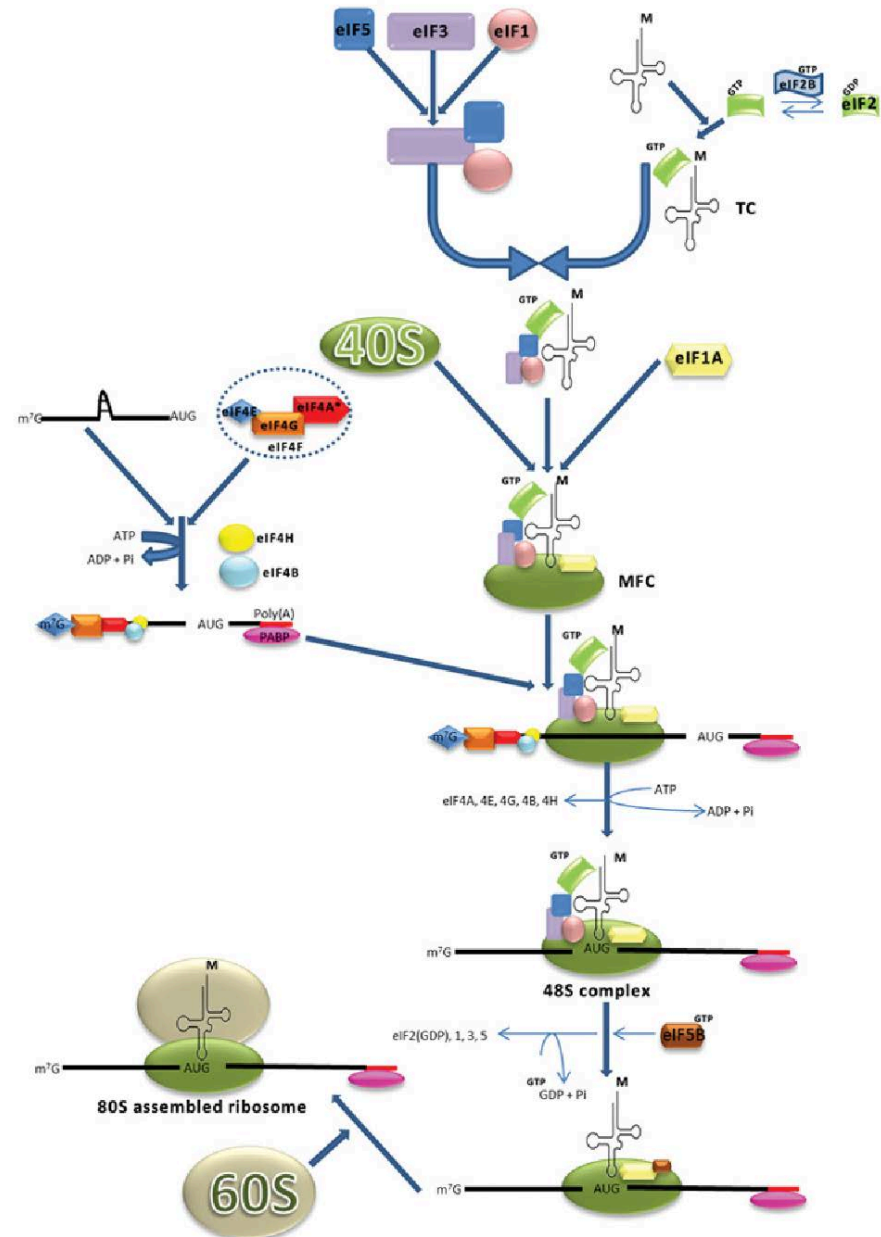
Tema 10

Introducció.

Regulació general per modificació de la maquinària traduccional: proteòlisi i fosforilació.

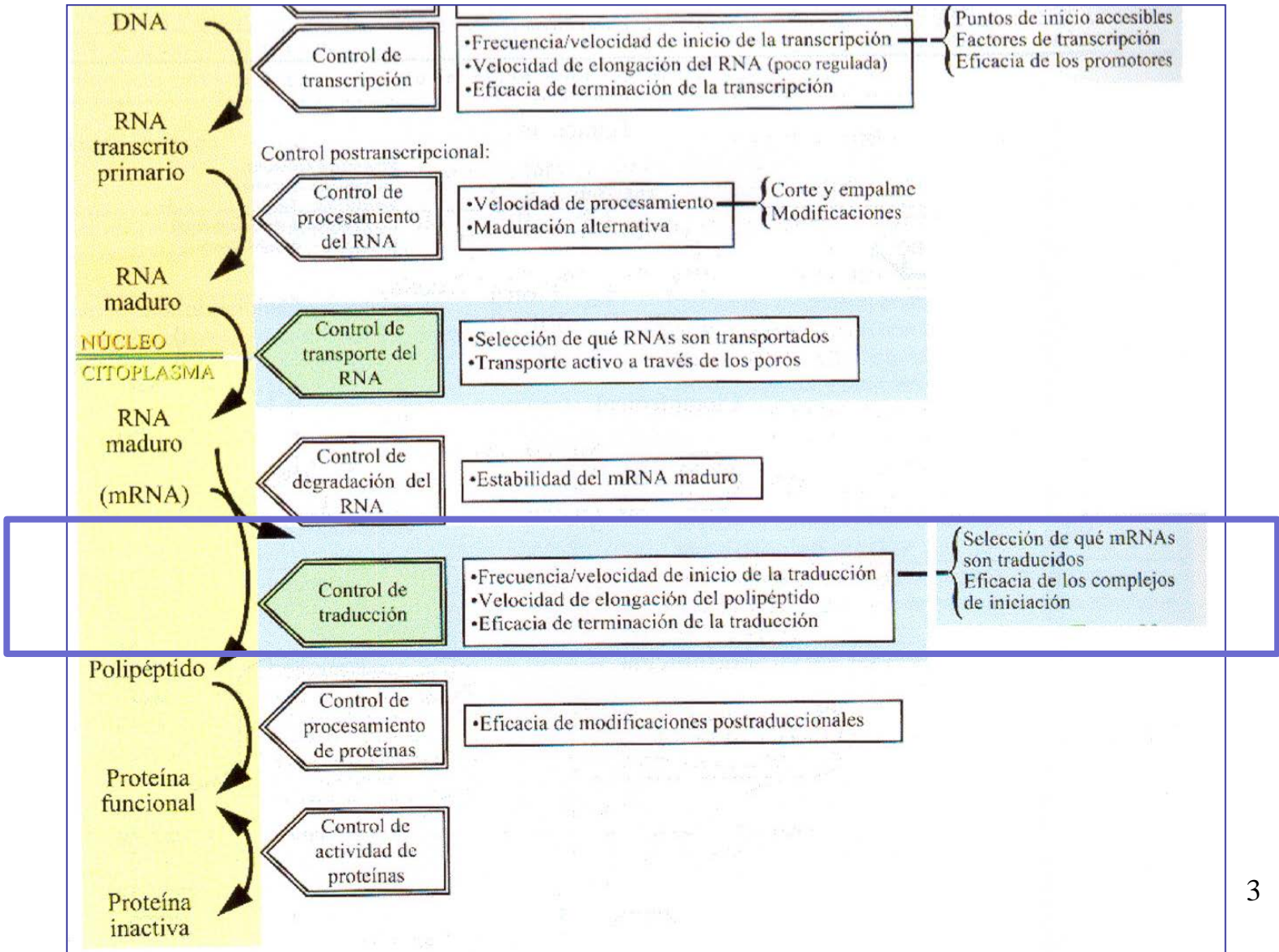
Regulació al nivell de l'mRNA: zona 5'UTR i zona 3' UTR.

Regulació de la traducció en procariotes: regulació autògena.



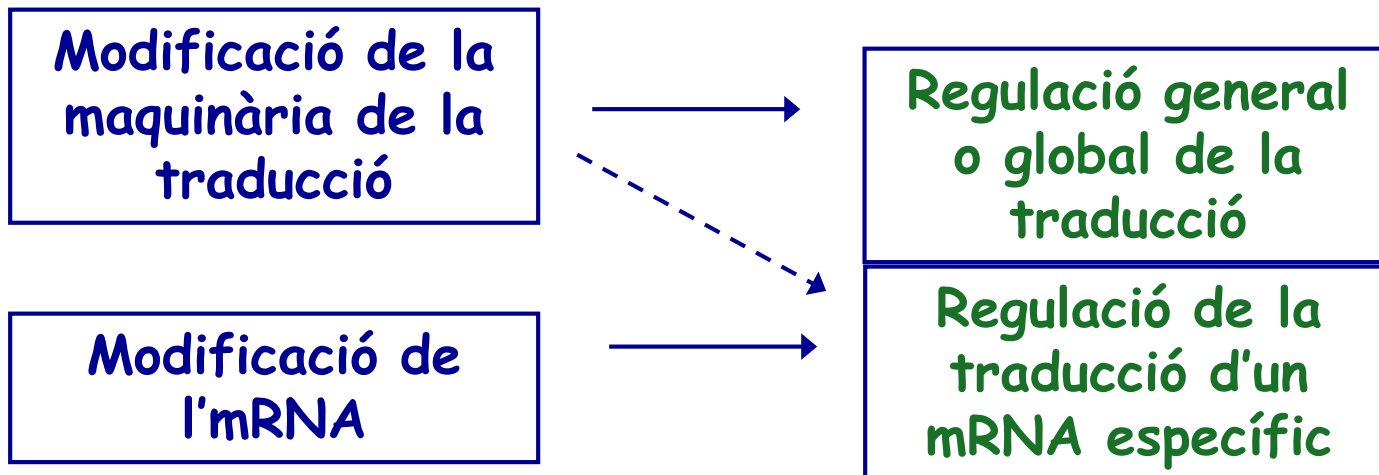
Regulació de la traducció en
eucariotes

Regulación de la traducción



Regulació de la traducció

- **Global o específica de gen**
- **Múltiples mecanismes:**
 - Modificació postraduccionals dels eIFs
 - Aspectes estructurals de l'mRNA (*cis*)
 - Interaccions mRNA-proteïna (*trans*)



- **Té lloc principalment en l'etapa d'inici**

Regulació de la traducció en eucariotes

- 1. Regulació global de la traducció**
2. Regulació de la traducció d'un mRNA particular

Regulació global de la traducció

- En resposta a l'estat fisiològic de la cèl·lula
- Pot activar o bloquejar
- Exemples de condicionants:

Mitosi

Diferenciació

Xoc tèrmic

Infecció viral

Toxines

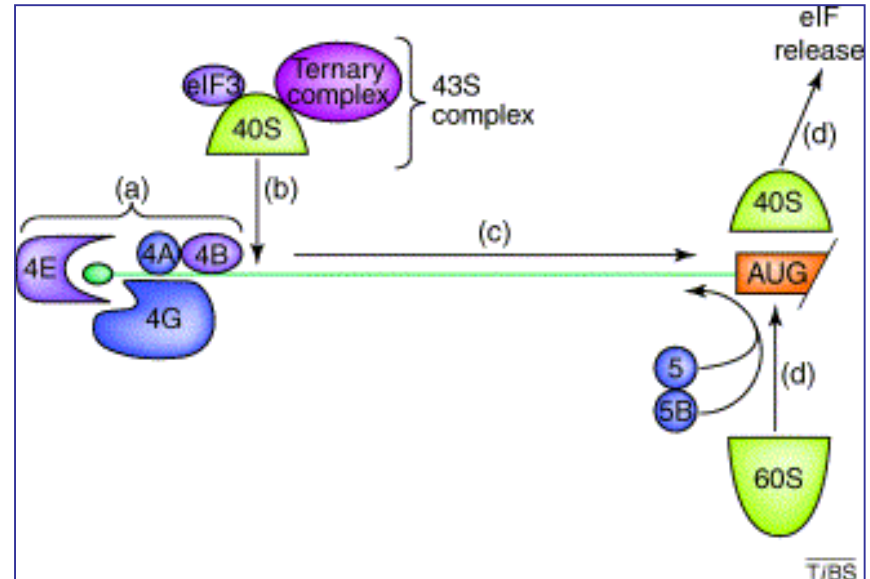
Concentració intracel·lular de ions

Hormones / factors de creixement

Regulació global de la traducció

Principals dianes:

- **eIF2**

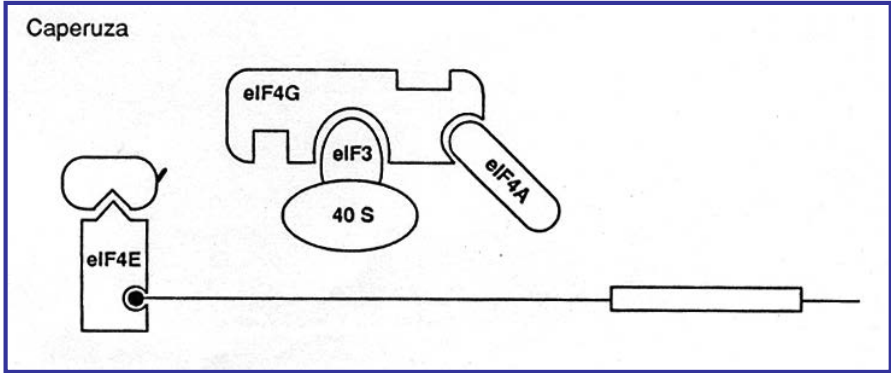
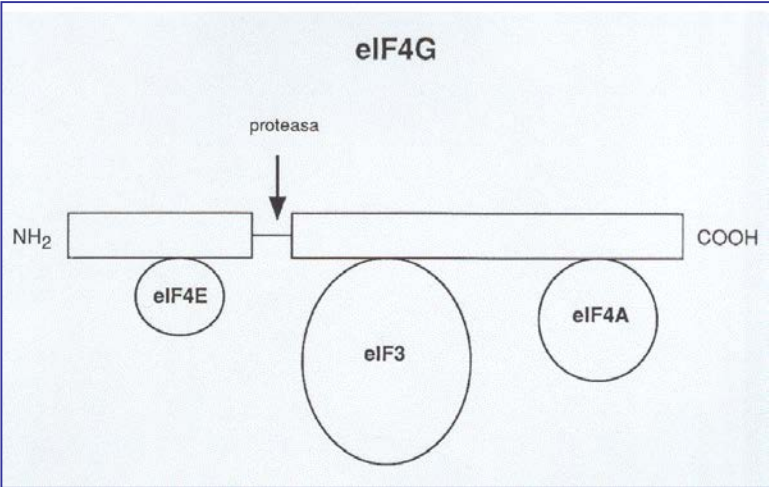
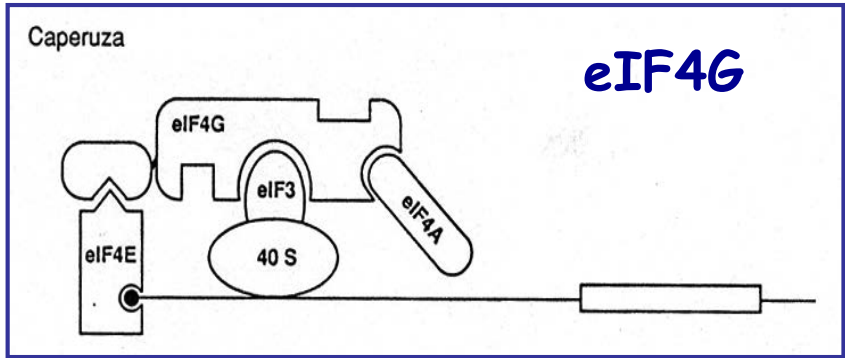


- El complex eIF4F:

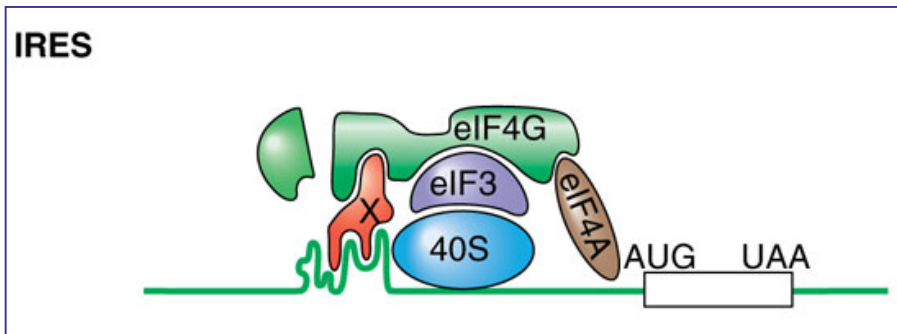
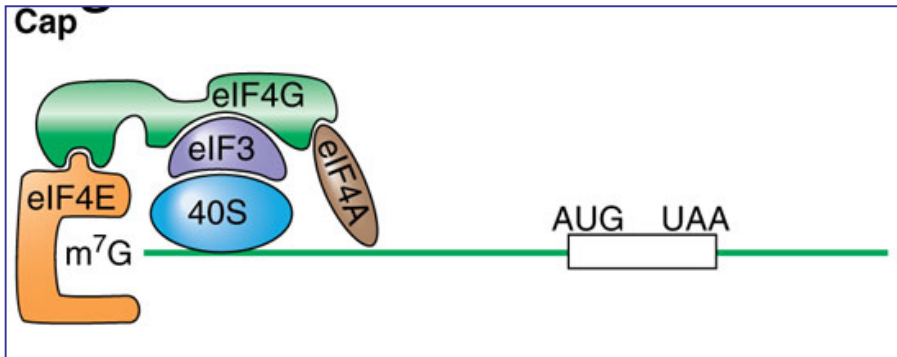
eIF4E - cap binding protein - ~25 kD

eIF4G - scaffoldin protein - 220 kD

Regulació global de la traducció: proteòlisi



Regulació global de la traducció: proteòlisi



P. ex.: infeccions per Picornavirus
Els seus mRNAs tenen IRES i no caputxa en 5'.

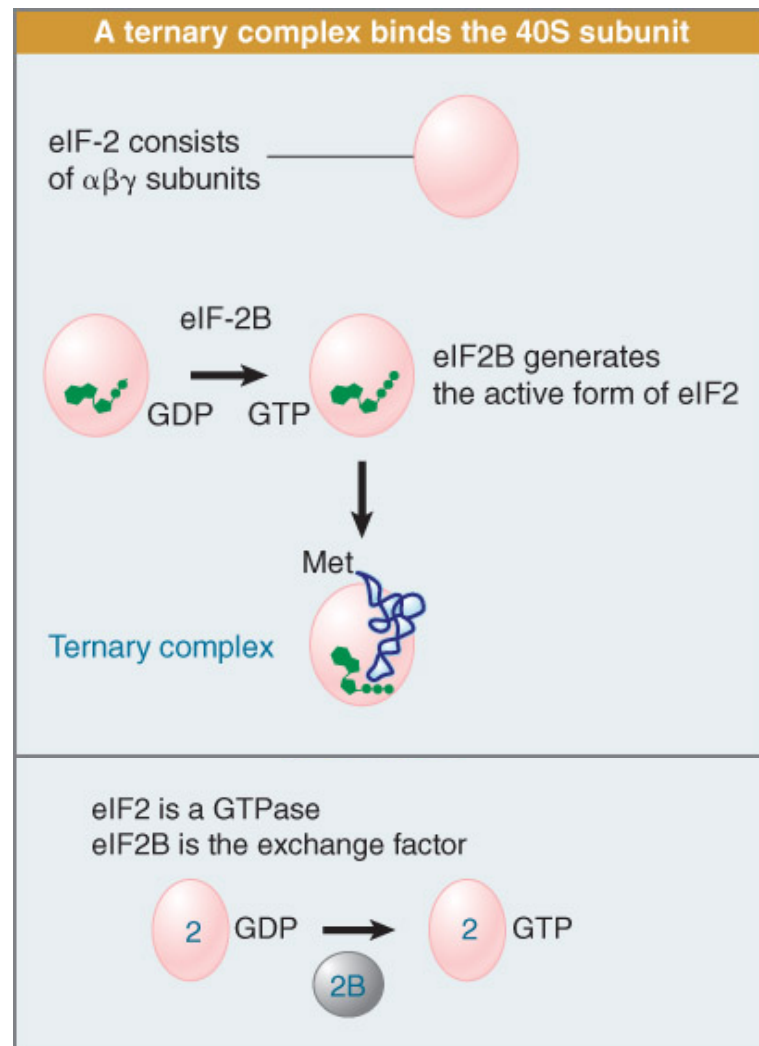
Codifiquen proteases que separen les regions amino i carboxil d'eIF-4G.

Regulació global de la traducció: fosforilació

Fosforilació d'eIF2

$eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met}$

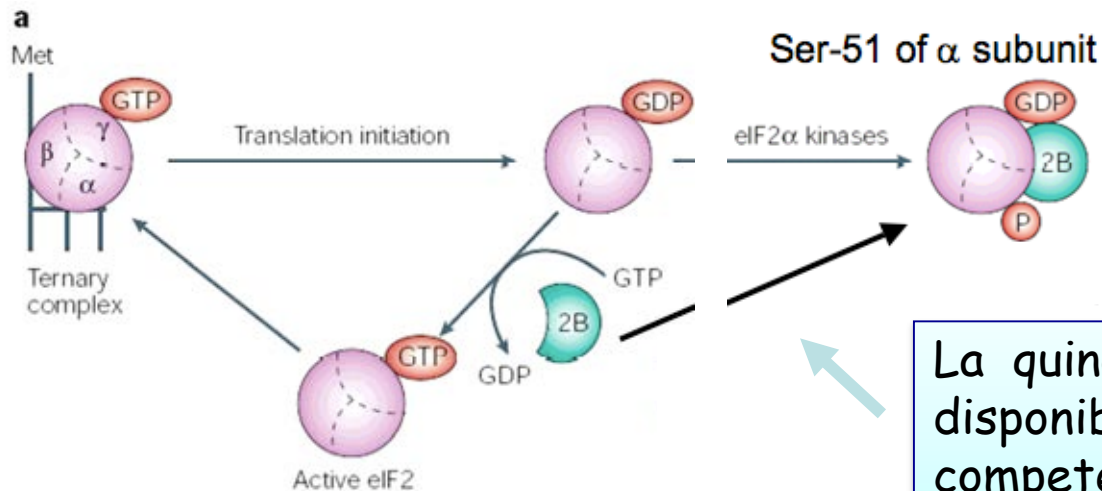
eIF2B: intercanvi GDP/GTP d'eIF2



Regulació global de la traducció: fosforilació

Fosforilació d'eIF2

- eIF2 té 3 subunitats: α^* , β , γ .



La quinasa d'eIF2 redueix la disponibilitat de la forma competent d'eIF2B

- La fosforilació d'eIF2 α inhibeix la traducció
→ associació irreversible amb eIF2B.

Regulació de la traducció per una quinasa que fosforila eIF2

Regulació global de la traducció: Fosforilació

QUINASES ESPECÍFIQUES fosforilen la subunitat α d'eIF2

Algunes d'aquestes quinases estan ben caracteritzades:

HCR -*Heme Controlled Repressor*

PKR -*dsRNA activated protein kinase*

GCN2 -*General Control Nonderepressible yeast*

Condicions fisiològiques que regulen les quinases:

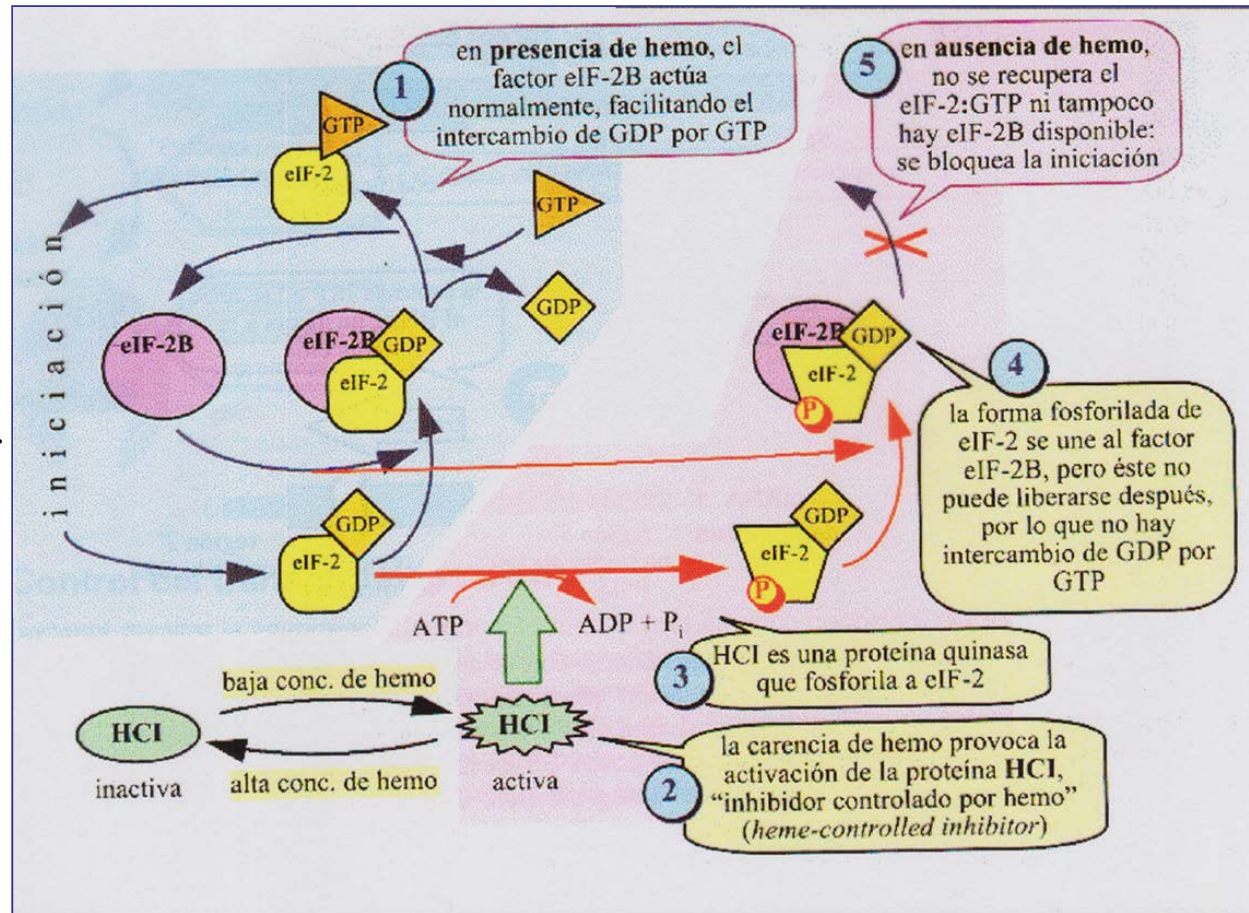
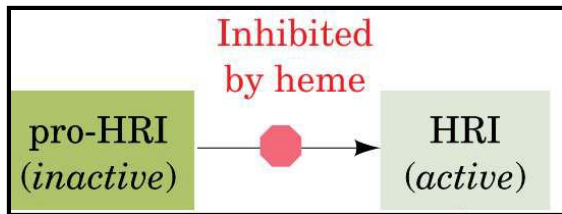
Xoc tèrmic, infecció viral (PKR), privació de nutrients, privació de factors de creixement, deficiència en hemo, mobilització de calci, estrès en el reticle endoplasmàtic.

Resultat final: bloqueig global de la síntesi de proteïnes;
es conserven els recursos i es limita la divisió cel·lular.

Regulació global de la traducció: fosforilació

Regulació de la síntesi de globina en eritròcits per fosforilació d'eIF2

HCR *Heme-Controlled Repressor*
 HRI *Heme Regulator Inhibitor*
 HCI *Heme-Controlled Inhibitor*



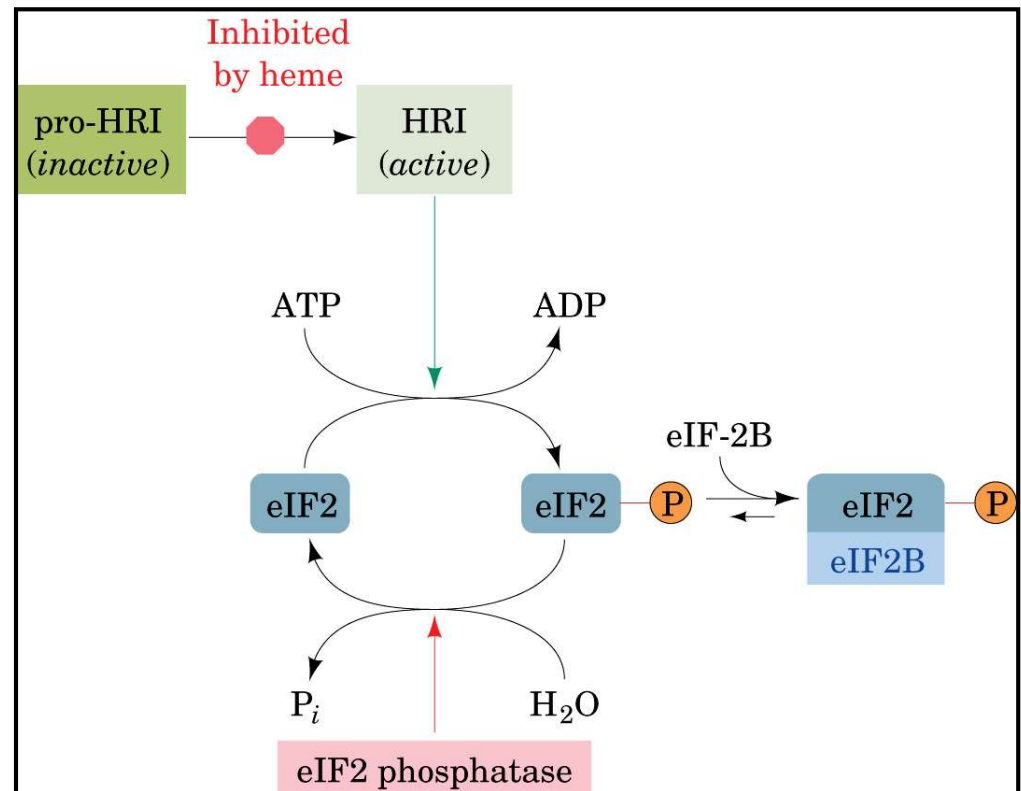
Regulació global de la traducció: fosforilació

Regulació de la síntesi de globina en eritròcits

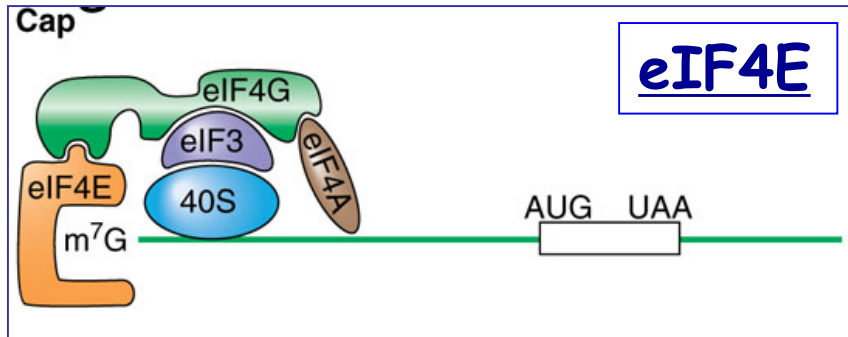
L'inhibidor regulat per hemo (**HRI**, *Heme-Regulated Inhibitor*)
fosforila el factor d'inici **eIF2**

- **Nivells elevats d'hemo** -> HRI inactiu:
 Síntesi de globina

- **Nivells baixos d'hemo** -> HRI actiu:
 La síntesi de globina s'inhibeix



Regulació global de la traducció: fosforilació



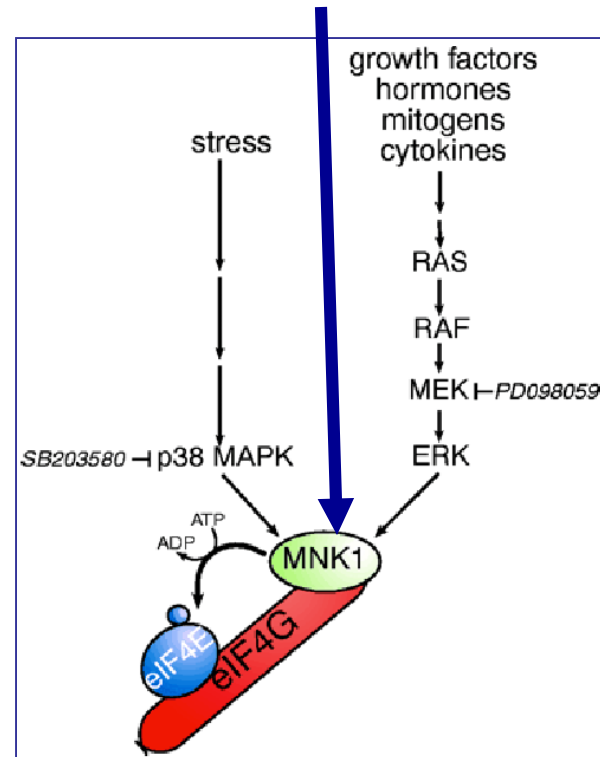
eIF4E pot fosforilar-se per Mnk1.
Associació amb eIF4G → Augmenta la seua afinitat per 5'CAP unes 4 vegades → Estimula la traducció.

Afavoreixen la fosforilació

Factors de creixement
 Insulina
 Mitògens

Afavoreixen la desfosforilació

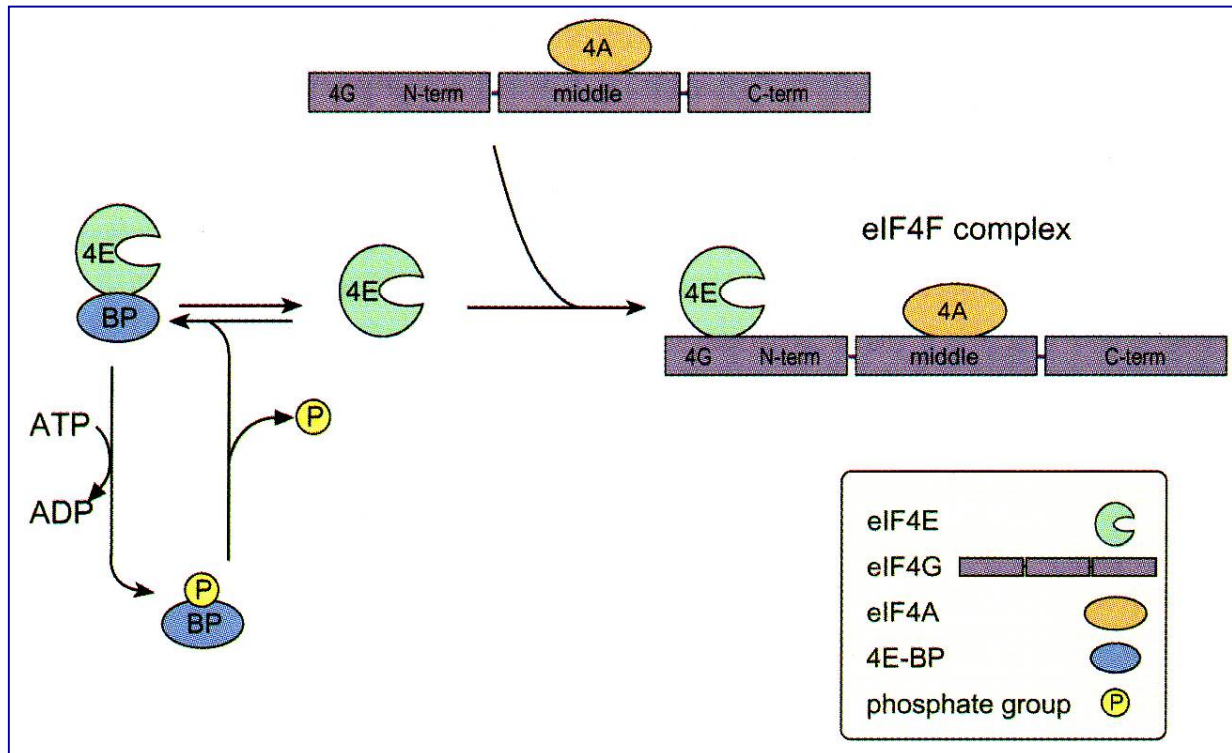
Xoc tèrmic
 Virus



Regulació global de la traducció: fosforilació

eIF4E-Binding Protein (4E-BP)

4E-BP reprimeix l'activitat de **4E** sense afectar la seua unió a la gorra 5'
4E-BP i **eIF4G** competeixen pel mateix lloc en **eIF4E**: si s'hi uneix **4E-BP**
 no es forma el complex **eIF4F**.



4E-BP

- hiperfosforilada té menys afinitat per **eIF4E**
- hipofosforilada té més afinitat per **eIF4E**

Regulació global de la traducció: fosforilació



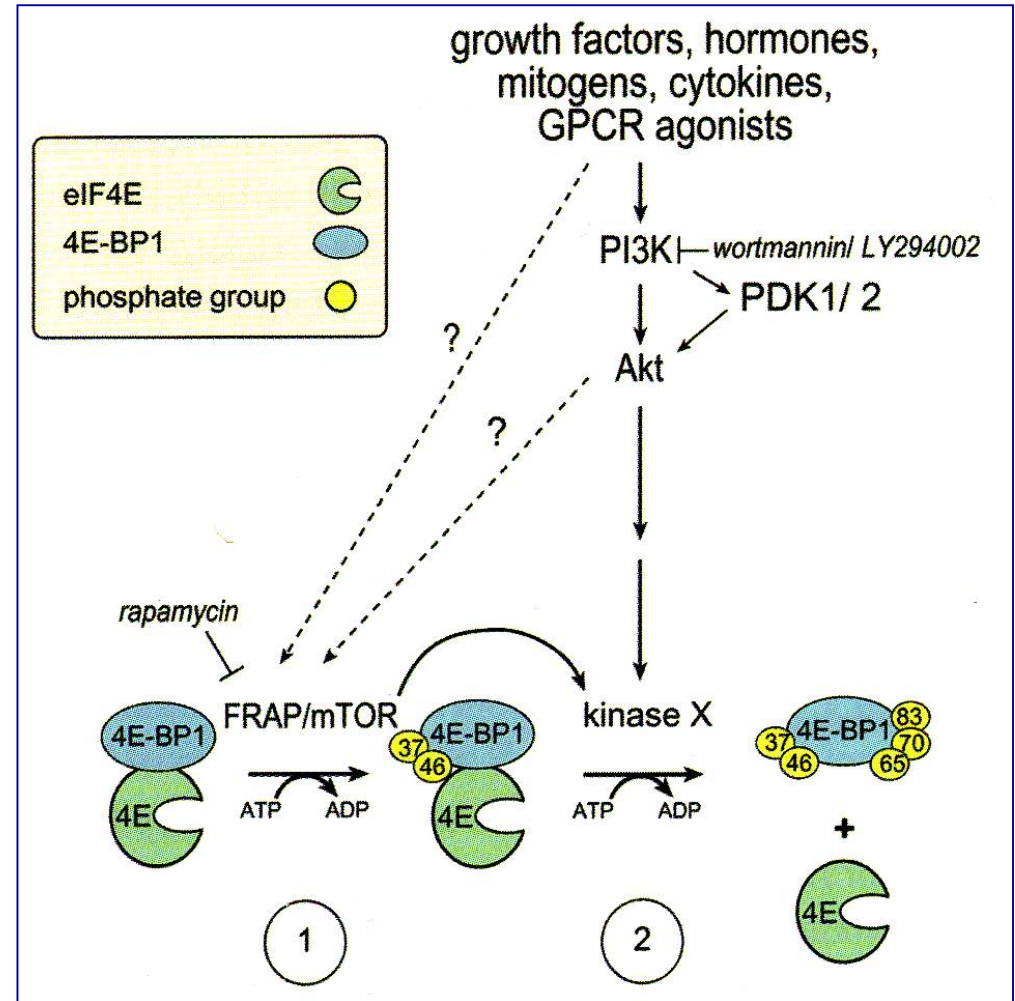
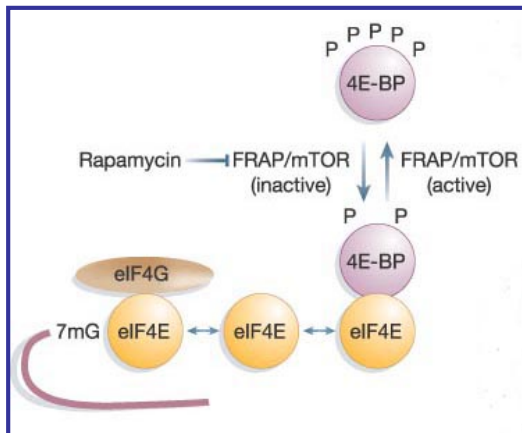
Fosforilació 4E-BP

Hormones
Factors de creixement
Mitògens

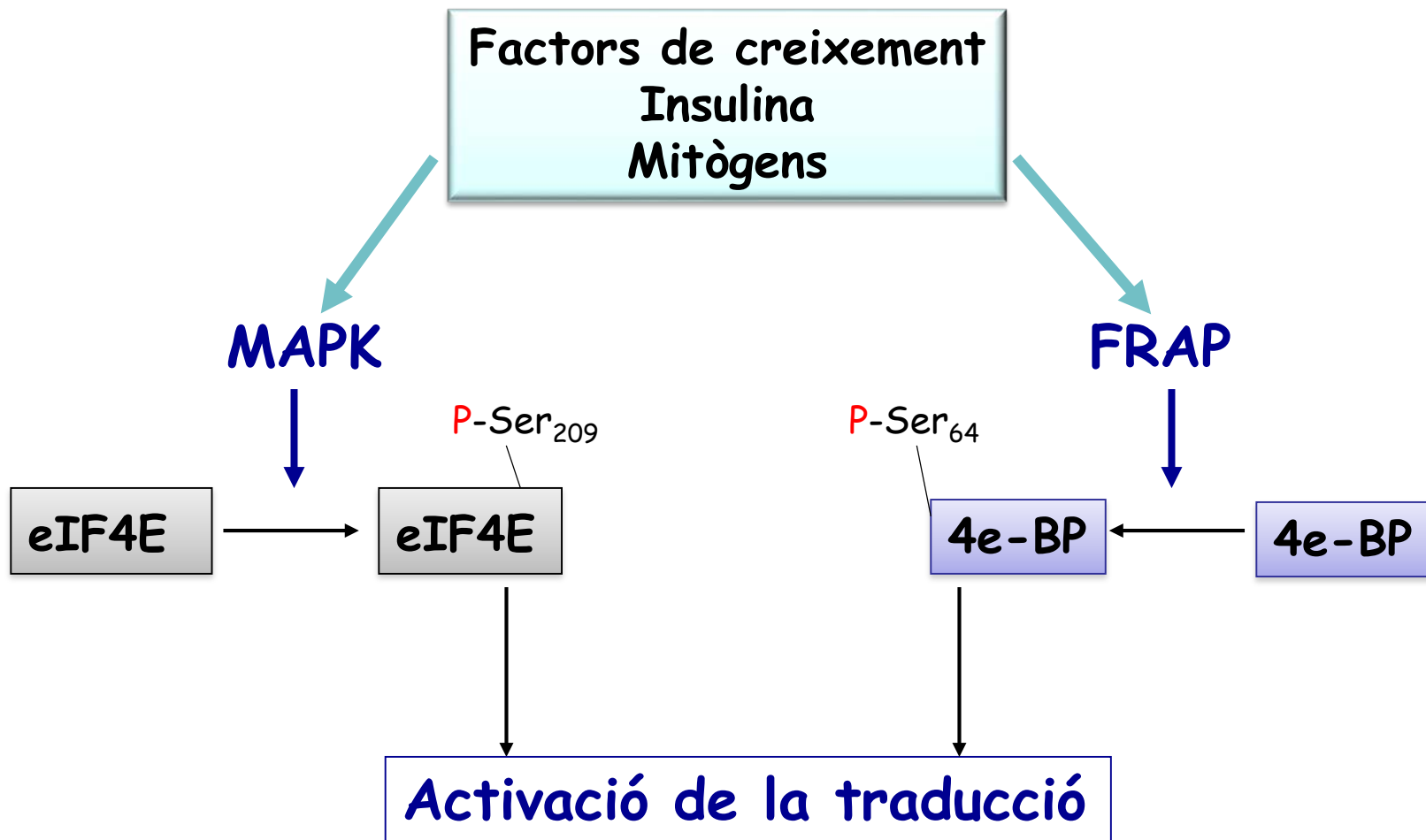


Fosforilació 4E-BP

Privació de nutrients
Certes condicions d'estrès

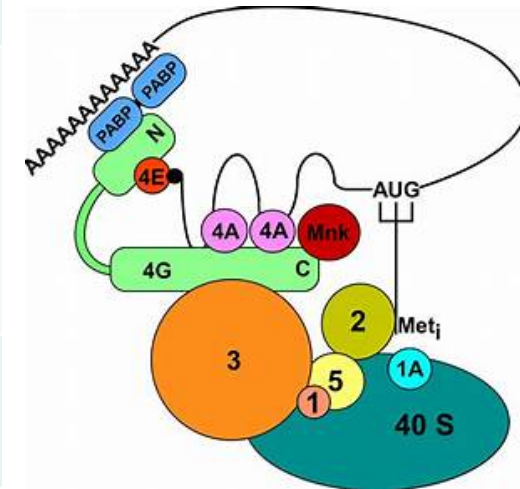


Regulació global de la traducció: fosforilació

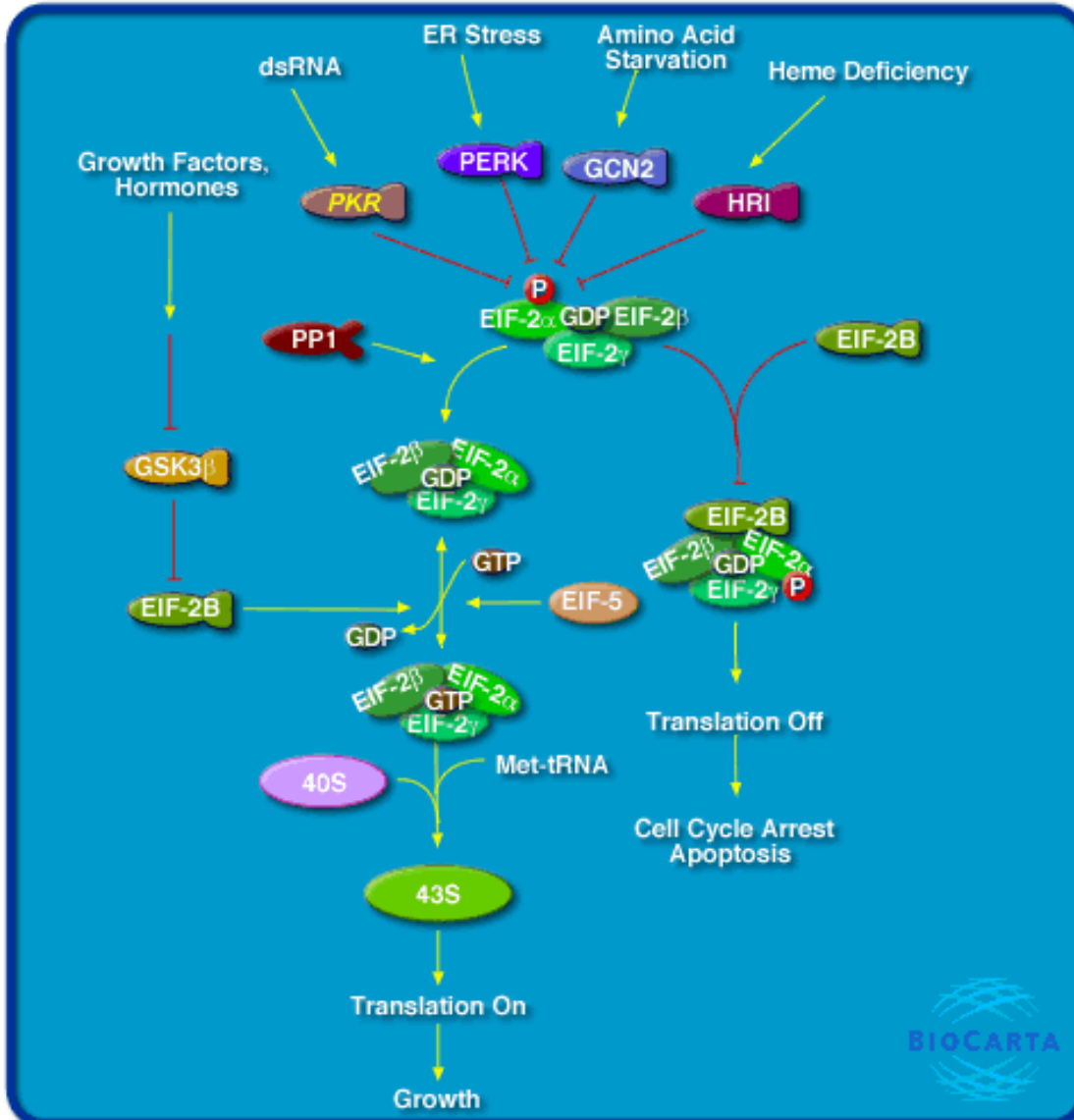


Regulació global de la traducció

Modificació postraduccional	Factor afectat	Efecte sobre la traducció	Condicions en les quals ocorre
Proteòlisi	eIF4G	Negatiu	Infeccions virals
Fosforilació per HCR, PKR, Gcn2	eIF2	Negatiu	Xoc tèrmic Infecció viral Deficiència en hemo Privació de nutrients
Fosforilació per Mnk1	eIF4E	Positiu	Factors de creixement Insulina
Fosforilació per FRAP	eIF4E-BP	Positiu	Hormones Factors de creixement



Regulació global de la traducció



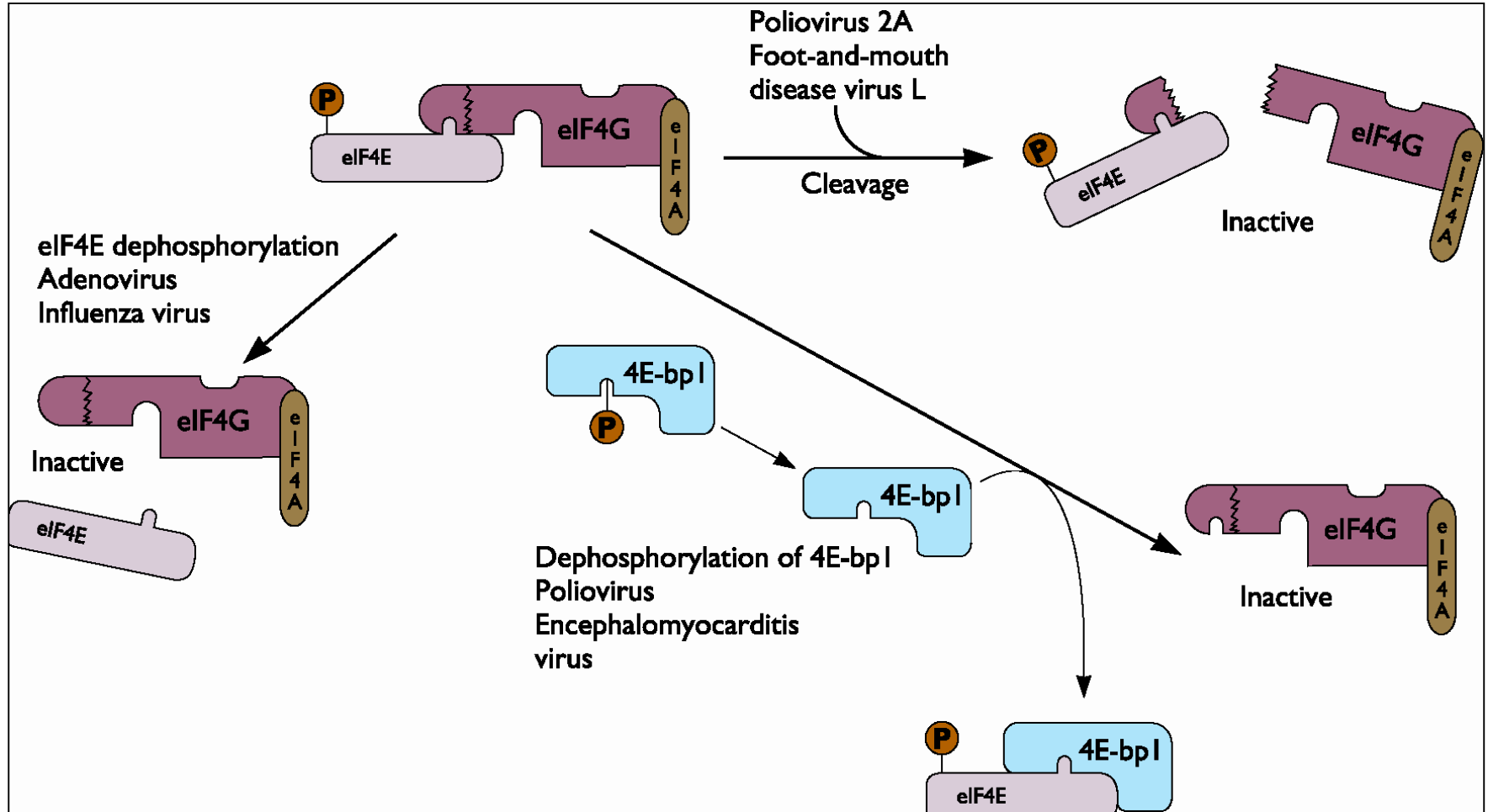
En resum:

1) Les condicions d'estrès activen quinases (PKC, HRI, GCN2) que fosforilen eIF2: s'inhibeix la traducció.

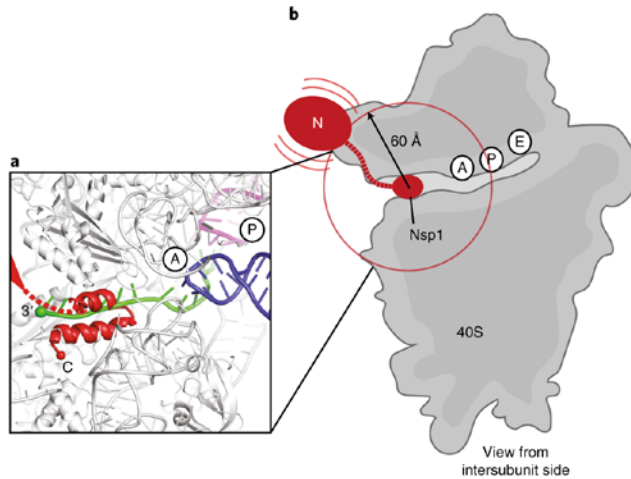
2) Els senyals de creixement activen altres rutes (MAPK, FRAP/TOR) que fosforilen eIF4E i 4E-BP: s'estimula la traducció.

3) Les condicions d'estrès activen fosfatases que inverteixen l'efecte 2: efecte negatiu sobre la traducció.

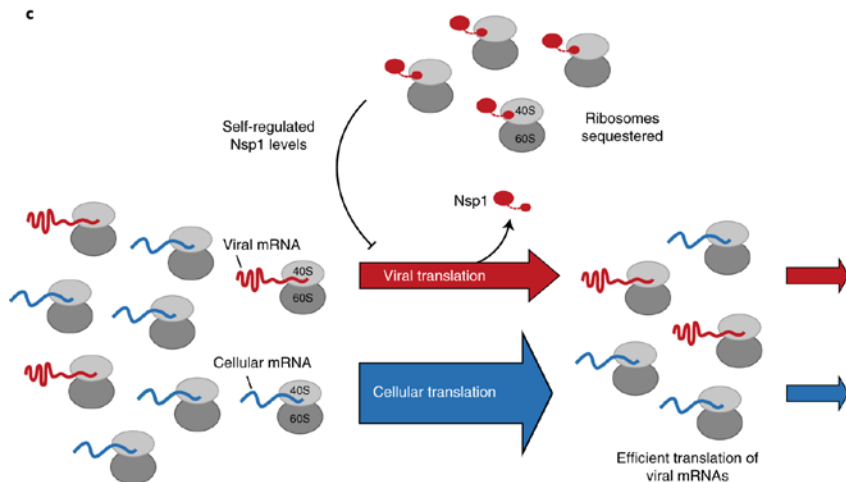
Regulació global de la traducció: regulació de l'activitat d'eIF4F per diferents virus



Regulació global de la traducció: regulació per coronavirus



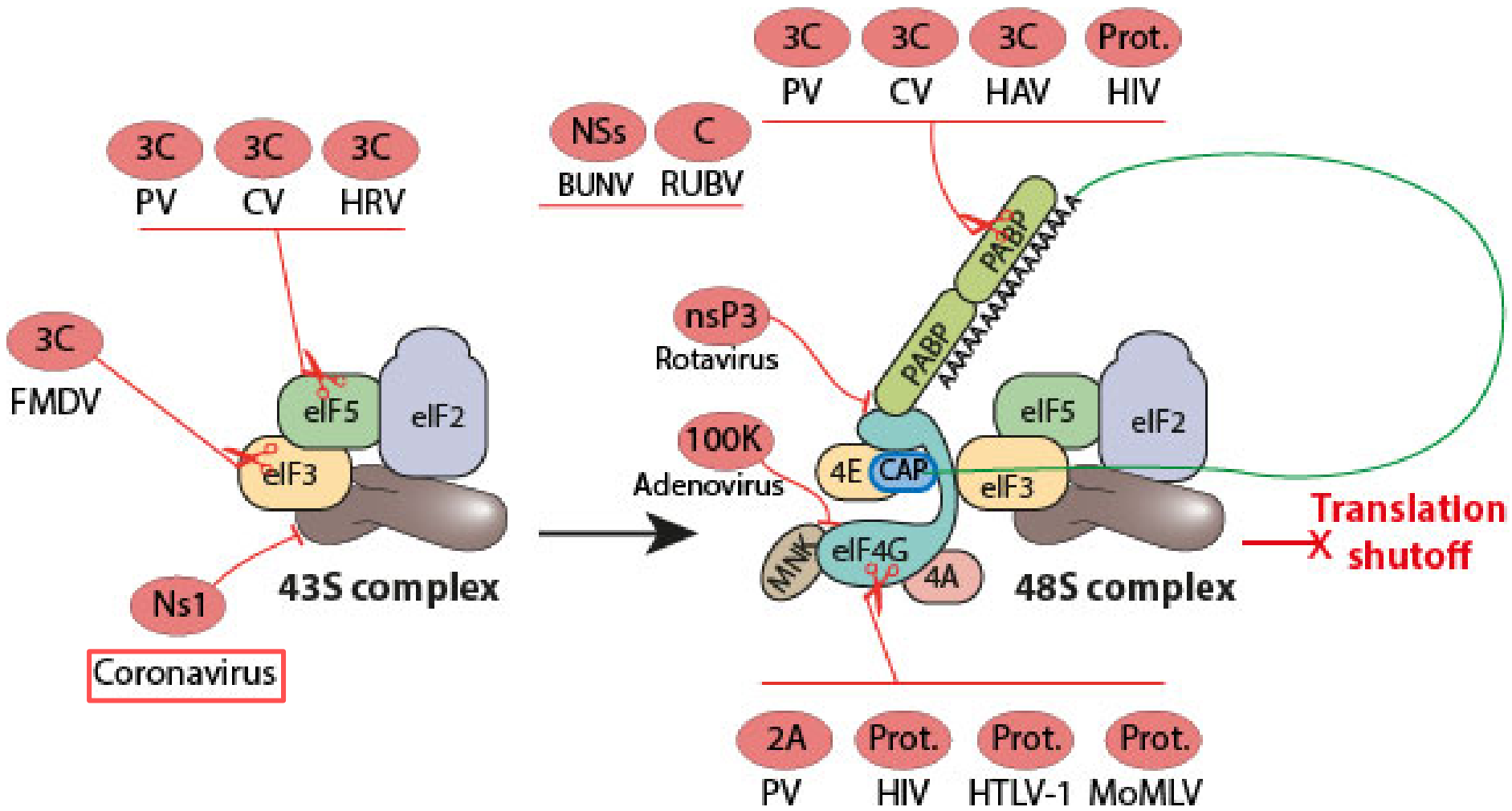
Schubert, K., Karousis, E.D., Jomaa, A. *et al.* SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* 27, 959–966 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>



Non-structural protein 1:

Inhibits host translation by interacting with the 40S ribosomal subunit. The nsp1-40S ribosome complex further induces an endonucleolytic cleavage near the 5'UTR of host mRNAs, targeting them for degradation. Viral mRNAs are not susceptible to nsp1-mediated endonucleolytic RNA cleavage thanks to the presence of a 5'-end leader sequence and are therefore protected from degradation. By suppressing host gene expression, nsp1 facilitates efficient viral gene expression in infected cells and evasion from host immune response (PubMed:[23035226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035226/)). May disrupt nuclear pore function by binding and displacing host NUP93 (PubMed:[30943371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30943371/)).

Regulació global de la traducció: regulació per diferents virus



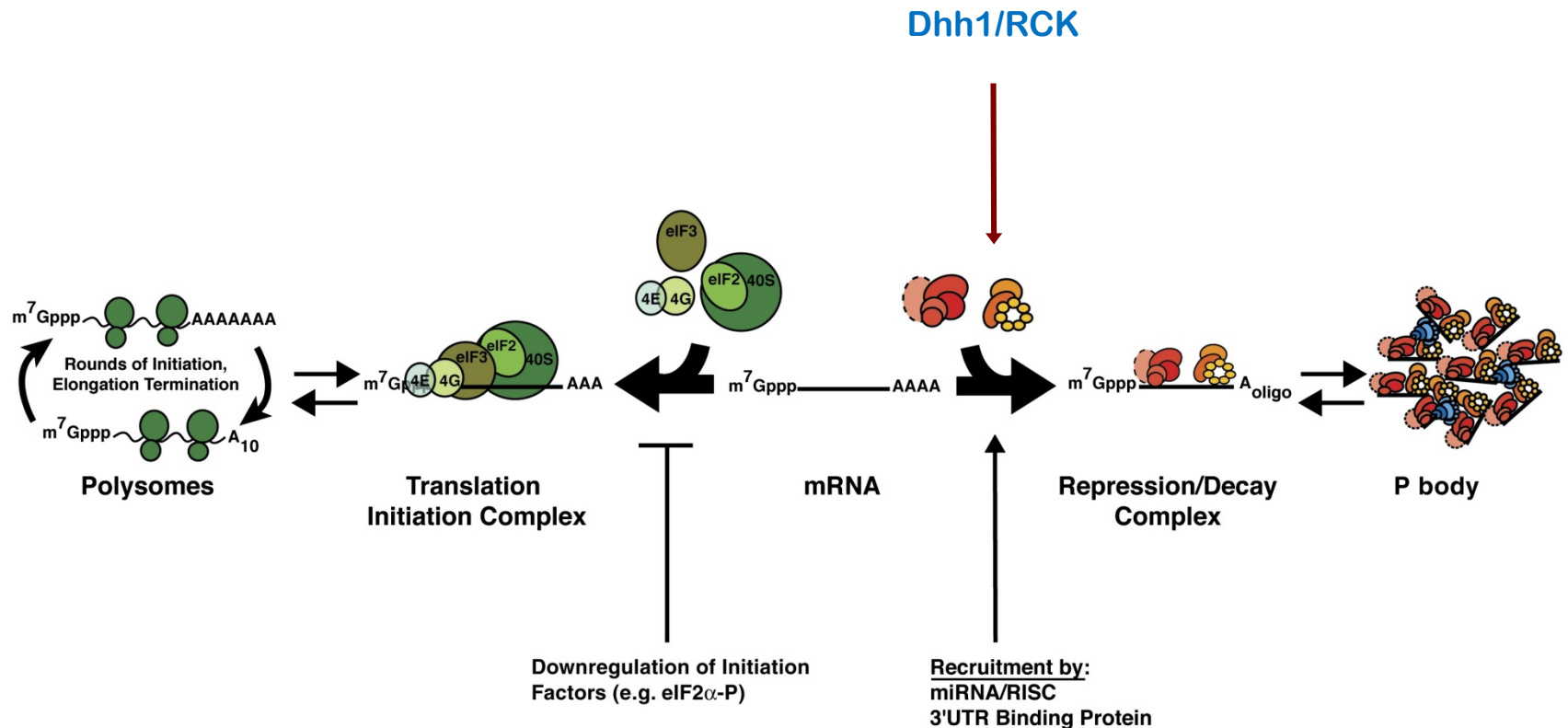
Regulació global de la traducció: els cossos P

Dhh1 (lleuat), RCK (humans): RNA helicasa

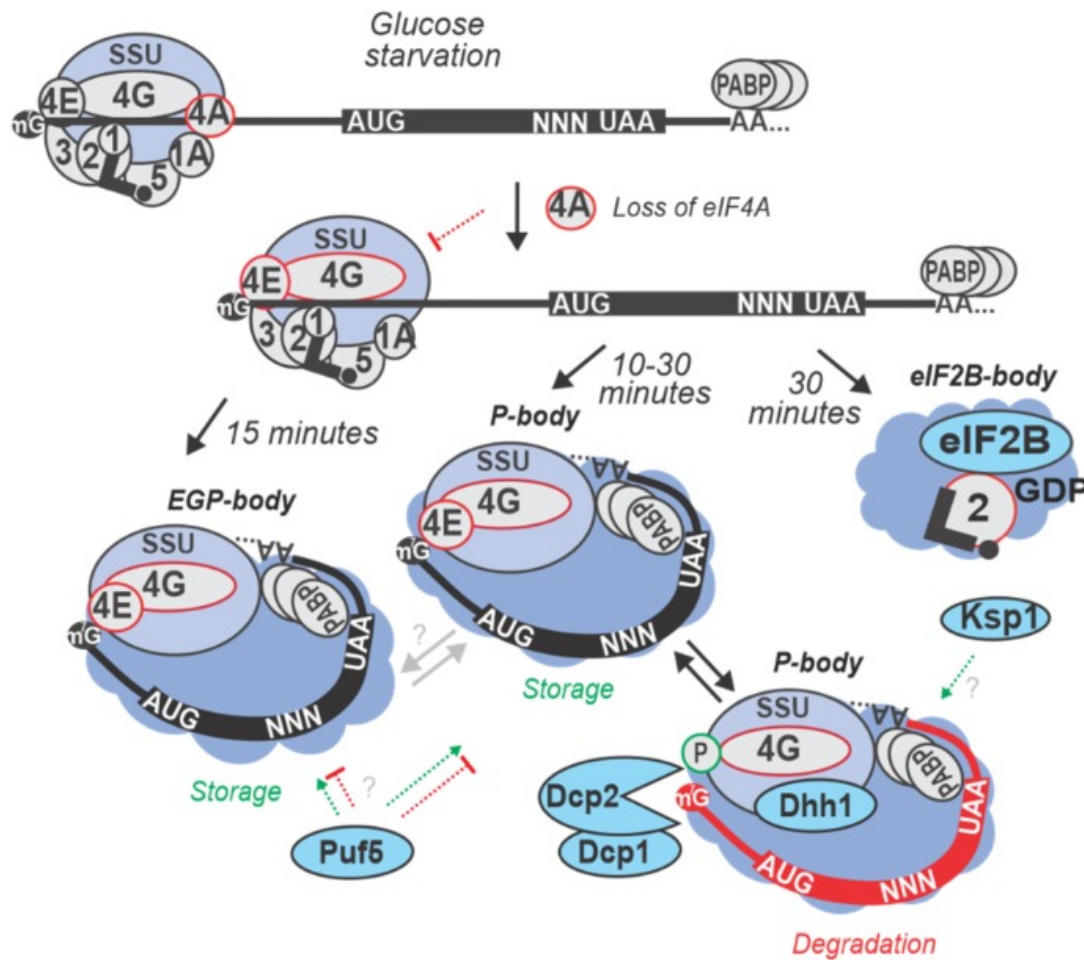
En condicions d'estrès per falta de nutrients provoca la repressió general de la traducció

Una vegada que Dhh1 ha sigut reclutat a l'mRNA, aquest és dirigit als cossos P

Mecanisme: Dhh1 inhibeix la formació del complex 48S en l'mRNA



Regulació global de la traducció: els cossos P



Re-localization of mRNA and translation factors into cytoplasmic foci during acute response to glucose starvation. Glucose starvation of 10 min in yeast results in the loss of eIF4A from the scanning complexes, which may stimulate utilization of other helicases, such as Ded1p or Dhh1p. EGP-bodies (SGs) are first formed at about 15 min of starvation, where the mRNA and the initiation factors are stored. Upon 30 min of glucose starvation, P-bodies (where mRNA can also be selectively degraded, such as due to phosphorylation of eIF4G by Ksp1p and recruitment of helicases like Dhh1p to glycolytic mRNAs) and eIF2B-bodies form. Regulatory RBPs, such as Puf5p, may mRNA-selectively promote storage or degradation decisions.

Regulació global de la traducció: els cossos P

Composició:

- 1.- mRNAs
- 2.- Proteïnes
 - Maquinària general de repressió de la traducció: Dhh1/RCK
 - Proteïnes implicades en degradació
 - Proteïnes d'unió a mRNAs específics

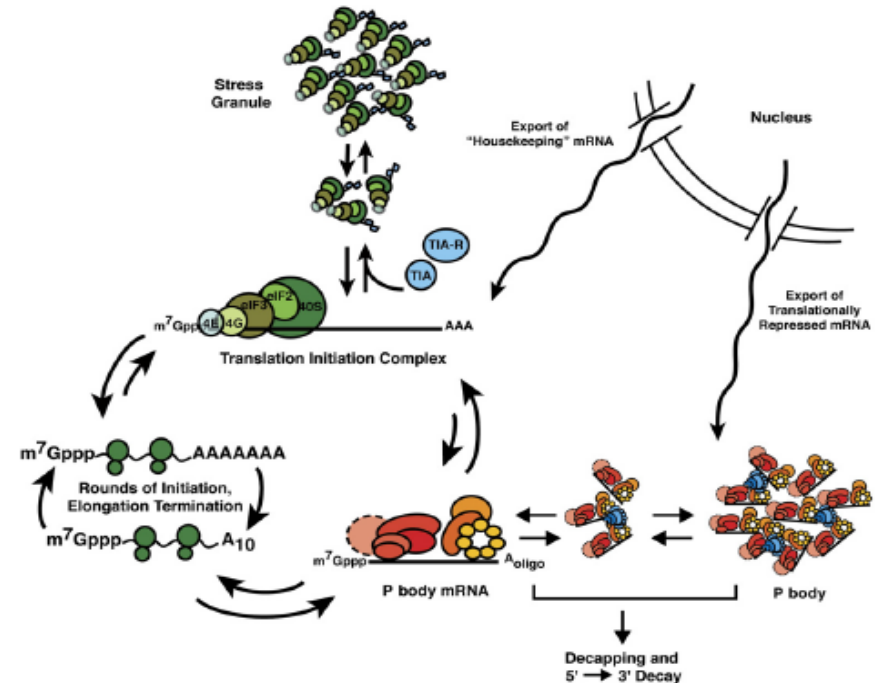
No contenen ni ribosomes ni factors d'inici de la traducció

Funció:

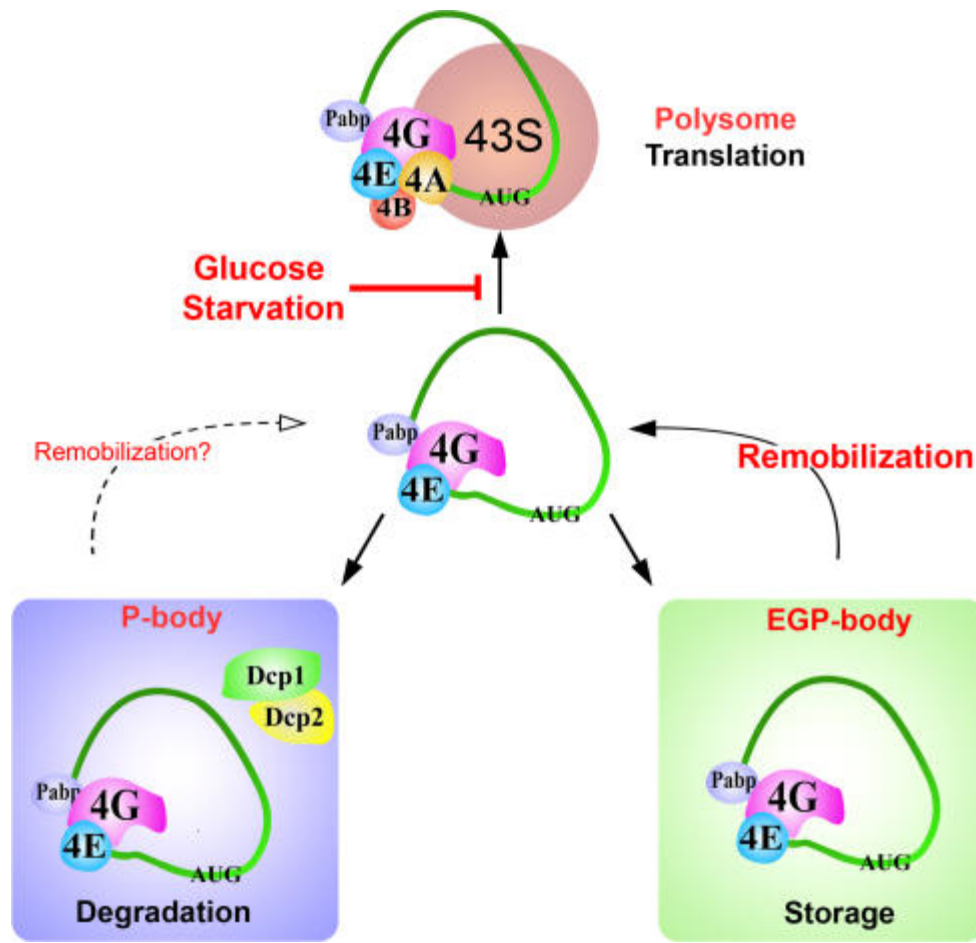
- 1.- Degradació dels mRNAs
- 2.- Control de la traducció dels mRNAs
- 3.- Emmagatzematge dels mRNAs

Quan un mRNA arriba a un cos P:

- 1- Pot ser degradat per la ruta 5' → 3'
- 2- Pot ser emmagatzemat per tal que en un moment determinat pugui abandonar el cos P i sigui traduït



Regulació global de la traducció: grànuls citoplasmàtics



Hoyle NP, Castelli LM, Campbell SG, Holmes LE, Ashe MP. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J Cell Biol.* 2007;179(1):65-74. doi:10.1083/jcb.200707010

A model for mRNA sorting in yeast. A closed loop mRNP enters the translational pool via interaction with the 43S complex. Glucose starvation inhibits this process, leaving the mRNP two potential fates: redistribution to P-bodies, in which decapping facilitates mRNA degradation, or transfer to EGP-bodies, in which a lack of decapping factors dictates mRNA storage.

Regulació de la traducció en eucariotes

1. Regulació global de la traducció
2. Regulació de la traducció d'un mRNA particular

Regulació de la traducció d'un mRNA específic

Al nivell de la regió 5'-UTR

Al nivell de la regió 3'-UTR

Dependent
de poliadenilació

Independent
de poliadenilació

Regulació específica de la traducció

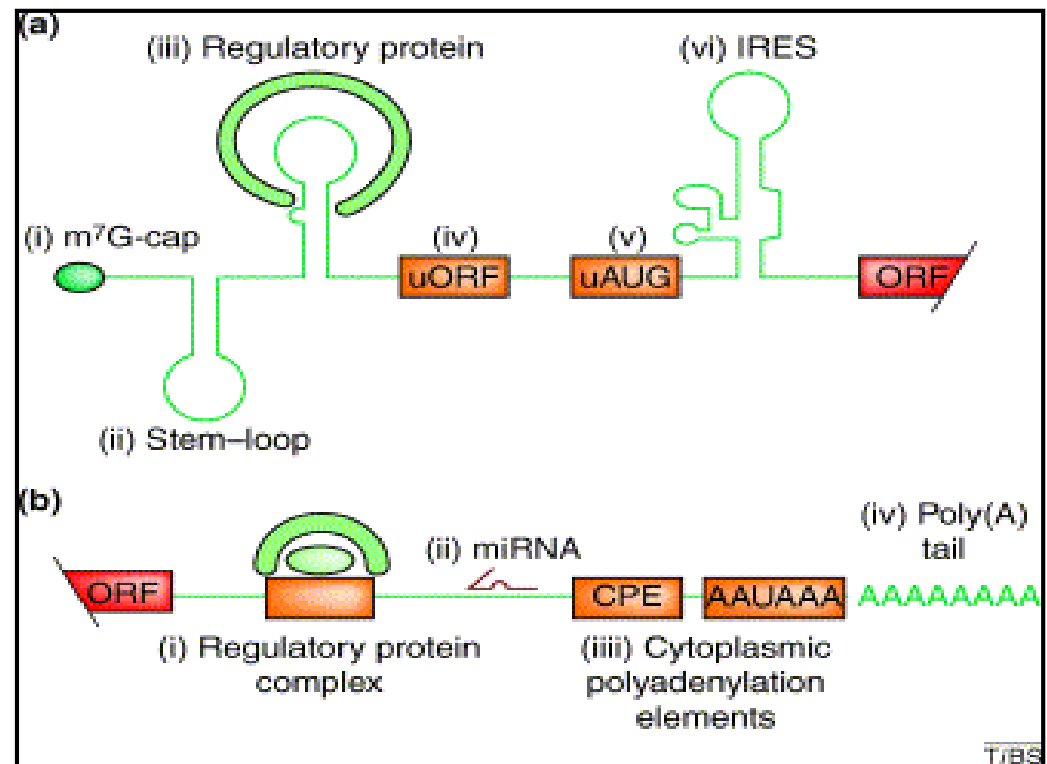
La diana és l'mRNA

Zona 5'-UTR

- Estructures secundàries
- ORFs *upstream*
- Llocs d'unió de proteïnes reguladores

Zona 3'-UTR

- Estructures secundàries
- Longitud de la cua poli(A)
- Llocs d'unió de proteïnes reguladores



Regulació específica de la traducció

Zona 5'-UTR

Regulació al nivell de l'mRNA: 5' UTR



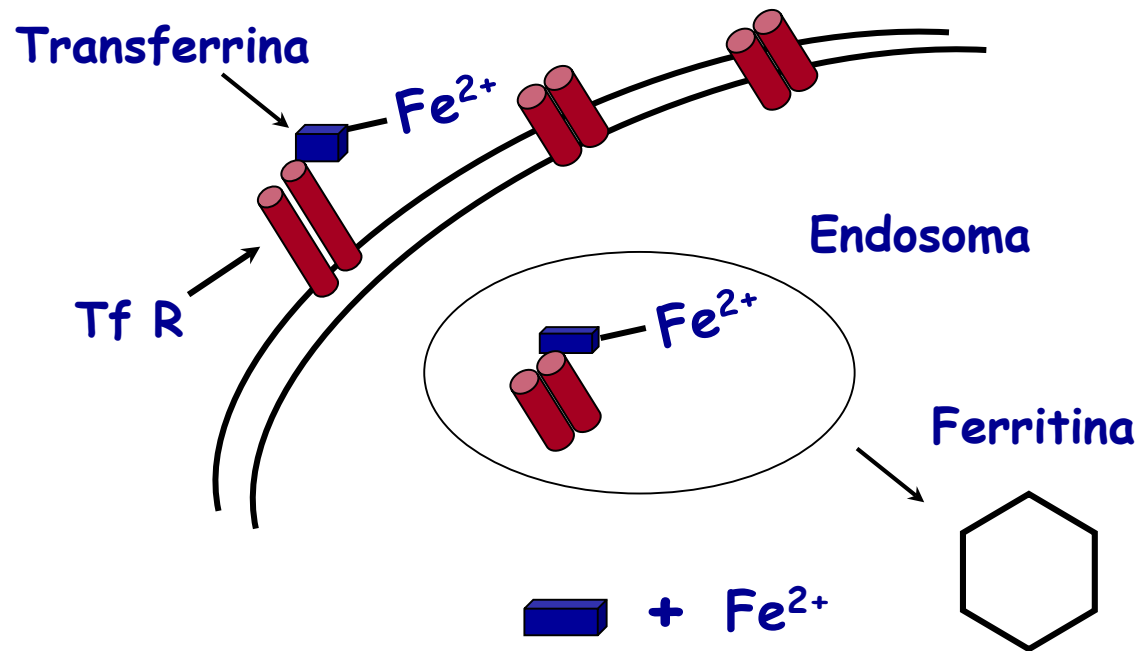
Estructures secundàries en la 5'-UTR inhibeixen el rastreig que du a terme el complex de preinici fins a trobar el codó AUG.

Exemple: regulació de la biosíntesi de ferritina

Regulació de la biosíntesi de ferritina

El ferro és essencial en el metabolisme cel·lular:
cofactor enzimàtic, hemoglobina, citocrom c.

- **Transferrina:** proteïna que transporta Fe
- **TfR:** receptor de la transferrina
- **Ferritina:** segresta i emmagatzema Fe



En presència de ferro →

Síntesi de ferritina ↑

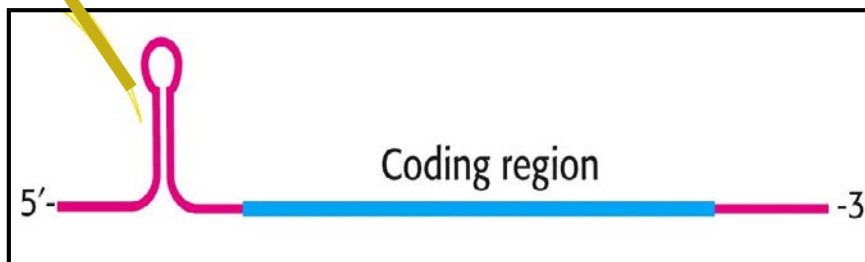
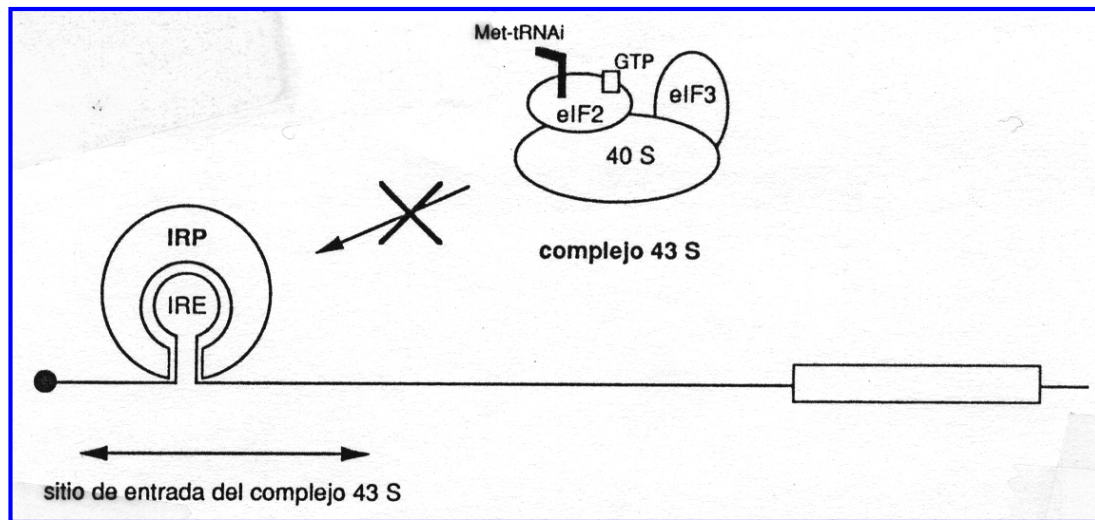
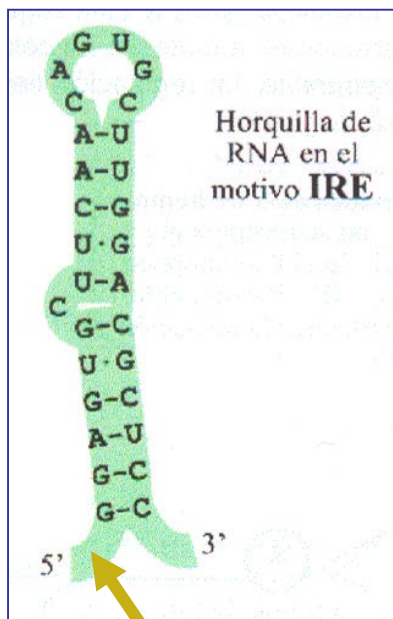
Síntesi del receptor de la transferrina ↓

Regulació al nivell de l'mRNA: 5' UTR

Dependent d'interaccions RNA-proteïna

IRP - *iron regulatory protein* (factor trans)

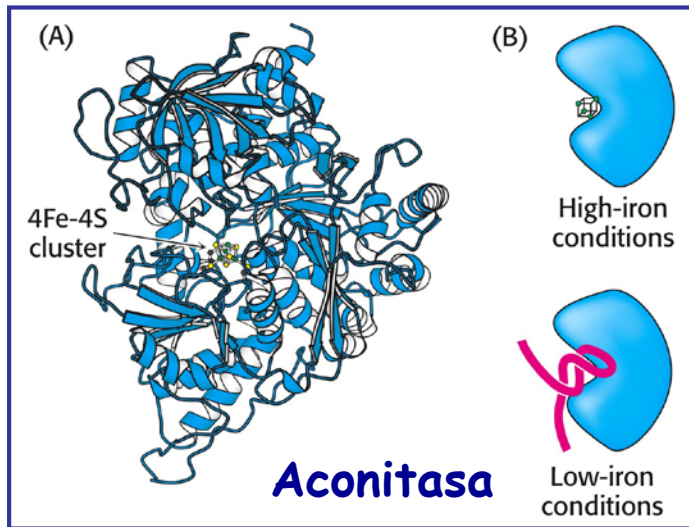
IRE - *iron response element* (RNA) (element cis en 5'-UTR)



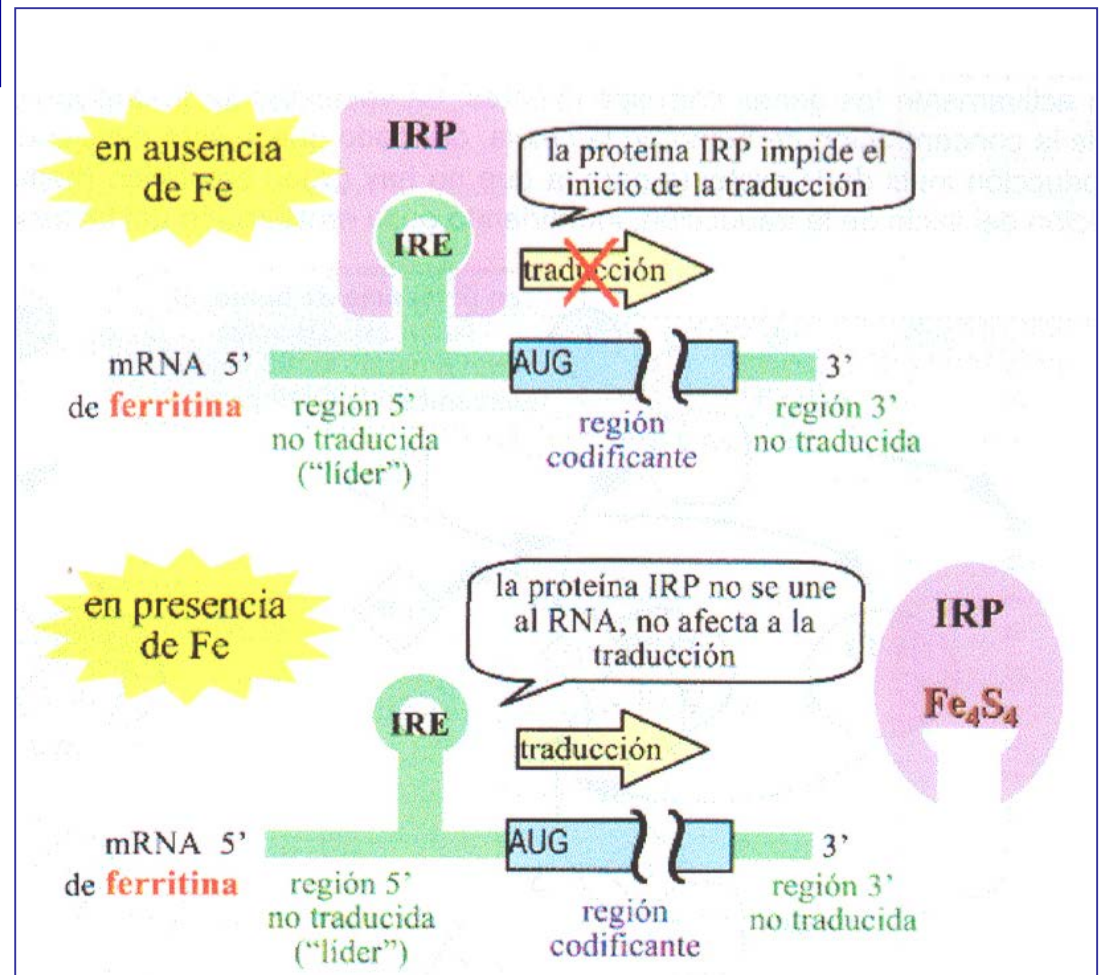
Regulació de la síntesi de ferritina

Regulació al nivell de l'mRNA: 5' UTR

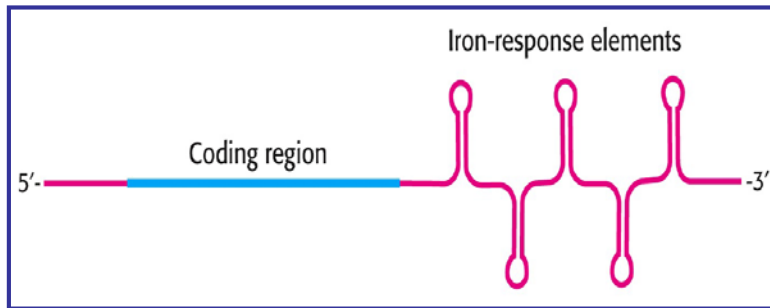
IRP només s'uneix a IRE quan els nivells de ferro són baixos



- En presència de Fe: c-aconitasa: activitat aconitasa, no afinitat per l'mRNA
- En absència de Fe: Apo-c-aconitasa, gran afinitat per l'IRE en l'mRNA



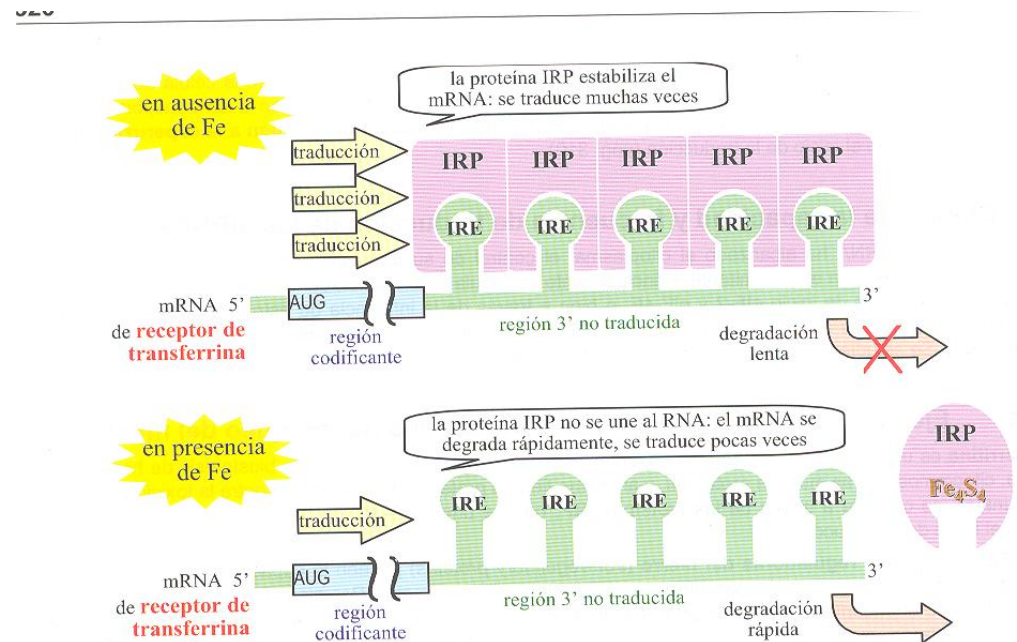
Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA



Regulació de la síntesi del receptor de la transferrina

El seu mRNA té elements IRE en la zona 3'-UTR

La unió d'IRP als IRE en condicions de deficiència de Fe **incrementa l'estabilitat de l'mRNA**



Regulació conjunta de l'expressió de la ferritina i del receptor de la transferrina

- Depèn dels nivells de Fe:

Nivells alts

Es necessita la ferritina

No es necessita el receptor de la transferrina

Nivells baixos

Es requereix el receptor de la transferrina

No es necessita la ferritina

- Està mediada per la mateixa proteïna, **IRP**, que pot unir-se als 2 mRNAs, tot produint efectes diferents.

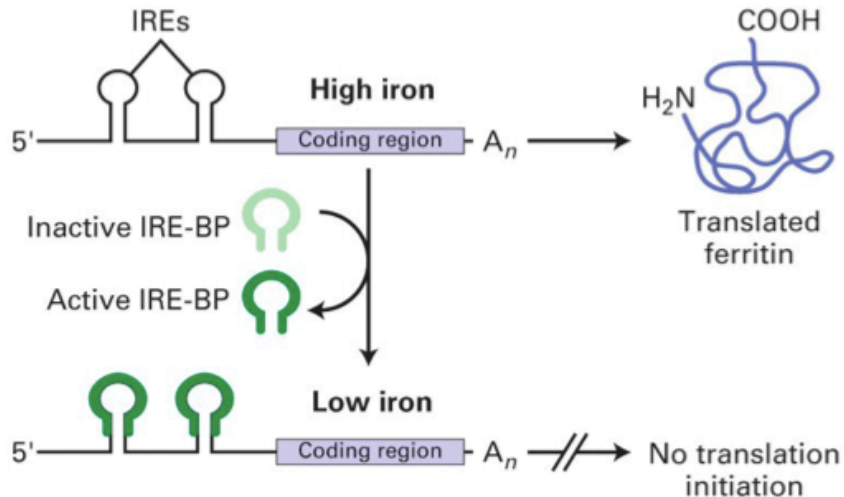
Low iron: increase free iron
• transferrin receptor expression **ON**
• ferritin expression **OFF**

High iron: prevent accumulation of toxic levels
of free iron
• transferrin receptor expression **OFF**
• ferritin expression **ON**

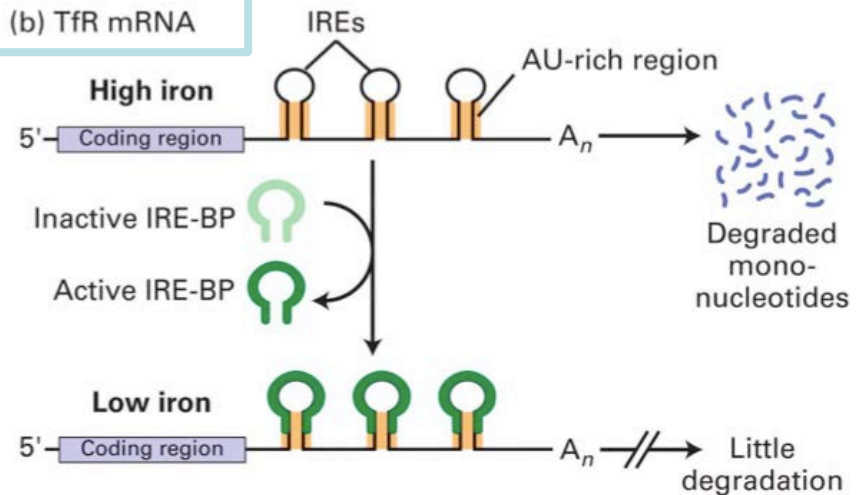
Regulació conjunta de l'expressió de la ferritina i del receptor de la transferrina

Control by Iron Regulatory Elements

(a) Ferritin mRNA



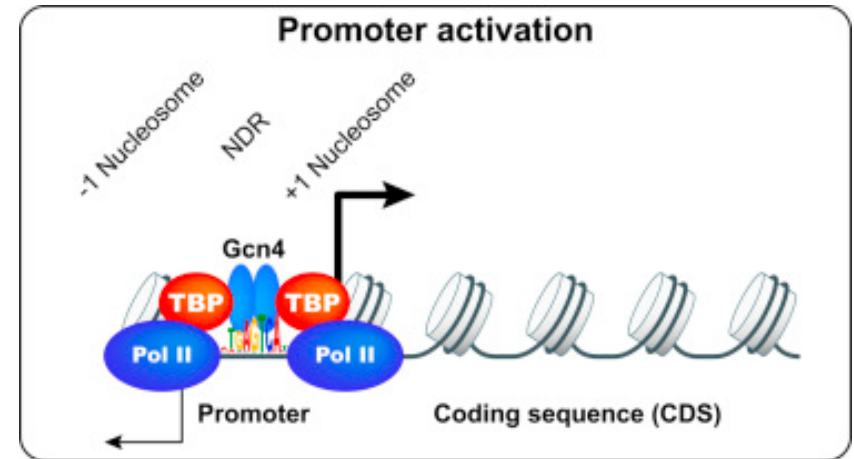
(b) TfR mRNA



Upstream ORFs (uORFs)

Exemple: regulació de *Gcn4* en llevat

- La proteïna *Gcn4* és un factor transcripcional de llevat, que respon a la deficiència en aminoàcids.
- *Gcn4* activa la transcripció de gens implicats en la biosíntesi d'aminoàcids.
- La síntesi de *Gcn4* està regulada al nivell traduccional.

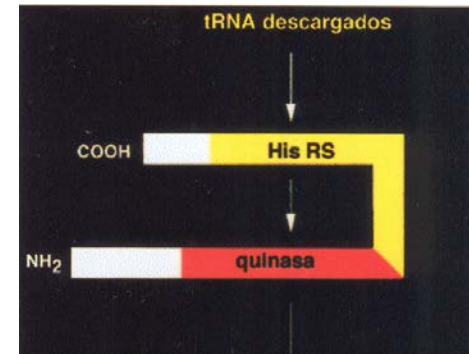
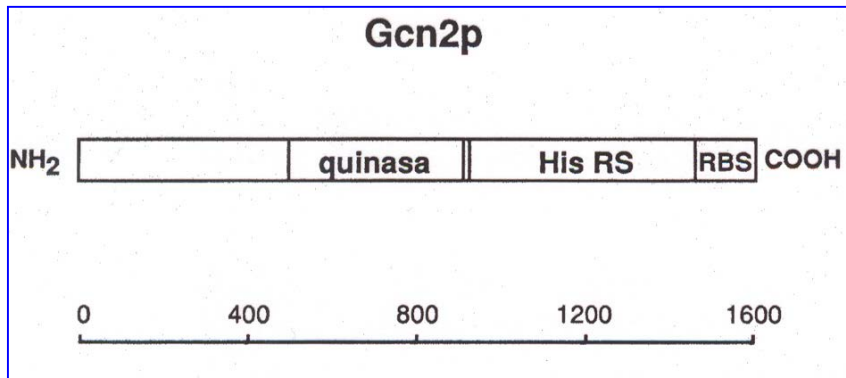


- La proteïna *Gcn4* es requereix quan hi ha pocs aas
 - Quan hi ha pocs aas s'activa la seua síntesi
 - Quan la cèl·lula disposa d'aas es bloqueja la seua síntesi

Regulació per uORFs) menudes: el cas de Gcn4

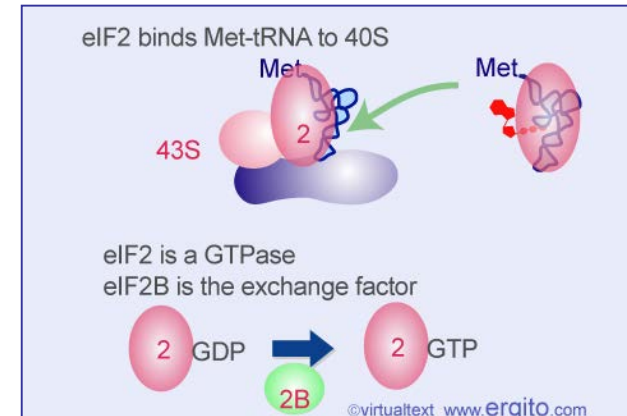
Què ocorre quan hi ha deficiència en aas?

i) *Gcn2p* és activada per tRNAs descarregats (pocs aminoàcids)



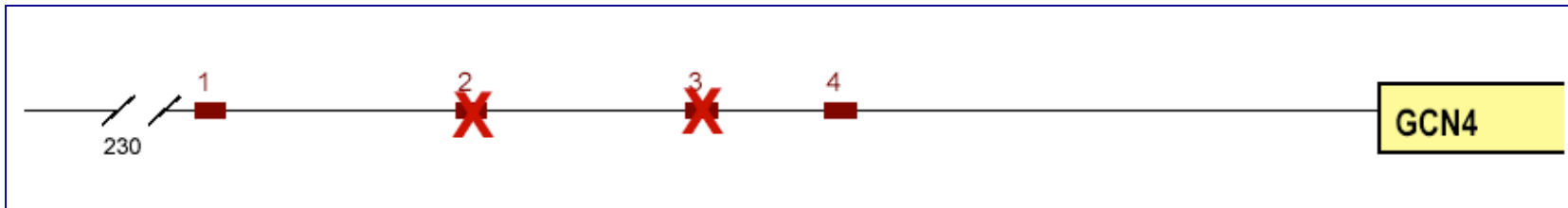
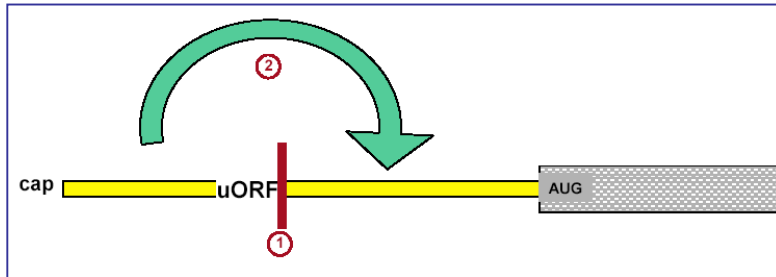
En condicions de dejuni, els tRNAs descarregats s'acumulen i s'uneixen a un domini de tipus histidil-tRNA sintetasa (HisRS) a *Gcn2*. Això, al seu torn, condueix a un canvi conformacional i s'activa la quinasa.

ii) *Gcn2* fosforila eIF2 α i disminueix la síntesi de proteïnes (en absència d'aas no es poden sintetitzar proteïnes)



Upstream ORFs (uORFs): el cas de Gcn4

Característiques del control traduccional per uORFs:

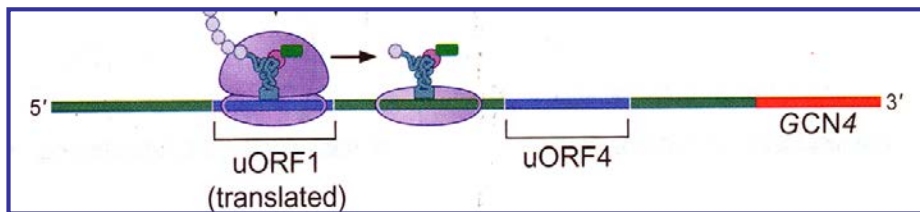
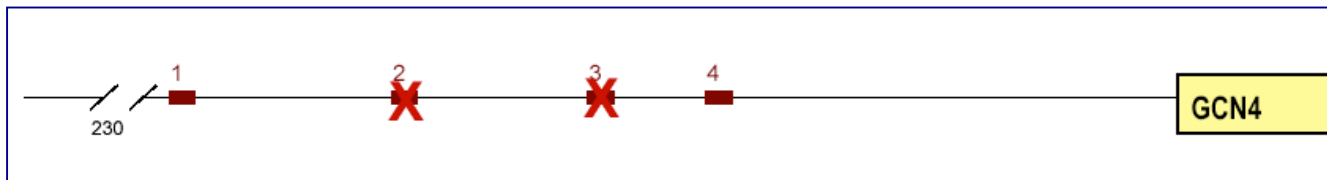


i) La zona 5'-UTR de l'mRNA de GCN4 conté 4 ORFs molt menudes (2-4 aas) anomenades uORF1-4

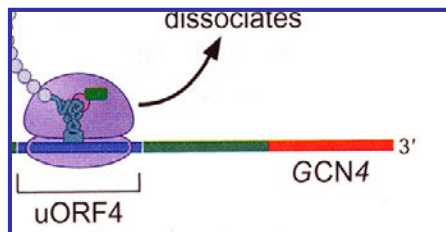
Regulació per uORFs) menudes: el cas de Gcn4

Característiques del control traduccional per uORFs:

ii) La primera uORF és permissiva i les altres no



Terminació permissiva*



Terminació no permissiva

* Es pot reiniciar la traducció de l'uORF següent si en el lloc P de la subunitat menuda entra **Met-tRNA**; abans d'arribar al codó d'inici, la qual cosa requereix que estiga unit a eIF2-GTP.

Regulació per uORFs) menudes: el cas de Gcn4

En llevat les uORFs són generalment **no permissives** (uORF 2, 3 i 4). Com que no hi ha interacció directa eIF4G/eIF3, no hi ha suficients contactes per a mantenir unida la subunitat menuda del ribosoma i aquesta es dissocia després de *STOP*.

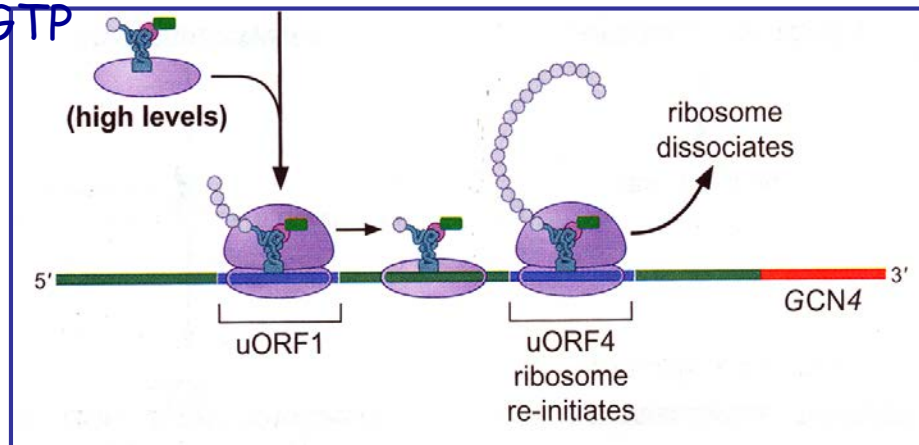
uORF1 és permissiva: el complex eIF4G/eIF3/40S segueix interaccionant degut al context del codó d'aturada. Seqüències al voltant del codó *STOP* afavoreixen la interacció per tal que pugui reiniciar-se la traducció, en romandre unida la subunitat menuda del ribosoma.

Regulació mediada per disponibilitat d'eIF2-GTP

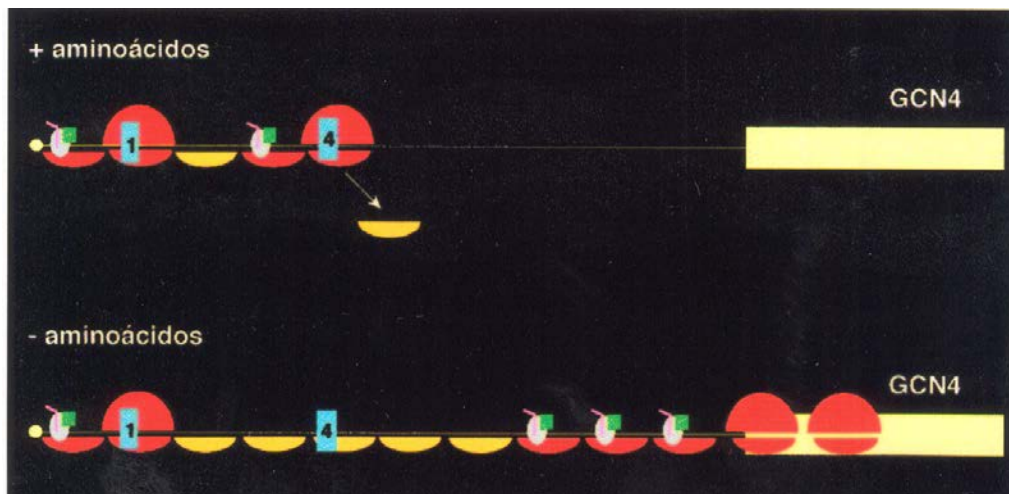
- Si hi ha eIF2-GTP s'ocuparà el lloc P amb Met-tRNA_i i eIF2-GTP i es podrà iniciar la traducció de l'uORF següent
- Si no hi ha eIF2-GTP no s'ocuparà el lloc P de la subunitat menuda i no es traduirà l'uORF següent.

Regulació per uORFs menudes: el cas de Gcn4

- Si es tradueix ORF4 no es tradueix GCN4 (dependrà de l'abundància d'eIF2-GTP)
- Per tal que es tradueixca GCN4 és necessari que no es traduïsquen uORF2-4 (les ORFs no permissives), la qual cosa ocorrerà quan hi haja nivells baixos d'eIF2-GTP



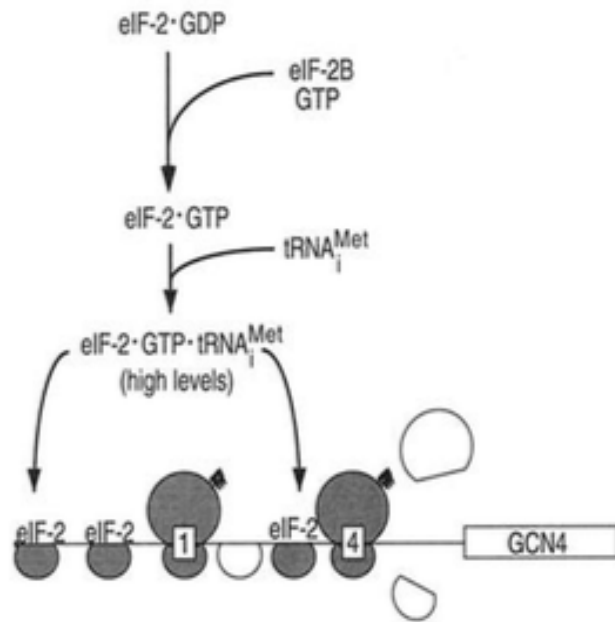
Terminació no permissiva



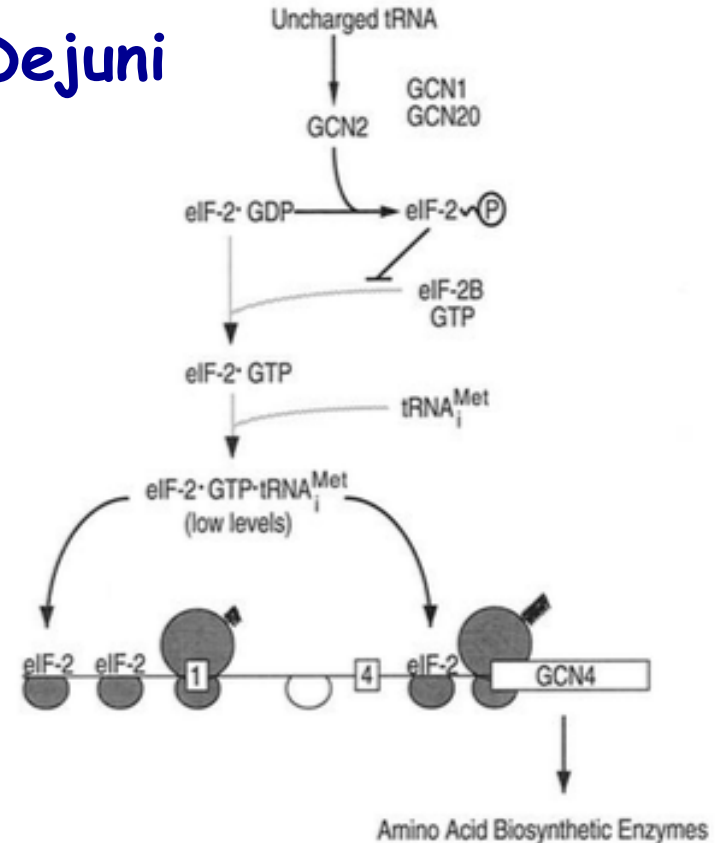
És un mecanisme cinètic

Regulació per uORFs menudes: el cas de Gcn4

Abundància d'aas



Dejuni



Encara que la traducció global disminuisca, la d'enzims implicats en biosíntesi d'aminoàcids ha d'augmentar⁴⁴

Regulació per uORFs menudes: el cas de Gcn4

Nivells baixos d'aminoàcids

- La formació del complex ternari eIF2/GTP/Met-tRNAi es redueix perquè:

- 1.- Els nivells de Met-tRNAi són baixos.
- 2.- La quinasa **Gcn2p** fosforila eIF2 i redueix la disponibilitat de la forma activa d'aquest factor.

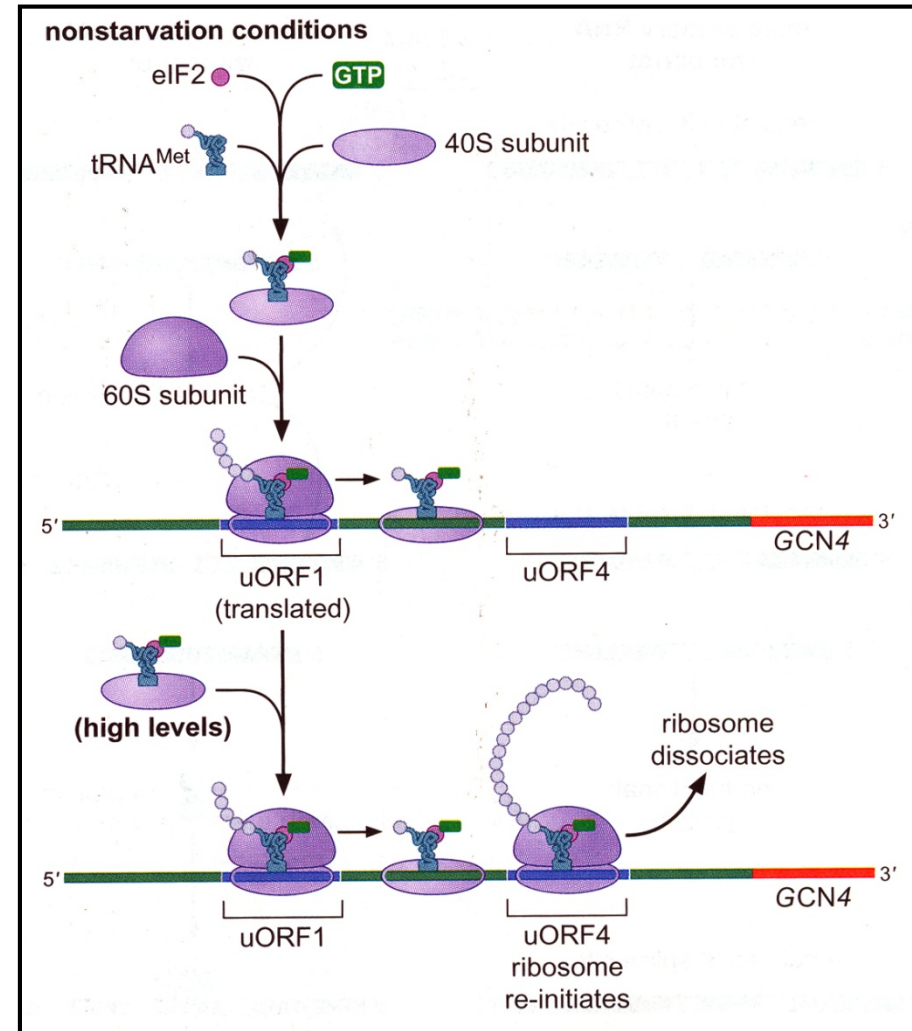
Conseqüència:

La subunitat 40S passa per les uORF2-4 sense traduir-les. Com que l'AUG de *GCN4* està més lluny, hi ha més temps per a la unió d'un complex ternari i s'hi pot iniciar la traducció.

Nivells alts d'aminoàcids:

El complex eIF2/GTP/Met-tRNAi s'uneix aviat a 40S i tradueix alguna altra uORF.

Les subunitats del ribosoma es dissocien quan acaba la traducció d'aquesta uORF i no tradueixen la de *GCN4*.



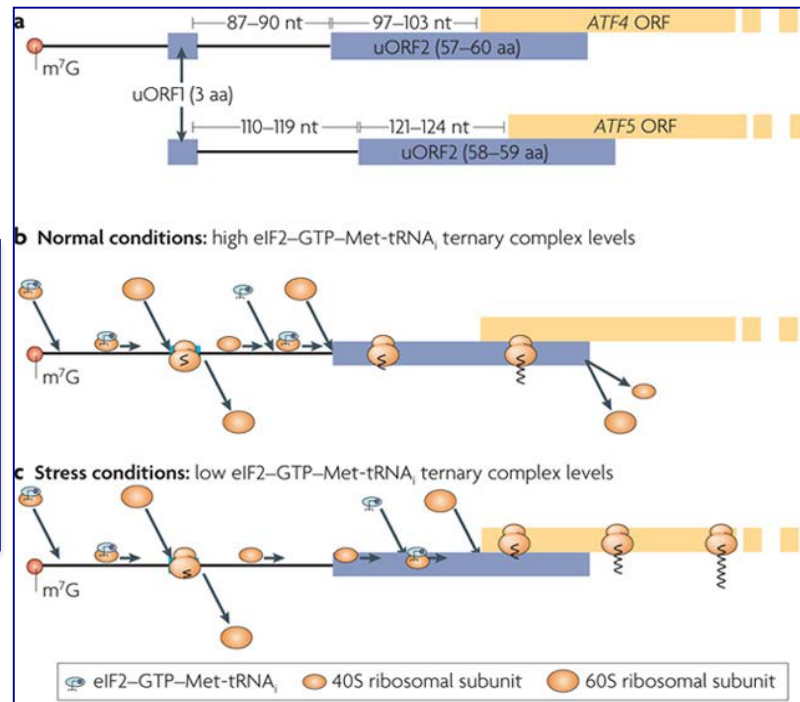
Regulació per uORFs menudes en vertebrats

En vertebrats les uORFs solen ser permissives. Degut a les característiques d'eIF3, aquest interacciona directament amb eIF4G; així doncs hi ha suficients contactes per a mantenir unida la subunitat menuda del ribosoma, 40S i es pot reiniciar la traducció.

La clau en aquest cas és el solapament entre les ORFs.

La traducció dels mRNAs dels gens **ATF4** i **ATF5** de mamífers s'incrementa 5 vegades per l'activació de **PERK** (*PKR like RE* quinasa), una de les quinases capaces de fosforilar eIF2.

Vattem KM, Wek RC.
Reinitiation involving
upstream ORFs regulates
ATF4 mRNA translation in
mammalian cells. *Proc Natl
Acad Sci U S A.*
2004;101(31):11269-11274.
doi:10.1073/pnas.0400541101



During nonstressed conditions, there are low levels of eIF2 α -P and high levels of eIF2-GTP. Ribosomes scanning the ATF4 mRNA initiate at the 5'-proximal uORF1, and following termination, quickly reacquire a new eIF2 ternary complex. Competent 40S scanning ribosomes (dark gray oval) then reinitiate translation at uORF2, which overlaps out-of-frame with the ATF4 CDS. Translation of uORF2 results in ribosome termination and dissociation 3' of the ATF4 initiation codon, resulting in low ATF4 expression. During cellular stress, elevated eIF2 α -P results in low levels of eIF2-GTP. Ribosomes scanning the ATF4 mRNA initiate at uORF1 and post-uORF translation resume scanning. Due to the low levels of eIF2 ternary complex, the 40S ribosome (light gray oval) scans past the initiation codon of the inhibitory uORF2 before reacquiring a new ternary complex (dark gray oval). Delayed acquisition of the eIF2 ternary complex results in translation initiation at the ATF4 CDS and an increase in ATF4 expression during cellular stress.

Regulació específica de la traducció

Zona 3'-UTR

Regulació específica de la traducció: 3'-UTR

Relacionada amb l'estabilitat dels transcrits (nivells de mRNA)

Dependent de la cua poli(A)

No dependent de la cua poli(A)
(receptor de transferrina, diapositiva 35)

Relacionada amb la traducció pròpiament dita

Dependent de la cua poli(A)

Relació taxa de traducció-longitud de cua poli(A)

Interacció de PABP amb factors d'inici de la traducció

Poliadenilació citoplasmàtica per a activar la traducció de certs transcrits durant el cicle cel·lular

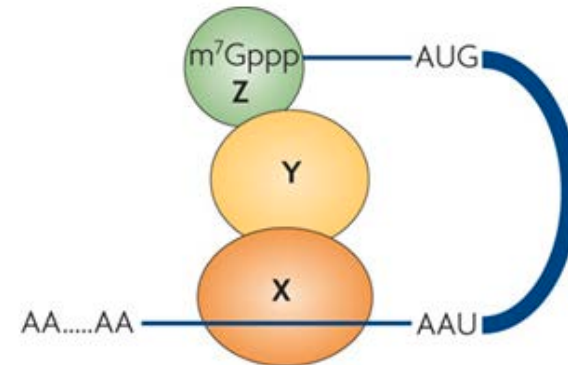
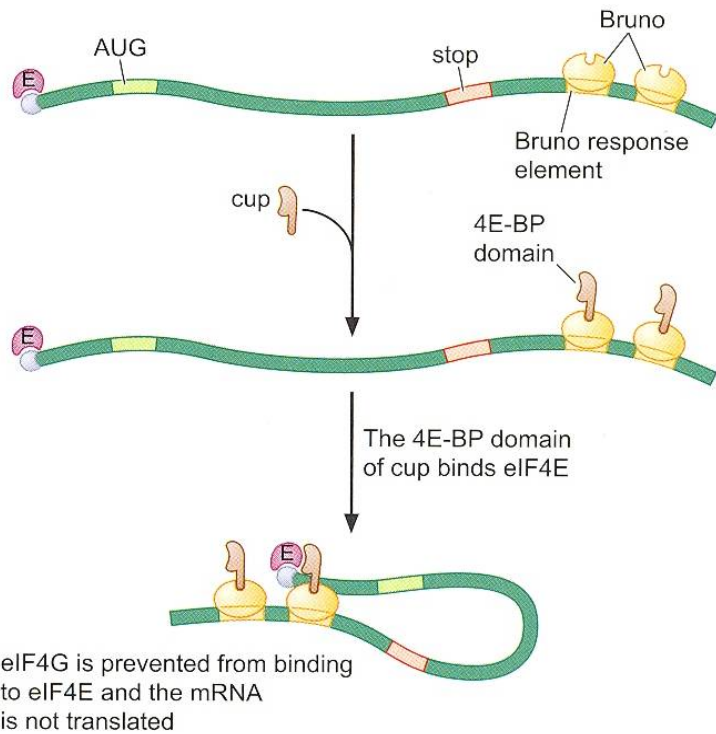
No dependent de la cua poli(A)

Interaccions *cis* (seqüències en 3'-UTR) – *trans* (repressors de la traducció) poden afectar la traducció (diapositiva 49) o la localització de les proteïnes (p. ex., en el desenvolupament de l'embrió, diapositiva 50)

Interaccions amb miRNAs. Diapositives 51-55

Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA no dependent de la cua poli(A)

En 3'UTR poden existir elements *cis* d'unió de proteïnes que controlen la traducció (repressors)



Organism	mRNA	Protein X	Protein Y	Protein Z
<i>Xenopus laevis</i> oocytes	Cyclin B1 (and others)	CPEB*	4E-T [‡]	eIF4E1b
<i>Drosophila melanogaster</i> embryos	Nanos	Smaug	CUP	eIF4E1a [§]
	Oskar	Bruno	CUP	eIF4E1a [§]
	Caudal	Bicoid	Bicoid	4EHP
	Hunchback	Nanos, Pumilio and Brat	Nanos, Pumilio and Brat	4EHP

Cup unida a Bruno competeix per unir-se a eIF4E amb eIF4G

CPEB, cytoplasmic polyadenylation element-binding protein; 4EHP, eIF4E homologous protein; eIF, eukaryotic initiation factor; eIF4E-T, eIF4E transporter. *CPEB homologues with the same function are present in *D. melanogaster* (ORB) and *Caenorhabditis elegans* (FOG-1), but not in budding yeast. [‡]4E-T homologues with the same function are present in *D. melanogaster* (CUP) and *C. elegans* (SNP-2), but not in budding yeast. [§]*D. melanogaster* has eight eIF4E-like proteins, including one 4E-HP, but no equivalent of mammalian eIF4E1b. eIF4E1a is by far the most abundant species in embryos, and thus is likely to be protein Z. ^{||}Fulfills the functions of both protein X and protein Y.

Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA.

Regulació espacial en l'embrió (gradients de proteïnes)

Exemple en *Drosophila*:

La proteïna *nanos* inhibeix la traducció de l'mRNA *hunchback* (hb) en una zona específica de la cèl·lula mitjançant la seua unió a la zona 3'-UTR de l'mRNA hb.

Resultat: L'mRNA hb està homogèniament distribuït en la cèl·lula però no la seua proteïna

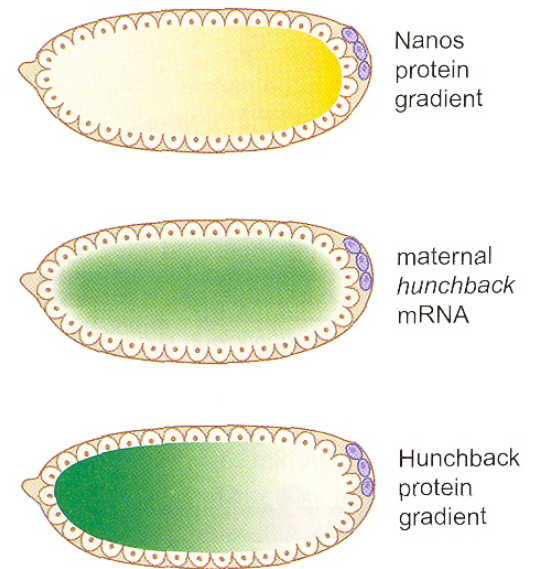
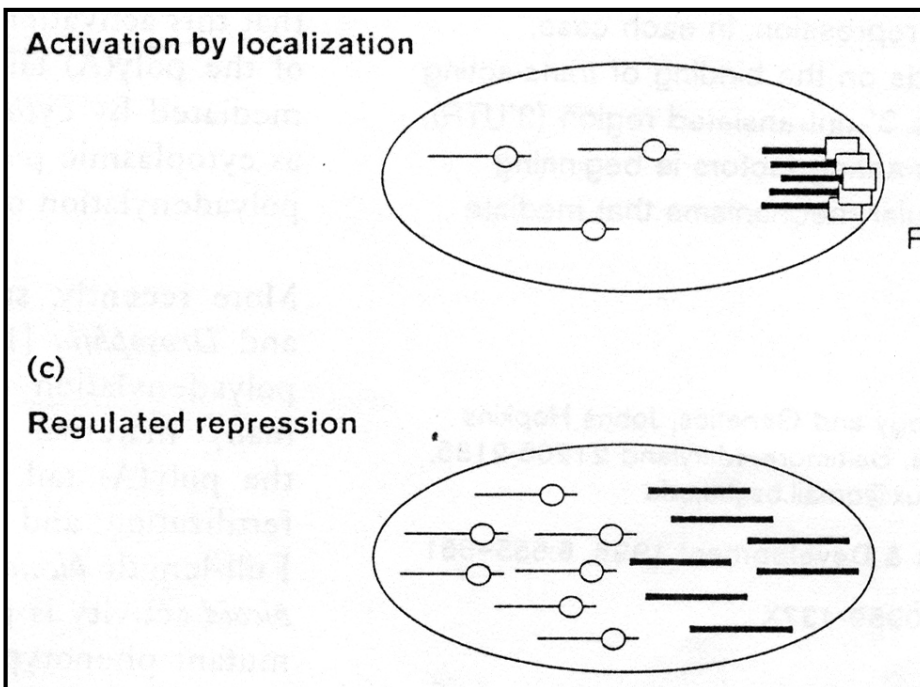
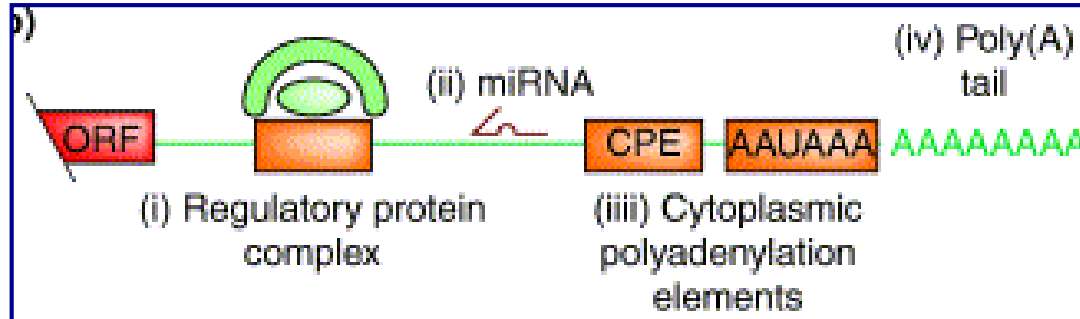


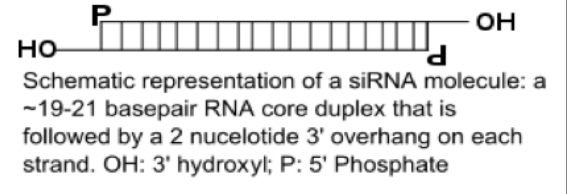
FIGURE 18-19 Hunchback protein gradient and translation inhibition by Nanos. The *Nanos* mRNA is associated with polar granules. After its translation, the protein diffuses from posterior regions to form a gradient. The maternal *hunchback* mRNA is distributed throughout the early embryo, but its translation is arrested by the *Nanos* protein, which binds to specific sequences in the *hunchback* 3' UTR. The *Nanos* gradient thereby leads to the formation of a reciprocal *Hunchback* gradient in anterior regions.



Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA. miRNAs



siRNA



Diferències entre siRNA i miRNAs

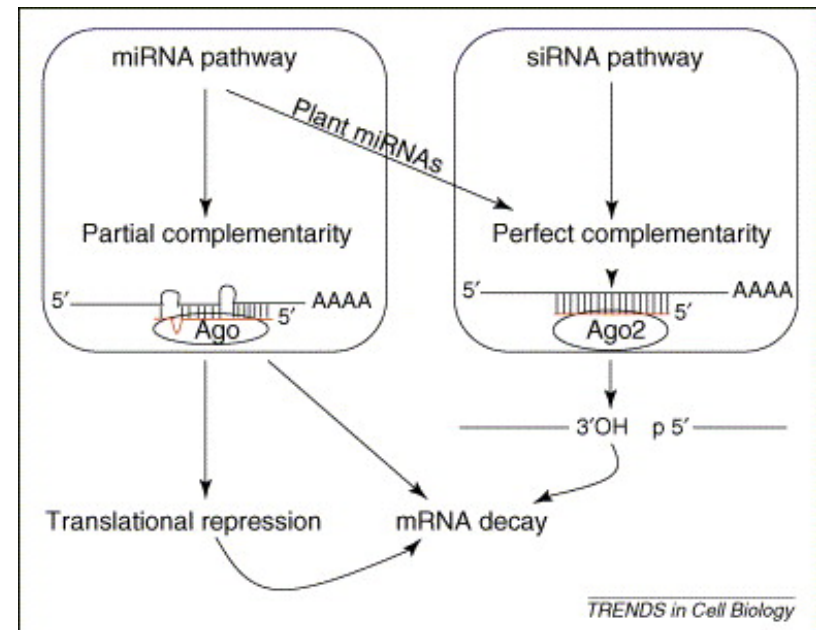
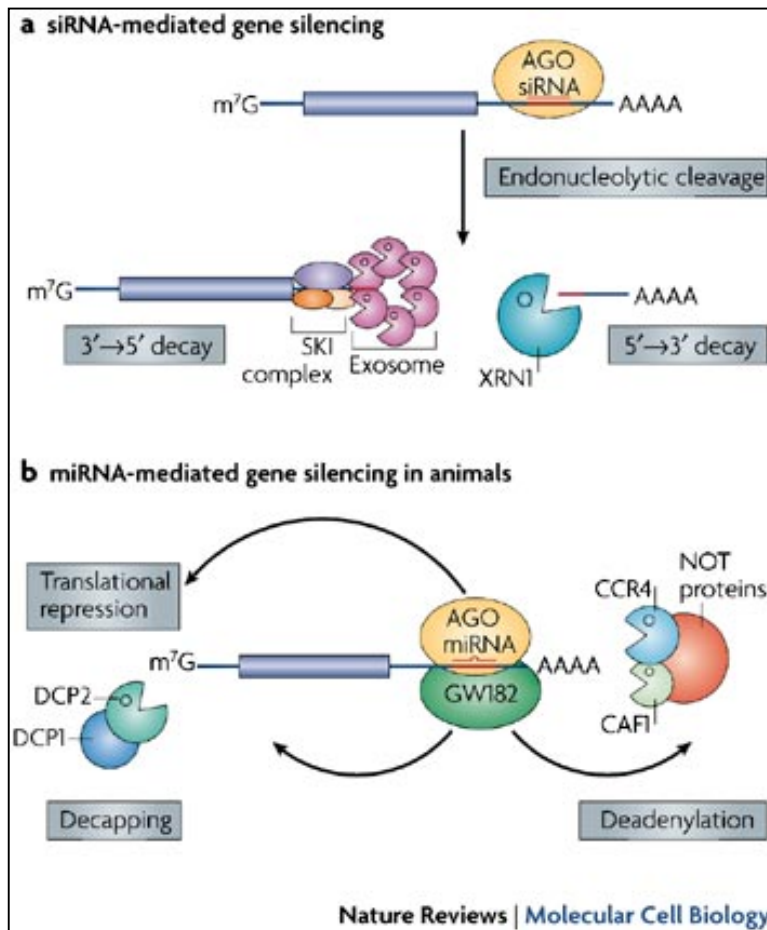
miRNA origen endogen (gens), **siRNA** origen endogen o exogen (virus o experiments de manipulació genètica)

siRNAs: s'uneix amb complementarietat perfecta i desencadena la degradació de la diana (tall endonucleolític mediat per Ago2 (RISC))

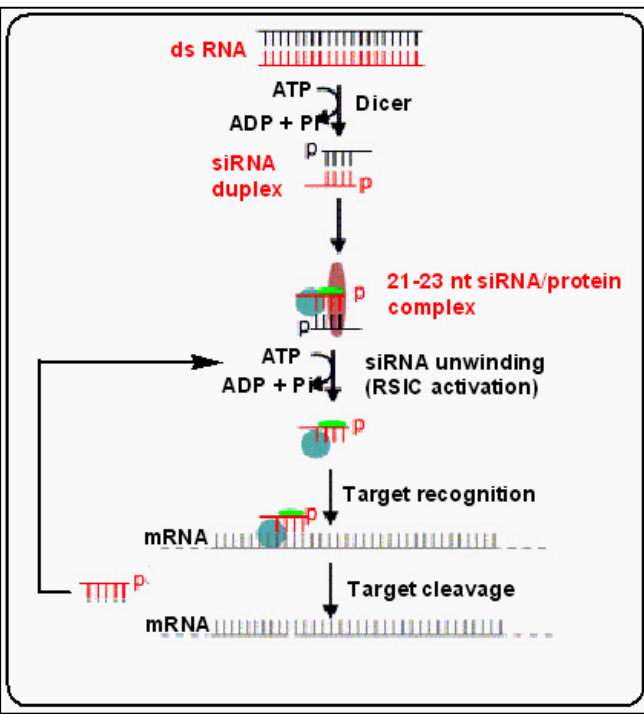
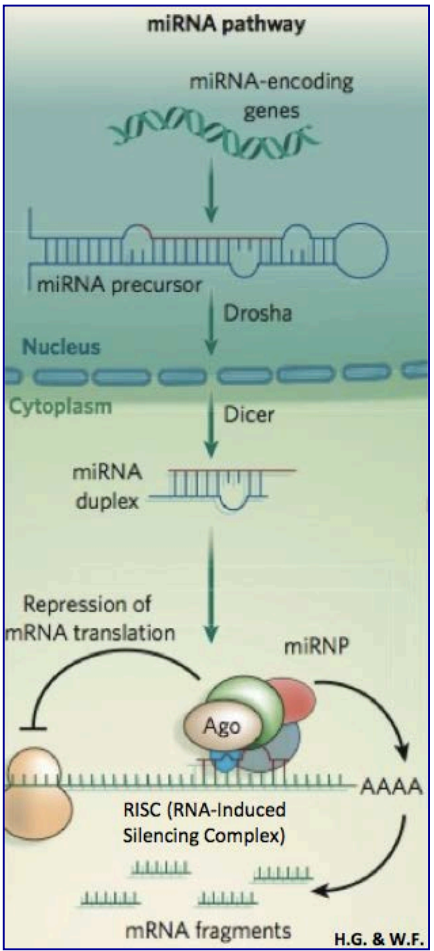
miRNAs: solen unir-se a 3'UTR de forma imperfecta i poden produir degradació, inhibició de la traducció o segrest de l'mRNA en els cossos P (*P-bodies*)

Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA. miRNAs

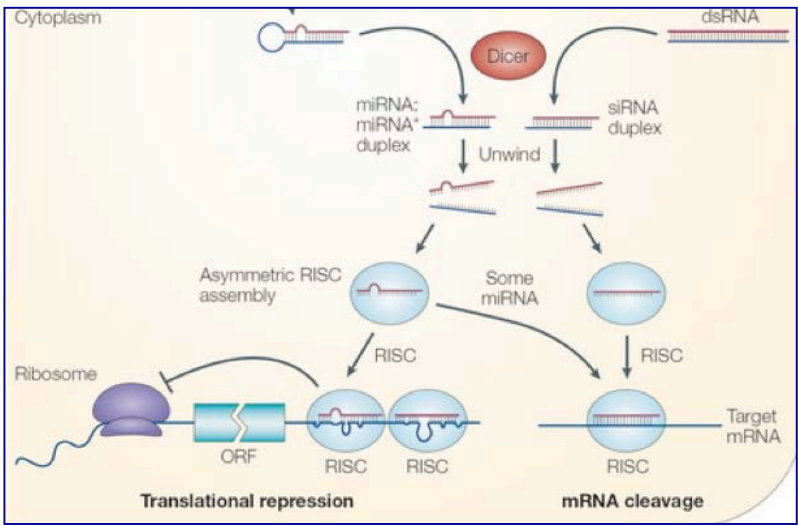
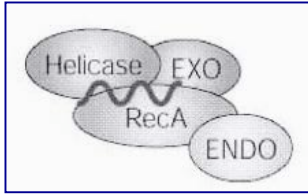
Diferències entre siRNA i miRNAs



Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA. miRNAs



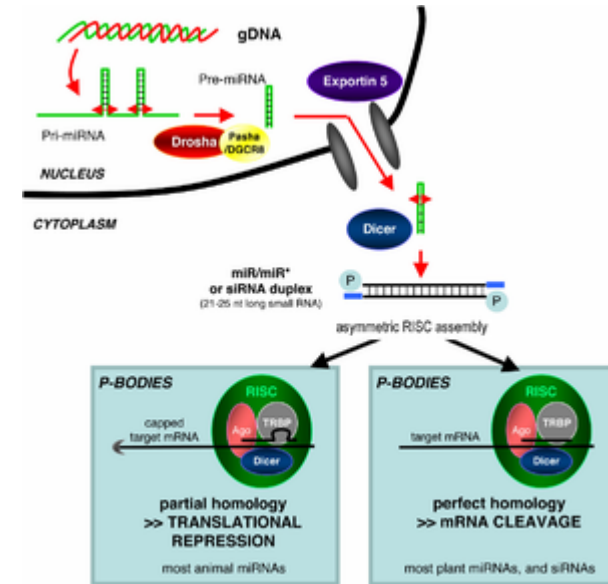
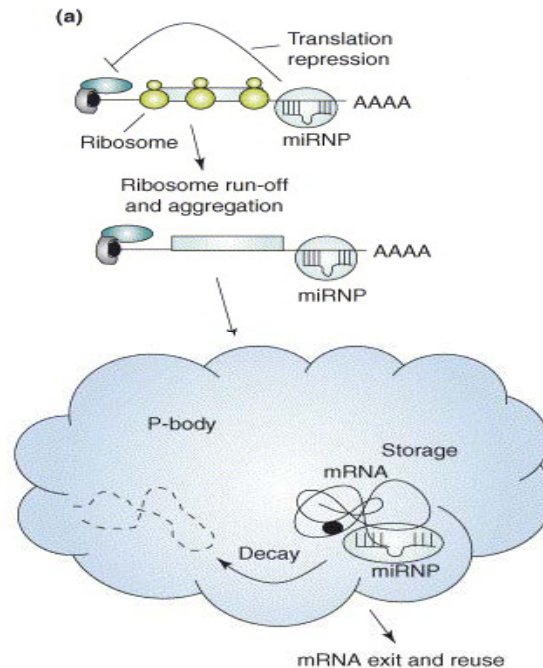
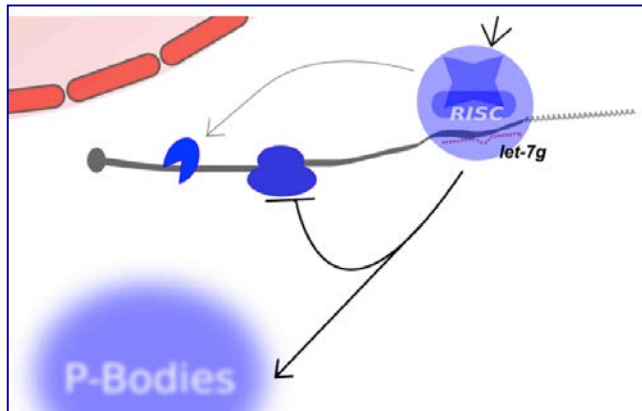
RISC



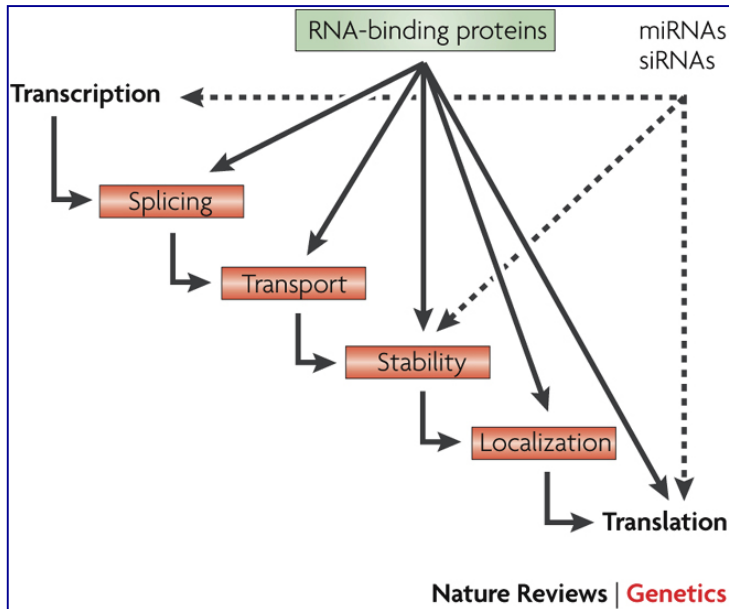
Regulació al nivell de la regió 3' UTR de l'mRNA. miRNAs

Quan els mRNAs no es tradueixen:

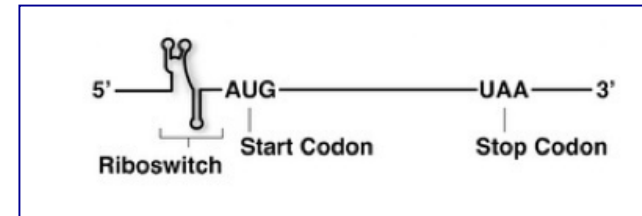
- es poden emmagatzemar en els ***P-bodies***, fins que es necessiten.
- es poden degradar en els ***P-bodies***
- els miRNAs condueixen mRNAs complementaris als ***P-bodies***



Regulació al nivell de l'mRNA: Ribointerruptors (*riboswitches*)

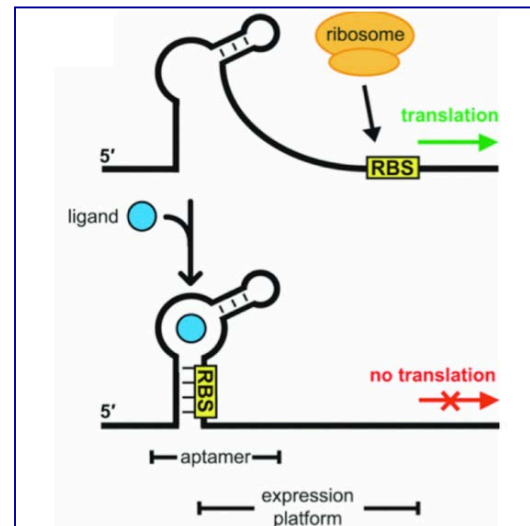


- RNA capaços de reconèixer específicament molècules menudes, unir-les i modificar l'expressió del gen
- Regulació no mediada per proteïnes
- Existeixen pel fet que els RNAs poden formar estructures complexes



Exemple: regulació de la traducció

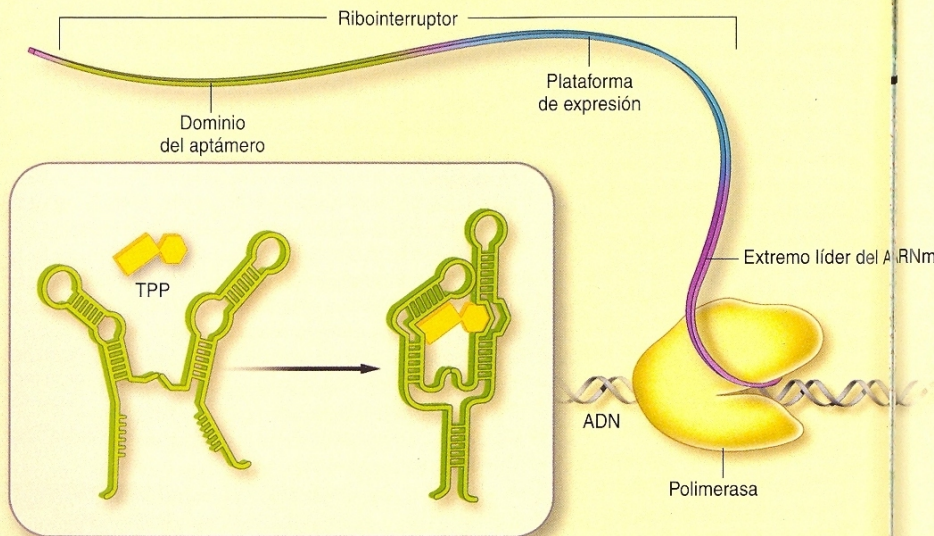
Riboswitches are typically positioned in the 5' untranslated region of bacterial mRNAs, where they control gene expression by transcriptional or translational attenuation. However, the recent investigation of additional riboswitch classes has revealed a more complex repertoire of regulatory mechanisms. This also includes splicing control in filamentous fungi, green algae and higher plants by thiamin pyrophosphate-binding riboswitches, the only class of metabolite-sensing RNAs identified in eukaryotes so far. All eukaryotic riboswitches characterized to date modulate, in a first step, splicing.



Regulació al nivell de l'mRNA: Ribointerruptors (*riboswitches*)

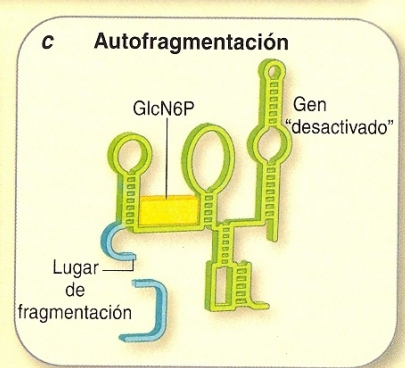
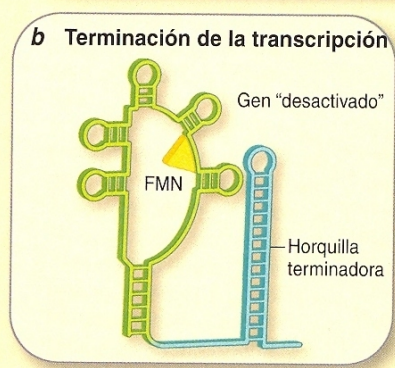
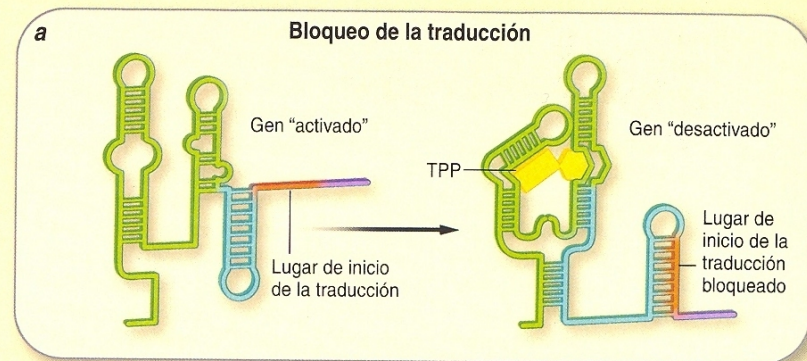
INTERRUPTORES CON PODER DE AUTODETERMINACION

Una forma de regulación celular descubierta en fecha reciente se basa en la capacidad de ciertos genes de autorregularse a través de sus copias en ARN. Los ribointerruptores constituyen segmentos integrados en el extremo de la secuencia puntera de un transcrito de ARN mensajero que cuantifican la demanda celular para la proteína cifrada por el resto de su mensaje; luego remodelan su propia estructura para determinar la síntesis o no de esa proteína. Los ribointerruptores constan, por tanto, de dos dominios: un aptámero, que detecta un metabolito específico (*abajo*), y una plataforma de expresión, que decide el destino del ARNm mediante la adopción de una de las numerosas configuraciones estructurales posibles (*derecha*).



DETECCION DEL METABOLITO

Un aptámero para la coenzima tiamina pirofosfato (TPP) adopta una forma definida (*izquierda*) a medida que se va alejando de la polimerasa. En presencia de TPP, el aptámero se une a ella, engarzando firmemente la molécula (*derecha*).



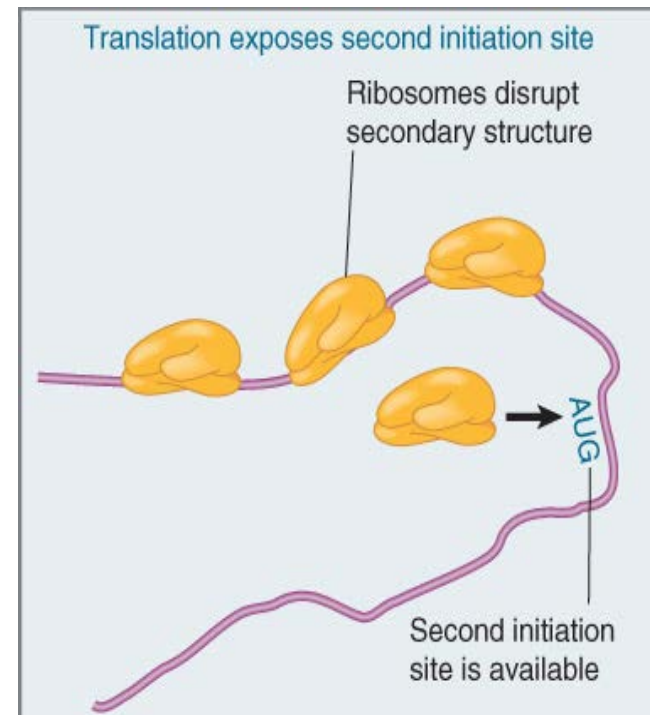
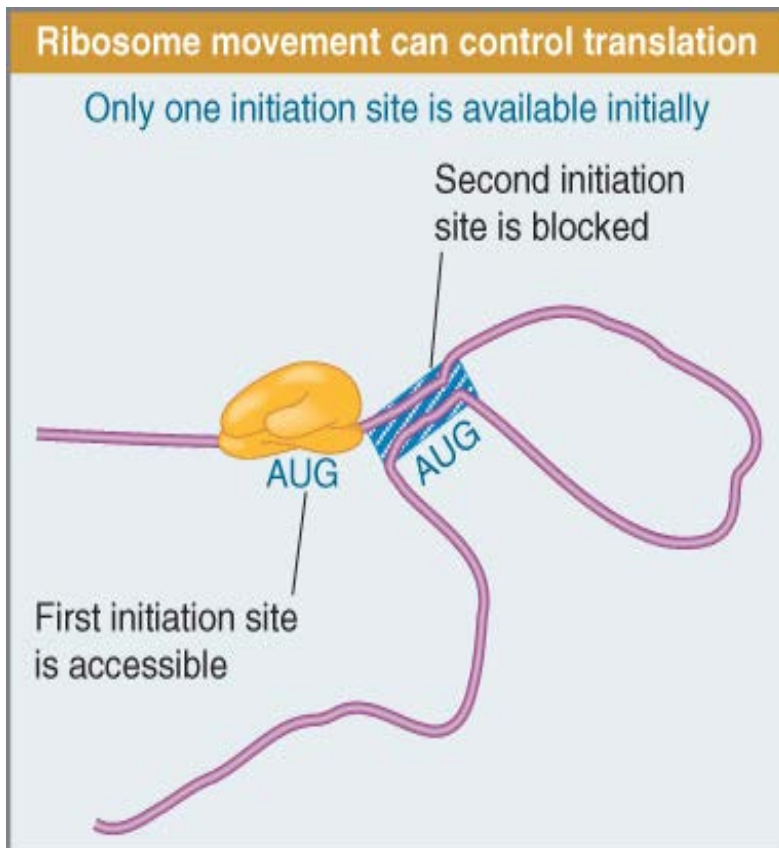
RESPUESTAS DEL RIBOINTERRUPTOR

Los ribointerruptores utilizan diversas estrategias para controlar la fabricación de proteínas. En ausencia de TPP, por ejemplo, la plataforma de expresión deja un lugar de inicio de la traducción accesible a los ribosomas; de ese modo, la expresión de las instrucciones génicas permanece en estado "activado" (*a, izquierda*). Cuando el TPP se encuentra unido al aptámero, la plataforma de expresión forma una horquilla que bloquea la traducción: desactiva el gen (*a, derecha*). Un ribointerruptor que detecta la coenzima flavina mononucleótido (FMN) forma una horquilla terminadora que suspende la transcripción de su mensaje por parte de la polimerasa (*b*). Una ribozima atípica activada por medio de la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) se autodestruye mediante autofragmentación (*c*).

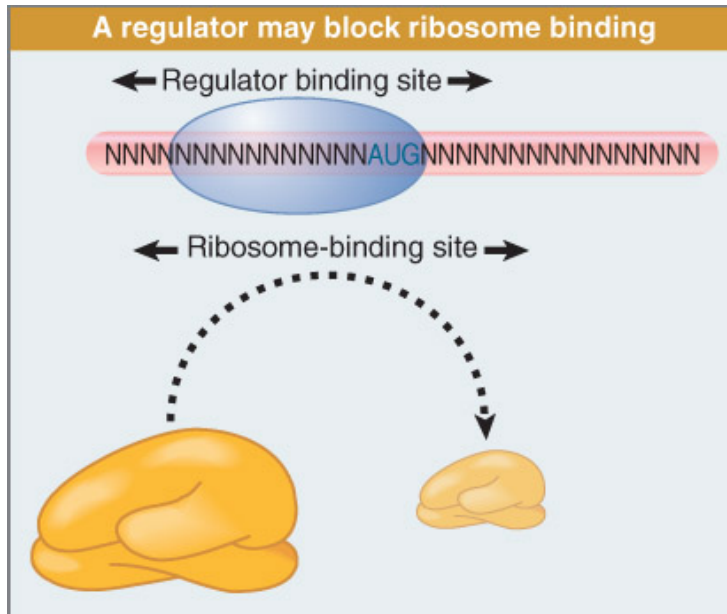
Regulació de la traducció en
procariotes

Regulació de la traducció en procariotes

El moviment del ribosoma pot controlar la traducció



Regulació de la traducció en procariotes

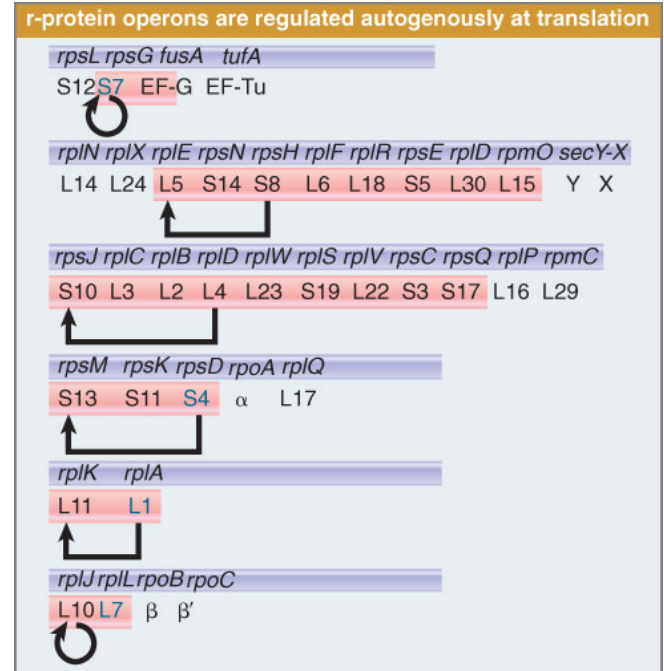
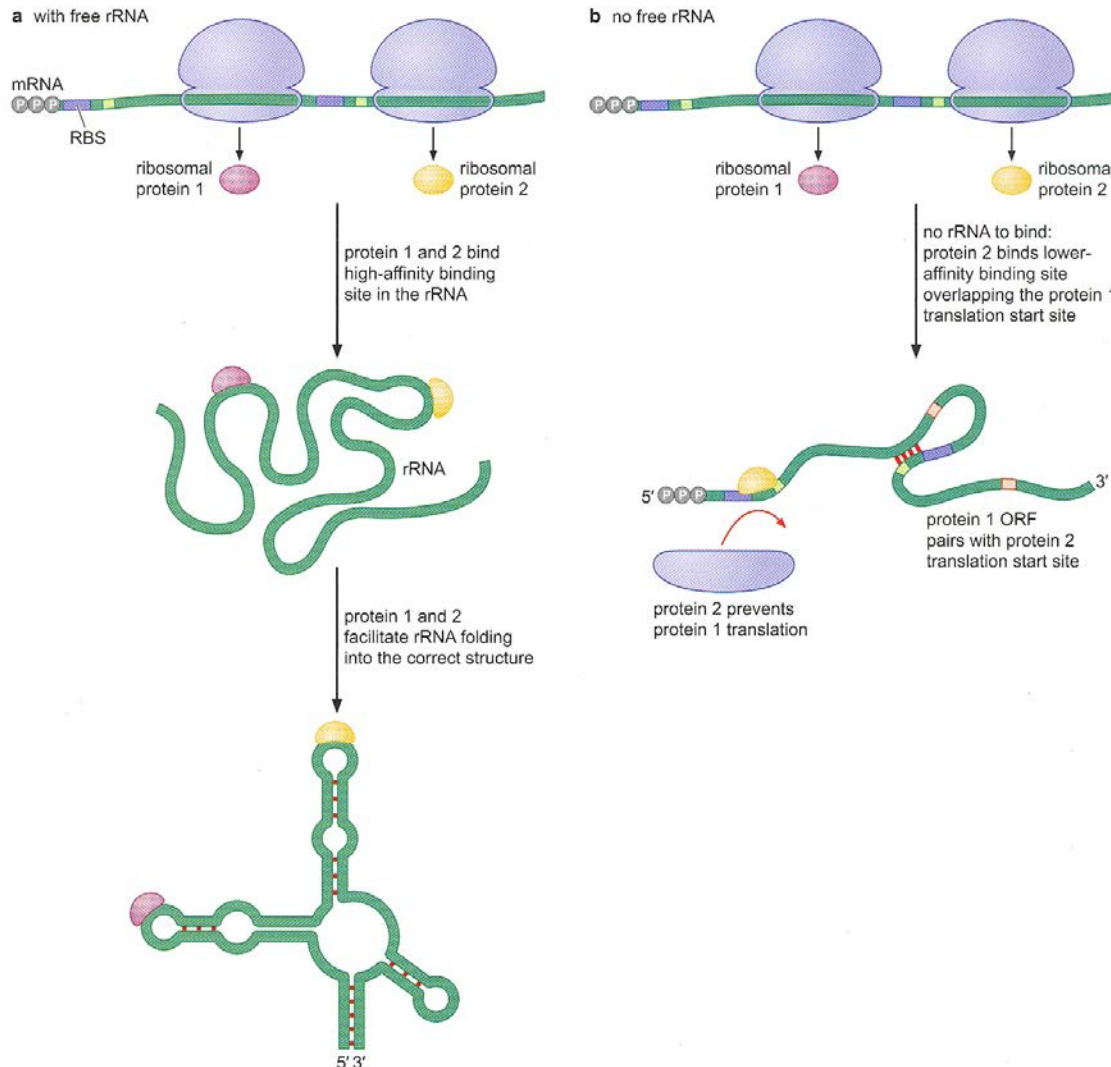


Bloqueig de la traducció per repressors

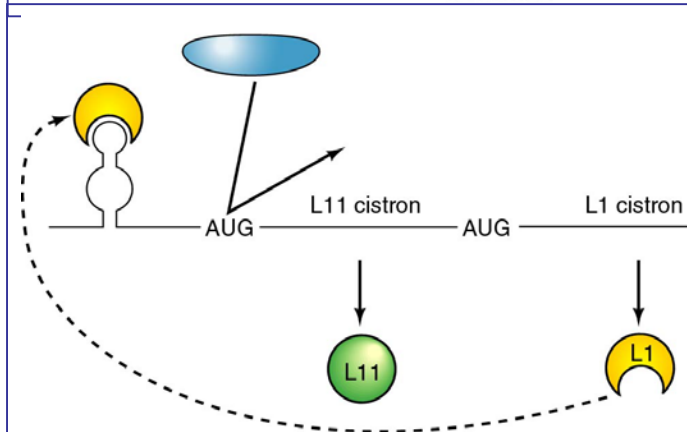
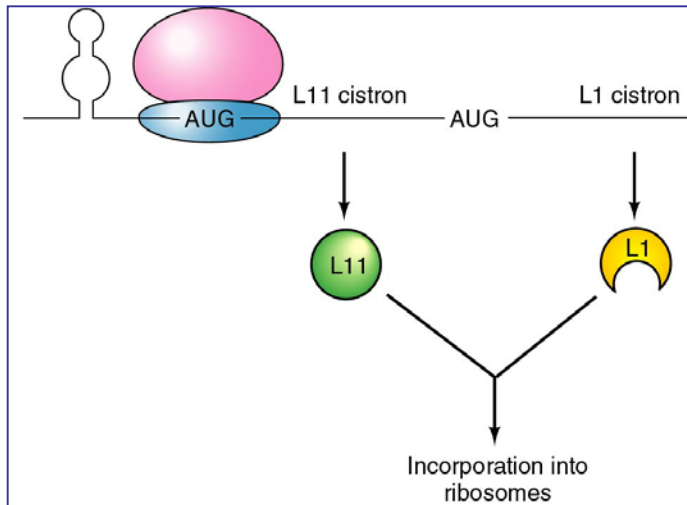
Translational repressors bind to mRNA

Repressor	Target Gene	Site of Action
R17 coat protein	R17 replicase	hairpin that includes ribosome binding site
T4 RegA	early T4 mRNAs	various sequences including initiation codon
T4 DNA polymerase	T4 DNA polymerase	Shine-Dalgarno sequence
T4 p32	gene 32	single-stranded 5' leader

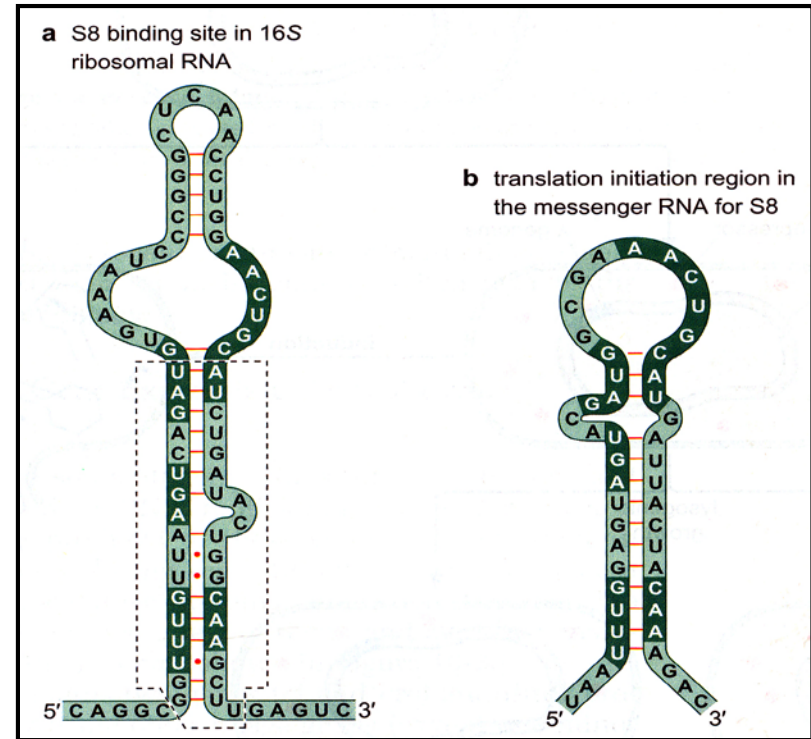
Regulació de la traducció en procariotes: regulació autògena



Regulació de la traducció en procariotes: regulació autògena

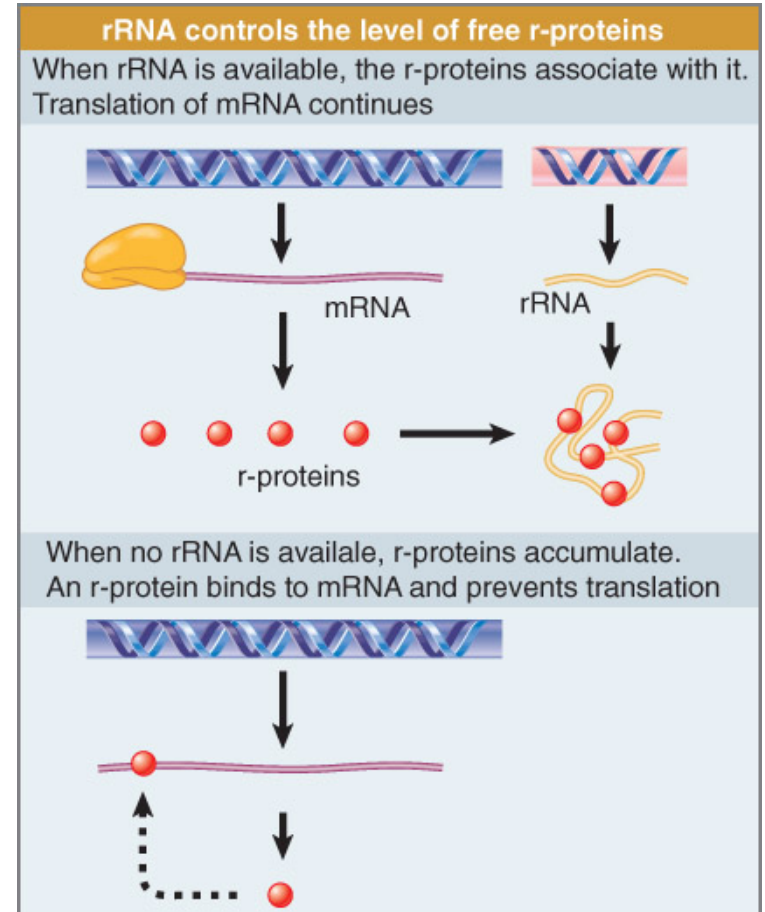
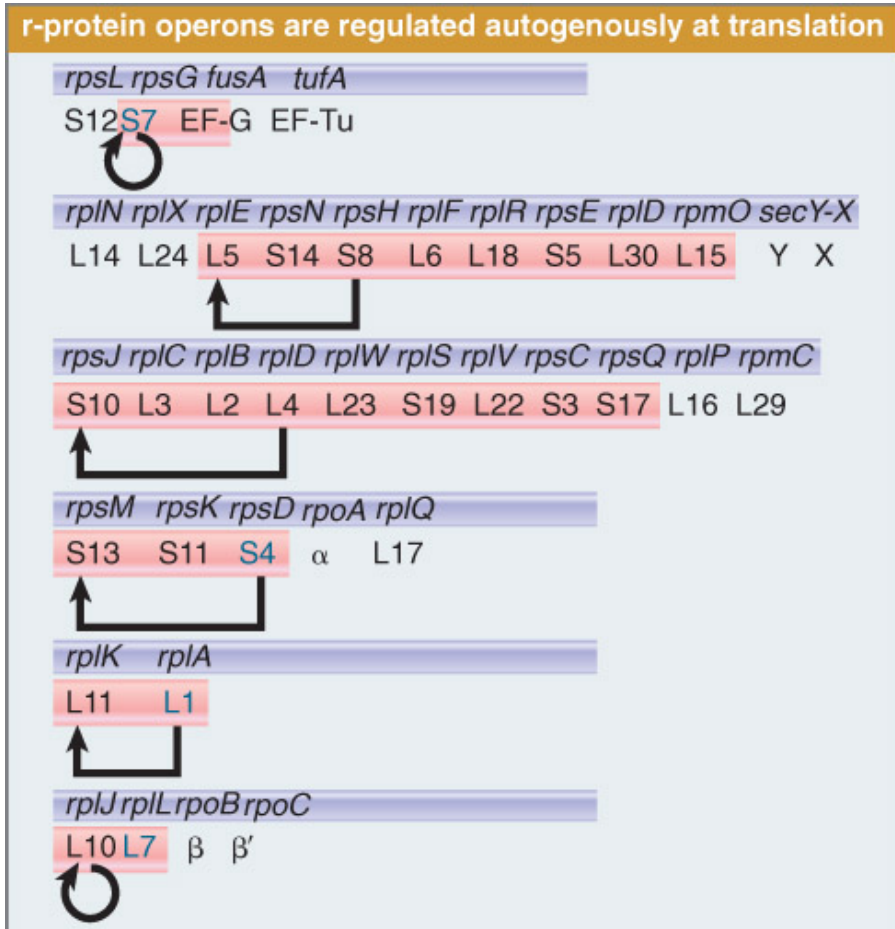


Regulació de l'operó L11-L1 per la proteïna ribosomal L1.



Els llocs d'unió de la proteïna a rRNA i mRNA són similars en seqüència i estructura secundària.

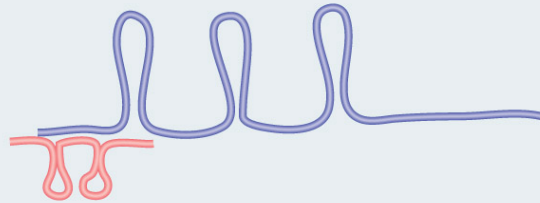
Regulació de la traducció en procariontes: regulació autògena



Regulació de la traducció en procarïotes: RNA antisentit

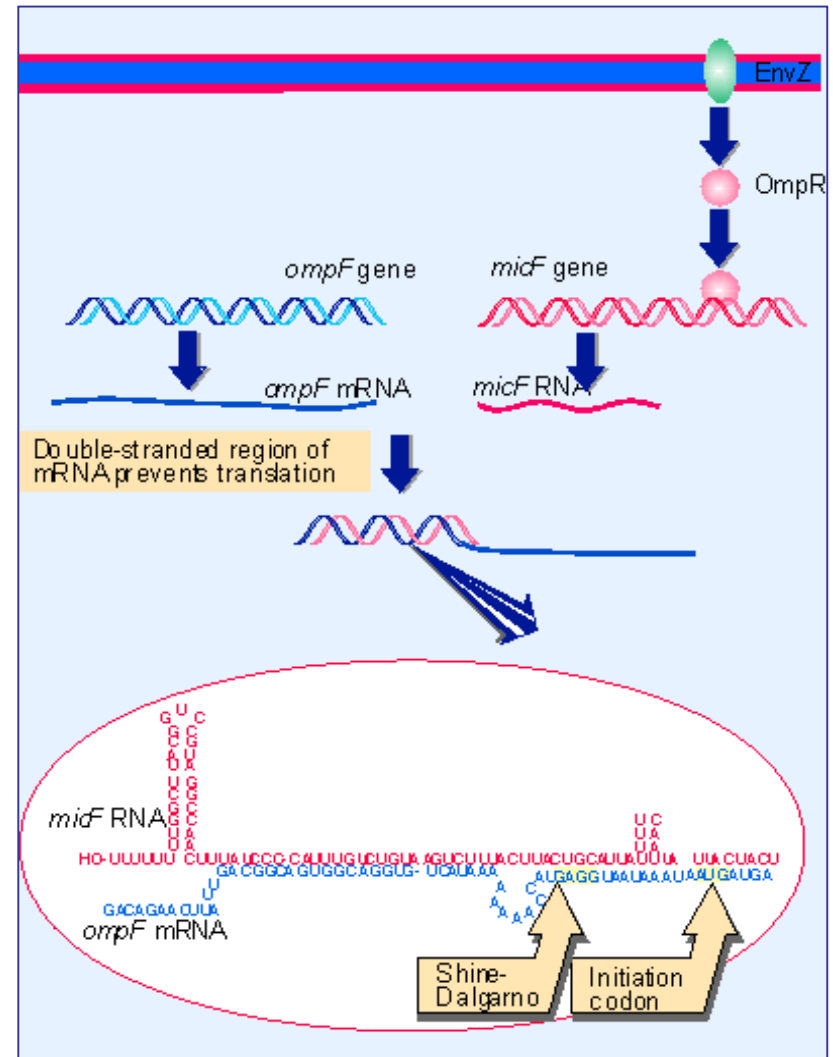
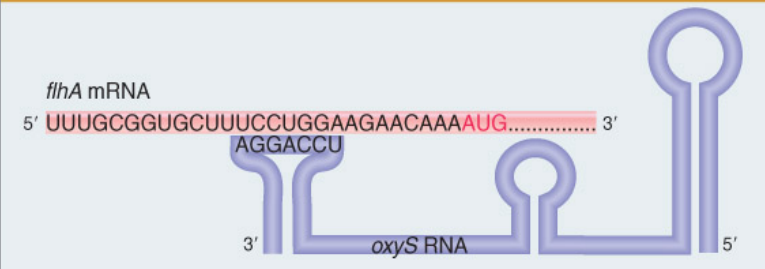
Regulator excludes protein binding

Protein binds single-stranded region in target



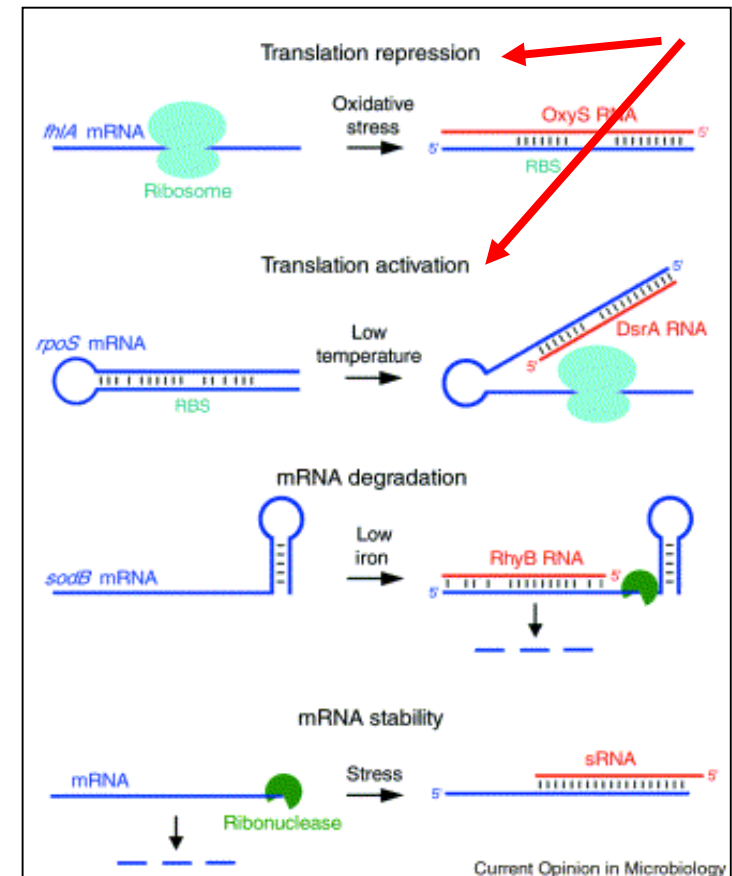
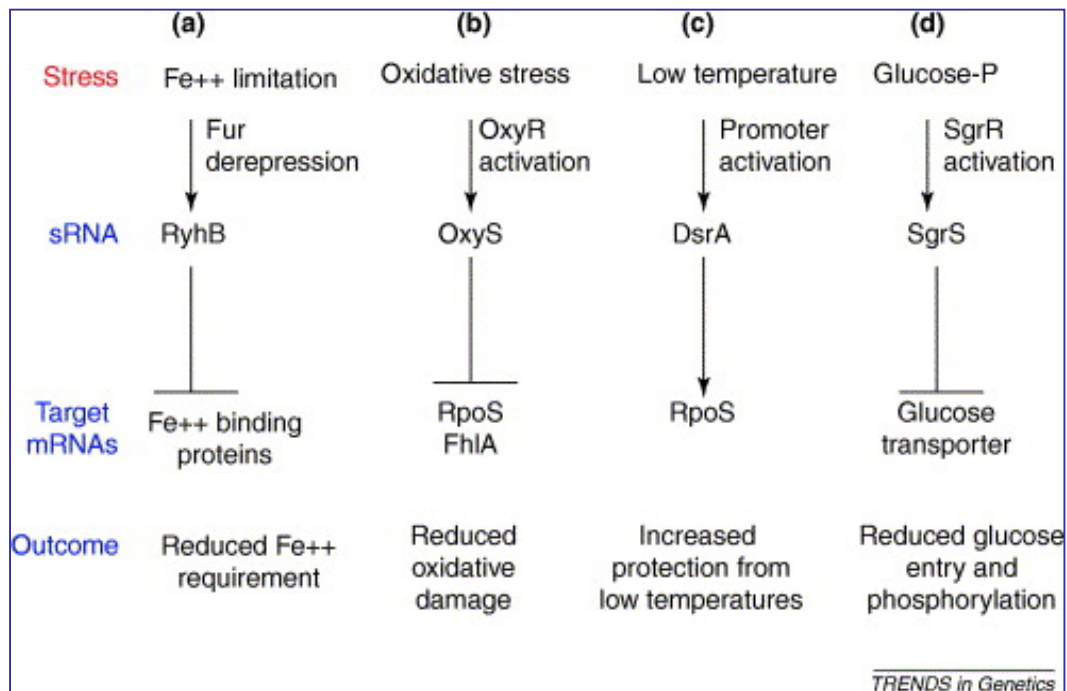
Protein cannot bind to target

A 3' terminal loop in *oxyS* RNA pairs with the initiation site of *flhA* mRNA



sRNA: small non-coding RNA

- Són menuts (~100nt)
- Hi ha ~ 60 en *E. coli*
- Afecten l'expressió gènica mitjançant aparellament de bases
- Regulen l'expressió gènica en condicions d'estrès.



Una altra visió: mecanismes de regulació de la traducció a partir d'una molècula d'mRNA presintetitzada

- Regulació per tall de l'mRNA
 - A través de la taxa de degradació: CsrABC en *E. coli*
 - Fent traduïble un mRNA que no ho és per acció de ribonucleasa III
- Control mitjançant proteïnes d'unió a l'mRNA
 - Activadors: proteïnes que activen mRNA de la subunitat gran de RuBisCO
 - Repressors: IRP en mRNA de ferritina
- Traducció preferent de certs mRNAs per alteracions del ribosoma: S6-P
- Regulació per RNA antisentit
- Regulació per regions no traduïbles
 - 5'UTR: uORFs
 - 3'UTR: p. ex., unió de proteïnes que afecten localització
- Regulació per atenuació
- Regulació per ribointerruptors
- Regulació per modificació de bases, com metilació d'adenines (efectes en *splicing* alternatiu, transport de l'mRNA al citosol, traducció o degradació)

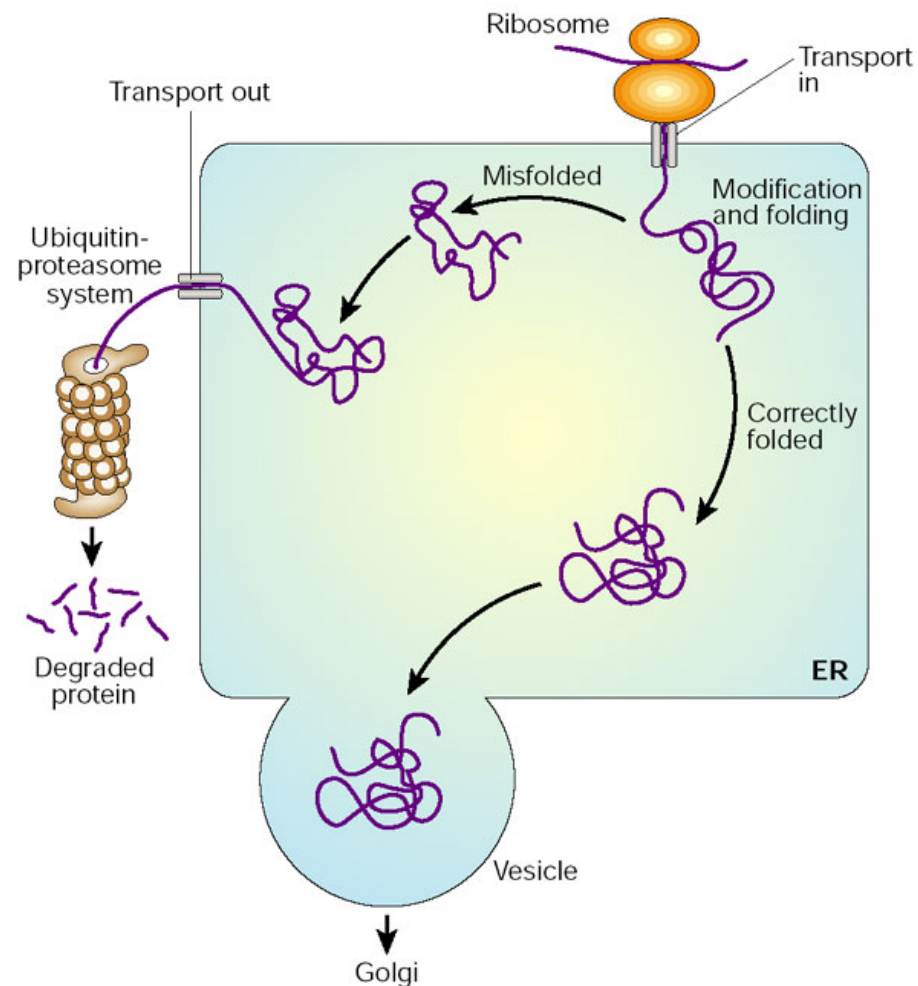
Tema 11

Plegament de les proteïnes i modificacions químiques de les cadenes polipeptídiques.

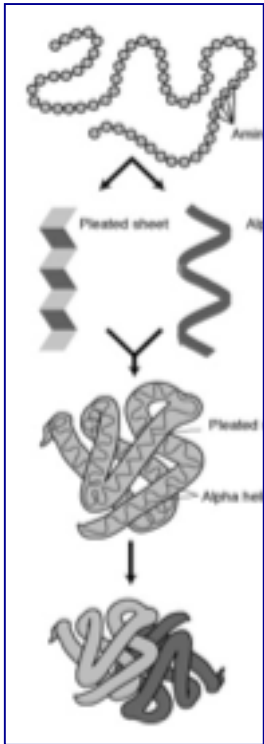
Principis generals de l'autoensamblatge.

Xaperones moleculars: tipus i funcions.

Processament del polipèptid naixent: modificació d'aminoàcids i escissió proteolítica.



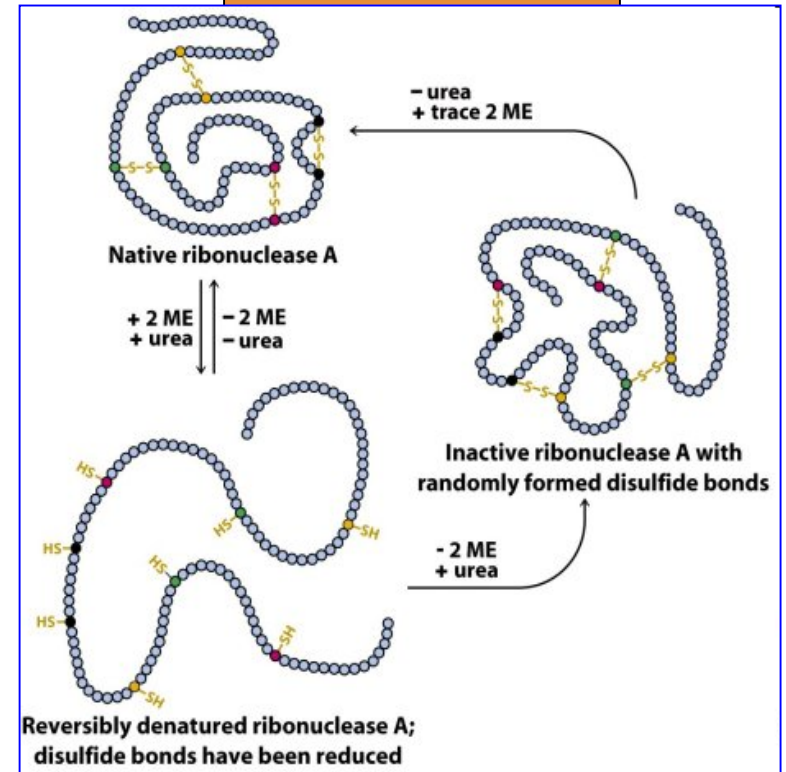
Plegament de proteïnes



- L'estructura que adopta una proteïna és essencial per a les seues propietats.
- Determina quins aminoàcids resten exposats, amb quins substrats poden reaccionar...

Com es pleguen les proteïnes?

Experimento de Anfinsen:
renaturalización de la RNasa

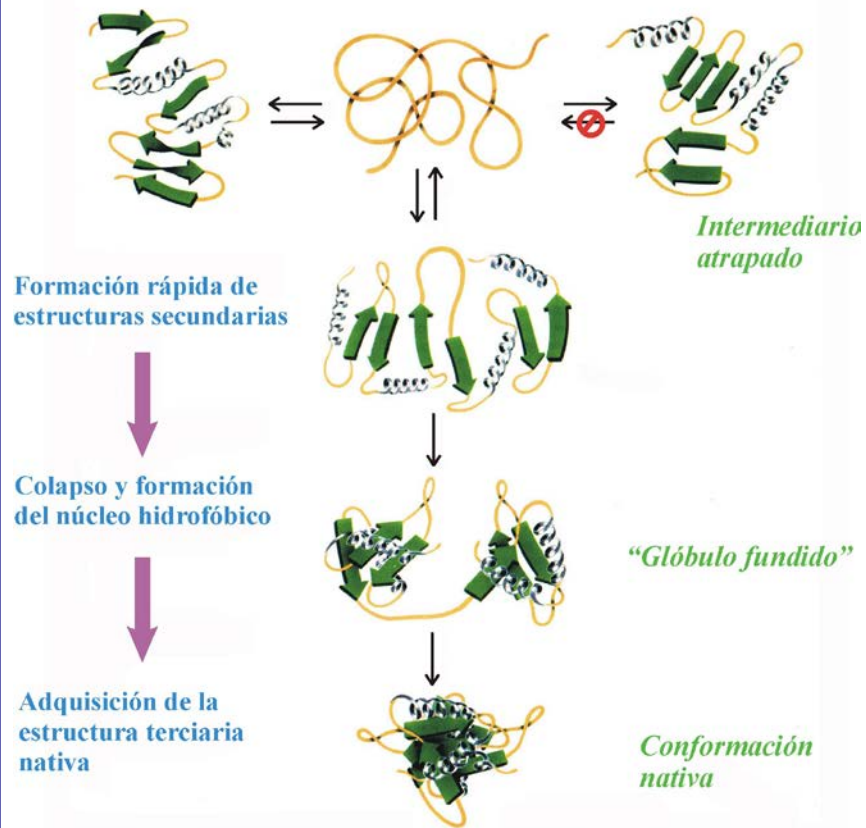


PRINCIPIO DE AUTOENSAMBLAJE

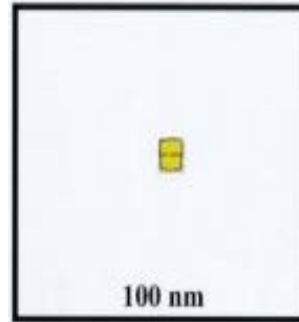
“La información necesaria y suficiente para determinar la conformación nativa y funcional de una proteína reside en su secuencia de aminoácidos”

Principis generals d'autoensamblatge

MECANISMO DE PLEGAMIENTO DE UNA PROTEÍNA *IN VITRO*



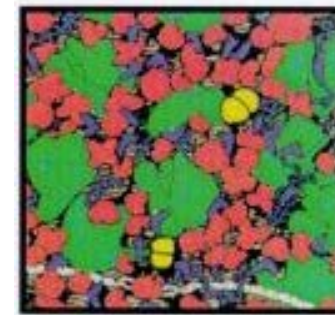
in vitro



Diferències

1. *In vitro* la proteïna té tota la informació per a plegar-se; *in vivo* apareix de forma gradual
2. L'entorn cel·lular és diferent i, a més, hi ha una major concentració de molècules

Citosol de *E. coli*

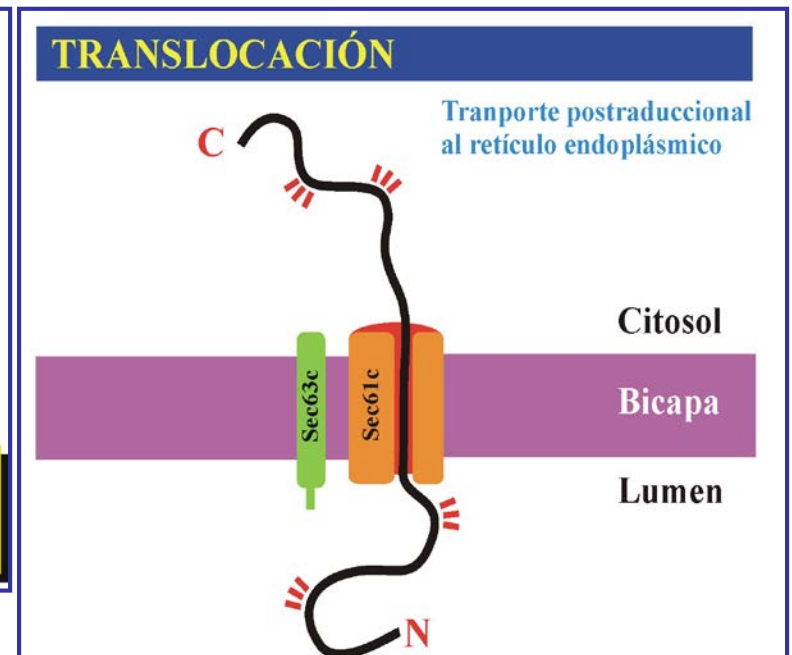
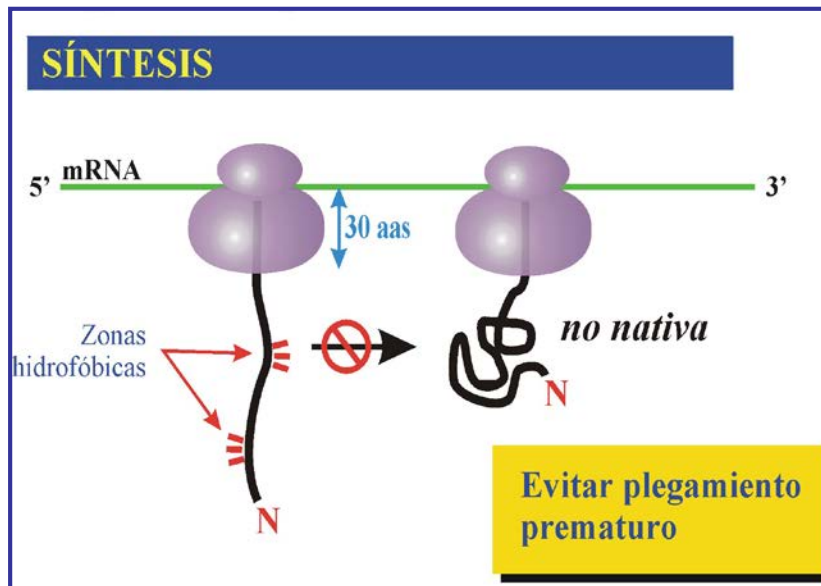


~340 mg/mL

ribosoma
 xaperona proteïna
 àcids nucleics
 altres macromolècules

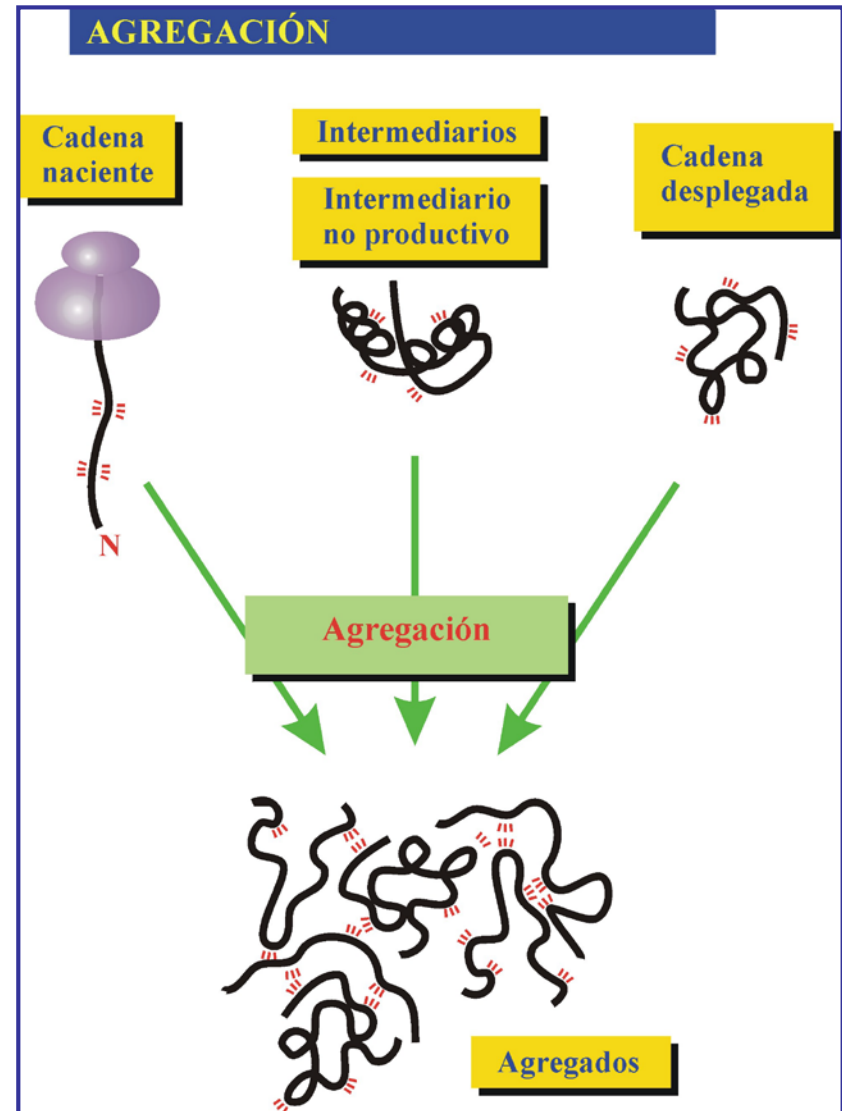
Problemàtica del plegament *in vivo*

- Processos vectorials (biosíntesi de proteïnes, transport a través de membrana).



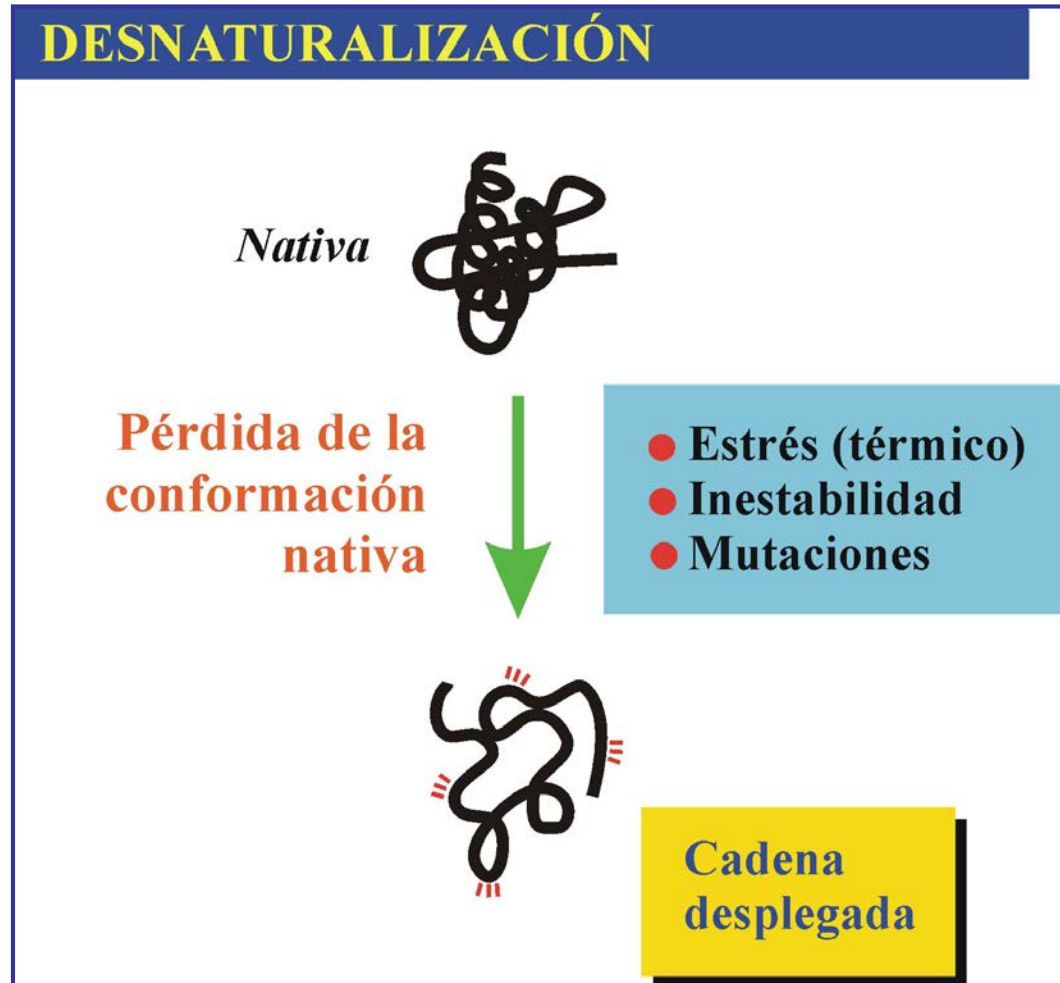
Problemàtica del plegament *in vivo*

- Concentració de proteïnes molt superior en la cèl·lula → agregació per interacció entre superfícies hidrofòbiques.



Problemàtica del plegament *in vivo*

- Proteïnes oligomèriques o amb grups prostètics.
- Condicions d'estrès que desencadenen la desnaturalització de proteïnes.



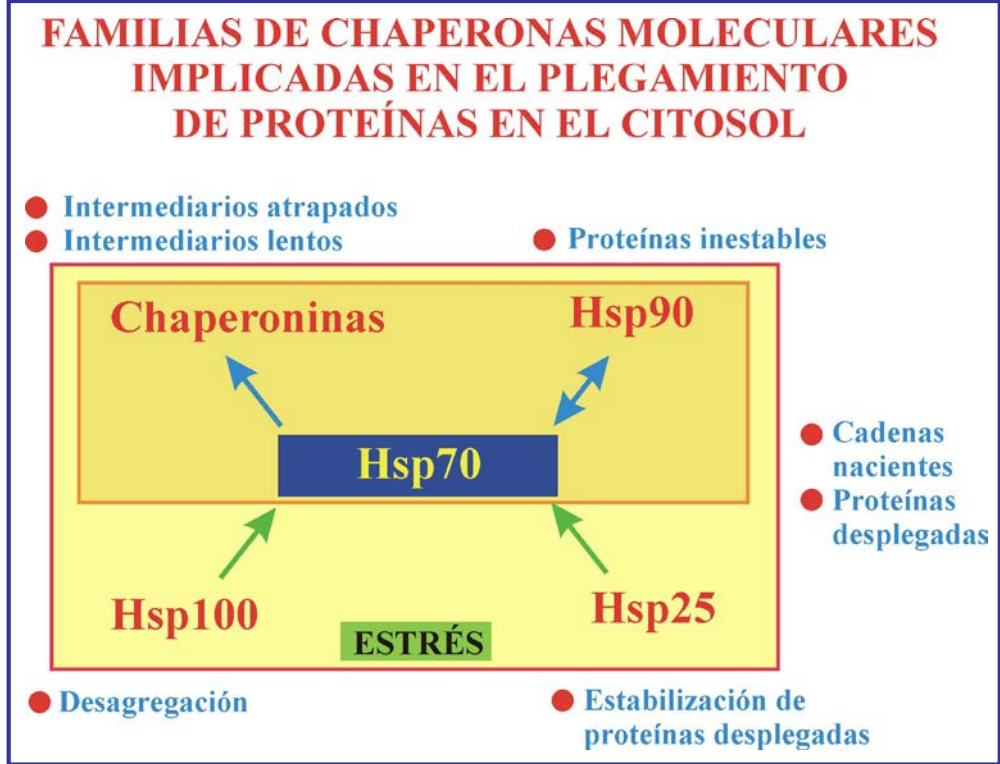
Problemàtica del plegament *in vivo*

Altres obstacles per a adoptar la conformació nadiua són:


- Formació de ponts disulfur no nadius
- Isomerització de l'enllaç peptídic que procedeix de prolina

Xaperones moleculars: tipus i funcions

- Eviten la formació d'interaccions inapropiades
- Unió **no covalent i reversible**
- No contenen informació estèrica que especifiqui el plegament correcte
- Incrementen la producció però no la velocitat de les reaccions de plegament
- Moltes es descriviren inicialment com **proteïnes de resposta a xoc tèrmic** (*Heat Shock Proteins* o HSPs)

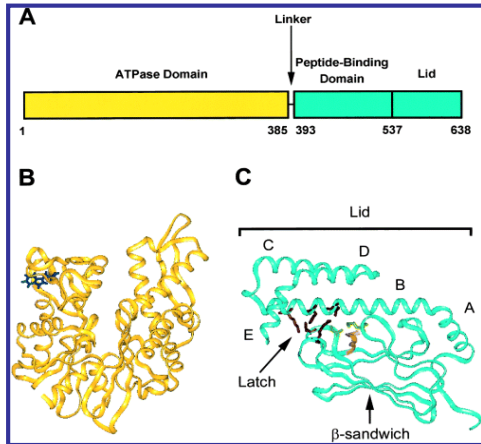
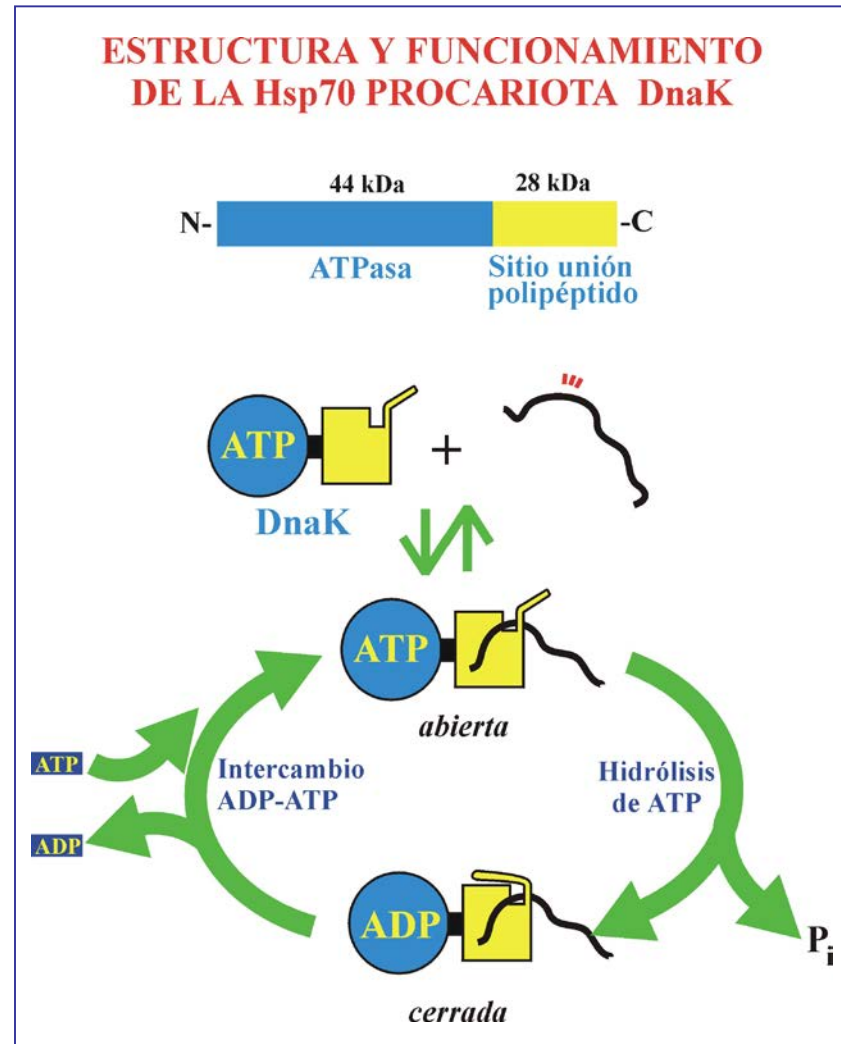
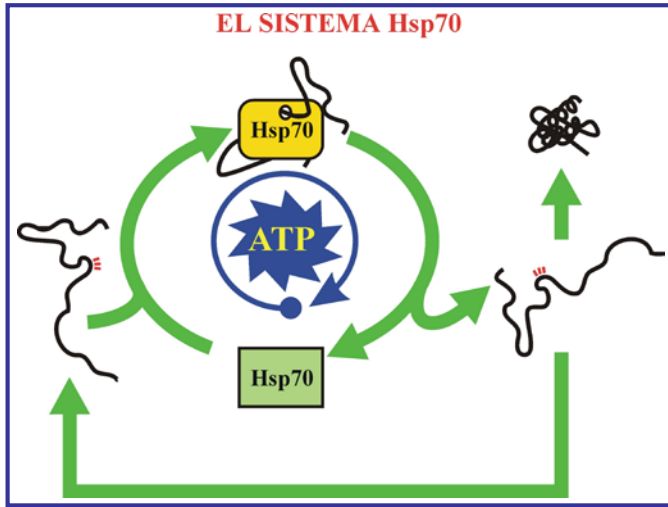


Hsp 70, menudes. 
Estabilitzen cadenes naixents de proteïnes i proteïnes desplegadas.

Hsp 60, grans, xaperones.
Faciliten plegament d'intermediaris lents o atrapats cinèticament. 

Hsp 90
Gestionen el plegament de proteïnes inestables. 

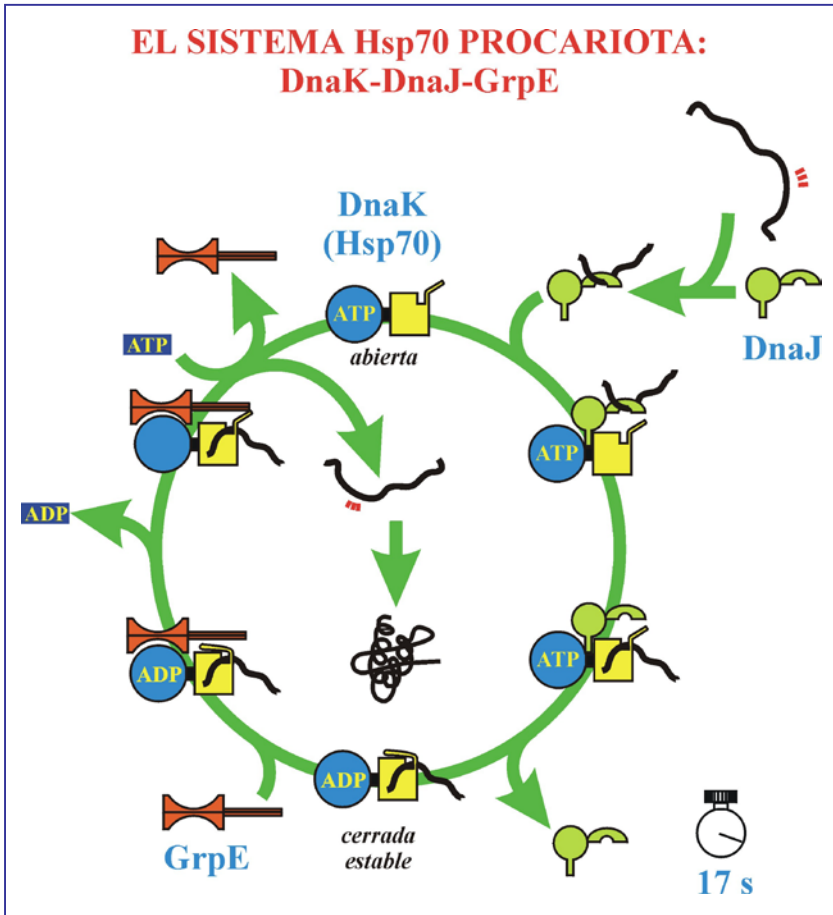
Xaperones moleculars: Hsp70



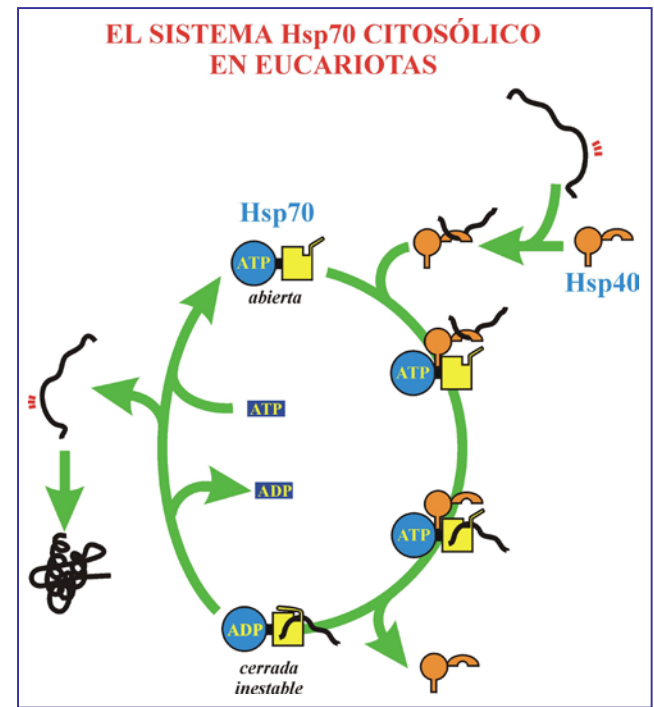
En *E.coli* Hsp70 s'anomena DnaK

Xaperones moleculars: Hsp70

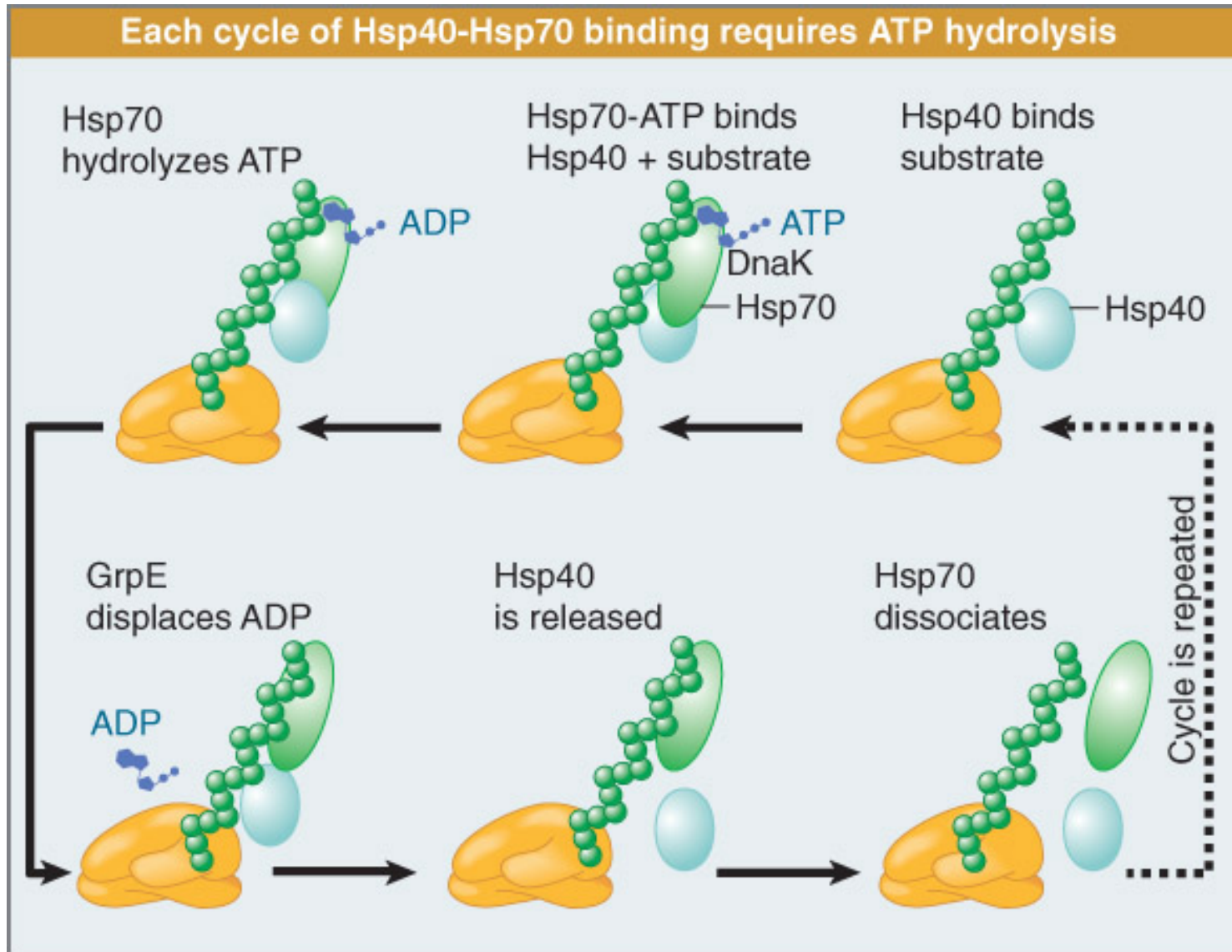
Co-xaperones: DnaJ i GrpE



Procariotes	Eucariotes
DnaK	hsp70 (cit, RE, clp i mit)
DnaJ	hsp40
GrpE	-



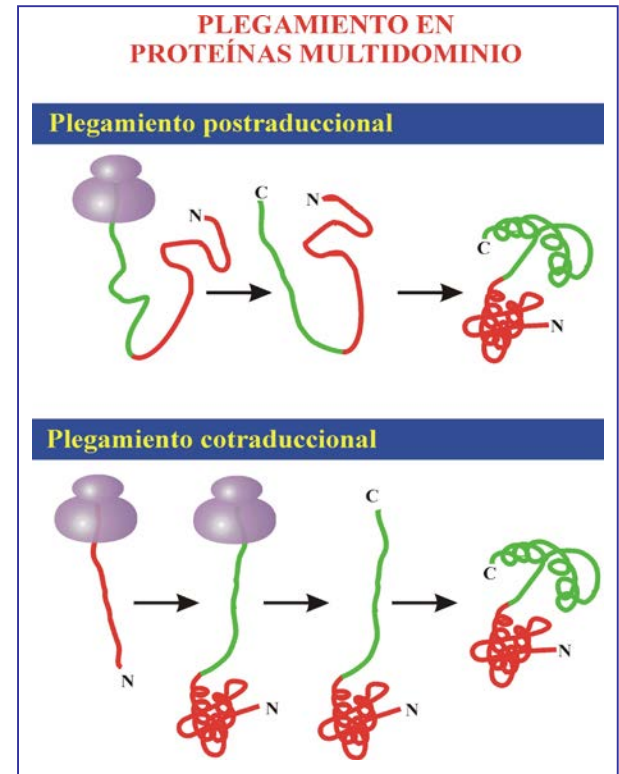
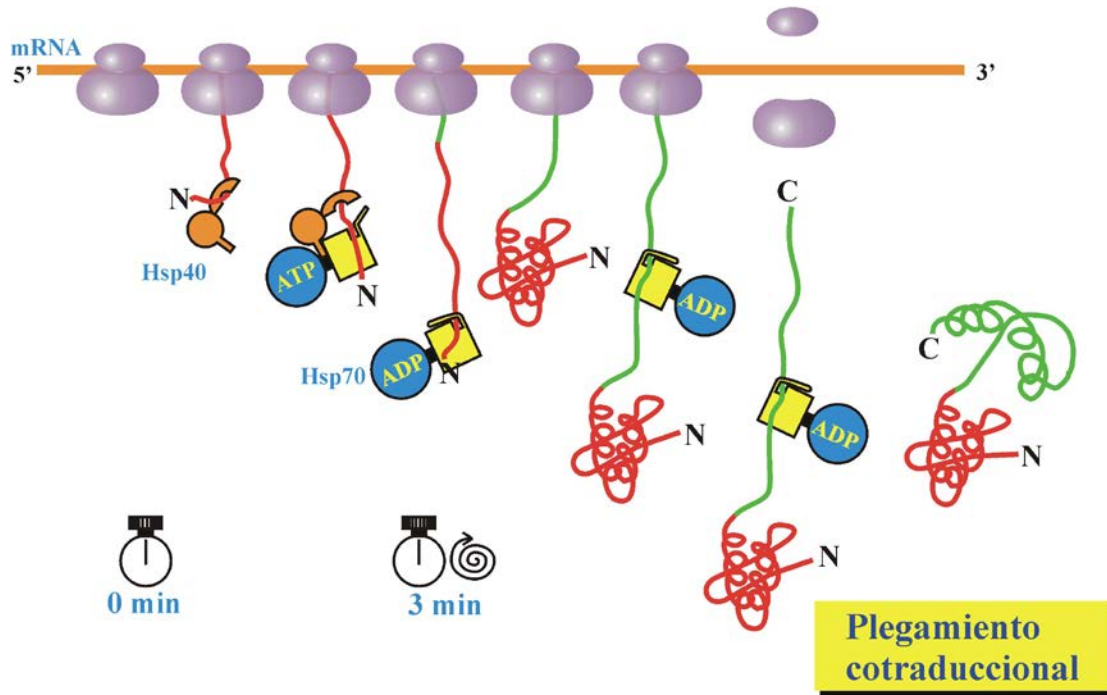
Xaperones moleculars: Hsp70



Xaperones moleculars: Hsp70

El sistema Hsp70 procariota afavoreix el plegament posttraduccional

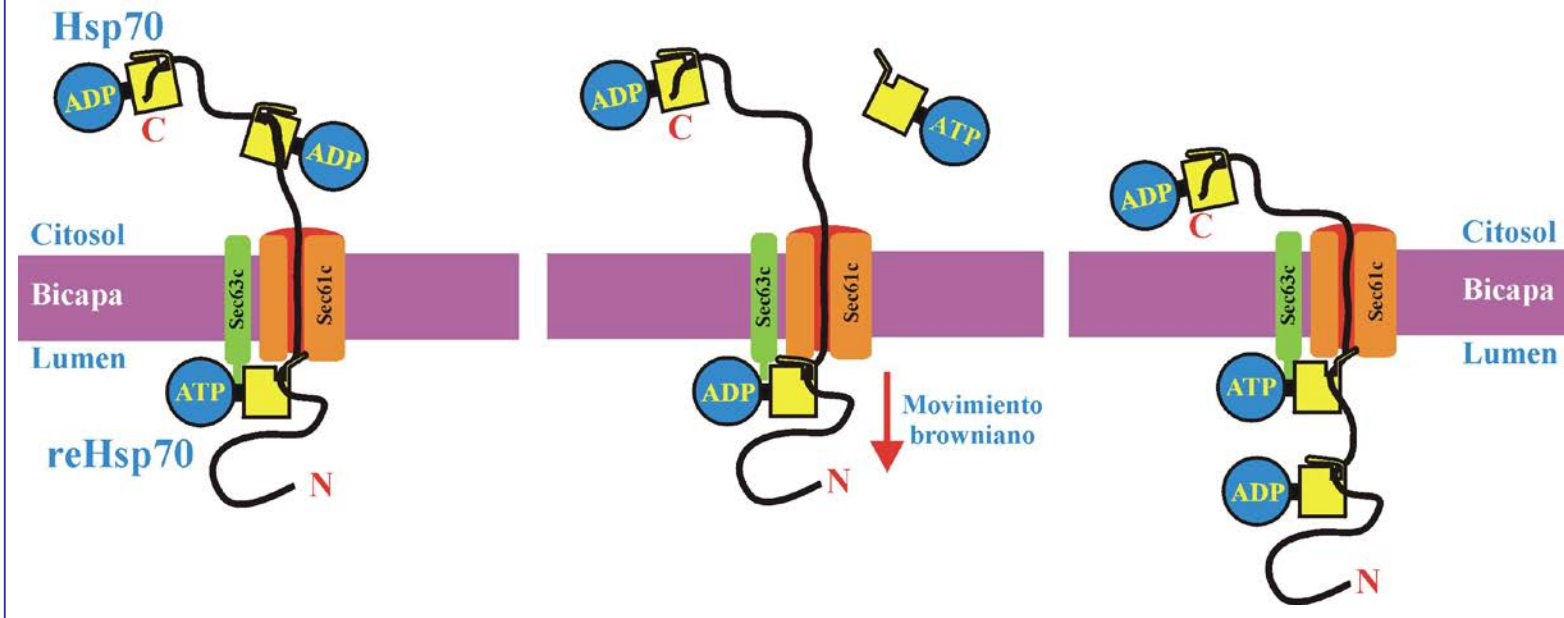
EL SISTEMA Hsp70 EUCARIOTA FAVORECE EL PLEGAMIENTO COTRADUCCIONAL



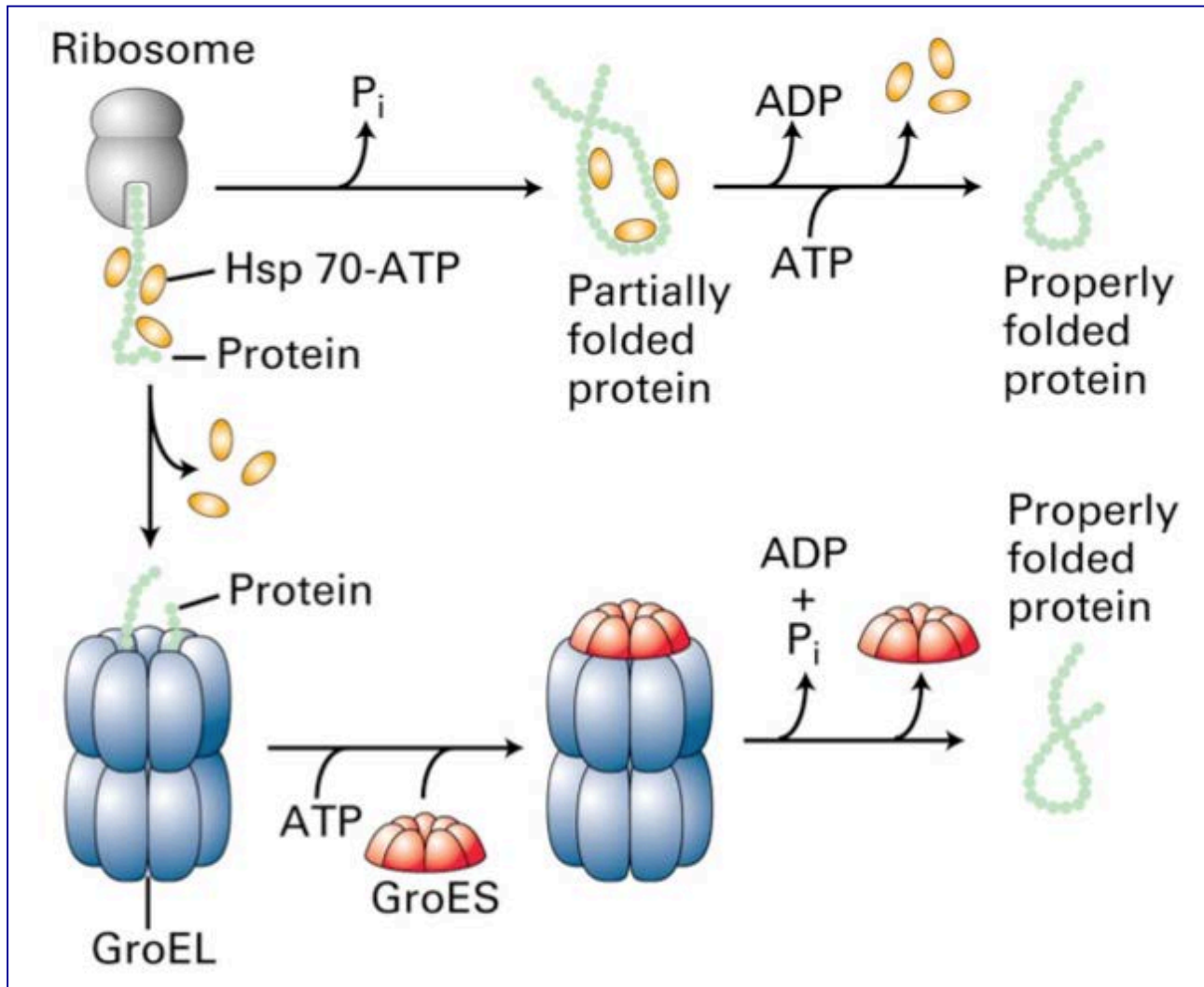
Xaperones moleculares: Hsp70

PAPEL DE Hsp70 EN LA TRANSLOCACIÓN DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DE MEMBRANA

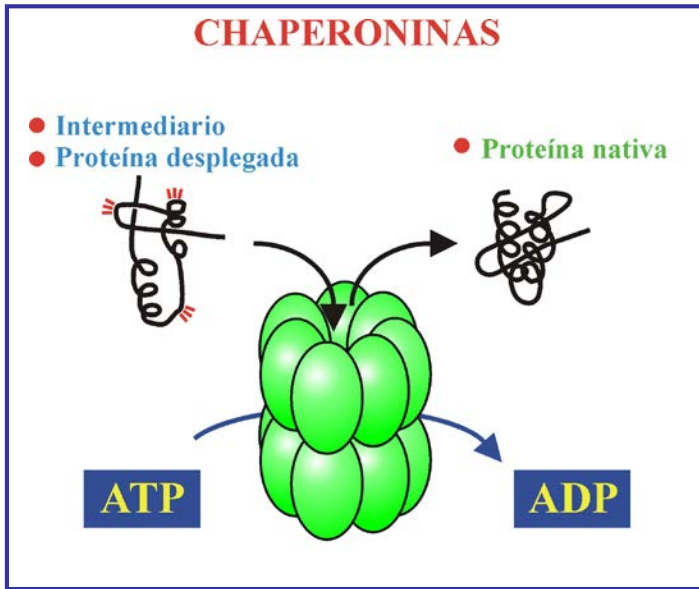
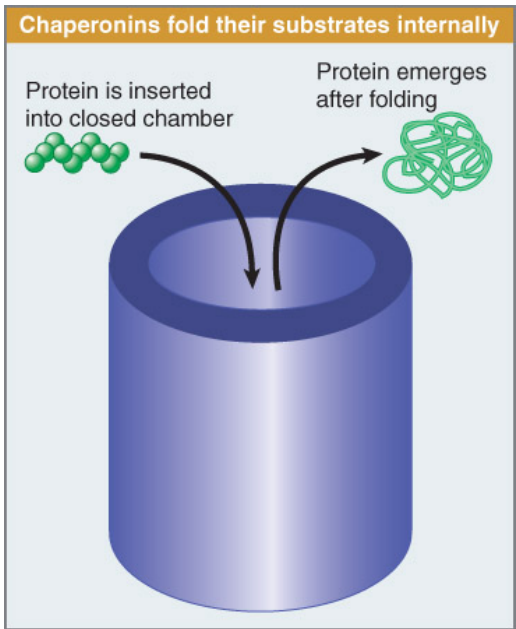
Transporte postraduccional al retículo endoplásmico



Xaperones moleculars: tipus i funcions



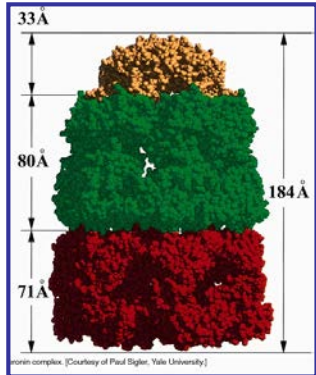
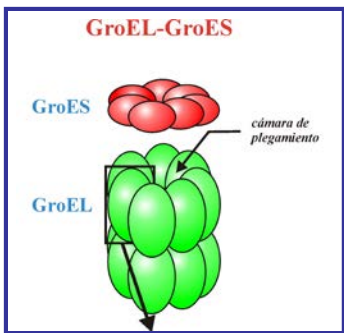
Xaperones moleculars: Hsp60



En procariotes: **GroEL** és un cilindre format per dos anells oposats, cadascun amb 7 subunitats idèntiques de 60 kDa

Co-Xaperona
Procariotes
 GroES cpn10

Eucariotes
 hsp10



GroES

GroEL

Xaperones moleculars: Hsp60

Cada subunitat de **GroEL** conté 3 regions:

- **Apical (motiu α/β)**
Entrada de la proteïna desplegada
Hidrofòbica, flexible
- **Intermèdia (hèlixs α)**
Frontissa flexible
Permet difusió d'ATP i d'ADP
- **Equatorial (hèlixs α)**
Llocs d'unió d'ATP
Estabilitza l'estructura de doble anell

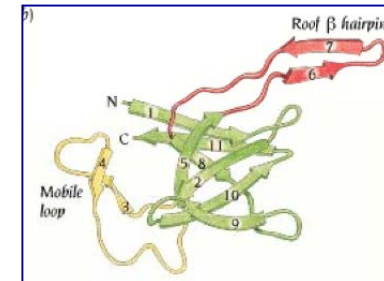
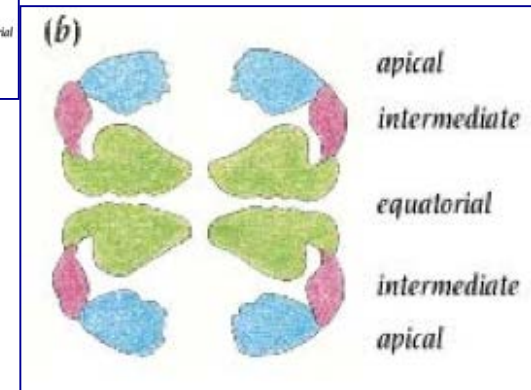
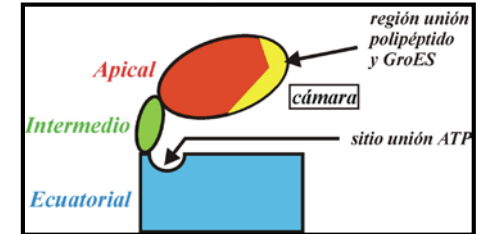
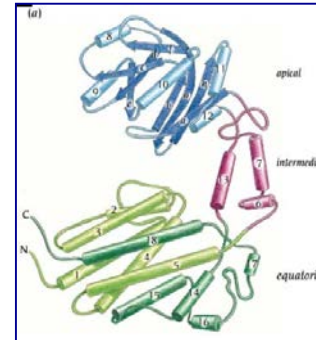
El conjunt limita una cavitat central (90Å de diàmetre)

Tapa de la cavitat (**GroES**):

7 subunitats

s'uneix un polipèptid en un dels anells cada vegada

s'inhibeix al·lostèricament l'altre lloc d'unió



Plegament actiu de la proteïna només en un dels anells durant cada cicle d'activitat.

Xaperones moleculars: Hsp60

En citosol i orgànuls, però no en reticle endoplàsmic

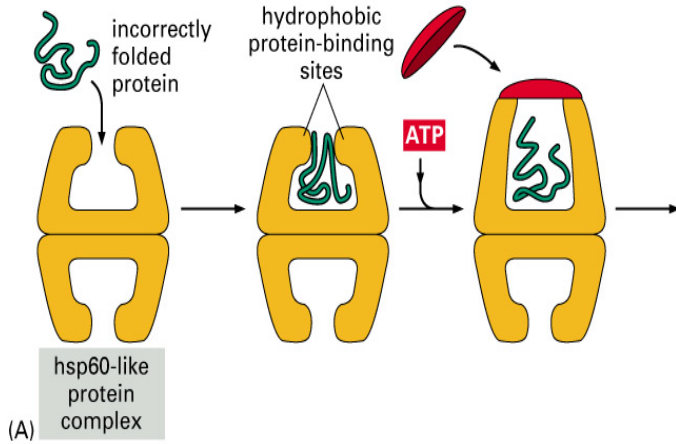
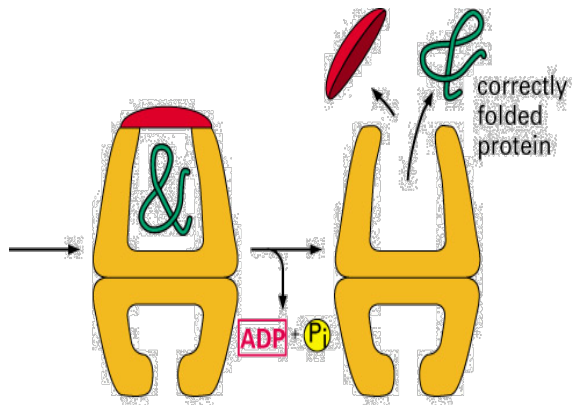
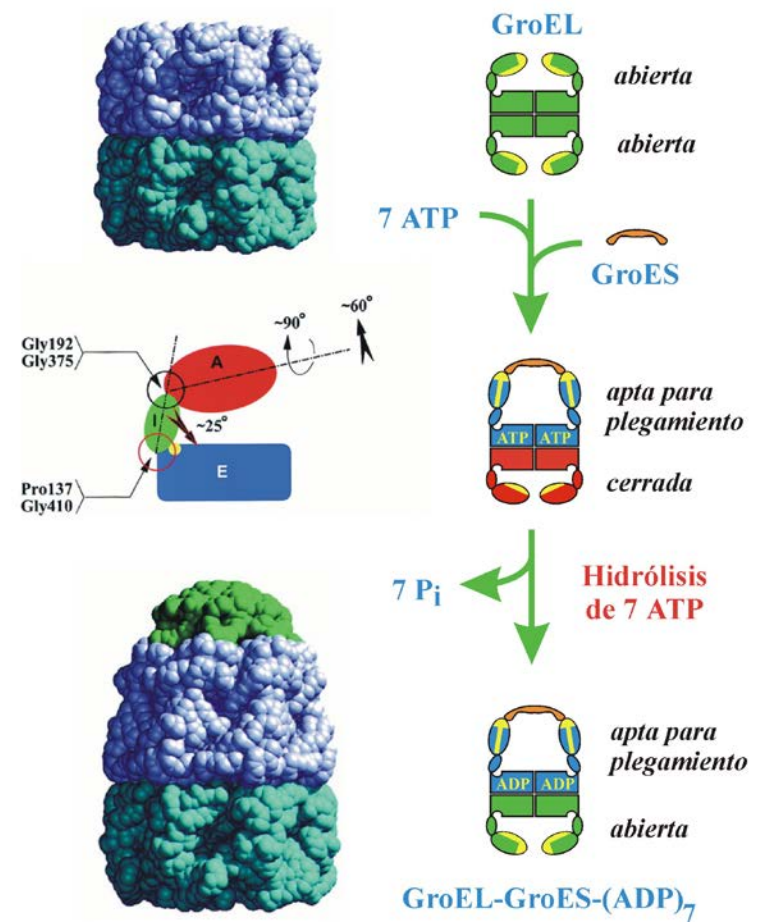


Figure 6-84 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



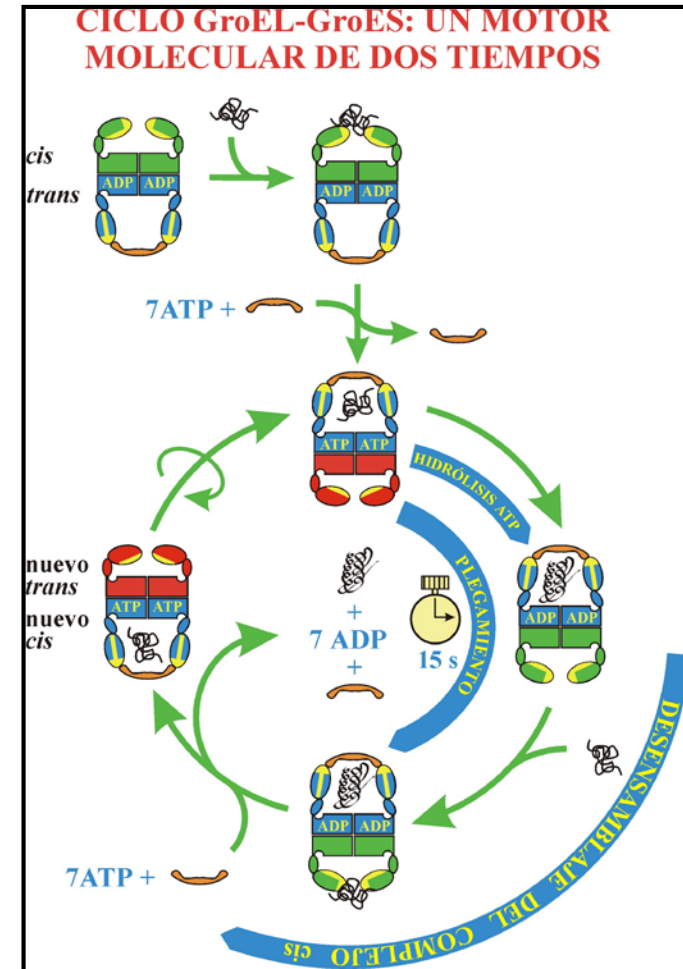
FORMACIÓN DEL COMPLEJO ASIMÉTRICO GroEL-GroES-(ADP)₇



Xaperones moleculars: Hsp60

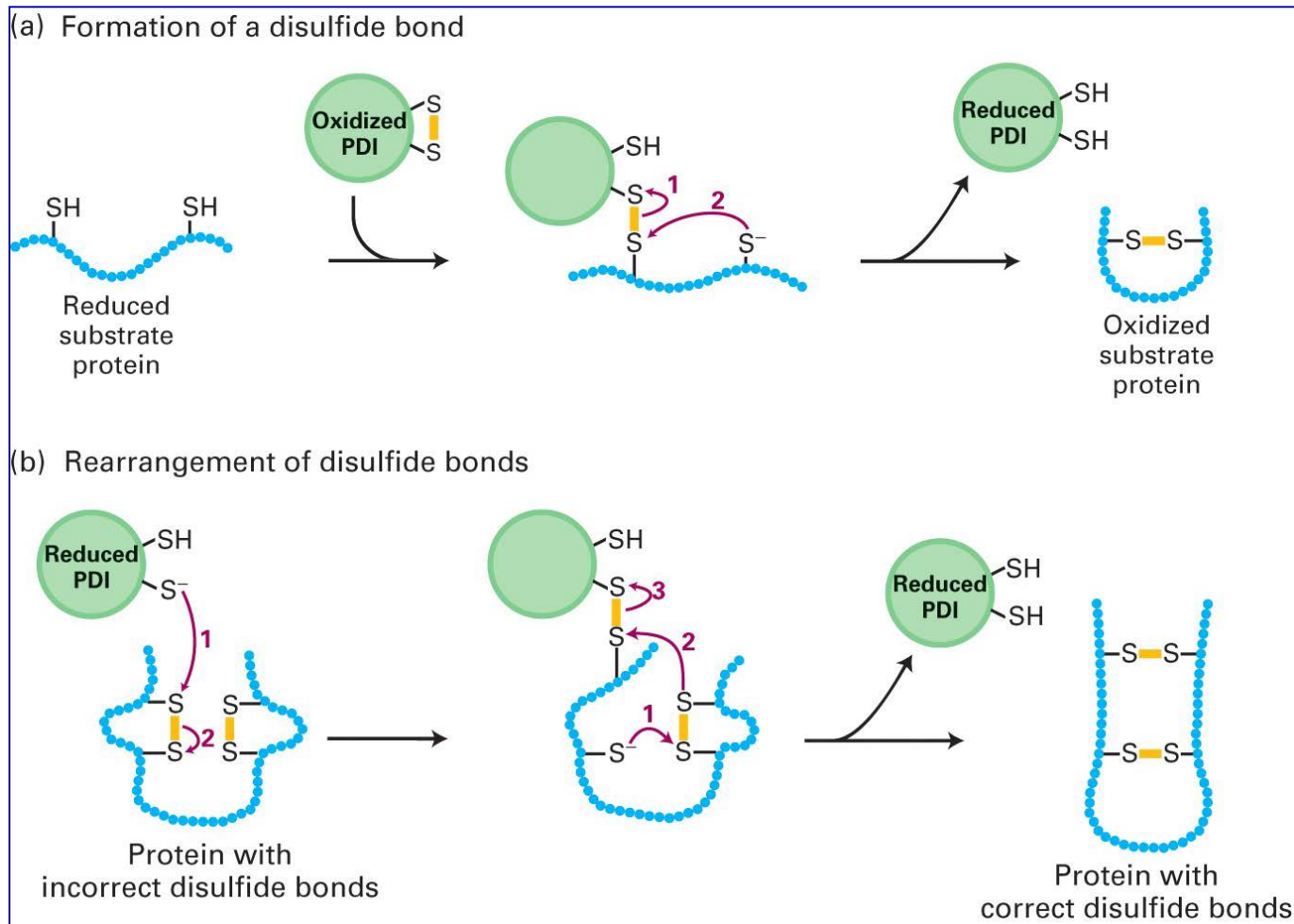
Cicle GroEL-GroES

1. Comença amb la conformació GroEL-GroES-(ADP)₇, anell *cis* obert i anell *trans* apte per a plegament
2. Unió del polipèptid amb zones hidrofòbiques exposades. Aquesta unió és més ràpida que la unió d'ATP i GroES
3. Unió de 7 ATPs i GroES a l'anell *cis* i canvis conformationals. El polipèptid comença a plegar-se.
4. Hidròlisi d'ATP: actua com a temporitzador tot permetent el plegament del polipèptid durant 15 segons. L'anell *trans* s'obri i uneix un nou polipèptid
5. La unió de 7 ATPs i GroES a l'anell *trans* provoca l'expulsió del contingut de l'anell *cis*
6. L'anell *cis* esdevé *trans* i el *trans* es converteix en *cis*



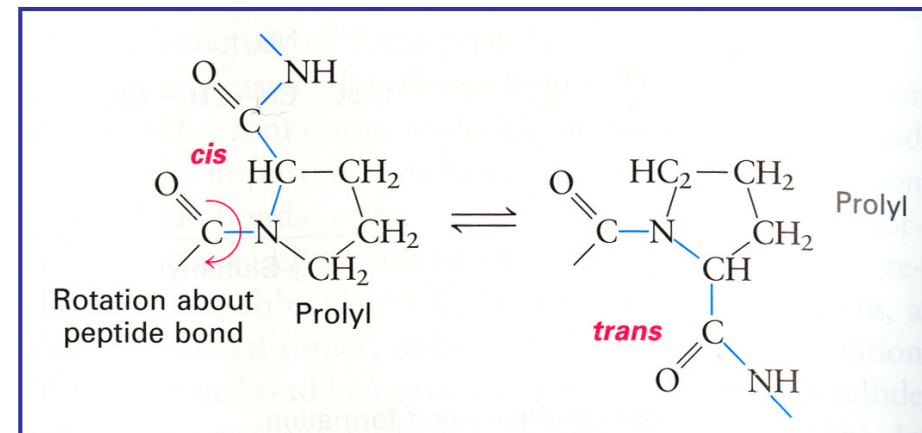
Plegases (foldases)

PDI (protein-disulfur isomerasa) Catalitza l'intercanvi de ponts disulfur



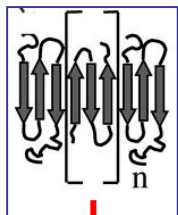
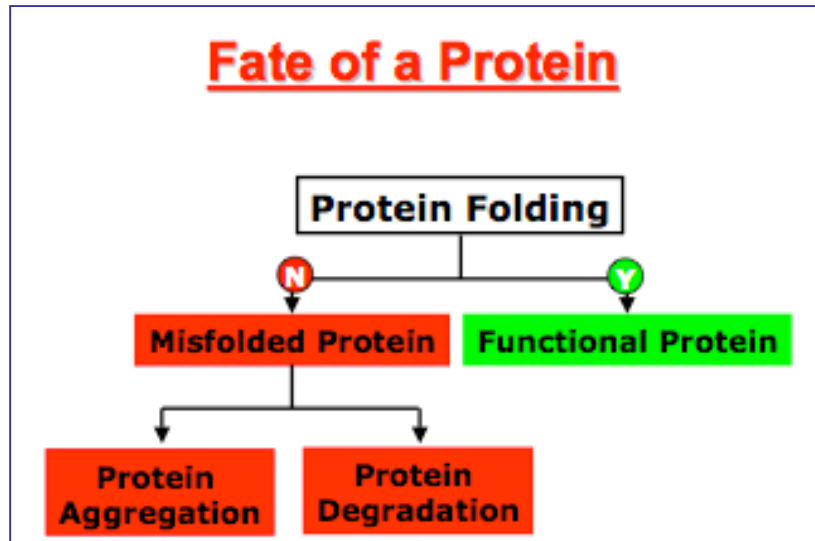
Plegases (foldases)

PPI (peptidil-prolil isomerasa)
 Catalitza la isomerització *cis-trans* de l'enllaç peptídic en el qual participa prolina.



La seqüència d'aminoàcids dicta l'estructura tridimensional de la proteïna i el plegament *in vivo* ocorre amb l'assistència de proteïnes que el faciliten.

Malalties relacionades amb el plegament de les proteïnes



Protein misfolding diseases

diseases	protein(s)
Cystic Fibrosis	CF transmembrane regulator (CFTR)
Huntington's disease	Huntingtin
Alzheimer's disease	β -amyloid
Parkinson's disease	α -synuclein
Retinitis pigmentosa	rhodopsin
cataracts, desmin-related myopathy	α -crystallin
cancer	p53, VHL
BBS, MKKS	BBS chaperonin
CJD, BSE ('mad cow')	prion protein
sickle cell anaemia	haemoglobin

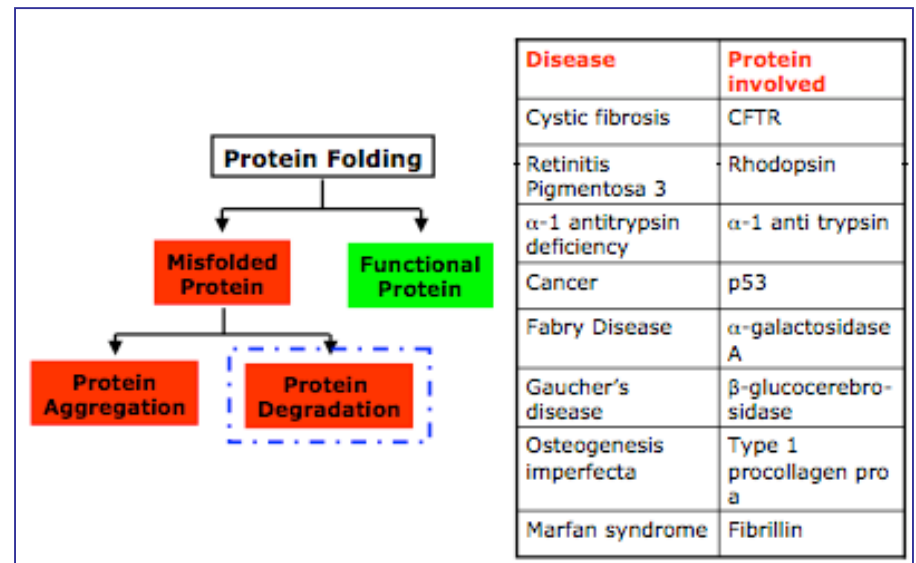
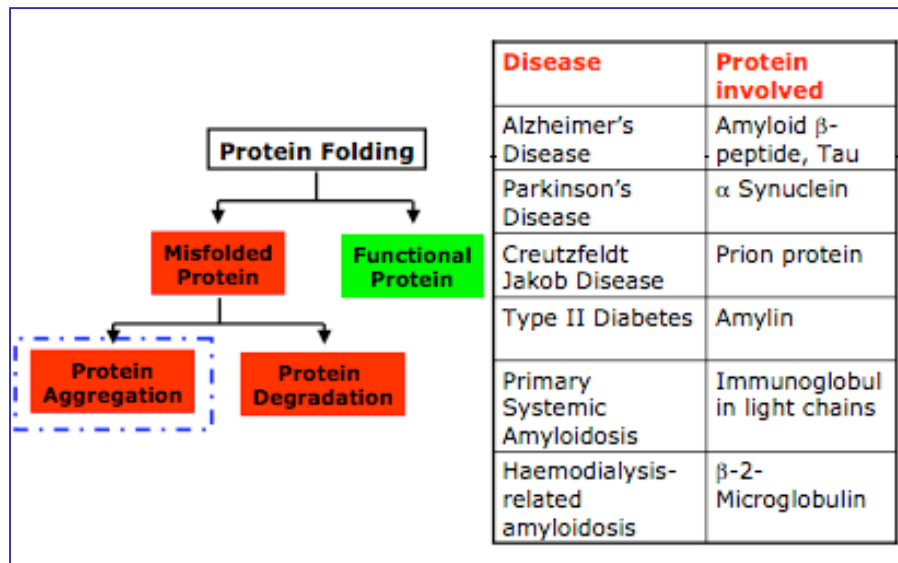
Exemples de malalties relacionades amb deficiències en el plegament de les proteïnes:

Alzheimer

Creutzfeld-Jacob (prions)

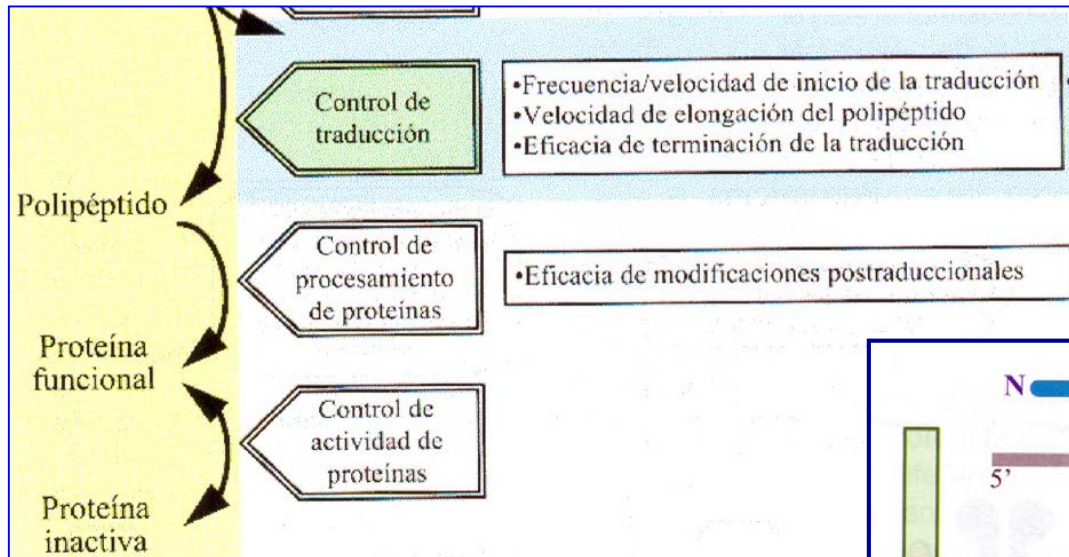
TSE disease	Natural host species affected	Route of transmission
Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)	Humans	Ingestion of BSE-contaminated food. Two cases associated with transfusion of blood from vCJD-infected blood donor
Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	Humans	Unknown. Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP ^c into PrP ^{sc} ?
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease	Humans	Accidental medical exposure to CJD-contaminated tissues or tissue products
Familial Creutzfeldt-Jakob disease	Humans	Associated with germline mutations in <i>PRNP</i> gene
Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome	Humans	Associated with germline mutations in <i>PRNP</i> gene
Fatal familial insomnia	Humans	Associated with germline mutations in <i>PRNP</i> gene
Kuru	Humans	Ritualistic cannibalism
Scrapie	Sheep, goats and mouflon	Acquired (for example, ingestion), horizontal transmission, vertical transmission unclear
Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Cattle	Ingestion of BSE-contaminated meat and bonemeal
Chronic wasting disease	Mule deer, white-tailed deer, Rocky mountain elk and moose	Acquired (for example, ingestion), horizontal transmission, vertical transmission unclear
Feline spongiform encephalopathy	Domestic and zoological cats	Ingestion of BSE-contaminated food
Transmissible mink encephalopathy	Farmed mink	Acquired (ingestion) but source unknown
Exotic ungulate encephalopathy	Zoological greater kudu, nyala and oryx	Ingestion of BSE-contaminated food

Malalties relacionades amb el plegament de les proteïnes



Processament del polipèptid naixent.

Modificacions de les proteïnes

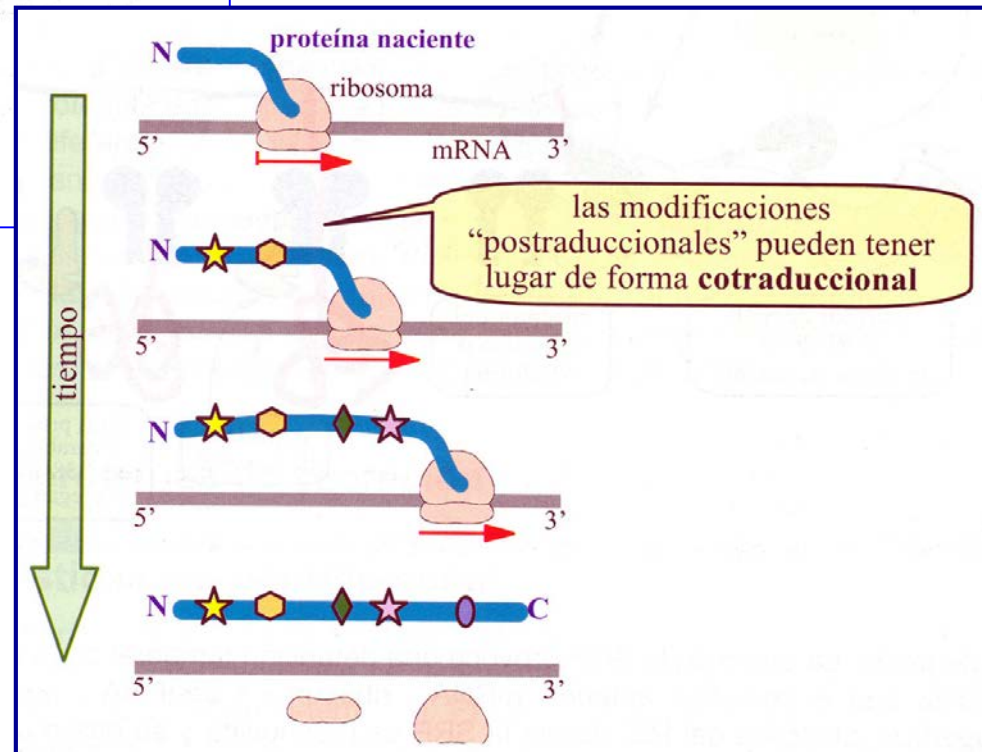


Poden ser de tres tipus:

- **Modificació d'aminoàcids**
- **Formació de ponts disulfur**
- **Processament proteolític**

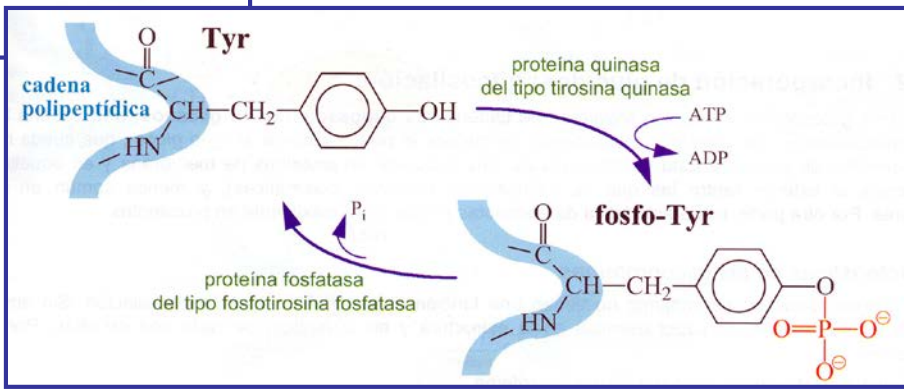
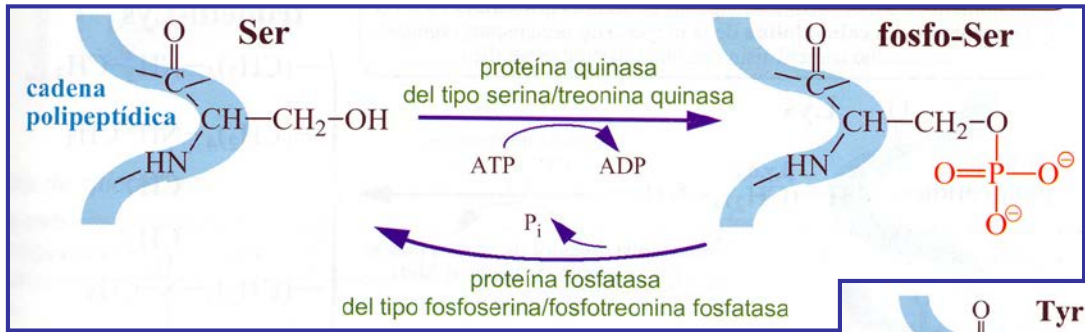
Alguns tipus de modificacions d'aas:

- **Acetilació**
- **Carboxilació**
- **Fosforilació**
- **Hidroxilació**
- **Metilació**
- **Glicosilació**
- **Acilació i prenilació**

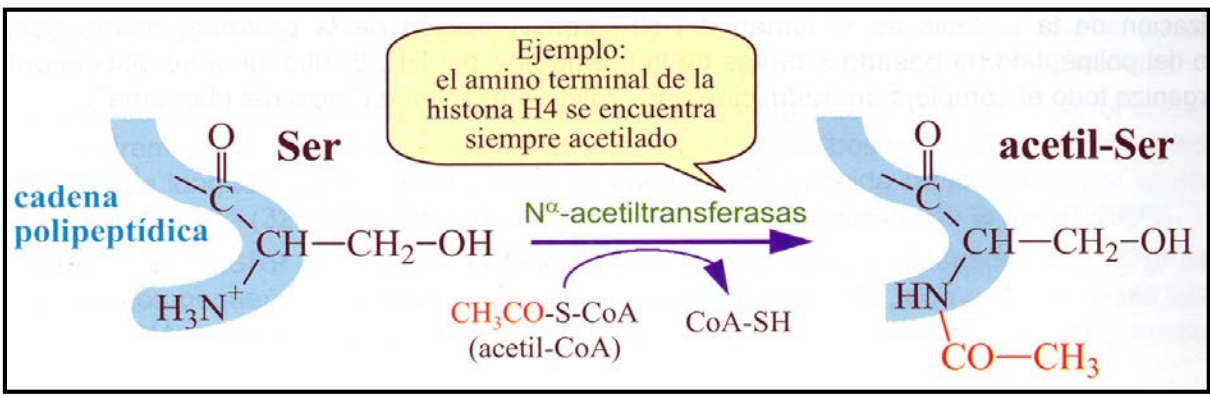


Modificaciones químicas d'aminoàcids

Fosforilació

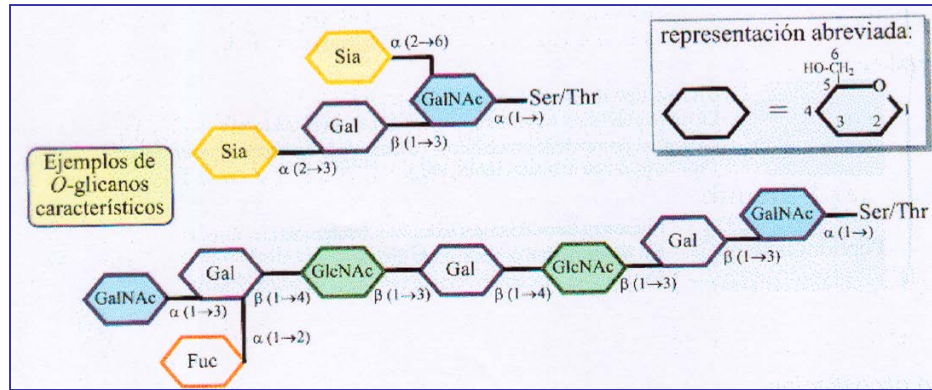
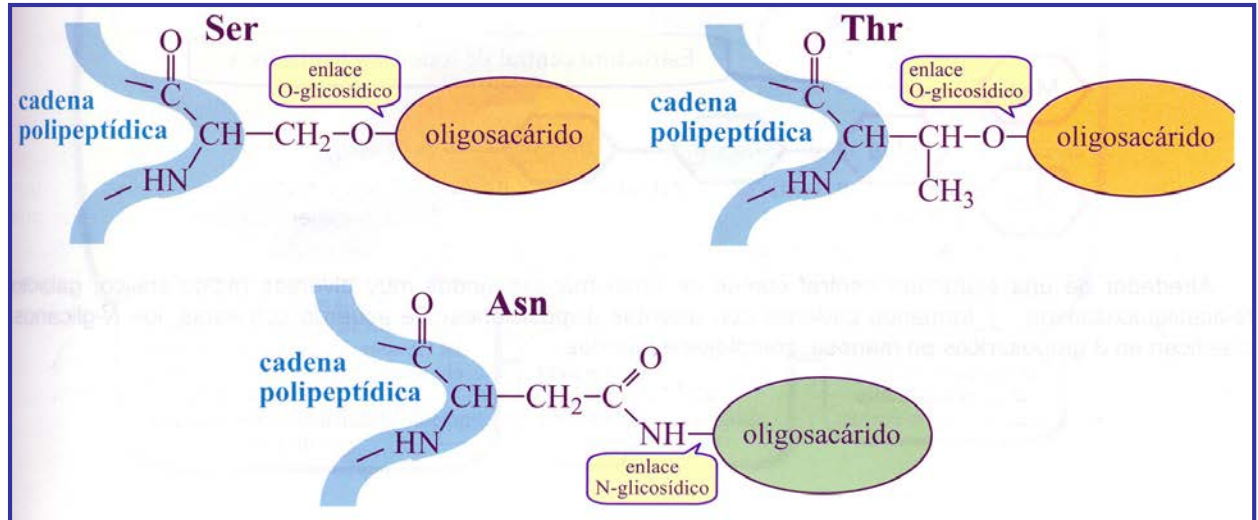


Acetilació

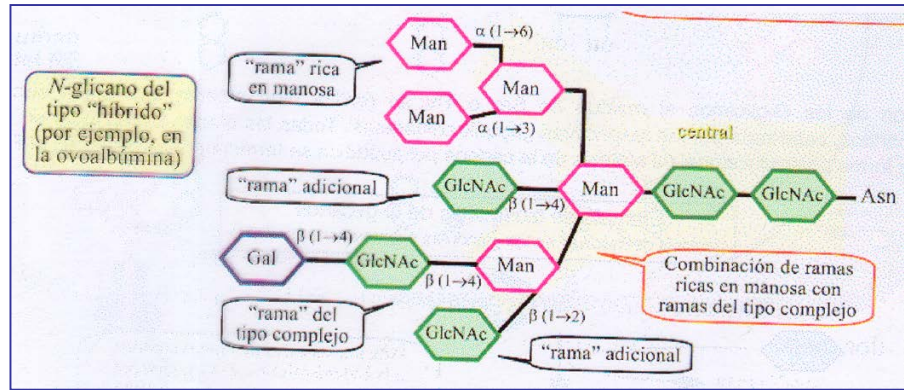


Unió covalent d'unitats orgàniques, sucres o lípids, a aminoàcids individuals

Glicosilació
(en el RE i
aparell de
Golgi)



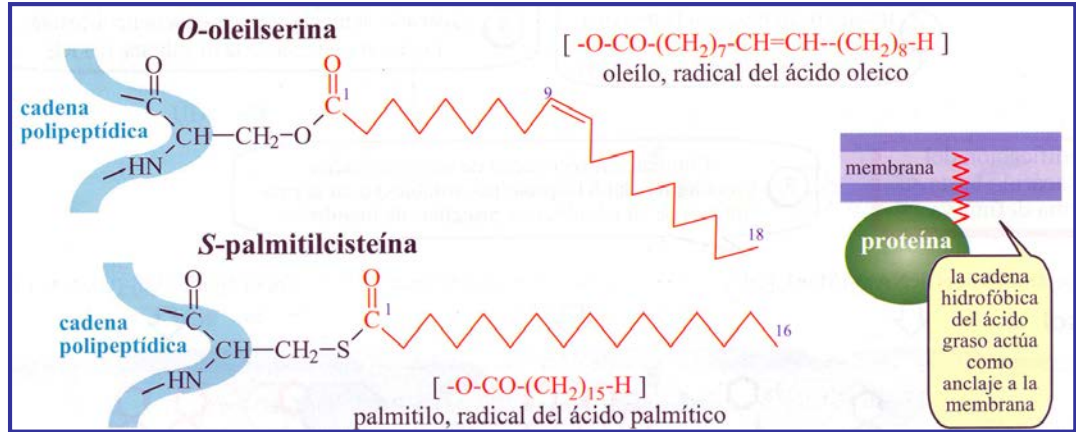
O-glicosilació (Ser, Thr, Tyr)



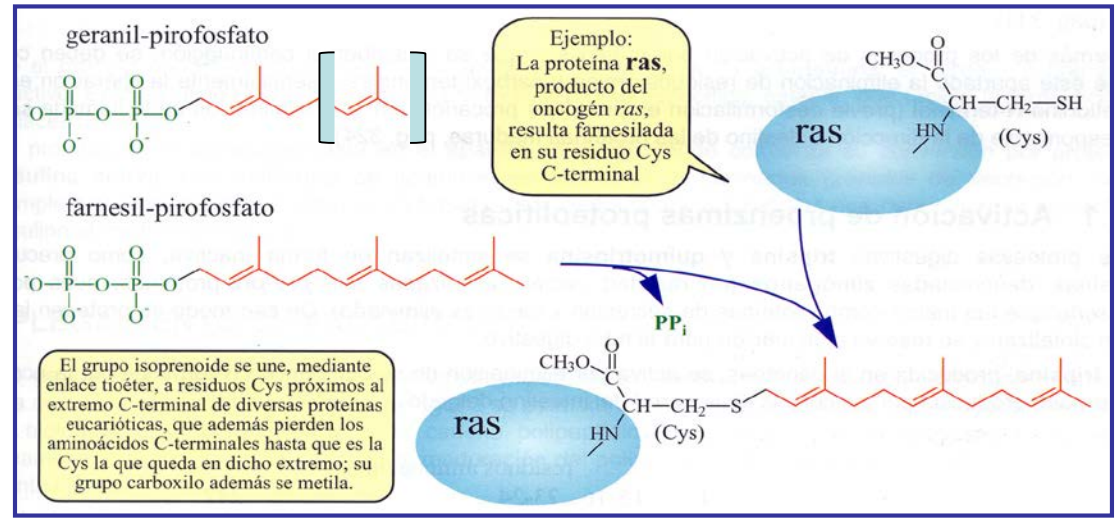
N-glicosilació (Asn, Gln)

Unió covalent d'unitats orgàniques, sucres o lípids, a aminoàcids individuals

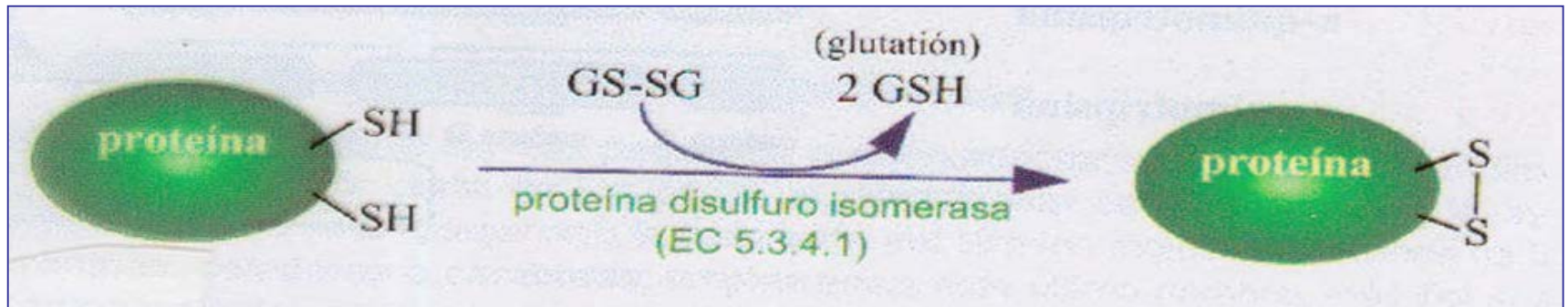
**Acilació
(àcids grassos)**



**Prenilació
(terpens,
principalment
de 10, 15 i
20 C)**

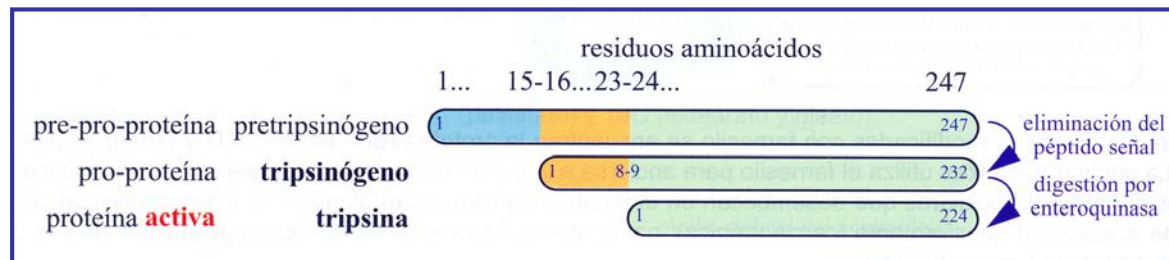


Formació de ponts disulfur

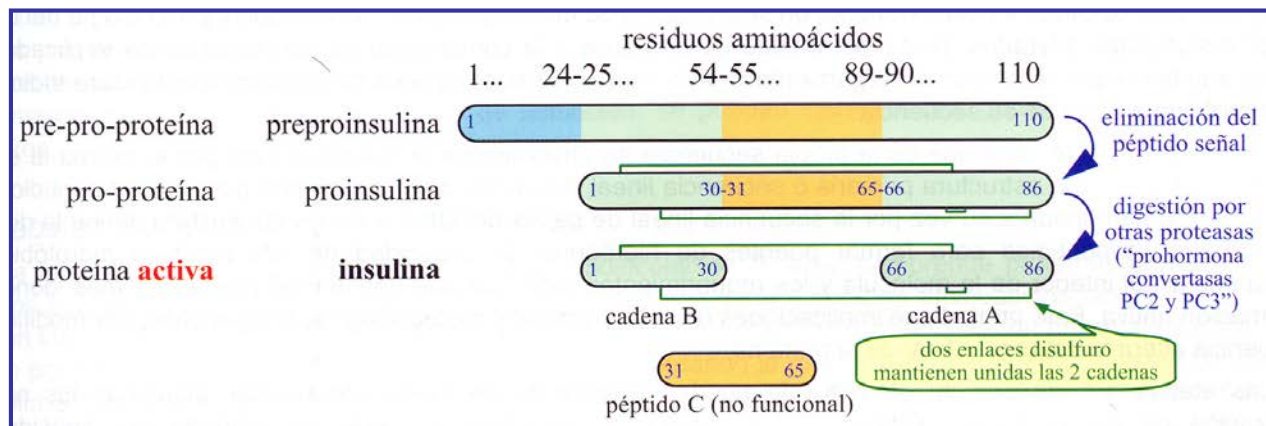


Processament proteolític

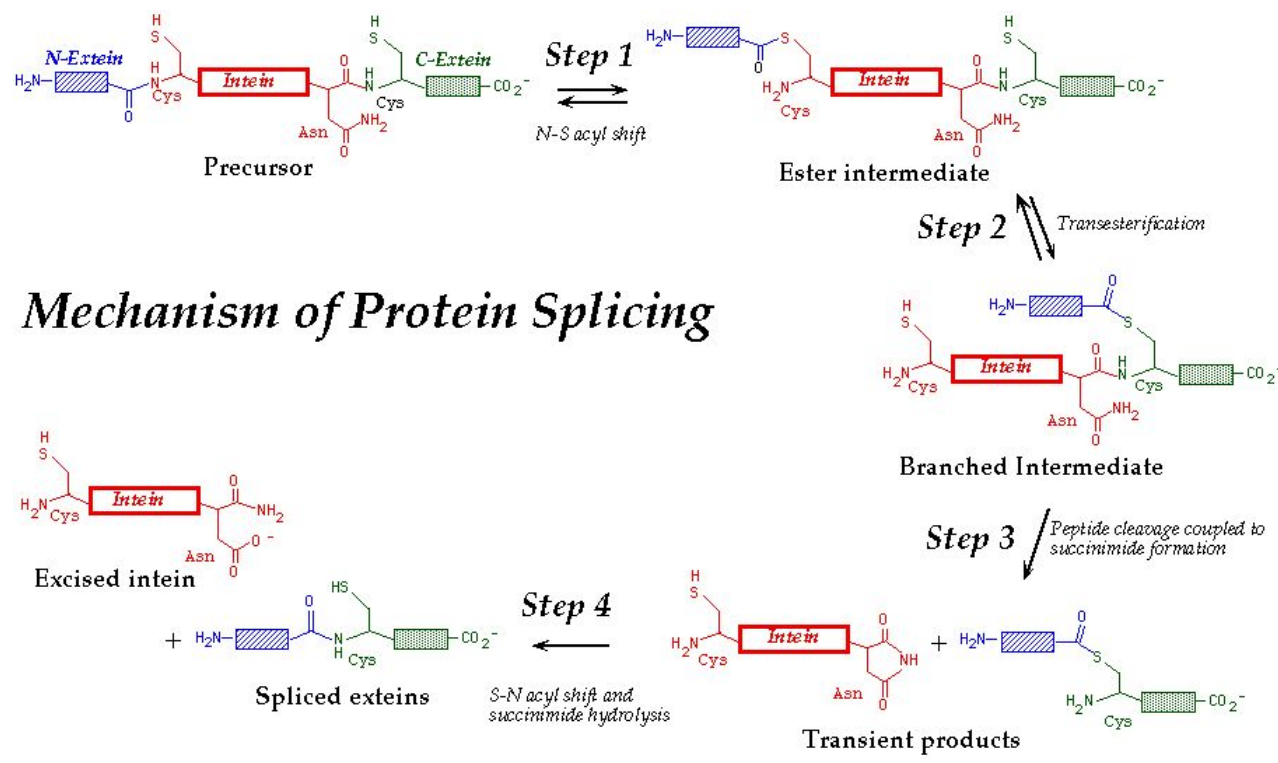
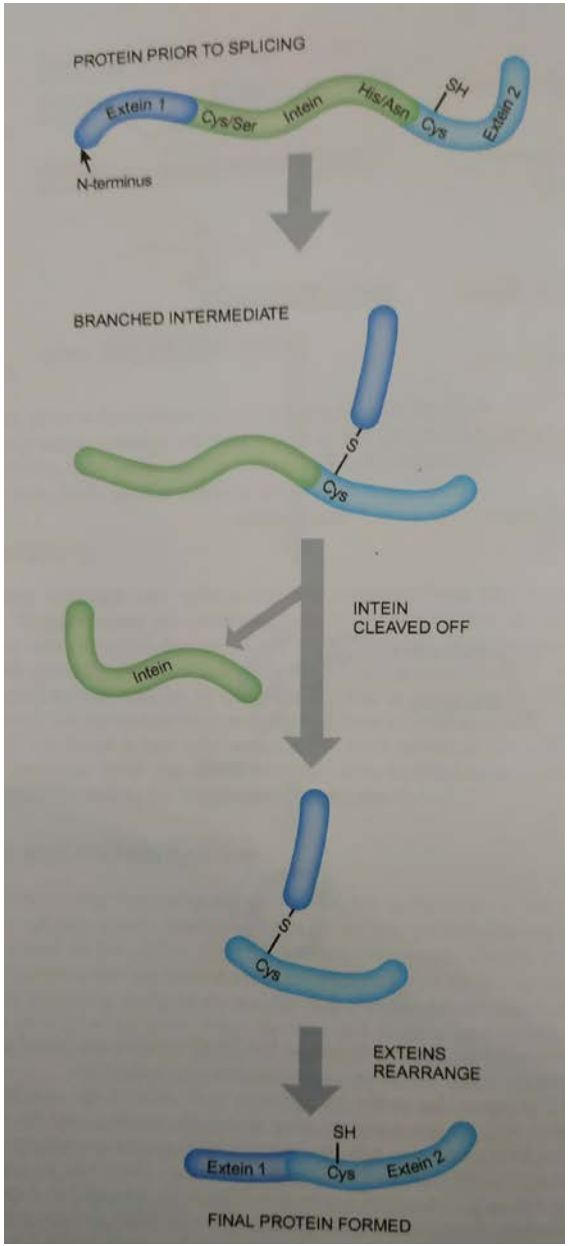
- Eliminació de la Met terminal
- Eliminació de la seqüència senyal
- Activació d'enzims proteolítics



- Activació de precursors d'hormones peptídiques



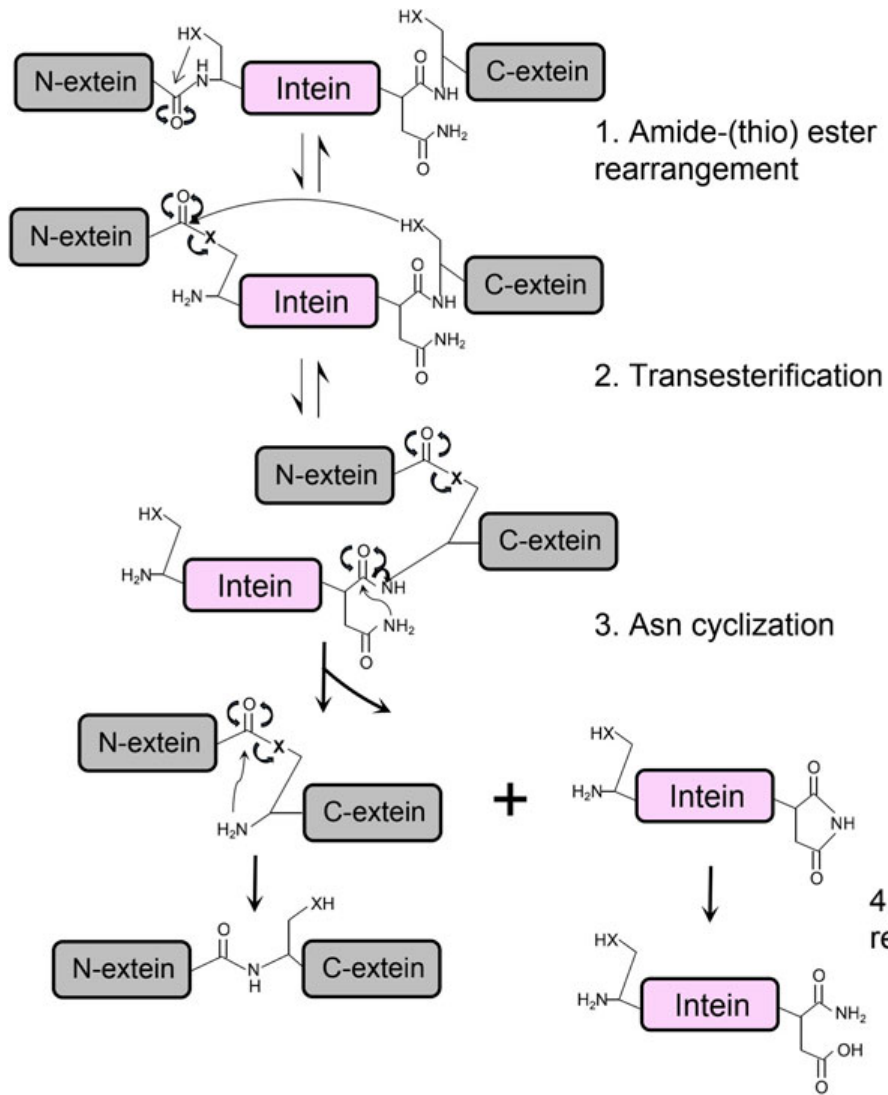
Protein Splicing



Mechanism of Protein Splicing

La inteïna conté un residu de Cys/Ser i un altre bàsic en els extrems amb les exteïnes 1 i 2 respectivament. L'exteïna 2 presenta en el seu extrem amb la inteïna una Cys, a la cadena lateral de la qual queda unida l'exteïna 1 en la primera etapa del procés, amb la formació transitòria d'un intermediari ramificat. Després s'allibera la inteïna i s'uneixen les exteïnes.

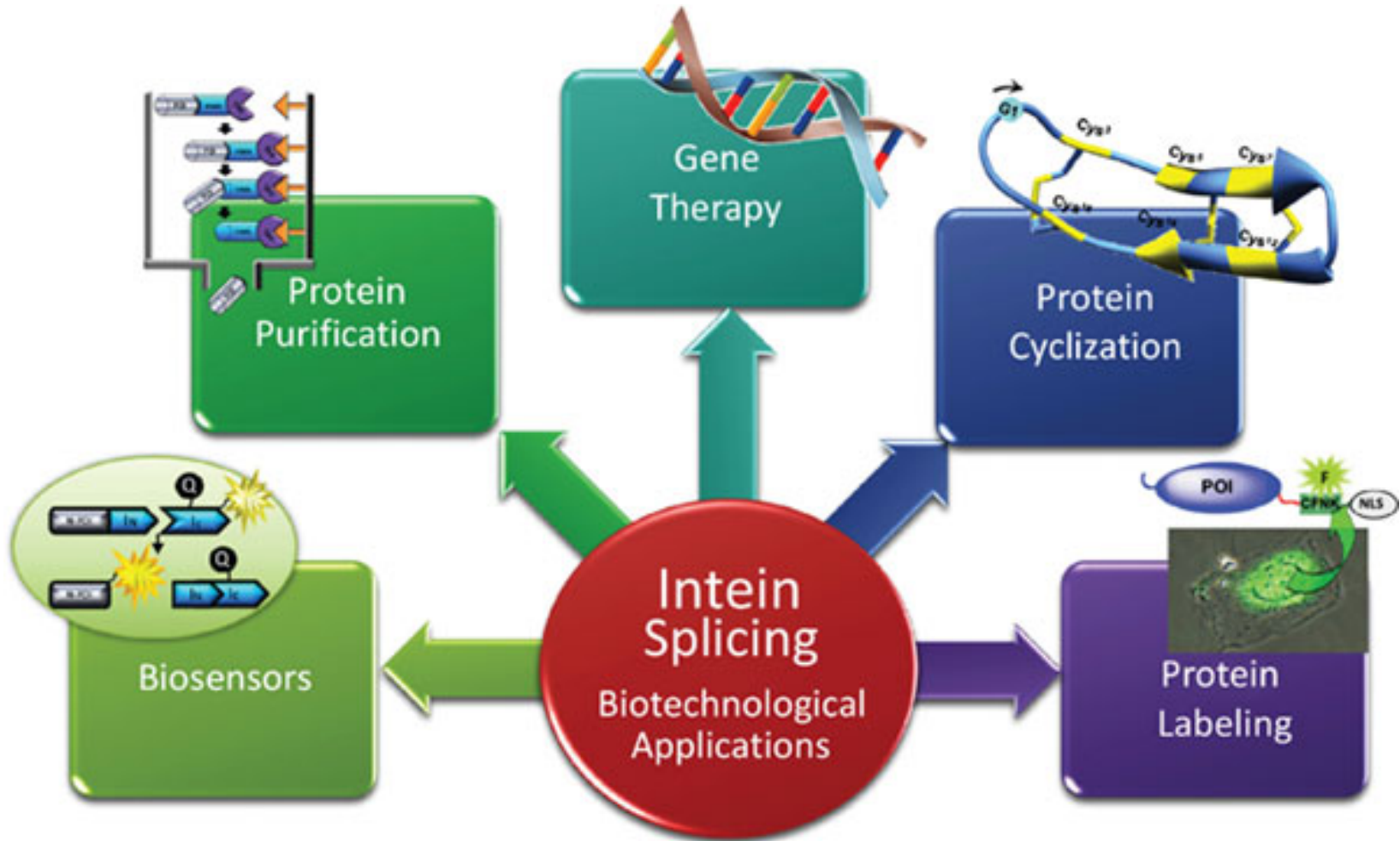
Protein Splicing



MINI REVIEW article
 Front. Bioeng. Biotechnol., 21 February 2022
 Sec. Synthetic Biology
 Volume 10 - 2022
[| https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.810180](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.810180)

The protein splicing mechanism of class 1 intein composes four main steps, in which X is referred to an oxygen or sulfur atom.

Protein Splicing



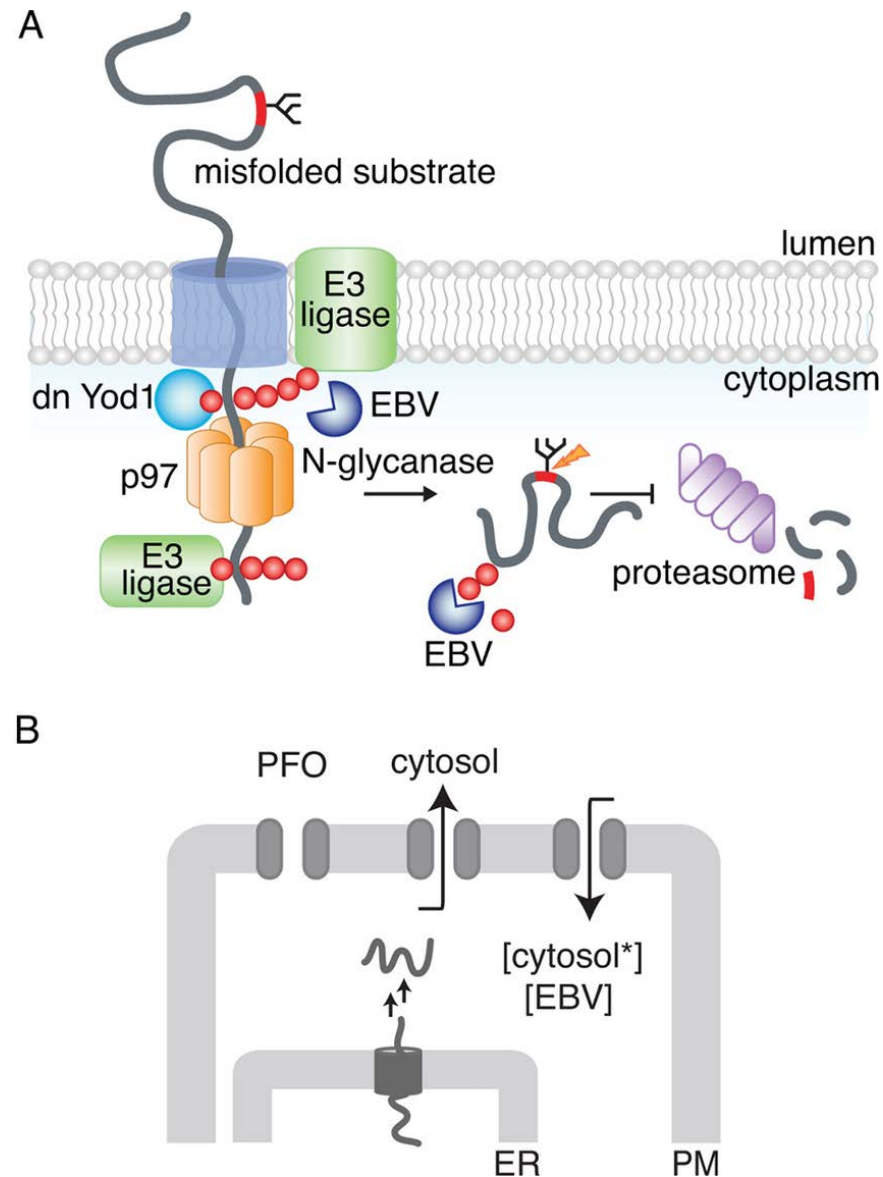
Imatge procedent de <https://www.benthamscience.com/contents/issue-xml/cpps/cpps-619-171014-issue.xml>

Tema 12

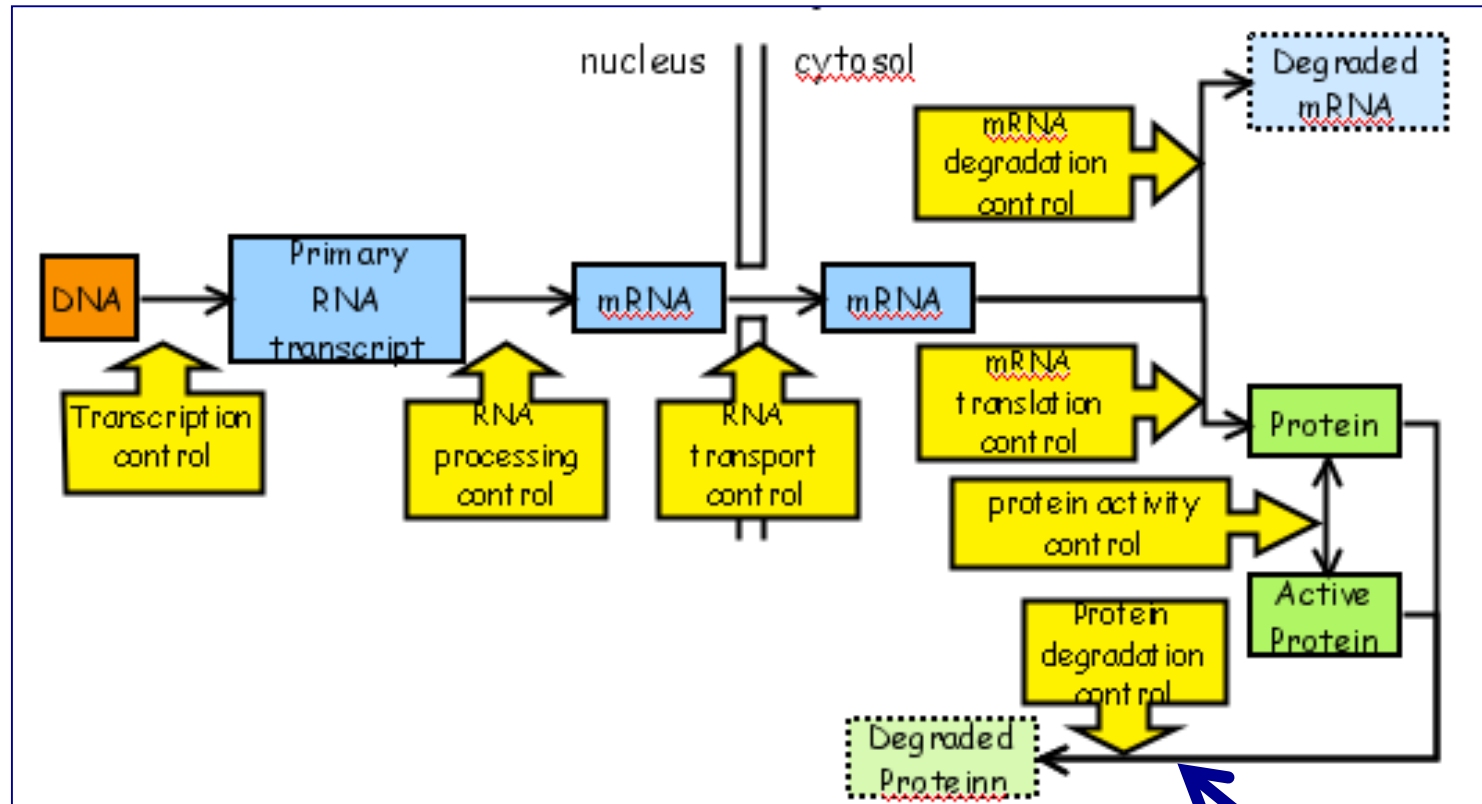
Degradació de proteïnes.

Sistema lisosòmic de proteòlisi en eucariotes.

Proteòlisi no lisosomal: calpaines i proteasoma.



Nivells de regulació de l'expressió gènica en eucariotes



Recanvi de proteïnes

Les proteïnes se sintetitzen i degraden contínuament en totes les cèl·lules.

La vida mitjana ($t_{1/2}$) varia d'unes proteïnes a d'altres.

Enzyme	Half-life Hours
Ornithine decarboxylase	0.2
RNA polymerase I	1.3
Tyrosine aminotransferase	2.0
Serine dehydratase	4.0
PEPcarboxylase	5.0
Aldolase	118
GAPDH	130
cytochrome <i>c</i>	150

Recanvi ràpid per a proteïnes reguladores, p. ex.:

Proteïna que controla la velocitat d'una ruta metabòlica

→ $t_{1/2}$ min-hores

Proteïna estructural com el col·lagen → $t_{1/2}$ quasi 1 any.

Degradació de proteïnes

Serveix per a:

- Destruir proteïnes innecessàries (errònies, desplegades...)
- Bloquejar o disminuir la velocitat d'una reacció bioquímica
- Degradar material captat de l'exterior (fagocitosi)

És un procés que consumeix energia

L'estabilitat de la proteïna està "codificada genèticament"

- Una característica biofísica
- Pot canviar en funció de condicions ambientals: T, pH...

Degradació de proteïnes

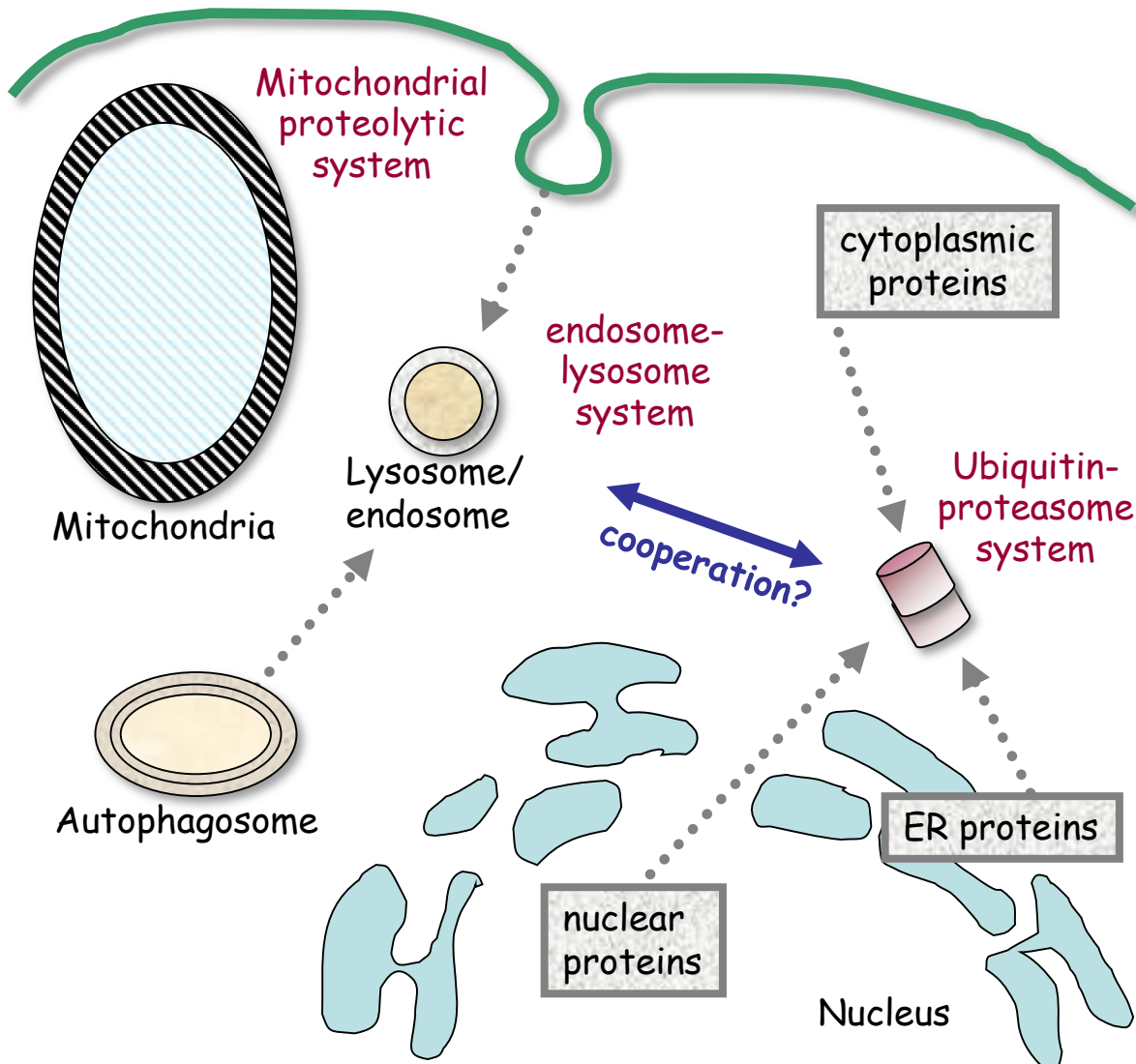
- **Proteòlisi limitada**
(per a generar formes madures a partir de precursors)
- **Degradació completa de proteïnes a aminoàcids.**
Dues rutes principals:
 - **Proteòlisi lisosomal:** destrucció de la majoria de proteïnes de membrana plasmàtica i procedents de l'exterior
 - **Proteòlisi citosòlica:** sistema ràpid, irreversible i selectiu que intervé sobretot en mecanismes de regulació

On es degraden les proteïnes?

- **Lisosomes**
 - Fagocitosis i endocitosis mediada per receptor
 - També proteïnes citosòliques

- **Proteasomes:** proteïnes endògenes com ara
 - Factors de transcripció
 - Ciclines
 - Proteïnes codificades per virus
 - Proteïnes mal plegades
 - Proteïnes danyades

Principals vies proteolítiques en eucariotes

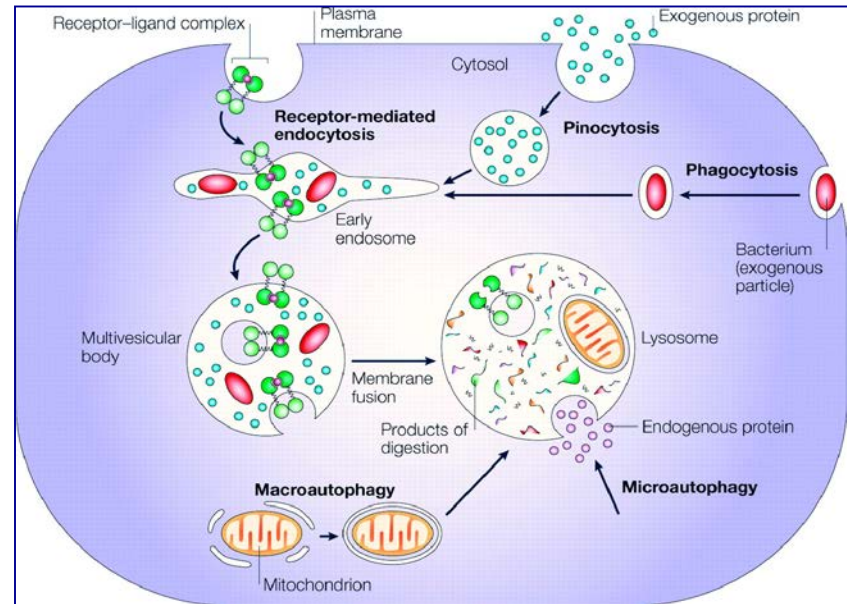
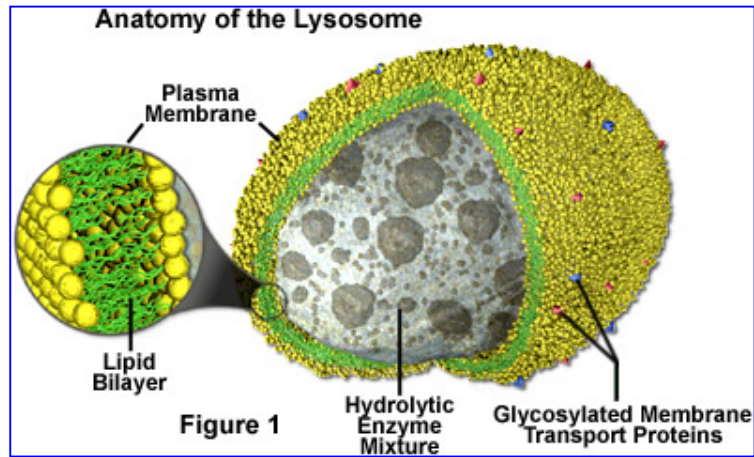


❖ **endosoma-lisosoma**
degrada proteïnes sobretot
extracel·lulars i de la
superfície cel·lular

❖ **ubiquitina-proteasoma**
degrada proteïnes del
citoplasma, nucli i RE

❖ **mitocondris (i cloroplastos)**
tenen el seu propi sistema
proteolític, d'origen bacterià.

Sistema lisosòmic de proteòlisi



*Els lisosomes contenen una **gran varietat d'enzims hidrolítics** que degraden proteïnes i altres materials captats per endocitosis.

*Transportadors embeguts en la membrana condueixen els productes de la digestió lisosomal al citosol (aminoàcids, sucres, colesterol...)

Sistema lisosòmic de proteòlisi

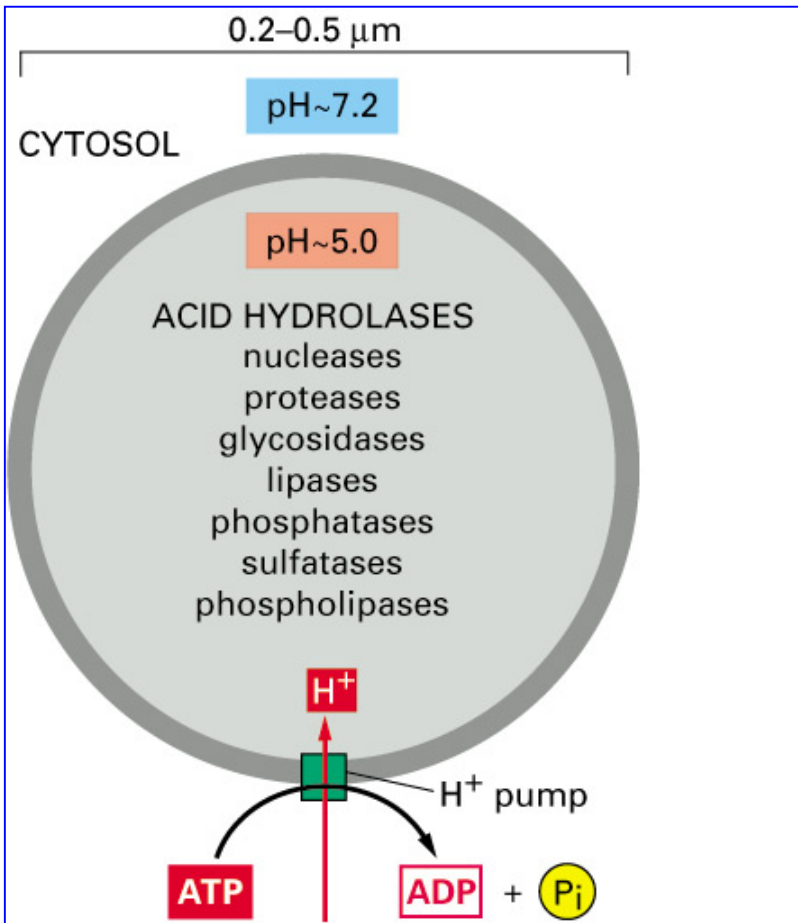


Figure 13–31. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Totes les hidrolases del lisosoma tenen pH òptim àcid.

Proteases lisosomals

- moltes catepsines (proteases de Cys)
- alguna Asp-proteasa
- una proteasa de Zn

*Activació d'aquestes proteases a pH àcid.

Es regula quines proteïnes són enviades als lisosomes per a la seua degradació?

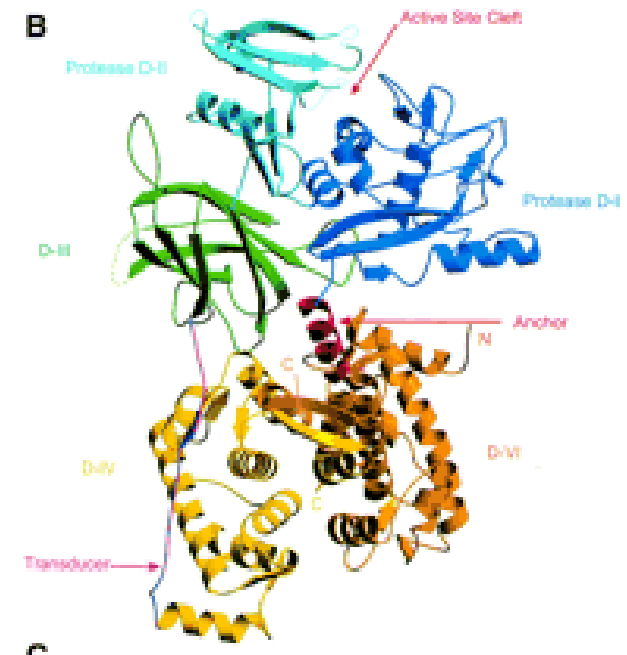
- La major part de l'**autofàgia** no és un mecanisme selectiu per a la degradació de molècules individuals.
- Proteïnes citosòliques amb la seqüència **KFERQ** poden dirigir-se **selectivament** als lisosomes (**autofàgia mediada per xaperones**).
- Aquest procés s'estimula en condicions d'**estrès oxidatiu** o **nutricional**

Proteòlisi no lisosomal en eucariotes

- 1. Dependent de calpaines**
- 2. Ruta ubiquitina-proteasoma**

Degradació no lisosomal per calpaines

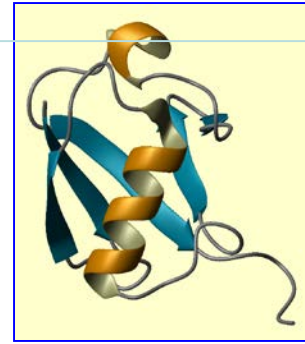
- Requereixen calci
- Contenen dues subunitats
- Són Cys-proteases
- Implicades en motilitat i adhesió cel·lular
- Entre els seus substrats s'inclouen reguladors transcripcionals i traduccionals, canals iònics transmembrana, proteïnes del citoesquelet, fosfatases i altres enzims
- Expressades en nivells alts en cervell i medul·la espinal
- Són les principals proteases de Cys implicades en apoptosi. Poden promoure-la en el cas de desordres neurodegeneratius
- Presents en tots els eucariotes i en alguns bacteris, però no en arqueobacteris



Proteòlisi no lisosomal en eucariotes: ruta ubiquitina-proteasoma

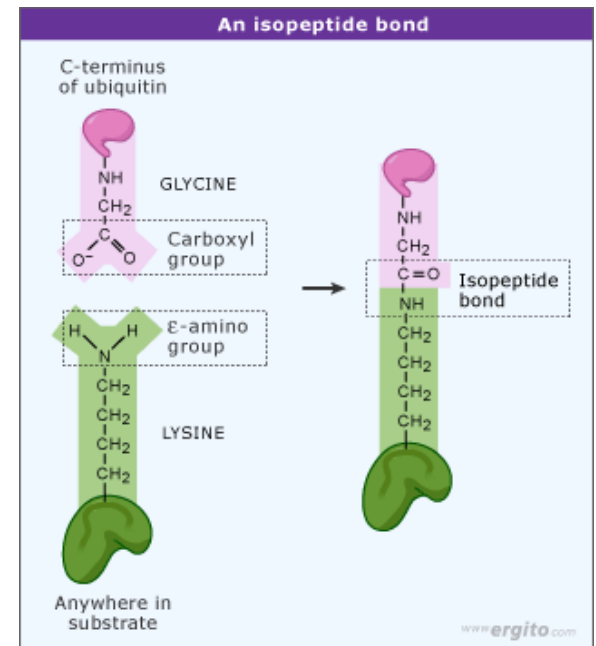
- 1. Marcatge** de les proteïnes a degradar amb ubiquitina.
 - Reconeixement de senyals en les proteïnes per a la ubiquitinació
 - Conjugació de les proteïnes amb ubiquitina
- 2. Actuació de proteases** responsables de la degradació.

Ubiquitina



- Proteïna de 76 aa.
- Característica d'eucariotes.
- Molt conservada (53% d'homologia entre llevats i humans).
- S'uneix covalentment a la proteïna a degradar, en forma de polímers.
- També pot tenir paper en la degradació lisosomal, situacions d'estrès, privació de nutrients...

La ubiquitina s'uneix mitjançant un **enllaç isopeptídic** entre el grup carboxil terminal de la ubiquitina i un grup ϵ -amino d'un residu de lisina de la proteïna a degradar.



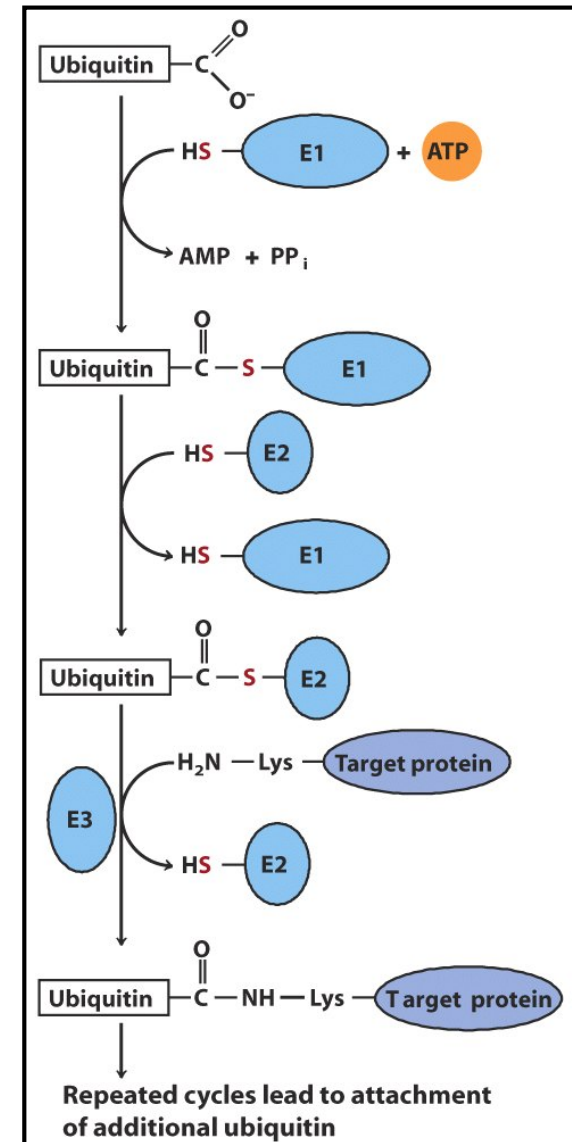
Ubiquitinació

Components del sistema de degradació de proteïnes per ubiquitinació:

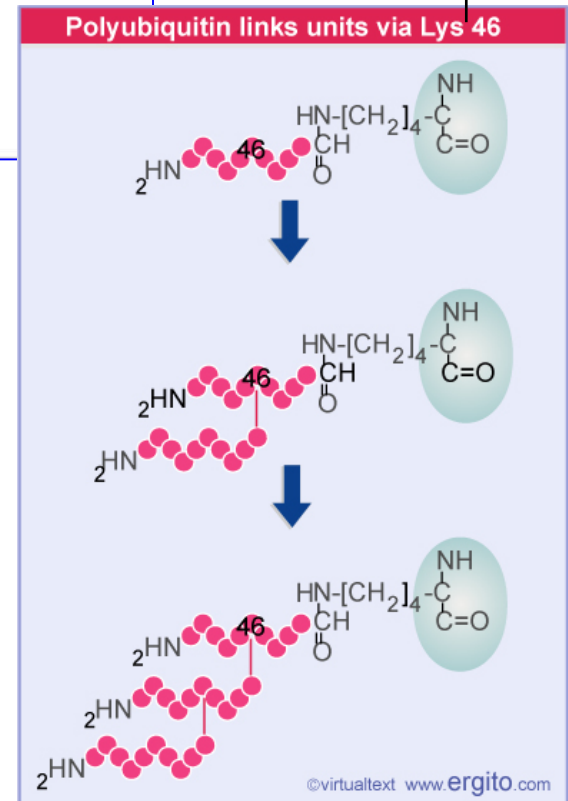
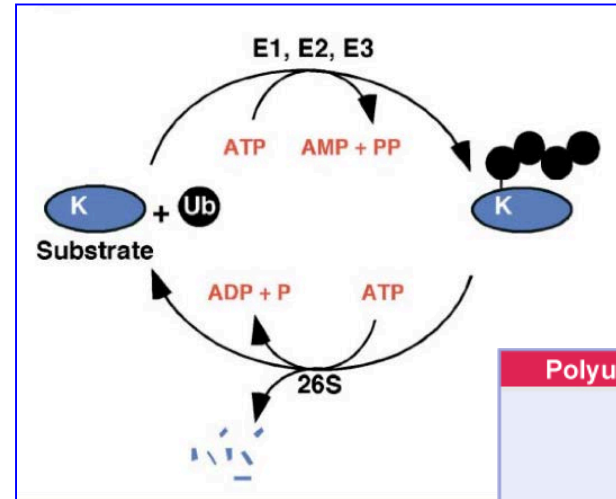
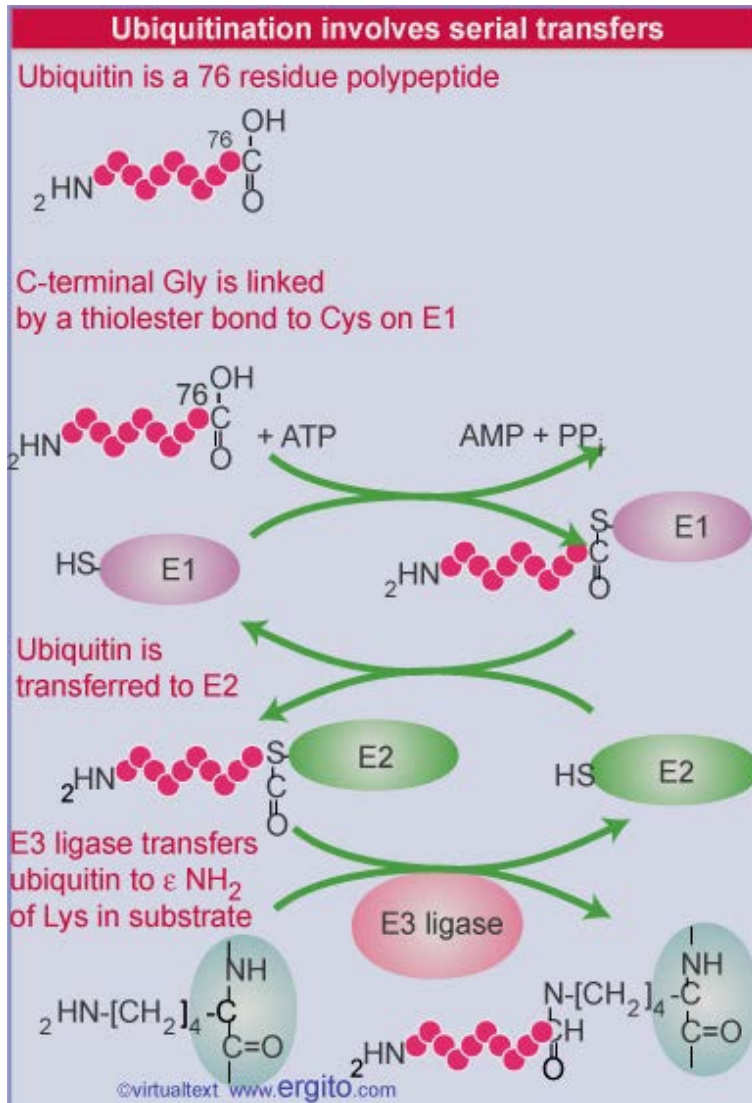
- **E1: enzim activador de la ubiquitina** (*ubiquitin-activating enzyme*)
- **E2: enzim conjugant de la ubiquitina** (*ubiquitin-conjugating enzyme*)
- **E3: ubiquitina ligasa** (*ubiquitin ligase*)

E2 i E3 són responsables de l'especificitat del substrat que serà ubiquitinat

La degradació requereix la unió d'una cadena de poliubiquitina formada per uns 20 monòmers d'ubiquitina



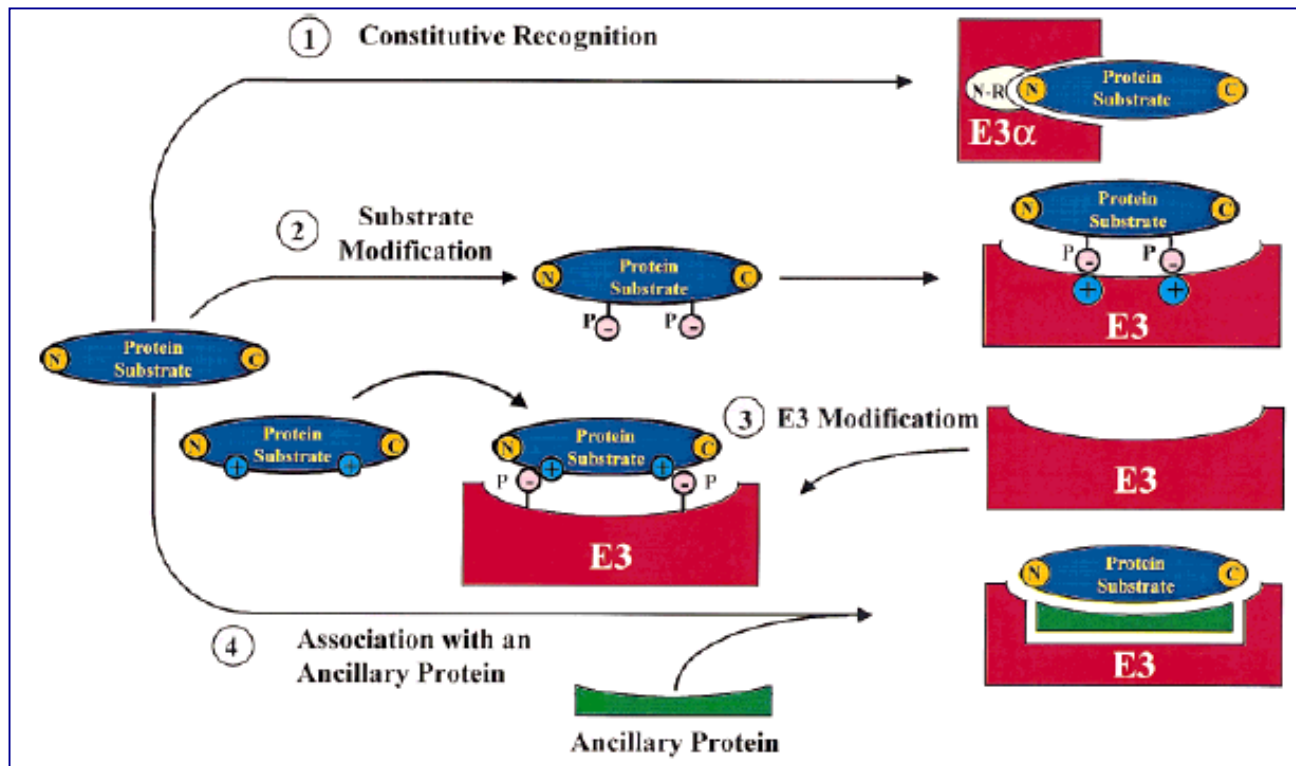
Ubiquitinació



Ubiquitinació

Nombre de tipus de molècules de cada component:
E1 (1); E2 (12-30); E3 (>200?)

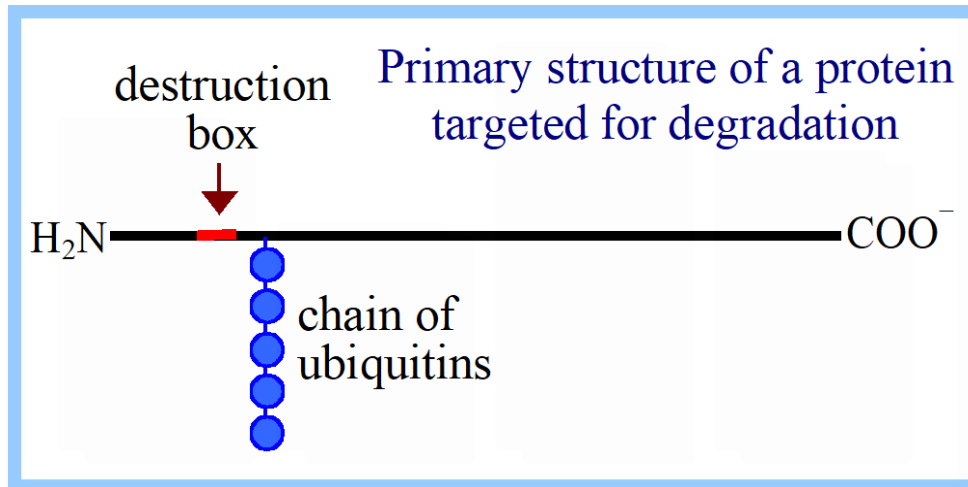
Hi ha **distintes ubiquitin-ligases** amb diferent especificitat de substrat



Determinants d'ubiquitinació

Algunes **proteïnes** regulen o faciliten la conjugació amb ubiquitina

- Proteïnes com les ciclines tenen seqüències anomenades **caixes de destrucció** (R A/T A L G X I/V G/T N).



Aquesta seqüència és reconeguda per la corresponent **ubiquitina ligasa (E3)**

- Moltes proteïnes ubiquitinades contenen dominis **PEST**

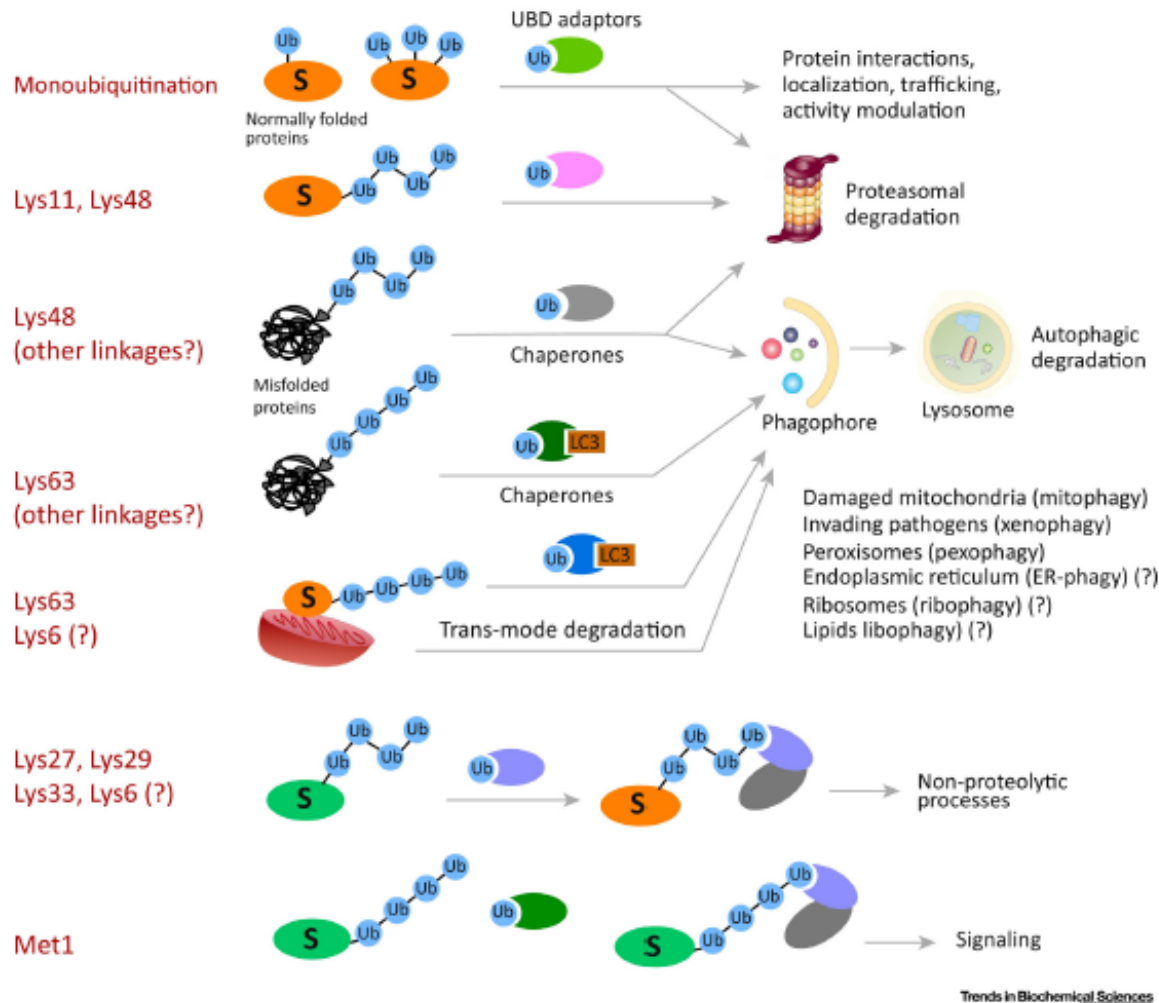
Determinants de la ubiquitinació

- S'ha observat influència de la **fosforilació** de determinades seqüències com ara **DS*GLDS***.
- La **glicosilació** de algunes proteïnes PEST amb **GlcNAc** prolonga la seua vida mitjana. Es tracta d'una modificació que augmenta quan els nivells de glucosa extracel·lular són alts i podria funcionar com a **sensor nutricional**.
- En certes malalties causades per **virus**, aquests codifiquen la seua pròpia Ub-ligasa (E3) o activen l'enzim de l'hoste, la qual cosa provoca una major degradació de proteïnes de l'hoste.

Ubiquitina: substrats i funcions

- **Substrats units a ubiquitina:**
ciclins, factors de transcripció, oncoproteïnes...
- **Funcions de la ubiquitina en:**
 - Regulació de l'expressió gènica
 - Resposta a estrès
 - Reparació del DNA
 - Modulació de receptors de la superfície cel·lular
 - Regulació de la ruta de secreció
 - Importació de proteïnes a mitocondris
 - Apoptosi...

Figure 2. Key Figure: The Interactions of Ubiquitin (Ub) Chains with Ubiquitin-Binding Domain (UBD) Adaptors and Their Functions in Various Biological Processes



Ubiquitinació: codi

Yong Tae Kwon, Aaron Ciechanover,
The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System
and Autophagy,
Trends in Biochemical Sciences,
Volume 42, Issue 11, 2017, pages 873-886,
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>.

La ubiquitinació no
implica necessàriament la
degradació al proteasoma

Ubiquitin linkages are recognized and interpreted by a class of UBDs of specific adaptors. These effector molecules decipher the ubiquitin code – in other words the linkage type and length of ubiquitin chains – and link the substrates to downstream processes. Overall, monoubiquitination participates in protein interaction, localization, and activity modulation as well as in proteolysis through either the ubiquitin-proteasome system (UPS) or autophagy. Lys48 and Lys11 linkages mediate proteasomal degradation of normally folded short-lived proteins, whereas Lys48 and Lys63 linkages are involved in the degradation of misfolded proteins through the UPS or autophagy. Lys63 linkage facilitates the autophagic degradation of substrates in a 'cis'-mode as well as their associated cellular materials, such as damaged mitochondria and invading pathogens, in a 'trans'-mode. Lys63 linkages can also modulate various non-degradative processes such as DNA repair and the activation of protein kinases. Compared to Lys48 and Lys63, relatively little is known about the functions and mechanisms of atypical linkages such as Lys6, Lys27, Lys29, Lys33, and Met1. Abbreviation: S, substrate for ubiquitination.

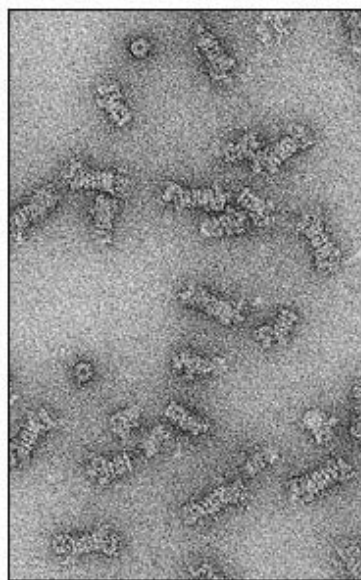
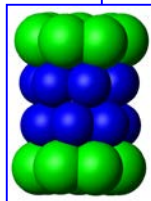
Degradació no lisosomal pel proteasoma

- El sistema més important
- Representa l'1% de la proteïna total
- Responsable de la major part de la degradació citosòlica
- Degrada proteïnes de $t_{1/2}$ curta o llarga en la seua conformació nadiua
- Destruïx també proteïnes mal plegades o incorrectes
- Participa en la degradació de proteïnes ubiquïtinades
- És un complex localitzat en el nucli i en el citosol
- També pot servir per a regular l'activitat de proteïnes substrat



El proteasoma

- Descrit per Alfred Goldberg & Martin Rechsteiner als 1980's
- Similar en estructura a la carabinina GroEL-GroES, amb anells centrals i tapa
- Proteòlisi (previ desplegament de les proteïnes)



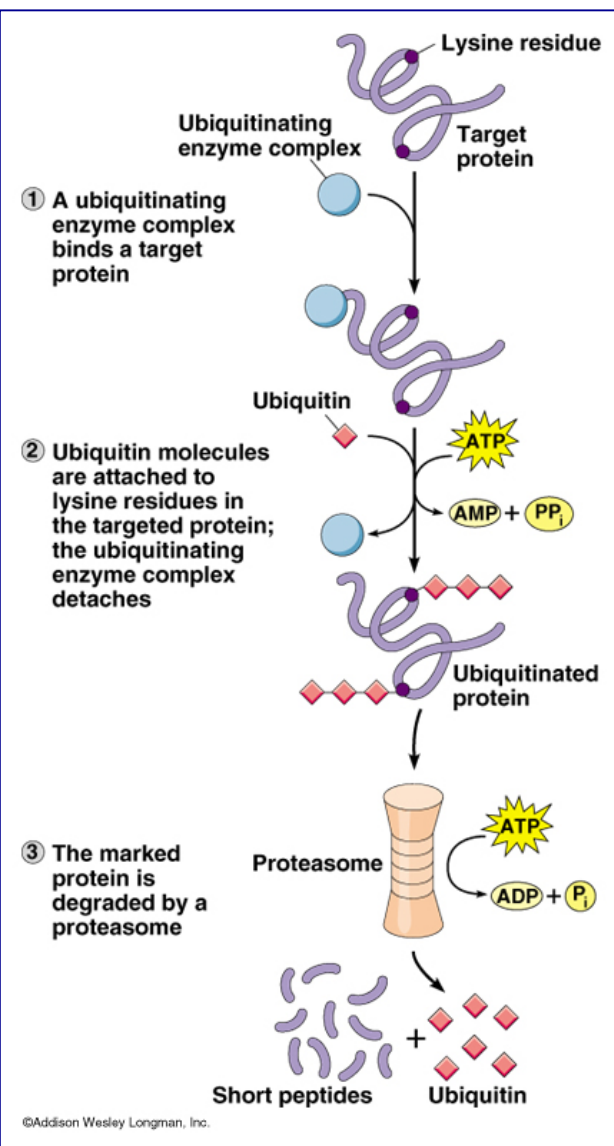
(A)

100 nm

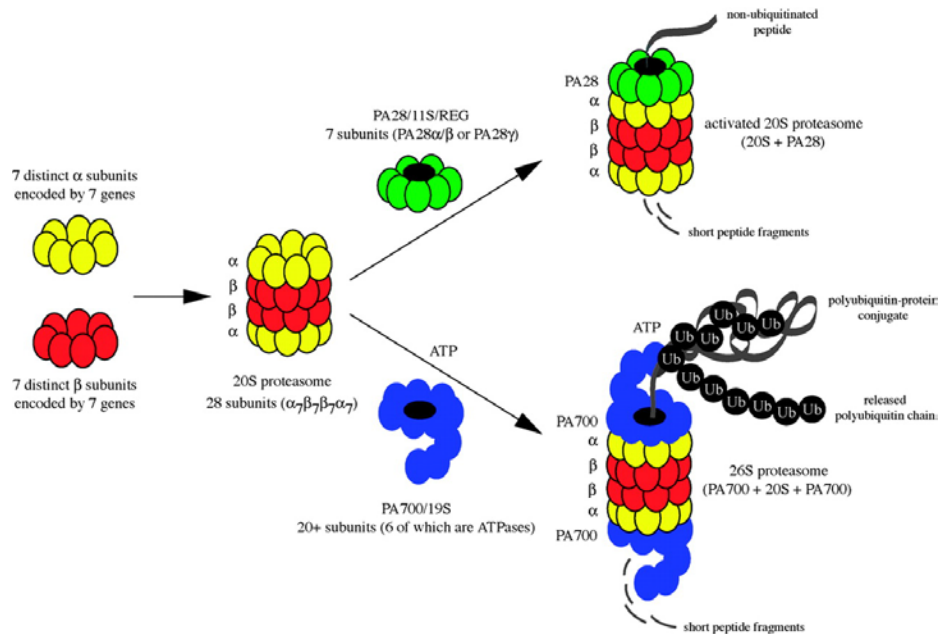


(B)

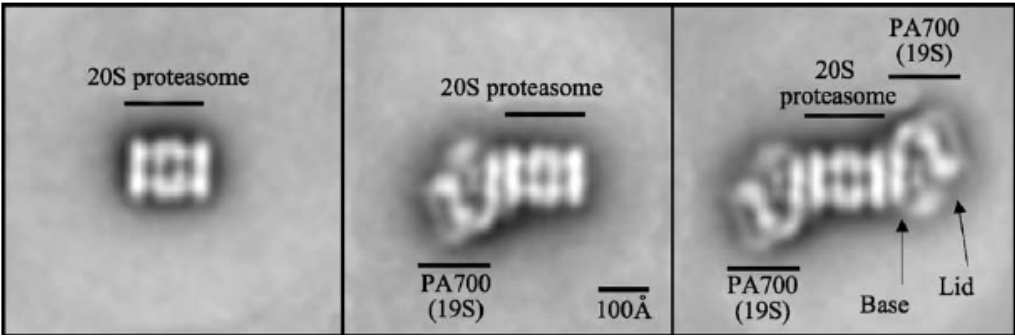
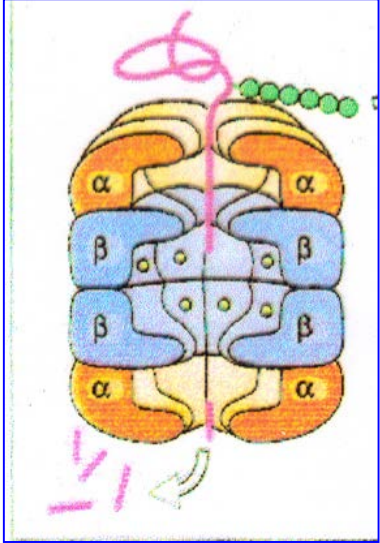
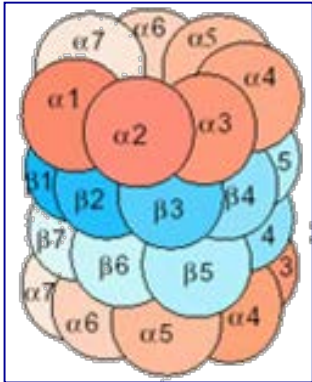
10 nm



El proteasoma: estructura



Nucli, 20S



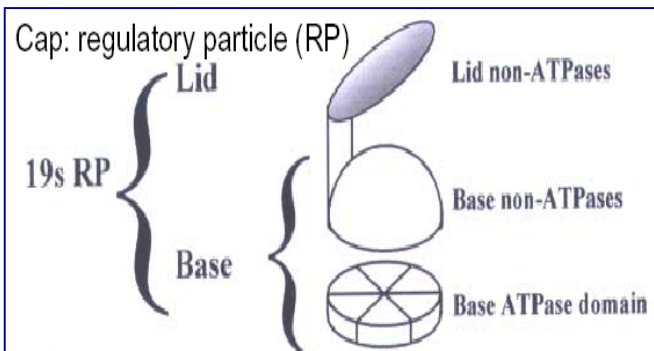
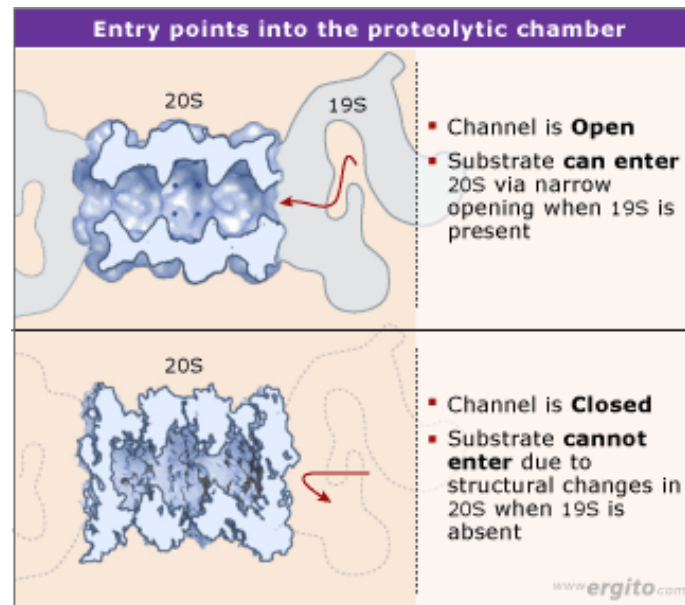
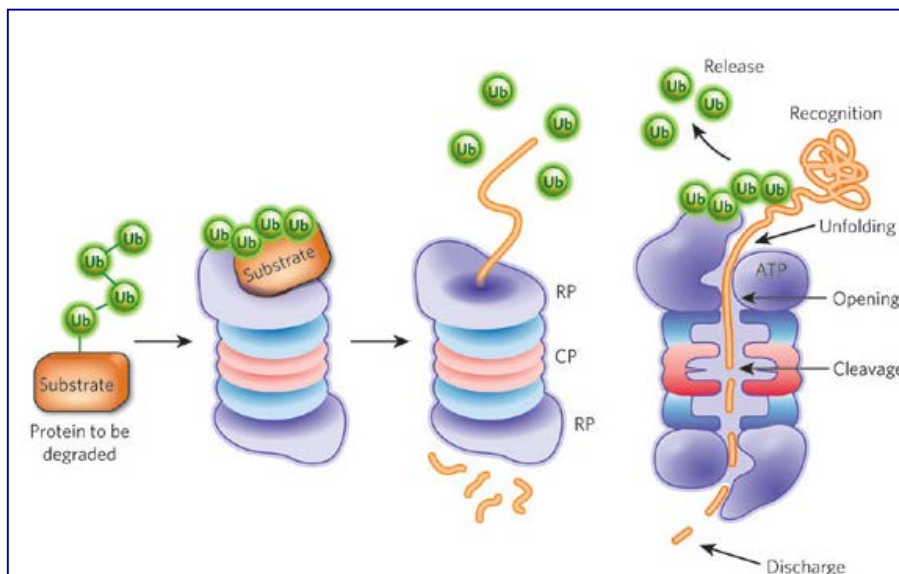
- Les subunitats α dels anells exteriors tenen funció estructural

- L'activitat proteasa està associada a tres de les subunitats β (anells interiors), cadascuna amb una especificitat de substrat diferent.

Complex 20S eucariòtic: forma cilíndrica amb 4 anells cadascun dels quals té 7 subunitats diferents

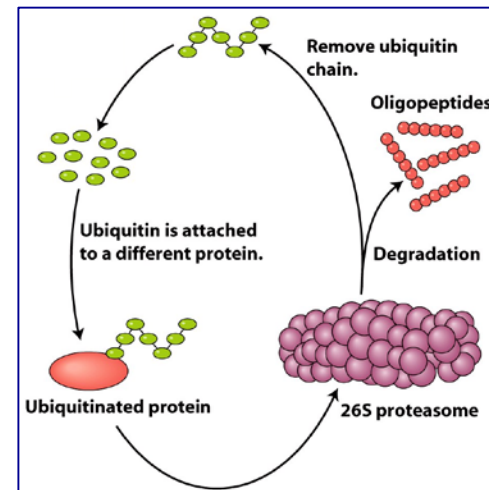
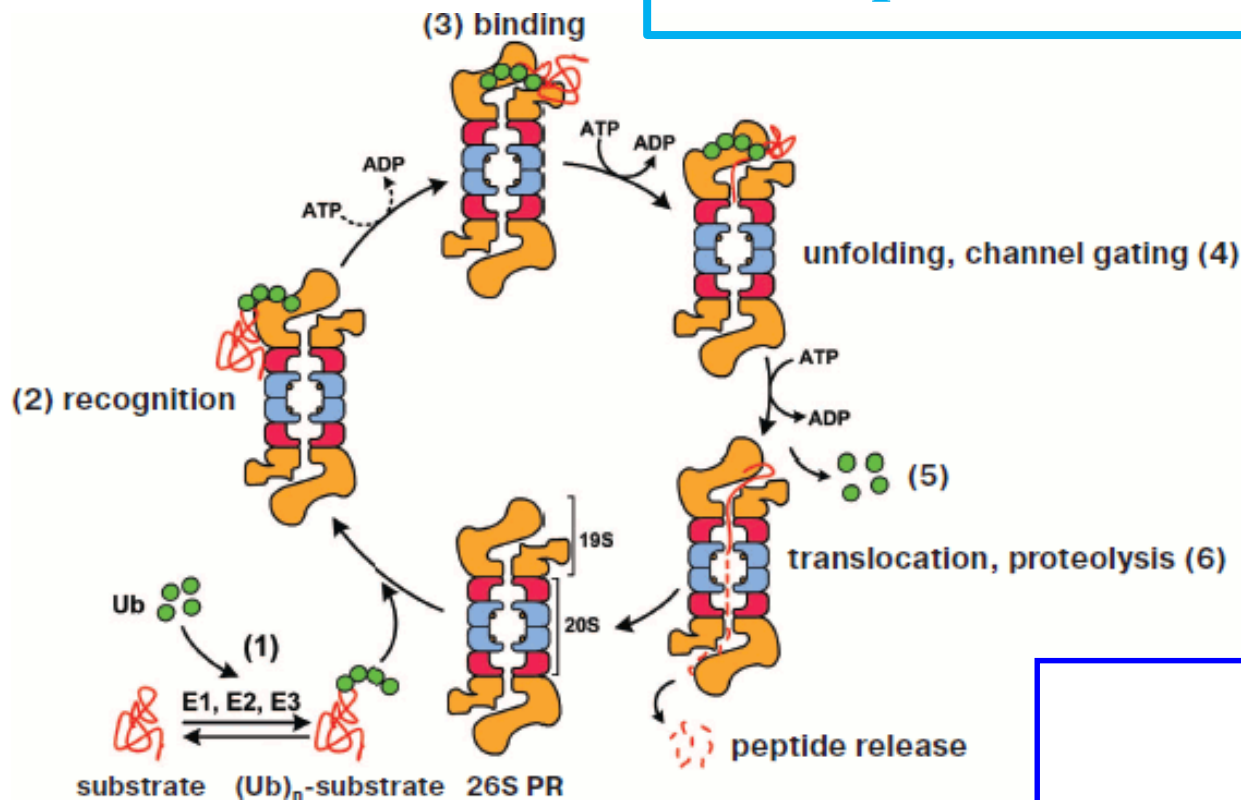
El proteasoma: estructura

19S: 19 a 20 subunitats diferents, algunes amb activitat ATPasa. Reconeix proteïnes multiubiquitinades, les desplega, elimina la cadena d'ubiquitina i les condueix cap al nucli. Existeixen altres alternatives, com ara **PA28**.

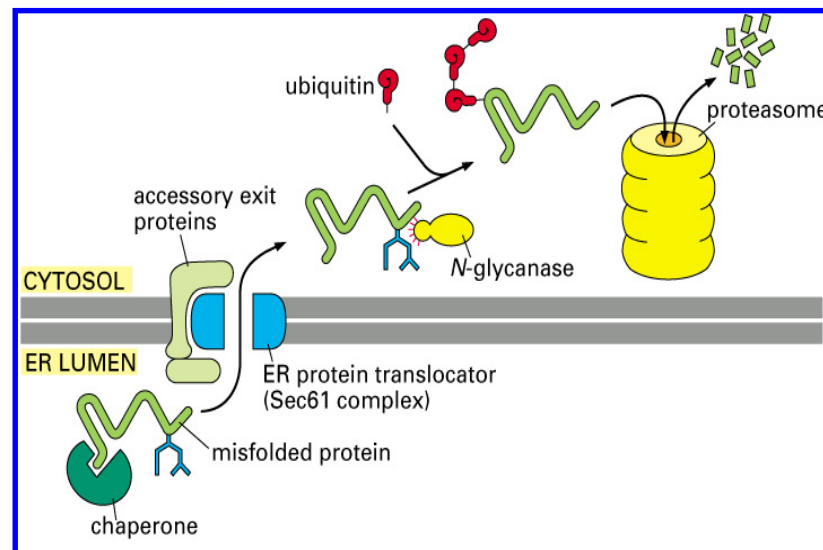


La interacció amb el complex **cap** (19S, PA28...) produeix un canvi conformacional i obri el pas al **core** (20S). Els extrems del cilindre estan bloquejats pel domini Nt de les subunitats α .

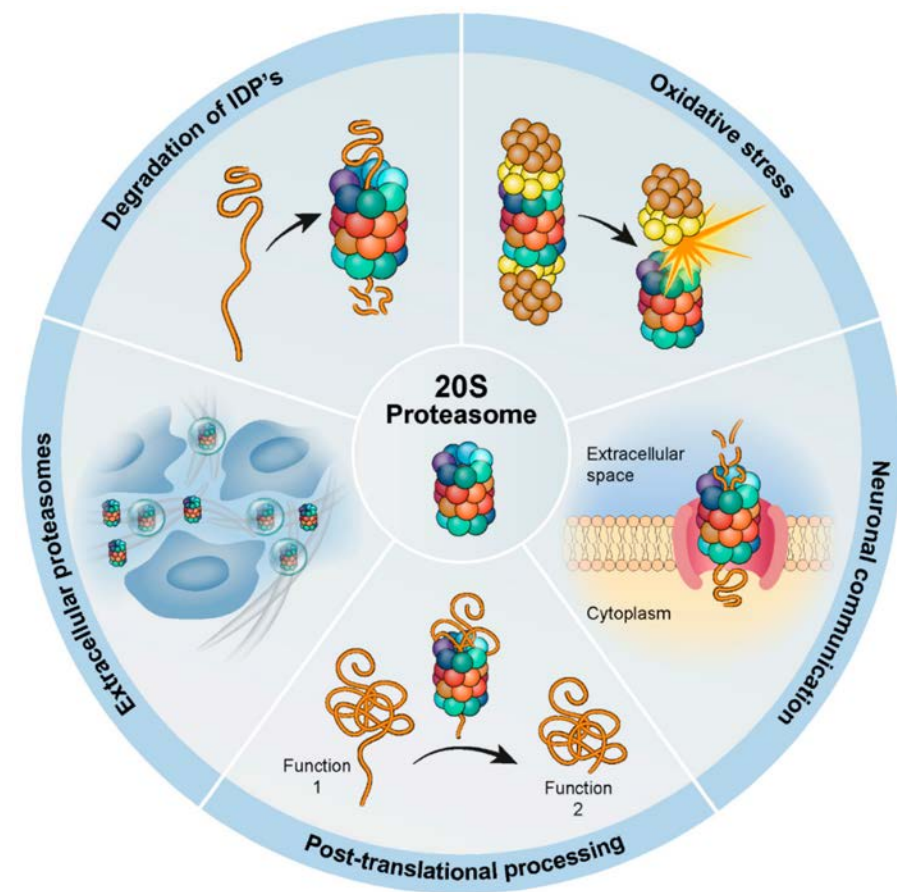
El proteasoma



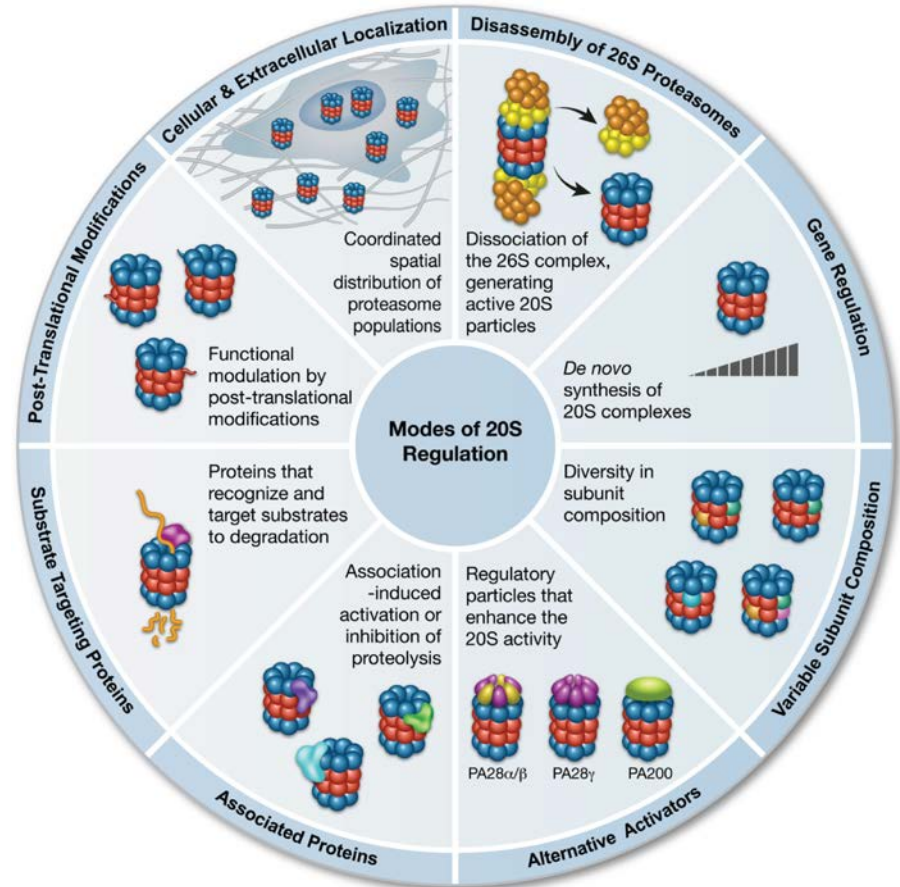
El proteasoma també degrada les proteïnes mal plegades del reticle endoplasmàtic.



El proteasoma i la seua regulació



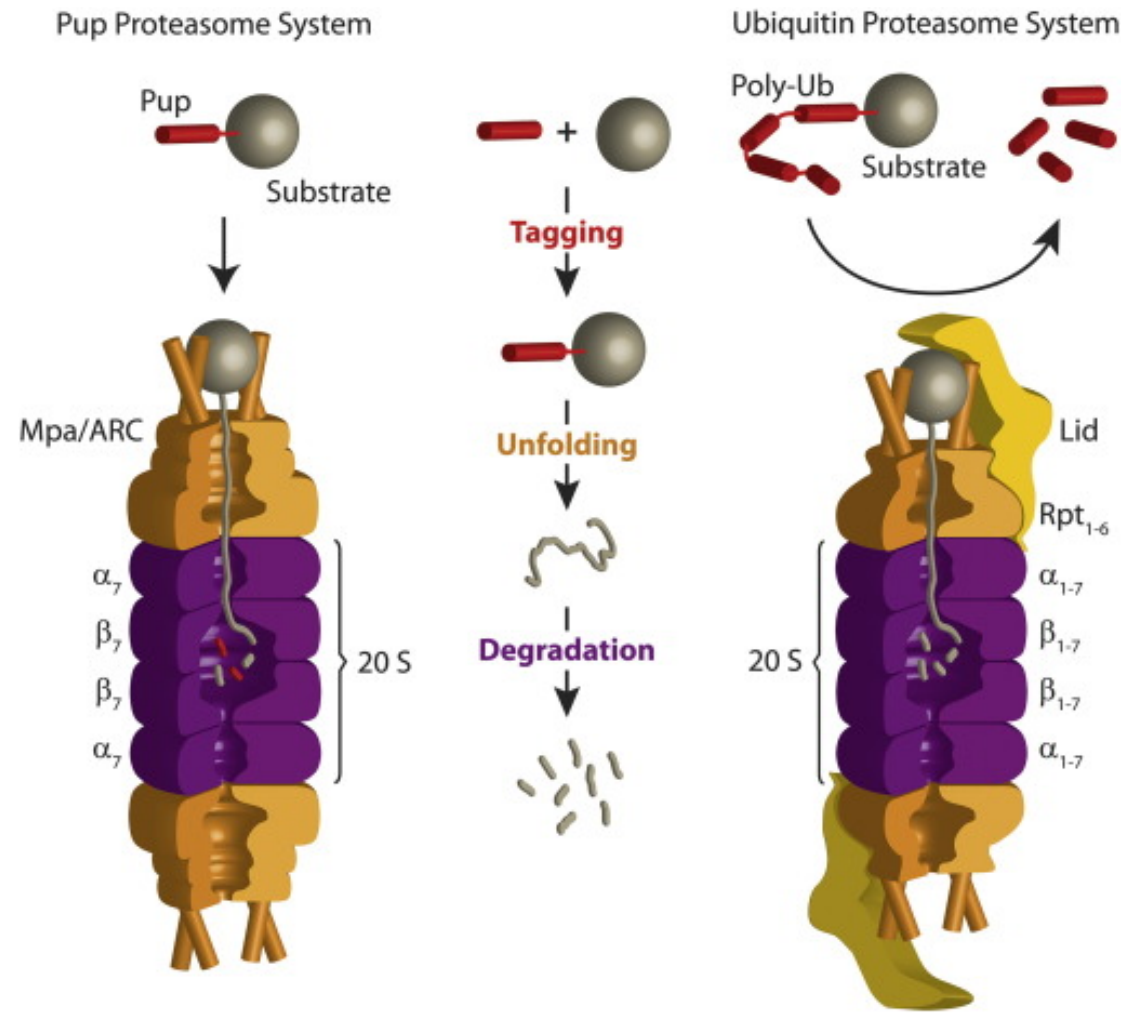
IDP: Intrinsically Disordered Protein



Algunes malalties desencadenen nivells alts de proteasomes 20S extracel·lulars

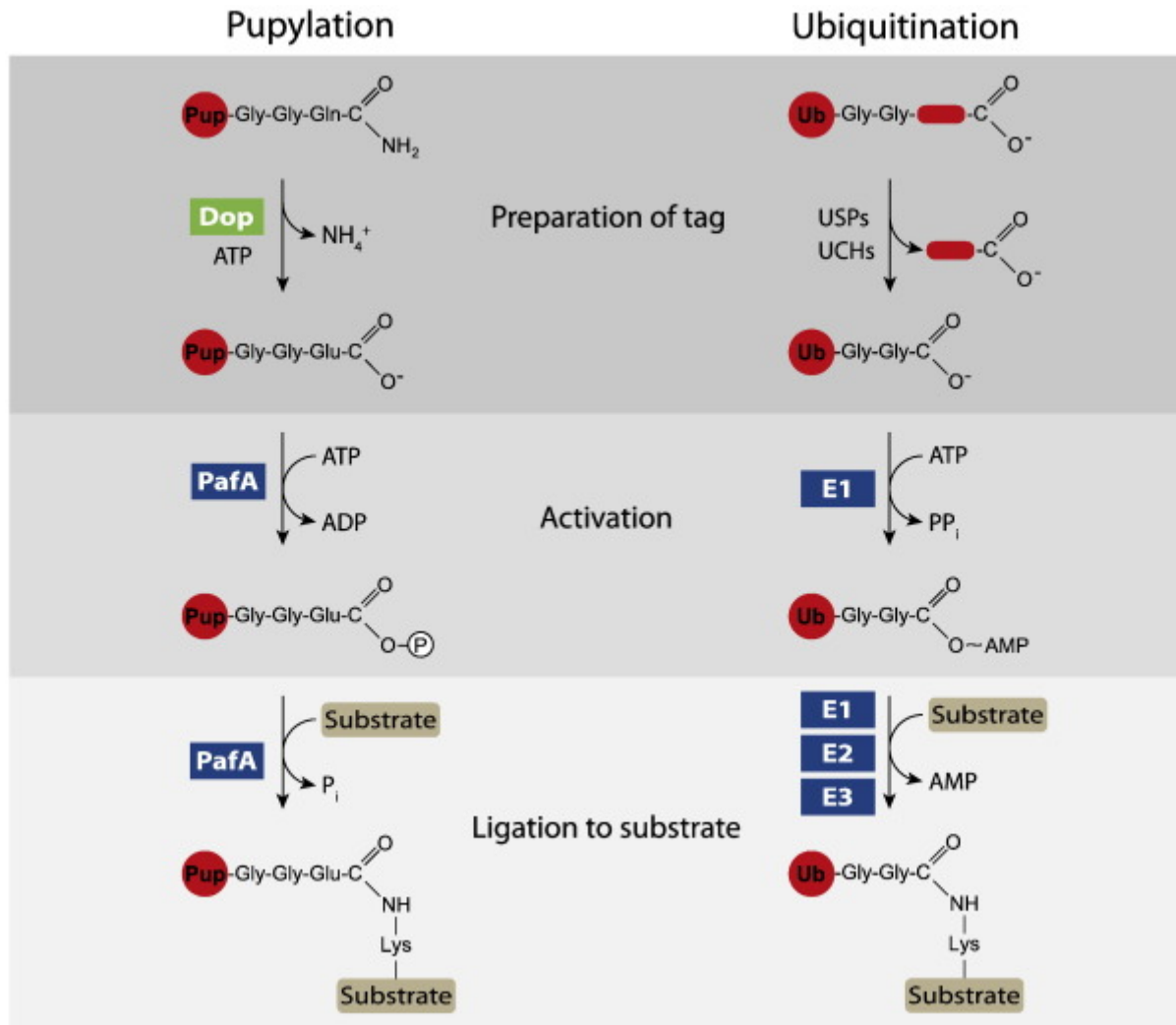
Proteasoma eucariota
vs. proteasoma
procariota

Pupil·lació vs.
ubiquitinació



Pup = Prokaryotic ubiquitin like protein

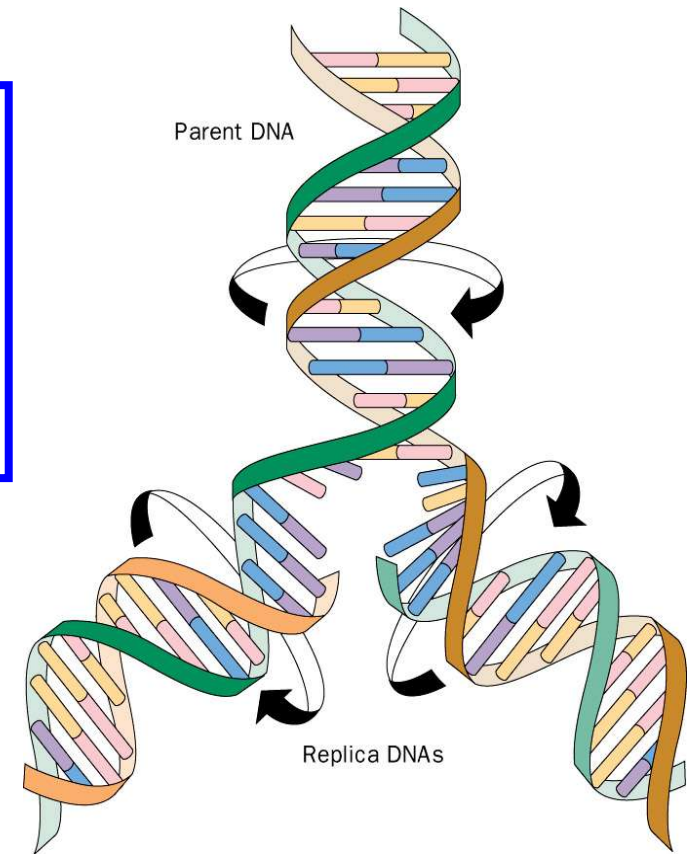
Pupul·lació vs. ubiquitinació



Existeixen importants diferències de seqüència i estructura entre Pup1 i ubiquitina²⁹

Tema 13

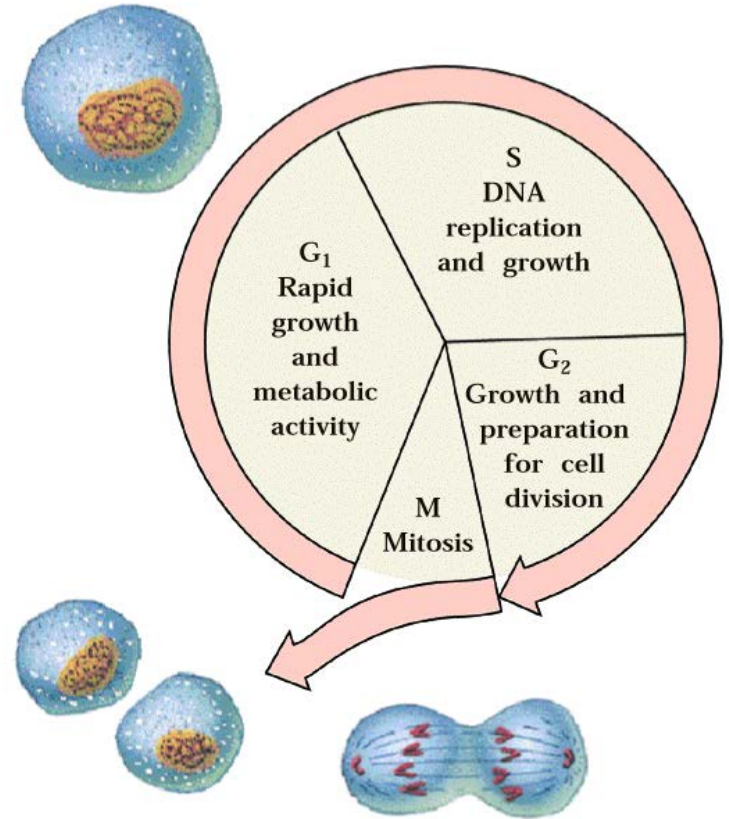
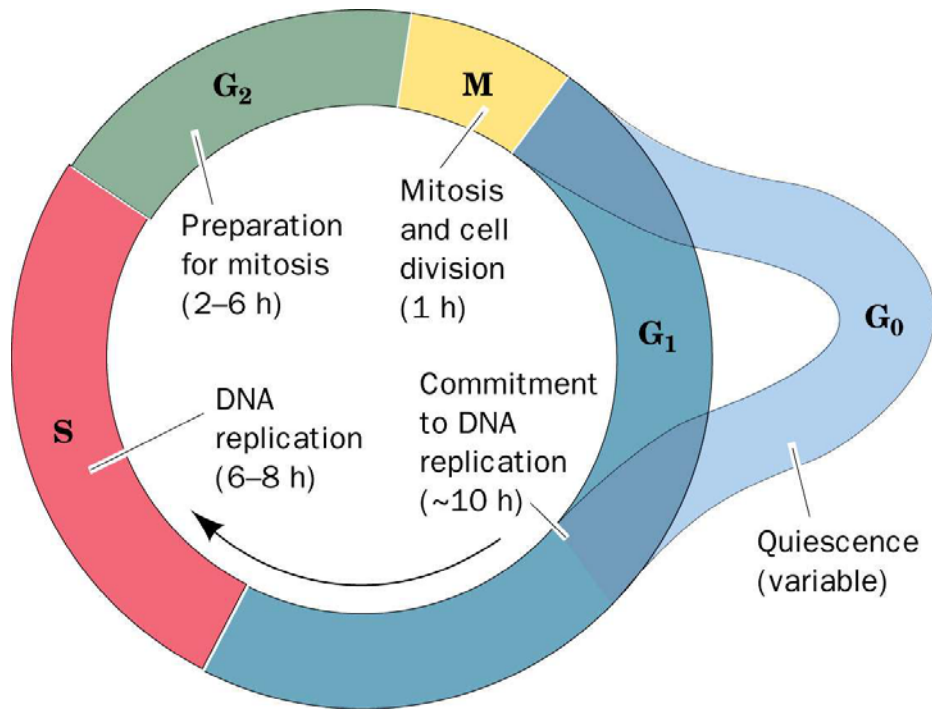
Propietats generals de la replicació.
Caràcter semiconservatiu i
seqüencial. Replicació en forqueta.
Replicació bidireccional en el
cromosoma d'*E. coli*.



Alguns conceptes sobre replicació

- Consisteix en la duplicació del material genètic d'un organisme.
- Per replicó entenem la unitat de DNA en la qual ocorre un acte individual de replicació.
- Replisoma fa referència a la maquinària proteica implicada en un procés de replicació.
- Presenta una taxa d'error baixa (aproximadament un nucleòtid cada 10^7 en *E. coli*), degut a l'activitat exonucleasa 3'-5' de la majoria de les DNA polimerases. A més, en la cèl·lula existeixen mecanismes addicionals de reparació.

Ha de ser un procés precís, ràpid i correlacionat en el temps amb el cicle cel·lular



Cicle cel·lular eucariòtic

És un procés semiconservatiu

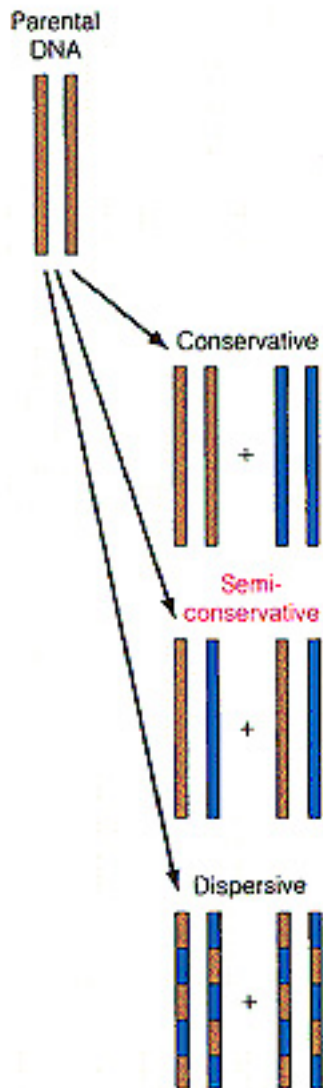
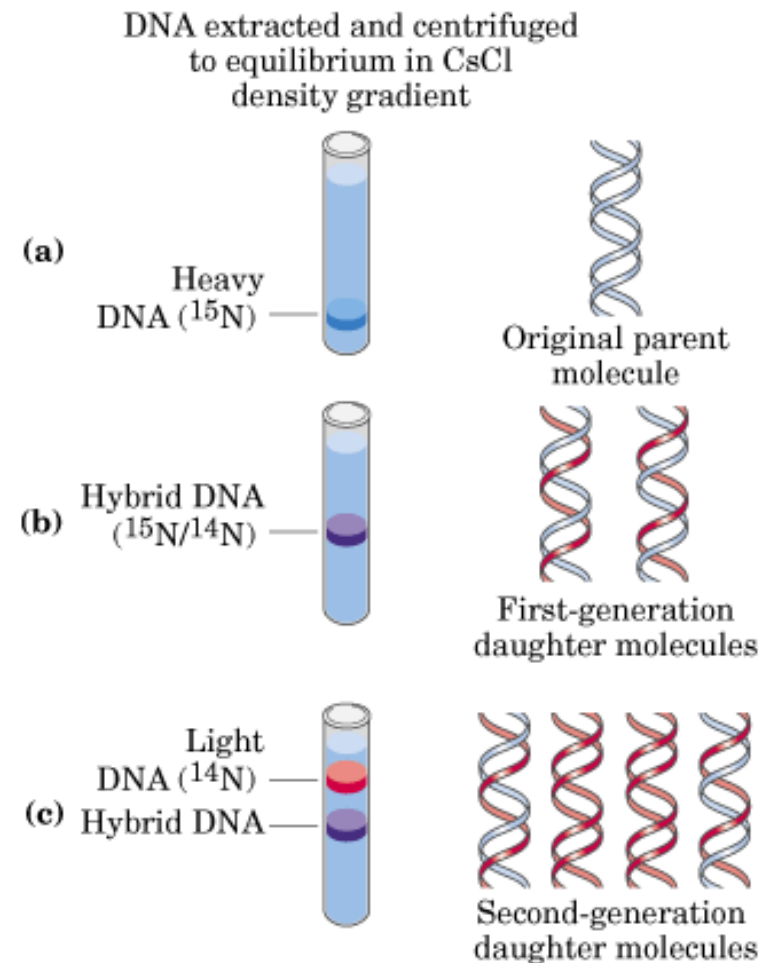


FIGURE 2-6 The replication of DNA.
The newly synthesized strands are shown in orange.

És un procés semiconservatiu

- Messelson i Stahl, 1958
- *Escherichia coli*.
- Mètodes isotòpics i de centrifugació en gradient de densitat
- Excepcions: virus d'una sola cadena de DNA o d'RNA.



És un procés semiconservatiu

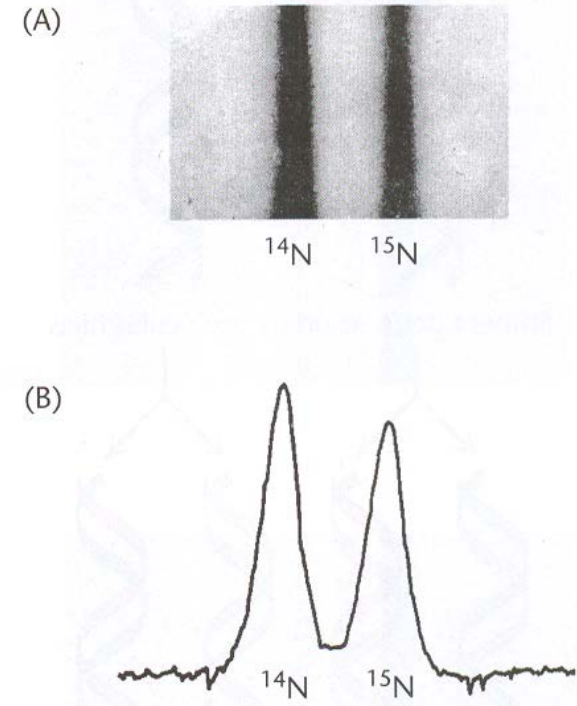
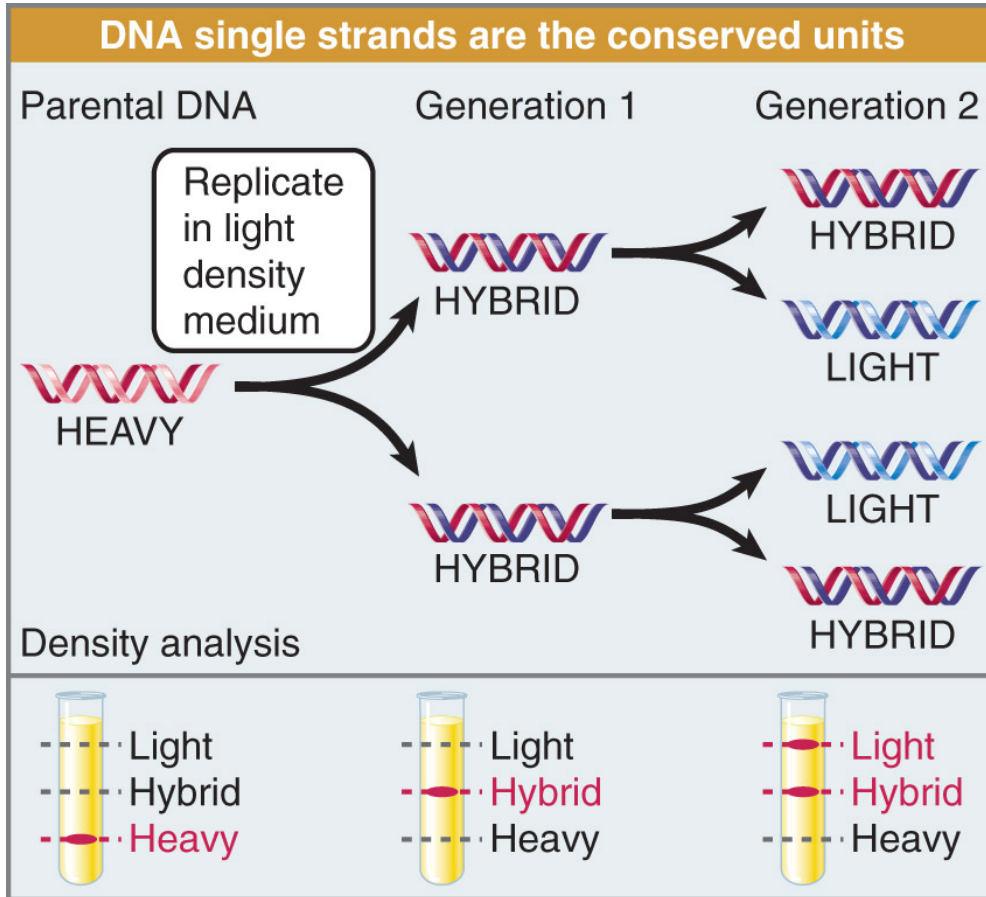
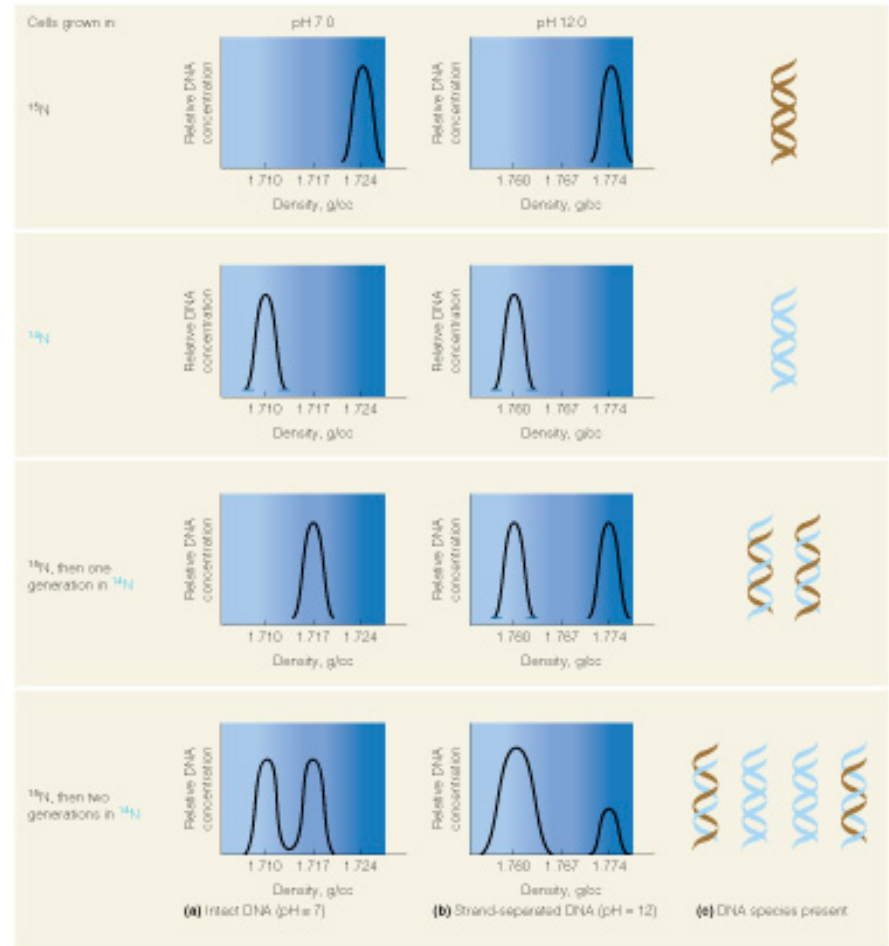
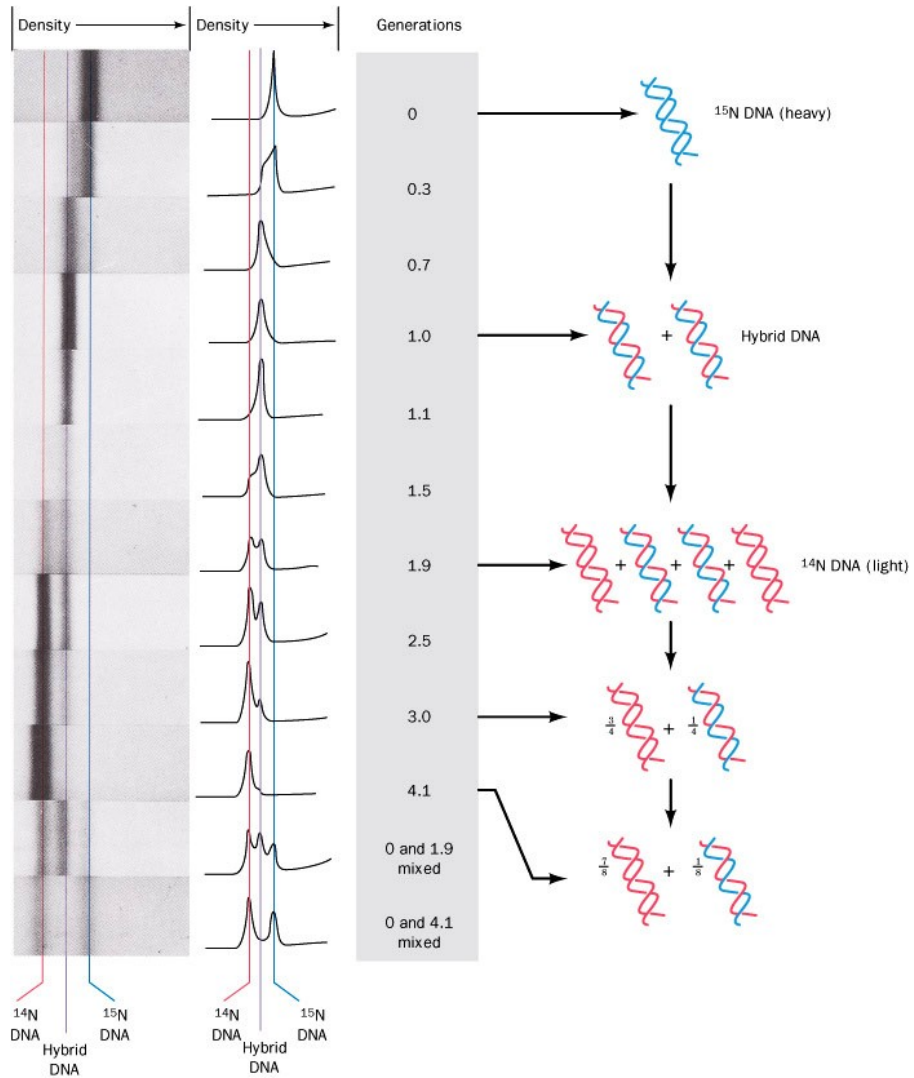
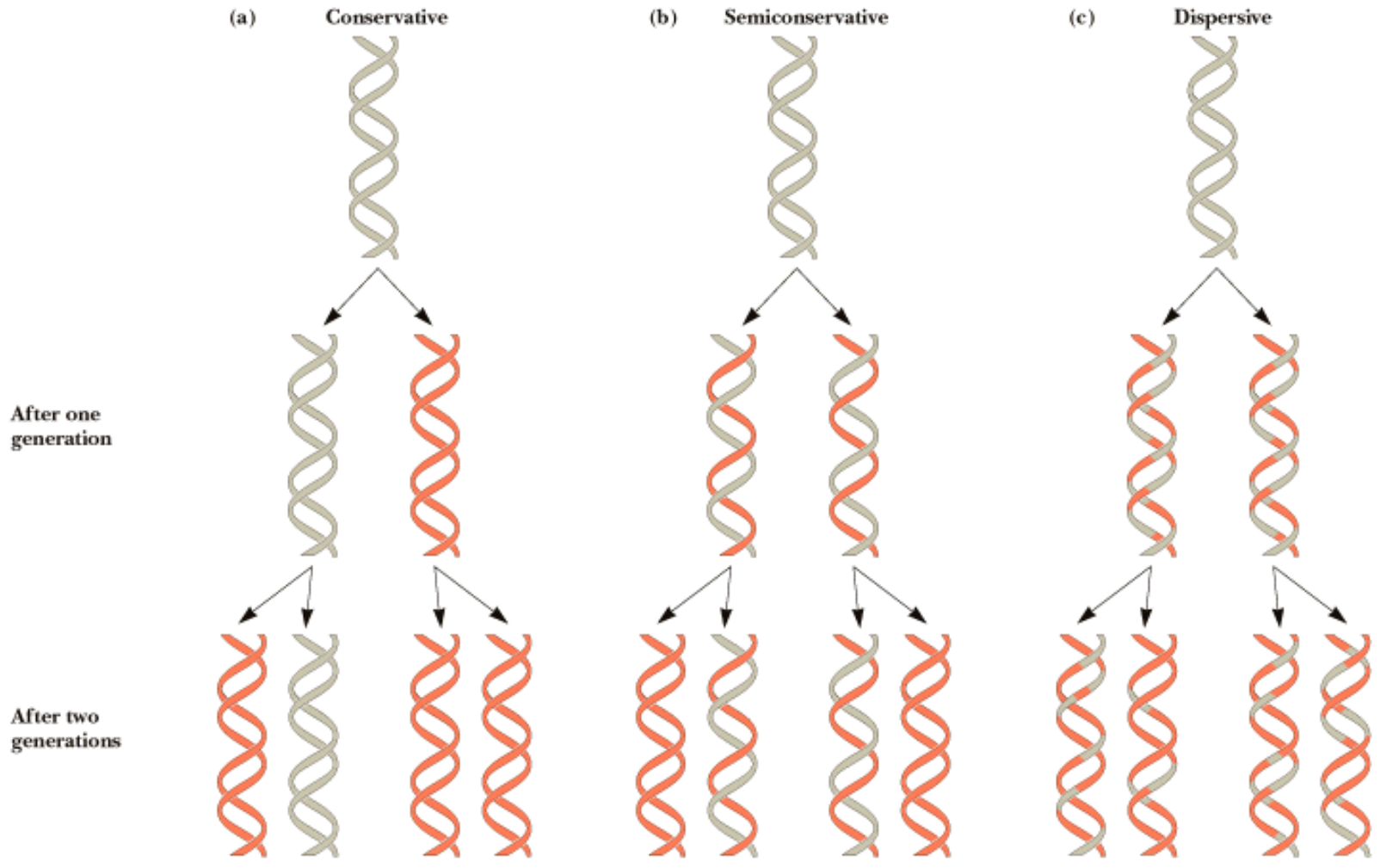


FIGURA 5.14 Resolución del ^{14}N DNA y del ^{15}N DNA por centrifugación en gradiente de densidad. (A) Fotografía de la absorción ultravioleta de una célula de centrifugación mostrando las dos bandas distintas de DNA. (B) Curva densitométrica de la fotografía de absorción. [Tomado de M. Meselson y F. W. Stahl. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44(1958): 671.]

És un procés semiconservatiu

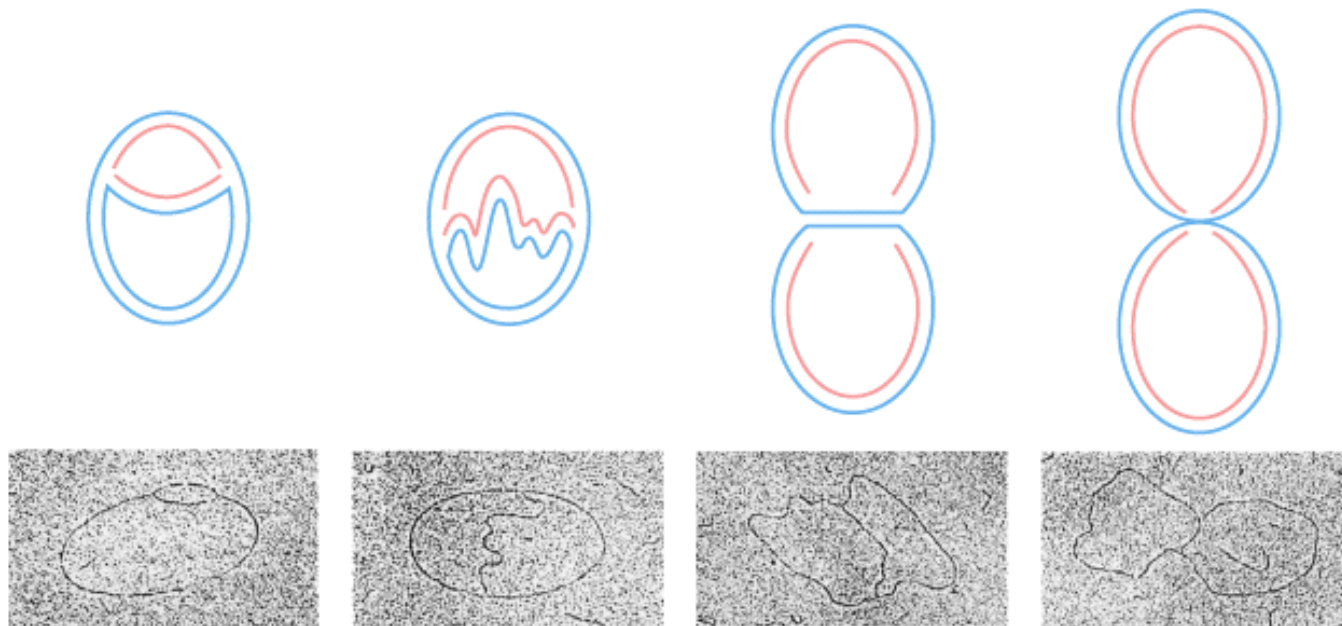


És un procés semiconservatiu



S'inicia en seqüències específiques anomenades orígens

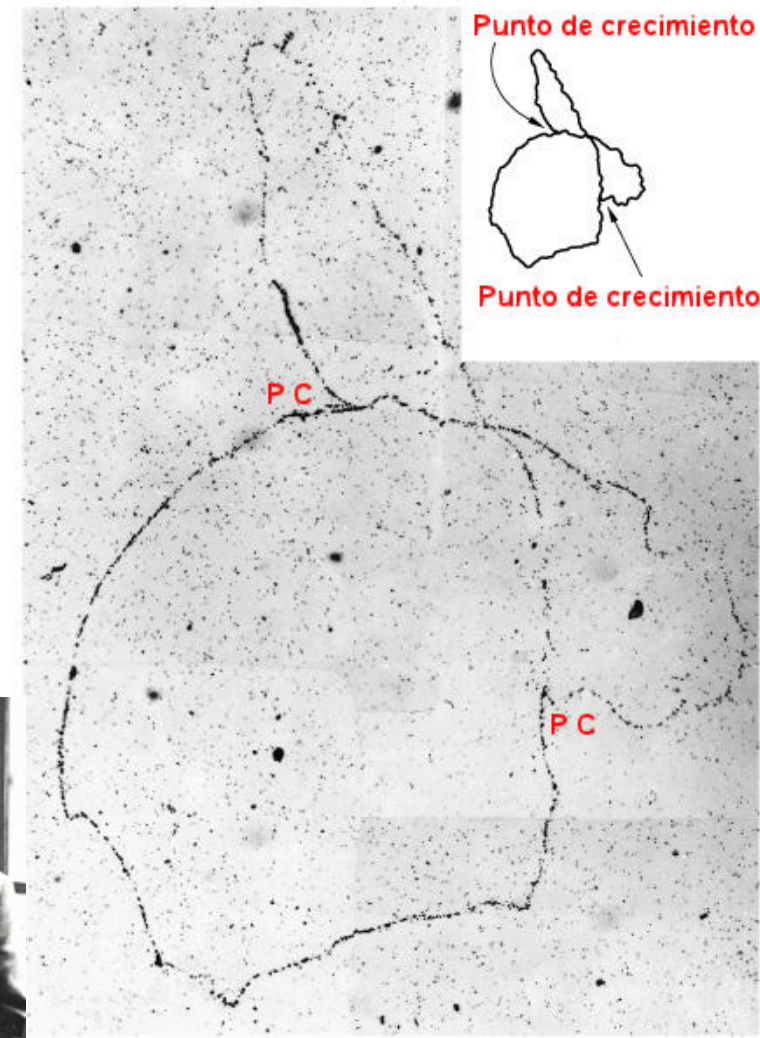
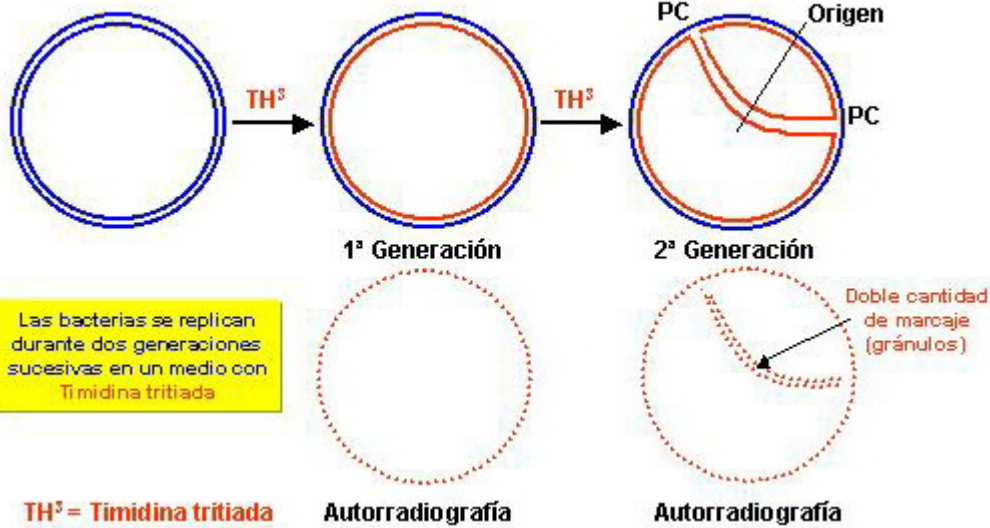
- En virus i bacteris només hi ha un origen
- En eucariotes n'hi ha un cada 20 kpb aproximadament
- Casos particulars: DNA mitocondrial, plasmidi ColE1 de bacteris i alguns genomes menuts de fags.
- Cairns, 1963



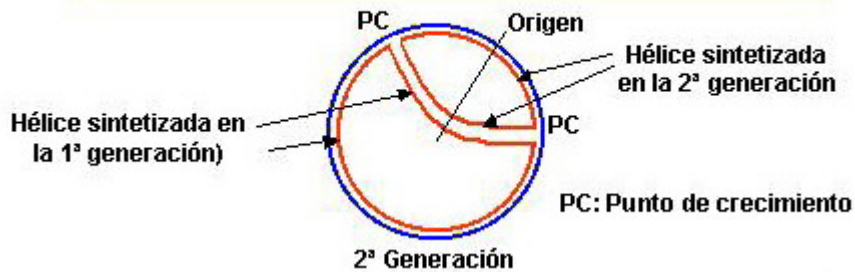
(a)

S'inicia en seqüències específiques anomenades orígens

Resumen del Experimento de Cairns (1963)



Explicación del intermediario de replicación de la 2ª generación



S'inicia en seqüències específiques anomenades orígens



Courtesy of John Cairns, Cold Spring Harbor Laboratory

Autoradiografia d'un cromosoma d'*E. coli* en replicació i la seua imatge interpretativa

Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial

- Sueoka i Yoshikawa, 1963
- *Bacillus subtilis*
- Estudis genètics de complementació de mutacions

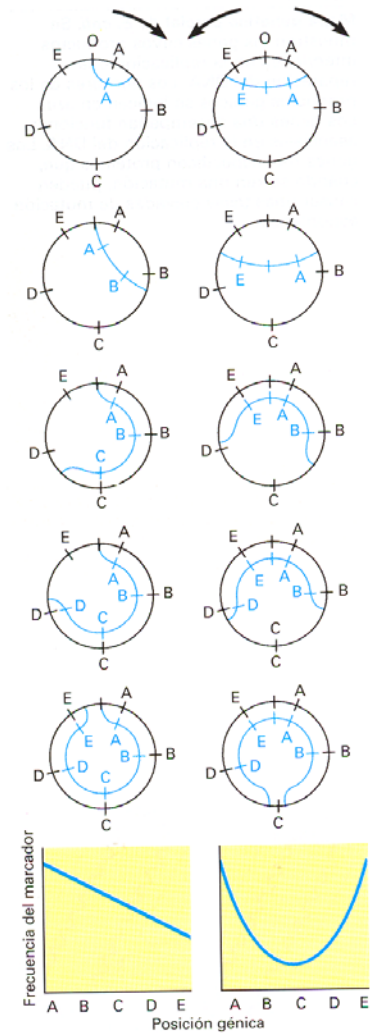


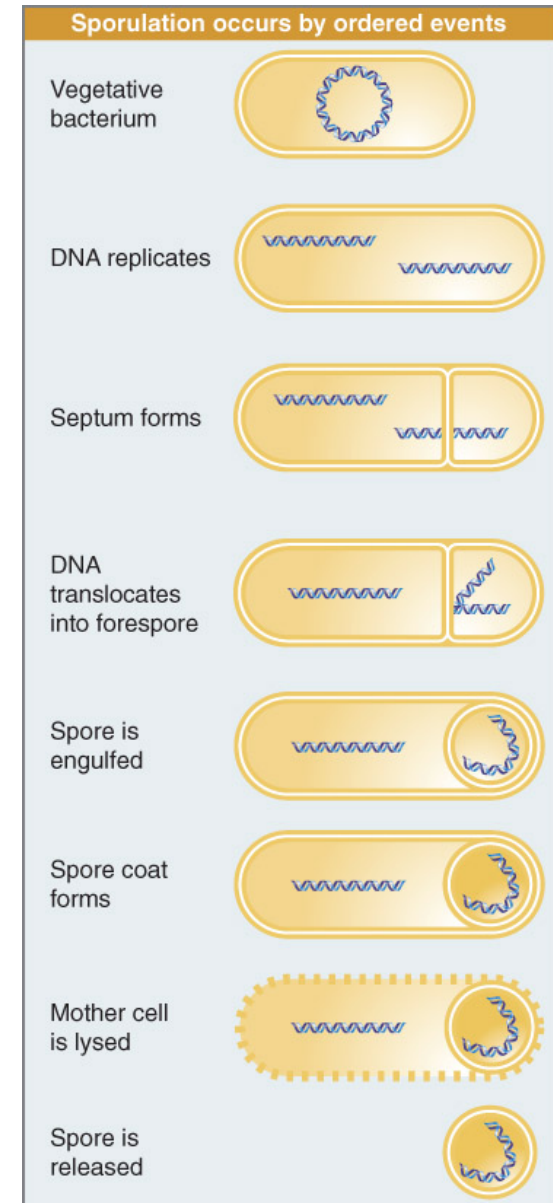
FIGURA 24.9

Diferenciació entre la replicació bidireccional i la unidireccional mitjançant gradients de marcadors de freqüència. Quan se deixa que una població de molècules de DNA circular portadores de gens marcadors se repliqui de manera aleatòria a partir d'un origen fix, o, i se compta el nombre de còpies de cada gen marcador, les corbes resultants poden utilitzar-se per diferenciar la replicació unidireccional (lloc esquerre) de la bidireccional (lloc dret).

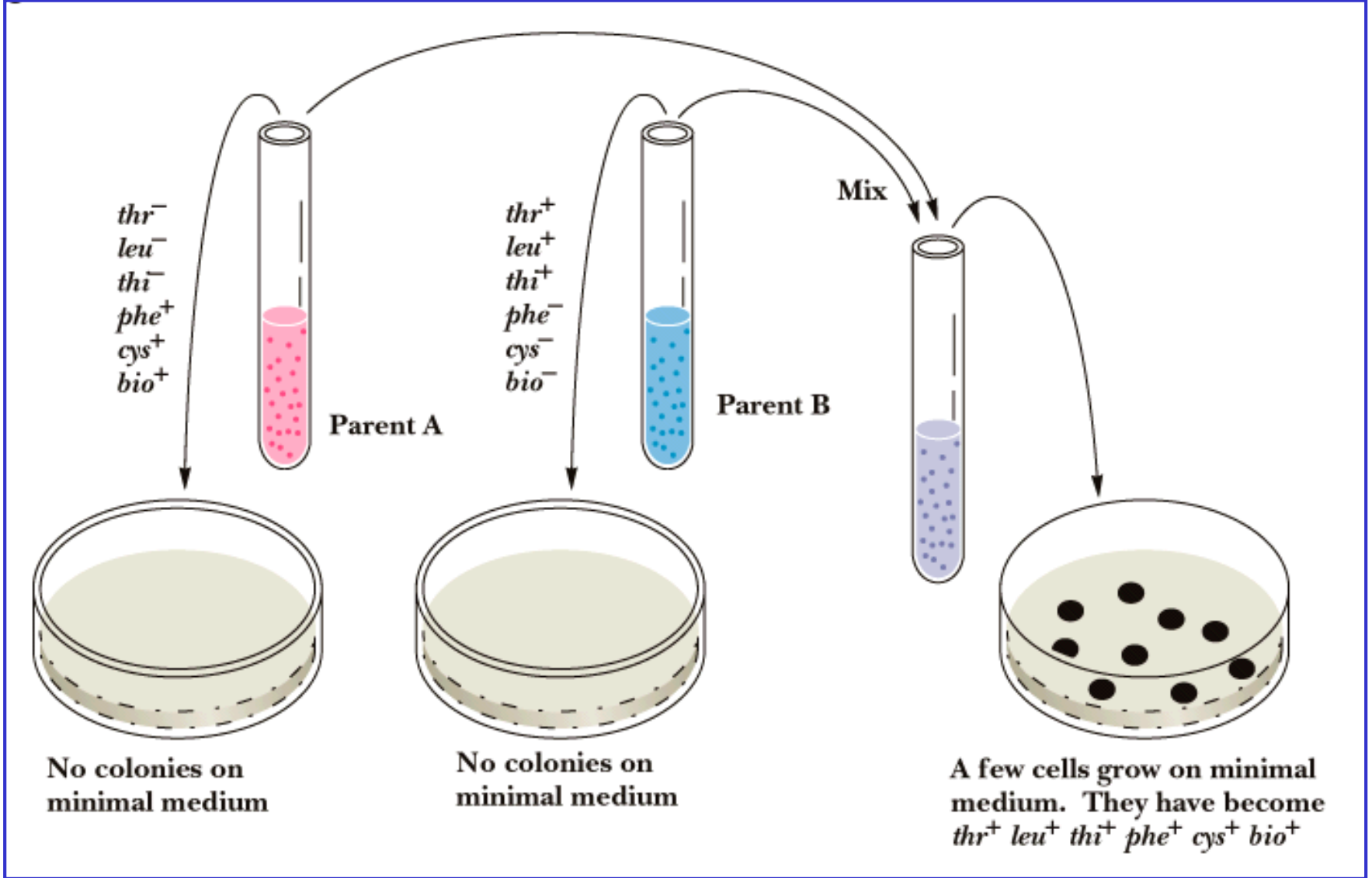
Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial

Bacillus subtilis

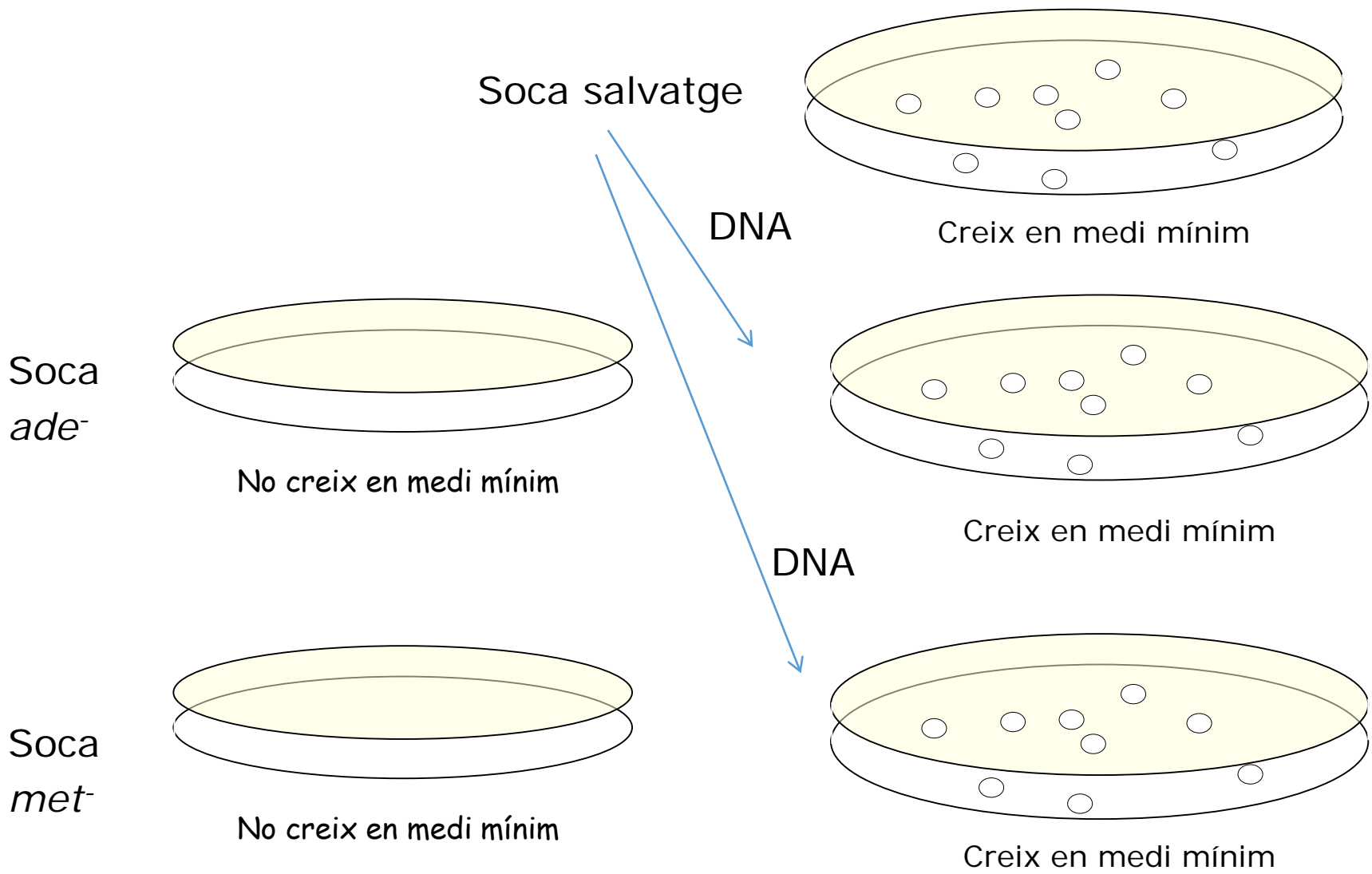
- Pot transformar-se amb DNA exogen i canviar de genotip
- Els seus cultius són fàcils de sincronitzar degut a la seua capacitat d'esporejar



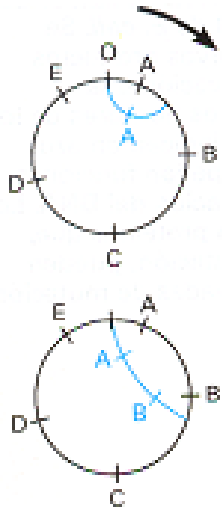
Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial



Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial



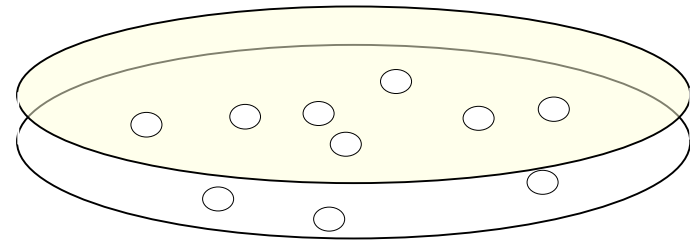
Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial



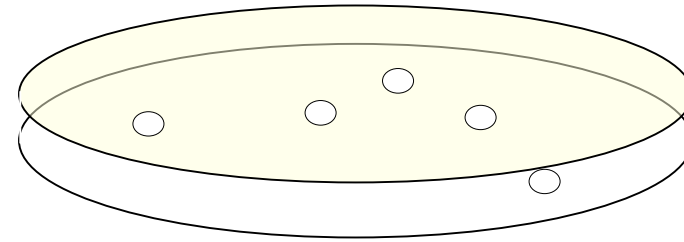
Aïllament de DNA de la soca salvatge i transformació de les soques auxòtrofes

Aïllament de DNA de la soca salvatge i transformació de les soques auxòtrofes

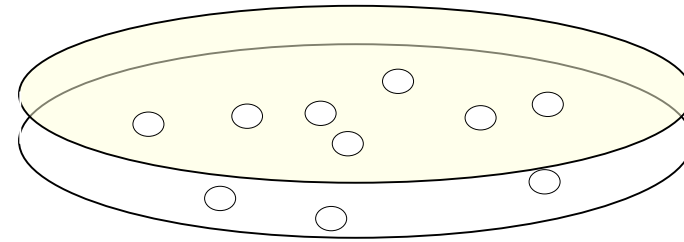
Soca *ade⁻*



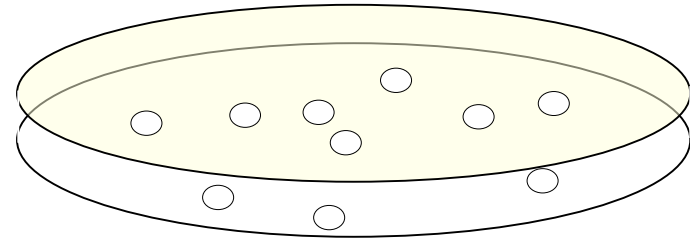
Soca *met*



Soca *ade⁻*



Soca *met*



Creixement en medi mínim

Des dels orígens la replicació avança de forma seqüencial

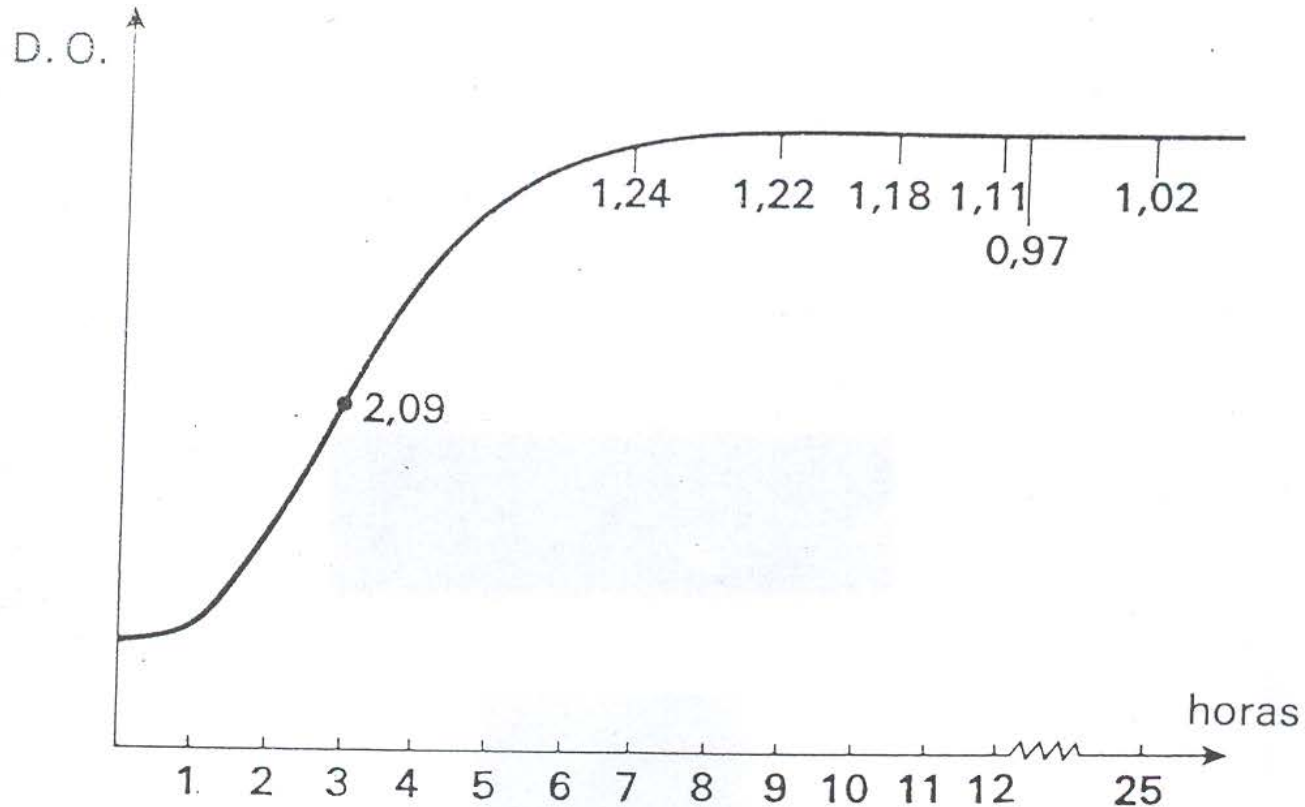
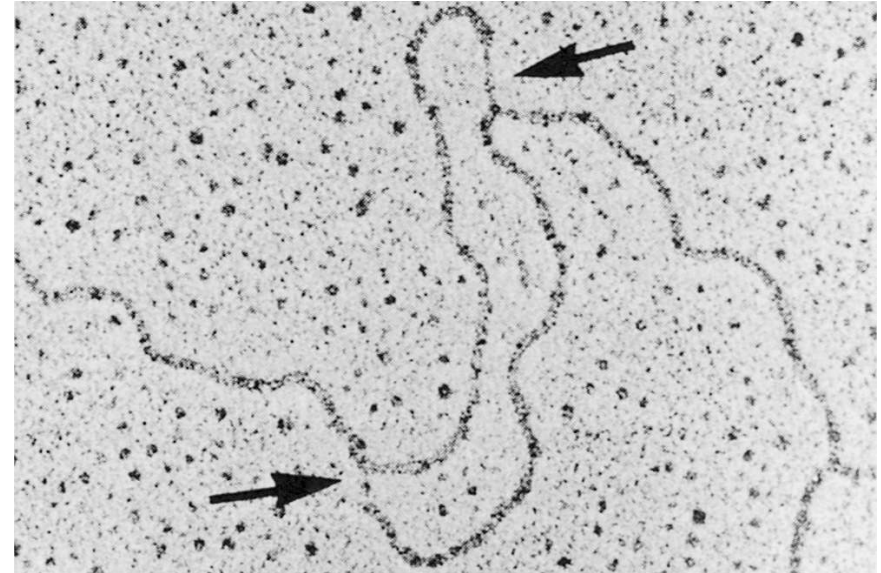
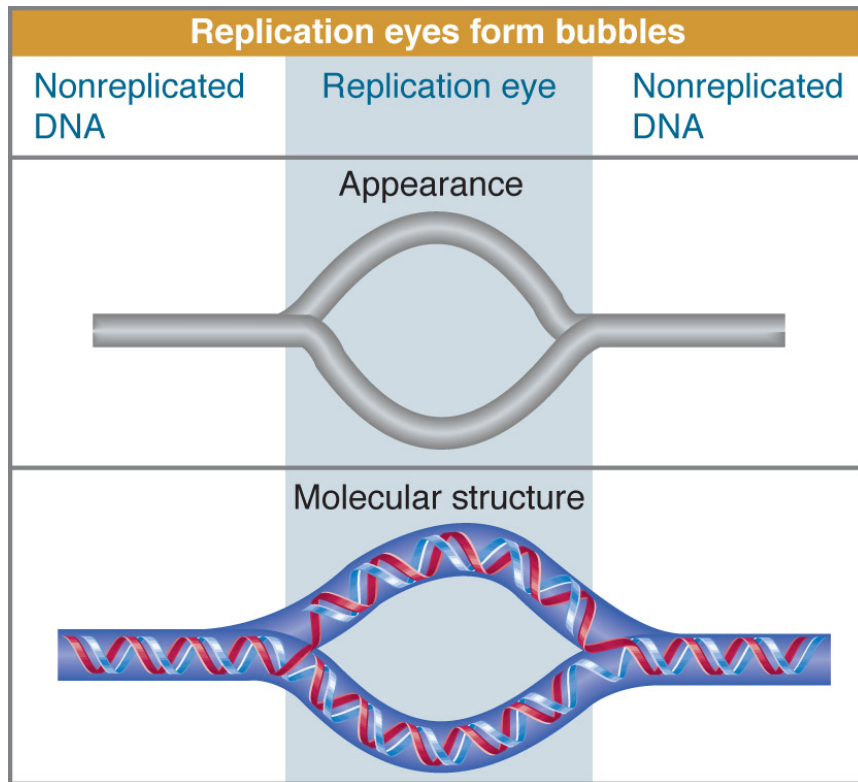


Figura 19. Evolució de las frecuencias relativas de "transformación" para los marcadores proximales durante el crecimiento de *Bacillus subtilis*. Los valores numéricos representados sobre la curva corresponden a la relación: actividad transformante para el marcador "Adenina"/actividad transformante para el marcador "metionina" a medida que progresa el crecimiento del cultivo.

Des dels orígens la replicació avança mitjançant estructures en forma de forqueta

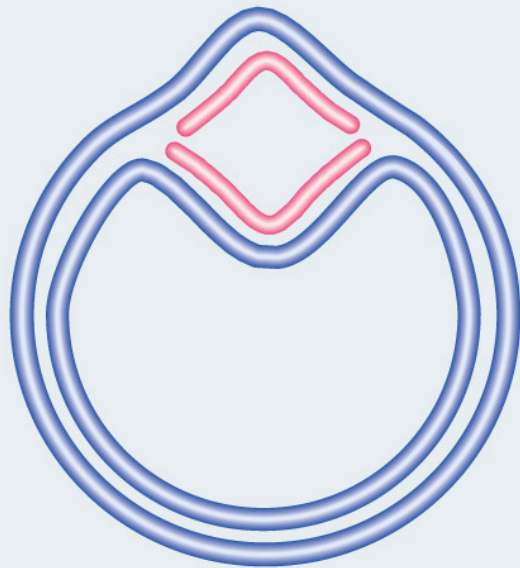


From Kreigstein, H.J. and Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 173 (1974)

Micrografia electrònica d'un ull de replicació en el DNA de *Drosophila melanogaster*

Des dels orígens la replicació avança mitjançant estructures en forma de forqueta

Replicating eyes are visible in e/m

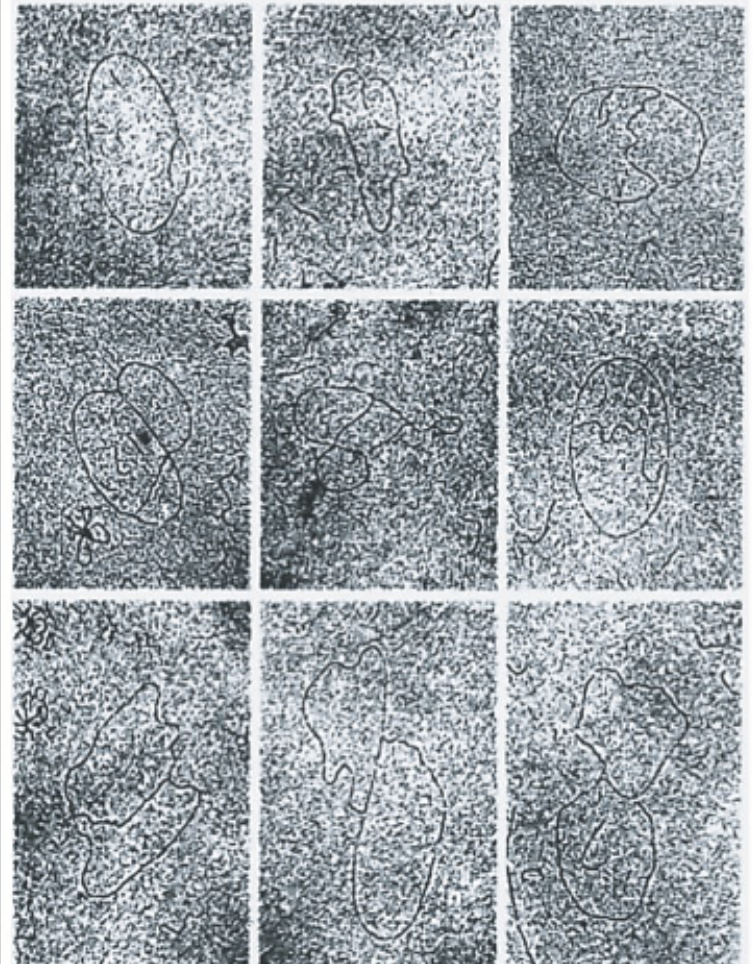


Replicating θ structure

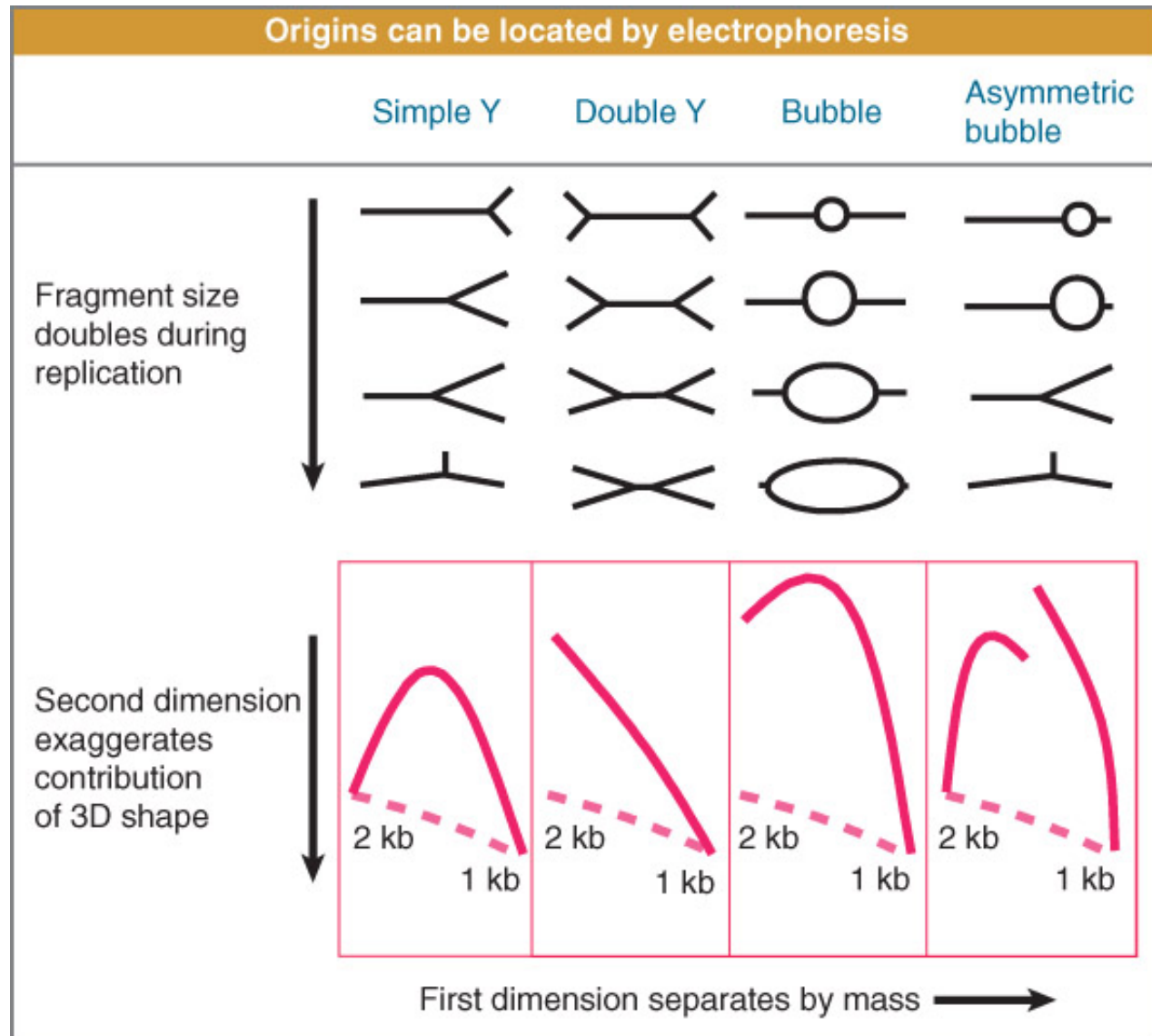


Appearance of θ structure by electron microscopy

Circular replicons form theta structures

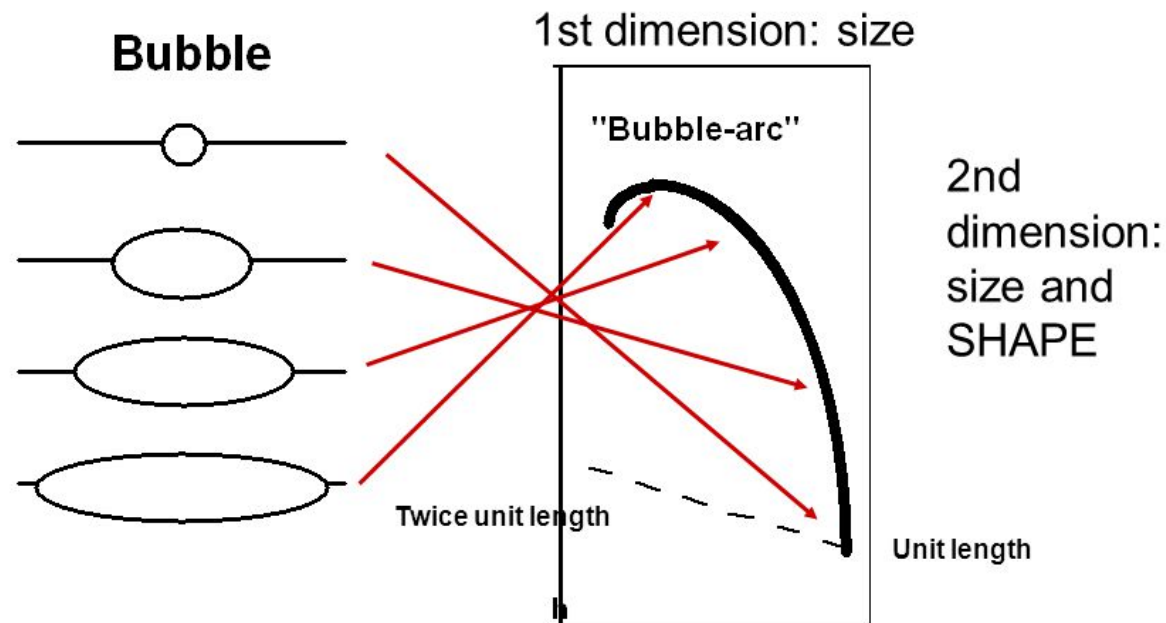


Des dels orígens la replicació avança mitjançant estructures en forma de forqueta



Des dels orígens la replicació avança mitjançant estructures en forma de forqueta

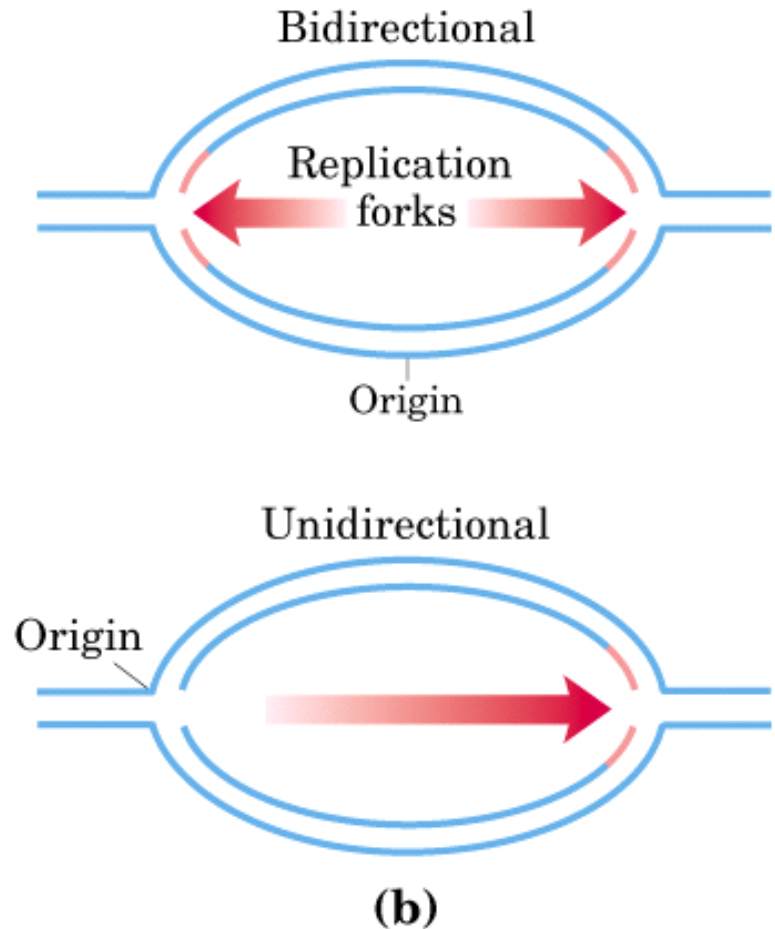
Bubble arcs on 2-D gels



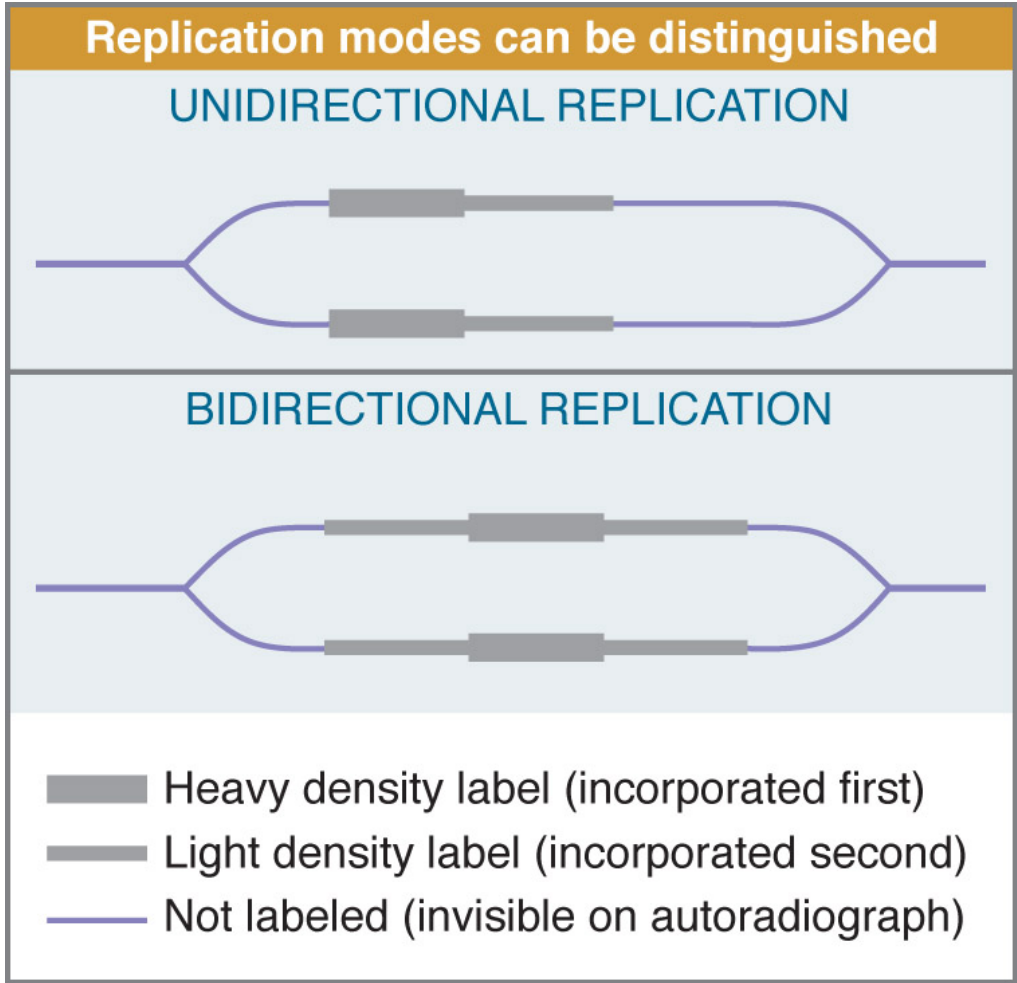
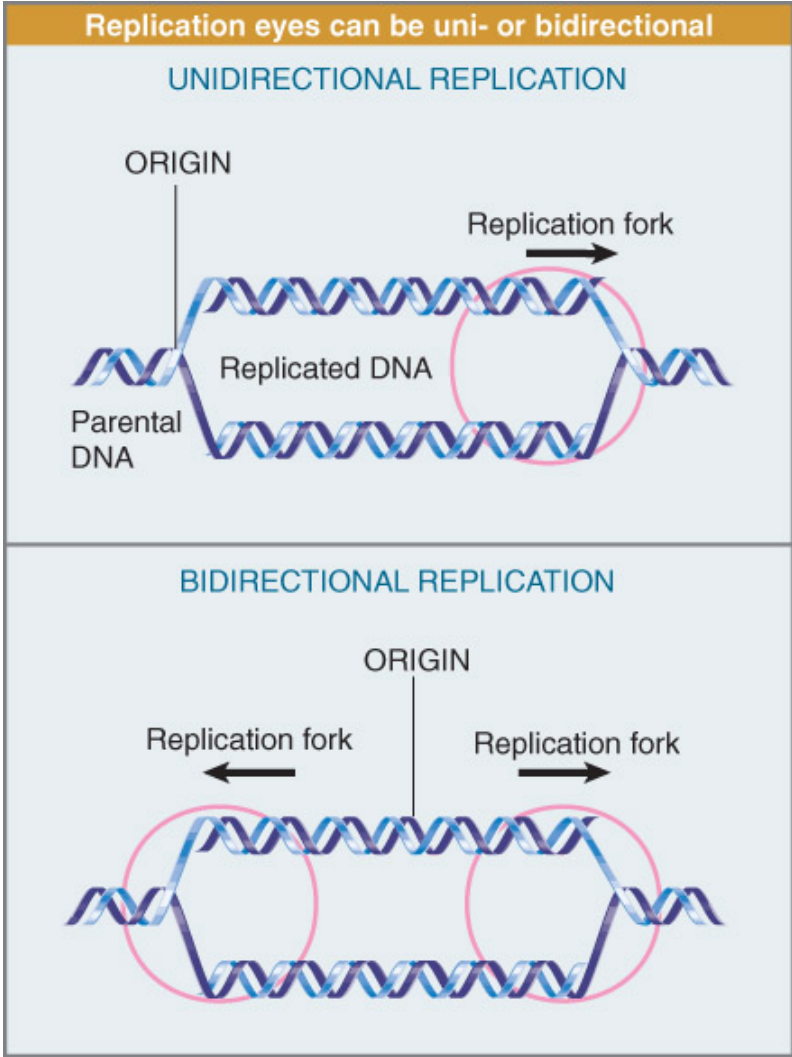
A fragment containing an origin will have one or two replication forks moving through it, generating bubbles of increasing size. These will be detected as bubble arcs on 2-D gels of the replicating DNA, when that region is used as a hybridization probe.

En la majoria dels casos el moviment de la forqueta és bidireccional

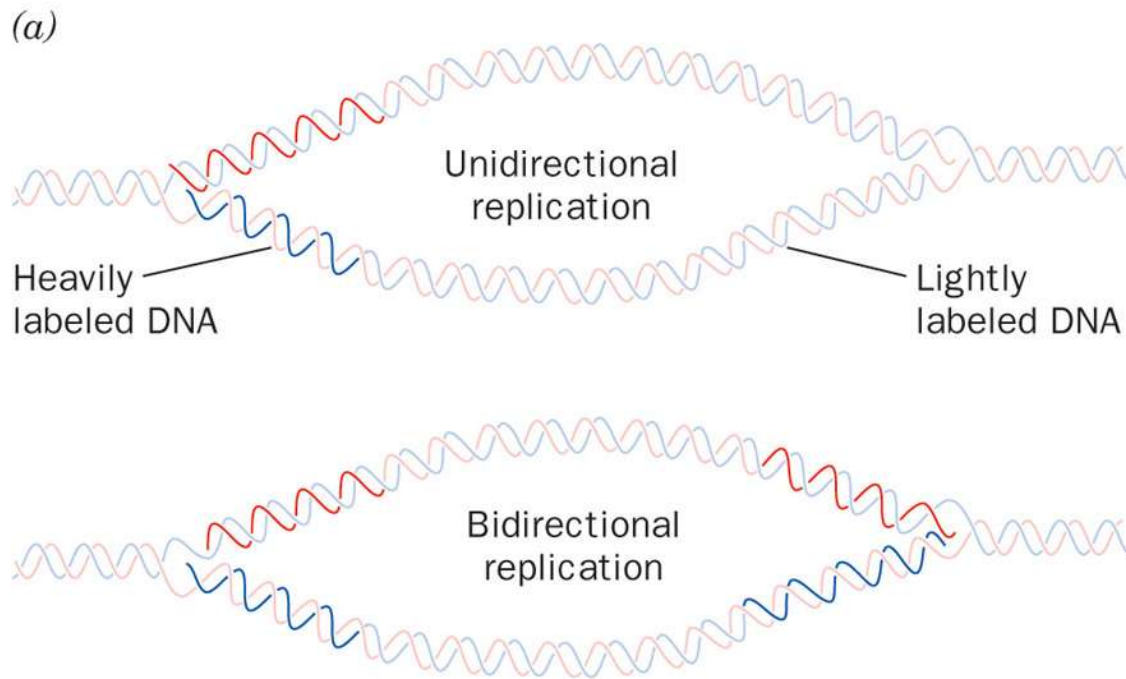
- Masters i Broda, 1971
- La replicació unidireccional es dona en fags de DNA d'una sola cadena i en el DNA mitocondrial.
- Anàlisis genètiques, migració electroforètica i mesura de distàncies des de l'ull fins els extrems en un DNA lineal (o convertit prèviament en lineal).



En la majoria dels casos
el moviment de la forqueta és bidireccional



En la mayoría de los casos el movimiento de la forqueta es bidireccional



Diferenciació
autoradiogràfica
entre replicació
unidireccional i
bidireccional

(b)



En la mayoría dels casos el moviment de la forqueta és bidireccional

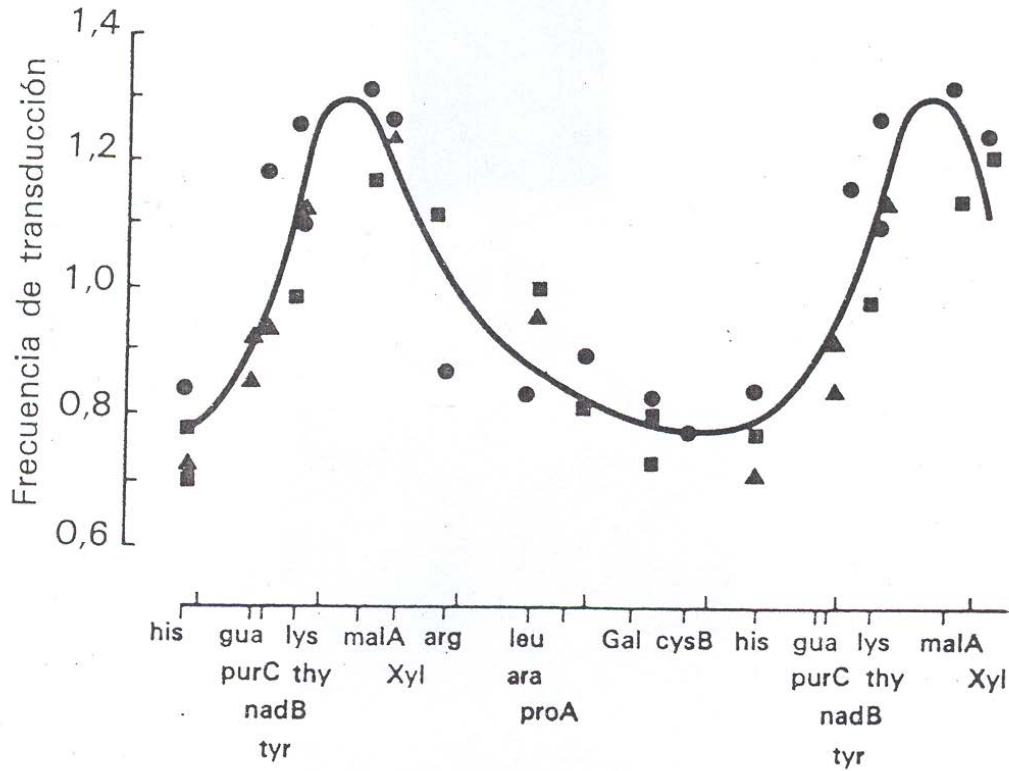


Figura 23. Evolució del número relatiu de transduccions (utilitzant lisats de cultius realitzats respectivament en burbuja i en medi mínim) per a una sèrie de marcadors genètics en tres cepes F- de *E. coli*.

▲ B/r ■ W 1485 ● W 3110

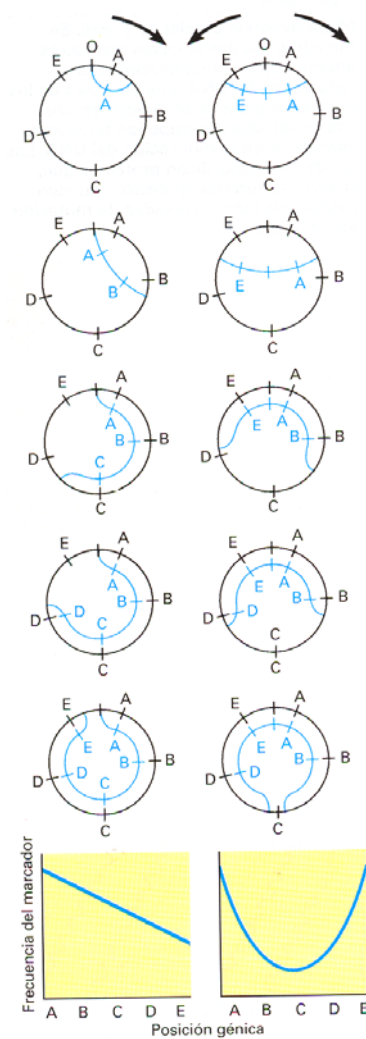
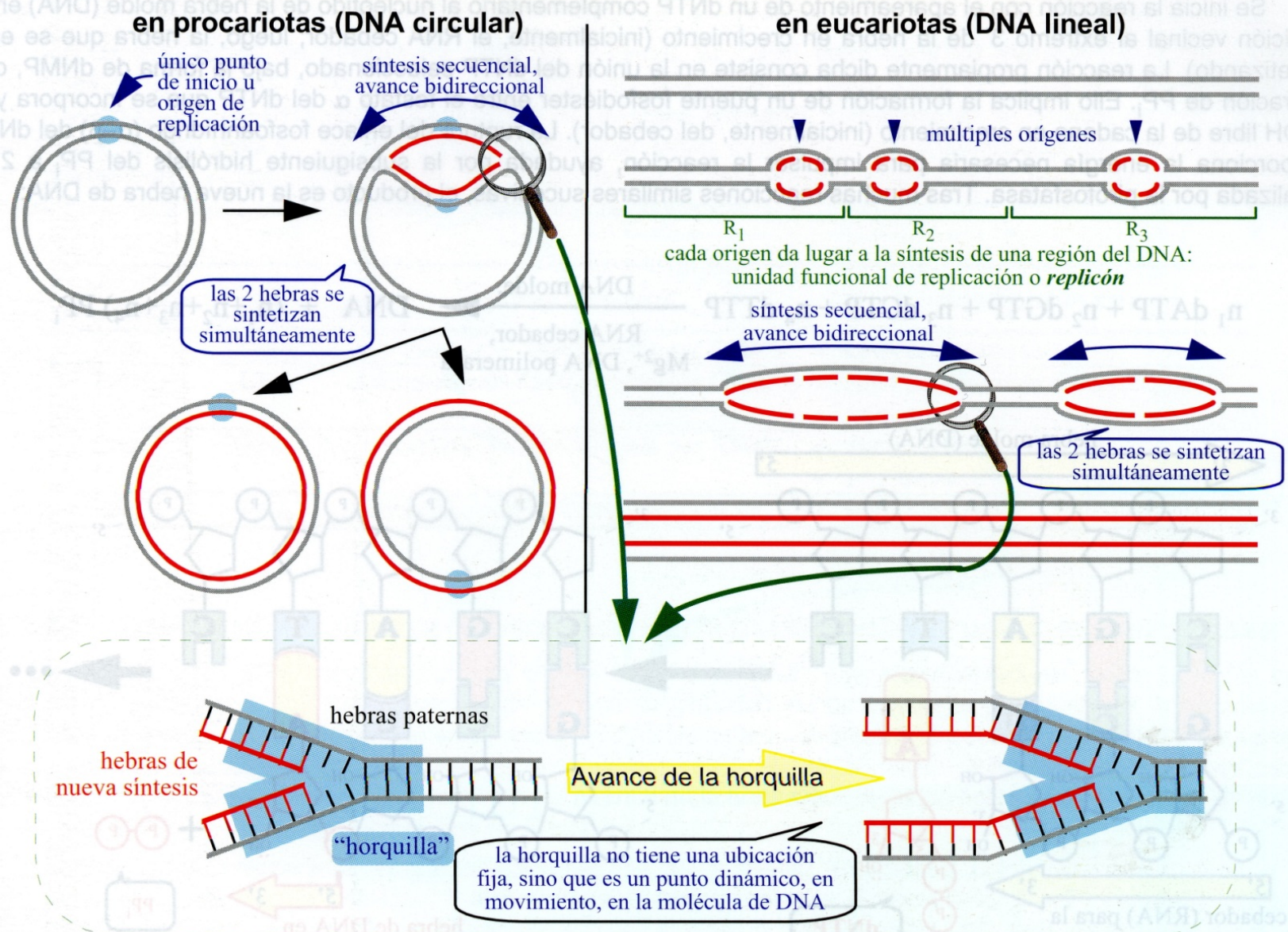


FIGURA 24.9
Diferenciació entre la replicació bidireccional i la unidireccional mitjançant gradients de marcadors de freqüència. Quan se deixa que una població de molècules de DNA circular portadores de gens marcadors se replique de manera aleatòria a partir d'un origen fix, o, i se compta el nombre de còpies de cada gen marcador, les corbes resultants poden utilitzar-se per diferenciar la replicació unidireccional (lloc esquerre) de la bidireccional (lloc dret).

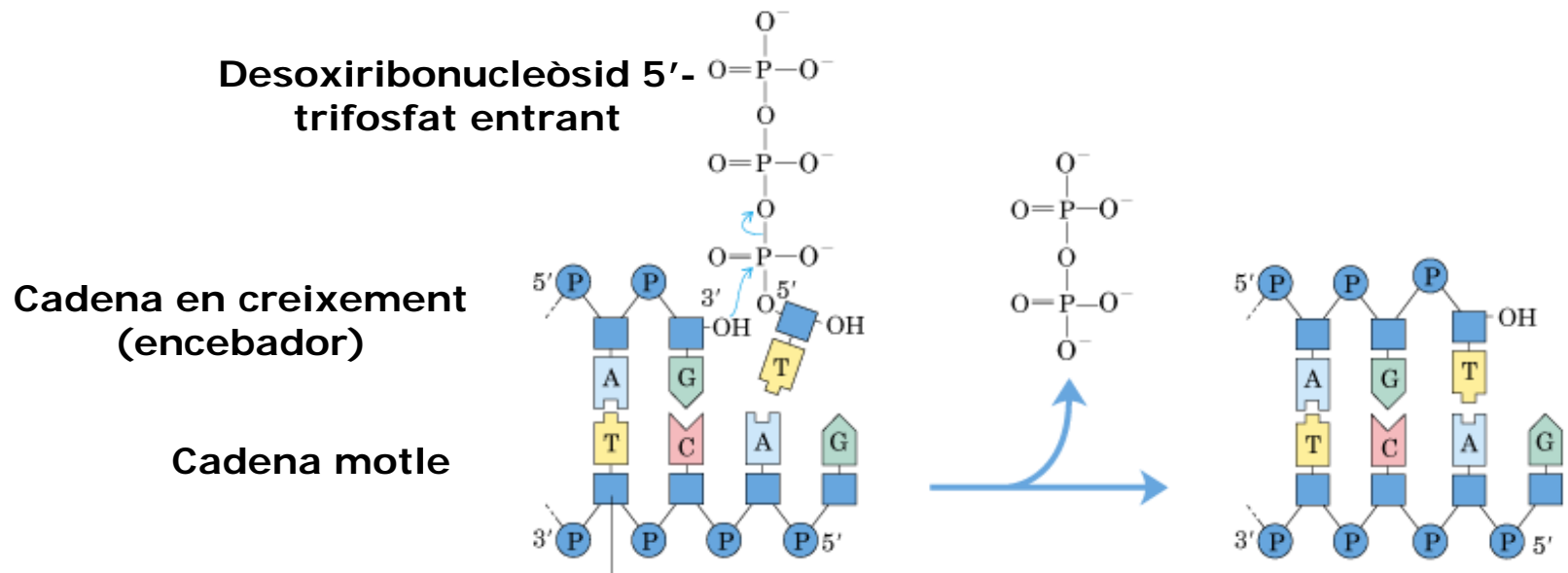
FORMACIÓN Y AVANCE DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN



És un procés catalitzat per enzims

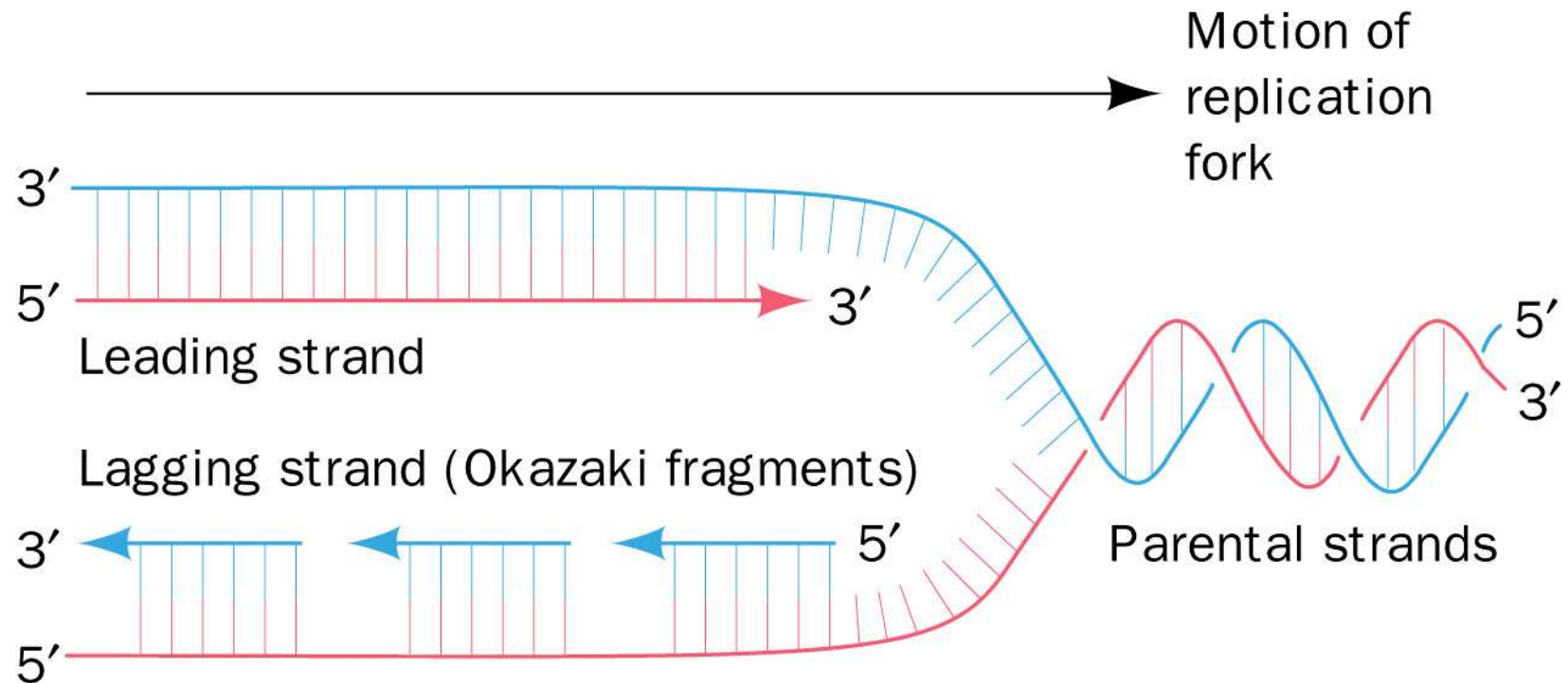
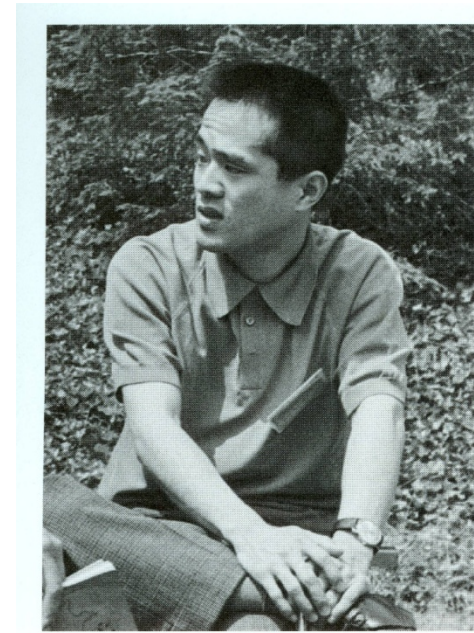
- Kornberg, 1956
- DNA-polimerases DNA-dependents (o RNA-polimerases RNA-dependents)
- Participació d'enzims auxiliars

Les polimerases allarguen les cadenes en direcció 5'-3'



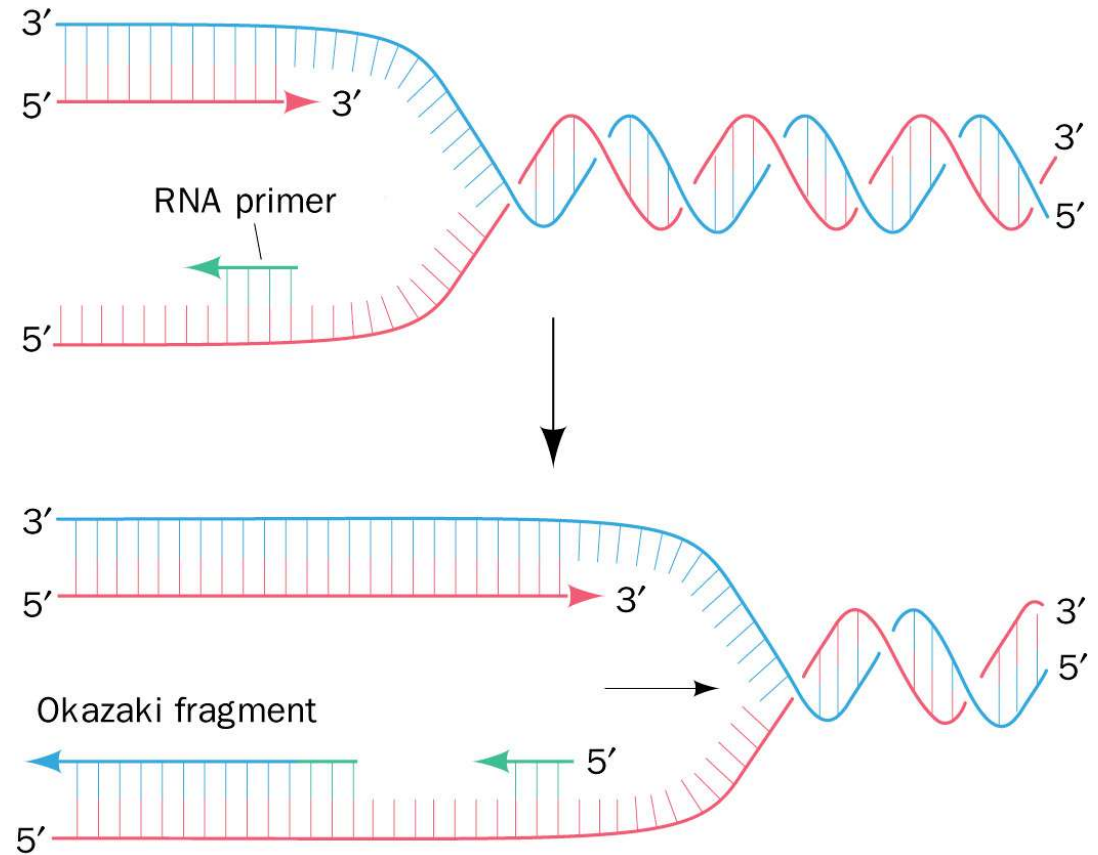
**És majoritàriament
semidiscontínua**

- Okazaki
- Relativament contínua per a la cadena conductora i discontinua per a l'altra, la retardada.
- Excepcions: DNA monocatenari i DNA mitocondrial.



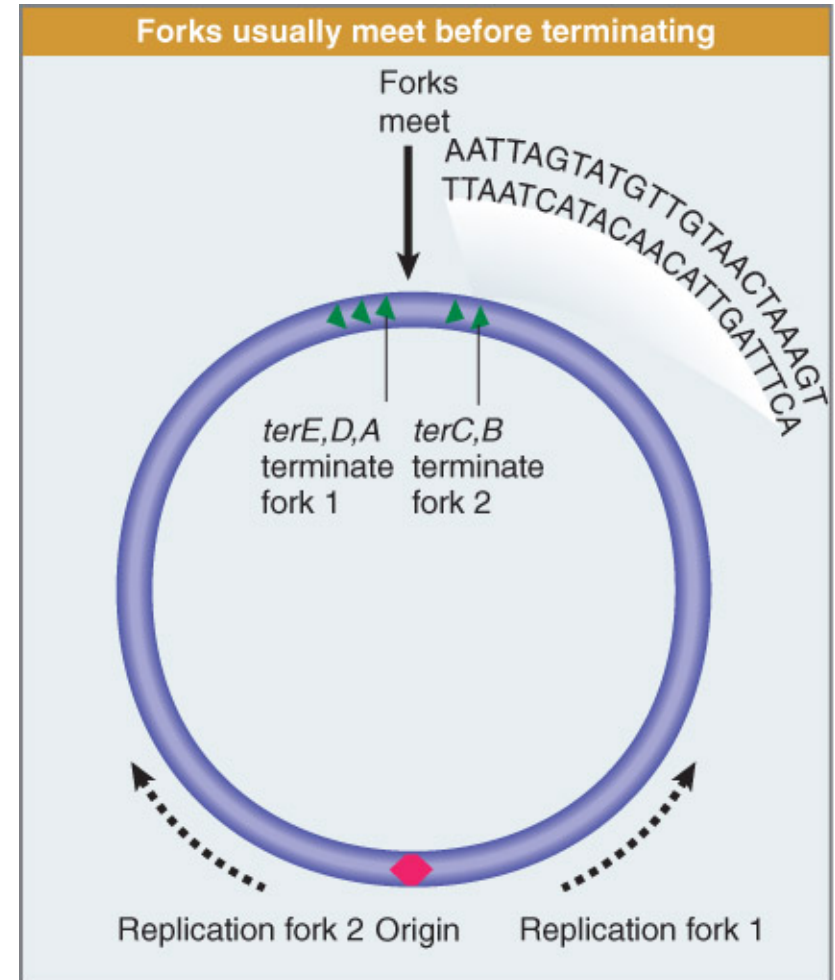
Existeixen mecanismes per a iniciar una cadena de DNA

- Les DNA-polimerases no poden iniciar cadenes sense disposar d'un extrem 3'-OH
- El mecanisme més comú per a iniciar una cadena és fer servir un encebador d'RNA



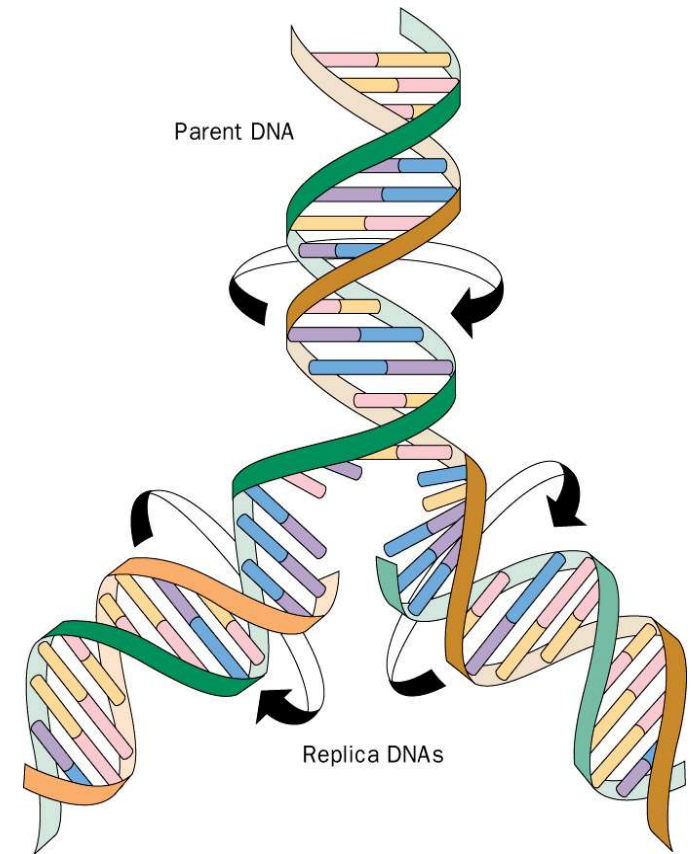
L'acabament pot ocórrer en un punt fix

- No és imprescindible l'existència d'una regió amb una seqüència determinada.
- En els cromosomes d'*Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* i en alguns plasmidis el punt de terminació està definit per regions *ter* que impedeixen l'avançament de les forquetes de replicació.
- En el fag λ i en SV40 no hi ha regions *ter* i la replicació acaba on es troben les dues forquetes que es mouen bidireccionalment des de l'origen.



Tema 14

DNA polimerases. Característiques generals.
DNA polimerases d'*E. coli*. DNA
polimerases d'altres bacteris i de virus.



Característiques de les DNA polimerases

- Requereixen desoxiribonucleòsids trifosfat així com un motle i un encebador correctament aparellats

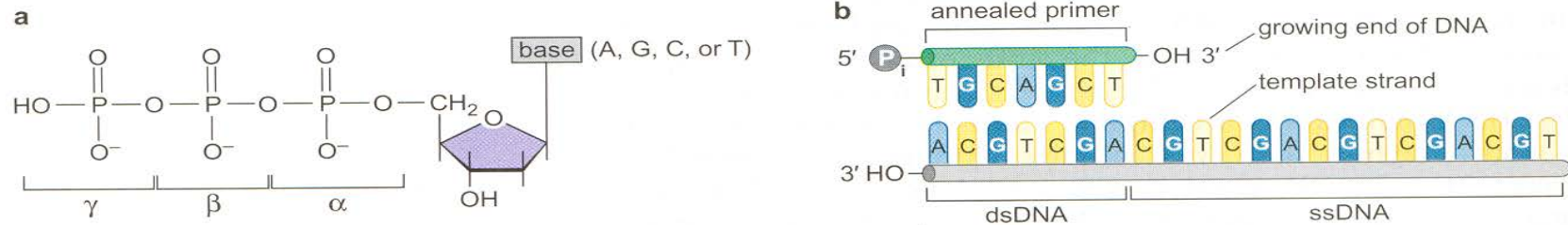
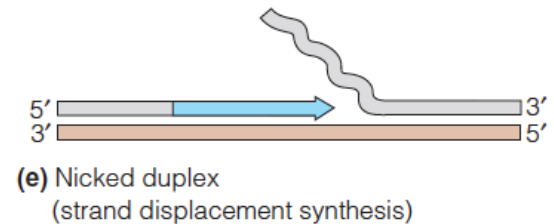
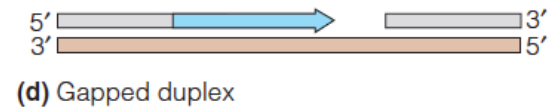
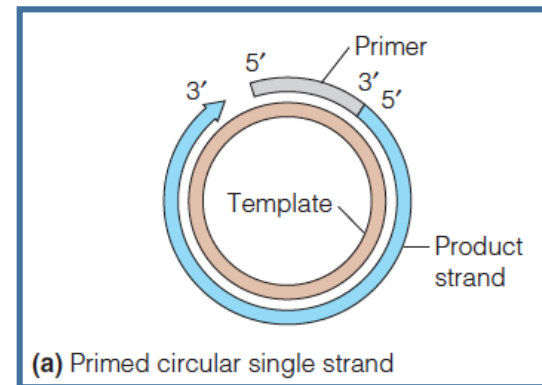


FIGURE 8-1 Substrates required for DNA synthesis. (a) The general structure of the 2'-deoxynucleoside triphosphates. The positions of the α -, β -, and γ -phosphates are labeled. (b) The structure of a generalized primer:template junction. The shorter primer strand is completely annealed to the longer DNA strand and must have a free 3'OH adjacent to a ssDNA region of the template. The longer DNA strand includes a region annealed to the primer and an adjacent ssDNA region that acts as the template for new DNA synthesis. New DNA synthesis extends the 3' end of the primer.

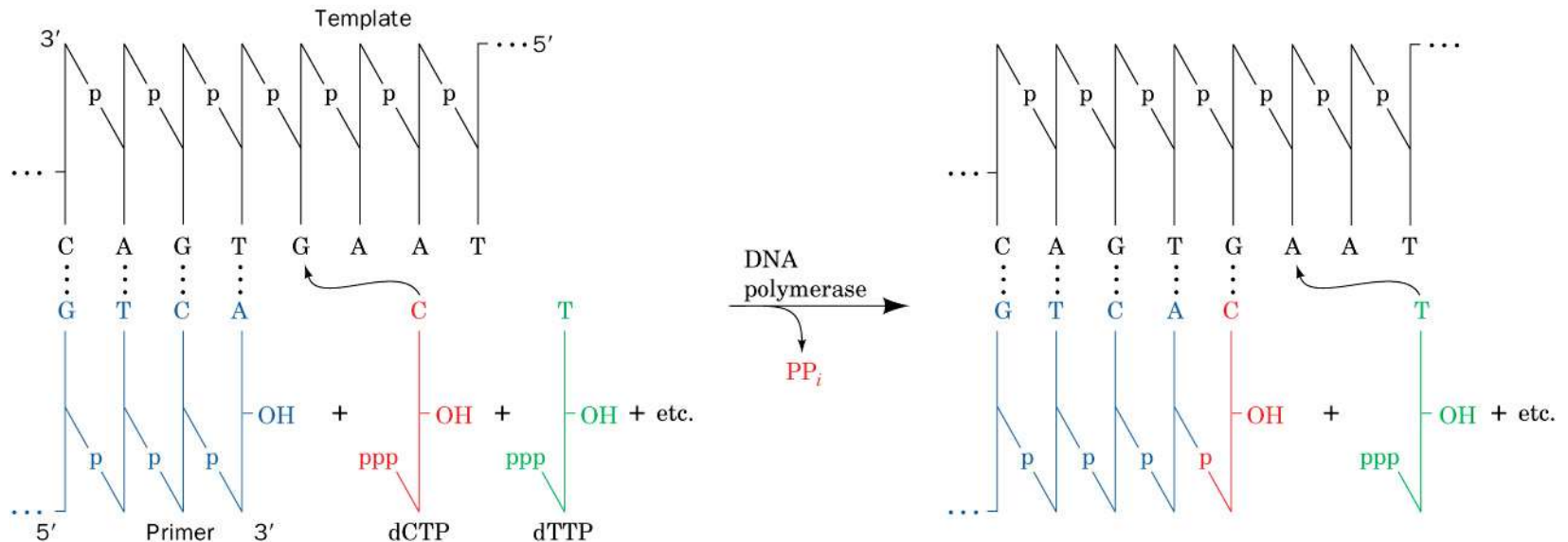
Característiques de les DNA polimerases

- Poden fer servir diferents tipus de substrats, però cada DNA polimerasa presenta peculiaritats en aquest aspecte



Característiques de les DNA polimerases

- Sintetitzen el DNA estenent l'extrem 3'-OH de l'encebador
- L'enllaç fosfodièster es forma per l'atac nucleofílic del grup 3'-OH de l'encebador sobre el fosfat α del dNTP entrant
- La hidròlisi del pirofosfat és la força conductora per a la síntesi del DNA
- La direcció de polimerització és 5' \longrightarrow 3'



Características de les DNA polimerases

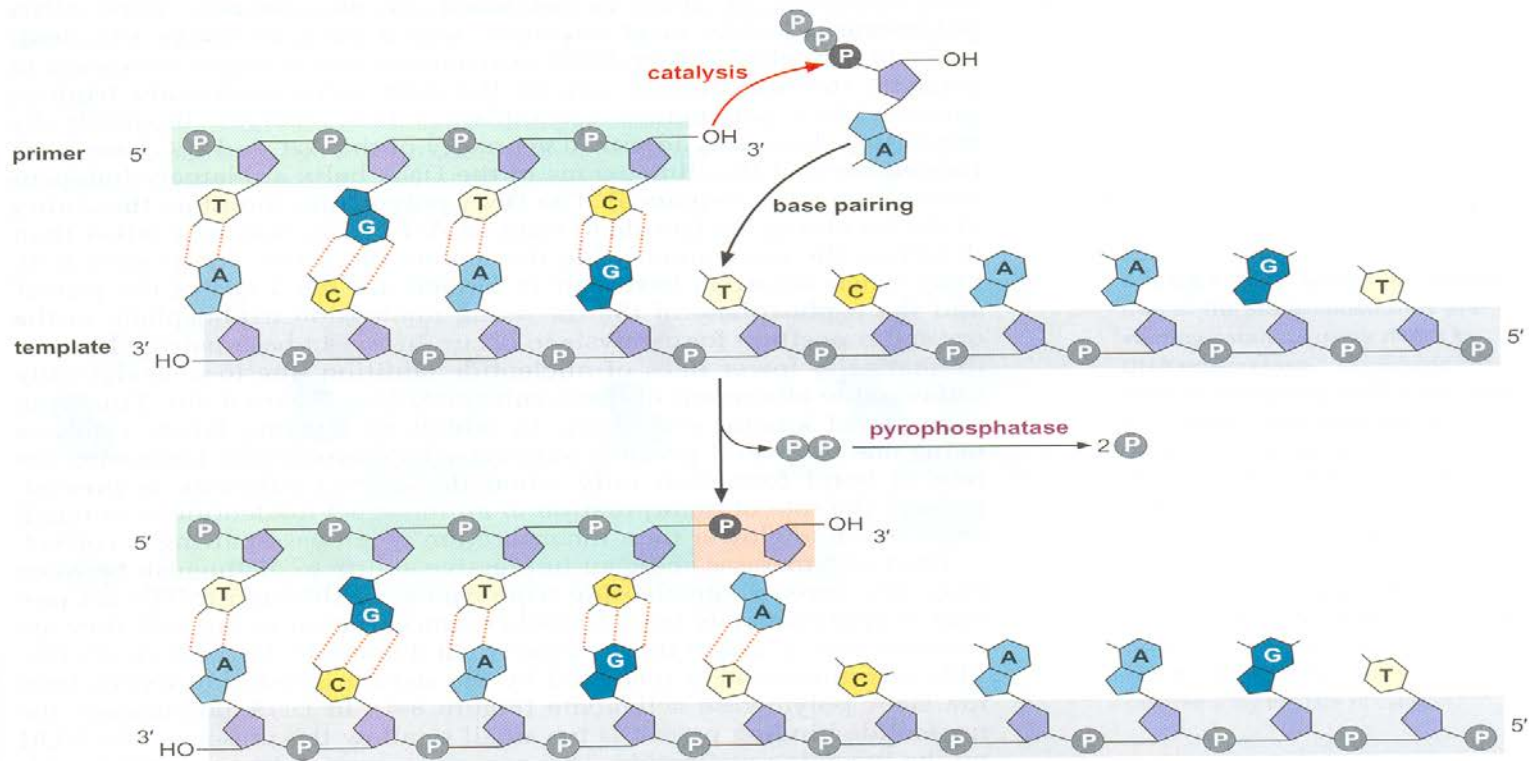


FIGURE 8-2 Diagram of the mechanism of DNA synthesis. DNA synthesis is initiated by the nucleophilic attack of the α -phosphate of the incoming dNTP. This results in the extension of the incoming 3' end of the primer by one nucleotide and the release of one molecule of pyrophosphate. Pyrophosphatase rapidly hydrolyzes the pyrophosphate into two phosphate molecules.

Característiques de les DNA polimerases

- Les DNA polimerases fan servir un únic centre actiu per a catalitzar la incorporació de qualsevol dels quatre desoxiribonucleòsids trifosfat, però diferencien entre dNTPs i rNTPs

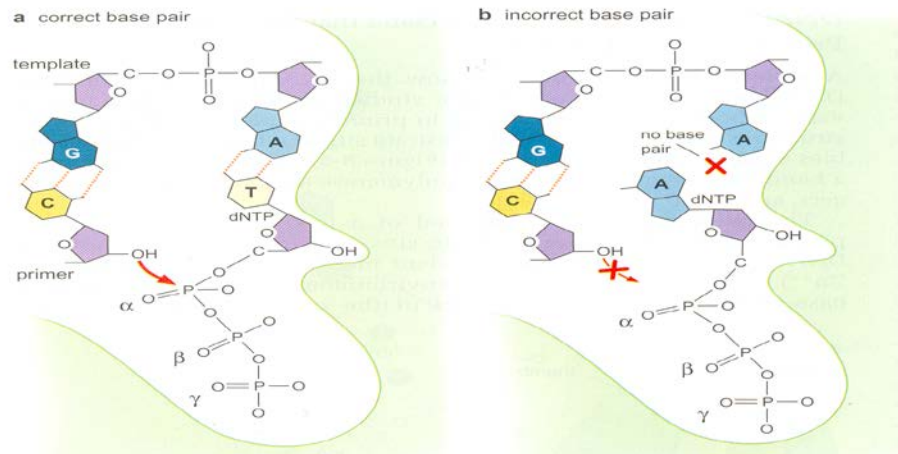
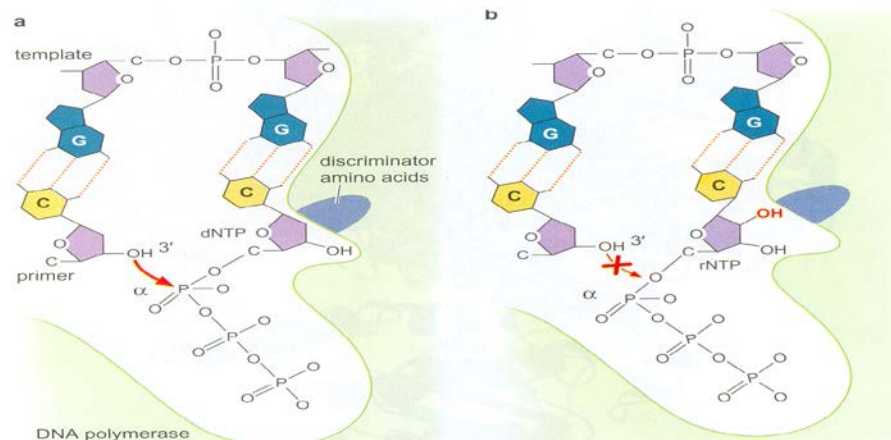


FIGURE 8-3 Correctly paired bases are required for DNA polymerase catalyzed nucleotide addition. (a) Schematic diagram of the attack of a primer 3'OH end on a correctly base-paired dNTP. (b) Schematic diagram of the consequence of incorrect base-pairing on catalysis by DNA polymerase. In the example shown, the incorrect A:A base pair displaces the α -phosphate of the incoming nucleotide. This incorrect alignment reduces the rate of catalysis dramatically resulting in the DNA polymerase preferentially adding correctly base-paired dNTPs. (Source: Based on Brautigam C.A. and Steitz T.A. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerase. *Curr. Opin. Structural Biology* 8: 60, fig 4, part d. Copyright © 1998 with permission from Elsevier.)

FIGURE 8-4 Schematic illustration of the steric constraints preventing catalysis using rNTPs by DNA polymerase. (a) Binding of a correctly base-paired dNTP to the DNA polymerase. Under these conditions, the 3'OH of the primer and the α -phosphate of the dNTP are in close proximity. (b) Addition of a 2'OH results in a steric clash with amino acids (the discriminator amino acids) in the nucleotide binding pocket. This results in the α -phosphate of the dNTP being displaced and a misalignment with the 3'OH of the primer, dramatically reducing the rate of catalysis.



Característiques de les DNA polimerases

- Experimenten canvis estructurals quan s'incorpora un nucleòtid correctament aparellat

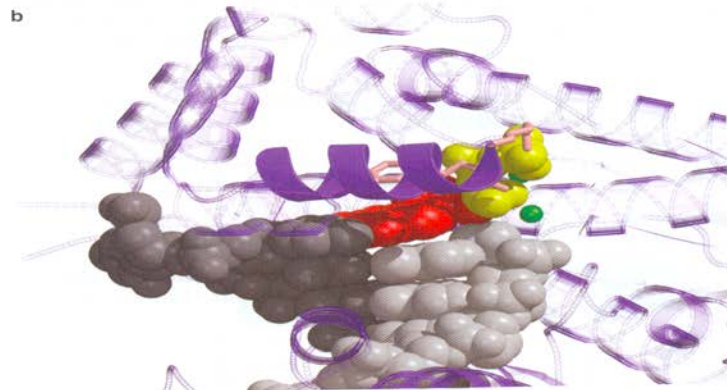
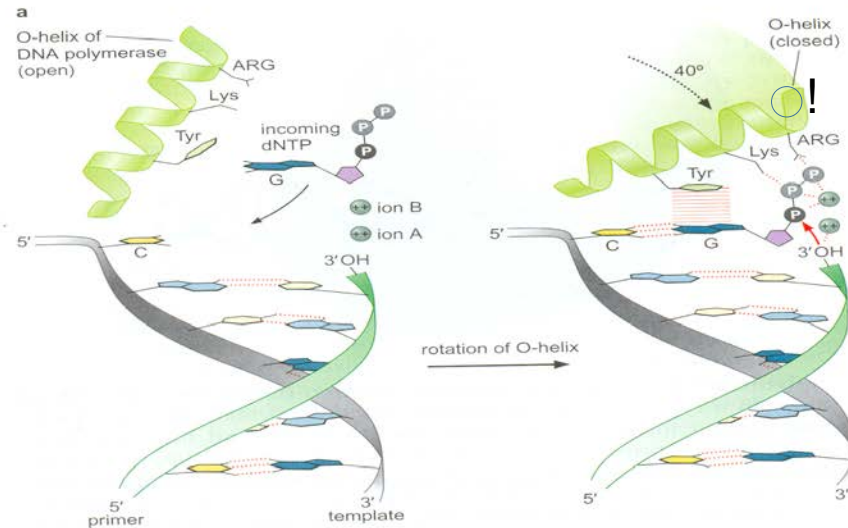


FIGURE 8-7 DNA polymerase "grips" the template and the incoming nucleotide when a correct base pair is made. (a) An illustration of the changes in DNA polymerase structure after the incoming nucleotide base-pairs correctly to the template DNA. The primary change is a 40° rotation of one of the helices in the finger domain called the O-helix. In the open conformation this helix is distant from the incoming nucleotide. When the polymerase is in the closed conformation, this helix moves and makes several important interactions with the incoming dNTP. A tyrosine makes stacking interactions with the base of the dNTP and two charged residues associate with the triphosphate. The combination of these interactions positions the dNTP for catalysis mediated by the two metal ions bound to the DNA polymerase. (Source: Based on Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., and Ellenberger T, 1998. *Nature* 391: 251, fig 5. Copyright © 1998) (b) The structure of T7 DNA polymerase bound to its substrates in the closed conformation. The O-helix is shown in purple and the rest of the protein structure is shown as transparent for clarity. The critical tyrosine, lysine, and arginine can be seen behind the O-helix in pink. The base and the deoxyribose of the incoming dNTP are shown in red, the primer is shown in light gray, and the template strand is shown in dark gray. The two catalytic metal ions are shown in green, and the phosphates are shown in yellow. (Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., and Ellenberger T. 1998. *Nature* 391: 251.) Image prepared with BobScript, MolScript, and Raster 3D.

Característiques de les DNA polimerases

- L'activitat polimerasa requereix dos cations divalents (normalment Mg^{2+} , encara que també poden ser Zn^{2+} o Mn^{2+}) com a cofactors.

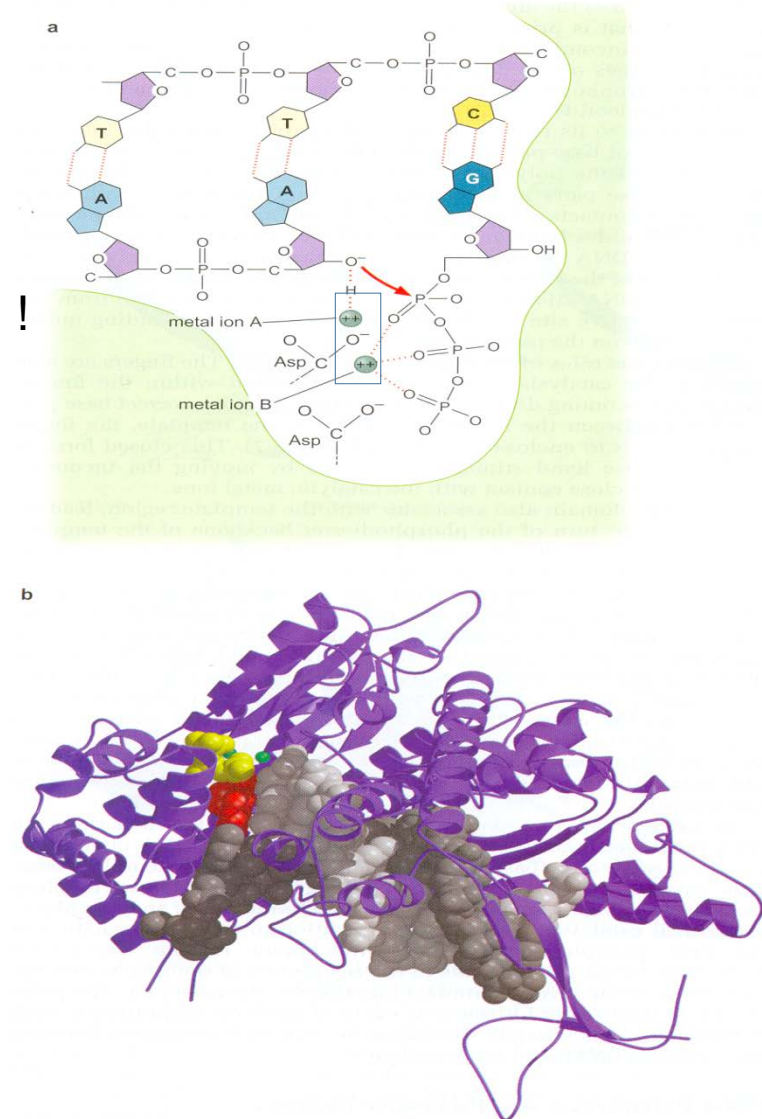
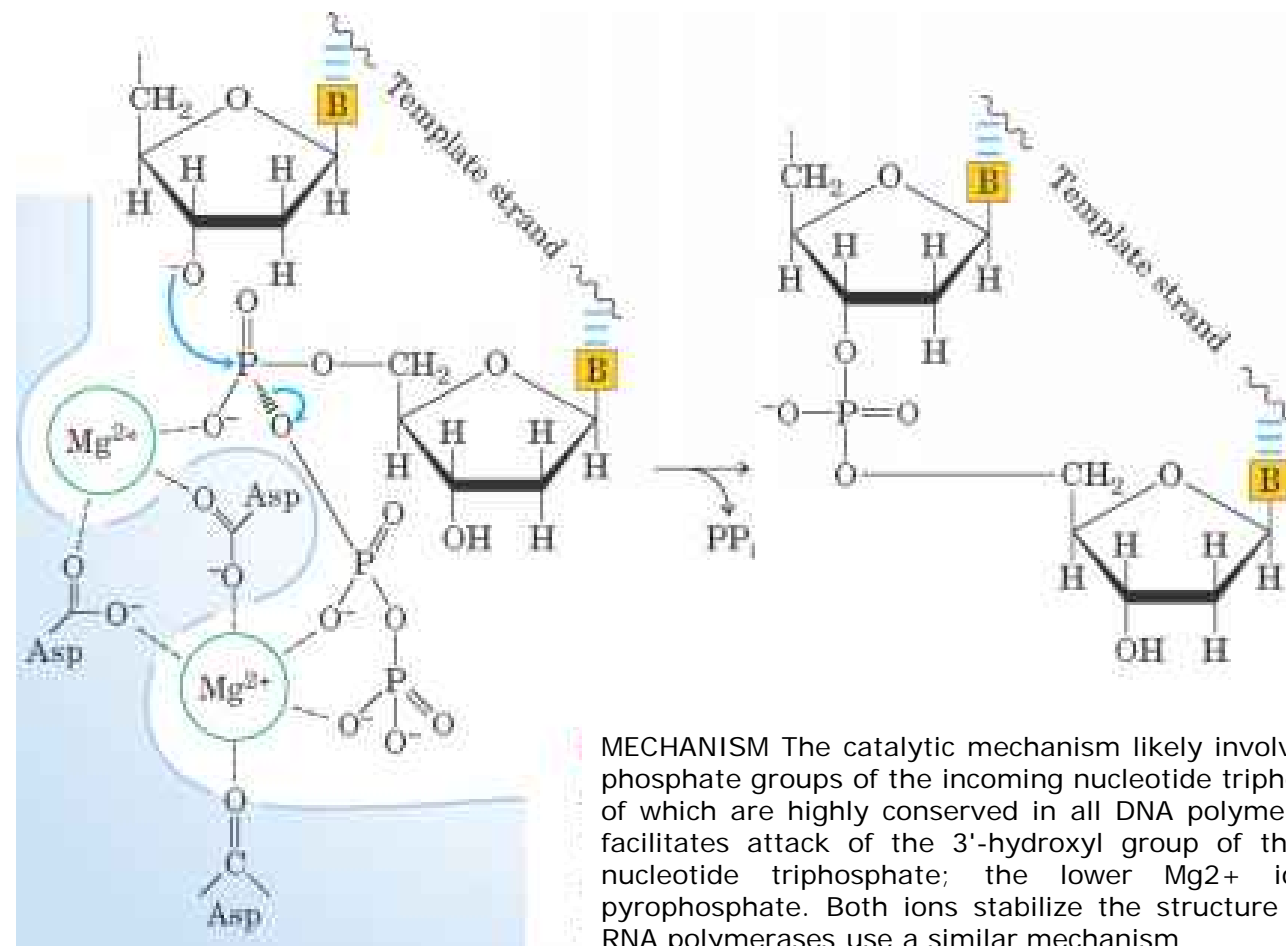


FIGURE 8-6 Two metal ions bound to DNA polymerase catalyze nucleotide addition.

(a) Illustration of the active site of a DNA polymerase. The two metal ions (shown in green) are held in place by interactions with two highly conserved Aspartate residues. Metal ion A primarily interacts with the 3'OH resulting in reduced association between the O and the H. This leaves a nucleophilic 3'O⁻. Metal ion B interacts with the triphosphates of the incoming dNTP to neutralize their negative charge. After catalysis, the pyrophosphate product is stabilized through similar interactions with metal ion B (not shown). (b) Three-dimensional structure of the active site metal ions associated with the T7 DNA polymerase, the 3'OH end of the primer and the incoming nucleotide. The metal ions are shown in green and the remaining elements are shown in the same colors as in Figure 8-5b. The view of the polymerase shown here is roughly equivalent to rotating the image shown in Figure 8-5b ~ 180° around the axis of the DNA helix. (Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., and Ellenberger T. 1998. *Nature* 391: 251.) Image prepared with BobScript, MolScript, and Raster 3D.

Característiques de les DNA polimerases

- L'activitat polimerasa requereix dos cations divalents (normalment Mg^{2+} , encara que també poden ser Zn^{2+} o Mn^{2+}) com a cofactors.

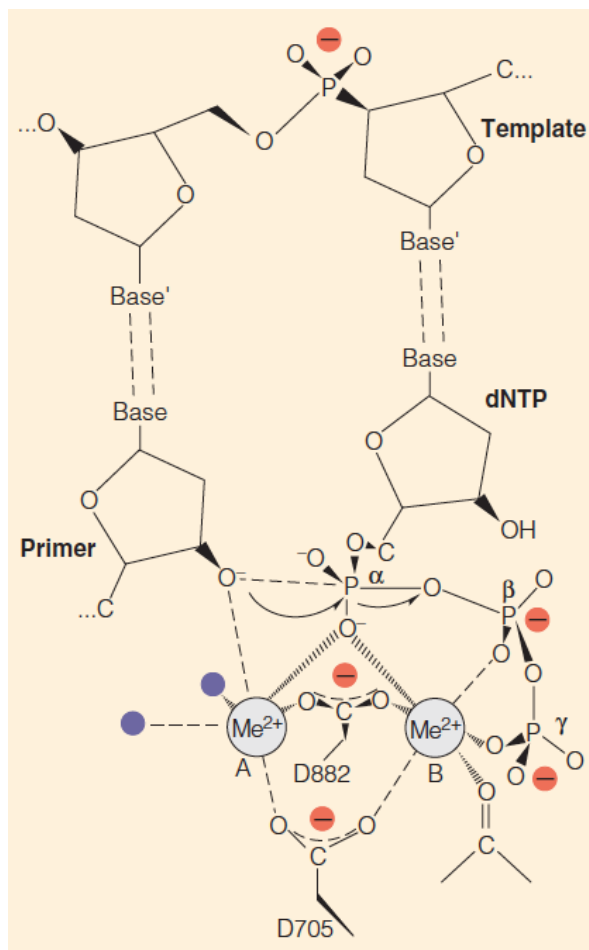


<https://quizlet.com/428620233/biochemistry-gmu-flash-cards/>

MECHANISM The catalytic mechanism likely involves two Mg^{2+} ions, coordinated to the phosphate groups of the incoming nucleotide triphosphate and to three Asp residues, two of which are highly conserved in all DNA polymerases. The top Mg^{2+} ion in the figure facilitates attack of the 3'-hydroxyl group of the primer on the α phosphate of the nucleotide triphosphate; the lower Mg^{2+} ion facilitates displacement of the pyrophosphate. Both ions stabilize the structure of the pentacovalent transition state. RNA polymerases use a similar mechanism

Característiques de les DNA polimerases

- L'activitat polimerasa requereix dos cations divalents (normalment Mg^{2+} , encara que també poden ser Zn^{2+} o Mn^{2+}) com a cofactors.



The two-metal mechanism of the DNA polymerase reaction:

- This mechanism was suggested originally from the structure of the T7 phage DNA polymerase–substrate complex.
- D705 and D882 are conserved aspartate residues, and the blue dots are water molecules bound to metal ion A.

α -CNP as nucleoside triphosphate mimics

Jan Balzarini, Kalyan Das, Jean A. Bernatchez, Sergio E. Martinez, Marianne Ngure, Sarah Keane, Alan Ford, Nuala Maguire, Niki Mullins, Jubi John, Youngju Kim, Wim Dehaen, Johan Vande Voorde, Sandra Liekens, Lieve Naesens, Matthias Götte, Anita R. Maguire, Eddy Arnold

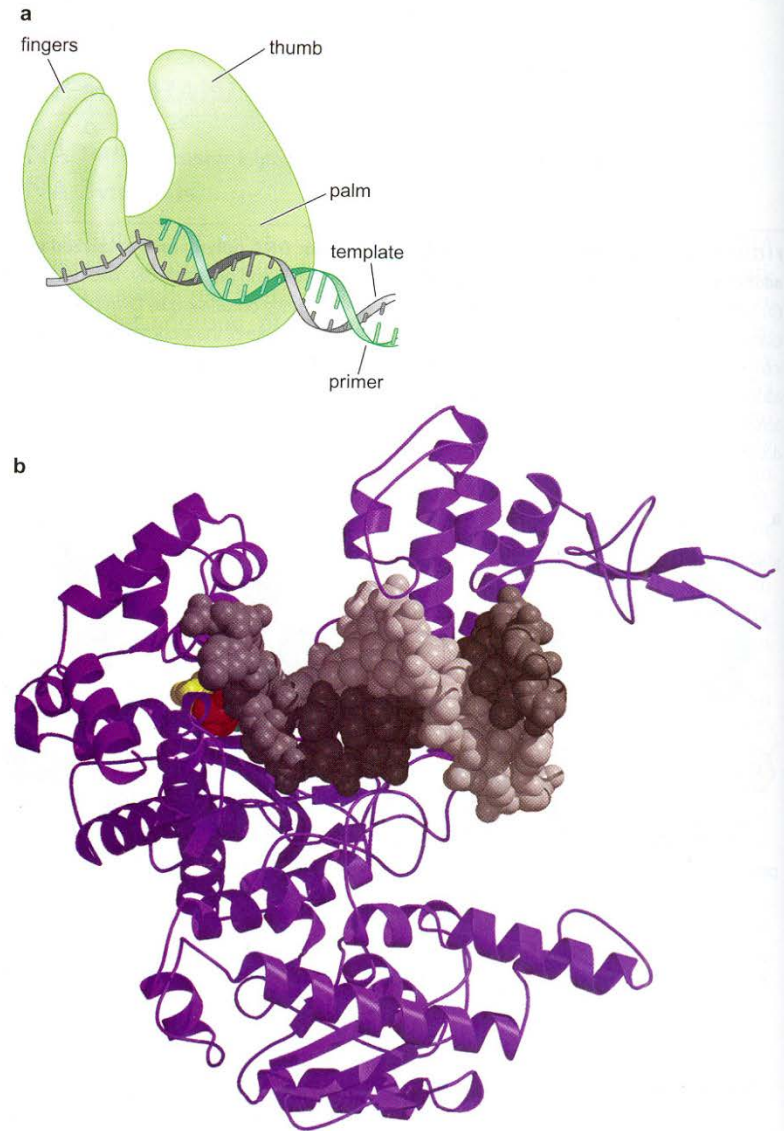
Proceedings of the National Academy of Sciences Mar

2015, 112 (11) 3475-3480; DOI: 10.1073/pnas.1420233112

Característiques de les DNA polimerases

FIGURE 8-5 The three-dimensional structure of DNA polymerase resembles a right hand.

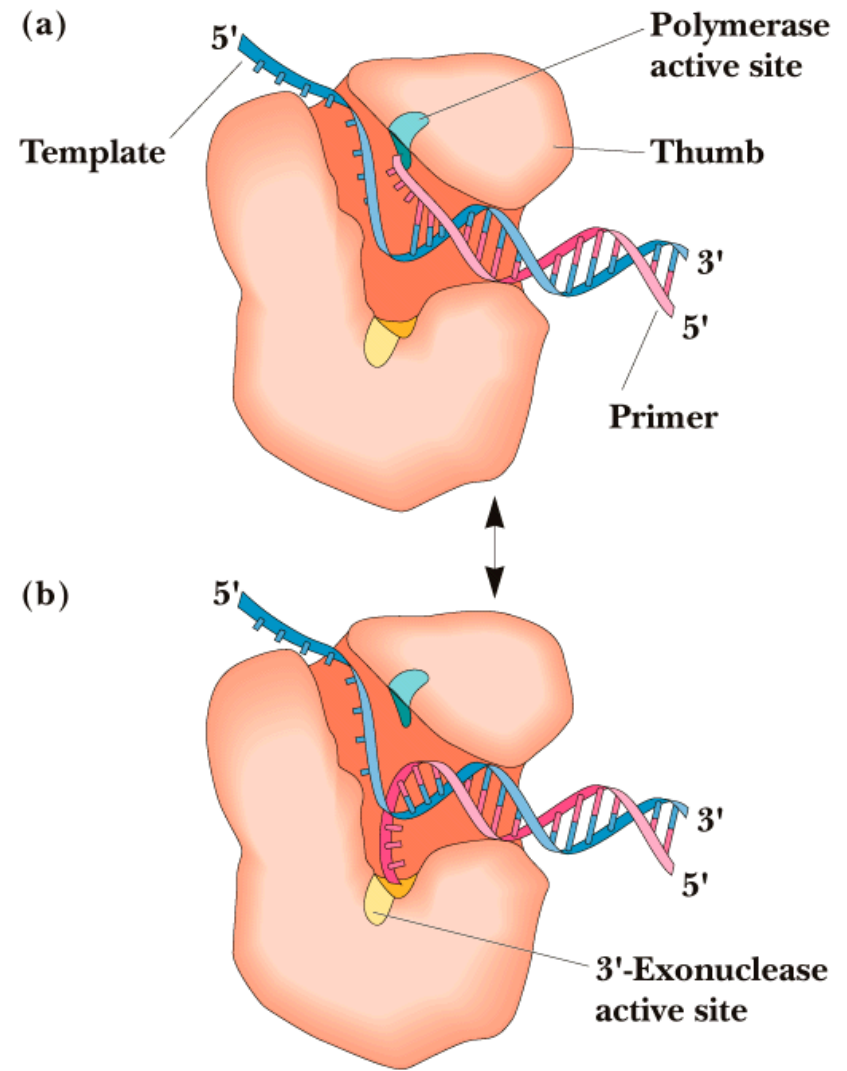
(a) Schematic of DNA polymerase bound to a primer:template junction. The fingers, thumb, and palm are noted. The recently synthesized DNA is associated with the palm and the site of DNA catalysis is located in the crevice between the fingers and the thumb. The single-stranded region of the template strand is bent sharply and does not pass between the thumb and the fingers. (b) A similar view of the T7 DNA polymerase bound to DNA. The DNA is shown in a space-filling manner and the protein is shown as a ribbon diagram. The fingers and the thumb are composed of α helices. The palm domain is obscured by the DNA. The incoming dNTP is shown in red (for the base and the deoxyribose) and yellow (for the triphosphate moiety). The template strand of the DNA is shown in dark gray and the primer strand is shown in light gray. (Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., and Ellenberger T. 1998. *Nature* 391: 251.) Image prepared with BobScript, MolScript, and Raster 3D.



- S'assemblen a una mà que agafa el motle, l'encebador i el nucleòtid entrant quan s'estableix un aparellament correcte

Característiques de les DNA polimerases

- S'assemblen a una mà que agafa el motle, l'encebador i el nucleòtid entrant quan s'estableix un aparellament correcte



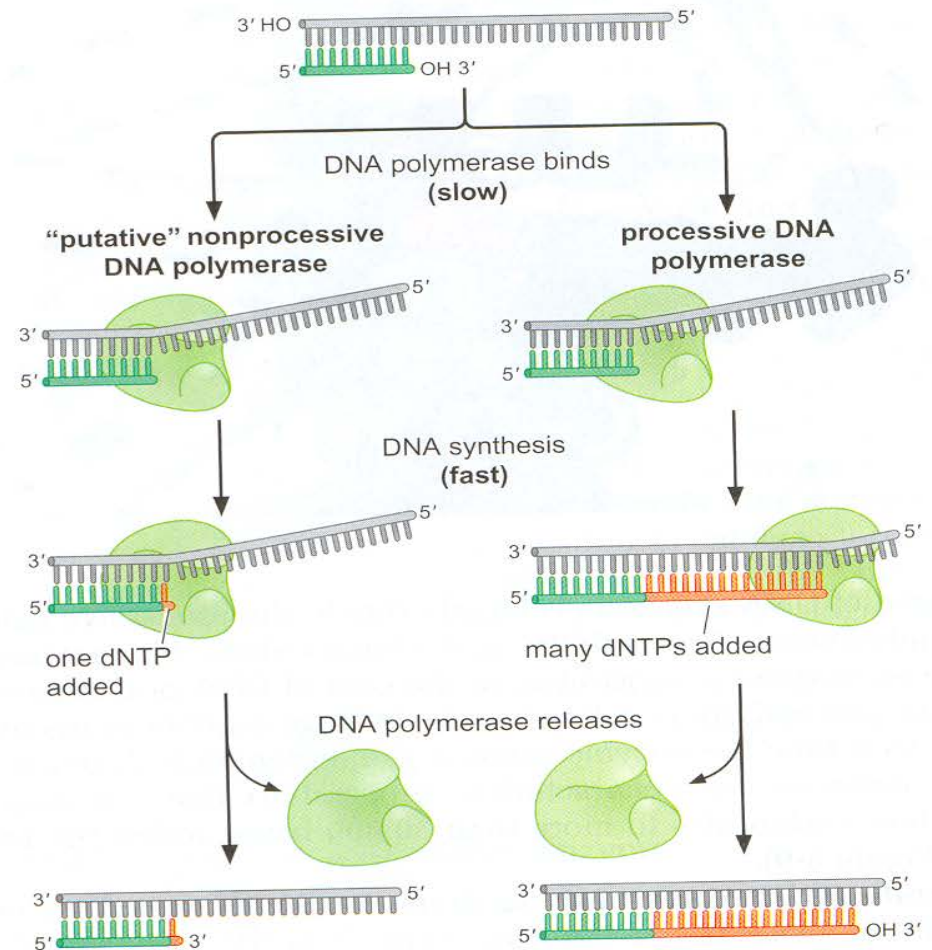
Características de les DNA polimerases

- Les DNA polimerases són enzims processius

FIGURE 8-9 DNA polymerases

synthesize DNA in a processive manner.

This illustration shows the difference between a processive and a nonprocessive DNA polymerase. Both DNA polymerases bind the primer:template junction. Upon binding, the nonprocessive enzyme adds a single dNTP to the 3' end of the primer and then is released from the new primer:template junction. In contrast, a processive DNA polymerase adds many dNTPs each time it binds to the template.



Característiques de les DNA polimerases

- Les abraçadores lliscants de les DNA polimerases contribueixen a la processivitat

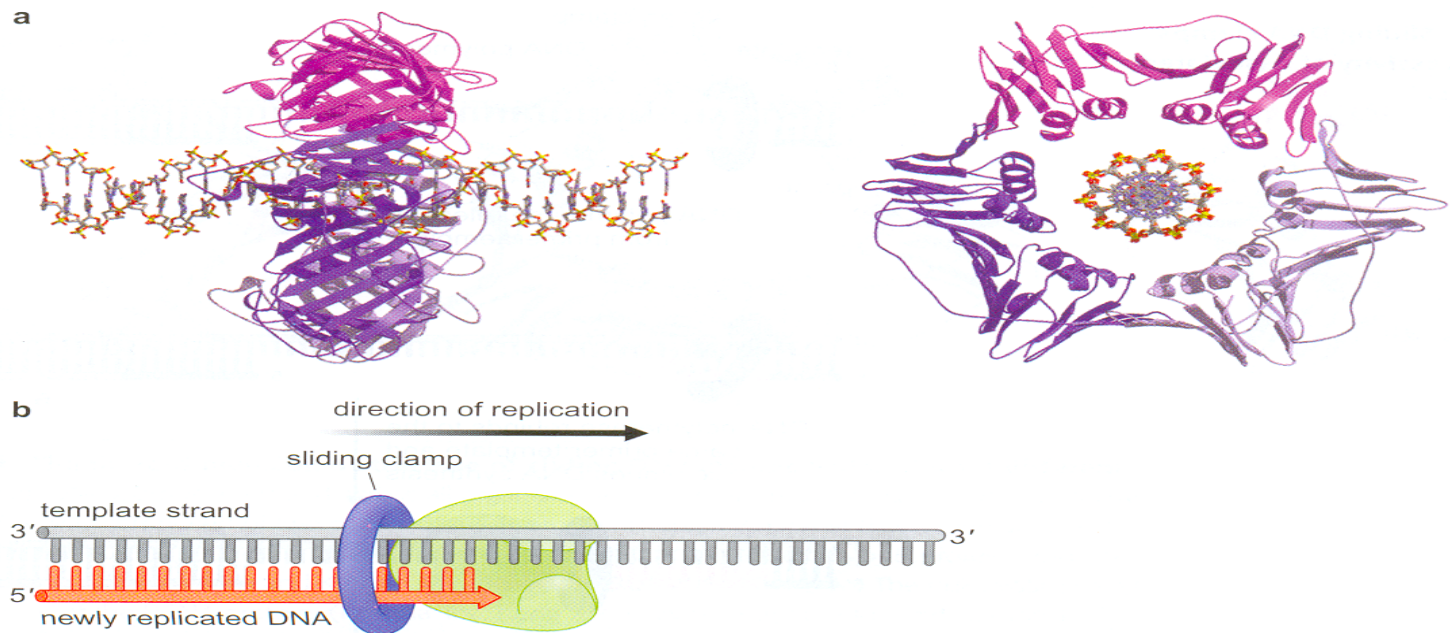
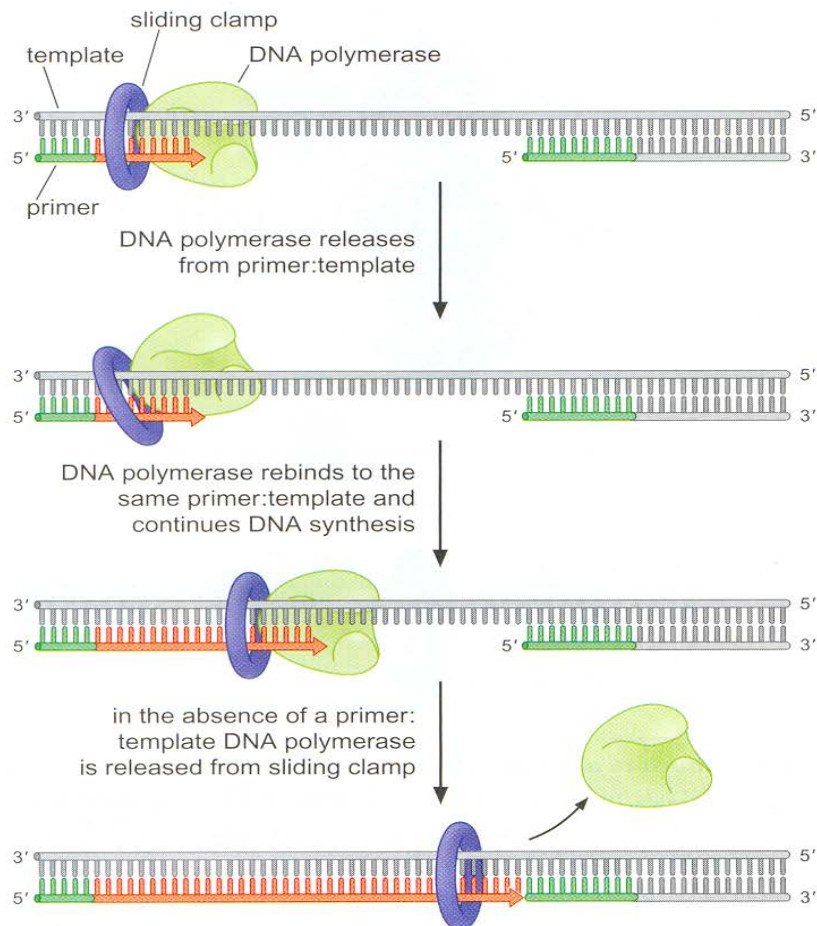


FIGURE 8-17 Structure of a sliding DNA clamp. (a) Three-dimensional structure of a sliding DNA clamp associated with DNA. The opening through the center of the sliding clamp is about 35 angstroms and the width of the DNA helix is approximately 20 angstroms. This provides enough space to allow a thin layer of one or two water molecules between the sliding clamp and the DNA. This is thought to allow the clamp to slide along the DNA easily. (Krishna T.S., Kong X.P., Gary S., Burgers, P.M., and Kuriyan J. 1994. *Cell* 79: 1233.) Image prepared with BobScript, MolScript, and Raster 3D. DNA modelled by Leemor Joshua-Tor. (b) Sliding DNA clamps encircle the newly replicated DNA produced by an associated DNA polymerase. The sliding clamp interacts with the part of the DNA polymerase that is closest to the newly synthesized DNA as it emerges from the DNA polymerase.

Característiques de les DNA polimerases

- Les abraçadores lliscants de les DNA polimerases contribueixen a la processivitat

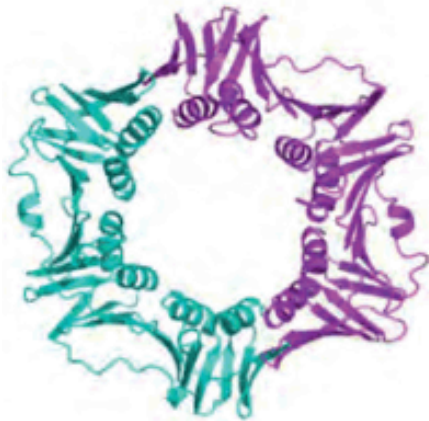
FIGURE 8-18 Sliding DNA clamps increase the processivity of associated DNA polymerases.



Característiques de les DNA polimerases

- Les abraçadores lliscants de les DNA polimerases contribueixen a la processivitat

E. coli
 β



Human
PCNA



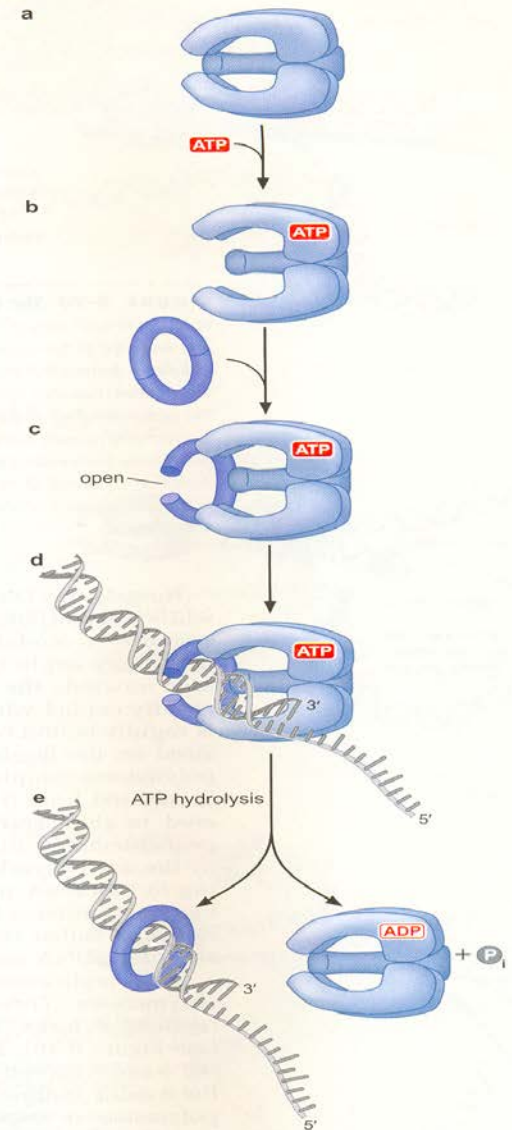
Bacteriophage RB69
gp45



Característiques de les DNA polimerases

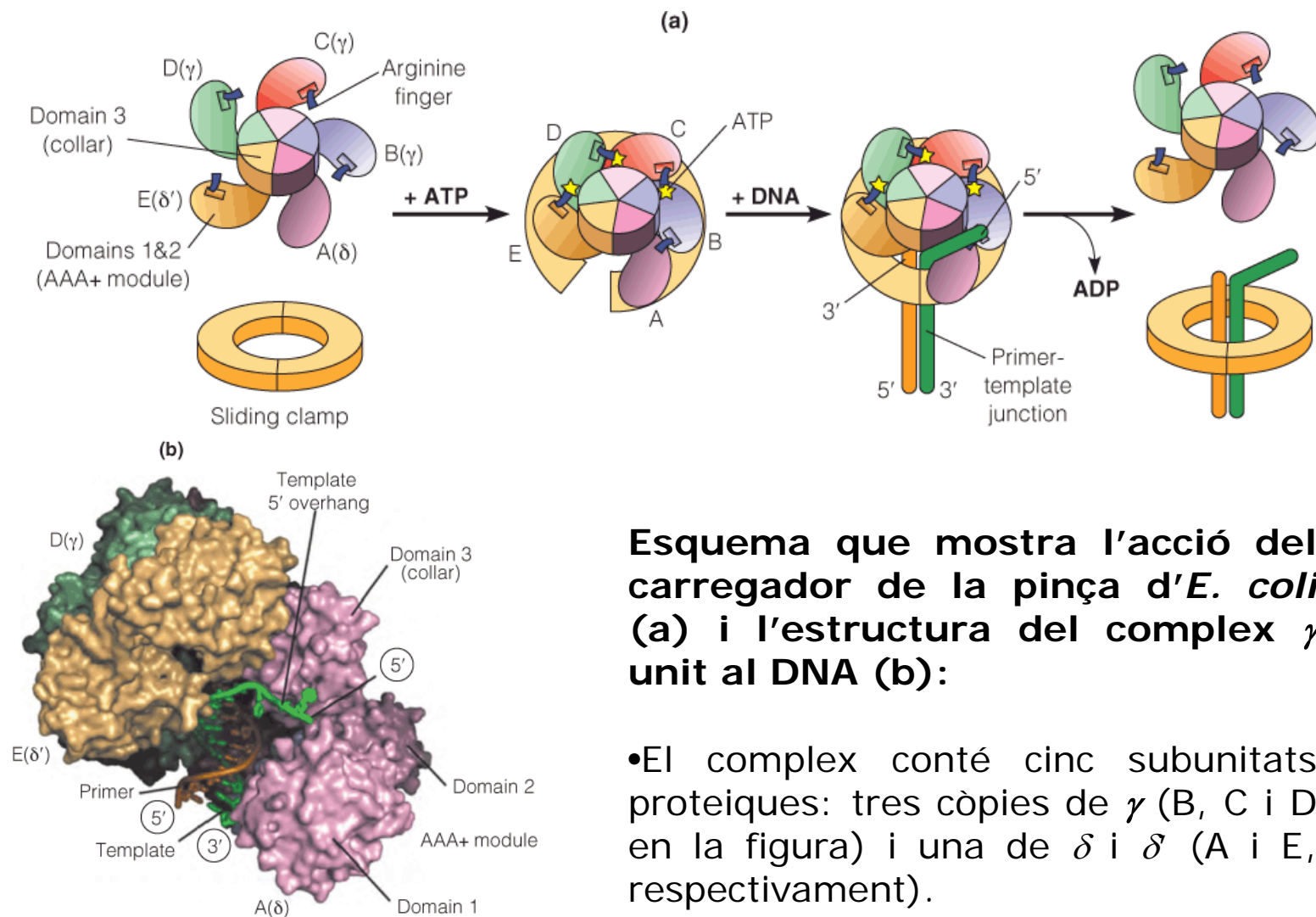
▪ Les abraçadores
lliscants de les DNA
polimerases
contribueixen a la
processivitat

BOX 8-2 FIGURE 1 ATP control of sliding DNA clamp loading. (a) Sliding clamp loaders are five subunit protein complexes whose activity is controlled by ATP binding and hydrolysis. In *E. coli* the clamp loader is called the γ -complex, and in eukaryotic cells it is called replication factor C (RF-C). (b) To catalyze the sliding clamp opening, the clamp loader must be bound to ATP. (c) Once bound to ATP, the clamp loader binds the clamp and opens the ring at one of the subunit:subunit interfaces. (d) The resulting complex can now bind to DNA. DNA binding is mediated by the clamp loader, which preferentially binds to primer: template junctions. Correct binding to the DNA has two consequences. First, the opened sliding clamp is positioned so that dsDNA is in what will be the "hole" of the clamp. Second, DNA binding stimulates ATP hydrolysis by the clamp loader. (e) Because only an ATP-bound clamp loader can bind to the clamp and to DNA, the ADP form of the clamp loader rapidly disassociates from the clamp and the DNA, leaving behind a closed clamp positioned around the dsDNA portion of the primer: template junction. (Source: Based on O'Donnell M. et al. 2001. Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Current Biology* 11: R942, fig 5. Copyright © 2001 with permission from Elsevier.)



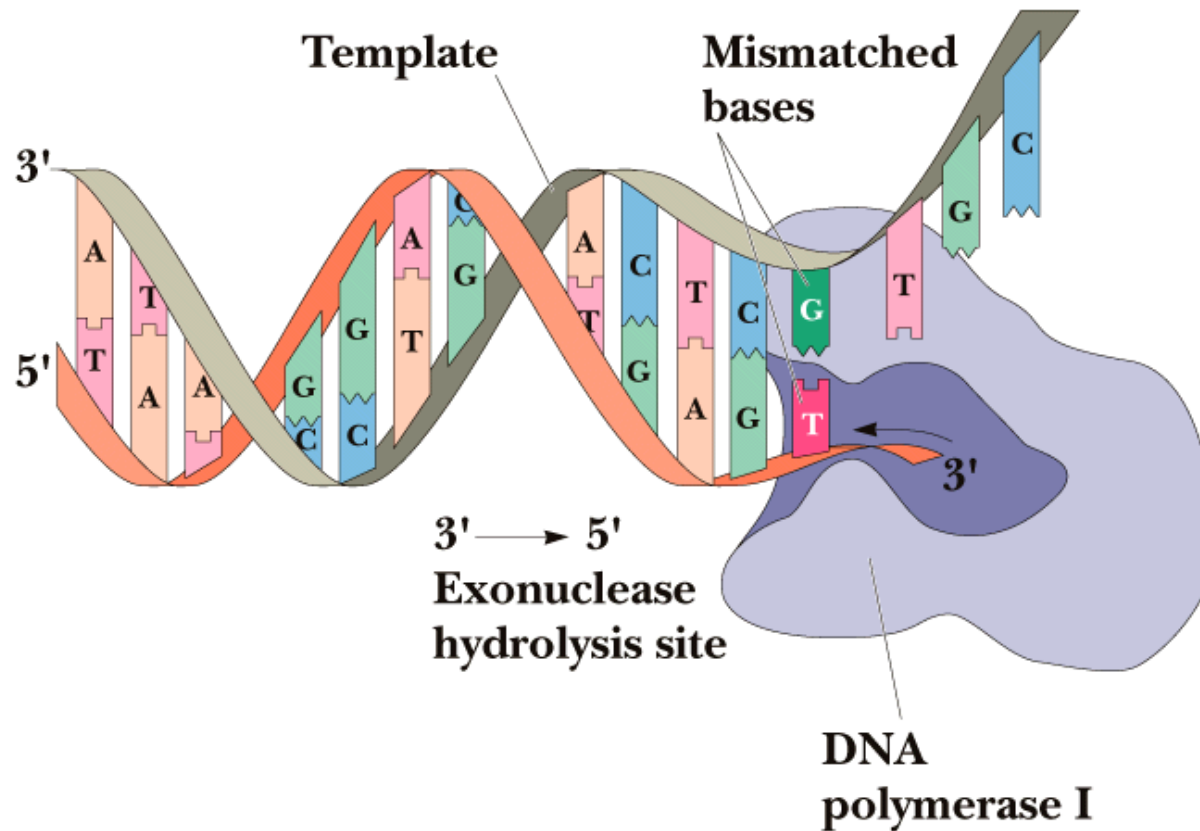
Característiques de les DNA polimerases

- Les abraçadores lliscants de les DNA polimerases contribueixen a la processivitat



Característiques de les DNA polimerases

- La majoria de les DNA polimerases presenten activitat exonucleasa 3'-5' que permet la correcció d'errors



Característiques de les DNA polimerases

- La majoria de les DNA polimerases presenten activitat exonucleasa 3'-5' que permet la correcció d'errors

DNA polymerases have a common structure

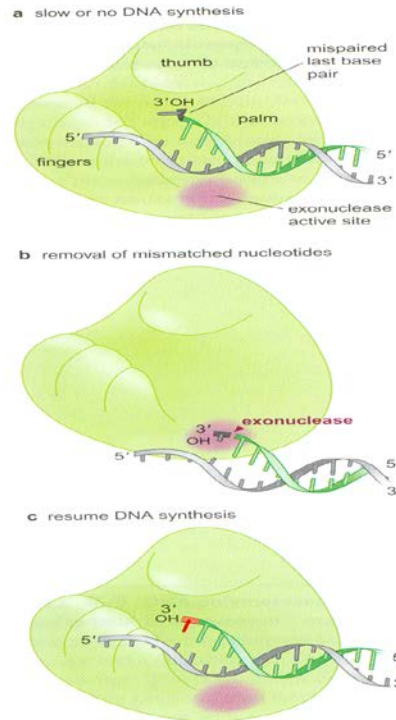
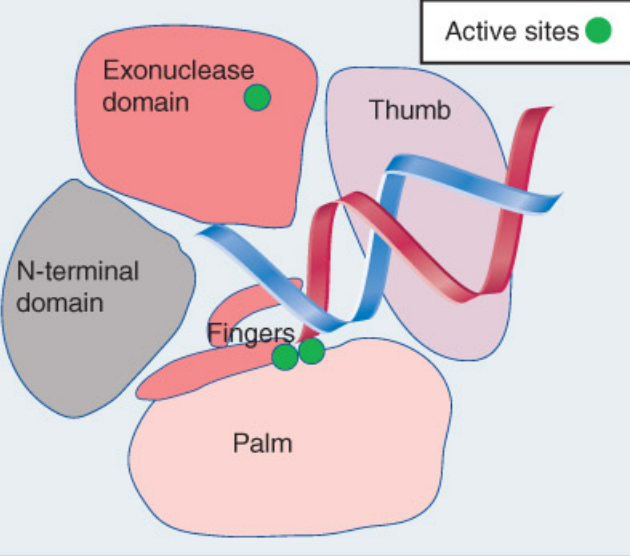
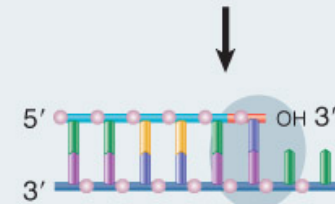
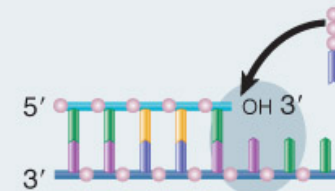


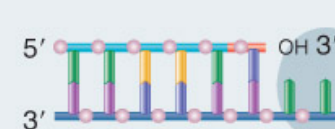
FIGURE 8-10 Proofreading exonucleases removes bases from the 3' end of mismatched DNA. (a) When an incorrect nucleotide is incorporated into the DNA by a polymerase, the rate of DNA synthesis is reduced and the affinity of the 3' end of the primer for the DNA polymerase active site is diminished. (b) When mismatched, the 3' end of the DNA has increased affinity for the proofreading exonuclease active site. Once bound at this active site, the mismatched nucleotide is removed. (c) Once the mismatched nucleotide is removed, the affinity of the properly base-paired DNA for the DNA polymerase active site is restored and DNA synthesis continues. (Source: Adapted from Baker T.A. and Bell S.P. 1998. Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell* 92: 296, fig. 1b. Copyright © 1998 with permission from Elsevier.)

DNA polymerases have exonuclease activity

Enzyme adds base to growing strand



Enzyme moves on if new base is correct

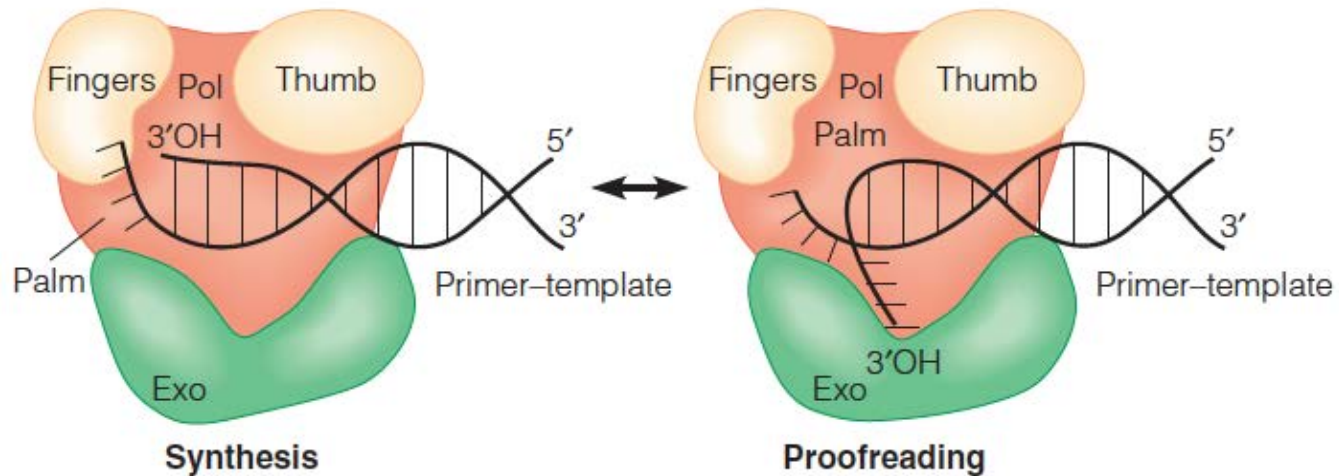


Base is hydrolyzed and expelled if incorrect



Característiques de les DNA polimerases

- La majoria de les DNA polimerases presenten activitat exonucleasa 3'-5' que permet la correcció d'errors



Base cinètica per a l'escissió preferencial de nucleòtids incorrectament aparellats per un lloc amb activitat exonucleasa distant del lloc polimerasa:

- El retard en l'extensió quan es produeix un desaparellament possibilita el desenvolupament del dúplex en l'extrem, la qual cosa permet situar el nucleòtid incorrecte en 3' en el lloc exonucleasa.

Característiques de les DNA polimerases

- La majoria de les DNA polimerases presenten activitat exonucleasa 3'-5' que permet la correcció d'errors

Activitat exonucleasa 3'-5'

Enzim

Taxa de error

Sense exo 3'-5'

Amb exo 3'-5'

DNA pol I <i>E. coli</i>	10 exp-5	5 x 10 exp-7
DNA pol III <i>E. coli</i>	7 exp-6	5 exp-9
DNA pol T4	5 exp-5	exp-7
DNA pol T7	exp-5	exp-6
Transcriptasa inv.	exp-5	no en té

DNA polimerases vs. RNA polimerases

	Reacción de la DNA polimerasa		Reacción de la RNA polimerasa
1	Requiere una estructura desenrollada.	=	Requiere también una estructura desenrollada.
2	La enzima toma instrucciones de una hebra de DNA (molde).	=	También necesita como molde una hebra de DNA. No sirve el RNA.
3	Las dos hebras del DNA actúan como molde para la síntesis del nuevo DNA, simultáneamente. Cada DNA dúplex formado conserva una de las hebras del DNA original.	≠	Las dos hebras del DNA pueden actuar como molde del RNA, pero no simultáneamente. Tras realizarse la copia de una sola hebra (la molde), se conserva íntegro el DNA de doble hebra.
4	Utiliza cuatro dNTPs como sustrato: dATP, dGTP, dTTP y dCTP.	≠	Utiliza cuatro NTPs como sustrato: ATP, GTP, UTP y CTP.
5	No es autoiniciadora. Para iniciar la síntesis requiere RNA como cebador, que se aparea por complementariedad de bases y antiparalelamente sobre el DNA molde.	≠	Sí es autoiniciadora, no requiere cebador. Se inicia en región promotora, con un NTP (generalmente ATP) apareado al molde. El NTP mantiene su tri-P-5' y su 3'-OH libre.
6	La síntesis comienza por el extremo 3'-OH del cebador. La enzima asociada al DNA molde hace que este 3'-OH libre ataque nucleofílicamente al α -P del primer dNTP, ya apareado. Se forma el 1 ^{er} enlace fosfodiéster, se rompe el fosfoanhídrido α - β y se libera PP _i . Su hidrólisis favorece la reacción de síntesis.	=	La síntesis comienza por el 3'-OH del 1 ^{er} NTP apareado. La enzima asociada al DNA molde hace que este 3'-OH ataque nucleofílicamente al α -P del 2 ^o NTP, ya apareado. Se forma el 1 ^{er} enlace fosfodiéster, se rompe el fosfoanhídrido α - β y se libera PP _i , cuya hidrólisis favorece la reacción de síntesis.
7	Requiere Mg ⁺² como cofactor enzimático para que la actividad sea óptima.	≈	Necesita un ion metálico divalente. Sirven Mn ⁺² y Mg ⁺² , pero este último actúa <i>in vivo</i> .
8	Se producen apareamientos definitivos A=T y C≡G entre la hebra de DNA nuevo y la de DNA molde.	≈	Se producen apareamientos temporales A=U y C≡G entre RNA y DNA molde.
9	Es reiterativa (elongación). Se repite la adición de dNMPs por ataques nucleofílicos del 3'-OH del DNA nuevo sobre el α -P-5' de cada dNTP apareado. La síntesis es en dirección 5'→3' de la nueva cadena de DNA, es decir, en dirección 3'→5' del DNA molde.	=	Ídem. El proceso se repite. La adición de NMPs es por ataques nucleofílicos del 3'-OH del RNA nuevo sobre el α -P en 5' de cada NTP apareado. Igualmente, la síntesis es en dirección 5'→3' del RNA naciente, es decir, en dirección 3'→5' del DNA molde.

DNA polymerases d'*Escherichia coli*

E. coli has five DNA polymerases

Enzyme	Gene	Function
I	<i>polA</i>	major repair enzyme RNA primer excision
II	<i>polB</i>	replication restart
III	<i>polC</i>	replicase
IV	<i>dinB</i>	translesion replication
V	<i>umuD'₂C</i>	translesion replication

DNA polimerases d'*Escherichia coli*

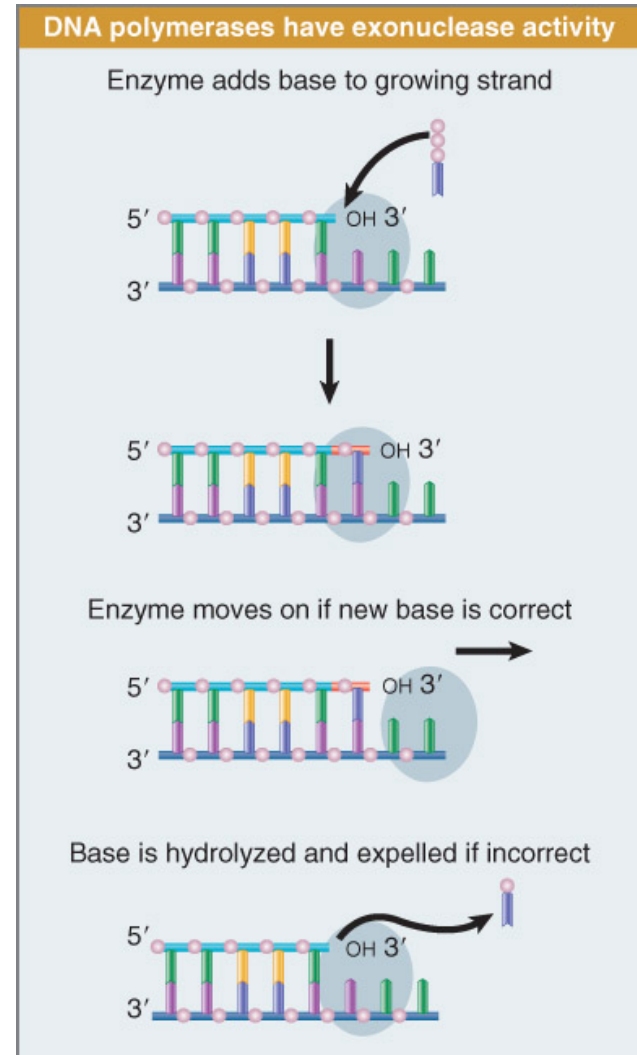
5 DNA polimerases:

DNA polimerasa I:

Activitats polimerasa 5'-3', exonucleasa 5'-3' i exonucleasa 3'-5' (les dues primeres determinen que actue en l'eliminació d'encebadors i en processos de reparació del DNA).

DNA polimerasa I d'*Escherichia coli*

Activitat exonucleasa 3'-5'
correctora d'errors



Característiques de les DNA polimerases

Activitat exonucleasa 3'-5'

Enzim

Taxa d'error

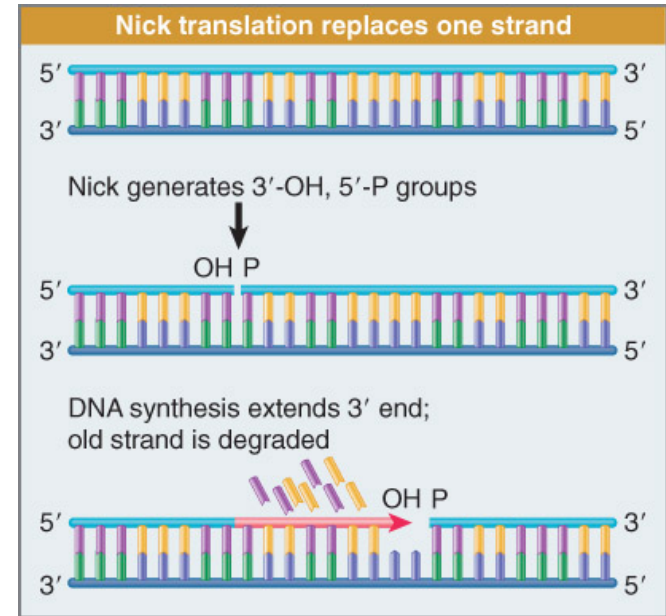
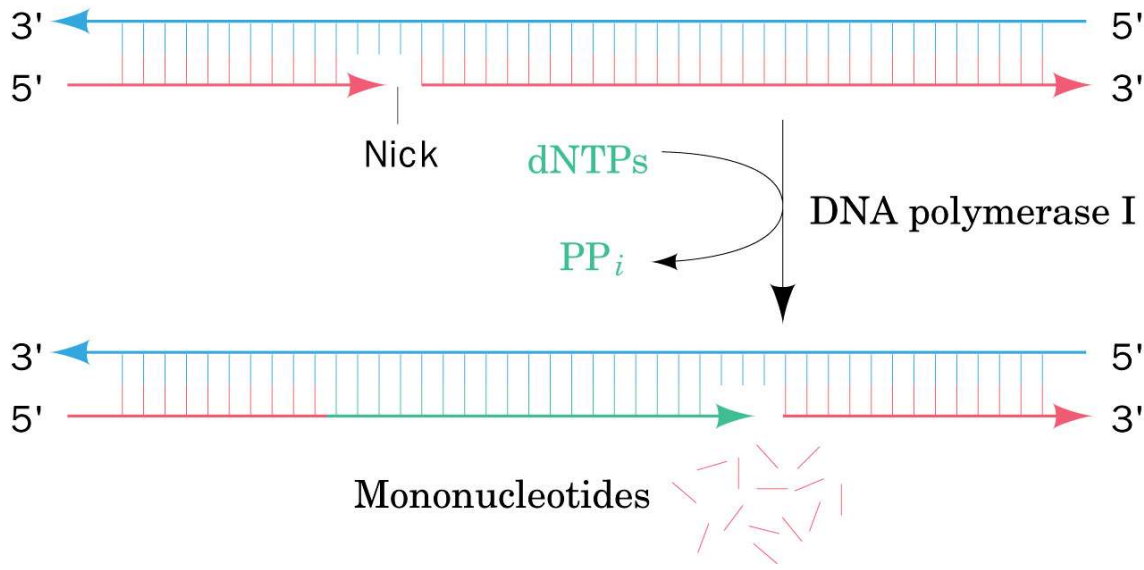
Sense exo 3'-5'

Amb exo 3'-5'

DNA pol I <i>E. coli</i>	10 exp-5	5 x 10 exp-7
DNA pol III <i>E. coli</i>	7 exp-6	5 exp-9
DNA pol T4	5 exp-5	exp-7
DNA pol T7	exp-5	exp-6
Transcriptasa inv.	exp-5	no en té

DNA polimerasa I d'*Escherichia coli*

Activitat exonucleasa 5'-3': desplaçament del tall



Estructura de la DNA polimerasa I d'*E. coli*

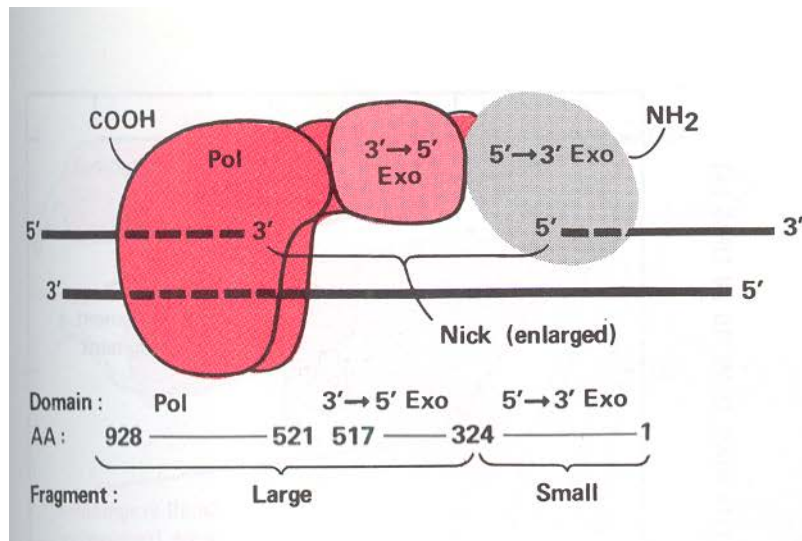


Figure 4-1

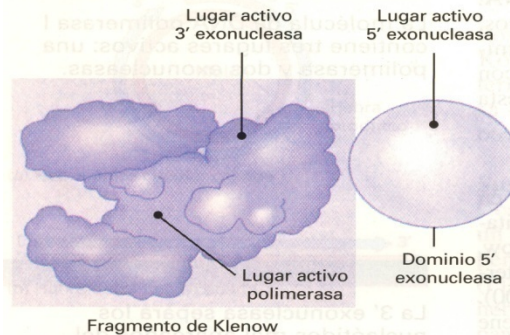
Proposed domain structure of pol I. The colored areas represent the experimentally determined large fragment structure; the shaded area indicates a possible location for the small fragment produced by proteolytic cleavage of pol I. The 5'→3' exonuclease domain interacts with the DNA 5' end downstream of the primer terminus. Me^{2+} = divalent metal cation; AA = amino acid residues; Exo = exonuclease. [Adapted from Joyce CM, Steitz TA (1987) *TIBS* 12:288]

Característiques de la DNA polimerasa I d'*E. coli*

Fragment Klenow:
 fragment carboxi terminal resultant del tractament de l'enzim amb tripsina.
 Activitats polimerasa i exonucleasa 3'-5'



(a) Fragmento de Klenow, configuración de revisión

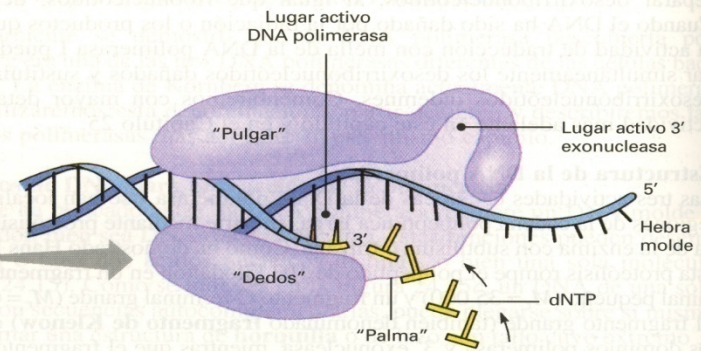


(b) DNA polimerasa I

FIGURA 24.16

Fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. (a) Representación del esqueleto de carbonos α de un fragmento de Klenow formando un complejo con el DNA, en una configuración de revisión. Esto es, el extremo 3' de la hebra en crecimiento (azul claro) está unido al lugar activo de la 3' exonucleasa de la enzima (amarillo). Las localizaciones de los lugares activos polimerasa y 3' exonucleasa se han identificado mediante mutagénesis de lugar dirigida. La hebra molde se muestra en verde, y el dCTP unido se indica en rojo. (b) Modelo de relleno espacial de la DNA polimerasa I completa. La estructura del dominio 5' exonucleasa no se ha determinado. (c) Vista esquemática del DNA unido al fragmento de Klenow, con el lugar activo polimerasa realizando la elongación de la cadena. La relación de la enzima con la hélice de DNA puede imaginarse como una mano que sujeta un cilindro.

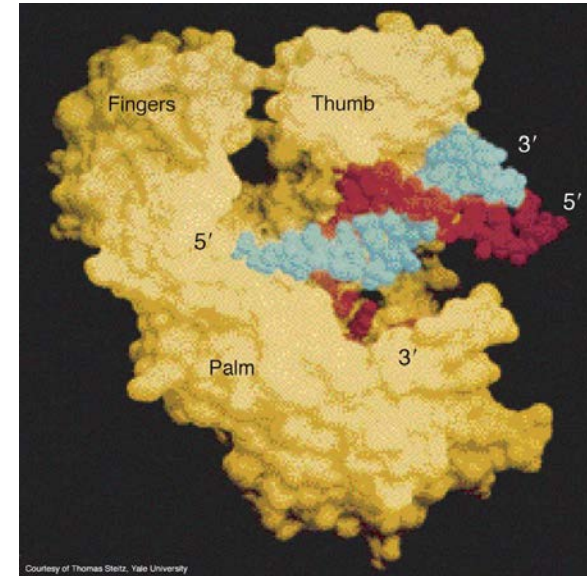
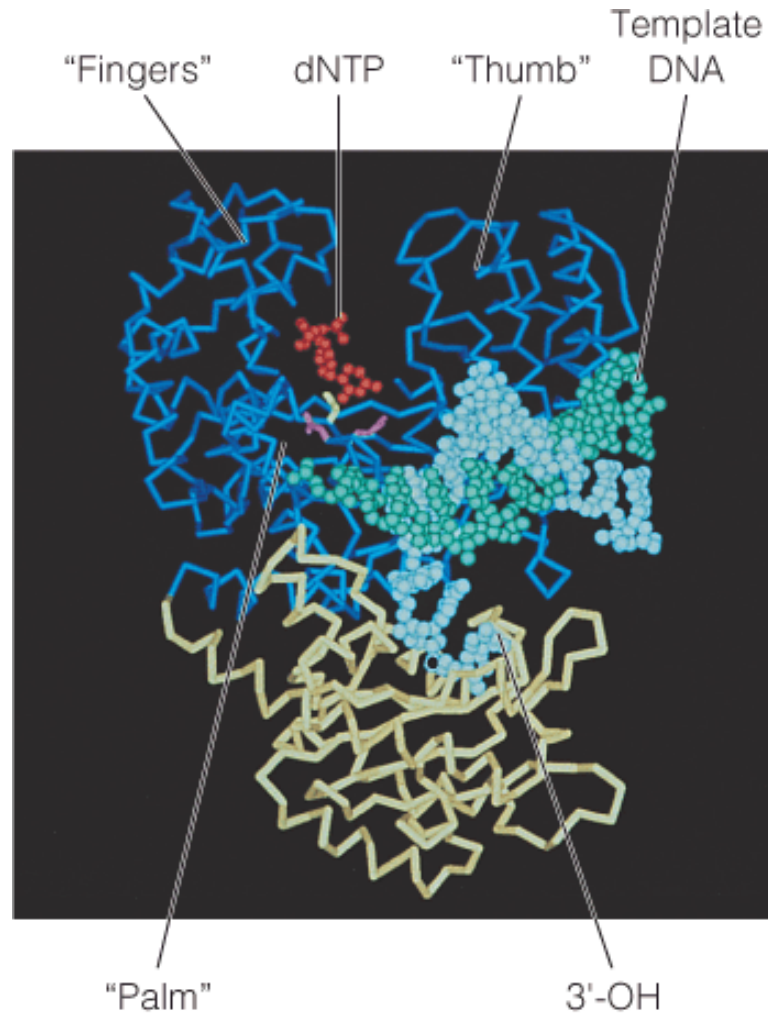
(a) Cortesía de L. Beese y cols., *Science* (1993) 260:352, (b, c) adaptado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2nd ed. (New York: W. H. Freeman, 1992), p. 139. © 1992 W. H. Freeman and Co. Utilizado con autorización.



(c) Fragmento de Klenow, elongación de la cadena

Característiques de la DNA polimerasa I de *E. coli*

Fragment Klenow:
 fragment carboxi terminal resultant del tractament de l'enzim amb tripsina.
 Activitats polimerasa i exonucleasa 3'-5'



DNA polimerases d'*Escherichia coli*

Polimerasa

Act. enzimàtiques

Primasa

Pol. 5'-3'

Exo 3'-5'

Exo 5'-3'

Funció

Síntesi en replicació

Unió frag. Okazaki

Vel. Pol. (nt/s)

Processivitat

Mr (kDa)

Nre. subunitats

I

No

Sí

Sí

Sí

No

Sí

16-20

baixa
3-200

103

1

II

No

Sí

Sí

No

No

No

2-7

intermèdia
> 10000

90

4 almenys

III

No

Sí

Sí

No

Sí

No

250-1000

molt alta
> 5 exp5

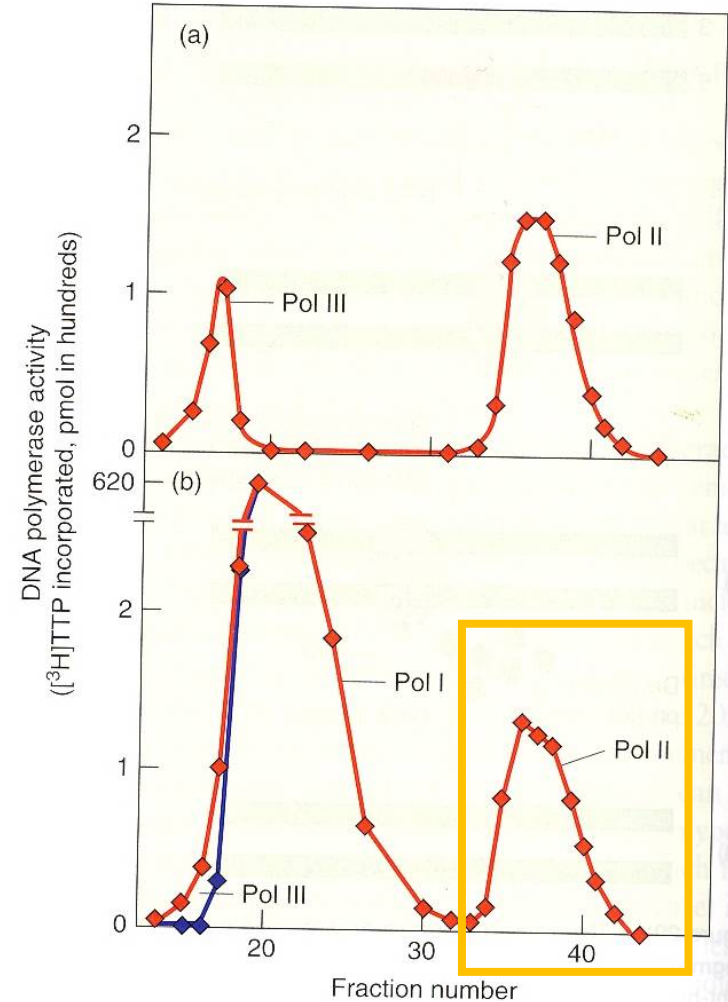
900

10 almenys

DNA polymerases d'*Escherichia coli*

Descobriment de les DNA polymerases II i III

Figure 20.18 Phosphocellulose chromatography of DNA polymerases from *polA1* and wild-type cells. Gefter and colleagues separated DNA polymerases from (a) *polA1* (lacking pol I) and (b) wild-type *E. coli* cells by phosphocellulose chromatography. Pol II is well separated from pol III (a) and from pol I (b), but pol III is hidden by pol I in wild-type cells (b). The existence of pol III can be detected in the presence of pol I by assaying the fractions in panel (b) in the presence of *N*-ethylmaleimide (blue line). This reagent inhibits pol III, but not pol I. Thus, the pol III activity is the difference between the red and blue lines in panel (b). (Source: Adapted from Gefter, M.L., Y. Hirota, T. Kornberg, J.A. Wechster, and C. Barnoux, Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for DNA Synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68(12):3150–53, December 1971.)



DNA polimerases d'*Escherichia coli*

5 DNA polimerases:

DNA polimerasa II:

Activitats polimerasa 5'-3' i exonucleasa 3'-5'

Paper en reinici de replicació en cèl·lules tractades amb llum UV

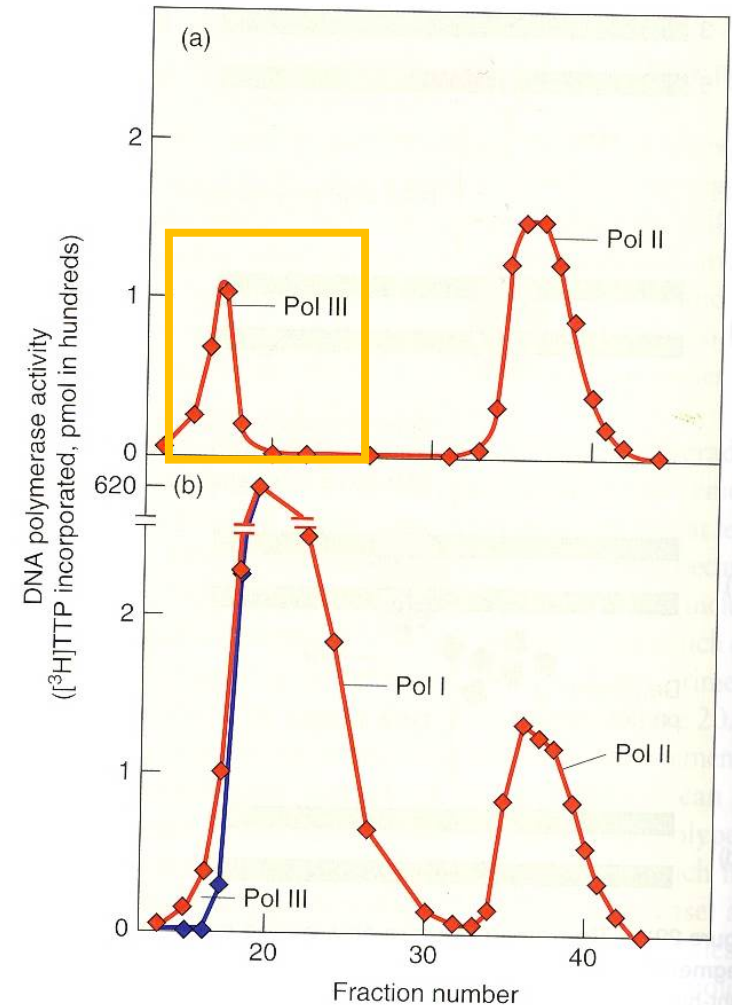
DNA polimerases d'*Escherichia coli*

Polimerasa	I	II	III
Act. Enzimàtiques			
Primasa	No	No	No
Pol. 5'-3'	Sí	Sí	Sí
Exo 3'-5'	Sí	Sí	Sí
Exo 5'-3'	Sí	No	No
Funció			
Síntesi en replicació	No	No	Sí
Unió frag. Okazaki	Sí	No	No
Vel. Pol. (nt/s)	16-20	2-7	250-1000
Processivitat	baixa 3-200	intermèdia > 10000	molt alta > 5 exp5
Mr (kDa)	103	90	900
Nre. subunitats	1	4 almenys	10 almenys

DNA polymerases d'*Escherichia coli*

Descobriment de les DNA polymerases II i III

Figure 20.18 Phosphocellulose chromatography of DNA polymerases from *polA1* and wild-type cells. Gefter and colleagues separated DNA polymerases from (a) *polA1* (lacking pol I) and (b) wild-type *E. coli* cells by phosphocellulose chromatography. Pol II is well separated from pol III (a) and from pol I (b), but pol III is hidden by pol I in wild-type cells (b). The existence of pol III can be detected in the presence of pol I by assaying the fractions in panel (b) in the presence of *N*-ethylmaleimide (blue line). This reagent inhibits pol III, but not pol I. Thus, the pol III activity is the difference between the red and blue lines in panel (b). (Source: Adapted from Gefter, M.L., Y. Hirota, T. Kornberg, J.A. Wechster, and C. Barnoux, Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for DNA Synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68(12):3150–53, December 1971.)



DNA polimerases d'*Escherichia coli*

5 DNA polimerases:

DNA polimerasa III:

Activitats polimerasa 5'-3' i exonucleasa 3'-5'

És la replicasa

És la més ràpida i processiva

Actua en forma de trímer asimètric constituït per alguns tipus de subunitats amb diverses funcions

DNA polimerases d'*Escherichia coli*

Polimerasa	I	II	III
Act. enzimàtiques			
Primasa	No	No	No
Pol. 5'-3'	Sí	Sí	Sí
Exo 3'-5'	Sí	Sí	Sí
Exo 5'-3'	Sí	No	No
Funció			
Síntesi en replicació	No	No	Sí
Unió frag. Okazaki	Sí	No	No
Vel. pol. (nt/s)	16-20	2-7	250-1000
Processivitat	baixa 3-200	intermèdia >10000	molt alta > 5 exp5
Mr (kDa)	103	90	900
Nre. subunitats	1	4 almenys	10 almenys

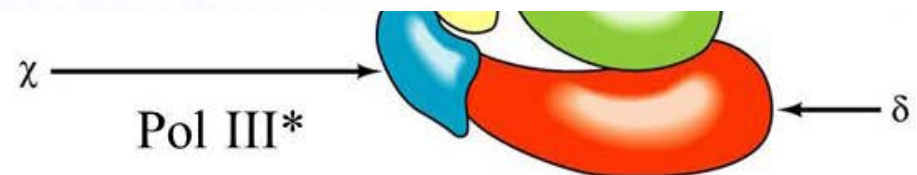
DNA polimerasa III d'*Escherichia coli*

Subunit Function

Subassemblies

Table 1. *The subunits of DNA polymerase III holoenzyme*

Subunit	Mass (kda)	Functions	Subassembly
α	130	DNA polymerase	} polIII core } polIII'
ϵ	27	Proofreading 3'-5' exonuclease	
θ	10	Unknown	
τ	71	Dimerizes core, DNA-dependent ATPase	
γ	47	Binds ATP	} γ complex
δ	35	Interacts with γ to transfer β to DNA	
δ'	33	DNA-dependent ATPase with γ	
χ	15	Unknown	
ψ	12	Unknown	
β	40	Sliding clamp on DNA. binds core	



DNA polimerasa III d'*Escherichia coli*

Subunit	Mass (kD)	Structural Gene
α^a	130	<i>polC (dnaE)</i>
ε^a	27.5	<i>dnaQ</i>
θ^a	10	<i>holE</i>
τ^b	71	<i>dnaX^c</i>
γ^b	45.5	<i>dnaX^c</i>
δ^b	35	<i>holA</i>
δ'^b	33	<i>holB</i>
χ^b	15	<i>holC</i>
ψ^b	12	<i>holD</i>
β	40.6	<i>dnaN</i>

^aComponents of the Pol III core.

^bComponents of the γ complex.

^cThe γ and τ subunits are encoded by the same gene sequence; the γ subunit comprises the N-terminal end of the τ subunit.

Sources: Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), p. 169, Freeman (1992); and Baker, T.A. and Wickner, S.H., *Annu. Rev. Genet.* **26**, 450 (1992).

DNA polimerasa III d'*Escherichia coli*

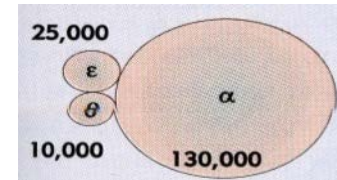
Subunitats principals i subensamblatges de la DNApol III d'*E. coli*

Pol III "core":

α (dnaE, 130 KDa)
 ϵ (dnaQ, 27,5 KDa)
 θ (10 KDa)

Processivitat

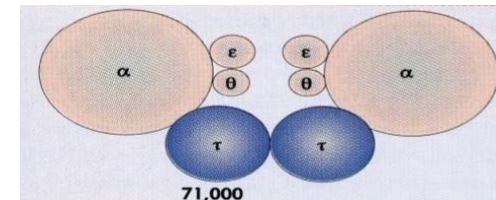
10



Pol III*:

Pol III core + τ (dnaX, 71 KDa)

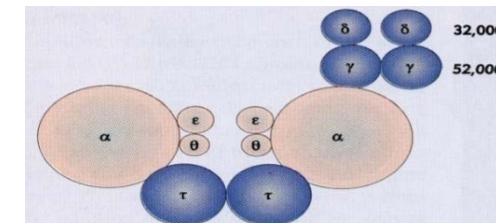
60



Pol III':

Pol III* + complex γ :
 γ (47.5 KDa), δ (35 KDa), δ' (33 KDa),
 χ (15 KDa), ψ (12 KDa)

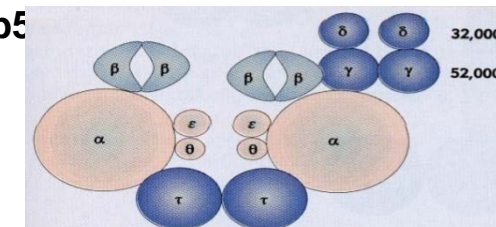
200



Pol III holoenzim

Pol III' + β (dnaN, 40,6 KDa)

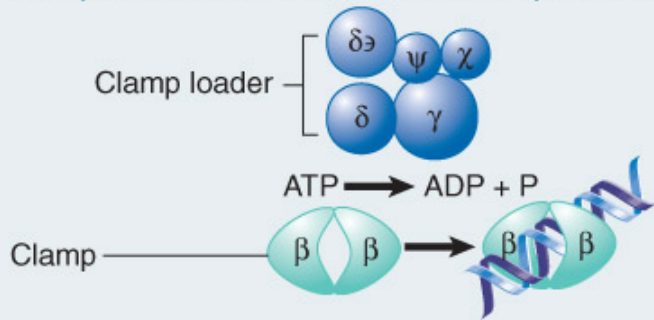
> 10 exp5



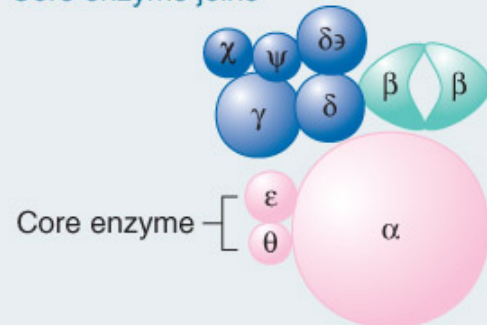
La forma activa de l'enzim en replicació té en realitat 3 nuclis

A dimer synthesizes lagging and leading strands

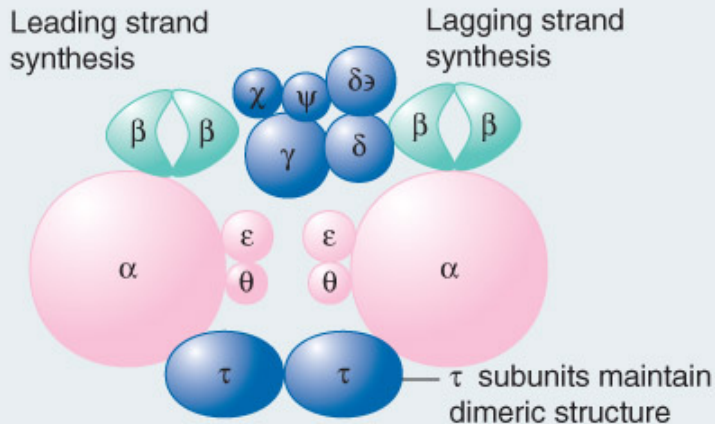
Clamp loader cleaves ATP to load clamp on DNA



Core enzyme joins

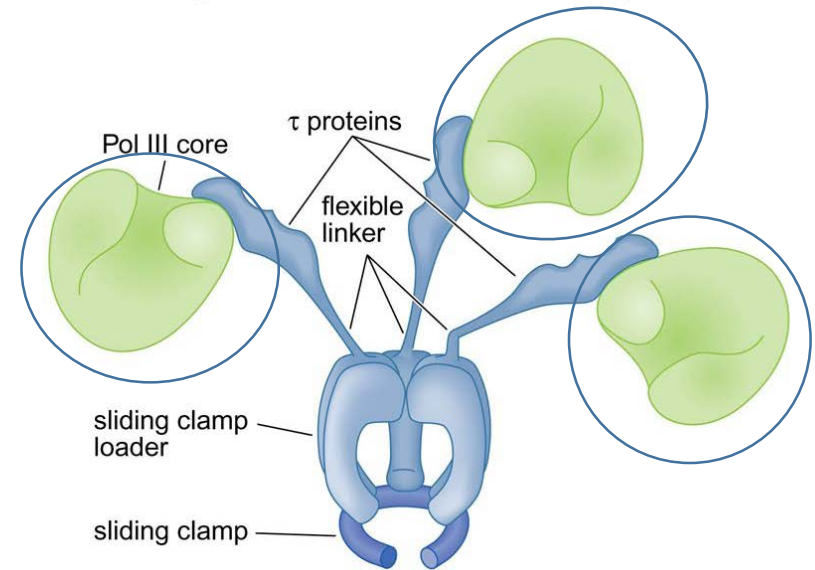


tau + second core joins to give a symmetric dimer



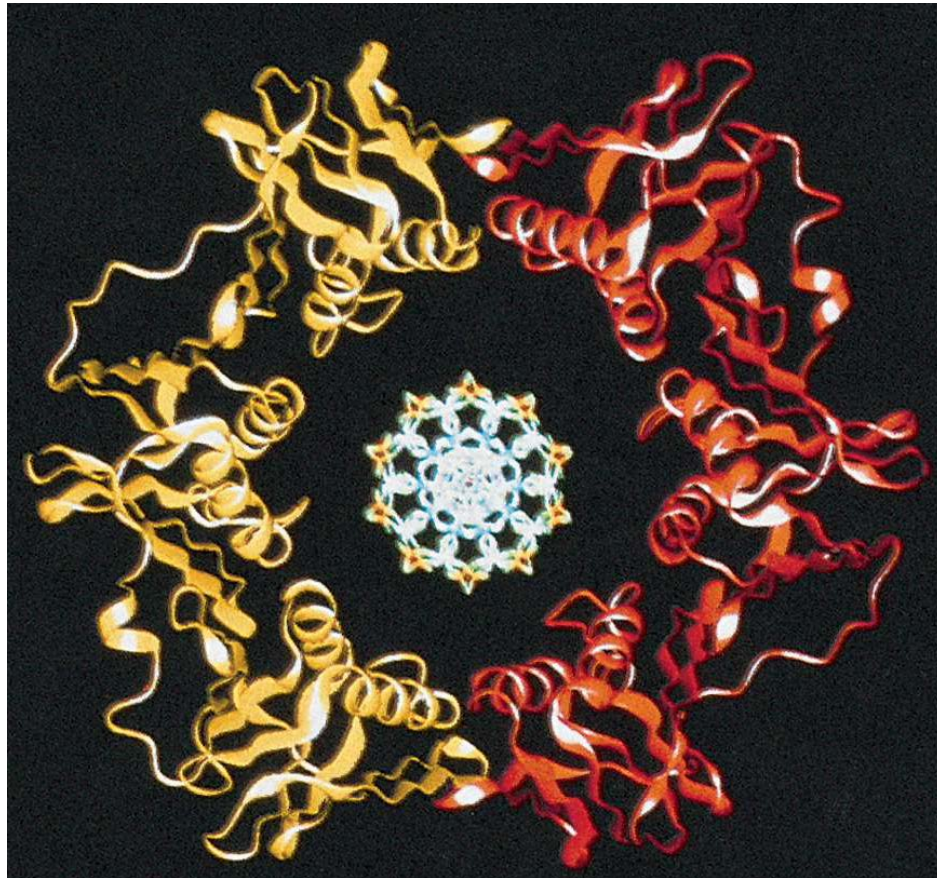
**DNA polimerasa III
d'*Escherichia coli***

Composition of DNA Pol III holoenzyme

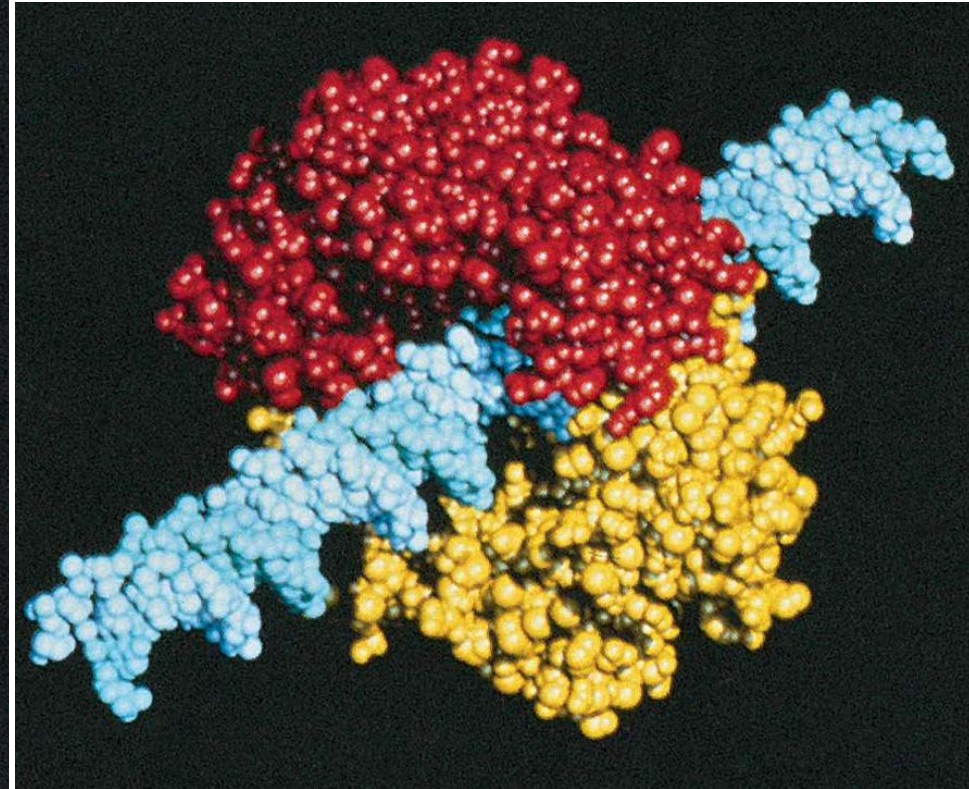


3 nuclis

DNA polimerasa III d'*Escherichia coli*



Estructura de raigs X de la subunitat β de l'holoenzím Pol III d'*E. coli*.



Model de l'abraçadora lliscant en una imatge hipotètica amb DNA B.

DNA polimerasa III d'*Escherichia coli*

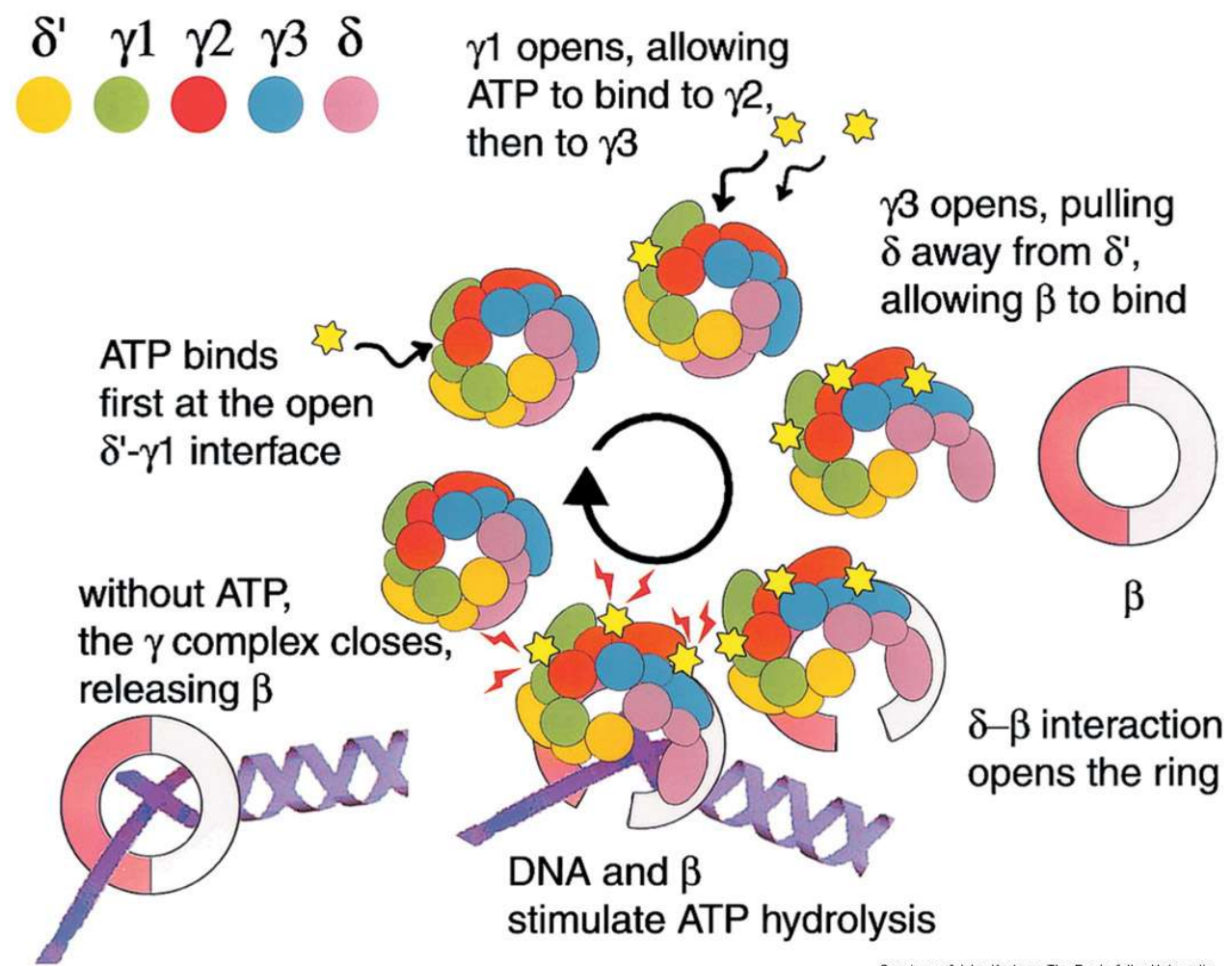


Diagrama esquemàtic especulatiu del cicle de càrrega de la pinça.

Courtesy of John Kuriyan, The Rockefeller University

DNA polymerases d'*Escherichia coli*

	Pol I	Pol II	Pol III
Mass (kD)	103	90	130
Molecules/cell	400	?	10–20
Turnover number ^a	600	30	9000
Structural gene	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i>
Conditionally lethal mutant	+	–	+
Polymerization: 5' → 3'	+	+	+
Exonuclease: 3' → 5'	+	+	+
Exonuclease: 5' → 3'	+	–	–

~100



^aNucleotides polymerized $\text{min}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$ at 37°C.

Source: Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), p. 167, Freeman (1992).

DNA polymerases d'*Escherichia coli*

Table 5-1
Properties of polymerases I, II, and III of *E. coli*

	pol I ^a	pol II ^a	pol III ^a (core)	
Functions				
Polymerization: 5'→3'	+	+	+	
Exonuclease: 3'→5'	+	+	+	
Exonuclease: 5'→3'	+	—	—	
Pyrophosphorolysis and PP _i exchange	+		+	
Template primer				
Intact duplex	—	—	—	
Primed single strands, ^b	+	—	—	
stimulation by SSB	—	+	—	
Nicked duplex [poly d(AT)]	+	—	—	
Duplex with gaps or protruding single-strand				
5'ends of : < 100 nucleotides	+	+	+	
> 100 nucleotides	+	—	—	
Polymer synthesis de novo	+	—	—	
Activity				
Effect of KCl (percent of optimal activity)	20 mM	60	60	100
	50 mM	80	100	50
	100 mM	100	70	10
	150 mM	80	50	0
K _m for dNTPs	low	low	high	
Stimulation by β subunit	—	+	+	
Inhibition by 2'-deoxy analogs	—	+	+	
Inhibition by arabinosyl CTP	—	+	—	
Inhibition by sulfhydryl (—SH)-blocking agents	—	+	+	
Inhibition by pol I antiserum	+	—	—	
General				
Size (kDa)	103	90	130, 27.5, 10 ^d	
Affinity to phosphocellulose:				
molarity of phosphate required for elution	0.15	0.25	0.10	
Molecules/cell, estimated	400		10–20	
Turnover number, ^e estimated	600	30	9000	
Structural genes	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i> ^g	
Conditional lethal mutant	yes	no	yes	

^a + and — represent the presence and absence, respectively, of the property listed.

^b A primed single strand is a long single strand with a short length of complementary strand annealed to it. SSB = single-strand binding protein.

^c Nucleotides polymerized at 37°/min/molecule of enzyme.

^d Sizes of the α, ε, and θ subunits.

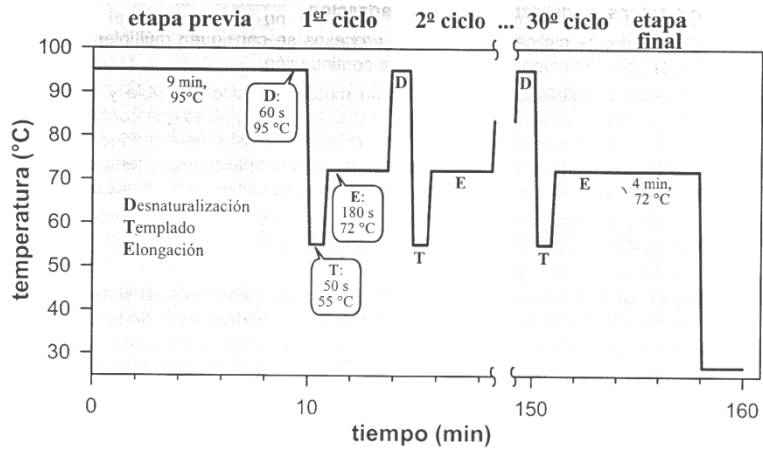
^e Also known as *dnaE*, the gene for the large (α) subunit.

DNA polimerases d'altres bacteris

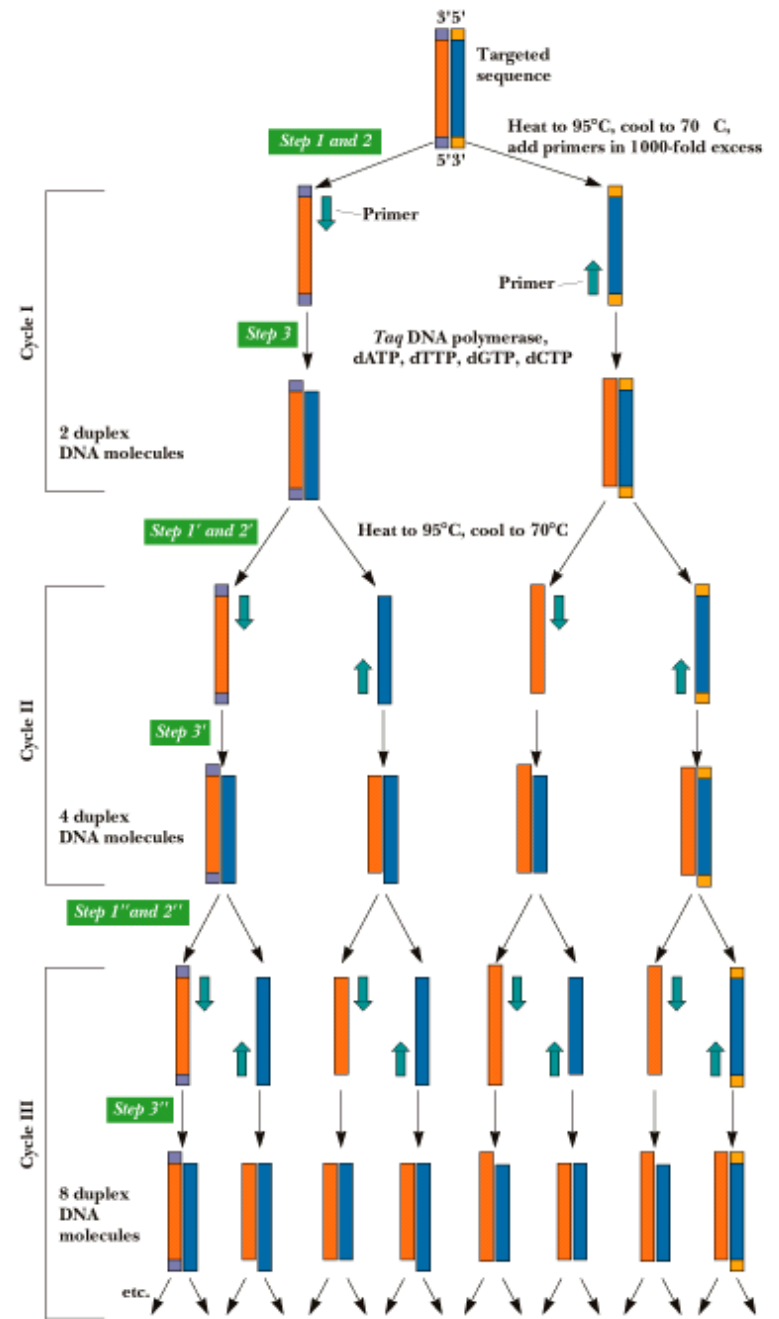
- Les de *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* i *Micrococcus luteus* són ben conegudes i s'assemblen a la DNA polimerasa I d'*Escherichia coli*.
- La de *Sulfolobus acidocaldarius* és termoestable: temperatura òptima de 70°C, però encara és estable a 80°C i pot sintetitzar cadenes de fins a 150 nucleòtids a 100°C. No presenta activitat exonucleasa 3'-5'.
- En *Thermus aquaticus* s'ha identificat la polimerasa Taq, també termoestable i enzim clau per a PCR. Té només 9 KDa. La seua vida mitjana és de 45 minuts a 95°C i és capaç d'incorporar aproximadament 100 nucleòtids per segon a 70°C. No presenta activitat exonucleasa 3'-5' però sí 5'-3'. Mostra homologia amb la DNA polimerasa I d'*E. coli* en l'extrem N-terminal i en la regió d'unió al DNA.

DNA polimerasa Taq: PCR

Esquema temporal de una reacció de PCR
(las temperaturas y, especialmente, los tiempos son orientativos, varían para adecuarse a cada muestra concreta)



n ^o de ciclos realizados	n ^o total de copias	n ^o de copias "largas"	n ^o de copias diana	dianas/total
1	2	2	0	0
2	4	4	0	0
3	8	6	2	25%
4	16	8	8	50%
5	32	10	22	69%
10	1.024	20	1.004	98%
20	≈10 ⁶	40	≈10 ⁶	99,996%
40	≈10 ¹²	80	≈10 ¹²	100%
x	2 ^x	2x	2 ^x -2x	



Polimerases de virus

- Alguns fags fan servir la polimerasa de l'hoste (*E. coli*)

- DNA polimerases DNA dependents

Virus amb DNA de cadena senzilla com a material genètic

Virus amb DNA de doble cadena com a material genètic

- RNA polimerases RNA dependents

Virus amb RNA de cadena senzilla com a material genètic

Virus amb RNA de doble cadena com a material genètic

- DNA polimerases RNA dependents (transcriptases inverses)

En alguns virus amb RNA com a material genètic

DNA polimerases de virus amb DNA com a material genètic

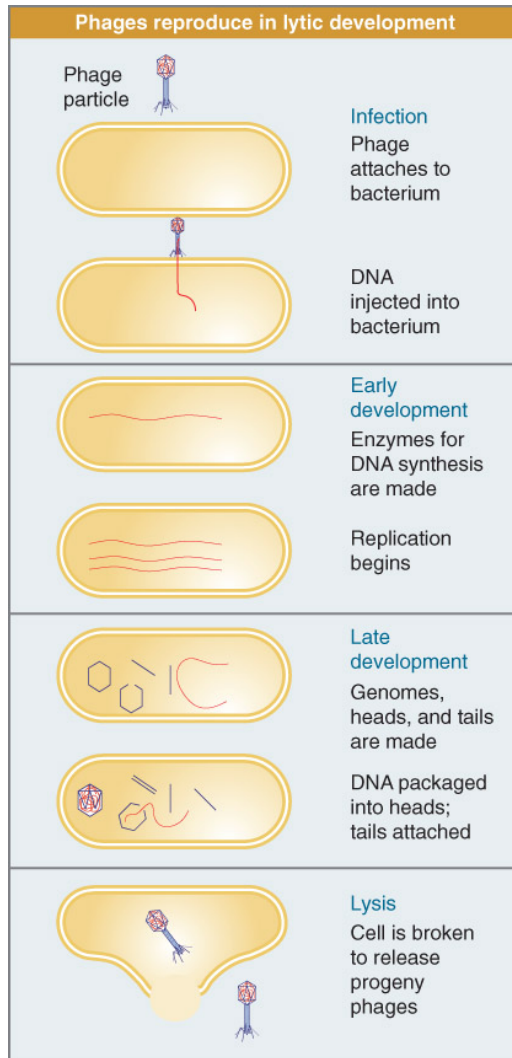
Fags amb DNA de cadena senzilla com a material genètic

- M13, ϕ X174: utilitzen la polimerasa de l'hoste (*E. coli*)

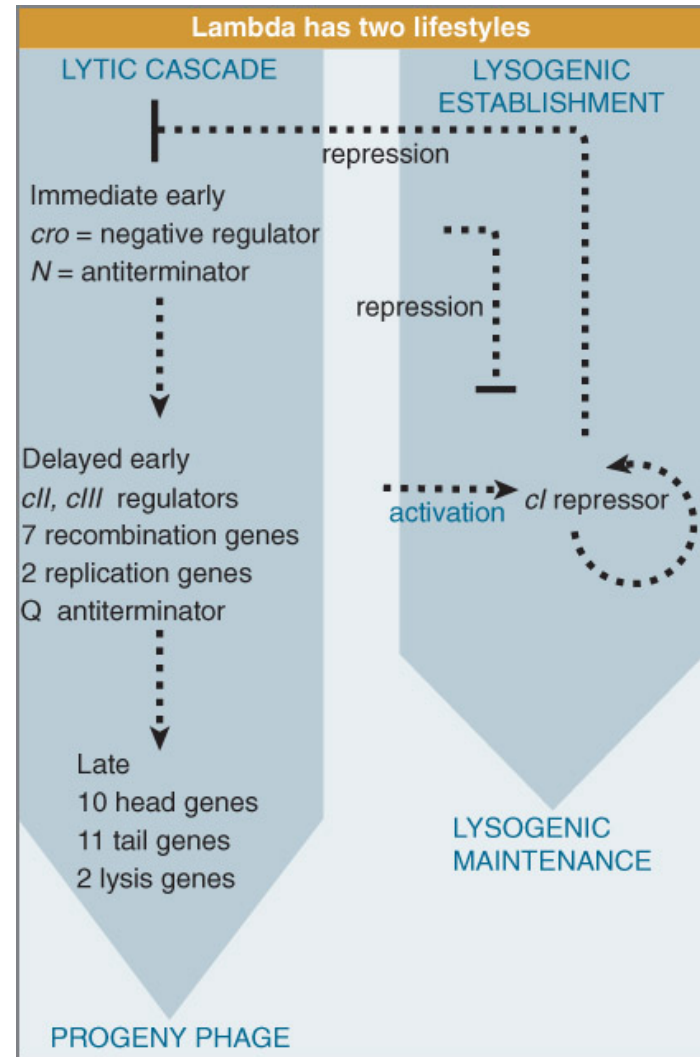
Fags amb DNA de doble cadena com a material genètic

- Fag T4: grandària similar a la DNA pol d'*E. coli*, però major velocitat de polimerització que aquesta i major homologia amb altres polimerases de virus i bacteris. Requereix motle de cadena senzilla. Té activitat exonucleasa 3'-5' molt activa. Usa com a substrats dTTP, dATP, dGTP i hidroximetilCTP. Forma un holoenzim amb altres proteïnes, incloent-hi una exonucleasa 5'-3'.
- Fag T7: també actua en forma d'holoenzim, del qual formen part algunes proteïnes de l'hoste, com la tioredoxina.
- ϕ 29, M2, PRD1, N4, T5: fan servir proteïnes accessòries per a iniciar la síntesi. La DNA polimerasa és molt processiva i presenta activitats exonucleasa 3'-5' i 5'-3'.
- Fag λ : utilitza la DNA polimerasa III de la cèl·lula hoste, però és necessària la participació de les proteïnes O i P del virus.

DNA polimerases de virus amb DNA com a material genètic



T4



λ

DNA polimerases de virus amb DNA com a material genètic

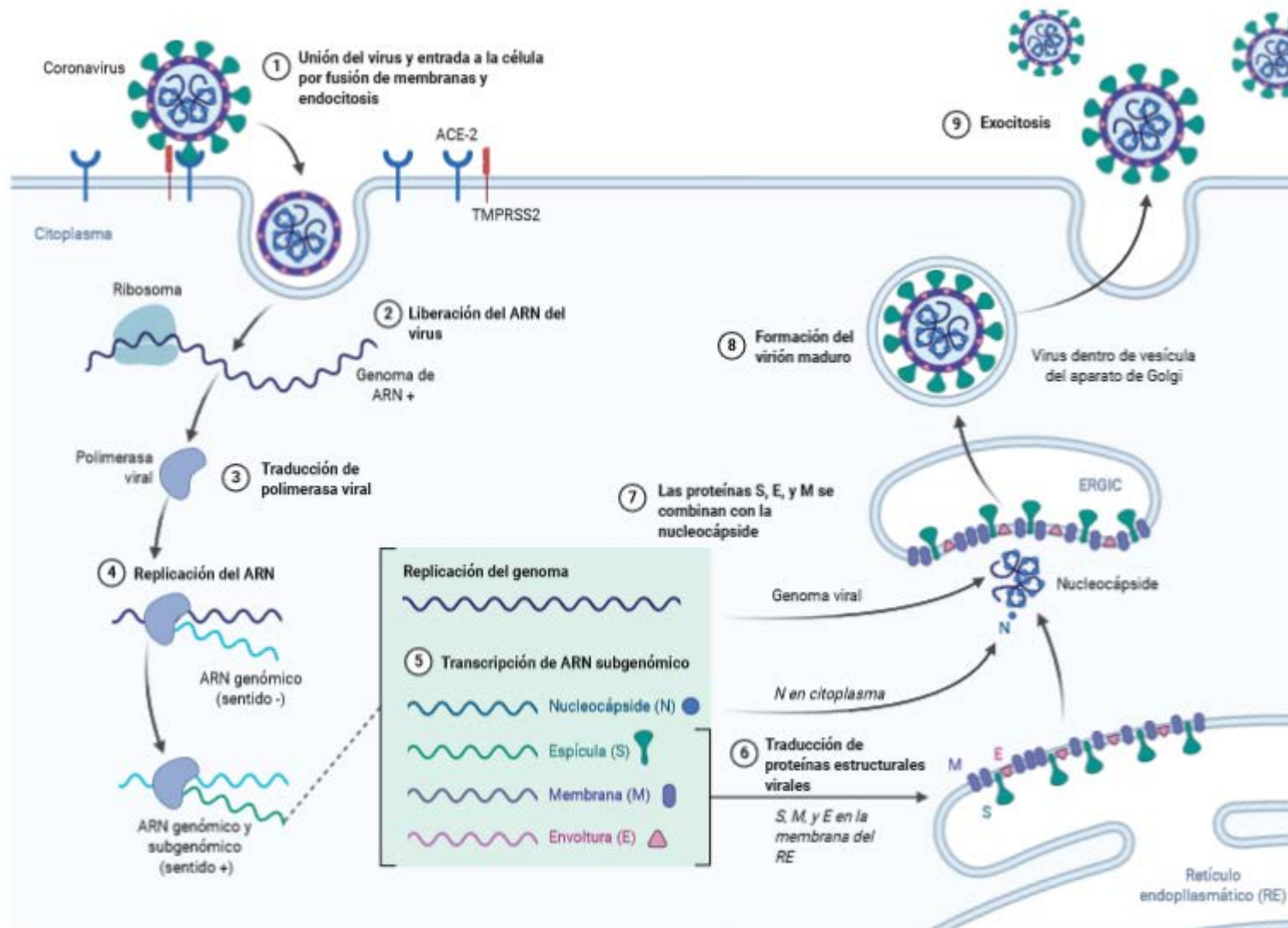
Phages and plasmids live in bacteria			
Type of Unit	Genome Structure	Mode of Propagation	Consequences
Lytic phage	ds- or ss-DNA or RNA linear or circular	Infects susceptible host	Usually kills host
Lysogenic phage	ds-DNA	Linear sequence in host chromosome	Immunity to infection
Plasmid	ds-DNA circle	Replicates at defined copy number May be transmissible	Immunity to plasmids in same group

Polimerases de virus amb RNA com a material genètic

Utilització d'RNA polimerases RNA dependents

- **Virus amb cadena +** (seqüència de nucleòtids idèntica a la de l'mRNA): el genoma serveix com a mRNA que guia la síntesi de proteïnes, una de les quals és la replicasa. Aquesta copia la cadena (+) per tal de generar la (-) i no requereix encebador. Exemples: R17, MS2 (bacterians), pòlio, coronavirus i sindbis (animals).
- **Virus amb cadena -** (seqüència de nucleòtids complementària a la de l'mRNA): el virus conté un complex d'RNA genòmic amb una replicasa específica, que s'activa quan entra en la cèl·lula hoste i copia les cadenes (-) per a generar cadenes (+). Aquestes cadenes serveixen d'mRNA per a la síntesi de proteïnes i de motle per a la generació de còpies del genoma viral. Exemples: estomatitis vesicular i grip.
- **Virus de doble cadena** (reovirus per exemple): la replicació s'inicia amb enzims que formen part del virus i formen cadenes (+) a partir de la (-). Aquestes noves cadenes (+) serveixen com a mRNA. Entre les proteïnes sintetitzades durant el procés de traducció es genera una altra replicasa que copia aquestes cadenes (+) acumulades per a generar molècules de doble cadena.

Ús d'RNA polimerases RNA dependents: replicació del genoma de SARS-CoV-2

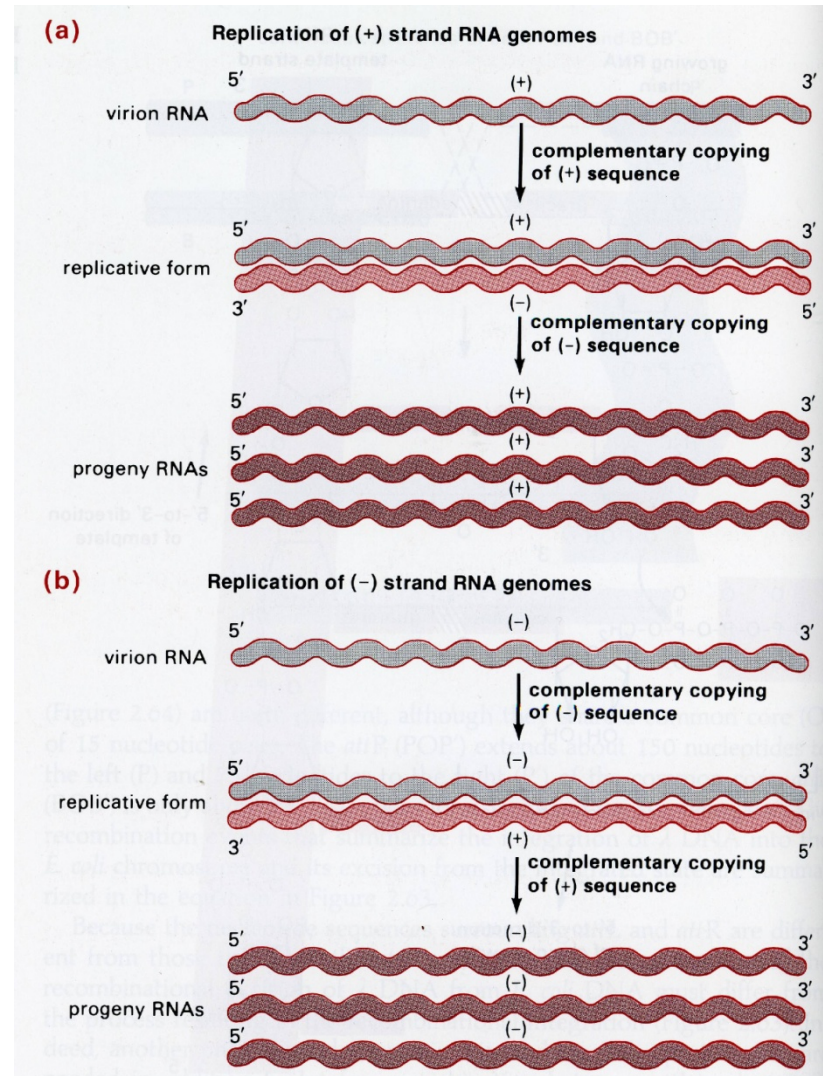


Cascella M, i al. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> amb modificacions.

<https://www.youtube.com/watch?v=zvuYJTL90J8>

Polimerases de virus amb RNA com a material genètic

Utilització
d'RNA polimerases
RNA dependents

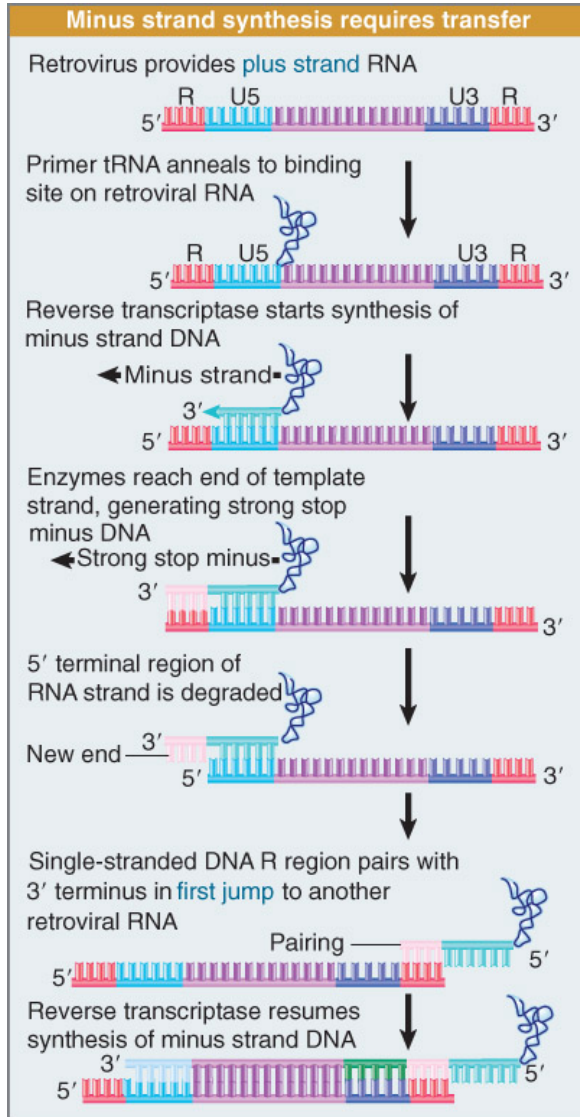


Polimerases de virus amb RNA com a material genètic

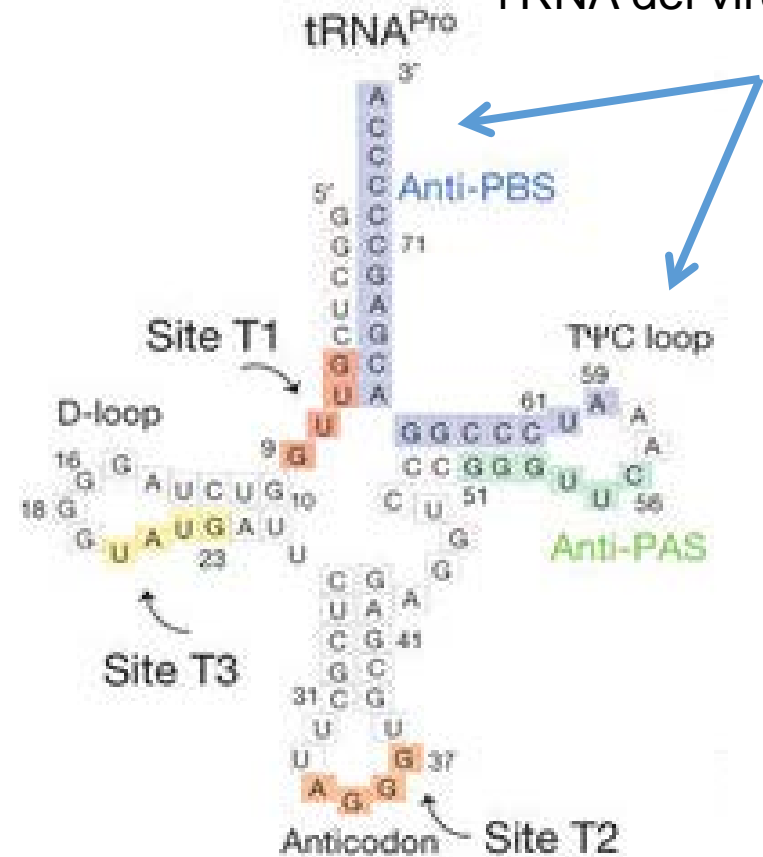
Utilització de DNA polimerases RNA dependents: transcriptasa inversa

- Aquests virus contenen una cadena (+) que codifica, per tant, directament proteïnes.
- La transcriptasa inversa genera una cadena de DNA (-) i després, a partir d'aquesta se sintetitza la (+), la qual cosa resulta en la formació d'un DNA de doble cadena. L'RNA és eliminat progressivament mitjançant l'activitat RNAsa H de l'enzim.
- L'enzim no presenta activitat exonucleasa 3'-5', la qual cosa explica l'alta variabilitat en aquest tipus de virus.
- La transcriptasa inversa fa servir com a encebador per a la síntesi de la primera cadena de DNA un tRNA de l'hoste (característic per a cada virus).

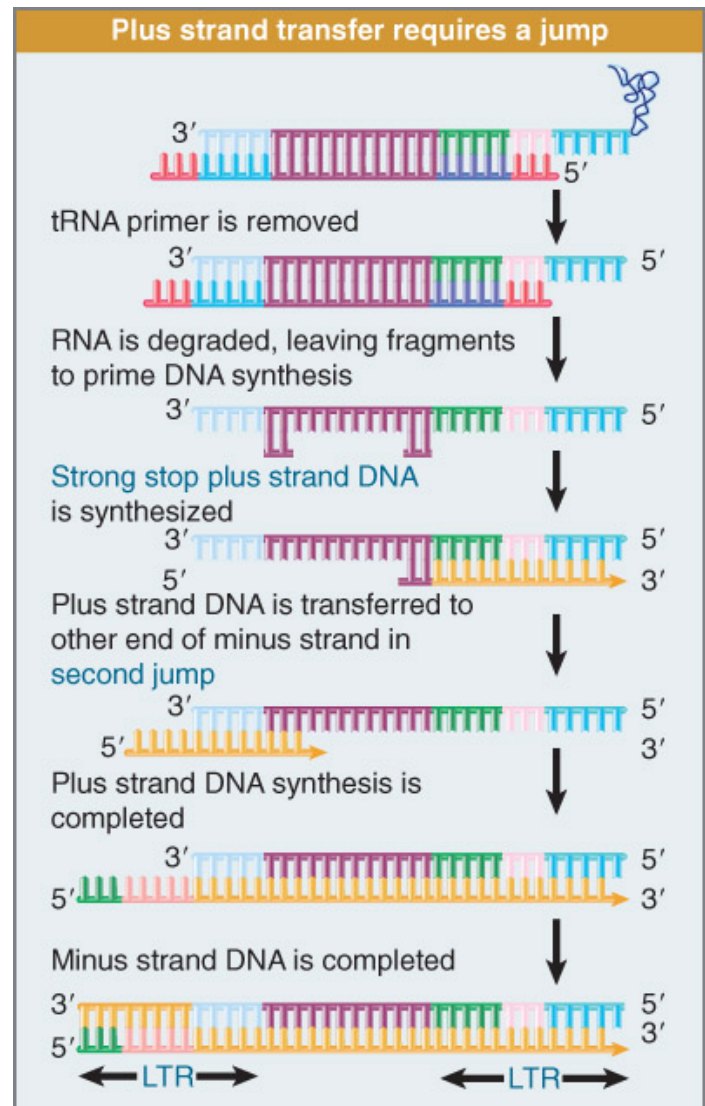
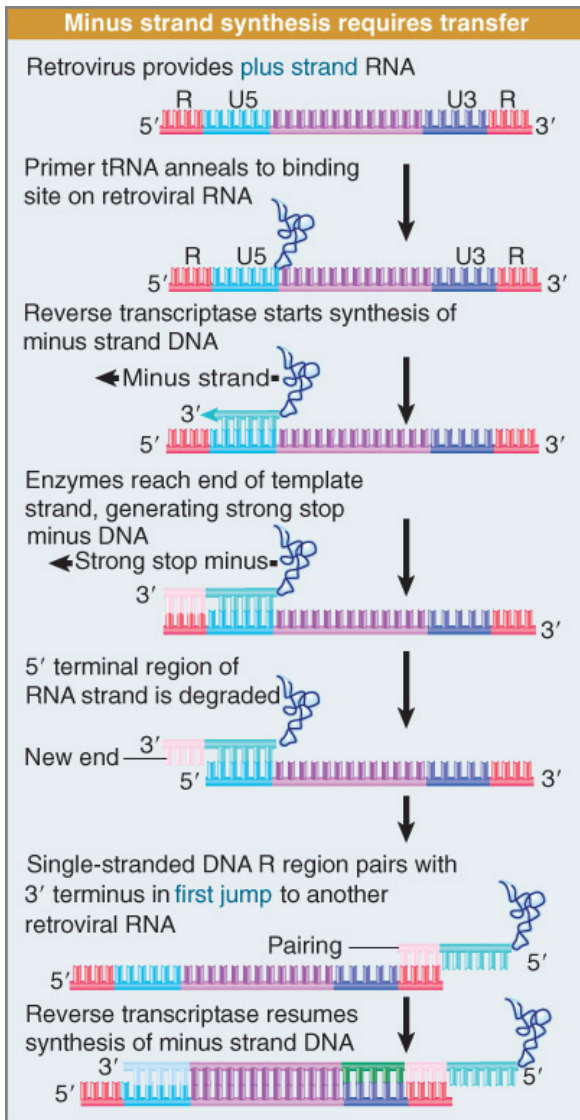
Polimerases de virus amb RNA com a material genètic: transcriptasa inversa



Regions d'interacció amb l'RNA del virus

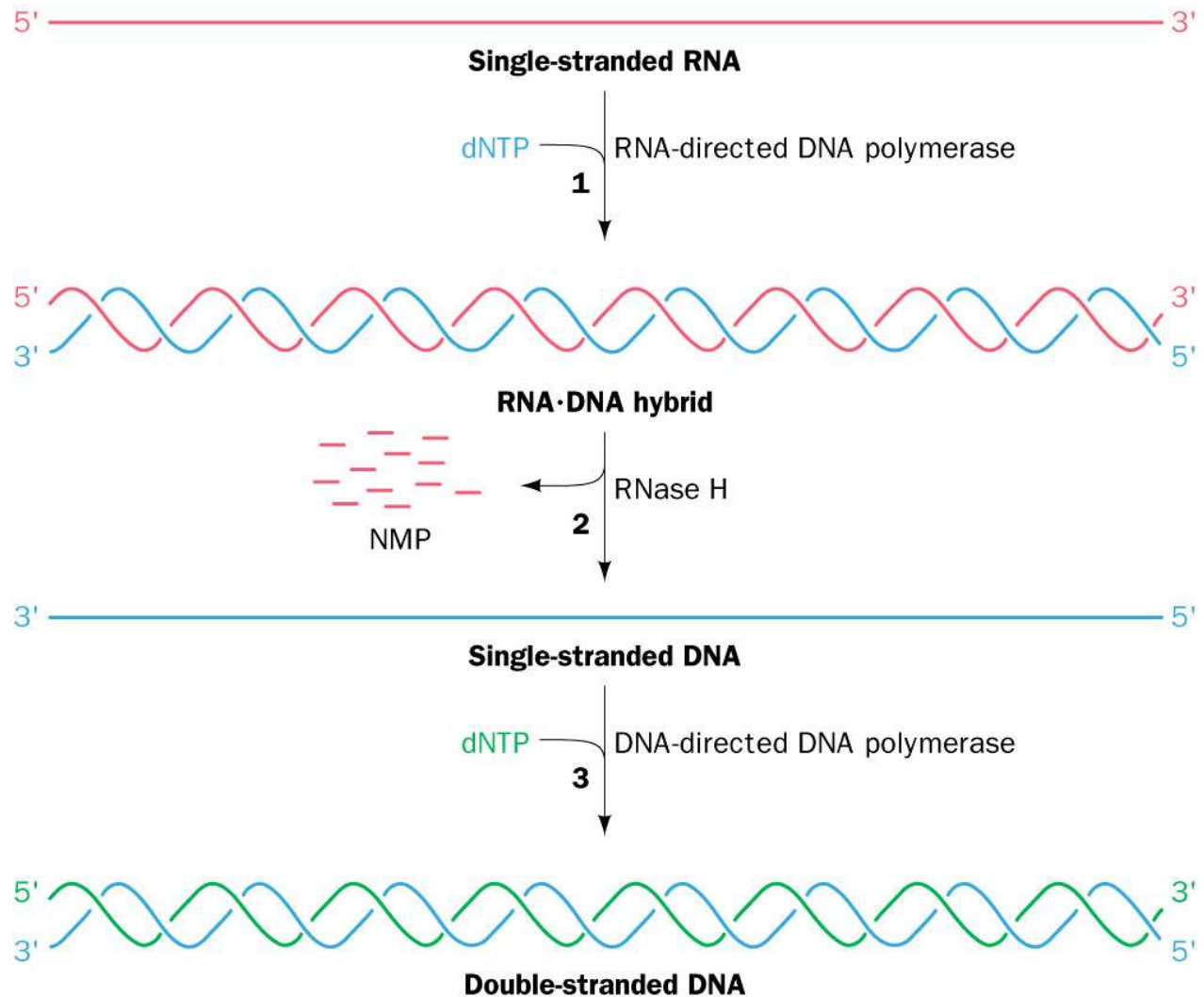


Polimerases de virus amb RNA com a material genètic: transcriptasa inversa

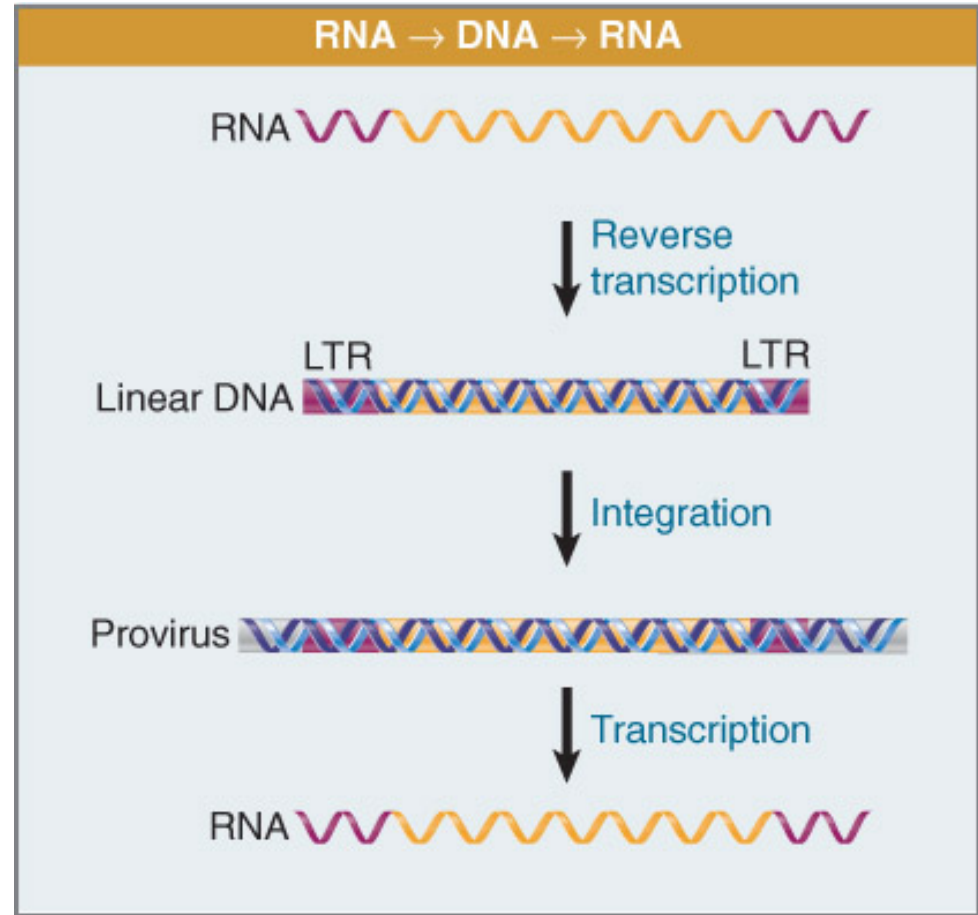
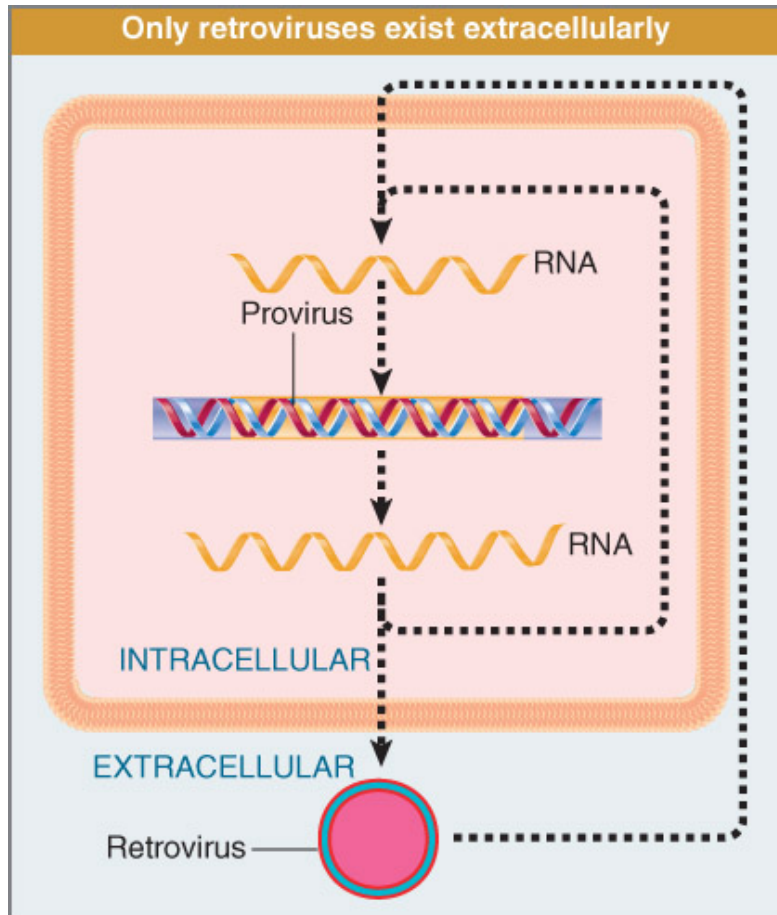


Polimerases de virus amb RNA com a material genètic

Utilització de DNA
 polimerases RNA
 dependents:
 transcriptasa
 inversa

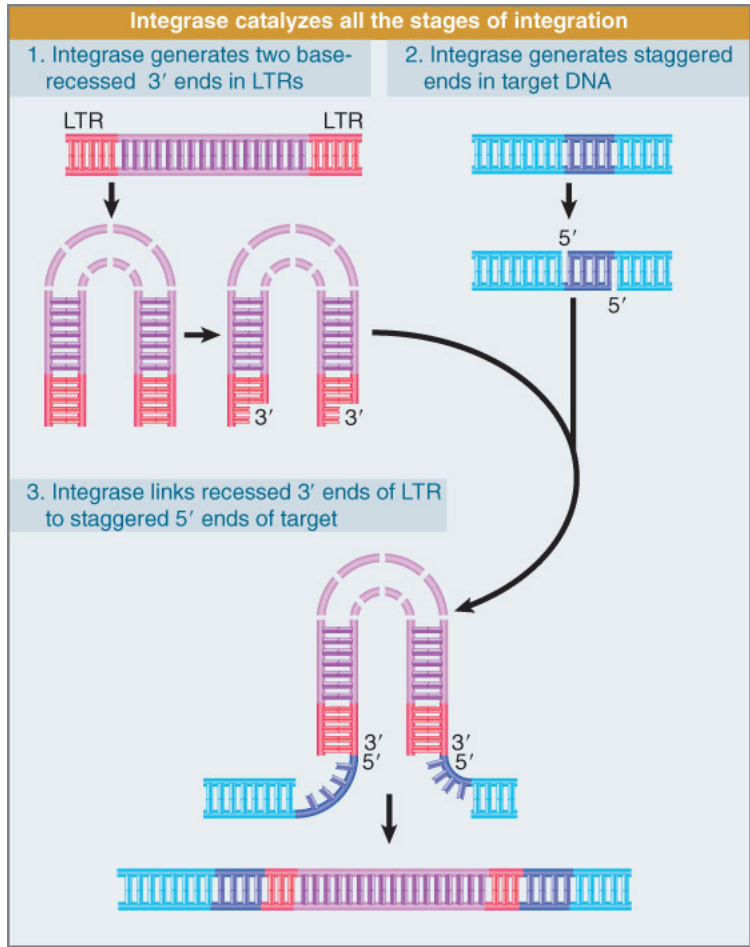
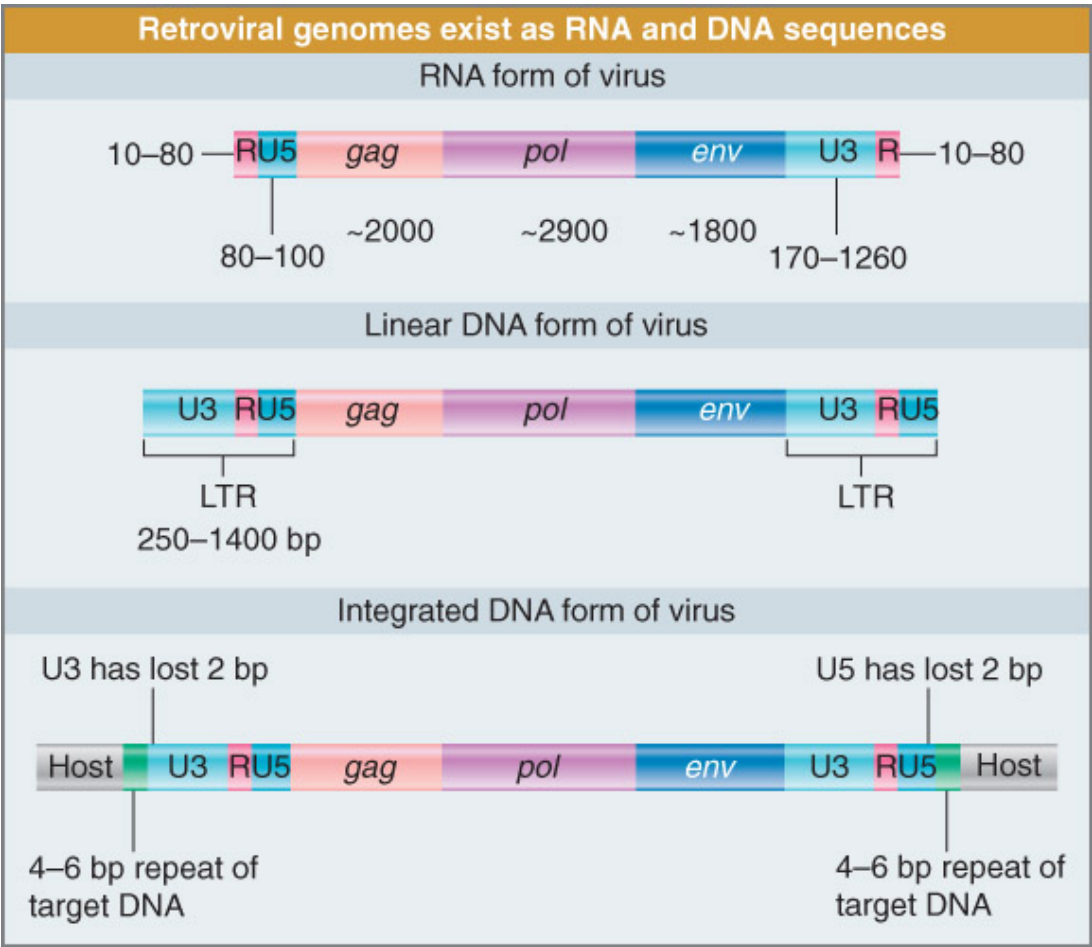


Replicació de retrovirus



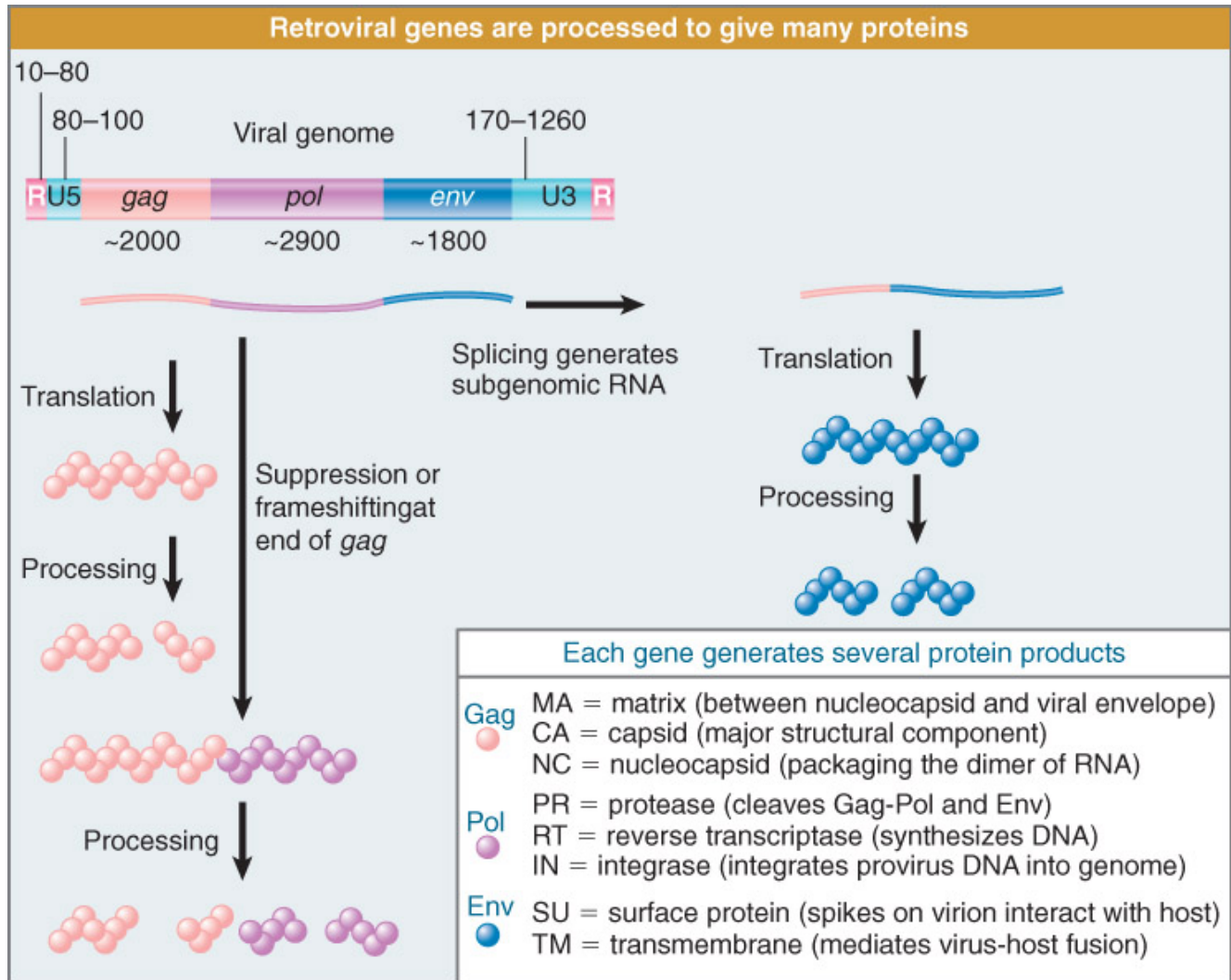
El DNA resultant de la replicació s'integra en el genoma de l'hoste

Replicació de retrovirus



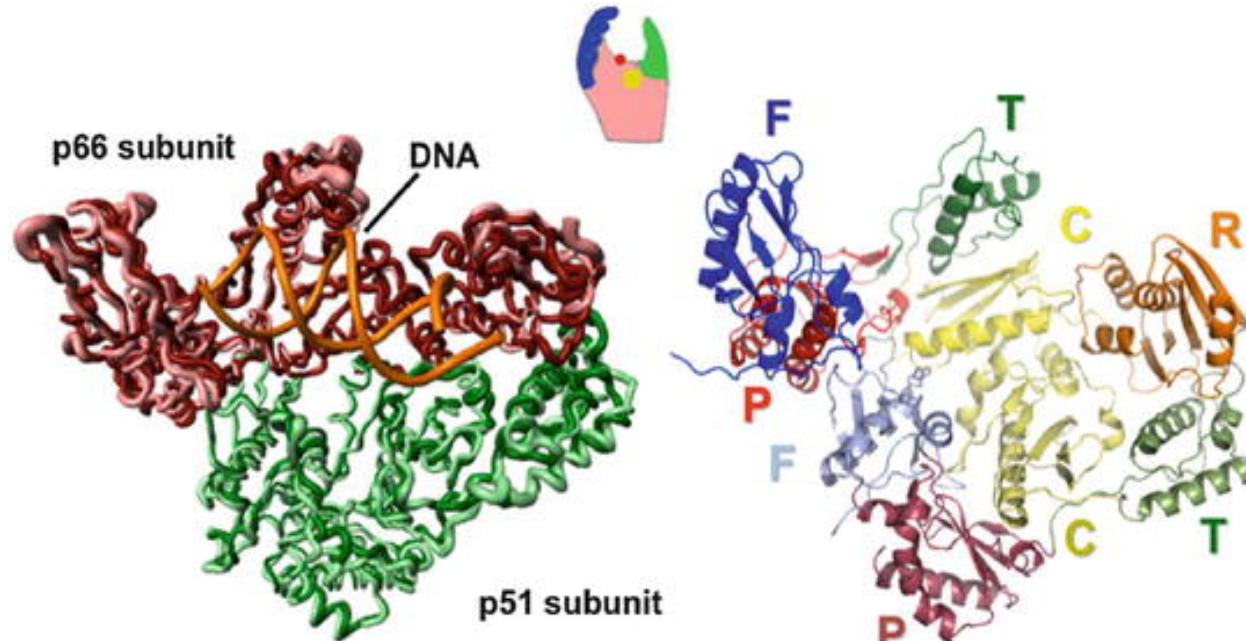
El DNA resultant de la replicació s'integra en el genoma de l'hoste

Replicació de retrovirus



En la replicació i la integració participen proteïnes codificades pel genoma viral

Polimerases de virus amb RNA com a material genètic



Miller J.T., Le Grice S.F.J. (2013) Reverse Transcriptase-Catalyzed HIV-1 DNA Synthesis. In: Hope T., Stevenson M., Richman D. (eds) Encyclopedia of AIDS. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9610-6_58-1

Estructura de raigs X de les dues subunitats de la transcriptasa inversa de L'HIV-1

The p66 subunit consists of two domains: polymerase and RNase H; in the mature HIV-1 RT heterodimer, p66 contains the active sites for the two enzymatic activities of RT. The polymerase domain has been compared to a human right hand and is composed of the fingers, palm, thumb, and connection subdomains. The p51 subunit corresponds closely, but not exactly, to the polymerase domain of p66, and contains the same four subdomains. However, the relative arrangement of the subdomains differs in the two subunits. The p66 domain plays the catalytic role, whereas the p51 subunit plays a structural role.

Polimerases de virus amb RNA com a material genètic



Courtesy of Edward Arnold, Rutgers University

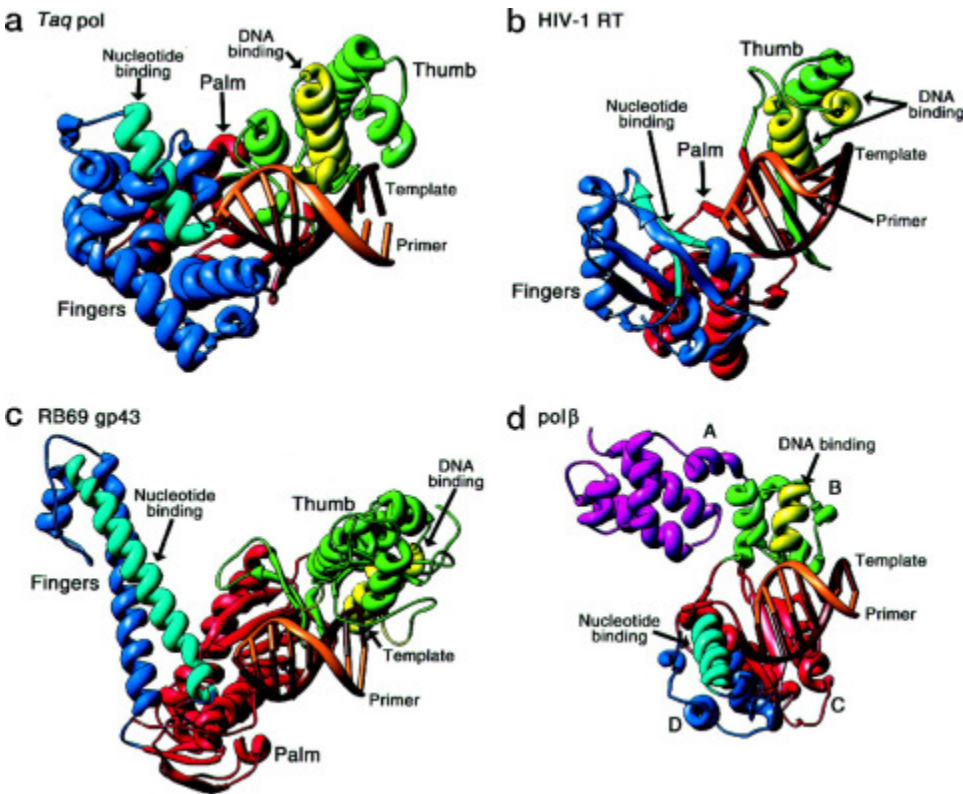
Estructura de raigs X de la transcriptasa inversa de l'HIV-1. Diagrama de l'heterodímer en complex amb el DNA.

Característiques d'algunes DNA polimerases de bacteris i virus

Enzim	Exo 3'-5'	Exo 5'-3'	Velocitat Pol.	Processivitat
Pol I <i>E. coli</i>	Baixa	Present	Intermèdia	Baixa
Frag. Klenow	Baixa	No	Intermèdia	Baixa
Transc. Inv.	No	No	Lenta	Intermèdia
DNA pol. T4	Alta	No	Intermèdia	Baixa
DNA pol. T7	Alta	No	Ràpida	Alta
DNA pol. Taq	No	Present	Ràpida	Alta

DNA polymerases: semblança estrutural

Comparison of DNA polymerase structures with primer and template bound:



The four structures shown are oriented with respect to each other by superposition of the first two base pairs at the primer terminus.

Palm, thumb, and fingers are shown for each structure.

Taq polymerase is a thermostable enzyme used in PCR.

HIV-1RT is the reverse transcriptase (RNA-directed DNA polymerase) from human immunodeficiency virus.

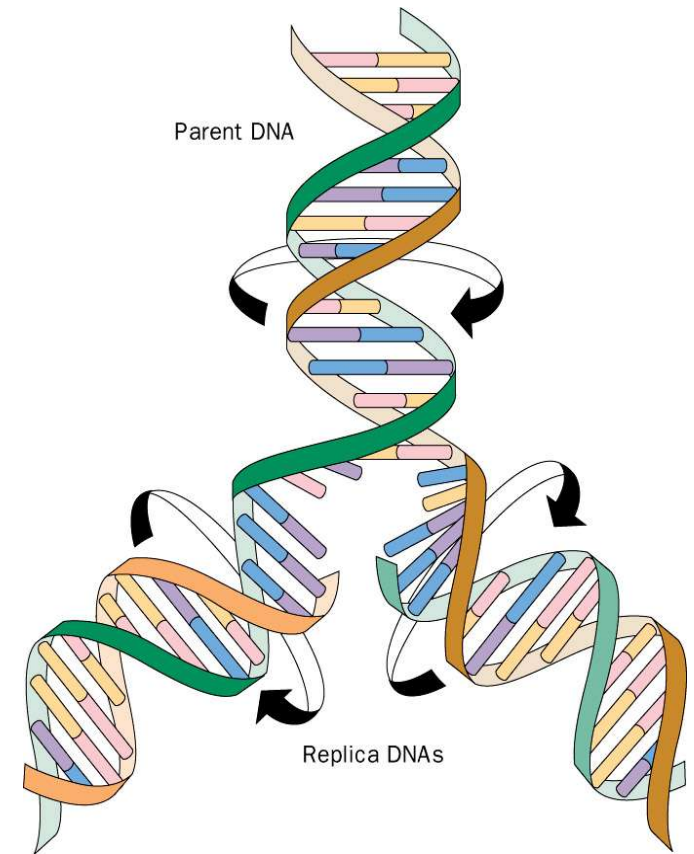
RB69 gp43 is the replicative DNA polymerase encoded by RB69, a bacteriophage closely related to T4.

Steitz TA. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18;274(25):17395-8. doi: 10.1074/jbc.274.25.17395.

- $\text{pol } \beta$ is a eukaryotic DNA polymerase involved in DNA repair.

Tema 15

Replicació semidiscontínua. Elements participants i la seua funció. Fragments d'Okazaki. DNA ligases. L'RNA com a encebador. La primasa i el primosoma. Proteïnes SSB. DNA helicases. DNA topoisomereses.



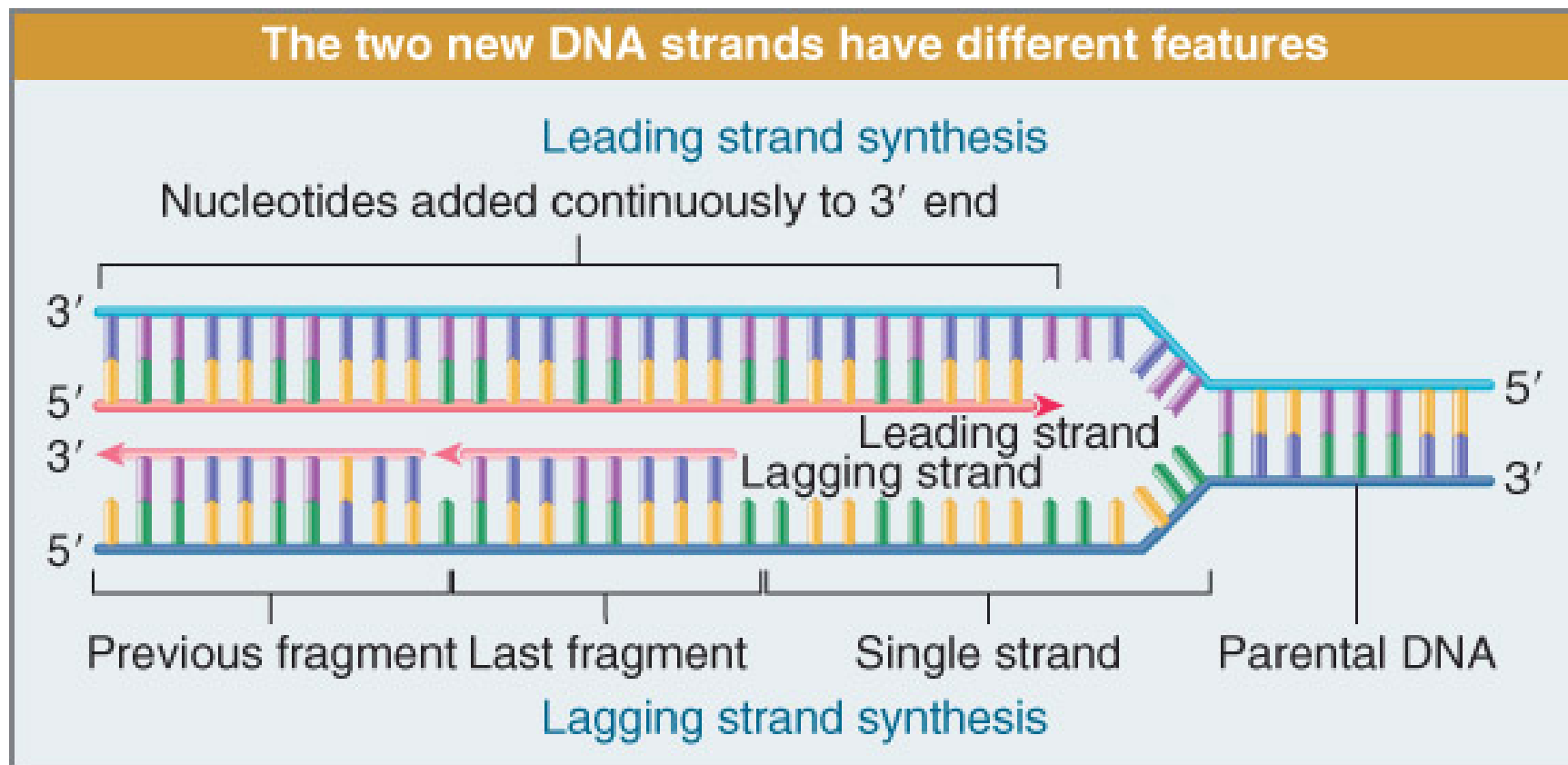
La replicació semidiscontínua

- El DNA és una doble hèlix antiparal·lela
- Replicació bidireccional
- Síntesi en direcció 5'-3'



Replicació semidiscontínua
(Okazaki, principis dels 70)

La replicació semidiscontínua



La replicació semidiscontínua

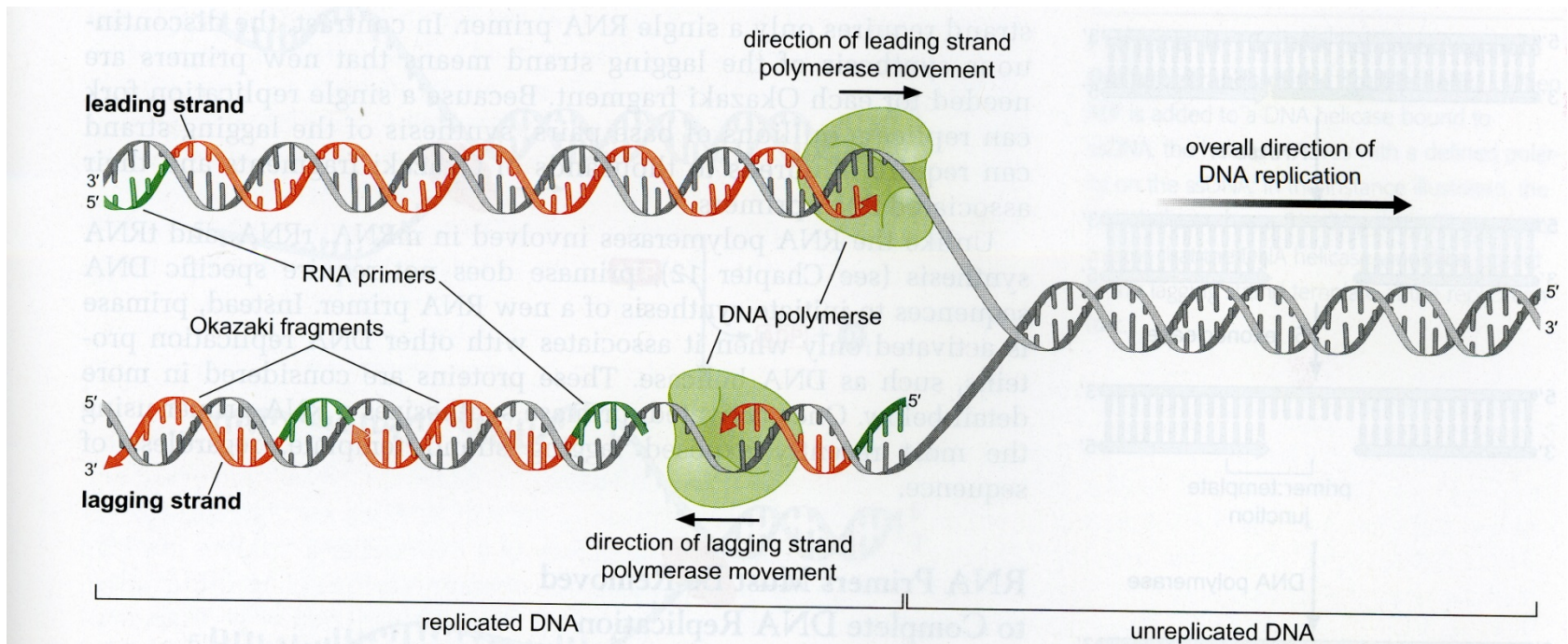


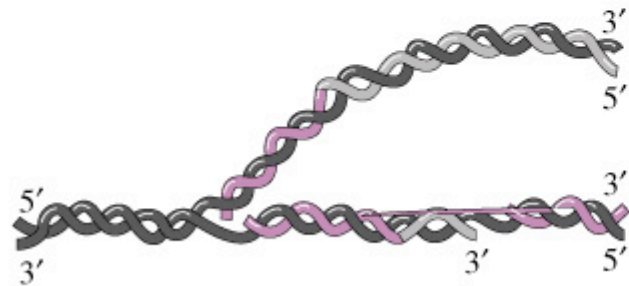
FIGURE 8-11 The replication fork. Newly synthesized DNA is indicated in red and RNA primers are indicated in green. The Okazaki fragments shown are artificially short for illustrative purposes. In the cell, Okazaki fragments can vary between 100 to greater than 1,000 bases.

Demostració de la replicació semidiscontínua

■ Parental DNA (unlabeled)

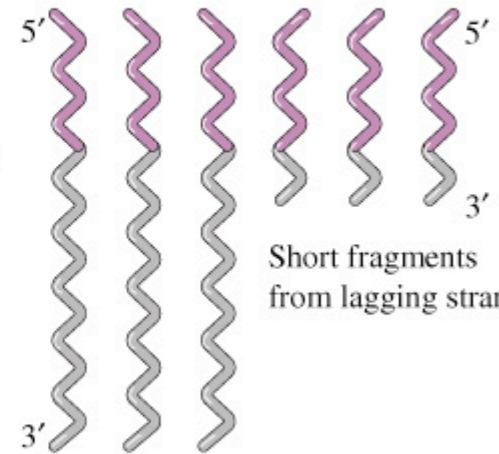
■ Newly synthesized DNA without ³H label

■ Newly synthesized DNA labeled with ³H-deoxythymidine



Lyse cells. Isolate and denature DNA.

Separate by size (only newly synthesized DNA containing ³H-deoxythymidine is shown).



Short fragments from lagging strand

Long fragments from leading strand

La replicació semidiscontínua

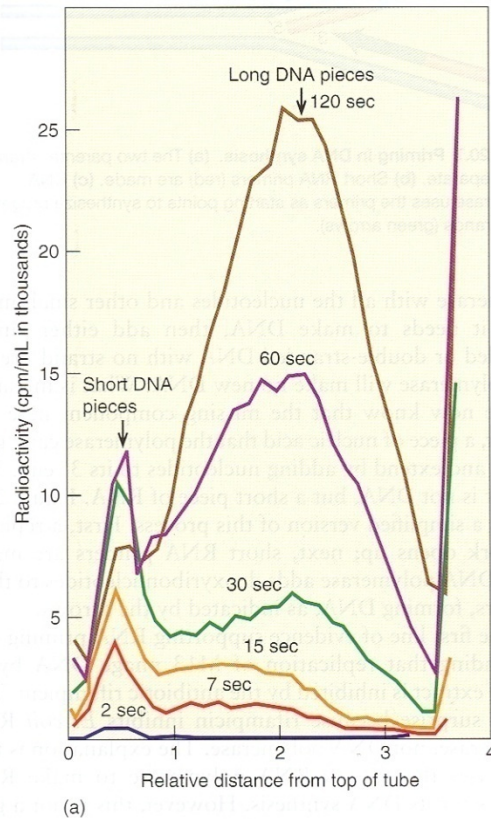
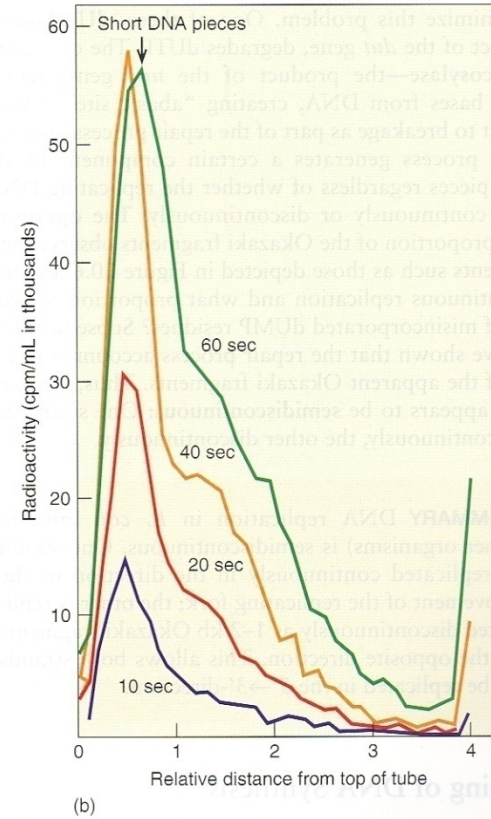


Figure 20.6 Experimental demonstration of at least semidiscontinuous DNA replication. (a) Okazaki and his colleagues labeled replicating phage T4 DNA with very short pulses of radioactive DNA precursor and separated the product DNAs according to size by ultracentrifugation. At the shortest times, the label went primarily into



short DNA pieces (found near the top of the tube), as the discontinuous model predicted. **(b)** When these workers used a mutant phage with a defective DNA ligase gene, short DNA pieces accumulated even after relatively long labeling times (1 min in the results shown here).

Demostració de la replicació semidiscontínua

Segons aquests resultats, no seria la replicació discontinua?

Hi ha pseudofragments d'Okazaki que són conseqüència de la incorporació errònia de nucleòtids d'uracil durant la replicació i la seua eliminació per acció de la uracil-N-glicosidasa

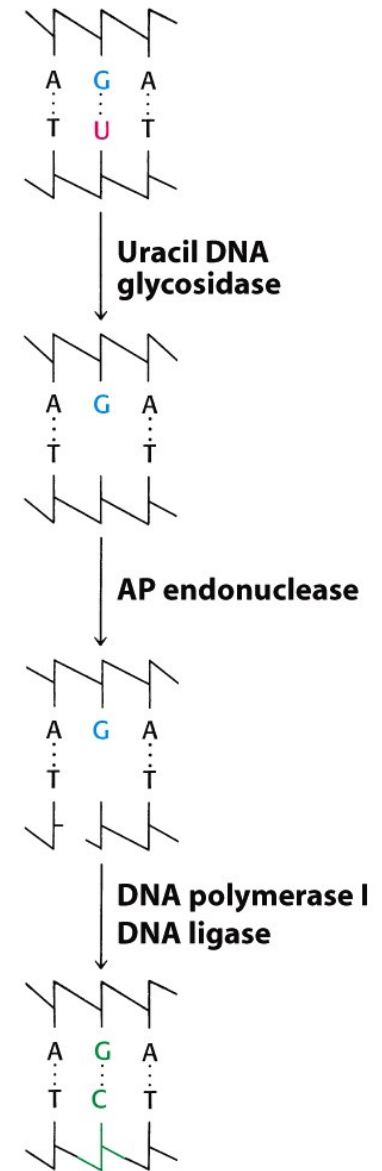


Figure 28.39

Biochemistry, Seventh Edition

© 2012 W. H. Freeman and Company

Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- DNA helicases: separació de cadenes
- Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla
- Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar
- DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki
- DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA

Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- **DNA helicases: separació de cadenes**
- Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla
- Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar
- DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki
- DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA

Separació de cadenes: DNA helicases

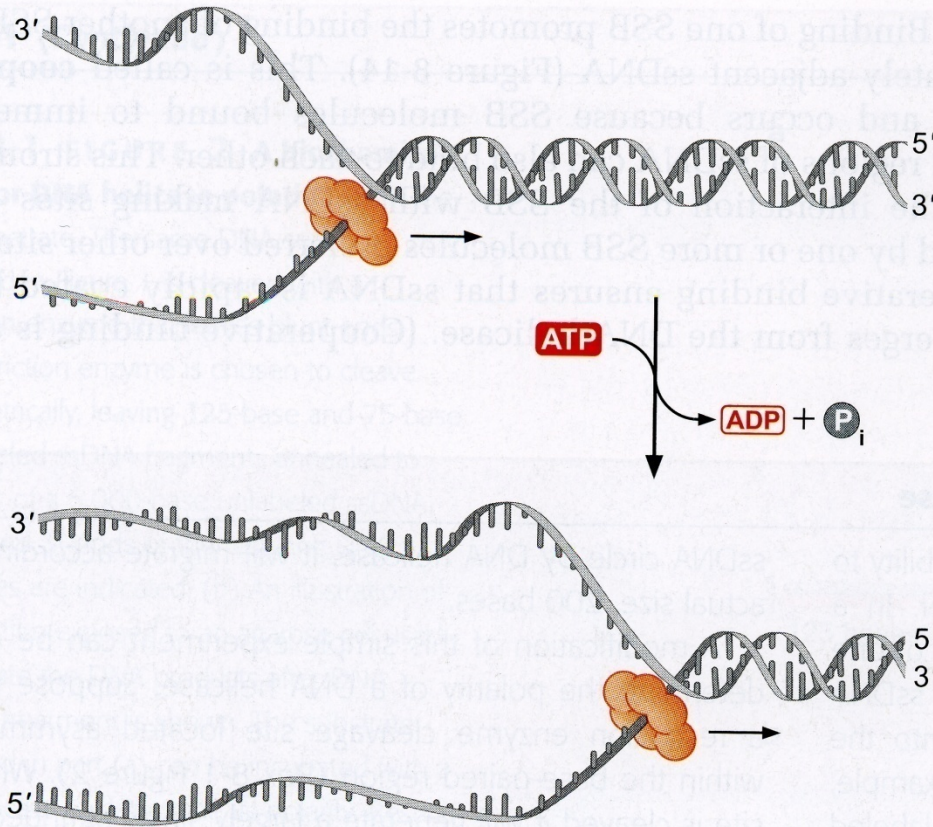
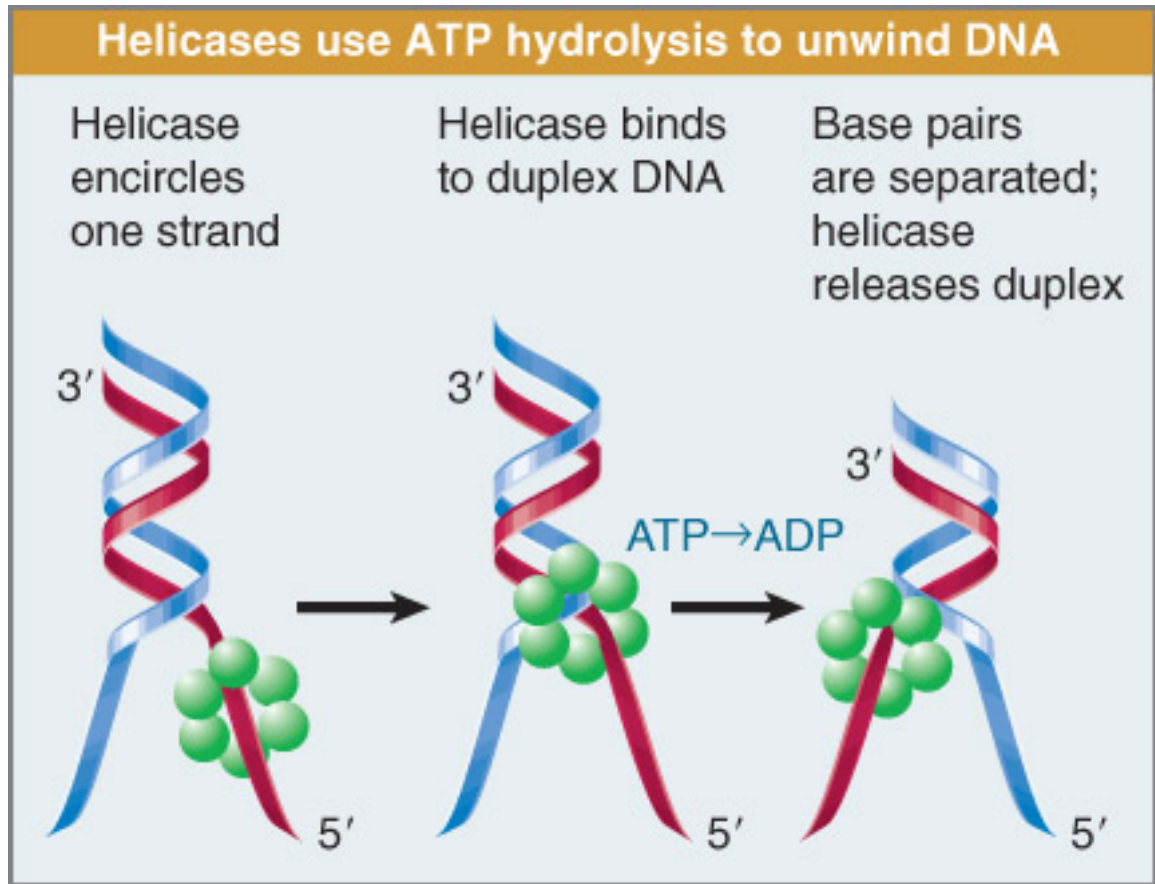
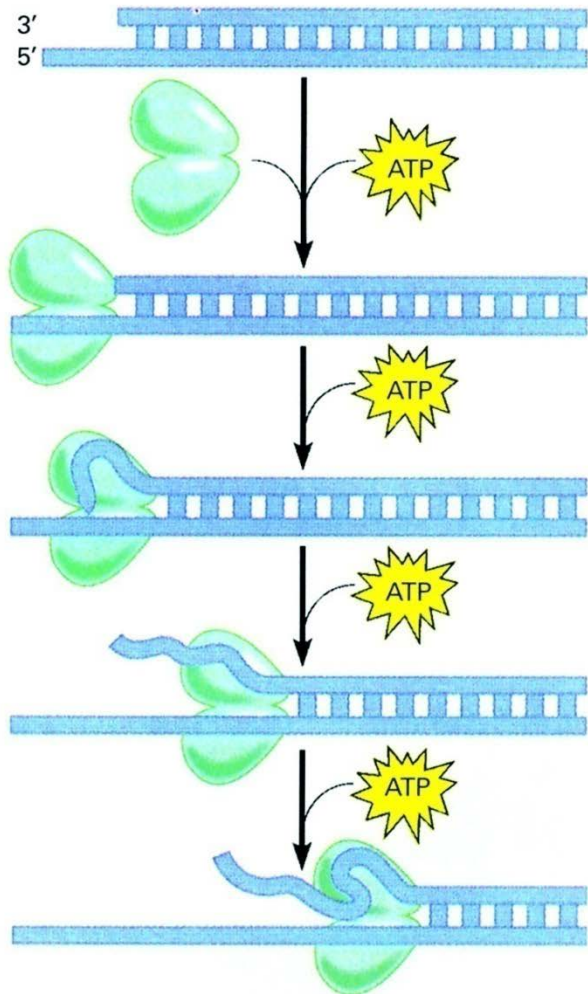


FIGURE 8-13 DNA helicases separate the two strands of the double helix. When ATP is added to a DNA helicase bound to ssDNA, the helicase moves with a defined polarity on the ssDNA. In the instance illustrated, the DNA helicase has a 5'→3' polarity. This polarity means that the DNA helicase would be bound to the lagging strand template at the replication fork.

Separació de cadenes: DNA helicases



Separació de cadenes: DNA helicases

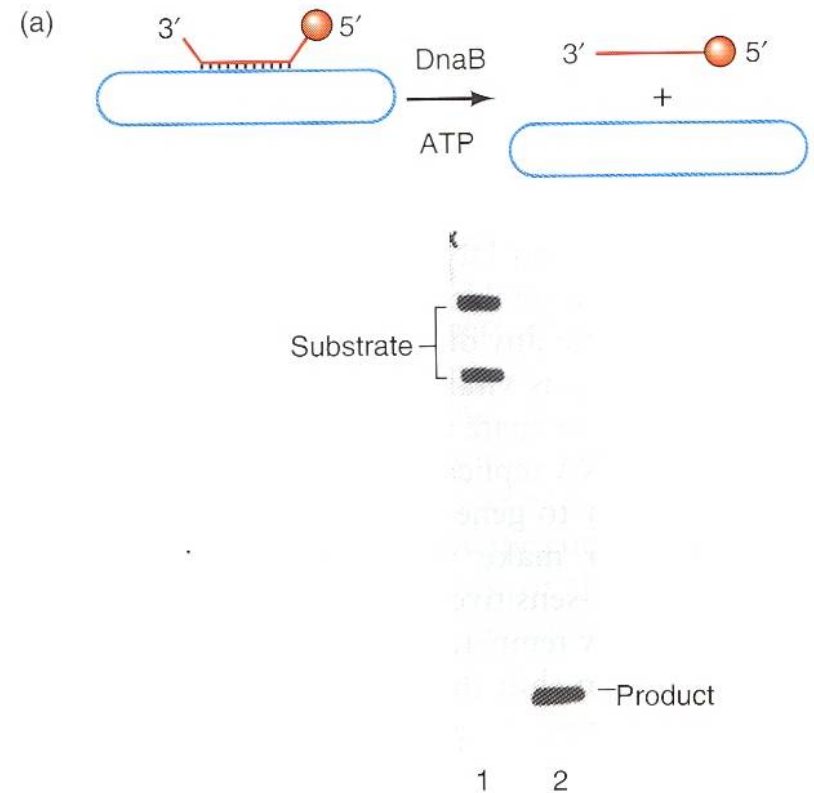


Figure 20.21 DNA helicase assay. (a) Principle of assay. LeBowitz and McMacken made a helicase substrate (top) by ^{32}P -labeling a single-stranded 1.06-kb DNA fragment (red) at its 5'-end and annealing the fragment to an unlabeled single-stranded recombinant M13 DNA bearing a complementary 1.06-kb region. The *dnaB* protein, or any DNA helicase, can unwind the double-stranded region of the substrate and liberate the labeled short piece of DNA (red) from its longer, circular partner. Bottom: Electrophoresis of the substrate (lane 1) yields two bands, which probably correspond to linear and circular versions of the long DNA annealed to the labeled, short DNA. Electrophoresis of the short DNA by itself (lane 2) shows that it has a much higher mobility than the substrate (see band labeled "Product").

Separació de cadenes: DNA helicases

Table 11-2
Comparison of *E. coli* and phage replicative helicases

Protein	Mass (kDa), form	Polarity	Rate (bp/sec)	Processivity	Effect of primases	Effect of DNA polymerase
dnaB	50 hexamer	5'→3'	35–60 750 ^b	high ^b > 50 kb	stimulated by <i>E. coli</i> dnaG	stimulates rolling-circle synthesis
T7 gp4	63, 56 ^a multimer	5'→3'	300 ^b	high ^b	same protein	specific for T7 pol
T4 gp41	59 multimer	5'→3'	250 ^b	high ^b	stimulated by T4 gp61	accessory proteins stimulate
PriA	76 monomer	3'→5'	50	< 500 bp	none ^c	none
Rep	68 monomer	3'→5'	150 ^d	high ^d < 500 bp alone	none	none

^a Two forms, 63 and 56 kDa; the large form also has primase activity.

^b When DNA polymerase is present during rolling-circle synthesis.

^c Part of primosome.

^d In the presence of gpA endonuclease.

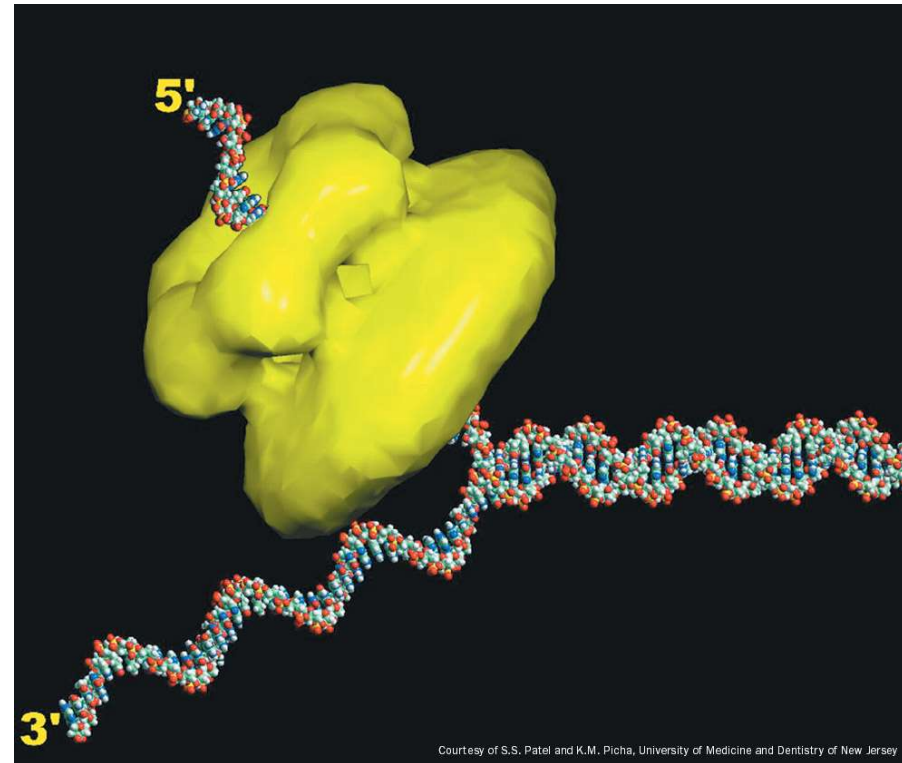
Table 11-3
Nonreplicative prokaryotic helicases

Protein	Mass (kDa)	Polarity	Comments
Helicase II (<i>uvrD</i> gene product)	82 ^a	3'→5'	stoichiometric mechanism; DNA repair ft
UvrAB complex	180 ^b	5'→3'	DNA repair function
Helicase IV	75 ^a	3'→5'	possible function in repair; low intracellular abundance
RecBCD complex	330 ^b	both	involved in recombination
T4 Dda	49 ^a	5'→3'	stoichiometric mechanism; displaces prot bound to DNA
Helicase I	180 ^a	5'→3'	encoded by F plasmid; required for DNA during conjugation
Rho	50 ^a	5'→3'	specific for RNA–DNA hybrids; functions transcription termination at specific sites
Helicase III	20 ^a	5'→3'	unknown function

Separació de cadenes: DNA helicases



Estructura de raigs X del domini helicasa de l'helicasa/primasa codificada pel gen 4 del fag T7



Reconstrucció d'una imatge basada en microscòpia electrònica de l'helicasa/primasa codificada pel gen 4 del fag T7

Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- DNA helicases: separació de cadenes
- **Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla**
- Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar
- DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki
- DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA

Estabilització de l'ssDNA: proteïnes SSB

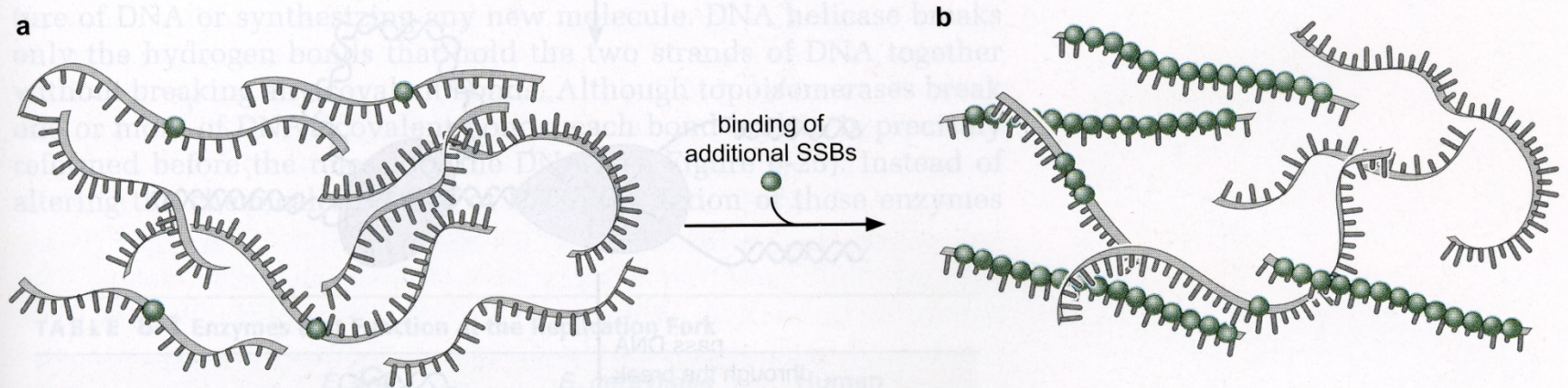


FIGURE 8-14 Binding of single-stranded binding protein (SSB) to DNA. (a) A limiting amount of SSB is bound to four of the nine ssDNA molecules shown. (b) As more SSB binds to DNA, it preferentially binds adjacent to previously bound SSB molecules. Only after SSB has completely coated the initially bound ssDNA molecules does binding occur on other molecules. Note that when ssDNA is coated with SSB, it assumes a more extended conformation that inhibits the formation of intramolecular base pairs.

Estabilització de l'ssDNA: proteïnes SSB

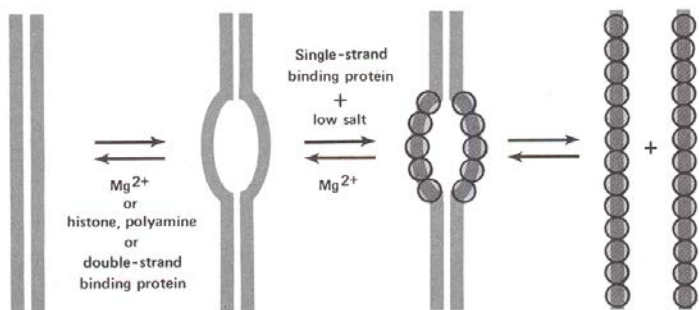
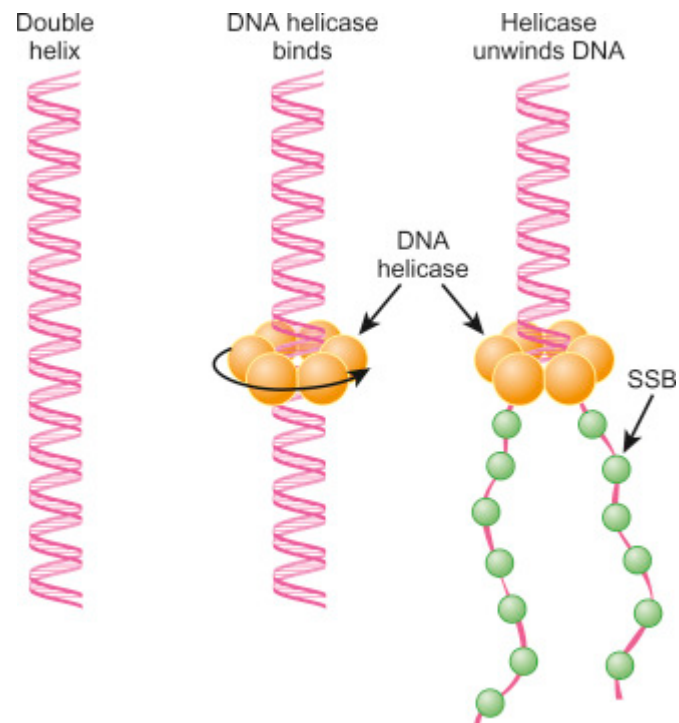


Figure 10-1
Single-strand binding protein displaces the equilibrium toward the single-stranded form; histones, polyamines, or double-strand binding proteins favor the duplex form.

Table 10-2
Properties of three prokaryotic SSBs

Property	T4 gp32	M13 gp5	<i>E. coli</i> SSB
Binding			
DNA > RNA	yes	yes	yes
ss >> double strand	yes	yes	yes
DNA strands in protein complex	one	two	one
Nucleotides bound per monomer	10	4	8-16
Weight ratio, protein/DNA	12	8	4-8
Cooperativity	unlimited	unlimited	unlimited and limited
Biological functions	stimulates replication and combination	inhibits complementary strand synthesis	stimulates replication and repair
Copies per cell	10,000	75,000	800
Copies per replication fork	170	—	270
Isoelectric pH	5.5	—	6.0
Mass, native (kDa)	33.5	19.4	75.6
Native form	monomer	dimer	tetramer



Estabilització de l'ssDNA: proteïnes SSB

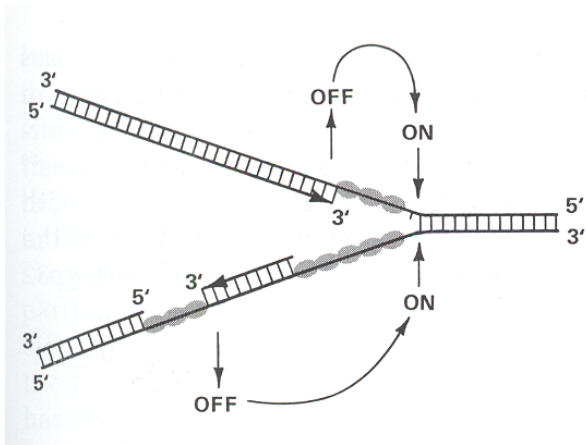


Figure 10-3

Hypothetical scheme for single-strand binding protein action at a replicating fork. The protein is recycled after binding single-stranded regions of the template and facilitating replication. (Courtesy of Professor B Alberts)

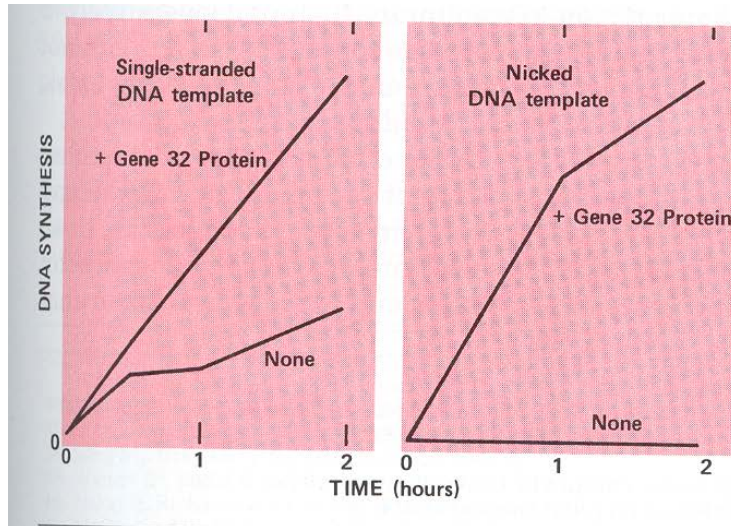
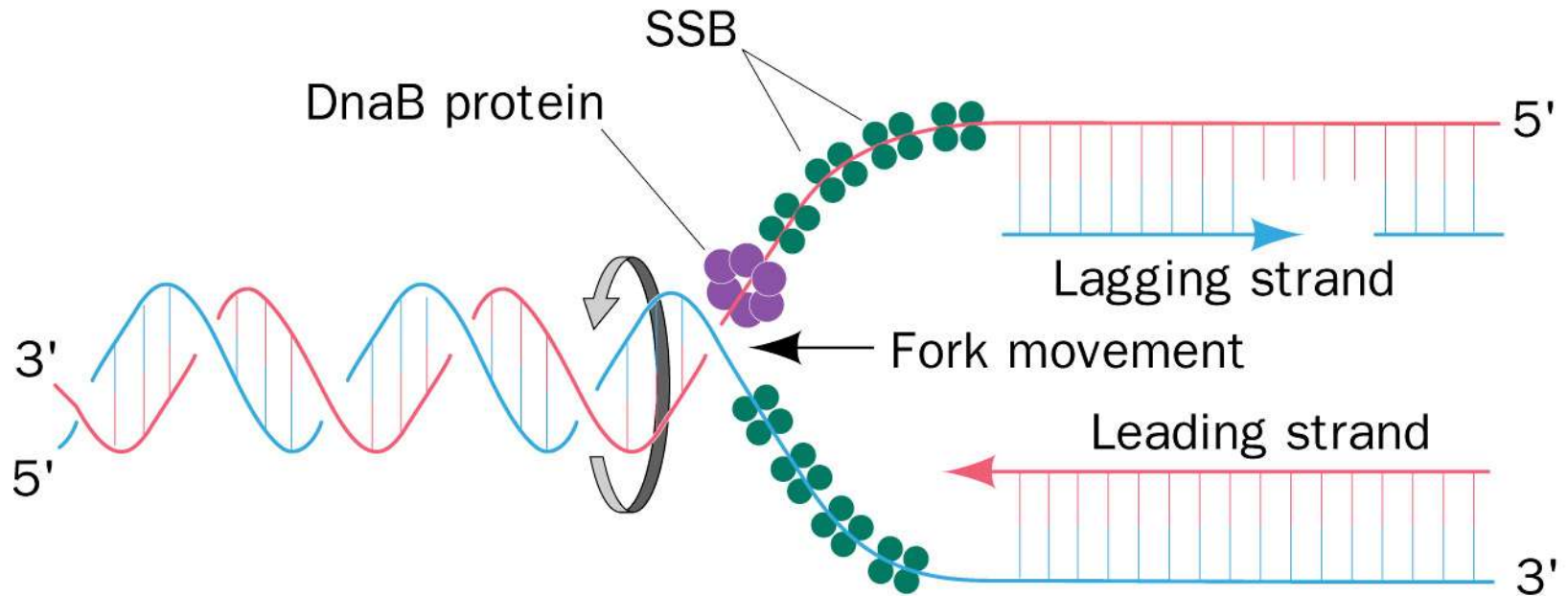


Figure 10-4

T4 phage gene 32 protein stimulates T4 DNA polymerase (left) in replication of a single-stranded template and (right) enables the polymerase to utilize a nicked duplex template.

Separació de cadenes: DNA helicases i proteïnes SSB

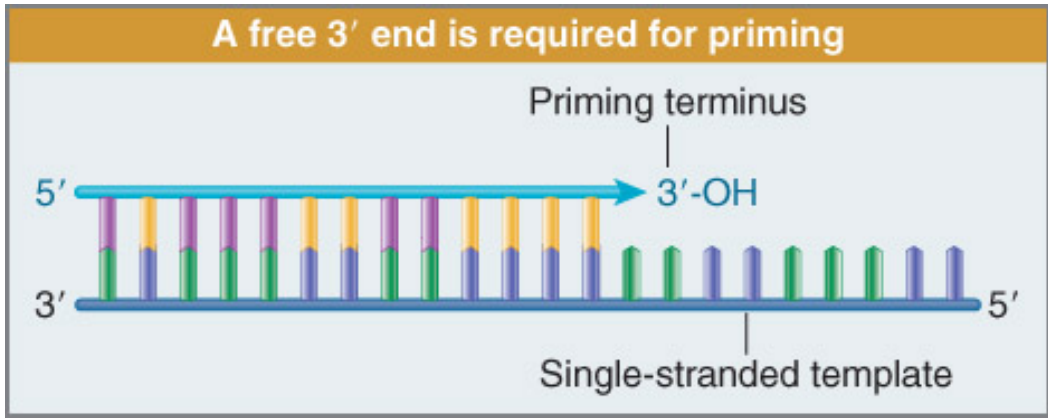


Acció combinada de proteïnes SSB i DnaB

Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- DNA helicases: separació de cadenes
- Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla
- **Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar**
- DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki
- DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA

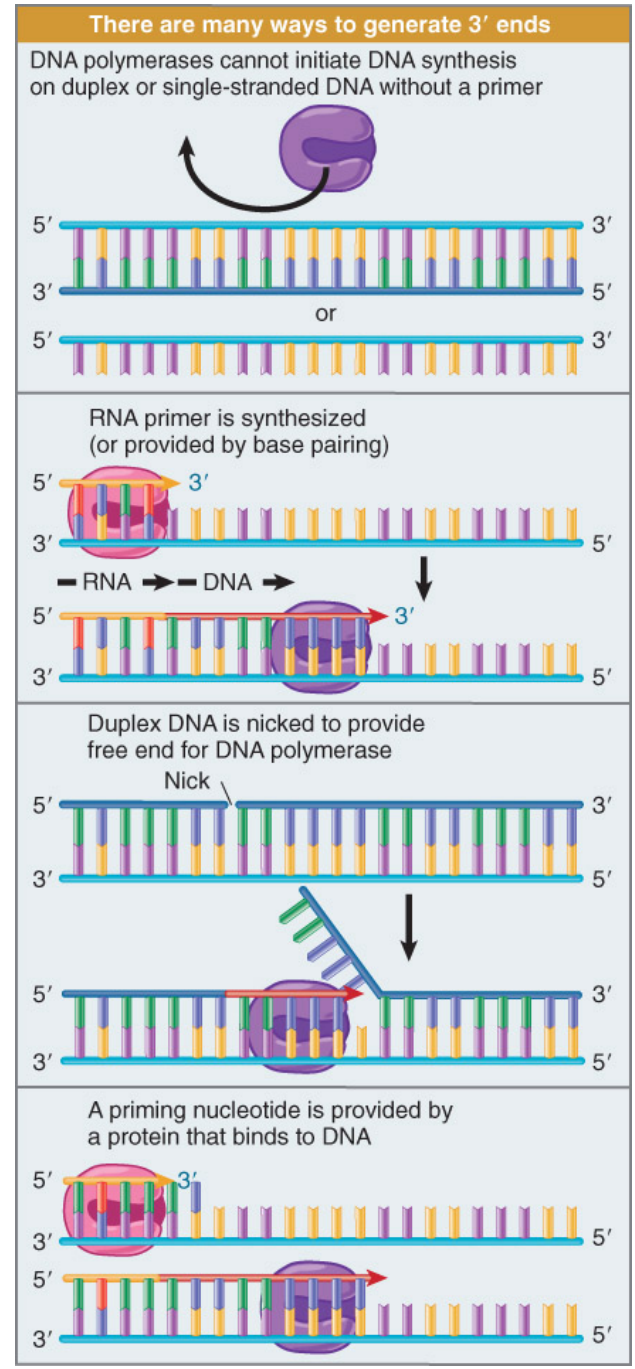
Generació d'un extrem 3'-OH lliure



Bacteris, eucariotes, alguns virus (M13, G4, ϕ X174ss a ds)

ϕ X174ds per a generar formes ss)

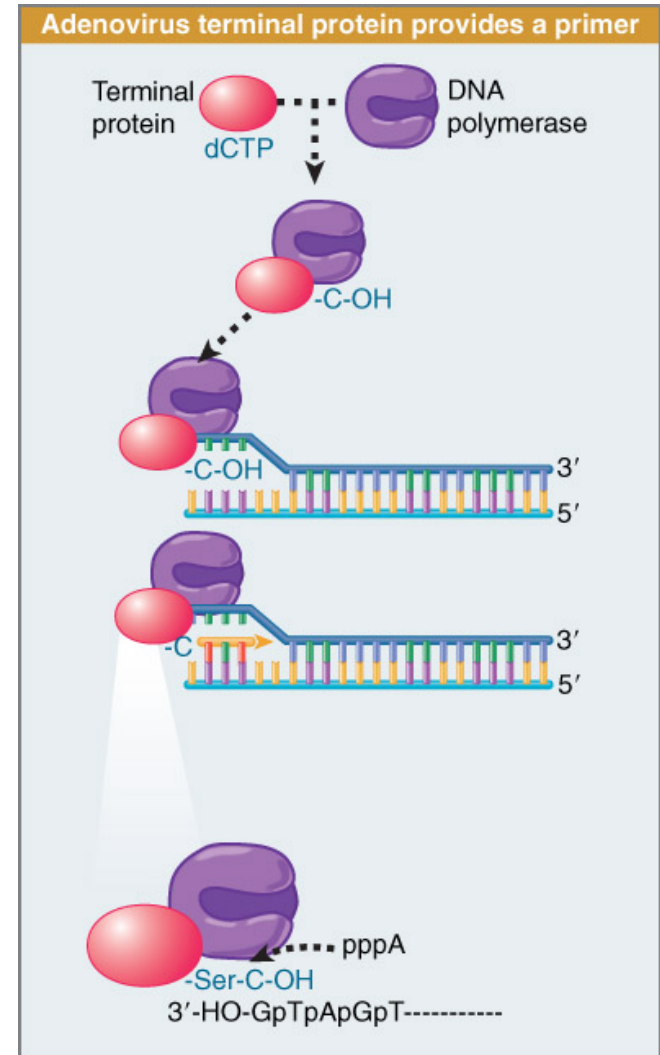
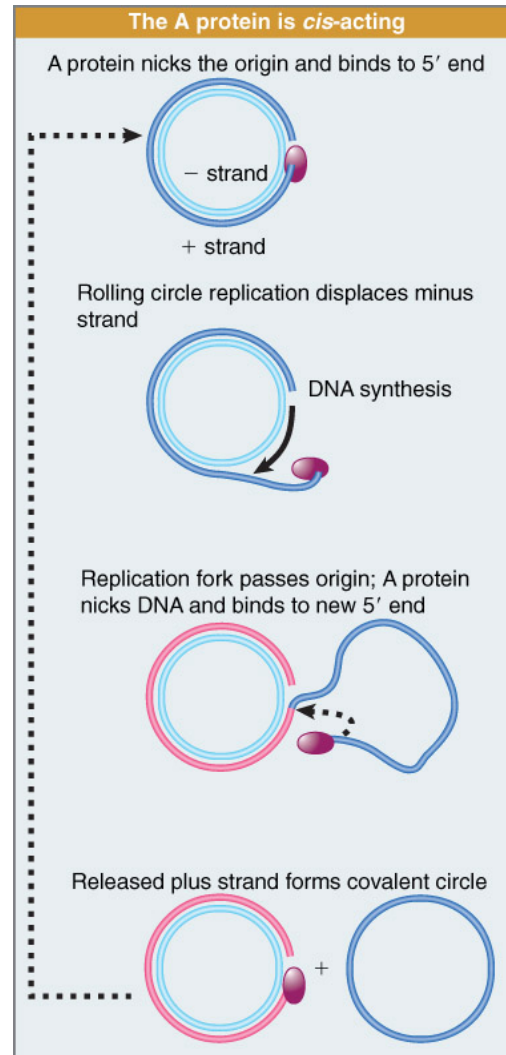
Adenovirus



Generació d'un extrem 3'-OH lliure

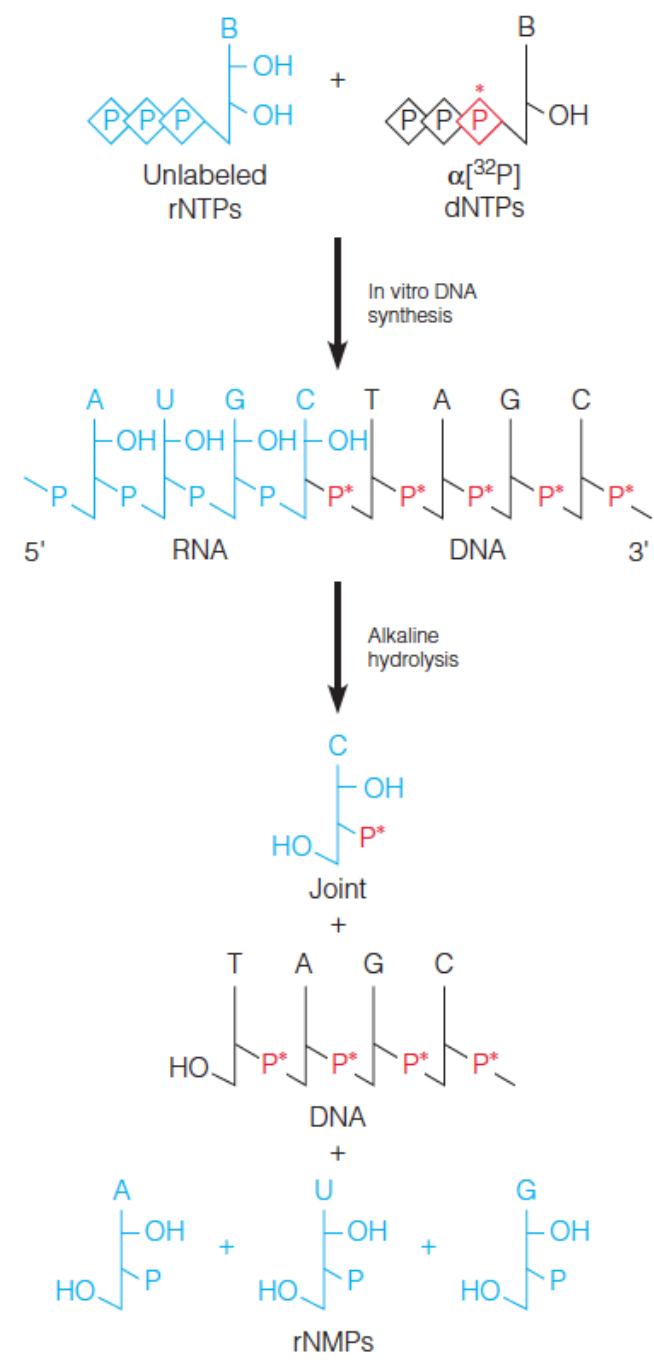
El virus ϕ X174 presenta una forma infectiva de cadena senzilla i una replicativa de doble cadena.

La replicació de ss a ds i la posterior de ds a ss tenen diferents requisits. Per a generar formes infectives a partir de formes replicatives es necessita un tall generat per la proteïna A



En Adenovirus l'encebador és una proteïna de 55 KDa que du un nucleòtid de citosina unit a un residu de serina

**Generació d'un
encebador d'RNA:
RNA polimerasa,
primasa i primosoma**



**Generació d'un
encebador d'RNA:
RNA polimerasa,
primasa i primosoma**

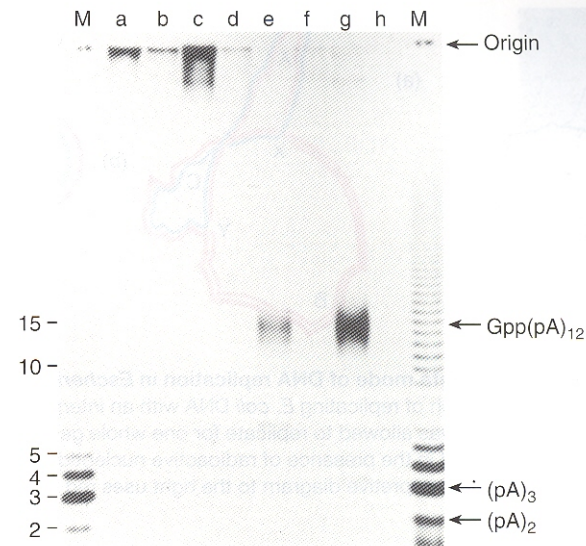
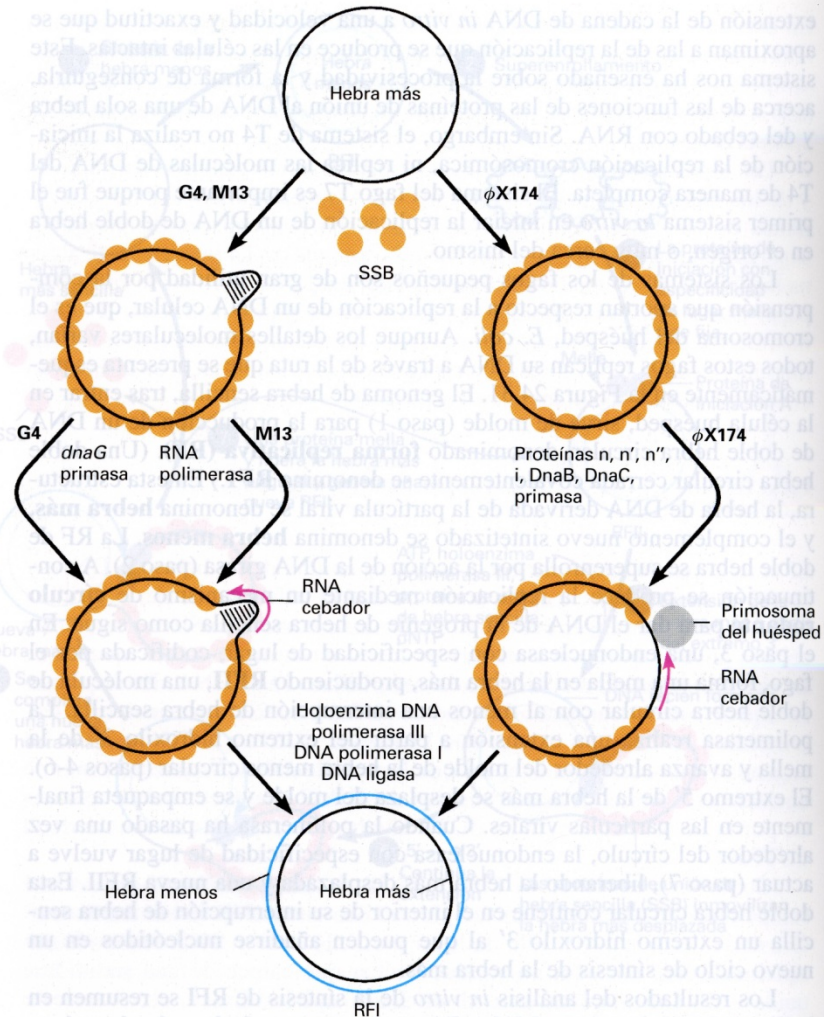


Figure 20.8 Finding and measuring RNA primers. Tuneko Okazaki and colleagues isolated Okazaki fragments from wild-type and mutant *E. coli* cells lacking one or both of the nucleases that degrade RNA primers. Next, they labeled the intact primers on the Okazaki fragments with [^{32}P]GTP and a capping enzyme. They destroyed the DNA in the fragments with DNase, leaving only the labeled primers. They subjected these primers to electrophoresis and detected their positions by autoradiography. Lanes M are markers. Lanes a–d, before DNase digestion; lanes e–h, after digestion. Lanes a and e, cells were defective in RNase H; lanes b and f, cells were defective in the nuclease activity of DNA polymerase I; lanes c and g, cells were defective in both RNase H and the nuclease activity of DNA polymerase I; lanes d and h, cells were wild-type. The best yield of primers occurred when both nucleases were defective (lane g), and the primers in all cases were 11 ± 1 nt long. The position of the 13-mer Gpp(pA) $_{12}$ marker is indicated at right. (Source: Kitani, T., K.-Y. Yoda, T. Ogawa, and T. Okazaki, Evidence that discontinuous DNA replication in *Escherichia coli* is primed by approximately 10 to 12 residues of RNA starting with a purine. *Journal of Molecular Biology* 184 (1985) p. 49, f. 2, by permission of Academic Press.)

Generació d'un encebador d'RNA: RNA polimerasa, primasa i primosoma

FIGURA 24.32

Conversión de las hebras más de un fago de DNA de una sola hebra en RFI.
Se presentan los mecanismos para G4, M13 y ϕ X174. A diferencia de M13 y G4, el cromosoma de ϕ X174 en replicación ensambla un primosoma idéntico al que se utiliza en la replicación del cromosoma de *E. coli*. SSB = proteína de unión de DNA de hebra sencilla.



Generació d'un cebador d'RNA: RNA polimerasa, primasa i primosoma

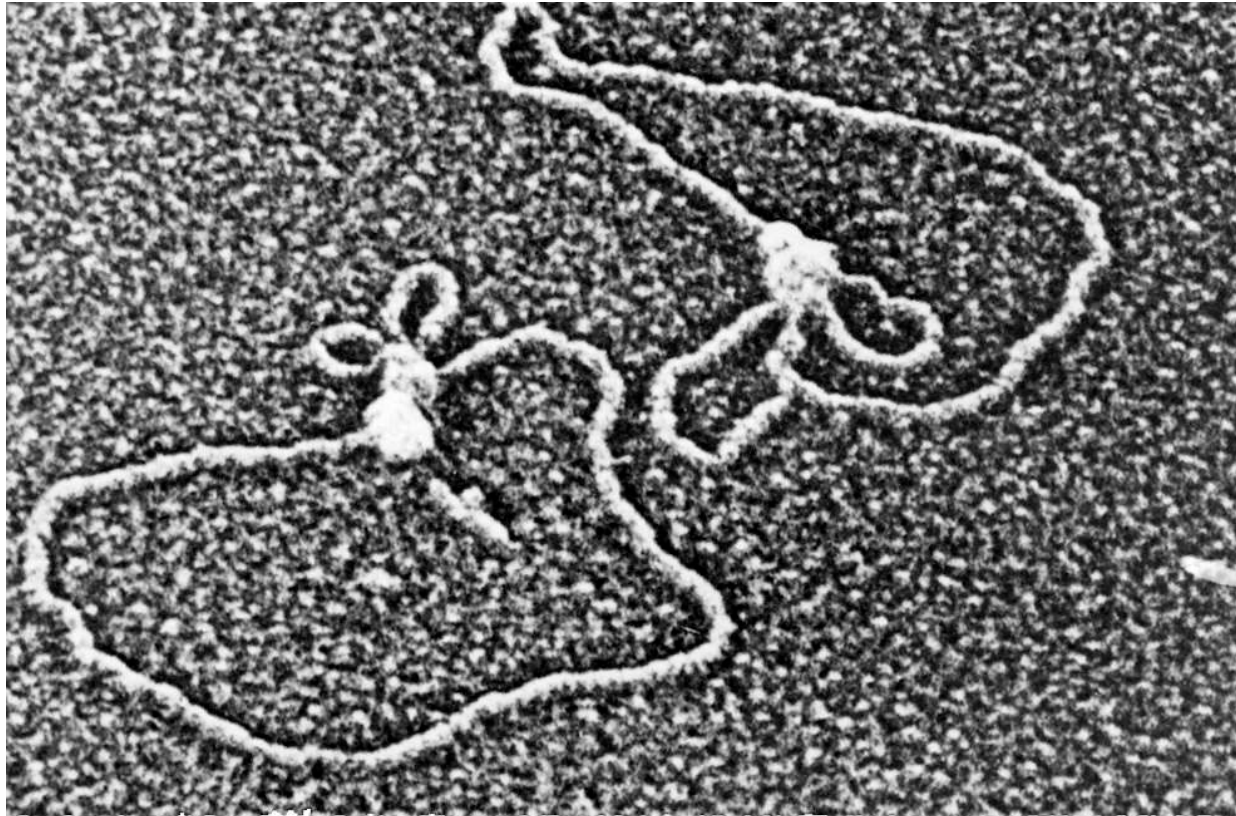
Protein	Subunit Structure	Subunit Mass (kD)
PriA	monomer	76
PriB	dimer	11.5
PriC	monomer	23
DnaT	trimer	22
DnaB	hexamer	50
DnaC ^b	monomer	29
Primase (DnaG)	monomer	60

^aThe complex of all primosome proteins but primase is known as the preprimosome.

^bNot part of the preprimosome or the primosome.

Source: Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), pp. 286–288, Freeman (1992).

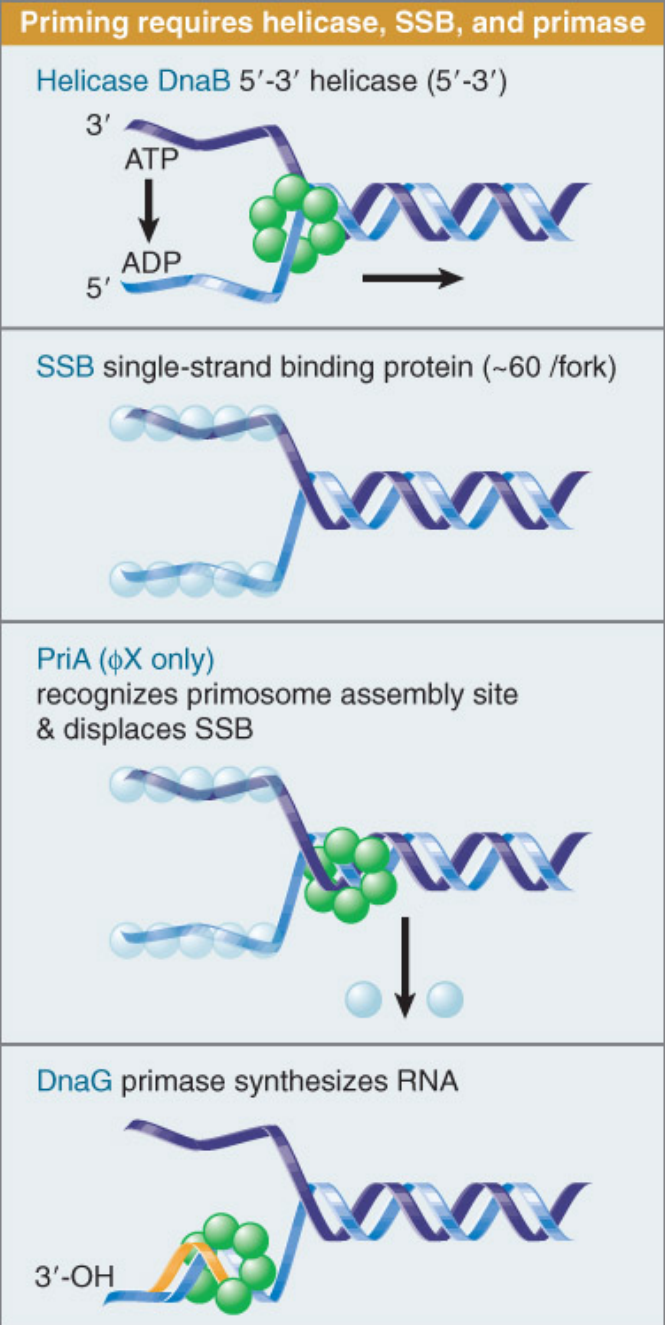
**Generació d'un encebador d'RNA:
RNA polimerasa, primasa i primosoma**



Courtesy of Jack Griffith, Lineberger Cancer Research Center, University of North Carolina

Micrografia electrònica d'un primosoma unit a la forma RF del DNA de ϕ X174. Aquests complexos sempre contenen un primosoma amb un o dos llaços de DNA menuts associats.

Helicases, proteīnes SSB
i primosoma

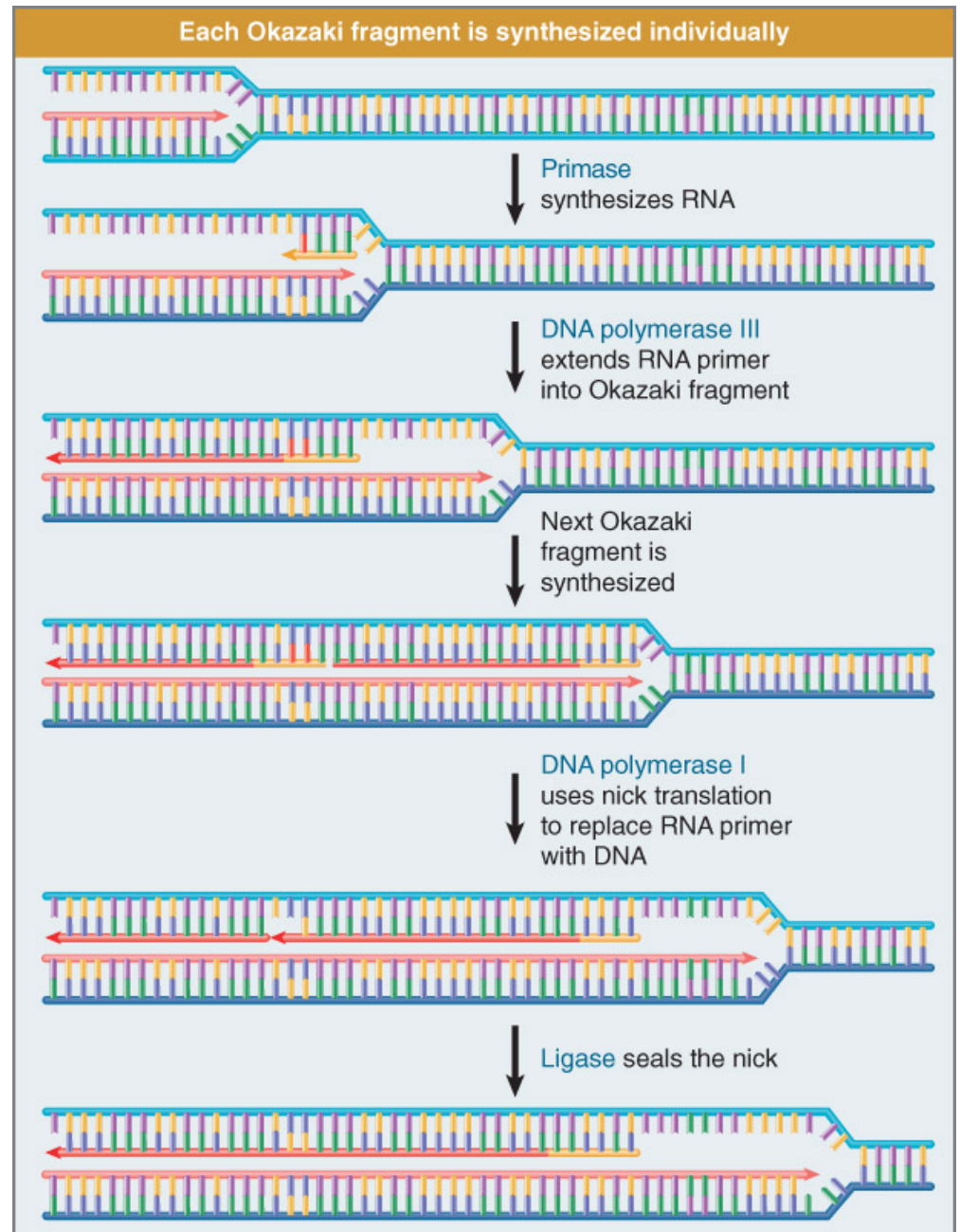


Proteïnes que participen en la replicació en *E. coli*

Protein	Subunit Structure	Subunit Mass (kD)
DnaB protein	hexamer	50
SSB	tetramer	19
Rep protein	monomer	68
PriA protein	monomer	76

Source: Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), p. 366, Freeman (1992).

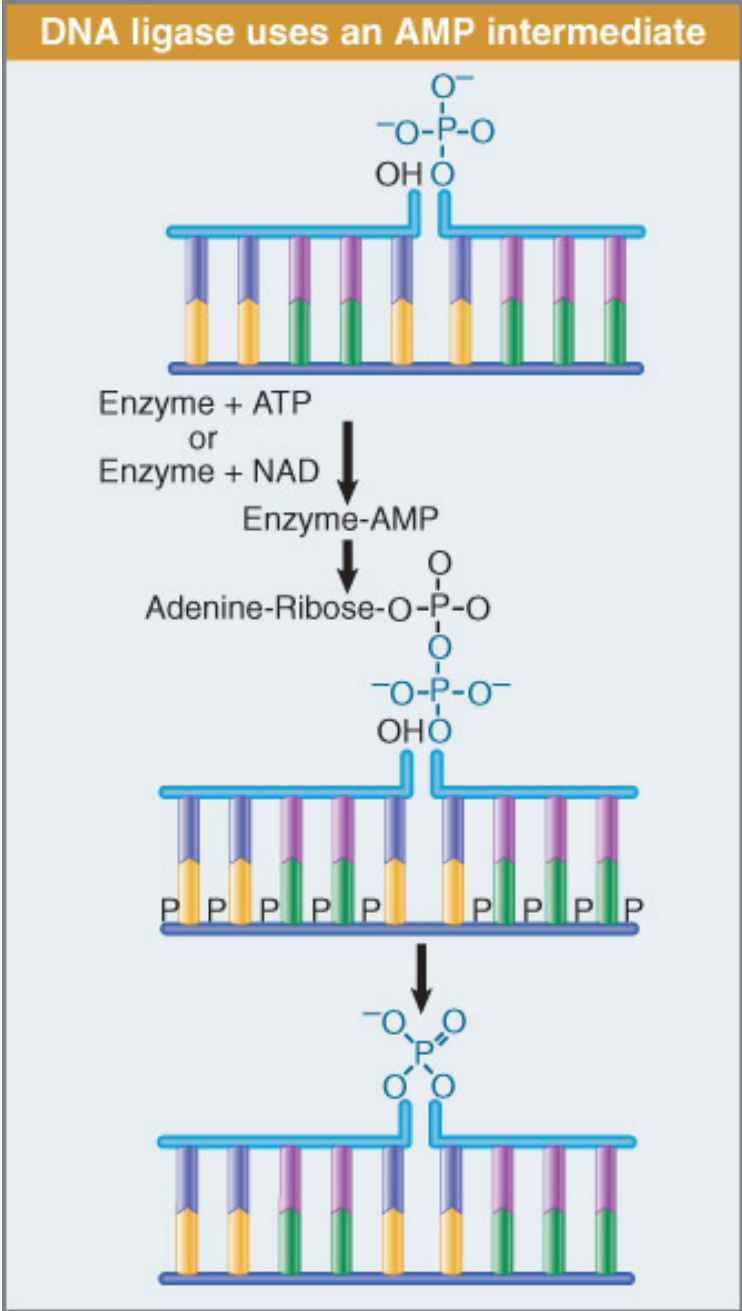
La replicació
semidiscontínua: activitats
enzimàtiques necessàries



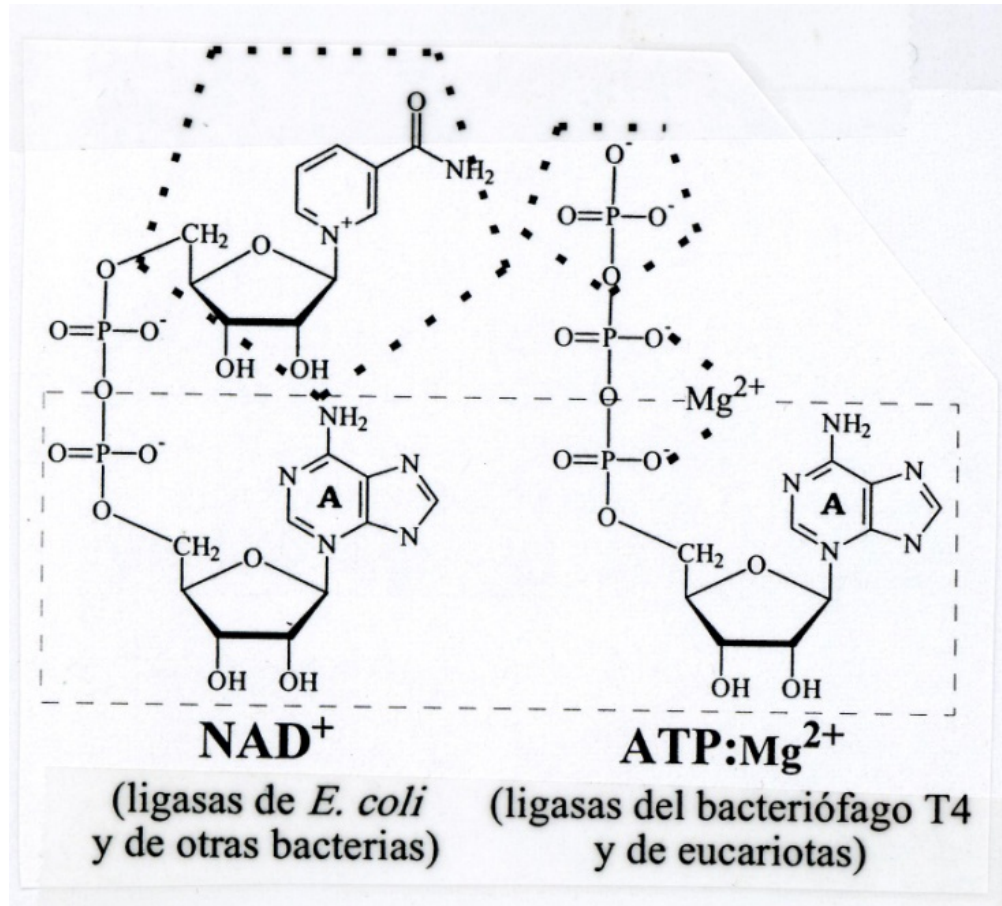
Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- DNA helicases: separació de cadenes
- Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla
- Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar
- **DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki**
- DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA

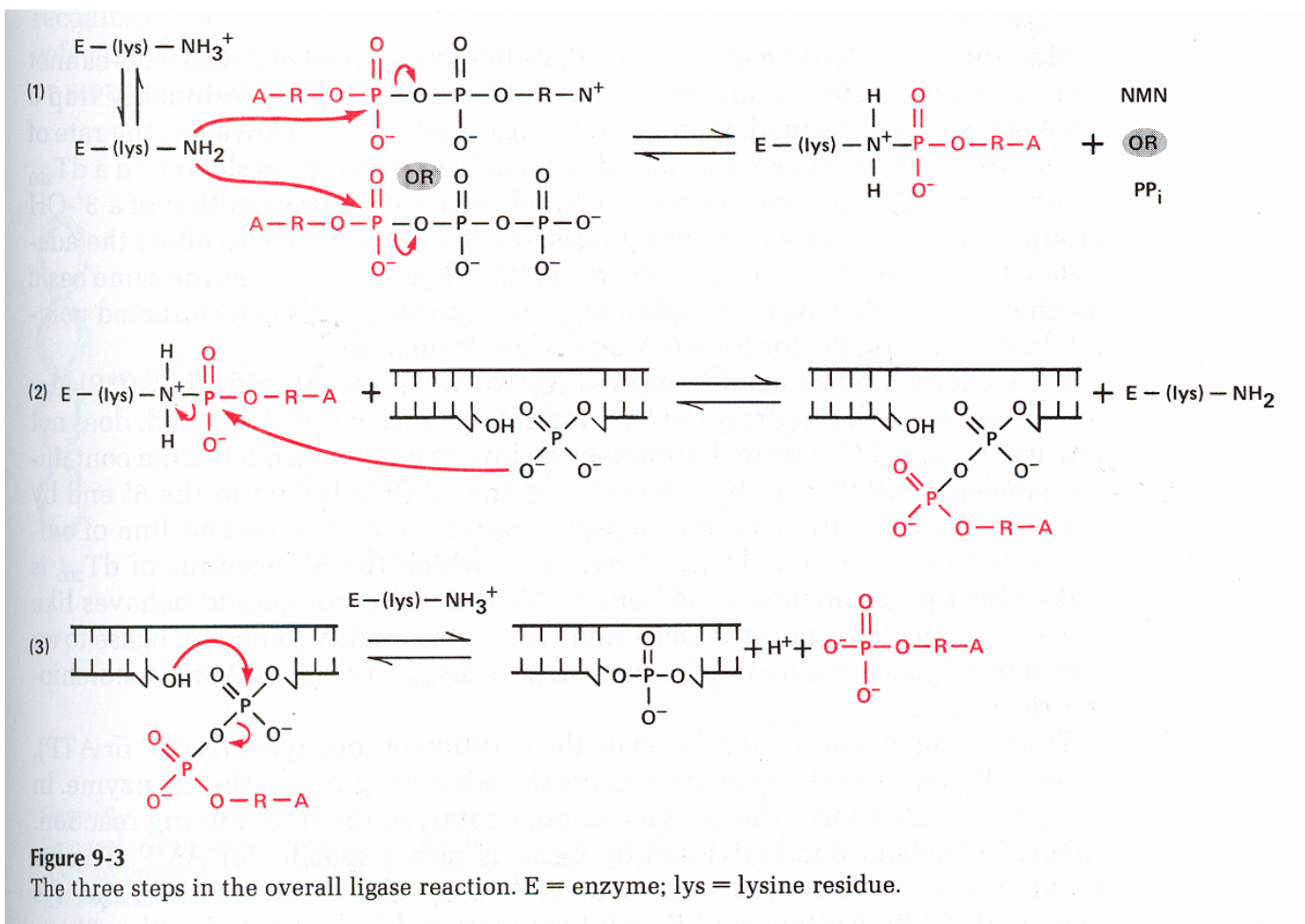
Unió de fragments
d'Okazaki:
les DNA ligases



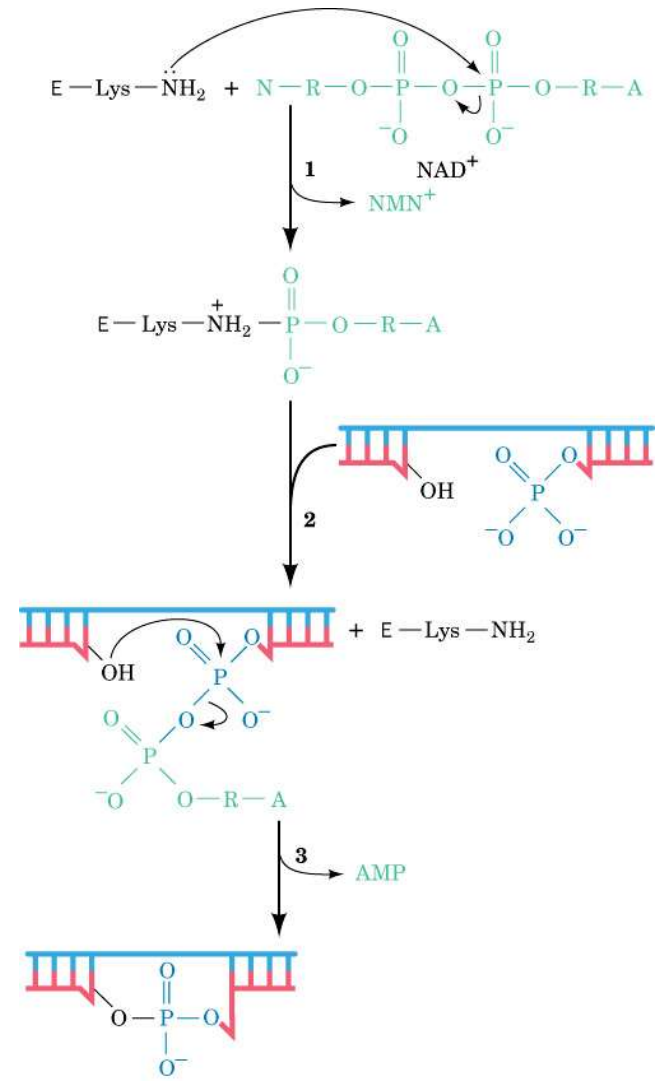
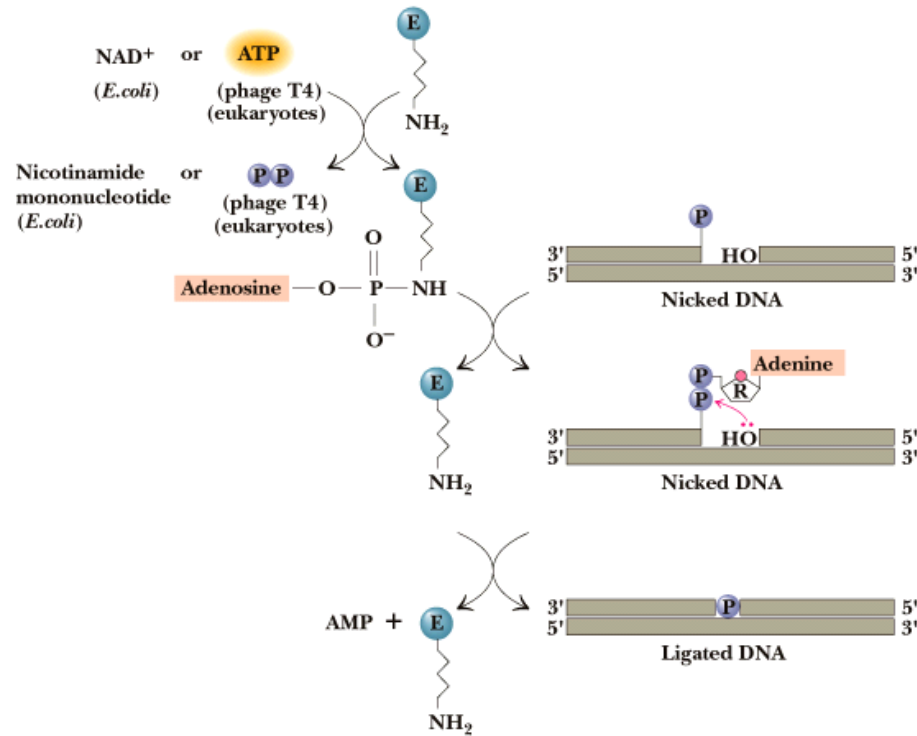
Unió de fragments d'Okazaki: les DNA ligases



Unió de fragments d'Okazaki: les DNA ligases



Unió de fragments d'Okazaki: les DNA ligases



Unió de fragments d'Okazaki: les DNA ligases

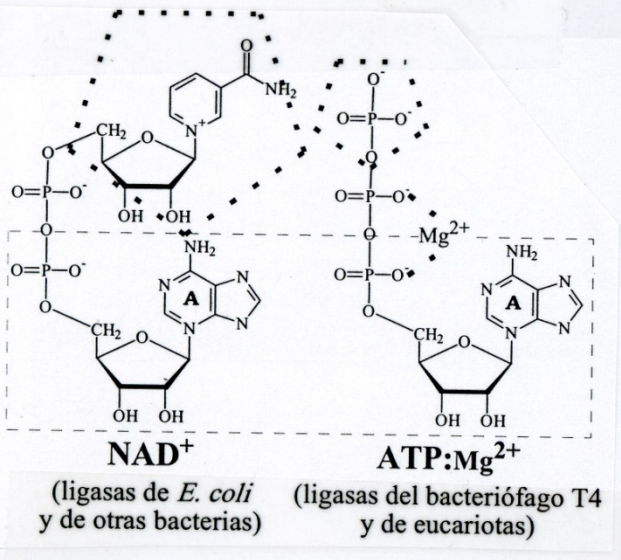


Table 9-1
Comparison of *E. coli* and T4 ligases

	<i>E. coli</i>	T4
Cofactor	NAD ⁺	ATP
NH ₄ ⁺ activation	yes	no
Substrates		
Poly dA · oligo dT	yes	yes (100) ^a
Poly rA · oligo dT	no	yes (2) ^a
Poly dT · oligo rA	no	yes (2) ^a
Poly dA · oligo rU	no	no
Base pairs at nick	> 10	≥ 6
Blunt ends	no ^b	yes

^a Relative to poly dA · oligo dT set at 100.

^b Some activity in the presence of hydrophilic polymers.

Només es produirà la unió dels fragments d'Okazaki quan els encebadors d'RNA hagen sigut substituïts per DNA

Enzims i proteïnes addicionals necessaris per a la replicació

- DNA helicases: separació de cadenes
- Proteïnes SSB: estabilització de les regions de cadena senzilla
- Proteïnes responsables de la generació d'extrems 3'-OH a elongar
- DNA ligases: unió de fragments d'Okazaki
- **DNA topoisomerases: control del superenrotllament del DNA**

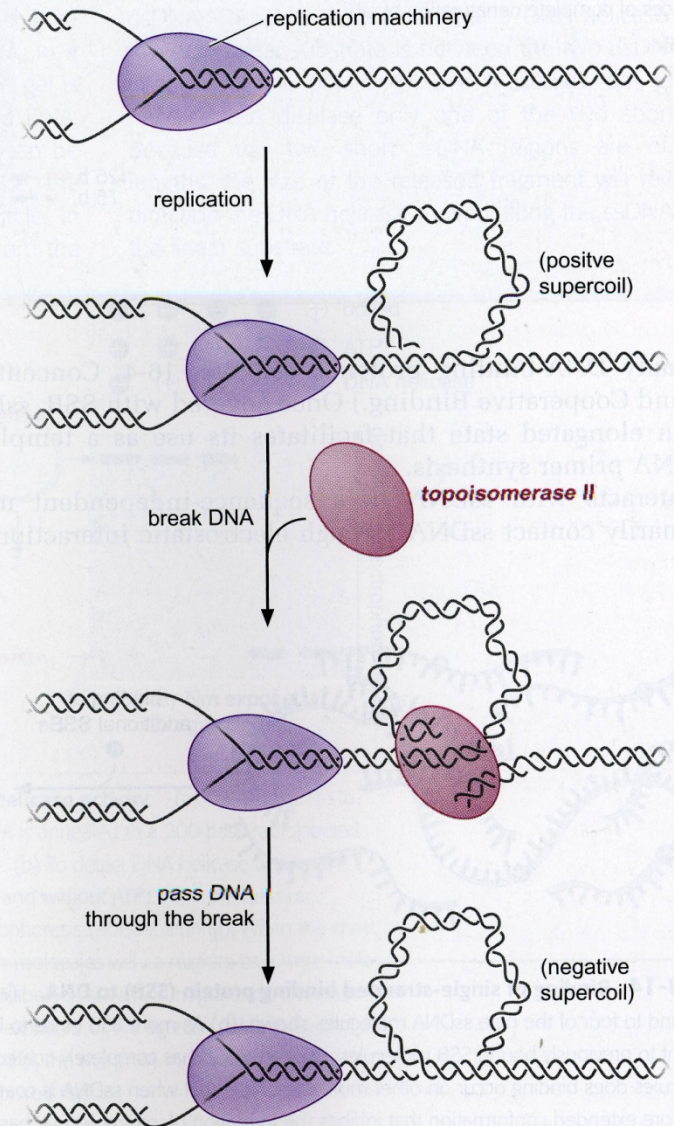
Algunes nocions bàsiques sobre superenrotllament

- Permet la compactació del DNA mitjançant la formació de voltes de la doble hèlix sobre si mateixa (superenrotllament plectonèmic) o sobre un complex proteic (s. toroidal).
- Un dels paràmetres que el defineixen és l'índex d'enllaç (*Linking number*, L , L_k): nombre d'enllaços topològics entre les dues cadenes (nombre de vegades que una cadena creua sobre l'altra si es considera, hipotèticament, que el DNA descansa sobre un pla). Només pot modificar el seu valor si s'introdueixen talls en enllaços fosfodièster (almenys un tall de cadena senzilla).
- Experimenta canvis locals com a conseqüència de processos com la transcripció o la replicació.

Regulació del superenrotllament: DNA topoisomereses

FIGURE 8-15 Action of topoisomerase at the replication fork.

As positive supercoils accumulate in front of the replication fork, topoisomerases rapidly remove them. In this diagram, the action of Topo II removes the positive supercoil induced by a replication fork. By passing one part of the unreplicated dsDNA through a double-stranded break in a nearby unreplicated region, the positive supercoils can be removed. It is worth noting that this change would reduce the linking number by two and thus would only have to occur once every 20 bp replicated. Although the action of a type II topoisomerase is illustrated here, type I topoisomerases can also remove the positive supercoils generated by the replication fork.



DNA topoisomerases

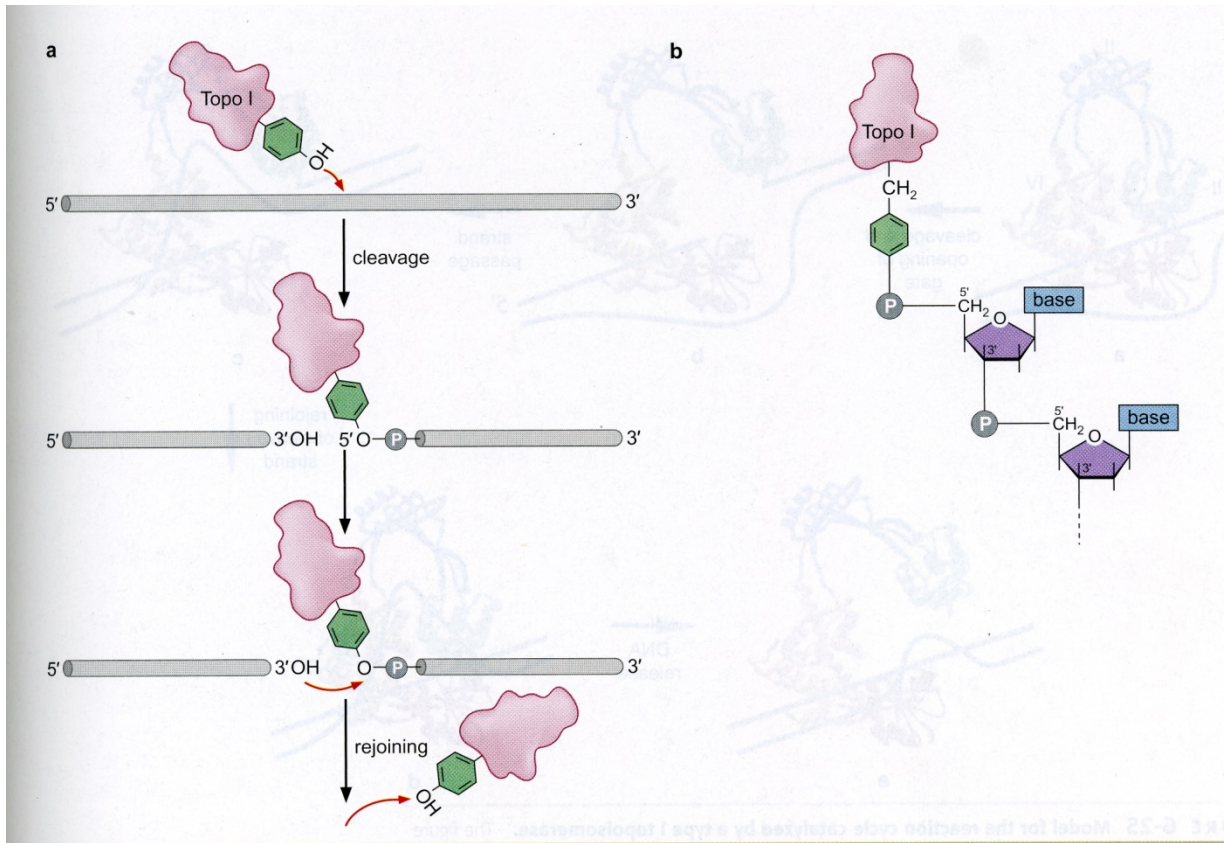
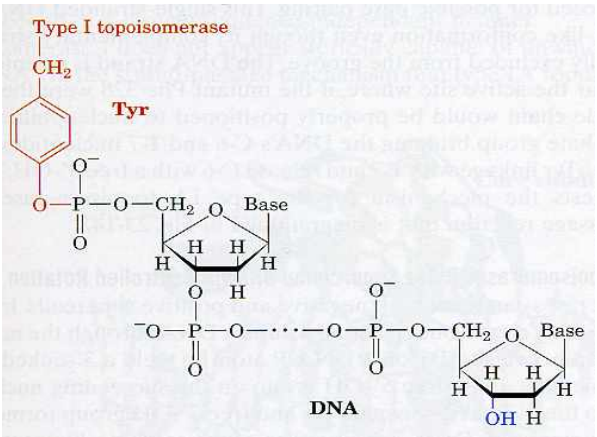


FIGURE 6-24 Topoisomerases cleave DNA using a covalent tyrosine-DNA intermediate.

(a) Schematic of the cleavage and rejoining reaction. For simplicity, only a single strand of DNA is shown. See Figure 6-25 for a more realistic picture. The same mechanism is used by type II topoisomerases, although two enzyme subunits are required, one to cleave each of the two DNA strands. Topoisomerases sometimes cut to the 5' side and sometimes to the 3' side. (b) Close-up view of the phospho-tyrosine covalent intermediate.



DNA topoisomereses: tipus

Tipus	Subfamília	Nom	Organisme	Necessitat d'ATP	Necessitat de Mg ²⁺	Unió de la Tyr a l'extrem del DNA	Mecanisme
I	IA	Topo I	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	/	+	5'	Pas de cadena
		Topo III	Eubacteris, arqueobacteris, eucariotes	/	+	5'	Pas de cadena
		Girasa Reversa	Eubacteris, arqueobacteris	+	+	5'	Pas de cadena
	IB	Topo I	Eucariotes, virus, plantes	/	/	3'	Rotació controlada
	IC	Topo V	Arqueobacteris	/	/	3'	Rotació controlada
II	IIA	Topo II	Eucariotes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Girasa	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Topo IV	Eubacteris	+	+	5'	Pas de dsDNA
	IIB	Topo VI	Arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA

**DNA topoisomerasas que participen en la replicació
bacteriana: tipus I**

DNA topoisomereses: tipus

Tipus	Subfamília	Nom	Organisme	Necessitat d'ATP	Necessitat de Mg ²⁺	Unió de la Tyr a l'extrem del DNA	Mecanisme
I	IA	Topo I	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	/	+	5'	Pas de cadena
		Topo III	Eubacteris, arqueobacteris, eucariotes	/	+	5'	Pas de cadena
		Girasa Reversa	Eubacteris, arqueobacteris	+	+	5'	Pas de cadena
	IB	Topo I	Eucariotes, virus, plantes	/	/	3'	Rotació controlada
	IC	Topo V	Arqueobacteris	/	/	3'	Rotació controlada
II	IIA	Topo II	Eucariotes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Girasa	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Topo IV	Eubacteris	+	+	5'	Pas de dsDNA
	IIB	Topo VI	Arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA

DNA topoisomerases

Table I. The three DNA topoisomerase families

Family	Characteristics	Enzyme	Gene	Organism	Ref(s)
Type I-5'	Cleave single DNA strands, forming a 5'-phosphotyrosine covalent intermediate	Bacterial DNA topoisomerase I	<i>TOPA</i>	<i>Escherichia coli</i>	a
		Bacterial DNA topoisomerase III	<i>TOPB</i>	<i>Escherichia coli</i>	b
		Eukaryotic DNA topoisomerase III	<i>TOP3</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	c
		Reverse gyrase		<i>Sulphobus acidocaldarius</i>	d
Type I-3'	Bind duplex DNA and cleave one of the strands, forming a 3'-phosphotyrosine covalent intermediate	Eukaryotic DNA topoisomerase I	<i>TOP1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	e
			<i>TOP1</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	f
			<i>TOP1</i>	<i>Homo sapiens</i>	g
		DNA topoisomerase V		<i>Methanopyrus kandleri</i>	h
		Vaccinia virus topoisomerase			i
		Variola virus topoisomerase			j
			Shope fibroma virus topoisomerase	k	
Type II	Cleave both strands of duplex DNA, forming a pair of 5'-phosphotyrosine covalent intermediates. Function as dyadic enzymes and are ATP dependent	Bacterial DNA gyrase	<i>GyrA + GyrB</i>	<i>Escherichia coli</i>	l, m
		Bacterial DNA topoisomerase IV	<i>ParC + ParE</i>	<i>Escherichia coli</i>	n
		Eukaryotic DNA topoisomerase II	<i>TOP2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	o
			<i>TOP2</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	p
			<i>TOP2α</i>	<i>Homo sapiens</i>	q
			<i>Top2β</i>	<i>Homo sapiens</i>	r, s
		Bacteriophage T4 topoisomerase	<i>gn39 + gn60 + gn52</i>		t
African swine fever virus topoisomerase			u		

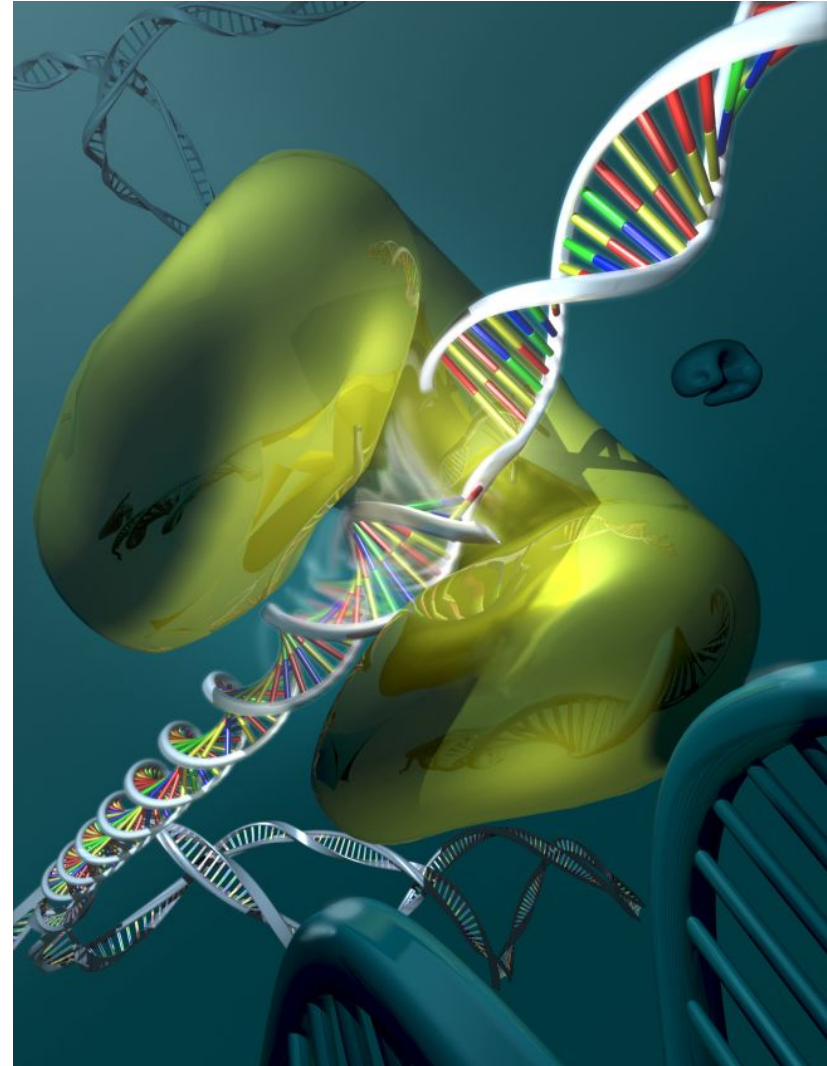
DNA topoisomerases

Table 3.2
Properties of DNA Topoisomerases

Enzyme	Type	Gene	Size (kDa)	ΔL	Cofactors	Activities
Prokaryotic <i>E. coli</i> Topoisomerase I	I	<i>topA</i>	97	increase L; $\Delta L = 1$	Mg^{2+}	Relaxes negatively supercoiled DNA; (will form knots and catenated DNA in nicked molecules); DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> DNA gyrase	II	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	105 95	decrease L; $\Delta L = -2$ increase L; $\Delta L = 2$	ATP, Mg^{2+}	ATP-dependent negative supercoiling (to $\sigma < -0.1$); ATP-independent relaxation of negatively supercoiled DNA; relaxes positively supercoiled DNA; (will form knotted and catenated DNA); responsible for supercoiling the chromosome; DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> Topo III	I	<i>topB</i>	73.2	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Decatenase activity, also relaxes negatively supercoiled DNA; active in chromosome decatenation following replication <i>in vitro</i>
<i>E. coli</i> Topo IV	II	<i>parC</i> <i>parE</i>	75 70	increase L; $\Delta L = +2$	ATP, Mg^{2+}	Similar to DNA gyrase; has a DNA relaxing activity but will not negatively supercoil DNA; involved in chromosome decatenation following replication
Bacteriophage T4 topoisomerase	II	gene 39 gene 52 gene 60	64 51 12	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes negatively or positively supercoiled DNA; does not possess DNA supercoiling activity
Eukaryotic (Yeast) Topo I	I	<i>top1</i>	90	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 1$	none	Relaxes positively or negatively supercoiled DNA; DNA linked by a 3' phosphotyrosine bond (human enzyme)
Topo II	II	<i>top2</i>	164	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes positively or negatively supercoiled bond DNA; DNA linked by a 5' phosphotyrosine
Topo III	I	<i>top3</i>	74	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Weak relaxation activity; only partially relaxes negative supercoiled DNA; strong activity on DNA with single-strand heteroduplex

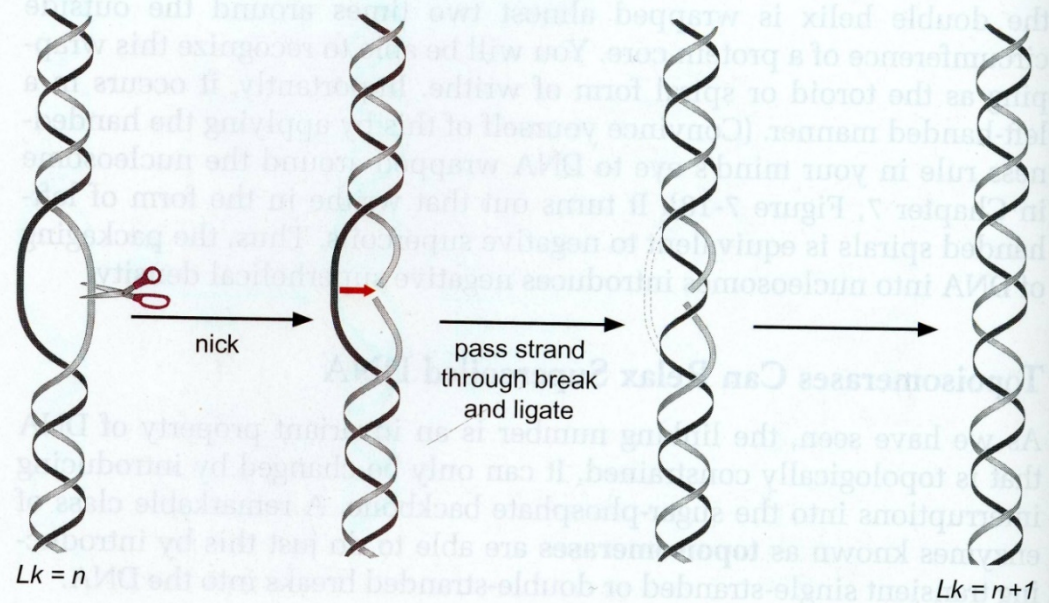
DNA topoisomerases: tipus I

- ❑ Conserven l'energia de l'enllaç mitjançant la formació de l'enllaç fosfotirosina
- ❑ No necessiten cap font d'energia addicional (tret de la girasa reversa)
- ❑ Segons la subfamília (IA o IB) poden seguir diferents tipus de mecanismes per a la relaxació del DNA:
pas de cadena o rotació controlada
- ❑ Només produeixen tall en una de les cadenes
- ❑ Produeixen ΔL de ± 1 , en funció del tipus de topoisomerasa:
la majoria del tipus IA relaxen superenrotllament negatiu mentre que alguna relaxa superenrotllament positiu. Les de tipus IB poden relaxar els dos tipus de superenrotllament.



DNA topoisomerasa IA

FIGURE 6-22 Schematic mechanism of action for topoisomerase I. The enzyme cuts a single strand of the DNA duplex, passes the uncut strand through the break, then reseals the break. The process increases the linking number by +1.



Reacció de la DNA topoisomerasa tipus IA

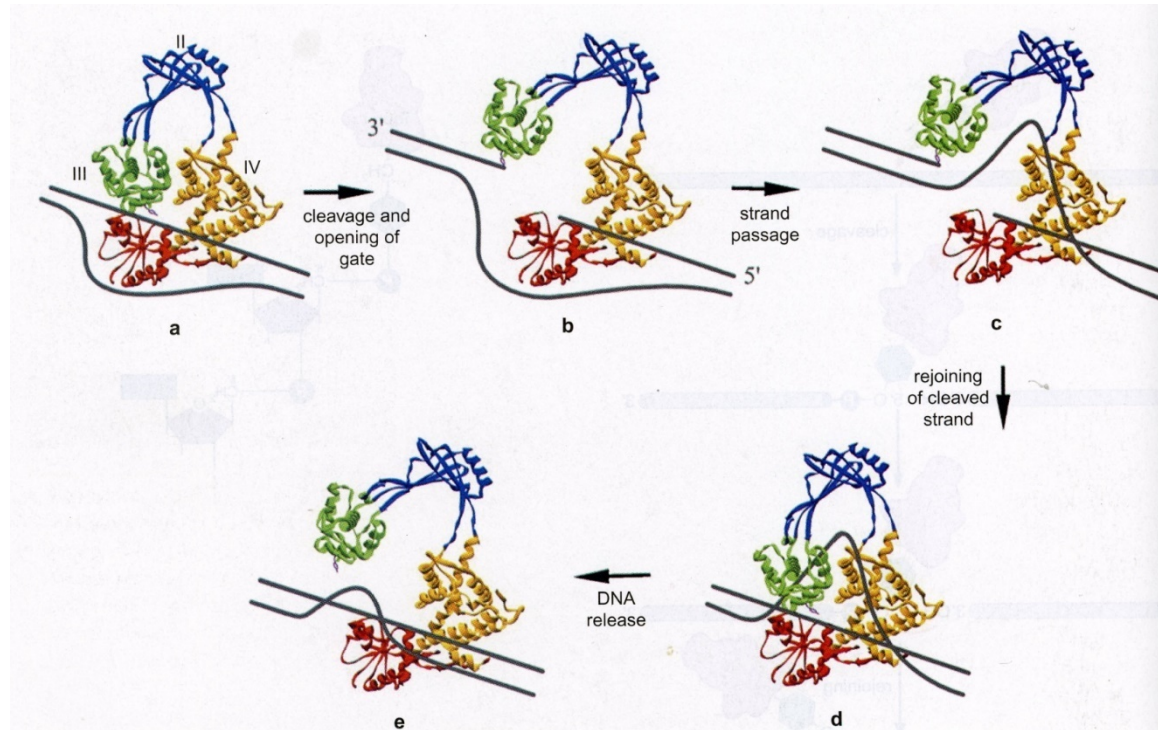
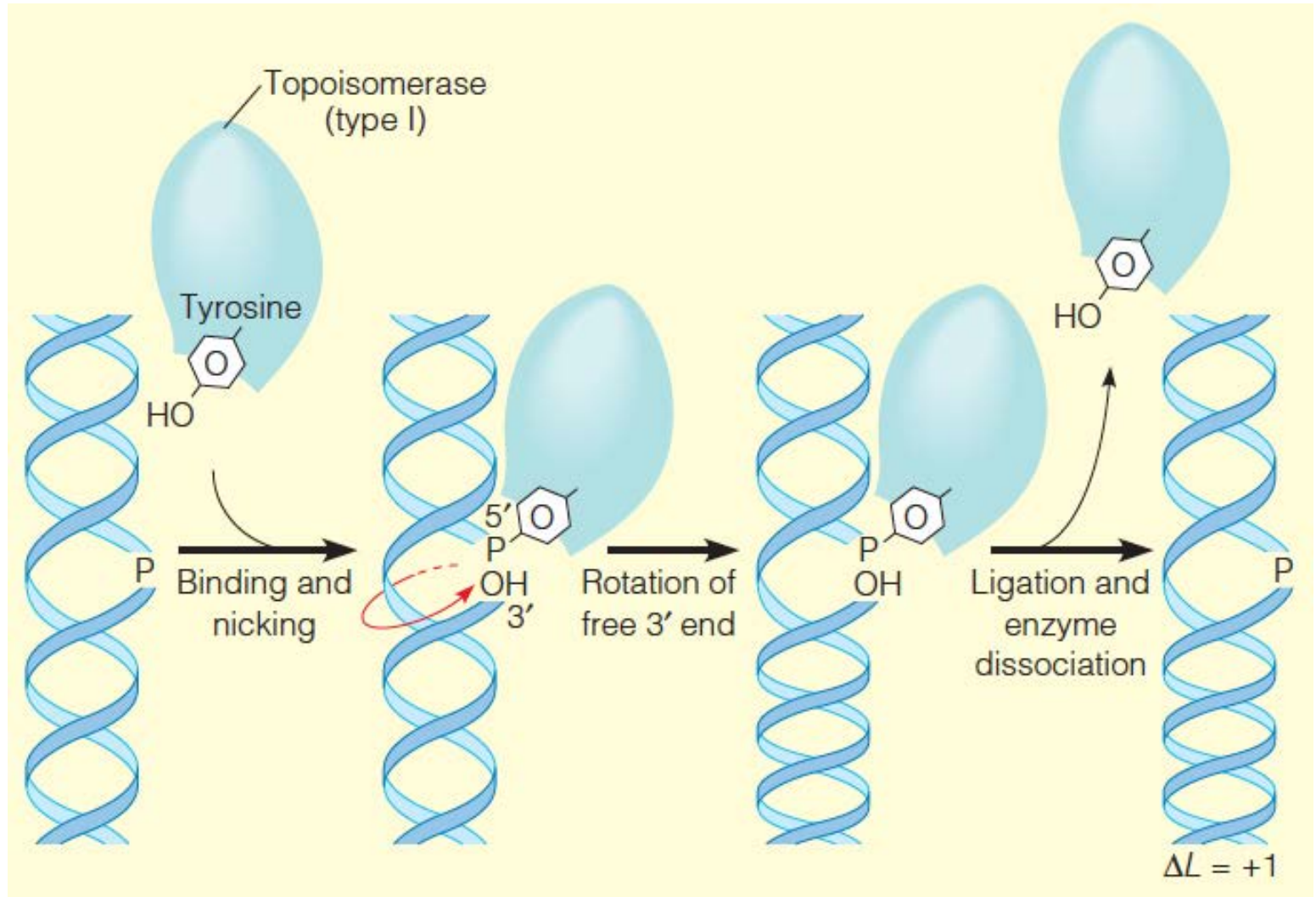


FIGURE 6-25 Model for the reaction cycle catalyzed by a type I topoisomerase. The figure shows a series of proposed steps for the relaxation of one turn of a negatively supercoiled plasmid DNA. The two strands of DNA are shown as dark gray (and not drawn to scale). The four domains of the protein are labeled in panel (a). Domain I is shown in red, II is blue, III is green, and IV is orange. (Source: Adapted from Champoux J. 2001. DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry* 70: 369–413. Copyright © 2001 by Annual Reviews. www.annualreviews.org.)

DNA topoisomerasa IB



**DNA topoisomerasas que participen en la replicació
bacteriana: tipus II**

DNA topoisomereses: tipus

Tipus	Subfamília	Nom	Organisme	Necessitat d'ATP	Necessitat de Mg ²⁺	Unió de la Tyr a l'extrem del DNA	Mecanisme
I	IA	Topo I	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	/	+	5'	Pas de cadena
		Topo III	Eubacteris, arqueobacteris, eucariotes	/	+	5'	Pas de cadena
		Girasa Reversa	Eubacteris, arqueobacteris	+	+	5'	Pas de cadena
	IB	Topo I	Eucariotes, virus, plantes	/	/	3'	Rotació controlada
	IC	Topo V	Arqueobacteris	/	/	3'	Rotació controlada
II	IIA	Topo II	Eucariotes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Girasa	Eubacteris, arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA
		Topo IV	Eubacteris	+	+	5'	Pas de dsDNA
	IIB	Topo VI	Arqueobacteris, plantes	+	+	5'	Pas de dsDNA

DNA topoisomerases

Table I. The three DNA topoisomerase families

Family	Characteristics	Enzyme	Gene	Organism	Ref(s)
Type I-5'	Cleave single DNA strands, forming a 5'-phosphotyrosine covalent intermediate	Bacterial DNA topoisomerase I	<i>TOPA</i>	<i>Escherichia coli</i>	a
		Bacterial DNA topoisomerase III	<i>TOPB</i>	<i>Escherichia coli</i>	b
		Eukaryotic DNA topoisomerase III	<i>TOP3</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	c
		Reverse gyrase		<i>Sulphobus acidocaldarius</i>	d
Type I-3'	Bind duplex DNA and cleave one of the strands, forming a 3'-phosphotyrosine covalent intermediate	Eukaryotic DNA topoisomerase I	<i>TOP1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	e
			<i>TOP1</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	f
			<i>TOP1</i>	<i>Homo sapiens</i>	g
		DNA topoisomerase V		<i>Methanopyrus kandleri</i>	h
		Vaccinia virus topoisomerase			i
		Variola virus topoisomerase			j
Shope fibroma virus topoisomerase			k		
Type II	Cleave both strands of duplex DNA, forming a pair of 5'-phosphotyrosine covalent intermediates. Function as dyadic enzymes and are ATP dependent	Bacterial DNA gyrase	<i>GyrA + GyrB</i>	<i>Escherichia coli</i>	l, m
		Bacterial DNA topoisomerase IV	<i>ParC + ParE</i>	<i>Escherichia coli</i>	
		Eukaryotic DNA topoisomerase II	<i>TOP2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	o
			<i>TOP2</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	p
			<i>TOP2α</i>	<i>Homo sapiens</i>	q
			<i>Top2β</i>	<i>Homo sapiens</i>	r, s
		Bacteriophage T4 topoisomerase	<i>gn39 + gn60 + gn52</i>		t
African swine fever virus topoisomerase			u		

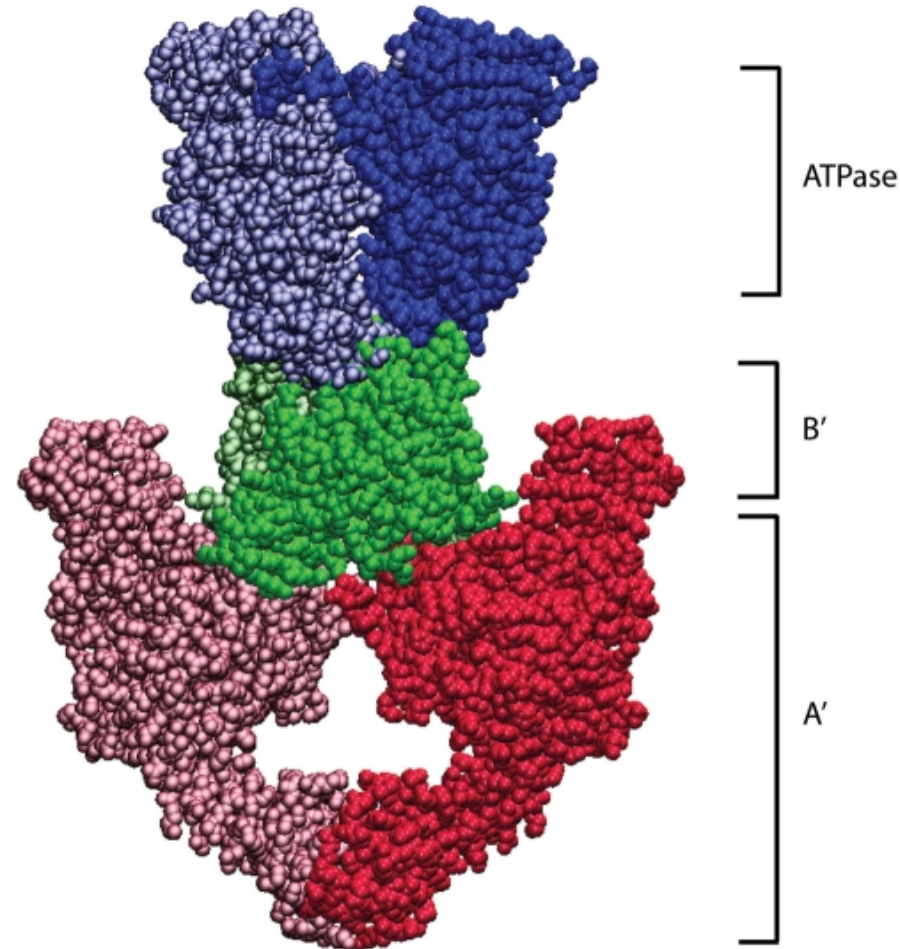
DNA topoisomerases

Table 3.2
Properties of DNA Topoisomerases

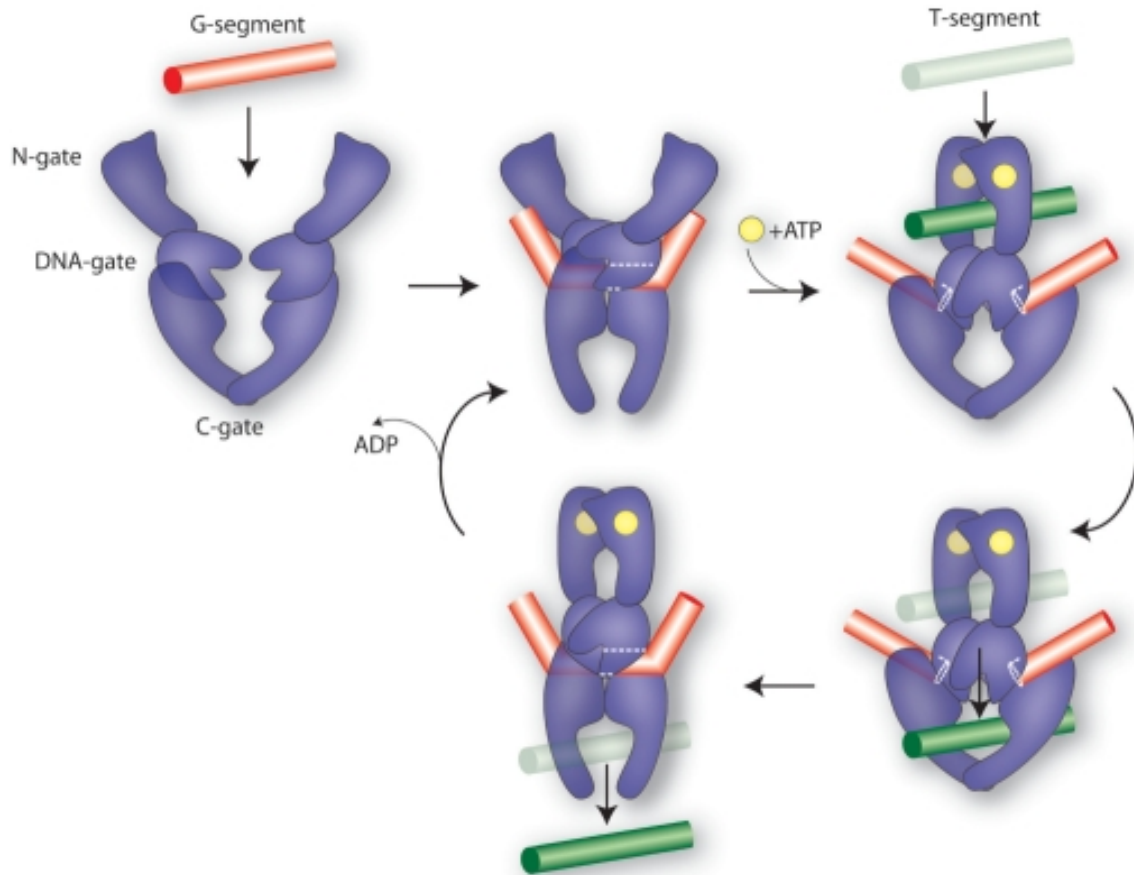
Enzyme	Type	Gene	Size (kDa)	ΔL	Cofactors	Activities
Prokaryotic <i>E. coli</i> Topoisomerase I	I	<i>topA</i>	97	increase L; $\Delta L = 1$	Mg^{2+}	Relaxes negatively supercoiled DNA; (will form knots and catenated DNA in nicked molecules); DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> DNA gyrase	II	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	105 95	decrease L; $\Delta L = -2$ increase L; $\Delta L = 2$	ATP, Mg^{2+}	ATP-dependent negative supercoiling (to $\sigma < -0.1$); ATP-independent relaxation of negatively supercoiled DNA; relaxes positively supercoiled DNA; (will form knotted and catenated DNA); responsible for supercoiling the chromosome; DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> Topo III	I	<i>topB</i>	73.2	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Decatenase activity, also relaxes negatively supercoiled DNA; active in chromosome decatenation following replication <i>in vitro</i>
<i>E. coli</i> Topo IV	II	<i>parC</i> <i>parE</i>	75 70	increase L; $\Delta L = +2$	ATP, Mg^{2+}	Similar to DNA gyrase; has a DNA relaxing activity but will not negatively supercoil DNA; involved in chromosome decatenation following replication
Bacteriophage T4 topoisomerase	II	gene 39 gene 52 gene 60	64 51 12	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes negatively or positively supercoiled DNA; does not possess DNA supercoiling activity
Eukaryotic (Yeast) Topo I	I	<i>top1</i>	90	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 1$	none	Relaxes positively or negatively supercoiled DNA; DNA linked by a 3' phosphotyrosine bond (human enzyme)
Topo II	II	<i>top2</i>	164	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes positively or negatively supercoiled bond DNA; DNA linked by a 5' phosphotyrosine
Topo III	I	<i>top3</i>	74	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Weak relaxation activity; only partially relaxes negative supercoiled DNA; strong activity on DNA with single-strand heteroduplex

DNA topoisomerases: tipus II

- ❑ Conserven l'energia de l'enllaç mitjançant la formació d'enllaços fosfotirosina
- ❑ Necessiten l'energia de l'ATP. Consumeixen una molècula d'ATP per a generar la porta per al pas del dsDNA i una altra per a tornar al seu estat inicial
- ❑ Produeixen talls en les dues cadenes
- ❑ Produeixen ΔL de ± 2 . Poden relaxar superenrotllament positiu i negatiu. La girasa bacteriana és capaç d'introduir superenrotllament negatiu
- ❑ La forma funcional és un dímer amb un domini Nt amb activitat ATPasa i dominis A' i B' que contenen el centre catalític per al tall i unió posterior



DNA topoisomerases: tipus II



Catalytic cycle of topo II. Topo II binds to a DNA duplex, the G-segment (red bar), causing significant DNA bending. ATP (yellow circle) binds to the N-terminal domains, promoting the capture of a second DNA duplex, the T-segment (green bar) and dimerization of the ATPase domains (N-gate). Closure of the N-gate stimulates cleavage of G-segment DNA, coupled with opening of the DNA gate to allow passage of the T-segment through this double-stranded break. The G-segment is religated and the T-segment exits after opening of the C-gate.

DNA topoisomerases: tipus II

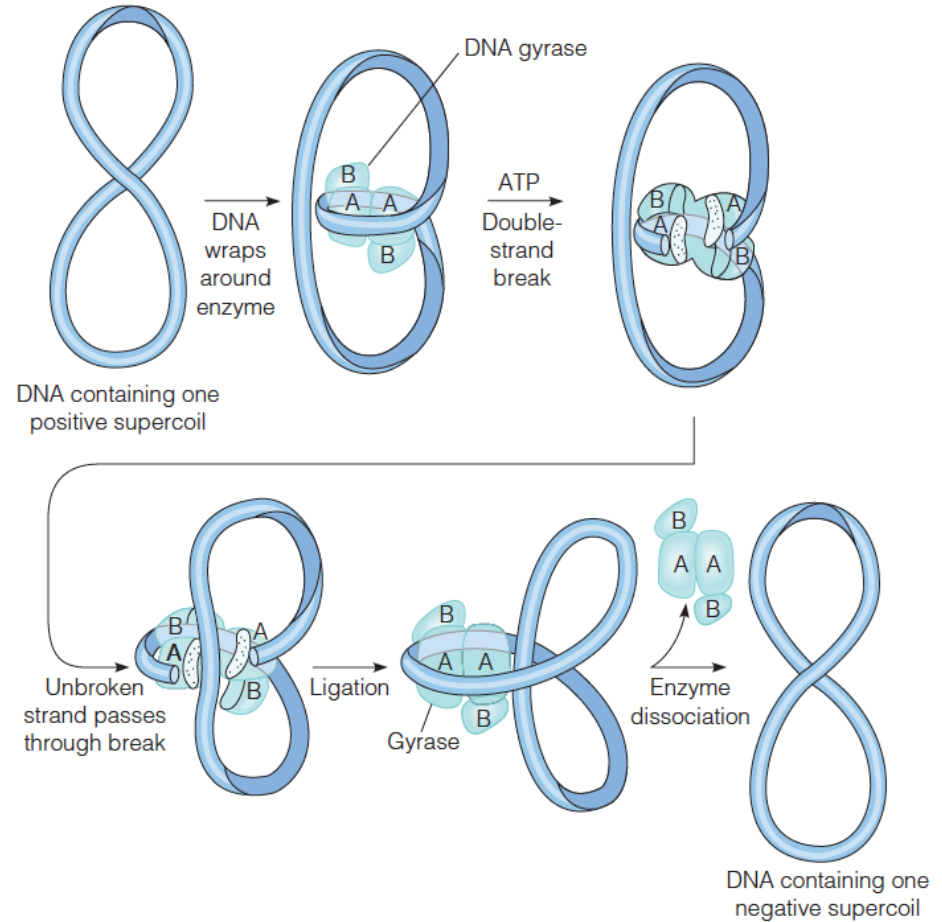
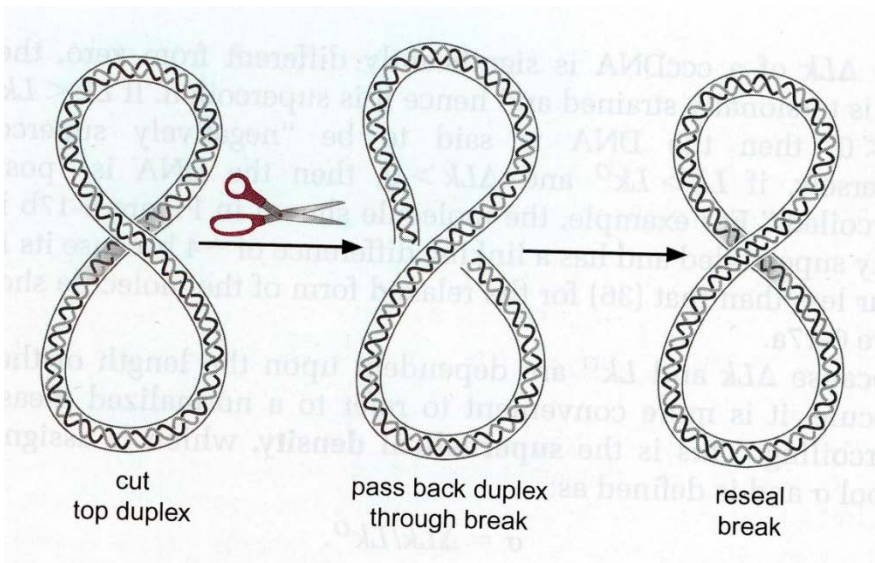
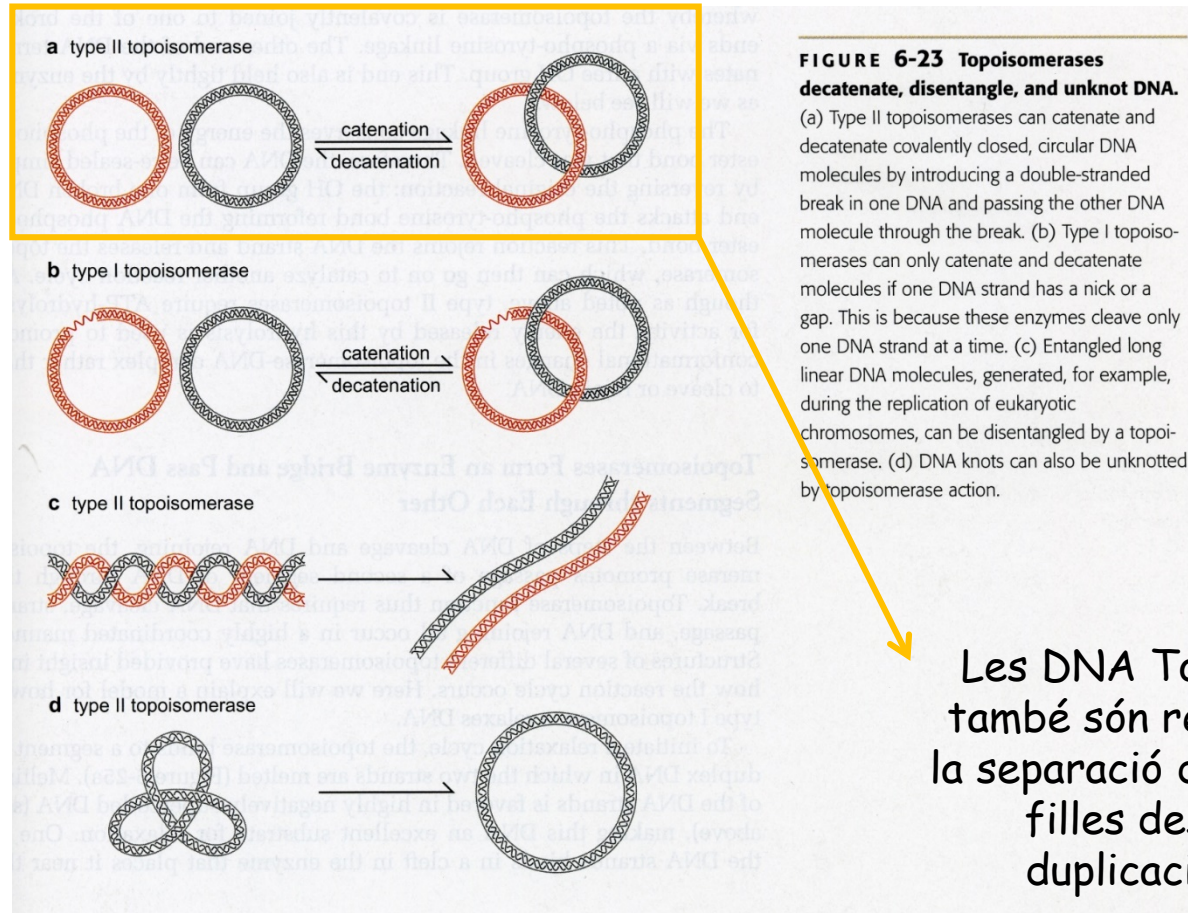


FIGURE 6-21 Schematic for changing the linking number in DNA with topoisomerase II. Topoisomerase II binds to DNA, creates a double-stranded break, passes uncut DNA through the gap, then reseals the break.

DNA topoisomerases

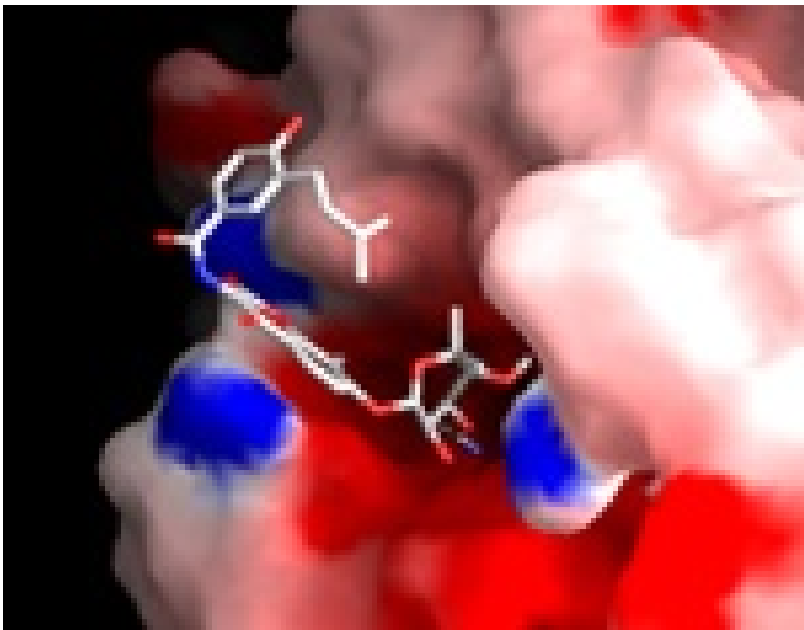


DNA topoisomerases

Table 3.2
Properties of DNA Topoisomerases

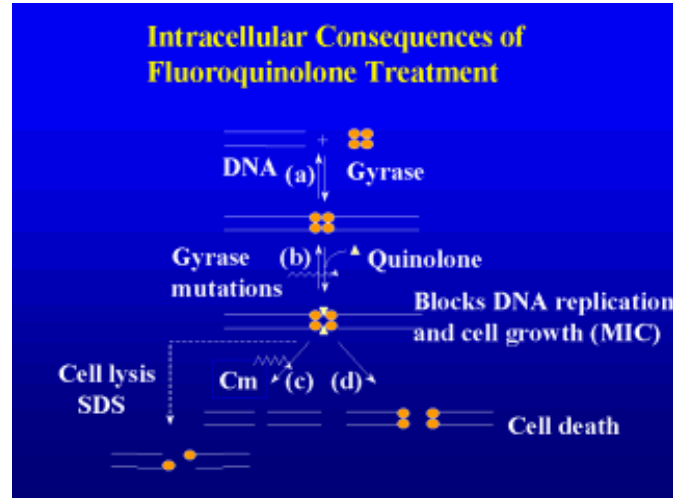
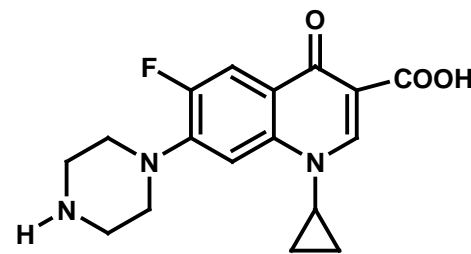
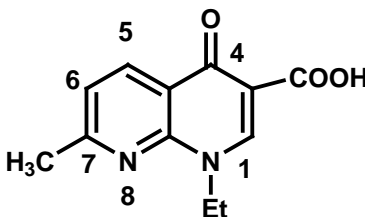
Enzyme	Type	Gene	Size (kDa)	ΔL	Cofactors	Activities
Prokaryotic <i>E. coli</i> Topoisomerase I	I	<i>topA</i>	97	increase L; $\Delta L = 1$	Mg^{2+}	Relaxes negatively supercoiled DNA; (will form knots and catenated DNA in nicked molecules); DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> DNA gyrase	II	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	105 95	decrease L; $\Delta L = -2$ increase L; $\Delta L = 2$	ATP, Mg^{2+}	ATP-dependent negative supercoiling (to $\sigma < -0.1$); ATP-independent relaxation of negatively supercoiled DNA; relaxes positively supercoiled DNA; (will form knotted and catenated DNA); responsible for supercoiling the chromosome; DNA transiently bound by a 5' phosphotyrosine bond
<i>E. coli</i> Topo III	I	<i>topB</i>	73.2	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Decatenase activity, also relaxes negatively supercoiled DNA; active in chromosome decatenation following replication <i>in vitro</i>
<i>E. coli</i> Topo IV	II	<i>parC</i> <i>parE</i>	75 70	increase L; $\Delta L = +2$	ATP, Mg^{2+}	Similar to DNA gyrase; has a DNA relaxing activity but will not negatively supercoil DNA; involved in chromosome decatenation following replication
Bacteriophage T4 topoisomerase	II	gene 39 gene 52 gene 60	64 51 12	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes negatively or positively supercoiled DNA; does not possess DNA supercoiling activity
Eukaryotic (Yeast) Topo I	I	<i>top1</i>	90	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 1$	none	Relaxes positively or negatively supercoiled DNA; DNA linked by a 3' phosphotyrosine bond (human enzyme)
Topo II	II	<i>top2</i>	164	increase or decrease L; $\Delta L = \pm 2$	ATP, Mg^{2+}	Relaxes positively or negatively supercoiled bond DNA; DNA linked by a 5' phosphotyrosine
Topo III	I	<i>top3</i>	74	increase L; $\Delta L = +1$	Mg^{2+}	Weak relaxation activity; only partially relaxes negative supercoiled DNA; strong activity on DNA with single-strand heteroduplex

Les DNA topoisomerases com a dianes terapèutiques



FLUOROQUINOLONES

Inhibeixen la DNA girasa bacteriana



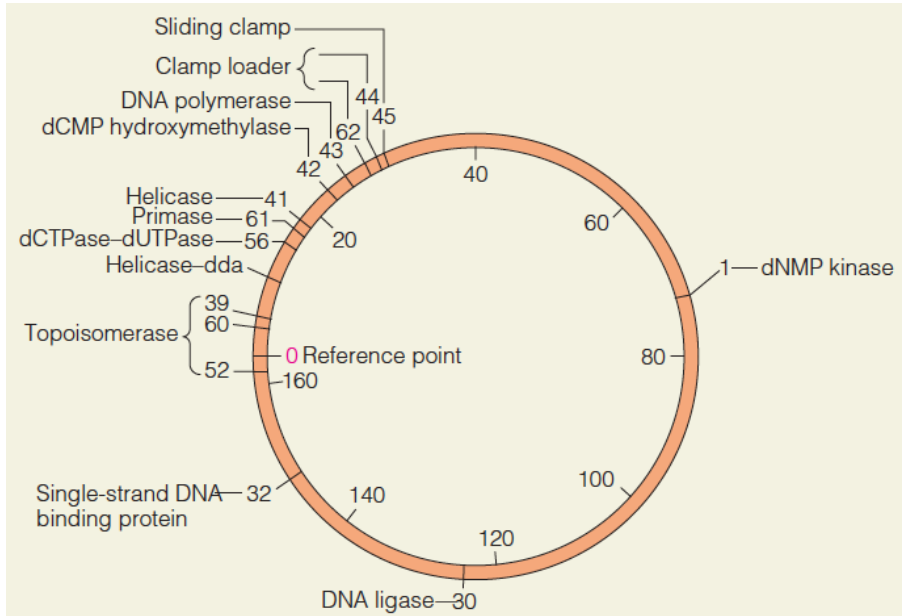
Proteïnes que participen en la replicació en *E. coli*

Table 10-3 Replication Proteins of *E. coli*

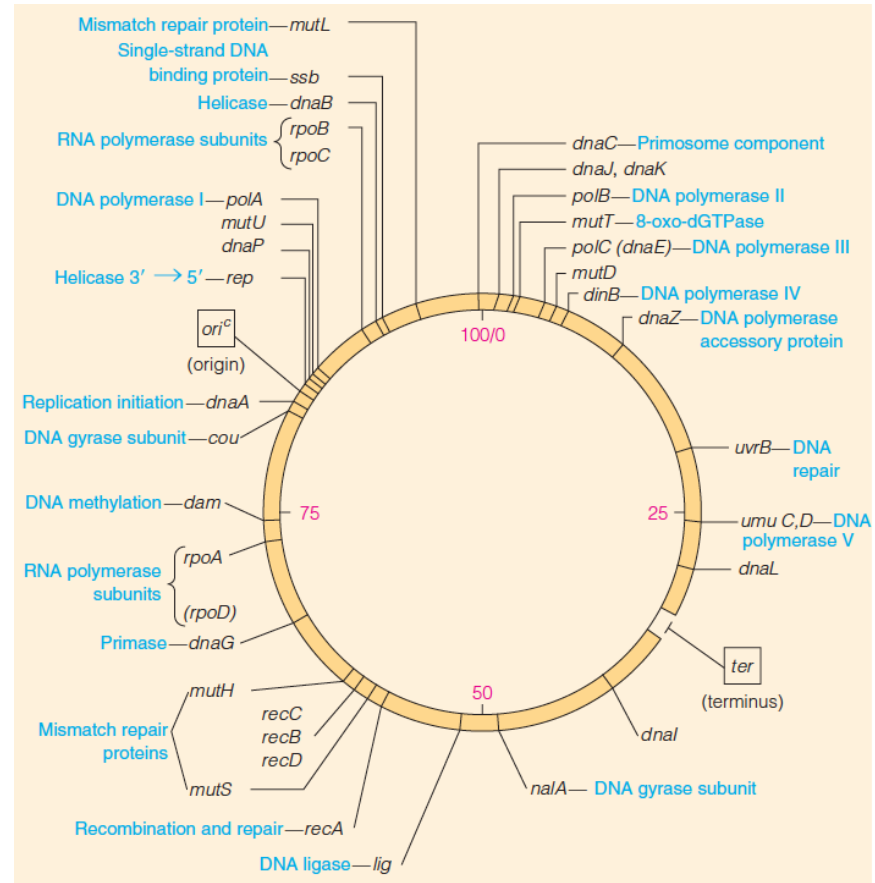
Protein	Native Mass, kdal	Subunits	Function
SSB	74	4	Single-strand binding
Protein i	66	3	
Protein n	28	2	
Protein n'	76	1	
Protein n''	17	1	
DnaC	29	1	Primosome assembly and function
DnaB	300	6	
Primase	60	1	
Pol III Holoenzyme	(760)	(2)	
α	140	1	
ε	25	1	Processive chain elongation
θ	10	1	
β	37	1 × 2	
γ	52	1	
δ	32	1	
τ	83	1	Gap filling, primer excision
Pol I	102	1	
Ligase	74	1	Ligation
Topoisomerase II (gyrase)	400	4	Supercoiling
GyrA	210	2	
GyrB	190	2	
Rep	65	1	Helicase
Helicase II	75	1	Helicase
DnaA	48		Origin of replication
Topoisomerase I	100	4	Relaxing negative supercoils

SOURCE: After A. Kornberg, 1982 *Supplement to DNA Replication* (San Francisco: Freeman, 1982), Table S11-2.

Proteïnes que participen en la replicació: mapes parcials de genomes



T4



Escherichia coli

Proteïnes que participen
en la replicació en *E.*
coli:
mutants "quick-stop" i
"slow-stop"

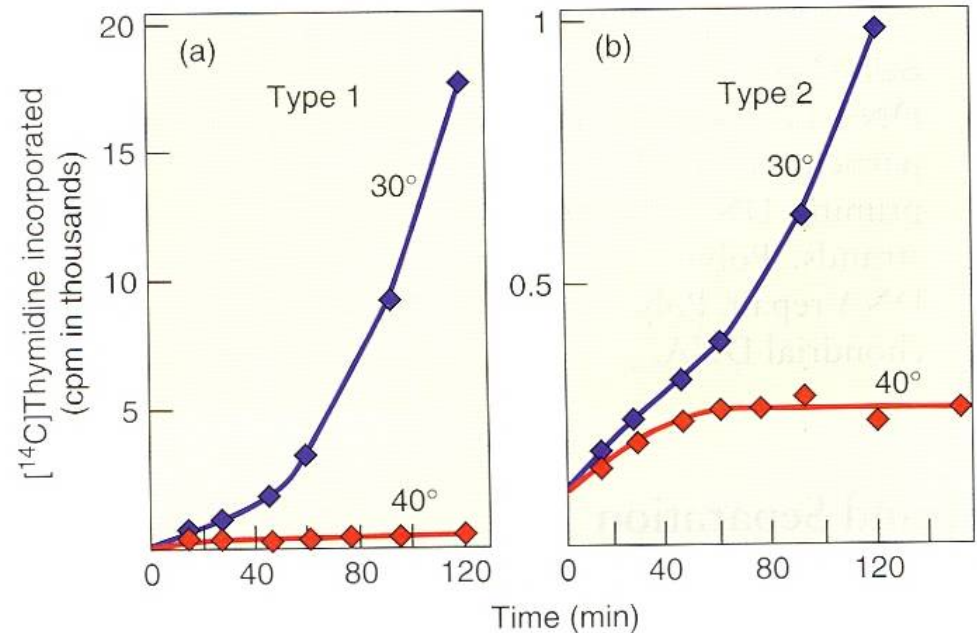


Figure 20.20 Two classes of *E. coli* DNA replication mutants. Jacob and colleagues tested mutants that were temperature-sensitive for DNA replication as follows: They shifted half of a culture to the nonpermissive temperature (40°C), and left the other half at the permissive temperature (30°C), then added [¹⁴C]thymidine to label newly synthesized DNA. They distinguished two classes of mutants; **(a)** type 1, in which DNA replication stopped abruptly upon shift to high temperature; and **(b)** type 2, in which DNA replication leveled off more gradually. (Source: Adapted from Hirota, Y., A. Ryter, and F. Jacob, Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 33:678, 1968.)

Proteïnes que participen
en la replicació en *E. coli*:
mutants "quick-stop" i
"slow-stop"

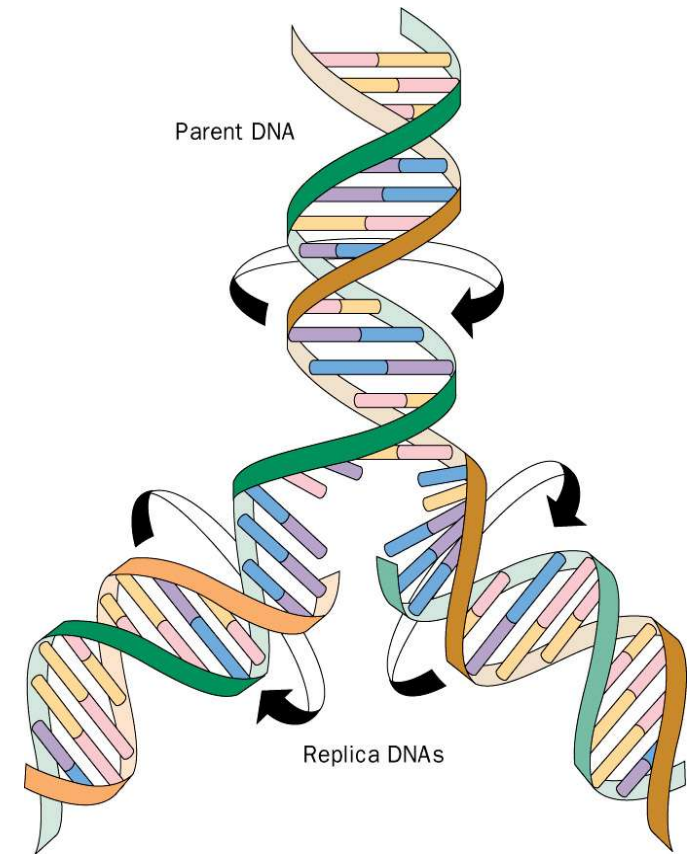
Replication genes and proteins of *E. coli**

Gene	Map location (minutes)	In vivo phenotype of mutant	Protein and in vitro function
<i>dnaA</i>	83	slow-stop; defective origin initiation	<i>dnaA</i> : initiation at the origin
<i>dnaB</i>	92	quick-stop	<i>dnaB</i> : helicase
<i>dnaC</i>	99	slow- or quick-stop	<i>dnaC</i> : complex with <i>dnaB</i>
<i>dnaE</i> (<i>polC</i>)	4	quick-stop	α subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaG</i>	67	quick-stop; defective initiation of fragments	primase
<i>dnaJ</i>	0	slow-stop	<i>dnaJ</i> : phage λ initiation; heat-shock response
<i>dnaK</i>	0	slow-stop	<i>dnaK</i> : phage λ initiation; heat-shock response
<i>dnaN</i>	83		β subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaQ</i>	5	mutator	ϵ subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaT</i>	-99	slow-stop; stable replication	<i>dnaT</i> (protein i): primosome assembly
<i>dnaX</i>	11	quick-stop	γ and τ subunits of pol III holoenzyme
<i>dnaY</i>		quick-stop	arginine tRNA for rare codon
<i>dnaZ</i>	11	quick-stop	ν subunit of pol III holoenzyme; renamed <i>dnaX</i>
<i>dut</i>	82	very short nascent fragments	dUTPase
<i>grpE</i> ^b			initiation of phages λ and P1; heat-shock response
<i>gyrA</i> (<i>nalA</i>)	48	quick- and slow-stop; nalidixate-(oxolinat)-sensitive	DNA gyrase subunit α : nicking-closing
<i>gyrB</i> (<i>cou</i>)	83	quick- and slow-stop; coumermycin-(novobiocin)-sensitive	DNA gyrase subunit β : ATPase
<i>lig</i>	52	accumulation of replication fragments	DNA ligase: covalently seals DNA nicks
<i>nrdA</i> (<i>dnaF</i>)	49	quick-stop	R1 subunit of ribonucleotide reductase
<i>nrdB</i>	49	quick-stop	R2 subunit of ribonucleotide reductase
<i>ori</i>	84	nonviability	origin of chromosomal replication
<i>polA</i>	87	defective in DNA repair	pol I : gap filling, RNA excision
<i>polB</i>	2	defective in DNA repair	DNA polymerase II
<i>priA</i> ^c	88		protein PriA (n'): primosome
<i>priB</i> ^c	96		protein PriB (n): primosome
<i>priC</i> ^c			protein PriC (n''): primosome
<i>rep</i>	85	slowed fork movement	helicase
<i>rnhA</i>	5	"stable" replication; mutants suppress <i>dnaA</i> ⁻ or <i>oriC</i> ⁻	RNase H1: removal of RNA primers
<i>rpoA</i>	73		α subunit of RNA polymerase
<i>rpoB</i>	90	defective in transcription; chromosome initiation	β subunit of RNA polymerase
<i>rpoC</i>	90		β' subunit of RNA polymerase
<i>rpoD</i>	(67) ^d		σ subunit of RNA polymerase
<i>ssb</i>	92	quick-stop; defective in repair, recombination	SSB (single-strand binding protein)
<i>ter</i>	27-36		terminus of chromosomal replication
<i>topA</i>	28	mutants suppress <i>dnaA</i> ⁻	topoisomerase I
<i>trxA</i>	86	phage T7 negative	thioredoxin: coenzyme of ribonucleotide reductase, subunit of phage T7 DNA polymerase
<i>tus</i> (<i>tau</i>)	36	none	<i>ter</i> - binding protein; termination

* Unless noted, references are in Bachman BJ (1990) *Microbiol Rev* 54:130.^b Zylitz M, Ang D, Georgopoulos C (1987) *JBC* 262:17437.^c Lee EH, Masai H, Allen GC Jr, Kornberg A (1990) *PNAS* 87:4620

Tema 16

El complex de replicació. Esquema general de tots els components del complex de replicació en la forqueta replicativa. El replisoma i la replicació simultània de les dues cadenes. Inici de la replicació en procariotes i virus. Finalització de la replicació en DNAs circulars. Acabament de la replicació en DNAs no circulars. Interacció entre replicació i transcripció.



Gens i proteïnes de replicació en *E. coli*

Table 15-1
Replication genes and proteins of *E. coli*^a

Gene	Map location (minutes)	In vivo phenotype of mutant	Protein and in vitro function
<i>dnaA</i>	83	slow-stop; defective origin initiation	<i>dnaA</i> ; initiation at the origin
<i>dnaB</i>	92	quick-stop	<i>dnaB</i> ; helicase
<i>dnaC</i>	99	slow- or quick-stop	<i>dnaC</i> ; complex with <i>dnaB</i>
<i>dnaE</i> (<i>polC</i>)	4	quick-stop	α subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaG</i>	67	quick-stop; defective initiation of fragments	primase
<i>dnaJ</i>	0	slow-stop	<i>dnaJ</i> ; phage λ initiation; heat-shock response
<i>dnaK</i>	0	slow-stop	<i>dnaK</i> ; phage λ initiation; heat-shock response
<i>dnaN</i>	83		β subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaQ</i>	5	mutator	ϵ subunit of pol III holoenzyme
<i>dnaT</i>	99	slow-stop; stable replication	<i>dnaT</i> (protein i); primosome assembly
<i>dnaX</i>	11	quick-stop	γ and τ subunits of pol III holoenzyme
<i>dnaY</i>		quick-stop	arginine tRNA for rare codon
<i>dnaZ</i>	11	quick-stop	γ subunit of pol III holoenzyme; renamed <i>dnaX</i>
<i>dut</i>	82	very short nascent fragments	dUTPase
<i>grpE</i> ^b			initiation of phages λ and P1; heat-shock response
<i>gyrA</i> (<i>nalA</i>)	48	quick- and slow-stop; nalidixate-(oxolinolate)-sensitive	DNA gyrase subunit α ; nicking-closing
<i>gyrB</i> (<i>cou</i>)	83	quick- and slow-stop; coumermycin-(novobiocin)-sensitive	DNA gyrase subunit β ; ATPase
<i>lig</i>	52	accumulation of replication fragments	DNA ligase; covalently seals DNA nicks
<i>nrdA</i> (<i>dnaF</i>)	49	quick-stop	R1 subunit of ribonucleotide reductase
<i>nrdB</i>	49	quick-stop	R2 subunit of ribonucleotide reductase
<i>ori</i>	84	nonviability	origin of chromosomal replication
<i>polA</i>	87	defective in DNA repair	pol I; gap filling, RNA excision
<i>polB</i>	2	defective in DNA repair	DNA polymerase II
<i>priA</i> ^c	88		protein PriA (n'); primosome
<i>priB</i> ^c	96		protein PriB (n); primosome
<i>priC</i> ^c			protein PriC (n"); primosome
<i>rep</i>	85	slowed fork movement	helicase
<i>rnhA</i>	5	"stable" replication; mutants suppress <i>dnaA</i> ⁻ or <i>oriC</i> ⁻	RNase H1; removal of RNA primers
<i>rpoA</i>	73		α subunit of RNA polymerase
<i>rpoB</i>	90	defective in transcription; chromosome initiation	β subunit of RNA polymerase
<i>rpoC</i>	90		β' subunit of RNA polymerase
<i>rpoD</i>	(67) ^c		σ subunit of RNA polymerase
<i>ssb</i>	92	quick-stop; defective in repair, recombination	SSB (single-strand binding protein)
<i>ter</i>	27-36		terminus of chromosomal replication
<i>topA</i>	28	mutants suppress <i>dnaA</i> ⁻	topoisomerase I
<i>trxA</i>	86	phage T7 negative	thioredoxin; coenzyme of ribonucleotide reductase, subunit of phage T7 DNA polymerase
<i>tus</i> (<i>tau</i>)	36	none	<i>ter</i> -binding protein; termination

^a Unless noted, references are in Bachman BJ (1990) *Microbiol Rev* 54:130.

^b Zyllicz M, Ang D, Georgeopoulos C (1987) *JBC* 262:17437.

^c Lee EH, Masai H, Allen GC Jr, Kornberg A (1990) *PNAS* 87:4620.

INICI DE LA REPLICACIÓ

Inici de la replicació: el model del replicó (Jacob, Brenner, Cuzin, 1963)

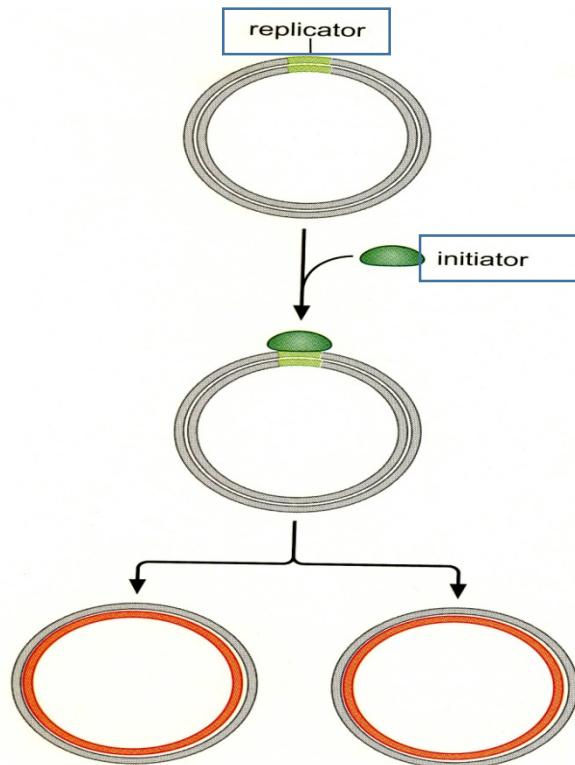


FIGURE 8-23 The replicon model. Binding of the initiator to the replicator stimulates initiation of replication and the duplication of the associated DNA.

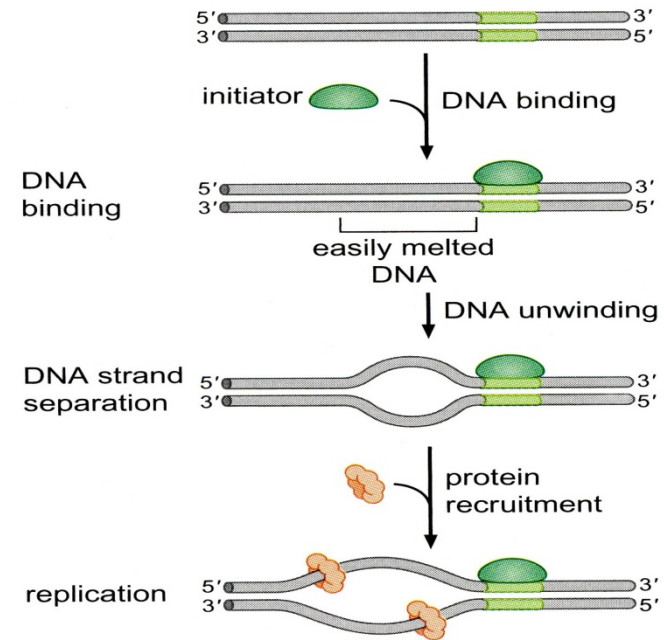


FIGURE 8-25 Functions of the initiator proteins during the initiation of DNA replication. The three common functions of initiator proteins are illustrated: DNA binding, DNA strand separation, and replication protein recruitment. (Here the recruited protein is illustrated as a DNA helicase; however, the recruited proteins differ for each initiator protein.)

Inici de la replicació: el model del replicó

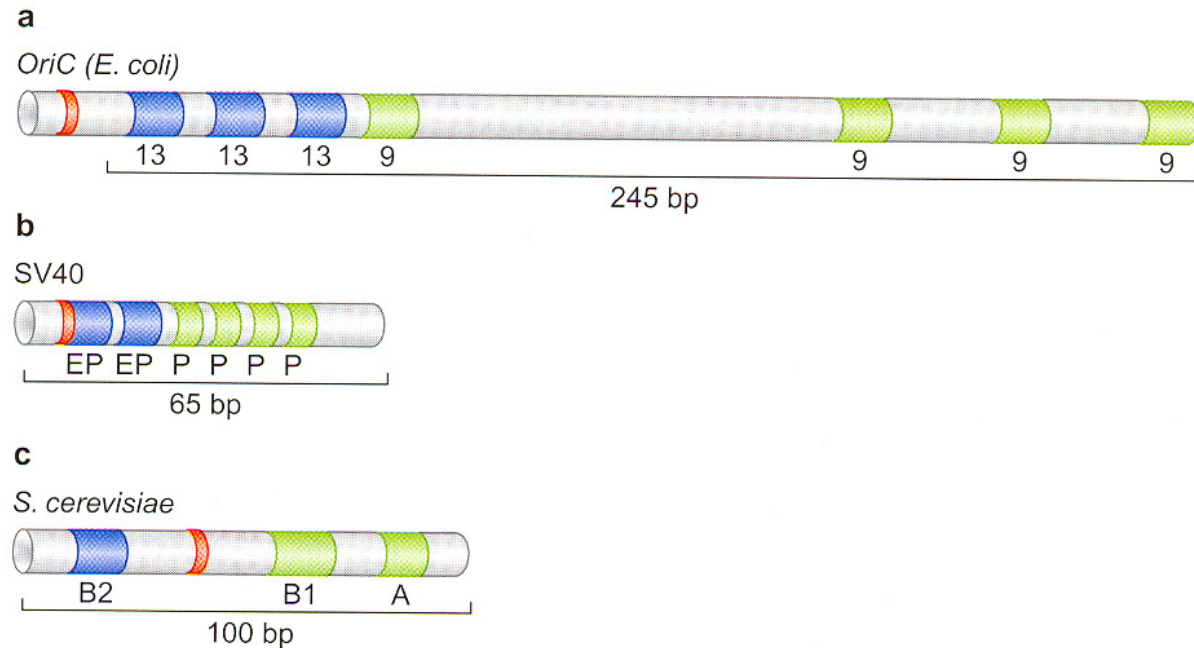
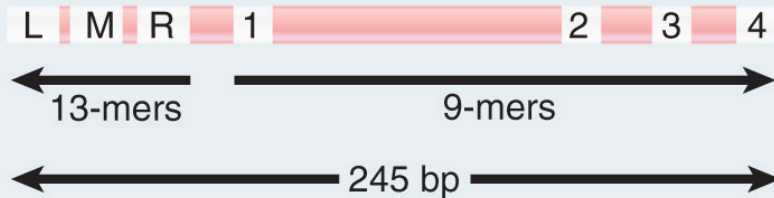


FIGURE 8-24 Structure of replicators. The DNA elements that make up three well-characterized replicators are shown. The initiator DNA-binding sites are shown in green, elements that facilitate DNA unwinding in blue, and the site of the first DNA synthesis in red (the site for *oriC* is outside the sequence shown). (a) *oriC* is composed of four “9-mer” DnaA binding sites and three “13-mer” repeated elements that are the site of initial DNA unwinding. (b) The origin of the eukaryotic virus SV40 is composed of 4 pentamer binding sites (P) for the initiator protein called T antigen and a 20 bp early palindrome (EP) that is the site of DNA unwinding. (c) Three elements are commonly found at *S. cerevisiae* replicators. The A and B1 elements bind to the initiator ORC. The B2 element facilitates DNA unwinding and binding of other replication factors.

Inici de la replicació en *Escherichia coli*

The origin has two sets of repeats



Strand separation initiates at the origin

The origin has three 13-bp repeats and four 9-bp repeats

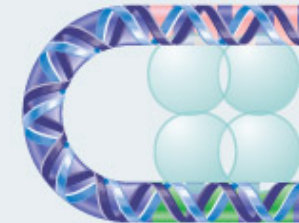
GATCTNTTNTTTT TTATNCANA



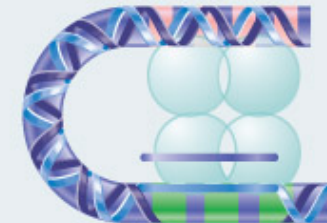
DnaA monomers bind at 9-bp repeats



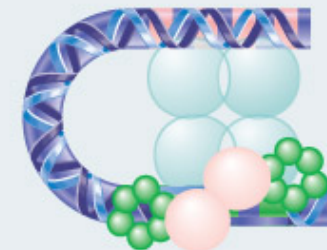
DnaA binds to 13-bp repeats



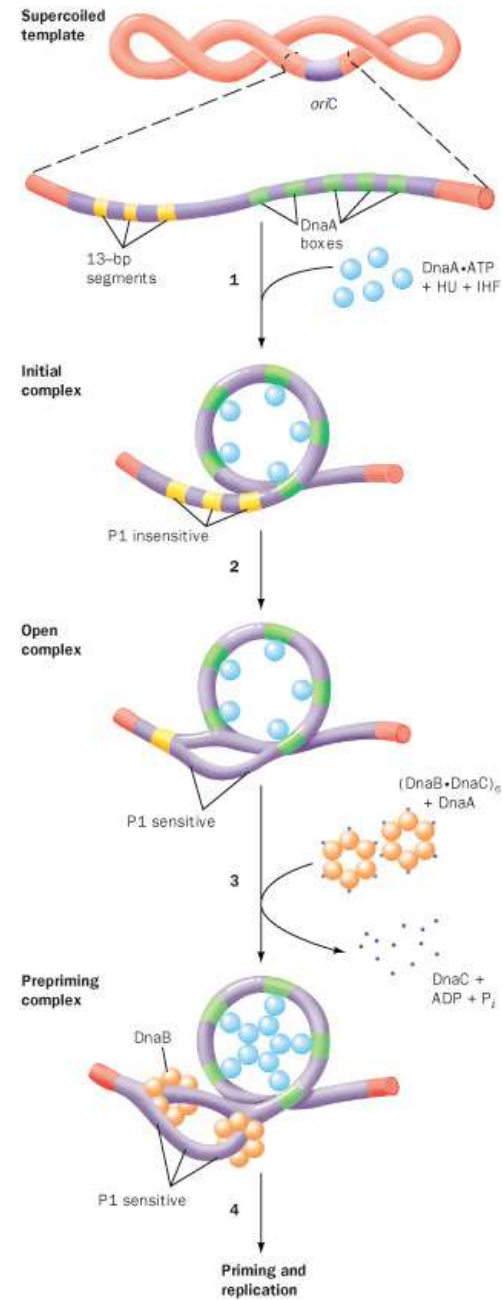
DNA strands separate at 13-bp repeats



DnaB/DnaC joins complex, forming replication forks



Inici de la replicació en *Escherichia coli*

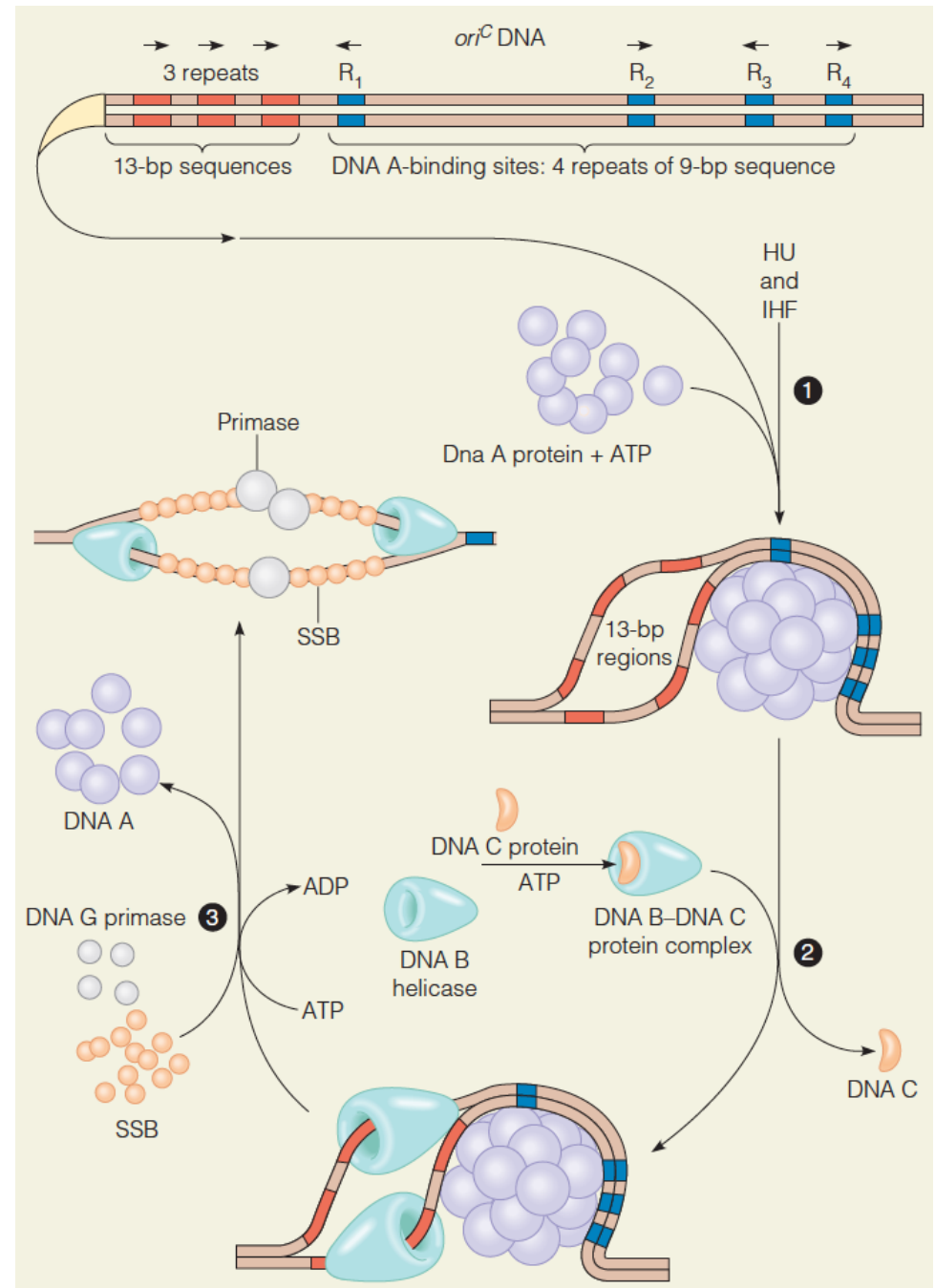


Inici de la replicació en *Escherichia coli*

FIGURA 24.33

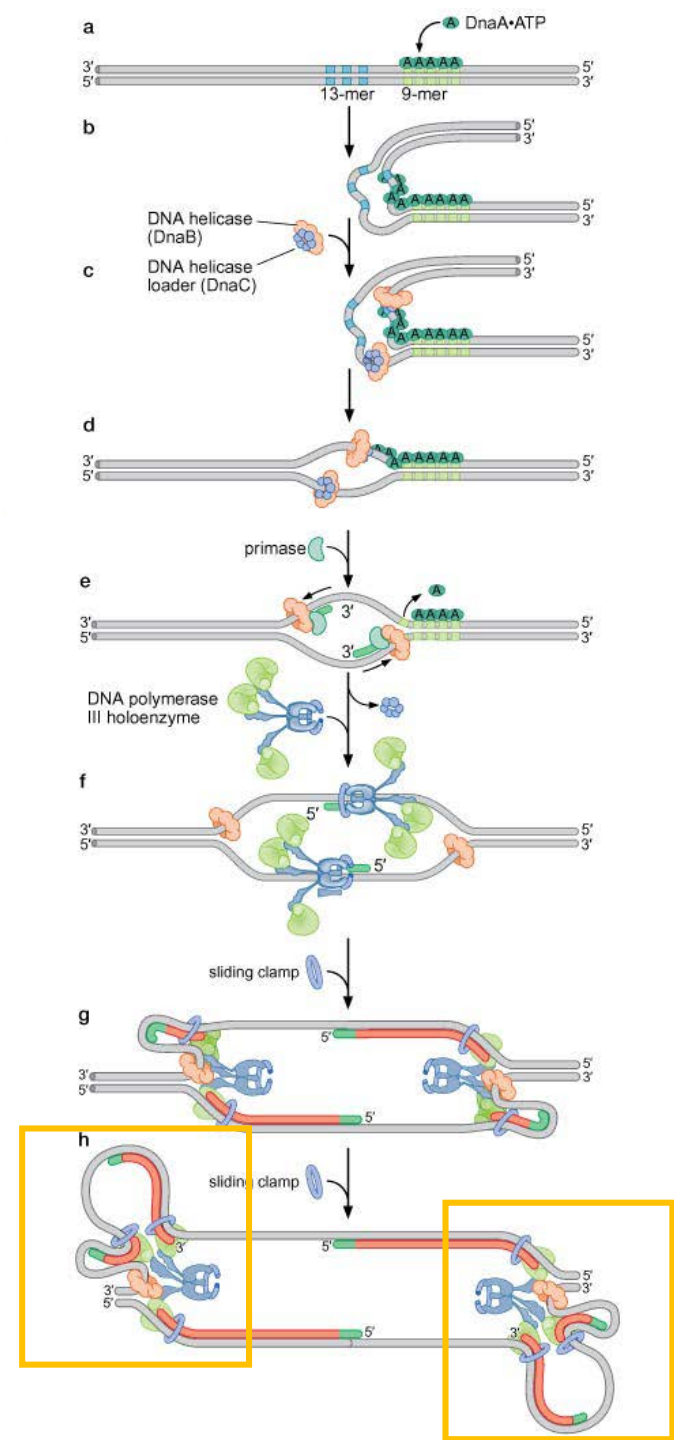
Modelo de la iniciación de la replicación del DNA de *E. coli* en *ori^c*. HU e IHF son proteínas de unión al DNA de doble hebra que facilitan que el DNA se doble en el origen.

Redibujado con permiso de T. A. Baker y S. H. Wickner, *Annu. Rev. Genet.* (1992) 26:447-477. © 1992 Annual Reviews.



Inici de la replicació en *Escherichia coli*

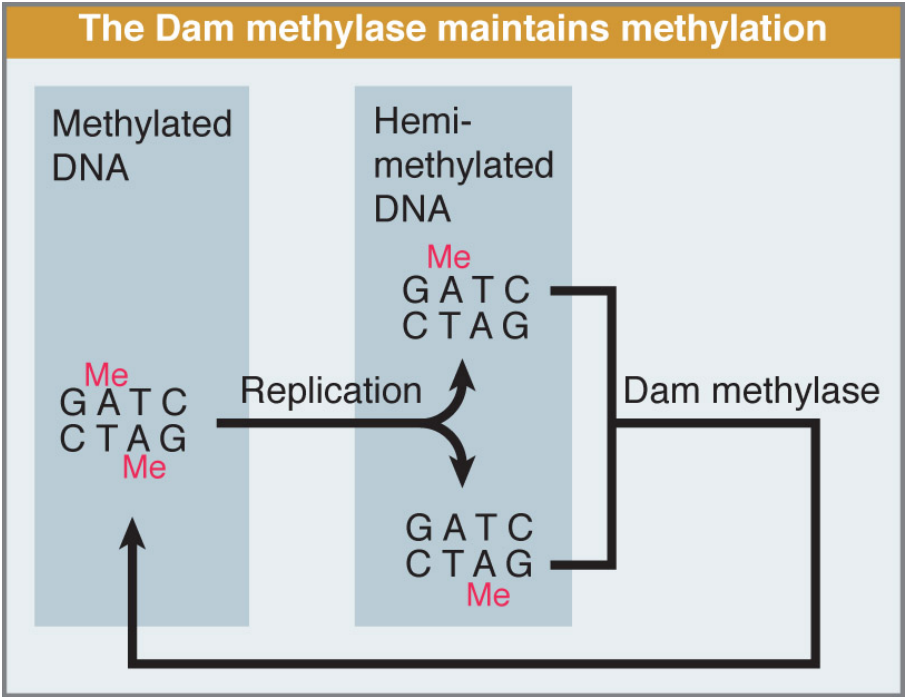
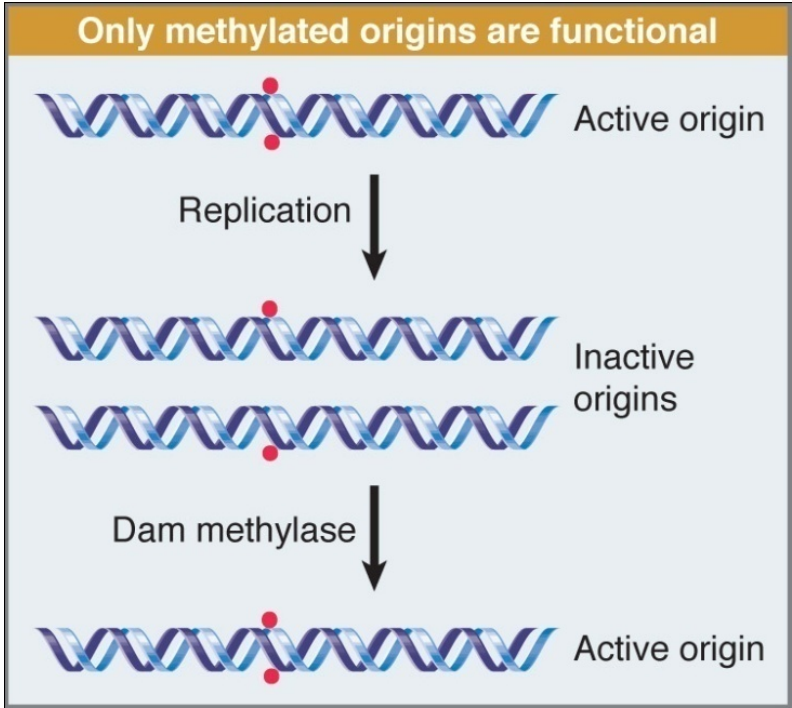
FIGURE 8-26 A model for *E. coli* initiation of DNA replication. The major events in the *E. coli* initiation of replication are illustrated. (a) Multiple DnaA-ATP proteins bind to the repeated 9-mer sequences within *oriC*. (b) Binding of DnaA-ATP to these sequences leads to strand separation within the 13-mer repeats. This is mediated by an ssDNA binding domain in DnaA-ATP. (c) DNA helicase (DnaB) and the DNA helicase loader (DnaC) associate with the DnaA bound origin. An ssDNA binding domain in the helicase loader as well as protein-protein interactions with DnaA are required to form this complex. (d) DNA helicase loaders catalyze the opening of the DNA helicase protein ring and placement of the ring around the ssDNA at the origin. Loading of the DNA helicase leads to the dissociation of the helicase loader from the replicator and activates the DNA helicases. (e) The DNA helicases each recruit a DNA primase which synthesizes an RNA primer on each template. The movement of the DNA helicases also removes any remaining DnaA bound to the replicator. (f) The newly synthesized primers are recognized by the clamp loader components of two DNA Pol III holoenzymes. Sliding clamps are assembled on each RNA primer, and leading strand synthesis is initiated by one of the two core DNA Pol III enzymes of each holoenzyme. (g) After each DNA helicase has moved approximately 1,000 bases, a second RNA primer is synthesized on each lagging strand template and a sliding clamp is loaded. The resulting primer:template junction is recognized by the second DNA Pol III core enzyme in each holoenzyme, resulting in the initiation of lagging strand synthesis. (h) Leading and lagging strand synthesis is now initiated at each replication fork and continues to the end of the template or until another replication fork from an adjacent origin of replication is reached.



3 nuclis de DNA polimerases!

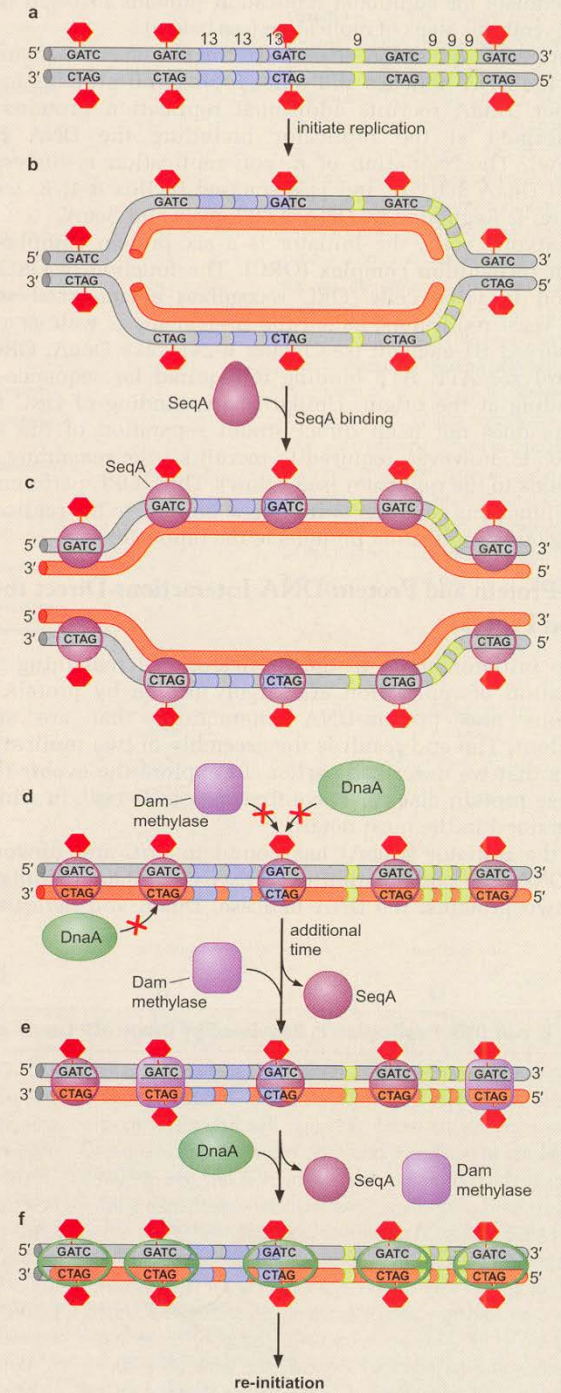


Per què no es pot reiniciar de forma immediata la replicació en *Escherichia coli*?



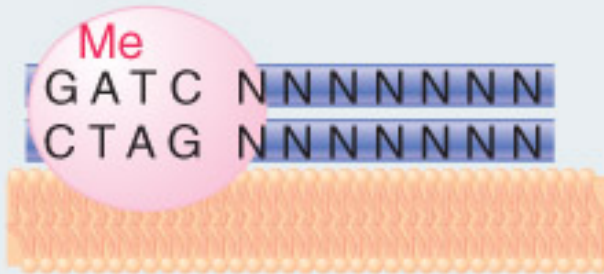
Per què no es pot reiniciar de forma immediata la replicació en *Escherichia coli*?

BOX 8-4 FIGURE 1 SeqA bound to hemimethylated DNA inhibits re-initiation from recently replicated daughter origins. (a) Prior to DNA replication, GATC sequences throughout the *E. coli* genome are methylated on both strands ("fully" methylated). Note that throughout the figure, the methyl groups are represented by red hexagons. (b) DNA replication converts these sites to the hemimethylated state (only one strand of the DNA is methylated). (c) Hemimethylated GATC sequences are rapidly bound by SeqA. (d) Bound SeqA protein inhibits the full methylation of these sequences and the binding of *oriC* by DnaA protein (for simplicity, only one of the two daughter molecules is illustrated in parts d, e, and f). (e) When SeqA infrequently disassociates from the GATC sites, the sequences can become fully methylated by Dam DNA methyl transferase, preventing rebinding by SeqA. (f) When the GATC sites become fully methylated, DnaA can bind and direct a new round of replication from the daughter *oriC* replicators.

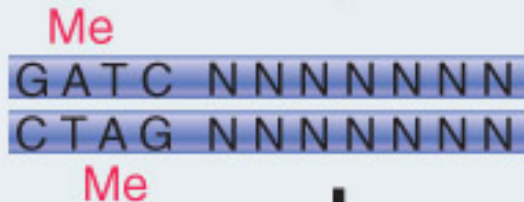


Per què no es pot reiniciar de forma immediata la replicació en *Escherichia coli*?

Hemimethylated origins bind inhibitor



Membrane-bound inhibitor binds to hemimethylated DNA



DNA is remethylated and releases inhibitor



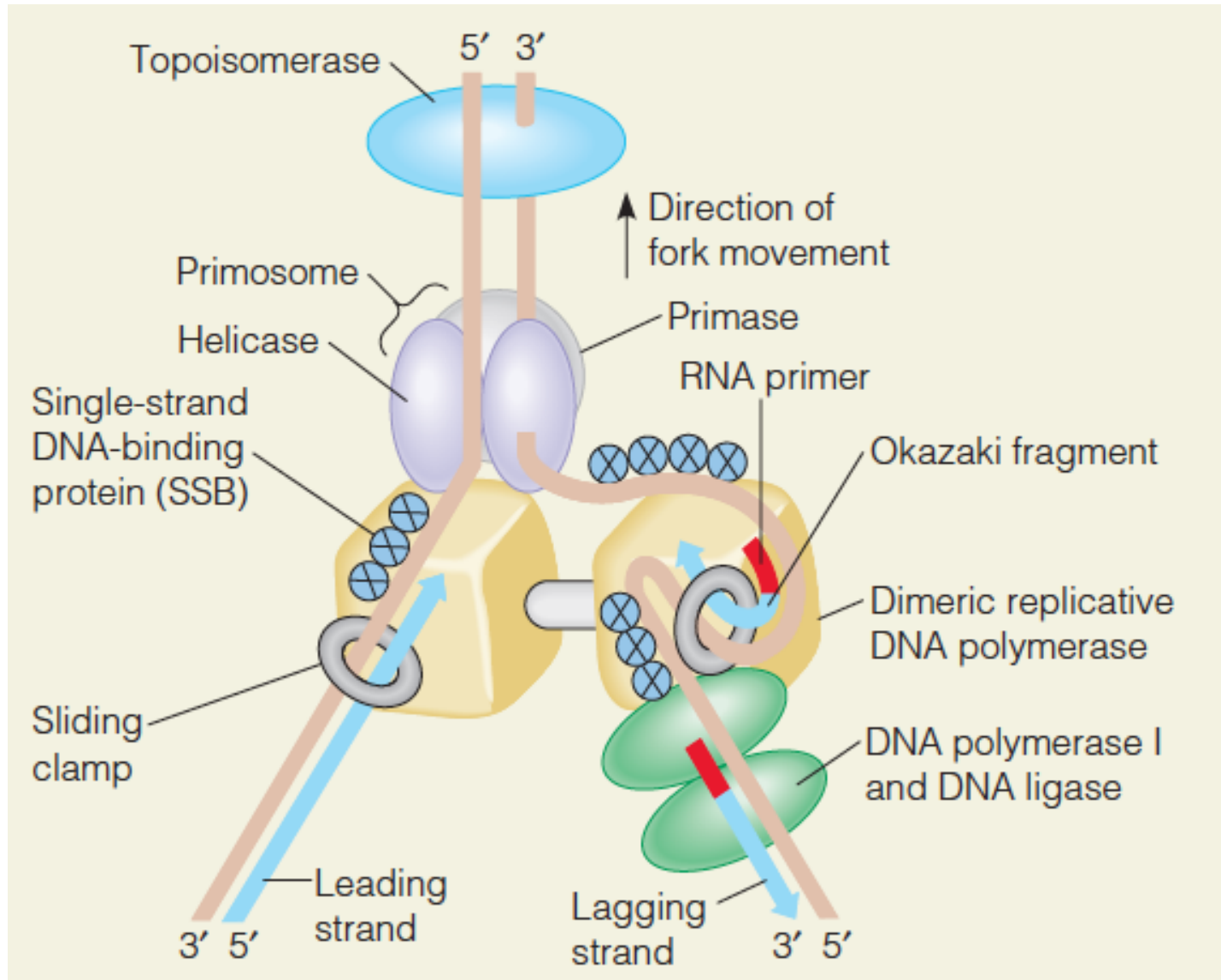
DnaA binds to *oriC*

A més:

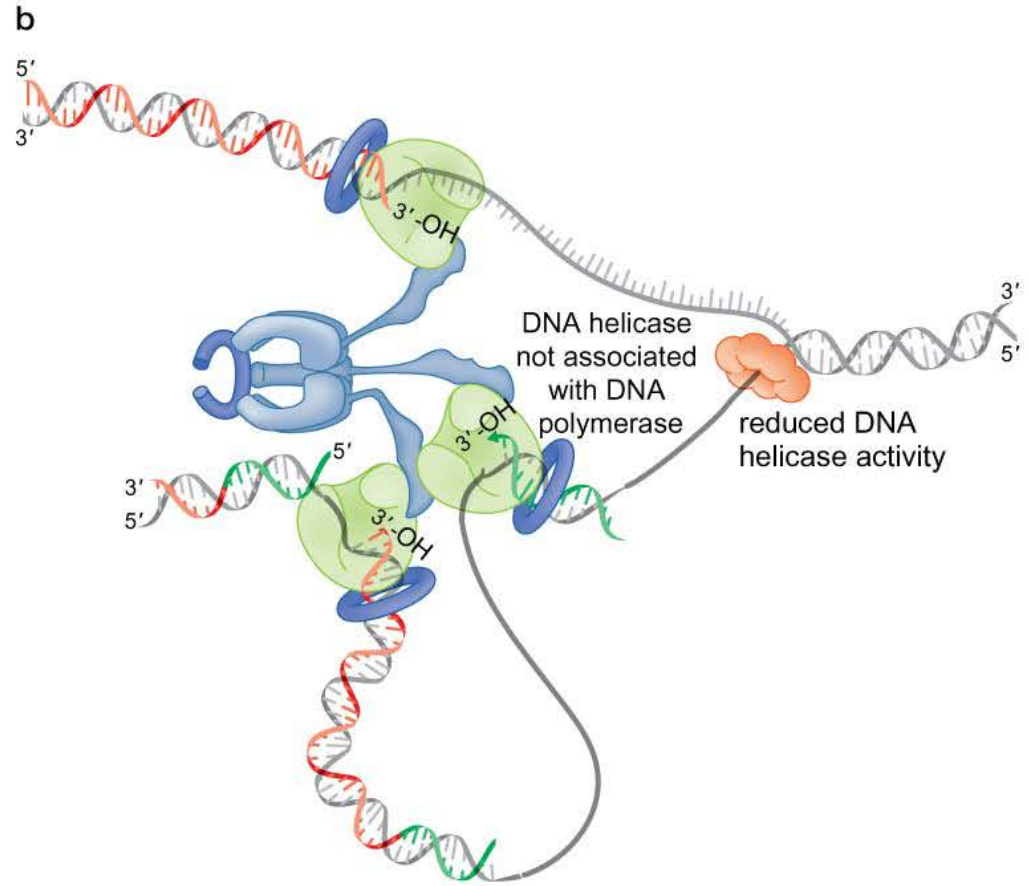
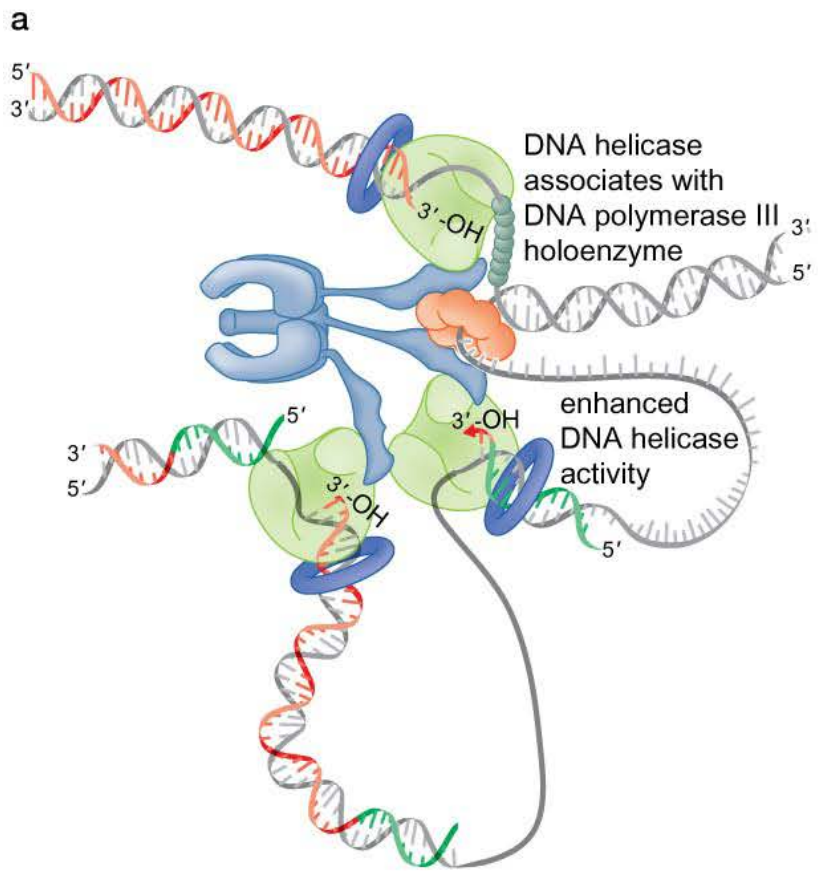
- La unió de DnaA-ATP a l'*oriC* té lloc en associació amb la membrana interna. L'activitat ATPasa de DnaA és estimulada per fosfolípids de la membrana, així com ssDNA generat per la seua activitat.
- Regulació de la transcripció del gen *dnaA* per metilació del seu promotor.

ELONGACIÓ DE LA REPLICACIÓ

La forqueta de replicació en *E. coli*



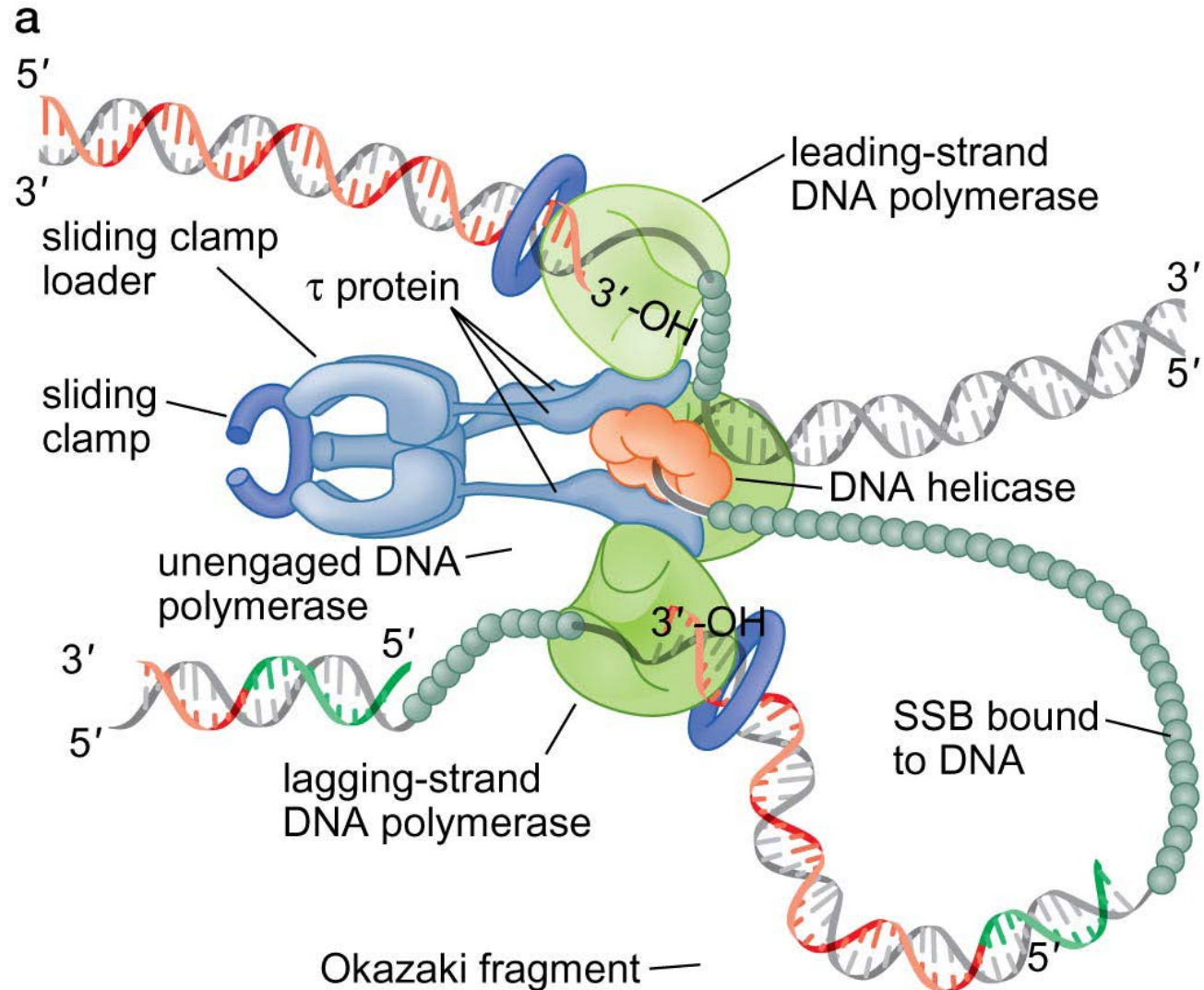
Interacció entre DNA polimerasa III i helicasa



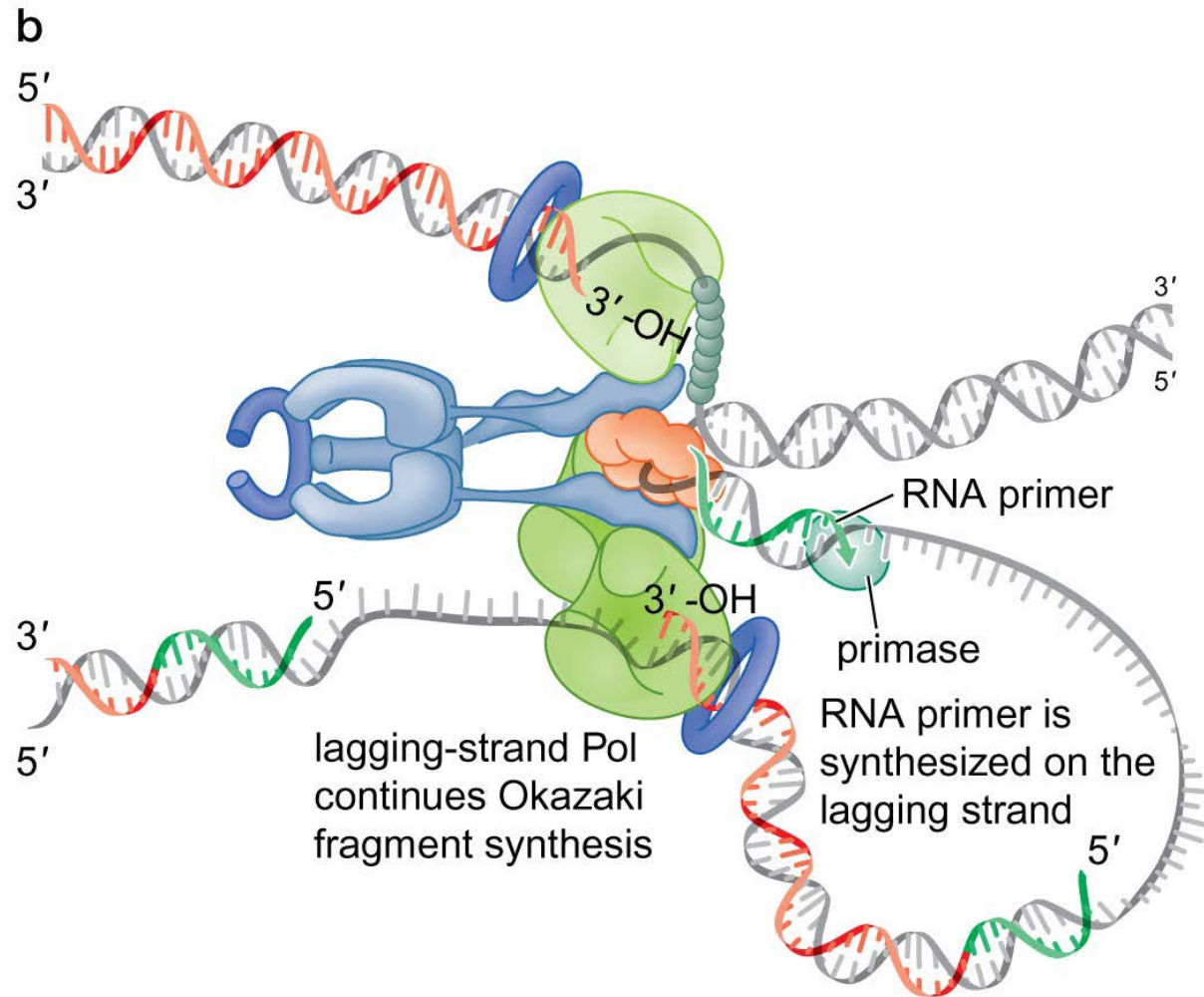
Interrogants que planteja la replicació semidiscontínua

1. Com pot ser compatible la síntesi discontinua de la cadena retardada i la contínua de la conductora?
2. Com és compatible la dissociació i reassociació amb una elevada processivitat?

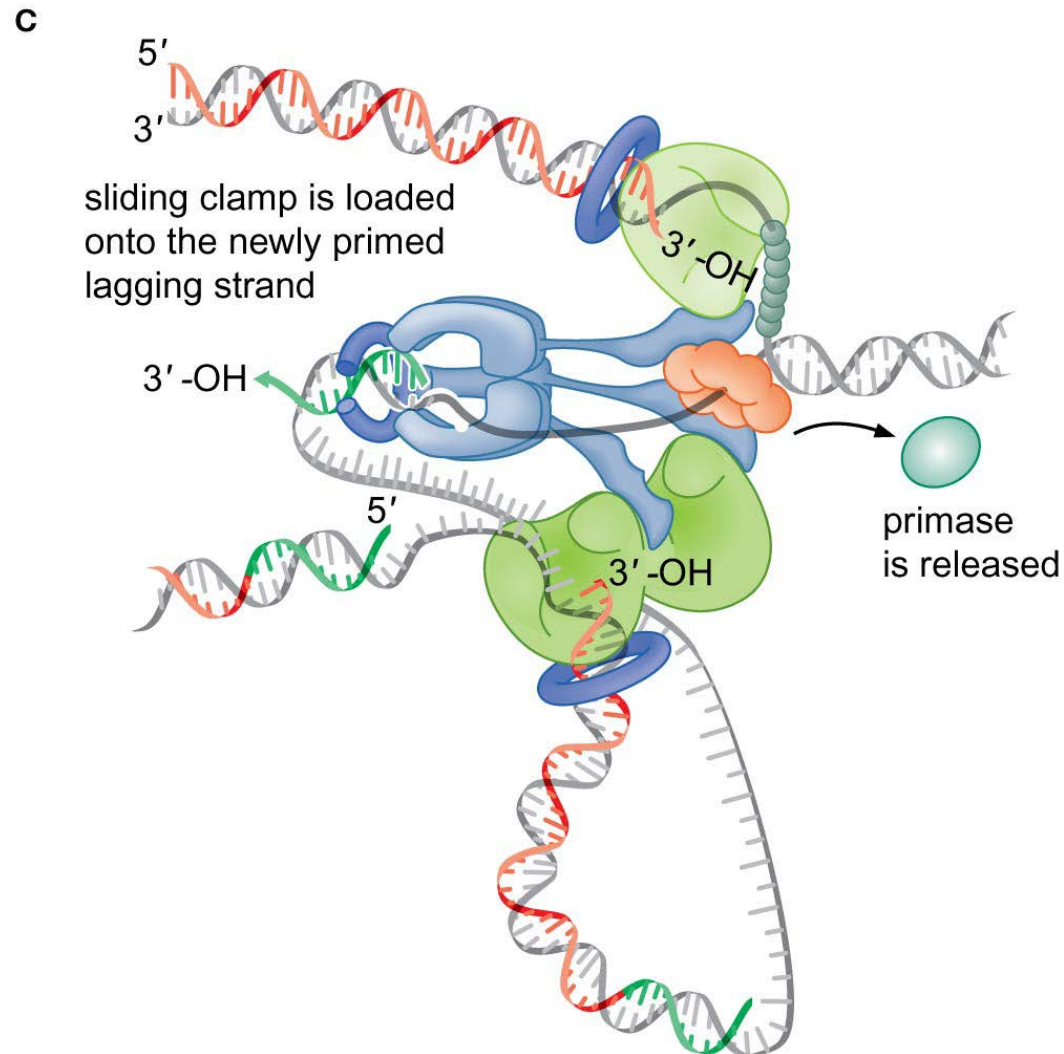
Els nuclis dels monòmers de la DNA polimerasa III es mantenen units durant tota la replicació



Els nuclis dels monòmers de la DNA polimerasa III es mantenen units durant tota la replicació



Els nuclis dels monòmers de la DNA polimerasa III es mantenen units durant tota la replicació



El motle per a la
síntesi de la cadena
retardada forma un
llaç

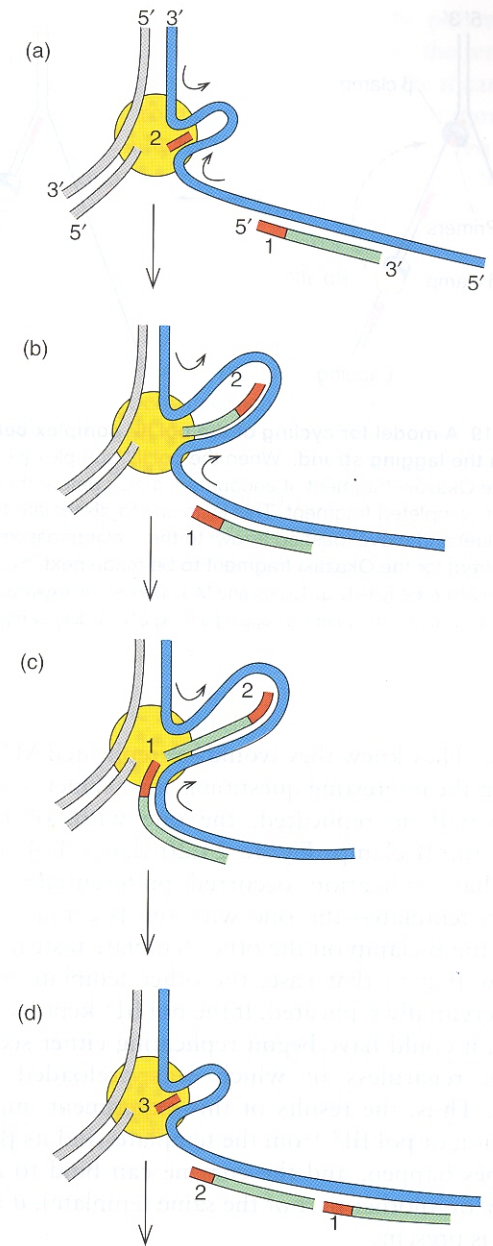


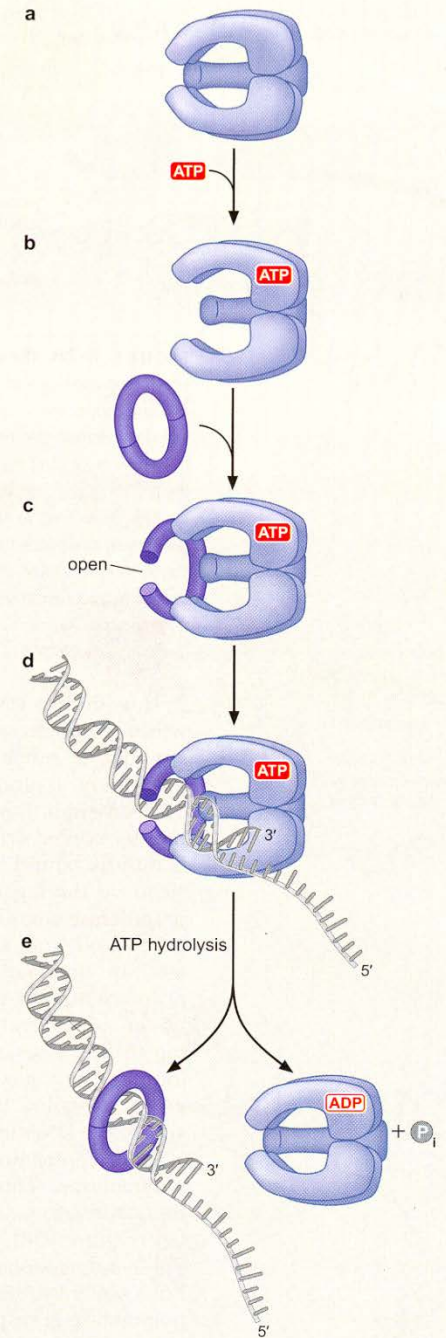
Figure 21.18 A model for simultaneous synthesis of both DNA strands. (a) The lagging template strand (blue) has formed a loop through the replisome (gold), and a new primer, labeled 2 (red), has been formed by the primase. A previously synthesized Okazaki fragment (green, with red primer labeled 1) is also visible. The leading strand template and its progeny strand are shown at left (gray), but the growth of the leading strand is not considered here. (b) The lagging strand template has formed a bigger loop by feeding through the replisome from the top and bottom, as shown by the arrows. The motion of the lower part of the loop (lower arrow) allows the second Okazaki fragment to be elongated. (c) Further elongation of the second Okazaki fragment brings its end to a position adjacent to the primer of the first Okazaki fragment. (d) The replisome releases the loop, which permits the primase to form a new primer (number 3). The process can now begin anew.

Interrogants que planteja la replicació semidiscontínua

1. Com pot ser compatible la síntesi discontinua de la cadena retardada i la contínua de la conductora?
2. Com és compatible la dissociació i reassociació amb una elevada processivitat?

Les pinces lliscants i la replicació

BOX 8-2 FIGURE 1 ATP control of sliding DNA clamp loading. (a) Sliding clamp loaders are five subunit protein complexes whose activity is controlled by ATP binding and hydrolysis. In *E.coli* the clamp loader is called the γ -complex, and in eukaryotic cells it is called replication factor C (RF-C). (b) To catalyze the sliding clamp opening, the clamp loader must be bound to ATP. (c) Once bound to ATP, the clamp loader binds the clamp and opens the ring at one of the subunit:subunit interfaces. (d) The resulting complex can now bind to DNA. DNA binding is mediated by the clamp loader, which preferentially binds to primer: template junctions. Correct binding to the DNA has two consequences. First, the opened sliding clamp is positioned so that dsDNA is in what will be the "hole" of the clamp. Second, DNA binding stimulates ATP hydrolysis by the clamp loader. (e) Because only an ATP-bound clamp loader can bind to the clamp and to DNA, the ADP form of the clamp loader rapidly disassociates from the clamp and the DNA, leaving behind a closed clamp positioned around the dsDNA portion of the primer: template junction. (Source: Based on O'Donnell M. et al. 2001. Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Current Biology* 11: R942, fig 5. Copyright © 2001 with permission from Elsevier.)



Les pines lliscants i la replicació

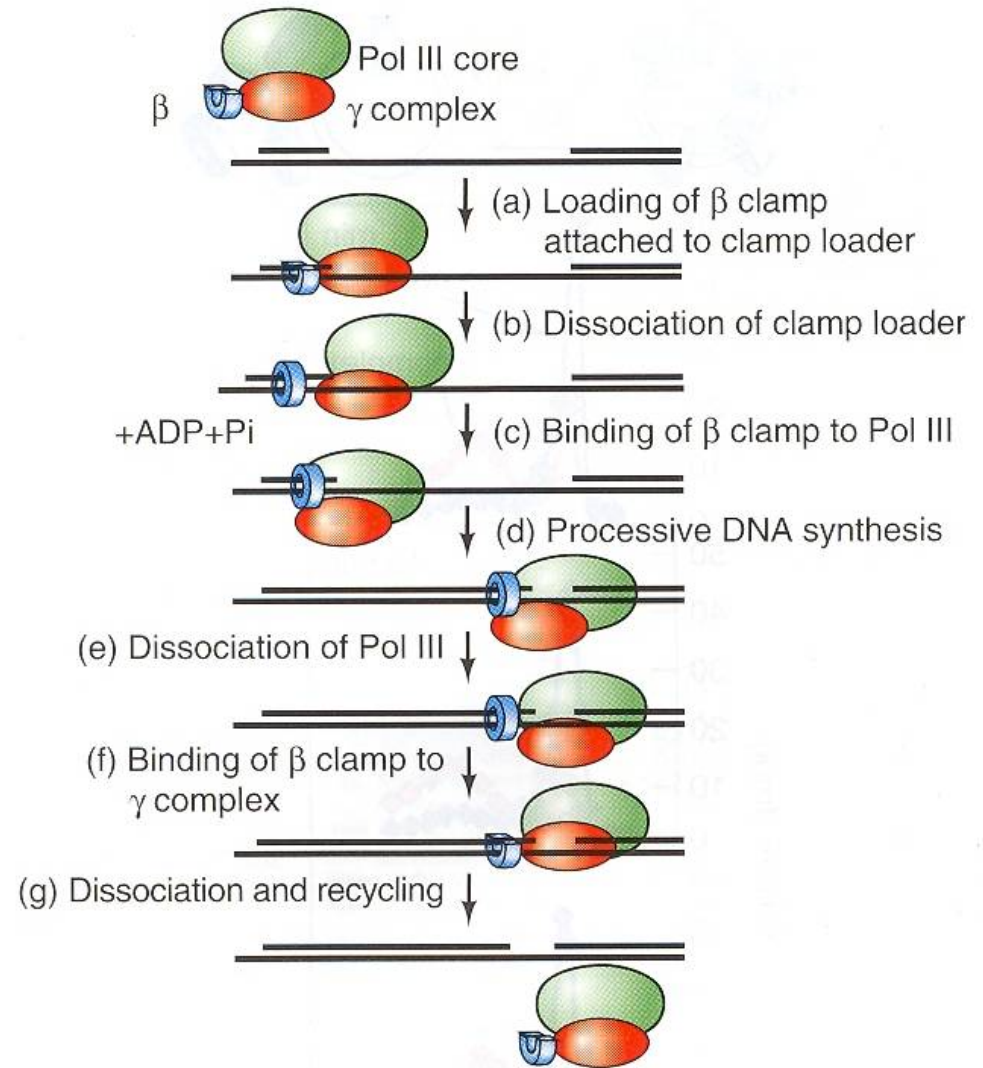
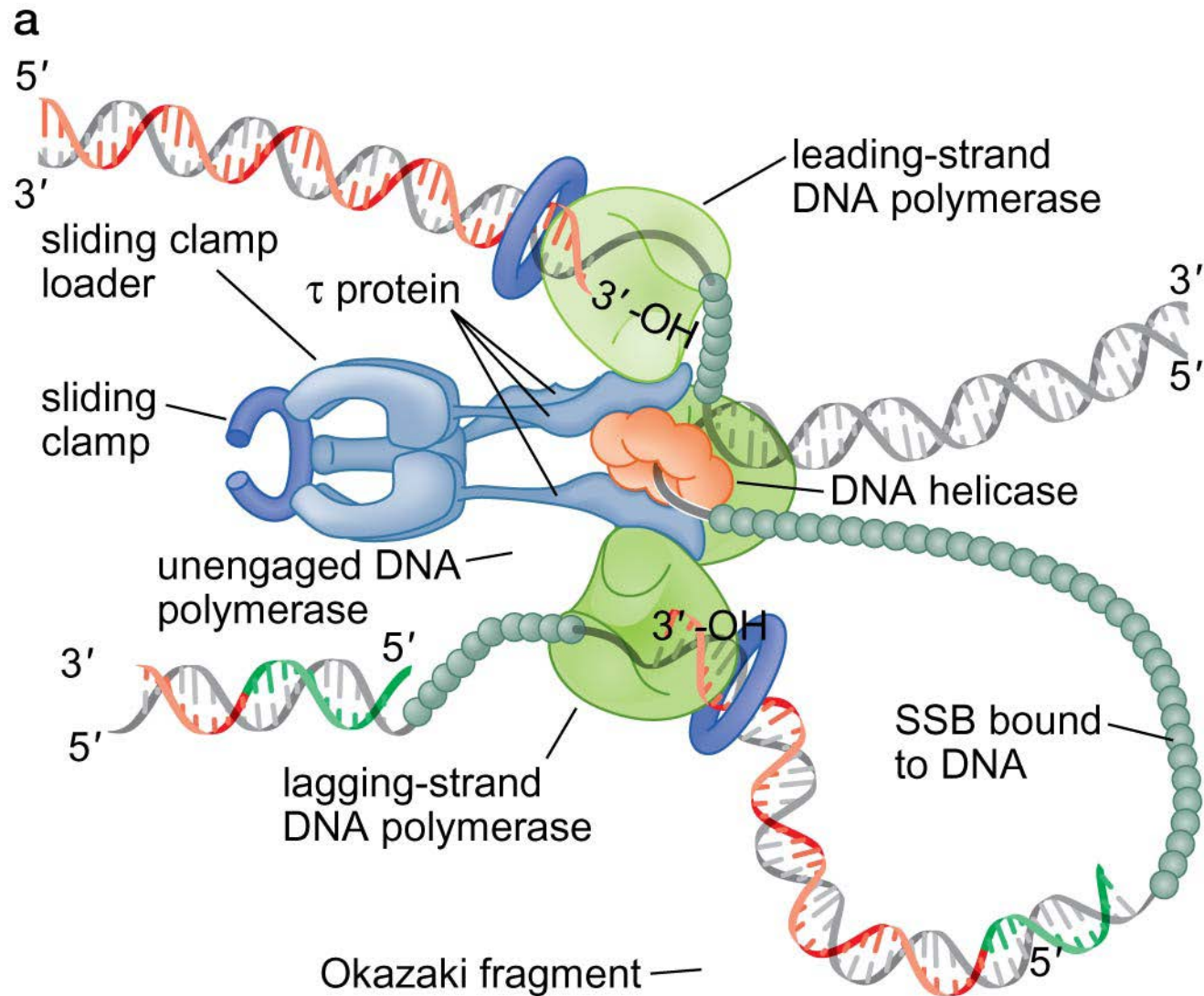
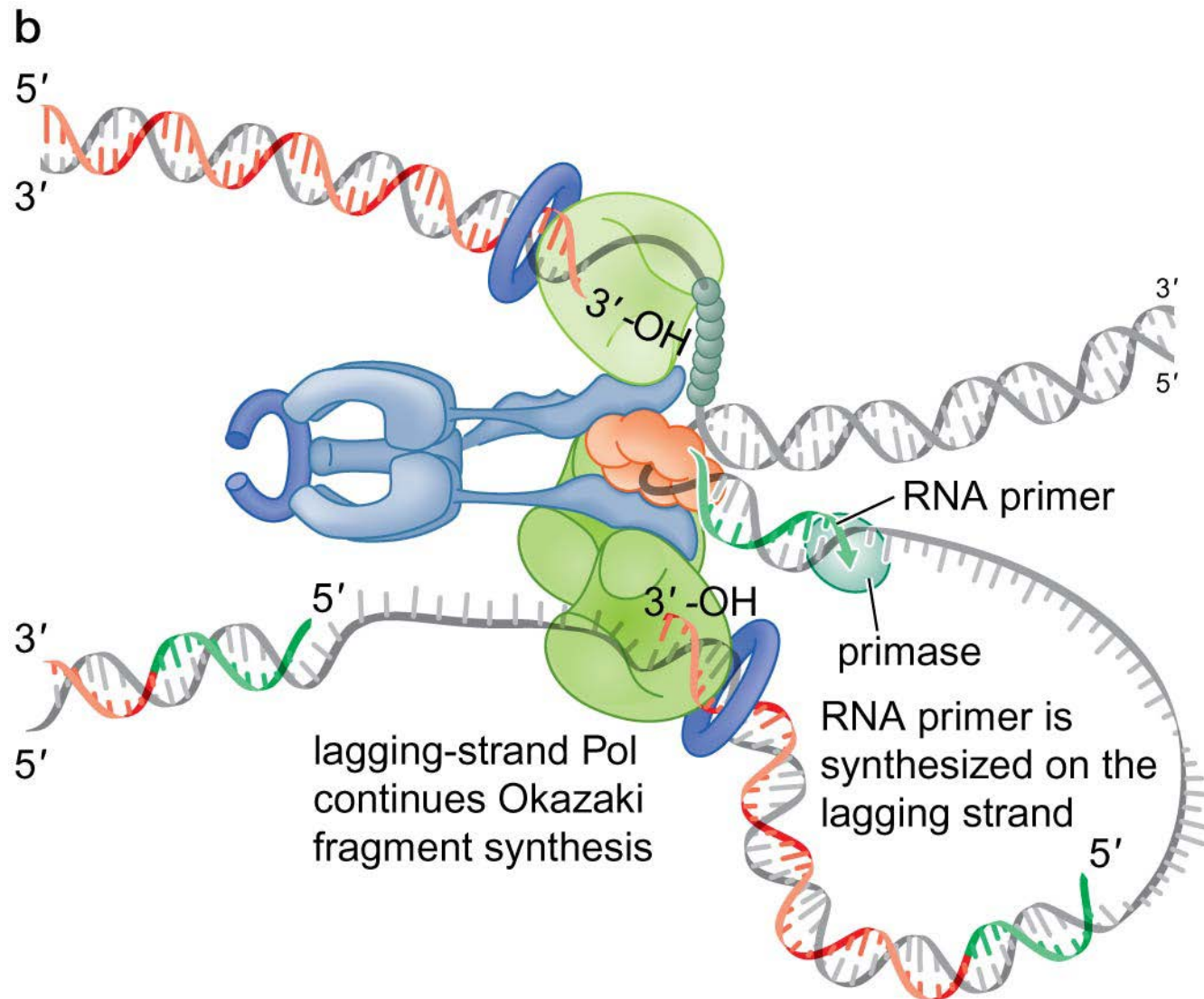


Figure 21.25 Summary of lagging strand replication. We begin with a β clamp associated with the γ complex part (red) of a pol III*. **(a)** The γ complex loads the β clamp (blue) onto a primed DNA template. **(b)** The γ complex, or clamp loader, dissociates from the β clamp. **(c)** The core (green) associates with the clamp. **(d)** The core and clamp cooperate to processively synthesize an Okazaki fragment, leaving just a nick between two Okazaki fragments. **(e)** The polymerase core dissociates from the clamp. **(f)** The γ complex reassociates with the β clamp. **(g)** The γ complex acts as a clamp unloader, removing the β clamp from the template. Now it is free to repeat the process, recycling to another primer on the template. (Source: Adapted from Herendeen, D.R. and T.J. Kelly, DNA polymerase III: Running rings around the fork. *Cell* 84:7, 1996.)

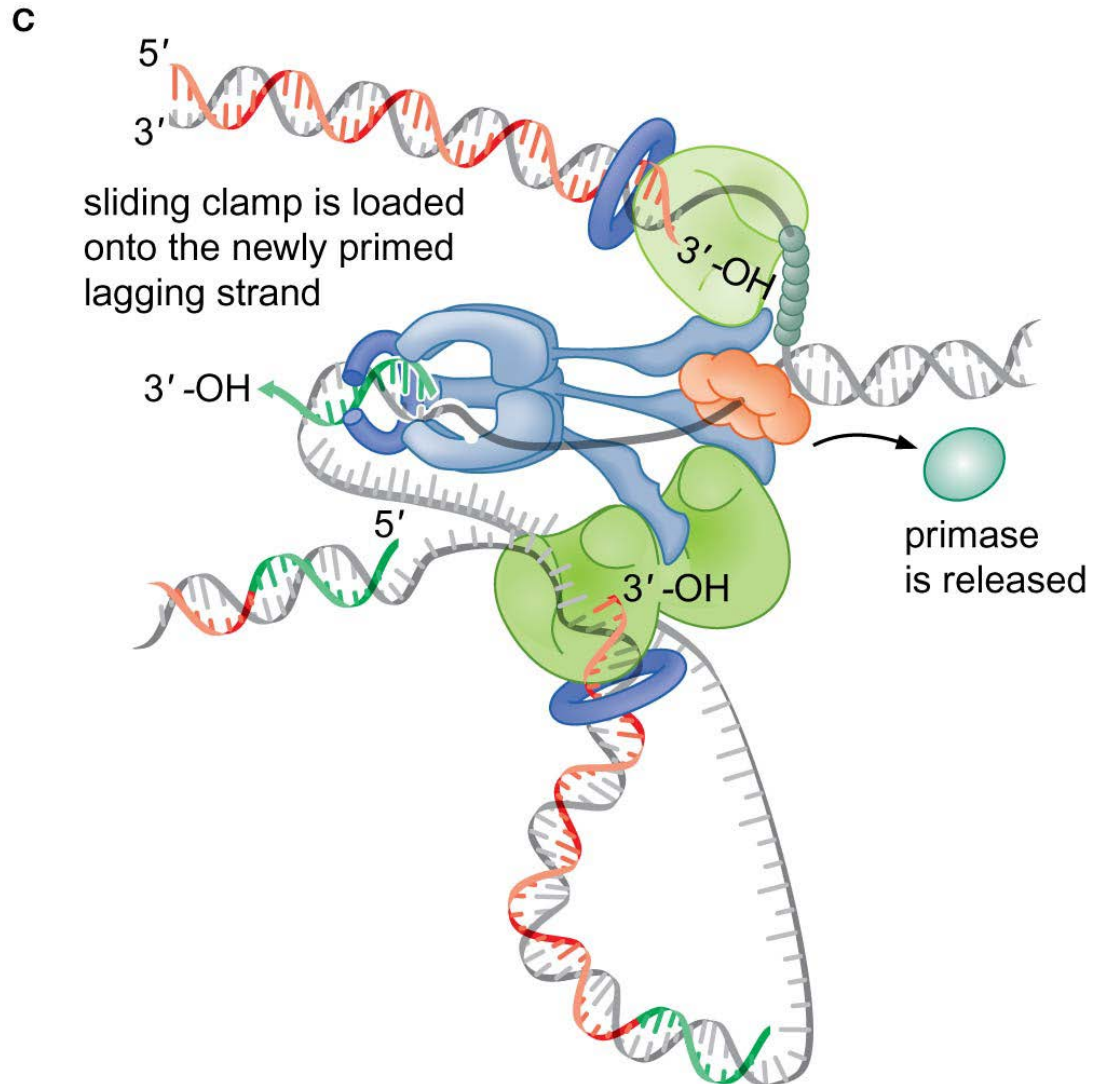
Les pinces lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



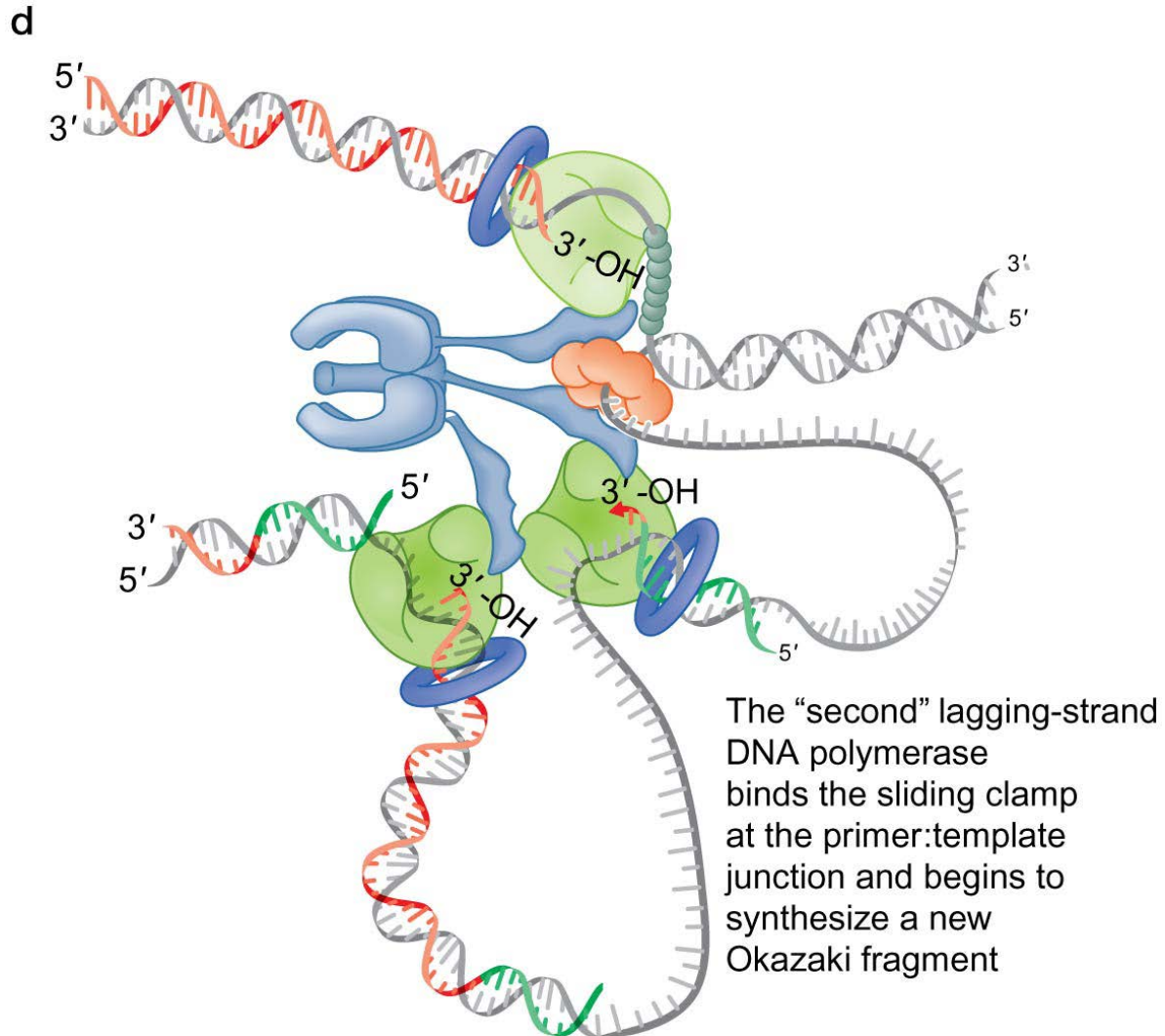
Les pinces lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



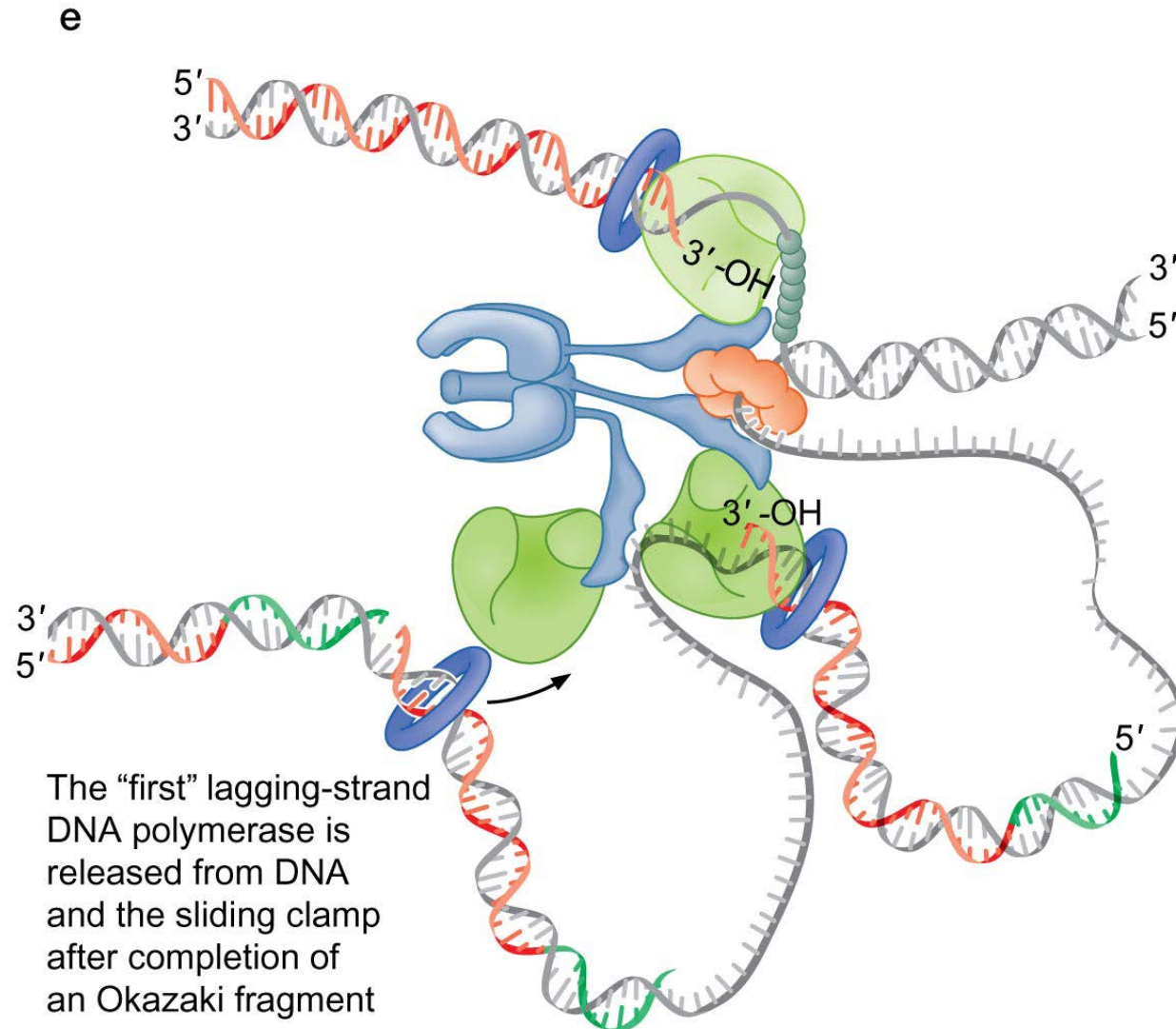
Les pincas lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



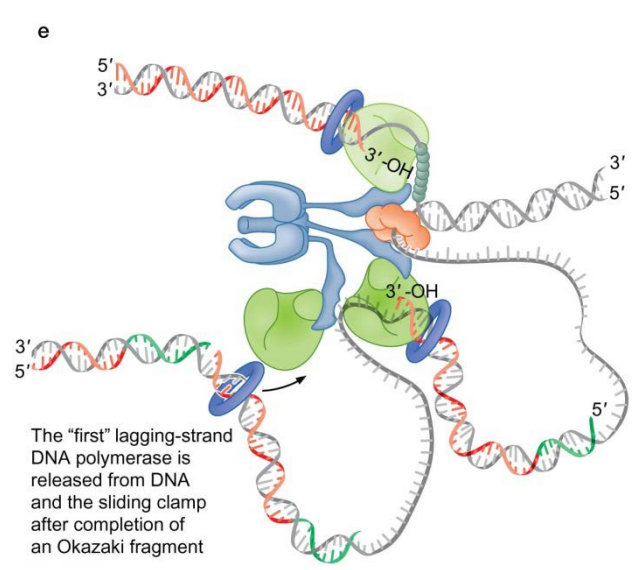
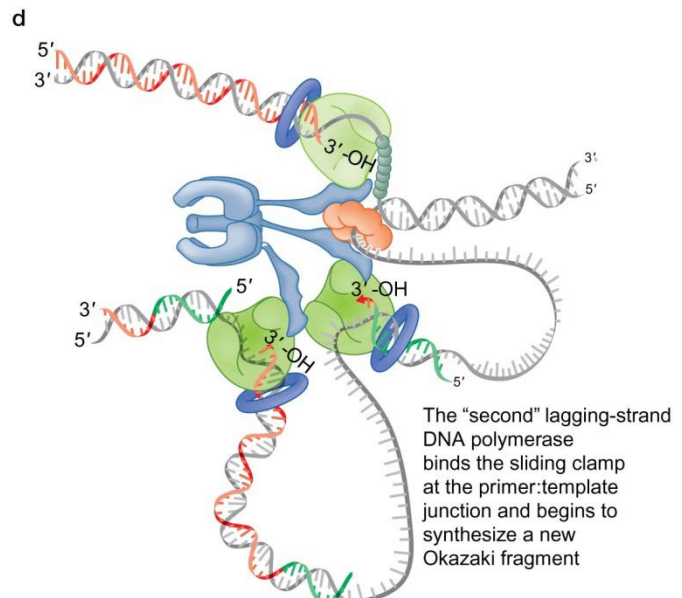
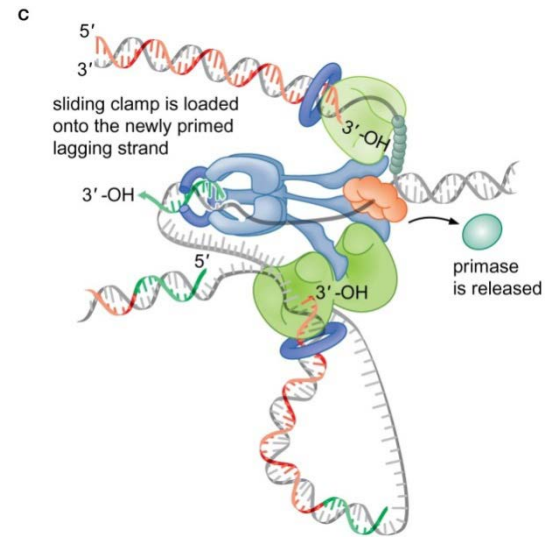
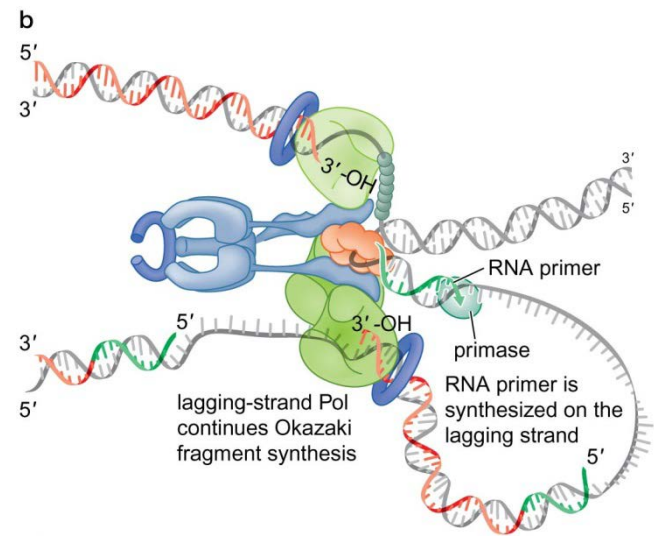
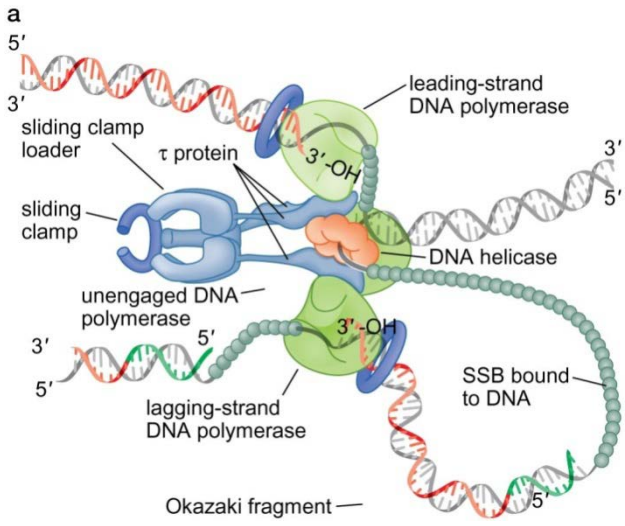
Les pinces lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



Les pines lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



Les pinces lliscants i la síntesi coordinada de les dues cadenes



TERMINACIÓ DE LA REPLICACIÓ

Terminació de la replicació en *E. coli*

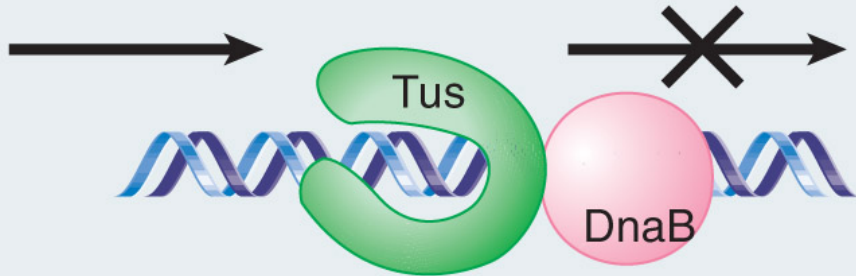
Tus acts asymmetrically

DNA accessible

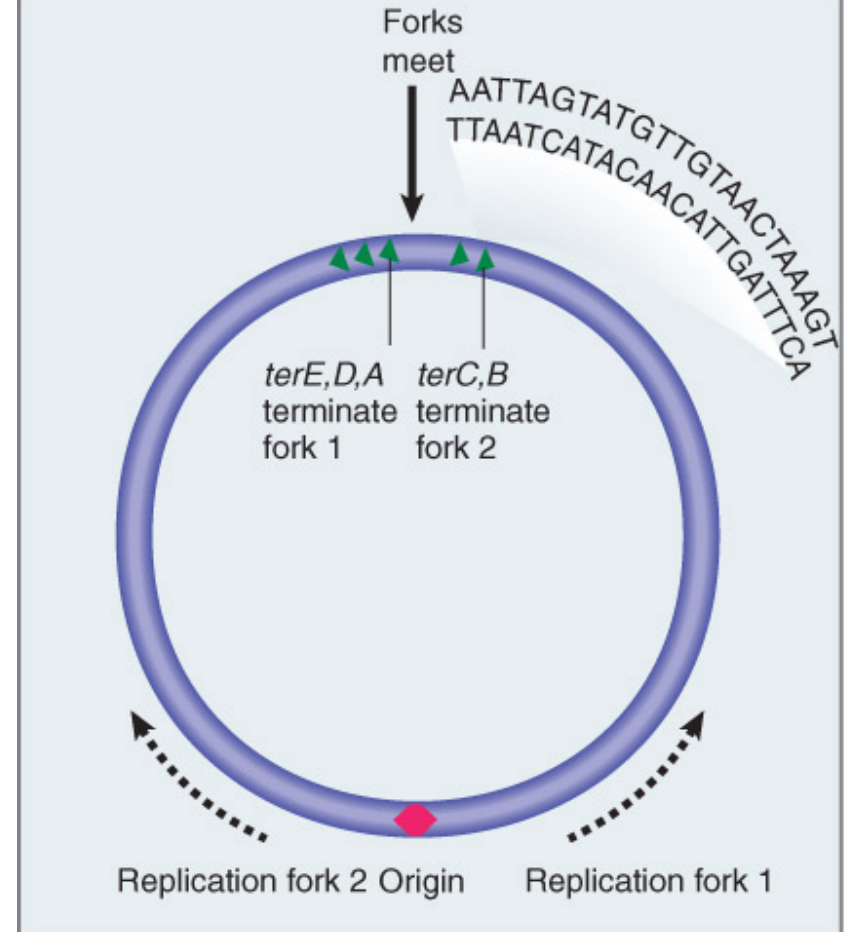
Replication proceeds

DNA blocked

Replication terminates

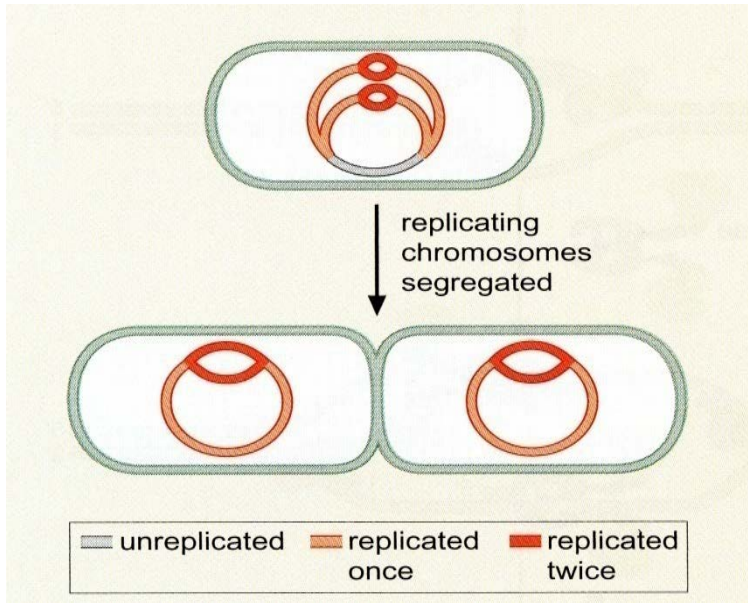


Forks usually meet before terminating



Hi participen els elements *ter* en el DNA i la proteïna Tus

Terminació de la replicació en *E. coli*



La topoisomerasa IV és la possiblement implicada en decatenació en *E. coli*

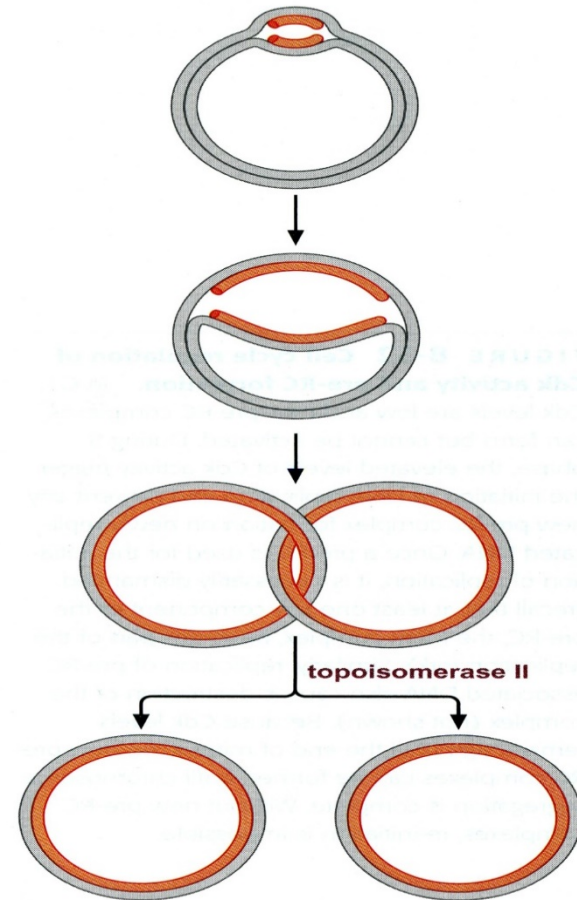
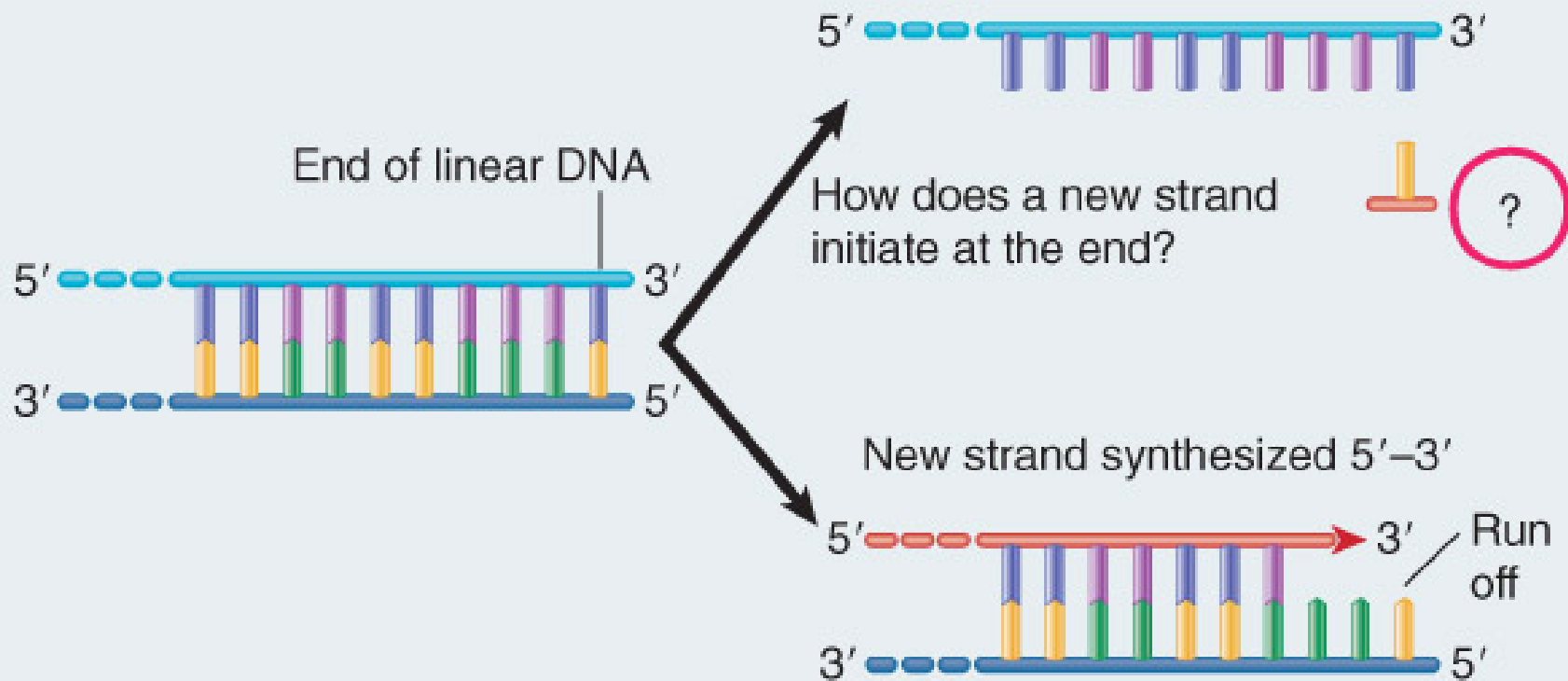


FIGURE 8-33 Topoisomerase II catalyzes the decatenation of replication products. After a circular DNA molecule is replicated, the resulting complete daughter DNA molecules remain linked to one another. Type II DNA topoisomerases can efficiently separate (or decatenate) these DNA circles.

La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

Replication of a 5' end is a problem



La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

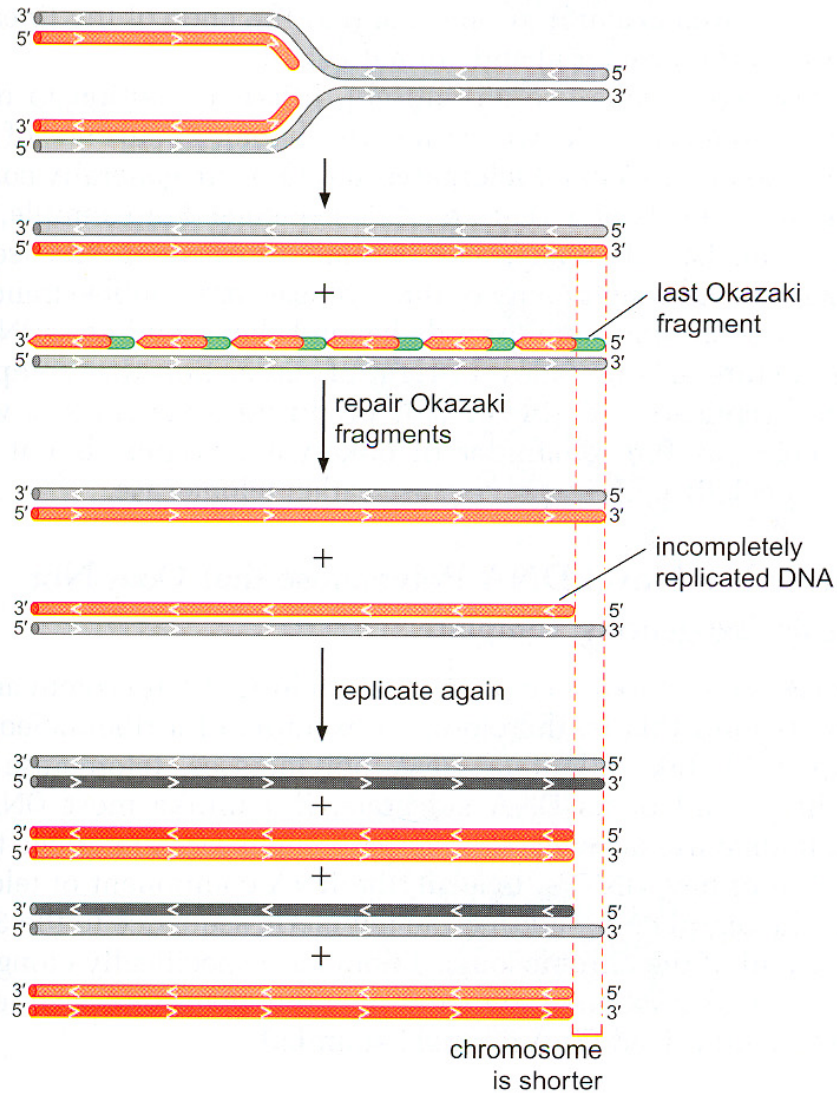
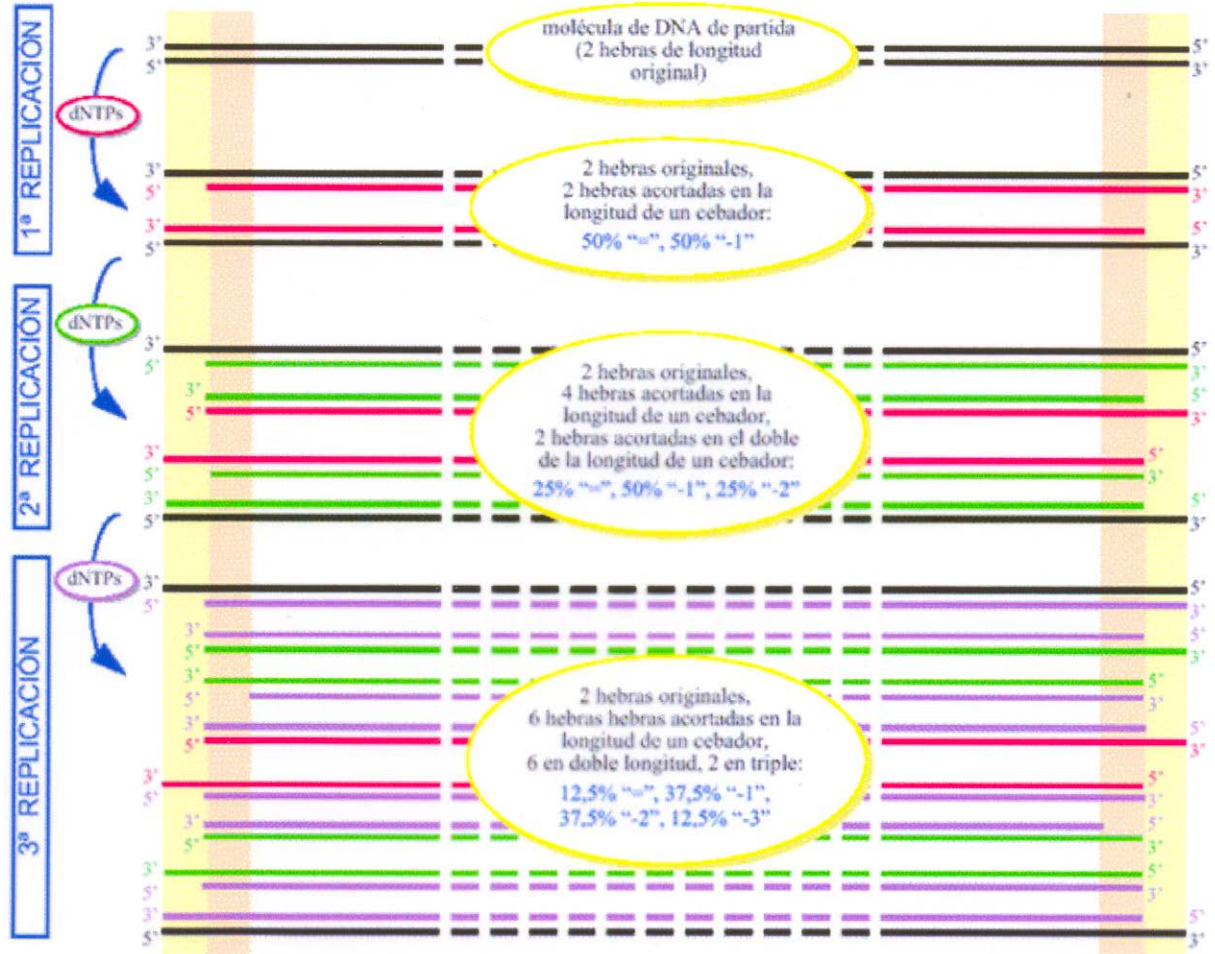


FIGURE 8-34 The end replication problem. As the lagging strand replication machinery reaches the end of the chromosome, at some point primase no longer has sufficient space to synthesize a new RNA primer. This results in incomplete replication and a short ssDNA region at the 3' end of the lagging strand DNA product. When this DNA product is replicated in the next round, one of the two products will be shortened and will lack the region that was not fully copied in the previous round of replication.

Replicación del DNA

Replicación de los telómeros



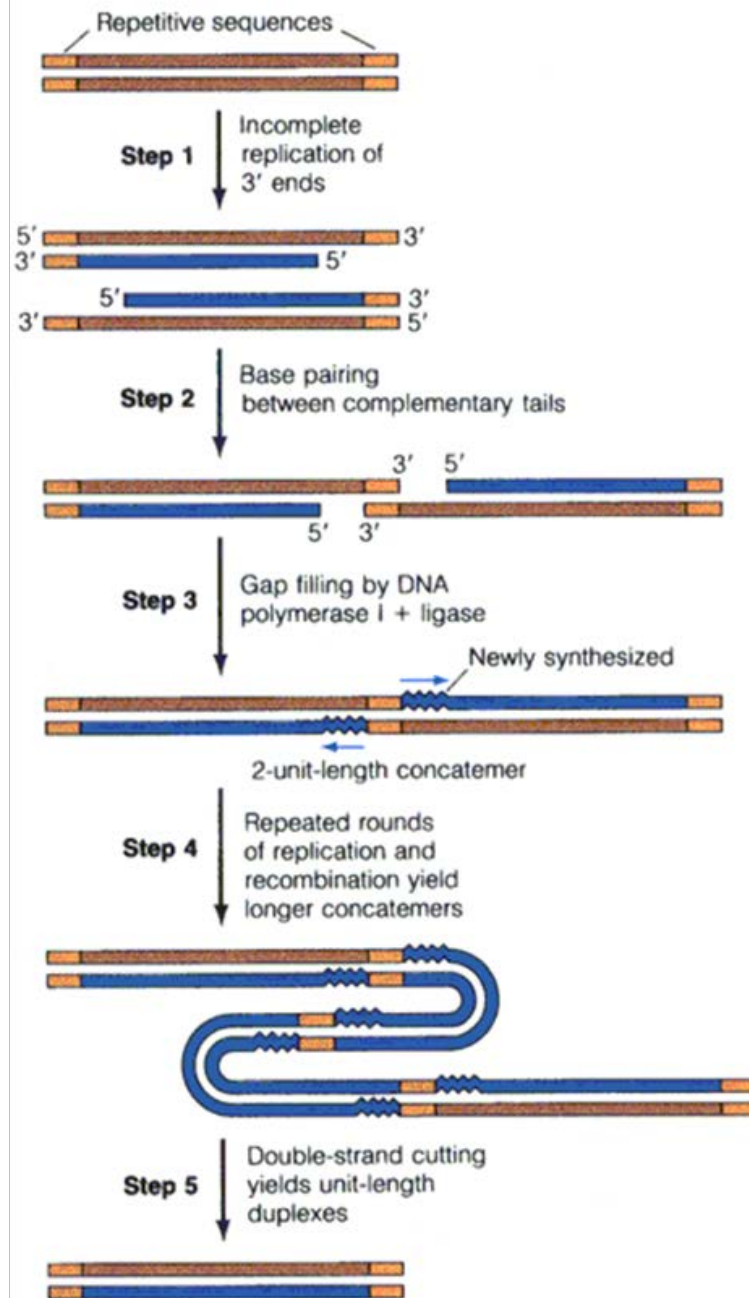
En cada ronda sucesiva de replicación las hebras nuevas son más cortas en 5' que su molde. Como consecuencia, la longitud del cromosoma se va acortando progresivamente, en sus dos extremos o telómeros

La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

Solucions enfront d'aquesta situació en diferents sistemes:

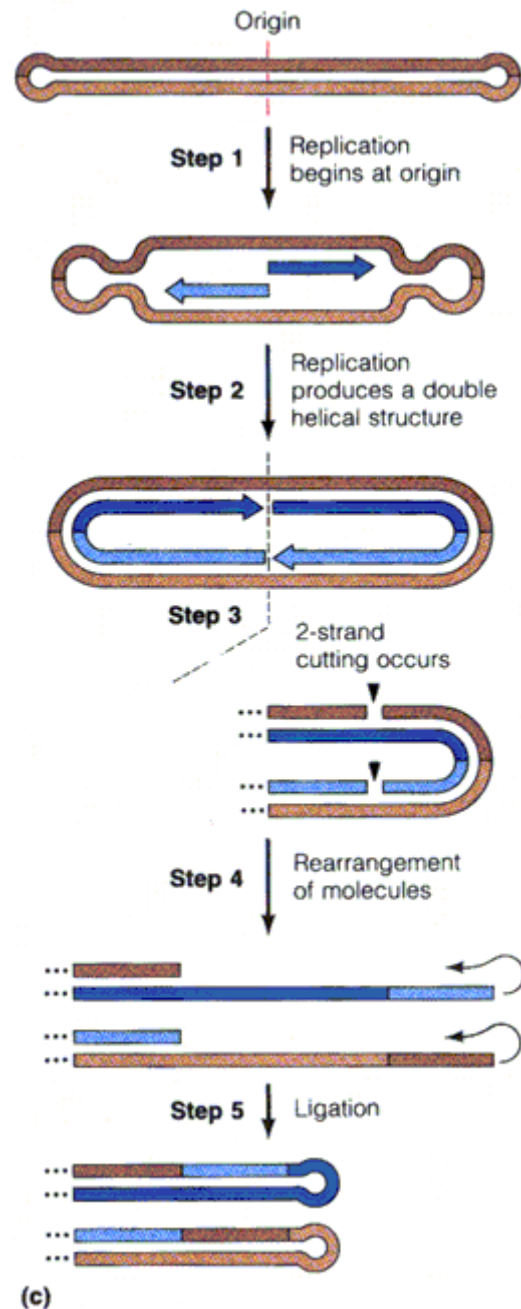
- Conversió del replicó lineal en circular o multimèric (alguns fags)



La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

Solucions enfront d'aquesta situació en diferents sistemes:

- Formació d'una estructura inusual en el DNA de manera que no quede lliure l'extrem (DNA mitocondrial lineal de *Paramecium*)



La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

Solucions enfront d'aquesta situació en diferents sistemes:

- Intervenció d'una proteïna unida a la base 5' terminal que actue com a encebador (adenovirus)

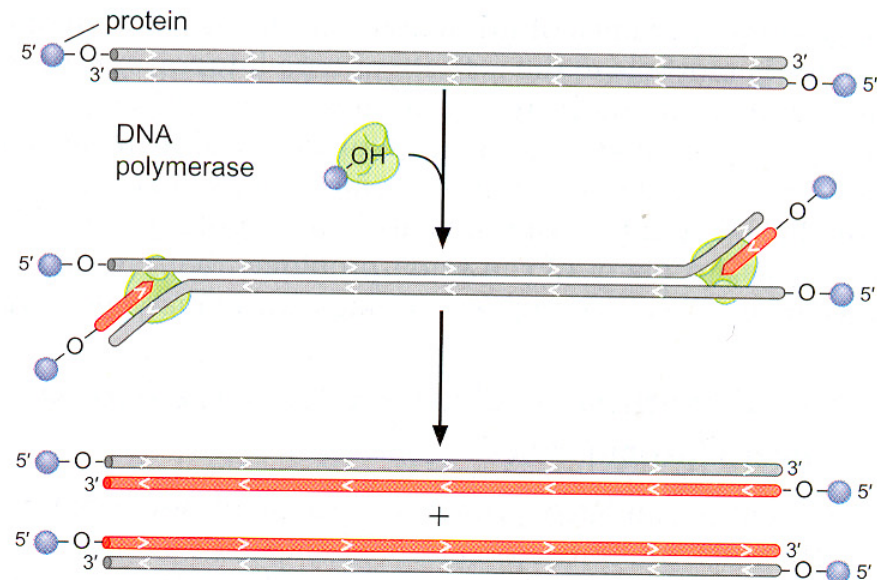


FIGURE 8-35 Protein priming as a solution to the end replication problem.

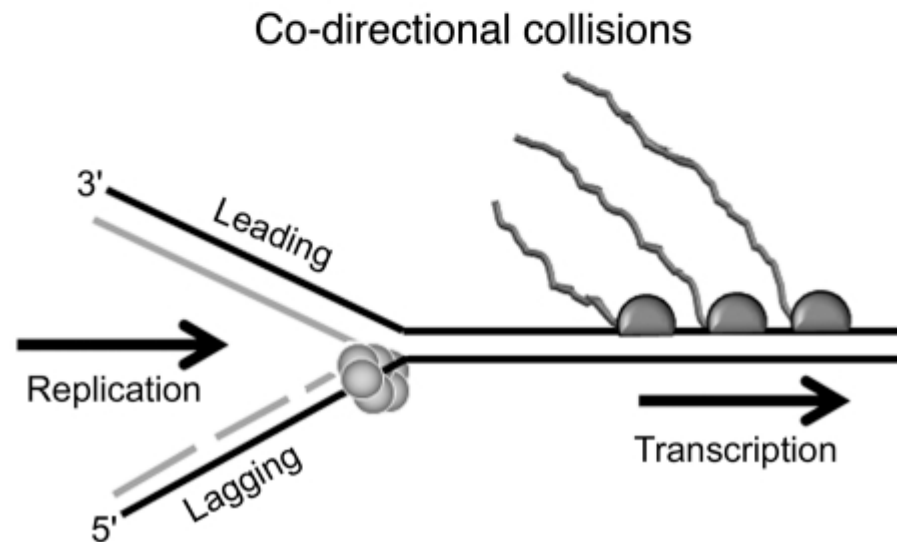
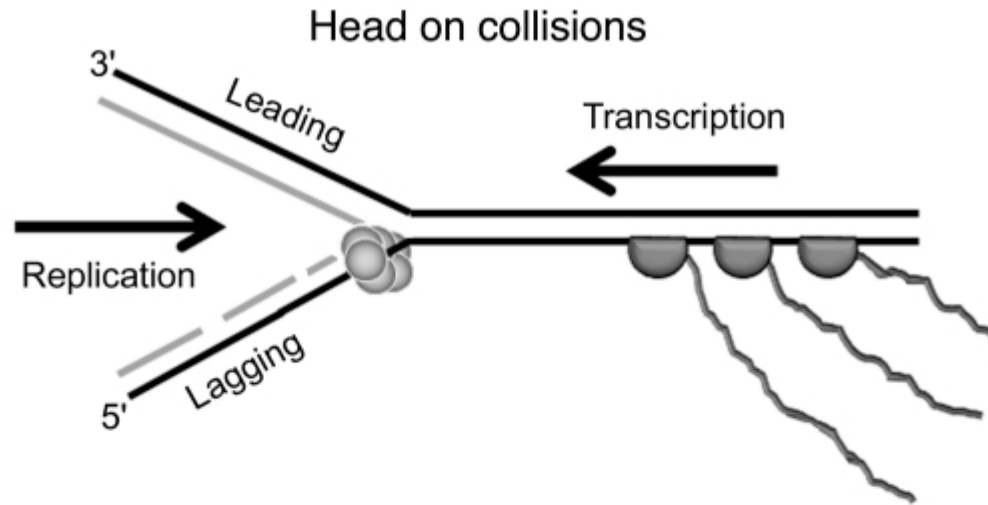
By binding to the DNA polymerase and to the 3' end of the template, a protein provides the priming hydroxyl group to initiate DNA synthesis. In the example shown, the protein primes all DNA synthesis as is seen for many viruses. For longer DNA molecules, this method combines with conventional origin function to replicate the chromosomes.

La problemàtica de la terminació de la replicació en genomes lineals

Solucions enfront d'aquesta situació en diferents sistemes:

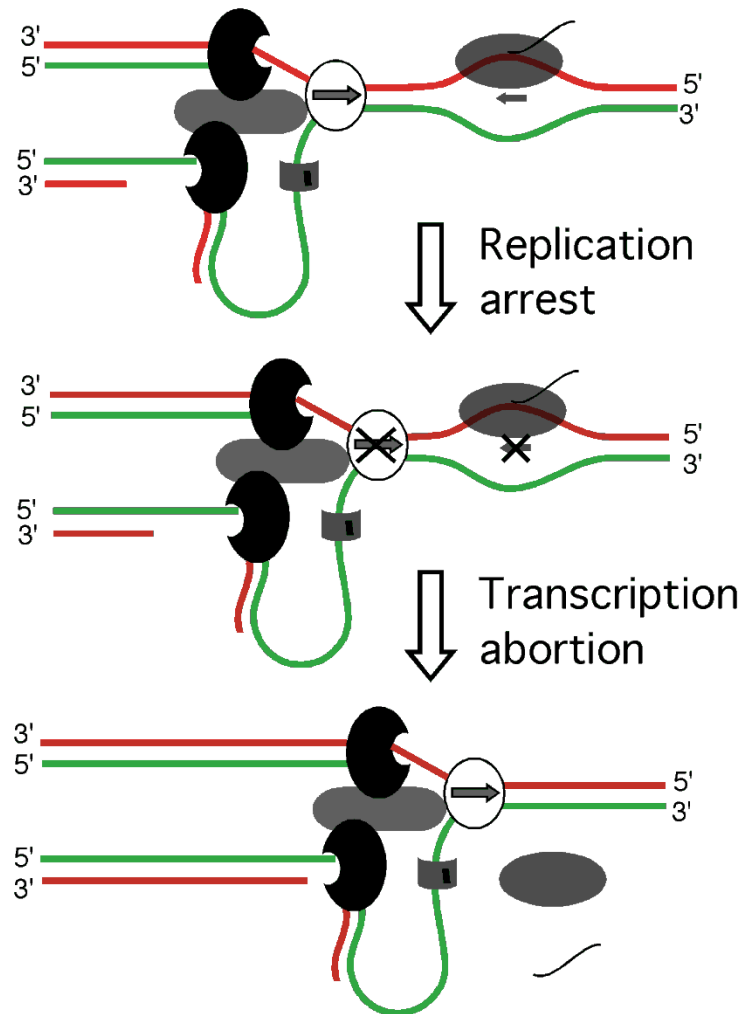
- Participació d'un enzim que afegeix nucleòtids allargant la cadena motle (telomerasa d'eucariotes, Tema 17)

Interacció entre replicació i transcripció

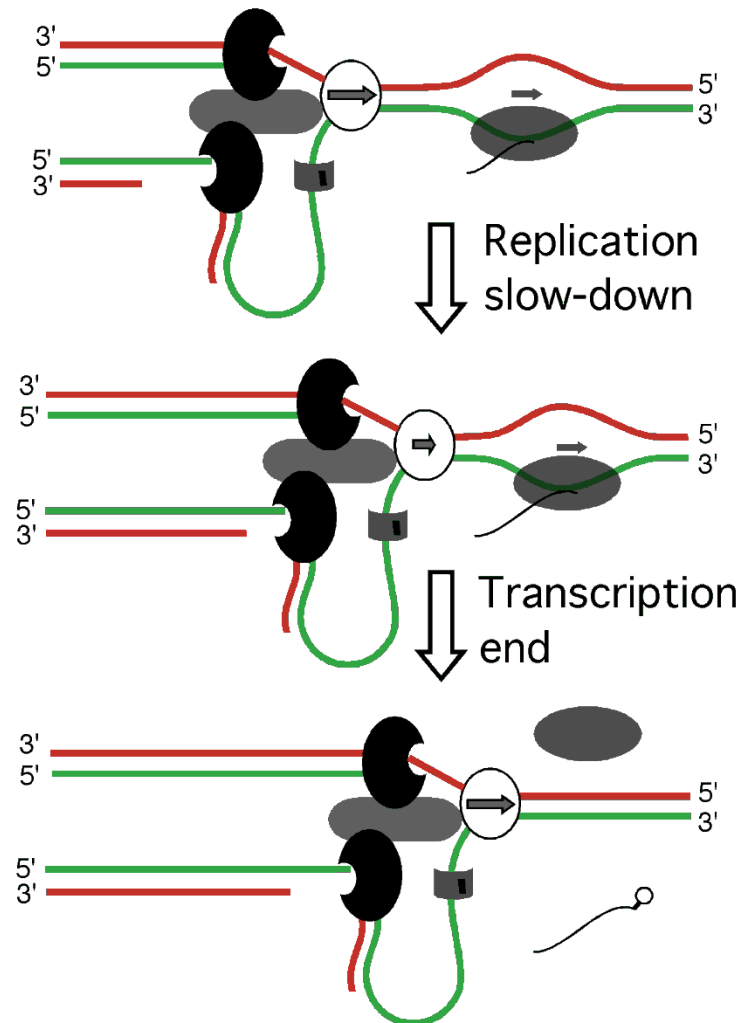










Interacció entre replicació i transcripció

Head-on collision



Co-oriented collision



-  DNA polymerase
-  Primase
-  Helicase
-  lagging strand
-  leading strand
-  RNA polymerase
-  Incomplete transcript
-  Complete transcript

Tema 16

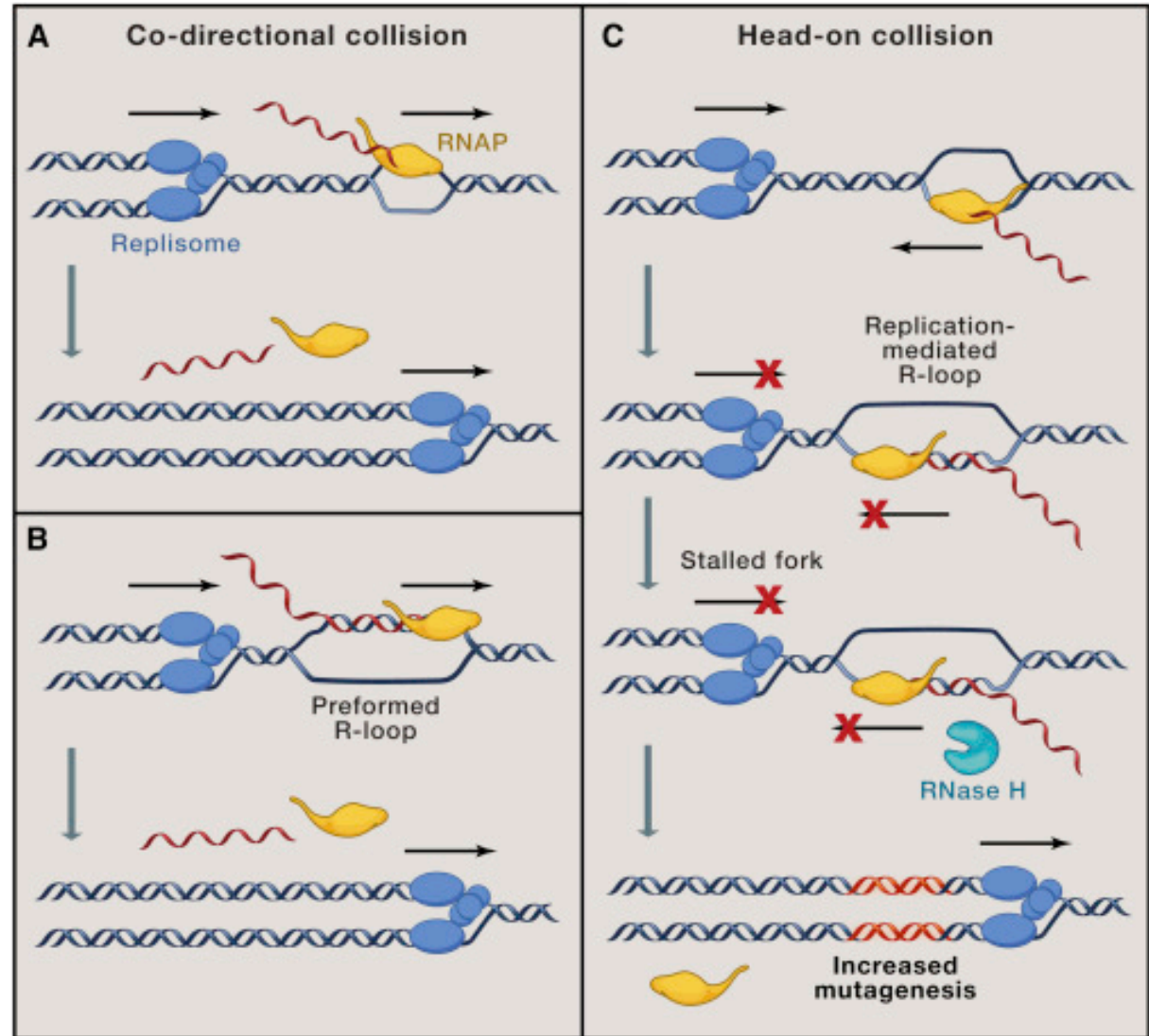
Figure 1. DNA Replication Impacts on the Formation and the Clearance of R-Loops in an Orientation-Dependent Manner

(A) Replication forks progressing through genes in a co-directional orientation can displace RNA polymerases (RNAP).

(B) Hamperl et al. (2017) report that co-directional collisions lead to the eviction of pre-formed R-loops.

(C) In contrast, head-on collisions increase R-loop formation and block fork progression in both human (Hamperl et al., 2017) and *B. subtilis* cells (Lang et al., 2017). Replication resumption in *B. subtilis* depends on the degradation of RNA-DNA hybrids by RNase HIII and promotes the accumulation of mutations in head-on genes. In human cells, fork stalling caused by R-loops activates ATR and leads to DNA breaks.

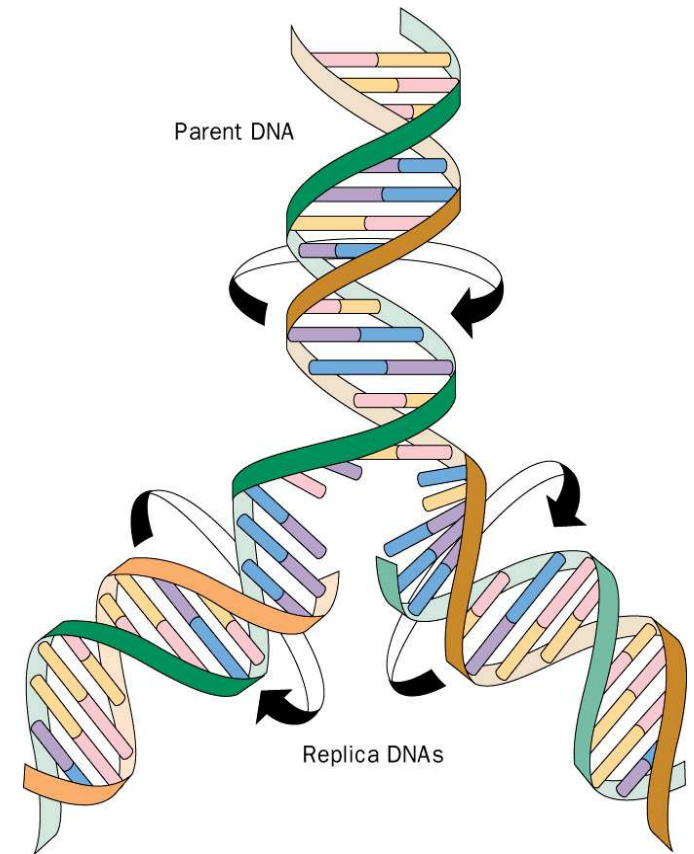
Interacció entre replicació i transcripció



Yea-Lih Lin, Philippe Pasero (2017)
Transcription-Replication
Conflicts: Orientation Matters,
Cell, 170:603-604,
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.040>.

Tema 17

Característiques específiques de la replicació en eucariotes. Enzimologia.
Origen múltiple de replicació.
Seqüències ARS. Replicació dels telòmers. Replicació de la cromatina.



Paràmetres comparatius de la replicació en *E. coli* i en eucariotes

TABLA 24.1. Parámetros cuantitativos de la replicación del DNA en distintas células

	Proceso de replicación	
	<i>E. coli</i>	Ser humano
Contenido de DNA, número de pares de nucleótidos por célula	3.9×10^6	ca. 10^9
Velocidad de progresión de la horquilla de replicación, $\mu\text{m}/\text{minuto}$	30	3
Velocidad de replicación del DNA, nucleótidos/segundo por horquilla de replicación	850	60-90
Número de orígenes de replicación por célula	1	10^3 - 10^4
Horas necesarias para la replicación del genoma completo	0.67	8
Horas necesarias para una división celular completa	0.33	24

Nota: Los datos corresponden a una célula de *E. coli* con una nutrición óptima y cultivada a 37 °C. Los valores indicados para una célula humana corresponden a datos de células HeLa, que se obtuvieron inicialmente de un tumor y se han mantenido en cultivo durante muchos años.

Paràmetres comparatius de la replicació en *E. coli* i en eucariotes

Velocidad de replicación de los genomas eucarióticos

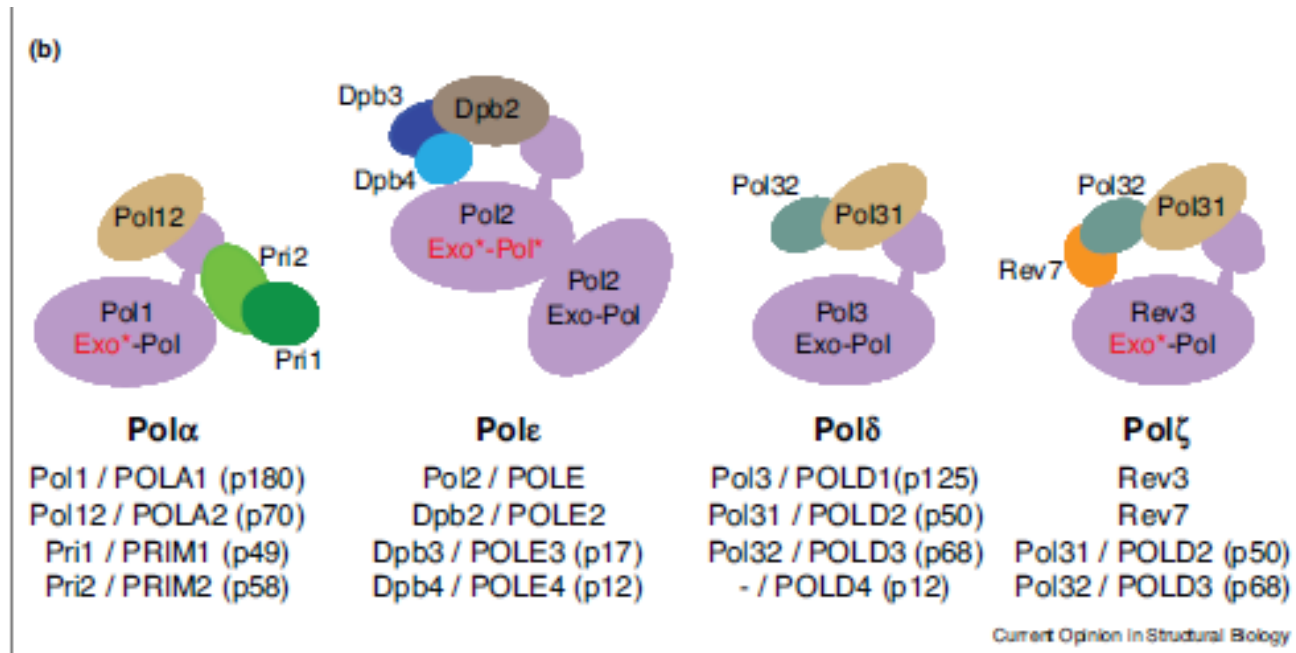
Espece	Número de replicones	Tamaño del replicón medio (kb)	Velocidad de la horquilla de replicación
<i>E. coli</i> (bacteria)	1	4.200	40-50 kb/min
<i>S. cerevisiae</i> (levadura)	400	40	6-8 kb/min
<i>D. melanogaster</i> (mosca) ...	4.000/2.000	40/8 ^a	2-3 kb/min
<i>X. laevis</i> (sapo)	15.000	200	0,5-1 kb/min
<i>Homo sapiens</i>	20.000- — 100.000	150	1-6 kb/min

* En cèlulas en cultivo es de 40 kb (la fase S dura \approx 10 h), pero en núcleos de embriones tempranos es de 8 kb (la replicación dura sólo 4 min).

Proteïnes implicades: DNA polimerases d'eucariotes

Enzyme	Probable role
DNA polymerase α	Priming of replication of both strands
DNA polymerase δ	Elongation of lagging strand
DNA polymerase ϵ	Elongation of leading strand
DNA polymerase β	DNA repair
DNA polymerase γ	Replication of mitochondrial DNA

Proteïnes implicades: DNA polimerases d'eucariotes



Schematic of the eukaryotic replication fork and replicative polymerases. (a) Active Mcm2–7 heterohexameric encircles the leading strand and unwinds the parent duplex using ATP hydrolysis. Priming of both the leading and lagging strands is performed by Pol α -primase that is anchored to the CMG complex via Ctf4. The primers are extended by Pol δ on the lagging strand. Pol ζ is recruited to the leading strand via interactions with the CMG complex. There is evidence for Pol ζ or Pol δ as the leading strand polymerase. Accessory factors such as PCNA and RPA are labeled.

(b) Subunit composition of replicative polymerases from *Saccharomyces cerevisiae*. Inactive exonuclease and polymerase activities are indicated in red with an asterisk. In the legend below, yeast and human subunits are separated by a slash.

Proteïnes
implicades: DNA
polimerases
d'eucariotes

Presenta activitat
transcriptasa inversa

TABLE 8-2 Activities and Functions of DNA Polymerases

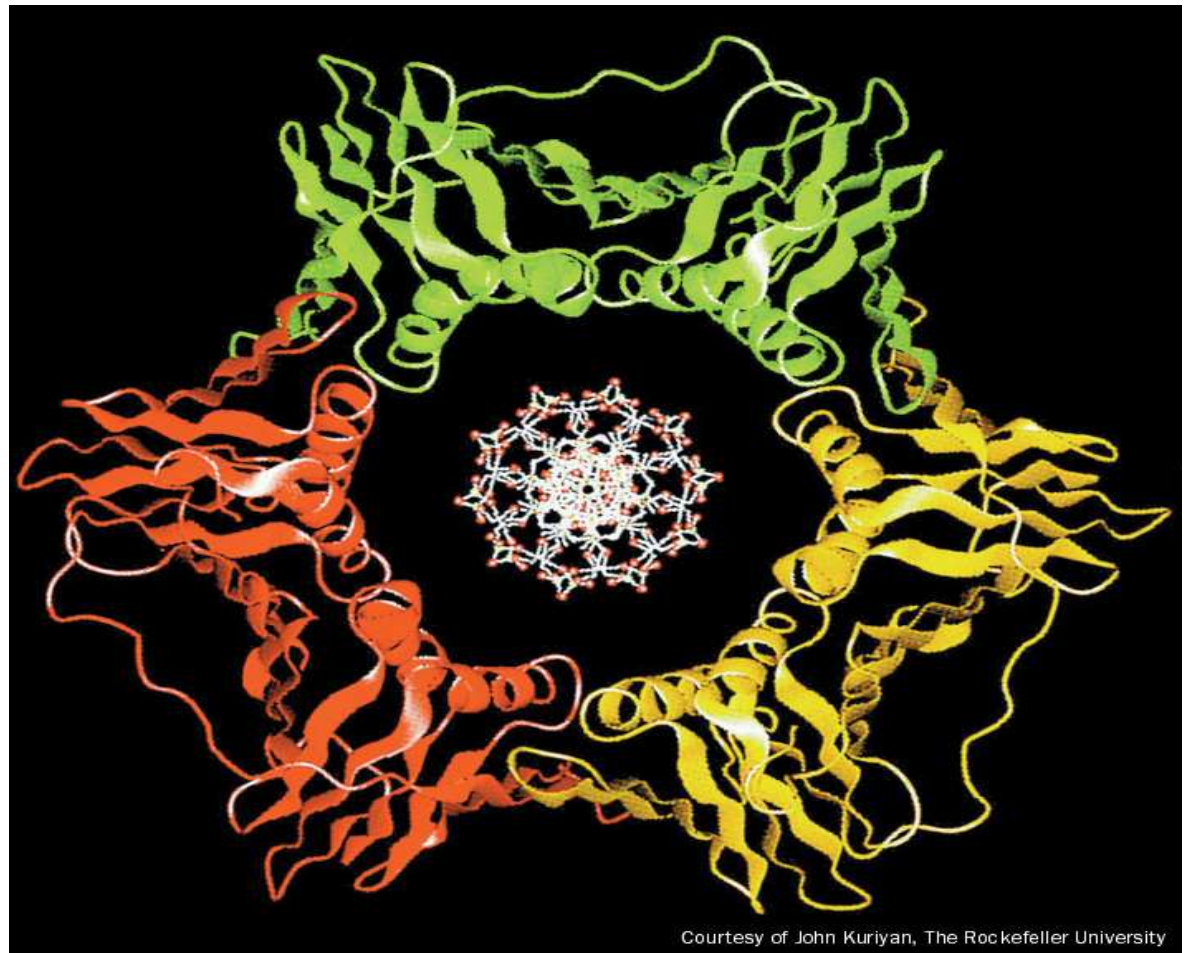
Prokaryotic (<i>E. coli</i>)	Number of Subunits	Function
Pol I	1	RNA primer removal, DNA repair
Pol II (Din A)	1	DNA repair
Pol III core	3	Chromosome replication
Pol III holoenzyme	9	Chromosome replication
Pol IV (Din B)	1	DNA repair, translesion synthesis (TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' ₂ C)	3	TLS
Eukaryotic	Number of Subunits	Function
Pol α	4	Primer synthesis during DNA replication
Pol β	1	Base excision repair
Pol γ	3	Mitochondrial DNA replication and repair
Pol δ	2–3	Lagging-strand DNA synthesis; nucleotide and base excision repair
Pol ϵ	4	Leading-strand DNA synthesis; nucleotide and base excision repair
Pol θ	1	DNA repair of cross-links
Pol ζ	1	TLS
Pol λ	1	Meiosis-associated DNA repair
Pol μ	1	Somatic hypermutation
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	Relatively accurate TLS past <i>cis-syn</i> cyclobutane dimers
Pol ι	1	TLS, somatic hypermutation
Rev1	1	TLS

Data from Sutton M.D. and Walker G.C. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8342–8349, and references therein.

Primpol: TLS + activitat primasa

Proteïnes implicades: DNA polimerases d'eucariotes

Estructura de raigs X de PCNA. Les seues tres subunitats (en roig, verd i groc) formen un anell simètric que envolta el DNA.



Altres proteïnes implicades en la replicació en eucariotes

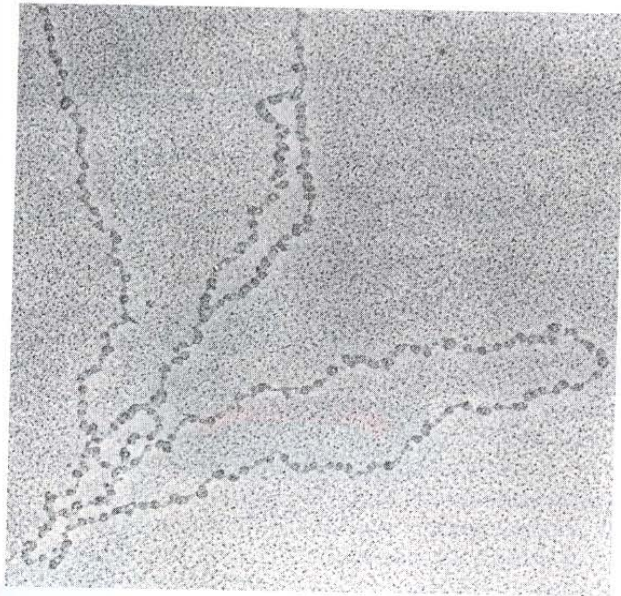
TABLE 25.3 Proteins that carry out analogous functions in DNA replication

Function	<i>E. coli</i>	Phage T4	SV40/Human	Yeast
DNA polymerase	Pol III core enzyme	gp43	Pol δ , Pol ϵ	Pol δ , Pol ϵ
Primase	DnaG	gp61	Pol α	Pol α
Helicase	DnaB	gp41	SV40 T antigen	MCM proteins
Proofreading	ϵ subunit of Pol III holoenzyme	gp43	Pol δ	Pol δ , Pol ϵ 3' exonuclease
Sliding clamp	β subunit of Pol III holoenzyme	gp45	PCNA	PCNA
Clamp loader	γ complex of Pol III holoenzyme	gp44/62	Replication factor C	Replication factor C
Single-strand DNA-binding protein	SSB	gp32	Replication protein A	Replication protein A
RNA primer removal	Pol I, RNase H	<i>E. coli</i> Pol I T4 RNase H	Pol δ , FEN 1	Pol δ , FEN 1

Altres proteïnes implicades en la replicació en eucariotes

Funció	<i>Escherichia coli</i>	Eucariotes
Reconeixement de l'origen	DnaA	ORC, Cdc6, Cdt1
Helicasa	DnaB	MCM (Mcm2, 3, 4, 5, 6, 7)
Càrrega de l'helicasa	DnaC, PriA	GIN5, Cdc45
Unió a ss-DNA	SSB	RPA (p14, p32, p70)
Síntesi d'encebador	DnaG	Pol α
Pinça	β	PCNA
Carregador de la pinça	Complex γ	RF-C (p140, p40, p38, p37, p36)
Polimerasa replicativa	Pol III	Pol α , δ , ϵ
Exonucleasa 5'-3' (eliminació de l'encebador)	Domini Nt de Pol I	Fen1, Dna2
Exonucleasa 3'-5'	Subunitat ϵ de Pol III	Subunitats de Pol δ i ϵ
DNA ligasa	DNA ligasa	DNA ligasa 1
Topoisomerasa	Girasa, Topo I	Topo I, Topo II

Orígens de replicació en eucariotes



(a)

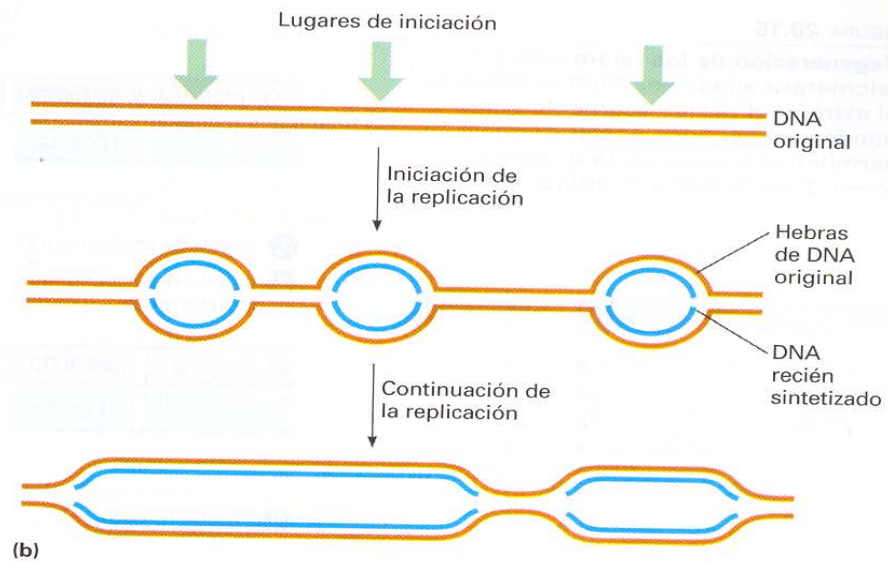


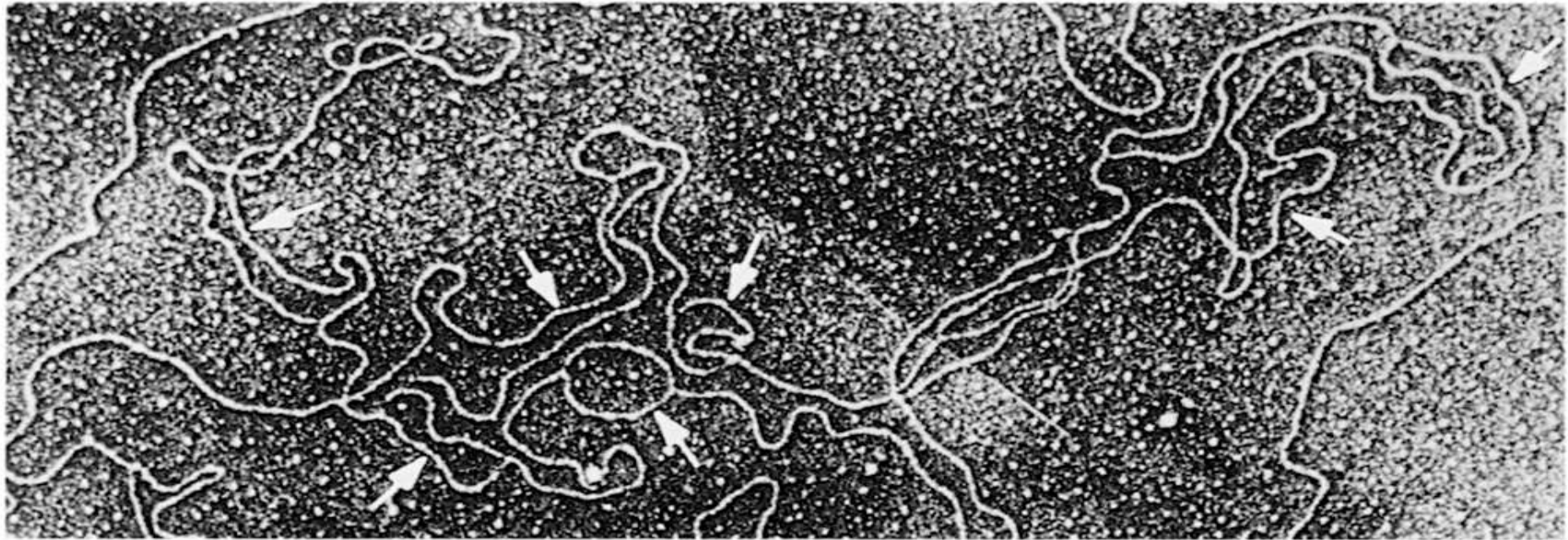
FIGURA 28.18

Replicación del DNA en los eucariotas.

(a) Fotografía de microscopía electrónica de la cromatina de *Drosophila* en replicación, en la que se observan dos burbujas de replicación. Los puntos sobre las fibras son nucleosomas. (b) Imagen esquemática de la replicación de los eucariotas.

(a) Cortesía de S. L. McKnight y O. L. Miller, Jr. *Cell* (1977) 12:795-804.

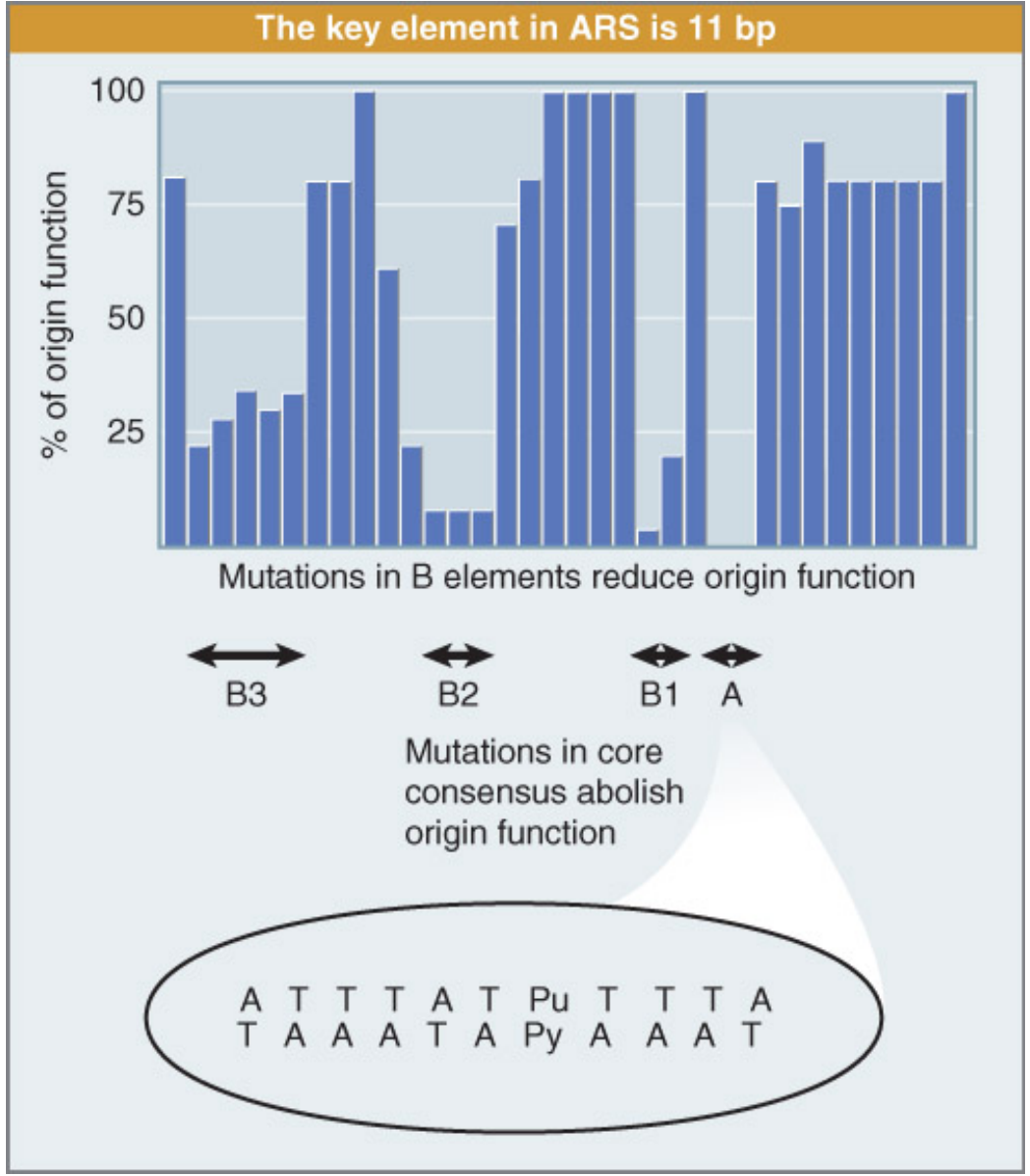
Orígens de replicació en eucariotes



From Kreigstein, H.J. and Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 136 (1974)

Micrografia electrònica d'un fragment de DNA de *Drosophila* en replicació. Les fletxes indiquen les múltiples forquetes de replicació.

Orígens de replicació en eucariotes (llevats)



Orígens de replicació en eucariotes (metazous)

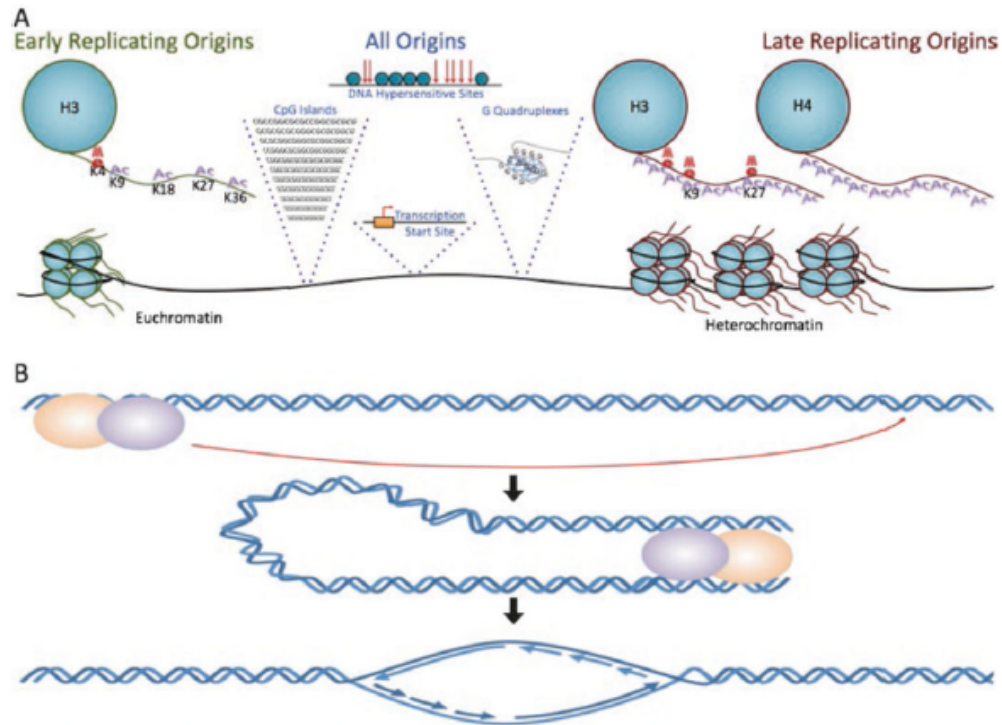
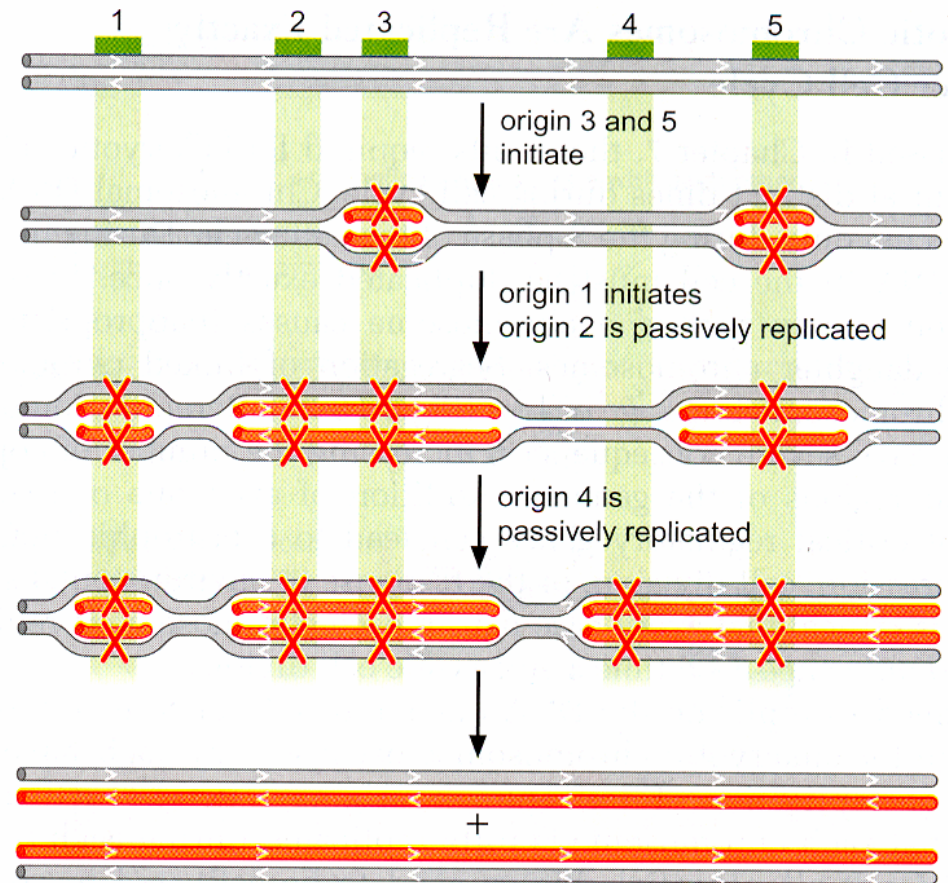


Fig. 3.

(a) Metazoan replication origins share several sequence features. Origins generally associate with regions that exhibit strand asymmetry, CpG islands, G-quadruplexes, transcription start sites, origin G-rich-repeated elements (OGREs), and regions of DNase hypersensitivity. In agreement, local histone modifications correlate with and can determine replication origin locations and timing. Early replicating regions associate with H3K4me_{1/2/3}, H3K9ac, H3K18ac, H3K36me₃, and H3K27ac. These histone modifications also associate with open chromatin and are enriched in moderately active transcription start sites. Late replicating regions tend to associate with H3 and H4 hypoacetylation, H3K9 and H3K27 methylation, and are found in heterochromatic regions. (b) Distal DNA sequences affect origin activity and transcriptional through long-distance interactions. Such interactions can be mediated via protein interaction with enhancers and locus control regions, by chromatin remodeling factors and transcriptional activators that bind enhancers and locus control regions, and by long noncoding RNAs

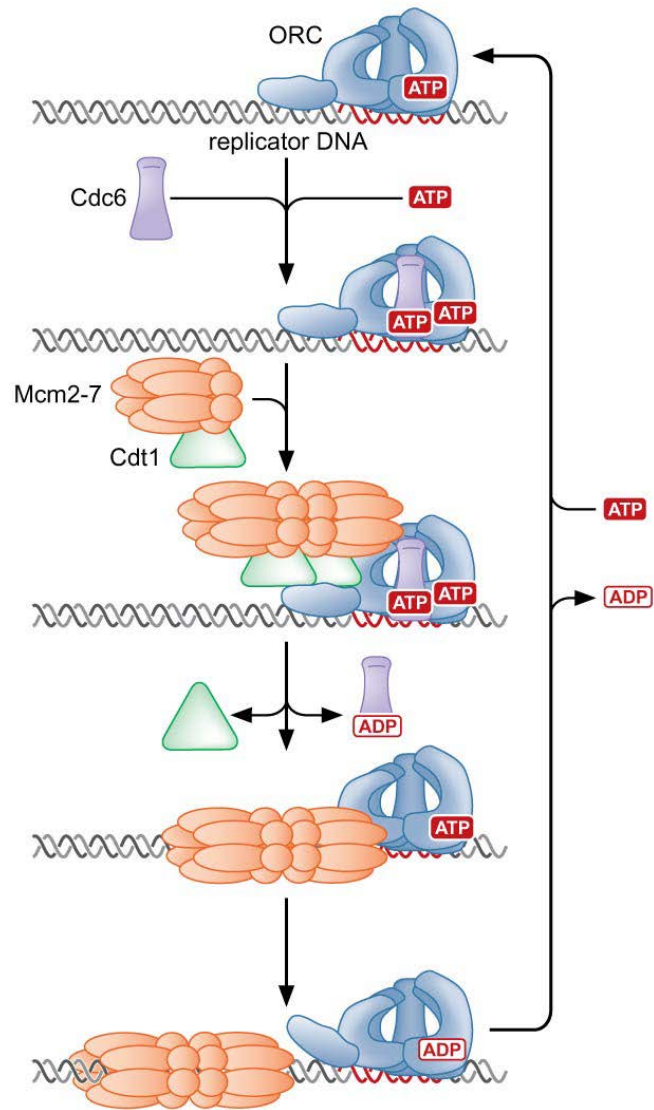
No tots els orígens de replicació són funcionals simultàniament

FIGURE 8-28 Replicators are inactivated by DNA replication. A chromosome with five replicators is shown. The replicators labeled 3 and 5 are the first to be activated, leading to the formation of two pairs of bidirectional replication forks. Activation of the parental replicator results in the inactivation of the copies of each replicator on both daughter DNA molecules until the next cell cycle (indicated by a red X). Further extension of the resulting replication forks replicates the DNA overlapping with the number 2 and 4 replicators. When a replicator is copied by a fork derived from an adjacent origin prior to initiation, it is said to have been passively replicated. Although these replicators have not initiated, they are nevertheless inactivated by the act of replicating their DNA. In contrast, replicator 1 is not reached by an adjacent fork prior to initiation and is able to initiate normally. The presence of more replicators than needed to complete DNA replication is a form of redundancy to ensure the complete replication of each chromosome.

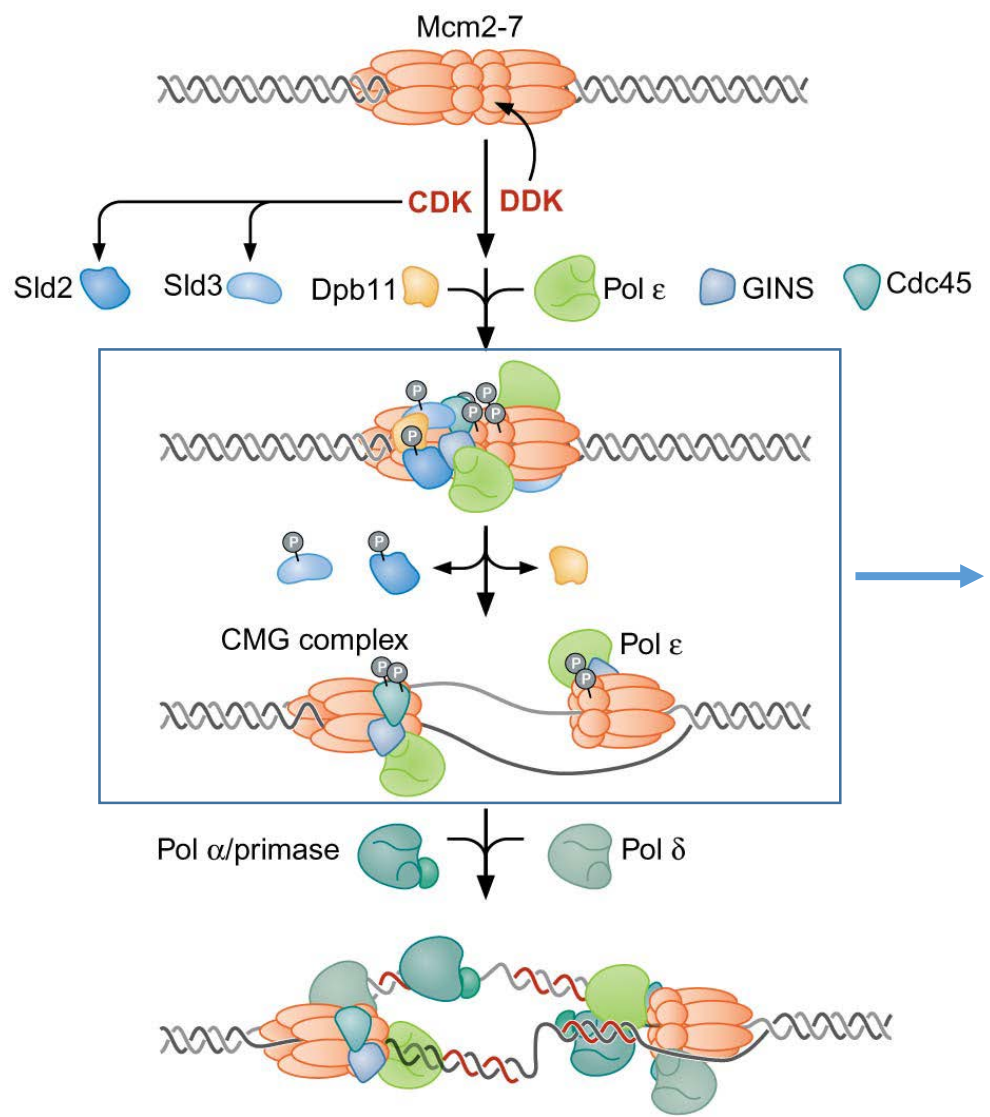


Inici de la replicació en eucariotes

Formació del complex prereplicatiu

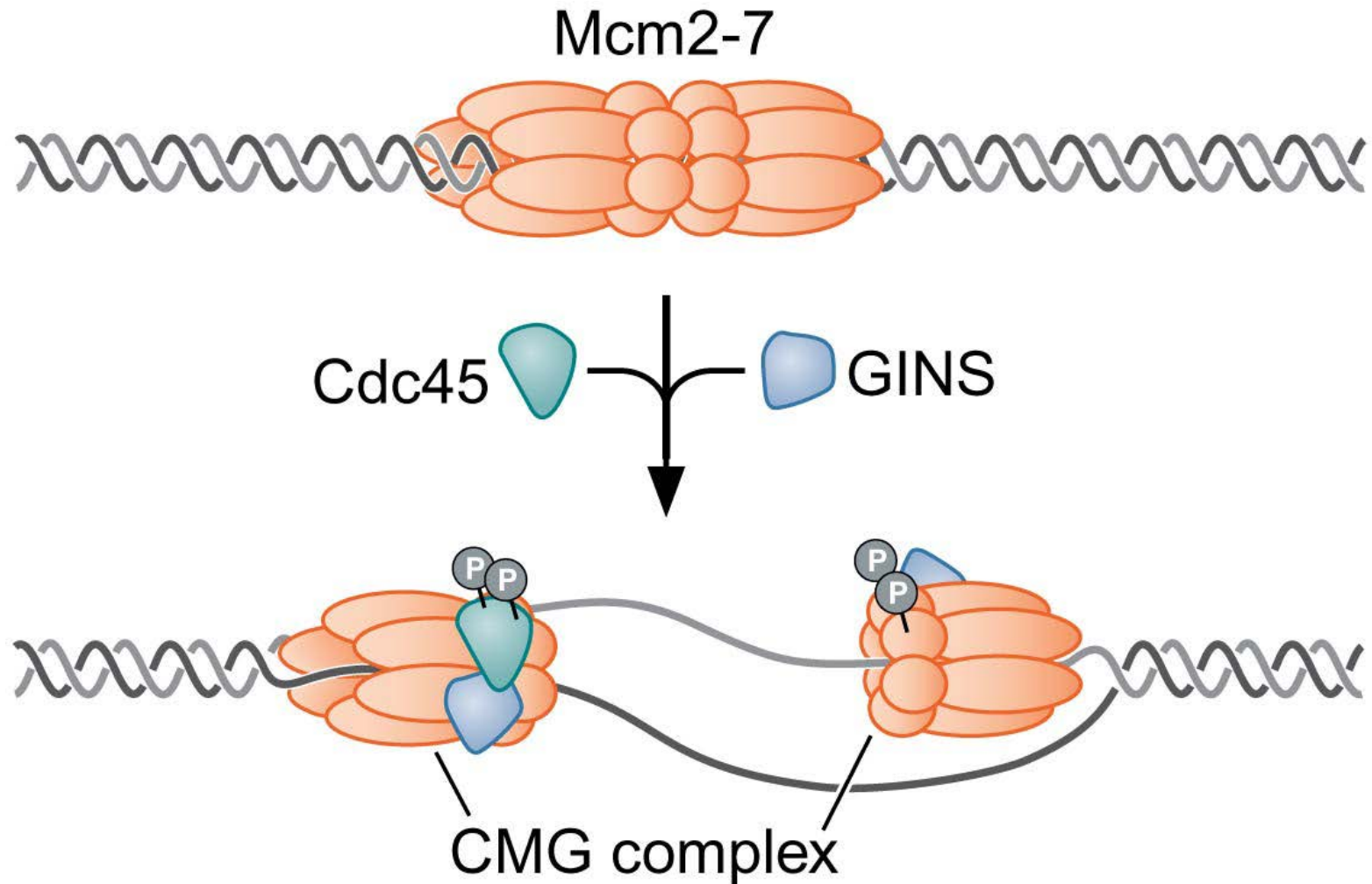


Activació del complex prereplicatiu

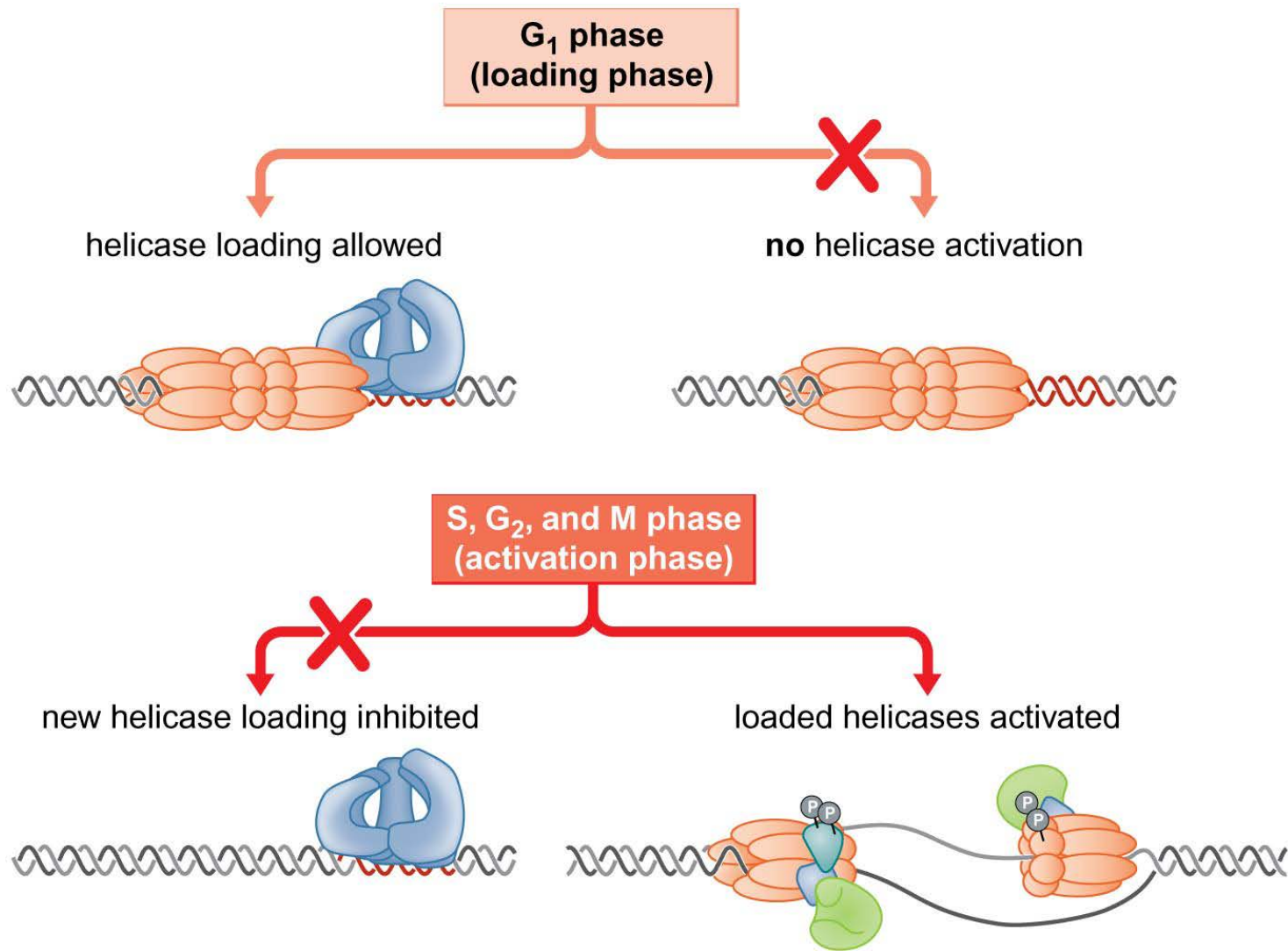


Inici de la replicació en eucariotes

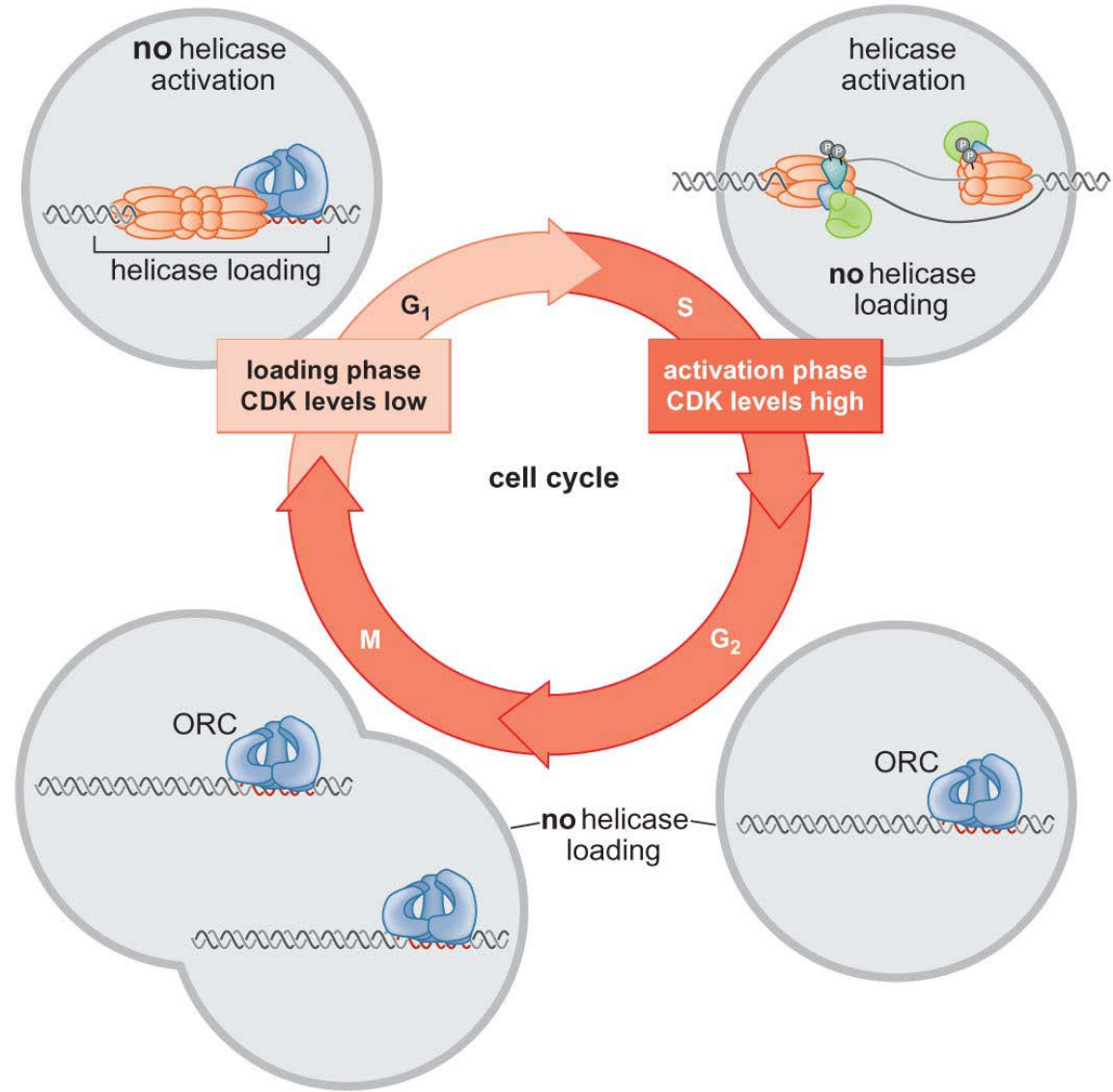
Activació del complex prereplicatiu



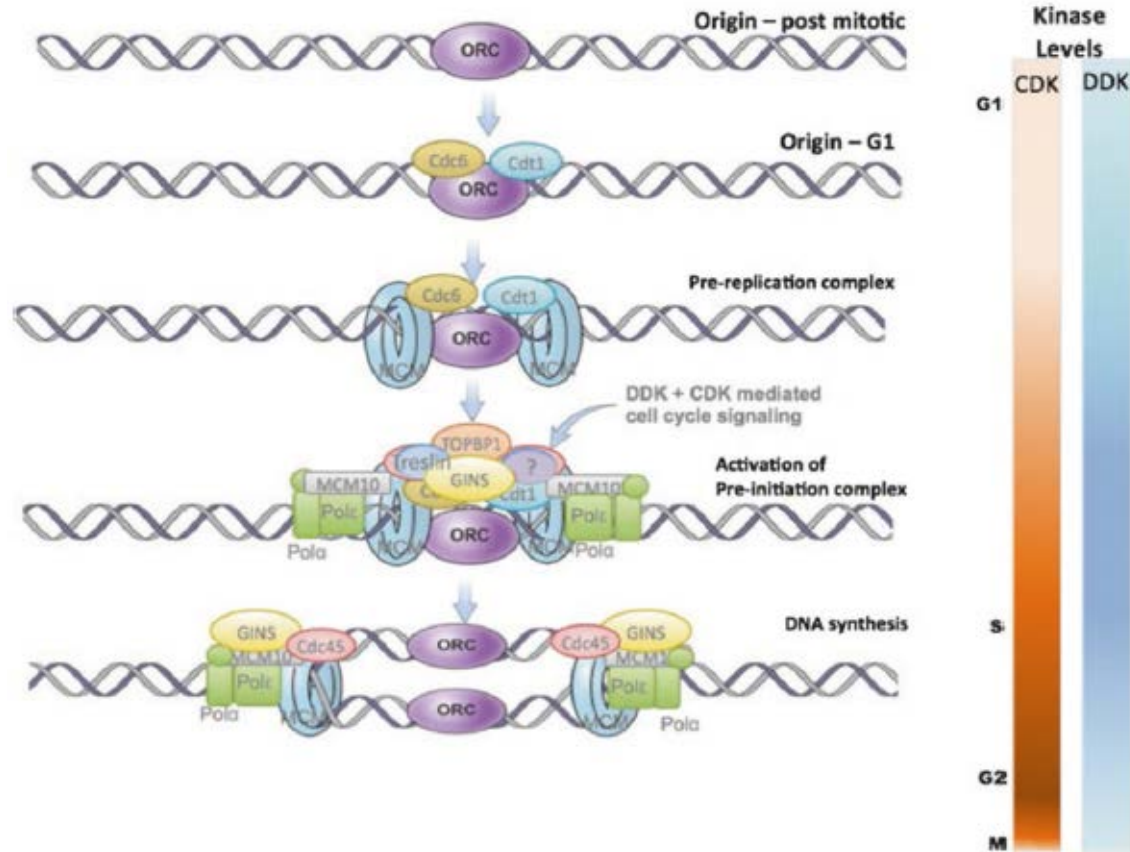
Per què no es pot tornar a utilitzar un origen de replicació durant el mateix cicle cel·lular?



Per què no es pot tornar a utilitzar un origen de replicació durant el mateix cicle cel·lular?

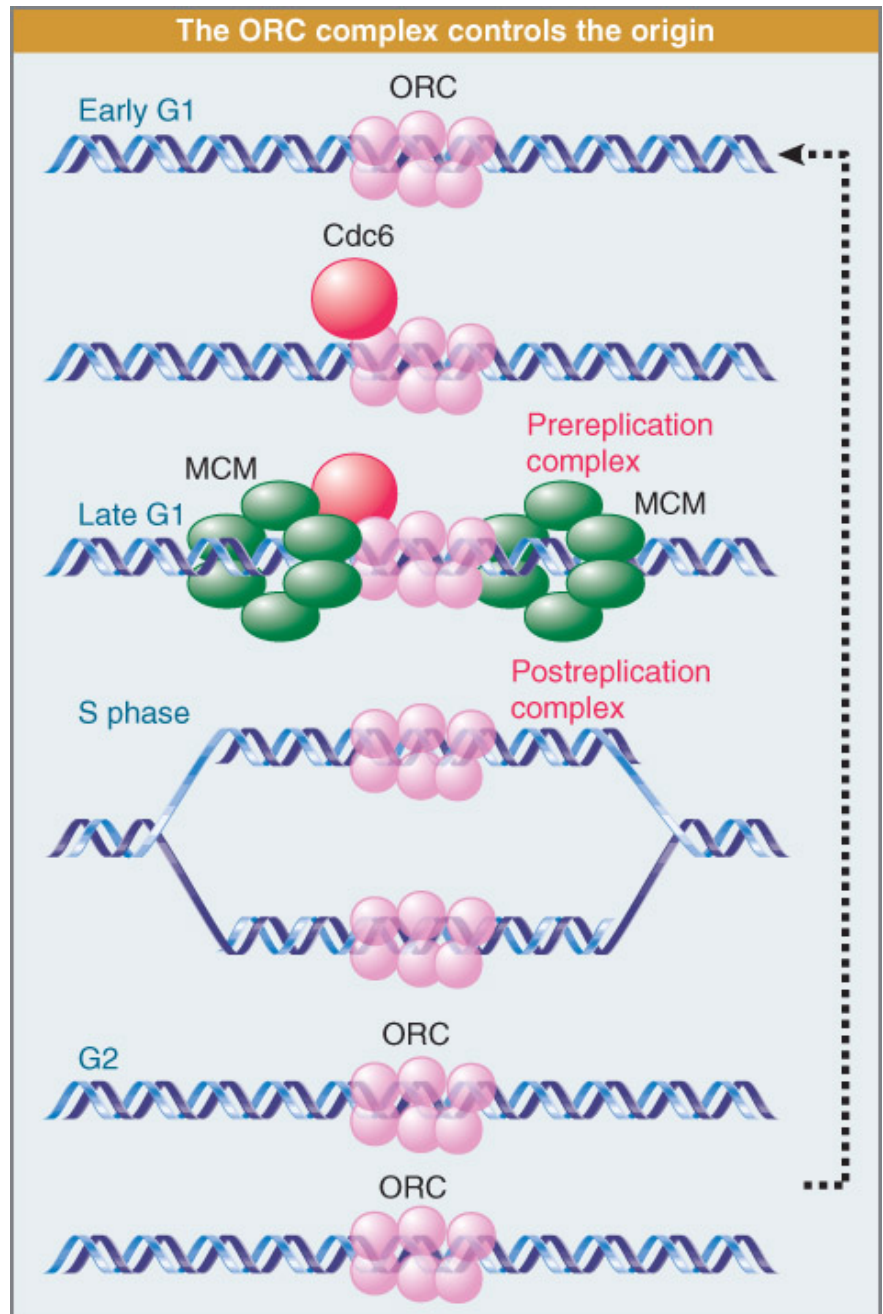


Per què no es pot tornar a utilitzar un origen de replicació durant el mateix cicle cel·lular?



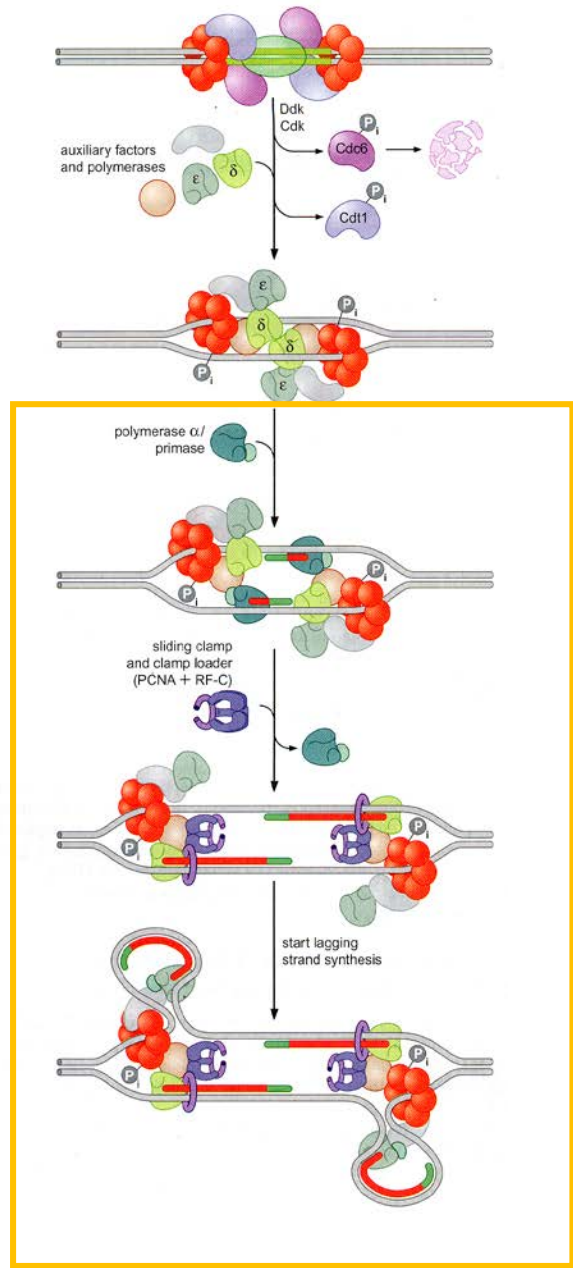
Pre-replication complex proteins bind in a stepwise manner throughout G1. Recruited during the M to G1 transition, the origin recognition complex (ORC) is a platform to recruit a conserved group of helicases, polymerases, and accessory proteins that catalyze the initiation of DNA replication. ORC binds to chromatin as cells emerge from mitosis. Licensing factors Cdc6 and Cdt1 bind to ORC, followed by the inactive form of the replicative helicase MCM2-7. Additional proteins are required to activate the MCM helicase and initiate DNA replication. Specifically, the inactive MCM2-7 helicase then interacts with CDC45, MCM10, and GINS (Sld5, Psf1, Psf2, Psf3) to form the complete helicase (CMG) complex. Cyclin-dependent kinase (CDK)- and Ddb4-dependent kinase (DDK)-mediated phosphorylation activates proteins and allows Cdc45 interact with Treslin (Sld3 in yeast). Sld2/RecQL4 and DPB11/TopBP1 are then recruited to the complex. Chromatin-associated DNA polymerases (Pol- α and pol- δ), replication protein A (RPA), CMG, and Dpb11/TopBP1 then initiate DNA replication

Inici de la replicació
en eucariotes



Inici de la replicació en eucariotes

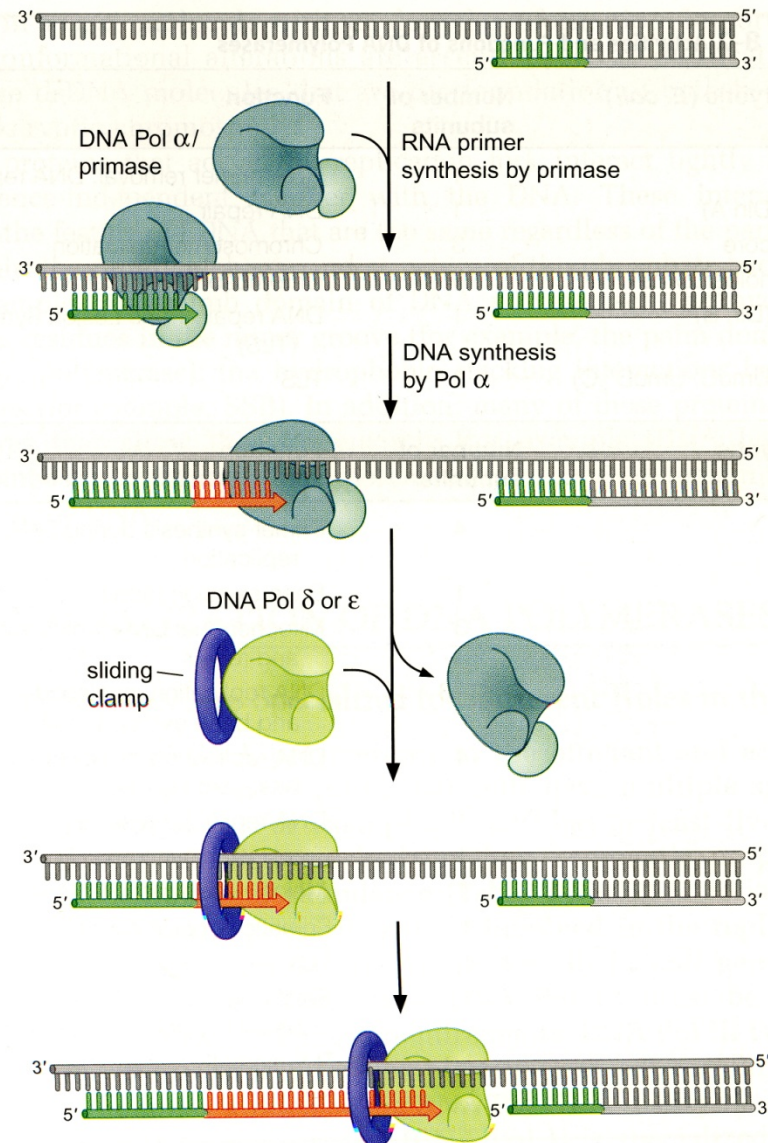
FIGURE 8-30 Activation of the pre-RC leads to the assembly of the eukaryotic replication fork. As cells enter into the S phase of the cell cycle, Cdk and Ddk phosphorylate replication proteins to trigger the initiation of replication. The events that lead to DNA unwinding at the origin are poorly understood but are likely to require the activity of the Mcm complex and result in the recruitment of a number of auxiliary replication factors and DNA Pol δ and ϵ . DNA Pol α /primase is only recruited after DNA Pol δ and ϵ . Once present at the origin, DNA Pol α /primase synthesizes an RNA primer and briefly extends it. The resulting primer:template junction is recognized by the eukaryotic sliding clamp loader (RF-C), which assembles a sliding clamp (PCNA) at these sites. Either DNA Pol δ or ϵ recognizes this primer and begins leading strand synthesis. After a period of DNA unwinding, DNA Pol α /primase synthesizes additional primers, which allow the initiation of lagging strand DNA synthesis by either DNA Pol δ or ϵ . Here we illustrate Pol δ on the leading strand and Pol ϵ on the lagging strand.



Elongació de la replicació en eucariotes

FIGURE 8-16 DNA polymerase switching during eukaryotic DNA replication.

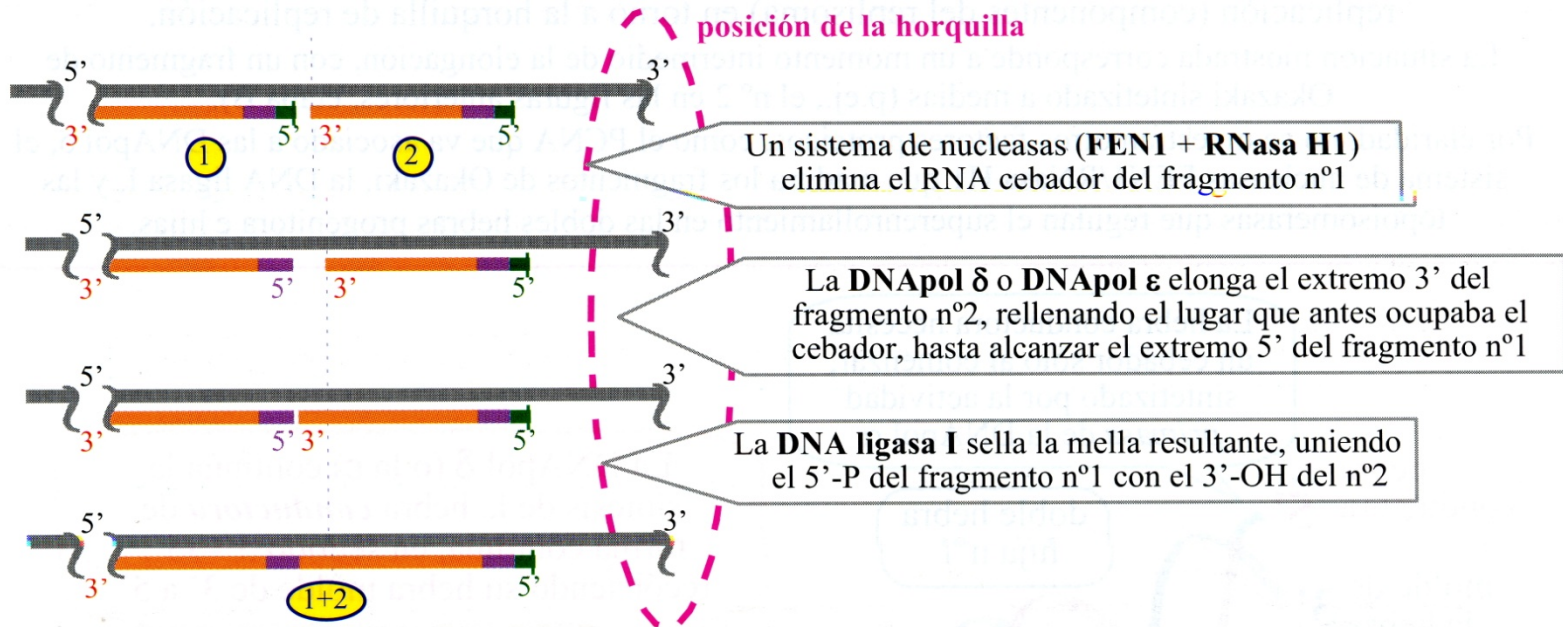
The order of DNA polymerase function is illustrated. The length of the DNA synthesized is shorter than in reality for illustrative purposes. Typically the combined DNA Pol α /primase product is between 50–100 bp and the further extension by Pol ϵ or Pol δ is between 100 and 10,000 nucleotides. Although both DNA Pol δ and ϵ can substitute for DNA Pol α /primase, it is likely that they function in the replication of specific DNA strands (leading or lagging). Current studies have yet to determine which polymerase functions on which strand, however.



Elongación de la replicación en eucariotes

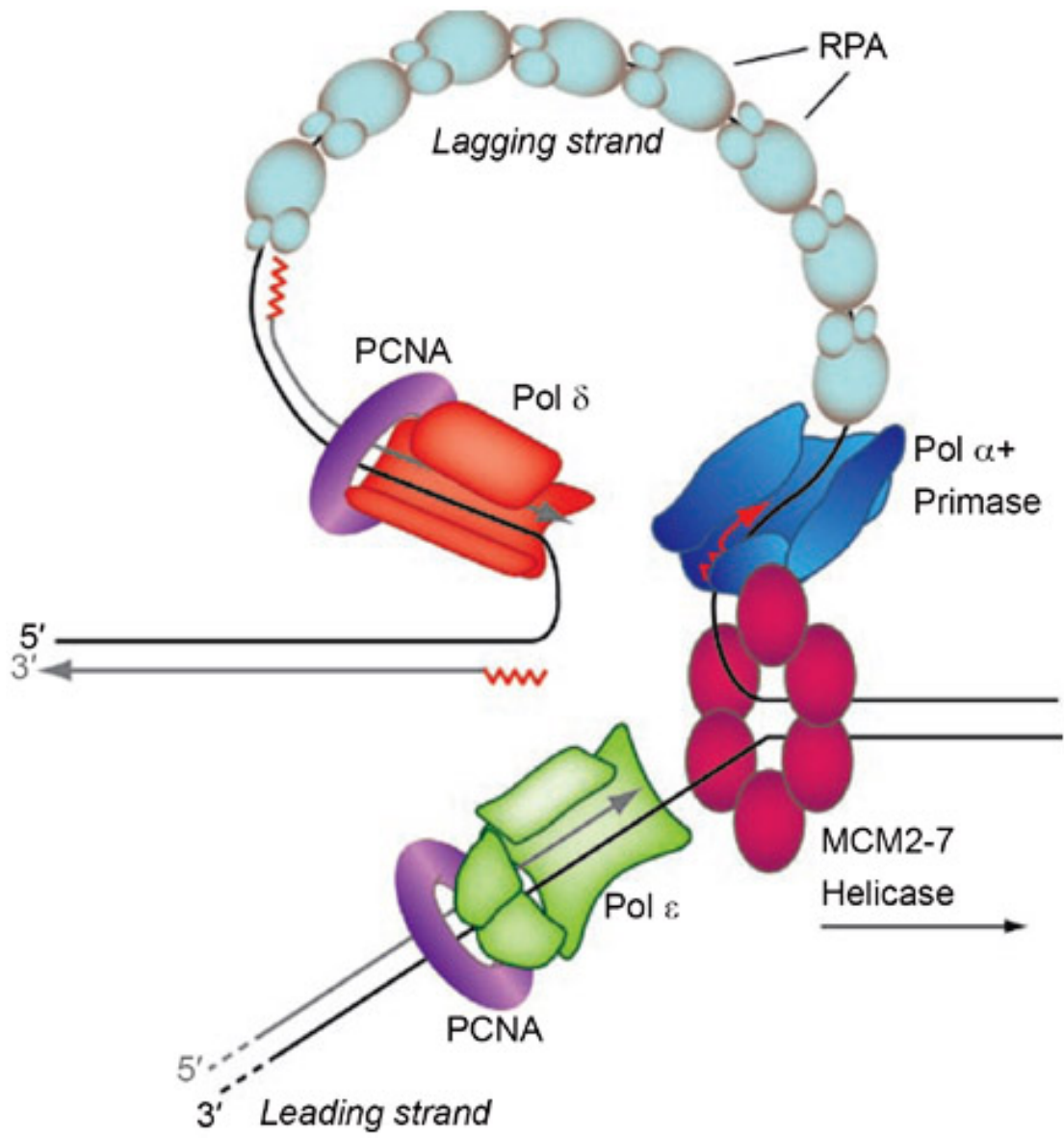
Maduración de uno de los fragmentos de Okazaki

(se representa ya sólo la hebra retardada y su molde)

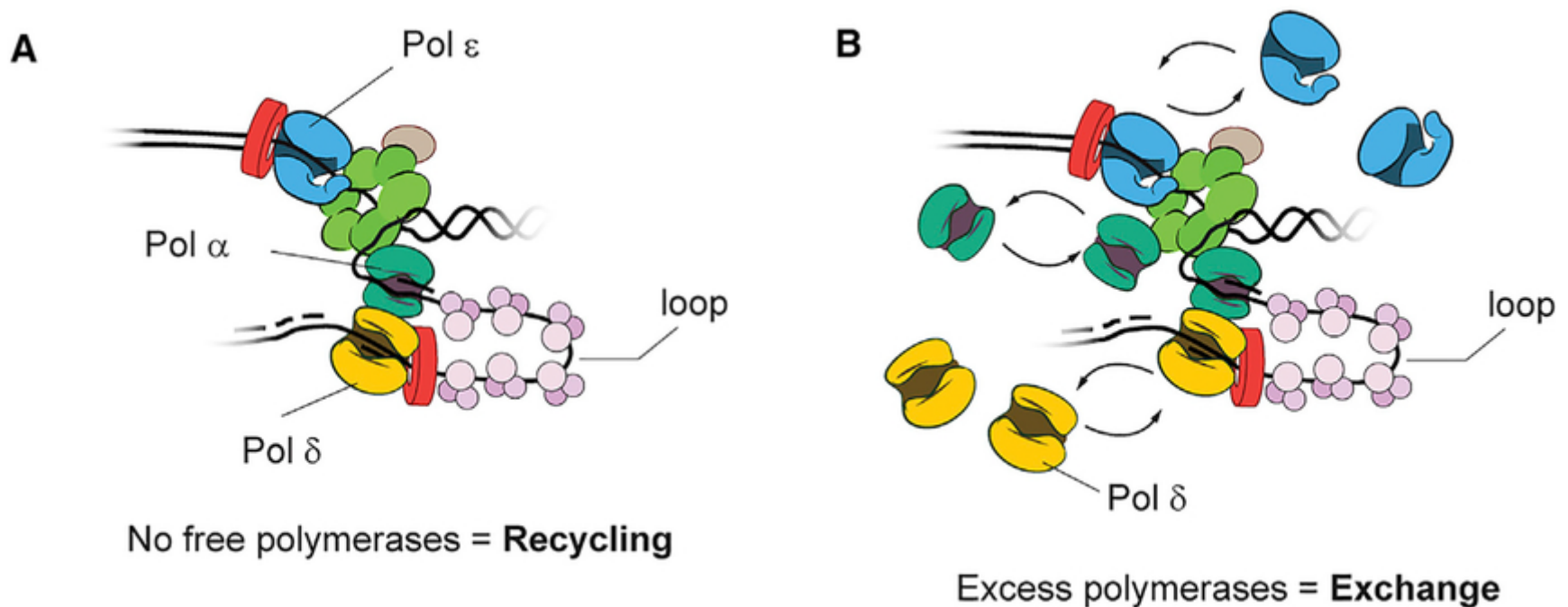


La última etapa en esta maduración de la hebra retardada, la unión de los fragmentos, es catalizada por **DN ligasas** (o simplemente **ligasas**). El mecanismo químico de la reacción es el siguiente:

Elongació de la replicació en eucariotes



Elongació de la replicació



Compositional Plasticity at the Eukaryotic Replication Fork(A) All three replicative polymerases can form a stable complex in the absence of free polymerases in solution, indicating that [the lagging-strand Pol \$\alpha\$ -primase and Pol \$\delta\$ can recycle for synthesis of many Okazaki fragments](#) (Pol ϵ , blue; Pol α -primases, turquoise; Pol δ , yellow; CMG, green; PCNA, red; RPA, pink). The Pol δ linkage is unclear, but its Pol32 subunit is involved. The Ctf4 and MTC components of the replisome are not shown for clarity.

(B) [In the presence of excess polymerase, all three Pols undergo exchange in a concentration-dependent manner. However, CMG remains stably bound and does not undergo exchange.](#)

Tunability of DNA polymerase stability during eukaryotic DNA replication

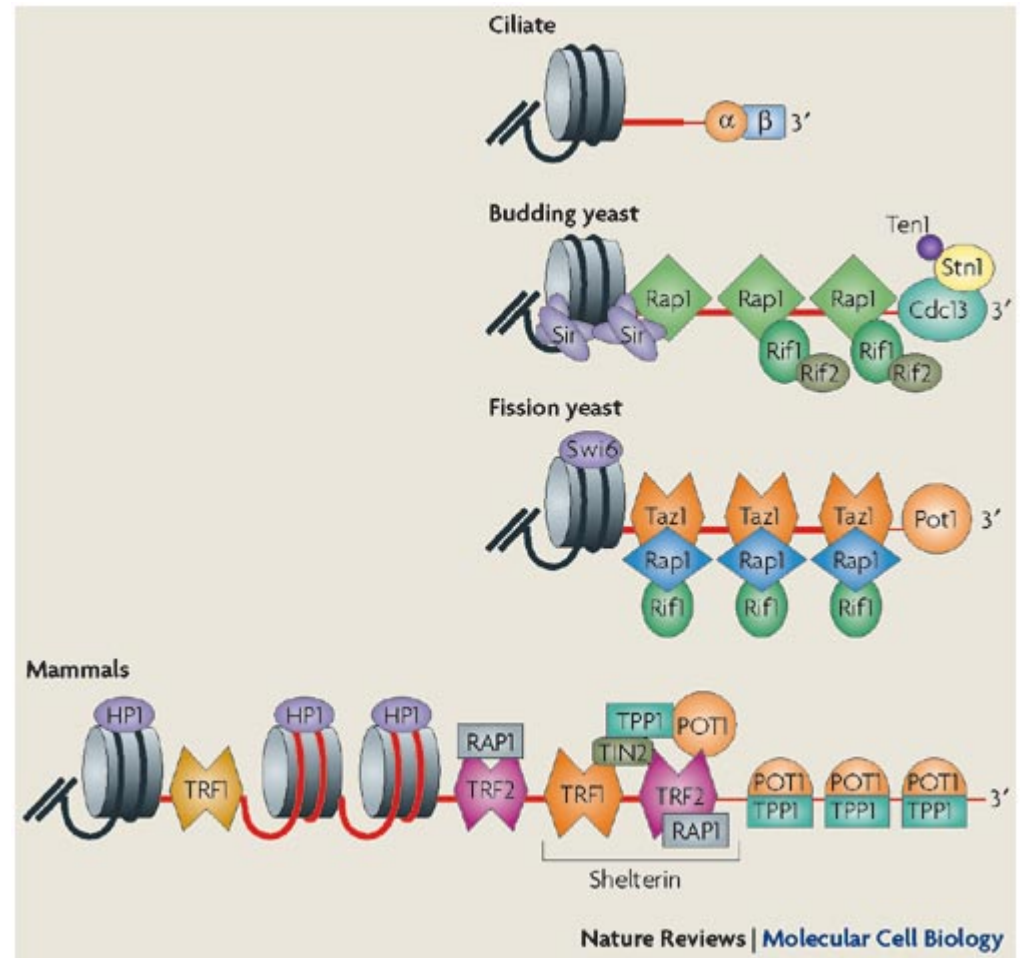
Jacob S. Lewis, Lisanne M. Spenkelnik, Grant D. Schauer, Olga Yurieva, Stefan

H. Mueller, Varsha Natarajan, Gurleen Kaur, Claire Maher, Callum Kay, Michael E. O'Donnell, Antoine M. van Oijen

bioRxiv 602086; doi: <https://doi.org/10.1101/602086>

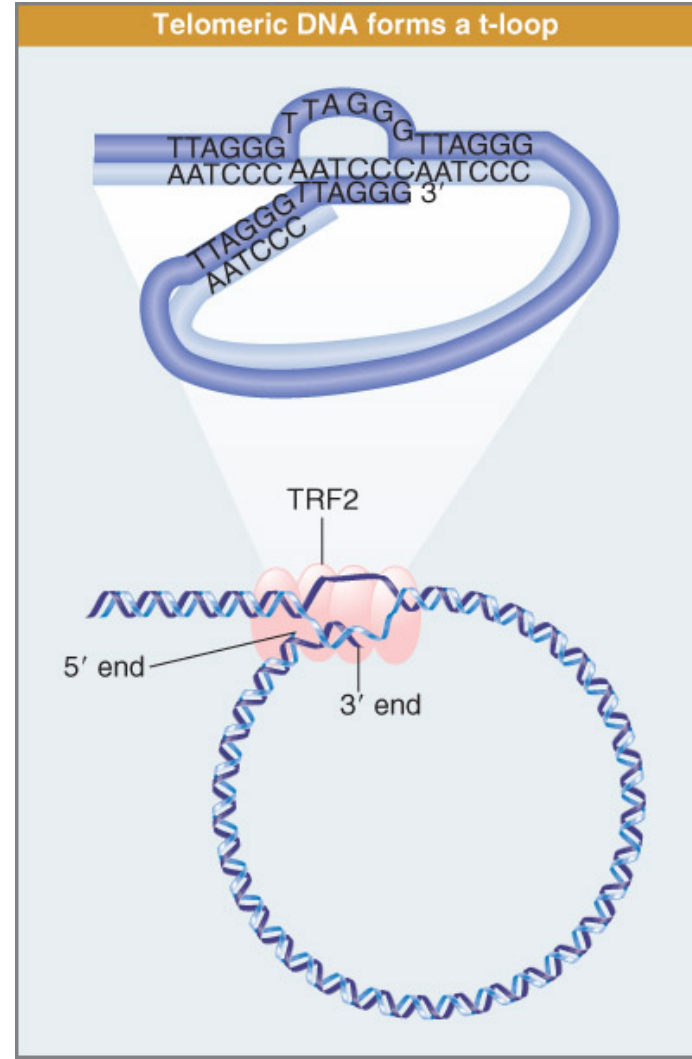
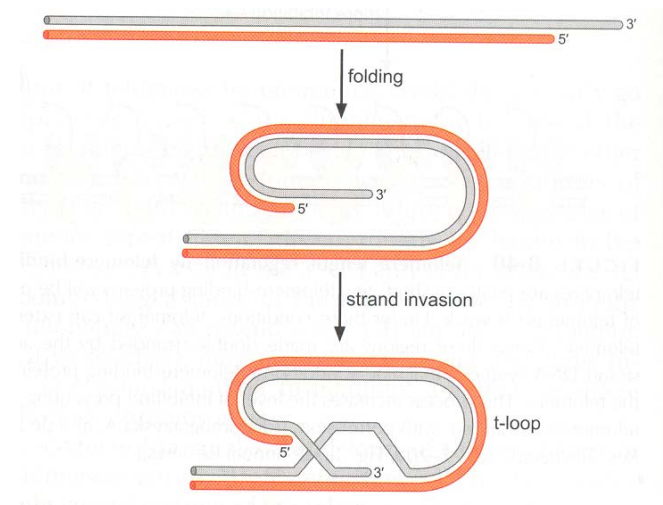
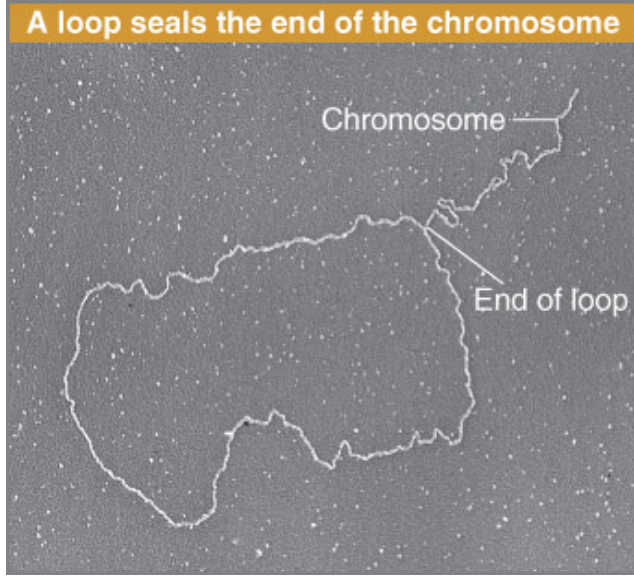
Els telòmers

Els telòmers, regions terminals dels cromosomes, presenten moltes proteïnes associades que desenvolupen funcions estructurals, de silenciament i de control de la seua longitud després de la replicació. A més, protegeixen els extrems dels cromosomes davant de la seua degradació.



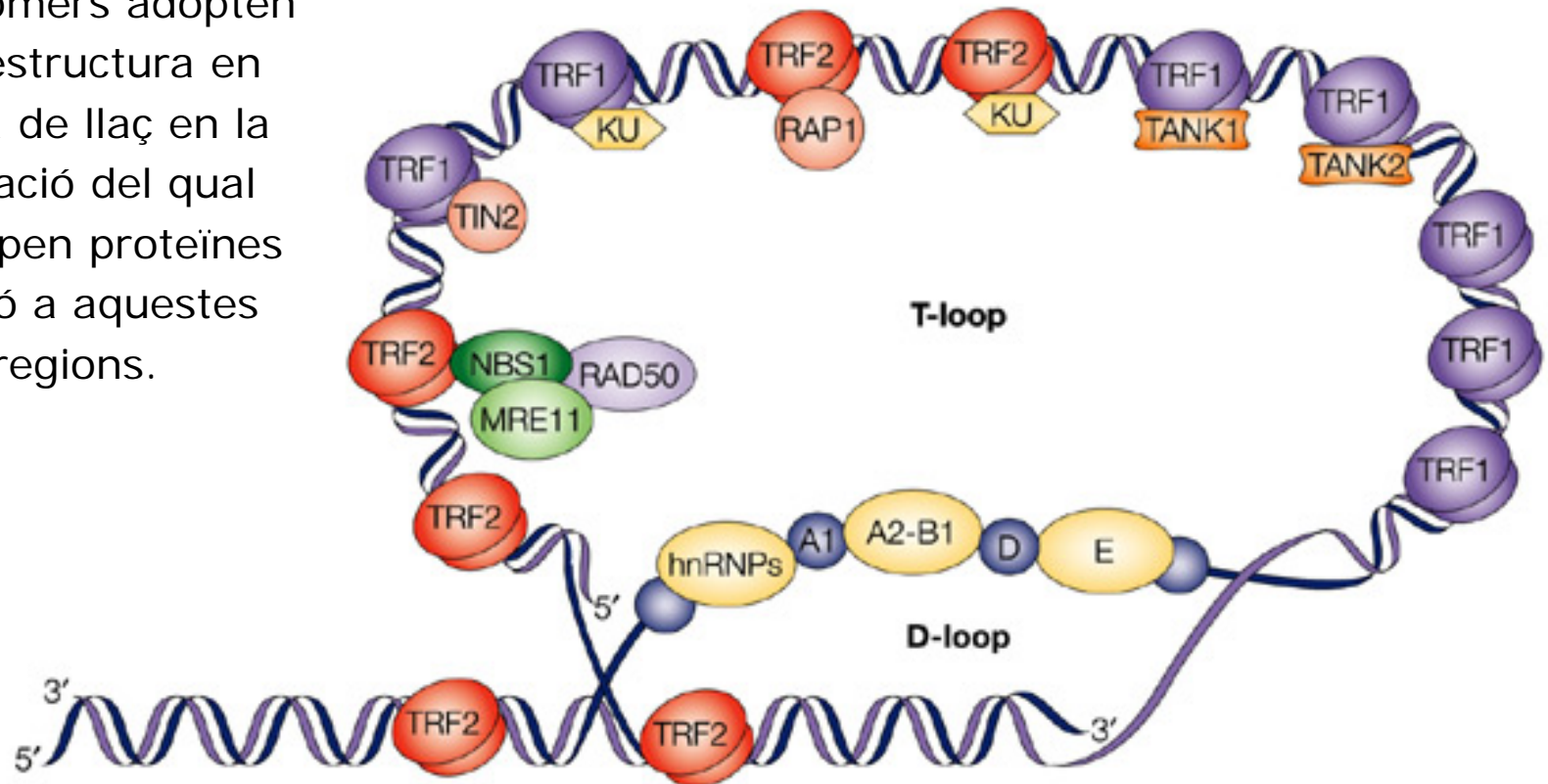
Els telòmers

Els telòmers adopten una estructura en forma de llaç en la formació del qual participen proteïnes d'unió a aquestes regions.



Els telòmers

Els telòmers adopten una estructura en forma de llaç en la formació del qual participen proteïnes d'unió a aquestes regions.



Els telòmers

TABLE 25.4 Representative telomeric repeat sequences from several organisms

Organism	Repeat ^a
<i>Tetrahymena thermophila</i> (protist)	TTGGGG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆ ^b
<i>Arabidopsis thaliana</i> (plant)	TTAGGG
<i>Bombyx mori</i> (silkworm)	TTAGG
Human	TTAGGG

Els telòmers contenen repeticions d'una seqüència rica en G i característica d'espècie en la cadena protuberant

Els telòmers

La regió telomèrica rica en G pot adoptar una estructura peculiar, el quartet G.

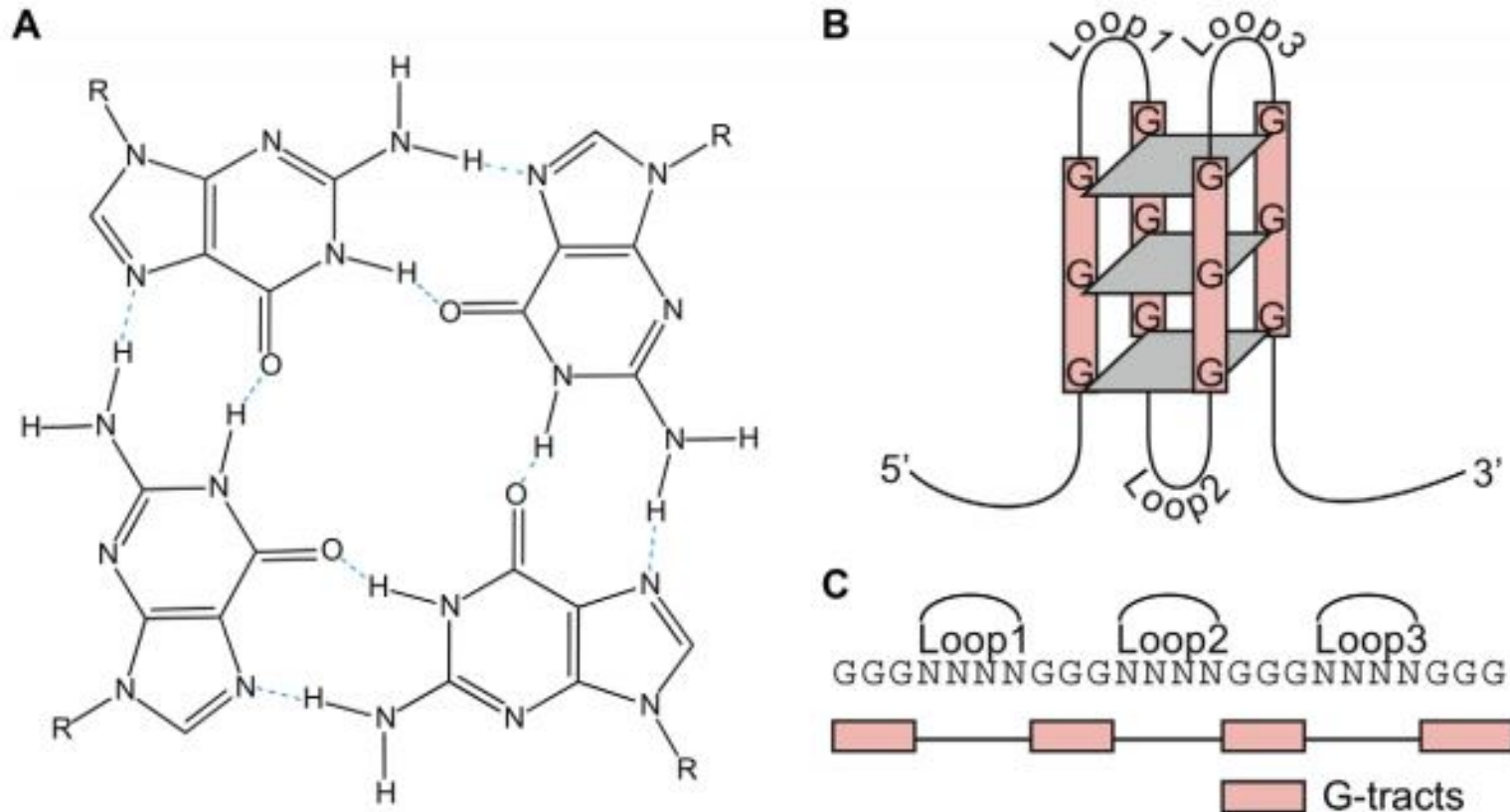
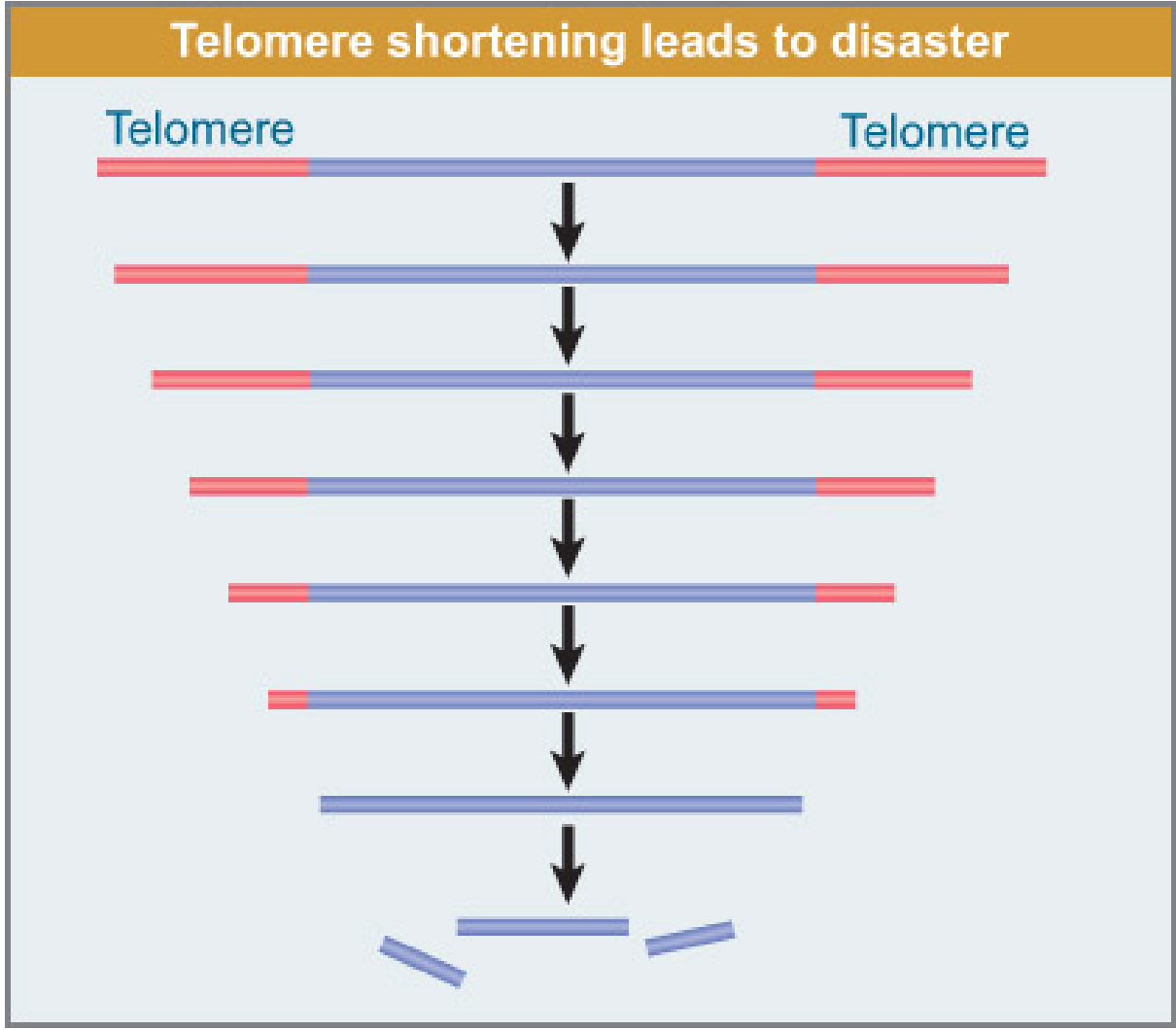
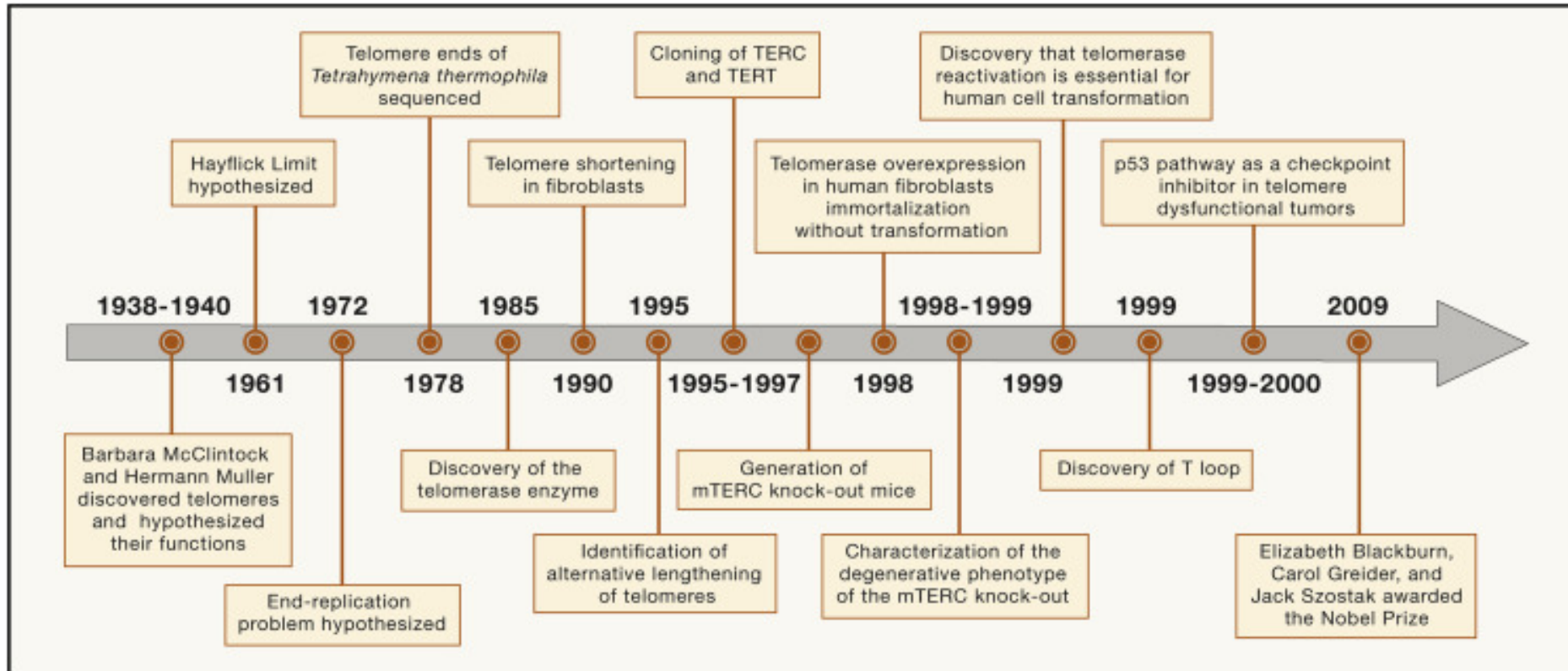


Figure 1. The G4 DNA structure and motif. (A) Structure of a G-quartet. The planar ring of four hydrogen-bonded guanines is formed by guanines from different G-tracts, which are separated by intervening loop regions in the intra-molecular G4 DNA structure. (B) Schematic of an intramolecular G4 DNA structure consisting of three G-quartets. Inter-molecular G4 DNA structures can also form from two or four strands. (C) The G4 DNA motif sequence used in this study with four G-tracts of three guanines separated by loop regions.
doi:10.1371/journal.pcbi.1000861.g001

Replicació dels telòmers



Replicació dels telòmers



Replicació dels telòmers

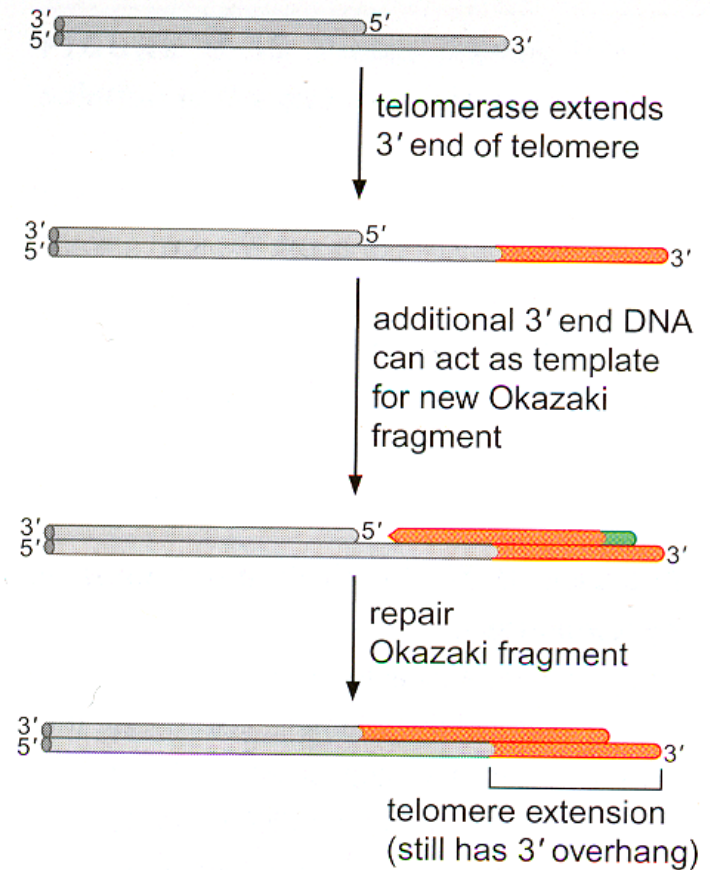
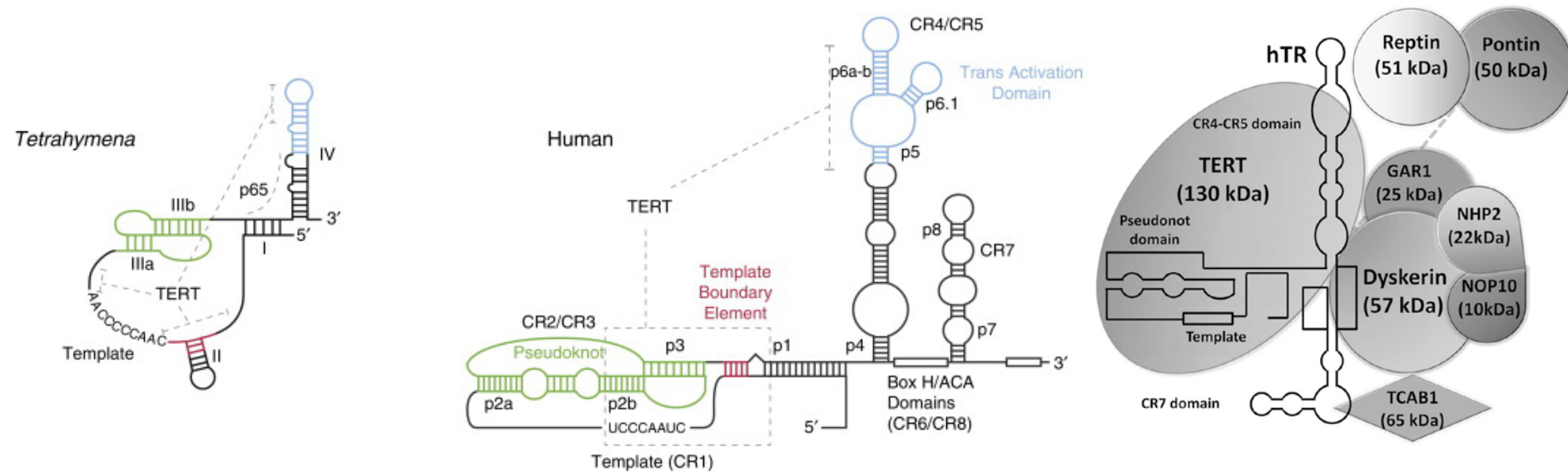


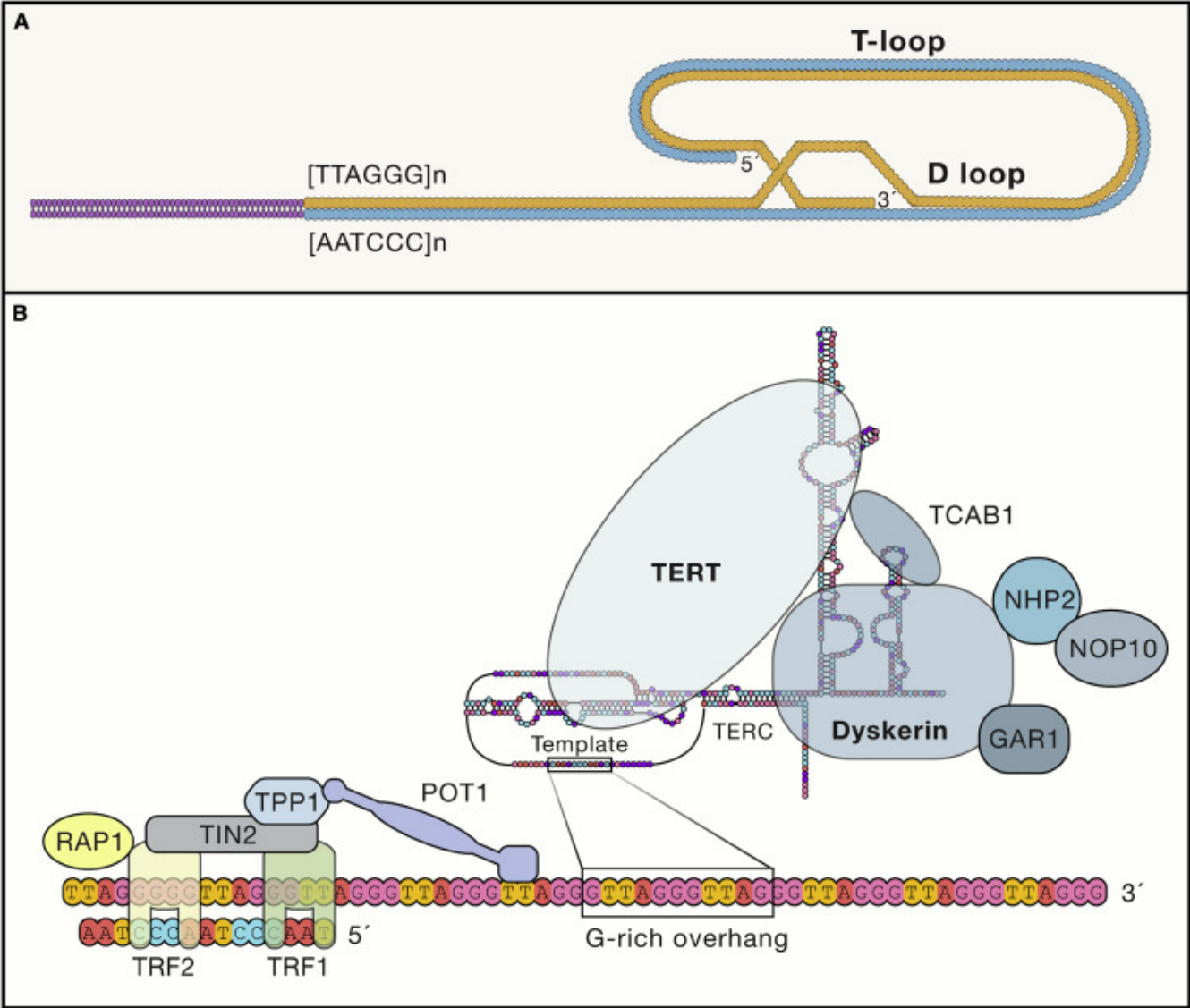
FIGURE 8-37 Extension of the 3' end of the telomere by telomerase solves the end replication problem. Although telomerase only directly extends the 3' end of the telomere, by providing an additional template for lagging strand DNA synthesis, both ends of the chromosome are extended.

Components de la telomerasa

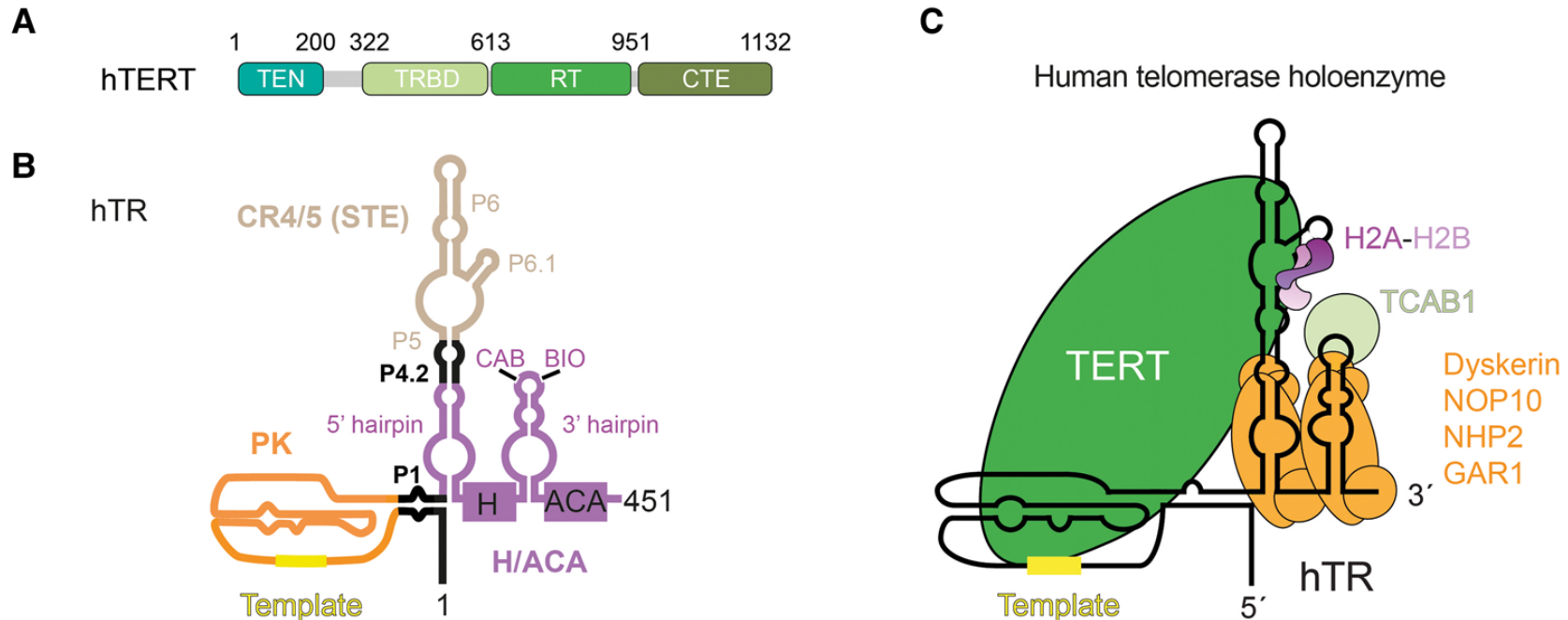
- ❑ Component RNA de la telomerasa: TER (150 a >1300 nt). Conté una forqueta i un pseudonus en tots els casos estudiats
- ❑ Component proteic de la telomerasa (transcriptasa inversa de la telomerasa): TERT (aprox. 1100 aa)
- ❑ Requereix ions Mg^{2+} , units a residus conservats d'Asp i Glu



Componentes de la telomerasa



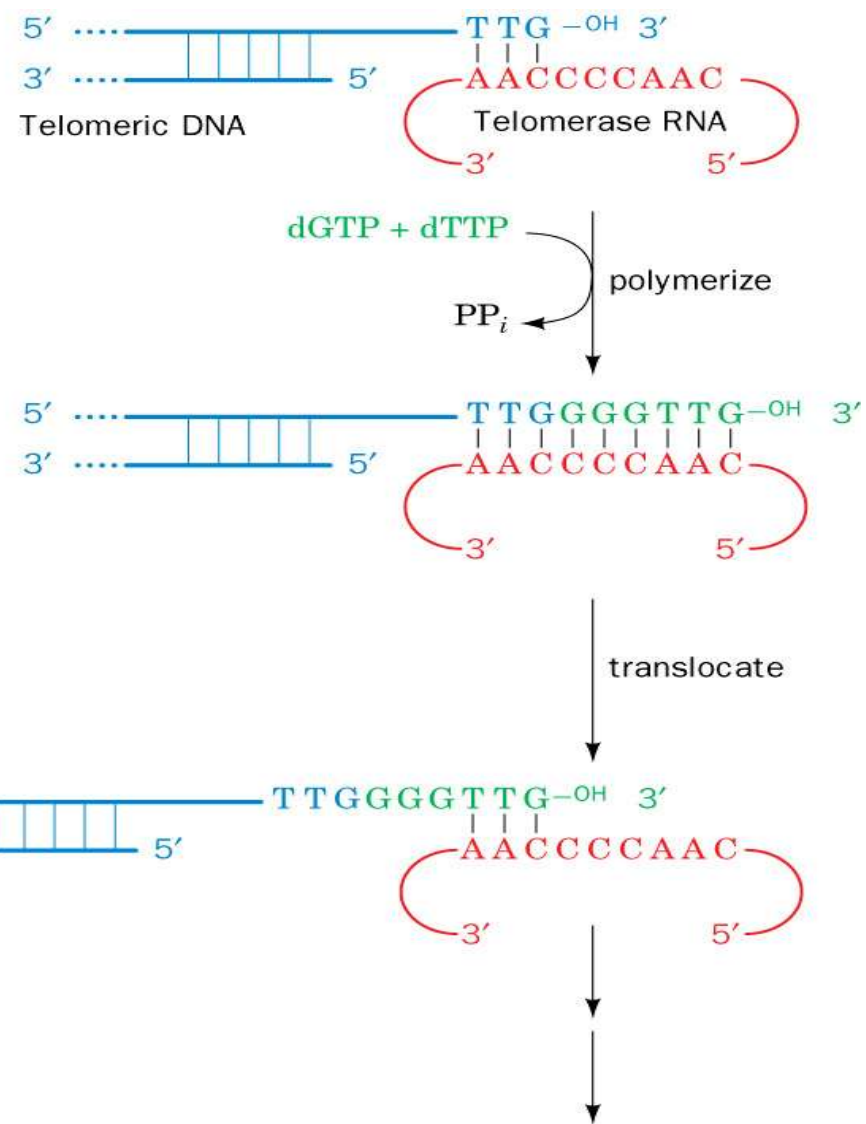
Componentes de la telomerasa



Schematic presentation of human telomerase. (A) Domain architecture of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). TEN, telomerase essential N-terminal domain; TRBD, telomerase RNA binding domain; RT, reverse transcriptase; CTE, C-terminal extension. (B) Secondary structure presentation of human telomerase RNA (hTR). PK, pseudoknot; CR4/5, conserved regions 4 and 5; H/ACA, box H and box ACA; STE, stem-terminus element. P5, P6 and P6.1 of the CR4/5 and the 5' and 3' RNA hairpins of the H/ACA domain are labelled. (C) Schematic of human telomerase holoenzyme.

Ghanim, G.E., Fountain, A.J., van Roon, AM.M. *et al.* Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. *Nature* 593, 449–453 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03415-4>

Replicació dels telòmers



Replicació dels telòmers

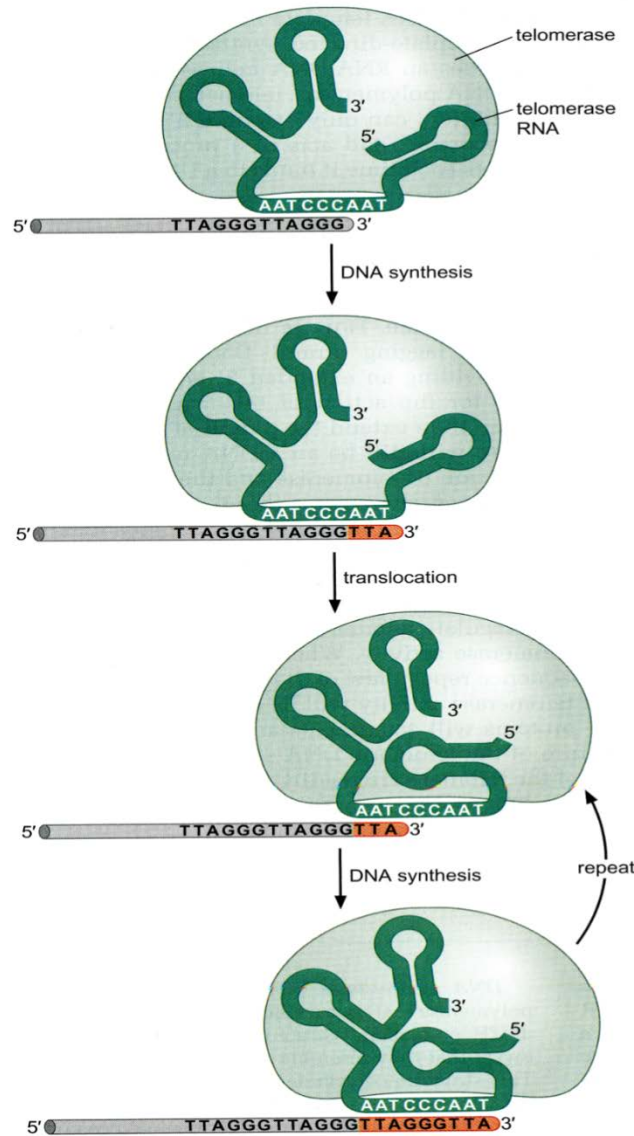
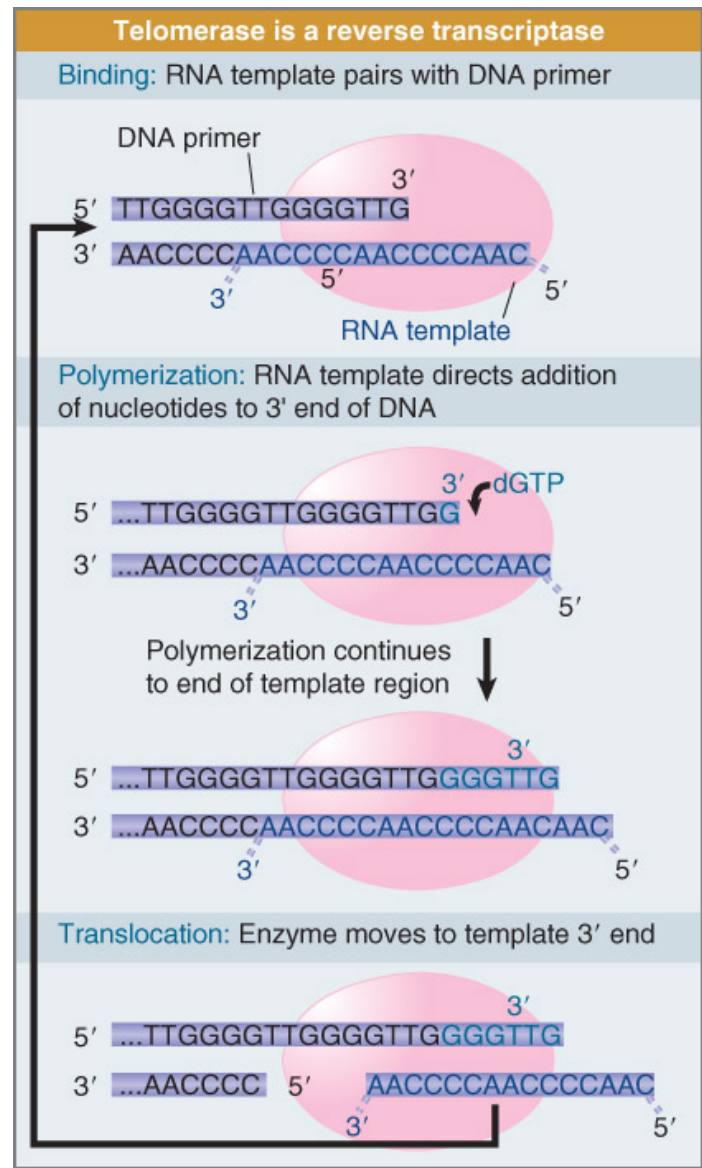
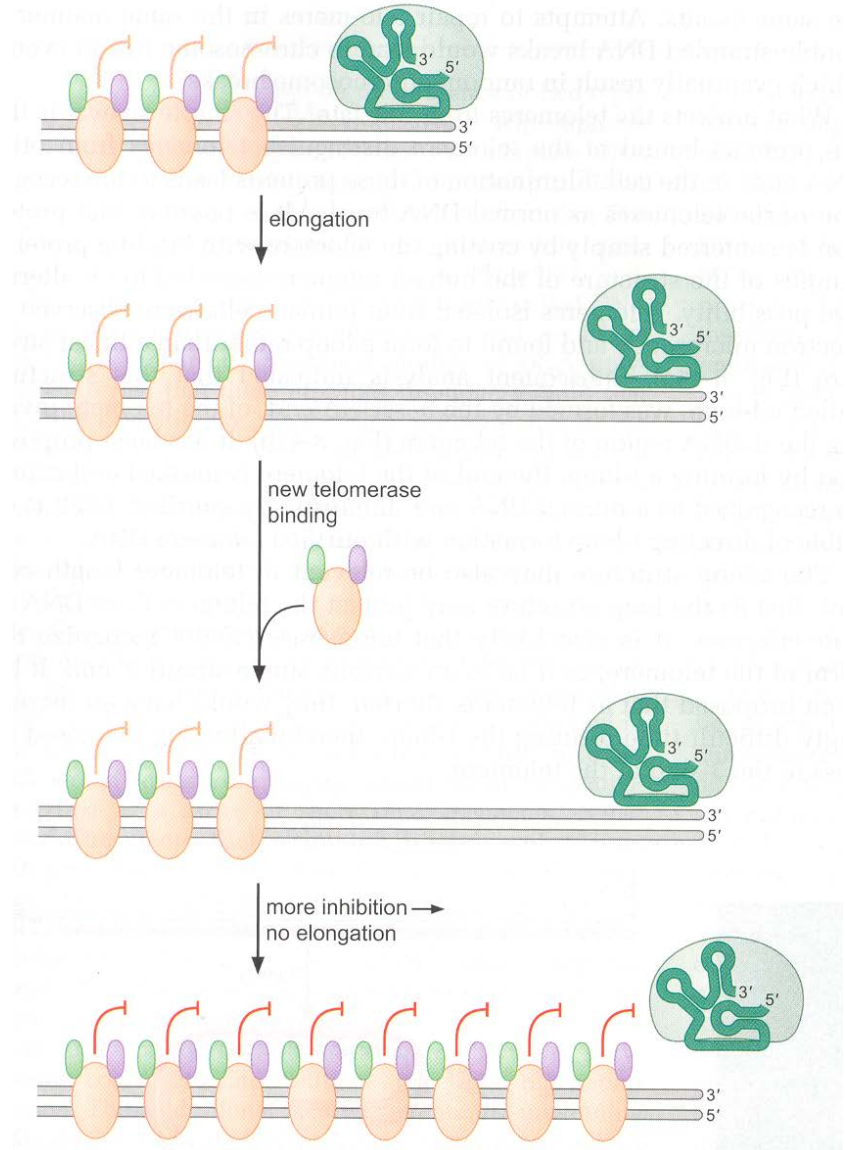
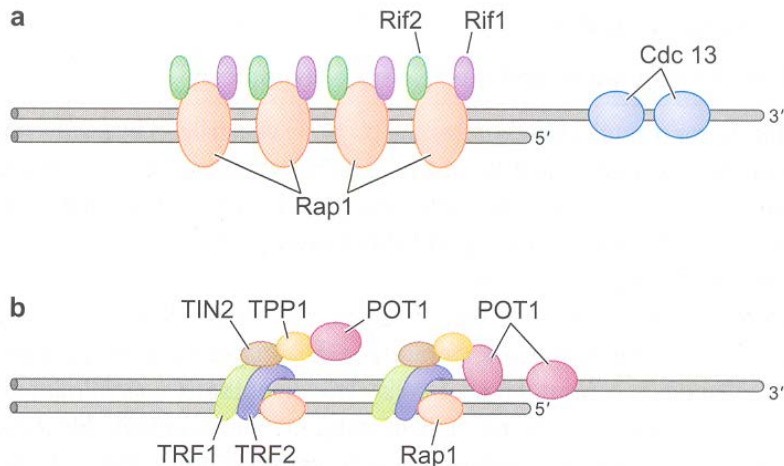


FIGURE 8-36 Replication of telomeres by telomerase. Telomerase uses its RNA component to anneal to the 3' end of the ssDNA region of the telomere. Telomerase then uses its reverse transcription activity to synthesize DNA to the end of the RNA template. Telomerase then displaces the RNA from the DNA product and rebinds at the end of the telomere and repeats the process.

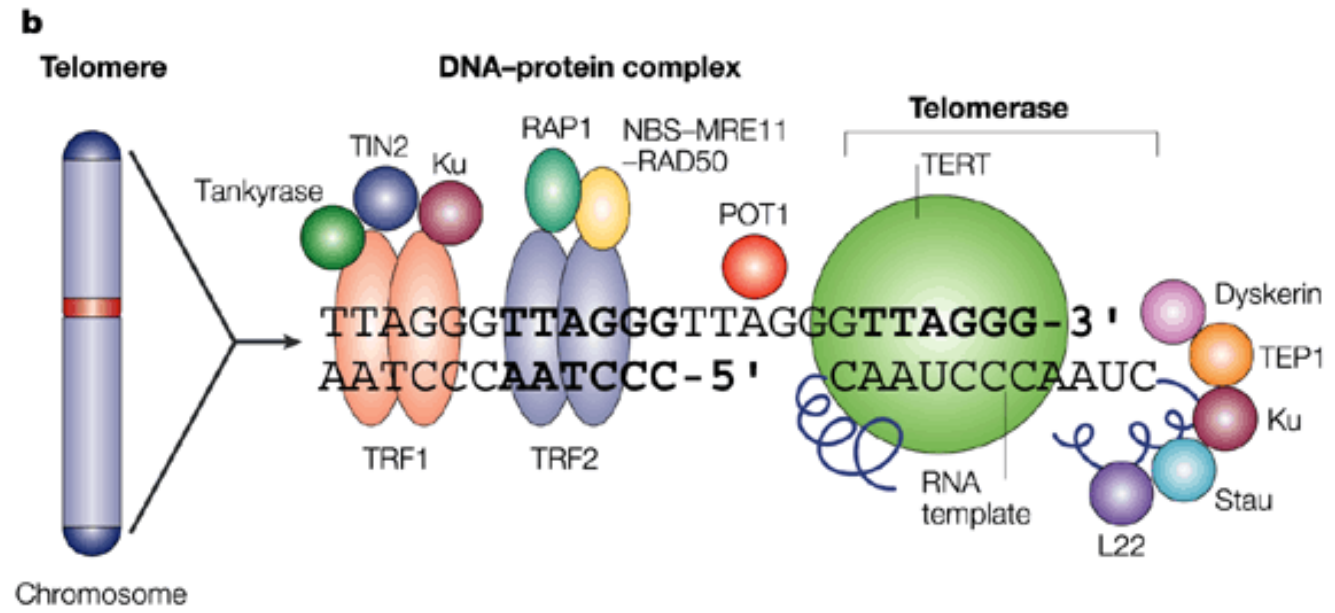
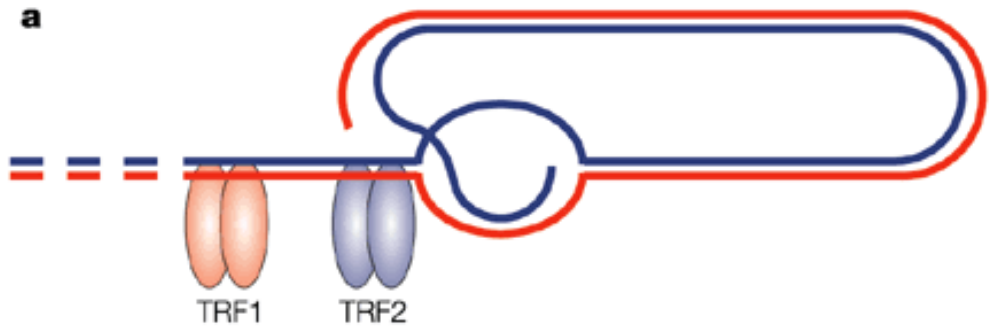


Regulació de la longitud dels telòmers

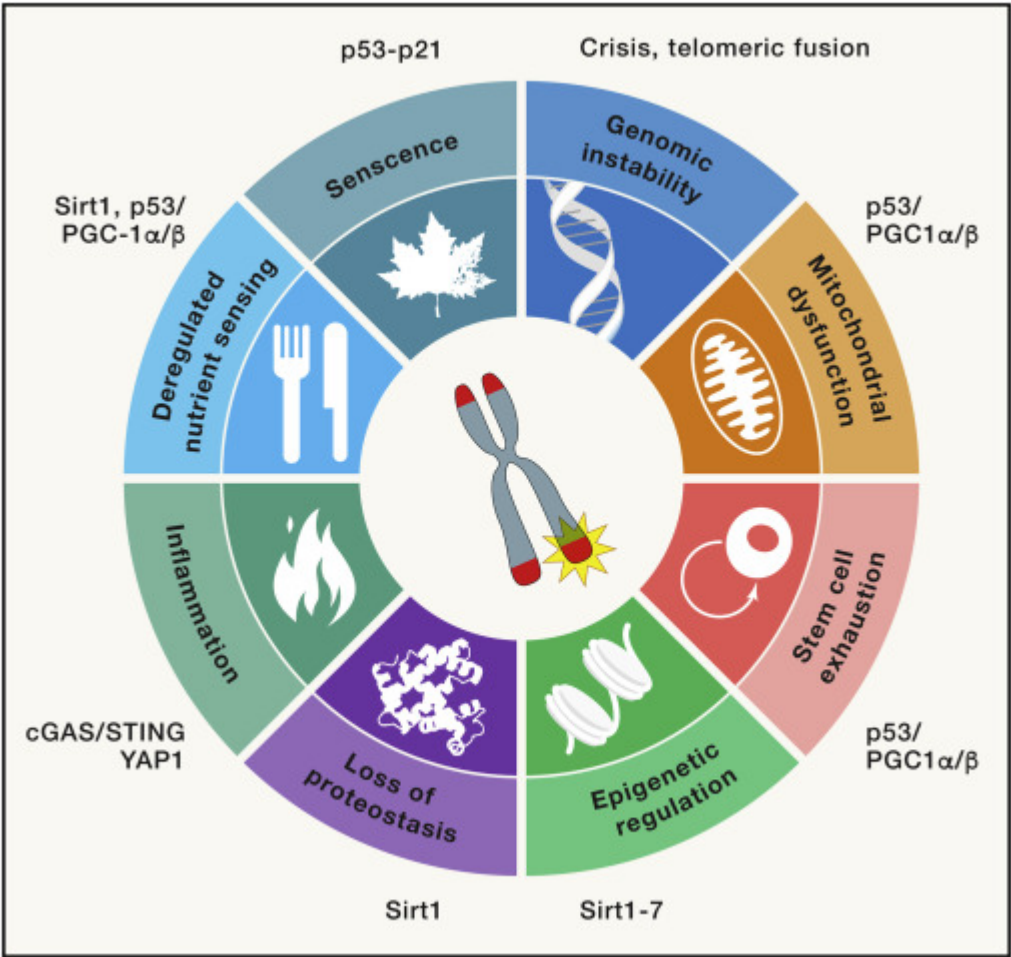
Proteïnes d'unió al telòmer intervien en la regulació de la seua longitud. Quan els telòmers són curts hi ha poques proteïnes unides i exerceixen una inhibició dèbil sobre la telomerasa. A mesura que s'estén el telòmer s'hi uneixen més proteïnes i s'incrementa el nivell d'inhibició.



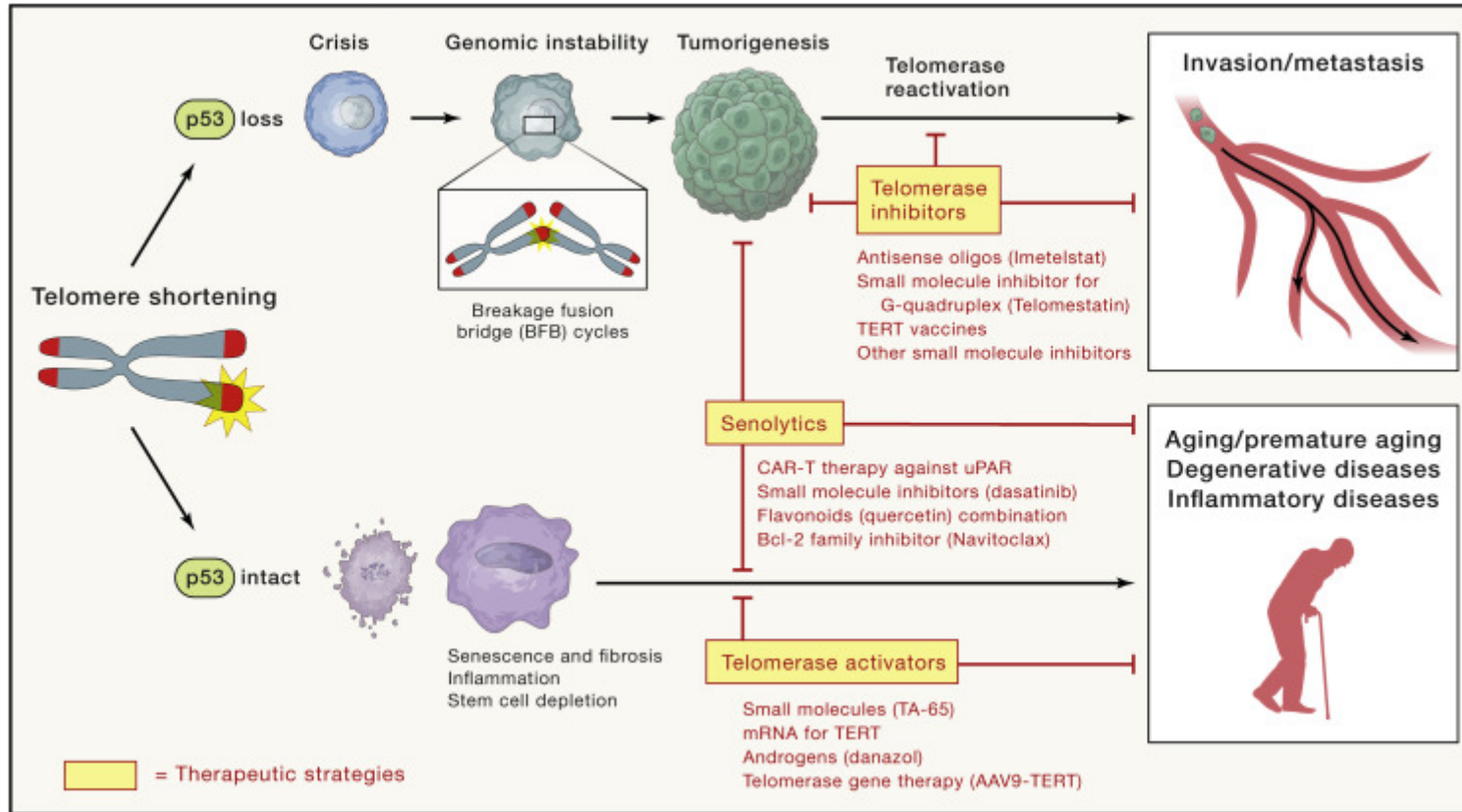
Regulació de la longitud dels telòmers



Telomeropatias



Telomeropatias



Deepavali Chakravarti, Kyle A. LaBella, Ronald A. DePinho, **Telomeres: history, health, and hallmarks of aging (2021).** Cell 184, 306-322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.028>.

Telomere shortening leads to senescence, fibrosis, inflammation, and stem cell depletion in the presence of a functional p53 checkpoint. These processes lead to aging and other degenerative and inflammatory diseases. Telomerase activators and senolytics can inhibit these processes and inhibit aging and age-related diseases. Shortened telomeres also lead to telomeric fusion and cycles of break-fusion-bridges. In the absence of a p53 checkpoint, these events lead to tumorigenesis. Further activation of telomerase leads to progression to invasion and metastasis. Telomerase inhibitors and senolytics inhibit processes that can thwart tumor progression, invasion, and metastasis.

Es pot fer alguna cosa per a mantenir els telòmers llargs?

UN ACERCAMIENTO REVOLUCIONARIO PARA
**VIVIR MÁS JOVEN,
 MÁS SANO Y MÁS TIEMPO**



Elizabeth Blackburn
 PREMIO NOBEL DE MEDICINA

Elissa Epel

AGUILAR

Marcas A-Z > Enzymedica

Categorías > Hierbas y homeopatía > Hierbas > Astrágalo

Categorías > Suplementos > Vitaminas > Vitamina D > D3 (colecalférol)



Enzymedica, Telomere Plus, 30 cápsulas

Por Enzymedica

★★★★★ 9 Opiniones | Preguntas

Disponible

Cantidad: 30 Contar

30 Contar
 €28.38
 €0.95/Contar

Mejor Oferta

60 Contar (2x30)
 €53.92 5% de descuento
 €0.90/Contar

- Fecha de Expiración: ? Mayo 2021
- Peso de Envío: ? 0.06 kg
- Código del Producto: ENZ-15010
- Código UPC: 670480150108
- Contenido: 30 Contar
- Dimensiones: 9.1 x 5.1 x 5.1 cm, 0.05 kg

Lugar de Posición del Producto:

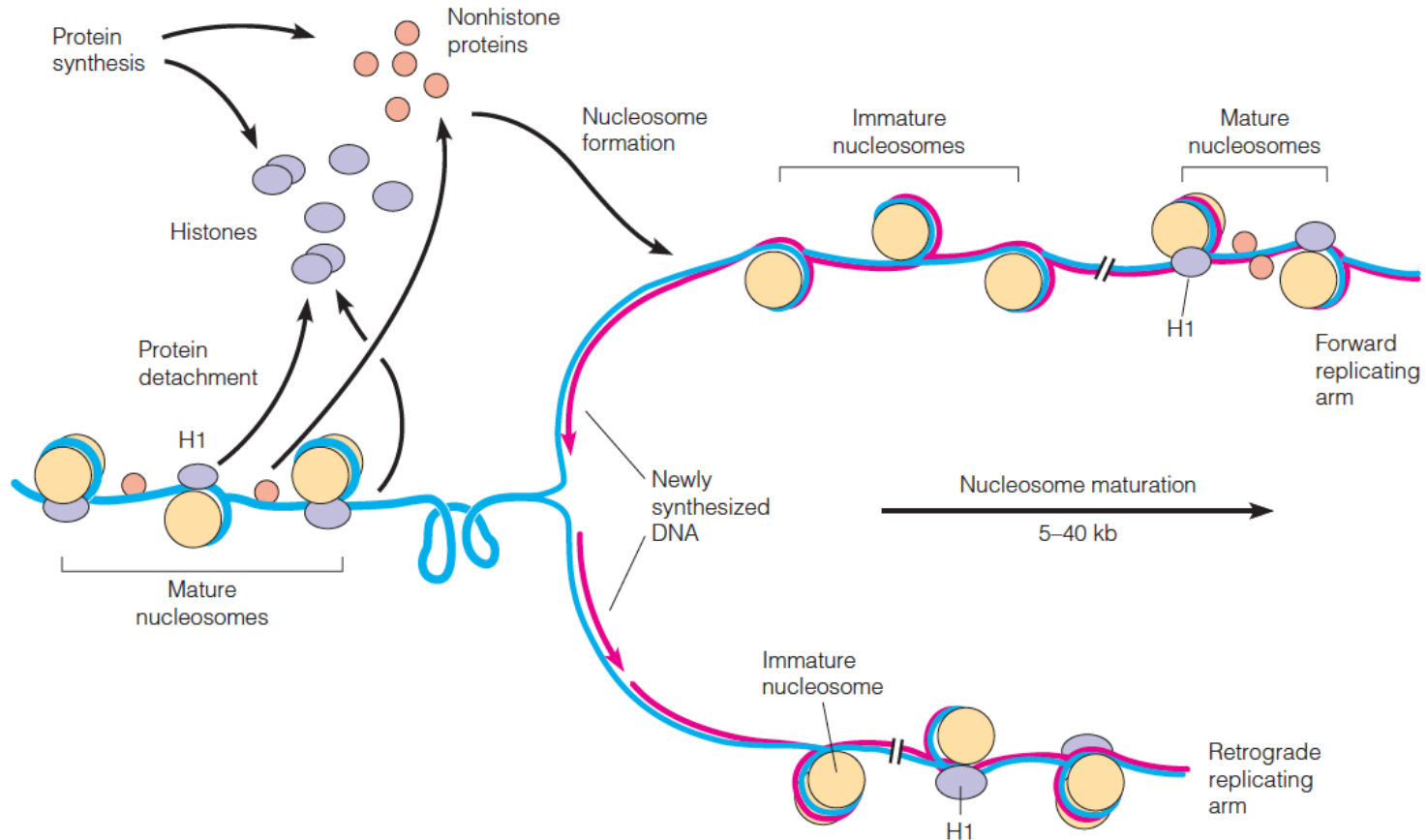
#9 in Astrágalo

#136 in D3 (colecalférol)

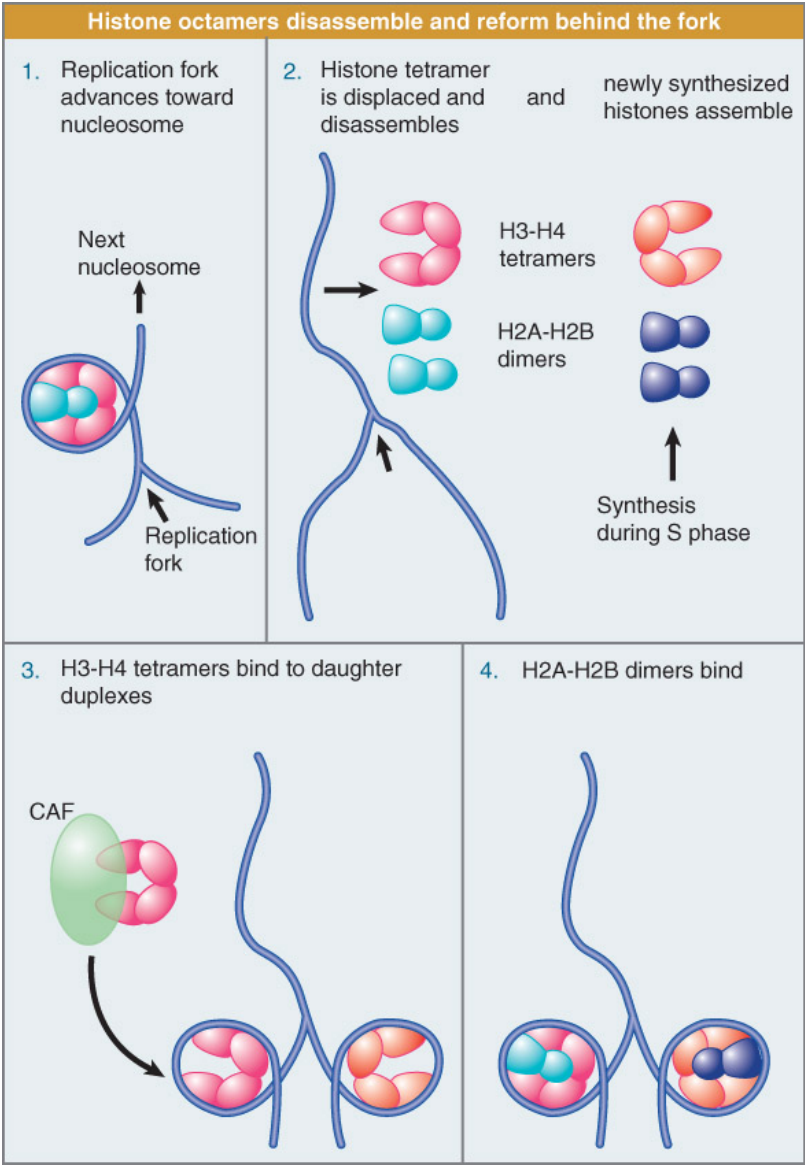
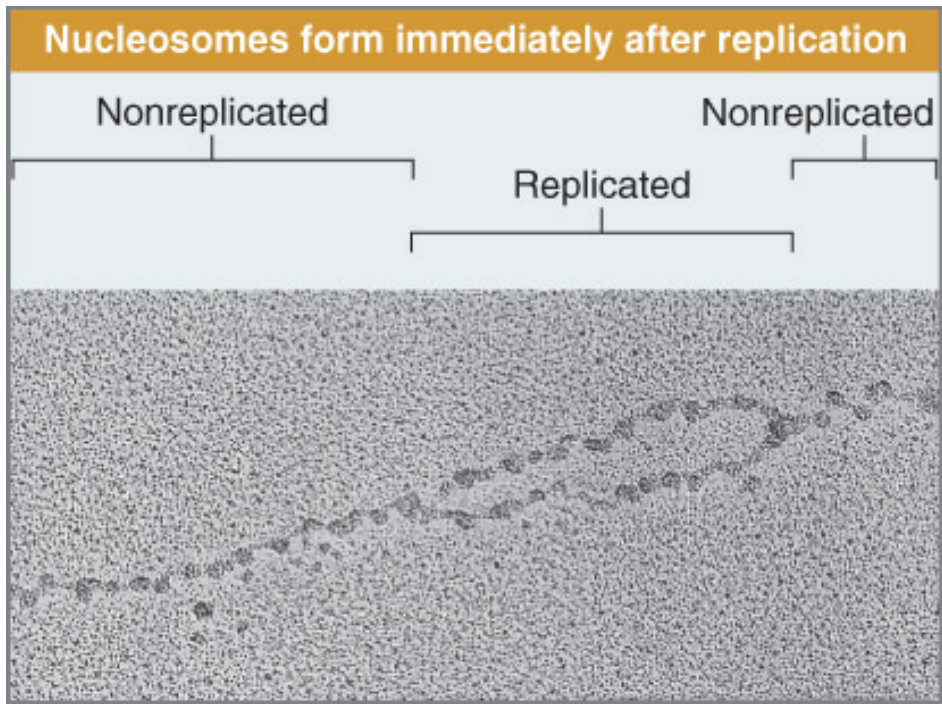
Replicació de la cromatina

Model per a la replicació de la cromatina:

- Els nucleosomes del DNA parental es dissocien a mesura que la forqueta de replicació s'aproxima i es reformen sobre les cadenes filles de nova síntesi, amb la utilització d'histomes velles i de nova síntesi.
- La maduració ocorre lentament. L'organització completa no es restableix fins a moltes kilobases per darrere de la forqueta en moviment.

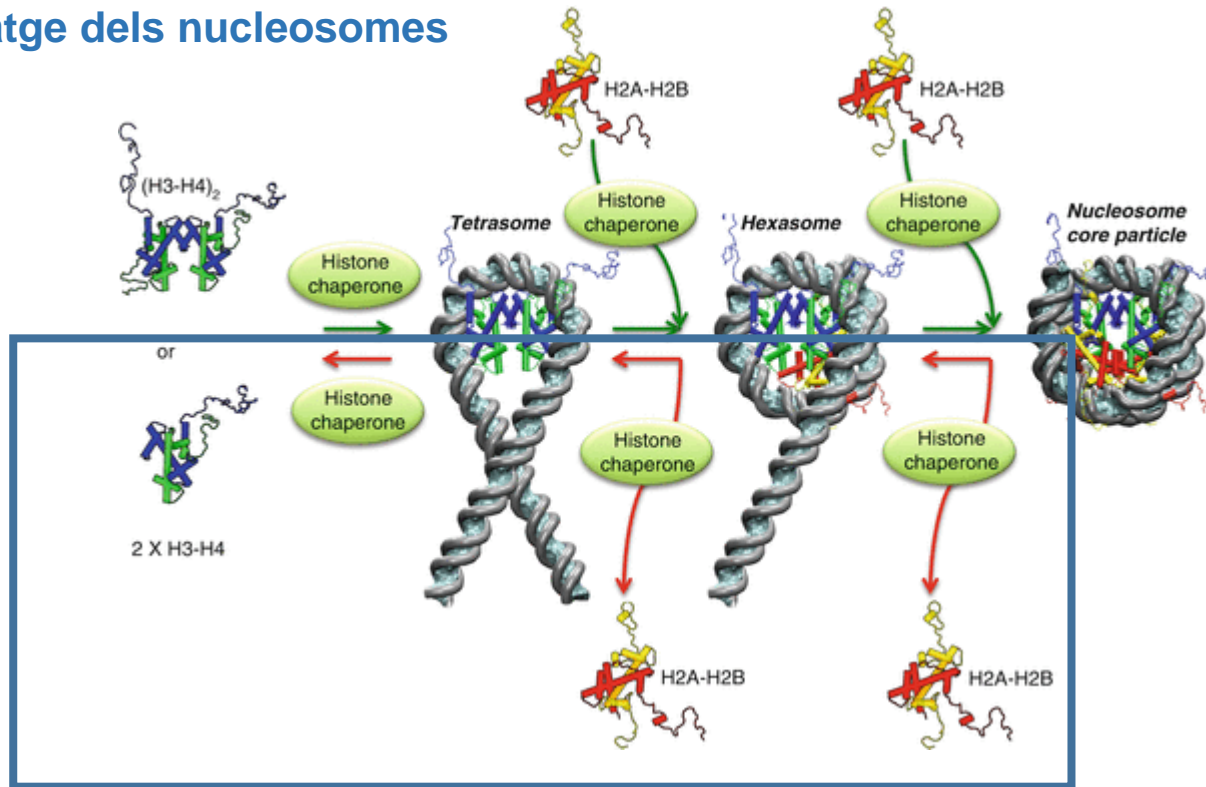


Replicació de la cromatina



Replicació de la cromatina

Desensamblatge dels nucleosomes

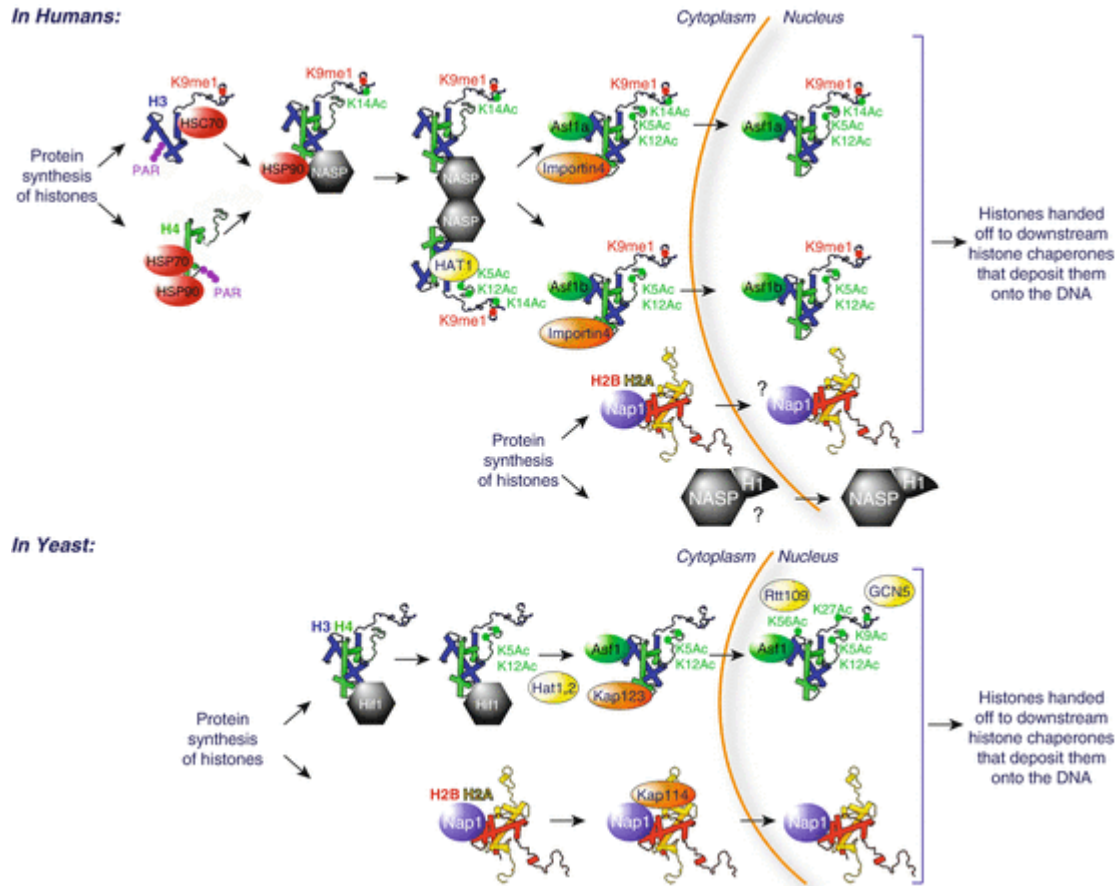


Schematic of the stepwise assembly and disassembly of the nucleosome core particle. *Green arrows* represent steps in chromatin assembly and the *red arrows* indicate steps in chromatin disassembly. On the right is shown the nucleosome core particle, derived from the X-ray crystal structure of Luger and others (Luger et al. 1997) including the DNA (grey—DNA backbone and cyan—bases), and histones H3 (blue), H4 (green), H2A (yellow), and H2B (red). The unstructured tails of the histones that were not visible in the nucleosome core particle structure have been added, and the *rods* indicate the alpha helices of the histones. The remaining images are models derived from the nucleosome core particle structure. Whether or not it is a tetramer of histones (H3–H4)₂ or two dimers of H3–H4 that are deposited onto, or removed from, the DNA depends on which specific histone chaperone and which H3 variant is being utilized.

Histone Chaperones in the Assembly and Disassembly of Chromatin

Replicació de la cromatina

Preparació d'histones de nova síntesis



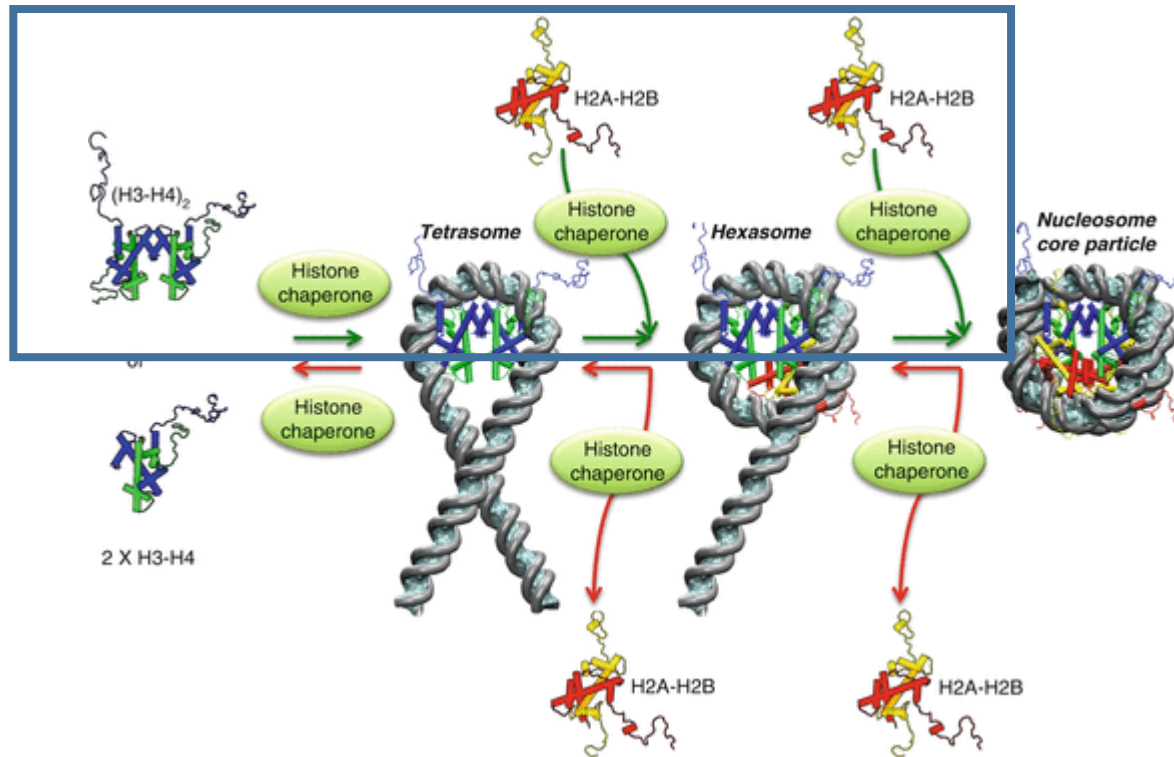
The histone's journey from the cytoplasm to the nucleus. The *red* and *green dots* indicate the positions of methylation (*red*) or acetylation (*green*) that occur on the histones during their journey described in the text. The *yellow ovals* depict specific histone acetyl transferase enzymes. The *orange oval shapes* depict nuclear importers and the remaining shapes depict specific histone chaperones as described in the text. With the exception of the histone chaperone Asf1, the region of the histone shown bound to the histone chaperone has not been experimentally proven and should be considered to be arbitrary. *Question marks* indicate predicted functions for histone chaperones that have not yet been unequivocally proven.

Histone Chaperones in the Assembly and Disassembly of Chromatin

Briana K. Dennehey and Jessica Tyler

Replicació de la cromatina

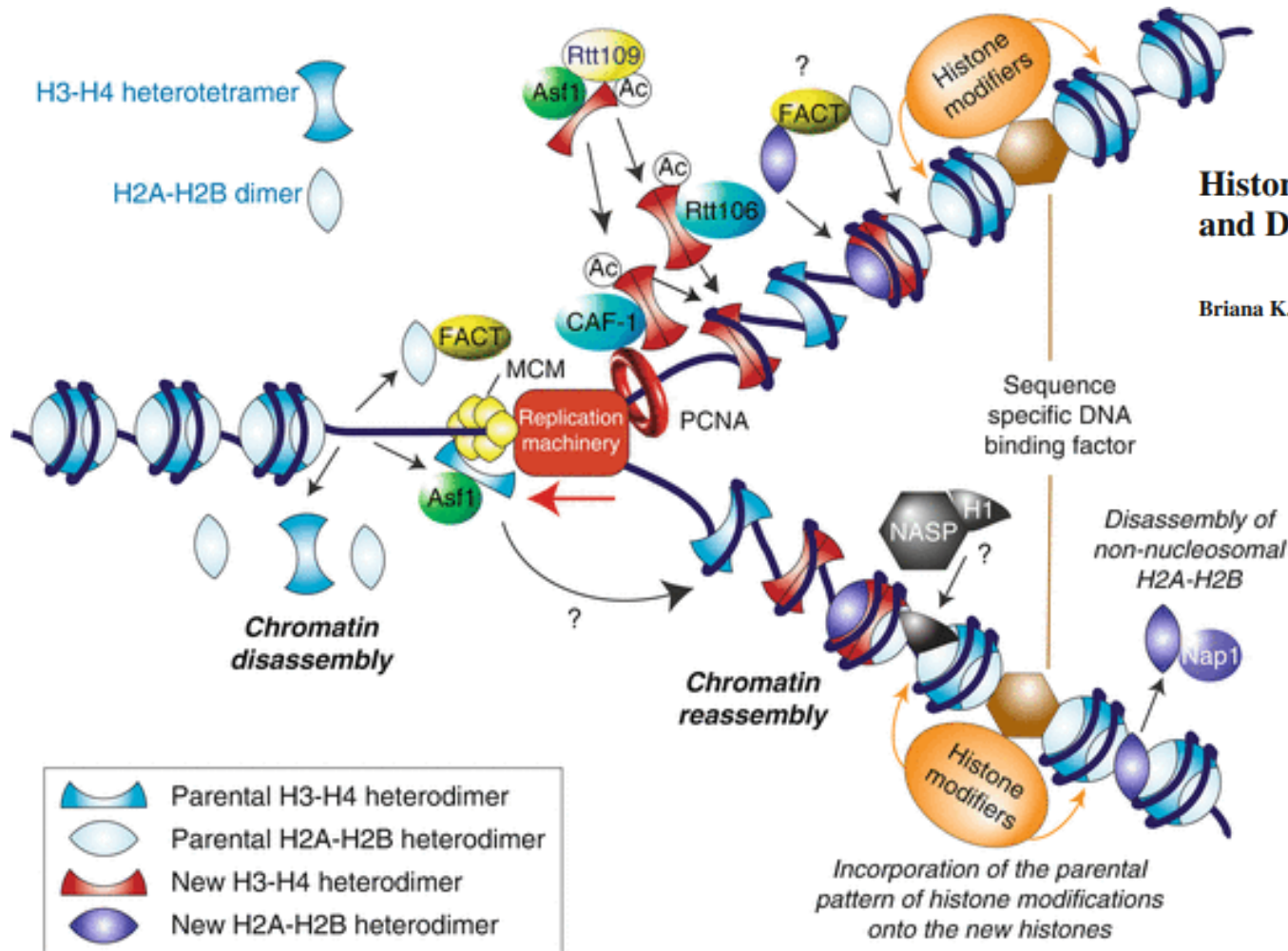
Ensamblatge dels nucleosomes



Schematic of the stepwise assembly and disassembly of the nucleosome core particle. *Green arrows* represent steps in chromatin assembly and the *red arrows* indicate steps in chromatin disassembly. On the right is shown the nucleosome core particle, derived from the X-ray crystal structure of Luger and others (Luger et al. [1997](#)) including the DNA (*grey*—DNA backbone and *cyan*—bases), and histones H3 (*blue*), H4 (*green*), H2A (*yellow*), and H2B (*red*). The unstructured tails of the histones that were not visible in the nucleosome core particle structure have been added, and the *rods* indicate the alpha helices of the histones. The remaining images are models derived from the nucleosome core particle structure. Whether or not it is a tetramer of histones $(H3-H4)_2$ or two dimers of H3-H4 that are deposited onto, or removed from, the DNA depends on which specific histone chaperone and which H3 variant is being utilized.

Histone Chaperones in the Assembly and Disassembly of Chromatin

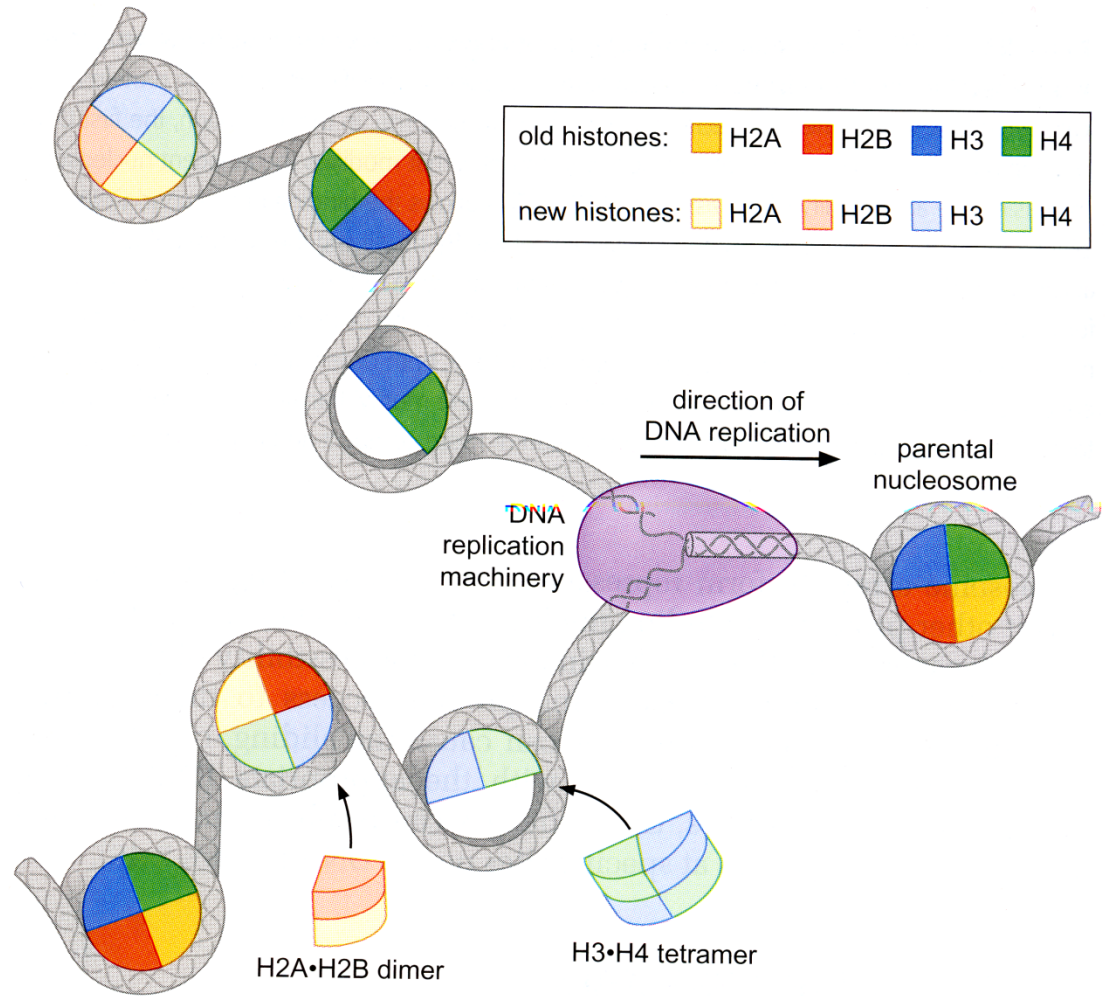
Replicació de la cromatina



Replication-dependent chromatin disassembly and assembly. Schematic showing chromatin disassembly ahead of the replication fork and stepwise chromatin reassembly behind the DNA replication fork. Ac refers to the acetylation of H3K56 by the fungal-specific Rtt109 HAT enzyme that promotes the interaction of the histones with CAF-1 and Rtt106 in yeast. *Question marks* indicate predicted functions for histone chaperones that have not yet been unequivocally proven. The model shown is a compilation of information derived from studies in both yeast and mammalian cells.

Replicació de la cromatina

FIGURE 7-41 The inheritance of histones after DNA replication. As the chromosome is replicated, histones that were associated with the parental chromosome are differently distributed. The histone H3•H4 tetramers are randomly transferred to one of the two daughter strands but do not enter into the soluble pool of H3•H4 tetramers. Newly synthesized H3•H4 tetramers form the basis of the nucleosomes on the strand that does not inherit the parental tetramer. In contrast, H2A and H2B dimers are released into the soluble pool and compete for H3•H4 association with newly synthesized H2A and H2B. As a consequence of this type of distribution, on average, every second H3•H4 tetramer on newly synthesized DNA will be derived from the parental chromosome. These tetramers will include all the modifications added to the parental nucleosomes. The H2A•H2B dimers are more likely to be derived from newly synthesized material.



Replicació de la cromatina

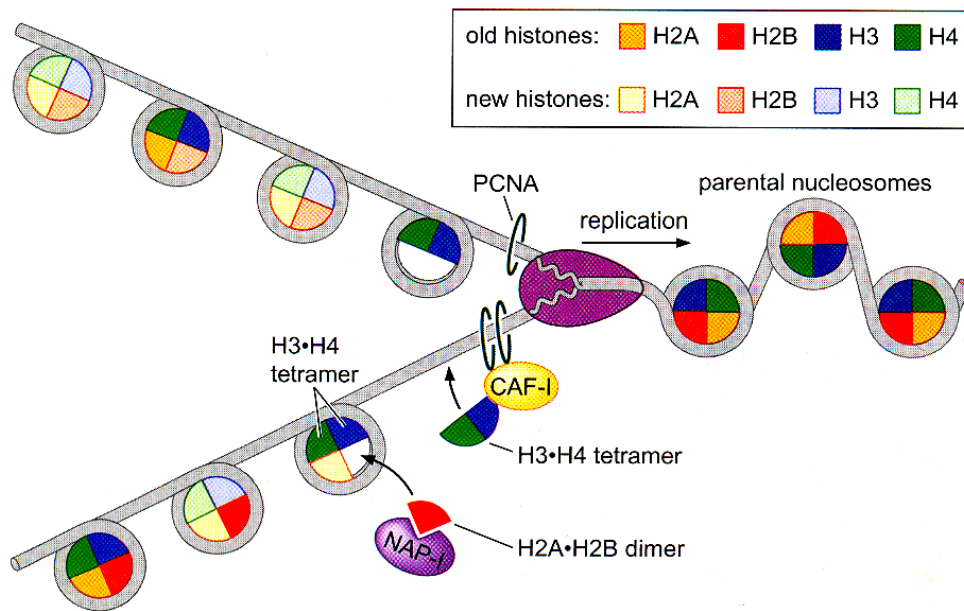


FIGURE 7-43 Chromatin assembly factors facilitate the assembly of nucleosomes. After the replication fork has passed, chromatin assembly factors chaperone free H3•H4 tetramers (CAF-I) and H2A•H2B dimers (NAP-I) to the site of newly replicated DNA. Once at the newly replicated DNA, these factors transfer their histone contents to the DNA. The CAF-I factors are recruited to the newly replicated DNA by interactions with DNA sliding clamps. These ring-shaped, auxiliary replication factors encircle the DNA and are released from the replication machinery as the replication fork moves. A more detailed description of DNA sliding clamps and their function in DNA replication is presented in Chapter 8.

TABLE 7-8 Properties of Histone Chaperones

Name	Number of subunits	Histones bound	Interaction with sliding clamp
CAF-I	4	H3•H4	Yes
RCAF	1	H3•H4	No
NAP-I	1	H2A•H2B	No

Replicació de la cromatina

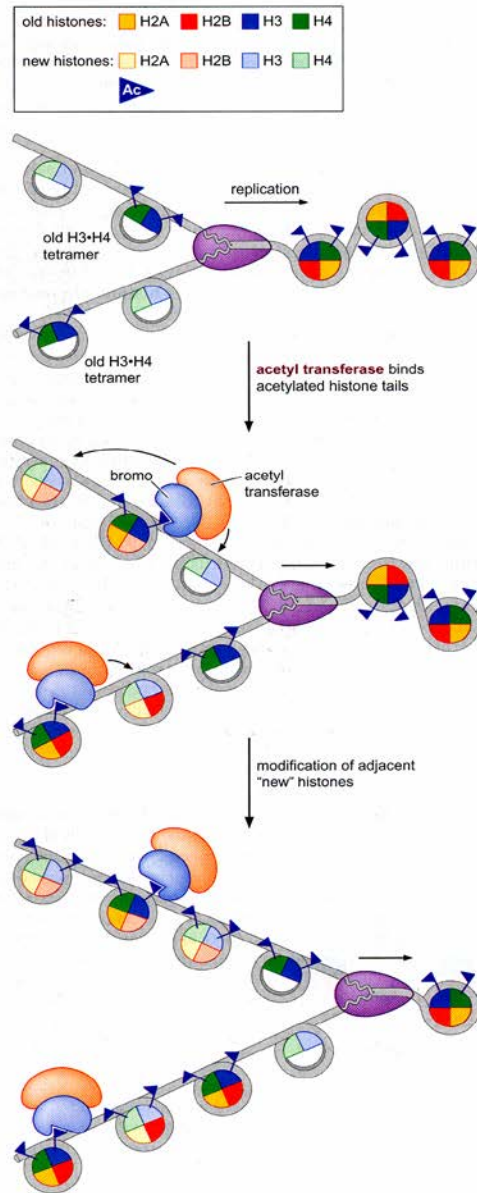
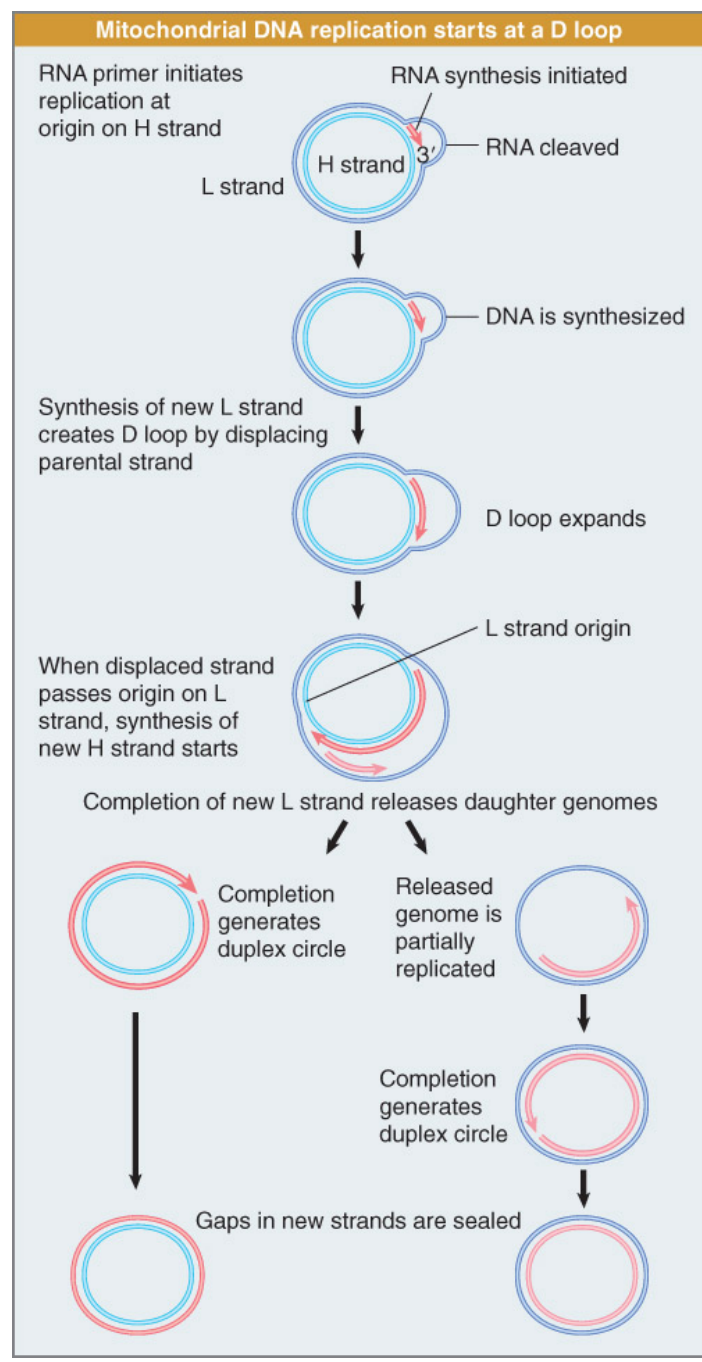
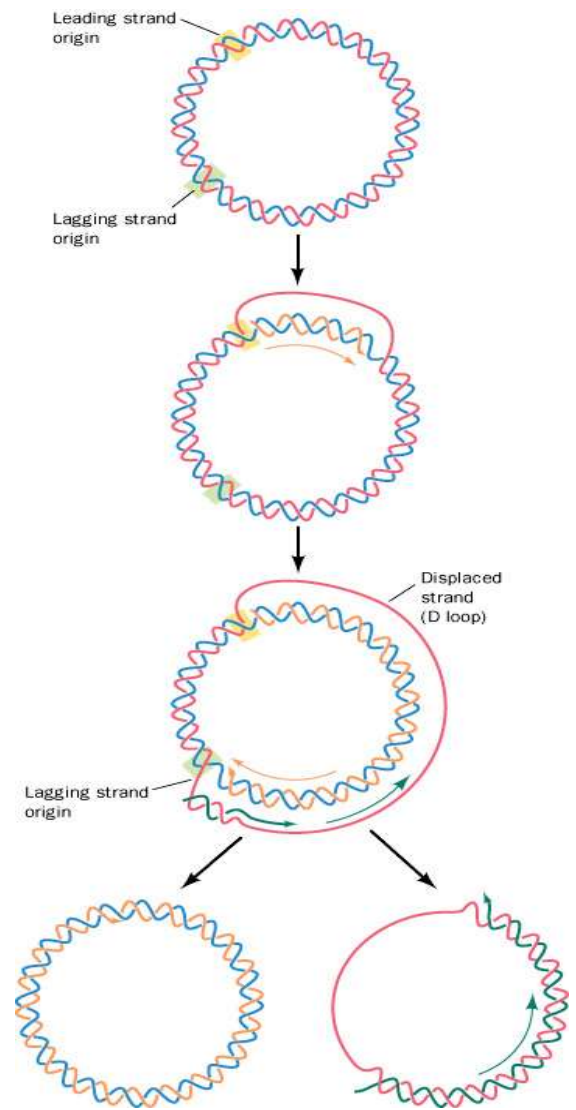


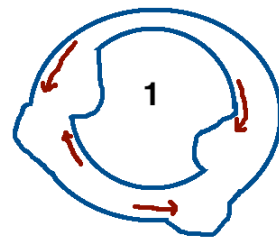
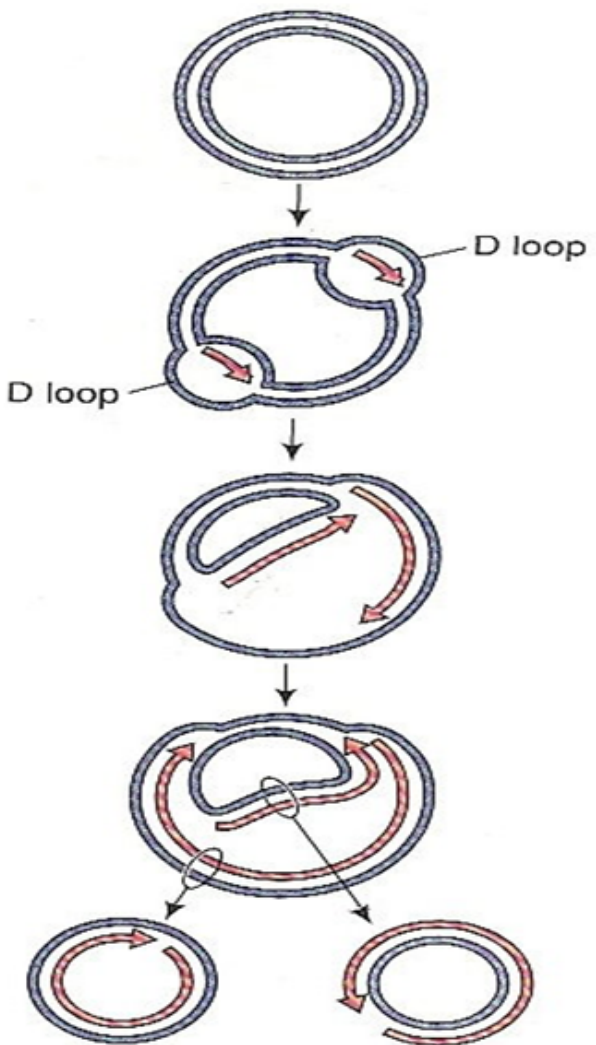
FIGURE 7-42 Inheritance of parental H3-H4 tetramers facilitates the inheritance of chromatin states. As a chromosome is replicated, the distribution of the parental H3-H4 tetramers results in the daughter chromosomes receiving the same modifications as the parent. The ability of these modifications to recruit enzymes that perform the same modifications facilitates the correct propagation of the same state of modification to the two daughter chromosomes. Acetylation is shown on the core regions of the histones for simplicity. In reality, this modification is generally on the N-terminal tails.

Replicació del DNA mitocondrial

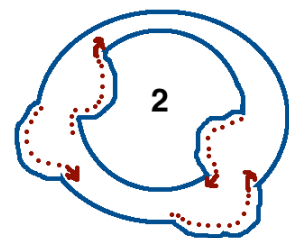


Replicació del DNA del cloroplast

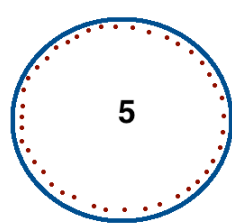
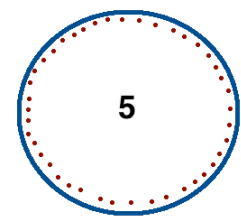
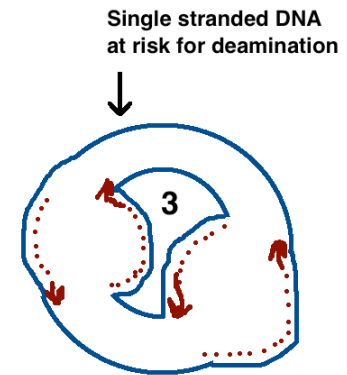
CHLOROPLAST DNA



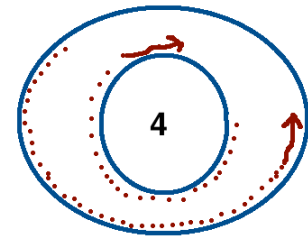
Four D loop structures form. The strands bow away from each other to make room for replication machinery.



Replication forks expand.

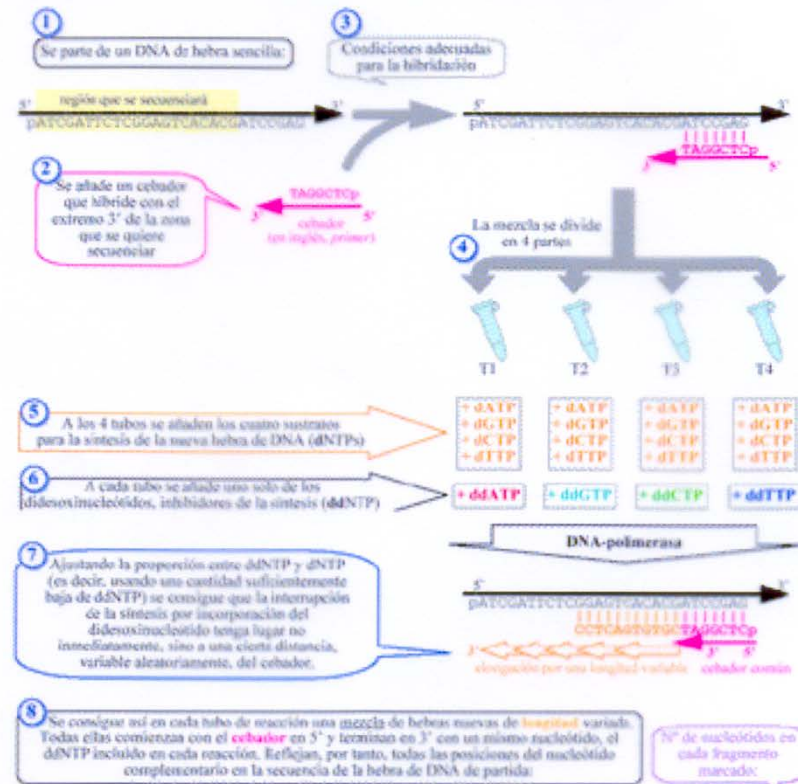


— Template Strand
- - - - - New Strand



This diagram is adapted from Krishnan and Rao's Figure 11 from "A comparative approach to elucidate chloroplast genome replication."

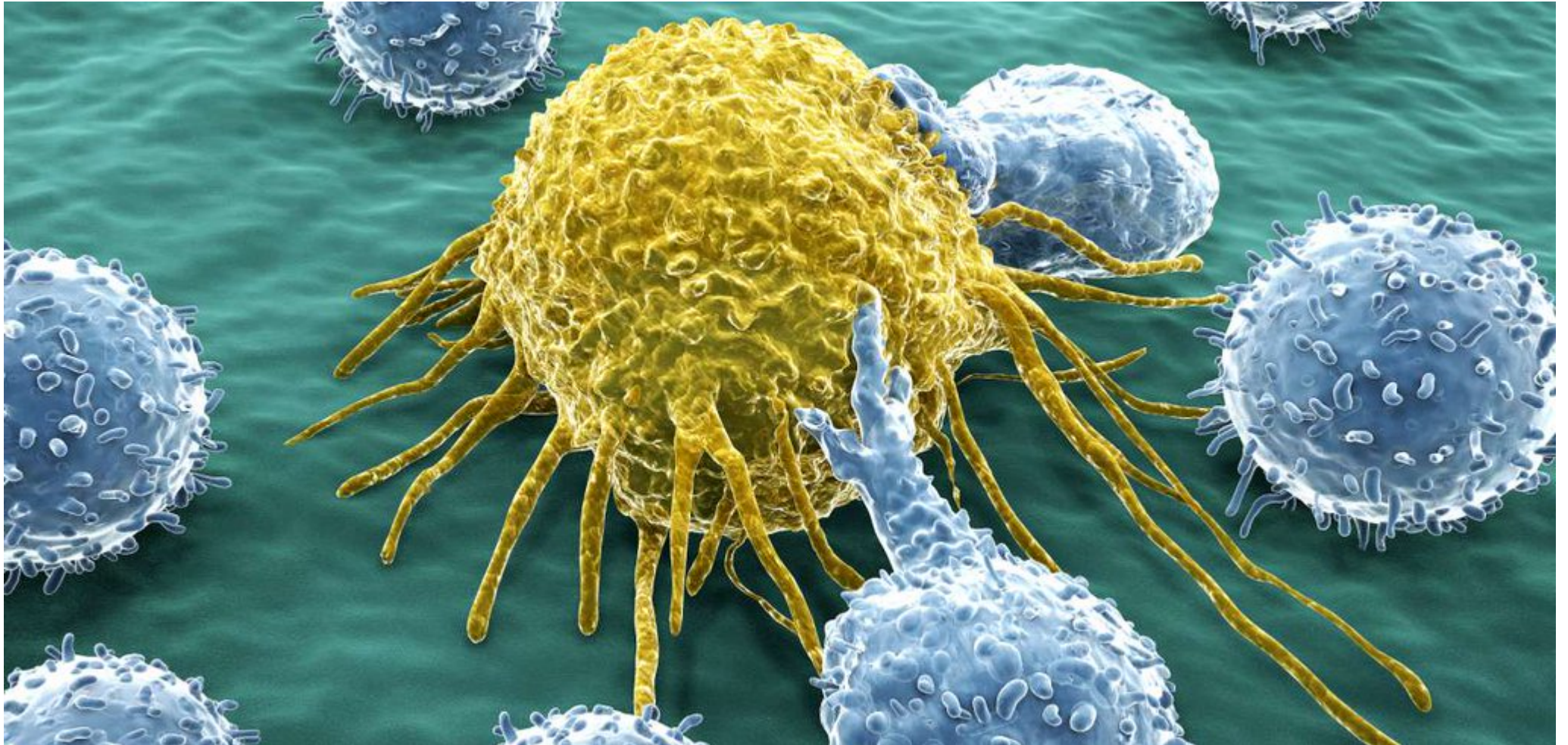
Método enzimático de secuenciación del DNA (I)



<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' AATGTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>7+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' C-TAGGCTCp 5'</p> <p>1+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' AAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>13+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GAGTTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>8+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' AAGAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>15+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' CTAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>10+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' AAGAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>16+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' CTTCAATTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>11+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' AACTAAGAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>20+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' CTAAGAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>18+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' G-TAGGCTCp 5'</p> <p>2+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' T-TAGGCTCp 5'</p> <p>3+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GAT-TAGGCTCp 5'</p> <p>4+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' TTT-TAGGCTCp 5'</p> <p>5+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GTTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>6+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' TCAATTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>9+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>12+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' TCAATTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>9+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>14+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' TAAAGAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>17+7</p>
<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' GAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>14+7</p>	<p>5' PATCGATTCCTCGGAGTTCACACGATCCGAG 3'</p> <p>3' TAGCTAAGAGCTCAAGTTC-TAGGCTCp 5'</p> <p>21+7</p>

Aplicació:
seqüenciació del DNA
(assignatura de
"Mètodes en Biologia
Molecular i
Enginyeria Genètica")

INTRODUCCIÓ A LA BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER

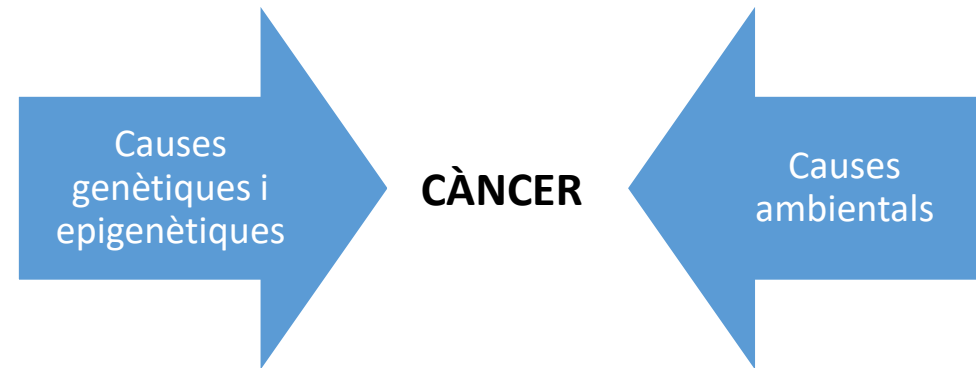


Generalitats

Neoplàsia: creixement nou i anormal de teixit. Pot ser benigne o maligne

Càncer: tumor maligne (generalment)

Al voltant de 300 gens (1% del genoma) involucrats en el desenvolupament del càncer



Mutacions:

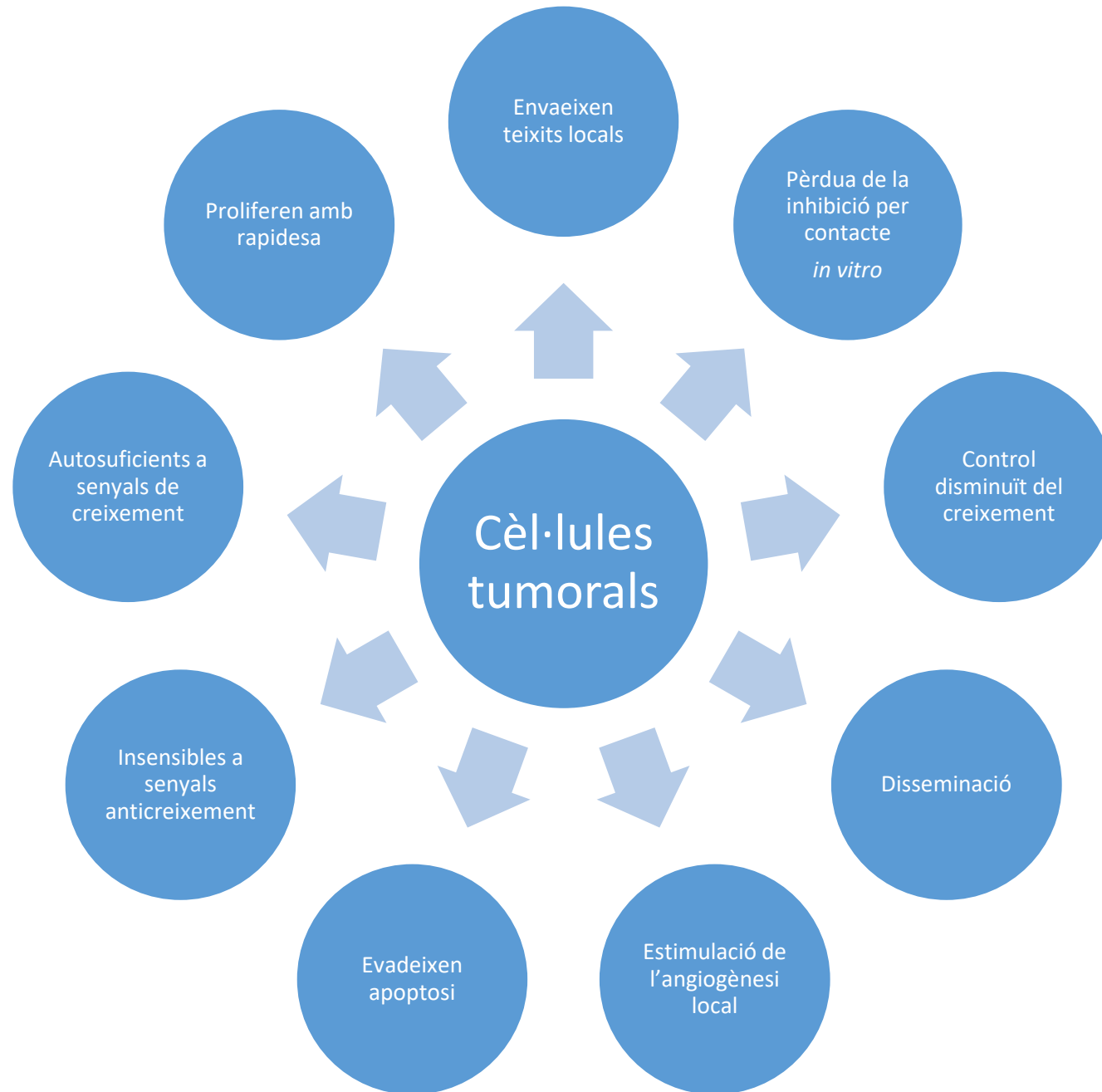
- Hereditàries
 - Adquirides per exposició a
 - Espontànies
- (~1000/cèl·lula i generació)

radiacions
agents químics
virus oncogènics

Altres factors que influeixen en el desenvolupament del càncer:

- Estrès oxidatiu
- Estat immunològic de l'organisme
- Microambient tissular
- Defectes en vies de senyalització
- Estimulació de l'angiogènesi
- Aneuploidia

Propietats de les cèl·lules canceroses



Trets característics del càncer



Molècules involucrades en el desenvolupament del procés inflamatori associat al càncer

NF- κ B { Factor transcripcional que s'activa en tumors en resposta a estímuls inflamatoris o mutacions oncogèniques
Indueix l'expressió de proteïnes involucrades en processos proinflamatoris, proliferatius i de reparació

STAT3 { Activador transcripcional implicat en processos de transducció de senyals
És activada per la interleuquina 6 (IL-6), que activa la quinasa janus (JAK-STAT)

Inflamasona { Complex multiproteic que actua com a detector del dany cel·lular
La seua activació afavoreix la secreció de citoquines proinflamatores, com ara IL-1b o IL-18

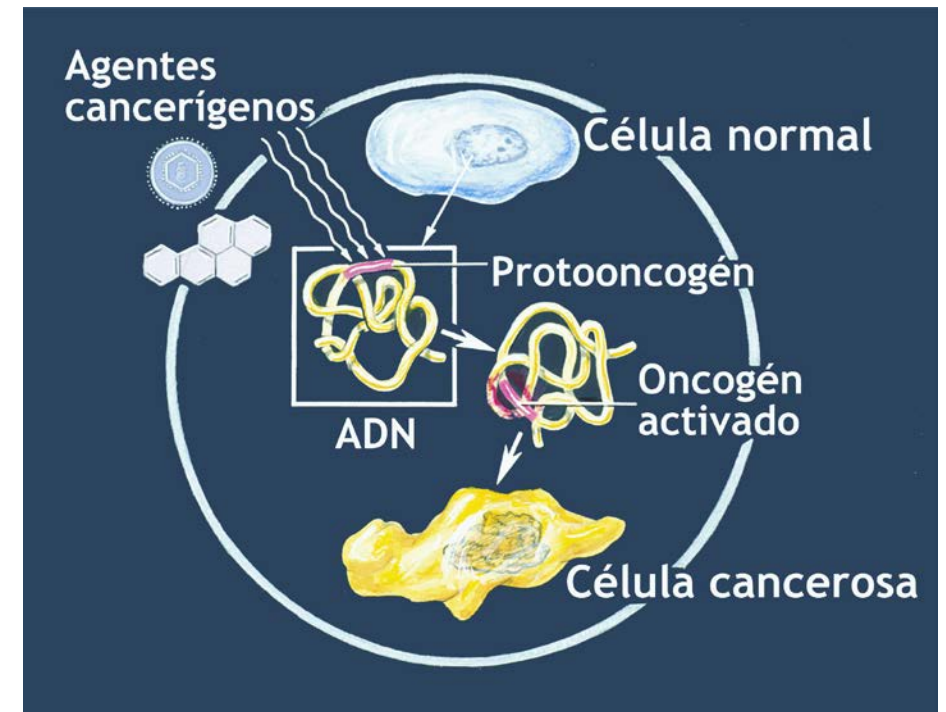
Protooncogenes i oncogenes

Protooncogenes: gens codificants de proteïnes que regulen de forma normal i fisiològica la cascada d'esdeveniments que permeten mantenir el control de la progressió del cicle cel·lular i l'estat normal de diferenciació de la cèl·lula.

Oncogenes: versions alterades per mutació dels protooncogenes que codifiquen proteïnes que provoquen canvis cel·lulars i moleculars. Es tracta de proteïnes estimuladores del creixement com ara:

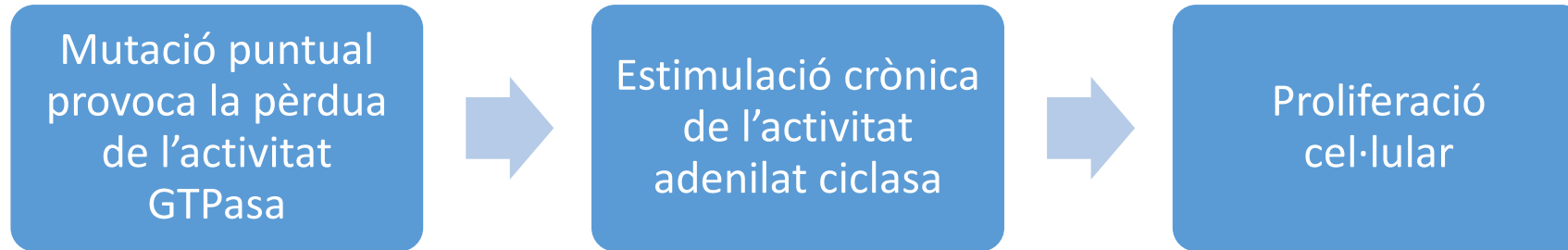
- Factors de creixement
- Receptors de factors de creixement
- Proteïnes G
- Molècules senyalitzadores corrent avall de la proteïna G
- Reguladors de la transcripció
- Reguladors del cicle cel·lular
- Participants en interaccions cèl·lula-cèl·lula
- Implicades en apoptosi

Se'n coneixen més de 100.

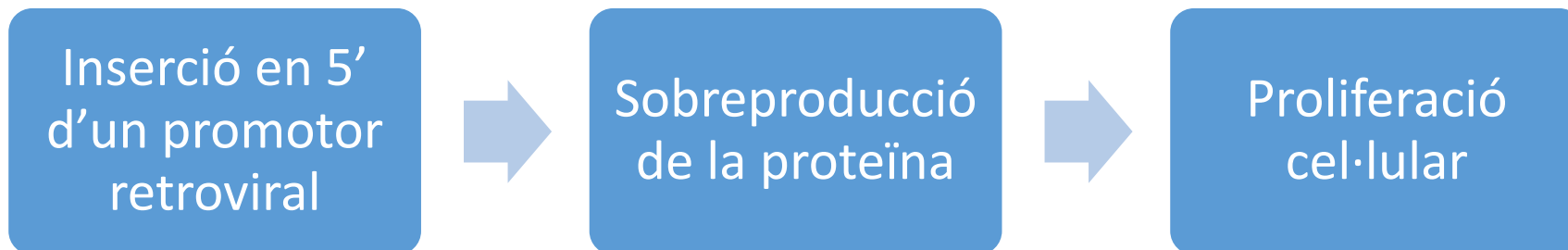


Exemples d'activació de protooncogens

RAS: codifica una GTPasa



Myc: codifica un factor transcripcional amb cremallera de leucina que està implicat en proliferació i creixement; pràcticament no s'expressa en cèl·lules completament diferenciades



En altres casos l'activació pot resultar d'amplificació gènica, que incrementa els nivells de proteïna, o de translocació.

Exemples de protooncogens

Protooncogen	Descripció	Funció
Família RAS	3 protooncogens estretament relacionats (Harvey (ha)-ras, Kirsten (Ki)-ras i N-ras) que codifiquen proteïnes d'uns 21 kDa, situades en la superfície interna de la membrana plasmàtica. Mutacions que provoquen una activació inapropiada determinen creixement descontrolat. Es detecten en el 25% dels càncers	Activitat GTPasa. Participació en rutes de transducció de senyals que regulen el creixement
v-sis	Procedent del virus del sarcoma dels simis i similar a la cadena b del PDGF.	Factor de creixement
HER2	Es detecta amplificat en càncer de pit i gàstric i, en menor grau, en el de pulmó.	Receptor de factor de creixement
BCR-ABL1	En la leucèmia mieloide crònica i en algunes leucèmies limfocítiques agudes de limfòcits B.	Tirosina quinasa
C-MYC	En limfoma de Burkitt	Factor transcripcional
N-MYC	En càncer microcític de pulmó i neuroblastoma	Regulador transcripcional
EGFR	En adenocarcinoma de pulmó	Receptor de factor de creixement
EML4-ALK	“	Nova proteïna resultant de la fusió d'una quinasa i una proteïna associada a microtúbuls

RAS

- La senyalització via RAS té un paper essencial en la proliferació cel·lular normal.
- La ruta MAPK és activada per la majoria de factors de creixement, citoquines i receptors immunològics, així com per moltes integrines.
- En la ruta intervé el receptor RTK i la cascada RAS-RAF-MEK-ERK.
- Les GTPases de la família RAS (KRAS, NRAS i HRAS) experimenten un cicle entre formes actives (amb GTP unit) i inactives (amb GDP unit), controlat per RAS-GEFs i RAS-GAPs.
- Alteracions en components de la ruta tenen conseqüències importants en molts càncers. Desencadenen en últim extrem l'activació de factors transcripcionals que determinen increments d'entrada en el cicle cel·lular, reprogramacions metabòliques, creixement i supervivència i angiogènesi.
- En la majoria de càncers es detecten mutacions o amplificacions de RAS, especialment de KRAS en els tumors sòlids. Al voltant del 95% de les mutacions en RAS associades a càncer afecten els codons 12, 13 o 61 i impliquen una ratio basal incrementada de RAS-GTP:RAS-GDP, la qual cosa resulta en una activació constitutiva dels efectors de RAS. També es detecten en certs mutants canvis en l'activitat GTPasa o en la interacció amb efectors.
- La investigació sobre molècules menudes capaces d'inhibir formes mutades ha resultat molt complicada degut a la gran afinitat de les isoformes RAS per GTP, les elevades concentracions intracel·lulars d'aquest nucleòtid i l'absència d'una butxaca per a la unió d'aquestes molècules.
- El 2013 es pogué trobar la primera molècula capaç d'unir-se a una forma mutant de RAS: KRAS G12C-GDP. La FDA aprovà el 2021 la utilització d'una d'aquestes molècules, sotorasib.

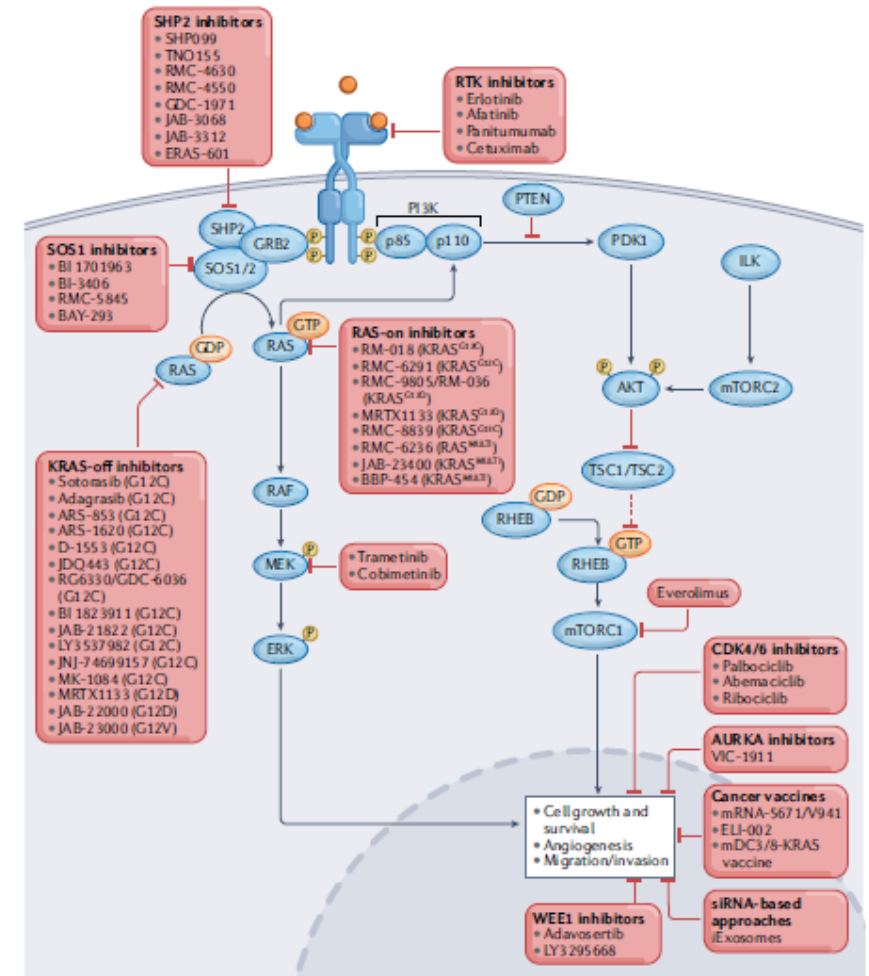


Fig. 1 | The RAS signalling pathway and therapeutic approaches to target this pathway in cancer. Numerous direct inhibitors have been developed to target mutant RAS proteins, either in their inactive, GDP-bound state (KRAS-off inhibitors) or in their active, GTP-bound state (RAS-on inhibitors). Many of these inhibitors are being evaluated in clinical trials. The RAS signalling pathway has many upstream and downstream mediators, which are attractive targets for combination therapies with RAS inhibitors to improve antitumour responses and to mitigate intrinsic and acquired resistance; agents that have been combined with direct KRAS inhibitors in preclinical or clinical studies are listed. Therapeutic cancer vaccines against mutant RAS epitopes and small interfering RNA (siRNA)-based approaches that target oncogenic RAS isoforms are also under ongoing development. ILK, integrin-linked kinase; mTORC2, mTOR complex 2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RTK, receptor tyrosine kinase.

RAS

- La senyalització via RAS té un paper essencial en la proliferació cel·lular normal.
- La ruta MAPK és activada per la majoria de factors de creixement, citoquines i receptors immunològics, així com per moltes integrines.
- En la ruta intervé el receptor RTK i la cascada RAS-RAF-MEK-ERK.
- Les GTPases de la família RAS (KRAS, NRAS i HRAS) experimenten un cicle entre formes actives (amb GTP unit) i inactives (amb GDP unit), controlat per RAS-GEFs i RAS-GAPs.
- Alteracions en components de la ruta tenen conseqüències importants en molts càncers. Desencadenen en últim extrem l'activació de factors transcripcionals que determinen increments d'entrada en el cicle cel·lular, reprogramacions metabòliques, creixement i supervivència i angiogènesi.
- En la majoria de càncers es detecten mutacions o amplificacions de RAS, especialment de KRAS en els tumors sòlids. Al voltant del 95% de les mutacions en RAS associades a càncer afecten els codons 12, 13 o 61 i impliquen una ràtio basal incrementada de RAS-GTP:RAS-GDP, la qual cosa resulta en una activació constitutiva dels efectors de RAS. També es detecten en certs mutants canvis en l'activitat GTPasa o en la interacció amb efectors.
- La investigació sobre molècules menudes capaces d'inhibir formes mutades ha resultat molt complicada degut a la gran afinitat de les isoformes RAS per GTP, les elevades concentracions intracel·lulars d'aquest nucleòtid i l'absència d'una butxaca per a la unió d'aquestes molècules.
- El 2013 es pogué trobar la primera molècula capaç d'unir-se a una forma mutant de RAS: KRAS G12C-GDP. La FDA aprovà el 2021 la utilització d'una d'aquestes molècules, sotorasib.

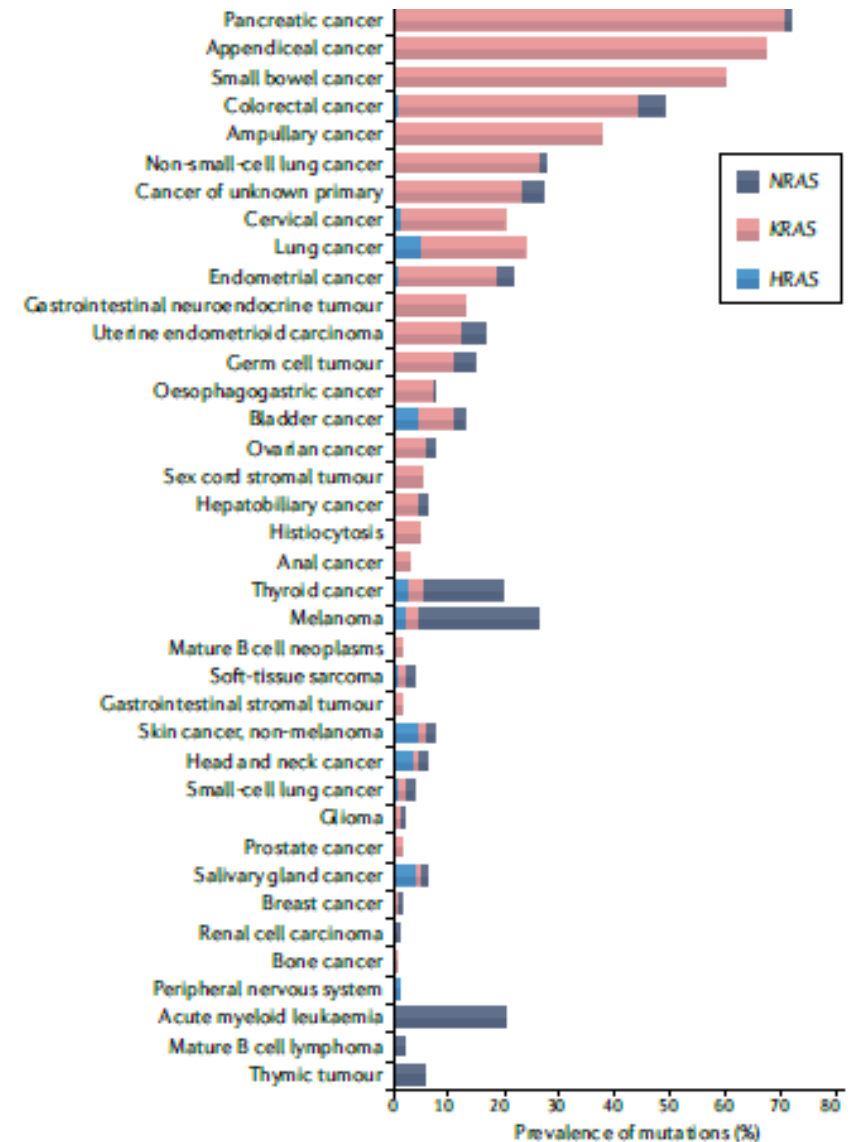


Fig. 2 | The prevalence of KRAS, NRAS and HRAS mutations across cancer types. Mutations in the RAS genes are common in gastrointestinal and lung cancers, with KRAS mutations comprising most of these mutations, but also occur more rarely in various other cancer types. The data shown in the graph are from the cBioportal TCGA and MSK-IMPACT cohorts (available via the cBioPortal for Cancer Genomics)¹²¹⁸.

Factors de creixement i càncer

- Factors de creixement com EGF (factor de creixement epidèrmic), FGF (factor de creixement de fibroblastos), TGF- α (factor de transformació de creixement alfa), KGF (factor de creixement de queratinòcits) o IGF2y (factor de creixement de tipus insulina 2) poden induir morfogènesi així com el desenvolupament de molts tumors.
- Moltes rutes oncogèniques mediades per aquests pèptids poden promoure EMT (Transició Mesenquimàtica Epitelial).

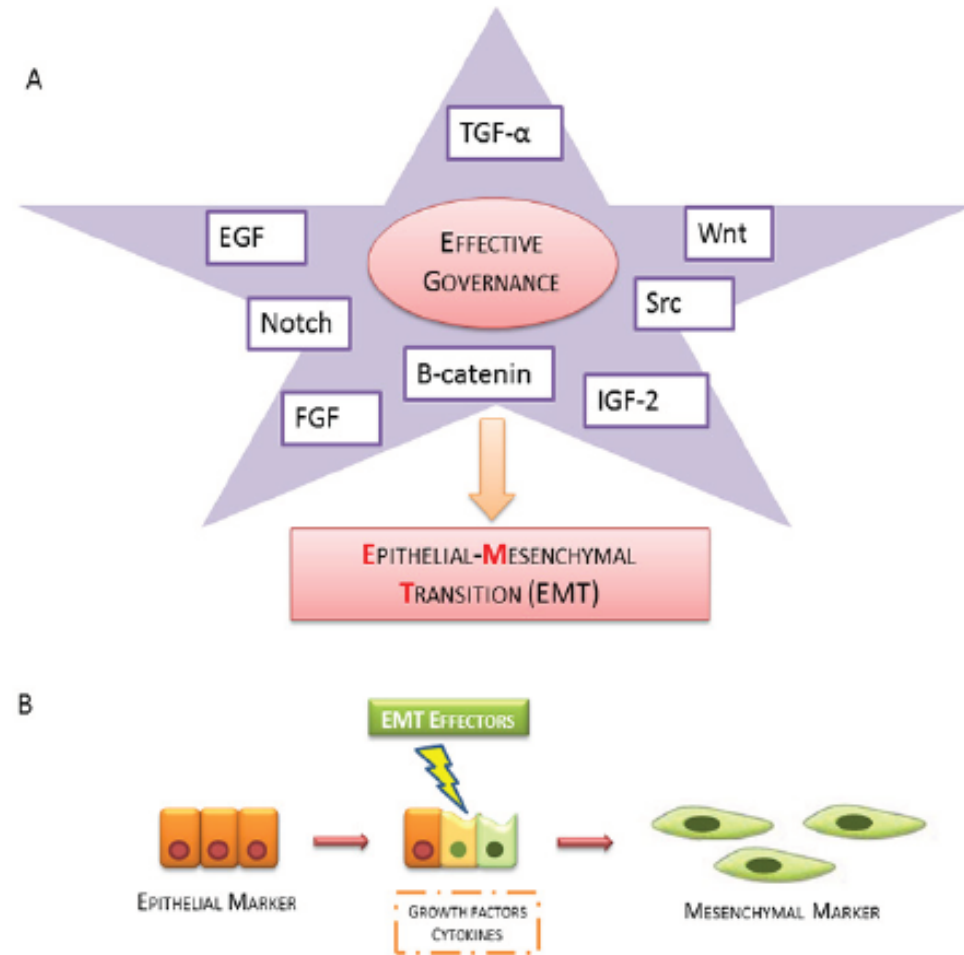


Figure 1: Epithelial mesenchymal transition scheme. A. The broad spectrum of growth factors and related activating downstream effectors (EGF, TGF- α , WNT, Notch, Src, β -catenin, IGF-2 and FGF) involved in induction of EMT B. Epithelial cells promote the expression of mesenchymal markers by the production of growth factors cytokines.

Factors de creixement i càncer: mecanismes de control del creixement en cèl·lules canceroses

- **Control autocrí:** la cèl·lula tumoral produeix factors de creixement que actuen sobre receptors de la mateixa cèl·lula, de manera que el creixement tumoral és independent de l'administració exògena d'aquests factors.
- **Control paracrí:** factors de creixements alliberats per cèl·lules canceroses interaccionen amb els receptors apropiats situats en les cèl·lules veïnes tot desencadenant processos de transducció de senyals en aquestes.
- Exposició a quantitats augmentades d'un factor de creixement o a quantitats disminuïdes d'un factor d'inhibició del creixement pot alterar l'equilibri del creixement cel·lular.
- El factor de creixement transformant b (TGF-b) exerceix efectes inhibidors sobre el creixement de certes cèl·lules.
- Els factors de creixement epidèrmic i derivat de plaquetes tenen activitat tirosina quinasa i estimulen la mitosi.

Factors de creixement i càncer

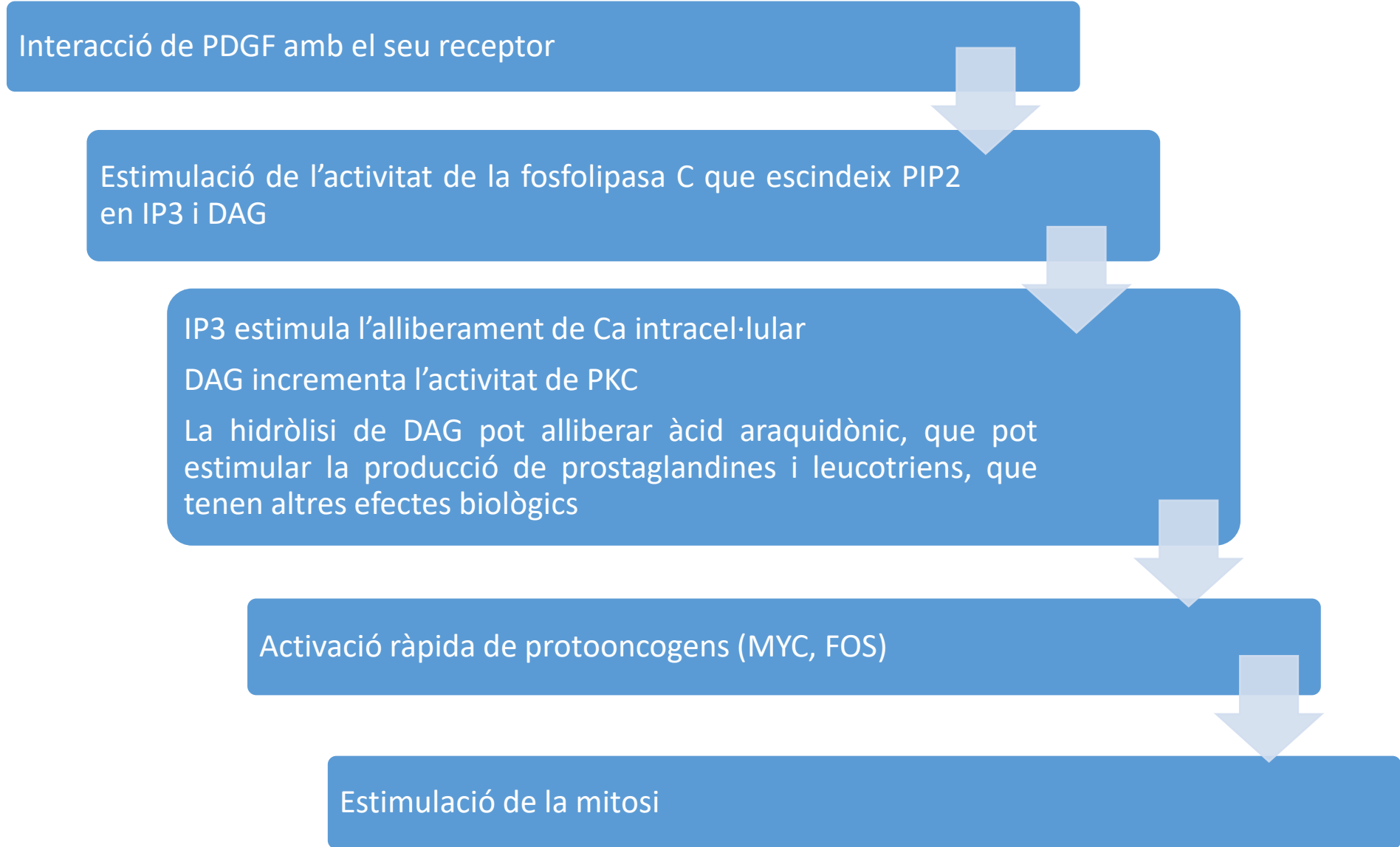
PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes, important en el desenvolupament embrionari i la proliferació cel·lular

PIP2: fosfatidilinositol bisfosfat

IP3: trifosfat d'inositol

DAG: diacilglicerol

PKC: proteïna quinasa C



Factors de creixement i càncer: factor de creixement epidèrmic

Unió del factor de creixement epidèrmic (EGF) al seu receptor (EGFR) (glicoproteïna amb activitat tirosina quinasa v-erb-B)

Dimerització d'EGFR
Estimulació de l'activitat de la tirosina quinasa
Autofosforilació
Activació de diverses rutes de transducció de senyals

- v-erb-B es pot activar inespecíficament.
- El receptor del factor de creixement epidèrmic pot estar sobreexpressat o mutat.
- Després de la seua activació EGFR es transloca i transporta a l'endosoma per a la seua tornada a la membrana plasmàtica o la degradació en lisosomes

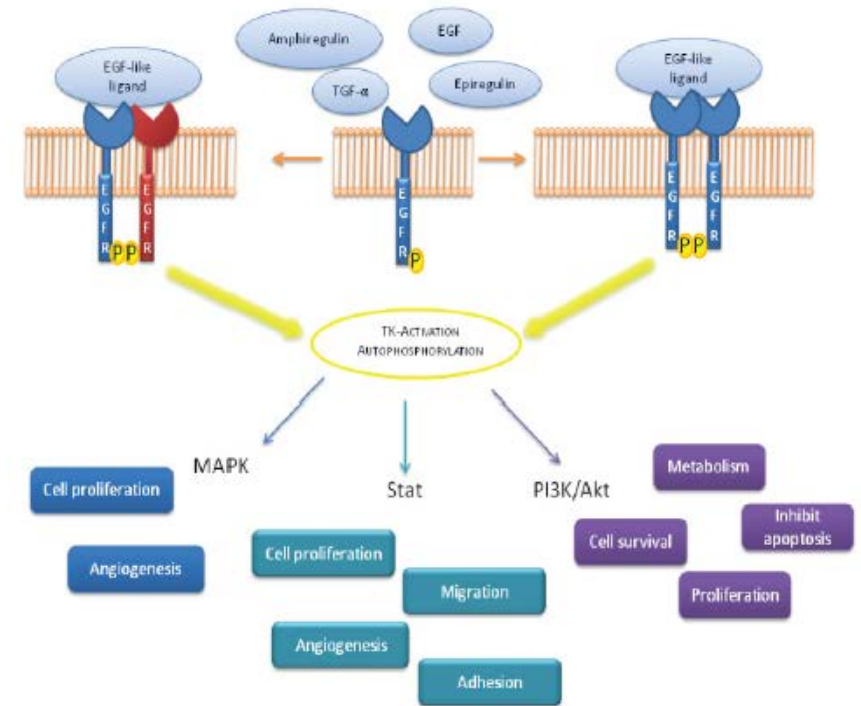


Figure 2: Schematic representation of signal transduction pathways involved after EGFR activation. EGFR ligands binding leads to a receptor dimerization followed by Tyrosine Kinase (TK) autophosphorylation; this mechanism induces a down-stream precise signaling correlated to different biological effects.

Factors de creixement i càncer: factor de creixement epidèrmic

Unió del factor de creixement epidèrmic (EGF) al seu receptor (EGFR) (glicoproteïna amb activitat tirosina quinasa v-erb-B)

Dimerització d'EGFR
Estimulació de l'activitat de la tirosina quinasa
Autofosforilació
Activació de diverses rutes de transducció de senyals

- v-erb-B es pot activar inespecíficament.
- El receptor del factor de creixement epidèrmic pot estar sobreexpressat o mutat.
- Després de la seua activació EGFR es transloca i transporta a l'endosoma per a la seua tornada a la membrana plasmàtica o la degradació en lisosomes.

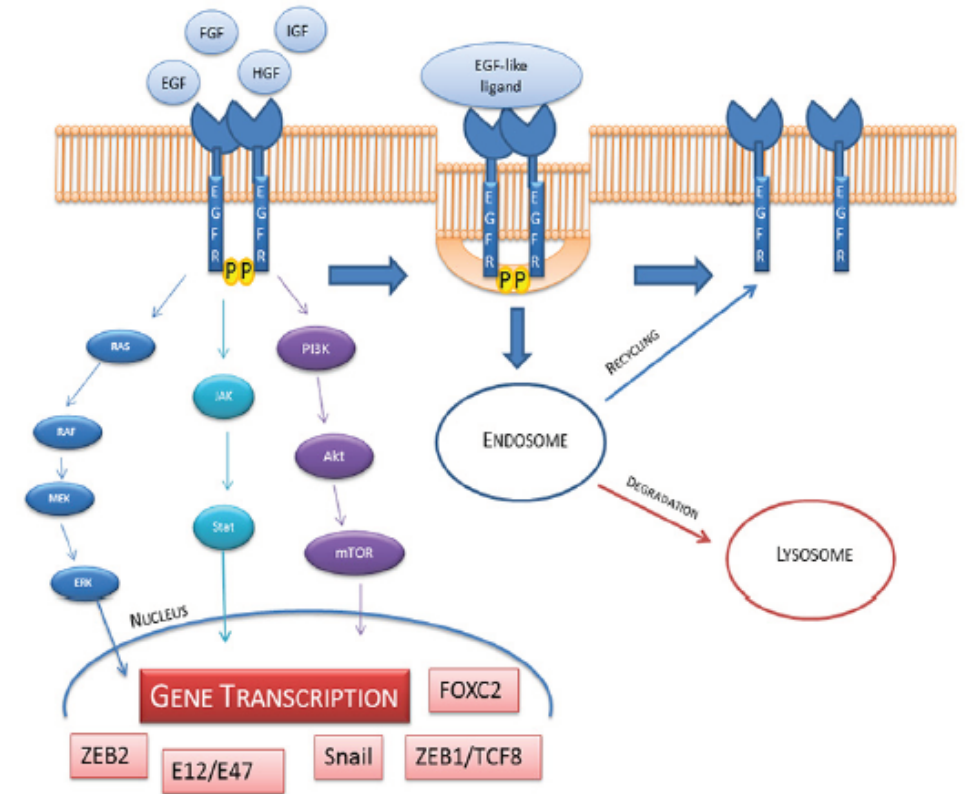


Figure 3: EGFR activation, internalization, recycling and degradation. The down-stream signaling involve Ras/Raf/Mek/Erk; Jak/Stat and PI3K/Akt/mTOR pathways. These pathways activate the transcription of ZEB1/TCF8, Snail, ZEB2, Snail2, E12/E47, FOXC2 that are able to influence the cell fate. On the right side of the figure we show the internalization and endosomal sorting of EGFR.

Gens supressors de tumors

- Codifiquen proteïnes que, en condicions normals, suprimeixen el creixement o la divisió cel·lular.
- La seua mutació implica increment de creixement o divisió cel·lular.
- S'han d'afectar les 2 còpies del gen corresponent per tal que es perden els efectes inhibidors.
- Se'n poden distingir 2 tipus:

Gens amb funcions de guardabarrera:

controlen la proliferació cel·lular

regulen el cicle cel·lular i l'apoptosi

Gens curadors de supressors de tumors:

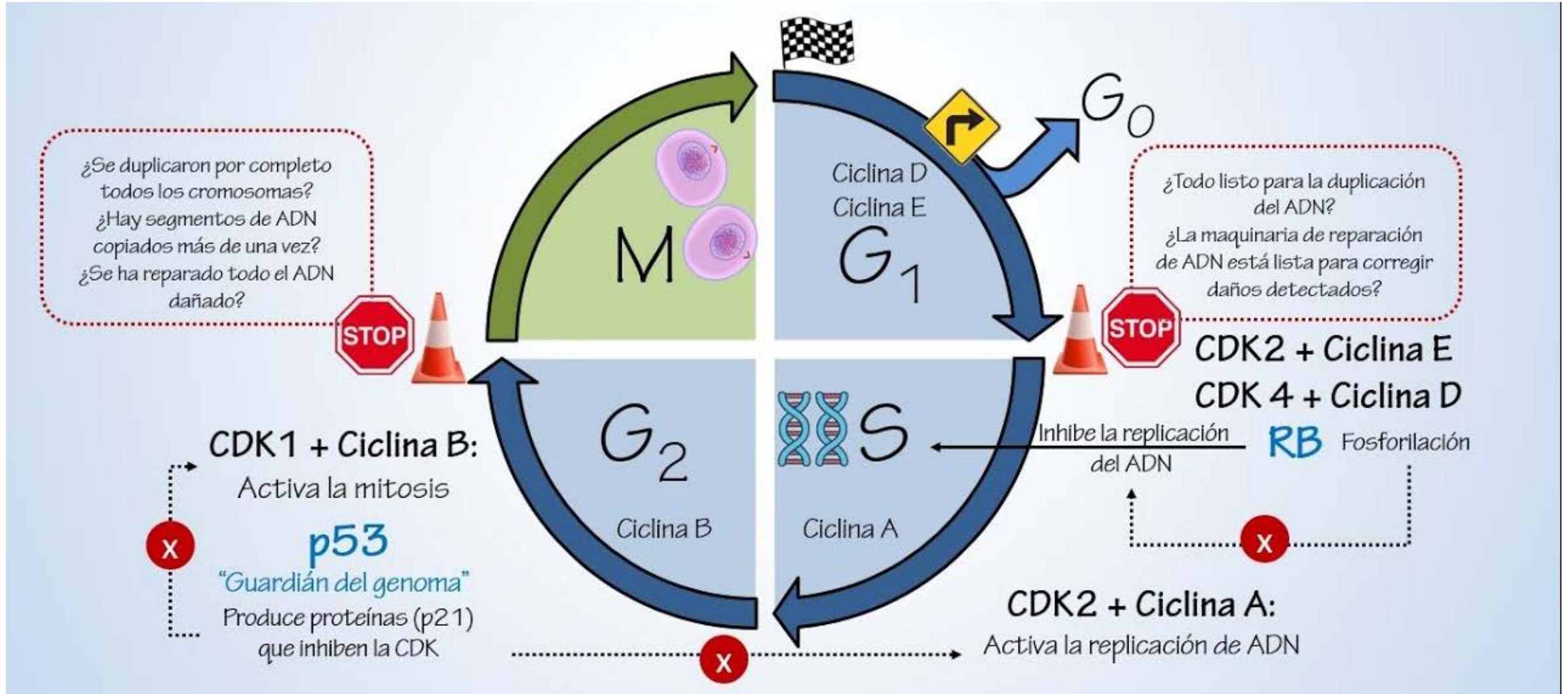
preserven la integritat del genoma

les proteïnes codificades detecten danys en el DNA i els corregixen o mantenen la integritat del genoma durant la divisió cel·lular

Exemples de gens supressors de tumors

Gen	Descripció	Implicació en tipus de càncer
Gen del retinoblastoma (RB)	<p>En el cromosoma 13</p> <p>Codifica una fosfoproteïna nuclear implicada en la regulació del cicle cel·lular. La fosforilació al final de la fase G1 permet la transcripció de gens implicats en la proliferació cel·lular dependents de l'activador transcripcional E2F. La desfosforilació durant la mitosi inhibeix la proliferació.</p> <p>Una causa d'inactivació pot ser la metilació del seu promotor.</p>	Retinoblastoma, osteosarcoma, càncer pulmonar de cèl·lules xicotetes, tumors cerebrals
Gen p53	<p>En el cromosoma 17</p> <p>Activador transcripcional que reconeix llocs d'unió específics en promotors proximals o distals.</p> <p>En resposta a danys en el DNA inhibeix la formació de complexos CDK-ciclins i la fosforilació de RB tot i provocant l'aturada del cicle cel·lular. Evita la replicació de DNA danyat. Si la lesió no pot reparar-se desencadena l'entrada en apoptosi.</p> <p>Cada tipus de càncer mostra determinades mutacions en el gen. El 70% són puntuals <i>missense</i>, sobretot entre els exons 5 i 8. El 10% hi són <i>nonsense</i>.</p> <p>Formes inactives permeten la supervivència i divisió de cèl·lules amb DNA alterat.</p>	Defectuós en molts càncers humans
APC, DCC	En el cromosoma 5 i 18, respectivament	Significació en càncer de colon
NF-1, NF-2	En el cromosoma 17 i 22, respectivament	Associat a neurofibromatosi
BRCA1, BRCA2	En el cromosoma 17 i 13, respectivament	En càncers de pit i ovari

Exemplos de gens supressors de tumors



p53

En cèl·lules en condicions normals es troba en nivells baixos degut a:

- Degradació constitutiva en el proteasoma (dirigida per la ubiquitín-ligasa MDM2)
- Inhibició de l'activitat bioquímica per MDM4

Com a factor de transcripció promou:

- Aturada del cicle cel·lular
- Apoptosi
- Reparació del DNA

De forma independent de transcripció té efectes antiproliferatius.

Afecta pràcticament tots els compartiments i orgànuls cel·lulars.

Pot suprimir la progressió de tumors per controlar la composició de microRNAs en exosomes i el patró de citoquines secretades

Les mutacions en p53 poden provocar:

- important desplegament
- alteració de la capacitat de unió al DNA sense importants efectes estructurals.

Els efectes de les mutacions poden ser:

- Acumulació de la proteïna mutada amb pèrdua d'activitats inhibidores del càncer
- Adquisició de noves activitats promotores de càncer (guany de funció)
- Actuació sobre altres factors transcripcionals per activar l'expressió de gens promotors de tumors
- Facilitar la progressió de tumors per la modulació del contingut dels exosomes i els canvis en el microentorn del tumor que això provoqe.

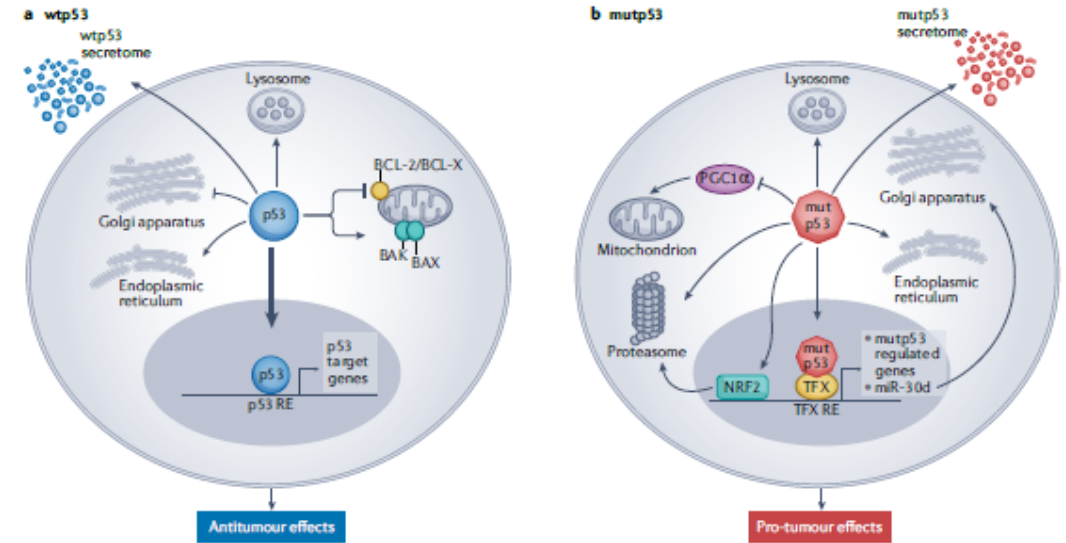


Fig. 1 | Tumour-suppressive effects of wild-type p53 and oncogenic effects of mutant p53. a | Wild-type p53 (wtp53) acts predominantly as a transcription factor to restrict cancer cell proliferation and survival. Many non-transcriptional effects are also involved. Wtp53 can promote mitochondrially induced apoptosis by interacting with multi-domain members of the apoptosis regulator BCL-2 family (such as BCL-2 and BCL-X), unleashing the activity of pro-apoptotic BH3-only proteins such as BAK and BAX. Wtp53 can also increase Ca^{2+} load upon stress, resulting in induction of apoptosis. Additionally, wtp53 is an important regulator of autophagy. **b** | Mutant p53 (mutp53) can modulate transcription by piggybacking on other transcription factors (TFX) and can also promote cancer by non-transcriptional mechanisms. Mutp53 can inhibit peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC1 α), a master regulator of mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation. Moreover, in contrast to wtp53, mutp53 inhibits endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis by modulating the unfolded protein response

(UPR), which increases cell survival upon ER stress. Mutp53 also induces the transcription of many genes that encode proteasome subunits. This transcriptional activation, mediated by the binding of mutp53 to the transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), results in elevated proteasome activity and enhanced degradation of tumour suppressor proteins. Both wtp53 and mutp53 impinge on multiple cellular organelles and compartments, and can also elicit non cell-autonomous effects through secretion of various molecules, both soluble and those carried by exosome or extracellular vesicle. The presence of wtp53 inhibits the expression of Golgi scaffolding proteins, thus inhibiting secretory vesicle biogenesis in the Golgi apparatus, while mutp53 can modulate Golgi apparatus function by inducing microRNA miR-30d expression through interacting with the hypoxia responsive factor HIF1 α . Consequently, miR-30d modulates tubulo-vesiculation of the Golgi apparatus, promoting vesicular trafficking and secretion. RE, response element.

- No resulta una diana molt apropiada per a fàrmacs, ja que aquests solen actuar mitjançant la inhibició d'una excessiva activitat proteica.
- Fa algunes dècades començaren a dissenyar-se estratègies per tal de modular l'activitat de p53. De moment poques iniciatives han arribat a fases clíniques avançades i no hi ha cap que haja rebut aprovació per part de FDA o EMA.
- Una línia d'investigació es basa en la identificació de molècules menudes. En el cas de tumors amb mutacions puntuals *missense* en p53 es pretén restaurar la conformació i l'activitat de la forma mutada. En els casos en els quals es manté p53wt la idea és evitar els mecanismes d'inhibició dependents sobretot de MDM2. Hi ha uns 50 compostos d'aquests tipus en fase clínica.
- Una altra possibilitat és la immunoteràpia, degut a la major exposició de p53 en cèl·lules canceroses.
- L'altra estratègia és la teràpia gènica, ja siga emprant virus o nanopartícules.

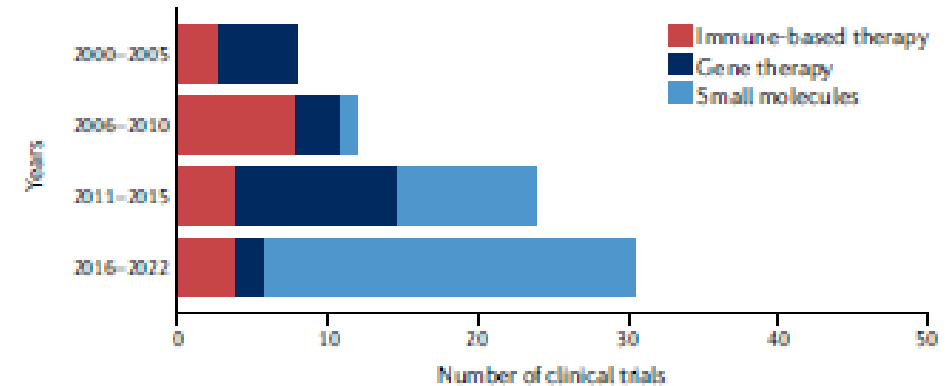


Fig. 2 | Numbers of p53-targeted clinical trials by year and treatment category. Clinical trials with p53-targeted therapies initiated after 1 January 2000 were stratified by year blocks and category. Gene therapy clinical trials were popular before the year 2000 (12 clinical trials initiated), but their number declined sharply soon thereafter, owing to mounting concerns about the safety of this strategy. These numbers increased again in the course of 2011–2015, mostly reflecting the clinical trials driven by Shenzhen SiBiono GeneTech and several trials of SGT-53 (SynerGene Therapeutics). Immune-based clinical trials targeting p53 were rather uncommon before 2000 (two clinical trials). With the introduction of new anticancer vaccination approaches, the number of relevant p53-based clinical trials has increased. Presently, most p53-based immunotherapy clinical trials use a combination of immune checkpoint inhibition and a p53-activating agent (either gene therapy or small molecules). It is expected that, owing to the growing interest in bispecific antibodies and T cell receptor (TCR)-like antibodies (see FIG. 4), p53-centric clinical trials that use these strategies will become more popular in the coming years. Visibly, the biggest increase in p53-based clinical trials in the past decade involved small-molecule drugs. This may be attributed, at least in part, to the emergence of new screening methods and improved compound libraries, along with better understanding of the deregulation of p53 in cancer.

p53

- No resulta una diana molt apropiada per a fàrmacs, ja que aquests solen actuar mitjançant la inhibició d'una excessiva activitat proteica.
- Fa algunes dècades començaren a dissenyar-se estratègies per tal de modular l'activitat de p53. De moment poques iniciatives han arribat a fases clíniques avançades i no hi ha cap que haja rebut aprovació per part de FDA o EMA.
- Una línia d'investigació es basa en la identificació de **molècules menudes**. En el cas de tumors amb mutacions puntuals *missense* en p53 es pretén restaurar la conformació i l'activitat de la forma mutada. En els casos en els quals es manté p53wt la idea és evitar els mecanismes d'inhibició dependents sobretot de MDM2. Hi ha uns 50 compostos d'aquests tipus en fase clínica.
- Una altra possibilitat és la immunoteràpia, degut a la major exposició de p53 en cèl·lules canceroses.
- L'altra estratègia és la teràpia gènica, ja siga emprant virus o nanopartícules.

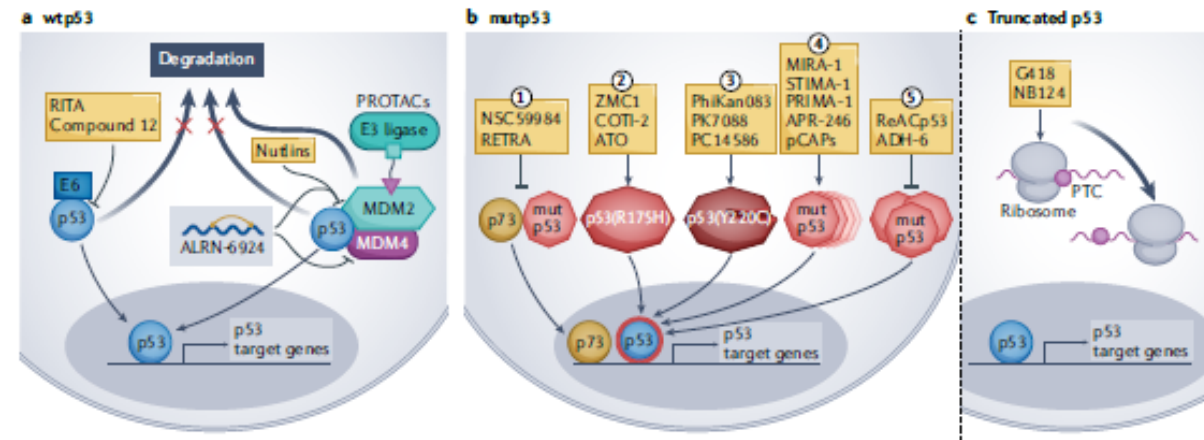


Fig. 3 | p53-based small molecules for cancer therapy. a | In p53-wild-type (wtp53) tumours, small-molecule drug development is mainly focused on inhibiting or degrading negative regulators of p53, including MDM2, MDM4 and human papillomavirus (HPV) E6. Such inhibition increases p53 protein abundance and wtp53 activity in the cancer cells, promoting the expression of p53 target genes. ALRN-6924 is a stapled peptide that blocks both MDM2-p53 and MDM4-p53 interactions. p53-activating proteolysis targeting chimeras (PROTACs) work by targeting MDM2 for ubiquitylation by particular E3 ligases, resulting in MDM2 degradation. b | In tumours expressing missense mutant p53 (mutp53) proteins, drug development aims to restore wtp53 conformation and/or inhibit gain-of-function activities of mutp53 such as inhibition of p73. From left to right: (1) small molecules such as RETRA (re-activation of transcriptional reporter activity) or NSC59984, which inhibit the interaction of mutp53 with p73, unleash p73 and enable it to enter the nucleus and transactivate target genes that partly overlap with p53 target genes. (2) Some small molecules (arsenic trioxide (ATO), ZMC1) act predominantly on structural p53 mutants (such as p53(R175H)) to restore wtp53 conformation and induce p53 target gene expression. (3) The p53(Y220C) mutant has an accessible crevice near the site of mutation, which can be targeted by small molecules to thermodynamically stabilize the mutant protein and shift it towards a wild-type-like state. (4) Many compounds (such as APR-246 and pCAPs) target a broad spectrum of p53 mutants to restore a wtp53-like structure, thus enabling p53 target gene activation (for a more detailed mechanistic description see REF¹⁶). (5) Some small molecules — such as ReAC p53 or ADH-6 — act by inhibiting mutp53 aggregation, restoring wtp53-like structure and activating p53 target genes. c | Other small molecules inhibit the recognition of premature termination codons (PTCs), enabling translational readthrough and synthesis of full-length p53 protein in cells that harbour truncating TP53 mutations. The overarching goal of all these drugs is to restore the expression of wtp53 target genes as a means to induce cancer cell death or replicative senescence, thereby curtailing tumour growth. RITA, reactivation of p53 and induction of tumour cell apoptosis.

p53

- No resulta una diana molt apropiada per a fàrmacs, ja que aquests solen actuar mitjançant la inhibició d'una excessiva activitat proteica.
- Fa algunes dècades començaren a dissenyar-se estratègies per tal de modular l'activitat de p53. De moment poques iniciatives han arribat a fases clíniques avançades i no hi ha cap que haja rebut aprovació per part de FDA o EMA.
- Una línia d'investigació es basa en la identificació de molècules menudes. En el cas de tumors amb mutacions puntuals *missense* en p53 es pretén restaurar la conformació i l'activitat de la forma mutada. En els casos en els quals es manté p53wt la idea és evitar els mecanismes d'inhibició dependents sobretot de MDM2. Hi ha uns 50 compostos d'aquests tipus en fase clínica.
- Una altra possibilitat és la **immunoteràpia**, degut a la major exposició de p53 en cèl·lules canceroses.
- L'altra estratègia és la teràpia gènica, ja siga emprant virus o nanopartícules.

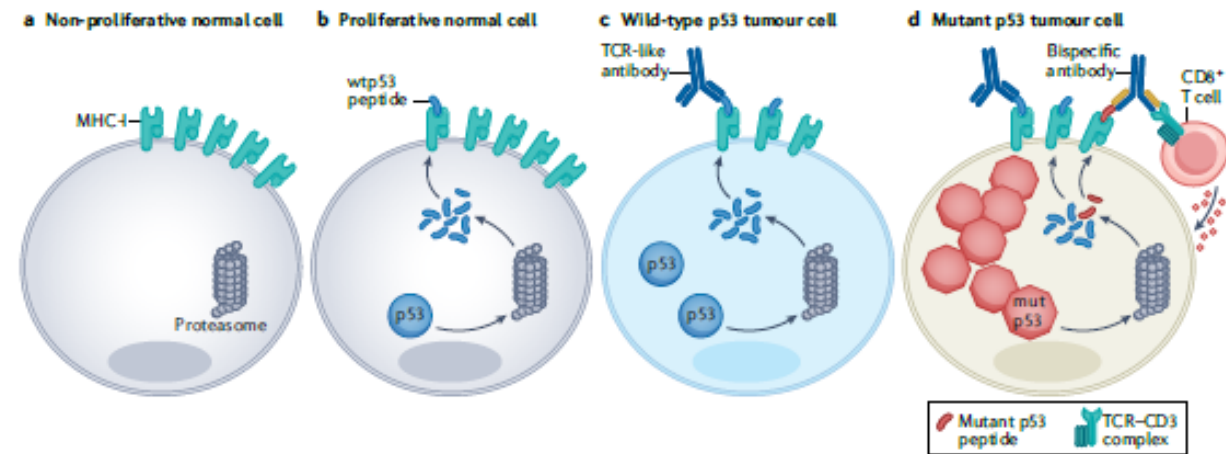


Fig. 4 | New antibody-based strategies to target p53 in cancer cells. a | In the non-proliferative compartment of normal tissues, TP53 is usually silent, and therefore cells do not produce p53 protein and do not present p53-derived peptides on their surface major histocompatibility complex (MHC) class I. b | Proliferating normal cells produce low amounts of p53 protein and present small amounts of p53-derived peptides on their MHC class I (MHC-I). c | In cancer cells expressing wild-type p53 (wt p53), oncogenic stress upregulates p53 mRNA synthesis and translation, causing a more pronounced presentation of p53-derived peptides. These differences in quantity and quality of presented peptides provide the rationale for developing antibody-based strategies to target selectively the cancer cells. T cell receptor (TCR)-like antibodies recognize p53-derived epitopes displayed on MHC-I on the cell surface, triggering an immune response. d | In cancer cells that harbour TP53 missense mutations, p53 protein levels are even more elevated; consequently, such cells may present increased amounts of peptides derived from non-mutated regions of the protein (wtp53 peptides in blue), along with neoepitopes comprising the mutated sequence (mutp53 peptide, in red). Bispecific antibodies can be engineered to recognize a neoantigen derived from mutp53 and the TCR-CD3 complex on CD8⁺ T cells, which results in selective cytotoxicity against mutp53-expressing cancer cells.

p53

- No resulta una diana molt apropiada per a fàrmacs, ja que aquests solen actuar mitjançant la inhibició d'una excessiva activitat proteica.
- Fa algunes dècades començaren a dissenyar-se estratègies per tal de modular l'activitat de p53. De moment poques iniciatives han arribat a fases clíniques avançades i no hi ha cap que haja rebut aprovació per part de FDA o EMA.
- Una línia d'investigació es basa en la identificació de molècules menudes. En el cas de tumors amb mutacions puntuals *missense* en p53 es pretén restaurar la conformació i l'activitat de la forma mutada. En els casos en els quals es manté p53wt la idea és evitar els mecanismes d'inhibició dependents sobretot de MDM2. Hi ha uns 50 compostos d'aquests tipus en fase clínica.
- Una altra possibilitat és la immunoteràpia, degut a la major exposició de p53 en cèl·lules canceroses.
- L'altra estratègia és la **teràpia gènica**, ja siga emprant virus o nanopartícules.

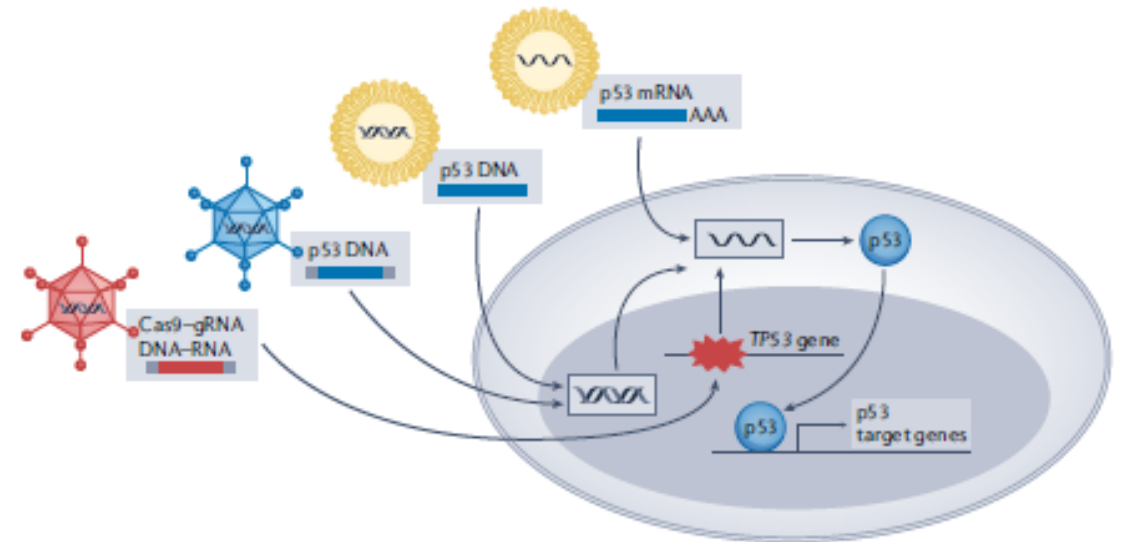
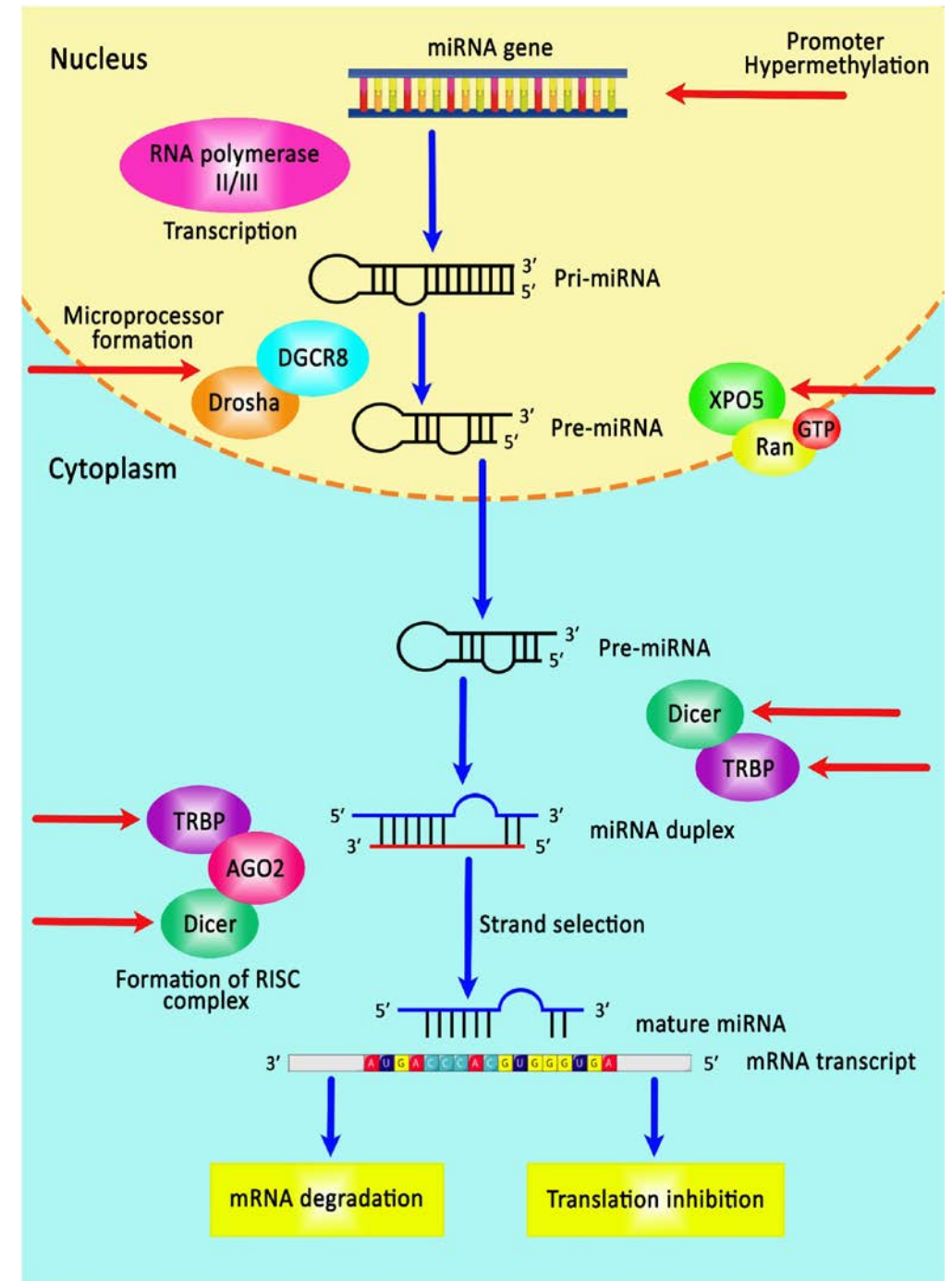


Fig. 6 | **p53-based genetic therapies.** Wild-type p53 (wtp53)-encoding DNA and RNA can be introduced into cancer cells by several approaches, including recombinant viruses and nanoparticles. This drives p53 expression and transcription of wtp53 target genes, resulting in anticancer effects. In TP53-mutated tumours, delivery of CRISPR-Cas9 together with suitable guide RNA (gRNA) might potentially enable base editing, restoring wild-type TP53 sequence.

miRNAs

- Les primeres indicacions sobre correlacions entre miRNAs i càncer s'obtingueren el 2002: es detectaren delecions recurrents en una regió codificant de miRNAs en la meitat dels pacients estudiants amb leucèmia limfocítica crònica de cèl·lules B.
- És clar actualment que la desregulació dels miRNAs és altament influent en el desenvolupament i la progressió del càncer.
- Alguns són supressors de tumors (miR-15a i miR-16-1), mentre que d'altres tenen papers oncogènics (miR-17-92 i miR-155).
- A més poden servir com a marcadors de susceptibilitat genètica a càncer.
- miRNAs extracel·lulars mitjançant comunicacions intercel·lulars poden crear un ambient favorable al creixement de les cèl·lules canceroses. És el cas de miR-200c.



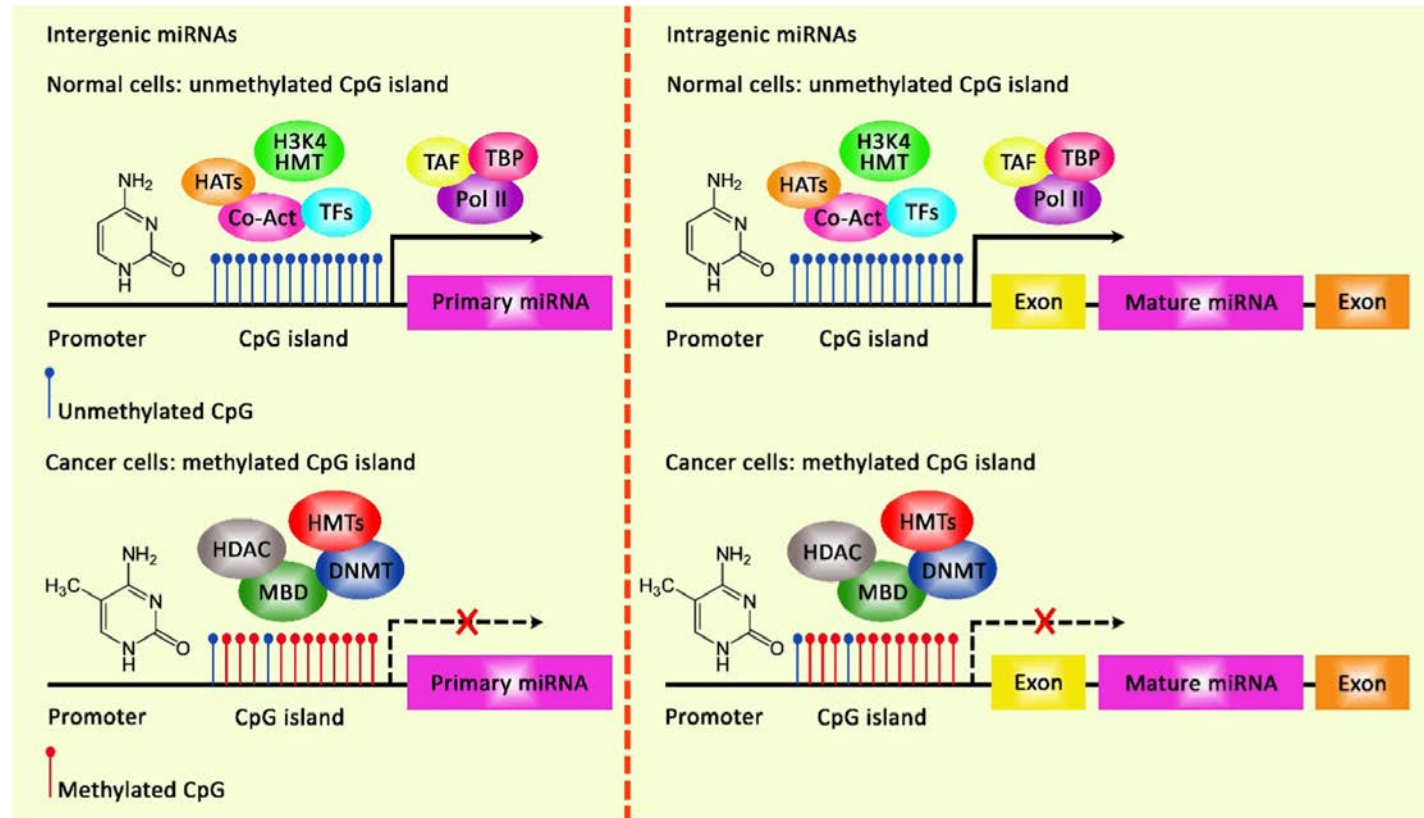
miRNAs: mecanismes que determinen expressió anormal

- Amplificació o deleció de gens de miRNAs.
- Activitat anormal de factors transcripcionals implicats en la regulació de l'expressió dels gens codificants de miRNAs (p. ex., p53 i c-Myc).
- Desregulació epigenètica (la desmetilació del DNA i la inhibició d'histona desacetilases provoca la sobreexpressió de certs miRNAs en determinats tipus de càncer):

En cèl·lules de càncer de pit s'ha observat hipermetilació de gens codificants de 10 miRNAs diferents.

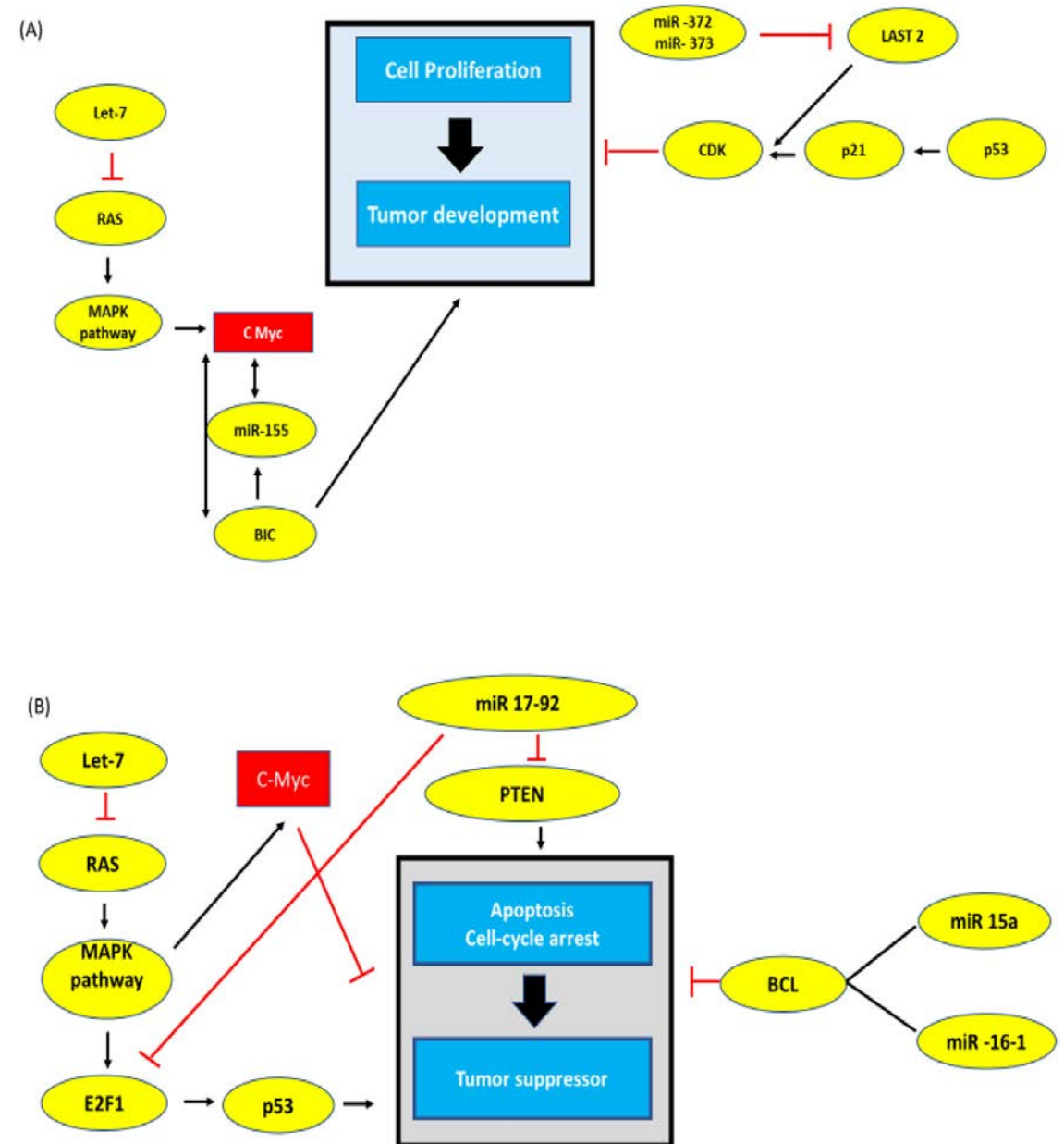
Degut a sobreexpressió de HDAC, miR-29b, miR-15a i iR-16 estan reprimits en alguns limfomes.

- Defectes en els gens implicats en la biogènesi dels miRNAs.
- Disminució en els nivells de miRNAs degut a RNA endògens competitiu (ceRNAs). Poden ser circRNAs, lncRNAs i pseudogens que contenen llocs d'unió de miRNAs (MREs) com els mRNAs diana d'aquests.



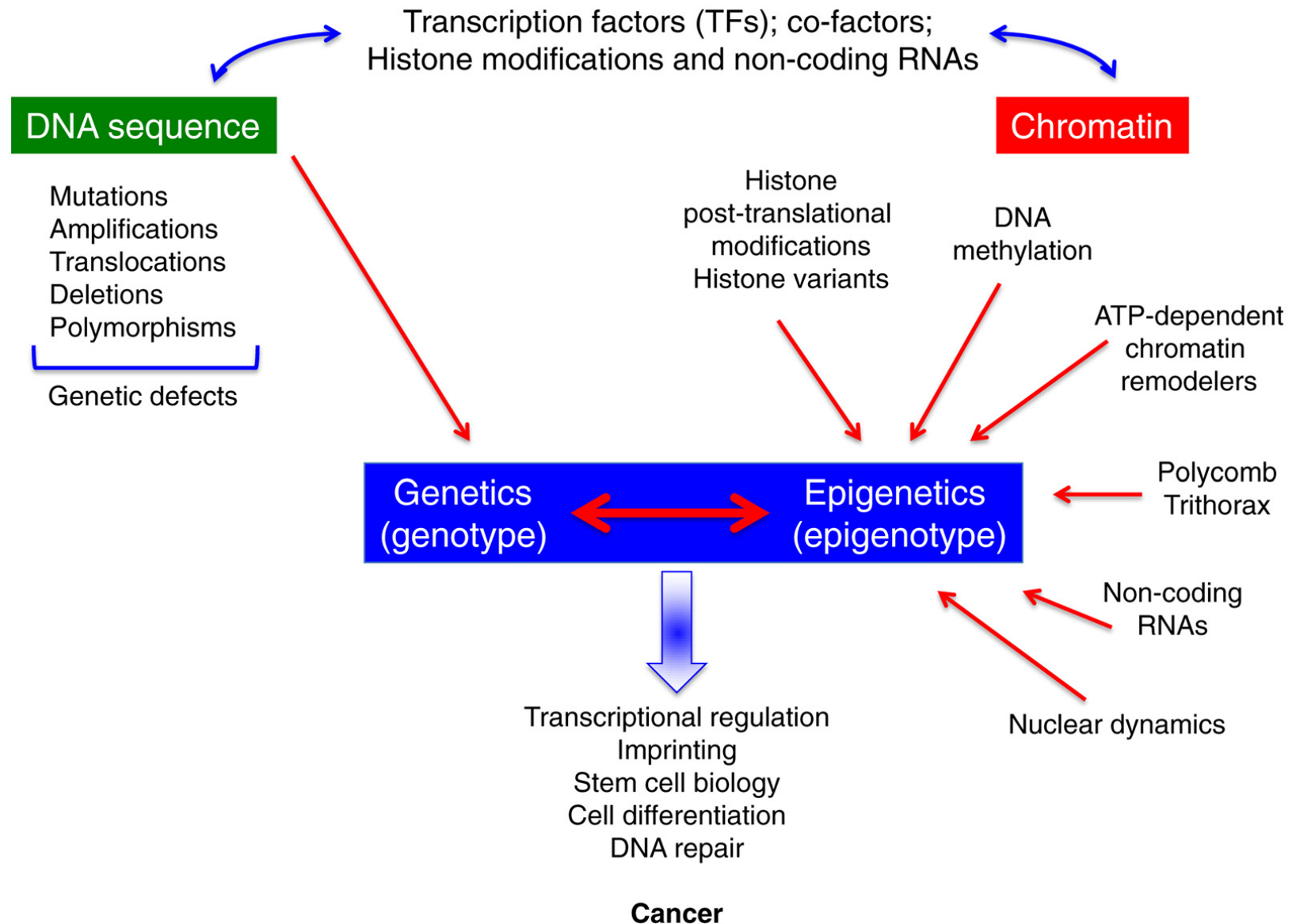
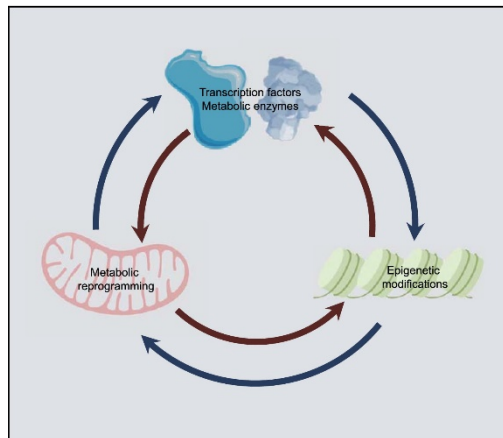
miRNAs: mecanismes moleculars de la patogènesi que impliquen miRNAs

A schematic model which shows the molecular mechanisms of cancer pathogenesis involving micro RNA. Arrow in red depicts inhibition. Abbreviations employed in the figure, BCL2: B cell lymphoma 2, an antiapoptotic gene; BIC: an evolutionarily conserved non-coding RNA; CDK: cyclin-dependent kinase; c-Myc; oncogenes; E2F1: a cell cycle transcription factor; LAST2: Large Tumor Suppressor homolog 2, a serine-threonine kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; p53: a critical tumor suppressor that is involved in most, if not all, tumorigenesis; PTEN: phosphatase and tensin homology, a tumor suppressor gene; RAS: a common proto-oncogene.



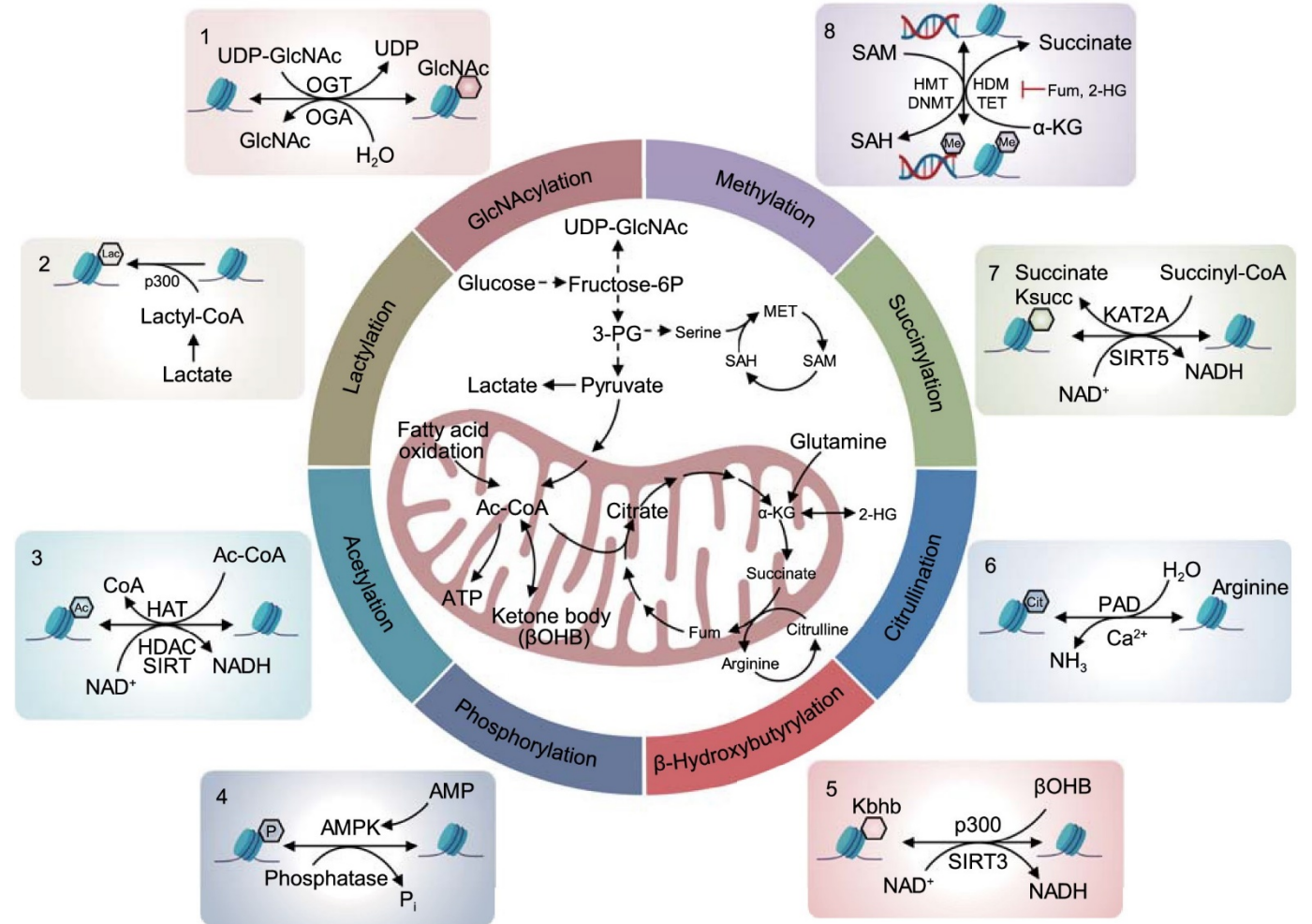
Epigenètica i càncer

- La pèrdua de l'equilibri entre metilació i desmetilació del DNA pot provocar càncer. La gradual pèrdua de la metilació del DNA amb l'envelliment pertorba en un grau important els patrons d'expressió gènica i l'estabilitat genòmica, la qual cosa contribueix a la inducció de diferents malalties, incloent-hi el càncer.
- S'ha identificat mutacions somàtiques *missense* en histones associades amb patologies com el càncer. P. ex., en regió codificant de H3 en càncer d'os o en H1 en limfomes.
- També s'ha detectat en càncers mutacions en components de complexos remodeladors de la cromatina com ara SWI/SNF.



Epigenètica i càncer

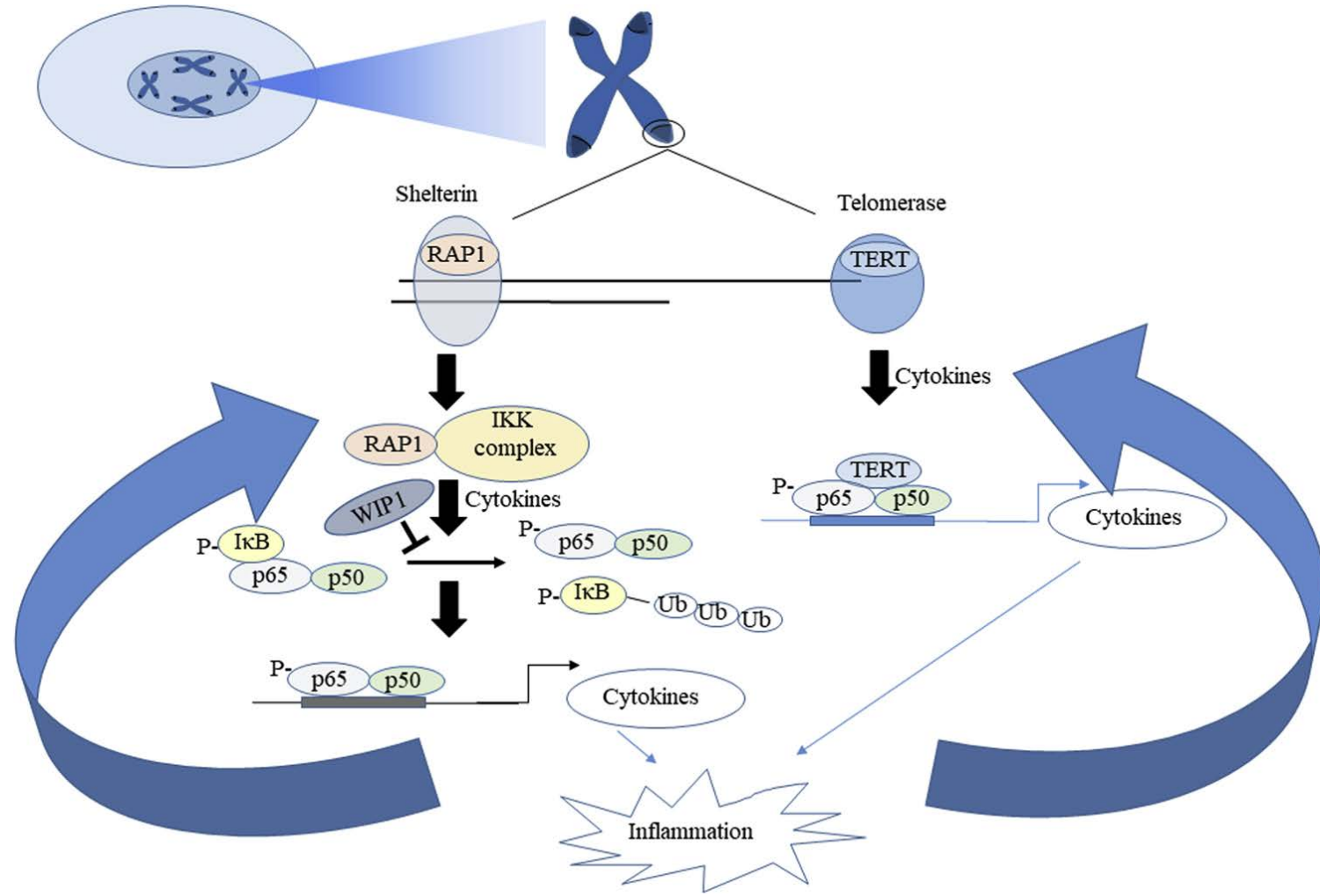
- Anormalitats epigenètiques regulen l'expressió de molts gens metabòlics, per la qual cosa desenvolupen funcions importants en metabolisme i homeòstasi redox en cèl·lules canceroses.
- El flux metabòlic està implicat en regulacions epigenètiques, en afectar la biosíntesi de macromolècules i la producció d'energia.
- Hi ha, doncs, una sinèrgia entre epigenètica i metabolisme en el desenvolupament del càncer.
- Per exemple: c-Myc regula el metabolisme de glucosa, serina i glutamina al nivell transcripcional. A més, mitjançant altres efectes, provoca la desactivació del complex succinat deshidrogenasa i, per tant, l'acumulació de succinat; aquest inhibeix l'activitat d'histona desmetilases. El resultat n'és la trimetilació de la Lys4 de H3, la qual cosa determina l'expressió de gens específics de tumors i la progressió d'aquests.



An overview of metabolic connections to epigenetic remodeling. Nutrients such as glucose, fatty acids, and amino acids are metabolized by cells to produce a variety of metabolites, such as acetyl-CoA, NAD⁺, SAM, α-KG, ATP, and succinate, which function as substrates or cofactors to modify chromatin and proteins. Specifically, 1) UDP-GlcNAc, as a donor substrate derived from the HBP pathway integrating glucose, glutamine, fatty acid (acetyl-CoA), and nucleotide metabolism (UDP), is catalyzed by OGT for GlcNAcylation modification, and OGA controls the reverse reaction. 2) Lactate generates lactyl-CoA, which contributes a lactyl group to lysine residues of histone proteins through p300, generating a novel modification called lactylation. 3) Glucose-, fatty acid-, amino acid-, and acetate-derived acetyl-CoA are widely involved in acetylation modification. Histone acetylation is catalyzed by HATs, and the reverse reaction is mediated by lysine deacetylases (HDAC and SIRT). 4) Based on the ratio of ATP:AMP, AMPK is required for the phosphorylation of histones under various stress conditions. 5) Histone lysine β-hydroxybutyrylation (Kbhbs) depends on the metabolite β-hydroxybutyrate (βOHb), which is produced by the ketone body metabolic pathway. The enzymes involved in acetylation modification mediate this reversible reaction. 6) Citrulline is categorized into two types: free citrulline from the arginine-coupled urea cycle and the guanidine dehydration of arginine residues on proteins to create citrulline residues. Histone citrullination is a PTM that converts arginine residues to citrulline via PAD enzymes, which are Ca²⁺-dependent. 7) TCA cycle-derived succinyl-CoA is the major substrate for succinylation, and the opposite reaction is mediated by KAT2A, CPT1A, and SIRT5. 8) Reversible chromatin methylation is coupled with SSP, the folate cycle, and the methionine cycle. SAM is the substrate for HMTs and DNMTs, leading to the production of SAH. Succinate, fumarate, and 2-HG inhibit the demethylases HDMs and TETs, which catalyze the demethylation reaction in an α-KG-dependent manner. In addition, NAD⁺ and NADH transitions are involved in modifications such as acetylation, β-hydroxybutyrylation, and succinylation.

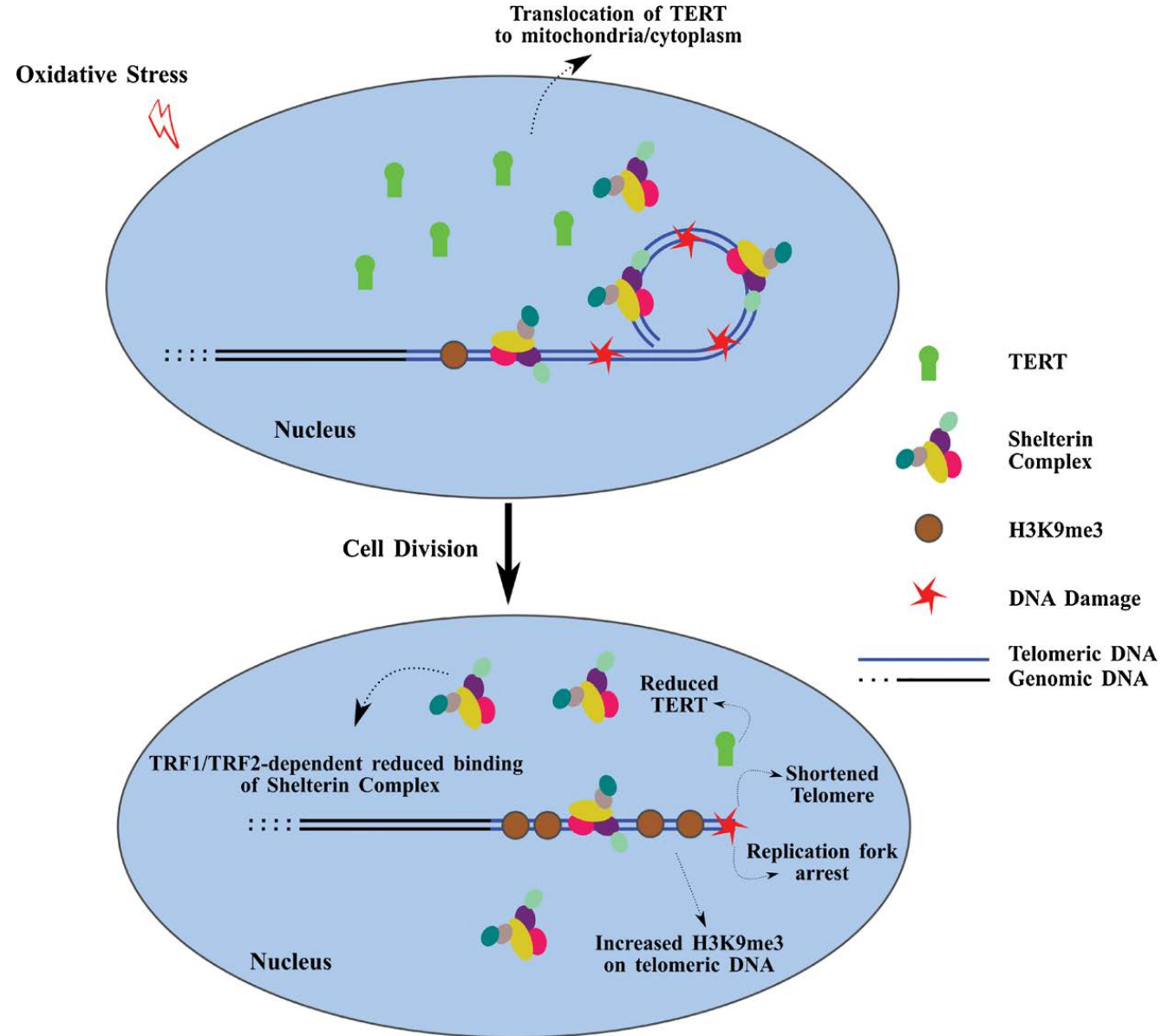
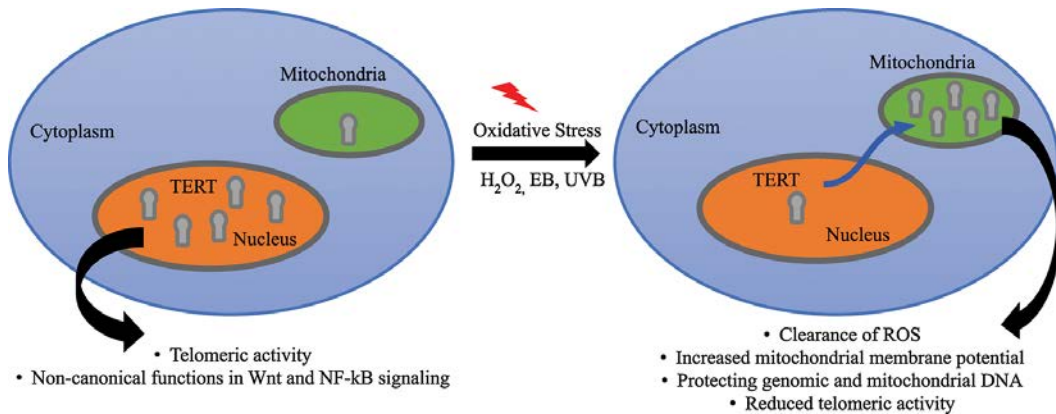
Telòmers i càncer

- La telomerasa té relació amb processos inflamatoris, estrès oxidatiu i tumorigènesi.
- La proteïna associada a la telomerasa RAP1 pot regular la inflamació a través de la seua influència en la ruta de senyalització NF- κ B. A més TERT es pot unir a p65 i reclutar promotors de NF- κ B. Finalment, la ruta NF- κ B pot activar transcripcionalment l'expressió de TERT.



Telòmers i càncer

- La telomerasa té relació amb processos inflamatoris, estrès oxidatiu i tumorigènesi.
- En condicions d'estrès oxidatiu TERT es transloca del nucli al mitocondri, on redueix ROS, millora l'eficiència mitocondrial i protegeix el DNA de mutacions. La reducció de nivells nuclears en aquestes condicions no és suficient per a mantenir la longitud dels telòmers de cèl·lules en proliferació.
- També degut a l'estrès oxidatiu, les lesions degudes a talls de cadena senzilla en els telòmers causen l'aturada de les forquetes replicatives, incrementen els senyals de metilació en H3K9 i l'acurtament dels telòmers.



Telòmers i càncer

L'activitat de la telomerasa sol ser elevada en cèl·lules canceroses.

Reactivació de TERT
en cèl·lules
canceroses per:

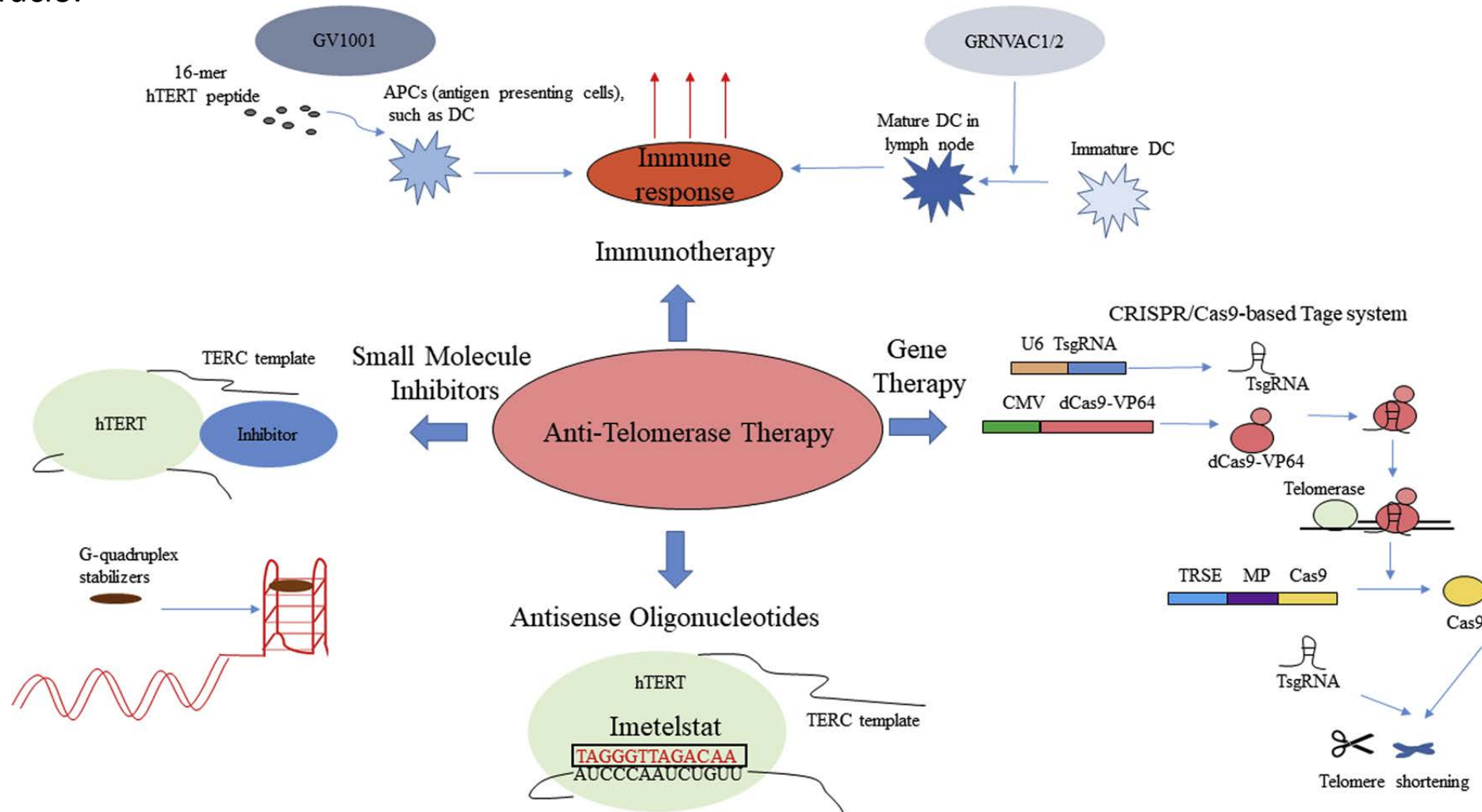
- Increment del nombre de còpies
- Amplificació gènica
- Reorganitzacions genòmiques
- Mutacions puntuals en la regió del promotor

Progressió del
càncer per:

- Activació de rutes relacionades amb oncogens, com ara MYC i PTEN/AKT
- Proliferació cel·lular (increment de nivells de tRNAs, promoció de la transició G1 a S)

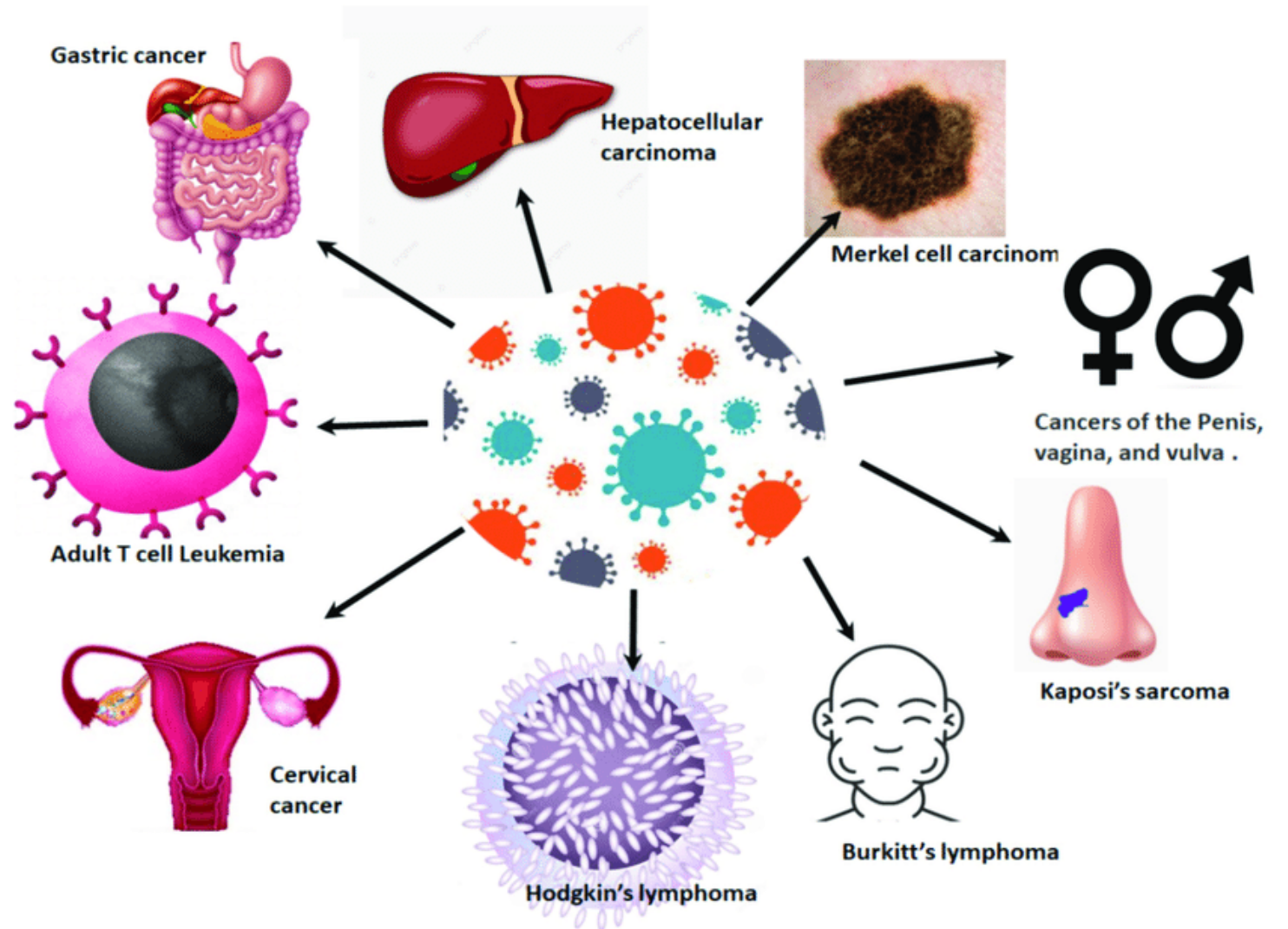
Telòmers i càncer

L'activitat de la telomerasa sol ser elevada en cèl·lules canceroses, la qual cosa la converteix en una diana terapèutica, encara que s'ha de considerar l'efecte sobre les funcions no canòniques de TERT en cèl·lules en proliferació.



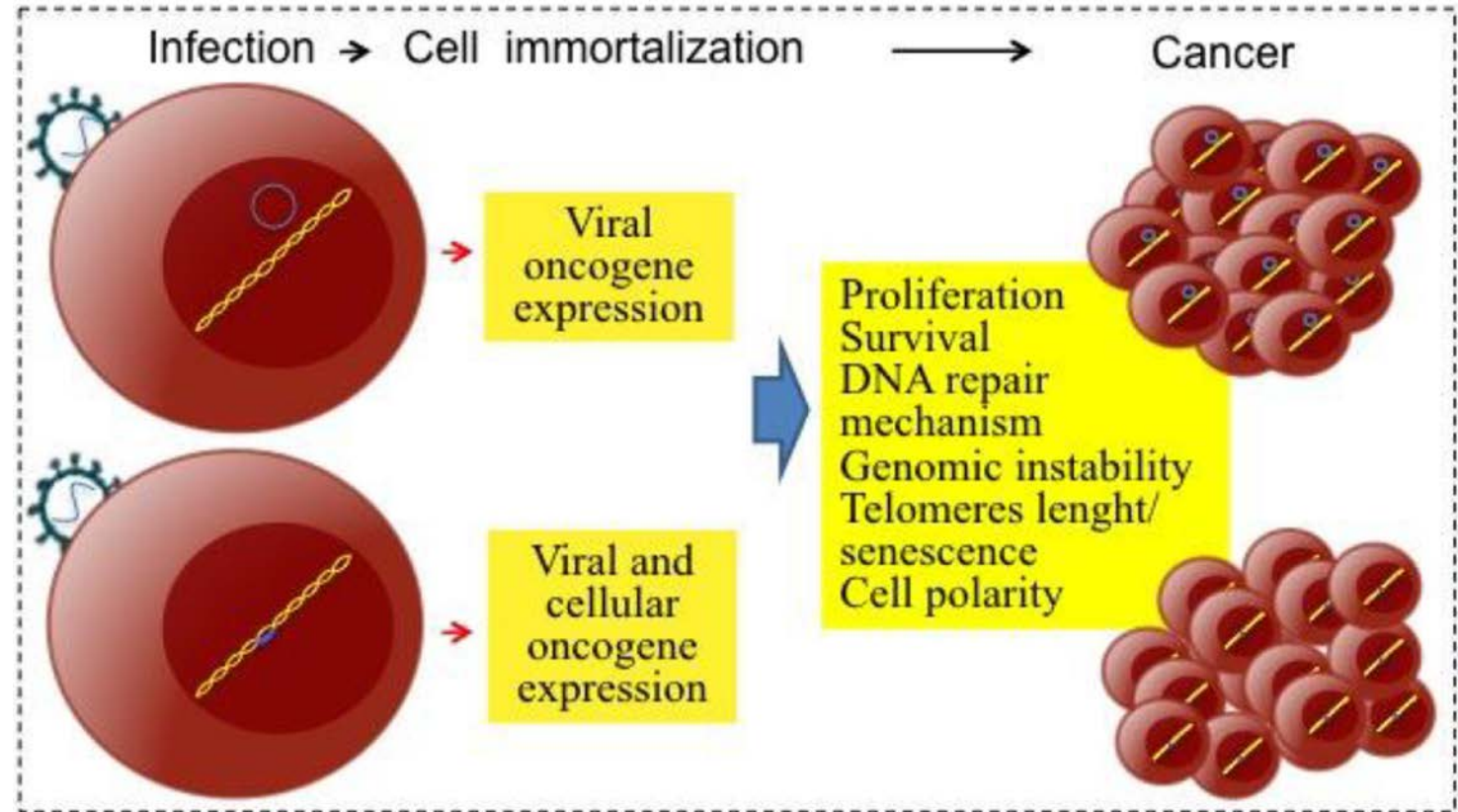
Virus i càncer

- Hi ha virus responsables de càncer en humans. Alguns exemples en són:
Hepatitis C
Virus del papil·loma humà
Retrovirus com HTLV-1



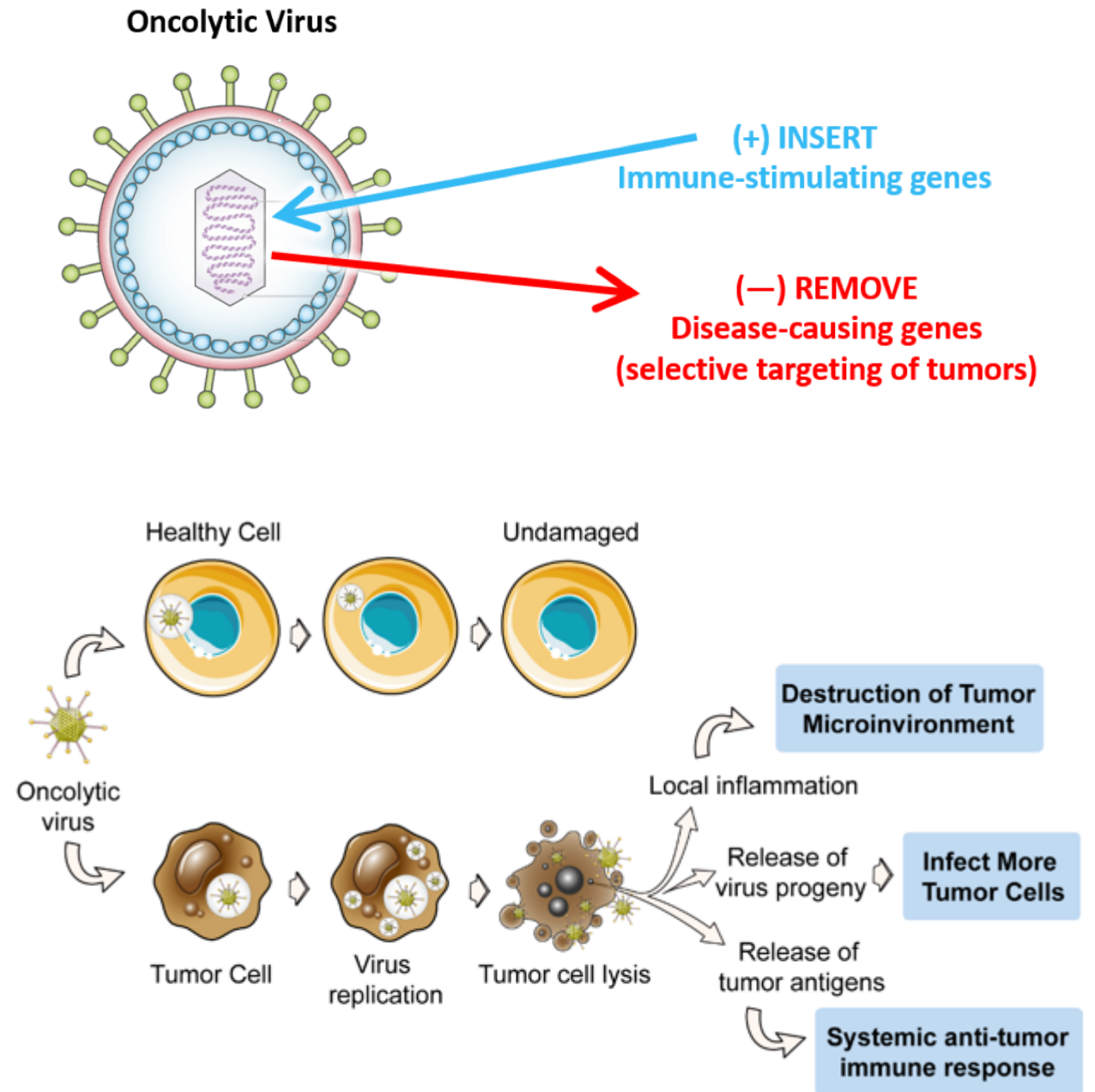
Virus i càncer

- Alguns virus sobreexpressen proteïnes que inactiven gens supressors de tumors (exemple: oncoproteïnes E6 i E7 del virus del papil·loma humà inactiven la funció de p53 i Rb respectivament).
- Sembla que en cèl·lules infectades aquests virus podrien desencadenar metilació anormal del DNA.



Virus i càncer

- També hi ha virus aliats contra el càncer (virus oncolítics), que permeten dissenyar estratègies terapèutiques basades en el seu ús.



Virus i càncer

- També hi ha virus aliats contra el càncer (virus oncolítics), que permeten dissenyar estratègies terapèutiques basades en el seu ús.

1240 Cell 176, February 21, 2019 © 2019 Published by Elsevier Inc. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.051>

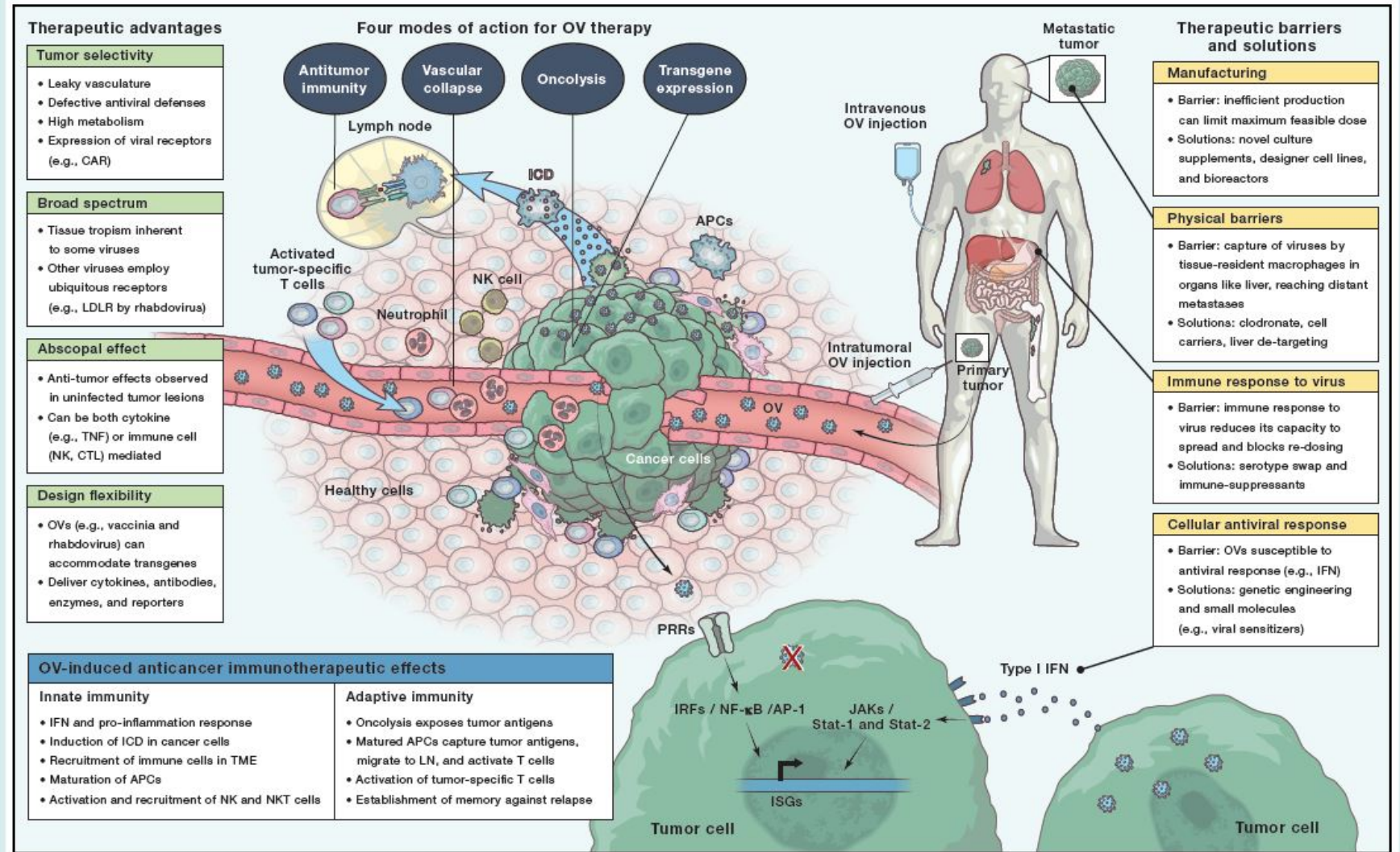
See online version for legends and references

SnapShot: Cancer Immunotherapy with Oncolytic Viruses

Shashi Gujar,¹ John Bell,^{2,3} and Jean-Simon Diallo^{2,3}

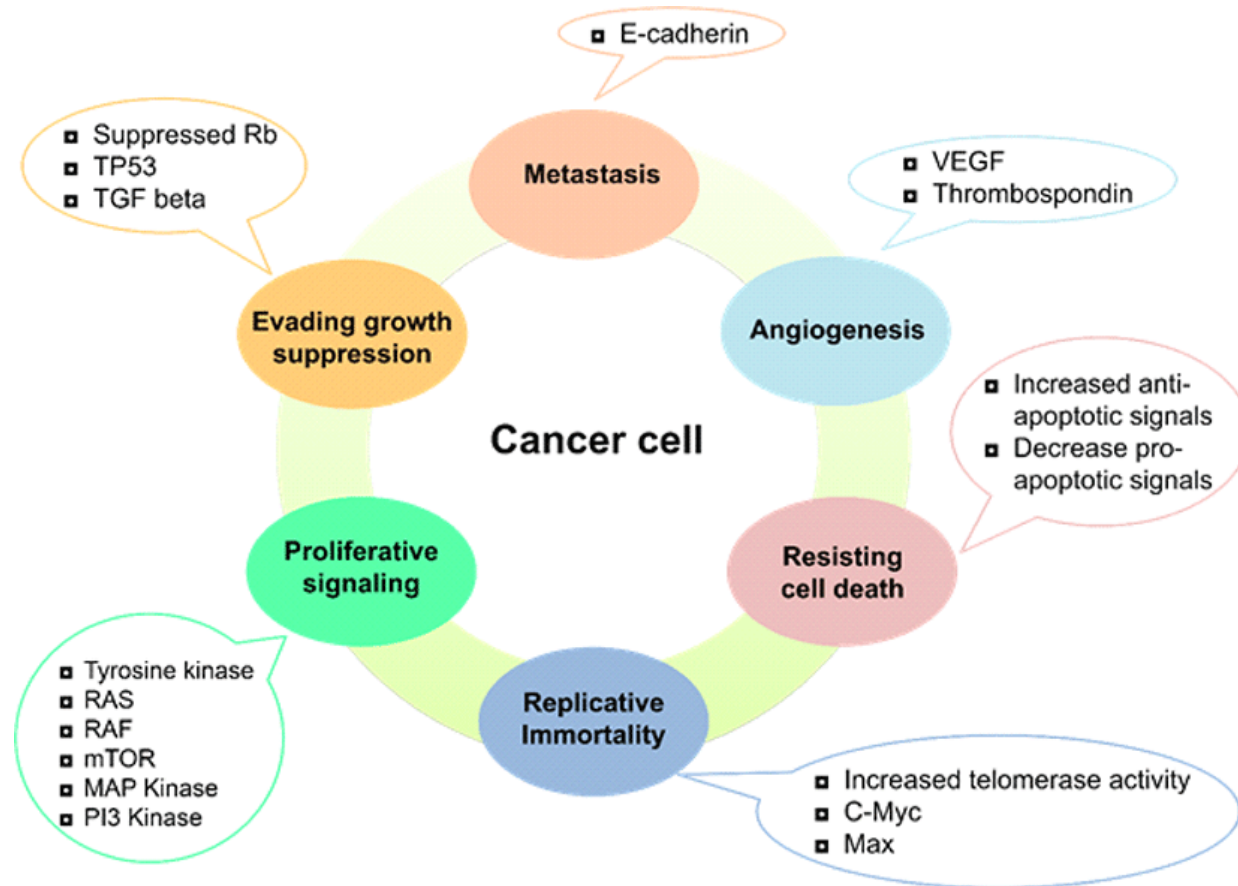
¹Departments of Pathology, Biology, and Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada; ²Departments of Medicine & Biochemistry and Microbiology & Immunology, University of Ottawa, ON, Canada; ³Cancer Therapeutics Program, Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, ON, Canada

Cell

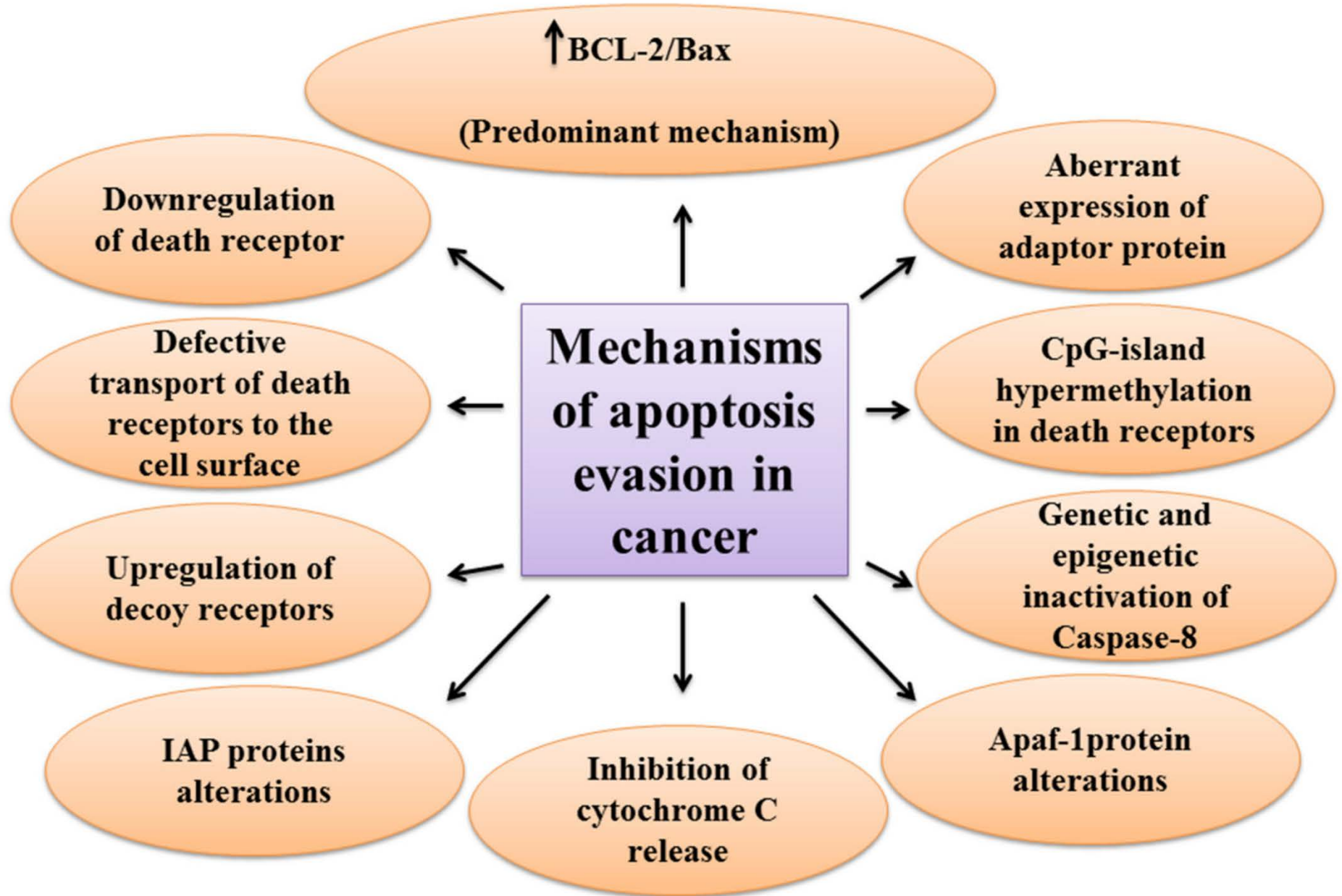


Aspectes moleculars relacionats amb la metàstasi

- En cèl·lules canceroses amb baixa agressivitat s'observen disminucions en els nivells de E-cadherina, molècula important en l'adhesió de cèl·lules normals.
- La degradació de la matriu extracel·lular, en la qual intervenen catepsina D i elastases, afavoreix la invasió per part de les cèl·lules tumorals.




Apoptosi i càncer



Les proteïnes Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) són reguladores clau de l'apoptosi. El reclutament de la proteïna citosòlica reguladora de l'apoptosi Bcl-2/Bax al mitocondri s'associa amb permeabilització de la membrana mitocondrial externa i apoptosi.

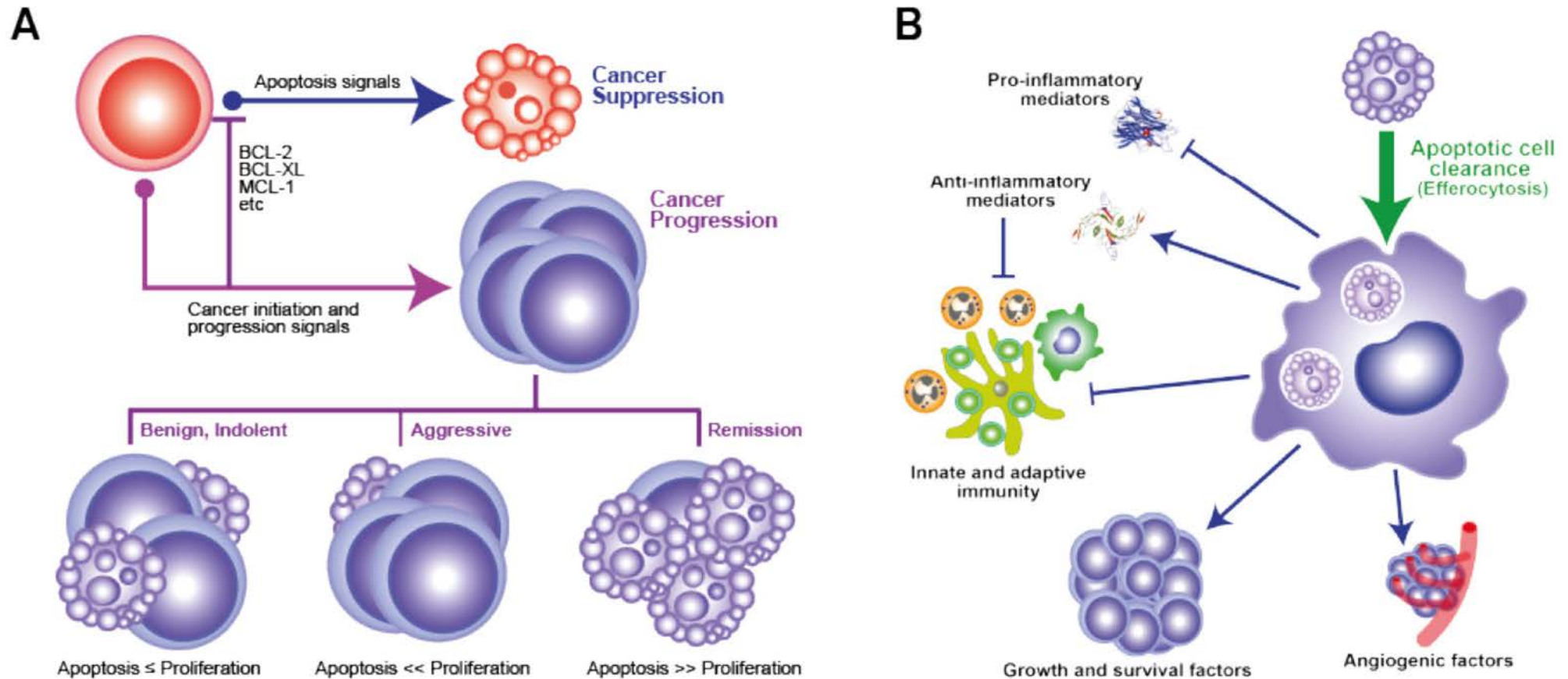
Apoptosi i càncer: la paradoxa



Com a procés cel·lular autònom, l'apoptosi té un efecte supressor de tumors i la protecció front a l'apoptosi permet la progressió de poblacions de cèl·lules malignes. És conseqüència de la inactivació de p53 o de l'activació de l'expressió de gens antiapoptòtics

L'apoptosi és una resposta fisiològica normal a molts estímuls, infeccions o danys, incloent-hi els resultants de tractament amb drogues citotòxiques o programes de radiació emprats en els tractaments contra el càncer.

Apoptosi i càncer: la paradoxa



The 'apoptosis paradox' in malignant disease (**A**): Apoptosis as a cell-autonomous process is tumour-suppressive (top, blue arrow). Protection from apoptosis (e.g., by anti-apoptotic BCL-2 family members) permits survival of mutant cells and outgrowth of premalignant or malignant populations. Fractional apoptosis within these populations, dependent upon the relative levels of proliferating and dying cells, yields different growth rates. Therapeutic efficacy is achieved when cell death exceeds cell birth (remission, bottom right). (**B**): The best-known functional programmes of phagocytes (especially macrophages) engaging in efferocytosis. All have pro-oncogenic features. Note that immune responses (shown here as suppressed) may also be stimulated by apoptotic cells in certain contexts.

QÜESTIONS DE BIOLOGIA MOLECULAR

QÜESTIONS DE TRANSCRIPCIÓ EN PROCARIOTES

1. La hipòtesi “un gen, un ribosoma, un enzim” es va posar a prova mitjançant un experiment dut a terme per Brenner, Jacob i Meselson. En el seu estudi es va fer créixer el bacteri *Escherichia coli* en un medi amb isòtops pesats i, quan les molècules ja estaven enriquides en ^{15}N i ^{13}C , s'infectaren les cèl·lules amb el fag T4 al mateix temps que es transferien en un medi amb isòtops lleugers i uridina ^3H . Posteriorment es va sotmetre a centrifugació en gradient de densitat l'extracte cel·lular procedent d'eixos bacteris. Explica quin va ser el resultat obtingut i què s'hauria trobat si la hipòtesi haguera sigut certa.
2. Quins són els substrats per a la síntesi de l'RNA? Què és el motle? Quin enzim hi participa? Necessita encebador?
3. Què és l'mRNA? En què es diferencia del transcrit primari? Què és la cadena codificant? I la cadena antisentit? Què és un RNA policistrònic? Quines parts d'una molècula d'mRNA no són traduïdes?
4. Defineix els termes següents: nucli de l'RNA polimerasa, factor sigma, holoenzim de l'RNA polimerasa, promotor i operador.
5. Quin sentit fisiològic té que els complexos inespecífics entre l'holoenzim de l'RNA polimerasa bacteriana i el DNA tinguen una vida mitjana molt inferior a la dels complexos inespecífics entre el nucli (“core”) de l'enzim i el DNA? Com es pot explicar aquesta diferència des del punt de vista de les interaccions moleculars?
6. Quina és la diferència entre complex tancat i complex obert en el promotor? Què determina el canvi d'un a l'altre?
7. Relata breument els esdeveniments que ocorren des que l'RNA polimerasa procariòtica troba un promotor fins que es produeix l'elongació de l'mRNA.
8. La caixa Pribnow és un exemple d'allò que s'anomena “seqüència consens”. Què ens pot indicar des del punt de vista bioquímic i evolutiu aquesta seqüència consens? Quines diferències bioquímiques esperaries entre seqüències que difereixen només lleugerament en les bases no conservades?
9. L'RNA polimerasa no presenta l'activitat exonucleasa 3'-5' característica de la DNA polimerasa, però té altres activitats o capacitats que no mostra aquesta. Podries anomenar-ne dues?
10. Per què no es necessiten proteïnes d'unió a DNA de cadena senzilla (SSB) en la transcripció?
11. Es mescla holoenzim RNA polimerasa purificat a partir d'*E. coli* amb DNA en presència dels 4 rNTPs. Els RNAs produïts presenten una àmplia varietat de grandàries i una distribució pràcticament contínua d'aquests. Si s'afeg una quantitat menuda d'un

extracte cel·lular sense activitat RNasa, apareixen fragments de menor grandària i distribució discreta. Què conté molt probablement l'extracte?

12. Distingeix entre regulació positiva i negativa.

13. Quin és el significat de: reprimint, induït i constitutiu?

14. La regulació de l'expressió gènica en procariotes és fonamentalment transcripcional o postranscripcional? En quines etapes de la síntesi d'RNA s'exerceix la regulació de la transcripció?

15. Quin tipus de fenotip tenen tots els mutants en l'operador d'un operó procariota?

16. En una soca d'*E. coli* $i_z^+y^+$ creixent en lactosa com a font de carboni, què ocorrerà en afegir glucosa?

17. En un diploide $I^- Z^+ Y^- / I^- Z^+ Y^+$, es produirà β -galactosidasa de manera induïble? Podria créixer en lactosa com a única font de carboni? I en un $I^+ Z^+ Y^- / I^- Z^- Y^+$?

18. Explica què ocorrerà amb l'expressió de l'operó triptòfan en les condicions següents: presència de glucosa i de triptòfan, absència de glucosa i de triptòfan, presència de triptòfan i absència de glucosa.

19. Per què els promotors procariotes no són palindròmics?

20. En una soca d'*E. coli*, amb un operó *Lac* funcional, s'ha introduït un plasmidi amb una regió de DNA que inclou l'operador d'aquest operó. La síntesis de β -galactosidasa passa a ser constitutiva. Com ho pots explicar?

21. Analitza detingudament la figura inferior sobre la regulació de l'operó arabinosa.

a) Quina creus que és la funció dels gens estructurals d'aquest operó?

b) Quin tipus de circuit de regulació presentaria? Per què?

c) Creus que estaria sotmès a algun altre tipus de control transcripcional?

22. OxyR és una proteïna procariota d'unió a seqüències específiques del DNA situades en la proximitat de promotors de gens o operons que expressen proteïnes implicades en la detoxificació d'espècies reactives de l'oxigen.

- a) Com creus que s'unirà OxyR a les seues seqüències de reconeixement?
- b) Quin paper desenvoluparà en l'expressió d'aquests gens?
- c) Suggereix un mecanisme que explique com OxyR pot modular l'expressió d'aquests gens només en situacions de dany oxidatiu.

QÜESTIONS DE TRANSCRIPCIÓ EN EUCARIOTES

1. L'RNA polimerasa té una k_M per als rNTPs major en inici que en elongació. Quina importància té això per a la regulació de la transcripció?
2. El factor transcripcional A té un paper central en la prevenció i reparació del dany oxidatiu provocat per exposicions a aigua oxigenada. S'uneix al promotor dels gens implicats en aquesta resposta. A és un activador i exerceix un control positiu sobre la transcripció. A més, funciona com a sensor del dany oxidatiu. Explica com actua (com afavoreix l'expressió d'aquests gens en resposta al dany oxidatiu).
3. En el genoma nuclear d'una cèl·lula eucariota coexisteixen tres tipus de gens transcrits per RNA polimerases diferents. Què determina que cadascun siga transcrit per una polimerasa específica?
4. Podries donar una explicació molecular al fet que, *in vitro*, el factor transcripcional TFIIA tinga afinitat per l'rRNA 5S?
5. Entre els gens d'eucariotes els de les histones tenen com a peculiaritat que no contenen introns i els seus mRNAs no tenen cua poliA. A més, en quasi tots els eucariotes els gens de les histones estan disposats en múltiples dominis en tàndem, de manera que cada domini porta una còpia de cadascun dels 5 gens de les histones. Suggerix una explicació per a aquestes característiques en base a les necessitats especials de la síntesi d'aquestes proteïnes.
6. Les tècniques modernes d'enginyeria genètica permeten la introducció de gens d'un organisme en un altre. a) Els gens animals no sempre es transcriuen en *E. coli* i la transcripció és molt més segura en llevat. Per què? b) En alguns casos (si s'introdueix junt amb el gen un promotor d'*E. coli*), la transcripció pot ocórrer però no sempre se sintetitza la proteïna. De nou la síntesi de la proteïna és més eficaç en llevat. Per què?
7. S'ha postulat recentment que l'origen evolutiu de l'embolcall nuclear en eucariotes rau en la necessitat de fer compatible un mecanisme lent del processament d'introns amb una traducció molt més ràpida de l'mRNA. Comenta algun motiu que pugui fonamentar aquest postulat.
8. Tenint en compte tot allò que has estudiat al llarg d'aquest apartat del programa, què esperaries trobar en mutants que tingueren afectat: a) l'inici de la transcripció, b) la formació de l'extrem 3' de l'mRNA (tall i poliadenilació), c) l'estabilitat de l'mRNA?
9. Comenta dos processos postranscripcionals i previs a la traducció que podrien produir variabilitat pel que fa al producte proteic final d'un gen eucariòtic.
10. Per què el mediador i els modificadors de nucleosomes són necessaris per a assolir nivells elevats de transcripció en cèl·lules eucariotes però no *in vitro*?
11. Quines etapes en el cicle de transcripció eucariota són estimulades per fosforilació del domini CTD de la subunitat gran de l'RNA polimerasa II?

12. Pretens marcar radioactivament l'extrem 5' d'un mRNA mitjançant l'addició de la caputxa. Hauràs de fer servir α -, β - o γ - ^{32}P GTP en la teua reacció de formació de la gorra? Justifica la resposta.

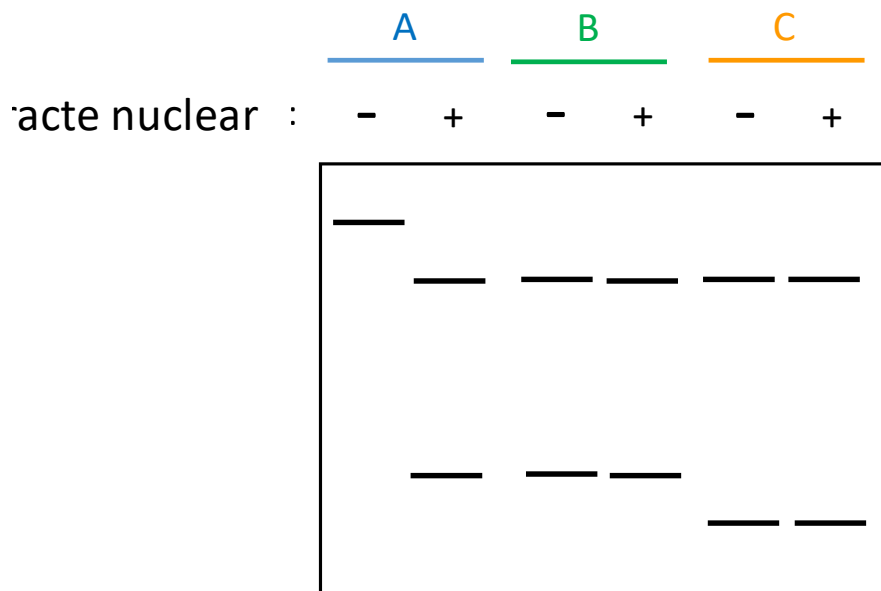
13. En què difereix la funció de la poli(A) polimerasa de la de l'RNA polimerasa?

14. Tenint en compte que les dues reaccions clau durant el procés d'eliminació d'introns poden ocórrer en direcció directa o inversa, com s'evita *in vivo* la reversibilitat?

15. Explica els efectes que tindria respecte d'interaccions intermoleculares i desenvolupament del procés d'eliminació d'introns que la seqüència del lloc 5'ss es modificara de 5'-GUAAGU-3' a 5'-GUAUGU-3'.

16. Descriviu el producte d'una reacció de processament en la qual l'espliceosoma reconeguera un "pseudo" 3'ss dintre l'intró en comptes del lloc 3'ss real. S'hi veuria afectada la traducció?

17. Pretens comparar en un experiment bioquímic els productes de reaccions d'eliminació d'introns de tipus I, II i controlades per l'espliceosoma. En tots els casos utilitzes com a substrat un intró rodejat per dos exons i d'una grandària molt similar. Cada substrat està marcat de manera que pugua ser detectat mitjançant electroforesi en gel. Dus a terme dues condicions de reacció: sense extracte nuclear (-) i amb extracte nuclear (+). Indica quin tipus d'intró es correspon amb els resultats marcats com a A, B i C en la figura. Per simplificació només es mostren els productes finals de la reacció de processament, però abans de la degradació dels introns.



18. Per què el gen *lacZ* d'*E. coli* s'utilitza sovint com a gen reporter en cèl·lules de *S. cerevisiae* però no en cèl·lules d'*E. coli*?

19. Explica quina funció desenvolupa la metilació del DNA en l'expressió gènica en cèl·lules de mamífer. En què difereix respecte d'*E. coli*?

QÜESTIONS DE TRADUCCIÓ

1. La colicina E3 és un inhibidor proteic molt efectiu de la síntesi de proteïnes en procariotes. Es tracta d'una nucleasa que ataca específicament un enllaç fosfodièster prop de l'extrem 3' de l'rRNA 16S. Suggereix un mecanisme que explique l'efecte de la colicina sobre la traducció.
2. La Gly-tRNA sintetasa és un enzim que no necessita mecanisme de correcció d'errors. Per què?
3. S'ha identificat un nou antibiòtic molt efectiu contra una determinada malaltia bacteriana. Com podries comprovar quina etapa de l'expressió gènica és la que s'hi veu afectada en la seua presència?
4. Una empresa biotecnològica està interessada a poder introduir aminoàcids modificats químicament en posicions determinades en les proteïnes. Amb aquesta finalitat pretenen realitzar transcripció *in vitro* de l'mRNA de la proteïna que es desitja modificar. Totes les proteïnes sintetitzades han d'incorporar l'aminoàcid modificat. Comenta tots els aspectes que han de considerar per tal d'abordar aquest problema.
5. Un investigador vol expressar el gen de l'actina de *Paramecium* en *E.coli*. Aquest gen no té introns. Construeix un gen recombinant amb tota la regió transcribible del gen, obtinguda per PCR, sota el control d'un promotor funcional d'*E.coli* en un plasmidi, amb el qual transforma aquest organisme. La soca resultant no produeix actina. Quins problemes hi pot haver hagut?
6. De quina o quines maneres es pot evitar que quan el ribosoma arribe a un triplet d'aturada es produïska la terminació de la traducció?
7. Quina creus que és la raó per la qual hi ha molts antibiòtics naturals que actuen al nivell del procés de traducció?
8. Quin significat fisiològic té que l'activitat GTPasa d'EFTu-aa-tRNA estiga accelerada pel ribosoma?
9. L'anàlisi del DNA que conté l'ORF d'una proteïna d'interès però molt làbil assenyalava que hi ha una altra pauta de lectura a continuació que afegiria un extrem C-terminal a la proteïna d'interès; aquesta modificació resultaria en una molècula més estable. Explica de quina o quines maneres podríem aconseguir la forma proteica més estable.
10. Certes mutacions puntuals en l'ORF d'un gen es poden corregir mitjançant una altra mutació puntual en un altre gen. Com s'anomena aquest fenomen genètic? Quina és la seua explicació molecular? És innocu per a l'expressió de la resta de gens?
11. IRP és una proteïna que uneix ferro i regula de manera coordinada la traducció de la ferritina i la del receptor de la transferrina. **a.** Quins efectes té sobre la taxa de traducció d'aquestes dues proteïnes? (activació/inhibició). **b.** A quina seqüència s'uneix? On està localitzada eixa seqüència? **c.** Quin mecanisme de regulació actua en cada cas (bloqueig de l'elongació, activació de la poliadenilació, activació de l'elongació, estabilitat de

l'mRNA, bloqueig de l'inici de la traducció, inhibició d'eIF2)? **d.** Explica quin és el significat fisiològic de la regulació per ferro de la traducció de les dues proteïnes.

12. Quin o quins avantatges pot suposar per al funcionament de les proteïnes el fet que la naturalesa haja seleccionat estructures relativament poc estables com a conformació nadiua d'aquestes?

13. La major part de les proteïnes que constitueixen la maquinària implicada en la biosíntesi de proteïnes en cèl·lules procariotes es produeixen en quantitats equimolculars en la cèl·lula. Per tal d'aconseguir això es fan servir dos mecanismes. En primer lloc moltes d'aquestes proteïnes són codificades en mRNAs policistrònics. La segona estratègia s'anomena regulació autògena. Explica els dos mecanismes. Com podries explicar que es pugui afectar la regulació de la traducció per la mutació de només algun dels cistrons de l'operó i no de tots els altres que en formen part?

14. El gen *flhA* d'*E. coli* codifica una proteïna relacionada amb la resposta a l'estrès oxidatiu. L'expressió d'aquest gen es pot bloquejar mitjançant l'expressió d'un altre gen menut de 109 nt, *oxyS*. Com pot actuar aquest gen? Com podries comprovar el seu mecanisme d'acció?

15. Què diferencia els aminoàcids glutàmic, triptòfan o treonina d'hidroxiprolina, cistina o acetil-lisina?

16. Una proteasa intracel·lular presenta en la seua estructura un N-glicà dels anomenats rics en manosa i una de les seues manoses durant cert període de la seua maduració té un grup fosfat. La localització final de la forma madura és un orgànul membranós. **a.** És probable que en la proteïna recent sintetitzada existisca una regió d'uns 20 aminoàcids amb predomini de residus hidrofòbics? Seria probable que tinguera més d'una d'aquestes regions? Justifica la resposta. **b.** Quin seria el destí probable d'aquesta proteïna si per algun tipus d'accident no adquirira el grup fosfat de la manosa? Per què?

17. Com és possible que un mecanisme general de bloqueig de la traducció com la fosforilació d'eIF2 afavorisca la síntesi de Gcn4? Té significat fisiològic?

18. En molts casos les regions 5'UTR (no traduïbles) dels gens tenen pautes de lectura obertes (ORFs) menudes. Al llarg del programa hem vist que aquestes ORFs menudes poden tenir un paper regulador en l'expressió del gen corresponent, a diferents nivells.

- Quins dos exemples hem estudiat en classe?

- Indica quina etapa de l'expressió gènica es regula en cada cas.

- Aquestes dues formes de regulació de l'expressió gènica, ocorren indistintament en procariotes i en eucariotes?

19. Com pots explicar que la regulació de la síntesi de globina, una proteïna específica, tinga lloc mitjançant una modificació d'un factor traduccional general com eIF2?

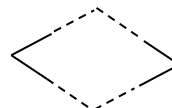
QÜESTIONS DE REPLICACIÓ

1.- L'experiment de Sueoka i Yoshikawa va permetre demostrar l'origen fix de replicació en el genoma de *Bacillus subtilis*. En el resultat que obtingueren "la relació entre les freqüències de transformació dels gens *Ade* i *Met* (per tant *Ade/Met*) evolucionava, tot i disminuint des de 2.09 –al principi de la corba de creixement– fins 1.02 –al final. Les mateixes dades per a la parella de gens *His* i *Met*, tanmateix, evolucionaven des de 1.55 fins a 1.01".

- Per què creus que el valor final és similar en ambdós casos (1.02 i 1.01)?
- Què et suggereix el valor de 2.09 (i no 2.00)?
- En un cercle que represente el genoma de *B. subtilis* dibuixa la posició aproximada que tindrien els gens *Ade*, *Met* i *His*.

2.-La replicació bidireccional del DNA eucariòtic s'ha demostrat mitjançant marcatge amb timidina tritiada i observació del DNA en autoradiografia. El resultat es mostra en la figura inferior.

- Com seria l'autoradiografia si la replicació fora unidireccional?
- Quin seria l'aspecte si hi haguera nombroses unitats de replicació unidireccional?



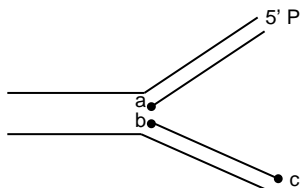
3.- Indica si les afirmacions següents són vertaderes o falses:

- En la síntesi de DNA l'enllaç es forma entre un grup 3'OH i un 5'P.
- L'enzim responsable de la replicació de la major part del DNA en *Escherichia coli* és la DNA polimerasa I.
- Una cadena senzilla de DNA pot ser copiada en presència dels quatre dNTPs i la DNA polimerasa III.
- Si s'afeg la DNA polimerasa I als quatre dNTPs sense un motle de DNA, se sintetitza DNA però amb seqüència a l'atzar.
- Un encebador d'RNA ha de ser complementari en seqüència de bases a alguna regió del DNA per a poder iniciar la síntesi de DNA.

4.- Si un dels següents enzims o activitats enzimàtiques no hi és present no és possible afegir ni tan sols un nucleòtid en la forqueta de replicació. De quin enzim o activitat enzimàtica es tracta?

- Activitat polimerasa de la DNA polimerasa I
- Activitat exonucleasa 5'-3' de la DNA polimerasa I
- DNA polimerasa III
- DNA ligasa

5.- Indica quin és el grup químic (3'-P, 5'-P, etc.) en els llocs de la figura marcats com a, b i c.



6.- El gen *dnaE* codifica la polimerasa que replica el DNA en *E. coli*. Els mutants coneguts en aquest gen són termosensibles: la replicació és normal a 30°C, mentre que a 42°C no hi ha síntesi de DNA.

- a) Suposa que en un cultiu de cèl·lules es marca el DNA en síntesi amb timidina tritiada. Transcorregut un cert temps aquesta s'elimina i es transfereixen les cèl·lules a 42°C. Què passarà amb els fragments precursors durant el període a 42°C?
- b) Esperaries trobar fragments precursors radioactius en un mutant *dnaE*⁻ crescut a 42°C en presència de timidina tritiada?

7.- Per què l'activitat de la majoria de nucleases i de polimerases és inhibida per l'addició d'un agent quelant com l'EDTA?

8.- Si una molècula de DNA lineal es replica formant una estructura en Y, quines propietats del DNA i de la DNA polimerasa d'*E. coli* determinen que ambdues cadenes no puguin replicar-se per creixement en la mateixa direcció? Com soluciona la cèl·lula aquest problema?

9. Si el genoma d'*Escherichia coli* té 4.7×10^6 pb i els fragments d'Okazaki tenen una grandària aproximada d'entre 1-2 kb:

- a) Per què durant la cerca de la DNA polimerasa responsable de la seua replicació *in vivo* es considerarà com a requisit que fora capaç de copiar 1000 nucleòtids/segon?
- b) Quant de temps necessita un fragment d'Okazaki per a replicar-se?
- c) Quants fragments d'Okazaki es generen en un cicle de replicació?

10. Per què quan es duen a terme polsos curts amb timidina tritiada en experiments de replicació del genoma bacterià sembla que la replicació siga discontinua i no semidiscontinua?

11.- En els primers estudis sobre les propietats dels fragments d'Okazaki s'observà que aquests podien hibridar amb les dues cadenes parentals del cromosoma d'*Escherichia coli*. Aquest resultat es va considerar una evidència de replicació discontinua en les dues cadenes de la forqueta replicativa. En realitat aquesta conclusió està invalidada per una característica de la replicació en aquest i en la majoria de sistemes. Quina és aquesta característica? Per què invalida la conclusió?

12.- El pas de DNA de cadena senzilla (DNAss) a doble cadena (DNAds) en un virus descobert recentment és inhibit per rifampicina (inhibidor de l'RNA polimerasa) i per cloramfenicol (inhibidor de la síntesi de proteïnes). Què podries deduir en relació amb la maquinària enzimàtica implicada en la síntesi de l'encebador d'RNA necessari per a aquest pas?

13.- Un experiment molt interessant dut a terme en els anys 1960 fou la conversió enzimàtica *in vitro* d'una molècula de DNA circular del fag ϕ X174 en un cercle de doble cadena covalentment tancat mesclant el DNAss amb els quatre dNTPs, DNA polimerasa I altament purificada i un extracte cel·lular altament purificat que no contenia proteïnes funcionalment actives. Si es dialitzava l'extracte, la polimerització no ocorria. Què contenia l'extracte?

14.- Com podries explicar que la velocitat de reacció *in vitro* de la DNA ligasa de T4 (mesurada com el nombre d'unions per molècula i minut) estiga inhibida per concentracions elevades d'ATP?

15.- Quina de les següents seqüències d'enzims o activitats enzimàtiques és, probablement, més usada per a unir dos dels fragments precursors? Assumeix que els dos fragments ja estan sintetitzats.

- a) Polimerasa I (exonucleasa 5'-3'), polimerasa I (polimerasa), ligasa
- b) Polimerasa I (exonucleasa 5'-3'), polimerasa III, ligasa
- c) Ribonucleasa, polimerasa III, ligasa
- d) Primasa, polimerasa I, ligasa.

16.- a) Tant les helicases com les proteïnes SSB desplacen l'equilibri

DNAds ===== DNAss cap a la dreta. Podem dir, aleshores, que les SSB tenen activitat DNA helicasa?

b) Les DNA helicases desenvolupen DNAds. Les DNA topoisomerases també poden ser enzims desenvolupants. Són topoisomerases les helicases? Són helicases les topoisomerases?

17.- En la taula següent es mostren algunes propietats de certs gens (i dels seus productes) en *E. coli*. Identifica'ls raonadament.

Gen/proteïna	Fenotips del mutant	Nre. molècules de proteïna/cèl·lula	Activitat enzimàtica
A	Parada ràpida	20	No activitat enzimàtica
B	Parada lenta	50	ATPasa dependent de DNA
C	Parada ràpida	800	Sense activitat enzimàtica
D	No essencial. Creixement lent	400	DNA polimerasa

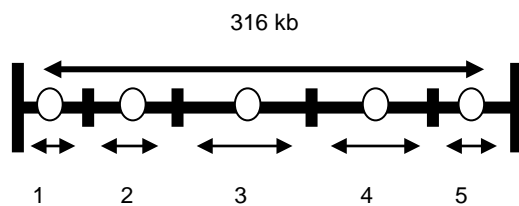
18.- Quin seria l'efecte de cadascun dels següents mutants d'*Escherichia coli*?

- a) *dnaA*⁻
- b) *dnaB*⁻
- c) *dnaC*⁻
- d) *dnaE*⁻
- e) *dnaG*⁻
- f) *polA*⁻
- g) *polB*⁻
- h) *lig*⁻

19.- El cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae* té 316 kb (vegeu la figura adjunta). Si suposàrem que només existeixen les cinc seqüències ARS marcades com a cercles en el cromosoma, assenjala amb fletxes que indiquen la direcció d'avançament de la forqueta, les zones del cromosoma replicades a partir de cada origen de replicació, en cadascun dels casos següents:

- a) Si els cinc ARS són funcionals i la replicació s'inicia simultàniament en tots els orígens
- b) Si 1 i 3 comencen a replicar a temps 0, però 2, 4 i 5 ho fan a t = 3 min
- c) Si només són funcionals els ARS 1 i 3, i comencen a temps 0.

Si assumírem una velocitat d'avançament de la forqueta de replicació de 3 Kb per minut, quin seria el temps necessari per a la replicació completa d'aquest cromosoma en cada cas?



20. Per què els eucariotes necessiten telomerasa i els procariotes no? Per què *Tetrahymena* és un bon organisme per a estudiar aquest enzim?

21. Diferència entre:

- DNA polimerasa i replicasa
- Velocitat de polimerització i processivitat
- Activitats exonucleasa 5'-3' i 3'-5'

22. Alguns investigadors han suggerit que l'existència d'una activitat exonucleasa 3'-5' en la majoria de DNA polimerases ha determinat que la direcció de polimerització durant la replicació siga 5'-3'. En què es pot basar aquesta afirmació?

23. Proposa un mètode per a marcar radioactivament el DNA en una reacció *in vitro* per a la qual disposes de les següents polimerases purificades:

- DNA polimerasa I d'*Escherichia coli*
- Fragment Klenow d'aquesta mateixa polimerasa

24. Quina o quines DNA polimerases bacterianes són capaces d'iniciar la replicació a partir d'un DNA de doble cadena amb un tall en una de les cadenes? Quina o quines característiques d'aquestes DNA polimerases fan possible això?

25. En els experiments d'Okazaki, a temps relativament curts de pols, només s'observava radioactivitat en fragments menuts de DNA. És conegut que durant la replicació del DNA s'incorpora amb una freqüència de 1:1200 dUTP; aquest nucleòtid és reconegut per l'enzim uracil-N-glicosidasa que produeix el trencament de l'enllaç N-glicosídic entre l'uracil i el sucre, i deixa així un buit apirimidínic; abans d'introduir el nucleòtid correcte una endonucleasa AP trenca l'enllaç fosfodièster que estableix el nucleòtid erroni amb el veí. D'altra banda, l'enzim dUTPasa s'encarrega de convertir dUTP en dUMP per tal d'evitar la seua incorporació en el DNA amb major freqüència. Tenint en compte totes aquestes dades, per què els resultats d'Okazaki suggereixen una replicació "semidiscontínua" i no "discontínua"? Com s'hi veurien afectats els resultats dels seus experiments en utilitzar mutants en l'uracil-N-glicosidasa (*ung*⁻) i en la desoxiUTPasa (*dut*⁻)?

26. Per a la determinació de la funció que desenvolupen diferents proteïnes d'*Escherichia coli* en el procés de replicació s'ha recorregut sovint a la utilització de mutants termosensibles i s'ha determinat si a la temperatura no permissiva es troben defectes en el procés de forma ràpida (mutants "quick-stop") o transcorregut un cert temps (mutants "slow-stop").

- a) Per què és necessari en la majoria dels casos fer servir mutants termosensibles?
- b) Per què els mutants en components del primosoma són de parada ràpida de replicació?
- c) Esmenta algun gen el mutant del qual siga de parada lenta i justifica per què és així.

27. Podries explicar com és possible en *Escherichia coli* garantir una elevada processivitat durant la replicació si es tracta d'un procés semidiscontinu?

28. Quin paper desenvolupen les "xaperones d'histones" en la replicació eucariòtica?

QÜESTIONS DE BIOLOGIA MOLECULAR PER A RESOLDRE PELS ESTUDIANTS EN GRUP

La resolució d'aquestes qüestions ha d'anar acompanyada necessàriament d'algunes referències bibliogràfiques sobre el tema proposat (almenys dues) adequadament presentades. Les cites poden haver ajudat o no a trobar la resposta a aquestes.

TRANSCRIPCIÓ

1. La taula següent mostra algunes característiques de tres tipus de complexos que components de l'RNA-polimerasa poden formar amb el DNA.

Tipus de complex	(1) Específic	(2) No específic	(3) No específic
Naturalesa del complex	Obert	Tancat	Tancat
Vida mitjana	20-40 h	0.1-1 ms	60 min
Seqüència reconeguda	Específica	A l'atzar	A l'atzar
Inici de la cadena	Ràpida	Lenta	Lenta

Quina forma de l'enzim (nucli ("core"), factor sigma, holoenzim) es troba present en cadascun d'aquests tipus de complexos? Justifica la resposta.

2. Un bacteri és capaç de metabolitzar la florinasa, un sucre minoritari que és produït per les flors en les quals pot créixer el microorganisme en determinades condicions de lluminositat. El bacteri fa servir la glucosa com a font preferida de carboni, però, en absència d'aquesta, obté energia metabolitzant la florinasa. L'enzim essencial per a aquesta finalitat és codificat pel gen *Alt1*.

a) Indica, mitjançant un esquema, quins seran els elements *cis* que intervenen en la regulació de l'expressió d'aquest gen.

b) Quin tipus de circuit regulador seria més raonable trobar en aquest cas? Indica tots els factors *trans* que participarien en la regulació.

c) Descriu quin serà el nivell d'expressió esperable i els complexos entre elements *cis* i *trans* que trobaries en cadascuna de les situacions següents. Justifica les respostes.

- Absència de qualsevol dels dos sucres considerats
- Absència de glucosa i presència de florinasa
- Absència de florinasa i presència de glucosa

3. Dissenya el mecanisme de regulació de la transcripció d'un **gen eucariota inventat que es pugui induir**, tenint en compte els aspectes següents:

- a) Indica quin tipus de proteïna codifica el gen (el que tu hages triat) i a què hauria de respondre la regulació.
- b) Assenyala quins elements de seqüència hi ha en el seu promotor que permeten una expressió al nivell basal, així com la seua funció.
- c) Quins elements de seqüència necessitaria el gen per tal que la seua transcripció s'indueïra en el moment que es requereix la proteïna en qüestió?
- d) La transcripció podria estar controlada per proteïnes activadores o repressores. Comenta què passaria en cada cas (tot allò que ocorreria) com a resposta al senyal.
- e) Con que es tracta d'un gen eucariota, quins mecanismes addicionals podrien intervenir en la regulació transcripcional del gen? Comenta'n un.

4. Per a l'estudi de la transcripció, tant en procariotes com en eucariotes, s'han fet servir mutants. En aquesta qüestió es consideren dos possibles mutants en factors implicats en aquest procés.

a) Què ocorreria amb l'RNA polimerasa bacteriana en un procés d'acabament dependent de rho si es deleccionara la seqüència de reconeixement d'aquesta proteïna de la seua posició habitual i s'introduïra dins de la regió codificant? Afectaria aquesta situació la viabilitat de les cèl·lules?

b) Creus que és possible obtenir un mutant de llevat sense el gen que codifica la proteïna TBP (proteïna d'unió a la caixa TATA)? Per què?

TRADUCCIÓ

5. Existeix una diferència entre procariotes i eucariotes respecte del nombre de pautes de lectura oberta (ORFs) contingut en un mRNA típic.

a) Quina és?

b) Té sentit aquesta diferència a la vista de l'estratègia de cada tipus d'organisme per a l'inici de la traducció? Assenyala les diferències pel que fa a elements de la molècula d'mRNA i proteïnes implicades en cadascun dels dos casos en el seu reconeixement.

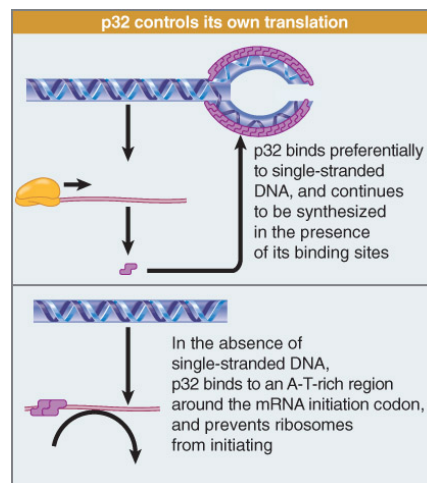
c) Quines conseqüències té aquesta diferència per a la regulació coordinada de l'expressió gènica? És a dir, com s'aconsegueix que una mateixa proteïna reguladora active la transcripció d'un grup de gens relacionats en procariotes i en eucariotes?

d) La presència de pautes de lectura menudes en la regió 5'UTR de l'mRNA (uORFs) és un mecanisme possible de regulació de la traducció en eucariotes. En què es basa aquesta regulació? Quin factor traduccional n'és el responsable? Com actua? Creus que pot funcionar aquest mecanisme de la mateixa manera en cèl·lules procariotes?

6. Quina funció desenvolupen els tRNAs en l'expressió gènica? Quines són les seues característiques estructurals més rellevants? Per què tots els tRNAs han de tenir aspectes estructurals únics i alhora altres de comuns?

7. El descobriment dels prions va fer pensar durant un cert temps que s'havia trobat un fenomen que invalidava el dogma central de la biologia molecular. Per quin motiu? Quines diferències existeixen entre les proteïnes PrPc i PrPSc? Quines malalties pot desencadenar la forma alterada? Com es transmeten aquestes malalties?

8. La figura següent mostra un mecanisme de regulació de la traducció en el fag T4. Quina és la funció de la proteïna p32 d'aquest fag? Quina relació existeix entre aquesta funció i aquest mecanisme de control sobre la seua síntesi? Quin nom rep aquest mecanisme? En quines altres proteïnes el podem trobar?

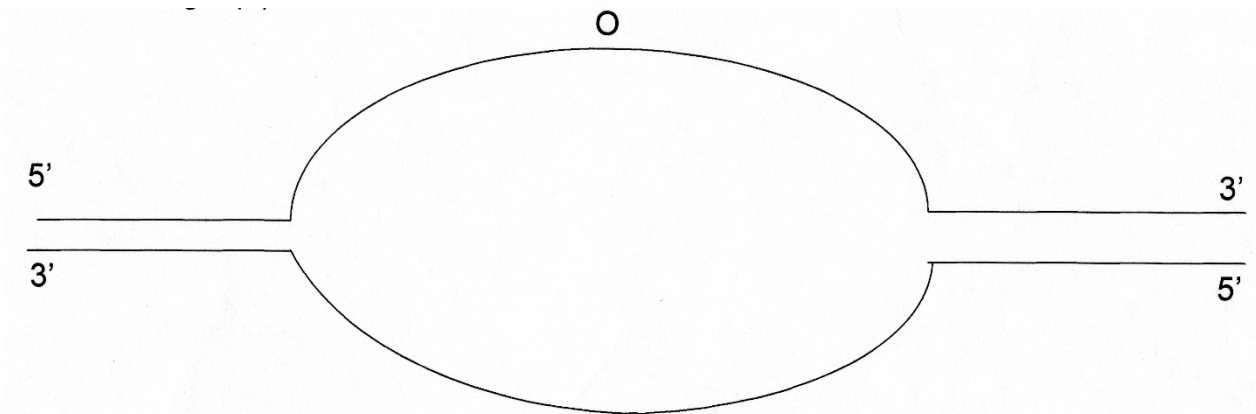


9. Què són els ribointerruptors? Explica quines característiques estructurals presenten. Selecciona dos exemples i comenta com actua cadascun en la regulació de l'expressió gènica.

REPLICACIÓ

10. La figura següent mostra la regió d'una molècula de DNA en la qual està començant un procés de replicació al nivell de l'origen (O). Suposa que aquest ocorre de forma bidireccional i assenjala en aquesta figura:

- Cadascun dels encebadors que seran necessaris per a la còpia de les dues cadenes de DNA.
- El DNA que s'haurà sintetitzat en la regió amb les cadenes desaparellades abans de continuar l'obertura de la doble hèlix. Indica en forma de línies curtes els fragments d'Okazaki.
- Marca de forma particular (amb color o línia més grossa) qualsevol regió d'RNA que puga haver-hi. Considera que la replicació està molt poc avançada encara.
- Situa la DNA polimerasa que està catalitzant les reaccions d'incorporació de nucleòtids.



11. Considera l'experiment de Meselson-Stahl, en el qual *Escherichia coli* es creix durant algunes generacions en un medi amb ^{15}N i posteriorment és transferida en un medi amb ^{14}N .

a) Tot i assumint que la replicació és semiconservativa, indica en la taula els percentatges respecte del DNA total que hi haurà de les densitats corresponents a DNA pesat, DNA híbrid i DNA lleuger transcorregudes 0, $\frac{1}{2}$, 1 i $1\frac{1}{2}$ generacions (duplicacions cel·lulars) des de la transferència de les cèl·lules al medi amb l'isòtop lleuger del N.

% RESPECTE DEL TOTAL DE DNA

Generació	pesat	híbrid	lleuger
0			
$\frac{1}{2}$			
1			

1 1/2			
-------	--	--	--

Indica sobre la mateixa taula les dades que es trobarien si la replicació fora conservativa.

b) Imagina que el resultat obtingut és el mostrat en la taula inferior. Quina conclusió podries deduir sobre el procés cel·lular de replicació?

% RESPECTE DEL TOTAL DE DNA

Generació	pesat	híbrid	lleuger
0	100	0	0
½	34	66	0
3/4	25	75	0
7/8	6	82	12
1	0	80	20

12. En el procés de replicació participen diverses proteïnes amb activitat ATPasa.

a) Quines són?

b) Quina funció hi desenvolupa cadascuna?

c) La proteïna DnaA presenta una dèbil activitat ATPasa i és activa només en presència d'ATP. Com creus que influirà en la replicació d'*E. coli* el fet que l'abraçadora β estimule l'activitat ATPasa de DnaA?

13. Una de les característiques més importants de les histones és el nombre elevat de modificacions postraduccionals que presenten. Entre aquestes es troba, per exemple, l'acetilació. Les regions transcripcionalment actives es caracteritzen per un grau important d'acetilació d'histones en residus concrets de lisina. Com es pot garantir que després de la replicació es mantinga el grau d'acetilació característic de les histones associades en una regió determinada del DNA? Explica-ho detalladament.

14. Quines semblances i diferències podries establir entre els mecanismes de replicació i les replicases de: ϕ X174, fag T4, fag λ , virus de la pòlio, virus VIH i coronavirus SARS-CoV-2?

D'INTEGRACIÓ

15. Els diferents processos de perpetuació i transmissió de la informació genètica han d'incloure necessàriament mecanismes de control de qualitat per tal d'assegurar-ne la fidelitat i evitar que es produïsquen errors letals. Quina rellevància tenen en cadascun dels processos? En quines etapes ocorren? Quines proteïnes o complexos hi participen?

16. El text següent correspon a part del resum d'un article publicat l'any 2006 per Chiu, Baker i Almo en la revista *Trends in Cell Biology*:

*“Multi-component **macromolecular machines** contribute to all essential biological processes, from cell motility and signal transduction to information storage and processing. Structural analysis of assemblies at atomic resolution is emerging as the field of structural cell biology. Several recent studies...have demonstrated the ability of a hybrid approach that combines imaging, crystallography and computational tools to generate testable atomic models of fundamental biological machines. A complete understanding of cellular and systems biology will require the detailed structural understanding of hundreds of biological machines. The realization of this goal demands a concerted effort to develop and apply new strategies for the systematic identification, isolation, structural characterization and mechanistic analysis of multi-component assemblies at all resolution ranges. The establishment of a database describing the structural and dynamic properties of protein assemblies will provide novel opportunities to define the molecular and atomic mechanisms controlling overall cell physiology”.*

Al llarg d'aquest curs hem estudiat diverses màquines cel·lulars complexes. Indica quines són, les seues principals característiques estructurals i la funció que desenvolupen en les cèl·lules procariotes i eucariotes.