

## TEMA 10

# REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

1. Introducción
  2. El ADN como portador de la información genética
  3. Herencia y replicación del ADN
  4. Transcripción y ARN
  5. Código genético y traducción. Síntesis de proteínas
- 

### 1. Introducción

En este tema estudiamos el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, explicaremos como la información genética se transmite de una generación a otra con absoluta fidelidad, pero a la vez que permite pequeños cambios en el material genético para que tenga lugar la evolución. Y descubrimos como esta información genética se transcribe a ARNm y se expresa en último lugar en la secuencia de aminoácidos de una asombrosa variedad de moléculas proteicas.

Mientras que en las reacciones del metabolismo intermediario solo la estructura tridimensional de la enzima condiciona la reacción, los substratos o inhibidores que actuarán. Las reacciones que encontramos en el metabolismo de la información genética, se caracterizan por la necesidad de un molde que actúa junto a la enzima, para especificar la reacción catalizada.

### 2. El ADN como portador de la información genética

Ya en el S XIX se conocía que en el núcleo celular había una sustancia, la nucleína, formada por una parte ácida (hoy ADN) y una parte básica (hoy proteína). Pero fue entre 1944 y 1952, cuando una serie de experimentos cruciales apuntaron claramente al DNA como el material genético. Antes de esta fecha los ácidos nucleicos se consideraban demasiado simples, estaban formados simplemente por 4 clases de monómeros y se consideraron simplemente como una sustancia estructural del núcleo

celular. Se consideraba más probable que los genes estuvieran formados por proteínas, que eran moléculas mucho más complejas

En 1944 Avery y sus colaboradores descubrieron que el ADN extraído de cepas patógenas de la bacteria *Streptococcus Pneumoniae* podía transferirse a cepas no patógenas, transformándolas en patógenas. Este experimento consistía en inocular ratones con células de pneumococcus (S) patógenas que morían y células (R) no patógenas que permitían que el ratón permaneciera vivo. Si las bacterias patógenas (S) se sometían a calentamiento perdían su virulencia. Si se incubaban las bacterias no patógenas (R) con ADN extraído de las bacterias patógenas, y se inoculaban los ratones con estas bacterias, los ratones morían. Parece como si la cepa no virulenta recibiera algo de las bacterias patógenas. Avery y sus colegas concluyeron que el DNA extraído de la estirpe virulenta portaba el mensaje hereditario de la virulencia. Algunos científicos mantenían que las proteínas presentes en el DNA como impurezas podrían ser responsables de este cambio genético. Esta posibilidad fue eliminada al encontrar que el tratamiento del DNA con enzimas proteolíticas no destruía las propiedades transformadoras del ADN, mientras que el tratamiento con nucleasas sí lo hacía.

Un segundo experimento independiente proporcionó la evidencia definitiva. Hersey and Chase (1952) demostraron, mediante el experimento de la batidora, el papel del ADN. Para esto usaron en fago T2, que solo tiene ADN y las proteínas de la cápsida. Marcaron radioactivamente dos muestras de fago T2. En el primer caso las proteínas del fago T2 con S35 y en segundo el ADN con P32 (las proteínas no tienen P y los nucleicos no tienen S). Estas muestras se usaron para infectar muestras separadas de bacterias. Las suspensiones bacterianas se agitaron con una batidora y las cápsidas se separaron de las bacterias por centrifugación. Solo las bacterias infectadas con virus marcados con P32 tenían radiactividad, indicando que era el ADN el agente infectante. En el otro caso la radiactividad quedaba en el sobrenadante donde estaban las cápsidas marcadas con S35

### **3. Herencia y replicación del ADN**

El ADN posee la información necesaria para transmitir los caracteres de una especie de generación en generación y conseguir la supervivencia de la especie. Por lo tanto la molécula de ADN constituye la base química de la herencia. La mayoría de las

moléculas de ADN se encuentran en los cromosomas del núcleo de las células. El número de cromosomas depende de la especie, así por ejemplo, las bacterias poseen un único cromosoma, mientras que las células humanas poseen 46 (23 de cada progenitor). La información genética en forma de ADN se organiza estructuralmente dentro del cromosoma arrollándose alrededor de ciertas proteínas (histonas) constituyendo asociaciones ADN-proteína denominadas nucleosomas (Figura 1).

Las cadenas de ADN de cada especie difieren en longitud y en la secuencia de las bases nitrogenadas, de tal manera que esta secuencia contiene la información genética característica de cada especie. La información genética debe reproducirse exactamente cada vez que la célula se divide. El proceso por el que las moléculas de ADN se copian a si mismas en el núcleo de las células recibe el nombre de **replicación del ADN**. La replicación pretende a partir de una cadena de ADN obtener dos iguales.

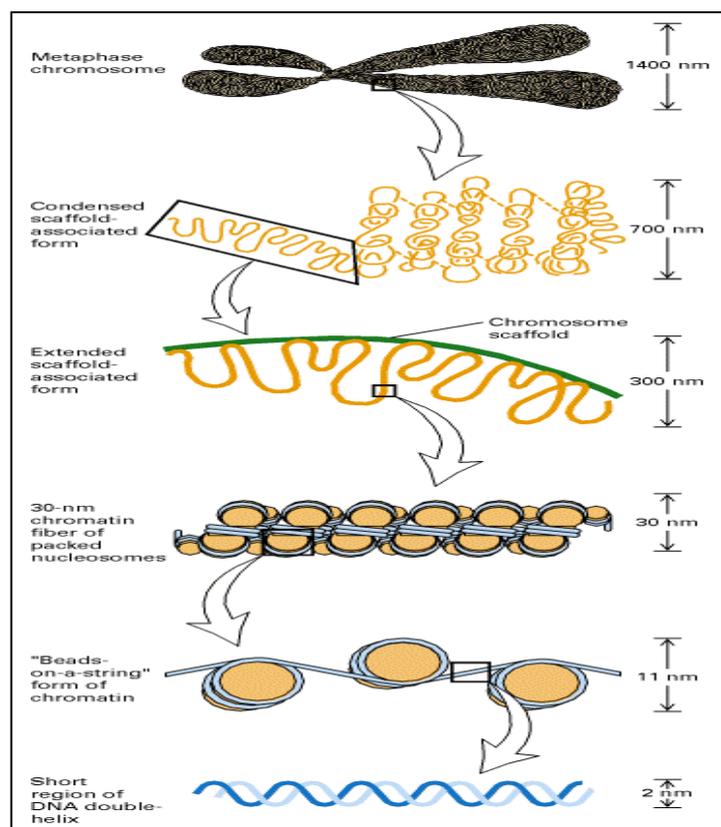


Figura 1.

**Organización estructural del ADN en el cromosoma.**

### 3.1. Principales características de la replicación

Las características principales del proceso son: su carácter semiconservador, la realización simultánea en ambas hebras, de forma secuencial y con carácter bidireccional y origen monofocal (procariotas) o multifocal (eucariotas).

*Semiconservador.* Es decir cada hebra sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, produciendo dos nuevas moléculas de ADN, cada una con una de las hebras viejas y una nueva hebra hija. Esta hipótesis fue propuesta por Watson and Crick poco después de la publicación del modelo de la doble hélice, y fue probado definitivamente por los ingeniosos experimentos diseñados por Meselson and Stahl en 1957.

Solo caben tres posibles hipótesis para explicar el mecanismo de la replicación: conservadora (las dos hebras se copiaran para dar una nueva molécula, de forma que el ADN progenitor permanece intacto y el ADN hijo tendría dos hebras nuevas), dispersante (el ADN progenitor se rompería antes de que se sintetizaran los nuevos fragmentos de ADN, estos luego se unirían a los fragmentos originales para dar ADN hijos con fragmentos tanto nuevos como de las dos hebras del progenitor) y semiconservadora (Las dos nuevas moléculas de ADN formadas tienen cada una una hebra vieja y una hebra nueva).

Meselson and Stahl cultivaron células de E.coli en medio con N15 (isótopo pesado de N14) durante muchas generaciones, hasta que todo el ADN de E. coli estuviera marcado con N15. El ADN aislado de estas células tenía una densidad un 1% mayor que el ADN normal con N14. Esta pequeña diferencia puede apreciarse en una centrifugación en gradiente de densidad CsCl.

Las células de E. coli cultivadas con N15 se transfirieron a medio fresco con N14, y se dejaron crecer durante el tiempo suficiente para que la población se duplicara. El ADN aislado de estas células formaba una sola banda en la centrifugación en gradiente. Esto eliminaba la hipótesis de la replicación conservadora. Si las células de E. coli se dejaban en el medio fresco con N14 durante dos generaciones se observaban en la centrifugación en gradiente dos bandas. Una con la densidad

correspondiente al ADN ligero y otra con la densidad del ADN mixto obtenido en la primera generación. Esto descartaba también la hipótesis dispersante y confirmaba la replicación semiconservativa como la única hipótesis posible.

*Bidireccional.* La separación de las hebras progenitoras que comienza en cada origen de replicación progresa en ambas direcciones. Los puntos de transición entre la doble hebra y las hebras sencillas se llaman horquillas de replicación y van alejándose entre sí. Estos datos se obtuvieron utilizando el marcaje isotópico del ADN con Tritio H<sup>3</sup>. El ADN marcado, aislado y expuesto a una emulsión fotográfica durante semanas podía fotografiarse. Si el tritio se añadía durante un corto período de tiempo y la reacción se paraba observando los autoradiogramas podía observarse que el ADN marcada aparecía a ambos lados de la horquilla de replicación.

*El inicio de la replicación* en procariotas es monofocal, comienza siempre en un punto determinado del cromosoma circular denominado origen (ORI). La replicación progresa formando dos horquillas de replicación. Por el contrario en eucariotas la replicación es multifocal, pues en cada cromosoma existen múltiples orígenes de replicación (cientos o miles) que dan lugar a un número doble de horquillas de replicación. Esto permite completar la replicación de los cromosomas en un tiempo razonable. Esto puede visualizarse mediante microscopía electrónica. Vemos como la replicación de un cromosoma circular se inicia un punto en concreto y es simultánea (las dos hebras se replican a la vez).

*Semidiscontinuo.* Como veremos más adelante la síntesis de la nueva cadena tiene siempre lugar en el sentido 5´-3´, siendo el grupo 3´OH el punto por el cual el ADN es elongado. Esto es válido para todas las polimerasas tanto la ADN como las ARN polimerasas. Si las dos hebras son antiparalelas, como pueden las dos hebras ser sintetizadas de manera continua mientras progresa la horquilla de replicación. La solución que la célula adopta ante este problema fue descubierta por Okazaki. Que descubrió que una de las hebras era sintetizada en pequeños fragmentos llamados fragmentos de okazaki. Por lo tanto una de las hebras es sintetizada de forma continua, y la otra de forma discontinua. La longitud de los fragmentos de okazaki

puede variar desde unos cientos de nucleótidos hasta unos miles, según el tipo de célula.

### 3.2. Pasos de la replicación del ADN en eucariotas

La replicación se lleva a cabo gracias a la **ADN polimerasa III**, esta enzima cataliza la unión de los desoxinucleótidos trifosfato que son abundantes en el fluido del núcleo celular. Estos desoxinucleótidos trifosfato se desplazan hacia la parte desenrollada de la molécula de ADN y se colocan por complementariedad enfrente de la base que les corresponde ( $A=T$ ;  $C\equiv G$ ) de la cadena que actúa como molde, y una vez que están en el sitio adecuado se unen entre si por acción de la polimerasa III. La adición de dos unidades nucleóticas consecutivas tiene lugar mediante la unión del grupo hidroxilo del carbono 3' de un nucleótido con el grupo fosfato del extremo 5' del siguiente. El mecanismo por el que se produce esta unión es un ataque nucleofílico del grupo 3'-OH de un nucleótido al 5'-trifosfato del nucleótido adyacente, eliminándose el pirofosfato y formándose un enlace fosfodiéster. La polimerasa lee la hebra que hace de molde en el sentido  $3' \rightarrow 5'$  y sintetiza la nueva hebra en el sentido  $5' \rightarrow 3'$ . Esta enzima necesita para iniciar la síntesis un pequeño fragmento de nucleótidos que denominamos **cebador**. En la síntesis del cebador interviene un tipo de ARN polimerasa denominado **primasa**.

Durante el proceso de replicación, una de las cadenas madre se lee "bien" (en sentido  $3' \rightarrow 5'$ ) y, por lo tanto, la nueva cadena se sintetiza de corrido (hebra conductora), pero la otra está dispuesta en sentido contrario al que la polimerasa puede leer (hebra retardada). La solución a este problema es sintetizar la cadena en pequeños fragmentos en el sentido  $5' \rightarrow 3'$ . Los cebadores son luego eliminados por la acción exonucleasa de la **ADN polimerasa tipo I** y los nuevos fragmentos resultantes son unidos por la acción de la **ligasa**, que elimina las mellas que quedan entre fragmentos. La secuencia de pasos implicados la replicación del ADN puede resumirse como sigue (Figura 2):

- Apertura de la doble hélice del ADN por acción de las helicasas.
- Síntesis de los cebadores para que la ADN polimerasa pueda actuar. Las enzimas implicadas denominan primasas.
- Se inicia la polimerización por acción de la ADN polimerasa III
- Cuando se alcanza el cebador del fragmento sintetizado anteriormente la Polimerasa I sustituye a la Pol III y, haciendo uso simultáneo de sus actividades

exonucleasa (degradadora de nucleótidos) y polimerasa, va sustituyendo los cebadores por el ADN correspondiente.

- Las ligasas cierran las mellas que hay entre cada dos fragmentos.

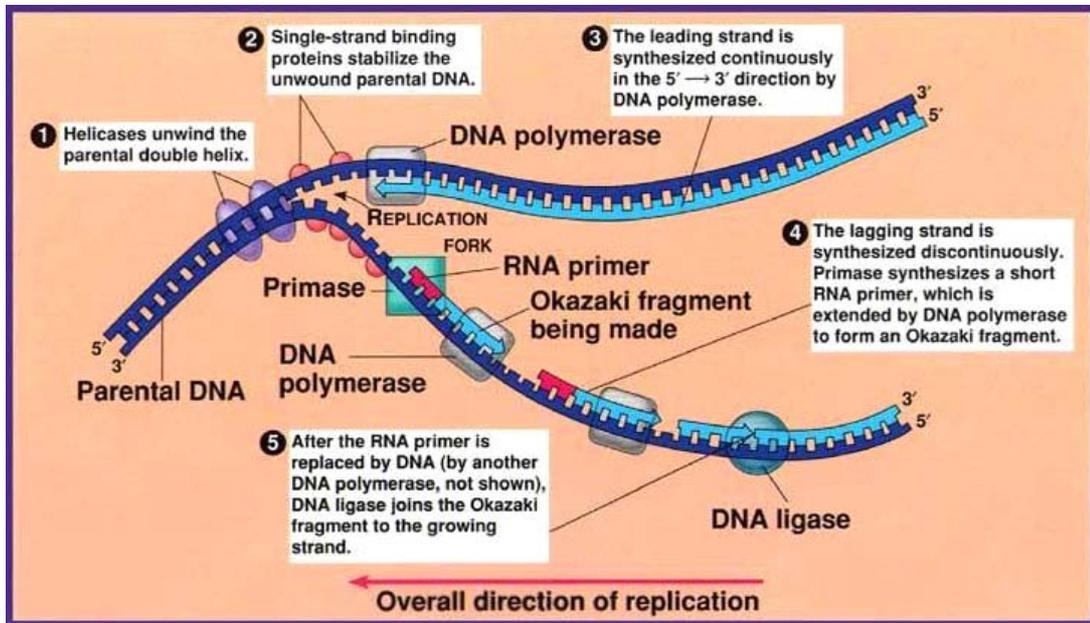


Figura 2.

**Visión general del proceso de replicación del ADN.**

#### 4. Transcripción y ARN

La transcripción consiste en la formación de una molécula de ARN a partir de la información genética contenida en un segmento de ADN. Es decir da lugar a una copia de ARN con secuencia complementaria y antiparalela, a partir de una secuencia molde en una de las hebras del ADN. Mientras que en la replicación se copia el cromosoma entero, la transcripción es más selectiva. En un momento dado solo son transcritos ciertos genes o grupos de genes. La célula restringe la expresión de la información genética a la formación de los productos génicos necesarios en cada momento, en un proceso finamente regulado por secuencias reguladoras específicas que indican el principio y el fin de los segmentos que deben ser transcritos. Estos procesos regulatorios serán estudiados con detalle en el tema siguiente.

Existen tres clases principales de ARN. El mensajero que codifica la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos especificados por un gen. El ARN transferente que lee la información codificada en el ARNm y transfiere el aminoácido adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica y el ARN ribosómico que forma parte de los ribosomas, las complejas maquinarias celulares donde se sintetizan las proteínas.

El proceso empieza cuando la ARN polimerasa se une a unas secuencias específicas llamadas promotores. La doble hélice del ADN se desenrolla formando el bucle de transcripción (unos 17 nucleótidos) para servir de molde para la síntesis del ARN, de tal manera que solamente una de las dos cadenas es la que transcribe la información al ARN. La cadena de ADN que sirve de molde se denomina "cadena molde", mientras que la complementaria se llama "cadena codificante", idéntica en secuencia de bases al ARN transcrito excepto que la timina es sustituida por uracilo. Los ribonucleótidos trifosfato existentes en el fluido celular (ATP, GTP, CTP y UTP) se desplazan hacia la parte desenrollada de la doble hélice del ADN y se sitúan complementando la cadena (T=A; A=U; C=G). Cuando estos nucleótidos se encuentran adecuadamente situados se unen entre sí por acción de la enzima ARN-polimerasa (en el sentido 5' → 3'). Finalmente, el ARN se separa y el ADN recupera la estructura de doble hélice. El ARNm así formado sufre pocas modificaciones en el caso de los procariotas, pero sufre importantes **modificaciones postranscripcionales** en el caso de los eucariotas, eliminándose los intrones (secuencias del genoma que no codifican nada), formando así el ARNm maduro que se traducirá en proteínas. El ADN se utiliza también como molde para la síntesis de los otros dos tipos de ARN, el transferente y el ribosómico.

Las principales diferencias entre el proceso de transcripción en procariotas y eucariotas pueden resumirse como sigue:

- En procariotas no hay separación física entre transcripción y traducción, mientras que en los eucariotas la transcripción tiene lugar en el núcleo, donde está el ADN, y la traducción en el citoplasma donde están los ribosomas.
- En procariotas los ARNm son policistronicos (llevan varios genes) y en eucariotas por lo general son monocistronicos.
- En procariotas hay un solo tipo de ARN polimerasa, mientras que en eucariotas hay al menos 3 tipos de ARN polimeras distintas (una para cada tipo de ARN).

- En Procariotas los ARNm sufren pocas modificaciones postranscripcionales, mientras que en eucariotas sufren muchas, entre ellas la eliminación de intrones.

(1) Initiation:

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

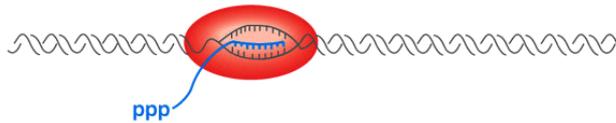
(a) RNA polymerase binds to promoter.



(b) First few phosphodiester bonds form.



(2) Elongation.



(3) Termination.

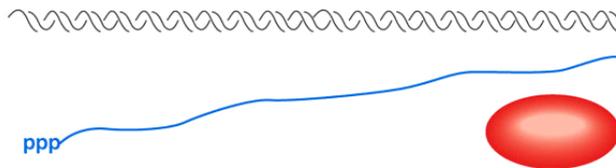


Figura 3.

**Visión general del proceso de transcripción del ADN.**

La ARN polimerasa necesita al igual que la ADN polimerasa los cuatro nucleótidos trifosfato (ATP, GTP, CTP, UTP),  $Mg^{2+}$  y la cadena patrón de ADN cuya secuencia determinará la del ARN, pero a diferencia de la ADN polimerasa no necesita cebador para iniciar la síntesis de la cadena (Figura 3). La ARN polimerasa al igual que la ADN polimerasa sólo lee en el sentido  $3' \rightarrow 5'$  y sintetiza la nueva hebra en el sentido  $5' \rightarrow 3'$ . La primera etapa del proceso de transcripción es la unión de la ARN polimerasa a la molécula de ADN; esta unión se produce por unas zonas específicas del ADN denominadas promotores, que indican a la enzima que tiene que empezar a transcribir. El reconocimiento del promotor es un paso crucial de la transcripción, tanto en lo que se refiere al mecanismo como para la regulación de la transcripción, como veremos en el próximo tema. También la terminación obedece a ciertas secuencias específicas denominadas secuencias de terminación.

Los promotores son zonas específicas del ADN donde se une la ARN polimerasa para empezar la transcripción, y dirigen la transcripción de los genes adyacentes. Las secuencias de los promotores no son idénticas pero se han encontrado en muchas bacterias ciertas secuencias que son particularmente comunes en ciertas posiciones (secuencia consenso). Se sitúan unos 10 y 35 nucleótidos a la izquierda

de donde se inicia la transcripción y se llaman secuencia -35 o caja de entrada y secuencia -10 o caja TATA (Figura 4).

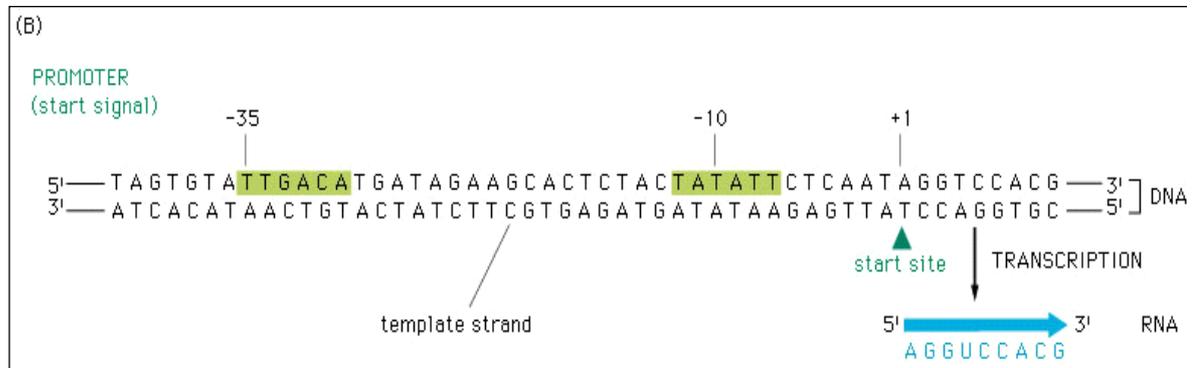


Figura 4.

**Visión de la región del promotor en el ADN.**

## 5. Código genético y traducción. Síntesis de proteínas

La traducción es un proceso muy complejo con un elevado coste energético (consume el 90% de la energía de la biosíntesis) y con necesidad de una estrecha de regulación. Es sin duda el proceso de síntesis en que participa mayor número de macromoléculas diferentes. Las principales son:

- . Al menos 32 tipos de ARNt portadores de aminoácidos
- . Ribosomas (formados por unas 70 proteínas y 5 ARNr diferentes)
- . Un ARNm molde
- . Mas de una docena de enzimas y factores proteicos adicionales para asistir al inicio, elongación y terminación
- . Unas 100 proteínas adicionales para la modificación de las distintas proteínas

En total mas de 300 macromoléculas diferentes

Como hemos visto antes, el ADN es el molde mediante el cual la información genética necesaria para la síntesis de proteínas se transcribe al ARNm. Una vez formado, el ARNm sale del núcleo y se dirige a los ribosomas donde tendrá lugar la

síntesis proteica. La traducción se realiza utilizando una secuencia específica de tres bases del ARNm llamada *tripleto de bases o codón*. Cada aminoácido está codificado por, al menos un tripleto, que constituyen en código genético y que se recogen en la Figura 5. Este código es universal (válido para todas las especies) y redundante (un aminoácido puede estar codificado por varios codones), pero no es ambiguo (un codón codifica uno y sólo un aminoácido).

La traducción del ARNm tiene lugar en los ribosomas y sigue los mismos pasos en procariotas y eucariotas. Cada tripleto de nucleótidos o codón del ARNm determina un aminoácido específico. Cada molécula de ARNt porta el aminoácido correspondiente a un codón. El reconocimiento entre el ARNt y el codón tiene lugar gracias al anticodón. Entre los dos aminoácidos consecutivos debe formarse el enlace peptídico, este paso está catalizado por la enzima *peptidil transferasa*. Luego el ribosoma se transloca, desplazándose a lo largo de la cadena peptídica que se está formando y dejando un sitio vacante para un nuevo ARNt-aminoácido. La traducción continúa hasta que aparece un codón de terminación.

El desciframiento del código genético fue un trabajo complejo y se ha considerado el mayor descubrimiento científico del SXX. Fundamentalmente se basó en la síntesis in vitro de moldes de ARNm artificiales que incubados con extractos celulares, GTP, ATP y los 20 aa en 20 tubos (cada uno con un aa marcado radioactivamente con  $^{14}\text{C}$ ) permitían obtener polipéptidos de cuya secuencia se establecieron las claves del código genético.

Se comenzó con con ARN muy sencillos (con homopolímeros)

Homopolímero	Polipéptido	Asignación codón
UUUUUU...	Phe-Phe-Phe...	UUU → Phe
CCCCCC...	Pro-Pro-Pro...	CCC → Pro
AAAAAA...	Lys-Lys-Lys..	AAA → Lys
Heteropolímeros simples		
(AC) <sub>n</sub>		ACA → Thr CAC → His

Que luego se fueron completando. En 1963 se descifró el código genético completo. Los codones escritos en el sentido 5´-3´. Todos los aa excepto la Met y el trip tienen

más de un codón, que normalmente se diferencian en la tercera base. Además el codón AUG es también el codón de iniciación y hay tres codones de parada.

El código genético es:

- . Redundante: porque un aa puede ser codificado por más de un codón
- . No ambiguo. Pero cada codón especifica un solo aa
- . Universal o casi universal (salvo pequeñas variaciones en las mitocondrias, en algunas bacterias y algunos eucariotas unicelulares) El ser humano, E.coli, las plantas o virus. Indicando que todas las formas de vida provienen de un ancestro común cuyo código genético se ha preservado a lo largo de la evolución.

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

Figura 5.

El código genético.

En este proceso el reconocimiento del aminoácido por su correspondiente RNAt es fundamental. Este reconocimiento se debe a una enzima la *aminoacil-ARNt sintetasa* que tiene dos sitios específicos, uno presenta afinidad por el aminoácido y otro por el ARNt. De forma, que gracias a la especificidad de esta enzima es posible la especificidad de un ARNt por su aminoácido.

En esta fase se forma el complejo de iniciación, formado por un ribosoma unido al ARNm y aun ARNt iniciador cargado. Primero se unen el ARNm y el ARNt iniciador cargado a la subunidad pequeña, luego se unirá la grande. El proceso requiere la intervención de varios factores de iniciación. La traducción siempre comienza en un codón AUG. El crecimiento de la cadena polipeptídica en el ribosoma se produce por un proceso cíclico que se repite tantas veces como aa haya en la cadena. Intervienen tres sitios del ribosoma donde puede unirse el ARNt. El sitio P(peptidil), A (aminoacil) y E (de salida). Al comienzo cada ciclo la cadena naciente está enganchada a un ARNt del sitio P y los lugares A y E vacíos. Cuando el segundo ARNt cargado con el aa adecuado se une al sitio A. Se produce un ataque nucleófilo del grupo amino del aa-ARNt entrante que está en el sitio A, sobre el carboxilo del péptido en crecimiento del sitio P con lo que se forma un enlace peptídico entre el nuevo aminoácido y el péptido en crecimiento y el bloque del péptido en crecimiento se transfiere del sitio P al sitio A. Esta reacción la cataliza una actividad peptidiltransferasa localizada en el ARNr 23s (28s en eucariotas) componente de la subunidad grande (se trata pues de una ribozima aunque varias proteínas ribosómicas parecen contribuir a que se active). En este último paso de la elongación el ribosoma se desplaza un codón en el sentido 5'-- 3'.. Con este desplazamiento conseguimos que ARNt (ya descargado) que estaba en el sitio P pase al sitio E, mientras que el peptidil-ARNt del sitio A pasa al P. El nuevo codón queda enfrentado al sitio A que ahora está vacío.

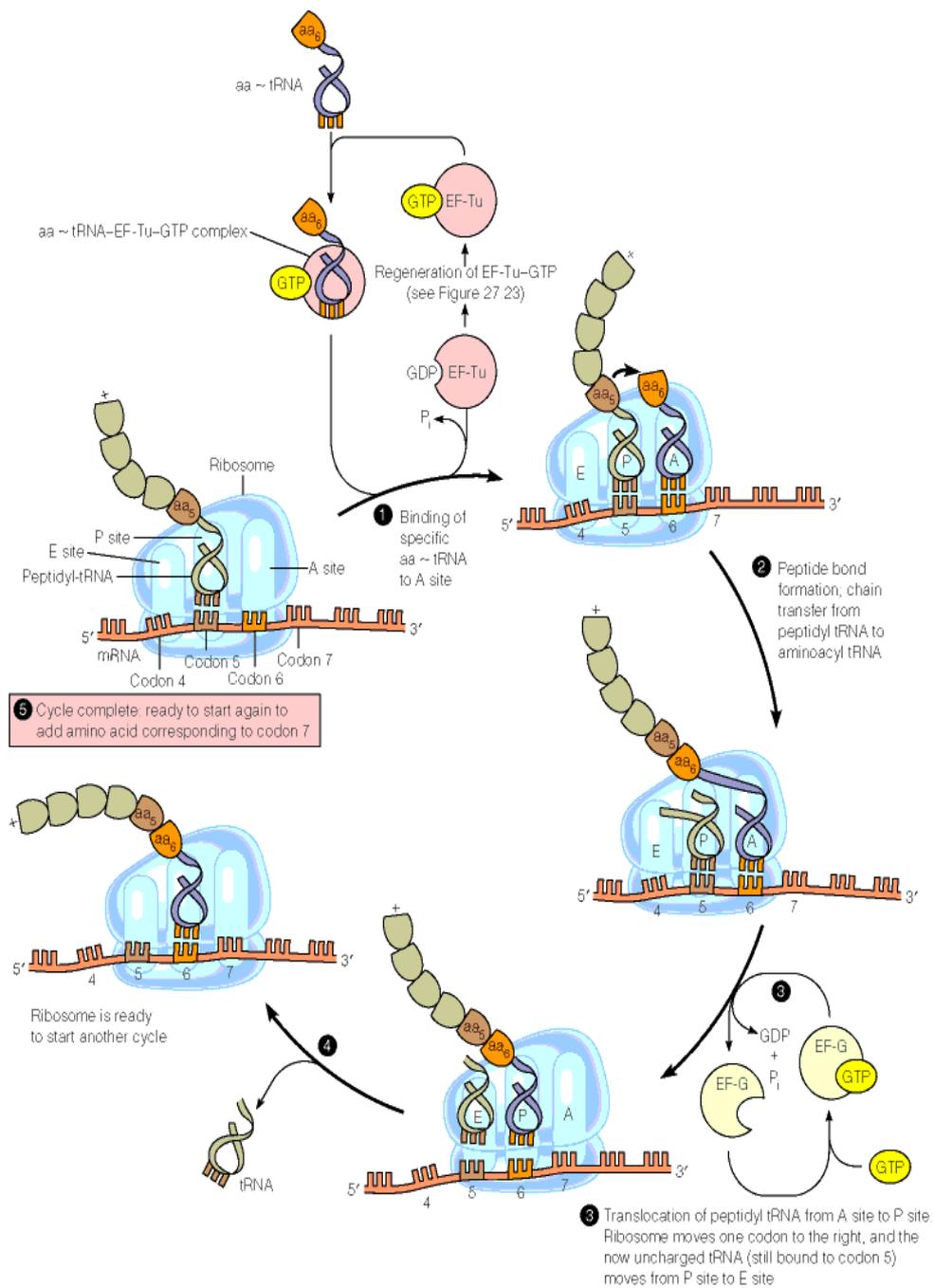


Figura 6.

**Visión general del proceso de traducción del ARNm**