

BIOLOGIA MOLECULAR I

Llicenciatura de Bioquímica

CURS 2003-2004

1. DNA: ESTRUCTURA

Introducció: la Biologia Molecular en el període clàssic i a l'actualitat. Estructura del DNA B: el model de Watson i Crick; estructura del DNA en dissolucions aquoses. Desnaturalització i renaturalització del DNA: efecte de la temperatura i del pH; estabilització per apilament de bases. Conformacions de la cadena de ribosa-fosfat. Aparellaments de bases diferents dels proposats per Watson i Crick. Estudis de cristallografia de raigs X i de NMR d'oligonucleòtids: àngles de *twist*, *tilt*, *roll*, i *propeller twist*; desplaçament lateral (*slide*) entre parelles de bases. Estructura del DNA de forma A i Z. Estructura de les seqüències poli(dA)·poli(dT).

2. DNA CIRCULAR

DNA circular: descobriment i interpretació inicial de les seves propietats. Teorema topològic fonamental: relació entre el nombre d'enllaços topològics (L), el nombre de voltes de doble hèlix (T) i el nombre de superhèlixs (W) en una molècula de DNA circular; significat físic de L, T i W. Densitat superhelicoidal del DNA circular natural. Agents intercalats: canvis estructurals del DNA; efecte sobre la velocitat de sedimentació i la migració electroforètica. Topoisomerases: estructura i mecanisme d'actuació de les topoisomerases de tipus I i II. Electroforesi bidimensional de DNA circular. Implicacions biològiques de les propietats topològiques del DNA.

3. POLIMORFISME ESTRUCTURAL DEL DNA

Bases estructurals de la flexibilitat de la doble hèlix. Corbament intrínsec i induït per proteïnes. Importància biològica del corbament del DNA. Dobles hèlixs de DNA amb bases mal aparellades i amb les dues cadenes paral·leles. Estructures induïdes per la tensió superhelicoidal: regions de DNA monocadena; transicions B/Z; estructures cruciformes; hèlixs triples intramoleculars. Estructures intermoleculars: DNA circular concatenat i amb nusos; llaços D i R; unions de Holliday; hèlixs triples i quàdruples; possibles aplicacions biotecnològiques d'aquestes estructures. Estructures artificials: propietats i possibles aplicacions del PNA. Dinàmica del DNA en dissolució.

4. DNA: INFORMACIÓ LINEAL

Introducció: mapes genètics i mapes físics. Tècniques de purificació del DNA. Cinètica de reassociació del DNA: disseny experimental; físico-química de la reassociació; complexitat del DNA; significat biològic; importància de les tècniques de hibridació en Biologia Molecular. Manipulació i anàlisi de molècules intactes de DNA cromosomal: microscòpia electrònica; electroforesi de camp pulsat. Modificació i restricció. Enzims de restricció: bases químiques del reconeixement de seqüències específiques de DNA; mapes de restricció; aplicacions en Enginyeria Genètica; polimorfisme de la longitud dels fragments de restricció.

5. SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

Clonació molecular de DNA. Mètode químic de seqüenciació. Mètode enzimàtic. Mètodes quimioluminescents. Mètodes fluorescents automàtics. El genoma humà i altres genomes: genòmica. Perspectives de futur dels mètodes de seqüenciació i diagnòstic genètic. Síntesi automàtica d'oligonucleòtids.

6. DNA: EMPAQUETAMENT

Introducció: el problema biològic del emmagatzemament tridimensional de informació continguda en molècules d'estructura lineal. Empaquetament del DNA en virus i bacteris. Empaquetament del DNA en la cromatina del nucli cel·lular: el nucleosoma. Estructura del DNA i les proteïnes histones en la partícula nucli del nucleosoma: bases químiques de la interacció inespecífica entre proteïnes i DNA. Estructures d'ordre superior de la cromatina: fibres de cromatina; cromosomes metafàsics; matriu nuclear.

7. REPLICACIÓ

Implicacions funcionals de l'estructura del DNA: replicació semiconservadora del DNA. Mecanismes de replicació: avanç bidireccional de les forquetes (*E. coli*); cercle rodant (bacteriófag X174); llaç D (DNA mitocondrial). Mecanisme molecular de la replicació de DNA en *E. coli*: inici de la replicació en les seqüències *oriC*; el replisoma (helicasa, RNA primasa, DNA polimerases); proteïnes d'unió a DNA monocadena; DNA lligasa; topoisomerases. DNA polimerases I i III: estructura tridimensional; activitat polimerasa i exonucleasa; processivitat. Replicació del DNA en eucariotes: cicle cel·lular; seqüències de origen de replicació i nombre de replisomes; proteïnes del replisoma eucariòtic. Dinàmica dels nucleosomes durant la replicació de la cromatina. Altres enzims amb activitat DNA polimerasa: transcriptasa reversa; telomerasa. Importància biotecnològica de les DNA polimerases: millora dels mètodes de seqüenciació enzimàtica; obtenció de cDNA; marcatge

de DNA (*nick translation*); reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Reparació del DNA. Recombinació homòloga i altres reaccions de reordenament genètic.

8. TRANSCRIPCIÓ

Dogma central de la Biologia Molecular. RNA missatger. Transcripció en procariotes: estructura i funció dels enzims RNA polimerases; tècniques de *footprinting* per a la caracterització de promotors; dinàmica de l'associació de la RNA polimerasa amb el promotor; desenrotllament de la doble hèlix de DNA a la zona d'inici de la transcripció; problemes topològics durant l'elongació; acabament de la síntesi de RNA. Regulació de la transcripció en procariotes: l'operó lac i altres operons bacterians. Transcripció en eucariotes: RNA polimerases eucariòtiques; estructura del promotor; seqüències enaltidores (*enhancers*); factors de transcripció generals i específics. Motius estructurals de les proteïnes reguladores: hèlix-volta-hèlix (*helix-turn-helix*); dits de zinc (*zinc fingers*); cremalleres de leucina (*leucine zippers*). Implicacions de l'estructura de la cromatina sobre la transcripció: cromatina condensada inactiva; mecanisme de la transcripció en presència de nucleosomes a la cromatina poc condensada. Processament postranscripcional del mRNA: seqüències poli(A) a l'extrem 3' i caputxes (*caps*) al 5'; introns i exons; processament del transcrit primari. Estudis a gran escala de la transcripció.

9. TRADUCCIÓ

El codi genètic. RNA de transferència. Aminoacil t-RNA sintetases. Estructura dels ribosomes. Síntesi de proteïnes: iniciació; elongació; acabament. Traducció en eucariotes: diferències respecte als procariotes; regulació. Modificacions postraduccionals. Localització cel·lular de les proteïnes: seqüències de senyal pel transport de proteïnes al seu punt de destí. Enginyeria de proteïnes: mutagènesi dirigida; producció de proteïnes d'interès en grans quantitats. Proteòmica.

Pràctiques:

A les Llicenciatures de Bioquímica i Química aquesta assignatura no té pràctiques de laboratori. Les pràctiques de laboratori de Biologia Molecular a la Llicenciatura de Bioquímica es fan a les assignatures de Metodologia i Experimentació Bioquímica II i Biologia Molecular II

Avaluació:

Examen amb preguntes teòriques i problemes relacionats amb la matèria explicada durant el curs.

Professor: Joan-Ramon Daban

BIBLIOGRAFIA:

- Molecular Biology of the Gene (fifth edition).
J.D. Watson et al. (2004) Benjamin/Cummings.
 - Fundamentals of Biochemistry.
D. Voet et al. (2002) Wiley.
 - Molecular Biology of the Cell (fourth edition).
B. Alberts et al. (2002) Garland Science.
 - Genes VII.
B. Lewin (2000) Oxford University Press.
-

- DNA Replication (second edition).
A. Kornberg & T. Baker (1992) Freeman.
 - Understanding DNA (second edition)
C.R. Calladine & H.R. Drew (1997) Academic Press.
 - DNA Structure and Function
R.R. Sidney (1994) Academic Press.
 - Nucleic Acids: Structure Properties, and Functions.
V.A. Bloomfield et al. (2000) University Science Books.
 - DNA-Protein Interactions.
A. Travers (1993) Chapman and Hall.
 - Chromatin: Structure and Function (third edition).
A. Wolffe (1998) Academic Press.
 - Dinàmica Estructural de Macromolècules.
L. Cornudella (editor) (1998). Treballs de la Societat Catalana de Biologia (volum 48).
-

- Genomics: The Science and Technology behind the Humand Genome Project.
C.R. Cantor & C.L. Smith (1999) Wiley.
- Biología Molecular e Ingeniería Genética.
J. Luque & A. Herráez (2001) Hardcourt.
- Molecular Biotechnology (third edition).
B.R. Glick & J.J. Pasternak (2003) ASM Press.

PROBLEMES/SEMINARIS:

1. Història de la Biologia Molecular

- The Coming of the Golden Age. G.S. Stent (1969) Doubleday and Co.
- A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance. F.H. Portugal & J.S. Cohen (1979) MIT Press.
- The Golden Helix: Inside Biotech Ventures. A. Kornberg (1995) University Science Books.

2. Estructura del DNA en dissolució

- Helical Periodicity of DNA Determined by Enzyme Digestion. D. Rhodes & A. Klug (1980) Nature, 286, 573-578.
- Helical Repeat of DNA in Solution. J.C. Wang (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 200-203.

3. DNA circular

- Topology of DNA: Whem Manipulation Supports the Lack of “Space-filling” Imagination. G. Balliano & P. Milla (1997). Biochem. Education, 25, 209-210.
- Energetics of B-to-Z Transition in DNA. L.J. Peck & J.C. Wang (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6206-6210.

4. Seqüenciació de DNA

- Seqüenciació quimioluminescent. F. Gallego (1994) Tesi doctoral, UAB.
- Video sobre seqüenciació amb un aparell fluorescent automàtic (1993) LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska.

5. Empaquetament del DNA al nucli cel·lular

- Action of Micrococcal Nuclease on Chromatin and the Location of Histone H1. M. Noll & R.D. Kornberg (1977) J. Mol. Biol., 109, 393-404.
- Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 X resolution. K. Luger et al. (1997) Nature, 389, 251-260.
- Structure of the 300Å Chromatin Filament: X-Ray Diffraction from Oriented Samples. J. Widom, J & A. Klug (1985) Cell, 43, 207-213.
- Interdigitated Solenoid Model for Compact Chromatin Fibers. J.R. Daban & A. Bermúdez (1998) Biochemistry, 37, 4299-4304.

6. Replicació i transcripció

- The Replication of DNA in *Escherichia coli*. M. Meselson & F.W. Stahl (1958). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44, 671-682.
- Structure of the Repressor Operator Complex of Bacteriophage 434. J.E. Anderson, M. Ptashne & S.C. Harrison (1987) Nature, 326, 846-852.
- Changing the Binding Specificity of a Represor by Redesigning an ∇ -helix. R.P. Wharton & M. Ptashne (1985) Nature, 316, 601-605.
- Genes Fragmentados. P. Chambon (1981) Investigación y Ciencia, 58(julio), 22-35.