

II, C. U.
III 466842

DANA IORDĂCHESCU

**BIOCHIMIA
ACIZILOR NUCLEICI**

Partea I

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1997

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
București

Cota III 466842
Inventar C 00059/97

DANA IORDĂCHESCU

BIOCHIMIA ACIZILOR NUCLEICI

Partea I

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1997

Referenți științifici:

Prof. dr. RADU MEȘTER

Lector MARIETA COSTACHE

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

BUCUREȘTI

COTA

111 466 842 dublet

B.C.U. București



C 00059 97

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universității București.
Orice reproducere sau traducere, fie și parțială, precum și
contrafacerea de orice tip intră sub incidența legii penale.

ISBN - 973 - 575 - 076 - 7

<https://biblioteca-digitala.ro/> / <https://unibuc.ro>

Introducere

Nici un alt domeniu al științelor vieții nu a cunoscut o dezvoltare atât de dinamică ca biochimia acizilor nucleici, rezultatele cercetărilor permițând practic explicarea la nivel molecular a tuturor proceselor biologice. Prin contopirea acestui domeniu cu genetica a apărut biologia moleculară, care oferă un tablou general, integrator, al tuturor fenomenelor care explică caracteristicile generale ale organismelor vii. Biologia moleculară permite cea mai profundă corelare între structura materialului genetic și exprimarea lui fenotipică, între structura și funcția unei macromolecule, a unui ansamblu supramolecular, a unui organit intracelular, a unui organ, etc.,

Rezultatele cercetărilor în domeniul biochimiei acizilor nucleici sunt dependente de tehnicile de investigație în biologia moleculară, adesea extrem de sofisticate. De fapt, evoluția cunoașterii în acest domeniu a urmărit dezvoltarea acestor tehnici.

Numeroase dogme au fost infirmate, cercetări premiate cu valoroase premii **NOBEL** având în prezent numai o valoare istorică.

Necesitatea apariției acestei cărți, destinată studenților biochimisti și biologi de la *Facultatea de Biologie a Universității București* a fost impusă de evoluția Planurilor de învățământ la facultatea noastră. Realizarea unei documentări exhaustive într-un domeniu atât de dinamic a fost posibilă grație ajutorului acordat de *Comunitatea Europeană* printr-un program **TEMPUS** ce a oferit cadrelor didactice de la *Catedra de Biochimie* posibilitatea unei instrucții teoretice și practice în domeniul biologiei moleculare.

Dedic această lucrare, coordonatorului acestui program, Dna Dr. **RITA BAROT** de la *Universitatea Paris-Sud*.

Autoarea

1. EVOLUȚIA CUNOAȘTERII

În apariția biologiei moleculare au existat câteva etape care au marcat progresul cunoașterii structurii și funcției acizilor nucleici.

◆ 1869-1943 : Descoperirea acizilor nucleici

Era moderna a biologiei a început odată cu descoperirea unui nou compus fosfo-organic, concentrat în zona nucleară a tuturor celulelor . Acest "compus" numit la început nucleina și apoi cromatina, s-a dovedit în timp a fi constituit din acizi deoxiribonucleici (DNA) și proteine.

A urmat descoperirea acizilor ribonucleici (RNA) . Analiza DNA și RNA a arătat că cele doua tipuri de acizi nucleici conțin 4 tipuri de unități, numite nucleotide. DNA s-a dovedit a se deosebi de RNA printr-un glucid: deoxiriboză în loc de riboză (la RNA) și printr-o bază distinctă: timină în loc de uracil (la RNA). Fiecare moleculă de DNA era considerată a fi un polimer repetitiv a unui tip de unitate tetranucleotidică. A existat o perioadă când s-a atribuit rolul de material genetic proteinelor, cu o structură mult mai variabilă datorită celor 20 aminoacizi din compoziția lor.

În 1930, DNA era numit *thymus nucleic acid* și se considera a fi prezent numai în celulele animale. RNA, numit pe acea vreme *yeast nucleic acid*, era considerat a fi caracteristic celulelor vegetale.

◆ 1944-1960: DNA - substanța genetică

Epoca de aur începe cu descoperirea că DNA este materialul genetic, prin experimentul realizat de AVERY, MAC LEOD și MAC CARTY (1944) care au demonstrat ca "principiul activ" ce realizează transformarea unei tulpini nevirulente de pneumococi într-una virulentă este de fapt DNA. Deci acest tip de acid nucleic, purificat, poartă un mesaj genetic ce poate fi asimilat și exprimat în alte celule. Ulterior, molecula DNA s-a dovedit a fi mai mare și mai complexă decât un tetranucleotid repetitiv, variind de la un organism la altul.

Au urmat alte doua mari descoperiri. În 1952, s-a demonstrat posibilitatea infectării unor celule de *E.coli* prin injectare cu DNA extras din bacteriofagul T2 și că proteina virală servește numai penetrării DNA în bacterie, fiind apoi abandonată în afara celulei.

DNA viral, intrat în celula bacteriană, este capabil de a produce multe copii identice ale virusului. Acest experiment a demonstrat rolul DNA ca purtător al informației.

Al doilea eveniment remarcabil a fost descoperirea de către WATSON și CRICK, în 1953, a structurii DNA, dublu-catenare (duplex), complementare, prezentând și un model în care molecula DNA poate fi replicată. Formarea de perechi de baze, complementare, între resturile nucleotidice din cele două catene ale unei molecule de DNA explică replicarea semiconservativă a acestui acid nucleic. În acest model, fiecare catenă a duplexului DNA servește ca tipar pentru sinteza unei noi catene complementare.

Aceste descoperiri, și multe altele, au demonstrat că DNA are două funcții majore. Prima este de a purta informația genetică ce conferă genotipul și fenotipul specific al fiecărei celule. DNA este transcris în RNA, care este apoi "tradus" în structura proteinelor. În dogma centrală a biologiei moleculare, informația este transferată de la acizii nucleici la proteine și niciodată în direcție inversă. Cealaltă funcție majoră a DNA este propria lui replicare. În duplicarea genotipului celulei, DNA servește ca tipar pentru replicarea unui cromozom în doi cromozomi identici. A fost descoperită DNA polimeraza, care catalizează copierea unei noi catene DNA, virtual fără nici o eroare.

◆ 1960-1973 : Consolidarea

Aceasta perioadă este caracterizată prin cercetări de înaltă ținută științifică. În ciuda complexității, DNA a fost modificat, "disecat", analizat și sintetizat. S-a evidențiat faptul că DNA suferă leziuni în cursul proceselor de pliere, replicare, transcriere, etc., leziuni care pot fi reparate. S-a descoperit că DNA există și își îndeplinește cele două funcții majore nu numai în nucleu ci și în mitocondrii și cloroplaste.

◆ 1974-1980 : A doua epocă de aur

Dezvoltarea unor metode cu o mare putere de rezoluție a condus la reconsiderarea și revizuirea unor concepte mai vechi privind organizarea cromozomului, exprimarea genelor, replicarea și recombinarea, considerată de Arthur KORNBERG o dramă și o speranță continuă.

Conceptul că o moleculă de DNA corespunde unei singure gene, ce permite sinteza colinară a unei proteine unice a fost abandonat. De exemplu DNA bacteriofagului ϕ x174 codifică cinci proteine diferite. O genă poate codifica o proteină multifuncțională care are o sumă de activități enzimatică. Secvența genetică din organisme superioare nu este continuă cum se credea, ea fiind adesea întreruptă de regiuni nefuncționale, intronii.

Aceste descoperiri au fost realizate cu tehnici noi de scindare, clonare și amplificare a genomului. Un genom de 5000 nucleotide poate fi secvențializat în câteva săptămâni. Elementele de inserție din DNA, separate, facilitează transpoziția DNA între plasmide, virusuri și cromozomi, permițând studii de mare finețe. A fost descoperită "mașinaria" enzimatică ce acționează asupra DNA, mai mult de 20 polipeptide fiind angajate în copierea unui singur DNA monocatenar, circular, pentru a sintetiza duplexul lui. În 1980, Arthur KORNBERG a elaborat un concept privind replicarea DNA ce oferă un tablou asupra organizării, controlului replicării și al expresiei genetice.

◆ 1980 - prezent : DNA în centrul atenției

Izolarea, analiza, sinteza și rearanjarea secvenței DNA și genelor, posibilitatea de a insera DNA recombinată în celule au capacitat practic toată biologia moleculară. Replicarea, repararea, transpoziția și multiplicarea virală sunt studiate pe sisteme celulare intacte. Mai multa atenție este acordată proteinelor funcționale implicate în transmiterea mesajelor genetice.

2. BIOCHIMIA NUCLEOTIDELOR

Nucleotidele sunt molecule cu o importanță deosebită în metabolismul celular privind transferul de energie, stocarea de informație și cataliza enzimatică. Ele joacă roluri cheie în aproape toate procesele biochimice :

1. **Elemente constitutive.** Acizii nucleici DNA și RNA sunt compuși din resturi de nucleotide, asamblate prin legături 3',5'- fosfodiesterice ;

2. **Rol în metabolismul energetic.** ATP este un purtător universal de energie în sistemele biologice fiind sintetizat în cantități mari în mitocondrie prin fosforilare oxidativă. ATP susține energetic majoritatea căilor anabolice, fiind implicat și în contractia musculară, transportul activ și menținerea integrității membranelor celulare. El servește ca donator de grupări fosfat și în sinteza altor nucleozid trifosfați : GTP, UTP, CTP, etc. GTP subvenționează energetic multe mișcări ale macromoleculilor, ca de exemplu translocarea catenelor peptidice nascente pe ribozomi și activarea proteinelor de cuplare a semnalelor.

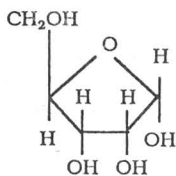
3. **Rol de mediatori fiziologici.** Nucleozid-monofosfații ciclici sunt mediatori ai multor procese metabolice. Modificările covalente ATP-dependente realizate în prezența cAMP afectează activitățile multor enzime, ca de exemplu glicogen-sintaza și glicogen-fosforilaza. cGMP este un alt mediator al unor evenimente celulare. ADP are un rol critic în agregarea plachetelor sangvine și deci în coagularea sângelui. Adenozina produce dilatarea vaselor sangvine coronariene, fiind un reglator al curgerii sângelui prin sistemul coronarian.

4. **Componente ale unor coenzime.** NAD și NADP sunt substraturi obligatorii, iar FAD este grupare prostetică a unor oxidoreductaze. Coenzima A este un purtător de grupari acil, implicat într-o serie de reacții metabolice.

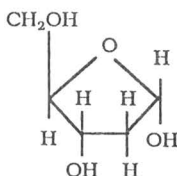
5. Derivații nucleotidici sunt **intermediari activați** în multe biosinteze. De exemplu, UDP-glucoza și CDP-diacilglicerolul sunt precursori în sinteza glicogenului și respectiv a fosfogliceridelor. S-adenozil metionina este forma activată, de transport, a grupărilor metil.

6. **Efectori alosterici.** Multe căi metabolice sunt controlate de concentrațiile intracelulare ale unor nucleotide : AMP, ADP, etc.

Un nucleotid este format dintr-un glucid, o bază azotată și cel puțin o grupare fosfat. Un ribonucleotid are restul glucidic β -D-riboza, iar un deoxiribonucleotid β -2-deoxi-D-Riboza :

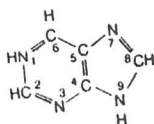


β -D-Riboza

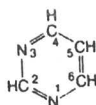


β -2-deoxi-D-riboza

Baza azotată poate fi un derivat de la o purină sau de la o pirimidină:

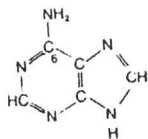


Purina

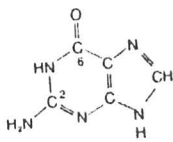


Pirimidina

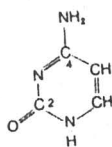
Bazele purinice majore sunt **adenina** (6-amino-purina) și **guanina** (2-amino, 6-oxo-purina), iar **bazele pirimidinice majore** sunt **citozina** (2-oxo,4-amino-pirimidina), **uracilul** (2,4-di-oxo-pirimidina) și **timina** (2,4-di-oxo,5-metil-pirimidina):



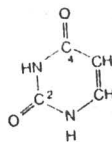
Adenina



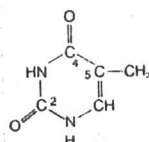
Guanina



Citozina

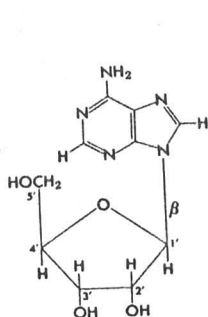


Uracilul

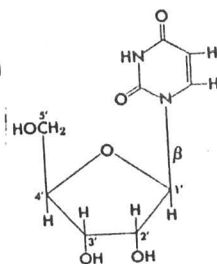


Timina

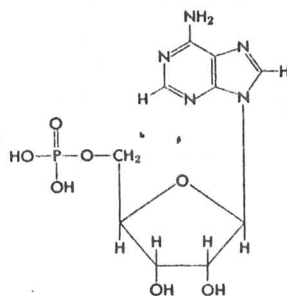
Prin atașarea unei baze azotate la riboză sau deoxiriboză se formează un **nucleozid**. Baza azotată este atașată printr-o legatură N-β-glicozidică între C-1' din glucid și N-9 de la purină sau N-1 de la pirimidină. Ribonucleozidele majore sunt **adenozina**, **guanozina**, **citidina** și **uridina**, iar deoxiribonucleotidele majore sunt: **deoxiadenozina**, **deoxiguanozina**, **deoxicitidina** și **deoxitimidina**.



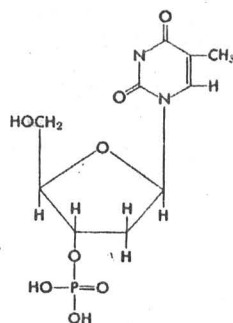
Adenozina



Uridina



Adenozin 5'-
monofosfat (AMP)



Timidin-3'
monofosfat

Grupările fosfat pot esterifica orice grupare hidroxil (2',3' sau 5') a pentozei unui nucleozid, formându-se nucleotide. Cel mai comun este esterificată gruparea alcool primară de la C-5' (Tabelul 1).

Tabelul 1: Nomenclatura bazelor, nucleozidelor și nucleotidelor

Baza	Nucleozidul	Nucleozid 5'-monofosfat
Adenina (Ade)	Adenzina (Ado)	Adenzin 5'-monofosfat (AMP) (adenilat)
Guanina (Gua)	Guanozina (Guo)	Guanozin 5'-monofosfat (GMP) (guanilat)
Citozina (Cyt)	Citidina (Cyd)	Citidin 5'-monofosfat (CMP) (citidilat)
Uracil (Ura)	Uridina (Urd)	Uridin 5'-monofosfat (UMP) (uridilat)
Timina (Thy)	Deoxitimidina (dThd)	Deoxitimidin 5'-monofosfat (dTMP) (deoxitimidilat)

În general, un nucleotid poate fi abreviat NMP, unde N- este simbolul unui nucleozid. În particular, adenozin 5'-monofosfatul este abreviat AMP. Deoxiadenozin 5'-monofosfatul este abreviat dAMP.

La pH 7, nucleotidele există predominant ca anioni datorită sarcinii negative a grupărilor fosfat, baza azotată fiind neîncărcată. De aceea, în discuțiile ulterioare vom denumi nucleotidele: adenilat, guanilat, citidilat, timidilat și uridilat.

♦ Apariția în celule

Principalii compuși purinici și pirimidinici din celule sunt derivați 5'-nucleotidici. În celule nucleotidul care se găsește în cea mai mare concentrație este ATP.

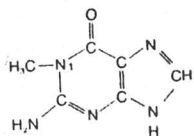
În funcție de tipul celulei concentrația nucleotidelor variază. De exemplu, în eritrocit adenin nucleotidele se găsesc în mare exces față de alte tipuri de nucleotide. În hepatocite și alte țesuturi există, de asemenea, concentrații mari de UDP-glucoză, UDP-acid glucuronic, NAD⁺, NADH, etc. Prezența de baze libere, nucleozide sau 2', 3'- nucleotide în fracția acido-solubilă a celulei se datorează degradării nucleotidelor și acizilor nucleici exogeni și endogeni.

Concentrația ribonucleotidelor în celulă este de ordin milimolar, iar cea a deoxiribonucleotidelor de ordin micromolar. Concentrația ATP în celulele tumorii Ehrlich este de 3,600 pmoli/10⁶ celule, iar a dATP este de 4 pmoli/10⁶ celule. Nivelul deoxiribonucleotidelor prezintă fluctuații mari în timpul ciclului celular, în contrast cu cel al ribonucleotidelor - care este relativ constant.

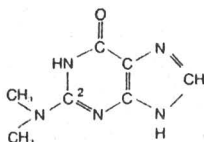
În celulele normale, concentrațiile totale ale nucleotidelor se găsesc în limite fixe, deși concentrația componentelor individuale variază. Astfel concentrația adenin-nucleotidelor (AMP+ADP+ATP) este constantă, deși raportul [ATP]/[AMP+ADP] depinde de starea energetică a celulei.

◆ Baze modificate

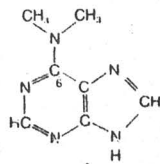
Aceste baze apar prin alterarea nucleului purinic sau pirimidinic după ce bazele standard au fost încorporate în structura acizilor nucleici.



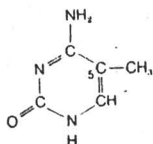
1-metilguanina



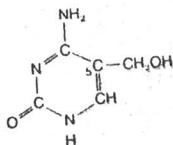
N²-dimetilguanina



N-dimetiladenina

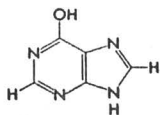


5-metilcitozina

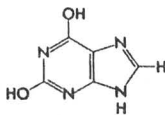


5-hidroxiometilcitozina

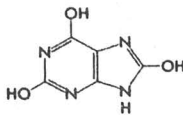
Termenul de **bază minoră** este frecvent utilizat pentru a indica acele baze modificate care apar în cantități mici, relativ la bazele standard. Baze modificate se găsesc în urina ca o măsură directă a turnover-ului acizilor nucleici :



Hipoxantina



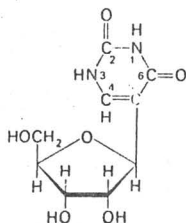
Xantina



Acidul uric

Nucleozide modificate apar în structura tRNA. Astfel,

pseudouridina are o legătură C-glicozidică în loc de N-glicozidică. Ea se formează numai după ce UMP a fost incorporat în RNA. Concentrația de pseudouridina în urină este o măsură a turnover-ului tRNA.



Ribotimidina este un component minor al tRNA. Acest derivat este format prin metilarea uracilului la C-5 cu S-adenozil metionina.

◆ Proprietățile nucleotidelor

Bazele purinice și pirimidinice, nucleozidele și nucleotidele corespunzătoare pot fi ușor detectate datorită absorbției în UV. Bazele purinice și derivații lor nucleozidici și nucleotidici au o absorbție mai puternică decât pirimidinele și derivații lor. În Tabelul 2 prezentăm coeficienții de extincție molară (o măsură a absorbției luminii la o lungime de undă specifică compusului) și lungimea de undă cu absorbție maximă.

Se constată că lungimea de undă la care se înregistrează un maxim de absorbție variază cu natura bazei azotate, dar în majoritatea cazurilor este în apropierea valorii de 260 nm.

Spectrul de absorbție în UV pentru fiecare nucleozid sau nucleotid depinde de pH. Absorbțiile puternice în UV și diferențele datorate structurii specifice a bazei au permis punerea la punct a unor metode sensibile pentru dozarea acestor compuși. De exemplu, dezaminarea nucleozidelor sau nucleotidelor citozinei la derivații uracilului produce o deplasare marcantă a λ_{max} de la 271 nm la 262nm.

Tabelul 2 Constantele spectrofotometrice ale nucleozidelor

Nucleozid	Coeficient de extincție molară $\times 10^{-3}$	Lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție la pH 7
Adenzina	15.4	259
Guanozina	13.7	253
Citidina	8.9	271
Uridina	10.0	262
Timidina	10.0	262

Datorită coeficienților de extincție molară mari ai bazelor purinice și pirimidinice, se constată că, de exemplu, o soluție de RNA sau DNA de concentrație 1 mg/ml are o absorbție la 260 nm de circa 20, în timp ce o proteină la aceeași concentrație de 1 mg/ml are o absorbție la 280 nm de aproximativ 1. În consecință acizii nucleici sunt ușor de detectat la concentrații mici, în UV.

În timp ce legătura N-glicozidică a nucleotidelor este stabilă în mediu alcalin, comportamentul acesteia la hidroliza acidă este diferit. Legătura N-glicozidică a purin-nucleotidelor este ușor hidrolizată în mediu acid diluat și la temperaturi ridicate (60°C) producând baze purinice libere, pentoza sau pentozofosfați. Pe de altă parte legătura N-glicozidică a uridin-, citidin- și timidin-nucleozidelor/nucleotidelor este stabilă la acest tratament acid. În prezență de acid percloric 60% și la 100°C are loc eliberarea pirimidinelor libere cu distrugerea completă a pentozei. Legătura N-glicozidică a pirimidin nucleotidelor cu dihidouracil este labilă la tratament acid moderat.

Datorită grupării fosfat înalt polare, purin- și pirimidin-nucleotidele sunt considerabil mai solubile în soluții apoase decât nucleozidele și bazele libere. În general, nucleozidele sunt mai solubile decât bazele libere.

Bazele purinice și pirimidinice, derivații lor nucleozidici și nucleotidici pot fi separați prin diferite tehnici: cromatografie pe hârtie, cromatografie în strat subțire (plăci de celuloză), electroforeză sau cromatografie pe rășini schimbătoare de ioni. Cele mai bune separări se realizează prin HPLC (high pressure liquid chromatography). Sunt accesibile echipamente comerciale care constau dintr-o pompă sau pompe, un sistem de injectare, o coloană, un detector UV și un înregistrator. Utilizând acest echipament, pot fi separate cantități mici, de ordinul nanomolilor, în perioade scurte de timp (până în 30 minute). Dezvoltarea acestei tehnici, pe coloane umplute cu schimbători de ioni sau prin cromatografie în faza inversă, a permis dozarea nucleozidelor și nucleotidelor într-o varietate de condiții celulare.

◆ Biosinteza purin nucleotidelor

Purin nucleotidele sunt sintetizate, **de novo**, printr-o cale metabolică implicând 10 etape ce conduce la un metabolit bogat în energie **fosforibozil pirofosfatul (PRPP)**, apoi la **inozin monofosfat (IMP)**, precursorul AMP și GMP.

Experiențele de marcarea izotopică au relevat sursele atomilor nucleului purinic, din calea **de novo** :

N-3 și N-9 provin de la N amidic al glutaminei ;

C-4, C-5 și N-7 provin de la glicină ;

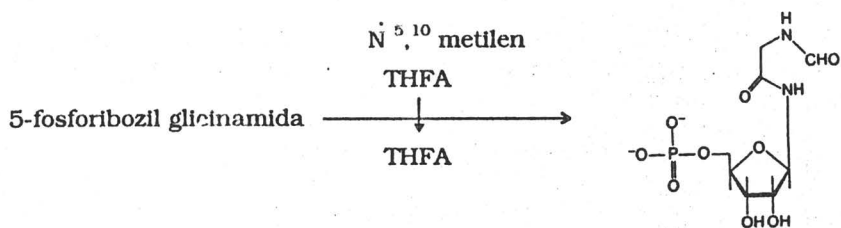
C-2 și C-8 se formează de la derivați ai tetrahidrofolatului;

C-6 provine de la CO₂ iar N- - de la aspartat.

Deși etapele individuale implicate în această cale sunt aceleași pentru toate organismele, structurile enzimelor ce catalizează aceste etape la procariote diferă marcat de cele de la eucariote. În timp ce la majoritatea procariotelor, cele 10-11 reacții ce conduc la sinteza **de novo** a IMP sunt catalizate de 10 enzime separate, neasociate, la multe eucariote, șapte din cele 10-11 reacții sunt catalizate de proteine multifuncționale, în care două sau mai

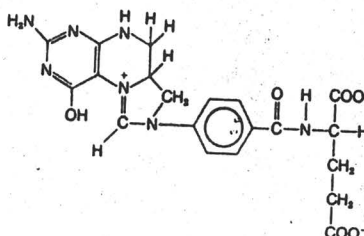
catalizată de fosforibozil glicinamid sintetaza.

4) Introducerea grupării formil via THFA

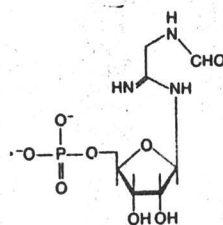
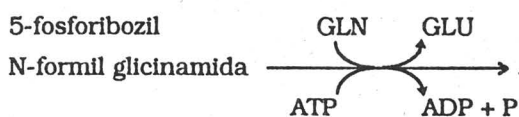


5'-fosforibozil N-formil glicinamida
catalizată de fosforibozil glicinamid formil transferaza.

N^{5,10} metilen
tetrafolnic acid
(THFA)

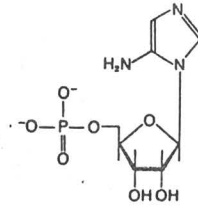
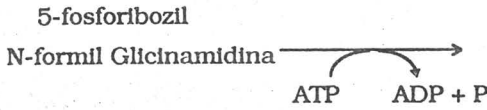


5) Inserarea N de la glutamina (N-3 a nucleului purinic)



5 fosforibozil N-formilglicinamidina
catalizată de 5-fosforibozil N-formil glicinamidin sintetaza

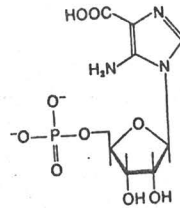
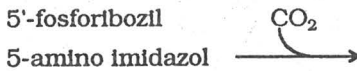
6) Închiderea ciclului cu formarea nucleului imidazol



5'-fosforibozil 5-amino imidazol

catalizată de 5'-fosforibozil 5-amino imidazol sintetaza.

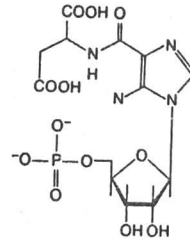
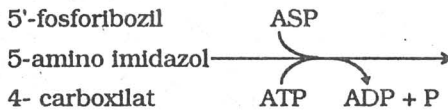
7) Inserarea CO₂ (C-6 a nucleului purinic)



5'-fosforibozil 5-aminoimidazol 4-carboxilat

catalizată de 5'-fosforibozil 5-amino imidazol carboxilaza.

8) Inserarea grupării amino a acidului aspartic (N-1 din nucleul purinic)



5'fosforibozil 5-aminoimidazol-4-N-succin carboxamida

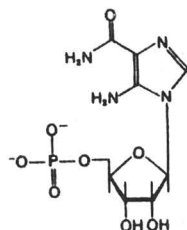
catalizată de o sintetază.

9) Scindarea legăturii N-C din aspartat

5'-fosforibozil

5-aminoimidazol

4-N-succin carboxamida fumarat



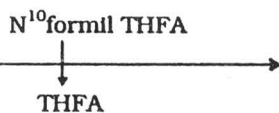
5'-fosforibozil 5-aminoimidazol-4-carboxamida
catalizată de **adenilosuccinat liaza**.

10) Introducerea formiatului via THFA (C-2 a nucleului purinic):

5'-fosforibozil

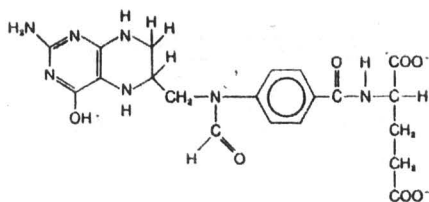
5-aminoimidazol

4-carboxamida



5'-fosforibozil 5-formamidoimidazol 4-carboxamida
catalizată de o **formil transferază**.

structura 10-formil THFA

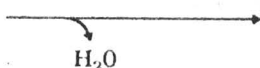


11) Închiderea ciclului cu formarea IMP

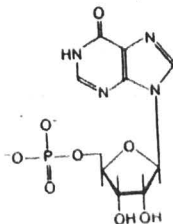
5'-fosforibozil 5-

formamidoimidazol

4-carboxamida



IMP



catalizată de **IMP ciclohidrolaza**.

IMP este transformat la AMP și GMP prin transformările prezentate în Figura 1.

GMP poate fi transformat la GDP prin acțiunea **nucleozid monofosfat kinazei** și a ATP :



Enzima **nucleozid-difosfat kinaza** catalizează formarea GTP din GDP și ATP :



Transformări similare pot suferi toți nucleozid monofosfații și nucleozid difosfații.

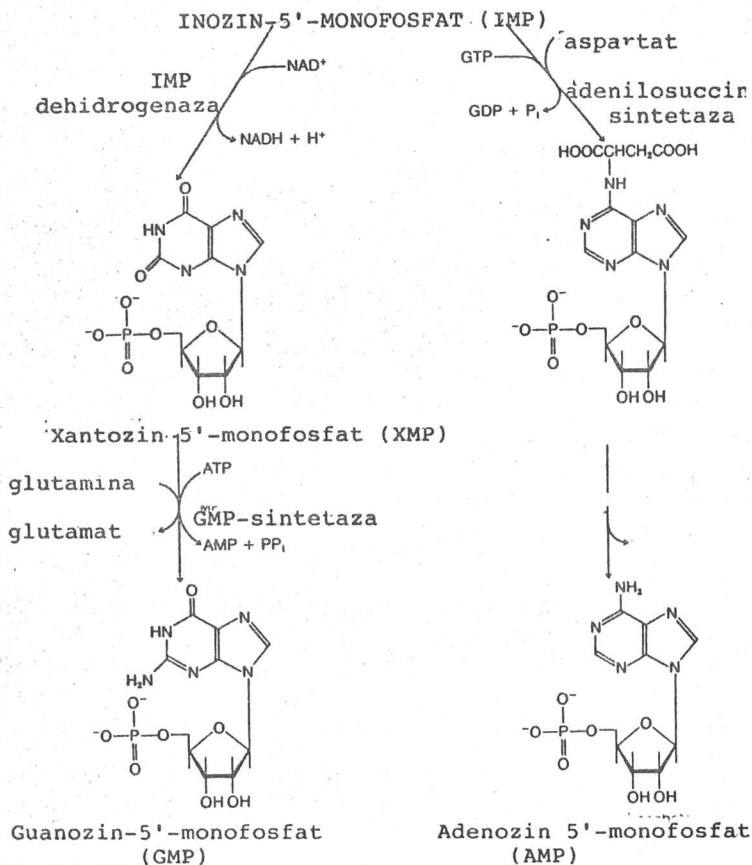
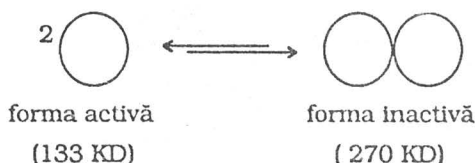


Figura 1. Formarea AMP și GMP din IMP

În secvența de reacții care conduc la sinteza IMP, la multe eucariote, există o singură proteină multifuncțională numită **5'fosforibozil aminoimidazol sintaza**, care catalizează activitățile enzimatice ale etapelor 3,4 și 5. Există alte două proteine multifuncționale: **5'fosforibozil-aminoimidazol succinocarboxamid sintaza**, care catalizează etapele 7 și 8, și **IMP sintaza** care catalizează etapele 10 și 11. Beneficiul acestor proteine multifuncționale este o sinteza coordonată, mai rapidă a purin nucleotidelor.

Se remarcă faptul că transformarea IMP în GMP necesită ATP ca sursă de energie, în timp ce transformarea IMP - AMP necesită GTP. Când celula are concentrații mari de ATP, IMP este transformat în GMP și invers când există suficient GTP în celulă - IMP se transformă în AMP.

PRPP amidotransferaza este o enzima reglatoare care limitează viteza întregului proces, efectorii fiind IMP, GMP și AMP. Enzima din placenta omului există în două forme, cea cu masa moleculară mai mică fiind activă enzimatic.



Enzima din placenta are cel puțin două situsuri de legare a efectorilor. Un situs leagă specific oxipurin nucleotidele (IMP și GMP), în timp ce celălalt leagă aminopurin nucleotidele (AMP).

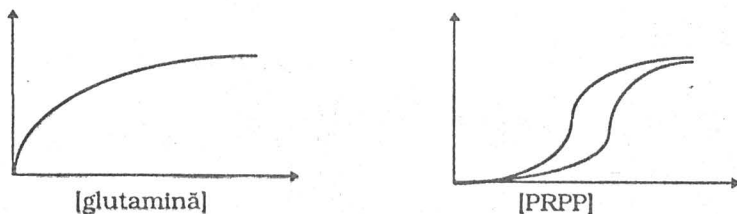


Figura 2. Activitatea PRPP-amidotransferazei în funcție de concentrațiile de glutamină și PRPP

Legarea simultană a unui oxipurin nucleotid și a unui aminopurinnucleotid are ca rezultat o inhibiție sinergică a enzimei.

PRPP amidotransferaza prezintă o cinetică hiperbolică față de glutamină și sigmoidală față de PRPP (Figura 2). Prezența nucleotidelor deplasează funcția sigmoidală a lui $v/[PRPP]$.

Concentrațiile intracelulare ale glutaminei sunt aproximativ egale cu K_M enzimei pentru glutamină. Pe de altă parte, concentrația PRPP în celulă fluctuează, putând fi de 10+100 ori mai mică decât K_M enzimei pentru PRPP. În

consecință, concentrațiile PRPP în celulă joacă un rol important în controlarea sintezei *de novo* a purin nucleotidelor.

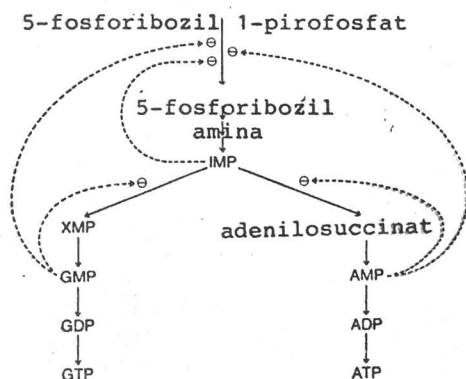


Figura 3. Reglarea sintezei purin nucleotidelor

Este cunoscută reglarea la punctul de ramificație IMP-GMP și IMP-AMP. Cele două enzime implicate : **IMP dehidrogenaza** și **adenilosuccinat sintetaza** au valori similare K_M pentru IMP. AMP este un inhibitor competitiv cu IMP al **adenilosuccinat sintetazei**, în timp ce GMP este un inhibitor competitiv al **IMP dehidrogenazei**. GTP servește ca sursă de energie pentru reacția **adenilosuccinat sintetazei**, în timp ce AMP este un inhibitor competitiv al acestei etape . ATP servește ca sursă de energie pentru transformarea XMP în GMP, în timp ce GMP acționează ca un inhibitor al formării XMP.

◆ Căi de salvare a bazelor purinice

Eficiența metabolismului în condiții normale este exprimată și prin existența unor căi de salvare a bazelor purinice, provenite din surse exogene sau din catabolismul acizilor nucleici, care permit realizarea unor apreciable economii de ATP. Reacțiile :



sunt catalizate de aceeași enzima **hipoxantin-guanin fosforibozil transferaza** care necesită Mg^{2+} și este reglată de prezența IMP sau GMP, inhibitori competitivi ai PRPP.

Adenin fosforibozil transferaza catalizează reacția :



care necesită Mg^{2+} , AMP fiind un inhibitor al transformării.

Aceste reacții nu numai că realizează o mare economie de energie, dar permit și unor celule ca eritrocitele să-și sintetizeze nucleotidele din bazele purinice. Eritrocitele neavând **PRPP amidotransferaza** nu pot realiza sinteza **de novo** a purin nucleotidelor, calea de salvare a bazelor lor fiind singura posibilitate de refacere a acestor nucleotide.

În sindromul **LESCH-NYHAN**, datorită lipsei **hipoxantin-guanin fosforibozil transferazei**, la pacienți se observă stări de hiperuricemie, retardare mentală (în cadrul metabolismului purinele sunt catabolizate la acid uric). Pacienții mor datorită insuficienței renale rezultate din depozitarea masivă a uratului de sodiu (produsul degradării purin nucleotidelor).

◆ Interconversia purin nucleotidelor

Există o serie de transformări enzimatice care permit echilibrarea concentrației adenin și guanin nucleotidelor. Aceste purin nucleotide pot fi redistribuite conform necesităților celulare prin transformarea GMP în AMP și înapoi la IMP. Aceste reacții pot fi realizate prin enzime separate, fiecare fiind sub un control diferit.

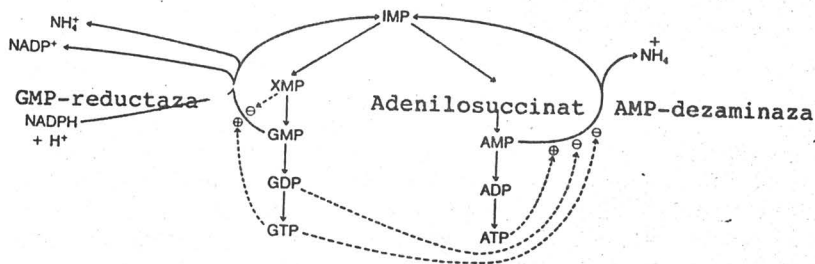


Figura 4. Interconversia purin nucleotidelor

Dezaminarea reductivă a GMP la IMP, catalizată de **GMP reductaza**, este activată de GTP și este inhibată de XMP.

XMP este un inhibitor competitiv al **GMP reductazei** umane, având un $K_i=0,2 \mu M$. Datorită acestei K_i scăzute, concentrația XMP din celulă poate influența transformarea GMP-IMP. Pe de altă parte, GTP este un activator al **GMP reductazei** provocând scăderea K_M enzimei față de GMP și creșterea V_{max} . Activitatea **AMP dezaminazei** (5'-AMP amidohidrolaza) care catalizează specific dezaminarea AMP la IMP, este activată de K^+ și ATP și este inhibată de P_i , GDP și GTP. În absența ionilor de K^+ , curba $V/[AMP]$ este sigmoidală. Prezența ionilor de K^+ nu este necesară pentru activitatea maximă, ci mai degrabă acționează ca un efector pozitiv pentru a reduce K_M pentru AMP.

◆ Sinteza de novo a pirimidin nucleotidelor

Nucleul pirimidinic este sintetizat de novo în celulele mamiferelor utilizând aminoacizii ca surse de C și N și CO_2 ca surse de atomi de carbon:

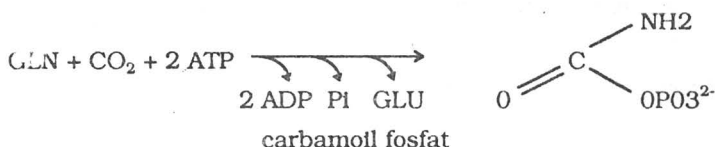
N-1, C-4, C-5 și C-6 provin de la aspartat

C-2 de la CO_2

N-3 de la N amidic al glutaminei

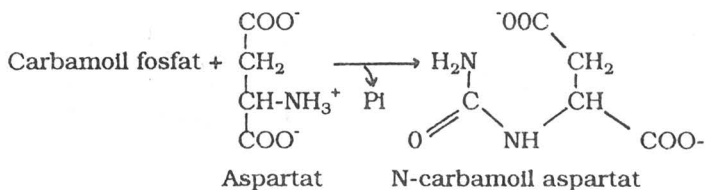
În continuare vom prezenta etapele sintezei pirimidin nucleotidelor în celulele mamiferelor :

1) Formarea carbamoil fosfatului (C-2 și N-3 a nucleului pirimidinic)



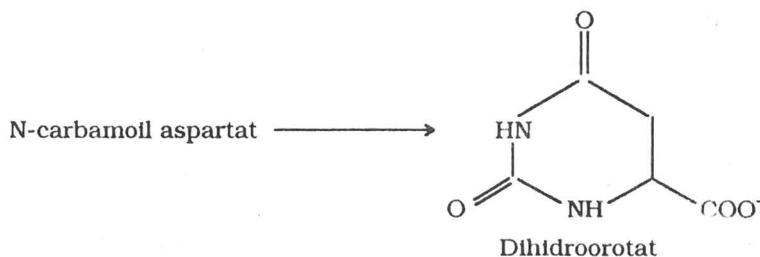
este catalizată de **carbamoil fosfat sintetaza II** (distinctă de enzima I din mitocondrie, implicată în ciclul ureei).

2) Inserarea aspartatului (N-1, C-4, C-5 și C-6 a nucleului pirimidinic)



este catalizată de **aspartat carbamoil transferaza**. Enzima mamiferelor nu este reglată alosteric.

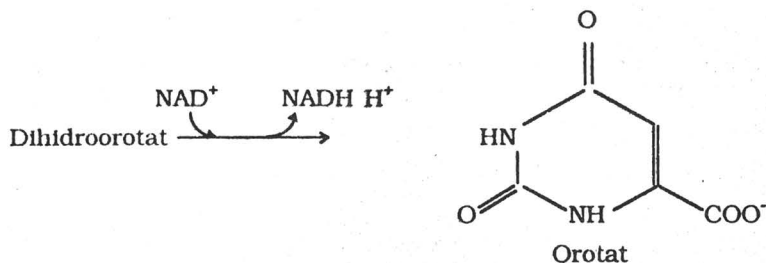
3) Închiderea ciclului pentru formarea nucleului pirimidinic



este catalizată de **dihidroorotază**.

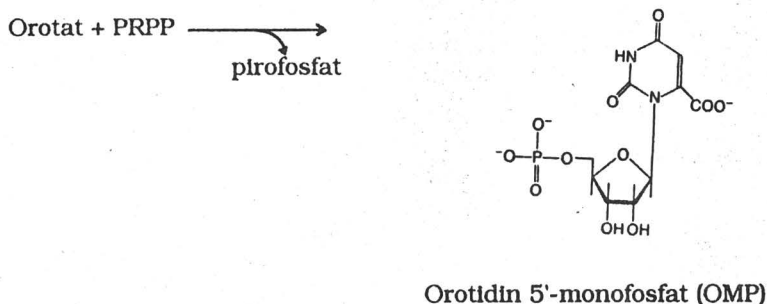


4) Oxidarea dihidroorotatului



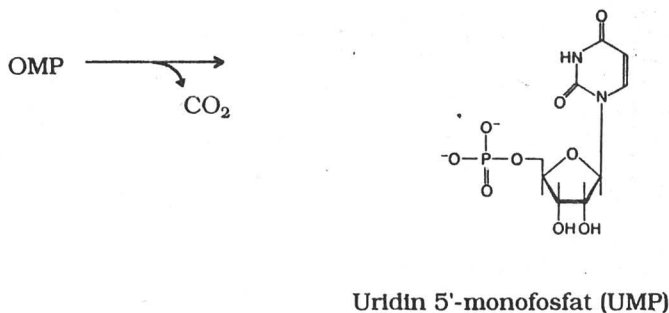
este catalizată de o flavin enzimă - **dihidroorotat dehidrogenaza**.

5) Adăugarea ribozo 5-fosfatului (formarea legăturii N-ribozidice)



este catalizată de **orotat fosforibozil transferaza**.

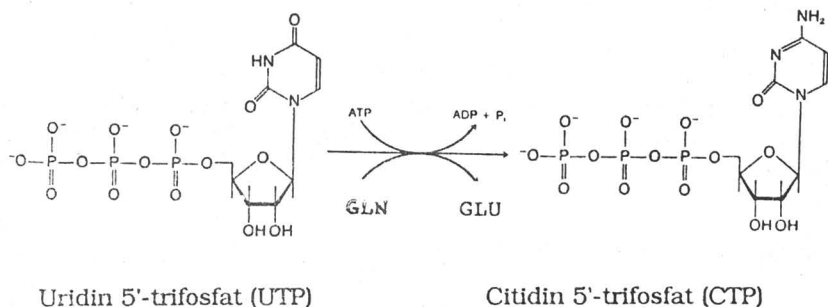
6) Decarboxilarea OMP



este catalizată de **OMP decarboxilaza**. Absența uneia sau a ultimelor două enzime conduce la orotic acidurie (maladie ereditară, caracterizată prin

creștere întârziată, anemie severă și nivele mari de acid ototic excretate în urină).

Prin aceste reacții, este sintetizat UMP. Formarea citidin nucleotidelor are loc numai de la UTP, printr-o reacție catalizată de **CTP sintetaza**. Enzima nu are o necesitate absolută pentru GTP, dar concentrații mici de 0,2 mM stimulează activitatea sintetazei de 5-10 ori.



Calea sintezei **de novo** a nucleotidelor se caracterizează prin două aspecte:

1) În sinteza purin nucleotidelor se formează mai întâi legătura N-glicozidică și apoi nucleul bazei azotate pe când în sinteza pirimidin nucleotidelor se sintetizează mai întâi nucleul și apoi se adaugă și restul pentozo-fosfat;

2) toate enzimele din sinteza purin nucleotidelor se găsesc în citosol, în timp ce în al doilea caz - dihidroorotat dehidrogenaza se găsește în mitocondrie. Celelalte enzime sunt citosolice și se găsesc asamblate în complexe. Carbamoil fosfat sintetaza II, aspartat transcarbamoilaza și dihidroorotaza formează complexul I, în timp ce orotat fosforiboziltransferaza și OMP-decarboxilaza constituie complexul II. Ca rezultat al canalizării intermediarilor între aceste complexe, niciunul din metaboliți nu se găsește în mod normal în fracțiile acido-solubile separate din celule.

◆ Reglarea sintezei pirimidin nucleotidelor

În cazul secvențelor metabolice lineare, de regulă, produsul final inhibă activitatea primei enzime implicată în calea anabolică respectivă - atunci când se acumulează în cantități mai mari decât necesitățile fiziologice. În cazul procariotelor, CTP inhibă activitatea aspartat carbamoil transferazei. Când concentrația CTP (sau a UTP) în celulă este mare, formarea N-carbamoil aspartatului este inhibată.

Spre deosebire de celulele bacteriene, reglarea sintezei la mamifere nu este asigurată de aspartat carbamoil transferaza.

Reglarea sintezei în celulele mamiferelor are loc la nivelul carbamoil fosfat sintetazei II, care este inhibată de UTP.

Următorul situs de reglare al sintezei pirimidin nucleotidelor este la nivelul OMP-decarboxilazei. UMP și într-un grad mai mic, CMP sunt inhibitori ai OMP-decarboxilazei, dar nu și ai orotat fosforibozil transferazei. Cu toate acestea, deoarece aceste doua enzime sunt componente ale complexului II, orotat fosforibozil transferaza nu poate continua să funcționeze, neavând loc transferul produsului. În situația în care OMP-decarboxilaza este inhibată, orotatul și nu OMP se acumulează.

În orotic acidurie, sunt produse cantități excesive de acid orotic datorită deficiențelor în orotat fosforibozil transferaza sau/și OMP decarboxilaza.

Alt situs de reglare este la nivelul CTP sintetazei. Această enzimă prezintă o curbă hiperbolică viteză / [UTP]. În prezența CTP curba devine sigmoidală. În acest fel activitatea CTP sintetazei este represată, prevenind transformarea UTP în CTP.

◆ Căi de salvare a pirimidinelor

Pirimidinele pot fi salvate prin reacția :

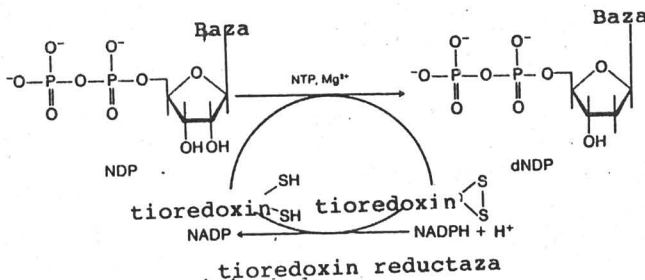


catalizată de **pirimidin fosforibozil transferaza**. Enzima a fost purificată din eritrocitele omului și s-a dovedit a utiliza ca substrate orotatul, uracilul și timina, dar nu și citozina. Ficatul normal, în prezența uracilului îl va degrada rapid, în timp ce ficatul în curs de regenerare va transforma uracilul în UMP. Acesta este rezultatul accesibilității PRPP, a enzimelor și în general a stării metabolice a animalului.

◆ Sinteza deoxiribonucleotidelor

Concentrațiile de deoxiribonucleotide sunt extrem de scăzute în celula în repaus. În faza S, a replicării DNA, concentrația lor crește pentru a suporta sinteza DNA.

Deoxiribonucleotidele sunt formate prin reducerea directă la poziția 2' a ribonucleotidelor corespunzătoare. Reacția este reglată, dar nu alosteric, ci de modificările concentrației enzimei ce catalizează formarea deoxiribonucleotidelor:



Reducerea necesită un NTP specific ca efector pozitiv al ribonucleotid reductazei. Reacția este controlată și de alți NTP care servesc ca efectori negativi (Tabelul 3).

Tabelul 3. Efectori ai ribonucleotid reductazei

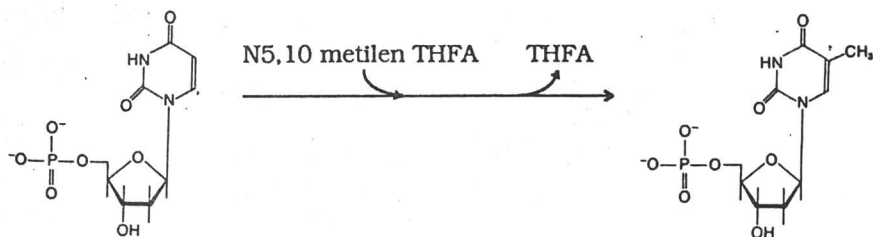
Substrat	Efector pozitiv	Efector negativ
CDP	ATP	dATP,dGTP,dTTP
UDP	ATP	dATP, dGTP
ADP	dGTP	dATP,ATP
GDP	dTTP	dATP

Ribonucleotid reductaza mamiferelor constă din două subunități identice, fără activitate enzimatică. Una dintre subunități are situsul de legare al efectorului, cealaltă - conține numai Fe neheminic. Pentru sistemul de la mamifere nu se știe dacă există o singură enzimă pentru cele patru substraturi sau dacă sunt enzime separate pentru fiecare substrat. dATP este un inhibitor puternic pentru toți NDP, aceasta explicând toxicitatea deoxiadenozinei pentru multe celule ale mamiferelor.

Tioredoxina este o proteină mică de 12 KD, care este oxidată în timpul reducerii grupării 2'-OH a ribozei. Pentru a completa ciclul catalitic, tioredoxina redusă este regenerată de o flavin enzima, tioredoxin reductaza, în prezența de NADPH.

◆ Sinteza deoxitimidilat nucleotidului

Deoxitimidilatul se formează în urma unei reacții unice. Timidilat sintaza catalizează transferul și reducerea unei grupări metilen la o grupare metil :



Deoxiuridin 5'- monofosfat

Timidin 5'-monofosfat

dUMP ia naștere din două căi diferite : 1) dezaminarea directă a dCMP la dUMP în prezența unei dezaminaze și 2) reducerea UDP la dUDP, urmată de hidroliza la dUMP ; prima cale predominând cantitativ în celulele mamiferelor.

3. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE DNA

În structura DNA, există resturi de deoxiadenozină, deoxiguanozină, deoxicitidină și deoxitimidină, legate prin legături 3',5'-fosfodiesterice.

O catenă DNA are o polaritate, având extremități 5' și 3' libere. Prin convenție, un tetranucleotid desemnat prin simbolul ACGT (Figura 6) prezintă la capătul 5' un rest de deoxiadenozină, iar la 3'-de timidină. Deci secvența de baze este scrisă în direcția 5'-3'. Secvențele ACGT și TGCA reprezintă două tetranucleotide diferite, izomere.

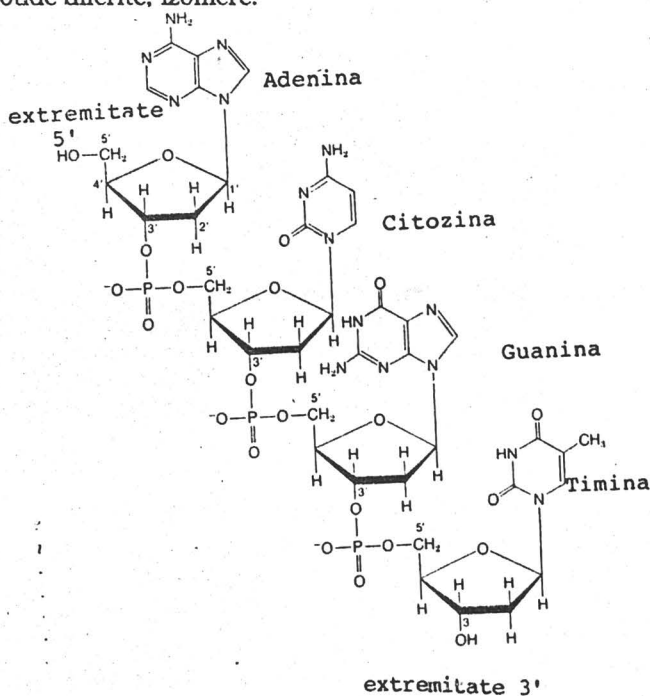


Figura 6. Structura tetranucleotidului 5'-ACGT-3'

◆ Dovezi că DNA este materialul genetic

Bacteria pneumococcus prezintă în mod normal o capsulă polizaharidică lipicioasă și strălucitoare, esențială pentru patogenicitatea ei (provocă pneumonia). Mutanții lipsiți de acest înveliș polizaharidic (le lipsește o enzimă implicată în biosinteza) nu sunt patogeni. Se indică bacteria normală prin litera majusculă S deoarece formează colonii netede (smooth) pe plăci Petri și bacteria mutantă fără capsulă - R datorită coloniilor cu aspect rugos (rough).

În 1929, GRIFFITH a observat că un mutant nepatogen R poate fi transformat în forma S. El a injectat la șoareci un amestec de pneumococi vii R și pneumococi S omorâți termic, amestec care s-a dovedit letal. Sângele șoarecilor morți conține pneumococi vii. Prin urmare pneumococii S omorâți termic s-au transformat în pneumococi S vii.

Această modificare a fost permanentă: pneumococii transformați producând progenituri patogene ale formei S.

S-a demonstrat că transformarea R → S are loc și **in vitro**. Unele celule ale formei R, dintr-o cultură în creștere, au fost transformate în forma S prin adăugarea unui **extract celular** din pneumococii S omorâți termic.

În 1944, AVERY, MAC LEOD și MC CARTY au fracționat extractul acelular din pneumococii S omorâți termic și au purificat principiul activ al transformării, care s-a dovedit a fi DNA. **Această descoperire a condus la atribuirea DNA - proprietatea de specificitate genetică.** Până în 1944, proteinele cromozomiale erau considerate ca purtătoare a informației genetice, DNA atribuindu-se un rol secundar.

Următoarea dovadă în sprijinul rolului genetic al DNA a fost obținută din studiul unui virus ce infectează *E.coli*: bacteriofagul T2 care constă dintr-un miez de DNA, înconjurat de un înveliș proteic. **În 1951, HERRIOTT** a sugerat că virusul acționează ca un mic ac hipodermic, umplut cu principiul transformării: virusul nu intră în celulă, prin coada lui contactează celula gazdă, produce enzimatic un orificiu prin membrana externă și DNA viral intră prin acesta în celula gazdă.

În 1952, HERSHEY și CHASE au marcat DNA fagului cu P^{32} și proteina învelișului cu S^{35} . Cultura de *E.coli* a fost infectată cu fagul marcat, care devine atașat la bacterie o scurtă perioadă de timp. Suspensia este macerată într-un waring blender la 10.000 rpm când se rup conexiunile fag-bacterie. După centrifugare, sedimentul conține bacteriile infectate. Analiza P^{32} și S^{35} arată că:

- majoritatea DNA fagului este găsită în bacterie ;
- majoritatea proteinelor fagului rămân în supernatant.

Deci proteina cu S^{35} rămâne în resturile fagului, având un rol protector și fiind responsabilă pentru absorbția pe bacterie și injectarea DNA în celula gazdă. DNA marcat cu P^{32} are rolul genetic, fiind implicat în creșterea intracelulară a fagului.

Studii ulterioare au arătat că, **la o specie dată, conținutul în DNA este același în toate celulele care au un set diploid de cromozomi și este redus la jumătate în celulele haploide.**

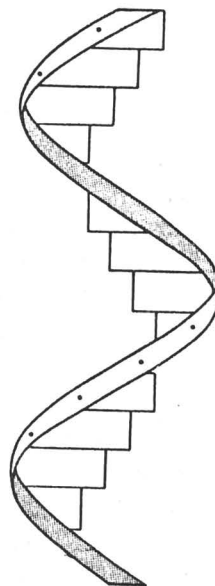
♦ Modelul WATSON-CRICK - B DNA

În 1953, WATSON și CRICK au dedus structura tridimensională a DNA și au intuit mecanismul replicării lui. WATSON și CRICK au analizat fotografiile difracției razelor X prin fibre de DNA, realizate de Rosalind FRANKLIN și WILKINS și au propus un model structural care, în timp, s-a dovedit corect în principalele lui caracteristici. Acestea sunt :

- 1) Două catene polinucleotidice helicoidale sunt răsucite în jurul unei axe comune, în direcții opuse.
- 2) Bazele purinice și pirimidinice sunt orientate spre interiorul helixului în timp ce resturile fosfat și de deoxiriboza se află la exterior. Planurile bazelor sunt perpendiculare pe axa helicală. Planurile deoxiribozei sunt aproape la unghi drept față de cel al bazelor.
- 3) Diametrul helixului este de 20Å. Bazele vecine sunt separate printr-o distanță de 3,4 Å, proiecție pe axa helicală și rotite cu 36°. Deci structura helicală se repetă după 10 resturi ale fiecărei catene, deci la intervale de 34Å.
- 4) Cele două catene sunt menținute împreună prin punți de hidrogen între perechile de baze A=T și G=C.
- 5) Secvența de baze de-a lungul unei catene polinucleotidice poartă informația genetică.

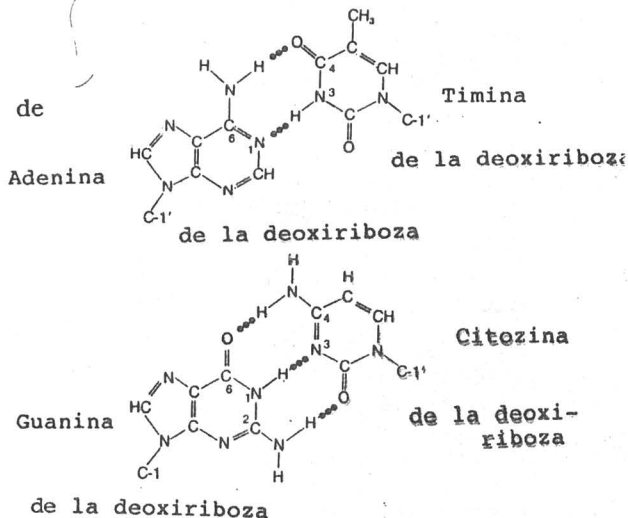
În Figura 7 prezentăm conformația ipotetică a unei singure catene polinucleotidice.

Figura 7. Conformația unei catene polinucleotidice perfect helicoidale. Banda helicoidale reprezintă scheletul legăturilor 3',5'-fosfodiesterice. Dreptunghiurile paralele dispuse perpendicular pe axa structurii reprezintă bazele azotate.



Cel mai important aspect al dublu helixului DNA este specificitatea împerechierii bazelor. WATSON și CRICK au dedus formarea perechilor A-T și G-C pe baza analizei unor factori sterici și a probabilității formării punților de hidrogen. Natura regulată a structurii helixului impune o serie de restricții sterice. Legăturile glicozidice ce sunt atașate la o pereche de baze se găsesc la circa 10,85Å distanță. O pereche de baze purină-pirimidină se potrivește perfect în acest spațiu. În contrast, o pereche de baze purină-purină ar conduce la o distanță mai mare, iar o pereche pirimidină-pirimidină - la o distanță mult mai mică. Modul de împerechere purină-pirimidină este în acord și cu posibilitățile de stabilire a punților de hidrogen.

Figura 8. Perechi de baze WATSON-CRICK



Orientările și distanțele acestor punți de hidrogen între perechile A-T și G-C sunt optime pentru realizarea unei atracții optime între baze. Examinarea modelelor moleculare indică compatibilitatea structurală a acestor baze în formarea de punți de hidrogen colineare.

Acest mod de împerechiere a bazelor a fost susținut și de studiul compoziției în baze a DNA din diferite specii. În 1950, CHARGAFF a găsit că raporturile A/T și G/C sunt aproape egale cu 1 la toate speciile studiate. Interpretarea acestor echivalențe nu a fost posibilă până când WATSON și CRICK nu au propus acest model.

Această relație între bazele unui duplex al DNA este numită **complementaritate**.

O caracteristică importantă a duplexului DNA este ca cele două catene sunt antiparalele. Polinucleotidele sunt structuri asimetrice cu o polaritate intrinsecă. Cele două catene polinucleotidice sunt aliniate în direcții opuse: una are sensul 5'-3', iar cealaltă - sensul 3'-5'. Acest aranjament antiparalel produce o asociere stabilă între catene.

Dublul helix convențional poate avea diferite geometrii; A, B, C, Z. Aceste forme au unele caracteristici comune: localizarea resturilor pentozo-fosfat spre exteriorul helixului, ionizarea totală la pH neutru ce crează un exterior al helixului încărcat negativ, împachetarea spre interior a bazelor, formarea prin încolăcire a celor două catene a unor fose: majoră și minoră.

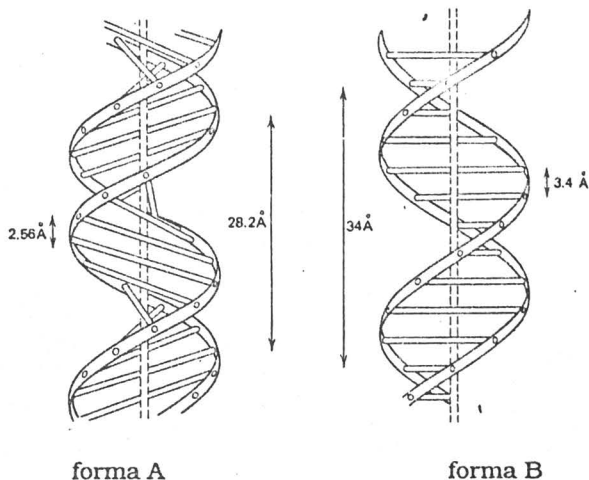


Figura 9. Geometriile A și B ale DNA

În condiții fiziologice și în soluție - DNA se află în forma B descrisă de WATSON și CRICK.

◆ Stabilitatea duplexului DNA

Duplexul DNA adoptă o conformație spațială, stabilizată de multiple interacții. Proprietățile hidrofobe ale bazelor sunt, într-un mare grad, responsabile pentru adoptarea conformațiilor helicale. Examinarea modelelor moleculare ale bazelor relevă că substituții polari ai bazelor azotate (amino, hidroxil) pot interacționa cu alte grupări polare din mediu sau cu moleculele de apă. Planurile nucleelor sunt incapabile de a participa la astfel de interacții și tind să evite contactul cu apa, interacționând între ele și formând o conformație stivuită. Stabilitatea acestui aranjament este reântărită de un interschimb între electronii ce ocupă orbitalii π localizați deasupra și dedesubtul planului bazei. În mod clar, helicele monocatenare sunt stabilizate atât de interacțiile **hidrofobe** cât și de cele de **stivuire** ce implică orbitalii $1/\pi$ ai bazelor.

O contribuție esențială la stabilitatea duplexului DNA o are **natura cooperativă a punților de hidrogen**. Spre deosebire de interacțiile hidrofobe, punțile de hidrogen sunt direcționate și reprezintă un factor discriminator în alegerea corectă a partenerilor care le formează.

Studiile privind efectului diferiților reactivi asupra stabilității dublu helixului DNA au sugerat că efectul destabilizant al unui reactiv nu este proporțional cu capacitatea acestuia de a scinda punțile de hidrogen. Mai degrabă, stabilitatea duplexului este determinată de **solubilitatea bazelor libere** în reactiv, stabilitatea scăzând cu creșterea solubilității (Tabelul 4).

Interacțiile ionice au de asemenea un efect asupra stabilității și conformației dublu-helixului. Într-o soluție cu pH fiziologic, repulsiile electrostatice între grupările fosfat încărcate negativ forțează catena să adopte

o configurație relativ rigidă în formă de baghetă. Aceste forțe repulsive conferă un anumit grad de rigiditate structurii. În condiții fiziologice, la pH neutru dar la concentrații relativ mari de săruri, sarcinile resturilor fosfat sunt parțial neutralizate de cationii prezenți și structura devine un ghem flexibil. În condiții extreme stivuirea bazelor dispare și se distruge helixul (stare random coil).

Tabelul 4. Efectul diferiților reactivi (în concentrații 1 m) asupra stabilității dublu helixului DNA.

Reactiv	Solubilitatea adeninei $\times 10^{-3}$	Molaritatea care produce 50 % denaturare
Etil uree	22,5	0.60
Propionamida	22,5	0.62
Etanol	17,7	1.20
Uree	17,7	1,00
Metanol	15,9	3.50
Formamida	15,4	1,90

Dublu helixul este stabilizat de o energie de circa 1 kcal per pereche de baze. Deci o perturbație minora poate produce ruperea duplexului. Când câteva perechi de baze sunt separate, ele se unesc rapid, și eliberează o cantitate de energie care produce despiralizarea unor perechi de baze adiacente. Deci separările minore ale duplexului DNA pot fi propagate de-a lungul structurii. Modelul Zipper este caracterizat prin deplasarea unor regiuni deschise pe lungimea helixului, indicând natura dinamică a acestei structuri, esențială pentru funcția biologică a DNA.

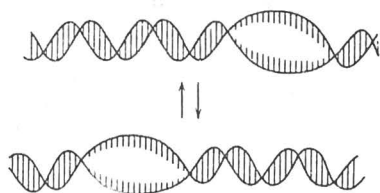
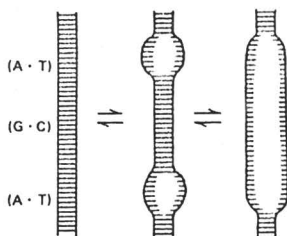


Figura 10. Modelul Zipper al duplexului DNA

Cele doua catene ale unui duplex DNA pot fi ușor separate prin încălzirea unei soluții de DNA sau prin adăugare de acizi sau baze, pentru a ioniza bazele azotate. De exemplu, prin creșterea progresivă a temperaturii se formează bucle deschise, în special la nivelul regiunilor bogate în perechi de baze A-T, a căror diametru crește progresiv cu temperatura.

Figura 11.

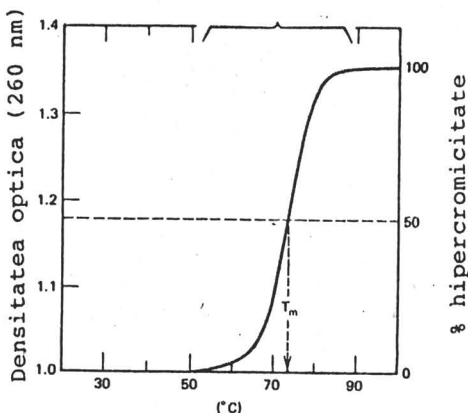
Structura duplexului DNA
la temperaturi crescânde



La temperaturi mari ($70\text{--}80^\circ$) catenele se separă fizic și adoptă o conformație random-coil. Acest proces, numit **denaturare**, este însoțit de modificarea unor proprietăți fizice: cresc densitatea de plutare și absorbanta în UV (la 260 nm) și scade vâscozitatea.

Încălzirea lentă a unei soluții de DNA este însoțită de o creștere gradată a absorbantei deoarece catenele se separă. Cu toate acestea, deoarece interacțiunile dintre cele două catene sunt cooperative, tranziția de la configurația dublu-catenară la cea de random-coil are loc într-un mic interval de temperatură, procesul amintind de topirea unui cristal.

Figura 12. Dependența
absorbantei unei soluții de
DNA de temperatură



Temperatura de topire
(T_m) reprezintă temperatura

la care $1/2$ din structura duplexului este distrusă. În mod normal, absorbanta la 260 nm a unei soluții de DNA reprezintă mai puțin de 40% din valoarea la care ne-am fi așteptat prin însumarea absorbanelor tuturor bazelor componente (**efect hipocromic**), datorită stivuirii și deci a mascării acestora. O structură random-coil prezintă o absorbanta aproximativ egală cu suma absorbanelor componentelor purinice și pirimidinice. Creșterea absorbantei, la denaturare, poartă numele de **efect hipercromic**.

Temperatura de topire a unei molecule de DNA depinde marcant de compoziția ei în baze. Moleculele de DNA, bogate în perechi de baze G-C au o T_m mai mare decât acelea bogate în perechi de baze A-T. De fapt, T_m DNA de la multe specii variază linear cu conținutul în perechi de baze G-C, crescând de

la 77° la 100° când conținutul procentual în G-C crește de la 20% la 78%. Perechile de baze G-C sunt mai stabile decât cele A-T deoarece sunt stabilizate prin trei punți de hidrogen în loc de două. Deci regiunile bogate în A-T ale DNA se topesc primele. **In vivo**, dublu-helixul DNA este topit sub acțiunea unor **proteine specifice**.

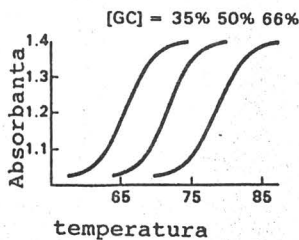


Figura 13. Curbe de topire a DNA

Răcirea rapidă a unei soluții fierbinți de DNA produce în mod normal DNA denaturat, caracterizat prin formarea unor punți de hidrogen între baze complementare - fie între catenele separate, fie între diferitele regiuni ale unei singure catene.

Gradul în care punțile de hidrogen se reformează între perechile de baze originale depinde de mulți factori, printre care: omogenitatea DNA și viteza de răcire. Răcirea lentă, în special în condiții de tărie ionică moderată, furnizează condiții optime pentru restaurarea structurii originale. Acest proces reversibil de renaturare se numește **anelare**. Procesul are loc la tării ionice moderate, deoarece în soluții saline foarte diluate grupările fosfat încărcate negativ generează repulsii electrostatice care împiedică apropierea bazelor azotate. Renaturarea necesită o concentrație minimă de DNA, sub care renaturarea este neglijabilă.

Catenele complementare a unei molecule de DNA complet denaturate anealează într-un proces constituit din două etape. Prima etapă ce implică șansa întâlnirii secvențelor complementare de pe cele două catene diferite este o reacție de ordinul 2. Constanta de viteză a acestei etape este o caracteristică a fiecărui DNA și este invers proporțională cu numărul de perechi de baze (mărimea) din DNA. A doua etapă este de ordinul 1 în care perechile de baze complementare stabilesc punți de hidrogen.

◆ Hibridizarea

Auto-asocierea catenelor complementare a stat la baza tehnicii de **hibridizare**. Acest proces poate avea loc nu numai între catenele DNA dar și între catene DNA și RNA apropiate ca structură primară. Prin această tehnică se determină **cantitatea maximă a polinucleotidului** ce poate fi hibridizată și **viteza de hibridizare**.

DNA de testat pentru hibridizare este mai întâi denaturat. Catenelile singulare rezultate sunt imobilizate prin legare pe un polimer convenabil, suportul rezultat fiind plasat pe o coloană cromatografică. DNA obținut din precursori marcați, de exemplu cu timidină tritiată, este plasat pe coloana care conține legat DNA nemarcat. Viteza cu care radioactivitatea este reținută pe coloană este egală cu viteza de anelare între catenele complementare.

Măsuratori de acest tip au stabilit că DNA celulelor eucariotice conțin secvențe nucleotidice care se repetă de un număr de ori. Principiul acestei determinări este simplu. Pentru un DNA de o mărime dată, viteza anelării depinde de frecvența cu care două secvențe complementare suferă coliziunea. Deci, cu cât numărul de secvențe repetitive dintr-un DNA dat este mai mare, cu atât crește șansa unei coliziuni și deci a procesului de anelare. Pe baza gradului în care anelarea are loc în unitatea de timp se calculează numărul de secvențe repetitive din DNA.

Determinarea cantității maxime de DNA ce poate fi hibridizată a fost utilizată în stabilirea omologiei DNA din diferite specii. Acest fapt este posibil deoarece secvențele de baze ale DNA din fiecare organism sunt unice. Deci secvențele helicoidale anelate prezintă omologii structurale chiar dacă catenele DNA individuale provin din celule diferite. Omologiile observate servesc la stabilirea unor **corelații evoluționare**.

Studiile de hibridizare între DNA și RNA au furnizat informații despre rolul biologic al DNA, în particular despre mecanismul transcripției.

De asemenea, studiile de hibridizare au permis stabilirea mapei fizice a genelor. Aceasta tehnică depinde de vizualizarea directă la microscopul electronic a buclilor monocatenare din structuri de DNA dublu helicoidal, formate artificial, numite **heteroduplexuri**. Acestea sunt constituite prin hibridizarea a două catene DNA complementare. Una dintre aceste catene are o genă lipsă în urma unei mutații cunoscute. Catena complementară se va potrivi perfect pe lungimea primeia cu excepția regiunii unde lipsește gena, la nivelul căreia se formează o buclă vizibilă. Poziția buclei permite localizarea și determinarea genei care lipsește.

♦ **Marimea DNA**

DNA variază ca dimensiuni de la câteva mii de perechi de baze - în cazul DNA virusurilor mici, la câteva milioane - la DNA cromozomial bacterian și la bilioane - la DNA cromozomial de la animale. Mărimea DNA poate fi exprimată prin numărul de perechi de baze, lungimea conturului catenei, greutatea sau masa moleculară. Aceste moduri de exprimare sunt interconvertibile, un DNA cu o masă de 1 milion D are aproximativ 1500 perechi de baze și o lungime de 0,5mm. Deoarece DNA este o macromoleculă, greutatea DNA poate fi transformată în masă moleculară prin împărțirea cu greutatea moleculară medie a unei perechi de baze.

Tabelul 5 arată că într-o celulă cantitatea de DNA crește cu complexitatea funcției celulare.

Moleculele DNA din multe bacterii și virusuri au fost vizualizate direct prin microscopie electronica, toate speciile studiate având o lungime și o asimetrie remarcabile. DNA virusului polioma sau SV40 are 5,1 kilobaze și o lungime de 1,7 μm .

Cromozomul *E.coli* are un diametru de 20Å, fiind constituit dintr-o singură moleculă de DNA de $2,6 \times 10^6$ KD, cu o lungime de 1,4 mm (14×10^6 Å). El are o **formă asimetrică** când este izolat din celulă.

Cel mai mare **cromozom** de la *Drosophila melanogaster* conține o singură moleculă de DNA, de $6,2 \times 10^7$ perechi de baze, ce are o lungime de 2,1cm. Are, de asemenea, o formă asimetrică care-l face susceptibil scindării datorită forțelor de forfecare la care este supus.

Tabelul 5. Cantitatea de DNA din diferite celule

tip de celulă	Organism	pg DNA/ celulă
fag	T 4	$2,4 \times 10^{-4}$
bacterie	E.coli	$4,4 \times 10^{-3}$
fungi	N.crassa	$1,7 \times 10^{-2}$
eritrocite pasăre	pul	2,5
leucocite mamifer	om	3,4

DNA dintr-o singură celulă umană are câțiva metri lungime, sugerând înalta împachetare și caracterul compact al moleculei pentru a se potrivi dimensiunilor mici ale celulei.

Cu toate acestea, celulele plămânului peștilor conțin o cantitate de DNA de 40 ori mai mare decât cea din celulele omului, dar în primul caz DNA are multe secvențe repetitive.

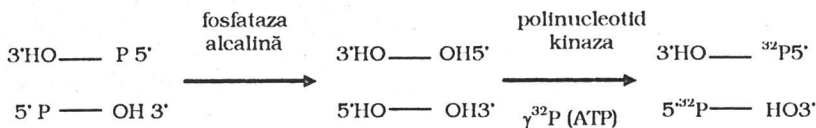
Datorită lungimii extraordinar de mari în raport cu gradul lor înalt de compactare, moleculele de DNA sunt extrem de sensibile la forțele de forfecare ce apar în timpul manipulărilor de laborator. Chiar o pipetare făcută cu grijă poate scinda o moleculă de DNA. În plus, în timpul procesului de izolare este dificil de a preveni ruperea legăturilor fosfodiesterice sub acțiunea endonucleazelor contaminante. Din aceste motive, mărimea precisă a DNA, în special de la organismele superioare este extrem de dificil de determinat exact.

Metodele clasice pentru determinarea masei moleculare a proteinelor nu sunt utilizabile în studiul acizilor nucleici. Centrifugarea la echilibru într-un gradient de densitate (CsCl), microscopia electronică și electroforeza în gel de agaroză sunt metode care dau numai informații asupra masei moleculare a DNA. Microscopia electronica permite măsurarea lungimii catenelor DNA, din care pot fi calculate masele moleculare. Determinarea masei moleculare prin electroforeză se bazează pe capacitatea de cernere moleculară a gelurilor de agaroză. Într-un domeniu limitat al maselor moleculare mobilitatea DNA este direct proporțională cu logaritmul masei moleculare.

Pentru a determina masa moleculară a DNA prin echilibru de centrifugare, un volum mic dintr-o soluție de DNA este plasat la suprafața unui gradient dintr-un tub de centrifugare. La centrifugare, moleculele DNA sedimentează la echilibru prin gradient. În aceste condiții, un DNA cu masa moleculară omogenă va forma o bandă gaussiană centrată în gradient într-o poziție ce corespunde densității macromoleculei. Moleculele cu diferite densități vor fi separate într-o serie de benzi. S-a demonstrat o relație între lățimea benzii și masa moleculară, ce permite determinarea masei moleculare.

O metodă biochimică pentru determinarea masei moleculare este bazată pe marcarea extremităților unei macromolecule. DNA este tratat cu fosfatază alcalină, enzimă care hidrolizează legăturile fosfat-esterice de la extremitatea 5'

a DNA dublu catenar. Aceste extremități sunt apoi esterificate cu ATP- P^{32} în prezența polinucleotid kinazei care transferă P^{32} la capătul 5'. DNA marcat este apoi separat prin centrifugare zonală (gradient de densitate în zaharoză) și analizat din punctul de vedere al absorbanței la 260 nm și al conținutului în P^{32} .



Masa moleculară este calculată din raportul dintre cantitatea de P^{32} și absorbanță, ambele măsurate în maximele benzilor care coincid. Acuratețea acestei metode depinde de omogenitatea preparatului de DNA folosit.

Metodele prezentate mai sus au permis determinarea masei moleculare a DNA cu o precizie de cel puțin 10 %, dar sunt limitate pentru anumite domenii ale maselor moleculare.

Electroforeza este recomandabilă pentru masele moleculare cuprinse între $1,5 \times 10^5$ și $1,5 \times 10^7$. Acest domeniu este crescut până la 2×10^8 în cazul utilizării microscopiei electronice. Metoda cu cele mai multe aplicații este centrifugarea la echilibru a cărui domeniu de utilizare este $2 \times 10^5 + 10^9$, dar în acest caz forțele de forfecare sunt mari.

Pentru DNA cu mase moleculare foarte mari ($> 10^{10}$) se recomandă utilizarea metodei de retardare vascoelastică. Această metoda este bazată pe întinderea moleculelor lungi de DNA prin forțe hidrodinamice. Odată aceste forțe anulate, moleculele de DNA se pot relaxa înapoi la configurația lor normală. Timpul de relaxare este dependent de masa moleculară a moleculelor de DNA și poate fi folosit pentru determinarea acestora.

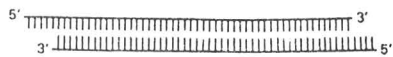
◆ Forma moleculelor de DNA

Duplexul circular.

Din studiile de microscopie electronică s-a putut constata că majoritatea moleculelor de DNA, de la procariote, există în formă circulară. Faptul că E.coli are un cromozom circular a fost de fapt anticipat în urma studiilor genetice care au relevat că harta legării genelor acestei bacterii este circulară. **In vivo**, moleculele DNA au o formă deosebit de compactă. De notat că lungimea cromozomului E.coli este de aproximativ 1000 ori mai mare decât diametrul cel mai mare al bacteriei.

Ulterior s-a demonstrat că multe molecule de DNA (din mitocondrii, cloroplaste, plasmide bacteriene, virusuri ale mamiferelor) au formă de cercuri închise.

În principiu, structura circulară poate fi considerată a rezulta prin formarea unei legături fosfodiesterice între capetele 3' și 5' ale unor polinucleotide lineare.

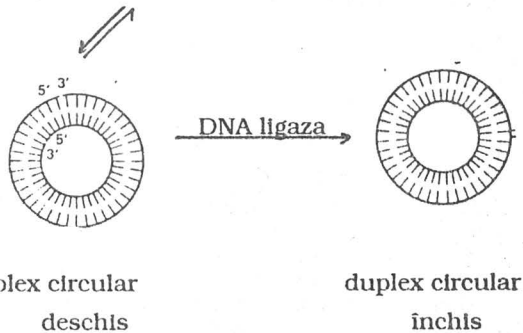


duplex DNA linear

Figura 14.

Circularizarea

unui duplex linear



duplex circular
deschis

duplex circular
închis

Dublu helix linear.

Moleculele DNA din unii bacteriofagi există în formă dublu-catenară lineară, care au tendința de a se circulariza când intră în celula gazdă. Forma lineară a DNA bacteriofagului λ a E.coli, de exemplu, are la capetele 5' secvențe de 20 nucleotide monocatenare și complementare care permit transformarea structurii de **cerc deschis** într-o formă de **cerc închis** (Figura 14).

Deci unele virusuri, de tipul bacteriofagului λ , prezintă **forme lineare și circulare, interconvertibile**. Forma lineară este prezentă în particula virală, în timp ce forma circulară există numai în celula gazdă.

În plus, în unele molecule de DNA (de la bacteriofagi) există regiuni interne mono-catenare, care rezultă prin hidroliza unor legături fosfodiesterice sau sunt datorate lipsei unui rest de deoxiriboza. De exemplu, DNA colifagului T5 constă din două catene: una intactă și o alta cu patru fragmente complementare ordonate perfect de-a lungul primeia. O situație similară s-a observat în structura DNA de la **fagul B3 al Pseudomonas aeruginosa**. Structura totală a dublu helixului este menținută perfect de catena intactă.

DNA mono-catenar.

La unii bacteriofagi foarte mici (ϕ x 174 și G4) DNA poate avea o formă monocatenară. S-a demonstrat că aceste virusuri au DNA monocatenar numai într-o parte a ciclului vieții. **SINSHEIMER** a descoperit că DNA din ϕ x174, un virus mic ce infectează E.coli, este monocatenar. S-au realizat cercetări pe acest DNA și s-au tras următoarele concluzii:

- 1) Nu se respectă raportul **CHARGAFF** : $[A]=[T]$ și $[G]=[C]$.
- 2) Soluțiile de DNA sunt mai puțin vâscoase decât soluția de aceeași concentrație a DNA din E.coli. Proprietățile hidrodinamice ale DNA ϕ x174 sunt similare cu cele ale unui polimer pliat la întâmplare. În contrast, DNA dublu helicoidal se comporta hidrodinamic ca o "bagheta" rigidă.

3) Grupările amino ale bazelor DNA ϕ x174 reacționează ușor cu CH_2O , în timp ce bazele DNA dublu helicoidal sunt inaccesibile reacției.

Caracteristicile acestui DNA monocatenar au creat dubii privind universalitatea schemei replicării semiconservative, propuse de **WATSON** și **CRICK**. Cu toate acestea, s-a demonstrat că DNA ϕ x174 are o structură monocatenară numai o perioadă din ciclul celular al virusului. **SINSHEIMER** a demonstrat că celulele E.coli infectate conțin forma dublu catenară a DNA ϕ x174. Acest DNA dublu catenar a fost numit **formă replicativă**.

◆ Topologia DNA - Superhelixuri

Cunoașterea conformației DNA a devenit posibilă prin aplicarea conceptelor topologiei, o ramură a matematicii care se ocupă cu proprietățile structurale ale unui compus supus diferitelor deformări. În general, DNA dublu-catenar circular posedă niște caracteristici topologice, deoarece structura circulară conține mai puține ture de helix/unitatea de lungime a polinucleotidului decât duplexul linear.

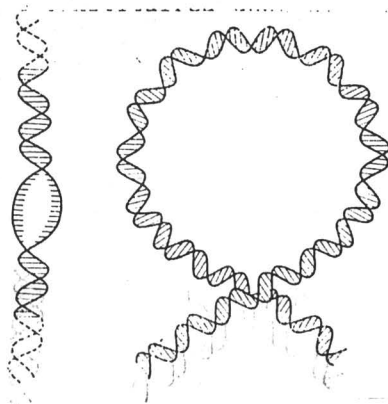
Structura favorabilă termodinamic a dublu-helixului conține într-o tură de helix 10 perechi de baze. Orice deviație de la acest aranjament are ca rezultat formarea unei structuri tensionate.

Unele specii moleculare de DNA circular sunt pliate într-un mod particular, proces numit **superâncolăcire (supercoiling, supertwisting) sau superhelicitate** care constă în răsucirea în spațiu a unui duplex DNA. Termenul de **super** este utilizat pentru a indica faptul că răsucirea helicală se suprapune rotirii celor două catene ale DNA, una în jurul celeilalte. Când aceasta superâncolăcire a fost descoperită, ea a fost considerată fie o caracteristică proprie moleculelor circulare mici (cromozomii virali, plasmidele bacteriene, DNA mitocondrial), fie un artefact experimental.

De fapt, o structură tensionată poate fi obținută prin disocierea punților de hidrogen și prin deschiderea duplexului DNA într-o mică regiune din structura lui macromoleculară și formarea unei bucle (loop) monocatenare. De asemenea, duplexul poate suferi o supraplîiere care poate conduce la un exces de ture de helix pe unitatea de lungime, conducând la conformații superâncolăcite (supercoil) (Figura 15).

Figura 15.

Două reprezentări de structuri
DNA
tensionate



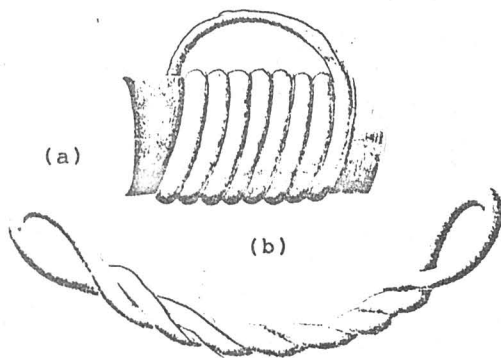
Superâncolăcirea poate fi de două tipuri (Figura 16).

Tipul supercoil "toroidal" apare prin răsucirea duplexului în jurul unui cilindru imaginar, în condițiile fixării sau sudării capetelor lui. Tipul de structură supercoil interrăsucită "interwound" rezultă prin răsucirea duplexului în direcții opuse.

Figura 16

Tipuri de structuri
supercoil:

- (a) toroidal și
- (b) interrăsucit



Moleculele de DNA superâncolăcite se deosebesc de cele relaxate fiind mai compacte având astfel capacitatea de a migra mai rapid la centrifugare sau electroforeză.

Superâncolăcirea este importantă biologic din doua motive :

- 1) o molecula superâncolăcită de DNA are o formă mai compactă decât una relaxată, superâncolăcirea fiind critică pentru împachetarea DNA în celulă;
- 2) superâncolăcirea afectează capacitatea duplexului de a se deplia și interacțiile cu alte molecule.

Deși DNA cu forma de cerc închis este un candidat ideal pentru apariția unei structuri superhelicale, orice segment de DNA dublu-catenar ce este imobilizat într-un fel la ambele capete poate suferi o superpliere. Deci apariția unei structuri superhelicale este o proprietate caracteristică nu numai a DNA circular, ci a oricărei molecule de DNA ancorate.

DNA celulelor animale, în mod normal se asociază cu proteinele nucleare. Chiar în absența unei structuri circulare, DNA din celulele animalelor pot adopta o formă suprahelicală datorită asocierii lui cu proteine nucleare ce creează numeroase domenii topologice închise. În plus, majoritatea fagilor bacterieni, virusurilor animale, plasmițele bacteriene și organitele celulare conțin DNA superhelicoïdal.

Conformația unui DNA poate fi definită prin trei parametri topologici:

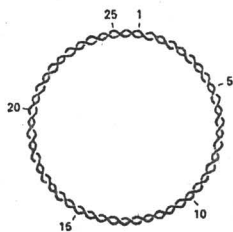
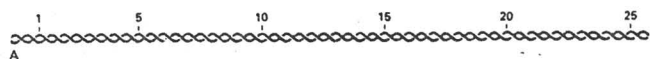
- 1) **L- numărul de legare (linking number)** reprezintă numărul de câte ori o catenă a unei molecule de DNA se rotește în jurul celeilalte spre dreapta. Acest număr este ușor de calculat când duplexul moleculei este considerat coplanar. Valoarea lui L este invariabilă, indiferent dacă molecula circulară este răsucită sau distorsionată cât timp legăturile covalente din catenele polinucleotidice rămân intacte.

Capitolul 16

2) **T** - este numărul de rotații (twist) complete ale unei catene polinucleotidice în jurul axei duplexului. Prin convenție T este pozitiv pentru turele unui duplex orientate spre dreapta, cum este cazul B-DNA în soluție. T este egal cu numărul de perechi de baze împărțit la 10,5 (numărul exact de perechi de baze per tura de duplex B în condiții fiziologice).

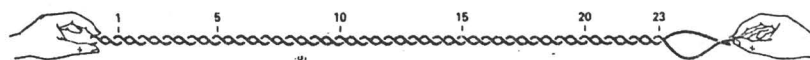
3) **W** - (writing number) este o măsură a superhelicității și reprezintă numărul de ture pe care axa duplexului îl face în cadrul conformației, deci numărul de structuri superâncolăcite.

T și W pot să nu fie numere întregi, în timp ce L este un număr întreg. Acești parametri sunt legați prin relația : $L = T + W$.



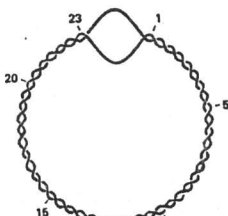
B $L = 25, T = 25, W = 0$

cerc relaxat



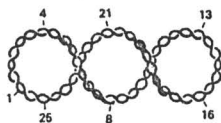
DNA linear despiralizat cu doua ture

la dreapta



D $L = 23, T = 23, W = 0$

cerc despiralizat



E $L = 23, T = 25, W = -2$

superhelix negativ

Figura 17. Definierea parametrilor topologici ai unei molecule de DNA

Noțiunea de superhelicitate este dificil de explicat fără examinarea unui model fizic. Să considerăm un duplex de 260 perechi de baze (pb) în forma B-DNA (Figura 17 A). Numărul de ture helicale în acest DNA linear este 25 (260/10,4). În general, T are o valoare aproape egală cu numărul de perechi de baze împărțit la 10,4. Prin unirea capetelor acestui helix rezultă un **DNA circular relaxat** (Figura 17 B), având parametrii topologici : $L=25$, $T=25$ și $W=0$.

O structură lineară total diferită poate fi obținută prin despiralizarea duplexului linear cu două ture (Figura 17 C). Prin unirea capetelor structurii C rezultă un DNA circular care se poate plia într-o conformație conținând 23 ture de helix B și o buclă despiralizată ($L=23$, $T=23$, $W=0$) (Figura 17 D). Alternativ, el poate adopta și o conformație de superhelix negativ cu 23 ture de helix B și două ture de superhelix ($L=23$, $T=25$ și $W=-2$) (Figura 17 E). De fapt, această formă superâncolăcită este energetic favorizată având o buclă despiralizată.

DNA despiralizat (D) sau cu structura superâncolăcită (E) au același L dar diferă prin numărul de ture din helix T și prin numărul de ture de superhelix W. Aceste forme pot fi intertransformate fără scindarea catenei DNA deoarece au același $L = 23$.

În Figura 18 prezentăm o diagramă a unor molecule de DNA care diferă prin structurile lor superhelicate.

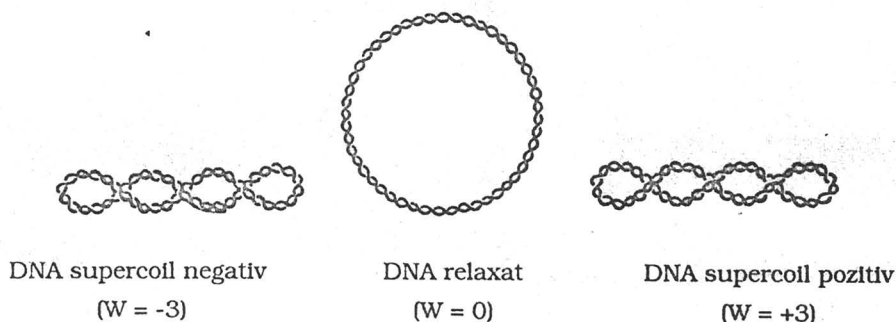


Figura 18. Structuri topologice închise de DNA cu diferiți parametri W

Din examinarea acestor tipuri de modele pot fi desprinse două concluzii:

- 1) pentru un DNA relaxat numărul de legare L trebuie să fie egal cu numărul de ture helicale (T);
- 2) DNA cu un L specific poate adopta diferite aranjamente în spațiu, toate conformațiile cu același L fiind interconvertibile, fără scindarea unor legături covalente.

Un DNA real, superhelicat, trebuie să prezinte un echilibru între aceste forme și multe alte aranjamente intermediare din spațiu care au același L.

Moleculele diferind numai prin L sunt izomeri topologici sau **topoizomeri**. Topoizomerii DNA pot fi intertransformați prin scindarea uneia sau ambelor catene DNA.

Deci, variațiile în valoarea L a DNA conduc la modificări în gradul de superhelicitate (W), mai degrabă decât în numărul de ture Watson-Crick (T). Topoizomerii diferind prin valorile L și deci prin W chiar cu 1 pot fi ușor separați prin electroforeză în gel de agaroză.

Gradul de superhelicitate a DNA poate fi exprimat prin **diferența de legare specifică** (λ), care este independentă de lungimea moleculei:

$$\lambda \equiv \frac{(L - L_0)}{L_0} \quad \text{unde } L_0 \text{ este valoarea } L \text{ pentru molecula DNA circulară}$$

relaxată. Pentru DNA superâncolăcit (E) $L=23$, $L_0=25$ și $\lambda=-0,08$. Această cantitate este numită, de asemenea, **densitatea superhelixului**, deoarece în cazul majorității moleculelor naturale de DNA λ ia valori între $-0,03$ și $-0,09$. Semnul negativ semnifică faptul că superhelixurile DNA din natură sunt pliate spre stânga.

Superplierea negativă pregătește DNA pentru separarea catenelor în **replicare, recombinare și transcripție**. Superplierea pozitivă conferă DNA un caracter compact la fel de eficient ca cea negativă, dar separarea catenelor este mai dificilă.

Topoizomeraza I

Intertransformarea topoizomerilor DNA este catalizată de enzimele numite topoizomeraze, descoperite de **WANG și GELLERT**. Aceste enzime modifică valoarea L a DNA prin cataliza unui proces care are loc în trei etape :

- 1) scindarea unei catene din duplexul DNA;
- 2) trecerea unui segment de DNA prin aceasta creștătură;
- 3) sudarea creștăturii.

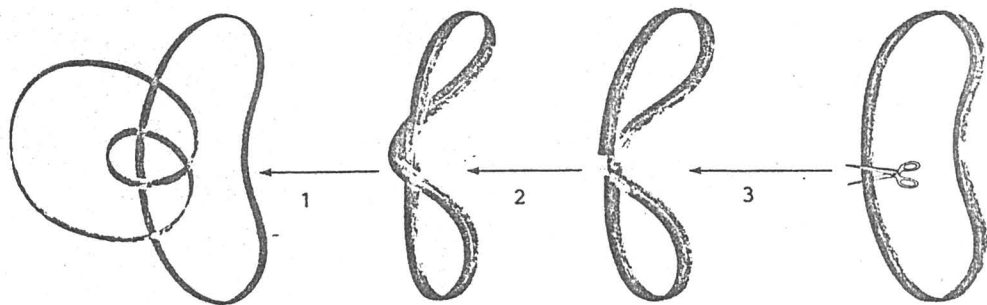


Figura 19. Topoizomerazele catalizează modificări în valoarea L a DNA. DNA giraza scindează ambele catene ale DNA și trece un segment de DNA dublu-catenar prin această creștătură. Unele catene sunt apoi resudate.

Tipul I de topoizomeraze scindează numai o catenă din duplexul DNA în timp ce tipul II clivează ambele catene. Topoizomeraza I din *E.coli* catalizează relaxarea DNA superâncolăcit negativ. La început s-a considerat că topoizomeraza I acționează întâi ca o nuclează și apoi ca o ligază. Astăzi se

consideră că o extremitate a catenei scindate rămâne activată prin legarea covalentă la enzimă. De fapt, un complex covalent enzima-DNA a fost izolat dintr-un amestec de topoizomerază I denaturată cu dodecilsulfat de sodiu (SDS) în care extremitatea 5'-fosfat a unei catene DNA este legată la o grupare hidroxil a unui rest de tirozina din structura acestei enzime de 100 KD.

Figura 20. Intermediarul covalent enzimă-substrat în acțiunea topoizomerazelor. Capătul 5'-P al catenei scindate este legat covalent la gruparea hidroxil a unui rest de tirozină din enzimă.

Gruparea 3'-OH de la celălalt capăt al catenei scindate atacă acest intermediar activat pentru sudarea structurii circulare. Trebuie subliniat că legăturile chimice din substratul și produsul acestei reacții sunt identice, unicul rol al topoizomerazelor I fiind acela de a realiza o scindare tranzitorie ce permite trecerea unui segment al DNA. L crește cu +1 la fiecare ciclu catalitic.

Introducerea unei ture în plus în molecula DNA cu $\lambda = -0,06$ necesită circa 9 Kcal/mol.

Formarea structurii superhelicate la *E.coli* este catalizată de DNA giraza, o topoizomerază formată din două catene A de 105 KD și două catene B de 95 KD, enzimă care transformă energia liberă a ATP în energie torsională de superpliere. Reacția începe cu despiralizarea a circa 200 pb din DNA, care pur și simplu învește enzima. Legarea ATP induce apoi scindarea ambelor catene ale DNA.

Capătul 5'-fosfat al fiecărei catene scindate este legat la un rest tirozină specific de pe o subunitate A a enzimei. Ancorarea celor două extremități ale DNA scindat este esențială pentru prevenirea liberei lor rotații, care ar conduce rapid la pierderea structurii superâncolăcite.

◆ Forme topologice de DNA

O trăsătură marcantă a helixului DNA-B este prezența a două tipuri de fose (Figura 21), numite: fosa majoră (12 Å lățime) și fosa minoră (6 Å lățime).

Topoizomeraza

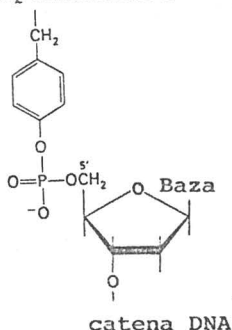
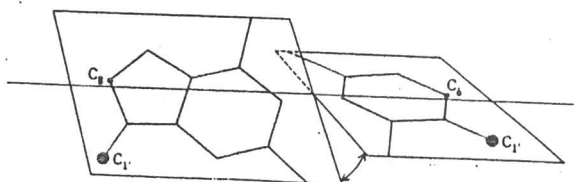
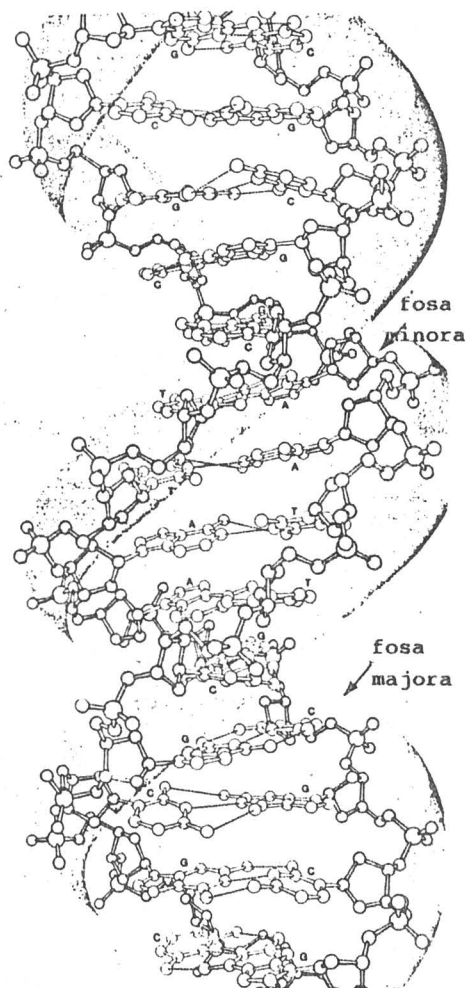


Figura 21.

Reprezentarea schematica a DNA-B

De notat că fosa majoră joacă un rol distinct, permițând interacții cu proteine ce recunosc specific anumite secvențe de DNA. Modelul propus de **WATSON și CRICK**, cunoscut ca B-DNA a fost bazat pe schițele de difracție a razelor X pe fibre de DNA, care furnizează informații generale asupra duplexului și asupra comportamentului mediu al constituenților. Mult mai multe informații pot fi obținute prin analiză cu raze X a cristalelor de DNA. Cu toate acestea astfel de studii se pretează la studiul oligonucleotidelor sintetice. Astfel de analize au relevat o mare variabilitate și diversitate structurală.

DICKERSON a realizat o astfel de analiză pe un dodecamer (dCGCGAATTCGCG), constatând o structură generală asemănătoare cu modelul **WATSON CRICK**, cu mici deviații locale. Modelul **WATSON CRICK** are 10 resturi de nucleotide per tură completă de helix și prezintă un rest rotit față de următorul din catenă cu 36° . În dodecamerul lui **DICKERSON**, unghiurile de rotație variază de la 28° la 42° , apărând și o rotație opusă a unei baze dintr-o pereche față de axa lor.



Această trăsătură structurală numită rotire propulsată (*propeller twisting*) mărește capacitatea de stivuire a bazelor din fiecare catena polinucleotidică. Alte surse de variabilitate sunt răsucirea bazei (*base roll*) și înclinarea unor perechi de baze față de alte perechi vecine. Aceste variații locale din dublu helix depind de secvența în baze. a acestuia.

O altă trăsătură a helixului B-DNA este aceea că poate adopta o structură "*supercoiled*" fără o modificare esențială în structura locală. Această ușoară deformare este importantă biologic deoarece permite formarea DNA circular și interacția (acoperirea) lui cu proteine. Deformabilitatea DNA îi permite concentrarea într-un volum mult mai mic, deci adoptarea unei structuri compacte.

Studiile de difracție cu raze X pe fibre de DNA deshidratate au pus în evidență alt tip de DNA, denumit A-DNA, ce apare când umiditatea relativă este redusă sub aproximativ 75 %. Helixul A, asemenea celui B este dublu catenar, format din două catene antiparalele pliate spre dreapta. Helixul A este mai lat și mai scurt decât helixul B și perechile lui de baze sunt mai înclinate în raport cu axa helixului. Multe din diferențele structurale dintre cele două tipuri de helixuri apar datorită plierii diferite a unităților de deoxiriboză. Nucleele furanozice pot fi împachetate astfel că patru atomi sunt aproape coplanari iar al cincilea este la aproximativ 0,5 Å distanță de acest plan. Structura formată când C-2' este în afara planului este numită C-2' endo, iar cea formată când C-3' este coplanară - C-3' endo.

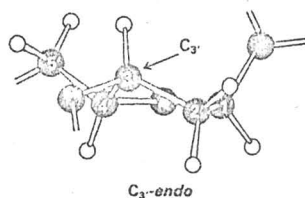
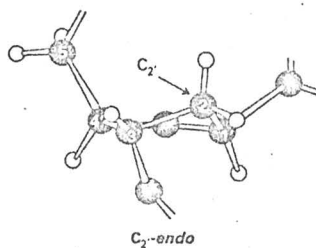


Figura 22. Orientarea legăturilor fosfodiesterice și a legăturii glicozidice: C-2' endo din DNA-B și C-3' endo din A-DNA.

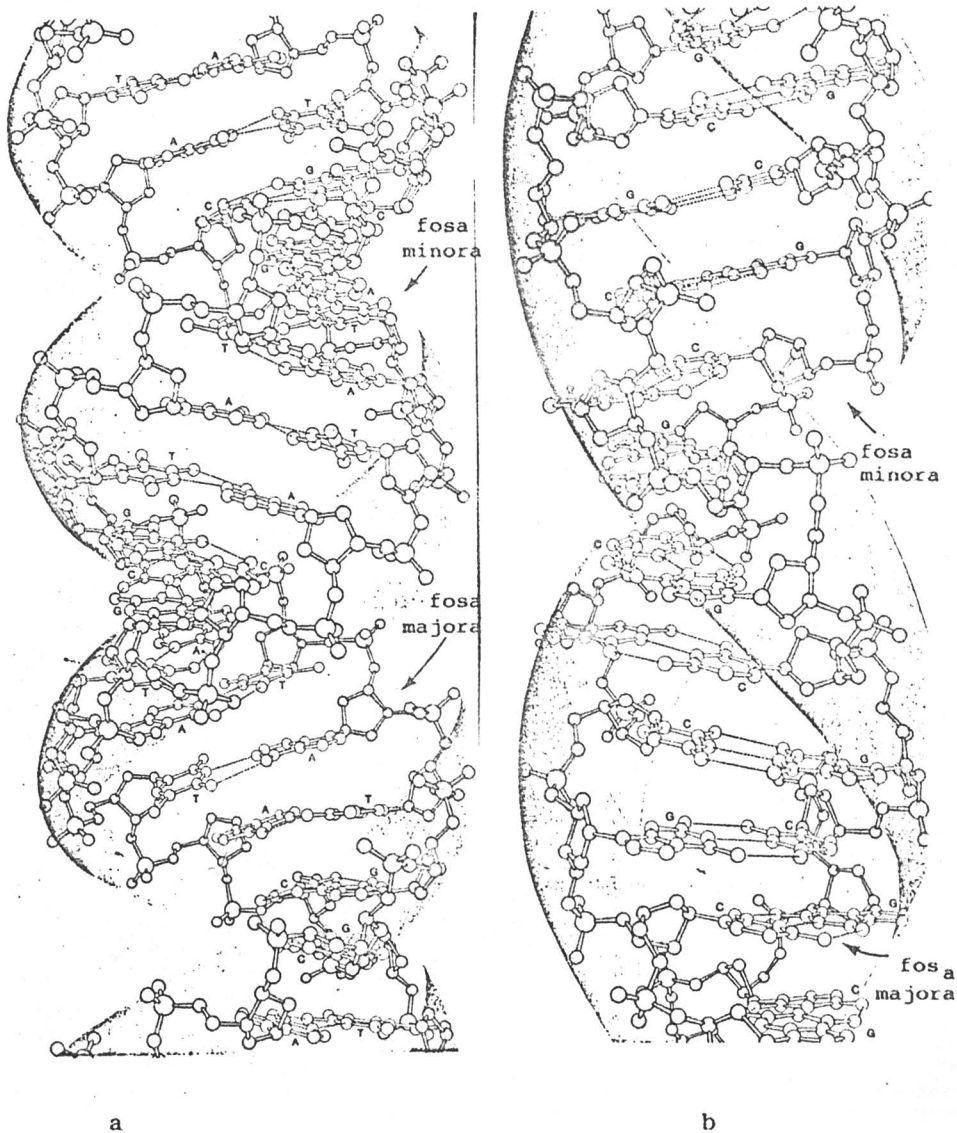


Figura 23. Reprezentarea schematica a DNA-A (a) si DNA-Z (b)

A-DNA are unități glucidice C-3' endo, în timp ce B-DNA are C-2' endo. Această diferență structurală mică în unitățile pentozice are consecințe importante. Conformația C-3' endo conduce la o pliere la 19° a perechilor de baze față de helixul normal, iar fosa minoră aproape dispare. Grupările fosfat din A-helix leagă mai puține molecule de H₂O decât în B-DNA. Deci deshidratarea favorizează forma A (Figura 23 a)

A-helixul nu trebuie considerat o formă deshidratată a DNA. Regiunile dublu catenare ale RNA (cu structuri "hairpins") și hibridii RNA-DNA adoptă configurații apropiate A-DNA. Gruparea 2'-OH a ribozel din RNA previne formarea unui helix tip WATSON CRICK datorită împiedicărilor sterice. Această grupare HO-2' nu se potrivește în B-helix, fiind prea apropiată de cei trei atomi ai grupării fosfat vecine și unul al bazei următoare. În A-DNA, în contrast, gruparea HO-2' este în afara acestei structuri.

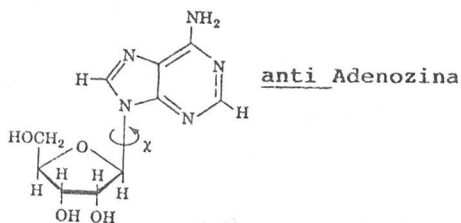
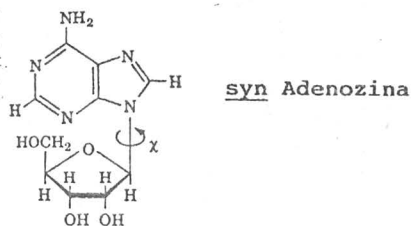
Un al treilea tip de helix al DNA a fost descoperit de WANG și RICH când au studiat structura cristalină a hexamerului sintetic d(CGCGCG). Ei au observat că acest hexanucleotid formează un duplex de catene antiparalele stabilizat prin punți de hidrogen conform perechilor de baze WATSON CRICK, dar răsucite spre stânga, în care scheletul legăturilor fosfodiesterice formează un zig-zag în jurul helixului, de unde a primit și numele de Z-DNA. În acest caz unitatea repetitivă este un dinucleotid d(XpYp) și nu un mononucleotid, în care X este uzual un rest de pirimidină, iar Y - un rest de purină. A treia diferență este că Z-DNA conține o singură fosă helicală (Figura 23 b).

Difracția razelor X și studiile RMN pe fibre de polinucleotide complementare de purine și pirimidine alternante, au evidențiat ca acestea adoptă conformația Z la concentrații saline mari, care reduc interacțiile de repulsie electrostatică între grupările fosfat aparținând catenelor opuse.

Structura Z-DNA apare în secvențe alternante de purine și pirimidine, când legăturile glicozidice alternează între anti și syn. Baza azotată și pentoza sunt distanțate când sunt anti și apropiate când sunt syn.

Un nucleotid pirimidinic formează obișnuit o legătură glicozidică anti, în timp ce un nucleotid purinic o poate forma în poziția anti sau syn. Toate legăturile glicozidice în A- și B-DNA sunt anti. În Z-DNA, pirimidina este anti și purina este syn.

O secvență Z-DNA poate apare în interiorul B-DNA. Transformarea unei secvențe alternative pirimidină-purină de la B la Z-DNA este însoțită de deplasarea perechilor de baze cu 180° și rotirea resturilor pentozei bazelor purinice (Figura 24). Cu toate acestea formarea Z-DNA este termodinamic nefavorabilă. Repulsile electrostatice între grupările fosfat sunt mai puternice în forma Z (sunt la 8 Å distanță) decât în B-DNA (sunt la 12 Å distanță). Tranziția spre forma Z este favorizată de metilarea citozinei la C-5, o modificare ce apare la eucariote. O grupare metil la acest situs din Z-DNA umple o mica fosă și promovează



interacțiilor hidrofobe, fiind mai puțin expusă solventului în Z-DNA decât în B-DNA.

Procesul de superpliere ("supercoiling") negativă, ce apare frecvent în moleculele de DNA în mod natural de asemenea promovează tranziția B - Z. Într-adevăr, anticorpii specifici pentru Z-DNA colorează regiuni discrete din cromozomii eucariotelor. De asemenea, DNA eucariotelor conțin multe secvențe repetitive pirimidine-purine (de tip CACACA) ce pot forma Z-DNA.

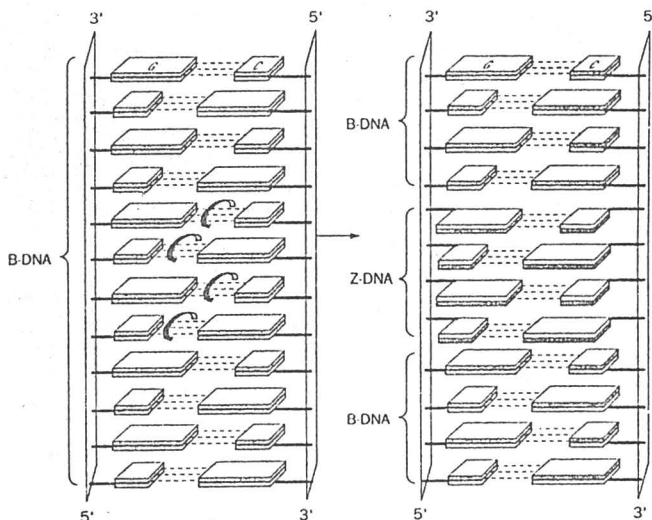


Figura 24 . Transformarea unui segment de DNA-B în DNA-Z printr-o rotire a perechilor de baze.

Majoritatea DNA dintr-un genom bacterian sau eucariotic există în forma clasică **WATSON CRICK** . Cu toate acestea descoperirea Z-DNA subliniază caracterul flexibil, dinamic al moleculei DNA.

În legătură cu rolul fiziologic al DNA-Z **RICH** propune că transformarea DNA-B în DNA-Z poate surveni în anumite segmente ale cromozomului și acționând ca un comutator în reglarea expresiei genetice.

În Tabelul 6 prezentăm comparativ caracteristicile celor trei tipuri de DNA forma, diametrul și sensul helixului , configurațiile celor două fose, precum și o serie de parametri cristalografici.

Tabelul 6 - Compararea A-,B- și Z-DNA

Forma	Tipul de helix		
	A cea mai lată	B intermediară	Z mai alungită
Creșterea / pereche de baze	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Diametrul helixului	25,5 Å	23,7Å	18,4Å
Sensul rotirii	dreapta	dreapta	stânga
Legătura glicozidică	anti	anti	anti-C,T syn-G
Perechi de baze/tură helix	11	10,4	12
Pitch per tură de helix	24,6 Å	33,2 Å	45,6Å
Înclinarea perechilor de baze față de axa normală a helixului	19°	1°	9°
Fosa majoră	adâncă și largă	plată	îngustă și adâncă
Fosa minoră	foarte largă	îngustă și adâncă	foarte îngustă și adâncă

◆ Materialul genetic în RNA virusuri

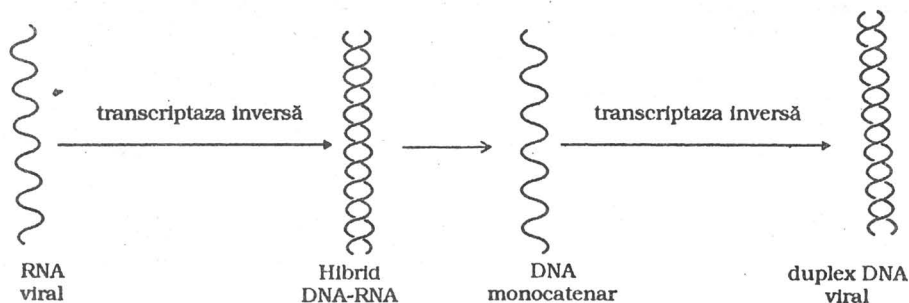
Genele tuturor organismelor procarlote și eucarlote sunt formate din DNA. În virusuri, materialul genetic poate fi constituit și din RNA, un polimer neramificat constând din ribonucleotide legate prin legături 3',5'-fosfodiesterice. Moleculele de RNA pot fi monocatenare sau dicatenare. RNA nu poate forma un duplex tip B-DNA datorită împiedicărilor sterice produse de grupările 2'-HO ale resturilor de riboză. Cu toate acestea, RNA poate adopta o formă dublu-helicoidală modificată în care perechile de baze sunt înclinate la aproximativ 20° față de poziția perpendiculară la axa helixului, o structură tip A-DNA.

Virusul mozaicului tutunului, care infectează frunzele plantei de tutun este unul dintre cel mai bine studiate RNA-virusuri. El constă dintr-o singură catenă de RNA (6390 nucleotide) înconjurată de o proteină formată din 2130 subunități identice. Prin tratarea virusului cu fenol este posibilă separarea proteinei de RNA. În timp ce proteina virală nu este infecțioasă, RNA viral are această proprietate biologică.

Virusul mozaicului tutunului se replică în celula plantei infectate, sintetizând inițial catena (-) RNA care este complementara catenei (+) din particula virală. Catena (-) RNA apoi servește ca țipar pentru sinteza unui mare număr de catene RNA (+), ce sunt încorporate în noi particule virale ce părăsesc celula plantei. Aceste sinteze sunt catalizate de RNA polimeraze RNA dependente.

Un număr de RNA virusuri produc tumori maligne după ce pătrund în animalele gazdă susceptibile. **Virusul sarcomului ROUS** este un RNA virus tumoral, ce conține un RNA monocatenar. O trăsătură importantă a acestor virusuri tumorale este că ele se replică prin intermediarii DNA.

RNA din particula virală, indicat prin catena (+), intră în celula gazdă fiind țiparul sintezei unei catene complementare (-) de DNA cu ajutorul enzimei transcriptaza inversă, ce este o DNA polimerază RNA-dependență. În acest caz, informația este citită de pe RNA pe DNA. . Catena (-) DNA apoi servește ca țipar pentru sinteza (+) DNA. Rezultă un DNA dublu catenar care este încorporat în DNA cromozomial al celulei gazdă, urmând a fi replicat împreună cu DNA celular normal în cursul diviziunii celulare. Genomul viral integrat este apoi exprimat ca (+) RNA viral și proteine virale, care se asamblează în noi particule virale. Aceste virusuri se mai numesc retrovirusuri, deoarece informația genetică trece de la RNA la DNA.



4. STRUCTURA RNA

RNA este o macromoleculă lungă, neramificată, constând din ribonucleotide legate prin legături 3',5'-fosfodiesterice. După cum deja s-a menționat, bazele azotate din structura RNA sunt: adenina, guanina, citozina și uracilul, iar din structura pentozel este riboza.

Numărul de nucleotide din RNA variază de la 75 la câteva mii. Cu excepția unor virusuri, moleculele de RNA sunt uzual monocatenare. În consecință, o moleculă de RNA nu trebuie să aibă un raport echimolecular între baze complementare. Moleculele de RNA conțin regiuni cu structură dublu-catenară care conduc la formarea unor structuri buclă "hairpin", în care există perechi de baze: A-U și G-C. Împerechiera bazelor în RNA este frecvent imperfectă, G putând forma perechi de baze cu U, dar mai puțin stabile decât cu C. Proporția de regiuni helicale în diferite tipuri de RNA variază mult, fiind de circa 50 %.

Celulele conțin diferite tipuri de RNA. **RNA mesager (mRNA)** este tiparul pentru sinteza proteinelor. O moleculă de mRNA este produsă de o genă sau de un grup de gene, în consecință mRNA este clasa cea mai heterogena de RNA. În E.coli, lungimea medie a unei molecule de mRNA este de circa 1,2 kb.

Tabelul 7 .Tipuri de RNA în E.coli

Tip	Cantitatea relativă (%)	Coeфициent de sedimentare	Masa (KD)	Număr de nucleotide
rRNA	80	23	$1,2 \times 10^3$	3700
		16	$0,55 \times 10^3$	1700
		5	36	120
tRNA	15	4	25	75
mRNA	5	heterogen		

RNA de transfer (tRNA) transportă aminoacizii într-o formă activată spre ribozom pentru formarea legăturii peptidice, într-o secvență comandată de tiparul mRNA. Există cel puțin un tip de tRNA pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi. tRNA consta din circa 75 nucleotide și are o masă moleculară de circa 25 KD.

RNA ribozomal (rRNA) este componenta majoră a ribozomilor, dar rolul lor precis în sinteza proteică nu este cunoscut. Descoperirea rolului catalitic al RNA complică și mai mult presupunerea unor funcții concrete. În E.coli există trei tipuri de rRNA: 23 S, 16 S și 5 S, definite pe baza constantelor lor de sedimentare. Câte o moleculă din fiecare din aceste specii este prezentă în ribozom.

Celulele eucariote conțin în plus mici molecule de RNA. **Small nuclear RNA (sn RNA)** sunt molecule care participă la scindarea-sudarea (splicing)

exonilor RNA. O moleculă mică de RNA din citosol joacă rolul în marcarea (*targeting*) proteinelor nou sintetizate.

◆ mRNA

Conceptul de mRNA a fost formulat în 1961 de **JACOB și MONOD**. Deoarece proteinele sunt sintetizate în citoplasmă, este evidentă necesitatea prezenței unui intermediar chimic care să poarte mesajul specificat de gene. Cel doi mari biochimiciști au propus următoarele caracteristici pentru molecula acestui mesager :

- 1) să aibă o viață scurtă;
- 2) să fie un polinucleotid ;
- 3) să fie heterogen ca dimensiuni deoarece și genele variază ca lungime;
- 4) să fie asociat cu ribozomii, sediul sintezei proteice ;

Se presupunem cazul general al bacteriei E.coli infectată de un bacteriofag. După infectare, celula sintetizează majoritar proteinele fagului, neobservându-se o creștere concomitentă și a sintezei RNA total. Numai o mică fracție de RNA, cu viață scurtă și cu compoziție în nucleotide similară cu cea a DNA fagal, apare într-o concentrație mai mare. Oamenii de știință au fost puși în situația a discerne între două posibilități :

- 1) DNA fagului specifică un nou set de ribozomi, tipici fagului, care permite sinteza prioritară a proteinelor fagale.
- 2) ribozomii sunt structuri nespecializate ce primesc informația genetică de la gene sub forma unui mRNA instabil.

Ipoieza existenței unui RNA mesager cu viață scurtă a fost testată de **BRENNER, JACOB și MESELSON** pe E.coli infectată cu bacteriofagul T 2. Aceste experiențe au stabilit dacă noi ribozomi sunt sintetizați după infecție sau dacă noi RNA se leagă la ribozomii preexistenți. Bacteriile care au fost crescute într-un mediu care conține izotopii grei : ^{14}N și ^{13}C , infectate cu fag, au fost transferate imediat pe un mediu cu izotopii ușori: ^{13}N și ^{12}C . Ribozomii sintetizați înainte și după infecția cu fagul T 2 au putut fi separați pe baza densităților lor diferite, prin centrifugare în gradient de densitate. RNA nou sintetizat a fost marcat cu ^{32}P sau ^{14}C -uracil, iar proteina nou sintetizată cu ^{35}S . Aceste experiențe au arătat că :

- 1) ribozomii n-au fost sintetizați după infecție;
- 2) RNA a fost sintetizat după infecție. Majoritatea RNA marcat se află în picul ribozomilor "gri", deci majoritatea RNA nou sintetizat a fost asociat cu ribozomii preexistenți. Alte experiențe au arătat că acest nou RNA suferă un turnover rapid în timpul creșterii fagului.
- 3) ^{35}S apare tranzitoriu în picul ribozomilor gri, deci proteinele sunt nou sintetizate în ribozomii preexistenți.

Deci ribozomii sunt structuri nespecifice care sintetizează la un timp dat o proteină dictată de un mesager.

În 1961, **SPIEGELMAN** a pus la punct tehnica hibridizării care a adus date noi privind natura mesajului genetic la nivel citoplasmatic. DNA dublu catenar a fost despiralizat prin topire conform metodei lui **MARMUR și DOTY**,

rezultând catenele lui separate. Se poate obține un hibrid DNA-RNA cu o singură catenă a DNA numai dacă RNA are o secvența de baze complementară. Acest tip de experiențe au avut următoarele etape:

- 1) Marcarea RNA sintetizat după infectarea E.coli cu fagul T2 cu ^{32}P și a DNA fagal cu ^3H .
- 2) Un amestec de T2 mRNA și T2 DNA a fost încălzit la 100° pentru separarea catenelor DNA. Soluția cu amestecul de acizi nucleici a fost lăsată să se răcească lent la temperatura camerei.
- 3) Amestecul răcit a fost analizat prin centrifugare în gradient de densitate, colectându-se probe de la diferite nivele ale tubului de centrifugă.

Se separă trei benzi. Frația cu cea mai mare densitate (la baza tubului) este cea a RNA monocatenar. Urmează spre gura tubului banda DNA dublu catenar. A treia bandă corespunde moleculelor hibrid DNA-RNA. Deci T2 mRNA formează o structură hibridă cu T2 DNA. T2 mRNA nu formează hibrizi cu DNA derivat de la alte bacterii și virusuri.

Deci, în cazul T2 mRNA și a T2 DNA, secvența de baze este complementară.

Prin aceasta tehnică a hibridizării s-a determinat și dacă rRNA și tRNA sunt de asemenea sintetizați pe tipare de DNA. În acest caz, formarea hibrizilor DNA-RNA a fost demonstrată prin tehnica filtrării, mai simplă, mai rapidă și mai sensibilă. Se supune filtrării pe nitroceluloză un amestec de RNA monocatenar, DNA dublu catenar și hibridul lor DNA-RNA. RNA monocatenar a fost filtrat, în timp ce duplexul DNA și hibridul DNA-RNA a fost reținut. Diferite tipuri de RNA din E.coli marcate cu ^{32}P au fost adăugate la DNA E.coli nemarcat. Aceste amestecuri au fost încălzite, apoi răcite lent și supuse filtrării pe nitroceluloză. A fost măsurată radioactivitatea reținută pe filtru, demonstrându-se că toate speciile moleculare de tRNA și rRNA au secvențe complementare în genomul E.coli.

Recunoașterea existenței unui RNA mesager a stimulat investigarea gășirii unei enzime care sintetizează RNA conform mesajului înscris în DNA. În 1960, HURWITZ și WEISS au descoperit independent enzima: RNA polimeraza-DNA dependentă, care izolată din E.coli are următoarele necesități pentru a acționa:

- 1) țiparul optim este un DNA dublu catenar. DNA monocatenar poate funcționa și el ca țipar. RNA, mono- sau dicatenar nu poate fi un țipar eficient și nici hibridul DNA-RNA.
- 2) Precursorii activați: ATP, GTP, CTP și UTP.
- 3) Ioni metalici divalenți: Mg^{2+} sau Mn^{2+} , primul funcționând și in vivo.

RNA polimeraza catalizează inițierea sintezei și alungirea catenei RNA conform reacției:



Sinteza are loc în direcția 5'-3', gruparea 3'-OH terminală a catenei în creștere realizând un atac nucleofil asupra grupării fosfat a rNTP care urmează a fi adăugat conform mesajului țiparului. Sinteza devine ireversibilă prin hidroliza pirofosfatului sub acțiunea pirofosfatazei anorganice. RNA polimeraza nu necesită un primer la care să adauge resturi rNMP putând cataliza sinteza

primei legături fosfodilesterice(Figura 25). În sinteza RNA, tiparul DNA este semiconservat. La E.coli, toate speciile de RNA sunt sintetizate prin acțiunea aceleiași RNA polimeraze.

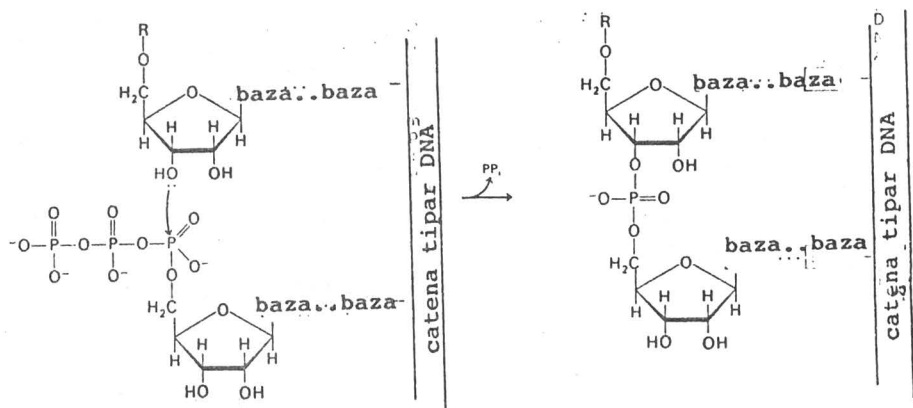


Figura 25. Mecanismul de acțiune al RNA polimerazel

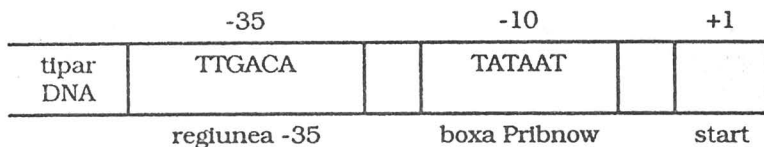
În celulele mamiferelor, există mai multe RNA polimeraze-DNA dependente care catalizează sinteza mRNA, rRNA și t RNA.

La multe virusuri există enzime care sintetizează RNA total diferiți de cel ale celulelor gazdă. De exemplu, RNA replicaza din RNA fagul $\phi\beta$, este o RNA polimerază RNA dependentă ce copie informația de pe un tipar RNA.

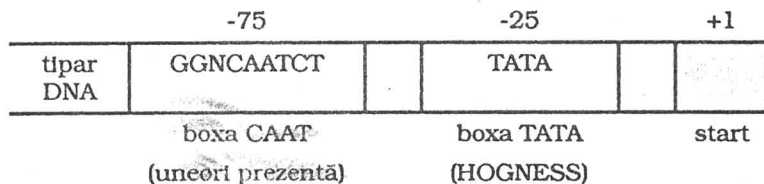
Tiparul DNA conține regiuni numite situsuri promotor ce specifică legarea RNA polimerazei DNA-dependente și deci de unde începe transcripția (de regula o purină și notată +1). La bacterii există două secvențe poziționate spre capătul 5' înaintea primului nucleotid care urmează a fi transcris. Aceste secvențe s-au dovedit importante în inițierea transcripției :

- 1) prima numită **Pribnow box** care are **secvența consens TATAAT** centrată în poziția -10 și
- 2) o a doua numită **regiunea -35** ce are **secvența consens TTGACA**.

Genele eucariotice ce codifică proteine au situsuri promotor cu o secvență consens **TATAAA** centrată aproximativ în poziția -25. Această secvență, numită **TATA box** (sau **boxa Hogness**), este similară **boxei Pribnow** de la procarlote. Mulți promotori eucariotici conțin de asemenea și secvența consens **CAAT** centrată aproximativ în poziția -75. Transcripția genelor eucariote este stimulată de **secvențe enhancer**, care se găsesc la distanță de câteva kilobaze de situsul start, fie pe partea 3', fie pe partea 5'.



A

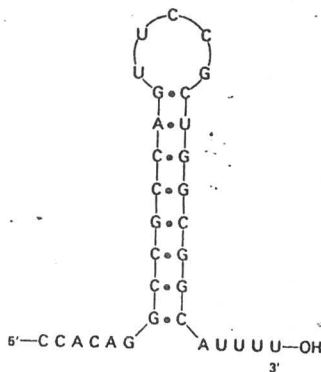


B

Figura 26. Situsuri promotor pentru transcripțiile la procariote (A) și la eucariote (B).

RNA polimeraza DNA dependentă acționează de-a lungul țiparului DNA și transcrie o catenă până atinge un situs terminator. Semnalul de terminare, la *E.coli*, este o structură "hairpin" cu perechi de baze constituită în molecula RNA nou sintetizată. Această structură este formată prin împerecherea unor baze în secvențe complementare bogate în G și C. RNA nascent disociază spontan de RNA polimerază când acest hairpin este terminat prin mai multe resturi U.

Figura 27. Secvența de baze la extremitatea 5' a unui mRNA la *E.coli*.



Există și posibilitatea ca sinteza RNA să fie terminată prin acțiunea unei proteine rho (ρ). Există puține detalii privind terminarea transcripției la eucariote.

◆ Codul genetic

Relația dintre secvența de baze în DNA și secvența de aminoacizi a proteinelor codificate este stabilită de codul genetic. **CRICK, BRENNER** și alții au stabilit următoarele trăsături ale codului genetic:

- ⇒ un aminoacid este codificat de un grup de trei baze, numit codon;
- ⇒ codul genetic este constituit din codoni nesuprapuși parțial ;
- ⇒ secvența de baze este citită secvențial de la un punct fix de start ;
- ⇒ pentru mulți aminoacizi există mai mult decât un codon care-l specifică.

În descifrarea cuvintelor de cod s-au utilizat molecule de mRNA sintetice. Astfel, în 1961 **NIRENBERG** a pus în evidență ca polimerul sintetic poli (U), într-un sistem acelular de sinteză proteică, conduce la sinteza poli (Phe), deci codonul UUU codifică fenilalanina. Un astfel de sistem acelular de sinteză proteică se prepară astfel: celule de E.coli sunt mojarate în prezență de alumina, resturile celulare fiind îndepărtate prin centrifugare. Extractul supernatant conține DNA, mRNA, tRNA, ribozomi, enzime și alți constituenți celulari. Dacă se adăuga ATP, GTP și aminoacizi marcați radioactiv se poate urmări incorporarea lor în proteine prin incubarea amestecului la 37°C timp de o oră. Prin tratare cu acid tricloroacetic se precipită proteinele și se stopează procesul, în supernatant rămânând numai aminoacizii liberi. Precipitatul este spălat și radioactivitatea este măsurată pentru a determina cantitatea de aminoacid marcat ce a fost incorporată în proteina nou sintetizată. La adăugarea enzimei deoxiribonuclează, tiparul pentru mRNA este distrus și sinteza proteică încetează în câteva minute. Dacă se adaugă mRNA, sinteza proteică este reluată.

mRNA sintetice au fost preparate utilizând polinucleotid fosforilaza, enzima descoperită în 1955 de **Marianne GRUNBERG-MANAGO** și de **Severo OCHOA**, care catalizează reacția :



și care nu necesită un tipar. În general, RNA sintetizat cu această enzimă are o compoziție dictată numai de raporturile ribonucleotidelor prezente în amestecul de incubare, secvența rezultată având un caracter întâmplător. Poli (U) a fost sintetizat prin incubarea unor concentrații mari de UDP cu enzima. La fel s-au sintetizat mRNA sintetici : Poli (A)și Poli (C) punându-se în evidență ca tripleta AAA codifica lisina, iar CCC - prolina . Poli (G) nu poate funcționa ca un mRNA sintetic deoarece formează o structură triplu catenară helicoidală.

Au fost utilizate apoi ca tipare polinucleotide sintetice constând din două feluri de baze. De exemplu, un copolimer întâmplător a U și G conține opt triplete diferite: UUU, UUG, UGU, GUU, UGG, GUG, GGU și GGG. Cu un tipar ca conține un raport molar de 0,76 U și 0,24 G este incorporată Phe în cel mai mare grad deoarece predomină tripleta UUU. Urmează Val, Leu, Cys, Trp și Gly în ordine descrescătoare. Deci Val, Leu și Cys sunt specificați de codoni care conțin 2U și 1G, iar Trp și Gly sunt specificați de codoni care conțin 1U și 2G.

KHORANA a reușit sinteza de poliribonucleotide cu o secvență repetitivă definită. De exemplu, poli (UC) permite sinteza poli (Ser-Leu), deoarece tripleta UCU codifică serina, iar CUC - leucina , etc.

Acest tip de experimente au permis stabilirea compoziției codonilor pentru toți cei 20 aminoacizi. S-au determinat 64 codoni dintre care 61 corespund unor aminoacizi particulari, iar trei : UAG, UGA și UAA nu specifică nici un aminoacid ci indică sfârșitul translației. Codonii de terminare nu sunt utilizați cu aceeași frecvență, tripleta UAA (*ochre*) reprezentând semnalul normal(Tabelul 8) .

Analiza codului genetic a permis remarcarea unor trăsături generale:

⇒ **Codul genetic este degenerat.** Un aminoacid este codificat de mai multe cuvinte de cod. Degenerarea nu este uniformă, astfel SER și ARG sunt aminoacizii care au șase codoni, VAL, PRO, THR, ALA și GLY prezintă patru codoni, ILE are trei codoni, iar PHE, TYR, HIS, GLN, ASN, LYS, ASP, GLU, CYS câte doi codoni, MET și TRP fiind unicii aminoacizi codificați de câte o singură tripletă de nucleotide.

Tabelul 8 . Codul genetic

	U	C	A	G	
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 } Met	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

Degenerarea cuvintelor de cod este deosebit de evidentă la nivelul celei de a treia baze nucleotidice, la extremitatea 3' a codonului.

Codonii care specifică același aminoacid se numesc sinonimi. Majoritatea codonilor sinonimi diferă numai prin ultima bază a tripletelor: doi codoni XYZ și XYU codificând uneori același aminoacid, în timp ce doi codoni XYG și XYG - uzual codifică același aminoacid. De exemplu, prolina este codificată de patru codoni: CCU, CCC, CCA și CCG. Deci, primele două litere ale unui cuvânt de cod reprezintă determinantii principali ai specificității mesajului genetic.

CRICK denumește cea de a treia literă de cod, mai puțin specifică, **bază wobble**.

Semnificația biologică a degenerării codului genetic nu a fost total elucidată. O explicație posibilă ar fi faptul că degenerarea minimizează efectul unor mutații, modificarea celei de a treia baze neconducând la înlocuirea unui aminoacid cu altul în structura proteinei mutante.

⇒ **Codul genetic este fără punctuație.** Nu există semnale care să indice începutul și sfârșitul citirii mesajului unui codon.

⇒ **Cuvintele de cod au o polaritate specifică 5' - 3'.** Astfel, codonul UCA specifică SER, iar codonul ACU - treonina.

⇒ **Codul genetic este aproape universal.** Un mare număr de cercetări au indicat faptul că diferite organisme vii utilizează aceleași structuri de codoni în specificarea aminoacizilor. Astfel, când ribozomii din reticulocitele de țepure care conțin mRNA ce codifică hemoglobina sunt incubati cu sistemele aceluia de sinteză a proteicilor din E.coli se observă că are loc sinteza acestei proteine.

S-au observat excepții la codul genetic al mitocondriilor omului:

Tabelul 9. Abateri de la codul genetic universal în mitocondriile omului.

codon	Cod standard	Cod mitocondrial
UGA	STOP	TRP
UGG	TRP	TRP
AUA	ILE	MET
AUG	MET	MET
AGA	ARG	STOP
AGG	ARG	STOP

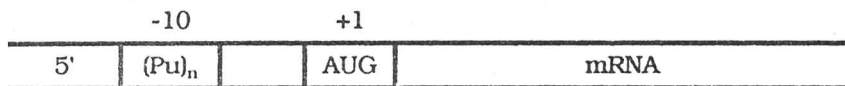
Variații apar în mitocondrii și ciliate - ceea ce reprezintă un punct de ramificare timpuriu în evoluția eucariotelor.

⇒ **Evoluția codului genetic.** Mulți cercetători consideră că acest cod genetic a apărut în cursul evoluției moleculelor biologice. Se pare că la început cuvintele codului genetic erau constituite din două nucleotide, într-un număr suficient pentru a specifica cei 15 aminoacizi primordiali. Cea de a treia literă de cod putea fi folosită ca o virgulă, un semn de punctuație în translația mesajului genetic. Când pe parcursul evoluției au

apărut noi aminoacizi s-a ivit necesitatea sporirii numărului cuvintelor de cod și codonii au căpătat structuri de triplete nucleotidice. Un argument în favoarea ipotezelor evoluției codului genetic este prezentă feredoxinelor din clostridii anaerobe ancestrale care au în compoziția lor numai 13 aminoacizi diferiți.

Semnalul start de începere a sintezei proteice este complex. La bacterii codonii AUG și mai puțin frecvent GUG pot constitui un tip de astfel de semnal. Deoarece AUG este și codonul pentru inserarea metioninei, iar GUG - a valinei, semnalul start trebuie să fie mai complex. În Figura 28 prezentăm semnale start pentru inițierea sintezei proteice la (a) procariote și (b) eucariote.

(a)



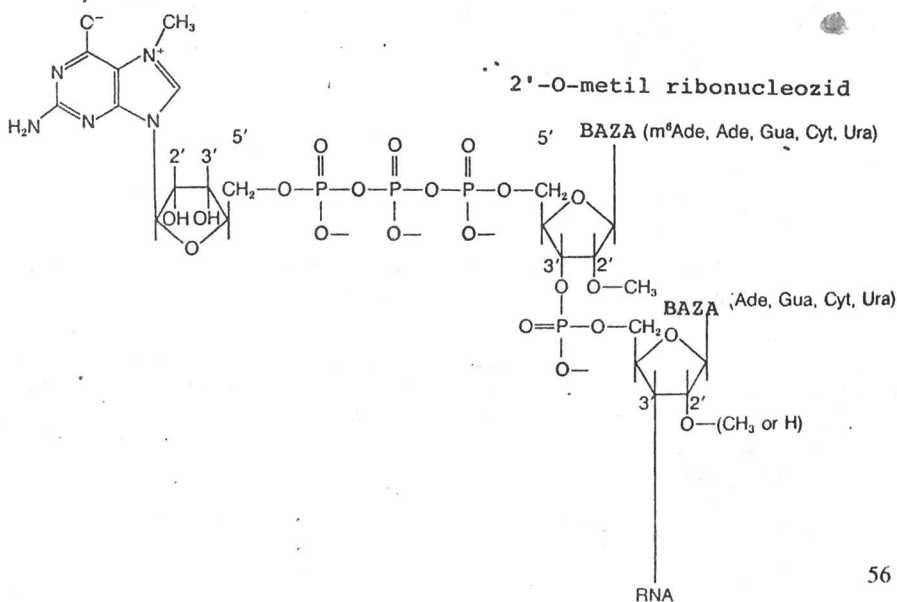
(b)



Figura 28. Semnale start pentru inițierea sintezei proteice la procariote (a) și la eucariote (b)

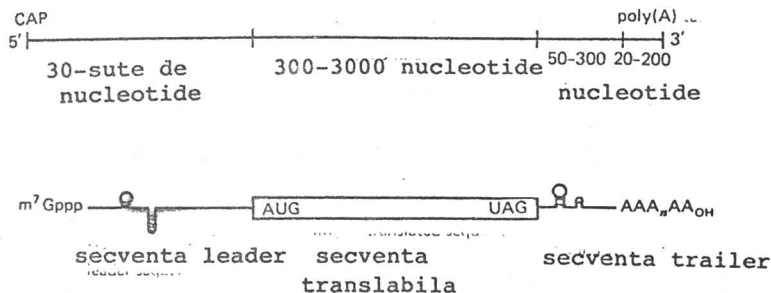
Deci, la bacterii o secvență de ribonucleotide bogată în purine "avertizează" asupra unui codon start AUG. La eucariote, tripleta AUG este în vecinătatea capătului 5' al mRNA, care are o structură cap (m⁷G₅ppp) care blochează capătul 5'.

7 metil guanozina



Structura *cap* este atașată la primul nucleotid transcris, care are uzual o purină metilată la gruparea 2'-OH a ribozei.

mRNA eucariotelor are niște trăsăturile structurale unice, ce nu apar în rRNA și tRNA, ce îl ajută în realizarea funcției lui biologice.



Extremitatea 5' este blocată prin structura *cap*, urmează o regiune "leader" netranslată ce conține o **secvență promotor**. Regiunea translabilă începe cu AUG și se termină cu UAG, UAA sau UGA, fiind urmată de o regiune "trailer" netranslabilă și de o coadă poli (A) la capătul 3'. Regiunea "leader" are o lungime variabilă și include situsul de atașare la ribozom. Coada poli (A) variază de la 20 la 200 nucleotide.

Structura 5'cap blochează acțiunea RNA exonucleazelor și fosfatazelor care pot ataca aceasta extremitate, având și un efect pozitiv asupra inițierii translației. Structura **m⁷GpppN** are o conformație rigidă care, favorizând stivuirea bazelor, promovează formarea unor complexe de inițiere stabile. Un mesaj cu un capăt 5' metilat este mai eficient decât nemetilat **5'-GpppN** sau necapat **7'-pppN**.

Rolul cozii poli (A) este neclar, existând posibilitatea de a funcționa în transportul mRNA prin membrana nucleară, de a împiedica atacul exonucleolitic la capatul 3', sau în interacția mRNA cu proteine ribozomale sau neribozomale. Deși majoritatea mRNA au o coadă poli (A), există și excepții care nu au această caracteristică.

Există două tipuri de proteine asociate cu mRNA eucariotelor. Un tip se leagă puternic la regiunea 5' cap și al doilea tip la extremitatea 3'.

mRNA eucariotelor conține informația pentru o singură catenă polipeptidică, deci este monocistronic, în timp ce mRNA procariotelor este policistronic.

♦ tRNA

Secvența de baze a unui tRNA a fost determinată pentru prima dată în 1965 de **HOLLEY**, în cazul tRNA^{Ala} din drojdie. Această performanță, rodul a șapte ani de cercetări, a permis stabilirea rolului adaptor a acestei molecule de 76 resturi de ribonucleotide. Ulterior și alte molecule de tRNA au fost studiate și structurile lor elucidate. Toate moleculele de tRNA prezintă niște caracteristici comune :

- 1) Au structuri primare monocatenare, fiind constituite din 73+93 ribonucleotide și au mase moleculare de circa 25 KD.

2) Conțin multe baze neobișnuite, 7-15 per moleculă. Multe dintre ele sunt derivați metilați ai A, U, G și C, metilarea survenind prin modificarea enzimatică a unui tRNA precursor. Metilarea previne formarea unor perechi de baze conferind o structură secundară tipică tRNA și crescând caracterul hidrofob a unor regiuni, importante în stabilirea de interacții cu enzime citoplasmatică și proteine ribozomale. Alte modificări sunt importante în recunoașterea codonului.

3) Capătul 5' al tRNA este constituit din pG.

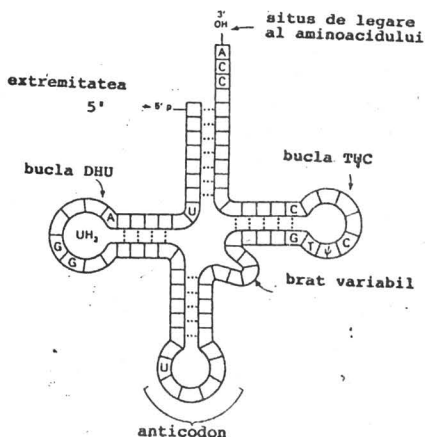
4) Secvența de baze de la extremitatea tuturor tRNA este CCA. Aminoacidul activat este atașat la gruparea 3'-OH a adenozei terminale.

5) Aproximativ jumătate din nucleotidele din tRNA formează perechi de baze și segmente duplex. Cinci segmente nu formează perechi de baze: **regiunea terminală 3'-CCA**; **bucla TΨC** care are secvența ribotimină-pseudouracil-citozină; **brațul extra** care conține un număr variabil de resturi; **bucla DHU** care conține câte resturi de dihidrouracil și bucla anticodon.

6) Bucla anticodon constă din șapte baze cu următoarea secvență:

5'-Py-Py-X-Y-Z-Pu modificată-Baza variabilă-3'

Figura 29 .Trasaturile generale structurale ale moleculelor de tRNA



Structura tridimensională a unei molecule de tRNA a fost elucidată în 1974 prin studii de cristalografie cu raze X realizate de RICH și KLUG. Analizele lor independente asupra tRNA^{Phe} au condus la următoarele concluzii:

1) Molecula are forma literel L.

2) Există două segmente de dublu-helix. Fiecare din aceste segmente conține circa 10 perechi de baze, ceea ce corespunde unei ture de helix. Segmentele helicale sunt perpendiculare unul pe celălalt, conferind moleculei forma literel L (Figura 3o .) . Împerechiera bazelor în modelul frunzei de trifol, postulată pe baza studiilor de secvență, este corectă.

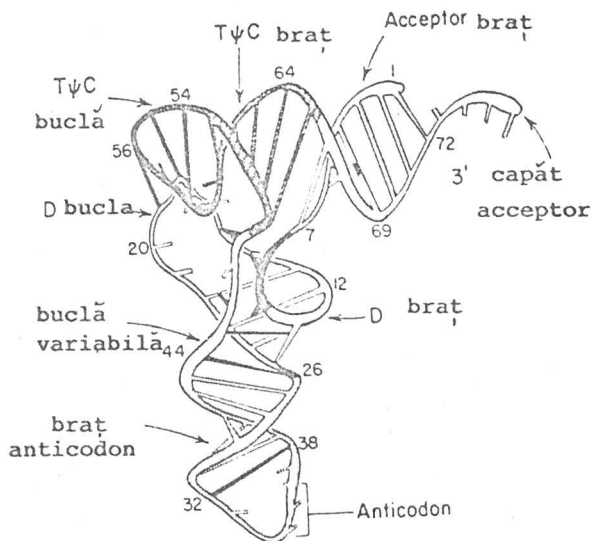
GG,AA și AC. Mai mult, scheletul ribozo-fosfat interacționează cu unele baze și chiar cu alte regiuni ale acestuia. Grupările 2'-OH ale resturilor de riboză acționează ca donori/acceptori de protoni în multe interacții între nuclee aromatice adiacente și joacă un rol major în stabilizarea arhitecturii moleculei.

4) Segmentul CCA terminal conținând situsul de atașare al aminoacidului este la un capăt al literei L. La celălalt capăt este bucla anticodon. Distanța dintre restul aminoacid din aminoacil-tRNA și anticodon este de circa 80Å. Buclele DHU și TΨC formează colțul moleculei și își poate modifica conformația în timpul activării aminoacizilor și de asemenea în timpul sintezei proteice pe ribozom.

5) Segmentul terminal CCA și regiunea helicală vecină nu interacționează puternic cu restul moleculei. Această parte a moleculei își poate modifica conformația în timpul activării aminoacizilor și de asemenea în timpul sintezei proteice pe ribozom.

Figura 30

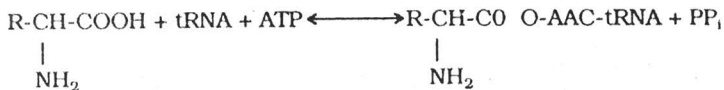
Structura terțiară a tRNA



Analizele cu raze X ale tRNA eucariotelor arată o arhitectură moleculară similară.

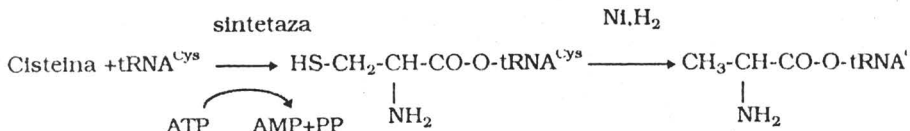
Brațul de legare al aminoacidului este implicat în legarea unui anumit aminoacid, conform instrucțiunilor date de anticodonul tRNA care se leagă la un codon specific din structura mRNA. În 1957, ZAMECNIK și HOAGLAND au descoperit enzimele care catalizează această legare (activarea aminoacidului):

aminoacil-tRNA sintetaze:



Există cel puțin câte un tRNA specific și câte o sintetază specifică pentru fiecare din cei 20 aminoacizi proteici. Codonul stop UAA, UAG și UGA nu sunt recunoscuți de molecule tRNA ci de niște proteine specifice, numite factori de eliberare.

Anticodonul tRNA este situsul de recunoaștere al codonului din structura mRNA, cu care stabilește punți de hidrogen. S-a demonstrat că structura aminoacidului atașat la tRNA lui specific nu este recunoscută de codonul care-l specifică din mRNA, rolul adaptor avându-l tRNA. În experiența prezentată prin reacțiile :



se formează un hibrid care, plasat într-un sistem aceluiaș de sinteză a unei proteine (hemoglobina - pe reticulocitele de lepure) produce un mutant cu resturi de Ala în locul celor de Cys. Deci, restul aminoacizilor nu are nici un rol în selectarea codonului.

În continuare vom analiza tipul de interacții codon-anticodon.

Prima ipoteză a fost că fiecare bază a codonului formează o pereche **WATSON CRICK** cu o bază complementară a anticodonului și că atât codonul cât și anticodonul sunt aliniați antiparalel.

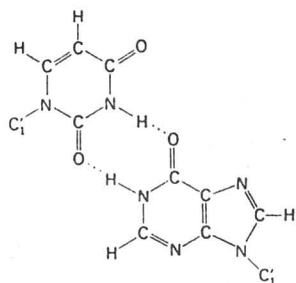
Ulterior s-a descoperit că moleculele pure de tRNA pot recunoaște mai mult decât un codon. De exemplu, tRNA^{Ala} din drojdie, studiat de **HOLLEY**, se leagă la trei codoni: GCU, GCC și GCA, care au primele două baze identice și diferă prin a 3-a bază (degenerarea codului genetic).

Pe baza unor analize sterice, **CRICK** a presupus că stabilirea punților de hidrogen la nivelul celei de a treia baze este mai puțin critică decât în cazul primelor două. Au fost studiate modele cu diferite perechi de baze, care sunt similare cu perechile de baze standard AU și GC în ceea ce privește distanța și unghiul dintre legăturile glicozidice. În aceste studii a fost inclusă inozina, care apare frecvent în structura unor anticodonii. Presupunând un grad de libertate sterica ("Wobble") în împerechiera celei de a 3-a baze a codonului s-au constatat anumite combinații plauzibile (Tabelul 10).

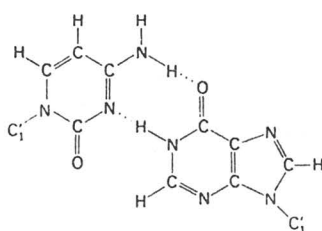
Prima bază a anticodonului	A 3-a bază a codonului
C	G
A	U
U	A sau G
G	U sau C
I	U, C sau A

Ipoteza *Wobble* este astăzi confirmată. Anticodonul tRNA cu secvență cunoscută se leagă la codonul prezis de aceasta ipoteză . De exemplu, anticodonul tRNA^{Ala} din drojdia de bere este IGC și recunoaște codonii GCU, GCC și GCA. *Ne reamintim ca, prin convenție, secvența nucleotidelor trebuie scrisă în direcția 5'--3' :*

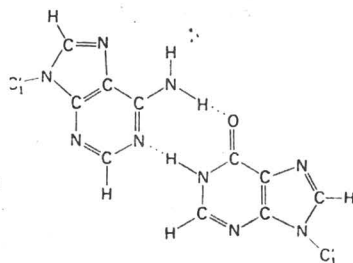
Anticodon	Anticodon	Anticodon
3'-C-G-I-5'	3'-C-G-I-5'	3'-C-G-I-5'
5'-G-C-U-3'	5'-G-C-C-3'	5'-G-C-A-3'
Codon	Codon	Codon



I-U



I-C



I-A

Două generalizări privind interacția codon-anticodon pot fi făcute :

- 1) Primele două baze ale unui codon formează perechi de baze standard, recunoașterea fiind precisă. Deci, codonii ce diferă prin primele două baze trebuie să fie recunoscuți de diferiți tRNA.
- 2) Prima baza a unui anticodon, dintr-o secvență consens determină dacă o moleculă de tRNA interacționează cu 1, 2 sau 3 tipuri de codoni: C sau A (un codon), U sau G (doi codoni), I (trei codoni). Deci parte din degenerarea codului genetic derivă din împerecherea imprecisă (*wobble*) a celei de a 3-a baze a codonului.

Cele 60 de gene ale moleculelor tRNA din *E.coli* sunt grupate în 25 unități care sunt transcrise în precursori multimerici. Unele unități codifică și rRNA, în timp ce altele conțin numai tRNA. Unul dintre acești transcripți (Figura 31) este precursorul a șapte specii de tRNA,:

unul specific pentru Leu,

doi -pentru Met interne,

câte 2 pentru două tipuri de codoni ai GLN.

Transcriptul primar de 950 nucleotide este scindat de ribonucleaza P pe latura 5' a primului nucleotid din fiecare tRNA matur. Ribonucleaza D taie apoi capătul 3' expus al fiecăruia până ajunge la secvența CCA care devine capatul 3' al moleculei mature.

RN-aza P este o enzimă cu structura ribonucleoproteică care constă dintr-o parte de 377-nucleotide (componentul M 1 RNA) și o proteină de 20 KD. ALTMAN a descoperit că acest component RNA posedă activitate enzimatică. La concentrații mai mari decât cele fiziologice, 60 mM Mg^{2+} , M 1 RNA interacționează specific cu substratul deoarece posedă grupări catalitice. Rolul proteinei este subsidiar, inducând creșterea vitezei de hidroliză și permițând ca reacția să aibă loc și la concentrații mult mai mici de Mg.

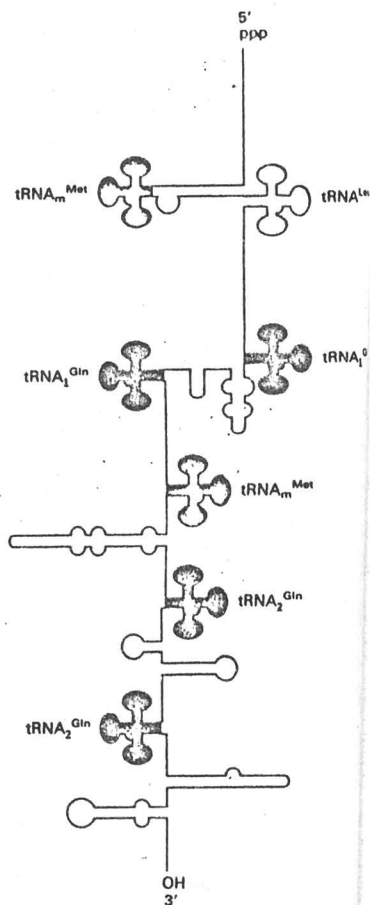


Figura 31. Structura unui transcript primar de 950 nucleotide.

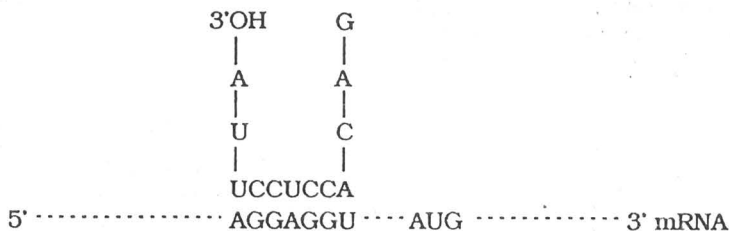
Acest tip de RNA intră în compoziția ribozomilor, care sunt particule intracitoplasmice de natură ribonucleoproteică, implicați în sinteza proteică. Compoziția și caracteristicile ribozomilor din diferite tipuri de celule sunt prezentate în tabelul 11:

Tabelul 11 . Caracteristicile ribozomilor

RIBOZOMI de la	E.coli	Ficat sobolan
Greutatea	2700 KD	4220
Diametrul	200 Å	
Coefficient de sedimentare	70 S	80 S
Subunitatea mare cuprinde:	50 S	60 S
tipuri de rRNA	23 S și 5 S	28,5 S, 5,8 S, 5 S
număr proteine	34	49
Subunitatea mica cuprinde:	40 S	
tipuri de rRNA	16 S	18 S
număr proteine	21	33

Speciile moleculare de rRNA reprezintă cca 80 % din totalul RNA celular, fiind stabili metabolici. Această stabilitate, corespunde funcționării repetate a ribozomilor și este mărită de asocierea cu proteinele ribozomale.

La procariote, cele trei specii de rRNA- 5 S, 16 S și 23 S au o arhitectură critică, prin pliere formând multe regiuni duplex scurte. În Figura 33 prezentăm modul de pliere al 16 S rRNA. Capătul 3' al acestuia joacă un rol cheie în selectarea situsului start de pe tiparul mRNA. De fapt situsul de legare al mRNA și capătul 3' al 16 S rRNA sunt situate adiacent pe subunitatea 30 S. Capătul 3' al 16 S rRNA conține o secvență de șapte baze bogate în pirimidine, complementară cu o regiunea inițiator de pe mRNA, care indică începerea citirii mesajului genetic și biosinteza proteinei codificate :



Codonul AUG indicând startul sintezei proteice.

Pe subunitatea mica a ribozomului există și două situsuri de legare a tRNA.

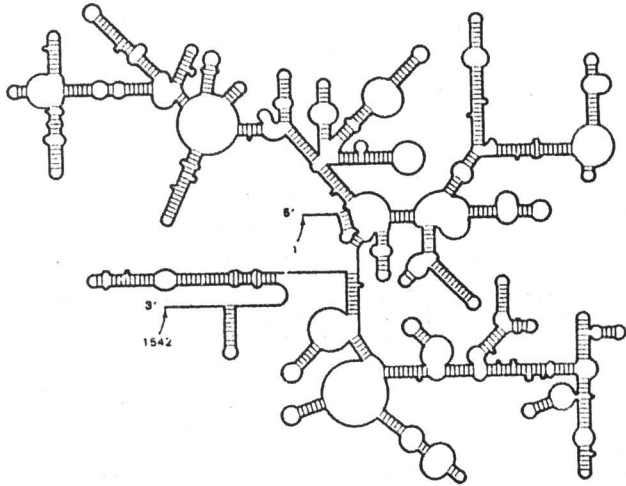


Figura 32. Structura secundară a 16 S rRNA

Moleculele rRNA sunt formate prin scindarea unor molecule transcript primare ce conțin un aranjament în tandem a unităților 16 S, 23 S și 5 S (Figura 33). Acești precursori mari sunt codificați de șapte operoni *rrn* diferiți. În fiecare transcript, 1-2 molecule de tRNA se află între 16 S și 23 S rRNA, fiind urmat de 5 S rRNA. Precursorul RNA este scindat de RNaza III în două fragmente: pre-16 S și pre-23 S. Transformarea acestora are loc după legarea proteinelor ribozomale la aceste fragmente.

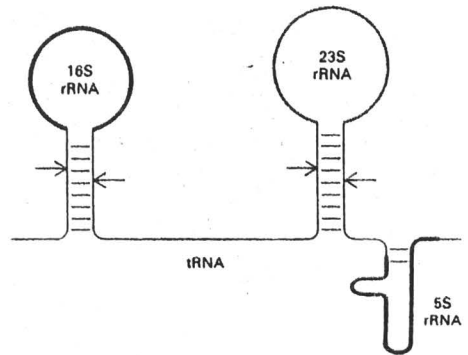


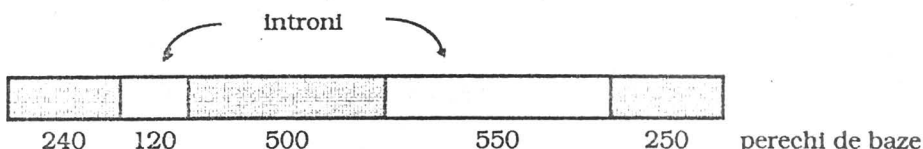
Figura 33.. Procesarea unui transcript primar ce conține trei specii de rRNA și o specie de tRNA

◆ Gene continue și gene întrerupte. Procesul de splicing

YANOFSKY a demonstrat corespondența lineară dintre o genă și produsul ei polipeptidic utilizând mutații ai *E.coli* ce produc o moleculă modificată a catenei α a triptofan sintetazei, enzimă care catalizează etapa finală în sinteza triptofanului. Aceleași concluzii au fost ulterior obținute în multe alte sisteme. **Deci, genele și produsii lor polipeptidici sunt coliniari.**

La bacterii, catenele polipeptidice sunt codificate de un aranjament continuu de triplete codon a DNA. La organismele superioare, multe gene sunt discontinue, fiind întrerupte de secvențe de nucleotide neinformaționale, numite intron.

De exemplu, gena catenei β a hemoglobinei are două secvențe intron : una de 120 și lăta de 550 perechi de baze :



Secvențele informaționale se numesc exoni.

În principiu, secvențele intron și exon se evidențiază prin studii de microscopie electronică pe hibridi formați între mRNA și DNA ce codifică o catenă polipeptidică dată (heteroduplexuri DNA-RNA). Duplexul DNA este parțial topit pentru a permite mRNA să hibridizeze cu catena complementară a DNA. Dacă există un intron, hibridul DNA-RNA formează o buclă, dacă există doi formează - două bucle, etc. (Figura 34). Dimensiunile și localizările exacte ale acestor introni se determină prin tratarea heteroduplexurilor cu nucleaza S1 care degradează specific bazele neâmperechiate ale DNA lăsând intacte fragmentele genomice de DNA legate la mRNA funcționali. Secvențele funcționale ale genelor sunt denumite exoni deoarece ele ies ("exit") din nucleu pentru a-și îndeplini rolul biologic în citoplasmă.

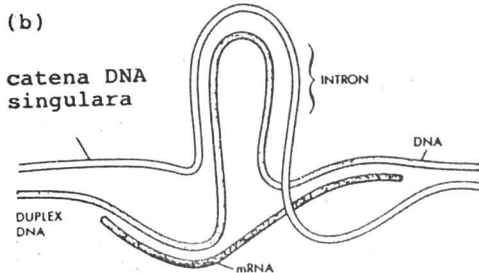
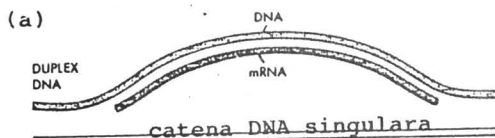
Figura 34.

Heteroduplexuri

DNA-mRNA în cazul

a) unui DNA fără introni

b) unui DNA cu un intron



Structura RNA transcrisă în nucleu , după mesajul genetic din DNA este numită transcript primar sau pre-mRNA , reprezentând o secvență mult mai mare decât cea corespunzătoare mRNA matur . Intronii sunt acele secvențe din genă care sunt copiate în transcriptul primar și apoi îndepărtate din mRNA matur prin procesul numit "splicing". Exonii sunt secvențele din pre-mRNA incluse și în mRNA matur.

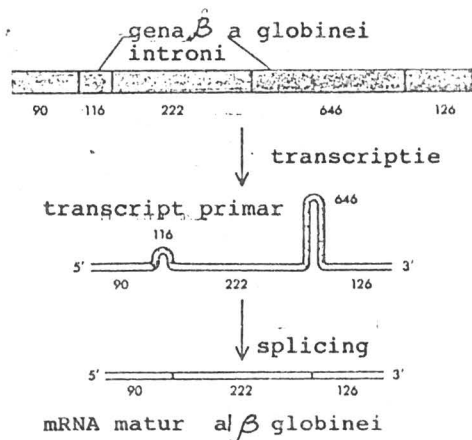
Procesul de "splicing" are loc înainte ca RNA să părăsească nucleul, reprezentând o etapă importantă în reglarea expresiei genetice la eucariote. Astfel, de la un singur transcript primar, prin procese de "splicing" la situsuri diferite pot rezulta mai multe molecule de mRNA ce pot genera diferiți produși proteici. Acest fenomen poate conduce la sinteza de proteine înrudite deoarece includerea sau excluderea unor exoni individuali poate să le modifice structura, funcția și/sau localizarea . Procesul de "splicing" diferențial poate , de asemenea, "comuta citirea" mesajului genetic , oferind flexibilitate în creșterea de proteine cu diverse structuri și funcții , codificate de o singură genă.

La tripanosomi și nematode s-au pus în evidență procese de rearanjare a secvențelor de RNA , organismele respective posedând mecanisme de "trans-splicing". Acest proces de "trans-splicing" este o reacție intermoleculară ce produce un mRNA cu secvențe exon originale din două molecule transcript separate .

În Figura 35 prezentăm schema transcripției genei β a globinei cu formarea unui transcript primar de 15 S ce conține două regiuni netranslate, care sunt scindate și legate simultan printr-un proces numit "splicing" (scindare-sudare) cu formarea mRNA matur de 9 S.

Figura 35.

Transcripția genei catenei β a globinei cu formarea unui transcript primar ce suferă procese post-transcripționale de "maturare".



Intronii există virtual la toate genele mamiferelor și vertebratelor, precum și în gene ale microorganismelor eucariote (drojdiilor) dar cu o frecvență mai mică. Numarul și dimensiunile intronilor variază de la o gena la alta, de exemplu genele care codifica catenele lungi ale colagenului având aproape 40

exoni. O trăsătură comună în exprimarea acestor gene este faptul că exonii lor sunt ordonați în același sens în mRNA ca și în DNA. Astfel, genele discontinue (*split*), asemenea genelor continue sunt colinare cu produșii lor polipeptidici.

Operația complexă de "splicing" este realizată de spliceosom care este un complex mare RNA-proteine ce catalizează îndepărtarea intronilor din precursorul pre-mRNA nuclear . Această mașinarie enzimatică recunoaște semnale în RNA nascent ce specifică situsuri splice. Intronii aproape totdeauna încep cu GU și se sfârșesc cu AG, precedat de o regiune bogată în pirimidine. Această secvență consensus este parte din semnalul pentru *splicing* (Figura 36).

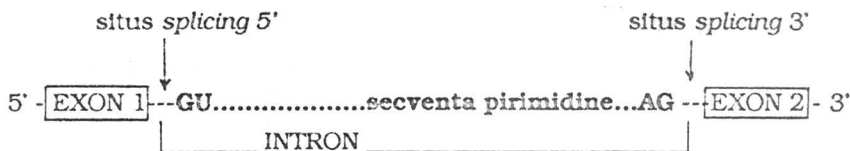


Figura 36. Secvența consensus pentru "*splicing*"-ul precursorilor mRNA.

Spliceosomul are o structură dinamică care se assemblează cu transcriptul pre-mRNA. Nucleul și citosolul conține multe tipuri de molecule mici de RNA cu mai puțin de 300 nucleotide :

snRNA (*small nuclear RNA*) și *scRNA* (*small cytoplasmic RNA*).

Aceste molecule mici de RNA sunt asociate cu proteine specifice cu formarea de complexe :

snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) și *scRNP* (*small cytoplasmic ribonucleoprotein particles*) , denumite de unii cercetători și "*snurps*", respectiv "*scurps*".

Spliceosomul care are un coeficient de sedimentare 60 S conține pe lângă mRNA precursor mai multe tipuri de *snRNP* :

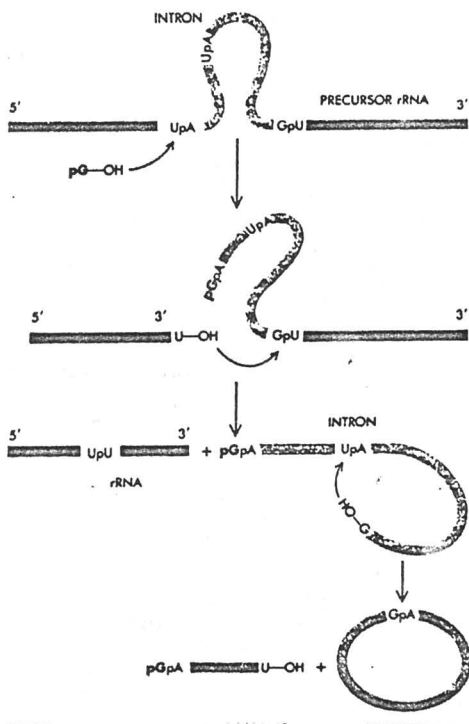
- 1) **U1** *sn RNP* recunoaște situsul de *splicing* 5", conținând de fapt o secvență complementară cu acesta;
- 2) **U2** *sn RNP* se leaga la un situs de ramificare (*branch*) și la secvența de pirimidine printr-o reacție ATP dependentă;
- 3) **U5** *sn RNP* recunoaște situsul de *splicing* 3'.
- 4) două *sn RNP* **U4** și **U6** participă la asamblarea spliceosomului .

CECH a descoperit un proces de *splicing* autonom în eliberarea unui intron de 413 baze dintr-un precursor al unui rRNA (L 19 rRNA) din Tetrahymena (un protozoar ciliat) . Intronul din acest RNA precursor este îndepărtat prin activitatea catalitică a RNA însăși . Scindarea inițială este catalizată de o moleculă de GMP ce atacă legătura fosfodiestică dintre două baze specifice (UpA) de la capătul 5" al intronului (Figura 37) . La capătul 5' al intronului este adăugat GMP formându-se o secvența 5'pGpA--- , iar la

extremitatea 3' a exonului rămâne un rest de uridina cu o grupare hidroxil liberă.

Figura 37.

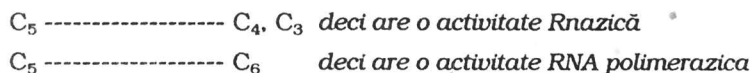
Procesul de *auto-splicing* al intronului din precursorul rRNA de la Tetrahymena.



Această grupare 3'-hidroxil atacă legătura fosfodiestică dintre bazele (GpU) de la capătul 3' al intronului formând rRNA matur. Intronul eliberat suferă o reacție ulterioară de scindare-legare ce generează o moleculă circulară de RNA și un scurt fragment linear.

Acest intron eliberat catalizează transformarea și a altor molecule RNA. În situații specifice fără a se consuma, acționând ca o adevărată enzimă, motiv pentru care a fost numit ribozim.

În mod concret, **CECH** a descoperit că L 19 RNA catalizează scindarea-sudarea (*splicingul*) substratelor oligonucleotidice (C₅ - penta-citidilatul) într-o manieră înalt specifică:



Pentacitidilatul (C₅) poate fi transformat de L 19 RNA în oligomeri mai lungi (C₆) și mai scurți (C₄ și C₃) în mod specific. Deci L 19 RNA se comporta atât ca o ribonuclează cât și ca o RNA polimerază.

Această **RNA enzimă** acționează mult mai rapid asupra C₆ decât asupra U₆ și nu acționează asupra A₆ și G₆. Ea respectă cinetica Michaelis-Menten, având o K_M de 42 μM și o k_{cat} de 0,033 s⁻¹ pentru C₅. Necesitatea absolută pentru o grupare 2'-hidroxil în substrat este demonstrată prin observația că

deoxi-C5 este un inhibitor competitiv a lui C5 cu $K_i = 260 \mu\text{M}$. Deci, L 19 RNA respectă caracteristicile unei catalize enzimaticice clasice: gradul înalt de specificitate de substrat, cinetica de saturație Michaelis-Menten și susceptibilitatea la inhibiția competitivă.

C_5 se leagă la un situs specific de pe L 19 RNA. O parte din cele cinci baze C ale substratului formează probabil perechi de baze cu o secvență bogată în G. Legătura fosfodiestică dintre C_4 și C_5 este apoi atașată la gruparea 3'-hidroxil a G terminală din această RNA-enzimă. O legătură fosfodiestică este formată între G terminală a RNA-enzimei și C terminală a substratului producând un intermediar covalent -GpC. Concomitent C_4 este eliberat în timpul acestei reacții de transesterificare. Această nouă legătură fosfodiestică înalt labilă poate fi atacată de apă, eliberându-se pC și rearanjând RNA-enzima. Această serie de 3 etape explică activitatea ribonucleazică a L 19 RNA.

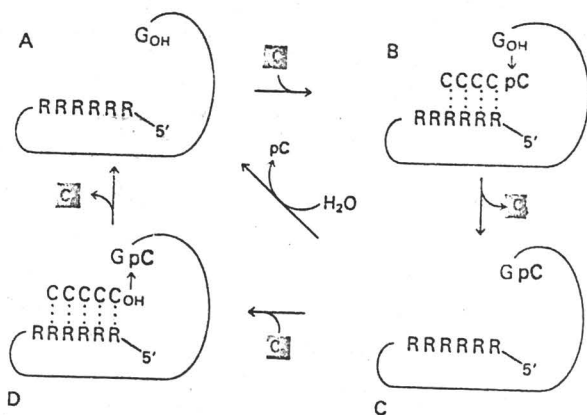


Figura 38 . Mecanismul propus pentru acțiunea catalitică a L 19 RNA. . A) RNA-enzima L 19 RNA ; B) C_5 este legat la enzima prin punți de hidrogen, pC terminal este legat covalent la G terminal al enzimei. C) Hidroliza legăturii GpC readuce enzima la starea originală. D) Alternativ pC atașat covalent poate fi atacat de o a doua moleculă C_5 dând C_6 .

Astfel, intermediarul covalent -GpC poate fi atacat fie de HO- fie de gruparea 3'-OH a celui de al doilea substrat. Hidroliza este favorizată la un pH mare, în timp ce transesterificarea la forma C_6 este promovată la o concentrație mare de substrat C_5 . C_6 astfel format poate fi alungit la C_7 sau mai mult, prin reacții de transesterificare succesive. Deci legătura fosfodiestică a -GpC este neobișnuit de reactivă deoarece este activată electrostatic pentru a forma o stare de tranziție pentacovalentă.

Viteza de hidroliză a C_5 de către această RNA enzimă este de circa 10^{10} ori mai mare decât viteza reacției necatalizate.

Această caracteristică a RNA l-a condus pe **GILBERT** să presupună că moleculele de RNA și-au catalizat propria replicare și a dezvoltat un repertoriu de activități enzimatiche. În aceasta etapă, RNA a început să sintetizeze proteine. Apoi DNA a fost format prin transcripția inversă a RNA și DNA a înlocuit RNA ca material genetic datorită duplexului mai stabil ce permite și stocarea unui volum mai mare de informații genetice.

Compararea secvențelor DNA a genelor ce codifică proteine înalt conservate în evoluție sugerează că intronii au apărut în cursul evoluției acum cca 10^9 ani. Mai mult, un mecanism comun "*splicing*" a fost dezvoltat înainte de divergența fungilor, plantelor și vertebratelor, astfel că extracte din celula mamiferelor pot realiza procesul "*splicing*" a RNA din drojdie.

Mulți exoni codifică unități structurale și funcționale discrete ale proteinelor. De exemplu, exonul central din genele mioglobinei și hemoglobinei codifică regiunea din vecinătatea a hemului implicată în legarea reversibilă a O_2 . Alți exoni specifică segmente α -helicale ce ancorează proteine în membranele celulei. Un domeniu întreg al unei proteine poate fi codificat de un singur exon. Este posibil ca noi proteine să ia naștere în evoluție prin rearanjarea exonilor ce codifică elemente structurale discrete, situsuri de legare și situsuri catalitice. Intronii sunt regiuni în care DNA poate fi scindat și recombinat fără vreun efect periculos asupra proteinelor sintetizate. În contrast, schimbul de secvențe între diferiți exoni conduce obișnuit la pierderea funcției.

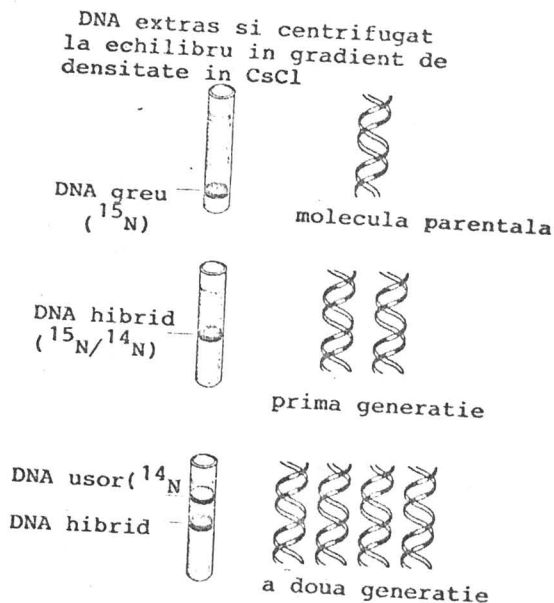
5. REPLICAREA DNA

◆ Principiul replicării

Modelul dublu helicoidal al lui **WATSON** și **CRICK** sugerează un mecanism pentru replicarea DNA, conform căruia catenele complementare ale duplexului parental acționează ca un tipar pentru sinteza a două noi molecule fiice de DNA dublu catenar. În fiecare din duplexurile fiice, una din catene provine din DNA parental.

O demonstrație a replicării semiconservative a DNA a fost făcută de **MESELSON** și **STAHL**. O cultură de *E.coli* a fost crescută mai multe generații pe un mediu cu $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ - ca unică sursă de azot. Din această cultură s-a izolat un DNA greu (proba 1), marcat cu N^{15} . Apoi cultura a fost trecută pe un mediu cu $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ și a fost separat și caracterizat DNA (probele 2... n) timp de mai multe generații de bacterii, prin studii de sedimentare la echilibru într-un gradient de densitate în CsCl .

Figura 39. Principiul experienței lui **MESELSON** și **STAHL**



DNA din proba 1 are o densitate mare, datorită izotopului greu al azotului. DNA din proba 2 are o densitate mai mică (medie). Probele 3... n prezintă două benzi de sedimentare: una corespunzătoare DNA din

proba 2 (cu densitate medie) și una corespunzătoare DNA ușor, cu mică densitate. Rezultatele acestor studii arată că DNA din proba 2 este un DNA hibrid care conține o catenă polinucleotidică grea (cu ^{15}N) și o catenă polinucleotidică ușoară (cu ^{14}N). Deci, replicarea se realizează într-o manieră semiconservativă.

În 1958, Arthur **KORNEBERG** a izolat din E.coli o enzimă care catalizează sinteza DNA, pe care a numit-o DNA-polimeraza. Astăzi este denumită DNA polimeraza I deoarece au fost descoperite mai multe enzime de acest tip, știut fiind că replicarea DNA este realizată prin coroborarea a peste 20 proteine.

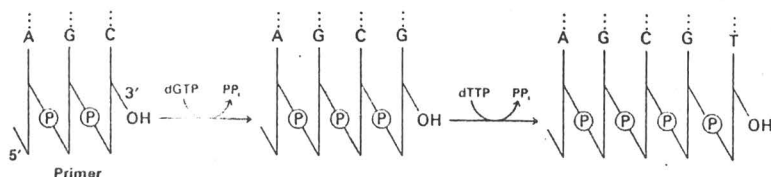
DNA polimeraza I are o catenă polipeptidică de 103 KD, ce catalizează adăuga succesivă de unități deoxiribonucleotidice la o catenă de DNA :



DNA polimeraza I necesită :

- 1) prezența tuturor celor patru precursori în stare activată: dATP, dGTP, dTTP, dCTP, precum și a ionilor de Mg^{2+} ;
- 2) prezența unui DNA primer la care enzima adaugă deoxiribonucleotide la gruparea lui 3'-OH terminală;
- 3) prezența unui DNA țipar, care poate fi monocatenar sau un dicatenar în care scheletul pentozo-fosfatic este scindat la cel puțin un situs.

Reacția de alungire a catenei, catalizată de DNA polimerază este un atac nucleofil al grupării 3'-OH terminale a primerului asupra atomului de P α a dNTP. O legătură fosfodilesterică este formată prin eliberarea concomitentă a pirofosfatului. Urmează hidroliza acestuia din urmă, sub acțiunea pirofosfatazei anorganice, ceea ce asigură ireversibilitatea reacției. Alungirea DNA are loc în direcția 5'-3' (Figura 40)



DNA polimeraza catalizează formarea unei legături fosfodilesterice numai dacă baza nucleotidului care vine este complementară bazei de pe catenă țipar. Probabilitatea formării unei legături covalente este foarte mică dacă baza care urmează a fi inserată nu formează o pereche de baze tip **WATSON-CRICK** cu o bază de pe catenă țipar. Deci, DNA polimeraza este o enzimă direcționată de țipar.

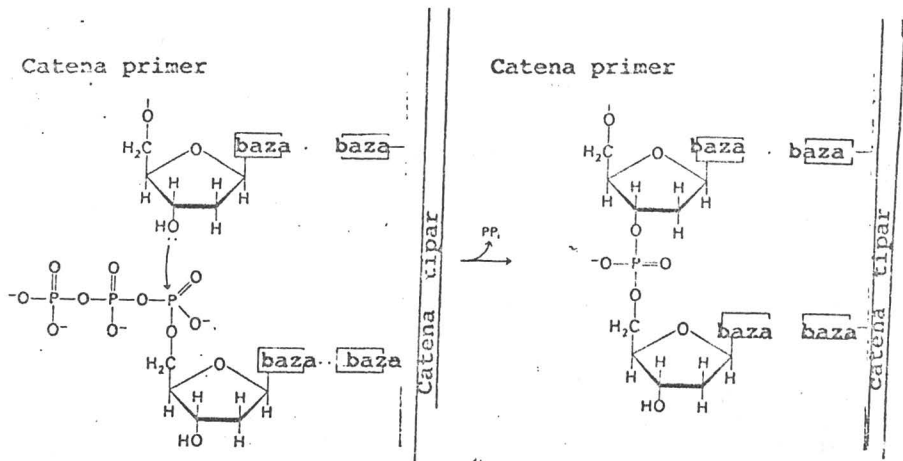


Figura 40. Principiul mecanismului de acțiune al DNA polimerazel

◆ Furci de replicare

Deci DNA este replicat de DNA polimeraze DNA dependente, care utilizează ca tipare DNA monocatenar, catalizând sinteza unei catene complementare cu tiparul. John CAIRNS studiind cromozomii în timpul replicării prin autoradiografie și apoi prin microscopie electronică, utilizând DNA marcat prin incorporare de timidină sau timidină tritiată a demonstrat forma DNA E.coli în replicare : un cerc închis cu o buclă internă. Astfel de forme se numesc structuri theta (θ) datorită asemănării cu litera grecească . Aceste structuri theta arată că moleculele DNA își mențin forma lor circulară când sunt replicate, catenele DNA se despiralizează complet servind ca tipare pentru sinteza de noi molecule DNA. Deci, sinteza DNA este însoțită de despiralizarea DNA parental. Un situs de depliere simultană cu sinteza este numit furca de replicare.



Necesitatea ca DNA parental să se deplieze la furca de replicare întâmpină un mare obstacol topologic. De exemplu, DNA E.coli este replicat cu o viteză de cca 1000 nucleotide/secunda. Dacă ținem seama

că lungimea cromozomului este de circa 1300 μm și de faptul că molecula este circulară realizăm imensă forță de împotrivire la procesul de despiralizare. Structurile *supercoil* negative din DNA promovează într-un grad mic (5 %) despiralizarea. La procarlote, aceste structuri *supercoil* negative sunt introduse prin acțiunea unei topolizomaze de tip II, DNA giraza, pe seama energiei de hidroliză a ATP. Inhibitorii ai DNA girazel ca novobiocina și acidul oxolonic împiedică replicarea DNA, excepție făcând mutanții la care DNA giraza nu leagă aceste antibiotice.

◆ Replicarea semidiscontinua.

Imaginile autoradiografice , cu o mică capacitate de rezoluție arată că cele doua catene ale duplexului DNA sunt replicate simultan prin avansarea furcii de replicare. Dacă ținem seama că cele două catene parentale sunt antiparalele și că replicarea are loc semiconservativ, este dificil să presupunem că DNA polimerazele sintetizează DNA numai în direcția 5'-3'.

În 1968, R.OKAZAKI a evidențiat în urma unor experiențe cu timidină-³H formarea unor fragmente de 1000-2000 nucleotide, dând modelul replicării semidiscontinue. Cele două catene sunt replicate diferit (Figura 41).

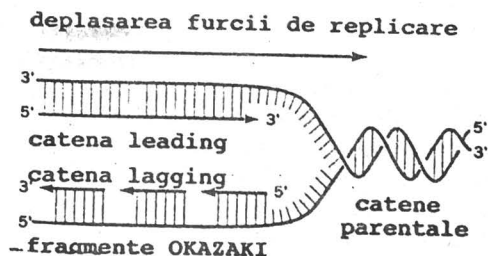


Figura 41.
Replicarea continuă a catenei *leading* și discontinuă a catenei *lagging* și deplasarea furcii de replicare

Catena care copie tiparul 3'-5' , și se alungește continuu în direcția 5'-3' se numește catenă *leading*. Cealaltă catenă 5'-3' este copiată discontinuu, în fragmente, tot în direcția 5'-3' . Fragmentele vor fi prelucrate și sudate ulterior (de DNA ligaza) , constituind catena *lagging*.

◆ Primerii RNA

DNA polimerazele necesită existența unei grupări 3'-OH la care să se adauge nucleotide. Analiza fragmentelor **OKAZAKI** a relevat existența la capătul lor 5' a unor segmente de RNA formate din 1 - 60 ribonucleotide, lungimea lor fiind specie-specifică și complementară DNA țipar (Figura 42) .

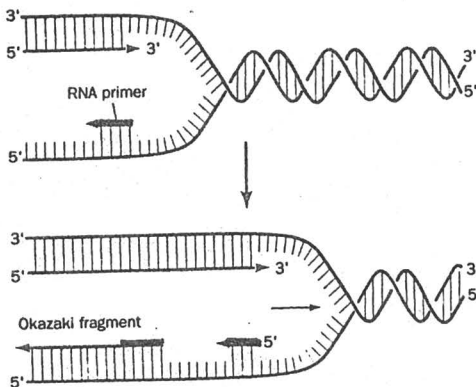


Figura 42
Sinteza DNA este inițiată de fragmente scurte de RNA

E.coli are două enzime care pot cataliza formarea acestor primeri RNA : o RNA polimerază DNA dependentă (enzima transcriptivă) și o enzimă primaza, mult mai mică de 60 KD, produsul monomeric al genei **dnaG**.

Primaza nu este sensibilă la inhibitorul RNA polimerazel : **rifampicina**. Observația că rifampicina inhibă numai sinteza catenei *leading* la E.coli denotă că primaza inițiază primerii fragmentelor **OKAZAKI**. Inițierea catenei *leading* la E.coli este un eveniment mult mai rar, *in vitro*, procesul fiind realizat atât de primază cât și de RNA polimeraza, fiind stimulat când ambele enzime sunt coprezente. Se consideră că ambele enzime acționează sinergic *in vivo* în inițierea

Duplexul din Figura 43 conține o pereche greșită G..T cu restul de timidină pe catena 5'-3'. DNA polimeraza I, în prezența dCTP, scindează restul de timidină neâmperechiat. dTMP este eliberat și o grupare 3'-OH este expusă la restul G terminal al catenei primer.

În general, DNA polimeraza I îndepărtează resturile inserate greșit la capătul primerului înainte de a cataliza polimerizarea.

Această activitate 3'-5'-exonucleazică crește marcant acuratețea replicării DNA, acționând corector. De fapt, DNA polimeraza I examinează rezultatul fiecărei polimerizări înainte de a cataliza o nouă runda de polimerizare. Importanța activității exonucleazice pentru fidelitatea replicării a fost evidențiată prin studiul unui mutant al fagului T 4. Virusurile ce codifică o DNA polimeraza I cu o activitate 3'-5'-exonucleazică scăzută au o viteză a mutațiilor mult mai mare decât este normal. Invers, fagi cu o activitate exonucleazică scăzută au o rată mică a mutațiilor spontane.

DNA polimeraza I poate, de asemenea, hidroliza DNA începând de la capătul 5' al unei catene, deci are o activitate 5'-3' exonucleazică, această activitate având unele caracteristici:

- 1) Legătura clivată trebuie să fie într-o regiune dublu-helică.
- 2) Scindarea poate avea loc la legătura fosfodiestică terminală sau la o legătură ce se află la distanță de câteva resturi de capătul 5' (care poate da naștere unei grupări HO libere sau fosforilate).
- 3) Activitatea 5'-3' exonucleazică este marită prin sinteza concomitentă a DNA.
- 4) Situsul activ pentru acțiunea exonucleazei este separat de situsurile active pentru polimerizare și hidroliza 3'-5'. Deci, DNA polimeraza I conține trei situsuri active diferite pe o singură catenă polipeptidică.

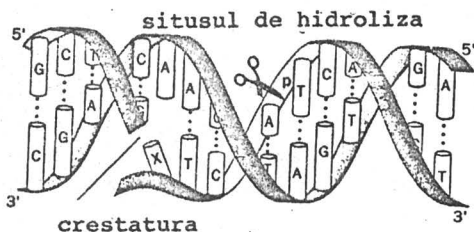


Figura 44. Funcția 5'-3' exonucleazică a DNA polimerazei I

Activitatea 5'-3' exonucleazică joacă un rol cheie în replicarea DNA , prin îndepărtarea RNA primer. Mai mult, 5'-3' exonucleaza completează activitatea 3'-5' exonucleazică, în vederea corectării erorilor. De exemplu, 5'-3' exonucleaza participă la excizia dimerilor pirimidinici formați la expunerea DNA la lumină UV.

Activitățile combinate ale Pol I : 5'-3'-exonucleazică și polimerazică pot interacționa asupra unui duplex DNA cu o creștătură în catena 5'-3' deplasând creștătura spre capătul 3' fără modificarea moleculei (Figura 45) :

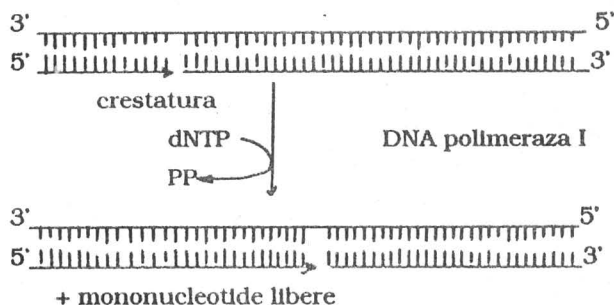


Figura 45 . Deplasarea unei creștături, catalizată de DNA polimeraza I

Acest proces de deplasare a creștăturii, în prezență de deozinucleotide marcate, este utilizat în laborator pentru a prepara DNA înalt radioactiv (creștăturile pot fi realizate prin tratarea DNA cu mici cantități de DNaza I pancreatică).

Această enzimă trifuncțională poate fi scindată de proteaze în fragmente:

- ⇒ un fragment mic de 36 KD cu toată activitatea 5'-3'-exonucleazică originală și
- ⇒ un fragment mare de 67 KD (fragment **KLENOW**) cu toată activitatea polimerazică și 3'-5'-exonucleazică

5'-3' exonucleaza	3'-5' exonucleaza	Polimeraza
-------------------	-------------------	------------

fragment mic (36 KD) fragment mare **KLENOW** (67 KD)

Studiile cristalografice cu raze X asupra fragmentului mare au arătat că este constituit din două domenii. Domeniul mic conține situsul 3'-5'-exonucleazic deoarece leagă dNMP care inhibă nucleaza și nu polimeraza. Gruparea fosfat a dTMP se leagă în apropiere la un ion de

Zn^{2+} . Domeniul mai mare formează o structură cu o fantă adâncă ce amintește de mâna dreaptă ținând un creion. Fanta are circa 25A lățime, 30 A adâncime și 50 A lungime. Mărimea și forma fantei sugerează că leagă duplexul DNA produs prin sinteză. Capacitatea de polimerizare (procesivitatea) a DNA polimerazel I poate fi datorată închiderii acestor fante , care ar perinde disocierea DNA de enzimă în timpul acestui proces . Situsul exonucleazic de pe domeniul mic este la 25 A depărtare de situsul polimerazic de pe domeniul mare. Există următoarea ipoteză : catena DNA în creștere stă la situsul polimerazic până când o pereche de baze greșită este sesizată, când suferă o translocăție spre situsul 3'-5' exonucleazic pentru scindare.

În 1969 Paula De LUCIA și CAIRNS au izolat un mutant al E.coli ce are 1 % din activitatea polimerizantă a DNA polimerazel I. Acest mutant (numit pol A 1) se multiplică cu același viteză ca tulpina parentală, dar este omorât mai ușor de lumina UV decât tulpina parentală. Cei doi cercetători au conchis că replicarea DNA are loc normal, dar că repararea DNA este defectuoasă. Aceste experiențe au condus la concluzia că DNA polimeraza I are altă funcție decât cea polimerazică, esențială în replicare.

◆ DNA polimerazele II și III

În E.coli s-au evidențiat alte două DNA polimeraze : II și III, care se aseamănă cu DNA polimeraza I în mai multe aspecte:

- 1) catalizează sinteza DNA , direcționată pe un tipar, din precursorii dNTP;
- 2) este necesar un primer cu o grupare 3'-OH liberă ;
- 3) sinteza are loc în direcția 5'-3'
- 4) posedă activitate 3'-5' exonucleazică.

Pol II și Pol III nu au fost detectate ușor deoarece activitățile lor combinate reprezintă < 5 % din activitatea Pol I. Mutanții cărora le lipsește Pol II nu au defecte detectabile, astfel că funcția acestei polimeraze nu este cunoscută.

Încetarea replicării DNA la mutanții pol C sensibili la temperaturi mai mari a demonstrat că Pol III este DNA replicaza E.coli. Această enzimă are o structură subunitară $\alpha\theta$, unde α - este produsul genelor polC și are funcție polimerazică (Tabelul 12) .

Proprietățile catalitice ale Pol III se aseamănă cu cele ale Pol I, cu excepția faptului că Pol III este incapabilă de a replica un DNA monocatenar sau un duplex DNA cu creștătură. Pol III acționează in vitro asupra unor goluri de pe o catenă de mai puțin de 100 resturi nucleotidice , o situație similară cu starea DNA la furca de replicare . Funcția 3'-5' exonucleazică care rezidă pe subunitatea ϵ este responsabilul principal pentru repararea greșelilor din timpul replicării, mărind fidelitatea acestui proces de circa 200 de ori.

Tabelul 12 . Proprietățile DNA polimerazelor din E.coli

Proprietatea	Pol I	Pol II	Pol III
Masa (KD)	109	120	140
Molecule/celulă	400	?	10-20
Numărul de turnover ^a	600	30	9000
Gena structurală	polA	polB	polC
mutant letal condițional	+	-	+
polimerizare 3'-5'	+	+	+
exonucleaza 3'-5'	+	+	+
exonucleaza 5'-3'	+	-	+

^a număr de nucleotide polimerizate într-un minut
la 37° C de o moleculă

Pol III funcționează in vitro ca o parte a unui complex enzimatic, subunitar și labil, holoenzima lui constând din cel puțin șapte subunități (Tabelul 13) .

Tabelul 13 . Componentele holoenzimei DNA polimerazel III

Subunitatea	Masa(KD)	Gena structurală
α^a	130	polC(dnaE)
ϵ^a	27,5	dnaQ
θ^a	10	necunoscută
τ	71	dnaZX ^b
γ	52	dnaZ ^b
δ	32	necunoscută
β	40,6	dnaN

^a - componente ale Pol III

^b - subunitățile γ și τ sunt codificate de același genă; subunitatea γ cuprinde extremitatea N-terminală a subunității τ .

Ultimele patru subunități acționează ca modulatori ai DNA polimerazei III. De exemplu, legarea holoenzimei Pol III la tiparul primer necesită hidroliza ATP într-o reacție care implică subunitatea β . Această subunitate leagă strâns holoenzima la tipar formând un complex ce are o procesivitate limitată, de circa 5000 resturi. Pol III singură ($\alpha\epsilon\theta$) nu hidrolizează ATP și are o procesivitate de 10-15 resturi.

◆ Helicaze și proteine de legare

În despiralizarea duplexului DNA sunt implicate trei tipuri de proteine:

- 1) Proteinele Rep;
- 2) Helicaza II și
- 3) Proteinele SSB (*Single strand binding proteins*)

care acționează concertat într-un proces ATP dependent, înainte de avansarea furcii de replicare.

Proteina Rep, cu o structură monomerică, de 65 KD, este produsul genei *rep* din *E.coli*. Ea separă duplexul DNA prin deplasarea de-a lungul tiparului catenei *leading*, în direcția 3'-5', consumând 2 moli ATP la fiecare pereche de baze separată.

Helicaza II, o enzimă de 75 KD, are o acțiune similară proteinei Rep, dar se deplasează de-a lungul tiparului catenei *lagging*, în direcția 5'-3'. De remarcat, că mutații *rep* prezintă o replicare lentă a DNA, ceea ce denotă că proteinele rep și helicaza acționează împreună la furca de replicare, pentru despiralizarea DNA.

Proteinele SSB care au o structură tetramerică, în care fiecare subunitate are 19 KD, implică reanelarea catenelor DNA despiralizate. Numeroase copii de proteine SSB învelesc cooperativ DNA monocatenar, menținând structura monocatenară. DNA trebuie eliberat de proteinele SSB, înainte de a fi replicat de holoenzima Pol III.

DNA ligaza catalizează sinteza unei singure legături fosfodiesterice între gruparea 3'-OH de la capătul unui segment DNA și gruparea 5' fosfat de la capătul altui segment, fiind implicată în sinteza normală a DNA, în procesele de reparare ale acestuia și în recombinări genetice. Reacția este endergonică și necesită o sursă de energie: la *E.coli* și alte bacterii este NAD^+ , la animale și bacteriofagul T 4 fiind ATP:



În Figura 46 prezentăm mecanismul de acțiune al DNA ligazei. Enzima nu poate lega două molecule de DNA monocatenar, necesitând existența unui duplex DNA cu o creștătură.

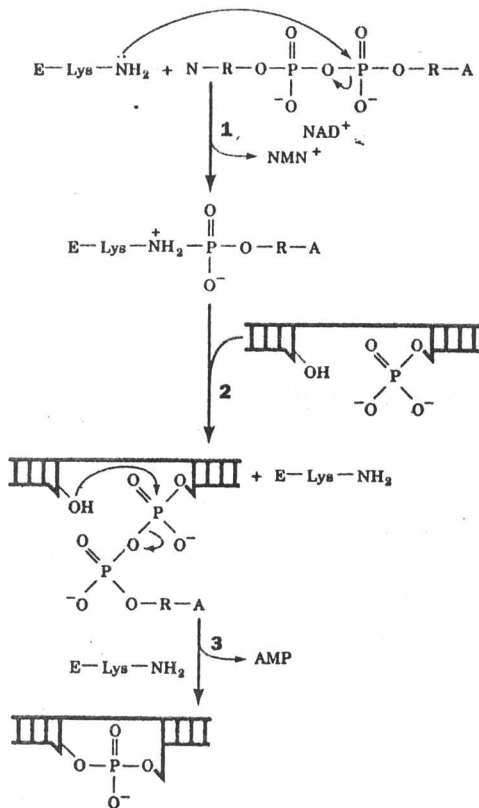


Figura 46.
Mecanismul de acțiune al DNA ligazel de la *E. coli*

Enzima din *E. coli* este un monomer de 77 KD, care utilizează energia NAD⁺, într-o reacție care constă din trei etape :

- 1) gruparea adenil a NAD⁺ este transferată la gruparea ε -amino a unui rest de lizină din enzimă, formând un derivat fosfamidic, ce a fost izolat ;
- 2) gruparea adenil a enzimei activate este transferată la extremitatea 5'-fosfat a creștăturii, formând un intermediar DNA-AMP în care AMP este legat la capătul 5', printr-o punte profosfat ;
- 3) se formează o legătură fosfodiestică prin atacul nucleofil al grupării 3'-OH asupra grupării 5'-fosfat, sudând creștătura cu eliberarea AMP.

◆ Replicarea bacteriofagului M 13

Bacteriofagul M 13 are un DNA circular, monocatenar, de 6408 nucleotide (catena [+]) . Când infectează E.coli, catena [+] este copiată, sintetizându-se catena [-] și apărând formele replicative FR de duplex circular : FR II (cu creștătură) și FR I (cu structură *supercoil*) (Figura 47).

Procesul de replicare a DNA bacteriofagului M 13 reprezintă o paradigmă pentru sinteza catenei *leading* din duplexul DNA.

Deci, catena [+] a bacteriofagului M 13 intră în E.coli , este acoperită de proteinele SSB pe toată lungimea ei, cu excepția unui segment palindromic de 57 resturi nucleotidice ce se constituie într-o structură "*hairpin*". RNA polimeraza , asistată de subunitatea σ pentru recunoașterea situsului de inițiere, începe sinteza unui RNA primer la o distanță de șase nucleotide înaintea structurii "*hairpin*", pe care îl extinde până la 20-30 resturi, formând un duplex hibrid DNA-RNA. Holoenzima Pol III extinde catena polinucleotidică de la RNA primer, formând catena [-]. Primerul este îndepărtat prin translația creștăturii, catalizată de Pol I, formându-se forma RF II, care este apoi transformată în RF I prin acțiunea succesivă a DNA ligazei și DNA girazei .

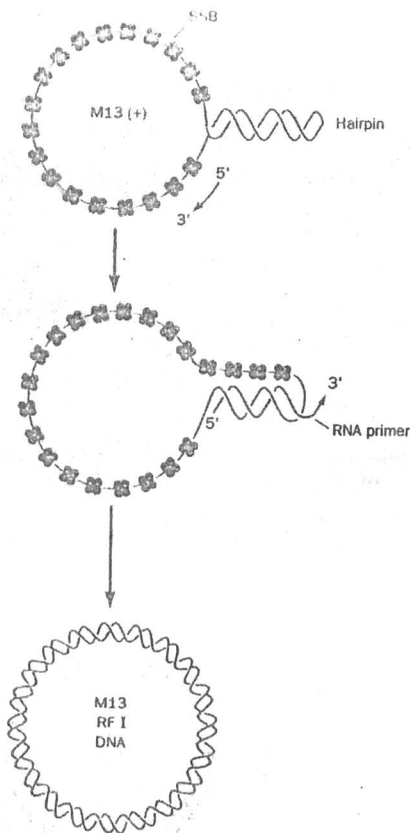


Figura 47.

Sinteza unei catene [-] pe tiparul catenei [+] la bacteriofagul M 13

◆ Replicarea bacteriofagului Φ x174

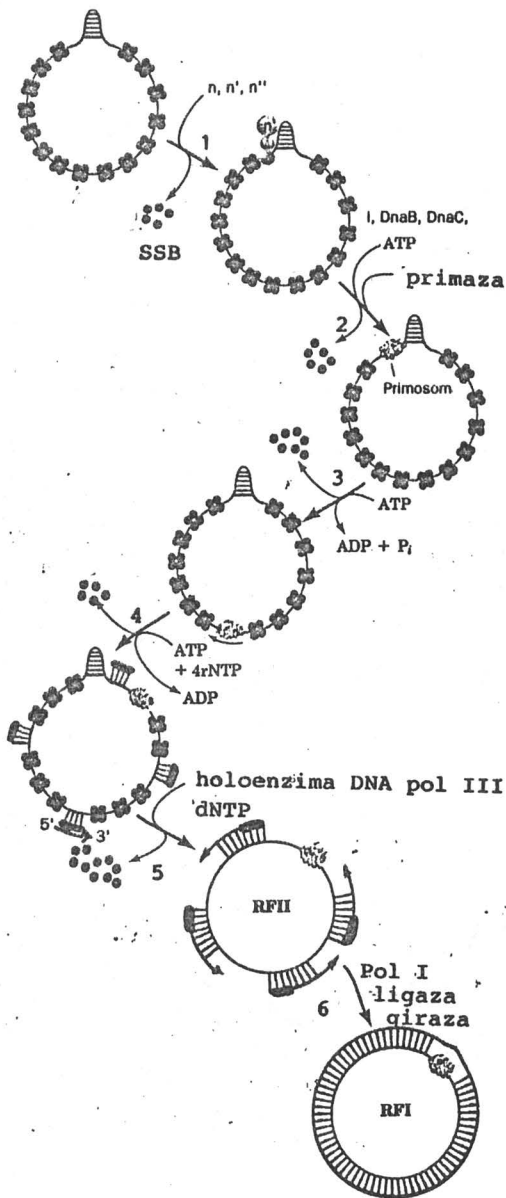
Bacteriofagul Φ x174 are un DNA circular, monocatenar, de 5386 resturi de nucleotide. Transformarea in vivo a DNA viral la forma lui replicativă este un proces mai complicat decât cel descris la M 13 și necesită participarea unui ansamblu proteic de 600 KD, numit primosom.

Tabelul 14. Componentele proteice ale primozomului

Proteina	Structura	Masa (KD) subunități	Molcule/celulă
n	dimer	14	80
n'	monomer	76	70
n''	monomer	17	-
I	trimer	22	50
DnaB	hexamer	50	20
DnaC	monomer	29	100
Primaza	monomer	60	50

Replicarea catenei [-] a bacteriofagului Φ x174 reprezintă o paradigmă pentru sinteza catenei *lagging*. Această sinteză parcurge șase etape :

- 1) catena [+] este acoperită de proteinele SSB, cu excepția unui segment "hairpin" de 44 nucleotide, situat lângă poziția 2300. O secvență de 55 nucleotide, conținând acest "hairpin" este apoi recunoscută de proteinele n,n' și n'', care se leagă la acesta.
- 2) proteinele I, DnaB și Dna C se adaugă la acest complex, într-un proces ATP dependent, formând preprimosomul, care leagă primaza, conducând la constituirea primozomului.
- 3) primozomul se deplasează în direcția 5"-3", de-a lungul catenei [+], datorită hidrolizei ATP, reacție catalizată de proteina n'. Această deplasare, care dizlocuiește proteinele SSB din calea lui, se realizează în direcție opusă celei de citire a tiparului.
- 4) la situsuri selectate la întâmplare, primozomul prin componenta primaza sintetizează un RNA primer. Inițirea sintezei primerului necesită participarea proteinei DnaB care concomitent cu hidroliza ATP modifică conformația DNA tipar, la o formă cerută de primază.



5)
 Holoenzima Pol
 III extinde
 primerii
 formând
 fragmentele
 OKAZAKI.

6) Pol I taie
 primerii și îi
 înlocuiește cu
 DNA.
 Fragmentele
 sunt apoi
 sudate de DNA
 liaza și DNA
 giraza formează
 structuri
 supercoil
 caracteristice
 RF I a DNA
 bacteriofagului
 Φx174.

Figura 48.

Sinteza
 catenel (-) a
 fagului Φx174
 pe un tipar al
 catenel (+), cu
 formarea formel
 RF I.

Primozomul rămâne complexat cu DNA, participând la sinteza catenei [+], care reprezintă un model pentru sinteza catenei *leading*.

Replicarea catenei [+] a DNA fagului Φ x 174 se realizează după modelul *looped rolling circle*.

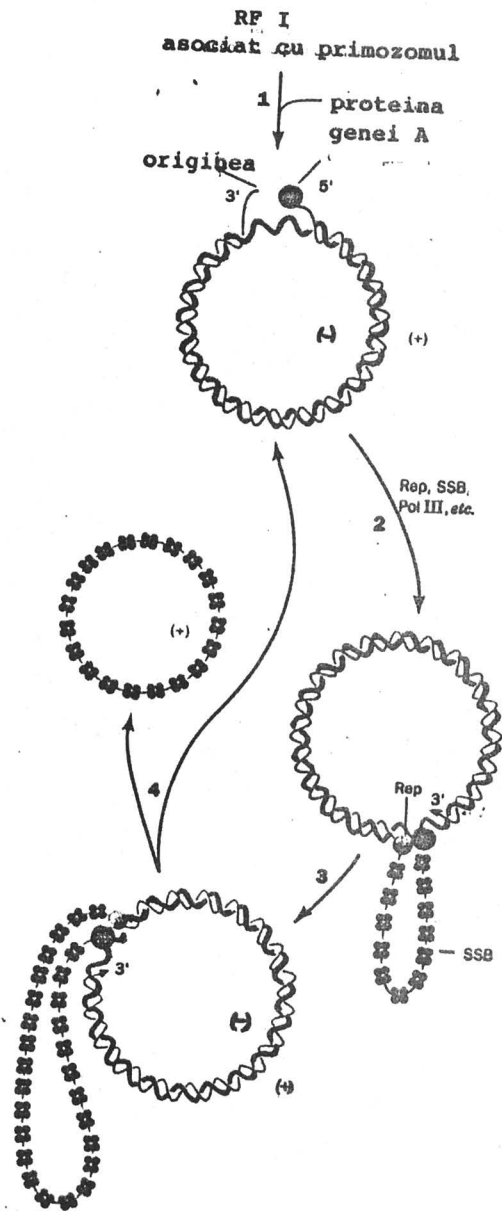


Figura 49.
Sinteza catenei [+] a DNA fagului Φ x 174 prin modelul "looped rolling circle".

În cadrul acestui model *looped rolling circle* (Figura 49) se observă următoarele etape:

- 1) sinteza catenei [+] începe prin legarea asistată de primozom a **proteinei genul A** (60 KD) , codificată de fag, la situsul ei de recunoaștere de 30 perechi de baze. Aici proteina genul A scindează specific legătura fosfodiesterică ce precede nucleotidul 4306 al catenei [+], formând o legătură covalentă cu gruparea lui 5'fosfat, care conservă energia legăturii scindate.
- 2) **Proteina Rep** atacă apoi catena [-] la gena proteinei A și cu ajutorul primozomului asociat catenei [+] începe despiralizarea duplexului DNA de capătul 5' al catenei [+]. Catena [+] separată este acoperită cu **proteinele SSB** care împiedică reanelarea cu catena [-]. **Holoenzima Pol III** extinde catena [+] de la captul ei 3'-HO liber.
- 3) Procesul de extindere generează o structură *looped rolling circle* în care capătul vechi [+] rămâne legat la proteina genul A, la furca de replicare . Se consideră că vechea catenă [+] disociază de pe RF, primozomul fiind necesar pentru sinteza de noi catene [-].
- 4) Pentru definitivarea structurii circulare, în jurul catenei [-], proteina genul A realizează din nou o scindare specifică la originea replicării, formând o legătură covalentă cu capătul 5' al noii catene [+]. Simultan, gruparea 3'-OH terminală, nou formată a catenei [+] vechi aproape circularizată atacă nucleofil gruparea ei 5' fosfat atașată la proteina genul A, ceea ce conduce la eliberarea catenei [+] închisă. Furca de replicare contunuă deplasarea ei în jurul duplexului circular producând noi catene [+].

În stadii intermediare ale infecției ϕ x 174, fiecare catenă [+] nou sintetizată direcționează sinteza catenei [-] pentru a forma RF I. În stadii târzii ale infecției, catenele nou formate [+] sunt împachetate în particulele fagului.

◆ Replicarea la *E.coli*

Cromozomul *E.coli* se replică prin mecanismul bidirecțional θ de la un singur punct de origine a replicării. Modelul cel mai plauzibil al replicării a fost propus de **KORNBERG**.

Duplexul DNA este despiralizat de **Proteina Rep** care acționează asupra tiparului catenei *leading* concomitent cu **helicaza II** și **primozomul** care acționează asupra tiparului catenei *lagging*. Catenele separate sunt imediat învelite de **proteinele SSB**. Sinteza catenei *leading* este catalizată de **DNA Pol III**, ca și catena *lagging* după legarea **primazei** asociate la primozom. Se consideră că sinteza ambelor catene

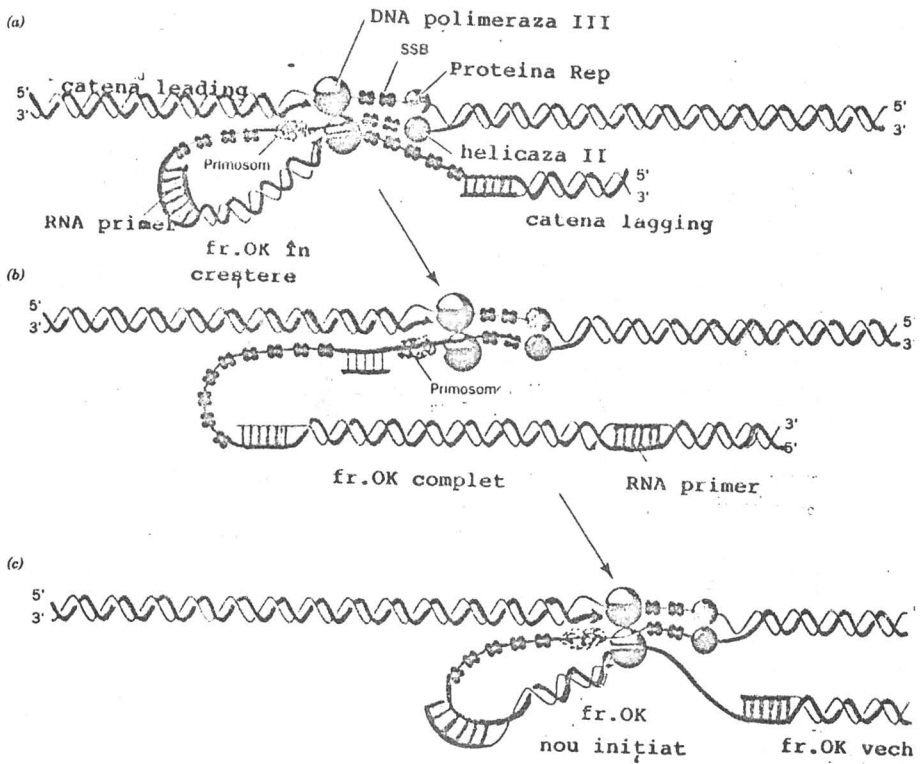


Figura 50 . Replicarea DNA E.coli

[a) Replisomul DNA E.coli care conține două holoenzime ale DNA polimerazei III sintetizează ambele catene leading și lagging. Tiparul catenei lagging trebuie să facă o buclă pentru a permite holoenzimei să extindă complexul catenei lagging-primosom; b) Holoenzima eliberează tiparul catenei lagging când ea întâlnește fragmentul **OKAZAKI** anterior sintetizat. Aceasta semnalizează primosomului să inițieze sinteza RNA primer al catenei lagging; c) Holoenzima releagă tiparul catenei lagging și extinde primerul RNA pentru a forma un nou fragment **OKAZAKI**. În acest model, sinteza catenei leading are loc înaintea sintezei catenei lagging] .

leading și *lagging* are loc pe o singură particulă multiproteică, **replisomul**, dar tiparul catenei *lagging* face o buclă în jurul ei. După terminarea sintezei unui fragment **OKAZAKI**, holoenzima catenei *lagging* se reorientează spre un nou primer lângă furca de replicare, primerul din capul fragmentului **OKAZAKI**, anterior sintetizat, este excizat prin tranzlația creștăturii, proces catalizat de Pol I și creștătura este sudată de DNA ligaza (Figura 50).

◆ Inițierea replicării

Originea replicării în cromozomul *E.coli* constă dintr-un segment unic de 245 perechi de baze, cunoscut sub numele de locus **oriC**.

Bazat pe un număr mare de experiențe, **KORNBERG** a propus un model pentru inițierea replicării la *E.coli* care are loc în mai multe etape:

1) **Proteina Dna A** (52 KD) recunoaște și se leagă la un segment din locusul **oriC** de 9 perechi de baze care se repetă de patru ori, în prezența **proteinei HU**, de tip histonă. Se formează un complex al **oriC supercoil** negativ care înconjură un miez central de 20-40 monomeri ai proteinei DnaA.

2) Subunitățile proteinei DnaA "topesc" succesiv trei segmente care se repetă în tandem, de 13 perechi de baze, bogate în AT, localizate la stânga zonei **oriC**, cu formarea unui **complex deschis** de 45 perechi de baze, a cărui existență a fost demonstrată prin sensibilitatea lui la **nucleaza P 1** o endonuclează specifică pentru structuri monocatenare. Formarea complexului deschis necesită prezența proteinei DnaA și a ATP, pe care DnaA îl leagă puternic și-l hidrolizează la temperaturi peste 22° C (*in vitro*).

3) Proteina DnaA orientează legarea proteinelor Dna B și Dna C spre regiunea topită pentru a forma **complexul de preîncărcare** (*prepriming*).

4) În prezența **proteinelor SSB** și **girazel**, **proteina DnaB** cu activitate helicazică despiralizează DNA din complexul *prepriming* în ambele direcții pentru a permite intrarea primazei și RNA polimerazei.

Replicarea cromozomului *E.coli* este înalt controlată având loc numai o dată la fiecare diviziune celulară. **Timpul de dedublare** al *E.coli* la 37 ° C variază cu condițiile de creștere, de la mai puțin de 20 minute, la circa 10 ore. Dacă viteza de deplasare a fiecărei furci de replicare este fixă (850 nucleotide/secundă), ținând seama că la *E.coli* cromozomul are 4×10^6 perechi de baze, durata **replicării întregului cromozom**

tipar
supercoil

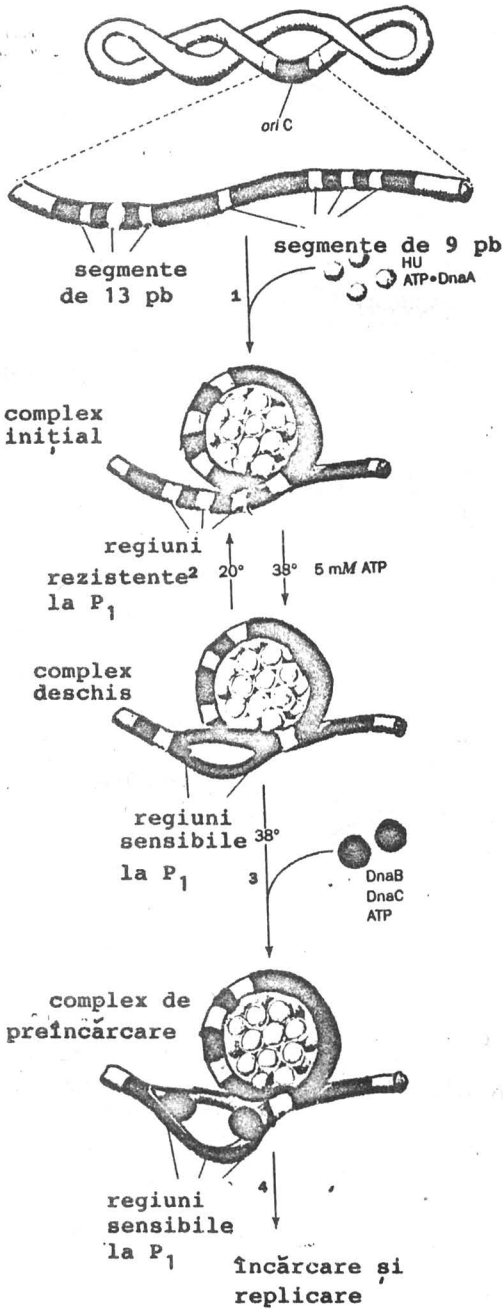


Figura 51
Modelul lui
KORNBERG
privind inițierea
replicării DNA
la E.coli

(C) este de 40 minute. Segregarea componentelor celulare și formarea septumului între ele, care trebuie să precedă diviziunea celulară necesită un timp constant **D** de 20 minute, după care are loc completarea replicării circulare a cromozomului. Celulele cu **timpi de dedublare** C+D mai mici de 60 minute trebuie să inițieze replicarea cromozomului înainte de sfârșitul ciclului de diviziune celulară precedent. Pentru a explica timpul de diviziune celulară de circa 35 minute cromozomii trebuie să aibă mai multe furci de replicare.

În mod cert există un semnal care inițiază fiecare ciclu de replicare al cromozomului, dar natura lui este încă necunoscută. Totuși observații de la E.coli că:

- 1) secvența repetitivă de 13 perechi de baze a **oriC** începe cu structura GATC ce are baze metilate ;
- 2) bacteriile defectivă în enzima care metilează secvența GATC sunt ineficiente în transformarea plasmidelor conținând **oriC**

sugerează că inductorul replicării DNA în E.coli răspunde la nivelul metilării locusului **oriC**.

Există dovezi morfologice că la E.coli cromozomul este asociat cu membrana celulară, asociere ce permite, probabil, segregarea cromozomilor replicați în celule diferite în cursul diviziunii celulare. Nu există cu toate acestea o dovadă directă că un anumit component membranar este necesar pentru replicarea DNA.

◆ Terminarea replicării

Sunt puține date privind terminarea replicării la E.coli. Este știut că terminarea are loc într-o regiune specifică a cromozomului, locusul **terC**, după o jumătate de parcurs în jurul cromozomului, față de **oriC**, unde cele două furci de replicare se întâlnesc.

◆ Fidelitatea replicării

Faptul că mai mult de 20 proteine și enzime acționează coordonat în procesul de replicare al DNA E.coli îi asigură fidelitatea copierii mesajului genetic.

Vitezele reversei unui mutant al E.coli sau a unui fag T 4 la tipul sălbatic indică faptul că poate avea loc numai o împerechere greșită la 108-109 perechi de baze replicate.

O asemenea fidelitate în replicarea materialului genetic poate fi asigurată prin :

- 1) funcțiile 3'-5' exonucleazice ale Pol I și Pol III care detectează și elimină erorile ocazionale în funcțiile lor polimerazice;

2) incapacitatea unei DNA polimeraze de a iniția sinteza unei noi catene DNA , deoarece inserarea primelor nucleotide se realizează cu mari erori datorită lipsei cooperativității între perechile de baze RNA primer fiind scindat și înlocuit ulterior;

3) sistemul complex de sinteză discontinuă a catenei *lagging* oferă o posibilitate de mărire a fidelității replicării.

◆ Replicarea DNA eucariotic

Există similitudini între mecanismul replicării DNA la procarlote și la eucariote, dar există și diferențe datorită complexității materialului genetic la eucariote.

Ciclul celular este o secvență generală de evenimente ce are loc în timpul vieții unei celule eucariote și poate fi divizat în patru faze distincte (Figura 52) :

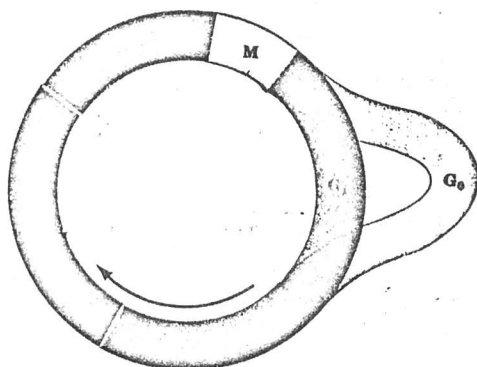


Figura 52
Ciclul
celulei
eucariote

1) **Faza M** (mitoză) în care are loc mitoză și diviziunea celulară (circa o ora);

2) **Faza G-1** (*gap*), care acoperă aproape tot ciclul celular (circa 10 ore) ;

3) **Faza S** pentru sinteză, unica perioadă când este sintetizat DNA (de circa 6-8 ore) ;

4) **Faza G-2**, în care celula tetraploidă se prepară pentru mitoză (2-6 ore), de a începe un nou ciclu celular.

În faza G -1, cantitatea de DNA este **2 C**, nu are loc sinteza de acizi nucleici. În faza S , cantitatea de DNA devine **4 C**, cantitate care se

menține și în faza G-2. În afara celulelor la care ciclul de diviziune se desfășoară normal, există și celule în repaus (în faza Go).

Ciclul celular pentru celule în cultură durează 16-24 ore. Durata ciclului celular pentru diferite tipuri de celule dintr-un organism multicelular poate varia de la 8 ore la mai mult de 100 zile. Majoritatea variațiilor apar în faza G-1. Multe celule diferențiate final, ca neuronii sau celulele musculare nu se divid și intră în faza Go.

Decizia ireversibilă dacă o celulă proliferază este luată în faza G-1. Perioada Go se poate instala dacă, de exemplu, nu există substanțe nutritive sau dacă celula este în contact cu alte celule (inhibiția de contact). Invers, sinteza DNA poate fi indusă de diferiți agenți cum sunt substanțele carcinogene sau virusurile tumorale care induc proliferarea necontrolată a celulei, prin îndepărtarea chirurgicală a unui țesut (când are loc regenerarea lui rapidă) sau cu proteine mitogene care se leagă la receptorii de suprafață și induc diviziunea celulară.

Celulele în creștere conțin factori citoplasmatici ce stimulează replicarea DNA, a căror mecanism de acțiune este insuficient cunoscut.

◆ DNA polimerazele eucariotelor

Celulele animalelor conțin cel puțin patru tipuri de DNA polimeraze distincte: α , β , γ și δ (Tabelul 15)

Tabelul 15. DNA polimerazele eucariotelor

Tipul	α	β	γ	δ
Localizare	nucleu	nucleu	mitocondrie	nucleu
Masa (KD)	120-220	30-50	150-300	140-160
Inhibitori				
AFIDICOLINA	+	-	-	+
DIDEOXI NTP	slab	puternic	puternic	slab
ARABINOZIL NTP	puternic	slab	slab	puternic
N-ETILMALEIMIDA	puternic	slab	puternic	puternic

Funcțiile lor au fost elucidate prin răspunsurile diferite la inhibitori.

DNA polimeraza α , care apare aproape în toate celulele participă la replicarea DNA , rol evidențiat prin studii cu un inhibitor specific : **afidicolina** și prin observația că activitatea DNA polimerazel α variază cu viteza proliferării celulare. Această enzimă multisubunitară (patru tipuri de subunități la Drosophila, cinci tipuri în ficatul de șobolan) replică DNA prin adăugarea la un primer în direcția 5'-3' de deoxiribonucleotide pe baza informației unui DNA morocatenar. DNA polimeraza α este puternic asociată cu activitatea primazel, dar pierde activitatea exonucleazică, astfel că etapele de corecție sunt realizate prin alte mecanisme.

DNA polimeraza δ , o enzimă nucleară cu sensibilități la inhibitori similare cu cele ale DNA polimerazel α , diferă de aceasta prin faptul că pierde primaza asociată și că prezintă o activitate 3'-5'-exonucleazică corectoare. O alta diferență este că DNA polimeraza δ are o procesivitate practic nelimitată, putând replica întreaga lungime a tiparului în timp ce DNA polimeraza α are o procesivitate moderată (de circa 100 nucleotide). Se consideră că DNA polimeraza δ este replicaza catenel *leading* (care necesită o înaltă procesivitate și numai ocazional este necesară prezența unui primer), în timp ce DNA polimeraza α este replicaza catenel *lagging*, care necesită realizarea frecventă a inițierii cu RNA și o procesivitate limitată.

DNA polimeraza β este remarcabilă prin mărimea ei mică. Funcția biologică a acestei enzime nucleare nu este cunoscută deși observația că nivelul ei de activitate nu variază cu viteza creșterii celulare sugerează că ea participă la procesul de reparare a DNA.

DNA polimeraza γ apare numai în mitocondrie unde probabil replică DNA mitocondrial. Cloroplastele conțin o enzima similară.

Sistemele de replicare a DNA eucariotici și procariotici diferă în special prin aceea ca la eucariote cromozomii au multiple origini de replicare în contrast cu originea unică din cromozomii procariotelor. Studiile autoradiografice de măsurare a lungimii DNA prin *pulse-labeled* au arătat că DNA polimeraza α sintetizează DNA cu o viteză de circa 50 nucleotide/secundă , de aproximativ 20 ori mai lent decât DNA polimeraza procariotelor. Deoarece un cromozom eucariotic conține de regula de 60 ori mai mult DNA, replicarea bidirecționată de la o singură origine ar dura o lună. Micrografiele electronice ale cromozomilor eucariotici au arătat că aceștia conțin mai multe origini , una la fiecare 3 - 300 Kb în funcție de specie și țesut, astfel că faza S are loc numai în câteva ore.

Observațiile citologice indică faptul că diferite regiuni ale cromozomului nu sunt replicate simultan ci are loc activarea concomitentă a unor clustere de 20-80 **repliconi** (unități de replicare, care fiecare au o origine). Noi repliconi sunt activați în timpul fazei S

care fiecare au o origine). Noi repliconi sunt activați în timpul fazei S până când întregul cromozom este copiat.

Replicarea unei unități replicon este inclusă de transcripta primărilor, care este sub controlul segmentelor *enhancer* asociate cu originea. Segmentele din DNA *enhancer* reglează inițierea transcripției prin intermediul factorilor de transcripție, proteine care stimulează RNA-polimeraza. Factori de transcripție țesut-specifici și specifici ciclului celular pot comuta între diferiții repliconi.

◆ Transcriptaza inversa

Retrovirusurile , care sunt virusurile ale eucariotelor care conțin RNA (virusurile tumorale, virusul imunodeficienței umane HIV) conțin o **DNA polimeraza RNA-dependență** (p.47) . Aceasta **transcriptază inversă** ce a fost descoperită în 1970 de **TEMIN** și **BALTIMORE** acționează similar Pol I, sintetizând DNA în direcția 5'-3' pornind de la un primer, tiparul fiind RNA.

Transcriptazele inverse din virusul mieloblastozei aviane și din virusul sarcomului **ROUS** sunt dimeri $\alpha\beta$ cu mase ale subunităților de 65 și 95 KD. Aceste enzime au două activități enzimatice în plus:

- 1) **exoribonucleazică** , prin care degradează specifice RNA din hibridul RNA-DNA (**RNaza H**, de la hibrid) ;
- 2) o activitate **DNA polimerazică DNA dependentă**.

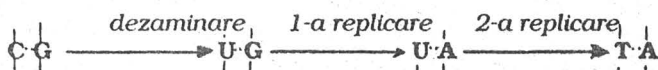
În timpul infecției virale cu un retrovirus, transcriptaza inversă transcrie RNA viral pe o catenă complementară cDNA formând un hibrid RNA-DNA , după care enzima degradează RNA și replică cDNA formând duplexul DNA care este responsabil pentru infecția virală din gazdă.

Transcriptaza inversă este un adevărat instrument în cercetările de Inginerie genetică datorită capacității ei de a copia mesajul de pe mRNA pe cDNA.

6. MUTATIILE SI REPARAREA DNA

Una dintre necesitățile fundamentale pentru ca o structură să aibă rolul de depozit permanent al informației genetice este **extrema ei stabilitate** din punct de vedere al conținutului în baze, al secvenței, etc. Deși în mod normal, DNA este o moleculă stabilă, ea nu este inertă chimic, existând într-un mediu reactiv cu o mulțime de agenți fizici sau chimici care pot provoca modificarea sau îndepărtarea bazelor, scindarea legăturilor fosfodiesterice, legarea covalentă a catenelor între ele, etc. . Supus radiațiilor UV, are loc modificarea bazelor, legăturilor oză-fosfat.

Erori pot apărea, de asemenea, în timpul proceselor de replicare și recombinare, conducând la o incorporare eronată a unei sau mai multor baze într-o nouă catenă. În majoritatea cazurilor sunt necesare câteva cicluri de replicare a DNA înainte ca o modificare în structura unei baze să conducă la o leziune ireversibilă.



Utilizarea catenei cu defect ca tipar extinde defectul de la nivelul unei singure baze la modificarea completă a unei perechi de baze, iar următoarea replicare stabilizează modificarea.

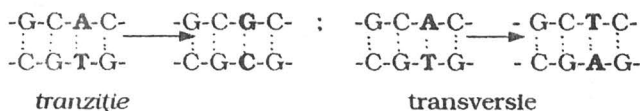
Deoarece proprietățile celulelor organismelor vii depind de secvența DNA din genele lor, modificările ireversibile ale câtorva perechi de baze din DNA provoacă schimbări substanțiale în organismul corespunzător. Aceste modificări numite **mutații** pot fi **ascunse** sau **vizibile**, ultimele fiind exprimate fenotipic.

O mutație este o modificare stabilă în structura DNA, și este frecvent exprimată ca o modificare fenotipică în organismul corespunzător.

În funcție de originea lor, mutațiile pot fi clasificate în : 1) substituții de baze și 2) mutații frame shift cu deplasarea cadrului de citire a informației genetice.

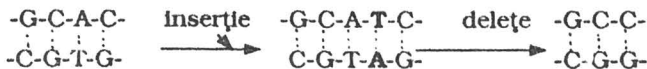
Substituțiile de baze pot fi :

- 1) **tranziții** (substituția unei perechi de baze purină-pirimidină (Pu-Py) cu altă pereche de baze Pu-Py și
- 2) **transversii** (substituția unei perechi de baze Pu-Py cu o pereche de baze Py-Pu) :



Mutațiile frame shift sunt mai radicale fiind :

- 1) **insertii** (inserarea unei noi perechi de baze) și **deleții** (dispariția unei perechi de baze) :

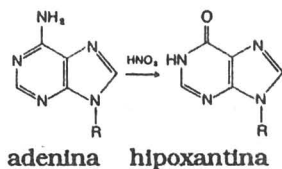
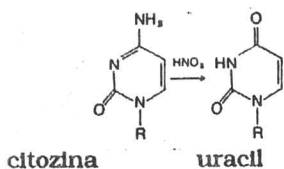


◆ AGENTII MUTAGENI

Iradierarea și anumiți compuși chimici sunt principalii mutageni ; rareori, incorporarea greșită de baze de către DNA polimeraze conduce la mutații.

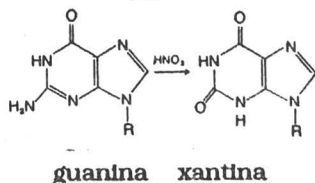
Mutații chimice ale bazelor. Bazele DNA sunt sensibile la acțiunea diferitelor substanțe chimice : HNO_2 , NH_2OH , diferiți agenți de alchilare ca dimetil sulfatul și N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina.

HNO_2 produce dezaminări :

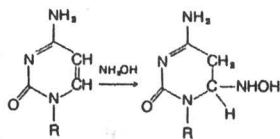


Aceste mutații conduc la ruperea punților de hidrogen din duplexul DNA.

Dezaminarea guaninei la xantină nu are niciun efect asupra capacității de a forma punți de hidrogen, deoarece xantina formează pereche cu citozina ca și guanina.

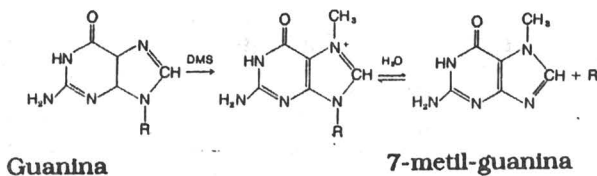


Hidroxilamina dă reacții de adiție nucleofilă la dubla legatură $\text{C}^5 = \text{C}^6$ a citozinei:



Dimetil sulfatul alchileaza

guanina :



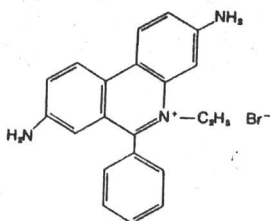
Un alt exemplu este cel al 5-brom uracilului, care este încorporat în locul timinei. Echilibrul *enol* *ceto* pentru aceste două baze conduce la formarea într-o proporție mai mare a formei *enol* a 5-brom uracilului decât în timină. Acest fapt apare datorită caracterului electronegativ al bromului. Forma *enol* a 5-brom uracilului formează pereche cu guanina, conducând la o tranziție:

tranzitie



Anumiți compuși organici care au nuclee aromatice și au structuri coplanare cu dimensiuni apropiate bazelor pot fi inserate între perechile de baze ale duplexului DNA. Acest proces este numit **intercalare**. În cursul intercalării, perechile de baze din DNA sunt distanțate permițând inserarea nucleului intercalat și provocând alungirea duplexului. Continuitatea secvențelor de baze în DNA este întreruptă și citirea bazelor de către DNA polimerază produce o catenă nouă datorită deplasării citirii mesajului genetic. **Acridina și bromura de etidium** sunt substanțe de intercalare care produc mutații *frame shift*.

Bromura de etidium



◆ Mecanisme de reparare

Orice leziune în structura DNA este reparată rapid, pentru menținerea mesajului genetic, prin mecanisme similare la *E.coli* și la eucariote.

1. Repararea prin inversarea directă a leziunii

⇒ Fotoliza dimerilor pirimidinici

Radiatiile UV (200-300 nm) induc formarea unui inel ciclobutil între resturi de timina adiacente, de pe aceeași catenă DNA, formând un dimer timinic.

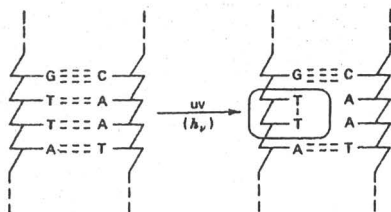
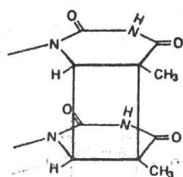


Figura 53.
Dimerizarea resturilor de timină adiacente

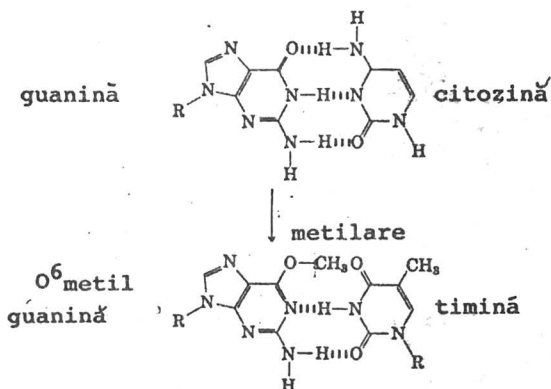
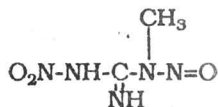


Similar, citozina formează dimeri timină-citozină, dar cu viteze mai mici. Astfel de dimeri pirimidinici distorsionează local structura dublu catenară a DNA, împiedicând utilizarea lui ca țipar în transcripție și replicare (Figura 53).

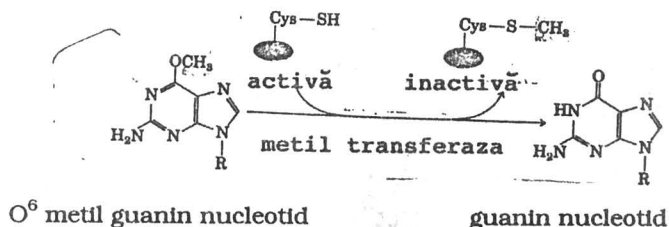
Dimerii pirimidinici pot fi scindați la formele monomerice prin acțiunea unei enzime ce absoarbe lumina, numită **enzimă de fotoreactivare sau fotoliaza**. Enzima din *E.coli* are 35 KD și se leagă la dimerii pirimidinici într-un proces ce poate avea loc și la întuneric, după care absoarbe lumina de 300-500 nm în prezența unor agenți cromofori (FADH₂ și pterinei) legați necovalent, scindând dimerul .

⇒ **Indepărtarea radicalilor alchil din duplexul DNA**

Expunerea DNA la agenți de alchilare de tipul **N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidină** (MNNG) produce resturi de O⁶-metil guanină. Formarea acestor derivați este mutagenă deoarece la replicare produc incorporarea T în loc de C:



Lezuniile cu O⁶-Metil -guanină și O⁶-Etil-guanină din DNA *E.coli* și din celulele mamiferelor sunt reparate cu **O⁶-metil guanin-DNA- metil transferaza**, care transferă direct gruparea alchil la unul din resturile ei de cisteină:



Reacția inactivează proteina, care nu poate fi strict clasificată ca enzimă. Reacția alchil transferazel este foarte mult studiată deoarece carcinogeneza indusă de agenți de alchilare este corelată cu o reparare deficientă a lezuniilor O⁶-alchil-guanină.

2. Repararea prin excizie

⇒ cu enzima multisubunitară Uvr-ABC endonucleaza

Dimerii pirimidinici pot fi îndepărtați și prin acțiunea a trei activități enzimatică. Prima este de fapt un complex enzimatic multisubunitar constând din proteine codificate de genele *uvrABC*, numit **UvrABC endonucleaza**. De fapt, complexul enzimatic scindează printr-un proces ATP dependent catena DNA cu leziune la două situsuri, cu opt nucleotide înaintea dimerului pe partea 5' și cu patru nucleotide după dimer pe latura 3'. Oligonucleotidul de 12 resturi scindat difuzează. DNA polimeraza I umple golul și DNA ligaza sudează creștatura rămasă.

UvrABC endonucleaza scindează și alte tipuri de leziuni din DNA, caracterizate prin deplasarea bazelor de la pozițiile lor normale sau rezultate din adăugarea unui substituent voluminos în structura bazei. Capacitatea catalitică a UvrABC endonucleazei este mărită de distorsionarea helixului și nu de recunoașterea unor grăpări particulare (Figura 54).

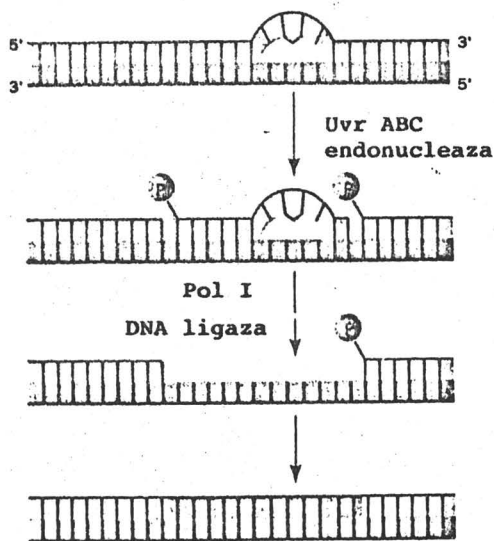


Figura 54. Repararea dimerilor pirimidinici cu ajutorul UvrABC endonucleazei.

La oameni, boala ereditară *xeroderma pigmentosum* (*xeros* - uscat ; *derma* - piele, în greacă) este rezultatul incapacității celulelor pielii de a repara leziunile induse de UV în DNA. Indivizii care suferă de aceasta boală autosomală recesivă sunt extrem de sensibili la lumina soarelui. În timpul copilăriei, ei prezintă modificări marcante ale pielii ca : uscarea, prăstierea excesivă, keratoza , ca și leziuni la nivelul ochilor cu ulcerarea corneei. Ei dezvoltă cancere ale pielii, fatale.

⇒ cu DNA glicozilaze, endonucleaza AP

DNA cu o leziuni poate reparat prin excizie cu participarea unei varietăți de enzime. Celulele conțin **DNA glicozilaze** care scindează specific legătura glicozidică a nucleotidului modificat, eliberând baza azotată modificată. Astfel de **situsuri apurinice și apirimidinice (AP)** pot fi, de asemenea, generate în condiții fiziologice normale prin hidroliza spontană a unei legături glicozidice.

Restul de deoxiriboză este apoi scindat pe o parte de o **AP endonuclează**, resturile de deoxiriboză, iar pe cealaltă de exonucleaze celulare. Golul este umplut de DNA polimeraza și creștatura este sudată de DNA ligaza.

Studiile de dezaminare a citozinei au arătat că uracilul este o bază înalt mutagenă. Când apare în DNA, **U** este scindat de **uracil-N-glicozilaza**, fiind apoi înlocuit cu **C** prin mecanismul reparării prin excizie.

Uracil N-glicozilaza are și o altă funcție importantă în replicarea DNA. dUTP este un intermediar în sinteza dTTP. DNA polimerazele nu discriminează suficient între dUTP și dTTP și în ciuda concentrației mici de dUTP în celulă, apare posibilitatea inserării greșite a **U** (Figura 55).

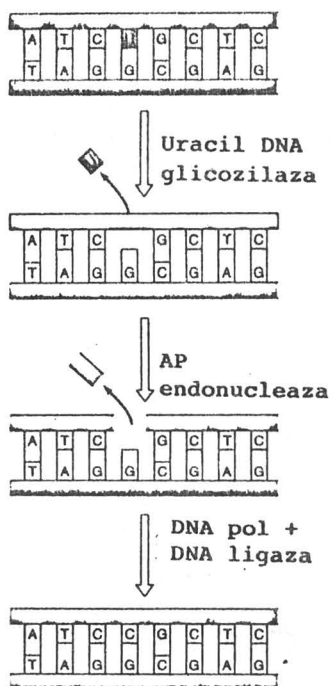


Figura 55.

Repararea DNA cu uracil DNA glicozilaza

3. Repararea prin recombinare

DNA cu leziuni poate suferi replicarea înainte ca leziunea să poată fi eliminată de sistemele de reparare descrise anterior. Replicarea DNA conținând un dimer pirimidinic poate fi întreruptă de distorsionarea tiparului și

poate fi reinițiată la o anumită distanță de situsul dimer. Catenă fiică rezultată prezintă un gol în poziția opusă dimerului pirimidinic. O astfel de leziune poate fi reparată prin recombinare (reparare post-replicativă), când se transferă segmentul de pe catenă parentală intactă pe catenă cu defect (Figura 56).

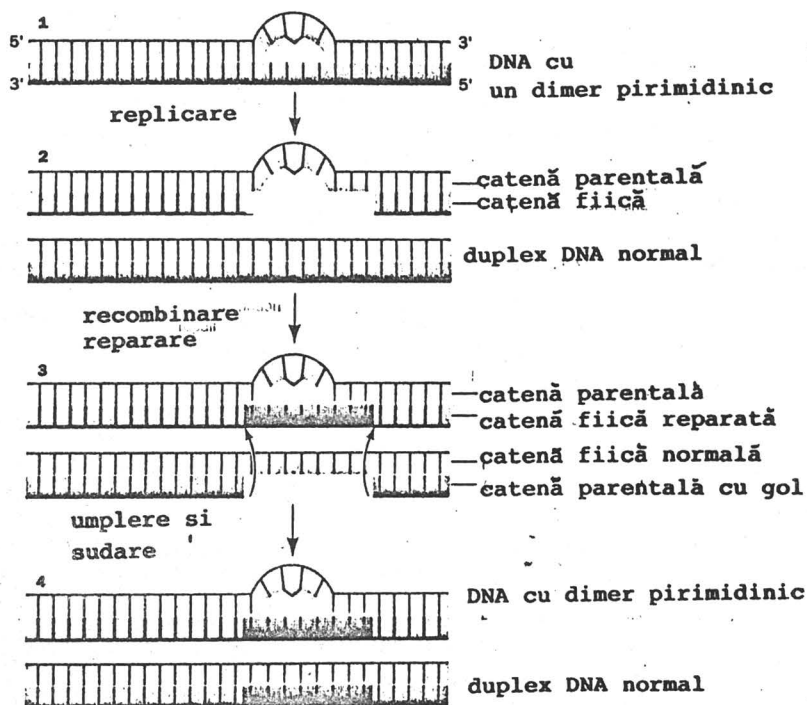


Figura 56 . Mecanismul reparării DNA prin recombinare

◆ Răspunsul SOS

Agentii care produc leziuni în DNA (radiatiile UV, agentii de alchilare, agentii de înrețelare) induc un sistem complex de modificari celulare, care la E.coli este numit **răspunsul SOS**.

O celulă de E.coli conține în mod normal câteva copii moleculare ale **proteinei recA**. S-a observat că o leziune la nivelul DNA induce sinteza unui număr de 100 ori mai mare de copii moleculare ale **proteinei recA**, precum și a altor 15 proteine. În mod normal, sinteza mRNA care codifică aceste proteine este blocată de o **proteină represor lex A** (22 KD). Analize genetice au arătat că **LexA** funcționează ca un represor al unui număr de operoni, incluzând și pe acela al genelor **recA** și **lexA**.

Complexul format între segmentul monocatenar al DNA cu **recA** hidrolizează o legătură **Ala-Gly** din structura **proteinei lex A**, anulându-i capacitatea de a bloca transcripția. Distrugerea **represorului lexA** conduce la

sinteza crescută a **proteinei recA**, a **protenelor SSB**, a **complexului UvrABC** și a **nucleazelor** care scindează dimerii timinei.

S-a observat că mutanții ai E.coli la nivelul genelor **recA** sau **lexA** prezintă acest răspuns **SOS** în mod permanent.

◆ **Identificarea carcinogenilor**

Multe forme de cancer (circa 80 %) sunt cauzate de expunerea la anumite agenți chimici (carcinogeni). În carcinogeneză, evenimentul primar este lezarea DNA. Substanțele cancerigene induc răspunsul **SOS** la bacterii și acționează ca agenți mutageni indirecti. De fapt, există o **înaltă corelație între carcinogeneză și mutageneză**.

Există teste standard, efectuate pe animale, pentru testarea efectului posibil carcinogen al unor substanțe (chiar medicamente), care durează circa trei ani.

AMES a prezentat o metodă pentru testarea carcinogenezei bazată pe corelația carcinogeneză-mutageneză. Pentru testare se folosesc tulpini de Salmonella typhimurium His⁻ (nu pot sintetiza histidina, deci nu pot trăi în absența acestui aminoacid), cu înveloasa celulară lipsită de polizaharidul care conferă bacteriei impermeabilitate față de multe substanțe și cu un sistem de reparare prin excizie inactivat. Mutageneza, în aceste tulpini, este indicată de reversarea lor la fenotipul **His⁺**.

În testul **AMES**, circa 10^9 bacterii sunt pulverizate pe o placă cu mediul de cultură fără histidină. Un agent mutagen introdus în mediul de cultură provoacă revenirea unui număr de bacterii la fenotipul **His⁺** care este detectat ușor prin apariția la 37°C după două zile unor colonii vizibile. Mutagenicitatea unei substanțe este calculată în funcție de numărul coloniilor care apar, prin comparație cu un experiment din care lipsește agentul mutagen.

Multe substanțe necarcinogene sunt transformate în substanțe carcinogene în ficat și în alte țesuturi printr-o varietate de reacții de detoxifiere. Dacă se supun mici volume de homogenate hepatice testului **AMES** se poate aproxima efectul metabolizării lor.

S-a stabilit o bună corelație (cca 80 %) între rezultatele testului **AMES** și al experiențelor pe animale privind corelația carcinogeneză-mutageneză a unor compuși. Curbele doză-răspuns, care se trasează în testarea unui compus dat la diverse concentrații sunt aproape totdeauna lineare, arătând neexistența unei concentrații prag de mutageneză.

O serie de compuși pe care oamenii îi folosesc curent s-au dovedit mutageni prin testul **AMES** și carcinogeni prin testele pe animale. **Aflatoxina B₁**, produsă de mucegaiuri ce trăiesc pe cereale s-a dovedit unul dintre cei mai potenți carcinogeni testați. Alimentele brunificate sau carbonizate ce apar în carnea fiartă sau pâinea prăjită conțin o varietate de produși ce produc leziuni la nivelul DNA.

7. TRANSCRIPTIA

Expresia informației genetice conținută într-un segment de DNA este transcrisă în structura diferitelor tipuri de RNA. Cu excepția RNA genomului anumitor virusuri, toate moleculele de RNA sunt derivate din informația stocată în DNA. Sinteza macromoleculilor de RNA direcționată de DNA poartă denumirea de **transcripție**. Procesul de transcriere a mesajului genetic de pe DNA pe RNA are loc în trei etape distincte: **inițierea**, **alungirea** și **terminarea transcripției**.

Astăzi se cunoaște că macromoleculile de RNA au nu numai funcții informaționale ci și catalitice, participând la procesul complex de maturare al transcriptului RNA primar.

♦ RNA polimeraza procariotelor

La procariote există o singură enzimă care sintetizează toate speciile de RNA cu excepția RNA primar implicată în replicare. Enzima catalizează condensarea ribonucleozid trifosfaților cu eliberare de pirofosfat într-un proces dependent de ioni de Mg^{2+} (p.50). Fiecare nucleotid din RNA nou format este selectat pe baza interacțiilor dintre perechile de baze **WATSON-CRICK**: resturile uridilat (U) sunt inserate în RNA în poziții opuse resturilor de adenilat (A) din catena țipar DNA; resturile de guanilat (G) și citidilat (C) de pe DNA specifică C și respectiv G în noua catenă a RNA:

5' **GCAATTCGATC** 3' catena (+), non-țipar, non-sense a DNA

3' **CGTTAAGCTAG** 5' catena (-), țipar, sense a DNA

5' **GCAAUUCGAU** 3' catena nou formată a RNA

RNA polimeraza de la E.coli are o masă moleculară mare, de 480 KD, un diametru de circa 100 Å, fiind totuși o enzimă solubilă.

După cum deja s-a arătat **RNA polimeraza** are funcții multiple:

- 1) selectează corect ribonucleozid trifosfații conform informației genetice înscrise în DNA și catalizează policondensarea lor în direcția 5'-3', enzima deplasându-se unidirecțional de-a lungul țiparului;
- 2) copie mesajul de pe o singură catenă a duplexului DNA țipar, nunită catena sense sau (-), în fiecare cromozom fiind utilizate ca țipar gene de pe diferite catene;
- 3) recunoaște și se leagă la situsuri specifice (**situsuri promotor**) de pe molecula DNA (la E.coli există circa 2000 situsuri promotor la un genom de 4×10^6 perechi de baze); secvențele reglatoare în transcripție prin convenție sunt descrise ca secvențe ale catenii non-sense;
- 4) depliază parțial DNA pentru a produce un țipar monocatenar;

- 5) interacționează cu proteine activator sau represor ce modulează viteza transcripției;
- 6) sintetizează RNA primer esențial pentru tranzlație ;
- 7) recunoaște semnale de terminare fiind implicată și în terminarea procesului de transcripție după copierea genelor ;
- 8) neavând activitatea 3'-5' exonucleazică fidelitatea transcripției este mai mică decât cea a replicării; frecvența erorilor fiind de o bază încorporată greșit la $10^4 - 10^5$ transcrise.

Complexitatea activității **RNA polimerazelor** se reflectă în structura ei cuaternară. Holoenzima izolată de la E.coli are o structură oligomerică (Tabelul 16) cu compoziția $\alpha_2 \beta \beta' \sigma$.

Tabelul 16. Structura subunitară a RNA polimerazelor din E.coli

Subunitatea	Masa moleculară (KD)	rolul
α	37	necunoscut
β	151	subunitatea catalitică, cu rol în formarea de legături fosfodiesterice
β'	156	legare la DNA țipar
σ	70	recunoaște promotorul și inițiază sinteza

RNA polimeraza fără subunitatea σ este numită **core polimeraza** și deși este implicată în procesul de policondensare (**procesivitate**) nu este capabilă de a iniția transcripția.

Subunitatea σ permite holoenzimei să se deplaseze rapid de-a lungul unei catene DNA pentru a găsi și recunoaște **secvențele promotor**. Odată transcripția inițiată, subunitatea σ disociază, **core polimeraza** se leagă mai puternic la DNA formându-se un complex ternar **enzimă-DNA-RNA** .

Subunitatea β' conține doi atomi de zinc cu rol în funcția catalitică.

♦ Secvențele promotor la procarlote

RNA polimeraza se leagă la situsuri de inițiere cu secvențe de baze specifice de pe catena DNA țipar , numite **promotori** - ce sunt recunoscute de un **factor σ** . Aceste situsuri au fost evidențiate prin experimente în care complexul **DNA țipar - RNA polimeraza** , în absența ribonucleotidelor a fost tratat cu o **deoxirbonuclează** care scindează țiparul cu excepția secvențelor promotor protejate prin legare cu RNA polimeraza . Studiul de acest tip au arătat că este protejat un segment de circa 40- 60 resturi nucleotidice, localizate la extremitatea 5' a **situsului start al transcripției**.

Contactele promotor-holoenzimă a fost identificate prin metoda **foot printing** care constă în alchilarea cu dimetil sulfat (DMS) a pozițiilor N⁷ a guaninei, N¹ și N³ a adeninei și N³ a citozinei . Deoarece N¹ de la adenină și N³

de la citozină participă la formarea de perechi de baze, metoda diferențiază între DNA mono- și di-catenar.

Prin convenție, o pereche de baze este desemnată printr-un număr însoțit de semnul [+] sau [-] în funcție de direcția de deplasare a RNA polimerazelor. Primul nucleotid transcris în RNA este notat +1 (situsul start). Nu există situsul zero (0). RNA polimeraza se deplasează în direcția 5'-3', deci promotorul se află înaintea nucleotidului +1.

Regiunea [-20] - [+20] este protejată total față de digestia cu DNază I, deci holoenzima se leagă puternic (constantă de disociere $K = 10^{-14} M$). Regiunea [-60] - [-20] este protejată într-un grad mai mic, deci holoenzima se leagă mai puțin puternic.

Secvențele promotor ale bacteriilor nu sunt identice dar anumite ucleotide rămân conservate. Astfel, majoritatea promotorilor de la E.coli și bacterii înrudite au la extremitatea 5' a situsului start:

1) **secvența [-10]** sau **boxa PRIBNOW**, de circa șase perechi de baze, cu o structură *consensus* 5' **TATAAT3'**, conservată de-a lungul evoluției și

2) **secvența [-35]**, denumită astfel deoarece se găsește în jurul poziției [-35], cu o structură *consensus* 5' **TCTTGACAT 3'**.

Studiul a 112 regiuni promotor, la procarlote, indică o secvență conservată (Figura 57):

	regiunea -35	spacer	regiunea -10	spacer	start
<i>trp</i>	TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
<i>tRNA^{Tyr}</i>	TTTACA	N ₁₆	TATGAT	N ₇	A
<i>lac</i>	TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>	TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A
<i>araB,A,D</i>	CTGACG	N ₁₈	TACTGT	N ₆	A
secvența consensus	TTGACA		TATAAT		

Figura 57. Secvențele a cinci promotor de la E.coli pentru genele implicate în metabolismul triptofanului (*trp*), lactozel (*lac*) și arabinozel (*ara*); pentru gena ce codifică *tRNA^{Tyr}* și proteina *recA*. Toate secvențele sunt prezentate în direcția 5'-3' (pe catena netipar), fiind separate prin regiuni de spațiere (*spacer*) formate dintr-un număr variabil de nucleotide (N).

Nucleotidul de inițiere (+1) care este A sau G este centrat într-o secvență mai puțin conservată CAT sau CGT după 5-8 perechi de baze de la boxa **PRIBNOW**.

Unii promotori de la E.coli diferă considerabil de promotorii standard prezentați în Figura 57, recunoașterea acestora de către RNA polimeraza fiind mediată de alți factori σ . Un exemplu în acest sens este cazul genelor *heat-shock* a căror exprimare este indusă de o stare de stres, cum ar fi creșterea

bruscă a temperaturii . RNA polimeraza se leagă la acești promotori când subunitatea σ normală (desemnată σ^{70} deoarece are o masă moleculară de 70 KD) este înlocuită de o subunitate σ diferită , σ^{32} (masă moleculară 32 KD) specifică pentru promotorii *heat-shock*.

Diferitele secvențe promotor se deosebesc prin eficacitatea lor : unii inițiază frecvent inițierea transcriptului (la fiecare două secunde) alții acționează mai lent (o dată la 10 minute). Primii , așa numiții promotori "*strong*" se găsesc în regiunile [-10] și [-35] - separate de o secvență de circa 17 nucleotide. Al doilea tip de promotori "*weak*" prezintă multiple substituții la nivelul acestor regiuni. O singură mutație în regiunea [-10] sau [-35] poate conduce la pierderea rolului de inițiere a transcriptului .

♦ Inițierea transcriptiei

În căutarea secvențelor promotor, RNA polimeraza se leagă la un DNA dublu helicoïdal, care însă nu poate servi ca tipar pentru citirea mesajului . O regiune din acest duplex trebuie despiralizată pentru că numai una din catene să poată fi transcrisă (catena *sense*). O asemenea situație este favorizată de apariția unor structuri *supercoil* negative în molecula duplexului DNA, însăși RNA polimeraza putând deplia 1,6 ture de helix din B-DNA. DNA giraza poate crește eficacitatea promotorilor prin capacitatea ei de a introduce aceste structuri.

RNA polimeraza se leagă la promotor printr-un proces care are loc în două etape . Inițial holoenzima se leagă la DNA , migrând apoi spre regiunea [-35] și formând așa numitul **complex închis** . DNA este despiralizat pe parcursul unui segment de aproximativ 17 perechi de baze începând de la regiunea [-10] , expunând situsul de inițiere de pe catena tipar . RNA polimeraza se leagă mai puternic la această regiune despiralizată formând **complexul deschis** , datorită prezenței perechilor de baze A..T din regiunea **PRIBNOW** (Figura 58).

Nucleotidul 5'-terminal din structura RNA procariotelor are aproape întotdeauna o bază azotată purinică (de regulă adenina), existând o structură 5'-trifosfat terminală **pppG** sau **pppA** . Spre deosebire de DNA polimeraze, RNA polimeraza nu necesită prezența unui primer, reacția de inițiere fiind :



După formarea primei legături fosfodiesterice, subunitatea σ disociază, iar **core polimeraza** rămâne legată la tiparul DNA până la terminarea procesului de transcripție. Subunitatea σ se poate uni cu o altă moleculă de **core polimeraza** pentru a forma un nou **complex de inițiere**,

Inițierea procesului de transcripție este reglată deoarece necesitățile celulare pentru produsul unei anumite gene variază în anumite condiții celulare și în diferite stadii ale dezvoltării. Variația afinității RNA polimerazelor pentru diferite secvențe promotor este un prim control. De asemenea, o varietate de proteine se leagă la promotor sau la secvențe din vecinătatea acestuia activând sau inhibând transcripția. La *E.coli* , **proteina CAP** (*catabolite gene activator protein*) activează transcripția genelor care codifică enzime din catabolismul glucidelor, altele decât glucoza, când celulele sunt forțate să crească în absența glucozei . **Represorii** sunt proteine care blochează sinteza RNA la gene specifice .

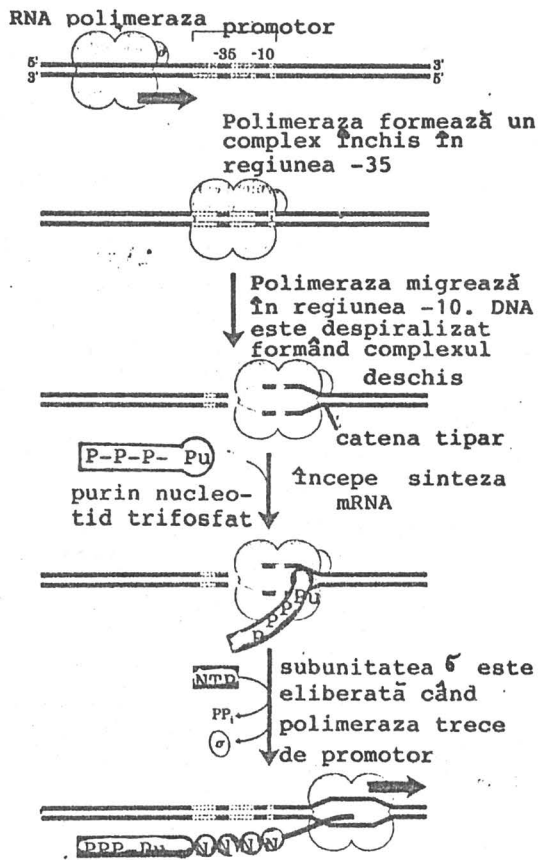


Figura 58.

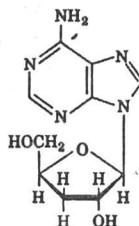
Etapele procesului de transcripție la *E.coli* : formarea complexelor închis și deschis.

◆ Alungirea catenei RNA

Această etapă începe după formarea primei legături fosfodiesterice .

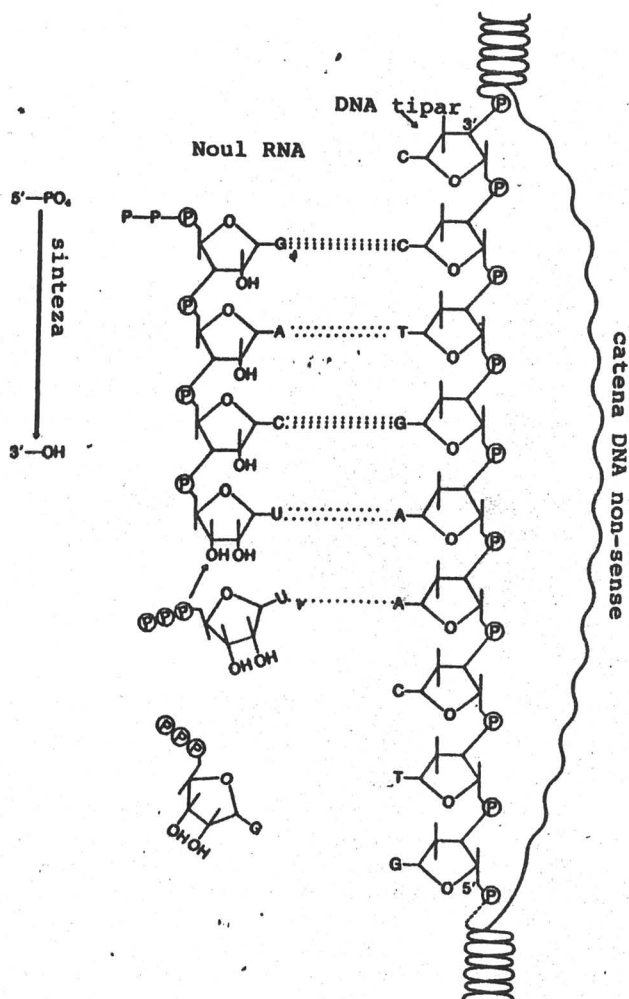
Studiul de incorporare a γ 32 P -GTP în RNA și cu cordicepină au demonstrat ca din holoenzimă core polimeraza adaugă noi resturi de ribonucleotide în direcția 5'-3' (Figura 59) . Cordicepina este un antibiotic cu structură analoagă adenozinei care inhibă sinteza RNA prin inserarea la capătul lui 3' și prin blocarea etapei de alungire . Ea nu ar afecta sinteza RNA, dacă

Cordicepina



alungirea s-ar realiza in directia 3'-5'.

Figura 59. Alungirea catenel RNA nou format pe un tipar DNA



In cursul etapei de alungire **core polimeraza** formează un complex cu RNA nou format, legat într-un helix hibrid de catena tipar a DNA. (cu o lungime de circa 12 perechi de baze). Regiunea conținând **RNA polimeraza**, DNA și RNA nascent se numește **buclă de transcripție** deoarece conține un segment din duplexul DNA despiralizat, "topit" (Figura 60). Lungimea hibridului DNA-RNA și a regiunii despiralizate din DNA rămân constante când **RNA polimeraza** se deplasează de-a lungul DNA tipar. Capătul 3'-hidroxil al RNA din acest hibrid atacă atomul de fosfor α al ribonucleozid trifosfatului care urmează a fi condensat. **Core polimeraza** mai conține un situs de legare și pentru cealaltă catenă DNA.

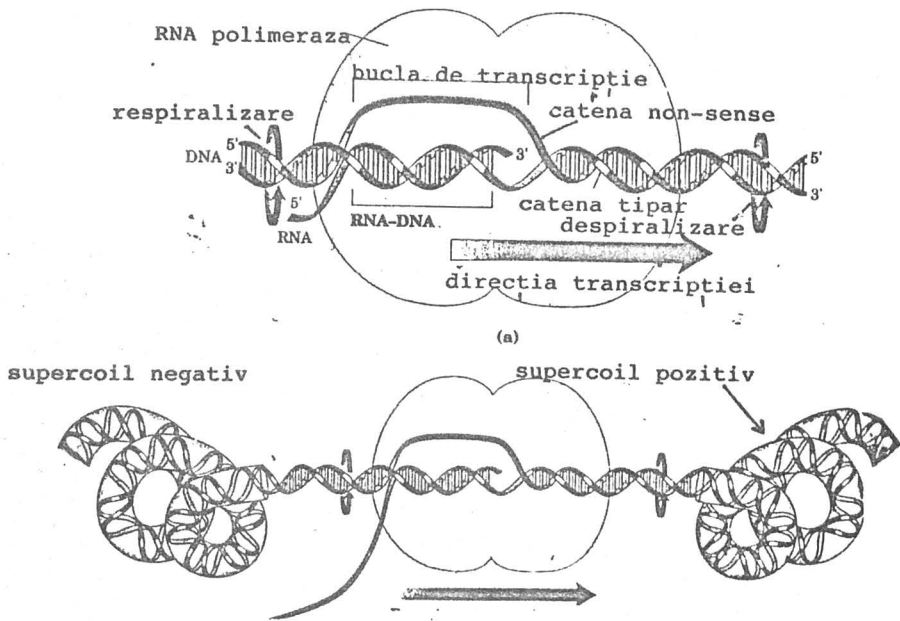


Figura 60. Alungirea moleculei RNA nou formate. a) bucla de transcripție și b) structurile *supercoil* din fața și din spatele buclei .

Viteza transcripției este de 20-50 nucleotide/secundă la 37° C, bucla de transcripție deplasându-se în același timp. Hibridul RNA-DNA trebuie să se rotească la fiecare nucleotid adăugat astfel ca extremitatea 3'-OH a RNA să rămână la situsul catalitic .

◆ Terminarea transcripției

Sinteza RNA are loc până când RNA polimeraza întâlnește o secvență care îi induce disocierea . În această etapă nu se mai formează noi legături fosfodiesterice , hibridul DNA-RNA disociază, regiunea "topită" este respiralizată și RNA polimeraza disociază de pe DNA .

La E.coli există cel puțin două tipuri semnale **stop** ,care indică sfârșitul citirii mesajului genetic: unul dependent de un factor proteic ρ (rho) și un altul independent de acesta .

Tipul de semnal **stop** independent de factorul proteic ρ are două trăsături distincte :

- 1) catena țipar DNA are o secvență palindromică bogată în resturi GC urmată de o alta bogată în resturi AT , care sunt transcrise în RNA într-o manieră auto-complementară ce conduce la formarea unei structuri **hairpin** ((Figura 28, p. 52) cu 15-20 nucleotide înainte de sfârșitul moleculei transcriptului RNA ;
- 2) apare în catena DNA țipar o secvență oligo-adenilat care este transcrisă în oligo- uridilat la sfârșitul RNA.

Helixul hibridului RNA-DNA ,la nivelul structurii **hairpin** este instabil datorită perechilor de baze **U-A** , **RNA polimeraza** face o pauză de câteva secunde în deplasarea ei - soldată cu o modificare conformațională în structura enzimei . În aceste condiții RNA nou format disociază de pe catena DNA țipar . **Core polimeraza** are o afinitate mai mică față de duplexul DNA decât față de DNA monocatenar , ceea ce permite eliberarea DNA și relegarea subunității σ .

Semnalele **stop** dependente de **factorul ρ** ce indică terminarea transcripției nu au secvența oligo-adenilat ci o altă structură palindromică care transcrisă conduce la formarea în transcriptul primar a unei structurii **hairpin**. **RNA polimeraza** face o pauză în dreptul acestor secvențe și disociază numai dacă **proteina ρ** este prezentă. **Factorul ρ** recunoaște cel puțin trei semnale **stop**.

Proteina ρ este un homohexamer format din șase subunități a câte 46 KD fiecare - care se leagă specific la o secvență de 72 nucleotide de RNA monocatenar (12 nucleotide la fiecare subunitate). Această proteină are o activitate RNA-DNA helicazică ATP-dependență care îi permite deplasarea unidirecțională de-a lungul RNA nou sintetizat către bucla de transcripție și scindarea helixului hibrid RNA-DNA prin îndepărtarea RNA.

O trăsătură comună secvențelor **stop** dependente sau nu de proteina ρ este că aceste semnale se găsesc mai degrabă în RNA nou sintetizat decât în DNA țipar .

O altă proteină, **nusA** ajută RNA polimeraza din E.coli să recunoască o clasă de situsuri de terminare . Bacteriofagul λ sintetizează **proteine de antiterminare** ce facilitează transcrierea anumitor gene. La E.coli semnalele de terminare, numite **atenuatori** sunt reglate pentru a răspunde la necesitățile nutriționale ale celulei.

♦ RNA polimerazele eucariotelor

La eucariote există 4-5 polimeraze, fiecare sintetizând o anumită specie moleculară de RNA , deosebindu-se prin specificitatea pentru DNA țipar, localizare și susceptibilitate la inhibitori (în special la α -amanitină) . Fiecare se leagă la o secvență promotor distinctă .

RNA polimeraza I, localizată în nucleol, sintetizează precursorii majorității rRNA : 18S , 5,8S și 28S. Promotorul ei variază ca secvență de la o specie la alta . Enzima este insensibilă la α -amanitină, la concentrații mai mari de 1 mg/ml.

RNA polimeraza II, localizată în nucleoplasmă sintetizează precursorii mRNA Această enzimă recunoaște sute de promotori, mulți prezentând similitudini . În legarea RNA polimerazelor la promotori sunt implicate proteine numite **factori de transcripție**. Enzima este extrem de sensibilă la α -amanitină, care o inhibă la concentrații foarte mici de 10^{-8} - 10^{-9} M.

RNA polimeraza III , localizată în nucleoplasmă sintetizează precursorii 5S rRNA, tRNA și RNA mici nucleolari și citosolici. Unele secvențe necesare pentru reglarea inițierii transcripției de către această enzimă sunt localizate în interiorul genei însăși, în timp ce altele sunt localizate înaintea situsului start .

Această enzimă este sensibilă la α -amanitină ,care o inhibă însă la concentrații mai mari (10^{-5} - 10^{-4} M).

În afara enzimelor nucleare , eucariotele au **RNA polimeraze** în mitocondrii și cloroplaste . Enzima din mitocondrie sintetizează toți mtrNA, fiind insensibilă la α -amanitină . Ea este inhibată de rifampicină, un antibiotic la care este sensibilă și **RNA polimeraza E.coli**.

RNA polimerazele I,II și III au o structură subunitară și o masă moleculară care variază între 500 și 700 KD. Ele conțin două subunități diferite " *large* " cu masă moleculară mai mare de 100 KD și mai multe subunități diferite " *small* " cu mase mai mici de 90 KD. Unele din subunitățile mici apar în două sau în toate trei tipurile de RNA polimeraze . Subunitățile cele mai mari din **RNA polimerazele II și III**, de la drojdie , prezintă un grad mare de omologie între ele și cu subunitatea β a **RNA polimerazei din E.coli**.

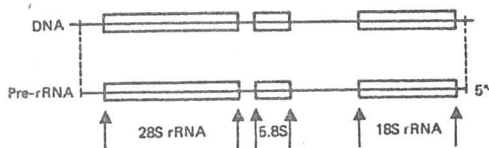
RNA polimerazele eucariotelor prezintă un mecanism de acțiune similar cu cel al enzimei de la procarionte : catalizează atacul nucleofil al grupării 3'-OH din catena RNA în creștere asupra atomului de fosfor α din ribonucleozid trifosfatul care urmează a fi condensat, nefiind necesară prezența unui primer, alungirea catenei având loc în direcția 5'-3' citind mesajul catenei țipar a DNA.

Aceste **RNA polimeraze** nu au activitate exonucleazică cu ajutorul căreia să poată corecta erorile inserate în RNA nou sintetizat .

◆ Secvențe promotor la eucariote

Genele care codifică rRNA sunt localizate în nucleol. Într-o celulă eucariotă există câteva sute de copii ale fiecărei gene a rRNA . Aceste secvențe transcrise în rRNA sunt repetate în tandem în DNA conținut într-o regiune specifică a unui cromozom . Fiecare astfel de unitate repetitivă este transcrisă ca o unitate, producând un transcript primar ce conține o copie din fiecare din speciile 28 S, 5,8S și 18 S (Figura 61) .

Figura 61. Structura unei unități de transcripție a rRNA



Promotorul recunoscut de RNA polimeraza I a fost identificat prin determinarea vitezelor de transcripție a unor mutații ai genelor rRNA din *Xenopus laevis*. Exprimarea optimă a acestor gene necesită integritatea segmentului [-142] - [+6], iar secvența minimă necesară pentru inițierea transcripției este [-7] - [+6]. , **RNA polimeraza I** se leagă la acest ultim segment minimal , în timp ce restul promotorului are rolul de legare a factorilor de transcripție.

Transcripția rRNA este foarte rapidă deoarece sinteza ribozomilor limitează creșterea celulei. Există date că fosforilarea **RNA polimerazei I** poate activa

transcripția rRNA, de exemplu, în timpul creșterii embrionare sau a regenerării ficatului .

RNA polimeraza II este responsabilă pentru sinteza mRNA în nucleu. În acest caz ,procesul transcripțional este caracterizat prin trei trăsături comune:

- 1) secvențele DNA care controlează transcripția sunt complexe, o singură genă fiind controlată de 6-8 segmente DNA în afara promotorului, care acționează concertat;
- 2) efectul secvențelor DNA care controlează transcripția este mediat de proteine (factori) de legare pentru fiecare segment;
- 3) factorii de transcripție când se leagă la secvențele DNA interacționează între ei și cu **RNA polimeraza II** pentru a activa transcripția. Activitățile acestor factori de legare a DNA și de activare sunt realizate de domenii separate ale moleculelor proteice

Promotorii RNA polimerazei II, asemenea celor ai enzimelor procariotelor sunt poziționați pe latura 5' a situsului start al transcripției.

O primă secvență promotor localizată înaintea situsului start al transcripției, centrată în jurul poziției [- 25] este numită **boxa TATA** sau **boxa GOLDBERG-HOGNESS** (după numele celor care au descoperit-o în 1978) și prezintă similitudini cu boxa **PRIBNOW (TATAAT)** de la procariote :

5' TATAAAA 3'

Boxa **TATA** este prezentă la aproape toate genele eucariotelor ce dau naștere la mRNA . Deleții sau mutații în boxa **TATA** nu elimină transcripția ca la eucariote, indicând faptul că boxa **TATA** participă numai la selectarea situsului **start** translațional.

Elemente promotor apar și în regiunea [-50] - [-110] unde există **boxa CAAT** și **boxa GC** :

5' GGNCAATCT 3'

5' GGGCGG 3'

Genele structurale exprimate constitutiv (genele *house keeping*) au una sau mai multe copii ale **boxei GC (CGGCGG)** localizate în fața situsului start al transcripției. Pozițiile acestor secvențe variază de la un promotor la altul, în contrast cu localizarea aproape constantă a **regiunii -35** de la procariote .

Deci, un promotor al precursorilor mRNA din eucariotele superioare are următoarea structură de bază :

-110	-40	-25	situs start
vvvvvvv	CAAT	vvvvvvv	GC
	vvvvvvvvv	TATA	vvvvvvvvv
	boxă	boxă	boxă

Diversitatea naturii și pozițiilor secvențelor promotor din genele eucariote arată că ele trebuie să fie recunoscute de diferite proteine specifice. Astfel, de exemplu **RNA polimeraza II** nu poate recunoaște situsurile promotor în absența **factorilor de transcripție**. De exemplu, proteina **SpI** din celulele mamiferelor este necesară pentru transcripția genelor a căror promotori conțin boxe **GC**. Duplexul DNA din **virusul SV40** conține cinci boxe **GC** de la situsul de start pe fiecare parte. Studiile cu **DNază I** au arătat că trei boxe **GC** leagă **Sp**

1 puternic și două se leagă slab. Legarea unei molecule de **Sp1** protejează o secvență de aproximativ 20 perechi de baze contra digestiei .

Factorul de transcripție CTF (*CCAAT-binding transcription factor*) este o proteină de 60 KD ce se găsește în celulele mamiferelor și se leagă la boxa **CAAT**.

Proteina B din *Drosophila* stimulează transcripția prin legarea la boxa **TATA**.

Factorul de transcripție HSTF (*Heat shock transcription factor*) este exprimat la *Drosophila* în urma creșterii temperaturii . Multiplele copii ale lui HSTF se leagă la promotorul genelor *heat-shock*, poziționate cu 15 perechi de baze înaintea de boxa **TATA** . HSTF este implicat în legarea la promotorii *heat-shock*.

Proteina gal 4 din drojdie stimulează transcripția celor trei gene ce codifică enzimele implicate în metabolizarea galactozel prin legarea la secvențele specifice ale promotorilor acestor gene .

În Figura 62 prezentăm un model al interacției factorilor de transcripție cu promotorii. Este redat un aranjament ipotetic al factorilor ce interacționează cu secvențe DNA specifice de lângă promotor : factorul **TFIID** (*transcription factor II D*) care se leagă la **boxa TATA** și proteinele **Jun** și **Fos** care sunt protooncogene.

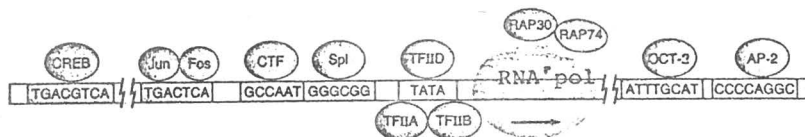


Figura 62. Interacția factorilor de transcripție cu promotorii

În DNA eucariotelor superioare există și alte segmente care se numesc **enhancer** pentru a le diferenția de promotorii cu care conlucrează pentru a induce inițierea transcripției la eucariote . Secvențele **enhancer** pot să-și manifeste activitatea stimulatorie de la distanță de câteva sute de perechi de baze, fiind plasate înaintea, după sau chiar în mijlocul genei transcrise . Aceste secvențe sunt active când se găsesc localizate atât pe catena *nonsense* cât și pe catena tipar .

O secvență **enhancer** particulară este eficace numai în anumite tipuri de celule. Astfel secvența **enhancer** pentru imunoglobuline este activă numai în limfocitele B .

Mult studiată este secvența **enhancer** ce mediază acțiunea hormonilor glucocorticoizi care interacționează cu un receptor solubil. Legarea complexului hormon-receptor la secvența **enhancer** a glucocorticoizilor conduce la stimularea transcripției unui set de gene .

DNA din celulele eucariote infectate cu virusuri conține secvențe **enhancer** ce sunt activate de proteine din celula gazdă. De exemplu, DNA din virusul ce produce tumori mamare la șoarece conține o secvență **enhancer** pentru glucocorticoizi . Deci acest virus atacă celule care sunt în mod normal

stimulate de acești sterolzi, de exemplu celulele epiteliale ale glandei mamare, deoarece ele conțin complexul hormon-receptor ce activează secvența **enhancer**. Domeniul restrâns al gazdelor acestui virus este o consecință a secvențelor **enhancer** țesut și specie-specifice.

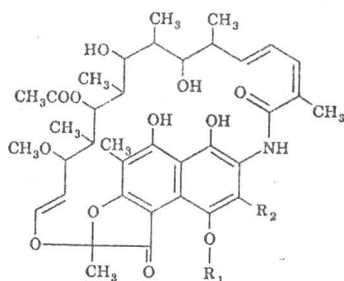
Secvențele **enhancer** sunt recunoscute de **factorii de transcripție** care asistă legarea **RNA polimerazei II** la promotor. Ele conțin un segment cu configurație **Z DNA** care favorizează legarea **RNA polimerazei II**, fiind puncte de intrare pe DNA a enzimei probabil prin pierderea afinității de legare a histonelor care învelesc normal DNA. Aceste secvențe apar numai la **genele exprimate selectiv în anumite țesuturi**.

Promotorii RNA polimerazei III sunt localizați în interiorul genelor transcrise. Studiul pe mutanți ai genei 5S rRNA de la *Xenopus borealis* au demonstrat că promotorul se găsește în secvența [+40] - [+80]. Factorii de transcripție se leagă direct la DNA afectând funcția **RNA polimerazei III**.

◆ Inhibitorii transcripției

Actinomicina și **rifamicina** inhibă procesul de transcripție de la organismele procarote, prin două mecanisme diferite.

Rifamicina, antibiotic produs de *Streptomyces mediterranei* și **rifampicina** (un derivat semi-sintetic) inhibă specific inițierea sintezei RNA numai la procarote. Aceste substanțe nu inhibă legarea **RNA polimerazei** la promotor, interferând în formarea primei legături fosfodiesterice. **RNA polimeraza** inactivată rămâne legată la promotor. Odată inițierea terminată, rifamicinile nu mai afectează procesul de alungire. Mutanți rezistenți la rifamicină (**rif^r**) au **RNA polimeraze** cu subunitățile β modificate, deci subunitatea β este situsul de legare al acestui antibiotic.



rifamicina B R₁ = CH₂COO⁻; R₂ = H

rifampicina R₁ = H; R₂ = CH = N⁺ (CH₂)₄ N⁻ CH₃

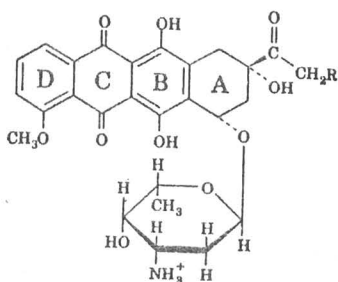
Selectivitatea și înalta capacitate de inhibiție a rifampicinei (o concentrație de 2x10⁻⁸ M produce o inhibiție de 50 %) au permis utilizarea acestui antibiotic în tratamente medicale contra infecțiilor cu bacterii gram-pozitive și este în tratarea tuberculozei.

Actinomicina D este un antibiotic cu structură polipeptidică, produs de o altă tulpină de *Streptomyces* ce inhibă transcripția prin legare specifică la DNA dublu helicoïdal împiedicându-l să funcționeze ca tipar (nu se leagă la DNA monocatenar, RNA dublu catenar sau la un hibrid DNA-RNA). Nucleul fenoxazonic al actinomicinei D este plasat între perechile de baze vecine din DNA prin **intercalare**. Acest antibiotic recunoaște secvența de baze **GpC** din DNA intercalându-se între 5'-GC-3' și 3'-CG-5'.

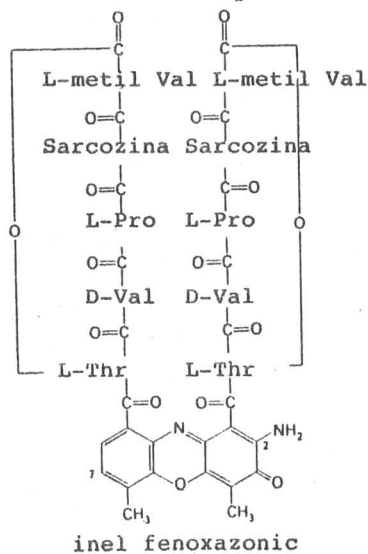
La concentrații mici, **actinomicina D** inhibă transcripția fără a afecta apreciabil replicarea DNA și sinteza proteică.

Efectul său inhibitor asupra creșterii și diviziunii celulare a făcut ca **actinomicina D** să fie utilizată în terapia unor forme de cancer .

R=H daunomicina
R=PH adriamicina



Intercalarea între perechile de baze G.C de la ambele capete ale unui fragment dublu helicoïdal. Nucleul A necoplanar se extinde spre fosa minoră unde radicalii săi stabilizează complexul format prin punți de hidrogen .



Inhibată numai de concentrații mari de α -amanitină (10^{-6} M) în timp ce **RNA polimeraza I** este insensibilă la această toxină.

Agentii de intercalare afectează atât **RNA polimeraza** cât și **DNA polimeraza**, inhibând astfel replicarea și transcripția. **Daunomicina** și **adriamicina** sunt, de asemenea, medicamente utilizate în tratarea unor forme de cancer la om, ele legându-se la duplexul DNA și interferând în mecanismul de acțiune al celor două polimeraze. Sistemul aromatic coplanar al nucleelor **B-D** din **daunomicină** îi permite

α -amanitina, o otrăvă produsă de ciuperca Amanita phalloides care conține mai multe tipuri de substanțe toxice cu structuri neobișnuite de octapeptide biciclice, numite **amatoxine**. **α -amanitina** este un inhibitor al transcripției la eucariote, blocând etapa de alungire. Ea se leagă puternic la **RNA polimeraza II** ($K=10^{-8}$ M) blocând formarea precursorilor mRNA. **RNA polimeraza III** este

◆ Procesarea moleculelor transcript primar

După cum deja s-a arătat în majoritatea cazurilor produsul imediat al transcripției, **transcriptul primar** nu este funcțional biologic. Pentru a dobândi activitatea biologică, **transcriptul primar** suferă o serie de transformări catalizate de enzime sau de un RNA, numite generic **procesare post-transcripțională**:

- 1) îndepărtarea exo- și endonucleolitică a unor segmente polinucleotidice;
- 2) adăugarea unor segmente la capetele 3' și 5' ale moleculei;
- 3) modificarea unor resturi nucleotidice

La **procariote** moleculele mRNA suferă mici modificări după terminarea transcripției sau nu se transformă deloc. În contrast, speciile moleculare ale tRNA și rRNA sunt formate numai după diverse transformări ale transcriptului primar. Am arătat deja (Figura 34, p. 64) că la *E. coli* dintr-un singur transcript primar se sintetizează trei tipuri de rRNA și o moleculă de tRNA. Ribonucleaza P în care partea catalitică este o moleculă de RNA generează capătul 5'-terminal al tuturor moleculelor de tRNA de la *E. coli*. Ribonucleaza III scindează speciile de rRNA 5S, 16S și 23S din transcriptul primar prin scindarea regiunilor "hairpin" dublu catenare la situsuri specifice.

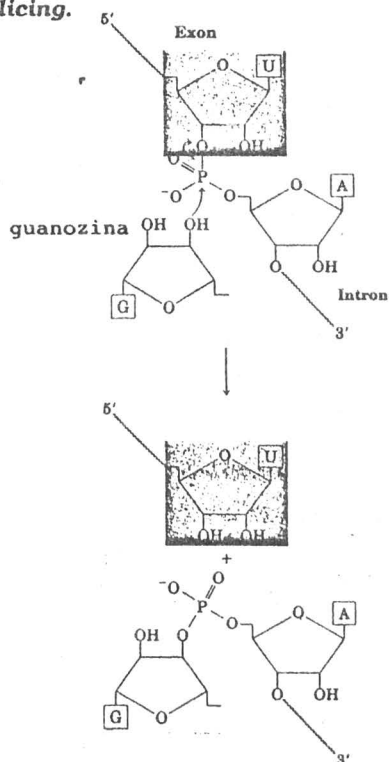
Procesul de "splicing"

Un transcript primar pentru mRNA de la eucariote conține **introni** și **exoni**, primul fiind secvențe neinformaționale. Scindarea și îndepărtarea intronilor precum și sudarea exonilor rămasei pentru a forma o secvență informațională continuă poartă denumirea de **splicing**.

Intronii sunt prezenți în majoritatea genelor de la vertebrate, cu puține excepții (genele care codifică histonele). La mRNA eucariotelor majoritatea exonilor au mai puțin de 1000 nucleotide lungime, în timp ce intronii au lungimi mai mari și variabile (50 - 20 000 nucleotide).

Figura 63. Prima etapă, de transterificare, din cadrul procesului de "splicing" al intronilor clasei I.

Există patru clase de introni. Primele două clase I și II suferă procesul de "splicing" după mecanisme



similare, dar nu identice. **Intronii clasei I** se găsesc în unele gene nucleare, mitocondriale și din cloroplaste care codifică rRNA; **intronii clasei II** apar, în general, în structura moleculelor transcript primar al mRNA din mitocondrii și cloroplaste. Ambele clase de introni suferă un proces de "**splicing**" care constă din două etape de transesterificare (Figura 63). O grupă 2'-sau 3'-OH a unui rest de riboză atacă nucleofil atomul de fosfor, în fiecare etapă formându-se o nouă legătură fosfodiestică pe seama celei vechi, cu menținerea echilibrului energetic.

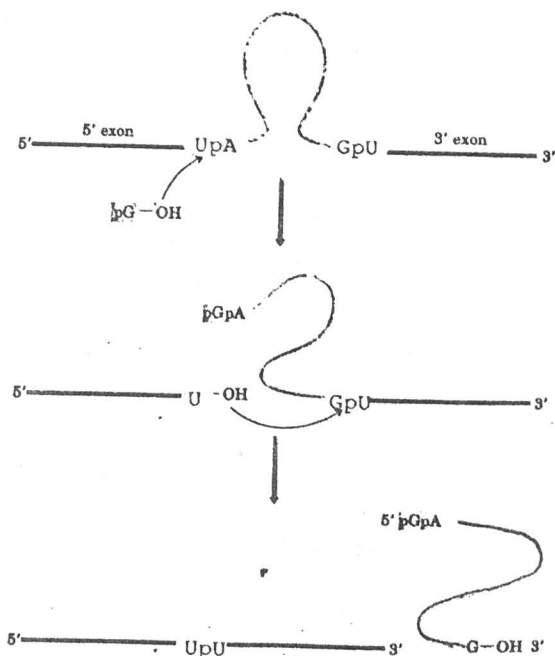
Intronii clasei I necesită pentru procesul de "**splicing**" un cofactor nucleotidic, de exemplu GMP, GDP sau GTP - care nu este utilizat ca o sursă de energie. Gruparea 3'-OH a guanozinei este utilizată ca un catalizator nucleofil ce facilitează formarea unei legături 3',5'-fosfodiestică la capătul 5' al intronului (Figura 64).

Figura 64. Mecanismul procesului de splicing al intronilor clasei I

În prima etapă, gruparea 3'-OH a guanozinei acționează ca un nucleofil atacând legătura fosfodiestică **UpA** dintre exonul 5' (la situsul 5' de scindare-sudare) și intron. Se eliberează exonul 5' cu un rest de uridină nefosforilată la capătul 3' și un intermediar al intronului cu exonul 3'. În etapa a doua, gruparea 3'-OH a uridinei din exonul 5' devine catalizator nucleofil atacând legătura fosfodiestică **GpU** dintre intron și exonul 3'.

Rezultatul este excizia precisă a intronului și sudarea exonilor.

Mecanismul procesului de "**splicing**" al intronilor clasei II este similar, cu excepția faptului că agentul nucleofil din prima etapă nu este un cofactor extern ci gruparea 2'-OH a unui rest adenilat din interiorul intronului (Figura 65). Această grupare atacă nucleofil legătura fosfodiestică **UpG** de la situsul 5' de scindare-sudare cu eliberarea exonului 5' și cu formarea unui intermediar (intron-exon 3') cu o structură arcuită la capătul 5'. În etapa a doua gruparea 3'-OH a exonului 5' atacă nucleofil intermediarul la nivelul situsului 3' de scindare-sudare, cu eliberarea intronului circularizat și a celor doi exoni sudați.



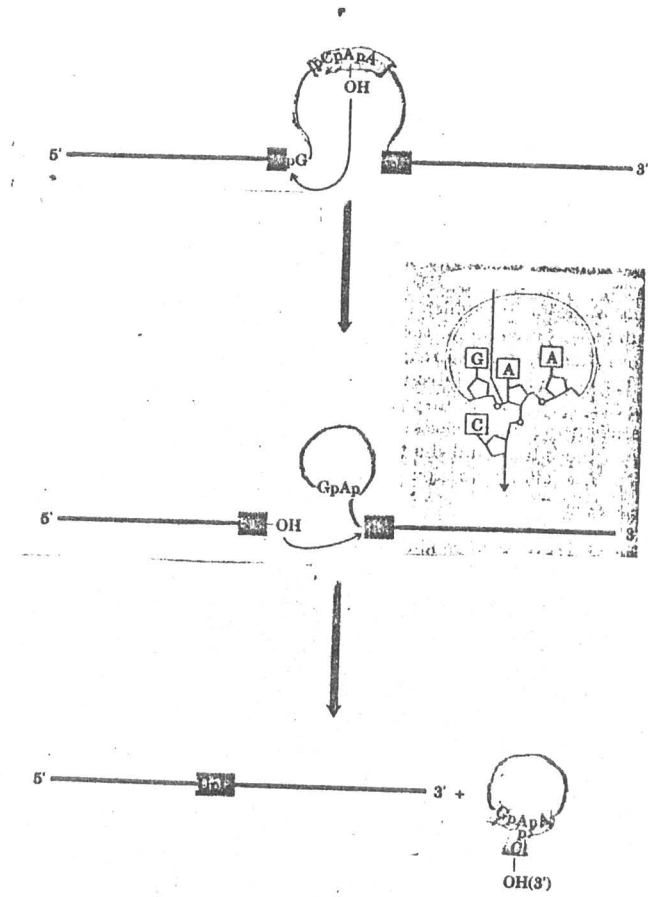


Figura 65. Mecanismul procesului de "splicing" al intronilor clasei II.

Se observă că restul de adenozină din structura intermediarului arcurat are trei legături fosfodiesterice și o legătură 2',5' fosfodiesterică neobișnuită.

Încercările de a separa enzimele implicate în procesul de "splicing" a intronilor claselor I și II au condus la concluzia că multe etape sunt catalizate de însuși intronii, care deci suferă un proces de "self-splicing". Acest mecanism a fost demonstrat în cazul particular al intronului rRNA (ce aparține clasei I) din protozoarul ciliat *Tetrahymena thermophila* (v.Figura 37).

A treia clasă de introni și cea mai bine reprezentată, de moleculele transcriptului primar al mRNA nuclear suferă un proces de "splicing" cu formarea unui intermediar cu structură arcurată (tip laț) ca în cazul intronilor clasei II. Cu toate acestea, intronii clasei III nu suferă un proces de "self-splicing" necesitând prezența spliceosomilor (v.pag.67) - complexe RNA-proteice specializate în acest sens care se găsesc în abundență în nucleul celulelor eucariote. U1 sn RNA (small nuclear ribonucleic acid) are o secvență complementară cu cea a situsului 5' de scindare-sudare din intronii mRNA nucleari (Figura 65). U2 sn RNA formează perechi de baze activând un rest de adenozină, a cărei grupare 2'OH este implicată în formarea structurii de tip "laț" printr-o legătură 2',5'-fosfodiesterică. De asemenea, ribonucleoproteinele U1 sn RNP se leagă la anumite regiuni din transcriptul primar. Adăugarea U2, U4, U5 și U6 snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) conduce la formarea spliceosomului în cadrul căruia are loc procesul de "splicing". ATP este

necesar pentru asamblarea spliceosomului , neexistând date care să indice că reacțiile de scindare-sudare ar necesita ATP.

Siturile de scindare-sudare au secvențe conservate la multe eucariote.

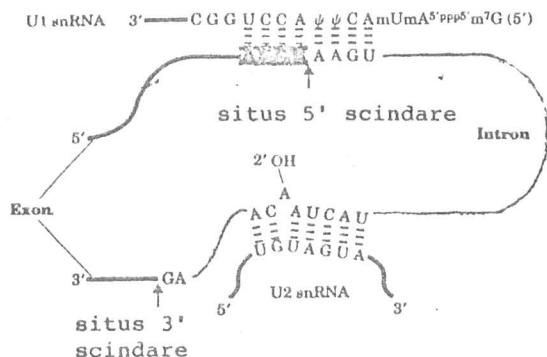


Figura 66 Mecanismul procesului de "splicing" a intronilor clasei III. ψ reprezintă pseudouridina. m indică resturile metilate .

A patra clasă de introni, găsiți în structurile precursorilor unor tRNA se deosebește de intronii claselor I și II prin aceea că procesul de "splicing" este ATP-dependent , energia rezultată din hidroliza acestui compus macroergic fiind utilizată în etapa de sudare .In acest caz, o **endonuclează "splicing"** scindează legăturile fosfodiesterice de la ambele capete ale intronului, cei doi exoni fiind sudați printr-un mecanism similar celui catalizat de **DNA ligaza** (Figura 67).

Mecanismul procesului de " splicing" a precursorului tRNA din drojdie presupune mai multe etape :

- 1) intronul este îndepărtat de **endonuclează**, care acționează la ambele capete ale acestuia;
- 2) gruparea 2',3'-fosfat ciclică de la capătul 3' al exonului 5' este scindată de o **fosfodiesteraza** cu formarea unui derivat 2'-fosfat ;
- 3) gruparea 5'-OH liberă a exonului 3' este activată în două trepte;
- 4) gruparea 3'-OH liberă a exonului 5' acționează ca un nucleofil dizlocuind AMP și sudând cei doi exoni printr-o legătură 3'.5'-fosfodiesterică;
- 5) gruparea 2'-fosfat este hidrolizată de o **fosfatază**.

◆ Continuarea procesării mRNA

La eucariote, mRNA matur are trăsăturile distincte . Majoritatea moleculelor au structura **cap** la extremitatea 5' și structura **coada poli(A)** de 20-250 resturi adenilat la extremitatea 3'. Funcțiile acestor structuri sunt numai parțial cunoscute. Structura 5'-**cap** leagă o proteină ce participă la inserarea mRNA pe ribozomi pentru a iniția biosinteza proteică (translația). Structura **coadă poli(A)** , de asemenea , se leagă la o proteină specifică. Este probabil ca ambele structuri asociate cu proteinele specifice să aibă rolul de a proteja mRNA contra atacului unor enzime .

Ambele structuri terminale sunt adăugate prin intermediul unor mecanisme complexe care se desfășoară în mai multe etape .

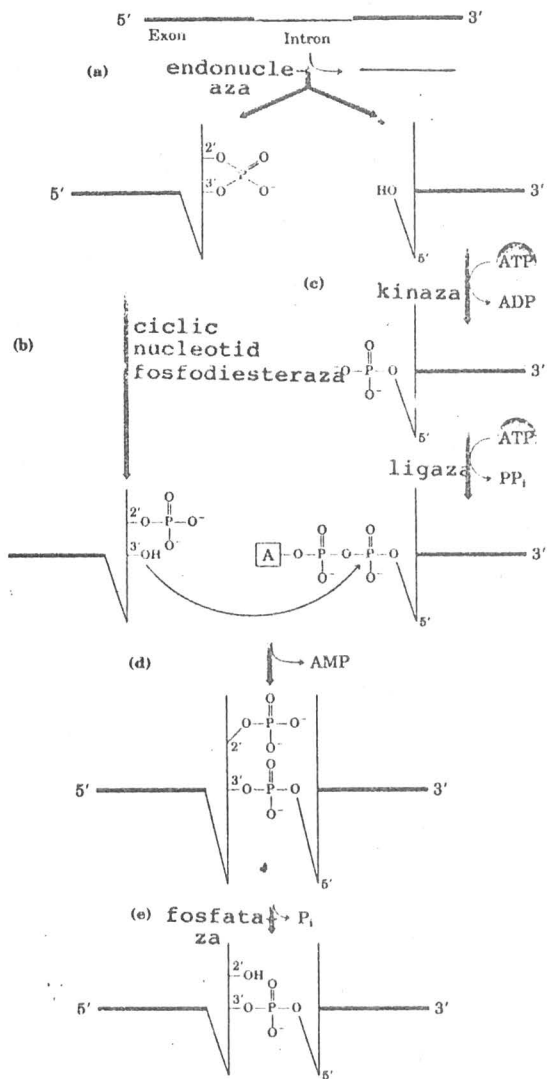


Figura 67. Procesul de "splicing" al moleculei transcript primar pentru tRNA din drojdie. Etapele a, b, c, d și e sunt descrise în text

Extremitatea 5' a RNA nou format are o grupare trifosfat. Într-o primă etapă, un rest fosfat este îndepărtat prin hidroliză. Capătul 5' al restului difosfat atacă P^α al GTP cu formarea unei legături neobișnuite 5'-5' trifosfat. Apoi restul de guanină este metilat la N⁷ printr-un proces catalizat de **guanin**

7-metil transferaza rezultând structura **cap 0** . Pot fi metilate și grupările 2'-OH ale primelor două nucleotide ce succed structurii **cap** formându-se **cap 1** și **cap 2** . Toate metilările sunt realizate enzimatic, în prezență de **S-adenozil metionină** (Figura 68) .

Capătul 5' al RNA

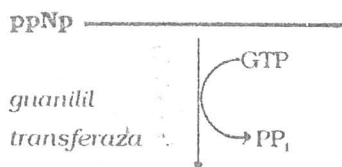
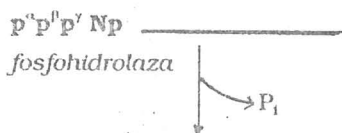
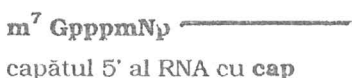
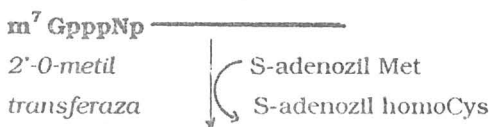
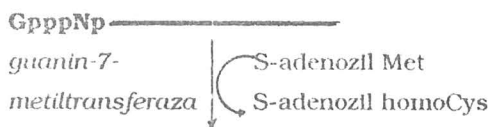


Figura 67. Formarea structurii **cap** a mRNA



Transcriptul primar al moleculelor mRNA are, de regulă, la capătul 3' segmente suplimentare . Înainte de a se adăuga structura **coadă poli(A)** aceste segmente suplimentare sunt scindate de o **ribonuclează** specifică care recunoaște o secvență semnal **5' AAUAAA 3'** situată la 11-30 nucleotide distanță de capătul 5' al situsului de scindare . În urma acestui proces se formează o grupare 3'-OH liberă la care se adaugă resturi adenilat, printr-o reacție catalizată de **poliadenilat polimeraza** :



Un complex care conține **ribonucleaza**, **poliadenilat polimeraza**, alte **proteine** ,precum și unul sau mai mulți **snRNA** este implicat în aceste transformări (Figura 68) . Decl. segmentul **coadă poli(A)** nu este codificat în DNA .

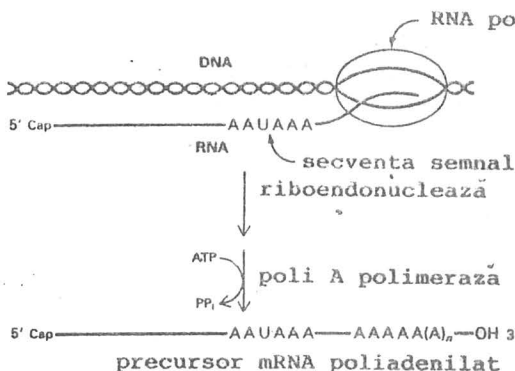


Figura 68. Poliadenilarea transcriptului primar al mRNA

Moleculile transcriptului primar pot fi de două feluri : **simple și complexe**. Moleculile transcript simple produc un singur mRNA matur și apoi un singur produs polipeptidic. Moleculile transcript complexe produc mai multe molecule de mRNA și implicit de proteine diferite. Moleculile transcript primar pot avea semnale pentru cel puțin două căi alternative de procesare, conducând la mai multe molecule mRNA diferite. În celule diferite sau în diverse stadii de dezvoltare, transcriptul primar poate fi procesat diferențiat permițând sinteza de diferiți produși proteici.

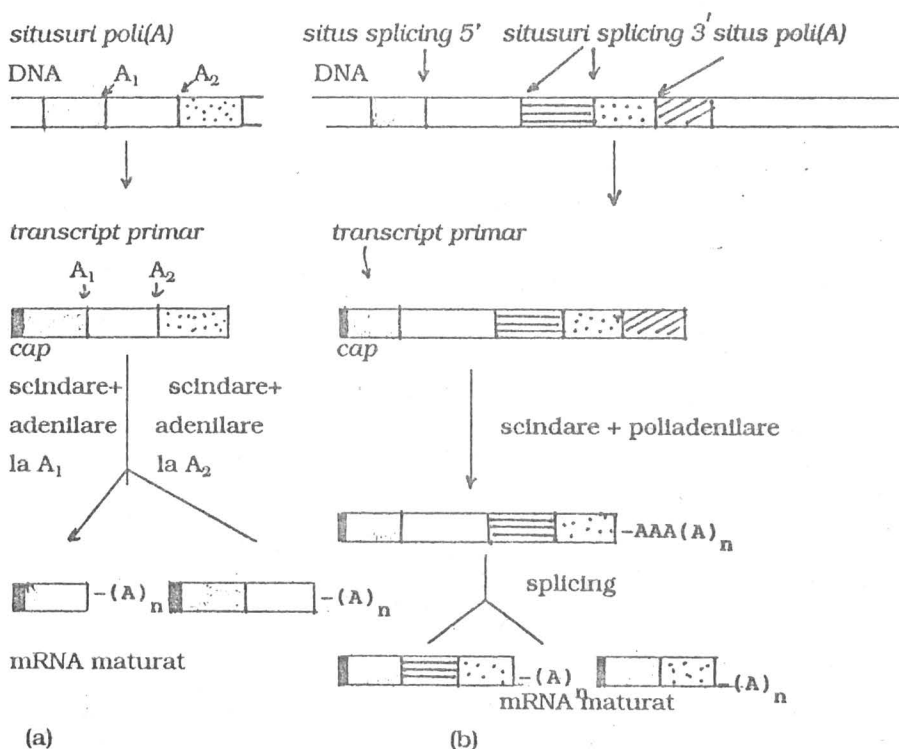


Figura 69. Două mecanisme de procesare diferențială a unor molecule de transcript primar complex (explicația în text).

În Figura 69 prezentă două mecanisme de procesare diferențiată a moleculelor transcript complexe la eucariote :

- 1) când există situsuri multiple de scindare/poliadenilare { două situsuri A_1 și A_2 } ;
- 2) când există posibilități alternative de "**splicing**" (două situsuri diferite 3' de scindare sudare].

Dacă există două situsuri de scindare și poliadenilare utilizarea aceluia mai apropiat capătului 5' conduce la îndepărtarea majorității moleculei transcriptului primar (Fig. 69 a) . Prin acest mecanism de procesare sunt produse catenele H ale **imunoglobulinelor** care diferă prin structura lor carboxil-terminală.

În cazul mușchilor fructelor, în **genom sunt situsuri de scindare-sudare alternative** (Fig. 69 b) care permit **producerea a trei** forme diferite ale catenei "**heavy**" a miozinei, în diferite stadii ale **dezvoltării** .

La șobolan, ambele mecanisme sunt **utilizate pentru a produce dintr-un transcript primar comun a calcitoninei în tiroidă și a unui hormon diferit (calcitonin gene-related peptide)** în creier .

În timpul sau la scurt timp după sinteza **moleculelor transcript primar a mRNA** de la vertebrate, circa 0,1 % din resturile lor **A sunt metilate la N⁶** . Aceste resturi metilate apar frecvent în secvența **NNm⁶ACK**, unde **X** este rareori **G**. Semnificația funcțională a acestor **secvențe metilate care apar în speciile de mRNA mature este încă necunoscută**.

◆ **Continuarea procesării rRNA**

rRNA ,la bacterii și în celulele eucariotelor sunt sintetizați din precursori mai lungi, numiți **RNA preribozomiali** . La bacterii, speciile moleculare 16S , 23S și 5 S rRNA sunt formate dintr-un precursor comun de 30 S (Figura 33).

La **E.coli** există șapte operoni rRNA , fiecare conținând câte o copie aproape identică din cele trei tipuri de **gene rRNA**. Moleculele transcript primar policistronice conțin 16S rRNA la capătul 5', urmat de 1-2 specii tRNA , 23S rRNA, 5S rRNA și numai în unul operoni au încă 1-2 molecule de tRNA la capătul 3' (Figura 70 a) . Deci cele șapte operoni diferă prin numărul, localizarea și identitatea speciilor de tRNA incluse în transcriptul primar

Procesarea transcriptului primar 30 S are loc în **trei etape** :

- 1) înainte de scindare, precursorul 30 S RNA este metilat la baze specifice;
- 2) scindarea produce intermediarii 17 S și 25 S
- 3) rezultă în final produșii 16 S rRNA și 23S rRNA sub acțiunea unor nucleaze specifice .

5S rRNA ia naștere de la capătul 3' al precursorului 30 S.

Etapa b (Figura 70 a) ce poartă numele de **procesare primară** este realizată prin acțiunea unor **ribonucleaze III, P,E și F**.

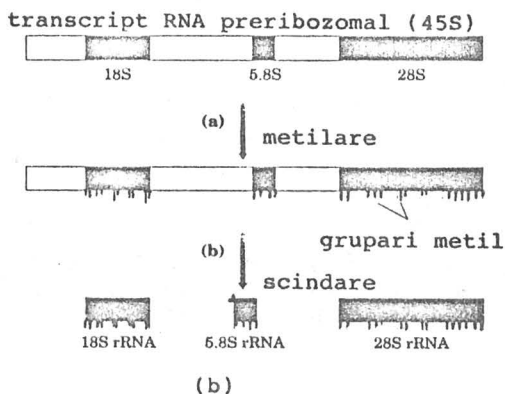
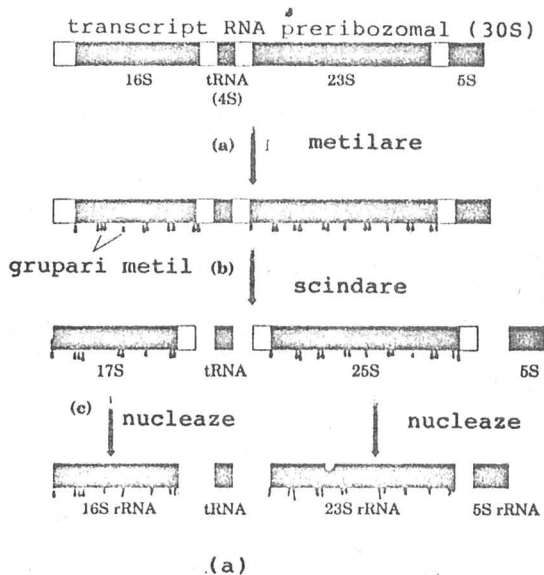


Figura 70
Procesarea moleculelor transcript RNA preribozomale la procarote (a) și la eucariote (b).

Etapa c (Figura 70 a) ce poartă numele de **procesare secundară** este realizată sub acțiunea catalitică a **ribonucleazelor M16, M23 și M5** - aceste scindări având loc numai după ce pre-rRNA a fost asociat cu proteinele ribozomale .

În timpul asamblării ribozomale , speciile 16S și 23 S rRNA de la procarote sunt metilate la nivelul a 24 resturi nucleotidice prin reacții care utilizează S-adenozil metionina ca donator de grupări metil. Se produc resturi N⁶ N⁶-dimetil adenină și O² -metil riboză. Rolul acestei metilări este încă necunoscut .

În genomul eucariotic, în nucleoli , există sute de copii ale genelor rRNA , dispuse repetitiv în tandem . Transcriptul primar rRNA (45 S) conține începând de la capătul 5' speciile 18S , 5.8S și 28 S rRNA separate prin secvențe "spacer" . În Figura 70 b prezentăm procesarea moleculelor transcript RNA preribozomale la eucariote . În etapa a precursorul 45 S este metilat la mai mult de 100 resturi din cele 7 500 nucleotide pe care le conține. Aproximativ 80 % din metilări survin la nivelul grupărilor 2'-OH ale unităților de riboză,

restul apărând la resturile de adenină (N^6, N^6 -dimetil adenină) și guanină (2-metil guanină). În etapa **b** au loc scindări enzimatice care dau naștere formelor active biologice: 18 S, 5.8S și 28 S rRNA. Enzimele implicate sunt de tipul RN-azei III și RN-azei P. 5S rRNA este procesat separat, similar tRNA.

◆ Continuarea procesării tRNA

Cromozomul *E.coli* conține circa 60 gene tRNA: unele sunt componente ale operonilor rRNA, altele sunt distribuite, în ansambluri (cluster) pe parcursul cromozomului. Transcriptul primar tRNA, care conține 1 - 5 specii identice de tRNA are nucleotide suplimentare la capetele 3' și 5' ale fiecărei secvențe de tRNA. Scindarea acestor secvențe prezintă similitudini cu procesul descris pentru rRNA la *E.coli*, utilizând aceleași nucleaze.

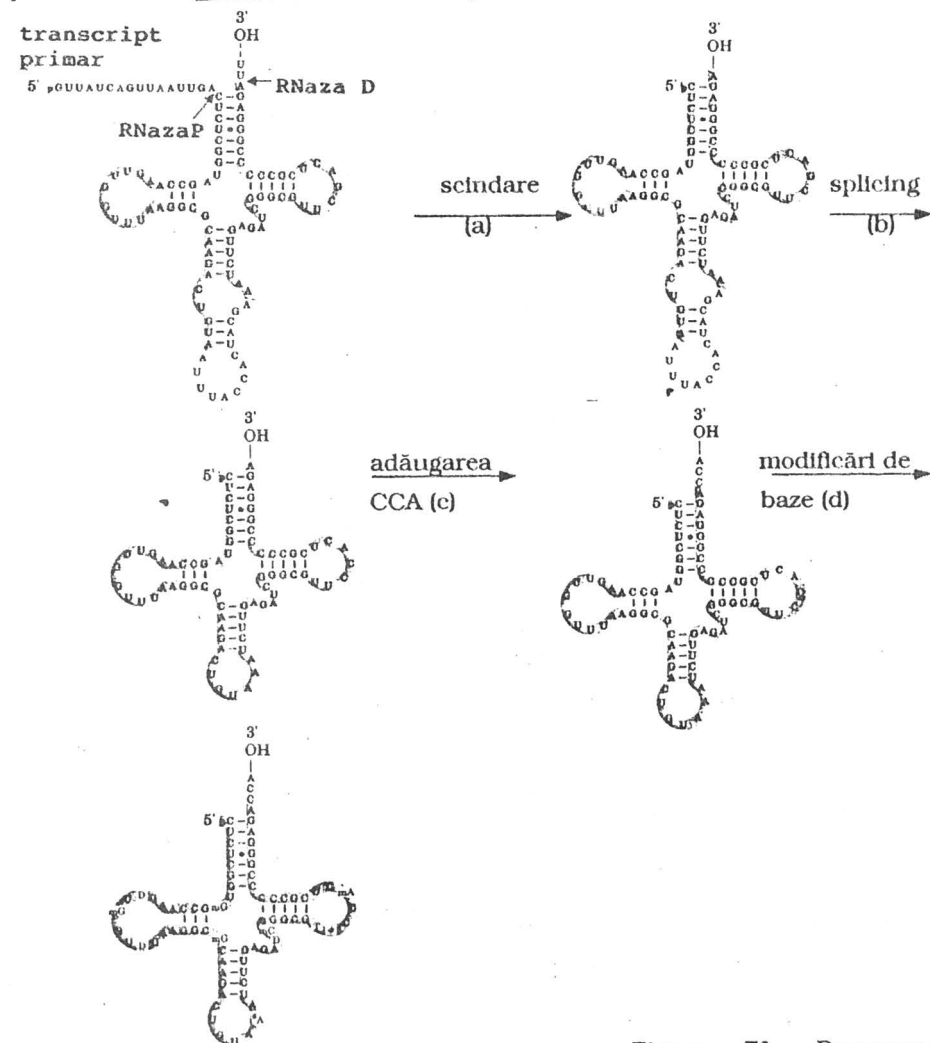


Figura 71. Procesarea moleculelor transcript primar tRNA

RNaza P. o endonuclează care generează capetele 5' ale tuturor speciilor tRNA la E.coli este un **ribozim** deoarece partea neproteică a enzimei (un component RNA de 377 nucleotide) este esențială în actul catalitic . Partea proteică, datorită caracterului bazic, reduce repulsiile electrostatice dintre ribozimul polianionic și substratul RNA.

Capătul 3' este eliberat de secvențele suplimentare prin intervenția unei exonucleaze , denumită **RNaza D.**

Genomul eucariotelor conține sute sau mii de gene tRNA . Multe molecule transcript primar tRNA , ca de exemplu tRNA^{Tyr} conține un intron mic în vecinătatea anticodonului și nucleotide suplimentare la capetele 5' și 3'.

Moleculele transcript primar de la unele bacterii și din toate celulele eucariote sunt lipsite de secvența -CCA de la capătul 3', care este adăugată de enzima : **tRNA nucleotidil transferaza** cu ajutorul CTP și ATP. Această enzimă apare și la procarionte deși aici genele tRNA codifică tripleta terminală -CCA. În acest ultim caz , **tRNA nucleotidil transferaza** are funcția de a repara tRNA degradate . **tRNA nucleotidil transferaza** este o enzimă care produce formarea celor trei legături fosfodiesterice simultan având multiple centre catalitice active.

În final, procesarea tRNA este definitivată prin modificarea unor baze prin metilare , dezaminare sau reducere .În Figura 71 prezentăm procesarea tRNA la bacterii și eucariote .

VERIFICAT
2017

Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 233/1996
la Tipografia Editurii Universității București

VERIFICAT
2007



DATA RESTITUIRII

5. MAR. 2002	1 IUN. 2002	MAL 2013
28. MAI. 2002		
7. OCT. 2002	700% NIN 21	17 SEP. 2012
13. DEC. 2002	21 IUN. 2002	17 SEP. 2012
21. MAI. 2003	700% NIN 7	
22. MAI. 2003		
24. MAI. 2003	700% NIN 82	
25. MAI. 2003	20 IAN 77	
20 AUG. 2003	4 MAR. 2009	
9. FEB. 2004	5. APR. 2009	
30. APR. 2004		
1 IUN. 2004		MAL 2013

ISBN - 973 - 575 - 076 - 7

Lei 4200