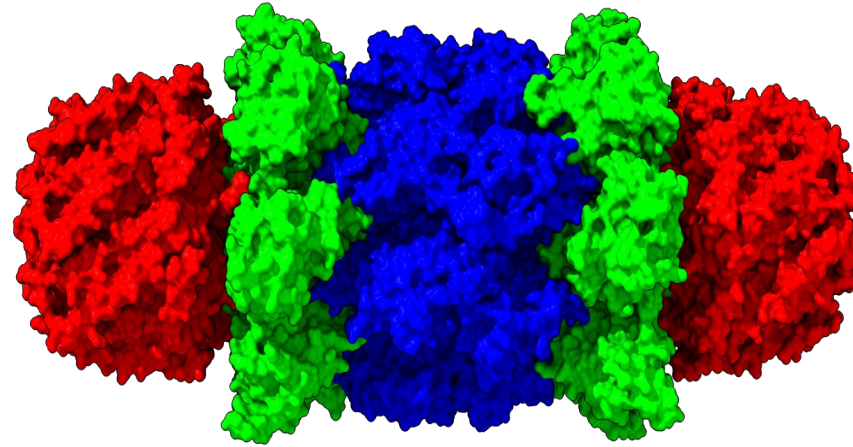
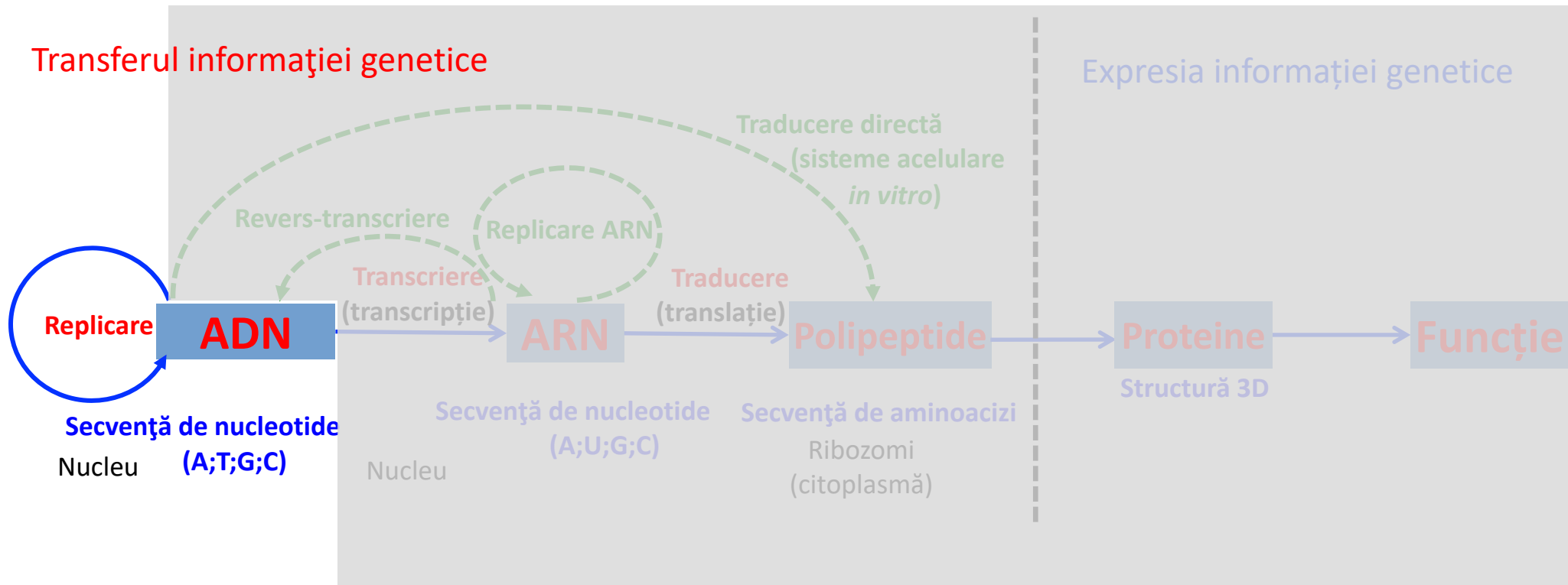
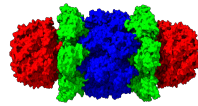


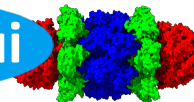


Capitolul II

ADN –ul, suportul material al informației genetice



Structura chimică a acizilor nucleici. Particularități structurale ale ADN-ului



- în 1869 Friedrich Miescher izolează din nucleii o substanță albă pe care o denumește **nucleină**. Datorită caracterului ușor acid capătă mai apoi denumirea de **acid nucleic**.

- funcția și structura acestei substanțe rămâne necunoscută până în jurul anilor 1920.

Acizii nucleici sunt **polimeri** rezultați în urma legării prin **legături fosfodiesterice** unui număr mare de **nucleotide**. Funcție de tipul de nucleotide, acizii nucleici se clasifică în:

- **acid ribonucleic (ARN)** – conține în structura sa riboză;
- **acid dezoxiribonucleic (ADN)** - conține în structura sa deoxiriboză;

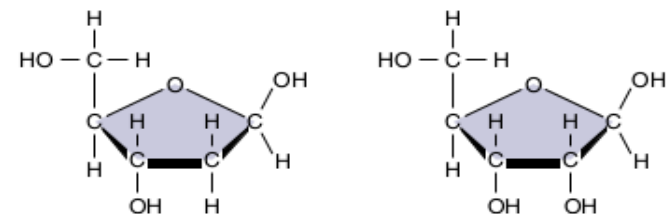
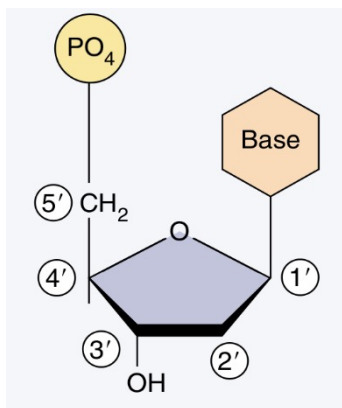
O **nucleotidă** este alcătuită din

- un **glucid** cu 5 atomi de C (**riboza sau deoxiriboza**) în formă furanozică;
- o **grupare fosfat** (PO_4) legată de atomul C 5 al glucidului;
- **bază azotată** legată de atomul C1 al glucidului;

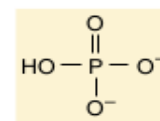
Bază azotată se leagă printr-o legătură glicozidică de pentoză formând un **nucleozid**. **O nucleotidă se definește astfel ca fiind un ester fosforic al nucleozidului corespunzător.**

În acizii nucleici se întâlnesc două tipuri de baze azotate:

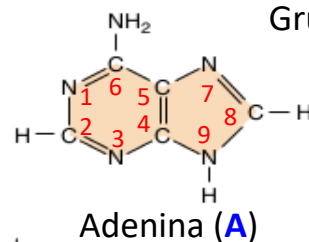
- **purinice** - două heterocicluri cu N: **Adenina (A)** și **Guanina (G)** în ADN și ARN
- **pirimidinice** – un heterociclu cu N: **Citozină (C)** și **Timină (T)** în ADN și **C** și **Uracil (U)** în ARN



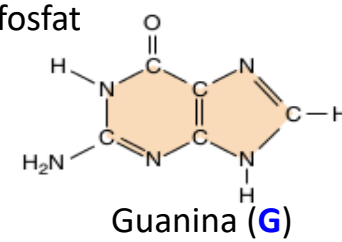
2`-dezoxi-β-D-ribofuranoză (ADN) β-D-ribofuranoză (ARN)



Grupă fosfat

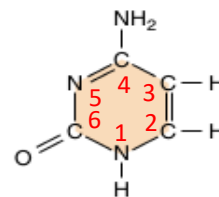


Adenina (A)

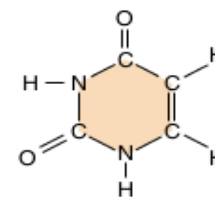


Guanina (G)

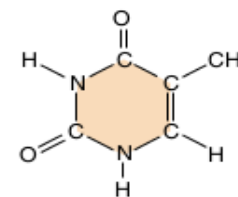
Purine (R)



Citozina (C)

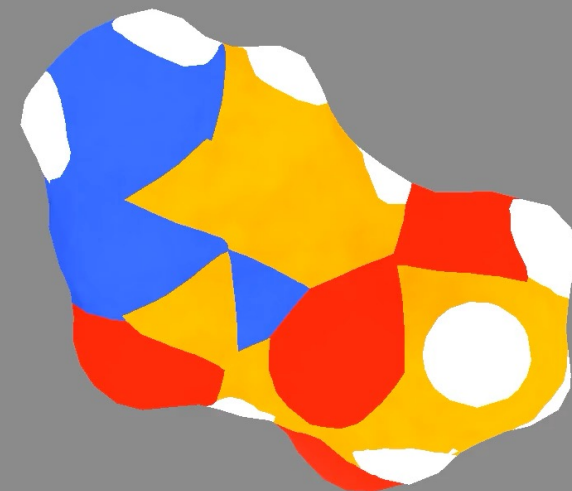
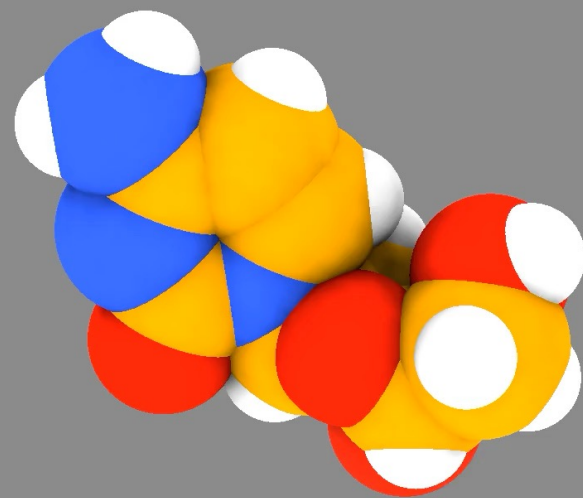
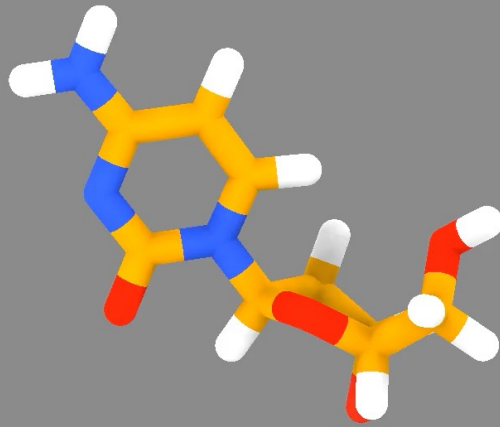
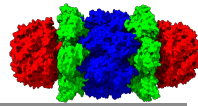


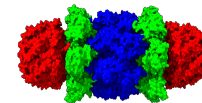
Uracil (U)
(doar în ARN)



Timina (T)
(doar în ADN)

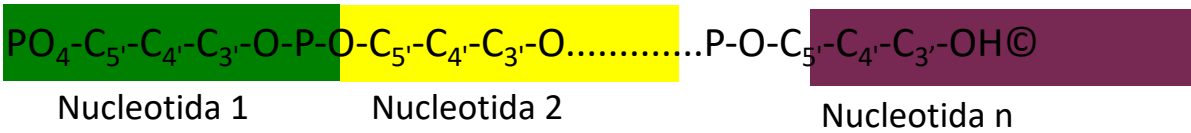
Pirimidine (Y)





Structura primară a ADN-ului

Între gruparea $-PO_4$ de pe carbonul 5 (poziția 5') al unei nucleotide și gruparea $-OH$ de pe carbonul 3 (poziția 3') al altei nucleotide se poate elimina o moleculă de apă cu formarea unei **legături fosfodistice** ($-O-P-O-$). Se pot astfel forma astfel catene lungi de nucleotide al căror schelet are structura:



Aproape toate moleculele de ADN au două capete diferite:

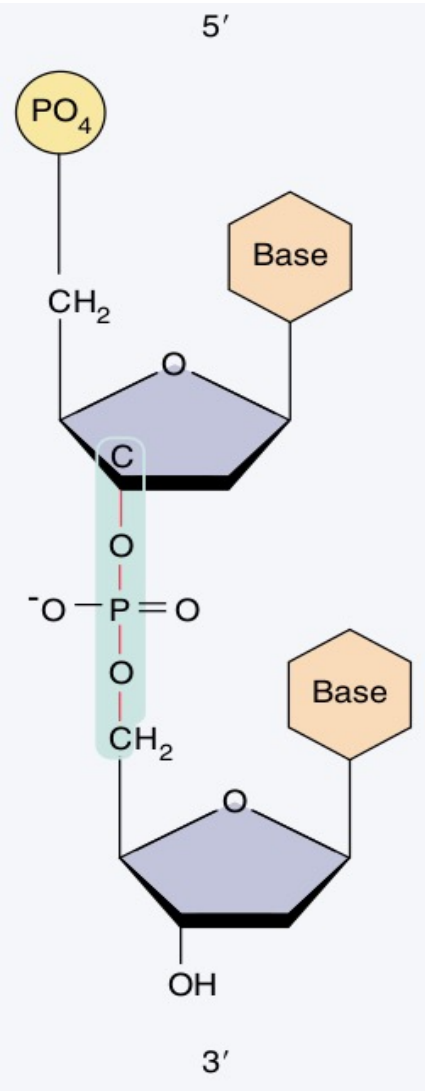
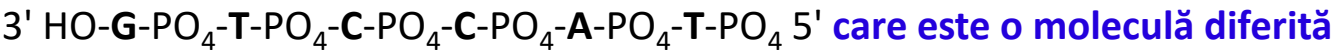
- capătul 3' cu o grupare $-OH$ liberă;
- capătul 5' cu o grupa $-PO_4$ liberă.

Ce molecule de ADN nu respectă această regulă?

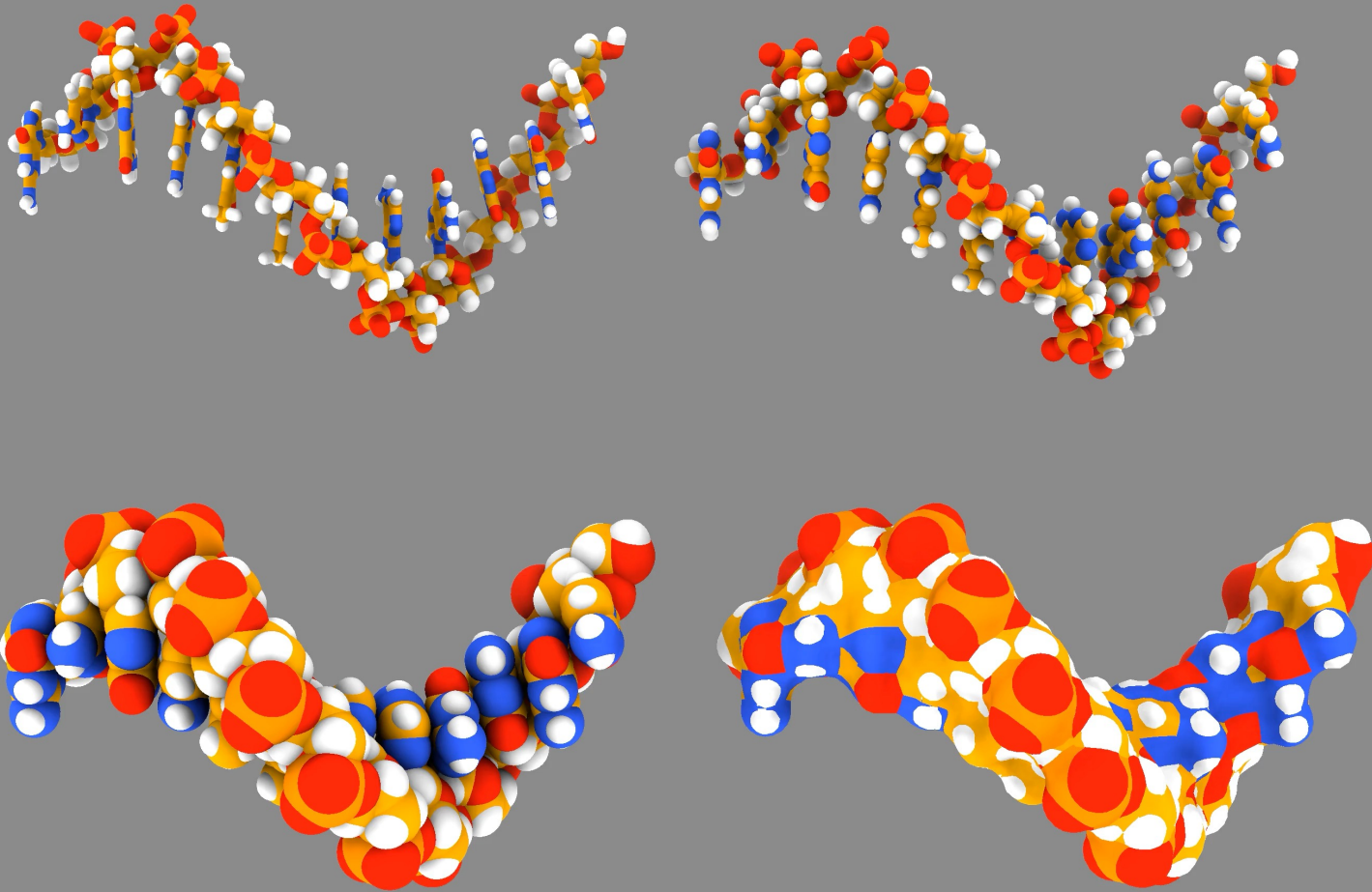
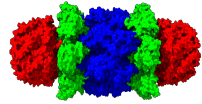
Secvența de nucleotide **GTCCAT** se referă la o catenă cu structura:

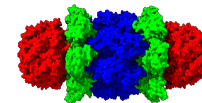


Și nu la



Diverse reprezentări ale unui fragment de ADN: CGCGAATTCGCG





Analiza lui Chargaff privind compoziția în baze azotate a ADN-ului

Organism	Procente molare			
	A	T	G	C
<i>Escherichia coli</i> tulpina K12	26.0	23.9	24.9	25.2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	14.6	34.9	35.4
Drojdia de bere	31.3	32.9	18.7	17.1
Hering	27.8	27.5	22.2	22.6
Șobolan	28.6	28.4	21.4	21.5
Om	30.9	29.4	19.9	19.8

De ce procentele nu sunt perfect egale?

Regulile lui Chargaff:

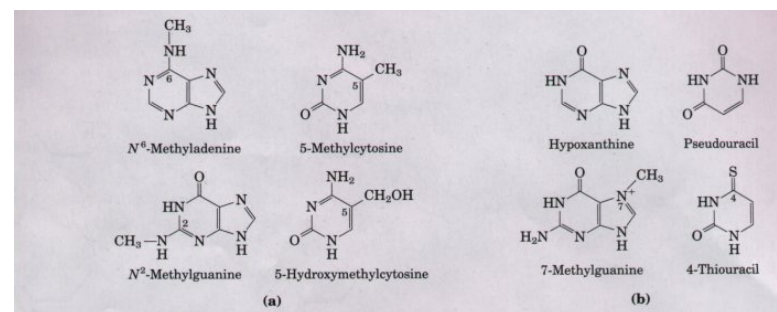
Într-o moleculă de ADN au loc întotdeauna următoarele relații:

- proporția de A este întotdeauna egală cu cea de T, iar cea de G cu cea de C

$$A=T; G=C$$

- proporția de baze azotate purinice este întotdeauna egală cu cea de baze pirimidinice

$$A+G=T+C$$



ADN

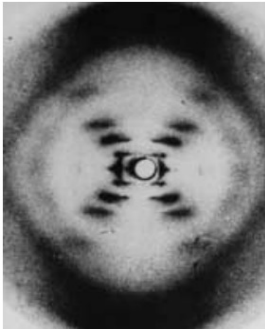
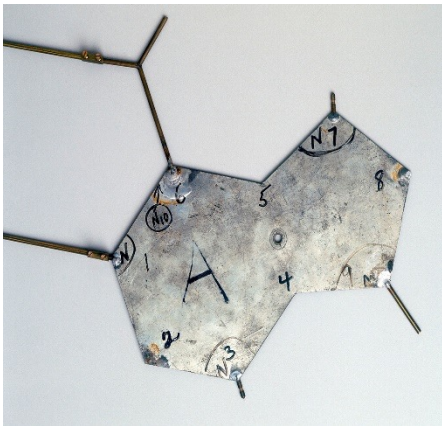
ARN

Structura tridimensională a AND-ului

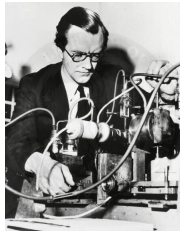
- Analizând modul în care razele X sunt difractate de o fibră cristalizată de ADN, **Franklin** propune în 1953 că **molecula de ADN are forma de tirbușon**, cu diametrul de 2 nm și o spiră de 3.4 nm;
- Watson and Crick** propun în 1953 un model al structurii ADN-ului ce are la bază un **dublu helix**;



Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737-738 (1953)



Rosalind Elsie Franklin
(1920 - 1958)



Wilkins Maurice (1916 - 2004)

no. 4386 April 25, 1953 NATURE 737

equipment, and to Dr. G. E. R. Duncan and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

¹Young, T. R., James, H., and Jerns, W., *Phil. Mag.*, 48, 149 (1954).

²Logan, J. G., M. S., *Mem. Nat. Res. Soc. Lond., Geophys. Supp.*, A, 25 (1954).

³Van der Waals, J. D., *Woolf Note Papers in Phys. Chem., London*, 11 (1956).

⁴Elmore, V. W., *Acta. Nat. Acad. Sci. (Washington)*, 2 (1) (1955).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey.¹ They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining 5'-deoxy-ribose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain, loosely resembling Furberg's model No. 1,² has the bases on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 90° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-coordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on those assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

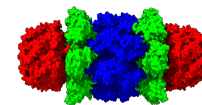
It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material. Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

Structura tridimensională a ADN-ului



- Scheletul moleculei este reprezentat de catenele cu legături fosfodiesterice ce formează **un dublu helix** spre dreapta. Catenele sunt **antiparalele**, una are orientare $5' \rightarrow 3'$ iar cealaltă $3' \rightarrow 5'$

- Bazele azotate** sunt orientate **spre interior**. Între bazele de pe o catenă și formează legături de hidrogen pe bază de **complementaritate: A-T (2 legături); G-C (3 legături)**. O pereche de baze azotate complementare formează un plan perpendicular pe catenă. **Distanța dintre 2 perechi de baze (pb) consecutive** este **de 0.34 nm**.

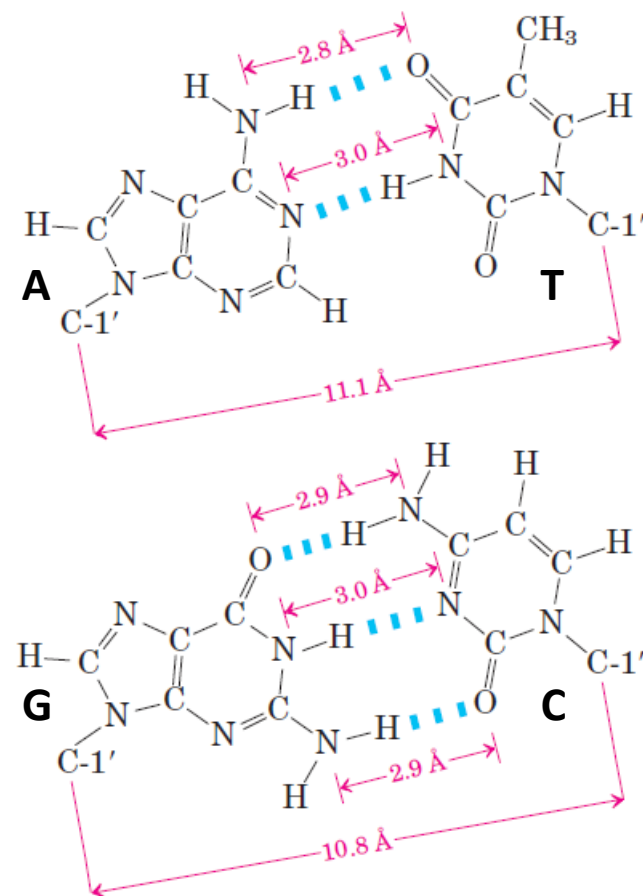
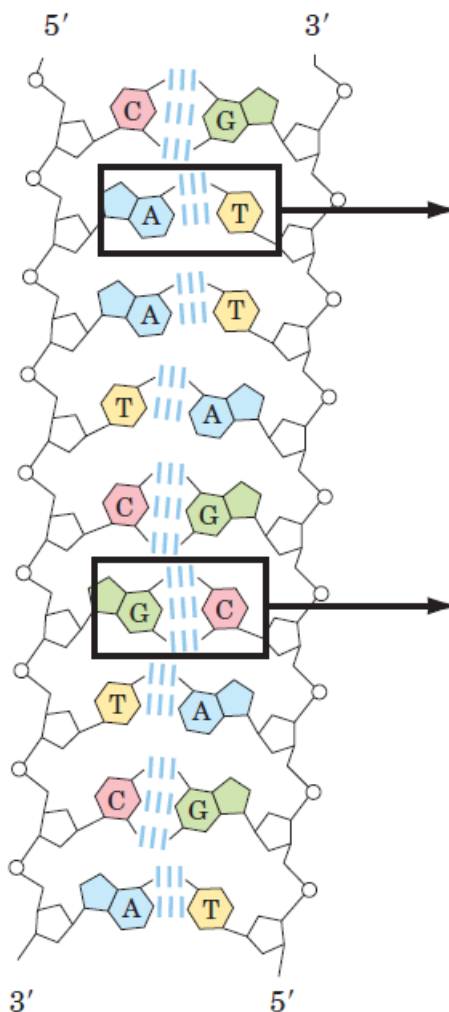
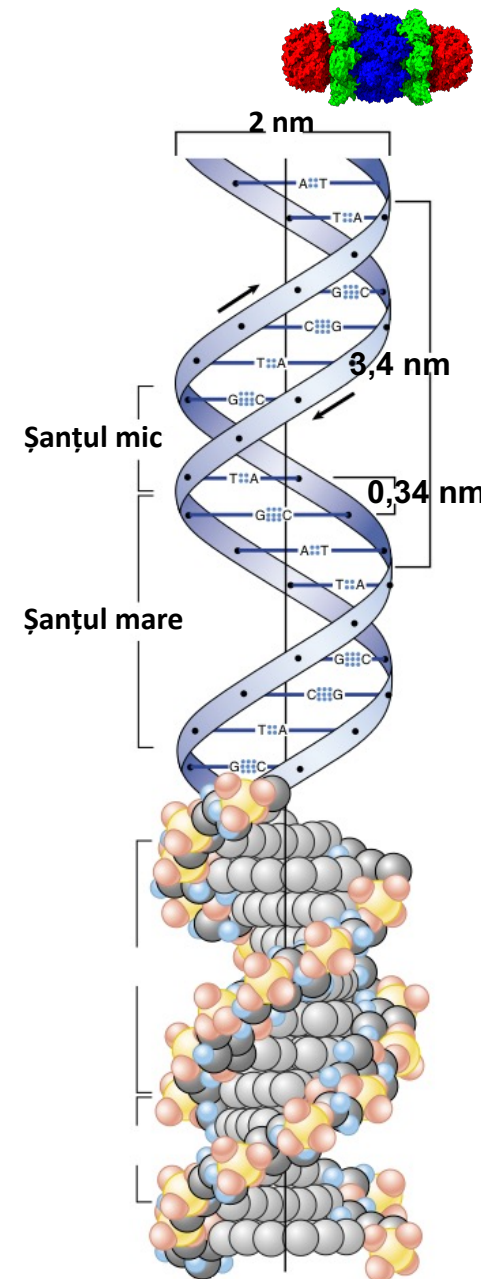
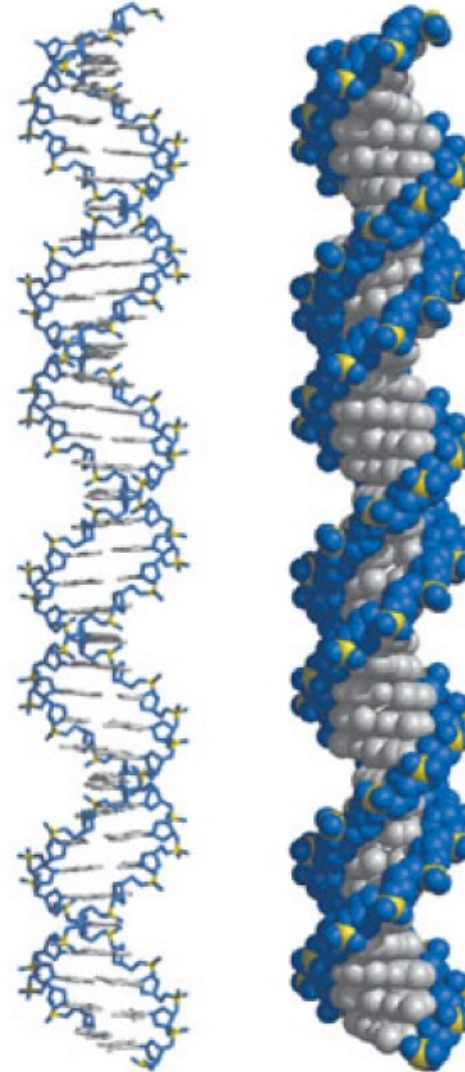
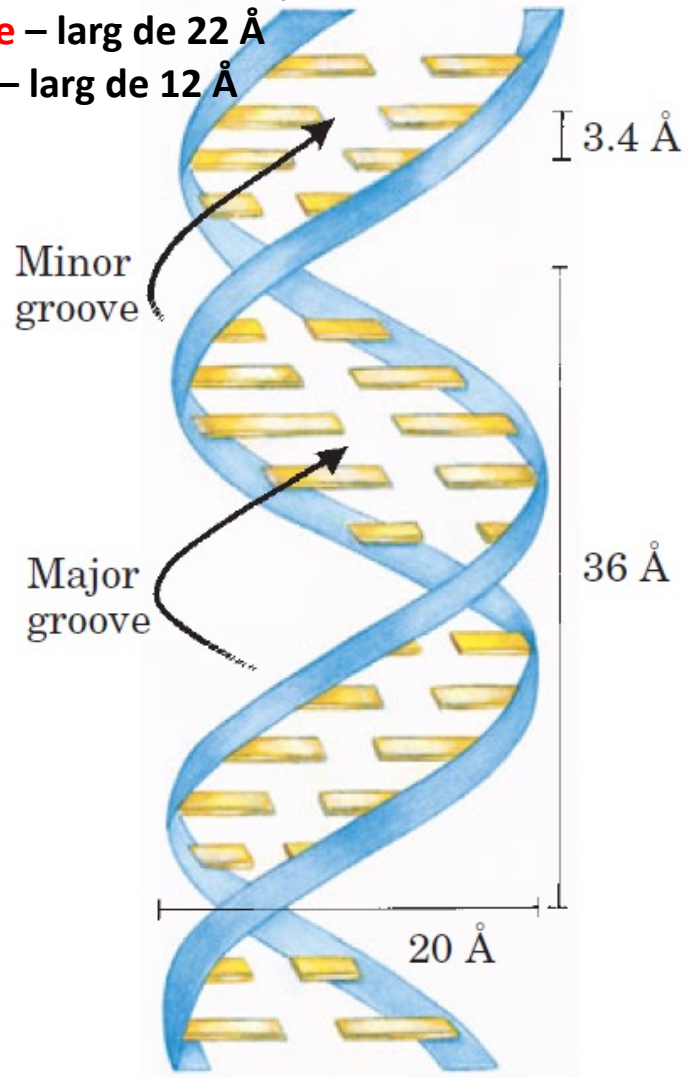
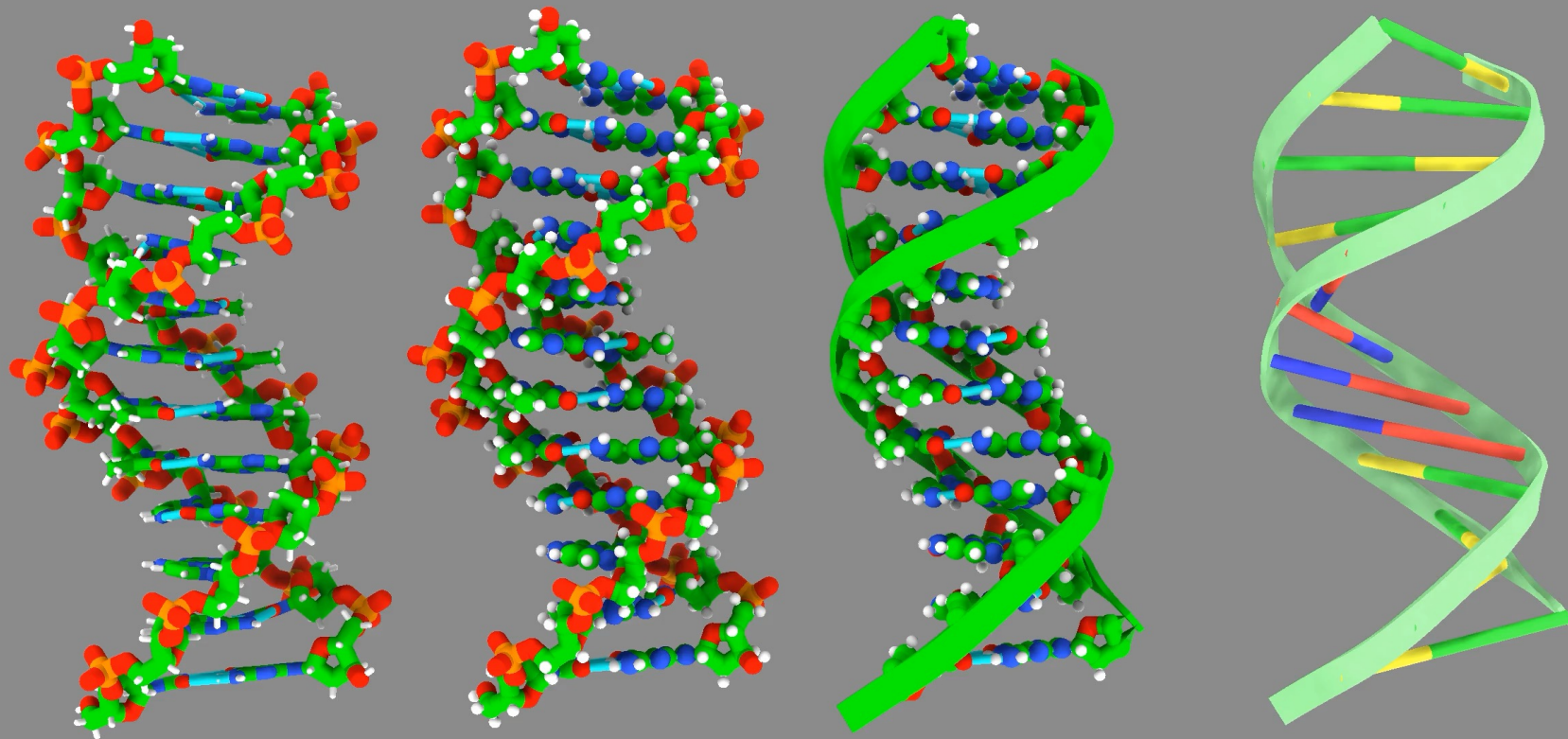
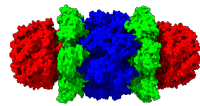


FIGURE 8-11 Hydrog
by Watson and Crick.
sented by three blue li
Pagina 9 din 30

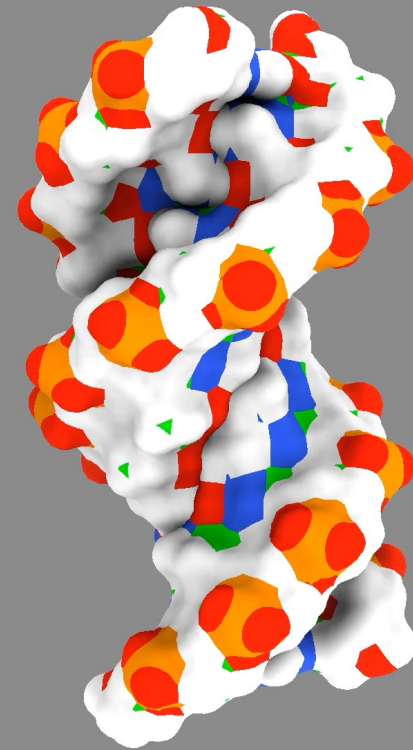
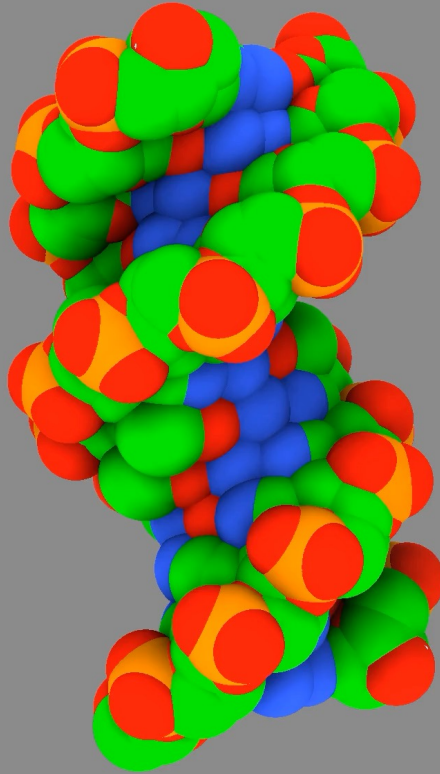
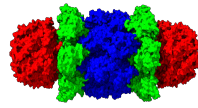
Structura tridimensională a ADN-ului

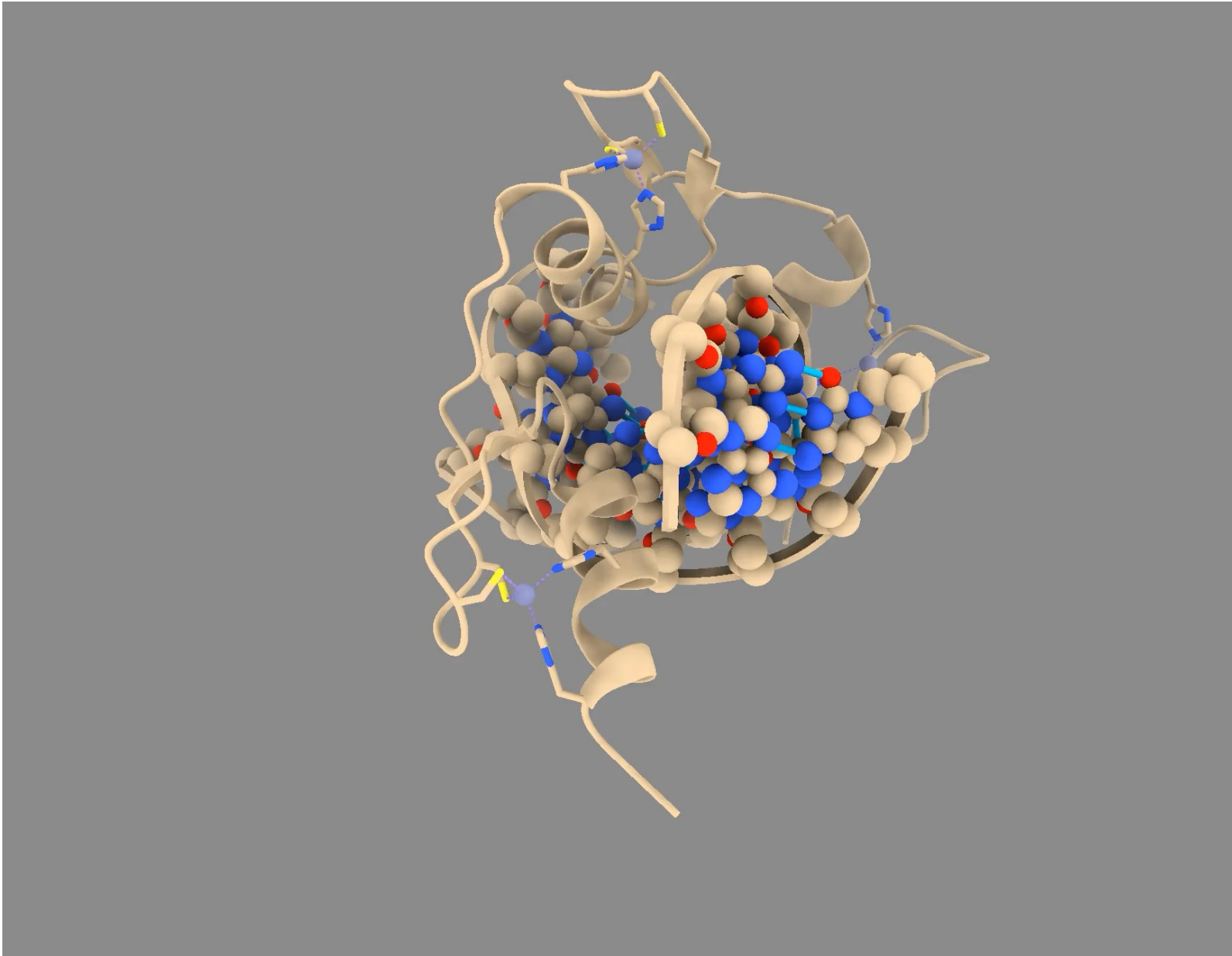
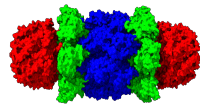
- O **spiră completă** a dublul helix-ului are **10 pb - 3.4 nm**
- Au fost descrise **două sanțuri**:
 - **șanțul mare** – larg de **22 Å**
 - **șanțul mic** – larg de **12 Å**

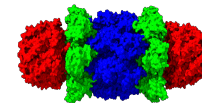




Cum putem reprezenta structura AND-ului

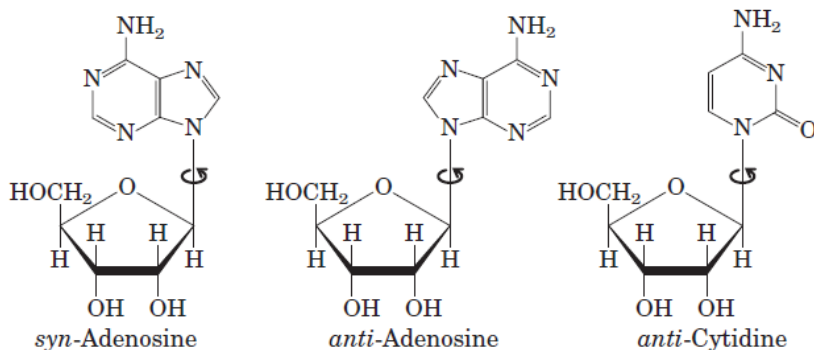




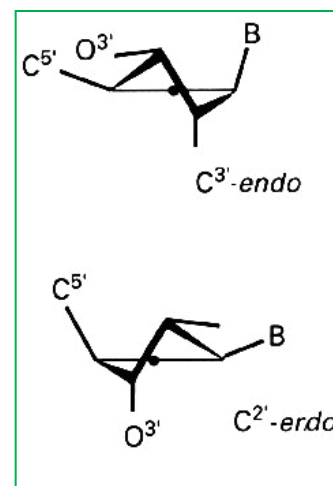
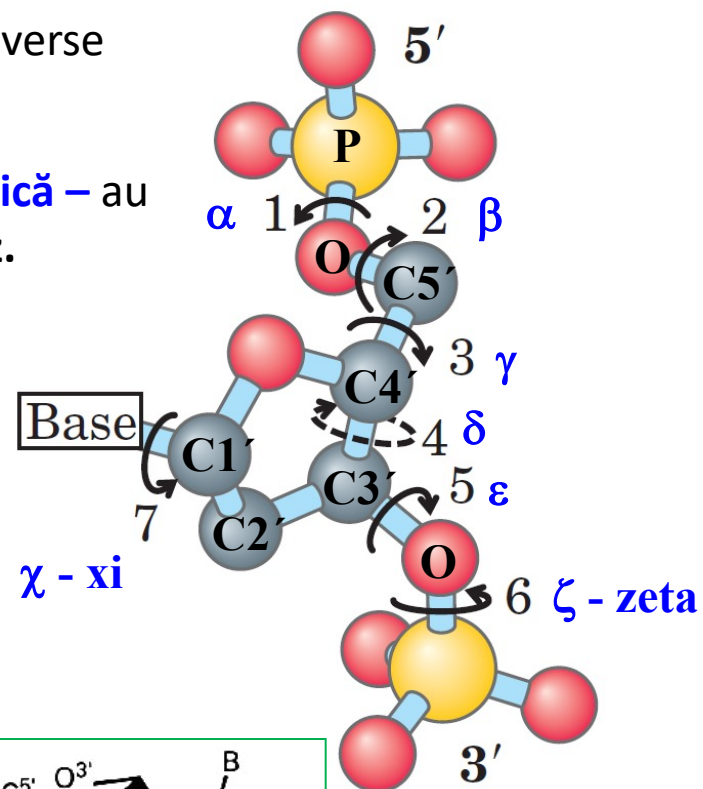


Catena de ADN (și ARN) este deosebit de flexibilă și poate adopta diverse **conformații**. Această flexibilitate rezultă din:

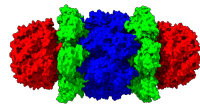
- rotația liberă a covalențelor ce alcătuiesc legătura fosfo-diestică** – au fost descrise 6 unghiuri posibile de rotație, notate: **a, b, g, d, e, z**.
- rotația liberă a legăturii glicozidice C1' - N** - al 7-lea unghi de rotație, notat **c**. O serie de constrângeri sterice fac ca acest unghi să ia valori limitate, în raport cu glucidul bazei azotate putând avea 2 orientări distincte: **syn** și **anti** (pentru purine doar **anti**)



- conformațiile posibile ale restului glucidic -**



Conformațiile moleculei de ADN



Funcție de valorile pe care le iau cele 7 unghiuri și conformația restului de deoxiriboză au fost descrie 3 forme majoritare diferite ale moleculei de ADN:

1.Conformația sau forma B (ADN-ul B) – este structura descrisă de Watson-Crick, forma în care ADN-ul este cel mai stabil în condiții fiziologice, o spiră completă este alcătuită din **10,5 baze**;

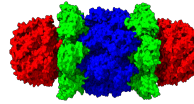
2.Conformația sau forma A (ADN-ul A) - forma în care ADN-ul este cel mai stabil în medii ne-apoase; helix-ul este mai larg, bazele nu sunt perpendiculare pe catene ceea ce face ca sanțul mare să fie mai adânc, o spiră completă conține **11 baze** ;

3.Conformația sau forma Z (ADN-ul Z) – helix-ule este spre stânga, o spiră completă conține **12 baze**.

	A form	B form	Z form
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Base pairs per helical turn	11	10.5	12
Helix rise per base pair	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Base tilt normal to the helix axis	20°	6°	7°
Sugar pucker conformation	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines
Glycosyl bond conformation	Anti	Anti	Anti for pyrimidines; syn for purines



Molecula de ADN este puternic împachetată



Cromozomii conțin o singură moleculă de ADN. Cromozomul 22 uman de exemplu este alcătuit dintr-o moleculă de ADN cu lungimea de 48 milioane de perechi de nucleotide. Ținând cont că distanța dintre 2 pb consecutive este de 0.34 nm, cromozomul 22 ar avea deci lungimea de:

$$0.34 \text{ nm} \times 48\,000\,000 \text{ pb} = 16\,320\,000 \text{ nm, adică } 1,63 \text{ cm}$$

Cromozomul uman 22 are lungimea de **2 μm** în timpul mitozei. **ADN-ul celular este așadar puternic împachetat.**

Nivele de împachetare ale ADN-ului:

A. Suprarăsucirea ADN-ului (supercoiling) – reprezintă răsucirea suplimentară a axei α -helixului ADN.

O moleculă de ADN poate să adopte **topologii** (stări de suprarăsucire) diferite:

- în condiții obișnuite de laborator, axa α -helixului este relativ dreaptă, **molecula de ADN este relaxată și respectă** structura ADN-ului B descrisă anterior în care **o spiră completă este alcătuită din 10,5 baze**;
- în condiții specifice ce apar frecvent în celulă, **o spiră completă se realizează cu mai puțin de 10,5 baze**, ceea ce generează o tensiune structurală. Această tensiune se rezolvă prin **suprarăsucirea ADN-ului**. Cu cât numărul de baze/spiră este mai depărtat de 10,5, cu atât suprarăsucirea este mai puternică.

Topologiile diferite ale unei molecule de ADN pot fi decelate prin parametrul numit **număr de legătură (linking number)** – Lehninger, Sixth Edition pg. 955 - 961

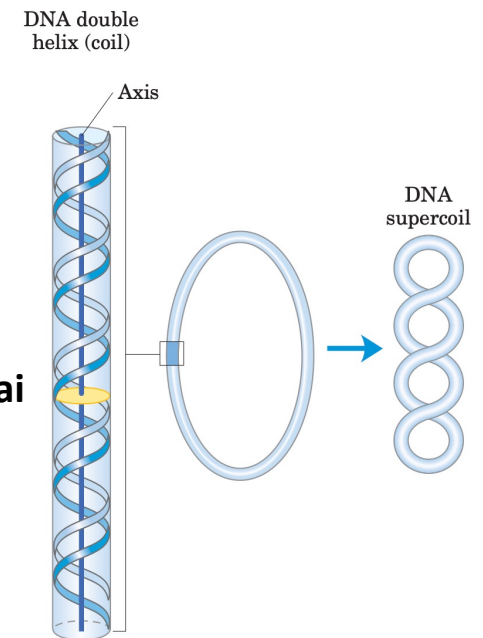
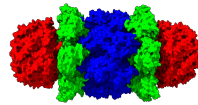


FIGURE 24–11 Supercoiling of DNA. When the axis of the DNA double helix is coiled on itself, it forms a new helix (superhelix). The DNA superhelix is usually called a supercoil.

Molecula de ADN este puternic împachetată



B. Asocierea ADN-ului cu histone și formarea nucleosomilor

Dacă nucleii de la celule EK aflate la interfază sunt distruși prin aplicarea unor condiții blânde și conținutul lor este evaluat sub microscopul electronic, se poate observa apariția unor **fibre cu diametrul de 30 nm** ce au primit numele **de fibre de cromatină**. Prin deplierea parțială a acestor fibre, aspectul cromatinei se schimbă și apare sub microscopul optic sub aspectul unor „**mărgele pe ață**”. Așa este molecula de ADN, iar fiecare „mărgea” poartă numele de **particulă nucleosomală**.

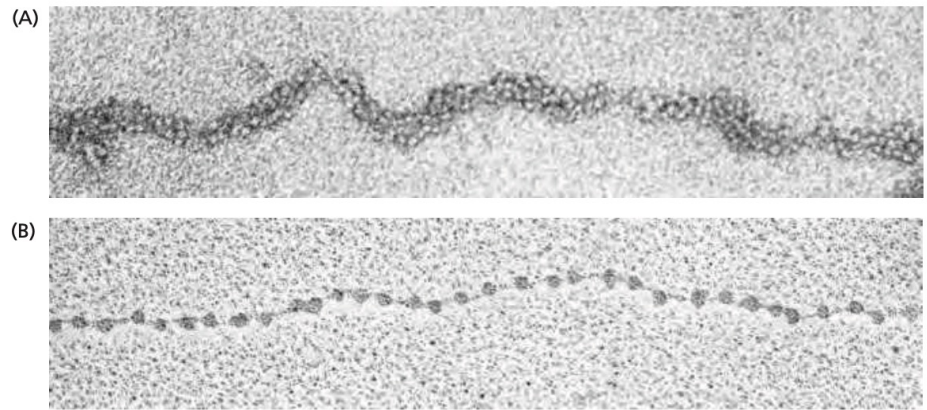
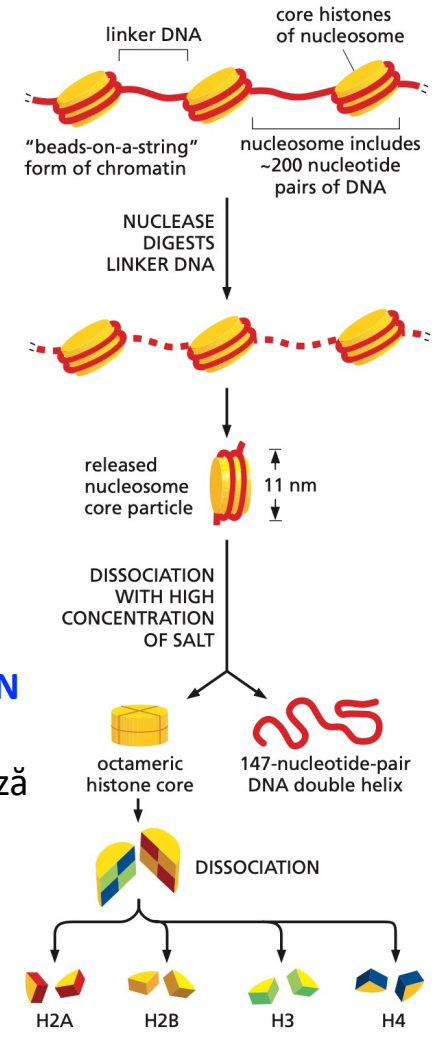


Figure 4–21 Nucleosomes as seen in the electron microscope. (A) Chromatin isolated directly from an interphase nucleus appears in the electron microscope as a thread about 30 nm thick. (B) This electron micrograph shows a length of chromatin that has been experimentally unpacked, or decondensed, after isolation to show the nucleosomes. (A, courtesy of Barbara Hamkalo; B, courtesy of Victoria Foe.)

Alberts Molecular Biology of the Cell, 6th ed.



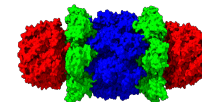
- Fiecare **particulă nucleosomală** este un complex alcătuit din:
- opt proteine numite **histone**: câte 2 molecule din histonele numite **H2A, H2B, H3, and H4**;
 - un fragment de **ADN dublu catenar de 147 nucleotide**.

Octamerul histonic formează un nucleu proteic pe care molecula de ADN se înfășoară formând o **spirală spre dreapta de 1.7 spire**. Între două particule nucleosomale există o porțiune de ADN ce poate varia ca lungime între câteva nucleotide până la 80 nucleotide și care poartă numele de **ADN de legătură (ADN linker)**.

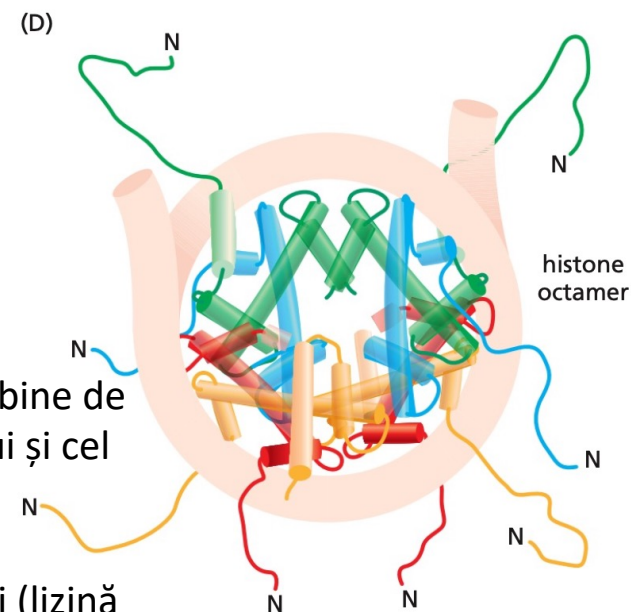
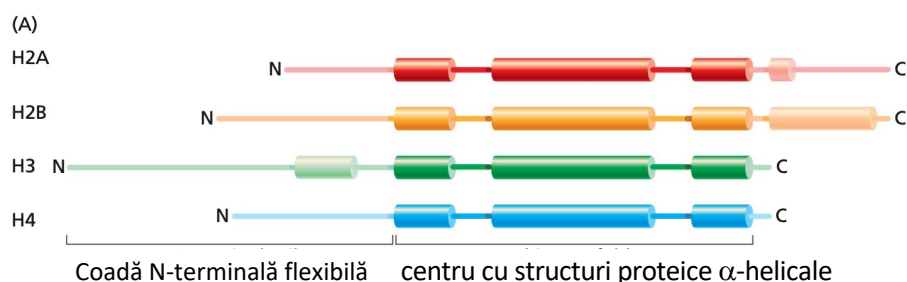
Particula nucleosomală împreună cu unul dintre fragmentele de **ADN-ul de legătură** formează **nucleosomul**. (Termenul este însă folosit în mod frecvent și pentru particula nucleosomală).

În medie, un nucleosom conține în jur de 200 perechi de nucleotide. O celulă umană diploidă al cărei ADN are ce cu 6.4×10^9 pb va conține aproximativ 30 milioane de nucleosomi, ceea ce micșorează lungimea moleculei de ADN de aproximativ 3 ori.

Structura histonelor și interacțiunea acestora cu ADN-ul



Histonele sunt proteine de dimensiuni relativ mici ce diferă prin numărul de aminoacizi (conțin între 102-135 aminoacizi), dar care au structuri tridimensionale apropiate. Toate histonele conțin un **centru alcătuit preponderent din 3 structuri proteice α -helicale** (curs 8 pentru mai multe detalii) și o **coadă N-terminală flexibilă**. Pentru a forma nucleosomul, histonele formează mai întâi dimeri H3–H4 și H2A–H2B, iar apoi doi dimerii H3–H4 interacționează pentru a forma un tetramer. La un tetramer H3–H4 se atașează 2 dimeri H2A–H2B și se obține octamerul proteic.



Complexul dintre nucleul octamERIC de histone și ADN este stabilizat prin :

- **Legături de H** - un număr total de 142 legături de H dintre histone și ADN, mai bine de jumătate dintre acestea realizându-se între scheletul pentozo-fosfat al ADN-ului și cel peptidic al proteinelor;
- **Interacțiuni hidrofobe**;
- **Interacțiuni ionice** – o cincime din aminoacizii histonelor sunt aminoacizi bazici (lizină și arginină), încărcăți deci pozitiv. Între aceste sarcini și sarcinile negative ale resturilor PO_4 din ADN apar forțe de atracție ionice;
- **Punți de sare** – legături chimice cu caracter parțial de legătură de H și parțial de interacțiune

Toate interacțiunile dintre histone și ADN ce stabilizează nucleosomul se realizează preponderent între scheletul pentozo-fosfat al ADN-ului, fiind deci independente de secvența de nucleotide a ADN-ului. Din acest motiv, **practic orice secvență de ADN va putea fi răsucită în jurul unui octoamer histonic.**

Structura particulei nucleosomale

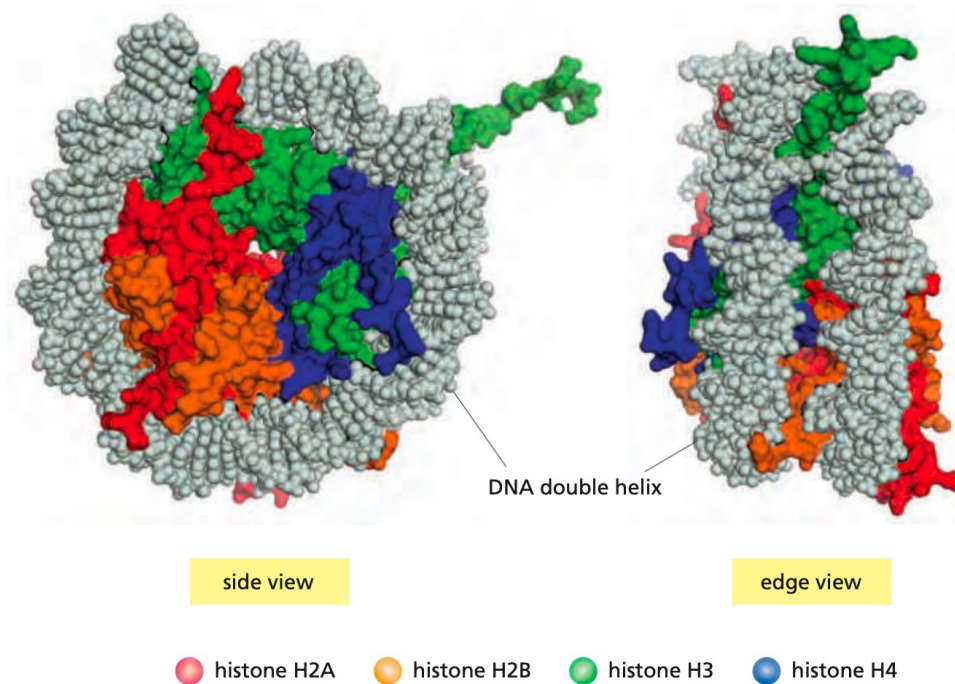
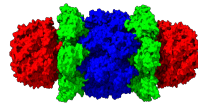
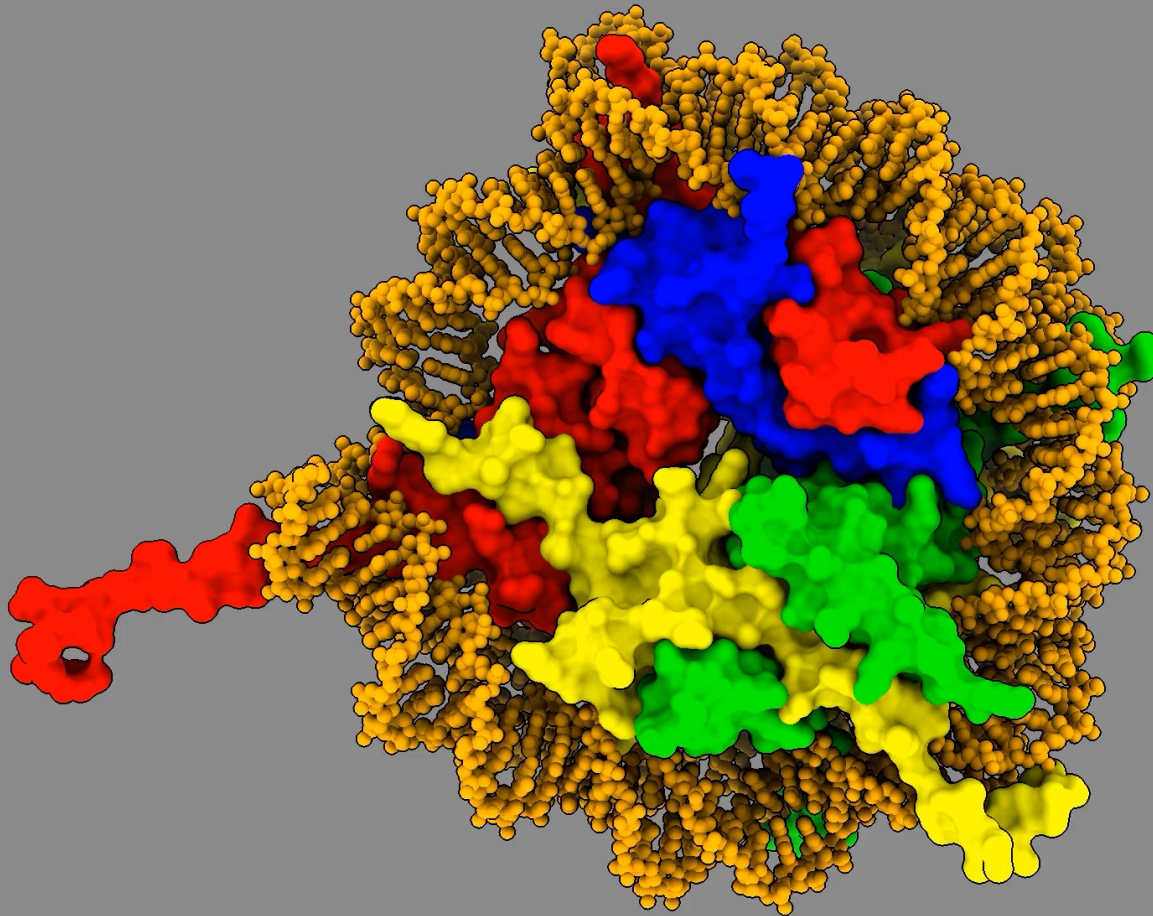
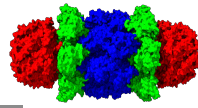
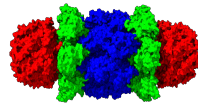


Figure 4-23 The structure of a nucleosome core particle, as determined by x-ray diffraction analyses of crystals. Each histone is colored according to the scheme in Figure 4-22, with the DNA double helix in *light gray*. (Adapted from K. Luger et al., *Nature* 389:251–260, 1997. With permission from Macmillan Publishers Ltd.)

Alberts Molecular Biology of the Cell, 6th ed.



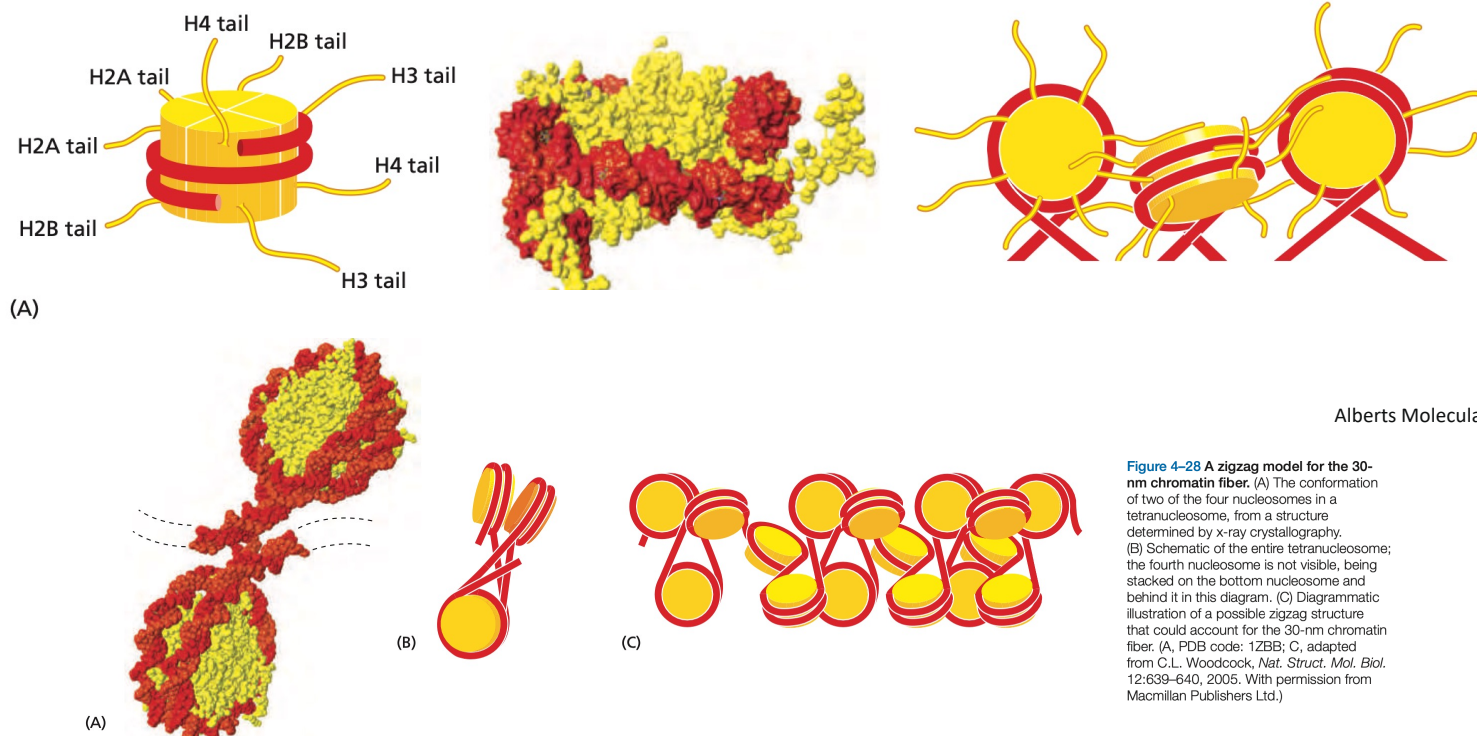
Structura histonelor și interacțiunea acestora cu ADN-ul



C. Asocierea nucleosomilor pentru a forma fibra de cromatină

În celulă, cromatina rareori adoptă aspectul „**mărgelilor pe ață**”. De cele mai multe ori, nucleosomii sunt împachetați unul peste altul pentru a forma fibre cu diametrul de 30nm și aspect de zig-zag. Nu se cunoaște încă cu exactitate cum se realizează această împachetare, dar s-a pus în evidență existența unor **tetranucleosomi**. **Împachetarea strânsă a nucleosomilor pentru a forma tetranucleosomi și mai apoi complexe de dimensiuni mai mari este mediată de către cozile histonelor, în special a histonei H4.** Un alt factor frecvent implicat în împachetarea nucleosomilor este o histonă suplimentară numită **H1** sau **histona de legătură (linker histone)**. O singură moleculă de H1 se leagă de fiecare nucleosom și modifică orientarea ADN-ului la ieșirea sa din nucleosom, favorizând formarea de tetranucleosomi.

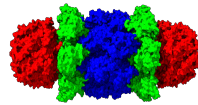
Prin organizarea ADN-ului în fibra de cromatină acesta este compactat de aproximativ 100 ori.



Figures 4-29 A model for the role played by histone tails in the compaction of chromatin. (A) A schematic diagram shows the approximate exit points of the eight histone tails, one from each histone protein, that extend from each nucleosome. The actual structure is shown to its right. In the high-resolution structure of the nucleosome, the tails are largely unstructured, suggesting that they are highly flexible. (B) As indicated, the histone tails are thought to be involved in interactions between nucleosomes that help to pack them together. (A, PDB code: 1KX5.)

Alberts Molecular Biology of the Cell, 6th ed.

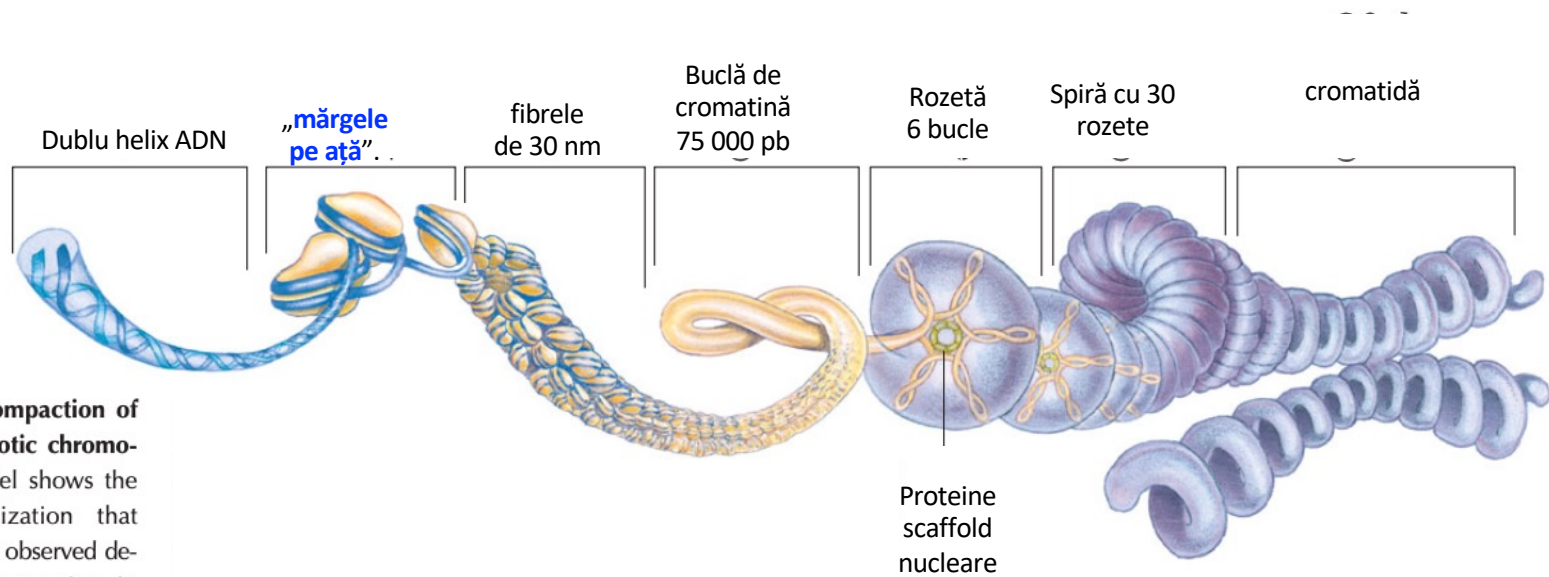
Figure 4-28 A zigzag model for the 30-nm chromatin fiber. (A) The conformation of two of the four nucleosomes in a tetranucleosome, from a structure determined by x-ray crystallography. (B) Schematic of the entire tetranucleosome; the fourth nucleosome is not visible, being stacked on the bottom nucleosome and behind it in this diagram. (C) Diagrammatic illustration of a possible zigzag structure that could account for the 30-nm chromatin fiber. (A, PDB code: 1ZBB; C, adapted from C.L. Woodcock, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:639-640, 2005. With permission from Macmillan Publishers Ltd.)



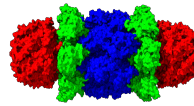
D. Formarea de bucle, rozete și cromosomi

Modelul acceptat actual privind organizarea superioară a ADN-ului pleacă de la premiza că fibrele de cromatină obținute prin condensare nucleosomilor sunt suplimentar împachetate prin contribuția unor proteine nucleare numite **proteine scaffold**. Acestea interacționează specific cu anumite zone ale ADN-ului și formează **rozete** din **6 bucle de cromatină**, în general conținând gene foarte înrudite. Rozetele interacționează între ele și formează **o spirală**, fiecare spirală conținând 30 rozete. Spirele de rozete la rândul lor interacționează și formează cromatida unui cromozom. Modelul prezentat respectă împachetarea naturală a fibrei de cromatină în cromozom, dar este foarte probabil ca toate structurile superioare fibrei de cromatină de 30 nm să fie semnificativ mai ne-uniforme.

FIGURE 24–33 Compaction of DNA in a eukaryotic chromosome. This model shows the levels of organization that could provide the observed degree of DNA compaction in the chromosomes of eukaryotes. The levels take the form of coils upon coils. In cells, the higher-order structures (above the 30 nm fibers) are unlikely to be as uniform as depicted here.



Replicarea moleculei de ADN



Complementaritatea bazelor azotate din cele două catene antiparalele dictează strict secvența unei catene funcție de cealaltă – dacă o catenă este **5'-ATTGCAT-3'** cealaltă trebuie să fie obligatoriu : **3'-TAACGTA-5'**.

Pe bază de complementaritate, orice catenă de ADN poate fi duplicată. Moleculele de ADN dublu catenar se sintetizează *in vivo* printr-un proces numit **replicare semi-conservativă**:

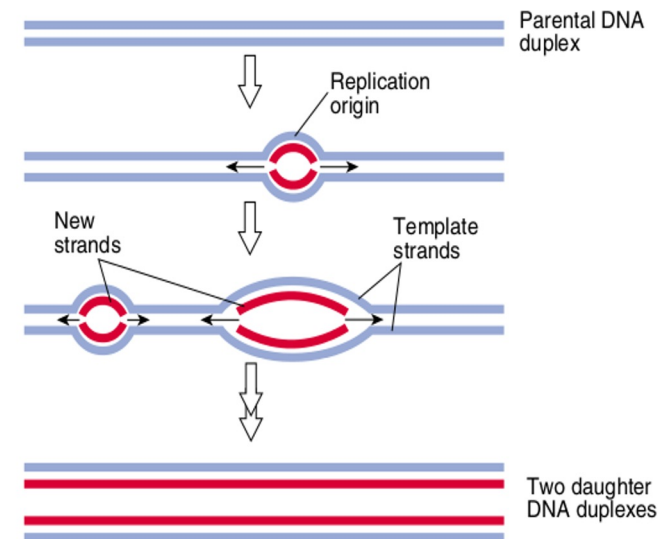
- **secvența moleculei originale este replicată, nu molecula dublu catenară helicoidală în sine;**
- **fiecare catenă a moleculei dublu catenare originale devine parte componentă a uneia din cele două molecule noi sintetizate**

Replicarea moleculei de ADN este un proces esențial pentru celula și trebuie să fie **rapidă și precisă**.

Procesul de replicare **începe în una sau mai multe origini de replicare** și este realizată prin activitatea corelată a unui complex de proteine dintre care cea mai importantă **este ADN-polimeraza**. Elementul genetic ce este capabil de replicare autonomă se numește **replicon**.

La procariote – repliconul - întregul cromozom sau un plasmid

La eucariote – repliconul – o porțiune de aprox. 100 000 pb – un cromozom are mai mulți repliconi.



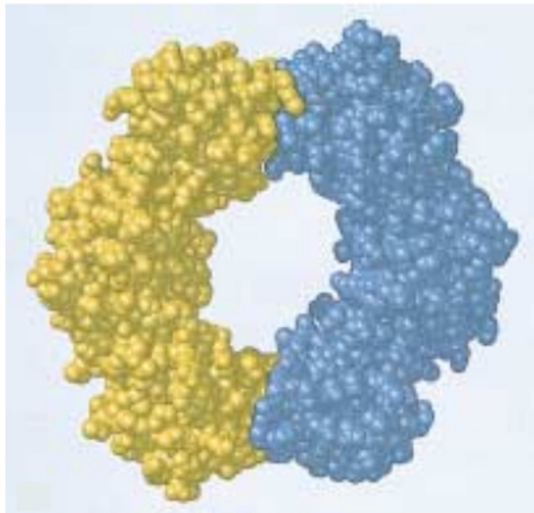
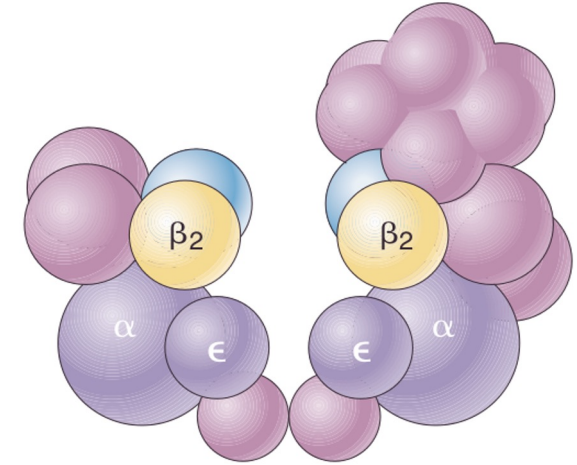
ADN-polimeraza III, exemplul tipic de polimerază ADN

- are capacitatea de a ataşa nucleotide la capătul 3' al unei catene existente, ataşarea realizându-se pe baza complementarităţii cu o a doua catenă (**catenă matrită sau template**). **Direcţia de polimerizare** este 5' → 3'.
- viteza de polimerizare este de **1000 nucleotide/s**
- enzimă dimer, fiecare subunitate conţinând 10 catene polipeptidice (domenii) diferite:

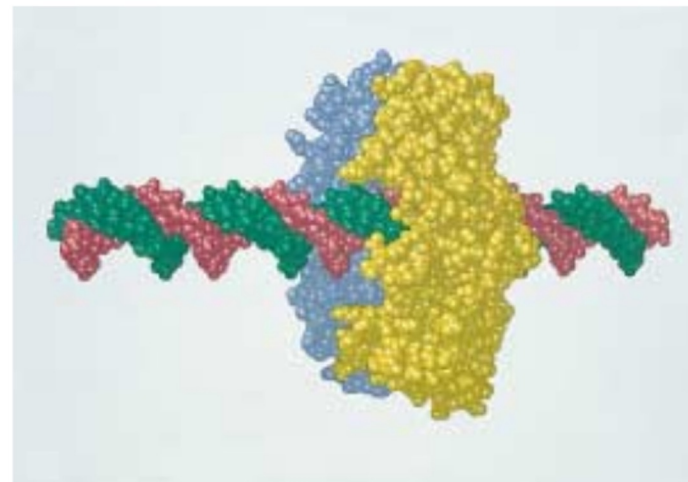
.Domeniul α – domeniul catalitic - catalizează **polimerizarea nucleotidelor în direcţia 5' → 3'**

.Domeniul ϵ – domeniul de verificare – verifică **corectitudinea** bazelor azotate înserate în direcţia **3' → 5'**

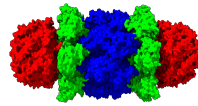
.Domeniul β_2 – domeniul de legare – fixează complexul enzimatic de molecula de ADN



Domeniul β_2



Domeniul β_2 – legat de ADN



Procesul de replicare a ADN-ului presupune parcurgerea a 6 etape:

1. Desfacerea helix-ului dublu al ADN-ului se realizează în patru etape distincte:

- legare unei **proteine inițiator** de originea de replicare
- despiralizarea helix-ului dublu realizată prin acțiunea unei **helicaze (DnaB)**. Apare o structură specifică numită **bifurcație (furcă) de replicare**.
- protejarea zonelor monocatenare de proteine specifice (**single-strand binding proteins; SSB**) ce împiedică reformarea legăturilor de H
- relaxarea tensiunilor în catenă. La o viteză de replicare de 1000 pb/s, helix-ul se despiralizează (răsucește) cu o viteză de 100 rotații/s. Tensiunea creată este eliminată prin clivarea unei legături fosfodiesterice, rotirea catenei clivate în jurul celei întregi și refacerea legăturii fosfodiesterice de către enzima **girază (topoizomerază)**.

2. Legarea oligonucleotidelor amorsă -

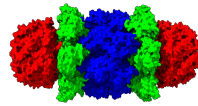
ADN-polimeraza poate atașa nucleotide de o catenă deja existentă, de aceea pentru inițierea replicării în zonele monocatenare se atasează o oligo-nucleotidă amorsă ARN sintetizată pe bază de complementaritate de către o enzimă specifică – **ADN primază (DnaG)**. Oligo-nucleotida amorsă produsă oferă capătul 3' necesar inițierii polimerizării.

3. Sinteza propriu-zisă a celor două catene

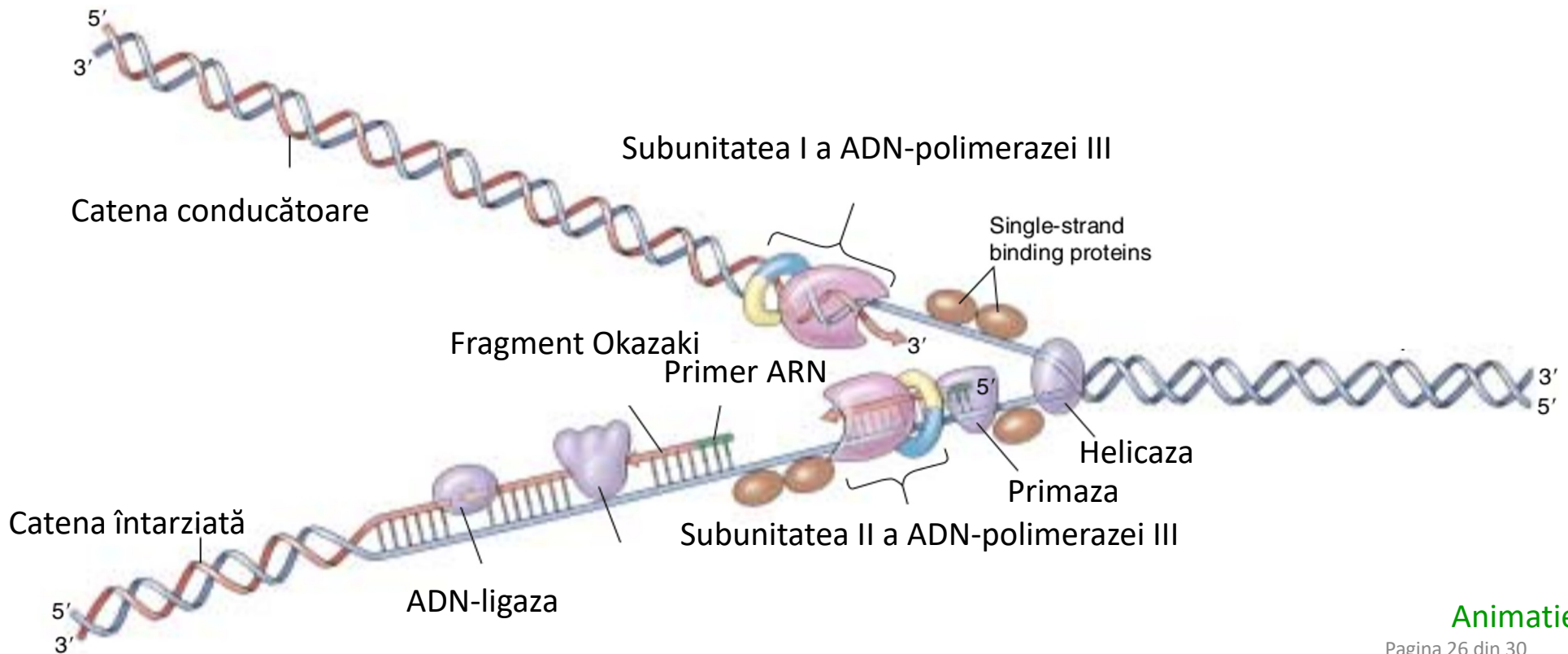
ADN-polimeraza dimeră se leagă de **furca de replicare** – o subunitate de o catenă, cealaltă de a doua catenă. Pe baza celor două catene matriță, se produc simultan două catene noi, după cum urmează:

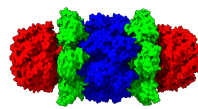
- în cazul **catenei matriță cu direcția 5' → 3'** - ADN-polimeraza începe să încorporeze nucleotide pornind de la oligonucleotida amorsă ARN în direcția 3' → 5', adică spre furca de replicare – **catenă conducătoare**

Mecanismul molecular al replicării ADN-ului



- în cazul **catenei matrice cu direcția 3' → 5'** - ADN-polimeraza începe să încorporeze nucleotide pornind de la oligonucleotida amorsă ARN tot în direcția 3' → 5' de această dată dinspre furca de replicare, îndepărtându-se de aceasta. Sintetizează un fragment scurt de ADN (100-200 de nucleotide la EK, 1000 – 2000 nucleotide la PK), după care eliberează catena și se amplasează din nou lângă furca de replicare, unde este o nouă oligonucleotidă amorsă și procesul se reia. Sinteza nu este continuă, ci sub forma unor fragmente scurte - **fragmente Okazaki**. Catena se numește - **catenă întârziată**.



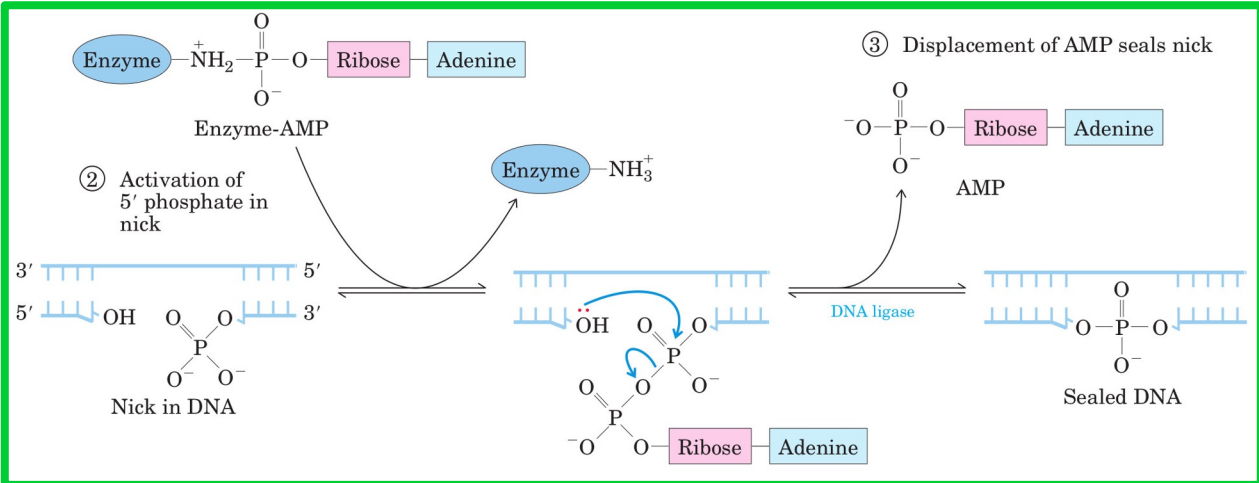
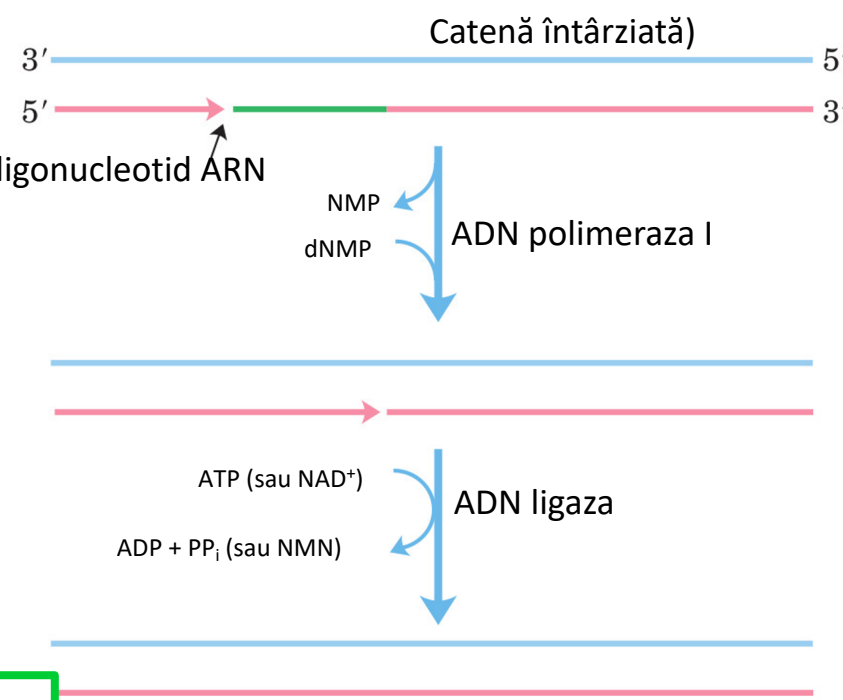


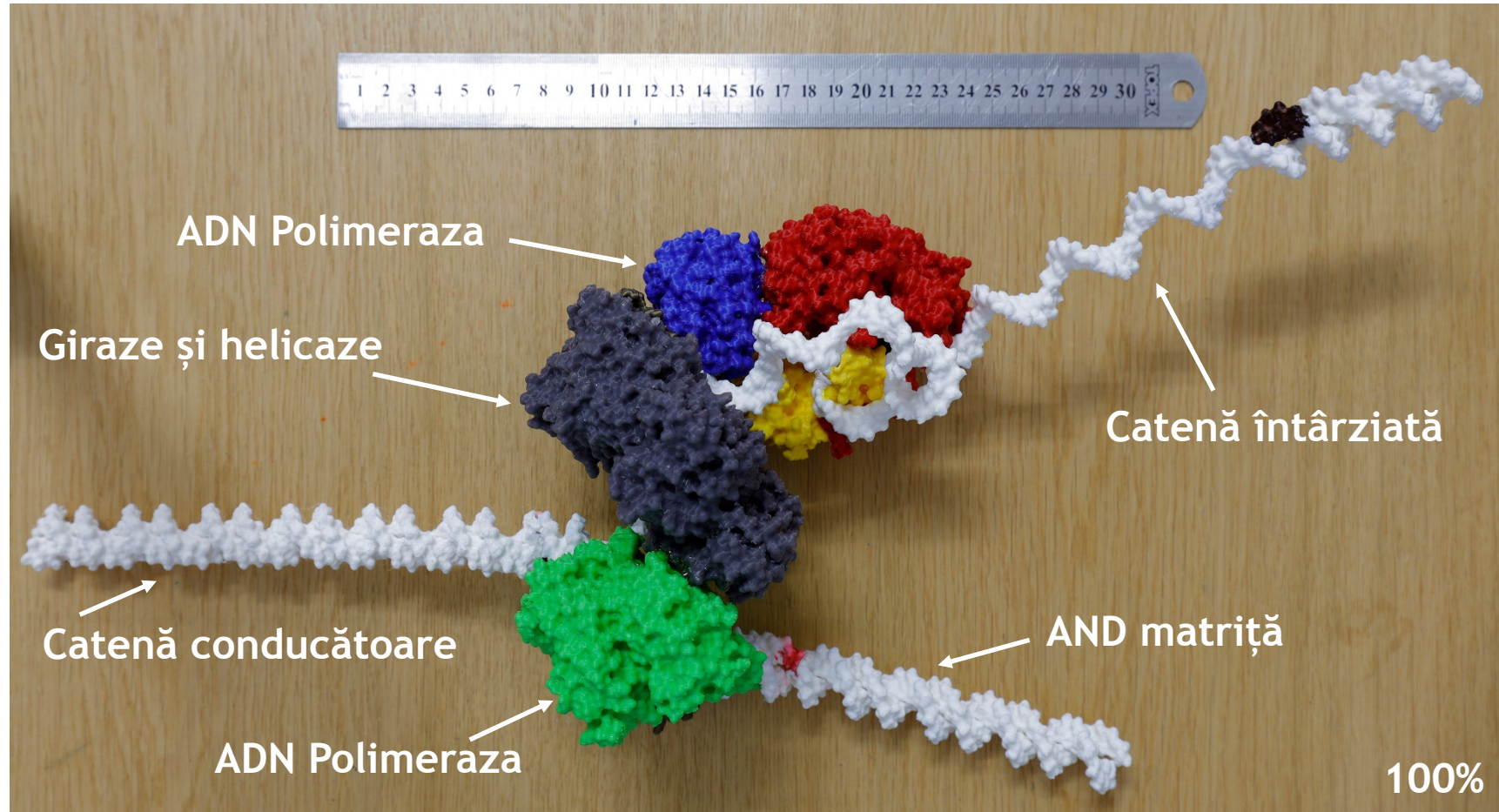
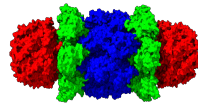
4. Eliminarea oligonucleotidelor amorsă

O altă enzimă - **ADN-polimeraza I** hidrolizează oligonucleotidele ARN și sintetizează în locul lor catene de ADN, atât pe catena conducătoare cât și în zonele de la începutul fragmentelor Okazaki. Între 2 fragmente Okazaki rămâne însă o legătură fosfodiestică 5' → 3' pe care polimeraza nu o poate forma.

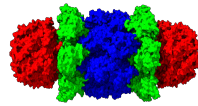
5. Ligarea fragmentelor Okazaki

- fragmentele Okazaki sunt apoi conectate de către **ADN-ligază** ce poate realiza legături fosfodiesterice între un OH 3' și o grupare PO₄ 5'. Enzima din EK folosește ATP, iar cea din PK - NAD⁺.

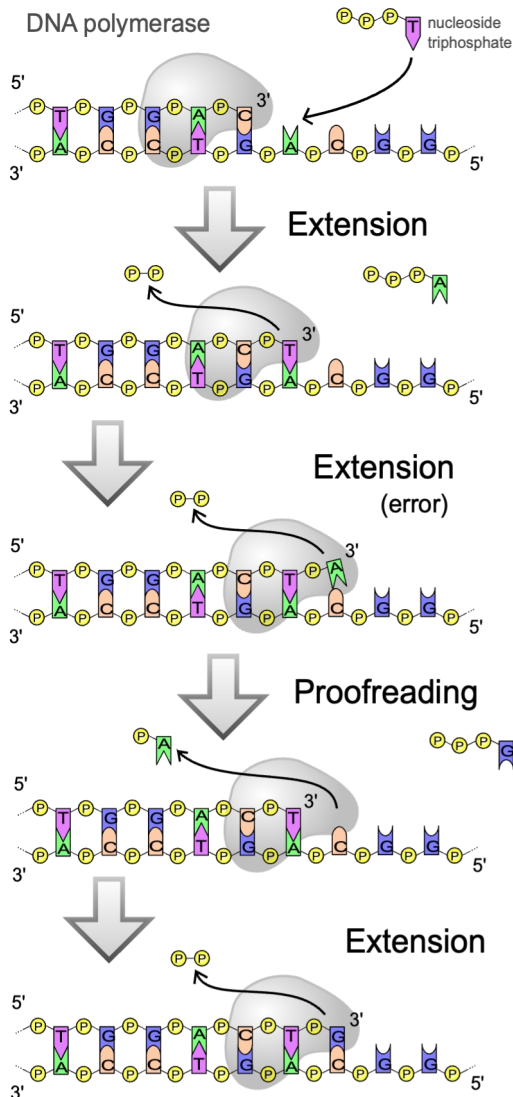




Mecanismul de corectare al bazelor inserate greșit

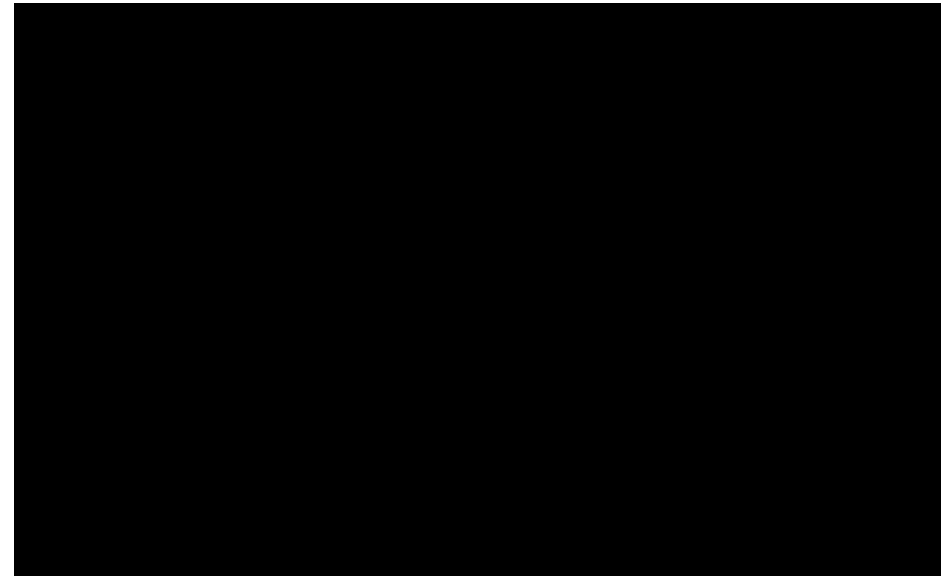


Subunitatea catalitică a ADN polimerazei are o rată de eroare de o bază greșită la $10^4 - 10^2$ nucleotide încorporate. Rata de eroare a DNA polimerazei per ansamblu, adică a replicării este de o bază greșită la $10^6 - 10^8$ nucleotide încorporate.

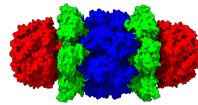


Diferența de datorează existenței unui mecanism de **proof-reading** - eliminarea bazelor azotate introduse greșit de domeniul catalitic al ADN-polimerazei prin intermediul unei activități 3'-5' exo-nucleazice a DNA-polimerazei.

Thomas A. Kunkel -DNA Replication FidelityJ. Biol. Chem. 2004 279: 16895-16898. First Published on February 26, 2004,doi:10.1074/jbc.R400006200



Particularitățile structurale AND-ului sunt corelate cu rolul acestuia

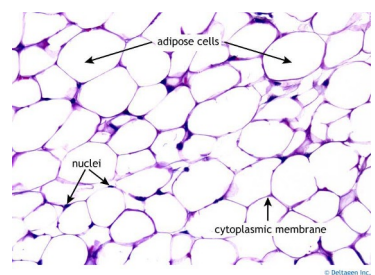


Molecula de ADN conține toată informația necesară funcționării celulei până la următoarea diviziune. Această informație trebuie să:

1. fie împachetată într-un volum mic;

1 cromozon de *E. coli* conține o molecula circulară dublu catenară de 4,639,221 pb ce are un perimetru de 1.7 mm (de 850 ori mai mare decât lungimea celulei);
ADN-ul dintr-o celulă umană – cele 46 de molecule de ADN duble din cei 44 de cromosomi somatici plus XY sau XX amplasate cap la cap au o lungime de peste 2 metri. ADN-ul din toate celulele corpului unui om (10^{14}) are o lungime totală de 2×10^{11} km (circumferința Pământului este de 4×10^4 km, distanța Pământ – Luna $1,5 \times 10^{18}$ km)

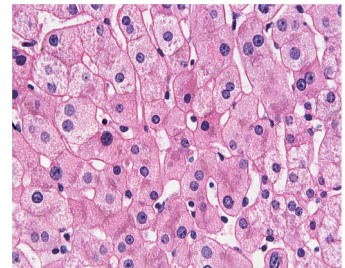
2. fie accesibil în orice moment, funcție de specificul (rolul, diferențierea) celulei;



Adipocit - aprox. 12 500 gene sunt active

Genomul uman conține 25 – 35 000 de gene ce codifică proteine.

8000 de gene sunt active simultan în celulele tuturor țesuturilor.



Hepatocit - aprox. 11 000 gene active

3. fie păstrată intactă și nealterată.

În corpul uman secvența și structura ADN-ului sunt deteriorate cu o rată de 10 000 – 1 000 000 leziuni moleculare / zi / celulă – 0,000165% din genomul unei celule umane este afectat zilnic. Cu toate acestea informația este nealterată.

Ramsköld D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R (2009) An Abundance of Ubiquitously Expressed Genes Revealed by Tissue Transcriptome Sequence Data. PLoS Comput Biol 5(12): e1000598. doi:10.1371/journal.pcbi.1000598

Tissue/Cell	Number of genes*	Fraction of genes*	Ensembl genes†
Skeletal muscle ¹	11,276	0.61	11,953
Liver ^{1,3}	11,392	0.61	12,191
BT474 ⁴	11,844	0.64	12,808
MB435 ⁴	11,847	0.64	12,726
HME ⁵	12,084	0.65	12,920
T47D ⁴	12,205	0.66	12,983
Heart	12,209	0.66	13,159
MCF7 ⁴	12,281	0.66	13,216
Adipose tissue	12,553	0.68	13,503
Colon	13,016	0.70	14,052
Cerebellum ^{2,3}	13,132	0.70	14,043
Kidney	13,235	0.71	14,177
Brain ¹	13,298	0.71	14,107
Breast	13,406	0.72	14,537
Lymph node	13,534	0.73	14,686
Testes	15,518	0.84	16,869

*annotations from RefSeq, protein-coding genes.
†number of protein-coding genes, annotations from Ensembl.
¹number of genes detected in mouse: skeletal muscle 11,799; liver 11,201; brain 13,626.
²standard deviation for samples from different individuals: 106.
³mean number for different individuals.
⁴breast cancer cell line.
⁵human mammary epithelial cell line.
doi:10.1371/journal.pcbi.1000598.t002

Detalii suplimentare legate de punctele 2 și 3 sunt prezentate în cadrul cursului:
Structura și metabolismul macromoleculelor informaționale, Master Genetică Moleculară, An I