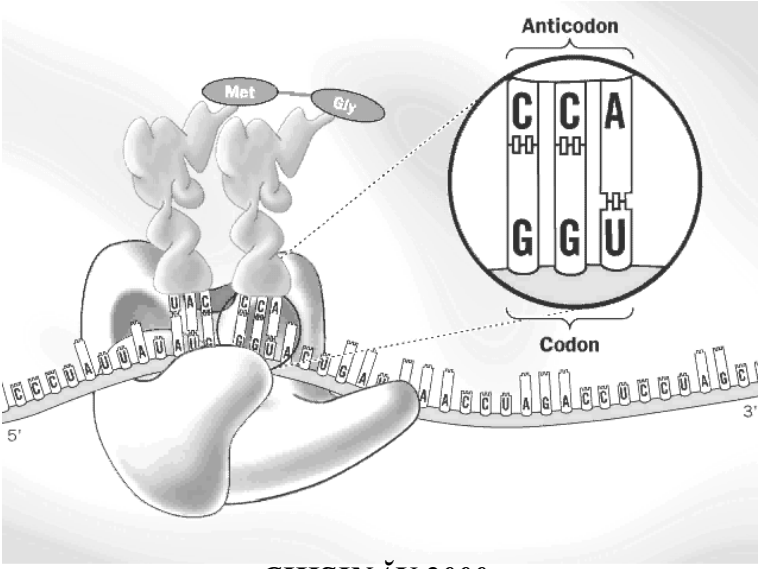
M S R M

USMF "Nicolae Testemiţanu"

CURS DE

BIOLOGIE MOLECULARĂ



CHIŞINĂU 2000

IGOR CEMORTAN
SVETLANA CAPCELEA
LARISA ŢARANOV
DUMITRU AMOAŞII

Curs de

BIOLOGIE MOLECULARĂ

USMF "NICOLAE TESTEMIŢANU"
CHIŞINĂU 2000

CZU 577.1/2
C 95

Colectivul de autori
Colaboratorii Catedrei de Biologie moleculară şi Genetică umană USMF "N. Testemiţanu":

Igor Cemortan – conferenţiar, doctor în ştiinţe biologice
Svetlana Capcelea – lector superior, doctor în ştiinţe medicale
Larisa Ţaranov – conferenţiar, doctor în ştiinţe medicale
Dumitru Amoaşii – conferenţiar, doctor în ştiinţe medicale

Recenzenţi:

Leonid Lîsîi – profesor universitar , doctor habilitat , şeful catedrei de Biochimie, USMF "N. Testemiţanu"
Nicolae Eşanu - conferenţiar universitar, doctor în ştiinţe medicale, şeful Catedrei de Histologie şi Embriologie, USMF "N. Testemiţanu"
Galina Lupaşcu – doctor habilitat în ştiinţe biologice, şeful Laboratorului de Imunogenetică, AŞM

Manualul a fost aprobat de Comisia Metodică Centrală a USMF "N. Testemiţanu" (2 noiembrie 2000). Cursul este elaborat conform Programului Universitar pentru studenţii Facultăţii de Medicină generală USMF "N. Testemiţanu".

Coordonator ştiinţific:
Nicolae Barbacaru – Conferenţiar universitar, doctor în ştiinţe biologice, Şeful Laboratorului de Biologie moleculară, AŞM

Consultant:
Natalia Cherdivarenco – Profesor universitar, doctor habilitat în ştiinţe medicale, Catedra de Biologie moleculară şi Genetică umană, USMF "N. Testemiţanu"

Redactor:
Olga Tagadiuc - conferenţiar universitar, doctor în ştiinţe medicale, Catedra de Biochimie USMF "N. Testemiţanu"

Desene şi tehnoredactare computerizată – Valeriu Gudima, inginer

"Viaţa este distinctă, faţă de celelalte fenomene naturale, printr-o singură trăsătură: ea are un program … (care este) înscris într-o substanţă unică, substanţa genelor…"

Salvador Luria

genetician

Laureat al Premiului Nobel

Ultimele decenii se caracterizează printr-o dezvoltare rapidă a bazelor tehnologiilor biologiei moleculare. Descifrarea genomului uman a produs un decalaj vizibil între informaţiile pe care le putem obţine în baza microscopiei electronice vizavi de mijloacele molecular-biologice. Ritmul intens al acumulării datelor lasă prea puţin timp sistematizărilor, analizelor critice şi conceptualizărilor riguroase.

Medicina actuală este o ***medicină moleculară****, având următoarele realizări:*

- ***elucidarea mecanismelor patogenice*** *ale bolilor genetice şi a celor cu predispoziţie genetică (cancer, boala coronariană);*
- ***diagnosticul genotipic****: presimptomatic sau prenatal;*
- ***farmacologia genomică*** *- blocarea expresiei sau replicării genelor mutante (SIDA);*
- ***terapia genică*** *- introducerea de gene normale în celulele somatice ale unor bolnavi cu gene mutante;*
- ***profilaxia individualizată a bolilor.***

Cuprins

Cuvânt înainte 1
SISTEME BIOLOGICE 6
Organizarea sistemelor biologice 6
Nivele de organizare a sistemelor biologice 7
Formele acelulare de viaţă 9
Celula – unitatea elementară structural-funcţională a viului . 12
Metodele de studiu utilizate în cercetarea celulelor 16
Unele realizări importante în biologia celulei 18
Verificarea cunoştinţelor: 20
ORGANIZAREA CHIMICĂ A MATERIEI VII 21
Componenta neorganică a organismelor vii 22
Componenta organică a materiei vii 24
ACIZII NUCLEICI 32
Acidul dezoxiribonucleic 32
Acizii ribonucleici 42
Verificarea cunoştinţelor: 45
MEMBRANELE BIOLOGICE 46
Organizarea moleculară a membranelor 47
Membrana plasmatică 51
Particularităţile membranelor interne 51
Biogeneza şi evoluţia membranelor 53
Transportul prin plasmalemă 54
Adeziunea celulară 60
Verificarea cunoştinţelor: 62

COMPARTIMENTARA CELULEI EUCARIOTE 63
Reticulul endoplasmatic 64
Aparatul (complexul) Golgi. 66
Lizozomii 69
Peroxizomii 71
Mitocondriile 73
Citoscheletul 76
Verificarea cunoştinţelor: 80
PROCARIOTELE 81
Învelişul celular al bacteriei 82
Bacteriile *Gram – pozitive* 82
Bacteriile *Gram-negativ*e 85
Flagelii şi pilii 86
Componente intracelulare 87
Aparatul genetic al celulelor bacteriene 88
Recombinarea genetică la bacterii 90
Verificarea cunoştinţelor 93
NUCLEUL 94
Anvelopa nucleară 96
Nucleolul 99
Biogeneza ribozomilor 101
Cromatina = cromozomii interfazici 101
Nivelurile de organizare a cromozomilor 103
Verificarea cunoştinţelor: 108
REPLICAREA ŞI REPARAREA ADN 109

Aparatul de replicare 109
Mecanismul replicării 114
Etapele replicării 116
Modele de replicare 117
Reparaţia ADN 121
Metilarea ADN 123
Verificarea cunoştinţelor: 125
GENA 127
Funcţia genei 128
Organizarea moleculară a genelor 129
Particularităţile organizării genelor structurale la eucariote 131
Particularităţile organizării genelor pentru ARNr şi ARNt la eucariote 136
Particularităţile organizării genelor la procariote 137
Particularităţile organizării genomului uman 138
Transpozonii 143
Verificarea cunoştinţelor: 146
TRANSCRIPȚIA. PROCESSINGUL ARN 147
Transcripţia la eucariote 148
Transcrierea genelor de clasa II 149
Processingul ARN 154
Editarea ARN 159
Particularităţile transcripţiei genelor de clasa I şi clasa III 159
Reglarea transcripţiei la eucariote 159
Nivelele de reglare ale transcripţiei 160

Transcripţia la procariote 163
Verificarea cunoştinţelor 164
TRANSLAŢIA 165
Proprietăţile codului genetic 165
Aparatul de translaţie 168
Mecanismul translaţiei 173
Reglarea translaţiei 178
Particularităţile translaţiei în mitocondrii 180
Verificarea cunoştinţelor: 181
TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT 182
Izolarea acizilor nucleici 183
Obţinerea fragmentelor de interes 184
Clonarea ADN 186
Biblioteci de ADN 189
Hibridarea acizilor nucleici 192
Verificarea cunoştinţelor: 193
TEHNICI DE ANALIZĂ A GENELOR 194
Secvenţierea ADN 195
Tehnica Southern-blot 198
Tehnica Northern-blot 199
Tehnica Western-blot 200
Tehnica PCR în analiza genelor 200
Hibridarea *in situ* 202
Verificarea cunoştinţelor: 203
CICLUL CELULAR 204

Interfaza 205
Mitoza şi citochineza 206
Reglarea ciclului celular 208
Evoluţia celulelor după diviziune 214
Verificarea cunoştinţelor:..... 219
RECOMBINAREA GENETICĂ 220
Recombinarea genetică la eucariote..... 220
Mecanismul molecular al crossing-overului 232
Recombinarea genetică la procariote 233
Verificarea cunoştinţelor:..... 235
BIBLIOGARFIE 236

Cuvânt înainte

Cursul de Biologie Moleculară oferă studentului–medic o înţelegere amplă privind funcţiile celulei în termeni moleculari. Aceste cunoştinţe vor fi utile şi pentru înţelegerea mai profundă a conţinutului unor discipline tradiţionale ca: histologia, citologia, anatomia, embriologia, fiziologia, genetica şi evoluţia.

Cursul de Biologie Moleculară prezintă într-un mod foarte sumar ipotezele privind structura morfologică şi moleculară a celulei, organizarea şi funcţiile componentelor celulare în termeni moleculari şi procesele genetice de bază exprimate la nivel celular. O realizare importantă a cursului este şi redarea cunoştinţelor contemporane cu privire la unele aspecte patologice ale celulei – anomaliile membranelor şi citoscheletului şi ontogenetice – senescenţa şi moartea celulară, cît şi a elementelor de bază ce determină evoluţia malignă a celulelor. Cursul prevede necesitatea ulterioară de integrare cu informaţiile ce vor fi prezentate mai detaliat la alte discipline, cum ar fi: genetica, biochimia, fiziologia, virusologia, microbiologia, histologia, anatomia etc.

***

Cu ocazia tipăririi acestei cărţi avem posibilitatea să le exprimăm gratitudinea noastră tuturor care au contribuit la realizarea acestui curs.

În primul rând dorim să mulţumim D-lui conferenţiar, doctor în ştiinţe biologice Nicolae Bărbăcaru, şeful laboratorului de Biologie Moleculară la Institutul de Genetică a AŞM, care ne-a inspirat interesul către această ramură a biologiei, ne-a sfătuit şi ne-a coordonat partea ştiinţifică a acestui curs.

Recunoştinţa noastră este îndreptată spre prim-vice Rectorul USMF "N.Testemiţanu" Profesorul Petru Galeţchi care ne-a încurajat editarea acestui curs.

În mod deosebit dorim să mulţumim recenzenţilor Cursului dat D-lui Decan al Facultăţii de Medicină Generală conferenţiar Nicolae Eşanu, D-lui Profesor Leonid Lîsîi, D-ei doctor habilitat în ştiinţe biologice Galina Lupaşcu, şefa laboratorului de Imunogenetică la Institutul de Genetică a AŞM.

Elementele esenţiale pe care studentul trebuie să le cunoască:

- Biologia moleculară este disciplina care studiază organizarea şi structura moleculara a celulelor şi cooperarea acestora întru realizarea unui organism atât de complex ca fiinţa umană.
- Celula normală este o celulă care recepţionează şi coordonează semnale biologice complexe, provenite de la surse foarte diferite, şi la care ea răspunde printr-o expresie corectă a funcţiilor de diferenţiere şi proliferare.
- Substratul material al eredităţii şi variabilităţii organismelor vii este reprezentat de ADN – principalul deţinător de informaţie genetică pe care o realizează în procesul sintezei proteinelor. Prin replicarea fidelă a moleculelor de ADN acest mesaj se transmite descendenţilor, astfel asigurându-se continuitatea vieţii.
- Spre deosebire de celulele procariote care sunt construite dintr-un singur compartiment limitat de o membrană plasmatică, celulele eucariote sunt constituite din multiple compartimente funcţional distincte, fiecare fiind delimitat de membrană proprie. Aceste compartimente care prezintă în fond o colecţie de structuri subcelulare, au fost denumite organite celulare. Fiecare organit joacă un rol unic în creşterea şi metabolismul celulei şi conţine o colecţie specifică de enzime şi alte molecule specializate. Comunicarea între aceste compartimente se face printr-un sistem complex de distribuţie care asigură trecerea produselor specifice dintr-un compartiment în altul.
- Organismele multicelulare depind de capacitatea celulelor eucariote de a-şi exprima informaţia ereditară într-un mod diversificat (diferenţierea celulară), realizarea asocierii

celulelor şi stabilirea unui sistem de conexiune intercelular. La om întâlnim mai mult de 200 tipuri celulare, care apar în mod net distincte. Acestea stau la baza formării diferitor tipuri de ţesuturi. Creşterea şi diferenţierea celulelor se realizează după un program genetic bine stabilit. Unele gene sunt activate sau represate în funcţie de necesităţile celulelor.

- Diviziunea mitotică stă la baza multiplicării celulelor, asigură creşterea organismului pluricelular, determină citologic biomasa organismului. La organismele cu reproducere sexuată există un tip deosebit de diviziune – meioza, proces prin care din celule cu nuclee diploide rezultă celule cu nuclee haploide – gameţii. Prin contopirea gameţilor haploizi se formează zigotul diploid (celulă unică) care stă la originea dezvoltării organismului. Declanşarea, derularea şi succesiunea evenimentelor implicate în diviziunea celulară se află sub controlul a numeroşi factori intra- şi extracelulari: formarea şi disocierea complexelor *ciclină-protein kinaze dependente de ciclină* (cdk); proteine senzor ale creşterii celulare; factori de creştere; densitatea celulară; proteine inplicate în adeziunea celulară; proteine codificate de antioncogene (pRB, p53).
- Pe lângă proliferare şi diferenţiere, în organism, celulele a căror funcţie este epuizată, sunt înlăturate şi înlocuite de celule tinere. Înlăturarea este un proces fiziologic şi a fost numit apoptoză. În mod obişnuit apoptoza asigură homeostazia organelor prin participarea la *turnover*-ul celular. Procesul apare în cursul dezvoltării normale a embrionului, involuţia organelor provizorii, pierderea celulelor interdigitale la embrionul uman, selecţia clonală în sistemul imun.
- Capacitatea proliferativă a celulei normale este controlată de gene care stimulează (protooncogene) şi de gene care inhibă (antioncogene) multiplicarea celulară. Cancerul apare din

cauza unui dezechilibru dintre cele două seturi de gene, favorizând proliferarea nelimitată.

- Biologia moleculară s-a dezvoltat datorită apariţiei unor noi tehnici avansate de microscopie electronică, folosirii culturilor celulare, realizării anticorpilor monoclonali, tehnologiei ADN-recombinant, manipulării genice şi ştiinţei computerilor, factori care au demonstrat puterea lor analitică şi au permis unificarea experimentului biologic, a substratului molecular şi a terminologiei.

Importanţa practică

a cunoştinţelor acumulate de studenţi la cursul de

BIOLOGIE MOLECULARĂ:

Cunoaşterea organizării şi a funcţiilor celulei normale va asigura studentului un suport substanţial pentru înţelegerea cunoştinţelor necesare altor discipline şi perceperea mai bună a fenomenelor patologice la nivel celular şi molecular. În plus, studentul şi viitorul medic sau cercetător va putea înţelege şi chiar contribui (dacă are şi imaginaţie) la elaborarea unor noi medicamente cu acţiune specifică, unor noi strategii în prevenirea, diagnosticul şi terapia numeroaselor boli.

Descoperirea tehnicilor de analiză directă a genei - tehnica ADN-ului recombinat - constituie o revoluţie tehnologică în biologie şi medicină.

Pentru orice maladie, debutul, starea şi finalitatea alterărilor au un singur sediu – celula – cu infrastructurile sale specifice în funcţie de calitatea şi topografia acestora. De aceea viitorul medic urmează a fi neapărat familiarizat cu bazele moleculare ale organizării celulelor în normă şi patologie.

1

SISTEME BIOLOGICE

Sistemul biologic la nivel molecular reprezintă un complex de biopolimeri (acizi nucleici, proteine, lipide, glucide) ce interacţionează între ei, asigurând fluxul permanent de informaţie, energie şi materie. Programul activităţii sistemului biologic este înscris în macromoleculele de ADN. Realizarea acestuia se efectuează prin intermediul diferitor tipuri de proteine.

Organizarea sistemelor biologice

Sistemele biologice se caracterizează printr-o serie de particularităţi:

– ***autoreproducerea*** – proprietatea sistemelor biologice de a forma sisteme noi prin divizarea unor sisteme iniţiale (de ex., 1 moleculă ADN → 2 molecule ADN; 1 celulă → 2 celule; etc.). Are ca bază proprietatea moleculelor acizilor nucleici de a se replica.

– ***autoconservarea*** – proprietatea sistemelor vii de a rămâne neschimbate în timp (de ex., existenţa speciilor de-a lungul timpului). Se bazează pe capacitatea acizilor nucleici (ADN) de a se replica, formând molecule noi cu acelaşi conţinut şi structură şi pe cea de repartizare uniformă a materialului genetic în timpul diviziunilor celulare.

– ***autoreglarea*** – capacitatea sistemelor biologice de a se regla singure. Se realizează după un mecanism ***feedback*** prin care rezultatul final al unor procese reglează procesul în

întregime (de ex., cantitatea de hormon în sânge determină activitatea glandei care elimină hormonul; numărul de indivizi dintr-o populaţie determină rata natalităţii).

– ***metabolismul*** – reprezintă schimbul de substanţe din cadrul organismului. Metabolismul se caracterizează prin ***selectivitate*** (preluarea din mediu nu a oricăror substanţe, ci doar a celor necesare) şi ***specificitate*** (proprietate prin care substanţele nutritive preluate din exterior sunt transformate în substanţe mai simple, din care apoi se sintetizează molecule caracteristice organismului dat).

– ***echilibrul dinamic*** – însuşirea care explică în cel mai înalt grad modalităţile de păstrare a individualităţii, organizării şi funcţionării unui sistem în cadrul anumitor limite, în timp şi în spaţiu. Menţinerea echilibrului dinamic a stării de ***homeostazie*** a sistemelor biologice se realizează în baza mecanismelor de autoreglare.

– ***integralitatea*** – capacitatea sistemului de a funcţiona ca un tot întreg în raport cu mediul, fiind compus din subsisteme ierarhizate (de ex., un organism este format din organe subordonate, care la rândul lor constau din ţesuturi, formate din celule etc.).

Nivele de organizare a sistemelor biologice

Materia vie are câteva nivele de organizare, enumerate mai jos de la de la micro- spre macronivele.

Molecular – reprezentat de moleculele din care sunt formate organismele. În compoziţia materiei vii sunt prezente atât substanţe anorganice (apa, ioni anorganici), cît şi substanţe organice. Dintre acestea o importanţă decisivă o au biopolimerii (acizi nucleici, proteine, polizaharide), dar şi substanţele mai simple, cum ar fi mono-, di-, oligozaharidele şi lipidele.

Celular – reprezentat de celule atât procariote, cât şi eucariote; atât cele ce duc o viaţă solitară, cât şi cele din componenţa organismelor pluricelulare.

Scara obiectelor biologice

Nivel celular

Ameba	100 μm
Majoritatea celulelor eucariote	50 μm ↕ 10 μm
Majoritatea celulelor procariote	5 μm ↕ 1 μm
Cel mai mare virus	300 nm
Cea mai mică bacterie	100 nm
Cel mai mic virus	20 nm

Nivel subcelular

Diametrul nucleului	10 μm ↕ 5 μm
Mitocondria	1 μm
Cromozomul metafazic	200 nm
Diametrul ribozomului	20 nm

$1 \mu m = 10^{-6} m$

$1 nm = 10^{-9} m$

$1 \mu m = 1000 nm$

Nivel molecular

Lungimea moleculei de colagen	300 nm
Diametrul unei proteine globulare	4 nm
Diametrul unui aminoacid	0,5 nm
Diametrul atomului de carbon	0,3 nm

Tisular - celulele specializate cu funcţii şi structură similare formează ţesuturi. Prin asocierea programată a diferitor ţesuturi se formează organe şi sisteme de organe ce asigură fiziologia organismului pluricelular.

Individual – reprezentat de organisme separate, acelulare (virusuri), monocelulare (procariote şi eucariote) şi pluricelulare.

Populaţional – grupuri de indivizii din aceeaşi specie, separate geografic.

Biocenotic – totalitatea comunităţilor de organisme vii ce convieţuiesc pe un anumit teritoriu.

Biosfera – ansamblul materiei vii de pe Pământ.

Formele acelulare de viaţă

Există entităţi biologice care nu se încadrează în definiţia viului şi nu se caracterizează prin toate proprietăţile materiei vii: autoreproducere, autoreglare, autoregenerare. Acestea sunt virusurile şi prionii, care nu au un metabolism propriu şi nu se înmulţesc în afara gazdei pe care o parazitează. Aceşti agenţi sunt nişte paraziţi obligatorii care provoacă boli la diferite organisme. În timp ce virusurile ocupă o poziţie intermediară între materia vie şi cea nevie, prionii sunt doar nişte agenţi infecţioşi şi nu pot fi clasificaţi la organismele vii.

Virusurile

Din punct de vedere structural, virusurile sunt formate dintr-o capsulă proteică, numită capsidă, în interiorul căreia se conţine o moleculă de ADN sau ARN mono- sau bicatenar (fig. 1.1). Uneori pot avea la suprafaţă o membrană, care provine din membrana gazdei distruse. Capsida virală poate avea cele mai diverse forme: sferică, ixoedrică, de bastonaş etc.

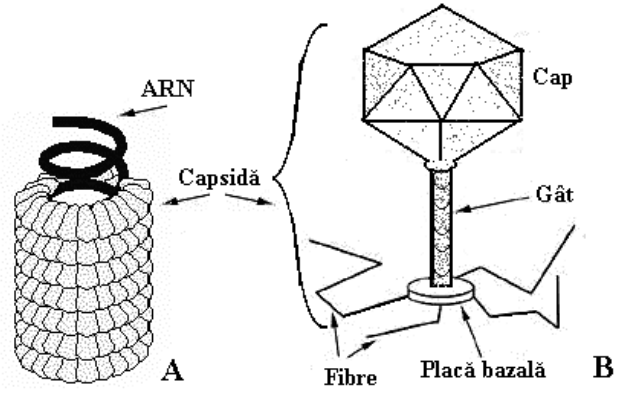


Fig. 1.1. Structura unor virusuri
A – virusul mozaicului tutunului
B – bacteriofagul λ

Dimensiunile virusurilor variază în limitele 20-250 nm. Atunci când virusurile se află în afara celulei-gazdă ele sunt inerte din punct de vedere metabolic – nu se înmulţesc, nu consumă şi nu elimină nimic în exterior. Astfel, virusurile reprezintă paraziţi genetici obligatorii. În momentul contactului particulei virale cu celula-gazdă, materialul genetic al parazitului este injectat în interiorul gazdei. Utilizând resursele şi aparatul enzimatic al gazdei are loc multiplicarea particulelor virale, urmată de distrugerea celulei. Astfel de multiplicare poartă denumirea de ***ciclu litic***. Unele virusuri pot rămâne în stare latentă mai mult timp, fiind integraţi în ADN-ul gazdei, această stadie numindu-se ***profag***. Sub acţiunea anumitor factori din exterior are loc inducţia sau reactivarea virusului. ADN viral se excizează din genomul gazdei şi se transferă în citoplasmă. La această etapă este cunoscut sub denumirea de ***virus vegetativ***. Particulele virale se multiplică pe baza sistemului metabolic celular, după care are loc distrugerea

gazdei. Acest tip de virusuri se numesc virusuri cu ***ciclu lizogenic*** (fig. 1.2).

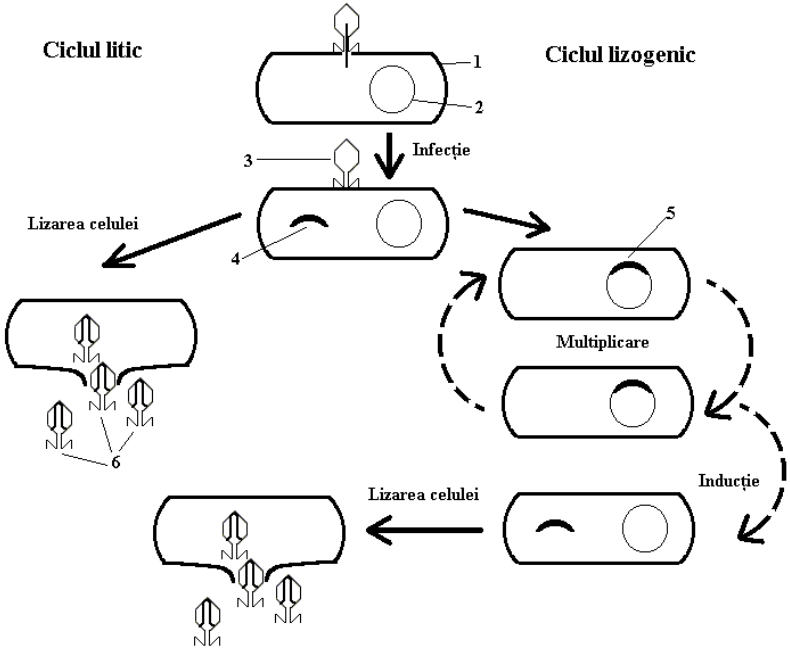


Fig. 1.2. Ciclul litic şi ciclul lizogenic de dezvoltare a bacteriofagilor.
1 – celula-gazdă; 2 – ADN-ul gazdei; 3 – capsula virală; 4 – ADN viral; 5 – ADN viral integrat în ADN-ul gazdei; 6 – particule virale noi

O trăsătură caracteristică pentru virusuri este specificitatea înaltă faţă de celulele infectate, aceasta fiind determinată atât de specie, cât şi ţesutul infectat. Totodată, există virusuri care pot infecta câteva specii înrudite. Virusurile sunt agenţi patogeni care provoacă foarte multe boli: gripa, răceala, SIDA, herpesul, hepatitele, poliomielita etc. De asemenea, unele forme de cancer se asociază cu infecţiile virale. Prin infecţia diferitor organisme virusurile pot transporta

informaţia genetică de la un individ la altul, sau chiar între indivizii diferitor specii.

Prionii

Prionii reprezintă nişte secvenţe de peste 250 aminoacizi, dar spre deosebire de proteinele celulare obişnuite, care se sintetizează pe baza ARNm, pentru prioni nu este caracteristică existenţa unor ARNm corespunzători. Ei prezintă rezultatul degradării incomplete a unor proteine celulare normale. Ca rezultat al acţiunii acestor agenţi patogeni, proteinele normale îşi modifică conformaţia, ceea ce le face incapabile de a mai funcţiona normal. Prionii sunt cauza unor boli neurodegenerative şi musculare. Adesea bolile reprezintă nişte encefalopatii spongiforme care duc la degradarea creierului. Astfel de maladii se întâlnesc atât la oameni, cât şi la animale (mai ales bovine şi ovine). Una dintre cele mai răspândite este ***scarpia***, întâlnită la vitele mari cornute. Dintre bolile umane cauzate de prioni cea mai cunoscută este ***Kuru***, întâlnită între aborigenii din Papua Noua Guinee, la care este răspândit canibalismul ritual, el fiind şi mijlocul de transmitere a agentului infecţios. Bolile prionice pot fi de asemenea moştenite cu frecvenţa 1:1000000.

Celula – unitatea elementară structural-funcţională a viului

Celula reprezintă un sistem complex, caracterizat prin:

- autoreproducere;
- autoreglare :
- autoreînnoire.

Fiecare celulă este delimitată de mediul extern printr-o ***membrană plasmatică*** care are o structură lipoproteică (fig. 1.3). Membrana plasmatică (plasmalema) permite

individualizarea celulelor, realizarea schimbului de substanţe dintre mediul intern şi cel extern, astfel autoreglând compoziţia chimică a celulei. Toate celulele conţin ***material genetic sub formă de ADN***. În moleculele de ADN se conţine informaţia despre organizarea şi funcţionarea fiecărei celule. Datorită

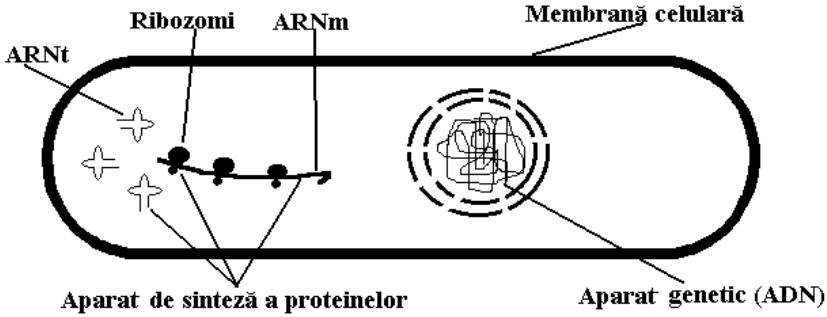


Fig. 1.3. Componentele principale ale celulelor

capacităţii moleculelor de a se autoreproduce, celulele nou formate conţin acelaşi material ereditar. În celulele organismelor pluricelulare se conţine ADN cu acelaşi mesaj genetic. În funcţie de localizarea moleculelor de ADN – în citoplasmă sau nucleu, toate celulele se clasifică în procariote şi eucariote.

Un alt component obligatoriu al celulelor este reprezentat de ***citoplasmă***, în care se desfăşoară toate procesele metabolice celulare – sinteza şi degradarea substanţelor, obţinerea energiei etc. În citoplasmă este localizat şi ***aparatul de sinteză a proteinelor*** – component obligatoriu al fiecărei celule. Sinteza proteinelor se efectuează în baza moleculelor de ARNm cu ajutorul ribozomilor şi a moleculelor ARNt .

Celulele procariote

Din procariote fac parte bacteriile, micoplasmele, cianobacteriile (algele cianofite). Toate procariotele sunt organisme monocelulare sau coloniale, aerobe sau anaerobe, cu

dimensiuni 1–10 μm. Celulele procariote se caracterizează prin lipsa nucleului bine evidenţiat, materialul ereditar reprezentat prin molecule de ADN inelar (fig. 1.4), plasat direct în citoplasmă şi numit ***nucleoid***.

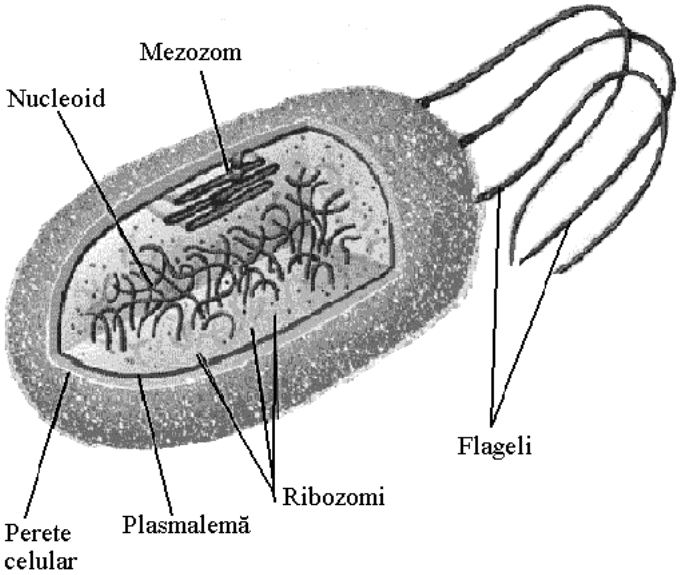


Fig. 1.4. Structura generală a unei celule bacteriene

O altă însuşire distinctivă a procariotelor este lipsa organitelor mebranare. Sistemele enzimatice sunt localizate în citoplasmă, pe plasmalemă sau pe mezozomi. Sinteza proteinelor la procariote se efectuează cu ajutorul ribozomilor cu coeficientul de sedimentare 70S (50S + 30S). Reproducerea celulelor se realizează prin diviziune directă (amitotică). Multe bacterii au un rol patogen important, fiind cauza numeroaselor boli infecţioase (tuberculoza, pneumonia, meningita, sifilisul, holera, difteria). Unele bacterii (*Escherichia coli)* sunt utilizate în biotehnologia modernă: producerea medicamentelor, obţinerea unor substanţe biologic active, clonarea genelor.

Celulele eucariote

Eucariotele reprezintă celule nucleate, de regulă cu dimensiuni cuprinse între 10-1000 μm, care formează organismele monocelulare, coloniale şi pluricelulare. ***Nucleul*** conţine majoritatea ADN-ului celular şi este principalul loc unde se desfăşoară sinteza ARN-ului. ***Citoplasma*** din jurul acestuia este formată din ***citosol*** şi ***organite celulare*** (reticulul endoplasmatic, aparatul Golgi, mitocondriile, lizozomii, peroxizomii) aflate în suspensie (fig. 1.5). Membranele, organitele sau particulele din interiorul celulei au funcţii speciale, determinate de setul de proteine pe care îl conţin. Celulele eucariote se înmulţesc prin mitoză şi meioză. Metabolismul, de regulă, se caracterizează prin respiraţie aerobă. Celulele vegetale sunt autotrofe sau mixotrofe, iar cele animale sunt heterotrofe.

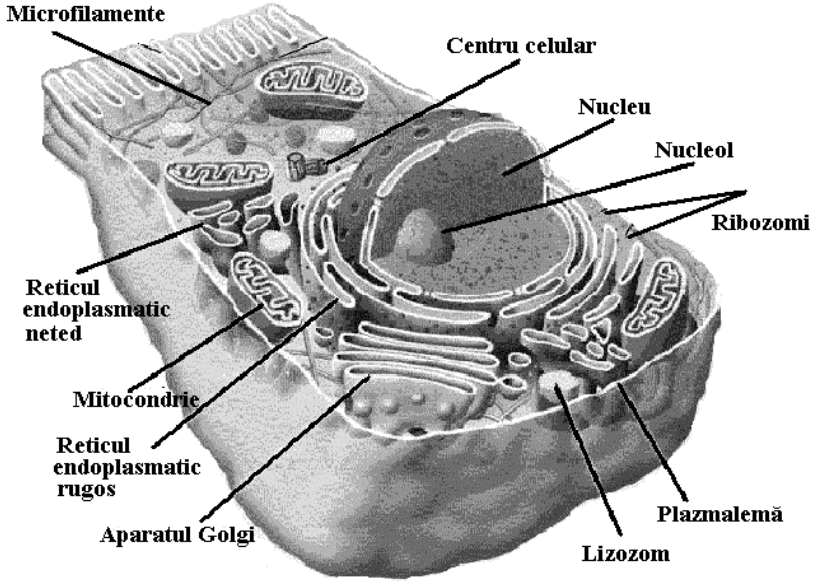


Fig. 1.5. Schema celulei eucariote

Celulele organismelor pluricelulare se grupează formând ţesuturi, care alcătuiesc organe cu funcţii specifice în organism.

Metodele de studiu utilizate în cercetarea celulelor

La studierea obiectelor mici apar dificultăţi, deoarece capacitatea de rezoluţie a ochiului omenesc este de ~0,1 mm (100μ). De aceea, pe larg sunt utilizate metodele microscopice şi cele biochimice.

Microscopia în spectrul vizibil al luminii. Se efectuează cu ajutorul microscoapelor fotonice (optice). Pot fi studiate organisme monocelulare, celule separate din culturi celulare sau secţiuni fine prin ţesuturi. Preparatele necesită a fi fixate, apoi colorate în mod special. Mai rar se studiază celule vii. Spectrul vizibil al luminii cuprinde raze cu o lungime de undă λ = 400 – 700 nm, de aceea capacitatea de rezoluţie sporeşte până la 200 – 350 nm (0,2 – 0,35μ).

Microscopia în ultraviolet (UV). Razele UV, având o lungime de undă mică (λ = 260 – 280 nm), permit studierea preparatelor cu o capacitate de rezoluţie de 130 – 140 nm (0,13 – 0,14μ). Pentru realizarea studiului sunt necesare microscoape cu lentile speciale, care permit trecerea razelor UV.

Microscopia "în câmp întunecat". Se realizează în spectrul vizibil al luminii, la o iluminare laterală a obiectului. Lumina nu trece prin obiectul de studiu, ci se reflectă de la el. Pot fi studiate celule vii. Capacitatea de rezoluţie este sub 0,2μ.

Microscopia cu contrast de fază. Deoarece diferite molecule şi structuri celulare au o capacitate de refracţie diferită, pot fi studiate celule vii, fără o fixare şi colorare prealabilă.

Microscopia cu polarizare. Se utilizează pentru studierea structurilor celulare care polarizează lumina (de ex., fusul de diviziune, miofibrilele).

Microscopia cu fluorescenţă. Fluorescenţa este proprietatea unor compuşi chimici de a lumina în cazul absorbţiei luminii de o anumită lungime de undă. Spectrul luminii fluorescente este deplasat spre o lungime de undă mai mare. De exemplu, clorofila iluminată cu raze UV, apare de culoare roşie. Pot fi studiaţi de asemenea şi alţi pigmenţi, cât şi vitamine, hormoni în celulele vii.

Microscopia histocitochimică. Se bazează pe fixarea şi colorarea specifică a anumitor structuri sau molecule cu coloranţi speciali (de ex., fuxina bazică – pentru acizii nucleici; sudanul negru – pentru lipide etc.).

Citofotometria. Se efectuează determinarea cantităţii de substanţe organice pe baza absorbţiei luminii de o anumită lungime de undă specifică pentru diferite clase de compuşi (de ex., absorbţia maximă pentru acizii nucleici – λ = 260 nm; pentru proteine – λ = 280 nm).

Imunofluorescenţa. Permite studierea repartizării diferitor substanţe pe baza reacţiilor imunochimice prin utilizarea anticorpilor marcaţi cu agenţi fluorescenţi.

Autoradiografia. Iniţial culturile celulare se cresc pe medii speciale, care conţin precursori radioactivi (nucleotide, aminoacizi). După fixare şi colorare, preparatele se acoperă cu un strat fin de emulsie fotografică, care permite identificarea locurilor în care s-a incorporat precursorul radioactiv.

Microscopia electronică cu transmisie. Utilizează un fascicul de electroni în locul luminii. Capacitatea de rezoluţie este de până la 1Å, adică poate fi atinsă o mărire de 10^6 ori. Ca obiecte de studiu servesc secţiuni ultrafine prin preparatele fixate şi contrastate cu agenţi speciali (săruri ale metalelor grele).

Microscopia electronică cu scanare. Se caracterizează prin obţinerea imaginilor în volum, obiectul cercetat fiind acoperit cu un strat subţire de metal (Au). Puterea de rezoluţie este mai mică decât cea a microscopiei electronice cu transmisie, însă poate fi evidenţiată configuraţia exactă a structurii analizate.

Fracţionarea componentelor celulare. Celulele cercetate se distrug prin omogenizare mecanică sau cu ultrasunet. Fracţiile de organite se pot separa fie prin centrifugare la diferite viteze, fie prin centrifugare utilizând gradiente de concentraţie.

Analiza biochimică. Celulele, ţesuturile şi lichidele corpului pot fi analizate pe cale biochimică, punând în evidenţă componentele proteice, lipidice, glucidice.

Analiza molecular-genetică. Se realizează studiul moleculelor de acizi nucleici în ce priveşte numărul de copii a genelor per genom, nivelul de transcripţie, structura primară, detecţia mutaţiilor. Tehnicile de biologie moleculară sunt bazate pe manipulările ADN-ului recombinat.

Unele realizări importante în biologia celulei

1590 Jansen a inventat microscopul, cu care mărirea imaginii se realiza prin unirea a două lentile

1665 Robert Hook, utilizând un microscop perfecţionat, a studiat structura plutei şi pentru prima dată a utilizat termenul de ***celulă*** pentru descrierea unităţilor structurale, din care sunt constituite acest ţesut.

1650 –1700 Antoni van Leeuwenhoeck cu ajutorul unor lentile simple bine şlefuite (x200) a examinat embrioni şi diferite organisme unicelulare, inclusiv bacterii. Pentru prima dată bacteriile au fost descrise în 1676.

1827 Dolland a îmbunătăţit calitatea lentilelor, astfel a

crescut mult interesul faţă de microscop.

1831–1833 Robert Brown a descris ***nucleul*** ca un corpuscul sferic ce se prezintă în celulele vegetale.

1838–1839 Botanistul Schleiden şi zoologul Schwann au îmbinat ideile diferitor cercetători şi au formulat ***teoria celulară***, postulatul de bază al căreia era, că unitatea structurală şi funcţională de bază a organismelor vii este celula.

1840 Purkinje a propus denumirea de protoplasmă pentru conţinutul celular, fiind convins că anume ea (dar nu pereţii celulari) reprezintă substanţa vie. Mai târziu a fost introdus termenul de citoplasmă (citoplasma + nucleu = protoplasma).

1855 Virchov a demonstrat că celulele se formează din alte celule prin diviziune celulară.

1866 Haeckel a determinat că păstrarea şi transmiterea caracterelor ereditare o realizează nucleul.

1866–1888 A fost studiată minuţios ***diviziunea celulară*** şi au fost descrişi ***cromozomii***.

1890 Au fost descoperite ***mitocondriile***.

1898 A fost descoperit ***aparatul Golgi***.

1887–1900 Perfecţionarea microscopului, a metodelor de fixare, colorare şi preparare a secţiunilor. Una din ramurile citologiei devine ***citogenetica***, ce studiază rolul nucleului în transmiterea informaţiei ereditare.

Anii 1930 Apare microscopul electronic, ce permite posibilităţi mult mai mari în vizualizarea structurilor celulare.

Din 1946 Microscopul electronic este foarte răspândit în biologie, ceea ce a permis cercetarea ***ultrastructurii*** celulei.

1950 Descoperirea ***ribozomilor*** de savanţii A. Claude, K.R.Porter, G. Palade.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: sistem biologic, celulă, virus, eucariote, procariote, prion, autoreproducere.
2. Care este obiectul de studiu al biologiei moleculare?
3. Care sunt proprietăţile fundamentale ale sistemelor biologice?
4. Care sunt nivelele de organizare a materiei vii?
5. Care sunt metodele de studiu a sistemelor biologice?
6. Care sunt particularităţile celulelor eucariote?

2

ORGANIZAREA CHIMICĂ A MATERIEI VII

Elementele chimice cel mai frecvent întâlnite în materia vie sunt H, C, N, O, P, S (numite elemente organogene) care reprezintă în medie 99% din masa organismelor şi stau la baza unui număr impunător de compuşi, caracterizaţi printr-o stabilitate înaltă şi interacţiune lentă între ele cu apa sau alţi componenţi celulari. În tabelul 2.1este prezentată compoziţia elementară a unuia dintre cele mai studiate organisme vii – bacteria *Escherichia coli*.

Tabelul 2.1. Compoziţia elementară a *E. coli* (concentraţia procentuală raportată la masa uscată)

Elementul	%	Elementul	%
C	50	K	1
O	20	Na	1
N	14	Ca	0,5
H	8	Mg	0,5
P	3	Cl	0,5
S	1	Fe	0,2

În compoziţia materiei vii se conţin atât molecule organice, cât şi anorganice. În tabelul 2.2. sunt expuse principalele tipuri de molecule şi numărul aproximativ de molecule per celulă.

Tabelul 2.2. Compoziţia moleculară a organismelor vii

Substanţe din celula bacteriană	% din masa totală a celulei	Numărul tipurilor de molecule
Apă	70	1
Ioni neorganici	1	20
Hidraţi de carbon şi precursorii lor	1	250
Aminoacizi şi precursorii lor	0,4	100
Nucleotide şi precursorii lor	0,4	100
Acizi graşi şi precursorii lor	1	50
Alte molecule mici	0,2	~ 300
Macromolecule (proteine, acizi nucleici, polizaharide)	26	~ 3000

Componenta neorganică a organismelor vii

Apa şi rolul ei în organismele vii

Între componenţii neorganici ai celulei cea mai întâlnită este apa. Molecula de H_2O reprezintă un dipol electric, ceea ce în mare măsură determină proprietăţile sale unice şi funcţiile de bază care sunt enumerate în continuare.

Proprietatea de solvent. Moleculele solubile în H_2O se numesc ***hidrofile.*** La ele se referă compuşii ionici (de ex., săruri, acizi, baze) care în apă disociază în ioni, cât şi unii compuşi organici – posesori ai unor grupuri funcţionale purtătoare de sarcină (alcooli, glucide). Moleculele nepolare nu se combină cu apa şi sunt numite ***hidrofobe*** (de ex., grăsimi).

În rezultatul combinării apei cu diferite substanţe se pot obţine următoarele sisteme:

- ***Soluţii*** – se obţin la dizolvarea substanţelor (de ex., apă + sare, apă + zahăr);
- ***Suspensii*** – se obţin la combinarea apei cu substanţe insolubile solide, care, în dependenţă de densitatea lor, se lasă la fund sau se ridică la suprafaţă (de ex., apă + nisip, apă + sulf);

- ***Emulsii*** – se obţin la combinarea apei cu substanţe insolubile lichide. Fazele se separă prin decantare (de ex., apă + ulei; laptele);
- ***Soluţii coloidale*** – se obţin la combinarea apei cu substanţe cu greutate moleculară mare; decantarea nu are loc (de ex., albuşul de ou – apă + proteine).

Coeziune. Reprezentând dipoli, moleculele de H_2O se "lipesc" între ele datorită legătorilor de hidrogen. Aceasta determină temperatura înaltă de evaporare şi tensiunea superficială înaltă.

Adeziunea. Este capacitatea moleculelor de apă de a se uni cu alte molecule. Aceasta provoacă, în special, fenomenele capilare, pe baza cărora apa se ridică în sus prin tuburile ultrasubţiri.

Apa şi reacţiile chimice. Fiind un bun solvent, apa prezintă un mediu ideal pentru desfăşurarea diferitor reacţii chimice. Concomitent ea participă în unele procese chimice (de ex., reacţii de hidroliză, fotosinteză). În celule apa se formează în rezultatul respiraţiei aerobe.

Capacitatea termică a apei. Datorită adeziunii moleculelor, apa are o capacitate termică foarte înaltă (este necesară o cantitate mare de energie pentru a-i schimba temperatura). Această proprietate face posibilă existenţa vieţii în apă şi explică stabilitatea celulelor în diferite condiţii termice.

Substanţele minerale

În dependenţă de conţinutul în organe şi necesităţile diurne, substanţele minerale se clasifică în trei grupuri: macroelemente (K, Na, Ca, Mg, Cl, P, S), microelemente (Cu, Co, Bi, I, Zn, Mn, Mo) şi ultramicroelemente (U, Ra, Au, Ag, Ce). Rolul substanţelor minerale este divers. Ele participă la menţinerea presiunii osmotice (NaCl), asigură stabilitatea valorii pH (Na+, K+, Cl-, H+), îndeplinesc funcţii de susţinere (Ca, P –

intră în componenţa oaselor), asigură potenţialul membranar de repaus şi cel de acţiune (Na+, K+, Mg2+, Ca2+, Cl-), îndeplinesc funţii de cofactori enzimatici (Mg2+, Mn2+), au rol important în procesul de respiraţie (Fe, Cu) şi fotosinteză (Mg).

Componenta organică a materiei vii

Organismele vii se caracterizează printr-o varietate mare de substanţe organice dintre care putem deosebi patru clase principale: hidraţi de carbon (glucide), lipide (grăsimi), proteine, acizi nucleici. Substanţele organice pot fi reprezentate prin substanţe simple şi polimeri.

Moleculele organice mici sau substanţele simple prezintă compuşi cu masa moleculară de la 100 la 1000 şi conţin până la 30 de atomi de carbon. Astfel de molecule de obicei se găsesc în stare liberă în citoplasmă, fiind reprezentate de produse intermediare ale căilor metabolice, care, la rândul său, pot sta la baza formării macromoleculelor.

Macromoleculele sau biopolimerii sunt substanţe cu masa moleculară mare, au funcţii definite în celule şi sunt programate genetic. Toţi polimerii sunt formaţi din monomeri, uniţi în rezultatul reacţiilor de polimerizare prin legături covalente. Scindarea lor are loc prin reacţia de hidroliză. Polimerii formaţi dintr-un singur tip de monomeri poartă denumirea de homopolimeri (celuloza, amidonul). Homopolimerii se deosebesc între ei prin greutatea moleculară (numărul de resturi monomerice) şi gradul de ramificare a moleculelor. Ei îndeplinesc funcţii structurale (celuloza), de rezervă (amidon, glicogen), de semnalizare (receptorii celulari).

Polimerii formaţi din mai multe tipuri de monomeri se numesc copolimeri sau heteropolimeri (ADN, ARN, proteine). Diversitatea copolimerilor este asigurată de numărul, tipul şi modul de aranjare a monomerilor, toate fiind programate genetic.

Hidraţii de carbon.

Formula care caracterizează toţi hidraţii de carbon este Cx(H2O)y, unde x şi y pot avea diferite valori mai mari ca 3. După numărul de resturi monomerice hidraţii de carbon se împart în **monozaharide, dizaharide, oligozaharide şi polizaharide**.

Monozaharidele. Au formula generală (CH2O)n, unde 9≥n≥3. În dependenţă de numărul de atomi de carbon deosebim: trioze, tetroze, pentoze, hexoze etc.

- Trioze ($C_3H_6O_3$) – gliceraldehida, dihidroxiacetona – sunt compuşi intermediari importanţi în căile metabolice de sinteză şi scindare.
- Pentoze ($C_5H_{10}O_5$) – riboza, ribuloza, dezoxiriboza. Riboza şi dezoxiriboza intră în compoziţia acizilor nucleici, ATP, NAD, NADP, FAD, FMN, CoA.
- Hexoze ($C_6H_{12}O_6$) – glucoza, fructoza, galactoza – reprezintă surse importante de energie. Servesc în calitate de monomeri în sinteza dizaharidelor (2 monomeri), oligozaharidelor (până la 10 monomeri) şi a polizaharidelor (peste 10 monomeri).

Dizaharidele. Dizaharidele se formează prin reacţia de condensare între 2 molecule de monozaharide, mai frecvent 2 hexoze. Legătura dintre monomeri se numeşte ***legătură glicozidică***.

Cele mai frecvente dizaharide sunt:

- Maltoza (α-glucoză + α-glucoză)
- Zaharoza (α-glucoză + β-fructoza)
- Lactoza (β-galactoza + β-glucoza)

Polizaharidele. Reprezintă molecule formate dintr-un număr mare de resturi monomerice, unite prin ***legături glicozidice***. Cel mai frecvent polizaharide sunt formate din resturi de ***glucoză***. Funcţiile principale ale polizaharidelor sunt cele structurale (celuloza) şi de depozitare (glicogen, amidon).

Lipidele

Lipidele sunt substanţele organice insolubile în apă, dar solubile în solvenţi nepolari (cloroform, eter, benzen). Conform importanţei fiziologice lipidele se împart în: ***lipide de rezervă*** şi ***lipide structurale***. Lipidele structurale participă la formarea membranelor biologice, învelişurilor protectoare. În calitate de exemple de lipide structurale pot servi sterolii şi fosfolipidele, care au rol major în realizarea ultrastructurii funcţionale a celulei.

Funcţiile lipidelor:

- energetică – la scindarea 1g lipide se degajă 39,1 kJ;
- structurală – în componenţa membranelor celulare (fosfolipidele, colesterolul);
- de emulsionare – emulgatorii se orientează la limita apă-ulei, stabilizează emulsia, împiedică stratificarea lor (fosfogliceridele, acizii biliari - emulgatori pentru acilgliceroli în intestin);
- mecanică – protejează organele de lezări mecanice;
- termoizolatoare – păstrează căldura (ţesutul adipos subcutanat);
- de solvenţi pentru alte substanţe de natură lipidică (acizii biliari pentru vitaminele liposilubile);
- hormonală - toţi steroizii (hormonii sexuali, hormonii corticosuprarenali) sunt de natură lipidică;
- vitaminică - vitaminele liposolubile (acizii graşi nesaturaţi: A, D, E, K).

Proteinele

Proteinele sunt principalele molecule funcţionale din celule şi sinteza lor este determinată genetic. Aceşti compuşi organici sunt alcătuiţi din una sau mai multe catene de aminoacizi, plicaturate şi spiralate într-o structură spaţială, tridimensională, care le conferă funcţiile lor biologice.

Monomerii moleculelor proteice sunt ***aminoacizii***. Fiecare aminoacid este format dintr-o ***regiune constantă***, comună pentru toţi aminoacizii şi o ***regiune variabilă***, care se deosebeşte la diferiţi aminoacizi (fig. 2.1). Regiunea constantă conţine la rândul său grupele carboxil şi amino legată la atomul de carbon din poziţia α. În dependenţă de structura regiunii variabile aminoacizii pot fi acizi, bazici sau neutri. Din cei peste 150 de aminoacizi cunoscuţi în natură, în componenţa proteinelor intră doar 20 α-aminoacizi.

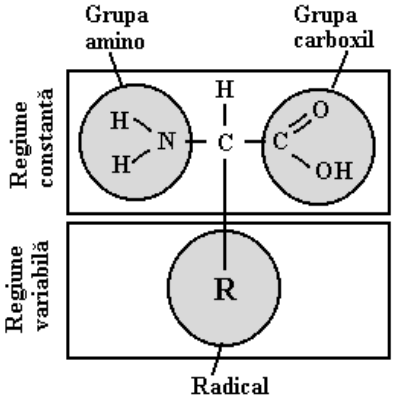


Fig. 2.1. Structura generală a aminoacidului

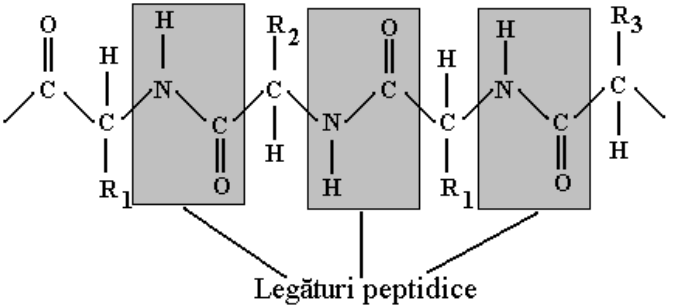


Fig. 2.2. Structura primară a proteinelor

Între grupele funcţionale ale aminoacizilor pot apărea diferite legături chimice. Cele mai frecvente sunt ***legăturile peptidice,*** care apar la interacţiunea grupei α-carboxil a unui aminoacid cu grupa α-amino din alt aminoacid. Aceste legături sunt nişte legături covalente trainice, determinând formarea

structurii primare a proteinei. Destul de numeroase sunt ***legăturile de hidrogen***, care apar la interacţiunea atomilor de hidrogen din grupele –OH sau –NH cu oxigenul din grupa C=O. Aceste legături sunt destul de slabe, dar datorită numărului lor mare formează structuri stabile. Dintre alte tipuri de legături pot fi specificate ***punţile disulfidice, legăturile ionice, legăturile hidrofobe*** etc.

Proteinele se caracterizează prin mai multe nivele de organizare. Cel mai simplu nivel de organizare este ***structura primară***. Structura moleculară a acestui nivel de organizare este realizată cu ajutorul legăturilor peptidice (fig. 2.2). În dependenţă de numărul de aminoacizi din catenă pot fi deosebite dipeptide (2 aminoacizi), tripeptide (3 aminoacizi), oligopeptide (până la 10 aminoacizi), polipeptide (peste 10 aminoacizi). Se consideră că cea mai scurtă proteină conţine 51 de aminoacizi. Cu toate acestea, există numeroase polipeptide naturale cu o lungime mai scurtă şi care îndeplinesc diverse funcţii în celule.

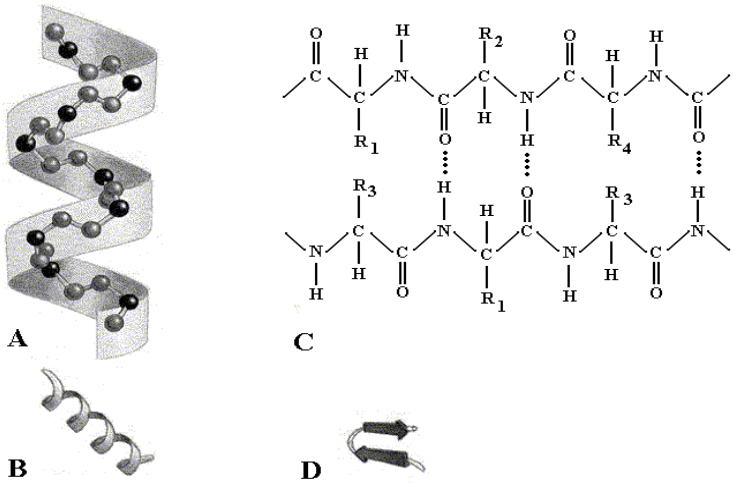


Fig. 2.3. Structura secundară a proteinelor. A – formarea α-spiralelor; B – reprezentarea grafică a α-spiralelor; C – schema formării β-structurilor; D – reprezentarea grafică a β-structurilor

Următorul nivel de organizare a proteinelor, ***structura secundară,*** este realizat cu ajutorul legăturilor de hidrogen. Structura secundară se caracterizează prin formarea diverselor conformaţii spaţiale. Cele mai frecvente sunt ***α-spiralele***. Într-o spiră se conţin 3,6 resturi de aminoacizi. O altă conformaţie este reprezentată de ***β-structuri***, care apar la interacţiunea a 2 regiuni mai îndepărtate ale aceleaşi molecule, sau între molecule diferite (fig. 2.3). Unele proteine cu structură fibrilară (de ex., colagenul) au conformaţia spaţială determinată de structura secundară.

Un nivel superior conformaţional, caracteristic proteinelor globulare, este reprezentat de ***structura terţiară*** – o alternare a ***α-spiralelor***, ***β-structurilor*** şi a regiunilor nestructurate (fig. 2.4). Structura terţiară este asigurată de legăturile de hidrogen care apar între diverse grupe funcţionale din radicali, cât şi de punţile disulfidice, legăturile hidrofobe, care apar între radicalii hidrofobi, legăturile ionice etc. Unele proteine cu structură terţiară pentru a deveni active interacţionează cu molecule neproteice (de ex., hemul în molecula de mioglobină – pentru transportarea oxigenului).

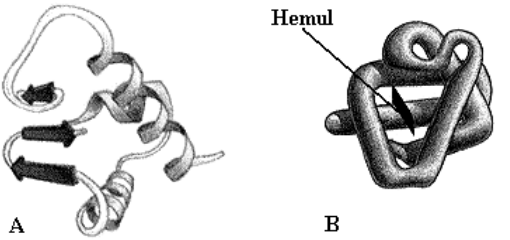


Fig. 2.4. Structura terţiară a proteinei. A - Schema alternării α-spiralelor şi β-structurilor; B – Structura globinei

Nivelul cel mai complicat de organizare a proteinelor este reprezentat de ***structura cuaternară***. În astfel de molecule se conţin câteva lanţuri polipeptidice, care pot fi identice, sau diferite. Astfel, în molecula de hemoglobină se conţin 2 catene de α-globină şi 2 catene de β-globină (fig. 2.5). Structura

cuaternară este determinată de legăturile hidrofobe, legăturile de hidrogen şi cele ionice.

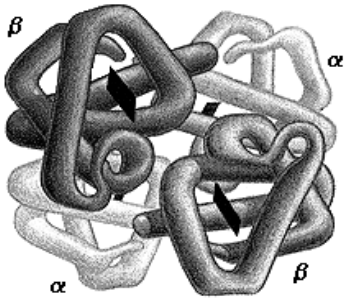


Fig. 2.5. Structura cuaternară a hemoglobinei

Structurile terţiară şi cuaternară asigură formarea ***centrilor activi*** ai proteinelor, regiuni prin care moleculele proteice interacţionează cu alte molecule. O deosebită importanţă o au centrii activi ai enzimelor, care catalizează modificarea substratului. Aminoacizii care participă la realizarea structurilor tridimensionale, spaţiale, biologic active sunt deosebit de importanţi, formând ***situsuri funcţionale***. Substituirea lor ca rezultat al mutaţiilor, duce la pierderea activităţii proteinei. Acelaşi fenomen pentru aminoacizii, neimplicaţi în legătulile spaţiale, este mai puţin important.

Secvenţa aminoacizilor dintr-o proteină reprezintă elementul esenţial al structurii sale, deoarece:

- este unică, constantă şi specifică fiecărei proteine;
- determină caracterul ei funcţional;
- este specifică pentru o anumită specie;
- este determinată genetic (de informaţia ereditară conţinută în ADN).

Sub acţiunea diferitor factori ai mediului, legăturile dintre atomi se pot rupe, ceea ce duce la ***denaturarea proteinei.*** Denaturarea poate surveni sub acţiunea factorilor fizici (temperatură, radiaţie, factori mecanici), chimici (acizi, baze, săruri ale metalelor grele). Denaturarea poate fi ***reversibilă***, dacă la înlăturarea factorului proteina revine la structura iniţială şi îşi poate îndeplini funcţiile şi ***ireversibilă***, dacă în rezultatul

denaturării proteina nu-şi poate restabili structura şi funcţia. Ruperea legăturilor peptidice întotdeauna duce la denaturare ireversibilă.

După compoziţia chimică toate proteinele se împart în ***proteine simple*** şi ***proteine conjugate***.

Proteinele simple (holoproteinele) formează în urma hidrolizei doar aminoacizi. Ele includ: proteinele globulare, solubile în apă (de ex., *histonele, actina, tubulina, majoritatea enzimelor)* şi proteinele fibrilare – majoritatea insolubile în apă (de ex., *keratina, colagenul, fibrina, laminina* etc.**)**.

Proteinele conjugate (heteroproteide) rezultă din combinaţia unei proteine simple cu o altă substanţă sau grup prostetic. Prin hidroliză se obţin aminoacizi şi un compus neproteic: *nucleoproteidele, glicoproteidele, lipoproteidele, metaloproteidele* etc.

Proteinele reprezintă suportul biochimic al caracterelor, realizând următoarele funcţii majore:

- *catalitică* – accelerarea transformărilor chimice (ATP-sintetaza, ADN-polimeraza);
- *hormonală* – reglare a metabolismului (insulina);
- *de recepţie* – fixarea hormonilor, mediatorilor la suprafaţa membranei celulare sau în interiorul celulei (glicoforina);
- *de transport* – (pompa Na^+/K^+, hemoglobina, mioglobina – transportarea oxigenului);
- *structurală* – intră în componenţa tuturor compartimentelor celulare şi extracelulare;
- *de sprijin, mecanică* – determină forma şi motilitatea celulară (colagenul, tubulina, actina);
- *imunologică* – anticorpii (IgA, IgM, IgG) inactivează antigenele;
- *de dezintoxicare* – grupele funcţionale ale proteinelor leagă metalele grele, alcaloizii (de ex.: albuminele);

- *homeostatică* – formarea trombilor în procesul coagulării sângelui (fibrinogenul);
- *de substrat energetic* – la scindarea 1g de proteină se degajă 17,1 kJ de energie.

ACIZII NUCLEICI

Acizii nucleici sunt biopolimeri reprezentaţi în celule prin ***acid dezoxiribonucleic (ADN)*** şi ***acid ribonucleic (ARN)***. În calitate de monomeri servesc ***nucleotidele.*** Ambele tipuri de molecule poartă sarcină negativă şi migrează în câmpul electric spre polul pozitiv. La fel ca şi proteinele, acizii nucleici au câteva nivele de organizare conformaţională.

Acidul dezoxiribonucleic

Moleculele de ADN sunt alcătuite din dezoxiribonucleotide (fig. 2.6).

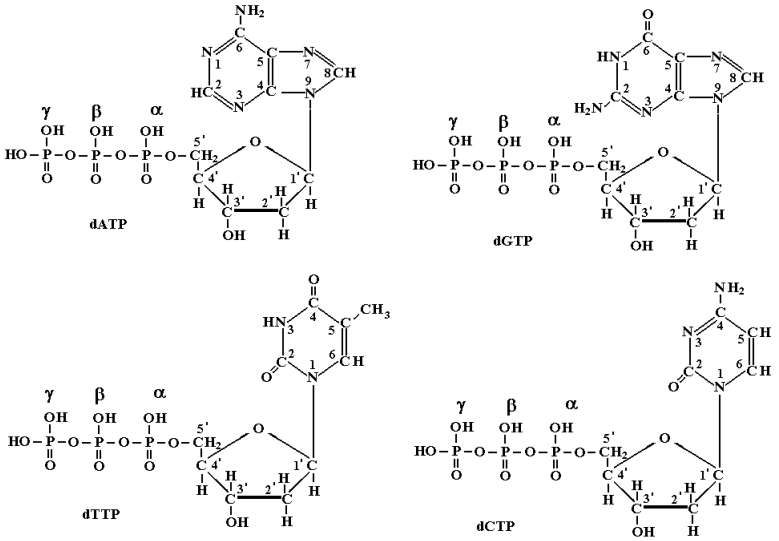


Fig. 2.6. Dezoxiribonucleozidtrifosfaţi – monomeri ai ADN

În calitate de baze azotate în componenţa nucleotidelor servesc ***adenina (A)*** şi ***guanina (G) – baze purinice, timina (T)*** şi ***citozina (C) – baze pirimidinice.*** Pentoza din ADN este reprezentată de ***2-dezoxiriboză***. Bazele pirimidinice se unesc de pentoză prin N_1, iar cele pirimidinice – prin N_9. Pentru a preveni ambiguitatea în enumerarea atomilor în bazele azotate şi pentoză, atomilor din dezoxiriboză li se adaugă prim (′). O bază azotată împreună cu pentoza formează ***nucleozidul*** (adenozina, guanozina, timidina, citidina). La adăugarea acidului fosforic se obţine ***nucleotidul***.

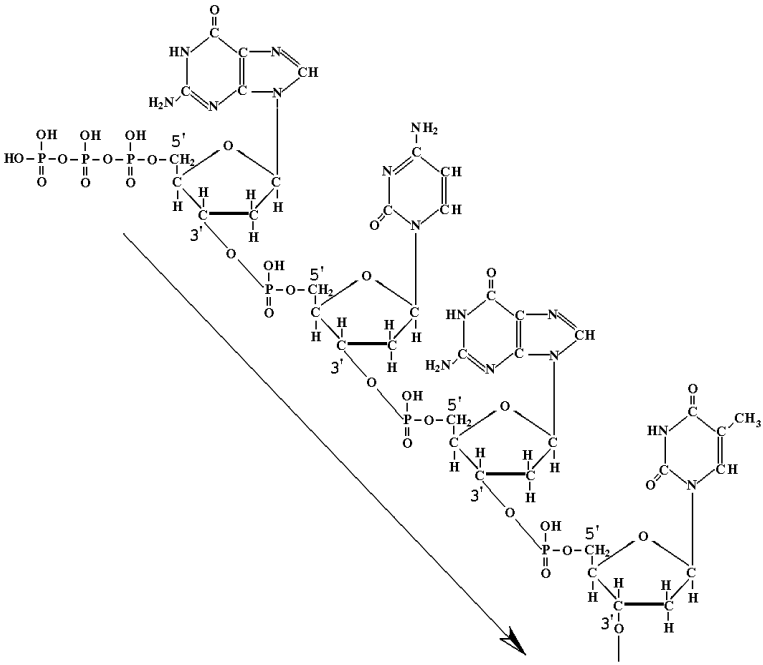


Fig. 2.7. Structura primară a ADN – polinucleotid (Secvenţa de nucleotide unite prin legături fosfodiesterice 3′ – 5′)

Denumirea nucleotidelor provine de la baza azotată şi numărul de resturi de acid fosforic. Dacă se conţine un rest

fosfat – nucleozid monofosfat (de ex., dAMP – dezoxiadenozin monofosfat), două resturi – nucleozid difosfat (dADP – dezoxiadenozin difosfat), trei – nucleozid trifosfat (dATP – dezoxiadenozin trifosfat). Resturile de acid fosforic se unesc la capătul 5' al dezoxiribozei şi se numerotează prin ***α, β, γ***.

Nucleotidele se unesc între ele prin ***legături fosfodiesterice*** în urma înlăturării resturilor fosforice β şi γ. Capătul 3' al unei dezoxiriboze este unit cu capătul 5' al alteia printr-un rest de acid fosforic, formând ***lanţuri polinucleotidice***. Secvenţa polinucleotidică (ordinea nucleotidelor în catenă) constituie ***structura primară a ADN*** (fig. 2.7). Ordinea nucleotidelor este arbitrară, ceea ce permite obţinerea unui număr mare de molecule. Un capăt al moleculei are liberă grupa P~P~P-5', iar al capăt – grupa 3'-OH, de aceea catena de ADN este direcţionată 5'→3'.

Moleculele de ADN se caracterizează prin existenţa ***structurii secundare*** specifice – dublul helix, modelul căruia a fost propus şi argumentat în 1953 de *James Watson* şi *Francis Crick*. Molecula de ADN reprezintă două catene polinucleotidice antiparalele 5'→3' / 3'←5'' unite între ele prin legături de hidrogen, care apar la nivelul grupelor funcţionale din bazele azotate (fig. 2.8; fig. 2.9).

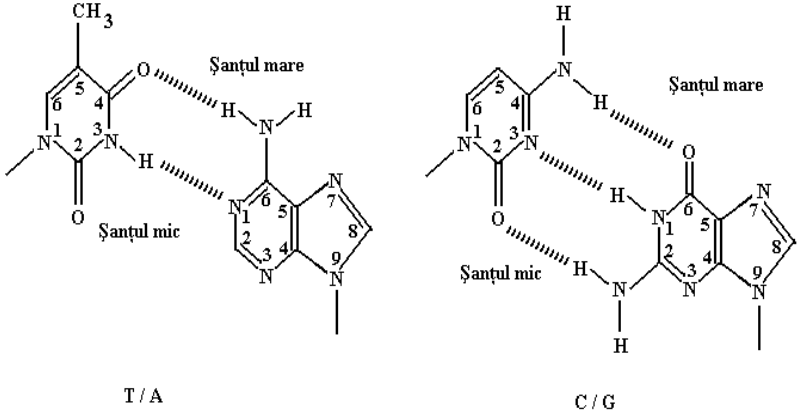


Fig. 2.8. Formarea legăturilor complementare între bazele azotate

S-a constatat că legăturile apar între o bază purinică şi una pirimidinică. Legitatea prin care Adenina se uneşte cu Timina prin 2 legături de hidrogen, iar Guanina cu Citozina – prin 3 legături de hidrogen poartă denumirea de ***principiul complementarităţii*** (fig. 2.8).

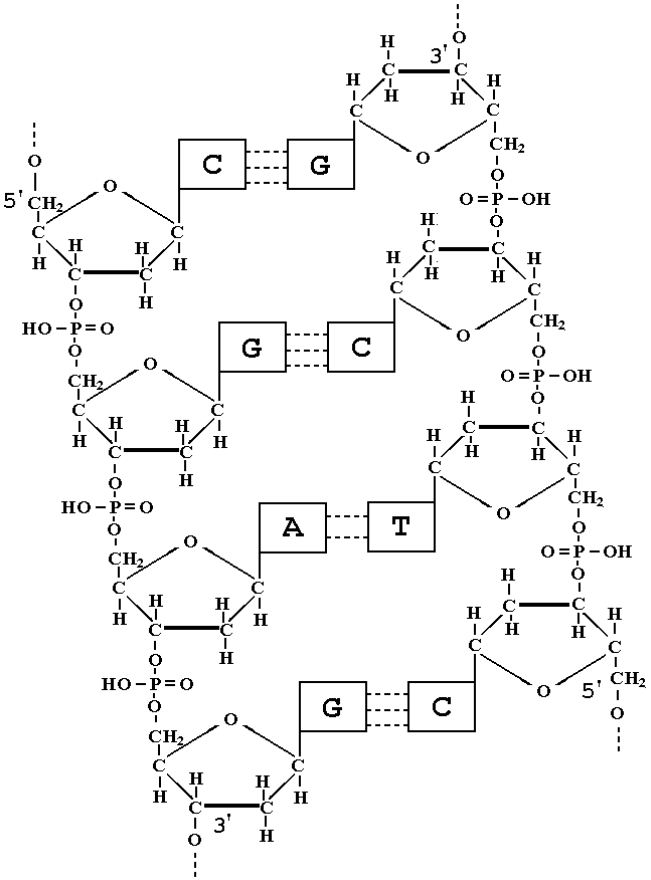


Fig. 2.9. Structura secundară a ADN: 2 catene complementare antiparalele

Această regulă este universală, comună pentru toate organismele vii şi stă la baza proceselor genetice fundamentale – replicaţia şi transcripţia. Aceste legităţi au fost observate pentru prima dată de *Erwin Chargaff*, care a dedus că cantitatea de Adenină este aproximativ egală cu cea de Timină, iar cantitatea de Guanină – cu cea de Citozină.

Deoarece legăturile fosfodiesterice conferă flexibilitate, este posibilă rotirea fiecărei perechi de baze cu ~36˚ în jurul axei relative a helixului. Astfel, într-o spiră completă (360˚) încap ~10 nucleotide. Rotirea unei catene în jurul alteia face ca dublul helix să conţină un şanţ mare (cu un diametru de ~20 Å) şi un şanţ mic (~12 Å) (fig. 2.8; fig. 2.10).

Complementaritatea bazelor azotate (A=T şi G≡C) determină:

- stabilitatea moleculei ADN;
- mecanismul replicării;
- mecanismul transcripţiei;
- mecanismul recombinării;
- mecanismul reparării leziunilor ADN.

Faptul că catenele ADN sunt antiparalele explică mecanismul replicării moleculelor de ADN, funcţie prin care este conservată informaţia genetică în succesiunea generaţiilor de celule şi indivizi.

În anumite condiţii legăturile de hidrogen dintre catene se pot rupe, provocând astfel denaturarea ADN. În calitate de factori de denaturare servesc acizii, bazele şi temperaturile înalte. Cu cât o moleculă este mai lungă, sau conţine mai multe perechi G≡C faţă de A=T, cu atât molecula este mai stabilă. După denaturarea prin încălzire, la răcirea lentă molecula poate să renatureze prin restabilirea legăturilor complementare între bazele azotate. În cazul răcirii bruşte (de ex., introducerea eprubetei în baie cu gheaţă) renaturarea n-are loc şi moleculele rămân monocatenare.

Structura secundară a ADN este reprezentată de mai multe tipuri de spirale, care se deosebesc prin înclinarea bazelor azotate faţă de axa centrală, numărul de baze azotate într-o spiră completă, direcţia răsucirii catenelor şi ca rezultat – proprietăţile ADN. Se cunosc mai multe forme răsucite spre dreapta, dintre care cel mai des se întâlnesc formele A, B, C. Există şi o formă răsucită spre stânga – forma Z (tab. 2.3).

Tabelul 2.3. Parametrii unor forme de ADN

Parametrii helixului	**A – ADN**	**B – ADN**	**Z – ADN**
Sensul helixului	Dreapta	Dreapta	Stânga
Numărul de baze în spiră	11	10,4	12
Distanţa dintre baze (Å)	2,9	3,4	3,7
Diametrul moleculei (Å)	25,5	23,7	18,4

Incidenţa cea mai înaltă se remarcă pentru forma B, care este constatată în toate celulele (fig. 2.10). Anume forma B de ADN a determinat modelul Watson-Crick. Totodată, după cum s-a stabilit, în cadrul formei B mai pot exista unele devieri în ce priveşte numărul de nucleotide per spiră şi care poate varia în limitele 10,0 – 10,6.

Forma mai compactă de tip A este caracteristică în special pentru moleculele de ARN. Totodată, s-a constatat că hibrizii ADN/ARN, de asemenea, se caracterizează prin forma A de conformaţie. Aceasta are o mare importanţă

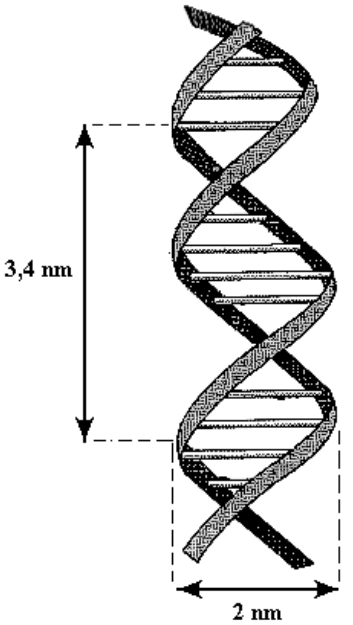


Fig. 2.10. Structura moleculei de ADN, forma B

în procesul de replicaţie, când pentru iniţierea sintezei fiecărei catene se utilizează un primer ARN.

Forma Z se deosebeşte mult de toate celelalte în primul rând prin direcţia de rotire a helixului. Denumirea provine de la forma zig-zag a acestei conformaţii. O altă caracteristică este existenţa unui singur şanţ, ceea ce o determină ca purtătoare a unei sarcini negative mai mari. Forma Z poate să se formeze *in vitro* la o concentraţie sporită de săruri în regiunile unde alternează o purină cu o pirimidină (de ex., $d\frac{\{GC\}}{\{CG\}}$ sau $d\frac{\{AC\}}{\{TG\}}$). Se consideră că forma Z se întâlneşte şi în sistemele *in vivo* în cazul metilării ADN-ului.

În toate sistemele *in vivo* moleculele de ADN sunt cuplate cu proteine prin legături de hidrogen sau electrostatice, rezultând o structură supramoleculară – ***structura terţiară***. Proteinele au roluri diverse în complexele cu ADN: participă la compactizare (histone), controlează replicarea (ADN-polimeraza) şi transcripţia (ARN-polimeraza, factori de transcripţie), participă la repararea moleculelor lezate (ADN-ligaza). Având proprietăţi acide, moleculele de ADN se asociază cu proteine bazice, formând nişte complexe stabile. La eucariote aceste proteine poartă denumirea de ***histone***. La formarea structurii terţiare participă histonele H1, H2A, H2B, H3, H4. Structura care se formează în urma răsucirii ADN-ului în jurul unui miez proteic poartă denumirea de ***nucleozom*** – mod de organizare a ADN-ului nuclear al eucariotelor (fig. 2.11). La procariote ADN-ul are formă de

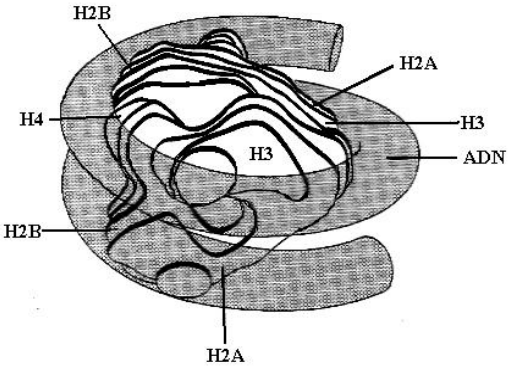


Fig. 2.11. Nucleozomul – structura terţiară a ADN

inel. Datorită tensiunii intramoleculare ADN-ul procariotic, de obicei, are formă de supraspirală şi este asociat cu proteine bazice (fig. 2.12).

Proprietăţile moleculelor de ADN

Structura unicală a ADN-ului determină şi proprietăţile unicale, cum ar fi autoreproducerea (replicarea) şi autoreparaţia. Structura chimică şi sarcina electrică negativă asigură interacţiuni cu alte molecule, prezentând posibilităţi funcţionale diverse.

Replicarea reprezintă sinteza unor molecule noi, identice cu molecula iniţială pe baza structurii secundare.

Reparaţia este proprietatea ADN-ului de a-şi restabili secvenţa de nucleotide în cazul leziunilor. Se bazează pe principiul complementarităţii şi previne apariţia mutaţiilor.

Denaturarea (topirea ADN) este ruperea legăturilor de hidrogen între catenele complementare; *renaturarea* – restabilirea structurii bicatenare – proprietăţi importante în procesele de replicare, reparare şi transcriere, cât şi în manipularea ADN-ului *in vitro*;

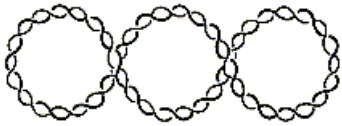


Fig. 2.12. Supraspiralizarea moleculelor de ADN inelar

Spiralizarea (fig. 2.11), *superspiralizarea* (fig. 2.12), *despiralizarea* sunt proprietăţile dublului helix şi determină trecerea macromoleculei de ADN de la o stare funcţională la alta.

Heterogenitatea secvenţelor de ADN se exprimă prin aranjarea aperiodică a bazelor în moleculă, unele secvenţe de nucleotide se întâlnesc cu frecvenţă diferită de-a lungul moleculei de ADN ($\frac{A=T}{G\equiv C}\neq 1$);

Flexibilitatea ADN este capacitatea dublului helix de a trece de la o formă conformaţională la alta – de ex.: trecerea de la forma B la forma A se asociază cu activarea ADN-ului pentru transcripţie, iar trecerea la forma Z – cu inactivarea secvenţei.

Funcţiile ADN-ului

ADN-ul deţine, păstrează, transmite şi realizează informaţia genetică. Secvenţa (succesiunea) nucleotidelor din molecula de ADN reprezintă informaţia ereditară codificată. Codul genetic este universal pentru toate organismele vii şi determină succesiunea aminoacizilor în proteină. Mecanismul de transmitere a mesajului genetic este determinat de structura bicatenară, complementaritate şi se realizează în timpul replicării ADN, urmată de mitoză sau meioză. În procesul de transcripţie de pe ADN se sintetizează trei tipuri de ARN ce participă la sinteza matricială a proteinelor. Proteinele sunt substratul molecular a tuturor caracterelor şi proprietăţilor unui organism.

Heterogenitatea ADN-ului la eucariote

În urma investigaţiilor s-a constatat că cantitatea de ADN din celule este cu mult mai mare decât necesară. Acest fenomen a fost numit ***paradoxul mărimii*** care se caracterizează prin următoarele:

– există un exces de ADN în comparaţie cu cantitatea necesară pentru a codifica totalitatea proteinelor din organism;

– există variaţii mari în ce priveşte cantitatea de ADN între speciile care nu se deosebesc esenţial din punct de vedere structural; de exemplu: la diferite specii de amfibieni care nu se deosebesc mult, mărimea genomului variază în limitele 10^9-10^{11} pb (perechi baze – nucleotide).

În dependenţă de reprezentativitate ADN-ul nuclear la eucariote se clasifică în mai multe categorii:

- secvenţe unicale – 45-56%;
- secvenţe moderat repetitive – 8-30%;
- secvenţe înalt repetitive – 12-25%.

Tipurile de secvenţe pot fi determinate în rezultatul ciclurilor de denaturare/renaturare a ADN-ului. Secvenţele înalt repetitive renaturează rapid, cele moderat repetitive mai încet, iar cele nerepetitive (unicale) – cel mai încet.

Secvenţele nerepetitive se întâlnesc în genom într-o singură copie şi, de obicei, reprezintă gene, care determină sinteza moleculelor ARNm. Lungimea totală a secvenţelor nerepetitive este de ~2 x 10^9 pb.

Secvenţele repetitive sunt cele care se repetă în genom de două sau mai multe ori. Ele pot fi de două tipuri: secvenţe moderat repetitive şi secvenţe înalt repetitive.

Secvenţele moderat repetitive au o lungime totală de până la 6 x 10^5 pb. Lungimea lor individuală variază în limite mari, iar secvenţele respective se repetă în mediu de 350 ori. Secvenţele moderat repetitive formează familii de secvenţe, spre exemplu – genele pentru histone sau genele pentru ARNr. În genomul uman cea mai mare parte de ADN moderat repetitiv există în formă de secvenţe cu o lungime de ~300 pb, repartizate între secvenţele nerepetitive - ***familia Alu***.

Secvenţele înalt repetitive reprezintă nişte succesiuni scurte de nucleotide (câteva zeci, mai rar sute de nucleotide), care se repetă de sute de mii de ori în genom şi, de regulă, nu se transcriu. Datorită secvenţei scurte care se repetă ele se mai numesc ***secvenţe simple de ADN*** sau ***ADN satelit***. Prin tehnici de hibridare s-a constatat că ADN satelit este localizat în regiunile de heterocromatină, în deosebi, lângă centromer. O clasă specială de sateliţi o reprezintă ***minisateliţii*** – repetări de până la 50 ori a unor secvenţe scurte. Aceste secvenţe sunt foarte variabile ca lungime la diferite persoane şi permit identificarea moleculară a indivizilor.

O clasă specială de secvenţe înalt repetitive este reprezentată de ***palindromi.*** Palindromii reprezintă succesiuni de nucleotide inversate, care au proprietatea de a se uni complementar pe aceeaşi catenă, formând "agrafe" sau bucle în moleculele monocatenare de ARN sau ADN şi structuri în formă

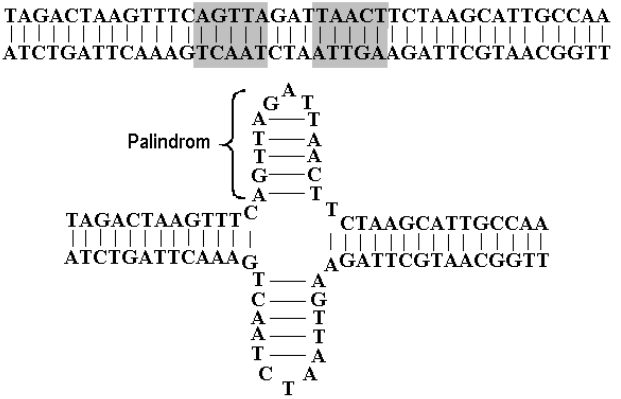


Fig. 2.13. Structura palindromului în formă de cruce în molecula de ADN

de cruce în moleculele bicatenare de ADN (fig. 2.13). Aceste secvenţe asigură interacţiunea cu proteinele (de ex., reprezintă situsuri pentru enzimele de restricţie sau suprafeţe de contact cu proteinele iniţiatoare ale transcripţiei, replicaţiei, semnal de terminare a transcripţiei).

Acizii ribonucleici

Molecule ARN sunt biopolimeri monocatenari, care constau din nucleotide unite prin legături fosfodiesterice 3′ → 5′. Spre deosebire de nucleotidele din componenţa ADN, monomerii ARN-ului conţin în calitate de pentoză riboza, iar bazele azotate sunt Adenina, Guaniana, Citozina şi ***Uracilul (U)***, care substituie Timina din ADN (fig. 2.14). De regulă,

moleculele de ARN sunt monocatenare, excepţie fiind moleculele de ARN viral, care pot fi şi bicatenare.

Structura primară a moleculelor de ARN este reprezentată de secvenţa nucleotidelor şi determinată de secvenţa de ADN, de pe care are loc transcrierea. ***Structura secundară*** reprezintă conformaţia spaţială a moleculei. Ea este stabilizată cu ajutorul legăturilor complementare care se formează în cadrul aceleaşi catene datorită existenţei secvenţelor inversate. Moleculele de ARN se pot asocia cu proteinele specifice în scopul protecţiei contra ARN-azelor (particulele RNP – ribonucleoproteice, care reprezintă forma de export a

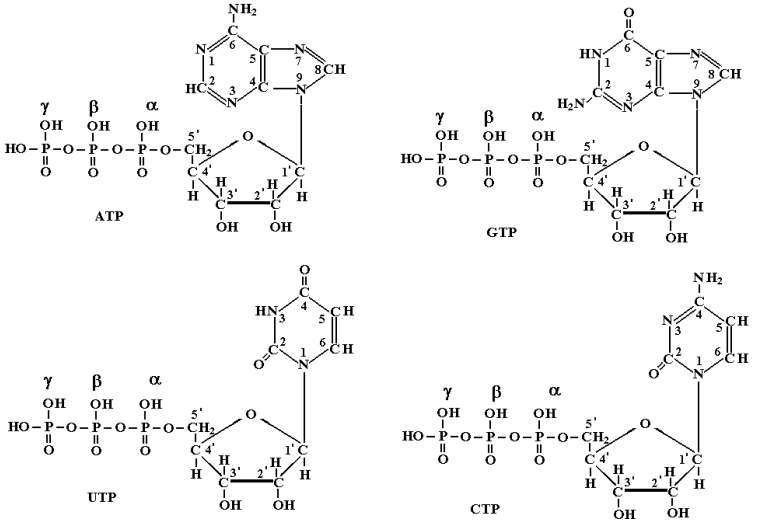


Fig. 2.14. Ribonucleozidtrifosfaţi – monomeri ai ARN

ARNm din nucleu în citoplasmă) sau asigurării funcţiei speciale (ARNr în ribozomi).

În orice celulă numărul moleculelor de ARN este mult mai mare decât cel al moleculelor de ADN. Cantitatea de ARN

variază în dependenţă de perioada ciclului vital sau de tipul ţesutului din care face parte. În celula există mai multe tipuri de ARN, dintre care cele mai reprezentative sunt ***ARN mesager (informaţional, matricial) – ARNm, ARN ribozomal – ARNr, ARN de transport (de transfer) – ARNt, ARN nuclear mic (ARNsn), ARN heterogen nuclear.***

ARNm se sintetizează în rezultatul transcripţiei genelor structurale şi serveşte ca matriţă în procesul de sinteză a proteinelor. În celule există o varietate mare de ARNm, care se deosebeşte cantitativ şi calitativ la diferite celule (vezi capitolul 9).

ARNr – reprezintă molecule cu lungime şi succesiune de nucleotide conservată (tab. 2.4), care fiind asociate cu proteine formează ribozomii. ARNr participă la sinteza proteinelor, asigurând legătura dintre ribozom ARNm şi ARNt.

Tabelul 2.4. Tipuri de ARNr

Tipul celulelor	**Coeficientul de sedimentare**	**Lungimea (baze)**
Procariote	5S 16S 23S	120 1540 2900
Eucariote	5S 5,8S 18S 28S	120 160 1900 4700

ARNt sunt molecule mici, cu o lungime de ~80 baze, care asigură transportul aminoacizilor spre ribozomi şi traducerea codului genetic. În celule se pot conţine până la 61

tipuri de ARNt, sau cel puţin 20 tipuri. Fiecare tip de ARNt este capabil să transporte un singur tip de aminoacid. Structura secundară a ARN de transport are o configuraţie specifică, numită "frunză de trifoi", formată din trei bucle funcţionale, care se obţin datorită secvenţelor inversate de nucleotide (fig. 10.3).

ARNsn este reprezentat de secvenţe de câteva zeci de nucleotide şi intră în componenţa enzimelor ce catalizează metabolismul acizilor nucleici (primaza, telomeraza, splicesomul).

ARN heterogen nuclear este întâlnit doar la eucariote şi reprezintă transcripţii primari sau produşii intermediari ai processingului.

Verificarea cunoştinţelor:

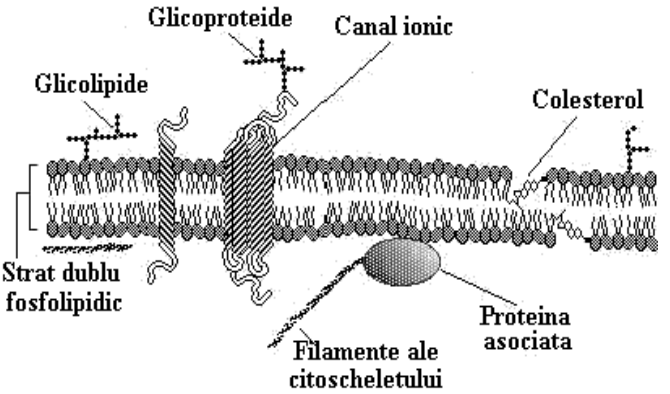
1. Definiţi noţiunile: polimer, monomer, structură primară, structură secundară, polipeptid, nucleotid, complementaritate, catene antiparalele, heterogenitate, palindrom, nucleozom, histonă, ARNm, ARNr, ARNt.
2. Care sunt constituenţii chimici de bază ai materiei vii?
3. Care este rolul biologic al proteinelor?
4. Cum se formează structura primară şi secundară a ADN?
5. Care este rolul sarcinii negative a acizilor nucleici?
6. Care sunt tipurile conformaţionale ale helixului dublu?
7. Care sunt funcţiile şi proprietăţile moleculelor de ADN?
8. Care este rolul biologic al ARN?

3

MEMBRANELE BIOLOGICE

Celulele ca sisteme biologice sunt delimitate de ambiant prin membrane semipermeabile. Acestea asigură funcţiile:

- barieră biologică;
- transport selectiv al ionilor şi moleculelor;
- recepţionarea şi transmiterea semnalelor extracelulare şi intercelulare;
- suport pentru enzimele implicate în diferite procese metabolice;
- compartimentalizare a mediului intern al celulelor eucariote;
- reglează homeostazia intracelulară şi intercelulară.



Membranele biologice sunt formate din trei componente moleculare de bază: lipide, care asigură funcţia de barieră semipermeabilă; proteine, ce asigură funcţionalitatea membranei; glucide – cu rol de recunoaştere şi semnalizare.

Organizarea moleculară a membranelor

După modul de aranjare a lipidelor şi proteinelor cel mai acceptat model este cel mozaico-fluid propus de Singer şi Nicolson (1972). Membrana celulară e formată dintr-un dublu strat (bimolecular) lipidic străpuns total sau parţial de proteine (fig. 3.1). Acest model explică fluiditatea membranară, fuziunea membranară, activităţile enzimatice, proprietăţile electrice şi antigenice ale membranelor biologice.

Bistratul lipidic

Principalele lipide întâlnite în membranele celulare sunt fosfolipidele (fosfogliceride şi sfingolipide), colesterolul, glicolipidele (situate spre exteriorul plasmalemei sau spre lumenul organitelor) (fig. 3.2).

Fosfolipidele au structura amfifilă având "cap" hidrofil şi "coadă" hidrofobă. Această proprietate permite aranjarea specifică a moleculelor de lipide la contactul cu apa: regiunea hidrofilă (polară) este întotdeauna îndreptată spre apă, iar cozile hidrofobe sunt maximal îndepărtare de ea. În cazul obţinerii emulsiilor moleculele lipidice formează nişte structuri globulare, numite ***micele,*** care respectă aceeaşi regulă de dispunere a moleculelor (fig. 3.2, D). Structurile de tipul dublu strat de lipide şi glicolipide au tendinţa de a se închide formând nişte vezicule sferice, numite ***lipozomi***. Deci, *fosfolipidele se*

pot autoasambla determinând formarea barierelor între diferite medii lichide. Totodată, membranelor le este caracteristică fluiditatea, asigurată în mare măsură de mobilitatea fosfolipidelor care poate fi de mai multe tipuri:

- mişcarea în interiorul moleculei de fosfolipidă;
- mişcarea întregii molecule de fosfolipidă;
- mişcarea de difuziune laterală, transversală, mişcarea de rotaţie în jurul axei longitudinale a moleculei;
- salturi extrem de rare de pe un strat pe altul (flip-flop)

În consecinţă, bistratul lipidic are proprietate de *barieră semipermeabilă* (doar unele molecule mici, nepolare, liposolubile pot trece uşor prin bistrat). Fosfolipidele sunt heterogene şi, interacţionând cu alte molecule (proteine, glucide), asigură specificitatea funcţională a membranelor.

Colesterolul din compoziţia membranelor celulelor animale asigură elasticitatea şi rezistenţa mecanică, păstrarea integrităţii celulei ca sistem biologic.

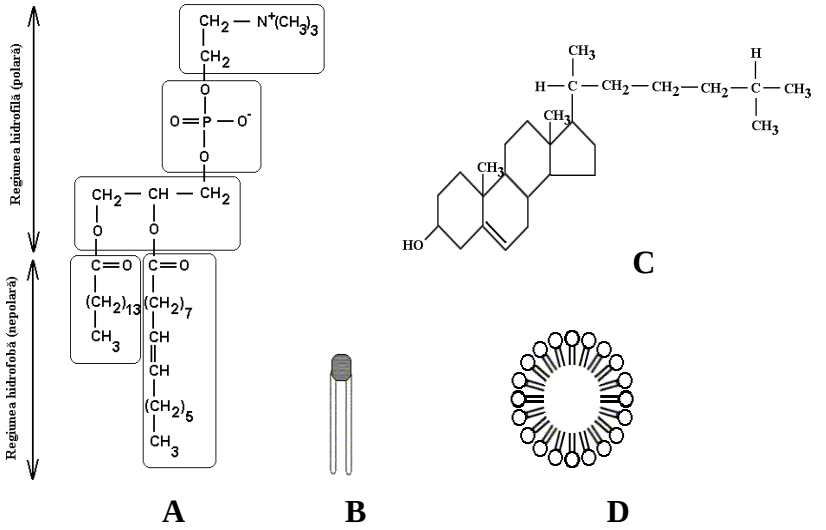


Fig. 3.2. Structura lipidelor membranare: A – Structura moleculei de fosfatidilcolină (fosfogliceridă); B – Reprezenrarea grafică a fosfolipidelor; C – Structura moleculei de colesterol; D – Structura micelei

Proteinele membranare

Proteinele constituie baza materială a funcţiilor principale ale membranei: transportul substanţelor, cataliza unor reacţii biochimice, recepţie. Cantitatea de proteine variază la diferite tipuri de celule. Astfel, în teaca de mielină proteinele constituie 25% din greutate, în plasmalemă – în medie 50%, în membrana internă a mitocondriei – 75%. După localizare se deosebesc două categorii de proteine membranare (fig. 3.3):

- periferice (extrinseci) - sunt ataşate la exteriorul stratului dublu lipidic, unde interacţionează în principal cu grupurile polare ale lipidelor sau altor proteine.
- integrale (intrinseci) - ce trec prin stratul lipidic; aceste proteine penetrează parţial sau total stratul dublu de lipide. Proteinele care străbat bistratul lipidic de la o faţă la altă se numesc ***proteine transmembranare***. Pot exista proteine cu mai multe domenii transmembranare. Se consideră că şi proteinele au porţiuni hidrofile care proeminează în afara membranei pentru a contacta cu mediul apos şi cu grupările polare ale fosfolipidelor. Partea hidrofobă se găseşte în interiorul membranei şi interacţionează cu lanţurile acizilor graşi din molecula fosfolipidelor.

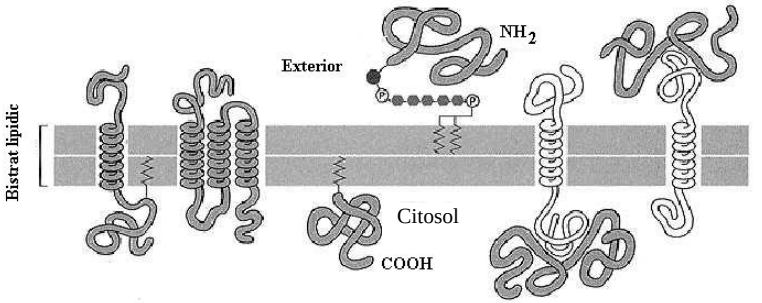


Fig. 3.3. Aranjarea proteinelor membranare

Dintre proteinele membranei plasmatice ale eritrocitului

pot fi menţionate ***spectrina*** (asigură forma biconcavă şi stabilitatea celulelor), ***glicoforina*** (are rol în recepţia celulară), ***proteina banda 3*** (menţinerea şi controlul pH al celulei).

Proteinele se pot deplasa şi ele în cadrul membranelor. Mişcările lor sunt laterale, determinate de schimbarea conformaţiei spaţiale. Totodată moleculele se pot roti în jurul axei perpendiculare planului membranei.

Glucidele membranare

Glicolipidele şi glicoproteidele formează un înveliş periferic la suprafaţa celulelor animale numit ***glicocalix*** (fig. 3.4).

Funcţiile glicocalixului:

- asigură recunoaşterea şi adeziunea intercelulară – servesc în calitate de receptori moleculari;
- asigură individualitatea celulei;
- este un depozit de cationi;
- ajută la orientarea corectă a proteinelor în membrană

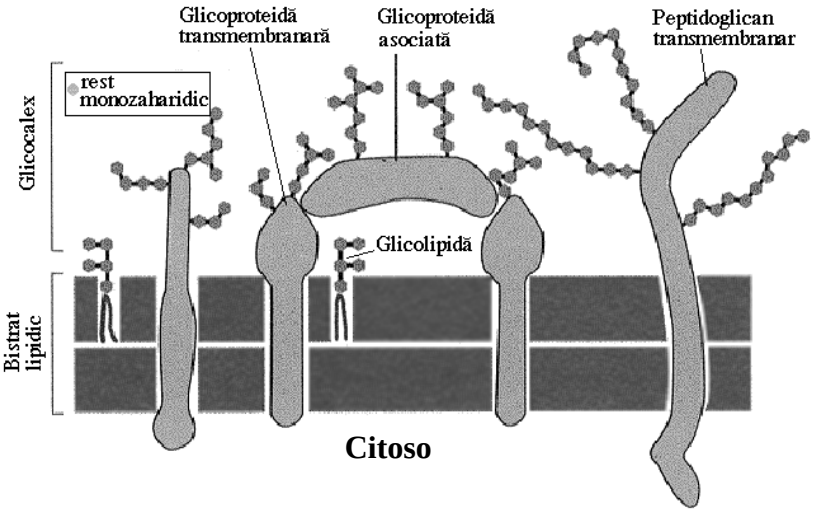


Fig. 3.4. Structura glicocalixului

Membrana plasmatică

Membrana plasmatică (membrana citoplasmatică, plasmalema) are grosimea de 6-10 nm, separă celula de mediul înconjurător, permite desfăşurarea schimbului de substanţe dintre celulă şi mediul extern, serveşte la comunicarea celulei cu alte celule sau cu mediul înconjurător.

Membrana plasmatică îndeplineşte diverse funcţii, printre care evidenţiem:

- funcţia de barieră, prin delimitarea mediului intern al celulei de cel extern;
- participă la metabolismul celulei, catalizând procesul de transport al substanţelor şi reglând proprietăţile fizico-chimice ale celulei (pH, presiune osmotică, potenţial electric etc.);
- controlează fluxul de informaţie dintre mediul extern şi celulă, prin recepţia şi transmiterea semnalelor din mediu;
- intervine în recunoaşterea şi adeziunea celulară;
- funcţia de protecţie imunologică a celulei şi a organismului.

Particularităţile membranelor interne

Membranele organitelor sunt asemănătoare cu structura membranei plasmatice. În funcţie de tipul organitului diferă cantitatea de proteine şi lipide. O caracteristică a membranelor interne este lipsa glicocalixului, sau prezenţa acestuia orientat spre lumenul organitelor (în reticulul endoplasmatic, aparatul Golgi).

Reticulul endoplasmatic se caracterizează prin conţinutul înalt de enzime care participă la procesele de biosinteză a diferitor clase de substanţe. Totodată, în RE rugos are loc îmbogăţirea permanentă cu proteine hidrofobe, care se integrează în membrană şi, ulterior, se transportă la locul de

destinaţie.

Veziculele endocitare şi cele de secreţie conţin în cantităţi mari proteina ***clatrina***, care facilitează procesul de endocitoză sau, respectiv, exocitoză.

În cadrul organitelor bimembranare membranele internă şi externă se deosebesc atât după compoziţia chimică, cât şi funcţiile exercitate. Funcţiile membranelor derivă din structură şi compoziţie. Astfel, membrana externă a mitocondriilor conţine proteina ***porina***, care asigură transportul unor molecule mici, inclusiv a unor proteine cu greutate moleculară mică. Membrana internă se caracterizează printr-un conţinut înalt de proteine (80%), ce fac parte din lanţul transportor de electroni (succinat-dehidrogenaza, citocromii) şi participă la procesul de sinteză a ATP (ATP-sintetaze), cât şi lipide specifice, dintre care se evidenţiază ***cardiolipina*** (10%)

Anvelopa nucleară

Nucleul este delimitat de citoplasmă printr-o membrană dublă, străbătută de pori, numită ***anvelopă nucleară***.

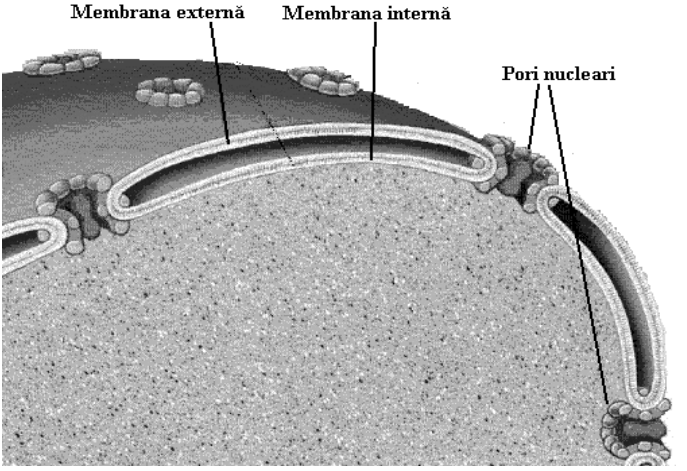


Fig. 3.5. Structura microscopică a anvelopei nucleare

Membrana nucleară internă se uneşte prin proteine specifice de ***lamina fibroasă*** a nucleului. Ea vine în contact cu ADN-ul şi ARN-ul transcris în nucleu (fig. 3.5).

Membrana nucleară externă continuă cu membrana reticulului endoplasmatic granulat. Pe suprafaţa ei, la fel ca şi pe suprafaţa RE rugos se găsesc ribozomi care participă la biosinteza proteinelor.

Între cele două membrane ce alcătuiesc anvelopa nucleară se află un ***spaţiu perinuclear*** cu o lăţime de 20-40 nm. Proteinele sintetizate pe suprafaţa nucleului nimeresc direct în lumenul RE cu care comunică spaţiul perinuclear.

Prezenţa a două membrane alăturate face imposibilă trecerea moleculelor de acizi nucleici în ambele direcţii. Transportul macromoleculelor se realizează prin intermediul numeroşilor ***pori nucleari***, care străbat ambele membrane. În medie se conţin 3000 – 4000 pori per nucleu, ceea ce constituie aproximativ 10% din suprafaţa nucleului. Fiecare por este format din ***complexul porului*** care constă din opt seturi de proteine plasate în trei starturi. Octamerul proteic mărgineşte un canal cu diametrul de 9 nm şi lungimea de 15 nm prin care nucleul comunică cu citoplasma (vezi fig. 6.3). În mijlocul porului se află ***granula centrală*** cu rol de diafragmă. Prin pori trec particulele RNP, subunităţile ribozomale, componentele necesare pentru activitatea normală a nucleului.

Biogeneza şi evoluţia membranelor

Membranele biologice se formează prin completarea membranelor preexistente. Astfel, componentele mebranare noi se sintetizează pe suprafaţa RE şi ulterior pot suferi transformări în AG (fig. 3.6).

Sinteza fosfolipidelor şi etapele finale ale sintezei colesterolului se realizează pe suprafaţa RE neted sau AG. Proteinele membranare se sintetizează pe suprafaţa RE rugos

sau în citosol. Proteinele intrinseci, de regulă, se sintetizează pe suprafaţa RE granular, conţin regiuni hidrofobe şi rămân integrate în permanenţă în membrane. Conformaţia spaţială a proteinelor poate fi stabilă, sau poate fi modificată în RE neted şi AG prin glicozilare. Grupele oligozaharidice atât pentru proteine, cât şi pentru lipide sunt adăugate în partea îndreptată spre lumenul RE sau AG.

Traficul de membrane se realizează prin intermediul veziculelor, care se află într-o mişcare continuă. Veziculele se inserează într-o membrană deja preexistentă. Reciclarea membranelor este un proces continuu, ceea ce asigură funcţionarea lor normală în permanenţă.

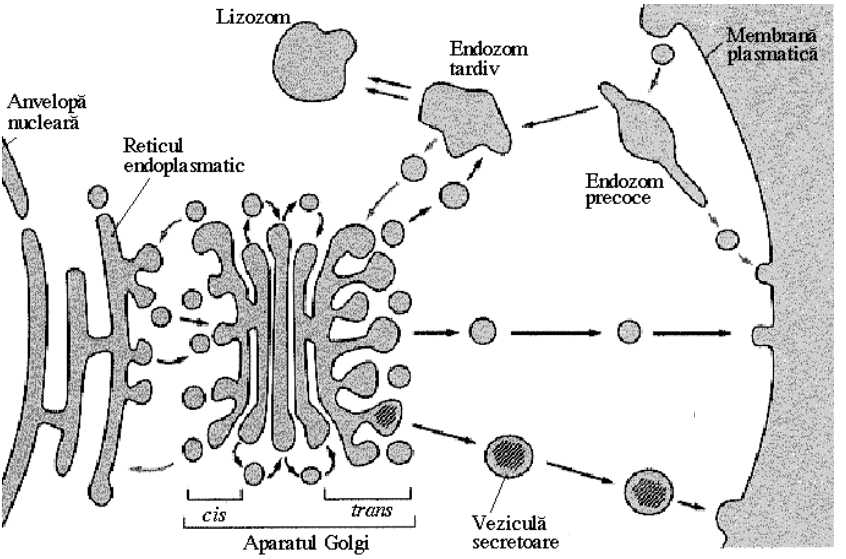


Fig. 3.6. Biogeneza, evolutia si traficul membranelor

Transportul prin plasmalemă

Plasmalema prezintă o permeabilitate selectivă care asigură transportul de materiale prin membrana plasmatică. Se

disting două tipuri de transport: pasiv şi activ.

Transportul pasiv

Transportul pasiv – se face fără consum de energie, substanţele se deplasează în sensul gradientului de concentraţie sau în sensul gradientului electrochimic (pentru ioni). Gradientul electrochimic e compus din gradientul de concentraţie şi cel electric. Partea internă a membranei are sarcină electrică negativă, iar cea externă - pozitivă.

A) ***difuziunea simplă***, are loc prin stratul dublu lipidic. Pătrunderea substanţelor liposolubile are loc conform coeficientului de repartiţie între ulei şi apă. De asemenea prin bistratul lipidic trec gazele şi, ca excepţie, unele substanţe hidrofile din care face parte apa, ureea, metanolul.

B) ***transportul ionilor*** prin intermediul unor substanţe numite ***ionofori*** (ionofori - polipeptide produse de microorganisme). Există două tipuri de ionofori: transportori mobili (de exemplu Valinomicina), care se unesc cu ionul de o parte a membranei, complexul străbate startul dublu de lipide, iar mai apoi ionul este eliberat de partea opusă; şi de tip canal (de ex., Gramicidina) două molecule de Gramicidină în stratul dublu lipidic formează un canal.

C) ***difuzia facilitată*** se produce de la o concentraţie mai mare spre una mai mică (se opreşte în momentul egalării concentraţiilor de pe cele două părţi ale membranei), dar substanţele transportate trec mult mai rapid (100.000 ori), decât ar fi de aşteptat pentru dimensiunea şi solubilitatea lor în lipide. Substanţele sunt transportate de către proteine specifice, numite ***permeaze***, care se comportă ca nişte enzime legate de membrană, fiindcă difuziunea facilitată are

caracteristici comune cu cataliza enzimatică. Fiecare proteină transportoare are un loc specific de legătură a substratului. Orice permează se poate uni şi, respectiv, este capabilă de a transporta un singur tip de molecule sau o anumită familie de molecule.

D) Exemple de difuziune facilitată: transportul anionilor, ureei, glicerolului şi a altor neelectroliţi. Transportatorul reprezintă o proteină transmembranară care suferă modificări conformaţionale reversibile. Într-o anumită stare conformaţională "pong", locurile de legătură se găsesc la exteriorul stratului dublu lipidic. În cealaltă stare conformaţională "ping" aceleaşi locuri sînt expuse pe partea opusă a membranei, iar substanţa este eliberată. Acest mecanism poartă denumirea de "pong - ping" (fig. 3.7).

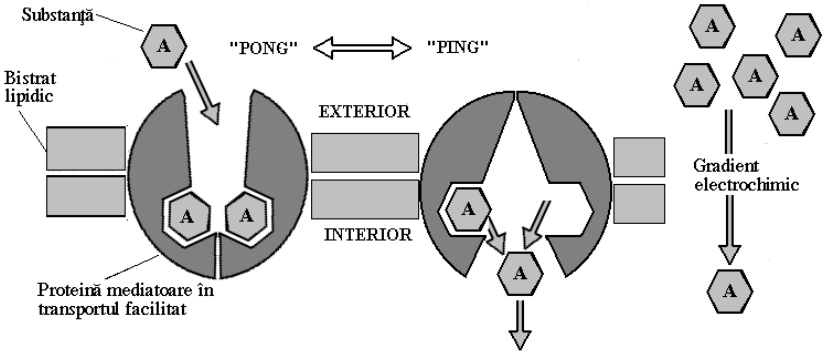


Fig. 3.7. Schema difuziei facilitate

E) ***difuziunea simplă mediată de proteine canal*** - se deosebeşte de difuziunea facilitată. Proteinele membranare formează canale care sunt deschise în mod continuu - "canale de poartă". Canalele se deschid :

- la legarea unui ligand de un receptor - canale cu poartă comandată de ligand;
- în dependenţă de voltaj - "canale cu poartă comandată de

voltaj”;

- canale care se deschid ca răspuns la creşterea concentraţiei intracelulare a unor ioni.

Transportul activ

Transportul activ - transport contra gradientului electrochimic, care necesită consum de ATP.

Transportul activ se efectuează de proteine transportatoare integrate în membrana plasmatică.

A) Transportul ionilor - pompa de Na^+ şi K^+ reprezintă o proteină-enzimă (Na^+ - K^+ ATP-aza) ce scindează ATP în ADP şi fosfat anorganic şi necesită Na^+ şi K^+ pentru activitatea sa. Pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizat se pompează la exterior $3Na^+$ şi la interior $2K^+$ (fig. 3.8). Proteina contribuie la generarea potenţialului electric de membrană. Pompa de Ca^{2+} menţine concentraţia scăzută de Ca^{2+} în citosol faţă de concentraţia mai mare a Ca^{2+} extracelular.

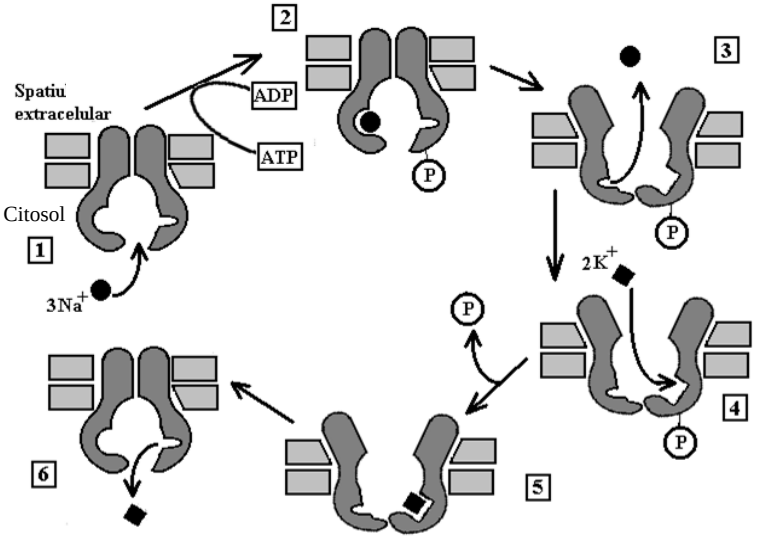


Fig. 3.8. Mecanismul funcţionării pompei Na^+/K^+

B) Transportul activ cuplat cu gradiente ionice e reprezentat de transportul glucozei şi al aminoacizilor prin plasmalemă. Glucoza este transportată de un cărăuş al glucozei de care se leagă şi Na^+ - sistem sinport. Na^+ tinde să intre în celulă conform gradientului electrochimic, antrenând în acelaşi sens glucoza. Cu cît gradientul de Na^+ este mai mare şi viteza transportului e mare; dacă se reduce gradientul de Na^+ se opreşte şi transportul glucozei. Na^+ care pătrunde cu glucoza este pompat în exterior de Na^+/K^+ ATP-aza ce menţine gradientul de Na^+.

Transportul aminoacizilor se face prin sistemul sinport cu Na^+, existând cel puţin cinci proteine diferite în plasmalema celulelor animale.

Direcţia de transportare a substanţelor

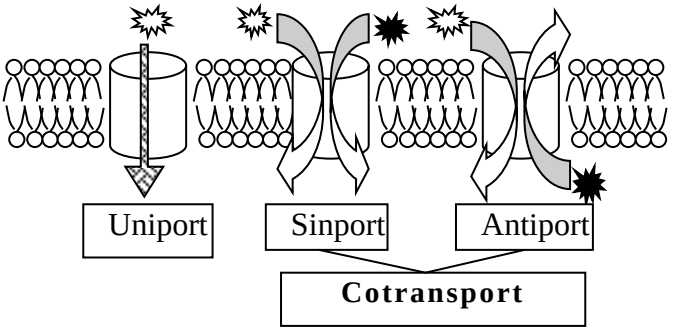


Fig. 3.9. Tipurile transportului prin membrane

Diferite tipuri de proteine transportoare asigură transferul fie a unui singur tip de molecule (ioni), fie a mai multor (fig. 3.9). Dacă printr-un canal se transportă un singur tip de substanţe astfel de transport se numeşte ***uniport*** (canalele de Ca^{2+} în membrana reticulului sarcoplasmatic). Transportarea mai multor substanţe prin acelaşi canal se numeşte ***cotransport***. Cotransportul poate fi de două tipuri: ***sinport***, în cazul dacă

diferite moleculele (ioni) sunt transportate în aceeaşi direcţie (Na^+ - glucoză, Na^+ - aminoacizi) şi ***antiport***, dacă substanţele se transportă în direcţii diferite prin membrană (pompa Na^+ - K^+, Na^+ - Ca^{2+}, Cl^- - HCO_3^-, Na^+ - H^+).

Transportul macromoleculelor prin membrane

Macromoleculele (proteine, polizaharide, picături de grăsimi, bacterii, fragmente celulare) nu pot trece liber prin membrane pasajul lor fiind facilitat de anumite proteine. Pentru ele este caracteristic transportul prin vezicule, care poate fi de trei tipuri: ***endocitoză, exocitoză, transcitoză***.

Endocitoza se clasifică în fagocitoză şi pinocitoză.

Fagocitoza este capacitatea unor celule de a înglobа din exterior particule solide (proteine, fragmente celulare, bacterii). Ea reprezintă o modalitate de nutriţie a protozoarelor, iar la mamifere joacă rolul de apărare a organismului datorită capacităţii leucocitelor de a fagocita. Prin fagocitoză sînt îndepărtate celulele senescente. Fagocitoza are câteva faze:

- chemotaxia - mişcarea dirijată a fagocitelor, spre locul infecţiei;
- recunoaşterea şi ataşarea fagocitelor de particulele străine se face cu ajutorul ***receptorilor*** din plasmalema fagocitului ce recunosc ***liganzii*** de pe suprafaţa particulei;
- înglobarea particulelor într-o veziculă;
- digerarea celulelor fagocitate.

Transportul macromoleculelor în procesul endocitozei este realizat prin intermediul veziculelor ce se formează din membrana plasmatică. Veziculele iau naştere în regiuni specializate ale membranei plasmatice ce au aspectul unor depresiuni. Pe suprafaţa citoplasmatică a depresiunilor se găseşte ancorată o reţea proteică, cel mai bine caracterizată este ***clatrina***, care determină formarea veziculelor.

Pinocitoza - este capacitatea celulei de a îngloba din exterior picături de lichide (mai frecvent picături de lipide), procesul fiind similar fagocitozei.

Exocitoza se produce prin fuziunea unor vezicule din citoplasmă cu plasmalema şi, astfel, materialul din vezicule este vărsat în afara celulei. Acest proces are loc în cazul eliberării hormonilor şi a neuromediatorilor în membrana presinaptică.

Transcitoza - o formă de transport prin vezicule, când macromoleculele sunt captate de o parte a celulei prin endocitoză, traversează citoplasma şi sunt eliberate în partea opusă prin exocitoză. Acest mecanism asigură transportul macromoleculelor prin epiteliul intestinal şi endoteliul capilar.

Adeziunea celulară

În organismele pluricelulare celulele care îndeplinesc funcţii similare formează ţesuturi, în care, în majoritatea cazurilor, se stabilesc contacte. Contactul intercelular este realizat prin intermediul unor structuri specializate numite ***joncţiuni intercelulare***. (fig. 3.10). Joncţiunea se realizează cu ajutorul complexului de macromolecule localizat în spaţiile intercelulare numit ***matrice intercelulară***.

Joncţiunile strânse (***joncţiuni de ocluzie***) – se formează prin apropierea puternică a două membrane vecine. Reţinerea membranelor în apropiere se realizează cu ajutorul unor proteine speciale, care sunt comune pentru ambele membrane. Ele apar între celulele epiteliale ce delimitează lumenul unor cavităţi (vezica biliară, unele glande endocrine).

Joncţiuni de adeziune – se întâlnesc, de asemenea, între celulele epiteliale, în apropierea joncţiunilor strânse. Astfel de contacte se menţin cu participarea citoscheletului (filamentelor de actină), distanţa dintre membranele vecine păstrându-se de 15-20 nm.

Desmozomii – asigură adeziunea celulelor în epitelii, necesară pentru asigurarea rezistenţei mecanice. Membranele celor două celule îşi păstrează individualitatea, între ele există un spaţiu de 15-20 nm. Contactele sunt menţinute cu ajutorul

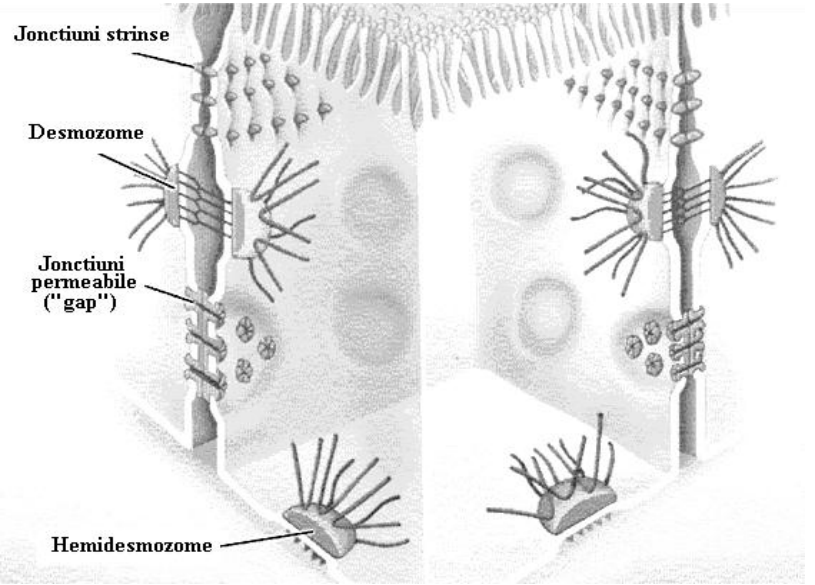


Fig. 3.10. Tipuri de joncţiuni celulare

filamentelor intermediare din celulele vecine, care constituie un tot întreg. Componenta fibrilară a desmozomilor e prezentată de exemplu prin keratină (între celulele musculare ale inimii).

Hemidesmozomii – structural sunt asemănători cu desmozomii, însă asigură contactul celulelor cu o structură specializată a matricei extracelulare, numită ***lamină bazală***. Sunt proprii ţesuturilor epiteliale.

Joncţiunile permeabile (***joncţiunile "gap"***) – se formează între membranele a două celule care comunică prin canale cilindrice formate de o proteină, numită ***conexină***. Distanţa dintre membrane este de 20-40Å. Canalele permit trecerea substanţelor cu greutate moleculară mică dintr-o celulă

în alta în mod direct prin punţi citoplasmatice şi formează un ***sinciţiu***. Sunt întâlnite între celulele musculare netede din intestin, sau între celulele embrionilor.

Sinapsa – reprezintă o joncţiune specializată între celulele nervoase, sau între celulele nervoase şi cele musculare prin intermediul cărora are loc transmiterea impulsurilor nervoase. În sinapsele chimice membranele celulelor vecine sunt separate printr-o spaţiu numit ***fantă sinaptică,*** în care se eliberează veziculele cu neuromediator. În sinapsele electrice impulsul electric este transportat prin intermediul ionilor, care trec prin joncţiuni de tip "gap".

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: plasmalemă, glicocalix, receptor, ligand, transport pasiv, transport activ, endocitoză, exocitoză, transcitoză, clatrină, joncţiune celulară.
2. Care sunt funcţiile membranei plasmatice?
3. Care este structura moleculară a membranei plasmatice?
4. Care sunt particularităţile organizării membranelor interne?
5. Care este organizarea moleculară şi funcţiile glicocalixului?
6. Care este importanţa transportului membranar pentru activitatea vitală a celulelor?
7. Care sunt particularităţile transportului pasiv?
8. Care este rolul biologic şi particularităţile pompei Na^+-K^+?
9. În ce constă evoluţia şi interacţiunea membranelor?
10. În ce constă rolul biologic al contactelor celulare?

4

COMPARTIMENTARA CELULEI EUCARIOTE

Celulele eucariote conţin membrane interne care separă diferite medii fermentative, formând organite membranare, care ocupă aproximativ o jumătate din volumul total al celulei (tab. 4.1). Principalele compartimente membranare sunt ***reticulul endoplasmatic (RE), aparatul Golgi (AG), lizozomii, peroxizomii, mitocondriile*** şi ***nucleul***. Fiecare dintre acestea conţine un set specific de proteine şi îndeplineşte o funcţie definită. Astfel, în celulă se pot realiza multiple reacţii chimice care asigură vitalitatea: asimilarea substanţelor din exterior, sinteza substanţelor proprii, metabolismul energetic, autoreproducerea, reînnoirea structurilor celulare, adaptarea la condiţiile de mediu, interacţiunile cu alte celule. Numărul, forma organitelor membranare şi, în special, compoziţia lor chimică diferă de la celulă la celulă, de la ţesut la ţesut.

Tabelul 4.1. Volumul relativ al compartimentelor celulare dintr-un hepatocit

Componenta	**% din volum**	**Numărul per celulă**
Citozolul	54	1
Mitocondriile	22	1700
RE rugos	9	1
RE neted şi AG	6	
Nucleu	6	1
Peroxizomi	1	400
Lizozomi	1	300
Endozomi	1	200

Reticulul endoplasmatic

Reticulul endoplasmatic reprezintă un sistem complex de membrane, organizate în canale şi cisterne. RE reprezintă aproximativ 10% din volumul celular total.

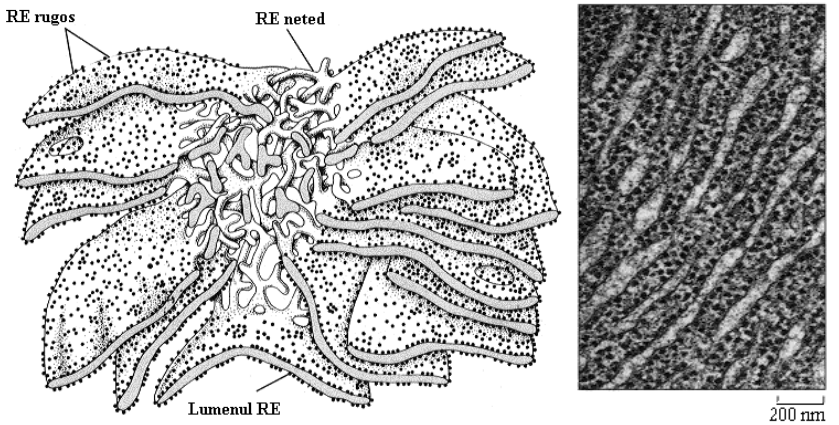


Fig. 4.1. Schema şi microfotografia reticulului endoplasmatic

Membranele RE au o organizare moleculară similară altor membrane (bistrat lipidic, proteine, hidraţi de carbon). Particularităţile funcţionale sunt determinare de proteinele prezente (de ex., riboforinele sunt prezente doar în membranele RE rugos şi asigură asocierea ribozomilor). Spre deosebire de membrana plasmatică în membranele din RE glucidele sunt orientate spre lumen, iar enzimele - spre citozol.

Din punct de vedere morfologic şi funcţional se deosebesc două tipuri de reticul endoplasmatic: a) ***RE rugos*** şi b) ***RE neted***. Ambele tipuri interacţionează între ele, au membrană şi lumen comune (fig. 4.1).

RE rugos. Are la suprafaţa membranei numeroşi ribozomi, iar lumenul reprezintă o continuare a spaţiului perinuclear. Canalele au un diametru de 20-30nm. În diferite celule apare sub diferite forme: *corpusculul Nissl* în neuroni, *corpusculii Berg* - hepatocite, *ergastoplasmă* - celulele pancreasului.

RE rugos este responsabil de sinteza diferitor tipuri de proteine:

- ✓ proteine secretate;
- ✓ plicoproteine pentru membranele:
  - plasmalemei;
  - nucleului;
  - RE;
  - aparatului Golgi;
- ✓ enzime lizozomale;
- ✓ enzime ale RE rugos;
- ✓ Enzime ale aparatului Golgi;
- ✓ proteine ataşate pe suprafaţa externă a membranei celulare: colagenul, laminina etc.

RE neted. RE neted este conectat la cisternele formate de RE rugos şi reprezintă o reţea de canale cu un diametru de 30-60nm. Este responsabil de sinteza şi metabolizarea acizilor graşi şi a fosfolipidelor, sinteza colesterolului şi a hormonilor steroizi, cât şi de detoxifierea xenobioticelor (pesticide, medicamente, cancerigeni chimici). Enzimele implicate în biosinteză sunt proteine membranare integrate şi au centrele active îndreptate spre citozol.

În sinteză RE exercită următoarele funcţii biologice:

- ♦ crearea în interiorul celulei a gradientelor ionice transmembranare şi a potenţialului de membrană;
- ♦ biosinteza proteinelor;
- ♦ glicozilarea proteinelor;
- ♦ biogeneza membranelor;
- ♦ detoxifierea substanţelor endogene şi exogene prin neutralizarea efectelor lor nocive (hidroliza, oxidarea, reducerea, conjugarea);
- ♦ biosinteza lipidelor;
- ♦ transportul substanţelor organice sintetizate;
- ♦ depozitarea substanţelor organice.

Aparatul (complexul) Golgi.

Aparatul Golgi (AG) a fost pus în evidenţă de Camille Golgi (1898) printr-o coloraţie specială, observată în celulele sistemului nervos şi reprezintă un set de compartimente funcţional distincte, formate dintr-un sistem de cisterne turtite şi delimitate de o membrană (5-11 compartimente per celulă) (fig. 4.2). Proteinele sintetizate în RE trec în AG pentru a fi prelucrate, sortate şi exportate.

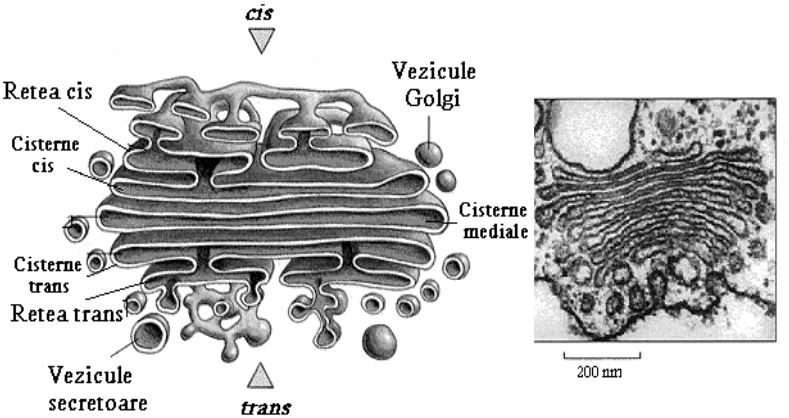


Fig. 4.2. Schema şi microfotografia aparatului Golgi

Funcţional AG este format din trei regiuni distincte (fig. 4.3):

- ***compartimentul cis*** (orientat spre RE) sau de "intrare", în care proteinele (sau componentele membranare) nou sintetizate sunt transferate din RE în aparatul Golgi; aici unele proteine sunt fosforilate sau/şi glicozilate (se adaugă una sau mai multe molecule de manoză);
- ***compartimentul median***, în care se face glicozilarea proteinelor şi lipidelor: se adaugă lanţuri mari de manoză, se adaugă N-acetil–glucozamină, galactoză şi fructoză;
- ***compartimentul trans***, în care se îndepărtează galactoza, se adaugă acid sialic, formând acidul N-acetil neuraminic (NANA). Compatrimentul *trans* continuă cu o reţea de

tuburi ce formează reticulul Golgi *trans* sau reţeaua Golgi *trans*. Acest compartiment reprezintă "poarta de ieşire", de export a produselor procesate şi sortate, destinate funcţiilor bine determinate în interiorul (anumite organite) sau exteriorul celulei. În jurul cisternelor proeminează grupuri de vezicule ce realizează traficul molecular de la RE la aparatul Golgi, între compartimentele complexului, şi exportă pe diferite direcţii molecule biologic active.

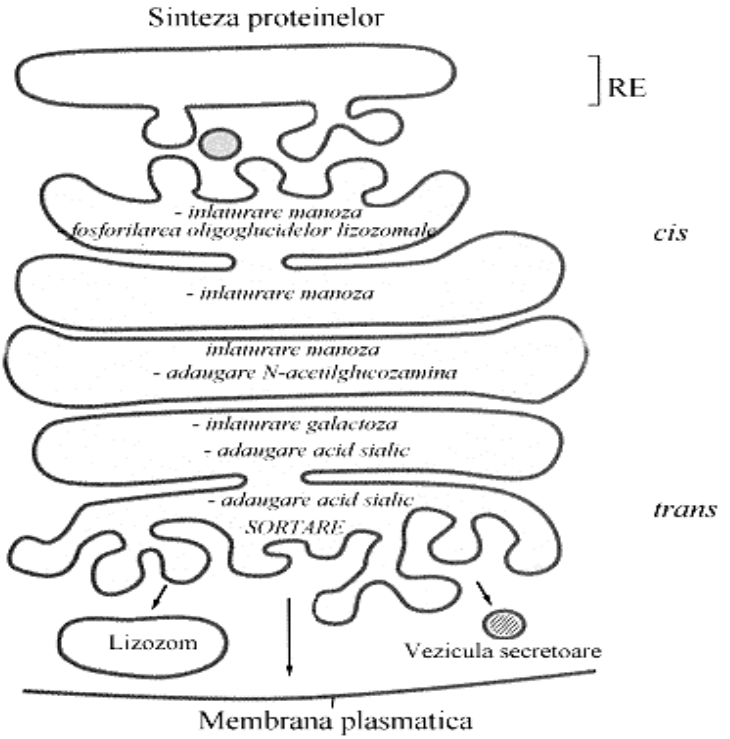


Fig. 4.3. Funcţionarea AG

Sortarea şi repartizarea moleculelor se face datorită interacţiunii lor specifice ligand – receptor (fig. 4.4).
În general, complexul Golgi este considerat sediul central al sintezei hidraţilor de carbon şi al modificării specifice a macromoleculelor. Proteinele şi lipidele care trec prin aparatul Golgi sunt supuse în mod dirijat unor modificări specifice. Procesul cel mai important constă în ataşarea lanţurilor de oligozaharide sau grupări fosfat la proteine şi lipide, care pot servi şi ca semnale de direcţionare sau sortare.

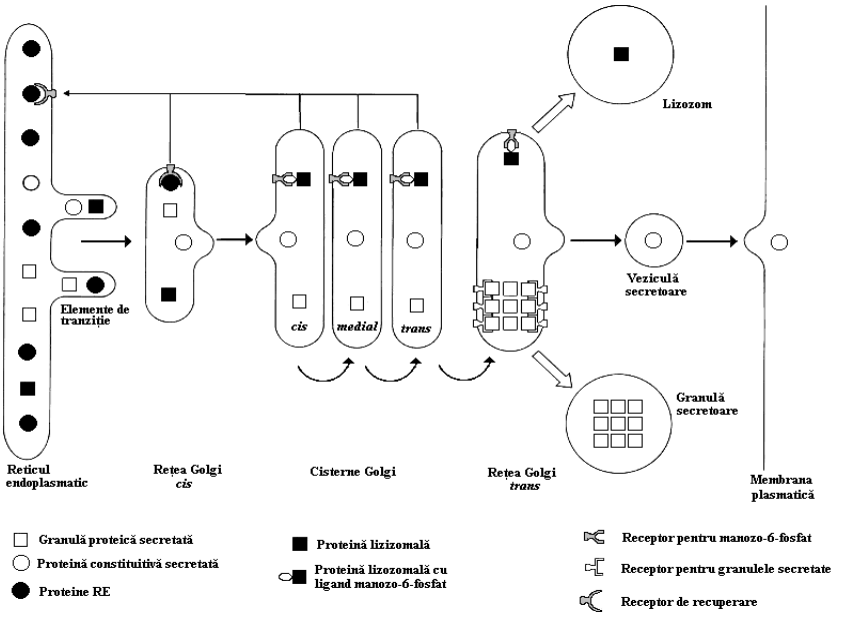


Fig. 4.4. Sortarea moleculelor în aparatul Golgi

Patologia AG:

- ✓ boala von Geerke – defect genetic enzimatic ce duce la supraîncărcarea celulelor cu glicogen;
- ✓ sindromul adrenogenital – sinteza deficitară a unor steroli;

- ✓ miopatii congenitale – RE anormal în fibrele musculare striate şi cele cardiace;
- ✓ toleranţa la unele medicamente în cazul alcoolismului cronic (alcoolul induce enzimele microsomale, ceea ce accelerează metabolismul medicamentelor şi respectiv eliminarea lor rapidă din sânge).

Lizozomii

Lizozomul a fost vizualizat ca organit celular doar prin microscopia electronică (Cristian de Duve, 1950). El a fost descris ca o veziculă, limitată de o membrană, funcţia lui principală fiind digestia intracitoplasmatică a diverselor molecule, componente celulare, corpusculi fagocitaţi. Sub aspect biochimic, lizozomii au fost prevăzuţi înainte de identificarea lor morfologică, prin acţiunea hidrolitică pe care o aveau omogenatele obţinute din celulele hepatice. Dimensiunea şi mărimea lizozomului variază în limite foarte largi 0,05-0,5 µm, însă însuşirea comună a acestora este faptul că reprezintă depozitul cu enzimele hidrolitice acide (enzime de digestie) (fig. 4.5). În membrana lizozomului se găsesc proteine puternic glicozilate, ceea ce o face rezistentă la acţiunea hidrolitică a enzimelor din lizozom.

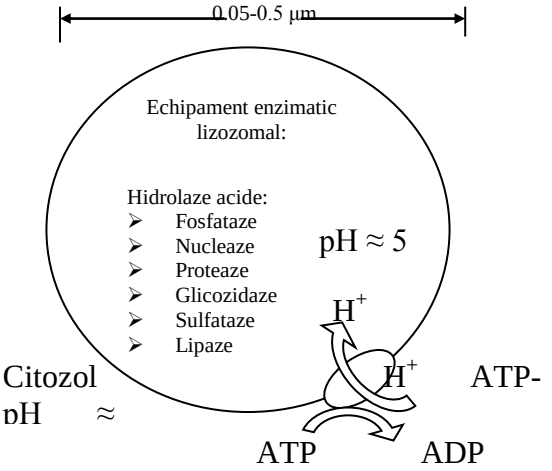


Fig. 4.5. Structura lizozomului.

Lizozomul conţine aproximativ 40 enzime hidrolitice a căror activitate optimă are loc la pH ~5,0. Această dependenţă a acţiunii enzimatice de pH protejează componentele citozolului (care are pH ~7,2) de o eventuală lezare a membranei lizozomale, deoarece enzimele devin inactive la pH 7,2.

În interiorul lizozomului pH-ul acid este menţinut de o pompă de H^+ (H^+-ATPaza) prezentă la nivelul membranei, care foloseşte hidroliza ATP ca sursă de energie. Astfel, ionii de hidrogen sunt pompaţi continuu în lumenul lizozomal asigurând în permanenţă un mediu acid. Acest mediu este necesar pentru denaturarea proteinelor, care le fac accesibile acţiunii hidrolazelor lizozomale.

Traficul materialelor spre lizozomi

Materialele care urmează a fi digerate sunt transportate la lizozomi pe diferite căi (fig. 4.6).

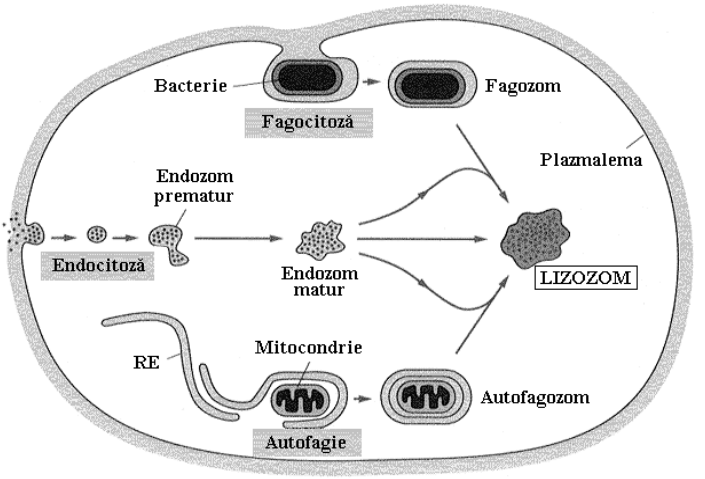


Fig. 4.6. Traficul materiallor spre lizozomi

- ***Endocitoză***, prin care materialul este transportat de la endozomi la lizozomi.

- ***Autofagocitoza***, prin care resturile celulare (părţile de celule) sunt transportate în lizozom pentru a fi distruse.
- ***Crinofagocitoză***, prin care se reglează cantitatea de produse secretate din celulară (de ex., hormonii în celulele endocrine).
- ***Fagocitoza***, care reprezintă procesul în care particulele sau microorganismele sunt incorporate în lizozomi şi ulterior digerate. Acest proces are loc numai în celule specializate (macrofagi, neutrofile). Prin incorporarea acestor materiale se formează ***fagozomii***, care se transformă în ***fagolizozomi***.

Patologii lizozomale:

√ boala *Tay Sachs* – se manifestă prin întârzierea dezvoltării mintale a copilului, perturbarea sistemului nervos central şi moartea până la vârsta de 5 ani. Boala este cauzată de alterarea unei enzime lizozomale necesare pentru catabolizarea mucopolizaharidelor; ca rezultat, în membrana celulelor nervoase se acumulează gangliozida GM2.

√ *boala cu celule I* este cauzată de incapacitatea ataşării grupării manozo-6-fosfat la enzimele lizozomale, din care cauză aceste enzime nu mai pot fi sortate şi direcţionate spre lizozomi la nivelul AG. Ca rezultat majoritatea enzimelor hidrolitice lipsesc din celule, având ca efect acumularea incluziunilor nedigerate în citoplasmă. La astfel de bolnavi fibroblaştii conţin nişte vezicule mari cu glicolipide şi componente extracelulare, care în mod normal ar trebui să fie hidrolizate de enzimele lizozomale.

Peroxizomii

Peroxizomii au fost identificaţi prin microscopie electronică de către Rhodin în anul 1954. Organitul are dimensiuni de 0.5-1μm şi este înconjurat de o singură membrană cu grosimea de 6 nm. În interior se află o matrice ce conţine ***oxidaze*** (*urat-oxidază, D-aminoacid oxidază)* şi ***catalaza***.

Peroxizomii utilizează oxigenul molecular pentru îndepărtarea atomilor de hidrogen din D-aminoacizi proveniţi din bacteriile intestinale. În felul acesta se obţine apa oxigenată (H_2O_2), toxică pentru celulă, care este mai apoi utilizată de *catalază* pentru detoxificarea fenolilor, acidului formic, formaldehidei şi alcoolilor.

$$RH_2 + O_2 \xrightarrow{Oxidaza} R + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + R'H_2 \xrightarrow{Catalaza} R' + 2H_2O$$

Reacţiile decurg, în deosebi, în celulele hepatice şi cele renale. În absenţa reacţiilor de detoxificare apa oxigenată se descompune până la apă şi oxigen molecular. În cazul dacă H_2O_2 nu este descompus de *catalază* pot apărea radicali liberi cu efecte nocive pentru celulă.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalaza} O_2 + 2H_2O$$

B**iogeneza peroxizomilor**: membrana peroxizomilor este generată prin reînnoirea fosfolipidelor de la RE neted. Proteinele peroxizomale sunt sintetizate de ribozomii liberi din citozol. Se presupune, că catalaza are o secvenţă semnal, orientată spre citozol, ce recunoşte enzimele peroxizomale întegrându-le în organit. Noii peroxizomi apar prin diviziunea peroxizomilor preexistenţi.

Patologia peroxizomilor:

√ sindromul Zellweger – este cauzat de lipsa peroxizomilor, ceea ce duce la disfuncţii cerebro-hepato-renale, ca rezultat copii mor până la vârsta de 1 an;

√ adrenoleucodistrofii – sunt cauzate de diminuarea funcţiei peroxisomilor în oxidarea acizilor graşi, ceea ce duce la distrugerea progresivă a substanţei albe din creier şi a corticosuprarenalei;

√ acatalazemia – peroxisomii lipsesc în celulele tumorale, ceea ce duce la creşterea rapidă a tumorii.

Mitocondriile

Mitocondriile sunt prezente în toate celulele eucariote şi sunt responsabile de conversia energiei eliberate din metabolizarea glucidelor, acizilor graşi şi aminoacizilor în legăturile macroergice fosfoanhidrice ale ATP. Au lungime de 2-10 μm, diametrul de 0.5-1 μm şi ocupă aproximativ 25% din volumul citoplasmatic. Orientarea şi distribuirea lor se realizează prin intermediul asocierii la microtubulii citoplasmatici.

Structural mitocondriile constau din două membrane (cu grosimea de 6 nm fiecare), compartiment periferic (spaţiu intermembranar) şi compartimentul central (matricea mitocondrială) (fig. 4.7).

– ***Membrana externă*** este alcătuită din proteine (50%), colesterol şi fosfolipide. Are un aspect neted şi îndeplineşte funcţia de filtru între citozol şi compartimentul periferic. Proteina *porina* funcţionează ca un canal ce permite transportarea diferitor molecule cu dimensiuni mai mici de 10kD.

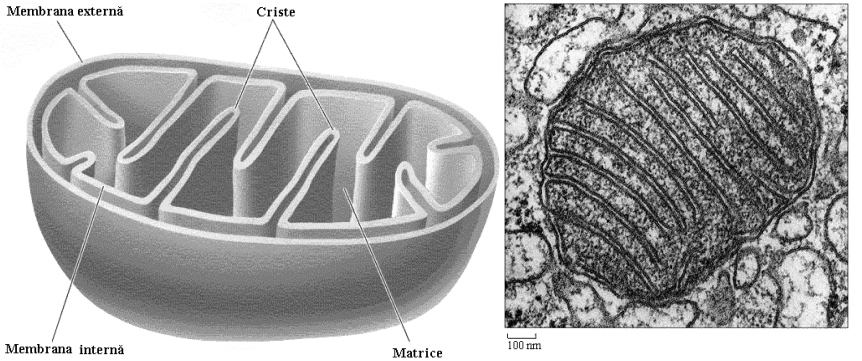


Fig. 4.7. Schema şi microfotografia mitocondriei

– ***Compartimentul periferic (spaţiul intermembranar)*** are lăţimea de 6-8 nm şi serveşte la acumularea protonilor, cât şi transportarea substanţelor.
– ***Membrana internă*** este alcătuită din proteine (80%) şi *cardiolipină* (difosfatdiglicerol – 10%), care oferă impermebialitate pentru mai multe tipuri de ioni. Proteinele se clasifică în:

➢ proteine implicate în reacţiile de oxido-reducere, ce se realizează la nivelul lanţului respirator;
➢ proteine transportoare, ce asigură intrarea metaboliţilor în matricea mitocondrială sau ieşirea lor în spaţiul intermembranar;
➢ complexul enzimatic ATP-sintetaza care asigură fosforilarea oxidativă.

Membrana internă formează numeroase invaginări numite ***criste,*** numărul lor fiind determinat de intensitatea metabolismului celular.

– ***Compartimentul central (matricea mitocondrială)*** care este format din:

♦ genomul mitocondrial (ADN circular, se conţine în mai multe copii);
♦ ribozomii mitocondriali (coeficientul de sedimentare de în mediu 70S; la mamifere – 55S);

- molecule de ARNm, ARNt;
- granulaţii cu densităţi electronice diferite (depozite de Ca^{2+});
- enzime implicate în:
  - ✓ replicarea şi funcţionarea aparatului genetic al mitocondriei;
  - ✓ oxidarea piruvatului şi a acizilor graşi până la acetil-CoA;
  - ✓ ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Crebs).

Procesele metabolice mitocondriale

În mitocondrii se desfăşoară procese metabolice legate de metabolismul energetic şi plastic.

Metabolismul energetic (fig. 4.8):

- oxidarea piruvatului şi a acizilor graşi până la CO_2, însoţită de reducerea cofactorilor enzimatici NAD^+ şi FAD;
- transportul protonilor şi electronilor prin lanţul respirator mitocondrial, însoţit de generarea unui gradient electrochimic de protoni;
- utilizarea energiei stocate în gradientul electrochimic de protoni pentru sinteza ATP din ADP şi fosfat anorganic;
- combinarea protonilor cu oxigenul molecular şi formarea apei.

Metabolismul plastic:

- autoreproducerea – este determinată de prezenţa genomului propriu, care este semiautonom faţă de genomul nuclear;
- expresia genelor mitocondriale cu participarea propriului aparat de translaţie: ARNm, ARNt, ribozomi;
- importarea din citozol a proteinelor sintetizate pe baza genelor nucleare (80% din proteinele mitocondriale sunt de origine nucleară).

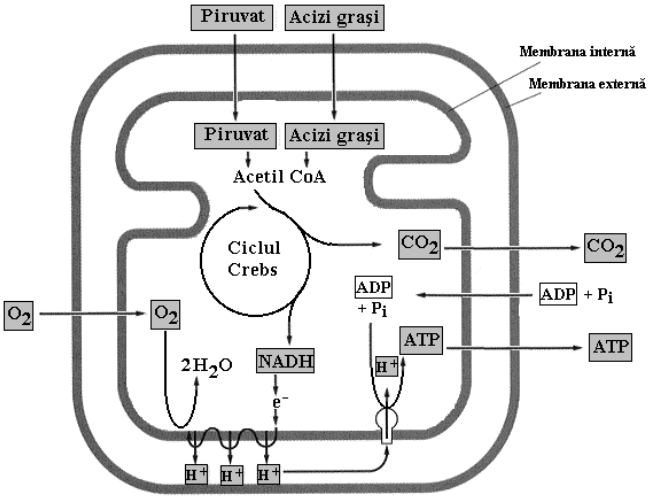


Fig. 4.8. Reprezentarea schematică a metabolismului energetic în mitocondrie

Patologia mitocondriilor.

În cazul defectului genelor mitocondriale boala poate fi transmisă doar pe linie maternă. Bolile provocate se referă la miopatii şi neuropatii:

√ miopatia mitocondrială;
√ encefalopatia şi encefalomiopatia familială;
√ neuropatia optică ereditară Leber;
√ sindromul Kearns-Sayre – afecţiune neuromusculară, cauzată de alterarea enzimelor lanţului respirator.

Citoscheletul

Una din particularităţile celulelor eucariote este capacitatea lor de a-şi păstra forma, de a efectua mişcări coordonate şi direcţionate, care se bazează pe existenţa unui sistem de filamente proteice numit ***citoschelet***.

Funcţiile principale ale citoscheletului sunt:

√ determină şi menţine forma celulei;

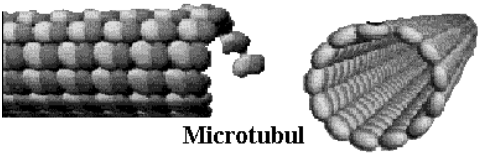
√ asigură localizarea precisă a organitelor;
√ asigură motilitatea celulară:
  – mişcări de contracţie musculară,
  – mişcarea de locomoţie ameboidală,
  – mişcările cililor şi flagelilor,
  – mişcările din microvli,
  – mişcările din cadrul diviziunii celulare,
  – curenţii citoplasmatici prin sistemul microtubul;
√ intervine în organizarea moleculară şi funcţională a membranei celulare, în chemotaxis şi în adezivitatea celulară;
√ asigură transportul intracelular al macromoleculelor asociate filamentelor.

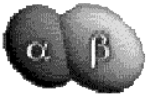
Citoscheletul este alcătuit, în principal, din trei tipuri de structuri fibrilare: microfilamente de actină, microtubuli şi filamente intermediare.

Filamentele de actină (***microfilamente***) sunt polimeri bicatenari formaţi din proteina actina. Reprezintă nişte structuri flexibile cu diametrul de 5-9 nm. Deşi filamentele de actină sunt dispersate în celulă, ele sunt concentrate mai mult în regiunea corticală a celulei. Actina interacţionând cu miozina, determină formarea miofilamentelor asigurând contracţia musculară şi motilitatea membranei plasmatice în timpul fagocitozei sau deplasării celulelor pe substrat.

Filamentele intermediare reprezintă nişte filamente heterogene cu diametrul ~10 nm formate din proteine fibrilare. Există o specificitate înaltă a filamentelor intermediare în dependenţă de ţesut (de ex., keratina în celulele epiteliale, desmina în celulele musculare, vimentina în fibroblaşti). Ele intră în compoziţia laminei nucleare, străbat citoplasma, asigurând rezistenţa la stresurile mecanice şi participă la joncţiunea celulelor.

Microtubulii reprezintă nişte cilindri lungi formaţi din tubulină (fig. 4.9). Ei au diametrul de 25 nm şi sunt mai rigizi decât filamentele de actină. Microtubulii, de obicei, sunt fixaţi cu un capăt de centrozom – centrul de origine a microtubulilor. Fiecare microtubul este format din 13 protofilamente, iar acestea la rândul lor sunt formate fiecare din heterodimeri de tubulină (α şi β) aşezaţi cu capul spre coadă, ceea ce conferă microtubulilor un caracter polar. În celulă microtubulii pot fi izolaţi, forma structuri provizorii (fibrele fusului de diviziune) sau organite permanente (centrioli, corpusculi bazali, cili, flageli) (fig. 4.10). Microtubulii realizează numeroase funcţii vitale pentru celulă: distribuţia cromozomilor în mitoză sau meioză, transportul intracelular, motilitatea celulară.





Tubulina

<u>Patologia citoscheletului:</u>

√ patologia motilităţii celulare:

- modificări complexe ale motilităţii leucocitare – sindromul Chediak-Higashi (*se caracterizează prin albinism parţial, infecţii piogene severe şi pancitopenie*) ca rezultat al defectului de asamblare a tubulinei în microtubul scade motilitatea neutrofilelor;
- diminuarea capacităţii chemotaxice a celulelor – "sindromul leucocitelor leneşe" (lazy-leucocyte syndrome);
- alterări moleculare şi funcţionale ale mişcării ciliare – sindromul Kartagener *(caracterizată prin triada: bronşiectazie bilaterală, inversiune viscerală, polipoză nazală sau sinuzită maxilară + sterilitate masculină din cauza pierderii motilităţii spermatozoizilor);*

√ modificări ale citoscheletului la nivelul celulelor canceroase; moleculele suprafeţei celulare sunt implicate în metastazarea tumorilor maligne;
√ cardiomiopatia familială ca urmare a anomaliilor discurilor intercelulare din miocard;
√ anemia megaloblastică – modificarea conformaţiei spectrinei eritrocitare.

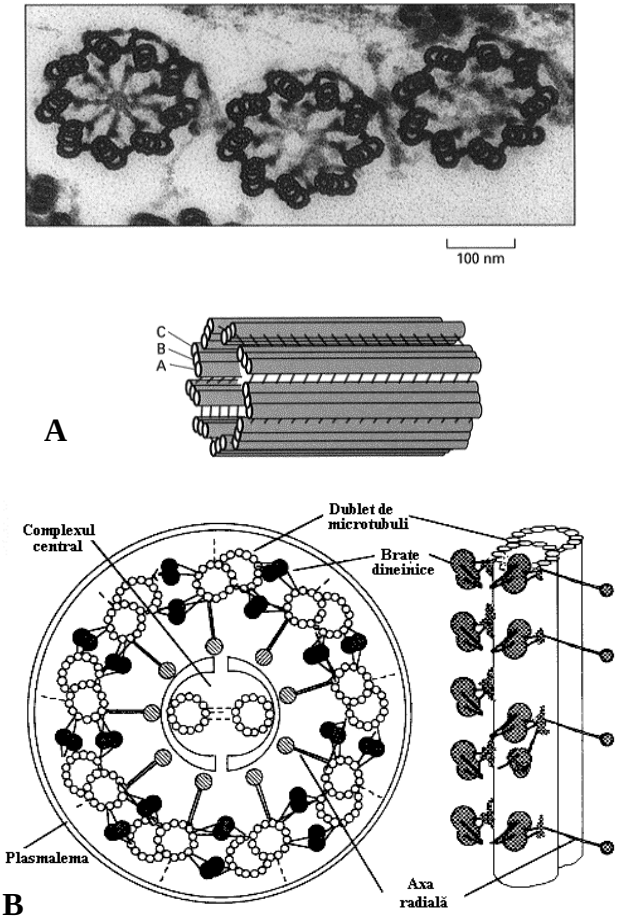


Fig. 4.10. A. Microfotografia şi schema centriolului. B. Structura corpuscului bazal al flagelului

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: organit, endosom, hidrolază, catalază, citoschelet, tubulină, centriol.
2. Care este rolul compartimentalizării celulare?
3. Care sunt funcţiile reticulului endoplazmatic?
4. Care sunt particularităţile de organizare ale AG?
5. Care sunt etapele sortării enzimelor lizozomale?
6. Care sunt funcţiile peroxizomilor?
7. Care sunt procesele metabolice din mitocondrii?
8. Ce roluri îndeplineşte citoscheletul în activitatea celulelor?

5

PROCARIOTELE

Celulele procariote se caracterizează printr-o organizare relativ simplă, dar posedă toate însuşirile de bază ale unei celule vii: membrană, aparat genetic, aparat enzimatic pentru sinteza substanţelor organice. Membrana plasmatică formează un singur compartiment citoplasmatic, fără o structură internă bine organizată. Conţin un singur cromozom (nucleoidul), constituit dintr-o singură moleculă inelară de ADN, fără a prezenta un nucleu bine conturat. Din acest motiv ele au fost denumite procariote. Principalii reprezentanţi ai acestei grupe de organisme vii sunt bacteriile şi algele cianofite. Bacteriile sunt procariotele care se întâlnesc cel mai frecvent în mediul înconjurător, fiind considerate cele mai mici entităţi vii, autonome, guvernate de informaţia conţinută în ADN.

În natură se întâlnesc diverse tipuri de bacterii. În dependenţă de formă se deosebesc:

- **bacili** – bacterii în formă de bastonaş (*Escherichia coli*);
- **coci** – bacterii sferice (*Micrococcus cerolyticus*);
- **diplococi** – doi coci într-o capsulă (*Diplococcus pneumoniae* – provoacă pneumonia);
- **streptococi** – şiraguri de coci (*Streptococcus pyogenes* – provoacă angina şi scarlatina);
- **stafilococi** – ciorchine de coci (*Staphylococcus aureus* – provoacă boli ale căilor respiratorii);
- **spirilă** - spirală cu flagel (*Spirrilum*);

- **vibrion** – formă de virgulă, cu flagel (*Vibrio cholerae* – provoacă holera).

Învelişul celular al bacteriei

În dependenţă de structura învelişului celular se disting **bacterii Gram – pozitive** şi **bacterii Gram – negative** (fig. 5.1). Denumirea depinde de culoarea pe care o obţin bacteriile în rezultatul colorării după Gram (cu colorant bazic).

Celulele sunt înconjurate de un **perete celular** rigid format dintr-un **peptidoglican** numit **mureină**. Unele bacterii sunt înconjurate de **capsule mucilaginoase** care asigură formarea coloniilor. Capsulele, de rând cu peretele celular, au rol de protecţie a celulelor. Astfel, suşele (bacterii dintr-o specie care se caracterizează prin anumite proprietăţi) de pneumococi posesori de capsule sunt virulenţi şi provoacă pneumonia, în timp ce suşele lipsite de capsule sunt avirulente, deoarece sunt distruse de fagociţi.

Bacteriile *Gram – pozitive*

La bacteriile Gram-pozitive învelişul celular este alcătuit dintr-o membrană plasmatică acoperită de un perete celular gros la care sunt asociaţi acizii teihoici, lipoteihoici şi polizaharidele.

Membrana plasmatică are o structură asemănătoare cu cea a eucariotelor. Bistratul de fosfolipide este asociat cu proteine integrale (proteine canal) şi semiintegrale (proteine enzime). Enzimele bacteriene sunt asociate la suprafaţa citoplasmatică a membranei, catalizând transportul activ al substanţelor, procesele lanţului respirator, sistemele de transformare a energiei. Membrana plasmatică conţine H^+-ATP-aza, componentele necesare pentru sinteza fosfolipidelor, peptidoglicanului, lipopolizaharidelor, conţine de ancorare a moleculelor de ADN. Membrana plasmatică bacteriană

reprezintă o structură multifuncţională care combină funcţiile realizate de diferite compartimente ale celulei eucariote.

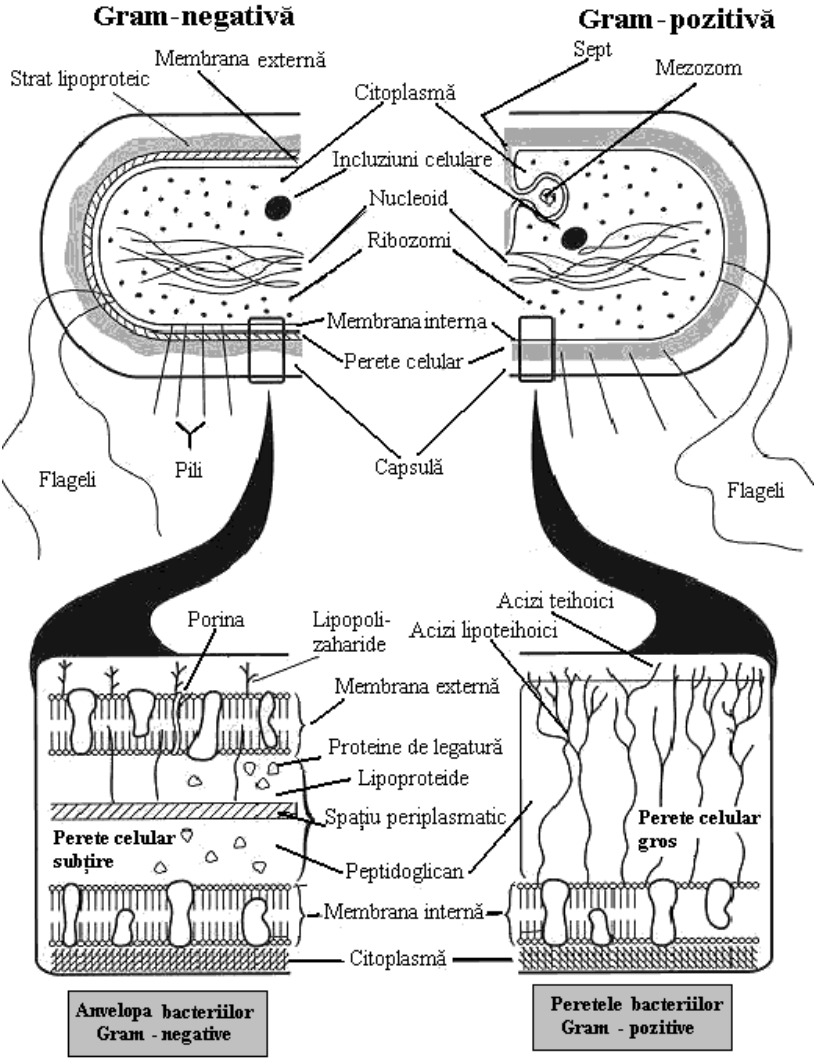


Fig. 5.1. Structura bacteriilor Gram-pozitive şi Gram-negative

În bacteriile Gram – pozitive se pot depista nişte structuri membranare veziculare sau veziculo-membranare numite **mezozomi**, care se formează prin invaginarea membranei plasmatice. La moment se consideră că mezozomii sunt nişte analogi ai mitocondriilor din celulele eucariote şi participă la procesele de respiraţie aerobă.

Peretele celular al bacteriilor este constituit din ***mureină***, care prezintă un polimer format din catene de N-acetilglucozamină (NAG), acid N-acetomuramic (NAM), unite între ele prin aminoacizi (fig. 5.2). Grosimea peretelui celular variază între 20-80 nm (la bacteriile Gram–pozitive), constituind de la 5-10% şi, respectiv, până la 95% din masa uscată a celulei.

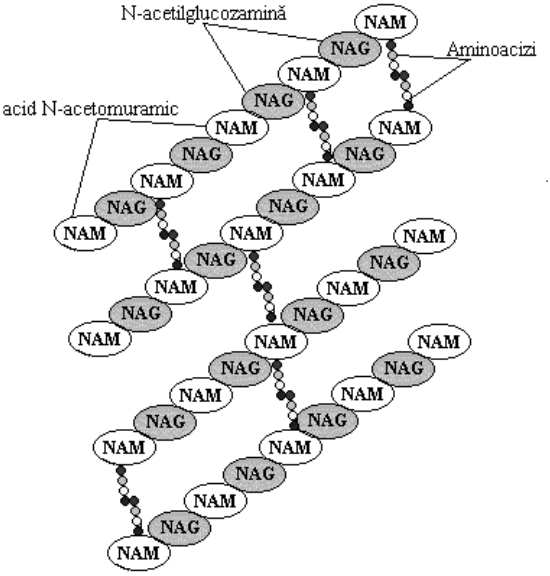


Fig. 5.2. Structura peptidoglicanului

La suprafaţa celulelor se află şi alţi componenţi:

- ***acizii teihoici*** care reprezintă polimeri purtători de sarcini negative şi reţin cristalele violete la colorare după Gram.

Acizii teihoici sunt strâns legaţi de peptidoglican la bacteriile Gram–pozitive, în timp ce la bacteriile Gram–negative lipsesc;

- ***Acizii lipoteihoici*** – reprezintă polimeri din glicofosfaţi şi glicolipide şi sunt ancoraţi de plasmalemă. Ei au rol antigenic, citotoxic şi adeziv (*Streptococcus pyogenes*).

La exterior peretele celular este acoperit cu un strat subţire de lipide care-l protejează de acţiunea ***lizozimei*** – enzimă capabilă să hidrolizeze legăturile dintre resturile de glucide, distrugând mureina. Stratul lipidic apără celula şi de acţiunea ***penicilinei***, care represează procesul de formare a legăturilor dintre componentele peretelui celular la bacteriile Gram–pozitive.

Bacteriile *Gram-negativ*e

Bacteriile Gram–negative se caracterizează prin existenţa a două membrane: ***membrana plasmatică internă*** - membrana, care comunică direct cu citoplasma, şi ***membrana plasmatică externă*** cu grosimea de 7.5-10 nm, situată spre exteriorul celulei. La majoritatea bacteriilor Gram–negative membrana plasmatică internă este unită covalent de peptidoglican prin intermediul lipopoproteidelor. La unele bacterii *(E. coli*), membrana externă şi cea internă comunică în mai multe locuri, ceea ce provoacă întreruperea continuităţii peretelui de mureină.

Membrana plasmatică internă la bacteriile Gram-negative are o organizare şi funcţii similare cu membrana plasmatică a bacteriilor Gram-pozitive, cu deosebirea că nu formează mezozomi.

În spaţiul periplasmatic există un strat de mureină cu grosimea de 3-10 nm, unit covalent cu membrana plasmatică externă prin intermediul unor lipoproteide.

Membrana plasmatică externă are o structură asimetrică formată de: fosfogliceride şi cardiolipine din stratul intern al acestei membarane şi lipidele A (molecule hidrofobe) din stratul

extern asociate cu polizaharide, formând stratul extern al învelişui bacteriilor Gram-negative de natură lipopolizaharidică.

Lipopolizaharidele reprezintă complexe formate din lipida A cu funcţie de ancoră şi lanţuri de carbohidraţi (Antigenul O).

În componenţa membranei externe doar la bacteriile Gram–negative intră o proteină specifică numită ***porina***, care formează canale pentru transportarea substanţelor hidrofile. Aceste canale au permeabilitate selectivă, astfel împiedicând trecerea unor antibiotice (ampicilina) cu acţiune contra bacteriilor Gram–pozitive. O trăsătură specifică pentru membrana externă a bacteriilor este incapacitatea realizării transportului activ din cauza lipsei complexelor enzimatice specializate.

Flagelii şi pilii

De la suprafaţa celulelor bacteriene pornesc nişte excrescenţe filiforme care pot fi de două tipuri: pili şi flageli. Unele bacterii posedă ambele tipuri de structuri.

Flagelii sunt prezenţi de obicei la suprafaţa bacililor, mai rar a cocilor. Ei reprezintă nişte tubuli cu grosimea de 10-60 nm formaţi din 3-11 filamente asamblate din proteina globulară ***flagelina***. Spre deosebire de flagelii celulelor eucariote, flagelii bacterieni nu sunt acoperiţi cu membrană plasmatică. Ei se unesc cu plasmalema şi peretele celular prin intermediul unor discuri, care la bacteriile Gram–pozitive sunt în număr de o pereche, iar la bacteriile Gram–negative – în număr de două perechi. Deoarece flagelina nu posedă activitate de ATP-ază, flagelii nu sunt capabili să efectueze mişcări ondulatorii ca la eucariote. Mişcarea lor se datorează rotirii flagelului în jurul axei sale. Ca sursă de energie pentru mişcare serveşte gradientul H^+ de la suprafaţa membranei plasmatice. Flagelii posedă proprietăţi antigenice (antigenul H).

În dependenţă de numărul de flageli deosebim următoarele tipuri de bacterii:

- **monotrihi** – cu un singur flagel (*Vibrio ohoterae*);
- **lofotrihi** – cu un mănunchi unipolar (situat la un singur capăt) de flageli (*Bartonella bacilliformis*);
- **amfitrihi** – cu mănunchiuri bipolare (la două capete) de flageli (*Spririllum serpens*);
- **peritrihi** – cu flageli în jur (*Escherichia coli*).

Pilii reprezintă nişte excrescenţe subţiri situate la suprafaţa celulelor Gram – negative şi sunt formaţi dintr-un grup de proteine numite ***piline***. Numărul lor variază de la câţiva până la 200 per celulă. Există 2 tipuri de pili: numeroşi pili scurţi care participă la adeziunea celulară faţă de substrat şi 1-6 pili lungi, numiţi ***pili de sex***, sau ***F-pili***, care participă la conjugarea bacteriană. În procesul conjugării are loc schimb de material genetic între celule. De asemenea, pilii conferă proprietăţi adezive acelor suşe care trăiesc în interiorul altor organisme.

Componente intracelulare

Bacteriile nu conţin organite celulare membranare aşa ca RE, AG, lizozomii, peroxizomii, mitocondriile. Unele specii conţin membrane fotosintetizatoare şi sunt de asemenea, descrise vezicule umplute cu gaze.

Celulele bacteriene conţin ribozomi cu coeficientul de sedimentare 70S (30S + 50S), responsabili de sinteza proteinelor. Ribozomii pot fi dispersaţi în citoplasmă sau pot fi asociaţi la ARNm în preajma nucleoidului. În citoplasmă se mai pot găsi şi substanţe de rezervă sub formă de granule de glicogen etc.

Numeroase specii bacteriene pot forma ***endospori*** – structuri care permit supravieţuirea speciei în condiţii nefavorabile. Au fost descoperiţi spori care au existat în stare latentă peste 25 milioane ani, păstrându-şi capacitatea de

restabilire. Endosporii au un perete celular gros ce conţine proteine, iar citoplasma este deshidratată.

Aparatul genetic al celulelor bacteriene

Materialul genetic al celulelor bacteriene este reprezentat prin ***nuocleoid*** şi ***plasmide***.

Nucleoidul constituie partea principală a genomului bacterian şi reprezintă o moleculă circulară de ADN cu lungimea de aproximativ 1 mm care conţine aproximativ $5x10^6$ perechi de nucleotide (pb). Nucleoidul este fixat de membrana plasmatică prin punctul de origine a replicării. Bacteriile se divid foarte intens, astfel, ADN se replică permanent. Deoarece bacteriile nu posedă microtubuli (fus de diviziune) care ar asigura migrarea cromozomului bacterian, diviziunea celulară de tipul mitozei este imposibilă. Pentru a asigura segregarea nucleoizilor în celulele nou-formate ei se îndepărtează în rezultatul creşterii membranei plasmatice, iar după formarea peretelui despărţitor nimeresc în celule diferite (fig. 5.3)

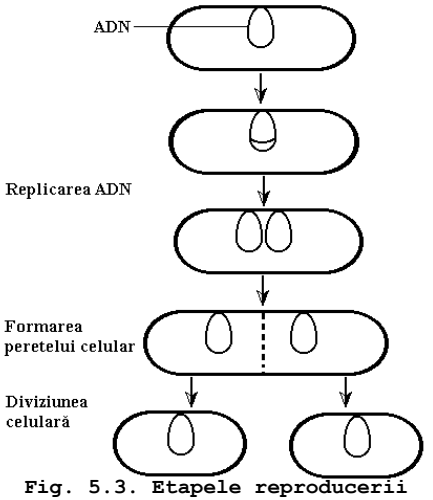


Fig. 5.3. Etapele reproducerii celulei bacteriene

Din punct de vedere chimic nucleoidul constă din 80% ADN (comparativ, la eucariote – 40%), proteine şi ARN. Proteinele din cadrul nucleoidului au proprietăţi bazice şi se aseamănă cu proteinele histonice ce asigură compactizarea ADN-ului la eucariote. ADN-ul bicatenar se asociază cu

proteinele bazice prin răsucire. La fiecare 40 mii nucleotide (40kb) ADN-ul astfel compactizat formează nişte bucle prin asocierea fizică la alte proteine bazice (fig. 5.4). Mecanismul de menţinere a structurilor superspiralizate nu este deocamdată cunoscut, dar posibil sunt implicate moleculele de ARN.

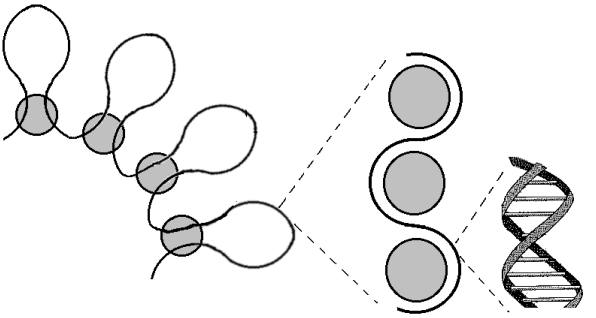


Fig. 5.4. Etapele condensării ADN-ului la procariote

Sub aspect funcţional, majoritatea secvenţelor de ADN reprezintă secvenţe unicale – gene structurale. Genele care codifică principalele clase de ARNr sunt grupate în tandem şi se repetă de 7 ori în genomul *E.coli.*

Plasmidele reprezintă molecule circulare de ADN capabile să se replice independent de nucleoid şi care constituie 0.05-10% din genomul bacterian. Ele sunt responsabile de sinteza unor metaboliţi (aminoacizi, antibiotici, factori de rezistenţă la antibiotici etc). Pentru replicare şi transcripţie plasmidele utilizează produsele codificate de genele din nucleoid, în timp ce iniţierea replicării este dirijată de gene plasmidice. După numărul de copii per genom există:

– plasmide cu un număr mic de copii (1-5) - de obicei sunt molecule mari, numărul şi activitatea cărora se află sub un control strict al nucleoidului;

– plasmide cu un număr mediu de copii (10-50) - molecule de dimensiuni medii, se află sub control parţial;
– plasmide cu un număr înalt de copii (>50) - molecule mici, semiautonome.

După genul de activitate în celulă deosebim:

- **plasmide R** - codifică sinteza factorilor de rezistenţă la antibiotice;
- **plasmide Col** - asigură sinteza ***colicinilor*** – proteine capabile de a distruge bacteriile lipsite de aceste plasmide;
- **plasmide F (plasmide de sex)** - asigură transferul de gene în cadrul conjugării bacteriene.

Recombinarea genetică la bacterii

Recombinarea materialului genetic între diferite celule bacteriene reprezintă sursa de variabilitate genetică, foarte importantă pentru selecţia lor naturală în lupta pentru existenţă.

Există trei mecanisme de transfer a materialului genetic de la o celulă bacteriană la alta: **conjugarea, transducţia** şi **transformarea.**

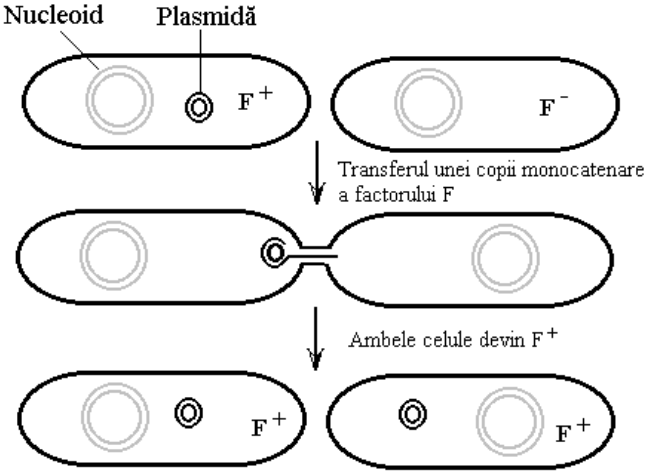


Fig. 5.5. Conjugarea bacteriană şi transferul factorului F

Conjugarea reprezintă procesul în care două celule bacteriene fac schimb de material genetic prin intermediul pililor. În acest scop contactează o bacterie purtătoare de plasmidă F **(F^+)** şi una lipsită de plasmidă **(F^-)**. Se consideră ca donor de material genetic celula F^+, iar celula F^- - acceptor de material ereditar. Din celula-donor se transferă o copie monocatenară a plasmidei F. În celula acceptor molecula monocatenară se transformă în bicatenară şi obţine formă de cerc. Ca rezultat ambele celule se transformă în F^+ şi în continuare pot funcţiona ca donori de informaţie genetică (fig. 5.5).

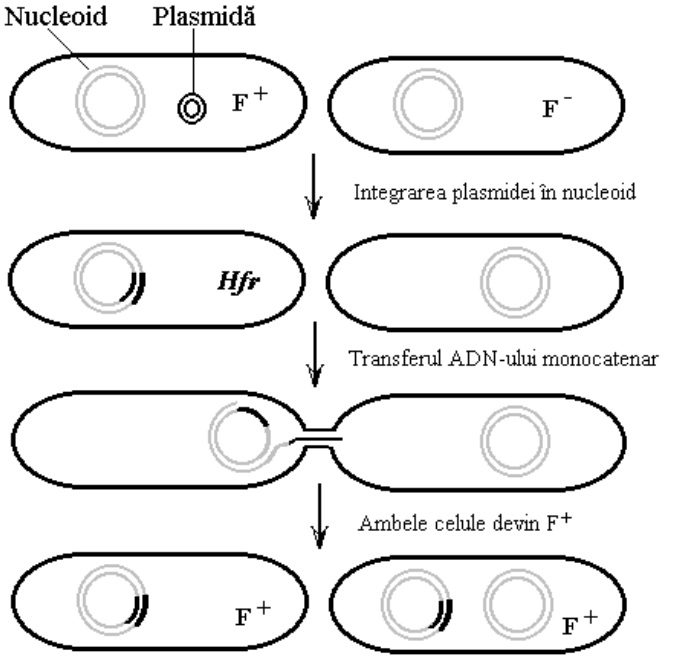


Fig. 5.6. Integrarea factorului F în genomul bacterian. Formarea bacteriilor Hfr

În unele cazuri factorul F se integrează în nucleoid, iar suşele respective se numesc **Hfr** (High frequency recombination). Celula Hfr serveşte ca donor la conjugarea cu o celulă F^-, transferând în celula-recipient o copie întreagă a nucleoidului (fig. 5.6). La fel ca şi factorul F, în celula acceptor trece o moleculară monocatenară. În unele cazuri procesul de conjugare se întrerupe, ca rezultat are loc transferul doar a unui fragment din nucleoid.

În unele celule Hfr factorul F se excizează din nucleoid, purtând cu sine şi un fragment al acestuia. În acest caz molecula recombinată poartă denumirea de ***factor F′*** (plasmidă F') (fig. 5.7). Celulele cu plasmide F' pot participa în procesul de conjugare.

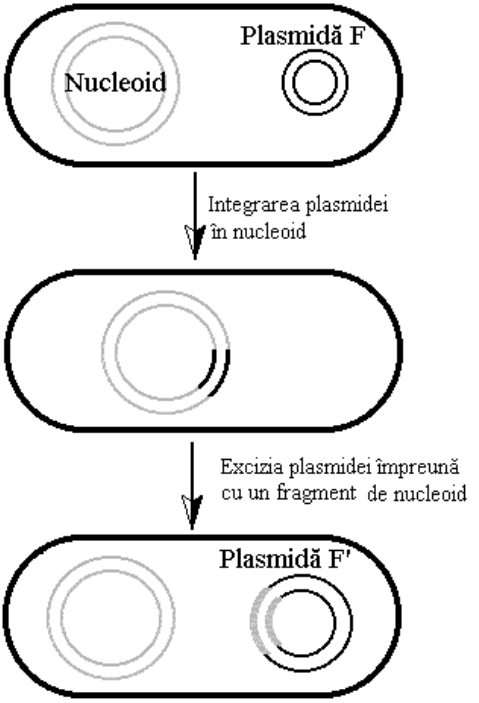


Fig. 5.7. Recombinarea între nucleoid şi plasmidă. Obţinerea factorului F′

Transformare genetică se caracterizează prin pătrunderea în bacterie a moleculelor de ADN din exteriorul celulei. Celulele pregătite pentru transformare poartă denumirea de ***celule competente*** şi pot fi obţinute în condiţii de laborator prin incubarea la temperaturi scăzute în prezenţa ionilor de Ca^{2+}, Cs^+ etc. Importanţa practică a transformării genetice constă în posibilitatea introducerii unor

gene de interes (de ex., gena insulinei) în bacterii cu scopul obţinerii proteinelor ce pot fi utilizate în calitate de preparate medicamentoase. În condiţii de laborator pentru transformare se utilizează în special plasmidele din familiile R şi Col. În condiţii naturale s-a descris transformarea pneumococilor şi a *E.coli* cu ADN circular şi liniar. Pentru ca moleculele de ADN să nu fie hidrolizate de enzimele gazdei ele devin circulare, sau se integrează în genomul gazdei.

Transducţia reprezintă transmiterea informaţiei ereditare de la o celulă bacteriană la alta prin intermediul bacteriofagilor. Bacteriofagii lizogeni sunt capabili să se integreze în genomul celulei gazde. Sub acţiunea factorilor exogeni (radiaţie, temperatură, pH), ei se excizează din nucleoid purtând un fragment al acestuia. Bacteriofagul excizat se multiplică, ceea ce conduce la distrugerea celulei-gazdă. Infectând alte celule, bacteriofagul transportă şi informaţia genetică de la celula distrusă.

Recombinarea genetică la bacterii are şi un rol medical. În primul rând, este vorba despre posibilitatea obţinerii preparatelor farmaceutice prin utilizarea bacteriilor transformate. Datorită recombinărilor genetice în natură apar populaţii de bacterii patogene rezistente la preparatele medicamentoase, ceea ce pune în dificultate vindecarea bacteriozelor.

Verificarea cunoştinţelor

1. Definiţi noţiunile: procariot, mureină, nucleoid, plasmidă, conjugare, mezozom, transducţie, transformare.
2. Care sunt componentele celulei procariote?
3. Care sunt particularităţile învelişului celular la bacterii?
4. Care este caracteristica genomului bacterian?
5. Care sunt tipurile de recombinare genetică la bacterii?
6. Ce rol biologic şi medical are recombinarea genetică la bacterii?

6

NUCLEUL

Nucleul este o structură intracitoplasmatică prezentă în toate celulele eucariote cu excepţia hematiilor adulte (fig. 6.1).

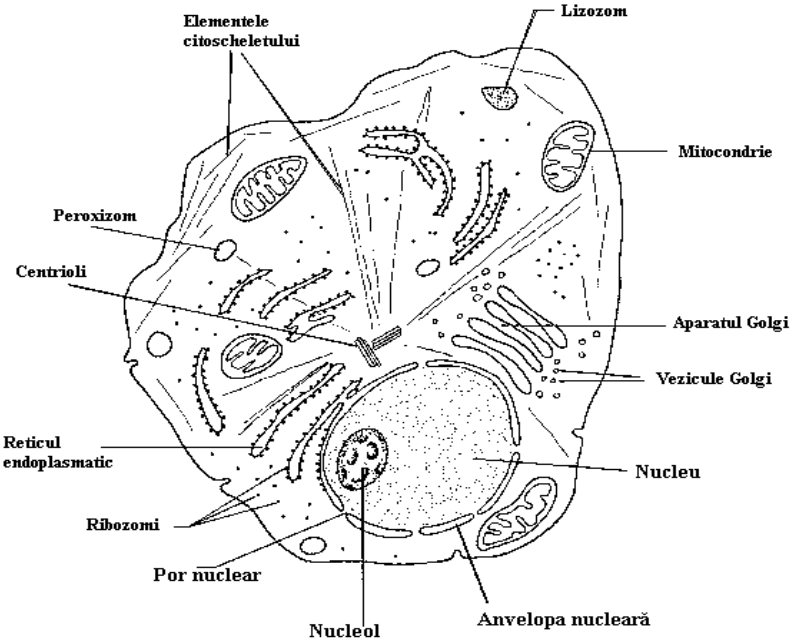


Fig. 6.1. Poziţia şi conexiunile nucleului în celulă

Nucleul îndeplineşte două funcţii importante:

- depozitează majoritatea informaţiei genetice din celulă (conţine circa 98% din ADN-ul celular);
- controlează şi reglează activitatea celulei.

Nucleul este alcătuit din ***matrice*** sau suc nuclear, ***cromatină*** sau cromozomi, ***nucleoli*** şi ***anvelopă nucleară*** (fig. 6.2.). În compoziţia nucleului intră ADN, ARN, două tipuri de proteine (histone şi non-histone), diferiţi compuşi organici şi anorganici. Lipidele şi glucidele există în cantităţi foarte mici, prezente doar în anumiţi componenţi nucleari.

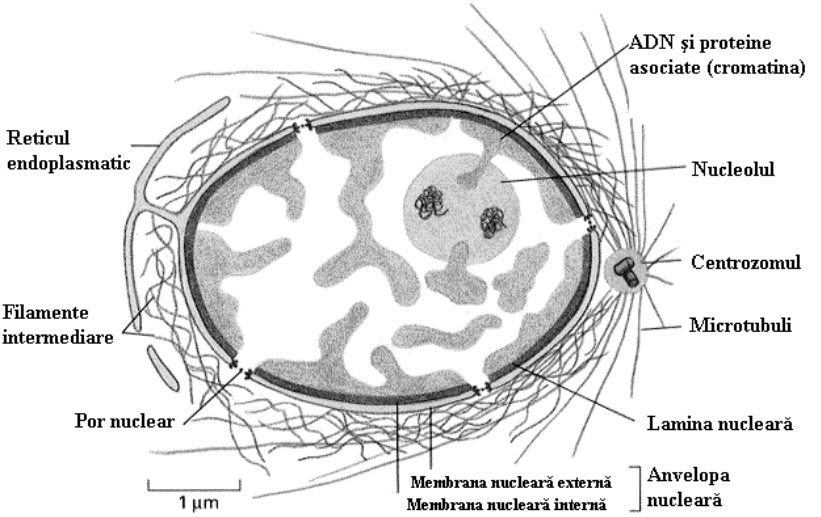


Fig. 6.2. Structura nucleului

Nucleul este centrul coordonator al celulei eucariote, funcţionând ca un computer chimic prevăzut cu un program (ADN) şi memorie (ARN). Ca centru informaţional, nucleul coordonează toate reacţiile chimice de desfăşurare a proceselor vitale prin controlul sintezei proteinelor – enzime celulare, iar organizarea celulei – prin sinteza proteinelor de structură. În fluxul informaţional există trei puncte cheie: replicarea ADN, transcripţia ARN şi traducerea mesajului genetic. Autoreplicarea

şi transcripţia se efectuează în nucleu, iar traducerea mesajului – în citoplasmă.

Anvelopa nucleară

Anvelopa nucleară este o membrană dublă prevăzută cu pori. ***Membrana externă*** a învelişului nuclear continuă cu RE rugos, ***membrana internă*** e lipsită de ribozomi. În locurile unde foiţa internă continuă cu cea externă se formează porii nucleari, iar spaţiul dintre membrane este numit perinuclear (20-40nm) şi comunică cu RE. Porii reprezintă circa 10% din toată suprafaţa învelişului nuclear (la mamifere).

Complexul porului nuclear

Complexul porului este compus din porul propriu-zis de formă octagonală cu un diametru de 60 nm, trei inele (annulus) cu diametrul de 120 nm. Inelul e format din opt granule proteice globulare cu diametrul de 15 nm care dau formă o octagonală. În centru e prezentă granula centrală cu rol de diafragmă fină, care, conform unor ipoteze, de fapt reprezintă molecule sau particule în tranziţie. Canalul porului are lungimea de 15 nm şi diametrul de 9 nm. Porul nuclear interacţionează cu matricea nucleară prin intermediul unor filamente cu diametrul de 4-8 nm, care se termină cu o extremitate pe inelul intern. (fig. 6.3).

Funcţia porilor: prin intermediul lor se realizează în special transportul macromoleculelor din nucleu în citoplasmă şi invers:

(i) din citoplasmă sunt importate în nucleu proteine ale matricei nucleare, enzime de sinteză a acizilor nucleici, proteine ce fac parte din componenţa cromatinei, proteine ribozomale;

(ii) din nucleu în citoplasmă se exportă precursorii ribozomilor, particule formate din complexe de ARNm cu proteine speciale, ARNt.

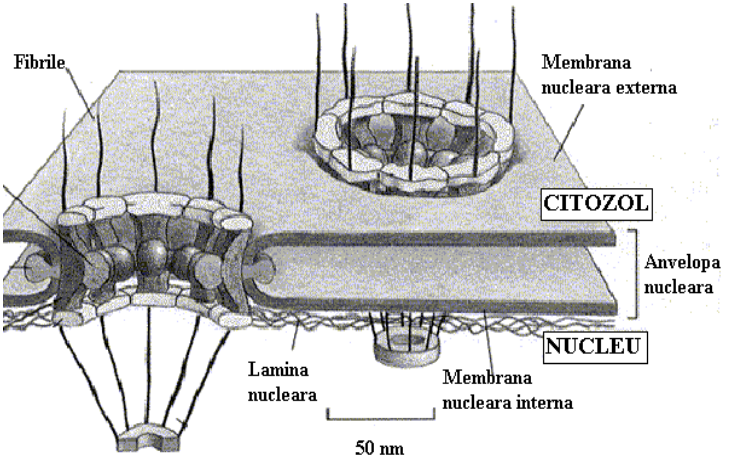


Fig. 6.3. Structura porului nuclear

Matricea nucleară

Matricea nucleară este denumirea atribuită scheletului de natură proteică care înglobează cromatina şi nucleolii şi care se sprijină pe membrana nucleară. Ea are un rol esenţial în organizarea nucleului şi sinteza ADN sau ARN, în medierea semnalelor hormonale, diviziune şi alte funcţii nucleare.

Matricea nucleară este compusă din două părţi:

- **matricea nucleară propriu-zisă** reprezentată de scheletul sau reţeaua proteică şi alcătuită din proteine stabile cu masă moleculară mare;
- **fracţiunea labilă** a matricei care este legată lax de reţeaua proteică şi conţine proteine solubile cu masă moleculară mică, molecule organice mici, substanţe anorganice şi apă.

Cea mai mare parte din proteinele ce intră în alcătuirea matricei nucleare (atât în matricea propriu – zisă, cât şi în fracţia labilă) este reprezentată de aşa-numitele proteine nehistonice, la care se adaugă şi enzimele nucleare. Proteinele nehistonice sunt o familie de proteine foarte heterogene atât ca masă moleculară,

cât şi ca particularităţi chimice. Spre deosebire de histone, o mare parte din acest grup de proteine sunt bogate în triptofan; ele au un turnover foarte rapid, fluctuând în limite foarte largi de la o stare funcţională la alta. Enzimele nucleare catalizează în mod special sinteza ADN, ARN şi processingul.

Matricea nucleară propriu zisă

Matricea nucleară propriu zisă sau scheletul nuclear este formată din trei componente:

- matricea sau *reţeaua fibrilară* intranucleară, intercromatică şi pericromatică;
- componentele nemembranoase ale învelişului nuclear, formate din *lamina densa* (*lamina fibroasa*) internă şi complexele por;
- *componenta nucleolară* sau reţeaua fiblirală din *pars fibrosa* şi *pars garanulosa* a nucleolului.

Lamina densa interna se află pe faţa nucleară a membranei interne din învelişul nuclear. Se prezintă sub forma unei reţele fibrilare conexate la reţeaua matricei nucleare, precum şi la componentele fibrilare ale complexului por.

Lamina densa internă a nucleolemei împreună cu complexul por formează partea scheletului nuclear denumită ***complex lamina-por***. Complexul este alcătuit din fibrile ce realizează trei reţele:

(i) fibrile ale laminei densa interconexate cu fibrile ale porului, formează o reţea în planul membranei interne nucleare sau imediat adiacent acesteia;
(ii) fibrile intranucleare ataşate complexului por orientate perpendicular pe învelişul nuclear;
(iii) fibrile intranucleare care structurează regiunea ocupată de heterocromatina periferică din nucleul intact. Această reţea

diferă de la o celulă la alta după cantitatea de heterocromatină în nucleul respectiv.

Nucleoscheletul complexului lamina-por conţine 2-3% din totalul proteinelor din nucleu. Este alcătuit în principal din proteine nehistone (95%), între care predomină cele acide. Pe faţa internă a complexului lamină-por se realizează activitatea nucleozid-trifosfatazei, considerată a fi implicată în transportul ARN către citoplasmă.

Rolul matricei nucleare

Matricea nucleară menţine forma nucleului şi stabilitatea sa în interfază. Modificările matricei nucleare sunt strâns cuplate cu funcţiile nucleului: organizarea cromatinei, replicarea ADN, transcripţia şi transportul intranuclear al ARN.

Matricea nucleară poate modula fluiditatea membranei nucleare, fluiditate necesară la rândul ei funcţiei matricei nucleare, în special în cea de transport al subunităţilor ribozomale prin porii nucleari.

Matricea nucleară poate modifica structura cromatinei, fenomen important pentru realizarea replicării ADN, transcripţiei ARN (activarea sau inactivarea genelor).

În timpul mitozei 95% din proteinele matricei nucleare sunt distribuite în citoplasmă. În refacerea nucleului după diviziune un rol important îl joacă glicozilarea acestor proteine la nivelul AG.

În nucleol scheletul ar avea rol de suport pentru depozitarea subunităţilor ribozomale.

Nucleolul

Nucleolul e prezent la toate celulele eucariote cu excepţia celulelor blastomerilor, în care nu are loc biosinteza proteinelor proprii (fig. 6.4). El conţine trei componenţi principali: ADN - 3%; ARN - 7%; proteine - 90%.

Nucleolul nu este separat prin membrană de restul nucleului. Numărul şi volumul nucleolilor depinde de etapa funcţională a nucleului (în celulele omului teoretic pot fi maximal 10 nucleoli mici la începutul interfazei şi un nucleol mare la sfârşitul interfazei). Nucleolii ocupă circa 30% din volumul nucleului. Există un raport determinat între volumul

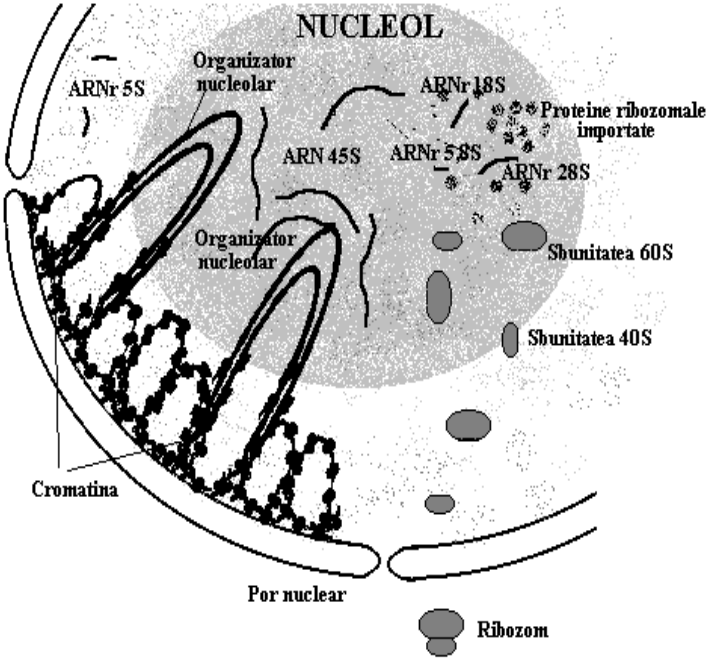


Fig. 6.4. Structura nucleolului. Biogeneza ribozomilor

nucleului şi cel al nucleolului numit ***volum nucleolo-nuclear***. Cu cât mai activă este celula în ce priveşte sinteza proteinelor cu atât acest raport este mai mare.

La microscopul electronic se disting 3 zone componente ale nucleolului:

- *componentul granular - particule cu diametrul 15-20 nm, ce reprezintă precursorii ribozomali;*

- *componentul fibrilar - din fibre de ADN de 5 nm (pe care se sintetizează ARNr) şi fibre de transcripţi;*
- *componenta amorfă a spaţiilor dintre fibre şi granule, se găseşte la periferia nucleolului.*

Rolul nucleolului este sinteza ARNr şi asamblarea precursorilor ribozomali. Segmentul de ADN (cromozom) în care se conţin gene ce codifică pentru ARNr poartă denumirea de *organizator nucleolar*. La om există 5 perechi de cromozomi cu organizatori nucleolari care controlează formarea nucleolilor la sfârşitul mitozei (perechile: 13, 14, 15, 21, 22).

Biogeneza ribozomilor

În nucleol are loc sinteza a trei fracţii de ARNr (5,8S; 18S; 28S) şi stocarea precursorilor ribozomali. De pe ADN se transcrie un precursor - ARNr 45S, care este procesat în trei fracţii mai mici (28S; 18S; 5,8S). ARNr 5S este sintetizat în afara nucleolilor. Moleculele de ARNr se asociază cu proteine ribozomale sintetizate în citoplasmă şi importate în nucleu. Particulele ribonucleoproteice (RNP) sunt transportate în citoplasmă sub formă de subunităţi ale ribozomilor (40S şi 60S).

Cromatina = cromozomii interfazici

Cromatina este compusă din ADN, proteine histone, proteine nehistone şi ARN. Astfel, cromatina poate fi considerată o nucleoproteidă în care proteinele histone şi nehistone interacţionează atât între ele, cât şi cu ADN-ul.

Cromatina se caracterizează prin forma extinsă şi despiralizată a cromozomilor în interfază.

La microscopul optic se pot fi observate granule, reţele de filamente şi corpusculi numiţi cariozomi, care se colorează cu coloranţi bazici. Din punct de vedere al interacţiunii cu coloranţii bazici, cromatina se clasifică în două categorii:

- eucromatina care se colorează slab cu coloranţi bazici;

- heterocromatina care se colorează foarte intens cu coloranţi bazici.

Eucromatina reprezintă regiunea cromatinei care conţine gene structurale şi este porţiunea funcţional activă a ADN-ului, de pe care are loc transcripţia. Aceasta este slab condensată şi, deci, se replică timpuriu, la începutul perioadei S a interfazei.

Heterocromatina reprezintă segmente de cromatină inactivă genetic, care nu se supune transcripţiei. Este mai puternic condensată şi se replică tardiv în faza S. Se disting două tipuri de heterocromatină: constitutivă şi facultativă. ***Heterocromatina facultativă*** reprezintă secvenţe care în anumite condiţii se pot despiraliza şi transforma în eucromatină. ***Heterocromatina constitutivă*** conţine ADN repetitiv sau satelit. Acest tip nu se transformă niciodată în eucromatină. Localizarea segmentelor heterocromatice în cromozomii omologi este identică.

Organizarea moleculară a cromatinei:

ADN (30%-40%) – în cei 46 de cromozomi din setul diploid al celulei somatice umane se conţin 46 de molecule liniare de ADN cu o lungime de 7 X 10^9 p.b.

Proteine histonice (40%) - polipeptide bazice, ce conţin peste 22% aminoacizi bazici, în special arginină şi lizină. Există cinci fracţii de histone: H1, H2A, H2B, H3, H4 (tab. 6.1). Proteinele histonice nu au specificitate de ţesut.

Tabelul 6.1. Caracteristica proteinelor histone

Tipul de histonă	Aminoacizii predominanţi	Număr aminoacizi	Masa moleculară
H1	Lizina	215	21500
H2A	Leucina, lizina	129	14000
H2B	Serina, prolina, lizina	125	13775
H3	Arginina, conţine cisteină	135	15320
H4	Arginina, lizina	102	11280

Funcţiile histonelor

Proteinele histone stabilizează dublul helix de ADN, inducând o structură terţiară – nivel elementar de organizare a ADN la eucariote. Din punct de vedere funcţional ele represează nespecific transcripţia, împiedicând unirea ARN-polimerazei la ADN.

Proteinele nonhistone - proteine acide (20%) cu un conţinut mărit de aminoacizi acizi (acid glutamic şi acid aspartic). Sunt heterogene, au o mobilitate mare, îndeplinesc funcţii catalitice în metabolismul ADN-ului şi expresia informaţiei genetice (polimeraze, ligaze, topoizomeraze, SAR, factori de transcripţie). O cantitate mare a proteinelor nonhistonice este prezentă în ţesuturile active, pe când histonele sunt prezente în cantităţi egale în ţesuturile active şi inactive.

ARN – este prezent în cromatină fiind produsul de sinteză de pe ADN, în special transcripţi primari şi ARNsn (de ex., ARN din compoziţia primazei, telomerazei, etc.).

Nivelurile de organizare a cromozomilor

Împachetarea ADN-ului într-un cromozom presupune existenţa câtorva nivele de organizare sau condensare, fiecare fiind responsabil de un anumit grad de micşorare a lungimii ADN-ului.

Primul nivel – nucleozomic – este determinat de asamblarea ADN-ului cu histonele, ce formează filamentul de cromatină (DNP) cu diametrul 11 nm (fig. 6.5). În cadrul acestui

nivel molecula de ADN se scurtează de ~6 ori. Fiecare ***nucleozom*** constă dintr-***un miez histonic*** (*core*) format din: 8 proteine: 2H2A, 2H2B, 2H3, 2H4 şi o secvenţă de ADN cu o lungime de 146 pb.

ADN-ul înfăşoară de ~2 ori octamerul histonic, formînd un complex stabil – nucleozomul. Între nucleozomi secvenţa de ADN- linker are o lungime variabilă, de la 8 până la 114 pb. Astfel filamentul polinucleozomic de cromatină are aspectul unui "şirag de mărgele".

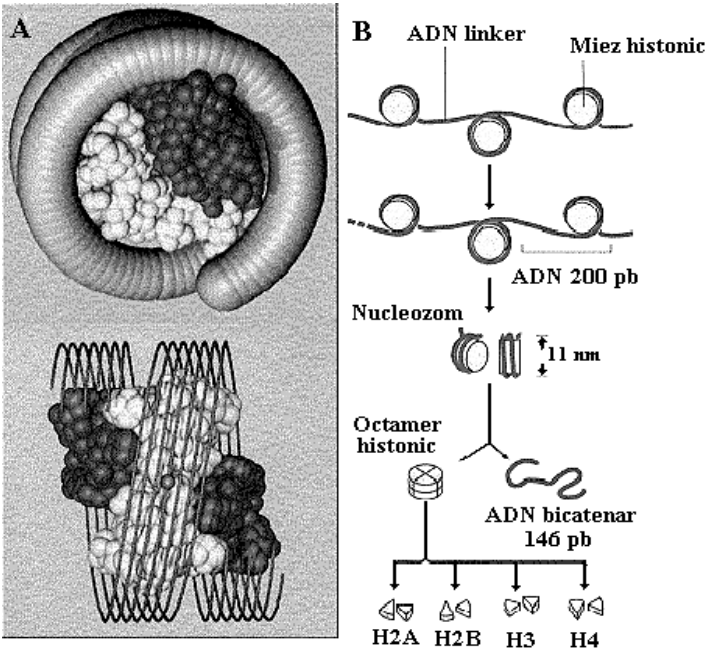


Fig. 6.5. Structura nucleozomului

<u>Al doilea nivel</u> – ***solenoidul*** – este reprezentat de fibra de cromatină de 30 nm ce rezultă din superspiralizarea

filamentului de cromatină (fig. 6.6). Acest nivel de compactizare scurtează molecula de ADN de 40-60 ori.

Solenoidul reprezintă o superspirală de dreapta cu şase nucleozomi per tur (fig. 6.6., B,C). Trecerea cromatinei de la nivelul I la II şi invers este determinată de modificările chimice ale histonei H1. Fosforilarea H1 se asociază cu superspiralizarea DNP, iar defosforilarea H1 – cu despiralizarea solenoidului (fig. 6.6., A). Acest lucru este important în reglarea activităţii genelor. Histona H1 este asociată atât cu miezul nucleozomic, cât şi cu segmentul ADN linker şi are rol în stabilitatea nucleozomului.

<u>Al treilea nivel</u> de compactizare este reprezentat de împa-chetări suplimentare, formând structuri mai complexe denumite ***bucle*** (300 nm,700 nm)**.**

Acest tip structural de cromatină este bine legat într-un suport structural în nucleu denumit ***matrix nuclear*** sau ***axă cromozomială (scaffold)*** prin interme-diul unor proteine acide ***SAR*** (<u>S</u>caffold <u>A</u>ssociated <u>R</u>egions) (fig. 6.7).

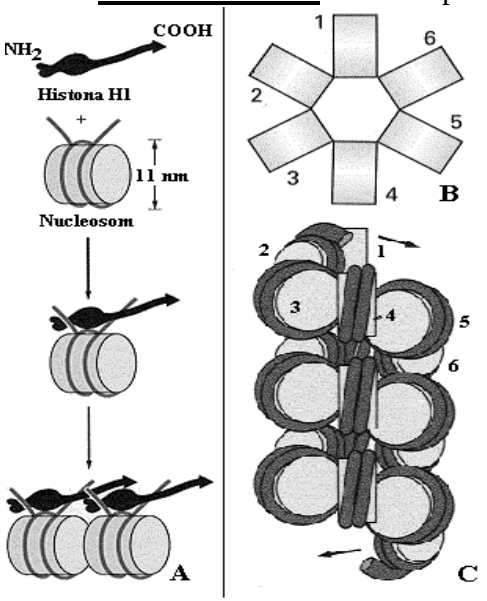


Fig. 6.6. Formarea solenoidului – al II-lea nivel de compactizare a ADN

<u>Al patrulea nivel</u> reprezintă condensarea şi plicaturarea buclelor ce duce la formarea cromatidelor ***cromozomului metafazic***. Fiecare cromatidă are grosimea de la 700 la 1200 nm, iar ADN în cromosom se scurtează de ~ 10000 ori.

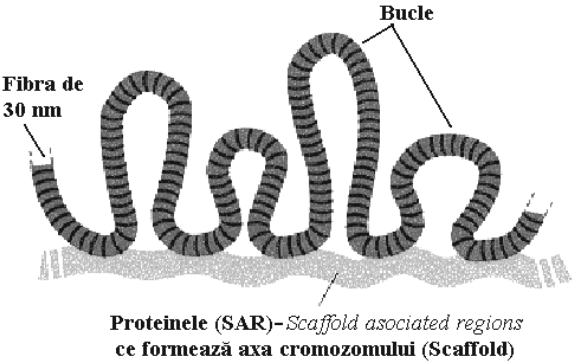


Fig. 6.7. Asocierea buclelor la proteinele axei cromozomiale (Scaffold)

Datorită proprietăţii cromatinei de a se compactiza în nucleul celulei umane cu diametrul de ~4μm încap 46 molecule de ADN cu lungimea totală de circa 2 m.

Cromozomul metafazic este format din 2 cromatide surori identice unite prin centromer la nivelul constricţiei primare (fig. 6.8). Constricţia primară cât şi perechea de ***kinetocori*** (disc trilamelar din fibre de cromatină superior organizate) – reprezintă situsurile de ancoraj ale microtubulilor fusului de diviziune.

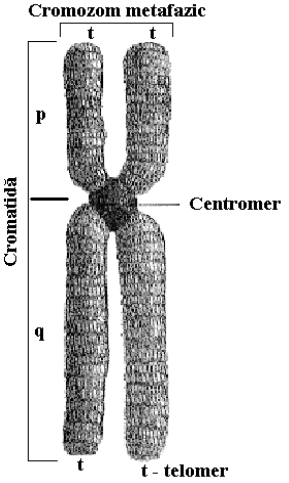


Fig. 6.8. Aspectul unui cromozom metafazic

Centromerul reprezintă punctul de unire a cromatidelor şi de asamblare a kinetocorilor.

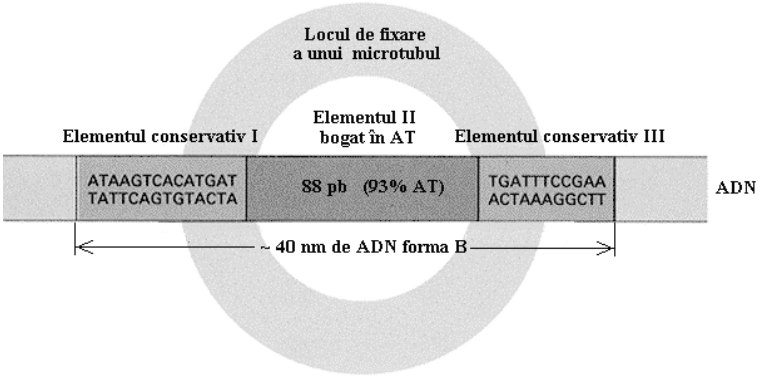


Fig. 6.9. Structura centromerului la drojdii

Centromerul împarte cromozomul în două braţe: braţul **p** - proximal, mai scurt; braţul **q** - distal, mai lung. Regiunea centromerică a cromozomului este formată din ADN şi proteine speciale. ADN centromeric conţine secvenţe repetitive în tandem şi secvenţe repetitive dispersate cu localizare pericentromerică, ce intervin în recunoaşterea cromozomilor omologi la conjugare, menţinerea celor două cromatide surori până la sfârşit de metafază şi separarea lor în anafază. La drojdii centromerul are dimensiuni de ~120 pb (fig. 6.9). La eucariotele superioare regiunea centromerică are dimensiuni mult mai mari, de ordinul sutelor de mii de nucleotide.

Telomerii reprezintă complexe din ADN şi proteine specializate care formează capetele cromozomilor eucariotelor.

La procariote toate moleculele de ADN sunt circulare ceea ce previne degradarea lor enzimatică. La eucariote ADN are structură liniară, de aceea pentru a asigura protecţia de exonucleaze şi individualitatea cromozomilor (împiedică reanrajamentele cromozomice) apare o structură specifică din secvenţe scurte repetate de ADN (tab. 6.2).

Tabelul 6.2 Varietatea secvenţelor telomerice

Specia	Secvenţa repetată
Macronucleul ciliatelor (*Tetrahymena)*	CCCCAA
Minicromozomul la *Trypanosoma*	CCCTA
Cromozomii drojdiei *Saccharomyces*	$C_{2-3}A(CA)_{1-3}$
Cromozomii plantelor (*Arabidopsis*)	C_3TA_3
Cromozomii umani	C_3TA_2

Capătul 3' al moleculei de ADN este mai lung, format dintr-o secvenţă conservată $(GGGGTT)_n$ şi formează o buclă prin legături de hidrogen nespecifice G•G (necomplimentare) (fig. 6.10).

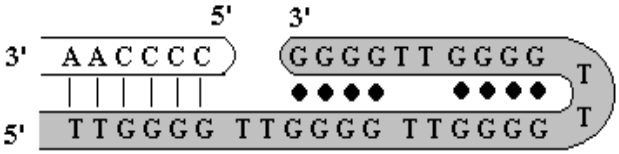


Fig. 6.10. Structura telomerului

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: por nuclear, organizator nucleolar, eucromatină, heterocromatină, nucleozom, solenoid, histonă, centromer, telomer, cromatidă.
2. Care sunt componenţii structurali ai nucleului interfazic?
3. Care sunt particularităţile organizării anvelopei nucleare?
4. Ce rol îndeplineşte complexul porului nuclear?
5. Care sunt etapele biogenezei ribozomilor?
6. Care sunt nivelurile de compactizare a cromatinei?
7. Care sunt componenţii nucleozomului?

7

REPLICAREA ŞI REPARAREA ADN

Replicarea ADN este procesul molecular prin care se realizează copierea exactă a moleculelor de ADN (a secvenţei nucleotidice). Datorită replicării are loc transmiterea exactă a mesajului genetic de la o generaţie de celule la alta, astfel toate celulele organismului pluricelular conţin aceeaşi informaţie ereditară.

Procesul de sinteză a ADN este, de regulă, exact. Dintr-o moleculă de ADN se formează două molecule identice atât între ele, cât şi cu molecula parentală. Acest proces are loc datorită particularităţilor de structură ale ADN:

- ADN este bicatenar;
- catenele ADN sunt complementare şi antiparalele.

Principalele caracteristici ale replicării sunt:

➢ sinteza replicativă a ADN-ului este ***semiconservativă***, deoarece, cel mai des, fiecare din cele două catene este folosită ca matriţă pentru sinteza unei catene noi de ADN;

➢ sinteza este bidirecţionată;

➢ polimerizarea nucleotidelor are loc doar în direcţia $5' \rightarrow 3'$;

➢ procesul implică participarea mai multor factori proteici.

Aparatul de replicare

Aparatul de replicare include ADN-matriţă cu punctul de origine, nucleozide trifosfaţi cât şi proteine pentru despiralizarea

helixului de ADN, iniţierea replicării, polimerizarea nucleotidelor etc.

Originea replicării

Originea replicării este reprezentată de o secvenţă specifică de nucleotide numită secvenţă autonomă de replicare ori. Unitatea capabilă de replicare independentă se numeşte un singur replicon, la eucariote ADN conţine mai multe puncte de origine, deci mai mulţi repliconi. În tabelul 7.1. sunt prezentate datele privind numărul de repliconi per genom, lungimea medie a unui replicon şi viteza de polimerizare la diferite organisme.

Tabelul 7.1. Unele caracteristici ale repliconilor

Organismul	Nr. de repliconi	Lungime medie, kb	Viteza replicării, pb/min
E. coli	1	4200	30000
S. pombe	500	40	3600
D. melanogaster	3500	40	2600
M. musculus	25000	150	2200
Homo sapiens	10^5-10^6	100-1000	3000

Secvenţa ***ori*** are următoarea structură :

AUX-2 — A/T — ORE — DUE — AUX-1

ORE – secvenţa ADN-ului la care se unesc proteinele situs-specifice şi proteinele replicării;
DUE - situsul care uşor se despiralizează, este sensibil la nucleaze şi nesensibil la mutaţii;
A/T – situsul ce reglează activitatea helicazei;
AUX-2 şi AUX-1 - situsuri ce se unesc cu factorii de iniţiere ai replicării cu specificitate înaltă.

La procariote punctul de origine este fixat de membrana plasmatică, iar la eucariote se fixează cu metaloproteine de axa proteică a cromozomilor (***SAR***).

Proteinele aparatului de replicare

Replicarea ADN implică acţiunea mai multor factori proteici şi enzime (fig. 7.1).

ADN-helicazele realizează despiralizarea şi denaturarea locală a moleculei de ADN prin hidroliza ATP. Datorită existenţei a două furci replicative există două helicaze care se deplasează în direcţii opuse de la punctul de origine a replicării.

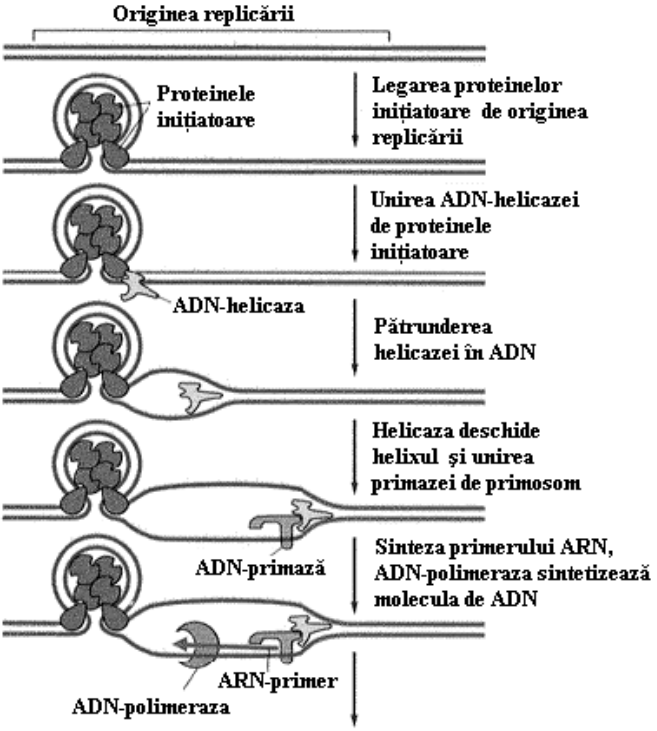


Fig. 7.1. Enzimele aparatului de replicare

Primaza este enzima cu activitae ARN-polimerazică care iniţiază replicarea ADN prin sinteza unei secvenţe de 11-12

ribonucleotide, care este numită ***primer*** (***ARN-primer***). Helicazele împreună cu primaza formează complexul ***primozom***.

Topoizomerazele de tip I scindează legăturile fosfodiesterice ale unei catene, relaxând dublul helix prevenindu-se supraspiralizarea ADN. ***Topoizomerazele de tip II*** taie ambele catene ale duplexului.

Proteinele ce se leagă de ADN monocatenar (proteine SSB) - factori ce stabilizează catenele de ADN în regiunile denaturate şi împiedică refacerea structurii dublucatenare prin unirea celor două catene, sau în cadrul aceleaşi catene în regiunile cu secvenţe palindromice (fig. 7.2).

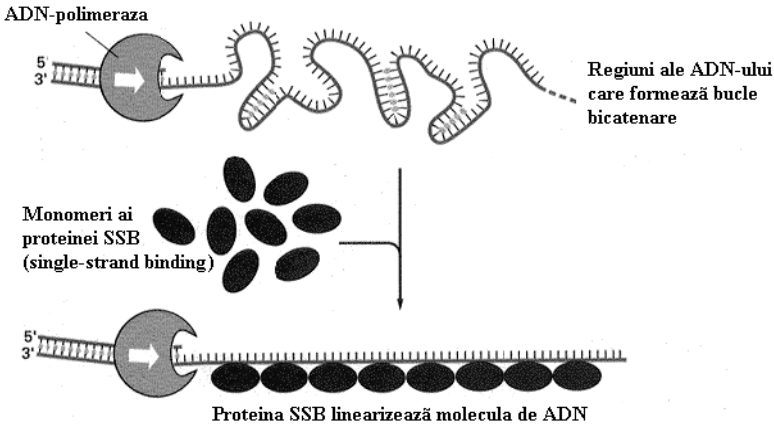


Fig. 7.2. Stabilizarea monocatenei de ADN în timpul replicării

ADN-polimerazele sunt enzime capabile să sintetizeze catene noi de ADN pe catenele matriţe. Au fost descoperite mai multe clase de ADN-polimeraze: α, β, γ, δ, ε – la eucariote şi I,II şi III - la procariote (tab. 7.2).

Tabelul 7.2. Caracteristica ADN-polimerazelor la eucariote

ADN – polimeraza	α	δ	ε	β	γ
Localizarea	Nucleu	Nucleu	Nucleu	Nucleu	Mitocon-drii
Funcţia sintetică	Sinteza primerilor	Sinteza ADN	Reparaţie	Reparaţie	Replicare
Funcţii suplimentare	-	Exonucle-ază	Exonucle-ază	-	Exonucle-ază

Activitatea polimerazică are următoarele particularităţi:

- sinteza se produce doar în direcţia 5' → 3' prin adăugarea nucleotidului la gruparea 3'-OH a pentozei (fig. 7.3);
- citirea are loc doar în direcţia 3' → 5';
- pentru sinteză se utilizează precursori trifosfaţi, care pierd în reacţie două grupe fosfat;
- ADN-polimeraza nu poate iniţia sinteza unei catene noi de ADN, ele au capacitatea doar de a extinde o catenă preexistentă de ADN sau *ARN-primer*.

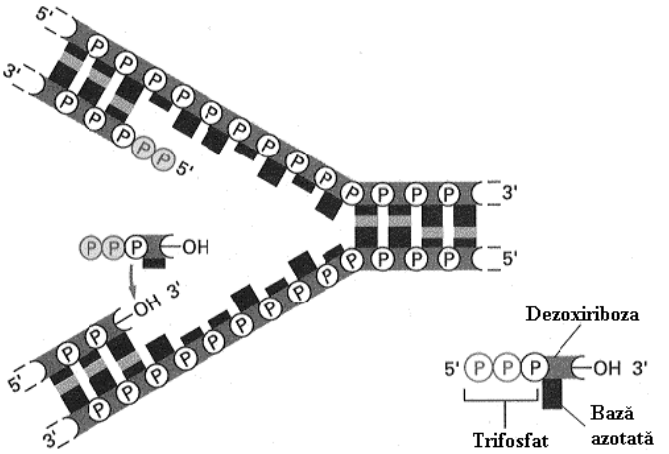


Fig. 7.3. Activitatea ADN-polimerazelor

De rând cu activitatea sintetică, ADN polimeraza conţine subunităţi care prezintă activitate nucleazică pentru scindarea ARN-primerului din fragmentele de ADN sintetizate sau excizia nucleotidelor în procesul de corecţie a erorilor introduse în timpul replicării.

ADN–ligaza este enzima ce leagă capetele fragmentelor de ADN sintetizate prin formarea legăturilor 3' → 5' fosfodiesterice.

Mecanismul replicării

Sinteza începe prin despiralizarea catenelor de ADN şi formarea ***furcii de replicare***. Fiecare catenă reprezintă o matriţă pentru catena nou formată. Despiralizarea este necesară pentru expunerea bazelor celor două catene în aşa mod ca noile baze să le poată recunoaşte şi să formeze perechea complementară. Sinteza decurge bidirecţional: de la fiecare punct de origine se formează două furci replicative în direcţii opuse faţă de origine (fig. 7.8).

Replicarea necesită un complex proteic numit ***replizomă*** care recunoaştere punctul de origine a acesteia şi o iniţiază. Proteina / proteinele de recunoaştere (la drojdii sunt cunoscute cinci proteine) se leagă de ***ori*** şi iniţiază despiralizarea locală a ADN în situsul *DUE*.

Complexul multifermentativ, numit replizoma, se mişcă de-a lungul ADN-ului şi efectuează sinteza pe ambele catene ale furcii. Replicarea ar putea fi văzută ca creşterea continuă a celor două catene de ADN în dublul helix. Este necesar de accentuat că:

- citirea matriţei se efectuează doar în direcţia $3' \rightarrow 5'$;
- sinteza catenei noi se efectuează doar în direcţia $5' \rightarrow 3'$.

În furca de replicare (fig. 7.4):

- **catena – matriţă 3′ → 5′** de ADN se numeşte ***catenă – lider,*** se citeşte în direcţia 3′ → 5′; catena fiică este sintetizată neîntrerupt în direcţia 5′→3′;
- **catena - matriţă 5′→ 3′** este numită ***catenă – întârziată,*** se citeşte la fel în direcţia 3′ → 5′; catena fiică se sintetizează la fel în direcţia 5′ → 3′ discontinuu, pe fragmente, cunoscute ca ***fragmente Okazaki***,. Lungimea fragmentelor Okazaki este de 1000-2000 de nucleotide la procariote şi de 100-200 de nucleotide la eucariote.

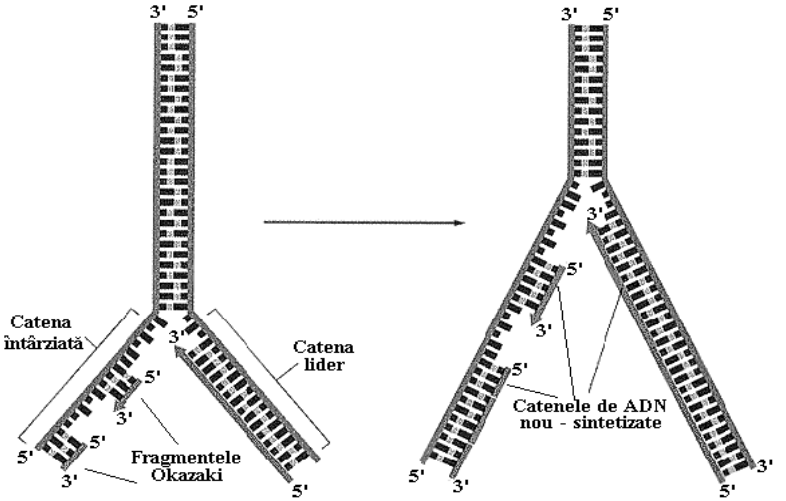


Fig. 7.4. Mecanismul replicării într-o furca replicativă

Conform ipotezei lui Artur Cornberg, catena întârziată, este inversată la 180° (este aplicată pe sine însăşi). Astfel moleculele ADN-polimerazei unite cu alte proteine ale repliconului determină sinteza concomitentă a ambelor catene.

La întâlnirea a două furci replicative procesul de replicare se stopează. Enzima ADN-ligaza uneşte între ele fragmentele Okazaki.

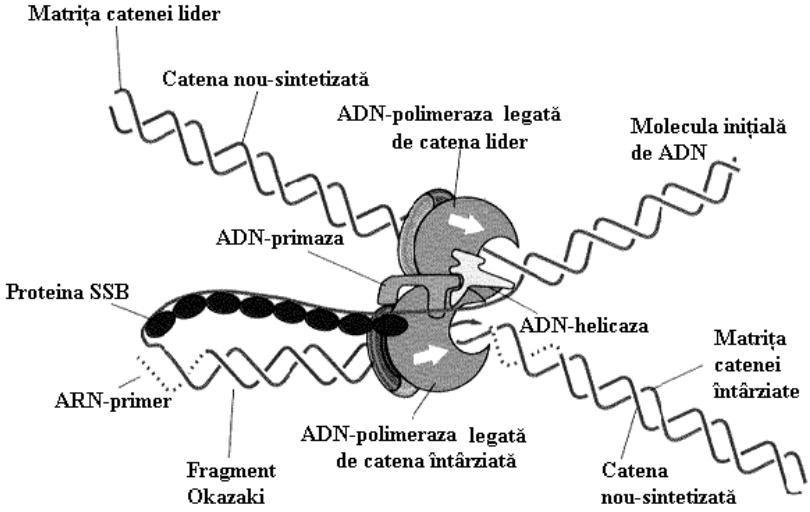


Fig. 7.5. Topografia replicării conform ipotezei lui A. Cornberg

Etapele replicării

1. **Iniţierea** include următoarele procese:

- atașarea replizomului la punctul de origine al replicării şi despiralizarea locală a helixului ADN de către helicaze;
- sinteza ARN–primerului – o secvenţă scurtă de ribonucleotide – de către primază (o enzimă cu actrivitate ARN-polimerazică);
- adăugarea dezoxiribonucleotidelor complementare matriţei la capătul 3′ al primerului realizată de ADN polimerază.

2. **Elongarea** se caracterizează prin alungirea catenelor nou - sintetizate înfăptuită de ADN-polimerază, ce se deplasează rapid de-a lungul catenelor de ADN, făcând posibilă sinteza pe ambele părţi ale furcii într-un mod coordonat şi eficient. Evenimentele principale sunt:

- creşterea continuă a catenei lider;

- sinteza discontinuă a fragmentelor Okazaki;
- controlul erorilor de împerechere a bazelor în timpul replicării şi înlăturarea lor, înfăptuită de o exonucleaza 3′→5′ din componenţa ADN-polimerazei.

3. **Terminarea** include următoarele procese:

- înlăturarea ARN–primerilor de către o componentă enonucleazică 5′ → 3′ a polimerazei;
- înlocuirea golurilor de către ADN-polimerază;
- unirea capetelor fragmentelor catenelor de ADN sintetizate cu ajutorul ADN-ligazei.

Modele de replicare

Moleculele circulare ale procariotelor (nucleoidul, plasmidele) se replică prin mecanismul replicării de tip θ. Din situsul ***ori*** pornesc concomitent două furci replicative, ceea ce duce la formarea unor structuri asemănătoare cu litera grecească θ (teta) (fig. 7.6).

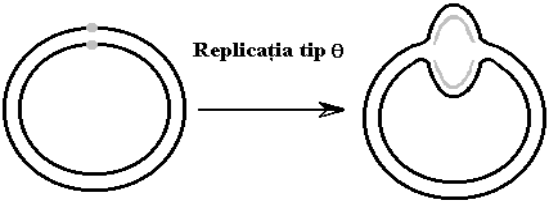


Fig. 7.6. Replicarea de tip θ la procariote

La unii viruşi, a unor celulele procariote şi eucariote, există un alt tip de replicare: replicarea după modelul inelului rotitor (replicare de tip σ). Nucleaza produce o ruptură monocatenară cu formarea capetelor libere 5'-P şi 3'-OH. ADN-polimeraza sintetizează o moleculă complementară în direcţia 5' → 3' prin rotirea matriţei ADN. Capătul 5' se depărtează de molecula inelară şi serveşte ca matriţă pentru sinteza unei alte catene de ADN. Concomitent se pot obţine mai multe copii ale

genomului viral, care mai târziu se separă prin excizie cu endonucleaze specifice (fig.7.7., A).

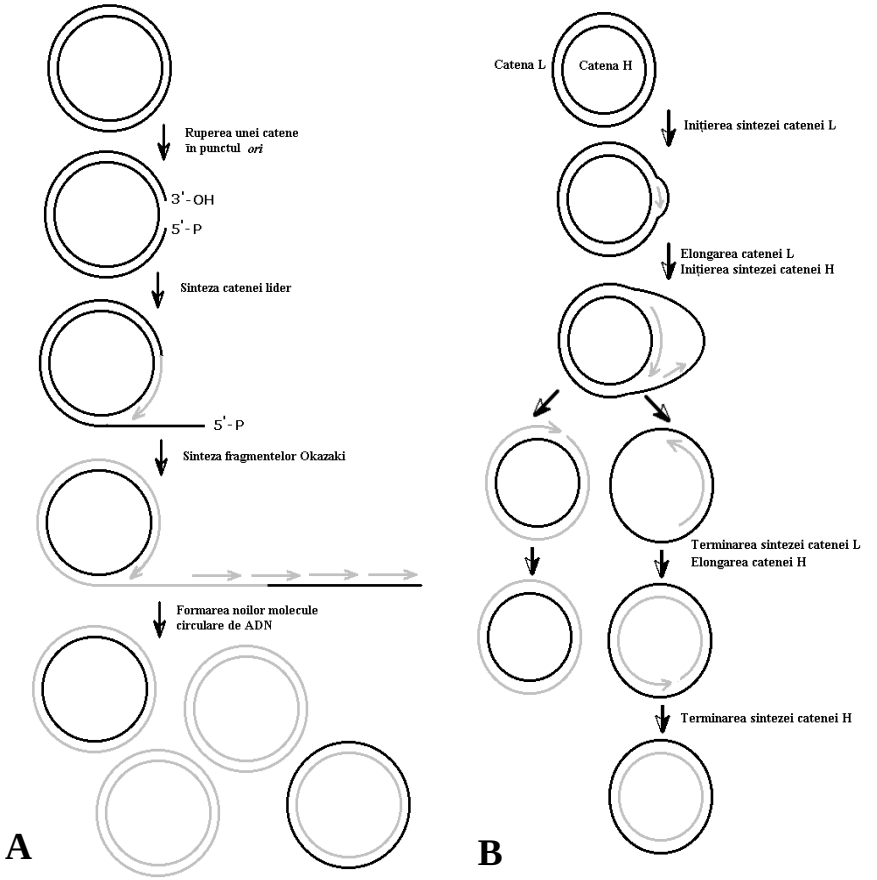


Fig. 7.7. A. Replicarea de tip σ la virusuri.
B. Replicarea de tip D în mitocondrii

În ADN mitocondrial, care are o structură inelară, *fiecare catenă conţine câte un situs de iniţiere propriu*. Sinteza începe de pe catena H (catena grea). În momentul când furca de

replicare ajunge la punctul ***ori*** al catenei L (catena uşoară) începe replicarea acesteia în sens opus. Astfel replicarea celor două catene este asincronică (replicare de tip D) (fig. 7. 7., B).

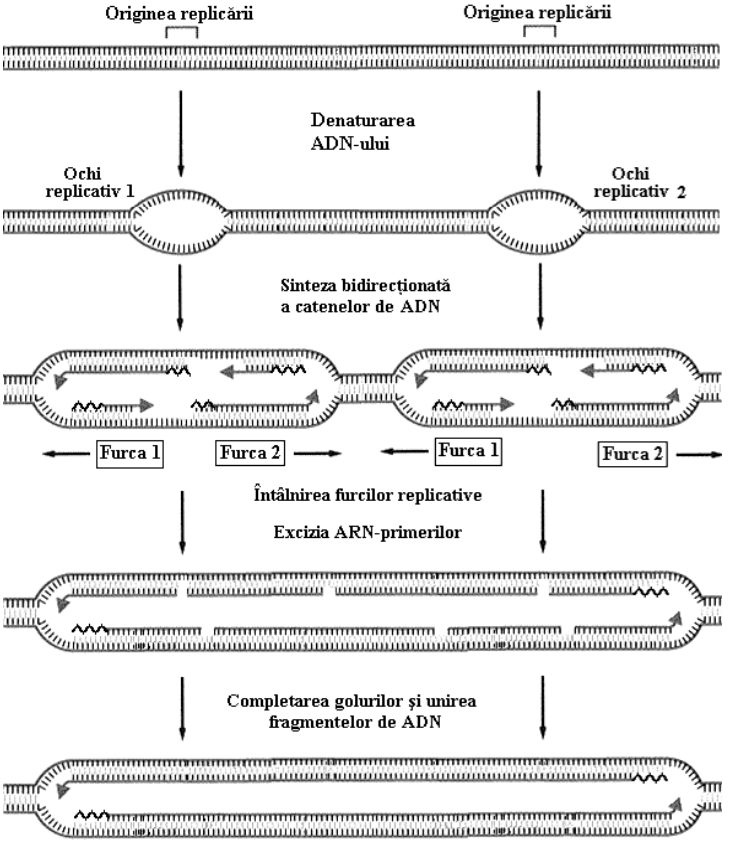


Fig. 7.8. Mecanismul şi etapele replicării la eucariote

La eucariote ADN este reprezentat de molecule liniare mari, cu diferit grad de compactizare, iar viteza de replicare este de ordinul a mii de nucleotide pe min (spre comparaţie la procariote – 30000 pb/min). Pentru asigurarea sintezei întregii

molecule într-un timp limitat (în celulele umane 7 x10^9 pb se replică în 8-9 ore) replicarea începe în mai multe puncte ***ori*** (cele 46 de molecule de ADN din celula umană conţin 10^5 –10^6 repliconi) (fig. 7.8).

La eucariote replicarea are loc numai în perioada S a ciclului celular şi este asincronă: secvenţele eucromatice se replică mai timpuriu, la începutul perioadei S, iar secvenţele heterocromatice – la sfârşitul perioadei S.

O particularitate a replicării ADN eucariotic este că capătul 5′ al catenei noi este mai scurt, deoarece nu există posibilitatea completării golului după înlăturarea primerului ultimului fragment Okazaki. Astfel apare riscul ca în succesiunea generaţiilor de molecule să se scurteze cromozomii, ceea ce ar putea cauza pierderea informaţiei genetice de la capătul lor. Pentru prevenirea pierderilor de secvenţe terminale de ADN capătul cromozomului este prevăzut cu o structură specială (telomerul) cu un mecanism propriu de sinteză.

Regiunile telomerice ale cromozomilor se replică după un mecanism special, cu participarea enzimei ***telomeraza,*** formată dintr-o proteină cu funcţie de reverstranscripţie ce conţine ARN în calitate de matriţă (fig. 7.9). În prima etapă are loc asocierea telomerazei la capătul 3' al catenei lider din regiunea telomerică. Ulterior enzima extinde catena, utilizând ca matriţă ARN telomerazic. Procesul de extindere a capătului 3' se repetă de mai multe ori. Catena complementară a ADN telomeric este sintetizată după principiul catenei întârziate de ADN-polimerază.

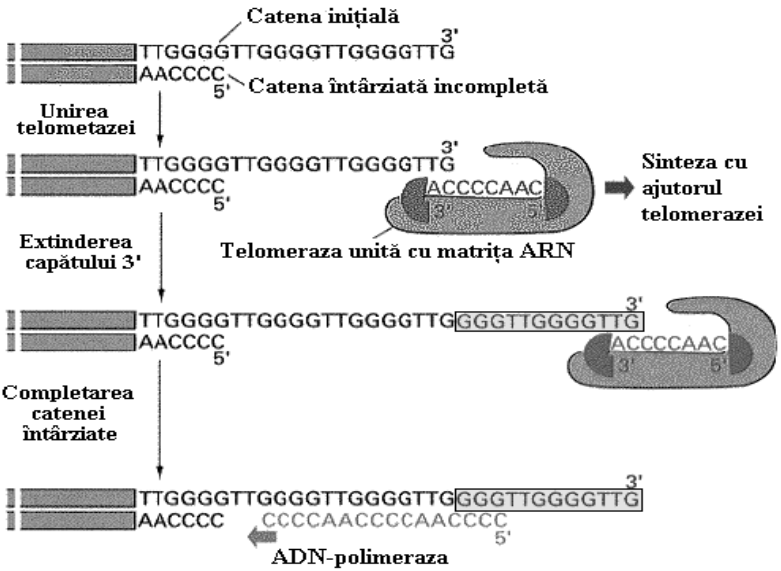


Fig. 7.9. Mecanismul activității telomerazei

Reparaţia ADN

Procesul de restabilire a leziunilor din moleculele de ADN care asigură păstrarea intactă a materialului genetic de-a lungul mai multor generaţii poartă denumirea de ***reparaţie***. Acest proces este caracteristic doar pentru moleculele de ADN şi este determinat de particularităţile de structură a acestor molecule: existenţa a două catene complementare şi antiparalele.

În structura moleculelor de ADN pot surveni două tipuri de schimbări:

✓ Substituţia unui nucleotid. Se afectează doar secvenţa ADN-ului fără a ainfluenţa structura lui. Aceste schimbări nu se reflectă asupra proceselor de replicare sau transcripţie. Ele pot apărea ca rezultat al erorilor în cadrul replicării din cauza împerecherii necomplementare a bazelor (de ex., C::A) sau datorită transformărilor chimice ale bazelor azotate: (de ex., dezaminarea citozinei duce la formarea uracilului).

✓ Modificări structurale. Se formează ca rezultat al apariţiei legăturilor covalente nespecifice între nucleotidele aceleaşi catene sau din catene opuse. De exemplu, razele ultraviolete (UV) duc la apariţia dimerilor timinici – legături între resturile de timină alăturate, de pe aceeaşi catenă. Astfel de schimbări pot împiedica replicarea şi transcripţia.

Sistemele reparative principale întâlnite la diferite organisme sunt:

- reparaţia directă – se întâlneşte foarte rar şi constă în revenirea moleculei la starea iniţială (de ex., prin aminare U→C);
- fotoreactivarea – este este larg răspândită în natură şi constă în înlăturarea dimerilor pirimidinici cu ajutorul unei enzime dependente de lumină;
- reparaţia prin excizie – constă în recunoaşterea de către enzime a fragmentelor denaturate şi înlăturarea fragmentului monocatenar defect. Ulterior are loc restabilirea catenei lezate cu ajutorul ADN-polimerazei, utilizându-se ca matriţă catena intactă. ADN-ligaza uneşte fragmentul nou-sintetizat cu restul moleculei, restabilind integritatea ei (fig. 7.10);
- reparaţia prin recombinare – constă în excizia fragmentului defectat, urmată de importarea secvenţei corespunzătoare normale dintr-o moleculă omoloagă de ADN (fig. 7.11). Dimerul pirimidinic după recombinare este înlăturat prin mecanismul reparării prin excizie (fig. 7.10, B);
- reparaţia inducibilă SOS - sistemul SOS funcţionează ca rrăspuns la acţiunea unor factori de stres. De exemplu, la E.coli sub acţiunea şocului termic sau a apariţiei dimerilor pirimidinici se sintetizează abundent proteina RecA-proteaza, cantitatea căreia este reglată de activitatea altei proteine – LexA. Proteina LexA este unită la o secvenţă de ADN numită blocul SOS care blochează sinteza enzimelor de reparaţie. *RecA-proteaza*, fiind în cantitate mare, hidrolizează proteina *LexA*, făcând posibilă activarea unor gene ce codifică proteinele de reparaţie

(aproximativ 15 la număr). Răspunsul celulei se produce foarte rapid – în decursul câtorva minute. În a doua etapă se sintetizează în exces proteina *LexA*, care blochează sinteza *RecA-proteazei* şi peste 30-60 minute sistemul de reparare se inactivează. Mecanismul de reparaţie SOS intervine în cazul leziunilor masive. Scopul lui este completarea golurilor prin mecanisme de excizie sau recombinare. Acest tip de reparaţie nu este întotdeauna foarte exact, iar principiul complementarităţii nu se respectă în toate cazurile. Ca rezultat, moleculele reparate prin SOS pot conţine erori.

La eucariote au fost determinate mai multe gene incluse în procesul de reparaţie – de exemplu familia **RAD** de la drojdii: RAD3 – reparaţia prin excizie; RAD6 – reparaţia post-replicativă; RAD52 – reparaţia prin recombinare.

La oameni cel mai bine a fost studiat sistemul responsabil de maladia *xeroderma pigmentosum* (XP). XP este o boală genetică cu transmitere autosomal recisivă şi se caracterizează prin hipersensibilitate la lumina solară, în deosebi la radiaţia UV. Boala este determinată de deficienţa mecanismelor de reparaţie prin excizie.

Metilarea ADN

La procariote există enzime care asigură metilarea (adăugarea grupelor metil $–CH_3$) citozinei şi adeninei, din care rezultă metilcitozina şi metiladenina. Secvenţele metilate sunt rezistente la acţiunea unor enzime specifice ***endonucleaze de restricţie (restrictaze).*** La bacterii restrictazele digerează moleculele străine de ADN, în timp ce ADN-ul propriu care este metilat nu se hidrolizează. La eucariote metilarea bazelor azotate conduce la inactivarea genelor nefuncţionale. Astfel, regiunile heterocromatice din nucleu conţin secvenţe de ADN metilat.

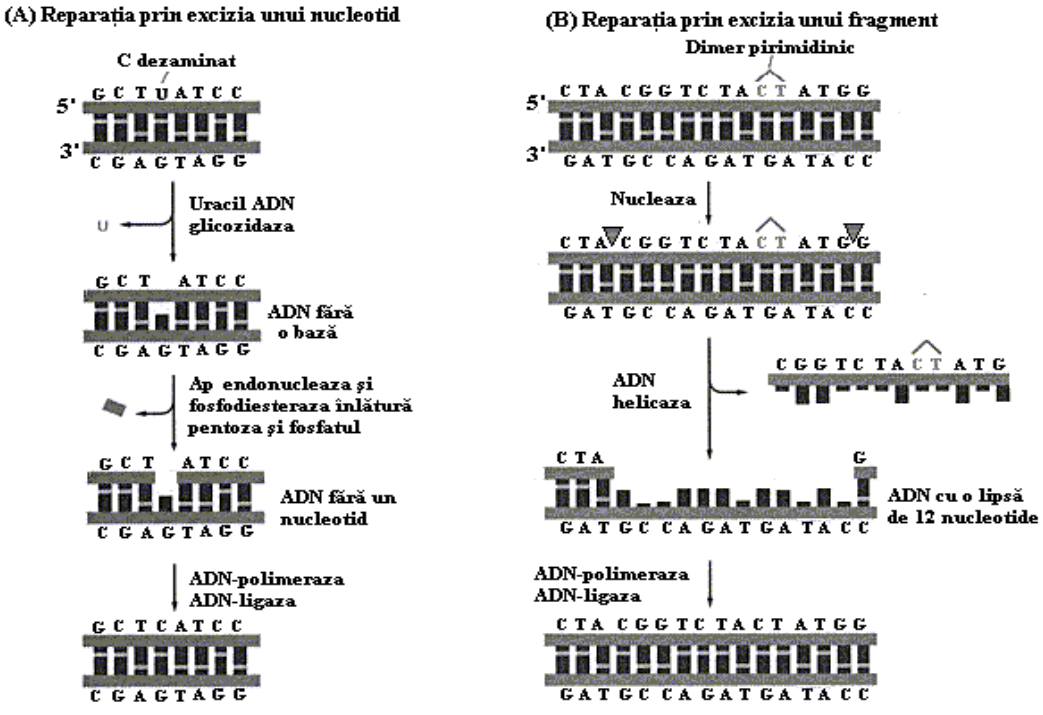


Fig. 7.10. Reparaţia prin excizie

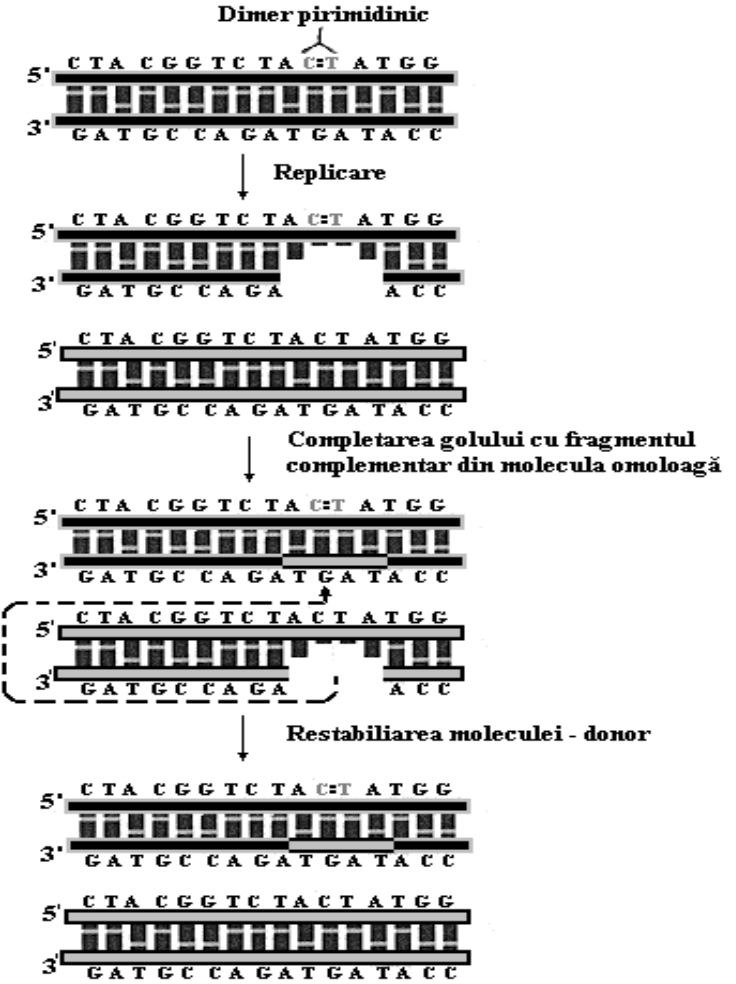


Fig. 7.11. Reparaţia prin recombinare

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: replicare, replicon, replizomă, polimerază, fragment Okazaki, reparare, metilare.
2. Care sunt principiile ce stau la baza replicării ADN?
3. Care sunt particularităţile replicării la pro- şi eucariote?
4. Ce componenţi intervin în procesul replicării?
5. Care sunt particularităţile sintezei catenei lider şi catenei întârziate?
6. Ce modele de replicare a ADN cunoaşteţi?
7. Cum se replică capetele cromozomilor?
8. Care sunt mecanismele ce intervin în stabilitatea moleculei de ADN?
9. Care enzime intervin în procesul de reparaţie?
10. Care este importanţa biologică a metilării moleculelor de ADN?

8

GENA

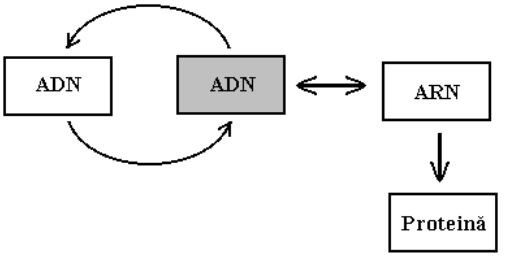
Prima ipoteză despre structura şi funcţia materialului genetic a fost formulată de *Gregor Mendel* (1865). Pentru a explica geneza unor caractere fenotipice ereditare şi modul lor de transmitere la descendenţi, el a presupus existenţa unor "factori ereditari". Aceste elemente, care iniţial erau pur ipotetice, au devenit, în timp, structuri reale, materiale. După descoperirea şi descrierea cromozomilor (*Waldeyer, 1988*) *Boveri* şi în special *Sutton (1902)* au emis şi susţinut ipoteza că factorii ereditari sau ***genele*** (după termenul introdus de *Wilhelm Johansen*, 1903) sunt părţi din cromozomi. Această idee a fost confirmată de *Thomas Hunt Morgan* şi colaboratorii săi (1910-1925). În felul acesta, gena încetează să mai fie o supoziţie logică, abstractă, a geniului mendelian şi capătă un conţinut concret, material. Cercetările ulterioare au demonstrat natura chimică a cromozomilor şi genelor. În 1944 *Oswald Avery* şi colaboratorii săi au demonstrat că materialul genetic este reprezentat de molecula de ADN. În 1953 *Francis Crick* şi *James Watson* au descoperit organizarea moleculară a ADN şi au determinat că succesiunea de baze azotate (A, G, C, T) reprezintă codul genetic. Informaţia genetică perpetuează datorită replicării moleculelor de ADN şi se realizează prin transcripţia ARN şi sinteza de proteine.

În concluzie, ***gena*** reprezintă un fragment din molecula de ADN care conţine informaţia genetică despre sinteza unui

anumit tip de proteină sau a unei molecule de ARN. Grupul de gene alăturate, localizate într-un cromozom formează un ***grup de înlănţuire*** (***grup lincaj***). În cadrul acestor grupări, gena ocupă o poziţie delimitată de genele vecine. Gena nu este delimitată de graniţe morfologice sau grupări chimice particulare. Ea are o delimitare funcţională, relevată de semnificaţia mesajului genetic înscris.

Funcţia genei

Gena deţine secvenţa de nucleotide ce controlează sinteză diferitor molecule de ARN (ARNm, ARNr, ARNt, ARNsn) şi a diferitor molecule de proteine. Fiecare genă are o succesiune specifică de baze, de regulă de pe ea se sintetizează un singur tip de ARN.



Complexitatea structurii şi funcţiei organismelor vii este determinată de spectrul proteinelor pe care le conţine. De aceea, organismele simple (de ex., bacteriile) conţin câteva sute de gene, iar organismele mai complexe - câteva zeci de mii de gene. În setul diploid de cromozomi umani se conţin circa 125000 de gene diferite.

Genele care codifică ARNm, tradus în lanţuri polipeptidice specifice, sunt denumite ***gene structurale.*** Pentru acestea se utilizează frecvent termenul de ***cistron***. Genele care se transcriu independent poartă denumirea de *unităţi transcripţionale* ***monocistronice*** (caracteristice pentru eucariote)**,** iar mai multe gene ce se transcriu în comun – unităţi transcripţionale ***policistronice*** (caracteristice procariotelor).

Prin sinteza diferitor tipuri de proteine genele controlează structurile, funcţiile şi proprietăţile celulei şi a organismului în întregime. Produşii genelor, interacţionând cu factorii de mediu, pot modula activitatea organismului pentru adaptarea lui în condiţiile schimbătoare ale ambiantului.

Sub acţiunea factorilor de mediu genele îşi pot modifica structura chimică (apar gene mutante). Mutaţiile determină apariţia diferitor variante alelice ale uneia şi aceleaşi gene care pot avea asupra fenotipului diferite efecte:

- neutre – apar variaţii individuale ale unuia şi aceluiaşi caracter (grupele sanguine şi serice la om);
- folositoare – gene de rezistenţă la anumite noxe;
- defavorabile – apar caractere patologice letale sau semiletale (de ex., deficienţe enzimatice şi blocarea unor lanţuri metabolice).

Totalitatea genelor din setul diploid de cromozomi al unui individ se numeşte ***genotip***. Totalitatea caracterelor şi proprietăţilor individului controlate de genotip în interacţiune cu mediul se numeşte ***fenotip***.

Organizarea moleculară a genelor

Genele sunt formate din ***regiunile transcrise*** şi ***regiunile reglatoare*** (fig. 8.1).

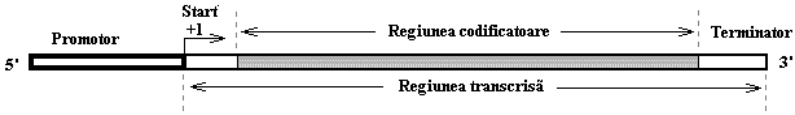


Fig. 8.1. Structura generală a genei

Fiecare genă (unitate de transcriere) conţine ***promotorul*** – secvenţa recunoscută de ARN-polimeraza, care realizează transcrierea genei, sau a setului de gene. Promotorul este o secvenţă obligatorie şi se găseşte în aval de regiunea transcrisă

(la capătul 5′) (gene pentru ARNm şi ARNr) sau se conţine în interiorul secvenţei transcrise (gene pentru ARNt). Primul nucleotid incorporat în molecula de ARN este notat cu +1; nucleotidele din genă situate în faţa punctului de iniţiere a transcripţiei se notează cu (-), iar cele ce se găsesc spre capătul 3' – cu (+). Promotorul conţine unele secvenţe consens care se deosebesc la procariote şi eucariote.

Terminatorul este plasat la sfârşitul unităţii transcripţionale şi reprezintă o secvenţă de nucleotide invertate, urmată de secvenţa TTTT. Secvenţa invertată copiată în molecula de ARN va condiţiona formarea unei bucle, care stopează înaintarea ARN-polimerazei şi determină terminarea procesului de transcripţie. Terminatorul are o structură asemănătoare la procariote şi eucariote (fig. 8.2).

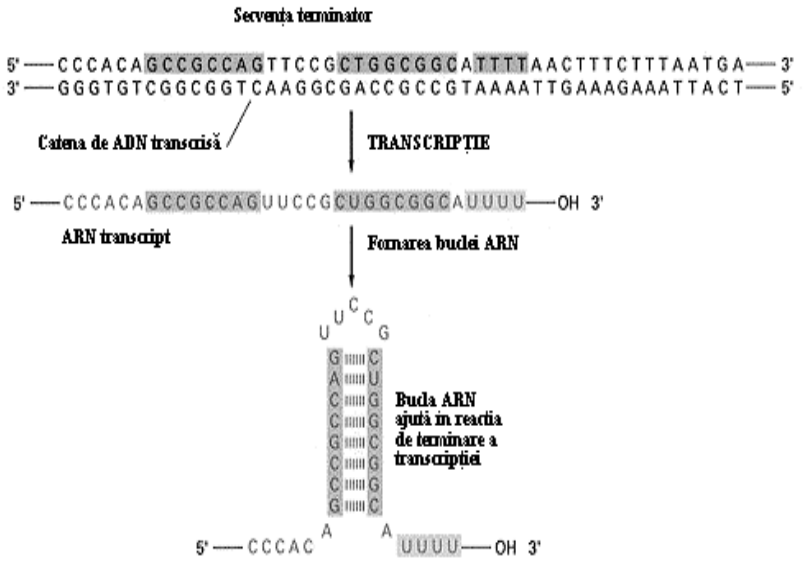


Fig. 8.2. Organizarea secvenţei terminatorului genelor

Particularităţile organizării genelor structurale la eucariote

Promotorul genelor eucariotelor constă dintr-un segment de câteva sute de nucleotide situate la extremitatea 5' a genei. Această regiune conţine o combinaţie de ***secvenţe consens*** ce constituie situsuri pentru factorii de transcripţie (tab. 8.1). Promotorul genelor structurale, recunoscut de ARN-polimeraza II, prezintă la distanţa de -20 – -30 nucleotide de la situsul de iniţiere (+1) ***boxa Goldberg-Hogness*** sau ***boxa TATA*** la nivelul căreia se găseşte secvenţa 5' TATA ATAAA-3'. Această secvenţă direcţionează enzima ARN-polimeraza II spre situsul de iniţiere al transcripţiei.

În poziţia -75 se găseşte ***boxa CAAT***, caracterizată prin secvenţa 5'-GGCCAATCT-3'. Boxa CAAT controlează legarea proteinelor de iniţiere a transcripţiei şi eficienţa acestui proces.

Mai proximal, la -90 nucleotide se găseşte o altă secvenţă conservată – ***boxa GC*** cu succesiunea 5'-GGGCGG-3'. Boxa GC poate avea mai multe copii în promotor şi intervine în direcţionarea procesului de transcripţie.

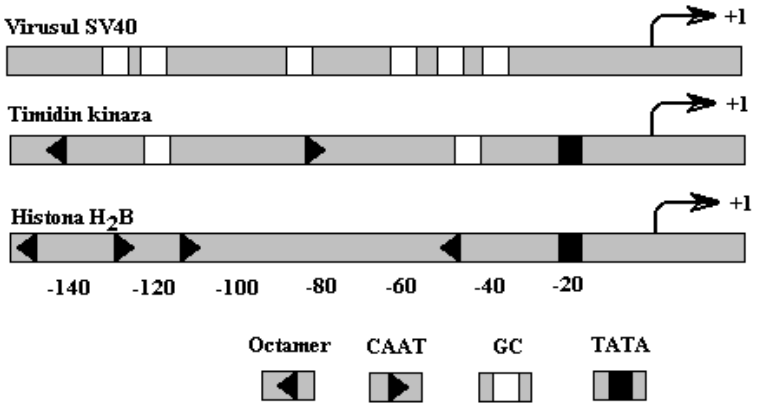


Fig. 8.3. Organizarea promotorilor diferitor gene ce activează în celulele eucariote

În afară de aceste boxe mai sunt şi alte secvenţe consens, ce se leagă de proteine reglatoare specifice pentru gena dată (fig. 8.3). Acestea sunt necesare pentru o expresie diferenţiată a genelor în celule diferite şi perioade diferite ale ciclului celular (de ex., genele pentru globină se transcriu doar în celulele precursoare ale eritrocitelor, gena pentru miozină –în celulele musculare, iar gena pentru insulină - în celulele specializate ale pancreasului etc.).

Tabelul 8.1. Caracteristica secvenţelor consens din promotorii genelor structurale la eucariote

Boxa	**Secvenţa**	**Poziţia**	**Fragmentul de ADN acoperit**	**Factorii de transcripţie corespunzători**
TATA-box	TATAAAA	- 30	10 p.n.	TBP
CAAT-box	GGCCAATCT	- 75	22 p.n.	CTF/NF1
GC-box	GGGCGG	- 90	20 p.n.	SP1
Octamer	ATTTGCAT		20 p.n.	Oct1, Oct2

Secvenţe codificatoare

S-a demonstrat că la eucariote structura genei este discontinuă. Paradoxul valorii C confirmă că din totalul ADN-ului genomic doar o parte (10-15%) participă la sinteza proteinelor. Secvenţele neinformaţionale au rol diferit:

- separă genele (***spacieri***);
- se conţin în gene, dar nu sunt reprezentate în secvenţele de aminoacizi (***introni***);
- au rol structural propriu-zis (telomeri, centromeri, sateliţi).

S-a constatat o discordanţă între dimensiune moleculei de ARNm, cu cea a ARN precursor (transcript primar) şi dimensiunea secvenţei de ADN care a servit ca matriţă pentru transcripţia ARN respectiv. P. Sharp (1977) a emis ipoteza structurii discontinue, sau în mozaic, a genei la eucariote.

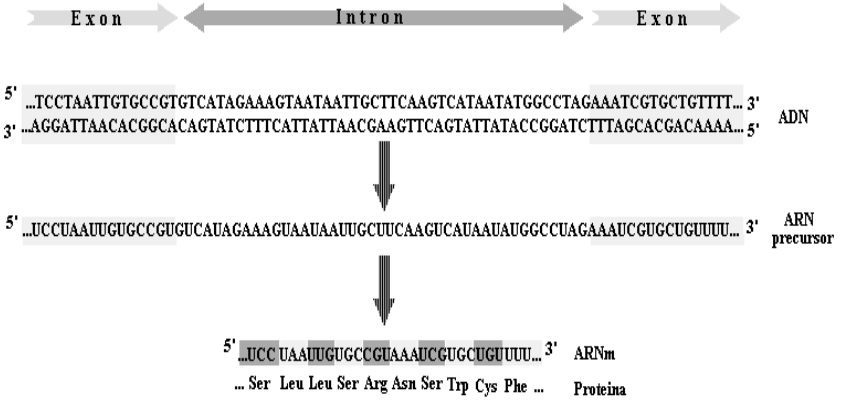


Fig. 8.4. Structura discontinuă (exon – intron) a secvenţei codificatoare în genele eucariotelor

Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3
142-145 pb	116-130 pb	222 pb	573-904 pb	216-255 pb
Capătul 5' netranslat + aminoacizii 1-30		Aminoacizii 31-104		Aminoacidul 105 + capătul 3' netranslat

Fig. 8.5. Structura exon-intron a genei β-globinei şi relaţia cu structura proteinei corespunzătoare

Regiunea transcriptibilă a genelor la eucariote cuprinde secvenţe codificatoare denumite ***exoni*** şi secvenţe necodificatoare – ***introni*** (fig. 8.4)**.** Numărul de exoni şi introni este variabil şi depinde de complexitatea proteinei pe care o codifică:

- gena β-globinei conţine 3 exoni şi 2 introni (fig. 8.5);
- gena pentru precolagen conţine 51 exoni şi 50 introni;
- gena pentru Hemofilia A conţine 26 exoni şi 25 introni (secvenţa de ADN constă din 180000 p.b., iar molecula ARNm respectiv are o lungime de doar 9000 b. şi constituie 0,2%);
- gena care codifică distrofina conţine mai mult de 25000000 pb, iar ARNm - doar 14000 b.

Exonii

Exonii reprezintă secvenţe codificatoare ale genei ce se transcriu, sunt prezenţi în ARN precursor, în ARNm şi se regăsesc în secvenţa de aminoacizi a proteinei (fig. 8.4). La capătul 5′ al primului exon este o secvenţă scurtă de câteva zeci de nucleotide (***secvenţa lider***) cu rol de iniţiere a translaţiei care este urmată de codonul universal de iniţiere a translaţiei – **ATG.** La capătul 3′ al ultimului exon se află unul din cei trei codoni de STOP informaţional (TAA, TAG, TGA) ce determină terminarea sintezei proteinei şi o secvenţă scurtă netranslată.

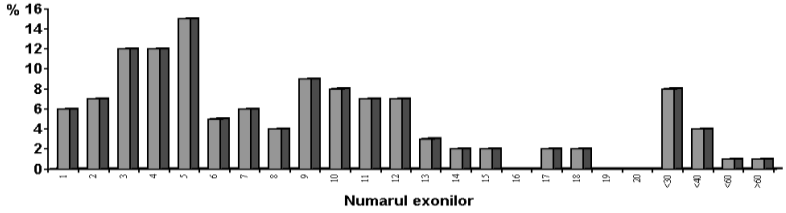


Fig. 8.6. Numărul exonilor la diferite gene ale vertebratelor

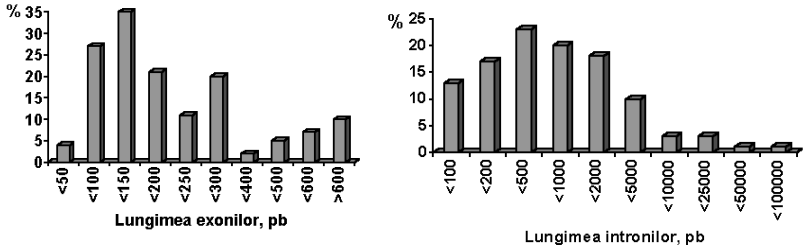


Fig. 8.7. Lungimea exonilor şi intronilor la diferite gene ale mamiferelor

Numărul exonilor la diferite gene este diferit. În fig. 8.6. este reprezentată dependenţa dintre numărul de exoni şi frecvenţa lor în genomul vertebratelor.

Intronii

Intronii reprezintă secvenţe necodificatoare ale genei ce se transcriu, sunt prezenţi în ARN-precursor, dar nu sunt prezenţi în ARNm (fig. 8.4). În timpul maturizării ARNm (***splicing***) intronii sunt eliminaţi din ARN-precursor.

Intronii au o lungime cuprinsă între 100 şi 10000 pb şi, de regulă, sunt mai lungi decât exonii (fig. 8.7). Majoritatea intronilor prezintă la extremitatea 5' secvenţa dinucleotidică **GT** iar la 3' **AG**, astfel sunt recunoscuţi de enzimele ce îi înlătură în timpul *splicing*-ului.

Tabelul 8.2. Funcţiile intronilor

Conceptul clasic	Conceptul contemporan
Spaţiatori ai exonilor Reziduuri ale evoluţiei ADN	Codifică biopolimeri Realizează autoclivarea ADN Participă la realizarea expresiei genelor

Particularităţile organizării genelor pentru ARNr şi ARNt la eucariote

Genele pentru ARNr (5,8S; 18S; 28S) sunt organizate într-o unitate de transcripţie ce se repetă în tandem de câteva sute de ori şi formează organizatorul nucleolar (fig. 8.8).

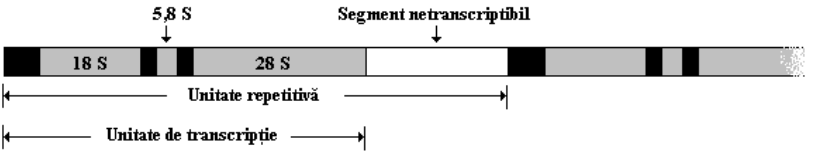


Fig. 8.8. Organizarea genelor pentru ARNr 5,8S, 18S, 28S

Fiecare unitate de transcripţie este separată de unităţile vecine prin secvenţe netranscriptibile - *spacer*i. Unitatea repetabilă conţine ~12000 pb. Genele pentru ARNr de regulă nu conţin introni, excepţie făcând genele protozoarelor. Promotorii genelor pentru ARNr au o varietate mică şi sunt recunoscuţi de enzima ARN-polimeraza I. Promotorii au o structură bipartită: o secvenţă de bază localizată în regiunea -45 – +20 ce controlează iniţierea transcripţiei şi un element de control proximal în regiunea -180 – -107 (UCE – upstream control element).

Genele pentru ARNr 5S sunt localizate în afara nucleolului şi sunt transcrise de enzima ARN-polimeraza III. Aceste gene formează unităţi transcripţionale în care gena pentru ARNr 5S se repetă în tandem. Promotorul este localizat în interiorul genelor în limitele +55 – +80.

Genele pentru ARNt, de asemenea, sunt organizate în unităţi transcripţionale în care secvenţele codificatoare sunt separate prin succesiuni necodificatoare. La drojdii genele pentru ARNt pot conţine introni de 10-30 pb. Genele pentru ARNt sunt transcrise de ARN-polimeraza III, iar promotorul are o structură similară cu cea a genelor ARNr 5S.

Particularităţile organizării genelor la procariote

Aparatul genetic al procariotelor este reprezentat de molecule circulare de ADN (nucleoid şi plasmide). Genomul procariotelor conţine puţine secvenţe necodificatoare. Genele se caracterizează printr-o structură mai simplă şi sunt lipsite de introni. Deoarece metabolismul este intens şi necesită modificări rapide în dependenţă de condiţiile de moment ale mediului, majoritatea genelor implicate într-un lanţ metabolic formează unităţi transcripţionale numite ***operoni.***

Operonul conţine un singur promotor la capătul 5′, mai multe gene structurale (numărul de gene structurale este egal cu numărul proteinelor implicate în procesul metabolic dat), iar la capătul 3′ se află terminatorul (fig. 8.9). Unii operoni pot conţine şi alte secvenţe reglatoare (secvenţe operatoare, secvenţe atenuatoare etc.).

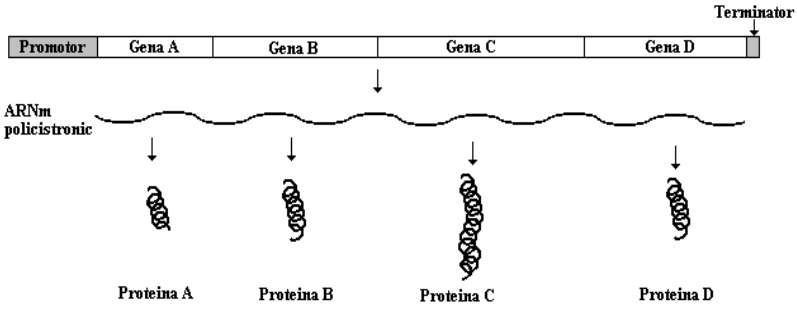


Fig. 8.9. Organizarea unui operon cu patru gene structurale

Promotorul la procariote conţine secvenţele specifice caracterizate prin ***boxa Pribnow*** în poziţia -10, responsabilă de iniţierea denaturării locale a ADN-ului şi ***boxa TTGACA*** în poziţia -35, la care are loc asocierea primară a ARN-polimerazei (fig. 8.10).

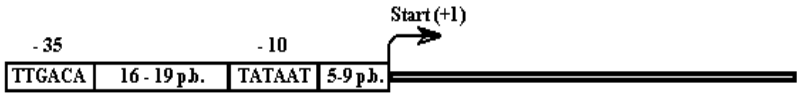


Fig. 8.10. Structura promotorului la procariote

Celelalte clase de gene (pentru ARNr, ARNt) sunt organizate în unităţi transcripţionale mixte, separate prin *spaceri*. În fig. 8.11 este prezentată schema unui astfel de *cluster* de gene.

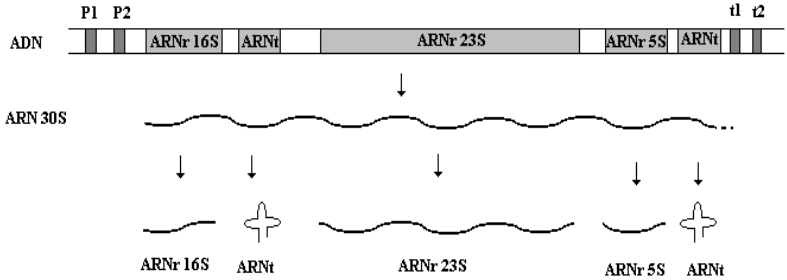


Fig. 8.11. Operonii genelor ARNt şi ARNr la procariote

Particularităţile organizării genomului uman

Genomul uman constă din ADN nuclear (98%) şi ADN mitocondrial (2%). Genele acestor două sisteme interacţionează între ele şi controlează activitatea organismului uman prin controlul sintezei proteinelor de structură, enzimelor şi proteinelor reglatoare.

Genomul nuclear

Genomul nuclear al celulelor somatice este reprezentat de 46 molecule de ADN, ce corespund celor 46 de cromozomi monocromatidieni din setul diploid. În nucleul celulelor umane se conţin circa 125000 de gene. Acestea sunt repartizate de-a lungul cromozomului. Între gene sunt secvenţe necodificatoare, reprezentate de spaceri, ADN-satelit. Fiecare cromozom conţine în mediu 3000 de gene (fig. 8.12). Sub aspect funcţional genele

nucleare pot fi clasificate în gene esenţiale (comune pentru toate celulele organismului), gene ce intervin în specializarea celulelor şi gene ce codifică proteinele reglatoare. De aceea, în diverse ţesuturi sau etape ale ontogenezei se exprimă (se transcriu) un număr diferit de gene.

În genomul nuclear pot exista mai multe copii ale aceleaşi gene. Grupul de gene, exonii cărora sunt asemănători, codifică proteine cu secvenţă şi proprietăţi similare, derivate de la o genă ancestrală, se numeşte ***familie de gene***. Familiile de gene pot fi repetitive, nerepetitive şi pseudogene.

Familiile de gene repetitive - reprezintă repetări ale uneia şi aceleiaşi gene de mai multe ori per genom. Pot să funcţioneze în acelaşi ţesut simultan, sau în ţesuturi diferite (genele pentru histone, ARNr, ARNt etc.).

Familiile de gene nerepetitive – sunt repetiţii ale unor gene cu efect similar, dar care se deosebesc atât prin structură, cât şi prin modul de acţiune (gene pentru globine, HLA etc.).

În fig. 8.13 este prezentată organizarea *cluster*ului pentru α-globine. Familia constă din patru gene funcţionale (ζ, α1, α2, θ) şi trei pseudogene (ψζ, ψα, ψα). Globina ζ întră în compoziţia hemoglobinei embrionare, iar globinele α – în compoziţia hemoglobinelor embrionare, fetale şi la adult.

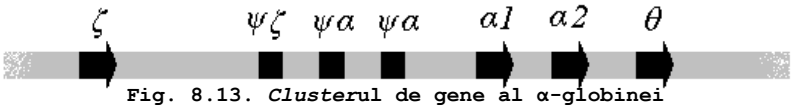


Fig. 8.13. *Clusterul de gene al α-globinei*

Pseudogene – sunt secvenţe rezultate prin duplicare, dar care nu funcţionează. Sunt genele care "tac". Ele acumulează mai multe mutaţii şi pot rezulta peste o perioadă de timp ca membru nou al familiei, cu proprietăţi distincte.

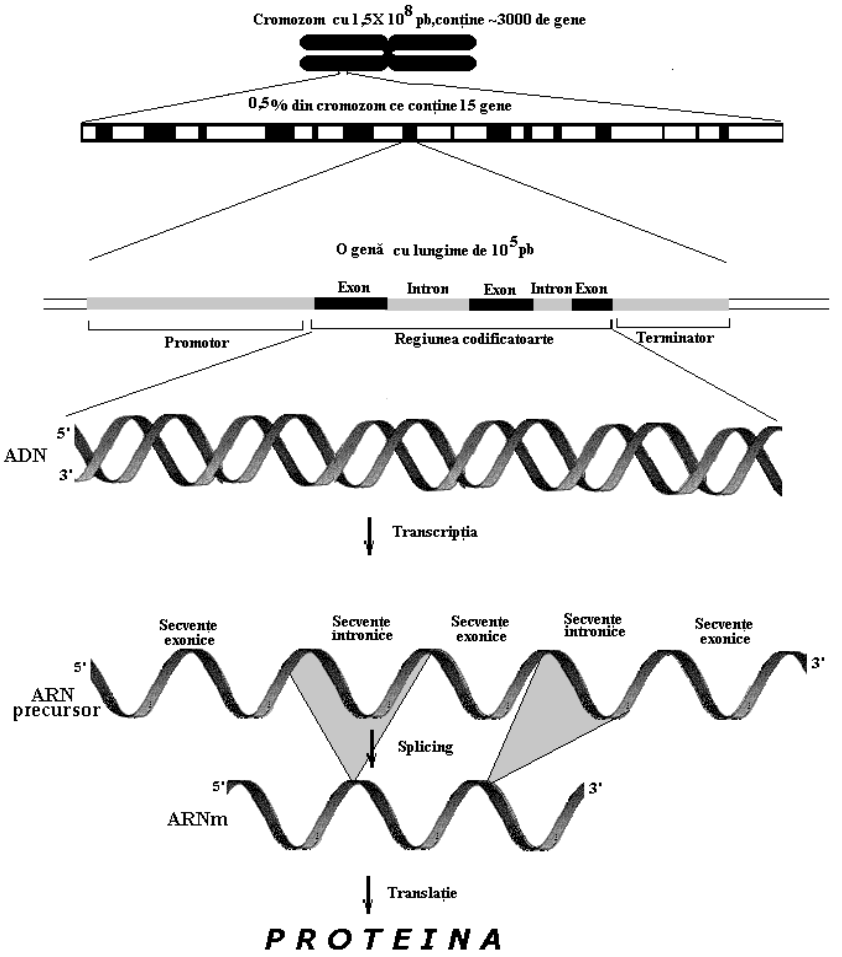


Fig. 8.12. Relaţia dintre localizarea, structura şi funcţia genelor în genomul uman

Genomul mitocondrial

Genomul mitocondrial este reprezentat de molecule circulare de ADN cu lungimea de 16.6 kb. În fiecare mitocondrie se conţine un număr variabil de molecule în dependenţă de necesitatea energetică a celulei. Aproape toate nucleotidele aparţin secvenţelor codante, secvenţele ADN cu funcţii reglatoare fiind foarte mici (ADN mitocondrial al celulelor umane nu conţine introni). Toate genele formează două unităţi transcripţionale: una pe catena grea cu promotorul HSP şi una pe catena uşoară LSP (fig. 8.14). ADN mitocondrial deţine 13 gene structurale, două gene pentru ARNr şi 22 gene pentru ARNt.

Genele structurale codifică enzimele implicate în metabolismul energetic. O genă pentru citocromul b (cit b), trei gene pentru subunităţile 1-3 ale citocrom-c-oxidazei (COI-III), şase gene pentru subunităţile 1-6 şi 4L ale NADH dehidrogenazei (ND 1-6 şi ND4L), două gene pentru subunităţile 6 şi 8 ale ATP-sintetazei (A6 şi A8) (fig.8.14).

Genele pentru ARNr controlează sinteza a două tipuri de molecule: ARNr 12S şi 16S se asociază cu proteinele importate din citoplasmă la formarea ribosomilor.

ADN mitocondrial codifică doar 22 molecule de ARNt. De regulă, ARNt mitocondrial recunoaşte specific doar primele două baze ale codonului din molecula de ARNm. A treia poziţie a codonului poate fi ocupată de o altă bază din aceeaşi clasă (purinică sau pirimidinică).

Replicarea ADN mitocondrial nu este limitată la faza de sinteză a ciclului celular. Moleculele de ADN se replică aleatoriu, unele de două ori, iar altele - nici odată. Totuşi, în fiecare ciclu celular, numărul moleculelor de ADN mitocondrial se dublează, menţinându-se constantă cantitatea de ADNmt per celulă. Genele mitocondriale se transmit pe linie maternă.

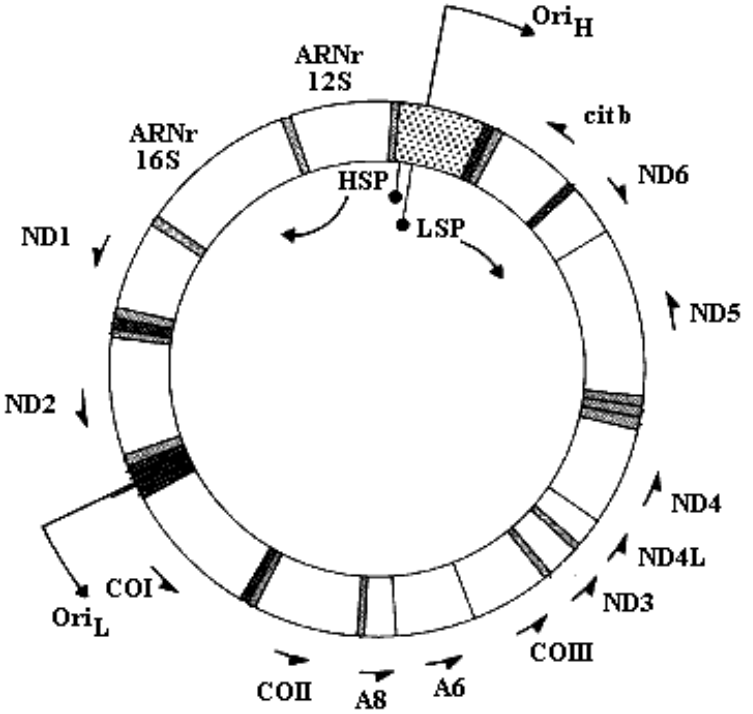


Fig. 8.14. Genomul mitocondrial uman. Săgeţile indică direcţia transcripţiei şi replicaţiei. Segmentele haşurate reprezintă genele ARNt

Cooperarea dintre genomul nuclear şi cel mitocondrial constituie un factor esenţial atât în funcţia normală a celulei, cât şi a mitocondriei. Circa 90 gene nucleare codifică proteine ce au rolul de susţinere a sistemului genetic mitocondrial: proteine ribozomale, aminoacil-ARNt-sintetaze, ADN- şi ARN-polimeraze, enzime implicate în procesarea şi modificarea ARN, etc. O serie de proteine codificate de gene nucleare intervin în reglarea numărului de mitocondrii per celulă şi a cantităţii de

proteine sintetizate de aceste organite. Studii efectuate asupra complexelor enzimatice din membrana mitocondrială internă au evidenţiat faptul că acestea conţin subunităţi ţesut-specifice ce acţionează ca reglatori ai transportului de electroni şi care sunt codificate de gene ce aparţin genomului nuclear.

Transpozonii

Secvenţele de ADN capabile să migreze de sine stătător şi ocupa o nouă poziţie în genom poartă denumirea de ***elemente genetice migratoare*** sau ***transpozoni.*** Cei mai simpli transpozoni au fost depistaţi la *E.coli* şi constau din gena *transpozaza* flancată de elemente repetitive invertate. Ele formează o familie cu denumirea de **IS** (insertion sequences). De obicei ele se inserează în locuri ţintă cu o secvenţă specifică pentru fiecare transpozon (des. 8.15).

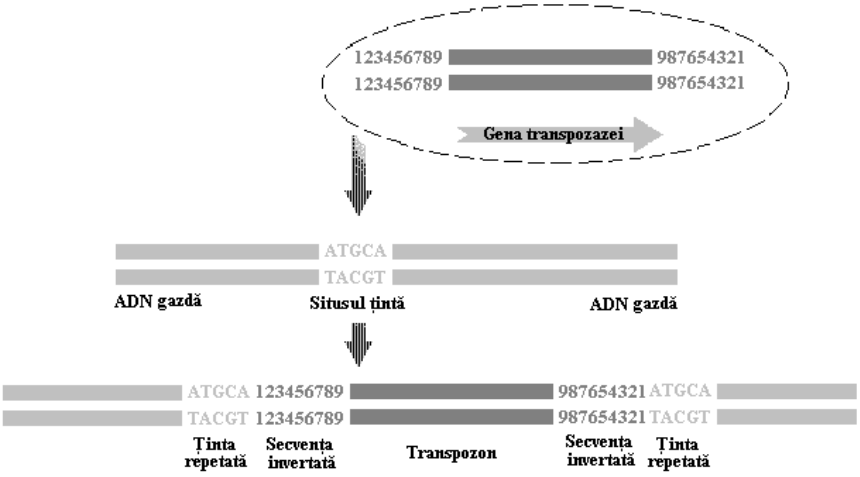


Fig. 8.15. Structrura transpozonului de tip IS

Unii transpozoni poartă şi alte gene, de exemplu gene de rezistenţă la antibiotice sau alte preparate medicamentoase. Din ei face parte familia **Tn** care conţine o regiune centrală cu gene specifice, iar regiunile periferice sunt reprezentate de elemente **IS** (fig. 8.16).

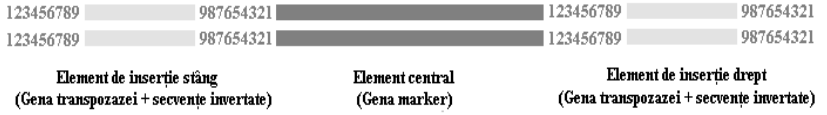


Fig. 8.16. Structura transpozonului Tn

Retrotranspozonii (de ex: **Ty, *copia*, Alu**) utilizează în mecanismul de transpoziţie ***reverstranscriptaza***, de aceea, în mod obligatoriu conţin gena pentru această enzimă, cât şi gena ***integrazei***, care participă la integrarea moleculei de cADN într-un alt loc. La capete retrotranspozonii conţin secvenţe repetitive lungi – **LTR** (**long terminal repeat**) care asigură inserarea fragmentelor. Transpoziţia poate fi de mai multe tipuri: transpoziţie nereplicativă, transpoziţie replicativă, transpoziţie conservativă şi retrotranspoziţie (fig. 8.17).

Transpoziţia nereplicativă constă în transferarea în întregime a unui fragment de ADN din poziţia veche în una nouă, ca rezultat, adesea apar rupturi bicatenare ale moleculei iniţiale. Cantitatea de ADN, totodată, nu se modifică.

Transpoziţia replicativă se caracterizează prin replicarea transpozonului, după care copia obţinută se transferă în loc nou. Ca rezultat cantitatea de ADN creşte.

Transpoziţia conservativă se caracterizează prin migrarea fragmentelor de ADN în întregime fără a cauza modificări în cantitatea de ADN şi fără a produce rupturi.

Retrotranspoziţia are loc în două etape. Mai întâi elementul migrator se transcrie, apoi de pe copia de ARN cu ajutorul *revertazei* (ADN-polimerază ARN-dependentă) are loc sinteza unei molecule complementare de ADN. Fragmentul nou format se integrează în locus nou. Ca efect are loc creşterea cantităţii de material genetic.

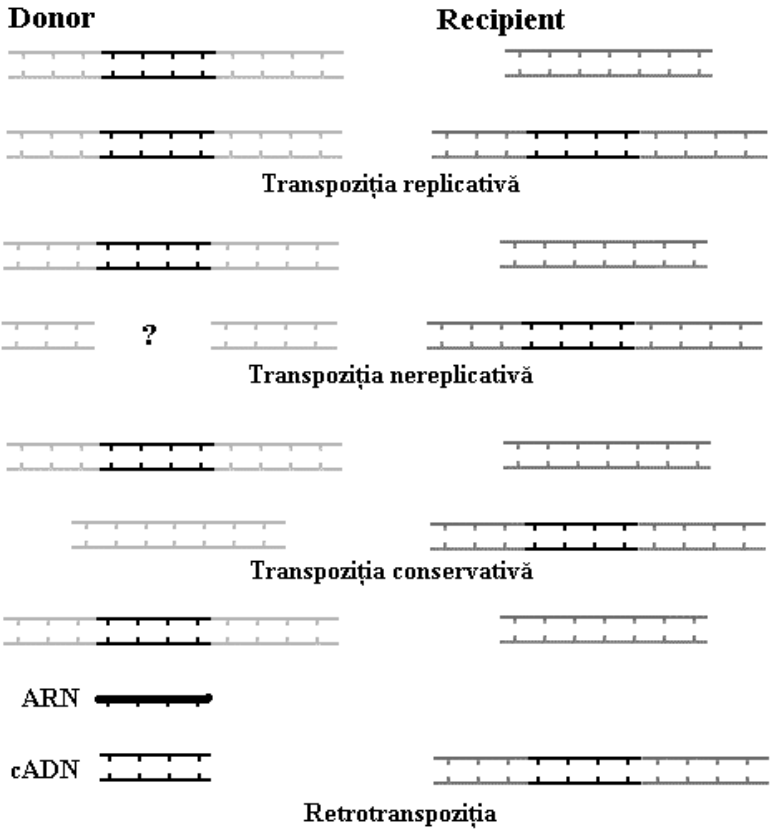


Fig. 8.17. Schema diferitor mecanisme de transpoziţie

Transpozonii pot cauza mai multe rearanjări genomice dintre care cele mai importante sunt:

↳ translocarea poate provoca deleţii sau întreruperi ale genelor, ceea ce cauzează inactivarea genelor;
↳ elementele migratoare servesc ca substrat pentru sistemele de recombinare celulară; două copii ale aceluiaşi transpozon în diferite poziţii în cromozom pot cauza recunoaşterea şi împerecherea incorectă a cromozomilor pe parcursul crossing-overului.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: genă, genă structurală, cistron, promotor, exon, intron, operon, transpozon.
2. Care este structura generală a genelor?
3. Care sunt funcţiile secvenţelor promotorilor la eucariote?
4. În ce constă structura mozaică a genelor?
5. Ce reprezintă operonul?
6. Care sunt particularităţile genomului mitocondrial?
7. Prin ce se deosebesc transpozonii IS, Tn şi retrotranspozonii?

9

TRANSCRIPȚIA. PROCESSINGUL ARN

ADN deţine, sub formă codificată, informaţia ereditară necesară edificării şi funcţionării structurilor ce alcătuiesc fiinţa vie, precum şi realizării proceselor metabolice care caracterizează viaţa. Sinteza proteinelor este realizată pe baza genelor de structură şi are loc în citoplasmă, pe ribozomi. Informaţia ereditară necesară secvenţierii aminoacizilor din proteină se găseşte în ADN nuclear. Această moleculă nu poate părăsi nucleul şi de aceea mesajul genetic ce corespunde unei proteine va fi mai întâi copiat, transcris, sub forma unei molecule mai mici, ARNm, care va putea trece prin porii membranei nucleare şi transmite informaţia în citoplasmă. Astfel, sinteza proteinelor se realizează în două etape majore: transcripţia şi translaţia.

Prima etapă este ***transcripţia*** sau copierea mesajului codificat în ADN, sub forma unei secvenţe specifice complementare de nucleotide, intr-o moleculă de ARNm. A doua etapă constă în: ***translaţia*** (descifrarea) informaţiei copiată de ARNm de către moleculele de ANRt (care fixează specific un aminoacid), aşezarea aminoacizilor în secvenţa indicată de ARNm şi legarea lor peptidică.

Sinteza proteinelor este precis controlată în funcţie de programul ontogenetic al organismului sau de necesităţile sale, impuse de anumite condiţii metabolice sau de mediu.

Transcripţia este realizată de enzimele numite - ***ARN-polimeraze***. Sinteza ARN pe baza matriţei ADN se desfăşoară în direcţia 5'→3' după principiul complementarităţii (A=U; T=A; G≡C; C≡G). Procesul decurge în mai multe etape (iniţierea, elongarea, terminarea) cu participarea mai multor componente. Transcripţia este reglată de secvenţe de ADN specifice ale promotorului, terminatorului şi alte secvenţe modulatoare (enhancer, silencer, operator). Secvenţele consens sunt recunoscute de proteine specifice reglatoare, ce interacţionează cu ARN-polimeraza, direcţionând, accelerând sau încetinind procesul.

Transcripţia la eucariote

În funcţie de ARN-polimeraza care realizează transcrierea, la eucariote genele se împart în trei clase:

- ***Gene de clasa I*** – gene ce codifică ARNr 5,8S, 18S, 28S şi sunt transcrise de ARN-polimeraza I. ARN-polimeraza I reprezintă activitatea sintetică cea mai mare - aproximativ 50-70%.
- ***Gene de clasa II*** – gene ce codifică sinteza lanţurilor polipeptidice, transcrise de ARN-polimeraza II (gene structurale). Se apreciază că 10% din ADN uman este transcris în ARNm. Enzima mai transcrie câteva gene care codifică molecule mici de ARN nuclear (snRNA= smal nuclear RNA). Activitatea relativă a ARN-polimerazei II este egală cu 20-40%.
- ***Gene de clasa III*** – gene ce codifică ARNr 5S şi ARNt, transcrise de ARN-polimeraza III. Activitatea relativă a enzimei respective este egală cu aproximativ 10% din total.

Transcrierea genelor de clasa II

Aparatul de transcriere:

Gena cu secvenţe codificatoare şi reglatoare (promotor, terminator):

- regiunea promotorului include secvenţe consens: boxa TATA, boxa CAAT, boxa CG, octamer etc., care sunt recunoscute de proteine reglatoare;
- secvenţa transcrisă a moleculei de ADN include: +1, secvenţa lider, exonii, intronii, terminatorul (fig. 9.1).

Poziţia secvenţelor consens din promotor determină care din cele două catene de ADN va servi drept matriţă în sinteza moleculei de ARN. Catena 5'→3' poartă denumirea de ***catena codogenă***, netranscrisă. Catena 3'→5' poartă denumirea de ***catena anticodogenă***, este transcrisă, deci serveşte drept matriţă pentru activitatea ARN-polimerazei.

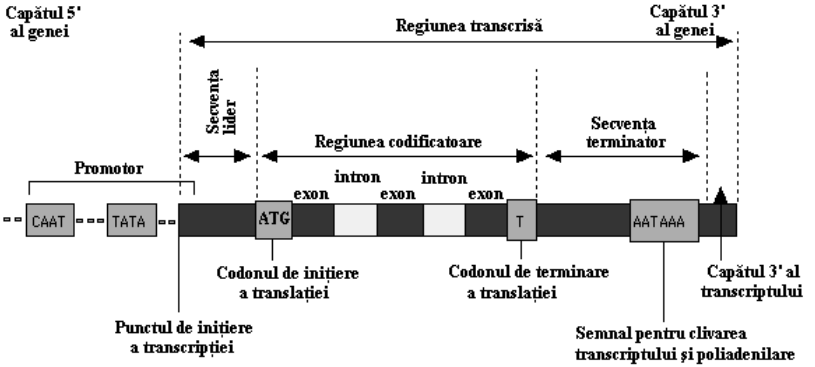


Fig. 9.1. Organizarea genelor structurale la eucariote

ARN-polimeraza II – o enzimă nucleoplasmatică, responsabilă pentru transcripţia ARNm. În structura ei se disting 10 subunităţi funcţionale responsabile de recunoaşterea

factorilor generali de transcripţie, denaturarea şi renaturarea ADN-ului, catalizarea împerecherii bazelor azotate din ADN şi ARN. Polimerizează ribonucleotidele în direcţia 5'→3' după principiul complementarităţii pe baza catenei 3'→5' a moleculei de ADN. Această enzimă nu poate recunoaşte direct promotorul şi, respectiv, nu poate iniţia transcrierea, de aceea activează în complex cu proteinele reglatoare. Spre deosebire de ADN-polimeraze, ARN-polimerazele pot iniţia sinteza ARN pe loc gol, în lipsa primerului (fig. 9.2). Ca unităţi de polimerizare utilizează **ribonucleozid trifosfaţi** – NTP: ATP, GTP, CTP, UTP;

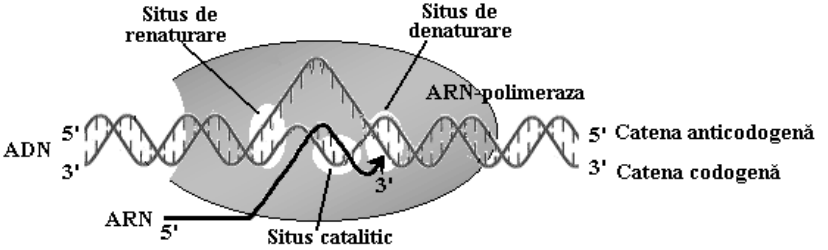


Fig. 9.2. Activitatea ARN-polimerazei

Factori proteici de transcriere:

A. *Factori de transcriere generali* – proteine care recunosc secvenţele consens ale promotorului, punctul de iniţiere a transcripţiei (+1) şi interacţionează cu ARN-polimeraza II. Aceste proteine sunt implicate în iniţierea şi direcţionarea, elongarea şi terminarea procesului la toate genele de clasa II.

B. *Factori de transcriere specifici* – proteine care recunosc secvenţe specifice ale promotorilor genelor ce se exprimă în anumite ţesuturi (de ex., receptorii hormonali steroidici, care transportă hormonii ce reglează sinteza anumitor tipuri de proteine). Sunt implicaţi în activarea anumitor gene (decondensarea cromatinei, eliberarea promotorului şi activarea factorilor de transcriere generali).

Secvenţe ADN modulatoare ale transctipţiei ce reglează rata şi viteza de transcriere prin intermediul unor proteine reglatoare**:** secvenţe intensificatoare (***enhanceri***) şi secvenţe atenuatoare (***silenceri***). Aceste secvenţe pot fi localizate în regiunea promotorului sau în afara genei, chiar la o distanţă considerabilă.

Mecanismul transcrierii

Transcripţia este un proces ce se desfăşoară în mai multe etape: ***iniţierea, elongarea, terminarea***. Produsul primar al transcripţiei este o moleculă de ARNm-precursor. Această moleculă este rezultatul polimerizării ribonucleotidelor după principiul complementarităţii de pe catena 3'→5' (catena anticodogenă) a moleculei de ADN.

Iniţierea. Un factor decisiv pentru iniţierea procesului de sinteză a ARN este recunoaşterea primului nucleotid care va fi citit (+1). Punctul de start al transcripţiei este determinat de poziţia secvenţelor consens ale promotorului, iar ARN-polimeraza este responsabilă doar de sinteza ARN. Promotorul şi punctul de start al transcripţiei sunt recunoscute de factorii proteici de transcripţie (pentru iniţierea transctipţiei se formează un complex din circa 20 proteine diferite). Pentru recunoaşterea promotorului genei care va fi transcrisă este necesară decompactizarea secvenţelor respective de ADN, care este înrulat în jurul unor octamere de histone formând nucleozomul. Pentru a se realiza transcripţia unei catene de ADN, aceste structuri se modifică, luând o dispoziţie liniară, prin desfacerea celor două unităţi simetrice ale miezului nucleozomului. Moleculele histonice rămân ataşate numai la una din catene, permiţând desfacerea locală a celeilalte catene de ADN şi, deci, producerea transcripţiei. Aceasta se realizează cu ajutorul factorilor specifici de transcripţie.

Iniţierea transcripţiei se caracterizează prin succesiunea următoarelor evenimente (fig. 9.3).

1. Formarea complexului de iniţiere a transcripţiei:
   - ataşarea la promotor a factorilor specifici de transcriere;
   - legarea factorului de transcripţie **TFIID (TBP)** la boxa TATA (TF – Transcription Factor, II – gene clasa II; TBP – TATA Binding Protein);
   - legarea factorului de transcripţie **TFIIA** proximal, care stabilizează complexul TBP-boxa TATA;
   - în faţa factorului TBP se ataşează factorul **TFIIB**, care având activitate ATP-azică, ajută la denaturarea ADN făcând posibilă citirea matriţei de către ARN-polimeraza II;
   - pentru menţinerea complexului de iniţiere în stare activă TBP interacţionează cu o proteină intensificatoare aducând enhancerul lângă promotor (fig.9.4).

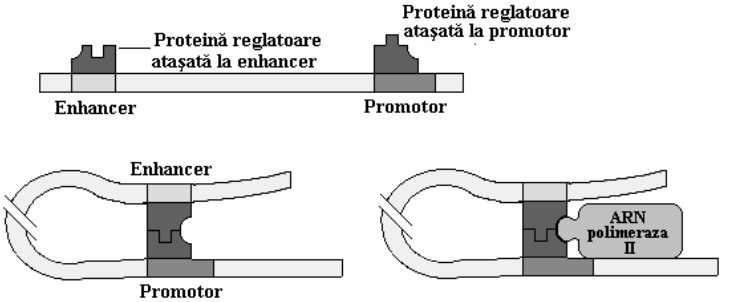


Fig. 9.4. Interacţiunea dintre enhancer şi complexul de iniţiere

2. Ataşarea la complexul proteic a enzimei **ARN polimeraza II**, care este activată de factorul **TFIIF.** TFIIF îndeplineşte şi funcţia de helicază ATP-dependentă, denaturând local ADN-ul;
   - transcripţia începe după ataşarea factorilor **TFIIE** şi **TFIIH**, care permite ARN-polimerazei să alunece de-a lungul matriţei;
   - are loc citirea primului nucleotid (+1) şi incorporarea primului ribonucleotid, care de regulă este un ATP

3. Iniţierea se termină prin formarea primei legături fosfodiesterice în molecula de ARN.
   Regiunea de ADN denaturat formează ***complexul deschis*** (fig. 9.2).

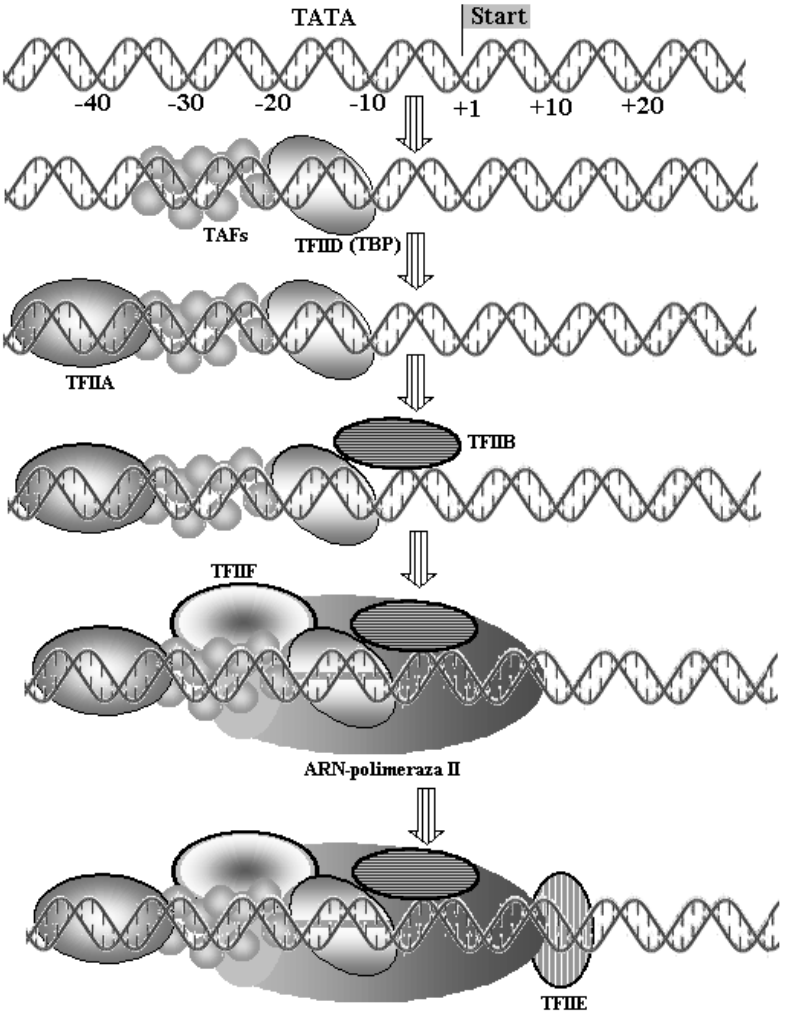


Fig. 9.3. Complexul de iniţiere a transcripţiei

Elongarea. Primul eveniment al acestei etape constă în modificarea configuraţiei complexului proteic de transcripţie. Astfel, se eliberează de la ARN-polimeraza II factorii TFIIB şi TFIIE rămânând ataşat TFIIF şi FTIIH. Factorul TFIIH este considerat factor de elongare, având activitate de helicază ATP-dependentă, kinază şi poate fi implicat în repararea ADN.

ARN polimeraza II citeşte catena de ADN 3'→5' şi polimerază în direcţia 5'→3' cu o rată de 30 nucleotide/sec.

La începutul fazei de elongare la ARN- polimerază se ataşează **TFIIS** care deţine rol în prevenirea eliberării premature a ARN-polimerazei. În spatele ARN-polimerazei, de-a lungul catenei de ARN se deplasează un factor proteic de eliberare.

La promotor rămân ataşate următoarele proteine: FTIID, FTIIA şi proteina intensificatoare. Acestea sunt necesare pentru ataşarea altor molecule de ARN-polimerază II care vor sintetiza alte lanţuri de ARN, până la recepţionarea semnalelor reglatoare care blochează transcripţia.

Terminarea transcripţiei. Când ARN-polimeraza ajunge la secvenţa terminatorului transcrie şi secvenţa palindromică. Molecula de ARN imediat formează o buclă care încetineşte deplasarea ARN-polimerazei (fig. 8.2). În consecinţă, polimeraza este ajunsă de factorul de eliberare ceea ce condiţionează disocierea complexului ADN, ARN, ARN-polimerază.

Processingul ARN

Produsul primar al transcripţiei nu poate fi imediat transportat în citoplasmă. În primul rând, ARNm precursor conţine secvenţe necodificatoare (introni), în al doilea rând poate fi uşor scindată de ARN-aze. Pentru a preveni degradarea, are loc prelucrarea capetelor moleculei, iar intronii sunt înlăturaţi. Totalitatea reacţiilor de modificare a ARNm precursor poartă denumirea de ***maturizarea ARNm*** sau ***processing***. Aceste procese se desfăşoară în nucleu şi sunt catalizate de

enzime specifice. Etapele *processing*-ului sunt următoarele: prelucrarea capătului 5' (*cap*-are), prelucrarea capătului 3' (poliadenilare), înlăturarea intronilor (*splicing*) (fig. 9.5).

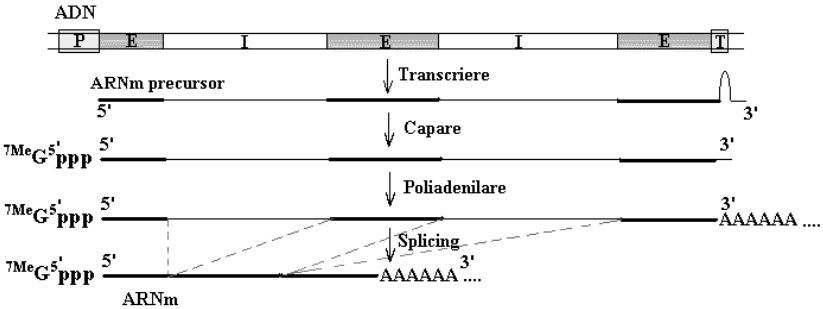


Fig. 9.5. Etapele processing-ului genelor de clasa II

Modificarea capetelor moleculei de ARNm precursor

Prelucrarea capătului 5'. Capătul 5' al transcriptului primar este modificat în timpul transcripţiei. După sinteza unui fragment de ARN cu lungimea 30 baze enzima guanilat transferaza adaugă o Guanină (GTP) metilată prin legătură 5'-5' la primul nucleotid din ARN (de regulă o adenină). Structura ^{7Me}**G**^{5}**ppp**^{5} **N** poartă denumirea de *"CAP"*. De asemenea, pot fi metilate şi ultimele două riboze în poziţia 2' (fig. 9.6).

Funcţiile CAP-ului:

- asigură stabilitate moleculei de ARN datorită legăturii nespecifice 5' - 5';
- reprezintă un situs de recunoaştere pentru ribozomi în iniţierea translaţiei.

Prelucrarea capătului 3'

Capătul 3' al moleculei de ARNm precursor conţine secvenţa palindromică în formă de buclă. La 11-30 baze de la situsul AAUAAA molecula este clivată de o endonuclează. O altă enzima – **poli(A)-polimeraza** adaugă 100-200 resturi de

acid adenilic. ARNm ce codifică histonele nu este supus poliadenilării.

Funcţiile secvenţei poli-A:

- asigură stabilitatea capătului 3' al moleculei de ARNm;
- controlează pasajul moleculei de ARNm din nucleu în citoplazmă.

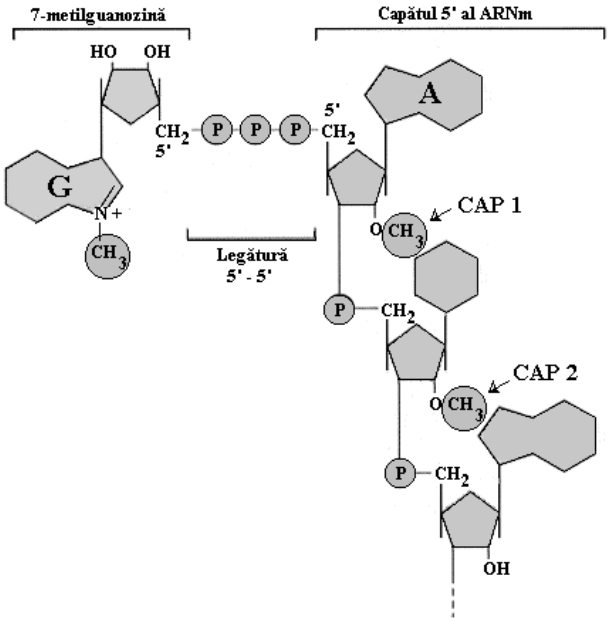


Fig. 9.6. Structura CAP-ului ARNm

Splicing-ul

Înlăturarea intronilor din ARNm precursor şi unirea exonilor are loc în nucleu, cu participarea unui complex enzimatic denumit ***splicesom.*** Componentele acestui complex sunt reprezentate de moleculele mici de ribonucleoproteide nucleare (snRNP), notate U_1 –U_6. Intronii sunt recunoscuţi după

secvenţa GU la capătul 5' şi secvenţa AG la extremitatea 3'. Procesul se desfăşoară în mai multe etape (fig. 9.7):

- la situsul GU a intronului se leagă ribonucleoproteida U_1;
- ribonucleoproteida U_2 se uneşte la nivelul unei adenine din interiorul intronului (***situsul buclei***);
- ribonucleoproteidele U_4,U_5,U_6 se asociază cu U_1, şi U_2 formând o buclă. Bucla se formează prin unirea capătului 5' al intronului cu adenina printr-o legătură nespecifică 5'–2';
- eliberarea ribonucleoproteidei U_4 din complex duce la clivarea capătului 3' al intronului. Intronul este înlăturat sub formă de lasou împreună cu proteinele U_2, U_5, U_6;
- formarea legăturilor fosfodiesterice 3' – 5' între capetele exonilor.

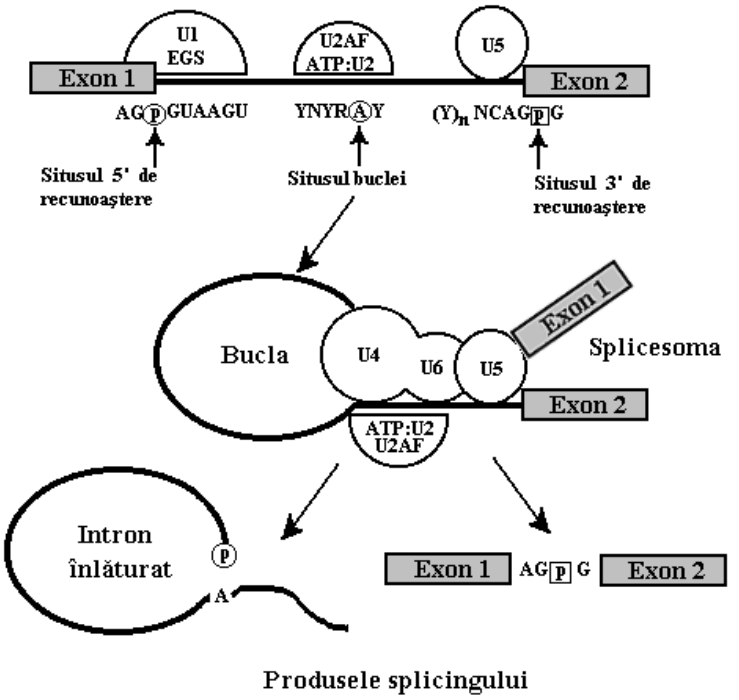


Fig. 9.7. Mecanismul *splicing*-ului ARNm

Ca rezultat al *splicing*-ului se formează un ARNm, ulterior va fi transferat în citoplasmă şi va servi matriţă pentru sinteza proteinei.

La eucariote există mai multe tipuri de *splicing*.

- ***Splicing constitutiv*** – prin care se înlătură toţi intronii, iar exonii sunt uniţi în ordinea în care erau dispuşi în genă.
- ***Splicing alternativ*** – are loc prin selecţia exonilor şi/sau eliminarea diferenţiată a intronilor. Astfel, de pe un ARNm precursor pot fi obţinute mai multe variante de ARNm şi respectiv mai multe tipuri de proteine. În diferite ţesuturi şi/sau la diferite perioade de dezvoltare pot fi sintetizate proteine diferite de pe aceeaşi genă (fig. 9.8).

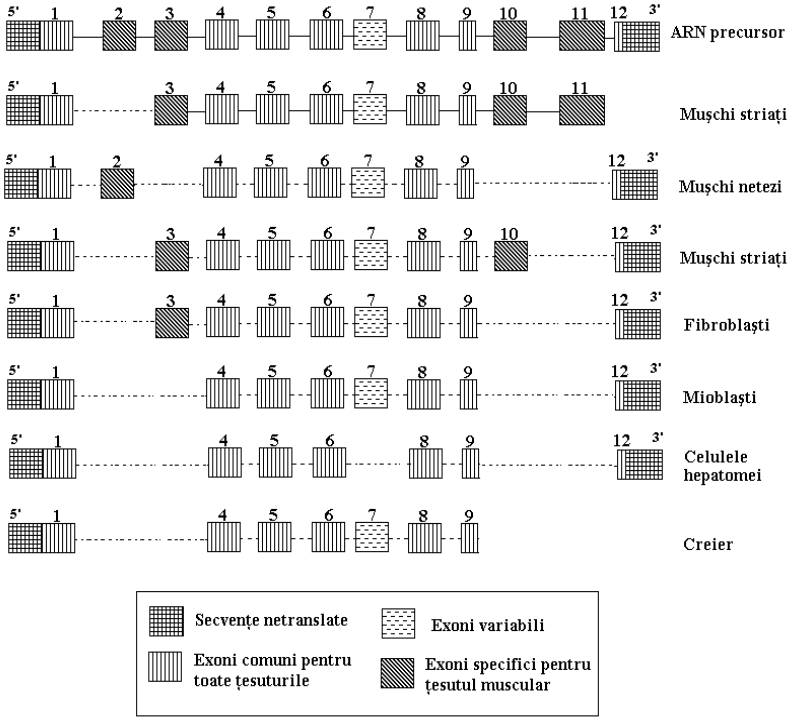


Fig. 9.8. *Splicing*-ul alternativ al ARN pentru tropomiozine

- ***Splicing prin amestec de exoni (exon shuffling)*** – moleculele de ARNm se pot forma prin schimbarea ordinii exonilor. Se întâlneşte foarte rar.
- ***Trans-splicing*** – formarea unei molecule de ARNm din câteva molecule de ARNm precursor, sintetizate de pe gene diferite. Se întâlneşte la tripanosome, la unele nematode şi trematode.

Editarea ARN

În urma processing-ului în ARNm pot fi adăugate, înlocuite sau înlăturate unele nucleotide. Acest fenomen decurge în nucleu cu participarea unor enzime specifice. Ca rezultat informaţia din molecula de ARNm nu coincide cu cea corespunzătoare din ADN. Procesul de modificare a secvenţei codificatoare din ARNm poartă denumirea de ***editarea ARN***.

Particularităţile transcripţiei genelor de clasa I şi clasa III

Genele de clasa I codifică sinteza ARNr. Ele formează unităţi transcripţionale repetate de mai multe ori în tandem cu localizare în diferiţi cromozomi (vezi fig. 8.8). Aceste gene formează organizatorii nucleolari. ARN-polimeraza I transcrie o moleculă de ARNr precursor cu coeficientul de sedimentare 45S. Ca rezultat al auto*splicing*-ului se formează trei fracţii de ARNr: 5,8S, 18S, 28S.

Genele de clasa III codifică pentru sinteza ARNt şi ARNr 5S. La fel ca şi genele de clasa I sunt organizate în unităţi transcripţionale mari. Ca rezultat al *processing*-ului transcriptului primar se obţin molecule de ARNt şi ARNr 5S.

Reglarea transcripţiei la eucariote

Controlul transcripţional determină posibilitatea de a fi sau a nu fi transcrisă o genă. Pentru înţelegerea mecanismelor de control ale transcripţiei genelor eucariote este necesar să se cunoască câteva particularităţi ale genomului eucariot.

- ADN are o structură supramoleculară realizată prin interacţiunea puternică cu diferite tipuri de proteine. În această stare transcripţia este imposibilă fiind blocată nespecific de histone. Unele secvenţe sunt metilate, fenomen asociat cu inactivarea ADN-ului.
- La eucariote cea mai mare parte a genomului nu este transcrisă. Majoritatea secvenţelor ADN sunt repetitive, necodificatoare (*spacer*i, ADN-satelit).
- Într-un organism eucariot pluricelular, celulele nu doar cresc şi se divid, dar şi suportă modificări morfologice, fiziologice şi metabolice, adică se diferenţiază. Pentru aceasta este necesară o expresie diferenţiată a genelor.
- Programul general al dezvoltării ontogenetice a unui organism asigură desfăşurarea etapelor de bază ale vieţii până la bătrâneţe şi moarte. Fiecare etapă are anumite particularităţi şi o anumită durată, iar existenţa unui individ este limitată. Astfel, expresia genelor este diferenţiată şi în funcţie de perioada de dezvoltare.
- Transcrierea mesajului genetic se realizează în nucleu. De aceea, ARNm pentru a fi transportat în citoplasmă unde se află ribozomii necesită anumite modificări.
- La eucariote ARNm poartă informaţia pentru sinteza unui singur lanţ polipeptidic. Astfel, este necesar un mecanism de reglare a expresiei genelor ce controlează un lanţ metabolic.

Nivelele de reglare ale transcripţiei

Controlul pretranscripţional constă în decondensarea cromatinei, modificarea histonelor, ce permite accesul factorilor transcripţionali şi denaturarea ADN. Au loc demetilarea şi schimbările conformaţionale în molecula de ADN pentru asigurarea intreacţiunii cu proteinele reglatoare.

Controlul iniţierii transcripţiei. Pentru iniţierea transcripţiei este necesară activarea promotorului genei-ţintă.

Elementele promotorului funcţionează ca modul în reglarea expresiei genei. Unele elemente promotoare (secvenţa TATA) sunt absolut necesare pentru iniţierea transcripţiei. În schimb, alte elemente stimulează sau împiedică transcripţia genei. Acestea sunt secvenţe de ADN, de care se leagă proteine specifice reglatoare (fig. 9.9). Dacă transcripţia a fost activată de legătura dată, elementul promotor se numeşte *element de reglare pozitivă,* iar proteina este o proteină reglatoare pozitivă. Dacă transcripţia este blocată, elementul promotor se numeşte *element de reglare negativă.*

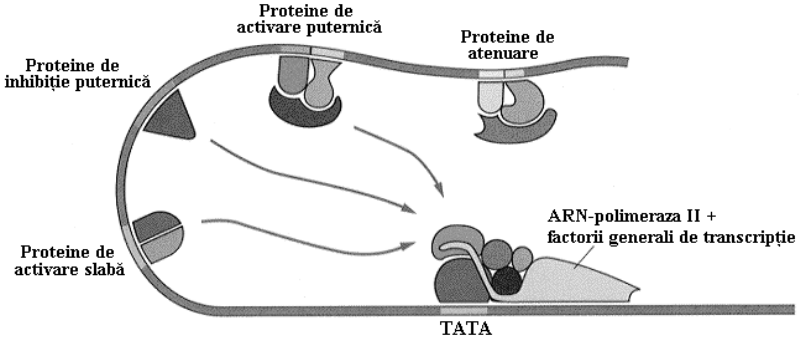


Fig. 9.9. Elementele reglatoare şi modulatoare implicate în controlul transcripţie

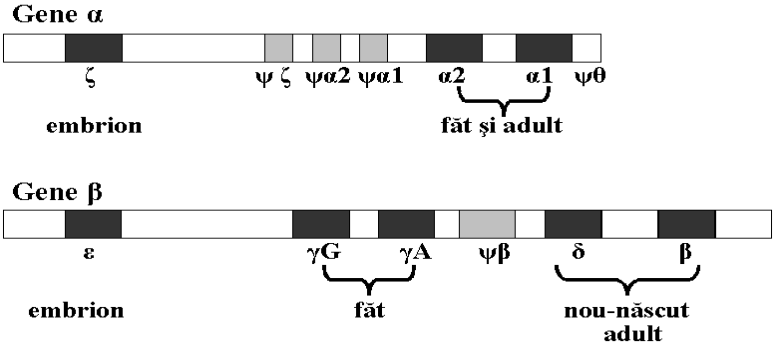
Elementul reglator al promotorului este specializat pentru fiecare genă pe care o controlează, pentru că se leagă de o moleculă semnal. O genă particulară poate avea unul sau mai multe elemente promotoare deoarece, în condiţii diferite, pot exista una sau mai multe proteine reglatoare care controlează expresia acestei gene (fig. 8.3).

Un model prin care elementele stimulatoare (*enhancerii)* influenţează transcripţia de la distanţă este următorul: o proteină specifică reglatoare se leagă de secvenţa stimulatoare. ADN-ul formează apoi o buclă în aşa fel, încât proteina reglatoare, legată de stimulator, să poată interacţiona cu proteinele reglatoare şi cu alţi factori asociaşi elementelor promotoare. Această

interacţiune dintre proteine determină activarea sau supresia transcripţiei (fig. 9.4; fig. 9.9).

De aceea, efectul unui element de reglare asupra transcripţiei depinde de combinaţia diferitelor proteine legate. Deci, combinaţiile particulare dintre proteinele reglatorii controlează, în mod specific, transcripţia genelor în diferite tipuri de celule. Aceasta se numeşte *reglare genică combinativă.*

Genele care controlează acelaşi proces şi/sau lanţ metabolic, de regulă, conţin secvenţe reglatoare similare şi sunt recunoscute de aceleaşi proteine reglatoare. De exemplu, genele implicate în dezvoltarea embrionară conţin o secvenţă comună numită homeoboxă. Astfel de gene sunt localizate pe acelaşi cromozom în ordinea conectării lor, formând astfel o familie de gene. Un al exemplu de expresie diferenţiată a genelor în timp şi spaţiu este sinteza hemoglobinei la om (fig. 9.10). Hemoglobina embrionară este formată din două polipeptide ζ şi două ε şi se sintetizează iniţial în sacul vitelin. Hemoglobina fetală începe să se sintetizeze în ficat şi în splină din două polipeptide α şi două γ. La nou-născut şi adult sinteza hemoglobinei se transferă în măduva osoasă unde sunt sintetizate adevăratele catene α şi β, cu un % mic de polipeptide δ de tip β.



Des. 9.10. Organizarea familiilor de gene pentru α-globine (pe cromozomul 16) şi β-globine (pe cromozomul 11)

Controlul sintezei ARN. După formarea complexului de iniţiere a transcripţiei ARN-polimeraza II sintetizează molecula de ARN până la situsul de terminare. Viteza şi rata de transcripţie este determinată de configuraţia promotorului şi de interacţiunea cu proteinele reglatoare. Sfârşitul procesului este semnificat prin secvenţa palindromică şi formarea buclei în molecula de ARN.

Controlul posttranscripţional. Pentru prevenirea degradării ARN şi transportul lui în citoplasmă are loc CAP-area şi poliadenilarea capetelor. Varianta splicing-ului decide structura proteinei ulterior sintetizate. Astfel de pe aceeaşi genă pot fi sintetizate diferite proteine. În consecinţă o genă poate controla diferite perioade ontogenetice sau diferenţierea celulară.

Controlul transferului ARNm în citoplasmă. ARNm – produsul processing-ului şi splicing-ului se asociază cu proteine speciale, inracţionează cu receptorii complexului porului nuclear şi se transferă din nucleu în carioplasmă.

Transcripţia la procariote

În capitolul 8 este descrisă structura şi organizarea moleculară a genelor la procariote. Unitatea transcripţională este reprezentată de ***operon*** care este format din secvenţe reglatoare (promotor/operator, terminator) şi secvenţe codificatoare (gene structurale) lipsite de introni (fig. 8.9).

La procariote există o singură ARN-polimerază care are aceleaşi proprietăţi ca şi ARN-polimerazele de la eucariote. Structural, ARN-polimeraza procariotelor reprezintă o holoenzimă formată din mai multe subunităţi funcţionale. Astfel, ea recunoaşte promotorul, este responsabilă de denaturarea şi renaturarea ADN, catalizează polimerizarea ribonucleotidelor. Moleculele de ARNm sunt policistronice şi utilizate imediat ca matriţă pentru sinteza proteinelor. Deoarece nu sunt protejate de CAP, moleculele ARNm degradează rapid.

Transcripţii de pe genele pentru ARNt şi ARNr sunt procesaţi, formând molecule mature de ARNt şi ARNr (fig. 8.11).

Reglarea transcripţiei la procariote

Particularităţile ciclului vital al organismelor procariote, cât şi organizarea simplă a aparatului genetic fac ca reacţiile de activare/inactivare a sintezei proteinelor să decurgă rapid. Se disting două tipuri de control al genelor: control negativ şi control pozitiv.

Controlul negativ este mecanismul de inactivare a genelor printr-o proteină ***represor***. Proteina represor este controlată de o genă reglatoare, plasată în afara operonului. Ea se uneşte la regiunea promotorului şi împiedică deplasarea ARN-polimerazei. Proteina represor poate fi inactivată de un ***inductor*** (factori de natură neproteică care poate fi substratul).

Controlul pozitiv reprezintă mecanismul de activare a genelor cu ajutorul unei proteine ***activator***. De regulă, activatorul este în stare inactivă şi nu are afinitate faţă de promotor. ***Inductorul*** condiţionează legarea proteinei activator la promotorul operonului ce va fi transcris. În aşa mod ARN-polimeraza recunoaşte regiunea promotorului şi efectuează transcripţia.

Verificarea cunoştinţelor

1. Definiţi noţiunile: expresia genei, transcripţie, promotor, exon, intron, factor de transcripţie, boxa TATA, ARN polimeraza II, transcript primar, ARN precursor, ARN mesager, *splicing*, splicesom, *enhancer*, *silencer*, control pozitiv, control negativ.
2. Care sunt etapele transcripţiei genelor structurale?
3. Cum se formează complexul de iniţiere a transcripţiei?
4. Care sunt particularităţile activităţii ARN polimerazei II?
5. În ce constă processingul ARNm-precursor?
6. Care sunt nivelele de control al transcripţiei la eucariote?

10

TRANSLAŢIA

După transcripţia şi transmiterea mesajului genetic din ADN nuclear în citoplasmă, secvenţa nucleotidelor din ARNm este convertită într-o secvenţă specifică de aminoacizi în proteină. Procesul se numeşte translaţie, întrucât "limbajul" nucleotidelor este tradus în "limbajul" celor 20 de aminoacizi ce alcătuiesc proteinele. Catenele polipeptidice sunt sintetizate prin aranjarea riguroasă a aminoacizilor într-o anumită ordine, asigurată de către ***codul genetic*** – un sistem de corespondenţe dintr-o anumită secvenţă de trei nucleotide (codon) din ARNm şi fiecare din cei 20 de aminoacizi.

În procesul transcrierii ARNm a preluat mesajul genetic din molecula de ADN despre succesiunea aminoacizilor din lanţul polipeptidic. Sistemul prin care succesiunea nucleotidelor din molecula de ADN (sau ARN) determină ordinea aminoacizilor în proteină poartă denumirea de ***cod genetic***.

Proprietăţile codului genetic

- ✓ Este alcătuit din triplete, fiecare triplet formează un ***codon***. Există 64 de codoni, dintre care 61 codifică pentru anumiţi aminoacizi, iar trei - sunt codoni de STOP informaţional.
- ✓ Este universal - la toate organismele există acelaşi cod genetic, cu unele excepţii la procariote, protozoare şi în mitocondrii.

	U	C	A	G	
U	(Phe)	(Ser)	(Tyr)	(Cys)	**U**
	(Phe)	(Ser)	(Tyr)	(Cys)	**C**
	(Leu)	(Ser)	STOP	STOP	**A**
	(Leu)	(Ser)	STOP	(Trp)	**G**
C	(Leu)	(Pro)	(His)	(Arg)	**U**
	(Leu)	(Pro)	(His)	(Arg)	**C**
	(Leu)	(Pro)	(Gln)	(Arg)	**A**
	(Leu)	(Pro)	(Gln)	(Arg)	**G**
A	(Ile)	(Thr)	(Asn)	(Ser)	**U**
	(Ile)	(Thr)	(Asn)	(Ser)	**C**
	(Ile)	(Thr)	(Lys)	(Arg)	**A**
	(Met)	(Thr)	(Lys)	(Arg)	**G**
G	(Val)	(Ala)	(Asp)	(Gly)	**U**
	(Val)	(Ala)	(Asp)	(Gly)	**C**
	(Val)	(Ala)	(Glu)	(Gly)	**A**
	(Val)	(Ala)	(Glu)	(Gly)	**G**

- ✓ Fiecare codon codifică un singur aminoacid. Prezintă ambiguitate doar codonii AUG, care specifică metionina şi formil-metionină, cât şi GUG – pentru valină şi formil-metionină.
- ✓ Este degenerat. Acelaşi aminoacid poate fi codificat de mai multe triplete (triplete sinonime) - astfel serinei îi corespund 6 codoni, prolinei - 4 etc.
- ✓ Este colinear - ordinea tripletelor în molecula de ARN corespunde ordinii aminoacizilor în lanţul polipeptidic.
- ✓ Nu este suprapus - tripletele vecine nu conţin nucleotide comune (fig. 10.1).
- ✓ Este fără virgule - codonii urmează unul după altul, fără spaţii.
- ✓ Există un triplet universal de iniţiere - **AUG**. La procariote şi la unele plante în calitate de codon de iniţiere poate fi **GUG**.
- ✓ Există trei codoni STOP - **UAA, UAG, UGA**.

Ordinea codonilor în molecula de ARNm se numeşte ***fază de lectură***. În fiecare moleculă de ARNm există trei faze de lectură. Faza de lectură care începe cu AUG se numeşte ***fază de lectură deschisă*** (fig. 10.1).

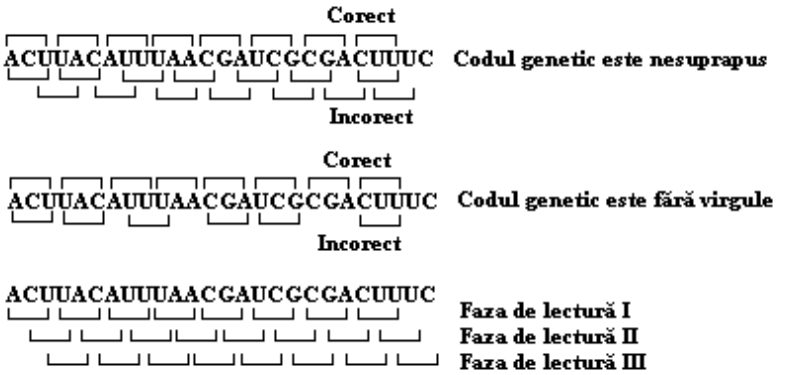


Fig. 10.1. Proprietăţile codului genetic

Procesul de decodificare a informaţiei cifrate în molecula de ARNm se realizează pe ribozomi cu ajutorul ARNt. Aparatul de translaţie include numeroşi factori proteici ce catalizează traducerea corectă a codului genetic, polimerizarea aminoacizilor, asamblarea ribozomilor, controlul duratei de viaţă a ARNm, controlul numărului de polipeptide sintetizate de pe aceeaşi matriţă.

Procesul de translaţie este similar la procariote şi eucariote. Sunt diferiţi factorii proteici de translaţie, tipurile de ribozomi implicaţi şi modul de iniţiere a translaţiei. De asemenea, diferă şi structura moleculelor de ARNm. La procariote ARNm, de obicei, este policistronic - conţine informaţia despre sinteza mai multor proteine, iar la eucariote conţine informaţia despre sinteza unui singur polipeptid. La procariote procesele de transcripţie şi translaţie pot decurge

concomitent. Aceasta este posibil deoarece ambele procese decurg direct în citoplasmă, iar viteza de sinteză a proteinelor (**10 aa/sec**) este comparabilă cu viteza de sinteză a ARN (**30 b/sec**). La eucariote aceste procese decurg separat: transcrierea - în nucleu, iar translaţia - în citoplasmă. Realizarea mesajului genetic în mitocondrii şi plastide are loc integral în organitele respective.

Aparatul de translaţie

Aparatul de sinteză a proteinelor este constituit din următoarele componente:

- ✓ ARNm – matriţă pentru sinteza proteinei;
- ✓ ribozomi – sediu pentru asamblarea polipeptidului;
- ✓ ARNt – translator al codului genetic de pe ARNm;
- ✓ aminoacil–ARNt sintetaze – adaproti penru aminoacizi la ARNt corespunzător;
- ✓ aminoacizi – monomerii proteinei;
- ✓ ATP şi GTP – surse de energie;
- ✓ Mg^{2+}, Ca^{2+} - cofactori ai enzimelor;
- ✓ factori proteici, catalizatori ai translaţiei – reglatori specifici ai procesului de decodificare a codului genetic şi sintezei proteinei.

ARNm la eucariote conţine mesajul genetic pentru sinteza unei molecule proteice, este monocistronic. Se sintetizează şi procesează în nucleu, apoi se transportă în citoplasmă (ARNm este asociat cu proteine specifice, recunoscute de complexul porului nuclear). Capătul 5′ este protejat de CAP, care serveşte ca semnal de recunoaştere pentru ribozom în iniţierea translaţiei. CAP-ul este urmat de câteva zeci de nucleotide netranslate – ***secvenţa lider*** – care reprezintă situs de legare a ARNm de ribozom (fig. 10.2).

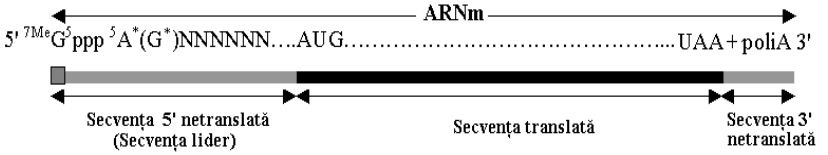


Fig. 10.2. Organizarea ARNm la eucariote

Regiunea translabilă conţine secvenţa de baze ce controlează ordinea asamblării aminoacizilor în polipeptid. La capătul 5′ al secvenţei translate se conţine codonul de iniţiere AUG, iar terminaţia este determinată de unul din cei trei codoni STOP. La capătul 3′ al mesagerului se găseşte o regiune de 100-200 nucleotide netranslate – coada poli(A).

ARNm procariotic este policistronic, produs al transcripţiei unui operon. Spre deosebire de ARNm de la eucariote, la procariote mesagerul nu este procesat. Capetele moleculei nu conţin CAP şi poli(A). Secvenţa lider este formată din circa 10 nucleotide netranslate şi conţine un hexamer conservat (5'…AGGAGG…3') numit ***secvenţa Shine-Dalgarno***. Ea este complementară unei secvenţe conservate de la capătul 3' al moleculei ARNr 16S. Într-o moleculă de ARNm se pot conţine mai mulţi codoni de iniţiere AUG (mai rar GUG sau UUG).

ARNt. În procesul de sinteză a proteinei sunt implicaţi 20 de aminoacizi. Ei sunt transportaţi la locul de sinteză cu ajutorul moleculelor de ARNt. Astfel, ARNt serveşte ca translator (traducător) al codului genetic de pe ARNm şi adaptor pentru aminoacizii corespunzători. Fiecare moleculă este formată din ~70-80 nucleotide care formează o structură secundară specifică - ***"frunză de trifoi"*** (fig. 10.3). Molecula ARNt conţine în afară de cele patru baze majore A, U, G, C şi

câteva baze minore: pseudouracil (ψ), dihidrouridina (D), timina (T) etc.

Regiunile funcţionale ale ARNt:

- **braţul acceptor** de care se uneşte aminoacidul (aa);
- **bucla ψ** care asigură recunoaşterea ribozomului;
- **bucla D** care este centrul de recunoaştere de către aminoacil-ARNt-sintetază;
- **bucla anticodon** care conţine un triplet ce determină tipul aminoacidului, transportat ulterior de ARNt şi are proprietatea de a se împerechea cu cele trei nucleotide ale codonului din ARNm.

În total există 61 tipuri de ARNt, în corespundere cu numărul de triplete codificatoare.

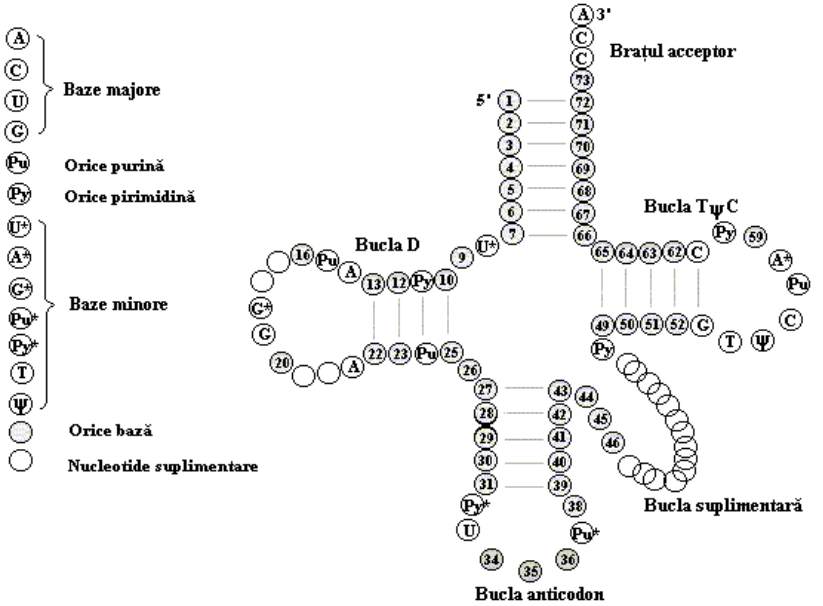


Fig. 10.3. Structura moleculelor de ARNt

Aminoacil-ARNt-sintetaza. Selecţia corectă şi legarea aminoacidului la molecula respectivă de ARNt se realizează cu ajutorul enzimei ***aminoacil-ARNt-sintetaza.*** Această enzimă are specificitate pentru fiecare dintre aminoacizi, de aceea în total există 20 tipuri (fig. 10.4). Aminoacidul se uneşte la grupa OH din poziţia C2' sau C3' de la capătul 3' al moleculei de ARNt. Adiţionarea se realizează în 2 etape:

1) Enzima + aminoacid + ATP $\xrightarrow{Mg^{2+}}$ Enzima-aminoacil-AMP + P~P

2) Enzima-aminoacil-AMP + ARNt $\longrightarrow$ A<u>minoacil-ARNt</u> + AMP + enzima.

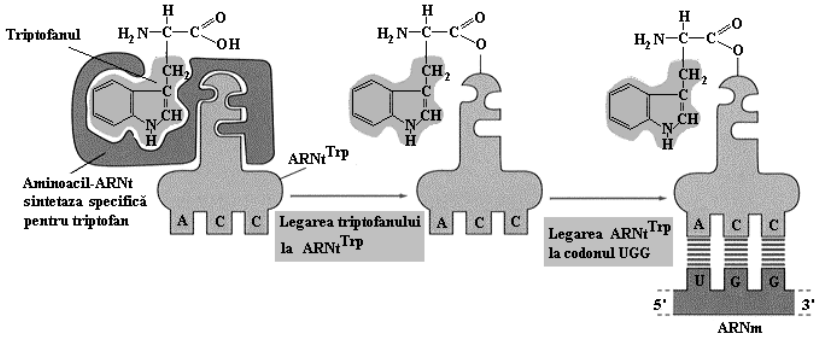


Fig. 10.4. Mecanismul interacţiunii aminoacidului, ARNt şi ARNt-sintetatzei

Ribozomii. Ribozomii reprezintă sediul de traducere a ARNm şi polimerizare a aminoacizilor. Ei constituie complexe ribonucleoproteice şi sunt formaţi din două subunităţi de mărime inegală. În citoplasmă, dacă ribozomii nu sunt implicaţi în procesul de translaţie, subunităţile ribozomale sunt disociate. Formarea ribozomului are loc doar la unirea cu ARNm. Structura ribozomilor, la fel ca şi structura ARNr este similară, însă nu identică, la toate speciile (fig. 10.5).

Ribozomii eucariotici. Subunitatea 40S conţine o moleculă de ARNr 18S şi ~33 proteine. Subunitatea 60S conţine la rândul său, trei molecule de ARNr (5S, 5,8S, 28S) şi circa 49 proteine. ARNr şi subunităţile ribozomale 40S şi 60S se formează în nucleol.

Ribozomii procariotici. Subunitatea 30S conţine o moleculă de ARNr 16S şi 21 proteine. Subunitatea 50S este formată din ARNr 5S, 23S şi 31 proteine. Sinteza ARNr şi formarea subunităţilor ribozomale are loc direct în citoplasmă.

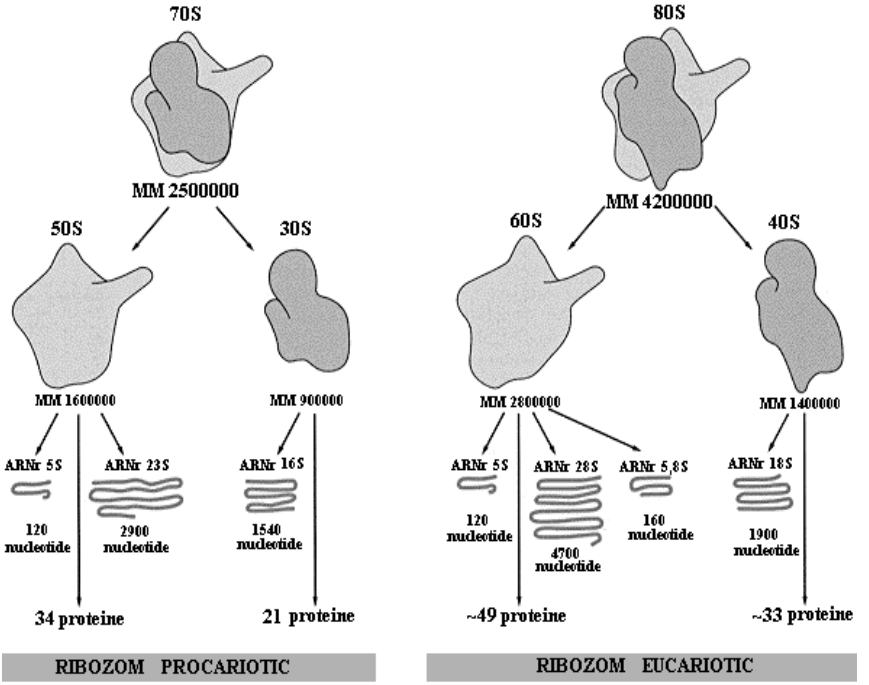


Fig. 10.5. Organizarea moleculară a ribozomilor

Ribozomii au câteva centre catalitice:

Situsul A - aminoacil - este responsabil de unirea complexului aminoacil-ARNt;

Situsul P - peptidil - este responsabil de unirea peptidil-ARNt;

Situsul E – este responsabil de eliminarea ARNt.

Legătura dintre ribozom, molecula de ARNt şi molecula de ARNm se realizează prin intermediul ARNr. Molecula ARNr din subunitatea mică este responsabilă de recunoaşterea şi unirea la ARNm. Moleculele de ARNr din subunitatea mare sunt responsabile de unirea celor două subunităţi ribozomale, interacţiunea ARNt cu subunitatea mare şi cu molecula de ARNm. Reacţiile ce se desfăşoară pe ribozom sunt catalizate de proteinele ribozomale.

Factori proteici de translaţie. Fiecare etapă a translaţiei este controlată de un complex de factori proteici specifici: IF – factori de iniţiere; EF – factori de elongare; RF – factori de terminare.

Mecanismul translaţiei

Sinteza proteinelor se face prin aşezarea secvenţială a aminoacizilor în ordinea impusă de mesajul genetic preluat de ARNm, în procesul sintezei sale pe matriţă de ADN. Descifrarea mesajului se face în sensul 5'→3' al moleculei de ARNm, deci în aceeaşi ordine în care a fost copiat de ARNm în procesul de transcripţie.

Procesul de biosinteză a proteinelor decurge în trei etape: ***iniţierea, elongarea*** şi ***terminarea.*** Fiecare etapă este controlată de factori proteici specifici, care diferă la procariote şi eucariote.

Iniţierea include reacţiile care preced formarea legăturii peptidice între primii doi aminoacizi din proteină. Ea necesită legarea ribozomului la ARNm şi formarea complexului de

iniţiere care include primul aminoacil-ARNt. Aceasta este o etapă relativ lentă a translaţiei şi determină rata cu care ARNm este tradus (fig. 10.6).

Iniţierea decurge în câteva etape:

(1) formarea complexului metionil-ARNt $_{met}$ (la procariote – formilmetionil-ARNt $_{fmet}$);
(2) activarea complexului metionil-ARNt$_{met}$ prin adăugarea unei molecule de GTP;
(3) formarea complexului [metionil-ARNt$_{met}$] – [GTP] – [subunitatea ribozomală mică]. Metionil-ARNt se situează în situsul P (proprietate unică doar pentru ARNt de iniţiere);
(4) asocierea complexului format la ARNm şi recunoaşterea codonului de iniţiere AUG, cu consumul unei molecule de ATP;
(5) asocierea subunităţii ribozomale mari şi disocierea GTP în GDP şi P_i.

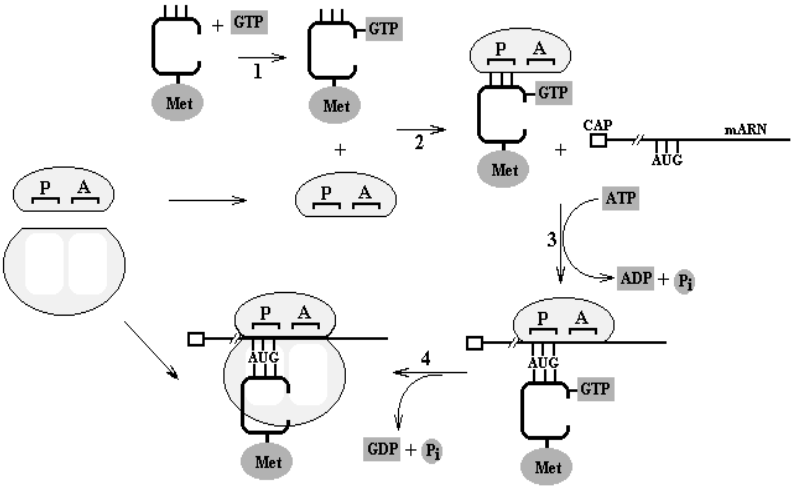


Fig. 10.6. Mecanismul iniţierii translaţiei

La **eucariote** mai întâi se recunoaşte CAP-ul, apoi subunitatea ribozomală mică migrează până când ajunge la primul codon AUG. Primul aminoacid incorporat este **metionina** (Fig 10.7).

La **procariote** se recunoaşte fiecare AUG care serveşte drept semnal pentru iniţierea translaţiei. Primul aminoacid incorporat este **formilmetionina.**

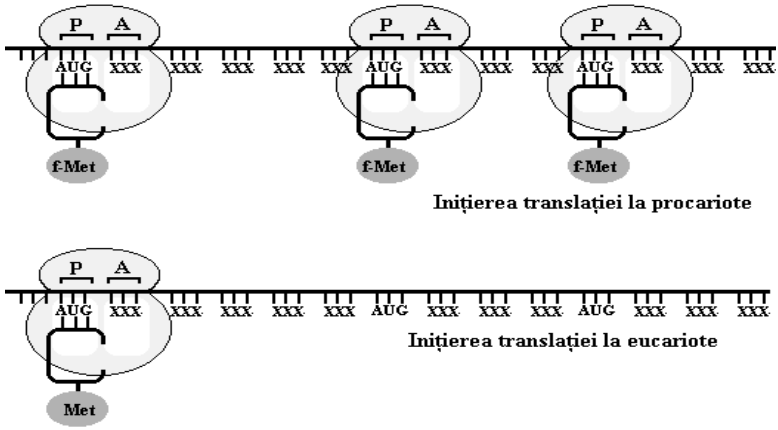


Fig. 10.7. Particularităţile iniţierii translaţiei la procariote şi eucariote

Elongarea include toate reacţiile de la formarea primei legături peptidice, până la adăugarea ultimului aminoacid. Aminoacizii se ataşează unul câte unul în conformitate cu succesiunea codonilor în molecula de ARNm. Este cea mai rapidă etapă a translaţiei (fig. 10.8).

Elongarea se caracterizează prin succesiunea următoarelor evenimente:

(1) formarea complexelor aminoacil-ARNt;
(2) activarea complexelor aminoacil-ARNt prin adăugarea a câte o moleculă de GTP;

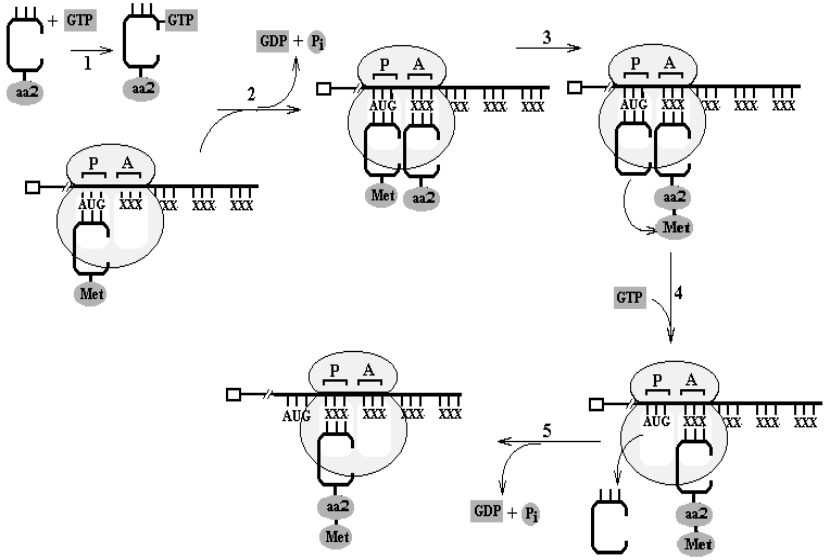


Fig. 10.8. Mecanismul elongaţiei lanţului polipeptidic

(3) transportarea complexului [aminoacil-ARNt] – [GTP] la **situsul A** al ribozomului şi eliberarea GDP + P_i;

(4) transferul aminoacidului iniţiator din situsul P în situsul A şi formarea legăturii peptidice între aminoacizi. Procesul este catalizat de enzima ***peptidil-transferaza***. În etapele următoare ale elongaţiei din situsul P se va transfera în situsul A întregul lanţ polipeptidic;

(5) eliberarea moleculei de ARNt din situsul P şi asocierea unei molecule de GTP la ribozom;

(6) ***translocarea*** ribozomului cu un triplet. Mişcarea ribozomului se efectuează în direcţia 5' → 3' al moleculei de ARNm:

- tripletul decodificat nimereşte în afara sectorului P;
- în situsul P se va deplasa ARNt cu polipeptidul format (**peptidil-ARNt**);

- în sectorul A se situează următorul codon, iar în situsul A – următorul aminoacil-ARNt. În calitate de energie serveşte GTP care se hidrolizează până la GDP + P_i.

Procesul decurge până când în sectorul A nimereşte unul din cei trei codoni STOP.

Terminarea cuprinde evenimentele necesare pentru eliberarea lanţului polipeptidic sintetizat şi disocierea ribozomilor de la ARNm.

Când în sectorul A se situează unul dintre cei trei codoni STOP (UAG, UGA, UAA), la ribozom se uneşte factorul de eliberare **RF. RF** condiţionează disocierea complexului de translaţie. Subunităţile ribozomale, ARNt, ARNm, RE, factorii proteici de translaţie pot fi reutilizaţi (fig. 10.9.).

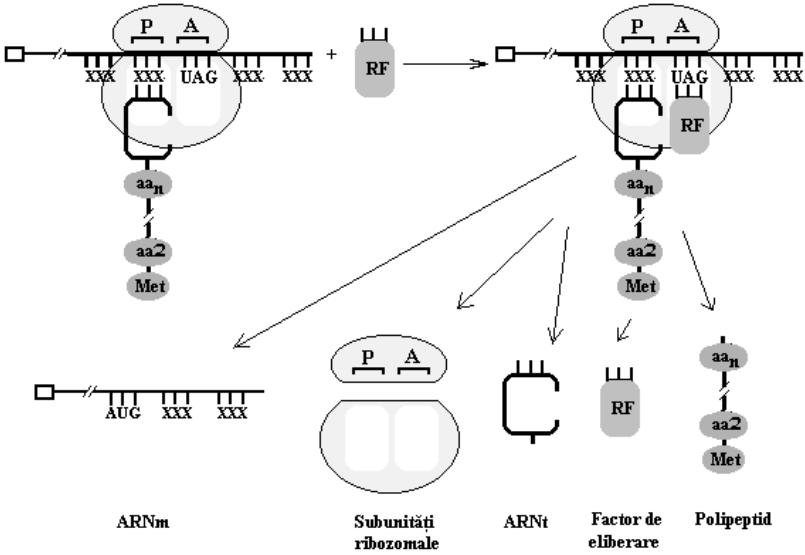


Fig. 10.9. Terminarea translaţiei şi eliberarea componenţilor aparatului de translaţie

Lanţul polipeptidic sintetizat, de obicei, suferă unele modificări posttranslaţionale: înlăturarea metioninei iniţiale, fosforilarea, glocozidarea, hidroliza specifică etc.

Reglarea translaţiei

Biosinteza proteinelor poate fi activată/inactivată de diverşi factori de natură proteică sau neproteică care interacţionează cu componenţi aparatului de translaţie.

În tab. 10.1 sunt enumeraţi principalii factori de translaţie la procariote şi eucariote, mecanismul lor de acţiune la diferite etape ale iniţierii, elongării şi terminării biosintezei proteinei.

La procariote este bine studiat mecanismul de acţiune şi al altor factori ce pot modula translaţia. Spre exemplu sunt prezentate unele antibiotice şi modul lor de blocare a sintezei proteice la bacterii.

- **Cazagamicina** – blochează iniţierea translaţiei prin legarea ei la capătul 3' al moleculei 16S, responsabilă de interacţiunea cu ARNm.
- **Puromicina** – blochează sinteza proteinei prin unirea ei la ARNt în loc de aminoacid.
- **Tetraciclina** blochează legarea aminoacil-ARNt la situsul A al ribozomului.
- **Streptomicina** împiedică trecerea de la iniţierea la elongarea lanţului polipeptidic.
- **Cloramfenicolul** blochează activitatea peptidil-transferazei.
- **Eritromicina** - blochează translocaţia ribozomului.

Unele modificări (mutaţiile) din structura ARNm pot cauza dereglări în procesul de translaţie. Mutaţiile pot fi cauzate de modificările din structura ADN transcris sau pot apărea în ARNm sintetizat.

Modificarea secvenţei-lider poate împiedica recunoaşterea şi legarea ribozomilor la ARNm.

Tabelul 10.1. Factorii de translaţie şi mecanismul lor de acţiune

Iniţierea	**Procariote**	
	IF-1	Se uneşte la subunitatea 30S şi stabilizează complexul de iniţiere până la interacţiunea cu alţi factori proteici
	IF-2	Se uneşte la ARNt de iniţiere şi controlează pătrunderea lui pe ribozom
	IF-3	Controlează unirea corectă a subunităţii 30S la ARNm
	Eucariote	
	eIF-2	Activează complexul Met-ARNt$_{met}$
	eIF-3	Asigură unirea subunităţii 40S la CAP-ul ARNm
	eIF-4A	Recunoaşte CAP-ul şi asigură denaturarea palindroamelor din secvenţa lider a ARNm
	eIF-4B	Asigură stabilitatea moleculei ARNm şi previne formarea buclelor
	eIF-5	Este o GTP-ază ce asigură unirea subunităţii 60S la complexul de iniţiere
	eIF-6	Previne legarea prematură a subunităţii 60S la subunitatea 40S
Elongarea	**Procariote**	
	EF-Tu	Mediază pătrunderea aminoacil-ARNt în situsul A
	EF-Ts	Asigură hidroliza GTP; regenerează EF-Tu
	EF-G	Asigură translocarea ribozomului
	Eucariote	
	eEF-1α	Asigură unirea aminoacil-ARNt la ribozom; este omologul EF-Tu
	eEF-1βγ	Asigură hidroliza GTP; este omologul EF-Ts
	eEF-2	Asigură translocarea ribozomului; este omologul EF-G
Terminarea	**Procariote**	
	RF-1	Recunoaşte codonii STOP **UAA** şi **UAG**
	RF-2	Recunoaşte codonii STOP **UGA** şi **UAA**
	RF-3	Asigură specificitatea RF-1 şi RF-2.
	Eucariote	
	???	Mecanism asemănător ca la procariote; factorii de terminare sunt încă puţin studiaţi

Pierderea/adiţionarea unui sau mai multor nucleotide provoacă ***decalarea fazei de lectură*** şi modificarea secvenţei de aminoacizi în întregul lanţ, după locul de modificare. Substituţia nucleotidelor poate provoca apariţia codonilor ***missens*** sau ***nonsens.*** Mutaţiile missens determină înlocuirea unui aminoacid cu altul. În cazul formării unor codoni STOP prematuri (mutaţie nonsens), are loc sinteza unor lanţuri polipeptidice mai scurte. Înlocuirea unui codon STOP cu un codon sens duce la alungirea lanţului polipeptidic.

Numărul de polipeptide sintetizate de pe aceeaşi matriţă ARNm este determinat de durata de viaţă a mesagerului. La procariote ARNm sintetizat este supus imediat translaţiei şi are o durată de viaţă de 2-5 min. La eucariote există mai multe mecanisme ce asigură stabilitatea ARNm, care au o durată de viaţă de la 20 min – până la 48 ore. Unul dintre ele este asociat cu lungimea secvenţei poli(A). În plus la eucariote există particule RNP ce păstrează ARNm. Asocierea ARN cu proteinele previne degradarea enzimatică a mesagerului. Date recente pun în evidenţă existenţa unor molecule de ARN-antisens, care se pot lega complementar cu moleculele de ARNm, blocând astfel degradarea şi prevenind translaţia mesagerilor respectivi.

Particularităţile translaţiei în mitocondrii

Mitocondriile posedă un aparat propriu de translaţie care include ribozomi proprii (în mediu 70S), ARNt propriu şi utilizează ca matriţă ARNm transcris de pe ADN mitocondrial. Procesul de translaţie se aseamănă, în linii generale, cu cel descris la procariote, având unele particularităţi. ARNm este policistronic şi nu este supus CAP-ării sau poliadenilării. În mitocondrii există doar 22 tipuri de ARNt, deoarece al treilea nucleotid din bucla anticodogenă respectă principiul: **G**

recunoaşte orice pirimidină din tripletul codogen, iar **U** - orice purină.

În mitocondrii sunt sintetizate doar o parte din enzimele implicate în metabolismul energetic. Celelalte proteine mitocondriale, inclusiv proteinele reglatoare ale replicării, transripţiei, translaţiei sunt codificate de genomul nuclear, sintetizate în citoplasmă şi importate în mitocondrii. De aceea, biosinteza proteinelor mitocondriale este reglată în mare parte de activitatea genelor nucleare.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: translaţie, cod genetic, codon, anticodon, fază de lectură, situs A, situs P, aminoacil-ARNt-sintetaza.
2. Care sunt proprietăţile codului genetic?
3. Care sunt componentele aparatului translaţional?
4. Prin ce se deosebeşte procesul de translaţie la pro- şi eucariote?
5. Care sunt etapele procesului de biosinteză a proteinelor?
6. Care sunt mecanismele de reglare ale sintezei proteice la eucariote?

11

TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT

Descifrând enigmele structurii genelor, savanţii au început să se preocupe de izolarea şi sinteza lor. În urmă cu 30 de ani cei care credeau în reuşita acestor deziderate erau puţini şi nimeni nu bănuia explozia actuală a ingineriei genetice şi consecinţele cu adevărat extraordinare pe care le va avea.

Primii paşi au fost făcuţi de *Beckwith* şi *Shapiro,* care în 1969 au izolat şi fotografiat operonul lactozei. Un an mai târziu *G. Khorana* reuşeşte sinteza artificială a primelor gene de procariote. Cu aceeaşi tehnică se sintetizează gena ce codifică somatostatina – un hormon hipofizar (1977). După descoperirea transcriptazei inverse se reuşeşte sinteza altor gene de mamifere (pentru hemoglobină, ovalbumină, insulină etc.). Genele obţinute nu erau însă active, deoarece nu aveau un sistem propriu de replicare, nici secvenţele necesare declanşării transcripţiei şi apoi a sintezei proteinelor pe care le codifică. Aceste dificultăţi au fost depăşite, introducând genele artificiale în plasmidele unor bacterii sau virusuri. Pentru inserţia genelor în plasmide se folosesc enzime speciale care taie ADN în locuri specifice – enzime de restricţie (Premiul Nobel, 1978).

Realizările ingineriei genetice au un mare interes teoretic şi practic incontestabil. Izolarea sau sinteza genelor a dus la obţinerea artificială a unor produşi naturali de mare valoare (insulina, somatostatina, interferonul), dar speranţele justificate pe care savanţii şi le pun în acest domeniu sunt mult mai mari.

Nu este vorba numai de o nouă industrie farmaceutică care să producă antibiotice, hormoni, vaccinuri antivirale ci şi de posibilităţile reale de a realiza o terapie cauzală – terapie genică, corectând genele mutante sau înlocuindu-le şi rezolvând, astfel, marea problemă a incurabilităţii bolilor genetice.

Actualmente există toate posibilităţile tehnice pentru studierea directă sau indirectă a acizilor nucleici – purtători ai mesajului ereditar. Gena de interes poate fi extrasă din organism, supusă unor modificări structurale, introdusă în alt organism, poate fi obţinut produsul ei proteic. Toate procedeele manipulării acizilor nucleici se reunesc în termenul genetic – ***tehnica ADN recombinant***.

Pentru studiul acizilor nucleici sunt necesare următoarele procedee:

- extragerea şi purificarea moleculelor de ADN (sau ARN) din celule;
- izolarea fragmentului de ADN de interes;
- multiplicarea fragmentelor izolate;
- analiza secvenţelor de interes (determinarea succesiunii bazelor, determinarea expresiei, determinarea poziţiei în genom).

Izolarea acizilor nucleici

Pentru analiza ADN poate fi utilizată orice celulă nucleată, indiferent de ţesutul din care face parte (de ex., la om pot fi folosite celulele dintr-o picătură de sânge, din salivă, fire de păr, ţesut epitelial, etc.).

Pentru izolarea fragmentelor de ADN se utilizează metode biochimice care includ lizarea celulelor, denaturarea proteinelor, înlăturarea proteinelor prin prelucrarea cu proteaze, centrifugarea diferenţiată, purificarea cu solvenţi organici.

Pentru izolarea unei anumite moleculele de ARNm se utilizează celulele ţesuturilor în care are loc expresia genei

respective (de ex., ARNm pentru insulină poate fi izolat doar din celulele β ale pancreasului; ARNm pentru globine – din celulele eritroblaştilor etc.).

Obţinerea fragmentelor de interes

În ADN genomic secvenţele codificatoare alternează cu cele necodificatoare. Pentru izolarea fragmentului ADN de interes pot fi aplicate două căi:

- direct, prin clivarea enzimatică a moleculelor de ADN genomic şi selectarea fragmentelor de interes;
- indirect, prin obţinerea ADN complementar (ADNc) pe baza ARNm.

Restricţia ADN

Clivarea enzimatică a moleculelor de ADN se efectuează cu ajutorul unor ***enzime de restricţie*** (ER) care recunosc secvenţe specifice dublucatenare, numite ***situsuri de restricţie***.

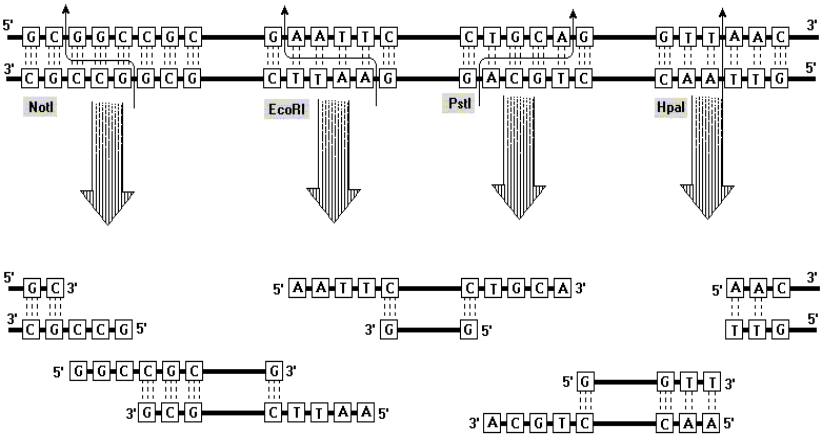


Fig. 11.1. Clivarea ADN cu enzime de restricţie. Producerea fragmentelor cu capete adezive şi neadezive

ER sunt enzime întâlnite la procariote care, în natură, sunt responsabile de clivarea ADN-ului exogen (de ex., ADN virual). SR reprezintă nişte succesiuni specifice formate, de regulă, din 4-6-8 pb ce formează palindroame (fig. 11.1). Secvenţele respective în ADN-ul gazdei sunt metilate şi nu pot fi recunoscute de ER proprii.

Ca rezultat al acţiunii diferitor ER se pot obţine fragmente de ADN cu capete monocatenare adezive (lipicioase) sau cu capete neadezive.

ADN-ul din genomul eucariotelor (inclusiv genomul uman) conţine diferite SR dispersate la întâmplare de-a lungul macromoleculei. Utilizând ER pot fi obţinute fragmente de ADN cu lungimi diferite. Comparând fragmentele de restricţie se poate construi ***harta de restricţie*** a moleculei de ADN – localizarea SR pentru diferite restrictaze.

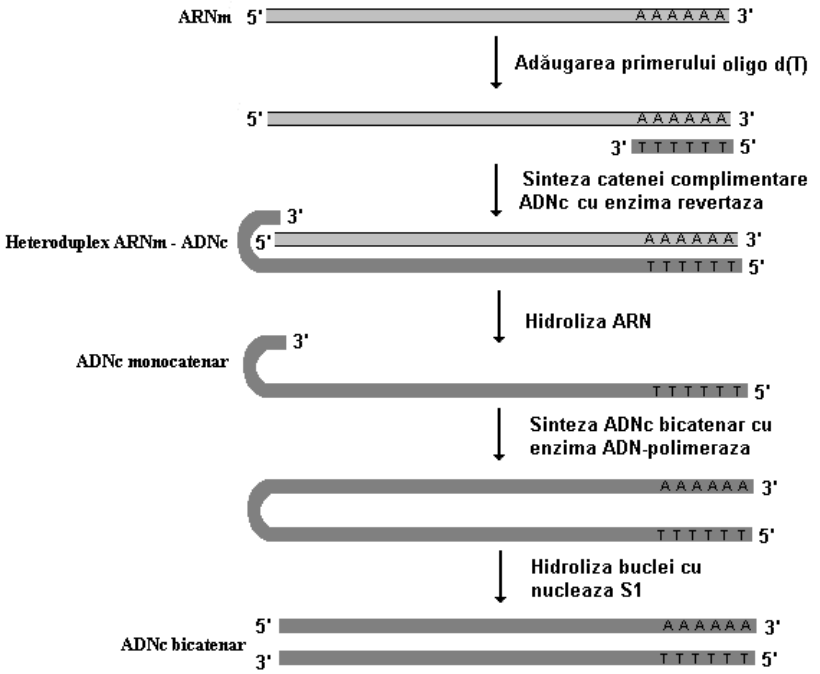
Sinteza ADNc

Din ţesuturi se izolează setul de ARNm specific. Pe baza ARNm cu ajutorul ***reverstranscriptazei*** (ADN-polimeraza-ARN-dependentă) se sintetizează molecule complementare de ADN (ADNc). ADNc se deosebeşte de ADN genomic prin lipsa intronilor şi este identic cu secvenţa exonilor.

Sinteza ADN complementar include mai multe etape (Fig. 11.2):

(1) izolarea ARNm;
(2) adăugarea secvenţelor oligo(dT) care servesc în calitate de primer pentru polimerizare;
(3) enzima reverstranscriptaza sintetizează o catenă complementară de ADN pe baza matriţei de ARN; reverstranscriptaza formează o buclă la capătul 3' al catenei ADNc;
(4) hidroliza ARNm;

(5) sinteza catenei complementare a ADNc, bucla servind în calitate de primer pentru ADN-polimerază;
(6) înlăturarea buclei cu ajutorul nucleazei S_1.



Clonarea ADN

Procesul de obţinere a unui număr mare de copii a secvenţei ADN de interes cu utilizarea tehnicilor ADN recombinant poartă denumirea de ***clonare.*** Procesul poate fi realizat atât *in vivo* , cât şi *in vitro* (PCR).

Clonarea ADN în vivo

Clonarea ADN în vivo constă în izolarea unui fragment de ADN, introducerea lui prin ligare într-un vector şi multiplicarea lui într-o celulă gazdă.

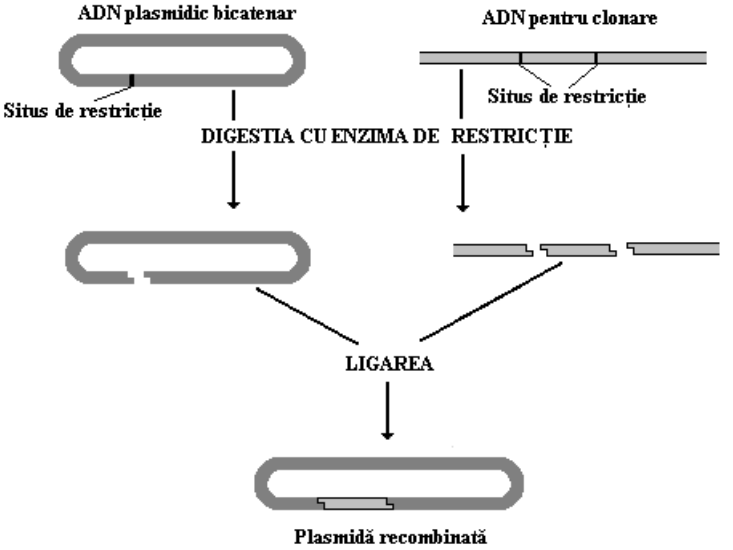
Vectorii de clonare sunt molecule de ADN care se replică independent de cromozomul celular, chiar şi atunci când sunt introduse artificial în structura lor fragmente de ADN străin. Pentru replicare vectorul are nevoie de două elemente: punctul ORI de iniţiere a replicării şi gena pentru proteinele SSB care pregătesc matriţa pentru replicare. În calitate de vectori se utilizează plasmidele R, bacteriofagul λ, virusul simian SV-40, cosmidele, cromozomii artificiali bacterieni (BAC), cromozomii artificiali ai drojdiilor (YAC), etc. Selectarea vectorului de clonare se face în funcţie de dimensiunile fragmentului multiplicat: fragmentele mici de până la 15 kb pot fi clonate în plasmide, fragmentele cu o lungime de până la 50 kb – în cosmide şi bacteriofagi, fragmentele mai mari de 300 kb – pot fi clonate în cromozomii artificiali BAC sau YAC.

În calitate de ***gazdă de clonare*** sunt utilizate: celula bacteriană (pentru plasmide, cosmide, bacteriofagi, BAC), celulele drojdiilor (pentru plasmide, YAC), celulele vegetale (plasmide, virusuri), celulele animale (virusuri). Există vectori care se pot replica în mai multe gazde – ***vectorii navetă***.

Moleculele hibride formate din ADN vector şi ADN pentru cercetare poartă denumirea ***ADN recombinant***. Obţinerea ADN recombinant necesită următoarele procese (fig. 11.3):

- izolarea ADN pentru clonare (o secvenţă de ADN sau o genă) şi selecţia vectorului de clonare;
- clivarea ADN de interes şi a vectorului cu aceeaşi enzimă de restricţie ce produce capete adezive;
- introducerea secvenţei de ADN în vector prin ligarea fragmentelor rezultate din digestia cu ER cu ajutorul enzimei

ADN-ligaza. ADN-ligaza uneşte complementar capetele adezive ale fragmentelor prin legături fosfodiesterice.



Moleculele recombinate se introduc în gazda de clonare. După un anumit timp, datorită replicării independente a vectorului se obţin copii numeroase ale genei de interes. Moleculele recombinate sunt izolate din celula-gazdă purificate, după care fragmentul de interes se extrage cu ajutorul aceleaşi ER.

Clonele ADN obţinute pot fi utilizate pentru determinarea structurii primare, cartarea restrictivă, producerea sondelor moleculare, analiza funcţiei genelor corespunzătoare, sinteza proteinelor solicitate (de ex., insulina, somatotropina, interferonul etc.).

Amplificarea ADN in vitro

Reacţia de polimerizare în lanţ (PCR – Polimerase Chain Reaction) reprezintă tehnica de amplificare *in vitro* a secvenţelor de ADN aplicând fenomenul de hibridare ADN-ADN şi proprietatea de replicare semiconservativă. Hibridarea se produce după recunoaşterea specifică a unor fragmente nucleotidice de pe o catenă a ADN-ului de interes, de către nişte secvenţe scurte de ADN, numite ***primeri***. Primerii iniţiază sinteza catenelor complementare de ADN care se realizează cu o ADN-polimerază termorezistentă (Taq-polimeraza).

PCR decurge prin succesiunea ciclică a următoarelor etape (Fig. 11.4):

1. denaturarea ADN prin încălzire la o temperatură ~96^0C;
2. legarea primerilor la temperatura de renaturare ~50^0C;
3. elongarea fragmentelor complementare la temperatura 72^0C.

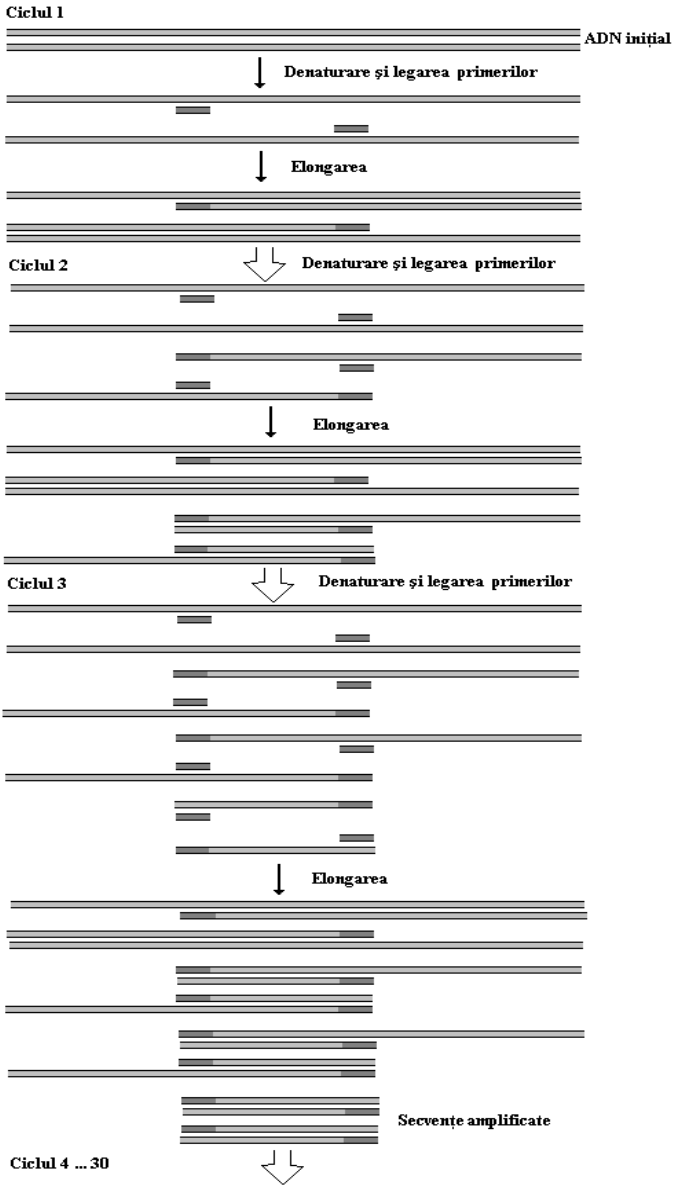
Aceste etape se repetă de 25-35 ori. Produsele din ciclul anterior servesc ca matriţe pentru sinteza noilor catene (astfel în I ciclu dintr-o moleculă de ADN de interes se obţin 2 molecule, în ciclul II – 4 molecule, în ciclul 3 – 8 molecule etc., după 30 cicluri se obţin peste 1 mlrd copii).

Biblioteci de ADN

Colecţiile fragmentelor de ADN clonate dintr-o celulă, ţesut sau organism formează ***biblioteci de ADN***. Acestea sunt utile pentru identificarea genelor solicitate.

Biblioteca genomică

Colecţia de clone ce conţine cel puţin o copie a fiecărei secvenţe de ADN al genomului se numeşte ***bibliotecă***


Ciclul 1
ADN inițial
Denaturare și legarea primerilor
Elongarea
Ciclul 2
Denaturare și legarea primerilor
Elongarea
Ciclul 3
Denaturare și legarea primerilor
Elongarea
Secvențe amplificate
Ciclul 4 ... 30

genomică. O bibliotecă genomică este utilă pentru a găsi şi izola o genă de interes prin ***screeningul*** cu sonde specifice.

Bibliotecile genomice se obţin prin două tehnici:

1. ADN genomic este digerat complet cu o enzimă de restricţie, iar fragmentele rezultate sunt clonate fie printr-un vector derivat din bacteriofagul λ, fie într-un vector cosmidic.

2. O altă cale este digestia parţială cu ER, care recunosc secvenţe de 4 pb. Prin digestie parţială doar o parte din SR este tăiată de ER.

Biblioteci cromozomiale

Dimensiunea genomului uman este atât de mare, încât sunt necesare mii de clone pentru a reprezenta întregul genom. De aceea sunt obţinute biblioteci ADN pentru fiecare cromozom în parte – ***biblioteci cromozomiale***. Pentru om sunt necesare 24 de biblioteci diferite. Deci, dacă o genă este localizată pe un cromozom cunoscut cu metode genetice, cercetarea va fi limitată la biblioteca acelui cromozom.

Izolarea cromozomilor este posibilă datorită dimensiunii şi morfologiei diferite ale cromozomilor, care pot fi separaţi cu ajutorul citometriei în flux. Acum sunt disponibile biblioteci preparate din toţi cromozomii umani.

Biblioteci de ADNc

Colecţia de clone obţinute pe baza ADN complementar se numeşte ***bibliotecă ADNc***. Fiind sintetizat pe matriţa moleculelor de ARNm, ADNc va corespunde numai genelor aflate în stare de activitate transcripţională, reproducând doar genele funcţionale specifice celulei respective. ADNc este clonat în vectori plasmidici sau în vectori derivaţi din bacteriofagul λ. Spre deosebire de fragmentele obţinute prin digestie cu ER, moleculele de ADNc nu posedă capete adezive,

de aceea pentru introducerea în vector la moleculele de ADNc se adaugă adaptori care conţin capete adezive.

Hibridarea acizilor nucleici

O proprietate naturală a acizilor nucleici este capacitatea de hibridizare. Hibridările de acizi nucleici constau di unirea a două fragmente monocatenare în structuri bicatenare stabile în condiţii adecvate de temperatură, concentraţie ionică şi pH. Hibridarea este condiţionată de complementaritatea secvenţelor de baze azotate, componente ale celor două catene. Din complementaritate rezultă şi omologia de împerechere.

Tipuri de hibridare:

1. ADN – ADN în care sonda este una dintre monocatenele de ADN;
2. ARN – ADN unde sonda este reprezentată de una din cele două catene ale heteroduplexului.

Una din cele mai importante aplicaţii ale fenomenului de hibridizare este obţinerea sondelor moleculare. ***Sondele moleculare*** sunt fragmente de ADN sau ARN marcate sau nu (radioactiv), care prin fenomenul de hibridare pot recunoaşte în mod complementar fragmente "de interes", pe o moleculă de acid nucleic "destinat cercetării".

Din punct de vedere aplicativ, sondele nucleare reprezintă căile de acces direct la nivelul ADN, acestea putând detecta unele gene mutante, chiar în stadiul prenatal.

Tipuri de sonde moleculare:

1. sonde "calde" – marcate radioactiv cu izotopi de ^{32}P sau ^{35}S care sunt foarte sensibile, dar au o durată scurtă de viaţă şi sunt periculoase pentru cei ce le manipulează; se vizualizează prin autoradiografie (impresie pe filmul fotografic);

2. sondele “reci” – fragmente de acid nucleic, marcate cu un produs chimic neutru: direct, cu enzime sau fluorocromi sau indirect, cu biotină. Se vizualizează în funcţie de tipul de marcaj. Deşi sunt mai puţin sensibile, au avantajul de a fi inofensive pentru cercetător.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: ADN recombinant, clonare, vector de clonare, enzimă de restricţie, situs de restricţie, ADNc, bibliotecă ADN, fragmente de restricţie, sondă moleculară, hibridare.
2. Care sunt etapele obţinerii genei de interes dintr-o celulă?
3. Ce proprietăţi au enzimele de restricţie?
4. Ce vectori de clonare cunoaşteţi? Prin ce se deosebesc?
5. Care sunt etapele obţinerii ADNc?
6. Ce importanţă are clonarea ADN?
7. Care este destinaţia bibliotecilor ADN?
8. În ce constă hibridarea ADN?
9. În ce scopuri se utilizează sondele moleculare?

12

TEHNICI DE ANALIZĂ A GENELOR

Genele reprezintă substratul molecular al eredităţii. Structura şi localizarea genelor în genom controlează proprietăţile organismului. Ca rezultat al interacţiunii genomului cu diverşi factori ai mediului, în ADN se pot produce mutaţii. Mutaţia poate modifica metabolismul celular şi tisular, ceea ce conduce la dezvoltarea stărilor patologice (boli genetice). Tehnologia ADN recombinant a creat premisele dezvoltării unor metode de diagnostic molecular dotate cu capacitate de rezoluţie, grad de precizie şi nivel informativ net mai superioare celor ale metodelor convenţionale. Superioritatea absolută a abordării moleculare rezultă însă din faptul că spre deosebire de toate celelalte metode de diagnostic, limitate la determinarea exclusivă a trăsăturilor fenotipice, - analiza ADN, destinată nemijlocit studiului genotipului este singura în măsură să obiectiveze alterările primare (mutaţiile) care se fac direct responsabile pentru starea de boală.

Tehnicile ADN recombinant permit identificarea genelor normale şi/sau a variantelor lor mutante, stabilirea purtătorilor de gene mutante, diagnosticul prenatal sau presimptomatic al patologiilor genetice, iar în viitorul apropiat apare posibilitatea terapiei genice.

Studiul molecular al genelor poate fi realizat pe mai căi în dependenţă de scopul propus:

1. secvenţierea ADN pentru determinarea structurii primare a genei;
2. tehnica Southern-blot pentru identificarea poziţiei genei în genom.
3. tehnica Northen-blot pentru determinarea expresiei genelor (analiza ARNm);
4. tehnica Western-blot pentru determinarea produsului proteic al genei;
5. tehnica PCR pentru identificarea genei normale sau mutante.

În laboratoarele de biologie moleculară se utilizează diverse variante ale metodelor menţionate.

Pentru separarea fragmentelor de acizi nucleici se utilizează electroforeza macromoleculelor în gel de agaroză sau de poliacrilamidă. Purtând sarcină negativă, moleculele acizilor nucleici migrează în câmpul electric cu viteze diferite, în dependenţă de greutatea moleculară. Fragmentele mai scurte migrează mai rapid, în timp ce fragmentele lungi migrează mai lent. Pentru determinarea dimensiunilor fragmentelor din gel, concomitent cu fragmentele de interes sunt supuse electroforezei în trecuri vecine şi fragmente-marker ai lungimii. Moleculele acizilor nucleici pot fi vizualizate în gel prin colorare cu agenţi fluorescenţi chimici, sau sunt marcate radioactiv. În cazul marcării radioactive fragmentele se identifică cu ajutorul autoradiografiei care constă în suprapunerea gelului cu un film fotosensibil.

Secvenţierea ADN

Analiza secvenţei bazelor azotate din structura primară a ADN poate fi realizată prin două căi: 1) ***calea chimică (Maxam-Gilbert)***, în care se folosesc reacţiile chimice de clivare a ADN-ului în baze individuale (fig. 12.1), dar fiind o metodă complicată şi laborioasă, în ultimii ani nu se mai utilizează; 2) ***calea enzimatică (Sanger)*** în care ADN-ul este sintetizat *in vitro pe baza matriţei ADN studiat,* în aşa fel încât reacţia se

termină specific în poziţia care corespunde unei baze anumite. Pentru a determina o secvenţă de nucleotide pe una din căile menţionate, ADN-ul este supus seriei de patru reacţii separate, fiecare reacţie fiind specifică pentru una din baze. Prin electroforeză produşii de reacţie vor migra în patru curse paralele, pe acelaşi gel. Urmărind bandă cu bandă, poate fi identificată ordinea nucleotidelor în ADN (fig. 12.2).

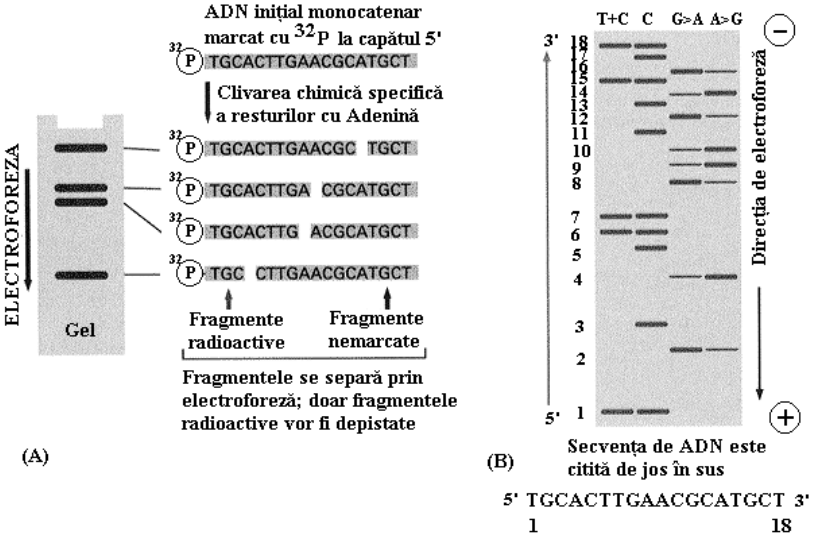


Fig. 12.1. Secvenţierea ADN prin clivarea chimică (Maxam-Gilbert)

Tehnica SANGER (dideoxi)

Tehnica Sanger (dideoxi) utilizează sinteza enzimatică a unei catene, complementară cu o matriţă clonată. În cadrul acestei proceduri sinteza este stopată prin încorporarea unui ***dideoxinucleozid trifosfat*** - un analog al dezoxiribonucleotidelor. Dideoxinucleozidtrifosfaţii conţin în poziţia 3' grupa –H, dar nu

grupa –OH care împiedică polimerizarea nucleotidelor (fig. 12.2).

Folosind patru analogi dedeoxi diferiţi în timpul sintezei catenei noi de ADN, se poate de identificat fiecare nucleotid normal din catena matriţă. Electroforeza fragmentelor obţinute permite stabilirea ordinii nucleotidelor în molecula de ADN.

În ultimii ani se utilizează o metodă automată de secvenţiere, bazată pe metoda dideoxi.

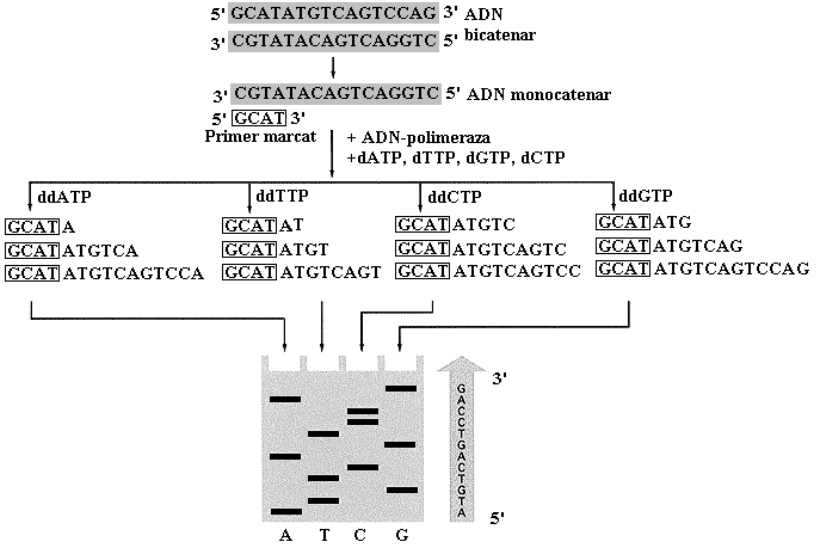


Fig. 12.2. Secvenţierea ADN prin metoda dideoxi (Singer)

În scopuri de diagnostic al purtătorilor de gene normale sau mutante se compară rezultatele secvenţierii cu datele structurii primare normale a genei din bibliotecile de ADN. Spre regret, nu se cunoaşte încă secvenţa tuturor genelor umane, de aceea în diagnostic se utilizează metode indirecte: înlănţuirea cu markeri genetici apropiaţi (repetiţii hipervariabile de ADN mini- şi microsatelitic), determinarea situsurilor de restricţie caracteristice genei date, hibridarea cu sonde specifice etc.

Tehnica Southern-blot

Pentru analiza unor gene e necesar să se determine localizarea specifică a situsurilor de restricție. Această informație e utila pentru compararea genelor omoloage ale diferitelor specii, analiza organizării intronilor, clonarea într-un vector a părților unei gene. Succesiunea situsurilor de restricție într-o gena poate fi determinată fără a fi necesară clonarea genei, folosind ***sonde moleculare*** (secvențe scurte de ADN monocatenar, marcate radioactiv sau cu agenți fluorescenți şi care sunt complementare secvenței de interes).

Analiza constă din următoarele etape:

(1) extragerea ADN genomic cu greutate moleculară mare din celule;
(2) digestia enzimatică a ADN-ului cu diferite ER, fiecare producând fragmente de lungime diferită;
(3) separarea fragmentelor de restricție prin electroforeză în gel de agaroză;
(4) denaturarea fragmentelor bicatenare cu o soluție alcalină;
(5) neutralizarea gelului cu o soluție tampon;
(6) transferul capilar al fragmentelor de ADN pe filtre de nailon sau nitroceluloză;
(7) hibridarea cu sondele monocatenare radioactive;
(8) autoradiografia pentru vizualizarea hibrizilor ADN cercetat / ADN sondă.

Transferul pe filtru de nitroceluloză se realizează prin ***tehnica Southern-blot*** (de la numele inventatorului Edward Southern) (fig. 12.3).

Analiza poate determina prezenţa sau lipsa unor situsuri de restricţie caracteristice genei analizate care se asociază cu anumite mutaţii. Diferenţele dintre hărţile de restricţie obţinute de la doi indivizi este numită Polimorfismul Lungimii Fragmentelor de Restricţie (RFLP – Restriction Fragment Lenght Polimorphism). Acest polimorfism poate fi folosit ca marker genetic în evaluarea genotipului.

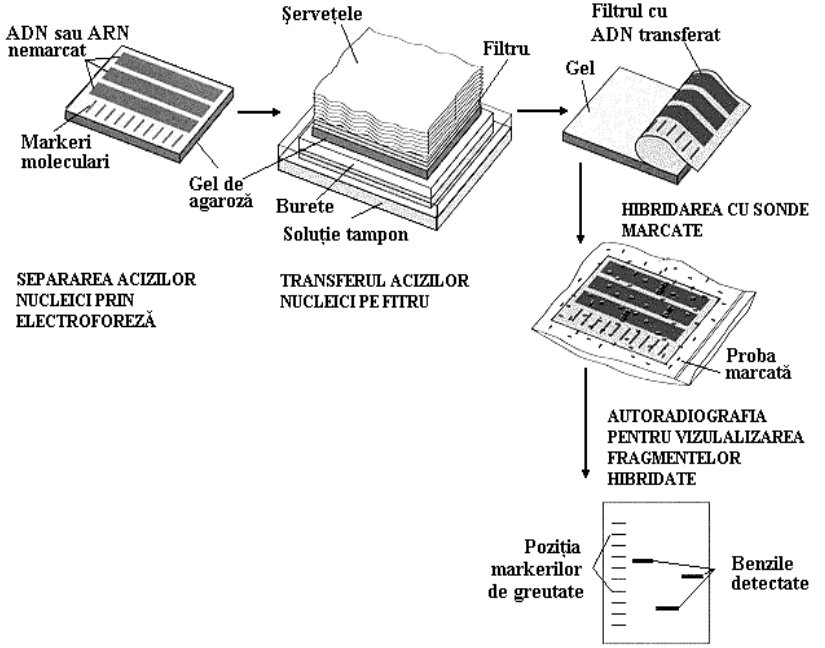


Fig. 12.3. Principiile transferului acizilor nucleici pe filtru şi hibridarea cu sonde radioactive

(Southern-blot şi Northern-blot)

Tehnica Northern-blot

Metoda Northern-blot constă în transferul moleculelor denaturate de ARN pe filtre de nailon sau nitroceluloză, urmat de hibridarea cu sonde marcate. Această metodă este similară

tehnicii Southern-blot cu deosebirea că ARNm extras şi purificat nu este supus scindării cu enzime, iar electroforeza decurge în condiţii de denaturare.

Tehnica Northern-blot permite identificarea transcripţilor genelor analizate, stabilirea lungimii lor.

Tehnica Western-blot

Această metodă constă în identificarea unei proteine specifice din amestecul de proteine celulare. Pentru aceasta, proteinele sunt separate prin electroforeză în condiţii de denaturare în prezenţa SDS (Dodecil Sulfat de Sodiu). Proteinele fracţionate după greutatea moleculară sunt transferate pe filtre de nailon sau nitroceluloză şi supuse tratării cu anticorpi specifici marcaţi radioactiv sau fluorescent. Prin această metodă se poate identifica prezenţa/lipsa proteinei, dimensiunile ei, rata de expresie a genei.

Tehnica PCR în analiza genelor

Tehnica PCR poate fi utilizată pentru multiplicarea selectivă a unei secvenţe dintr-o genă. Ca rezultat, se obţin populaţii omogene de fragmente care pot fi utilizate în studiile de în genetică moleculară sau diagnostic (fig. 12.4, fig. 12.5). Pentru a realiza amplificarea unei secvenţe este necesară cunoaşterea structurii genei normale sau mutante şi sinteza ***primerilor*** specifici complementari capetelor fragmentului de interes. ***Primerii*** reprezintă secvenţe oligonucleotidice monocatenare de 20-30 baze care sunt obţinute prin sinteză artificială. PCR se bazează pe hibridarea ADN cercetat - primer şi replicarea semiconservativă a ADN (Vezi cap. 11).

Avantajele tehnicii PCR sunt următoarele: suficienţa cantităţilor mici de ADN, rapiditatea ei (în câteva ore se obţin milioane copii de ADN), specificitatea primerului permite amplificarea selectivă a ADN, produsele de amplificare pot fi utilizate în calitate de sonde pentru hibridări în alte tehnici.

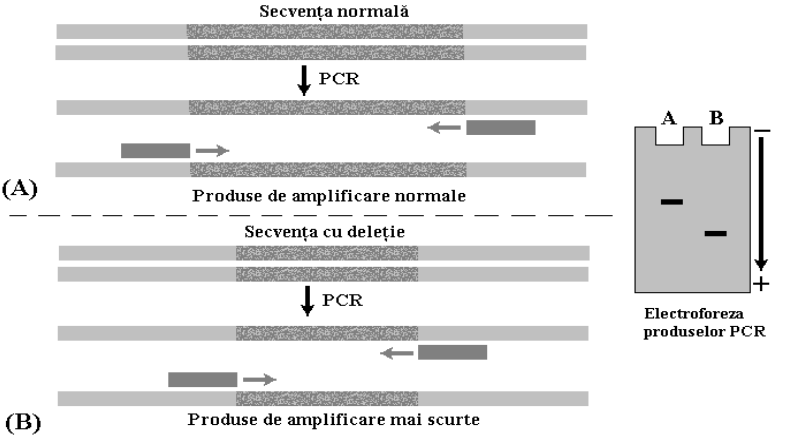


Fig. 12.5. Utilizarea tehnicii PCR pentru identificarea deleţiilor

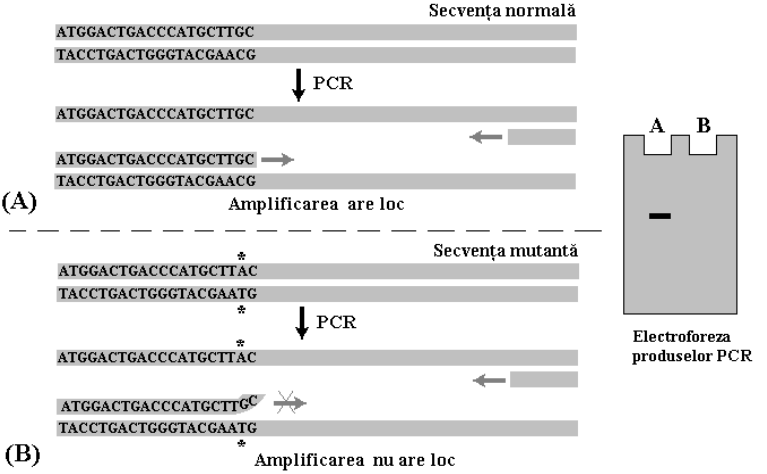


Fig. 12.4. Utilizarea tehnicii PCR pentru identificarea mutaţiilor punctiforme cu primeri specifici pentru gena normală

Aplicaţiile practice ale tehnicii PCR:

- detectarea mutaţiilor cunoscute la bolnavi şi purtători;
- diagnosticul prenatal şi presimptomatic al bolilor ereditare;
- determinarea genelor de predispoziţie la bolile comune (coronaropatii, boala hipertonică, tulburări psihice etc.);
- diagnosticul precoce şi evaluarea pronosticului bolilor canceroase;
- determinarea prenatală a sexului;
- identificarea agenţilor patogeni (viruşi, bacterii);
- dactiloscopia genomică (identificarea persoanelor);
- analiza filiaţiei (paternitate, maternitate);
- tipizarea HLA.

Hibridarea *in situ*

Hibridarea in situ reprezintă o tehnică moleculară , în care o sondă specifică marcată poate identifica direct pe preparatele celulare:

(1) un ARNm într-o celulă particulară sau ţesut;
(2) o genă pe un anumit cromozom sau fragment de cromozom;
(3) numărul moleculelor de ARNm în dependenţă de perioada ontogenetică sau tip tisular;
(4) ADN viral;
(5) deleţiile cromozomiale submicroscopice;
(6) genele responsabile de producerea cancerului, localizarea şi nivelul lor de expresie.

Din motiv că sondele marcate radioactiv au unele dezavantaje (tehnică laborioasă, pericol pentru sănătate) în ultimii ani se utilizează metoda FISH (Fluorescence In Situ Hibridization) care utilizează sonde fluorescent marcate (fig. 12.6). Metoda FISH este simplă, poate fi aplicată pe preparate celulare arhivate, este rapidă, nu modifică morfologia celulelor.

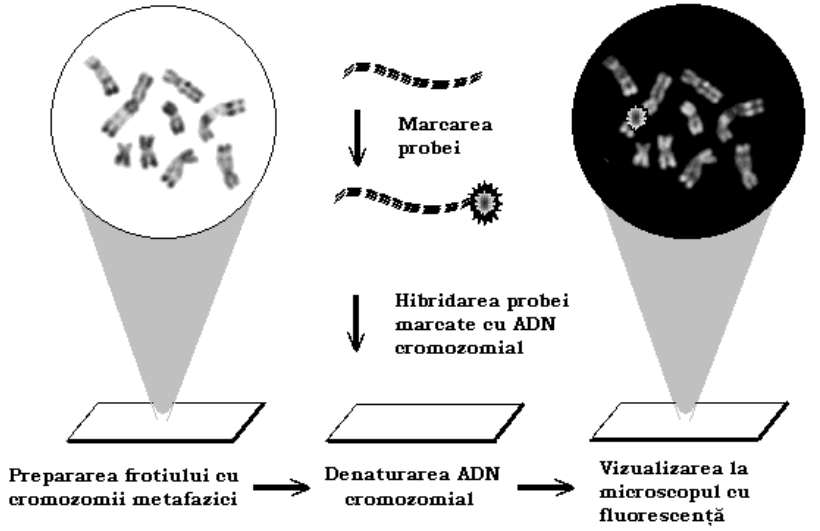


Fig. 12.6. Tehnica FISH

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: secvenţierea ADN, hibridarea acizilor nucleici, Southern-blot, Northern-blot, hibridarea *in situ*, autoradiografie, primeri, sonde moleculare.
2. Ce tehnici moleculare se utilizează pentru studiul acizilor nucleici?
3. Care sunt aplicaţiile practice ale acestor tehnici?
4. Care sunt principiile secvenţierii ADN?
5. Care sunt etapele tehnicii Southern-blot?
6. Care sunt avantajele şi dezavantajele tehnicii Southern-blot?
7. În ce constau aplicaţiile practice ale tehnicii PCR?

13

CICLUL CELULAR

Organismele vii sunt compuse din celule, a căror creştere şi diviziune necesită succesiunea programată a unor evenimente şi procese care formează ***ciclul celular***. Unele din aceste procese sunt continue, ca de exemplu sinteza proteinelor sau a lipidelor. Altele, de exemplu sinteza ADN, din contra, sunt procese discontinui şi depind de procesul de diviziune celulară. Fiecare ciclu celular cuprinde două perioade dinamic şi calitativ distincte: ***interfaza*** şi ***mitoza*** (fig.13.1). Se accentuează că procesul multiplicării celulare are la origine replicarea ADN-ului cromozomial, replicare care are loc în perioada interfazică S.

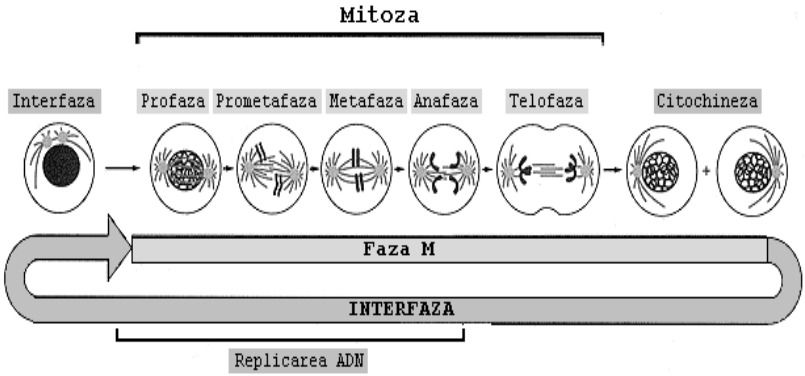


Fig. 13.1. Etapele ciclului celular

Interfaza

Interfaza ocupă cea mai mare parte din durata ciclului celular (90%), constituie perioada în care celula desfăşoară o susţinută activitate biosintetică (sinteza de ADN, ARN, proteine), asigurând condiţiile necesare realizării diviziunii celulare. In cadrul acestei etape au fost descrise trei perioade distincte:

- ***Perioada G1*** – perioada presintetică sau postmitotică, se caracterizează prin:
  - intensificarea transcripţiei şi a proteosintezei, procese aproape blocate în perioada mitotică;
  - decondensarea cromatinei – proces important pentru activarea transcripţiei genelor;
  - reorganizarea nucleolilor;
  - cromozomii sunt monocromatidieni şi se caracterizează prin set diploid (2n = 2c).
- ***Perioada S*** – perioada sintetică, se caracterizează prin:
  - replicarea semiconservativă asincronă a moleculelor de ADN;
  - dublarea cantitatăţii de ADN ;
  - cromozomi bicromatidieni (2n = 4c);
  - sinteza simultană de proteine histone şi nehistone implicate în sinteza şi compactizarea ADN;
  - dublarea centriolilor (fig. 13.2).
- ***Perioada G2*** – perioada postsintetică sau premitotică – care se caracterizează prin:
  - transcripţia şi sinteza proteinelor cu aceeaşi intensitate ca şi în G1, asigurându-se condiţiile necesare intrării celulei în mitoză.

Mitoza şi citochineza

Diviziunea celulară debutează prin ***diviziunea nucleară*** sau ***mitoza***, se încheie cu ***diviziunea citoplasmei*** sau ***citochineza***.

Mitoza şi citochineza ocupă o scurtă perioadă de timp (10%) din durata desfăşurării ciclului celular, numită perioada mitotică (M). Mitoza, odată declanşată, este un proces continuu. Dar pentru studiu şi descriere, a fost împărţită în patru etape: profaza, metafaza, anafaza şi telofaza.

Profaza. Se caracterizează prin prezenţa în nucleu a cromozomilor bicromatidieni (2n=4c). Aceste cromatide, unite la nivelul centromerului, reprezintă imaginea citologică a procesului chimic de replicare a ADN-ului. Cromozomii se condensează puternic, se îngroaşă şi devin vizibili. Pe ambele părţi ale centromerilor se maturizează câte un ***kinetocor.*** La sfârşitul profazei nucleolul dispare iar membrana nucleară disociază. Concomitent se organizează aparatul de diviziune: centriolii se deplasează spre polii opuşi ai celulei, se formează fusul de diviziune prin asamblarea microtubulilor.

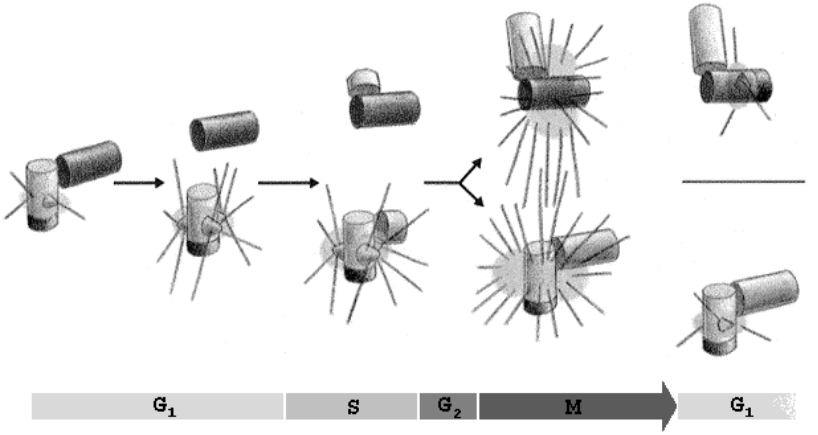


Fig. 13.2. Ciclul centriolilor

Metafaza. Firele fusului de diviziune unesc centriolii şi cromozomii prin intermediul kinetocorilor. Cromozomii sunt dispuşi în plan ecuatorial, formând placa ecuatorială. La această fază cromozomii sunt maximal condensaţi şi prezintă forma optimă pentru studiul citologic.

Anafaza. Începe prin clivarea longitudinală a centromerului fiecărui cromozom, separarea celor două cromatide surori şi migrarea lor simultană spre polii opuşi ai celulei (fig. 13.3). La această fază cromozomii devin monocromatidieni, iar celula are un set tetraploid de cromozomi (4n = 4c).

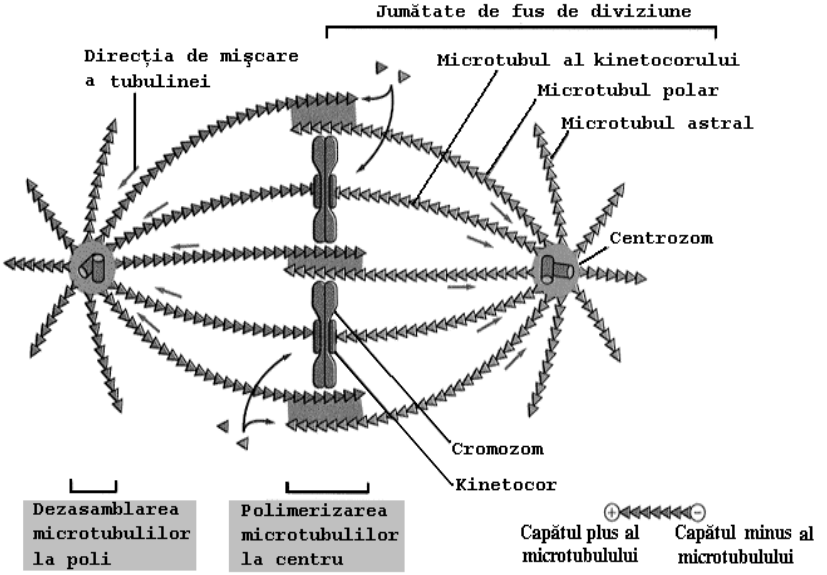


Fig. 13.3. Mecanismul mişcării filamentelor fusului de diviziune

Telofaza. În telofază se încheie migrarea cromozomilor fii către polii celulei, fiecare pol conţinând 2n cromozomi monocromatidieni (set diploid). Începe decondensarea progresivă a cromozomilor şi revenirea la starea cromatinei

interfazice a materialului ereditar. Fibrele fusului acromatic disociază. Se reasamblează membrana nucleară în jurul fiecărui grup de cromozomi. Reapar nucleolii.

Citochineza defineşte fenomenul de diviziune, în care are loc separarea masei citoplasmatice în două jumătăţi şi a organitelor citoplasmatice în cele două celule. La celulele animale diviziunea citoplasmatică se realizează prin clivare.

Fiecare celulă fiică moşteneşte în urma citochinezei un set de componente celulare. Deoarece, cu excepţia nucleului, organitele celulare nu se pot duplica în absenţa unei copii preexistente, în celula parentală are loc dublarea constituenţilor celulari înaintea declanşării citochinezei. Duplicarea organitelor celulare se realizează prin mecanisme diferite. Mitocondriile cresc şi se divid prin fisiune semiautonom. Aparatul Golgi şi RE se fragmentează în vezicule din care vor fi constituite noile organite celulare, în timp ce ribozomii se multiplică prin asamblarea elementelor constituente (ARNr şi proteine ribozomale). Se apreciază că celula nu dispune de un mecanism specializat de distribuire a organitelor celulare, astfel încât celulele fiice nu sunt identice după conţinutul citoplasmatic. Totodată replicarea ADN în interfază şi mitoza asigură formarea celulelor identice genetic atât între ele cât şi cu celula mamă.

Diviziunea mitotică stă la baza înmulţirii celulelor somatice, asigură creşterea organismului pluricelular, determină biomasa organismului şi regenerarea ţesuturilor.

Reglarea ciclului celular

Durata ciclului celular este variabilă în funcţie de specie şi tip celular, ba chiar şi pentru celulelr aceluiaşi ţesut. Există celule în organism care se divid foarte rapid, parcurgând întregul ciclu celular în 8 ore, pe când altele se divid rar, cu ciclul celular de 100 zile sau chiar mai mult. La eucariotele

superioare ciclul celular durează 10-25 ore, din care diviziunea celulară durează o oră. Perioada G1 are durata cea mai variabilă, în timp ce perioada S este cea mai constantă pentru un anumit tip celular.

După ce au depăşit perioada G1, timpul necesar pentru perioada S şi G2, deci până la începutul diviziunii este foarte constant pentru diferite celule. De acea s-a introdus noţiunea de **punct de restricţie (punct R)** pentru momentul imediat, urmat de sfârşitul perioadei G1, care trebuie depăşit pentru ca celula să poată parcurge etapele următoare ale ciclului celular (fig. 13.4).

Un **alt punct de restricţie** se află spre sfârşitul perioadei G2. Inhibarea sintezei proteinelor în această fază împiedică intrarea celulei în mitoză. Se consideră că o proteinkinază solubilă (o enzimă ce catalizează fosforilarea proteinelor) este activată spre sfârşitul perioadei G2 şi acţionează asupra proteinelor din lamina nucleară şi asupra histonelor H1. Fosforilarea proteinelor din lamina nucleară induce dezasamblarea învelişului nuclear, pe când fosforilarea histonelor H1 produce condensarea cromozomilor, fenomen caracteristic mitozei.

Reglarea succesiunii evenimentelor ciclului celular

Acurateţea proceselor de replicare şi segregare a ADN depinde de succesiunea evenimentelor ciclului celular într-o ordine strictă, astfel încât, declanşarea unui nou eveniment să survină doar în urma încheierii complete a evenimentului precedent.

Există mecanisme şi factori reglatori, ce controlează trei evenimente cheie ale ciclului celular:

- iniţierea sintezei ADN este controlată de complexul ***activator al perioadei S;***

- derularea replicării materialului genetic nuclear este controlat de alt ***factor – semnal de întârziere a perioadei mitotice***;
- declanşarea procesului mitotic, în care are loc segregarea materialului genetic, este dirijată de ***factorul de activare a mitozei (M-phase promoting factor: MPF).***

Factorii de creştere

S-au descris ***mitogene*** specifice ca: eritropoietina, factorii de creştere ai unor celule (nervilor, fibroblastelor), poliamine (putrescina), hormoni (în special estrogenii). Există şi factori tisulari, care inhibă diviziunile celulare cum sunt chalonele (peptide sau glicoproteine) (tab. 13.1).

Tabelul 13.1. Factorii de creştere şi acţiunea lor asupra celulelor ţintă

FACTORII DE CREŞTERE	ACŢIUNEA ASUPRA CELULELOR ŢINTĂ
Factorul de creştere epidermal – EGF	Stimulează proliferarea mai multor tipuri celulare
Factori de creştere de tip insulinic – IGF1, IGF2	Stimulează proliferarea adipocitelor şi a celulelor din ţesutul conjunctiv
Factorul de creştere a fibroblaştilor – FGF	Stimulează proliferarea: fibroblaştilor, celulelor endoteliale şi mioblaştilor
Factorul de creştere neuronal – NGF	Induce creştere axonală şi viabilitatea neuronilor simpatici şi senzori
INTERLEUKINA 2 – IL2	Stimulează proliferarea limfocitelor T
INTERLEUKINA 3 – IL3	Stimulează proliferarea celulelor Stem şi a majorităţii celulelor precursoare ale multor celule diferenţiate
ERITROPOIETINA	Stimulează proliferarea celulelor precursoare ale eritrocitelor
Factori de stimulare a coloniilor granulocitare – G-CSF	Stimulează proliferarea: celulelor precursoare ale macrofagelor şi granulocitelor, neutrofilelor
Factori de stimulare a coloniilor de macrofage – M-CSF	Stimulează proliferarea celulelor precursoare ale macrofagelor şi granulocitelor

Competiţia celulelor pentru factorii de creştere menţine constantă densitatea populaţiei celulare. În momentul în care densitatea populaţiei celulare depăşeşte o valoare prag, concentraţia factorilor de creştere scade şi în consecinţă diviziunea celulară este oprită.

Ciclinele

Descoperirea ***ciclinelo***r şi a ***protein-kinazelor*** dependente de cicline (***cdk***) a permis interpretarea corectă a mecanismelor ce reglează ciclul celular.

Ciclinele reprezintă un grup restrâns de proteine a căror sinteză se realizează într-un mod dependentă de perioadele ciclului celular. Ele activează ***cdk,*** formând cu acestea complexe ce prezintă activitate kinazică. Pe parcursul formării complexelor, ciclinele induc modificări conformaţionale şi de locaţie a cdk ceea ce conferă acestora specificitate în folosirea diferitelor substraturi. Specificitatea activităţii catalitice a complexelor ciclina /cdk stă la baza parcurgerii de către celulă a ciclului celular.

Evenimentele ce marchează intrarea celulei în perioada mitotică sunt rezultatul fosforilării directe sau indirecte a unor proteine de către MPF. Prin fosforilarea laminelor nucleare, MPF declanşează dezorganizarea membranei nucleare. Fosforilarea histonei H1, proces ce iniţiază condensarea cromatinei, este catalizată de proteinkinază, enzimă activată prin fosforilare de către MPF. Se consideră că un mecanism indirect similar de fosforilare stă la baza asamblării fusului de diviziune. Ciclinele şi protein-kinazele dependente de cicline constituie componentele motorului ciclului celular (fig. 13.4).

Ciclinele se clasifică în trei grupe (fig. 13.5):

1. ciclinele perioadei G1 – ciclinele D şi E;
2. ciclinele perioadei S – ciclina A;
3. ciclinele perioadei G2 – ciclina B.

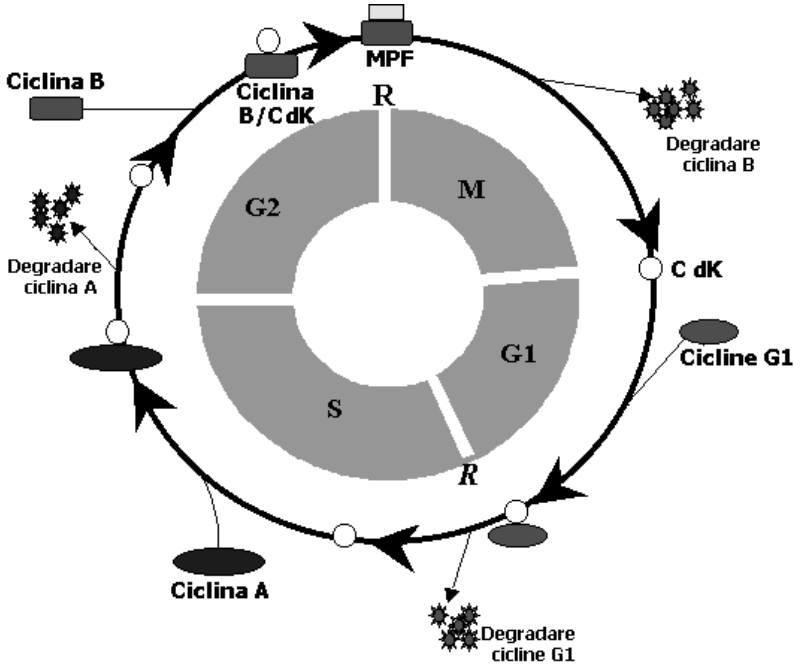


Fig. 13.4. Reglarea ciclului celular

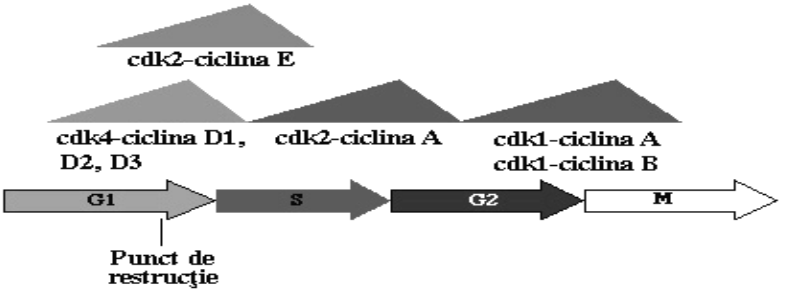


Fig. 13.5. Activitatea ciclinelor în ciclul celular

Gene implicate în controlul ciclului celular

Organismele multicelulare şi-au dezvoltat sisteme complexe de comunicare între celulele care le alcătuiesc. Prin intermediul acestor sisteme se asigură reglarea dezvoltării şi organizării ţesuturilor, controlul creşterii şi proliferării, coordonarea activităţii celulelor, ţesuturilor şi organelor. Sunt descrise două clase principale de gene care codifică proteine implicate în reglarea ciclului celular: protoncogenele şi genele supresoare de tumori (antioncogene).

Protooncogenele reprezintă o clasă eterogenă de secvenţe de ADN, aflate în celulele normale, ale căror funcţii se exercită în cadrul proceselor de creştere, proliferare şi diferenţiere celulară. Acestea codifică factori de creştere, receptori ai factorilor de creştere, cicline şi alţi mitogeni. Protooncogenele sunt active în celulele embrionare, iar la adult – doar în celulele ţesuturilor proliferative (celulele epiteliale, celulele hematopoezei). Prin mutaţii, eveniment accidental, protooncogenele se pot transforma în oncogene (de ex., c-bcl, c-myc, c-ras, c-jun etc.). Oncogena este, deci, forma anormală, activată, a unei protooncogene, care se caracterizează prin capacitatea de a induce şi/sau promova proliferarea anormală (în exces) – caracter specific celulelor canceroase.

Genele supresoare de tumori (GST) au roluri cruciale în fiziologia celulelor. Produşii lor proteici alcătuiesc reţele de semnalizare intracelulare cu funcţii diametral opuse celor pe care le îndeplinesc reţelele formate din proteinele codificate de protooncogene. GST funcţionează inhibând proliferarea şi diferenţierea celulară. Unele GST codifică factori proteici ce controlează replicarea şi reparaţia ADN şi stopează intrarea celulei în mitoză atât timp cât aceste procese nu iau sfârşit. Pierderea sau inactivarea GST (de ex., prin hipermetilarea unor secvenţe ADN reglatoare ale unor unităţi transcripţionale)

conferă celulelor capacitatea proliferării autonome (de ex., p53, Rb).

Adeziunea celulară

La majoritatea celulelor organismelor vertebrate, formarea adeziunilor intercelulare şi celula-matrice este o condiţie importantă în depăşirea punctului de restricţie. După intrarea în perioada sintetică, până la încheierea mitozei, celulele pierd parţial legăturile ce le stabilizează în ţesut şi se rotunjesc (fig.13.6).

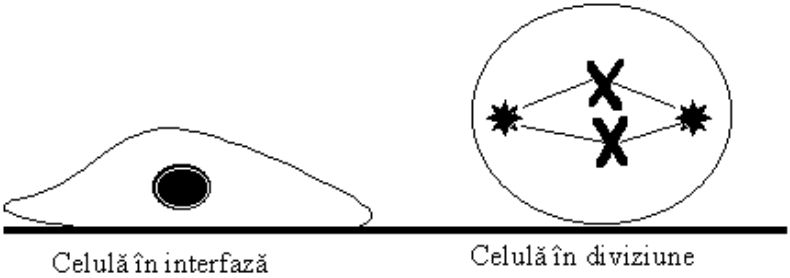


Fig. 13.6. Configuraţia celulelor în diferite etape ale ciclului celular

S-a constatat că celulele cultivate în suspensie, supuse unei agitări permanente, devin sferice şi îşi pierd capacitatea proliferativă, fenomen numit dependenţă de ancorare a diviziunii celulare.

Evoluţia celulelor după diviziune

În dependenţă de perioada ontogenetică şi tipul ţesutului după diviziune celulele pot avea o evoluţie diferită, controlată genetic. Celulele ţesuturilor proliferative se divid intens, producând populaţii noi de celule. Alte celule părăsesc ciclul celular pentru o diferenţiere (specializare) terminală şi rămân într-o perioadă de activitate metabolică de susţinere G_0. Celulele

care şi-au epuizat programul de supravieţuire sunt eliminate din ţesut prin apoptoză. Pe lângă proliferare şi diferenţiere, în organism, celulele a căror funcţie este epuizată, sunt înlăturate şi înlocuite de celule tinere. Procesul de înlăturare este un proces fiziologic şi a fost denumit ***apoptoză*** sau ***moarte celulară programată.***

Diferenţierea celulară

Toate celulele unui organism pluricelular pornesc de la o celulă ***zigot*** cu setul de gene capabil să asigure creşterea şi dezvoltarea unui organism complex format din diferite ţesuturi. Replicarea ADN şi mitoza asigură transmiterea aceleaşi informaţii genetice tuturor celulelor care vor rezulta din diviziunea zigotului. În diferite perioade ontogenetice celulele îşi modifică aspectul, compoziţia şi ca rezultat – funcţiile. Diferite celule se deosebesc între ele prin setul de proteine necesare pentru activitatea celulei şi setul specializat de proteine necesare pentru îndeplinirea unor funcţii specifice ţesutului dat. De exemplu, în celulele dermului se sintetizează keratină, în eritrocite – hemoglobina, în celulele intestinului – fermenţi digestivi, în celulele retinei – opsine etc. Conţinutul diferenţiat de proteine în diferite celule este determinat de expresia diferenţiată a genelor în timp şi spaţiu. Astfel, diferenţierea celulară este determinată de "conectarea" sau "deconectarea" unor gene cu expresie diferenţiată în timp şi spaţiu.

Apoptoza

Homeostazia tisulară necesită un echilibru între moartea şi proliferarea celulară. În general, sinuciderea celulară este activată pentru a elimina selectiv celulele devenite indezirabile ("nedorite"). Acestea pot fi: celule lezate sau senescente (polinucleare acumulate la nivelul situsului inflamator), celule

recunoscute ca străine sau preneoplazice (a căror apoptoză este indusă de celule citotoxice) sau celule care au pierdut contactul cu mediul lor înconjurător (de exemplu, celulele epidermice, care au migrat, în urma unui traumatism în ţesutul subcutanat), sau celule în exces care intră în competiţie cu alte celule pentru un semnal inhibitor.

S-a demonstrat că apoptoza are loc în:

- cursul dezvoltării normale a embrionului;
- regresia organelor la larve în timpul metamorfozei;
- pierderea celulelor din spaţiul interdigital al mânii la embrionul uman;
- eliminarea celulelor senescente sau lezate din ţesuturi;
- eliminarea celulelor transformate (canceroase);
- în sistemul imun - prin apoptoză se realizează îndepărtarea unor clone limfocitare şi selecţia altora.

Fiecare celulă primeşte multiple semnale (hormoni, citokine) prin intermediul receptorilor specifici. Aceste semnale pot induce intrarea celulei în ciclul celular sau în apoptoză. De exemplu, glucocorticoizii sau ionoforul de Ca^{2+} induc apoptoza în timocite. Acest proces este inhibat prin activarea protein-kinazei C de către un ester forbol sau de către IL1. Alterarea unui receptor specific ar putea determina apariţia unei clone maligne, dezechilibrând această relaţie între semnalele inductoare şi represoare ale apoptozei şi ale proliferării.

Caracteristica esenţială a apoptozei este reprezentată de clivajul ADN dublu–catenar la nivelul *linker*-ilor intranucleozomici (fig.13.7).

Modificările din nucleu ce afectează în principal moleculele de ADN, sunt produse în urma activării sau inducţiei unei endonucleaze care este dependentă de ionii de Ca^{2+} şi Mg^{2+}. Această enzimă este prezentă în mod constitutiv, în unele tipuri de celule (timocitele din cortex), însă ea apare indusă în alte tipuri de celule. Această endonuclează clivează ADN

internucleozomal, dând naştere la o serie de fragmente formate din 180-200 perechi de baze.

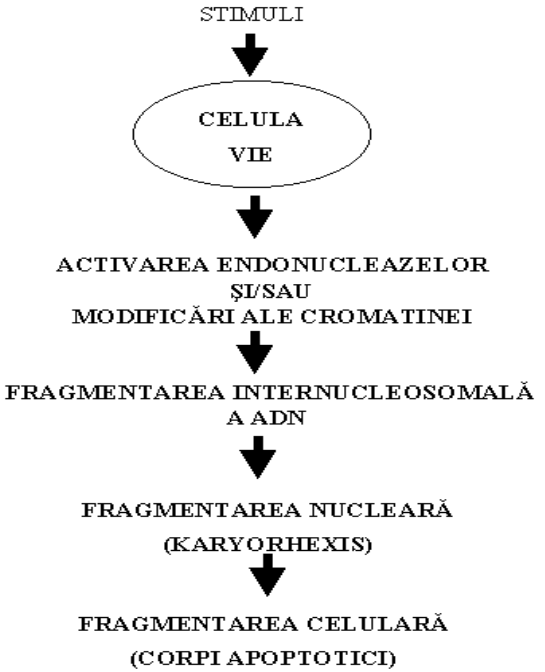


Fig. 13. 7. Schema evenimentelor din apoptoză

După clivarea ADN urmează fragmentarea nucleului urmată de fragmentarea celulei şi formarea ***corpilor apoptotici***. Aceştia sunt fagocitaţi de celulele vecine sau de limfocte. Fagocitarea corpilor apoptotici se realizează în urma recunoaşterii de către celulele fagocitare a noilor molecule, care sunt expuse pe suprafaţa membranei corpilor apoptotici (de ex., glicani bogaţi în reziduuri de N-acetil- glucozamină). În mecanismul declanşării acestui proces au fost identificate o serie de gene. Din categoria acestor gene s-a demonstratrolul a două grupuri principale: oncogenele (myc, ras, bcl-2) şi unele gene

supresoare ale creşterii tumorale (p53) care pot fi implicate în iniţierea sau blocarea apoptozei.

Unele proto-oncogene (c-bcl-2) blochează specific moartea fiziologică a celulei (apoptoza). Supraexpresia oncogenelor mutante c-ras poate produce acelaşi efect blocant, chiar dacă celulele au fost expuse la diferiţi factori de creştere, la care ele sunt sensibile şi care în condiţii normale ar fi condus la moartea lor prin apoptoză. În schimb, gena supresoare a creşterii tumorale, p53, are un efect opus, ea induce apoptoza în celulele susceptibile.

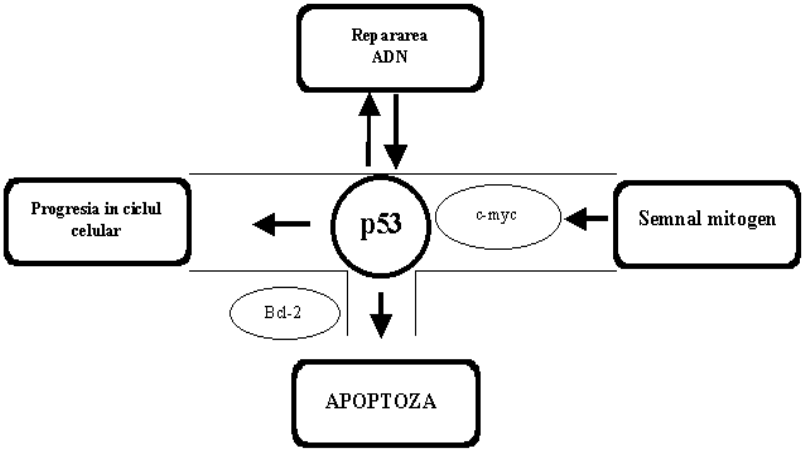


Fig. 13.7. Reglarea apoptozei

Apoptoza şi senescenţa

În timpul îmbătrânirii (senescenţei), s-a observat în majoritatea organelor o scădere a numărului de celule, ca rezultat al încetinirii ritmului de creştere a celulelor şi al eliminării lor prin apoptoză. Acestea ar putea fi consecinţe ale unei deficienţe de factori de creştere, a unor anomalii de

transmitere a semnalelor inter- şi intracelulare şi a modificării ciclului celular. Apoptoza intervine în eliminarea celulelor senescente alterate. Dacă apoptoza este perturbată, poate fi antrenată eliminarea celulelor sănătoase şi păstrarea celulelor anormale.

Deci, în cursul îmbătrânirii apoptoza ar permite eliminarea celulelor cu funcţionare deficitară – apoptoza normală. Mecanismele reglatoare ale apoptozei ar fi activate de către o leziune celulară incompatibilă cu supravieţuirea celulei.

În alt caz, activarea aceloraşi mecanisme va avea drept consecinţă dispariţia celulelor normale – apoptoza abuzivă. De exemplu, diminuarea progresivă a sintezei anumitor factori de creştere şi/sau de supravieţuire o dată cu vârsta nu ar permite menţinerea decât a unei populaţii celulare din ce în ce mai redusă numeric.

În alte cazuri, mecanismele de control ale apoptozei ar fi ele înseşi afectate de îmbătrânire şi activarea lor ar putea determina deleţia neadecvată a celulelor normale – apoptoză aberantă. Activarea inoportună şi/sau disfuncţia mecanismului apoptotic ar contribui la moartea celulară în exces, fenomen caracteristic senescenţei.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: ciclu celular, mitoză, interfază, kinetocor, punct de restricţie, cicline, factor de creştere, apoptoză.
2. Care sunt perioadele ciclului celular?
3. Ce procese au loc în interfază?
4. Care este durata ciclului celular?
5. Ce factori controlează evenimentele din interfază?
6. Ce factori induc mitoza?
7. Care este rolul biologic al mitozei?
8. Care este soarta celulelor după diviziune?
9. În ce constă rolul biologic al apoptozei?

14

RECOMBINAREA GENETICĂ

Prin recombinare genetică se defineşte fenomenul producerii unor combinaţii genetice noi prin rearanjarea, reasortarea sau redistribuţia materialului genetic cuprins în două unităţi genetice diferite.

Recombinarea genetică este un proces general în natură şi reprezintă una din cheile mecanismelor prin care se formează noi indivizi, proces important în selecţia naturală. Mecanismele de recombinare genetică sunt diferite la procariote şi eucariote.

Recombinarea genetică la eucariote

La eucariote recombinarea materialului genetic este asigurată în general de procesele legate de înmulţirea sexuată şi de fenomenele de transpoziţie (vezi cap. 8). În dependenţă de cantitatea de material implicat în recombinare deosebim:

- ***recombinare genomică*** – recombinarea materialului ereditar în procesul fecundaţiei;
- ***recombinarea intercromozomică*** – asortarea independentă a cromozomilor neomologi în anafaza I a meiozei;
- ***recombinarea intracromozomică*** – recombinarea genelor între cromozomii omologi în procesul crossing-overului;
- ***recombinarea prin transpoziţie*** – inserarea secvenţelor scurte de ADN într-un loc nou în acelaşi sau alt cromozom.

Recombinarea genomică

Eucariotele superioare se caracterizează printr-un mecanism particular de înmulţire – ***înmulţire sexuată,*** la care participă două celule specializate - ***gameţii***. De regulă, gameţii sunt de origine diferită (maternă şi paternă). Contopirea gameţilor haploizi poartă denumirea de ***fecundare***, iar celula rezultată ce conţine materialul genetic al ambilor gameţi - ***zigot***. Participarea gameţilor (unui organism) la fecundaţie este aleatorie, asigurând formarea diferitor tipuri de zigoţi, ceea ce reprezintă ***recombinarea genomică***.

Fuziunea celor doi gameţi haploizi reface setul diploid de cromozomi, caracteristic speciei. Mitozele succesive ale zigotului duc la creşterea şi dezvoltarea organismului pluricelular. Începând cu zigotul toate celulele somatice vor avea cromozomii în perechi de omologi identici ca morfologie şi structură genică, dar diferiţi ca origine.

Recombinarea intra- şi intercromozomică

La animale formarea gameţilor are lor în gonade. Din celule precursoare (***gametogonii***), care sunt celule cu set diploid de cromozomi şi sunt identice genetic cu zigotul, se formează gameţi haploizi. Procesul de maturizare a gameţilor este reprezentat de ***meioză***. Meioza este un mecanism complex ce implică desfăşurarea succesivă a două diviziuni, care se termină cu înjumătăţirea setului de cromozomi în celulele fiice. Din fiecare celulă cu un set de 2n (***set diploid***) cromozomi se formează 4 gameţi cu câte 1n (***set haploid***) de cromozomi – proces invers fecundaţiei. Gameţii rezultaţi din meioză sunt produşi ai recombinării inter- şi intracromozomice. Aceste tipuri de recombinare au loc în diferite etape ale meiozei.

Meioza este precedată de o interfază premeiotică în care are lor replicarea ADN. Între cele două diviziuni există o perioadă scurtă – ***interkineza*** – în care nu are loc replicarea ADN.

I diviziune meiotică – diviziunea reducţională

Diviziunea reducţională este responsabilă de înjumătăţirea setului de cromozomi şi de recombinarea inter- şi intracromozomică.

Profaza I

Profaza I a meiozei reprezintă cea mai importantă şi complexă fază, în care are loc conjugarea cromozomilor şi recombinarea intracromozomică. Această fază este divizată în cinci etape în care are loc condensarea continuă a cromatinei şi formarea aparatului de diviziune.

Leptotenul (leptonemul) – cromozomii bicromatidieni se condensează, devin vizibili şi au aspectul unor filamente subţiri.

Zigotenul (zigonemul) – reprezintă momentul–cheie în care are loc conjugarea cromozomilor omologi (perechea de cromozomi identică după lungime, formă, structură, dar de origine diferită – unul matern şi altul patern). Conjugarea omologilor are loc centromer - la centromer, telomer – la telomer, genă alelă – la genă alelă, formând ***bivalenţi*** sau ***tetrade*** (doi cromozomi omologi bicromatidieni) (fig. 14.1). Procesul conjugării este facilitat de ***complexul sinaptonemal***, format din proteinele axului

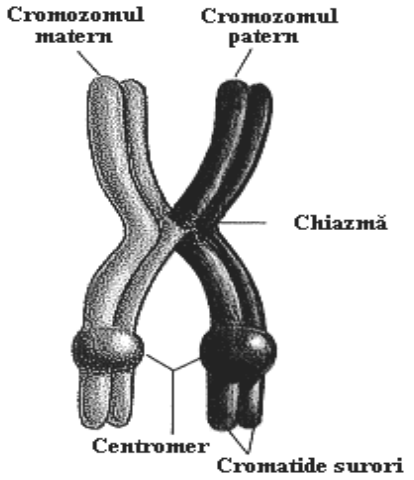


Fig. 14.1. Structura bivalentului (tetrada)

cromozomic, care asigură apropierea cromatidelor şi stabilizează tetradele.

Cromozomii X şi Y, nefiind omologi, în timpul conjugării se unesc prin capetele lor, formând un bivalent "vezicula sexuală".

Pachitenul (pachinemul) – se caracterizează prin schimbul reciproc de fragmente între cromozomii omologi – *crossing-overul*, care reprezintă recombinarea intracromozomică a materialului genetic. Astfel, fiecare dintre cromozomi va conţine material genetic de la ambii părinţi, iar noua combinaţie de gene va fi transmisă generaţiilor următoare.

Un rol important în realizarea crossing-overului îl are complexul sinaptonemal în cadrul căruia se formează un complex catalitic multiproteic - ***nodul de recombinare***, responsabil de ruperea şi reunirea încrucişată a fragmentelor omoloage (fig. 14.2).

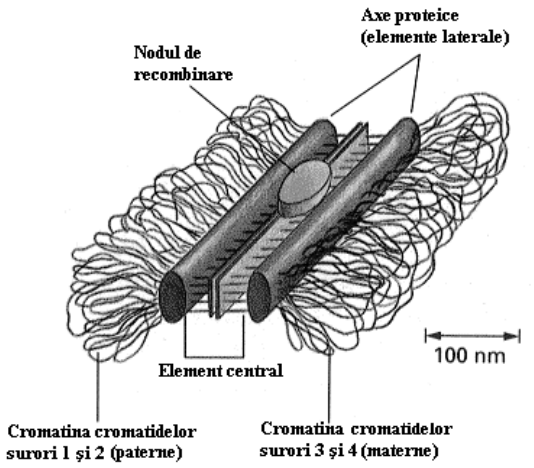


Fig. 14.2. Complexul sinaptonemal

Diplotenul (diplonemul) – reprezintă faza în care cromozomii omologi încep să se separe unul de altul prin dezorganizarea complexului sinaptonemal. Omologii rămân uniţi în punctele, în care a avut loc crossing-overul, formând ***chiasme*** (fig. 14.1). Numărul chiasmelor coincide cu numărul nodulilor de recombinare.

Diachineza se remarcă prin fenomenul de ***terminalizare a chiasmelor*** – deplasarea chiasmelor spre extremităţile cromozomilor. Bivalenţii rămân uniţi doar prin capete.

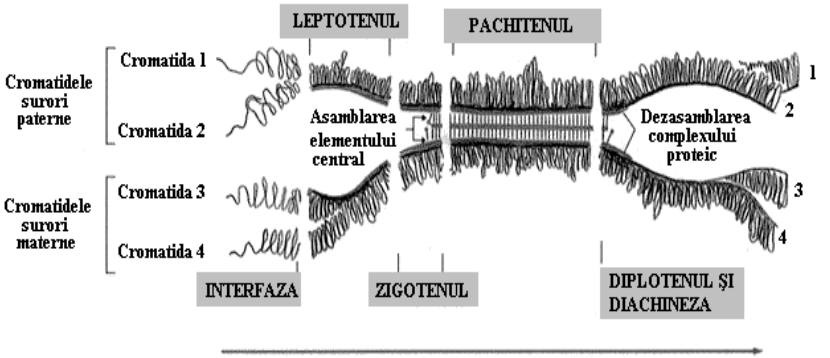


Fig. 14.3. Succesiunea principalelor evenimente din profaza I

La sfârşitul profazei I au loc următoarele procese: disocierea anvelopei nucleare, maturizarea kinetocorilor (câte un singur kinetocor pentru fiecare cromozom), unirea bivalenţilor la fusul de diviziune.

Metafaza I

În metafaza I are loc aranjarea bivalenţilor în plan ecuatorial, formând ***placa metafazică***. Centromerii cromozomilor omologi sunt orientaţi spre poli opuşi. La sfârşitul metafazei I are loc disocierea chiasmelor terminale şi eliberarea cromozomilor omologi din bivalent (fig. 14.4).

Anafaza I

Anafaza I se caracterizează prin disjuncţia cromozomilor omologi din bivalent şi migrarea cromozomilor bicromatidieni spre polii celulei (fig. 14.4). Spre fiecare pol migrează câte un cromozom din fiecare pereche (la om se formează 23 bivalenţi, astfel la fiecare pol ajung câte 23 cromozomi bicromatidieni). Cromozomii materni şi cei paterni segregă independent unii de

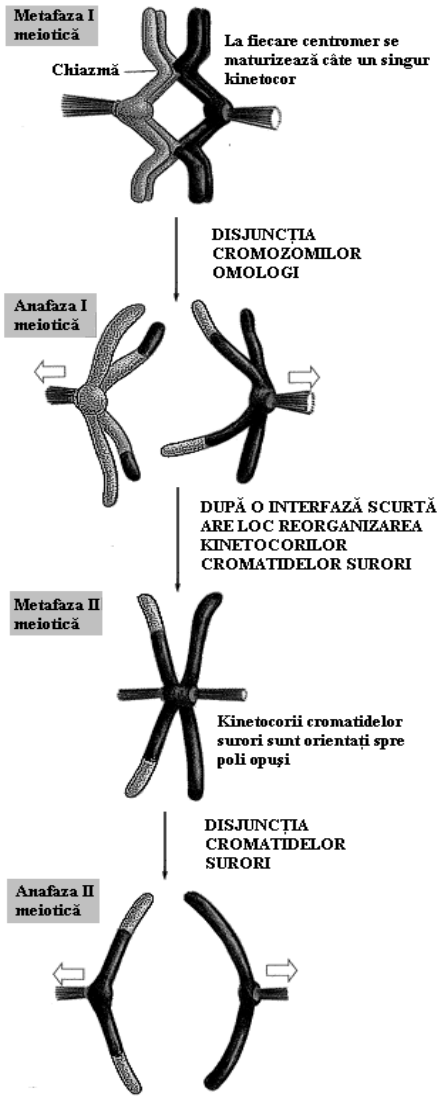


Fig. 14.4. Mecanismele de disjuncţie a cromozomilor în meioză

alţii, încât are loc o combinare independentă a cromozomilor neomologi – ***recombinare intercromozomică***. Numărul de combinaţii posibile poate fi 2^n (la om $2^{23} = 83886068$ combinaţii).

Telofaza I

În telofaza I cromozomii bicromatidieni se găsesc la polii celulei şi are loc decondensarea lor parţială; se reorganizează membrana nucleară, iar prin citikineză se formează doi gametociţi secundari cu set haploid de cromozomi bicromatidieni.

Diviziunea II – diviziunea ecvaţională

După interkineza scurtă, are loc diviziunea ecvaţională în ambele celule rezultate din I diviziune. Diviziunea II este asemănătoare cu mitoza şi asigură repartizarea egală şi identică a cromatidelor în celulele gameţi (fig. 14.4).

Mecanismul molecular al crossing-overului

În procesul crossing-overului participă două molecule omoloage de ADN, care sunt apropiate fizic prin intermediul complexului sinaptonemal. Recombinarea are loc între secvenţe înalt specifice şi se bazează pe principiul complementarităţii. Este un mecanism foarte precis şi se efectuează cu o acurateţe strictă.

Procesul de recombinare necesită ruperea duplexelor de ADN, formarea monocatenelor şi reunirea încrucişată a secvenţelor complementare. Ca rezultat al încrucişării moleculelor, se formează o configuraţie cruciformă specifică, numită ***structura Holliday*** (fig. 14.5).

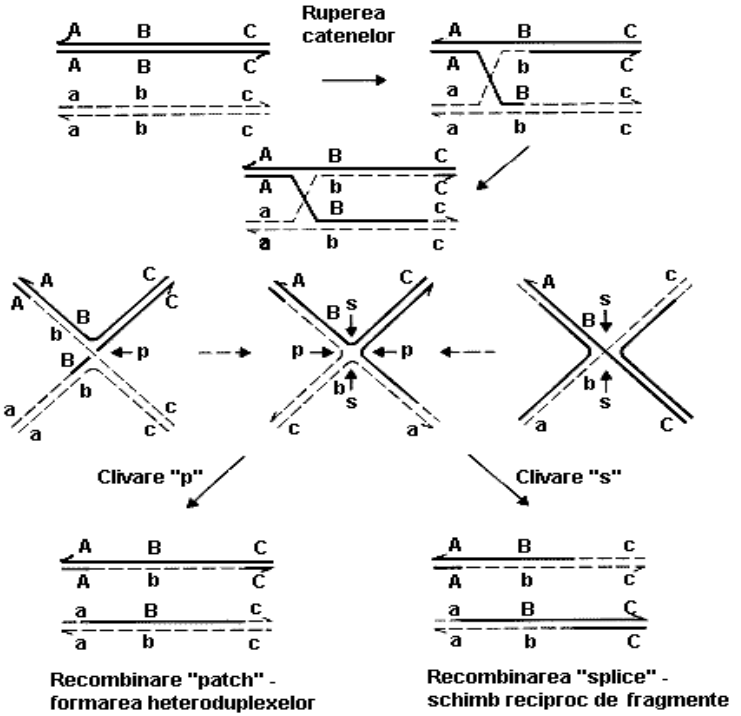


Fig. 14.5. Modelul Holliday de recombinare

În dependenţă de modul de tăiere a acestei structuri se pot obţine molecule recombinate de ADN de două tipuri:

(1) molecule recombinate cu secvenţe heteroduplexe (numai una din catene este recombinată);
(2) molecule recombinate, prin schimb reciproc de fragmente bicatenare.

Crossing-overul nu este un proces obligatoriu la toate eucariotele (de ex., la masculii dipterelor el n-a fost înregistrat). Mecanismul molecular de reglare, inclusiv proteinele implicate nu sunt deocamdată bine studiate. S-au găsit omologii între unele proteine participante la crossing-over cu proteinele de recombinare la *E.coli*.

Recombinarea genetică la procariote

La procariote există mai multe tipuri de recombinare genetică, bazate pe proprietatea ADN de a forma heteroduplexe şi capacităţii de a insera fragmente străine de ADN.

Recombinarea naturală se produce atunci când două molecule de ADN omoloage sunt prezente în aceeaşi celulă. La bacterii recombinarea genetică generală se efectuează prin transferul unor fragmente de ADN de la o celulă la alta prin fenomenele de transformare, conjugare, sau prin transducţie (vezi cap. 5).

Recombinarea prin transpoziţie se caracterizează prin inserarea unor noi secvenţe de ADN într-o moleculă–gazdă fără existenţa omologiei între secvenţele implicate (vezi cap. 8).

Recombinarea situs-specifică se realizează între succesiuni specifice de nucleotide ale moleculelor de ADN bacterian şi ADN fagic. Condiţia pentru realizarea recombinării este prezenţa secvenţelor omoloage în ambele molecule şi a unui complex enzimatic particular care asigură recunoaşterea secvenţelor implicate în recombinare.

Mecanismul molecular al recombinării la E.coli

Modelul cel mai accesibil pentru studierea recombinării genetice este *E.coli*. În procesul de recombinare participă:

- molecula ADN bicatenar recipient cu situsul *chi* (secvenţă conservată la bacterii, localizată la fiecare 5-10kb, formată din 8 perechi baze $\begin{matrix} 5'GCTGGTGG3' \\ 3'CGACCACC5' \end{matrix}$);
- fragmentul ADN monocatenar donor (ADN fagic, ADN plasmidic);
- complexul proteic RecBCD format dintr-o endonuclează, o exonuclează şi o ADN-helicază;
- proteina RecA ce catalizează reacţia de formare a heteroduplexurilor (fig. 14.6);
- proteine SSB care stabilizează monocatenele.

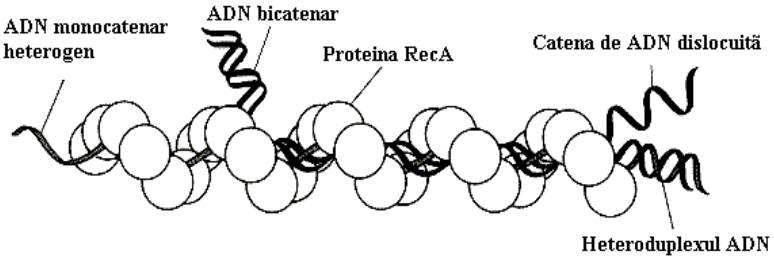


Fig. 14.6. Rolul proteinei RecA în recombinarea *genetică la bacterii*

Moleculele monocatenare donor se formează prin denaturarea unor molecule de ADN sau rezultă din replicarea σ a ADN fagic (vezi cap. 7). Pentru formarea heteroduplexului din molecula de ADN recipient se excizează una din catene, iar de cealaltă catenă originală se uneşte complementar ADN monocatenar donor.

Etapele recombinări:

(1) Complexul RecBCD găseşte în molecula ADN recipient secvenţa *chi*. RecBCD denaturează ADN bicatenar şi produce o ruptură în una dintre catene, obţinându-se un capăt 3' liber.
(2) Proteina RecA asigură recunoaşterea capătului 3' liber şi catalizează unirea complementară cu fragmentul de ADN donor monocatenar.
(3) Catena donor înlocuieşte una dintre catenele originale, formând un heteroduplex (ADN recombinat).
(4) Catena dislocuită este eliminată.

Există recombinare cu fragmente bicatenare omoloage de ADN, catalizată de complexul proteic RuvABC. Acest proces este asemănător cu mecanismul crossing-overului descris la eucariote.

Verificarea cunoştinţelor:

1. Definiţi noţiunile: recombinare genetică, complex sinaptonemal, nodul de recombinare, bivalent, cromozomi omologi, structura Holliday, heteroduplex.
2. Care este importanţa biologică a recombinării genetice?
3. Care sunt tipurile de recombinare genetică la procariote şi la eucariote?
4. Când şi cum are loc crossing-overul?
5. Care este importanţa biologică a anafazei I?
6. Care sunt condiţiile pentru recombinarea genetică la bacterii?

BIBLIOGARFIE

1. Adams, R.L.P. et al. (Eds) (1986) The Biochemistry of the Nucleic Acids, 10th revised edn (Chapman & Hall, London).
2. Bayer, M.E. (1968) Areas of adhesion between wall and membrane in Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 53, 395.
3. Benga G. (1985) Biologia celulară şi moleculară. Dacia, Cluj-Napoca.
4. Bickmore, W.A. & Sumner, A.T. (1989) Mammalian chromosome banding. Trends Genet. 5, 144178.
5. Blackburn, E.H. & Szostak, J.W. (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. A. Rev. Biochem. 53, 163194.
6. Bloom, K & Green, M. (Eds) (1992) Nucleus and gene expression. Curr. Opinion Cell Biol. 4, 377-567.
7. Brown, T.A. (1990) Gene Cloning, 2nd edn (Chapman & Hall, London).
8. Burke, D.T. et al. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236, 806812.
9. Clarke, L. (1990) Centromeres of budding and fission yeasts. Trends Genet. 6, 150-154.
10. Cormack, B.P. & Struhl, K. (1992) The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. Cell 69, 685-696.
11. Covic M. (1981) Biologie şi genetică medicală. Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti.
12. Darnell, J. et al. (1990) Molecular Cell Biology 2nd edn (Scientific American Books, San Francisco, CA).
13. Dunderdale, H.J. (1991) Formation and resolution of recombination intermediates by E. coli RecA and RuvC proteins. Nature 354, 506-510.

14. Evans, W.H. & Graham, J.M. (1989) Membrane Structure and Function (IRL Press, Oxford).
15. Felsenfeld, G. & McGhee, J.D. (1986) Structure of the 30-nm chromatin fiber. Cell 44, 375377.
16. Felsenfeld, G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature 355, 219224.
17. Gennis, R.B. (1989) Biomembranes (Springer-Verlag, Berlin).
18. Giaever, G.N. & Wang, J.C. (1988) Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. Cell 55, 849-856.
19. Goeddel, D. et al. (1979) Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature 281, 544-548.
20. Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1985) The identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43, 405413.
21. Hartwell, L.H. & Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246, 629-634.
22. Holliday, R. (1964) A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5, 282-304.
23. Ingraham, J.L. et al. (1983) Growth of the Bacterial Cell (Sinauer, Sunderland, MA).
24. Jeffreys, A.J. et al. (1991) Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. Nature 354, 204210.
25. Kuhlbrandt, W. (1992) Membrane proteins. Curr. Topics Struct. Biol. 2, 503-510.
26. Lai, M.M.C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiol. Rev. 56, 61-79.
27. Landy, A. (1989) Dynamic, structural and regulatory aspects of l site- specific recombination. Annu. Rev. Biochem. 58, 913-949.

28. Laskey, R. & Scott, M.P. (Eds) (1993) Gene expression and differentiation. Curr. Opinion Genet, Dev. 3.
29. Lewin, B. (1997) Genes VI, Chs 1N7 (Oxford University Press, Oxford).
30. Marsh, D. (1992) Lipids in membrane structure. Curr.Topics Struct. Biol. 2, 497-502.
31. Matsumoto H. et al. (1989) A human centromere antigen (CENP B)interacts with a short specific sequence in alphoid DNA. J. Cell Biol. 109, 19631973.
32. McGhee, J.D. (1983) Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30tnm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. Cell 33, 831841.
33. Moyzis, R.K. et al. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG) present on the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 66226626.
34. Murray, A.W. & Hunt, T. (1993) The Cell Cycle: An Introduction (W.H. Freeman, New York).
35. Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1989) Dominoes and clocks: the union of two views of cell cycle regulation. Science 246, 614-621.
36. Nasmyth, K. (1993) Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. Curr. Opinion Cell Biol. 5, 166-179.
37. Neidhardt, F.C. et al. (Eds) (1987) Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology (American Society for Microbiology, Washington, DC).
38. Nikaido, H. & Vaara, M. (1987) In Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology, 7-22 (American Society for Microbiology, Washington, DC).
39. Norbury, C. & Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. Annu. Rev. Biochem. 61, 441-470.

40. Oliver, S. et al. (1992) The complete DNA sequence of yeast chromosome III. Nature 357, 3846.
41. Palecek, E. (1991) Local supercoil-stabilized DNA structures.Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26, 151-226.
42. Rahmouni, A.R. & Wells, R.D. (1989) Stabilization of Z-DNA in vivo by localized supercoiling. Science 246, 358-363.
43. Rich, A. et al. (1984) The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. Annu. Rev. Biochem. 53, 791-846.
44. Richmond, T.J. et al. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 E resolution. Nature 311, 532537.
45. Roman, L.J. et al. (1991) Rec BCD-dependent joint molecule formation promoted by Escherichia coli RecA and SSB proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3367-3371.
46. Saenger, W. (1984) In Principles of Nucleic Acid Structure (Cantor, C.R., Ed.) (Springer-Verlag, Heidelberg/Berlin).
47. Schultz, M.C. et al. (1992) Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II and III promoters. Cell 69, 697-702.
48. Schulze, D.H. et al. (1983) Identification of the cloned gene for the murine transplantation antigen H2Kb by hybridization with synthetic origonucleotides. Mol. Cell. Biol. 3, 750-755.
49. Smith, G.R. (1987) Mechanism and control of homologous recombination in Escherichia coli. Annu. Rev. Genet. 21, 179-201.
50. Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.
51. Stryer, L. (1988) Biochemistry, 3rd edn (Freeman, San Francisco).
52. Svaren, J. & Horz, W. (1993) Histones, nucleosomes and transcription. Curr. Opinion Genet. Dev. 3, 219-225.

53. Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.
54. Voiculeţ N. (1997) Biologia Moleculară a celulei. BIC ALL, Bucureşti,
55. Watson, J.D. et al. (1987) The Molecular Biology of the Gene, 4th edn (Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA).
56. Watson, J.D. et al. (1992) Recombinant DNA, 2nd edn (Freeman, New York).
57. West, S.C. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. Annu. Rev. Biochem. 61, 603-640.
58. Zavel, L. & Reinberg, D. (1992) Advances in RNA polymerase II transcription. Curr. Opinion Cell Biol. 4, 488-495.
59. Албертс Б. и др. (1994) Молекулярная биология клетки. Мир.