

# Organizarea informației în celula eucariotă

## 3

Componenta informațională (genetică) a celulelor eucariote este inclusă într-un organit distinct numit **nucleu**. Caracteristic pentru eucariote, spre deosebire de procariote, nucleul este înconjurat de un înveliș nuclear, la baza structurii căruia stă o membrană dublă. Rolul primordial al învelișului nuclear este de a izola procesele genetice esențiale (replicarea ADN și sinteza ARN), de ribozomii citoplasmatici la nivelul cărora are loc sinteza proteinelor. O altă caracteristică a nucleului eucariotelor este faptul că acesta conține ADN complexat cu proteine specializate, numite **histone**, care îl împachetează și participă la reglarea activității sale.

Rolul esențial al nucleului rezultă din dogma centrală a geneticii moleculare. Conform acesteia, informația este transferată în direcția:



**Transcripția**, constă din transcrierea informației, reprezentată de o anumită succesiune de baze azotate din structura ADN, într-o secvență de baze complementare de ARN. Produsul transcris se numește ARNmesager și conține, pe lângă informația necesară sintezei unui lanț polipeptidic, și secvențe neinformaționale. Aceste secvențe neinformaționale sunt îndepărtate prin excizie, tot în nucleu, prin procesul numit **ARN-procesare** (ARN-prelucrare).

**Translația**, este procesul prin care mesajul genetic, reprezentat de secvența de baze azotate a ARNmesager, este tradus într-o secvență de aminoacizi corespunzătoare. Procesul are loc în citoplasmă, la nivelul ribozomilor și nu reprezintă altceva decât sinteza proteinelor.

**Replicația**, este un alt proces biochimic esențial căruia îi este supus ADN nuclear. Aceasta constă dintr-o serie de procese moleculare care se desfășoară foarte exact în nucleu și care asigură autoreproducerea informației genetice în scopul asigurării transmiterii sale nealterate de-a lungul generațiilor celulare.

# Organizarea ADN-ului în nucleu

ADN celular, localizat în nucleu, conține informația genetică. Această informație este condificată. "Literale" acestui cod sunt reprezentate de bazele azotate așezate într-o anumită ordine, iar "cuvintele" reprezintă tripletele de baze azotate, ele codificând un anumit aminoacid care urmează a fi încorporat într-o proteină. Această modalitate de codificare a informației rezolvă problema stocării informației genetice într-un spațiu foarte mic. Astfel, în ADN, un milion de nucleotide ocupă un spațiu liniar de 0,034 cm, având un volum total de  $10^{-15}$  cm<sup>3</sup>. Într-o celulă umană cu un diametru de 20 μm, există o secvență de  $3 \times 10^9$  nucleotide care pot fi împachetate într-un cub cu latura de 1,5 μm. Pentru comparație,  $3 \times 10^9$  litere dintr-o carte, ocupă aproximativ 1 milion de pagini. Aceasta înseamnă aproape 3500 de cărți a 300 de pagini fiecare.

ADN-ul celular, dacă este întins, are o lungime remarcabilă, respectiv ADN-ul dintr-un cromozom uman se estimează a avea lungimea de 5 cm. Aceasta presupune că macromoleculele de ADN trebuie împachetate pentru a încapa în nucleu. Împachetarea ADN în celula eucariotă este importantă din două considerente: (a) este esențial ca împachetarea moleculelor foarte lungi de ADN să se facă într-un mod organizat; (b) modul exact de împachetare a unei anumite regiuni din genom poate determina activitatea genelor din acea regiune. Aceste condiții sunt asigurate de interacțiunea dintre ADN și o serie de proteine: histonele și respectiv, proteinele cromozomiale nehistonice. În urma asocierii acestor proteine cu macromoleculele de ADN, rezultă **fibrelle de cromatină**.

## Stocarea informației genetice în moleculele de ADN

În primii 40 de ani ai acestui secol, biochimistii au crezut că ADN nu ar putea să poarte informația genetică deoarece erau convinși că aceste molecule au o structură monotonă, fiind formate dintr-o secvență tetranucleotidică repetitivă (...ATGCATGCATGC...).

Astăzi este cunoscut că molecula de ADN este extraordinar de lungă, un polimer liniar, care conține mai multe milioane de nucleotide aranjate în secvențe neregulate, dar nu întâmplătoare. Codul genetic, scris în "cuvinte" de câte trei nucleotide (**codonii**, care specifică un aminoacid), rezolvă problema stocării unei mari cantități de informație genetică într-un spațiu foarte mic. Fiecare moleculă de ADN este împachetată într-un **cromozom**, iar informația genetică totală este stocată în totalitatea cromozomilor unei celule și poartă numele de **genom**.

Genomul bacteriei *Escherichia coli* conține  $4,7 \times 10^6$  nucleotide perechi prezente într-o singură moleculă de ADN (un singur cromozom).

Genomul uman conține aproximativ  $3 \times 10^9$  perechi de nucleotide prezente în 24 de cromozomi (22 autozomi și 2 cromozomi sexuali diferiți), conținând deci 24 de molecule de ADN. Într-un organism diploid există două copii din fiecare tip de cromozom, unul moștenit de la mamă și unul de la tată, astfel că o celulă umană tipică conține un total de 46 de cromozomi, respectiv  $6 \times 10^9$  nucleotide perechi. Alte mamifere au genomul de o mărime asemănătoare. Această cantitate de ADN poate fi împachetată într-un cub cu latura de  $1,9 \mu\text{m}$ . Prin comparație,  $6 \times 10^9$  litere dintr-o carte ar ocupa mai mult de 1 milion de pagini, fiind necesar un spațiu de  $10^{17}$  ori mai mare.

Un cromozom uman conține în ADN-ul său între  $50 \times 10^6$  și  $250 \times 10^6$  perechi de nucleotide. Moleculele de ADN de această mărime au o lungime desfășurată de 1,7-8,5 cm. În situația în care se îndepărtează proteinele cromozomiale, acest ADN poate fi ușor rupt sub acțiunea unor forțe mecanice foarte slabe. Molecule de ADN intacte pot fi totuși izolate ușor de la unele organisme eucariote simple, cum este mucegaiul *Saccharomyces cerevisiae*, ale căror cromozomi sunt mult mai mici.

Prin tehnicile de electroforeză în gel, s-a constatat că fiecare cromozom al acestui mucegai este format dintr-o singură moleculă de ADN. Aceasta vine în concordanță cu măsurătorile mult mai complexe ale mărimii ADN din cromozomii de la *Drosophila*, a căror mărime este apropiată de cea a cromozomilor umani. Pe baza acestor considerente, precum și a altora, se consideră că este foarte probabil ca fiecare cromozom să fie alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN.

S-a constatat că la organismele superioare există un exces foarte mare de ADN. Cu mult înainte de a fi apărut tehnicile de determinare directă a secvențelor de nucleotide din ADN, a devenit evident faptul că toată cantitatea de ADN din genomul haploid al unui organism nu se află într-o relație sistematică cu complexitatea aceluia organism. De exemplu, o celulă umană conține de 700 de ori mai mult ADN decât *E. coli*, pe când celulele unor amfibieni sau ale unor plante, conțin de 30 de ori mai mult ADN decât o celulă umană. Cu alte cuvinte, genomul celulelor de mamifere conține atâta ADN, încât ar putea codifica aproximativ 3 milioane de tipuri de proteine de dimensiuni medii (de 300-400 aminoacizi). Dar fidelitatea limitată cu care pot fi menținute secvențele intacte de ADN, duce la estimarea că o celulă eucariotă de mamifere, nu poate fi formată din mai mult de 60.000 de tipuri de proteine esențiale. Astfel că, din punct de vedere genetic, o celulă umană, este puțin probabil să fie cu mai mult de 10 ori mai complexă decât o celulă de *Drosophila*, la care s-a estimat că ar exista aproximativ 5000 de gene structurale. Deci eucariotele conțin ADN în exces.

Motivul pentru care celulele eucariotelor superioare conțin o mare cantitate de ADN în exces, nu a putut fi încă explicat. Totuși, este clar astăzi că regiunile esențiale de codificare, sunt întrerupte de spații largi de ADN neinformațional.

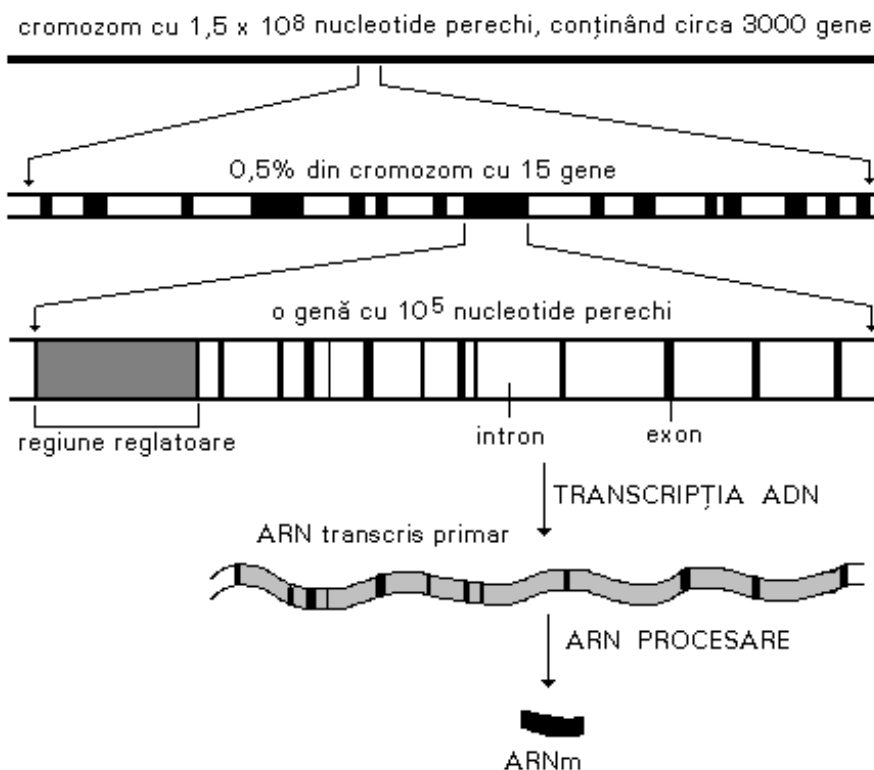
## Funcția genelor de a produce molecule de ARN

Principala funcție a genomului este aceea de a produce molecule de ARN. Anumite porțiuni de secvențe nucleotidice din ADN sunt copiate în secvențe complementare de ARN care codifică o anumită proteină (ARNm) sau care au un rol structural (ARNt și ARNr).

Fiecare regiune din ADN care produce o moleculă funcțională de ARN, formează o genă. Genele din cromozomii eucariotelor pot conține până la 2 milioane de nucleotide perechi, dar pentru codificarea unei proteine de mărime medie (300-400 aminoacizi), nu sunt necesare decât aproximativ 1000 de nucleotide. Genele eucariote conțin porțiuni lungi de ADN neinformațional care sunt intercalate între secvențele relativ scurte de ADN informațional. Secvențele informaționale au fost denumite **exoni**, iar cele neinformaționale, **introni**.

Molecula de ARN sintetizată de o asemenea genă (**ARN-transcris primar**), trebuie modificată pentru a se îndepărta secvențele intron neinformaționale. Procesul este numit **ARN-procesare** ("RNA splicing"). În urma acestuia rezultă molecula de ARNm folosită pentru sinteza proteinelor (Figura 3-1).

Genele mari sunt formate dintr-un lung șir de secvențe alternante de exoni și introni, cel mai mare spațiu ocupându-l intronii. În plus, fiecare genă conține secvențe reglatoare de ADN, de care se leagă proteinele reglatoare ale genelor care controlează transcripția acelei gene.



**Figura 3-1 Organizarea genelor într-un cromozom eucariot.** Secvențele *intron* sunt excizate din ARN transcris primar, rezultând astfel ARN mesager (ARNm).

## Rolul histonelor de a determina împachetarea moleculelor de ADN

Împachetarea ADN în celula eucariotă este asigurată de interacțiunea dintre ADN și o categorie de proteine speciale, numite **histone**, precum și de alte proteine, numite proteine comozomiale nehistonice. În urma asocierii acestor proteine cu macromoleculele de ADN din nucleul eucariotelor, rezultă fibrele de **cromatină**.

Histonele sunt proteine mici care conțin o proporție foarte mare de aminoacizi încărcăți pozitiv (lizină și serină). Această încărcătură pozitivă facilitează legarea lor de macromolecula de ADN, ai cărei radicali fosforici sunt încărcăți negativ.

În funcție de structurile moleculare pe care le formează, histonele sunt de două tipuri: histonele nucleozomale, **H<sub>2</sub>A**, **H<sub>2</sub>B**, **H<sub>3</sub>** și **H<sub>4</sub>**, și respectiv, histonele **H<sub>1</sub>**.

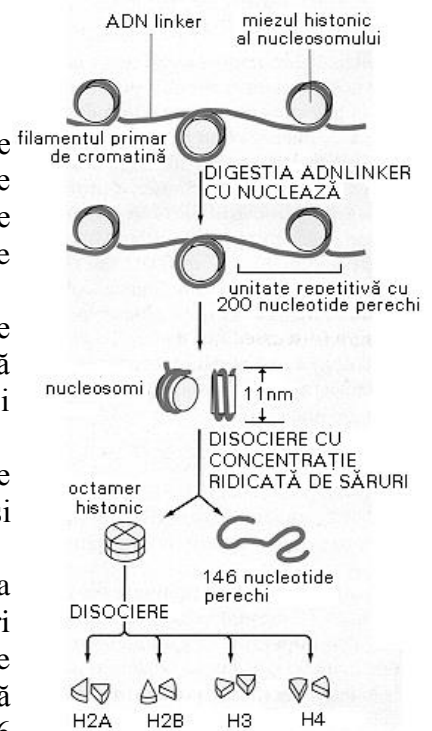
Histonele nucleozomale sunt responsabile de împachetarea primară a ADN (de ordinul I), ceea ce duce la formarea unei structuri numită **nucleozom**. Un nucleozom este format din 8 molecule de histone nucleozomale, câte două din fiecare tip (H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> și H<sub>4</sub>). Se formează astfel o particulă proteică în jurul căreia se înfășoară o porțiune de 146 perechi de baze ale ADN. Doi nucleozomi se leagă între ei prin *ADN liker* ("to link" = a lega), cu o lungime de 60 baze perechi. Această structură moleculară a fost studiată prin digestia parțială a fibrei de cromatină cu endonucleaze (DN-aza de *Micrococcus*) (Figura 3-2).

La microscopul electronic, structura primară a fibrei de cromatină dată de înșiruirea nucleozomilor, poate fi evidențiată ca un șirag de mărgele. Această structură se împachetează într-o formă întâlnită cel mai frecvent în nucleul interfazic, formând fibra de **cromatină de 30 nm**. Moleculele de histonă H<sub>1</sub> sunt și ele responsabile de această împachetare, asociindu-se la nivelul ADN linker (Figura 3-3).

## Heterogenitatea proteinelor asociate la ADN

Funcțiile importante ale ADN sunt modulate prin modificări subtile ale împachetării fibrei de cromatină din anumite regiuni ale genomului. Aceste modificări apar în principal în acele regiuni ale genomului care conțin gene active și sunt încă puțin cunoscute sub aspect molecular. Ceea ce este stabilit este faptul că moleculele de proteine asociate la ADN prezintă o heterogenitate marcată.

**Heterogenitatea histonelor nucleozomale**, constă din *acetilarea lizinei* sau *fosforilarea serinei* din structura lor. S-a observat că acetilarea histonelor este mai crescută la nivelul genelor active. Un alt element care determină această heterogenitate este **ubiquitina**, o proteină care se leagă covalent la histona H<sub>2</sub>A. Asocierea ubiquitinei cu cromatina dispare în mitoză.



**Figura 3-2**

### Structura nucleozomului.

Nucleozomul este format dintr-un miez octameric de proteine histonice în jurul căruia se înfășoară de două ori (83 nucleotide perechi), molecula de ADN. La acestea se adaugă "ADN linker". Nucleozomii se eliberează prin digestia "ADN linker" cu endonuclează de *Micrococcus*. În acest caz, în jurul miezului histonic al nucleozomului rămâne înfășurat ADN cu o lungime de 146 baze perechi (aproximativ 1,8 ture).

**Heterogenitatea histonei H<sub>1</sub>**, derivă din faptul că există 5 subtipuri de histone H<sub>1</sub>. Probabil, asocierea celor 5 subtipuri cu nucleozomii produce diferențe funcționale în cromatină.

**Heterogenitatea determinată de proteinele nehistonice**, a fost cel mai mult studiată. Aceste proteine pot recunoaște secvențe specifice ale ADN sau zone în care geometria helixului de ADN este particulară. Deși se află în cantități extrem de mici în celulă, de exemplu proteinele reglatoare se află în concentrație de doar 10.000 de molecule/celulă, ele se asociază la genele active fiind implicate în procesele complexe ale reglajului genetic.

### Împachetarea cromatinei de 30 nm în structura cromozomului

În timpul diviziunii celulare, informația genetică înscrisă în ADN organizat în interfază sub forma cromatinei de 30 nm, trebuie transmisă echilibrat la cele două celule fiice. Aceasta nu se poate realiza decât prin împachetarea specială a cromatinei nucleare în cromozomi.

**Cromozomii**, formațiuni structurale specifice unei celule doar în timpul diviziunii, sunt formați, probabil, dintr-un filament foarte lung de cromatină de 30 nm, organizat prin împachetare într-o serie de bucle. Modul de împachetare este încă puțin elucidat, dar se presupune că aceasta este asigurată de proteine asociate la ADN care stabilizează buclele de cromatină (Figura 3-4).

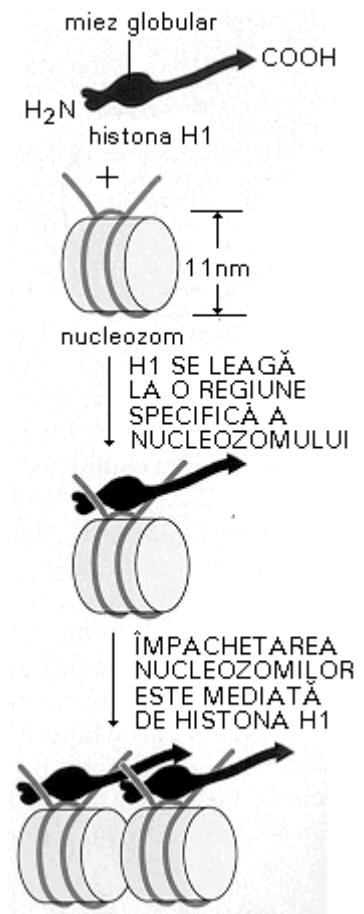
Nivelele de condensare ale ADN, pornind de la dublul helix, trecând la fibra de cromatină de 30 nm și până la structura unui cromozom, sunt reprezentate în Figura 3-5.

### Proteinele legate la secvențe specifice de ADN

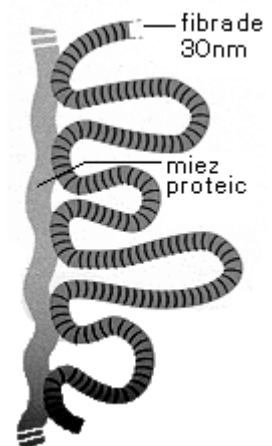
Informația stocată în ADN este organizată, replicată și citită de către o mare varietate de proteine legate stabil sau tranzitoriu la ADN. O parte din acestea se leagă la ADN relativ nespecific și contribuie la împachetarea sa, fără a bloca accesul la moleculă a altor proteine. Acestea se numesc **proteine de împachetare**. Alte proteine se leagă la secvențe specifice scurte de ADN. Aceste **proteine specifice de secvență** a o varietate de funcții:

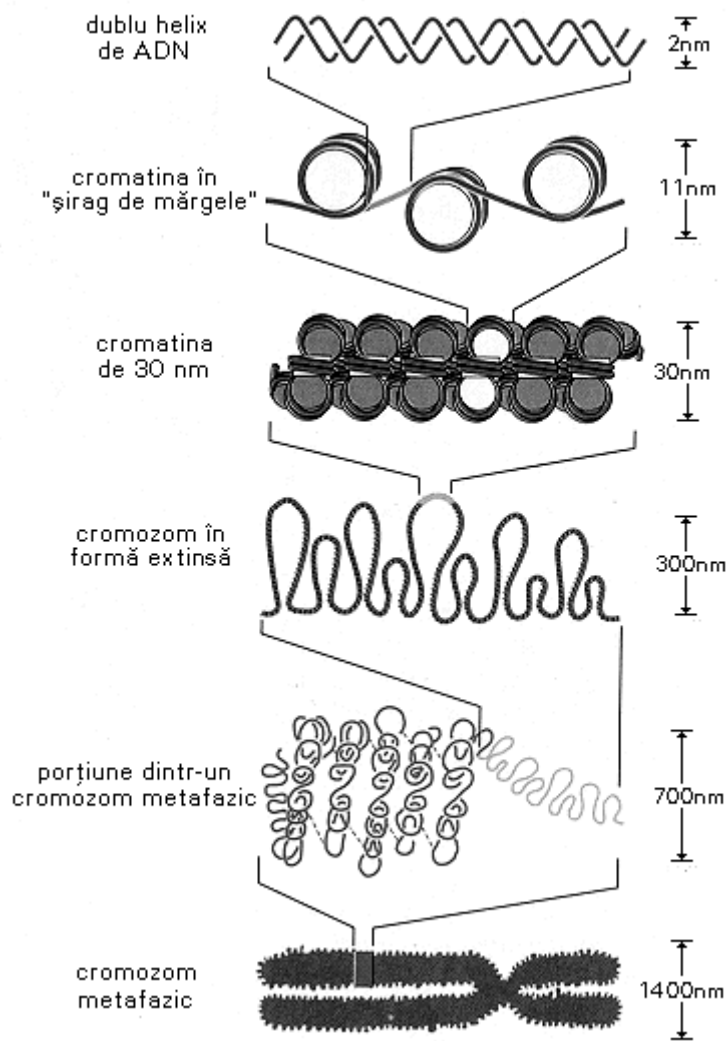
- ajută la împachetarea moleculei lungi de ADN în domenii distincte;
- inițiază replicarea ADN;
- controlează transcripția genelor.

**Figura 3-4 Principiul formării buclelor de cromatină din structura cromozomului.** În figură este reprezentată o porțiune dintr-un cromozom în care cromatina de 30 nm se dispune în bucle formate din 20.000, până la 100.000 de nucleotide perechi.



**Figura 3-3 Principiul de asociere a moleculelor de histonă H1 la nucleozomi.** Porțiunea globulară a moleculei de histonă H1 se leagă la fiecare nucleozom, la situsul în care ADN "intră" și "iese" din spirala care înfășoară nucleozomul. Când histonele H1 sunt asociate la nucleozomi, "ADN linker" nu poate fi digerat cu endonucleaze.





**Figura 3-5 Modelele de împacheta-re ale cromatinei.** Reprezentarea schematică înfățișează mai multe nivele de condensare ale fibrei de cromatină, până la nivelul cromozomului metafazic.

Fiecare tip de celulă dintr-un organism multicelular conține o mixtură distinctă de asemenea proteine reglatoare ale genelor care, acționând în diferite combinații, cauzează exprimarea anumitor gene.

Cum se leagă la ADN proteinele specifice de secvență? Toate proteinele specifice de secvență se caracterizează prin faptul că pot recunoaște o secvență particulară de ADN din afara moleculei și se leagă de aceasta fără a perturba împerecherea bazelor. Acest lucru este posibil deoarece fiecare pereche de baze este expusă spre exterior la nivelul așa numitelor "scobituri" ale dublu-helixului ("grooves"), numite *scobitura mare* ("major groove") și respectiv, *scobitura mică* ("minor groove") (Figura 3-6). În "scobitura mare", fiecare din cele patru perechi de baze (A-T, T-A, G-C, C-G), pot fi recunoscute dinspre exteriorul moleculei datorită aranjamentului particular al atomilor expuși. La nivelul "scobiturii mici", este expusă spre exterior o secvență mai scurtă. Aminoacizii din situsul de legare al unei proteine specifice de secvență sunt astfel aranjați încât favorizează la maximum formarea de legături de hidrogen sau electrostatice cu o astfel de secvență specifică de ADN.

După toate probabilitățile, majoritatea legăturilor de hidrogen se realizează la nivelul perechilor de baze expuse la nivelul "scobiturii mari".

## Famiile de proteine specifice de secvență

Factorul de transcripție III A (TF III A) este necesar la eucariote pentru a iniția sinteza celei mai mici molecule de ARN ribozomal, ARNr 5S. El se leagă la o secvență de ADN de aproximativ 50 perechi de baze, aflată în interiorul genei pentru ARNr 5S. Secvența de aminoacizi a acestei proteine este astfel organizată încât formează 9 domenii moleculare repetitive, fiecare conținând câte 30 de aminoacizi pliați în unități structurale identice datorită interacțiunii cu câte un atom de Zn. Alte proteine structurale de secvență se presupune că sunt structurate similar. Deoarece toate funcționează după aceleași principii, având domenii moleculare de interacțiune cu ADN asemănătoare, au fost incluse în familia proteinelor specifice de secvență cu "degete de zinc" (Figura 3-7). În afară de proteina TF III A, din această familie mai fac parte: factorul de transcripție Sp1, precum și o mare parte a receptorilor pentru hormonii sterolici.

A doua categorie de proteine specifice de secvență face parte din familia numită "helix-turn-helix" (termenul nu comportă traducere în limba română). Ele au o moleculă simetrică, formată din doi monomeri identici (homodimeri). Situsul care intră în contact cu molecula de ADN conține zone de 20 de aminoacizi aranjate în două  $\alpha$ -helixuri, separate printr-o buclă, de unde și denumirea lor. Cele două zone împachetate în  $\alpha$ -helix aparțin fiecare câte unuia din monomeri și, fiind perfect simetrice, se află la o asemenea distanță încât atunci când se asociază la

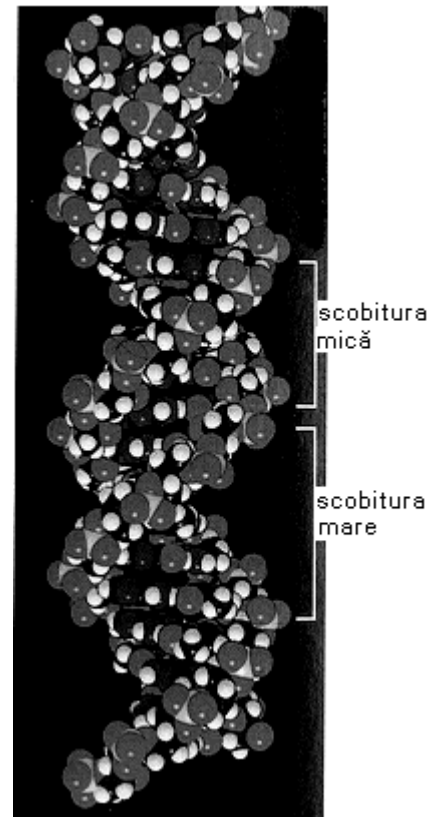


Figura 3-6 Modelul dublului helix de ADN cu cele două "scobituri".

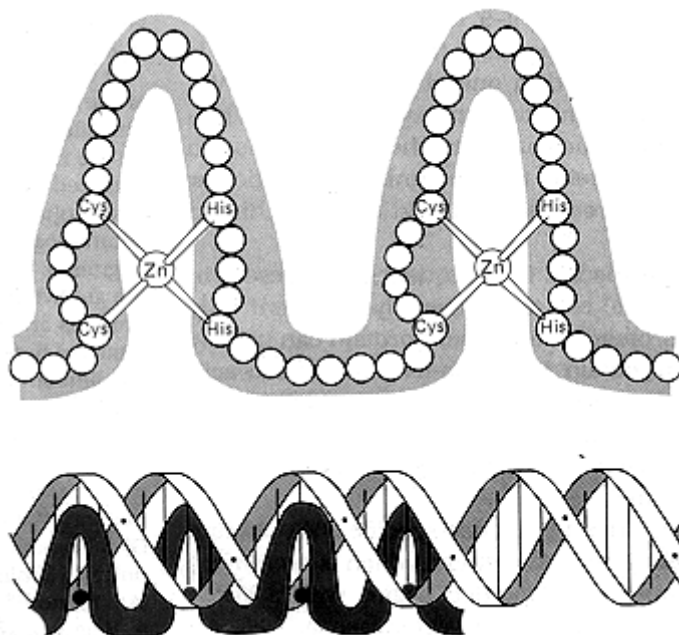


Figura 3-7 Proteină din familia "degete de zinc". Jos este reprezentat modelul ipotetic de interacțiune al acestor proteine cu molecula de ADN.



ADN, corespund perfect la două "scobituri mari" succesive din molecula acestuia (Figura 3-8).

Una din cele mai studiate proteine din familia "helix-turn-helix" este *proteina cro*, o proteină produsă de bacteriofagul  $\lambda$ . Studiul structurii spațiale a acestei proteine a contribuit în mod esențial la înțelegerea mecanismelor care intervin în reglarea activării unor gene. Astfel, modificarea simetriei acestor molecule sub acțiunea unui factor alosteric, poate altera dramatic afinitatea sa pentru molecula de ADN. O modificare minoră a distanței dintre cele două situsuri simetrice de recunoaștere a secvenței specifice sau o modificare a geometriei moleculelor de ADN este suficientă pentru a inactiva molecula. Astfel de schimbări sunt importante pentru activarea sau inactivarea genelor, ca răspuns la diferite condiții de mediu.

Primele proteine specifice de secvență care au fost descoperite la eucariote sunt: antigenul T al virusului SV40, factorul de transcripție TF III A și receptorii hormonilor sterolici. Din cauza concentrațiilor foarte mici în care se află aceste proteine într-o celulă, metodele folosite pentru izolarea lor sunt de o mare finețe și au fost puse la punct doar în ultimii ani.

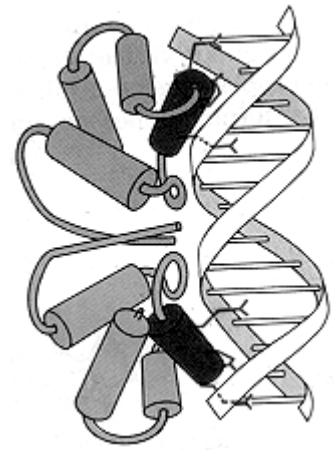
## Geometria helixului de ADN depinde de secvența de baze

Cu toate că, imediat după descrierea în 1953 a structurii spațiale a moleculei de ADN, s-a crezut că aceasta are o geometrie monotonă, ulterior s-a constatat că molecula de ADN este surprinzător de polimorfă și, chiar mai mult, ea depinde de secvența de nucleotide. Astăzi se cunosc mai multe variante de ADN, care implică modificări în geometria helixului său.

Cea mai stabilă formă de ADN este forma **ADN-B**. Aceasta este forma clasică, întâlnită cel mai frecvent în celulă, ea având helixul răsucit spre dreapta.

Studiile de difracție cu raze X au evidențiat forma de **ADN-A**. Aceasta apare în zone cu secvențe de baze neobișnuite, are helixul orientat tot spre dreapta, însă răsucit mult mai strâns decât în forma B. Această conformație este foarte importantă pentru împiedicarea formării de dublu-helix dintre un lanț de ADN și unul de ARN în momentele în care are loc transcripția. De asemenea, moleculele de ARN care formează în anumite regiuni structuri în dublu helix (ARN-ARN), se dispun de obicei în forma A.

Importanța biologică a unui al treilea tip geometric de ADN este mult mai puțin clară. Secvențele de ADN în care alternează bazele purinice cu cele pirimidinice de tipul ...GCGCGCGC..., formează foarte ușor un dublu helix orientat spre stânga, numit **ADN-Z**. Se presupune că asemenea regiuni, cu geometria atât de drastic alterată, sunt rare în genom. Ele însă ar putea fi recunoscute de proteine specifice, ceea ce duce la presupunerea că ar avea un rol biologic foarte important.



**Figura 3-8** Principiul de recunoaștere a secvenței specifice din molecula de ADN de către proteinele din familia "helix-turn-helix".

# Transferul informației din ADN, în moleculele de ARN. Transcripția

Una din cele mai importante funcții ale ADN nuclear este aceea de a constitui o matrită pentru sinteza moleculelor de ARN deoarece numai în acest fel informația genetică stocată în ADN poate fi utilizată de către celulă. Sinteza moleculelor de ARN în nucleu se numește **ADN-transcripție**. La majoritatea celulelor de mamifere, doar 1% din secvențele de dezoxiribonucleotide sunt copiate în secvențe de ribonucleotide (ARN) funcționale. Moleculele de ARN produse în acest fel sunt folosite de către celulă în mai multe direcții și, de aceea, sunt de mai multe tipuri:

-**ARN mesager** (ARNm) poartă informația pentru sinteza unui lanț polipeptidic;

-**ARN ribozomal** (ARNr), intră în structura ribozomilor;

-**ARN de transport** (ARNt), este folosit ca moleculă "adaptor" în procesul complex al sintezei proteinelor.

La eucariote, transcripția acestor trei tipuri de ARN are loc diferit, cu toate că în principiu, mecanismul are la bază aceleași reguli generale.

## ARN-polimerazele

ARN este sintetizat după o matrită de ADN prin procesul numit ADN-transcripție. Transcripția generează molecule de ARN care conțin copia informației înscrisă în ADN-ul matrită.

Procesul transcripției este realizat de enzime speciale numite **ARN-polimeraze**. La eucariote există diferite ARN-polimeraze pentru cele trei tipuri de ARN transcrise, pe când la procariote (bacterii), toate cele trei tipuri de ARN sunt transcrise de o singură ARN-polimerază.

În momentul începerii (inițierii) transcripției, ARN-polimeraza se leagă la o secvență specifică de ADN, numită **promotor**, care conține o secvență de 3 nucleotide, numită **situsul start**, situs din care începe copierea informației, adică sinteza ARN. După legarea la promotor are loc desfacerea dublu-helixului de ADN, secvențele de nucleotide fiind astfel expuse. Unul din cele două lanțuri de ADN cu nucleotidele expuse, acționează ca o matrită pe care se realizează împerecherea ribonucleotidelor cu bazele complementare și care vor forma ARN nou sintetizat.

Pe măsură ce are loc "citirea" informației, ARN-polimeraza înaintază despiralizând helixul ADN-ului și expunând succesiv alte baze pentru "citire". În acest fel, lanțul de ARN în creștere se extinde cu câte un nucleotid, succesiv, dinspre direcția 5' spre 3'. Alungirea lanțului de ARN se continuă până când se ajunge la o altă secvență specială de pe ADN, formată din 3 nucleotide, numită **semnal stop**. În momentul în care

ARN-polimeraza ajunge în dreptul semnalului stop, ea se desprinde de pe ADN, eliberându-se în același timp și molecula de ARN transcris (Figura 3-9.).

Viteza de polimerizare a ARN este de 30 nucleotide/secundă, la 37°C. Deci, un lanț de ARN de 5000 de nucleotide se sintetizează în 3 minute.

Cu toate că mecanismul transcripției este similar la procariote și eucariote, la eucariote procesul este mult mai complex. Eucariotele au trei tipuri de ARN-polimeraze, fiecare fiind responsabilă pentru transcrierea a diferite seturi de gene. Aceste enzime au fost notate cu ARN-polimeraza I, II și respectiv, III. Inițial aceste enzime au fost delimitate pe baza diferențelor chimice care apar în timpul purificării lor, precum și pe baza sensibilității lor la  $\alpha$ -amanitină, o substanță toxică izolată dintr-o ciupercă. Astfel, ARN-polimeraza I nu este afectată de  $\alpha$ -amanitină, ARN-polimeraza II este foarte sensibilă la  $\alpha$ -amanitină și ARN-polimeraza III este moderat sensibilă la  $\alpha$ -amanitină.

Deosebirea semnificativă dintre cele trei polimeraze constă în funcțiile lor:

- ARN-polimeraza I realizează sinteza ARN-ribozomal;
- ARN-polimeraza II transcrie genele al căror ARN va fi folosit pentru sinteza proteinelor (ARN-mesager);
- ARN-polimeraza III transcrie molecule foarte mici de ARN, care includ ARN 5S care intră în structura ribozomilor, precum și toate moleculele de ARN-transportor.

Celulele mamiferelor conțin aproximativ 40.000 de molecule de ARN-polimerază II, aproape același număr de molecule de ARN-polimerază I și aproximativ 20.000 de molecule de ARN-polimerază III.

## Transcripția ARNm realizată de ARN-polimeraza II

ARN-polimerazele eucariotelor nu pot, ele singure, să recunoască promotorul, ci au nevoie de o serie de proteine ajutătoare. Aceste proteine fac parte din categoria proteinelor nucleare specifice de secvență, și au fost denumite **factori de transcripție (TF)**. ARN-polimerazele I, II și III recunoasc diferite secvențe promotor și de aceea, au nevoie de diferiți factori de transcripție, denumiți **TF I**, **TF II** și respectiv, **TF III**.

Factorii de transcripție formează complexe relativ stabile cu promotorii specifici provocând atracția selectivă a ARN-polimerazei respective și deci inițierea transcripției.

Unul din cei mai importanți factori de transcripție ai ARN-polimerazei II este **TF IID**. El este reprezentat de un complex proteic mare, care a mai fost denumit **factor TATA**, deoarece se leagă la un promotor cu o secvență în care alternează timina (T), cu adenina (A), numită "cutia TATA" (Figura 3-10).

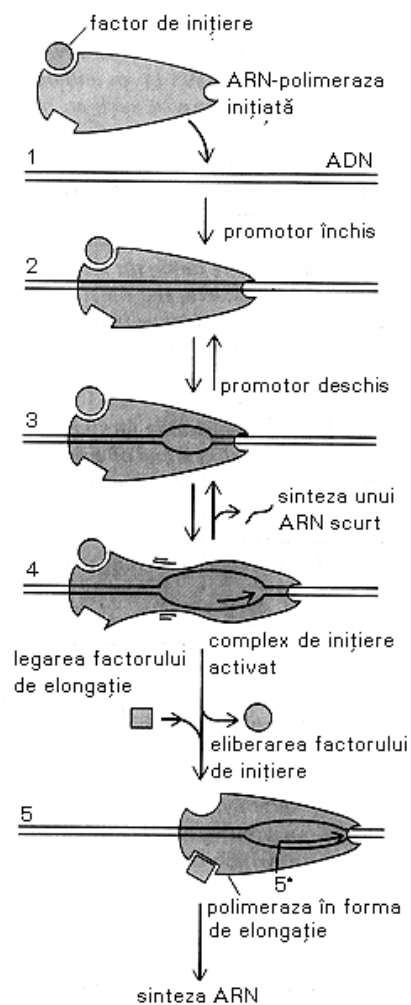


Figura 3-9 Principiul general al sintezei unei molecule de ARN. Explicațiile în text.

Una din funcțiile deosebit de importante ale ARN- polimerazei II este aceea de a realiza sinteza tuturor moleculelor de ARNm, determinând astfel, tipul particular de proteine care să fie sintetizate în celulă.

## Generarea și prelucrarea ARN transcris primar

ARN-ul transcris în nucleu de către ARN-polimeraza II se numește **ARN nuclear heterogen** (hnRNA), deoarece cea mai importantă caracteristică a sa, care îl deosebește de celelalte molecule de ARN din nucleu, este heterogenitatea dimensiunilor sale. Aceste molecule de hnRNA, după ce au fost sintetizate, vor fi supuse și altor modificări, înainte de a deveni ARNm și de a părăsi nucleul.

*Prima modificare* constă în adăugarea la capătul 5' al moleculei (capăt care este primul sintetizat în timpul transcripției), a unui **nucleotid G-metilat**. Procesul se numește "5'-capping". Acest capăt 5'-metilat va avea, ulterior, un rol foarte important în inițierea sintezei proteice, precum și de a asigura protecția împotriva degradării moleculei de ARN care este transcrisă,

*A doua modificare* are loc la capătul 3'. Aceasta constă din adăugarea la ARN transcris, imediat după ce ARN-polimeraza a depășit situsul stop, a unui **lanț poli-A** format din 100-200 de nucleotide cu Adenină. Acest proces este realizat de către o polimerază numită *poli-A-polimeraza*. Funcția acestui lanț poli-A nu este încă suficient de clară, dar se presupune că are un rol în exportul ARNm matur din nucleu spre citoplasmă. Există de asemenea, argumente că ar ajuta la stabilizarea moleculelor de ARNm, întârziind degradarea lor în citoplasmă.

După ce ARN transcris a suferit modificările descrise mai sus, el devine **ARN transcris primar** (Figura 3-11).

După cum am arătat mai sus, genele eucariotelor sunt întrerupte, informația înscrisă în ele fiind discontinuă. Secvențele informaționale se numesc exoni, pentru că ele pot fi găsite în ARNm matur folosit ca atare în sinteza proteinelor, iar secvențele neinformaționale se numesc introni, pentru că ele există în gena de pe ADN, însă sunt absente în molecula de ARNm. Din această cauză, ARN transcris primar, care poartă toată secvența de nucleotide copiată de pe ADN, atât intronii cât și exonii, este scurtat progresiv prin îndepărtarea intronilor, până devine **ARNm matur**, în care exonii se succedă neîntrerupt. Deoarece, după ce secvențele intron vor fi "tăiate", iar secvențele informaționale (exonii) vor fi legate unul de celălalt, acest proces complex a primit de denumirea de "ARN-îmbinare" ("RNA-splicing"), iar noi îl vom denumi **ARN-procesare**.

ARN-procesarea are loc numai în nucleu, iar molecula rezultată, ARNm matur, este exportată în citoplasmă doar după ce acest proces s-a încheiat.

Marea majoritate a genelor de la mamifere conțin mult mai multe secvențe intron decât exoni și, din această cauză, ARN-procesarea

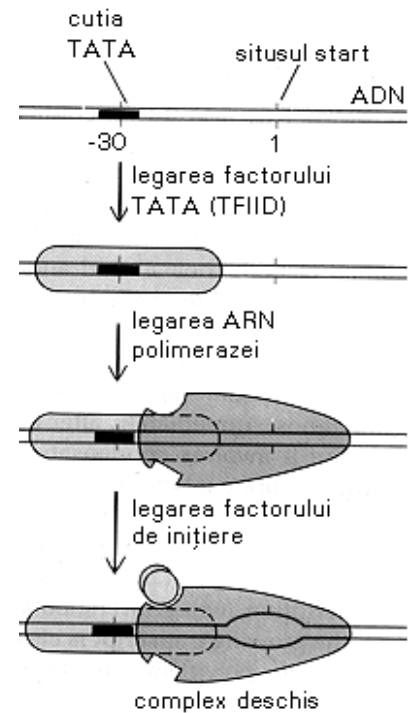
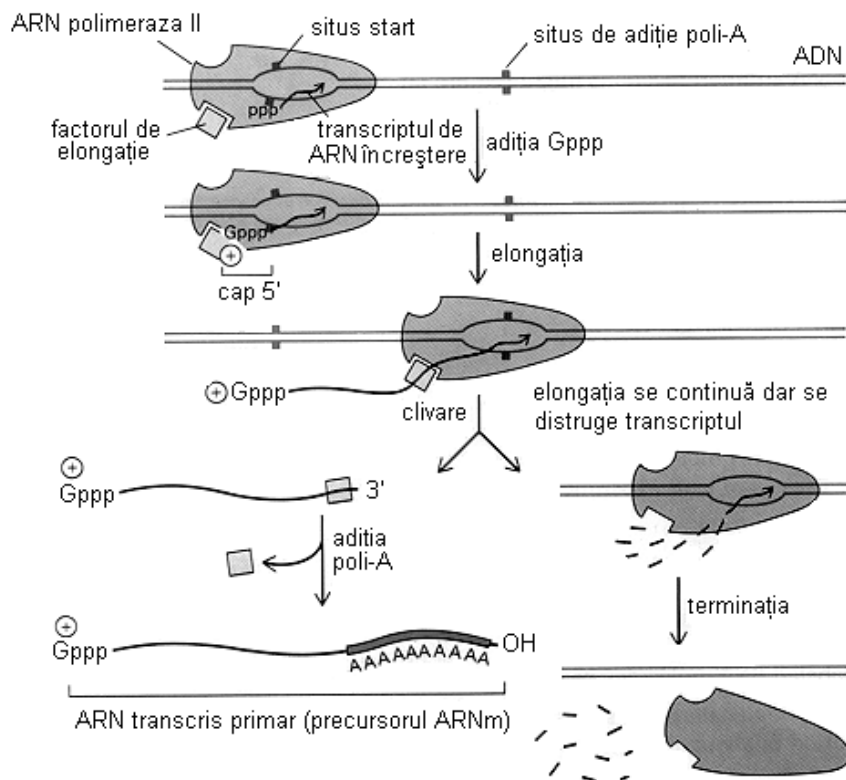


Figura 3-10 Recunoașterea promotorului de către ARN polimeraza II.



**Figura 3-11 Sinteza moleculelor de hnRNA, precursorul ARNm, și formarea ARN transcris primar.**

transformă moleculele foarte lungi de ARN transcris primar (cu mai mult de 50.000 de nucleotide), în molecule mult mai scurte de ARNm matur (între 300 și 5000 de nucleotide).

## **Rolul ribonucleoproteinelor nucleare în procesarea ARN transcris primar**

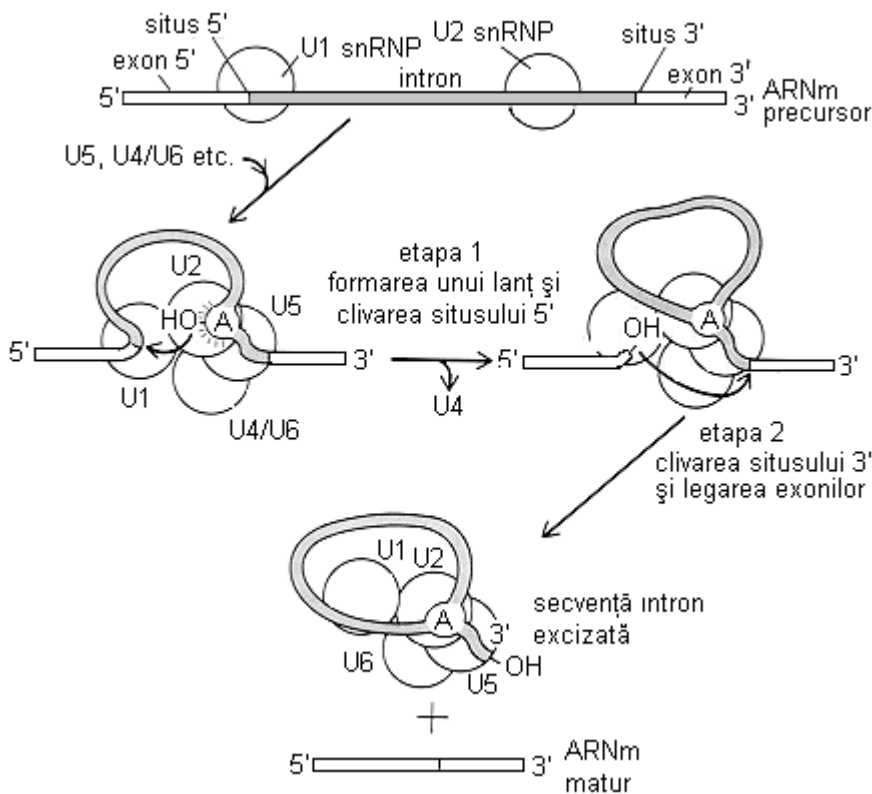
Intronii care trebuie să fie înlăturați din ARN transcris primar prin procesare, au mărimi variabile, cuprinse între 80 și 10.000 de nucleotide. Ei diferă foarte mult de exoni deoarece secvența lor exactă de nucleotide nu este importantă (nucleotidele lor formează secvențe ne-informaționale). Singurele secvențe importante din structura intronilor sunt cele implicate în excizia lor prin ARN-procesare. Aceste secvențe, numite **secvențe de consens**, sunt situate strict la cele două capete ale fiecărui intron și sunt aproximativ aceleași la toți intronii cunoscuți. Secvența specifică de la capătul 5' al intronului poartă numele de *situs donor*, iar cea de la capătul 3' se numește *situs acceptor*.

În timpul ARN-procesării are loc ruperea catenei de ARN la nivelul secvențelor de consens, îndepărtarea deci a segmentului intron și legarea la loc a moleculei, respectiv a celor doi exoni care erau despărțiți inițial de intronul excizat.

Cercetările biochimice au relevat faptul că nucleul conține o serie de complexe macromoleculare formate din proteine și ARN cu secvență

foarte scurtă (aproximativ 250 nucleotide). Aceste complexe, notate cu  $U_1, U_2, U_3, \dots, U_{12}$ , au fost denumite **ribonucleoproteine nucleare mici (snRNP)**. S-a constatat că snRNP au un rol esențial în ARN-procesare. În timpul procesării, moleculele de snRNP ( $U_1$  și  $U_2$ ) se leagă la situsul donor și respectiv la situsul acceptor și apoi, asociindu-se cu alte snRNP, formează complexe moleculare mari, numite **spliceosomi**. Aceste particule, de mărimea unui ribozom, produc excizia intronilor conform mecanismului reprezentat în Figura 3-12. După asamblarea spliceosomului reacția decurge în două trepte: în prima etapă se realizează ruperea moleculei de ARN la nivelul situsului donor și legarea capătului liber 5' la o adenină (A) din apropierea situsului acceptor, formându-se astfel o buclă (laț); în a doua etapă are loc ruperea ARN-ului la nivelul situsului acceptor și legarea capetelor libere ale exonilor.

După terminarea ARN-procesării, rezultă ARN matur, care conține informația pentru sinteza unei proteine într-o secvență neîntreruptă. S-a constatat că transportul ARNm în citoplasmă, locul unde are loc translația informației adică sinteza proteinelor, nu se poate face decât începând din momentul în care ARN-procesarea s-a încheiat. Transportul este un proces activ și specific, încă incomplet elucidat, și se efectuează la nivelul porilor membranei nucleare.



**Figura 3-12 Cataliza ARN-procesării de către spliceosomi.** Explicațiile în text.

# Sinteza ARN ribozomal. Biogeneza ribozomilor

O celulă în creștere trebuie să sintetizeze cel puțin 10 milioane de copii de ARNr pentru a-și construi cele aproximativ 10 milioane de ribozomi. Cantitatea adecvată de ARNr poate fi produsă doar dacă genomul celular conține copii multiple de gene care codifică acest ARN. Astfel, o celulă umană conține circa 400 de gene pentru ARNr, grupate în mai multe zone ale genomului.

Genele ARNr sunt transcrise de *ARN-polimeraza I*, iar produsul transcris este *ARN 45S*.

Alte gene, care sunt prezente tot în copii multiple, sunt genele care codifică *ARN 5S*, precum și cele care codifică toate tipurile de ARNt. Acestea sunt transcrise de *ARN-polimeraza III*.

## Organizarea genelor ARNr

Marea majoritate a proteinelor, oricât ar fi de abundente ele într-o celulă diferențiată (hemoglobina din eritrocite etc.), sunt sintetizate pe baza informației înscrise într-o genă prezentă într-un singur exemplar per genom. Aceste proteine sunt abundente pentru că fiecare moleculă de ARNm transcris de pe gena lor, poate fi folosită în translația a aproximativ 10 molecule de proteine per minut. Aceasta permite producția a mai mult de 10.000 de molecule proteice prin folosirea unei singure molecule de ARNm într-o generație celulară. Datorită acestei "amplificări", în genom este suficientă existența unei singure gene.

Procesul amplificării nu este însă posibil în cazul sintezei ARN-ului folosit în biogeneza ribozomilor deoarece aceste molecule de ARN sunt produsul final al transcripției genelor. De aceea, pentru a-și produce cantitățile adecvate de ARNr, genele din genomul celulelor eucariote care codifică ARNr, se află în copii multiple. Astfel, celulele umane conțin aproximativ 200 de copii de gene ARNr per genom haploid. Aceste copii sunt dispuse în mai multe serii, pe cinci din cei 23 de cromozomi. Din cauză că au un aranjament repetitiv și pentru că transcripția lor are loc cu o viteză foarte mare, genele ARNr dispuse în serie pot fi ușor evidențiate prin tehnicile de microscopie electronică. Pe o singură genă efectuează transcripția, în mod succesiv, până la 100 de ARN-polimeraze, ARN-ul transcris dispunându-se perpendicular pe molecula de ADN. Astfel, fiecare "unitate de transcripție" are aspectul unui brad, structură ușor de vizualizat.

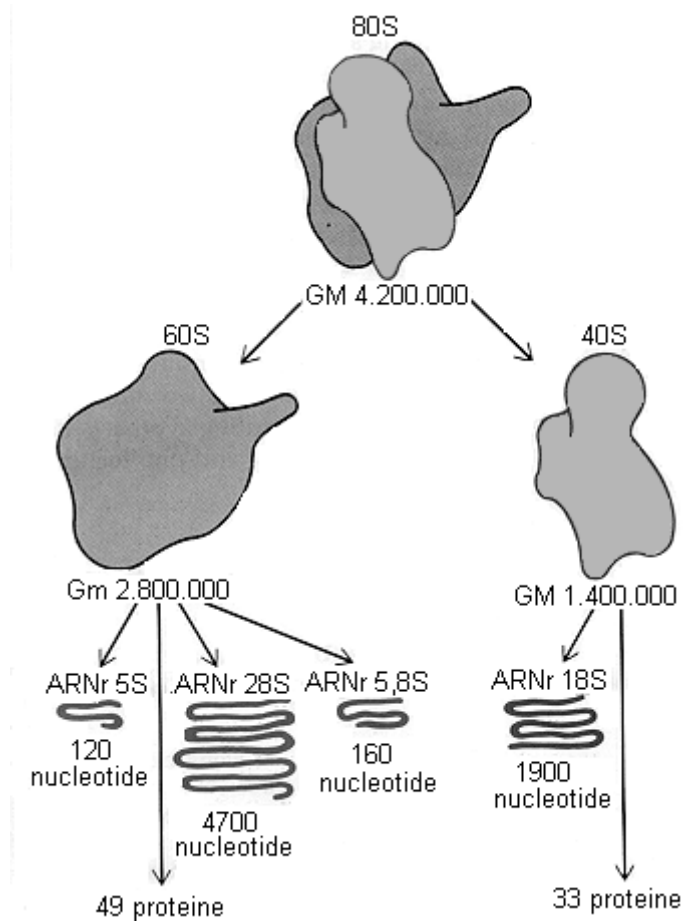
## Structura moleculară a ribozomilor

Pentru a înțelege mecanismul prin care are loc biogeneza ribozomilor, trebuie să trecem în revistă câteva aspecte legate de structura acestora.

Reacțiile sintezei proteice, pentru a se putea desfășura, au nevoie de un complex macromolecular care să le ghideze. Aceste complexe sunt formate din proteine și ARNr și se numesc **ribozomi**.

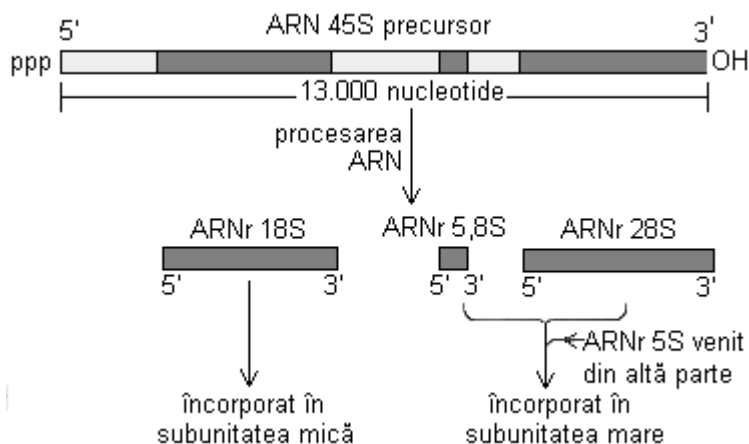
Ribozomii eucariotelor și procariotelor funcționează după aceleași principii, cu toate că între ei există unele diferențe structurale. La eucariote, ribozomii sunt mai mari decât la procariote. Ei sunt caracterizați după viteza de sedimentare (Svedberg) la care se izolează prin tehnicile de ultracentrifugare. Astfel, procariotele au ribozomi 70S, formați din două subunități, 50S și 30S, iar eucariotele au ribozomi 80S, formați din subunitatea mare 60S și respectiv subunitatea mică 40S (Figura 3-13).

Mai mult de jumătate din masa unui ribozom este reprezentată de ARNr și astăzi există tot mai multe dovezi că moleculele de ARNr ocupă un loc central în activitatea catalitică a ribozomilor. Prin tehnici de mare finețe a putut fi descifrată secvența în nucleotide a tuturor tipurilor de ARNr, iar structura lor tridimensională, care se formează ca urmare a împerecherilor de baze complementare, s-a dovedit că este extrem de importantă pentru exercitarea funcțiilor catalitice în sinteza proteinelor. La aceasta se adaugă și cele aproximativ 80 de molecule proteice care intră în structura unui ribozom eucariot.



**Figura 3-13** Reprezentare schematică a structurii unui ribozom 80S





**Figura 3-14** Procesarea moleculei de ARNr 45S cu formarea celor trei ARNr matur.

## Biogeneza ribozomilor

Genele ARNr sunt transcrise de **ARN-polimeraza I**. Fiecare genă produce același tip de ARN transcris primar. În celulele umane, acest ARN este **ARN 45S**. Înainte ca să părăsească nucleul sub formă de particule ribozomale asamblate, ARN 45S este clivat în cele trei molecule de ARNr matur, care intră în structura subunităților ribozomale: 18S, 28S și 5,8S (vezi Figura 3-13). Molecula de ARNr 45S conține și secvențe care nu vor intra în structura celor trei tipuri de ARNr matur. În timpul procesării, acestea vor fi degradate (Figura 3-14).

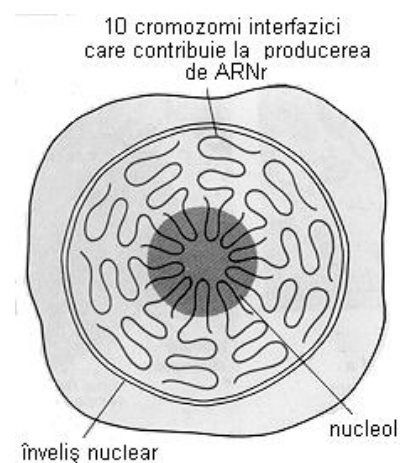
Genele pentru sinteza ARNr 45S nu conțin însă informația pentru a patra moleculă de ARNr care intră în structura ribozomilor eucarioți, și anume ARNr 5S din subunitatea mare. Genele pentru sinteza acestui ARNr sunt situate tot în serii repetitive (la om aproximativ 2000), în cu totul alte părți ale genomului. Aceste gene au o lungime de doar 120 nucleotide și, la fel ca și genele care codifică alte molecule mici de ARN din celulă (de exemplu, ARNt), sunt transcrise de ARN-polimeraza III. Nu se cunoaște motivul pentru care ARNr 5S este transcris separat.

## Rolul nucleolului în biogeneza ribozomilor

Transcripția neîntreruptă a genelor aflate în copii multiple, asigură aportul adecvat de ARNr care este imediat împachetat cu proteinele ribozomale pentru a forma ribozomii maturi. Împachetarea are loc în nucleu, într-o structură distinctă numită **nucleol**.

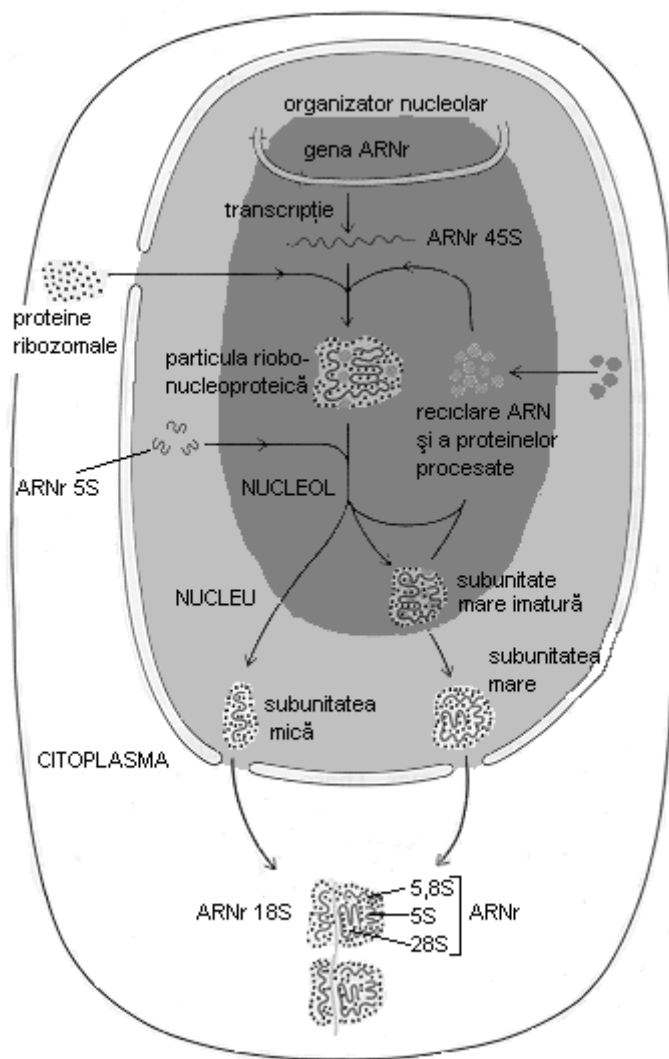
Nucleolul conține bucle mari de ADN care emană de la diferiți cromozomi, fiecare buclă conținând o serie de copii multiple de gene ARNr (Figura 3-15). Aici, genele ARNr sunt transcrise cu o viteză foarte rapidă de către ARN-polimeraza I.

Studiile experimentale au arătat că ARNr 45S este împachetat la început într-un complex mare care conține și o parte din proteinele ribozomale sintetizate în citoplasmă. În acest stadiu sunt asamblate peste 70 de diferite lanțuri polipeptidice cu ARNr 45S, precum și cu ARNr 5S,



**Figura 3-15** Reprezentare schematică a orientării în nucleol a buclor de ADN care conțin genele ARNr.

**Figura 3-16 Rolul nucleolului în biogeneza ribozomilor**



ultimul avându-și originea din altă zonă a nucleului. Toate aceste componente sunt asamblate în nucleol, de unde subunitățile ribozomale sunt exportate sub forma lor finită în citoplasmă (Figura 3-16). Asamblarea subunității mici, care conține ARNr 18S, durează 30 de minute, pe când asamblarea subunității mari, cu ARNr 28S, 5,8S și 5 S, durează aproximativ o oră. Ultima etapă a maturării ribozomilor are loc în citoplasmă.

# "Traducerea" informației din ARN într-o secvență de aminoacizi. Translația sau sinteza proteinelor

Proteinele constituie componentele active, "de lucru" ale "mecanismelor" celulare. Dacă ADN stochează informația necesară sintezei proteinelor, iar ARN transportă această informație, toate activitățile biologice sunt îndeplinite de proteine; sinteza lor se află în "inima" funcțiilor celulare.

Esențială pentru înțelegerea principiilor de bază după care are loc sinteza unei proteine specifice la eucariote, este următoarea succesiune de procese:

**Transcripția**, constă din copierea informației de pe ADN, într-o moleculă de ARN, și are loc în nucleu.

**ARN-procesarea**, constă din prelucrarea ARN transcris primar și are ca rezultat o moleculă de ARNm. Se desfășoară tot în nucleu.

**Transportul ARNm matur**, în citoplasmă, se face prin mecanisme încă puțin elucidate prin porii membranei nucleare.

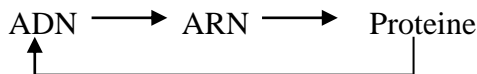
**Translația**, constă din "traducerea" informației din "limbajul" folosit de ARNm reprezentat de o succesiune de nucleotide, în "limbajul" unei proteine, reprezentat de o succesiune de aminoacizi. Acest proces are loc la nivelul ribozomilor, în citosol.

Deoarece funcțiile unei proteine sunt determinate de succesiunea de aminoacizi din structura sa, mecanismul care determină această succesiune pe tot timpul sintezei unei proteine, trebuie să fie foarte exact. Declanșarea procesului de sinteză a proteinelor presupune formarea în citoplasmă (locul unde se desfășoară sinteza) a unui agregat macromolecular de o complexitate foarte mare. Acesta este format din următoarele componente: un ribozom, care constituie suportul întregului complex, o moleculă de ARNm, care conține informația după care trebuie să se facă sinteza, molecule de ARNt, care poartă aminoacizii ce trebuie legați într-un peptid și respectiv, o serie de factori și enzime, care ghidează desfășurarea corectă a procesului.

În cele ce urmează, vom descrie sinteza proteinelor, prin explicarea în primul rând a codului genetic și a rolului ARNm ca purtător al informației codificate. Apoi vom descrie structura ARNt și vom arăta cum este tradus limbajul acizilor nucleici în limbajul proteinelor, iar în final, vom parcurge evenimentele care se desfășoară la nivelul ribozomilor, în cursul sintezei unei molecule proteice.

## Principiile generale ale sintezei proteinelor

Relația strânsă dintre sinteza ADN, ARN și a proteinelor (Figura 3-17), poate fi scrisă cu următoarea diagramă:



ADN direcționează sinteza ARN, iar ARN direcționează sinteza proteinelor; proteine speciale direcționează sinteza atât a ADN cât și a ARN. Această "curgere" ciclică a informației, care are loc în fiecare celulă, a fost denumită *dogma centrală a biologiei moleculare*. Toate cele trei categorii de molecule sunt polimeri. Sinteza lor se face după câteva principii generale comune.

*Proteinele și acizii nucleici sunt molecule formate dintr-un număr limitat de tipuri de subunități monomerice.* În structura proteinelor intră 20 de tipuri de aminoacizi, iar în structura acizilor nucleici intră 4 tipuri de nucleotide.

*În timpul sintezei, subunitățile se leagă una câte una, pentru a forma în final polimerul.* În principiu, polimerii biologici ar putea fi sintetizați prin alinierea prealabilă a subunităților într-o ordine corectă și apoi, legarea simultană a acestora. Dar în celulă procesul nu are loc în acest fel. Asamblarea proteinelor și a acizilor nucleici este un proces care se desfășoară "treaptă cu treaptă", într-o singură direcție chimică; sinteza proteinelor începe la capătul amino-terminal și se continuă spre capătul carboxil, iar sinteza acizilor nucleici începe la capătul 5' și se continuă spre capătul 3'.

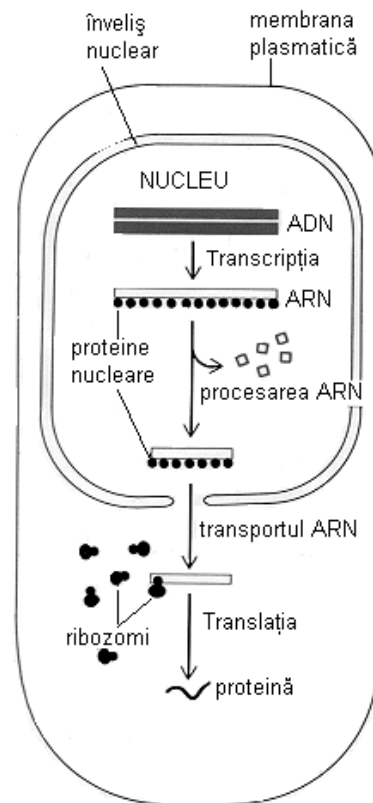
*Există un punct specific de pornire a sintezei, iar creșterea moleculei are loc într-o singură direcție, până la un punct terminus.* Aceasta presupune existența unui semnal *start* și a unui semnal *stop*.

*Produsul primar sintetizat este de obicei modificat.* Forma funcțională a unui acid nucleic sau a unei molecule proteice este foarte rar de aceeași lungime cu forma inițial sintetizată. Lanțul inițial este ori inactiv ori incopleț. Pentru a produce un lanț funcțional activ, există enzime specifice care acționează în sensul modificării lungimii lanțului original. Lanțurile proteice și de ARN sunt de obicei scurtate, iar lanțurile de ADN sunt legate între ele.

## Codul genetic de pe ARN mesager (ARNm)

Acizii nucleici sunt polimeri liniari care conțin patru tipuri de unități mononucleotidice. ARN conține ribonucleotide de **Adenină (A)**, **Citozină (C)**, **Guanină (G)** și **Uracil (U)**; ADN conține dezoxiribonucleotidele A, C, G și **Timină (T)**. Deoarece 4 nucleotide nu pot specifica aranjarea liniară a celor 20 de tipuri de aminoacizi după principiul un nucleotid-un aminoacid, codificarea unui aminoacid trebuie făcută de un grup de nucleotide; codul folosit trebuie să fie capabil să specifice cel puțin 20 de "cuvinte" (adică cei 20 de aminoacizi).

Dacă pentru codificarea unui aminoacid s-ar folosi câte două nucleotide, s-ar putea forma doar 16 "cuvinte" de cod ( $4^2$ ), deci și în acest



**Figura 3-17 "Dogma centrală a biologiei moleculare".** Principalele mecanisme implicate în sinteza proteinelor.

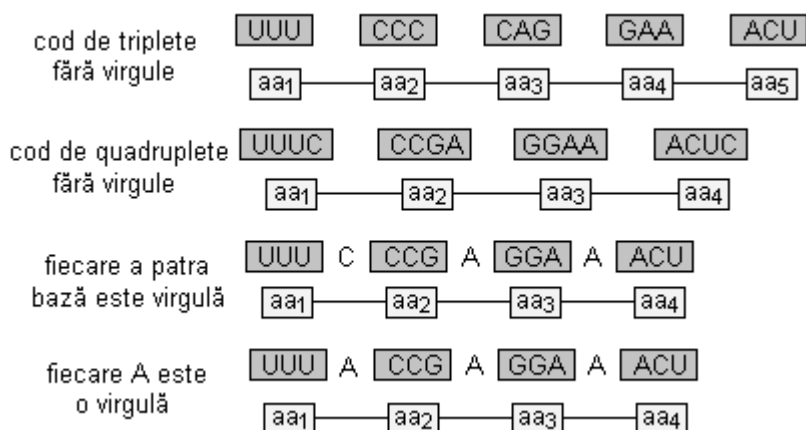


Figura 3-18. Secvența de baze din ARNm interpretată prin diferite sisteme de codificare ipotetice.

caz numărul ar fi insuficient. Dacă însă, se folosește un grup de trei nucleotide pentru codificarea unui aminoacid, se pot forma 64 de "cuvinte" ( $4^3$ ). Doar asemenea sisteme pot codifica cel puțin 20 de aminoacizi.

Folosirea a 3 nucleotide ca unitate de codificare face posibilă, din punct de vedere matematic, existența mai multor sisteme de codificare, inclusiv folosirea "semnelor de punctuație" (Figura 3-18). Dintre toate variantele posibile de codificare, prin folosirea tripletelor de baze celulele au adoptat sistemul fără semne de punctuație. Fiecare triplet a fost denumit codon; 61 din cei 64 de codoni posibili, specifică un anumit aminoacid. Semnificația fiecărui codon este aceeași la toate organismele cunoscute; acesta este un argument solid că viața are o origine comună pentru toate organismele. Deoarece există 61 de codoni pentru cei 20 de aminoacizi, un număr de aminoacizi au mai mult de un singur codon. De exemplu, serina, arginina și leucina, au fiecare câte 6 codoni. Codonii diferiți pentru un același aminoacid au fost denumiți *codoni sinonimi*, din această cauză codul genetic este considerat a fi un **cod degenerat**.

**Codonul start** (inițiatorul) este **AUG** și el specifică metionina; de aceea toate lanțurile proteice de la eucariote și procariote încep cu acest aminoacid. La începutul unor lanțuri proteice, metionina este codificată și de tripletul GUG, astfel că și acest codon este considerat ca fiind un codon start.

Alți trei codoni (**UAA**, **UGA**, și **UAG**), nu specifică nici un aminoacid, deci ei reprezintă **codoni stop**, care semnalizează sfârșitul informației pentru o proteină.

## Rolul ARNt

Nu s-a pus în evidență posibilitatea recunoașterii chimice directe dintre bazele acizilor nucleici și aminoacizii specifici. Aceasta înseamnă că tripletele de baze din ARNm nu pot selecta aminoacizii în mod direct. Pentru aceasta, sistemele celulare de sinteză proteică folosesc o categorie de *molecule adaptor*, reprezentate de **ARN de transport (ARNt)**.

Moleculile de ARNt au rolul de "traducători", deoarece ele produc translația informației codificate de un codon, într-un aminoacid. Aceasta este posibil, pe de o parte, pentru că ARNt conține *anticodonul* pentru un anumit aminoacid, iar pe de altă parte, pentru că se leagă specific de acest aminoacid.

Moleculile de ARNt sunt scurte (70-80 nucleotide) și au o conformație spațială particulară. Secvența de nucleotide la toate tipurile de ARNt (pentru toți aminoacizii) se termină la capătul 3' cu tripletul CCA. La adenozina terminală din acest triplet se leagă aminoacidul (Figura 3-19). La o buclă a moleculei de ARNt se află un triplet de baze care reprezintă anticodonul; cele trei baze ale acestuia se împerechează prin complementaritate cu codonul de pe ARNm, specific pentru aminoacidul pe care îl poartă legat.

### Aminoacil-ARNt-sintetazele

Cum poate o moleculă de ARNt să recunoască și deci să lege covalent aminoacidul specific pentru care poartă ea anticodonul? Acest lucru este realizat de către un set de 20 de enzime numite **aminoacil-ARNt-sintetaze**. Fiecare din aceste 20 de tipuri de enzime leagă unul din cei 20 de aminoacizi la ARNt corespunzător. În urma acestor reacții rezultă un **aminoacil-ARNt** (Figura 3-20).

Cu toate că moleculele de ARNt servesc ca adaptori finali pentru conversia secvențelor de nucleotide într-o secvență de aminoacizi, enzimele aminoacil-ARNt-sintetaze reprezintă adaptori de o importanță egală în procesul de decodificare.

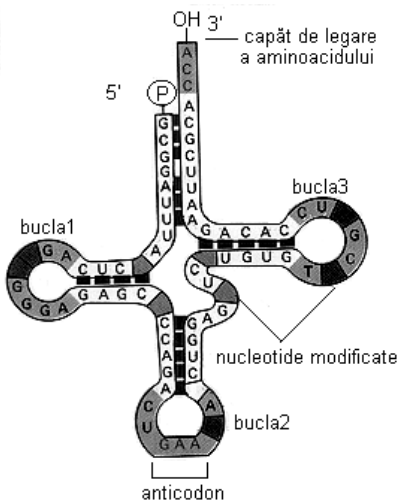
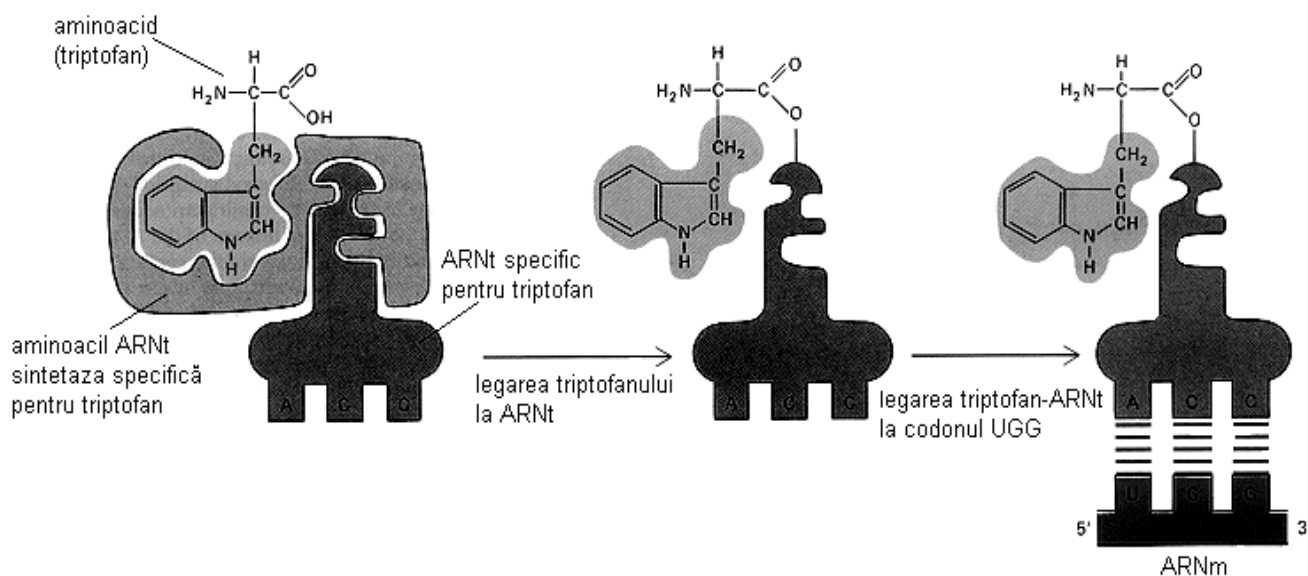


Figura 3-19. Structura unui ARNt tipic.

Figura 3-20. Reprezentare schematică a modului în care codul genetic este tradus cu ajutorul a 2 adaptori: Aminoacil-ARNt sintetaza și ARNt care se leaga la un codon corespunzător.



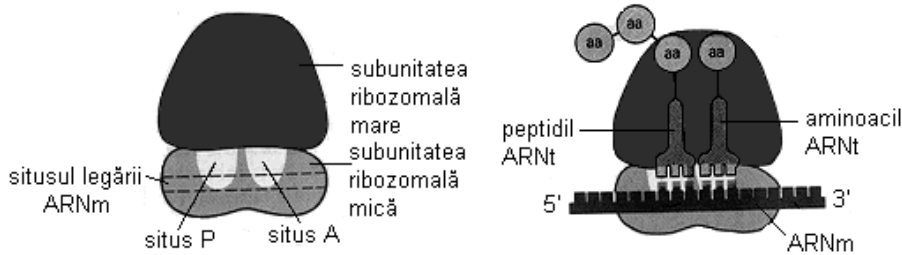


Figura 3-21. Cele trei situsuri specifice ale ribozomului și moleculele pe care le leagă.

## Inițierea sintezei proteinelor

Un ribozom, poate participa la procesul de sinteză al unui lanț polipeptidic pentru că conține pe suprafața sa trei situsuri specifice de legare a moleculelor de ARN (Figura 3-21).

**Situsul P**, numit și situs peptidil-ARNt, ține legată o moleculă de ARNt la care se află atașat lanțul polipeptidic în creștere. Acest ARNt este corespunzător ultimului codon citit.

**Situsul A**, numit și situs aminoacil-ARNt, ține legată o moleculă de ARNt care aduce următorul aminoacid ce urmează a fi atașat la lanțul polipeptidic, aminoacid corespunzător codonului care urmează a fi citit.

**Situsul de legare a ARNm**, situat pe subunitatea mică, asigură asocierea ARNm cu ribozomul în așa fel încât, doi codoni succesivi de pe molecula de ARNm să fie dispuși exact în dreptul situsurilor A și P.

Se consideră în general că sinteza proteinelor are loc în trei etape: **inițierea**, **elongația** și **terminația**. Fiecare din aceste trei etape implică desfășurarea unor procese biochimice distincte.

Înainte ca un ribozom să înceapă sinteza unui lanț polipeptidic, el trebuie să poată lega în situsul P un aminoacil-ARNt, cu toate că aici se leagă de obicei doar peptidil-ARNt. Pentru aceasta este necesară o moleculă specială de ARNt. Această moleculă, numită **ARNt-inițiator**, poartă aminoacidul corespunzător codonului start AUG (metionina). Acest ARNt inițiator se notează cu  $tRNA^{met}$  și este numit **metionil-ARNt-inițiator**.

La eucariote, molecula de ARNt-inițiator se leagă de subunitatea mică a ribozomului când ea se află încă liberă în citoplasmă, deci înainte de asocierea cu ARNm. La acest proces, precum și la cele care urmează, participă, cu rol de catalizatori, o categorie de proteine numite **factori de inițiere (IF)**. S-au descoperit până în prezent 6 asemenea factori și au fost notați cu IF<sub>1</sub>, IF<sub>2</sub>...IF<sub>6</sub>.

Într-o etapă ulterioară formării complexului ARNm + ARNt-inițiator + subunitatea ribozomală 40S (participă și o moleculă de GTP), complexul se poziționează în așa fel încât,  $tRNA^{met}$  se dispune împreună cu subunitatea mică ribozomală în dreptul situsului start (AUG) de pe ARNm (Figura 3-22). Procesul este facilitat de IF<sub>4</sub>. După ce IF<sub>4</sub> este eliberat, devine posibilă și legarea unei subunități ribozomale mari (60S).

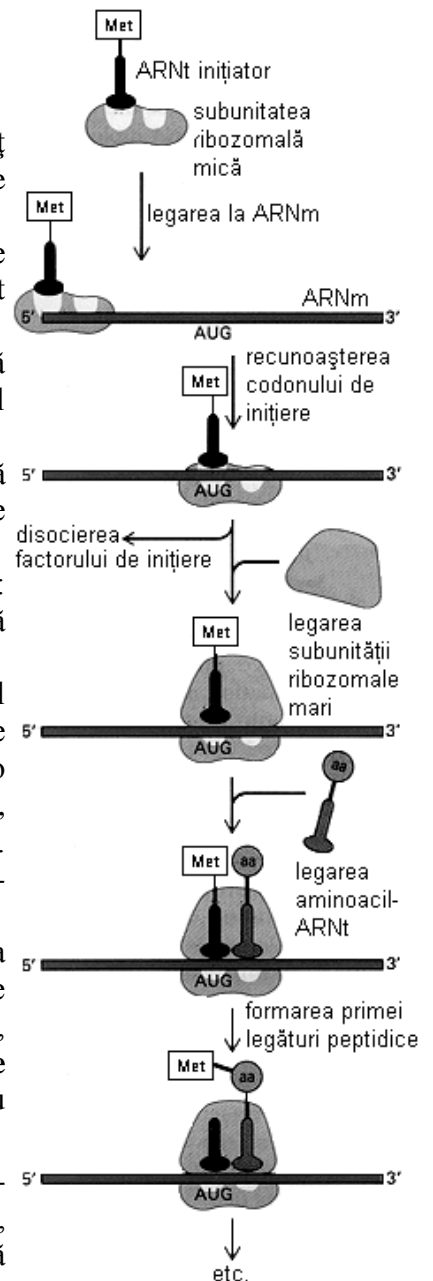


Figura 3-22 Etapa de inițiere a sintezei proteice

Pentru că molecula de ARNt-inițiator este legată în dreptul situsului ribozomal P, sinteza lanțului proteic poate începe prin legarea unui al doilea aminoacil-ARNt în situsul A al ribozomului.

## Elongația

Procesul elongației lanțului polipeptidic pe ribozom poate fi considerat ca un ciclu în care se succed trei etape (Figura 3-23).

1. În prima etapă, o moleculă de aminoacil-ARNt se leagă la situsul A vacant de pe ribozom (adiacent situsului P ocupat), prin formarea bazelor perechi dintre ARNt (anticodonul) și cele din codonul de pe ARNm expus aici.

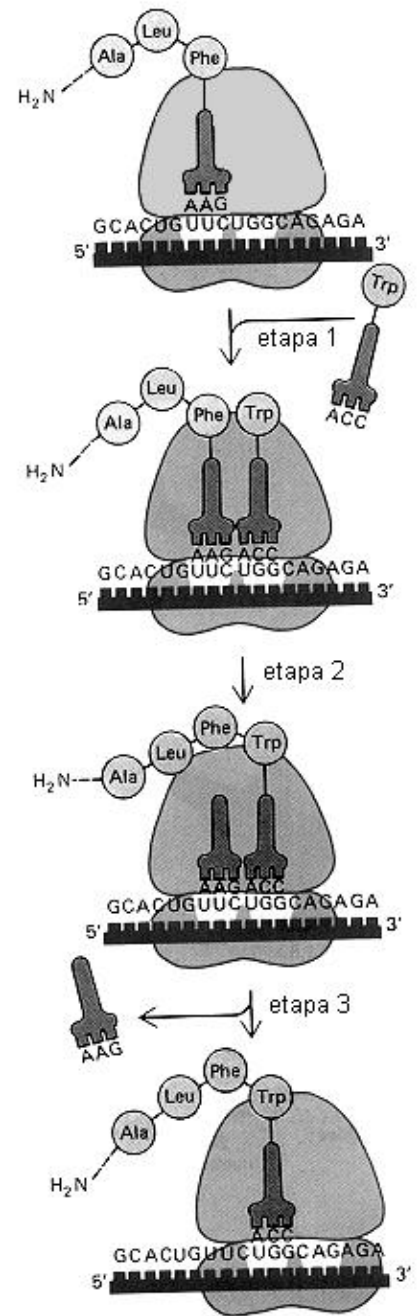
2. În etapa a doua, capătul carboxil (-COOH) al lanțului polipeptidic este decuplat de pe ARNt din situsul P și legat printr-o legătură peptidică la aminoacidul atașat la ARNt din situsul A. Această reacție este catalizată de enzima **peptidil-transferază**.

3. În etapa a treia, noul peptidil-ARNt, situat acum în situsul A, este translocat în situsul P prin mișcarea ribozomului exact cu trei nucleotide, înspre capătul 3' al ARNm. Această etapă necesită energie și are loc datorită unei serii de schimbări conformaționale ale componentelor ribozomale induse de hidroliza unui GTP. În momentul translocației, situsul P este eliberat prin pierderea din acest loc a ARNt rămas liber anterior acestei etape. În acest fel, ca urmare a translocației, situsul A rămâne liber, legând un nou aminoacil-ARNt și anume, pe cel corespunzător codonului expus aici.

## Terminarea sintezei unei molecule proteice

Trei din cei 64 de codoni ai ARNm (UAA, UAG și UGA), sunt codoni stop, ei semnalizând terminarea procesului de translație. La acești codoni se leagă o categorie de proteine citoplasmatiche numite **factori de terminație (TF)**. Aceasta se întâmplă în momentul în care codonul stop ajunge să fie expus în situsul A al ribozomului. Această legare alterează activitatea enzimatică a peptidil-transferazei, astfel că aceasta determină adăugarea la polipeptidul din situsul P a unei molecule de apă în locul unui aminoacid. Reacția face ca polipeptidul să se elibereze, deci are loc încheierea sintezei sale (Figura 3-24). Consecutiv, ribozomul eliberează ARNm și se disociază în cele două subunități.

Sinteza completă a unei proteine cu molecula de mărime medie, durează 20-60 secunde.



**Figura 3-23** Etapa de elongație a sintezei proteice. Ciclul format din cele trei etape se repetă până se termină citirea informației.



Un mare număr de inhibitori ai sintezei proteinelor la organismele procariote (bacterii) sunt folosiți ca **antibiotice**. Datorită diferențelor structurale dintre ribozomii procarioți și eucarioți, aceste substanțe pot interacționa specific numai cu ribozomii procariotelor. Această selectivitate permite utilizarea lor în tratamentul bolilor bacteriene, pentru că nu manifestă toxicitate pentru celulele umane.

**Antibiotice care acționează numai asupra procariotelor:**

*Tetraciclina* blochează legarea aminoacil-ARNt la situsul A al ribozomului. *Streptomicina* blochează trecerea din faza de inițiere în cea de elongație. *Cloramfenicolul* inhibă peptidil-transferaza.

*Eritromicina* blochează reacția de translație pe ribozomi.

*Rifamicina* blochează sinteza de ARN prin inhibarea ARN-polimerazei.

**Antibiotice care acționează asupra procariotelor și eucariotelor:**

*Puromicina* eliberează polipeptidul înaintea terminației.

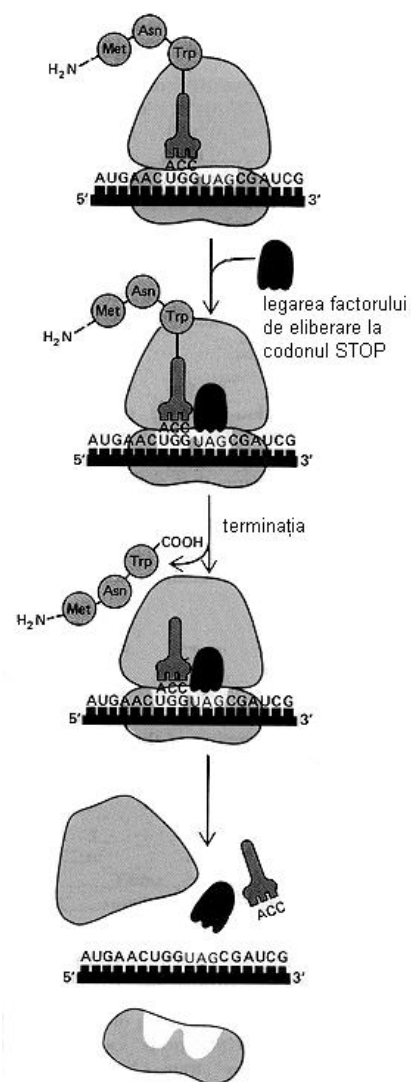
*Actinomicina D* blochează sinteza ARN prin inhibarea ARN-polimerazei.

**Antibiotice care acționează numai asupra eucariotelor:**

*Cicloheximida* blochează reacția de translație pe ribozomi.

*Anisomicina* inhibă activitatea peptidil-transferazei.

*α-Amanitina* blochează sinteza ARN prin inhibarea ARN-polimerazei II.



**Figura 3-24** Faza finală a sintezei proteice (terminația).

# Replicația ADN

Înainte ca o celulă să se dividă, ea trebuie să-și producă o nouă copie a fiecărui cromozom. Astfel, diviziunea celulară este precedată de o fază specială a ciclului vieții celulare, numită **faza S**, în care fiecare celulă trebuie să-și sintetizeze o copie de ADN. Într-o celulă eucariotă tipică, faza S durează aproximativ 8 ore. La sfârșitul ei, din fiecare cromozom rezultă doi cromozomi perfect identici cu cel de origine și care vor rămâne legați între ei prin intermediul centromerului până în metafaza mitozei. Duplicarea cromozomilor implică atât replicarea moleculei lungi de ADN a fiecăruia, cât și asamblarea la ADN-ul nou format a noi proteine cromozomiale, ceea ce duce la formarea cromatinei.

Procesul de copiere fidelă a succesiunii de nucleotide din moleculele de ADN, deci a informației genetice, în scopul transmiterii acesteia de-a lungul generațiilor celulare, se numește **replicația ADN**. Procesul, de fapt o reacție de polimerizare, are loc cu o rată de 500 nucleotide/secundă la bacterii și de 50 nucleotide/secundă la celulele de mamifere. Enzimele de replicație trebuie să fie foarte exacte și rapide. Viteza și acuratețea sunt asigurate de o "mașină replicativă" complexă, reprezentată de un complex multienzimatic.

## Fidelitatea replicației ADN

Copierea ADN ("DNA templating"; templet = șablon) este un proces prin care secvența de nucleotide a ADN-ului (sau a unei secvențe de ADN) este duplicată prin împerecherea complementară de baze (A cu T sau U, și G cu C), într-o secvență nucleotidică complementară (de ADN sau de ARN). Procesul presupune recunoașterea fiecărui nucleotid și implică în mod obligatoriu separarea tranzitorie a celor două lanțuri complementare ale dublului helix de ADN, astfel că grupările acceptoare și donoare ale fiecărei legături de hidrogen ale bazelor azotate să apară expuse pentru împerechere. Procesul este catalizat de o enzimă de polimerizare a nucleotidelor, descoperită în 1957, care a fost denumită **ADN-polimeraza**. Substratul acestei enzime îl constituie dezoxiribonucleotid-trifosfații, ei fiind polimerizați într-un singur lanț polinucleotidic pe baza modelului unei catene care are rol de matriță. Etapele acestui mecanism sunt reprezentate în Figura 3-25.

ADN-polimeraza catalizează adăugarea "treaptă cu treaptă" a dezoxiribonucleotidelor, la capătul 3'-OH al unui lanț polinucleotidic preexistent (lanțul *primer*) care se află împerecheat la lanțul matriță. Astfel lanțul nou sintetizat crește în direcția 5'→3'. Deoarece fiecare nucleotid care vine să se adauge la catena în sinteză, trebuie să se împerecheze cu nucleotidul de pe lanțul matriță, acesta din urmă determină care din cei 4 nucleotidtrifosfați să intre în reacție.

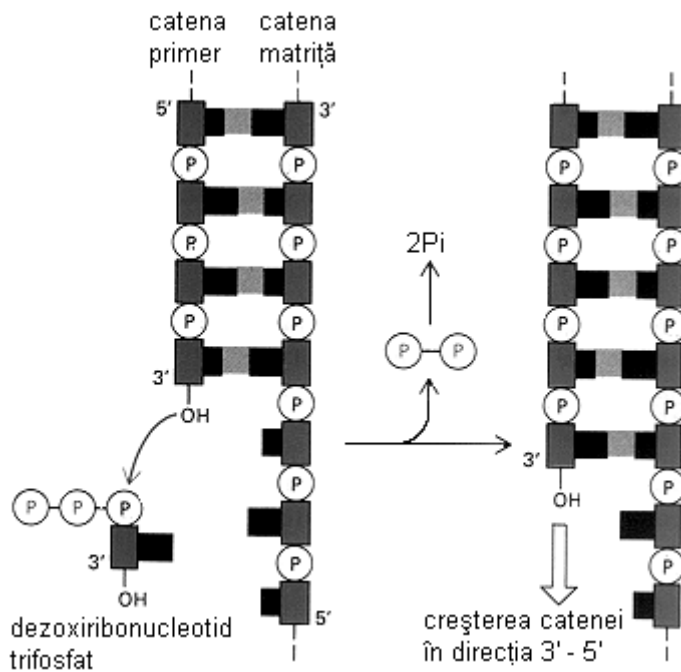


Figura 3-25 Reacția catalizată de ADN-polimerază.

În timpul replicației, fiecare catenă veche de ADN servește ca matrită pentru sinteza unei catene noi. Astfel, secvența ADN de o lungime enormă este replicată "semiconservativ" de către ADN-polimerază. Fiecare din cele două celule fiice rezultate din diviziune moștenește astfel, un dublu helix de ADN care conține o catenă veche și una nouă.

## "Furca replicativă"

Cercetările din anii '60 au evidențiat că regiunile aflate în replicare se mișcă de-a lungul helixului de ADN parental. Deoarece o asemenea regiune are o formă de Y, ea a fost denumită "**furca replicativă**". La nivelul furcii replicative, helixul ambelor molecule noi de ADN este sintetizat de un complex enzimatic complex care conține și ADN-polimeraza.

Inițial s-a crezut că mecanismul replicării ADN decurge simplu, prin creșterea ambelor lanțuri la nivelul furcii replicative, prin adăugarea nucleotid cu nucleotid, pe măsură ce furca replicativă se desface de la un capăt la celălalt (Figura 3-26). Dar din cauza orientării antiparalele a celor două lanțuri de ADN, acest mecanism ar presupune ca un lanț nou să crească în direcția 5'→3', iar celălalt în direcția 3'→5'. În acest caz, furca replicativă ar avea nevoie de două ADN-polimeraze diferite, una care să poată polimeriza în direcția 5'→3' și una care să polimerizeze lanțul în formare, în direcția 3'→5'. Nu s-a evidențiat însă existența vreunei ADN-polimeraze care să poată determina creșterea unui lanț polinucleotidic în direcția 3'→5' și care să adauge astfel fiecare nou nucleotid la capătul 5'-ppp al unui lanț în creștere (vezi Figura 3-26).

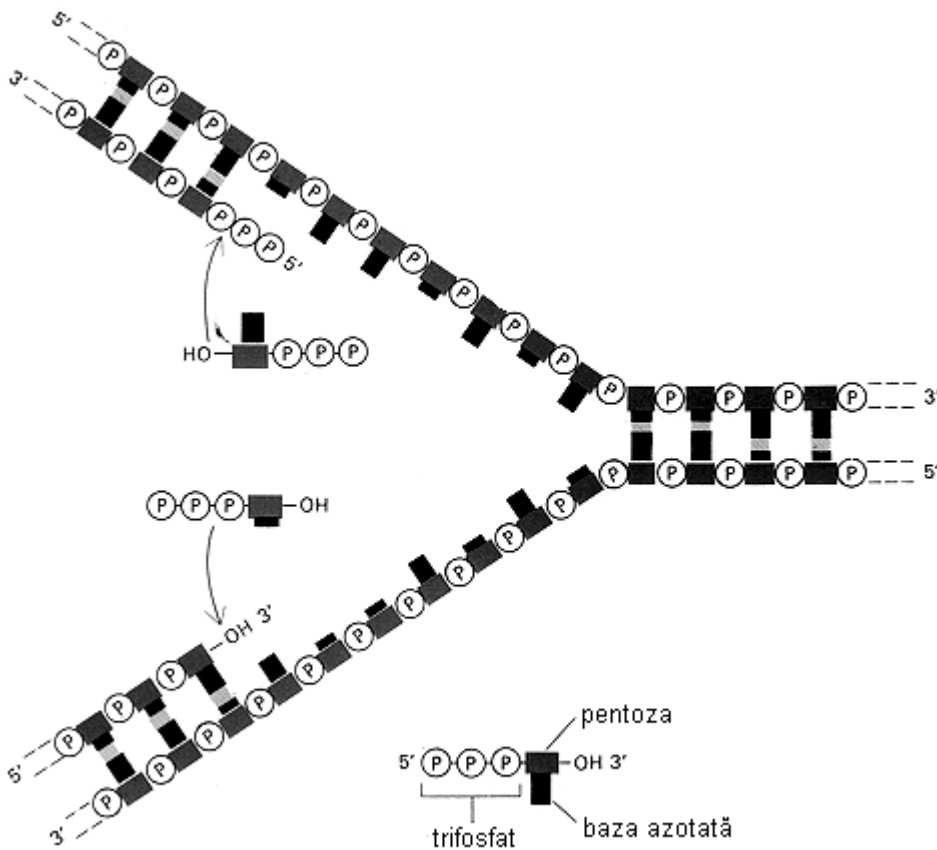


Figura 3-26 Deși mai simplu, mecanismul de alături, de creștere continuă a ambelor lanțuri ale ADN, în aceeași direcție, nu este utilizat de către celule.

Cum se face deci sinteza ADN în direcția 3'→5'? Răspunsul a fost prima dată sugerat la sfârșitul anilor '60 de rezultatele unor experimente în care s-a adăugat pentru câteva secunde, în mediul de creștere al unor bacterii în diviziune,  $^3\text{H}$ -timidina puternic radioactivă. Astfel, a devenit radioactiv doar ADN-ul recent sintetizat, strict de la nivelul furcii replicative. Această metodă selectivă de marcarea a evidențiat apariția temporară la nivelul furcii replicative a unor fragmente scurte de ADN, de 1000-2000 de nucleotide, cunoscute astăzi cu numele de *fragmente Okazaki*. Ulterior asemenea fragmente au fost evidențiate și la eucariote, ele fiind însă mult mai scurte, de 100-200 nucleotide. Fragmentele Okazaki sunt sintetizate doar în direcția 5'→3' și, după ce sinteza lor se încheie, ele sunt legate de către o enzimă numită *ADN-ligaza*, pentru a forma lanțul lung de ADN.

Furca replicativă are deci o structură asimetrică (Figura 3-27). Lanțul nou de ADN care este sintetizat continuu, fără întreruperi, se numește **lanțul prioritar** ("leading strand"), deoarece sinteza sa precede sinteza discontinuă a celuilalt lanț, numit **lanț tardiv** (întârziat) ("lagging strand"). Sinteza lanțului tardiv rămâne în urma sintezei lanțului prioritar deoarece fragmentele Okazaki se pot polimeriza doar după ce furca replicativă s-a desfășurat cu un număr de nucleotide egal cu lungimea acestor fragmente; de notat că sinteza fragmentelor Okazaki se face în sens invers sintezei lanțului prioritar, însă tot în direcția 5'→3', de aceea

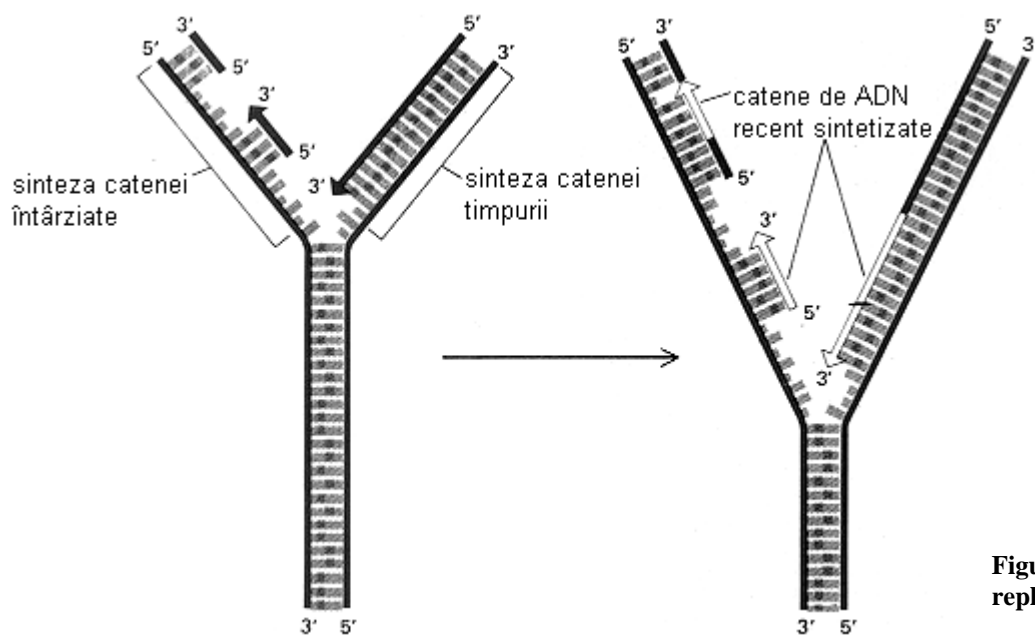


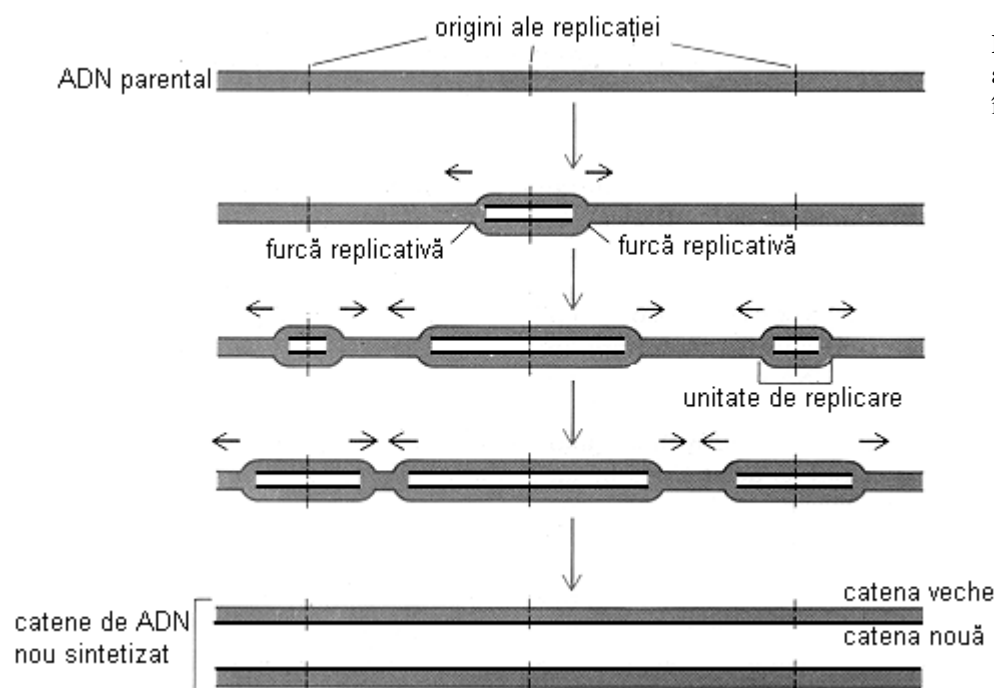
Figura 3-27 Structura "furcii" replicative. Explicațiile în text.

pentru replicarea ADN nu este necesară decât intervenția unui singur tip de ADN-polimerază.

## Inițierea replicării

La bacterii, furca replicativă este inițiată la nivelul unor secvențe speciale de ADN numite *origini de replicare*. La aceste celule se formează două furci replicative care apoi înaintază spre direcții opuse, mișcându-se cu o viteză de 500 nucleotide pe secundă, până ce este parcurs tot cromozomul circular al bacteriei. Genomul bacterian este atât de mic încât, aceste două furci replicative termină replicarea în 40 de minute.

Se estimează că un cromozom uman este format dintr-o singură moleculă de ADN care conține aproximativ 150 milioane de nucleotide perechi. Pentru a se asigura replicarea de la un capăt la altul a unei asemenea molecule, cu o singură furcă replicativă care se mișcă cu o viteză de 50 nucleotide/secundă, ar fi necesare 800 de ore! Conform acestor estimări, pe cromozomii eucarioți este necesară existența mai multor origini de replicare, fapt demonstrat experimental. S-a evidențiat existența mai multor furci replicative pe un cromozom eucariot, care se mișcă simultan. Furcile replicative funcționează însă grupat, la un moment dat putându-se evidenția pe un cromozom existența mai multor furci care funcționează, pe când alte regiuni sunt în repaus. Astfel originile de replicare sunt activate grupat, câte 20-80 de origini. Aceste grupuri de origini de replicare care sunt activate simultan, se numesc **unități replicative**. În timpul fazei S a ciclului celular, după ce o unitate replicativă și-a terminat activitatea, este activată următoarea, până ce a



**Figura 3-28 Modelul de replicare a ADN la eucariote.** Explicațiile în text.

fost replicat tot ADN-ul. În interiorul unei unități replicative, fiecare origine de replicare este separată de cealaltă printr-un spațiu de 30.000-300.000 de nucleotide. La fiecare origine de replicare se formează câte două furci de replicare care se mișcă în direcții opuse (ca și la bacterii), până ce se întâlnesc cu furca de replicare a originii de replicare învecinate care vine din direcție opusă (Figura 3-28).

## Corectarea erorilor de replicare

Pentru menținerea nealterată a unui genom eucariot de  $3 \times 10^9$  perechi de baze, fidelitatea copierii ADN în cursul replicării trebuie să fie atât de înaltă încât să nu se facă mai mult de o eroare la fiecare  $10^9$  perechi de baze. Ținându-se seama însă de faptul că complementaritatea celor patru baze care formează ADN nu este singura posibilă, gradul acesta înalt de fidelitate nu poate fi explicat. Cele patru baze azotate ale ADN prezintă forme tautomerice rare, care, totuși, apar tranzitoriu în genomul normal într-o rată de  $1/10^4$  sau  $1/10^5$ . Formele tautomerice se pot împerechea greșit; de exemplu, forma tautomerică a C se împerechează cu A în loc de G, ceea ce poate cauza o mutație. Astăzi este demonstrat că înalta fidelitate a replicăției ADN este determinată de o serie de "mecanisme de corecție" care înlătură erorile.

Unul din cele mai importante mecanisme de corecție este determinat de proprietățile speciale ale ADN-polimerazei. Spre deosebire de ARN-polimeraze, ADN-polimeraza nu poate începe sinteza unui polinucleotid de la legarea a două nucleotide laolaltă (primele două din lanț). Ea are nevoie necondiționat de un capăt 3'-OH liber al unui lanț în

creștere la care ultimul nucleotid care oferă capătul 3'-OH este împerecheat cu nucleotidul complementar de pe lanțul matriță. Acest lanț se numește lanț *primer*, la el adăugându-se următorul nucleotid (vezi Figura 3-25). Molecula de ADN cu ultimul nucleotid de pe lanțul primer (3'-OH) adăugat greșit (neîmperecheat) nu poate reprezenta capăt de continuare a sintezei (Figura 3-29). ADN-polimeraza este capabilă să evite asemenea împerecheri greșite datorită existenței în molecula sa unei subunități catalitice care "taie" baza greșit adăugată adică pe cea care nu este împerecheată cu baza complementară de pe lanțul matriță. Cu alte cuvinte are o activitate 3'→5' *exonucleazică*.

## Replicarea pe lanțul "tardiv"

Pentru sinteza lanțului prioritar, ADN-polimeraza are nevoie, pentru a începe sinteza acestuia, de o moleculă primer specială care să-i ofere un capăt 3'-OH liber. După ce acest primer a fost sintetizat, polymeraza înaintează pe măsură ce se desface furca replicativă, sintetizând continuu lanțul prioritar. Funcționarea ADN-polimerazei de pe lanțul tardiv este însă mai complicată. Deoarece funcționarea sa se desfășoară în sens invers față de sensul de înaintare al furcii replicative, ea are nevoie din timp în timp, pe măsură ce furca se desface, de câte un capăt 3'-OH nou. Sinteza se face în salturi, la fiecare salt fiind necesar un nou primer. Primerii însă nu sunt reprezentați de fragmente de ADN deoarece ADN-polimerazele nu pot începe o polimerizare de la zero (vezi mai sus). Producerea primerilor este realizată de o enzimă numită *ARN-primaza*, care utilizează ribonucleotide trifosforice pentru a produce primeri ARN. Acești primeri, lungi de 10 nucleotide se sintetizează la intervale regulate pe lanțul tardiv și, după ce au fost sintetizați, ei constituie punctul de plecare al alungirii acestuia, respectiv a câte unui fragment Okazaki (Figura 3-30). Sinteza fiecărui fragment Okazaki se termină în momentul în care ADN-polimeraza întâlnește capătul 5' al primerului ARN din fragmentul anterior, deja sintetizat. Pentru producerea unei molecule de ADN continuu din aceste fragmente de ADN, între care se află intercalate și fragmente de ARN primer, intervine un sistem de reparare special. Acest sistem enzimatic rupe fragmentele de ARN primer (RNază) și în spațiile rămase goale completează molecula de ADN nou sintetizată (vezi Figura 3-30). După ce completarea s-a realizat, intervine o ADN-ligază care sudează capetele fragmentelor Okazaki.

## Proteinele de la nivelul furcii replicative

În condiții normale, dublul helix de ADN este foarte stabil; pentru desfacerea experimentală a celor două catene, moleculele de ADN trebuie încălzite la 90°C. ADN-polimeraza poate copia însă succesiunea de nucleotide din fiecare catenă a ADN doar dacă cele două

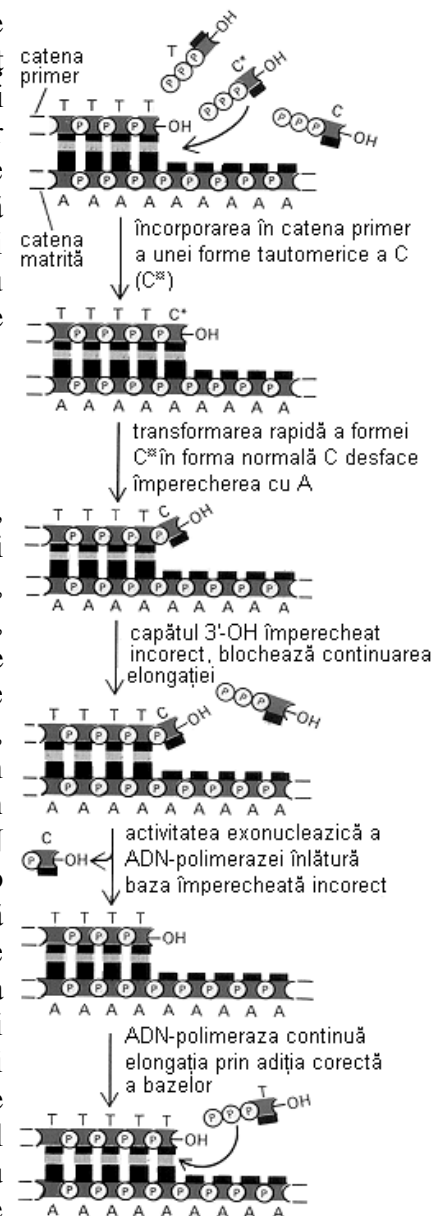


Figura 3-29 Mecanismul unui proces de corecție a replicăției exercitat de ADN-polimerază.

catene matriță sunt desfăcute. Această desfăcere este realizată de proteine speciale. Ele sunt de două tipuri.

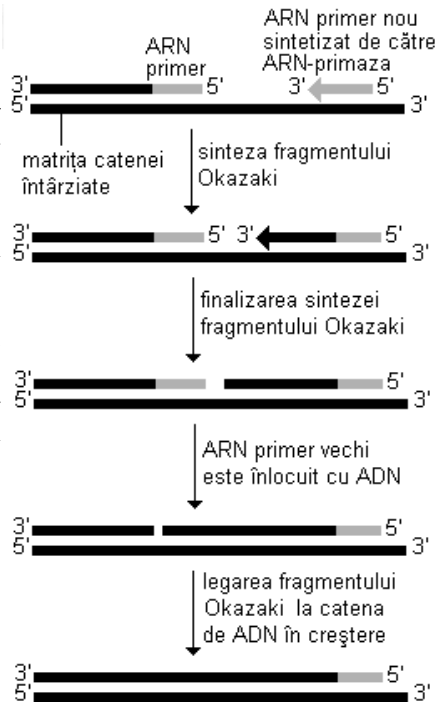
**ADN-helicaza**, hidrolizează ATP pentru a se mișca rapid de-a lungul unei monocatene de ADN. Când, în această mișcare enzima întâlnește o regiune dublu catenară, ea își continuă deplasarea pe catena sa, desfăcând în același timp dublul helix (Figura 3-31). La nivelul furcii replicative funcționează două ADN-helicaze, una mișcându-se pe lanțul primordial, iar cealaltă pe lanțul tardiv.

**Proteinele helix-destabilizatoare**, numite și proteine SSB ("single-strand DNA-binding proteins"), se leagă la catenele de ADN desfăcute din helix, fără a acoperi bazele. Ele stabilizează forma desfășurată a monocatanelor, prevenind astfel împerecherea bazelor din aceeași catenă (Figura 3-32).

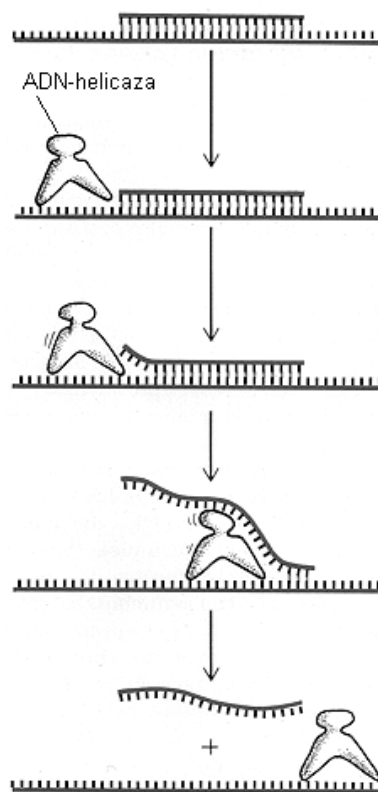
Deși au fost descrise mai sus în mod separat, toate proteinele care intervin în mecanismul de replicare formează un complex multienzimatic care se mișcă rapid de-a lungul ADN. Funcțiile subunităților acestei "mașini replicative" sunt reprezentate bidimensional în diagrama din Figura 3-33.

La nivelul furcii replicative funcționează două molecule de ADN-polimeraze identice, una pe lanțul primordial și alta pe lanțul tardiv. Concomitent, helixul de ADN este deschis de către ADN-polimeraza de pe lanțul primordial care acționează în același sens cu ADN-helicaza de pe lanțul întârziat; acest proces este facilitat de legarea cooperativă a proteinelor helix-destabilizatoare. Dacă ADN polimeraza de pe lanțul primordial sintetizează noua catenă în mod continuu, ADN-polimeraza de pe lanțul întârziat își întrerupe activitatea din interval în interval pentru a reîncepe sinteza la fiecare ARN primer, sintetizat de către ARN-primază. Eficiența replicării este mult crescută datorită asocierii strânse a tuturor acestor componente. În urma acestei replicări rezultă pe lanțul întârziat o serie de fragmente Okazaki, despărțite de segmente de ARN primer. Aceste fragmente de ARN sunt excizate de către enzime de reparație, iar legarea fragmentelor este asigurată de ADN-ligază.

Alături de aceste proteine, în replicare mai intervin ADN-topoizomerazele, care evită "încălcirea" dublu-helixului de ADN în timpul despiralizării sale. Prin desfăcerea rapidă a dublului helix de ADN ca urmare a înaintării unei furci replicative, moleculele dublu catenare de ADN ar trebui să se rotească pentru a împiedica formarea de bucle și de a slăbi tensiunea care se creează în moleculă (Figura 3-34). ADN-topoizomerazele funcționează ca "nucleaze reversibile", ele determinând ruperea dublei catene de ADN "în amonte" de furca replicativă, slăbirea astfel a tensiunii care s-a creat în moleculă, și apoi legarea la loc a capetelor libere.

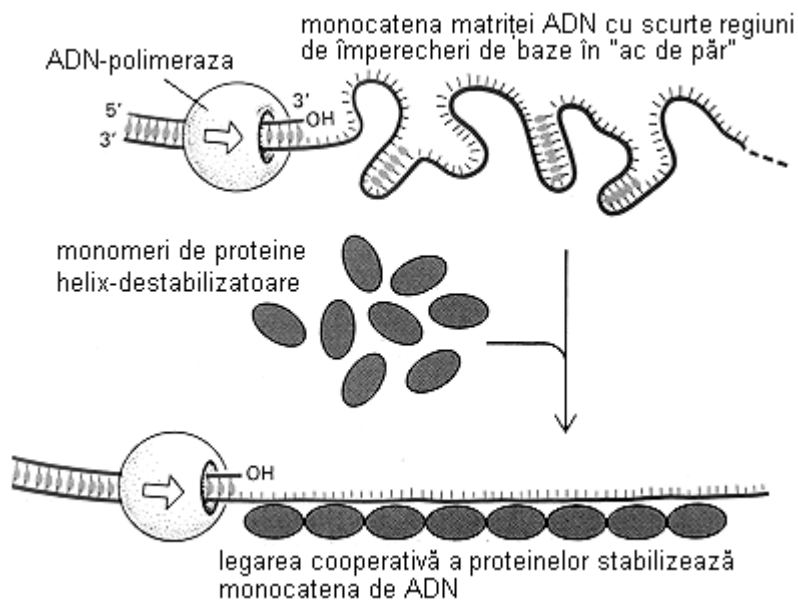


**Figura 3-30** Etapele sintezei lanțului tardiv de ADN.



**Figura 3-31** Principiul de funcționare al ADN-helicazei.

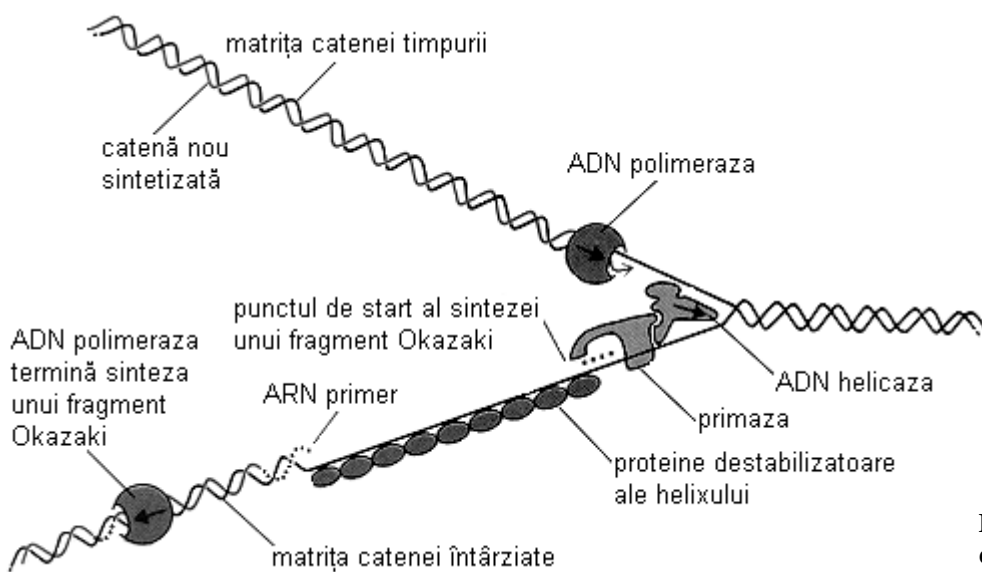




**Figura 3-32** Efectul proteinelor SSB asupra structurii regiunilor monocatenare ale ADN.

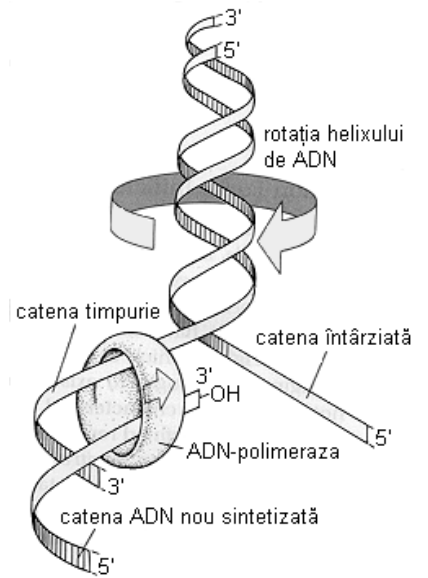
## Asamblarea histonelor pe parcursul procesului de replicare

Mecanismele de bază ale replicării ADN la eucariote, la care acesta este organizat în cromatina nucleară, sunt identice cu cele de la procariote, incluzând și geometria furcii replicative și utilizarea primerilor de ARN. Diferența majoră la eucariote constă din faptul că ADN-ul acestora este replicat în starea sa structurată sub formă de cromatină, deci complexat cu proteinele histonice. Fragmentele Okazaki de la eucariote sunt mult mai scurte (100-200 nucleotide) decât cele de la procariote (1000-2000 nucleotide), aceasta explicându-se probabil prin

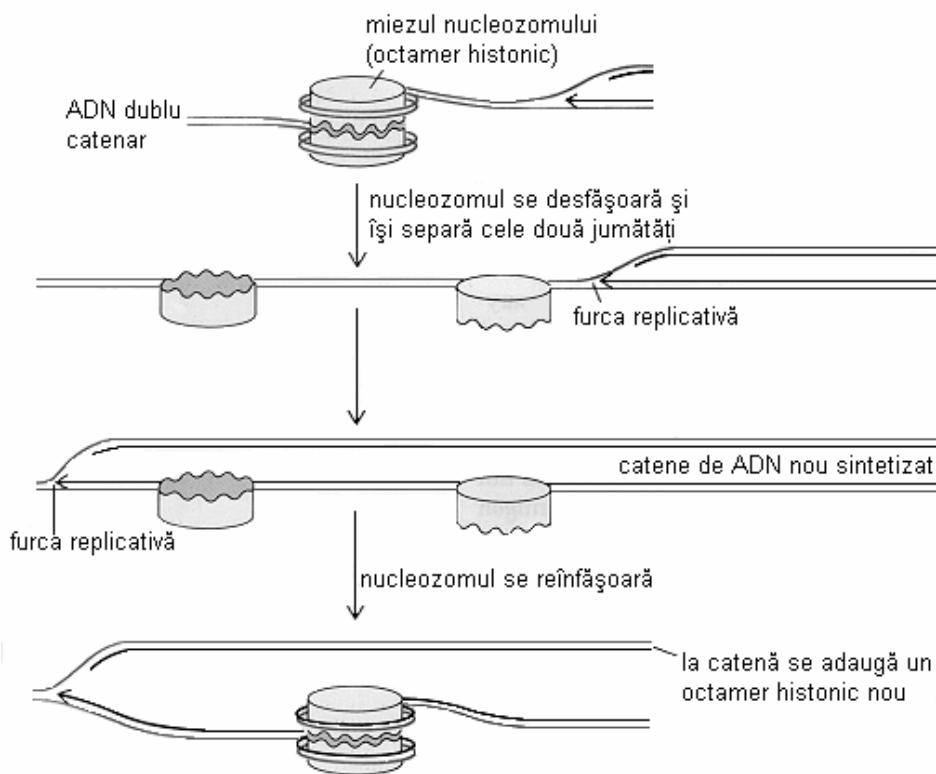


**Figura 3-33** Tipurile principale de proteine care funcționează la nivelul furcii replicative.

faptul că distanța dintre doi nucleozomi este de aproximativ 200 nucleotide. Este posibil ca nucleozomii să acționeze ca barieră pentru mișcarea ADN- polimerazei, ceea ce explică și viteza de 10 ori mai mică a replicării la eucariote față de procariote. Pentru formarea unei noi cromatine nucleare în fiecare ciclu celular, este necesară o mare cantitate de proteine histonice. De aceea, majoritatea organismelor posedă copii multiple ale fiecărei gene histonice. Spre deosebire de alte proteine, histonele sunt sintetizate aproape exclusiv în faza S a ciclului celular. Odată legate la ADN, moleculele histonice asamblate în nucleozomi părăsesc foarte rar molecula de ADN la care sunt legate. În timp ce furca replicativă avansează, ea trebuie cumva să depășească obstacolul reprezentat de nucleozomi deoarece aceștia nu se desfac de pe ADN în timpul replicării. O ipoteză care încearcă să explice aceasta, presupune că fiecare nucleozom se desface în doi "semi-nucleozomi", în momentul când furca replicativă ajunge la nivelul lui, permițând astfel ADN-polimerazei să copieze lanțul desfăcut (Figura 3-35). Odată ce s-au format cele două molecule de ADN, histonele vechi rămân la una din molecule, iar la cealaltă moleculă se asociază cu histone noi imediat după ce furca replicativă a depășit această zonă.



**Figura 3-34 Problema "încălcirii" care apare în molecula de ADN în timpul înaintării furcii replicative.**



**Figura 3-35 Modelul ipotetic prin care se presupune că ar avea loc replicarea pe ADN-ul eucariot organizat în cromatina nucleară.**