

4 FUNCȚIILE MATERIALULUI GENETIC

4.1 REPLICAREA ADN

Replicarea ADN reprezintă transmiterea fidelă a informației genetice la celulele fiice, în urma diviziunii celulare. Replicarea este una dintre cele două funcții esențiale ale materialului genetic. Mai mult decât atât, replicarea ADN este procesul de bază al continuității vieții pe Pământ.

4.1.1 Principalele etape ale replicării ADN

Ca și alte procese din biologia moleculară, și procesul de replicare se desfășoară în 3 etape – inițierea, elongarea și terminarea :

- **Inițierea** implică recunoașterea regiunii de pe o moleculă ADN unde va începe procesul de replicare
- **Elongarea** cuprinde evenimentele ce se desfășoară la o bifurcație de replicare, unde catenele parentale sunt copiate în catene fiice
- **Terminarea** este o etapă destul de puțin cunoscută și se desfășoară atunci când molecula parentală a fost complet replicată

Etapele chimice ale replicării ADN

Din punct de vedere chimic, replicarea ADN presupune următoarele etape principale:

- desfacerea inițială a dublului helix într-o zonă denumită regiune de origine a replicării
- sinteza unor fragmente de ARN m.c. scurt ce oferă capătul 3'-OH liber pentru sinteza primelor legături fosfo-diesterice; aceste fragmente poartă numele de **primeri** și sunt sintetizate de ARN polimeraze speciale denumite *primaze*
- în bucla de ADN desfăcut procesul de replicare se va desfășura în ambele direcții, formându-se deci 2 bifurcații de replicare
- în fața fiecărei bifurcații de replicare dublul helix va fi desfăcut prin intervenția *topoizomerazelor* (care derăsucesc dublul helix) și a *helicazelor* (care desfac legăturile de hidrogen dintre cele 2 catene); astfel, bucla de replicare se va lărgi în fiecare din cele 2 capete
- fiecare din cele 2 catene ale helixului parental va servi drept matriță pentru sinteza unei catene noi
- sinteza catenelor noi se realizează de către enzime numite **ADN polimeraze**, pe bază de complementaritate cu catena veche folosită ca matriță; nucleotidele sunt legate între ele prin formarea de legături fosfo-diesterice; alungirea catenei noi se realizează în direcție 5' – 3'
- datorită faptului că ADN polimerazele nu pot sintetiza o catenă nouă decât în direcție 5' – 3', la fiecare bifurcație de replicare, sinteza celor 2 catene noi are loc oarecum diferit :
- una din catenele noi este sintetizată continuu, pornind de la un singur primer: această catenă este denumită **catena conducătoare** („*leading*”) (Figura 4.1)
- cealaltă catenă este sintetizată discontinuu, pe măsură ce dublul helix parental este desfăcut în continuare; această catenă este denumită **catenă întârziată** („*lagging*”) și este formată din multe fragmente distincte, denumite fragmente Okazaki (de la numele celui care le-a descris prima oară) de aproximativ 100 nucleotide; fiecare asemenea fragment este inițiat de la un primer
- într-o fază mai avansată a replicării primerii sunt îndepărtați atât din structura catenei conducătoare, cât și din cea întârziată, după care golurile sunt umplute tot de o ADN polimerază
- aceste fragmente sunt apoi unite între ele prin refacerea legăturilor fosfo-diesterice de către o *ADN ligază*

- în timpul procesului de replicare monocatenarele ADN (atât cele vechi, cât și cele nou sintetizate) sunt stabilizate și protejate de acțiunea nucleazelor, de către o clasă specială de proteine numite **proteine Ssb** (*Single Stranded Binding*)
- terminarea replicării unei molecule de ADN diferă între moleculele circulare și cele lineare
- la moleculele circulare, întâlnite în majoritatea cazurilor la cromozomul bacterian și la plasmide, cele 2 bifurcații de replicare se întâlnesc într-o regiune denumită *ter*.
- la moleculele ADN lineare din cromozomii de la eucariote, capetele acestora (**telomerele**) sunt replicate printr-un mecanism diferit, iar fragmentele sunt apoi unite de ADN ligaze

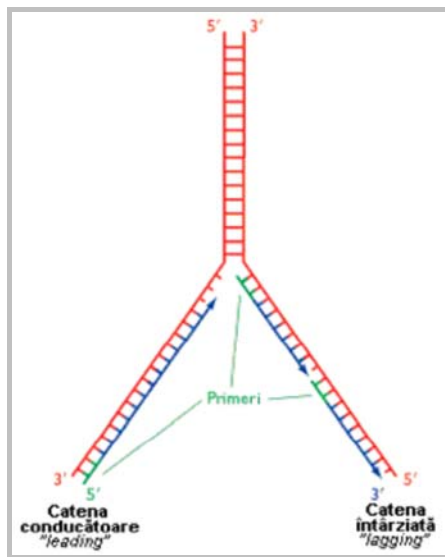


Figura 4.1 Reprezentarea schematizată a unei bifurcații de replicare.

Complementaritatea dintre bazele azotate de pe cele 2 catene ale moleculei de ADN determină o structură perfect adaptată funcției de replicare, fiecare dintre cele 2 catene servind drept matriță pentru sinteza unei catene complementare.

În majoritatea cazurilor, replicarea se realizează pe model **semiconservativ**, macromoleculele de ADN fiice fiind formate dintr-o catenă veche și una nouă (Figura 4.2).

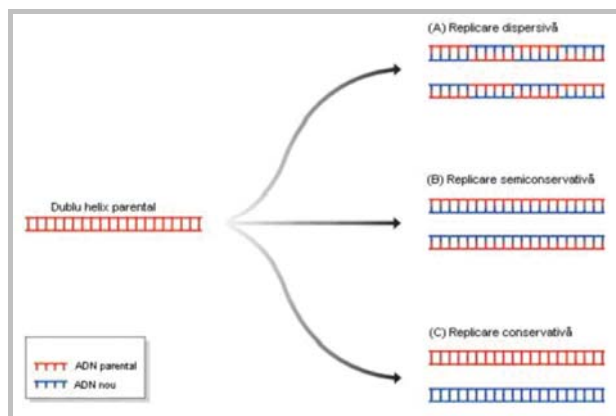
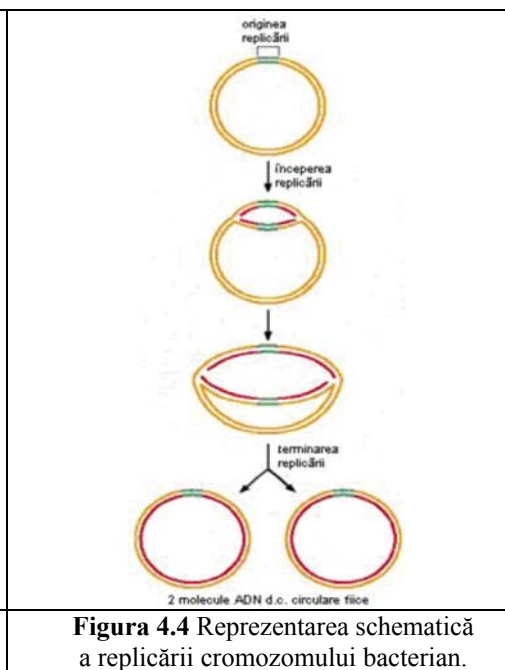
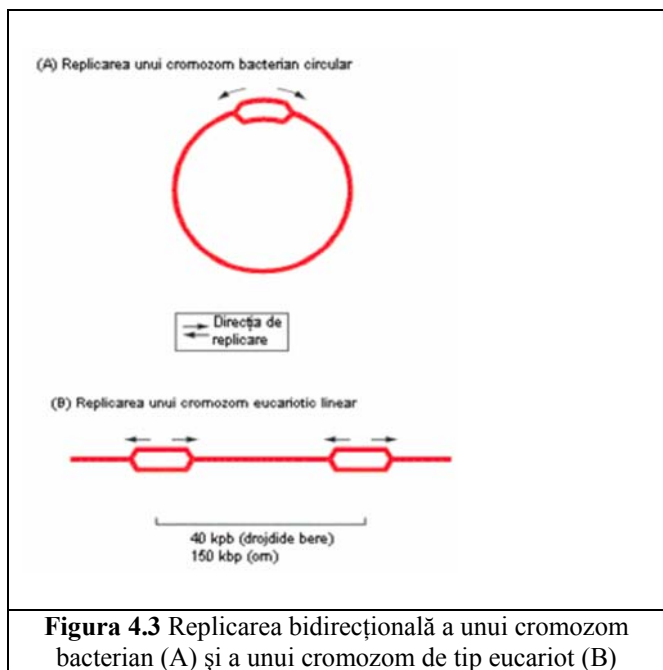


Figura 4.2 Principalele trei modele de replicare a moleculelor ADN.

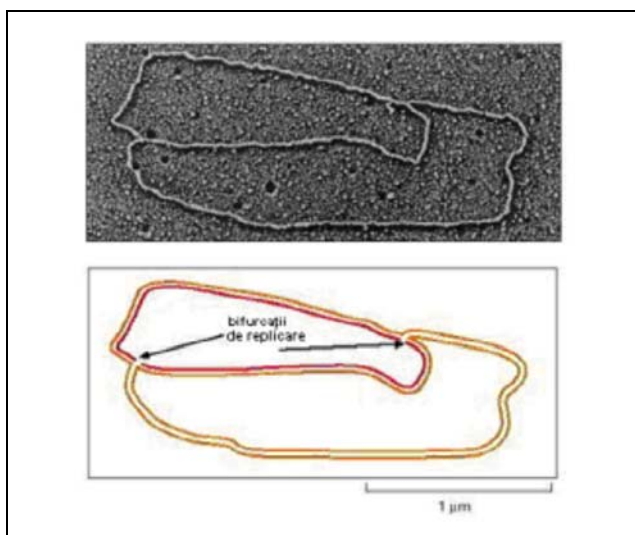
La majoritatea organismelor (chiar și la genomuri virale) replicarea ADN se desfășoară **bidirecțional**, ceea ce presupune formarea a **două bifurcații de replicare** ce avansează de la secvența de origine a replicării (denumită secvență *oriC* pentru cromozomul bacterian) către regiunea de terminare a replicării (denumită secvență *ter* în cromozomul bacterian).

Deși procesul de replicare a moleculelor de ADN se desfășoară enzimatic în mod similar la toate organismele, atât la cele procariote, cât și la cele eucariote, totuși există suficiente diferențe între cele 2 tipuri principale de organisme.

Astfel, cromozomul bacterian este un replicon unic, adică are o singură secvență de origine a replicării. În contrast, cromozomii de la eucariote sunt fiecare dintre ei structuri multirepliconice (au mai multe regiuni de origine a replicării ADN) (Figurile 4.3 și 4.4).



Mai mult chiar, apar diferențe și datorate structurii terțiare. Cromozomul bacterian are o structură circulară și, ca urmare, cele 2 bifurcații de replicare se întâlnesc la nivelul secvenței *ter* (Figura 4.5). Cromozomul de tip eucariot are o structură lineară, iar capetele lui (denumite **telomere**) se replică diferit de restul cromozomului.



4.1.2 Enzimologia replicării cromozomului bacterian

Cercetările asupra procesului de replicare a moleculei ADN precum și asupra enzimelor implicate au debutat pe cromozomul de *Escherichia coli* și, ca urmare, majoritatea datelor experimentale provin de la bacterii (Figura 4.6).

4.1.2.1 Complexul primozom

Complexul **primozom** este format dintr-o serie de proteine ce determină inițierea replicării ADN. Cele mai importante proteine sunt:

- **primaza:** la bacterii este denumită DnaG și este codificată de gena *dnaG*; această enzimă sintetizează scurte fragmente de ARN ce au funcție de *primeri*, adică oferă capul 3'-OH liber pentru polimerizare.

- **proteinele de inițiere: n', n, n'', DnaA, DnaB, DnaC și DnaT**

Inițierea replicării presupune detașarea secvenței *oriC* de membrana plasmatică, după ce, în prealabil, a fost atinsă o anumită masă celulară (denumită *masă de inițiere*) și în urma acumulării unei cantități substanțiale de fosfolipide acide pe fața internă a membranei plasmatică.

Secvența *oriC* din cromozomul de *E. coli* are 245 bp și prezintă 2 regiuni importante:

- o regiune cu 4 „cutii” *dnaA* (sunt formate din câte 9 bp, denumite 9-meri) la care se va atașa proteina DnaA
- o regiune cu 3 „cutii” de tip 13-meri, bogate în adenină-timină, la care se vor atașa complexe proteice DnaB-DnaC

Zece până la 12 molecule de DnaA se leagă la „cutiile” *dnaA*, determinând buclarea moleculei de ADN și, ca atare, desfacerea dublului helix în „cutiile” *dnaB*. Zonele monocatenare apărute se complexează cu proteina DnaB (cu funcție de helicază), adusă de proteina DnaC. Ulterior, primaza (DnaG) începe aici sinteza moleculelor de ARN primeri (Figura 4.7).

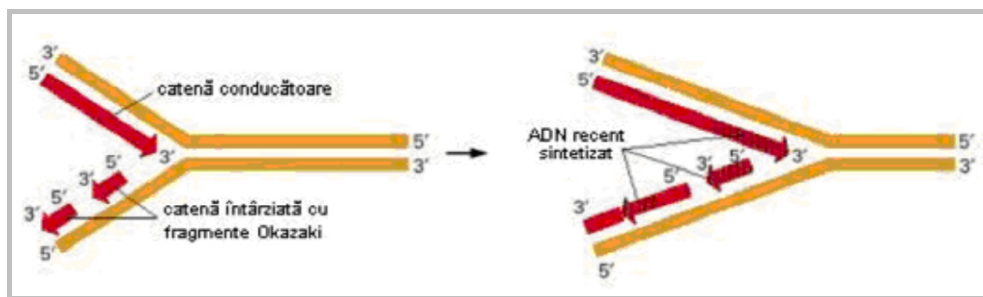


Figura 4.6 Reprezentarea schematică a unei bifurcații de replicare.

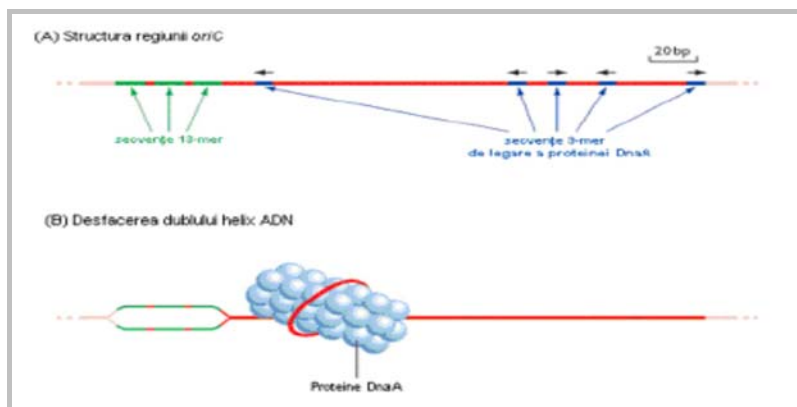


Figura 4.7 Originea replicării în cromozomul de *E. coli*.

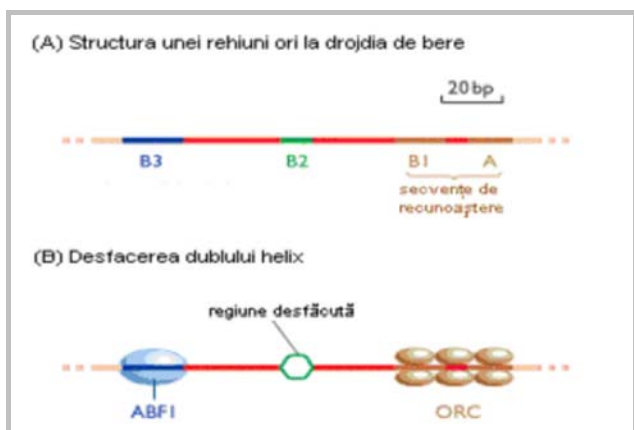


Figura 4.8 Structura regiunii de origine a replicării la drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*).

(A) Structura secvenței ARS1, o secvență ARS tipică de la *S.cerevisiae*, cu poziționarea secvențelor funcționale A, B1, B2 și B3. Desfășurarea dublului helix are loc în regiunea B2 prin atașarea proteinei ABFI la regiunea B3. Proteinele complexului de origine a replicării sunt atașate permanent la regiunile A și B1.

În procesul de replicare a ADN, în diverse etape, apar zone monocatenare ce sunt stabilizate (și „apărate”) față de acțiunea nucleazelor prin atașare de proteine de tip Ssb (*Single Stranded Binding* – proteine ce se atașează la monocatene ADN).

4.1.2.2 Topoizomerazele

Superspiralizarea cromozomului bacterian impune intervenția unor enzime care să realizeze relaxarea dublului helix ADN. Aceste enzime se numesc **topoizomeraze** și acționează asupra topoizomerilor ADN (Figura 4.9). Topoizomerii sunt molecule ADN cu structură primară și secundară identică și care diferă în structura terțiară.

Două molecule ADN d.c. ce au aceeași secvență de nucleotide dar număr diferit de înlănțuiri și suporarăsuciri sunt topoizomere datorită diferențelor de natură topologică.

La bacterii, ca de altfel și la eucariote, există 2 clase de topoizomeraze cu mecanisme diferite de acțiune (Figura 4.9) :

- **topoizomeraze tip I** – induc rupturi monocatenare (și tranzitorii) în ADN
- **topoizomeraze tip II** – induc rupturi bicatenare în ADN (Figura 4.10)

La bacterii, topoizomeraza de tip I cea mai bine caracterizată este TopA de la *E.coli*, care relaxează suprarăsuciri negative înalt răsucite. Topoizomerazele de tip II, în absența ATP, au rolul de a relaxa macromolecula ADN ca și TopA, în timp ce în prezența ATP induc suprarăsuciri negative în moleculele circular covalent închise (CCC) relaxate. Cea mai cunoscută enzimă din această clasă este ADN giraza, care poate introduce aproximativ 100 de suprarăsuciri negative per minut.

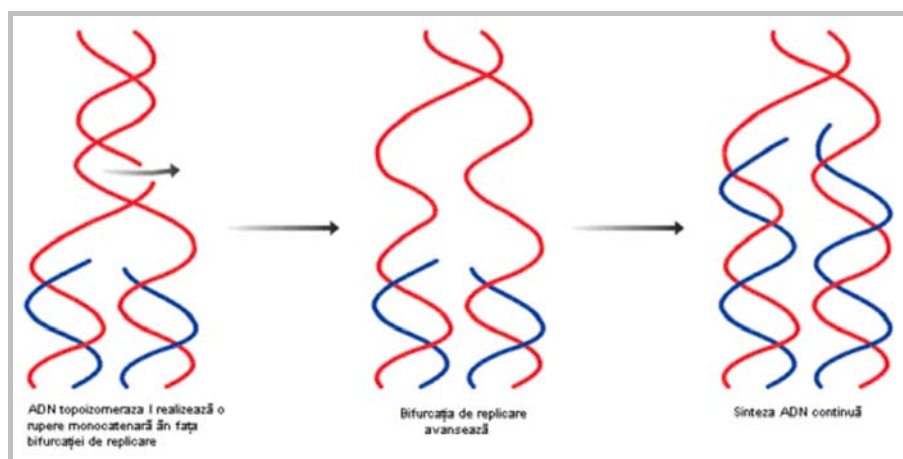


Figura 4.9 Desfășurarea dublului helix într-o bifurcație de replicare, prin acțiunea topoizomerazelor.

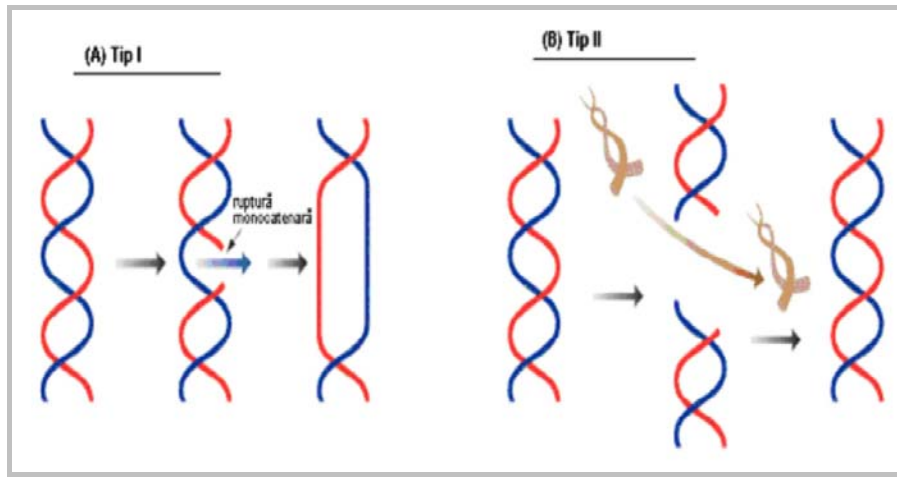


Figura 4.10 Modul de acțiune al ADN topoisomerazelor de tip I și II.

(A) Topoisomerazele de tip I realizează ruperi monocatenare, conduc catena intactă prin această rupere, refăcând apoi legătura fosfo-diestică. (B) Topoisomerazele de tip II taie ambele catene dintr-un dublu helix; prin acest spațiu este trecut un alt fragment al dublului helix, iar apoi se refac cele 2 legături fosfo-diesterice.

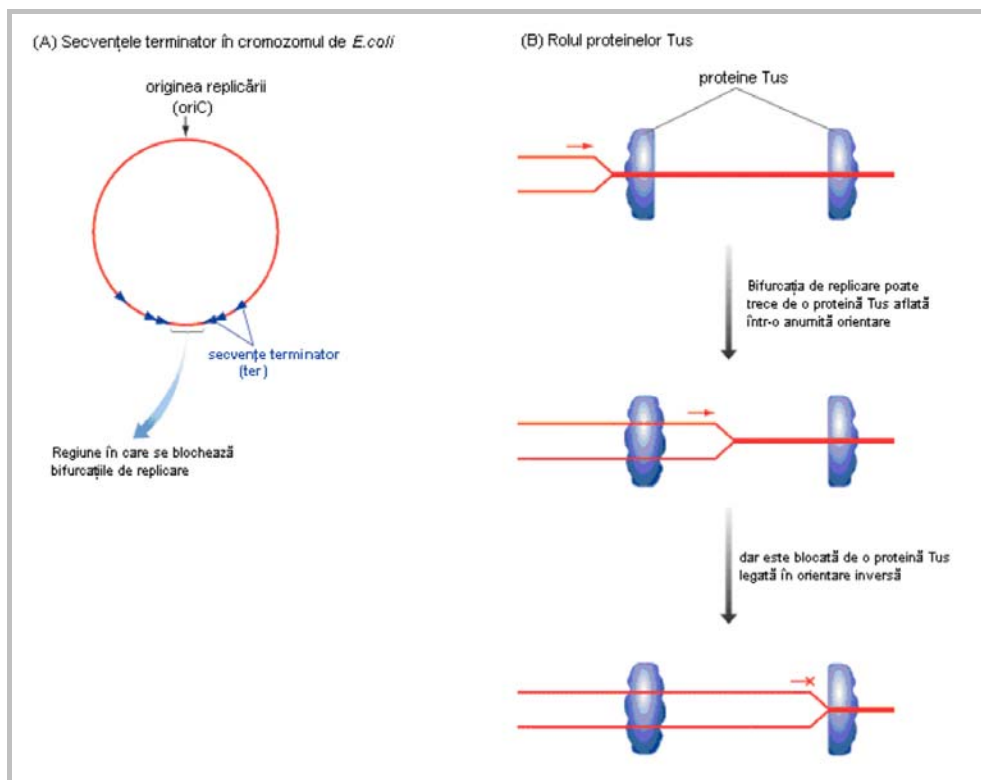


Figura 4.11 Rolul secvențelor terminator și al proteinelor Tus în replicarea cromozomului la *E.coli*.

4.1.2.3 ADN polimeraze

Procesul de replicare propriu-zisă a ADN este realizat de un complex de enzime denumite **ADN polimeraze**. Cea mai importantă activitate enzimatică desfășurată de o asemenea enzimă este formarea de legături fosfo-diesterice între nucleotide adiacente, cu creșterea lanțului în direcție 5' – 3'.

Toate ADN polimerazele descrise până în prezent polimerizează în direcție 5' – 3' și nu pot realiza acest proces decât pornind de la capul 3'OH liber al unei nucleotide. De obicei, acest cap este oferit de un scurt fragment monocatenar de ARN denumit **primer**.

La bacterii au fost descrise 3 tipuri de ADN polimeraze ce coexistă în aceeași celulă:

ADN polimeraza I (ADN pol I) este codificată de gena *polA* și are o g.m. de aprox 100 Md. În celula de *E.coli* există circa 400 molecule de ADN pol I care are o viteză de polimerizare de 667 nucleotide / min. În afară de activitatea de polimerizare, această enzimă poate desfășura și activitate de exonuclează (adică de desfacere de legături fosfo-diesterice și eliminare de nucleotide dintr-o catenă). Astfel, ADN pol I are un domeniu polipeptidic ce realizează activitate exonucleazică în direcție 3' – 5', activitate foarte importantă ce îi asigură enzimei și posibilitatea de a își corecta singură eventualele erori de încorporare a unor nucleotide împerecheate greșit. Această funcție este denumită „citire corectă” („*proof-reading*”). Totodată, ADN pol I poate desfășura și activitate exonucleazică în direcție 5' – 3', activitate ce îi permite îndepărtarea primerilor ARN.

ADN polimeraza II (ADN pol II) este codificată de gena *polB*. Și această enzimă poate avea și activitate exonucleazică 5' – 3'.

ADN polimeraza III (ADN pol III) este principala replicaza a cromozomului bacterian și reprezintă un adevărat complex enzimatic format din cel puțin 10 subunități funcționale (Tabelul din Figura 4.12).

Figura 4.12 Subunitățile ADN polimerazei III de la procariote.

Denumirea subunității	Masa moleculară	Gena	Funcții	Subansamblu
α	130	<i>pol C (dnaC)</i>	ADN pol Exo 5' – 3'	Miezul enzimei
ϵ	27	<i>dnaQ</i>	Exo 3' – 5'	
θ	10	<i>holE</i>	structural	
τ	71	<i>dnaXZ</i>	Dimerizarea miezului enzimei	complexul τ
γ	47	<i>dnaXZ</i>	ATPaze	complexul γ favorizează transferul sub. β la matricea ADN
δ	35	<i>holA</i>		
δ'	33	<i>holB</i>		
χ	15	<i>holC</i>		
ϕ	12	<i>holD</i>		
β	40	<i>dnaN</i>	Leagă miezul enzimei la ADN și îl reciclează	complexul β

Holoenzima ADN pol III acționează ca dimer, fiecare din cei 2 monomeri realizând sinteza pe una din cele 2 catene. O excepție o reprezintă complexul γ care acționează doar pe catena întârziată.

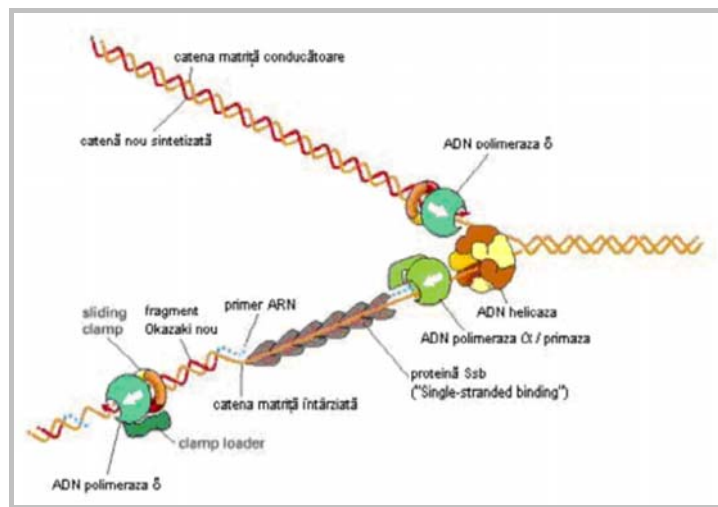


Figura 4.13 Reprezentarea schematizată a intervenției subunităților ADN polimerazei la eucariote.

4.1.3 Replicarea plasmidelor bacteriene

Indiferent dacă conferă bacteriei gazdă caractere esențiale sau neesențiale, toate plasmidele au în structura lor o regiune foarte importantă pentru replicarea și menținerea stabilă a plasmidului respectiv în populația bacteriană. În prezent se consideră că această regiune esențială ar conține:

- a) secvențe de origine a replicării plasmidiale, denumite convențional *oriV* (fata de *oriC* - originea replicării cromozomului bacterian); o secvență *oriV* trebuie să îndeplinească următoarele condiții:
 - regiunea ADN minimală, cu activitate *in cis*, ce poate sustine replicarea plasmidială
 - regiunea ADN în care cele 2 catene se despart pentru a iniția procesul de replicare
 - nucleotidul/nucleotidele la care începe sinteza catenei *leading*
- b) multe plasmide codifică o proteină implicată în inițierea replicării plasmidiale, denumita proteina de tip **Rep**
- c) gene implicate în controlul replicării plasmidiale

4.1.3.1 Replicarea plasmidelor lineare (ADN d.c. linear)

În ceea ce privește replicarea plasmidelor lineare, aceasta se desfășoară prin mecanisme diferite funcție de tipul de telomere.

a) plasmide cu telomere hairpin

Datorită capetelor legate covalent, ADN polimeraza poate trece peste ele continuând replicarea printr-un intermediar replicativ concatemic. Asemenea plasmide ar putea reprezenta un caz special de plasmide circulare monocatenare, în care jumătate din cerc este complementară cu cealaltă jumătate.

b) plasmide cu telomere invertroni

se replică printr-un mecanism de replicare ADN primată de proteine, în cazul de față proteina TP (Telomeric Protein). În cazul unor asemenea plasmide, telomerele reprezintă originea replicării și sunt recunoscute de proteine de inițiere care desfac dublul helix ADN. Plasmidele cu telomere invertroni sunt replicate de o ADN polimerază ce seamănă mai mult cu ADN polimeraza α de la eucariote, decât cu ADN polimerazele de la procariote.

Ultima nucleotidă de la capul 5' al fiecărei din cele 2 catene (nucleotida la care este atașată covalent proteina TP), este o adenină (A). Separat de molecula plasmidială, se formează complexe din alt monomer TP și altă moleculă de adenină. Cei 2 monomeri TP (unul atașat la o adenină, iar celălalt atașat la adenina din telomera plasmidială) se atrag și are loc procesul de dimerizare, iar între A și primul nucleotid (T) de pe catena complementară se formează legături de hidrogen. Totodată, acest al doilea A ofera capul 3' liber pentru primarea polimerizării (Figura 4.14).

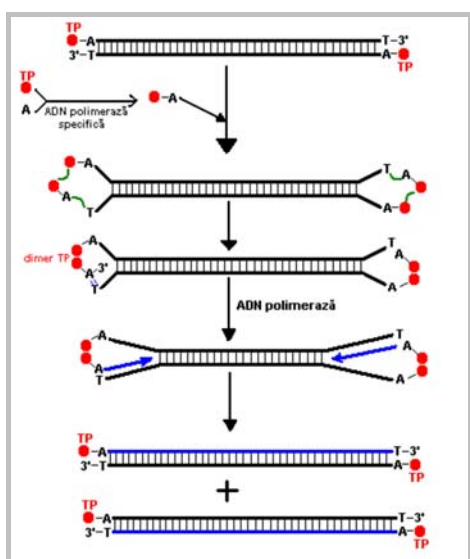


Figura 4.14 Replicarea plasmidelor lineare cu telomere invertroni.

4.1.3.2 Replicarea plasmidelor circulare.

Au fost descrise 3 mecanisme generale de replicare a plasmidelor circulare .

4.1.3.2.1 Mecanismul THETA

Acest mecanism prezintă asemănări foarte mari cu procesul de replicare a cromozomului bacterian. Ca și în cazul acestuia, acest mecanism poartă numele de “*theta*” datorită faptului că intermediarii de replicare sunt molecule cu forma literei grecești *theta*. Mecanismul *theta* de replicare se întâlnește cu precădere la plasmidele de la bacteriile Gram-negative, dar și la unele plasmide de la Gram-pozitive (streptococ, enterococ, unii lactococi).

Replicarea acestor plasmide necesită o proteină inițiator, codificată plasmidial și denumită **proteina Rep**, iar procesul pornește de la o regiune denumită **oriV**, ce are organizare similară cu **oriC** din cromozomul bacterian.

Întreg procesul de replicare de tip *theta* depinde de mai multe clase de proteine, din care însă doar proteinele de tip **Rep** sunt codificate plasmidial, celelalte sunt codificate cromozomal și sunt aceleași proteine ce intervin și în replicarea cromozomului bacterian. O excepție o reprezintă plasmidul Col E1, care se replică printr-un mecanism de tip *theta*, dar nu necesită prezența unei proteine inițiator de tip **Rep**.

La plasmidele ce se replică prin mecanism *theta*, regiunea **oriV** cuprinde: 4-5 secvențe ADN în repetiție directă și denumite **iteroni**, la care se atașează proteina Rep (iteronii există și în cazul celorlalte două mecanisme de replicare plasmidială), o regiune bogată în A/T, unde este inițiată desfacerea dublului helix, cutii **dnaA**, la care se atașează proteina **DnaA**.

Proteinele Rep sunt proteine de tip *leucine-zipper* cu un domeniu HTH (“*α-helix-turn-α-helix*”) și se atașează la ADN într-o manieră situs-specifică, și anume la secvențele **iteroni**. Atașarea se realizează astfel încât moleculele Rep sunt aliniate pe aceeași față a moleculei ADN.

Etape

Procesul de replicare a plasmidelor prin mecanism *theta* se desfășoară în următoarele etape :

- a) în prima etapă are loc atașarea proteinelor Rep la secvențele iteroni; acest lucru determină o curbare a moleculei ADN în această zonă, fapt ce facilitează etapa următoare;
 - b) atașarea proteinelor DnaA la cutiile **dnaA**; la rândul ei, această etapă o facilitează pe următoarea;
 - c) atașarea complexului proteic **DnaB-DnaC** la regiunea din **oriV** bogată în A/T; **DnaB** este o helicază și desface dublul helix în această zonă;
 - d) are loc sinteza unui ARN primer de către o ARN polimerază codificată de o genă cromozomală;
 - e) începe procesul de polimerizare desfășurat, la majoritatea plasmidelor din această clasă, de către ADN polimeraza III (excepție face plasmidul Col E1, care este replicat prin mecanism *theta*, dar de către ADN polimeraza I);
 - f) sinteza celor 2 catene (*leading* și *lagging*) este cuplată și se desfășoară cvasi-simultan;
 - g) sinteza se desfășoară în majoritatea cazurilor unidirecțional, spre deosebire de replicarea cromozomului bacterian care la marea majoritate a speciilor bacteriene se desfășoară bidirecțional.
- Dintre cele mai cunoscute plasmide ce se replică prin mecanism *theta*, amintim pSC101, P1, RK2, RP4, R6K, R1, CColE2, ColE3.

4.1.3.2.2 Mecanismul STRAND-DISPLACEMENT (SD)

Denumirea provine din termenul *strand-displacement* (dislocarea catenei) și se referă la faptul că în timpul procesului de replicare are loc dislocarea uneia din cele 2 catene ADN. Acest mecanism se întâlnește mai ales la plasmidele promiscue din grupul de incompatibilitate **IncQ**. La aceste plasmide regiunea **oriV** este alcătuită din 3 secvențe ADN de tip iteroni, 1 regiune bogată în G/C (174 bp), 1 regiune bogată în A/T (31 bp)

Procesul de replicare ADN de tip *strand-displacement* nu depinde de proteine ale celulei “gază” (codificate cromozomal, cum ar fi DnaA, DnaB, DnaC), ci de trei proteine codificate plasmidial:

RepA – este o helicază ce intra în dublul helix ADN în regiunea bogată în A/T și facilitează dislocarea catenei parentale nerePLICATE sub forma *buclei D* (forma literei D);

RepB – este o primază care sintetizează un primer ARN necesar inițierii polimerizării ADN;

RepC – este o proteină inițiator care se atașează la secvențele iteroni din **oriV**.

Replicarea pornește de la două origini (**ssiA** și **ssiB**) simetrice și adiacente, ce funcționează în forma monocatenară și sunt situate pe cele 2 catene. Procesul de replicare începe când aceste 2 origini sunt expuse monocatenar.

Etape

Procesul de replicare SD se desfășoară în următoarele etape:

1. monomerii ai proteinei **RepC** se atașează la secvențe iteroni din **oriV**;
2. proteina **RepA** (helicaza) se atașează la regiunea din **oriV** bogată în A/T, determinând desfacerea dublului helix;
3. proteina **RepB** (primaza) se atașează la bucla A/T și sintetizează un primer ARN;
4. începe procesul de polimerizare ADN;
5. helicaza **RepA** facilitează dislocarea catenei parentale nerePLICATE sub forma unei bucle D.

Produsele intermediare ale unui proces de replicare SD sunt:

- o moleculă ADN circulară d.c.
- o moleculă ADN circulară m.c. – pe aceasta va fi inițiat un nou proces de replicare care va conduce la formarea catenei complementare, și deci, a formei dublucatenare a plasmidului.

În cazul unui asemenea mecanism de replicare sinteza celor două catene noi ale moleculei de ADN nu este cuplată și simultană.

4.1.3.2.3 Mecanismul ROLLING-CIRCLE (RC)

Denumirea provine din faptul că în timpul procesului, molecula de ADN are forma unui cerc rotativ. Acest mecanism de replicare este întâlnit la plasmide din multe bacterii Gram-pozitive, de exemplu plasmidul pT181 (de la *Staphylococcus*), pUB110 și pC194 (de la *Bacillus subtilis*).

Ca și în cazul mecanismului SD, replicarea de tip RC depinde de o proteină inițiator codificată plasmidial (proteina Rep) și de o serie de proteine codificate pe cromozomul bacterian.

Plasmidele ce se replică prin mecanism RC au două secvențe **ori** situate distanțat una de alta:

dso (“double-stranded origin”), de la care este inițiată replicarea primei catene noi (catena *leading*); **dso** are 2 regiuni: regiunea “*bind*”, la care are loc atașarea proteinei inițiator **Rep** și regiunea “*nick*”, în care proteina Rep produce rupătura monocatenară inițială

sso (“single-stranded origin”), de la care este inițiată sinteza celei de-a doua catene noi (catena *lagging*)

Etape

În procesul de replicare RC se parcurg următoarele etape:

- proteina Rep se atașează la regiunea “*bind*” a secvenței **dso**;
- proteina Rep taie o legătură fosfodiestică (rupătură monocatenară) și rămâne atașată la capul 5’ Tyr-fosfodiestică; capul 3’ va servi ca primer pentru sinteza catenei *leading*;
- în procesul de sinteză a catenei *leading* intervin o serie de proteine codificate pe cromozomul bacterian: helicaza, **Ssb**, ADN polimeraza III;
- replicarea catenei *leading* continuă mai mult de o rundă completă depășind regiunea **dso**;
- pentru terminarea replicării catenei *leading* are loc o reacție de transfer de catenă: prin monomerul liber, proteina Rep atacă regiunea **dso** a catenei vechi, taie o legătură fosfodiestică și reface alta, rezultând o moleculă circulară d.c. care a eliberat și un dimer de Rep inactiv și, respectiv, o moleculă circulară m.c. pe care, de la **sso**, este sintetizat un primer și apoi o catenă nouă

Deci, și în cazul acestui mecanism sinteza celor două catene ADN noi nu este cuplată.

Intr-un asemenea proces proteina Rep are un rol mai complex decât într-o replicare SD :

- se atașează la **dso**, având rol în inițierea replicării;
- taie o legătură fosfodiestică, producând *nick*-ul inițial;
- la terminarea sintezei primei catene noi, Rep taie și reface legături fosfodiesterice

Datorită activității sale catalitice, proteina Rep de la plasmidele ce se replică printr-un mecanism RC este similară cu topozomerazele din clasa I.

În general, plasmidele ce se replică prin RC au o alcătuire modulară, cel mai important modul fiind **LIC** (“*Leading strand Initiation and Control region*”) care este format din *dso*, gena *rep* și elemente de control al replicării plasmidei. Pe baza structurii **LIC** au fost definite 4 familii de plasmide ce se replică prin mecanism RC, familii ce au drept reprezentanți următoarele plasmide: pT181, pC194, pMV158, pSN2. Alte module importante în aceste plasmide sunt: 1-2 *ss*, 1 *mob*, 1 genă de antibioretistență.

4.1.3.3 Mecanisme de control al replicării ADN plasmidial

Replicarea acestor plasmide se desfășoară unidirecțional și este realizată de ADN polimeraza I și nu de ADN pol III care replică cromosomul bacterian.

Plasmidele din familia Col E1

Procesul de replicare începe cu sinteza unui ARN primer (=ARN II), ce este transcris începând de la un situs localizat la 555 pb în amonte față de *oriV*. Inițial, acest transcript este separat de ADN, ca în cazul unei transcrieri obișnuite. Pe măsură ce ARN polimeraza se apropie de *oriV*, transcriptul începe să ramâne hibridizat cu matricea ADN; cauza probabilă: ARN II conține 6 G consecutive situate la circa 265 nucleotide în amonte față de *oriV*; aceste 6 G interacționează probabil cu 6 C consecutive din ADN matricea, ce se găsesc la cca 20 nucleotide în amonte față de *oriV*. Apoi hibridul este tăiat de RNaza H, iar capul 3' al ARN va fi elongat de ADN pol I.

O modalitate de control negativ al replicării plasmidelor din familia Col E1 este prin formarea unui al doilea ARN (=ARN I), care are funcție de ARN antisens, conține 108 nucleotide și este transcris de la -445 față de *oriV*, dar în direcție opusă, de pe cealaltă catenă ADN.

Prin legarea lui ARN I (antisens) de ARN II (primer) este alterată conformația secundară a acestuia din urmă, astfel încât ARN primer nu mai poate hibridiza cu *oriV*.

Acest ARN antisens este transcris constitutiv, dar este instabil, iar legarea lui la ARN II este mediată de o proteină numită **Rop** (codificată de gena *rop*).

Aplicarea unui inhibitor al sintezei proteice (de exemplu, cloramfenicolul) blochează sinteza proteinei Rop, rezultatul fiind o creștere a frecvenței de inițiere a replicării plasmidelor Col E1. Acest lucru se bazează pe faptul că în citoplasma bacteriană există suficiente molecule de ADN pol I (cca 300), chiar dacă este blocată proteosinteza.

pSC101

Prima citare a lui pSC101 în literatura de specialitate a fost în 1973 - Cohen care a folosit-o ca vector în experimente de clonare. Ulterior însă, această plasmidă a fost identificată ca plasmidă naturală la *Salmonella* și *Escherichia coli*. Ea prezintă un număr mediu de copii (6-7) per echivalent cromosomal și are o genă de rezistență la tetraciclină. Întreaga plasmida (9263 pb) a fost complet secvențiată.

Regiunea replicativă a acestei plasmide are 3 zone majore:

- (1) regiunea *par* - foarte importantă pentru stabilitate și afectează și numărul de copii;
- (2) regiunea *ori* - de la care pornește replicarea unidirecțională și care conține majoritatea situsurilor necesare pentru replicare și pentru incompatibilitate;
- (3) gena *repA* - care este o genă specific plasmidială și codifică o proteină de replicare.

pSC101, împreună cu fagul P1 și cu o serie de alte plasmide (F, R6K), aparține unei clase de repliconi a caror replicare nu este realizată de ADN polimeraza I. Acești repliconi codifică o proteină autoreglată (**RepA**) esențială pentru replicare și posedă copii repetate direct ale unei secvențe ce este specifică pentru fiecare plasmidă și la care se atașează proteina RepA. RepA se atașează la cele 3 secvențe RS din regiunea *ori*, participând la inițierea replicării.

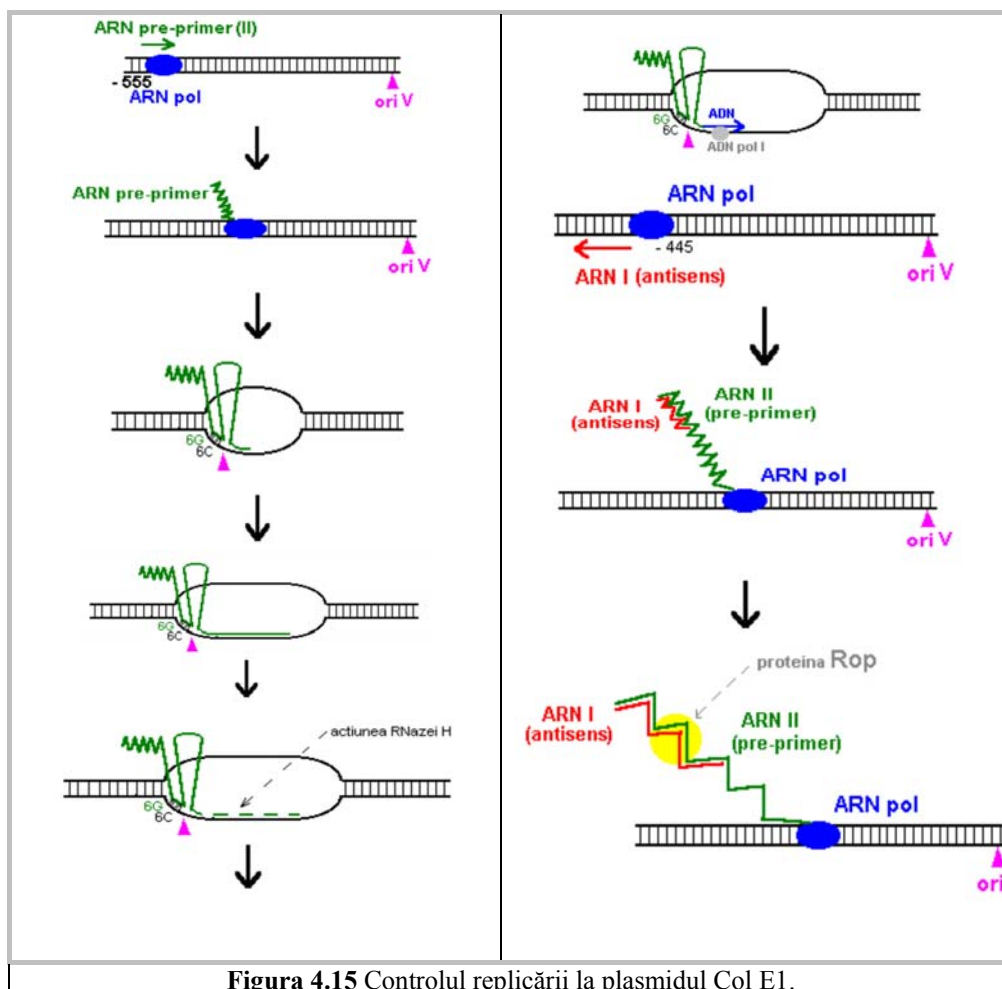


Figura 4.15 Controlul replicării la plasmidul Col E1.

Menținerea stabilă a lui pSC101 în celula bacteriană presupune intervenția a mai multor clase de proteine: **DnaA** (esențială și în inițierea replicării cromosomului bacterian), **IHF** (Integration Host Factor, proteină *histone-like* implicată în reglarea unei serii de procese celulare), **DnaB**, **DnaC**, **DnaG** (primaza), componente ale holoenzimei **ADN polimeraza III**.

Regiunea **ori** din plasmidul pSC101 conține situsuri multiple de legare pentru proteine esențiale în replicarea plasmidială:

- un situs de atașare a proteinei DnaA
- 2 secvențe repetate, formate din câte 13 pb (13-mer), omoloage cu secvențele din oriC și la care se atașează complexul DnaB-DnaC
- o regiune bogată în A/T
- între regiunea A și regiunea T se găsește situsul pentru IHF
- un cluster de 3 secvențe repetate direct RS1 (24 pb), RS2 (18 pb), RS3 (24 pb) la care se atașază proteina RepA
- ARN polimeraza se atașează la un promotor localizat în și între aceste 3 secvențe RS (promotorul pentru ARN-Y)

Procesul de transcriere în regiunea **oriV** și implicat în inițierea replicării este un fenomen extrem de frecvent în lumea bacteriană, atât pentru replicarea cromosomului, cât și a unor plasmide. În cazul lui pSC101, printr-un asemenea proces de transcriere la origine, este sintetizat ARN-Y care începe din mijlocul lui RS2. Acest proces nu se află sub controlul proteinei RepA, iar rolul moleculei ARN-Y pare să fie acela de a facilita deschiderea dublului helix ADN în regiunea **ori**.

Regiunea **par** nu este esențială pentru replicare (plasmidele **par⁻** se replică), dar este esențială pentru stabilitatea plasmidelor în celula bacteriană, probabil prin situsul pentru giraza.

Legarea simultană a proteinelor Rep A, IHF, Dna A, DnaB-Dna C este favorizată de curbarea ADN determinată de legarea IHF (curbeaza dublul helix ADN cu 150° la situsul de atasare), și determină formarea REPLISOMULUI.

Reglarea numărului de copii plasmidiale la pSC101 și, probabil, și la alte plasmide și sisteme similare, nu este produsul unui singur mecanism de reglare, ci este o rezultată a unui set de interacțiuni moleculare (ADN-proteine, ADN-ADN, proteine-proteine), fiecare dintre ele contribuind la replicarea, stabilitatea și partiția eficientă a plasmidului.

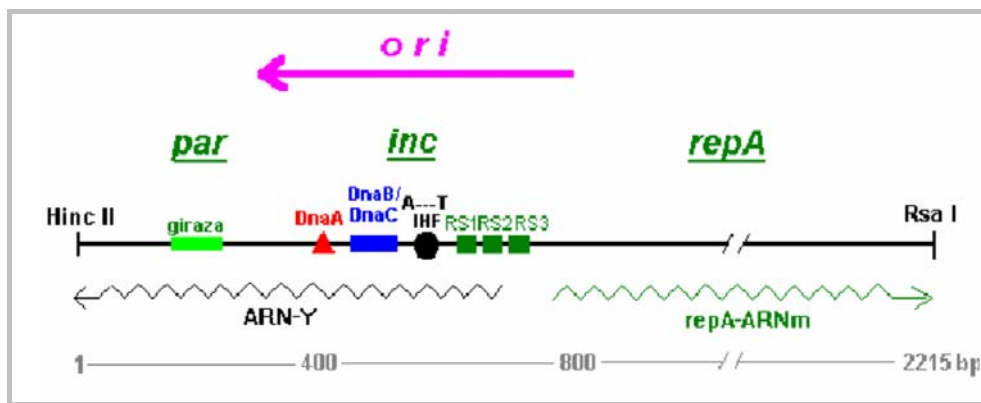


Figura 4.16 Structura regiunii replicative la plasmidul pSC101.

4.2 TRANSCRIEREA GENETICĂ

Principii și definiții

Transcrierea genetică reprezintă procesul de sinteză, catalizată enzimatic, a moleculelor de ARN, ca urmare a citirii informației codificate în molecule ADN. Procesul se desfășoară pe baza legilor de complementaritate chimică dintre cele 2 catene ale unei molecule de acid nucleic dublu catenar și conduce la formarea de legături fosfo-diesterice între ribonucleotide.

Prin transcriere genetică se sintetizează toate tipurile de molecule ARN proprii celulelor, atât la organisme procariote, cât și la eucariote, și anume: ARN mesager (ARNm), ARN ribozomal (ARNr), ARN de transfer (ARNt), ARN heterogen nuclear (ARNhn).

Molecula ARN rezultată prin transcriere, înainte de orice altă procesare, poartă numele de **transcript primar**.

Procesul de transcriere a unei porțiuni din ADN (denumită genă) presupune deci sinteza unei copii a informației genetice, copie care din punct de vedere chimic este o molecula de acid nucleic monocatenar, și anume ARN.

Transcrierea începe în anumite zone din molecula ADN, zone numite **promotori**. Aceștia au anumite secvențe de nucleotide care îi fac ușor de recunoscut de către ARN polimeraze (enzimele ce sintetizează molecule de ARN). În zona promotorilor dublul helix ADN este desfăcut de către ARN polimeraze, formându-se o așa-numită **buclă de transcriere**. În interiorul acesteia, ARN polimeraza sintetizează o moleculă de ARN, copiind informația genetică de pe una din catenele ADN pe care o folosește ca matrice.

Primul nucleotid de pe catena ADN matrice care este citit și căruia îi corespunde un prim nucleotid în catena ARN, este numerotat convențional cu +1 și denumit **startpoint** (punct de pornire a transcrierii). Următoarele nucleotide din matricea ADN sunt numerotate +2, +3, +4 etc.

Față de poziția nucleotidului +1, se definesc 2 zone în matricea ADN :

- zona amonte (*upstream*), în care nucleotidele sunt numerotate cu semnul minus (-1, -2, -3 etc)

- zona aval (*downstream*), în care nucleotidele sunt numeortate cu semnul plus (+2, +3, +4 etc)