

5. Proprietățile fizico-chimice ale ADN

5.1. Consecințele naturii fibroase și mărimii

Pentru a extrage acizii nucleici și a le evalua masa moleculară, sunt utilizate anumite proprietăți determinate de natura fibroasă și de mărimea ADN, pe care le-am anticipat deja în paragrafele precedente, și anume:

a) sărurile de sodiu ale ADN sunt solubile în apă și dau soluții cu vâscozitate ridicată caracterizate prin fenomenul de birefringență de curgere;

a) alcoolii, dintre aceștia cel mai folosit este etanolul, sunt utilizați pentru precipitarea acizilor nucleici din soluție, sub forma unor aglomerate formate din fibre foarte lungi;

c) densitatea acestor macromolecule este destul de mare pentru a permite separarea lor prin ultracentrifugare. Centrifugarea în gradient de densitate la echilibru permite determinarea masei moleculare și evaluarea conținutului în G+C*. În această tehnică, numită și izopicnică (densitate egală), gradientul este realizat cu soluții de clorură de cesiu (CsCl) (Figura 2.3).

Diferența de o unitate între masele moleculare ale cuplurilor GC și AT este suficientă pentru ca densitatea ADN să fie o funcție lineară a conținutului în G+C.

5.2. Consecințele compoziției

Dintre proprietățile datorate compoziției reținem:

a) Caracterizarea și dozarea ADN pentru conținutul în deoxiriboză. Colorația Feulgen a fost utilizată mult timp în histologie și citologie pentru localizarea nucleelor și cromozomilor pe diferite preparate și se bazează pe reacția aldehidică a deoxipentozei. Hidroliza acidă parțială, la cald, înlătură purinele demascând resturile de 2-deoxiriboză. O fracțiune suficientă dintre deoxiriboze atașate pe schelet, sub formă lor furanozică, sunt convertite în forma aldehidică care poate reacționa cu reactivul Schiff (fuxină decolorată cu acid sulfuros) pe care îl recolorează. Produsul obținut precipitată pe scheletul macromoleculei.

b) Absorbția în UV a ADN la 260 nm datorită conținutului lui în baze. Această absorbție este de aproximativ 30 de ori mai importantă decât a proteinelor cu o concentrație egală, dar totuși inferioară bazelor libere. Proprietățile de absorbție ale acizilor nucleici stau la baza metodelor de dozare și de caracterizare a stării lor moleculare (efectul hipocrom al ADN).

5.3. Proprietățile oferite ADN de către împerecherea și stivuirea bazelor

5.3.1. Proprietăți mecanice

Spre deosebire de elicea alfa a proteinelor, scheletul acizilor nucleici nu este stabilizat prin legături de hidrogen. Helixul este deci flexibil și extensibil ca un resort mai mult sau mai puțin întins. Astfel, se explică rezistența chimică și fragilitatea mecanică a ADN în afara celulelor. Când moleculea este ancorată la nivelul extremităților, ea este obiectul supra-răsucirilor despre care am discutat în paragraful anterior. Aceste calități sunt esențiale pentru evoluția proceselor de replicare și de transcripție în cursul căror diferențe regiuni trebuie să se adapteze pentru contactul cu diferențele complexe proteice, să se expună pentru a fi accesibile, etc.

5.3.2. Denaturarea acizilor nucleici

Procesul de denaturare reprezintă o alterare a structurii spațiale a unei macromolecule fără ruperea legăturilor covalente. Comportamentul la denaturare al acizilor nucleici este esențial diferit de al proteinelor.

5.3.2.1. Denaturarea și renaturarea termică

Denaturarea și renaturarea termică a ADN sunt pe de o parte modalități de studiu ale acestor molecule dar și unelte necesare în manipularea acestora. În continuare vom încerca să examinăm aspectele esențiale.

Denaturarea: încălzirea unei soluții de ADN este însotită de modificări spectaculoase ale proprietăților fizice: pierderea vâscozității și amplificarea absorbției în UV. Efectul de hiperchromicitate este o modificare foarte importantă și informativă

pentru studiul fenomenului de denaturare (Figura 3.21.). Din stare nativă, dublu catenară, molecula trece în stare denaturată: se rup legăturile de hidrogen ale împerecherilor și contactele Van der Waals care asigură stivuire, temperatura separă mai mult sau mai puțin complet cele două catene care își pierd forma elicoidală și adoptă o conformatie statistică aleatoare (Figura 3.22.a; 3.23a). În aceste condiții crește absorbția în UV a bazelor care până în acel moment erau mascate.

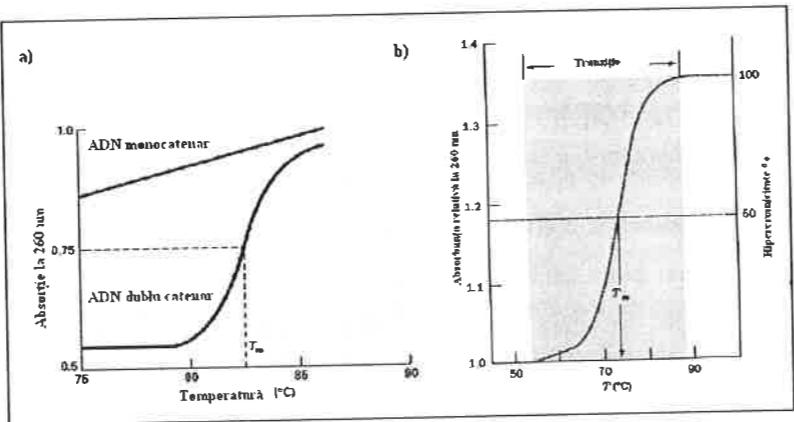


Figura 3.21. Efectul temperaturii asupra ADN dublu catenar: a) creșterea valorilor DO₂₆₀ nm în urma procesului de denaturare termică; b) efectul hiperchrom al procesului de denaturare și modalitatea de estimare a temperaturii de melting

Această modificare provocată de creșterea temperaturii a fost denumită fuziune prin comparație cu procesul care se produce la nivelul membranelor. Așa cum se poate observa în figura 3.22b, moleculele de ADN de origini diferite prezintă caracteristici de fuziune diferite prin:

- a) curba de fuziune: amplitudinea și etalarea efectului hiperchrom;
- b) valoarea temperaturii de fuziune T_m (m pentru melting), reprezentă valoarea la care jumătate din cantitatea de ADN dublu catenar se regăsește în formă monocatenară. Grafic, reprezintă 50% din valoarea maximă a absorbției, și corespunde punctului de inflexiune al curbei de variație a acesteia cu temperatura.

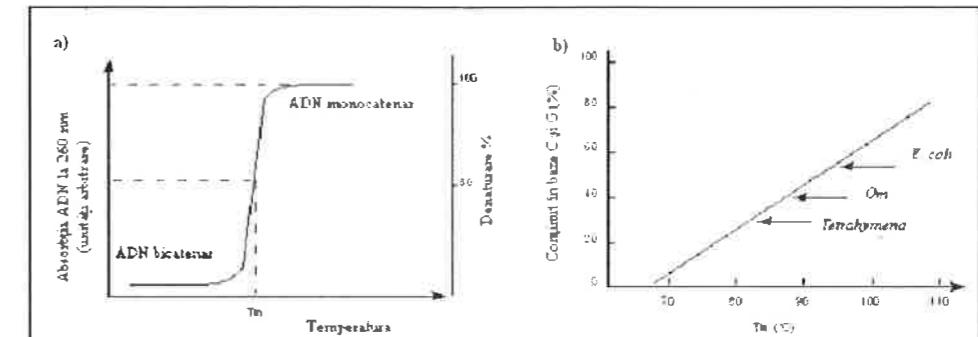


Figura 3.22 a) Efectul hiperchrom al denaturării termice și determinarea temperaturii de melting; b) Efectul conținutului G+C al ADN din diferite surse asupra temperaturii de fuziune

La originea acestor diferențe stau caracteristici intrinseci ale ADN: lungimea și compoziția în baze. Rezistența la fuziune este în relație directă cu conținutul în G+C, deoarece împerecherile GC se realizează prin intermediul a trei legături de hidrogen și sunt mai stabile în timp ce perechile AT se disociază primele. Astfel curba din figura 3.22(b) demonstrează existența unei relații lineare între T_m și (G+C). În tabelul 3.2. sunt furnizate câteva informații privind conținutul G+C și valoarea T_m la câteva tipuri de organisme. Pentru comparație sunt introduse și valorile pentru poli(AT) și poli(CG).

Tabel 3.2. Exemple de valori T_m în funcție de conținutul în (G+C)

polinucleotide sau ADN	G+G (% din conținutul total)	T_m (°C)
poli(AT)	0	65
Mamifere	40	87
<i>Escherichia coli</i>	50	92
<i>Micrococcus phlei</i>	70	>98
poli (CG)	100	105

Un factor important este concentrația în săruri a mediului. Aceasta reprezintă un factor extrinsec care are efect protector spectacular. Ionii minerali neutralizează sarcinile scheletului fosfat și anulează repulsiile electrostatice care destabilizează dublul helix. De reținut că în apă pură ADN se poate denatura la temperatura ambientă.

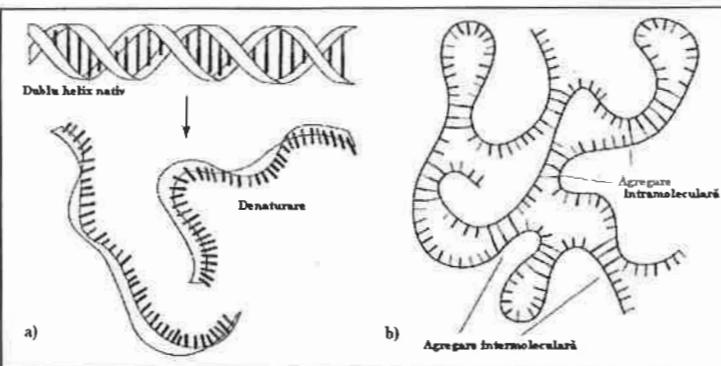


Figura 3.23 Fenomenul de denaturare și renaturare termică a acizilor nucleici:
a) denaturare; b) renaturare

Renaturarea: restaurarea stării inițiale de dublă catenă, plecând de la ADN denaturat, este posibilă. Succesul acestei renaturări depinde de: i) condițiile de mediu: pH, tările ionice; ii) starea mai mult sau mai puțin avansată a denaturării; iii) protocolul adoptat pentru revenirea la temperatura ne-denaturantă (Figura 3.24).

Procesul de renaturare face obiectul a numeroase studii în intenția înțelegerei cineticii și a modelării etapelor. Procesul de denaturare/renaturare parcurge diferite etape în funcție de protocolul utilizat:

a) dacă soluția este răcită prea repede, timpul de căutare al catenelor complementare este prea scurt: moleculele sunt „înghețate” în starea imperfectă de cupluri inter- și intramoleculare;

b) dacă soluția este menținută timp îndelungat la o temperatură inferioară T_m ($T_m - 20^{\circ}\text{C}$ sau la temperatura optimă $T_m - 25^{\circ}\text{C}$) s-a observat, din contră, o revenire gradată la proprietățile caracteristice structurii bicatenare. Trebuie asigurată durata necesară pentru explorarea bazelor prezente pe cele două catene, reconstituirea împerecherilor complementare și formarea dublei elice. Aceste condiții au fost denumite „de anelare”, „annealing” sau „trempe”, expresii împrumutate din activitatea de turnare a sticlei sau a metalelor.

Dacă se pornește de la o soluție complet denaturată, re-împerecherea se realizează în două etape de cinetică diferite

i) catenele separate se întâlnesc la întâmplare (hazard). Catenele complementare se pot împerechea la nivelul unei scurte regiuni și pot forma începutul unei duble elice. Această etapă este lentă și este limitantă de viteză pentru procesul total de renaturare;

ii) împerecherile se vor efectua foarte rapid, plecând de la punctele de inițiere a procesului, după modelul închiderii unui fermoar, impunând structura 2-D elicoidală pe toată lungimea moleculei.

În afară de determinarea vâscozității și absorbției, starea ADN mai poate fi controlată prin microscopie electronică și prin tehnici de biologie moleculară. Prin microscopie electronică se vizualizează direct moleculele, în timp ce biologia moleculară furnizează metodele indirecte: i) studiul activității de transformare a ADN pentru un anumit tip celular; ii) degradarea preferențială a duplexului de către enzime cum sunt nucleaza *S1* și *ExoII* (Tabel 2.4). Cromatografia de absorbție pe hidroxiapatită oferă o altă modalitate de separare a duplexului, prin reținerea pe suprafața suport a monocatenelor.

Denaturările și renaturările sunt etape cheie pentru numeroase tehnici de biologie moleculară. Hibridizarea, etapă tehnică foarte importantă, presupune formarea de duplexuri artificiale între ADN din diferite surse sau între ADN și ARN.

Regiunile de ARN al căror lanț monocatenar se repliază pentru a forma o structură elicoidală 2-D prezintă același fenomen de denaturare. Aceste duplexuri ARN sunt mult mai stabile. Valorile temperaturilor lor de melting sunt mai mari cu aproximativ 20°C decât cele ale secvențelor de ADN echivalente.

5.3.2.2. Alte tipuri de denaturări

Există o serie de alți factori care au acțiune denaturantă asupra ADN:

Valorile extreme de pH dezorganizează împerecherile modificând ionizarea grupelor de baze.

Tratamentul alcalin este o metodă importantă care este folosită în tehniciile de biologie moleculară pentru denaturarea ADN. Prin aceasta se separă rapid catenele fără a se produce degradare. Este o modalitate reversibilă de a obține molecule de ADN monocatenare care sunt foarte utile etapelor de hibridizare din tehniciile Southern

și Northern blot (Figura 3.24.). și moleculele de ARN se denaturează foarte bine în condiții blânde de tratament alcalin.

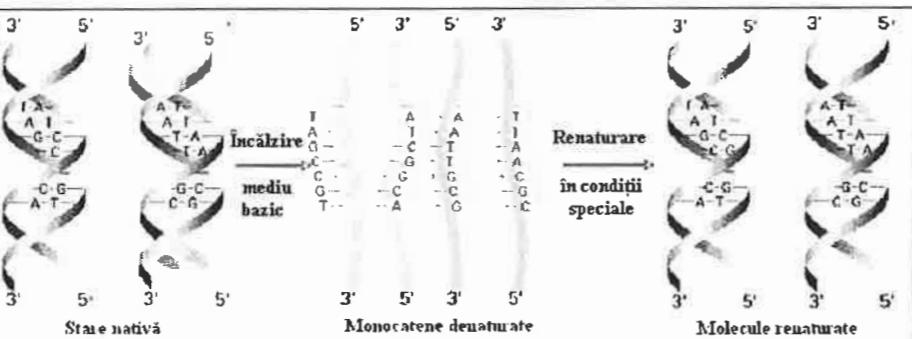


Figura 3.24. Procesul de denaturare prin încălzire și tratament alcalin (după Molecular Cell Biology Lodish H., et. al., 2000)

Corpii organici: compușii organici ca aldehida formică, formamida, ureea, au capacitatea de a stabili legături de hidrogen și sunt utilizati ca agenți denaturanți în tehniciile de separare a ADN (Figura 3.25.). Faptul că acțiunea lor necesită accesibilitatea grupelor de baze implicate în împerecheri a condus la concepția unei structuri dinamice pentru ADN, la nivelul căruia există regiuni care se desfac tranzitoriu și monocatene care se re-împerechează. Aceasta ne face să considerăm că molecula se comportă ca și cum ar „respira”. În ADN linear, desfacerea spontană a bazelor este totuși rară la temperaturi fiziologice: durata de viață a împerecherilor/desfacerii acestora este ordinul 10^{-2} și respectiv 10^{-7} secunde.

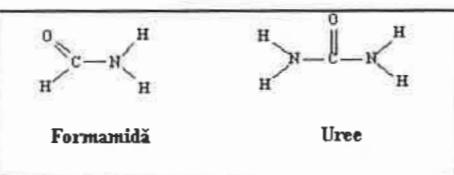


Figura 3.25. Agenți denaturanți pentru dubla elice ADN. Sunt molecule capabile să formeze legături de hidrogen și să inducă denaturarea ADN

Trebuie să reținem că *in vivo*: i) probabilitatea de denaturare a ADN în condiții de pH, forță ionică și temperatură celulară este minimă. Cu toate acestea existența procesului activ de împerechere parțială este obligatorie pentru replicare și transcripție; ii) proteinele care se leagă la ADN inhibă, pentru cea mai mare parte, denaturarea. Cu

toate acestea, în funcție de starea fiziologică a celulei, numeroase proteine destabilizează dubla elice.

6. Bilanț

Principalii factori care determină structura spațială a acizilor nucleici:

- conformația scheletului și sarcina electrostatică;
- dublele interacții ale bazelor cu solventul: hidrofobe prin intermediul nucleelor și hidrofile prin intermediul substituenților polari;
- stivuirea bazelor prin contacte Van der Waals;
- împerecherea specifică a bazelor prin legături de hidrogen.

Totuși, în raport cu proteinele diversitatea combinațiilor este limitată de utilizarea a numai patru monomeri constitutivi:

- ADN este macromoleculă formată din două catene polinucleotidice ale căror grade de libertate și varietate de organizare sunt reduse;
- moleculele de ARN prezintă un repertoriu structural care amintește de cel al proteinelor, motive și domenii, care le permit, de altfel, să exprime anumite funcții cum ar fi cea catalitică.

De ce T în ADN și U în ARN?

Dezaminările accidentale (oxidative) fac ca citozina (C) să poată pierde spontan gruparea sa amino (înlocuită de OH) și să se transforme în uracil, deci să stea la originea unei mutații. Din fericire, există enzime de reparare care recunosc U, deoarece U nu este prezent în mod normal în structura ADN. Acestea înălță U prin excizie și o pot înlocui cu C.

În ADN, baza T poate fi deci considerată ca un semnal care indică normalitatea, și că orice apariție a lui U trebuie considerată o greșală. Dacă ADN ar fi avut U în stare normală, enzimele de reparare nu ar fi putut distinge între „U normal” și U provenind din dezaminarea citozinei.

În ceea ce privește ARN, acesta posedă U fie în stare „normală” sau după dezaminarea accidentală a citozinei. Este deci imposibil diferențierea celor două tipuri de U. În același timp sinteza T (compus metilat) este mai scumpă din punct de

vedere energetic decât U. Deoarece integritatea ADN este esențială pentru organism, ARN nu a beneficiat de acest sistem de protecție specific ADN.

De ce deoxiriboză în ADN și riboză în ARN?

Helixurile care conțin riboză sunt mai puțin stabile decât cele care conțin deoxiriboză, datorită prezenței grupării OH din poziția 2'. Deci, deoxiriboză conferă un element de stabilitate ADN, gardianul informației genetice a organismelor.

Pe de altă parte, în structura ARN prezența OH în poziția 2' este esențială și utilă în excizia intronilor din pre-ARNm.

De ce 2 catene în ADN și una în ARN?

În molecula de ADN existența a două catene complementare reprezintă o modalitate de asigurare a păstrării informației genetice. Așa cum vom vedea în capitolul despre mutații, în cazul deteriorării unei catene, informația este conservată de celalătă. Cât privește ARN, se pare că acesta nu reprezintă decât o copie printre altele mii.

CAPITOLUL IV

STRUCTURA SECUNDARĂ ȘI TERȚIARĂ A ARN

Moleculele de ARN, care conțin două catene împerechete, reprezintă o excepție care este întâlnită la câteva virusuri. Diferitele tipuri de ARN sunt, de fapt, produși ai reacțiilor de transcripție a unei singure catene. În acest caz structura primară, reprezentată de compoziția și secvența nucleotidică constituie:

- a) suportul copiei codificate de gene destinat traducerii în proteine;
- b) obiectul unei serii de modificări importante și variate care determină obținerea unor baze atipice (dihidro-uridina, pseudo-uracilul, etc.);
- c) structura care individualizează situri specifice de legare a proteinelor;
- d) structura care determină orientarea spațială a polimerului la nivel secundar și terțiar.

1. Structura secundară a ARN

Forțele de stivuire și de împerechere a bazelor determină și în cazul ARN, structuri sub formă de elice. Acestea nu au perfecțiunea dublului helix de referință prezent în structura ADN, dar împreună cu regiunile existente între ele se organizează în structuri definite prin noțiunea de motive.

1.1. Elicele ARN

Numai sub acțiunea forțelor de stivuire, scheletul monocatenei tinde să ia o formă de elice dreaptă simplă și neregulată. Tendința de apropiere dintre două purine este mai puternică, astfel încât dacă două purine sunt separate de o pirimidină ele pot determina îndepărarea acesteia pentru a se stivui. Cu toate acestea, conformația

dominantă este cea de dublă elice care se poate obține din: i) două catene de ARN de tipul celor descrise mai sus; ii) dintr-o catenă ADN și una ARN în cazul hibrizilor tranzitorii care apar în celulă în timpul transcripției; iii) două segmente de ARN distante care prezintă o complementaritate destul de importantă pentru a se împerechea.

Dacă comparăm această structură cu dublul helix ADN constatăm următoarele:
 a) catenele sau segmentele sunt de asemenea antiparalele (antisens);
 b) împerecherile standard (A-U și G-C) sunt îmbogățite în cazul ARN cu alte împerecheri Watson-Crick (cuplul G-U), dar și de împerecheri ne-standard de tip A-I, U-I și C-I foarte frecvente în cazul moleculelor ARNt. De reținut că afinitatea relativă a perechilor G-C, A-U și G-U este 1 000, 100, 1 (Figura 4.1).

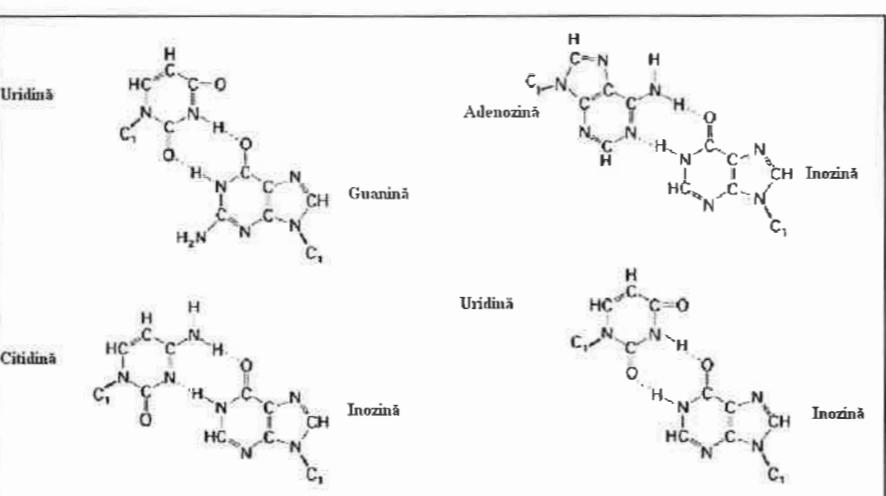


Figura 4.1. Tipuri de legături de hidrogen care sunt specifice structurii secundare a ARN (după Molecular Cell Biology Lodish H., et al., 2000)

- c) apar baze modificate derivate atât de la bazele purinice cât și pirimidinice (Figura 4.2);
- d) radicalii hidroxil din poziția 2' a ribozei se opun, prin interferență lor puternică cu baza, răsucirii pentru a forma o conformatie B. Înclinarea pe care acestea o impun planului bazei (de aproximativ 20° față de axă) are drept rezultat apariția unei

conformații asemănătoare cu conformatia A (numită adesea ARN 11 pentru a accentua faptul că sunt necesare 11 pb/tur).

Într-o moleculă de ARN monocatenară, împerecherea bazelor se face pe lungimi foarte variabile: de la una la mai multe sau la mai multe zeci de perechi de baze. Diferitele elice, formate împreună cu segmentele aleatoare ne-împerecheate care le separă, desemnează câteva structuri bine definite și reproductibile care reprezintă gradul secundar de organizare. Aceste motive pot fi reprezentate printr-un grafic bidimensional.

1.2. Motivele elementare 2-D

În figura 4.3 a este prezentată structura secundară a uneia dintre cele mai cunoscute molecule de ARN. Sunt evidențiate motivele identice care se regăsesc în structura tuturor moleculelor de ARN de transport. Se observă prezența unor „proeminențe” și „pliuri” care determină orientarea segmentelor. Structura reprezintă o alternanță interesantă de tije, la nivelul cărora bazele se împerechează pe bază de complementaritate, și bucle.

Bucile diferă prin: i) poziția lor internă sau externă în organizarea generală a moleculei; ii) mărimea elementelor lor, tijă și buclă; aceasta variază de la mai multe sute pentru cele mai mari la câteva unități pentru buclele cu motive în agrafă, mai puțin perfecte decât cele descrise în cazul ADN.

Aceste motive sub formă de agrafă sunt importante în structura și funcționarea ARN. Bucile acestora sunt constituite din secvențe particulare: i) secvențe stabilizante cum sunt UNCG care determină formarea unor bucle solitare; ii) secvențe dotate cu potențial de interacție cu alte secvențe, cum este cazul bucelor GNRA și a bucelor de șapte baze care sunt caracteristice ARNt.

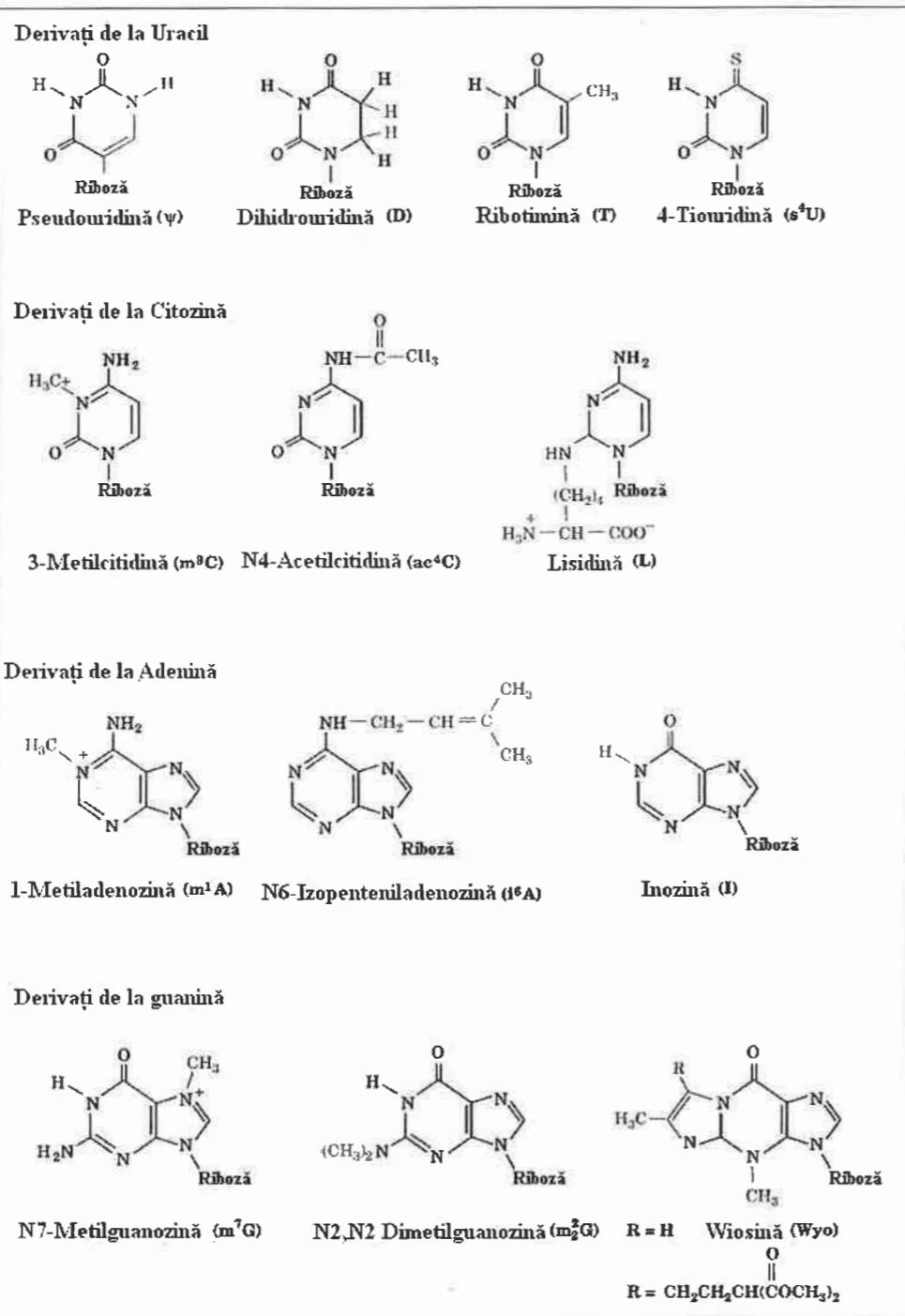


Figura 4.2. Tipuri de baze modificate prezente în structura acizilor nucleici

2. Structura terțiară a ARN

2.1. Interacții între structurile secundare

Diferite regiuni secundare, mai mult sau mai puțin distanțate în reprezentarea plană, determină prin interacție apariția de replieri spațiale. Legăturile implicate sunt legături de hidrogen:

- formate între bazele din regiunile ne-împerecheate care determină perechi Watson-Crick sau alte tipuri;
- determinate prin participarea bazelor modificate (Figura 4.2);
- foarte originale care implică grupări ale scheletului care formează asocieri cu trei sau chiar patru parteneri. În aceste cazuri pot participa grupările hidroxil din poziția 2' a ribozei sau un atom de oxigen al grupării fosfat.

2.2. Caracteristicile structurilor 3-D

În urma interacțiunilor descrise mai sus iau naștere structurile 3-D. Un număr restrâns de asocieri simple, prezente în motivele arhitecturale 3-D, au fost deja identificate iar altele sunt în curs.

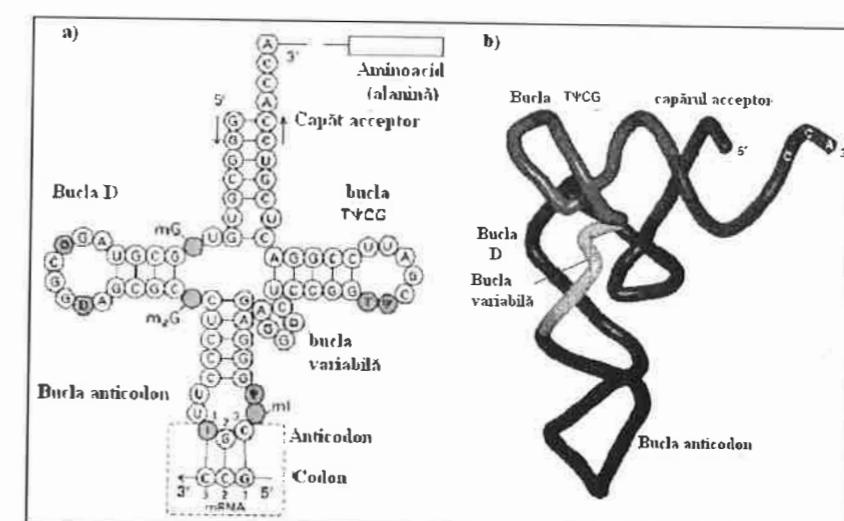
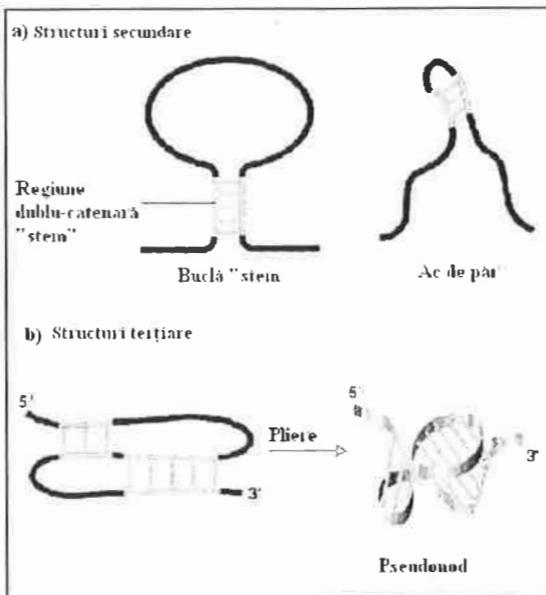


Figura 4.4. Tipuri de structuri secundare și terțiere caracteristice moleculelor de ARN: a) structuri secundare; b) structuri terțiere și pseudo-terțiere (după *Molecular Cell Biology* Lodish H., et. al., 2000)

Până în prezent au fost caracterizate câteva motive arhitecturale:

- a) două elice care se alătură sau se suprapun parțial (îmbucă) prin intermediul fosei lor aplatizate;
- b) o elice fixată într-o fosă: a) un segment ne-împerecheat se fixează prin împerecheri de tip Hoogsteen la nivelul fosei profunde și prin intermediul ribozei la nivelul altui fragment: se formează astfel o triplă elice; b) sau prin prinderea unei bucle GNRA în fosa sa aplatizată; c) asocieri între regiuni ne-împerecheate ale unei bucle cu un segment aleator determinând producerea unor pseudo-noduri (noduri false) (Figura 4.4).



2.3. Organizarea în domenii

Conformația globală a moleculelor de ARN mari prezintă domenii independente care determină apariția unei structuri specifice și compacte pentru unele din aceste motive. Acestea sunt separate de fragmente flexibile. Cel mai bun exemplu, în acest sens, îl constituie structura secundară a ARNr 16 S, de 1542 nucleotide, de la *E. coli* (Figura 4.5). Aceasta a fost obținută prin compararea secvențelor de la mai multe tulpi și se consideră a fi conservată evolutiv. În figura 4.5 sunt prezentate cele patru domenii și localizarea principalelor subdomenii la nivelul subunității ribozomale 30 S. Fiecare domeniu este alcătuit din structuri de tip tijă buclă specifice.

Asemenei proteinelor, secvența nucleotidică a polimerului conține întreaga informație a conformației sale. În același mod, achiziționarea structurii spațiale este o temă încă actuală de cercetare, care vede confruntându-se două concepții opuse: fie

motivele se formează secvențial și paralel cu biosinteza catenei fie, din contră, molecula completă suportă o pliere aleatoare provizorie la nivelul căreia se realizează ajustarea motivelor.

Indiferent de cronologie, important este că o moleculă de ARN poate exista sub diferite forme conformatoionale reversibile, dependente de ionii magneziu sau de liganzi de tipul polipeptidelor sau proteinelor.

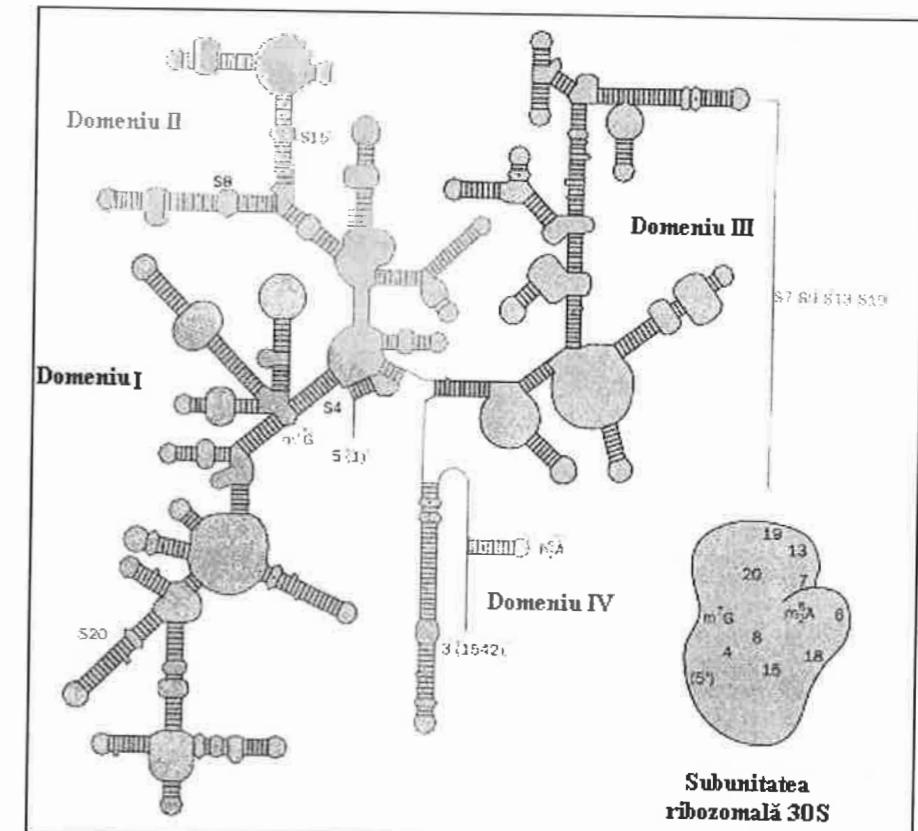


Figura 4.5. Structura secundară a ARNr de 16 S de la *E. coli* de 1542 nucleotide bazată pe compararea secvențelor de la diferite tulpi (după *Biochemistry*, Voet&Voet, 1995)

În cazul ARN, cristalografia cu raze X este adesea un eşec deoarece densitatea lor de sarcină reprezintă un impediment pentru determinările cristalografice sau determină rupturi. Utilizarea tehnicii RMN este limitată la moleculele de mărime mică. Pentru moleculele ARN de mărime mare, metoda cea mai bună pentru identificarea

replierilor 2-D și 3-D, plecând de la secvența primară, o constituie modelarea moleculară.

Mult timp, modelele de studiu ale conformației 3-D au fost constituite din moleculele de ARN de transfer (ARNt). În prezent, ribozimele de tipul celei descoperite la *Tetrahymena* reprezintă un material de studiu foarte interesant.

3. Tipuri de ARN

Studiul aprofundat al structurii diferitelor molecule de ARN nu prezintă interes real decât în corelație cu funcțiile acestora în mecanismul transcripției sau în cadrul biosintizei proteice. În aceste condiții ne vom limita numai la câteva aspecte ilustrative privind structurile elementare descrise anterior.

3.1. ARN mesager

Reprezintă copii ale genelor ADN. Aceste amprente în limbaj genetic ternar (aminoacizii sunt codificați de triplete de baze numite codoni) conțin secvența proteinei care va trebui sintetizată, flancată de secvențe adiționale necesare funcționării și reglării mașinăriei de translație. Conceptul de mesager a fost formulat pentru prima dată de F. Jacob și J. Monod în 1961. Aceștia au primit împreună cu A. Lwoff premiul Nobel pentru fiziologie și medicină în 1965.

La prokariote informația este adesea copiată de pe operonii bacterieni, ARNm fiind o molecule policistronică (Figura 4.6a)

La eucariote ARNm este monocistronic și conține exoni și introni. Utilizarea ARN mesager permite celulei să separe stocarea și utilizarea informației. În nucleul eucariotelor, în urma procesului de transcripție, moleculele de ARN nuclear heterogen (ARNnh) formează o colecție de transcripții pentru numeroase gene nucleare: i) transcripții primari, mărimea lor este identică cu cea a genei; ii) molecule parțial maturate care sunt lipsite de un număr variabil de introni. Moleculele de ARNm citoplasmatic sunt produsul unei astfel de colecții complexe de precursori care au suferit un complex proces de maturare (Figura 4.6b). Precursorii ARNm de la eucariote sunt procesați înainte de transportul ARNm în citoplasmă unde urmează a fi tradus de

către ribozomi. Acest proces constă în: i) adăugarea structurii "cap"; ii) scindare și poliadenilare în poziția 3'; iii) înălțarea intronilor și sudarea exonilor („splicing”).

În timp ce genele rămân izolate în nucleu, unde sunt părți integrante ale moleculelor enorme de ADN, informația acestora poate fi comunicată unei molecule de ARN mobilă, mult mai mică și capabilă să treacă în citoplasmă. La acest nivel, molecula servește drept model pentru a dirija încorporarea aminoacicilor într-o ordine specifică, codificată de secvența nucleotidelor în ADN și ARNm. De asemenea, folosirea ARNm permite celulei să își amplifice puternic activitatea. O moleculă de ADN poate servi de model pentru producerea unui număr mare de molecule de ARN care, toate vor reprezenta mătrițe pentru producerea unui număr și mai mare de catene polipeptidice.

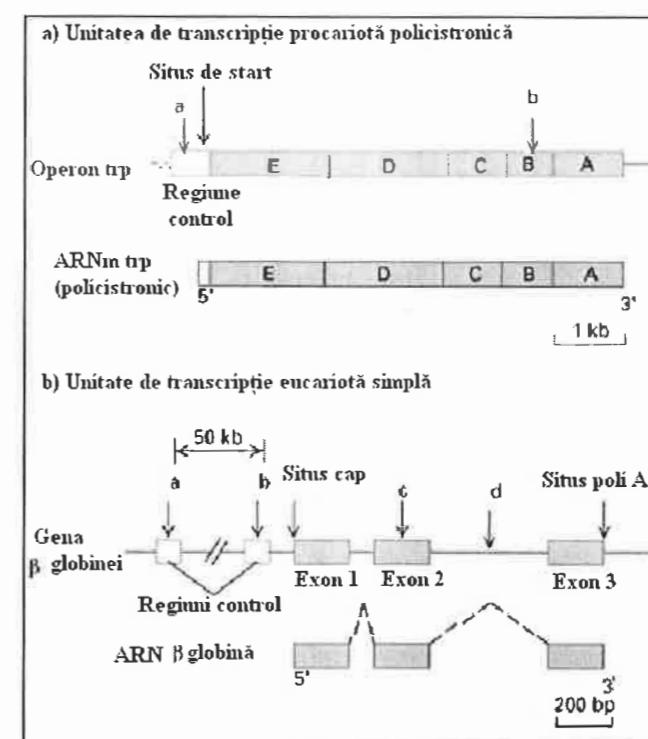


Figura 4.6. Sintiza moleculelor de ARNm: a) transcripția ARNm policistronic la prokariote; A, B; C, D și E sunt genele operonului triptofan (trp); b) transcripția și maturarea ARNm la eucariote (gena β globinei); ARN transcris de la nivelul unei unități complexe (albastru) conține exoni (c) și introni (d); poate fi procesat pe mai multe căi pentru a conduce la unul sau la mai multe unități ARNm monocistronice funcționale; liniiile punctate marchează înălțarea intronilor. (după Molecular Cell Biology Lodish H., et al., 2000)

Durata de viață a moleculelor de ARN mesager este scurtă. Din acest punct de vedere, ARNm este opusul ARNt a cărui durată de viață este mult mai mare. Aceeași molecule de ARNt este folosită de mai multe ori pentru a asigura transportul aminoacidului corespunzător la nivelul ribozomilor. La bacterii durata de viață a unui

ARNm este de numai câteva minute. La eucariote aceste molecule sunt mai stabile durata de viață variind de la câteva minute la câteva zile.

ARNm se reinnoiește foarte repede, aceste molecule fiind permanent produse și degradate. Ele au, asemenei trandafirilor, viață unui mesaj. Cu toate acestea, aceeași moleculă de ARNm poate fi citită de mai multe ori la nivelul ribozomilor.

Din punct de vedere cantitativ ARNm nu reprezintă decât câteva procente din totalul moleculelor de ARN din celulă.

În timpul transcripției unui fragment de ADN, în molecula de ARN corespunzătoare, se formează tranzitoriu hibrizi scurți ARN-ADN cu conformație A, la nivelul buclei unde catenele de ADN sunt local desfăcute.

Etapa de descifrare, pas cu pas, a mesajului purtat de ARNm de către ribozomi, pentru traducerea acestuia în catenă polipeptidică, este reglată de motive în formă de agrafă (ac de păr) sau, în anumite cazuri, de pseudo-noduri terțiare (Figura 4.4). Informația genetică copiată în structura ARNm, în urma procesului de transcripție, este tradusă în structura proteinelor prin intermediul codului genetic care realizează traducerea mesajului dintr-un cod format din înlănțuirea repetitivă și aleatoare a patru nucleotide în altul, reprezentat de alternanța a 20 de aminoacizi. Fiecare aminoacid este codificat de una sau mai multe secvențe de trei baze, numite codoni, din structura ARNm. Codul genetic este format din 64 de combinații posibile (codoni) dintre care 61 specifică aminoacizi și trei (UAA, UAG și UGA) semnalizează încheierea traducerii (STOP). Codonul de inițiere, AUG codifică formil-metionină la procariote și metionină la eucariote. Codul genetic este degenerat deoarece majoritatea aminoacizilor sunt codificați de mai mulți codoni (Figura 4.8). Codul genetic standard este comun pentru procariote și eucariote. Mici diferențe au fost evidențiate în cazul codului genetic utilizat de către mitocondrii.

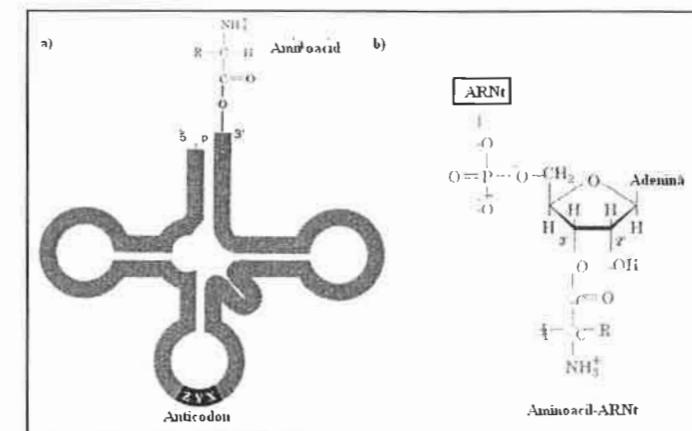


Figura 4.7. Schema unei molecule de ARNt încărcată: a) schema generală a structurii secundare a moleculei; b) modul de formare a legăturii între ARNt și aminoacil (după *Biochemistry*, Voet & Voet, 1995)

	Pozitia 1	Pozitia 2	Pozitia 3		
	U (A)	C (G)	A (T)	G (C)	
U (A)	Phe	Ser	Tyr	Cys	U (A)
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C (G)
	Leu	Ser	STOP	STOP	A (T)
	Leu	Ser	STOP	Trp	G (C)
C (G)	Leu	Pro	His	Arg	U (A)
	Leu	Pro	His	Arg	C (G)
	Leu	Pro	Gln	Arg	A (T)
	Leu	Pro	Gln	Arg	G (C)
A (T)	Ile	Thr	Asn	Ser	U (A)
	Ile	Thr	Asn	Ser	C (G)
	Ile	Thr	Lys	Arg	A (T)
	Met ^a	Thr	Lys	Arg	G (C)
G (C)	Val	Ala	Asp	Gly	U (A)
	Val	Ala	Asp	Gly	C (G)
	Val	Ala	Glu	Gly	A (T)
	Val	Ala	Glu	Gly	G (C)

Figura 4.8. Codul genetic standard. Codonul AUG care codifică pentru metionină este cel mai comun codon start. Trei dintre codoni UAA, UAG și UGA funcționează drept codoni STOP. Se poate observa degenerența codului genetic deoarece numai metionina și triptofanul sunt codificați de un singur codon, restul aminoacizilor fiind codificați de doi la șase codoni

3.2. ARN de transfer

Aceste molecule au rolul de a adapta fiecărui codon, prezent în structura ARNm, aminoacidul corespunzător. Sunt molecule polinucleotidice mici de 75-90 de resturi a căror funcționalitate se bazează pe existența a două situri strict specifice: i) capătul 3' care asigură fixarea unuia din cei 20 de aminoacizi, într-o formă activată; ii) capătul anticodon, structură complementară codonului care se potrivește foarte bine pe structura ARNm prin împerechere complementară. O moleculă de ARN de transfer, încărcată cu un aminoacid, poate fi reprezentată conform schemei elementare din figura 4.7.

O moleculă de ARNt are o serie de caracteristici datorate structurii sale primare:

a) conține nucleotide atipice, neobișnuite, prin natura bazelor pe care le conțin. Astfel, în structura ARNt găsim hipoxantina al cărei nucleotid corespunzător este IMP (Figura 4.9).

b) prezența timinei, o bază specifică ADN și a altor baze metilate.

Deoarece aceste baze nu sunt incorporate în momentul sintezei ARN, ele sunt obținute prin modificarea secundară a uneia dintre cele patru baze, A, U, C, G, întâlnite în mod normal în structura primară a ARN. Astfel, IMP provine din deaminarea adeninei din AMP și TMP provine prin metilarea UMP. Aceste modificări se numesc post-transcripționale.

Prima moleculă de ARNt, secvențializată în 1965, a fost cea pentru alanină de la drojdie (ARNt^{Ala}, 76 nucleotide). De atunci alte mii de molecule de la peste 500 de organisme sau din organite diferite au fost secvențializate. Compoziția lor se caracterizează printr-o varietate și un procentaj mare de baze modificate (Figura 4.3). Analiza tridimensională, prin difracție cu raze X, a ARNt pentru fenilalanină cristalizat, nu a fost realizată decât 10 ani mai târziu. Din păcate, de atunci numai un număr destul de mic de molecule ARNt au fost analizate prin această tehnică.

Rezultatele diferitelor metode de analiză sau a modelelor conformatiionale sunt uimitoare: în ciuda diferențelor existente între secvențele nucleotidice primare, din punct de vedere al structurii secundare și terțiare, moleculele de ARNt se prezintă sub forma același model structural.

3.2.1. Structura secundară sub formă de „frunză de treflă”

Imaginea vine de la reprezentarea în plan a moleculei (Figura 4.7a): o tijă cu trei foi de treflă, a patra putând fi adesea numai întrezoarăță.

Structura în care reperăm motivele descrise mai sus, se compune din patru brațe elicoidale pe care le diferențiem prin funcția și caracteristicile lor structurale:

1) extremitatea 3' CCA (constituită din trei nucleotide CMP, CMP și AMP) reprezintă tija care constituie brațul acceptor al aminoacidului. Aceasta se leagă covalent la hidroxilul extremității 3' hidroxil (Figura 4.7b);

2) brațul purtător al anticodonului: este o structură sub formă de agrafă a cărei buclă formată din șapte nucleotide poartă anticodonul. Numim anticodon grupul de trei nucleotide care este situat la nivelul unei bucle a ARNt și are capacitatea de a se împerechea prin legături slabe cu codonul într-o manieră antiparalelă și complementară. În cazul codonului și anticodonului este absolut necesară precizarea sensului de scriere a secvenței. Astfel, anticodonul „3' UAC 5' ” corespunde codonului „5' CAU 3' ”, (Figura 4.8);

3) brațele D și TΨC își datorează denumirile și simbolurile faptului că buclele lor conțin baze modificate rare: pentru brațul D este dehidouridina, iar pentru TΨC, este prezentă pseudouridina poziționată între timină și citozină și notată Ψ (Figura 4.7a).

Sistemul de numerotare de la 5' la 3' (de la stânga la dreapta) a fost utilizat pentru prima dată în cazul structurii ARNt de 76 nucleotide și a fost adoptată prin convenție pentru reprezentarea normală a unei molecule ARNt.

Diferențe între structurile secundare ale diferitelor molecule pot să apară la nivelul buclei brațului D dar acestea nu depășesc însă 4 baze. De asemenea, unele molecule posedă o buclă suplimentară, care reprezintă regiunea cea mai variabilă a moleculelor de ARNt. În funcție de structură, la acest nivel distingem: i) moleculele de ARNt de clasă 1, cele mai bine reprezentate și care prezintă un braț suplimentar scurt

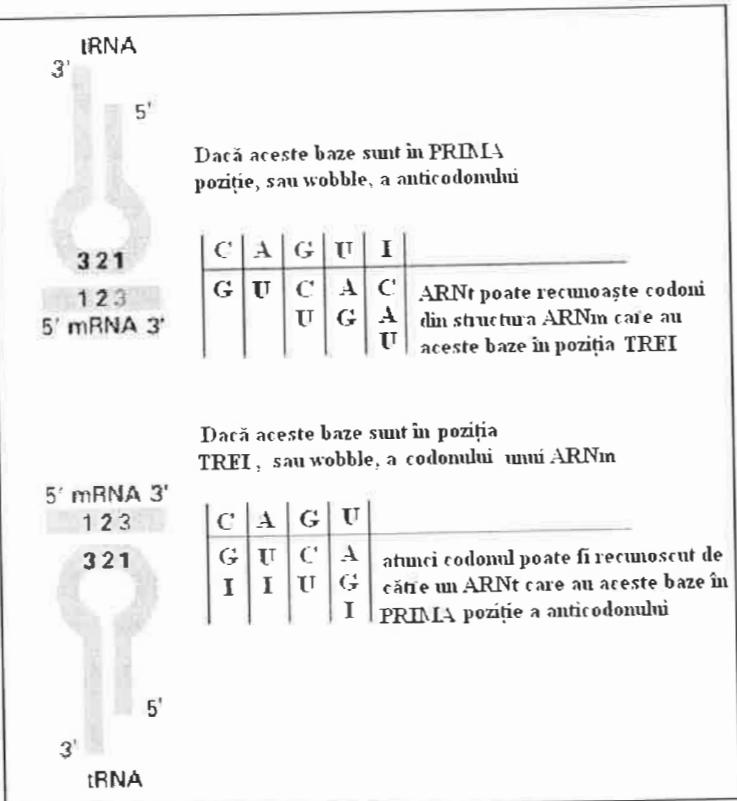


Figura 4.9. Recunoașterea codon anticodon (după *Molecular Cell Biology*, Lodish H., et al., 2000)

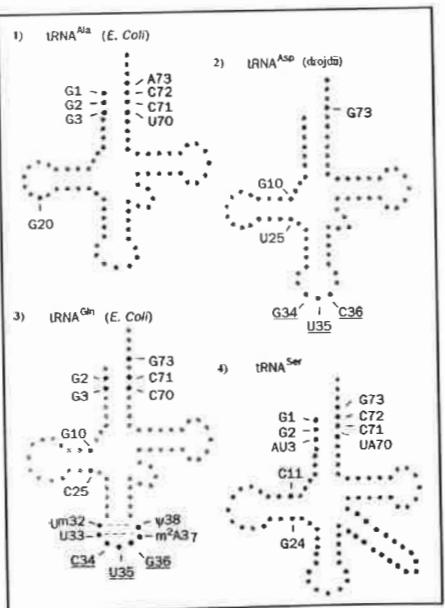


Figura 4.10. Tipuri de molecule de ARNt diferențiate în funcție de mărimea brațului suplimentar: structurile 1, 2 și 3 aparțin categoriei clasei 1 în timp ce 4 aparține clasei 2. Sunt marcate elementele de identitate majore în cele patru tipuri. Fiecare bază din structura ARNt este reprezentată de cercuri pline. Cercurile roșii indică pozițiile identice pentru recunoașterea ARNt de către aminoacil-ARNt sintetază. Bazele din structura anticodonului care reprezintă elemente de identificare sunt subliniate (după *Biochemistry*, Voet & Voet, 1995)

de 3 la 5 nucleotide; ii) moleculele ARNt de clasă 2 care posedă un braț suplimentar lung de 13 la 21 nucleotide dintre care 5 sunt complementare (Figura 4.10).

Împerecherea secundară a bazelor determină formarea de elice constante. Dacă parcurem structura din direcția 5' către 3' numărul de perechi de baze din care acestea sunt formate este 7, 3 (sau 4), 5 și 5. Împerecherile bazelor sunt de tip Watson-Crick cât și de alte tipuri.

Compararea secvențelor moleculelor de ARNt evidențiază conservarea în poziții invariabile a unor baze pirimidinice sau purinice.

3.2.2. Structura terțiară în L a moleculelor ARNt

În figura 4.3b este prezentată structura terțiară a unei molecule de ARNt. Numărul mare de punți de hidrogen, care se formează între baze situate la distanță, realizează replierea moleculei și apariția unei conformatii cu două regiuni elicoidale ale căror axe sunt situate în planuri perpendiculare.

Una dintre aceste elice lungi se formează între brațul D și anticodon iar celalătă între brațul acceptor și TΨC. Cu toate că moleculă în această conformatie 3-D este compactată, constatăm că doi poli sunt particular accesibili: extremitatea 3' și bucla anticodon.

În ciuda numărului mic de cristalizări reușite pentru moleculele de ARNt, datele obținute sunt suficiente pentru a admite existența unei structuri identice sau foarte apropriate pentru toate tipurile de ARNt.

3.3. ARN ribozomal

3.3.1. Ribozomii

Ribozomii reprezintă sediul sintezei proteice și sunt aggregate multi-moleculare necovalente, mari și compacte de proteine și ARN. Ei sunt formați din două subunități diferite, ca mărime și compoziție, care în cazul micșorării concentrației de ioni de Mg²⁺ se separă reversibil. La baza înțelegерii structurii și funcției ribozomilor stau studiile biochimice realizate de Nomura cât și utilizarea tehnicilor imunologice și de microscopie electronică.

Tratarea subunităților cu agenți denaturanți (fenol, uree, sulfat de amoniu) disociază legăturile slabe și precipită proteinele determinând separarea constituenților ARN, în trei specii diferite, și proteici, în mai multe zeci de proteine diferite.

Particulele ribozomale din citoplasma eucariotelor superioare sunt mai mari decât cele prezente la procariote. Celula ai cărei ribozomi au fost cel mai mult studiați este *E. coli*. Compoziția și caracteristicile acestor ribozomi sunt date în figura 4.11. Ribozomii 70S ai *E. coli* sunt formați din două componente: o subunitate mare (50S) și o subunitate mică (30S). Este prescurtarea pentru unitatea Svedberg care reprezintă măsura vitezei de sedimentare prin ultracentrifugare. Coeficientul de sedimentare depinde nu numai de masa, dar și de rigiditatea particulei. Astfel, se explică de ce asamblarea subunităților 50S și 30S poate da particule caracterizate printr-o constantă de sedimentare de 70S. Fiecare dintre aceste subunități sunt formate dintr-un amestec de proteine, denumite proteine ribozomale și ARN ribozomal (ARNr).

Subunitatea 30S conține: i) o moleculă ARNr 16S de 1 542 nucleotide; ii) 21 de proteine diferite, prezente într-un singur exemplar. Proteinele au fost denumite de la S1, S2 laS21. În cazul proteinelor ribozomale S are semnificația „small” și desemnează proteinele care intră în constituția subunității mici. Ansamblul ARNr împreună cu proteinele ribozomale are o masă de aproximativ 900 kDa.

Subunitatea 50S conține: i) o moleculă ARNr 5S de 120 nucleotide; ii) o moleculă ARNr 23S de 2 904 nucleotide; iii) 34 proteine ribozomale denumite L1, L2, ... L31. L este folosit pentru „large” și semnifică prezența acestor proteine în constituția subunității mari. Treizeci dintre aceste proteine se găsesc într-un singur exemplar iar una dintre proteine în patru exemplare. Ansamblul proteine-ARN al subunității mari are aproximativ 1,6 milioane daltoni.

În momentul asamblării subunității mici cu cea mare se formează între cele două o fosă la nivelul căreia va trece ARNm în timpul traducerii sale în proteine.

La eucariote ribozomii sunt mai mari, 80S, cele după subunități fiind de 40S și respectiv 60S. Compoziția acestora este diferită în ceea ce privește tipurile de ARNr și numărul proteinelor din care aceștia sunt constituși. Subunitatea mică conține o moleculă de ARNr 18S și 33 de proteine ribozomale, iar subunitatea mare trei molecule ARNr (5S, 5,8S și 28S) și 45 proteine ribozomale.

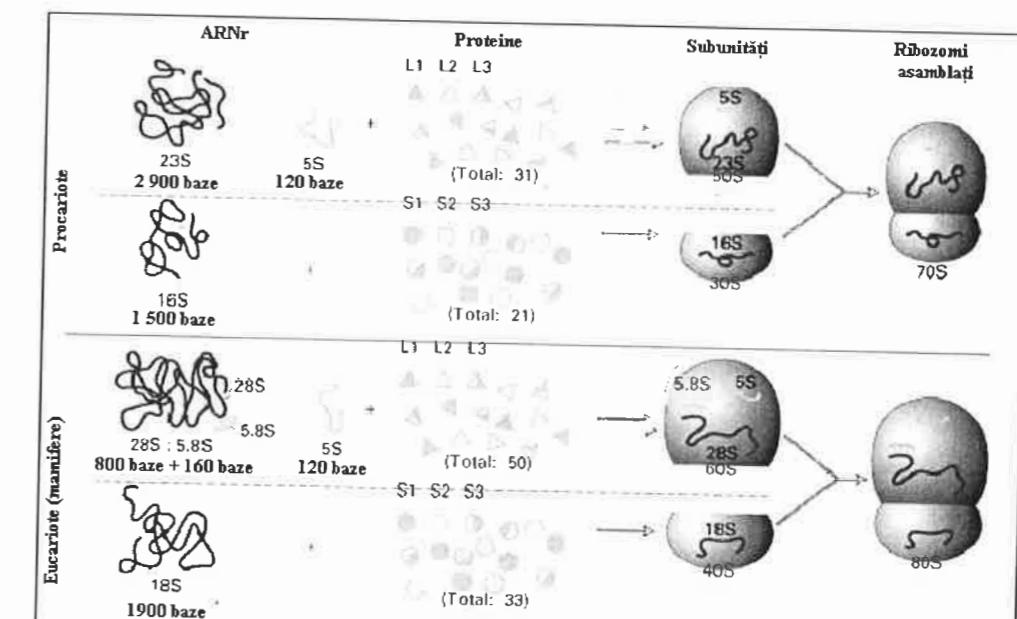


Figura 4.11. Principalele caracteristici ale ribozomilor de la procariote și eucariote (după Molecular Cell Biology Lodish H., et al., 2000)

Aceste diferențe ale constituției ribozomilor prezintă un interes foarte mare deoarece anumite antibiotice, care acționează la nivelul ribozomilor, pot să aibă o acțiune specifică asupra ribozomilor bacterieni fără a afecta ribozomii proprii organismului găzduș (Figura 4.12).

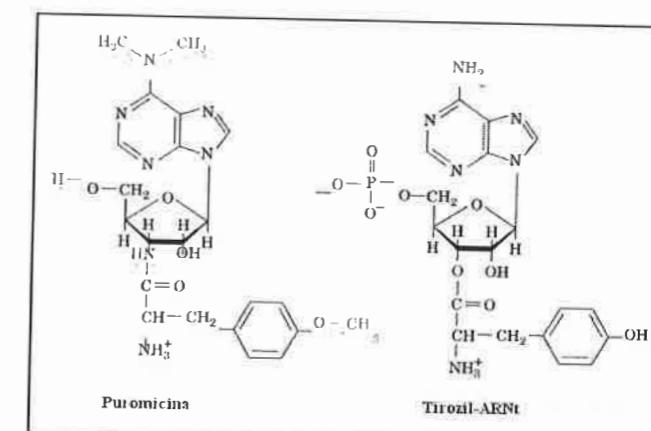


Figura 4.12. Structura puromicinei analogă cu tirozil-ARNt

Alte antibiotice de tipul puromicinei intervin în procesul de sinteză proteică atât la eucariote cât și la procariote determinând terminarea prematură a sintezei catenei

proteice datorită analogiei structurale. Această moleculă este asemănătoare cu extremitatea 3' a unui ARNr încărcat (Figura 4.12) și poate ocupa situsul aminoacil de pe structura ribozomului. Poziționarea sa permite transferul catenei în formare pe puromicină prin formarea unei legături covalente. Fixarea moleculei de antibiotic la capătul carboxi-terminal al polipeptidului stopează continuarea sintezei proteice.

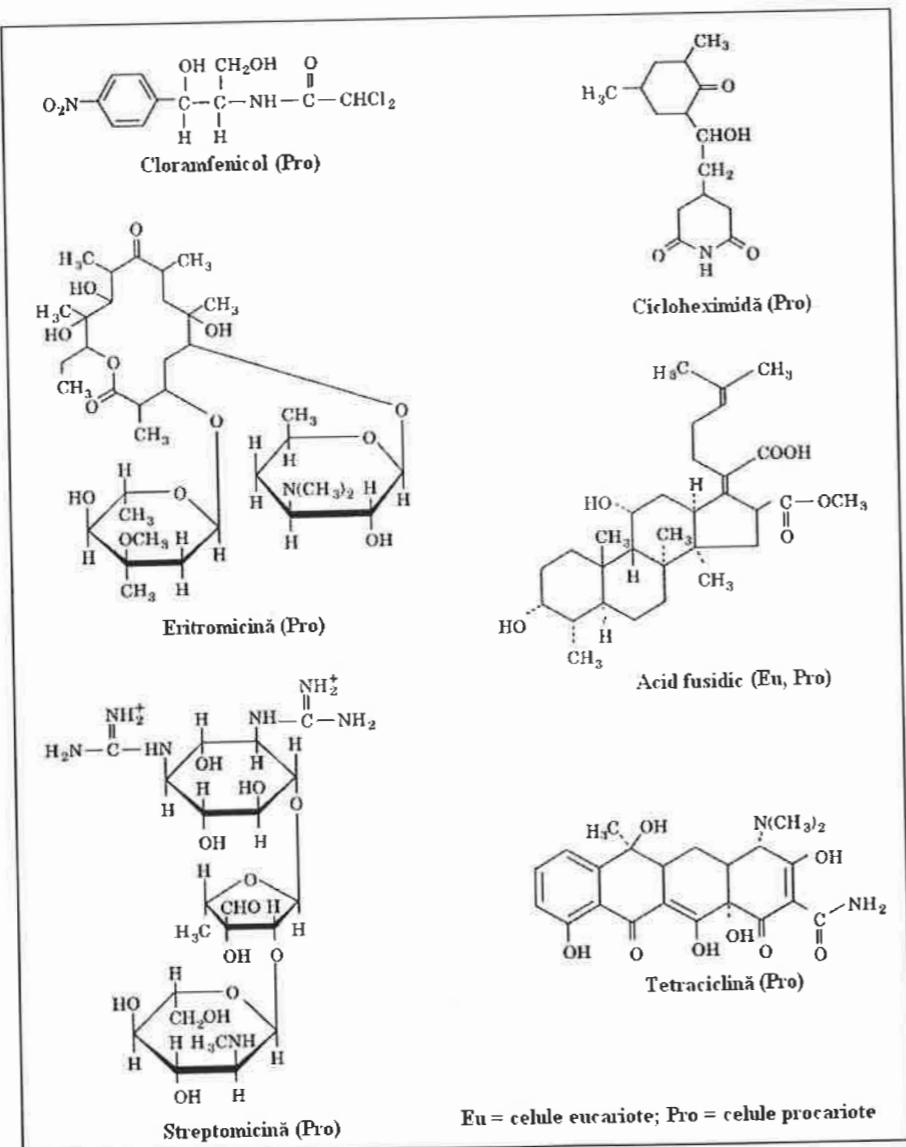


Figura 4.13 Diferite tipuri de antibiotice, majoritatea cu acțiune selectivă asupra sintezei proteice la nivelul ribozomilor celulelor procarioote

3.3.2. Structura ARN ribozomal

Moleculele de ARNr sunt constituenți majori ai ribozomilor reprezentând aproximativ 65% din structura acestora.

Moleculele ARNr se caracterizează prin câteva aspecte structurale importante care le diferențiază de celelalte tipuri de ARN. Acestea sunt molecule care suferă metilare după sinteza polinucleotidului la nivelul adeninei (N-dimetil adenină) sau prin formarea de O-metilriboze. Metilarea hidroxilului din poziția 2' a ribozei protejează polimerul de hidroliza punților fosfodiester și prelungesc durata de viață a acestuia.

A fost determinată structura primară a moleculelor de ARNr de diferite origini. Analiza secvențelor și studiile realizate asupra structurilor secundare au relevat același paradox ca și în cazul ARNr, și anume evidențierea unor structuri secundare tip care sunt conservate remarcabil cu toate diferențele importante de secvență constatate. Regiunile de secvență conservate sunt întotdeauna localizate la nivelul secvențelor neîmperechiate ale moleculei (Figura 4.14).

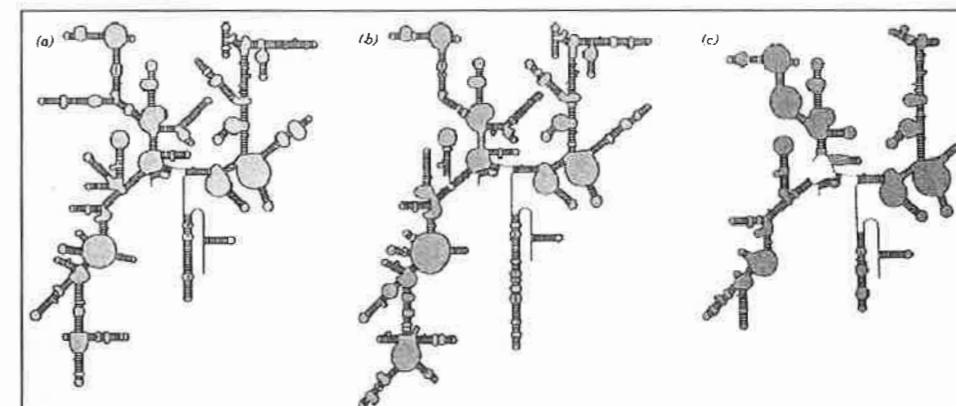


Figura 4.14. Tipuri de structuri secundare posibile ale ARNr de tip 16S: a) la archeobacterii; b) eucariote, drojdie; c) mitocondrie de mamifer (bovine). Se observă conservarea filogenetică a domeniilor și subdomeniilor din structură (după *Biochemistry*, Voet & Voet, 1995)

ACESTE molecule de ARN au conformații globale terțiare complexe care iau naștere prin stivuire multiple (asemănătoare celor din cazul ARNr) care compactează moleculea în diferite domenii identificabile. De exemplu, moleculele de ARNr 16S cuprind patru domenii formate din motive secundare care posedă regiuni împerechiate scurte de mai puțin de 10 nucleotide (Figura 4.14).

3.3.3. Rolul moleculelor ARNr

Deși nu putem afirma cu precizie că se cunosc toate implicațiile funcționale și structurale ale moleculelor de ARNr, se poate constata că acestea: i) au rol structural înrând în compoziția ribozomilor; ii) facilitează fixarea celorlalte specii de ARN (ARNt și ARNm) la nivelul ribozomilor; iii) la procariote au rol de recunoaștere, pe structura ARNm, a situsului de inițiere a traducerii (AUG) prin hibridizarea unei secvențe situată la capătul 3' al ARNr 16 S cu o secvență scurtă, numită „Shine-Dalgarno”, aflată la câteva nucleotide în amonte de AUG; iv) la eucariote nu se cunoaște încă cu precizie dacă una dintre moleculele de ARNr recunoaște o secvență situată în apropierea AUG dar, se știe că este absolut necesară recunoașterea extremității 5'', „cap” a ARNm înainte de începerea citirii informației acesta.

3.4. ARN cu rol catalitic

Certitudinea că numai proteinele au activitate enzimatică a fost total infirmată. Multă vreme identificarea enzimelor cu proteinele a condus la convingerea că, numai proteinele, cu variantele lor structuri tridimensionale și grupări laterale, posedă flexibilitate pentru a crea situsuri active care să catalizeze reacțiile biochimice. Caracterizarea sistemelor implicate în procesarea ARN a demonstrat că acest punct de vedere era deosebit de simplist.

T. Cech, în 1981 a făcut o descoperire uimitoare studiind molecula ARNr 26S de la protozoarul termofil *Tetrahymena*. Acest ARN este derivat dintr-un precursor (ARN brut obținut în urma transcrierii) care suferă un proces de maturare („splicing”) prin înlăturarea unui intron de 400 baze. Descoperirea importantă a constat în faptul că reacția de maturare (înlăturarea intronului) este catalizată de însăși molecula de ARN. De altfel, intronul eliberat devine un catalizator activ în procesul de maturare a altor molecule de ARN.

În 1983, a fost descoperit un alt exemplu de cataliză realizată de o moleculă de ARN. Sidney Altman și Norman Pace studiau în colaborare ribonucleaza P, enzimă implicată în maturarea unui precursor ARNr la bacterii. Această enzimă are o structură neobișnuită fiind compusă dintr-o proteină și o moleculă de ARN. De fapt, cercetările efectuate au demonstrat că activitatea enzimatică era datorată moleculei de

ARN, partea proteică având numai rol de structurare conformatională a ribonucleazei P. Spre deosebire de exemplul studiat de Cech, ARN din ribonucleaza P acționa asupra unei alte molecule substrat și nu asupra propriei structuri.

Numerose tipuri de reacții catalitice sunt acum cunoscute ca fiind catalizate de ARN. Au fost denumite ribozime acele molecule de ARN dotate cu capacitate enzimatică despre care, până la un anumit moment, se considera că este rezervată numai proteinelor. Activități catalitice ale ARN sunt direcționate către: i) substrate separate; ii) propria moleculă și sunt descrise ca auto-maturare sau „auto-splicing”, în funcție de tipul de reacție.

Câteva din cele mai cunoscute exemple de activitate catalitică a ARN sunt:

a) Enzima ribonucleaza P, ribonucleoproteină care conține o singură moleculă de ARN legată la o proteină. ARN posedă capacitatea de a cataliza clivarea substratului ARNr, în timp ce componenta proteică are un rol indirect, probabil în menținerea structurii conformationale a ARN catalitic.

b) Intronii din grupa I posedă capacitatea de a-și realiza propria maturare din pre-ARNm în care sunt conținuți. Reacția poate fi realizată *in vitro* numai de către ARN, dar *in vivo* ea este asistată de proteine. Acțiunea intronilor din grupa I generează molecule ARN care posedă multe alte activități catalitice corelate cu activitatea de origine.

c) Anumiți introni, atât din grupul I cât și din II, conțin faze de lectură care pot fi traduse în proteine. Unii introni din grupa I codifică pentru maturaze și pentru endonucleaze.

d) Moleculele mici de ARN din clasa virozilor și virusoidelor au capacitatea de a realiza reacții de auto-clivare. Cu toate că aceste reacții sunt intramoleculare, moleculă poate fi împărțită într-o parte „enzimatică” și o parte „substrat” ale căror funcții sunt independente. S-a demonstrat că majoritatea virozilor și virusoidelor care suferă auto-clivare au, în principiu, o structură secundară sub formă de „cap de ciocan”. În figura 4.15 este prezentată această structură obținută prin analize cu raze X. La nivelul structurii secundare a complexului ARN-ADN sunt reprezentate prin linii punctate interacțiile de tip Watson-Crick, iar cele diferite prin linii continue.