

CAPITOLUL I

COMPONENTELE STRUCTURALE ALE ACIZILOR NUCLEICI

1. Introducere

Acizii nucleici sunt substanțe, care aşa cum o indică numele lor, au fost pentru prima dată izolate din nucleii celulelor. De fapt, mai târziu s-a evidențiat existența acizilor nucleici atât în nucleu cât și în citoplasma celulelor. Deși denumirea generală nu este cea mai adecvată a fost, totuși, păstrată din considerente istorice.

Există două tipuri de acizi nucleici:

- i) ADN (acid deoxiribonucleic) localizat în principal în nucleul celulelor dacă acesta este individualizat, cum este cazul eucariotelor;
- ii) ARN (acid ribonucleic) prezent în principal în citoplasma celulelor dar și în nucleu.

Interesul studierii acizilor nucleici: acizii nucleici ADN și ARN au rol esențial în sinteza proteinelor, compuși fundamentali ai celulei, suportul marii majorități a activităților biologice.

ADN conține informația genetică necesară funcționării celulare și deci și „programul” sintezei proteinelor. El este responsabil de dictarea ordinii în care aminoacizii se leagă între ei pentru a da naștere unei proteine adecvate. ADN este un element permanent al celulei, informațiile continute în structura sa fiind transmise descendenților. Din acest motiv se afirmă că ADN este suportul eredității. Majoritatea tipurilor de acizii ribonucleici, ARNr, ARNt și ARNm, sunt molecule implicate în realizarea sintezei proteice.

Molecula de ADN este cea mai mare din organism, masa sa moleculară variind de la 10^3 - 10^5 pb, la virusuri, la 10^8 - 10^9 pb, la mamifere. Din punct de vedere structural, acizii nucleici sunt molecule polinucleotidice foarte mari formate din repetiția unor subunități numite nucleotide (**Figura 1.1**).

Unitățile nucleotidice sunt formate din acid fosforic, un monozaharid cu cinci atomi de carbon și o bază purinică sau pirimidinică.

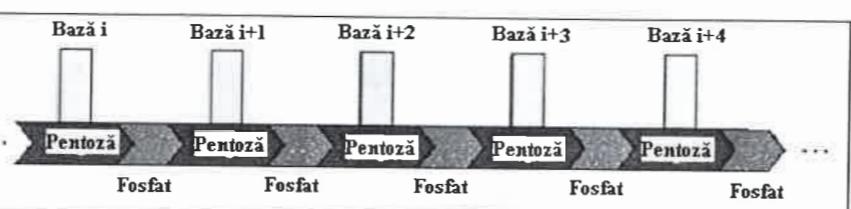


Figura 1.1. Structura polimeră a acizilor nucleici

2. Bazele azotate

În structura nucleotidelor și a polimerilor lor intră cinci baze azotate majore. Acestea le conferă proprietăți esențiale pe care le vom trece în revistă în continuare. Acestui grup îl se adaugă bazele modificate enzimatic în structura acizilor nucleici, după sinteza acestora, și care reprezintă adesea semnale chimice de protecție și control.

Diferitele baze din structură au origini diverse: intermediari metabolici, produși de transformare chimică în condiții celulare, analogi de sinteză, etc.

2.1. Tipuri de baze azotate

2.1.1. Baze majore

Sunt derivați oxi- sau amino- ai pirimidinei și ai purinei (imidazolpirimidină) care formează cele două familii de baze care intră în constituția nucleotidelor naturale. În figura 1.2 sunt prezentate cele două tipuri, în conformitate cu numerotarea convențională normală, iar în tabelul 1 sunt trecute simbolurile acestora.

Numele utilizate curent nu sunt corelate cu denumirile sistematice folosite în chimia organică. Anumite denumiri evocă sursa unde bazele azotate au fost descoperite: guanina de la guano (excremente de pasăre), timină de la evidențierea sa în timus de vacă. Pe de altă parte prin terminația sa «-ozină», citozina întreține o anumită confuzie interferând cu denumirea unor nucleozide.

Baze pirimidinice: pirimidina; citozina (2-oxi-4-aminopirimidina); uracilul (2,4-dioxopirimidina); timina (5-metil-2,4-dioxopirimidina).

Baze purinice: purina (imidazolpirimidină); adenina (6-aminopurina); guanina (2-amino-6-oxipurina).

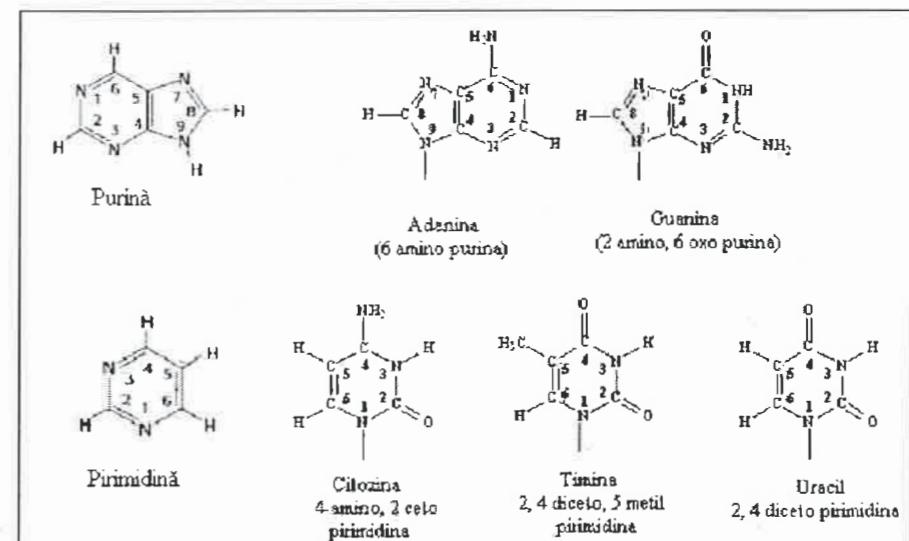


Figura 1.2. Bazele majore din structura acizilor nucleici

Nucleotidele din structura ADN și ARN nu conțin decât patru baze azotate: trei dintre acestea sunt comune celor două tipuri de acizi nucleici - cele două purine și citozina și căte una este specifică pentru fiecare tip: baza pirimidinică timina este specifică pentru ADN și derivatul său metilat, uracilul pentru ARN.

2.1.2. Baze modificate

În structura acizilor nucleici sunt prezente o serie de forme modificate sau substituite ale bazelor azotate. Siturile de modificare prezente la nivelul ciclului său sunt exociclice. Pentru nomenclatură, în primul caz, este suficientă indicarea numărului atomului, în timp ce în al doilea caz sunt necesare indicații privind natura grupării modificatoare și poziția în ciclul atomului pe care aceasta se grefează (Figura 1.3).

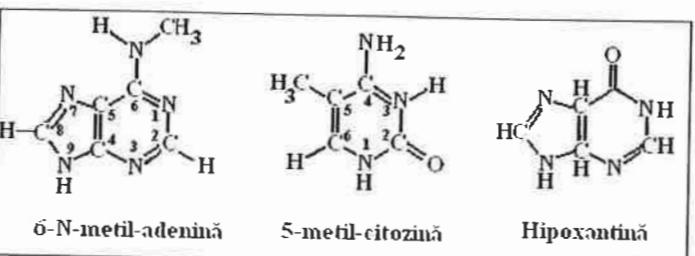


Figura 1.3. Baze modificate: 6-N-metil adenină (bacterii) 5-metil-citozină (plante, animale); hipoxantină.

ADN reprezintă un bun substrat pentru metilarea bazelor purinice în anumite regiuni ale moleculei (Figura 1.3). Rolul unora dintre aceste modificări este cunoscut. De exemplu, 5-metil-citozină din structura ADN de la plante și animale este un semnal negativ de reglare a expresiei genelor. Gruparea metil favorizează conformația inactivă a ADN în formă condensată și împiedică fixarea factorilor de transcripție, deci copierea informației în structura ARN.

Moleculele de citozină metilate din structura ADN bacterian au cel puțin două roluri:

i) constituie un sistem de distincție și de protecție a ADN bacterian față de ADN străin. Celula activează de fapt enzime de restricție (endonucleaze) pentru a distrugă ADN viral nemetalat, cel puțin în cazul primei infectări. Acest sistem de apărare este cunoscut sub numele de restricție-modificare;

ii) sunt elemente ale sistemului de corectare a eventualelor greșeli de replicare.

Moleculele de ARN, și mai ales ARNt conțin un număr variat de baze modificate derivate de la purină (hipoxantina derivată de la guanină) sau de la pirimidină.

Degradarea bazelor purinice implică reacții de deaminare: dacă nu sunt reciclate, bazele purinice sunt degradate la acid uric trecând prin forme de deaminare hipoxantină și xantină. Acidul uric, foarte puțin solubil, este produsul de excreție al acestor baze la primate (Figura 1.4).

În aceeași categorie, cu produși amintiți mai sus, putem introduce alcaloizii vegetali, cu structură de metil-xantine, care au și utilizări farmacologice: cafeina

(stimulant), teobromina și teofilina (stimulatori cardiaci, relaxanți ai musculaturii netede și vasodilatatori).

Analogii sintetici sunt molecule utile, care intră în structura acizilor nucleici și pot avea utilizări diferite:

a) în biologia moleculară: 5-bromo-uracilul este mutagen; de asemenea există derivați fluorescenti care servesc drept reactivi de marcare pentru polinucleotide;

b) în medicină ca agenți terapeutici: intră în competiție cu bazele naturale; se comportă ca antimetabolici ai sintezei acizilor nucleici și pot avea astfel rol bacteriostatic; agenți antivirali; antimitotici. În figura 1.5 sunt prezentate câteva exemple: i) derivați fluorurați, tiol și aza care sunt substanțe cu acțiune antitumorală; ii) derivat ester al N9-metilguanină care este un agent antiviral eficace față de herpesul genital (comercial aciclovir).

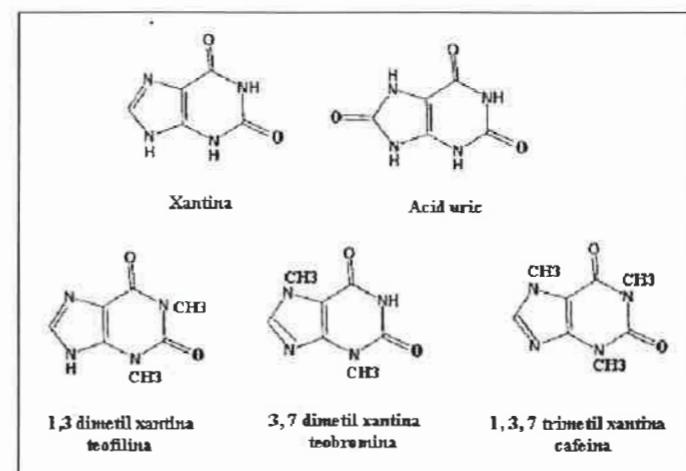


Figura 1.4. Producții de degradare și alcaloizii vegetali derivați ai bazelor purinice. (Xantina; acidul uric; 1,3-dimetil-xantina = teofilina; 3,7-dimetilxantina = teo-bromina; 1,3,7-trimetil xantina = cafeina)

2.2. Proprietățile bazelor azotate

În urma examinării structurilor din figura 1.2 se constată următoarele:

a) dubile legături creează sisteme conjugate cu consecințe structurale și fizice;

b) heterociclurile azotate sunt susceptibile de ionizare, caracterul lor de baze slabe variind în funcție de substituenții ciclurilor;

c) moleculele prezintă dualitate: grupările funcționale sunt purtate de nuclee heterociclice. Caracterul dual este la originea principalelor interacțiuni din structura polinucleotidelor și determină funcțiile acestora.

d) reactivitatea acestor structuri facilitează diferite transformări chimice, în anumite condiții celulare.

2.2.1. Conjugarea dublelor legături

În structura heterociclurilor purinice și pirimidinice starea de rezonanță, care apare între atomi, delocalizează electronii π ai dublelor legături. Consecințele sunt cele ale caracterului aromatic: i) stabilizarea puternică a moleculei; ii) structurile sunt aproape plane (pirimidinele sunt plane și purinele ușor pliate); iii) moleculele există sub diferite forme tautomere.

Tautomeria care apare la nivelul grupărilor keto/enol, amino/imino și deplasările de electroni din structura ciclurilor au drept consecință existența mai multor posibilități structurale. Figura 1.6 prezintă câteva dintre formele tautomere ale diferitelor baze azotate. Prin tehnici de cristalografie și prin spectroscopie în infra-roșu s-a demonstrat că la pH 7,0 sunt predominante formele keto-amino.

Heterociclii cu azot și derivații lor nucleozidici și nucleotidici prezintă spectre de absorbție moleculară caracteristice în ultraviolet (UV). Absorbanța derivaților purinici este mai importantă decât a celor pirimidinici. Existența celor două cicluri determină o condensare mai densă a sarcinilor deoarece acestea sunt mai dens conjugate. Aceste proprietăți optice permit dozarea și controlul purității nucleotidelor și a acizilor nucleici. Raportul absorbanțelor la lungimi de undă de 260 și 280 nm ne oferă informații importante privind puritatea compușilor nucleotidici și eventuala lor contaminare cu proteinele. Aminoacizii triptofan, tirozină, fenilalanină, prezente în proteine, conferă acestora absorbanță la 280 nm.

Fluorescența bazelor este o caracteristică care nu poate fi utilizată în aceste scopuri. Emisia fluorescentă se situează în regiunea spectrului UV între 300 și 320 nm și este foarte scăzută: pentru purine sensibilitatea este de 400 de ori mai mică decât cea a triptofanului, și pentru pirimidine de 2500 de ori mai mică.

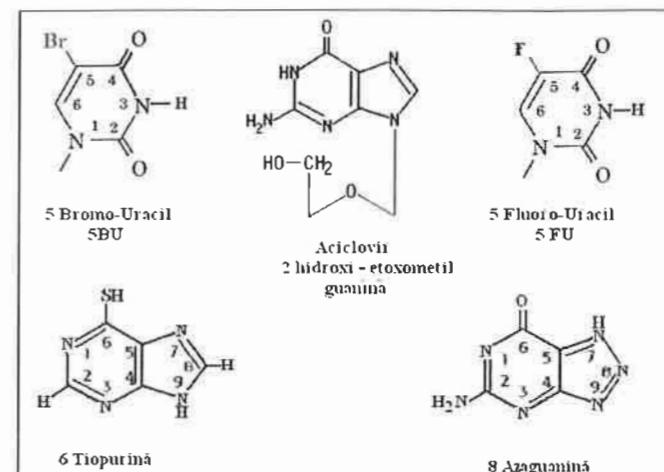


Figura 1.5. Câțiva analogi sintetici ai bazelor din structura acizilor nucleici: 5-bromouracil, aciclovir (2-hidroxi- etoxometil guanina), 5-fluoro-uracilul; 6-tiopurina; 8-azaguanina.

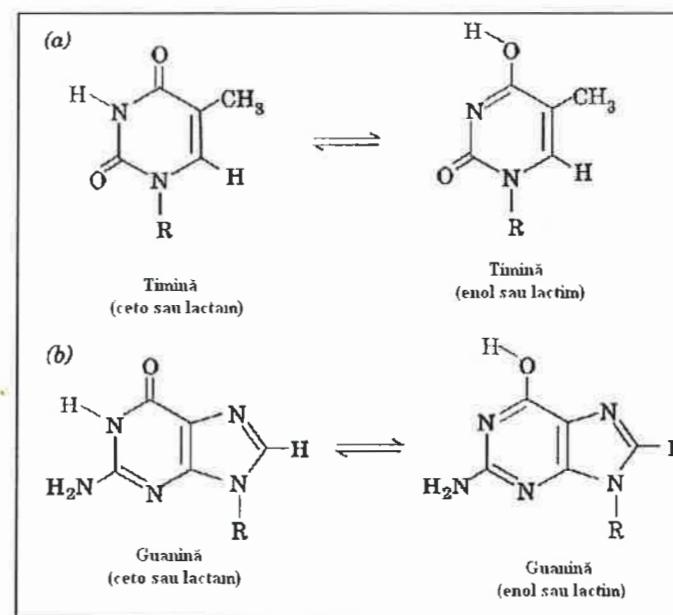


Figura 1.6. Echilibre tautomere posibile la pH 7,0 între formele lactam (la stânga) și lactim (la dreapta) ale bazelor pirimidinice și purinice (prezente sunt formă nucleozidică sau nucleotidică).



2.2.2. Ionizarea heterociclurilor azotate

Purinele, pirimidinele și nucleotidele derivate de la acestea sunt baze slabe ale căror molecule nu au sarcină ionică la pH 7,0. Pentru cele mai multe structuri comportamentul la titrare este complex deoarece posedă multiple situri potențiale donoare sau acceptoare de protoni cu localizare diferită în funcție de forma tautomeră implicată (ea însăși dependentă de pH).

2.2.3. Nuclee și grupări funcționale

Faptul că heterociclii substituiți sunt relativ hidrofobi are următoarele consecințe:

i) solubilitatea scăzută în apă a bazelor acizilor nucleici (contrar structurilor pirimidinice și purinice din care derivă). La pH și temperatură fiziologică bazele purinice sunt aproape insolubile. La valori de pH acide sau bazice dizolvarea lor în mediu apos este favorizată de ionizare;

ii) un efect de respingere al apei de către bazele ale căror planuri tind să se suprapună. Această tendință reprezentă fenomenul de stivuire sau „stacking” care este foarte mult studiat. În figura 1.7 este prezentat modelul de stivuire a inelelor din cristalul de 9-metil-adenină. Suprapunerea parțială a inelelor reprezintă o asociere tipică a bazelor în structuri cristaline și în dubla elice a acizilor nucleici.

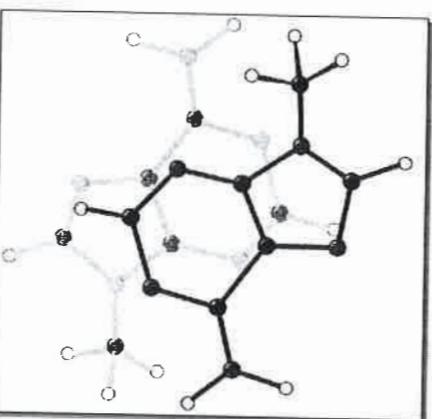


Figura 1.7. Stivuirea bazelor în cristalul de 9-metil-adenină (după Biochemistry, Voet & Voet, 1995)

De mai bine de treizeci de ani s-au realizat studii numeroase de difracție cu raze X pe cristale ale diferenților derivați ai bazelor și asupra comportamentului acestora în soluție (vâscozitate, presiune osmotica, absorbanță, spectre RMN și IR). Acestea au

dovedit că heterociclurile au o puternică tendință de a se suprapune plan peste plan, cu un decalaj caracteristic între planuri.

În soluție, condiția cea mai interesantă pentru extrapolarea interacțiilor celulare, apa are rolul determinant în formarea și stabilizarea acestor stivuirii. Repulsia apei prin efectul hidrofob al nucleelor reprezintă unul din motivele pentru care apare acest tip de organizare. Legăturile de hidrogen sunt total excluse. Stabilizarea se realizează prin forțe Van der Waals și interacții dipol-dipol între planuri. Apropierea dintre nuclee modifică distribuția lor electronică și determină apariția dipolilor în fiecare ciclu.

Cu toate acestea, trebuie să remarcăm că originea forțelor care dirijează asocierea spontană, remarcabilă, rămâne încă subiect de controverse. Reținem că fenomenul nu este asimilabil cu cel de repliere hidrofobă a proteinelor deoarece are un caracter contrar. Datele termodinamice demonstrează că acesta este controlat de entalpie în timp ce fenomenul characteristic resturilor aromatic din proteine este controlat de entropie.

Faptul că bazele se stivuiesc într-o ordine preferențială: pur-pur>pur-pir>pir-pir a fost demonstrat de valorile constantelor de disociere ale diferențelor combinații de baze, în soluție, și de frecvența dimerizării timinei prin fotoreactivare.

Această primă modalitate de interacțiune între baze este un factor primordial de stabilizare a structurii spațiale a acizilor nucleici, responsabilă de efectul hipocrom al acizilor nucleici. Stivuirea bazelor are drept consecință scăderea absorbției în UV a unui acid nucleic față de o soluție echivalentă de nucleotide libere, urmată în același timp de deplasarea spectrului cu câțiva nanometrii. Temperatura care, prin efectul său de creștere a agitației moleculare este un factor de dezorganizare, înălătură hipocromicitatea (Figura 1.8). Efectul temperaturii asupra forțelor de stivuire poate fi urmărit comparativ în cazul unui polinucleotid și al unui dinucleotid (Figura 1.9).

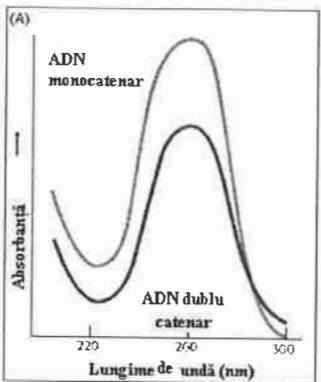


Figura 1.8. Absorbția diferențială în UV a moleculelor de ADN monocatenar și dublucatenar însoțită de deplasarea spectrului de absorbție

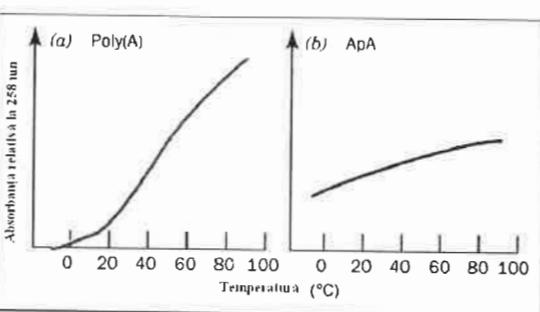


Figura 1.9. Variația absorbției relative la 258 nm cu creșterea temperaturii: a) polimerul poli (A); b) dinucleotidul ApA (după Biochemistry, Voet&Voet, 1995)

Capacitatea de a forma legături de hidrogen: grupele polare fixe, carbonil și amino, și atomii de azot ai ciclurilor sunt adecvate pentru stabilirea legăturilor de hidrogen între baze, de tip O---H și N---H. Această a doua modalitate de interacțiune, coordonată de împerecherea necovalentă dintre baze, este un fenomen cheie pentru formarea structurii secundare a acizilor nucleici și pentru duplicarea, copierea și exprimarea materialului genetic. Formele tautomere, în care se găsesc partenerii bazelor, au o importanță foarte mare deoarece condiționează posibilitatea formării acestor legături.

2.2.4. Transformarea chimică a bazelor

În celule, bazele din structura acizilor nucleici suportă alterări spontane sau sub efectul diferenților agenți fizici sau chimici. Dacă aceste modificări nu sunt reparate (ADN este singura moleculă supravegheată și reparată de către un sistem specific), ele pot sta la originea mutațiilor care determină apariția diferitelor maladii (de ex. cancer).

Deaminarea spontană lentă cu oxidarea grupelor amino exociclice, modifică natura bazei. Înținând cont de structurile bazelor azotate din compoziția nucleotidelor putem evidenția următoarele transformări (Figura 1.10):



Într-o celulă de mamifer, frecvența deaminărilor spontane este de ordinul 100/zi pentru citozină, și de numai 1/zi pentru bazele purinice.

Radiațiile energetice altereză mai mult sau mai puțin profund bazele din structura acizilor nucleici: i) iradierea UV deschide dublele legături din structura a două baze suprapuse și determină formarea de legături covalente C-C între acestea. Dimerizarea pirimidinelor (timinelor), este un factor care estimează capacitatea de carcinogenă a acestor radiații; ii) radiațiile ionizante (X, γ, etc.) deschid ciclurile și le distrug;

Numerosi agensi chimici reacționează cu bazele: i) acidul azotos (HNO_2) și compuși organici și minerali derivați de la acesta: nitrozamine, nitriți și nitrați ca și acidul sulfuros (HSO_3^-) au acțiune de deaminare (Figura 1.11). În industria alimentară regăsim acești compuși în categoria conservanților utilizati pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor. ii) mediul industrial este sursă de substanțe toxice alchilante care determină metilarea differitelor baze (guanina este cea mai ușor de metilat); iii) speciile reactive de oxigen - peroxizii, radicalii liberi, oxigenul „singlet” - sunt favorizate prin expunere la lumină și determină modificări oxidative la nivelul bazelor care obligă sistemele de reparare să reacționeze.

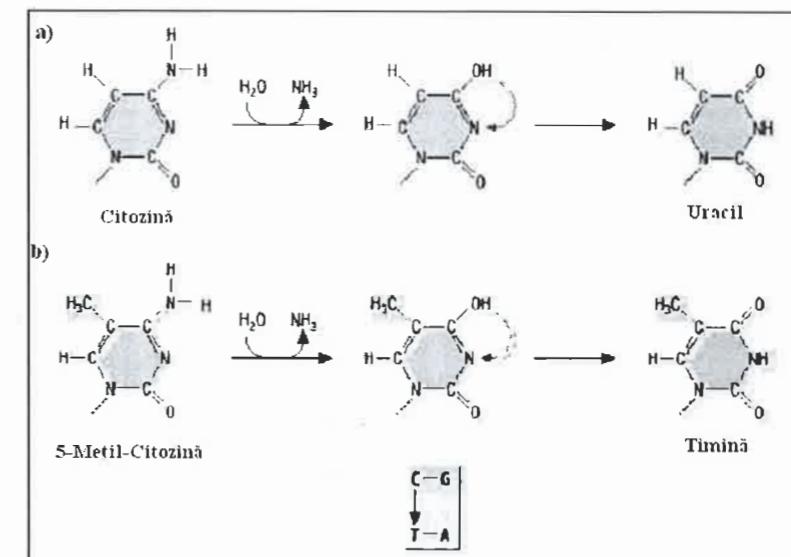


Figura 1.10. Reacții de dezaminare ale bazelor: a) citozină la uracil; b) 5-metilcitozină la timină

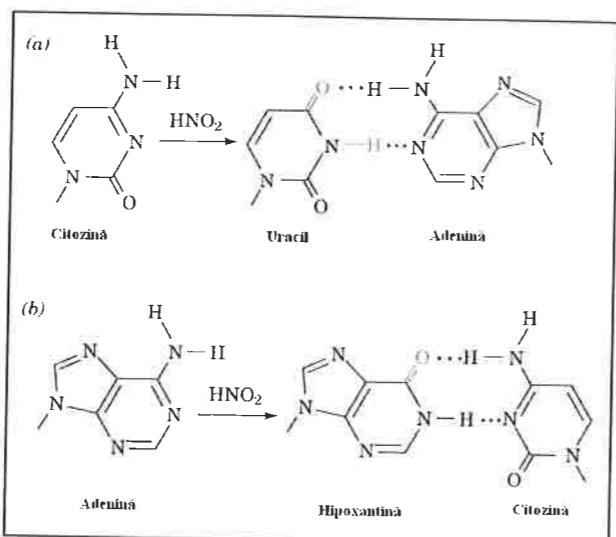


Figura 1.11. Dezaminări provocate de acidul azotos și consecințele acestora

3. Nucleozide

3.1. Pentoza nucleozidelor

3.1.1. Natură și configurație

În structura acizilor nucleici glucidele implicate sunt riboza (Rib) – în acizi ribonucleici și derivatul său 2-deoxiriboza (dRib) - în acizii deoxiribonucleici. Acestea au următoarele caracteristici de configurație (Figura 1.12):

Serie sterică	D
Cicлизare hemiacetalică	furanoză
Anomerie	β (beta)

3.1.2. Legătura cu baza azotată

Legătura cu baza este de tip N-glicozidică. Aceasta se stabilește între carbonul 1' al pentozei și azotul N1 al pirimidinelor și N9 al purinelor (se realizează numerotarea bazei și apoi se reîncepe prin numerotarea ribozei, dând numerelor apelativul „prim”) (Figura 1.13). Astfel se obțin ribo- și deoxiribonucleotidele a căror nomenclatură o prezentăm în tabelul 1.1. Ca regulă generală trebuie să reținem sufixul „-idină” pentru nucleozidele pirimidinice și „-ozină” pentru nucleozidele purinice.

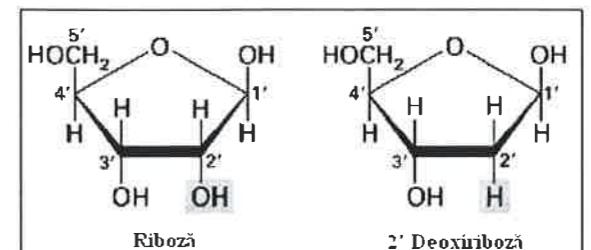


Figura 1.12. Structurile furanozice ciclice cu anomerie β ale ribozei și deoxiribozei

Legătura N-glicozidică, asemenea legăturii O-glicozidice, rezistă la tratament alcalin. Reacția sa cu acizii depinde de baza azotată: nucleozidele purinice se hidrolizează ușor, în timp ce pentru a degrada nucleozidele pirimidinice este necesară acțiunea prelungită a unui acid concentrat. Se estimează că într-o zi, într-o celulă de mamifere, numai unul din 10^5 nucleotidele purinice își pierde baza.

Tabel 1.1 Denumire și simbol cu trei litere și cu o literă pentru baze și nucleozidele lor

Baze azotate Nume	Ribonucleozide		Deoxiribonucleozide		
	S 3L	Nume 3L	Simbol 1L	Nume 3L	Simbol 1L
Baze pirimidinice Pyr	nucleozide pirimidinice	Pyd	Y pirimidinice	2'-deoxiribonucleozide dPyd	dY/Yd
Citozină Cyt	citidină cyd	C	2'-deoxicitidină dCyd	dC/Cd	
Uracil Ura	Uridină Urd	U	2'-deoxiuridină dUrd	dU/Ud	
Timină Thy	Ribozil-timină Thd	T	(2'-deoxi)timidină dTThd	dT/Td	
Baze purinice Pur	nucleozide purinice	Puo	R purinice	2'-deoxiribonucleozide dPu	dR/Rd
Adenina Ade	Adenozină Ado	A	2'-deoxiadenozină dAdo	dA/Ad	
Guanina Gua	Guanozină Guo	G	2'-deoxiguanozină dGuo	dG/Gd	
Xantina Xan	Xantozină Xao	X	2'-deoxixantozină dXao	dX/Xd	
Hipoxantina Hyp	Inozină Ino	I			

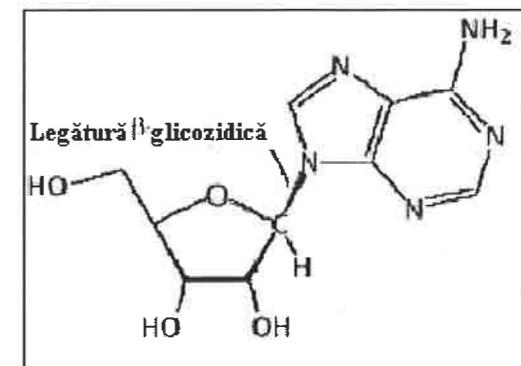


Figura 1.13. Legătura β-N glicozidică între o bază purinică și riboza

3.2. Conformația nucleozidelor

Deoarece heterocicul plan al bazelor nu este deformabil, izomeria de conformatie este dată de glucid și de legătura glicoazidică.

3.2.1. Conformerii pentozei

Ciclul furanozic al pentozelor nu este plan ci prezintă o structură spațială caracteristică. Această structură este rezultatul flexibilității legăturilor prezente în heterocicluri. Sunt recunoscute două tipuri de conformatii: E sau „envelope” și T sau „twist” ale căror niveluri de energie sunt apropiate. Conformația T reprezintă o formă intermedieră puțin stabilă care apare prin deformarea conformatiei E. Conformația T (twist), prezintă numai trei atomi coplanari: atomul de oxigen și cei doi atomi de carbon adiacenți. Ceilalți doi atomi de carbon se depărtează lejer de o parte și de alta.

În cazul conformatiei E („envelope”), sunt patru atomi adiacenți-oxigenul și trei atomi de carbon-care pot fi considerați împreună ca formând un plan. Deviațiile dintre aceștia sunt foarte mici, de ordinul picometrilor. În urma studiilor realizate pentru structura cristalină a peste 50 de nucleozide și nucleotide, s-a demonstrat că cel de al cincilea atom se depărtează la câteva zecimi de nanometri (mai puțin de 0,05 nm; distanța între cele două nuclee ale atomilor implicați într-o legătură covalentă C-C fiind de ordinul 0,15 nm) (Figura 1.14).

Aceste conformatii sunt desemnate ca *endo* dacă C care deviază din plan este de aceeași parte a planului cu carbonul C5', și *exo* dacă acesta se află orientat în direcție opusă. Nomenclatura adoptată este cea de E și T cu referire la atomii de carbon exoplanari.

La marea majoritate a nucleozidelor, atomii de C exteriori sunt C2' și C3'. Două dintre cele mai probabile conformatii pentru D-riboză și pentru derivatul său 2-deoxi-riboză din structura nucleotidelor, sunt prezentate în figura 1.15. Conformația ribozelor impune polinucleotidelor structuri spațiale diferite.

3.2.2. Izomerii de rotație în jurul legăturii glicoazidice

În cazul legăturii peptidice rigide și în cazul legăturilor C-C din structura acizilor grași, este asigurată o anumită libertate de rotație substituenților caracteristici

care stau la originea conformatiilor structurale multiple. În cazul nucleozidelor, nucleotidelor și acizilor nucleici legătura glicoazidică C1'-N permite rotația bazei azotate în jurul legăturii și situarea sa în două poziții diametral opuse în raport cu pentoza (Figura 1.16).

Pentru conformatia *syn* (împreună), planul bazelor este orientat de aceeași parte cu riboza, în timp ce pentru conformatia *anti* (contrar), orientarea este contrară. În cazul nucleozidelor pirimidinice singura conformatie naturală admisă este *anti* deoarece carbonul din poziția 2 purtător de grupă carbonilică determină apariția unor forțe de respingere cu oxigenul ciclului ribozic.

În figura 1.16 este prezentat modul convențional de definire a regiunilor syn și anti în funcție de unghiul de torsiu χ : i) considerăm rotația dreaptă a lui N1 către C1' în jurul legăturii considerate; ii) axa de referință (0°) este reprezentată de legătura C1'-O4' din pentoză; iii) legăturile bazelor considerate pentru calcularea unghiului sunt N1-C2 pentru pirimidine și N9-C4 pentru purine.

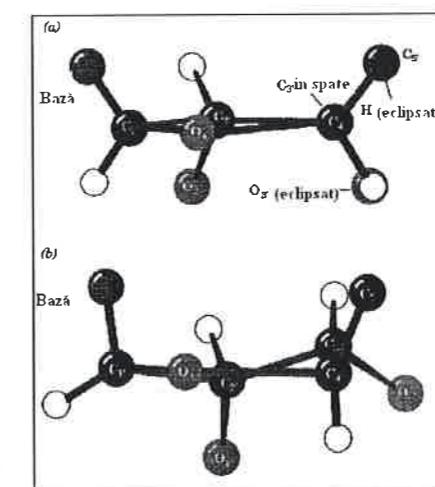


Figura 1.14. Cele două conformatii pe care le adoptă pentoza în structura acizilor nucleici: a) E („envelope”) și b) T („twist”) (după *Biochemistry*, Voet & Voet, 1995)

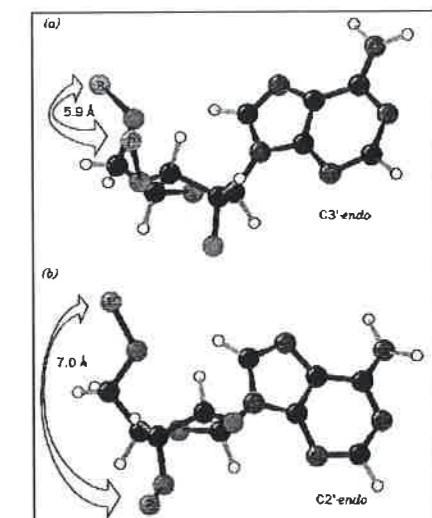


Figura 1.15. Cele mai probabile conformatii ale ciclului furanozic (riboză și deoxiriboză) din structura nucleotidelor: a) perspectivă; b) vedere din față (planul atomilor coplanari perpendiculari pe planul paginii) (după *Biochemistry*, Voet & Voet, 1995)

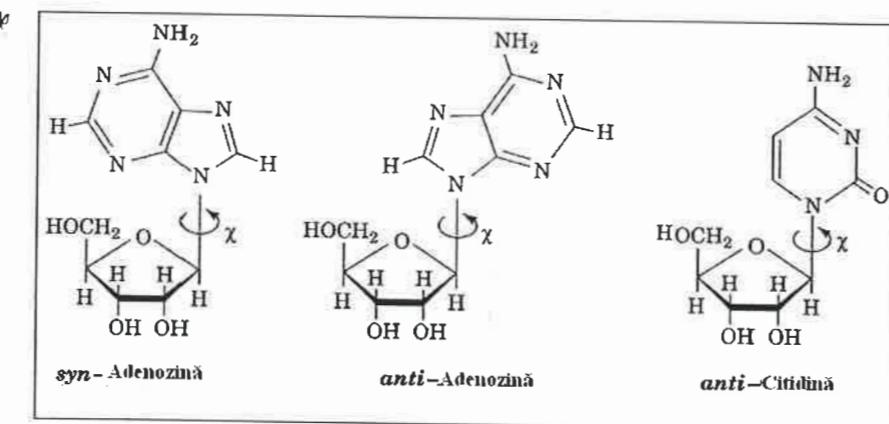


Figura 1.16. Izomerii de rotație în jurul legăturii glicozidice și definirea unghiului de torsiu χ (în raport cu legătura N9-C1' și N1-C1')

Constrângerile sterice și interacțiunile limitează posibilitățile de rotație: i) purinele pot să adopte două conformații în timp ce pentru pirimidine, interferența dintre gruparea hidroximetil a ozei (ribozei, deoxiribozei) și oxigenul grupării carbonil, defavorizează puternic conformatia *syn* și avantajează conformatia *anti*; ii) probabilitatea existenței unuia sau a altuia dintre rotameri (izomeri de rotație sau conformeri de rotație) depinde și de conformatia adoptată de pentoză.

Mai târziu se va discuta incidența acestei rotații asupra conformatiei finale a polinucleotidelor.

3.3. Nucleozide naturale și de sinteză

3.3.1. Nucleozidele: metaboliți și constituenți ai cofactorilor enzimatici

Ca și bazele lor, nucleozidele se regăsesc ca intermediari în metabolismul nucleotidelor: inozitol fosfatul este precursorul comun al nucleotidelor care conțin în structură adenozină și guanozină.

Alte nucleozide se regăsesc sub formă de cofactori sau coenzime. De exemplu, adenozina este prezentă: i) legată de gruparea sulfhidril a metioninei (Figura 1.17) formând **S-adenozilmethionină**, cofactor care asigură transferul unei grupări metil; ii) în molecula **coenzimei B12**, sub forma 5'-deoxadenozil cobalamină (Figura 1.18); iii) în **fosfoadenozil fosfatosulfatul** (PAPS, Figura 1.17) care este implicat în reacțiile de sulfatare a glicanilor și a

lipidelor; adenozin 3', 5' -difosfat fixează o grupare sulfat printr-o legătură anhidridică, formată între acid sulfuric și fosfatul din poziția 5' (Tabel 1.2).

Tabel 1.2. Coenzime și molecule intermediare metabolici în structura cărora intră adenozina

Compusul	funcția	nucleotidul sau nucleozidul din structură	legătura cu restul moleculei
Coenzima A (CoA)	acilare	adenozin 3'-fosfat 5'-difosfat (Ado3'P,5'PP)	ester: 5' diP-alcool
Flavin adenin dinucleotid	Oxido-red	adenozin 5'-difosfat (Ado 5' PP, ADP)	ester: 5' diP-alcool
Nicotinamid adenin dinucleotid (NAD și NADP)	Oxido-red	adenozin 5'-difosfat (Ado 5' PP, ADP)	ester: diP-oză
Coenzima B12 (Co B12)		5'-deoxadenozin (5' dAdo)	C5'-Co din nucleu
Fosfoadenozin fosfatosulfat (Ado3'P5'PS, PAPS)	trans.sulfat	adenozin 3',5'-bisfosfat (Ado3',5'diP)	anhidridă:5'P-sulfat
S-adenozilmethionină (AdoMet)	transf. metil	Adenozină (Ado)	sulfhidril: C5'-S(Met)

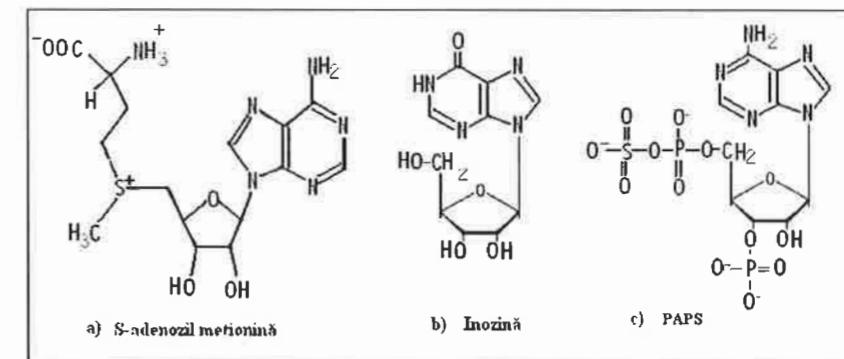


Figura 1.17. Exemple de nucleozide care intră în structura unor metaboliți sau/și cofactori: a) S-adenozilmethionină (SAM); b) inozină (hipoxantină riboză); c) fosfoadenozil fosfatosulfat (PAPS)

3.3.2. Nucleozide atipice naturale

Sunt cunoscute și analizate o serie de nucleozide atipice naturale:

a) prezente alături de alte baze minore în structura ARNt: **pseudouridina**, uracil legat de riboză prin intermediul carbonului C5 și nu prin intermediul azotului, **formând o legătură C-glicozidică (ozidică), exceptiională**. Acest nucleozid și derivatul obținut prin reducere, **5,6 dihidrouridina**, sunt prezente în majoritatea moleculelor de ARNt și reprezintă cele mai abundente nucleozide minore. Derivații 2'-O-metilați ai ribozei constituie puncte de rezistență la hidroliza enzimatică sau alcalină a ARNt.

b) microorganismele produc nucleozide libere în structura cărora riboza este înlocuită cu **arabinoză** (Ara), cu aceeași configurație. Deoarece au fost pentru prima

dată izolate din spongieri, aceste substanțe au fost denumite spongiozide și spongionucleotide. Arabinozilcitozina și arabinoziladenozina sunt folosite în terapia antivirală (Ara-Ade contra virusului Herpes) și anticanceroasă (Ara-Cyt în tratamentul leucemiiilor). Inactivarea lor enzimatică este întârziată prin transformarea în derivați carbociclici (Figura 1.19).

c) Puromicina este un antibiotic, inhibitor al sintezei proteice, secretat de *Streptomyces*. În acest nucleozid, foarte substituit, baza este reprezentată de adenozină N-dimetilată iar pentoza este o ribozamină dimetilată atașată printr-o legătură amidică la O-metiltirozină (Figura 1.19). Antibioticul intervine la nivelul sintezei proteice la procariote, și eucariote, blocând-o.

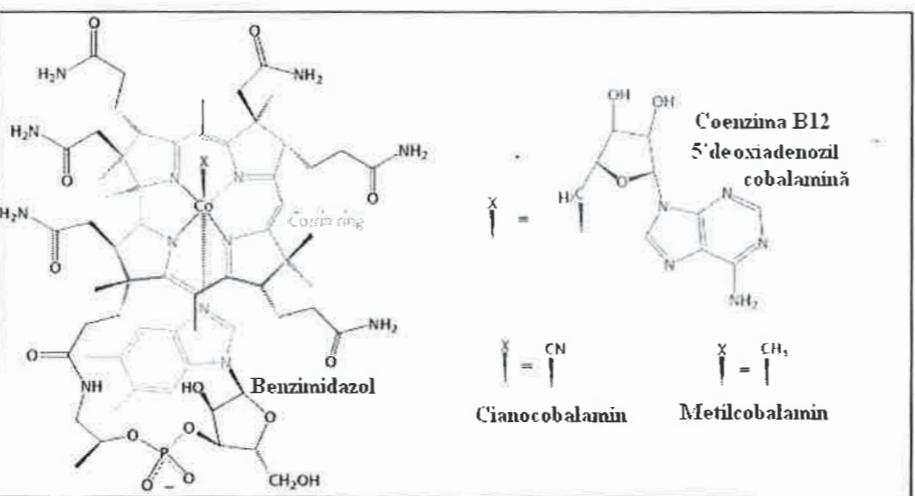


Figura 1.18. Structura moleculei B12 conține nucleozidul 5'-deoxadenozil

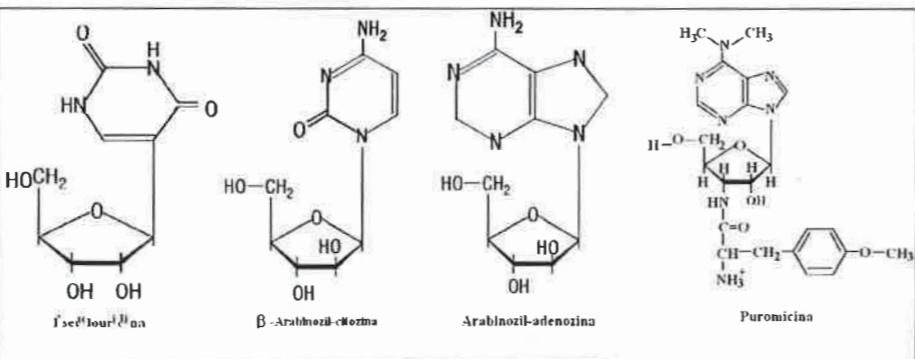


Figura 1.19. Nucleozide atipice naturale: pseudouridina, β -arabinozil-citozina, arabinozil-adenozina, puromicina

3.3.3. Nucleozide de sinteză

Nucleozidele de sinteză completează arsenalul de analogi antagoniști. Dintre structurile existente exemplificăm:

a) forme de deoxi-, halogenate sau nu ale nucleozidelor purinice și pirimidinice cu proprietăți bacteriostatice: 3'-deoxadenozina foarte eficace împotriva *Bacillus subtilis*;

b) 6-azauridina este de un mare interes în tratamentul maladiilor proliferative ale epidermei, iar derivatul său triacetat în psoriazis (Figura 1.20).

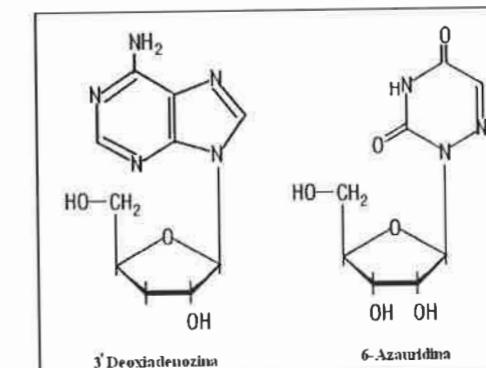


Figura 1.20. Nucleozide de sinteză: 3'-deoxadenozina, 6-azauridina

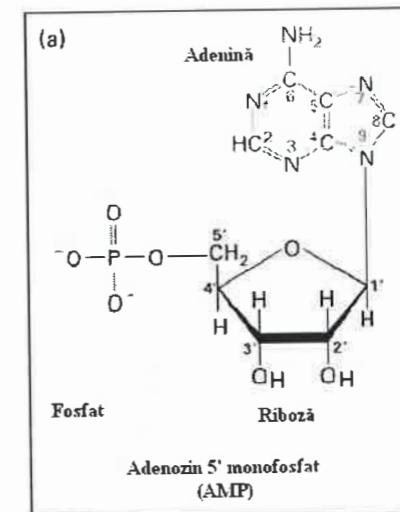


Figura 1.21. Adenozin 5'-monofosfat (adenilat, AMP)

4. Nucleotide

4.1. Tipuri de nucleotide

Sunt esteri fosfat ai nucleozidelor. Primele lor denumiri bazate pe numărul de grupări fosfat prezente în moleculă (mono-, di-, trifosfați) au fost înlocuite printr-o nomenclatură care înălță ambiguitățile. De fapt, în nucleotidele naturale:

- a) fosforilarea privește gruparea hidroxil legată la unul sau mai mulți atomi de carbon din ciclul pentozei: nucleotidul este un nucleozid mono-, di- sau trifosfat;
- b) gruparea fosfat poate ea însăși să fie angajată: i) cu alte molecule de acid fosforic în condensări anhidridice; ii) cu un nucleotid cu structură de nucleozid di- sau trifosfat, deoarece această combinație și cea de mai înainte nu se exclud;
- c) o altă grupare hidroxil, printr-o a doua legătură ester poate închide molecula și determină formarea de nucleotide ciclice.

Acizii nucleici sunt polimeri de nucleozide monofosfat. Celelalte nucleotide intervin în biosinteza acestora și în alte tipuri de interacțiuni de tipul acelora evocate mai sus. Nomenclatura și tipurile de nucleotide sunt prezentate în tabelul 1.3.

4.1.1. Mono- și difosfat nucleozide

4.1.1.1. Monofosfat nucleozide

Polifosforilarea C5' nu este o reacție foarte curentă. Acizii nucleici sunt polimeri de nucleozide 5'-fosfat. Existența legăturii internucleotidice 3'OH-5'P poate fi dovedită prin eliberarea de nucleozide 3'-fosfat, în anumite etape ale hidrolizei lor. În figura 1.21. este prezentat mononucleotidul derivat de la adenozină, care are și o serie de alte implicații metabolice.

Constantele de disociere acide (pK_a) ale grupărilor fosforice fixe fac ca la temperatură și pH fiziological grupările să conțină două sarcini negative: molecula este un acid (valoarea pK_a a primei etape de ionizare este apropiată de 1,0) de unde și denumirea de acid pe care o atribuim acestor esteri-fosfați (Tabel 1.3).

Solubilitatea lor în apă este variabilă dar rămâne redusă. Proprietățile optice de absorbție sunt datorate bazelor prezente în structură și au fost trecute în revistă în paragrafele anterioare.

4.1.1.2. Difosfat nucleozide

ACESTE STRUCTURI SUNT RARE. Cele mai bine reprezentate sunt nucleotidele deriveate de la adenină care sunt prezente în structura moleculelor de activare sau a coenzimelor (Tabel 1.2). De exemplu adenozin 3', 5' -difosfat fixează o grupare sulfat printr-o legătură anhidridică, formată între acidul sulfuric și fosfatul din poziția 5'. Fosfoadenozil fosfatosulfatul (PAPS) este implicat în reacțiile de sulfatare a glicanilor și lipidelor (Figura 1.17). De asemenea, adenozin 3'-fosfat 5'-difosfat (exemplu de nucleotid diester mixt și anhidridă) formează o parte a moleculei coenzimei A, implicată în procesul de acetilare.

4.1.2. Polifosfat nucleozide

Difosfat nucleozidele rezultă din fixarea, prin legătură anhidridică acidă, a celei de a două molecule de acid fosforic, la nivelul esterului fosforic al carbonului C5'. Reluarea reacției la nivelul acestui nucleozid difosfat (la nivelul celei de a două molecule fosfat) conduce la obținerea nucleozid trifosfațiilor. Pentru exemplificare luăm în discuție nucleotidul care conține adenină (Figura 1.22).

Consecința imediată a structurii este marea densitate de sarcini negative în condiții fiziologice: trei pentru difosfat și patru pentru trifosfat. Acestea ridică probleme pentru: i) echilibrul electric al celulei, concentrația de nucleotide libere fiind obligatoriu limitată; ii) fixarea acestor molecule la nivelul structurilor vii. Cationii divalaenți de magneziu și mangan temporizează repulsile electrostatice care pot să apară (Figura 1.23).

Acești compuși au un înalt potențial energetic. În condiții celulare, legăturile de tip anhidridă acidă au o entalpie liberă de hidroliză superioară legăturilor ester-fosfat (de ordinul a 30 kJ/mol). ATP este molecule selecționată evolutiv de către organisme pentru a constitui rezerva temporară și sursa de energie utilizabilă de către materia vie (Figura 1.24), cu toate că în câteva reacții metabolice intervin și CTP, GTP și TTP.

De hidroliza ATP depind: i) realizarea unor acțiuni fizice cum sunt contracția musculară și transportul activ al ionilor și moleculelor; ii) reacțiile chimice care sunt termodinamic imposibile fără cuplare energetică.

O diversitate mai mare de nucleotide sunt utilizate *in vivo* ca suport molecular de activare a grupelor sau moleculelor indispensabile intrării acestora în reacțiile

metabolice. Activarea-fixarea se realizează prin consumarea unei legături anhidridă acidă prezentă în structura unei molecule de nucleotid trifosfat:

a) etanolamina și colina sunt activate de către CDP (Figura 1.25);

b) glucidele sunt activate fie prin intervenția: i) UTP și mai rar de GTP și CTP, pentru biosintезa glicanilor și a lanțurilor glicozilate ale proteinelor; ii) ATP care reprezintă donorul de energie și de grupări fosfat pentru fosforilare.

Biosintiza polimerilor nucleozidici 5'-monofosfat (acizii nucleici) se realizează prin condensarea precursorilor trifosfat, energia necesară formării legăturii covalente fiind furnizată de hidroliza legăturii anhidridice. Este foarte clar că celula trebuie să întrețină permanent o rezervă și să echilibreze necesarul de NTP, aşa cum procedează în cazul aminoacicilor necesari sintezei proteice.

Tabel 1.3. Nomenclatura și simbolurile diferitelor tipuri de nucleotide (sunt figurate numai ribonucleotidele, în afară de timină care servește ca exemplu pentru deoxiribonucleotide).

Nucleotide* fosfat la nivelul a diferiti atomi de carbon (x',y': nr. atomilor de C ai pentozei)		
	Nume	Simboluri
Formulă generală	Nucleozid x',y'-bifosfat	Nuc x',y' P2
Exemple	adenozină 3'-5'-bifosfat	Ado3',5' P2
Nucleotide mono- și polifosfat (cu gruparea fosfat la nivelul aceluiasi atom de carbon)		
Formulă generală	Nucleozid x'-fosfat* Nuc5'P x'-difosfat Nuc5'PP x'-trifosfat Nuc5'PPP	NMP NDP NTP
Aplicații	citidină 5'-fosfat Cyd5'P 5'-difosfat Cyd5'PP 5'-trifosfat Cyd5'PPP uridină 5'-fosfat Urd5'P 5'-difosfat Urd5'PP 5'-trifosfat Urd5'PPP dtimina 5'-fosfat dThd5'P 5'-difosfat dThd5'PP 5'-trifosfat dThd5'PPP adenozină 5'-fosfat* Ado5'P 5'-difosfat Ado5'PP 5'-trifosfat Ado5PPP guanozină 5'-fosfat Guo5'P 5'-difosfat Guo5'PP 5'-trifosfat Guo5'PPP	CMP CDP CTP UP UDP UTP dTDP dTTP AMP ADP ATP GMP GDP GTP
Nucleotide ciclice (puncte fosfodiester între Cx' și y' din pentoza)		
Formulă generală	nucleozid x':y' -fosfat	Nucx':y'P
Aplicații	adenozină 3':5'-fosfat	Ado3':5'P
	guanozină 3':5'-fosfat	Guo3':5'P
NMPc		
AMPc		
GMPc		

*- caracterul acid al nucleozid monofosfaților face ca ele să fie denumite și:
acid 5'-citidilic (forma acidă) sau 5'-citidilat (forma ionizată);
acid 5'-uridilic (5'-uridilat); acid 5'-timidilic (5'-d timidilat);
acid 5'-adenilic (5'-adenilat); acid 5'-guanilic (5'-guanilat).

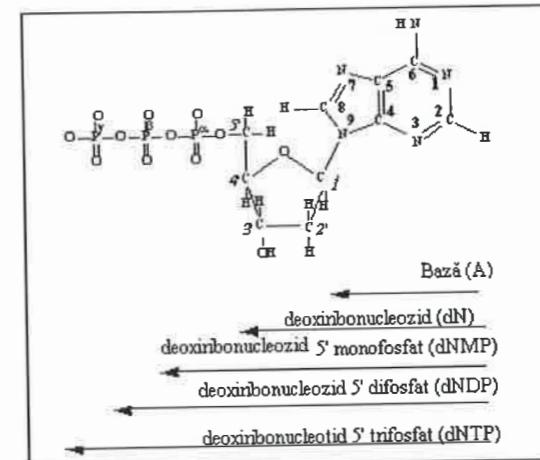


Figura 1.22. Structura nucleozid polifosfatului derivat de la adenină (ATP)

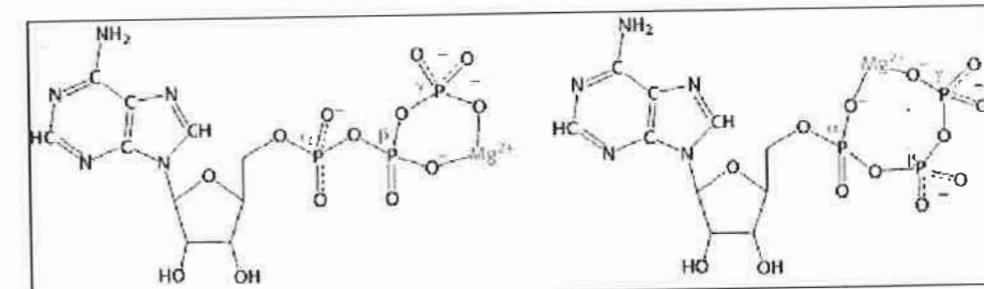


Figura 1.23. Complexul ATP Mg²⁺

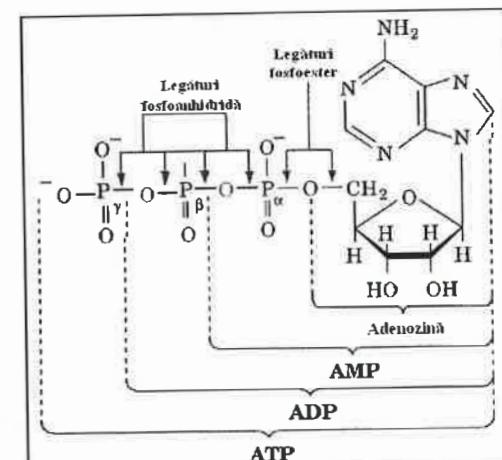


Figura 1.24. Structurile AMP, ADP și ATP cu marcarea legăturilor fosfoester și fosfoanhidridă

O serie de nucleotide sunt constituenți ai coenzimelor. Adenozină 5'-difosfatul intră în structura a două coenzime implicate în reacții de oxido-reducere: nicotinamid

adenin dinucleotid (NAD și omologul său fosforilat NADP) și a flavin adenin dinucleotid (FAD) (Figura 1.26). Denumirea acestora are mai mult caracter istoric deoarece partea a doua a moleculei are structură ciclică dar nu reprezintă un nucleotid în adevăratul sens al cuvântului. Nucleotidul se leagă la restul moleculei prin intermediarul difosfatului său. Cofactorii nu intervin în procesul catalitic ca în cazurile coenzimei A (Figura 1.27) și coenzimei B12 (Figura 1.18).

Mediatori extracelulari: nucleotidele extracelulare au fost recent recunoscute ca mediatori. Eliberate prin liză celulară sau prin exocitoza veziculelor membranare, acestea se fixează pe receptorii celulelor țintă, având, în general, acțiune activatoare. Familia ATP (ADP și AMP) este cea mai bine reprezentată pentru această funcție de comunicare celulară.

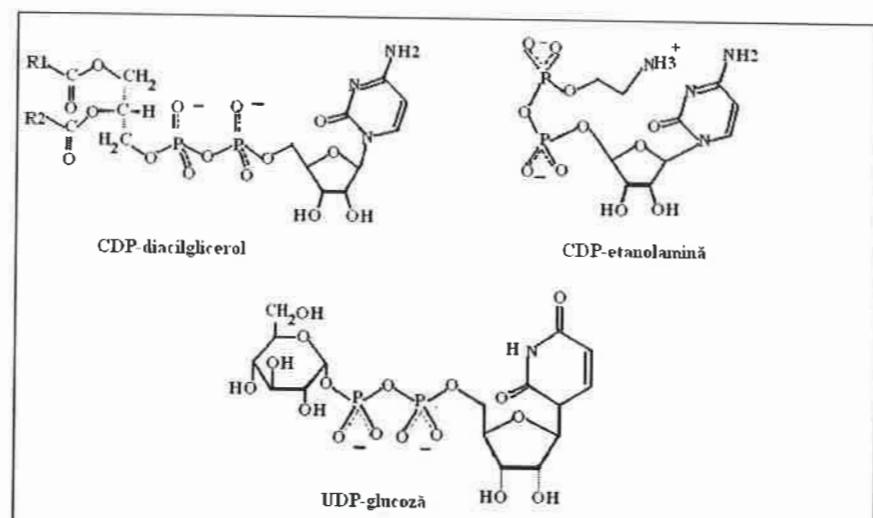


Figura 1.25. Exemple de intermediari metabolici activați: CDP-diacil glicerol, CDP-ethanolamină, UDP-glucozidase, UDP-glucozidase

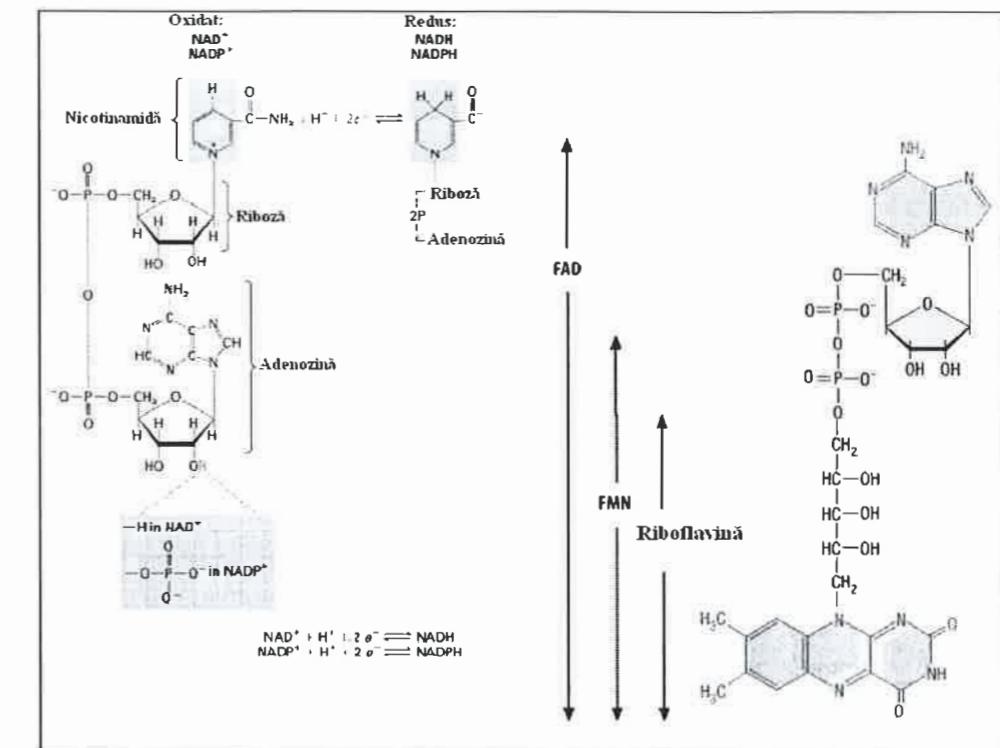


Figura 1.26. Structurile NAD(P)⁺ și FAD(H₂)

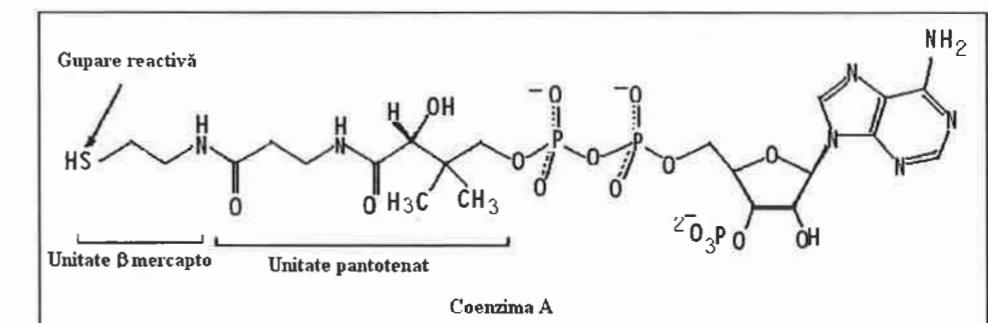


Figura 1.27. Structura Coenzimei A forma activă SH.

În tabelul 1.2 sunt prezentate coenzime și intermediari metabolici care conțin în moleculă adenozină.

4.1.3. Nucleotide ciclice

În structura acestor derivați, un fosfat formează o punte fosfodiester intramoleculară care ciclizează molecula. Acești compuși au fost selecționați pentru funcțiile lor în comunicare și semnalizare celulară fiind repartizați în compartimentul intracelular.

Mesagerii secundari: conceptul de mesager secundar a fost impus odată cu descoperirea AMP ciclic (AMPc) în 1950 de către Sutherland. Un mesager secundar este o moleculă care asigură acțiunea intracelulară a unui semnal extracelular. Acest semnal poate să fie un hormon sau un alt mediator și constituie primul mesager care se fixează la suprafața celulară.

AMPc (Figura 1.28) este produs plecând de la ATP la nivelul feței intracelulare a membranei plasmatici în urma fixării moleculei semnal. Producerea AMPc este oprită, în momentul în care acțiunea externă încetează, prin hidroliza uneia dintre legăturile ester, produsul 5'-AMP fiind recicabil.

Analiza reacțiilor la care participă acest tip de mesager ne face să înțelegem de ce această moleculă a fost aleasă evolutiv drept mesager secundar universal. GMP ciclic (GMPc) are o funcție similară dar pentru un număr foarte scăzut de căi de semnalizare (Figura 1.28).

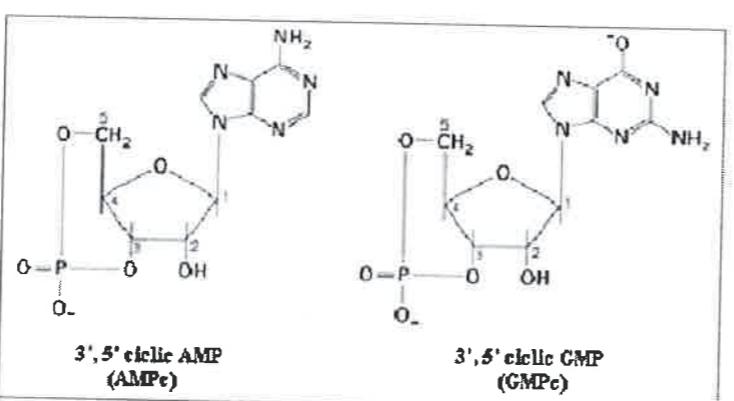


Figura 1.28. Nucleotide ciclice

4.2. Proprietățile nucleotidelor

Componentele celulare care conțin fie baze purinice, fie pirimidinice pot fi ușor detectate datorită absorbției puternice a luminii ultraviolete. Bazele purinice, nucleozidele și nucleotidele au absorbții mai puternice decât pirimidinele și derivații lor. Coeficienții de extincție molară (o măsură a absorbției luminii la lungimi de undă specifice) și lungimile de undă ($\lambda_{\text{max.}}$) corespunzătoare acestora sunt prezentate în tabelul 1. 4. Lungimea de undă la care se înregistrează absorbție maximă variază, în particular, cu baza din compoziția moleculei, dar în majoritatea cazurilor este apropiată de 260 nm. Spectrul UV pentru fiecare dintre aceste nucleozide sau derivați nucleotidici poate să diferă în funcție de pH. Absorbțiile UV puternice și diferențele datorate structurii specifice a bazelor, din structură, furnizează metode sensibile de dozare a acestor compuși atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. De exemplu, deaminarea citozinei din structura nucleozidului sau nucleotidului la derivații uracil corespunzători determină o deplasare a $\lambda_{\text{max.}}$ de la 271 nm la 262 nm, care este ușor de determinat. Datorită coeficienților molari de extincție mari ai bazelor purinice și pirimidinice în acizii nucleici, o soluție de ARN sau ADN de concentrație 1 mg/ml va avea o absorbanță la 260 nm de aproximativ 20 unități, în timp ce o soluție proteică obișnuită cu concentrația de 1 mg/ml va avea la 280 nm o absorbanță de aproximativ o unitate. În consecință, acizii nucleici pot fi ușor detectați și în concentrații foarte mici.

Legătura N-glicozadică, din structura nucleozidelor purinice și pirimidinice, este stabilă în prezență de baze. Totuși, stabilitatea acestei legături la hidroliză acidă diferă marcat. Legătura N-glicozadică din structura nucleozidelor și nucleotidelor purinice se hidrolizează ușor în prezență de acizi diluați și prin creșterea temperaturii (60°C) conducând la purine libere și glucide sau glucide-fosforilate. Pe de altă parte, legătura N-glicozadică din nucleozidele derive de la uracil, citozină și timină și din nucleotidele derive de la acestea este foarte stabilă la tratament acid. Pentru eliberarea pirimidinelor libere și completă distrugere a restului glucidic sunt necesare condiții drastice de hidroliză, cum ar fi acid percloric (60%) și temperatură de 100°C .

Legătura N-glicozadică din structura nucleozidului derivat de la dihidrouracil este sensibilă la tratament acid moderat.

Datorită grupărilor fosfat foarte polare, nucleotidele purinice și pirimidinice sunt mult mai stabile în soluții apoase decât nucleozidele și bazele libere din care derivă. În general, nucleozidele sunt mult mai solubile decât bazele purinice și pirimidinice libere.

Bazele purinice și pirimidinice, nucleozidele și nucleotidele derive din acestea pot fi ușor separate printr-o serie de tehnici. Aceste metode sunt: cromatografie pe hârtie, chromatografie în strat subțire (Thin Layer Chromatography TLC), chromatografie de schimb ionic, electroforeză. Cele mai bune separări ale compușilor purinici și pirimidinici s-au realizat prin chromatografie lichidă de înaltă presiune în fază inversă (High Pressure Liquid Chromatography HPLC). Prin această tehnică pot fi separate cantități de ordinul nano-molilor din aceste componente într-o scurtă perioadă de timp.

Tabel 1.4. Constante spectrofotometrice ale nucleozidelor purinice și pirimidinice

Nucleozidul	Coeficientul molar de extincție	λ_{max} la pH 7,0
Adenozină	15,4	259
Guanozină	13,7	253
Citidină	8,9	271
Uridină	10,0	262
Timidină	10,0	262

În figura 1.29 este prezentat profilul de separare prin HPLC al unui amestec format din baze, nucleozide și nucleotide. Dezvoltarea acestei tehnici prin introducerea coloanelor de înaltă rezoluție permite o determinare rapidă a nucleozidelor și nucleotidelor dintr-un număr mare și variat de celule în diferite stadii.

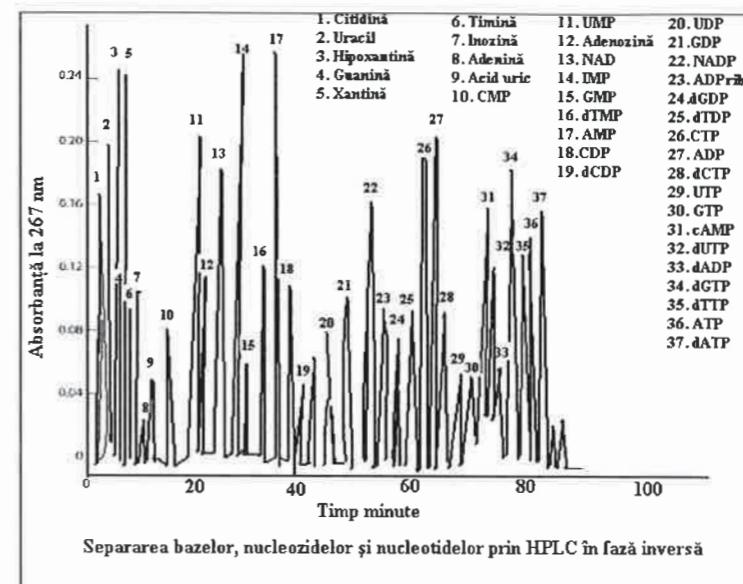


Figura 1.29. Separarea bazelor, nucleozidelor și nucleotidelor prin HPLC în fază inversă: Coloană Alltina C18-NUC, 5 µm, 250 x 4,6 mm; fază mobilă: gradient crescător de fosfat și descrescător de metanol; debit 1,5 ml/min; detector UV 267 nm

4.3. Funcții metabolice ale nucleotidelor

Toate tipurile de celule (mamifere, bacterii, plante) conțin o varietate foarte mare de nucleotide și de derivați ai acestora. Unele dintre aceste nucleotide se găsesc în cantități importante în celule (de ordin mili-molar). Rațiunea existenței unui număr mare de nucleotide și de derivați ai acestora, în celulă, este faptul că acestea sunt implicate într-un număr foarte mare de procese metabolice care asigură creșterea și funcționarea normală.

Rol în metabolismul energetic: după cum am prezentat mai sus ATP reprezintă principala formă sub care energia este disponibilă în celulă. Cantitativ, ATP este generat în celule prin fosforilare oxidativă și fosforilare la nivel de substrat. ATP este folosit pentru a coordona reacțiile metabolice, ca agent de fosforilare, fiind implicat și în procesele de contracție musculară, transport activ și menținerea integrității membranare. Ca agent de fosforilare, ATP servește drept donor de fosfat pentru generarea altor nucleozide 5'-trifosfat (GTP, UTP și CTP).

Unități monomere ale acizilor nucleici: acizii nucleici, ADN și ARN, sunt compuși din unități monomere, nucleotide. În reacțiile de sinteză ale acizilor nucleici, nucleozidele 5'-trifosfat sunt substrate care participă la formarea legăturilor 3', 5'-fosfodiester cu eliberarea unei molecule de pirofosfat la fiecare condensare.

Mediatori fiziologici: una dintre cele mai recent recunoscute funcții ale nucleotidelor și ale derivațiilor acestora este implicarea în procesul de mediere a unor proceze metabolice cheie. În primul rând, trebuie luat în considerare rolul AMPc ca mesager secundar în controlul glicogenolizei și glicogenezei mediată de epinefrină și glucagon și în semnalizarea transmembranară prin intermediul proteinelor G. De asemenea a fost recunoscută și importanța GMPc ca mediator celular. O serie de studii confirmă rolul critic al concentrației ADP în agregarea plachetelor în timpul coagulării săngelui. Adenozina provoacă dilatarea vaselor de sânge coronariene și poate avea un rol important în reglarea fluxului de sânge la nivelul coronarelor. GTP este necesar unor reacții cum este prelucrarea post-transcripțională a ARNm (adăugarea capului), transmiterea semnalului către proteinele G („GTP binding protein”), și formarea microtubulilor.

Componente ale coenzimelor: intră în structura NAD⁺, NADP⁺, FAD și CoA care sunt constituenți cellulari foarte importanți cu rol critic în multe reacții metabolice.

Intermediari activați: nucleotidele au și rolul de transportori („carriers”) ai intermediarilor „activați” într-o serie de reacții metabolice. Compusul UDP-glucoză este un intermediar cheie în sinteza glicogenului și glicoproteinelor. Compușii GDP-manoză, GDP-fucoză, UDP-galactoză, și CMP-acid sialic sunt cu toții intermediari cheie în reacțiile în care monomerii glucidici sunt transferați pentru sinteza glicoproteinelor. CTP este folosit pentru generarea CDP-colinei, CDP-etanolaminei și CDP-diacilglicerolilor, care sunt implicați în metabolismul fosfolipidelor. De asemenea, alți intermediari activați sunt S-adenoziilmethionina (SAM) și 3'-fosoadenozin 5'-fosfatosulfat (PAPS). S-adenoziilmethionina este un donor de grupări metil în reacțiile responsabile de metilarea glucidelor și a bazelor din structura ARN și ADN și în formarea unor compuși cum sunt fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, carnitina din lizină, etc. S-adenoziilmethionina furnizează și grupări aminopropil pentru

sinteza sperminei din ornitină. Intermediul PAPS este folosit ca donor de grupări sulfat pentru sulfatarea biomoleculelor de tipul proteoglicanilor și sulfatidelor.

Efectori alosterici: o serie din etapele metabolice reglatoare sunt controlate prin intermediul concentrațiilor intracelulare ale nucleotidelor.

În celule nucleotidele sunt distribuite diferit: principalele forme ale compușilor purinici și pirimidinici din celulă sunt derivații 5'-nucleotidici. În celulele normale ATP reprezintă nucleotidul cu concentrația cea mai mare. De reținut că, în funcție de tipul celular, concentrația nucleotidelor variază foarte mult. De exemplu, în eritrocite adenin nucleotidele depășesc mult concentrația altor nucleotide, care sunt în concentrații abia detectabile. În celulele hepatice și în alte țesuturi se regăsește un spectru complex al mono-, di- și trifosfaților care se regăsesc cuplați în structurile UDP-glucoză, UDP-acid glucuronic, NAD⁺, NADH, etc. Prezența bazelor libere, nucleozidelor sau nucleotidelor 2'- și 3'-fosfat, în fracția acidă solubilă din celule, este datorată reacțiilor de degradare normală a nucleotidelor exogene și endogene. În același mod se explică și prezența bazelor minore rezultate din degradarea acizilor nucleici.

Concentrația ribonucleotidelor în celulă este de ordin milimolar în timp ce concentrația deoxiribonucleotidelor este de ordin micromolar. De exemplu, concentrația ATP în celulele tumorii Erlich este de 3600 pmol/10⁶ celule, în timp ce dATP este în concentrație de numai 4 pmol/10⁶ celule. Totuși, nivelurile concentrațiilor deoxiribonucleotidelor sunt subiectul unor fluctuații majore în timpul ciclului celular, în contrast cu nivelul concentrației ribonucleotidelor care rămâne relativ constant.

În celulele normale, concentrația totală a nucleotidelor se modifică într-un domeniu îngust deși concentrația componentelor individuale poate să varieze. De exemplu, concentrația totală a adenin-nucleotidelor (AMP, ADP și ATP) este constantă, deși pot exista variații ale raportului ATP/AMP+ADP, dependente de starea energetică a celulelor. La baza „concentrațiilor fixe” ale nucleotidelor stă faptul că reacțiile de biosinteză ale acestora reprezintă căi metabolice care presupun o reglare celulară foarte fină.

CAPITOLUL II

STRUCTURA PRIMARĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Asemenea poliglucidelor și proteinelor, acești polimeri se caracterizează printr-o structură covalentă primară și prin aranjarea spațială a acesteia într-o ierarhie pe care o vom discuta în capitolele următoare.

Structura primară a acizilor nucleici (AN) se referă la secvența înlățuirii monomerilor nucleozid 5'-fosfat (NMP), legăturile dintre aceștia și mărimea polimerilor obținuți.

1. Caracteristicile de compoziție ale structurii primare

1.1. Nucleotidele

Cele două tipuri de acizi nucleici se deosebesc prin două caracteristici calitative fundamentale (**Tabelul 2.1**):

- 1) prezența unei pentoze diferite (riboză sau deoxiriboză); tipul de glucid dă numele celor două tipuri de acizi nucleici deoarece nu există structuri naturale mixte ADN/ARN în afară de hibrizii care apar tranzitoriu în timpul replicării și transcripției;
- 2) diferențe privind cele patru baze care intră în constituția ADN și ARN, una dintre pirimidine fiind diferită. O distincție mai nuanțată este dată de bazele și nucleotidele minore discutate în capitolul anterior.

Tabel 2.1. Constituenții ARN și ADN

Acidul nucleic	Pentoza	NMP majore		NMP minore
		Pvr	Pur	
ARN	D-riboza	U	A	foarte diverse ARNt
ADN	2'-deoxi-D-riboza	dT	dA	derivații metilați ai A și C

Cu toate că aceste diferențe par minime ele au consecințe spectaculoase și sunt suficiente pentru a împărți acizii nucleici în două categorii majore de molecule destul de asemănătoare pentru a se recunoaște dar care au funcții diferite. Astfel, prezența hidroxilului în poziția 2' a ribozei determină:

- a) imposibilitatea catenelor de ARN de a forma structuri dublu catenare pe distanțe mari;
- b) o reactivitate particulară a ARN;
- c) centre suplimentare de interacție prin legături de hidrogen.

O altă diferență de compoziție constă în faptul că ADN se caracterizează prin egalități și raporturi purine/pirimidine specifice pe care nu le regăsim în ARN.

1.2. Mărimea polimerilor nucleici

În privința lungimii polimerilor nucleici gama acoperită este foarte mare. De fapt, trebuie să subliniem că este luat în discuție grupul care cuprinde macromoleculele naturale cele mai mari. Mărimea acizilor nucleici se exprimă prin trei caracteristici (tipuri de unități): i) lungime; ii) masă moleculară în Daltoni (Da); iii) număr de nucleotide sau de baze ale acestora pentru monocatene (b) și în perechi de baze (pb) dacă molecula este constituită din două catene asociate. Multiplul cel mai folosit este cel de kilobaze sau kilo-perechi de baze (1000 b sau 1000 pb).

Numărul nucleotidelor din structura ARN variază de la mai multe zeci de baze la mai multe mii de baze.

ARN ribozomal (ARNr) de la 100 la 5 000 b

ARN de transfer (ARNt) 75 - 90 b

ARN mesager (ARNm) numărul de baze este în funcție de genă copiată

Mărimea ADN variază în funcție de regn și specie. Aceasta acoperă toată gama de la 5 000 la mai mult de un milion de perechi de baze. Masa moleculară medie a unei perechi de baze este de 660 Da, iar distanța între platourile a două baze este de 0,34 nm în conformitate cu caracteristicile geometrice ale dublei catene de ADN. Aceste caracteristici dă o echivalență foarte utilă în practică: 2×10^6 Da se pot approxima cu 3 000 pb și cu 1 μm.

În tabelul 2.2. sunt prezentate tipuri de ADN de proveniență diferită. Mărimea acestora este comparată cu colagenul care este o moleculă proteică gigant.

1.2.1. Metode de determinare a mărimiilor acizilor nucleici

Metodele de determinare a dimensiunilor acestor macromolecule se bazează pe diferite caracteristici. Mărimea poate fi determinată prin mai multe metode:

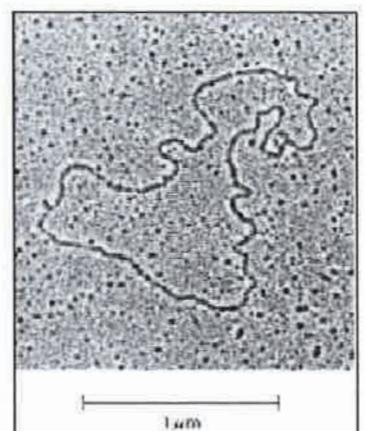


Figura 2.1. Imagine electrono-microscopică a unei molecule de ADN dublu catenară circular închisă (plasmidă)

Microscopie electronică: datorită dimensiunilor lor acizii nucleici pot vizualizați prin această tehnică. Metoda se potrivește foarte bine moleculelor de ADN de mărime medie (de la câteva mii la 200 000 pb) (Figura 2.1)

Electroforeza în gel: este o tehnică de separare a moleculelor în funcție de masa lor moleculară. Condițiile de densitate de sarcină asemănătoare sunt realizate în mod natural, de către scheletul oză-fosfat. De asemenea, dependența logaritmică, distanța de migrare în funcție de mărime, este bine respectată. Pentru separarea moleculelor de acizi nucleici de diferite dimensiuni sunt folosite geluri de agaroză cu porozități variate (Figura 2.2). Pentru facilitarea estimărilor cantitative există colecții de polimeri „markeri de masă moleculară” utilizăți pentru etalonarea separărilor. De altfel, această metodă de separare este omniprezentă în manipulările de biologie moleculară. Electroforeza se poate realiza și în geluri de poliacrilamidă pentru situațiile în care este necesară separarea moleculelor polinucleotidice mici sau a oligonucleotidelor. Prin electroforeza în gel de poliacrilamidă este posibilă identificarea unor fragmente care diferă numai printr-un singur nucleotid. Din acest motiv tehnica este foarte utilă în secvențializarea acizilor nucleici și în determinarea regiunilor de polymorfism normal sau patologic determinat de existența unor mutații.

Tabel 2.2. Mărimea unor molecule de ADN din diferite surse, comparată cu cea a unei proteine fibroase, colagenul.

ADN/ particule/ organisme	n de baze (kb)	Masă (MDa)	Lungime (nm)	ϕ (nm)	număr de cromozomi
Virusuri ADN					
SV40	5,2	3,2	$1,7 \times 10^{-3}$ (1,7 μm)	2	
fag φX174	5,4	3,6	$1,8 \times 10^{-3}$ (1,8 μm)	2	
fag λ	48	32	17×10^{-3} (17 μm)	2	
Prokariote					
<i>E. coli</i>	4000	2600	1,36	2	1
Eucariote					
Drosofila	62 000	41000	21	2	2x4
Om	125 000	80 000	41	2	2x23
Colagen	3×1000 aminoacizi	0,33	$0,3 \times 10^{-3}$ (0,3 μm)	1,5	
Celule					
Bacterie <i>E. coli</i>			2×10^{-3} (0,5x2 μm)		
Mamifere			aprox 10×10^{-3} (10 μm)		

SV40: virus simian; mărimea exactă a ADN este de 5243 pb. Bacteriofagii folosîți ca exemplu au drept gazdă *Escherichia coli*. ADN al fagului φX174 este monocatenar, dar în celulele infectate se imperechează sub formă de dublă catenă. În tabel sunt date dimensiunile celei de a doua forme. La drosofila este dată mărimea celui mai mare ADN, este vorba de cromozom gigant. La om este dată mărimea ADN/cromozom.

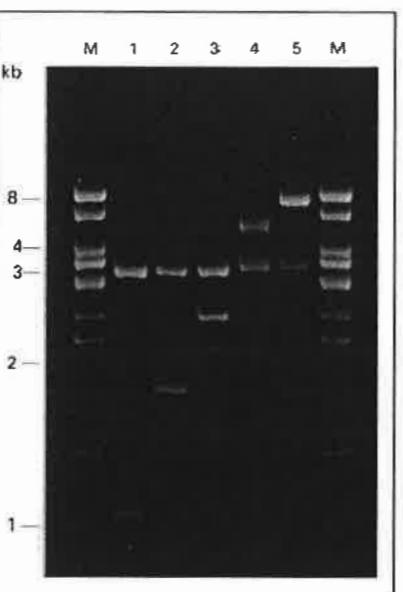


Figura 2.2 Imagine de separare electroforetică a ADN în gel de agaroză: M, markeri de masă moleculară; 1, 2, 3, 4 și 5, ADN plasmidal scindat cu enzime de restricție

Moleculele ADN de mărime mare sunt analizate și prin:

a) metoda clasică de ultracentrifugare cu toate că forțele de frecare existente între aceste molecule limitează câmpul aplicațiilor (molecule de până la $1,5 \times 10^6$ pb). Prin această tehnică pot fi separate, în gradient de densitate de clorură de cesiu, următoarele: i) fragmente de ADN care au un conținut diferit în guanină și citozină (Figura 2.3a); ii) ADN genomic bacterian; iii) ADN plasmidual; iv) ARN total, etc. Diferitele tipuri de ARN ribozomal de la eucariote și prokariote poate fi separat foarte simplu prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză (Figura 2.3b).

plasmidual; iv) ARN total, etc. Diferitele tipuri de ARN ribozomal de la eucariote și prokariote poate fi separat foarte simplu prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză (Figura 2.3b).

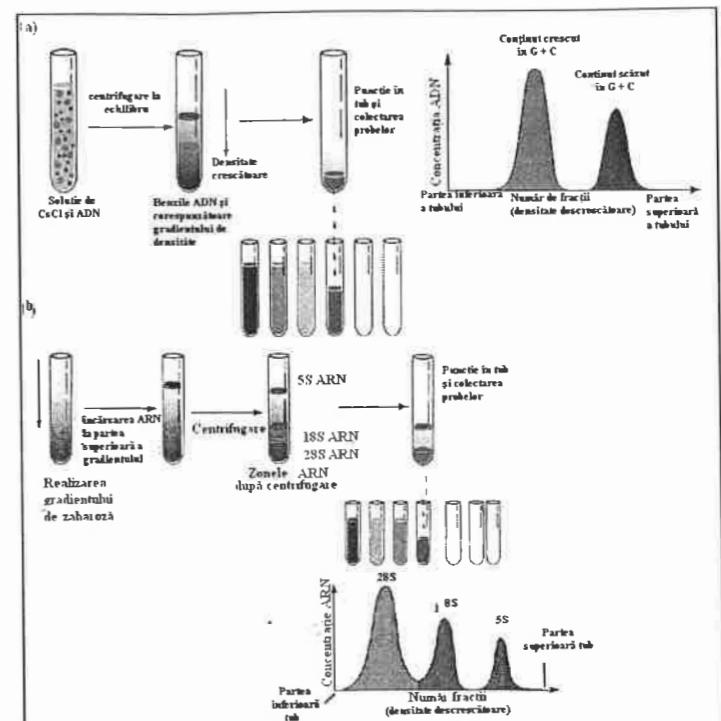


Figura 2.3. Separarea acizilor nucleici prin ultracentrifugare: a) Separare ADN prin ultracentrifugare în gradient de CsCl; b) separare ARN prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză

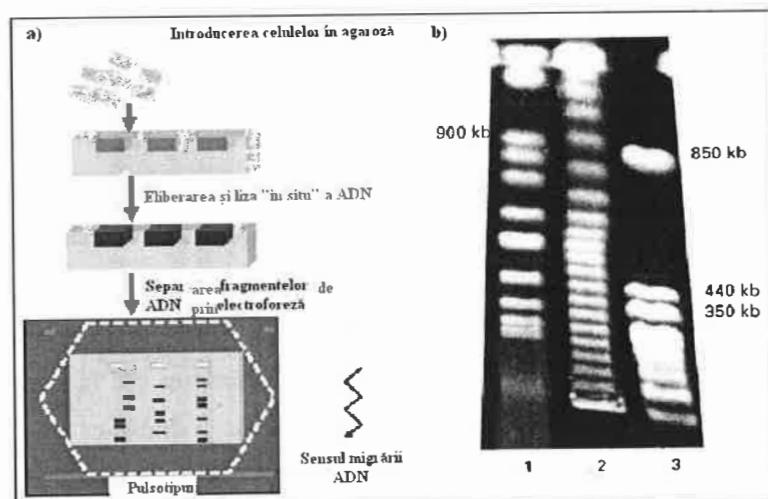


Figura 2.4. Electroforeză în câmp pulsatoriu: a) principiu de separare; b) electroforegramă obținută în urma separării unor fragmente mari de ADN. Vizualizarea a fost realizată în urma colorării cu bromură de etidium.

b) proprietăile hidrodinamice ale soluțiilor de ADN: i) birefringență de curgere, ii) vâscozitate, etc.

c) electroforeza în câmp pulsatoriu (sau alternant). Prin această tehnică care a fost imaginată la începutul anilor 1980, două câmpuri electrice se aplică alternativ pe două direcții diferite. Principul de separare se bazează pe viteza diferită de reorientare a moleculelor în momentul alternării celor două câmpuri electrice. Ele impun moleculelor de ADN etape de reorientare diferite înainte de migrarea lor efectivă. Aceste etape de reorientare sunt dependente de mărimea moleculelor. Separarea este eficace și utilizabilă pentru molecule de ADN mai mari de 10 000 kb (Figura 2.4).

1.3. Polimerizarea nucleotidică

Acizii nucleici sunt, asemeni proteinelor, polimeri neramificați care pot fi liniari sau circulari. Demonstrată de Levene în 1925 și confirmată după 1950 de către Todd, înlănuirea covalentă a nucleotidelor este de tip ester. Depolimerizarea se poate realiza prin hidroliză de diferite tipuri (acidă, bazică, enzimatică) și este destul de folosită în tehniciile de biologie moleculară.

1.3.1. Legătura fosfodiester

Indiferent de tipul de acid nucleic (ribonucleic sau deoxiribonucleic), reacția de asamblare polinucleotidică este aceeași: hidroxilul din poziția 3' al unui nucleozid monofosfat este esterificat de către 5'-fosfatul din structura nucleozid trifosfatului care participă la formarea legăturii (Figura 2.5). Faptul că acizii nucleici sunt polimeri fosfodiesterici ai NMP are următoarele consecințe directe:

a) asemeni polipeptidelor, catena este orientată (vectorizată). Sensul convențional 5'-3' a fost adoptat pentru lectura și scrierea (de la stânga la dreapta) polinucleotidelor ca și pentru reprezentările prescurtate și simbolice (Figura 2.6).

b) bazele fixate regulat în funcție de o secvență specifică speciei moleculare, sunt purtate de un schelet covalent pentoza-fosfat. Cu toate că imaginea este asemănătoare cu cea a scheletului polipeptidic purtător al catenelor laterale ale aminoacizilor, există o serie de diferențe față de acesta: i) scheletul acizilor nucleici este un polianion cu o sarcină pe unitate care are o densitate totală de sarcină negativă

foarte mare; ii) varietatea bazelor este redusă. Analizăm alternanța a patru baze față de alternanța a 20 de aminoacizi. Consecințele acestor diferențe sunt foarte importante pentru sistemele de informație genetică. Înțelegem astfel, de ce pentru codificarea aminoacizilor de către secvențele nucleotidice nu este nevoie numai de o simplă echivalență bază/aminoacid. Este necesar un limbaj ternar, format din ansambluri de trei baze adiacente a căror asociere determină existența a 64 de combinații posibile, care stau la baza codului genetic.

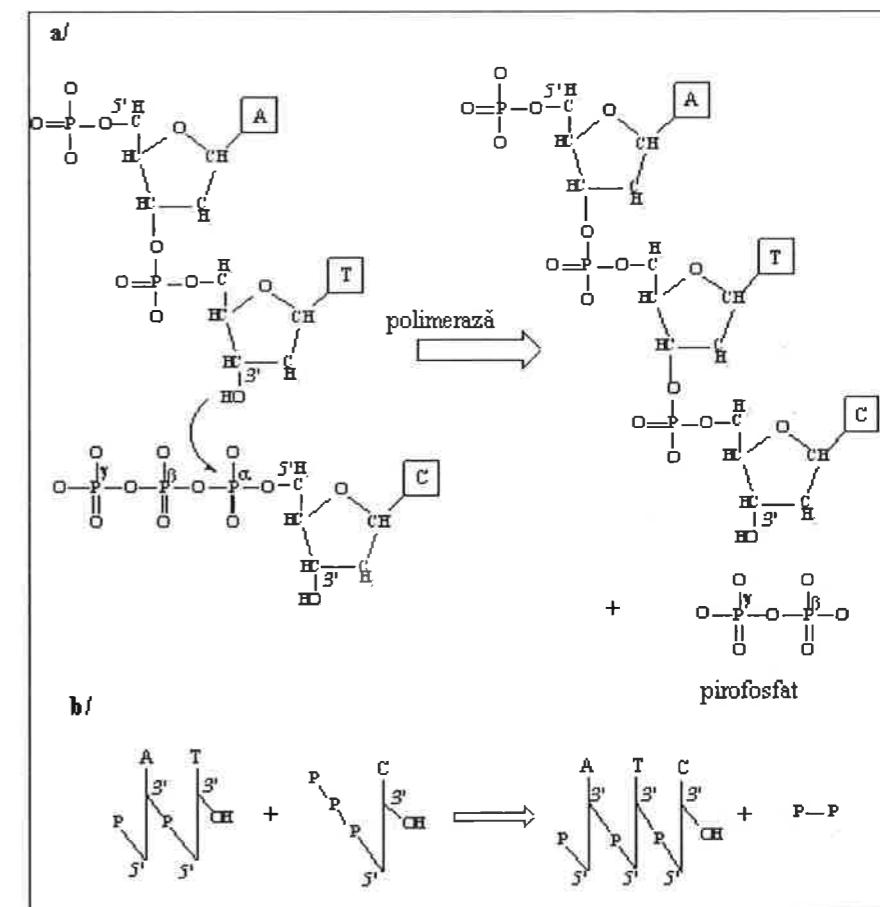


Figura 2.5. Sintiza unei monocatene de ADN: a) formarea legăturii fosfodiester între un dinucleotid și deoxiadenozin citidin trifosfat; b) reprezentarea schematică a reacției de sinteză cu marcarea orientării 5'-3' a catenei în formare

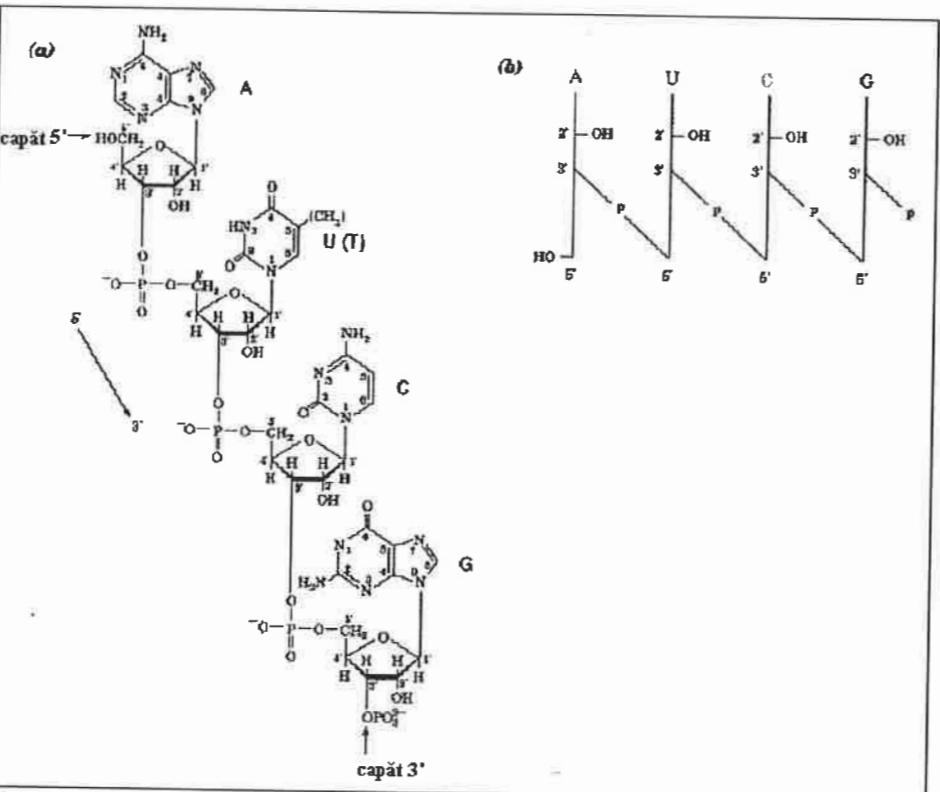


Figura 2.6. Structura unei molecule ARN: a) evidențierea înlăturării nucleotidelor și vectorizarea catenei; b) reprezentările prescurtată și simbolică

1.4. Hidroliza acizilor nucleici

Degradarea unui polinucleotid poate să se refere la: i) legătura fosfodiester atunci când se produce o depolimerizare; ii) unitățile nucleotidice dacă se rupe legătura glicozidică și se degradează componente. În ambele cazuri hidroliza poate fi de natură chimică sau enzimatică.

1.4.1. Hidroliza chimică a acizilor nucleici

Deși sunt printre cele mai stabile molecule, în condiții fiziologice celulare, acizii nucleici prezintă totuși, rezistențe diferite la condițiile de pH și de temperatură la care se realizează diferitele tipuri de hidroliză, *in vitro* (Tabel 2.3).

Tratamentul acid afectează la fel ARN și ADN:

- sunt necesare condiții drastice pentru a degrada scheletul pentozofosfat (încălzire, acizi concentrați). În aceste condiții celelalte legături din structură nu rezistă

și obținem un amestec de fosfați, oze și baze. Acest protocol, urmat de o fracționare cromatografică, a fost una dintre tehnici care au permis analiza compoziției acizilor nucleici;

ii) în condiții relativ blânde (pH 4,0), se vor rupe numai legăturile N-glicozidice cu purinele care sunt cele mai fragile. În acest caz, se obține un derivat de acid nucleic apurinic care prezintă interes pentru anumite analize.

Comportamentul ARN și ADN la hidroliză bazică este foarte diferit:

i) ADN rezistă la valori extreme de pH bazic. La pH 13,0 și 37°C se înregistrează aproximativ zece scindări pe oră și pentru un milion de punți fosfodiester. Cu toate acestea, punțile fosfodiester din ADN devin sensibile la hidroliză alcalină dacă bazele sunt înlăturate sau degradate. Este cazul ADN apurinic. Această proprietate este utilizată în tehnica de secvențializare chimică.

ii) ARN este total hidrolizat în ribonucleotidele componente în câteva minute, la 37°C și pH 11,0. Încă de la pH 8,0, se constată începerea unei degradări semnificative. Comportamentul ARN la hidroliză alcalină explică obținerea unui amestec de nucleozide 2' și 3' fosfat în loc de 5' fosfat, așa cum era de așteptat.

Tabel 2.3. Producții de degradare chimică a acizilor nucleici

Condiții	Producții de hidroliză	
	ARN	ADN
Acide		
pH 1,0 + încălzire	pentoze + fosfați + baze	
pH 4,0	baze purinice + AN apurinici	
Alcaline	NMP (2' sau 3')	-

Diferența dintre reactivitatea ARN și inerția ADN este dată de existența grupării hidroxil din poziția 2'. De fapt, această grupă autorizează o cataliză bazică hidrolizei punților fosfodiester schematizată în figura 2.7. Deprotonarea sa în condiții alcaline produce un anion alcooxid, puternic nucleofil care atacă gruparea fosfo-diester adiacentă. Absența hidroxilului în 2' din scheletul ADN este un factor determinant al stabilității sale chimice în condiții celulare, normale sau agresive. Astfel înțelegem esența selecționării evolutive a ADN, ca suport al informației genetice, datorită rezistenței sale. Această moleculă trebuie să suporte operații de duplicare și de copiere

care se desfășoară pe toată durata de viață a organismului și să asigure transmiterea informațiilor la descendenți.

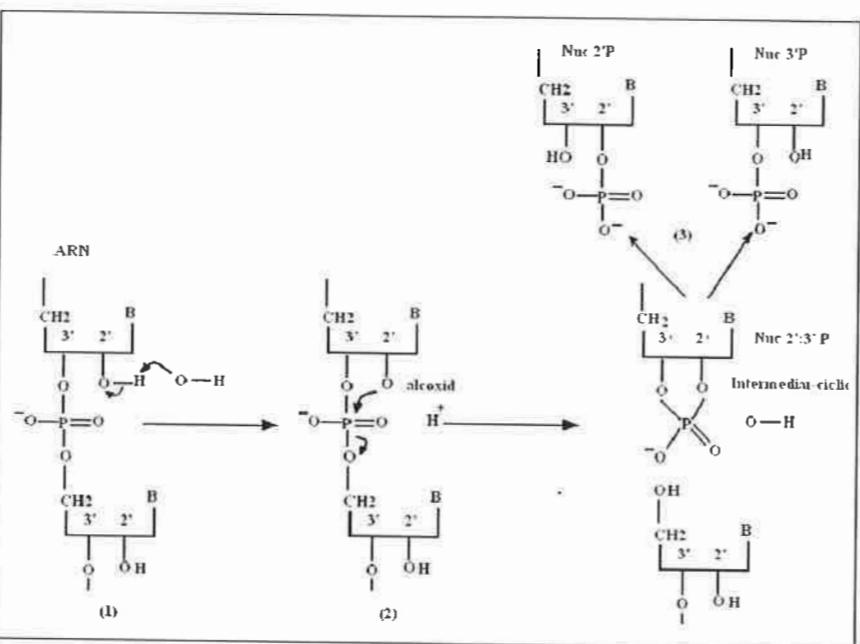


Figura 2.7. Schema mecanismului de hidroliză ARN prin cataliza bazică: 1. Hidroxilul din 2' este deprotonat de către ionul hidroxid; 2. Alcoxidul, nucleofil, atacă gruparea fosfodiester cu formarea unui diester ciclic 2': 3'; 3. Un al doilea hidroxid provoacă hidroliza uneia sau alteia dintre legăturile ester: se obțin izomerii 2' și 3' fosfat.

1.4.2. Scindarea enzimatică

Enzimele care catalizează hidroliza legăturii fosfodiester din structura acizilor nucleici, fosfodiesterazele, sunt numite și nucleaze. Acestea sunt prezente în toate celulele și sunt foarte utile în metabolismul acizilor nucleici și proteinelor. O parte dintre aceste nucleaze sunt secrete de către pancreasul exocrin, în intestin, și participă direct la digestia hranei. Aceste enzime prezintă niveluri de specificitate comparabile cu cele ale peptidazelor și proteazelor. Ele se pot clasifica în funcție de:

a) modul lor de atac al catenei: i) exonucleaze, enzimele care acționează la nivelul extremității catenelor; ii) endonucleaze, enzimele care atacă în interiorul catenelor;

b) specificitatea lor față de substrat: i) pentru tipul de acid nucleic: ribonucleaze pentru ARN, deoxiribonucleaze pentru ADN și nucleaze pentru ambele; ii) pentru tipul de structură: mono- sau dublu catenară;

c) specificitatea lor de recunoaștere a situsurilor: i) specificitate pentru baze; ii) specificitate pentru secvențe;

d) tipul de rupere a legăturii fosfodiester: i) exonucleaze și endonucleaze de tip d scindează extremitatea 5' și duc la formarea de 3'NMP; ii) exonucleaze și endonucleaze de tip p scindează extremitatea 3' și determină formarea 5'NMP (**Figura 2.8**);

În tabelul 2.4 sunt prezentate principalele nucleaze și caracteristicile acestora. O serie de endonucleaze cu specificitate mare nu sunt trecute în acest tabel. Acestea fac parte din categoria enzimelor de restricție, endonucleaze capabile să scindeze într-un mod bine definit și reproductibil moleculele de ADN dublu catenar indiferent de originea lor.

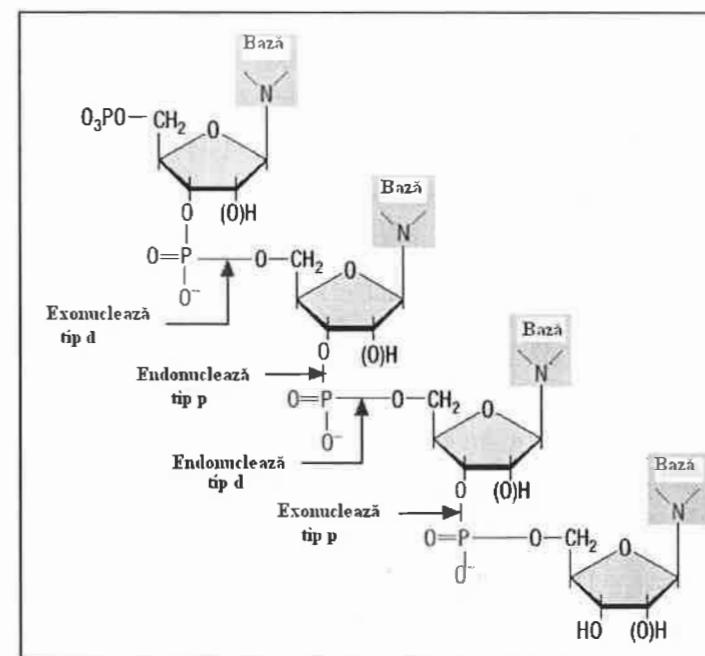


Figura 2.8. Tipuri de tăieturi la nivelul legăturilor: exonucleaze și endonucleaze de tip d scindează extremitatea 5' și duc la formarea de 3'NMP; exonucleaze și endonucleaze de tip p scindează extremitatea 3' și determină formarea 5'NMP (vezi tabelul 2.4)

Tabel 2.4. Exemple de nucleaze reprezentative și diferențele lor caracteristici.

Nucleaze	Substrat ¹	Tăietură tip ² ; specificitate	Producți
Exonucleaze			
fosfodiesteraza (venin de șarpe)	ARN, ADN s	p extremitatea 3'	5'-NMP
fosfodiesteraza (splină)	ARN, ADN s	d extremitatea 5'	3'-NMP
exonucleaza I (<i>E. coli</i>)	ADN	p extremitatea 3'	5'-NMP
exonucleaza III (<i>E. coli</i>)	ADN	p extremitatea 3'	5'-NMP+ADNs
Endonucleaze			
endonucleaza S1 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	ARN, ADN s.d	p aleatoare	5'-NMP + ON în 5' P
ribonuclează T1 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	ARN s	p G/N	5'-NMP + ON în 3' P
ribonucleaza A (pancreas)	ARN s	d-Pyr/N	3'-NMP + ON în 3' P
Deoxiribonucleaza II (timus)	ADN s	d-Pyr/dPur	ON în 3' P

¹s: monocatenar (single strand); ON: oligonucleotide. ²tip de tăietură p sau d: vezi figura 2.8.

Descoperirea enzimelor de restricție, în 1970, de către W. Harber, H. Smith și D. Nathans, a însemnat un pas gigantic pentru evoluția tehniciilor de biologie moleculară. Acestea au permis înălțarea principalului obstacol tehnologic privind manipularea ADN, deoarece pot reduce într-o manieră reproductibilă, un genom întreg la o serie de fragmente caracteristice pentru o specie dată. Astfel, genele sau părți ale genelor devin entități fizice izolabile. Aceste enzime sunt responsabile pentru fenomenul de restricție de unde și numele lor. În figura 2.9 sunt prezentate câteva dintre enzimele de restricție cele mai uzuale împreună cu motivele recunoscute de ele. Enzimele recunosc și tăie secvențe de baze cu structuri caracteristice de pe catena ADN, numite palindroame, a căror lungime variază între 4 și 10 pb. Se remarcă axa de simetrie de ordinul 2 pe care o prezintă secvențele ADN pe care aceste enzime le recunosc și scindează. Se observă că secvența de pe una din catene reprezintă palindromul secvenței celeilalte catene. Pe cele două catene există același mesaj care poate fi citit la fel în cele două sensuri (de tip RADAR sau ROTOR). Deci, situsul de clivare are o poziție simetrică în raport cu axa. În urma acțiunii enzimelor de restricție, se pot obține capete coeze sau capete drepte pentru fragmentele eliberate, în funcție de poziția situsurilor de scindare. (Figura 2.10).

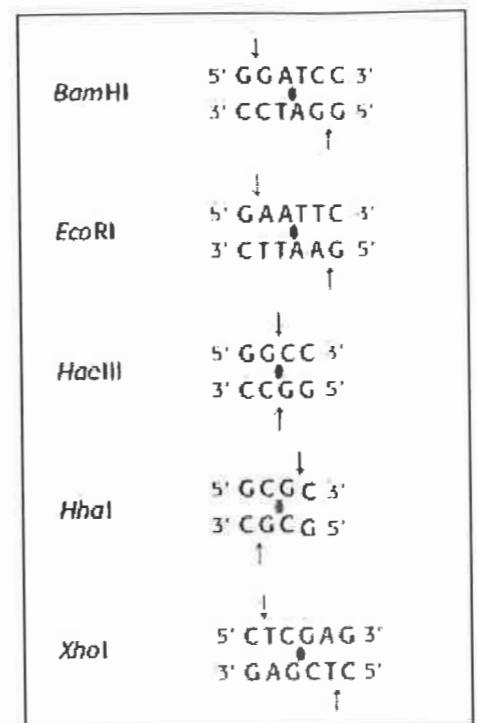


Figura 2.9. Exemple de enzime de restricție și situsurile recunoscute de acestea

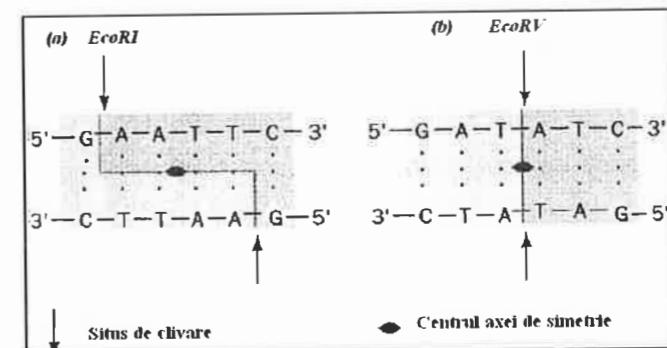


Figura 2.10. Exemple de enzime de restricție și palindroamele recunoscute de acestea cu marcarea situsurilor de clivare și a axei de simetrie: a) obținerea de capete coeze; b) obținerea de capete drepte (după Biochemistry, Voet&Voet, 1995)

Enzimele de restricție sunt clasificate în trei categorii, dar numai cele de tip II sunt utile în cercetările de biologie moleculară deoarece scindează catenele de ADN

Au fost izolate și purificate mii de enzime de restricție. Din fericire foarte curând după descoperirea lor s-a utilizat o nomenclatură adecvată. Prima literă este majusculă și reprezintă inițiala speciei bacteriene din care a fost extrasă endonucleaza. Următoarele două litere sunt minuscule și corespund genului bacteriei de unde enzima este extrasă. Aceste trei litere sunt urmate de o cifră română care reprezintă numărul de ordine al descoperirii enzimei în același tip de bacterie. Dacă este necesar se mai adaugă o literă majusculă reprezentând identificarea sușei bacteriene.

chiar la nivelul situsurilor specifice pe care le recunosc. Două enzime de restricție care recunosc aceeași secvență sunt numite *izoschizomere*.

Numărul de situsuri recunoscute și tăiate de anumite enzime este evident corelat cu structura ADN. În tabelul 2.5 este prezentat un exemplu de acțiune diferențiată a enzimelor de restricție asupra ADN viral din diferite surse. Scindarea diferențiată reprezintă o modalitate importantă de a obține markeri de masă moleculară utilizati în tehniciile de biologie moleculară.

Tabel 2.5. Numărul situsurilor de tăiere prezente la nivelul ADN din trei virusuri pentru trei endonucleaze comune.

Endonucleaza (sursa)	Număr de situsuri de tăiere		
	Virus SV40	fag $\Phi X 174$	fag λ
<i>EcoRI</i> (<i>E. coli RY13</i>)	1	0	5
<i>BamHI</i> (<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>)	1	0	5
<i>HaeIII</i> (<i>Haemophilus aegypticus</i>)	19	11	>50

1.5. Purificarea acizilor nucleici și evaluarea cantitativă a acizilor nucleici

Un procedeu clasic de purificare constă în tratarea soluției apoase de acid nucleic cu soluție fenolică care denaturează proteinele. De obicei este folosit amestecul fenol-cloroform care este destul de eficient. După separarea fazelor prin centrifugare, este recuperată faza apoasă care constituie supernatantul și care conține acizii nucleici. Urmele de fenol (care ar putea să inhibe activitatea enzimelor din etapele următoare) sunt eliminate printr-un nou tratament cu cloroform/alcool izoamilic. Dacă acizii nucleici provin din extracte celulare, proteinele sunt în prealabil hidrolizate cu ajutorul unei enzime proteolitice numită proteinaza K.

În ultimii ani au fost puse la punct procedee de purificare pe bază de rășini. Reactivii sunt livrați sub formă de „kituri” gata de întrebunțare simplificând mult procesul de purificare și crescând adesea randamentul acestuia.

1.5.1. Metode spectrofotometrice

Determinarea absorbției în ultraviolet cu ajutorul unui spectrofotometru permite verificarea purității unei soluții de ADN sau ARN. În urma determinării densității optice se va obține un peak la 260 nm. Pentru estimarea purității este necesară

calcularea raportului densităților optice la 260 nm/280 nm care, în mod normal, trebuie să fie apropiat de valoarea 1,8-2,0. În cazul ADN, un raport mai ridicat indică o contaminare cu ARN. Dacă există o contaminare cu proteine (280 nm) sau fenol (270 nm), raportul va fi net inferior valorii de 1,8. Dacă ADN și ARN sunt puri, cantitatea poate fi apreciată astfel:

$$\text{unitatea DO (260 nm)} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l pentru ADN dublu-catenar}$$

$$\text{unitatea DO (260 nm)} = 33 \text{ ng}/\mu\text{l pentru ADN monocatenar}$$

$$\text{unitatea DO (260 nm)} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l pentru ARN}$$

1.5.2. Utilizarea de mini-geluri

Dacă nu dispunem de ADN în cantitate suficientă sau de sisteme miniaturizate care să permită măsurarea densității optice la 260 nm, se poate realiza o estimare semi-cantitativă utilizând mini-geluri de agaroză. După realizarea separării electroforetice, se realizează colorarea cu bromură de etidium urmată de evaluarea intensității benzilor obținute după expunerea la UV. Estimarea semi-cantitativă se realizează prin compararea rezultatelor obținute cu migrarea unor cantități cunoscute de ADN standard folosite pentru etalonare.

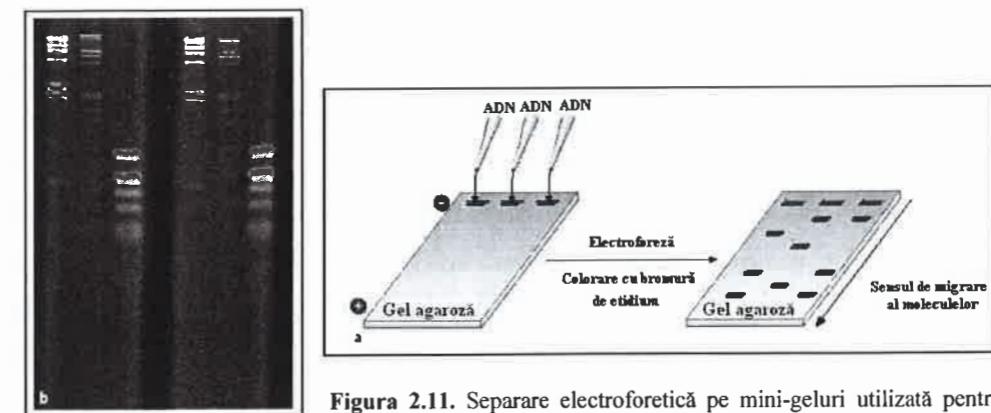


Figura 2.11. Separare electroforetică pe mini-geluri utilizată pentru estimarea semi-cantitativă a fragmentelor de acizi nucleici separate: a) principiu de separare; b) vizualizarea mini-gelului după tratament cu bromură de etidium

2. Determinarea secvenței primare a acizilor nucleici

2.1. Strategie și modalități

Strategia curentă de secvențializare a acizilor nucleici este formată din trei etape, conforme cu principiile comune de analiză a polimerilor:

a) acidul nucleic este întotdeauna prea lung pentru a fi secvențializat direct și trebuie fractionat în fragmente de mărime adecvată. Acestea sunt separate, fiecare fiind apoi supus secvențializării;

b) prin scindarea diferită a fragmentului de secvențializat, se produc amestecuri de segmente de oligonucleotide, de diferite lungimi (pentru fiecare tip de scindare) care se suprapun;

c) separarea și identificarea componentelor fiecărui dintre aceste amestecuri și apoi compararea lor în scopul reconstituirii secvenței inițiale a fragmentului.

În raport cu secvențializarea proteinelor, secvențializarea inițială a acizilor nucleici a fost mai complicată deoarece: i) structura ADN este dublu catenară; ii) macromoleculele sunt mult mai lungi; iii) prezența a numai a patru baze, face ca varietatea monomerilor să fie redusă și eventuala identificare a produșilor de hidroliză să constituie o operație delicată.

În concluzie, începuturile în secvențializarea acizilor nucleici au fost tributare modalităților de scindare și de fractionare a oligonucleotidelor. În rezolvarea acestei probleme, deceniul 1970-1980 a fost decisiv.

Înainte de 1970 cercetătorii nu dispuneau nici de endonucleaze specifice și nici de modalități de scindare echivalente degradării Edman. Secvențializarea realizată pentru ARNt pentru alanină a constat în: i) scindarea parțială cu ajutorul ribonucleazelor T1 și A (Tabel 2.4); ii) suprapunerea fragmentelor obținute în urma acțiunii secvențiale a unei exonucleaze (una din fosfodiesterazele din Tabelul 2.4); iii) analiza produșilor prin cromatografie.

În aceste situații, pentru a stabili secvența celor 72 de nucleotide ale ARNt pentru alanină, i-au fost necesari mai mulți ani lui R. Holley. Abia în 1965, la mai mult de 10 ani de la secvențializarea insulinei de către E. Sanger, a fost posibilă elucidarea structurii materialului genetic din structura unor fagi de aproximativ 4 000 nucleotide.

Anii 1970 marchează descoperirea endonucleazelor de restricție și primele realizări ale tehnicii de biologie moleculară, printre care și clonarea care permitea multiplicarea moleculelor de ADN disponibile.

La baza evoluției ulterioare a secvențializării ADN au stat două metode care se bazează pe un principiu comun:

i) ADN este decupat în fragmente cu enzime de restricție și catenele sunt separate;

ii) utilizând modalități specifice de tratare pentru fiecare bază, se obțin patru ansambluri de fragmente de mărimi diferite (prin intermediul unui semnal care identifică începutul sau sfârșitul catenei);

iii) separarea fragmentelor în funcție de mărime rezolvă problema secvențializării.

Diferența dintre cele două metode constă în modul de obținere a ansamblurilor de fragmente: una din metode se bazează pe scindarea chimică (metoda introdusă de A. Maxam și W. Gilbert), cealaltă se inspiră din procesul de replicare și se bazează pe tehnologia sintezei enzimaticice (metoda Sanger).

Cu toate că metoda Maxam și Gilbert a cedat de mult locul metodei Sanger, pentru care la ora actuală există numeroase variante, confrontarea dintre cele două concepții rămâne interesantă. În continuare vom descrie principiul și numai câteva aspecte tehnice pentru fiecare metodă.

2.2. Metoda chimică Maxam și Gilbert

Metoda de secvențializare chimică este formată din mai multe etape. Fragmentul de ADN care urmează a fi secvențializat este marcat la una dintre extremități printr-un semnal care va permite detectarea sa. Cea mai frecventă tehnică este marcarea cu fosfor radioactiv (^{32}P). Acestea se realizează în doi timpi: i) modificare-eliminare bază; ii) hidroliza alcalină a grupelor fosfodiester, posibilă prin pierderea sau deschiderea ciclului bazelor. Scindarea este dublă fiind realizată atât la capătul 3' cât și la cel 5'.

Specificitatea tăieturii este dată de reactivii utilizați și de condițiile de reacție:

i) pirimidinele: hidrazinoliză; în condiții controlate de tărzie ionică este realizată degradarea preferențială a citozinei sau a ambelor pirimidine (C și T);

ii) purinele: metilare cu protonare; alegerea pH este decisivă pentru orientarea reacției către guanină sau către ambele purine (G și A).

iii) Electroforeza în gel de poliacrilamidă urmată de autoradiografia fragmentelor reconstituie secvența (Figura 2.12).

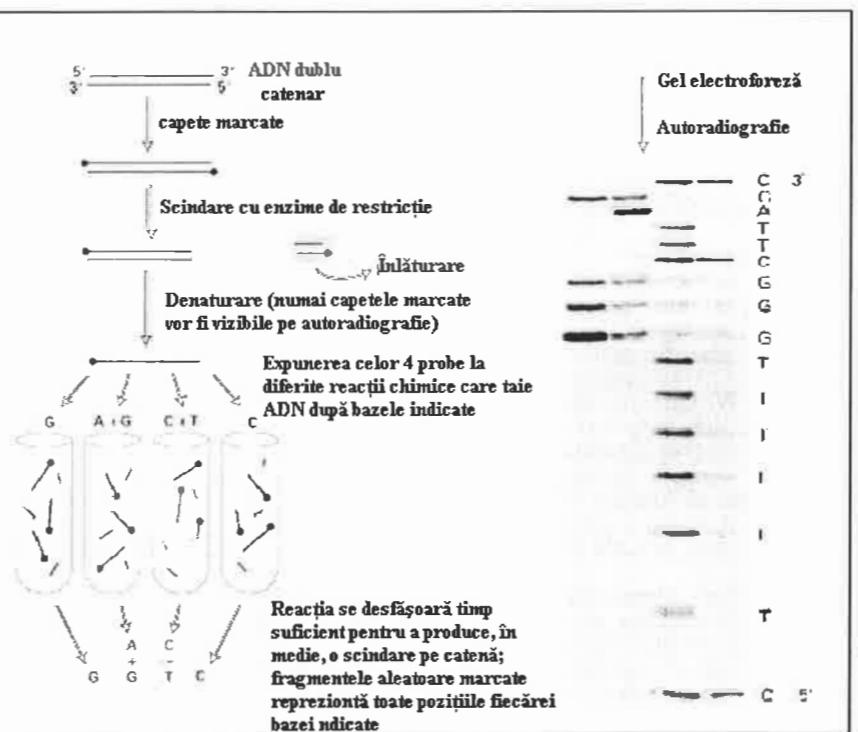


Figura 2. 12. Principiul și prezentarea schematică a secvențializării prin metoda Maxam și Gilbert

2.3. Metoda „dideoxi” a lui F. Sanger

F. Sanger, pionierul secvențializării insulinăi, a conceput o metodă genială de secvențializare care se bazează pe principiul replicării. Analiza structurii ADN și a rolului său în exprimarea genelor a fost ușurat enorm de punerea la punct a acestei tehnici de secvențializare. Esența tehnicii de secvențializare a ADN, propusă de F. Sanger și colaboratorii, a constituit-o generarea de fragmente a căror lungime era dependentă de ultima bază din structura secvenței. Colecții de astfel de fragmente au

fost generate prin întreruperea controlată a sintezei enzimatice. Această tehnică s-a impus în fața celorlalte tehnici de secvențializare datorită simplității sale.

Pentru înțelegerea principiului sunt necesare informații privind împerecherea specifică a bazelor în structura ADN și sinteza catenelor complementare cât și asupra modului de acțiune al polimerazei. Sanger a utilizat ADN polimeraza I bacteriană care realizează o copie complementară a catenei matriță ADN utilizând nucleotid trifosfați (dNTP).

2.3.1. Principiu

Același procedeu este aplicat pentru patru amestecuri de reacție, în același timp. În toate, ADN polimeraza este folosită pentru a sintetiza catena complementară unei secvențe matriță pornind de la un fragment oligonucleotidic (primer) complementar cu capătul 5'-3' al matriței.

a) Fragmentul care urmează a fi secvențializat (matriță), este denaturat, pentru obținerea de monocatene, și adus în contact cu un primer. Hibridizarea primerului cu matrița monocatenară permite inițierea acțiunii ADN polimerazei în prezența substratelor nucleotidice dNTP;

b) În fiecare dintre cele patru loturi se adăugă o mică cantitate dintr-un 2'-3'-dideoxiribonucleotid trifosfat (ddNTP) diferit, analog cu una dintre nucleotide. Încorporarea acestui analog, în locul unei nucleotide normale, blochează alungirea datorită lipsei hidroxilului din poziția 3' terminală. Din acest considerent ddNTP au fost denumite molecule terminatoare de catenă. Concentrația lor este destul de mică pentru a opri sinteza numai ocazional;

c) Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă se realizează separarea fragmentelor din cele patru loturi. Mărimea diferită a fragmentelor este datorată opririi copierii catenei matriță la un anumit nivel, corespunzător fiecărui dintre cele patru tipuri de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP și ddTTP). În figura 2.13 este prezentată simplificat schema principiului reacției și modalitatea prin care se deduce direct, din lectura gelului, secvența catenei complementare, deci cea a matricei de secvențializat. De remarcat că rezoluția gelului trebuie să fie de o nucleotidă;

d) Determinarea secvenței a fost realizată de Sanger prin autoradiografia gelului deoarece unul dintre dNTP introduse în reacție era marcat radioactiv cu ^{32}P sau ^{35}S , izotopi capabili să impresioneze un film fotografic.

Această metodă ingenioasă i-a permis lui F. Sanger, în 1977, să stabilească prima secvență completă de 5386 baze a bacteriofagului $\Phi\text{X}174$. Total automatizată ulterior, tehnica a permis descifrarea completă a genoamelor multor organisme prokariote și eucariote și a fost folosită cu succes în amplul proiect de secvențializare a genomului uman. Secvențializarea clasică a acizilor nucleici inventată de Sanger are la ora actuală o serie de variante care au făcut-o să se impună ca singura alternativă viabilă de determinare a secvenței acizilor nucleici. Toate aceste variante se bazează pe principiul inițial de sinteză de fragmente complementare cu matrița de analizat. Diferențele constau în evoluția spectaculoasă a modalităților de separare și identificare a acestor fragmente. Detectarea fluorescentă reprezintă o alternativă viabilă pentru tehnica autoradiografică. Acum, se folosesc primeri sau nucleotid trifosfați marcați fluorescent a căror separare se realizează prin electroforeză în gel de acrilamidă sau prin electroforeză capilară. Marcarea fluorescentă oferă posibilitatea combinării aînsecurilor de reacție urmată de separarea electroforetică a ansamblului. Benzile obținute pot fi detectate independent în funcție de reactivul cu care au fost marcate. O alternativă a metodei folosește analogi dideoxi marcați fluorescent diferit care permit realizarea tuturor reacțiilor într-o singură etapă (tub). Folosirea marcării fluorescente și evoluția interesantă a sistemelor de detectare și a programelor de interpretare a rezultatelor a permis automatizarea tehnicii și extinderea aplicațiilor acesteia. (Figura 2.14). Astăzi, pe lângă secvențializare, tehnica permite analiza de fragmente (genotipare) și identificare de mutații punctiforme la nivelul moleculelor ADN.

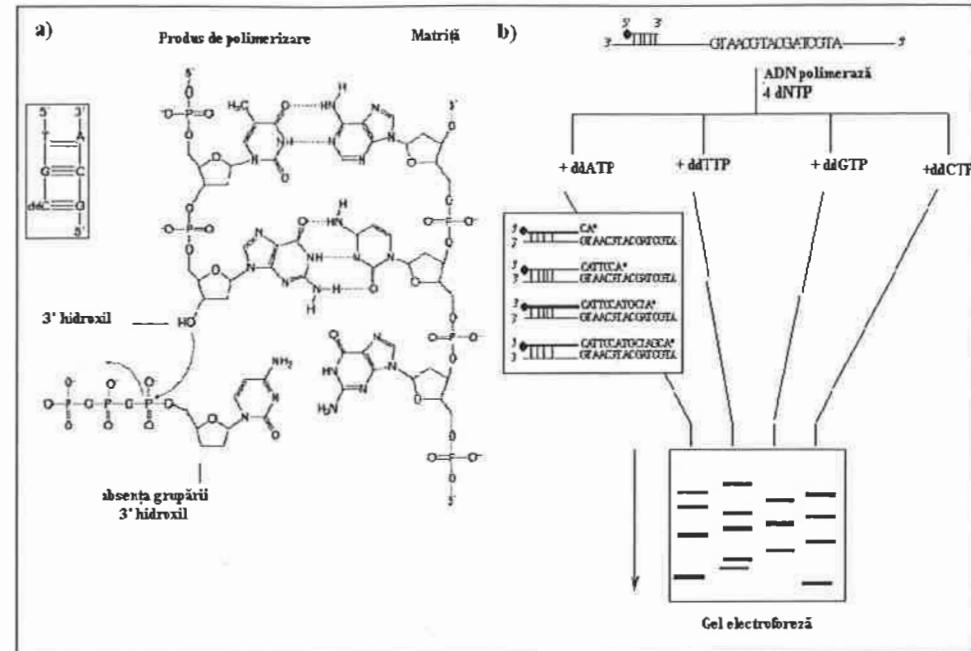


Figura 2.13. Metoda Sanger: a) Principiul de sinteză a catenei complementare și modul de intervenție al ddNTP; b) Prezentare schematizată a realizării practice a secvențializării. În urma electroforezei celor patru loturi se obține secvența catenei complementare

3. Sinteza chimică a polimerilor nucleici

Polinucleotidele au devenit repede unelte și materiale de experiență, astfel încât sinteza acestora s-a impus din ce în ce mai acut. Sintiza polimerilor nucleotidici ridică aceleasi probleme ca și cea a polipeptidelor. Este necesară: i) activarea grupării care este implicată în legătură, împiedicându-le, în același timp, pe celelalte să reacționeze; ii) fixarea nucleotidelor secvențiale în ordinea determinată.

Strategia este asemănătoare cu cea de la polipeptide fiind preferată sinteza prin „elongare în fază solidă”, care înălță obstacolele eliminării reactivilor neutilizați și produșilor fiecărei etape. Catena ADN poate fi sintetizată secvențial prin adăugarea de monomeri activați la un lanț în formare care este cuplat pe un suport solid. În cazul metodei „fosforoamidițiilor” monomerii activați sunt deoxiribonucleozide 3’fosforamidiți (Figura 2.15).

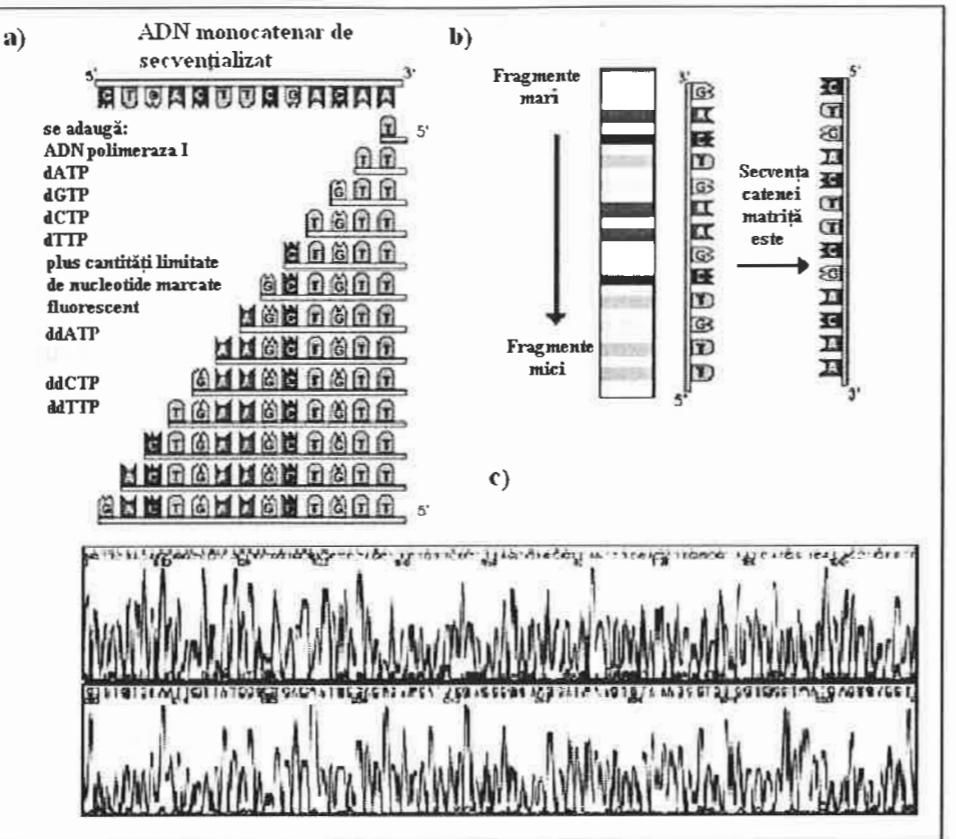


Figura 2.14. Utilizarea principiului reacției Sanger în secvențializarea automată: a) sinteza fragmentelor complementare și marcarea acestora folosind molecule ddNTP cuplate cu fluorocromi; b) principiu de separare a fragmentelor pe gel sau prin electroforeză capilară; c) modalitate de prezentare a rezultatelor

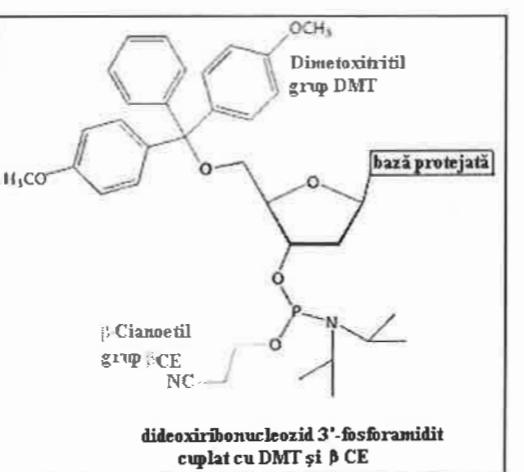


Figura 2.15. Protecția și activarea nucleotidelor. În acest procedeu fosforul trivalent poartă: i) o grupare protonată reactivă (fosforamidita) obținută printr-o legătură de tip amid; ii) o grupare ester care blochează gruparea OH (gruparea β -CE); iii) hidroxilul din poziția 5' este protejat cu o grupare (metoxitritil) aleasă datorită capacitatei sale de clivare ușoară în mediu acid (grup DMT). Grupările amino ale bazelor, susceptibile să reacționeze, sunt și ele protejate

3.1. Etapele sintezei în fază solidă

Sinteza în fază solidă este una dintre cele mai utilizate tehnologii pentru obținerea oligonucleotidelor și polinucleotidelor de diferite dimensiuni folosite ca primari în reacțiile de amplificare sau ca sonde în reacțiile de hibridizare.

Etapele sintezei sunt următoarele:

a) Nucleozidul n, care va constitui extremitatea 3', este fixat prin intermediul unui braț de bilele unui suport solid (silice, răsină). Hidroxilul său 5' este liber;

b) Nucleotidul n-1, activat și protejat, este legat în doi timpi: *i) condensarea 3'-5' în mediu anhidru, prin acțiunea unui agent de cuplare (nucleu tetrazoliu)*. În această etapă atomul de fosfor din poziția 3' a unității monomere se cuplează cu atomul de oxigen din poziția 5' a lanțului în creștere pentru a forma un fosfit triester. Gruparea 5' OH a monomerului activat nu reacționează deoarece este cuplată cu gruparea protectoare dimetoxitritil (DMT). De asemenea, gruparea 3' fosforil este inactivată de gruparea protectoare β -cianoetyl. În același mod sunt blocate grupările amino ale bazelor purinice și pirimidinice. Reacția se realizează în mediu anhidru deoarece apa reacționează cu fosforamidiții; *ii) oxidare cu iod a grupării fosfit triester (P (III)) în fosfat triester P (V)*. În această etapă fosfit triesterul în care fosforul este trivalent este oxidat cu iod pentru a trece în fosfotriester în care fosforul este pentavalent.

c) Hidroxilul din 5' este eliberat prin acidifiere: catena este gata pentru următorul ciclu. În această etapă gruparea protectoare DMT este eliberată în mediu de acid dicloracetic care eliberează 5'OH și lasă celealte grupări protectoare intacte. În acest moment catena are o unitate monomeră în plus și este gata pentru o nouă reacție (Figura 2.16).

Procedeul este automatizat și poate produce lanțuri de 150 baze necesitând 10 minute pentru fiecare ciclu. Sinteza ribopolinucleotidelor este mult mai delicată datorită reactivității hidroxilului din poziția 2': este dificilă protecția eficientă fără a altera posibilitățile de reacții ale grupării 3'.

La sfârșitul sintezei se realizează un tratament cu amoniac pentru a elimina toate grupările protectoare și detașază nucleotidele „curate” de pe suport. Sinteza în fază solidă reprezintă abordarea ideală atât pentru sinteza polipeptidelor cât și pentru a polinucleotidelor. Toate reacțiile au loc în același recipient și reacția poate fi

coordonată în funcție de cantitățile de reactivi introdusi. Produsii de reacție pot fi purificați prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau prin cromatografie lichidă de înaltă rezoluție (HPLC High Performance Liquid Chromatography).

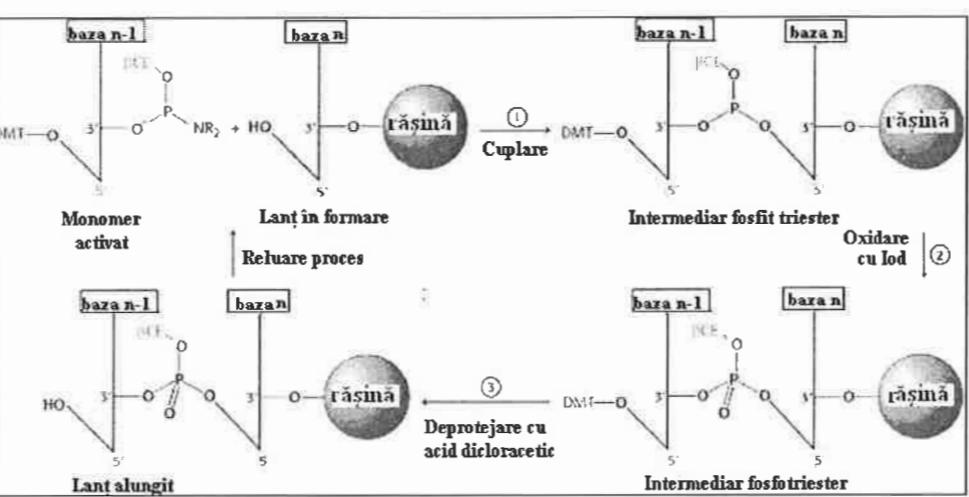


Figura 2.16. Sinteză în fază solidă a catenelor unui polinucleotid prin metoda „fosforamidiilor”

CAPITOLUL III

STRUCTURA SECUNDARĂ ȘI TERȚIARĂ A ADN

Legăturile prezente în structura secundară și terțiară a acizilor nucleici sunt comune cu cele din alte tipuri de polimeri biologici. Acestea sunt legături cu energie scăzută, a căror multiplicitate determină apariția unor forțe destul de puternice pentru a stabili și menține coeziunea de ansamblu, în spațiu, și pentru a autoriza modificările plastice.

Cu toate acestea secvența covalentă a lanțurilor polinucleotidice demonstrează diferențe fundamentale față de proteine. Acestea se traduc prin interacții particulare între compuși și cu mediul și stau la originea conformațiilor permise. Aceste diferențe vin: i) din structura scheletului polimer; ii) prin prezența substituenților laterală, bazele azotate, care aduc în structură proprietățile lor originale: planuri apolare susceptibile de stivuire (de suprapunere) și capabile să realizeze împerecheri specifice prin intermediul grupărilor lor polare.

1. Consecințele scheletului oză-fosfodiester

1.1. Posibilitățile de rotație

Geometria și conformația scheletului sunt dictate de posibilitățile de rotație ale componentelor în jurul legăturilor covalente succesive. Cel puțin din punct de vedere teoretic, acestea sunt mult mai numeroase decât cele care pot să apară în înlanțuirea catenelor proteice în care legătura peptidică este plană și rigidă și nu își găsesc echivalent în structura acizilor nucleici. În consecință, conformațiile posibile ale unui polinucleotid, în ansamblul său, sunt mult mai complexe decât cele din proteine. Această afirmație este susținută de informațiile structurale privind unghurile de

legătură și posibilitățile de rotație (torsiune) cât și de interacțiile sterice între grupări și cu moleculele din lanțurile vecine.

Se poate realiza o analiză simplificată a fiecărei unități mononucleotidice (Figura 3.1), independent de vecinii săi, pentru a determina conformațiile probabile, înainte de includerea acestea în lanțul polinucleotidic. În acest mod se realizează evaluarea tuturor interacțiilor posibile. În cadrul unității mononucleotidice, șase dintre legăturile scheletului (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) oferă posibilități de rotație substituenților lor (Figura 3.1). Prin cea de a șaptea legătură (χ), baza participă la formarea legăturii glicozidice. La acești factori de conformatie se adaugă izomeria conformatională a ciclului furanozic al pentozei discutată în capitolul 1.

În realitate, aceste posibilități multiple de rotație sunt supuse unor constrângeri interne care limitează gradele de libertate de mișcare. În unitatea mononucleotidică și mai ales în polinucleotid, scheletul riboză-fosfat are o conformatie restrictivă, în urma însumării interferențelor sterice și funcționale. Această structură nu este foarte rigidă. De asemenea, catenele separate de acizi nucleici sunt destul de flexibile pentru a trece în conformatii dezordonate de tip ghem statistic.

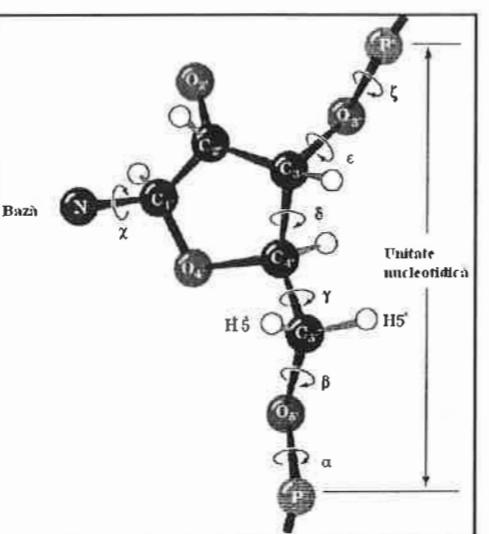


Figura 3. 1. Tipurile de rotații posibile în structura unei mononucleotide (după *Biochemistry*, Voet&Voet, 1995)

1.2. Natura polianionică a acizilor nucleici

Contrașcheletului proteic, polar dar cu sarcină totală neutră, cel al acizilor nucleici este polianionic. Densitatea sa de sarcină negativă, foarte crescută la pH celular, are următoarele consecințe:

i) repulsii între segmentele lanțului care se opun compactării acestuia. Din această cauză nu ne putem aștepta la forme globulare, compacte.

ii) o afinitate electrostatică crescută pentru cationi minerali și organici. Ionul Mg^{2+} este un factor important pentru achiziționarea structurilor spațiale și stabilizarea acestora (Figura 1.23). Ca urmare a acestei afinități, peptidele și proteinele încărcate pozitiv la pH fiziologic, se pot fixa pe scheletul acizilor nucleici.

2. Legătura de hidrogen

Pentru acizii nucleici, modul de formare a structurilor sub formă de elice (helix) este diferit de cel cunoscut pentru proteine datorită forțelor de repulsie și afinității electrostatice crescute precum și a interacțiilor dintre baze (pe care le vom discuta în continuare). De fapt, în cazul acizilor nucleici, legăturile de hidrogen nu se stabilesc între polii scheletului, ci între echivalenții lanțurilor laterale, bazele.

2.1. Împerecherea specifică a bazelor

2.1.1. Regula lui Chargaff

Compoziția ADN a fost stabilită abia în anii 1940, la 70 de ani de la descoperirea sa. Chargaff a stabilit compoziția ADN prin hidroliză și chromatografie și a remarcat următoarele:

a) conținutul în purine ($A+G$) este egal cu cel în pirimidine ($C+T$), indiferent de originea celulară a speciilor de ADN;

b) fracțiile molare ale bazelor sunt astfel distribuite încât $A=T$ și $G=C$.

La acea epocă nu a fost înțeleasă greutatea acestor observații care au fost numite mai târziu „*regula lui Chargaff*”. ARN nu prezintă aceste două caracteristici.

De reținut că, valorile sumelor A+T și G+C nu sunt egale. Acestea sunt specifice tipului și provenienței moleculei de ADN. Astfel, conținutul G+C poate reprezenta între 35 și 75% din conținutul total al bazelor.

2.1.2. Împerecherile Watson și Crick

La începutul anilor 1950, James Watson a propus o explicație pentru stoichiometria Chargaff a bazelor, în urma realizării unor machete moleculare: cuplurile Pur-Pyr se stabilesc prin legături de hidrogen care apar între bazele care prezintă o anumită complementaritate. În același context, specialistul în cristalografie Francis Crick a înțeles că hărțile ADN, obținute prin difracție cu raze X, pot fi interpretate printr-un complex de duble helixuri împerechate prin intermediul acestor cupluri.

Cei doi cercetători au definit aceste împerecheri ca fiind de tip „Watson și Crick” (Figura 3.2). Ele reprezintă asocierea specifică dintre: i) A și T (sau U) prin două legături de H; ii) G și C prin trei legături de H (o asociere mult mai solidă).

În structura ADN, ansamblul celor două baze împerechate este plan, iar lungimea totală a acestor cupluri este identică (Figura 3.2.).

2.1.3. Studiul împerecherilor

Datorită importanței lor cruciale în formarea structurilor în dublu helix și în copierea fidelă a informației în cazul replicării sau transcripției, caracterul specific al acestor împerecheri a determinat și mai determină un număr mare de studii. Principalele metode folosite sunt:

- cristalizarea bazelor și derivațiilor lor și co-cristalizarea diferitelor perechi urmată de analize prin difracție cu raze X a geometriilor de asociere;
- măsurarea energiei de legătură;
- determinări prin spectroscopie IR și RMN - care diferențiază speciile libere de formele împerechate. Se realizează determinarea constantelor de asociere a bazelor identice, diferite sau modificate prin folosirea unor solvenți neutri față de legăturile de hidrogen;

d) măsurarea directă a forțelor și a importanței atracțiilor. Se confectionează două suprafete acoperite cu bazele de studiat. Una dintre acestea este legată la un resort iar celălalt este apropiată controlând distanța prin interferometrie optică (precizia de 1/10 din raza atomică). Măsura forțelor care se exercită între baze este dată de deformarea resortului respectiv.

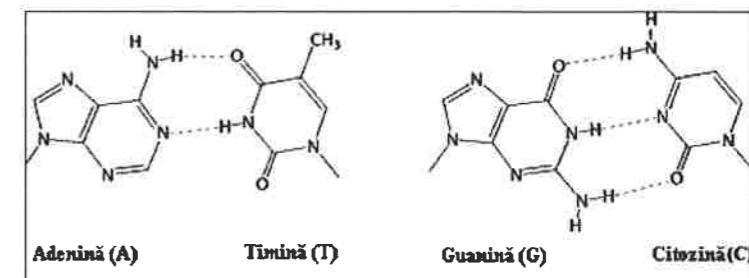


Figura 3.2. Împerecheri pirimidină-purină conform Watson și Crick (formarea legăturilor de hidrogen)

Bilanțul tipurilor de investigații, trecute în revistă mai sus, este rezumat în următoarele **concluzii**:

a) Existența mai multor tipuri de împerecheri diferite: în structura ADN perechile A-T și C-G se împerechează după modelul Watson și Crick. Cu toate acestea, perechea A-T co-cristalizează și în geometria denumită a lui Hoogsteen (Figura 3.3.), care este diferită. Modalitatea de împerechere Hoogsten, descrisă în figura 3.3., se întâlnește în fragmentele de triplu helix ADN sau în structura ARNt, constituind factori de stabilizare a structurii terțiară.

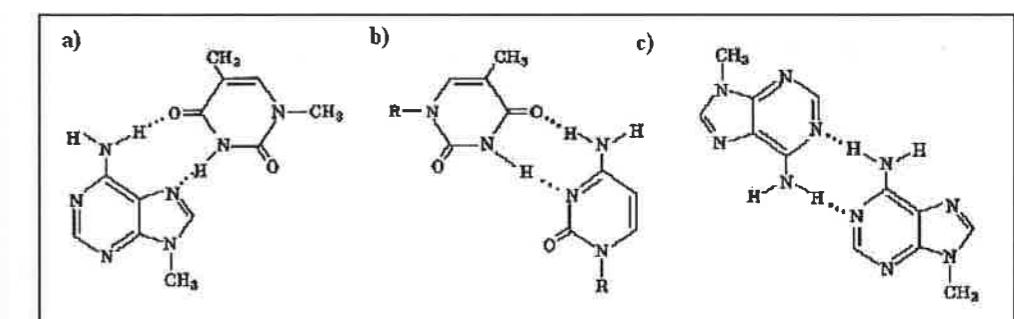


Figura 3.3. Împerecheri diferite de tipul „Watson-Crick”: a) împerecherea de tip Hoogsten a derivațiilor cuplurilor T-A (gruparea metil înlocuiește pentoza); b) împerechere ipotetică între C și T; c) împerechere de adenine în structura cristalului de 9-metil-adenină

b) Evaluarea selectivității atracției bazelor: începând din anii 1970, măsurările energiilor de legătură și ale constantelor de asociere au demonstrat preferința energetică a bazelor pentru stabilirea de cupluri. Datele prezentate în tabelul 2. 6 sunt elovente în acest sens. În raport cu autoasocierea, împerecherile Watson-Crick au o energie de legătură mult mai puternică și o constantă de asociere de 15 la 1 000 ori mai mare. Măsura directă a forțelor de atracție confirmă valorile energiei de legătură și evidențiază că atracția A-T domină pe distanță scurtă (10-20 nm) în timp ce la distanțe mai mari bazele par să se atragă indiferent de natura lor.

De reținut că *in situ*, în structura polinucleotidelor, aceste caracteristici de legătură nu sunt constante fiind dependente de bazele vecine, deci de secvența primară.

c) Explicația selectivității: este evident că asocierea specifică, în funcție de regulile lui Watson și Crick, depinde de posibilitatea stabilirii numărului de legături de hidrogen necesare. Astfel, apare obligativitatea ca grupările implicate să prezinte o geometrie complementară adecvată care este dependentă de formele tautomere pe care le adoptă bazele (Figura 1.6). Totuși, aceste considerații nu sunt suficiente pentru a explica total specificitatea de împerechere. În aceste condiții, s-a avansat ipoteza existenței unei complementarități electronice între A - T, și C - G, care pentru moment nu este complet elucidată.

3. Ierarhia plierii ADN

Interacțiile și conformațiile elementare pe care le-am descris sunt, asemenei cazului proteinelor, d dictate de structura primară specifică a acizilor nucleici. Compoziția și secvența bazelor vor determina replieri ale polimerului într-o structură spațială globală. Atât pentru ADN cât și pentru ARN putem defini mai multe nivele de organizare structurală.

Nivelul structurii secundare

Acest nivel este cel al împerecherii locale a bazelor provenind din două fragmente antiparalele (de zeci la mii de nucleotide), cu consecințele de răsucire în diverse tipuri de elice, pe care le vom descrie în continuare. Fragmentele care se împerechează aparțin la două catene diferite sau pot să facă parte din aceeași catenă.

Acste elice (helixuri), formate prin stivuirea planurilor bazelor față de o axă, le considerăm structuri în două dimensiuni (2-D). Ele pot fi uneori separate de fragmente neîmperecheate sau împerecheate diferit.

Nivelul tertiar

Nivelul terțiar este constituit din răsuciri, plieri sau suprarăsuciri ale elicelor. Se formează structuri arhitecturale în trei dimensiuni (structuri 3-D) care conferă macromoleculei conformația sa globală. Aceste structuri vor fi analizate, pentru ADN, în paragrafele următoare și pentru ARN în capitolul patru.

Nivelurile superioare de organizare, asocieri excepționale de subunități, pentru a forma structuri cuaternare cu grade complexe de compactare la nivelul cromozomilor vor fi descrise succint în capitolul cinci.

3.1. Structura spațială a ADN

Organizarea acestor polimeri, a căror mărime deosebită a fost evidențiată, este dominată de celebra dublă-elice (dublu helix sau duplex). Sunt deja cunoscute structura, deosebit de repetitivă și uniformă, dar și variațiile și deformările modelului de răsucire la nivel secundar și terțiar.

3.1.1. Dublul helix - Modelul Watson și Crick

Anul 1953 are o importanță deosebită pentru biologie: descoperirea structurii spațiale a ADN urma să deschidă calea cunoașterii mecanismelor eredității și ale biosintizei proteice, primele mari realizări ale domeniului biologiei moleculare. Utilizând și asamblând toate cunoștințele anterioare privind compoziția ADN, tautomeria bazelor, modelele moleculare anterioare, spectrele de difracție cu raze X (furnizate de M. Wilkins și R. Franklin), Watson și Crick au reușit, în acest an de grație, să deducă modelul de organizare în dublă elice și să demonstreze existența structurii denumită de atunci ADN B.

3.1.1.1. Răsucirea în dublă elice

Conformația ADN B este cea mai răspândită în natură și are următoarele caracteristici responsabile de răsucirea în dublă elice:

1) Este formată din două catene polideoxiribonucleotide cu secvențe simetrice asociate prin împerecherea bazelor complementare. Sensul celor două catene este obligatoriu opus: acestea sunt antiparalele (Figura 3.4.).

2) Asocierea celor două catene determină apariția de constrângeri care se traduc prin răsucirea obligatorie, în elice, a unei catene în jurul celeilalte. Catenele nu pot fi separate decât dacă pierd structura elicoidală regulată. Dubla elice (Figura 3.5) are câteva caracteristici bine definite:

a) bazele sunt împerecheate și stivuite prin intermediul planurilor lor, care au lungime egală, și constituie un cilindru central;

b) înlăturările pentoza-fosfat polianionice formează scheletele elicoidale paralele exterioare, planurile bazelor fiind aproape perpendiculare pe cele ale bazelor;

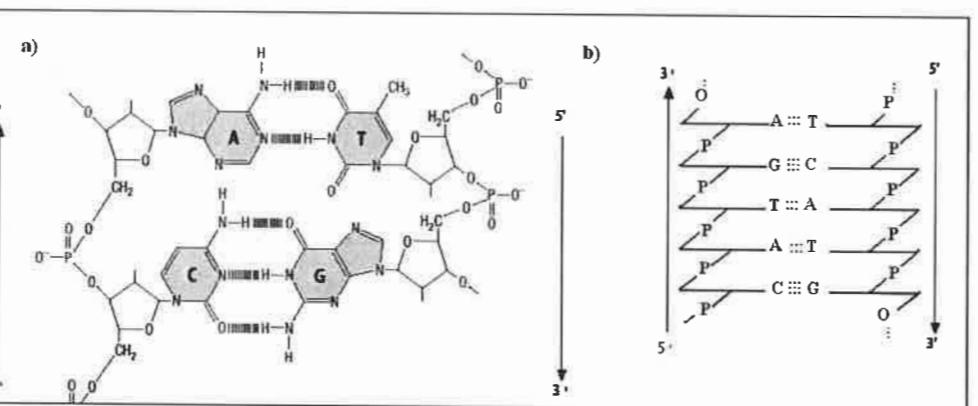


Figura 3.4. Legături de hidrogen între bazele complementare din structura catenelor elicei ADN: a) reprezentare în plan a legăturilor de hidrogen; b) prezentare schematică plană a vectorizării catenelor

c) marea axă a ansamblului este perpendiculară pe planul de stivuire a bazelor.

Această structură monotonă, de o remarcabilă regularitate, se stabilește pe toată lungimea unei molecule și îi conferă un caracter fibros. Ea este menținută prin două ansambluri de forțe, discutate în capitolul precedent: legăturile de hidrogen, care se formează între bazele celor două catene, și forțele de stivuire.

3.1.1.2. Caracteristicile geometrice ale structurii 2-D de tip B

Structura în două dimensiuni a acizilor nucleici prezintă următoarele caracteristici: i) din cele două sensuri de răsucire, posibile teoretic - drept/stâng, care determină obținerea unor structuri care constituie fiecare imaginea răsturnată a celeilalte în oglindă, pentru ADN se impune modelul considerat convențional drept. Aceasta este dictat de geometria scheletului pentoza-fosfat; ii) dimensiunile elicei (helixului) sunt indicate în tabelul 2.7. Elicea conține, în medie, 10 perechi de baze pe tură, care au un pas de 3,4 nm și un diametru de 2 nm. Distanța dintre planurile bazelor este corespunzătoare grosimii nucleelor în contact; iii) datorită poziției axei în centrul fiecărei perechi de baze și de atașarea lor covalentă di-simetrică pe schelet, se formează două fose (mare și mică) care au deschidere și profunzime diferită și care alternează la nivelul flancurilor elicei, pe toată lungimea acesteia (Figura 3.5.). Morfologia acestor fose suferă variații locale, în funcție de secvența de baze. De exemplu, într-o regiune bogată în A-T, fosa mică este mult mai îngustă decât în cazul unei regiuni bogate în G-C.

d) conformațiile pentozei și legăturii glicoziidice în structura unităților nucleotidice sunt caracteristice acestui tip de structură (Tabel 3.1).

Conformația B, cea descrisă de Watson și Crick, este cea mai stabilă în condiții fizioligice și deci considerată drept forma nativă de referință pentru ADN. Totuși, flexibilitatea relativă a structurii îi permite acesteia să adopte și alte conformații duplex, dintre care două sunt bine caracterizate prin cristalografie. În tabelul 3.1 sunt grupate principalele caracteristici ale diferitelor conformații, iar în figura 3.5. este prezentat modelul conformației B.

3.1.2. Conformația A

Dacă se concentrază o soluție de ADN în apă, moleculele încep să treacă reversibil într-o conformație diferită, care a fost numită A. ADN-A este tot o dublă elice dreaptă, dar cu o geometrie particulară:

i) aceasta este mult mai compactă; pentru același număr de perechi de baze lungimea sa totală este mai redusă iar diametrul este mai mare decât în cazul ADN-B. Ca urmare a acestei structuri bazele sunt mai puțin accesibile;