

REPLICAREA (BIOSINTEZA DNA)

Organismele vii trebuie să-și păstreze nu numai integritatea secvenței nucleotidelor din DNA (repararea), dar să-și reproducă foarte exact și subtil DNA propriu în mitoza celulară. Enzimele replicării acționează perfect și rapid (la bacterii într-o secundă se polimerizează pînă la 500 nucleotide). Operativitatea și precizia sunt datorate unui complex multienzimatic — mecanism perfect compus din diferite proteine.

În procesul de replicare informația codificată în secvența bazelor moleculei de DNA parental este transferată cu o exactitate maximă celei-fiice de DNA. Replicarea se bazează pe împachetarea complementară a bazelor nucleice. Activitatea matriceală a DNA se manifestă prin faptul că secvența nucleotidică se reproduce prin această împachetare complementară a bazelor (fig. 2.13).

Replicarea constă în desfacerea dublului helix parental și construirea catenelor pe fiecare dintre cele 2 catene complementare — replica celor dintîi. Rezultă 2 molecule de DNA identice cu parentală. Fiecare dintre ele conservează o catenă parentală veche. Așadar, procesul replicării e *semiconservativ*.

Precizările lui J.Watson și F.Crick au fost confirmate de M.Meselson și F.Stahl, care au cultivat *Escherichia coli* în diferite medii cu izotopi marcați. În 1956 a fost descrisă prima enzimă ce catalizează polimerizarea fermentativă — *DNA-polimeraza*. Procesul de biosinteză este deosebit de complex și necesită următoarele:

1. Prezența matricei DNA (templată).
2. Prezența celor 4 dRN trifosfați — dATP, dGTP, dCTP și TTP.
3. Prezența ribonucleozid trifosfaților — ATP, GTP, CTP, UTP.
4. Prezența ionilor de magneziu.
5. Sistem multienzimatic în baza constituenților:
 - a) *helicaza* — enzimă ce realizează desfacerea dublului helix parental în două catene complementare. Desfacerea decurge treptat, în porțiuni mici de DNA, pe măsură ce replicarea avansează. Cele două catene vor rămîne separate ca urmare a intervenției proteinelor de stabilizare (SSB) a DNA monocatenare. La desfacerea unei perechi de baze se utilizează minimum 2 molecule de ATP. Un rol important la desfacere îi revine unei enzime — *topoizomerazei*;
 - b) *RNA primaza* sintetizează mici fragmente de RNA - primer;
 - c) *DNA polimeraza* preia indicațiile de la matricea care decide secvența mononucleotidelor în catena nou-sintetizată (o sintetizează în direcția 5' → 3'). Enzima are și o acțiune exonucleazică, excizînd nucleotidele de la ambele capete ale catenei.

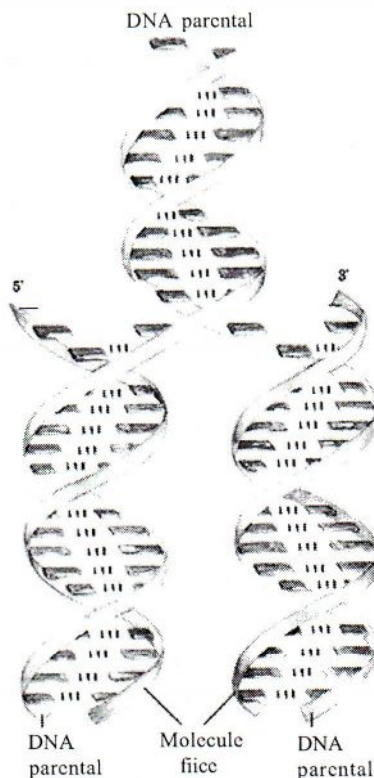


Figura 2.13. Replicarea DNA după J.Watson și F.Crick

Sunt atestate trei enzime de DNA-polimeraza (I, II, III). Enzima exercită și funcția de control a replicării, asigurând procesului o eficiență sporită. Cele expuse sunt confirmate prin:

1. Sinteza ce evoluează în prezența celor 4 dezoxiribonucleotidtrifosfați și a DNA matriceal.

2. Componenta nucleotidică a DNA sintetizat, dependent de caracterul matricei, dar nu de numărul relativ al nucleotidelor.

3. Cea mai convingătoare probă - DNA fagului FX174 replicat *in vitro* de DNA polimerază e complet contagioasă — erorile la sinteză sunt extrem de rare.

d) *DNA - ligaza* — enzima ce catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între 3'-OH ale unui fragment și 5'-monofosfat ale celuilalt. Reacția necesită ATP sau NAD⁺ (la procariote). Capetele trebuie să aparțină moleculelor bicatenare de DNA, în cadrul reconstituirii sau splicing-ului catenei de DNA la recombinația genetică. Procesul decurge în felul următor:



(aminogrupa lizinei din enzimă se leagă cu fosfatul din AMP)



Forța motrice a procesului de sudare a catenei e hidroliza pirofosfatului.

Recent s-a stabilit că sinteza DNA se cuplează cu desfășurarea DNA parental. Localizarea acestui proces e denumită *furcă de replicatie*. Ea începe într-un loc anumit cu extinderea la aceeași viteză în ambele direcții (fig. 2.14).

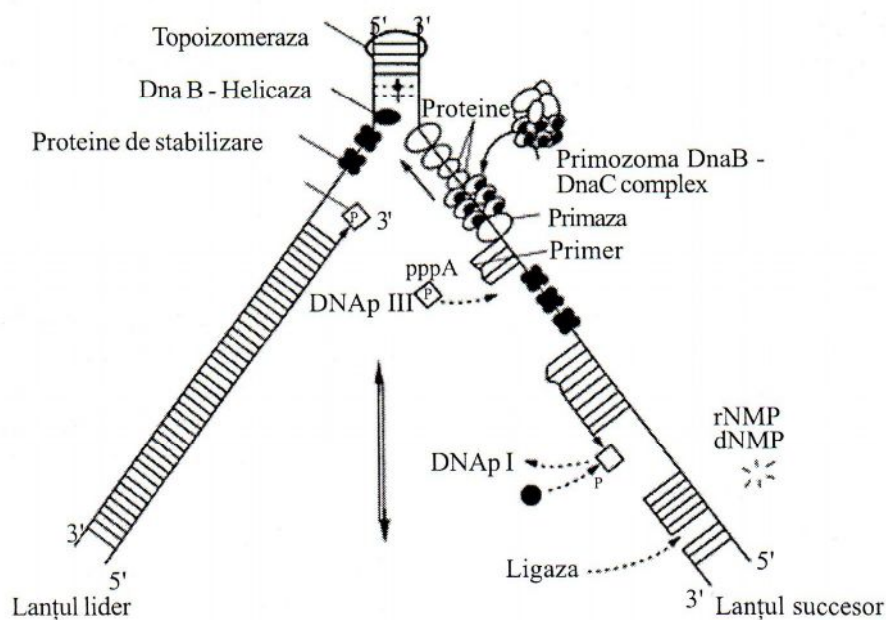


Figura 2.14. Imaginea schematică a proceselor fermentative în regiunea bifurcației

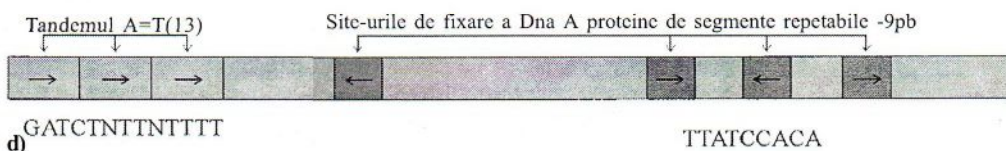
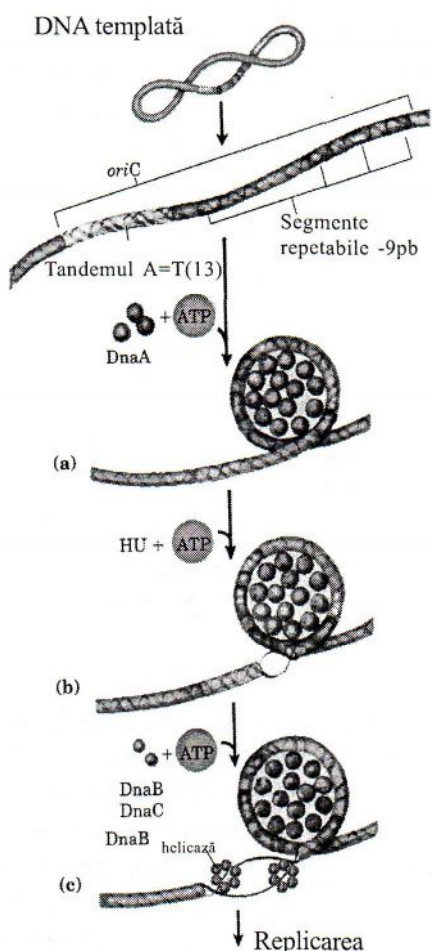


Figura 2.14a. Inițierea replicăției (model) la *E.coli*:

- a) Aproximativ 20 molecule proteice Dna A legate cu ATP se fixează de cele 4 segmente repetabile ce conțin 9 perechi de baze. DNA se atașează la acest complex.
- b) Tandemul compus din cele 3 segmente A=T (13) cu baze repetabile este denaturat secvențial.
- c) Hexamerul DnaB proteine se asociază cu proteinele DnaC. DnaB helicaza pregătește despiralizarea DNA pentru sinteza primerului în replicare.
- d) Aranjamentul secvențelor în crearea furcii replicative ori C.

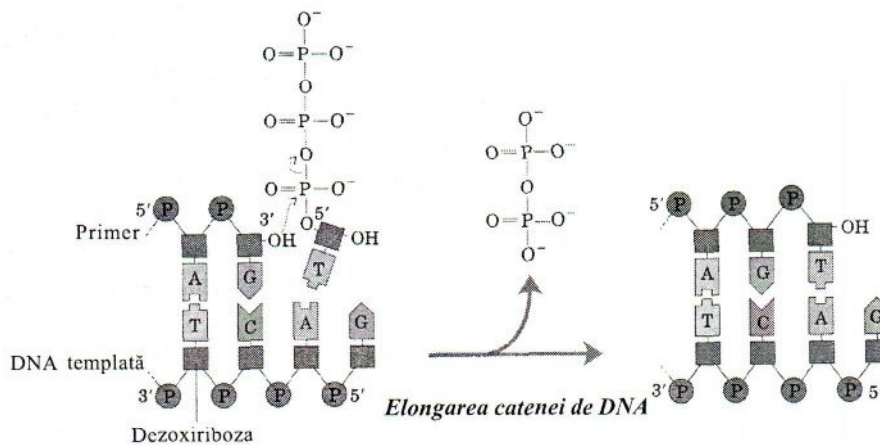
matrice. Primaza nu solicită inițiator al sintezei. DNAP supraveghează fragmentul sintetizat de primază și înlătură toate nucleotidele necomplementare (activitatea exonucleazică 3' → 5'), posedând funcția de autocorecție, numai după care începe procesul de sinteză catalizat de un complex multienzimatic (holoenzimă). Grupa 3'-OH a ribonucleozidului e un inițiator al sintezei DNA.

Enzima *helicaza* (Dna B), ce desfășoară DNA, conduce la formarea superspirelor (torsioni pozitive) într-o moleculă inelară. În regiunea furcii DNA parental se răsucește cu o viteză de 100 rotații pe secundă. Continuarea procesului de replicare implică lichidarea acestor structuri formate de rotație. *Topoizomeraza* (DNA giraza) efectuează rupturi monocatenare, apoi sudează legătura fosfodiestică și favorizează relaxarea structurii terțiare a DNA.

Inițierea specifică a unui ciclu nou de replicăție este determinată de complexul de proteine specifice (Dna A), aductor al complexului de proteină Dna B - Dna C la porțiunea anumită a genei, adică *punctul (origine) de replicăție(OR)*. Timpul de inițiere a replicăției este o valoare critică coordonată cu mitoză a celulei. Proteinele Dna B se deplasează pe DNA, utilizând energia hidrolitică a ATP. Enzima servește drept semnal pentru activarea primazei. În fig. 2.14a este redată inițierea replicăției la *E.coli*.

S-a stabilit că DNA polimeraza nu e capabilă să inițieze sinteza catenei. Ea are nevoie de un fragment cu grupă liberă 3'-OH. Acest fragment este sintetizat de *primază* (Dna G - proteina) - un fragment complementar cuplat la DNA

Cum se produce *elongarea*? Se declanșează un atac nucleofil al capătului 3'-OH pe atomul de fosfor (P), în apropierea ribozei din dRNTTP ulterioară. Se formează o legătură fosfodiestică și se eliberează pirofosfatul-hidroliza, căruia determină polimerizarea propriu-zisă. Elongarea se produce în direcția 5' → 3'.



Fenomenul e procesiv, adică enzima adăunează multe nucleotide, fiind legată și dirijată de matrice. Catenele DNA parental nu sunt paralele, adică orientarea sintezei pentru o catenă e 5' → 3', iar pentru alta - 3' → 5'. Toate DNA cunoscute pînă la moment sintetizează numai în direcția 5' → 3'. Cum are loc sinteza celorlalte catene?

R.Okazaki, renumit savant japonez, a determinat că o bună parte a acestei catene se

prezintă sub forma unor segmente de nucleotide (100-200 la eucariote și 1000-2000 la procarote) (fig.2.15).

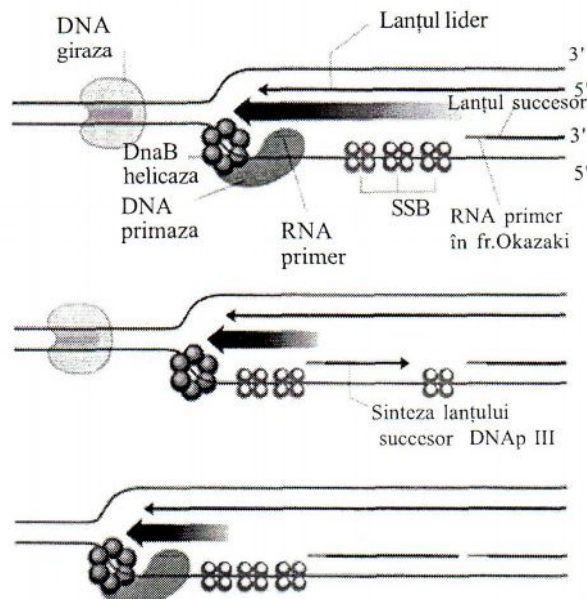


Figura 2.15. Sinteza fragmentelor Okazaki

Persistența lor e fragmentară, de scurtă durată și se apropie efectiv de bifurcație.

O dată cu avansarea bifurcației, fragmentele se leagă covalent cu ajutorul DNA-ligazei și se formează catena fiică, catena în care polimerizarea fragmentelor în direcția 5' → 3' se produce la nivel atomic, pe cînd la nivel general se extinde în direcția

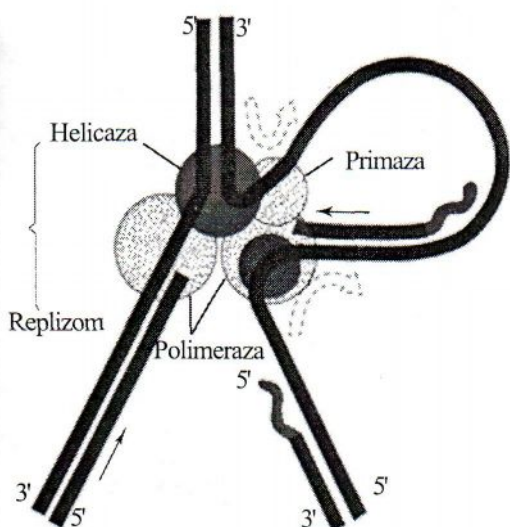


Figura 2.16. Modelul replicării în replizom, cu replicarea simultană a ambelor catene

nouă legătură fosfodiestică enzima controlează perfect geneza perechii de baze complementare. Funcția de redactor permite reducerea greșelilor pînă la minimum. RNAP nu posedă o atare funcție și, eventual, apar falsuri de împerecheri. De aceea, se sintetizează un fragment de nucleotide cu o fidelitate joasă, dar numai temporar, DNAP le controlează și exclude greșelile (o eroare la 10^{9-10} perechi de baze). Se cunoaște că sistemele enzimatice autocorectoare nu pot iniția sinteza de novo și toate enzimele care inițiază o astfel de sinteză nu sunt capabile de autocontrol și, în felul acesta, crește mult numărul de mutații.

Repararea DNA. Totuși, o mulțime de reagenți chimici și fizici provoacă lezări structurale în DNA. Celulele posedă *mecanisme specifice de reparare*. Multe modificări pot fi reparate datorită faptului că informația genetică se conține în ambele catene și poate fi păstrată în secvența de nucleotide, dată fiind funcționarea unui ansamblu de *enzime de reparare* care controlează DNA și-l repară. Procesul decurge conform fig. 2.17.

1. Una dintre metodele de reparare o constituie excluderea dimerului de pirimidină, care apare sub influența razelor ultraviolete:

a) *Endonucleozidazele specifice (E)* taie catena și fragmentul iese din helix.

b) DNAP (I) repară, concomitent sintetizînd normal catena. Ca primer servește 3'-OH liber al lanțului întrerupt, iar ca matrice se utilizează catena

3' → 5'. Sinteza fiecărui *segment Okazaki* necesită primer; DNA polimeraza I sintetizează în continuare catena și, avînd o acțiune exonucleazică, exclude primerul. În fine, fragmentele vor fi sudate de DNA ligaze, cu consum de ATP. Dar fiindcă replicarea e bidirecțională, pe cealaltă bifurcație a replicării procesul decurge identic. Datorită fidelității sporite, se menține capitalul genetic al speciei (fig. 2.16).

Ce factori reclamă sinteza primerului? De ce DNAP nu sintetizează catena de novo? S-a stabilit că dacă enzima ar avea o anumite capacitate rezultantă, ar fi incompatibilă cu fidelitatea înaltă a acestui proces. Pentru a forma o

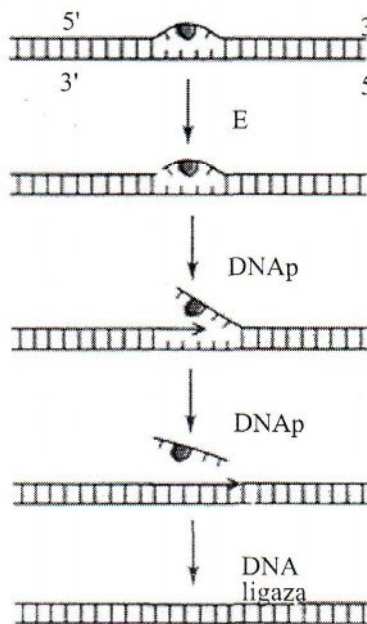


Figura 2.17. Repararea fragmentului de DNA

complementară.

c) Dimerul este exclus sub acțiunea exonucleazică a DNAp.

d) Sudarea o execută DNA-ligaza.

Menționăm maladia *xeroderma pigmentosum* în care pielea e deosebit de sensibilă la razele soarelui, la ultraviolet. Epiteliul devine uscat, se atrofiază, apare cheratoza, sunt afectați ochii. În consecință, apare cancerul pielii, bolnavii mor de timpuriu.

Studiind fibroblaștii pielii, s-a constatat că la acești bolnavi nu sunt excluși dimerii pirimidinici. Faptul se explică prin lipsa activării endonucleazei ce hidrolizează catena de DNA în preajma dimerului.

Dimerul poate fi scindat și fotochimic. Toate celulele conțin enzima fotoreagentă, care-l identifică și-l scindează, utilizând energia luminii (DNA fotoliaza).

Fluctuațiile termice dezordonate ale moleculelor din celule pot modifica mult starea genelor. DNA al fiecărei celule în 24 ore pierde 5000 de resturi de purină (apurinare), 100 de citozine își pierd grupa NH_2 (pag.142). Dimerul de timină (legăturile covalente între 2T) deja a fost descris. *Cum se menține stabilitatea genelor?*

1. În mod analog, cu excluderea dimerului de timină. Alte modificări vor fi excluse datorită funcționării diverselor nucleaze de reparație.

2. DNA — glucozidazele (peste 20) exclud bazele modificate. S-au depistat multe enzime (circa 50), ce repar DNA modificat. Care-i cauza că DNA posedă timina, dar nu uracilul cu toate că ambele baze se împerechează cu adenina. De ce uracilul metilat se identifică numai în DNA? Cert e că metilarea utilizează multă energie. S-a stabilit că citozina în DNA spontan se dezaminează, formând uracil (proces mutagen).

Mutația apărută se repară sub acțiunea sistemului de reparație, care identifică uracilul străin (fig. 2.18).

1. *Uracil-DNA — glucozidaza* — hidrolizează legătura glucozidică a uracilului cu dezoxiriboza (baza este eliminată).

2. *Endonucleaza specifică* identifică defectul și scindează scheletul în preajma bazei în lipsa ei.

3. DNAp sintetizează catena — include citozina complementară guaninei în catena intactă.

4. DNA-ligaza sudează catena nou-sintetizată.

Prima enzimă uracil-DNA — glucozidaza — nu exclude timina, fiindcă grupa CH_3 e indicele diferențierii de citozina dezaminată. Dacă n-ar fi acel CH_3 , uracilul adecvat nu s-ar deosebi de cel format din citozină și defectul ar rămâne neobservat, conducând la o mutație.

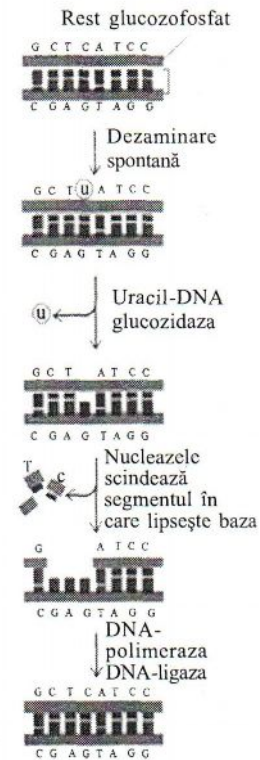


Figura 2.18. *Uracilul din DNA este excis și înlocuit cu baza primară - citozina*

Sistemul de reparație solicită un astfel de uracil apărut (mutagen) și lasă intactă timina, inhibând mutațiile. Se consideră că timina se utilizează pentru amplificarea exactității informației genetice. RNA nu se repară și utilizează uracilul ca bloc de construcție mai ieftin.

Particularitățile biosintezei DNA la eucariote

Replicarea DNA la eucariote se desfășoară după un mecanism asemănător cu cel de la procariote, prezentând unele particularități:

1. Replicarea la eucariote este la fel semiconservativă.
2. Complexitatea organizării materialului cromozomial la eucariote face ca fragmentele Okazaki să fie mult mai scurte (150-200 nucleotide), față de procariote (1000-2000 nucleotide).
3. Tot datorită nucleozomilor, furca de replicare se deplasează mai lent la eucariote față de procariote; la eucariote se adaugă lanțul de DNA 3.000 nucleotide/min, iar la procariote 16.000 nucleotide/min.
4. Datorită mărimii moleculei de DNA, la eucariote există mai multe FR, de unde sinteza începe simultan (~100). Dacă ar exista o singură origine de replicare, sinteza DNA pe un cromozom ar necesita circa 800 ore; dar întreaga replicare se desfășoară în faza S a ciclului celular, deci în 8-10 ore, ceea ce se explică prin începerea replicării simultan, în mai multe puncte de replicare.
5. Originea furcilor de replicare nu este întâmplătoare de-a lungul unui cromozom; ele sunt grupate într-o anumită zonă a cromozomului, alcătuind o unitate de replicare sau replizom.
6. La eucariote DNA-polimerazele sunt de asemenea de mai multe feluri: α , β , γ , δ .
 - DNA-polimeraza α este implicată în replicarea DNA nuclear. Este o proteină oligomeră alcătuită din patru subunități și se pare că este responsabilă de sinteza lanțului succesiv.
 - DNA-polimeraza β are mai degrabă un rol reparatoriu datorat acțiunii sale exonucleazice $5' \rightarrow 3'$.
 - DNA-polimeraza γ este implicată în replicarea DNA mitocondrial.
 - DNA-polimeraza δ este răspunzătoare de sinteza lanțului conducător, manifestând și o activitate $3' \rightarrow 5'$ exonucleazică; este asociată cu o proteină numită antigen nuclear, care-i stimulează activitatea.
7. Biosinteza DNA are loc numai în faza S a ciclului celular, separată de mitoză prin fazele de gol sintetic G_1 și G_2 . În cursul acestei faze DNA nuclear este replicat în întregime și o singură dată per ciclu celular; respectarea acestui imperativ este posibilă datorită unor procese de metilare, care marchează covalent molecula de DNA ce a trecut prin experiența replicării. Metilarea se realizează la citozină, formând 5-metil-citozină și are loc sub acțiunea unor metilaze care folosesc S-adenozilmetionina ca donatoare de grupări metil. Secvența recunoscută de metilare este: $5'-CG-3'$
 $3'-GC-5'$

La eucariotele superioare un număr restrâns de celule se divizează activ; cele mai multe sunt reținute în faza G_0 de nondiviziune. Decizia intrării din faza G_0 în G_1 și apoi S

este luată de proteine cu activitate kinazică, activare prin interacțiunea cu diverse ciclone, a căror concentrație suferă modificări profunde de-a lungul ciclului celular.

8. Ritmul sintezei de histone este similar celui de sinteză a DNA -ului; în faza S a ciclului celular cantitatea de DNA și histonele se dublează. Cele vechi rămân în nucleozom pe una din celulele-fiice. Cele noi sintetizate se unesc în nucleozom pe cealaltă catenă.

Telomeraza

Incontestabil, complexul replicativ se mișcă pe catenele antiparalele ale dublului helix, simultan în direcții diferite. Sinteza unei catene-fiice este continuă, iar cealaltă se sintetizează sub forma fragmentelor Okazaki, care sunt reparate prin excizie, completate cu deoxiribonucleotide și apoi cusute de DNA-ligază. DNA pot adăuga nucleotide numai la capătul 3' al catenei crescînde, fiindcă nu există enzime pentru elongarea nucleotidelor la cap 5'.

Ultima din RNA primer nu poate fi completată ca replică de DNA, dat fiind că eventual nu există ceva ce necesită prelungire. De aceea, capătul 3' al catenei-sens din DNA parental este nereplicat, iar capătul 5' al catenei antisens-fiică de DNA este mai scurt și, deci, capătul 3' al catenei-sens parentale este necuplat (fig. 2.19).

Savantul A.Olovnicov (1971) a sugerat ideea că, potențial, există un mecanism biologic specific, ce prevede efectul dat. Se presupune, de altfel, că acest posibil mecanism e activ în celulele sexuale, cancerigene și în celulele organismelor ce se înmulțesc vegetativ. Nu este activ mecanismul în majoritatea altor cazuri și, în particular, în majoritatea celulelor somatice.

Studiile au confirmat, mult mai târziu, prezența enzimei ce compensează scurtarea DNA în majoritatea celulelor enumerate și ea a fost numită *telomerază* — *transferază terminală* a telomerei.

Funcția constă în creșterea unui hexanucleotid repetabil multiplu (TTAGGG) la capetele DNA nuclear, ce formează așa-numita telomeră la om. În final, nu se pierde mesajul genetic și nu e dereglat mecanismul de descifrare a lui. Așadar, problema azi constă în replicarea incompletă a catenei întrerupte de DNA, însă dacă cromozomul

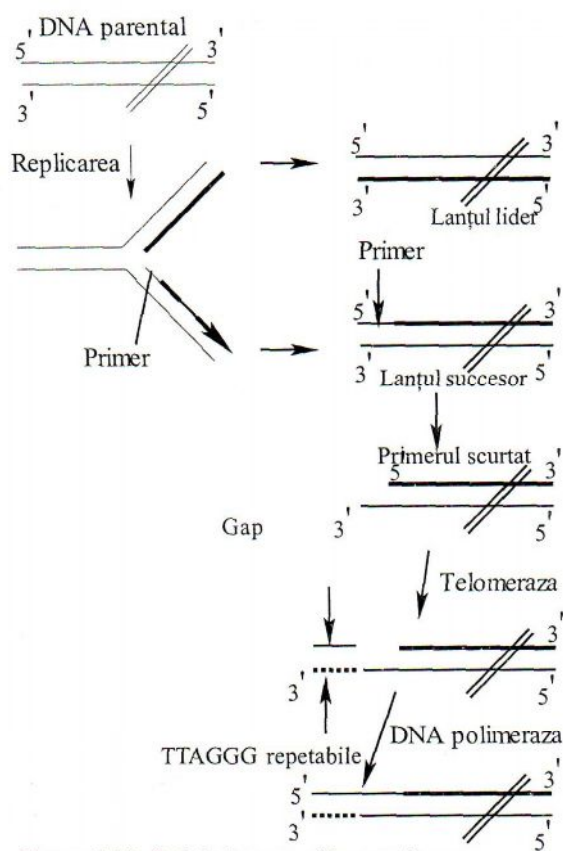


Figura 2.19. Rolul telomerazei în menținerea structurii DNA

dispune la capătul 3' de proeminență unicatenară *overheng*, apoi are loc o replicare incompletă și a catenei lider.

Telomeraza prezintă o enzimă-ribonucleoproteid compusă din RNA și proteină. Ea compensează marginalitatea replicării obișnuite, utilizând dezoxiribonucleotide și ca matrice o parte din succesiunea RNA, subunitate a telomerazei. Enzima posedă funcție de transcriptază inversă celulară — revers transcriptaza.

Telomeraza protejează cromozomul de degradare și preîntâmpină alipirea cromozomilor între ei. E știut că DNA-polimeraza e capabilă să sintetizeze în direcția 5' → 3', utilizând RNA-primer ca inițiator, apoi, după înlăturarea lui, capătul 5'-terminal al replicii rămâne nereplicat. Și, în consecință, la fiecare diviziune celulară cromozomii se micșorează. Aceste particularități ale replicării determină formarea conceptului că telomeraza posedă un mecanism specific deosebit, ce determină longevitatea celulei.

Studiul genelor ce codifică subunitățile RNA a favorizat aplicarea testelor genetice-cheie, ce au confirmat că RNA-telomerică dictează succesiunea nucleotidelor în telomerele cromozomiale *in vivo*.

Subunitatea proteică TRT (Telomerase Reverse Transcriptase) a fost depistată în organismele filogenetic neînrudite (de la unicelulare pînă la om), ce confirmă că poate fi universală pentru eucariote care posedă telomerază.

Unele proprietăți ale TRT nu diferă de cele ale cunoscutelor revers transcriptaze și funcționează în complexe ribonucleoproteice stabile. S-a stabilit că RT (revers transcriptaza) SID-ei poate fi transformată în enzima ce funcționează ca telomerază, preschimbînd simplu ionul Mn^{++} în Mg^{++} . În atare condiții RT (revers transcriptaza) rămîne în complex stabil cu matricea RNA și multiplu copie un fragment mic din lungimea sa. Aceste enzime posedă și unele particularități ce le deosebesc de RT cunoscute. Sunt mai mari, au domeniul N-terminal de bază și o distanță neobișnuit de mare între motivele A și B. Sunt modificări în resturile aminoacizilor în domeniile RT, care au caracter de conservatism vădit printre celelalte RT obișnuite.

Datele recente permit reprezentarea schemei construcției moleculare a TRT. Activitatea catalitică a telomerazei necesită numai 2 componente: RNA și proteina TRT. Un argument convingător este reconstrucția activității telomerazei din subunitățile recombinante izolate, purificate de RNA și TRT. Alte proteine sunt fixate de acest complex și pot avea un alt rol decît acel de participare la formarea centrului catalitic — iau parte la procesul de reglare a activității telomerazei.

Mecanismul elongării capetelor cromozomului este redat în figura 2.20. Se alungește capătul 3' al DNA, și datorită lui punctul extrem din replica 5' se mișcă spre dreapta. În continuare catena complementară se elonghează, cu implicarea DNA-polimerazei.

Mecanismul sintezei G-catenei de telomerază se studiază mult mai intens, decît acel al sintetizării catenei complementare C.

Există, posibil, 2 mecanisme de sinteză a catenei C.

a) Prin utilizarea catenei G ca primer, formînd bucle:



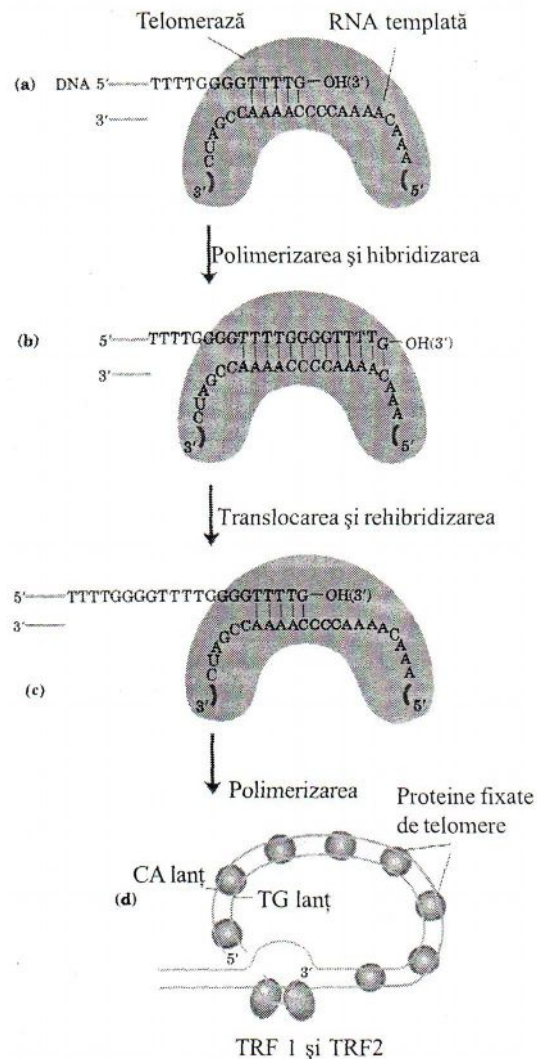


Figura 2.20. Mecanismul elongării capetelor cromozomiale

DNA. Replicarea telomerei se află sub un control complex, implicând și nucleaze.

S-a confirmat, la mijlocul anilor 1990, că telomeraza ce compensează tăierea cromozomilor este o enzimă caracteristică pentru celulele cancerigene. În aceste celule cancerigene telomera este scurtă și stabilă, iar activitatea telomerazei este foarte intensă. Totodată, activitatea telomerazei nu e detectată în celulele somatice la om, unde DNA telomerică lungă la naștere (12-15 mii de nucleotide) se scurtează cu vârsta, conform ipotezei expuse.

E studiată suficient telomeraza la *Tetrahymena thermophila* care conține peste 40000 telomere la o celulă. Această enzimă e depistată și caracterizată, utilizând metoda directă, precum și reacția polimerazică în lanț.

Bucula este un substrat nefavorabil pentru DNAP care nu poate forma perechi Watson-Crick; proteinele nu sunt capabile să se fixeze de orice structuri.

b) E mai verosimil mecanismul standard de inițiere a sintezei, cu participarea enzimelor care iau parte la sinteza catenei întrerupte: primaza, DNA polimeraza în complex cu proteinele corespunzătoare:



Analiza telomerelor din diferite organisme denotă că sinteza C-catenei a DNA-telomerică are loc la fel ca și la o replicare bidirecțională a DNA sau, în alte cazuri, fiind rezultatul unei reacții de “completare”, care substituie fragmentele G-repetabile unicateenare în DNA bicatenară telomerică. Asemenea reacții de “înlocuire” sunt necesare în foarte multe cazuri de determinare a lungimii telomerei. C-catena joacă un rol activ în determinarea numărului de repetări pe care telomeraza le poate adăuga la capătul

Caracteristica fermentativă a telomerazelor (TM):

a) *In vitro* TMsunt neprocesive, adică alungesc cromozomul numai o singură dată, cu o telomeră repetabilă.

Telomeraza la om e un ferment inalt procesiv, ce alungește DNA-primer la sute de repetări. Procesivitatea e dependentă de anumite condiții. S-a stabilit că dacă primerul are o lungime mai mică decât 10 nucleotide, el se alungește o singură dată. Procesul poate fi intensificat, dacă se adaugă din abundență oligonucleotide. Dacă primerul are mai mult de 10 nucleotide, procesul devine procesiv și DNA poate conține mii de nucleotide.

Se presupune că în telomerază, pe lângă fragmentul-matrice al RNA, e prezent și un alt fragment de fixare “ancoră”- site. E posibil că primerii majori se fixează de acest fragment, ceea ce evită disocierea produsului și-i permite telomerazei să funcționeze procesiv. Există modele schematice referitoare la acest proces.

b) *Specificitatea de substrat* — elongația primerilor netelomerici — are loc la o concentrație de Mg^{++} nu mai puțin de 1,25 mM și în lipsa de K^+ și Na^+ . Primar e alungit capătul 3' cu blocul dGGGGT. Eficacitatea e dependentă de structura primară atât 5', cât și 3' a oligonucleotidelor. Telomeraza cu aceeași eficacitate utilizează în catena polinucleotidică dezoxi, precum și didezoxiribonucleotid trifosfați. În ultimul caz are loc finalizarea sintezei DNA.

În calitate de substrat se utilizează rGTP și rTTP, procesul e procesiv la concentrații de 10-100 mkM de rTR. Pot fi utilizați și primere DNA-RNA. Ca substrat, însă, mai convenabil din punct de vedere termodinamic este duplexul RNA-RNA.

Cele descrise, precum și datele de secvență aminoacidică în proteina telomerazica p95, confirmă că evolutiv telomerazele au provenit din RNA — polimeraze RNA-dependente.

c) *Activitate exonucleazică* îi permite să hidrolizeze atât primerile, cât și produsele sintezei fermentative. Ea înlătură toate resturile nucleotidice netelomerice și începe sinteza DNA întotdeauna cu dG (la procariote, la eucariote date deocamdată lipsesc). Care-i sensul acestei activități? Activitatea de corecție determină o sinteză corectă, asemănătoare cu RNAp DNA — dependentă.

Structura și funcția RNA telomerazice. Sinteza la om a acestei subunități e determinată de RNAp III, la eucariotele primare — de RNAp II. Conservatismul în structura RNA e foarte mic, chiar și la organisme înrudite.

Structura primară diferă nu numai în succesiunea nucleotidelor, dar și în lungimea lor, care se mărește spre eucariote.

La majoritatea RNA telomerice regiunea matriceală se află la o depărtare de 50 nucleotide de la capătul 5'. Omologia e foarte mică și la genele RNA telomerazice — coincidența la om și șoarece este de 65%.

Structura secundară e bine studiată la *tetrahimene*: e compusă din 4 bucle și un fragment unicatenar, ce conține matrice pentru sinteza DNA telomerice. Unele sunt regiuni conservative, altele formează unghiuri una față de alta (60°), motive ce ar fi recunoscute de proteinele telomerazice. Se presupune și prezența centrului fermentativ (fig. 2.21).

Un component al centrului activ este regiunea matriceală a RNA telomerazice. Orice

modificare în această secvență a RNA telomerazică conduce la modificări complementare în structura primară a telomerei.

Aceste schimbări (mutații) nu modifică activitatea telomerazei, dar modifică telomera, cu consecințele respective — o îmbătrânire precoce sau moartea celulei. Dacă unele mutații se manifestă imediat, apoi altele acționează ca o bombă genetică, ce va apărea după 600 replicații, conducând la o creștere necontrolată.

E clar că, pe lângă funcția sa de matrice pentru sinteza DNA telomerazică, RNA telomerazică ia parte la funcția catalitică a telomerazei.

A fost realizată reconstrucția activității telomerazei și la om. S-a stabilit că fragmentul funcțional e între 1-203 resturi; fragmentul 1-44 spre 5' terminal nu e esențial pentru activitatea fermentativă, iar mutațiile între 170-199 complet inactivează enzima. Posibil că această regiune interacționează cu proteinele telomerazice.

Proteinele complexului telomerazic.

Spirala dublă de DNA telomerică umana este fixată de proteina TRF1, care modifică conformația DNA, formând o superspirală, în care o rotație e formată din sute de perechi de baze. S-a constatat recent că o altă proteină — TRF2, ce se leagă la capătul 5'-terminal al catenei C, fixează telomera la «bază» (trunchi), cu formarea unei bucle telomerice gigantă (t-bucă) comparabilă cu dimensiunile telomerei (fig.2.22).

Structura domenică a TRF1 e redată schematic în desen.

Ca proteina să interacționeze cu acidul nucleic este necesară oligomerizarea polipeptidelor pentru care și servește TRF domeniul. Fiecare moleculă de TRF1 înfășoară DNA sub un unghi de 120°. Experimental s-a constatat că în prezența TRF1 e facilitată circulația moleculei scurte de DNA, compusă din

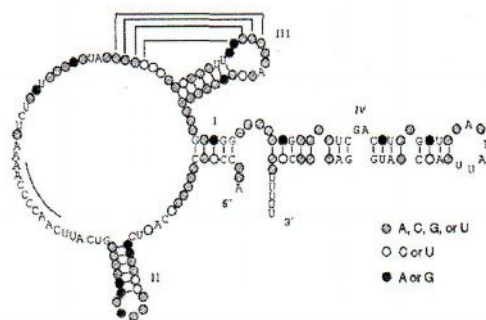


Figura 2.21. Structura secundară a RNA telomerazice la tetrahimene

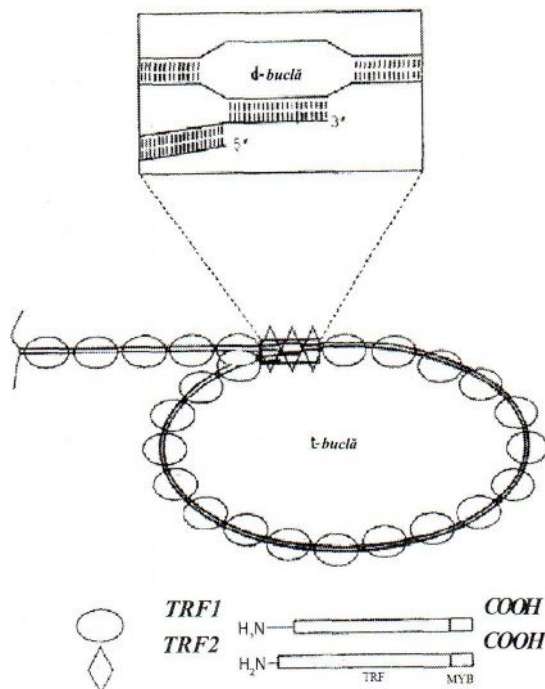


Figura 2.22. Modelul schematic al buclelor telomerice și structura domenică a proteinelor telomerice TRF1 și TRF2. Structura domenică a proteinelor telomerice TRF1 și TRF2

segmente telomerice repetate, ce confirmă rolul proteinei în formarea structurii spațiale telomerice.

Proteina TRF2 după structură e asemănătoare cu TRF1, dar domeniul final nu interacționează cu domeniile omoloage ale reprezentantei următoare din familia respectivă și deci ambele proteine în moleculă pot exista în formă de homodimeri. TRF2, ca și TRF1, în consecința splaisingului alternativ formează două variante.

S-a constatat că TRF2 se atașează în regiunea contactului telomeric cu baza (desenul). Buclele telomerice s-au depistat în cromozomii celulelor HeLa, în leucocitele periferice la om, în hepatocitele șoriceilor etc. Cele mai mici bucle conțin circa o mie de perechi de baze. Fixarea TRF2 la capătul cromozomului necesită un segment de DNA telomeric ce conține nu mai puțin de 6 nucleotide (TTAGGG). Cu cât mai multe sunt segmentele repetabile, cu atât procesul de fixare e mai favorizat. Se consideră că în acest loc DNA unicatenară-3', hibridizată cu porțiunea antiparalelă parțial desfășurată a spiralei duble «trunchi», formează așa - numita bucla-d (displacement loop).

Consecințele fenotipice în modificările activității proteinelor TRF. Lungimea telomerelor este asociată cu vârsta celulelor fenotipice. În celulele somatice, grație lipsei telomerazei sau a altor cauze, numărul segmentelor repetate telomerice se micșorează la fiecare diviziune celulară. La fibroblaști in vitro, dublarea numărului de celule duce la micșorarea telomerei cu 48-21 perechi nucleotidice. In vivo, la fibroblaștii umani valoarea e de 75 perechi la o mitoză. Telomera celulelor sanguine periferice la copii pierde mai mult de 1000 perechi nucleotidice în an. Se consideră că între 4 și 20 ani telomerele se micșorează mai încet, dar la vîrstă matură și senilă se micșorează cu o viteză constantă de 30-60 perechi nucleotide anual.

Cu vîrsta, telomerele ating o lungime critică, la fibroblaștii omului circa 5-7 mii perechi, la care apare o îmbătrînire replicativă și în consecința — inhibiția și stoparea proliferației. Expresia artificială a telomerazei preîntîmpină îmbătrînirea și e posibil de immortalizat celulele respective, ce înfîlînim în celulele cancerigene. În ultimele inhibînd telomeraza, e posibil stoparea răspîndirii celulelor.

S-a constatat că expresia proteinei TRF1 în cultura celulară duce la o mitoză prematură și moartea celulelor. Reglarea expresiei permite celulelor să supraviețuiască, dar după cîteva cicluri celulare are loc micșorarea telomerelor. În condițiile de inhibare a sintezei TRF1 în celule, ce expresează telomeraza, are loc o creștere lentă a lungimii telomerelor. Posibil, TRF1 favorizează formarea t-buclei, împiedicînd creșterea telomerelor din contul activității telomerazice. S-a arătat că TRF1 in vitro inhibibă lungirea catenei C - telomerice.

Inhibiția proteinei TRF2 conduce la o stopare imediată și ireversibilă a proliferației. La modificări morfologice în celulele, caracteristice îmbătrînirii și inducției markerilor celulari ai procesului, cromozomii formează structuri inelare, neperzînd segmentele telomerice. În telomerele nemodificate dispar segmentele unicatenare, fără modificări în activitatea telomerazei.

Se confirmă că nu telomera apară cromozomul de nucleaze, de adiție și ruperi în mitoză - asta-i funcția proteinei TRF2.

Creșterea concentrației de TRF2 în cultura de fibroblaști conduce la majorarea vitezei de micșorare a telomerelor în procesul de îmbătrînire. Efectul nu duce la o îmbătrînire precoce — celulele continuă să prolifereze. Dacă numărul limită la o îmbătrînire e de

6-7 mii perechi nucleotide la celule în control, apoi la cele care expresează mai mult TRF2 această limită e de 2-2,7 mii de perechi mai mică, ce permite ca ele să se divizeze de 15 ori mai mult pînă la îmbătrînire. De altfel, sunt preîntîmpinate alipirea și ruperea cromozomilor.

Se consideră că nu lungimea telomerei e cardinală pentru inducerea îmbătrînirii celulare, ci starea lor, determinată de funcția protectoare a proteinei TRF2.

Experimental s-a demonstrat că inhibiția TRF2 nu numai că conduce la modificări fenotipice caracteristice îmbătrînirii, dar și provoacă modificări genetice: alipirea cromozomilor, activarea p53, creșterea concentrației p16, micșorarea nivelului ciclului A și hipofosforilarea pRb. Inactivarea simultană a p53 și pRb preîntîmpină îmbătrînirea celulelor experimentale, determinată de inhibiția TRF2. Proteina p53 are o afinitate majoră față de segmentul uncatenar al telomerei, către locul de fixare a t-buclei și favorizează formarea ei în prezența TRF2.

Reglatorii naturali ai proteinelor TRF umane.

Efectul TRF2 asupra telomerei e stabilit cert în condiții de experiment, dar modulatorii proteinei nu sunt încă identificați. A fost identificată proteina *hRap1*, care are influență, fiind fixată pe telomere, dar ea poate interacționa și cu alte porțiuni ale cromozomului. Proteina TRF1 ușor modifică lungimea telomerei, fiind reglată in vivo diferit.

Proteina TRF1 poate fi poli-ADP-ribozilată, cu disocierea consecutivă de la DNA. O așa modificare spațială e catalizată de *tankirază* (poli-ADP-ribozil-polimerază ankirată de telomeră). Proteina (K.F.2.4.2.30) e partener al TRF1, care pătrunde în nucleu și în forma sa neactivă e fixată de proteina telomerică. După activare, tankirază poli-ADP ribozilează pe sine, cît și pe TRF1, ce conduce la disocierea complexului nucleoprotidic și eliberarea telomerelor. Ultimele sunt disponibile pentru acțiunea telomerazelor și a altor enzime. Tankirază se consideră reglator pozitiv al telomerazei.

La om și la vertebrate sunt depistate două izoforme ale *tankirazei* *TNKS (1)* și *TNKL (2)* cu masa moleculară, respectiv, de 142 și 127 kDa. Tankirază posedă un domeniu enzimatic, alt domeniu fixat (ankorat) compus din 24 repetări și al treilea domeniu SAM; ultimele participă în interacțiuni proteo-proteice. Tankirază 1, spre deosebire de tankirază 2, posedă și un domeniu suplimentar - N-terminal domeniu, care deocamdată nu-i asociat cu nici o funcție. Nu are localizație nucleară și majoritatea enzimei se găsește în citozol, unde este supusă fosforilării și activării de MAP-kinaza. Nu e clar dacă enzima activă este transferată în nucleu sau pulul nuclear al tankirazei este activat de MAP-kinază (proteinkinază, activată de mutageni).

Ultima poate fi translocată în nucleu. MAP-kinaza este reglată de insulină și factorii de creștere și se consideră că grație tankirazei organismul menține telomerele celulelor sub controlul hormonal.

A fost depistată o altă proteină telomerică, ce interacționează cu TRF1 numită TINF2 (TRF-1-interacting nuclear factor 2) cu o masă moleculară aproximativ de 40 kDa.

Structural e asemănătoare cu proteinele TRF, avînd la capătul C-terminal un domeniu fixator de DNA de tipul Myb. Acest factor favorizează scurtarea telomerei și negativ reglează activitatea telomerazei, intermediind efectul TRF1. Mecanismul de acțiune a TRF1 constă nu numai în superspiralizarea DNA și favorizarea formării buclei t. Grație interacțiunii cu diferite și multiple proteine TRF1, le poate concentra în apropierea telomerelor. Ea poate

fixa proteina PinXI-inhibitor, puternic al telomerazei, care acționează direct asupra enzimei, spre deosebire de alți modulatori, care vizează disponibilitatea telomerelor.

Recent, s-a depistat o alta proteină telomerică - Pot1, ce se fixează de segmentul unicatenar. Posibil, funcția proteinei respective constă în protejarea acestui fragment de efectul nucleazelor, agenților chimici, radiației. Pot 1 (Protection Of Telomeres) — un polipeptid de 71 kDa, interacționează cu TRF1. Acționând asupra procesului de fixare a Pot1, proteina TRF1, concentrația căreia este proporțională cu lungimea telomerei, transmite la capetele unicatenare informația despre mărimea totală a DNA telomerice. Toate proteinele cunoscute și necunoscute ale complexului nucleoprotidic formează *telozoma*.

E de constatat că numai unele proteine telomerice au omologie la alte eucariote. În organismele model nu au fost depistate toate proteinele cunoscute în genomul uman. Evoluția a parcurs altă cale, dar studiind, se poate obține informație utilizantă.

Telomera și sistemul reparativ

Radiația ionizantă și alți factori nocivi provoacă rupturi în DNA bicatenar - DSB (Double Strand Break). De altfel, transformările în DSB sunt considerate ca metodă de reinițiere a furcilor replicative lezate, ce preîntâmpină dublarea normală a cromozomilor în faza S. Deosebim 2 căi concurente de reparație a DSB: 1) împerecherea cromozomilor omologi, recombinarea și resinteza catenelor scurte; 2) legarea neomologică a capetelor DNA (NHEJ - Non-Homologous End Joining). Se consideră că prima cale predomină în fazele S și G₂ ale ciclului celular și la celulele ce se înmulțesc activ (drojdiile), a doua — în fazele G₀, și G₁ și la celulele ce se divizează rar (fig.2.23).

Capetele telomerei, dacă nu sunt protejate de t-bucă, sunt identice cu DSB și trebuie să fie reparate fie prin formarea cromozomilor inelari sau a cromozomilor cu două sau mai multe centromere, după mecanismul NHEJ. Ultima se observă în celulele cu telomere scurte la limită. Indiferent de mecanismele reparative atât DSB, cât și telomerele neprotejate activează proteinkinaza ATM, ce succede în activarea

p53 și la blocarea proliferației, inducției mecanismelor celulare ale îmbătrânirii și apoptoza. Când însă se formează bucla-t, segmentul unicatenar telomeric se împerechează cu «trunchiul», imitând recombinarea și în anumite condiții stimulează reconstrucția catenei DNA.

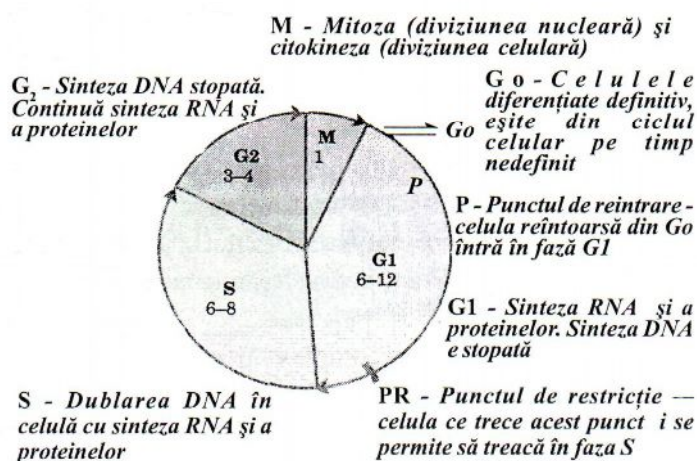


Figura 2.23. Ciclul celular la eucariote (în ore)

În componența complexului nucleoproteic la om, ca și la drojdii, e prezentă permanent proteina Ku - o componentă a căii NHEJ. E compusă din două subunități diferite cu masa moleculară de 69 și 83 kDa (Ku 70 și Ku 80). Depistat în anii 80 ca autoantigen, la care, la unii bolnavi cu maladii autoimune, se formează anticorpi utilizați în donare. Proteina leagă rupturile în DNA nu numai în zona telomerică, dar și în orice altă consecutivitate cu fisuri uni- sau bicatenare și posibil preîntâmpină degradarea acizilor nucleici. Insuficiența proteinei Ku duce la generarea unor compuși cu erori (deleția) multiple.

La mamifere, fixarea Ku pe DNA duce la formarea unei proteinkinaze-DNA dependente (DNA-PK) compusă din două subunități Ku și a treia subunitate catalitică (DNA-PK_{CS}), activată grație fixării celor două. Participarea Ku în funcționarea telomerelor se studiază intens și unele date confirmă că durata vieții și simptomele precoce ale îmbătrânirii la șorică sunt rezultatul inactivației genelor, ce codifică subunitățile Ku. Date analogice s-au înregistrat și pe cultura celulelor de om. Rolul diferit în procesele de reparație a DSB și în protejarea telomerei e explicabil, grație faptului că ambele sunt contrare după sens. Se consideră că Ku are numai funcție de protejare și evaluarea proceselor e în dependență de proteine specifice fiecărui proces: fie TRF sau sistemele de reparație și recombinare. După fixarea proteinei Ku și activării DNA-PK, în reparație participă multiple proteine. Printre ele și complexul Rad 50/Mre 11/Nbs1. Aceste proteine sunt implicate atât în recombinarea omologă cât și în menținerea integrității telomerei.

Proteina Rad 50 (Radiation mutant 50) are omologie și la om, după formă seamănă cu miozina. Are aceeași masă moleculară — 153 kDa. Polipeptidul are două domenii ce leagă DNA, aranjate la capetele N- și C-terminale, care posedă activitate enzimatică ATP-azică. Identitatea aminoacidică e de 50%. Domeniile enzimatice sunt legate cu un segment superspiralizat, aranjat sub un unghi în Z-motiv în centrul moleculei. Domeniul-Zn de legătură servește pentru dimerizarea Rad 50, ce va menține simultan moleculele de DNA, aranjate la o distanță de 1200Å.

Mre 11 (Meiotic recombination 11) este o nuclează, care-i prezintă atât în drojdii, cât și în lumea animală și om. În reparație, proteina degradează buclele și alte structuri incorecte în molecula de DNA. Complexul Rad 50/Mre 11 posedă activitate atât endo-, cât și exonucleazică în direcție 3' → 5'. Funcțiile acestei proteine nu sunt identice în reparație și în menținerea structurii telomerică.

Al treilea component al complexului n-are omologie la drojdii și la om. La om este o proteină - *nibrina* (Nbs 1 - Nijmegen breakage syndrome), mutația căreia la nivelul celular provoacă modificări asemănătoare cu mutația ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), dar cu o clinică diferită. Ambele molecule (Nbs 1 și ATM) iau parte la transmiterea semnalului în aceeași cale. Nbs 1 modulează activitatea enzimatică a Rad 50 și Mre 11 și-i transmite complexului capacitatea de a relaxa dublul helix de DNA în prezența ATP.

Informația despre mecanismele în funcționarea complexelor proteice este insuficientă, dar se poate, la moment, clasifica proteinele respective în următoarele grupe:

- a) proteinele ce mențin structura spațială a telomerei (TRF);

b) proteine ce determină și cauzează formarea heterocromatinei telomerice, modulează activitatea genelor, incluzându-le în hetero-cromatină (Rap, Rif, Sir, acetilazele histonice, metiltransferazele);

c) proteine ce realizează repararea telomerelor distruse, posibil negativ reglează mărimea lor nucleazele (Rad 50/Mre 11/Nbs 1 și Ku);

d) proteinele-semnale ce transmit informația despre starea telomerelor altor structuri (subcelulare) și inițiază îmbătrânirea celulară și apoptoza (PK ATM, p53, pRb), și altele ce reglează proliferarea și moartea celulelor.

Îmbătrânirea moleculară și dependentă de ea, regenerarea țesuturilor sunt probleme, studiul cărora continuă intens. Sunt deocamdată cunoscute două tipuri de îmbătrânire rapidă patologică, mecanismele moleculare ale cărora fiind studiate. *Sindromul Verner* sau progeria bătrânilor determinat de mutația în gena helicazei (112), ce îngreuează replicarea DNA și proliferarea celulelor. Bolnavii decedază de bătrânețe la vârsta de 35-50 ani. *Sindromul Hutchinson-Gilford* sau progeria dependentă de mutația *laminei A* (113), ce îngreuează proliferarea, ca consecința a disfuncției membranei celulare, îmbătrânirea apare pînă la 20 de ani. În ambele cazuri anomaliile genetice duc la inhibiția patologică a reînnoirii țesuturilor, care nu este consecința scurtării telomerelor. Îmbătrânirea naturală e cauzată de istovirea limitei Hayflick - mărimea telomei se apropie de limita 1-2 mii perechi nucleotide, necesare pentru formarea t-buclei. E posibil că mecanismul telomeric al îmbătrînirii e cauza schimbului natural al generațiilor la om.

Sunt depistate proteine noi telomerice (studiu bazat pe omologie cu cele cunoscute); s-au stabilit și genele ce le codifică. Spectrul funcțional al acestor proteine e foarte variat: reglează înmulțirea celulară, transcripția genelor, semnalizarea celulară, transmembranară, modificarea RNA-mesager, transportul vezicular, formarea complexelor multiproteice.

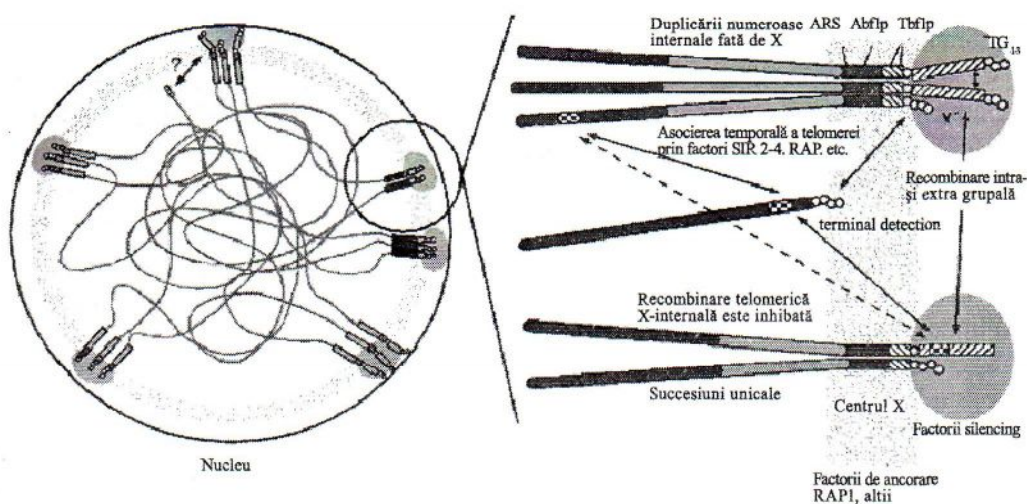


Figura 2.23a. Schema arhitecturii nucleului

Un număr limitat de organisme nu posedă activitate telomerazică și mențin lungimea telomerei prin alte mecanisme: posibil, prin recombinarea sau transpoziția unor fragmente mici – durata și viteza transpoziției sunt strict controlate de celulă. Se presupune participarea telomerei, în afară de replicarea și formarea “Chap”, la organizarea nucleului și a cromozomilor, segregarea meiotică și mitotică. Se atestă că poziția telomerelor în nucleu e perfect specializată și depinde de interacțiunea lor în membrana nucleului; au tendința de a forma claustru de partea nucleului, contrară cromocentrului (fig. 2.23a).

Telomerele interacționează (claustru), formând complexe poliproteice – direct sau indirect – printr-un component al membranei nucleare. O astfel de interacțiune, posibil și cu matricea nucleară, are atribuție la represia genelor.

Genele aranjate în vecinătate sau la capătul telomerei sunt expuse represiei transcripționale nestabile – *efect telomeric de poziție*. Ultimul e strâns legat de procesul excluderii genelor (silencers - inhibiție) – proces transcripțional ce determină tipul de conjugare.

Silencers constă în formarea unei structuri cromatinice speciale de represie, cu participarea unor proteine specifice.

Reglarea telomerazei în celulele somatice normale. La anumite etape ale dezvoltării, și unele celule specializate somatice posedă activitate telomerazică, care se reglează foarte fin și precis. Ca reglatori pot servi unii factori de creștere.

Concluzii:

a) Nu s-a depistat activitatea telomerazei în celulele somatice normale diferențiate terminal. De exemplu: fibroblaștii, fie că se găsesc în stare normală sau proliferativă. Deci, determinanta primară a activității telomerazice e originea celulei de anumit tip. Activitatea telomerazei integral e dependentă exclusiv de capacitatea celulelor la autore stabilire.

b) Al doilea factor ce influențează asupra activității telomerazice e activitatea mitotică celulară. Activitatea telomerazei se evidențiază în celulele mai primitive, bazale și proliferative.

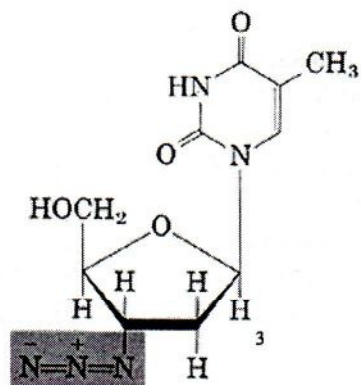
c) Activitatea telomerazei se reglează în procesul ciclului celular. Un factor decisiv în reglarea activității telomerazice ar trebui să fie nivelul expresiei genelor proteinelor ce formează centrele catalitice ale telomerazei. Reglarea fină e dependentă și de reglarea sintezei proteinelor asociate cu telomeraza și genele RNA matriceale.

Activatorii și inhibitorii telomerazei. *Reglarea sintezei DNA de diferite preparate* vezi fig.2.32.

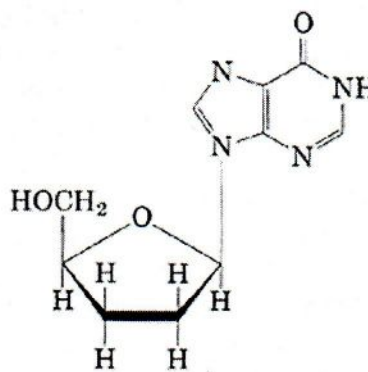
După ce a fost determinată legătura între activitatea telomerazică și oncogeneză, senilitate, se explorează două direcții:

- a) crearea DNA antisens față de telo-RNA și
- b) studierea inhibitorilor revers transcriptazelor.

Ca inhibitori servesc oligonucleotidele modificate, complementare regiunii-matrice a RNA-telo. Ele sunt rezistente la acțiunea proteinelor și a nucleazelor. Atare nucleotide se fixează în mod specific de matricea RNA-telo a omului, efectiv inhibând activitatea telomerazică *in vitro*. In vivo apare problema transportului inhibitorilor prin membrana celulară și mișcarea dirijată în nucleul celular.



3'-Azido-2',3'- dideoximidina (AZT)



2',3'- didoxiinozina (DDI)

Ca înhibitori au fost testați și inhibitorii revers transcriptazelor — *azidotimidina* (AZT), *dideoxiguanozina* (DDG), *2',3'-dideoxiinozina* (DDI). Efect semnificativ asupra celulelor imortalizate de om nu s-a înregistrat. După micșorarea inițială a lungimii telomerei, dimensiunea se stabilizează și efect asupra proliferației, morfologiei celulare nu se mai atestă. Studiul, eventual, va continua.