

TRANSCRIEREA (BIOSINTEZA RNA)

Spre deosebire de replicare, care antrenează simultan întregul cromozom, transcrierea vizează numai anumite porțiuni de DNA, și anume acelea care codifică proteinele necesare celulei la momentul dat. Structura RNA este concludentă, dictată de structura matricei. *In vivo*, transcrierea este asimetrică, adică într-o anumită regiune se copiază o singură catenă de DNA, desemnată drept catenă sens, spre deosebire de cea netranscrisă — catenă antisens.

În 1961, Sol Spiegelman elaborează metoda *hibridizării*, ce constă în încălzirea dublului helix DNA; depășind temperatura de topire, el trece într-o formă unicatenară. La răcirea lentă a soluției, catenele reasociază și formează dublul helix cu o structură nativă. Dublul helix se formează numai în cazul în care catenele de DNA provin din organismele unei specii sau ale speciei înrudite. Dacă secvența bazelor din mRNA e complementară, apoi în combinarea catenelor de DNA și RNA trebuie să formeze fragmente hibrid DNA-RNA (fig. 2.24).

Experimentele au demonstrat că succesiunea bazelor azotate în mRNA sunt complementare succesiunii DNA matrice. În 1960 a fost descoperită enzima ce sintetizează RNA corespunzător succesiunii din DNA matrice.

Pentru sinteza mRNA sunt necesare:

1. Matricea DNA — de preferință dublu helix;
2. Precursori activați — cele 4 ribonucleotide — ATP, GTP, CTP, UTP;
3. Ioni de Mg^{++} sau Mn^{++} ;
4. Enzima RNAP, ca și DNAP, necesită zincul pentru funcționare;
5. Sinteza are loc în aceeași direcție $5' \rightarrow 3'$. E analog și mecanismul de elongație a lanțului nucleotidic favorizant atacului nucleofil al fosfatului intern din următorul ribonucleotidtrifosfat de grupa 3'-OH ai catenei crescînde. Forța motrice a procesului e hidroliza pirofosfatului respectiv.

Particularitățile procesului de sinteză RNA:

- a) RNAP nu necesită prezența primerului;
- b) DNA matricea se păstrează intactă;
- c) RNAP nu posedă proprietăți nucleazice.

La eucariote deosebim trei RNAP: RNAP-I ce asigură sinteza rRNA 28 și 18S; RNAP-II-mRNA și acele RNA care pot fi marcate la capete; RNAP-III asigură sinteza tRNA și 5S rRNA, precum și RNA mult mai mici. RNA-polimeraza folosește informația înscrisă în DNA matrice, acest fapt este argumentat experimental (succesiunea bazelor în mRNA e întocmai copia complementară a succesiunii lor în DNA matriceal).

RNAP este o enzimă compusă din cîteva subunități — $(\sigma, \alpha, \alpha_2, \beta, \beta')$, adică e o holoenzimă (fig.2.25). Sigma subunitatea alege segmentul de inițiere. Enzima fără sigma

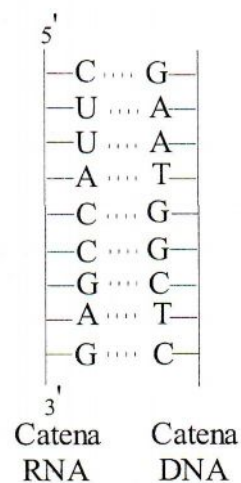


Figura 2.24. Secvențele complementare formează hibridul RNA-DNA

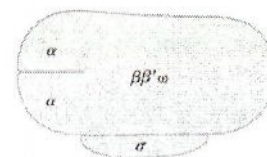


Figura 2.25. Structura RNA polimerazei la *E.coli*

poartă denumirea de «core» ferment (ferment minim): α subunitățile sunt centrele catalitice, β' — se leagă de DNA, iar β subunitatea fixează substratul — ribonucleotidtrifosfații. Sinteza decurge în mod similar, implicând următoarele etape:

I. Inițierea sintezei — începe în anumite fragmente de DNA, cu o secvență specifică ce poartă denumirea de promotor. În promotor participă aproximativ 40 de nucleotide și deosebim două locusuri — unul de recunoaștere, depistat cu ajutorul subunității sigma, și o altă secvență — locusul de legare laxă a RNA-polimerazei. Sigma amplifică afinitatea enzimei pentru acest locus de 10^4 ori în raport cu alte locusuri de pe DNA.

1. O importanță deosebită i se atribuie locusului de recunoaștere (7 nucleotide) situat la o distanță de 25 nucleotide de locusul de legare și circa 10 nucleotide de punctul de inițiere (+1). Punctul de start al transcrierii va dicta capătul 5' al transcriptului primar RNA. Promotorii sunt situați în amonte și notați cu minus (convențional). Secvențele în aval față de punctul de start sunt notate cu plus. Se consideră că *secvența Pribnow* la procariote sau *Hogness* la eucariote e responsabilă de exactitatea inițierii (fig. 2.26).

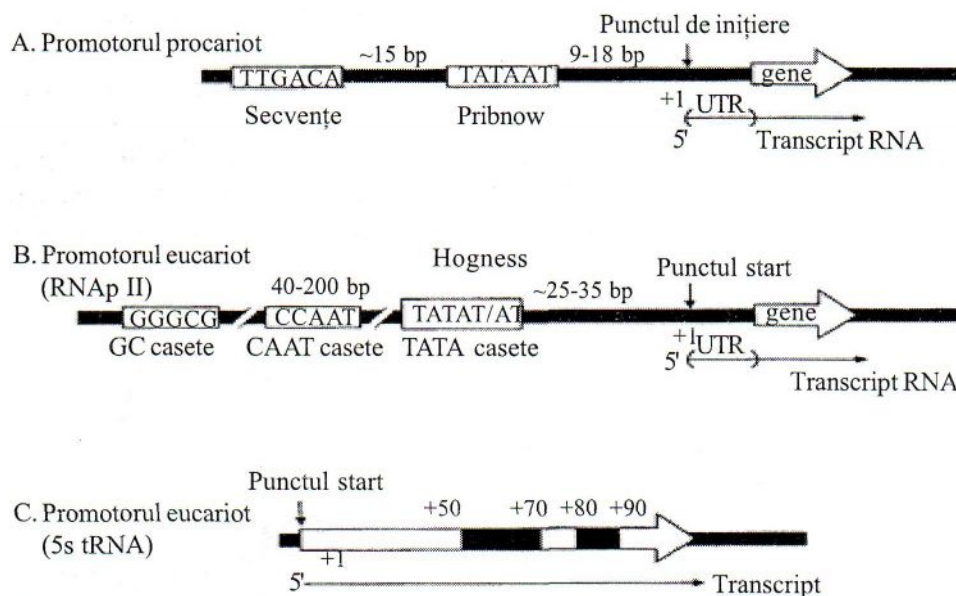


Figura 2.26. Secvențele tipice în promotor la pro- și eucariote

2. Sigma activează identificarea secvențelor de RNA-polimerază.

3. De asemenea ia parte la desfacerea dublului helix al DNA pentru ca aceasta să servească drept matrice și conlucrează la formarea primei legături fosfodiesterice în noua catenă a RNA.

Complexul de inițiere e format, sigma-subunitate e disociată de la holoferment și corfermentul continuă procesul de elongare. Sigma se atașează la alt corferment și ia parte la inițierea unui alt ciclu de transcriere (fig. 2.27).

II. Elongarea decurge după același mecanism descris mai sus. O moleculă de RNAP sintetizează tot transcriptul — fenomenul e procesiv și activează cu o viteză de 50 nucleotide pe secundă (fig. 2.28). RNAP nu controlează catena sintetizată, reducându-

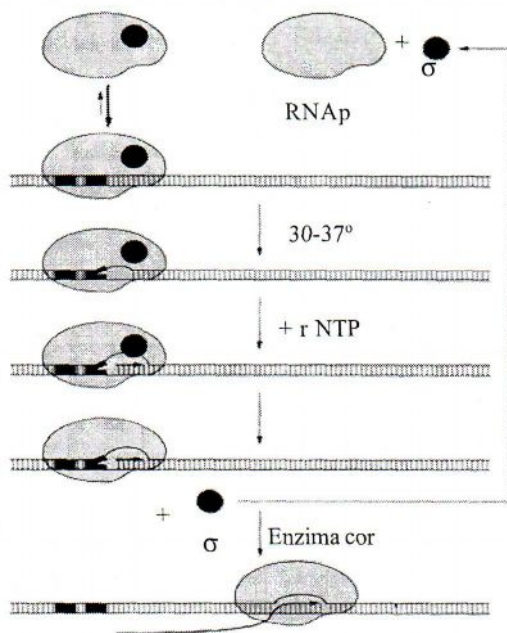


Figura 2.27. Inițierea transcrierii și formarea complexului de inițiere. Reciclarea factorului sigma

se precizia. Se comite o greșeală la 10^{4-5} nucleotide sau de 10^5 mai multe decât în DNA.

III. Finalizarea transcrierii: se reglează foarte fin, la nivelul unor secvențe nucleotidice specifice de pe catena DNA ce conțin un număr mare de G, C, T, recunoscute de RNAP. Un rol important îl joacă proteina ρ (rho), care se asociază cu enzima și se mișcă cu ea. La identificarea semnalelor de terminare coboară de pe matrice, încetînd acțiunea enzimei și producînd transcriptul cu folosirea energiei ATP. Transcriptul obținut e autocomplementar și poate forma perechi de baze, ceea ce generează structuri simetrice, favorizînd expulzarea lui din proces (fig. 2.29).

Dacă catena se extinde în direcția $5' \rightarrow 3'$, este evident că enzima RNA-polimeraza se mișcă pe DNA în direcția $3' \rightarrow 5'$ (antiparalel).

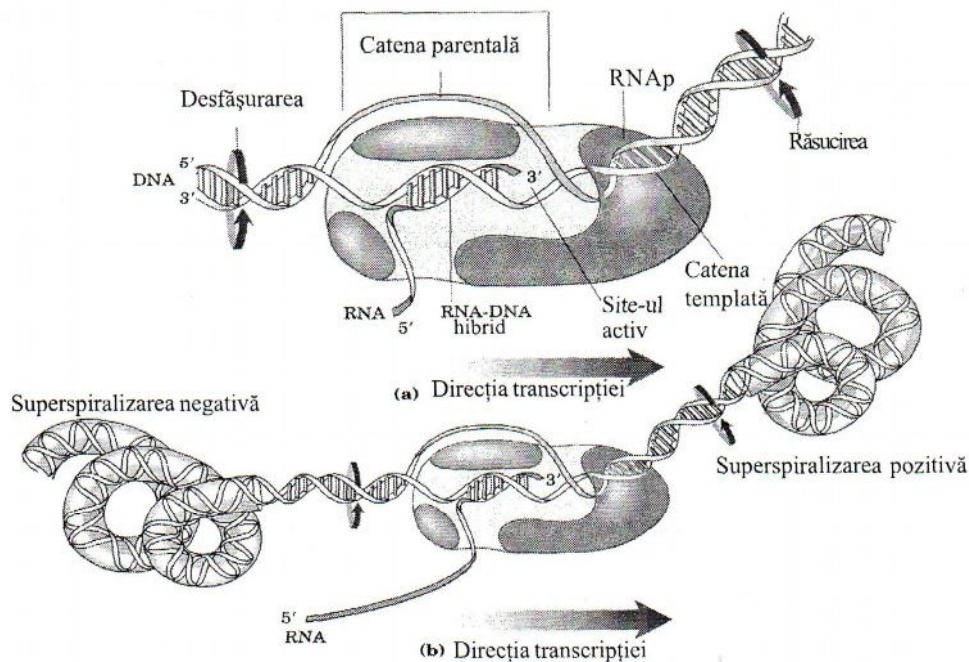


Figura 2.28. Transcripția la *E.coli*. a) RNAP și procesele ce sunt cauzate de activitatea ei, b) direcția elongării

După procesul de transcriere continuă formarea moleculelor funcțional active de RNA — așa-numitul *procesing*, care constă în următoarele:

1. «Cap»-area. La capătul 5' este adăugată guanozina metilată. În proces sunt utilizate ca substrat GTP, iar donator de grupe CH_3 este adenzilmetionina. Sunt implicate enzimele: fosfohidrolaza, guanil transferaza și metil transferazele.

2. Poliadenilarea. La 3' — o secvență mare de A (100-200). Acest fenomen are loc pînă la terminarea sintezei întregii molecule (e catalizat de poli-A-polimerază). Astfel de «coadă» e necesară pentru exportul moleculelor de RNA din nucleu.

3. Se modifică bazele și resturile glucidice — 2'-OH este metilată (1:100) de S⁺-adenzilmetionină, la procariote — 6-dimetil-adenina; se atestă în tRNA, de altfel și pseudouridilatul, ribotimidilatul.

4. Modificarea intensivă pe care o suferă transcriptul primar constă în scurtarea lui.

S-a constatat că mRNA nuclear este mult mai lung decât același mRNA ajuns în citoplasmă. S-a ajuns la concluzia că RNAp realizează o reproducere primară identică cu întreaga genă, apoi intronii sunt excizați și exonii se leagă între ei, formînd mRNA matur, traductibil (fig.2.30).

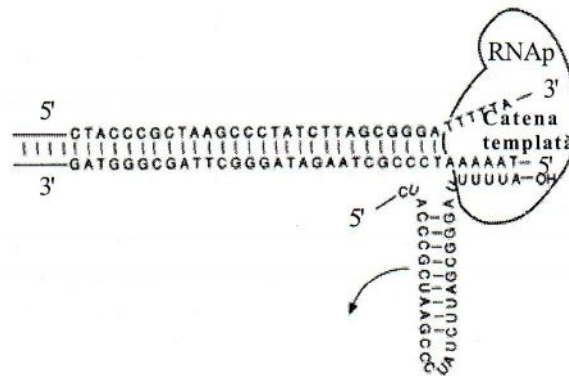


Figura 2.29. Terminarea independentă de Rho

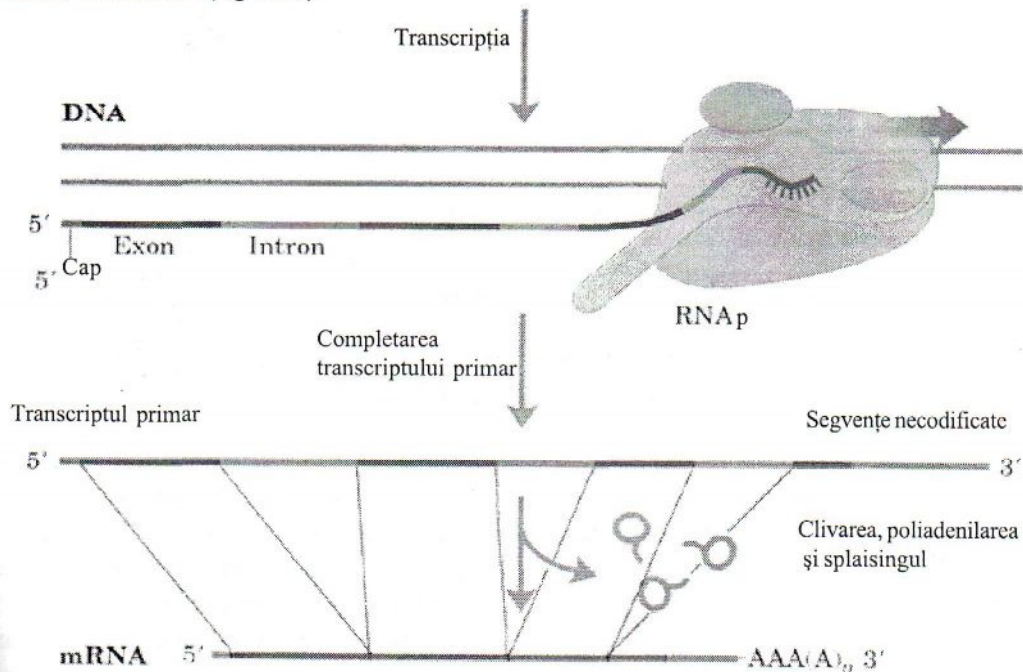


Figura 2.30. Formarea transcriptului primar și maturizarea RNAm la eucariote

Secvențele intronilor au dimensiuni de 10-100 ori mai mari decât exonii.

Cum se manifestă excizia intronilor? Așa-numitul *splicing* are loc în nucleul celulei.

a) unele enzime specifice identifică secvențele de baze la joncțiunea intron-exon (excizia pe introni este o excizie incorectă și conduce la generarea unui RNA inactiv ce conține un intron rezidual. În unele β -talasemii are loc descreșterea sintezei a lanțurilor β -globină);

b) în excizia intronilor un rol important îi revine unei categorii de RNA nuclear cu masă moleculară mică, desemnat RNA U (snRNAs), care are o secvență a bazelor complementară cu secvențele de la capetele fiecărui intron. Intronii sunt scoși de RNA nuclear și capetele exonilor corect juxtapuse, apoi sunt sudate într-un aparat enzimatic specializat (fig. 2.31);

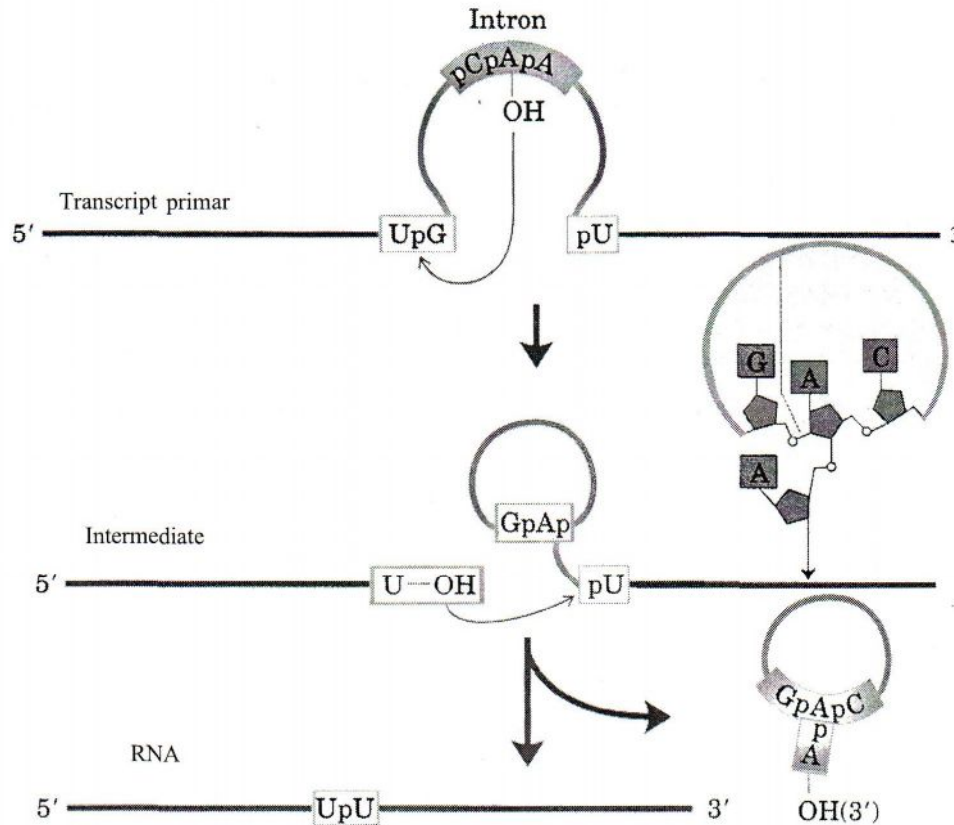


Figura 2.31. Sudarea exonilor și excizia intronilor de snRNAs

c) Thomas Cech a stabilit că pentru excizia intronilor și sudarea exonilor în eprubetă e nevoie numai de RNA, ioni Mg^{2+} și guanozină. Molecula în spațiu ocupă atare poziție, încât capetele secvenței de introni se localizează foarte aproape. Excizia și sudarea decursă în regim autocatalitic, unde singura RNA — segmentul intron — denotă comportamentul enzimei. Guanozina inițiază procesul, iar Mg^{2+} stabilizează structura de RNA - autosplicing. Astfel de RNA a fost denumit *ribozim*. Ribozimul de 10^{10} ori mai repede scindează legătura fosfodiestică decât prin hidroliză nefermentativă.

Prezența RNA cataliză e demonstrată în multe studii. S-a depistat, bunăoară, o enzimă (Escherichia coli ș.a.) RNA-aza P cu o funcție specifică — la maturizarea tRNA taie din molecula precursoră un fragment la un capăt. Enzima e compusă din compartiment proteic și nucleotidic. În unele condiții, enzima este efectivă și fără componenta proteică și nu contrar, cum era de așteptat. Unele compartimente ale enzimei pot scinda nu RNA, ci polizaharide — ceva nou în enzimologie. Demult s-a observat că extragerea moleculelor mari intacte de RNA e dificilă. Și numai după descoperirea ribozimelor, s-a clarificat că RNA-aza activă este atributul constant al moleculelor de RNA.

Ribozimul scindează molecula de RNA conform combinației = CUCU =, ceea ce se poate aplica în practică pentru scindarea RNA virotică și a celei de SIDA.

Transcripția și translația au loc în diferite compartimente ale celulei. Replicarea, transcripția pot fi modulate prin intermediul diferitelor substanțe. Efectul preparatelor medicinale sunt ilustrate în figura 2.32.

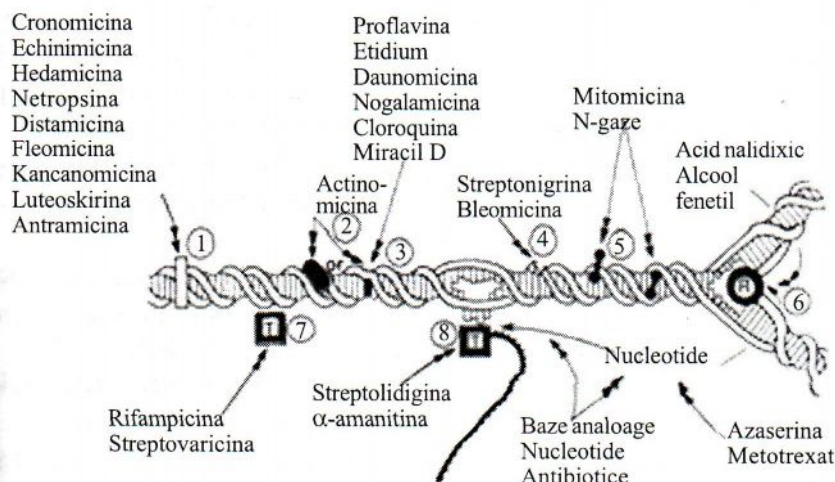


Figura 2.32. Locul acțiunii unor medicamente

1. O fixare noncovalentă cu DNA, ce împiedică replicarea.
2. Se leagă rigid în duplex, joncționând cu guanina și inhibând activitatea DNA ca matrice pentru RNA polimeraza (inhibă transcripția). Acționează similar: doxorubicina (adriamicina), cronicina A și distamicina.
3. Se fixează de DNA, fără a modifica structura helixului.
4. Medicamente ce rup punțile în DNA.
5. Preparate ce formează legături covalente între spiralele de DNA.
6. Substanțe ce fixându-se în bifurcație împiedică replicarea.
7. Inhibă sigma și beta subunități de RNAP, îngreunând inițierea procesului de transcripție.
8. Inhibă RNA-polimeraza II (α-amanitina etc.); preparatele ce conțin platină (cisplatina și carboplatina) induc formarea legăturilor transversale în DNA.

Structura subnucleozomică a cromatinei se menține în procesele de transcriere și replicare. Dret matrice servește complexul DNA histonic, dar nu DNA liber. RNA sintetizat se împachetează în complexe ribonucleoproteidice.

DNA netranscriptibil (linker) ia parte la procesul de reglare a transcrierii, servind drept promotor pentru RNAP II.

Elementele mai importante sunt blocurile TATA și CAAT situate la o distanță de 25-100 pn de la punctul de inițiere. Este descrisă prezența unor elemente reglatoare localizate în diferite regiuni ale DNA, numite *enhancers* și *silancers*.

Se presupune o modalitate anume în împachetarea RNA. După cum împachetarea DNA în cromatină e menită să determine funcționarea ei normală în celulă, procesul (insuficient studiat) condensării RNA cu proteinele nucleice e necesar pentru decurgerea perfectă a procesingului primar — RNA transcript cu transportul lor în citozol. Se știe că numai 5% din masa totală a RNA transcript părăsește nucleul celular. Semnalele specifice care servesc ca permis pentru părăsirea nucleului nu sunt identificate. E dovedit faptul că astfel de semnale apar în procesul de splicing al RNA. S-a argumentat că dacă în secvența nucleotidică nu sunt intronii, RNA transcript va rămîne în nucleu.

Particularitățile transcrierii la eucariote

Procesul de transcriere la eucariote este foarte complex, deși în principiu decurge după același mecanism ca și la procariote.

a) Dacă la procariote toate tipurile de RNA sunt sintetizate de aceeași RNA-polimerază, la eucariote intervin mai multe tipuri, fiecare transcriind seturi diferite de gene. De asemenea, dacă la procariote RNA-polimeraza era formată din 5 subunități, la eucariote acestea sunt constituite din 9-11 subunități.

În sinteza RNA la eucariote intervin patru tipuri de polimeraze: trei expuse mai sus și al patrulea tip - RNA-polimeraza mitocondrială ce sintetizează toate tipurile de RNA mitocondrial.

RNA-polimeraza II și RNA-polimeraza III sintetizează și RNA nuclear de mici dimensiuni. Fiecare tip de RNA-polimerază utilizează promotori diferiți, aceștea fiind extrem de variați pentru RNA-polimeraza II care produce sinteza mRNA.

Dacă considerăm poziția de start I (locul unde începe transcrierea genei structurale RNA-polimeraza II), există mai multe regiuni care condiționează această poziție:

- în poziția 35 se află caseta Hogness care este recunoscută de RNA-polimeraza II și prin urmare e responsabilă de acuratețea transcrierii;
- spre capătul 5, la o distanță mai mare de promotor se află caseta CAAT, care se pare că este responsabilă de frecvența cu care se transcrie gena structurală.

Elementele de control *enhancers* și *silancers* își exercită acțiunea numai în urma interacțiunii cu niște proteine specifice numite *factori de transcriere*, care induc modificări în molecula de DNA, avînd ca rezultat modificarea vitezei de transcriere a genei.

b) La eucariote transcrierea se realizează pe DNA complexat în nucleozomi, fără să fie necesară desprinderea lui.

c) Frecvența cu care se transcrie o genă este foarte diferită și depinde de necesarul de proteină codificată de gena respectivă.

Pentru majoritatea genelor transcrierea se face rar, astfel încît transcriptaza parcurge întreaga genă înainte ca o altă transcriptază să se lege. Pe alte gene însă transcrierea are loc cu frecvență mare; este vorba de genele care codifică sinteza unor proteine de care organismul are nevoie în cantitate mare. În acest caz de genă se leagă simultan mai multe transcriptaze, alcătuiind o așa-numită «*unitate de transcriere*».

d) S-au depistat mecanisme alternative ale procesingului în complexul transcripțional la eucariote (fig.2.32a).

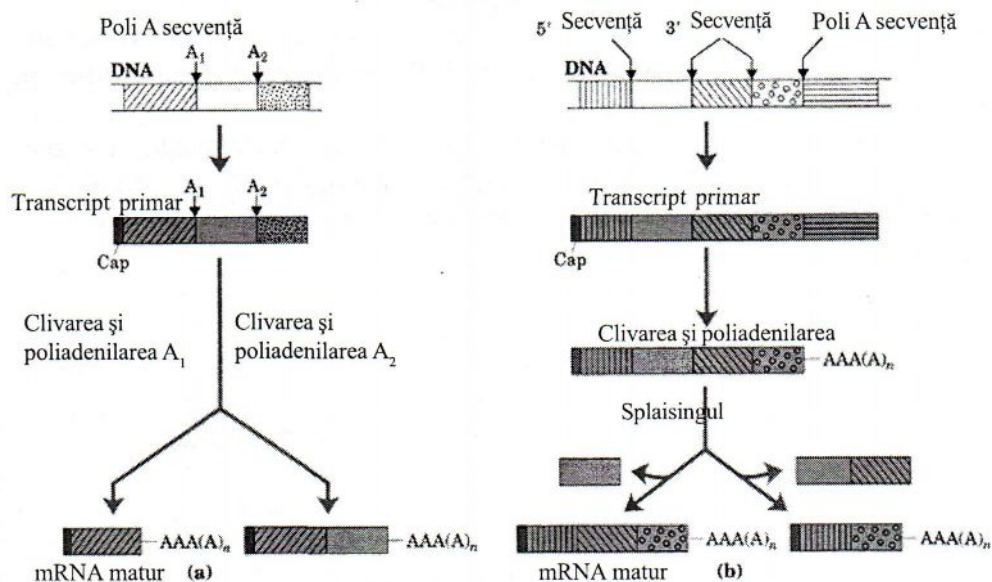


Figura 2.32a. Mecanisme alternative ale procesingului la eucariote

e) RNA nou-sintetizat este împachetat imediat sub forma unor complexe ribonucleoproteice, prin asocierea cu proteinele specifice. Aceste complexe sunt similare nucleozomului, avînd forme globulare.

f) Transcrierea DNA la eucariote, ca de altfel și la procariote, poate fi oprită; aceasta se realizează (fig.2.32):

- fie prin distorsionarea structurii DNA, astfel încît acesta nu mai poate servi ca matrice;
- fie prin inhibarea RNA-polimerazei.

Sinteza DNA pe matricea de RNA

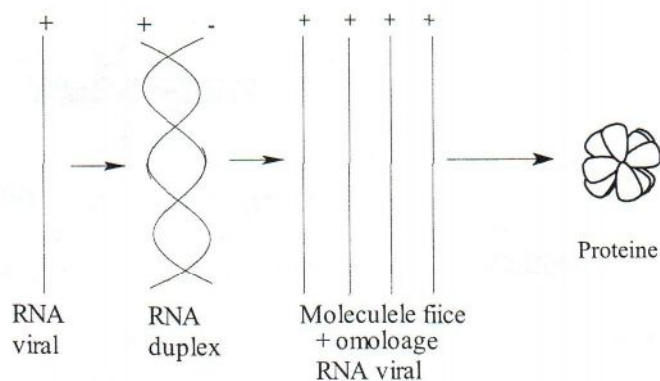
În virusii oncogeni s-a identificat o enzimă care a completat conceptul exprimat prin “dogma centrală” a geneticii moleculare, în care fluxul de informație are sensul DNA → RNA → proteina. Enzima e *revers transcriptaza* - și prezintă o DNA polimerază RNA dependentă. Ea posedă proprietatea, pătrunzînd în celula-gazdă, de a sintetiza un hibrid DNA-RNA, adică pe matricea de RNA a virusului generează o catenă de DNA. RNA viral este degradat enzimatic, iar catena DNA se autoreplică, dînd naștere la dublul helix de DNA, ce conține informația prezentă în RNA viral. DNA se inserează în genomul-gazdă, avînd capacitatea de a se exprima ca proteină. Se consideră că fiecare subiect este purtătorul unor gene oncogene neexprimate, fiind un rezultat al pătrunderii anumitor retrovirusi în organism într-un moment al evoluției. În anumite condiții nefavorabile pentru organism, poate avea loc transcrierea, traducerea și malignizarea celulei. Cu ajutorul acestei enzime se poate construi artificial pe orice matrice de RNA un DNA complementar, adică se pot obține gene sintetice care, prin tehnicile ingineriei genetice, produc mari cantități de proteină codificată.

Biosinteza RNA pe matrice de RNA

Materialul cromozomial al unor virusi RNA este replicat în celula gazdă sub acțiunea unei replicaze — *RNA polimeraza* — *RNA dependentă*.

Ca răspuns la infecția virală, ele se sintetizează în celula-gazdă, au o acțiune surprinzătoare, folosind RNA virusului ce se replică. RNA sintetizat nu e complementar, ci identic cu al virusului — RNA viral (+).

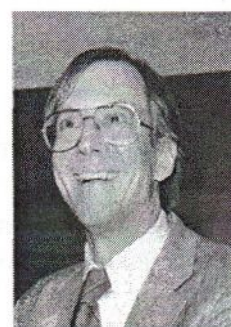
Catena RNA (-) va servi ca matrice pentru sinteza numeroaselor catene complementare (+) virale, care (RNA viral) vor funcționa ca RNA matrice pentru sinteza proteinelor virale (spre deosebire de RNA al retrovirusilor).



Francois Jacob



Laques Monod



Tomas Cech



Paul Zamecnik



George Palade

CODUL GENETIC

Noțiunea de genă s-a concretizat și am putea afirma că *gena este un fragment al DNA, transcris în molecula de mRNA ce codifică un lanț polipeptidic sau are o semnificație funcțională particulară* (tRNA etc). După descoperirea din a.1977 a intermitenței genelor, noțiunea nu s-a schimbat, însă unele fragmente ale DNA, datorită splicingului alternativ al RNA primar — transcript, pot asigura sinteza a mai mult de 2 mRNA și, în consecință, a mai mult de 2 proteine, fiecare cu funcția sa. Rămîne admisibilă ideea că o genă determină sinteza unui lanț polipeptidic.

Informația genetică referitor la biosinteza proteinelor se transmite cu ajutorul codului genetic ce reprezintă forma de exprimare a relației dintre secvența de nucleotide din DNA și succesiunea de aminoacizi din lanțul polipeptidic. Avînd 4 nucleotide și 20 de aminoacizi, este evident că un aminoacid este reprezentat de 3 nucleotide — codul este triplet și poate oferi 64 de posibilități pentru cei 20 de aminoacizi. Și toate tripletele sunt numite *codoni*. Ei (codonii) sunt identificați consecutiv de moleculele de tRNA, care îndeplinesc rolul de adaptor în sinteza proteinelor (tab.2.1).

Tabelul 2.1. Codul genetic

I (5')	II				III (3')
	U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
	UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Codon	UGA Cod.ter	A
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } term.	UGG Trp	G
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A
	AUG Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G

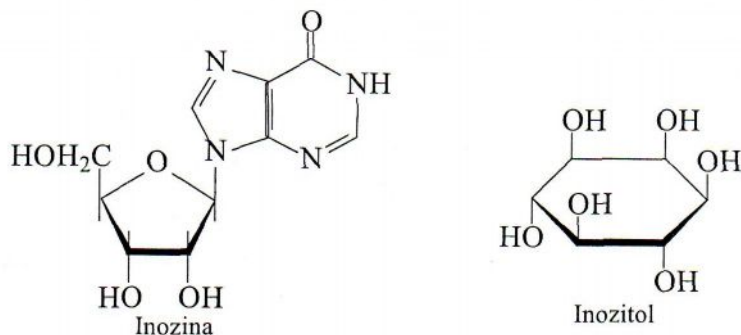
Proprietățile codului genetic

Este un *triplet* în care 61 codoni codifică aminoacizii corespunzători, 3 codifică terminația sintezei proteice.

Codul este degenerat — unui aminoacid poate să-i corespundă mai mulți codoni: Arg, Leu, Ser, fiecare fiind codificat de cîte 6 codoni, însă Met și Trp sunt specificați de către un singur codon (tab.2.1a). Codonii unui aminoacid sunt *sinonime*. Specificitatea codonului e determinată de primele două litere. Degenerarea se referă la nivelul nucleotidului 3 din codon. Primele două baze sunt constante. F.Crick a conchis că asocierea nucleotidelor 1 și 2 din codon cu nucleotidele 3 și 2 din anticodon este fixă,

respectându-se principiul complementarității, în timp ce împachetarea nucleotidelor 3 din codon și, respectiv, 1 din anticodon este laxă. Aceasta se datorează particularității nucleotidelor 1 din anticodon (5') de a se împerechea și cu alte nucleotide, în pofida regulilor lui Watson și Crick.

Foarte des nucleotidul 1 din anticodon e inozina, care oscilează (este bază șovăielnică) și e dispusă să încalce regulile (*efectul Wobble*).



Dacă toate legăturile vor fi de tip W-C, atunci orice aminoacid ar fi acceptat de un singur codon, iar deblocarea din complexul de sinteză s-ar complica, ceea ce ar micșora considerabil viteza procesului de sinteză. Anume degenerarea codonului favorizează eliberarea din complex a tRNA. Degenerarea codului minimizează efectele nocive ale mutațiilor și permite componenței nucleotidice a DNA să varieze în diapazon larg, nemodificând secvența aminoacidică în proteina codificată de acest DNA.

Codul nu are virgule sau alte semne de punctuație ce ar indica începutul și sfârșitul fiecărui codon. Citirea mesajului genetic se face neîntrerupt de la codonul start pînă la cel final.

Codul genetic este universal — toate viețuitoarele utilizează același mecanism de a asimila informația (abaterea prezintă codul genetic al mitocondriei).

Codul genetic nu este ambiguu (același triplet nu semnifică 2 aminoacizi diferiți), *nu se suprapune* (prezintă excepție la virusuri).

Codul genetic prezintă o structură liniară (este coliniar, adică există o concordanță liniară între genă și aminoacizii proteinei codificate).

De remarcat că *tripletul AUG reprezintă codonul de inițiere*, iar cei trei UAG, UAA, UGA de terminare (nonsens). Există unele deosebiri în secvența nucleotidică la DNA mitocondrial.

Tabelul 2.1a. Degenerarea codului genetic

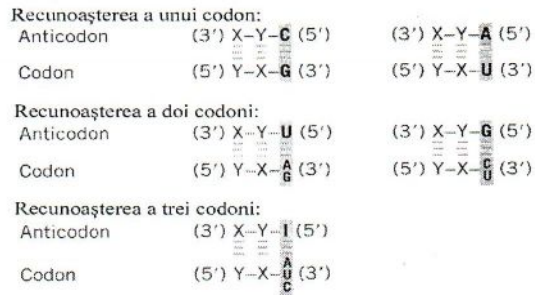
Aminoacidul	Numărul de codoni
Ala	4
Arg	6
Asn	2
Asp	2
Cys	2
Gln	2
Glu	2
Gly	4
His	2
Ile	3
Leu	6
Lys	2
Met	1
Phe	2
Pro	4
Ser	6
Thr	4
Trp	1
Tyr	2
Val	4

Studiile mai recente au confirmat că proprietățile chimice ale unor aminoacizi sunt reflectate în structura codonului: toți *codonii* cu U (în poziția 2) codifică aminoacizi hidrofobi, iar cei ce au în poziția 2 *adenina* codifică aminoacizii polari sau cu sarcină; *guanina*, respectiv, aminoacizi polari sau nepolari, iar *uracilul* în poziția 1 prezintă codonii nonsens.

Dacă în anticodon în direcția (5' → 3') prima bază nucleotidică e:

- a) citozina sau adenina, el va citi un singur codon;
- b) uracilul sau guanina, el va citi 2 codoni;
- c) inozina, respectiv, va citi 3 codoni.

S-a demonstrat că codonii sinonimi pentru aminoacid, dacă se deosebesc după cel puțin una din cele două baze (1-2), au nevoie de tRNA diferite: UUA și CUA codifică leucina, dar se atestă de tRNA diferite.



În 1977 s-a stabilit că genele au structură întreruptă — gena lanțului β al hemoglobinei (exonul) este întrerupt de secvențe netranscriptibile numite *introni*. Gena ovalbuminei are 8 exoni și 7 introni (fig. 2.33). 50 introni are gena collagenului. Lungimea intronilor variază de la câteva nucleotide pînă la zeci de mii de perechi. O proprietate a intronilor este localizarea conservativă în genele înrudite la aceeași specie sau în aceleași gene la diferite specii. Dar secvența nucleotidică e puțin conservativă. Practic, conservative sunt primele 2 și ultimele 2 baze în introni (GT ... AG) în locusuri de site ai splicingului.

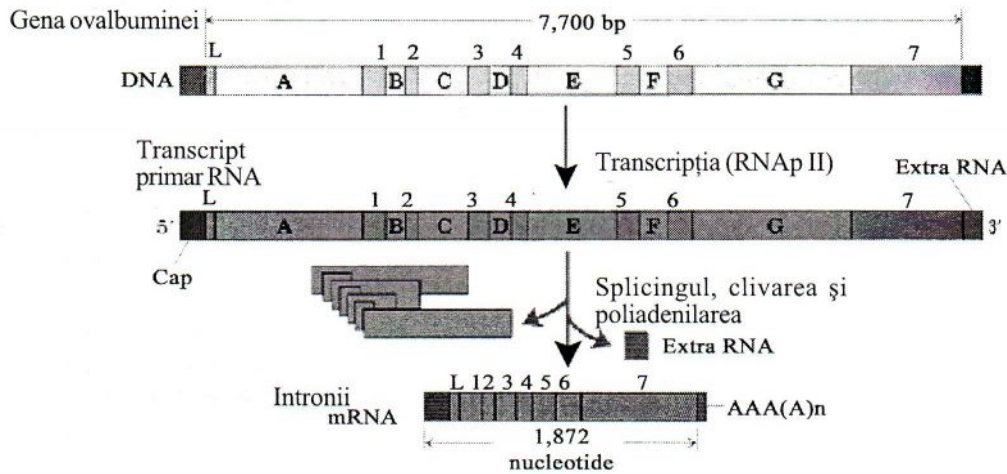


Figura 2.33. Structura genei ovalbuminei și modificările posttranscripționale ale RNA primar transcript cu formarea unei mRNA mature (zonele hașurate prezintă intronii)

O proprietate de expresie a genei este: localizarea exonilor în mRNA și în DNA în aceeași secvență. Intronii confirmă caracterul evolutiv al materiei vii formate în urma evoluției genei corespunzătoare. Fiecare exon corespunde unui domeniu, care apoi,

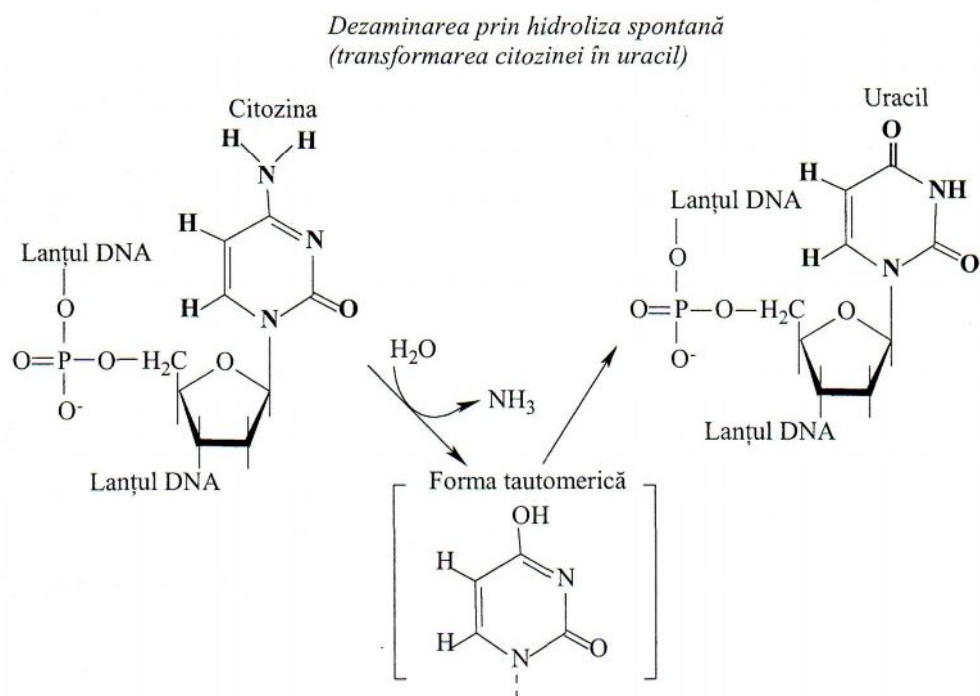
unindu-se, formează proteine cu proprietăți noi. Actualmente, e cert că fiecare domeniu este codificat de gena sa și intronii sunt o dovadă concludentă a structurii polidomenice a proteinelor.

S-a subliniat mai sus că excizia intronilor reglează torentul de RNA din nucleu în citozol și, în final, proteina ce va sintetiza celula.

MUTAȚIILE

Mecanismele de corecție și reparație ale DNA sunt eficace, dar totuși o parte din leziuni și erori din DNA rămân intacte. Apar modificări în genomul organismului care se mențin și se transmit prin ereditate. Aceste evoluări constante în *secvența de nucleotide transmise ereditar poartă numele de mutații*.

În viața reală a unui individ ele se manifestă rar cu o probabilitate egală cam cu 10^{-5} . *Mutațiile* sunt schimbări intermitente și rare care constau în modificări ale informației genetice și care devin apoi stabile în succesiunea generațiilor.



Modificărilor pot fi supuse o pereche de baze (mutații punctiforme) sau un grup de baze pe una sau pe ambele catene ale unei molecule de DNA.

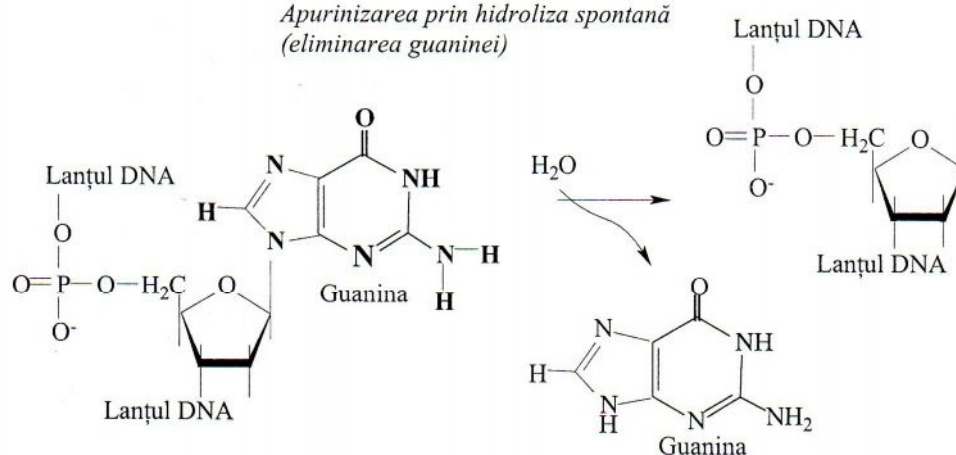
Mutațiile punctiforme decurg prin:

1. Substituție (misens mutații), în care deosebim 2 tipuri:

a) *tranziție* — o pereche de purină este înlocuită tot cu o purină sau o bază pirimidinică, înlocuită tot cu una pirimidinică.

Acidul azotos produce mutații prin tranziție, dezaminând adenina (A=T) în hipoxantină care se împerechează cu citozina (HX=C); tot acest acid modifică guanina la xantină și citozina la uracil, producând mutațiile respective.

Apurinizarea prin hidroliza spontană
(eliminarea guaninei)



Tranziție provoacă și astfel de *agenți mutogeni* ca 5-brom-uracil, 2-amino-purină, modificând legile complementarității la replicare: 5-brom-uracil, analog al timinei, dar se împerechează cu guanina și 2-amino-purina, analog al adeninei, dar se leagă cu citozina.

Watson și Crick au postulat perfect mecanismul tranziției — atomii de hidrogen din cele 4 baze își schimbă poziția — se dispun în forme tautomere care, la rîndul lor, formează perechi cu alte baze ca: iminoforma A ce se împerechează cu citozina etc.

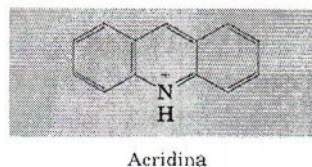
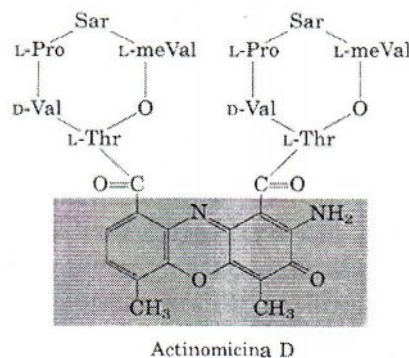
b) *transversie* — o pereche de baze purinice este substituită cu una pirimidinică sau viceversa.

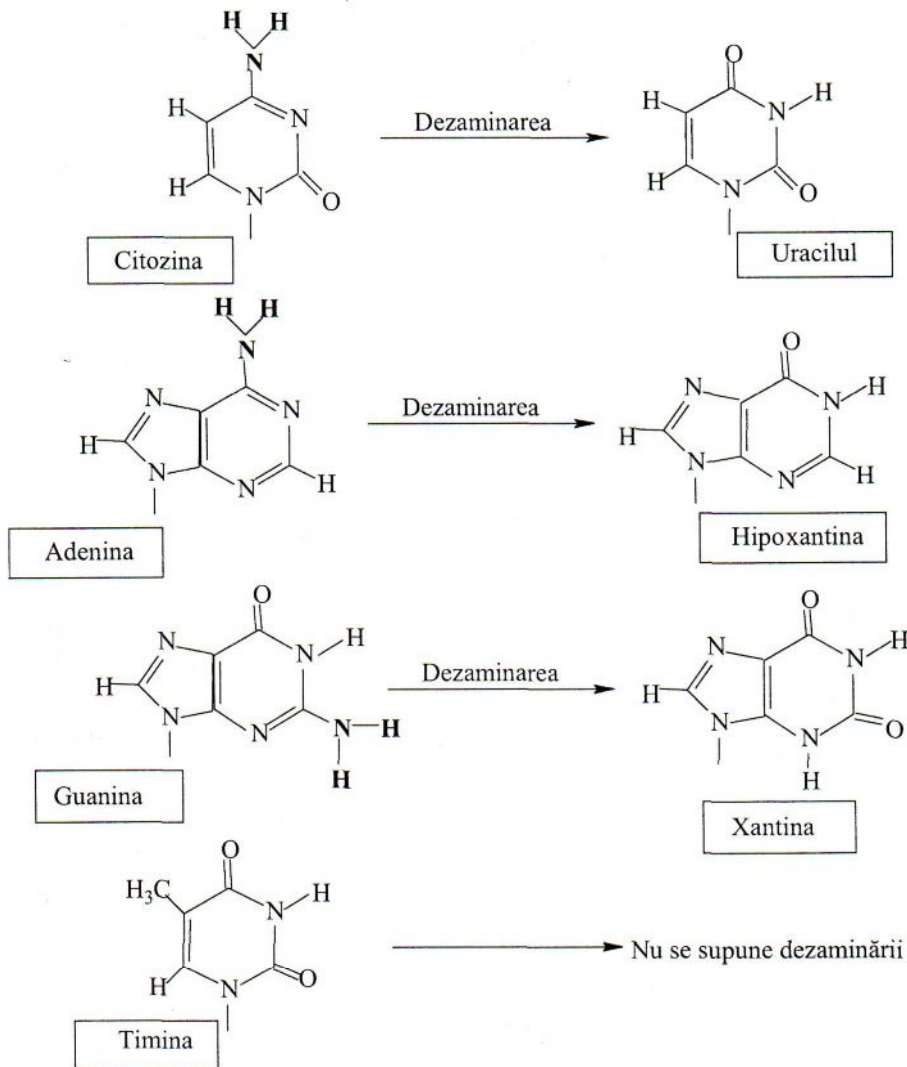
2. *Insertie*. Acest mecanism constă în introducerea unei perechi de baze suplimentare în catena de DNA. Acridina, intercalîndu-se în DNA, la replicare pe catena complementară se împerechează cu o bază suplimentară sau duce la deleția unei baze din acel lanț.

3. *Deleția* constă în excluderea unei perechi de baze: posibilă la hidroliză, modificări de pH, temperatură; unii agenți modifică o bază în așa mod, încît ea nu mai poate fi complementară, și la replicare apare “golul” în ambele catene.

4. Unele modificări în secvența nucleotidică pot forma codonul sinonim și succesiunea aminoacizilor nu se va schimba (mutații benigne).

La afectarea segmentelor mari de genă apar *mutații extinse*. Agenții mutageni pot provoca atît *mutațiile spontane*, cît și *mutațiile induse*. În dependență de consecințele modificărilor, deosebim *mutație benignă, neutră, nocivă*. O grupă deosebită prezintă *mutațiile nonsens*, unde are loc înlocuirea unui codon cu altul





nonsens, ce provoacă întreruperea lanțului polipeptidic. S-a confirmat existența unor *mutații supresoare* bazate pe funcționarea unor tipuri de tRNA, care, deși poartă anticodonul corespunzător unui triplet nonsens, sunt încărcate cu aminoacizi. Ca rezultat, lanțul polipeptidic nu se întrerupe fiind introdus un nou aminoacid. Provoacă în cadrul investigațiilor experimentale un proces mutațional, regenerăm caracterul sălbatic în locul celui mutant. Atare mutații sunt denumite *mutații inverse - reversii*.

În ultimii ani s-au elucidat mutațiile la hotarul *exon-intron*, unde se inactivează site-ul splicingului, ce nu scindează intronul de exon în locul convenit. Deseori funcția acestui site o preia alt locus din secvența nucleotidică și molecula de mRNA e rar modificată.

S-au depistat și *mutațiile punctiforme în introni* ce modifică splicingul; așa mutații au loc la unele tipuri de talasemii, unde dispar mai mult semnalele de splicing favorizând sinteza a două tipuri de mRNA normală și defectă (respectiv, 10% mRNA normală și 90% defectă).

Cum se pot depista mutagenii cancerigeni? Examinînd efectul mutagen pe bacterii, Bruce Ames a elaborat o metodă simplă și sensibilă pentru a depista mutagenii chimici. În piulița Petri se aranjează un strat subțire de agar-agar ce conține 10^9 celule de tulpină specială de Salmonelă (tulpină ce nu se dezvoltă în lipsa histidinei, fiindcă conferă mutații în gena biosintezei acestui aminoacid). Mutagenii generează multe mutații, iar o parte din ele conduc la reversii și, ca rezultat, celulele încep să sintetizeze și histidina. Acești revertanți apăruți se înmulțesc în lipsa histidinei exogene și formează colonii aparte. După incubația ce durează două zile la temperatura de 37°C , se atestă efectul mutagen al substanțelor chimice.

Studiile recente confirmă că acumularea catastrofală a erorilor în moleculele de DNA e cauza îmbătrînirii organismului. La cele amintite mai sus se adaugă și varianta cu modificarea tabloului metilării bazelor nucleice. Savanții de la Institutul de Gerontologie al Institutului Național al Cancerului SUA (1987) au stabilit că la șoarecii cu durata vieții de 42 luni numărul nucleotidelor metilate din DNA la o celulă se micșorează cu 47 mii într-o lună. La o altă specie, cu o longevitate de 96 luni, timpul de pierdere e de 23 mii pe lună — adică de 2 ori mai mic. Șoarecii pier atunci cînd scăderea metilcitozinei ajunge pînă la 2 milioane la celulă.

S-au studiat celulele omului, constatîndu-se că viteza pierderii e mai mică. Celulele bronhiilor pier lunar 1,3 mii, avînd același număr de baze metilate — 13-10 milioane. Dacă admitem că legitatea stabilită la animale e valabilă și pentru oameni, atunci ei pot trăi circa 125 de ani.

De altfel, este remarcabil că în celulele cancerigene nivelul bazelor metilate se menține permanent la nivelul standard. E posibil că ceasul metilic e veriga principală în lanțul de cauze și consecințe ce determină îmbătrînirea și moartea individului.

RECOMBINAREA GENETICĂ (INGINERIA GENETICĂ)

Unele modificări în gene și cromozomi reprezintă un fenomen normal în viața celulei - un schimb biologic adecvat între gene sau grupări de gene din diferite focare cu formarea unui cromozom metamorfozat capabil de replicare, transcriere și translare. Procesul se numește *recombinare genetică*.

Recombinarea genetică decurge în toate organismele și, firește, e posibilă numai în cadrul aceleiași specii, constituind în final criteriul de definire a speciei. Pentru eucariote e caracteristică recombinarea reciprocă, unde cantitatea de material genetic transformat este proporțională. Ea presupune segregarea și sinaptizarea regiunilor omoloage din cromozomi și schimbul reciproc de nucleotide realizat prin ruperea moleculelor de DNA, translocarea segmentelor rezultante și reunirea lor. Recombinarea e determinată de un aparat complicat enzimatic ce implică consum de energie enormă. Modificările pe care le suferă molecula de DNA reprezintă mecanismul principal al evoluției și al polimorfismului, de rînd cu selecția naturală.

Recombinarea genetică experimentală presupune includerea în genomul unui organism a unor gene ce nu figurează în patrimoniul ereditar al acestuia. Se atestă mai multe tipuri:

1. *Transformația* — DNA celulei donatoare se implică în genomul recipientului (implantarea virusului în celula sănătoasă).

2. *Lizogenie* — DNA se încadrează în cromozom, dar nu se manifestă. Un fenomen neordinar stimulează mecanismul de expresie a genei mute și în final se formează particule ce vor distruge celula-mamă (virusul herpesului).

3. *Transducția* — transferul unei părți de informație de la DNA (atașată covalent) în DNA parental celulelor-fiice și replicarea lor în continuare.

4. *Conjugația* — proces natural de unire a genelor la eucariote, cu o maximă precizie fără modificări — conjugație sexuală.

Unele gene sau grupe de gene la pro- sau eucariote pot abandona poziția inițială, ocupînd alt loc în genom. Atare elemente genetice flexibile se numesc *transpozoni*. Capacitatea de inserție se datorează unor fragmente scurte la capetele transpozonului - secvențe inserționale numite IS-elemente. Procesul e determinat de un sistem ce recunoaște secvențele și le sudează în loc nou.

Un tip neobișnuit de recombinare genetică se observă în procesul formării genelor, ce determină *sinteza anticorpilor* — imunoglobulinelor produse de limfocite, ca răspuns la pătrunderea în organism a antigenului. Fiecare antigen e capabil să jonctioneze cu imunocitele unui tip specific, provocînd creșterea, mitoză celulelor respective, formînd clona unică, adică un *aliniament* de limfocite identice, care vor elabora un tip de imunoglobuline specifice și vor fixa antigenul care a condiționat înmulțirea lor. În interacțiunea antigen-anticorp se formează complexul în care antigenul își pierde activismul.

E uimitor faptul că organismul nostru poate sintetiza milioane de anticorpi drept răspuns la orice macromoleculă. Oare e posibil așa ceva? Celulele noastre nu conțin atît DNA, încît să codifice milioane de anticorpi, nemaivorbind de activitatea individuală a organismului uman.

Răspunsul a fost căpătat, studiind structura anticorpilor și a genelor ce-i codifică (fig. 2.34, 2.35). Molecula anticorpilor e compusă din 2 catene lungi (H) cu cîte 446 aminoacizi fiecare și 2 catene scurte (L), respectiv, cu cîte 214 aminoacizi fiecare. Catenele sunt unite prin legături disulfidice; legăturile S-S sunt și intracatenare. Fiecare lanț dispune de regiuni segmentare de aminoacizi constante — C și o regiune variabilă — V; C-fragment e compus din 3 domenii H și 1 domeniu L. V-regiunile au locusuri de o variabilitate extraordinar de mare, numite hipervariabile. Fiecare lanț conține cîte

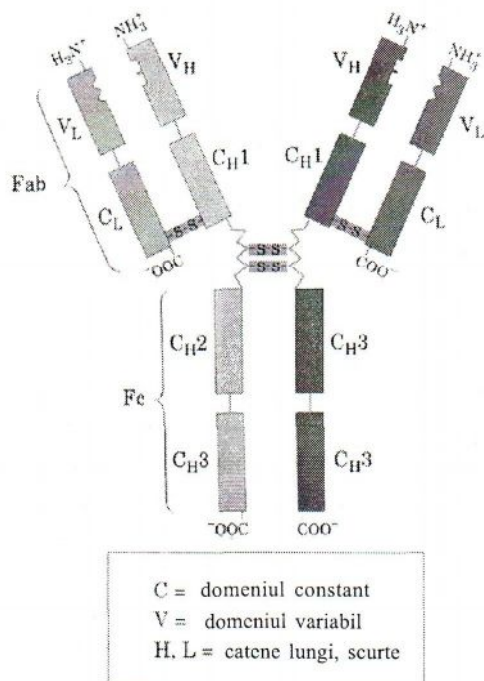


Figura 2.34. Structura IgG

trei locusuri — centre antigenofixatoare, compatibile cu antigenul. Fixarea e datorată legăturii de hidrogen, punților saline, interacțiunii hidrofobe, legăturii Van der Waals.

Localizarea în anticorpi a regiunilor C și V ne permite să concluzionăm că DNA

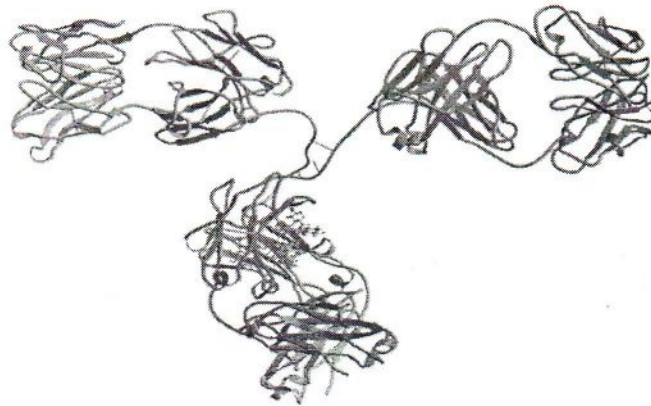
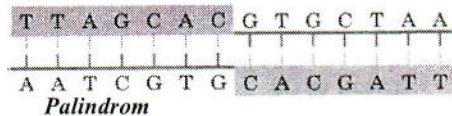


Figura 2.35. Structura dimerică conformațională a moleculei de imunoglobulină

ce le codifică e rezultatul sudării a două gene pentru C și V - fragmente. S-a adevărit experimental această ipoteză. Ulterior, s-a stabilit că DNA ce codifică fragmentele variabile atât în H, cât și în L-catene sunt compuse din gene de diferite tipuri care-și schimbă poziția și pot forma diverse îmbinări. În DNA - V - fragmentele au aproximativ 400 V gene, 12 D (Diversity), 4 J (de legătură) gene. Combinarea acestor gene face posibilă mai mult de 20000 de variante, care, la rândul lor, se modifică în secvența nucleotidică la adăugarea cu fragmentele de DNA ce codifică regiunea C. În consecință, pot fi formate milioane de gene diferite cu circa 10^{10} centre antigenofixatoare responsabile de sinteza anticorpilor.

Combinății noi de gene — o *recombinație artificială* — pot fi create și în eprubetă. Un rol decisiv l-au jucat elaborările *enzimelor de restricție* — endonucleaze ce recunosc în molecula de DNA o secvență anumită de baze. Enzimele clivează legătura fosfodiestică de pe ambele catene într-un loc special al secvenței recunoscute — secvențele cunoscute sunt *palindroame*. Evident, capetele rezultante pot fi necoezive sau coezive (conțin nucleotide complementare).

Un alt ferment este *terminal-transferaza* —, o enzimă care posedă capacitatea de a adăuga la capetele 3'-OH ale celor două molecule ce trebuie sudate cozi homopolimerice complementare (poli G, poli C) (fig.2.36).



Enzima *revers — transcriptaza* — permite sinteza unui DNA recombinat pe mRNA, adăugând poli T și dezoxiribonucleotidele respective, apoi se înlătură mRNA și cu ajutorul DNAp I reconstruim catena complementară.

Genele recombinate se includ într-un vector potrivit (o moleculă de DNA), care se introduce într-o celulă, unde se produce replicarea și exprimarea genotipică. Ca vector se folosesc *plasmidele* (DNA bicatenar din citozolul majorității bacteriilor). Ele se deplasează ușor de la o celulă la alta. Aceste molecule mici trec prin membrana celulei-gazdă și pot asimila cu ușurință gene străine (2.36.a). Ele se replică autonom și rapid, fapt ce permite amplificarea genei incluse. Selecționarea lor prin screening ne permite să identificăm genele respective (fig. 2.36).

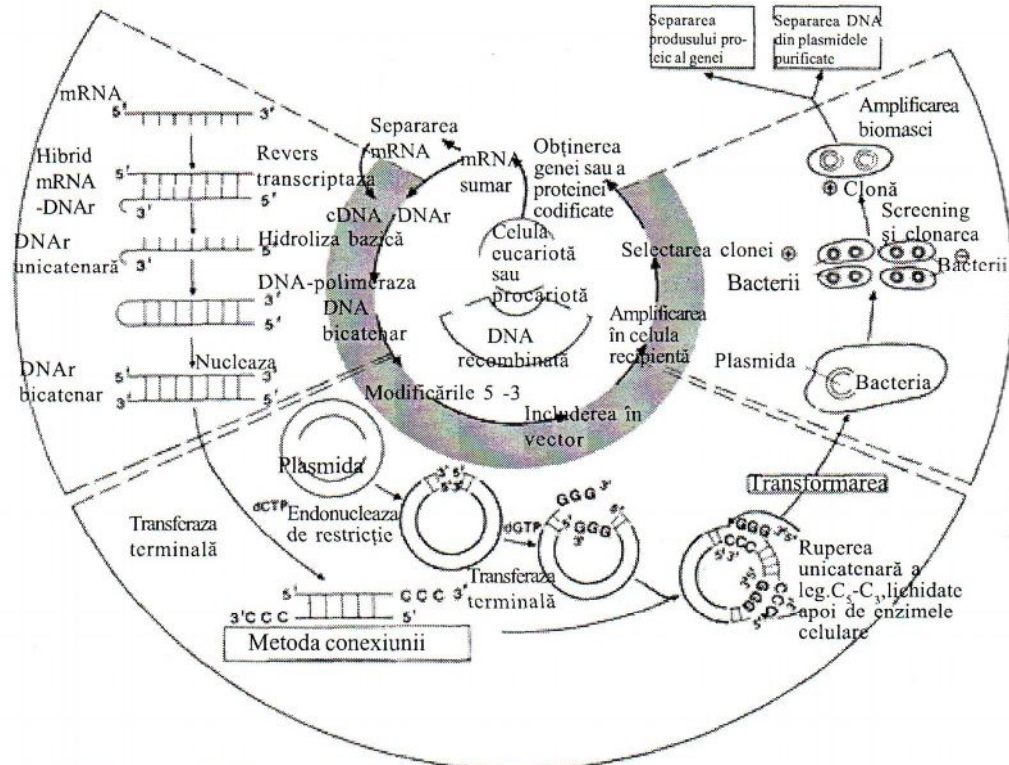


Figura 2.36. Ingineria genetică: clonarea genelor

Clonarea genelor a rezolvat problema insulinei, interferonului și a multor alte substanțe biologice active ca hormonul somatotrop etc.

Interferonul reprezintă o glicoproteină cu 160 aminoacizi; fiecare specie produce, în urma infecției virotice, cel puțin 3 tipuri de interferon în: 1) leucocite; 2) T-limfocite; 3) fibroblaștii țesutului conjunctiv.

Fixându-se de membrană, interferonul stimulează sinteza enzimelor specifice, care-s capabile să lezeze RNA - virale și să inactiveze factorii de inițiere a sintezei proteice în ribozomi. În 1980, în SUA a fost identificată și separată gena interferonului leucocitar al omului, inclusă apoi în *E. coli* pentru a o sintetiza în cantități substanțiale.

Se preconizează ca celulele modificate prin metoda ingineriei genetice să fie inoculate și în organismul uman. Se procedează la încorporarea genelor funcționale în locul celor defectate sau pierdute de organismul

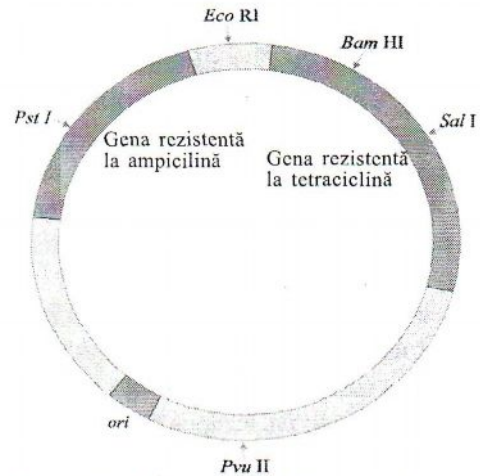


Figura 2.36a. Plasmida pBR322: conține 2 gene cu rezistență programată la tetraciclină (*tet*) și ampicilină (*bla*)

uman, ca metodă de tratament - *genoterapia*.

Adaosul de material genetic este eficient cînd defectul constă în insuficiența sau lipsa completă a unei proteine. Nu se consideră rațional cînd mutația conduce la surplus de proteine sau sinteza unor substanțe nocive precum are loc la anemia falciformă. Corecția unor atare tulburări necesită nu numai încadrarea unei gene funcționale, dar și a unei gene capabile să inactiveze gena mutantă. Savanții studiază posibilitățile inoculării genei funcționale în celulele separate ale pacientului, reincluse apoi în organism. Sperăm că în viitorul apropiat va deveni posibilă tratarea bolnavilor prin

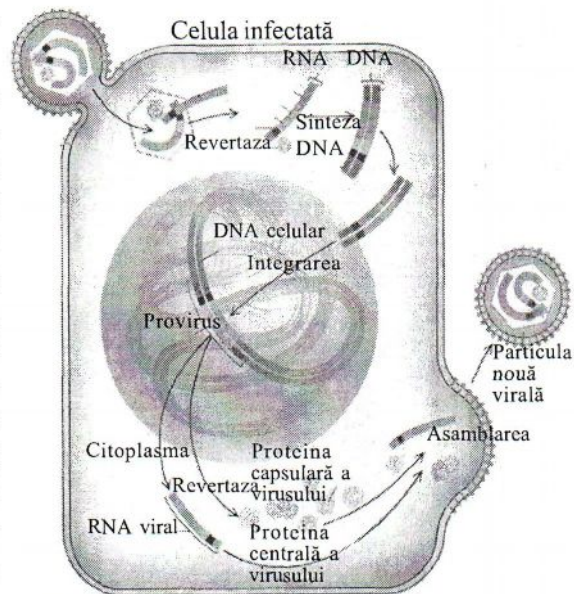


Figura 2.37. Ciclul vital al retrovirusurilor

metoda integrării genelor legate cu substanțe, ceea ce ar permite o fixare directă a genei în celulele-țintă. Azi integrarea în genom a genei dorite e nesemnificativă — o celulă la 10^{3-6} . Se constată că integrarea în genom nu e întotdeauna necesară la expresia genei, doar e limpede că gena integrată se va păstra mult mai mult în celulă. Apoi ea e aptă de a se replica cu DNA cromozomial, se va transmite la alte generații de celule și va determina sinteza produsului în decursul vieții pacientului.

Pentru încorporarea genei se utilizează capacitatea naturală a virusurilor de a pătrunde în celule și de a-și aduce materialul genetic propriu. Cel mai promițător sistem de transfer al genelor în celule o prezintă *retrovirusii*, ei sunt vectorii cardinali, dar tot ei sunt capabili să se includă în DNA cromozomial al celulelor apte de reproducere activă. Un minus extrem de mare comportă pericolul provocării cancerului și, deci, apare o sarcină importantă — posibilitatea de a stopa reproducerea acestor virusi. În figura 2.37 e redat ciclul vital al retrovirusurilor.

S-a elaborat o metodă efectivă de recepționare a retrovirusurilor, care posedă atât o membrană externă normală, cât și toate proteinele virale. Însă RNA viral nu conține informație de sinteză a acestor proteine și locusurile secvenței nucleotidelor corespunzătoare sunt ocupate de gena ce are a fi introdusă în celulă (fig. 2.38).

Dacă bolnavului i se integrează celule proprii ale sistemului imun preventiv, cultivate și prelucrate cu *interleukina-2*, se produce pătrunderea limfocitelor în tumoare, se înregistrează regresia celulelor cancerigene. Din 15 bolnavi tratați (după Rozenberg), la 9 (melanomă în stare gravă) s-a stabilit regresie vădită, la unul - completă.

În apropierea de Edinburg există o stîină cu oi transgenice (100), laptele cărora conține o cantitate suficientă de proteine ce favorizează coagularea sîngelui. Laptele acestor oi e suficient pentru toți bolnavii de hemofilie din Europa.

La Institutul de Fiziologie din Cambridge se experimentează niște purceluși neobiș-

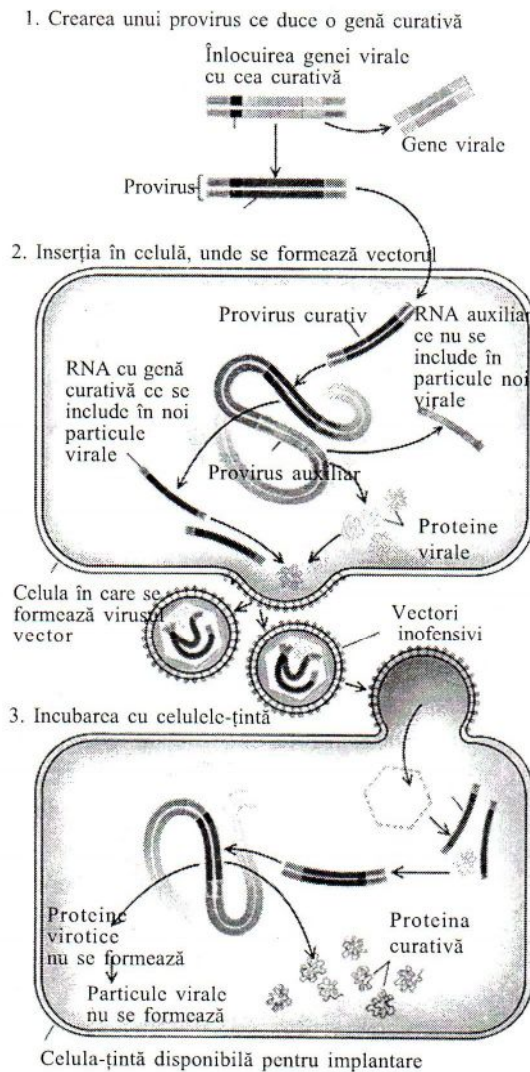


Figura 2.38. Vectorii retrovirusilor inofensivi se formează în celule

organismul omului și al animalelor. Savații examinau proteina Co (III) și mRNA respectivă. RNA s-a descoperit, dar gena — nu. Însă copie fără original nu există. După analogie cu organismele înrudite, au stabilit DNA care potențial ar trebui să conțină gena și au comparat-o cu RNA inițial. S-a dovedit complementară după toate bazele, cu excepția U. Gena exista, dar RNA era modificată cam de 60%. S-a constatat că asemenea modificări nu sunt un original, fiindcă se înregistrează și copii precise.

Care este, totuși, cauza? Se consideră că în celulă are loc o transferare efectivă a informației de pe DNA, ulterior, un redactor face unele corecturi în textul mRNA, direcționat specific. Evident că în gene, copiile cărora se corectează inițial, lipsește semnalul de asamblare a proteinei. Rezultatul redactării e apariția lui în mRNA,

nuiți. Lor li s-au introdus gene ce codifică hormonul somatotrop al animalelor mari cunoscute folosit în tratamentul diverselor patologii ale omului.

În baza investigațiilor efectuate, americani au obținut porci ce cresc foarte repede, iar carnea lor n-are slănină. Aceste animale sunt slab rezistente la temperaturi joase. S-au căpătat cartofi foarte rezistenți la frig etc.

În perspectivă se va modifica și stomatologia: se concep dinți naturali în caz dacă gena omului va fi introdusă în genomul bacteriilor care vor sintetiza dinții respectivi.

Deocamdată transferarea mai multor gene e imposibilă, deoarece organismul nu recepționează mai mult decât o singură genă. Savații modifică forma și dimensiunile multor animale. Se poate schimba și omul. Lui i se pot conferi proprietăți noi, pozitive, dar și dimpotrivă — negative. E un domeniu interzis de experimentări. Azi nu sunt cunoscute genele ce determină capacitățile mintale, dar unele informații referitoare la omul bolnav sunt elucidate. Includerea genelor ar modifica vădit armonia organismului uman.

La Institutul de Studii Biomedicale de pe lângă Universitatea Washington, din 1991 se studiază tripanosoma, un microorganism ce parazitează în

astfel proteina poate fi sintetizată. Redactorul știe ce face. Același lucru s-a stabilit și la speciile superioare. Funcția respectivă o îndeplinește *RNA de corecție*, care nu numai că determină locul inciziei nucleotidelor, dar și prezintă materialul respectiv. Enzimele favorizează acest proces datorită prezenței unei gene informative (1991). Principiul transmiterii mesajului genetic se complică întrucîtva (fig. 2.39).

Metoda ingineriei genetice e utilizată pentru crearea vaccinului contra SIDA, maladie provocată de o familie de viruși ce conțin RNA. Virușii posedă revers transcriptaze și sunt foarte instabili. Sistemul imun reacționează la proteinele superficiale ale virusului care se modifică permanent, modificări legate de deriva genei. Pentru crearea vaccinului e folosit virusul variolei — ca vector —, incluzîndu-se gena SIDA.

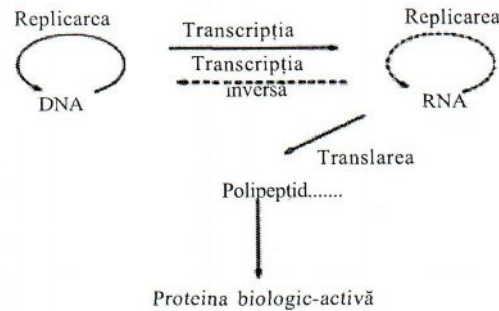


Figura 2.39. Dogma de transmitere a informației genetice

Moss a obținut o atare vaccină. La maimuțe apar anticorpi, dar rămîn neprotejate de SIDA. Efectul imun e de față, însă nu și de protejare. Capacitatea de apărare este determinată de alte caracteristici ale antigenului. D.Zaguri a creat o vaccină pentru o altă variantă a SIDA, dar cu același impact. Pentru diagnosticul SIDA e utilizată metoda de amplificare enzimatică a genei SIDA. Se confirmă prezența virusului după o oră de infectare, dacă din 5000 de celule e afectată măcar una. După 12 ore de la contaminare, diagnosticul se confirmă la afectarea unei celule din 500.000. La tratamentul efectiv al SIDA contribuie *azidotimidina* și *2'-3'-dezoxicitidina* — nucleozide ce inhibă revertaza virusului.

S-au sintetizat și alte preparate asemănătoare după structură cu tranchilizanții, ce sunt inhibitori activi ai revertazei la HIV- I și nu la HIV-II (virusul african).

În omida fluturelui *Hyalophora cecropina* s-a descoperit o substanță peptidică — cecropina B, ce lezează bacteriile și infectează omida. Biochimistii de la Universitatea din Louisiana (1990) au sintetizat un șir de peptide cu o structură identică, deosebindu-se după câțiva aminoacizi. Una din aceste peptide are o forță distrugătoare fantastică și a fost numită Siva -1 (după numele divinității indiene, ce nu-și cruța niciodată dușmanii).

Peptidele contribuie la formarea porilor intracelulari și, în consecință, apa pătrunde în celulă, distrugînd-o. Siva-1 acționează și asupra membranelor celulelor mamiferelor, dar celulele nu mor, fapt determinat de prezența citoscheletului ce păstrează forma celulei. În celulele cancerigene și în cele afectate de virusul SIDA citoscheletul e lezat. Secvența aminoacizilor din aceste peptide e identică cu fragmentele — semnale din fibrinogenul omului — proteină cauzată de stres, răni. S-a stabilit că aceste fragmente sunt mai efective decît Siva-1, la distrugerea celulelor cancerigene. Așadar, organismul uman în stare de stres elimină activ substanțe anticancerigene, antistresante și, deci, este concludent că rezervele proprii ale organismului sunt deosebit de efective în lupta cu factorii nocivi, rezerve care necesită o studiere amplă și profundă.