

Alexandra Simon-Gruia

Traian Șaitan

BIOLOGIE

manual pentru clasa a XII-a
Filiera teoretică

GENETICA 1

GENETICĂ MOLECULARĂ

- ☐ 1. INTRODUCERE
- ☐ 2. ACIZII NUCLEICI
- ☐ 3. DE LA ADN LA PROTEINE
- ☐ 4. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC
- ☐ 5. CONTROLUL EXPIMĂRII GENELOR
- ☐ 6. GENOMICA - O NOUĂ RAMURĂ A GENETICII

GENETICĂ UMANĂ

- ☐ 7. ORGANIZAREA CROMOZOMIALĂ ȘI MOLECULARĂ A GENOMULUI UMAN
- ☐ 8. CARACTERE UMANE MONO ȘI POLIGENICE
- ☐ 9. GENETICA ȘI CANCERUL
- ☐ 10. IMUNOGENETICĂ
- ☐ 11. BIOETICĂ

GENETICĂ MOLECULARĂ

1. INTRODUCERE

Genetica poate fi definită ca știința eredității și a variabilității organismelor.

Primele observații cu privire la transmiterea în descendență a caracterelor ereditare au fost efectuate de către oamenii Antichității, în cadrul preocupărilor lor pentru îmbunătățirea însușirilor plantelor cultivate și ale animalelor domestice.

Cu toate acestea, constituirea geneticii ca știință datează din cea de-a doua jumătate a secolului al XIX-lea, când, pe baza experiențelor de hibridare efectuate la plante, Gregor Mendel anunța descoperirea legilor eredității:

1. legea purității gameților;
2. legea segregării independente a perechilor de caractere.

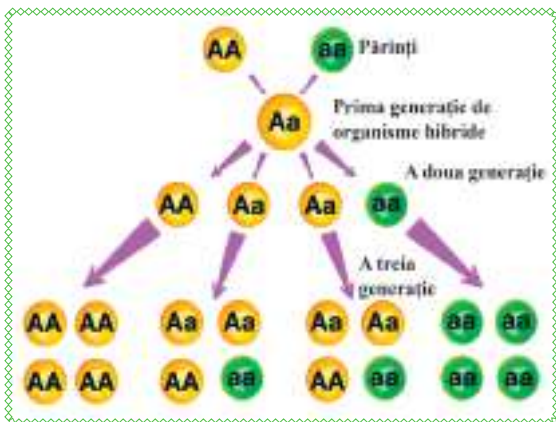


Fig. 1. Legea segregării independente a perechilor de caractere.

Știința eredității a fost numită **genetică** în 1905, de către geneticianul englez W. Bateson, care a cercetat și a demonstrat că legile mendeliene ale eredității sunt valabile și la animale, inclusiv la om.

În 1909, W. Johanssen a introdus noțiunile de *genotip*, pentru constituția genetică, și de *fenotip*, pentru înfățișarea organismului, arătând care sunt deosebiriile dintre acestea.

Progrese remarcabile în domeniul geneticii

au fost făcute de școala lui T. H. Morgan, care a elaborat tezele **teoriei cromozomiale a eredității** (dispunerea lineară a genelor pe cromozomi; linkage-ul; crossingover-ul), punând bazele unei noi științe – **citogenetica**.

Pe baza acestor descoperiri au fost alcătuite hărți cromozomiale sau genetice, la plante și animale, în care genele apar ca niște mărgeli înșirate pe ață (ața reprezentând cromozomul). Într-o asemenea concepție, genele sunt considerate unități funcționale în transmiterea caracterelor ereditare și, totodată, unități de recombinare și de mutație.

Ulterior, în 1958, utilizând sistemul bacterie-bacteriofag în analiza genetică, Benzer evidențiază faptul că genele sunt unități funcționale în transmiterea unui caracter, dar ele prezintă subunități de recombinare și de mutație, cea mai mică unitate mutațională fiind reprezentată de perechea de nucleotide.

Studiile de genetică biochimică au dus la descoperirea relației dintre gene și enzime.

Această relație, enunțată inițial sub forma „o genă – o enzimă”, a devenit mai apoi: „o genă – o catenă polipeptidică”.

Cu toate aceste progrese realizate în domeniul mecanismelor moleculare ale proceselor metabolice, natura chimică a genei a fost cunoscută abia în anul 1944, când O. T. Avery și colaboratorii acestuia au demonstrat experimental că ADN-ul stă la baza transformărilor pneumococilor din experiențele bacteriologului englez F. Griffith.

Se naște o nouă ramură a geneticii, **genetica moleculară**, care studiază ereditatea la nivel molecular. Utilizând tehnica pe care Linus Pauling a folosit-o în descoperirea modelului de structură în α -helix a proteinelor, pentru care a și primit Premiul Nobel, J. D. Watson și Crick descoperă, în 1953, modelul de structură dublu helicală a ADN-ului, care rămâne cea mai mare descoperire a biologiei secolului al XX-lea.

Acest model simplu, de dublu-helix, al struc-

turii ADN-ului a permis aflarea unor răspunsuri la numeroase întrebări legate de misterele vieții:

- cum se reproduce acesta în forme identice;
- cum dirijează sinteza catenelor polipeptidice cu o anumită secvență de aminoacizi și cum pot exprima acestea diferitele caractere ereditare;
- cum poate fi modificată informația ereditară, pentru ca, în descendență, să apară caractere noi, diferite de cele ale părinților.

Toate acestea au condus la elaborarea dogmei centrale a geneticii moleculare (Fig. 2), care, inițial, a fost considerată inviolabilă.

Schematic, aceasta se reprezintă astfel:

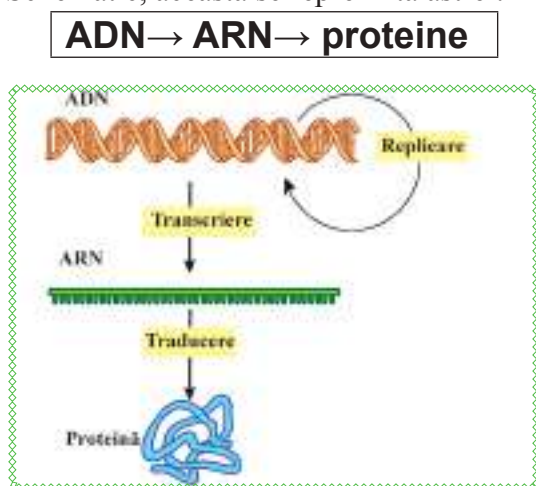


Fig. 2. Dogma centrală a geneticii.

Ulterior, studiul unor virusuri ARN a arătat că acesta se poate autoreplica și poate funcționa ca matriță pentru sinteza de ADN, printr-un proces numit *reverstranscriptic*.

2. ACIZII NUCLEICI

2.1. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Una dintre cele mai importante caracteristici ale lumii vii este reproducerea, care, la nivel molecular, se bazează pe o substanță capabilă să coordoneze toate activitățile celulare și, în același timp, să se replice pentru a asigura perpetuarea informației pe care o conține.

Pentru multă vreme, substanța capabilă să îndeplinească acest dublu rol nu a fost cunoscută. În anul 1869, Friedrich Miescher, medic și biochimist elvețian, a izolat din nucleii leucocitelor o substanță,

Prezentată adesea ca o știință scumpă, care necesită investiții substanțiale, genetica moleculară pare, însă, a compensa orice nivel de investiție, prin rezultatele pe care le oferă pentru un mare spectru al activității omului.

Aplicațiile geneticii moleculare acoperă o arie largă în domeniul diagnosticării și al tratării bolilor umane.

Ingenieria genetică a permis obținerea a numeroase produse de interes medical (insulina, hormonii de creștere, factorii de coagulare a sângelui, interferonul etc.), schimbând destinul multor oameni.

Cunoștințele geneticii moleculare și-au găsit utilitatea și în diferite ramuri ale industriei, prin **biotehnologii** care permit obținerea eficientă și ecologică a numeroase produse.

Astfel, în agricultură, s-a găsit posibilitatea ameliorării soiurilor de plante și a raselor de animale.

Pentru genetica moleculară, prezentul anunță o epocă de continuă descoperiri.

Reține!

Tehnologia ADN-ului recombinant a conferit geneticii moleculare statutul de „doamnă de onoare” a științelor sfârșitului de secol XX și începutului de secol XXI.

pe care a denumit-o **nucleină** și care, ulterior, a căpătat denumirea de **acid nucleic**.

Cu toate acestea, abia în anul 1928, datorită cercetărilor efectuate de microbiologul englez Frederick Griffith, s-a făcut primul pas în identificarea ADN-ului ca material genetic.

Experimentele sale asupra bacteriei *Streptococcus pneumoniae*, agentul patogen al pneumoniei, au demonstrat faptul că o tulpină bacteriană patogenă, omorâtă termic, poate induce patogenitatea la o tulpină mutantă, lipsită de această capacitate.

Tulpina patogenă, notată S (de la *smooth* – neted), formează, pe mediu de cultură adecvat, colonii cu aspect neted și este capabilă să inducă îmbolnăvirea atunci când este injectată la șoareci.

Cea de a doua tulpină, notată R (de la *rough* – rugos), formează colonii cu aspect rugos și este nepatogenă. Tulpina S este reprezentată de celule bacteriene învelite într-o capsulă proteică, ce conferă protecție împotriva mecanismelor de apărare a organismului infectat, spre deosebire de tulpina R, care îi lipsește enzima necesară pentru sinteza capsulei și, ca urmare, este anihilată de sistemul imun al gazdei.

chimici izolați din tulpinile de tip S omorâte termic și au concluzionat că singura substanță capabilă să inducă transformarea este **ADN-ul**.

Acestea au fost primele studii care au furnizat dovada că ADN-ul este materialul genetic celular; ele au fost urmate de studii efectuate pe virusuri, care au confirmat ipoteza inițială.

În celule, există două tipuri de **acizi nucleici**: ADN-ul (acidul dezoxiribonucleic) și ARN-ul (acidul ribonucleic), care reprezintă polimeri ai unor unități numite **nucleotide**.

Fiecare nucleotidă este formată din trei componente: o bază azotată, un zahar (o pentoză) și o

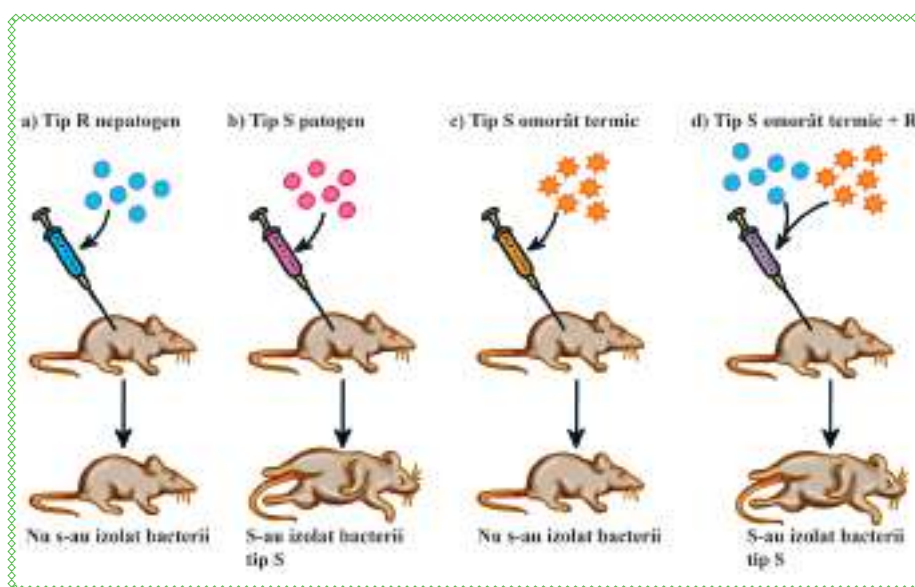


Fig. 3. Experimentele lui Griffith cu *Streptococcus pneumoniae*. Tulpina S omorâtă termic determină moartea șoarecilor, atunci când este injectată în amestec cu tulpina R nepatogenă.

Șoarecii injectați fie cu celule R, fie cu celule S omorâte termic rămân sănătoși. Însă, dacă se injectează un amestec de celule R și de celule S omorâte prin căldură, atunci șoarecii mor de pneumonie.

În plus, Griffith a descoperit în sângele șoarecilor morți celule S vii. El a concluzionat că, de fapt, celulele de tip R au achiziționat de la tulpina S ceva ce le-a transformat în bacterii virulente, fără a descoperi, însă, molecula responsabilă de acest lucru (Fig. 3).

Abia în 1944, Oswald Avery și colaboratorii săi au descoperit natura substanței care induce această transformare. Ei au purificat diferiți compuși

grupare fosfat (Tabel 1). Bazele azotate aparțin la două clase: **purine** și **pirimidine**.

Purinele sunt reprezentate de *adenină* (A) și *guanină* (G), care se întâlnesc atât în ADN, cât și în ARN, iar pirimidinele sunt reprezentate de *citozină* (C) și *timină* (T), în ADN, și de *citozină* (C) și *uracil* (U), în ARN (Fig. 4).

Tabel 1. Structura chimică a acizilor nucleici

	Gruparea fosfat	Zahar	Baze azotate	
			Purine	Pirimidine
ADN	Prezentă	Dezoxiriboză	Guanină Adenină	Citozină Timină
ARN	Prezentă	Riboză	Guanină Adenină	Citozină Uracil

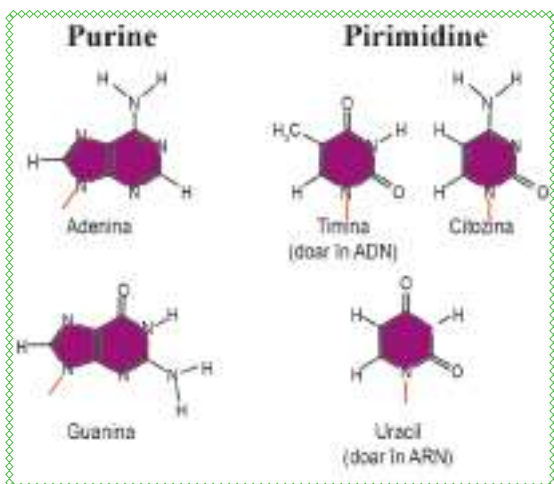


Fig. 4. Bazele azotate din compoziția acizilor nucleici.

Zaharurile legate la bazele azotate sunt **dezoxiriboza**, în nucleotidele ADN, și **riboza**, în ARN. Diferența dintre cele două zaharuri constă în lipsa unei grupări hidroxil la dezoxiriboză. Molecula formată dintr-o bază azotată legată la zahar se numește **nucleosidă**. Prin atașarea unei grupări fosfat la nucleosidă, se obține o **nucleotidă**. Nucleotidele se leagă unele de altele prin intermediul unei legături covalente între gruparea fosfat de la carbonul 5' al unei nucleotide și gruparea hidroxil (-OH) de la carbonul 3' al moleculei alăturate. Aceste legături sunt numite **fosfodiesterice** și stau la baza formării lanțurilor polinucleotidice ale acizilor nucleici (Fig. 5).

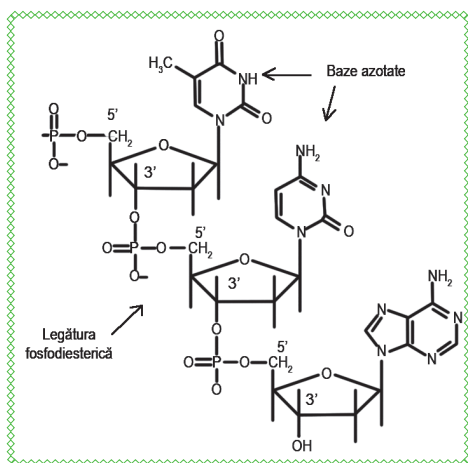


Fig. 5. Legătura fosfodiesterică dintre nucleotide succesive.

Reține!

O nucleotidă ADN sau ARN este formată dintr-o bază azotată purinică sau pirimidinică, un zahar (dezoxiriboza, în ADN, și riboza, în ARN) și o grupare fosfat.

Trebuie reținut faptul că nucleotidele sunt denumite în funcție de baza azotată și de zaharul pe care le conțin (Tabel 2).

Tabel 2. Nomenclatura nucleotidelor

Baza azotată	Nucleotida	Abreviere	
		Riboza	Dezoxiriboza
Guanină	Guanidin monofosfat Deoxiguanidin monofosfat	GMP	dGMP
Adenină	Adenozin monofosfat Deoxiadenozin monofosfat	AMP	dAMP
Citozină	Citidin monofosfat Deoxicitidin monofosfat	CMP	dCMP
Timină	Timidin monofosfat Deoxitimidin monofosfat	–	dTMP
Uracil	Uridin monofosfat	UMP	

2.2. STRUCTURA MOLECULARĂ A ADN-ULUI

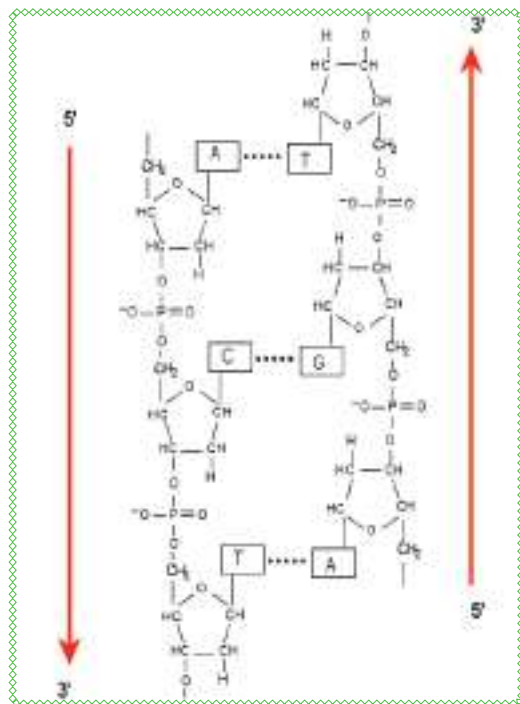
Cunoașterea compoziției chimice a moleculei de ADN nu este suficientă pentru a explica modalitatea în care funcționează ADN-ul. În descifrarea rolului macromoleculei de ADN, un pas important l-a reprezentat observația că, deși tipurile de nucleotide din molecula de ADN diferă cantitativ de la o specie la alta, cantitatea de timină este totdeauna aproximativ egală cu cea de adenină, iar guanina este egalată de citozină.

Cu alte cuvinte, la toate organismele, raportul purine: pirimidine este 1 : 1.

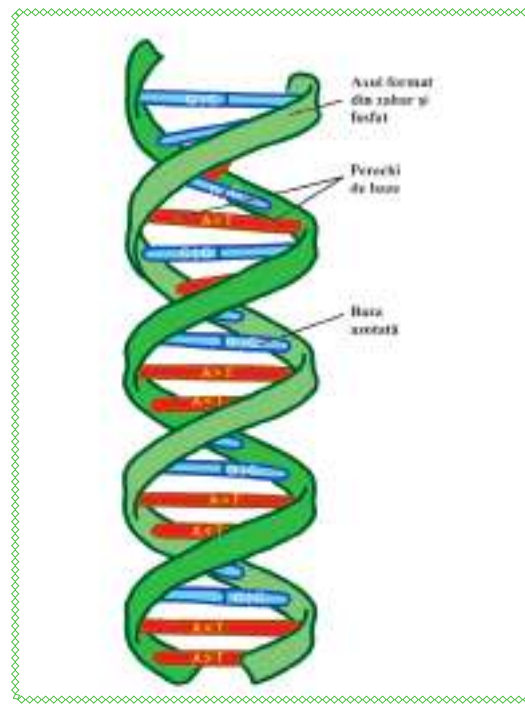
Pornind de la această constatare, în 1953, James Watson și Francis Crick au elucidat structura tridimensională a moleculei de ADN. Aceasta este formată din două lanțuri polinucleotidice (două catene) răsucite unul în jurul celuilalt, formând un **dublu-helix** (Fig. 6, B). În celule, ADN-ul este dublucatenar.

Fiecare bază azotată dintr-o catenă face pereche cu o bază azotată din cealaltă catenă, prin

intermediul unor legături de hidrogen, ținând, astfel, cele două catene reunite (Fig. 6, A). (Legăturile de hidrogen sunt legături slabe, prin care un atom încărcat pozitiv și un atom încărcat negativ sunt uniți prin intermediul unui atom de hidrogen).



(A)



(B)

Fig. 6. Structura primară a ADN-ului (A) și dublu-helixul ADN (B).

Bazele azotate se găsesc situate spre interiorul dublu-helixului, în timp ce spre exterior se află zaharul (pentozele), unite prin intermediul legăturilor fosfodiesterice. Aspectul general este asemănător unei scări flexibile, în care balustradele sunt zaharurile unite prin intermediul grupării fosfat, iar treptele sunt bazele azotate.

Distanța dintre cele două catene, datorată legăturii de hidrogen dintre o purină și o pirimidină, este de 2 nanometri (nm) și se menține constantă pe toată lungimea dublu-helixului.

O rotație completă a helixului are loc la fiecare 3,4 nm, iar distanța dintre două baze azotate succesive de pe aceeași catenă este de 0,34 nm. Astfel, fiecare rotație corespunde la 10 perechi de baze azotate.

Fiecare adenină dintr-o catenă face pereche, prin intermediul unei legături duble de hidrogen, cu timina din cealaltă catenă, în timp ce fiecare guanină formează pereche cu citozina, printr-o legătură triplă de hidrogen.

Numai aceste legături (A-T și G-C) sunt posibile și, din această cauză, dacă se cunoaște succesiunea de nucleotide dintr-o catenă, se poate deduce structura celeilalte catene. Catenele sunt, astfel, **complementare**.

Cele două lanțuri polinucleotidice ale dublu-helixului sunt orientate în direcție opusă unul față de celălalt, ceea ce înseamnă că sunt **antiparalele** (Fig. 6, A). Dacă una dintre catene are sensul 5' fosfat → 3' zahar, cealaltă va avea direcția 3' → 5'; cu alte cuvinte, la același capăt al dublu-helixului, o catenă se termină cu gruparea 5'- fosfat, în timp ce a doua catenă se termină cu gruparea 3'- OH.

Reține!

Catenele dublu-helixului ADN sunt complementare și antiparalele.

Structura tridimensională a ADN-ului a devenit simbolul biologiei moleculare și a sugerat descoperitorilor ei, încă de la început, mecanismul prin care acesta se replică cu atâta fidelitate.

Temă

1. Utilizând cunoștințele de chimie, realizează modele structurale pentru bazele azotate și pentru tipurile de nucleotide.
2. Compară structura chimică a ADN-ului și a ARN-ului. Precizează asemănările și deosebirile dintre acestea.
3. Analizează și stabilește dacă următoarele enunțuri sunt adevărate sau false. Motivează-ți alegerea, evidențiind corelația structură-funcție.

- a) Tulpina R de *Streptococcus pneumoniae* este inhibată de sistemul imunitar al gazdei.
- b) Legăturile fosfodiesterice stau la baza formării lanțurilor polinucleotidice din acizii nucleici.
- c) Uracilul înlocuiește adenina în compoziția ADN-ului.
4. Stabilește care este ordinea corectă a legăturilor într-o nucleotidă din ADN:
 - a) grupare fosfat – adenină – dezoxiriboză;
 - b) zahăr – citozină – grupare fosfat;
 - c) grupare fosfat – guanină – riboză;
 - d) pentoză – grupare fosfat – timină.

2.3. REPLICAREA ADN-ULUI

Regulile de împerechere a bazelor azotate determină modul în care se combină bazele azotate, care formează „treptele” dublu-helixului, dar nu influențează succesiunea de nucleotide de-a lungul aceleiași catene. Astfel, ordonarea celor patru perechi de baze variază enorm, iar fiecare genă are propria sa secvență.

Întrucât cele două catene sunt complementare, fiecare dintre ele conține informația necesară pentru reconstrucția celeilalte. Atunci când o celulă își copiază molecula de ADN, cele două catene se separă, iar fiecare catenă folosește ca matriță pentru sinteza unei noi catene.

De exemplu, când dublu-helixul este despiralizat la nivelul perechii A-T (adenină-timină), o catenă va conține A, iar cealaltă va conține pe T. În timpul replicării, A din matrița ADN-ului va face pereche cu T în noua catenă sintetizată, generând o altă pereche de baze A-T. La rândul său, T din cealaltă catenă-matriță se va împerechea cu A, într-o nouă catenă sintetizată. Vor rezulta, astfel, două perechi A-T, corespunzătoare a două dublu-helixuri. Procesul se va repeta pentru fiecare pereche de baze azotate din dublu-helixul moleculei de ADN.

Acest mecanism de replicare este cunoscut sub denumirea de **modelul semiconservativ**, deoarece fiecare moleculă-fică de ADN are o catenă-matriță conservată și o catenă nou sintetizată. Cu alte cuvinte, o catenă este întotdeauna conservată, reprezentând catena parentală, iar cealaltă catenă este nouă (Fig. 7).

Atunci când a fost propus, modelul de replicare semiconservativă nu a putut fi demonstrat

experimental. Din această cauză, au mai existat și alte două modele alternative: **replicarea conservativă** și **replicarea dispersivă** (Fig. 7). În cazul replicării conservative, molecula parentală rămâne intactă, iar noua moleculă se formează „de novo”. Modelul dispersiv presupune că, după replicare, fiecare dintre cele patru catene reprezintă un amestec de ADN parental și de ADN nou sintetizat.

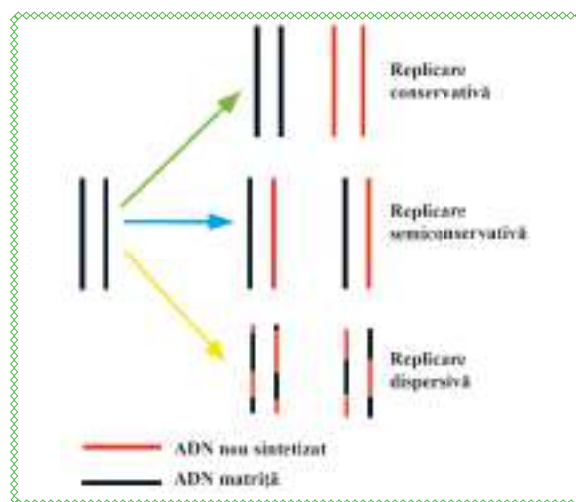


Fig. 7. Modele de replicare a ADN-ului.

Abia în anul 1957, Matthew Meselson și Franklin Stahl au efectuat un experiment prin care au dovedit că replicarea este, într-adevăr, semiconservativă, așa cum se deducea din modelul lui Watson și Crick.

Experimentul Meselson-Stahl a constatat în cultivarea bacteriei *Escherichia coli* pe mediu care conținea izotopul greu al azotului (^{15}N). (Un izotop este un atom cu număr diferit de neutroni față de

atomul obișnuit.) Bacteriile au încorporat ^{15}N în ADN-ul lor.

Ulterior, bacteriile au fost transferate pe un mediu care conținea ^{14}N , izotopul comun al azotului. Măsurând densitatea ADN-ului extras de la bacterii, s-a constatat că ADN-ul nou sintetizat este mai ușor decât ADN-ul de la bacteriile crescute pe mediu cu ^{15}N , dar mai greu decât cel extras de la *E.coli* cultivată pe mediu cu ^{14}N . Singurul model de replicare valabil s-a dovedit a fi cel al replicării semiconservative.

Reține!

ADN-ul se replică semiconservativ.

Etapele replicării ADN-ului

Replicarea unei molecule de ADN este un proces complex, cu mai multe etape, în care sunt implicate numeroase enzime.

Replicarea începe în regiuni denumite **origini de replicare**, iar fragmentele rezultate sunt, apoi, unite între ele. În timp ce cromozomul bacterian are o singură origine de replicare, la eucariote, cromozomii, fiind mai mari, posedă mai multe origini de replicare.

Prima condiție pentru ca replicarea să poată începe este despiralizarea și ruperea legăturilor de hidrogen dintre cele două catene; această etapă se realizează cu ajutorul unor enzime numite **helicaze**.

Replicarea este posibilă întotdeauna numai în direcția $5' \rightarrow 3'$, ceea ce face ca, pe una dintre catene (orientată $3' \rightarrow 5'$), replicarea să se desfășoare continuu, în timp ce pe catena complementară (orientată $5' \rightarrow 3'$), replicarea se desfășoară discontinuu, prin formarea unor fragmente scurte de ADN (numite, după descoperitorul lor, *fragmente Okazaki*), de 1500 de nucleotide, la eucariote, și de aproximativ 150 de nucleotide, la procariote. Unirea acestor fragmente se realizează prin intermediul unor enzime numite **ligaze**.

Modelul prezentat este un model general, care nu face decât pe alocuri referire la deosebirile dintre procariote și eucariote. În realitate, există diferențe

în desfășurarea replicării la cele două tipuri de celule, din cauza organizării diferite a materialului genetic. Una dintre cele mai importante deosebiri se referă la terminarea replicării, deoarece, liniaritatea cromozomilor de la eucariote implică formarea unor structuri specializate la capetele cromozomilor, structuri cunoscute sub numele de *telomere*.

La nivelul porțiunii deschise a dublu-helixului, numită *bifurcație de replicare* (Fig. 8), sub acțiunea unei enzime numite **ARN-polimeraza**, se sintetizează o secvență scurtă de ARN, numită **primer ARN**.

Acest primer ARN este necesar, deoarece ADN-ul însuși nu poate iniția replicarea. El furnizează un capăt liber $3'\text{-OH}$, necesar altei enzime, **ADN-polimeraza**, care, prin adăugare de nucleotide, determină elongarea lanțului polinucleotidic. Ulterior, primerul ARN este îndepărtat (Fig. 9).

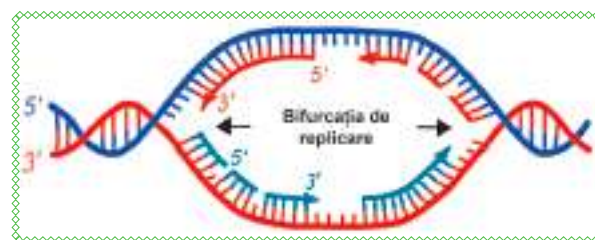


Fig. 8. Bifurcația de replicare a ADN-ului, care rezultă în urma despiralizării și a ruperii punților de hidrogen dintre catenele dublu-helixului.

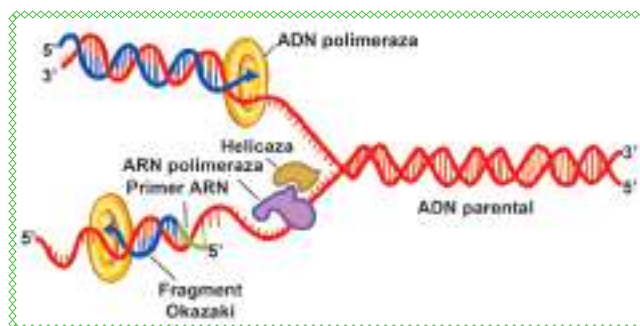


Fig. 9. Etapele replicării ADN-ului pe ambele catene și enzimele implicate în acest proces. Se observă că, pe una dintre catene, procesul este continuu, iar pe cealaltă, se formează fragmente Okazaki, care vor fi unite apoi cu ajutorul unor ligaze.

REZUMAT

- ⊙ ADN-ul conține informația necesară pentru sinteza proteinelor și autoreplicare. Pentru prima dată, ADN-ul a fost izolat în anul 1869 și a fost denumit *nucleină*. Identificarea ADN-ului ca material genetic a rezultat ca urmare a experimentelor lui Griffith, Avery și ale colaboratorilor lor.
- ⊙ Pornind de la observația că, în lungul moleculei de ADN, numărul de purine egalează numărul de pirimidine, Watson și Crick au descoperit structura terțiară a ADN-ului.
- ⊙ Dublu-helixul ADN este asemănător unei scări, în care balustradele sunt o alternanță de dezoxiriboză și fosfat. Treptele scării sunt reprezentate de perechi complementare de A-T și, respectiv, G-C. Dublu-helixul ADN este antiparalel, cele două catene care îl formează fiind orientate în direcții opuse.
- ⊙ Replicarea ADN-ului este semiconservativă, astfel că, întotdeauna, una dintre catene este o catenă parentală, iar cealaltă catenă este nou sintetizată. Replicarea ADN-ului presupune mai multe etape, în fiecare etapă fiind implicate diferite enzime.

Temă

1. Ce legătură există între ARN și procesul prin care are loc replicarea ADN? Argumentează.
2. Motivează importanța replicării ADN-ului după modelul semiconservativ.
3. Stabilește și explică ordinea implicării enzimelor în replicare. Precizează rolul lor. Ce consecințe ar avea modificarea succesiunii etapelor?
4. Precizează dacă enunțul este adevărat (A) sau fals (F). În cazul în care textul este greșit, înlocuiește cuvântul subliniat cu cel potrivit, pentru ca propoziția să devină adevărată.
 - a. Replicarea se realizează continuu, pe catena 5' - 3'.
 - b. Helicazele rup legăturile covalente dintre cele două catene ADN.
 - c. Cromozomii eucariotelor au mai multe origini de replicație.

3. DE LA ADN LA PROTEINE

Biosinteza proteică este un proces celular complex, care se desfășoară în două etape (Fig. 10):

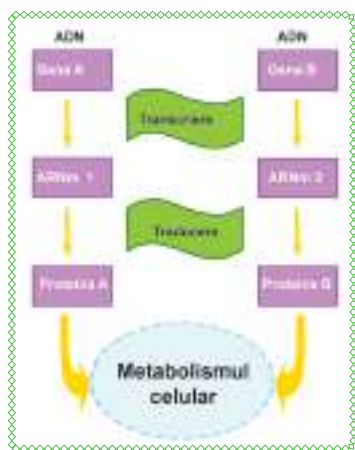


Fig. 10. Biosinteza proteică.

1. transcrierea genetică, cunoscută ca etapa de copiere a informației dintr-o secvență de ADN într-o secvență de ARN;

2. traducerea genetică¹, definită ca etapa de decodificare a secvenței de nucleotide din molecula ARNm, într-o secvență de aminoacizi, în structura unei catene polipeptidice.

3.1. TIPURI DE ARN

După cum s-a arătat anterior, ARN-ul este similar ADN-ului: amândoi sunt acizi nucleici reprezentând secvențe de baze azotate, unite lateral cu gruparea pentoza-fosfat. Totuși, există diferențe structurale și funcționale care fac ca ARN-ul să se deosebească de ADN. Structural, ARN-ul este, în general, monocatenar, în timp ce ADN-ul este dublucatenar. De asemenea, ARN-ul conține baza pirimidinică uracil (U) în loc de timină (T), care este prezentă în structura ADN-ului. ARN-ul include zaharul riboză,

¹⁾ În engleză, traducerea este denumită „translation” și, de aceea, în mod frecvent, geneticienii utilizează termenul de „translație”, ceea ce, conform DEX-ului, este o eroare.

În timp ce ADN-ul are în compoziție dezoxiriboza. Funcțional, ADN-ul conține informația genetică, iar ARN-ul utilizează această informație, care permite celulei să sintetizeze proteine specifice. La realizarea acestui proces, contribuie mai multe tipuri de ARN, care se sintetizează în procesul transcrierii mesajului genetic.

a) ARN-ul mesager (ARNm) poartă acest nume, deoarece transportă informația genetică (mesajul) de la ADN-ul din nucleu, în citoplasmă, la aparatul celular al sintetizării proteinelor (ribozomi). Are structură monocatenară și mărime variabilă, în funcție de mărimea genelor a căror informație o copiază (Fig. 11). Cele mai mari molecule de ARNm conțin între 500 și 1000 de baze (nucleotide).

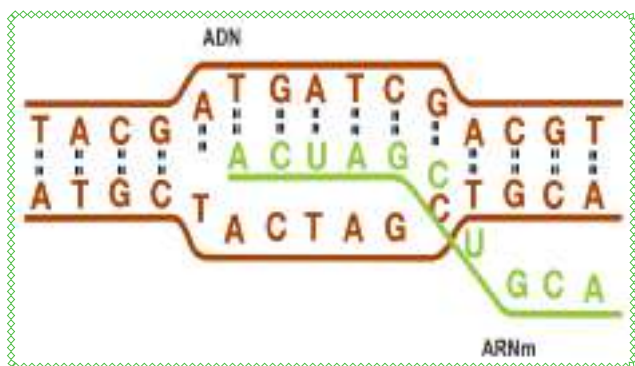


Fig. 11. ARNm copiază informația genetică din ADN.

b) ARN ribozomal (ARNr) este format din porțiuni monocatenare ce alternează cu porțiuni bicatenare și măsoară de la 100 până la aproximativ 3000 de nucleotide, în lungime. În citoplasmă, asociat cu proteine specifice, formează ribozomi – suportul structural al biosintezei proteice. Întrucât cele mai multe celule conțin mii de ribozomi, se consideră că ARNr este cel mai abundent tip de ARN din celulă (80-90% din totalul de ARN celular).

c) ARN-ul de transfer (ARNt), comparativ cu ARNm, are o greutate moleculară mică, conținând aproximativ 80 de nucleotide. Molecula sa, care are aspect de frunză de trifoi, prezintă o structură tridimensională, determinată de formarea legăturilor de hidrogen între bazele complementare, A–T și G–C, ajunse în vecinătate în anumite zone (Fig. 12).

ARNt activează și transferă aminoacizii la ribozomi, în timpul biosintezei proteice.

Aceste trei tipuri de ARN există atât în celula eucariotă, cât și în celula procariotă.

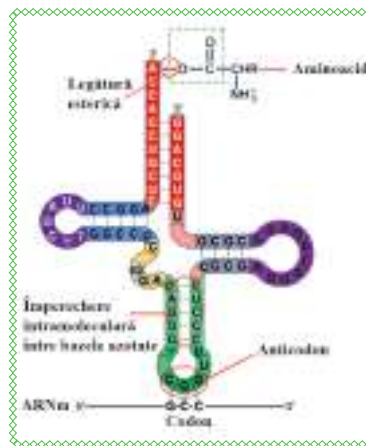


Fig. 12. Structura ARNt.

d) ARN-ul nuclear mic (ARN small nuclear – ARNsn), cel de-al patrulea tip de ARN identificat la eucariote, are rol în structura și funcționarea nucleului. ARNsn formează, împreună cu proteinele, complexe ribonucleoproteice, importante în procesul de maturare a ARNm.

e) Un alt tip de ARN este ARN viral (ARNv). ARNv constituie materialul genetic al ribovirusurilor (HIV, VMT, virusul gripal, virusul poliomielitei) și se prezintă sub formă lineară sau circulară, având structură monocatenară sau bicatenară.

Mărimea și greutatea sa moleculară depind de cantitatea de informație genetică pe care o conține. ARNv se reproduce în celula-gazdă pe căi diferite.

3.2. CODUL GENETIC

După descoperirea acizilor nucleici, a structurii și a rolului lor în transformarea genetică la bacterii, cercetătorii au emis ipoteza existenței unei corespondențe între succesiunea celor patru tipuri de baze azotate din molecula acizilor nucleici și succesiunea celor 20 de tipuri esențiale de aminoacizi din structura proteinelor. Ulterior, s-a demonstrat că această corespondență există și a fost numită **cod genetic**.

Unitățile de codificare a informației necesare sintezei proteinelor sunt triplete de nucleotide sau **codoni**. Dacă fiecare aranjament de trei nucleotide specifică un aminoacid, codul genetic poate fi

format din 64 de codoni ($4^3 = 64$, ceea ce reprezintă cele 4 tipuri de baze azotate luate câte 3), fiind mai mult decât suficient pentru recunoașterea celor 20 de tipuri de aminoacizi (Fig. 13).

	U	C	A	G
U	UUU Fenilalanină UUC UUA Leucină UUG	UCU Serină UCC UCA UCG	UAU Tirosină UAC UAA Stop UAG	UGU Cisteină UGC UGA Stop UGG Triptofan
C	CUU Leucină CUC CUA CUG	CCU Prolină CCC CCA CCG	CAU Histidină CAC CAA Glutamină CAG	CGU Arginină CGC CGA CGG
A	AUU Izoleucină AUC AUA AUG Metionină	ACU Treonină ACC ACA ACG	AAU Asparagină AAC AAA Lizină AAG	AUG Serină AGC AGA Arginină AGG
G	GUU Valină GUC GUA GUG	GCU Alanină GCC GCA GCG	GAU Acid Aspartic GAC GAA Acid Glutamic GAG	GGU Glicină GGC GGA GGG

Fig. 13. Codul genetic.

Experimental, s-a verificat dacă circulația informației de la gene la proteine se bazează pe tripletele codificatoare și s-a dovedit că instrucțiunile genetice pentru sinteza lanțului polipeptidic sunt înscrise continuu în molecula ADN-ului, fără pauză de codoni. De exemplu, poziția particulară a tripletei AGC, de-a lungul ADN-ului, determină plasarea aminoacidului serină într-o poziție corespunzătoare a polipeptidului sintetizat.

În timpul transcrierii, gena determină secvența de baze de-a lungul unei molecule de ARNm. Pentru fiecare genă, numai una dintre cele două catene ale ADN-ului este transcrisă. Această catenă se numește **catenă codificatoare** (matriță), deoarece furnizează modelul pentru ordonarea secvenței de nucleotide în ARNm transcris.

Molecula de ARNm este sintetizată în direcție antiparalelă față de catenă de ADN pe care o copiază. De exemplu, tripleta de baze ACC din structura ADN-ului ($3' - ACC - 5'$) devine o copie $5' - UGG - 3'$, în molecula ARNm. Tripletele de baze (nucleotide) ale ARNm-ului se numesc **codoni** și, în mod obișnuit, sunt transcriși în direcția $5' - 3'$. Acești codoni sunt complementari cu modelul catenei ADN și identici ca secvență, cu deosebirea că ARNm conține U în loc de T (Fig. 14).

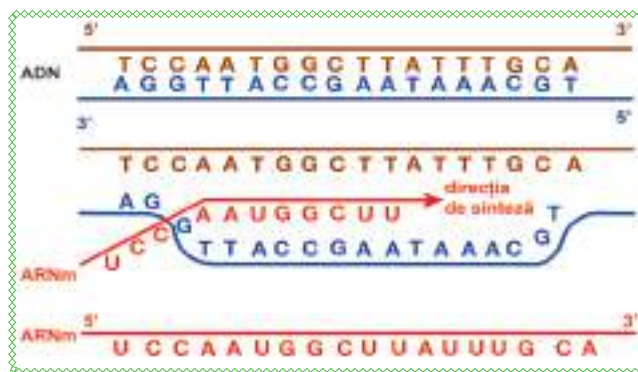


Fig. 14. Complementaritatea ARNm / catenă-matriță ADN.

În timpul traducerii, secvențele de codoni din molecula ARNm sunt traduse sau decodificate într-o secvență de aminoacizi din lanțul polipeptidic. În procesul traducerii, codonii sunt citați de-a lungul moleculei de ARNm, în direcția $5' - 3'$. Fiecare codon arată care dintre cele 20 de tipuri de aminoacizi esențiali va fi încorporat la poziția corespunzătoare, în molecula polipeptidică.

Deoarece codonii sunt triplete de baze, numărul de baze care formează mesajul genetic trebuie să fie de trei ori mai mare decât numărul aminoacizilor din structura proteinei sintetizate.

Primul codon a fost descifrat de Marshall Nirenberg. În 1961, în condiții de laborator, Nirenberg a demonstrat că aminoacidul fenilalanină este specificat de tripleta de nucleotide UUU. Deși a fost necesară utilizarea mai multor tehnici ca să descifreze tripleții micști, precum AUA și CGA, toți cei 64 de codoni au fost descifrați până la mijlocul anilor 1960. 61 dintre cele 64 de triplete de nucleotide descifrate codifică aminoacizi.

Cei trei codoni – UAA, UAG, UGA –, care nu semnifică includerea aminoacizilor în catenă polipeptidică, sunt semnale „Stop” și marchează sfârșitul traducerii mesajului genetic.

Codonul AUG are o dublă funcție: codifică aminoacidul metionină (Met) și funcționează ca semnal „Start” sau ca un codon de inițiere a traducerii genetice. Mesajele genetice reprezentate de moleculele ARNm încep cu un codon AUG, care îi indică sistemului de sinteză a proteinelor să înceapă cu legarea aminoacidului metionină. Pentru că AUG specifică metionina, lanțurile de polipeptide

sintetizate încep întotdeauna cu aminoacidul metionină, dar o enzimă poate înlocui metionina de la începutul lanțului polipeptidic.

Codul genetic este **degenerat**. Deoarece există mai mulți codoni decât aminoacizi, un aminoacid poate fi codificat de mai mulți codoni (aminoacidul fenilalanină este codificat de tripletele UUU și UUC). Cu toate acestea, în codul genetic nu există ambiguitate.

De exemplu, deși ambii codoni GAA și GAG specifică acidul glutamic, niciunul dintre ei nu codifică vreun alt aminoacid. Redundanța din cod nu este întâmplătoare. În multe cazuri, codonii care sunt sinonimi pentru un aminoacid particular diferă doar în a treia bază a tripletului. Se consideră că primele două nucleotide dintr-un codon sunt importante, a treia nucleotidă putând fi înlocuită cu oricare dintre cele patru tipuri. Excepție de la această regulă fac tripletele de nucleotide care codifică aminoacizii leucină și arginină.

Codul genetic este **nesuprapus**, ceea ce înseamnă că doi codoni învecinați nu au nucleotide comune. Citirea mesajului genetic se face continuu, **fără virgulă**. În exemplul următor sunt reprezentați 4 codoni care codifică 4 aminoacizi ai unei proteine și anume: triptofan (Trp), fenilalanină (Phe), glicină (Gly) și serină (Ser).

ARNm	UGG	UUU	GGC	UCA
Traducere	↓	↓	↓	↓
Proteină	Trp	Phe	Gly	Ser

Codul genetic este **universal**, egal distribuit la toate organismele, de la cele mai simple bacterii la cele mai complexe animale. Aceasta demonstrează originea foarte veche a codului genetic. De exemplu, codonul CCG din molecula ARNm specifică aminoacidul prolină, cel puțin la toate organismele al căror cod genetic a fost examinat în experimentele de laborator.

Excepțiile de la universalitatea codului genetic includ sistemele de traducere, unde puțini codoni se abat de la rolul lor standard. Ușoare variații ale codului genetic există la câteva eucariote unicelulare

și la genele organelor celulare ale unor specii. La unele procariote, codonii „Stop” pot codifica unul sau doi aminoacizi.

Codul genetic **a evoluat foarte puțin**, universalitatea lui în lumea vie fiind certă.

3.3. TRANSCRIEREA GENETICĂ

Molecula de ARNm rezultată în procesul transcrierii genetice este o copie fidelă a informației genelor, necesară sintezei proteinelor de care are nevoie celula la un moment dat.

Transcrierea informației genetice este un proces complex, care poate fi prezentat în trei faze: inițierea transcrierii, alungirea moleculei ARN și terminarea transcrierii (Fig. 15):



Fig. 15. Fazele transcrierii ARNm.

a) inițierea transcrierii

De-a lungul moleculei ADN, există secvențe de nucleotide specifice, care marchează atât locul în care începe transcrierea genelor, cât și locul în care se termină. Secvența de nucleotide ADN, la care se atașează enzima ARN-polimeraza și care inițiază transcrierea, este cunoscută sub numele de **promotor**, iar secvența de nucleotide care marchează sfârșitul transcrierii genelor se numește **terminator**.

Promotorul unei gene include în structura sa punctul de start al transcrierii și determină care dintre cele două catene ADN va fi catena codificatoare (matriță). La eucariote, atașarea enzimei ARN-polimeraza la promotorul unei gene este mediată de factorii de transcriere (complex de proteine), iar la procariote, aceasta se face direct.

Segmentul ADN-ului care este transcris într-o moleculă de ARN este numit **unitate de transcriere**.

b) alungirea moleculei ARN

ARN-polimeraza se deplasează de-a lungul moleculei de ADN și continuă să desfacă dublu-helixul ADN, expunând simultan aproximativ 10-20 de baze ADN, pentru împerecherea cu nucleotide ARN. Nucleotide noi sunt adăugate la capătul 3' al moleculei ARN în creștere. La eucariote, transcrierea progresează cu o rată de 60 de nucleotide pe secundă.

c) terminarea transcrierii

Mecanismul de încheiere a transcrierii este diferit la procariote față de eucariote. La procariote, o secvență de ARN funcționează ca semnal de încheiere a transcrierii, ceea ce face ca polimeraza să se detașeze de pe ADN și să elibereze transcriptul (ARN-ul nou sintetizat) care poate fi folosit imediat ca ARNm. La eucariote, procesul încheierii transcrierii genetice este mult mai complex. Inițial, se sintetizează un ARN pre-mesager, format din *introni* (secvențe noninformaționale) și *exoni* (secvențe informaționale). ARN-ul pre-mesager este supus unui proces enzimatic de maturare, care constă în eliminarea intronilor și asamblarea exonilor. ARNm rezultat trece din nucleu în citoplasmă, la ribozomi, unde se desfășoară traducerea.

3.4. TRADUCEREA GENETICĂ

Traducerea genetică sau **sinteza lanțului polipeptidic** poate fi împărțită, ca și transcrierea genetică, în trei faze: faza de inițiere a traducerii, faza de alungire a catenei polipeptidice și faza de terminare a traducerii.

a) inițierea traducerii

Această etapă aduce împreună ARNm, ARNt legat de primul aminoacid al lanțului polipeptidic și cele două subunități ale ribozomilor. Mai întâi, subunitatea mică a ribozomului leagă ARNm și un ARNt specific, care transportă aminoacidul metionină, numit **inițiatorul ARNt**.

De altfel, subunitatea mică a ribozomului se mișcă în josul moleculei ARNm, până la codonul **Start AUG**, care semnalizează începerea traducerii.

Legarea ARNm cu inițiatorul ARNt și cu subunitatea mică ribozomală este urmată de atașarea subunității mari ribozomale, completând complexul de inițiere a traducerii.

Formarea complexului de inițiere este mediată de factorii de inițiere și se bazează pe energia eliberată prin hidroliza **GTP** (guanozintrifosfat) din citoplasmă. Inițiatorul ARNt este trecut în **locusul P** al ribozomului, iar **locusul A** rămâne liber pentru un alt **ARNt - aminoacid**, sinteza polipeptidului realizându-se, întotdeauna, într-o singură direcție, de la metionina inițială către aminoacidul final.

Reacțiile caracteristice sunt:

- Activarea aminoacizilor:



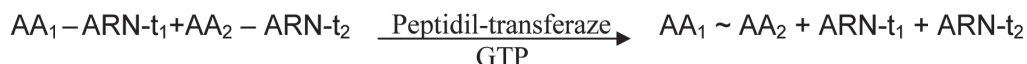
- Legarea aminoacizilor activați de ARNt specific:



Cele două reacții sunt catalizate de enzimele aminoacil-sintetaze. Energia necesară activării AA rezultă din hidroliza ATP (adenozintrifosfat). La nivel mitocondrial, AMP (adenozinmonofosfat), prin fosforilare, reface ATP.

b) alungirea catenei polipeptidice

Se realizează prin adăugarea aminoacizilor, unul câte unul, la aminoacidul precedent, între care se formează legături dipeptidice. Reacțiile se desfășoară în prezența factorilor de alungire, utilizând energia rezultată din hidroliza GTP (guanozintrifosfat).



Adăugarea aminoacizilor se face conform citirii mesajului genetic, codon cu codon, prin mișcarea ribozomului și a ARNm, unul după altul, uni-direcțional ($5' \rightarrow 3'$).

c) terminarea traducerii

Adăugarea aminoacizilor la lanțul polipeptidic continuă până când codonul „Stop” din ARNm ajunge în locusul A al ribozomului. Codonul „Stop” (UAA, UAG sau UGA) nu codifică niciun aminoacid, ci marchează sfârșitul traducerii. Procesul se produce în prezența **factorului de eliberare** care se leagă direct la codonul „Stop” din locusul A al ribozomului. Factorul de eliberare determină hidroliza polipeptidului format complet, aflat în locusul P al ribozomului, și eliberarea lui prin tunelul subunității mari ribozomale.

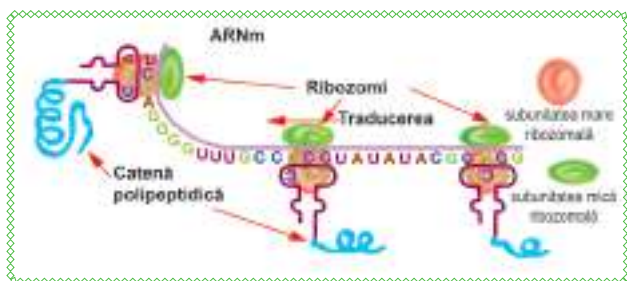


Fig. 16. Sinteza proteinelor.

Sfârșitul sintezei proteice este marcat de eliberarea ARNt, care poate fi utilizat în alte biosinteze, de dezorganizarea ribozomilor în cele două subunități și de dezintegrarea ARNm.

Proteinele sintetizate sunt folosite în metabolismul celular, îndeplinind rol structural sau catalitic.

REZUMAT

- ⊙ Pentru fiecare genă, numai una dintre catenele ADN-ului funcționează ca model pentru transcriere. Regulile împerecherii bazelor din sintezele de ADN dirijează, de asemenea, traducerea genetică, cu deosebirea că, în molecula ARNm, U ia locul lui T.
- ⊙ În timpul traducerii, ARNm este citit ca o secvență de triplete de baze, numite *codoni*. Totalitatea codonilor (64) formează *codul genetic*. Fiecare codon determină care aminoacid urmează să fie adăugat la lanțul polipeptidic ce se sintetizează.
- ⊙ Traducerea informației ARNm se face în direcția $5' - 3'$, în citoplasmă, la nivelul ribozomilor. Se formează o catenă polipeptidică folosită în metabolismul celular.

Temă

1. Evidențiază și notează într-un tabel asemănările și deosebirile dintre tipurile de ARN. Formulează concluzii legate de corelația structură-funcție.
2. Alcătuieste un segment din macromolecula de ADN, stabilește codonii ARNm corespunzători nucleotidelor inițiale, astfel încât, prin translație, aminoacizii codificați să aibă următoarea succesiune în catena polipeptidică: *leucină-glutamină-arginină-alanină*.
3. Compară transcripția cu translația și formulează concluzii referitoare la: *locul de desfășurare, enzimele implicate, particularitățile structurilor inițiale și ale celor finale pentru fiecare proces*.
4. Explică de ce următoarele două secvențe informaționale de ADN, deși sunt diferite, pot determina, în final, sinteza unor catene polipeptidice cu aceiași aminoacizi:
 - primul segment: TGATTATCA
 - alt segment: TGTTTGTCG
 ⇒ Utilizează figura 13 în care este prezentat codul genetic și stabilește aminoacizii care corespund informației genetice.
 ⇒ Construiește și alte exemple de catene ADN care să determine, după transcripție și translație, produși finali comuni.
5. Argumentează de ce lanțurile de polipeptide sintetizate încep întotdeauna cu aminoacidul metionină. Cum explici că, în final, această particularitate nu mai este prezentă?

4. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC

ADN-ul este molecula fără de care viața nu ar putea exista, întrucât aceasta asigură reproducerea prin transmiterea informației genetice generațiilor următoare.

La organismele cu structură celulară, ADN-ul este organizat în **cromozomi**, care reprezintă molecule de ADN individuale formate, la rândul lor, din **gene** și alte secvențe nucleotidice, cu rol de reglare sau fără o funcție identificată până în prezent.

Concepția privind genele a evoluat mult în ultimii ani. Mult timp a fost acceptată definiția conform căreia gena este o secvență de ADN, care este transcrisă și care determină caracterele aparente ale unui organism, respectiv **fenotipul**.

Însă, nu toate genele sunt traduse în proteine; multe dintre acestea determină sinteza diferitelor clase de ARN, altul decât ARN mesager. Cu alte cuvinte, produșii genelor sunt diferite tipuri de molecule ARN.

4.1. MATERIALUL GENETIC VIRAL

Virusurile sunt particule infecțioase formate din material genetic și proteine. Este important de reținut faptul că virusurile nu au organizare celulară, deci nu sunt organisme.

Materialul genetic viral – spre deosebire de concepția generală, conform căreia genele sunt formate din ADN dublucatenar – poate fi reprezentat de ADN-ul dublucatenar, de ADN-ul monocatenar de ARN-ul dublucatenar și de ARN-ul monocatenar. În funcție de tipul de acid nucleic conținut, există **virusuri ADN** și **virusuri ARN**.

La ambele tipuri de virusuri, materialul genetic este organizat fie sub forma unei molecule liniare de acid nucleic, fie sub forma unei molecule circulare. Cele mai mici virusuri au numai patru gene, în timp ce virusurile mai mari posedă câteva sute de gene.

Genomul viral se află protejat în interiorul unei **capside virale** formate din subunități proteice, numite **capsomere**. Forma capsulei virale variază foarte mult, de la cele mai simple – care sunt helicoidale, poliedrice etc. – până la cele cu format mult mai complex.

Unele virusuri posedă și alte structuri, care, de regulă, le ajută în infectarea gazdelor. Astfel, virusurile gripale (virusuri *influenza*) posedă o anvelopă virală, cu aspect membranos, care acoperă capsida.

Totuși, cele mai complexe capside se întâlnesc la virusurile care infectează bacteriile și care sunt denumite **bacteriofagi** (sau, mai simplu, **fagi**) (Fig. 17).

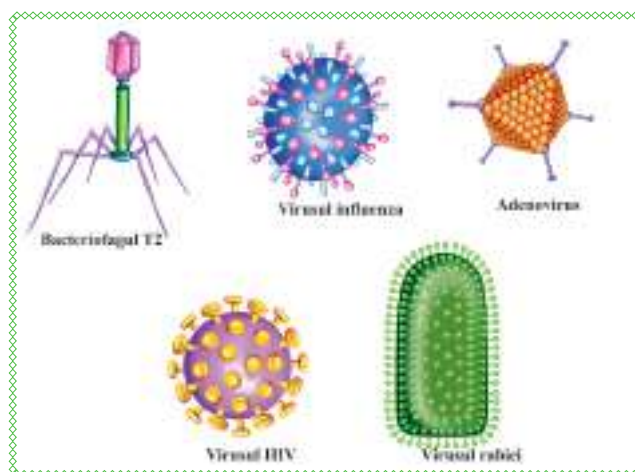


Fig. 17. Diferite tipuri de virusuri. Se observă forma variată a capsidei virale.

Reține!

Virusurile sunt de două tipuri (ADN și ARN) și nu au organizare celulară.

Deoarece nu se pot reproduce decât în celula-gază, virusurile sunt paraziți intracelulari obligați. Virusurile izolate sunt un fel de seturi de gene protejate de o capsulă proteică și aflate în tranziție de la o celulă la alta.

Fiecare tip de virus poate infecta și parazita un număr limitat de gazde. O infecție virală debutează cu pătrunderea virusului în celula-gază. Odată intrat, virusul reprogamează celula-gază, pentru a copia genele virale și pentru a sintetiza proteinele ce formează capsida. Indiferent de tipul materialului genetic viral, gazda va furniza nucleotidele necesare pentru sinteza acizilor nucleici, enzimele, ribozomii,

aminoacizii și alte componente necesare sintezei proteinelor virale (Fig. 18).

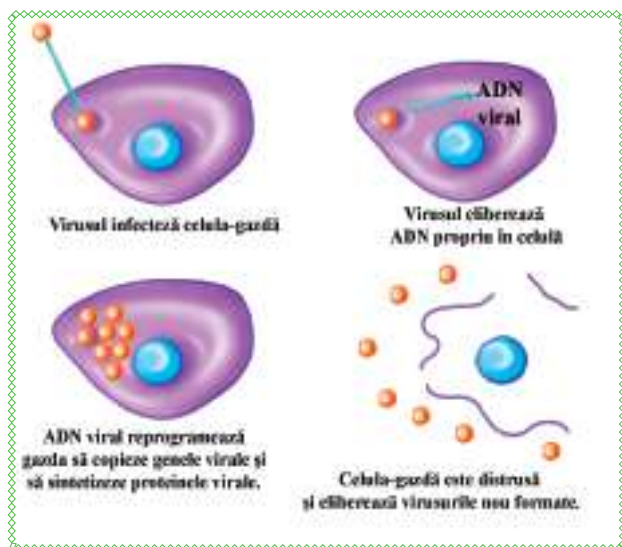


Fig. 18. Etapele unei infecții virale.

Cel mai simplu ciclu celular viral se încheie după ce s-au format sute sau mii de noi virusuri și acest lucru este, adeseori, simultan cu distrugerea celulei-gazdă.

4.2. CROMOZOMUL ȘI GENELE BACTERIENE

Materialul genetic bacterian se găsește, în cea mai mare parte, sub forma unei molecule circulare de ADN dublucatenar. Această moleculă este impropriu denumită „cromozom”, deoarece diferă foarte mult de cromozomii eucariotelor, prin modalitatea de împachetare și prin proteinele cu care este complexată. Cu toate acestea, în mod uzual, și în cazul bacteriilor, se păstrează denumirea de cromozom.

Mărimea și arhitectura cromozomului bacterian

Mărimea cromozomului bacterian variază de la mai puțin de 1000 pb (*pb* – perechi de baze) până la 12-13 milioane pb. *Escherichia coli*, de exemplu, are aproximativ 4,7 milioane pb, care corespund la 3000 de gene și care măsoară aproximativ 1 milimetru în lungime.

Pentru ca o celulă bacteriană să poată conține o moleculă ADN de asemenea mărime, de obicei de 1000 de ori mai lungă decât celula, este necesar

ca respectiva moleculă să fie strâns împachetată. Prin asociere cu proteine și ARN, ADN-ul bacterian formează aproximativ 50 de bucle, care, la rândul lor, sunt suprarăsucite (Fig. 19). Se pare că diferite categorii de enzime bacteriene sunt responsabile de gradul de răsucire. Una dintre cele mai importante enzime, cu rol în stabilirea și menținerea arhitecturii cromozomului bacterian, este **ADN-giraza**.

Cromozomul bacterian strâns împachetat formează acea regiune din celulă cunoscută sub denumirea de nucleoid, care este caracteristică procariotelor. Nucleoidul este atașat de membrana plasmatică a celulei bacteriene, în aproximativ 20 de puncte.

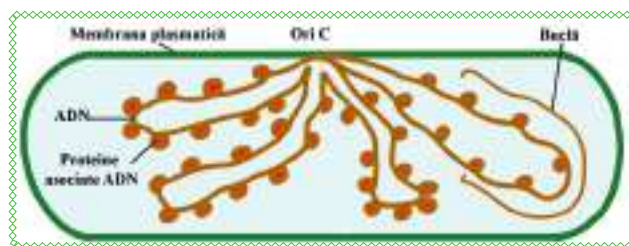


Fig. 19. Cromozomul bacterian. Se observă principalul punct de atașare la membrana plasmatică (de lângă regiunea Ori C), precum și modelul de împachetare.

În afară de cromozom, numeroase bacterii conțin **plasmide**. Acestea sunt molecule de ADN, mici, circulare, care conțin un număr redus de gene.

Retine!

Materialul genetic bacterian este format din cromozom și plasmide.

Replicarea și structura cromozomului bacterian

Replicarea cromozomului bacterian se desfășoară în ambele sensuri, începând de la o singură origine de replicare (*Ori C*), și precede diviziunea celulară (Fig. 20). În ceea ce privește plasmidele, la acestea s-au descris mai multe mecanisme de replicare, ce diferă în funcție de tipul plasmidei.

ADN-ul de la procariote este, în cea mai mare parte, codificator, iar cele mai multe gene se află într-o singură copie, per genom. O excepție o constituie genele care codifică pentru ARN ribozomal și de transfer și care se găsesc în mai multe copii.

În contrast cu organismele eucariote, la bacterii există și multe gene care nu au promotor propriu și care sunt cotranscrise pornind de la același promotor. Asemenea seturi de gene fac parte din unități mai mari, numite **operoni**.

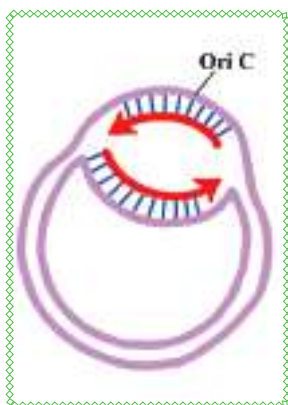


Fig. 20. Replicarea cromozomului bacterian.

4.3. CROMOZOMI ȘI GENE LA EUCARIOTE

Un cromozom eucariot conține o singură moleculă de ADN, a cărei lungime variază foarte mult. Astfel, cel mai mare cromozom de la *Drosophila melanogaster* are aproximativ 10^7 pb, fiind echivalent cu un duplex liniar de 18 mm lungime. Deoarece lungimea moleculelor de ADN cromozomial depășește cu mult mărimea celulelor, la eucariote funcționează un sistem elaborat de împachetare a ADN-ului.

ADN-ul tuturor eucariotelor este asociat cu numeroase proteine nucleare, împreună cu care formează **cromatina**.

Unele proteine sunt implicate în determinarea structurii cromozomilor, în timp ce altele par să regleze anumite funcții cromozomiale.

Organizarea cromatinei

Proteinele responsabile de modul în care este organizată cromatina se numesc **histone** și sunt esențiale în formarea **nucleosomilor**.

Aceste unități cromatinice conțin un miez format din câte două molecule de histone, care aparțin la patru dintre cele cinci clase histonice cunoscute (H2A, H2B, H3 și H4), și un fragment ADN, de aproximativ 200 pb, răsucit în jurul

acestui miez (Fig. 21). Nucleosomii sunt înșirați ca mărgelele în șirag și sunt uniți prin intermediul unor secvențe de nucleotide, numite **ADN linker**, iar în stabilizarea structurii lor este implicată histona H1.

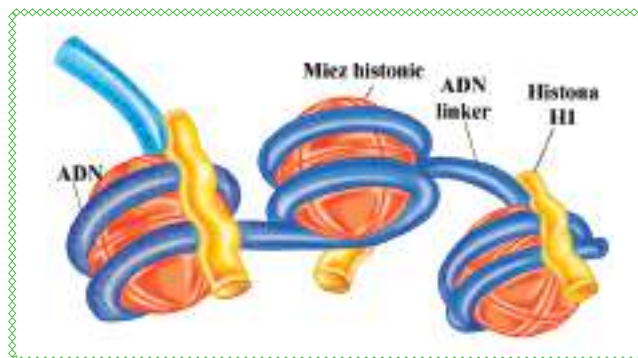


Fig. 21. Structura nucleosomilor.

Nucleosomii reprezintă primul nivel de împachetare a cromozomilor și pot fi observați în nucleii interfazici (Fig. 22).

Următorul nivel de împachetare corespunde **fibrei de 30 nm**, care rezultă din răsucirea strânsă a nucleosomilor, cu ajutorul histonei H1. Cea mai compactă structură o au **cromozomii metafazici**, în care ADN-ul este înalt condensat.

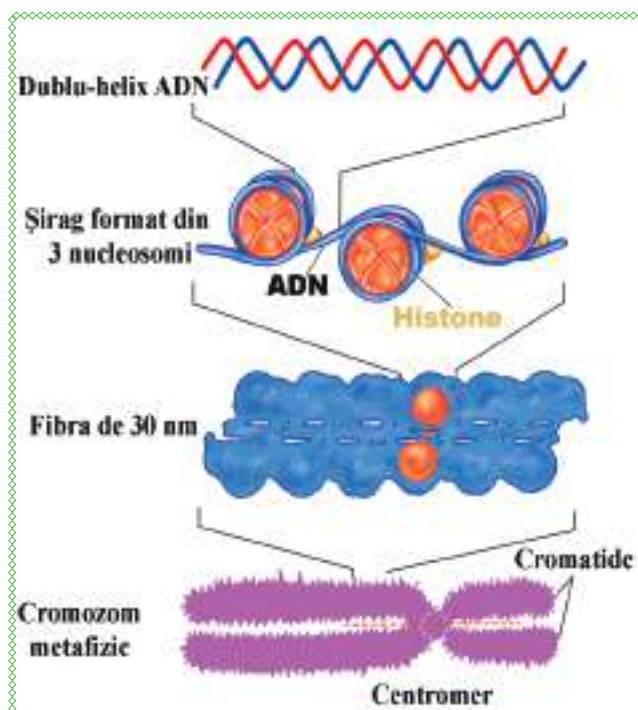


Fig. 22. Stadii de împachetare a ADN-ului în cromozomii eucariotelor.

Cromozomii metafazici tipici sunt cromozomi deja replicați, formați din două **cromatide**, fiecare reprezentând o moleculă continuă de ADN. Cele două cromatide sunt reunite la nivelul unei zone numite **centromer**, unde există o structură proteică (kinetocorul), care folosește pentru atașarea cromozomilor la fusul de diviziune. Centromerul separă cromozomul în două **brațe**.

Capetele cromozomilor se numesc **telomere** și au rol în replicare și în protejarea cromozomilor împotriva interacțiunilor chimice și a atacurilor enzimatice.

Chiar și în timpul interfazei, anumite porțiuni din cromozomi rămân puternic condensate; acestea reprezintă **heterocromatina**, denumită așa pentru a putea fi deosebită de cromatina, mai puțin densă, numită **eucromatină**. Între cele două tipuri de cromatină există diferențe funcționale, heterocromatina fiind inactivă din punctul de vedere al transcrierii.

Genele

Genele de la eucariote au o structură discontinuă; astfel, secvențele codificatoare, numite **exoni**, sunt întrerupte de secvențe necodificatoare, numite **introni** (Fig. 23). O genă tipică pentru eucariote conține un segment transcris, format din succesiunea de exoni și introni, și o regiune plasată, de obicei, înaintea segmentului transcris, cu rol reglator. Segmentul transcris începe în regiunea Start – o secvență de nucleotide care are rolul de a iniția transcrierea – și se termină cu codonii terminali. Reamintim că doar exonii sunt ulterior traduși în proteine. De obicei, înaintea zonei de inițiere a transcrierii se găsește **promotorul** care, așa cum am amintit în lecțiile anterioare, este un segment ce conține toate elementele necesare pentru un nivel minim al transcrierii. La eucariote, se mai întâlnesc

și alte elemente cu rol reglator, plasate fie înaintea, fie după segmentul transcris.

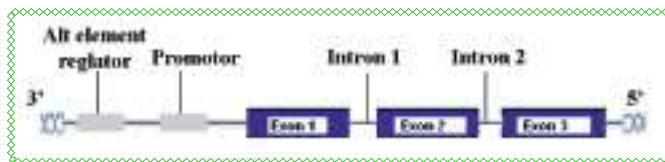


Fig. 23. Structura genei la eucariote. Se observă alternanța dintre exoni și introni.

Unele gene, la fel ca la procariote, se găsesc în număr mare de copii, în această categorie intrând atât genele care codifică unele proteine, cât și genele pentru ARN.

Reține!

Genele eucariotelor au structură discontinuă, fiind formate dintr-o succesiune de exoni și introni.

ADN-ul repetat

În anumite regiuni din cromozomii eucariotelor, compoziția în baze azotate este diferită, unele baze găsindu-se într-o cantitate mai mare. Aceste regiuni corespund **ADN-ului repetat**, aparent fără un rol funcțional bine stabilit. ADN-ul repetat este format din scurte secvențe nucleotidice, repetate de foarte multe ori, ceea ce îi conferă o densitate diferită și face posibilă separarea lui de restul ADN-ului din genom. Trebuie subliniat că ADN-ul repetat este o caracteristică a eucariotelor și că, de cele mai multe ori, reprezintă cea mai mare parte din cantitatea totală de ADN a unui organism.

Numărul de cromozomi este o caracteristică esențială a fiecărei specii de organisme și variază destul de mult în lumea vie, așa cum se întâmplă și cu numărul de gene sau cu cantitatea de ADN necodificator.

REZUMAT

- ⊙ La organismele cu structură celulară, ADN-ul este organizat în **cromozomi** formați din gene și alte secvențe nucleotidice, cu rol de reglare sau fără o funcție identificată.
- ⊙ O **genă** este o secvență de nucleotide, fiind necesară pentru producerea de ARN.
- ⊙ Materialul genetic viral poate fi reprezentat de ADN sau ARN, organizat fie sub forma unei molecule liniare de acid nucleic, fie sub forma unei molecule circulare. Genomul viral se află protejat în interiorul unei capside virale și posedă de la câteva gene la câteva sute de gene.
- ⊙ Materialul genetic bacterian se găsește, în cea mai mare parte, sub forma unei molecule circulare de ADN dublucatenar, strâns împachetată datorită asocierii cu proteine și ARN. În afară de cromozom, numeroase bacterii conțin **plasmide**. ADN-ul de la procariote este, în mare parte, codificator și este organizat în **operoni**. Fiecare genă dintr-un operon este formată dintr-o secvență continuă de ADN.
- ⊙ Un cromozom eucariot conține o singură moleculă de ADN, asociată cu numeroase proteine nucleare, împreună cu care formează **cromatina**. În celulele eucariote, funcționează un sistem elaborat de împachetare a ADN-ului. În funcție de gradul de condensare, întâlnim **heterocromatina** și **eucromatina**. Nu tot ADN-ul eucariot este codificator. Inclusiv genele au o structură discontinuă. Astfel, secvențele codificatoare, numite **exoni**, sunt întrerupte de secvențe necodificatoare, numite **introni**.

Temă

1. Alcătuieste un eseu cu tema „Cromozomul la procariote și eucariote”, după următorul plan: *compoziție chimică, localizare în celulă, număr și mărime, structura genelor conținute, replicare*.
2. Argumentează faptul că materialul genetic la eucariote are o organizare superioară celui de la procariote.
3. Completează următoarele fraze lacunare, astfel încât enunțul acestora să fie adevărat:
 - a) Cromozomul bacterian este format din, este atașat de și formează în celulă regiunea numită
 - b) Cromozomii metafazici ai eucariotelor sunt formați din două reunite într-un loc numit ce separă cromozomul în ce pot fi egale sau inegale.
4. Identifică răspunsul corect:
 - I. Plasmidele:
 - a) conțin ARN;
 - b) sunt de formă circulară;
 - c) au dimensiuni mari;
 - d) sunt localizate în cromozomul bacterian.
 - II. Virusurile:
 - a) conțin exclusiv ADN dublucatenar;
 - b) au capsidă de natură lipidică;
 - c) nu se pot reproduce decât în celula-gazdă;
 - d) au organizare celulară procariotă.
 - III. Nucleosomii:
 - a) sunt legați între ei prin ARN linker;
 - b) conțin un miez format din histone;
 - c) sunt formați exclusiv din ADN;
 - e) există în celule procariote și eucariote.

5. CONTROLUL EXPRIMĂRII GENELOR

5.1. REGLAJUL GENETIC LA PROCARIOTE

Activitatea metabolică a celulei bacteriene este reglată genetic, motiv pentru care o celulă simplă poate să răspundă, cu maximă eficiență, la modificările mediului de viață.

Cel mai simplu mecanism de reglaj genetic al activității celulare a fost descris, în 1961, de cercetătorii F. Jacob și J. Monod, care au studiat controlul exprimării genelor ce determină sinteza enzimelor implicate în metabolizarea lactozei la *Escherichia coli*.

Mecanismul de control descris se bazează pe faptul că, în genomul bacterian, există mai multe categorii de gene:

a) genele codificatoare – sunt genele care conțin informația necesară sintezei enzimelor. De regulă, genele codificatoare, ce controlează o anumită cale metabolică, se găsesc alăturate pe cromozomul bacterian, formând o unitate de transcriere. ARNm transcris permite traducerea separată a catenelor polipeptidice (a enzimelor), deoarece molecula sa este presărată cu codoni „Start” și codoni „Stop”, care marchează locul în care începe și în care se sfârșește fiecare secvență codificatoare.

b) operatorul – este reprezentat de un segment de ADN situat în interiorul promotorului sau între acesta și genele codificatoare. Operatorul controlează accesul enzimei ARN-polimeraza la genele codificatoare ale enzimelor lanțului metabolic, activând sau inhibând transcrierea.

c) promotorul – este locul situat pe cromozom, în care ARN-polimeraza se poate lega la ADN, inițiind astfel transcrierea pentru toate genele codificatoare ale enzimelor lanțului metabolic.

Genele codificatoare, împreună cu promotorul și cu operatorul, formează un operon.

În genomul bacterian există mai mulți operoni, fiecare controlând o anumită cale metabolică, care este activată la un moment dat, în funcție de necesitățile celulei.

d) gena reglatoare – controlează activitatea operonului, prin sintetizarea unui semnal proteic, numit **represor**. Conformația spațială a proteinei represor permite legarea reversibilă, într-un loc specific, a inductorului sau, respectiv, a corepresorului, precum și legarea, în alt loc specific, la gena operatoare, determinând astfel o modificare spațială a moleculei, care duce la modificarea activității operonului. Astfel de proteine cu două locuri specifice de legare au primit denumirea de **enzime alosterice**. Inductorii și corepresorii au fost denumiți **efectori alosterici**.

Gena reglatoare este localizată la o anumită distanță înaintea operonului și are propriul promotor.

La procariote, controlul exprimării genelor se manifestă la nivelul transcrierii genetice și se realizează prin **mecanisme** diferite (Fig. 24).

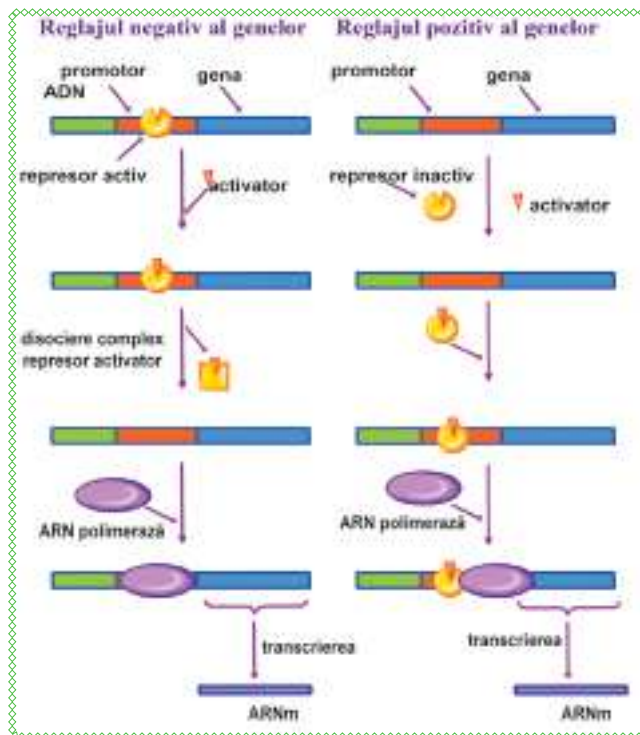


Fig. 24. Reglajul negativ și reglajul pozitiv al transcrierii la bacterii (activator – substanța care se metabolizează).

Reglajul negativ al transcrierii

În continuare, sunt prezentate două mecanisme de reglaj cu efect represiv asupra activității operonului:

- 1) **reglajul represibil** caracterizează sinteza enzimelor căilor anabolice. În mod normal, operonul represibil este activ, deoarece represorul sintetizat este inactiv. Când produsul căii metabolice (**corepresor**) atinge o concentrație optimă, se cuplează cu represorul inactiv, pe care îl activează. Represorul activat recunoaște și leagă operatorul blocând transcrierea genelor codificatoare și, ca urmare, sinteza enzimelor anabolice; de exemplu, funcționarea operonului *trp* (triptofan) de la bacteria *Escherichia coli*.
- 2) **reglajul inductibil** caracterizează sinteza enzimelor căilor catabolice. În acest caz, operonul inductibil este, de regulă, inactiv, deoarece gena reglatoare determină sinteza unui represor activ, care leagă direct operatorul, inhibând transcrierea genelor. Activarea operonului este rezultatul acumulării în mediu a substanței care urmează a fi metabolizată și care leagă represorul, inactivându-l. Substanța se numește **inductor**, deoarece induce funcționarea operonului concretizată în sintetizarea enzimelor necesare propriei catabolizări; de exemplu, funcționarea operonului *lac* (lactoză), de la bacteria *Escherichia coli*.

Reglajul pozitiv al transcrierii

La bacterii, există operoni catabolizanți, a căror funcționare nu este reglată prin represie, ci prin acțiuni stimulative. Este și cazul operonului *mal* (maltoză), ce determină sinteza enzimelor implicate în metabolizarea maltozei. În lipsa maltozei, operonul desfășoară o activitate redusă, enzimele necesare catabolizării maltozei fiind prezente în cantitate mică în mediul celular. Adăugarea maltozei în mediul de viață al bacteriei este urmată de creșterea cantității enzimelor implicate în metabolizarea ei. Sub acțiunea maltozei, se produce o inducție enzimatică controlată de gena reglatoare,

care determină sinteza unei proteine ce formează, împreună cu maltoza, un complex cu efect stimulator al activității operonului *mal*.

Reglajul prin retroinhibiție

Este o altă cale, mai simplă și mai rapidă, de control al activității metabolice a celulei. Astfel, când produsul final al unei căi metabolice este acumulat în concentrație mare, el se cuplează cu prima enzimă a lanțului metabolic, blocând întreaga lui desfășurare. Activitatea căii metabolice este reluată odată cu scăderea concentrației produsului final din celulă.

5.2. REGLAJUL GENETIC LA EUCARIOTE

Organismele eucariote conțin o mare cantitate de material genetic cu organizare complexă nucleosomală, ceea ce face ca mecanismele de reglaj al exprimării genelor să fie mult mai complicate și mai diversificate decât la procariote (Fig. 25).

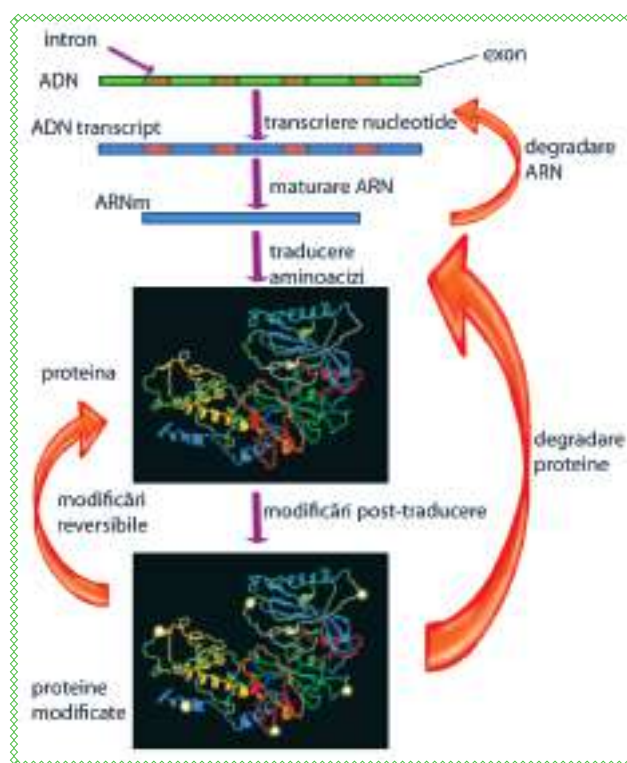


Fig. 25. Reglajul genetic al sintezei proteinelor la eucariote.

Activitatea genelor este reglată prin **două tipuri principale de reglaj**:

1) reglajul genetic pe termen scurt se bazează pe mecanisme moleculare reversibile, determinate de modificări apărute în activitatea unor gene, urmate de fluctuații în declanșarea și intensitatea proceselor de transcriere și traducere. Structura nucleosomală a cromozomului eucariot menține în stare represată informația genetică, la nivelul moleculei de ADN, motiv pentru care este necesară decondensarea fibrei de cromatină. Aceasta se realizează în mod selectiv, de către proteine reglatoare, din care fac parte și proteinele nonhistonice. În zonele activate, proteinele histonice sunt modificate prin procese de acetilare, fosforilare, metilare, acestea determinând interacțiunea cu ADN-ul. Modificarea histonelor și interacțiunea lor cu proteinele nonhistonice asigură condiții pentru inițierea transcripției. Realizarea transcripției nu depinde numai de activarea moleculei de ADN, un rol important jucându-l și prezența precursorilor ARN și a transcriptazei. Reglarea sintezei proteice la nivelul traducerii depinde de viteza de asamblare și de funcționare a poliribozomilor, de cantitatea diverselor tipuri de ARNt care transportă aminoacizii la locul sintezei proteice.

2) reglajul genetic pe termen lung, de regulă, se bazează pe modificări ireversibile ale materialului genetic, care se fixează în „memoria” celulei și se transmit constant în descendență.

Multitudinea mecanismelor de reglaj pe termen lung se bazează pe modificări la nivelul structurii cromozomilor, al succesiunii genelor în cadrul grupelor de linkage, al mecanismelor de distribuție a mutațiilor, precum și pe modificări care vizează funcționarea informației în ontogeneză sau în distrucția programată a unor gene.

Reglajul genetic al activității metabolice a organismelor eucariote se realizează la toate **nivelurile de organizare a materialului genetic**, după cum urmează:

a) Reglajul genetic la nivelul cromozomilor.

Un exemplu de acest tip de reglaj genetic îl reprezintă heterocromatinizarea unuia dintre cei doi cromozomi X de la femelele mamiferelor, ale cărui gene devin ireversibil inactive. Apariția cromatinei

sexuale la femelele mamiferelor reprezintă un tip de reglaj genetic pe termen lung, cu rol important în reducerea diferențelor morfologice, fiziologice și comportamentale dintre masculi și femele care, în caz contrar, probabil că nu s-ar mai recunoaște în cadrul aceleiași specii.

b) Reglajul genetic la nivelul fibrei de cromatină. Reprezintă un mecanism de reglaj genetic pe termen lung și asigură specializarea structurală și funcțională a celulelor și a țesuturilor organismului eucariot multicelular, în cursul dezvoltării embrionare. Deși au aceleași gene, celulele unui organism au structură și roluri diferite, deoarece sunt exprimate numai genele din regiunile eucromatice ale cromozomilor lor. Genele situate în regiunile de heterocromatină, în mod obișnuit, nu sunt funcționale. Efectul represiv al heterocromatinei a fost demonstrat experimental la drojdia de bere, prin inserția genelor active transcripțional în zonele de heterocromatină; în scurt timp, aceste gene au devenit inactive.

c) Reglajul genetic la nivelul genelor. Se realizează individual, fiecare genă fiind activată sau inhibată prin sistemul inductibil, ca răspuns la stimulii veniți din mediul intern sau din mediul extern.

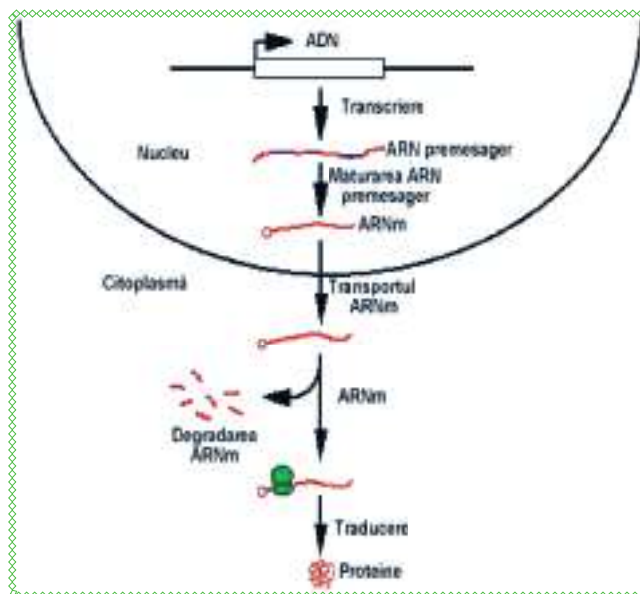


Fig. 26. Cele 5 niveluri de reglaj genetic al activității metabolice la eucariote.

Acest tip de reglaj genetic prezintă **cinci trepte de realizare** (Fig. 26):

➤ **Reglajul genetic la nivelul transcrierii.** Prin acest tip de reglaj sunt selectate acele gene ce urmează a fi copiate într-un ARN pre-mesager, în funcție de necesitățile celulei la un moment dat.

➤ **Reglajul genetic la nivelul maturării ARN-ului pre-mesager.** Acesta constă în selectarea moleculelor de ARN pre-mesager, care este supus maturării prin eliminarea intronilor și asamblarea exonilor. Se formează un ARN mesager capabil să participe la traducerea genetică.

➤ **Reglajul genetic la nivelul transportului ARN-ului mesager.** Nu toate moleculele de ARNm sintetizate vor migra prin porii membranei nucleare în citoplasmă, ci, mai întâi, vor trece printr-un proces de selecție.

➤ **Reglajul genetic la nivelul traducerii.** Ca și transcrierea, traducerea poate fi ținta reglajului

genetic, atât în faza de inițiere, cât și în faza de terminare a sintezei proteice. Posttraducere, reglajul genetic se poate realiza prin împiedicarea agregării lanțurilor polipeptidice sintetizate sau prin degradarea lor.

➤ **Reglajul genetic la nivelul degradării ARNm.** O parte dintre moleculele de ARNm ajunse în citoplasma celulei sunt supuse unui proces de degradare.

Reține!

Deși există diferite tipuri de reglaj genetic, cel mai important este cel care se realizează la nivelul transcrierii genetice.

REZUMAT

- ⊙ Reglajul exprimării genelor se face prin mecanisme diferite la procariote și eucariote, care corespund diferențelor în ceea ce privește organizarea materialului genetic între cele două tipuri de celule.
- ⊙ La procariote, reglajul este negativ sau pozitiv și se realizează la nivelul transcrierii. Reglajul negativ se realizează fie printr-un mecanism represibil, fie printr-un mecanism inductibil, în funcție de starea activă sau, respectiv, inactivă a operonului. Reglajul pozitiv se bazează pe stimularea activității operonului implicat.
- ⊙ La eucariote, acționează mecanisme moleculare reversibile, care determină un reglaj genetic pe termen scurt, și mecanisme ce produc modificări ireversibile, ce se transmit descendențelor și care realizează reglajul pe termen lung. De asemenea, la eucariote, mecanismele de reglaj acționează la mai multe niveluri, și anume: la nivelul cromozomilor, al fibrei de cromatină și al genelor. La nivel genic, exprimarea genelor este controlată în toate etapele cuprinse între transcriere și posttranscriere.

Temă

1. Completează un tabel comparativ cu tipurile de gene implicate în reglajul genetic la procariote, analizând localizarea, rolul și starea lor în diferitele categorii de reglaj.
2. Explică de ce la eucariote mecanismele de reglaj sunt mai variate față de procariote. Ce consecințe ar fi avut absența reglajului genetic la nivelurile cromozomului X și ale fibrei de cromatină?
3. Realizează o schemă cu cele 5 trepte de reglaj la eucariote, pentru situația ipotetică în care o genă cu 4 introni și 3 exoni ar fi implicată într-o sinteză proteică. Poți să dezvolti problema și să alegi și succesiunea de nucleotide.
4. Analizează și explică de ce nu există reglajul genetic pe cele 5 niveluri, reglaj prezent la eucariote.

5. Asociază tipurile de reglaj genetic la procariote, notate în prima coloană, cu particularitățile corespunzătoare, din a doua coloană:

A. reglaj inductibil	a. rol în sinteza enzimelor căilor anabolice
B. reglaj represibil	b. produsul final al căii metabolice inactivează prima enzimă a lanțului metabolic
C. reglaj prin retroinhibiție	c. substanța care urmează a fi metabolizată inactivează represorul

6. Precizează care sunt avantajele reglajului genetic pe termen lung. Cum asigură corelarea structură – funcție la nivel celular? Exemplifică.

6. GENOMICA – O NOUĂ RAMURĂ A GENETICII

6.1. GENOMICA STRUCTURALĂ ȘI FUNCȚIONALĂ

Genomul reprezintă cantitatea totală de ADN a unei celule haploide (sau jumătate din cantitatea de ADN a unei celule diploide).

Data fiind complexitatea genomului, a apărut o nouă știință: **genomica**. Genomica este o ramură a geneticii, care studiază *cartarea, secvențierea și analiza funcțională a întregului genom*.

Genomica, la rândul său, include două domenii: **genomica structurală** și **genomica funcțională**.

Genomica structurală studiază structura genomului, prin intermediul cartării și al secvențierii setului complet de molecule ADN din celulă (adică de cromozomi).

Cartarea genomului este prima etapă în analiza unui genom și constă în realizarea de hărți detaliate, care permit localizarea și izolarea genelor, precum și ordonarea diferitelor secvențe de ADN. Ordonarea secvențelor de ADN stă la baza secvențierii, următoarea etapă în descifrarea structurii genomului.

Secvențierea este o tehnică moleculară care permite identificarea succesiunii de nucleotide din moleculele de ADN.

Genomica structurală este mai avansată, întrucât, până în prezent, s-au realizat hărți citologice, genetice și fizice și au fost secvențiate genomurile mai multor organisme, inclusiv genomul uman.

Genomica funcțională folosește asemănările dintre diferite secvențe, precum și comparațiile în ceea ce privește ordinea genelor, pentru a determina funcția genelor și relațiile filogenetice dintre organisme.

Genomica oferă informații nu numai cu privire la gene și la interacțiunile dintre ele, ci și informații cu privire la interacțiunile dintre gene și mediu (intern sau extern). Așadar, genomica studiază genomurile, pornind de la analiza secvențelor de ADN și până la răspunsul organismului la factorii de mediu.

În afară de genomică, au mai apărut și alte discipline care vin să completeze informațiile cu privire la procesele complexe desfășurate la nivel molecular în celule. Astfel, **transcriptomica** stu-

diază setul complet de molecule ARN, transcris într-un genom, iar **proteomica** analizează toate proteinele codificate de genom.

Câteva caracteristici ale genomului eucariot

Genomul eucariotelor este mult mai mare și mai complex, comparativ cu genomul procariotelor. La procariote, un genom are în medie 2×10^6 pb, în timp ce la mamifere conține 2×10^9 pb.

Eucariotele au celule înalt specializate, în care există mecanisme ce activează sau inactivează genele, ca răspuns la stimuli interni sau externi. Ca urmare, celulele înalt specializate exprimă, în medie, doar 3-5% dintre gene.

Reglajul genelor la eucariote, la fel ca la procariote, se bazează pe interacțiunea ADN-proteine.

Genomul eucariotelor cuprinde, pe lângă genomul nuclear, și genomul organitelor, care conține informație genetică vitală. Genomul organitelor se referă la genomul mitocondrial, prezent la toate eucariotele, și la genomul cloroplastidian, din celulele vegetale.

În genom, se găsesc trei categorii de secvențe: *codificatoare* (genele), *necodificatoare cu rol funcțional* și *necodificatoare nefuncționale*, cel puțin în aparență (de exemplu: ADN-ul repetat).

Spre deosebire de secvențele funcționale, celelalte categorii de secvențe nu au localizare fixă și suferă frecvent rearanjamente. Ca urmare, genomul nu este o structură fixă, rigidă, ci o structură dinamică, în continuă transformare.

Reține!

La eucariote, genomului nuclear i se adaugă genomurile extranucleare: mitocondrial și cloroplastidian.

6.2. METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL GENOMULUI

Din cauza complexității genomurilor, studiul acestora necesită tehnici moleculare de mare sensibilitate.

Unele tehnici au fost dezvoltate special pentru a permite identificarea secvențelor de nucleotide,

în timp ce altele sunt tehnici de bază în genetica moleculară.

Pentru exemplificare, am ales două tehnici utilizate frecvent în cercetările de nivel molecular: **electroforeza ADN** și **metoda PCR** (*polymerase chain reaction* – reacție de polimerizare în lanț).

A. Electroforeza ADN

Electroforeza ADN se bazează pe faptul că moleculele de ADN migrează când sunt supuse unui curent electric, iar viteza de migrare depinde de mărimea moleculei. Metoda implică două etape:

I. separarea moleculelor în gel de agaroză sau poliacrilamidă;

II. vizualizarea moleculelor.

În prima etapă, probele sunt încărcate în gel, iar gelul este supus unui curent electric. Moleculele ADN vor migra în gel.

După un anumit interval de timp (de obicei, după câteva ore), gelul este imersat într-un colorant, iar în gel, în locația corespunzătoare moleculei, va apărea o bandă întunecată. Moleculele de dimensiuni diferite se vor vizualiza sub forma unor benzi diferite în gel (Fig. 27).

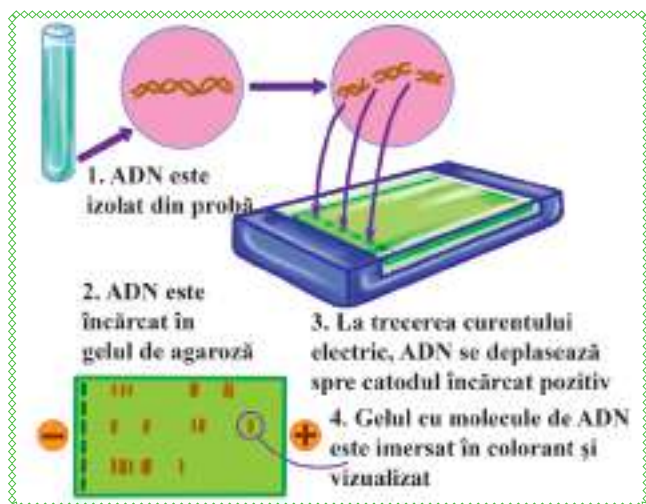


Fig. 27. Reprezentare schematică a electroforezei în gel de agaroză.

B. Reacția PCR (reacție de polimerizare în lanț)

Reacția PCR este o metodă de amplificare enzimatică a unei anumite secvențe de ADN. Din punct de vedere chimic, reacția PCR este constituită din cicluri succesive de replicare ADN *in vitro*. Reacția folosește ca primeri două secvențe foarte scurte de ADN, care se leagă, prin complementaritate, la cele două catene ale secvenței originale (**primeri ADN**).

Diferența dintre o asemenea reacție de replicare și replicarea *in vivo* o reprezintă faptul că în reacția PCR se folosește o singură enzimă (**ADN-polimeraza**).

Principalele etape ale reacției PCR sunt următoarele:

- **desfacerea** dublu-helixului, adică denaturarea ADN-ului (ADN dublucatenar → ADN monocatenar);
- **atașarea** primerilor la secvența originală, numită ADN-matriță;
- **alungirea** catenei, prin adăugarea de deoxiribonucleotide care se găsesc în mediul de reacție.

Ca rezultat al unui singur ciclu de amplificare, cantitatea de ADN inițială se dublează. În medie, într-o reacție PCR se practică 30-40 de cicluri de replicare, așa încât se pot obține cantități mari dintr-o singură secvență (Fig. 28). Ulterior, aceste molecule pot fi analizate prin alte tehnici moleculare.

Semnificativ este faptul că tehnica PCR este indispensabilă în orice cercetare de nivel molecular.

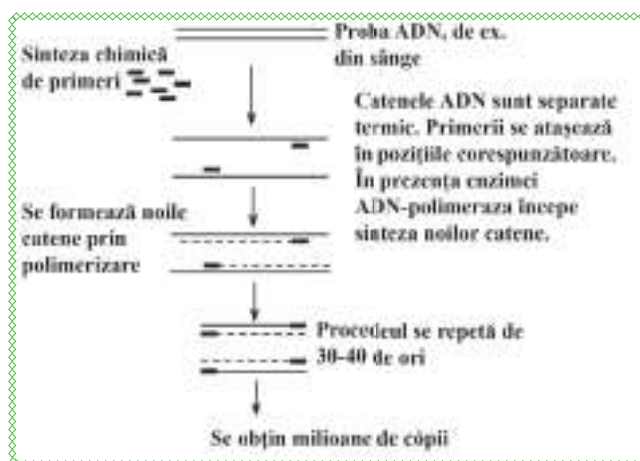


Fig. 28. Etapele reacției de polimerizare în lanț (PCR).

REZUMAT

- ⊙ Genomul reprezintă cantitatea totală de ADN a unei celule haploide.
- ⊙ Genomica este o ramură a geneticii și studiază cartarea, secvențierea și analiza funcțională a întregului genom. Include două domenii: **Genomica structurală** și **Genomica funcțională**. În afară de genomică, au mai apărut și alte discipline complementare, precum: **transcriptomica** și **proteomica**.
- ⊙ Genomul eucariot conține trei categorii de secvențe: **codificatoare** (genele), **necodificatoare** cu rol funcțional și **necodificatoare nefuncționale**.
- ⊙ Dată fiind complexitatea genomurilor, studiul acestora necesită tehnici moleculare de mare sensibilitate, ca de exemplu: **electroforeza ADN** și **metoda PCR** (reacție de polimerizare în lanț).

Temă

1. Argumentează următoarea afirmație: „Genomica funcțională poate determina relațiile filogenetice dintre reptile și păsări”.
2. Evidențiază și precizează care sunt efectele și avantajele diversificării materialului genetic la eucariote.
3. Identifică și notează varianta corectă pentru următorii itemi:

I. Genomul eucariotelor:

- a) este cantitatea de ADN din nucleu;
- b) se exprimă în totalitate, indiferent de tipul de celulă;
- c) include și informația genetică a mitocondriilor;
- d) reprezintă toată cantitatea de acizi nucleici dintr-o celulă 2n.

II. Reacția PCR:

- a) cuprinde și replicarea ADN in vitro;
- b) utilizează mai multe tipuri de enzime;
- c) are ca primă fază atașarea unor primeri;
- d) determină desfăcerea legăturilor fosfodiesterice.



LUCRĂRI PRACTICE

I. Modelarea structurii secundare a ADN-ului

Materiale necesare:

- cutii de scobitori diferit colorate (galbene pentru adenină, verde pentru timină, roșu pentru citozină și albe pentru legătura zahar-fosfat);
- boabe de mazăre înmuiate în apă, peste noapte;
- cârlige, ață.

Etapele de lucru:

1. Se completează tabelul următor cu bazele azotate corespunzătoare catenei complementare:
TAA GTA CCG CTA
.....
2. Se construiește prima catenă cu ajutorul boabelor de mazăre. Se ține cont de culoarea scobitorilor, care trebuie să corespundă bazei azotate, conform indicațiilor inițiale.
3. Se unesc între ele cele două catene, folosind ca modalitate de legare tot boabele de mazăre.
4. ADN-ul dublucatenar construit se agață de un suport cu ajutorul cârligelor și se încearcă să i se dea configurația de dublu-helix.

5. Se identifică secvența de aminoacizi corespunzătoare nucleotidelor din dublul-helix ADN, folosind datele din figura 13 (codul genetic).

II. Evidențierea microscopică a cromozomilor prin metoda feulgen de colorare rapidă cu fuxină bazică

Cu ajutorul metodei Feulgen, se pot studia:

- desfășurarea diviziunii celulare (mitoza și meioza);
- numărul și morfologia cromozomilor, caracteristice fiecărei specii;
- modificările numerice și morfologice determinate de acțiunea factorilor mutageni și de recombinările intraspecifice și interspecifice etc.

Materiale necesare: radicele de ceapă (*Allium cepa*, $2n = 16$), bob (*Vicia faba*, $2n = 12$), lame, lamele, alcool etilic, xilen, acid acetic glacial, fuxină bazică, carmin-acetic, orceină-acetică.

Etapele de lucru:

1. **Obținerea radiclelor.** Semințele de bob (*Vicia faba*) se pun pe hârtie de filtru umezită cu apă, iar bulbii de ceapă se plasează deasupra unor vase cu apă de robinet, astfel încât discul bulbului să se găsească în apă, la temperatura camerei. Se recomandă ca apa să fie schimbată zilnic. Radicelele se recoltează cu ajutorul unui ac spatulat sau al unei foarfece, după 2-3 zile, când ating lungimea de 5-10 mm.

Studiul numărului și al morfologiei cromozomilor se realizează în metafază (vezi figura), când aceștia sunt bine individualizați. Pentru a obține un număr cât mai mare de metafaze, se recomandă ca semințele germinate să fie supuse unui tratament termic (vasele cu semințe germinate se introduc în frigider, timp de 30-60 de minute, după care se transferă într-un termostat reglat la 30°C sau sub o lampă de birou, pentru 1-2 ore).

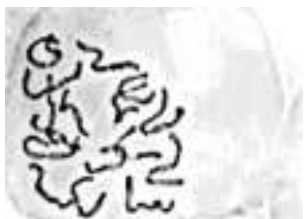
2. **Prefixarea.** Radicelele recoltate sunt puse în fiole de sticlă sau flacoane de medicamente cu o capacitate de 10 ml, în soluție de α -bromnaftalenă și hidroxichinoleină 0,03%, la care se adaugă 2-3 picături de colchicină 0.1-1%. Prefixarea durează 3-5 ore, timp în care are loc blocarea fusului de diviziune sau distrugerea lui, ceea ce permite o mai bună etalare a cromozomilor metafazici.

3. **Fixarea** radiclelor se face prin înlocuirea prefixatorului din fiole cu alcool etilic absolut, acid acetic glacial 3:1 sau cu fixator Carnoy (6 părți alcool etilic absolut, 3 părți acid acetic glacial și 1 parte cloroform) și se păstrează la temperatura de 4°C , timp de 12-15 ore. Fixatorul are rolul de a omorî celulele și de a conserva structura acestora.

4. **Hidroliza** determină macerarea peretelui celular al celulelor din vârful vegetativ al radiclelor, ușurând, astfel, etalarea lor pe lama de sticlă. Se face cu acid clorhidric (HCl) 1N care înlocuiește fixatorul din fiole, într-un termostat reglat la 60°C . Timpul de hidroliză depinde de compoziția peretelui celular și este caracteristic fiecărei specii (10-20 de minute pentru ceapă).

5. **Colorarea** radiclelor se realizează cu o soluție de fuxină bazică incoloră (reactivul Schiff), care colorează cromozomii în roșu-violaceu. O colorație mai accentuată se observă la nivelul vârfului vegetativ al radiclei, deoarece celulele de aici sunt active mitotic. Soluția de fuxină bazică (2-3 ml) se adaugă după îndepărtarea acid clorhidric și spălarea cu apă distilată a radiclelor. Pentru intensificarea colorației se recomandă montarea radiclelor pe lamă, într-o picătură de carmin-acetic sau orceină acetică.

6. **Realizarea preparatelor microscopice.** Se efectuează preparate de tip squash.



Cromozomii metafazici la *Allium cepa*



Metafaza mitotică la *Allium cepa*



Faze ale mitozei la *Allium cepa*

EVALUARE

I. Asociere

1 Realizează asocierea dintre nivelurile de reglaj genetic și descrierea proceselor caracteristice fiecărui nivel:

- A.** reglajul maturării ARNm;
- B.** reglajul transcripțional;
- C.** reglajul degradării ARNm;
- D.** reglajul transportului ARNm;
- E.** reglajul translațional.

- a.** se elimină intronii;
- b.** se selectează ARNm matur ce va părăsi nucleul;
- c.** se aleg genele ce vor fi copiate;
- d.** se selectează ARNm ce va fi descompus;
- e.** se selectează ARNm ce va fi tradus în proteină.

2 Realizează asocierea dintre caracteristicile codului genetic și definiția lor:

- A.** nesuprapus;
- B.** fără virgule;
- C.** degenerat;
- D.** universal.

- a.** citirea informației se face continuu;
- b.** mai mulți codoni codifică același aminoacid;
- c.** aceleași triplete codifică aceiași aminoacizi în lumea vie;
- d.** doi codoni vecini nu au nucleotide comune.

3 Realizează asocierea dintre caracteristicile ADN-ului și definiția lor:

- A.** dublu-helix;
- B.** catene antiparalele;
- C.** denaturare;
- D.** catene complementare.

- a.** legături intercatenare între o bază purinică și una pirimidinică;
- b.** două catene înfășurate în jurul unui ax comun imaginar;
- c.** ruperea punților de hidrogen la încălzirea soluției ADN;
- d.** catene cu sensuri diferite.

4 Realizează asocierea dintre tipurile de enzime și procesele în care intervin:

- A.** ADN-polimerază;
- B.** peptid-polimerază;
- C.** ARN-polimerază;
- D.** aminoacil-sintetază.

- a.** unirea aminoacizilor prin legături peptidice;
- b.** transcripția informației de la ADN la ARN;
- c.** activarea aminoacizilor;
- d.** replicația ADN.

5 Realizează asocierea dintre tipurile de ARN și funcțiile lor:

- A.** ARNm;
- B.** ARNt;
- C.** ARNr;
- D.** ARN viral.

- a.** transferă aminoacizii la nivelul ribozomilor;
- b.** copiază informația genetică de pe o catenă ADN;
- c.** se autocopiază;
- d.** intră în structura ribozomilor.