



REPLICAREA ȘI REPARAREA ADN

Replicarea ADN este procesul molecular prin care se realizează copierea exactă a moleculelor de ADN (a secvenței nucleotidice). Datorită replicării are loc transmiterea exactă a mesajului genetic de la o generație de celule la alta, astfel toate celulele organismului pluricelular conțin aceeași informație ereditară.

Procesul de sinteză a ADN este, de regulă, exact. Dintr-o moleculă de ADN se formează două molecule identice atât între ele, cât și cu molecula parentală. Acest proces are loc datorită particularităților de structură ale ADN:

- ADN este bicatenar;
- catenele ADN sunt complementare și antiparalele.

Principalele caracteristici ale replicării sunt:

- sinteza replicativă a ADN-ului este **semiconservativă**, deoarece, cel mai des, fiecare din cele două catene este folosită ca matriță pentru sinteza unei catene noi de ADN;
- sinteza este bidirecționată;
- polimerizarea nucleotidelor are loc doar în direcția $5' \rightarrow 3'$;
- procesul implică participarea mai multor factori proteici.

Aparatul de replicare

Aparatul de replicare include ADN-matriță cu punctul de origine, nucleozide trifosfați cât și proteine pentru

despiralizarea helixului de ADN, inițierea replicării, polimerizarea nucleotidelor etc.

Originea replicării

Originea replicării este reprezentată de o secvență specifică de nucleotide numită secvență autonomă de replicare **ori**. Unitatea capabilă de replicare independentă se numește un singur replicon, la eucariote ADN conține mai multe puncte de origine, deci mai mulți repliconi. În tabelul 7.1. sunt prezentate datele privind numărul de repliconi per genom, lungimea medie a unui replicon și viteza de polimerizare la diferite

Tabelul 7.1. Unele caracteristici ale repliconilor

Organismul	Nr. de repliconi	Lungime medie, kb	Viteza replicării, pb/min
<i>E. coli</i>	1	4200	30000
<i>S. pombe</i>	500	40	3600
<i>D. melanogaster</i>	3500	40	2600
<i>M. musculus</i>	25000	150	2200
<i>Homo sapiens</i>	10^5 - 10^6	100-1000	3000

organisme.

Secvența **ori** are următoarea structură :

AUX-2 — A/T — ORE — DUE — AUX-1

ORE – secvența ADN-ului la care se unesc proteinele situs-specifice și proteinele replicării;

DUE - situsul care ușor se despiralizează, este sensibil la nucleaze și nesensibil la mutații;

A/T – situsul ce reglează activitatea helicazei;

AUX-2 și AUX-1 - situsuri ce se unesc cu factorii de inițiere ai replicării cu specificitate înaltă.

La procariote punctul de origine este fixat de membrana plasmatică, iar la eucariote se fixează cu metaloproteine de axa proteică a cromozomilor (**SAR**).

Proteinele aparatului de replicare

Replicarea ADN implică acțiunea mai multor factori proteici și enzime (fig. 7.1).

ADN-helicazele realizează despiralizarea și denaturarea locală a moleculei de ADN prin hidroliza ATP. Datorită existenței a două furci replicative există două helicaze care se deplasează în direcții opuse de la punctul de origine a

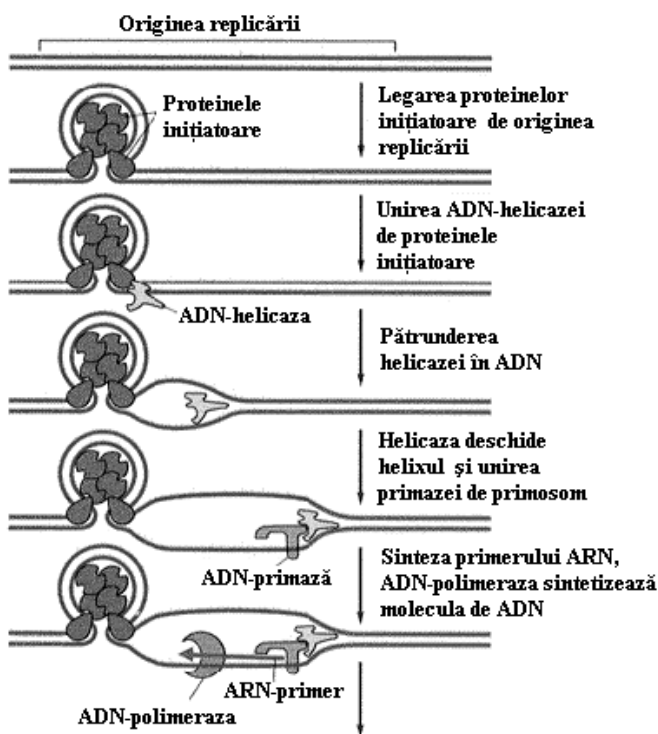


Fig. 7.1. Enzimele aparatului de replicare

replicării.

Primaza este enzima cu activitate ARN-polimerazică care inițiază replicarea ADN prin sinteza unei secvențe de 11-12 ribonucleotide, care este numită **primer** (ARN-primar).

Helicazele împreună cu primaza formează complexul **primozom**.

Topoizomerazele de tip I scindează legăturile fosfodiesterice ale unei catene, relaxând dublul helix prevenindu-se supraspiralizarea ADN. **Topoizomerazele de tip II** taie ambele catene ale duplexului.

Proteinele ce se leagă de ADN monocatenar (proteine SSB) - factori ce stabilizează catenele de ADN în regiunile denaturate și împiedică refacerea structurii dublucatenare prin unirea celor două catene, sau în cadrul aceleiași catene în regiunile cu secvențe palindromice (fig. 7.2).

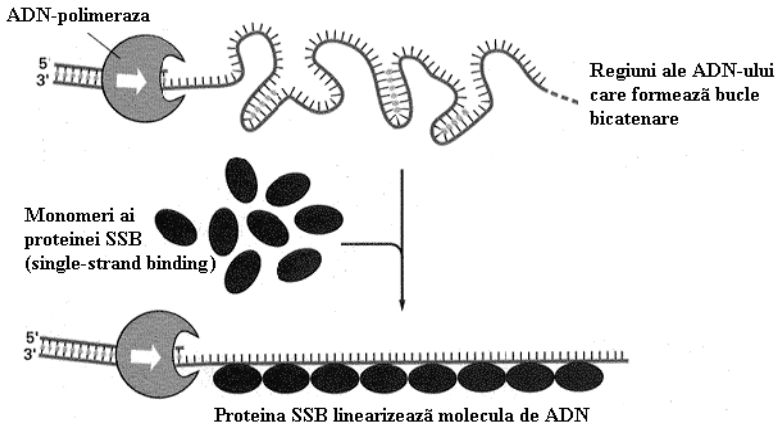


Fig. 7.2. Stabilizarea monocatenei de ADN în timpul replicării

ADN-polimerazele sunt enzime capabile să sintetizeze catene noi de ADN pe catenele matrițe. Au fost descoperite mai multe clase de ADN-polimeraze: α , β , γ , δ , ϵ – la eucariote și I, II și III - la procariote (tab. 7.2).

Capitolul 7

Tabelul 7.2. Caracteristica ADN-polimerazelor la eucariote

ADN polimeraza	α	δ	ϵ	β	γ
Localizarea	Nucleu	Nucleu	Nucleu	Nucleu	Mitocondrii
Funcția sintetică	Sinteza primerilor	Sinteza ADN	Reparație	Reparație	Replicare
Funcții suplimentare	-	Exonuclează	Exonuclează	-	Exonuclează

Activitatea polimerazică are următoarele particularități:

- sinteza se produce doar în direcția $5' \rightarrow 3'$ prin adăugarea nucleotidului la gruparea $3'\text{-OH}$ a pentozei (fig. 7.3);
- citirea are loc doar în direcția $3' \rightarrow 5'$;
- pentru sinteză se utilizează precursori trifosfați, care pierd în reacție două grupe fosfat;
- ADN-polimeraza nu poate iniția sinteza unei catene noi de ADN, ele au capacitatea doar de a extinde o catenă preexistentă de ADN sau *ARN-primer*.

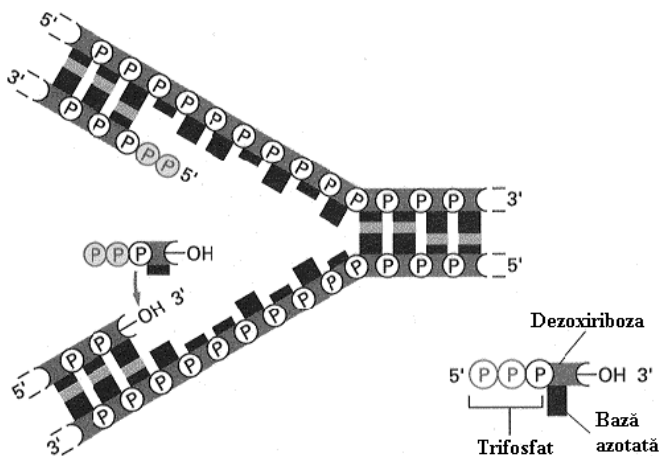


Fig. 7.3. Activitatea ADN-polimerazelor

De rând cu activitatea sintetică, ADN polimeraza conține subunități care prezintă activitate nucleazică pentru scindarea ARN-primerului din fragmentele de ADN sintetizate sau excizia nucleotidelor în procesul de corecție a erorilor introduse în timpul replicării.

ADN–ligaza este enzima ce leagă capetele fragmentelor de ADN sintetizate prin formarea legăturilor 3' → 5' fosfodiesterice.

Mecanismul replicării

Sinteza începe prin despiralizarea catenelor de ADN și formarea **furcii de replicare**. Fiecare catenă reprezintă o matriță pentru catena nou formată. Despiralizarea este necesară pentru expunerea bazelor celor două catene în așa mod ca noile baze să le poată recunoaște și să formeze perechea complementară. Sinteza decurge bidirecțional: de la fiecare punct de origine se formează două furci replicative în direcții opuse față de origine (fig. 7.8).

Replicarea necesită un complex proteic numit **replizomă** care recunoaștere punctul de origine a acesteia și o inițiază. Proteina / proteinele de recunoaștere (la drojdii sunt cunoscute cinci proteine) se leagă de **ori** și inițiază despiralizarea locală a ADN în situsul *DUE*.

Complexul multifерmentativ, numit replizoma, se mișcă de-a lungul ADN-ului și efectuează sinteza pe ambele catene ale furcii. Replicarea ar putea fi văzută ca creșterea continuă a celor două catene de ADN în dublul helix. Este necesar de accentuat că:

- ☐ citirea matriței se efectuează doar în direcția 3' → 5';
- ☐ sinteza catenei noi se efectuează doar în direcția 5' → 3'.

În furca de replicare (fig. 7.4):

Capitolul 7

- **catena – matriță $3' \rightarrow 5'$** de ADN se numește **catenă – lider**, se citește în direcția $3' \rightarrow 5'$; catena fiică este sintetizată neîntrerupt în direcția $5' \rightarrow 3'$;
- **catena - matriță $5' \rightarrow 3'$** este numită **catenă – întârziată**, se citește la fel în direcția $3' \rightarrow 5'$; catena fiică se sintetizează la fel în direcția $5' \rightarrow 3'$ discontinuu, pe fragmente, cunoscute ca **fragmente Okazaki**. Lungimea fragmentelor Okazaki este de 1000-2000 de nucleotide la procariote și de 100-200 de nucleotide la eucariote.

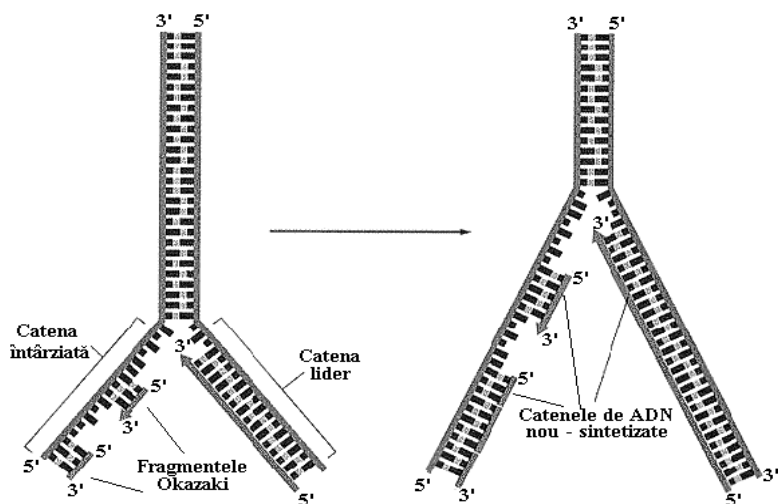


Fig. 7.4. Mecanismul replicării într-o furcă replicativă

Conform ipotezei lui Artur Cornberg, catena întârziată, este inversată la 180° (este aplicată pe sine însăși). Astfel moleculele ADN-polimerazei unite cu alte proteine ale repliconului determină sinteza concomitentă a ambelor catene.

La întâlnirea a două furci replicative procesul de replicare se stopează. Enzima ADN-ligaza unește între ele fragmentele Okazaki.

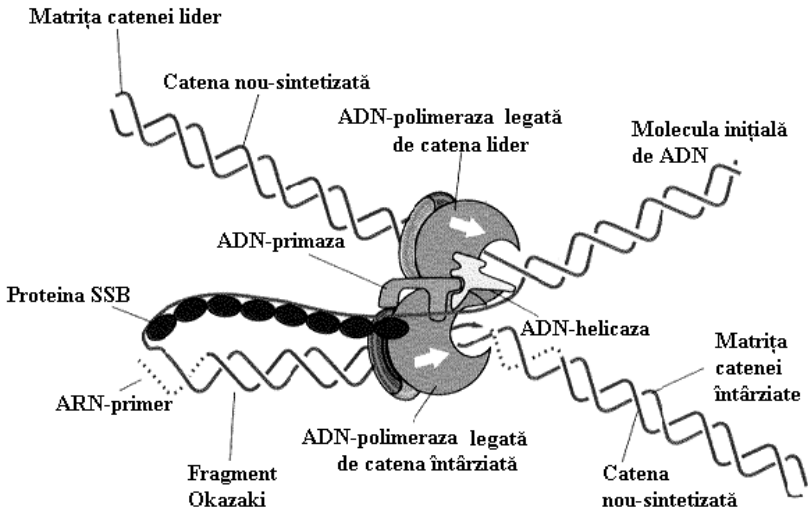


Fig. 7.5. Topografia replicării conform ipotezei lui A. Kornberg

Etapele replicării

1. **Inițierea** include următoarele procese:
 - ↳ atașarea replizomului la punctul de origine al replicării și despiralizarea locală a helixului ADN de către helicaze;
 - ↳ sinteza ARN–primerului – o secvență scurtă de ribonucleotide – de către primază (o enzimă cu activitate ARN-polimerazică);
 - ↳ adăugarea dezoxiribonucleotidelor complementare matriței la capătul 3' al primerului realizată de ADN polimerază.
2. **Elongarea** se caracterizează prin alungirea catenelor nou - sintetizate înfăptuită de ADN-polimerază, ce se deplasează rapid de-a lungul catenelor de ADN, făcând posibilă sinteza pe ambele părți ale furcii într-un mod coordonat și eficient. Evenimentele principale sunt:
 - ↳ creșterea continuă a catenei lider;

Capitolul 7

- ↳ sinteza discontinuă a fragmentelor Okazaki;
- ↳ controlul erorilor de împerechere a bazelor în timpul replicării și înlăturarea lor, înfăptuită de o exonucleaza $3' \rightarrow 5'$ din componența ADN-polimerazei.
- 3. **Terminarea** include următoarele procese:
 - ↳ înlăturarea ARN–primerilor de către o componentă enonucleazică $5' \rightarrow 3'$ a polimerazei;
 - ↳ înlocuirea golurilor de către ADN-polimerază;
 - ↳ unirea capetelor fragmentelor catenelor de ADN sintetizate cu ajutorul ADN-ligazei.

Modele de replicare

Moleculele circulare ale procariotelor (nucleoidul, plasmidele) se replică prin mecanismul replicării de tip θ . Din situsul **ori** pornesc concomitent două furci replicative, ceea ce duce la formarea unor structuri asemănătoare cu litera grecească θ (teta) (fig. 7.6).

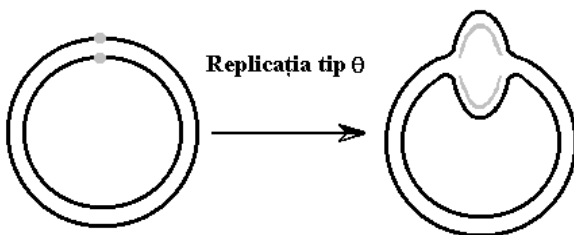


Fig. 7.6. Replicarea de tip θ la procariote

La unii virusi, a unor celulele procariote și eucariote, există un alt tip de replicare: replicarea după modelul inelului rotitor (replicare de tip σ). Nucleaza produce o ruptură monocatenară cu formarea capetelor libere $5'-P$ și $3'-OH$. ADN-polimeraza sintetizează o moleculă complementară în direcția $5' \rightarrow 3'$ prin rotirea matriței ADN. Capătul $5'$ se depărtează de molecula inelară și servește ca matriță pentru

sinteza unei alte catene de ADN. Concomitent se pot obține mai multe copii ale genomului viral, care mai târziu se separă prin excizie cu endonucleaze specifice (fig.7.7., A).

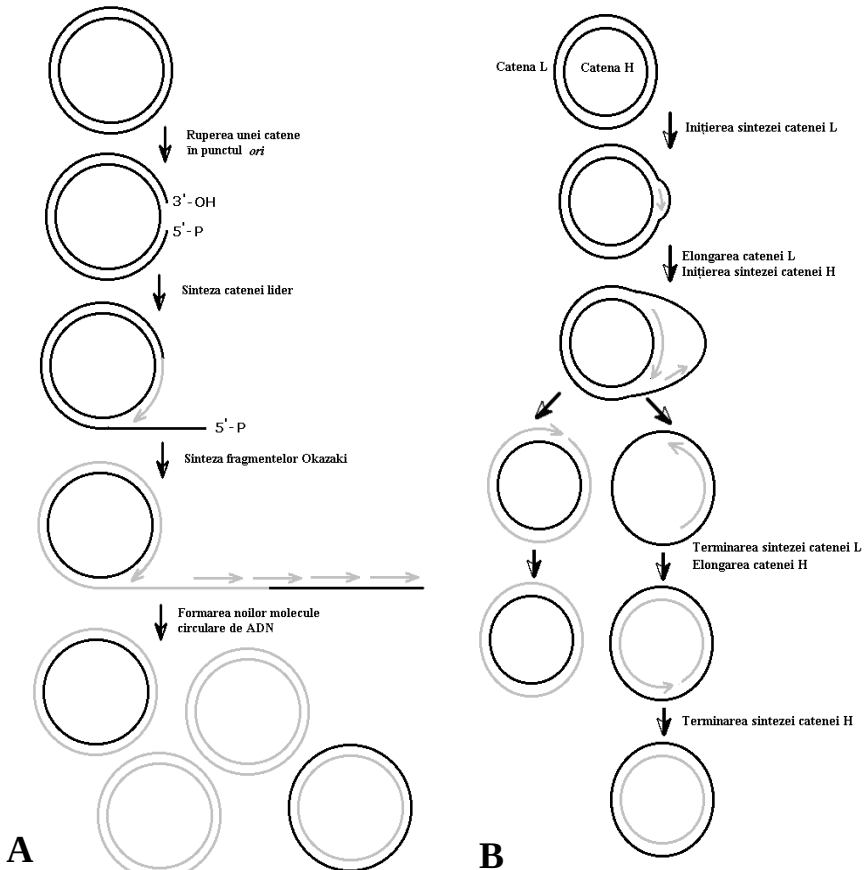


Fig. 7.7. A. Replicarea de tip σ la virusuri.
B. Replicarea de tip D în mitocondrii

În ADN mitocondrial, care are o structură inelară, fiecare catenă conține câte un situs de inițiere propriu. Sinteza începe de pe catena H (catena grea). În momentul când furca de

Capitolul 7

replicare ajunge la punctul **ori** al catenei L (catena ușoară) începe replicarea acesteia în sens opus. Astfel replicarea celor două catene este asincronică (replicare de tip D) (fig. 7.7., B).

La eucariote ADN este reprezentat de molecule liniare

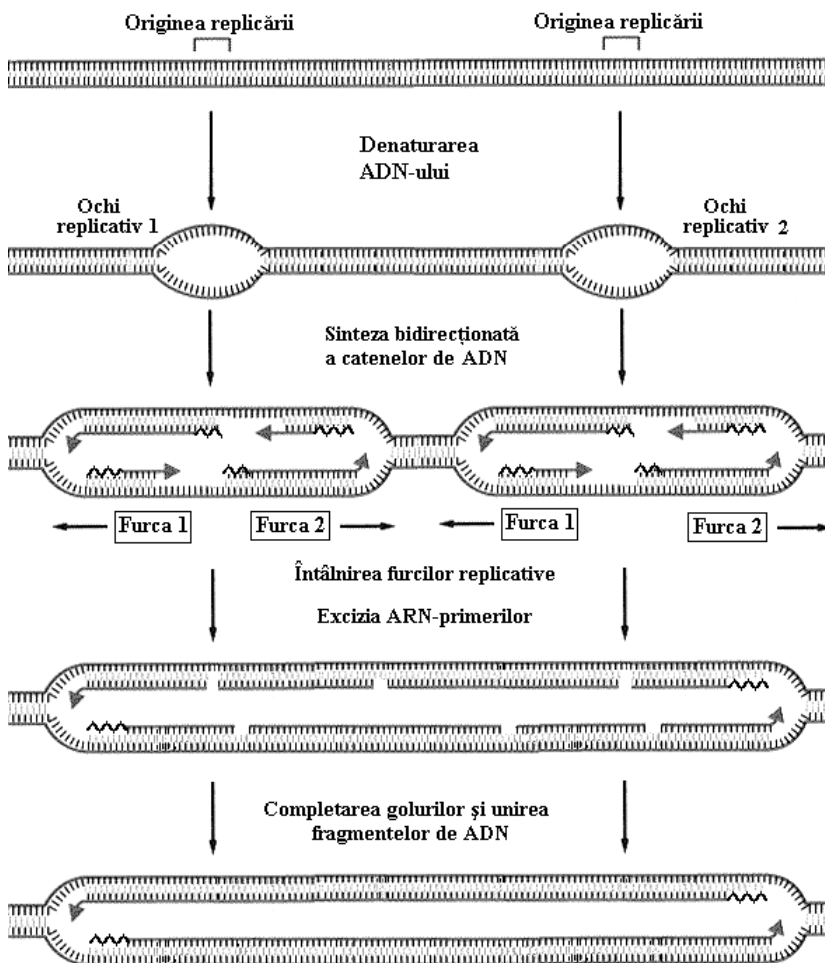


Fig. 7.8. Mecanismul și etapele replicării la eucariote

mari, cu diferit grad de compactizare, iar viteza de replicare este de ordinul a mii de nucleotide pe min (spre comparație la procariote – 30000 pb/min). Pentru asigurarea sintezei întregii molecule într-un timp limitat (în celulele umane 7×10^9 pb se replică în 8-9 ore) replicarea începe în mai multe puncte **ori** (cele 46 de molecule de ADN din celula umană conțin $10^5 - 10^6$ repliconi) (fig. 7.8).

La eucariote replicarea are loc numai în perioada S a ciclului celular și este asincronă: secvențele eucromatice se replică mai timpuriu, la începutul perioadei S, iar secvențele heterocromatice – la sfârșitul perioadei S.

O particularitate a replicării ADN eucariotic este că capătul 5' al catenei noi este mai scurt, deoarece nu există posibilitatea completării golului după înlăturarea primerului ultimului fragment Okazaki. Astfel apare riscul ca în succesiunea generațiilor de molecule să se scurteze cromozomii, ceea ce ar putea cauza pierderea informației genetice de la capătul lor. Pentru prevenirea pierderilor de secvențe terminale de ADN capătul cromozomului este prevăzut cu o structură specială (telomerul) cu un mecanism propriu de sinteză.

Regiunile telomerice ale cromozomilor se replică după un mecanism special, cu participarea enzimei **telomeraza**, formată dintr-o proteină cu funcție de reverstrascriptie ce conține ARN în calitate de matriță (fig. 7.9). În prima etapă are loc asocierea telomerazei la capătul 3' al catenei lider din regiunea telomerică. Ulterior enzima extinde catena, utilizând ca matriță ARN telomerazic. Procesul de extindere a capătului 3' se repetă de mai multe ori. Catena complementară a ADN telomeric este sintetizată după principiul catenei întârziate de ADN-polimerază.

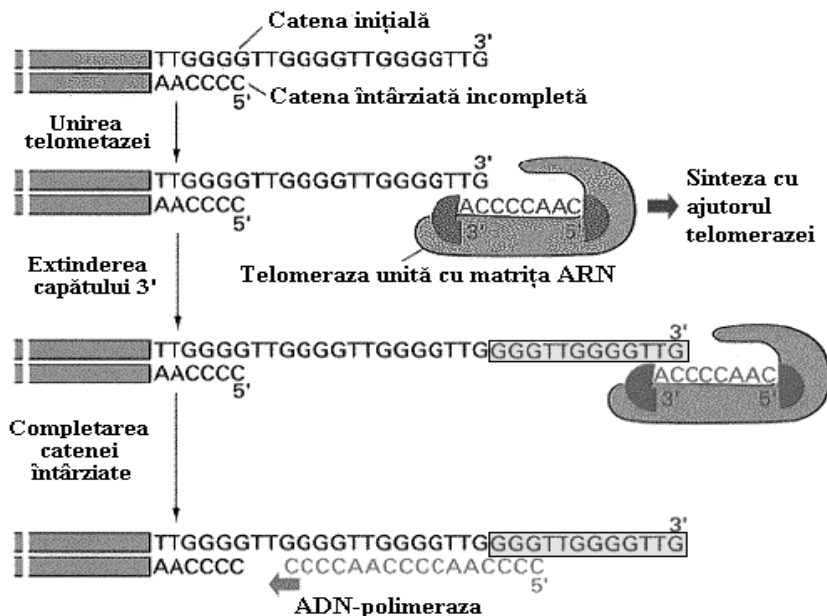


Fig. 7.9. Mecanismul activității telomerazei

Reparația ADN

Procesul de restabilire a leziunilor din moleculele de ADN care asigură păstrarea intactă a materialului genetic de-a lungul mai multor generații poartă denumirea de **reparație**. Acest proces este caracteristic doar pentru moleculele de ADN și este determinat de particularitățile de structură a acestor molecule: existența a două catene complementare și antiparalele.

În structura moleculelor de ADN pot surveni două tipuri de schimbări:

4 Substituția unui nucleotid. Se afectează doar secvența ADN-ului fără a influența structura lui. Aceste schimbări nu se reflectă asupra proceselor de replicare sau transcripție. Ele pot apărea ca rezultat al erorilor în cadrul replicării din cauza împerecherii necomplementare a bazelor (de ex., C::A) sau

datorită transformărilor chimice ale bazelor azotate:
(de ex., dezaminarea citozinei duce la formarea uracilului).

4 Modificări structurale. Se formează ca rezultat al apariției legăturilor covalente nespecifice între nucleotidele aceleași catene sau din catene opuse. De exemplu, razele ultraviolete (UV) duc la apariția dimerilor timinici – legături între resturile de timină alăturate, de pe aceeași catenă. Astfel de schimbări pot împiedica replicarea și transcripția.

Sistemele reparative principale întâlnite la diferite organisme sunt:

□ reparația directă – se întâlnește foarte rar și constă în revenirea moleculei la starea inițială (de ex., prin aminare $U \rightarrow C$);

□ fotoreactivarea – este larg răspândită în natură și constă în înlăturarea dimerilor pirimidinici cu ajutorul unei enzime dependente de lumină;

□ reparația prin excizie – constă în recunoașterea de către enzime a fragmentelor denaturate și înlăturarea fragmentului monocatenar defect. Ulterior are loc restabilirea catenei lezate cu ajutorul ADN-polimerazei, utilizându-se ca matriță catena intactă. ADN-ligaza unește fragmentul nou-sintetizat cu restul moleculei, restabilind integritatea ei (fig. 7.10);

□ reparația prin recombinare – constă în excizia fragmentului defectat, urmată de importarea secvenței corespunzătoare normale dintr-o moleculă omoloagă de ADN (fig. 7.11). Dimerul pirimidinic după recombinare este înlăturat prin mecanismul reparării prin excizie (fig. 7.10, B);

□ reparația inducibilă SOS - sistemul SOS funcționează ca răspuns la acțiunea unor factori de stres. De exemplu, la *E.coli* sub acțiunea șocului termic sau a apariției dimerilor pirimidinici se sintetizează abundant proteina *RecA-proteaza*, cantitatea căreia este reglată de activitatea altei proteine – *LexA*. Proteina *LexA* este unită la o secvență de ADN numită *blocul SOS* care blochează sinteza enzimelor de reparație.

Capitolul 7

RecA-proteaza, fiind în cantitate mare, hidrolizează proteina *LexA*, făcând posibilă activarea unor gene ce codifică proteinele de reparație (aproximativ 15 la număr). Răspunsul celulei se produce foarte rapid – în decursul câtorva minute. În a doua etapă se sintetizează în exces proteina *LexA*, care blochează sinteza *RecA-proteazei* și peste 30-60 minute sistemul de reparare se inactivează. Mecanismul de reparație SOS intervine în cazul leziunilor masive. Scopul lui este completarea golurilor prin mecanisme de excizie sau recombinare. Acest tip de reparație nu este întotdeauna foarte exact, iar principiul complementarității nu se respectă în toate cazurile. Ca rezultat, moleculele reparate prin SOS pot conține erori.

La eucariote au fost determinate mai multe gene incluse în procesul de reparație – de exemplu familia **RAD** de la drojdii: RAD3 – reparația prin excizie; RAD6 – reparația post-replicativă; RAD52 – reparația prin recombinare.

La oameni cel mai bine a fost studiat sistemul responsabil de maladia *xeroderma pigmentosum* (XP). XP este o boală genetică cu transmitere autosomal recisivă și se caracterizează prin hipersensibilitate la lumina solară, în deosebi la radiația UV. Boala este determinată de deficiența mecanismelor de reparație prin excizie.

Metilarea ADN

La procariote există enzime care asigură metilarea (adăugarea grupelor metil $-CH_3$) citozinei și adeninei, din care rezultă metilcitozina și metiladenina. Secvențele metilate sunt rezistente la acțiunea unor enzime specifice **endonucleaze de restricție (restrictaze)**. La bacterii restrictazele digerează moleculele străine de ADN, în timp ce ADN-ul propriu care este metilat nu se hidrolizează. La eucariote metilarea bazelor azotate conduce la inactivarea genelor nefuncționale. Astfel,

regiunile heterocromatice din nucleu conțin secvențe de ADN metilat.

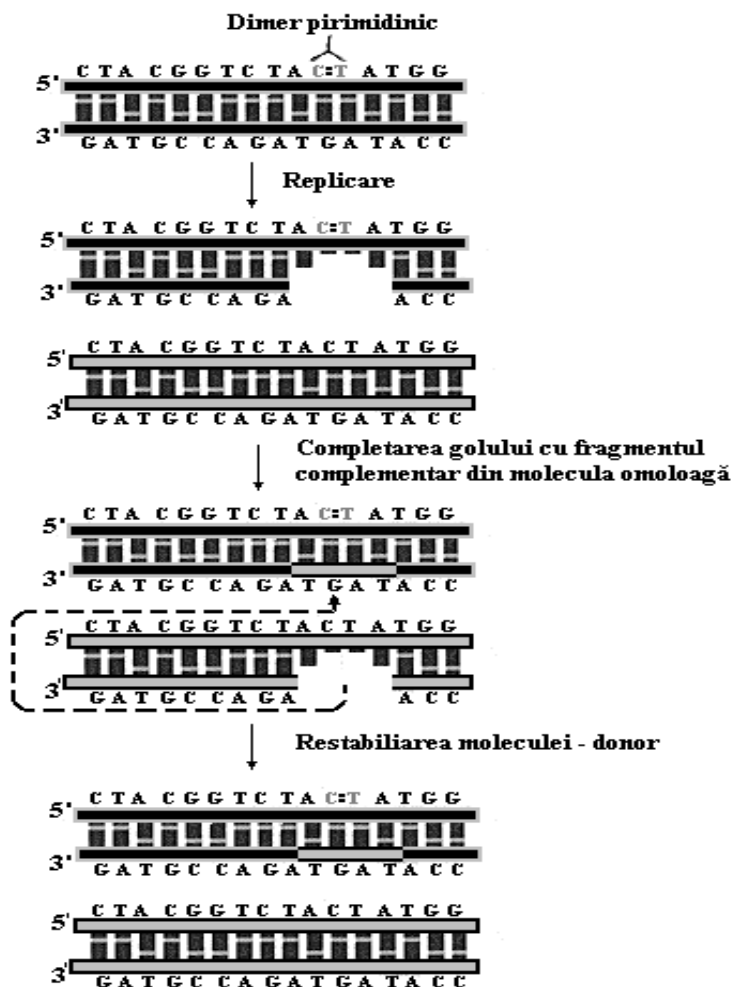


Fig. 7.11. Reparația prin recombinare

Verificarea cunoștințelor:

1. Definiți noțiunile: replicare, replicon, replizomă, polimerază, fragment Okazaki, reparare, metilare.
2. Care sunt principiile ce stau la baza replicării ADN?
3. Care sunt particularitățile replicării la pro- și eucariote?
4. Ce componenți intervin în procesul replicării?
5. Care sunt particularitățile sintezei catenei lider și catenei întârziate?
6. Ce modele de replicare a ADN cunoașteți?
7. Cum se replică capetele cromozomilor?
8. Care sunt mecanismele ce intervin în stabilitatea moleculei de ADN?
9. Care enzime intervin în procesul de reparație?
10. Care este importanța biologică a metilării moleculelor de ADN?