

EXPRIMAREA INFORMAȚIEI GENETICE

5.1. Transcrierea

ADN are două funcții primare: funcția **autocatalitică**, reprezentată de realizarea procesului de replicare și funcția **heterocatalitică** ce constă în procesul dirijării de către ADN a sintezei unor molecule specifice, în esență proteine. Dacă funcția autocatalitică o îndeplinește prin natura structurii sale bicatenare, funcția heterocatalitică a ADN este îndeplinită prin intervenția unor intermediari între ADN și proteinele sintetizate cu funcții variate. Acești intermediari sunt reprezentați de diferitele categorii de acizi ribonucleici (ARN) celulari. Sinteza acestora este dirijată de către ADN, la nivelul unor secvențe specifice ale acestuia.

Procesul de sinteză a diferitelor categorii de ARN celular se numește **transcriere genetică**. Molecula de ARN rezultată în urma acestui proces este identică în ceea ce privește secvența de nucleotide cu una dintre catenele ADN (cu excepția faptului că timina este înlocuită de uracil), aceasta fiind numită catenă sens sau codogenă și complementară cu cealaltă care, de altfel, a servit ca matriță pentru sinteză (aceasta fiind denumită catena nonsens) (fig.36).

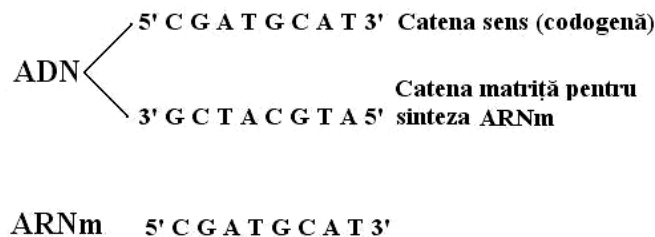


Fig.36. Relația dintre ARN sintetizat și catenele de ADN

La fel ca și în cazul replicării, transcrierea genetică se realizează numai în celule, existând diferențe în ceea ce privește locul transcrierii genetice la procariote și eucariote, impuse de specificul organizării celulare. La procariote transcrierea se realizează pe matrița ADN la nivelul nucleoidului, dar molecula de ARN poate fi folosită de mașinăria de traducere a mesajului genetic înainte ca sinteza lui să fie terminată. La eucariote organizarea nucleară impune ca transcrierea să se desfășoare în nucleu iar traducerea să se producă în citoplasmă,

după ce moleculele de ARN au suferit procesul de maturare și au trecut prin porii membranei nucleare.

În celule, indiferent că sunt procariote sau eucariote, există mai multe tipuri de ARN care sunt implicate în procesul de biosinteză proteică. Acizii ribonucleici sunt compuși ribonucleotidici sintetizați prin polimerizarea a patru tipuri de ribonucleotide (AMP, GMP, UMP și CMP)(tabelul 3), reacția fiind catalizată de transcriptază sau ARN-polimeraza dependentă de ADN.

Cercetările lui Chargaff (1950) au indicat că în macromoleculele de ARN raporturile molare dintre baze variază în limite foarte largi și nu se mai respectă principiile stabilite pentru ADN dublu catenar.

Structura primară a ARN este reprezentată de ordinea ribonucleotidelor din monocatena sa. Lungimea diferitelor tipuri de ARN variază între 75 la 10.000 nucleotide. Cele mai mici molecule de ARN sunt reprezentate de ARN de transfer (ARNt - 80 nucleotide).

ARN-polimeraza are capacitatea de a recunoaște cu mare exactitate secvențe specifice de baze azotate de pe matricea de ADN, realizând polimerizarea unor ribonucleozid-trifosfați liberi aliniați pe matricea în virtutea complementarității dintre bazele azotate: adeninei din matricea îi corespunde uracilul în catena ARN, timinei îi corespunde adenina iar guaninei îi va corespunde citozina (și invers), specific fiind faptul că nucleotidele care intră în componența ARN conțin în structura lor riboza (sunt ribonucleotide).

ARN-polimeraza catalizează formarea de legături fosfodiesterice între ribonucleotidele succesive. Majoritatea procariotelor conțin o singură ARN-polimerază (cel mai bine fiind studiată cea de la *E.coli*), în timp ce în celulele eucariote au fost identificate trei tipuri de ARN-polimeraze, cu localizare nucleară (fie în nucleoplasmă fie la nivelul nucleolului), "specializate" în sinteza unui anumit tip de ARN.

Transcrierea necesită existența matricei ADN fapt pentru care, la nivelul unor regiuni specifice, cele două catene ale ADN se separă (are loc o denaturare fiziologică), iar una dintre ele (catena nonsens) servește ca matrice pentru sinteza ARN. ARN-polimeraza are capacitatea de a iniția sinteza "de novo" a unei catene ARN fără a fi necesară existența unui primer; ea "citește" catena de ADN pe care o copiază în sensul 3'→5', iar sinteza ARN se realizează în sensul 5'→3'. În acest mod, ribonucleozid-trifosfații sunt adăugați pe rând la nivelul grupării 3'OH a ribonucleotidei anterioare, în urma reacției de polimerizare fiind eliberate grupări pirofosfat. Transcrierea realizată de ARN-polimerază este, în esență, asemănătoare cu replicarea și prezintă etapele de inițiere, elongare și terminare.

Procesul de transcriere începe atunci când ARN-polimeraza se leagă la nivelul unei regiuni specifice, numită **promotor**, localizat la extremitatea 5' a secvenței genice ce va fi transcrisă. Fenomenul debutează la nivelul așa numitului “punct de start” al transcrierii și se desfășoară până când ARN-polimeraza ajunge la nivelul unei secvențe de terminare (“terminator sequence”) (fig.37). Această acțiune definește o unitate transcripțională care se întinde de la promotor la secvența terminator și se referă de obicei la ARNm.

1. Componentele procesului de transcriere

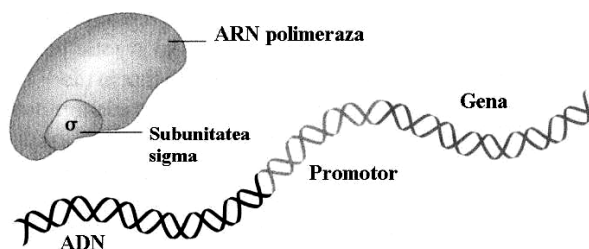
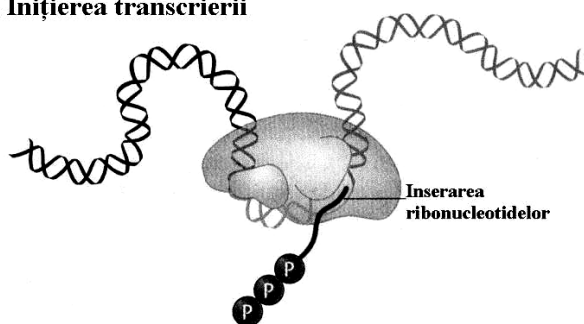
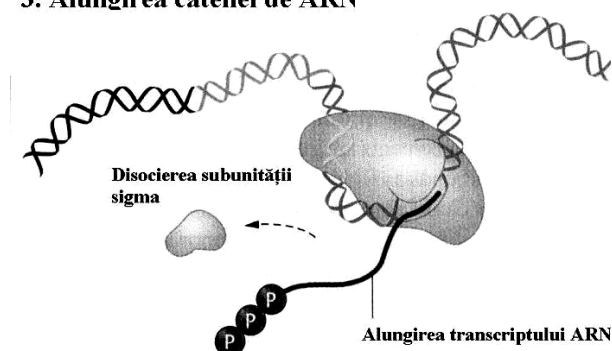


Fig.37. Etapele procesului de transcriere

2. Inițierea transcrierii



3. Alungirea catenei de ARN



Produsul rezultat în urma transcrierii a primit denumirea de **transcript primar** (sau produs primar de transcriere). La bacterii, ARNm copiază mai multe gene alăturate (ce formează un operon) fiind policistronic, în timp ce la eucariote el copiază o singură genă, fiind monocistronic. De regulă acest produs primar este instabil, atât la procariote cât și la eucariote, el “suferind” unele prelucrări posttranscripționale. In cazul procariotelor, produsul primar este fie degradat rapid, după ce și-a îndeplinit funcția (ARNm), fie este clivat pentru a

forma produși funcționali (ARNr sau ARNt). La eucariote, produsul primar ce a copiat o genă discontinuă este prelucrat prin eliminarea secvențelor non-informaționale (intronii) sau prin adăugarea unor secvențe specifice de nucleotide la extremitățile moleculei.

Înainte de a prezenta etapele procesului de transcriere la procariote și eucariote, sunt necesare câteva precizări. Atunci când se vorbește despre “funcționarea” unei gene se înțelege faptul că respectiva secvență de ADN servește ca matriță pentru sinteza unei molecule de ARN. Pe lângă genele ce codifică sinteza unor catene polipeptidice specifice și care sunt transcrise la ARNm, la nivelul ADN există numeroase alte gene a căror funcție este de a codifica molecule de ARN ne-mesager. Acesta este cazul genelor pentru ARNr, ARNt sau ARNsn. Despre particularitățile acestor categorii de ARN și despre funcțiile lor se va vorbi pe larg în capitolul următor.

5.1.1. Particularitățile transcrierii genetice la procariote

Cel mai studiat sistem bacterian de transcriere este cel de la *E.coli* și, cu toate că există particularități în cazul anumitor bacterii, el a căpătat un caracter de aplicabilitate generală în grupul bacteriilor. În procesul de transcriere este implicată o unitate transcripțională ce se întinde de la nivelul promotorului până la secvența de terminare.

Promotorul, secvență de nucleotide plasată la extremitatea 5' a genei, este esențial pentru transcrierea acesteia dar el nu se regăsește în structura ARNm. La capătul opus se găsește regiunea de terminare ce asigură încheierea transcrierii, dar nici ea nu este transcrisă și, prin urmare, nu intră în alcătuirea ARNm (fig.38).

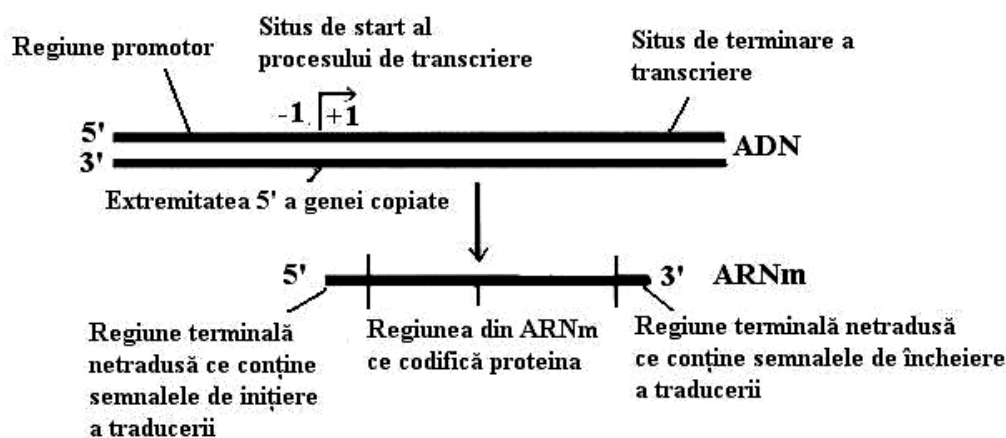


Fig.38. Structura unei unități transcripționale de la procariote

Așa cum se poate observa în fig.38, în structura unității transcripționale există situsul (punctul) de start de la nivelul căruia începe propriu-zis procesul de copiere a informației genetice din ADN în ARN. Prima nucleotidă transcrisă este notată cu +1 și este plasată în dreapta punctului de start, iar prima nucleotidă netranscrisă (plasată în stânga punctului de start) este notată cu -1; următoarea nucleotidă copiată este notată cu +2 și așa mai departe.

Molecula de ARNm rezultată în urma transcrierii unei asemenea gene conține două categorii de regiuni: o regiune ce va fi tradusă, regăsindu-se ulterior sub forma unei succesiuni de aminoacizi din structura unei proteine și alte două regiuni care nu vor fi traduse. Aceste secvențe de nucleotide sunt localizate, pe de o parte, la nivelul extremității 5' a ARNm și conțin semnalele necesare inițierii procesului de traducere (secvența Shine-Dalgarno) și, pe de altă parte, la extremitatea 3', conținând semnalele necesare încheierii traducerii.

Deși orice genă este alcătuită din două catene de ADN cu polaritate opusă, atunci când se fac referiri la aceasta se precizează doar extremitatea 5' și 3' de pe o catenă. Intotdeauna, capătul 5' al unei gene este cel care conține promotorul, el corespunzând cu capătul 3' al catenei complementare (matriță) și cu extremitatea 5' a ARNm corespunzător. Atunci când se dorește prezentarea schematică a unei gene, capătul 5' este plasat întotdeauna în stânga.

Trebuie precizat faptul că nu există obligativitatea ca toate genele să fie transcrise utilizându-se drept matriță aceeași catenă de ADN. La bacterii s-a dovedit că, deseori, gene adiacente sunt transcrise în sens opus: sinteza ARNm se face tot în sens 5'→3' dar catena copiată este diferită.

Procesul de transcriere genetică la procariote (ca de altfel și la eucariote) se desfășoară în **trei etape succesive**: inițiere, alungire și terminare. Dintre aceste etape, inițierea este cea mai complexă (are mai multe trepte: recunoașterea promotorului, despiralizări locale, inițierea propriu-zisă a sintezei) și presupune implicarea mai multor elemente: promotor, ARN-polimeraza și, în anumite cazuri a unor factori suplimentari.

5.1.1.1. Inițierea transcrierii

Procesul de inițiere debutează la nivelul unei secvențe specifice de ADN numită promotor care interacționează cu enzima ARN-polimeraza.

Secvența promotor ce precede orice genă a fost izolată pe baza experimentelor realizate la *E.coli*, prin amestecarea ARN-polimerazei cu ADN și apoi tratarea amestecului cu enzime care digeră ADN dar lasă intactă regiunea la care s-a legat ARN-polimerază. În final, după

digestia enzimatică și îndepărtarea ARN polimerazei, a fost determinată ordinea nucleotidelor din secvența de ADN rămas (aproximativ 50-60 pb).

Examinarea unui număr mare de secvențe promotor de la mai multe gene de la procariote a evidențiat anumite trăsături comune. Astfel, există o secvență TATAAT, denumită “cutia Pribnow” sau regiunea -10 (centrată pe nucleotida din poziția -10, raportat la punctul de start al transcrierii), ea fiind conservată la toate secvențele promotor de la procariote. O a doua secvență, denumită regiunea -35, este comună procariotelor și este localizată la aproximativ 35 pb în fața (în direcția de transcriere) situsului de start al transcrierii (este centrată pe nucleotida din poziția -35). Se consideră că ambele regiuni, -10 (TATAAT) și -35 (TTGACA) reprezintă secvențe consens, adică se regăsesc la majoritatea promotorilor bacterieni. Mai mult, se apreciază că punctul de start al transcrierii este de obicei o purină, localizat la mijlocul tripletei CAT.

Al doilea element esențial realizării transcrierii este reprezentat de **ARN-polimerază**. Cea mai studiată enzimă de acest tip este ARN-polimeraza de la *E.coli*. La această bacterie s-a evidențiat faptul că există aproximativ 7.000 molecule de enzimă per celulă, viteza de sinteză fiind de 40 ribonucleotide/ secundă la 37°C. Viteza de transcriere este comparabilă cu cea de traducere (aproximativ 15 aminoacizi/secundă), dar este cu mult mai mică decât viteza de replicare (800 nucleotide/secundă).

ARN-polimeraza dependentă de ADN sau transcriptaza este de fapt un complex enzimatic cu structură cuaternară. ARN-polimerazele, indiferent de origine, au în general aceleași trei funcții esențiale:

- “aleg” catena purtătoare de informație
- recunosc începutul și sfârșitul mesajului genetic
- răspund la acțiunea unor factori de reglare pozitivă sau negativă.

În ceea ce privește structura chimică, ARN-polimeraza de la *E.coli* are o masă moleculară de 465 kDa și este alcătuită din patru subunități majore (2 subunități α și câte o subunitate β și β') la care se mai adaugă o subunitate σ .

Holoenzima (enzima completă formată din cele cinci subunități: $2\alpha \beta \beta' \sigma$) poate fi separată în două componente: miezul enzimatic sau apoenzima ($2\alpha \beta \beta'$) și factorul σ (polipeptidul σ). Pentru realizarea corectă a transcrierii (mai ales a inițierii procesului) este necesară asamblarea tuturor componentelor (Zarnea, 1986).

S-a demonstrat că miezul enzimatic al ARN-polimerazei poate realiza sinteza de ARN dar nu poate iniția în mod corect procesul de transcriere pentru care este obligatorie asamblarea și a factorului σ . După ce procesul de transcriere a fost inițiat, iar lungimea catenei de ARN a

ajuns la 8-9 ribonucleotide, factorul σ se desprinde de holoenzimă, apoenzima continuând singură sinteza ARN.

Inițial, ARN-polimeraza recunoaște și se leagă la nivelul regiunii -35, considerată de unii autori ca fiind situsul R ("recognition"), după care contactul cu ADN se extinde și la regiunea -10 (situsul B, de legare strânsă).

Segmentul din ADN ce va fi transcris va suferi o denaturare fiziologică în zona de start a transcrierii: la nivelul său cele două catene complementare se separă prin desfacerea punților de hidrogen dintre, aproximativ, 12 pb situate între regiunea -10 și punctul de start și se formează astfel un "ochi" de transcriere (buclă de transcriere sau veziculă de transcriere = "transcription bubble"). Această denaturare locală a ADN este favorizată de faptul că regiunea -10 este bogată în AT. Se spune în acest caz că ARN-polimeraza formează împreună cu ADN un *complex promotor deschis*.

De asemenea, pe lângă rolul de a sintetiza efectiv sinteza ARN, ARN-polimeraza realizează în plus derularea duplexului în direcția de înaintare a veziculei de transcriere și respiralizarea ADN în urma acesteia. Lungimea regiunii de ADN temporar denaturată variază în funcție de faza de sinteză a ARN, de la 12 pb la 20 pb, dar mărimea regiunii hibride ADN-ARN (intermediar de transcriere) este mult mai mică. După desfacerea localizată a legăturilor de hidrogen dintre cele două catene ale ADN începe sinteza ARN, prima ribonucleotidă fiind, de regulă, purinică (AMP sau GTP).

Deseori, în procesul de inițiere a transcrierii, regiunea promotor este mult mai mult decât un situs de legare pentru ARN-polimerază. Ea conține informația pentru legarea, în unele cazuri, a factorilor de reglare accesorii, de tipul AMP_c - CAP (adenozin-monofosfat ciclic - "catabolite activation protein" = CAP = proteina receptoare a AMP_c = CRP).

O situație specială este cea a genelor suprapuse: la bacteriofagul ϕ X174, un genom de numai 5,3 kb nu ar putea conține 10 gene câte s-au identificat pe baza proteinelor virale codificate, iar analiza atentă a codonilor de inițiere și de terminare a dus la concluzia că două gene sunt complet incluse în alte două gene (B în A și E în D), fiind folosite două cadre de citire diferite în aceeași secvență de ADN. O altă genă K acoperă genele A și C (fig.39).

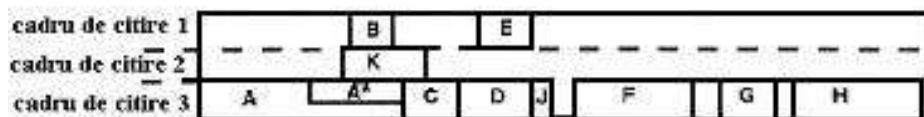


Fig.39. Evidențierea celor trei cadre de citirea diferite ale mesajului genetic la bacteriofagul ϕ X174

5.1.1.2. Alungirea ARN

Inițierea transcrierii face să fie atașat la matriță primul NTP care oferă gruparea 3'-OH ce va fi pusă în legătură de către ARN-polimeraza cu gruparea 5'- fosfat a nucleotidului următor prin reacția ce poartă numele de atac nucleofilic. Subunitatea β a enzimei catalizează formarea legăturii fosfodiesterice și astfel începe procesul de elongație a monocatenei poliribonucleotidice, finalizată printr-o moleculă de ARN.

Sinteza catenei ARN, adică transcrierea genetică se realizează în direcția 5'→3', aceasta fiind direcția de elongație, matrița de ADN fiind citită totdeauna în direcția 3'→5', astfel că matrița și produsul de transcriere sunt antiparalele.

Spre deosebire de ADN-polimerază care are numai specificitate de direcție, ARN-polimeraza are și specificitate de secvență recunoscând promotorul genei care trebuie să funcționeze la un moment dat.

5.1.1.3. Terminarea transcrierii

Incheierea procesului de transcriere se poate realiza la bacterii prin două mecanisme: unul care este determinat doar de secvența de ADN și altul care necesită prezența unor proteine specifice. În cazul anumitor procariote, la capătul unor gene transcrise se află secvențe de nucleotide ce corespund regiunii de terminare, care determină formarea la nivelul ARNm corespunzător a unei structuri de tip “trunchi și buclă” (“stem and loop”).

În cazul celui ce-al doilea mecanism de terminare a transcrierii este implicată o proteină specifică numită **factorul rho**. Aceasta se atașează la ARNm în curs de formare și se deplasează de-a lungul moleculei în urma ARN-polimerazei. Atunci când aceasta ajunge la nivelul regiunii de stopare a transcrierii, ARN-polimeraza își încetinește foarte mult activitatea de polimerizare astfel că factorul rho poate să interacționeze cu ARN-polimeraza. Factorul rho are acțiune helicazică specifică asupra hibridilor ADN-ARN formați în cursul transcrierii, rezultatul final al activității sale fiind detașarea ARNm de matriță și încheierea transcrierii (Platt, 1986).

5.1.2. Transcrierea genelor la eucariote

Din punct de vedere chimic, sinteza ARNm la eucariote este realizată în același mod ca și la procariote: cele patru categorii de ribonucleozid-trifosfați sunt asamblate de către ARN-

polimerază utilizându-se o catenă de ADN drept matriță. Cele mai importante diferențe provin din structura diferită a genelor de la eucariote, acestea având de regulă o structură discontinuă (sunt alcătuite din secvențe informaționale numite exoni ce alternează cu secvențe noninformaționale numite introni).

În esență, etapele procesului de transcriere sunt aceleași ca și la procariote: inițiere, alungire și terminare, aspecte deosebite apărând doar în procesul de inițiere.

5.1.2.1. Inițierea transcrierii la eucariote

În celulele eucariote s-a demonstrat că există trei tipuri de ARN-polimeraze care realizează transcrierea diferențiată a genelor:

- **ARN-polimeraza I** – transcrie genele pentru ARNr
- **ARN-polimeraza II** – determină sinteza ARNm
- **ARN-polimeraza III** – transcrie genele pentru ARNt și pentru alte molecule de ARN de dimensiuni mici (ARNsn).

Așa cum s-a menționat deja, localizarea nucleară a acestor enzime este variată: prima este localizată la nivelul nucleolului, iar celelalte două se găsesc în nucleoplasmă. Toate cele trei enzime sunt agregate macromoleculare, de cel puțin 500 kD, având mai multe subunități polipeptidice (8-14 subunități). La eucariote, pe lângă ARN-polimerazele nucleare au mai fost identificate și ARN-polimeraze care funcționează la nivelul organitelor citoplasmatică (mitocondrii și cloroplaste), dar acestea sunt de dimensiuni mai mici și sunt asemănătoare enzimelor bacteriene.

Nici una dintre cele trei tipuri de ARN-polimeraze de la eucariote nu recunosc promotorul în mod direct ci prin intermediul unor factori de transcriere, inițiindu-se astfel procesul de transcriere. Factorii de transcriere au aceleași funcții pentru toate tipurile de ARN-polimeraze, numărul lor fiind mai mare în cazul ARN-polimerazei II; ei au fost grupați în trei categorii:

- factori generali necesari pentru inițierea sintezei ARN indiferent de tipul de promotor. Ei interacționează cu ARN-polimeraza formând un complex macromolecular localizat în jurul punctului de start și determinând situsul de inițiere. Factorii generali de transcriere împreună cu ARN-polimeraza alcătuiesc “aparatură de transcriere”;

- factori suplimentari “din amonte” (“upstream factors”) sunt proteine de legare la ADN ce recunosc anumite secvențe de nucleotide comune mai multor promotori (elemente de consens) localizate în fața (spre capătul 5’) punctului de start. Activitatea acestor factori nu este supusă unor mecanisme reglatoare, ei acționând la nivelul oricărui promotor ce conține situsul de legare corespunzător. Ei au efect de creștere a eficienței inițierii și determină funcționarea promotorilor la un nivel adecvat. Setul specific de asemenea factori necesari pentru o exprimare optimă este caracteristic fiecărui promotor;
- factorii inductibili funcționează într-o manieră similară factorilor suplimentari dar ei au un rol reglator. Acești factori sunt sintetizați sau activați în anumite momente sau în anumite țesuturi și sunt responsabili de controlul “în timp și spațiu” al transcrierii.

Promotorul reprezintă un alt element esențial procesului de inițiere a transcrierii, el conținând regiunile de recunoaștere pentru ARN-polimerază și pentru factorii de transcriere. Promotorii ce conțin situsurile pentru factorii generali și pentru cei suplimentari “din amonte” vor fi transcriși în orice tip de celulă, ei fiind responsabili de exprimarea genelor cu funcționare constitutivă.

Inițierea specifică a transcrierii de către ARN-polimeraza II necesită intervenția și a altor elemente de control, cum sunt factorii inductibili. Aceștia pot interacționa atât cu factorii suplimentari cât și cu cei generali (interacțiunea este de tip proteină-proteină) precum și cu secvențe de nucleotide localizate în fața punctului de start al transcrierii.

Secvențele de nucleotide ce alcătuiesc promotorul (aproximativ 200 pb) sunt definite operațional pe baza localizării lor (în vecinătatea punctului de start) și a necesităților pentru inițiere. Analizele efectuate asupra unor promotori tipici au evidențiat faptul că aceștia conțin trei secvențe specifice de nucleotide, centrate la nivelul nucleotidelor din pozițiile -30, -75 și -90, toate fiind necesare pentru inițierea optimă a procesului de transcriere (Lewin, 1997).

Prima secvență dintre cele menționate (centrată pe nucleotida din poziția -30, raportat la situsul de start) este denumită cutia Hogness, cuprinde o secvență de 7 nucleotide TATAAAA și este echivalentă cutiei Pribnow de la procariote (Young, 1991). Această secvență este esențială pentru inițierea transcrierii ea fiind regăsită, cu aceeași succesiune de nucleotide, la majoritatea genelor de la eucariote. Din acest motiv, această secvență, ca de altfel și secvențele -75 și -90, au fost denumite secvențe consens, având caracter de generalitate. La nivelul cutiei TATA se leagă direct factorul TBP, iar această secvență

împreună cu regiunea inițiator din imediata vecinătate a punctului de start sunt responsabile de asigurarea startului corect al transcrierii de către ARN-polimeraza II.

A doua secvență, centrată pe nucleotida din poziția -75 , se numește cutia CAAT ea fiind, de asemenea, o secvență consens ($5' \text{ GGCCCAATCT } 3'$). Sensibilitatea la mutații a acestei secvențe sugerează faptul că ea joacă un rol important în determinarea “puterii” unui promotor.

Pe lângă cele două secvențe menționate, în zona -90 a majorității promotorilor se găsește așa numita cutie GC, cu secvența consens GGGCGG. Deseori, la nivelul multor promotori există copii multiple ale acestei secvențe, ele putând funcționa în ambele orientări.

În afară de promotor, în inițierea procesului de transcriere mai sunt implicate și alte secvențe de ADN ce stimulează declanșarea transcrierii dar acestea sunt localizate la o distanță considerabilă în raport cu punctul de start (fie spre capătul $5'$ fie $3'$ al regiunii de ADN luată în discuție). Asemenea secvențe, considerate a constitui un alt tip de elemente necesare transcrierii au primit denumirea de **elemente activatoare** sau secvențe de tip “**enhancer**” (termenul din limba engleză fiind de foarte multe ori preferat chiar și în lucrările de specialitate din limba română).

5.1.2.2. Alungirea catenei de ARN

După ce primele ribonucleotide au fost atașate la matrița de ADN de către ARN-polimeraza corespunzătoare, continuarea sintezei catenei de ARN se realizează la fel ca și la bacterii: citirea mesajului genetic se face în sensul $3' \rightarrow 5'$ iar sinteza catenei de ARN se realizează în sensul $5' \rightarrow 3'$.

5.1.2.3. Terminarea transcrierii la eucariote

Dacă la procariote aspectele legate de încheierea transcrierii sunt relativ clare, la eucariote lucrurile nu stau la fel. Astfel, nu se cunoaște cum are loc acest proces în cazul genelor eucariote nefiind identificate semnalele de terminare a transcrierii.

Experimentele efectuate cu ARN-polimeraza II au evidențiat că această enzimă, atunci când ajunge în regiunea $3'$ a genei transcrise, determină sinteza unei secvențe AAUAAA (conform matriței de ADN) dar, se pare că sinteza ARN continuă și după această secvență. În final, o enzimă specială taie produsul de transcriere la o scurtă distanță după secvența

AAUAAA, după care, o altă enzimă independentă de matriță (poliA polimeraza), adaugă o serie de nucleotide cu adenină (aproximativ 200), utilizând ca sursă de nucleotide ATP, formând “coada poliA” (poliadenilată) la nivelul căreia se leagă proteine specifice. Deoarece coada poli A lipsește în cazul ARNm pentru histone, înseamnă că aceasta nu este esențială pentru transcriere. Se pare că această secvență, adăugată după ce procesul de transcriere s-a încheiat, ar fi implicată în asigurarea stabilității moleculei de ARN în celulă (Ross, 1995).

La eucariote s-a evidențiat faptul că produsul de transcriere este supus unor **prelucrări postranscripționale**: adăugarea cozii poliA; adăugarea secvenței cap; modificarea chimică unor nucleotide; eliminarea intronilor și asamblarea exonilor (fig.40).

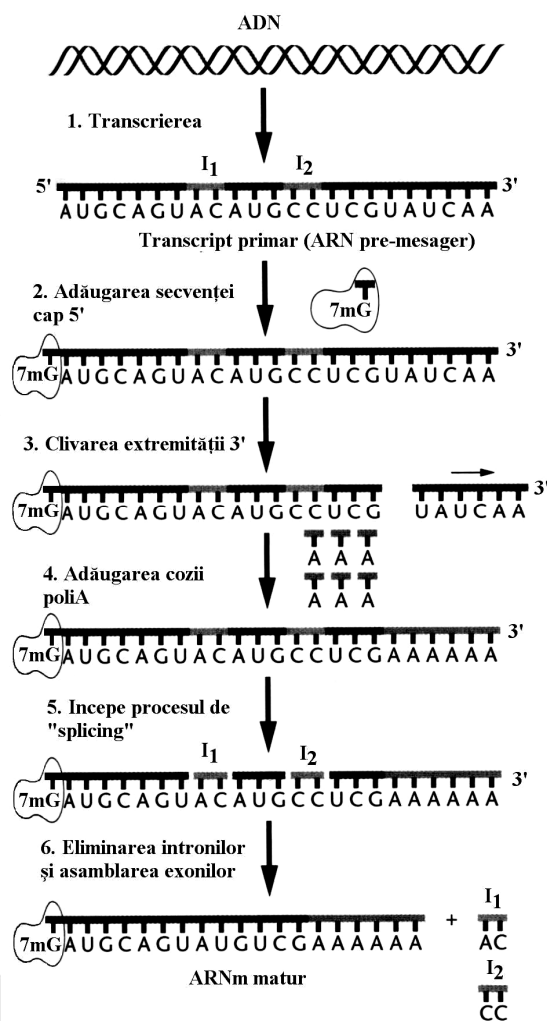


Fig.40. Prelucrările post-transcripționale al moleculelor de ARNm de la eucariote

De exemplu, imediat ce sinteza ARN începe, la capătul 5' al transcriptului primar se adaugă secvența 7-metil-guanozintrifosfat care constituie ceea ce englezii denumesc “cap” (acoperire). Semnificația acestui situs pare a fi legată de protejarea extremității 5' a ARNm de

atacul exonucleazic și de inițierea procesului de traducere. În plus, produsul primar de transcriere de la eucariote suferă modificări importante datorate faptului că genele copiate au structură discontinuă (procesul de „splicing”). Pot avea loc, de asemenea, modificări chimice ale unor baze azotate prin procese de metilare.

Moleculele de ARN pot forma configurații secundare și terțiare noi datorită împerecherii bazelor azotate din unele zone cu cele complementare localizate în alte zone ale catenei, ceea ce duce la alternanțe de regiuni mono- și bicatenare în moleculele respective.

Evidențierea transcrierii genetice la eucariote se poate realiza cu uridină tritiată, precursor al uracilului. Cele mai adecvate structuri cromosomale la nivelul cărora poate fi decelată autoradiografic transcrierea genetică sunt pufele și inelele Balbiani de la nivelul cromosomilor politeni precum și buclele laterale ale cromosomilor lampbrush.

5.1.3. Categorii de ARN celular

Atât în celulele bacteriene cât și în cele eucariote există mai multe categorii de ARN: ARN mesager (ARNm); ARN solubil sau de transfer (ARNt) și ARN ribosomal (ARNr). La acestea, în cazul eucariotelor, se mai adaugă ARN nuclear heterogen, ARN cromosomal și ARNsn (“small nuclear”= nuclear mic). Majoritatea moleculelor de ARN rezultate în urma transcrierii sunt supuse unor modificări specifice în urma cărora, moleculele respective devin biologic active. Formarea moleculelor de ARN matur implică adăugarea, deleția sau modificarea unor nucleotide.

5.1.3.1. ARN mesager (ARNm)

ARNm este singurul tip de ARN celular tradus în structura proteinelor, el reprezentând circa 5% din ARN total. ARNm este în același timp singura categorie de ARN celular care prezintă o structură integral monocatenară, cel puțin în momentul traducerii mesajului genetic la nivelul ribosomilor.

Fiind purtătoare de mesaj genetic, moleculele de ARNm au lungimi variabile deoarece și mărimea genelor de la care preiau informația sunt variate ca dimensiune. De aceea, constanta de sedimentare a diferitelor molecule de ARNm variază foarte mult, de la 8S la 54S. Una din cele mai mari molecule de ARNm este cea care determină sinteza fibroinei din fibra de mătase de la *Bombyx mori*.

ARNm a fost descoperit de către Volkin și Astrahan în 1958 în urma unor experimente efectuate cu o tulpină *E.coli* infectată cu fagul ΦX174. Cultura a fost menținută timp de 3 minute pe mediu de cultură ce conținea ³²P, timp în care a avut loc sinteza unui mesager fagic. Bacteriile au fost apoi centrifugate și s-au extras acizii nucleici. Acest extract a fost apoi tratat cu DN-ază (enzimă care distruge exclusiv ADN, nu și ARN). Ulterior, prin ultracentrifugare în gradient de densitate de zaharoză s-au evidențiat mai multe benzi care prezintă viteze de sedimentare diferite. Aceste benzi corespund mai multor categorii de ARN. Apar astfel benzi mari a căror densitate optică a permis atribuirea lor particulelor ribosomale 50S și 30S; la acestea radioactivitatea era foarte redusă. Intensitatea maximă a radioactivității a fost asociată cu banda ce a prezentat constanta de sedimentare 20S; banda reprezintă o mică fracțiune de ARN celular, sintetizat rapid în decursul celor 3 minute de menținere a bacteriilor în mediu cu ³²P. Analiza cromatografică a secvențelor de nucleotide a acestei fracțiuni ARN, realizată după o hidroliză ușoară a macromoleculor respective, a relevat că acest ARN este complementar cu ADN fagic. Rezultatele ulterioare au arătat că acesta reprezintă ARNm pentru proteinele fagice.

La procariote, **ARNm este policistronic** pentru că el copiază informația genetică necesară sintezei mai multor catene polipeptidice implicate, de obicei, în aceeași cale metabolică. Spre exemplu, la *E.coli* calea metabolică de sinteză a histidinei presupune participarea a 10 enzime diferite codificate de 10 gene care sunt copiate într-o singură moleculă de ARNm. Utilizarea ARNm policistronic la procariote reprezintă o cale economică de a regla sinteza unor proteine în mod coordonat, cu ajutorul unui singur semnal de reglare.

Durata de “viață” a unei molecule de ARNm variază în funcție de tipul de celulă în care se găsește. Stabilitatea moleculelor de ARNm presupune rezistența acestora față de acțiunea nucleazelor citoplasmice. Degradarea ARNm se datorează fie acțiunii unor exonucleaze (care acționează asupra moleculelor începând cu extremitatea 3’) sau a unor endonucleaze care recunosc și clivează anumite secvențe specifice de ribonucleotide localizate în interiorul moleculei de ARNm.

Protejarea ARNm bacterian de acțiunea exonucleazelor citoplasmice este realizată de o secvență de nucleotide localizată la capătul 3’ și care determină formarea unei structuri de tip “trunchi și buclă”. În cazul ARNm de la eucariote lucrurile nu sunt foarte clare dar se pare că secvența “cap” de la extremitatea 5’ și coada poliA de la extremitatea 3’ ar asigura stabilitatea moleculelor respective, în timp ce unele secvențe interne bogate în AU ar determina instabilitatea moleculelor de ARNm (Brawerman, 1990).

La procariote moleculele de ARNm sunt menținute funcționale doar 2-4 minute deoarece, după ce au fost utilizate pentru traducere, ele sunt degradate de către RN-aze. Se evită în acest fel alterările structurale și implicit ale mesajului conținut de ele, fenomenul fiind o consecință a adaptării rapide a metabolismului bacterian la condițiile de mediu. De asemenea, se permite activarea și represia unui mare număr de gene într-un timp foarte scurt. Fenomenul de degradare rapidă a ARNm explică proporția foarte mică de ARNm din celule față de alte categorii de ARN (de exemplu, ARNr) deși numărul cistronilor transcriși la ARNm este aproximativ de 1000 de ori mai mare decât al celor ribosomali.

La eucariote durata de viață a unei celule este mai mare decât la procariote și deci ARNm este mai stabil. Aceasta se datorează faptului că, la organismele pluricelulare celulele se găsesc într-un mediu intern mult mai stabil în privința parametrilor săi.

Există o serie de exemple de molecule de ARNm cu durată mai mare de viață decât cea specifică: de exemplu, ARNm din celulele de *Bacillus cereus* ce sporulează “trăiește” aproximativ 6 ore; ARNm necesar pentru sinteza hemoglobinei la mamifere este sintetizat pe baza mesajului din ADN al reticulocitelor din stadiul nucleat și păstrat pentru mai multe zile în eritrocitele anucleate în care are loc sinteza hemoglobinei. În cazul ouălor și semințelor care au stadiu de dormanță (inactivitate), ARNm este menținut într-o formă stabilă luni și chiar ani. Moleculele de ARNm cu durată lungă de viață care pot fi păstrate perioade lungi de timp înainte de a fi traduse sunt protejate față de atacul ribonucleazelor prin asocierea lor cu proteine, asocieri care se denumesc informosomi sau informomere.

Din punct de vedere structural, ARNm prezintă trei regiuni distincte: secvența “leader” de la capătul 5’ al moleculei; secvența codificatoare și regiunea 3’ terminală. **Regiunea “leader”** este importantă pentru inițierea traducerii dar nici una dintre nucleotide nu participă la decodificare (această secvență nu este tradusă). Secvența codificatoare determină structura primară a unei catene polipeptidice (constituie matricea pentru sinteza unei catene polipeptidice) în timp ce regiunea terminală conține nucleotide care nu vor fi traduse, rolul său fiind legat de asigurarea stabilității moleculei de ARNm.

La nivelul ARNm de la procariote există o secvență particulară de baze numită **situs de legare la ribosom** sau secvență Shine-Dalgarno care prezintă complementaritate cu o secvență de la capătul 3’ al ARNr 16S din subunitatea mică a ribosomilor. De asemenea, la nivelul ARNm policistronic se găsesc, de obicei, secvențe de “spațiere” (“spacer sequences”) lungi de 10 pb, care separă secvențele codificatoare pentru fiecare polipeptid (Watson și colab., 1993).

La eucariote de regulă **ARNm este monocistronic**, el este sintetizat sub forma unui precursor numit pre-ARNm sau ARN premesager care este supus prelucrărilor posttranscripționale în urma cărora se obține ARNm matur. Acesta trece în citoplasmă unde se asociază cu ribosomii cu care formează polisomi sau poliribosomi. Lungimea ARN matur nu corespunde secvenței genelor numai pre-ARNm este corespunzător cu aceasta, deoarece în cadrul prelucrărilor posttranscripționale, anumite porțiuni necodificatoare sunt eliminate (introni) fiind păstrate numai regiunile informaționale (exoni) care vor fi traduse. Rezultă că ARNm matur este reasamblat prin unirea exonilor.

La procariote, cu excepția arhebacteriilor, ARNm matur corespunde ca lungime secvenței genice pe care a transcris-o, fenomen denumit colinearitate.

5.1.3.2. ARN ribosomal (ARNr)

ARNr reprezintă aproximativ 80-85% din cantitatea totală de ARN celular, intrând în structura ribosomilor. Ribosomii sunt particule nucleoproteice citoplasmice implicate în sinteza proteinelor, respectiv în traducerea mesajului genetic dintr-o secvență de ribonucleotide din ARNm într-o secvență de aminoacizi din catena polipeptidică. În cadrul acestui proces se realizează al treilea transfer informațional la nivel molecular, de la ARNm la proteine.

Ribosomii conțin 40-60% ARN, restul fiind reprezentat de proteine bazice ribosomale. În ribosomii bacteriilor există aproximativ 55 tipuri de proteine în timp ce ribosomii de la eucariote conțin 75-80 tipuri de proteine ribosomale. În medie, diametrul unei particule ribosomale mature este de 12-23nm.

Ribosomii procariotelor prezintă o constantă de sedimentare de 70S. Particula ribosomală este formată din două subunități: subunitatea mică de 30S și subunitatea mare de 50S. Această subunitate are o formă globulară cu trei protuberanțe pe fața superioară.

Ribosomii la eucariote au o constantă de sedimentare de 80S, cu o subunitate mică de 40S și o subunitate mare de 60S. Ribosomii din organele celulelor eucariote (mitocondrii și cloroplaste) sunt de tip procariot cu constanta de sedimentare 70S.

În structura ribosomilor intră mai multe tipuri de ARNr. Astfel, la procariote, în subunitatea ribosomală mică intră o moleculă de ARNr de tip 16S asociată cu 21 de tipuri de proteine ribosomale caracteristice subunității mici, notate S_1-S_{21} ($S = \text{small}$). În subunitatea,

mare intră o moleculă de ARNr 23S și 34 tipuri diferite de proteine ribosomale desemnate L₁-L₃₄ (L = large) (fig.41).

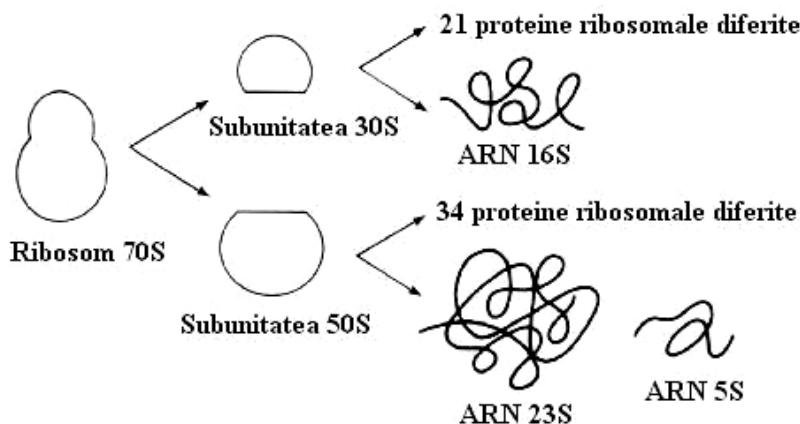


Fig.41. Componentele ribosomilor procariotelor

La eucariote subunitatea ribosomală mică conține o moleculă de ARNr 18 S și 33 tipuri de proteine ribosomale, iar în cea mare se găsesc trei tipuri de ARNr (28 S; 5,8 S și 5 S) 50 tipuri de proteine ribosomale. Moleculile de ARNr au o conformație complexă, în care alternează regiuni mono-catenare cu regiuni bicatenare (acolo unde se realizează împerecheri de baze azotate complementare).

Toate moleculele de ARNr la eucariote sunt sintetizate pe matriță ADN sub formă de molecule precursorare pre-ARNr care, după transcriere, sunt supuse prelucrărilor post-transcripționale. Acestea implică eliminări ale unor nucleotide precum și metilarea unor resturi de riboză ale nucleotidelor rămase. După această prelucrare, structura primară monocatenară a ARNr suferă contorsionări spațiale care facilitează formarea de regiuni bicatenare care alternează cu regiuni monocatenare. La procariote, aparent moleculele de ARNr nu sunt supuse prelucrărilor de posttranscripționale.

Genele pentru diferitele tipuri de ARNr sunt grupate la nivelul unor regiuni cromosomale cunoscute ca ADN ribosomal (ADNr), formând o unitate transcripțională. De asemenea, la nivelul cromosomului bacterian există mai multe asemenea unități transcripționale: de exemplu, la *E.coli* au fost identificate 7 asemenea unități transcripționale. Mai mult, s-a evidențiat faptul că între genele ribosomale există regiuni spațioare la nivelul cărora au fost identificate gene pentru ARNt (fig.42).

O situație asemănătoare se întâlnește și la eucariote, la care genele pentru ARNr 18S, 5,8S și 28S sunt strâns linkate, fiind transcrise sub forma unui pre-ARNr unic cu o constantă

de sedimentare 40S. De asemenea, unitățile de transcriere genetice care funcționează ca matrice pentru sinteza ARNr sunt separate de porțiuni netranscrise numite ADN spațiator sau silențios.

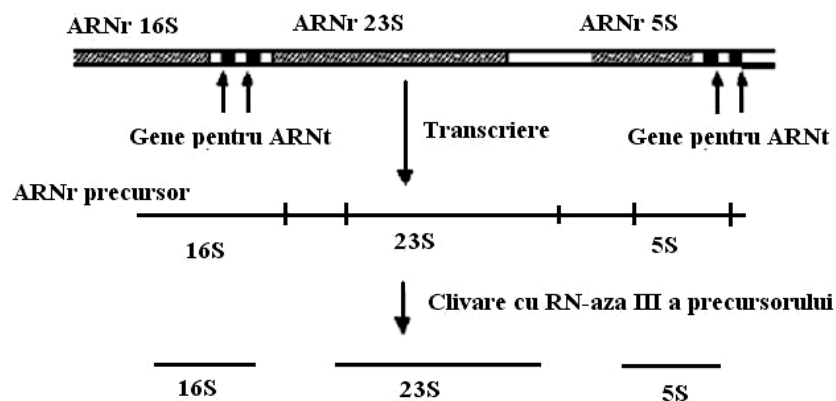


Fig.42. Reprezentarea schematică a unei unități transcripționale de ADNr și a etapelor producerii moleculelor de ARNr. Zonele hașurate reprezintă genele pentru ARNr; zonele închise la culoare reprezintă gene pentru ARNt, iar cele simple constituie regiuni spațiatoare

La eucariote genele pentru sinteza ARNr sunt localizate în regiunea organizatorului nucleolar (NOR) situată la nivelul constricțiilor secundare ale unor cromosomi ai complementului cromosomal. Acești cromosomi au fost denumiți cromosomi organizatori nucleolari. La majoritatea speciilor există câte un cromosom organizator nucleolar pentru fiecare set haploid de cromosomi. La unele specii există însă chiar mai mulți asemenea cromosomi: de exemplu, la om în organizarea nucleolului sunt implicate cinci perechi de cromosomi. Regiunea organizator nucleolar este vitală pentru organisme, dovadă moartea organismelor ce prezintă deleția acestei regiuni de pe ambii cromosomi omologi.

Genele pentru ARNr 5S prezente și ele în copii multiple la eucariote nu sunt linkate cu genele ribosomale pentru ARNr 18S și 28S, ele sunt distribuite pe cromosomii diferiți. Deși nelinkate, aceste gene sunt transcrise coordonat cu celelalte gene pentru ARNr. Prezența ARNr 5S este esențială pentru funcționarea normală a ribosomului matur.

ARNr din organitele celulelor eucariote prezintă o serie de particularități care determină anumite diferențe atât față de moleculele similare de la procariote cât și față de cele din structura ribosomilor citoplasmatici de la eucariote. Astfel, constanta de sedimentare la ribosomi este de 60S, având o subunitate mică de 32S (cu un ARNr 13S și un număr mai mic de proteine) și o subunitate mare de 40S (cu ARNr 21S).

Nu se cunoaște până în prezent care este funcția specifică a fiecăruia dintre tipurile de ARNr deși se consideră că ARNr 5S ar media legarea ARNt la subunitatea ribosomală mare

în prezența unor fracțiuni proteice. Se admite că bazele azotate neîmperecheate din ARNr ar participa într-un fel sau altul la interacțiunea cu celelalte categorii de ARN celular spre a decodifica mesajul genetic purtat de ARNm. Conlucrarea corectă dintre diferitele tipuri de ARN celular este cerută de traducerea corectă a mesajului, astfel încât să se obțină molecule proteice normale, funcționale. Un rol important în realizarea acestei conlucrări revine ionilor de Mg^{2+} care au importanță și în asamblarea celor două subunități ribosomale în ribosomi funcționali.

Proteinele ribosomale sunt bogate în arginină și lizină (70% din resturile de aminoacizi) ceea ce le conferă un caracter bazic (pH 8.5 – 10) cerut la complexarea cu moleculele de ARN acide spre a constitui ribosomi. Proteinele respective se dispun la suprafața ribosomilor împachetând ARNr. Proteinele ribosomale sunt sintetizate în citoplasmă și apoi transportate în nucleu, unde sunt asamblate în subunitățile ribosomale prin atașarea lor la precursorii ARNr. După asamblare la nivelul nucleolului, subunitățile ribosomale sunt transferate în citoplasmă. Procesul de transport bidirecțional este extrem de complicat, în realizarea sa putând fi implicate proteine ribosomale suplimentare, conținute de ribosomii de la eucariote (spre deosebire de cei de la procariote).

O celulă de *E. coli* conține aproximativ 15000 ribosomi, pe când o celulă eucariotă, fiind mult mai mare, prezintă și un număr mare de ribosomi. În celule se remarcă un ciclu ordonat al asamblării celor două subunități ale ribosomilor atunci când există ARNm de tradus, și de dezasamblare a lor când nu se face traducere.

5.1.3.3. ARN de transfer (ARNt)

ARNt reprezintă aproximativ 10-20% din totalul de ARN celular și constituie un component celular stabil atât la procariote cât și la eucariote. Acest tip de ARN (numit inițial ARN solubil deoarece a fost identificat în fracția solubilă a lizatului celular) este o moleculă specializată pentru acceptarea în citoplasmă a aminoacizilor și transferul lor la ribosomi, îndeplinind în felul acesta rolul de moleculă adaptoare între ARNm și catena polipeptidică în curs de sinteză. Se poate spune că ARNt mediază cel de-al treilea tip de transfer informațional: de la ARNm la proteine.

Din punct de vedere al compoziției chimice, moleculele de ARNt conțin, pe lângă bazele azotate obișnuite (AUCG) și o serie de baze neobișnuite: acid inozinic, derivați

metilați ai unor purine sau pirimidine (acid metilinozinic, acid metilguanilic); acid pseudouridilic; acid dehidrouridilic; acid ribotimidilic.

Moleculele de ARNt sunt de dimensiuni mici, fiind alcătuite din 73-93 ribonucleotide. Plierea ARNt determină realizarea unor legături de hidrogen intracatenare între ribonucleotidele complementare, rezultând molecule cu o structură secundară care are forma unei “frunze de trifoi”, cu “brațe” bicatenare și bucle monocatenare (fig.43).

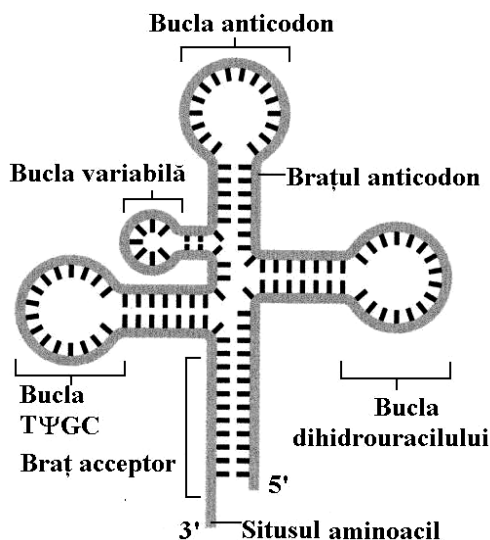


Fig.43. Structura generală a moleculelor de ARNt.

Regiunile monocatenare din cadrul structurii secundare apar sub forma unor bucle, prima dinspre capătul 3' fiind bucla timinei (sau TΨGC) formată din 7 baze (între care și timina și pseudouridina). Bucla cea mai importantă este bucla anticodonului și în sfârșit bucla D (a dihidrouracilului) formată din 8 – 12 baze semi - împerecheate. Capătul 5' al ARNt se termină cu guanină, nucleotidă ce este adăugată postranscripțional. De asemenea, la nivelul extremității 3' a ARNt există situsul aminoacil (de legare a aminoacizilor specifici la nivelul grupărilor 2' OH sau 3' OH de la capătul 3' al ARNt). Situsul aminoacil are la toate tipurile de ARNt aceeași succesiune de ribonucleotide: 3' ACC 5'.

Rolul regiunilor distincte din ARNt nu este încă elucidat cu precizie. Cea mai certă este funcția buclei anticodonului: anticodonul este tripleta de nucleotide din bucla centrală, care recunoaște, pe principiul complementarității, un codon din ARNm (o secvență de trei nucleotide care specifică plasarea în catena polipeptidică a unui anumit aminoacid). Anticodonul se leagă temporar de codon prin intermediul unor legături de hidrogen. Buclei variabile i se atribuie rolul de fixare a ARNt la ribosom, iar bucla D se pare că este implicată în recunoașterea de către enzimele aminoacil – ARNt – ligaze a ARNt corespunzător aminoacidului pe care aceste enzime l-au activat.

Teoretic, în natură ar trebui să existe 61 de tipuri de molecule de ARNt, corespunzător codonilor din codul genetic. Cu toate acestea, până acum, au fost identificate doar aproximativ 40 tipuri de molecule de ARNt. De asemenea, s-a evidențiat faptul că genele ce codifică ARNt sunt, de obicei, grupate pe cromosomi.

ARNt este sintetizat sub forma unei monocatene de pre-ARNt, iar secvența sa nucleotidică este cu 30–40 ribonucleotide mai mare decât în ARNt matur. În urma unor prelucrări posttranscripționale are loc excizia unor ribonucleotide și modificarea chimică a altora (acidul inosinic, metilguanina, dimetilguanina, acidul pseudouridilic, timina sub formă de acid ribotimidilic). De asemenea, după transcriere, la capătul 3' al ARNt este adăugată secvența CCA la nivelul căreia se va atașa aminoacidul activat în vederea transferului său la ribosom.

5.1.4.4. ARN nuclear heterogen și ARN cromosomal

Aceste tipuri de ARN sunt întâlnite numai în celulele eucariotelor. Se consideră că ARN_{nh} sintetizat în afara nucleolului este supus unor prelucrări posttranscripționale și va forma ARN_m matur.

ARN cromosomal este un tip de ARN ce reprezintă, cel puțin parțial, molecule precursore pentru celelalte tipuri de ARN. Pe de altă parte, se consideră că ARN_{cr} ar fi o categorie de ARN legată de reglarea funcțiilor genice având rol de activator al genelor.

În ultimul timp s-a avansat ideea că unele tipuri de ARN celular ar putea avea și rol catalitic pentru accelerarea unor procese biochimice din celulă. Astfel, la un tip de ARN_r precursor (ce conține un intron) s-a demonstrat că are capacitate autocatalitică care servește la excizia intronului, imediat după transcriere. Un sistem asemănător s-a observat și în cazul genei ce determină sinteza citocromului b din mitocondriile de la drojdia de bere: regiunea transcrisă ce corespunde intronului 1 are capacitatea de autoexcizie (Cech, 1985).

De asemenea, atât în nucleu cât și în citoplasma celulelor eucariote au fost identificate molecule de ARN de dimensiuni mici (în medie de 100-300 ribonucleotide). Moleculele de ARN de acest tip existente în nucleu au fost denumite ARN_{sn} ("small nuclear"), iar cele aflate în citoplasmă au primit denumirea de ARN_{sc} ("small cytoplasmic") (Symons, 1992). În starea lor naturală, aceste molecule de ARN se găsesc la nivelul unor particule ribonucleoproteice. Mai mult, a fost identificat încă un tip de ARN de dimensiuni mici,

localizat la nivelul nucleolului (notat ARNsno) implicat, se pare în prelucrarea precursorilor de ARNr.

În general, moleculele de ARNs_n împreună cu unele molecule proteice (aproximativ 40 tipuri de proteine) realizează procesul de prelucrare a moleculelor de ARNm precursor ce presupune eliminarea intronilor și asamblarea exonilor (fenomenul de “splicing”). Au fost identificate mai multe molecule de ARNs_n implicate în prelucrările postranscripționale ale moleculelor de ARN, ele fiind notate: U1, U2, U5, U4/U6.

S-a dovedit că procesul de prelucrare are loc prin intervenția unor particule ribonucleoproteice înrudite cu ribosomii, numite “**spliceosomi**”, procesul fiind consumator de energie (furnizată prin hidroliza ATP). Fenomenul de formare a spliceosomilor a fost intens studiat la *Saccharomyces cerevisiae* și în celulele de tip HeLa, în prezent el fiind destul de bine cunoscut (Reed, 2000). Experimentele efectuate au evidențiat faptul că recunoașterea specifică a situsurilor de prelucrare a ARNm precursor implică o serie de interacțiuni de tipul ARN-proteine, proteine-proteine și ARN-ARN.

Au fost identificate și situații în care moleculele de ARN își controlează propria prelucrare, acestea primind denumirea de **ribozime**. Unele activități catalitice ale ARN sunt direcționate față de diferite substraturi, în timp ce altele sunt intramoleculare. Un prim exemplu este cel al RN-azei P care este o ribonucleoproteină formată dintr-o moleculă de ARN legată la o proteină. ARN are capacitatea de a cataliza clivarea la nivelul unui substrat specific, reprezentat de ARN_t, în timp ce proteina joacă un rol indirect, probabil de menținere a structurii ARN catalitic. Un alt exemplu îl reprezintă moleculele de ARN de dimensiuni mici, din clasa viroizilor, care au capacitatea de a realiza reacții de autoclivare (“self-cleavage”). Deși această reacție este intramoleculară, molecula de ARN viroidal poate fi împărțită în două părți: partea “enzimatică” și partea “substrat”. Un al treilea exemplu este reprezentat de intronii din grupele I și II care au capacitatea de a prelucra ei înșiși ARNm precursor care îi conțin.

5.2. Decodificarea mesajului genetic

Structura primară a proteinelor sau ordinea așezării aminoacizilor în aceste molecule, componente esențiale pentru toate organismele vii (procariote sau eucariote), este legată de cea a acizilor nucleici. Informația genetică se află înscrisă în structura acizilor nucleici (în

gene) în mod codificat (codul genetic), corespunzând succesiunii specifice a celor patru tipuri de baze azotate (ATCG pentru ADN sau AUCG pentru ARN). Astfel, modificarea genelor prin mutații (deleții, aditii, substituții) reprezintă de fapt modificarea secvenței de baze azotate și, în consecință, determină schimbări în succesiunea aminoacizilor din proteine.

Proteinele sunt substanțe macromoleculare alcătuite din una sau mai multe catene polipeptidice, formate din aminoacizi legați între ei prin legături peptidice. În natură există 20 aminoacizi care, în funcție de natura radicalului din structura lor pot fi acizi, bazici, neutri și polari sau neutri și nepolari și care prezintă câte o grupare NH_2 și COOH libere. Din punct de vedere al organizării structurale, proteinele pot manifesta diferite tipuri de structuri (Russel, 2002):

- structură primară: corespunde succesiunii aminoacizilor din catena polipeptidică;
- structura secundară: se referă la plierea specifică a catenei polipeptidice formându-se regiuni cu structuri de tip α -helix sau de tip β -helix;
- structura terțiară se referă la conformația tridimensională a unei singure catene polipeptidice; această structură este de cele mai multe ori asociată cu proprietățile biologice active ale proteinei;
- structura cuaternară reprezintă asocierea mai multor catene polipeptidice cu formarea unor complexe multimerice. În anumite cazuri, catenele polipeptidice pot fi asociate și cu grupări neproteice (prostetice), formând macromolecule funcționale așa cum este exemplul hemoglobinei (formată din patru catene polipeptidice, 2α și 2β , asociate cu o grupare hem, ceea ce conferă macromoleculei capacitatea de a lega oxigenul)(fig.44).

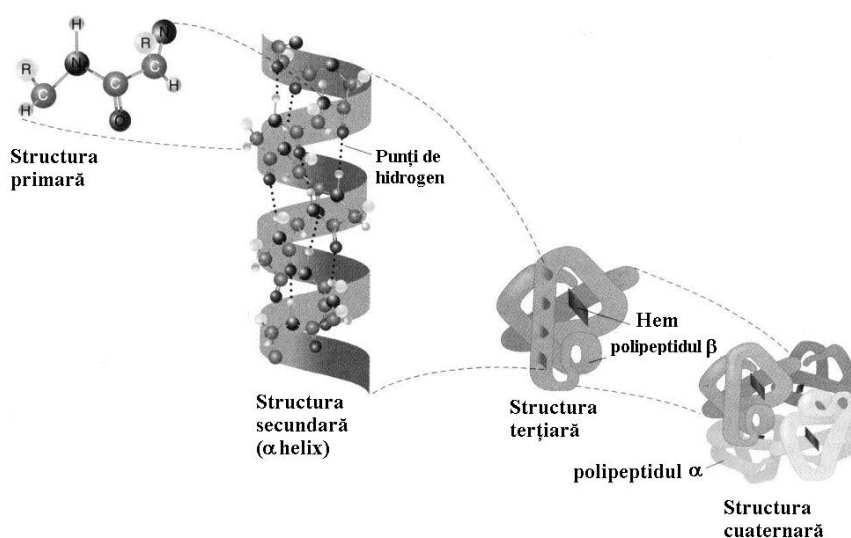


Fig.44. Tipurile conformaționale ale proteinelor

De remarcat faptul că aceste tipuri de structură a proteinelor nu sunt obligatorii, în totalitate, tuturor proteinelor, astfel că multe catene polipeptidice manifestă funcția specifică fără a se asocia cu alte catene polipeptidice (deci fără a prezenta structură cuaternară).

5.2.1. Descifrarea codului genetic

Codul genetic reprezintă ansamblul regulilor și principiilor după care informația genetică codificată în ADN (sau ARN în cazul ribovirusurilor și/sau a viroizilor) este copiată pentru a putea fi transmisă, de la locul său de origine (genomul organismului respectiv), la dispozitivele care realizează sinteza proteinelor, precum și modul în care mesajul transcris poate fi citit și tradus în secvențe specifice de aminoacizi.

Funcția codului genetic poate fi asemănată, în ultimă instanță, cu procesul de transmitere a unei informații codificate de la sursă (structura biochimică a genomului), pe anumite canale (ARNm), la locul de recepție (ribosomii) unde mesajul este decodificat (tradus) și folosit, în cazul activităților celulare, în procesul de biosinteză a proteinelor. Ea constă în conservarea criptografică a informației și transmiterea ei de la sursă la receptorul reprezentat de structurile cu funcții efectoare care sunt ribosomii. Analogia cu schemele de transmitere a informației este în general evidentă. Moleculele de ADN poartă în structura lor un adevărat cod molecular a cărui semnificație este determinată de succesiunea specifică a celor 4 baze și a cărui complexitate este proporțională cu mărimea genomului purtător de informație.

Structura codului genetic este determinată de secvența specifică a celor 4 baze (ATCG) cu care se pot face 4^n permutări (n = numărul de nucleotide dintr-o moleculă dată). Ca atare, numărul posibil de gene care să aibă, în medie, o greutate moleculară de 10^6 daltoni și să fie alcătuite din 1500 nucleotide este de aproximativ 4^{1500} , ceea ce reprezintă o valoare cu mult mai mare decât numărul de gene, care au existat în toate genomurile de la apariția vieții și până în prezent. Bazele se repetă de-a lungul moleculei așa cum se repetă literele unui alfabet de-a lungul frazelor unei cărți, în tot felul de combinații. După cum ordinea literelor dă sensul unui text, ordinea particulară a bazelor determină semnificația moleculei de ADN.

După descrierea structurii ADN de către Watson și Crick problema cea mai importantă a fost cea a modalității de asociere a celor 4 baze, pentru ca fiecare combinație să conțină informația corespunzătoare legării unuia din cei 20 de aminoacizi în constituția proteinelor.

Presupunând că toate unitățile fundamentale de codificare, denumite codoni, au aceeași lungime, Gamow (1954) este cel care a emis ipoteza că cea mai scurtă secvență nucleotidică necesară pentru a codifica un aminoacid constă din trei baze (cod triplet), ceea ce permite formarea a 64 de combinații. Dacă un aminoacid ar corespunde unei singure baze, nu ar fi posibilă decât codificarea a 4 aminoacizi. Un cod dublet, în care un aminoacid ar fi specificat de un codon alcătuit din două nucleotide nu ar putea codifica decât 4^2 , adică 16 aminoacizi. Codul triplet permite formarea a 64 de cuvinte (4^3) reprezentând forma cea mai simplă care asigură codificarea celor 20 de aminoacizi naturali.

Date și mai exacte au fost furnizate de tehnicile de secvențiere a acizilor nucleici și a proteinelor, care au permis stabilirea unor corespondențe riguroase între succesiunea codonilor în acizii nucleici și a aminoacizilor corespunzători în lanțul polipeptidic.

Rezultatele respective demonstrează, pe de o parte, existența codului triplet și, pe de alta, absența de intervale sau de spații între codoni, deoarece citirea informației genetice se face neîntrerupt, codon după codon, începând de la o extremitate până la cealaltă.

Prima descifrare a codului genetic ce demonstrează că o anumită secvență de ARN conține informația genetică necesară pentru sinteza unei catene polipeptidice cu o secvență specifică de aminoacizi, s-a realizat folosindu-se un ARN sintetic - acidul poliuridilic (poli - U) (Nirenberg, 1961). Acesta a fost incubat într-un sistem acelular care conține ribosomi, setul complet de molecule de ARNt, enzimele necesare pentru sinteza proteinelor, ioni de Mg^{2+} și ATP. Experiența a fost realizată în 20 de variante în care s-au pus amestecuri ale celor 20 de aminoacizi din care, câte unul singur marcat cu ^{14}C . S-a demonstrat, în acest caz, că o singură dată s-a obținut numai un singur polipeptid marcat - polifenilalanina, ceea ce demonstrează că tripleta UUU codifică fenilalanina.

Repetarea experiențelor cu alte tipuri de ARNm sintetici diferite sub raportul compoziției lor baze a dus la identificarea codonilor pentru alți aminoacizi: CCC codifică prolina, AAA codifică lizina.

Ulterior, folosind un ARNm sintetic care avea toate cele 64 de aranjamente posibile, Nirenberg și colab (1966) au demonstrat că 61 din cele 64 de triplete de cod au rol în specificarea celor 20 de aminoacizi naturali, ceilalți trei fiind caracterizați ca nonsens, deoarece nu au rol în codificarea unui aminoacid.

Ansamblul codonilor care specifică setul de aminoacizi standard, împreună cu codonii de punctuație (UAA, UAG, UGA) formează dicționarul codului genetic (tabelul 9).

Tabelul 9. Codul genetic

Prima bază a codonului	Nucleotida din mijlocul codonului				A treia bază a codonului
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

5.2.2. Caracteristicile codului genetic

Pe baza a numeroase experiențe s-a reușit să se determine caracteristicile de bază ale codului genetic:

1. *codul genetic este nesuprapus*, în sensul că un grup de trei nucleotide adiacente alcătuiesc un codon și determină legarea unui anumit aminoacid în lanțul polipeptidic. Bazele din structura fiecărui codon nu sunt implicate în nici un fel în semnificația de cod a tripletelor precedente sau următoare. Inițial, pe baza a diferite considerente fizico – chimice, Gamow a presupus că în structura codului genetic ar fi posibilă suprapunerea unor codoni, astfel încât o bază din structura unui codon ar putea intra în componența codonului adiacent. Acest tip de structură ar permite o economie semnificativă de material genetic. Examinarea a numeroase proteine, însă a infirmat această ipoteză și mai mult s-a demonstrat colinearitatea dintre informația genetică și structura polipeptidului. Nesuprapunerea codonilor determină trei posibilități de traducere a aceleiași secvențe de nucleotide, în funcție de punctul de start, acestea fiind denumite “cadre de citire” (“reading frames”). De exemplu, pentru secvența A C G A C G A C G A C G există trei “cadre de citire”:

ACG ACG ACG ACG ACG ACG
CGA CGA CGA CGA CGA CGA
GAC GAC GAC GAC GAC GAC

Orice modificare a secvenței de nucleotide prin adăugarea sau eliminarea (deleția) unei nucleotide determină modificarea cadrului de citire corect, începând de la nivelul nucleotidei modificate (mutațiile fiind de tip “frameshift”)(Lewin, 1997).

2. Codul genetic este "degenerat", această caracteristică decurgând din faptul că mai mulți codoni diferiți specifică același aminoacid. Codonii care specifică același aminoacid sunt numiți codoni sinonimi. Caracterul degenerat al codului genetic nu este uniform: unii aminoacizi cum ar fi serina, arginina, leucina sunt codificați de câte șase codoni; alți aminoacizi ca alanina, glicocolul, prolina, treonina și valina sunt codificați de câte patru codoni diferiți, în timp ce alți nouă aminoacizi sunt specificați de câte doi codoni. Excepție fac aminoacizii metionină și triptofan care sunt codificați de câte un singur codon (tabelul 9).

Codonul AUG, pe lângă funcția de a specifica metionina, îndeplinește și rolul universal de codon inițiator în sinteza proteică.

Caracterul degenerat prezintă o anumită regularitate care sugerează că este supus anumitor norme și că ar putea conferi unele avantaje biologice. Esențial este faptul că fiecare aminoacid este desemnat numai de codoni specifici, respectiv că nici un cuvânt de cod nu codifică mai mult de un aminoacid.

3. Flexibilitatea codului genetic se referă la codonii sinonimi la care primele două baze ale tripletei sunt constante, în timp ce a treia poate varia, deci această poziție este variabilă sau oscilantă. Ipoteza unei anumite flexibilități a codului genetic, cunoscută sub denumirea de efect “wobble” a fost formulată de Crick, având ca argument principal observația că toți codonii “sinonimi” (care codifică același aminoacid) au primele două baze ale tripletului constante, în timp ce a treia poate varia.

Crick a ajuns la concluzia că recunoașterea codon – anticodon se face în mod riguros specific în pozițiile 1 și 2 și în mod variabil (flexibil) la nivelul celui de-al treilea nucleotid situat în poziția “wobble” (wobble = a oscila). Poziția “wobble” corespunde celui de-al treilea nucleotid al codonului și primului din anticodon datorită polarității opuse dintre cele două molecule (ARNm și ARNt), una fiind în direcția $5' \rightarrow 3'$ și cealaltă în direcția $3' \rightarrow 5'$. De exemplu, dacă anticodonul din ARNt este de tipul $3'-CGG-5'$ el se împerechează, în mod corect, cu codonul $5'-GCC-3'$ din structura ARNm. Fenomenul “wobble” permite ca anticodonul $3'-CGG-5'$ să se poată împerechea cu codonul $5'-GCU-3'$ din ARNm. Deoarece, în exemplul de mai sus, codonul GCC și codonul GCU codifică pentru același aminoacid, alanina, fenomenul wobble nu este însoțit de modificarea secvenței de aminoacizi din structura catenei polipeptidice corespunzătoare.

Semnificația acestui fenomen se referă la faptul că aceeași moleculă de ARNt asigură traducerea mai multor codoni ceea ce permite celulei să sintetizeze mai puține tipuri de ARNt.

4. **Codul genetic este” fără virgule”**, ceea ce înseamnă că nu există nici un semn de punctuație între sfârșitul unui codon și începutul celui următor. Cuvintele de cod (tripletele) au o polaritate sau direcție specifică, datorită căreia, de exemplu, GUU codifică valina în timp ce UUG codifică leucina. Cadrul de citire (reading frame) al informației genetice trebuie stabilit cu rigurozitate la începutul unei molecule de ARNm și este marcat normal prin prezența codonului AUG. Acest codon codifică formil-metionina la procariote și metionina la eucariote. Decodificarea ARNm se face apoi secvențial de la o tripletă la alta până se întâlnește unul dintre cei trei codoni stop (nonsens): UAA, UAG sau UGA.

5. **Ambiguitatea codului genetic** este caracteristica prin care anticodonul din ARNt recunoaște doi codoni diferiți din ARNm. De exemplu, codonul GUG aflat la începutul mesajului genetic (în molecula de ARNm) este recunoscut de ARNt pentru formil metionină, pe când același codon aflat în interiorul moleculei de ARNm este recunoscut de ARNt pentru valină.

6. **Utilizarea preferențială a unor codoni**. Faptul că există mai mulți codoni pentru un același aminoacid a pus problema dacă acești codoni sinonimi sunt folosiți mai frecvent decât alții. Folosirea unuia sau altuia dintre codonii sinonimi se datorează întâmplării dar este cert că, în cadrul grupelor taxonomice mari, există o anumită preferință pentru anumiți codoni sinonimi. Alegerea preferențială a codonilor ar putea rezulta dintr-o armonizare între compoziția în codoni a mesajelor genetice și ansamblul moleculelor de care dispune celula pentru a traduce aceste mesaje (în special ARNt din care, până în prezent s-au izolat doar 54 de tipuri).

7. **Universalitatea codului genetic** evidențiază faptul că aceleași unități de codificare (codonii) specifică aceeași aminoacizi la toate organismele, indiferent de poziția lor taxonomică. În sprijinul acestei concluzii teoretice au fost aduse și date experimentale din rândul celor denumite himere, care folosesc sisteme acelulare de sinteză a proteinelor provenite de la o specie și ADN sau ARN provenit de la o alta. De exemplu, ARN genomic provenit de la VMT produce aceeași secvență de aminoacizi nu numai în plantele pe care le infectează (tutun), ci în orice altă plantă în care este activ. ARN din fagul ϕ 22 dirijează sinteza unei proteine capsidale normale atât în extractele acelulare provenite de la gazda sa normală (*E.coli*), cât și de la *Euglena gracilis*. În mod similar, mesagerii sintetici determină încorporarea în

polipeptide a acelorași aminoacizi indiferent de natura și proveniența sistemului acelar de sinteză proteică.

Utilizarea ARNm pentru sinteza polipeptidelor ce alcătuiesc hemoglobina, provenit din reticulocite de iepure într-un sistem acelar de la *E. coli* pentru sinteza proteică a dus la obținerea unor polipeptide tipice hemoglobinei de iepure.

Universalitatea codului genetic sugerează nu numai o origine comună a vieții pe Pământ, dar și imposibilitatea schimbării lui (ipoteza accidentului înghețat) odată ce viața a dobândit un anumit grad de complexitate. Mutațiile care ar altera codul genetic ar fi letale pentru celulă în cazul în care un codon ar fi tradus întotdeauna eronat. Toate acestea converg pentru a demonstra existența unui cod genetic comun tuturor organismelor, fără a exclude ca această universalitate să nu fie absolută, în sensul că în anumite privințe codul genetic nu putea fi diferit de la o specie la alta (Gavrilă, 1986).

Deși caracterul universal al codului genetic părea definitiv stabilit, un număr important de lucrări au scos în evidență faptul că ADNmt are un cod genetic puțin diferit de cel nuclear. Astfel, ADNmt uman și de șoarece codifică numai pentru 22 tipuri de ARNt, iar cel de levuri 24 tipuri, din care unii leagă mai mulți aminoacizi. În plus, s-au descris așa numiții “codoni eretici sau disidenți” care nu respectă codul genetic universal în sinteza proteică dirijată de ADNmt:

- la fungi și mamifere, triptofanul este codificat în mitocondrii nu numai de tripleta normală UGG ci și de UGA, care în mod normal este stop;
- în sinteza polipeptidelor, metionina este codificată nu numai de codonul AUG (normal) ci și de codonii AUA și probabil AUU, care semnifică normal izoleucina;
- codonii AGA și AGG care în citoplasmă codifică arginina, în ADNmt au rolul de codoni terminali.

Variațiile codului genetic mitocondrial observate la diferite microorganisme eucariote sugerează că aceste modificări s-au stabilit în perioade de timp diferite în cursul evoluției, probabil după divergența dintre plante pe de o parte și animale și fungi pe de altă parte.

5.2.3. Traducerea informației genetice

Biosinteza propriu-zisă a proteinelor este un proces complex în cursul căruia informația conținută în ADN, transmisă în citoplasmă (la ribosomi) prin intermediul ARNm este tradusă într-o secvență polipeptidică prin asamblarea aminoacizilor într-o ordine

specifică, prescrisă de informația genetică. Acest proces implică activitatea mai multor constituenți ai “mașinăriei” celulare de sinteză a proteinelor și evoluează în mai multe etape.

Toate procesele metabolice ale celulei se bazează pe existența și funcționarea proteinelor, care pot avea rol structural (cum ar fi, colagenul), transportor (hemoglobinele), de apărare a organismului (imunoglobulinele) sau rol enzimatic.

În cadrul biosintezei proteinelor participă atât acizi nucleici, cât și proteine. Pentru sinteza unei singure catene polipeptidice sunt mobilizate sute de alte proteine cu rol structural și enzimatic.

Proteinele sunt polimeri ai aminoacizilor, iar polymerizarea acestora se desfășoară la nivelul ribosomilor prin reacția de condensare dintre gruparea carboxil a unui aminoacid și cea amino a altui aminoacid, cu eliberarea unei molecule de apă.

Unele proteine sunt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică, altele au mai multe catene polipeptidice identice sau diferite. În acest din urmă caz, fiecare catenă este sintetizată pe baza informației genetice inclusă în gene diferite. Așa se explică de ce formularea inițială **o genă – o enzimă**, a fost înlocuită cu expresia: **o genă – o catenă polipeptidică**, ce exprimă mai bine realitatea la nivel molecular.

După realizarea polymerizării aminoacizilor (ordinea acestora în moleculă constituind structura sa primară) catena polipeptidică este supusă unor procese ulterioare prin care capătă structuri secundare, terțiare sau cuaternare ce îi dau în final configurația și funcționalitatea.

În decodificarea informației genetice rolul primordial îl joacă acizii ribonucleici celulari: ARNm, ARNt și ARNr. Rolul acestora a fost evidențiat după 1950 când, prin tehnici speciale, s-a constatat că sinteza proteică este însoțită de o creștere considerabilă a cantității de ARN din celulă. Prin experiențe efectuate pe alga unicelulară *Acetabularia mediterranea* (o celulă gigant) în urma cărora s-au extras nucleii din aceste celule, s-a constatat că în algele enucleate nu mai au loc nici procese de biosinteză proteică.

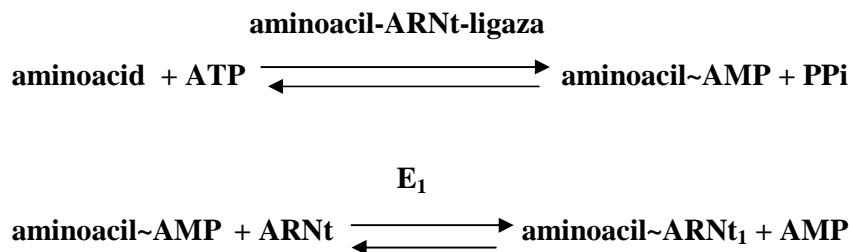
Ca orice reacție de polymerizare și în sinteza proteinelor au loc cele trei etape: de inițiere, elongare și terminare a catenei polipeptidice.

Sinteza unei catene polipeptidice începe cu un aminoacid amino-terminal și se termină cu un aminoacid carboxi-terminal. Ordinea includerii aminoacizilor este stabilită de ordinea codonilor din ARNm.

5.2.3.1. Etapa de inițiere a sintezei proteinelor

Prima etapă în inițierea biosintezei proteice este activarea aminoacizilor cu ATP, reacția fiind catalizată de aminoacil-sintetaza numită și aminoacil – ARNt – ligază și care este specifică fiecărui aminoacid. Aceste enzime reprezintă “cheia” în recunoașterea cifrului codului genetic.

Pentru așezarea aminoacizilor la ARNm este necesară o moleculă adaptor, reprezentată de ARNt, care să “lege” aminoacizii activați și să-i transporte la locul de sinteză. Cu alte cuvinte, are loc mai întâi o atașare a aminoacidului activat la restul de A (adenină) din gruparea CCA de la capătul 3' OH al ARNt, atașare catalizată tot de aminoacil-sintetaza (aminoacil– ARNt – ligaza):



Așa cum se cunoaște, specificitatea ARNt pentru un anumit aminoacid este dată de secvența anticodon, complementară unui codon din ARNm. De exemplu, molecula de ARNt al cărei anticodon este AAA poate lega doar fenilalanina deoarece codonul complementar din ARNm este UUU (specific pentru Phe); acest ARNt este notat ARNt^{Phe} , iar atunci când el a legat aminoacidul corespunzător notația utilizată este $\text{Phe-ARNt}^{\text{Phe}}$.

Etapa a treia în inițierea unei catene polipeptidice se desfășoară la nivelul ribosomului care prezintă suprafețe specifice de legare stereochemică a ARNm, ARNt și a catenei polipeptidice în creștere. Ribosomul asigură asocierea acestor trei elemente de așa manieră încât să facă posibilă recunoașterea codonilor din ARNm de către anticodonul corespunzător din ARNt, pe principiul complementarității.

Este esențial ca ribosomul să înceapă corect procesul de traducere al ARNm de la nivelul codonului start al secvenței codificatoare al acestuia (ARNm având la capătul 5', respectiv 3', două regiuni terminale, necodificatoare, care nu vor fi traduse). Inițierea precisă a traducerii depinde de corecta recunoaștere a cadrului de citire. Spre exemplu, dacă regiunea codificatoare a ARNm începe cu secvența 5' AUGUUUAAACCCUG 3', teoretic cadrele de citire ar putea fi:

AUG UUU AAA CCC CUG sau

UGU UUA AAC CCC UG sau

GUU UAA ACC CCU G, neexistând nimic care să indice care dintre nucleotide este prima nucleotidă a primului codon.

Cu toate acestea, s-a dovedit că primul codon cu care se începe procesul de traducere atât la procariote cât și la eucariote este, de regulă, AUG (mai rar GUG sau UUG), ceea ce înseamnă că există anumite mecanisme specifice care determină alegerea corectă a codonului AUG start. Codonul AUG codifică metionina indiferent dacă se găsește la începutul secvenței ce urmează a fi tradusă fie în interiorul acesteia. Pentru ca ribosomul să recunoască în mod specific codonul de inițiere este necesar un semnal suplimentar de discriminare între AUG inițiator și AUG din interiorul mesajului genetic. Acest semnal este reprezentat la bacterii de secvența Shine–Dalgarno, constituită din 7–15 ribonucleotide bogată în purine și aflată în amonte de codonul inițiator. Secvența Shine-Dalgarno este complementară cu o secvență formată din 3–7 nucleotide aflată la capătul 3' al moleculei ARNr 16 S din subunitatea ribosomală mică.

În cazul eucariotelor, ARNm nu conține secvența Shine-Dalgarno, dovedindu-se că ribosomii citoplasmatici nu se leagă direct la situsul de inițiere al traducerii. În acest caz, primul eveniment ce precede inițierea traducerii la eucariote este recunoașterea de către subunitatea ribosomală mică (40S) a secvenței terminale 5', metilată (secvența cap) de la nivelul ARNm, după care el migrează spre situsul specific de legare (“ribosome-binding site”). Între cele două regiuni ale ARNm există o secvență de aproximativ 1000 nucleotide.

“Migrarea” subunității ribosomale se oprește atunci când este întâlnit codonul de inițiere (AUG) plasat într-un context corespunzător (secvența GCCACCAUGG sau GCCGCCAUGG). Ulterior, subunitatea ribosomală 40S stabilizată la nivelul situsului de inițiere se asociază cu subunitatea 60S, iar procesul de sinteză a proteinelor începe.

La procariote, inițierea sintezei catenei polipeptidice este asigurată de intervenția unor factori proteici citoplasmatici de inițiere, desemnați IF1, IF2, IF3. Astfel, factorul IF3 mediază legarea subunității ribosomale 30S cu ARNm și previne reasocierea prematură cu subunitatea ribosomală 50S; un al doilea factor de inițiere, IF2, se leagă la nivelul unei molecule de GTP și a ARNt inițiator (pentru formil-metionină) și direcționează ARNt respectiv spre complexul ARNm-30S. În ceea ce privește rolul factorului de inițiere IF1, acesta este complex și se referă la stimularea inițierii, recunoașterea regiunii de inițiere, reciclarea IF2 și disocierea ribosomilor 70S (Zarnea, 1986).

La *complexul de inițiere 30S* reprezentat de ARNm + subunitatea ribosomală mică + fMet-ARNt + factori de inițiere + GTP ARNm-30S se atașează și subunitatea ribosomală mare, de 50 S și se formează *complexul de inițiere 70S*. Procesul este însoțit de hidroliza GTP cu eliberarea GMP, a pirofosfatului și a factorilor de inițiere.

Ribosomul astfel asamblat conține două situsuri de legare a ARNt: situsul A (acceptor) care este situsul pentru aminoacil-ARNt (ARNt asociat cu aminoacidul specific) și situsul P (sau situs donor) este situsul la care se atașează ARNt inițiator (Met_i-ARNt^{Met}) în cursul procesului de inițiere și peptidil-ARNt (ARNt asociat cu catena peptidică în curs de alungire) în cursul etapei de elongare (fig.45).

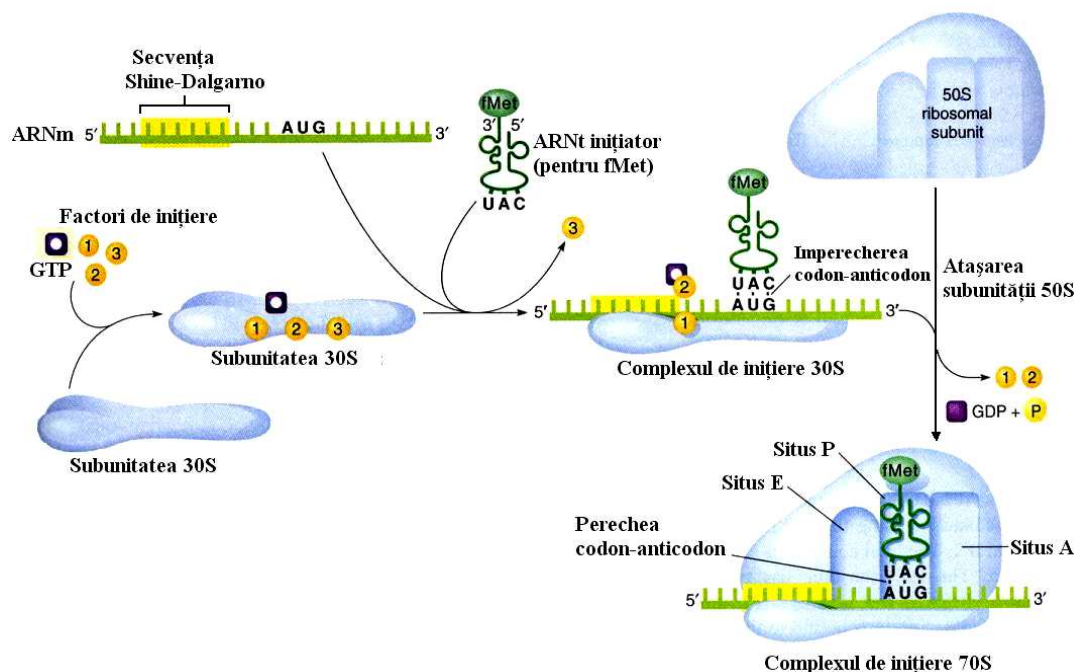


Fig.45 Inițierea procesului de traducere la procariote (după Russell, 2002)

În situsul A pătrunde aminoacil-ARNt corespunzător codonului din ARNm. De regulă, situsul P acceptă complexul aminoacil-ARNt numai dacă acesta a realizat recunoașterea codon – anticodon, adică dacă a trecut și prin situsul A și apoi a fost translocat în situsul P. Acceptarea se bazează pe unele posibile modificări conformaționale pe care le-a suferit complexul aminoacil-ARNt când a fost în situsul A.

O particularitate a procesului de inițiere este folosirea unui ARNt^{Met} specific pentru codonul de inițiere. Acest ARNt inițiator diferă de omologul său ce interacționează cu codonii AUG interni pentru metionină. Acest ARNt inițiator (fARNt^{Met} la procariote și iARNt^{Met} la eucariote) se leagă de metionină prin mecanismul prezentat, după care complexul respectiv

mai suferă un proces de formilare prin atașarea unui grup CH=O (formil) la nivelul NH₂ al metioninei, aceasta devenind formil – metionină. Formilarea este întâlnită numai la procariote unde toate catenele polipeptidice încep cu N-formil–metionina. La eucariote, în procesul de inițiere a sintezei catenei polipeptidice, nu are loc formilarea metioninei, dar există un ARNt^{Met} inițiator care diferă de celelalte tipuri și care se leagă direct la situsul P al ribosomului. Dacă la procariote există numai 3 factori de inițiere, la eucariote există 10 asemenea factori de inițiere.

5.2.3.2. Etapa de alungire

După legarea aminoacidului inițiator cu ARNt respectiv are loc deplasarea ribosomilor pe ARNm (sau invers) printr-o mișcare de translație, în așa fel încât la nivelul situsului A să ajungă următorul codon la care să se atașeze ARNt cu aminoacidul pe care-l transportă (fig.46). Între gruparea COOH a aminoacidului inițiator (metionina) și NH₂ a aminoacidului următor (corespunzător celui de-al doilea codon din ARNm) legat de ARNt și aflat în situsul A are loc reacția de condensare și realizarea primei legături peptidice. Reacția respectivă este catalizată de enzima peptidil-polimeraza, care face parte din proteinele ribosomale. În acest fel, etapa elongației constituie o succesiune ordonată de cicluri în care aminoacil-ARNt intră în situsul A al unui ribosom la care situsul P este ocupat de peptidil-ARNt. Această reacție se desfășoară până la terminarea citirii mesajului genetic.

În procesul de elongare intervin și factorii de elongație, proteine ribosomale care se atașează în această fază la particula ribosomală (la subunitatea mare).

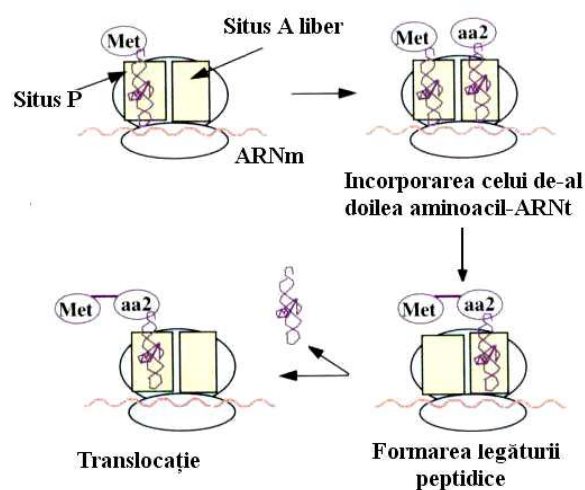
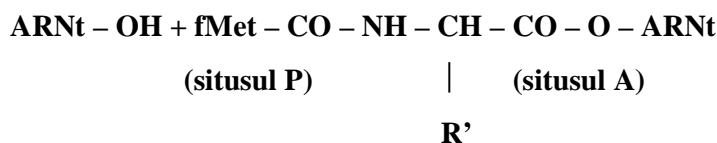
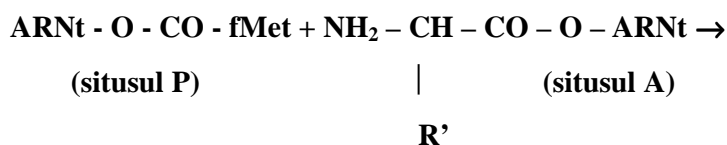


Fig.46. Inceputul etapei de alungire cu evidențierea formării primei legături peptidice între primul aminoacid (metionina) și următorul

Grupările aminoacil cuplate cu moleculele de ARNt aflate la nivelul situsurilor ribosomale P și A se găsesc în vecinătatea unei enzime ribosomale numită peptidil transferaza care transferă grupul fMet al ARNt din situsul P la gruparea amino liberă a aminoacil-ARNt din situsul A, formându-se un dipeptid atașat la ARNt. Deși peptidil transferaza este descrisă ca fiind enzimă, s-a dovedit că activitatea sa este menținută chiar și atunci când proteinele ribosomale sunt îndepărtate în proporție de 95%. Această observație sugerează posibilitatea ca activitatea enzimatică respectivă să fie o proprietate a ARN ribosomal (Elliott și Elliott, 1997). Activitatea peptidil transferazei se realizează în cazul reacției:



După formarea primei legături peptidice, la nivelul situsului A se găsește peptidil-ARNt, iar situsul P conține o moleculă ARNt nelegată de nici un aminoacid (format prin separarea de aminoacidul purtat). În acest moment are loc re poziționarea ribosomului prin “deplasarea” cu un codon de-a lungul ARNm, proces numit translocare. ARNt lipsit de aminoacid aflat în situsul P este “mutat” la nivelul unui al treilea situs ribosomal, situs de “ieșire” (“exit site”= situs E), de unde este liberat în citoplasmă putând fi refolosit. Deplasarea ribosomului de-a lungul moleculei de ARNm în direcția 5' → 3' necesită participarea unui alt factor de elongare, EF-G care mai este denumit și translocază. Procesul de translocație necesită energie care este furnizată prin hidroliza GTP.

După ce situsul P a fost ocupat de dipeptidil-ARNt, la situsul A liber poziționat pe al treilea codon al ARNm se atașează aminoacil-ARNt corespunzător complexat cu EF-Tu-GT. La nivelul acestuia se adaugă apoi gruparea peptidil de la situsul P, ARNt “descărcat” se deplasează spre situsul de ieșire, iar noul complex peptidil-ARNt se deplasează din situsul A în situsul P după care ciclul se reia (fig.47).

La *E.coli*, sinteza unei proteine de dimensiune medie la nivelul unui singur ribosom se realizează în 20 secunde (viteza de sinteză este de, aproximativ, 15 aminoacizi/secundă). Prin urmare, teoretic, dacă sinteza unei proteine s-ar realiza la nivelul unui singur ribosom s-ar sintetiza câte o copie a respectivei proteine la fiecare 20 secunde.

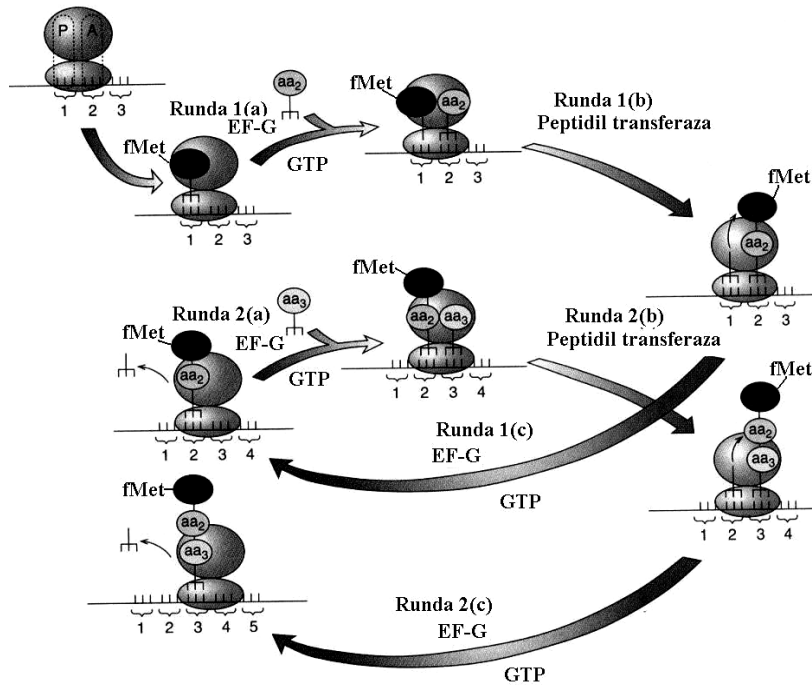


Fig.47. Reprezentarea schematică a etapei de alungire

Cu toate acestea, în realitate, după ce ribosomul a asigurat traducerea a aproximativ 25-30 codoni, capătul 5' al ARNm devine liber spre a forma un alt complex de inițiere și astfel, un al doilea ribosom se angajează în traducerea mesajului genetic spre a asigura sinteza unei noi catene polipeptidice, apoi urmează al treilea, al patrulea etc. De obicei, la nivelul unei molecule de ARNm utilizată pentru traducere se pot găsi cinci ribosomi, structura rezultată numindu-se polisom sau poliribosom (fig.48). (Elliott și Elliott, 1998).

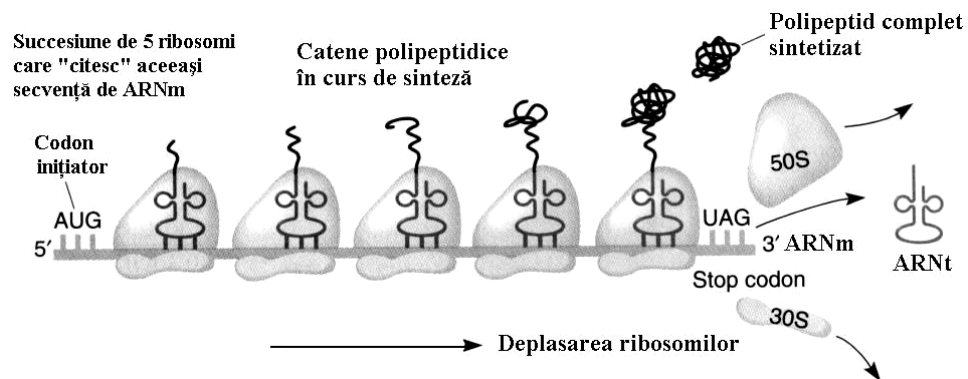


Fig.48. Alcătuirea unui poliribosom

Poliribosomii există și la eucariote ei evidențiind intensele procese de sinteză proteică.

La procariote transcrierea mesajului genetic și traducerea sa pot avea loc simultan deoarece înainte de terminarea sintezei ARNm, datorită absenței membranei nucleare, capătul său 5' se poate asocia cu ribosomii (fig.49).

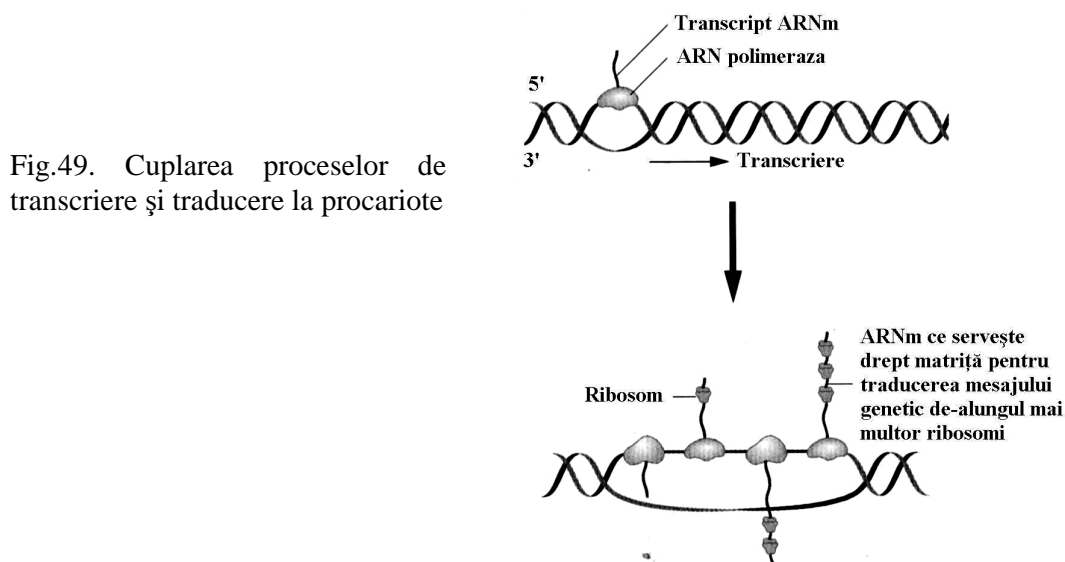


Fig.49. Cuplarea proceselor de transcriere și traducere la procariote

5.2.3.3. Terminarea sintezei proteice

Când deplasarea ribosomilor pe ARNm ajunge cu situsul său A la nivelul unui codon nonsens (stop, codon terminator, UAA, UAG, UGA) nu se mai atașează nici un aminoacil-ARNt și astfel se asigură terminarea sintezei catenei polipeptidice. Codonii stop sunt recunoscuți de factori de eliberare sau de terminare: factorii TF-R1, TF-R2 și TF-R3 la bacterii și factorul RF la eucariote. Factorul TF-R3 asigură desfacerea grupului carboxil al aminoacidului terminal de ARNt transportor. În urma acestui proces are loc eliberarea de pe ribosom atât a catenei polipeptidice cât și a ARNt precum și separarea ribosomilor în cele două subunități ale sale (fig.48).

5.2.4. Particularitățile decodificării la eucariote

La eucariote transcrierea are loc în nucleu, iar traducerea are loc în citoplasmă unde se află ribosomii. Trecerea ARNm monocistronic din nucleu în citoplasmă se face prin porii membranei nucleare, în acest proces un rol important avându-l coada poliadenilată a ARNm. Etapele procesului de traducere sunt în esență aceleași ca și la procariote dar există și unele diferențe. O primă diferență se datorează faptului că ribosomii eucariotelor sunt mai mari (au

80S, iar subunitățile au 40S, respectiv 60S), în alcătuirea lor intrând mai multe tipuri de ARNr și proteine ribosomale. Așa cum s-a menționat deja, primul aminoacid cu care începe traducerea este tot metionina dar în stare neformată. Aceasta nu înseamnă însă că toate proteinele funcționale de la eucariote au ca prim aminoacid (ca extremitatea NH₂ a proteinei) metionina; de cele mai multe ori acest aminoacid este îndepărtat în urma unor prelucrări post-tranlaționale pe care le suferă catena polipeptidică nou sintetizată.

Etapa de inițiere la eucariote presupune mai întâi, la fel ca și la procariote, formarea complexului de inițiere dar mecanismul prin care ARNm este poziționat corect la nivelul situsului P ce conține codonul inițiator (AUG) este total diferit. Trebuie reamintit că ARNm de la eucariote prezintă la extremitatea 5' secvența "cap" (cu 7metil guanosin-trifosfat), dar nu conține nici o secvență de tip Shine-Dalgarno ca la procariote.

La eucariote, există un grup specific de proteine, inclusiv factori de inițiere, care se atașează la nivelul secvenței „cap” și împreună se leagă la subunitatea ribosomală 40S, rezultând complexul de pre-inițiere. Acesta este localizat la extremitatea 5' a ARNm, la distanță de codonul inițiator AUG. Printr-un mecanism ce presupune participarea ATP și GTP, complexul de pre-inițiere se deplasează de-a lungul ARNm până când ajunge la nivelul codonului AUG, moment în care se formează complexul de inițiere prin adăugarea subunității ribosomale 60S.

Celulele eucariote, pe lângă mesajul genetic purtat de ADN cromosomal nuclear mai conțin o serie de gene localizate la nivelul ADN cloroplastic și/sau mitocondrial. Ribosomii mitocondriali sunt asemănători celor bacterieni, iar în procesul de inițiere se utilizează fMet-ARNt^{Met}, ca și în cazul bacteriilor.

5.2.5. Modificări post-tranlaționale ale proteinelor

S-a dovedit că majoritatea proteinelor, pentru a deveni funcționale, sunt supuse unor modificări ce au loc după ce procesul de sinteză s-a încheiat. Asemenea modificări se numesc post-tranlaționale și se referă atât la stabilirea conformației spațiale corecte (fenomenul de "împachetare") cât și la modificările chimice ce presupun îndepărtarea sau adăugarea anumitor grupări.

Impachetarea proteinelor constituie un proces esențial pentru ca anumite proteine să dobândească proprietățile funcționale specifice. Multă vreme s-a considerat că imediat după sinteza unei catene polipeptidice la nivelul ribosomilor are loc, în mod automat, pe baza

interacțiunilor dintre resturile de aminoacizi conținuți, “împachetarea” (“folding”) acesteia pentru a forma o structură tridimensională.

La începutul anilor '90 s-a pus în evidență o familie specială de proteine care au primit denumirea de “**chaperone**” (Ellis și Van der Vies, 1991) care au capacitatea de a recunoaște și lega proteinele parțial “împachetate” sau, altfel spus, “desfășurate” parțial. Asocierea chaperonelor cu asemenea proteine asigură stabilizarea acestora până în momentul în care sunt îndeplinite condițiile de împachetare corectă, proces ce necesită ATP.

Rolul chaperonelor nu se rezumă doar la participarea la împachetarea corectă a proteinelor nou sintetizate ci include stabilizarea proteinelor denaturate și “îndrumarea” („targeting”) proteinelor “îmbătrânite” pentru distrugere la nivelul lizozomilor. Chaperonele mai sunt implicate în procesul de translocare a proteinelor prin membranele mitocondriale și în rearanjarea subunităților proteice în complexe macromoleculare.

Insemnătatea deosebită a corectitudinii procesului de împachetare a anumitor proteine a fost dovedită în urma descoperirii **prionilor**, agenți proteici infecțioși responsabili de maladii neurologice degenerative foarte grave, cum ar fi boala Creutzfeld-Jacob și boala kuru la om sau maladia “vacii nebune” de la bovine (encefalopatia spongiformă bovină = ESB)(Prusiner, 1995, Taubes, 1996). Infecția este asociată cu prezența în țesutul afectat a unor proteine modificate, rezistente la acțiunea proteazelor, care au fost denumite prioni (PrP = “proteinaceous infectious particle”). Cercetările efectuate asupra acestor proteine au condus la concluzia că ele sunt derivate de la proteine normale, în urma unor modificări conformaționale. Mecanismul exact al acestei conversii conformaționale nu este cunoscut dar, se pare că în acest proces este implicată o proteină de tip chaperonă și o sursă de energie. În prezența lor, proteina normală (notată PrP) este desfășurată (denaturată) și apoi reîmpachetată într-o formă anormală, sub influența unei molecule prionice (PrPsc).

Conform studiilor recente legate de conformația moleculelor prionice, proteina PrP normală de la șoarece prezintă trei regiuni spiralate de tip α -helical (catena polipeptidică se răsucește ca și cum s-ar încolăci pe suprafața unui cilindru) și două cu pliere de tip β (pliere a catenei polipeptidice în care segmente rectilinii ale acesteia sunt juxtapuse în zigzag, ca un metru de tâmplărie incomplet strâns) (Zarnea și Dumitru, 1996; Lasmegas și colab., 1997). În schimb, în cazul proteinelor anormale PrPsc plierea este aproape în întregime de tip β , acest tip de structură explicând insolubilitatea în detergenți și rezistența la proteoliză.

Inocularea animalelor de laborator cu diluții foarte mari de omogenat de creier infectat cu prioni este urmată de o acumulare în creierul acestora a unui număr mare de proteine

infecțioase (PrPsc). Descoperirea mecanismului de rearanjare conformațională (α -helix \rightarrow β -pliere) „in vitro” a PrP normale, catalizat de forma sa patologică, a permis stabilirea unui scenariu în care primele molecule de PrPsc apărute (prin infecție sau prin mutație genică) interacționează direct cu PrP pe măsură ce acestea se formează, impunându-le propria lor conformație (Zarnea și Dumitru, 1996).

Secreția proteinelor. Odată sintetizate, proteinele sunt redistribuite la nivelul celulelor în vederea îndeplinirii funcției pe care o au. Majoritatea proteinelor sunt citoplasmice deoarece, după sinteză rămân la nivelul citoplasmei. O altă parte a proteinelor celulare sunt localizate la nivelul membranei plasmatică sau sunt liberate în spațiul extracelular. În cazul celulelor eucariote, proteinele sintetizate în citoplasmă trebuie să ajungă la nivelul mitocondriilor, a lizozomilor, a peroxizomilor sau a nucleului (proteinele nucleare).

Studiile efectuate asupra unor tipuri de celule eucariote (de exemplu, celule pancreatice) au dovedit că proteinele care au altă destinație decât citoplasma (proteinele extracelulare și cele lizozomale), după sinteză, ajung mai întâi în interiorul reticulului endoplasmic (RE). Așa cum se cunoaște, reticulul endoplasmic reprezintă un sistem de canalicule la nivelul citoplasmei, asigurând transportul intra- și intercelular al unor substanțe. O parte a reticulului endoplasmic este asociat cu ribosomi, astfel că proteinele nou sintetizate trec rapid în lumenul RE. Se pune însă problema modului în care aceste proteine traversează membrana RE.

Cercetările realizate în cazul unor tipuri variate de proteine au dovedit că, în cazul celor ce vor fi secretate, sau care ajung la nivelul membranei plasmatică, în lizozomi sau în lumenul RE, la capătul amino terminal există o secvență specială formată din 25 ± 1 aminoacizi denumită secvență “leader” (sau secvență semnal). Ea este separată de restul proteinei (proteina matură) printr-un situs special numit situs de clivare proteolitică, recunoscut de o protează specifică.

O parte dintre proteinele ce ajung în lumenul RE sunt supuse unui proces de **glicozilare** (N-glicozilare la nivelul grupării NH_2 a asparaginei sau O-glicozilare la nivelul grupării OH a resturilor de serină sau treonină din proteină), proces necesar activării funcționale a multor tipuri de proteine (Abeijon și Hirschberg, 1992).

În ceea ce privește eliminarea proteinelor din lumenul RE (care constituie un sistem închis, “fără ieșire”) se consideră că acestea sunt transferate complexului Golgi prin intermediul unor vezicule de transport. La nivelul complexului Golgi, proteinele sunt “împachetate”, introduse în alte vezicule care, prin fuziune cu membrana plasmatică, asigură

eliminarea proteinelor în exteriorul celulei. Tot la nivelul complexului Golgi ajung și proteinele (enzimele) lizozomale care, după recunoaștere și “sortare” dintre celelalte proteine sunt transferate în lizozomi.

O situație specială apare în cazul proteinelor citoplasmatică a căror destinație sunt mitocondriile și cloroplastele (în cazul celulelor vegetale): aceste proteine sunt sintetizate la nivelul ribosomilor liberi (neasociați cu RE) sub forma unor pre-proteine ce prezintă la extremitatea NH₂ secvența semnal (Settles și Martienssen, 1998). Secvența semnal a proteinelor mitocondriale conține un număr variat de aminoacizi (12-70 aminoacizi), rolul său fiind acela de a “conduce” proteinele respective în interiorul mitocondriei, după traversarea dublei-membrane a acesteia (se pare la nivelul unor pori). În cursul procesului de traversare a membranelor mitocondriale are loc clivarea proteolitică a secvenței semnal de către peptidaze specifice.

În cazul cloroplastelor, s-a evidențiat existența a două secvențe semnal: una care mediază transportul din citoplasmă în interiorul cloroplastului, ea fiind eliminată la nivelul membranei plastidiale și o a doua secvență semnal care asigură trecerea proteinei respective prin membrana tilacoidală (Settles și Metierssen, 1998).

Proteinele ce au drept destinație nucleul sunt sintetizate în citoplasmă după care sunt translocate în nucleu prin intermediul unor pori speciali. Se pare că în procesul de translocare ar fi implicate scurte secvențe de aminoacizi care ar reprezenta secvențe semnal necesare traversării prin porii nucleari (Izaurrealde și Adam, 1998).

Trebuie făcută o precizare: o pre-proteină nu trebuie confundată cu o pro-proteină. Cel mai concludent exemplu este cel al insulinei: această proteină este sintetizată sub forma unei catene polipeptidice lungi, pre-proinsulina ce conține la capătul N-terminal o secvență semnal. Proteina este apoi secretată în RE, în cursul translocării fiind eliminată secvența semnal, astfel că în lumenul RE ajunge o formă scurtată a acesteia, proinsulina. Aceasta este apoi prelucrată prin eliminarea regiunii mediane a proinsulinei, astfel încât se formează două catene polipeptidice care se unesc prin intermediul unor punți disulfidice.

La procariote, procesul de secreție a fost mai bine studiat decât în cazul eucariotelor. Cele mai multe experimente au fost efectuate cu bacterii din genul *Bacillus* cunoscute ca eliminând în mediul extracelular un număr mare de proteine. De asemenea, mecanismul secreției proteinelor a fost examinat și în cazul bacteriei Gram negative *E.coli*, dată fiind existența spațiului periplasmic localizat între peretele celular și membrana externă. În acest caz, Blight și col.(1994) au propus utilizarea a două noțiuni: aceea de “export” pentru

transportul proteinelor din citoplasmă în spațiul periplasmic și termenul de “secreție” pentru transportul proteinelor din citoplasmă în mediul extern.

S-a dovedit că majoritatea proteinelor ce se elimină în mediul extern prezintă la capătul amino terminal o secvență semnal formată din 15-30 aminoacizi hidrofobi. Ghidată de această secvență semnal, proteina traversează membrana plasmatică în timp ce secvența semnal rămâne la nivelul membranei, ea fiind separată de restul proteinei prin acțiunea unei proteaze membranare (fig.50).

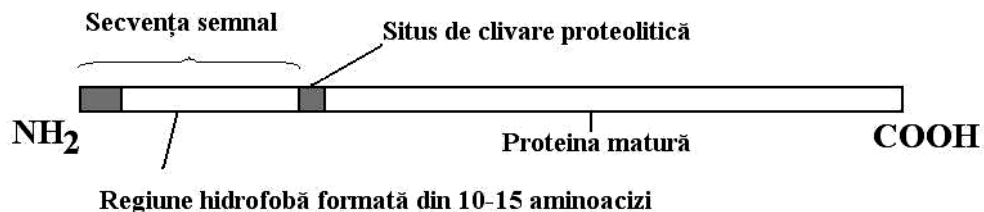


Fig.50. Diagrama unei secvențe semnal atașate la extremitatea amino terminală a unei proteine ce va fi eliminată în mediul extern

Datele recente confirmă faptul că procesul de secreție a proteinelor la bacterii este un proces complex, în care sunt implicate numeroase proteine de transport ce formează un “translocon” (mecanism dependent de proteine secretoare), precum și proteine de tip chaperone care asigură conformația optimă necesară secreției, fiind evidențiate unele asemănări cu mecanismele de secreție descrise la eucariote.

5.2.6. Degradarea proteinelor

Proteinele celulare, după îndeplinirea rolului pe care îl au, sunt supuse unui proces de degradare care are drept scop înlocuirea proteinelor “vechi” cu proteine “noi” (“turnover” proteic), procesul fiind foarte selectiv. Cauzele distrugerii proteinelor sunt multiple. Deseori, în urma procesului de traducere proteinele sintetizate prezintă erori în ceea ce privește compoziția în aminoacizi; unele proteine suferă alterări chimice ca urmare a oxidării devenind astfel incapabile de a-și realiza funcțiile; împachetarea incorectă a proteinelor etc (Jentsch, 1996).

Degradarea proteinelor se datorează, în principal, acțiunii proteazelor și, deși este mai bine studiat la eucariote procesul este destul de puțin cunoscut. Proteazele eucariotelor pot fi

incluse în trei grupe în funcție de acțiunea pe care au asupra proteinelor și de localizarea lor (Lewin, 1997):

- proteaze implicate în evenimentele de procesare proteolitică ce conduc la obținerea de proteine “mature”, funcționale, sau care determină eliminarea secvenței semnal de la nivelul proteinelor secretate;
- proteaze lizozomale, localizate la nivelul lizozomilor, implicate în degradarea proteinelor structurale importate în celule precum și în autoliza ce are loc în cursul dezvoltării;
- proteaze citoplasmatică ce formează complexe macromoleculare numite “**proteasomi**”. Aceste agregate proteolitice degradează proteinele din citosol (determinând completa convertire a proteinelor la fragmente foarte mici), iar în anumite cazuri realizează prelucrări specifice ale proteinelor.

Mecanismul exact al procesului de degradare a proteinelor este departe de a fi înțeles, mai ales dacă ne gândim că uneori el nu poate fi prevăzut. Un exemplu în acest sens este cel al proteinelor musculare care încep să fie degradate în condiții de inaniție, furnizând aminoacizii necesari gluconeogenezei (Elliot și Elliot, 1997).