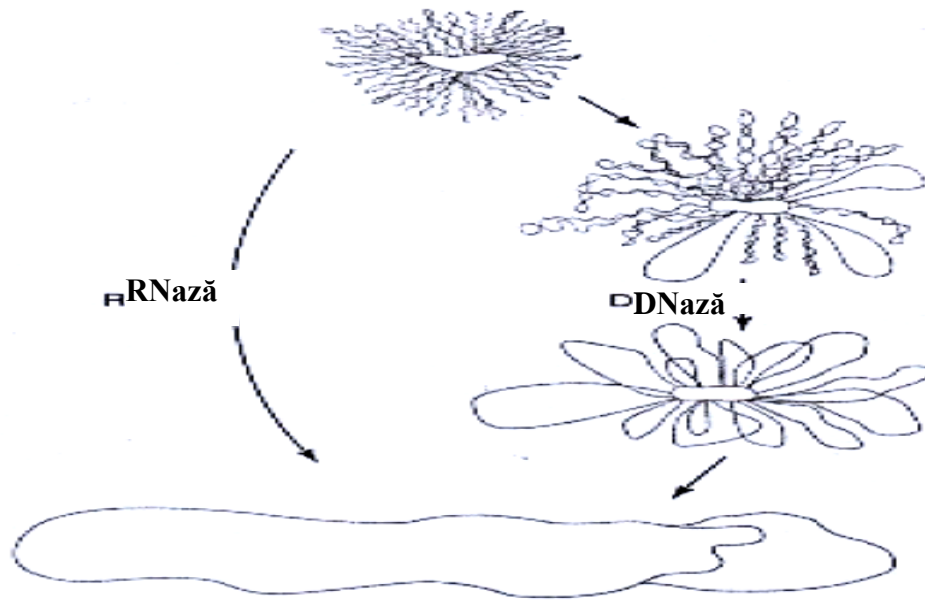


### Organizarea superioară a ADN

La celulele procariote, ADN este organizat într-un singur cromozom, care conține ADN dublu-catenar, circular, supraspiralat. Cromozomii bacterieni sunt organizați în structuri compacte, denumite **nucleoizi**, prin interacțiunea cu proteine histonice și participarea de cationi, poliamine (ca de exemplu spermina, spermidina, putresceina, cadaverina), ARN, proteine nonhistonice.



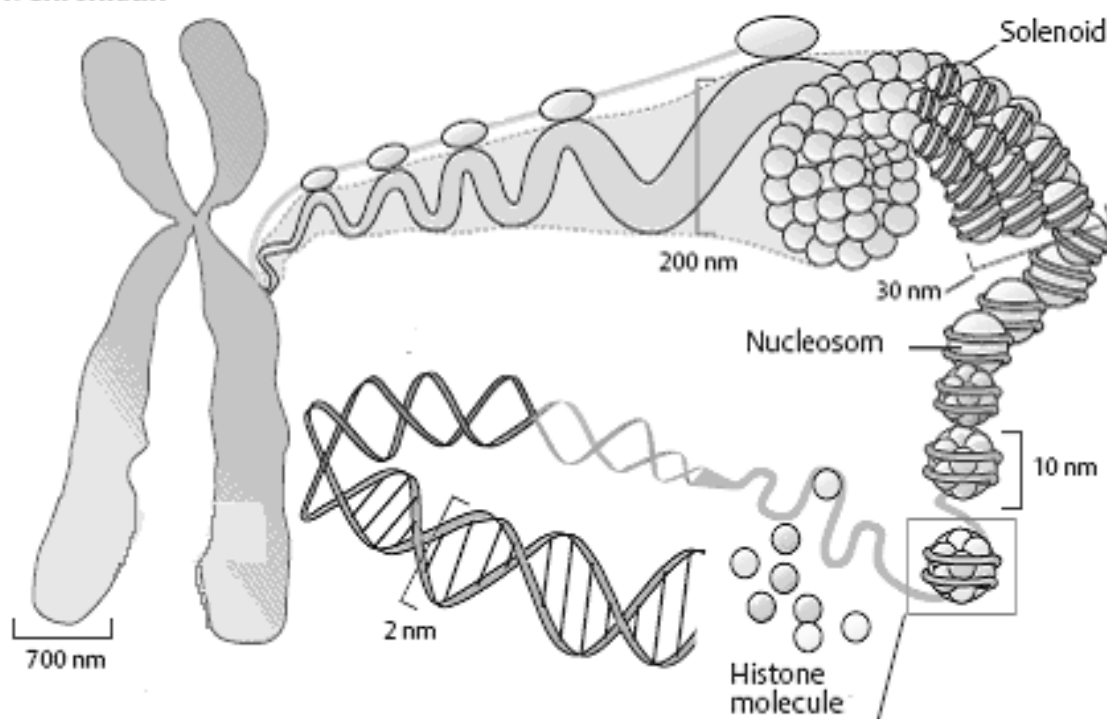
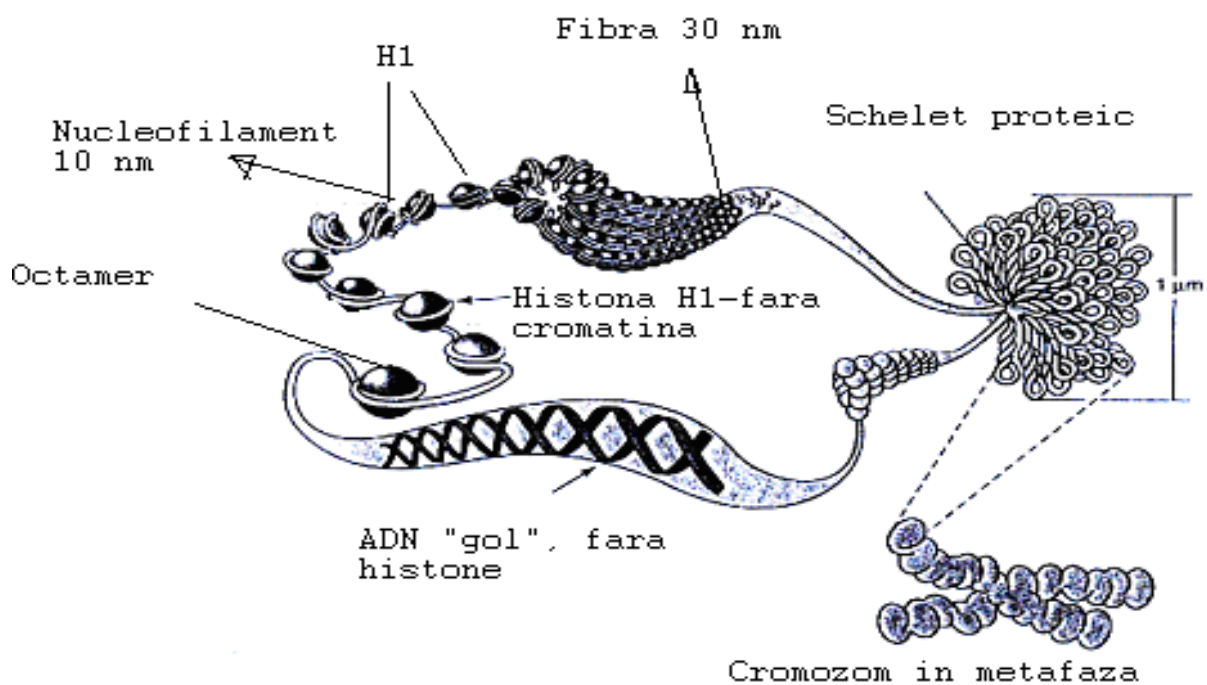
**Împachetarea cromozomului bacterian în nucleoizi. Cromozomul bacterian circular este împachetat în aproximativ 40-50 bucle de ADN supraspiralat, organizat pe un schelet format din ARN și proteine.**

La bacterii, unde cantitatea de ADN este mult mai mică, compactarea ADN se realizează prin superspiralarea formei B a ADN, superspiralare care poate fi de același sens (pozitivă) cu spiralarea formei B sau de sens opus (negativă). Cromozomii bacterieni sunt structuri dinamice, care disociază și se refac rapid, ceea ce reflectă nevoia de sinteză rapidă a ADN, diviziune celulară și transcripție rapide, ce caracterizează aceste organisme.

La organisme superioare, inclusiv la om, s-a constatat că, în cursul ciclului celular, ADN este compactat în două forme:

- a) sub formă de cromozomi, în mitoză, structuri vizibile la microscopul optic
- b) sub formă de cromatină, în interfază, o structură mai puțin densă decât cromozomii, mai adecvată desfășurării proceselor de transcripție și translație

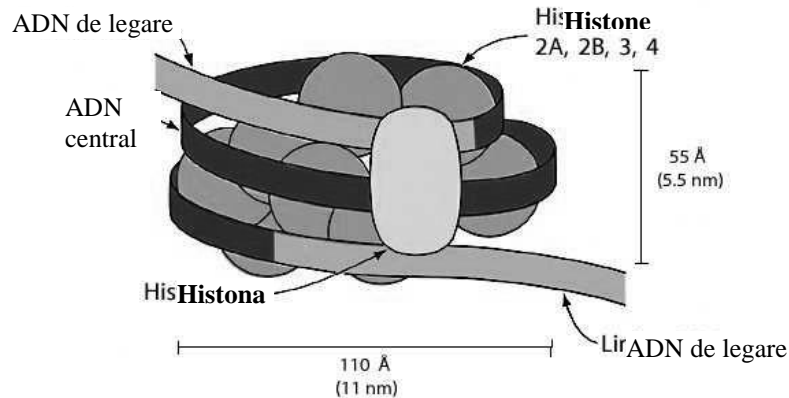
Lungimea ADN dintr-o singură celulă umană este de aproximativ 1,74 m, acest ADN găsindu-se în nucleul celular ale cărui dimensiuni nu depășesc 10  $\mu\text{m}$ . Acest lucru este posibil printr-un fenomenal proces de împachetare, proces prin care nu numai că ADN este compactat la dimensiuni miniaturale, dar își păstrează nealterat rolul funcțional.



### Organizarea ADN în cromozomi, în nucleozomi și nucleofilamente

Studiile de microscopie electronică a cromatinei au relevat existența unui mare număr de particule sferice, cu densitate optică mare, care au fost denumite nucleozomi. Aceste particule au diametrul de aproximativ 10 nm și sunt legate

între ele prin intermediul unor catene de ADN. Nucleozomii sunt constituiți din proteine bazice numite histone, care se leagă de ADN, având rol în compactarea și protecția ADN față de acțiunea enzimelor hidrolitice (nucleaze) (Figura 14).



**Structura nucleozomului**

Histonele sunt de cinci categorii ( $H_1$ ,  $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$  și  $H_4$ ), au un procent ridicat de aminoacizi bazici în moleculă și o conformația globulară. Structura lor a fost conservată în decursul evoluției ceea ce sugerează faptul că funcțiile lor sunt identice la toate eucariotele. În afara celor 4 histone ce formează miezul histonic, există și histona de tip  $H_1$  ce se leagă de ADN dintre nucleozomi, legătura formată fiind cea mai slabă dintre legăturile ADN-histone.

Histonele din miezul histonic pot fi modificate chimic prin procese de: acetilare, metilare, fosforilare, ADP-ribozilare și legare covalentă de ubiquitină. În urma acestor modificări histonele sunt implicate în următoarele procese:

1. Acetilarea histonelor  $H_3$  și  $H_4$  induce activarea sau inactivarea transcripției unor gene.
2. Acetilarea este asociată cu asamblarea cromozomilor în decursul replicării.
3. Fosforilarea histonei  $H_1$  este asociată condensarea cromozomilor în timpul ciclului celular.
4. ADP-ribozilarea histonelor intervine în reglare ADN.
5. Metilarea histonelor este corelată cu activarea și represiia procesului de transcripție.

Miezul histonic are o structură octamerică de forma  $(H_3/H_4) - (H_{2A} - H_{2B})_2$ .

Structura unui nucleozom are aspectul unui disc format dintr-un miez histonic octameric alcătuit din câte 2 molecule de histone  $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$  și  $H_4$ , care este înfășurat de o catenă ADN prin 1,75 spire, după care catena ADN se desprinde și face legătura cu următorul nucleozom, astfel obținându-se un polinucleozom. Polinucleozomul are aspectul unui șirag de mărgelă, în care mărgelile sunt nucleozomii, iar ața șiragului, catena de ADN. Într-un nucleozom, înfășurarea celor 1,75 spire ADN de miezul histonic protejează de denaturare între 145 - 212 perechi de nucleotide. ADN, ce face legătura între nucleozomi, cuprinde 20 - 80 perechi de nucleotide și este protejat de histone de tip  $H_1$ .

În cromatină, polinucleozomii constituie 2 tipuri de nucleofilamente cu structuri spiralate: nucleofilamente cu diametrul de 10 nm și nucleofilamente cu diametrul de 30 nm rezultate prin superspiralarea celor cu diametrul de 10 nm.

Condensarea cromatinei în cromozomi mărește gradul de compactare al ADN printr-un proces suplimentar de superspiralare și încolăcire al nucleofilamentelor din cromatină, formându-se în final bucle de 30 - 100.000 perechi de nucleotide care alcătuiesc structura matriceală a cromozomului. În metafază cromozomii mamiferelor au o simetrie bilaterală, în care două duplicate identice (cromatide surori) sunt legate la nivelul centomerului. Centromerul este o regiune bogată în adenină-timină (A-T) ce conțin aproximativ  $10^4$  perechi de baze. Capetele fiecărui cromozom se numesc telomeri și constau în secvențe repetitive de tipul 5'-TTAGGG-3' ce se întind de-a lungul a câtorva mii de perechi de baze. Fiecare cromatidă conține aproximativ  $1,3 \times 10^8$  perechi de nucleotide, astfel că genomul uman haploid conține  $3,3 \times 10^9$  perechi de nucleotide organizate în aproximativ  $1,7 \times 10^7$  nucleozomi. Lungimea fiecărei molecule ADN ce conține un cromozom este compactată de peste 8000 ori pentru a genera structura condensată.

În afara histonelor, în nucleu s-au identificat sute de tipuri de proteine, denumite generic proteine nehistonice. Proteinele nehistonice cuprind enzimele implicate în procesele de replicare a ADN (de ex. topoizomeraze) sau de transcripție a ADN (de ex. complexul ARN polimeraza). Elementul de bază al acestui proces este nucleozomul. Rolul acestor proteine constă probabil în controlul expresiei genice în timpul dezvoltării și diferențierii celulare precum și în asigurarea legăturii cu hormoni sau alte molecule reglatoare.

### Secvența și funcția ADN

Lungimea unei molecule de ADN "in vivo" ar corespunde unui cromozom, cuprinzând  $6 \times 10^6$  nucleotide la microbul *Escherichia coli* și  $10^8$  nucleotide la om. Genomul (totalitatea cromozomilor din nucleul uman) are 46 cromozomi, reprezentați prin  $3,3 \times 10^9$  perechi nucleotide. În secvența nucleotidelor din molecula de ADN se află înregistrată informația genetică. Înregistrarea informației este codificată, această codificare făcându-se prin cele 4 nucleotide ATGC, care sunt grupate sub forma unor triplete numite "codoni". Din cele 4 nucleotide se pot forma  $4^3 = 64$  triplete, un număr foarte mare pentru a codifica cei 21 aminoacizi din proteine. Surplusul de codoni determină un excedent de informație privind biosinteza proteinelor, fenomenul fiind denumit prin termenul de "degenerarea" codului, ceea ce exprimă faptul că același aminoacid poate fi codificat de mai mulți codoni, existând de asemenea și codoni "non sens", care nu specifică nici un aminoacid, dar indică oprirea (respectiv declanșarea) sintezei proteice. Descoperirea codului pentru fiecare din cei 21 aminoacizi din structura proteinelor se datorează lucrărilor lui Nierenberg, Ochoa, Khorana și Matthaei. Redăm în tabelul 3 codul genetic operațional (adică "codonii replică" față de codonii fundamentali din ADN, transcriși pe ARNm).

**Tabelul 3. - Codul genetic operațional (ARNm)**

Baza 1	Baza 2	Baza 3
--------	--------	--------

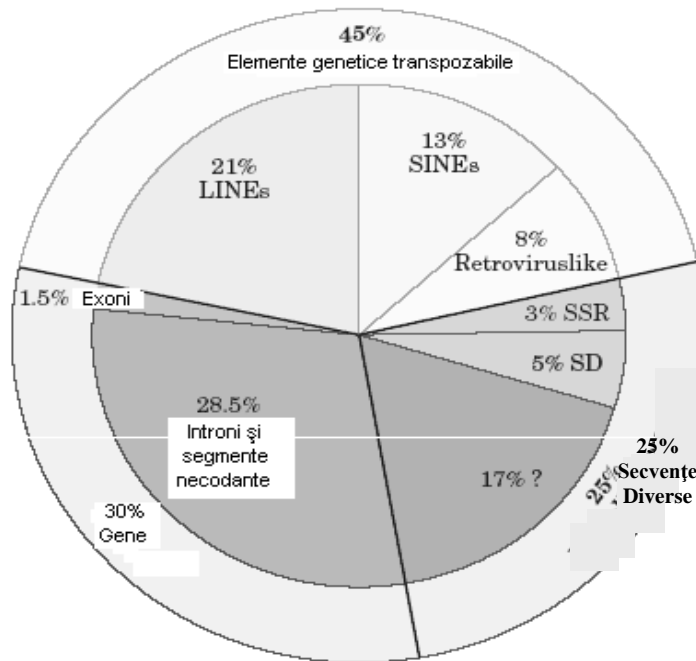
Baza 1	Baza 2				Baza 3
U	U	C	A	G	U C A G
	PHE	SER	TYR	CYS	
	PHE	SER	TYR	CYS	
	LEU	SER	STOP	STOP	
C	LEU	SER	STOP	TRP	U C A G
	LEU	PRO	HYS	ARG	
	LEU	PRO	HYS	ARG	
	LEU	PRO	GLN	ARG	
A	LEU	PRO	GLN	ARG	U C A G
	ILE	THR	ASN	SER	
	ILE	THR	ASN	SER	
	ILE	THR	LYS	ARG	
G	MET <sup>+</sup>	THR	LYS	ARG	U C A G
	VAL	ALA	ASP	GLY	
	VAL	ALA	ASP	GLY	
	VAL	ALA	GLU	GLY	
G	VAL	ALA	GLU	GLY	U C A G
	VAL	ALA	GLU	GLY	
	VAL	ALA	GLU	GLY	
	VAL	ALA	GLU	GLY	

Codul genetic este universal, adică indiferent de specie aminoacizii sunt codificați de aceleași triplete.

Prin urmare, în ADN-ul cromozomilor se găsește înscrisă, sub formă codificată întreaga informație necesară dezvoltării și multiplicării unei celule. Segmentele din ADN ce sunt implicate în realizare proteinelor au fost numite gene. Informația din ADN este copiată sub forma ARN și transformată în proteine-factori de realizare a informației ADN. Corelația dintre secvența nucleotidelor dintr-o genă și secvența aminoacizilor dintr-o proteină codificată constituie codul genetic. Pe baza acestuia s-a constatat, paradoxal, că pentru cele aproximativ 100000 de tipuri de proteine umane ar fi doar 1,1% din genomul uman, ceea ce înseamnă că restul secvenței ADN nu se regăsește în secvența proteinelor (Figura 15).

Acest așa-zis exces de informație este dat de :

- secvențe necodante (inotrni) din constituția genelor. Acestea reprezintă cca 24% din genom.
- gene ce sintetizează alte tipuri de ARN ce nu codifică proteine, dar asigură reglarea exresiei genelor codante implicate în dezvoltare și adaptare la mediu.
- familii de secvențe repetitive.



### Tipuri de secvențe din genomul uman

Din figura 15 se observă că genomul uman este alcătuit din următoarele tipuri de secvențe:

- Transpozoni (elemente transpozabile) – există 4 mari clase:
  - elemente lungi intercalate (LINEs = long interspersed elements) având o mărime de 6-8 kpb (1 kpb = 1000 perechi de baze); cuprind câteva dintre genele care catalizează transpoziția. În genom există aprox. 850 000 LINEs
  - elemente scurte intercalate (SINEs = short interspersed elements) cu o mărime de 100–300 pb. Dintre cele 1,5 milioane de astfel de elemente existente în genomul uman, mai mult de 1 milion sunt elemente Alu, denumite astfel deoarece includ o copie a secvenței de recunoaștere pentru Alu1 (o endonuclează de restricție)
  - transpozoni asemănători retrovirusurilor cu o mărime de 1,5-11 kpb. Deși aceștia nu se pot deplasa de la o celulă la alta, din punct de vedere al evoluției sunt înrudiți cu retrovirusurile, inclusiv HIV
  - rămășițele transpozonilor (nefigurate aici) reprezintă mai puțin de 1%, iar mărimile lor diferă semnificativ.
- Gene
- Secvențe diverse
  - repetiții ale secvențelor simple (SSR = simple-sequence repeats)
  - duplicații întinse ale segmentelor (SD = large segmental duplications)

Din acest punct de vedere al secvenței, există **ADN nerepetitiv** și **ADN repetitiv**. Din prima categorie fac parte și genele ce se găsesc într-o singură

copie în timp ce din a doua categorie sunt incluse secvențe ce se găsesc între 2 și  $10^4$  copii pe celulă.

ADN repetitiv poate fi moderat sau înalt repetitiv constituit din secvențe de 5-500 perechi de baze, repetate în tandem și ce conțin până la 10 milioane de copii pe celulă. Se consideră că au un rol structural în cromozom.

În categoria ADN moderat repetitiv, sunt secvențe ce nu depășesc  $10^6$  copii / celulă, secvențe intercalate cu secvențe unice. În funcție de lungime, există secvențe repetitive intercalate lungi (LINES) și secvențe intercalate scurte (SINES).

O categorie distinctă de secvențe ADN este cea a microsateliților. Acestea sunt secvențe de 2-6 perechi de baze ce se repetă de până la 50 de ori fie în tandem, fie dispersat. Secvențe comune de microsateliți sunt AC, TG, CG, AT, CAG, CTG, CGG.

Numărul de repetiții și localizarea acestora constituie polimorfismul microsateliților și reprezintă o caracteristică individuală. În unele cazuri modificarea structurii secvențelor microsateliților este asociată cu apariția unor boli de ex. modificarea (CAG) în atrofia musculară spinobulbară, modificarea CGG în sindromul fragil X etc.

1% din totalul ADN din celulă este reprezentat de ADN-ul mitocondrial. Acesta are o formă circulară și se găsește în 2-10 copii în fiecare mitocondrie. Acest ADN codifică ARN ribozomal, ARN de transport și ARN mesager pentru 13 proteine mitocondriale implicate în respirația celulară. Restul proteinelor mitocondriale, în număr de 54, sunt codificate de gene din nucleu.