

Structura ADN

Structura acizilor nucleici s-a definitivat la mijlocul secolului XX în urma activității laborioase a unui mare număr de cercetători. Astfel în 1944, Avery descoperă rolul ADN în transmiterea caracterelor ereditare; în 1951 Chargaff stabilește egalitatea cantitativă între componentele acizilor nucleici adenină-timină respectiv citozină-guanină; în 1953 Williams demonstrează structura ordonată a ADN și în același an Watson și Crick elaborează modelul dublu spiralat al ADN.

În cadrul structurii acizilor nucleici se disting mai multe nivele de organizare:

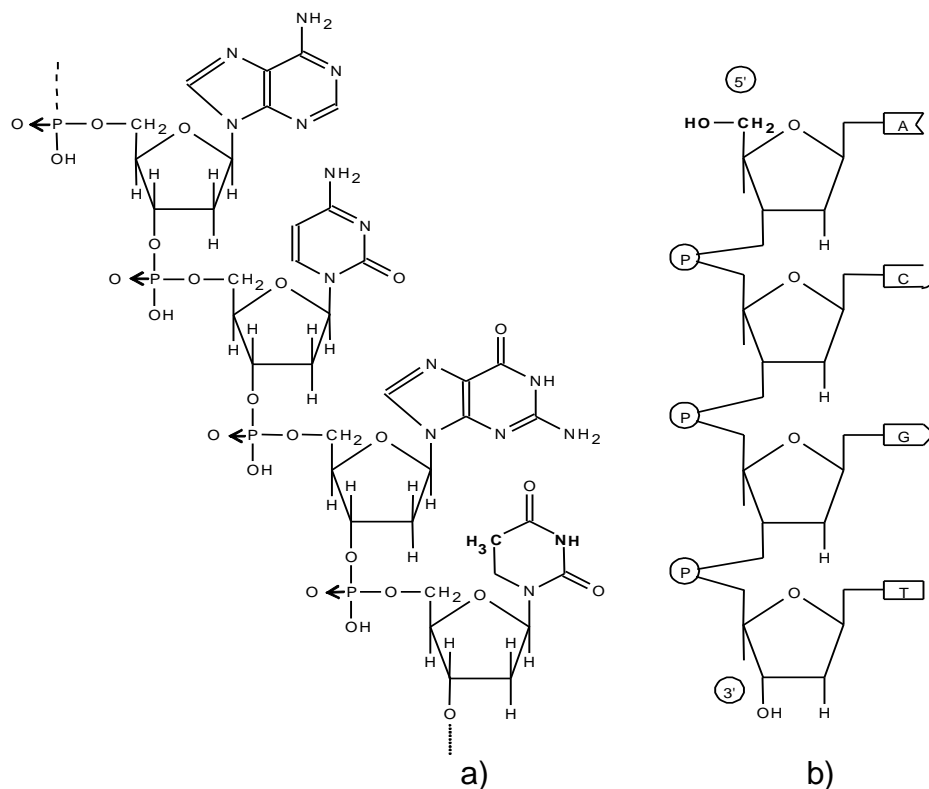
- structura primară, ce redă structura nucleotidică a lanțului polinucleotidic;
- structura secundară, ce redă conformația moleculei de ADN;
- structura superioară a ADN ce reprezintă modul de integrare al ADN în nucleu și celulă

Structura primară

Acizii dezoxiribonucleici (ADN). Structura primară, ca și în cazul proteinelor redă felul, numărul, secvența și modul de legătură al nucleotidelor componente. În secvența nucleotidelor este "codificată" informația genetică, prin intermediul ei fiind transmise caracterele ereditare. În molecula de ADN se găsesc patru tipuri de nucleotide, cu bazele azotate adenina (A), guanina (G), timina (T) și citozina (C); în ADN nu se găsesc nucleotide cu uracil (U). Acizii nucleici sunt formați din lanțuri de nucleozide legate prin legături fosfodiesterice. Lungimea acestor lanțuri variază considerabil. În general, lanțurile de acizi nucleici care conțin mai puțin de 50 nucleotide sunt denumite **oligonucleotide**, în timp ce lanțurile mai lungi sunt denumite **polinucleotide**. Fosfodiesterul leagă gruparea hidroxil din poziția 5' a unui rest, la gruparea 3' a următorului rest. Un capăt al polinucleotidului trebuie să se termine în poziția 5'-OH, în timp ce celălalt se termină cu 3'-OH (**directionalitate**). Aceste capete sunt denumite **5'-terminal**, respectiv **3'-terminal**.

Legătura dintre două mononucleotide succesive din lanțul de ADN se face prin intermediul moleculei de H_3PO_4 . Se realizează o legătură monofosfat-diestică între -OH-ul de la $C'_{3'}$ al pentozei unui mononucleotid și -OH-ul de la $C'_{5'}$ al pentozei mononucleotidului următor. Redăm, în Figura 7 o secvență de 4 nucleotide dintr-un fragment de ADN (a) și sub formă schematizată (b).

Din schemele prezentate se evidențiază faptul că fiecare fragment de ADN are un capăt 3' și unul 5'.



Secvența polinucleotidică a ADN

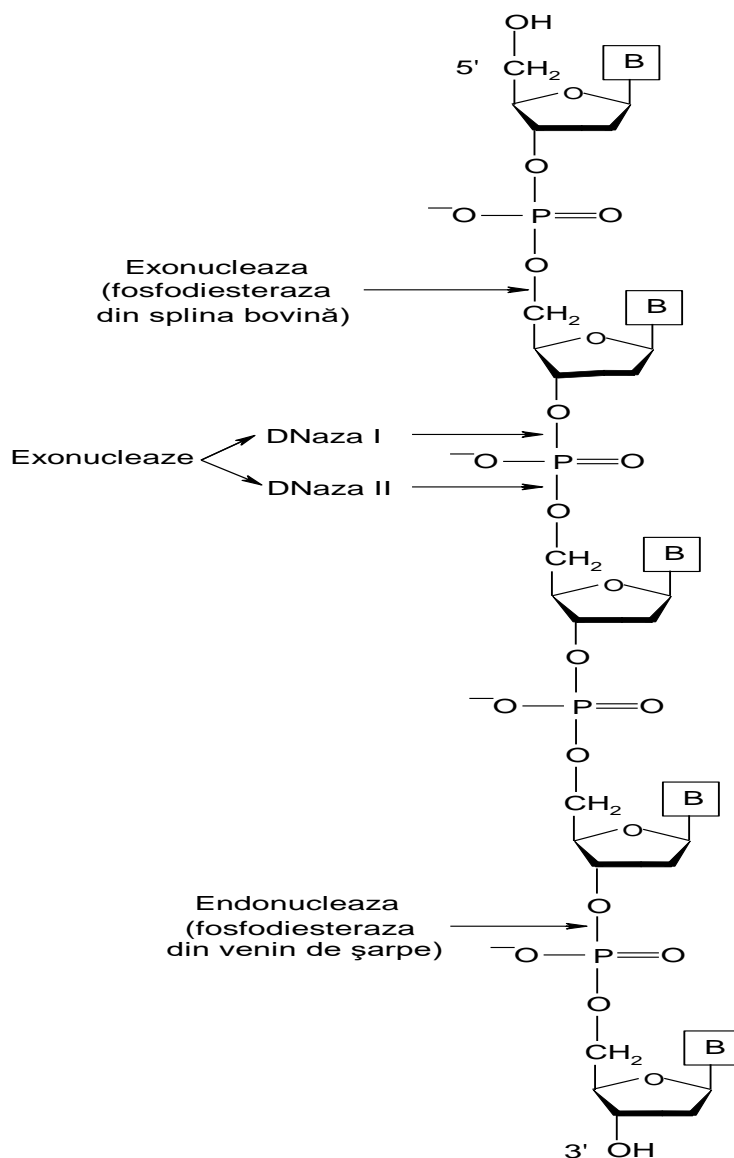
Conformația polinucleotidelor

Bazele azotate sunt responsabile de conformația polinucleotidelor, deoarece conțin azot și atomi de oxigen, care pot interacționa cu alte grupări polare. Fețele ciclurilor nu pot participa la astfel de interacțiuni, dar reacționează în schimb unele cu altele, rezultând o conformație înfășurată ordonată. Înfășurarea bazelor reduce suprafața hidrofobică. Acest aranjament al bazelor este stabilizat și de alte interacțiuni electronice favorabile (forțe van der Waals). Polinucleotidele adoptă conformații care favorizează interacțiunile dintre bazele vecine. Constrângerile impuse structurii de către legăturile pentoză-fosfodiester favorizează structura helicoidală. Suprastabilitatea acestei structuri helicoidale este dependentă de factori ce includ natura bazelor, pH, concentrația sărurilor, temperatură. De exemplu, unele polinucleotide sintetice, ca de exemplu poli(C) și poli(A), formează elice înfășurate spre dreapta, în care bazele sunt puternic împachetate. Multe alte polinucleotide rămân „dezordonate” în soluție, conformație denumită „spirală dezordonată”(random coil). Un număr mare de polinucleotide cu structură neregulată, prezintă atât structură helicoidală cât și regiuni neregulate, ce depind de secvența locală. Caracteristicile soluției joacă de asemenea un rol în determinarea conformației polinucleotidelor. De exemplu, concentrațiile mari în cationi, în special ioni divalenți de Mg^{2+} stabilizează conformația helicoidală prin schimbul de ioni cu grupările fosfodiesterice. În lipsa acestor schimburi ionice, sarcinile negative ale fosfaților ar stabili helixul prin respingere electrostatică.

Stabilitatea lanțului polinucleotidic

Polinucleotidele sunt relativ stabile în soluție apoasă la pH neutru. A fost estimat că timpul de înjumătățire pentru hidroliza legăturilor fosfodiesterice din ADN este de aproximativ 200 milioane de ani. Această înaltă stabilitate a ADN îl face potrivit pentru stocarea informației genetice. În schimb, ARN este mult mai susceptibil hidrolizei. Prezența grupărilor 2'-OH permite transesterificarea legăturii 3'-5'-fosfodiester. Rezultatul constă în scindarea lanțului polinucleotidic, lăsând un 2',3'-fosfat ciclic la un fragment și gruparea 5'-OH liberă la celălalt. Datorită acestei labilități, ARN este mai puțin potrivit ca material genetic în comparație cu ADN.

În timp ce lanțul ADN este relativ stabil la hidroliză, există totuși numeroase enzime ce catalizează scindarea legăturilor fosfodiesterice. Aceste enzime, denumite **nucleaze** se diferențiază în funcție de tipurile de polinucleotide pe care le hidrolizează și legăturile specifice asupra cărora acționează (Figura 8). De exemplu, **exonucleazele** scindează ultimul rest nucleotidic de la capătul 3'-sau 5'-terminal al polinucleotidului. Nucleazele care scindează legături fosfodiesterice aflate în interiorul lanțului polinucleotidic sunt denumite **endonucleaze**. Aceste enzime nu necesită capăt terminal; de aceea ele pot cliva și polinucleotide circulare. Endonucleaze ca DNase I și DNase II hidrolizează ADN cu o selectivitate redusă. Alte enzime, **endonucleazele de restricție**, recunosc și clivează secvențe strict specifice. Aceste endonucleaze de restricție au fost în mod particular folosite în metodologiile de secvențare a ADN, conferind baza pentru tehnicile de recombinare a ADN. Nucleazele manifestă de asemenea specificitate pentru anumite structuri polinucleotidice. De exemplu, unele nucleaze acționează asupra polinucleotidelor mono-și dublu-catenare, în timp ce altele acționează numai asupra uneia dintre aceste două structuri. Unele nucleaze acționează atât asupra ADN cât și asupra ARN, în timp ce altele acționează doar asupra unui anumit tip de polinucleotide.



Specificitatea nucleazelor

Exonucleazele îndepărtează reziduuri nucleotidice de la unul din capetele polinucleotidului, în funcție de specificitatea lor. Endonucleazele hidrolizează legături fوسفodiesterice interne. Ambele nucleaze prezintă specificitate în ceea ce privește legătura oxigen-fosfor ce urmează a fi hidrolizată.

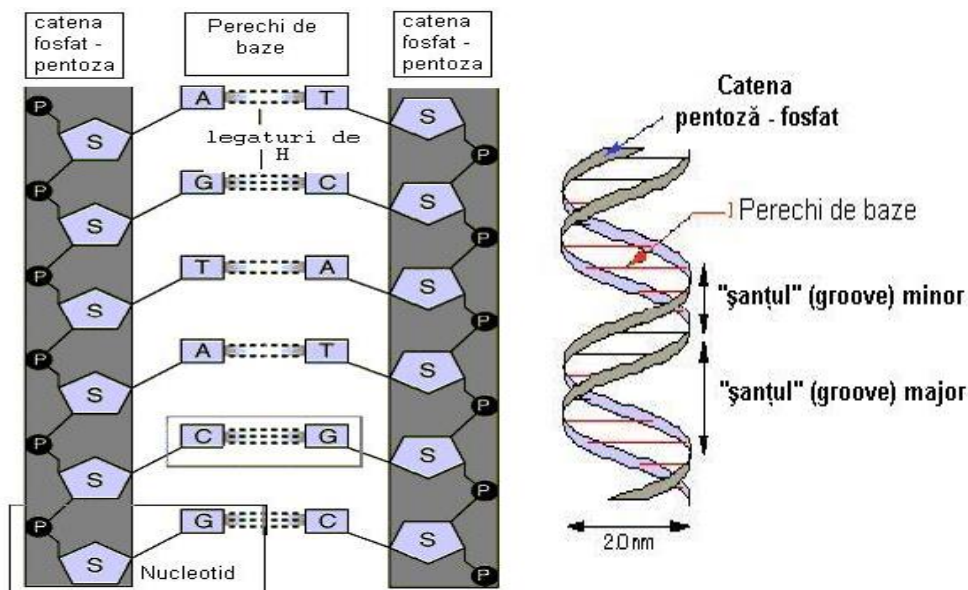
Structura secundară

În 1953 Watson și Crick au propus un model al structurii secundare de ADN, care ține cont de diversele proprietăți ale moleculei. De importanță au fost următoarele date :

- caracterul acid al substanței ("acid nucleic");
- analiza chimică privind compoziția bazelor în oricare moleculă ADN demonstrează că raportul adenină + guanină / timină + citozină = 1; în conse-

- cință, suma bazelor purinice este egală cu cea a bazelor pirimidinice ($A+G = T+C$);
- datele furnizate prin studiul difracției razelor X sugerează o configurație helicoidală;
 - rezultatele studiului pe model care sugerează o stabilitate maximă a moleculei ADN atunci când lanțurile polidezoxiribonucleotidice sunt menținute împreună prin număr maxim de legături de hidrogen între baze.

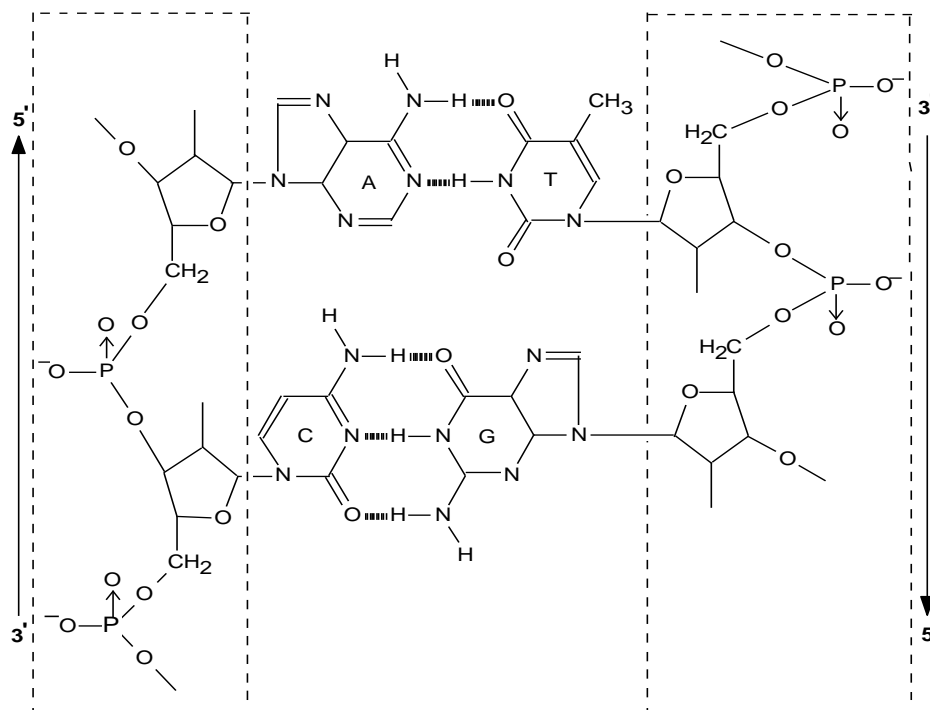
Pe baza acestor date modelul propus a postulat că molecula de ADN este alcătuită din 2 catene polinucleotidice înfășurate în jurul unui ax comun,



imaginar, constituind un dublu helix, cu bazele azotate proiectate spre interior, perpendicular pe ax. Cele două catene sunt legate între ele prin punți de hidrogen, stabilite între "bazele complementare" perechi ($A=T$ și $G=C$), adică cele ce asigură un număr maxim de legături și deci o stabilitate maximă; între A și T se poate forma numărul de maxim 2 punți de hidrogen, iar între G și C maxim 3. Molecula de ADN seamănă cu o "scară în spirală", balustradele fiind formate din H_3PO_4 și dezoxiriboză, iar treptele din punțile de hidrogen care leagă bazele azotate. În figura 9 redăm modelul dublului helix al ADN și a modului cum se realizează legăturile de hidrogen.

Structura secundară a ADN

Distribuția celor două catene în helix este antiparalelă.



Structura antiparalelă a catenelor ADN

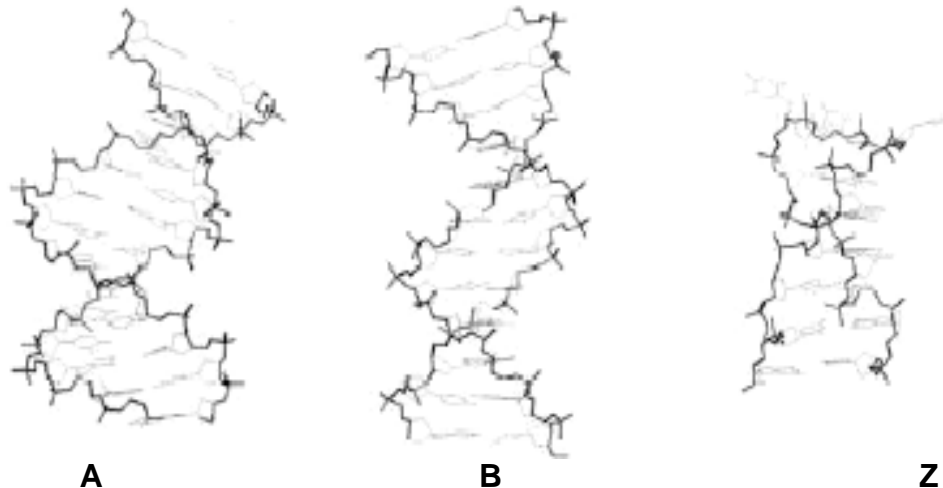
Diametrul elicei este de 20 Å, iar pasul ei de 34 Å. În cei 34 Å sunt cuprinse 10 perechi de nucleotide. Perechile de baze sunt astfel rotite cu $360^\circ/10 = 36^\circ$, unele în raport cu altele, aproape suprapuse. Distanța dintre perechile de baze succesive este de $34/10 = 3,4$ Å, deci structura se repetă după 10 baze. Cele două catene polinucleotidice ale dublului helix nu sunt identice, ci complementare una celeilalte. La stabilirea dublului helix contribuie major și legăturile van der Waals ce se stabilesc între bazele azotate adiacente, care nu au însă un caracter de specificitate. Se creează astfel în cadrul structurii helicoidale, după cum se observă și din figura 9, două „scobituri” sau „șanțuri”, una mică și una mare, ce alternează, acestea fiind locuri în care au loc interacțiuni cu proteinele, fără a fi afectată structura dublu catenară a ADN.

Structura helicoidală a ADN nu se menține în orice condiții, însăși formarea ei este condiționată de concentrații salin mari, care, reducând respingerea electrostatică a grupărilor fosfat ionizate la pH = 7,0 (ce se opun realizării unei structuri compacte), favorizează forțele ce tind să determine înfășurarea moleculei. În aceste condiții, structura secundară realizată este, în esență, rezultatul legăturilor de hidrogen și al forțelor hidrofobe. Pe lângă cele arătate, de importanță deosebită este și un fapt de semnificație biologică: modelul de structură secundară prezentat explică foarte bine capacitatea de replicare semiconservativă a materialului genetic, prin care, în cursul diviziunii celulare, se pot obține două copii identice ale elicei parentale, asigurându-se transferul acesteia, identic din punct de vedere cantitativ și calitativ, de la o generație celulară la următoarea.

Modelul Watson-Crick redă conformația predominantă a moleculei de ADN, fiind numit forma B a structurii ADN. În mediul apos celular, structura ADN

are un caracter dinamic, putând adopta cel puțin șase conformații, de regulă pe porțiuni restrânse ale moleculei. Cele mai întâlnite conformații alternative sunt formele A și Z (Figura 11).

Forma A are aceeași structură ca și forma B, fiind în schimb mai compactă prin faptul că dispune de 11 perechi de baze pe spirală, iar lungimea spirei are 26 Å.



Modele ale structurii dublu elicoidale

Forma Z, diferă structural de formele A și B, fiind o elice cu înfășurare pe stânga, cu un grad mai mic de compactare. Astfel, o spirală conține 12 perechi de baze, având lungimea de 57 Å. Forma Z se întâlnește numai în acele porțiuni ale catenei polinucleotidice, în care există o alternanță a bazelor purinice cu cele pirimidinice. Spre deosebire de formele A și B ce au conformație anti, forma Z are conformație syn, ceea ce explică structura mai afânată a acesteia. Cele două conformații minoritare A și Z sunt instabile, semnificația biologică constând în reglarea expresiei informației genetice.