

Structura și metabolismul macromoleculelor informaționale

12. XII. 2024

Metabolismul ADN-ului

Experimente ce indică localizarea și natura materialului genetic

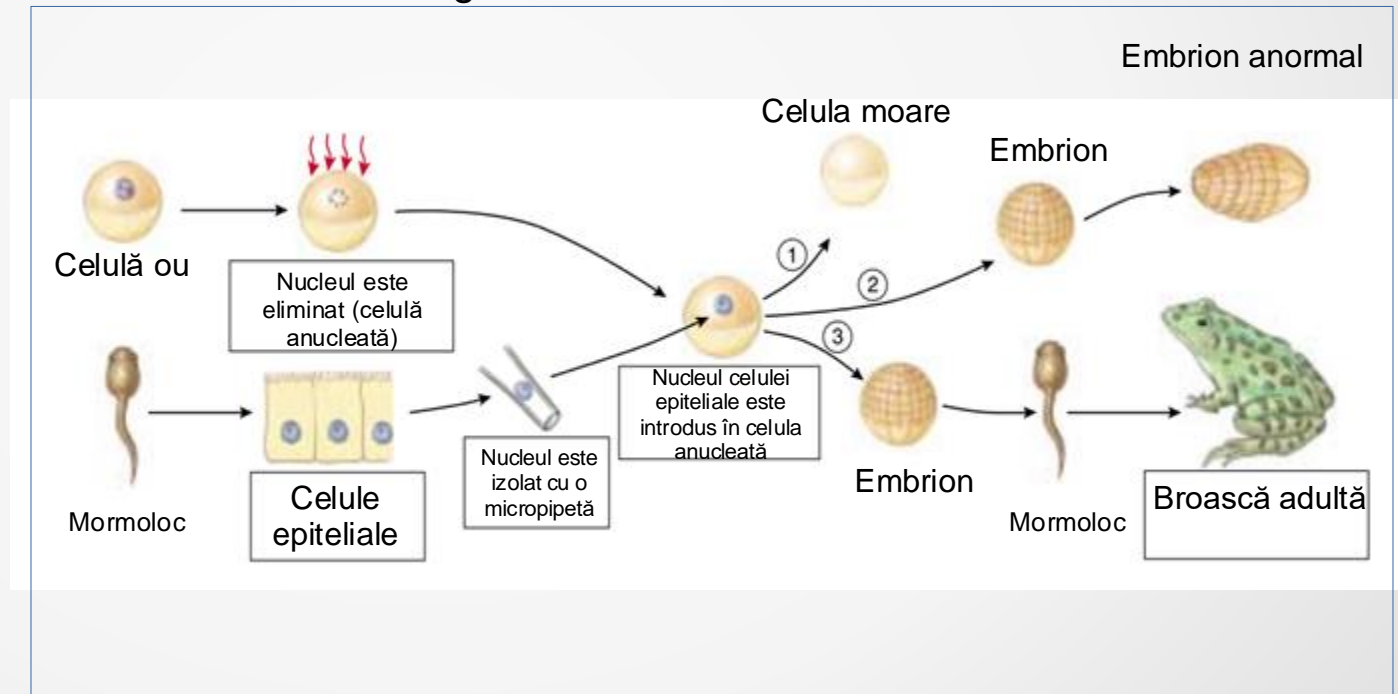
1. Experimentele lui **Hammerling** (1930) – demonstrează că informația genetică necesară funcționării întregii celule a algei unicelulare *Acetabularia* este stocată în nucleul acesteia

Acetabularia crenulata *Acetabularia mediterranea*



Nucleul din picior dictează ce tip de vârf se formează

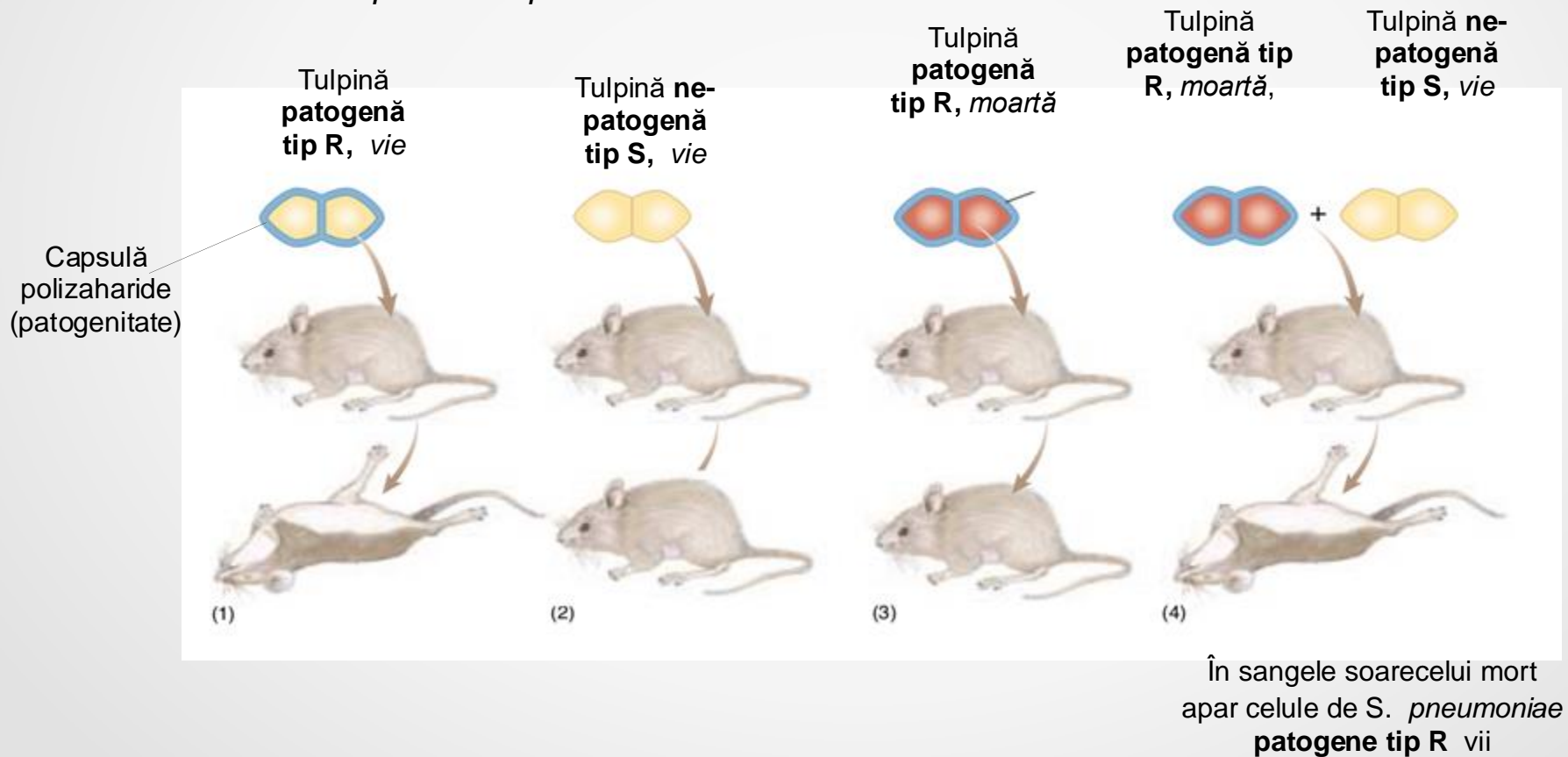
2. Experimentele de transplantare a nucleului – nucleul unei celule conține informația necesară dezvoltării și funcționării tuturor celulelor unui organism.



Experimente ce indică localizarea și natura materialului genetic

3. Experimentele lui **Griffith** (anii 1930) – demonstrează că informația genetică poate fi transferată de la o celulă la alta în mod natural printr-un proces numit **transformare**.

Streptococcus pneumoniae

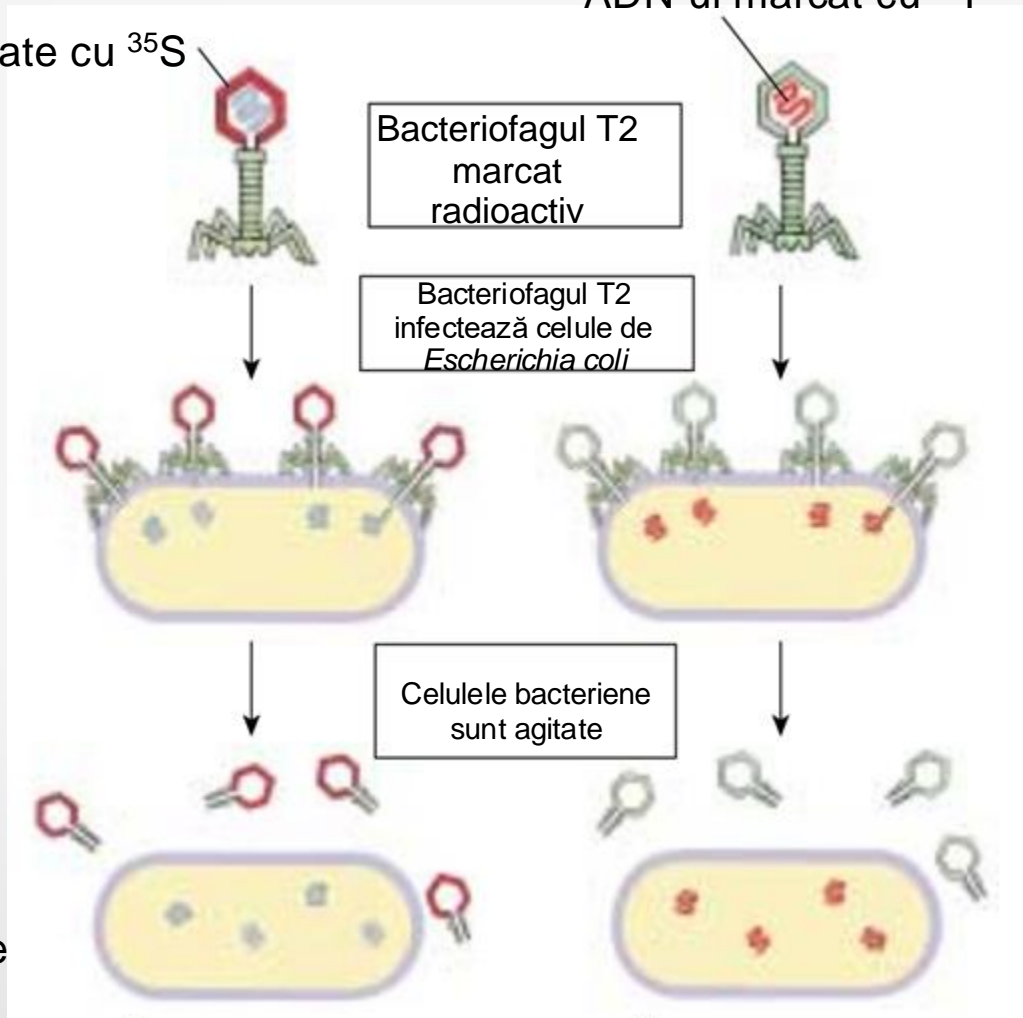


Experimente ce indică localizarea și natura materialului genetic

4. Experimentele lui **Avery și Hershey-Chase** (1944) – demonstrează că informația genetică este codificată de moleculele de ADN.

ADN-ul marcat cu ^{32}P

Proteinele marcate cu ^{35}S



Radioactivitatea specifică ^{35}S se regăsește în mediu

Radioactivitatea specifică ^{32}P se regăsește în celule

Structura chimică ADN-ului

- în 1869 Friedrich Miescher izolează din nucleii o substanță albă pe care o denumește **nucleină**. Datorită caracterului ușor acid capătă mai apoi denumirea de **acid nucleic**.

- funcția și structura acestei substanțe rămâne necunoscută până în jurul anilor 1920.

Acizii nucleici sunt **polimeri** rezultați în urma legării prin **legături fosfodiesterice** unui număr mare de **nucleotide**.

Funcție de tipul de nucleotide, acizii nucleici se clasifică în:

- **acid ribonucleic (ARN)** – conține în structura sa riboză
- **acid dezoxiribonucleic (ADN)** - conține în structura sa deoxiriboză

O **nucleotidă** este alcătuită din

• un **glucid** cu 5 atomi de C (**riboza sau deoxiriboză**) în formă furanozică;

• o **grupare fosfat (PO₄)** legată de atomul C 5 al glucidului;

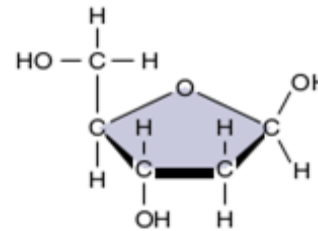
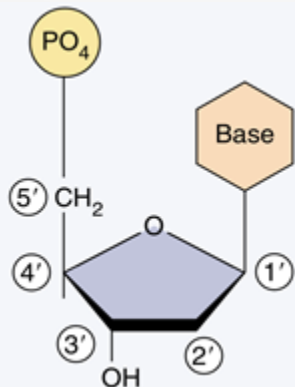
• **bază azotată** legată de atomul C 1 al glucidului;

Bază azotată se leagă printr-o legătură glicozidică de pentoză formând un **nucleozid**. **O nucleotidă se definește astfel ca fiind un ester fosforic al nucleozidului corespunzător.**

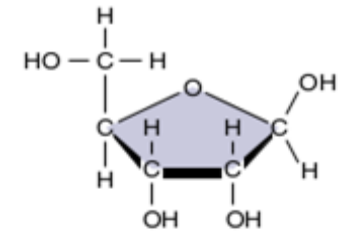
În acizii nucleici se întâlnesc două tipuri de baze azotate:

• **purinice** - două heterocicluri cu N:
Adenina (A) și **Guanina (G)** în ADN și ARN

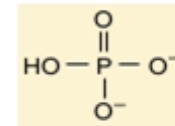
• **pirimidinice** – un heterociclu cu N:
Citozină (C) și **Timină (T)** în ADN și **C** și **Uracil (U)** în ARN



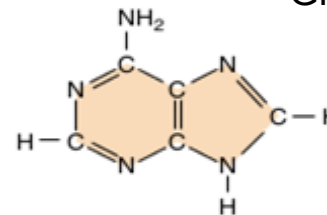
2'-deoxi-β-D-ribofuranoză
(ADN)



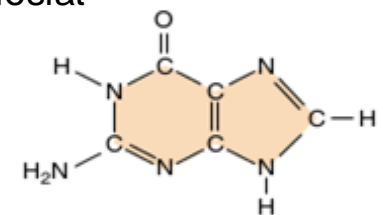
β-D-ribofuranoză
(ARN)



Grupă fosfat

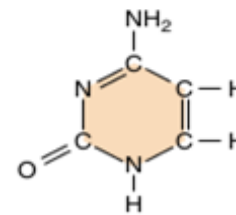


Adenina

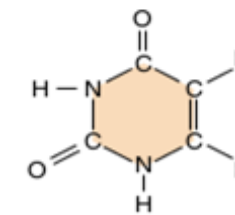


Guanina

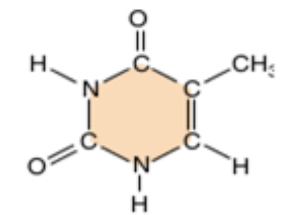
Purine



Citozina



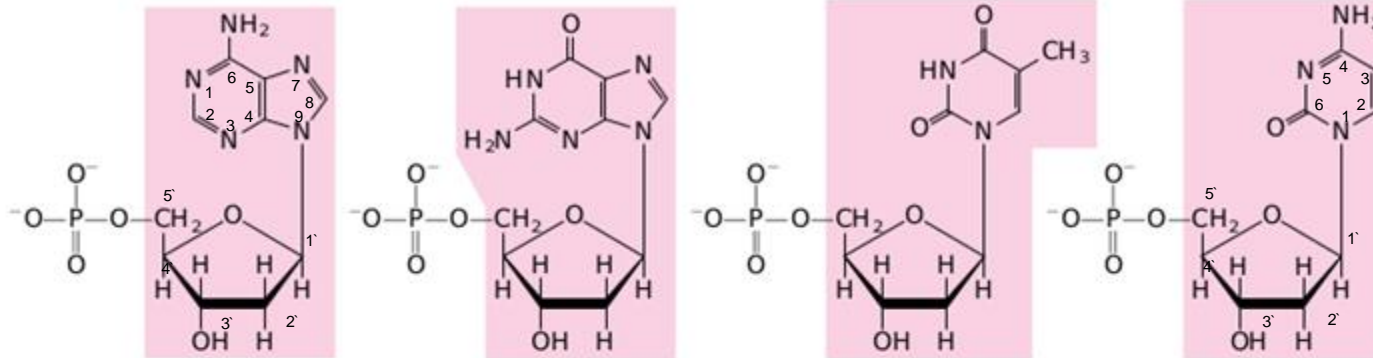
Uracil
(doar în ARN)



Timina
(doar în ADN)

Pirimidine

Structura chimică a principalelor nucleotide



Nucleotide: Deoxyadenylate
(deoxyadenosine
5'-monophosphate)

Symbols: A, dA, dAMP

Nucleoside: Deoxyadenosine

Nucleotide: Deoxyguanylate
(deoxyguanosine
5'-monophosphate)

Symbols: G, dG, dGMP

Nucleoside: Deoxyguanosine

Nucleotide: Deoxythymidylate
(deoxythymidine
5'-monophosphate)

Symbols: T, dT, dTMP

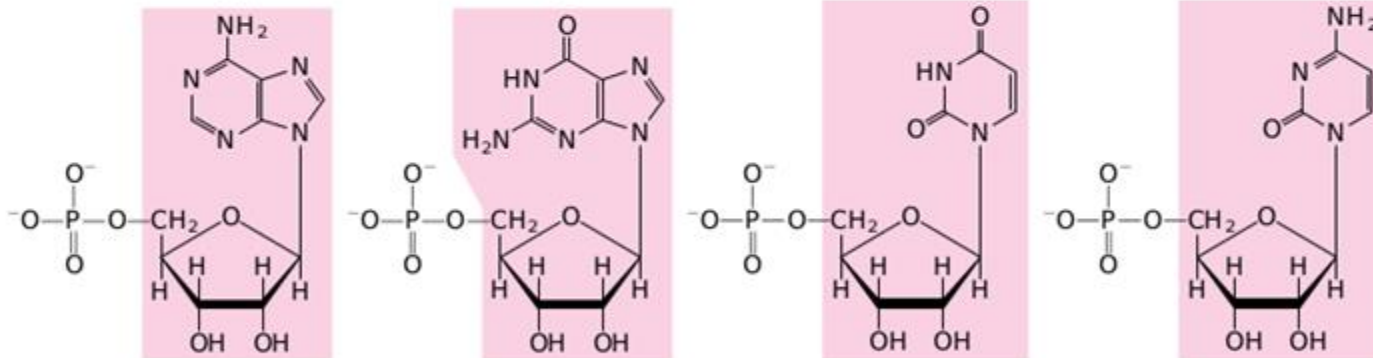
Nucleoside: Deoxythymidine

Nucleotide: Deoxycytidylate
(deoxycytidine
5'-monophosphate)

Symbols: C, dC, dCMP

Nucleoside: Deoxycytidine

(a) Deoxiribonucleotide



Nucleotide: Adenylate (adenosine
5'-monophosphate)

Symbols: A, AMP

Nucleoside: Adenosine

Nucleotide: Guanylate (guanosine
5'-monophosphate)

Symbols: G, GMP

Nucleoside: Guanosine

Nucleotide: Uridylate (uridine
5'-monophosphate)

Symbols: U, UMP

Nucleoside: Uridine

Nucleotide: Cytidylate (cytidine
5'-monophosphate)

Symbols: C, CMP

Nucleoside: Cytidine

(b) Ribonucleotide

Nucleotid

Simbol

Nucleozid

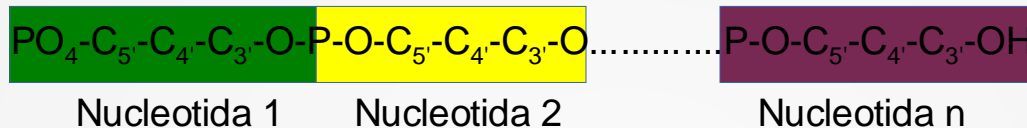
Nucleotid

Simbol

Nucleozid

Structura primară a ADN-ului

Între gruparea $-PO_4$ de pe carbonul 5 (poziția 5') al unei nucleotide și gruparea $-OH$ de pe carbonul 3 (poziția 3') al altei nucleotide se poate elimina o moleculă de apă cu formarea unei **legături fosfodiesterice** ($-O-P-O-$). Se pot astfel forma astfel catene lungi de nucleotide al căror schelet are structura:



Aproape toate moleculele de ADN au două capete diferite:

- **capătul 3'** cu o grupare **$-OH$ liberă**

- **capătul 5'** cu o grupa **$-PO_4$ liberă**.

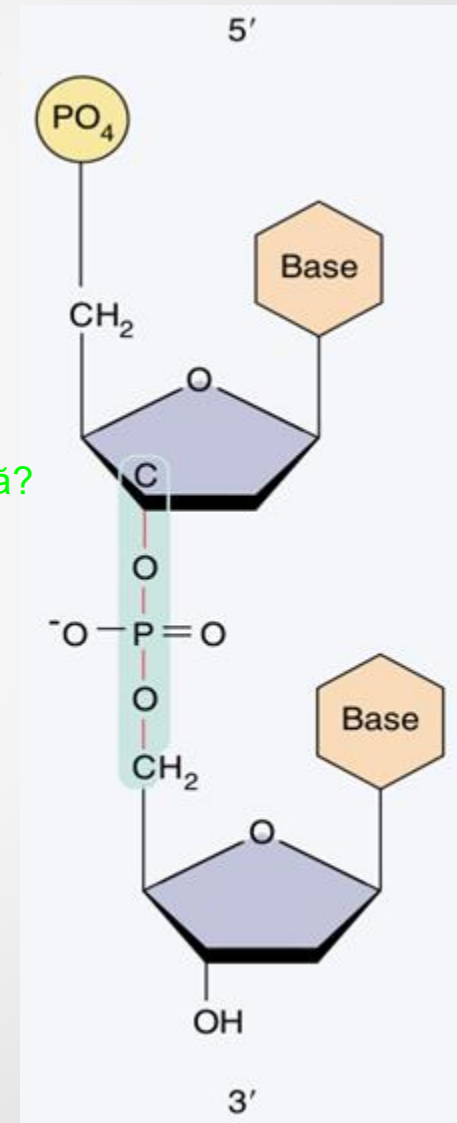
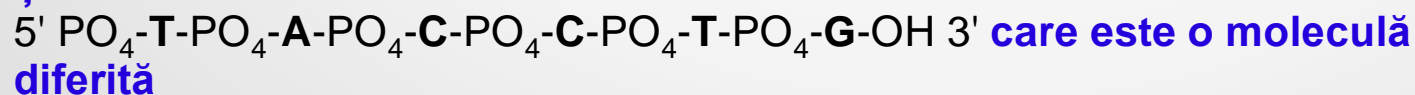
Ce molecule de ADN nu respectă această regulă?

Prin convenție, secvența de nucleotide a ADN-ului se notează în direcția 5' → 3'

Secvența de nucleotide **GTCCAT** se referă la o catenă cu structura:



Și nu la



Compoziția în baze azotate a ADN-ului

Analiza lui Chargaff privind compoziția în baze azotate a ADN-ului

Organism	Procente molare			
	A	T	G	C
<i>Escherichia coli</i> tulpina K12	26.0	23.9	24.9	25.2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	14.6	34.9	35.4
Drojdia de bere	31.3	32.9	18.7	17.1
Hering	27.8	27.5	22.2	22.6
Șobolan	28.6	28.4	21.4	21.5
Om	30.9	29.4	19.9	19.8

Date din E. Chargaff and J. Davidson (editori), *The Nucleic Acids*, 1955, Academic Press, New York, NY.

Regulile lui Chargaff:

Într-o moleculă de ADN au loc întotdeauna următoarele relații:

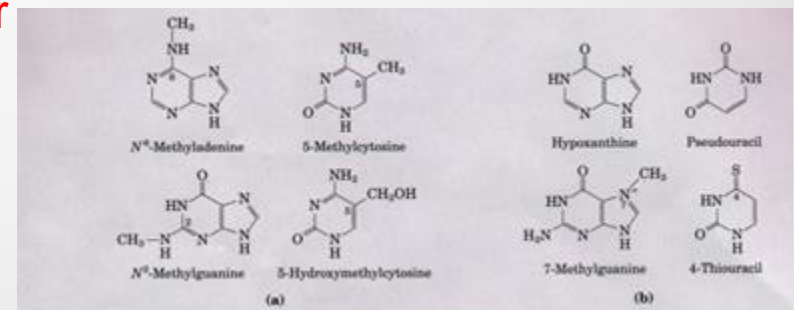
• proporția de A este întotdeauna egală cu cea de T, iar cea de G cu cea de C

A=T; G=C

• proporția de baze azotate purinice este întotdeauna egală cu cea de baze pirimidinice

A+G=T+C

De ce procentele nu sunt perfect egale?



ADN

ARN

Structura tridimensională a ADN-ului

.Analizând modul în care razele X sunt difractate de o fibră cristalizată de ADN, **Franklin** propune în 1953 că **molecula de ADN are forma de tirbușon**, cu diametrul de 2 nm și o spiră de 3.4 nm.

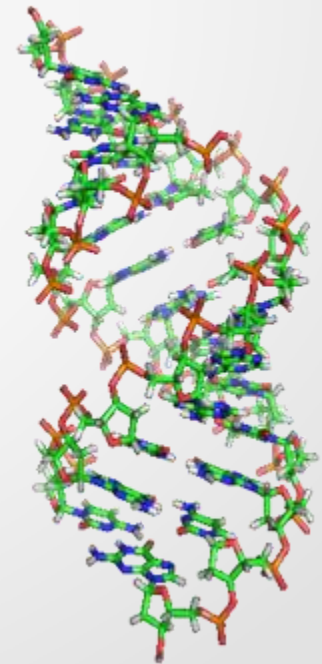
.**Watson and Crick** propun în 1953 un model al structurii ADN-ului ce are la bază un **dublu helix**



Rosalind Elsie Franklin (1920 - 1958)



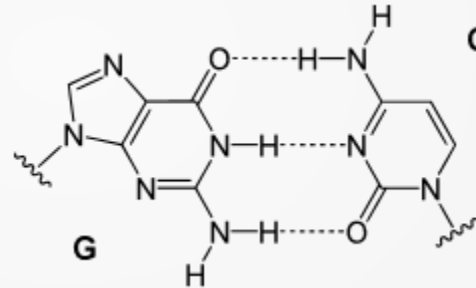
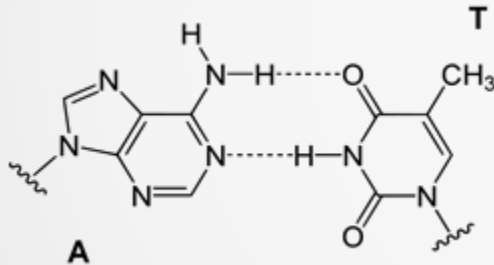
Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737-738 (1953)



Structura tridimensională a ADN-ului

.Scheletul moleculei este reprezentat de catenele cu legături fosfodiesterice ce formează **un dublu helix** spre dreapta. Catenele sunt **antiparalele**, una are orientare 5' → 3' iar cealaltă 3' → 5'

.Bazele azotate sunt orientate **spre interior**. Între bazele de pe o catenă și formează legături de hidrogen pe bază de **complementaritate: A-T (2 legături); G-C (3 legături)**. **O pereche de baze azotate complementare** formează un plan perpendicular pe catenă. **Distanța dintre 2 perechi de baze (pb) consecutive** este de **0.34 nm**.



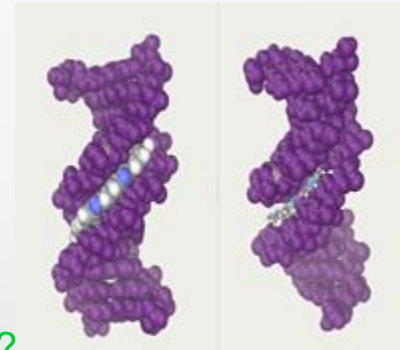
.Legăturile se formează întotdeauna între o bază purinică și una pirimidinică - dimensiunea unei perechi de baze complementare (pb) și deci diametrul helix-ului dublu este constant **- 2 nm**

.O spiră completă a dublului helix-ului are 10 pb - 3.4 nm

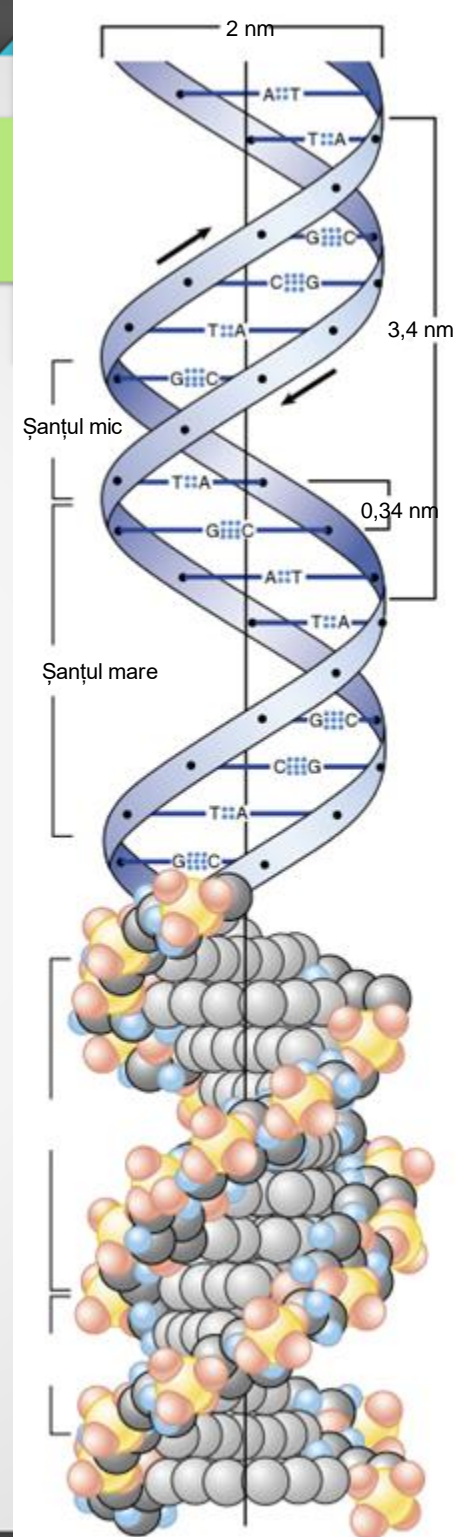
.Au fost descrise **două șanțuri**:

.- șanțul mare - larg de 22 Å

.- șanțul mic - larg de 12 Å



Cat de lungi sunt cele 2 șanțuri?



Anabolismul ADN-ului. A) Biosinteza nucleotidelor

Nucleotidele sunt încorporate în ADN plecând de la deoxiribonucleotide trifosfați (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Acestea sunt produse prin **2 căi distincte**:

- 1)- **căi metabolice de sinteză de novo**
- 2)- **căi anaplerotice de reutilizare** a nucleotidelor rezultate în urma degradării acizilor nucleici

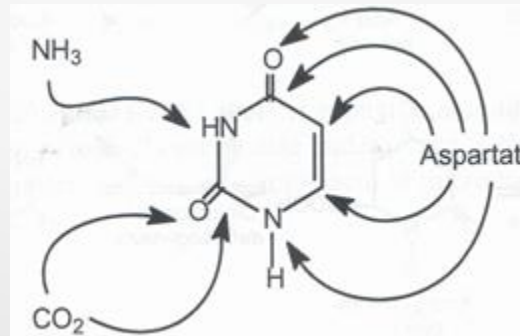
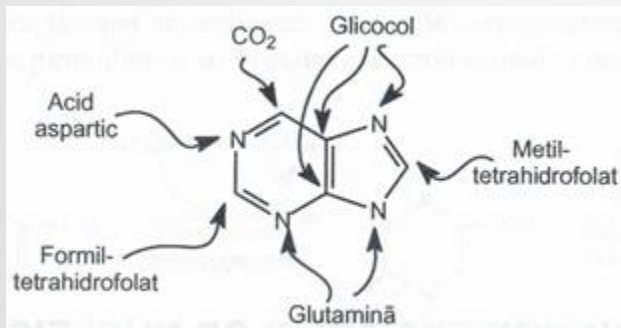
Căile metabolice de de sinteză de novo a nucleotidelor

Se diferențiază în **căi de sinteză a nucleotidelor pirimidinice** și **căi de sinteză a nucleotidelor purinice**.

Ambele căi au în comun o serie de intermediari:

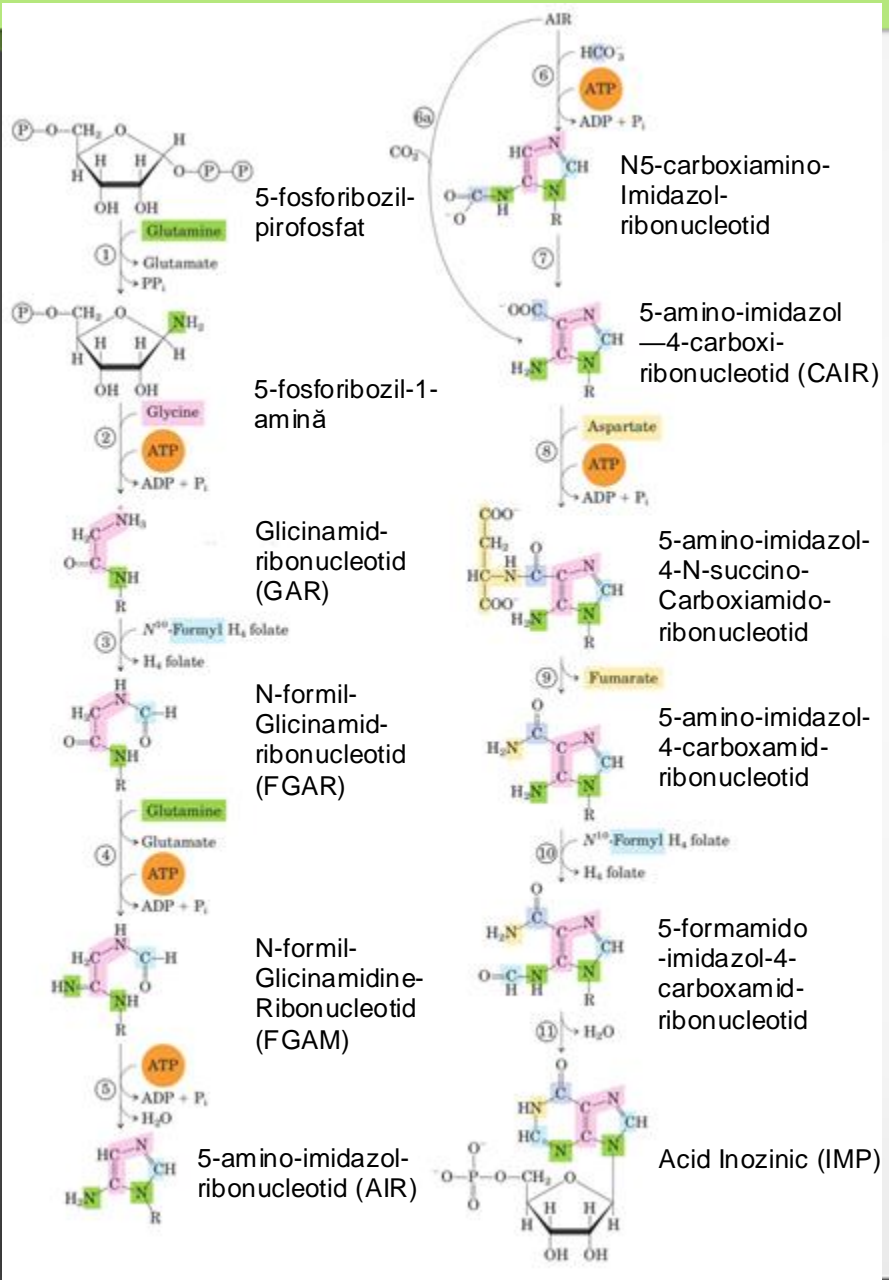
1. **fosforibozil-pirofosfat** – sursa restului de riboză
2. **glicina** – pentru sinteza purinelor; **acidul aspartic** – pentru sinteza pirimidinelor;
3. **glutamina** – sursă de grupe amino în ambele căi;

Cu excepția dTTP, deoxinucleotidele se sintetizează mai întâi sub formă de ribonucleotide ce sunt apoi reduse la deoxiribonucleotide.



Nivelele celulare de nucleotide libere (exceptând ATP-ul) reprezintă 1% sau mai puțin din cantitatea necesară pentru a sintetiza ADN-ului. Sinteza nucleotidelor este deci un factor limitant al replicării ADN-ului.

1. Calea de biosinteza *de novo* a ribonucleotidelor purinice



Bazele azotate (Adenina, Guanina) nu sunt intermediari (bazele nu sunt sintetizate și atașate pe pentoză), ci **inelele sunt construite treptat, atom cu atom**. Sinteza începe de la 5-fosforibozil-pirofosfat (PRPP).

Cuprinde 3 etape:
 a) formarea IMP
 b) sinteza din IMP a AMP și GMP-ului
 c) sinteza ATP și GTP.

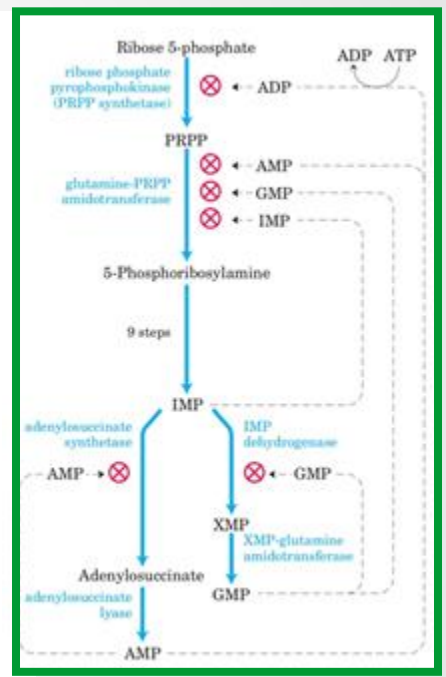
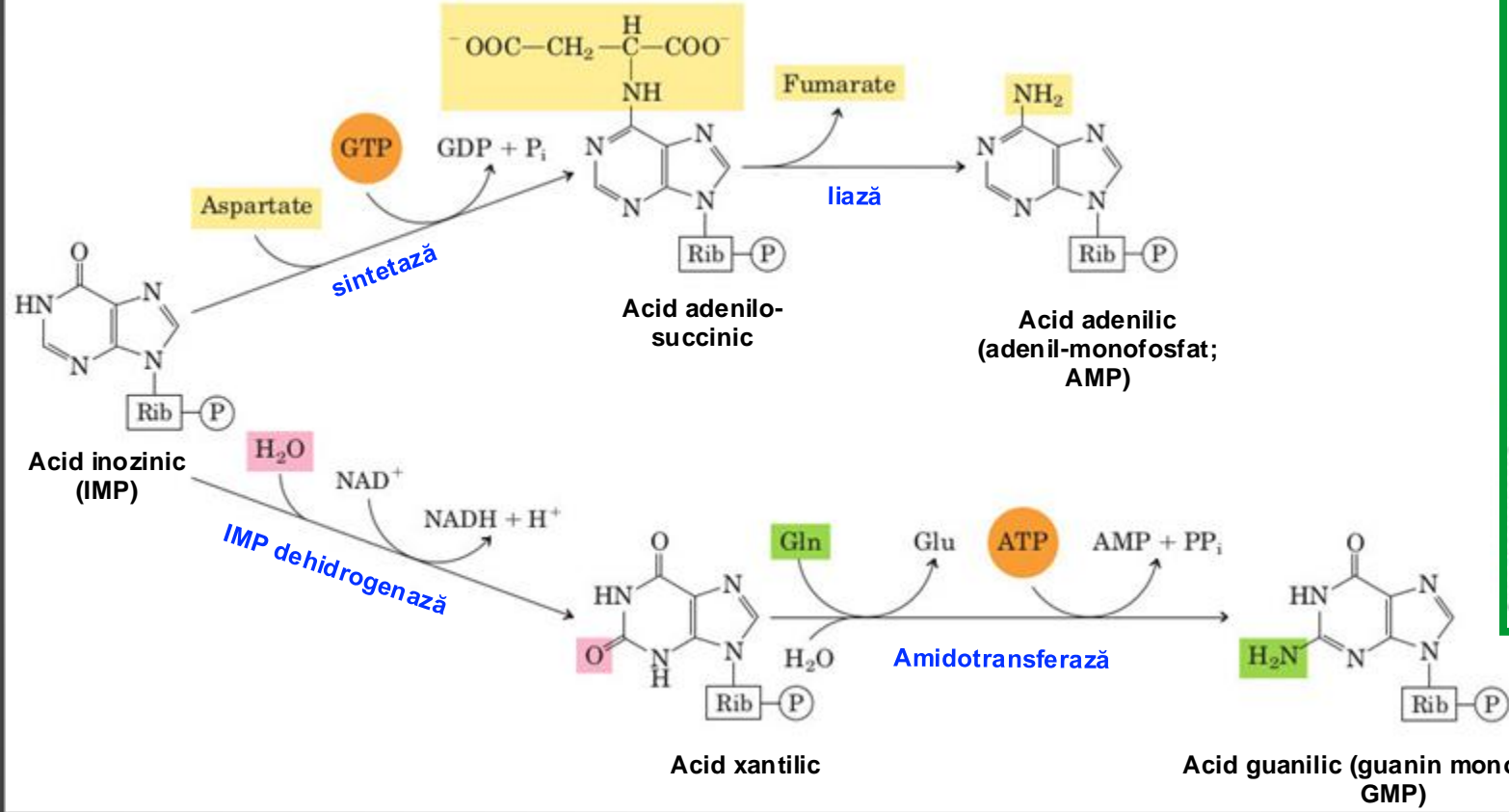
A. formarea inosin mono fosfatului (IMP; acidului inozinic)

1. Amino-fosforibozil transferaza
2. GAR sintetaza
3. GAR transformilază
4. FGAR amidotransferază
5. FGAM ciclază (AIR sintetază)
- 6a. AIR carboxilază
8. sintetază
9. liază
10. transformilază
11. IMP sintetază

În eucariote, etapele 1, 3, 5 sunt catalizate de o singură proteină multifuncțională, iar etapele 10 și 11 de o alta. La bacterii, fiecare etapă este catalizată de proteine individuale.

1. Calea de biosinteza *de novo* a ribonucleotidelor purinice

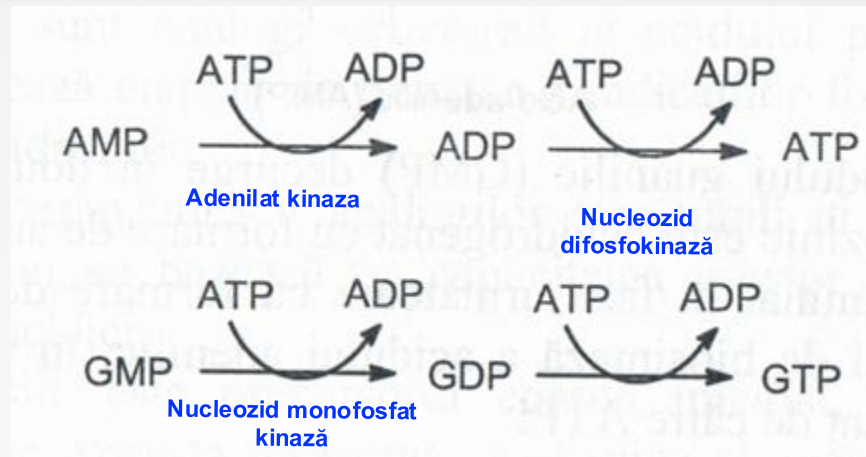
B. sinteza AMP și GMP



Lehninger, pg 867

1. Calea de biosinteza *de novo* a ribonucleotidelor purinice

C. sinteza ATP și GTP

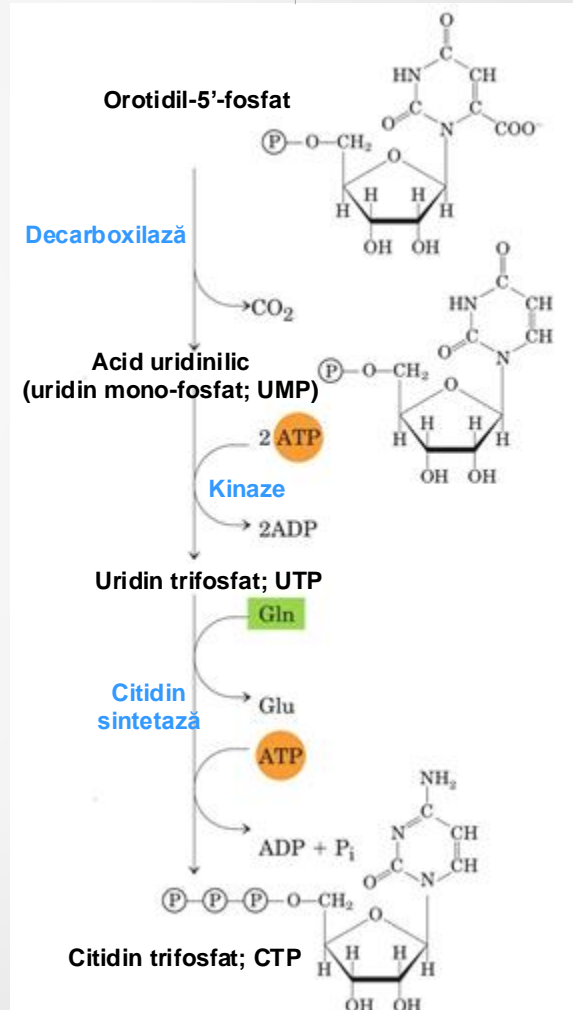
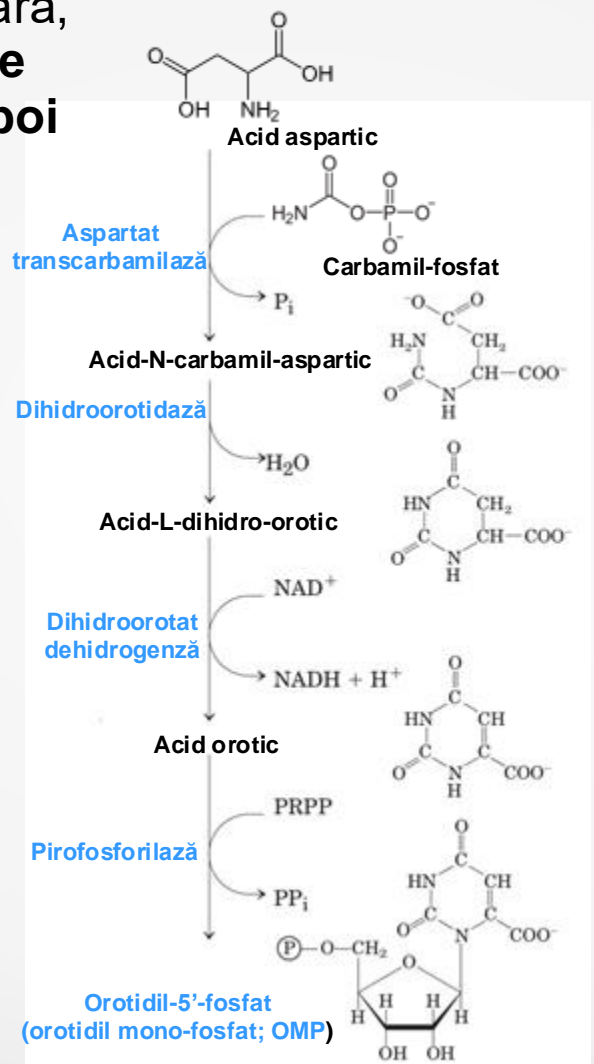


- Fosforilarea **AMP în ADP** este realizată de **adenilat kinaza**. ADP-ul rezultat este apoi fosforilat la ATP prin fosforilare oxidativă sau glicoliză (**sursa de energie a întregului proces**).
- **ATP-ul** este utilizat pentru fosforilarea celorlalte nucleozide difosfat de către **nucleozid monofosfat kinaze**, enzime cu specificitate pentru a anumită bază azotată (există o enzimă ce fosforilează numai GMP, una numai UMP și alta numai CMP) dar fără specificitate față de glucid (toate fosforilează în egală măsură și deoxi-ribonuclezide și ribonucleozide monofosfat).
- **Nucleozidele difosfat** sunt fosforilate la **trifosfati** de **nucleozid difosfokinază** – enzimă fără specificitate față bazele azotate sau glucid (aceeași proteină fosforilează și ADP, și GDP, și UDP și CDP precum și dADP, dGDP, dUDP, dCDP). Ca sursă de grupe fosfat, enzima poate folosi orice (d)NTP, însă cel mai frecvent folosește ATP pentru că acest nucleotid se află într-o concentrație mai mare în celulă.

2. Calea de biosinteza *de novo* a ribonucleotidelor pirimidinice

Spre deosebire de calea anterioară, mai întâi sunt sintetizate inelele bazelor azotate (C și U) care apoi se atasează de 5-fosfo-riboză.

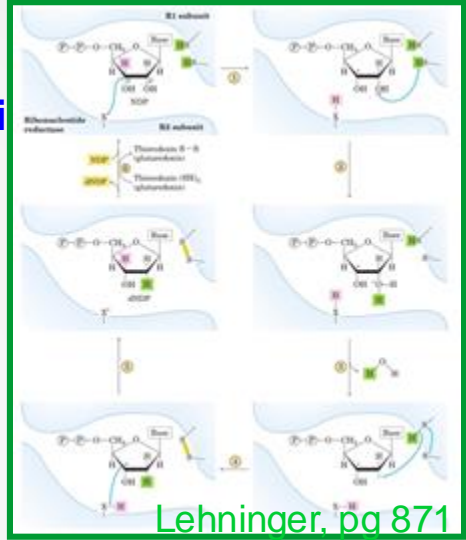
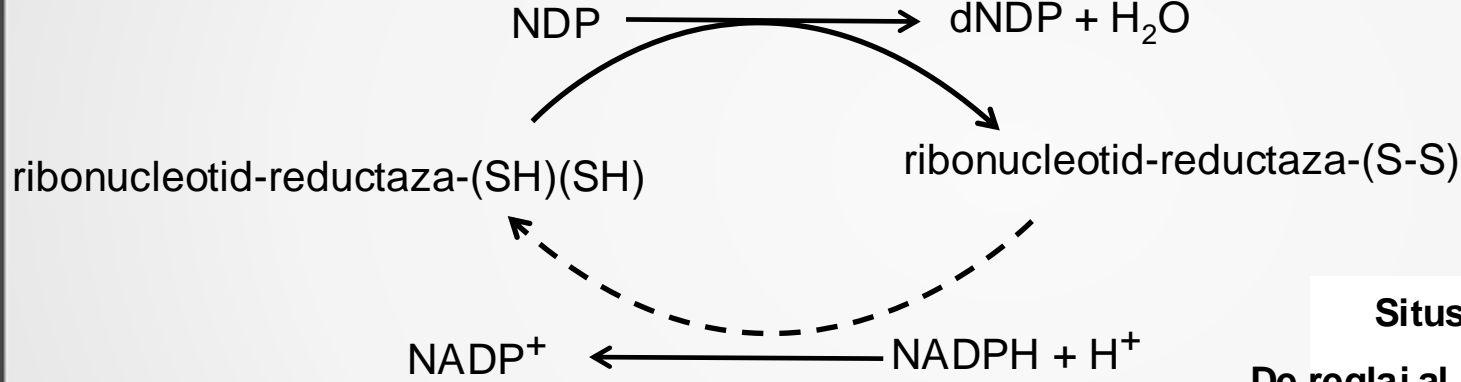
Sinteza pleacă de la acidul aspartic și carbamil-fosfat.



3. Sinteza dezoxiribonucleotidelor

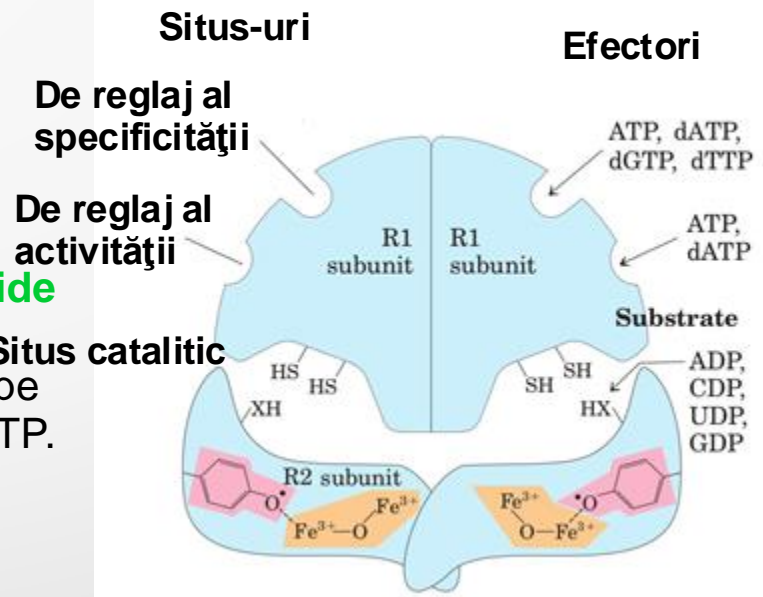
dNTP necesari pentru sinteza ADN-ului (exceptând dTTP) se produc sub formă de dNDP prin reducerea directă a ribonucleotidelor difosfat corespunzătoare (ADP, CDP, GDP). Reacția este catalizată de **ribonucleotid-reductaza** o-enzimă alcătuită din **4 subunități, 2 subunități mari (R1) și 2 subunități mici (R2)** asociate sub forma unui tetramer heterodimeric și care prezintă:

a) **2 situsuri catalitice** la interfața dintre subunitățile R1 și R2 în care sunt amplasate 2 resturi SH ce participă la reacția enzimatică:



b) **2 situsuri de reglare a activității** (câte unul pe fiecare subunitate R1) la care se pot lega **ATP-ul ce funcționează ca activator** și **dATP, dGTP si dTTP-ul ce inhibă enzima**;
Se reglează raportul în ribonucleotide si dezoxiribonucleotide

c) **2 situsuri alosterice de reglare a specificității** (câte unul pe fiecare subunitate R1) la care se pot lega dATP, ATP, dTTP, dGTP.



- Legarea **ATP sau dATP** - enzima produce **dUDP** și **dCDP**
- dTTP** - enzima produce **dGDP**
- dGTP** - enzima produce **dADP**

Se reglează raportul dintre nucleotidele purinice și pirimidinice

3. Sinteza dTTP

dTTP necesar sintezei ADN-ului este produs din **dUMP**. Acesta provine din:

1. **dCDP** care este fosforilat la **dCTP** si apoi deaminat cu formare de **dUTP**;
2. **dUDP** care este fosforilat la **dUTP**.

dUTP este convertit la dUMP de către o **dUTP-ază** extrem de activă. Sinteza propriu-zisă a dTTP este catalizată de o **timidilat-sintetază** după reacția:

