



Structura și metabolismul macromoleculelor informaționale

11. 01. 2024

Metabolismul ADN-ului 2

Anabolismul ADN-ului. B) Biosinteza catenelor de ADN = Replicarea moleculei de ADN

Complementaritatea bazelor azotate din cele două catene antiparalele dictează strict secvența unei catene funcție de cealaltă – dacă o catenă este **5'-ATTGCAT-3'** cealaltă trebuie să fie obligatoriu **3'-TAACGTA-5'**.

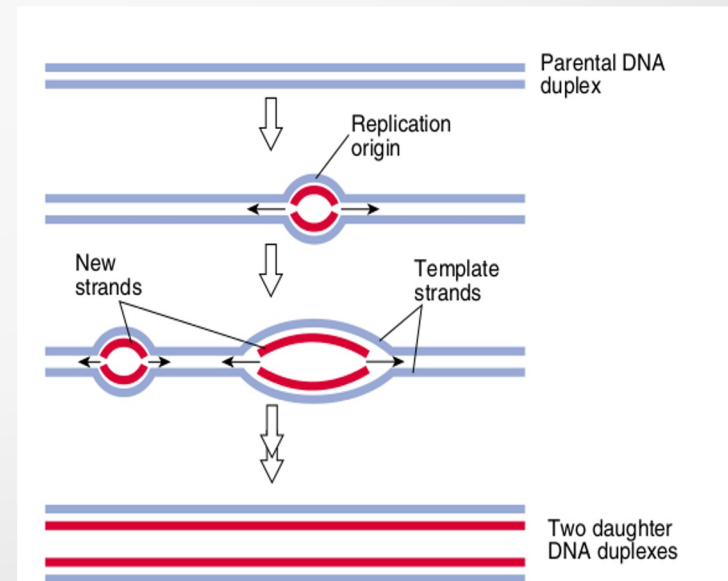
Pe bază de complementaritate, orice catenă de ADN poate fi duplicată. Moleculele de ADN dublu catenar se sintetizează *in vivo* printr-un proces numit **replicare semi-conservativă**:

- secvența moleculei originale este replicată, nu molecula dublu catenară helicoidală în sine;
- fiecare catenă a moleculei dublu catenare originale devine parte componentă a uneia din cele două molecule noi sintetizate

Replicarea moleculei de ADN este un proces esențial pentru celula și trebuie să fie **rapidă și precisă**.

Procesul de replicare **începe în una sau mai multe origini de replicare** și este realizată prin activitatea corelată a unui complex de proteine dintre care cea mai importantă **este ADN-polimeraza**. Elementul genetic ce este capabil de replicare autonomă se numește **replicon**.

La procarote – repliconul - întregul cromozom sau un plasmid
La eucariote – repliconul – o porțiune de aprox. 100 000 pb – un cromozom are mai mulți repliconi.



Structura ADN-polimerazei III

- are capacitatea de a atașa nucleotide la capătul 3' al unei catene existente, atașarea realizându-se pe baza complementarității cu o a doua catenă (**catenă matrice sau template**). **Direcția de polimerizare este 5' → 3'**.

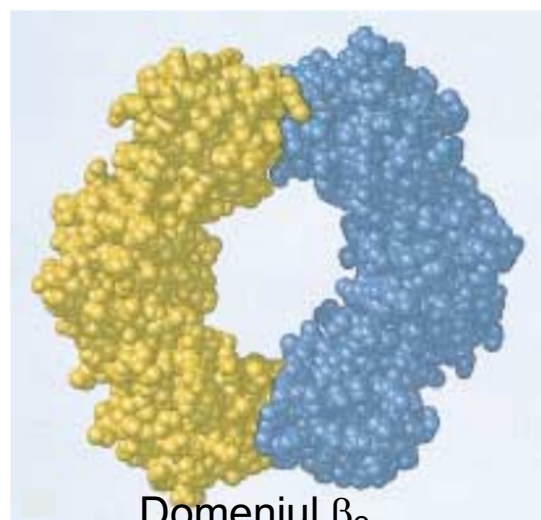
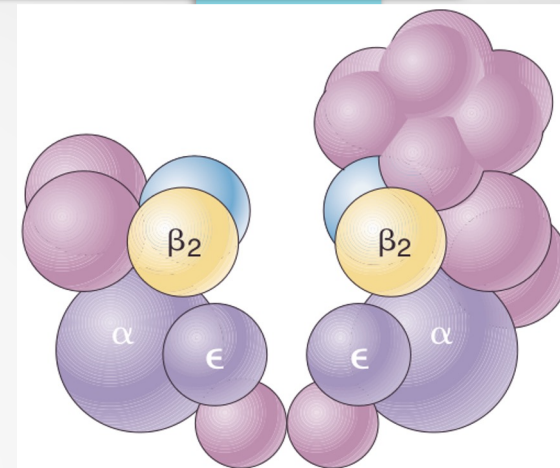
- viteza de polimerizare este de **1000 nucleotide/s**

- enzimă dimer, fiecare subunitate conținând 10 catene polipeptidice (domenii) diferite:

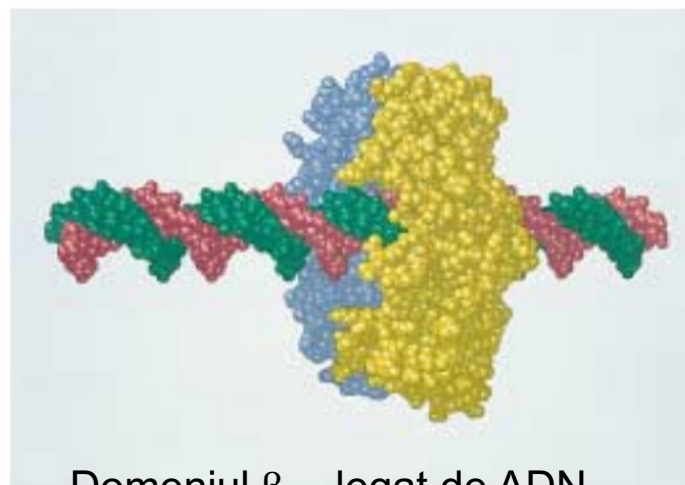
.Domeniul α – domeniul catalitic - catalizează **polimerizarea nucleotidelor în direcția 5' → 3'**

.Domeniul ϵ – domeniul de verificare – verifică **corectitudinea** bazelor azotate înserate în direcția **3' → 5'**

.Domeniul β_2 – domeniul de legare – fixează complexul enzimatic de molecula de ADN



Domeniul β_2



Domeniul β_2 – legat de ADN

Mecanismul molecular al replicării ADN-ului

Procesul de biosinteză a ADN-uului presupune parcurgerea a 6 etape:

1. **Desfacera helix-ului dublu al ADN-ului** se realizează în patru etape distincte:

- legare unei **proteine inițiator** de originea de replicare
- despiralizarea helix-ului dublu realizată prin acțiunea unei **helicaze (DnaB)**. Apare o structură specifică numită **bifurcație (furcă) de replicare**.
- protejarea zonelor monocatenare de proteine specifice (**single-strand binding proteins; SSB**) ce împiedică reformarea legăturilor de H
- relaxarea tensiunilor în catenă. La o viteză de replicare de 1000 pb/s, helix-ul se despiralizează (răsuțește) cu o viteză de 100 rotații/s. Tensiunea creată este eliminată prin clivarea unei legături fosfodiesterice, rotirea catenei clivate în jurul celei întregi și refacerea legăturii fosfodiesterice de către enzima **girază (topoizomerază)**.

2. **Legarea oligonucleotidelor amorsă** -

ADN-polimeraza poate atașa nucleotide de o catenă deja existentă, de aceea pentru inițierea replicării în zonele monocatenare se atasează o oligo-nucleotidă amorsă ARN sintetizată pe bază de complementaritate de către o enzimă specifică – **ADN primază (DnaG)**. Oligo-nucleotida amorsă produsă oferă capătul 3' necesar inițierii polimerizării.

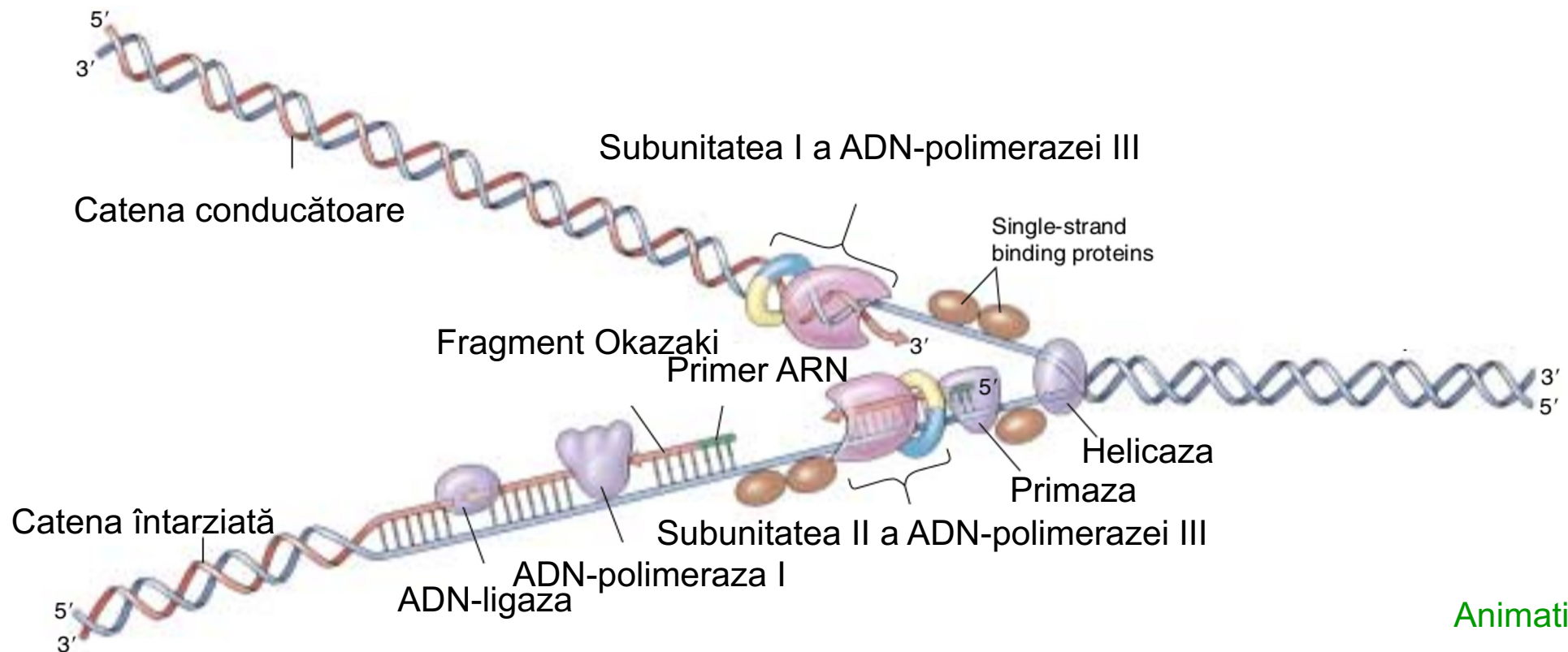
3. **Sinteza propriu-zisă a celor două catene**

ADN-polimeraza dimeră se leagă de **furca de replicare** – o subunitate de o catenă, cealaltă de a doua catenă. Pe baza celor două catene matriță, se produc simultan două catene noi, după cum urmează:

- în cazul **catenei matriță cu direcția 5' → 3'** - ADN-polimeraza începe să încorporeze nucleotide pornind de la oligonucleotida amorsă ARN în direcția 3' → 5', adică spre furca de replicare – **catenă conducătoare**

Mecanismul molecular al replicării ADN-ului

- în cazul **catenei matriță cu direcția 3' → 5'** - ADN-polimeraza începe să încorporeze nucleotide pornind de la oligonucleotida amorsă ARN tot în direcția 3' → 5' de această dată dinspre furca de replicare, îndepărtându-se de aceasta. Sintetizează un fragment scurt de ADN (100-200 de nucleotide la EK, 1000 – 2000 nucleotide la PK), după care eliberează catena și se amplasează din nou lângă furca de replicare, unde este o nouă oligonucleotidă amorsă și procesul se reia. Sinteza nu este continuă, ci sub forma unor fragmente scurte - **fragmente Okazaki**. Catena se numește - **catenă întârziată**.



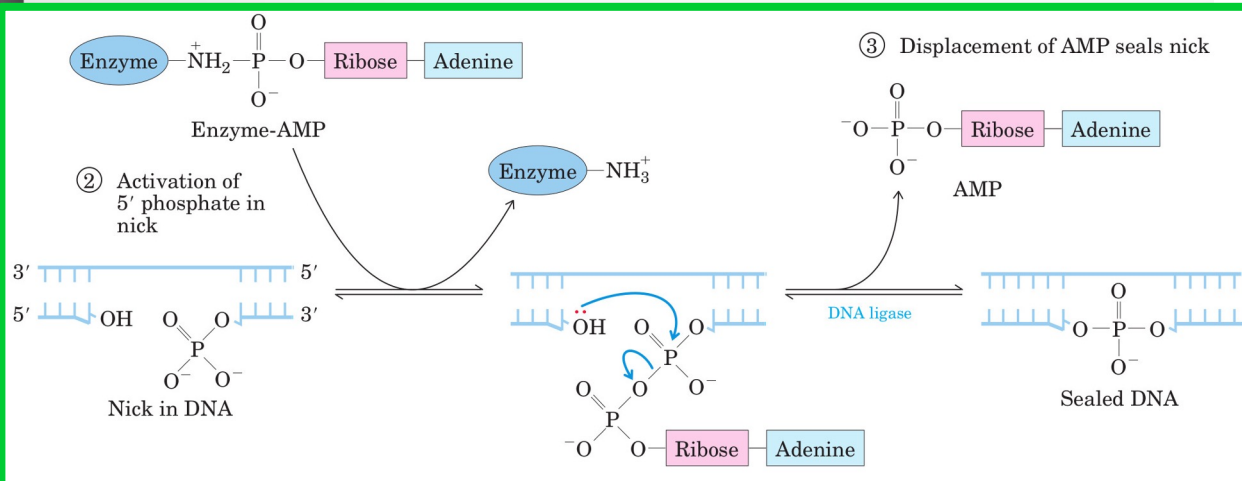
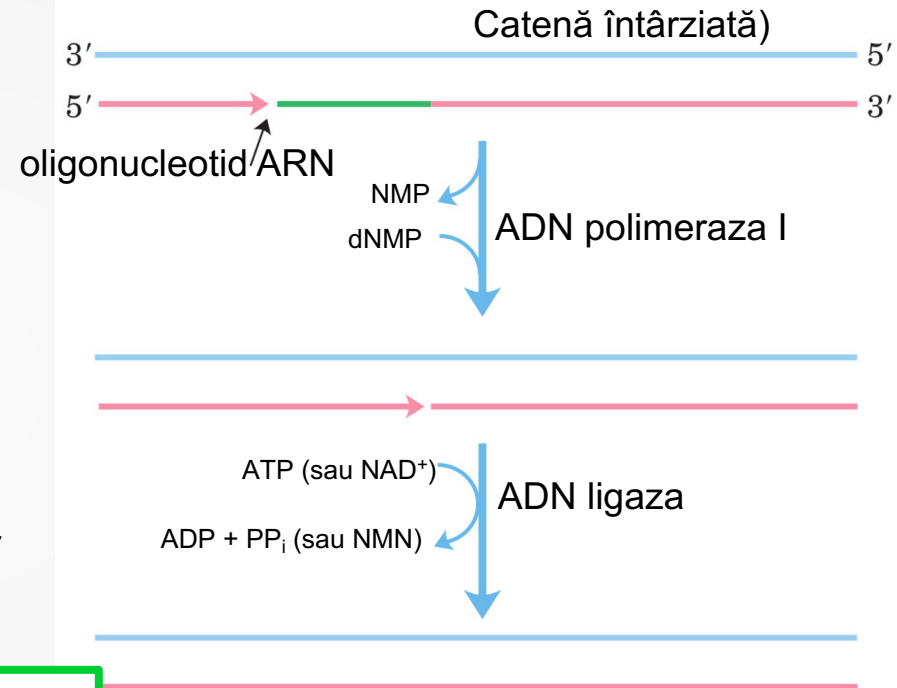
Mecanismul molecular al replicării ADN-ului

4. Eliminarea oligonucleotidelor amorsă

O altă enzimă - **ADN-polimeraza I** hidrolizează oligonucleotidele ARN și sintetizează în locul lor catene de ADN, atât pe catena conducătoare cât și în zonele de la începutul fragmentelor Okazaki. Între 2 fragmente Okazaki rămâne însă o legătură fosfodiestică 5' → 3' pe care polimeraza nu o poate forma.

5. Ligarea fragmentelor Okazaki

- fragmentele Okazaki sunt apoi conectate de către **ADN-ligază** ce poate realiza legături fosfodiestică între un OH 3' și o grupare PO₄ 5'. Enzima din EK folosește ATP, iar cea din PK - NAD⁺.



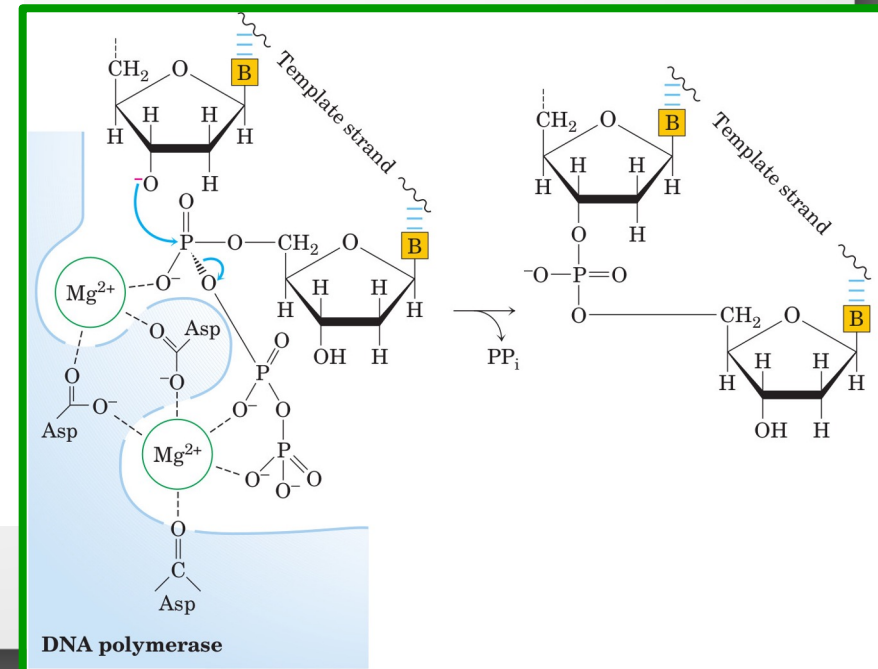
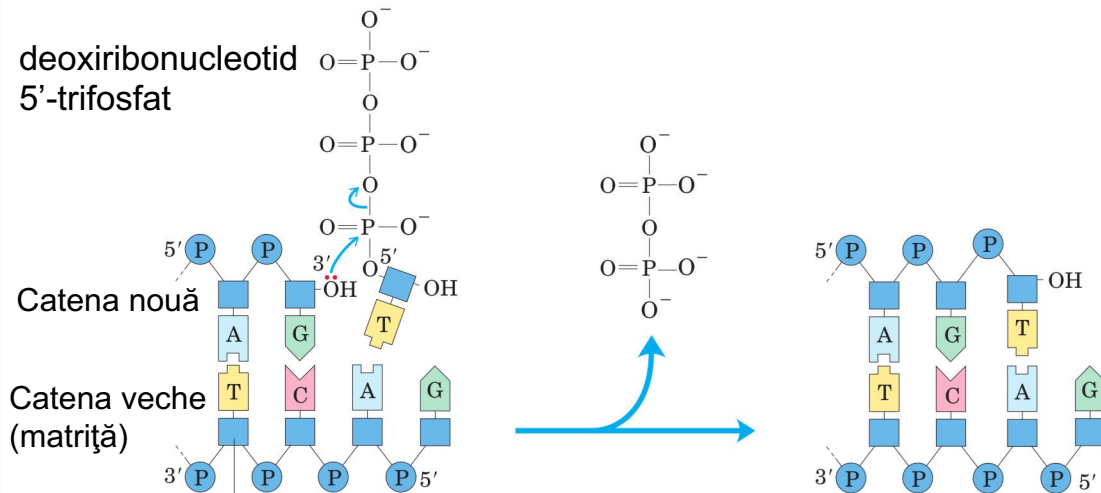
Mecanismul formării legăturii fosfodiesterice

Reacția catalizată de ADN-polimerază este în principiu o reacție de transfer a unei grupe fosforil (PO_3^- , de care se află atașată o nucleotidă) conform **reacției generale de biosinteză a ADN-ului**:



Reacția presupune un **atact nucleofil** al grupeii 3'-OH din nucleotida de la capătul catenei nou sintetizate asupra grupeii αPO_4 din deoxiribonucleotidul 5'-trifosfat ce urmează a fi atașat.

Mecanismul catalitic al ADN-polimerazei implică **2 atomi de Mg^{2+}** (unul coordonează grupele PO_4 ale dNTP-ului ce este atașat, iar celălalt facilitează eliminarea pirofosfatului (PP)) și **trei resturi de asparagină** (dintre care 2 sunt înalt conservate în toate polimerazele).



Modificări post-replicare ale ADN-ului

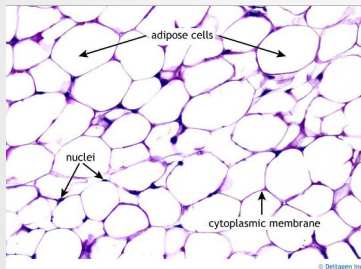
Odată sintetizată, molecula de ADN conține toată informația necesară funcționării celulei până la următoarea diviziune. Această informație trebuie să:

1. fie împachetată într-un volum mic;

1 cromozon de *E. coli* conține o moleculă circulară dublu catenară de 4,639,221 pb ce are un perimetru de 1.7 mm (de 850 ori mai mare decât lungimea celulei);

ADN-ul dintr-o celulă umană – cele 46 de molecule de ADN duble din cei 44 de cromosomi somatici plus XY sau XX amplasate cap la cap au o lungime de peste 2 metri. ADN-ul din toate celulele corpului unui om (10^{14}) are o lungime totală de 2×10^{11} km (circumferința Pământului este de 4×10^4 km, distanța Pământ – Lună $1,5 \times 10^{18}$ km)

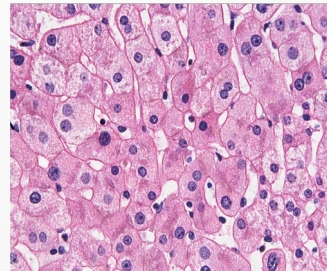
2. fie accesibil în orice moment, funcție de specificul (rolul, diferențierea) celulei;



Adipocit - aprox. 12 500 gene sunt active

Genomul uman conține 25 – 35 000 de gene ce codifică proteine.

8000 de gene sunt active simultan în celulele tuturor țesuturilor.



Hepatocit - aprox. 11 000 gene active

3. fie păstrată intactă și nealterată.

În corpul uman secvența și structura ADN-ului sunt deteriorate cu o rată de 10 000 – 1 000 000 leziuni moleculare / zi / celulă – 0,000165% din genomul unei celule umane este afectat zilnic. Cu toate acestea informația este nealterată.

Ramsköld D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R (2009) An Abundance of Ubiquitously Expressed Genes Revealed by Tissue Transcriptome Sequence Data. *PLoS Comput Biol* 5(12): e1000598. doi:10.1371/journal.pcbi.1000598

Tissue/Cell	Number of genes*	Fraction of genes*	Ensembl genes†
Skeletal muscle ¹	11,276	0.61	11,953
Liver ^{1,3}	11,392	0.61	12,191
BT474 ⁴	11,844	0.64	12,808
MB435 ⁴	11,847	0.64	12,726
HME ⁵	12,084	0.65	12,920
T47D ⁴	12,205	0.66	12,983
Heart	12,209	0.66	13,159
MCF7 ⁴	12,281	0.66	13,216
Adipose tissue	12,553	0.68	13,503
Colon	13,016	0.70	14,052
Cerebellum ^{2,3}	13,132	0.70	14,043
Kidney	13,235	0.71	14,177
Brain ¹	13,298	0.71	14,107
Breast	13,406	0.72	14,537
Lymph node	13,534	0.73	14,686
Testes	15,518	0.84	16,869

*annotations from RefSeq, protein-coding genes.
†number of protein-coding genes, annotations from Ensembl.
¹number of genes detected in mouse: skeletal muscle 11,799; liver 11,201; brain 13,626.
²standard deviation for samples from different individuals: 106.
³mean number for different individuals.
⁴breast cancer cell line.
⁵human mammary epithelial cell line.
doi:10.1371/journal.pcbi.1000598.t002

Modificări post-replicare ale ADN-ului. A) Metilarea

După finalizarea procesului de biosinteză a unei molecule de ADN, aceasta suferă o serie de **modificări** biochimice **post-replicare**. Principalele tipuri de modificări sunt :

A) **metilarea ADN-ului;**

B) **împachetarea ADN-ului** în nucleozomi, fibra de cromatină și în final cromozomi (**nu constituie subiectul acestui curs**);

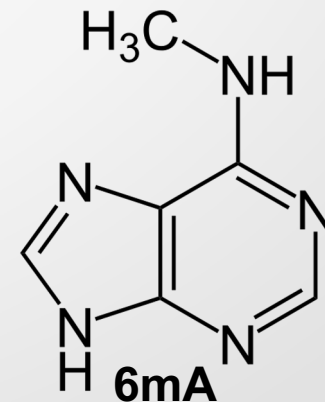
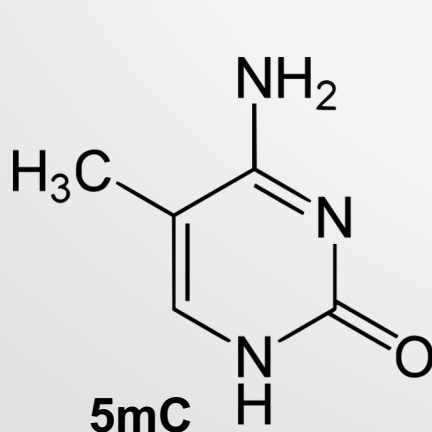
C) **repararea alterărilor structurale și de secvență** apărute în molecula de ADN ca urmare a acțiunii factorilor de mediu (biotici sau abiotici).

Modificările post-replicare se pot realiza **imediat după finalizarea bio-sintezei ADN-ului** (A și B) sau **la o distanță mare de timp** de acesta (A și C)

A) Metilarea ADN-ului

- este procesul de adaugare a unor grupe metil la nucleotidele A sau C din structura ADN-ului.

Metilarea citozinei are la carbonul 5 din inelul piridinic cu formarea **5-metil-citidinei (5mC, m5C)** și este cea mai frecventă formă de metilare. În bacterii, metilarea citozinei poate avea loc atât și la N4 cu formarea **4-metil-citidinei (4mC, m4C, N4mC)**. Metilarea adeninei a fost identificată toare în bacterii cu formare **N-6-metiladeninei (m6A, 6mA, N6mA)**.

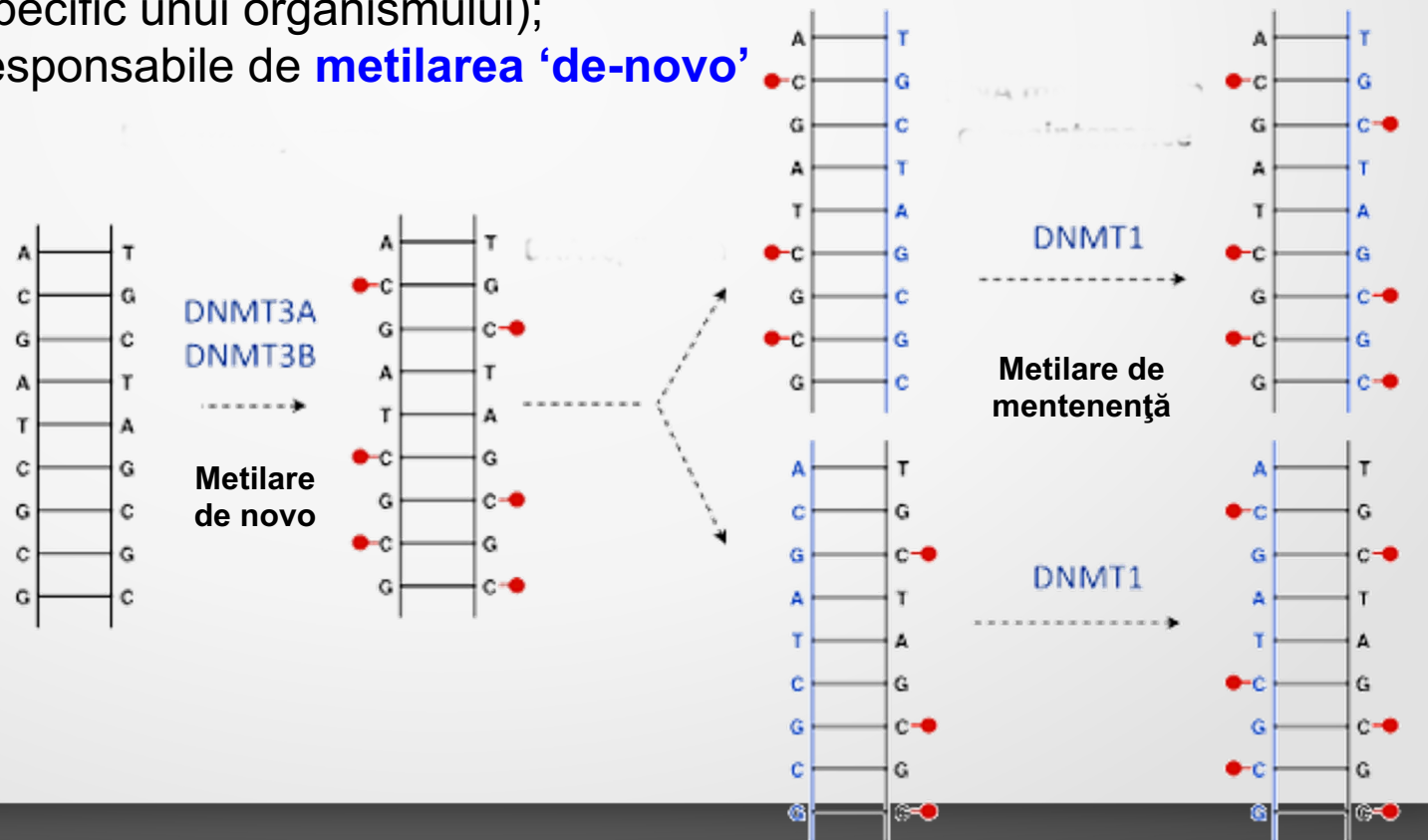


A) Metilarea ADN-ului

Metilarea ADN-ului este realizată de o familie de enzime numite **ADN-metil-transferaze** (DNA methyltransferases, DNMT) ce folosesc ca donator al grupei metil S-adenozin-metionină (SAM). În genomul uman există 3 gene ce codifică 3 ADN-metil-transferaze diferite:

• **DNMT1** – responsabilă de metilarea catenei nou sintetizate la câteva secunde după finalizarea procesului de replicare. Metilarea se realizează prin ‘copierea’ situsurilor de metilare de pe catena matriță și se numește **metilare de mentenență** (asigură păstrarea unui pattern de metilare specific unui organismului);

• **DNMT3a și DNMT3b** – responsabile de **metilarea ‘de-novo’** a ADN-ului.

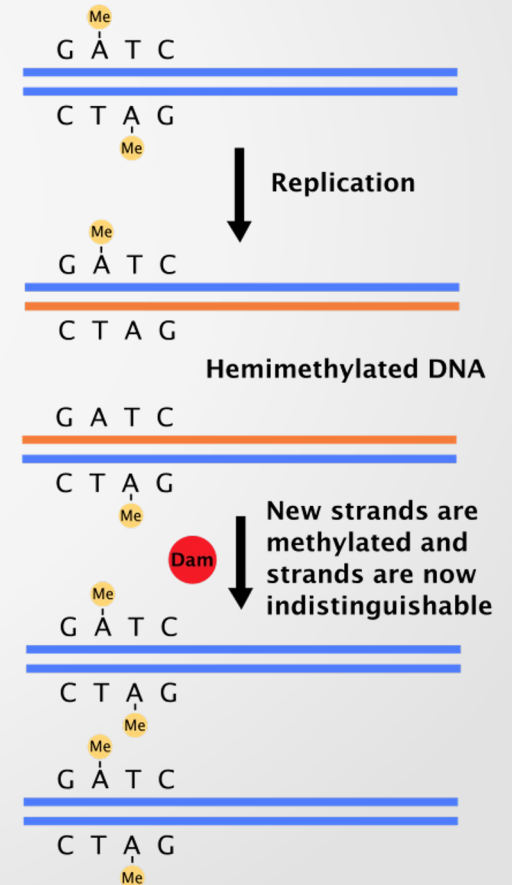


A) Metilarea ADN-ului

Rolul metilării ADN-ului:

A) la bacterii: metilarea A și G permite celulelor bacteriene să **recunoască ADN-ul propriu de cel exogen** (al bacteriofagilor de ex).

Cea mai cunoscută metilază bacteriană este **Dam** (*E. coli* DNA adenine methyltransferase, Dam) ce recunoaște secvențele 5'-GATC-3' și le metilează la nivelul A. ADN-ul metilat la secvența 5'-GATC-3' este recunoscut de celulele de *E. coli* ca fiind propriu, cel ne-metilat sau metilat în alte situs-uri este degradat de către **endonucleazele de restricție**.



A) Metilarea ADN-ului

B) la eucariote: metilarea **are loc aproape exclusiv la G din secvența**

GC (notată **GpC** și semnificând 5'—C—fosfat—G—3'). La mamifere, 70% - 80% din G din GpC sunt metilate. Secvențele GpC sunt în general concentrate în așa numitele **insule GpC** – secvențe de 200 pb cu un procent de GC mai mare de 50% frecvent întâlnite în **promotori (70% din promotorii umani conțin insule GpC)**.

Metilarea ADN-ului la G din GpC are ca efect reducerea expresiei genelor conținute în fragmentul de ADN metilat. Reducerea este **stabilă**, și de cele mai multe ori **permanentă și ireversibilă**.

Prin metilarea controlată a anumitor porțiuni de ADN, sunt inactivate în mod controlat anumite și gene și se realizează **procesul de diferențiere celulară**.

De-metilarea ADN-ului este procesul invers, de eliminare a grupelor metil din nucleotidele ADN -ului, ceea ce duce la re-activarea genelor. De-metilarea poate fi:

- Pasivă** – în cursul procesului de replicare, prin ne-realizarea metilării de către DNMT1 (enzima este inactivă – inactivată chimic sau ca urmare a unei mutații)
- Activă** - prin eliminarea directă sau prin modificarea chimică a grupei metil **Ex: oxidarea grupei metil la 5-Hidroxi-metil-citozină și transformarea ulterioară de către enzimele TET.**

Metilarea și demetilarea ADN-ului sunt strict controlate și fac parte din **controlul epigenetic al activității genelor**.

C) Repararea alterărilor structurale și de secvență

În corpul uman secvența și structura ADN-ului sunt deteriorate cu o rată de **10 000 – 1 000 000 leziuni moleculare / zi / celulă** – **0,000165% din genomul unei celule umane este afectat zilnic.**

Clancy, S. (2008) DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. Nature Education 1(1):103

Leziunile la nivelul ADN-ului pot apare:

.majoritatea covârșitoare – la **nivelul structurii primare** a moleculei de ADN prin **modificarea chimică a bazelor azotate**

.la **nivelul structurii secundare** a moleculei de ADN – afectează împachetarea ADN-ului cu histonele sau ruperea catenelor de ADN

Factori ce induc leziuni la nivelul ADN-ului:

.Factori endogeni:

a. **replicarea eronată** a ADN-ului

b. **speciile reactive de oxigen** generate prin procesele oxidative normale – respirație, generare ATP.

.Factori exogeni:

a. **radiația UV (200 – 400 nm)** emise de soare sau din surse antropice

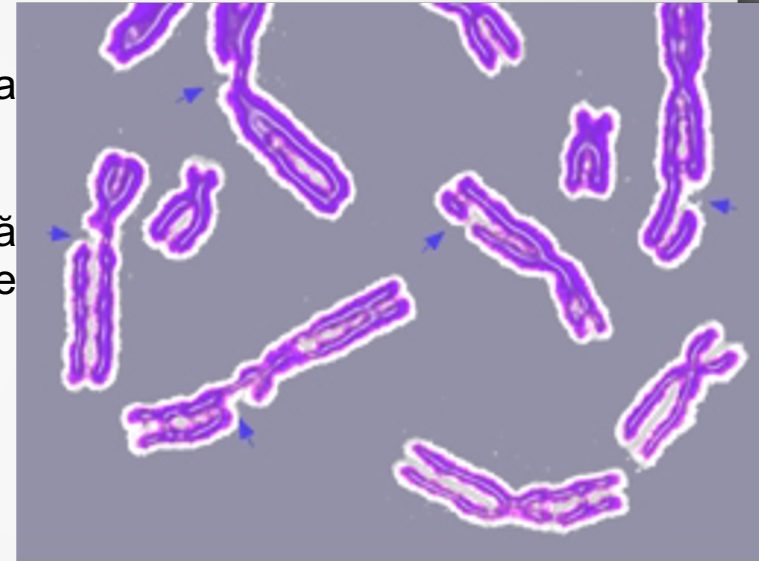
b. **radiațiile X sau Gamma** – ruperea catenelor

c. **temperatura** – pierderea bazelor purinice

d. **toxine** – de origine vegetală, animală sau fungice - aflatoxinele

d. **compuși antropici mutageni**

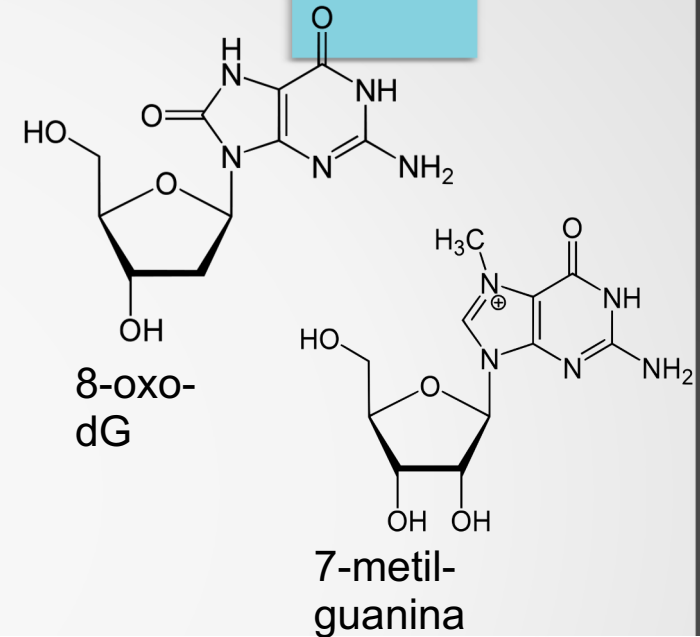
e. **virusuri**



Tipuri de leziuni moleculare ADN

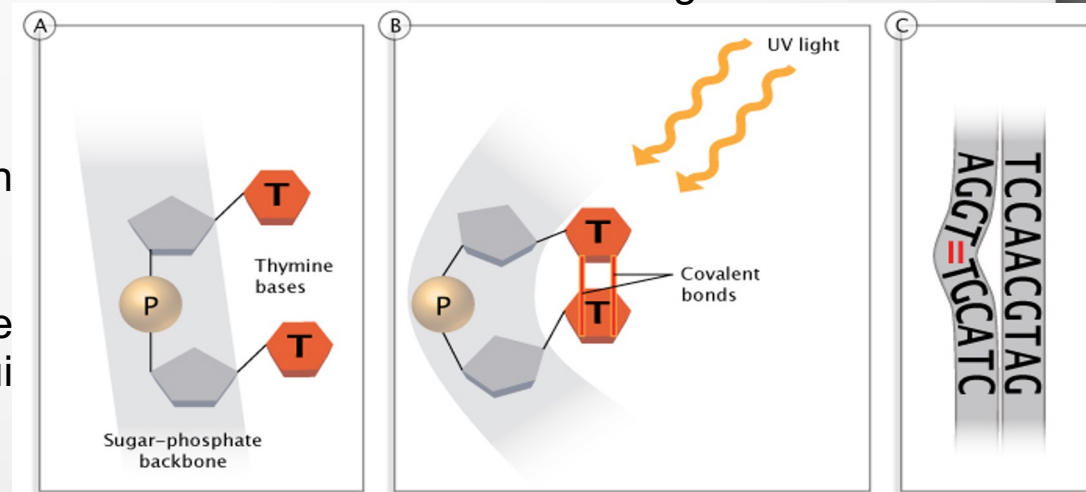
A. Induse de factorii endogeni:

1. **oxidarea bazelor** azotate cu formarea de derivați precum 8-oxo-2'-guanosina (8-oxo-dG)
2. **alchilarea** (metilarea) bazelor azotate cu formare de 7-metil-guanina, 1-metil-adenina, 6-O-Metil-guanina
3. **hidroliza** bazelor azotate prin de-aminare
4. formarea unor **derivați de adiție de dimensiuni mari** – adiția benzo-piren și obținerea de benzo-pirenediol epoxid-dG
5. **împerecherea greșită** a bazelor azotate în procesul de replicare



B. Induse de factorii exogeni:

1. formarea de **dimeri ai bazelor piridinice** prin acțiunea radiației UV
2. **ruperea catenelor de ADN**
3. **pierderea bazelor purinice** din catena de ADN (de-purinizare) ca urmare a tratamentului termic.



Apar "îndoituri" ale catenei ce nu permit replicarea sau transcrierea

Leziuni moleculare vs. mutații ADN

O leziune la nivelul ADN-ului nu se finalizează obligatoriu cu o mutație a moleculei de ADN datorită intervenției unor **sisteme enzimatiche specifice de reparație a ADN-ului**. Acestea au capacitatea de recunoaște o leziune și de a o elimina – mutațiile nu pot fi eliminate.

Leziune ADN

- anomalie fizică la nivelul ADN-ului – ruperea catenei/catenelor, **baze azotate modificate**
- poate fi detectată și reparată **dacă informația necesară există într-o copie neafectată** (catenă complementară sau cromozom omolog)
- odată reparată nu afectează funcțiile materialului genetic
- dacă nu poate fi reparată replicarea ADN-ului și sinteza ARNm este oprită
- **cauzează erori în procesele de replicare și reparare ceea ce generează mutații**

Mutație

- o modificare a secvenței de nucleotide la nivelul ADN-ului, **nucleotidele sunt ne-modificate**
- nu poate fi detectată și nu poate fi reparată
- afectează funcțiile genelor
- se replică odată cu replicarea ADN-ului

Mutation rates of different genes in different organisms

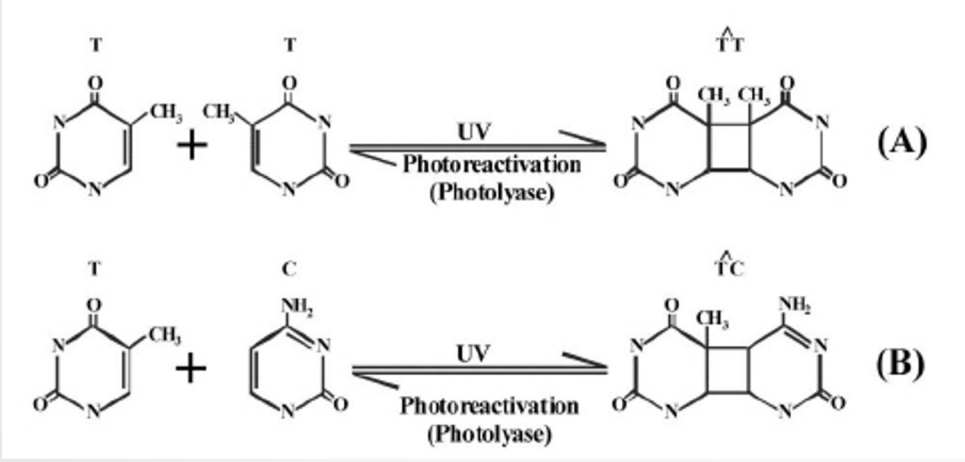
Organism	Mutation	Rate	Unit
Bacteriophage T2	Lysis inhibition	1×10^{-8}	Per replication
	Host range	3×10^{-9}	
<i>Escherichia coli</i>	Lactose fermentation	2×10^{-7}	Per cell division
	Histidine requirement	2×10^{-8}	
<i>Neurospora crassa</i>	Inositol requirement	8×10^{-8}	Per asexual spore
	Adenine requirement	4×10^{-8}	
Corn	Kernel color	2.2×10^{-6}	Per gamete
<i>Drosophila</i>	Eye color	4×10^{-5}	Per gamete
	Allozymes	5.14×10^{-6}	
Mouse	Albino coat color	4.5×10^{-5}	Per gamete
	Dilution coat color	3×10^{-5}	
Human	Huntington's disease	1×10^{-6}	Per gamete
	Achondroplasia	1×10^{-5}	
	Neurofibromatosis (Michigan)	1×10^{-4}	
	Hemophilia A (Finland)	3.2×10^{-5}	
	Duchenne muscular dystrophy (Wisconsin)	9.2×10^{-5}	

Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

1. Anularea catalitică a modificărilor chimice ale bazelor azotate

- nu necesită ruperea sau formarea de legături diesterice
- bazele azotate sunt modificate în mod direct de enzime specifice

Ex. **A) dimerii pirimidinici** rezultați în urma expunerii la UV sunt eliminați printr-un proces numit **fotoreactivare** de către enzime specifice – **fotoliază**. Activitatea fotoliazelor este dependentă de prezența luminii albastre/UV (300 – 500 nm)



SPECIAL REPORT

Photolyases: capturing the light to battle skin cancer

*George A. Garinix, Judith Jans & Gijbertus T.J. van der Horst**

*Author for correspondence
Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands
Tel.: +31 104 487 455;
g.vanderhorst@erasmusmc.nl

Keywords: 6-4 photoproducts, cyclobutane pyrimidine dimers, photolyases, skin cancer, transgenic mice, UV

DNA differs from other cellular macromolecules (e.g., RNA, proteins and polysaccharides) in that it is not continuously replenished and remains throughout the life span of the cell. However, its physicochemical make-up cannot ensure life-long stability. Moreover, various endogenous and environmental agents continuously pose a serious

immune system [5–8]. In the long term, however, mutations originating from replication of UV-damaged DNA can lead to the formation of skin cancer (i.e., basal and squamous carcinomas, melanomas), the most common type of cancer in the USA [7,10]. Altered lifestyle (i.e., natural and artificial sun tanning) and depletion of the

Photolyases comprise efficient enzymes to remove the major UV-induced DNA lesions, cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts (6-4PPs). While photolyases are present in all three kingdoms of life (i.e., bacteria, prokaryotes and eukaryotes), placental mammals appear to have lost these enzymes when they diverged from marsupials during evolution. Consequently, man and mice have to rely solely on the more complex and, for these lesions, less efficient nucleotide excision repair (NER) system. To assess the relative contribution of CPDs and 6-4PPs to the cytotoxic and genotoxic effects of the UV component of sunlight, we have recently generated a comprehensive set of transgenic mice expressing CPD and/or 6-4PP photolyases. Here, we discuss the use of photolyase transgenic mice as effective tools to study the adverse effects of UV irradiation.

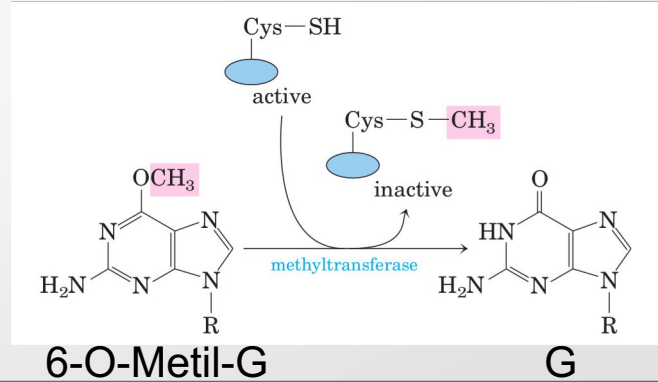
immune system [5–8]. In the long term, however, mutations originating from replication of UV-damaged DNA can lead to the formation of skin cancer (i.e., basal and squamous carcinomas, melanomas), the most common type of cancer in the USA [7,10]. Altered lifestyle (i.e., natural and artificial sun tanning) and depletion of the

future medicine

10.2217/14796694.2.2.191 © 2006 Future Medicine Ltd ISSN 1479-6694 *Future Oncol.* (2006) 2(2), 191–199 191

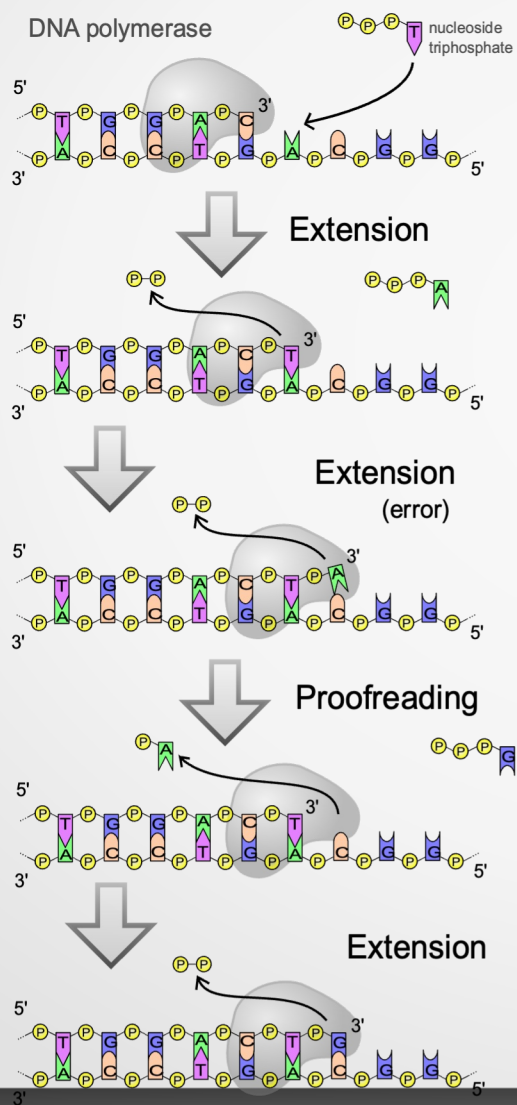
Fotoliază sunt prezente la bacterii, plante și animale dar nu și la mamiferele placentare inclusiv la om.

B) Metil-guanina – este eliminată prin acțiunea proteinei **metil-guanin-metil transferaza (MGMT)**. O moleculă MGMT convertește o metil-guanozină (o moleculă MGMT nu poate transforma mai multe molecule de metil-guanozină precum o enzimă) – nu este o reacție de cataliză.



Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

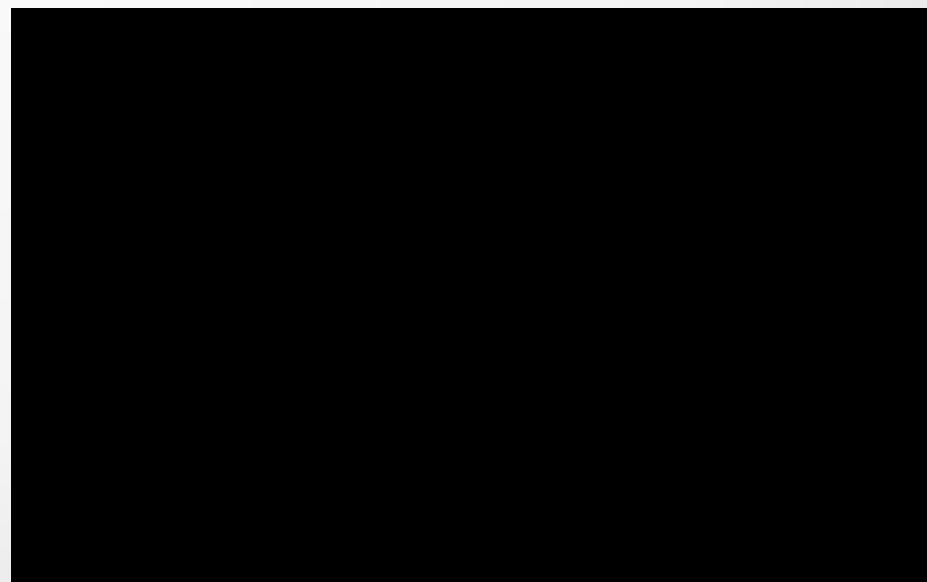
2. Mecanismul de proof-reading - eliminarea bazelor azotate introduse greșit de domeniul catalitic al ADN-polimerazei prin intermediul unei activități 3'-5' exo-nucleazice a DNA-polimerazei.



Rata de eroare a subunității catalitice a DNA polimerazei: o bază greșită la $10^4 - 10^2$ nucleotide încorporate

Rata de eroare a DNA polimerazei: o bază greșită la $10^6 - 10^8$ nucleotide încorporate

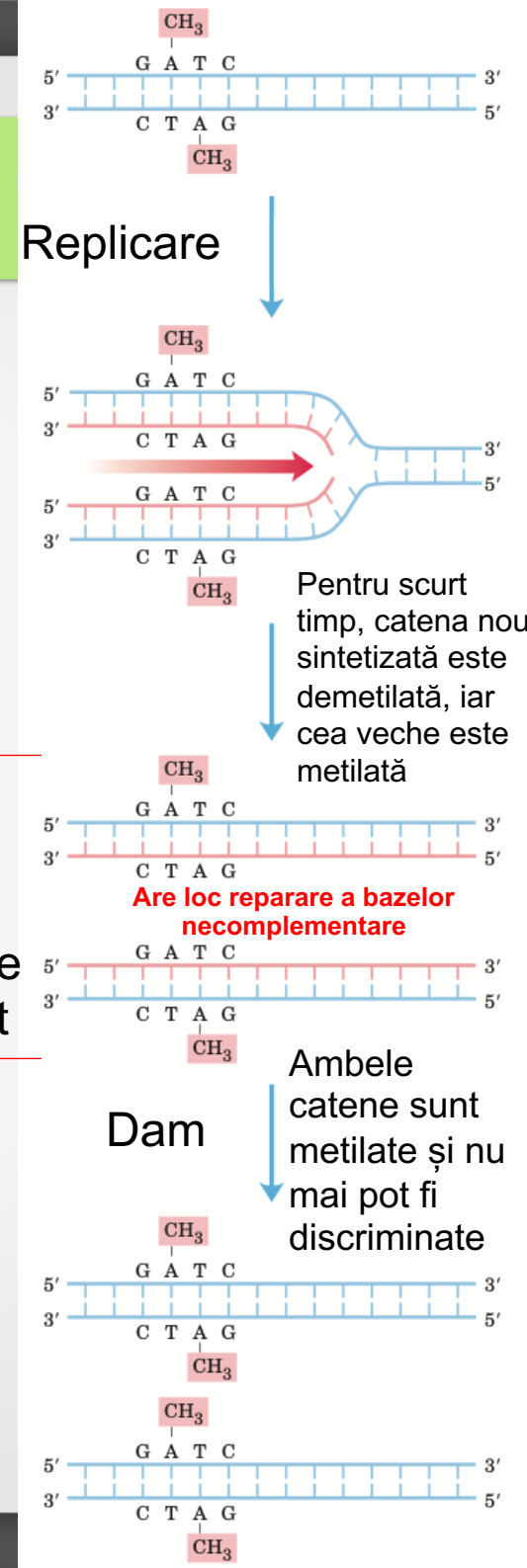
Thomas A. Kunkel -DNA Replication Fidelity J. Biol. Chem. 2004 279: 16895-16898. First Published on February 26, 2004, doi:10.1074/jbc.R400006200



Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

Suplimentar, eventualele nucleotide încorporate greșit de către ADN-polimeraza sunt identificate și eliminate după finalizarea procesului de replicare a moleculei de ADN printr-un proces de **reparare a bazelor necomplementare** (*mismatch repair*). Procesul nu are legătură cu activitatea de verificare a corectitudinii încorporării nucleotidelor specifică subunității ϵ a ADN-polimerazei, este realizată de un ansamblu de enzime specifice și **are loc în intervalul de câteva secunde până la minute în care molecula de ADN este hemimetilată**. Mecanismul recunoașterii catenei corecte, neafectate, de ce-a alterată a fost stabilit doar la *E.coli* și se bazează pe procesul de metilare a ADN-ului. În scurtul interval de timp de la finalizarea replicării până enzima Dam acționează:

a. Dacă nucleotidele încorporate greșit sunt în apropierea situsurilor **GATC**, nucleotida de de catena nemetilată este eliminată și este introdusă o nouă nucleotidă pe baza complementarității cu catena metilată;



Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

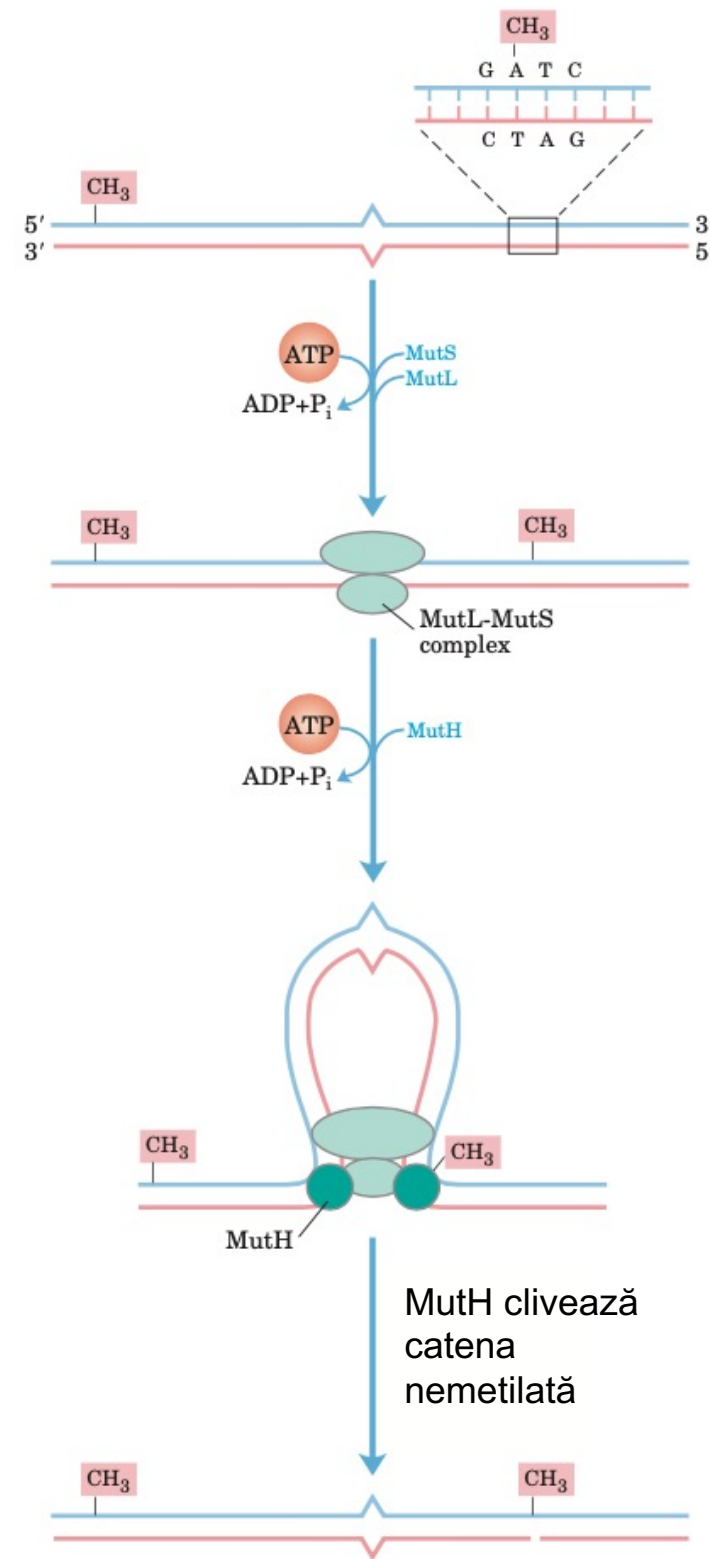
b. Dacă nucleotidele încorporate greșit sunt departe de situs-urilor de metilare GATC, repararea presupune implicarea mai multor proteine după cum urmează:

1. **MutL** și **MutS** identifică împerecherea greșită și se asociază cu aceasta;

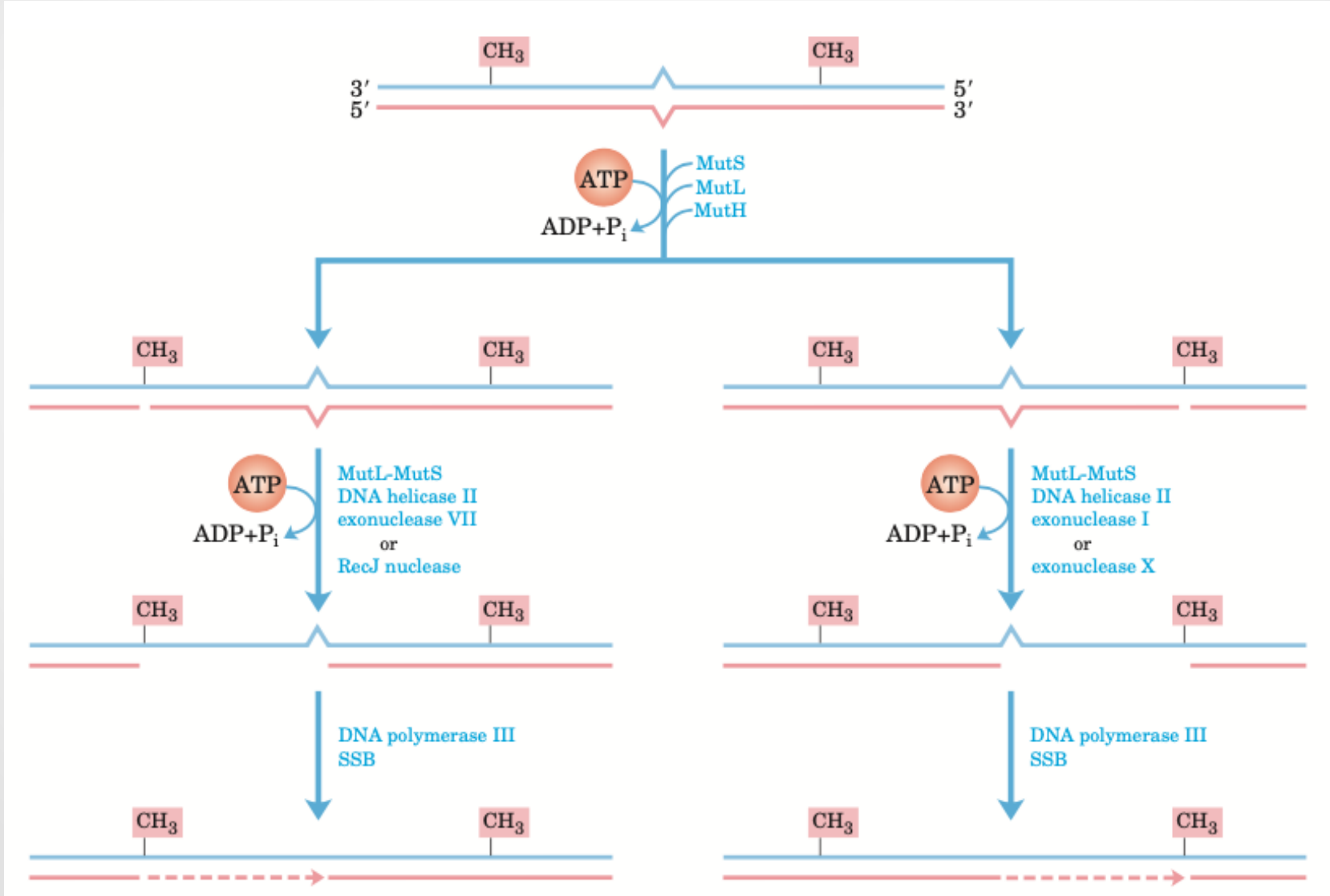
2. **MutH** recunoaște situs-urile metilate de o parte și de alta a complexului MutL-MutS, se leagă de acestea și apoi de MutL. În acest fel, ADN-ul va fi forțat să formeze o buclă;

3. Odată complexul format, **activitatea endonucleazică a MutH** se activează și catena nemetilată este clivată la capătul 5' al G din GATC;

4. Catena nemetilată este apoi degradată de la situsul de clivare către situs-ul nucleotidelor încorporate greșit de către **exonucleaza I sau X** (dacă direcția de degradare este 3'→5') sau de către **exonucleaza VII** (dacă direcția de degradare este 5'→3'). O nouă catenă este apoi sintetizată DNA pol III și o ligază. În proces sunt implicate de asemenea o helicază și SSBP).

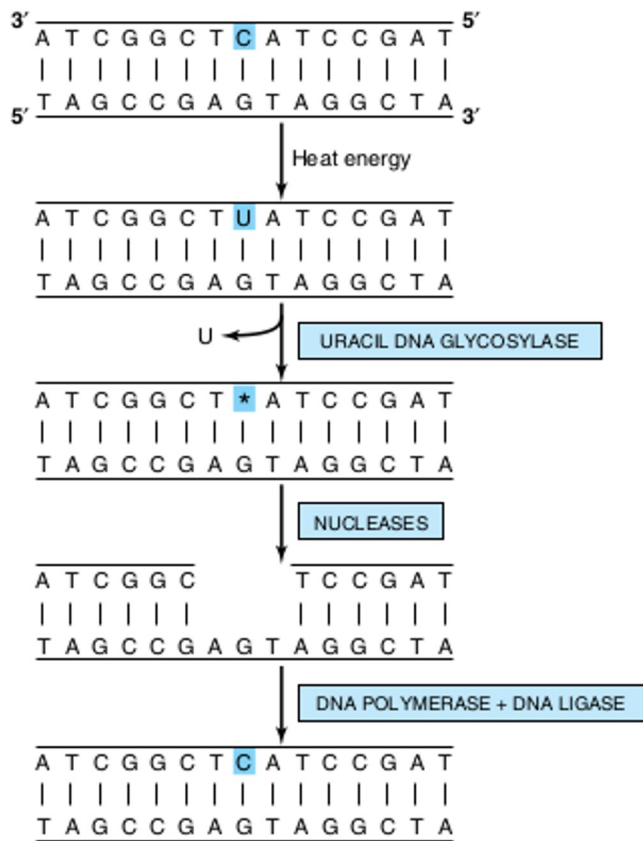


Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

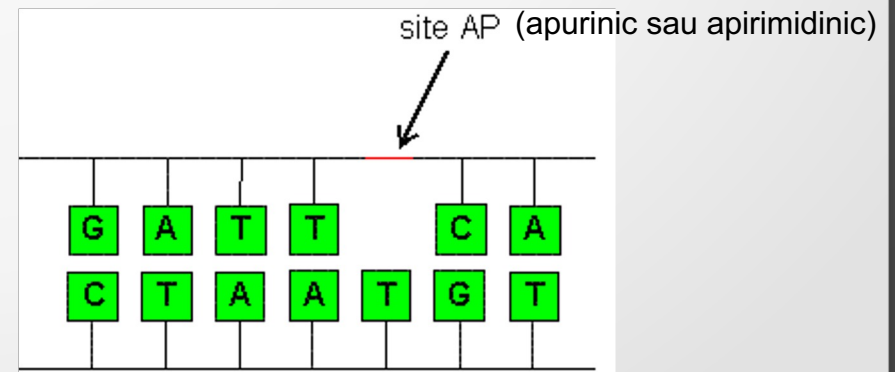


Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului

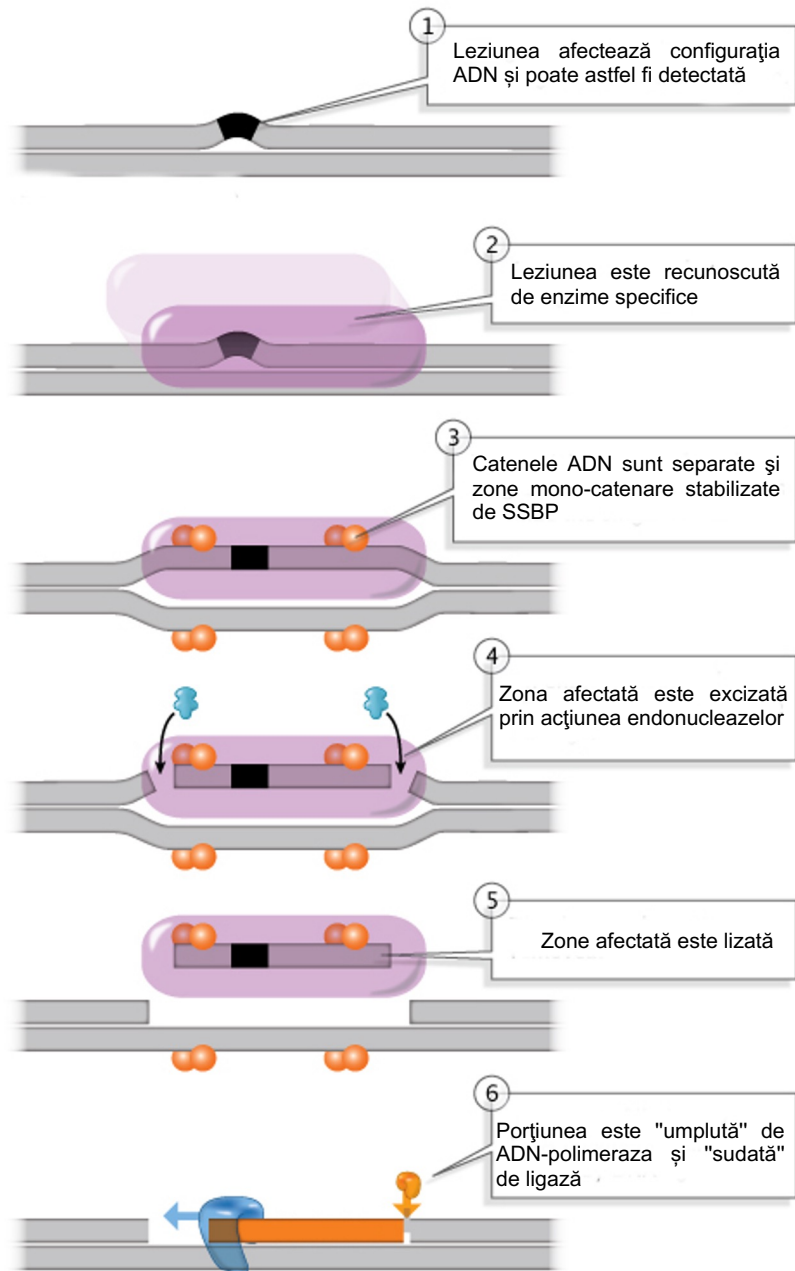
3. Leziunile la nivelul unei singure catene de ADN – sunt reparate pe baza informației de pe **catena complementară** prin acțiunea unor **mecanisme de excizie-reparație** ce taie zone afectată și resintetizează porțiunea de ADN pe bază de complementaritate. Au fost descrise **două tipuri** distincte de **mecanisme de excizie-reparație**:



A) prin excizia și inserția bazelor azotate - **base excision repair (BER)** – repară defectele ce afectează o singură nucleotidă prin acțiunea unor **glicozilase** ce elimină baza azotată afectată din nucleotidă și obținerea unui **situs AP (apurinic sau apirimidinic)**. Situs-ul AP este apoi lizat de o **AP endonuclează**, completat de o **polimeraza ADN** specifică iar legătura O-P-O refăcută de o **ligază**.



Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului



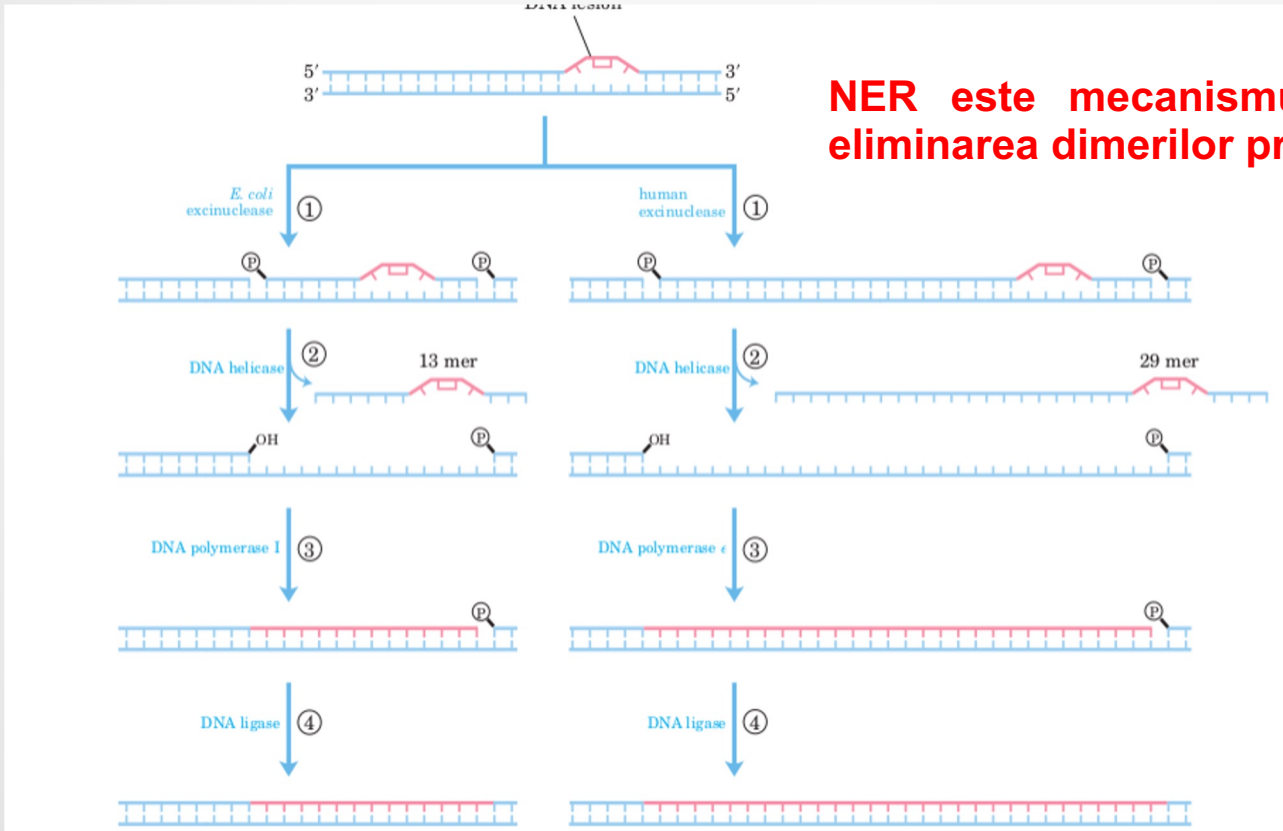
B) prin excizia și inserția uneia sau a mai multor nucleotide - **nucleotide excision repair (NER)** – repară defectele ce afectează una sau mai multe nucleotide prin:

- excizia zonei de ADN ce conține eroarea, precum și a unei zone din jurul leziunii cu obținerea unei porțiuni de ADN monocatenar – acțiunea **endonucleazelor**.

- sinteza noii catene pe baza de complementaritate cu catena veche de către **ADN-polimerază**

- ligarea noii catene produse prin acțiunea unei **ligaze**.

Mecanisme de reparare a leziunilor moleculare de la nivelul ADN-ului



NER este mecanismul utilizat de om pentru eliminarea dimerilor produși de UV.

4. Leziunile la nivelul unei ambelor catene de ADN – sunt reparate prin intermediul unor ligaze specifice. Uneori, dar nu întotdeauna, repararea se realizează pe baza homologiei ce există între 2 cromatide sau între 2 cromozomii perechi. Sunt dificil de reparat și au efecte puternice asupra genomului afectat.

Cel mai cunoscut sistem reparator al rupturilor ambelor catene este cel realizat de proteinele **Ku** (o helicază) și **ADN-PK** (o protein kinază ADN dependentă). În acest caz procesul de reparare presupune:

1. Cate o moleculă de helicaza Ku inactivă se leagă de cele câte unul din două capete ale moleculelor ADN bicatenar ce urmează a fi legate;
2. La complexul ADN-Ku se atașează câte o moleculă ADN-PK și cele două capete ADN se apropie
3. ADN-PK se fosforilează reciproc și apoi fosforilează helicaza Ku care devine activă.
4. Ku desface capetele dublu-catenare și le menține mono-catenare în așa fel încât acestea pot interacționa pe bază de complementaritate.
5. Capete în exces sunt eliminate de o exonuclează
6. Catenele sunt finalizate de o ligază

