

CAPITOLUL I. PROTEINELE. ENZIMELE

STRUCTURA ȘI FUNCȚIA BIOLOGICĂ A PROTEINELOR

Majoritatea covârșitoare a modificărilor biochimice în organismele vii sunt determinate de proteine: "Viața e nemijlocit legată de procesul de reînnoire a proteinelor și reprezintă modul de existență a corpului proteic" (F. Enghels). Anume proteinele sunt constituentele chimice cu cel mai înalt grad de complexitate, varietate moleculară, care reprezintă specificitate de specie, de organ.

Denumirea de proteină provine de la cuvântul grec *proteios*, care înseamnă *de prim rang, pentru viață*, folosit ca termen pentru prima dată în 1838 de către savantul german Müllder.

Proteinele formează clasa de substanțe dintre cele mai răspândite și de o varietate funcțională excepțională.

Proteinele îndeplinesc următoarele *funcții fundamentale* iminente organismelor vii:

1. Au un pronunțat și important rol structural, constituind baza structurilor celulare, membranare, precum și a organelor celulare, materialul intercelular al țesuturilor și organelor. Proteinele structurale sunt: *colagenul, elastina, keratina, fibroina*. Ele asigură diversitatea și specificitatea de formă a tuturor ființelor vii.

2. Exerciță cataliza fermentativă. Toate varietățile de reacții biochimice și tot specificul transformărilor din organismele vii sunt determinate de enzime care sunt, de fapt, proteine. Actualmente, sunt depistate mii de fermenți, mulți dintre care separați în forma cristalică.

3. Funcțiile contractilă și locomotoare (dinamică) sunt asigurate de proteinele respective: *actina, miozina, tubulina* - proteina microfilamentelor ce determină procesele de bază în celulă. Mișcarea coordonată la nivel microscopic (procesul mitozei) la fel e determinată de aceste proteine.

4. Funcția de transport și de depozitare a unor compuși chimici ca: *ionii metalici, vitamine etc. Hemoglobina* aprovizionează cu oxigen țesuturile, iar o proteină înrudită, *mioglobina*, îl depozitează în mușchi. *Transferina și feritina* asigură transportul și depozitarea fierului în sânge, ficat. *Lipoproteinele* plasmei transportă lipidele. Un grup specific de proteine se află în membrane, transferind prin membrană în celulă diferiți ingrediente.

5. Funcția de protejare față de corpi străini, virusuri, bacterii, macromolecule e asigurată de proteinele specifice eliminate, în majoritate, de limfocite. Reacțiile imunologice sunt determinate de imunoglobuline (proteine efectiv specifice). Astfel de proteine ca *fibrinogenul, trombina* ș. a. iau parte la procesul de coagulare a sîngelui, protejînd organismul de impactul lezării vaselor sanguine.

6. Funcția reglatoare contribuie la reglementarea creșterii și diferențierii celulelor. Într-un anumit interval de timp în viața organismului se produce expresia numai la o parte mică din genomul celulei. Funcția dată o îndeplinesc așa-numitele *proteine-represor*, care inhibă porțiuni specifice în DNA celular. Aici pot fi atașate și proteinele ce reglează activitatea fiziologică celulară.

7. O grupă specifică de proteine poate stoca, transmite și genera diverse mesaje chimice, impulsuri nervoase, servind drept **receptori** (*rodopsina* - proteina fotoreceptorie în retina ochiului) sau transmițători ai impulsului nervos în sinapse etc.

8. Funcția fizico-chimică a proteinelor e capabilă să mențină constantele sîngelui - homeostazia (albuminele determină presiunea oncotică - cantitatea, volumul lichidului în vasele sanguine).

9. Proteinele îndeplinesc și funcții insolite. De exemplu, sîngele peștilor antarctici conține proteine cu proprietăți de antigel, protejînd peștii de îngheț. Locul de fixare a aripilor la unele insecte conține *rizelină* - proteină purtătoare a unei elasticități ideale. Din plantele africane s-a extras o proteină foarte dulce - *monelina*, ce nu favorizează obezitatea, fiind folosită pe larg în rația alimentară.

10. O grupă interesantă și importantă o alcătuiesc proteinele alimentare și de rezervă: *proteinele laptelui*, *ovalbumina*, *semințele unor plante* (soe, grîu etc.), remarcîndu-se prin deosebitul lor rol energetic.

În momentul actual se studiază mii de proteine, structura și funcția sutelor dintre care sunt cunoscute. Astăzi deseori putem auzi despre obținerea unor proteine noi cu funcții excepționale. După zeci de ani de investigații, un grup de savanți de la Universitatea HARVARD (America) au obținut (1985) o proteină pură, susceptibilă de formarea vaselor sanguine la om - *angiogenina*, compusă din 123 de aminoacizi ce constituie un singur lanț. Folosind metodele ingineriei genetice, a fost reconstituită gena care reglează în organismul uman producerea angiogeninei. Investigațiile prognozează sinteza unor preparate care vor ameliora circulația sanguină în mușchiul cardiac, contracarînd infarctul, insultul, vor contribui la cicatrizarea leziunilor, ulcerului etc. Blocada angiogeninei, însă, poate fi utilă în tratamentul cancerului, bolilor în care apar vase mici nedorite - psoriazis, rinopatie diabetică, artrită reumatoidă; la supravegherea natalității, preparatele contraceptive fiind inhibitori ai acestei proteine.

E uimitor faptul că toate proteinele cu diversele lor proprietăți și funcții, sunt constituite din aceiași 20 aminoacizi fundamentali, începînd cu cea mai simplă bacterie și pîna la om. Se știe că separat fiecare aminoacid nu are nici o funcție biologică. Care e cauza că o proteină are proprietate catalitică, alta hormonală, cealaltă - anticorp? Prin ce se deosebesc ele din punct de vedere chimic?

Răspunsul e foarte simplu: *proteinele se deosebesc prin faptul că pentru fiecare în parte e caracteristică numai o singură secvență de aminoacizi. Aminoacizii sunt alfabetul structurii proteice.*

Prin legarea în lanțuri polipeptidice, variate ca lungime și succesiune a unităților, se poate obține un număr infinit de îmbinări de compuși. Fiecare specie conține mii de proteine, dar specii există circa 10 milioane. Putem oare asigura aceste proteine numai cu 20 aminoacizi? O analiză matematică simplă arată că pentru un polipeptid din 20 aminoacizi diferiți, nici unul dintre care nu se repetă măcar de 2 ori, numărul de variații este de $20 \times 19 \times 18 \dots$ ș.a.m.d., $\sim 2 \times 10^{18}$. Masa moleculei e de 2600 Da.

Dar dacă luăm o proteină cu masa de 34000 Da, unde 12 aminoacizi sunt reprezentați în același raport, atunci căpătăm 10^{300} de combinații. Dacă în componența lor vor fi incluși 20 aminoacizi în același raport, numărul va crește enorm. Dacă ar exista numai

cîte o moleculă din fiecare proteină posibilă, apoi greutatea lor ar fi mai mare decît a planetei noastre. Variații din acești 20 aminoacizi pot fi atît de multe, încît ar fi suficiente nu numai pentru proteinele existente azi, dar și pentru cele care vor apare în viitor. Potrivit calculelor specialiștilor, azi pe pămînt există 0,001 de specii dintre cele cunoscute cîndva.

Unitatea structurală de bază a proteinelor sunt *aminoacizii*.

Primul aminoacid descris în 1806 a fost asparagina, iar ultimul - treonina - a fost identificat de abia în 1936. Fiecare aminoacid are denumirea sa tradițională (conform originii lui), rațională (chimică), abreviere din trei litere și simbol de o literă. Aminoacizii sunt derivații acizilor grași saturați-aminoderivați. Au o structură în care, cu același atom de carbon este legată grupa carboxilică și aminică.

Aminoacizii se deosebesc între ei prin natura acestui radical (R).

$$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$

Anume radicalul R la diferiți aminoacizi diferă după structură, sarcină electrică, solubilitate în apă.

După proprietatea de a interacționa cu H₂O la un pH = 7,0, deosebim 4 grupe de aminoacizi (tab.1.1):

1. Aminoacizi cu radicali *hidrofobi, nepolari* - hidrocarburi. Reprezentanți: *alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofanul*.

2. Aminoacizii cu radicali *polari*, dar fără sarcină electrică. Ei formează legături de hidrogen cu molecule de H₂O. Reprezentanți: *serina, tirozina, treonina* - polaritatea e determinată de grupa OH; *asparagina și glutamina* - de grupa NH₂; *cisteina* - de SH, iar la *glicină* - radicalul (H) ce nu compensează polaritatea grupelor NH₂ și COOH.

3. Aminoacizii cu radicali *încărcați negativ* (*acidul aspartic și glutamic*).

4. Aminoacizii cu radicali *încărcați pozitiv* (*lizina, arginina - grupa guanidinică și histidina - grupa imidazolică*).

În structura unor proteine se remarcă și aminoacizi nefundamentali în componența colagenului: *4-hidroxiprolină, 5-hidroxilizină*; în miozină - *metilizină*; în protrombină - *acidul carboxiglutamic*; în elastină - *desmozină* formată din 4 molecule de lizină. Acești aminoacizi se mai numesc *aminoacizi minori* (tab.1.2).

Se mai întîlnesc aminoacizi cu alte funcții ca: *ornitina, citrulina, β-alanina*, etc. (tab.1.2).

Solubilitatea aminoacizilor în apă este influențată de prezența sărurilor. Cea mai mică solubilitate în apă o au cistina și tirozina (0,04 g/100 g a.d.), mult mai mare - prolina și oxiprolina (154 g/100 g a.d.). Foarte solubili sunt arginina, lizina și cisteina la pI în apă distilată și 20°C (tab.1.3). Prolina este singurul aminoacid cu o solubilitate bună în alcool, ceilalți aminoacizi se dizolvă foarte greu. Toți aminoacizii sunt ușor solubili în soluții slab acide sau alcaline. De remarcat că triptofanul pur în soluții acide este stabil, în timp ce în amestecuri sau în hidrolizate proteice ușor se oxidează.

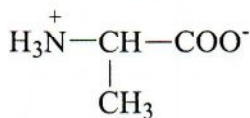
Toți aminoacizii fundamentali, cu excepția glicinei, posedă un *carbon asimetric* (*centru chiralic*) care este Cα (excepție prezintă izoleucina și treonina care au 2 centre chiralice Cβ (2 x 2 = 4)).

Formulele de configurație ale enantiomerilor unui aminoacid oarecare, repre-

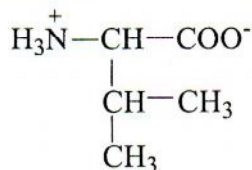
Tabelul 1.1 Structura și denumirile aminoacizilor proteinogeni

1. Grupa acizilor hidrofobi nepolari.

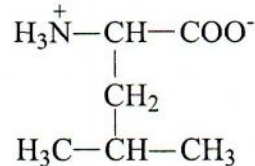
Alanina (Ala) A
Acid α -aminopropionic



Valina (Val) V
Acid α -aminoizovalerianic

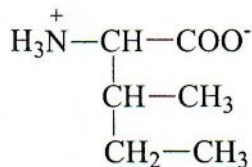


Leucina (Leu) L
Acid α -aminoizocaproic



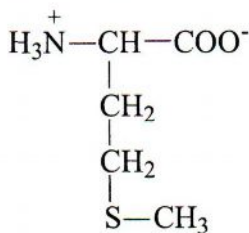
Izoleucina (Ile) I

Acid α -amino- β -metilvalerianic



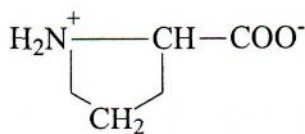
Metionina (Met) M

Acid α -amino-S-metiltiobutiric

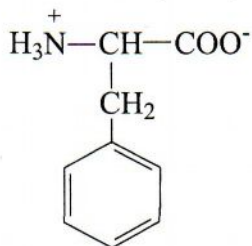


Prolina (Pro) P

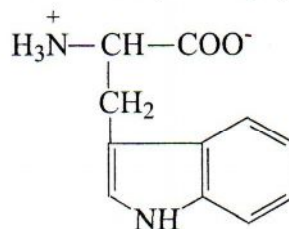
Acid pirolidin- α -carboxilic



Fenilalanina (Phe) F
Acid α -amino- β -fenilpropionic

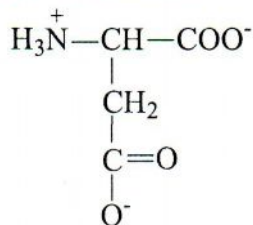


Triptofan (Trp) W
Acid α -amino- β -indolilpropionic

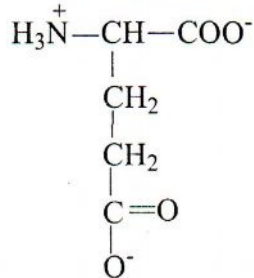


2. Grupa acizilor cu sarcină negativă.

Acid aspartic (Asp) D
Acid aminosuccinic



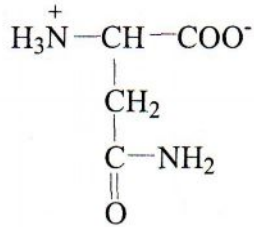
Acid glutamic (Glu) E
Acid α -aminoglutaric



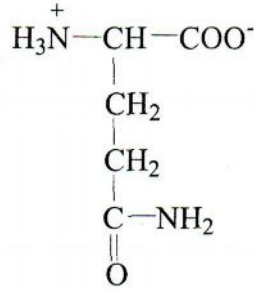
Tabelul 1.1 (continuare)

3. Grupa acizilor hidrofilii

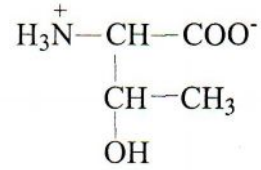
Asparagina (Asn) N
Acid α -amino-
 β -amidosuccinic



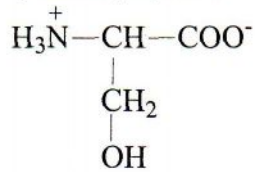
Glutamina (Gln) Q
Acid α -amino-
 γ -amidoglutaric



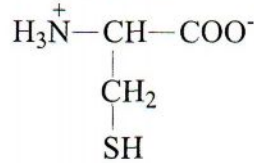
Treonina (Thr) T
Acid α -amino-
 β -hidroxibutiric



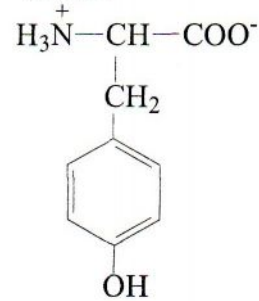
Serina (Ser) S
Acid α -amino-
 β -hidroxipropionic



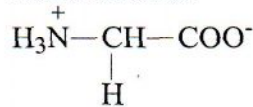
Cisteina (Cys) C
Acid α -amino-
 β -tiopropionic



Tirozina (Tyr) Y
Acid p-hidroxifenil-
alaninic

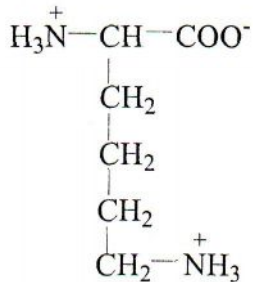


Glicina (Gly) G
Acid aminoacetic

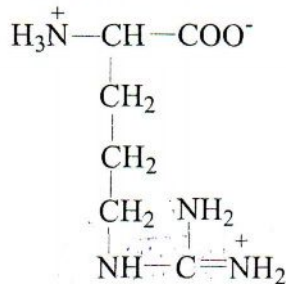


4. Grupa acizilor cu sarcină pozitivă.

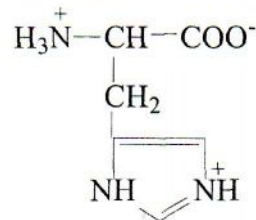
Lizina (Lys) K
Acid α, ϵ -diaminocapronic



Arginina (Arg) R
Acid α -amino- δ -guanidino
valerianic

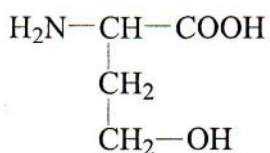


Histidina (His) H
Acid α -amino- β -imidazolil
propionic

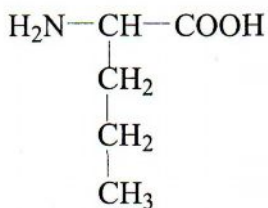


Tabelul 1.2 Aminoacizii neproteinogeni

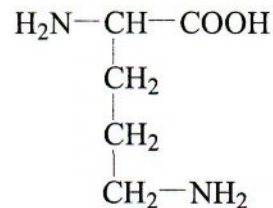
Homoserina
acid α - amino-
 γ -hidroxibutiric



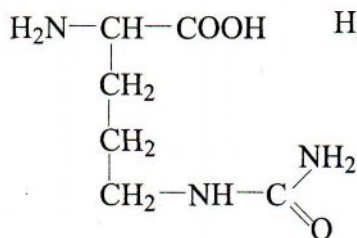
Norvalina
acid α -aminovalerianic



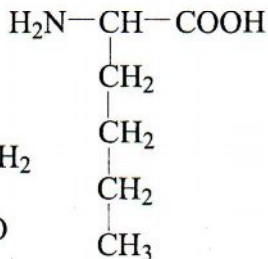
Ornitina
acid α , δ -diaminovalerianic



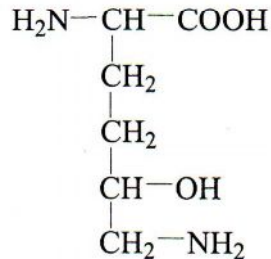
Citrulina
acid α - amino-
 δ -carbamilovalerianic



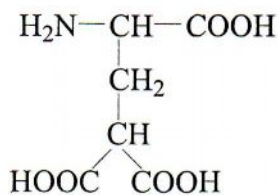
Norleucina
acid α -aminocapronic



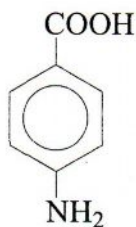
Hidroxilizina
acid α, ϵ - diamino-
 δ -hidroxicapronic



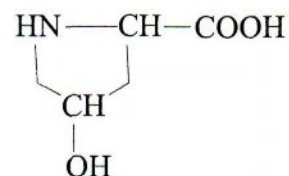
Acid γ -carboxiglutamic



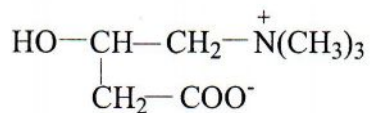
Acid p - aminobenzoic



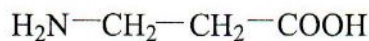
Hidroxirolina
acid pirolidin- γ - hidroxi-
 α - carboxilic



Carnitina



β -Alanina
acid β -aminopropionic

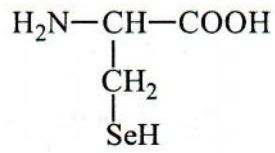


665146

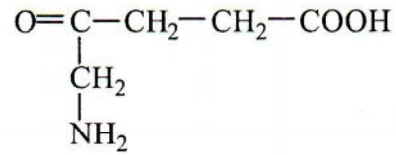


Tabelul 1.2 (continuare)

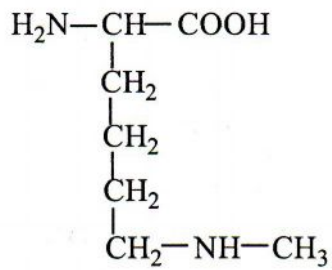
Selenocisteina



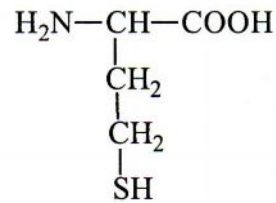
Acid δ - aminolevulinic



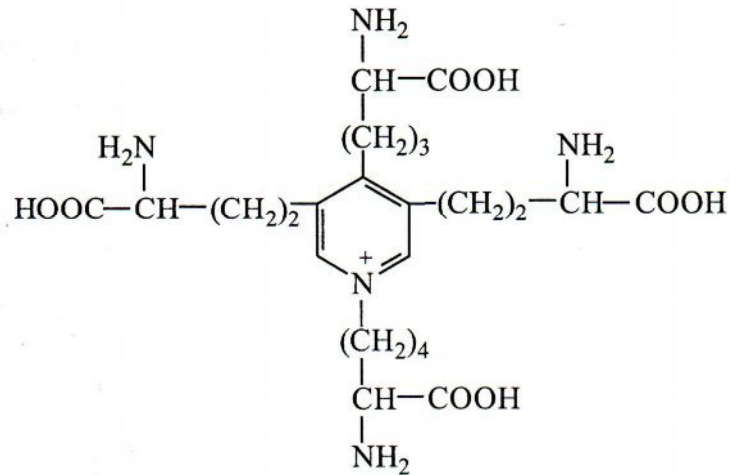
Metilizina



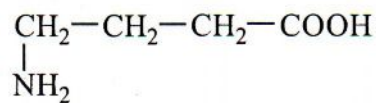
Homocisteina
acid α - amino-
 γ - tiobutiric



Desmozina



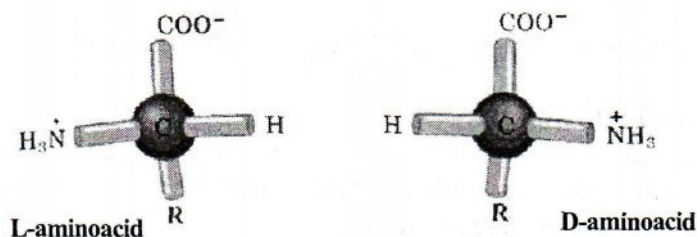
Acid γ - aminobutiric, GABA



Tabelul 1.3 Solubilitatea în apa distilată (g/g) la pH specific și 20°C

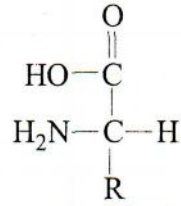
Aminoacid	Solubilitate (g/100 g a.d.)	Aminoacid	Solubilitate (g/100 g a.d.)
Alanina	22,50	Leucina	3,60
Arginina	f. solubil	Lizina	f. solubil
Asparagina	2,40	Metionina	3,00
Acid aspartic	0,40	Prolina	154,50
Cisteina	f. solubil	Serina	4,30
Fenilalanina	2,70	Treonina	1,60
Glicina	4,00	Triptofan	1,10
Glutamina	3,60	Tirozina	0,04
Acid glutamic	3,70	Valina	6,80
Histidina	4,00		

zentate în sistemul D-L, în care substanța de referință este aldehida glicerică dextrogiră, sunt redată în felul următor.

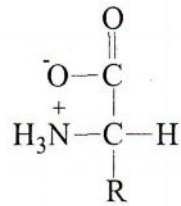


Literele se referă numai la configurația absolută: în cazul D-izomerului gruparea NH_2 se află în dreapta, iar a L-izomerului - în stînga. În structura proteinelor se întîlnesc numai L - aminoacizi, doar pentru ei există sisteme enzimaticе, care prezintă specificitate de substrat, grație căreia se asigură metabolizarea lor.

La valori de pH neutre aminoacizii în soluție se află în formă de ioni bipolari (Zwitterion). Grupa amină e protoionizată (NH_3^+), iar cea carboxilică (COO^-) - disociată.

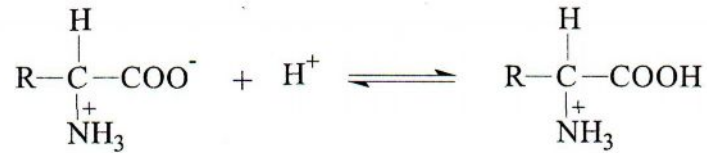


Forma neutră



Forma de ion bipolar (amfion)

Ionizația aminoacizilor depinde de valorile pH. În soluții acide grupa COOH este neionizată, iar cea amină - ionizată (NH₃⁺).



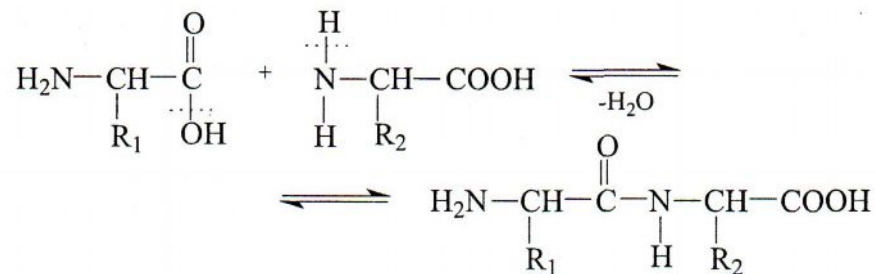
În soluții bazice situația e contrară, ionizată e grupa carboxilică (COO⁻).



În arhitectonica moleculei proteice deosebim patru niveluri structurale.

STRUCTURA PRIMARĂ

Cum se leagă aminoacizii în proteine? Procesul decurge în felul următor: α-grupa carboxilică a unui aminoacid se unește cu α-aminogrupa altui aminoacid, formînd *legătura peptidică*, cu eliberarea unei molecule de apă.



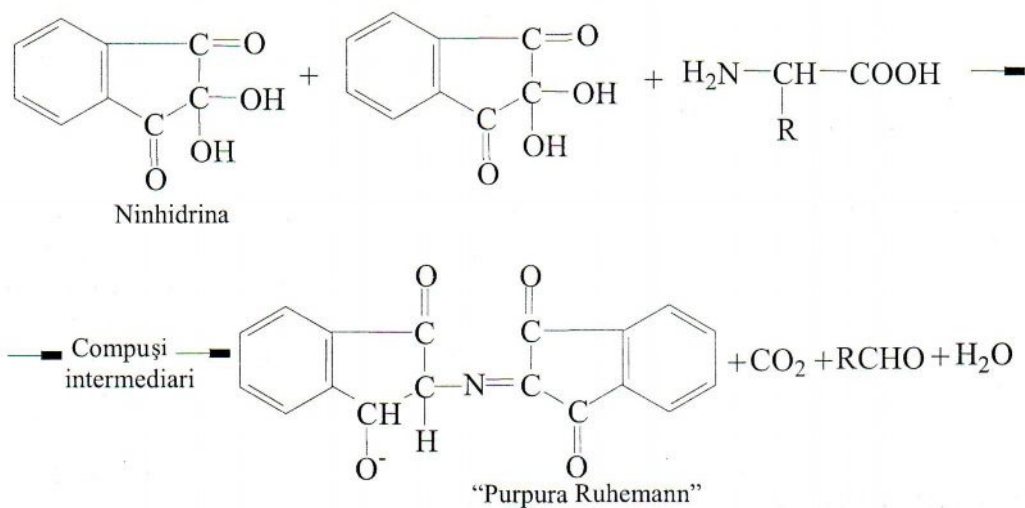
Echilibrul acestei reacții înclină mai mult spre procesul de hidroliză, dar nu de sinteză.

3. Modificările în succesiunea aminoacizilor pot conduce la tulburări ale funcției proteinelor și, în consecință, la apariția maladiilor. De menționat că modificarea unui singur aminoacid provoacă tulburări grave în metabolism. Evoluează o direcție nouă în medicină - *patologia moleculară*.

4. Succesiunea resturilor de aminoacizi furnizează informații sugestive despre evoluția procesului la nivel molecular.

Care sunt principiile de descifrare a succesiunii aminoacizilor?

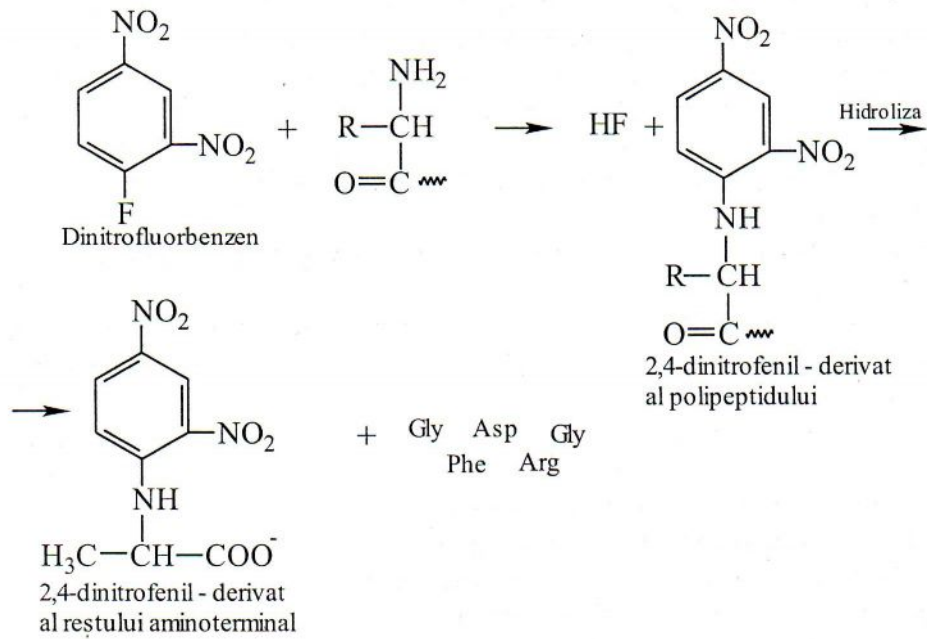
1. Proteina trebuie să fie hidrolizată pînă la aminoacizi, încălzind-o la 110°C timp de 24 ore în 6 N HCl. Hidrolizatului se separă prin metoda cromatografiei ionice cu polisterol sulfonizat. Aminoacizii fracționați se determină prin reacția cu *ninhidrină*: α -aminoacizii conferă o culoare albastră intensivă, prolina (iminoacid) - galbenă.



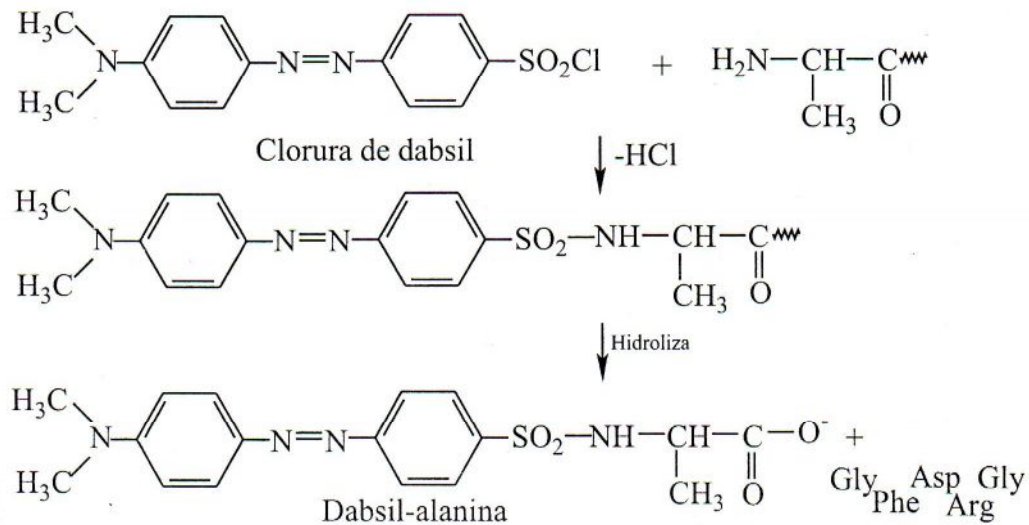
Metoda aplicată este deosebit de efektivă. Cantitatea de aminoacizi e proporțională densității optice a soluției după încălzire cu ninhidrină.

Dacă cantitatea de aminoacizi este minimă, se folosește *fluorescamina*. Comparînd rezultatele obținute cu amestecul standard, determinăm compoziția aminoacidică a proteinei și anume: compoziția, nu însă succesiunea aminoacizilor.

2. Procedeele de identificare a terminalelor N și C a fost utilizat de F. Sanger pentru stabilirea grupei NH_2 de către *dinitrofluorbenzen*, ce reacționează cu NH_2 , formînd compuși (de culoare galbenă) ai acestei substanțe. Legătura e stabilă și se păstrează la hidroliza legăturii peptidice; compusul e determinat cromatografic.



Atunci cînd aminoacizii constituie cantități mici, e folosit un alt reagent - *clorura de dabsil*, care, reacționînd cu grupa NH₂, conferă compusului sulfamidic o culoare intensivă, fluorescentă.



Determinarea capătului N-terminal prin marcarea cu clorură de dabsil

Resturile C - terminale ale catenelor polipeptidice se identifică în felul următor: polipeptida se incubează cu carboxipeptidaza (COP), care hidrolizează legătura peptidică la capătul C-terminal, compusul fiind determinat cromatografic. Carboxipeptidaza-A este inactivă la COOH ale argininei, lizinei și prolinei. Carboxipeptidaza-B scindează COOH ce aparține lizinei și argininei.

Metoda chimică: proteina se incubează cu hidrazină la 100°C, în lipsa apei, rezultă hidrazide ale aminoacizilor, excluzând COOH-terminal, care rămâne liber. Acest aminoacid este identificat cromatografic.

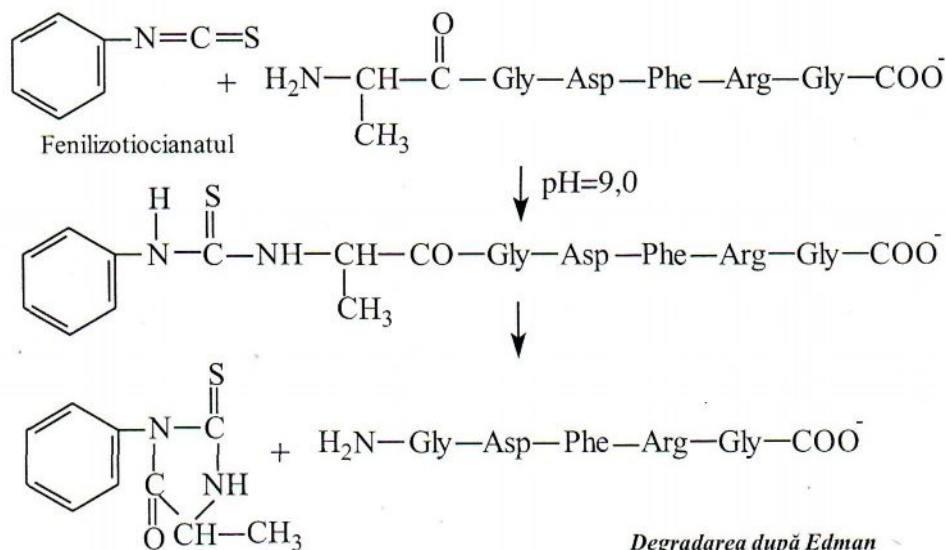
Un alt principiu constă în **scindarea lanțului polipeptidic în fragmente**, explorând diferite metode:

a) hidroliza catalitică limitată sub acțiunea enzimelor specifice - *tripsina* (scindează legăturile peptidice formate de grupa COOH a Lys și Arg, indiferent de lungimea și succesiunea aminoacizilor în lanț);

b) metode chimice specifice, de exemplu, *bromura cianidică* (CNBr) scindează legătura peptidică formată de COOH a metioninei. Această metodă e prea dificilă.

Peri Edman propune **metoda de determinare a succesiunii fragmentelor peptidice sau aminoacizilor**. În metoda elaborată de F.Sanger hidrolizatul nu poate fi folosit dublu din cauza că peptida se hidrolizează complet.

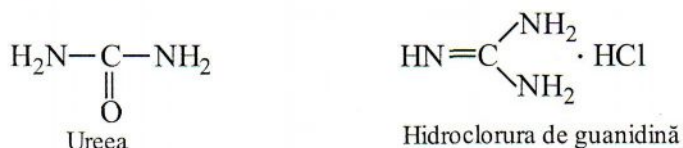
Peri Edman a reușit să marcheze capătul N-terminal și scindarea lui de la peptid, producându-se fără scindarea altor legături peptidice. Metoda constă în scindarea fiecărui rest de aminoacid din capătul N-terminal. În acest caz se folosește fenilizotiocianatul care reacționează cu NH₂, rezultând formarea feniltiohidantoina compusului:



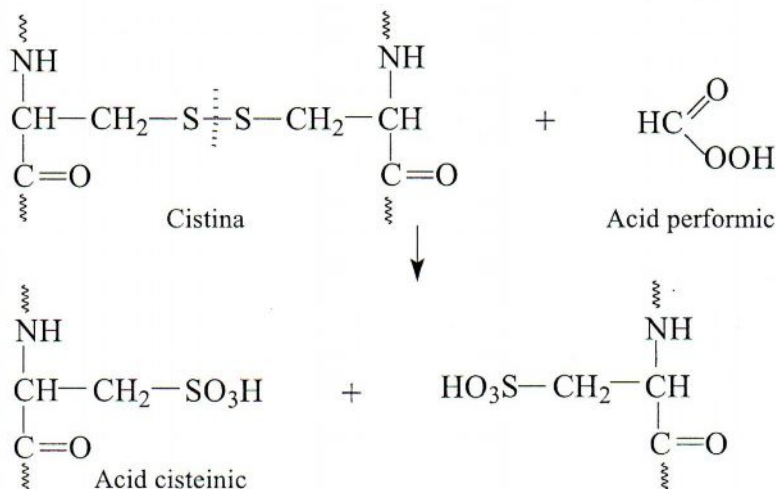
În mediu slab acid are loc disocierea compusului ciclic, iar peptida rămasă e mai mică cu un rest de aminoacid. Produsul este identificat cromatografic. Degradarea după Edman este repetată.

În fine, se ajunge la etapa în care succesiunea în fragmente de peptide e clară, dar nu e identificată succesiunea peptidelor înseși. Ultimele se determină după suprapunerea diferitelor segmente de peptide, stabilindu-se astfel segmentele de coincidență. Se folosesc și alți fermenți ca: *chymotripsina* (scindează legătura peptidică formată de COOH a Phe, Tyr și Trp), *pepsina* etc.

Metodele descrise mai sus se referă la proteinele compuse dintr-un singur lanț polipeptidic, fără prezența legăturilor disulfidice. În caz contrar, sunt necesare metode suplimentare. Disociația a mai multor catene polipeptidice e posibilă sub acțiunea detergenților ca: *ureea*, *hidroclorura de guanidină*, care scindează legăturile necovalente, distrugând structura terțiară și cuaternară.



Legăturile disulfidice se rup la oxidarea în acid performic, cu formarea resturilor de acid cisteinic.



Analiza structurală a proteinei poate fi accelerată prin utilizarea secvențiatorului - aparat ce permite determinarea automată a succesiunii de aminoacizi.

Proprietățile funcționale ale proteinelor sunt determinate de conformație, aranjamentul spațial al atomilor, esențială fiind succesiunea de aminoacizi, care, de fapt, și stabilește conformația proteinei.

La sfârșitul anilor 1930 L.Pauling și R.Corey au început explorarea structurii aminoacizilor și a peptidelor cu raze X și au determinat lungimea și unghiul standard ale legăturilor, ca apoi să prevadă conformația proteinei. S-a constatat un fapt important, și anume: unitatea peptidică posedă o structură planică rigidă. Atomul de hidrogen al grupei NH_2 ocupă o poziție trans în raport cu O_2 a grupei carbonilice (fig. 1.1).

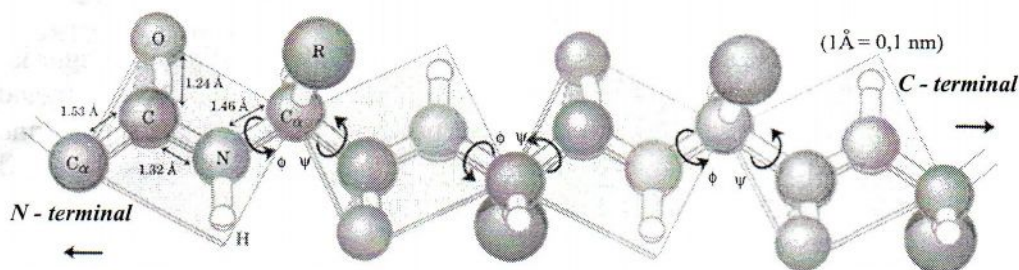
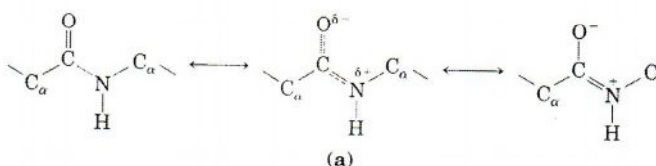


Figura 1.1. Grupa peptidică cu lungimea legăturilor

Legătura dintre carbonul grupei carbonilice și azotul grupei NH din legătura peptidică posedă un caracter parțial de legătură dublă.



Și, deci, rotirea în jurul acestei legături este îngreuiată. Lungimea ei este de $1,32\text{Å}$, media lungimii dintre legăturile ordinare C-N și legătura dublă C=N . Spre deosebire de cazul examinat, legătura dintre atomul de C și atomul de C al grupei carbonilice este ordinară. Prin urmare, în ambele părți ale legăturii peptidice rigide gradul rotirii libere este foarte mare. Fiecare aminoacid e caracterizat prin unghiurile sale de rotire. Rotirea față de aceste legături se notează prin unghiurile ψ și ϕ (fig. 1.2).

În concluzie, *structura primară nu este altceva decât succesiunea de aminoacizi în proteină și localizarea punților disulfidice*. Ea reprezintă o caracteristică completă a legăturilor covalente din proteină.

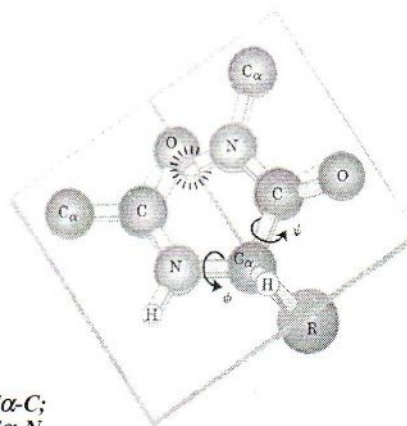


Figura 1.2. Determinarea unghiurilor ψ și ϕ
 ψ - caracterizează rotirea față de legătura ordinară $\text{C}\alpha\text{-C}$;
 ϕ - caracterizează rotirea față de legătura ordinară $\text{C}\alpha\text{-N}$

STRUCTURA SECUNDARĂ se obține în rezultatul interacțiunii sterice a resturilor de aminoacizi localizați alături în succesiunea liniară.

Unele dintre aceste interacțiuni au un caracter reglementat, generând astfel o anumită periodicitate. Drept exemplu ne servește α -elicea, structura β sau structura în foaie plisată și spirala de colagen. E posibil oare ca lanțul polipeptidic să obțină o structură din porțiuni repetabile?

L. Pauling și R. Corey, studiind un șir de conformații potențiale, au elaborat modele moleculare exacte - una din structurile secundare mai des întâlnite și dintre cele mai avantajoase, luând în considerare rigiditatea geometrică a legăturii peptidice și variațiile de unghi admisibile, se dovedește a fi α -elicea (fig. 1.3).

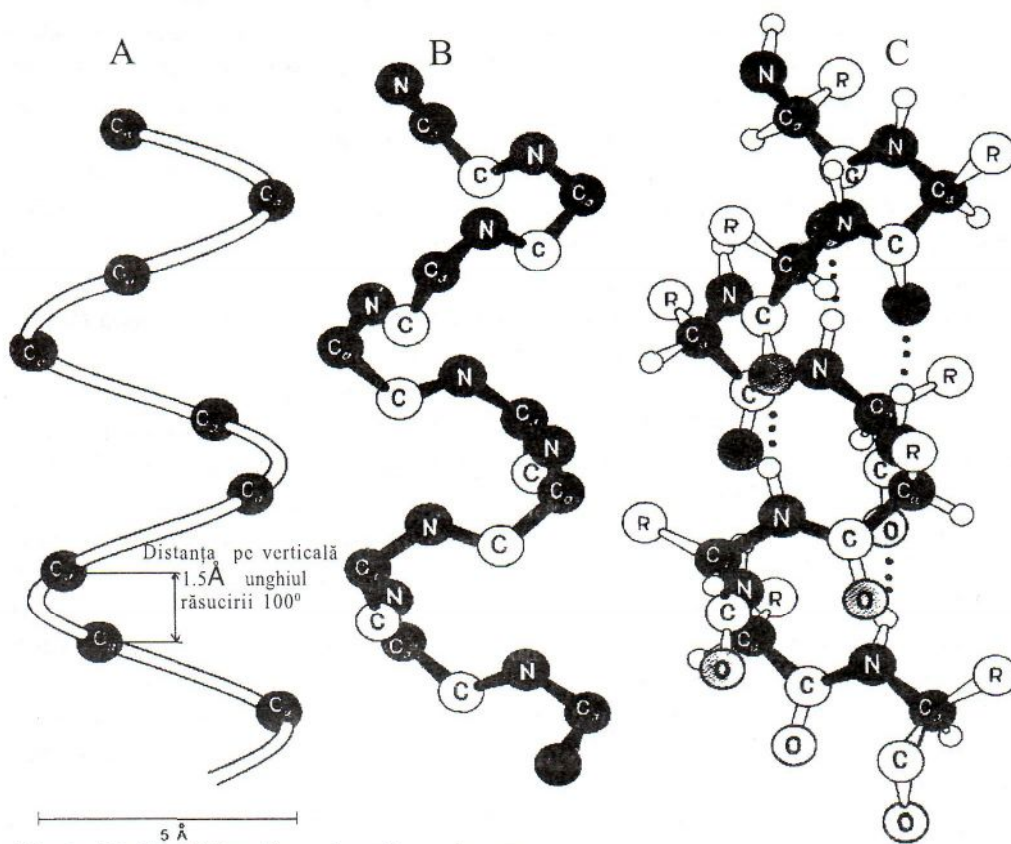


Figura 1.3. Modelul α -elice orientată spre dreapta

A - sunt prezentați în elice numai atomii $C\alpha$;

B - sunt atomii de azot (N) ce formează scheletul moleculei; atomii $C\alpha$ și carbonul carbonilic - C;

C - spirala completă, prin puncte sunt reprezentate legăturile de hidrogen între NH și CO grupe, ce stabilizează spirala

Spirala are forma unui cilindru, răsucit tensionat, lanțul de bază formează partea internă a cilindrului, iar radicalii (lanț exterior) sunt orientați spre exterior, mișcându-se conform spiralei. Spirala este stabilizată de legăturile de hidrogen dintre NH și CO, grupe ale lanțului de bază. Grupa CO a fiecărui aminoacid se reunește prin legătura de hidrogen cu NH, grupa aminoacidului situat în succesiune liniară cu patru resturi în

avans. Deci, toate grupele CO și NH ale lanțului de bază sunt unite între ele prin legături de hidrogen. Pasul elicei conține 3,6 resturi de aminoacizi, adică aminoacizi separați în succesiuni liniare de 3 - 4 resturi de aminoacizi, fiind amplasați foarte aproape în structura spiralei. Dimpotrivă, aminoacizii aflați la două resturi diferență unul de altul, spațial sunt plasați opus unul față de altul și, deci, interacțiunea reciprocă devine imposibilă. Pasul spiralei este de 5,4Å (angström, unitate de lungime echivalentă cu 0,1 nm, denumită astfel în cinstea savantului spectroscopist A. Angström). La fiecare rest, aminoacidul avansează pe verticală cu 1,5Å. Diametrul acestui bastonaș în care se află atomul C- α este de 10Å. Sensul răsucirii lanțului polipeptidic poate fi atât de la stînga la dreapta, cît și viceversa. Toate cercetările α -elicei proteinelor se referă la primul tip.

Cota α -elicei în proteinele studiate pînă acum este imens de variabilă. În unele proteine, de exemplu mioglobina și hemoglobina, α -elicea stă la baza acestor structuri, însă proteina chimotripsina e lipsită de ea complet. Elicele formează unele elemente proteice lungi, ajungînd la mai mult de 1000Å. Două și mai bine spirale pot să se răsucească ca firele în frînghie groasă. Astfel de structură se numește superspirală și o găsim în diferite proteine ca: miozina, keratina, tropomiozina, fibrina și în alte proteine sanguine etc. Asemenea structuri îndeplinesc un rol mecanic, formînd fibre, și sunt caracteristice pentru proteinele fibrilare. L. Pauling cu R. Corey au prezis această structură cu 6 ani înainte de a fi experimental depistată prin metoda analizei R-structurale. A fost descoperită o eră nouă în biologia moleculară, favorizînd posibilități de a prezice conformația lanțului polipeptidic, în cazul în care sunt explorate proprietățile ingredientelor.

Însă nu toate polipeptidele sunt capabile să formeze spirale. Există aminoacizi dezorganizatori ai elicei în structura primară. Aceste resturi de aminoacizi împiedică sau diminuează tendința de răsucire elicoidală a unui lanț polipeptidic. S-a stabilit că:

1. Prezența prolinei întrerupe răsucirea elicoidală a lanțului polipeptidic. Atomul de azot se include în componența inelului rigid din structura aminoacidului, ce exclude orice rotire cît de mică în jurul legăturii N-C. Atomul de azot care formează legătura peptidică n-are atom de hidrogen și de aceea el nu-i capabil să formeze legături de hidrogen intracatenare. În consecință, structura spiralică se dereglează întotdeauna acolo unde e prezent acest aminoacid, formîndu-se un cot, o îndoire, o încovoiere în lanț.

2. Dacă în succesiunea aminoacizilor sunt alăturate multe resturi de acid glutamic, apoi la pH = 7 apare o forță de respingere între grupele carboxilice încărcate negativ, forța căreia e mult mai mare decît forțele stabilizatoare ale punții de H a spiralei. Din aceeași cauză segmentul de catenă, cu un număr mare alăturat de resturi ale aminoacizilor ca lizina sau arginina, cu o sarcină pozitivă, nu va avea formă elicoidală.

3. Resturile unor aminoacizi (valina, serina, treonina, izoleucina, asparagina), avînd radicali voluminoși la C- α , conferă o oarecare strîngere sterică a elicei, servind drept factori destabilizatori (grupa OH a serinei, treoninei pot forma punți de H). La fel vor reacționa și resturile de cisteină, care formează punți disulfidice covalente. Ele vor lega rigid pozițiile lanțurilor polipeptidice și în vecinătatea acestor regiuni răsucirea elicoidală nu mai poate avea loc.

Rezultă că avem 4 tipuri de limitări care influențează asupra conformației catenei polipeptidice:

1. rigiditatea legăturii peptidice;
2. forțele electrostatice de respingere sau atragere, dacă aminoacizii le au în apropiere;
3. prezența radicalilor voluminoși;
4. prezența iminoacidului - prolina.

S-a stabilit că structura primară constă în succesiunea aminoacizilor în lanț, legăturile covalente peptidice aparținând catenelor. Structura secundară se caracterizează prin conformația în spațiu a resturilor de aminoacizi în lanțul polipeptidic. Exemplu clasic de α -spirală e α -spirală keratinei ce conține multă cisteină. După cantitatea de Cys se evidențiază keratina diferitelor surse. La broasca țestoasă, de exemplu, conținutul de Cys este egal cu 18%. Carapacea ei nu numai că are o duritate excelentă, dar în condiții fiziologice e insolubilă în apă. Globulinele și mai ales albuminele datorită solubilității lor în apă, permit formarea unei soluții de 60%.

Care-i cauza acestei deosebiri? α -keratinele conțin aminoacizi care au grupe hidrofobe localizate pe suprafața exterioară a elicei, ce ocupă o poziție fixată și sunt orientate spre faza apoasă. În proteinele globulare de asemenea avem grupe hidrofobe, dar ele sunt camuflate, n-au contact cu apa, iar pe suprafața exterioară sunt atașate grupe hidrofile sau polare.

În același an L. Pauling și R. Corey au descris o altă variantă de structură periodică - așa-numita β -structură sau structura în foaie plisată (fig. 1.4).

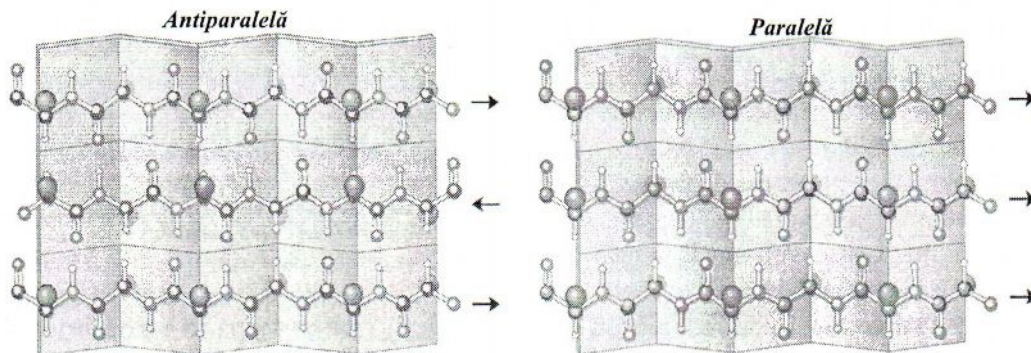


Figura 1.4. β -structură

Ea se deosebește de α -spirală prin:

1. Formă plată, dar nu de bastonaș, în fibroină, de exemplu, catenele polipeptidice sunt localizate paralel una față de alta, formând plise și de aceea astfel de structură se numește foaie plisată sau de straturi. Fibroina conține 100%, iar alte proteine - proporții variate de asemenea structuri.

2. Distanța între două resturi de aminoacizi e de 3,5E (nu de 1,5 ca la α -spirală). Structura- β e stabilizată prin punți de hidrogen intercatenare, dar nu intracatenare ca la α -spirală. Radicalii de aminoacizi ies în ambele părți ale structurii- β .

Există α și β -keratinele. În β nu se formează punți disulfidice între catene, lanțurile fiind direcționate diferit - antiparalel. Structura β , la rândul ei, e determinată de secvența de aminoacizi în lanțul polipeptidic. O condiție obligatorie e ca resturile de aminoacizi să

posede grupe mici. Așadar, în fibrinoia mătasei majoritatea acestor resturi revine glicinei și alaninei. Fiecare al doilea aminoacid e glicină. β -keratinele aparțin tot proteinelor fibrilare insolubile în apă, dar sunt mai flexibile și mai greu se extind. Periodicitatea structurii se repetă peste 7Å.

Aceste concluzii rezultă din următoarele experimentări:

Dacă α -keratina părului este prelucrată cu unele substanțe și apoi supusă acțiunii aburilor, ea se extinde aproape de 2 ori față de lungimea inițială. Radiograma acestei stări e caracteristică fibroinei, adică își pierde α -elicea și capătă β -structura, ca rezultat al ruperii legăturilor de hidrogen, ce stabilizau α -spirală. Dacă α -keratina se răcește și se ia greutatea respectivă, apoi automat se reîntoarce la conformația de α -spirală. Procesul e cauzat de faptul că în α -elice radicalul grupelor este mai mare decât în β -structură și de aceea ultima conformație în astfel de compuși e mai puțin stabilă. Această proprietate a α -keratinei se datorează și prezenței vădite a legăturilor transversale disulfidice care stau la baza elasticității firelor de păr (fig. 1.5).

Unii aminoacizi destabilizează structura plisată, printre ei: Glu, Pro, Lys, Ser, Asp. Alți aminoacizi favorizează formarea structurii plisate ca: Met, Val, Ile.

Al treilea tip de structură periodică e spirala de collagen.

Această structură specifică determină elasticitatea collagenului - componentă de bază a pielii, oaselor. Ca proteină fibrilară el se găsește, în condiții diverse, aproape în toate organele, determinând formarea unor

unități structurale. Fiind insolubil, s-a studiat dificil și numai după ce s-a observat că collagenul din țesuturile animalelor tinere poate fi extras în stare solubilă, deoarece în el lipsesc legăturile transversale, s-a putut stabili unitatea structurală de bază - tropocolagenul. Ultimul e alcătuit din trei catene de aceeași lungime și structură, care pot fi similare la unele tipuri de collagen. 1/3 din aminoacizi îi revine glicinei, cantități deosebite constituind prolina, rar întâlnită în alte proteine. Conține hidroxiprolină și hidroxilizină. Collagenul are o regularitate mare în succesiunea aminoacizilor - al treilea rest aparține glicinei. Foarte des se repetă secvențe ca Gly-Pro-Hidroxipro. Spirala de collagen se caracterizează printr-un grad de stabilitate a lungimii, determinat de interacțiunile cooperative, adică de formarea lanțurilor multiple care se amplifică reciproc (fig. 1.6).

Christian Anfinsen, studiind ribonucleaza, enzimă ce scindează RNA, a stabilit un principiu universal, fundamental în biologia moleculară și anume: succesiunea aminoacizilor determină și conformația.

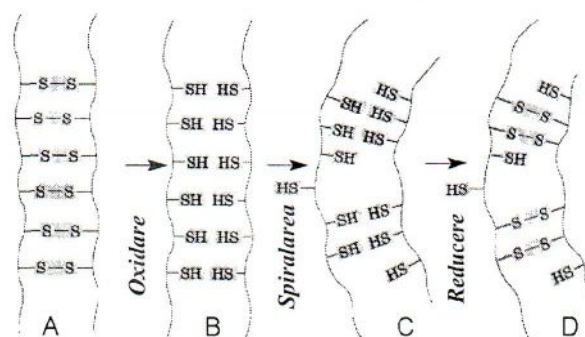


Figura 1.5. Fazele ondulației permanente a părului:
 A - α -elicea keratinei e stabilizată de legături disulfidice;
 B - agentul reducător transformă cistina în cisteină;
 C - modificările mecanice schimbă poziția gr. SH în catene;
 D - oxidarea grupa SH formează legături transversale noi.

STRUCTURA TRIDIMENSIONALĂ

Această structură rezultă din interacțiunea strictă a resturilor de aminoacizi care în succesiunea liniară se localizează departe unul de altul, acesta fiind modul de împachetare a lanțului polipeptidic într-un volum anumit.

Forța motrice la apariția acestei structuri e interacțiunea radicalilor aminoacizilor cu moleculele de apă. Cu alte cuvinte, structura e determinată de mărimea, forma, polaritatea acestor radicali. Anume structura tridimensională conține informația funcțională, ce stabilește proprietățile biologice și informația nativă a proteinelor.

Un lanț polipeptidic adoptă, în măsura în care-i permite structura sa primară, configurații de α -elice, de β -structură; împachetarea lanțului caută să satisfacă și afinitățile radicalilor, ceea ce fixează conformația ei. Această conformație e un compromis, deoarece nu se pot realiza toate legăturile posibile, dar acest compromis este cel mai favorabil și cel mai stabil din punct de vedere energetic.

Stabilizarea structurii e determinată de aceleași legături: de hidrogen, electrostatice, hidrofobe, Van der Waals. Prima proteină, a cărei structură a fost stabilită, este *mioglobina* - proteină ce leagă O_2 în mușchi. Ea conține în catena polipeptidică 150 aminoacizi și o grupare neproteică numită *hem* (fig. 1.7).

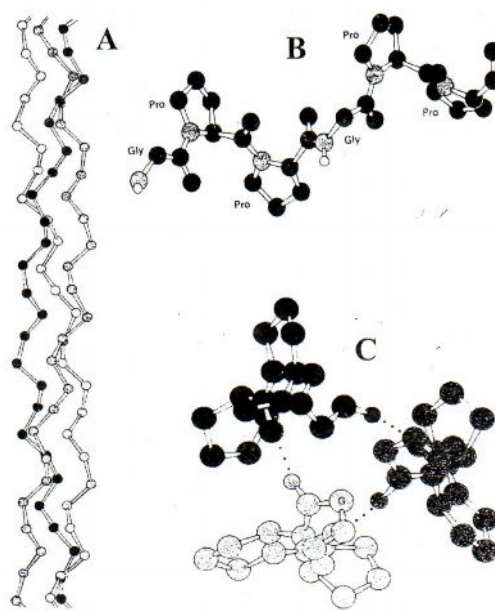


Figura 1.6. *Spirala de collagen*
A - spirala triplă, sunt prezentați atomii C α ;
B - conformația unei catene din triplu, este ilustrată secvența - Gly - Pro - Pro;
C - secțiunea transversală prin modelul de collagen - trei catene unite prin leg. H, unde C α e al Gly.

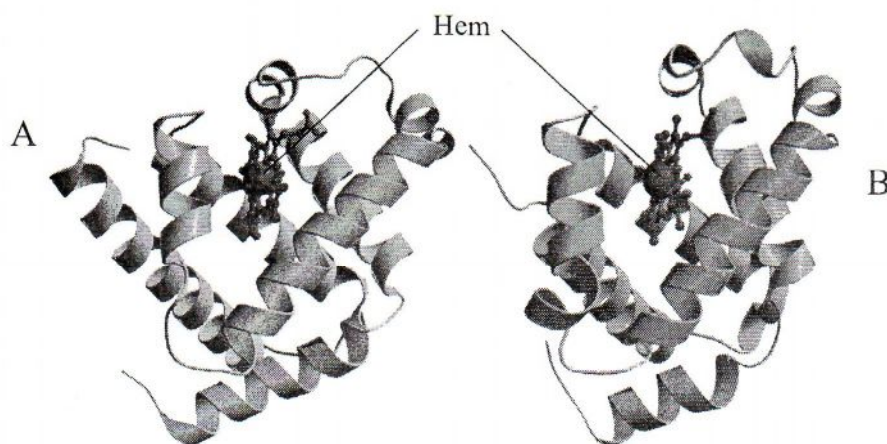


Figura 1.7. *Conformația catenei mioglobinei (A) și a catenei β din hemoglobină (B)*

Scheletul are 8 segmente elicoidale, cel mai lung conține 23 aminoacizi, cel mai scurt -7 aminoacizi, ce includ aproape 80% din resturile de aminoacizi. Radicalii ocupă aproape tot spațiul dintre segmente. Molecula e atât de compactă, încât în interiorul ei pot să se acumuleze numai 4 molecule de apă.

Regiunile elicoidale sunt separate de segmente neelicoidale la nivelul cărora lanțul polipeptidic își schimbă direcția. În aceste puncte finale se postează prolina. Interiorul moleculei e format din aminoacizi cu radicalul nepolar, excepție fiind două resturi de histidină ce leagă hemul.

Grupele polare se află pe exteriorul moleculei, în alte răsuciri - resturi de serină, treonină, asparagină: hemul ce conține Fe leagă o moleculă de O_2 .

Cum sunt împachetate alte proteine globulare, la fel constituite dintr-un lanț polipeptidic?

Citocrom C - proteină ce conține hem, dar se deosebește după structura secundară, terțiară, succesiunea de aminoacizi și proprietățile biologice; **lizozima** - 40% formează structuri elicoidale; **ribonucleaza**, la fel proteină globulară, conține foarte puține α -segmente, majoritatea se găsesc în β -structuri, dar ca și lizozima conține 4 resturi de cisteină ce determină duritatea structurii (fig. 1.8, 1.9).

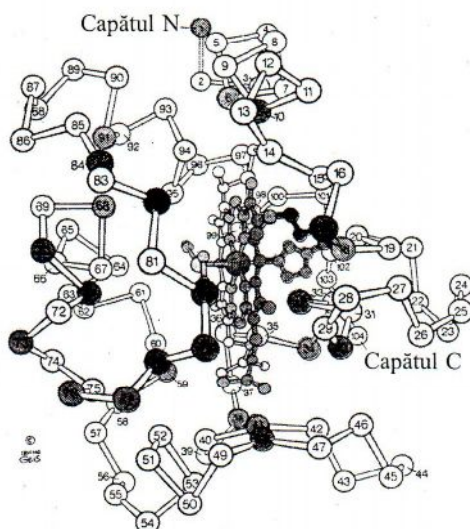


Figura 1.8. Scheletul moleculei de citocrom C - în centru hemogrupa fixată covalent, mai intensiv colorat sunt aminoacizii invariabili

În proteinele ce funcționează în exteriorul celulei astfel de legături intracatenare disulfidice sunt permanente. Fiecare proteină se caracterizează prin structură tridimensională proprie doar ei, special adaptată pentru îndeplinirea anumitei funcții biologice. Proteinele acestei clase sunt mult mai complexe după conformație decât cele fibrilare, îndeplinesc funcții variate și activitatea lor are un caracter dinamic. În majoritatea lor proteinele sunt globulare.

Care sunt datele experimentale ce confirmă că anume conformația moleculei e necesară pentru activitatea biologică a proteinei?

1. S-a constatat că sub acțiunea ureei, la încălzire, structura scheletului covalent rămâne neschimbată, dar lanțul polipeptidic

deține o conformație neregulată și își pierde activitatea biologică.

2. La compararea lungimii lanțului și diametrului spiralei cu mărimile reale ale proteinei se constată că un lanț polipeptidic din 584 aminoacizi are în β -structură o lungime de 200 nm și grosime de 0,5 nm, în α -spirală - 90 nm lungime și grosimea de 1,1 nm, globula acestui lanț se cuprinde în lungimea de 13 nm și diametrul de 3 nm. Așadar, lanțul polipeptidic al albuminei este foarte bine împachetat, în caz contrar nu ar îndeplini funcția necesară.

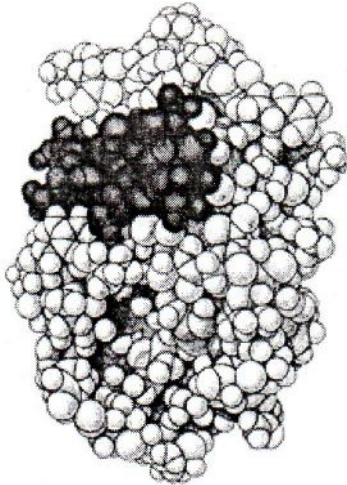


Figura 1.9. Modelul spațial al moleculei de lizozimă - mai intens colorat substratul polizaharidic. Lizozima e o moleculă foarte compactă

Aceștia se grupează la unghi, în locul fixării grupelor prostetice.

La o răcire lentă a soluției proteice sau la evoluarea pH spre normal, proteina își restabilește funcția biologică (*renaturație*), fapt ce confirmă că informația necesară pentru împachetare e determinată de structura primară. Proteina se împachetează nu chiar simplu, de exemplu: ribonucleaza în care se formează 4 punți disulfidice în aceleași poziții ca și în cea nativă, teoretic, din 8 resturi de aminoacizi se pot forma 105 variante, dar se formează numai una. Structura terțiară nu-i rigidă absolut, se caracterizează printr-un grad de fluctuație locală și o anumită elasticitate. De exemplu, moleculele enzimei la legarea substratului își schimbă conformația.

Proteinele se formează din aminoacizi, cu o viteză mare. Proteina compusă din 100 aminoacizi în 5 sec. își capătă conformația finală. Dar dacă s-ar căuta toate variantele, ar fi nevoie de 10^5 ani. Procesul de asamblare are loc momentan, cu un grad mare de cooperativitate. Aceasta înseamnă că dacă s-a împachetat un segment mic, apoi instantaneu crește probabilitatea aranjării celorlalte segmente.

După unele scheme structurale la nivelul organizării terțiare a moleculelor proteice, în planul de asamblare e inclus un concept nou, care facilitează perceperea perfectă a raporturilor dintre structură și funcție, a organizării pe *domenii structurale*. Prin cuvântul *domeniu* se subînțeleg regiunile compacte cu organizarea terțiară relativ rigidă, separate între ele de către segmentele mai puțin organizate, care permit mișcarea unui domeniu față de altul (fig. 1.10).

Fiecare domeniu structural e responsabil de o anumită funcție a proteinei. Gradul de flexibilitate a domeniilor variază de la mișcări mai ample la altele mai restrânse, în dependență de natura segmentelor interdomeniale. Domeniile se asociază cu funcțiile de legătură. Centrele active ale enzimelor sunt situate între domenii care își schimbă poziția unul față de altul în procesul funcționării biologice a proteinei. O altă proprietate foarte importantă: domeniile cu structuri și proprietăți similare sunt prezente în diferite proteine,

Modul de împachetare a catenelor polipeptidice în proteinele globulare într-o globulă sterică e structura terțiară. La formarea acestei structuri se evidențiază centrele active, locusurile de fixare și identificare a liganzilor ce determină funcția proteinelor.

Concluzie: *Dacă structura secundară e determinată de interacțiunea resturilor de aminoacizi în segmentele apropiate, apoi cea terțiară - de interacțiunea lor din segmentele depărtate. Un rol deosebit îl are și interacțiunea R-grupelor catenelor învecinate.*

O anumită importanță structurală în lanțurile polipeptidice au *aminoacizii invarianți* ce ocupă o poziție standard în lanț, indiferent de specia organismului respectiv (sursa proteinei).

exercitînd roluri asemănătoare.

Multe proteine sunt alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice și se numesc *proteine oligomere* (hemoglobina e constituită din patru lanțuri și patru grupe prostetice cu atomii săi de Fe) (fig. 1.11).

Fiecare lanț (2α și 2β) are structura sa terțiară, ocupă poziția de tetraedru unul față de altul, formînd în ansamblu **structura cuaternară**. Catena α contactează cu β , interacțiunea dintre ele (α - α și β - β) fiind minimă. Hemoglobina animalelor are aproape aceeași structură terțiară și cuaternară, avînd mult în comun cu structura mioglobinei, aceleași funcții. Cu certitudine, în cadrul succesiunii aminoacizilor, proteinele omoloage conțin un rînd de resturi de aminoacizi invariante, 9 aminoacizi ocupă aceeași poziție; e aceeași histidină distală și proximală, e la fel de reprezentativ și interiorul nepolar al structurii.

Modul de asociere în spațiu a protomerilor - moleculelor oligomere - se atestă ca structură cuaternară. La o asemenea proteină funcția specifică se manifestă numai la nivelul structurii cuaternare, protomerii separați sunt neactivi. Asamblarea subunităților se realizează prin forțe slabe necovalente și asocierea devine stabilă dacă suprafețele de contact (ale domeniilor) sunt complementare, iar un număr cît mai mare de atomi se apropie de nivelul razelor Van der Waals. Complementaritatea asigură un grad înalt de exactitate și de specificitate a structurii cuaternare. Interacțiunea prin suprafețele de contact reprezintă fenomenul de cooperare, adică primele interacțiuni favorizează formarea celorlalte. Structurile cuaternare permit funcționarea unor mecanisme fine de reglare a activității proteinelor (forma T - tensionată și R - relaxată). Perturbația are loc la nivelul unui protomer (Fe iese la 0,6 Å din planul hemului, la oxidare intră un plan-histidina proximală avînd 15 contacte, modifică conformația oligomerului, restructurează spirala și unghiurile ei) (fig. 1.12).

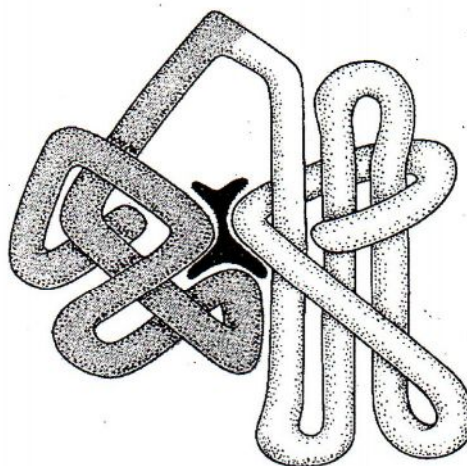


Figura 1.10. Imaginea schematică a unei proteine compuse din 2 domenii. Centrul de fixare a ligandului se află între domenii



Figura 1.11. Modelul hemoglobinei β -catene sunt colorate mai intensiv; α -catene sunt celelalte; h - hemul în moleculă (după M. Perutz)

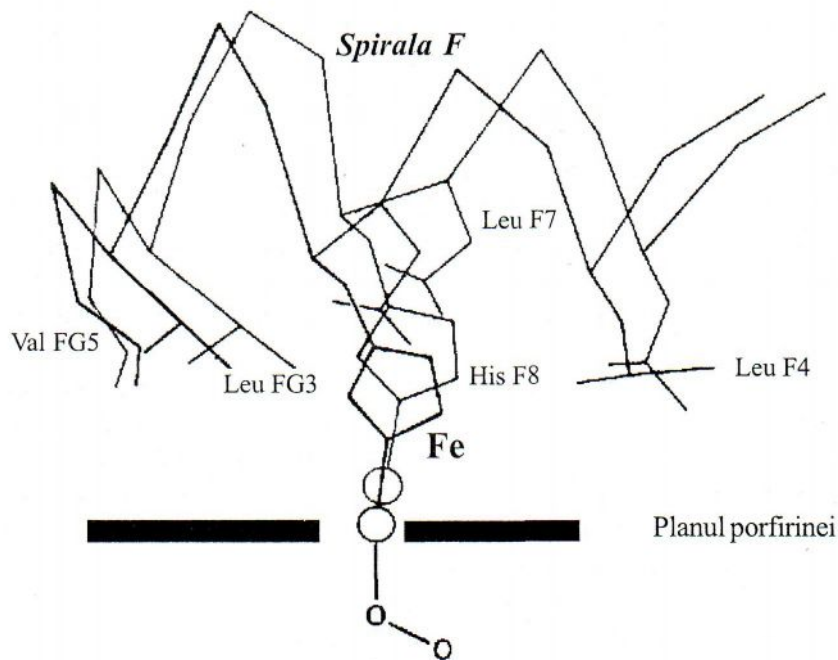


Figura 1.12. Modificările conformaționale induse de deplasarea Fe la oxigenare. Structura oxigenată e colorată mai intensiv decât cea dezoxigenată

Majoritatea proteinelor oligomere studiate, de regulă, au un număr pereche de protomeri, situați bilateral simetric. Moleculile proteice nu sunt rigide, au o anumită flexibilitate și manifestări diferite: de la mișcări simple în jurul legăturilor ordinare pînă la fluctuații respiratorii. La formarea compușilor flexibilitatea scade. Vibrațiile moleculare joacă un rol deosebit în procesul de depistare și stabilizare a stării tranzitorii.

FOLDINGUL. PROBLEMA ÎMPACHETĂRII SPECIFICE A LANȚULUI POLIPEPTIDIC

Au trecut mai mult de 40 de ani de la descoperirea științifică a lui C. Anfinsen, dar și acum sute de savanți studiază problema împachetării specifice a lanțului polipeptidic.

S-a dovedit că a prezice conformația proteinei în baza succesiunii de aminoacizi (ținînd cont de proprietățile lor, de solubilitatea în apă) nu e atît de simplu. Problema are și aspect practic: paralel cu dezvoltarea biotehnologiei și în baza reconstruirii genelor se poate asigura sinteza noilor proteine.

S-a stabilit că la împachetarea unor proteine imense iau parte și proteinele mult mai mici, numite *ciaperonine*, ce se întîlnesc în bacterii, citoplasma celulelor eucariote, matrixul mitocondrial. Sunt compuse din 2 elemente ce aparțin diferitelor familii proteice - Hsp 60 (Gro EL) și Hsp 10 (Gro ES), mai substanțial sunt studiate ciaperoninele la E.coli.

Gro EL e constituit din 14 subunități identice, protomeri cu masa moleculară 57 kDa (548 resturi de aminoacizi), fiecare aranjați simetric cîte 7. Analiza roentgenostructurală a descifrat structura spațială a complexului. Fiecare protomer e compus din 3 domenii - eucatorial, apical și intermediar.

Gro ES (co-ciaperoninele) sunt compuse din 7 protomeri identici aranjați simetric, masa moleculară a protomerului e de 10 kDa și conține 97 resturi aminoacide. Structura spațială a protomerului prezintă un nucleu de β -structură pliantă înconjurată de mici structuri de α -elice (fig.1.13).

Fiecare protomer în ciaperonine poate fixa câte o moleculă de ATP. Au fost determinate locusurile funcționale, unde are loc fixarea ATP, a polipeptidului substrat și a Gro ES în Gro EL. Sunt constatate particularitățile ciclurilor reactibile în ciaperonine la formarea complexului activ funcțional și fixarea substratului polipeptidic. Sunt propuse diferite modele ale complexului, posibilele mecanisme de funcționare și asamblare a proteinelor prin ciaperonine.

Complexul ciaperoninelor posedă activitatea ATP-azică, se presupune că complexul funcțional activ e obligat să asigure condițiile cinetice primare pentru asamblarea proteinei în afara ribozomului, în porțiuni mai îndepărtate în citozolul celulei. S-a constatat că formarea complexului activ necesită ionii de K^+ . Sunt date experimentale ce confirmă că *in vivo* asamblarea lanțului polipeptidic în proteina activă are loc cotranslațional, adică în același timp cu sinteza lanțului în ribozom.

Cum are loc procesul de autoîmpachetare a proteinelor?

Lanțurile polipeptidice desfășurate sau proaspăt sintetizate sunt numite *ghemuri dezordonate*. Studiul asupra proteinei denaturate a stabilit că în interiorul ei apar regiuni răsucite, asociate într-un mod anume și diferite de întreaga moleculă. Aceste substructuri (subdomenii) sau numai unele dintre ele sunt nestabile, fluctuante, servind în calitate de detonant (fitil), în jurul cărora se formează regiuni stabile structurale.

Despre starea denaturată a proteinei se știe mult mai mult decât despre cea desfășurată. Una din primele legități ale împachetării constă în faptul că contactul dintre moleculele de H_2O și aminoacizii hidrofobi trebuie, pe cât e posibil, să fie minim. A doua legitate: globula proteică urmează să fie împachetată compact, însă spațiul ei trebuie să fie umplut astfel încât atomii învecinați să nu se intercaleze.

La momentul actual se disting ***două concepții***:

Prima, mai puțin pronunțată, este cea care presupune că lanțul polipeptidic colapsează rapid pînă la dimensiunile finale ale globulei, cu ieșirea aminoacizilor hidrofobi din contactul cu apa. În starea dată molecula se reorganizează rapid, căpătînd proprietățile ei de structură secundară și terțiară (datele experimentale confirmă această teorie).

A doua concepție, mai reușită, stabilește că lanțul polipeptidic desfășurat foarte rapid formează segmente constante, limitate de structura secundară. Ele interacționează și temporar se realimentează reciproc. Segmentele stabilizate, microdomeniile respective transformă conformația moleculei proteice în direcția organizării supreme prin asociere cu alte segmente, favorizînd contactele dintre segmentele îndepărtate. În stadiile tranzitorii se formează intermediare, structuri ce pot fi determinate foarte greu, dat fiind existența lor de scurtă durată.

Caracteristica structurilor vizate:

a) au dimensiuni mai mari decât molecula nativă și posedă elemente formate de structura secundară;

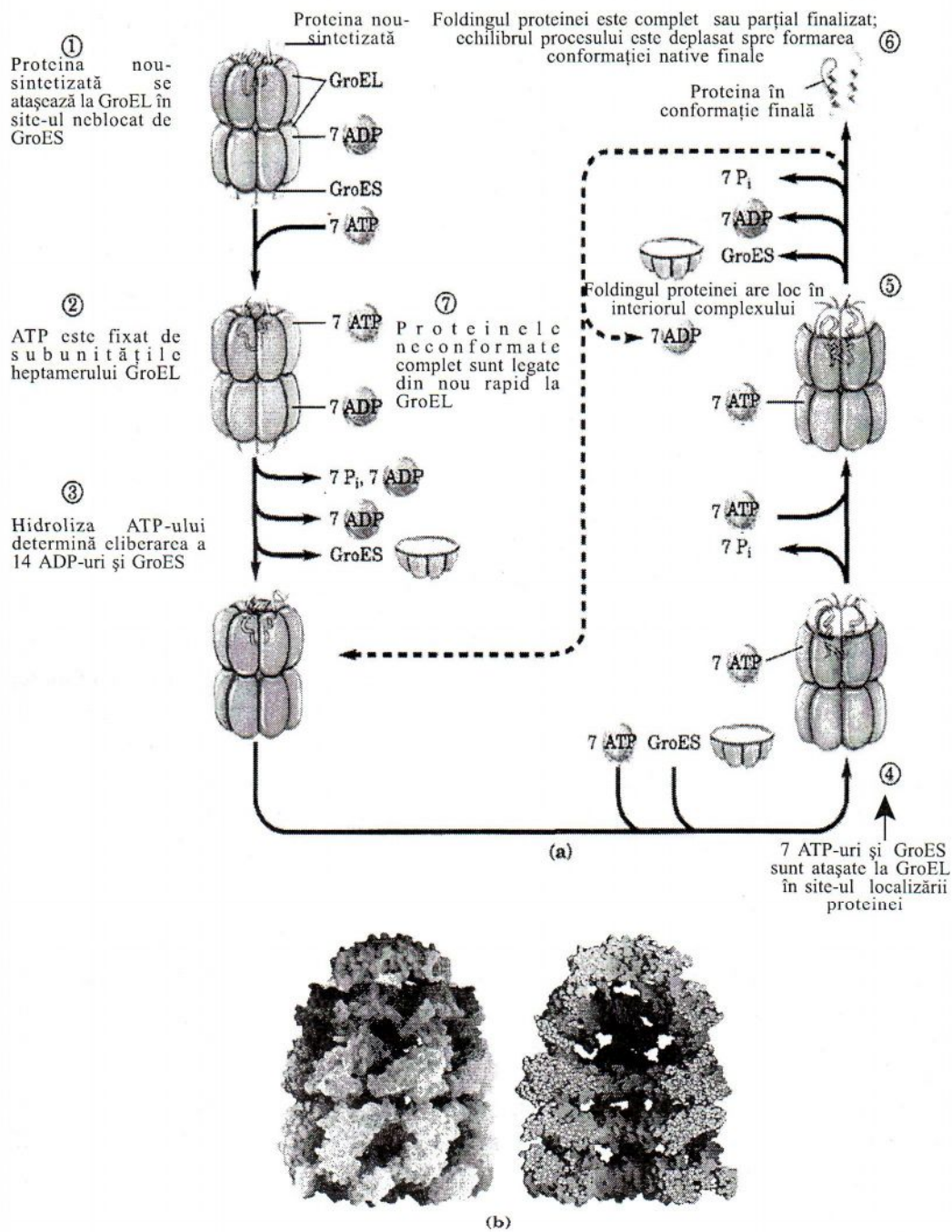


Figura 1.13. Ciaperoninele în foldingul proteinelor:

(a) mecanismul de acțiune a ciaperoninelor *E.coli* GroEL (aparține familiei proteinelor Hsp60) și GroES. Fiecare complex GroEL posedă 2 site-uri formate din 2 inele heptamerice (masa moleculară egală cu 57 000 Da). GroES este, de asemenea, heptamer (masa moleculară egală cu 10 000 Da) și poate bloca unul din site-urile GroEL.

(b) suprafața și secțiunea complexului GroEL/GroES. În imaginea secțiunii se vede spațiul intern al complexului, în interiorul căruia se amplasează alte proteine.

b) savanții au desfășurat proteina nativă și apoi au realizat împachetarea, oprind-o la diferite etape; au identificat intermediarele după formarea legăturii S-S, ce apăreau în procesul de împachetare și apoi dispăreau pe neobservate în molecula nativă.

S-a demonstrat că unele fragmente formează asociații temporare, altele stabile, și se păstrează în globula nativă, avînd un rol fundamental la inițierea procesului de împachetare a lanțului. Intermediarele au fost studiate prin metoda izotopilor. Hidrogenul din grupele peptidice a fost înlocuit cu deuteriu prin incubarea lanțului polipeptidic în apă grea. Apa grea substituită apoi cu cea obișnuită favoriza includerea hidrogenului în legăturile neformate, și în continuare, procesul avansa pînă la finisarea deplină. Identificarea regiunilor cu deuteriu a dezvoltat fragmentele moleculelor ce se împachetau în primul rînd. Așa s-a stabilit consecutivitatea formării intermediarelor. S-a confirmat că în citocromul C are loc asocierea primară a două spirale în capetele opuse ale lanțului polipeptidic. În ribonuclează, la început, se formează β -structura situată în centrul moleculei.

Împachetarea poate fi determinată și prin metode matematice, cu utilizarea funcției energiei potențiale. În computer se introduc valorile în cifre care caracterizează forțele de atracție între perechile de atomi ai moleculei din lanțurile polipeptidice. Apoi se iau coordonatele atomilor la care energia totală a moleculei se micșorează pînă la minim (în eventualitatea că structurile finale au energie minimă). Studiile recente elucidează posibilitatea precizării structurii terțiare după succesiunea aminoacizilor. O serie de investigații confirmă faptul că pentru împachetare sunt necesari factori spațiali și interacțiune hidrofobă. Rolul diferitelor forțe variază de la o proteină la alta. E posibil că forțele electrostatice joacă un anumit rol la stabilizarea conformației finale, dar nu și la formarea ei.

Rezultanta finală a foldingului este conformerul nativ ce posedă activitate biologică. Un domeniu cu o structură stabilă secundară care se formează primar, comparativ cu cealaltă parte a moleculei, e numit **foldon**.

Asamblarea proteinelor se consideră un proces fizic de o valoare biologică deosebită. Modelarea computerizată a procesului confirmă că asamblarea demarează de la lanțul desfășurat care fluctuează mult timp fără formarea unor contacte native esențiale. Apoi lanțul atinge întîmplător starea în care persistă un ansamblu de contacte native. După această situație, procesul de asamblare decurge foarte rapid pînă la starea finală - formarea structurii native.

Se consideră că un pas-limită în asamblarea acestor catene este formarea primară a unui complex de contacte native (nivelul asamblării), care, fulgerător, influențează toată molecula. Acest nucleu nu e identic cu stările intermediare. S-a consolidat ideea că:

- a) asamblarea începe cu formarea unui complex determinat de contacte native;
- b) resturile ce se includ în acest nucleu sunt aranjate la diferite distanțe în lanț.

Studiile au stabilit că nucleul asamblării este constituit din resturi nefuncționale mai conservative - proteinele legate evolutiv posedă 2 complexe de resturi conservative: unul pentru centrul funcțional și altul pentru nucleul de asamblare.

Asamblarea conform conotației «totul sau nimic» corespunde mecanismului nucleației și creșterii și e tipică pentru proteinele foarte mici. Asamblarea proteinelor majore trece

prin stări intermediare. Una dintre ele este și globula în fuziune ce se caracterizează prin stare intermediară compactă cu structură nativă asemănătoare, dar fără structură terțiară rigidă, prin lipsa de cooperativitate la temperatura de topire și mișcările intramoleculare rapide. O stare asemănătoare e proprie și intermediatelor.

S-a demonstrat că în globula în fuziune, molecula proteică păstrează unele particularități ale topologiei native (aranjarea reciprocă a α și β structuri), aranjarea rigidă a catenelor proteice. Aceasta clasifică globula ca *intermediat* între catena desfașurată și starea nativă, stare termodinamică între cele două. Se presupune că molecula proteică poate exista în trei stări: nativă, globula în fuziune și cea desfașurată.

S-a stabilit că globulele în fuziune, genetic, sunt un intermediat universal pentru asamblarea proteinelor.

Așadar, prin folding se subînțelege aranjarea spațială corectă de novo a catenei proteice, iar refoldingul presupune aranjarea spațială după denaturare.

Studiile contemporane confirmă că proteinele auxiliare pot fi împărțite în 2 grupe: ciaperonine moleculare și enzime. Prima grupă constituie o clasă funcțională de proteine neomogene, care favorizează asamblarea corectă necovalentă a altor structuri polipeptidice *in vivo*, nefiind componente ale acestor structuri organizate, ce îi îndeplinesc funcțiile biologice. Sunt evaluate multe proteine cu funcții asemănătoare - proteinele șocului termic formează o grupă mare de ciaperonine.

Enzimele denumite *foldaze* catalizează modificările covalente, strict necesare la formarea conformațiilor native funcționale ale diferitelor proteine. Deocamdată sunt identificate 2 enzime ca foldaze - *proteindisulfid izomeraza (PDI)* ce catalizează formarea legăturilor native disulfidice și *peptidil-prolil-cis-trans-izomeraza (PPI)* ce catalizează izomerizarea unor legături stabile trans-peptidil-prolil în cis-conformație, necesare pentru asamblarea funcțională a proteinelor. Ambele sunt reacții covalente, reacții-limite în etapele foldingului proteinei corespunzătoare. Procesul de Folding și formarea disulfidelor native sunt procese strâns legate între ele și decurg simultan.

S-a constatat că PDI prezintă nu numai o izomerază ce catalizează formarea legăturii disulfidice în peptidele sintetizate, dar și o ciaperonină moleculară, ce participă la procesul foldingului catenelor. Activitatea ciaperoninică nu e dependentă de cea izomerazică. Funcționând ca foldază în procesul de folding, este necesară atât activitatea izomerazică, cât și cea ciaperoninică.