

PEPTIDELE ACTIVE

Endotelinele reprezintă o familie de peptide noi cu o activitate biologică deosebită. În 1988, M. Yanagisawa și alți savanți au căpătat din cultura endoteliului vascular un peptid cu un efect biologic foarte pronunțat, numit *endotelină*. Timp de zece ani s-a efectuat un studiu amplu referitor la peptida respectivă, receptorii ei, enzima - endotelin convertaza și inhibitorii ei.

Endotelinele sunt cei mai efectivi factori vasoactivi. Sunt implicate în patogenia unor forme de maladii hipertensive, ischemiei renale, hemoragii subarahnoidale. Este determinat rolul lor în infarctul miocardic, aritmiile cardiace.

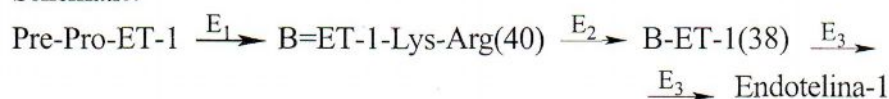
De rînd cu endotelina-1 (ET-1), un peptid biciclic din 21 aminoacizi, s-au depistat și alte 2 izoforme - ET-2 și ET-3, codificate probabil de gene diferite. Aceste peptide sunt marea speranță a savanților pe viitor! Toate trei endoteline în mod diferit sunt expresate în țesuturile vasculare. Primele două au o activitate majoră de vasoconstrictori.

Sunt clonate și secvențate 2 tipuri de receptori (ET-A și ET-B), care s-au depistat atît în endoteliul vaselor, cît și în rinichi, plămîni, suprarenale, țesutul nervos. Constricția vaselor e mediată de ET-A receptori, structuri fixatoare de G-proteină; pe cînd inducția receptorilor ET-B conduce atît la constricția, cît și la dilatarea vaselor. Funcția acestor receptori e cuplată cu activarea fosfolipazei C și A_2 , cu majorarea nivelului de Ca^{2+} intracelular, formarea intensivă a prostaciclinoi și/sau tromboxanului A_2 . ET-1 și ET-3 în țesutul nervos intensifică sinteza fosfoinozitolfosfatului.

ET-1 apare ca rezultat al proteolizei limitate a endotelinei majore - (B = ET) în trei etape:

- hidroliza proteolitică a preproendotelinei-1 la Arg(92) în endotelina-1-Lys-Arg(40) sub acțiunea convertazei (E_1);
- hidroliza capătului C-terminal B = ET-1-Lys-Arg(40) la B = ET-1-(38) de o carboxipeptidază (E_2);
- scindarea premergătorului B-ET-1 la legătura Trp(21) = Val(22) cu formarea endotelinei ET-1, etapă determinată de convertaza respectivă (E_3).

Schematic:



E_3 (enzima endotelin convertaza - ECE-1) este o metalproteinază din grupa celor fixate în membrană, care participă în procesingul postsecretorial al hormonilor peptidici și neuropeptidelor. Are unele proprietăți asemănătoare cu familia Zn^{2+} - metaloproteazelor. În centrul activ este restul Tyr și regiunea fixatoare de Zn^{2+} .

E depistată enzima ECE (endothelin-converting enzyme) în majoritatea țesuturilor. Activitatea ei e determinată atît prin metode imunochimice, cît și prin testare biologică. Ea prezintă un dimer cu subunitățile de 120-130 kDa fixate prin punți disulfidice. Splasingul alternativ a demonstrat variante ale ECE că grupa N terminală e diferită, cu o specificitate selectivă la substraturi. ECE-1 are o specificitate mare la B-ET-1 și mult mai puțin efectivă la ET-2 și ET-3. Aceste date presupun prezența enzimei în mai multe izoforme ale ECE-1 (1 α și 1 β).

ECE-2, o altă endotelin convertază, în 59% e omoloagă cu ECE-1 - o expresie majoră e depistată în țesuturile creierului. Ambele enzime au structuri de bază comune: sunt proteine integrale membranare de tip II, ce conțin o secvență cu Zn^{2+} caracteristică; au 10 site-uri glicozil, cu o localizare nu chiar identică, sunt inhibitate de aceiași inhibitori cu diferită sensibilitate.

ECE-2 hidrolizează B-ET-1 mai efectiv decât B-ET-2 și B-ET-3. Dar cea mai esențială deosebire e pH optim pentru forma 2, care este egal cu 5,5, și enzima e neactivă la valori neutre, optime pentru ECE-1. Prezența, de asemenea, a ECE-2 în țesuturile neendoteliale demonstrează că acest ferment funcționează ca enzimă extra- și intracelulară, responsabilă de hidroliza intraveziculară a precursorului ET-1, sintetizat în aparatul Golgi. Cele prezentate presupun 2 tipuri de sinteză a endotelinelor: *extra și intracelulară*.

Sunt depistate și enzime ce degradează fiziologic endotelinele «mature»-metaloendopeptidaza cu pH optim de 5,5; «endotelinaza» (serin proteinaza).

Endotelina și, corespunzător, ECE reglează tonusul vaselor și, în general, cardiohemodinamica. Peptidul participă la patogenia hipertensiei esențiale - inhibitorii ECE previn dezvoltarea hipertensiei pulmonare în experiment. Efectele sunt dependente de funcționarea sistemului renină-angiotenzină.

S-au depistat unele efecte neurologice ale ET-1 și ET-3, modificări în reacțiile de comportare, efect central cardiorespirator.

În prezent se presupune că endotelinele, de rînd cu alți reglatori ca histamina, bradikina, angiotensina II, participă la relinsingul diferențiat al adrenalinei și/sau noradrenalinei din suprarenale în stres (situații extremale). Esențial e rolul lor în reglarea stării funcționale a endoteliului - stratului intim arterial și venos din diferitele vase ale organismului. Dereglările metabolismului normal al endotelinelor, expresia intensivă a precursorilor și receptorilor respectivi, activitatea majoră a ECE devin factori de dezvoltare a proceselor patologice din organism, motiv care impune investigarea unor metode de control și de reglare a activității lor în organism - inhibitorii metaloproteazelor. Inhibitor clasic se consideră fosfoamidonul. Mult mai activ este analogul *tiorfanului*. În baza compușilor acidului fosfonic s-au sintetizat inhibitori ai ECE, foarte puternici și selectivi. Sunt utilizați și analogi ai ET-1, care blochează activitatea ECE atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

În ultimii ani se confirmă că *unele peptide cu o structură foarte simplă, predominant din glicină și prolină (PG, GP, PGP, GP GG), posedă o activitate biologică deosebită referitor la coagularea sîngelui*, acțiunea protectoare a mucoasei, nocicepție. La aceste peptide se alătură și PGc (ciclic) depistat în creier. O particularitate deosebită a acestor fragmente, ce conțin prolina terminală, este stabilitatea majoră în fluidele organismului față de altele (de mii de ori).

Aceste peptide au ca sursă și alimentele, căci e stabilit că tripeptidele ce conțin prolină sunt absorbite de celulele endoteliale intestinale nescindate. Un precursor al lor poate fi și *enterostatina* (APGPR), precum și colagenul și elastina.

Compartimentalizarea strictă a proceselor permite realizarea unor funcții diametral opuse, de exemplu, acidul glutamic, glicina, care îndeplinesc atât rol plastic, cât și energetic și servesc drept neurotransmițători. Asemenea compartimentalizare e reală și pentru

precursorii peptidelor reglatoare (PR). Determinant poate fi țesutul, organul, precum și repartiția locală a proteazelor.

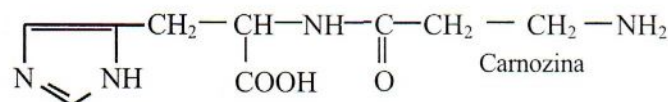
S-a stabilit că aceste peptide blochează agregarea trombocitelor, formarea trombinei și a fibrinei; sunt inhibitori ai fibrinazei (XIII_a). Posibil că aceste peptide simple ce conțin prolină (fragmente ale colagenului și elastinei) sunt factori endogeni cu acțiune de antitromboză și trombolitică.

Prolincomponentele peptidice, PGP și GPGG, amplifică rezistența mucoasei gastrice la acțiunea factorilor nocivi, devenind *protectori antiulceroși*. Este inhibată endo- și exosecreția pancreasului, motorica stomacului, utilizarea alimentelor (anorexia) de enterostatina (pentapeptida APGPR).

Peptida GP_c are efect stimulator în consolidarea memoriei, posibil se formează din collagen sau elastină.

Peptidele scurte, ce conțin prolină, sunt activatori ai hemotaxisei, favorizează formarea superoxidului, neutralizează analgezia provocată de morfină. Comparând structura peptidelor respective, se presupune dependența efectului de prezența prolinei la capătul N-sau C-terminal al peptidei.

Carnozina – dipeptida β-alanil-L-histidina, extrasă în anul 1900 din mușchiul scheletal. În prezența acestei dipeptide, mușchiul izolat de broască se contractă ca și la acumularea cantităților mari de lactat; pI a carnozinei este de 6,9, iar a anserinei - 7,1 – ultima este derivatul ei metilat. Acești compuși sunt ideal adaptați pentru rolul de tampon în regiunea fiziologică a pH – au o cotă pînă la 40%.



Capacitatea tampon protonică mărimea β- se măsoară în “slake” și se determină după numărul de mkmol NaOH sau HCl, necesari pentru a modifica pH a 1 g țesut cu o unitate – de la 6 la 7 sau 6,5 - 7,5. Se consideră că și peptidele înrudite iau parte la reglarea activității enzimaticice, la diminuarea reacțiilor oxidante.

Datele experimentale confirmă că carnozina prezintă un antioxidant multifuncțional, capabil să inactiveze radicalii liberi, să formeze compuși chelați cu metalele prooxidante (Cu) și posedă capacitatea de a forma conjugate cu produse aldehydice toxice de oxidare a lipidelor. În prezența carnozinei, *limita Heiflik* se extinde – celula din cultură îmbătrânește mult mai lent. Posibil, e și rezultatul unic al efectului diferit al carnozinei ca: izvor al histidinei, imunostimulator și neurotransmitter etc.

Glicozilarea nefermentativă a proteinelor este un proces dependent de vîrstă, activ în diabet. Formarea legăturilor transversale între polipeptidele modificate și proteinele normale este cauza complicațiilor în diabet. S-a confirmat că carnozina este un agent antiglicolical natural, ce se conține preponderent în mușchii albi cu o glicoliză intensivă. Carnozina indusă de alhedida malonică inhibă formarea în proteine a legăturilor transversale, precum și formarea grupărilor carbonilice în proteine, specifice la îmbătrînirea proteinelor și celulelor. Carnozina e capabilă să reacționeze cu metil-glioxalul și, indusă

de el, preîntîmpină modificările proteice. Carnozina protejează celulele de acțiunea toxică a aldehydelor și cetonelor.

Proteinele glicate sunt imunogene, iau parte la generare în procesul de îmbătrînire a autoantigenelor. E stabilit că carnozina glicată nu e mutagenă, spre deosebire de aminoacizi. Ea inhibă reacția de glicare a lizinei, modulează toxicitatea produsului pentru cultura celulelor.

Îmbătrînirea proteinelor este însoțită de acumularea polipeptidelor aderante, îndeosebi ale celor ce conțin grupa carbonil. Ultimele apar ca rezultat al oxidării radicalilor aminoacidici de FAO, precum și la interacțiunea produselor oxidării lipidelor – aldehida malonică și hidroxinonenalii – cu lizina și în al treilea rînd, în procesul de glicare în care aldehidele toxice induc formarea grupărilor carbonil în proteine.

S-a constatat că carnozina nu doar se fixează de gruparea carbonil din proteine, dar și modulează activitatea lor, inhibînd formarea legăturilor transversale în proteine, ca rezultat al generării complexului proteină-carbonil-carnozin aduct.

Deocamdată nu e clar unde anume are loc formarea acestui complex: în interiorul celulei sau în afara ei?

Care este soarta proteinelor carnozilate?

Posibil că reprezintă o formă a lipofuscinei – pigmentul îmbătrînirii. Lipofuscina are o natură foarte heterogenă și efectele ei sunt controversate. E enorm de multă în țesuturile bogate în carnozină – nervos și mușchi, creier. Posibil că forma lipofuscinei fără carnozină e capabilă să reacționeze cu alte macromolecule celulare.

O altă variantă ar fi proteoliza - scindarea de un sistem de *proteozome*. Carnozina maschează grupările carbonil, care sunt rezistente și chiar pot inhiba funcția proteozomelor. S-a constatat că în prezența carnozinei se activează metabolizarea unor proteine greu metabolizante.

Grupele carbonil se formează și la oxidarea fosfolipidelor (etanolamina) membranare. La depurinizare și depirimidinizare a DNA, cu scindarea legăturilor glicozidice, se formează o moleculă de D-oxiriboză cu proprietăți toxice aldehydice. Carnozina fixează, posibil, și aceste forme toxice, inhibînd formarea legăturilor transversale proteină - DNA, cu participarea aldehydelor, și micșorează numărul de aderații cromozomiale în cultura celulară. Carnozina favorizează procesele de detoxifiere. O dată cu îmbătrînirea, concentrația carnozinei se micșorează: nivelul corelează cu durata vieții. Indivizii care au o statură înaltă sunt asigurați cu longevitate mai mare.

Biosinteza carnozinei: se sintetizează din β -alanină și histidină, reacție catalizată de *carnozin sintaza*. β -alanină – aminoacid neproteinogen se produce în ficat ca metabolit final în degradarea uracilului și a timinei. Celulele capabile de sinteză posedă și un sistem benefic de transport al acestui aminoacid. Cu cît celulele sunt mai diferențiate, absorbția β -ala este mai efectivă. În oligodendrocite viteza maximă de sinteză corespunde capacității majore de expresie a proteinei – *mielina* – marker al diferențierii oligodendrocitelor în creier.

Carnozina e legată de celulele neurogliei, care pot absorbi rapid carnozina marcată print-un mecanism activ de transport al dipeptizilor. E prezentă carnozina în neuronii senzitivi, împreună cu acidul glutamic, ce marchează rolul de neuromediator în acest

proces. În secreție se consideră că sunt prezente mai multe mecanisme (depolarizare membranară, tumefierea astrocitelor cauzate de ionii K^+ , inversarea mecanismelor de transport). Se confirmă mecanismul vezicular, exocitoza determinată de Ca^{2+} .

Carnozina este un inhibitor selectiv al NO-dependent-activare a guanilatciclazei, ce o poate utiliza ca remediu efectiv la tratarea sepsisului, cancerului, astmului, migrenei, toate fiind legate de activarea sistemului de semnalizare intracelular: NO-Gc solubilă – GMPc.

Hidroliza carnozinei e cauzată de 2 izoenzime: 1) carnozinaza tisulară (citosolică) și 2) cea serică (KF.3.4.13.3 și KF3.4.13.20). Forma tisulară e zincodependentă și poate fi stabilizată de alte metale bivalente ($Cd > Mn \gg Zn \gg Co$).

Carnozina mărește de 2-3 ori longevitatea celulelor cultivate *in vitro*. E stabilit efectul de întinerire a celulelor senile. Carnozina distruge celulele transformate sau cancerigene. În amestec cu piruvatul (acidul oxaloacetat și α -cetoglutaratul), efectul se micșorează. Citratul, izocitratul, fumaratul, succinatul și malatul nu influențează asupra efectului citotoxic al carnozinei.

Efectul carnozinei poate consta în:

a) diminuarea gradului sau exprimarea efectelor care conduc la includerea mecanismelor ce blochează ciclul celular. De exemplu: poate favoriza micșorarea lungimii fragmentelor pierdute în DNA-telomerică sau diminuează metilarea DNA;

b) micșorarea efectelor fiziologice determinate de modificările în RNA, ce ar favoriza îndepărtarea momentului de oprire terminală a diviziunii celulelor. Un astfel de efect s-ar manifesta în întinerirea fenotipului celular, care se observă la cultivarea celulelor *in vitro* cu carnozină. Carnozina, posibil, inhibă glicoliza, de altfel și formarea de ATP în celulele cancerigene. Acest efect e reversibil la adaosul piruvatului.

CLASIFICAREA PROTEINELOR

Savanții M. Levitt și C. Chothia (1970), examinând structura proteinelor, le-au divizat în **5 clase** (fiecare clasă diferă **după prezența și poziția α -spiralei și β -structurii** (fig. 1.14, a-h)):

I. Proteine ce conțin 100% α -elice, formînd o structură globulară.

II. Proteine ce conțin β -structură și, de regulă, sunt alcătuite din două straturi antiparalele sau situate în formă de "butoiase".

III. Proteine ce includ atât α , cât și β componente segregate în structura terțiară.

IV. Proteine ce înglobează α/β segmente alternate în structura secundară, formînd structura terțiară cu centrul β și încercuite de α -spirală.

V. Proteine neorganizate cu structură secundară evidențiată nesemnificativ. Plierea lanțului este determinată în exclusivitate de interacțiunea radicalilor (coit proteic) - punților disulfidice. Acestea sunt proteinele mici.

Clasificarea sus-numită a fost desăvîrșită de J.S. Richardson (1981).

Așadar, organizarea structurală este determinată de modul aranjării reciproce a structurilor secundare. De aceea, un imperativ primordial pentru prognosticarea structurii proteinelor o au principiile de împachetare a elementelor constituente. Se știe că un rol deosebit în acest context îl joacă repartiția resturilor hidrofobe în α -elice și β -structură.

Proteinele se mai clasifică (W. Bennet și R. Huber, 1984) și **după dinamica domeniilor structurale:**

I. Proteine cu domenii rigide, imobile, dure, unite prin segmente mari, flexibile, ce le permit acestora fluctuații în diapazon larg reciproc.

II. Proteine cu domenii rigide, dure, unite prin porțiuni mici, denumite “Balama”, cu o circulație mai redusă.

III. Proteine în care domeniile au roluri diverse - folosesc flexibilitatea pentru asigurarea unor funcții (de legare); interacționează cu grupări determinate de antigen.

Clasificarea proteinelor e o problemă dificilă, deoarece structura multor proteine nu este studiată complet. O clasificare a proteinelor după funcție e practic imposibilă. Există proteine cu structuri apropiate, dar care îndeplinesc funcții diferite. Posibilități limitate de clasificare prezintă și proprietățile fizico-chimice.

După atitudinea față de hidroliză se disting proteine *simple* și proteine *conjugate* (proteide). Proteinele simple la hidroliză elimină numai aminoacizi, iar cele conjugate mai conțin și un component neproteic și, deci, deosebim: fosfoproteide, cromoproteide, nucleoproteide, glico-, lipo-, metaloproteide.

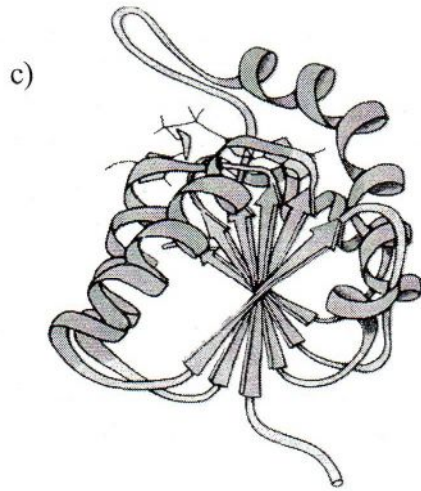
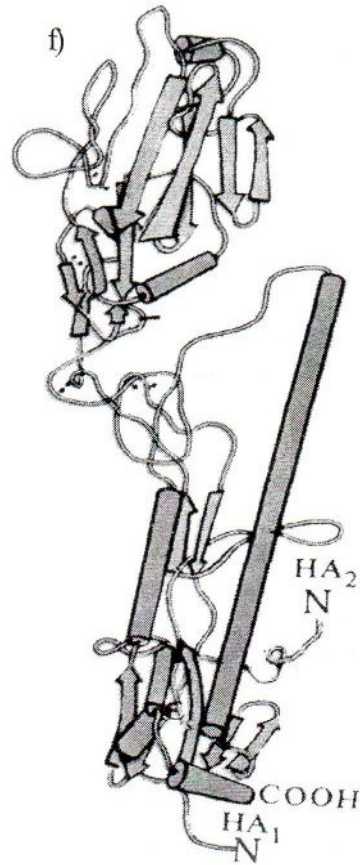
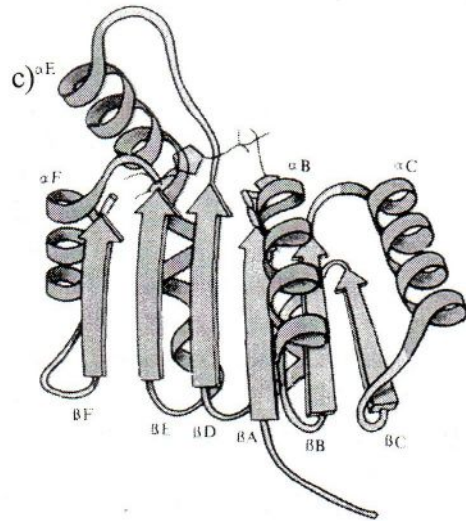
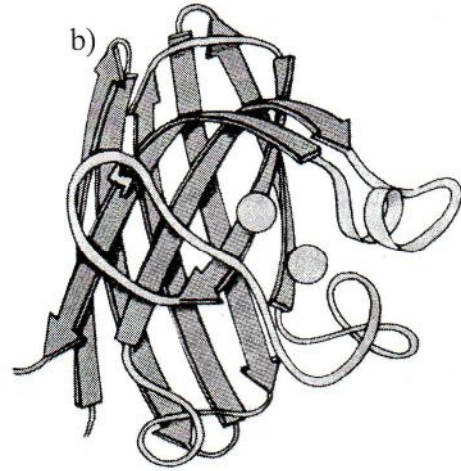
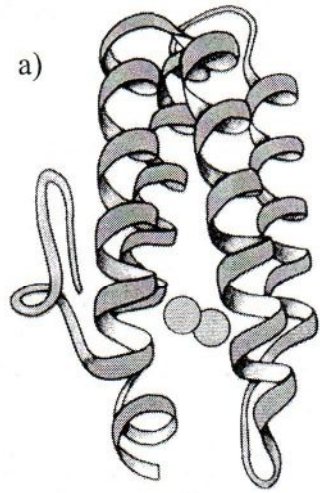
Holoproteinele (proteine simple). Protaminele au o masă moleculară mică și un caracter alcalin, determinat de prezența argininei și lizinei - 60-80%, fiindu-le caracteristic punctul izoelectric ce se află în mediul alcalin și la fierbere se coagulează la adaosul bazei în soluție. Proteinele sunt solubile în apă, se dizolvă și în soluție de NH_4 , soluții diluate de acizi și baze. Aceste proteine se găsesc în cantități mari în celulele germinale naturale ale peștilor: *salmina* (lapții somnului), *scumbrina* (scrumbia), *clupeina* (heringul), în componența lor triptofanul lipsește. Aminoacizii ce conțin sulf în majoritatea lor nu includ, de altfel ca și tirozina, și fenilalanina.

Histonele din componența nucleului celular iau parte la reglarea metabolică a activității genomului. Aminoacizi bazici se conțin pînă la 30%. Masa lor moleculară e mai mare decît la protamine, conțin puțin sau deloc triptofan. Sunt solubile în aceiași solvenți și precipitate de soluția NH_4 , se coagulează la încălzire.

Albuminele și globulinele prezintă masa principală a proteinelor sanguine, a lactatelor, masei musculare, a proteinelor oului. Raportul albumine-globuline în diferite țesuturi rămîne constant și este egal cu 1,5-2,3. În patologie acest coeficient se schimbă. Albuminele sunt mai solubile în apă, pe cînd globulinele sunt solubile numai în soluții diluate de săruri, iar în celelalte cazuri — insolubile. Solubilitatea diferită e folosită pentru fracționarea și determinarea lor în practica clinică. Pentru ultimele scopuri azi se folosește electroforeza pe hîrtie sau în gel, la cantități neînsemnate de sînge. Albuminele conțin 575 aminoacizi, formînd un lanț polipeptidic, au un punct izoelectric mic. Ele determină presiunea oncotică a sîngelui, iau parte la transportul substanțelor, prezintă o fracție omogenă. Globulinele formează o fracție heterogenă, fiecare comportînd diferite funcții.

Glutelinele și prolaminele sunt proteine de natură vegetală, se depozitează în semințele cerealelor, masa principală a glutenului.

Prolaminele sunt solubile în soluție apoasă de alcool etilic (60-80%). Conțin 20-25% acid glutamic și 10-15% prolină. Reprezentanții prolaminelor sunt: gliadina (grîu), zeina (porumb), orzeina (orz), hordeina (orz).



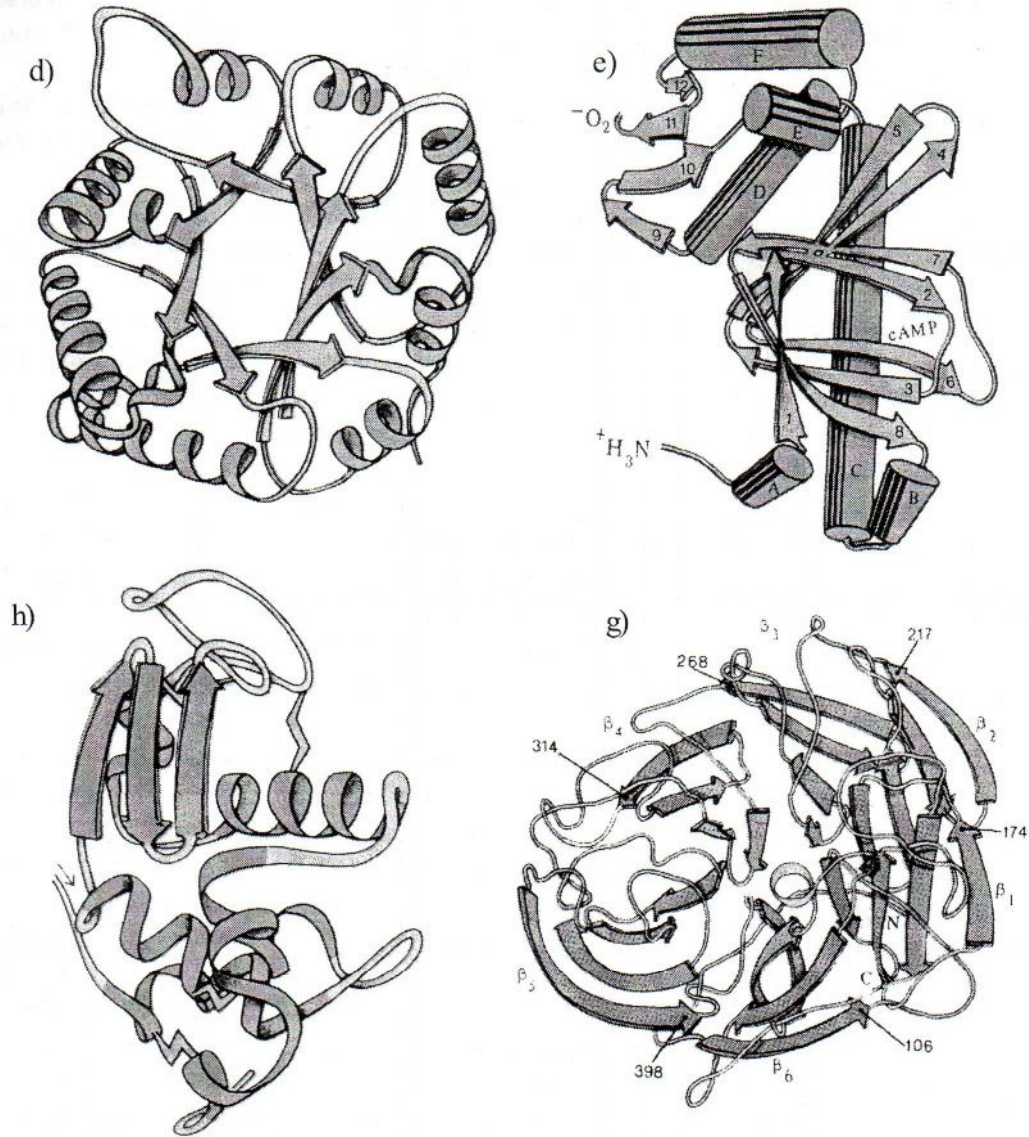


Figura 1.14. Tipologia unor structuri proteice:
 α - spiralele sunt în formă de cilindre și spirale;
 β - structura e reprezentată prin săgeți;
 a) proteină în α - structură (miohemeritina);
 b) proteină în β - structură (Cu, Zn-superoxiddismutaza);
 c) α/β structură (2 proiecții ale domeniului NAD din LDH);
 d) hemaglutinina virusului gripei;
 e) α/β structură (triozofosfatizomeraza);
 f) CAP din *E. coli*;
 g) $\alpha+\beta$ structură (lizozim);
 h) neuroaminidaza virusului gripei.

Heteroproteidele (proteine conjugate) conțin, pe lângă compuși proteici, diverse grupe neproteice numite grupe prostetice. Acestea sunt mai profund studiate. Ele sunt indispensabil legate de proteină și prezintă un anumit interes biologic.

Nucleoproteidele sunt compuse din proteine și acizi nucleici. Denumirea lor e derivată de la numirea nucleului celular, dar se află și în alte compartimente ale celulei. De aceea nucleoproteidele constituie o clasă individuală de substanțe organice, cu o componentă, structură și funcție independentă de localizarea lor în celulă. Astăzi putem afirma că natura proteinelor studiate în celulă e determinată de un reprezentant al nucleoproteinelor - DNA.

Proprietățile organismelor vii, ale celulelor și întregului organism sunt determinate însă de proprietățile proteinelor sintetizate. La hidroliza perfectă se observă descompunerea nucleoproteidelor în proteine și acizi nucleici. Componenta proteică o alcătuiesc histonele bogate în arginină și lizină. Natura proteinelor nu este suficient studiată.

Cromoproteidele sunt compuse din compartimentul proteic și cel neproteic colorat, de unde provine și denumirea lor; iau parte activă și obligatorie la procesele de acumulare a energiei, începând cu fixarea energiei solare în plantele verzi, utilizarea ei judicioasă de către organismul animalelor și al omului: fotosinteză, respirația celulară, transportul O₂ și CO₂, reacțiile de oxido-reducere, senzațiile de lumină și culoare etc.

Reprezentanți: clorofila, hemoproteidele, sistemul de citocromi, catalaza, peroxidaza. La baza structurii grupe prostetice se află inelul porfirinic, care adăunează elemente chimice diferite (Fe, Mg).

Fosfoproteidele sunt proteine compuse dintr-o parte proteică și acid fosforic. Acestor molecule le sunt proprii legături esterice ale acidului fosforic cu proteina ce se adăunează prin OH al aminoacizilor — serina, treonina.

Reprezentanții proteidelor — cazeinogenul (proteina laptelui), fosfovitina, vitelina, vitelinina (din gălbenușul oului), ihtulina (icre de pește) — ocupă un loc deosebit în compoziții ce conțin fosfor, mulți dintre aceștia se găsesc în sistemul nervos central. Fosfatul labil e absolut necesar pentru funcționarea celulei și exercitarea menirii sale biologice. În procesul de embriogeneză, de creștere postnatală și dezvoltare servesc drept material prețios energetic și plastic. Un șir întreg de enzime, ce reglează procesele de metabolism celular, se caracterizează prin legătura strânsă cu fosforul.

Glicoproteidele, ca exponenți ai grupe prostetice servind glicoaminglicanii, se includ în țesuturi și în formă liberă. Legătura cu glucozamina, galactozamina compușilor proteici se realizează prin asparagină, serină, treonină. Componenta glucidică determină rolul biologic al glicoproteidelor indispensabili de existența membranelor celulare, participând la reacțiile imunologice, schimbul de ioni, adeziunea intercelulară.

Lipoproteidele, ca grupă prostetică, sunt reprezentate de lipide neutre, acizi grași liberi, fosfolipide, colesterol, cu funcții variate. Fiind compuși ai membranelor celulare și organelor, pot exista și în formă liberă în plasma sîngelui.

Metaloproteidele — metalul este legat complex de resturile de aminoacizi (transferină, ceruloplasmină, feritină). Aici se includ și unele proteine enzimatică ca anhidraza carbonică (Zn), ascorbatoxidaza (Cu) etc.

PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE PROTEINELOR

Proteinele sunt compuși macromoleculari cu proprietăți hidrofile, adică sunt solubile. Această însușire se datorează repartizării pe suprafața moleculelor a resturilor de aminoacizi cu sarcini electrice sau a grupelor polare. Proteinele fibrilare sunt insolubile în apă, pe când cele globulare atestă grade diferite de solubilitate.

Solubilitatea proteinelor

Solubilitatea în apă este puternic influențată de diverse săruri ale metalelor ușoare: NaCl, MgCl₂, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄. În concentrații mici ele au un efect favorabil. De exemplu, globulinele sunt greu solubile în apa pură și se dizolvă ușor numai în soluții saline diluate. Efectul nu depinde de natura sării, dar de concentrația ei și de numărul de sarcini ale fiecărui ion din soluție. Mai eficiente sunt sărurile ce conțin ioni bivalenți (Mg), față de cele ce au ioni monovalenți. Solubilitatea mărită e determinată de creșterea gradului de disociere a grupelor ionizate în proteine.

În concentrații foarte mari sărurile amintite reduc solubilitatea proteinelor pînă la precipitarea lor din soluție - *salifiere*. Procesul e mai efectiv în punctul izoelectric al proteinelor. Mecanismul e complicat: ionii de sare atrag moleculele de apă polarizată, micșorînd cantitatea de apă ce interacționează cu proteina, cauza fiind concentrațiile mari de sare în care numărul ionilor este imens față de numărul grupelor cu sarcină a proteinei. Dar avînd în vedere că solubilitatea proteinelor în apă este dependentă de formarea membranei apoase în jurul grupelor ionice hidrofile, transferul molecular de apă la alți ioni micșorează solubilitatea proteinei. Procesul decurge mai rezultativ atunci cînd toate operațiile se efectuează la temperaturi joase, în condițiile în care proteinele sunt mai stabile.

Diferite proteine se salifiează la diferite concentrații de săruri — fenomen ce este utilizat pentru fracționarea lor. Globulinele precipită cînd soluțiile care le cuprind sunt aproximativ semisaturate în (NH₄)₂SO₄, pe cînd albuminele precipită la concentrații mai mari — de 75% saturație.

Procesul de salifiere a proteinelor în multe cazuri nu e legat de pierderea capacității proteinei de a se resolubiliza după înlăturarea agentului. Eliminarea prin dializă a (NH₄)₂SO₄ sau Na - sulfat complet conduce la resolubilizarea în apă a proteinei salifiate cu formarea soluțiilor adecvate. Capacitatea de resolubilizare rapidă se menține și în cazul înlăturării imediate a proteinei de la salifiat (alcool): proteina își păstrează proprietățile native.

Soluțiile în apă a proteinelor au un caracter *coloidal*. Diametrul unor astfel de particule e de la 1 la 100 mμ. Remarcăm soluții reale:

- a) ionice — particulele sunt mai mici decît 1 mμ, disociază în ioni, conduc curentul electric;
- b) moleculare — se descompun pînă la molecule, nu disociază și nu conduc electricitatea (glucoza, alcoolul) — dau spațiu optic nul.

Dacă particulele sunt mai mari de 100 mμ și substanța rămîne solidă în faza lichidă, rezultă suspensia, iar cea lichidă în lichid - emulsie.

Pentru soluțiile coloidale (dar proteinele formează soluții coloidale) e caracteristic:

- a) fenomenul lui Tindal pozitiv;

b) nu difundează prin membrane semipermeabile, care ușor transferă apa sau substanțele micromoleculare. Procesul e numit *dializă* și stă la baza funcționării aparatului rinichiului artificial. Majoritatea membranelor biologice normale nu sunt permeabile pentru proteine;

c) substanțele ce formează soluții coloidale nu se cristalizează la mărirea concentrației, dar generează precipitat amorf. Proteinele pot forma cristale numai în anumite condiții, din soluția-mamă;

d) soluțiile coloidale au o viscozitate mărită ce depinde de masa și forma moleculelor. Proteinele de aceeași masă moleculară, dar cu molecule asimetrice, au o viscozitate mult mai mare. Substanțele coloidale interacționează cu apa. În proteine grupele ionogenice leagă apa: COOH - 4 molecule de H₂O, NH₂ - 3 molecule, OH și NH - câte 2 molecule;

e) viteza de difuziune e foarte mică. Difuzia este procesul sumar de transfer al moleculelor dizolvate sub influența gradientului de concentrație. Coeficientul de difuzie depinde de mărimea și forma moleculelor, de rezistența determinată de viscozitatea solventului. Procesul de difuzie constituie baza funcționării celulei, transferului de substanțe. Viteza difuziei și distanța la care pot fi transportați diferiți metaboliți în celulă sunt parametrii principali ce limitează metabolismul în celulele vii și organitele lor;

f) soluțiile coloidale în concentrații mari au o presiune osmotică mică. Ea depinde de numărul particulelor dizolvate în unitate de volum, dar nu de natura lor;

g) au tendința de a forma diferite complexe moleculare;

h) sunt capabile de absorbție și singure se supun absorbției;

i) se tumefiază și se coagulează.

Soluțiile coloidale capătă forma de *sol* — soluție lichidă cu o anumită fluiditate și compoziție de *gel*, pierzându-și fluiditatea din cauza formării structurii de rețea internă cu fixarea apei. Atare structuri apar: 1) la tumefierea xerogelului (agar-agar, clei, gelatină); 2) în urma polimerizării fibrinogenului; 3) în urma condensării amidonului, gelatinei.

La învechirea gelului are loc *sinereza*, proces de expulzare a apei datorită contracției structurilor formate din particulele coloidale și eliminarea solventului imobilizat. Apa inclusă în rețeaua structurală e numită imobilizată, pe când apa structurală e legată de grupele hidrofile interne ale macromoleculei proteice. Sinereza are loc la coagularea sîngelui, în procesul de retracție a cheagului.

Proprietățile electrochimice

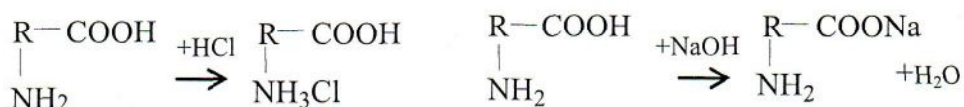
Proteinele sunt amfoliți macromoleculari, înglobînd un număr redus de grupări acide și bazice. Contribuția cea mai importantă o au resturile de glutamil, aspartil, lizil, arginil și histidil. Resturile aminoacide de la capetele C și N terminale nu au o influență semnificativă, mai ales cînd lanțul polipeptidic este mai lung. Grupele ionizate sunt dispuse în interiorul suprafeței moleculare.

Proprietățile acido-bazice sunt determinate de numărul mare de grupe ionizate ale resturilor de aminoacizi. De predominarea lor depind proprietățile electrice. În albumină există 109 resturi de COOH și 120 de NH₂; hemoglobina conține 48 COOH și 48 NH₂. Sarcina electrică e determinată de structura proteinei.

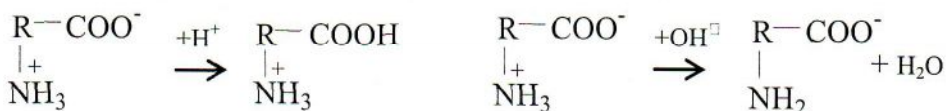
Moleculele proteice, fiind electroliți amfoliți, interacționează cu acizii și cu bazele,

participă la menținerea pH. În intervalul 6-7 al pH capacitatea-tampon a proteinelor e foarte mică. Numai aminoacidul histidina posedă proprietăți tampon la valori normale ale pH. Hemoglobina (Hb) eritrocitelor, transferind O₂, se caracterizează prin conținut evident de histidină, de aceea și are Hb - aceste proprietăți - tampon la pH = 7.

Particulele proteice în soluție pot să-și schimbe sarcina electrică în dependență de pH. În soluție acidă are loc inhibarea disociației COOH și, având sarcina pozitivă, proteina migrează spre catod, în soluție bazică invers — spre anod.



pH - soluției, în care proteina apare cu o sarcină electrică nulă, numărul grupărilor (+) este egal cu acela al grupărilor (-), este denumit *pH izoelectric* sau *punct izoelectric (pI)*. Valoarea pI depinde de compoziția proteinei în aminoacizi. O proteină ce are surplus de lizină și arginină denotă un pI >7, iar aceea care are o proporție mare de aminoacizi dicarboxilici - pI < 7.



În tabelele 1.4. și 1.5. sunt date valorile pI ale unor aminoacizi și ale unor proteide.

La pH izoelectric solubilitatea, mobilitatea proteinei în câmpul electric este minimă; pentru fiecare proteină e caracteristic pI propriu. Valoarea lui e determinată de numărul de grupe ionizate și de valoarea constantelor de ionizare (ribonucleaza — 7,8; citocromul — 10,6; pepsina — 1,0). În pI molecula proteică e cu sarcină nulă și între moleculele învecinate nu apar forțe electrostatice de respingere, ceea ce înseamnă că în atare condiții soluțiile sunt nestabile.

Tabelul 1.4. Valorile punctului izoelectric pentru unii aminoacizi proteinogeni

Aminoacid	pI	Aminoacid	pI
Acid L-aspartic	2,77	L-Valina	5,96
Acid L-glutamic	3,22	L-Leucina	5,89
L-Cisteina	5,07	L-Izoleucina	6,00
L-Cistina	5,66	L-Glicocol	5,97
L-Tirozina	5,66	L-Alanina	6,00
L-Serina	5,08	L-Prolina	6,30
L-Fenilalanina	5,48	L-Histidina	7,59
L-Triptofan	5,89	L-Lizina	9,74

Tabelul 1.5. Valorile punctului izoelectric pentru diferite proteide

Proteide	pI	Proteide	pI
Pepsina	1,0	Fibrinogen	5,5
Cazeina	4,6	γ - globulina serică	6,7
Ovalbumina	4,6	Hemoglobina	6,9
Albumina serică	4,9	Mioglobina	7,0
Ureaza	5,0	Chimotripsinogen	9,5
Insulina	5,4	Citocrom C	10,6
Miozina	5,4	Lizozim	11,0

Evident că prezența sarcinilor antipode pe segmentele distanțate ale particulelor creează condiții pentru o agregare rapidă cu formarea agregatelor mari. Acest lucru favorizează precipitarea lor și la asemenea valori ale pH au o solubilitate mică. Astfel de particularitate este caracteristică mai ales proteinelor globulare.

La valori mai mici sau mai mari de pI toate moleculele au aceeași sarcină și, ca rezultat, se resping una pe alta, agregarea fiind imposibilă. Așadar, *sarcina electrică e un factor stabilizant al soluțiilor coloidale*. În soluții supraacide sau suprabazice proteina nu va precipita chiar la fierbere, adică nici chiar atunci când își va pierde proprietățile hidrofiele. Se știe că un *factor stabilizator al soluțiilor coloidale e membrana apoasă*. Solubilitatea proteinelor e dependentă de hidratarea moleculară a lor, adică a grupelor ionizate. Apa, jonționându-se de pe suprafața moleculelor și cuplându-se sub o formă de dipoli, formează membrana apoasă care împiedică adiția, fuzionarea particulelor coloidale și în punctul pI.

Apa specific orientată în jurul grupelor hidrofiele e numită *apă legată* și se caracterizează prin :

- a) dispunere mai compactă, ce o apropie de un corp solid;
- b) proprietăți reduse de solvent;
- c) nu îngheață la temperaturi joase;
- d) constanta dielectrică este egală cu 2,8, pe când la apa obișnuită este de 8 (constanța dielectrică este forța de atracție a ionilor încărcăți opus). *Prin urmare, factorii stabilizatori ai sistemului coloidal sunt sarcina electrică și membrana apoasă.*

Precipitarea și denaturarea proteinelor

Pentru aplicarea acestor proprietăți ale moleculei proteice e necesar de a o lipsi anume de stabilizatori. Metodele sunt diferite. În medicină ele sunt folosite pentru caracteristica cantitativă și calitativă a proteinelor, din componenți biologici: urină, sânge, exudat etc.

Înlăturarea sarcinii electrice se efectuează prin aducerea proteinei la starea pI. Dacă drept ion de precipitație se folosește cationul, precipitarea e mai favorabilă în soluție slab

alcalină; dacă e folosit anionul, atunci soluția trebuie să fie puțin acidă — pentru a aduce particulele coloidale în starea electroneutră.

Membrana apoasă poate fi înlăturată cu ajutorul dehidraților (alcool, acetonă). Ultimii leagă apa. Dehidrații au o constantă dielectrică mică, micșorînd-o și pe cea a soluției. În consecință, ei măresc atragerea între două sarcini antipod, creînd astfel condiții pentru formarea perechilor de ioni ce favorizează agregarea proteinelor.

Corpurile proteice constituie o conformație nativă și posedă anumite calități fizico-chimice și biologice în condiții normale ale T, pH etc. Conformațiile sunt extrem de fragile și ușor perturbabile sub acțiunea multor agenți, care afectează interacțiunile covalente din conținutul moleculei. *Modificările conformației native unice se numește denaturare, iar agenții care o provoacă — agenți denaturanți.* Denaturarea e o particularitate a proteinelor.

La denaturare sunt lezate legăturile necovalente; agenții denaturanți nu afectează legăturile covalente, nu sunt lezate nici joncțiunile peptidice, nu se elimină aminoacizi. Structura primară a proteinei rămîne neafectată.

Trăsăturile caracteristice ale proteinei denaturate:

- 1) pierderea sau micșorarea activității biologice;
- 2) micșorarea solubilității;
- 3) schimbarea formei și mărimii moleculelor;
- 4) modificarea caracterului dispersiunii razelor Roentghen;
- 5) creșterea reactivității unor grupe (SH);
- 6) apariția unor grupe funcționale anterior nedeterminate;
- 7) pierderea capacității de a se cristaliza;
- 8) scăderea capacității de rezistență la hidroliză;
- 9) capacitatea sporită de a da reacții de culoare;
- 10) micșorarea mobilității electrice.

Denaturarea este provocată de diferiți agenți: temperatura înaltă, săruri ale metalelor grele care în concentrații mici produc denaturarea, coagularea proteinei. Proteina coagulată din soluție se leagă și se precipită cu factorul nociv. Fenomenul e utilizat în practica medicală. La intoxicație cu sublimat bolnavului i se administrează lapte, ovalbumină în cantități mari. Proteina formează, în ansamblu cu substanțele toxice, un precipitat ce micșorează absorbția lui. În unele condiții proteina denaturată poate rămîne în soluție, dacă aceasta este acidă sau alcalină, chiar și la temperatura de 100°C. Precipitatul va apărea la neutralizarea soluției.

La o acțiune de scurtă durată și la eliminarea rapidă a agentului denaturant e posibilă **renaturarea** proteinei cu restabilirea activității ei biologice. Denaturarea e ireversibilă atunci cînd se rup legăturile chimice, în special cele disulfidice inter- și intracatenare.

În procesul de sterilizare are loc denaturarea termică și, în consecință, insuficiența de timp sau de t^{θ} duce la generarea și răspîndirea microbului etc.

Multe proteine nu se denaturează la sublimare (*liofilizare*). Totuși, unele enzime își diminuează activitatea. E necesar să știm că există substanțe ce pot împiedica denaturarea, și anume: soluția de glucide simplă saturată, alcoolii multiatomi (glicerina), unii anioni organici (dodecilsulfat, unii acizi grași) etc. Pentru a evita denaturarea proteinele se izo-

lează. Ele se păstrează la rece, în soluții concentrate de săruri și la un pH anumit.

Metodele de identificare a proteinelor. *Problema elucidării complete a structurii macromoleculare* a proteinelor este una dintre cele mai actuale și de o incontestabilă importanță teoretică și practică. Pentru **determinarea masei moleculare proteice** pot fi utilizate următoarele metode: mărimea presiunii osmotice, constanta ultracentrifugării (proteinele sedimentează în raport cu mărimea și masa lor); metoda difuziunii luminii (intensitatea difuziunii e dependentă de numărul particulelor și de masa lor moleculară); mărimea difracției razelor Roentghen, microscopia electronică; conținutul unor elemente (în Hb concentrația Fe este egală cu 0,34%), care se conțin în cantități mici (în albumina serică concentrația triptofanului e de 0,58%).

$$\text{Masa moleculară minimă a proteinei} = \frac{\text{Masa atomului} \times 100}{\text{Cantitatea elementului în \%}}$$

$$\text{Masa moleculară a albuminei (Trp)} = \frac{204 \times 100}{0,6} = 34000 \text{ Da}$$

$$\text{Masa moleculară a hemoglobinei (Fe)} = \frac{56 \times 100}{0,34} = 16470 \text{ Da}$$

Stabilirea structurii unei proteine începe cu izolarea și purificarea ei, determinarea masei moleculare, identificarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor componenți, modului lor de legare, secvența aminoacizilor, în fine, cu orientarea tridimensională a macromoleculor.

1. Proteinele se separă de celelalte componente prin dializă, utilizându-se membrane semipermeabile. Pentru accelerarea procesului se aplică electroliza — electrodializă.

2. Soluțiile proteice se purifică, diferențiindu-se după mărime și formă prin filtrarea cu geluri speciale care funcționează ca site moleculare — moleculele de mărimi mici se repartizează între faze, iar cele mai mari nu pătrund în faza internă. Moleculele asimetrice pot să nu pătrundă în faza internă. (Granulele porozitate de gel sunt suspendate într-o soluție, formînd 2 faze - una internă — în granule, și alta externă — în afara lor). În cazuri aparte la purificarea unor enzime se pot utiliza și alte metode. Se observă afinitatea lor cu diverși ioni, grupe funcționale — cromatografia de afinitate (fig. 1.15 a,b,c).

a) *Cromatografia prin schimbători de ioni* este bazată pe distingerea semnului și sarcinii electrice la pH-ul dat. Coloana matrice prezintă un polimer sintetic ce conține grupări fixate. La legarea grupărilor anionice matricea este schimbătoare de cationi, iar la fixarea grupărilor cationice — schimbătoare de anioni. Afinitatea proteinei pentru grupările fixate în coloană este influențată de pH (starea ionizantă a moleculei) și de concentrația ionilor salini din mediul respectiv. Separarea poate fi optimizată prin schimbarea succesivă a pH-lui și /sau a concentrației saline a fazei mobile.

b) *Gel - filtrarea* separă proteinele în dependență de dimensiuni. Matricea coloanei prezintă un polimer fixat ce conține pori cu anumite mărimi. Proteinele mari migrează mai

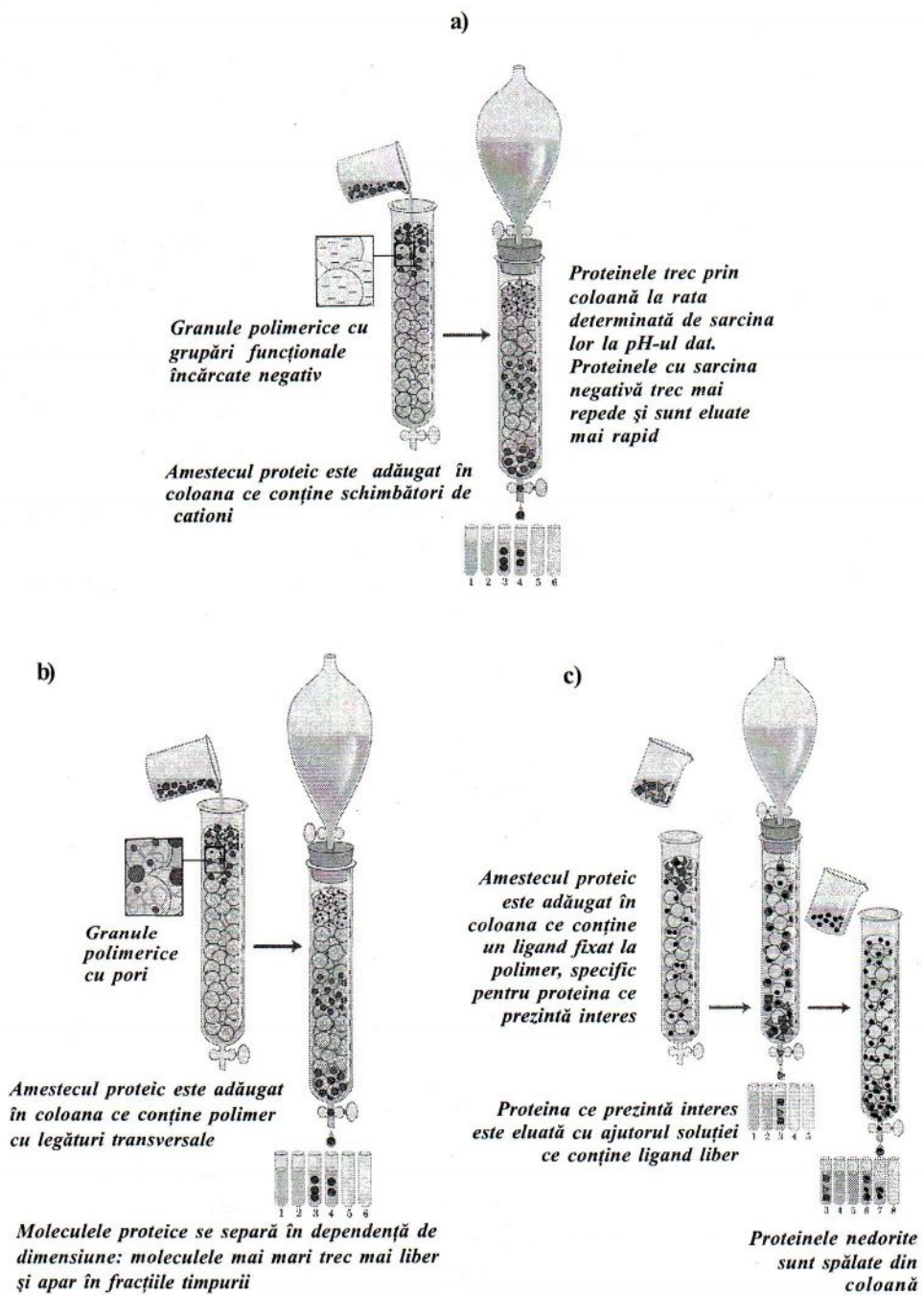


Figura 1.15. Metode cromatografice utilizate pentru purificarea proteinelor:
 a) cromatografia prin schimbători de ioni; b) gel-filtrarea; c) cromatografia de afinitate

rapid decât cele mici (nu pătrund în porii granulelor). Proteinele mai mici intră în pori, sunt reținute, avînd o cale mai lungă de traversat.

c) *Cromatografia de afinitate* separă proteinele în dependență de specificitatea lor de legare. Proteinele reținute în matrice sunt fixate specific de liganzi prin legături transversale (termenul «ligand» se referă la o grupă sau o moleculă care se leagă de macromolecule de tip proteic). După eluarea proteinelor nefixate în coloană, proteina legată de interes particular este eluată prin intermediul unei soluții ce conține ligand liber.

În știința contemporană este pe larg utilizată *metodă electroforezei* (fig 1.16a). Diferite probe sunt introduse în rezervoarele ce conțin gel de poliacrilamidă. Proteinele trec în gel, unde este aplicat un cîmp electric. După cîteva ore de la efectuarea electroforezei, proteinele pot fi vizualizate prin tratarea gelului cu diferiți coloranți (albastru de metilen), care se fixează de proteine, dar nu la gel. Fiecare bandă din gel reprezintă o proteină individuală. Proteinele mai mici migrează mai rapid și sunt depistate mai departe de baza gelului. În fugură este ilustrată purificarea enzimei RNA polimeraza din *E.coli*. Prima bandă corespunde proteinelor prezente în extractul celular nativ.

Necesitățile științifice impun utilizarea electroforezei cu cromatografia verticală sau focalizarea izoelectrică — *electroforeză bidimensională*.

În focalizarea izoelectrică (fig. 1,16 b), tehnica modernă permite separarea proteinelor în dependență de punctul lor izoelectric (tab.1.5).

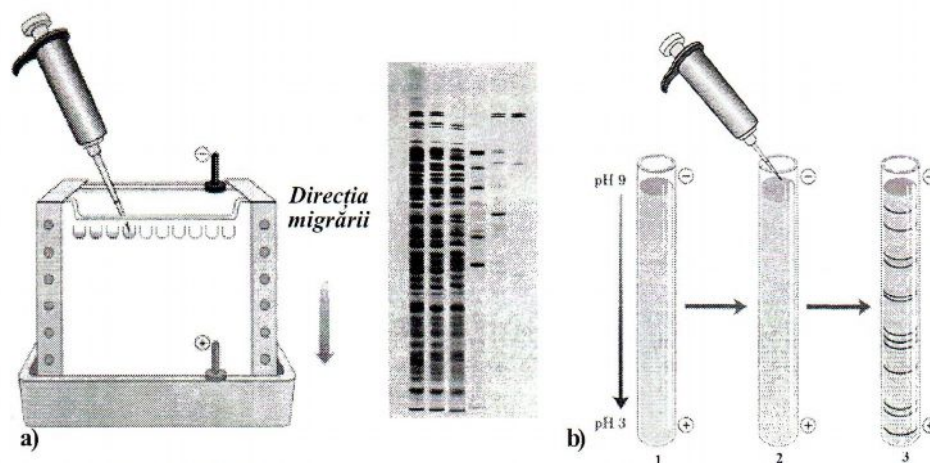


Figura 1.16. Metode utilizate pentru purificarea proteinelor: a) electroforeza, b) focalizarea izoelectrică

Un gradient constant al pH-lui este stabilit în gel prin adausul amfoliților potriviți (1). Amestecul proteic este plasat într-un rezervor în gelul la care se aplică un cîmp electric (2). Proteinele pătrund în gel și migrează pînă ce fiecare atinge pH-ul echivalent pI propriu (3). Amintim că atunci cînd pH este egal cu pI, sarcina netă a proteinei este egală cu zero. În figură sunt arătate proteinele după colorație, care sunt distribuite de-a lungul gradientului pH-lui în dependență de valoarea pI.

În electroforeza bidimensională (fig. 1.16c) proteinele inițial sunt separate prin focalizarea izoelectrică într-un gel cilindric. Apoi gelul este amplasat orizontal pe un alt gel în formă de placă, unde proteinele sunt separate prin electroforeză în gel de

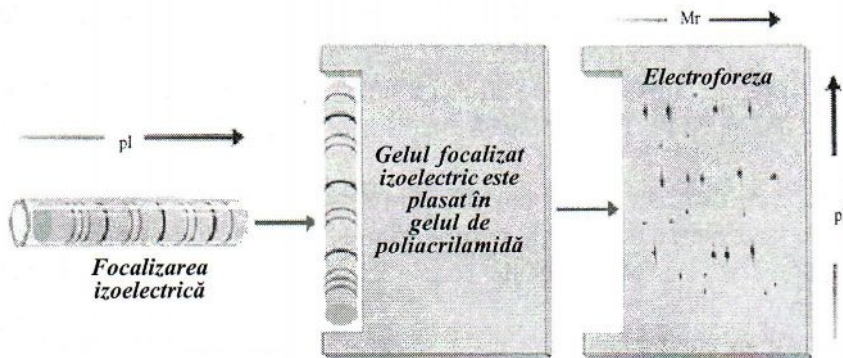


Figura 1.16. c) electroforeză bidimensională

poliacrilamidă. Separarea orizontală reflectă diferențele de pI, iar cea verticală — masa moleculară. Utilizând această tehnică, pot fi separate mai mult de o 1000 de diverse proteine din *E. coli*.

Mobilitatea electroforetică a proteinei în gel de poliacrilamidă poate fi utilizată și în determinarea masei moleculare (fig. 1.17).

Proteinele standarde cu masa moleculară cunoscută sunt supuse electroforezei. Aceste proteine - marker (1.17a) pot fi utilizate pentru a estima masa moleculară a proteinelor necunoscute.

În (1.17b) este redată dependența logaritmului masei moleculare a proteinelor marker versus migrației relative la o electroforeză liniară. Graficul respectiv permite determinarea masei moleculare a proteinei necunoscute. La moment sunt cunoscute metode mult mai sofisticate de purificare și apreciere structurală a proteinelor.

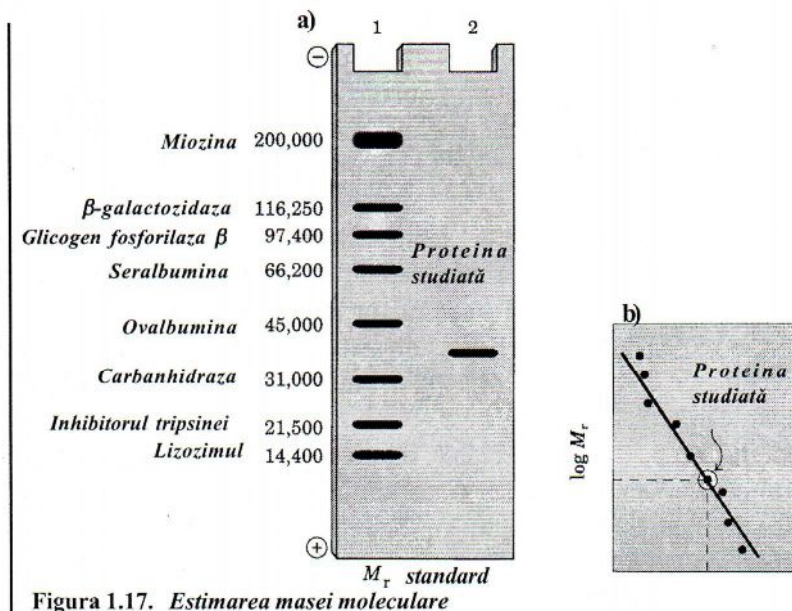


Figura 1.17. Estimarea masei moleculare

ENZIMELE

Istoria biochimiei este, în primul rând, istoria studierii enzimelor — celor mai distinctive și specifice proteine cu proprietăți catalitice.

Enzimologia e demult considerată o știință aparte și s-a dezvoltat efectiv în ultima perioadă de timp, dar începuturile ei se atestă din primele decenii ale secolului al XIX-lea.

Dacă în 1920 erau estimate 10-15 enzime prin observarea efectului acțiunii lor, astăzi sunt caracterizate parțial peste 2000 enzime, dintre care circa 500 au fost obținute sub forma unor preparate perfect purificate (unele cristaline) și studiate din punct de vedere fizico-chimic și biologic.

Manifestările acțiunii enzimelor (fermentația, digestia) erau cunoscute de foarte mult timp, dar explicația mecanismului acestor procese complexe, rolul și locul enzimelor în transformările substanțelor celulare rămâneau neelucidate. Un șir de mecanisme sunt și pînă astăzi nedefinite.

Definiția enzimei s-a conturat atunci cînd s-a observat că în sistemele biologice au loc procese catalitice survenite din extractele de orz germinal ce realizează hidroliza amidonului. Cu ajutorul precipitării repetate cu alcool etilic s-a obținut (1833) o pulbere albă — extrem de termolabilă — diastaza (din grecește *didotabis* - separare).

În perioada 1834-1837 savantul suedez J.Berzelius formulează conceptul de cataliză, conform căruia un catalizator mărește viteza reacțiilor chimice și rezultă la sfîrșitul lor nemodificat — cantitativ și calitativ. El sugerează că diferitele fenomene biologice (fermentația, digestia) pot fi explicate prin prezența unor catalizatori biologici specifici materiei vii. În 1860, L.Pasteur stabilește că fermentarea zahărului de drojdii în spirt e catalizată de “fermenți organizați indispensabil de organismele implicate în procesele fermentative”.

Această concluzie era în contradicție cu postulatul lui J.Liebig, care considera că fermentul e solubil, fiind produs de celula vie și nu constituie celula propriu-zisă.

În anul 1877, W.Kuhne propune termenul **enzimă** (de la grecescul *enzyme* — “în drojdii”) pentru atare grupă de substanțe. O fierbere aparentă cauzată de “ferment” (în latină *fervere* — a fierbe), cu degajarea CO₂ în procesul fermentativ, caracterizează aceste fenomene biologice.

Celebra dispută științifică Pasteur — Liebig a fost finalizată cu brio în 1897, de către H. și E.Buchner, care au demonstrat că sucii celulari ai unei culturi de drojdii conservează întreaga activitate fermentativă, proprie acestui microorganism.

În ultimii ani ai sec.XIX, E.Fischer, efectuînd studii asupra unor enzime hidrolitice, a specificității enzimelor, elaborează teoria interacțiunii enzimă-substrat. Această teorie a stimulat cercetările în acest domeniu.

Epoca modernă începe o dată cu izolarea, purificarea și cristalizarea primelor enzime. În 1926, J. Sumner a cristalizat ureaza și a determinat că enzimele totalmente sunt de natură proteică. El înaintează conceptul că toate enzimele sunt proteine, dar savantul german Richard Willstätter, o adevărată somitate în materie, confirmă că enzimele sunt substanțe cu o greutate moleculară mică, iar proteina depistată e o simplă murdărie.

Mai târziu, J. Northrop, împreună cu colaboratorii săi, cristalizează *pepsina* și *tripsina*, confirmând astfel că și ele sunt proteine. Așadar, natura proteică e stabilită incontestabil. S-au început studii intensive în acest domeniu, ce au dat rezultate remarcabile. Cu toate acestea, o serie de întrebări, cum ar fi: de ce proteinele joacă rol de catalizatori; care este cauza că molecula enzimei e mult mai mare decât a substratului; de ce aminoacizii nu posedă proprietăți similare, dar unite în lanț polipeptidic capătă proprietăți catalitice; în ce mod are loc reglarea activității enzimelor — toate așteaptă răspunsuri explicite.

Ce sunt enzimele?

Enzimele sunt unități funcționale ale metabolismului celular. Acționează strict într-o anumită consecutivitate. Catalizează sute de reacții în lanț, finalizând cu eliberarea moleculelor din substanțe nutritive. Energia substanțelor reagente trece dintr-o formă în alta cu o eficacitate mare și se acumulează în ATP ce este utilizat în procesele vitale. Din micile biomolecule se assemblează macromoleculele celulei.

O grupă deosebită sunt *enzimele reglatoare*, care sesizează diferite semnale perfect metabolice și, respectiv, își modifică activitatea catalitică. Datorită acestor enzime în celulă totul e coordonat: e garantat un echilibru armonios dintre procesele metabolice necesare pentru menținerea integrității și, în final, a vieții celulelor, viabilității sistemului și al întregului organism.

Insuficiența sau lipsa completă a unuia sau a mai multor fermenți duce la apariția diferitelor afecțiuni ereditare; diferite stări patologice apar la o activitate excesivă a uneia sau a mai multor enzime. Și o dată cu elaborarea unui preparat medicamentos care ar regla activitatea acestor enzime, vom trata eficient boala.

Enzimele joacă un rol important la stabilirea diagnosticului, determinând activitatea lor în lichidul biologic. În industria chimică și alimentară evaluarea enzimelor este utilizată pe larg. Enzimele au un rol aparte și în agricultură.

Structura enzimelor

Enzimele sunt proteine și posedă toate proprietățile fizico-chimice specifice acestor macromolecule (solubilitate, proprietăți osmotice, sarcină electrică netă, denaturare termică, reacții chimice etc.). Activitatea lor e dependentă de păstrarea structurii native a proteinei. Confirmările experimentale ale acestui postulat sunt:

1. Distrugerea lanțului polipeptidic prin fierbere în soluții acide sau prelucrarea lui cu tripsină duce la pierderea activității catalitice. Pentru menținerea ultimei e necesară păstrarea structurii primare.

2. Modificările în împachetarea lanțului polipeptidic (încălzind proteina sau acționând cu pH de valori extreme, cu agenți denaturanți) cauzează pierderea activității catalitice, ceea ce indică necesitatea menținerii structurii secundare și terțiare a proteinei.

Masele moleculare ale enzimelor variază în limite foarte largi. *Ribonucleaza* are o masă moleculară egală cu 13700Da. Limita superioară este greu de definit. Numeroase enzime sunt alcătuite numai din resturi de aminoacizi unite între ele prin legături covalente, peptidice și nu doar printr-un lanț, ci prin mai multe lanțuri polipeptidice.

Unele enzime sunt asociate cu compuși de mase moleculare mici, dializabili. Când acești compuși organici sunt strâns legați în structura enzimei, ei poartă denumirea de *grupări prostetice*, însă când îmbinarea lor este ușor dissociabilă — *coenzime*.

Acești biocatalizatori se numesc *holoenzime*, iar componenta proteică — *apoenzime*. Pentru totalitatea compușilor neproteici din structura heteroenzimelor se utilizează termenul *cofactor*. În calitate de cofactori apar frecvent cationii unor metale și foarte rar unii anioni. Un număr relativ redus de cofactori, de coenzime în asociere cu diferite apoenzime dau naștere unui număr foarte mare de *heteroenzime*. Se atestă sute de dehidrogenaze cu coenzima NAD^+ . Datorită legăturilor foarte slabe între NAD^+ și diverse apoenzime, un număr mare pot acționa simultan într-un compartiment celular, utilizând o cantitate neînsemnată de coenzime. Și în aceste situații este absolut necesar ca procesele de reducere să fie echilibrate cu reoxidarea lor.

Ce e comun și ce e distinct la cataliza enzimatică și cea chimică?

Enzimele sunt catalizatori și respectă legile catalizei:

1. Enzimele accelerează viteza reacțiilor chimice posibile din punct de vedere termodinamic, determinând o scădere a energiei de activare și conducând la instaurarea mai rapidă a stării de echilibru; accelerează reacțiile în ambele direcții în mod identic $\text{A} \rightleftharpoons \text{B}$.

În lipsa enzimei viteza ($\text{A} \rightarrow \text{B}$) e egală, de exemplu, cu 10^{-4} sec., reacția inversă ($\text{A} \leftarrow \text{B}$) decurge în 10^{-6} sec.

Constanta acestei reacții este egală:

$$C = \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} \times \frac{C_d}{C_i} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

În stare de echilibru concentrația substanței B este de 100 ori mai mare decât a substanței A, chiar dacă e prezentă sau nu enzima. În lipsa enzimei echilibrul se stabilește timp de câteva ore, iar cu enzima — în câteva secunde. Enzimele accelerează apariția echilibrului chimic în reacția catalizată.

2. Viteza reacției crește de milioane de ori. De exemplu, reacția catalizată de carbanhidrază: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$

Fiecare moleculă de enzimă hidratează în 1 sec. - 10^5 molecule de CO_2 și, prin urmare, viteza reacției în prezența enzimei crește de 10^7 ori.

Efectul enzimelor e extraordinar în comparație cu cel al catalizatorilor sintetici. Enzimele se prezintă în concentrații extrem de mici la concentrații de substrat relativ mari. Eficiența catalitică a enzimei este net superioară celei înregistrate în cazul catalizei chimice, exprimându-se prin *numărul de turnover* — numărul de molecule ale substratului transformat într-un minut de o moleculă de enzimă.

3. La sfârșitul reacțiilor chimice enzimele, la fel ca și catalizatorii, se regăsesc, din punct de vedere cantitativ și calitativ, într-o stare chimică neschimbată, participând la un nou act catalitic.

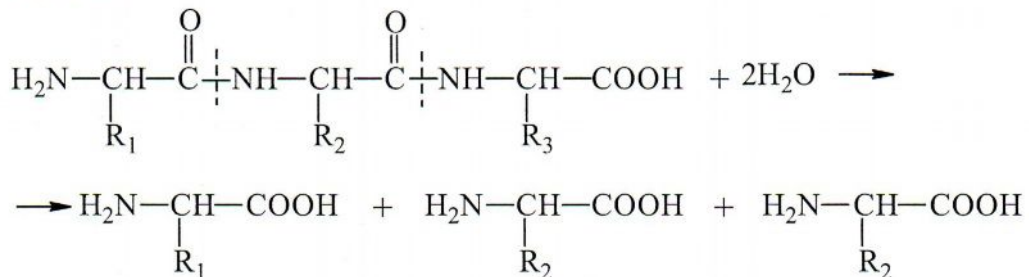
4. Enzimele sunt substanțe macromoleculare extrem de instabile, reacționând în condiții optime numai la anumiți parametri - parametri optimi de acțiune a enzimei — soluții apoase diluate, pH valorii fiziologice, T anumită și presiune adecvată.

SPECIFICITATEA ENZIMELOR

Cea mai importantă prioritate a enzimelor e înalta lor specificitate de acțiune - atribut fundamental ce determină succesiunea reacțiilor care favorizează calea metabolică.

Multitudinea formelor de manifestare a specificității poate fi încadrată în 2 categorii - cea de reacție și de substrat.

1. Specificitatea de reacție este proprietatea de a cataliza un anumit tip de reacție ce stă la baza clasificării enzimelor. Enzimele proteolitice catalizează hidroliza legăturilor peptidice:

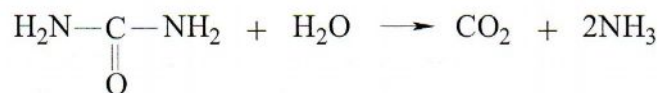


Multe enzime catalizează și hidrolizează legăturile esterice, reacția fiind asemănătoare.



Unele enzime au 2 zone distincte în structura lor proteică, fiecare responsabilă pentru un anumit tip de reacție specifică.

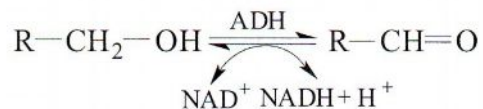
2. O enzimă cu o anumită particularitate de reacție poate asigura transformarea corespunzătoare a unui grup de substanțe înrudite chimic — **specificitate relativă**, sau reacția se resfrînge asupra unui substrat — **specificitate absolută**. Drept exemplu de specificitate absolută pot servi anhidraza carbonică, ureaza, ultima reprezentînd o enzimă ce catalizează următoarea reacție :



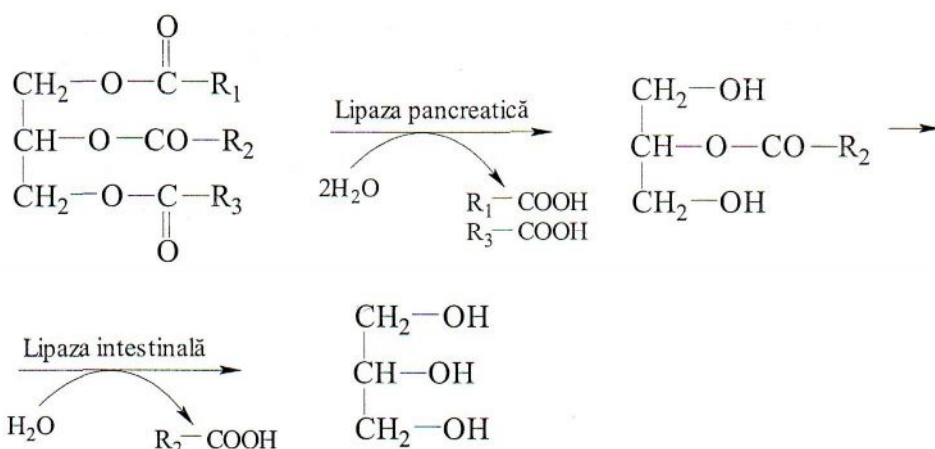
Specificitatea relativă se manifestă în diferite ipostaze:

a) posedă o arie largă, față de numărul substraturilor (proteazele în funcție de resturi de aminoacizi: chimotripsina — legătura peptidică, formată de COOH a Phe, Tyr, Trp; tripsina - de COOH ai Lys și Arg; trombina — de COOH ai Arg și NH₂ ai Gly);

b) formează o arie mai îngustă: alcool dehidrogenaza — dehidrogenază un grup de alcooli monohidroxilici cu un număr mic de atomi de C (specificitatea de grup), adică se manifestă prin gruparea chimică:



c) în lipazele digestive specificitatea corelează cu poziția legăturii esterice între glicerină și acizii grași:

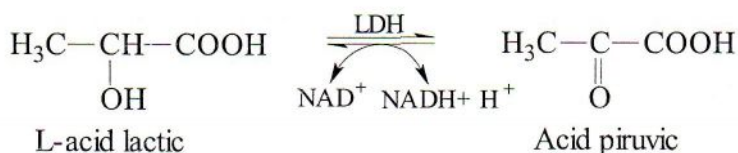


Stereospecificitatea de substrat și de reacție

Majoritatea biomoleculelor posedă un atom de C asimetric și, fiind chirali, pot exista sub forma celor 2 enantiomeri. O enzimă atacă numai un izomer — *stereospecificitate*:

a) în toate reacțiile glicolitice enzima corespunzătoare acționează asupra esterilor fosforici ai D-hexozelor și D-triozozelor; se utilizează numai L-aminoacizii; în aceste cazuri substratul optic activ se transformă în produs care poate fi sau nu optic;

b) când substratul este inactiv optic, dar este produsul optic al reacției, se consideră că reacția este o "sinteză asimetrică". Aceeași situație se observă și în activitatea fumarazei, SDH, LDH:



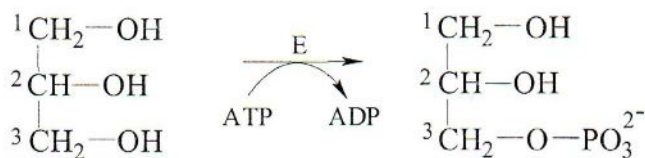
c) enzimele catalizează transformările doar a unui singur izomer - cis sau trans;

d) pentru a utiliza ambii antipozii optici, organismul dispune de racemaze (*epimeraze*), care transformă un izomer în altul:

D - alanină → L - alanină

Utilizându-se substraturi marcate cu izotopi radioactivi, s-a constatat că unele enzime sunt capabile să diferențieze două grupe chimice identice.

Glicerol kinaza fosforilează asimetric glicerolul, esterificând aceeași grupă de alcool primar:



Enzimelor le sunt proprii manifestări absolut specifice, anumite substraturi. Ele accelerează diverse reacții chimice, fără formarea produselor auxiliare. Moleculele substratului trebuie să posede anumite particularități structurale de bază:

- a) substratul conține o legătură chimică specifică pe care enzima o scindează;
- b) substratul trebuie să posede o anumită grupă funcțională, grupa de legătură, care jonționează cu enzima și orientează moleculele substratului în centrul activ. Cu alte cuvinte, legătura chimică a substratului trebuie să ocupe o poziție adecvată față de grupa catalitică a enzimei.

Ce mecanism de accelerare a vitezei reacției chimice posedă enzimele?

Pentru a pătrunde acest mecanism, e necesară conștientizarea unor noțiuni ca: energia de activare exprimată în calorii, energie necesară tuturor moleculelor unui mol de substanță, care la o anumită temperatură să atingă starea de tranziție corespunzătoare apexului barierei energetice. Factorul ce asigură desfășurarea reacțiilor în organismele vii la $T^{\circ}C$ internă constantă este delimitarea la valori minime a energiei de activare. Viteza reacțiilor e dependentă de diferența valorilor de energie liberă (ΔG) pentru starea A (s) și complexul de tranziție. Ea este egală cu: $\Delta G = G_{st} - G_s$. Se mai numește energie liberă de activare — Gibbs.

Viteza reacțiilor e proporțională cu numărul de molecule, a căror energie liberă este egală sau mai mare decât ΔG . O dată cu creșterea T, numărul moleculelor sporește de 2 ori la $10^{\circ}C$. Enzimele accelerează viteza reacțiilor chimice (VRC), micșorând bariera de activare, și reacția decurge după alt mecanism, ce se caracterizează printr-o energie de tranziție mult mai mică (fig.1.15).

Formarea și scindarea legăturii chimice de enzimă e precedată de formarea complexului enzimă-substrat [CES]. Substratul e fixat de o zonă restrînsă în enzimă, specifică, denumită "centrul activ" al enzimei. Așadar, **centrul activ (CA)** e o îmbinare în timp și spațiu a anumitelor grupe funcționale, ce intră în legătură cu moleculele substratului și determină activitatea catalitică a enzimei.

Disponem de numeroase investigații experimentale ce vizează formarea complexului enzimă-substrat (CES):

1. Investigații demonstrative prin intermediul microscopiei electronice și al analizei roentgenostructurale.

2. Formarea CES e însoțită de modificările fizice ale enzimelor: solubilitate, termolabilitate.

3. Se modifică și caracteristica spectroscopică, dacă în componența enzimei intră grupe prostetice colorante.

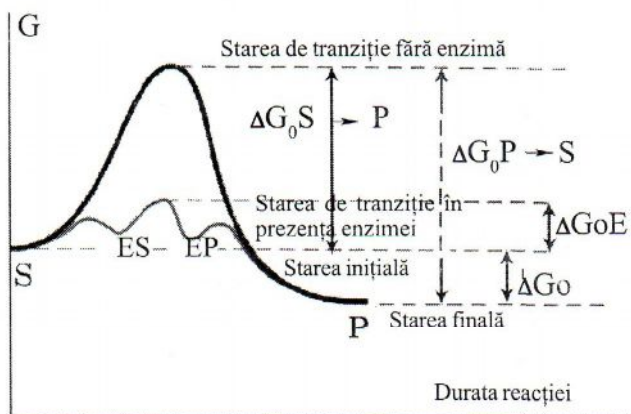


Figura 1.15. Diagrama ce reprezintă energia liberă de activare în reacțiile chimice: S-substrat A; P-produs final B; ES și EP- compuși intermediari, ΔG_0 - energia de reacție standard $S \rightarrow P$

4. Adecvată e și metoda rezonanței electronice de spin (RES) sau rezonanța magnetică nucleară (RMN).

5. La formarea CES se manifestă un grad mare de stereospecificitate (D-aminoacizii nu pot servi ca substraturi, nu se leagă cu enzima). Zona de legătură are o formă geometrică bine conturată (fig. 1.16).

6. Uneori afinitatea mare a enzimei cu substratul A (în lipsa B) înlesnește stabilirea complexului EA.

7. La concentrația constantă a enzimei viteza reacției sporește o dată cu mărirea concentrației de substrat, ajungând la viteza maximă.

În 1913, L. Michaelis a explicat noțiunea de viteză maximă a reacției fermentative față de formarea CES. Concluzia că viteza reacției devine maximă la concentrația mare a substratului, în condițiile în care acesta ocupă toate centrele active ale enzimei, e o argumentare înrădăcinată demult și o dovadă concludentă a funcționării complexului enzimă-substrat.

Unele particularități ale centrului activ (CA)

Centrul activ este alcătuit dintr-un “centru de legare” și un “centru catalitic”. Mai exact, în centrul activ unele grupări (sau resturi ale aminoacizilor) sunt implicate în legarea substratului, altele asigură cataliza propriu-zisă, fiind “intercalate” ca grupe catalitice.

Enzimele conferă o varietate structurală destul de mare, la fel de vaste sunt specificitatea și mecanismul acțiunii catalitice. Și, totuși, rezultă unele concluzii generale, referitoare la proprietățile lor:

1. CA ocupă o parte relativ mică din volumul enzimei și majoritatea din restul aminoacizilor moleculei de enzimă nu contactează cu substratul. E o enigmă solicitarea unor dimensiuni atât de mari de către enzime.

2. CA e o structură tridimensională (nu e doar punct, linie sau plan) — structură complexă, la formarea căreia participă grupe ale diferitelor resturi de aminoacizi (exemplu: în structura lizozimului, din cei 129 de aminoacizi radicalii aminoacizilor din secvența liniară — 35,52,62,63,101 participă la formarea CA). Centrele active ale unor enzime sunt redată în figurile 1.17-1.18.

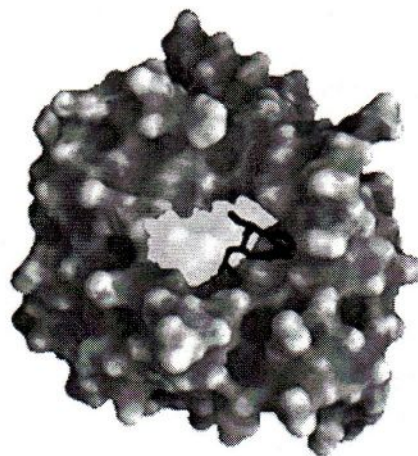


Figura 1.16. Fixarea substratului în centrul activ al chimotripsinei

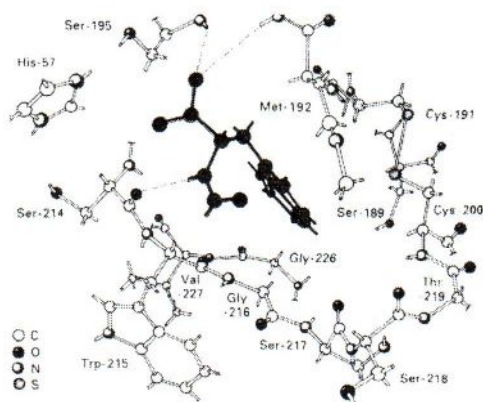


Figura 1.17. Centrul activ al chimotripsinei

3. Substratul relativ slab se leagă cu enzima. Energia liberă a interacțiunii e de 3-12 kcal/mol. Forța legăturilor covalente nu deviază de la limitele 50-110 kcal/mol.

4. CA are formă de “adâncitură” sau “cavitate” (șanț, despicătură), unde apa n-are acces, cu excepția dacă aceasta servește drept reagent al reacției. Această cavitate conține câțiva aminoacizi polari ce exercită legarea și cataliza. Regiunea CA are un caracter nepolar ce favorizează fixarea substratului. De menționat că forma CA creează un microspațiu, în care resturile polare capătă însușiri deosebite, necesare pentru cataliză.

5. Fixarea specifică e dependentă de poziția bine determinată a atomilor în CA. Substratul pătrunde în CA, cu condiția similitudinii de formă. În 1890, Emil Fischer a elaborat modelul “clasic” al structurii spațiale a CA în raport cu structura substratului. Anume acest principiu — “lacăt - cheie” — a contribuit cu succes la evoluția conceptului catalizei stereospecifice (fig.1.19).

În ultimii ani însă s-a constatat că centrul activ nu e o structură rigidă cum presupunea E.Fischer, ci se modifică la fixarea substratului. *Modelul dinamic*, propus de D. Koshland, presupune o flexibilitate a zonei de cazare a CA în enzima liberă. CA este preformat, ceea ce denotă că are o conformație spațială puțin diferită de cea necesară fixării substratului. Substratul induce o “modificare conformațională” a zonei CA, realizînd o configurație optimă fixării (fig.1.19a).

Unele enzime fixează substratul în forma lor tensionată, ce corespunde stării de tranziție.

Din punct de vedere termodinamic, situarea cea mai potrivită a substratului în raport cu enzima reduce la minim gradele de libertate ale translării și rotației substratului, îi micșorează entropia, ceea ce favorizează obținerea efectivă a stării de tranziție și motivează în mare parte scăderea energiei de activare a reacției catalizate enzimatic.

E incontestabil faptul că flexibilitatea structurii enzimei determină prezența substratului în sfera de acțiune a grupelor catalitice și ieșirea produsului din acest sistem.

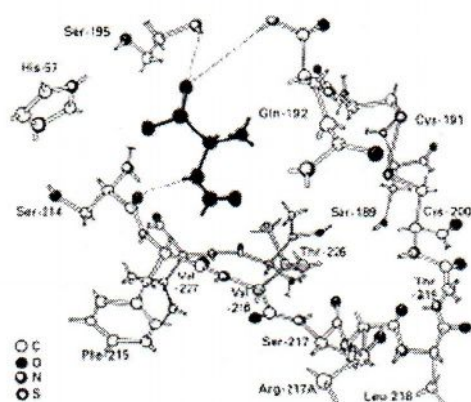


Figura 1.18. Centrul activ al elastazei

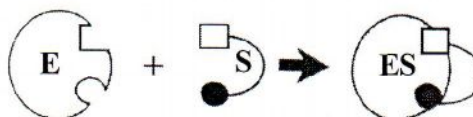


Figura 1.19. Formarea complexului enzimă-substrat (ES) după modelul E.Fischer

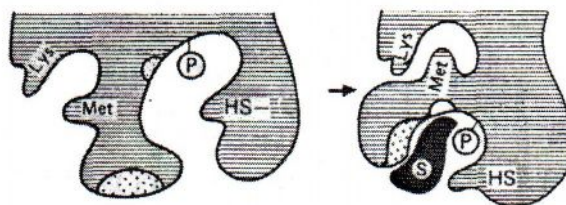


Figura 1.19a. Modificările conformaționale în molecula enzimei la fixarea substratului (modelul D.Koshland)

Unele enzime induc o perturbație a electronilor pe substrat, amplificând cu mult viteza catalizei (carboxipeptidază).

Există o varietate mare de *factori ce influențează viteza reacțiilor fermentative și determină activitatea catalitică a enzimelor*:

1. *Concentrația fermentului:*

a) în condiții standard, 2 molecule de enzime într-o anumită perioadă de timp vor cataliza de 2 ori mai multe molecule de substrat decât o moleculă de enzimă $V = R[E]$ — o relație strict proporțională. La mărirea concentrației de enzimă se observă devieri de la relațiile strict liniare — devieri imaginare ce țin de metoda de studiu;

b) în prezența mai multor enzime, viteza va fi limitată de concentrația uneia dintre ele;

c) o dată cu sporirea concentrației enzimei, viteza unei reacții complexe se va micșora în cazul în care coenzima practic va fi legată de o enzimă inaccesibilă pentru celelalte;

d) adaosurile toxice pot fixa enzima. Numai după legarea lor, enzima va deveni aptă pentru activitate.

2. *Concentrația substratului.* Concentrația enzimei din țesuturi suportă variații mici în timp (cu excepția enzimelor “inductibile”), astfel încât ea poate fi considerată constantă.

În schimb, concentrația substratului poate varia destul de mult conform stării metabolice a țesutului. Dependența vitezei reacțiilor de concentrația substratului constituie aspectul cel mai important al cineticii enzimatică (fig. 1.20).

Reprezentarea grafică reflectă o curbă cu afinități de hiperbolă. Explicarea ei se datorează lui L. Michaelis și M. Menten. K_M este egală cu concentrația substratului pentru care V_o prezintă o jumătate din V_{max} . Exprimarea K_M se face în unități de concentrație și se deduce din presupunerea de bază precum că factorul-limită al vitezei reacțiilor fermentative este scindarea complexului ES în produs și enzimă. Fiecare enzimă în parte are valoarea K_M pentru substratul dat. Unele enzime (catalaza, carbanhidraza) cer cantități relativ mari de substrat pentru a atinge viteza egală cu V_o ; altele (hexokinaza) ating mărimea dată la concentrații mici de substrat.

În condițiile de mediu al celulei, enzima nu-i saturată cu substrat și nu funcționează cu V_{max} . Modificând concentrația substratului, e posibilă, în anumită măsură, reglarea proceselor oxidative din celulă.

3. *pH optim* al fiecărei enzime, ce generează o acțiune maximă a ei, nu coincide obligatoriu cu valorile pH caracteristice mediului intracelular al enzimei.

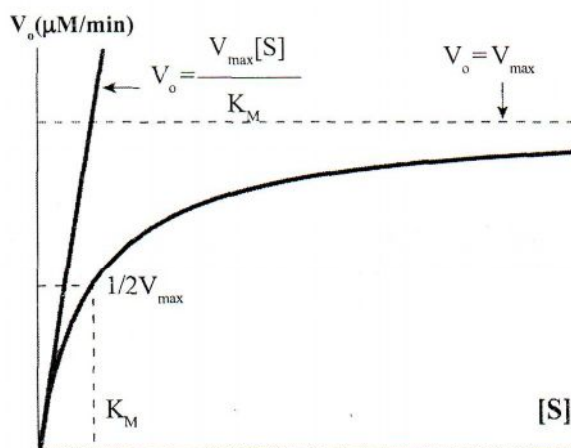


Figura 1.20. Variațiile vitezei reacțiilor enzimatică în funcție de concentrația substratului

Ecuția lui Michaelis-Menten.

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Mărind sau micșorînd pH-ul mediului, se poate regla activitatea catalitică a enzimelor. Acest optim pH e dependent de gradul de ionizare a grupelor funcționale, al afinității enzimei cu substratul și stabilității ei (fig.1.21).

Ionii H^+ și OH^- au un efect denaturant asupra enzimelor — rup legăturile, ce determină structura terțiară. Dacă în CA al enzimelor se află grupări ionizabile, acide sau bazice, acestea interacționează direct cu ionii H^+ și OH^- , rezultînd creșterea sau scăderea gradului lor de disociere și acționînd ca adevărați inhibitori ai enzimelor (amilaza în sucul gastric).

4. *Influența temperaturii (T)* determină stabilitatea și viteza de scindare a complexului ES, influențînd afinitatea enzimei la substratul activator sau inhibitor. Creșterea vitezei reacției o dată cu creșterea temperaturii este interpretată prin prisma “energiei de activare”. Pentru fiecare enzimă se poate stabili o temperatură optimă, viteza atingînd valoarea maximă. Creșterea temperaturii cu $10^{\circ}C$ pînă la $40^{\circ}C$ dublează în continuare viteza reacției. Viteza scade din cauza distrucției enzimei, iar temperatura inactivației enzimei coincide cu punctul de denaturare a proteinei (fig.1.22).

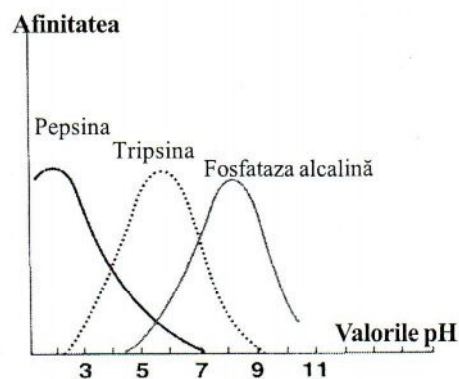


Figura 1.21. Activitatea unor enzime în dependență de pH

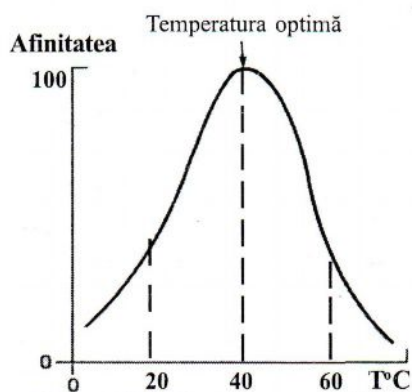


Figura 1.22. Efectul temperaturii asupra activității enzimelor