

BIOSINTEZA PROTEINELOR

Mecanismul biosintezei proteinelor, cu diversitatea activității biologice, s-a impus drept problemă dintre cele mai dificile în istoria biochimiei. Azi, în temei, el este studiat, dar posibil că aceasta e o mică parte din acel întreg, care trebuie cunoscut. Evident, mecanismul biosintezei e unul din cele mai complexe procese în natura vie, implicând conlucrarea a peste 300 macromolecule specifice, reprezentate de proteinezime, diferite tipuri de RNA cu funcții distinctive. Sinteza, cu o complexitate vastă, decurge cu o viteză rapidă: pentru sinteza lanțului polipeptidic din 100 resturi de aminoacizi ribozomului *E. coli* îi sunt destule 5 secunde.

Sinteza în fiecare celulă conlucrează cu metabolismul. Procesul de biosinteză presupune traducerea limbajului de 4 litere al acizilor nucleici în limbaj de 20 de litere (aminoacizi) al proteinelor.

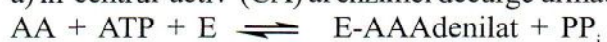
Baza cunoștințelor noastre de azi au fost cimentate de trei mari descoperiri ale anilor 50 din secolul precedent:

1. Paul Zamecnik (1950) stabilește că locul sintezei proteice e ribozomul.
2. Paul Zamecnik și Mahlon Hoagland (1957) au demonstrat că activarea aminoacizilor și adiționarea lor la tRNA e catalizată de aminoacil-tRNA-sintetaze.
3. Francis Crick a expus ipoteza transferului mesajului genetic codificat în acizi nucleici cu 4 litere în limbajul celor 20 aminoacizi, concluzionând: tRNA îndeplinește funcția de adaptor — o porțiune racordează aminoacidul specific, iar alta identifică în mRNA o secvență mică de nucleotide ce codifică acest aminoacid.

Biosinteza proteinelor include 5 etape:

1. *Activarea aminoacizilor*: Procesul are loc în citozolul celulei, în care cei 20 aminoacizi adiționează la tRNA prin legătura esterică. Procesul e catalizat de enzime diferite numite aminoacil-tRNA-sintetaze. Ele sunt caracteristice fiecărui aminoacid și tRNA, corespunzător. Activarea are loc în anumite faze:

a) în centrul activ (CA) al enzimei decurge următoarea reacție:

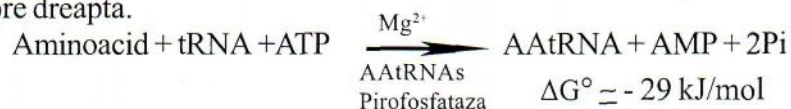


Legarea aminoacidului (COOH) are loc la gruparea 5'-fosfat a AMP din molecula enzimei.

b) Transferul de la E-AAA pe tRNA specific a restului de aminoacid:



Adiționarea aminoacidului are loc la grupele de OH în poziția 2' sau 3' a restului de adenzină în molecula tRNA (legătura e macroergică). Hidroliza ulterioară a pirofosfatului, sub acțiunea pirofosfatazei, face reacția ireversibilă — deplasează echilibrul spre dreapta.



Enzimele sunt foarte specifice — au 4 locusuri care participă la identificare, cataliză, posedînd capacitatea de autocontrol: 1) AA; 2) tRNA; 3) ATP; 4) HOH — ultimul e indicat pentru hidroliza aminoacidului “impotor”. Specificitatea e determinată exclusiv de structura tRNA (1 eroare la 400 resturi de aminoacid).

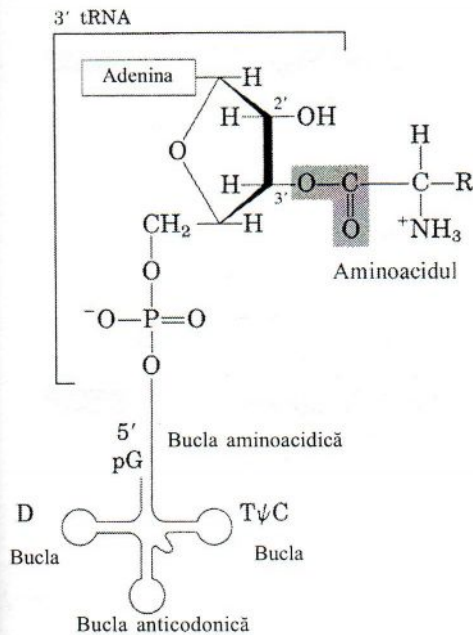
Siguranța procesului de traducere în mare măsură e condiționată de capacitatea de autocontrol a sintetazelor. Activarea necesită ATP și ioni de magneziu.

Deosebim 2 clase de aminoacil - tRNA-sintetaze:

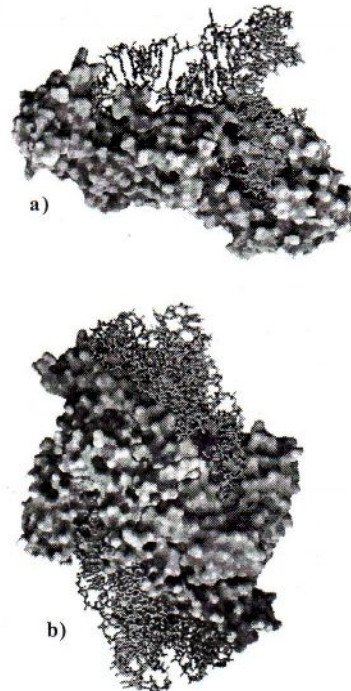
Clasa I - Arg, Cys, Gln, Glu, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr, Val (OH-2' terminal tRNA).

Clasa II - Ala, Asn, Asp, Gly, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr (OH-3' terminal tRNA).

Structura generală a unui aminoacil-tRNAs e redată mai jos. De asemenea sunt ilustrate și conformațiile celor două sintetaze - tip I și tip II.



Structura generală a AA -tRNAs



Aminoacil- tRNA sintetaza.
a) Gln -tRNAs, b) Asp -tRNAs

Sinteza lanțului polipeptidic începe cu capătul N-terminal, la care adăunează ulterior resturile de aminoacizi spre C-terminal. Aminoacidul inițiator la procariote este *N*-formilmetionina, la eucariote - metionina. *N*-formilmetionina se formează în două etape:



Reacția este catalizată de *transformilaza* specifică. Sunt 2 tRNA specifice la met-tRNA^{met} și N-formilmet-tRNA^{f.met}. Prima conduce la includerea metioninei în lanțul polipeptidic, a II - la legătura cu un anumit locus în ribozom.

II. *Formarea complexului de inițiere* decurge în 3 etape (fig. 2.40). Sunt necesare: 1) subunitatea mică a ribozomului; 2) mRNA ce codifică polipeptidul necesar; 3) N-fmet tRNA^{f.met}; 4) 3 proteine-factori de inițiere-IF-1, IF-2, IF-3; 5) GTP.

Etapa 1. Subunitatea mică leagă IF-3 și previne reasociația subunităților ribozomiale. La subunitate adăunează mRNA astfel codonul de inițiere AUG se fixează într-un loc

specific al subunității. Fixarea lui corectă e determinată de un fragment al mRNA aranjat la cap 5' terminal adiacent codonului AUG (compus din 6-8 resturi de A și G). Acest fragment *Shine-Dalgarno* este perfect complementar cu o succesiune de nucleotide de la cap 3'-OH al rRNA 16 S (fig.2.41). Sensibilitatea ribozomului la semnalul de inițiere modulează viteza traducerii. Semnalul indică locul de fixare a N-fmet-tRNA^{fmet}.

Etapa 2. La complexul format adăunează IF-2 legat de GTP și fmet-tRNA^{fmet}, care se fixează în centrul peptidic (P).

Etapa 3. Complexul interacționează cu subunitatea 50S, implicând simultan hidroliza GTP pînă la GDP și Pi, care se elimină din complex. Părăsesc ribozomul IF-1, IF-2 și IF-3. În consecință, se formează complexul de inițiere, alcătuit din ribozomul 70S, funcțional activ, și mRNA, N-fmet-tRNA^{fmet}.

Fixarea corectă a ultimei e determinată de formarea perechii complementare dintre tripletul anticodon și codonul mRNA cît și de fixarea tRNA de locusul P al ribozomului.

Această etapă la eucariote este mult mai complexă și include o mulțime de factori (fig.2.42).

III. Elongația lanțului polipeptidic

Ea reprezintă un proces repetat. Pentru realizarea lui sunt necesare: complexul menționat deja, următorul AA-tRNA corespunzător tripletului ulterior al mRNA, trei proteine solubile citozolice, factori ai elongației — Tu, Ts, G și GTP.

Procesul decurge în trei faze:

a) Aminoacidul următor activ (AA₂-tRNA) se fixează cu Tu și GTP, formînd complex ce adăunează la complexul de inițiere. Simultan, are loc hidroliza GTP, rezultînd abandonarea complexului Tu-GDP de către ribozom.

Ultimul e reactivat cu GTP și Ts — în Tu-GTP. AA₂-tRNA se fixează de locusul aminoacidic datorită interacțiunii complementare antiparalele între anticodon și codonul

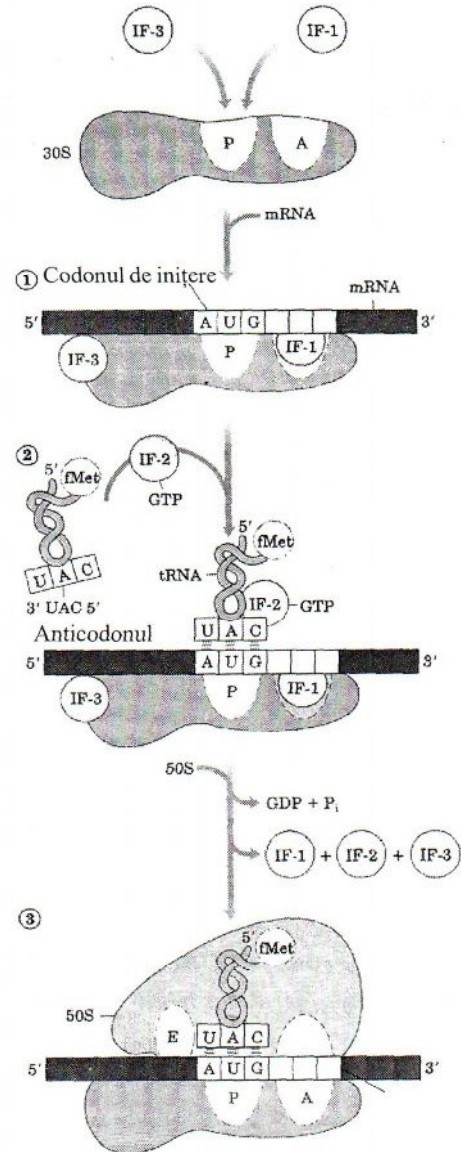


Figura 2.40. Formarea complexului de inițiere

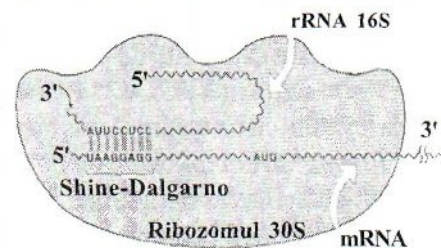


Figura 2.41. Segmentul complementar Shine-Dalgarno

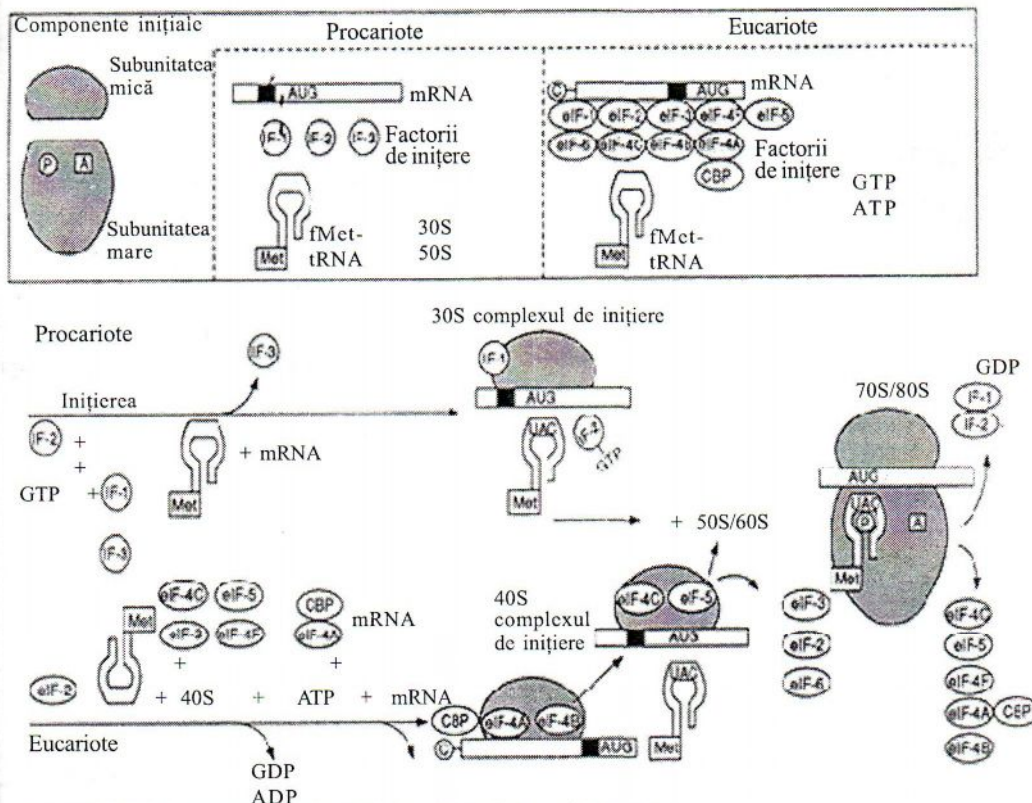


Figura 2.42. Formarea complexului de inițiere la pro- și eucariote

mRNA. Fixarea adecvată e determinată și de interacțiunea în locul A între tRNA și rRNA. S-a stabilit perfect că în bucla T Ψ C se localizează unele fragmente ce formează perechi cu bazele din 16S rRNA - la fixarea anticodonului. În 16S rRNA secvența C-C-A-A este complementară T Ψ C din tRNA (fig.2.10). Legarea se marchează numai după interacțiunea corectă dintre codon și anticodon — efect alosteric al fixării (fig. 2.43).

b) Elongarea continuă prin formarea legăturii peptidice între aminoacizi din locurile P și A. Complexul de inițiere cu N-formilmetionina de la tRNA este propriu-zis transferat pe grupa aminică a noului aminoacid în centrul A. Reacția e catalizată de *peptidil transferază*, ce intră în compoziția subunității 50S și în final se formează dipeptidil-tRNA, iar în centrul P rămîne tRNA liber (fig. 2.44).

c) În faza următoare ribozomul parcurge pe mRNA spre capătul 3' o distanță egală cu un codon, cu transferarea dipeptidului tRNA în centrul P, iar tRNA (hidroliza liberă) abandonează ribozomul și se permută în citozol. În centrul A se află al treilea codon al mRNA. Mișcarea, alunecarea ribozomului se numește *translocare*. Procesul este catalizat de o *translocază* și presupune hidroliza unei molecule de GTP. Procesul e condiționat de existența factorului de elongare. În această fază au loc modificări conformaționale a întregului ribozom. El e gata de următorul ciclu de elongare.

La legarea în lanț sunt antrenate două molecule de GTP (fig. 2.44a).

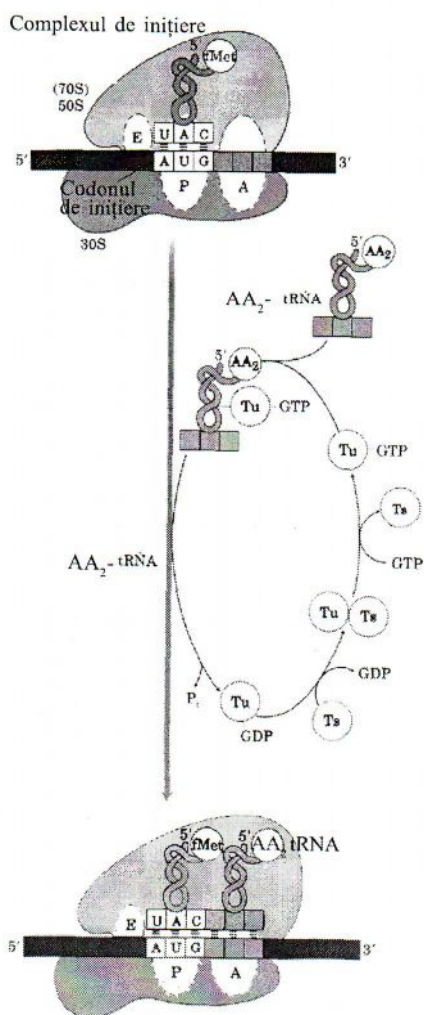


Figura 2.43. Etapa I a elongării

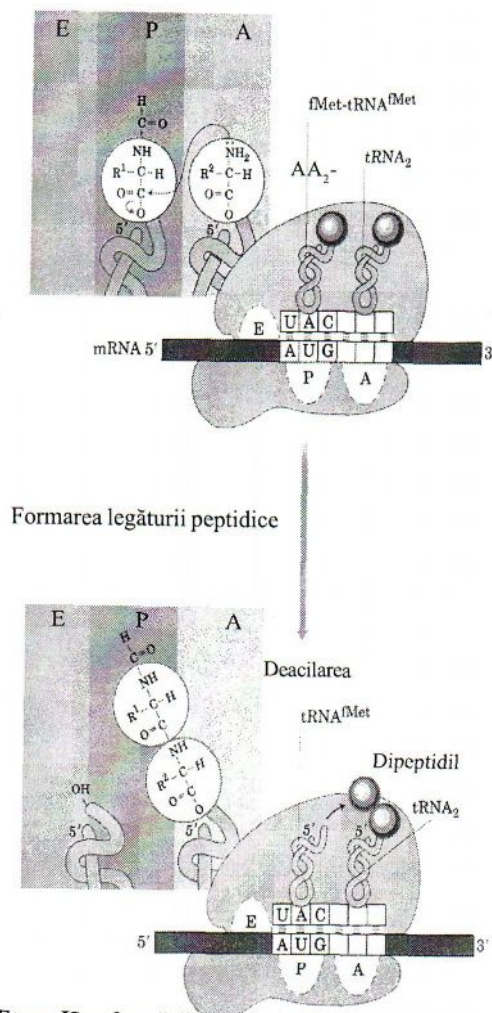
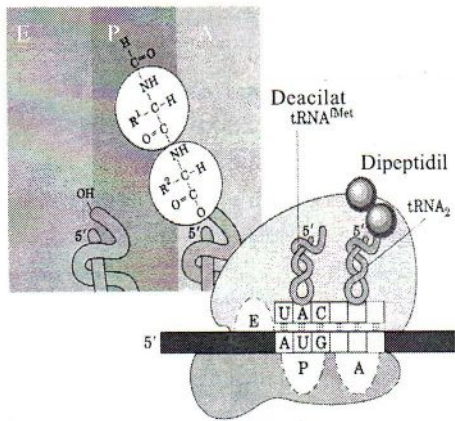


Figura 2.44. Etapa II a elongării, formarea legăturii peptidice

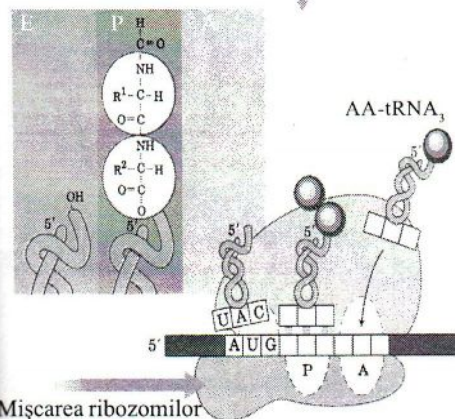
IV. Finalizarea sintezei lanțului polipeptidic (fig. 2.44b). Procesul se oprește atunci când ribozomul întâlnește unul dintre codonii nonsens, ce semnifică finalizarea. În ansamblu, acționează și factorii de finisare — R_1 , R_2 și S care efectuează următoarele operații:

- detașarea hidrolitică a polipeptidului de la tRNA și eliminarea lui (hidrolaza);
- eliminarea tRNA, purtător al ultimului aminoacid din locusul peptidic;
- disocierea ribozomului în subunitățile respective, apte să resintetizeze un alt lanț polipeptidic.

Biosinteza proteinelor cere un consum substanțial de energie — minimum 4 legături macroergice sunt necesare pentru formarea unei legături peptidice, ce asigură ireversibilitatea procesului și stabilitatea lui. Lanțul de mRNA poate reține mai mulți ribozomi împreună, formând *polizomi* ce accelerează considerabil sinteza și eficacitatea matricei (fig. 2.45).

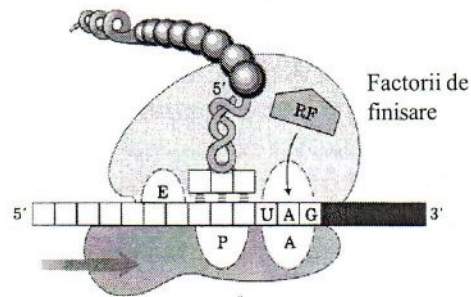


Translocarea
 $\text{EF-G} + \text{GTP} \rightarrow \text{EF-G} + \text{GDP} + \text{H}^+$

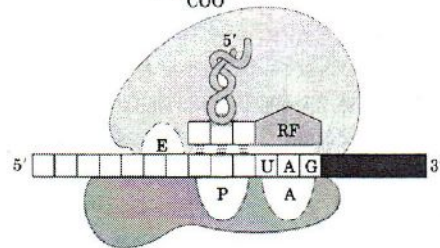


Mișcarea ribozomilor

Figura 2.44a. Etapa III a elongării, translocarea



Hidroliza polipeptidului sintetizat



Disocierea componentelor

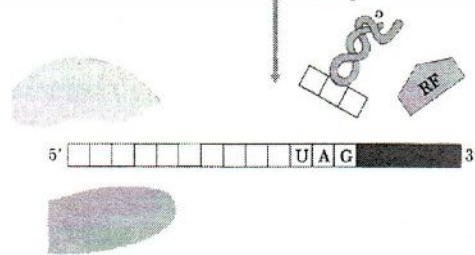


Figura 2.44b. Finalizarea sintezei proteinei

Dacă sinteza proteinei nu e necesară, nucleazele deprimă mRNA.

În procesul de sinteză sau imediat după ea, proteina se autoasamblează, formînd conformația nativă — structura tridimensională. Probabil lanțul polipeptidic sintetizat suferă modificări covalente, numite *modificări posttranzlaționale* (prelucrări posttraducere — faza V), ce constau în:

- 1) modificarea capătului N- și C-terminal, N - mai frecvent se acetilează;
- 2) îndepărtarea secvenței semnalizante cu ajutorul unor peptidaze;
- 3) atașarea unor grupări funcționale — fosfat, biotin, glicozil — pentru formarea fosfoproteinelor, carboxikinazelor, glicoproteinelor etc.;
- 4) clivarea unor oligopeptide (preproinsulina);
- 5) metilarea (lizina în mușchi); iodurarea reziduului de tirozină în tireoglobulină;
- 6) carboxilarea (în protrombină a acidului glutamic);

- 7) formarea punților disulfidice;
- 8) modificarea unor aminoacizi lipsiți de cod (hidroxiprolina, hidroxilizina etc.).

În ce mod proteina sintetizată se localizează în celulă?

La capătul N-terminal se păstrează secvențe specifice- lider — 15-30 de aminoacizi. Ei sunt sintetizați în primul rînd și sunt identificați de locusurile receptoral—specifice de pe suprafața exterioară a reticulului endoplasmatic adiacent sintezei complete. Această porțiune-lider, de obicei, e hidrofobă, liposolubilă, ușor pătrunde prin membrană în interiorul cisternelor reticulului endoplasmatic și trage după sine restul lanțului. Ideea originală îi aparține lui George Palade, laureat al Premiului Nobel, original din Moldova.

În cisterne, o peptidază specifică o clivează. Proteina matură în aparatul Golgi este incapsulată, apoi părăsește celula în forma unei bule secretoare (fig. 2.45a).

În ultima perioadă se postulează două concepții de asamblare a proteinelor în forma nativă, structură unică trispațială: *cotranslațională* și *posttranslațională*. Conform concepției cotranslaționale, proteinele se aranjează spațial în procesul sintezei lanțului polipeptidic în ribozom, iar potrivit concepției

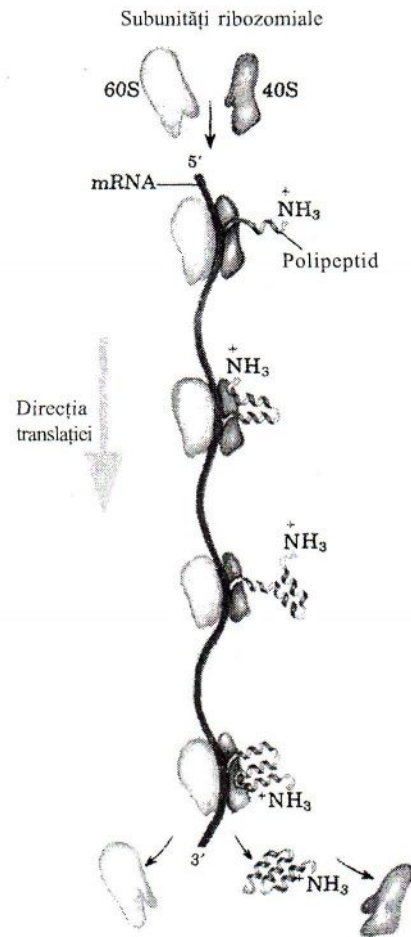


Figura 2.45. Polizomi

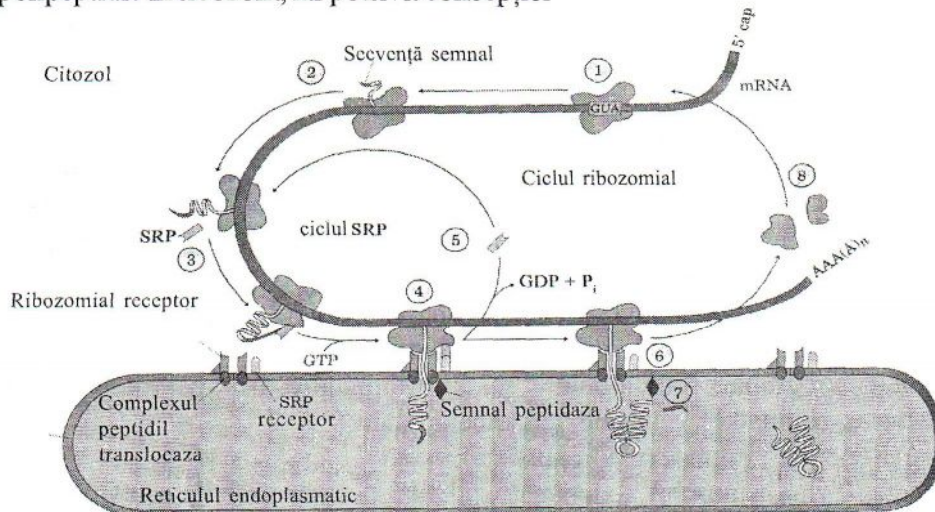


Figura 2.45a. Compartimentalizarea proteinelor în reticulul endoplasmatic

posttranslaționale – forma nativă apare numai în urma eliberării complete a lanțului polipeptidic din ribozom.

Sunt rezultatele unor experimente biochimice in vivo și pe sisteme-model, care confirmă conceptul cotranslațional de asamblare.

De regulă, foldingul proteinelor are loc în compartimentele corespunzătoare ale celulei – mitocondrii, reticulul endoplasmatic, citozol ribozomial. Proteinele penetrează mai multe membrane în calea spre locul de asamblare. Unele se pot asambla alături de membranele corespunzătoare.

În citozol și în plasma organelor celulare, unele proteine se assemblează cu participarea *complexului ciaperonic*.

Azi se pot evidenția trei cazuri de asamblare a proteinelor, în dependență de localizarea acestui proces: lângă ribozom, în apropierea membranei sau cu participarea ciaperonilor.

Asamblarea proteinelor lângă ribozom. Știm că lanțul polipeptidic părăsește ribozomul într-un anumit mod: începînd cu capătul N-terminal și, consecutiv, parcurge, segment după segment, lanțul din centrul polipeptidic — prin canalul ribozomial îngust — spre suprafața ribozomului, cu ieșirea cotraslațională în citoplasmă.

Dacă lanțul polipeptidic nu are secvența-lider, el nu este transportat și se assemblează în citoplasmă lângă ribozom. În ce constau mecanismele de asamblare, ce reprezintă acest model? Asamblarea începe cu momentul translocării primului rest terminal-N al lanțului din ribozom în citozol (de la acest moment au loc modificări conformaționale sub influența forțelor moleculare, ce cauzează asamblarea proteică). În continuare, asamblarea are loc simultan, cu translocarea lanțului, și se finisează după ieșirea ultimului C-rest terminal din ribozom.

- Asamblarea are loc în etape consecutive, analogice cu ciclurile de translație a lanțului din ribozom. Numărul de etape e identic cu fenomenul de translație la sinteza lanțului.

- La fiecare etapă se formează o conformație a capătului N-terminal al lanțului ce iese din ribozom. Aceasta este o structură inițială în formarea conformației unui lanț mai lung în etapa următoare a foldingului (are loc scindarea unor legături moleculare, cu formarea altora).

- Elementele de structură secundară (α – spațial, β – lanț, domeniile) formate în fiecare etapă a foldingului se distrug, se modifică sau pot rămîne nemodificate în etapa următoare.

- Formarea unei conformații a lanțului sintetizat la toate etapele foldingului, precum și a conformației native a proteinei la ultima etapă, durează nu mai mult decît este necesar ribozomului pentru realizarea unui ciclu de elongație. Durata foldingului este egală cu timpul sintezei lanțului polipeptidic de ribozom.

Sunt propuse și cîteva concepții referitoare la mecanismul asamblării *cotranslaționale*:

- a) e determinată de viteza de translație a diferitelor segmente ale lanțului polipeptidic;
- b) e determinată de viteza de translație a diferitelor segmente din mRNA, cauzată de clusterele codoanelor rar întîlnite, cît și de codul degenerat;
- c) altă concepție susține că modificările conformaționale temporare sunt determinate de “codoanele” aminoacizilor inițiatori și terminali pe suprafața α -spiralei.

Cu alte cuvinte: structura secundară, terțiară proteică nu e dependentă de resturile aminoacidice din lanțul polipeptidic.

Asamblarea lângă membrană. Translocația lanțului polipeptidic prin membrană are loc prin canalul respectiv membranal și coincide cu periodicitatea ciclului de elongație ribozomială. Se presupune că procesul de asamblare lângă membrană pe partea opusă a organitelor celulare este analogic cu schema propusă la asamblarea proteinei lângă ribozomi. Se consideră că regiunea suprafeței respective, unde are loc asamblarea lanțului polipeptidic în structura nativă, conține resturi de aminoacizi polari și e foarte hidratată. Acest fapt protejează lanțul de interacțiune cu complexul translocațional proteic.

Schema propusă presupune că asamblarea proteinelor este un proces dinamic de autoorganizare a structurii spațiale a lanțului polipeptidic, ce încontinuu se alungește, în funcție de etapele de timp. În compartimentele celulei îndepărtate de ribozom, lanțurile polipeptidice se vor asambla posttranslațional, adică după finisarea sintezei lor în ribozom (cu excepția acelor proteine care se sintetizează în ribozomii alăturați la membrana reticulului endoplasmatic).

Conform acestei ipoteze, asamblarea cotranslațională a proteinelor indică faptul că asamblarea lanțului în structură nativă are loc simultan cu translocarea lui în locul de asamblare.

Foarte multe aspecte sunt neelucidate. Unele proteine, primar fiind native, pierd structura terțiară rigidă la interacțiunea cu membranele. Asemenea modificări suferă toxinele, diversele proteine de transport. Datele confirmă că membrana poate servi ca factor denaturant în celula vie, cauzat de prezența în membrană a sarcinii negative. Acest potențial electrostatic al suprafeței membranelor manifestă o atracție a proteinelor din soluție, cauzând micșorări locale de pH pe suprafața ei, cu formarea unui gradient de pH în microspațiu. Se consideră că acest fapt, în ansamblu cu micșorarea permeabilității dielectrice a mediului, poate transforma molecula proteică în stare denaturată cu proprietățile caracteristice *globulei în fuziune* — starea a treia termodinamică a moleculei proteice.

Una din caracteristicile moleculei proteice nenative este proprietatea ei majoră de asociere. În procesul de renaturare, proteinele sunt capabile să formeze asociații de intermedie.

Anionii sunt capabili să inducă în proteinele globulare, parțial denaturate, asociații, care se amplifică odată cu diminuarea conținutului de structură secundară.

Se consideră că asocierea proteinelor e o problemă cardinală în biomedicină și biotehnologie, fiind cauza unor astfel de maladii ca: *boala Down, mieloma, cataracta, afecțiunile «prion»*.

În condiții extreme, adaptarea e cauzată de mutațiile la nivelul DNA și al proteinei cu participarea unor grupe prostetice, care pot stabiliza atât starea nativă, cât și intermediarele foldingului. S-a constatat experimental că:

- a) glicozilarea majorează mult stabilizarea și solubilizarea proteinelor;
- b) glicozilarea nu modifică mecanismul foldingului și al asociației proteice;
- c) componenta glucidică, grație capacității solubilizante, protejează partea proteică de agregare termică, manifestând un efect ciaperonic.

În diferite situații extremale, datorită reglării sintezei polioxizii a compușilor, se produc concentrații locale mari ale grupelor glucidice, ce posedă efect de protejare. Asemenea fenomene sunt înregistrate la bacterii, plante și animale mici.

La plantele rezistente la secetă proteinele înviate sunt bogate în lizină, serină, treonină, ce joacă rolul de imitatori ai apei intracelulare, în condiții extremale.

Organismele pot anihila stresul prin neutralizarea acidității anormale sau echilibrarea concentrației mari de săruri, grație concentrației izoosmotice de substanțe corespunzătoare sau a mutațiilor respective. Organismele termofile și barofile sunt capabile de adaptarea celulelor cauzată de împrejurările extremale pe parcursul întregului ciclu vital. La hipertermofile limita creșterii optime este de 80-110°, presiunii hidrostatice — pînă la 120 mPa, pH - de 0-11. Hipertermitele posedă o strategie de protejare puțin cunoscută azi. Foarte puțin se cunoaște și despre degradarea hidrotermală a aminoacizilor. Degradării oxidante sunt supuse cisteina, metionina; dezamidării — asparagina și glutamina.

Ionii, cofactorii, metaboliiți conjugați cu componentele neproteice modifică esențial stabilitatea proteinelor și denaturarea termică, ce poate fi permutată spre limita maximă — pînă la aproximativ 120°C.

Particularitățile biosintezei proteice la eucariote

Procesul biosintezei proteice la eucariote se desfășoară conform unui mecanism similar procariotelor, dar cu unele particularități:

- a) Aminoacidul inițiator nu este N-formilmetionina, ci metionina.
- b) Pe molecula mRNA, la eucariote, există un singur semnal de inițiere, reprezentat de 7-metil-guanozin trifosfat, legată printr-o succesiune de nucleotide metilate de codonul inițiator AUG; deci, mRNA la eucariote este *monocistronic*. Este singura succesiune de nucleotide AUG apropiată de 7-metil-guanosină care servește drept codon de inițiere; aceasta este posibil datorită exigențelor de legare a ribozomului. La procariote mulți mRNA sunt *policistronici*, codificînd sinteza a două sau mai multe proteine. Pe un astfel de mRNA există multiple semnale de inițiere, care vor codifica sinteza a tot atîtea proteine.
- c) Ribozomul eucariot nu «sare» peste codonii terminali ca cel procariot. Și acest fapt pledează pentru caracterul monocistronic al mRNA la eucariote.
- d) Viteza procesului de traducere este mai mare la eucariote; în plus, pentru creșterea eficienței traducerii, mai mulți ribozomi se angajează simultan în citirea mRNA, toți începînd citirea de la capătul 5'.

Asocierea mai multor ribozomi, ce traduc simultan aceeași moleculă de mRNA, se numește *poliribozom* sau *polizom*.

Inhibitorii sintezei proteinelor

Majoritatea toxinelor bacteriene se comportă ca inhibitori ai biosintezei de proteine. Acțiunea specifică a antibioticelor este incontestabilă. Aproape fiecare etapă a sintezei proteinelor e inhibată de un anumit antibiotic și această inhibiție se poate întîlni în orice moment al transferului de mesaj. S-au stabilit următoarele (vezi fig.2.46):

1. Streptomicina produce erori în reproducerea mesajului genetic; interferează în locul de inițiere, cu legarea fmet.-tRNA^{fmet}. De asemenea, neomicina, kanamicina, gentamicina produc erori în reproducerea codului genetic.
2. Mitomicina, acyclovir (aceiași mecanism) împiedică separarea catenelor

complementare ale DNA, acidul nalidixic inhibă DNA helicaza (giraza), actinomicina D se leagă trunic de DNA, împiedică transcrierea.

3. Tetraciclina blochează A situs în ribozom (inițierea).

4. Eritromicina se leagă de subunitatea 50S și inhibă translocarea.

5. Puromicina blochează elongarea, e analogă cu capătul 3'-OH al AA tRNA și formează peptidil puromicină, așa încât nu mai adăunează nici un aminoacid.

6. Toxina difterică inhibă translocaza.

7. Cloramfenicolul inhibă peptidil transferaza.

8. Ciclogeximida inhibă sinteza în ribozom 80S (translocaza).

9. Tunicamicina inhibă atașarea catenelor oligozaharidice. Rifampicina și amanitina — s-au descris mai sus (RNA-polimeraza).

10. Spiramicina previne fixarea în site-ul P ribozomial.

11. Acidul fuzidic sechestrează G-factor și GDP în site-ul GTP-azei.

12. Acidul aurintricarboxilic previne fixarea RNAm în subunitatea 30S ribozomială.

13. Thiostreptonă interacționează cu factorii G și T în site-ul GTP-azei.

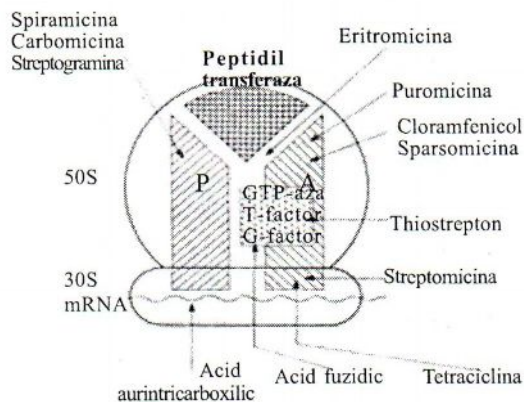
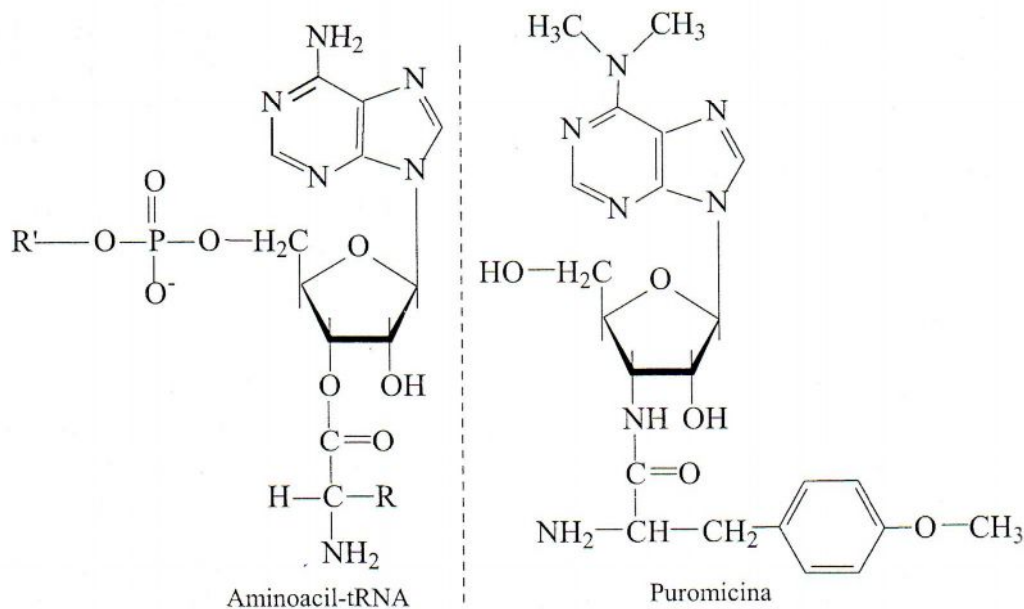


Figura 2.46. Site-urile de acțiune ale antibioticelor



REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Grație procesului de reglare a sintezei, în celule se stabilește un complex adecvat de enzime ce asigură activitatea normală a fenomenelor celulare. Deși fiecare celulă conține un set de genom caracteristic acestui organism, celulele lui exprimă numai o parte din genele structurale. Toate celulele conțin un set de enzime de bază, necesar pentru manifestarea metabolismului. Diferite celule, însă, conțin structuri proprii numai lor și îndeplinesc anumite funcții biologice. Biosinteza diferitelor tipuri de proteine specializate sunt programate strict în timp și consecutivitate, ceea ce permite o adaptare biochimică la acțiunea diversilor factori.

Celulele dispun de trei tipuri de enzime: **1.** enzime inductibile; **2.** enzime represibile; **3.** enzime constitutive. Ultimele se reprezintă în cantitate constantă, indiferent de starea metabolică a organismului (glicoliza). În alte celule reglarea e asigurată de cele inductibile și se sintetizează numai atunci când este necesar, sub influența inductorului. Inductorul poate determina sinteza unui grup de enzime — inducție coordonată, ceea ce permite o adaptare imediată și economă în utilizarea substanțelor nutritive. Concentrația enzimelor represibile depinde de prezența sau absența din mediu a unui compus denumit corepresor. Enzimele acestea sunt implicate în căile anabolice, cele inductibile, respectiv, în catabolice. Ne confruntăm și cu *represie coordonată*, *represie prin produs final*.

Represia, ca și *inducția*, e reflectarea principiului economiei celulare. Explicarea proceselor de inducție și represie enzimatică se datorează lucrărilor lui F. Jacob și J. Monod (1961) — *teoria lac-operonului* —, adică reglarea la nivelul transcripției.

Utilizarea lactozei la bacterii implică creșterea sintezei β -galactozidazei necesare pentru hidroliza lactozei cu scop energetic—, enzima codificată de gena Z. β -galactozidele (β -galactoză și α -glucoză) sunt transportate prin membrana plasmatică printr-un proces cuplat cu gradientul de protoni. Proteina implicată în acest proces este β -galactozid permiaza cu o masă moleculară de 46,5 kDa; sinteza ei este codificată de gena Y. Unele β -galactozide sunt acetilate sub acțiunea transacetilazei, care vor traversa membrana plasmatică, ieșind din celula. Enzima este un dimer și este codificată de gena A. Genele structurale care codifică sinteza celor trei enzime sunt controlate de alte două gene: gena reglatoare LacI și gena operatoare O. Ultima, împreună cu genele structurale, alcătuiește operonul lactozei (Lac - operon) (fig. 2.47).

Gena reglatoare se află la distanță mică de operon și determină sinteza unei proteine numită *represor*, care, legându-se de gena operatoare, împiedică transcrierea genelor structurale. *Inductorul* (metabolit) se leagă de proteina represor, modifică conformația, blocând fixarea ei de gena operatoare. În acest caz are loc transcrierea genelor și sinteza enzimelor codificate de ele.

Teoria modernizată constă în următoarele (fig. 2.47a).

În lipsa glucozei sau la concentrațiile mici ale acesteia (ca rezultat al activității adenilatciclazei și inhibării fosfodiesterazei), apare *AMPc*, concentrația căruia crește, reprezentând astfel semnalul foamei pentru bacterii. În consecință, se formează complexul cu proteina receptoare, cu legarea acesteia de promotor (p-locus). Proteina receptoare e numită proteina activatoare a genei catabolice (*CAP*). Acest proces favorizează

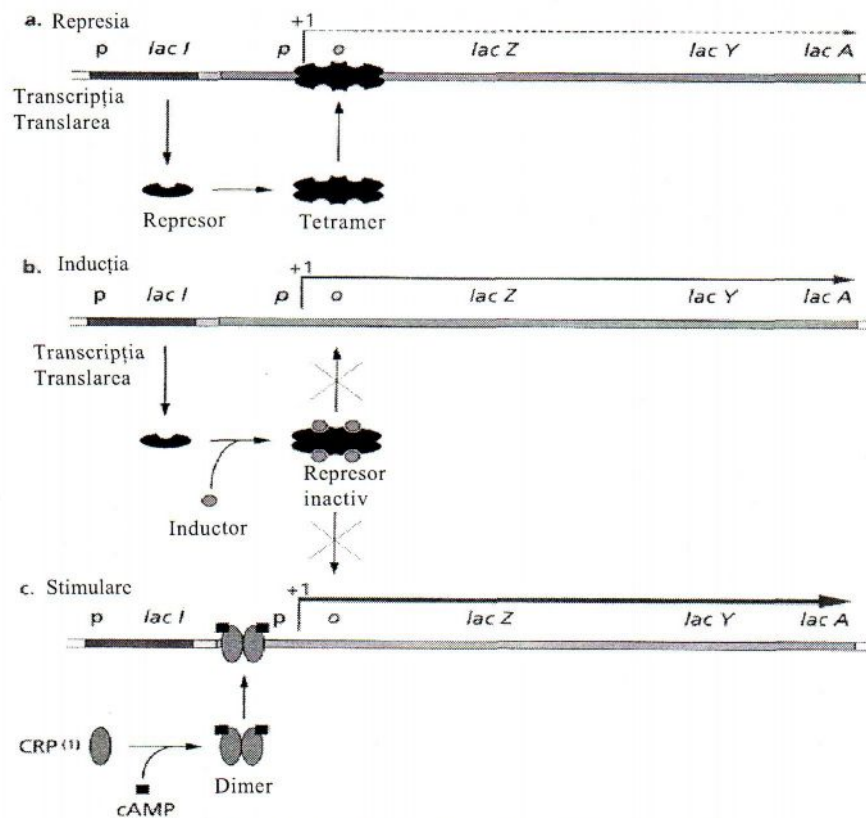


Figura 2.47. Reglarea activității Lac - operonului (CRP-protein receptor pentru AMPc)

pătrunderea RNA-polimerazei în locusul de reglare. CAP dispune de două centre pentru AMPc și pentru DNA.

Proteina represor a fost izolată. Ea are două centre pentru a se lega de locusul operator și de inductor. Atunci când concentrația glucozei e mare, concentrația AMPc e mică. Lipsește și complexul CAP-AMPc. În final, RNA polimeraza nu se leagă de promotor, iar genele Lac nu sunt transcrise, indiferent dacă există sau nu lactoza, adică indiferent de faptul dacă operatorul este sau nu ocupat de represor (fig. 2.47a).

Această dublă modalitate de reglare (de CAP-AMPc și represor-inductor) conferă organismelor o mare flexibilitate metabolică, permițându-le să-și rezolve problemele de adaptare în diverse medii nutriționale.

Promotorul e localizat în apropierea regiunii codificate. În anii 80 au fost depistate și alte elemente reglatoare, denumite *enhancers* (activatori), localizate la mii de nucleotide de la promotor sau regiunea codificată. Sunt depistate și elementele reglatoare — *silencers*, care servesc ca inactivatori.

Posibil că astfel se reglează și aceste structuri. Promotorii și enhancersele sunt compuse din câteva subiecte — secvențe de nucleotide scurte care formează locusuri de fixare a proteinelor reglatoare. Proteinele se atașează de subiecte bilateral simetric.

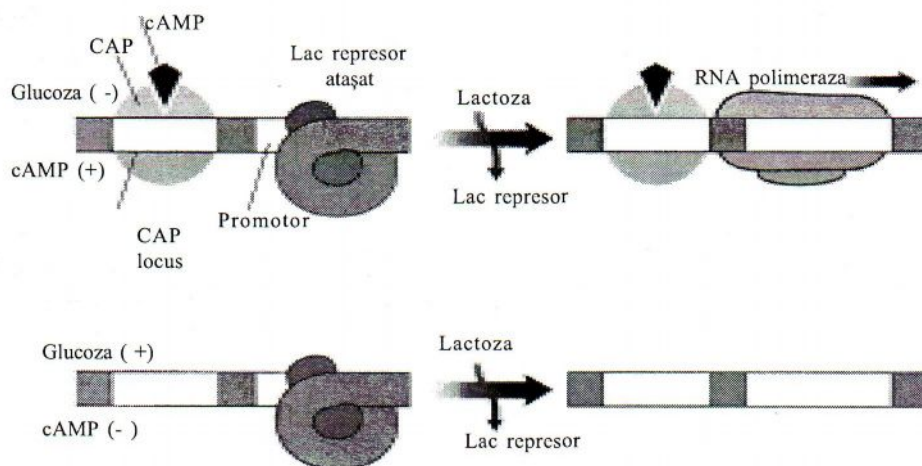


Figura 2.47a. Efectele combinate ale glucozei și lactozei în expresia Lac - operonului

Enhancers prezintă un puternic reglator pozitiv, efectul lui nu depinde de localizarea față de gena reglată. Fiecare genă poate avea unul sau mai mulți enhancers.

Proprietățile acestor elemente sunt:

- 1) cis-elemente active, numai dacă se află în structura anumitului DNA cu gena reglată;
 - 2) n-are polaritate, direcția sa poate fi reorientată, fără a diminua practic activitatea lor;
 - 3) localizarea poate fi schimbată față de genă, mai des e precedentă lui, la sute sau mii de nucleotide. S-a determinat prezența lor și în introni;
 - 4) indiferent de gena pe care o reglează, schimbînd-o pe alta, o activează pe ultima;
 - 5) posedă o slabă pronunțare de specie, însă în celulele sale acționează mai efectiv;
 - 6) mulți își manifestă o exprimată specificitate de țesut. Enhancers genei Hb sunt maximum activi în celulele eritrocitare; enhancers ale H — catenelor imunoglobulinei sunt activi în celulele limfocitare. Enhancers prezintă factori primordiali ai diferențierii;
 - 7) o genă poate avea mai mulți enhancers;
 - 8) enhancers sunt reglați de factorii celulari, de glucocorticoizi. Există mai multe secvențe ce sunt identificate de receptorii glucocorticoizilor. Eliminarea lor inactivează enhancers, fapt argumentat la virusul cancerului glandei mamare.
 - 9) hotarele enhancers nu-s strict delimitate, dar aflăm regiuni discrete, în care mutațiile brusc micșorează activitatea. Aceste regiuni corespund unor zone omoloage între enhancers; spre exemplu, blocul izolat - activ (GCTGTGCAAAG). Se înregistrează și alte zone conservative;
 - 10) un enhancers are mai multe zone de acest tip premergător. Între blocuri se manifestă sinergismul în acțiune;
 - 11) enhancers (unii) activează transcripția genei, dar nu o mențin. Gena mutațiilor celulari ce au pierdut enhancers, își pierde activismul în alte celule. Activitatea se restabilește numai dacă se atașează enhancers corespunzători.
- Silencers** constituie elemente de control negativ, cu aceleași proprietăți. Expresia genei va fi suficientă numai în cazul în care cu toate motivele în promoare sau enhancers

se vor fixa proteinele corespunzătoare. De aceea, expresia genelor va fi pronunțată doar în acele celule care sunt apte de sinteza unui complet de proteine reglatoare, capabile să recunoască anumite motive. Se cunoaște că albumina se sintetizează numai în hepatocite, însă celulele creierului, ale splinei conțin proteine care pot identifica elementele reglatoare ale genei de albumină, dar nu sintetizează albumina. Concluzia e unică: activarea genei e un proces mult mai complex.

S-a dovedit că proteinele ce se atașează de DNA trebuie să corespundă după structură proteinelor fixate în vecinătate. Fiecare promotor și enhancers este capabil să reacționeze cu câteva combinații diferite de molecule proteice, dar numai o singură combinație activează gena. Proteinele reglatoare formează homodimere (perechi de proteine identice) sau heterodimere. Ultimele conferă organismului unele avantaje (identifică 2 secvențe nucleotidice diferite în același subiect de DNA) și lărgesc spectrul de reglare.

E argumentat și faptul că activarea genei poate fi realizată de către fragmentele proteice reglatoare, care n-au nimic în comun cu locusurile responsabile de fixarea DNA - aceste domenii activatoare într-un mod anumit interacționează cu RNA-polimeraza. Domeniile active pot servi ca locusuri de contact cu alte proteine și, în consecință, cercul de interacțiuni se lărgesc, îndeosebi la heterodimere.

În ce mod interacționează proteinele atașate la DNA?

Parțial rezolvă problema așa-numitele fermoare de leucină (fig.2.48 a, b, c).

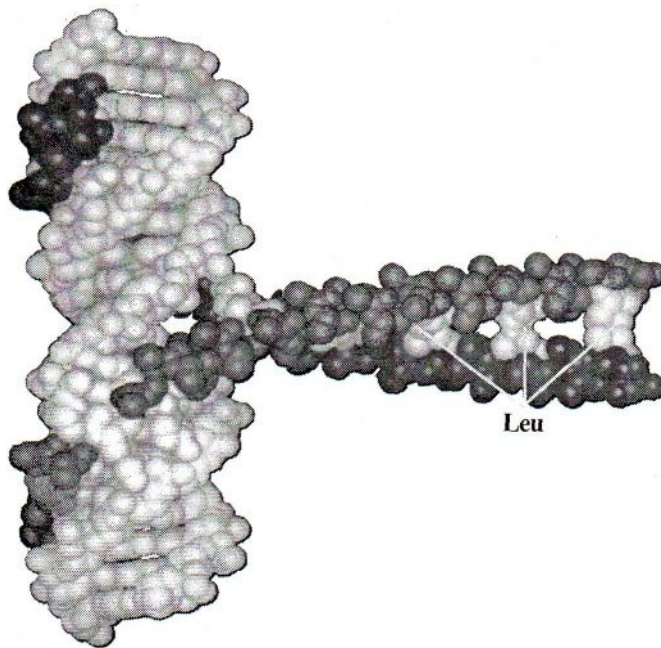


Figura 2.48a. Fixarea "fermoar" a două molecule proteice prin leucină. Ea favorizează fixarea proteinelor reglatoare cu DNA, modificând activitatea genelor

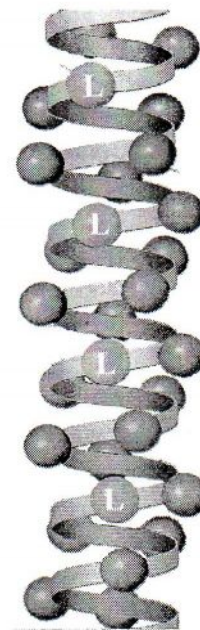


Figura 2.48b. «Fermoarul» leucină (fiecare al șaptelea aminoacid) în α -elicea proteică

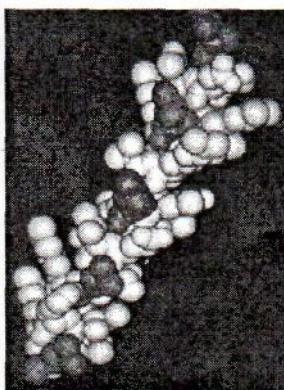


Figura 2.48c. Modelul computerizat (imaginea mai închisă indică resturile de leucină)

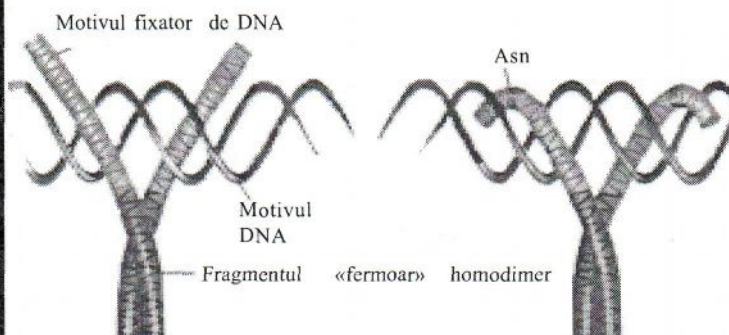


Figura 2.48d. «Fermoarul» leucină contactează cu DNA, favorizând fixarea. Asparagina și alți aminoacizi în aceste fragmente sunt invariabile

În proteinele vizate aminoacidul al șaptelea este leucina— aminoacid hidrofob ce permite moleculei de proteină să se asocieze în perechi cu locusurile lor, formînd astfel dimere - superspirală. Fragmentele sunt aranjate paralel, ca-n collagen, determinînd duritatea spiralei. Pot asocia diferite proteine, dar la fixarea DNA nu participă.

În apropierea acestor fragmente sunt situate secvențe bogate în arginină și lizină, care contactează cu DNA. Poziția adecvată a fragmentelor de arginină și lizină, ce determină fixarea cu subiectele bilateral simetrice din DNA, este asigurată de asocierea a 2 molecule de proteine (fermoar (g)-piciorușul - fermoar; umerii-aminoacizi bazici). Spirala e deformată de asparagină, ce-i permite spiralei să contacteze cu DNA. Aceste fragmente au un grad mare de conservatism, un rezultat evident evolutiv și posibil relevă formarea heterodimerilor din proteinele neidentice (fig.2.48.d).

Reglarea fină a biosintezei proteinei e necesară pentru funcționarea normală afit a celulei, cît și a întregului organism. Generarea insuficientă sau excesivă măcar a unei proteine poate conduce la consecințe nefaste. Surplusul unor factori de evoluție provoacă malignizarea celulelor.

E clar că durata sintezei fiecărei proteine e direct proporțională cantității de mRNA. Factorii ce reglează cantitatea de mRNA, în final, determină și nivelul de sinteză a proteinei. Cantitatea de mRNA și proteină corespunzătoare din celulă era determinată, după presupuneri, numai de durata procesului de sinteză. Recent, s-a stabilit că un rol important îl joacă și durata de degradare a mRNA. Producerea proteinei depinde nu numai de intensitatea sintetizării mRNA, dar și de durata scindării lui.

Ce determină durata degradării mRNA?

mRNA degradează în citozol sub acțiunea enzimelor denumite *ribonucleaze*, care activează sub influența unor factori ce se fixează de moleculele de mRNA. Unul dintre factorii principali este structura lor proprie (fig.2.49.a,b).



Figura 2.49a. Molecula de mRNA

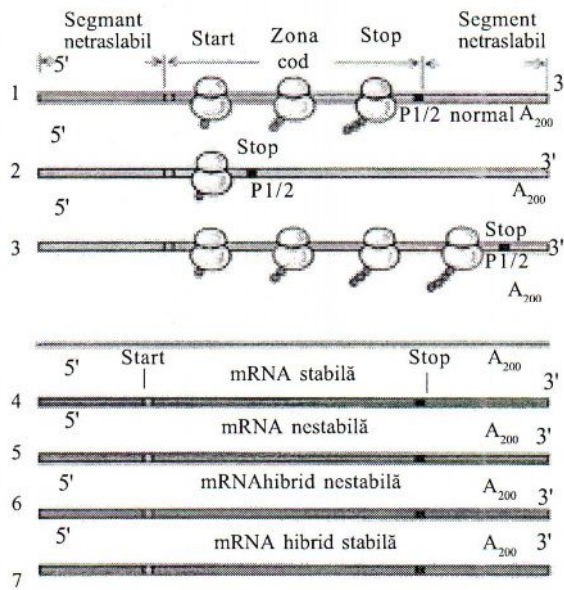


Figura 2.49b. *Influența diferitelor porțiuni de mRNA la stabilitatea moleculei proprii. Modificând poziția semnalului "stop", se mărește sau se micșorează zona codificată, ce conduce la majorarea P 1/2 mRNA, cu creșterea numărului de ribozomi fixați (2,3). Modificând în mRNA stabilă cap.3 netranslabil cu fragmentul analog din 5, hibridul devine foarte nestabil (6) și invers, la modificarea în mRNA nestabilă (5) a segmentului 3 netranslabil cu cel din molecula stabilă, durata vieții e prolongată (7)*

și, deci, au un P1/2 mult mai mare.

b) S-a dovedit că modificările din dimensiunile fragmentului de codificare a mRNA dereglează P1/2 și influențează mult degradarea mRNA.

c) S-a studiat P1/2 al mRNA la β și δ globine în celulele măduvei osoase a omului, gene ce codifică compartimentele proteice ale moleculelor din două variante de hemoglobină. S-a stabilit că mRNA la δ degradează de 4 ori mai rapid decât mRNA la β globină. Ele, însă, se deosebesc după fragmentul 3'-netranslabil. Savanții în materie din Cambridge (SUA) au determinat că viteza de degradare depinde de conținutul de adenină și uracil în acest segment. Cu cât e mai mare conținutul lor, cu atât mai rapid degradează mRNA.

d) Un anumit mesaj îl conferă și poli A. Se consideră că coada poli A trebuie să fie înlăturată anterior degradării mRNA. E posibil că nu singurul poli A, ci o proteină ligandă sporește stabilitatea mRNA. Această proteină (PABP) se racordează la coadă de 100 ori mai puternic decât la alte porțiuni de molecula mRNA. Anume această proteină stabilizează mRNA, durabil protejând poli A de invazia ribonucleazelor (fig. 2.49c).

Este elocvent și faptul că în cadrul stabilității legăturii proteina poli A influențează și celelalte segmente ale mRNA. Prin urmare, nu numai fiecare segment influențează stabilitatea mRNA, ci, în unele cazuri, stabilitatea e determinată și de combinarea proprietăților acestor segmente, în ansamblu.

Pentru sinteza proteinelor rolul primordial îl are secvența codificată, unde acționează ribozomii. Acest proces este influențat efectiv de celelalte fragmente.

a) Lipsa 5'-fragment netranslabil în gena C-myc (genă protooncogenă, ce codifică proteina necesară pentru mitoză normală. Dacă, însă, proteina e modificată sau e în exces, celula normală se malignizează) mărește perioada de înjumătățire (P1/2) a mRNA, generează surplus de proteină în celulele ganglionilor limfatici și fenomene de anomalie exprimate în celulele cancerigene.

În 1984, K.Dani și F.Janter (Franța) au demonstrat că mRNA normal la transcripția genei e relativ stabil și are o perioadă de înjumătățire egală cu 10 minute. Tot ei au stabilit că în celulele cancerigene ale ganglionilor limfatici mRNA e mai scurt, fără segmentul 5'-netranslabil

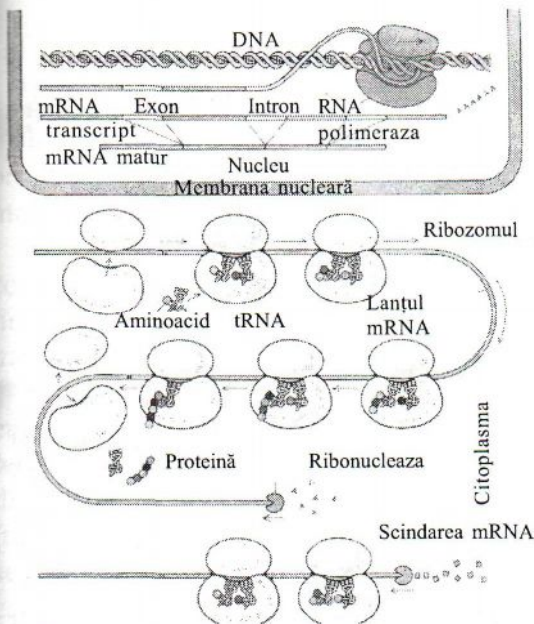


Figura 2.49c. Ciclul vital al mRNA

Histonele iau parte la activarea genelor, reglarea transcripției. Pentru inițierea transcripției e necesară o interacțiune directă sau indirectă a proteinelor activatoare, cu o porțiune din coada histonei H_4 pe TATA-bloc al DNA în promotor. Ca urmare, are loc o disociație menajată a octamerului histonic, prin detașarea histonelor H_2A și H_2B .

Dar care sunt mecanismele anume, mai concret va arăta viitorul.

Putem, totuși, afirma că:

1. Stabilitatea mRNA depinde și de viruși. Ei grăbesc degradarea mRNA celulare, activând ribonucleazele și polizomii liberi, sintetizează proteine virotice proprii.

2. Estrogenii măresc stabilitatea, la fel ca și hormonul de creștere, cortizonul etc.

3. În unele cazuri, proteina își reglează conținutul propriu al mRNA. Autoreglarea de tipul dat e descrisă la compartimentul sinteza histonelor (fig.2.49d,e).

Histonele libere, nelegate cu DNA, favorizează scindarea mRNA histonice, probabil legându-se cu fragmentul 3'-netranslator, care se scindează primul.

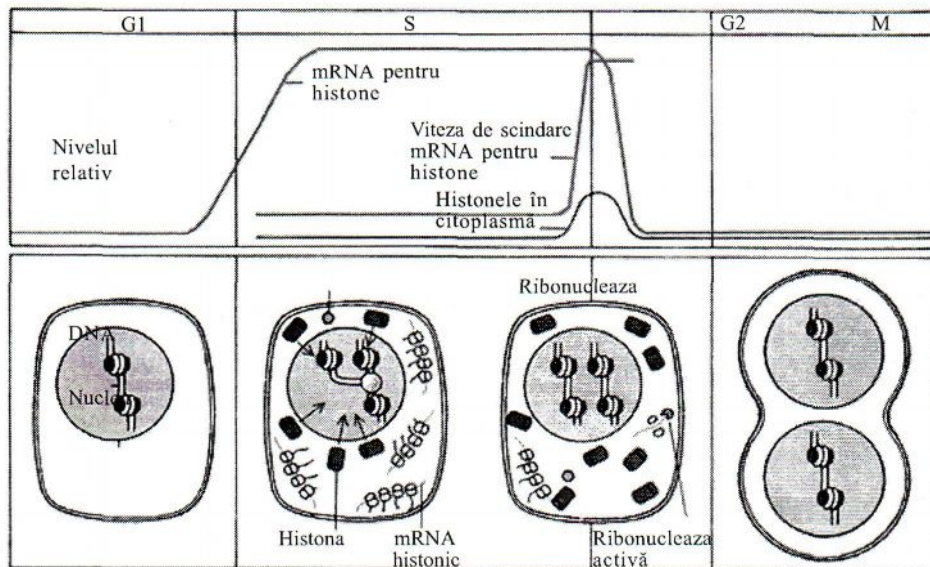


Figura 2.49d. Ipoteza autoreglării conținutului de histone la diferite faze ale ciclului celular

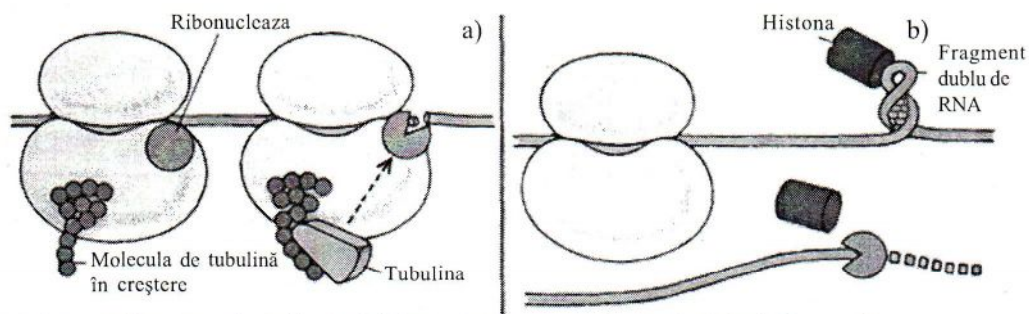


Figura 2.49e. Mecanismul inducției lizei mRNA propriu de tubulină (a) și histone (b)

În consecință, TATA-bloc e disponibil pentru asocierea cu factori bazali (inclusiv și RNA- polimeraza) și formarea complexului preinițial și începutul transcripției cu o viteză mică.

Sunt cunoscuți câțiva factori sus-menționați, dar mecanismul de reglare a biosintezei proteinelor rămâne a fi, în multe cazuri, neclar. Când savanții vor putea modifica intenționat stabilitatea mRNA, posibil vom stăvili înmulțirea celulelor anormale, vom reduce sau complet vom suprima incidența cancerului.

În calea de la DNA la proteină, controlul se poate realiza, practic, la fiecare fază. Se remarcă următoarele puncte de control:

- 1) control la nivelul transcripției — timpul și caracterul transcripției genei respective;
- 2) control la nivelul procesingului — caracterul procesingului al transcriptului RNA primar;
- 3) control la nivelul de transport — selecția în nucleu a mRNA mature, menită exportului în citozol;
- 4) control la nivelul translației — selecția în citozol a mRNA, menită translării în ribozomi;
- 5) control la nivelul de degrație a mRNA — stabilizarea specifică a unor tipuri de mRNA în citozol.

Sucesiunea proceselor în stabilirea concentrației de proteine, cât și punctele potențiale de control sunt redate în fig. 2.50.

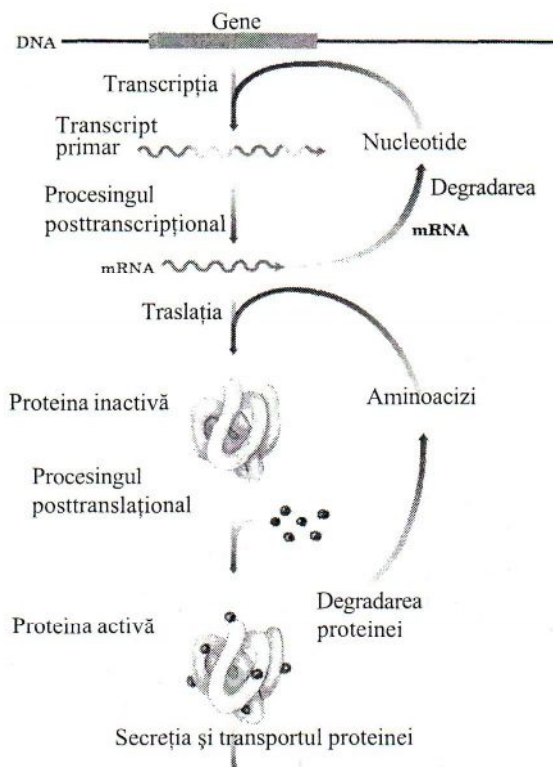


Figura 2.50. Punctele potențiale de control în reglarea echilibrului proteic