

B. U. U.
1462881

DANA IORDĂCHESCU

BIOCHIMIA AMINOACIZILOR ȘI PROTEINELOR

EDITURA UNIVERSITĂȚII BUCUREȘTI
1995



BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
București

Cota III 462884

Inventar 799003

117080

DANA IORDĂCHESCU

BIOCHIMIA AMINOACIZILOR ȘI PROTEINELOR

EDITURA UNIVERSITĂȚII BUCUREȘTI
- 1 9 9 5 -

Biblioteca Centrală Universitară
BUCUREȘTI
Cota III 46288/1
inventar - 799003

DNF 809

Referenți științifici: Lector Marieta Costache
Lector Diana Dinu

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universității București.
Orice reproducere sau traducere, fie și parțială, precum
și contrafacerea de orice tip, intră sub incidența Codului Penal.

ISBN - 973 - 9160 - 89 - 4

CUPRINS

	pag.
Introducere	1
1. AMINOACIZII.....	2
1.1. Aminoacizii proteici.....	2
1.2. Aminoacizii neproteici.....	8
1.3. Proprietatile acido-bazice.....	9
1.4. Stereochimia aminoacizilor.....	13
1.5. Proprietatile spectrale ale aminoacizilor.....	17
1.6. Proprietatile chimice ale aminoacizilor.....	18
1.7. Metode de determinare cantitativa ale aminoacizilor.....	24
1.8. Analiza cromatografica a aminoacizilor.....	25
2. PEPTIDELE.....	29
2.1. Peptide cu importanta biochimica.....	30
2.2. Sinteza peptidelor.....	38
3. PROTEINE.....	40
3.1. Clasificarea proteinelor.....	40
3.2. Proprietatile fizico-chimice ale proteinelor...	42
3.3. Metode de studiu a proteinelor.....	46
3.4. Structura primara a proteinelor.....	67
3.5. Conformatia proteinelor.....	71
3.5.1. Structura secundara a proteinelor.....	74
3.5.2. Structura terciara a proteinelor.....	89
3.5.3. Structura cuaternara a proteinelor.....	91
3.5.5. Corelatii intre structura primara si conformatia unei proteine.....	92
3.6. Proteine structurale fibroase.....	101
3.6.1. Keratinele.....	102
3.6.2. Colagenele.....	105
3.6.3. Elastina.....	113
3.7. Proteinele globulare.....	114
3.7.1. Mioglobina.....	114
3.7.2. Hemoglobina.....	118
3.7.3. Proteine contractile.....	133
3.7.4. Imunoglobuline.....	140

3.8. Proteinele citoscheletului.....	157
3.9. Proteine membranare.....	169
3.9.1. Proteinele membranei eritrocitare.....	174
3.9.2. Proteinele G.....	178
3.9.3. Receptori membranari.....	183

Introducere

Scopul final al biologiei moleculare este intelegerea proceselor biologice in termenii chimiei si fizicii macromoleculelor care participa la ele. Una dintre diferentele esentiale dintre biochimia sistemelor vii si chimia sistemelor nevii este marea complexitate structurala si functionala a macromoleculelor biologice. In prezent, biochimia structurala nu poate fi conceputa fara cunoasterea in detaliu atomic a proteinelor si acizilor nucleici.

Proteinele joaca un rol crucial in toate procesele biologice. Daca DNA este molecula "legislativa" a celulei - avind capacitatea de a dirija dezvoltarea organismelor si activitatea celulara, proteinele sunt molecule "executive" - controlind si reglind metabolismul celular , integrind activitatile fiziologice ale organismelor pluricelulare.

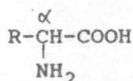
Istoria biologiei molèculare a cunoscut numeroase dogme care au marcat intelegerea relatiei dintre structura chimica si functia biologica a unei macromolecule. Astfel, in biochimia proteinelor a existat conceptul ca proteinele adopta o anumita conformatie biologic activa fara participarea vreunui alt compus sau a unui aport de energie, structura ei tridimensionala depinzind numai de secventa aminoacizilor din catena polipeptidica si deci a resturilor de nucleotide din gena structurala care o codifica. In aceasta carte nivelele de organizare ale proteinelor vor fi tratate in viziunea teoriei domeniilor si a implicarii proteinelor Chaperon in plierea catenei polipeptidice, urmarindu-se permanent raportul dintre structura si functie.

Dedic aceasta carte tuturor celor implicati in instructia universitara in domeniul biologiei moleculare.

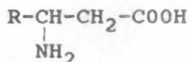
Autoarea

1. AMINOACIZII

Dupa cum indica si denumirea lor, aminoacizii sunt compusi carboxilici care contin si o grupare amino. Cu exceptia, prolinei, aminoacizii care intra in constitutia proteinelor sunt α -aminoacizi, avind gruparile carboxil si amino, legate la acelasi atom de carbon,



Daca gruparea amino este atasata la un atom de carbon vecin lui C_α , se formeaza un β -aminoacid, care nu apare in structura proteinelor,



fiind regasit rar in natura, in structura unor oligopeptide. De asemenea, in stare libera se pot gasi β , γ -aminoacizi.

1.1. Aminoacizii proteici

Prin hidroliza completa a proteinelor se obtine un amestec de aproximativ 20 aminoacizi.

Exista mai multe sisteme de clasificare a aminoacizilor proteici, majoritatea bazindu-se pe structura si proprietatile radicalilor R, care substituie α -atomul de carbon.

Conform comportamentului in mediu apos, aminoacizii proteici pot fi clasificati in trei tipuri majore :

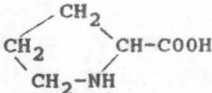
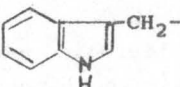
- (i) cu grupari R nepolare ;
- (ii) cu grupari R polare, dar neincarcate electric ;
- (iii) cu grupari R polare, dar incarcate electric la pH fiziologic.

Noua aminoacizii sunt considerati a avea grupari R nepolare (Tabelul 1). Glicocolul sau glicina (acidul aminoacetic) este primul aminoacid identificat (1820) in hidrolizatele gelatinei si are cea mai mica grupare R, un atom de hidrogen.


Tabelul 1. Aminoacizii proteici

aminoacid	Simbolul cu 3 litere 1 litera	pI	Structura radicalului R
-----------	----------------------------------	----	----------------------------

aminoacizii cu grupari R nepolare

1. Glicina	Gly	G	5,97	H-
2. Alanina	Ala	A	6,02	CH ₃ -
3. Valina	Val	V	5,97	(CH ₃) ₂ CH-
4. Leucina	Leu	L	5,98	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -
5. Isoleucina	Ile	I	6,02	CH ₃ -CH ₂ -CH- CH ₃
6. Metionina	Met	M	5,75	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -
7. Prolina	Pro	P	6,10	
8. Fenilalanina	Phe	F	5,98	C ₆ H ₅ -CH ₂ -
9. Triptofan	Trp	W	5,88	

aminoacizii cu grupari R polare, neionizabile

10. Serina	Ser	S	5,68	HO-CH ₂ -
11. Treonina	Thr	T	6,53	CH ₃ -CH- OH
12. Asparagina	Asn	B	5,41	NH ₂ -CO-CH ₂ -
13. Glutamina	Gln	Q	5,65	NH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ -
14. Tirozina	Tyr	Y	5,65	HO-  -CH ₂ -
15. Cisteina	Cys	C	5,02	HS-CH ₂ -

aminoacizii cu grupari R polare si ionizabile

16. Lizina	Lys	K	9,74	NH ₂ -(CH ₂) ₄ -
------------	-----	---	------	--

continuare

17.Arginina	Arg	R	10,76	$\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-(\text{CH}_2)_3^-$
18.Histidina	His	H	7,58	$\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_2^-)-\text{NH}-\text{CH}$ $\text{HN} \quad \text{N}$
19.Acid aspartic	Asp	D	2,97	$\text{HOOC}-\text{CH}_2^-$
20.Acid glutamic	Glu	E	3,22	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2^-$

Glicina (acidul aminoacetic) este aminoacidul cu cea mai simpla structura. Datorita faptului ca radicalul R este un atom de hidrogen, glicina prezinta functia unica de a se "acomoda" in regiunile inalt pliate ale catenelor polipeptidice.

Alanina (acidul α -aminopropionic), valina (acidul α -aminoizovaleric), leucina (acidul α -aminoizocaproic) si izoleucina (acidul α -amino, β -metil, β -etil propionic) au catene laterale alifatice si hidrofobe. Desi acesti patru aminoacizi sint chimic nereactivi, ei joaca un rol important in stabilirea si mentinerea structurii tridimensionale a proteinelor datorita tendintei lor de a evita apa. Alanina este cel mai abundent aminoacid din structura majoritatii proteinelor.

Metionina (acidul γ -metiltiol- α -amino-butiric) are in catena laterala un tioeter care prezinta similitudini cu gruparea n-butil. Atomul de S are aproximativ aceiasi marime ca gruparea metilen. Spre deosebire de gruparea metilen, atomul de S prin electronii sai neparticipanti poate stabili legaturi cu atomii metalelor sau poate reactiona cu alte grupari electrophile. Prolina (acidul pirolidin α -carboxilic) difera marcant de restul aminoacizilor, fiind un α -iminoacid ciclic . Deoarece atomul de N nu poate participa la formarea de puncti de hidrogen, prolina introduce constrangeri conformationale producind modificarea brusca a directiei catenei polipeptidice.

Fenilalanina (acidul β -fenil, α -aminopropionic) are o grupare fenil, iar triptofanul (acidul α -amino, β -indolpropionic) are o

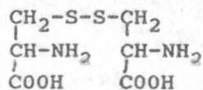
grupare indol, ce prezinta o inalta hidrofobitate. In structura proteinelor si in mediu apos, acesti aminoacizi sunt grupati spre interiorul moleculei evitind contactele cu apa si stabilind intre ei multiple interactii van der Waals.

Sase aminoacizi sunt considerati a avea grupari R polare, dar neionizate la pH fiziologic (Tabelul 1).

Serina (acidul β -hidroxi, α -aminopropionic) contine o grupare hidroxil care intr-un micromediu special reprezinta situsul catalitic activ al multor enzime, jucind rolul unui catalizator nucleofil si putind ioniza. Treonina (acidul β -hidroxi, α -aminobutiric) desi are de asemenea o grupare hidroxil, nu participa la structura situsului catalitic activ al enzimelor.

Tirozina (acidul β , p-hidroxifenil α -aminopropionic) are o grupare R fenolica. Gruparea ei hidroxil are un caracter slab acid, ca si al fenolului. Tirozina se gaseste in situsul catalitic activ al enzimelor.

Cisteina (acidul β -tio, α -aminopropionic) este un alt aminoacid cu sulf. Deoarece atomii de C si S au aproximativ aceiasi electronegativitate, legatura C-S practic nu este polara. Pentru acelasi motiv, si legatura S-H este nepolarizata. Dar atomul de S este polarizabil datorita electronilor din orbitalii exteriori care sunt usor distorsionati de cimpurile electrice ale altor molecule si ioni polari. Ca rezultat, gruparea SH din cisteina este reactiva chimic. In mod specific, atomul de hidrogen din gruparea SH poate forma puncti de hidrogen slabe cu atomii de O si N ai altor grupari. Gruparile SH a doua molecule de cisteina pot fi oxidate cu formarea unei disulfuri numita cistina [acid di(β -tio, α -aminopropionic)].



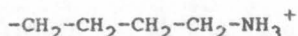
Punctile -S-S- au o mare importanta in structura proteinelor, puntind lega

doua catene polipeptidice separate sau putind inretela aceiasi catena polipeptidica. Introducerea de puncti disulfurice in structura unei proteine ii confera acesteia o stabilitate si o rigiditate crescuta.

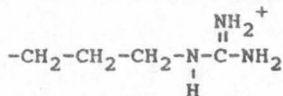
Asparagina si Glutamina sunt amidele altor doi aminoacizi: acidul aspartic si acidul glutamic. Catenele lor laterale inalt

polarizate se găsesc în contact cu mediul apos, într-o poziție externă a catenei polipeptidice pliate.

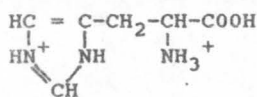
Cinci aminoacizi au grupări R încărcate electric. Aminoacizii bazici sunt încărcați pozitiv la pH fiziologic și cuprind lizina (acidul α, ϵ -diaminocaproic), arginina (acidul δ -guanidil, α -amino-valerianic) și histidina (β -4-imidazolil alanina). Catena laterală a lizinei conține o grupare amino primară atașată la un ϵ -atom de carbon. La pH 7,0 lizina este o bază puternică, specie predominantă având ionul amoniu:



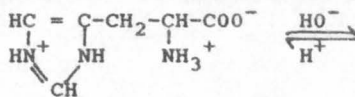
Arginina este cel mai bazic aminoacid. La pH 7,0 gruparea ei guanidinică este protonată la ionul guanidinium:



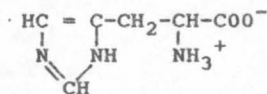
Dintre cei 20 aminoacizi proteici, histidina ocupă o poziție aparte având mai multe stări de ionizare :



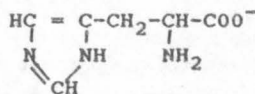
forma A



forma B



forma C (izoelectrică)



forma D

La pH 6,1 - 50 % din nucleul imidazolic este protonat, iar la pH 7 numai 10 % din molecule sunt încărcate pozitiv. Aceste posibilități de ionizare îi conferă histidinei proprietatea de soluție tampon și de catalizator nucleofil în centrul catalitic al

doua formiat dehidrogenaze, cu cite un rest de seleno-cisteina.

1.2.Aminoacizi neproteici

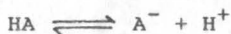
In Tabelul 2 prezentam un numar de aminoacizi care nu intra in structura proteinelor, dar au un rol biochimic important.

Tabelul 2. Aminoacizi neproteici

Aminoacid	Structura	Rol biochimic
1. β -alanina	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	component al acidului pantotic, al coenzimei A, al carnozinei, al anserinei
2. Acidul γ -amino butiric	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$	neurotransmitator al influxului nervos
3. Sarcozina	N-metil-glicina	intermediar metabolic, constituent al actinomicinelor (antimetaboliti puternici)
4. Betaina	N,N,N-trimetil glicina	intermediar metabolic
5. Homoserina	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH} \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$	intermediar metabolic
6. Homocisteina	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH} \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$	intermediar metabolic
7. Ornitina	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$	intermediar metabolic
8. Citrulina	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_3\text{-NH-CO-NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$	intermediar metabolic
9. Penicilamina	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{C-SH} \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$	component al antibioticului penicilina

1.3. Proprietatile acido-bazice

Aminoacizii au cel puțin două grupări ionizabile. De exemplu, gruparea acida ionizează conform ecuației :



descrisă de constanta de aciditate K_a :

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]} \quad (1)$$

Logaritmind ecuația (1) se obține :

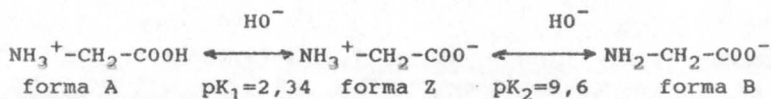
$$\log K_a = \log [\text{H}^+] + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}] \quad (2)$$

Știind că $-\log [\text{H}^+] = \text{pH}$, iar $-\log K_a = \text{p}K_a$ (exponentul de aciditate), ecuația (2) devine :

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}] \quad (3)$$

care este ecuația HENDERSON-HASSELBALCH, ce stabilește o corelație între pH soluției unui acid, constanta sa de aciditate K_a și raportul concentrațiilor bazei sale conjugate și a acidului, în condiții de echilibru.

Să considerăm ionizarea celui mai simplu aminoacid, glicina:

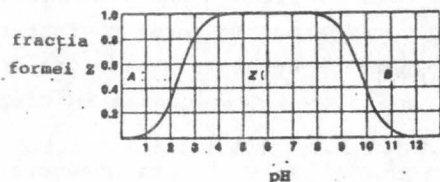


În mediu puternic acid predomină forma A, total protonată. Prin alcalinizarea ușoară a mediului se deprotonază gruparea carboxil și se formează forma Z (zwitterion, amfion) care are sarcină electrică netă zero. Prin alcalinizarea în continuare a mediului se formează forma B, total neprotonată.

La pH fiziologic (pH 7,4) caracteristic plasmei sanguine normale, distributia diferitelor forme ale glicinei este urmatoarea

$\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	- forma Z	99,58 %
$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	- forma B	0,41 %
$\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$	- forma A	0,00089 %
$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	-	0,0000037 %

Figura 1



Fractia moleculelor de glicina, prezente in forma Z la diferite valori de pH

Din Figura 1 se constata ca glicina se gaseste prioritar in forma Z, intr-un domeniu larg de pH. In Figura 2 prezentam curba de titrare a glicinei.

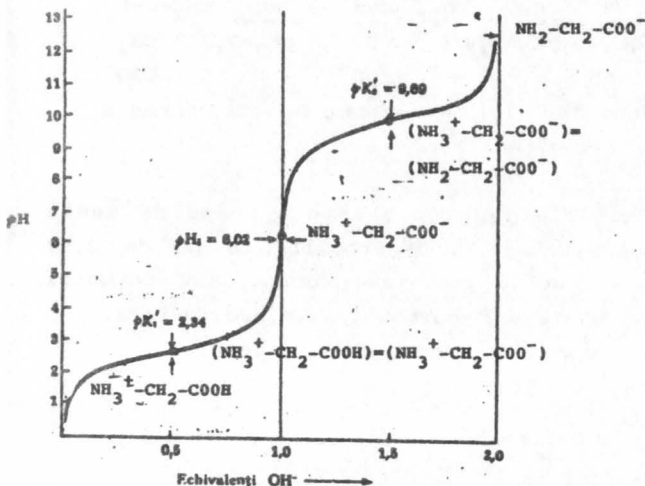


Figura 2
Curba de titrare a glicinei

La pH 2,34 (pK_1) se gasesc concentratii echimolare din forma A si forma Z. La pH 9,6 (pK_2) se gasesc concentratii echimolare din forma Z si forma B. Punctul de inflexiune intre cele doua trepte ale curbei de titrare a glicinei, notat pI, corespunde pH izoelectric, in care predomina forma Z. Conform ecuatiei HENDERSON_HASSELBACH,

$$pI = (pK_1 + pK_2)/2$$

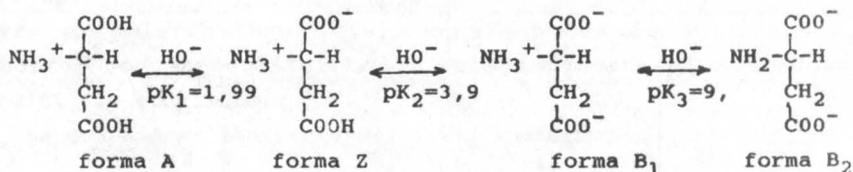
si in cazul particular al glicinei are valoarea 5,97.

Curbe de titrare similare celei prezentate in Figura 2 se obtin in cazul tuturor acizilor monoaminomonocarboxilici.

Aminoacizii in forma A, incarcati pozitiv, intr-o solutie acida, in cimp electroforetic migreaza spre catod. In forma B, intr-o solutie alcalina, avind o incarcare electrica negativa, vor migra in cimp electric spre anod. Aminoacizii in forma Z nu migreaza in cimp electric.

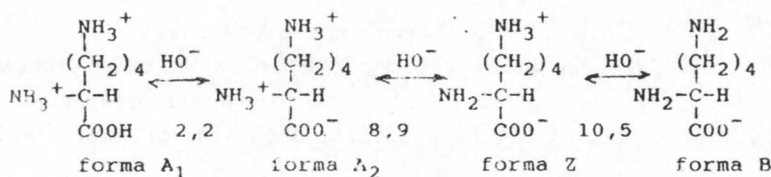
pH solutiilor de aminoacizi afecteaza si solubilitate acestora. La pH izoelectric, aminoacizii (ca si proteinele) sunt putin solubili si nu pot cristaliza din solutiile lor.

In cazul aminoacizilor cu grupari R ionizabile, proprietatile acido-bazice depind si de natura acestui radical. De exemplu, ionizarea acidului aspartic are loc conform urmatoarelor etape:



Punctul izoelectric al acidului aspartic este aproape de media valorilor pK_a pentru gruparile α - si β -carboxil. La pI de 2,97 functia amino este aproape complet protonata, gruparea α -carboxil este puternic ionizata, iar gruparea β -carboxil este nedisociata.

Ionizarea lizinei are loc conform urmatoarelor etape:



acest aminoacid avind un pH izoelectric de 9,74

In Tabelul 3 prezentam valorile pK_a ale gruparilor ionizate din aminoacizii standard.

Tabelul 3

Valorile pK_a ale constituentilor acizi si bazici ale aminoacizilor

Aminoacid	pK_a		Catena laterala
	gruparea α -COOH	gruparea α -NH ₂	
Glicina	2,35	9,78	
Alanina	2,34	9,87	
Valina	2,29	9,72	
Leucina	2,33	9,74	
Isoleucina	2,32	9,76	
Metionina	2,17	9,27	
Prolina	1,95	10,64	
Fenilalanina	2,58	9,78	
Triptofan	2,43	9,44	
Serina	2,19	9,44	
Treonina	2,09	9,10	
Cisteina	1,86	8,71	8,73
Tirozina	2,20	9,11	10,11
Asparagina	2,02	8,80	
Glutamina	2,17	9,10	
Aspartat	1,99	10,00	3,96
Glutamat	2,13	9,05	4,32
Lizina	2,36	9,70	10,80
Arginina	1,82	8,94	12,48
Histidina	1,81	9,15	6,0

Din aceste date se pot trage unele concluzii :

1. Gruparea carboxil din pozitia α a acizilor monoaminomonocarboxilici este un acid mai puternic decit gruparea carboxil a acizilor alifatici corespunzatori datorita gruparii amino cu un efect $-I_s$;

2. Gruparea amino din pozitia α a acizilor monoaminomonocarboxilici este o baza mai slaba decit gruparea amino a aminelor alifactice corespunzatoare;

3. Toti acizii monoaminomonocarboxilici cu radicali R nein arcati electric au valori pK_a aproape identice;

4. Niciunul din acizii monoaminomonocarboxilici nu au o capacitate de tamponare semnificativa in jurul pH fiziologic (intre pH 6 si 8). Ei prezinta o capacitate de tamponare la pH apropiate de valorile pK_a 1,3-3,3 si 8,6-10,6. Singurul aminoacid cu capacitate de tamponare intre pH 6 si 8 este histidina.

5. Gruparea β -carboxil a acidului aspartic si γ -carboxil a acidului glutamic , desi complet ionizate la pH 7 au valori pK_a considerabil mai mari decit valorile pK_a a gruparilor α -carboxil si aproape egale cu cele ale acizilor carboxilici simpli , de exemplu acidul acetic.

6. Gruparea SH a cisteinei si gruparea p-hidroxi a tirozinei au un caracter slab acid , la pH 7-prima fiind 8 % ionizata, iar a doua -0,01 %.

7. Gruparea ξ -amino a lizinei si gruparea guanidinium a argininei sunt puternic bazice ; la pH 7, acesti aminoacizi avind o sarcina electrica neta pozitiva.

1.4. Stereochimia aminoacizilor

Cu exceptia glicinei, toti aminoacizii izolati din hidrolizatele proteinelor sunt optic activi, adica au capacitatea de a roti planul luminii polarizate. Activitatea optica este o caracteristica a substantelor care contin atomi de carbon hibridizati sp^3 (simetrie tetraedrica) ce au cele patru valente satisfacute de patru substituenti diferiti. α -atomii de carbon din structura aminoacizilor sunt centre de asimetrie sau centre chirale.

Moleculele optic active sunt dextrogire notindu-se prin litera d

(dextro) sau prefixul (+) daca rotesc planul luminii polarizate in sensul acelor unui ceasornic sau pot fi levogire [notatii : litera l (levo) sau (-)] daca rotesc planul luminii polarizate in sensul invers acelor unui ceasornic.

Sensul si gradele de rotatie sunt determinate la polarimetru.

O masura cantitativa a activitatii optice a unei molecule este rotatia specifica :

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\text{rotatia observata (grade)}}{l.c}$$

unde l - este lungimea drumului optic parcurs de lumina;

c - este concentratia solutiei, in g/100 ml ;

25°C - este temperatura masuratorii ;

D - reprezinta linia D a spectrului sodiului (589,3 nm), care este lumina monocromatica utilizata in polarimetru.

Semnul si marimea rotatiei optice a aminoacizilor depinde de natura gruparii R si de pH solutiei respective. De exemplu, prolina, leucina si arginina, aminoacizi izolati din proteine, au rotatii specifice in solutii apoase de -86,2 , -10,4 si respectiv +12,5°. Enantiomerii lor au aceiasi valoare $[\alpha]_D^{25}$ dar cu un semn opus.

Configuratia absoluta a gruparilor (aranjamentul spatial) din jurul unui centru asimetric a fost stabilita in 1891 de EMIL FISCHER, conventional in raport cu gliceraldehida.

Stereoizomerii (+) si (-) ai gliceralhidei au fost notati D si respectiv L. L- α -aminoacizii vor avea gruparea amino pe aceiasi parte ca gruparea OH a L-gliceralhidei. D- α -aminoacizii se afla in acelasi raport cu D-gliceraldehida.



L-gliceraldehida L- α -aminoacid D-gliceraldehida D- α -aminoacid

Izomerii D si L reprezinta imaginea unuia fata de celalalt intr-o oglinda si se numesc enantiomeri. Organismele vii pot diferentia cele doua forme enantiomere, majoritatea lor putind sintetiza si metaboliza numai L-aminoacizii. Toti α -aminoacizii derivati din

proteine au configuratia stereochemica L. De exemplu , in hidrolizatele proteice se gasesc L-(+)-alanina, L-(+)-valina, L-(+)-izoleucina, acidul L-(+)-aspartic, acidul L-(+)-glutamic, etc., sau L-(-)-leucina, L-(-)-fenilalanina, L-(-)-serina, etc.

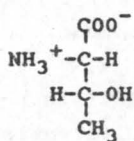
Distinctia intre cei doi enantiomeri este atit de critica incit multe microorganisme utilizeaza D-aminoacizii pentru sinteza unor peptide ce sunt toxice pentru alte organisme.

D-aminoacizii sunt incorporati in structurile multor antibiotice, de tipul bacitracinei, gramicidinei, actinomycinelor etc.

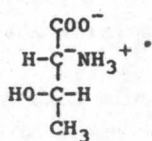
Rinichii animalelor au capacitatea de a distruge D-aminoacizii, eliminind orice posibilitate de sinteza a unor peptide toxice. D-aminoacizii sint legati de doua probleme biologice majore cancerul si senescenta. O serie de cercetatori au pus in evidenta ca proteinele tumorale contin D-aminoacizi.

Exista ideea ca atita timp cit organismele isi mentin gradul de puritate a izomerilor optici in proteine ele sunt tinere si pline de vitalitate. KUHN considera dozarea continutului in D-leucina din hidrolizatele keratinei din par - o posibilitate de stabilire a virstei cailor.

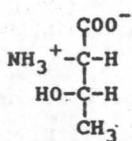
O molecula poate avea mai multe centre asimetrice. Pentru astfel de molecule, termenii de stereoizomeri si izomeri optici se refera la molecule cu configuratii diferite la cel putin unul din centrele lor chirale. Termenul de enantiomer se refera la o molecula ce reprezinta imaginea in oglinda a alteia, de care difera la toate centrele chirale. Deoarece fiecare centru asimetric dintr-o molecula chirala poate avea doua configuratii posibile, o molecula cu n centre chirale are 2^n diferiti stereoizomeri posibili si 2^{n-1} perechi de enantiomeri. De exemplu, treonina si izoleucina au cite doua centre chirale si deci $2^2=4$ stereoizomeri posibili.



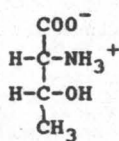
L-treonina
(I)



D-treonina
(II)



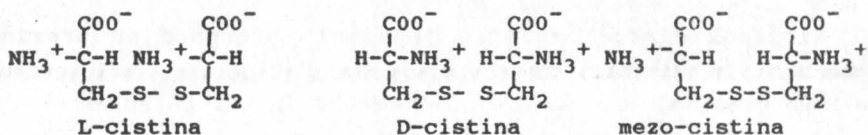
L-allo-treonina
(III)



D-allo-treonina
(IV)

În cazul treoninei, perechile de enantiomeri sunt structurile I cu II și III cu IV. L- și D-treonina sunt diastereoizomeri cu L-allo- și D-allo-treonina. Formele D și L, pe de o parte și formele D-allo- și L-allo- pe de altă parte se găsesc în aceeași relație cu un obiect și imaginea lui în oglindă. În contrast cu cazul perechilor de enantiomeri, diastereoizomerii se deosebesc prin unii parametri fizico-chimici : puncte de topire, spectre, reactivitate chimică.

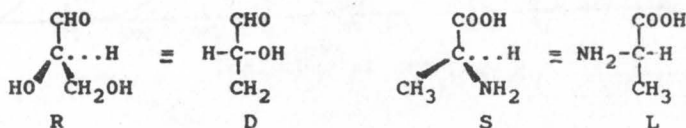
Produsul de oxidare al cisteinei, cistina are trei stereoizomeri:



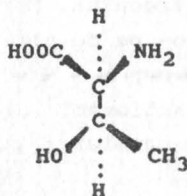
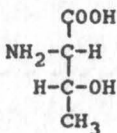
Formele D și L se afla într-un raport ca un obiect cu imaginea lui în oglindă, în timp ce forma mezo are un plan de simetrie internă care duce la naștere unei compensații intramoleculare ce conduce la pierderea activității optice. Izomerul mezo nu există în natură.

Pentru moleculele cu mai mult decât un centru asimetric se recomandă folosirea convenției CAHN-INGOLD-PRELOG introdusă în 1956, în care cele patru grupări substituente ale unui centru chiral sunt considerate printr-o schemă de prioritate specifică pe baza numărului atomic al grupării (atomului legat direct).

Acest sistem utilizează simbolurile R (rectus-dreapta) și S (sinister-stînga). Astfel, D-glicerinaldehida poate fi descrisă ca R-glicerinaldehida, iar L-alanina ca S-alanina :



De asemenea, L-treonina poate fi descrisa ca 2(S),3(R) treonina :



1.5. Proprietatile spectrale ale aminoacizilor

Niciunul dintre cei 20 aminoacizii standard nu prezinta o absorbtie in vizibil, trei aminoacizi : tirozina, triptofanul si intr-un grad mai mic fenilalanina absorb in UV. pH solutiei are un efect pronuntat asupra maximului de absorbtie, dozarile spectrofotometrice realizandu-se in solutii alcaline (Figura 3).

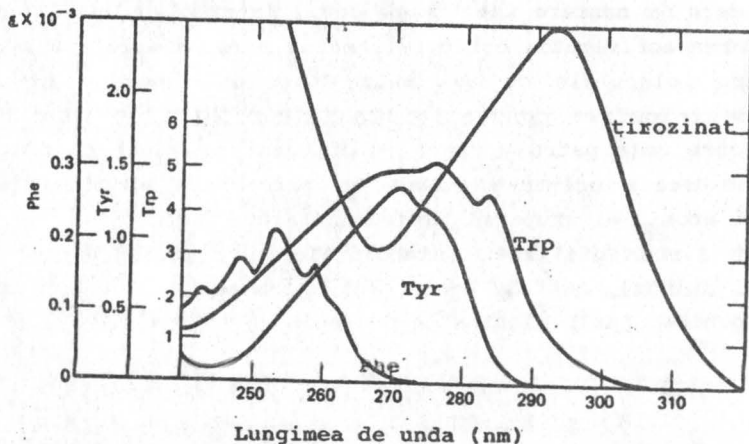


Figura 3. Absorbtia in ultraviolet a cromoforilor aromatici fenilalanina, tirozina, triptofanul si tirozinatul.

La punctele de intersectie ale curbelor de absorbtie, 257 si 294 nm, valorile extinctiei sunt proportionale cu continutul total TRP+TYR. Dozarile se realizeaza la 294 nm deoarece acest punct corespunde maximului curbei de absorbtie a tirozinei. La 280 nm, concentratia celor 2 aminoacizi poate fi calculata dupa formula lui GOODWIN si MORTON :

$$E_{280} = y \cdot EM_1 + (x-y)EM_2$$

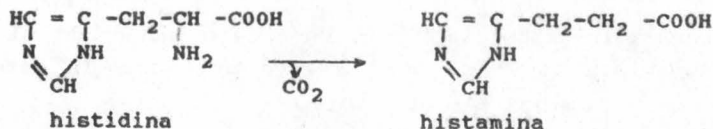
unde x - moli totali/l ; y - moli TYR/l ; $(x-y)$ - moli TRP/l ; EM_1 si EM_2 sunt extinctiile molare ale tirozinei si respectiv triptofanului in solutie alcalina (0,1 N) la 280 nm.

Intrucit majoritatea proteinelor contin resturi de tirozina, determinarea DO_{280nm} a unei solutii proteice reprezinta o metoda rapida de determinare a concentratiei proteice. Cistina prezinta o absorbtie slaba la 240 nm datorita puntii disulfurice. Toti aminoacizii absorb in UV indepartat (220 nm).

1.6. Proprietatile chimice ale aminoacizilor

Aminoacizii dau reactii caracteristice gruparii carboxil, gruparii amino si gruparii R care pot fi folosite in identificarea si dozarea lor din hidrolizatele proteice.

Gruparile carboxil dau reactii cunoscute cu metale, oxizi metalici, hidroxizi, de formare a unor derivati acizi (esteri, cloruri acide, amide, nitrili etc.). O reactie importanta, cu implicatii biochimice speciale este decarboxilarea aminoacizilor cu formare de amine. In vivo, reactia are loc sub actiunea unor enzime piridoxal 5-fosfat dependente (decarboxilaze) :

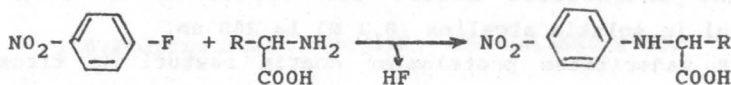


Histamina este un agent vasodilatator, creste permeabilitatea vaselor sangvine provocind pierderea proteinelor din plasma in spatiul extracelular, creste viteza batailor inimii, scade presiunea arteriala - simptome care insotesc reactiile alergice in care

aceasta amina este implicata. Forma acuta a acestor efecte poarta numele de soc histaminic. De asemenea, histamina stimuleaza secretia gastrica a pepsinei si a HCl, stimuleaza constrictia bronhiolilor, contractiile uterine, etc.

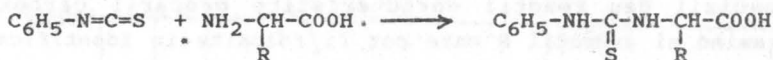
Gruparile amino dau reactii caracteristice cu HCl, HNO₂, de acilare, alchilare, etc.

Arilarea aminoacizilor cu 1-fluor-2,4-dinitrofluorbenzen

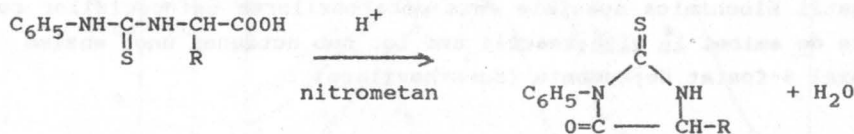


cu formare de dinitrofenil-aminoacizi, derivati galbeni ce pot fi dozati spectrofotometric - a fost folosita pentru prima data de SANGER, in determinarea structurii primare a unei proteine, insulina.

Fenilizotiocianatul reactioneaza usor cu aminoacizii producind acizii feniltiohidantoici corespunzatori:

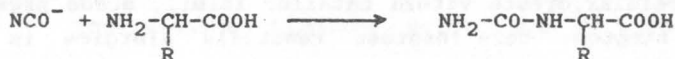


Acesti produsi, in prezenta unor solventi nehidroxilici si in mediu acid ciclizeaza formind feniltiohidantoine :

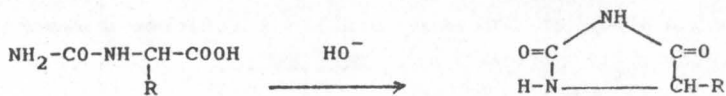


Feniltiohidantoin-aminoacizii sunt usor de caracterizat si de aceea pot fi dozati cantitativ, reactia este utilizata in determinarea secventei de aminoacizi a proteinelor.

Cianatul reactioneaza cu aminoacizii intr-o maniera similara cu fenilizotiocianatul:



In mediu slab alcalin produsul ciclizeaza formind o hidantoina:

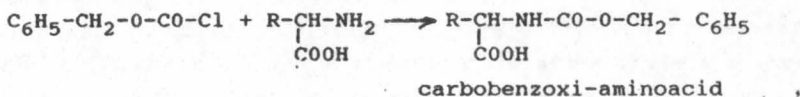


Si aceasta reactie este utilizata in elucidarea secventei de aminoacizi din proteine.

Clorurile acide acileaza gruparea amino a aminoacizilor. De exemplu, clorura de benzoil reactioneaza cu glicina - formind acidul hipuric, forma de excretie a acidului benzoic.

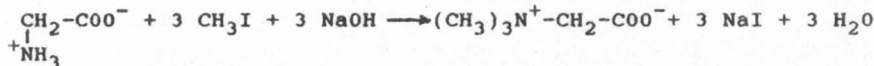


O alta clorura acida mult utilizata in biochimia proteinelor este clorocarbonatul de benzil:



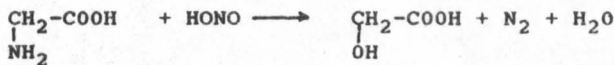
care conduce la formarea unor derivati carbобенzoxi.

Metilarea aminoacizilor conduce la betaine:



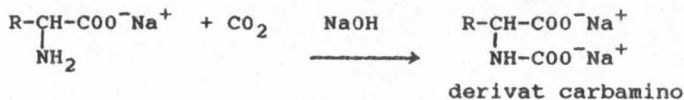
care sunt agenti de metilare in reactiile biochimice.

Aminoacizii reactioneaza cu acidul azotos formind hidroxiacizi:



Reactia sta la baza metodei VAN SLYKE de dozare a -aminoacizilor.

Aminoacizii reactioneaza cu dioxidul de carbon:



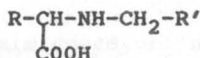
O reactie similara are loc intre dioxidul de carbon si gruparea amino a hemoglobinei formind grupari carbamino, in cadrul functiei acestei proteine de transport a acestui gaz de la tesuturile

periferice la plamini.

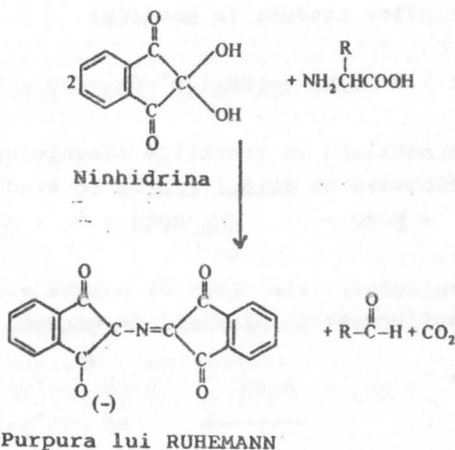
Grupurile α -amino ale aminoacizilor reactioneaza reversibil cu aldehidele, formind compusi numiti baze Schiff:



Compusi Schiff apar, intermediar, intr-un numar de reactii enzimatice, in cazul unor substraturi - compusi carbonilici si a unor enzime care au in centrul lor catalitic activ un rest de lizina. In acest caz particular, baza Schiff poate fi redusa in prezenta de $LiBH_4$, formindu-se un produs separabil :

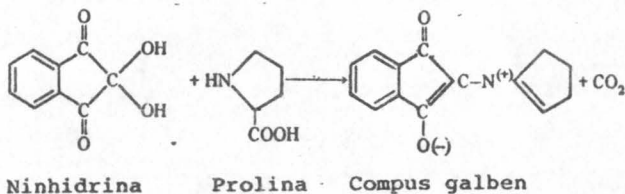


Reactia cu ninhidrina (tricetohidriden hidrat) este cea mai comuna reactie de detectie si dozare cantitativa a unui aminoacid. Ninhidrina este un puternic agent oxidant care provoaca dezaminarea oxidativa a α -aminoacizilor eliberind amoniac, CO_2 , aldehida corespunzatoare si o forma redusa a ninhidrinei :



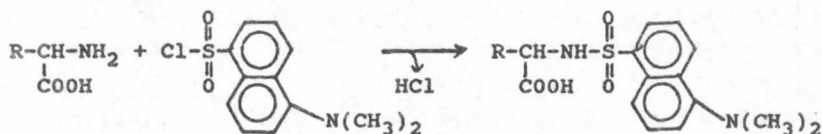
Amoniacul apoi reactioneaza cu ninhidrina redusa si cu un al doilea mol de ninhidrina formind o substanta purpurie ce are o absorbtie

maxima la 570 nm. Prolina formeaza un compus de culoare galbena cu un maxim de absorbtie la aproximativ 440 nm.



Deoarece absorbtia este proportionala cu cantitatea de aminoacid prezent in proba, aceasta reactie furnizeaza o metoda colorimetrica cantitativa de dozare a acestor compusi.

O metoda mai recenta de determinare a concentratiilor mici de aminoacizi utilizeaza clorura de dansil (clorura de dimetil-aminonaftalen-5-sulfonil) cind se formeaza compusi fluorescenti, a caror concentratie poate fi dozata la un fluorimetru :



Aceasta reactie este curent utilizata in descifrarea structurii primare a proteinelor .

Gruparile R ale aminoacizilor contin, de asemenea, radicali reactivi care pot participa la diferite tipuri de reactii.

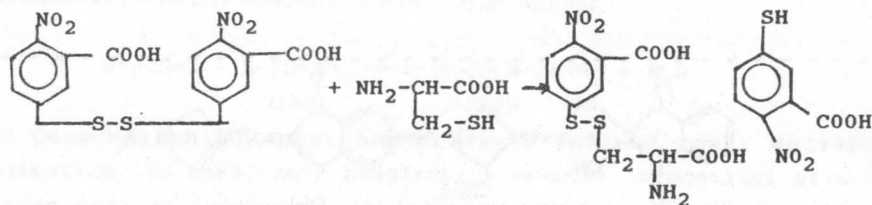
De exemplu, cisteina poate reactiona cu saruri ale metalelor grele (Ag,Pb sau Hg).



In reactia cu clorura mercurica, cisteina formeaza cloromercuri cisteina (un mercaptan).

Tot cisteina in reactia cu acidul 5,5'-ditio-bis-2-nitro

benzoic (reactivul Ellman) formeaza acidul tionitrobenzoic care poate fi determinat colorimetric, permitind dozarea aminoacidului.



In Tabelul 4 prezentam reactiile curente, folosite in biochimie, pentru detectarea unor aminoacizi particaliari.

Tabelul 4. Metode de identificare a aminoacizilor

DENUMIREA	REACTANTI	AMINOACID	CULOAREA
Reactia Millon	HgNO ₃ , in HNO ₃ cu urme de HNO ₂ .	TYR	rosu
Reactia xanto- proteica	HNO ₃ conc. la fierbere	TYR, TRP, PHE	galben
Reactia Hopkins- Cole	acid glioxilic in H ₂ SO ₄ conc.	TRP	purpuriu
Reactia Ehrlich	p-dimetilaminobenz- aldehida, in HCl conc.	TRP	albastru
Reactia Sakaguchi	α-naftol si NaClO	ARG	rosu
Reactia cu nitroprusiat	nitroprusiat de sodiu in NH ₃ diluat	CYS	rosu
Reactia Sullivan	1,2-naftochinon-4- sulfonat de sodiu si hidrosulfit de sodiu	CYS	rosu
Reactia Pauly	acid sulfanilic dia- zotat, in mediu alcalin	HIS, TYR	rosu
Reactia Folin- Ciocalteu	acid fosfomolibdo- tungstic	TYR	albastru

1.7. Metode de determinare cantitativa ale aminoacizilor

Metodele colorimetrice prezentate in Tabelul 4 sunt putin precise in special datorita faptului ca reactantii prezentati dau o serie de reactii secundare care interfereaza.

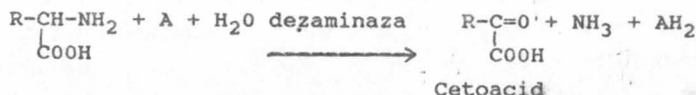
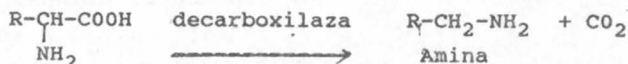
Metode microbiologice

Multe microorganisme cresc pe medii care includ cantitati adecvate de aminoacizi, vitamine, saruri, baze purinice si pirimidinice. Unele bacterii cresc cu o viteza scazuta cind unul dintre aminoacizi este prezent in cantitati mai mici decit cea optima. Se realizeaza un studiu al variatiei vitezei de crestere a unei bacterii in functie de diferite cantitati cunoscute dintr-un anumit aminoacid. Intr-un experiment paralel se determina viteza de crestere a bacteriei in medii in care s-au introdus cantitati variabile dintr-un hidrolizat proteic. Prin compararea vitezelor de crestere in cele doua tipuri de experimente se poate calcula cantitatea de aminoacid prezenta in hidrolizatul proteic si deci din proteina originala.

Viteza de crestere a unei suspensii bacteriene poate fi determinata prin masurarea cresterii turbiditatii sau a concentratiei unui produs al metabolismului ei.

Metode enzimatic

Cele mai precise si sensibile metode de dozare a aminoacizilor utilizeaza enzime ce catalizeaza transformarea unui singur aminoacid (chiar a unui singur stereoisomer al acestuia) cum ar fi decarboxilazele si dezaminazele,



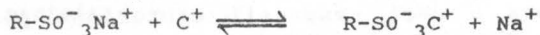
unde A. este un acceptor de hidrogen. Volumul de gaze (CO_2 , NH_3) eliberat poate fi determinat fie prin metode micro-manometrice, fie cu electrozi sensibili la ele.

1.8. Analiza cromatografica a aminoacizilor

Separarea cantitativa a fiecarui aminoacid dintr-un amestec complex, cum este hidrolizatul unei proteine este o tehnica laborioasa care presupune mai intii purificarea proteinei si apoi hidroliza ei.

Hidroliza totala se realizeaza cu HCl 6 N, la 100°C , in vacuum, timp de 24-72 ore, aminoacizii eliberati fiind separati prin cromatografie pe hartie, in strat subtire sau pe un schimbator de ioni (cationi).

Un schimbator de cationi este constituit dintr-o rasina (copolimer) cu o structura tridimensionala, in ochiurile ei de retea grefindu-se grupari sulfonil ($-\text{SO}_3^-$). Sarcina negativa a gruparilor sulfonil este neutralizata de protoni ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) sau de cationi ($-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$). Aceste structuri macromoleculare pot realiza reactii de schimb ionic de tipul



unde C^+ este un alt cation decit Na^+ . Schimbatorul de cationi este plasat pe o coloana cromatografica. Daca amestecul de aminoacizi este adus la pH 3, toti compusii devin incarcati pozitiv si pot fi retinuti pe coloana. Dupa sorbtia in stratul cromatografic a amestecului de aminoacizi se procedeaza la spalarea ei (elutia) cu solutii tampon adecvate ce au un pH si o concentratie (tarie ionica) crescinde. In aceste conditii, sarcinile pozitive ale aminoacizilor vor fi reduse gradat, interactiile de atractie electrostatica cu schimbatorul vor fi diminuate si aminoacizii vor fi eluati treptat de pe coloana. Se colecteaza lichidul (efluent) care paraseste coloana, sub forma unor fractii de volume egale. Aceste fractii sunt analizate din punctul de vedere al continutului in aminoacizi prin reactia cu ninhidrina. Reprezentind grafic pe ordonata absorbtia la 570 nm iar pe abscisa volumul de eluent se obtine o cromatograma. Identificarea fiecarui aminoacid in parte se realizeaza prin comparatie cu experimente similare realizate cu

aminoacizi puri. Estimarea concentratiei fiecarui aminoacid se realizeaza prin masurarea fiecarui pic de elutie. Teoretic, cel mai rapid vor fi eluati aminoacizii dicarboxilici : acidul aspartic si acidul glutamic , apoi cei neutri si in final vor parasi stratul cromatografic aminoacizii bazici (lizina, arginina si histidina) .

In Figura 4 prezentam cromatograma obtinuta in cazul analizei hidrolizatului acid al unui preparat de ribonucleaza.

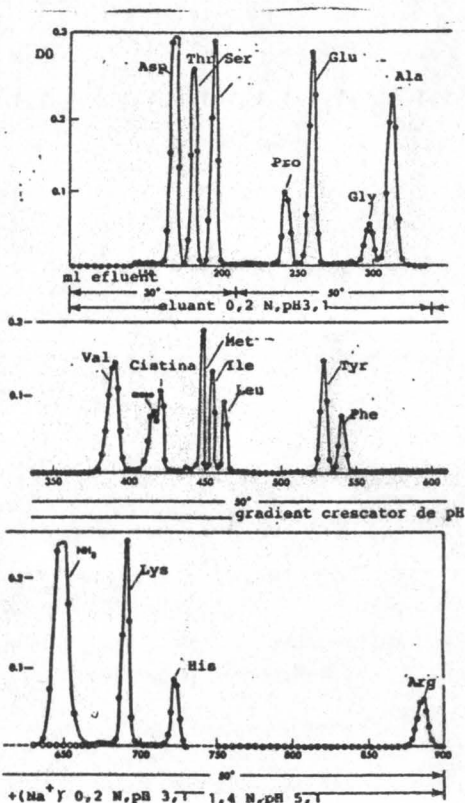


Figura 4

Analiza aminoacizilor dintr-un hidrolizat de ribonucleaza

În prezent există analizoare automate de aminoacizi care permit analiză rapidă a amestecurilor de aminoacizi. În Figura 5 prezentăm schematic principiul de funcționare al unui analizor automat de aminoacizi.

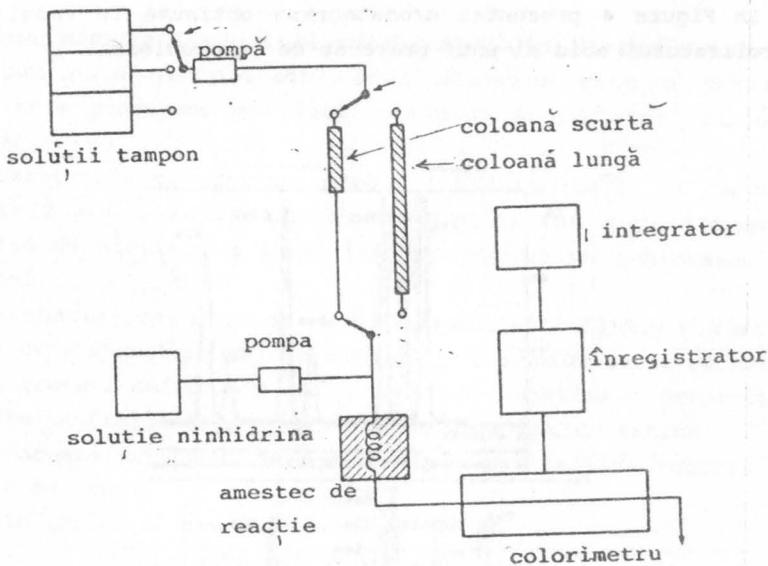


Figura 5

Componentele unui analizor automat de aminoacizi

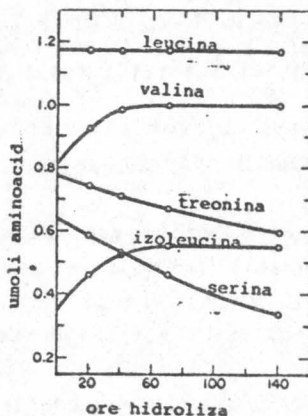
Cromatografia lichida de inalta performanta (High-performance liquid chromatography-HPLC) a înlocuit metodele cromatografice înstrat subțire și pe schimbatori de ioni în multe laboratoare. În HPLC, eluentul nu curge prin coloana (de oțel) sub acțiunea forței gravitaționale, ci sub o înaltă presiune. Particule foarte fine divizate sunt utilizate ca suport în coloana. Una dintre tehnicile HPLC cele mai noi utilizează și tratamentul hidrolizatului proteic cu fenilizotiocianat. Feniltiocarbamil-aminoacizii sunt separați pe coloana conform hidrofobicității lor pe un suport de silice la care radicalii R sunt atașați (HPLC în fază inversă).

Analiza rezultatelor trebuie să țină seama de faptul că prin

hidroliza acida unui aminoacizi sunt distrusi partial sau total. De exemplu, triptofanul este distrus total, iar identificarea si dozarea lui trebuie realizata dupa o hidroliza alcalina. Serina, treonina si tirozina sunt distrusi partial prin hidroliza acida a proteinei, de aceea pentru dozarea lor probele sunt hidrolizate un timp mai scurt. De fapt, analiza compozitiei in aminoacizi se face dupa realizarea hidrolizei perioade variabile de timp, rezultatele finale reprezentind compilarea mai multor date obtinute in experiente diferite. In Figura 6 prezentam scaderea continutului unor aminoacizi pe parcursul hidrolizei.

Figura 6

Degradarea unor aminoacizi in cursul hidrolizei acide a proteinelor



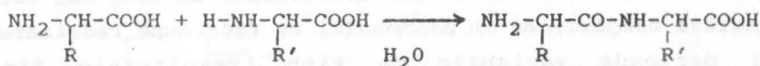
Indiferent de timpul hidrolizei glutamina si asparagina sunt hidrolizate la acizi corespunzatori. Pentru analiza lor se determina cantitatea de amoniac eliberat sau se realizeaza o hidroliza enzimatica.

Majoritatea aminoacizilor sunt distrusi complet in timpul hidrolizei alcaline. Pentru analiza continutului in triptofan, proteina este hidrolizata la 110°C, 16 ore, in 4,2 N NaOH - in prezenta amidonului in calitate de antioxidant.

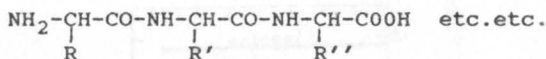
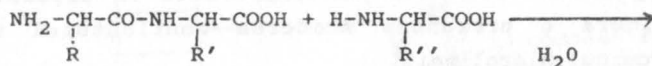
Hidroliza enzimatica se realizeaza cu proteaze, dupa ce proteina de analizat a fost denaturata termic, rezultind un amestec de peptide. Proteazele utilizate pot avea o larga specificitate de substrat : papaina, pepsina, chimotripsina, subtilizina sau pot fi specifice, cum este cazul tripsinei.

2. PEPTIDELE

Principala proprietate a aminoacizilor este aceea de a condensa între ei formind peptide și proteine :



dipeptida

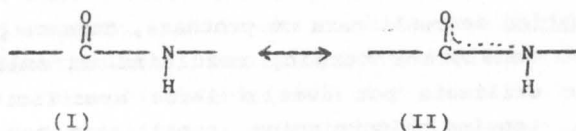


tripeptida

Prin adaugarea secventiala de noi aminoacizi se formeaza : tetrapeptide, pentapeptide, hexapeptide, etc. numite in general polipeptide.

La formarea legaturilor peptidice participa numai gruparile α -amino și α -carboxil, între care se elimina apa cu formarea unei legaturi peptidice (amidice). Echilibrul acestei reactii este deplasat spre hidroliza, formarea unei legaturi peptidice necesitind un aport de energie libera, biosinteza polipeptidelor și proteinelor fiind un proces endergonic.

Studiile cristalografice cu raze X realizate de PAULING și COREY în 1930 au stabilit structura precisa a aminoacizilor și peptidelor prin determinarea distantelor interatomice și a unghiurilor dintre legaturi. În cadrul legaturii peptidice, distanta C-N (1,32 Å) este mai mica decât este normal (1,49 Å) și are un caracter partial de dubla legatura. De asemenea, legatura C=O este mai lunga, indicind un caracter partial de simpla legatura. Deci, legatura peptidica poate fi descrisa mai corect de structura II :

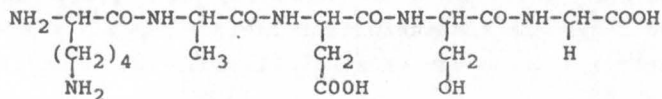


Astfel s-a stabilit ca legatura C-N prezinta proprietatile unei duble legaturi deci nu se poate roti liber. De asemenea, acesti cercetatori au aratat ca cei patru atomi ai legaturii peptidice sunt coplanari si ca oxigenul carbonilic si hidrogenul iminic se afla in pozitie trans. Cu alte cuvinte, aranjamentul in spatiu a unei catene peptidice este definit de rotatia in jurul α -atomului de carbon, unitatea peptidica fiind rigida si plana.

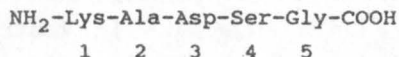
2.1. Peptide cu importanta biochimica

Peptidele care se gasesc in natura pot avea o structura lineara, ramificata sau ciclica. Nomenclatura biochimica a peptidelor lineare se realizeaza indicind succesiv aminoacizii, sub forma de radicali, de la extremitatea amino-terminala spre cea carboxil-terminala, ultimul aminoacid fiind denumit ca atare.

De exemplu, structura:



reprezinta o pentapeptida denumita lizil-alanil-aspartil-seril-glicina, ce poate fi scrisa prescurtat astfel :



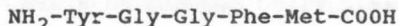
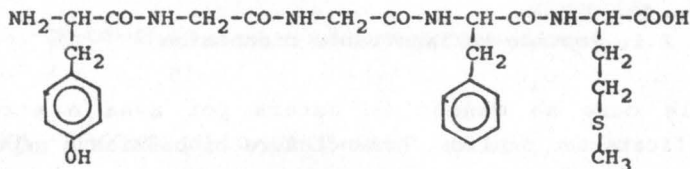
Peptide opiat

Opiatii de tipul morfinei sunt utilizati de mult pentru anihilarea durerii. S-a pus de mult intrebarea : De ce creierul vertebratelor contine receptori pentru alcalozii produsi de diferite plante ?

Astazi se cunoaste ca receptorii opiatii servesc pentru detectarea unor substante endogene ce regleaza perceptia durerii. Morfina isi exercita efectele farmacologice prin aceea ca prezinta similitudini functionale cu aceste substante prezente normal in

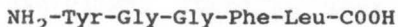
organismele vetebratelor.

In 1975, John HUGHES izoleaza doua peptide cu activitate opiat din creierul de porc. Acestea pentapeptide, numite metionin encefalina si leucin encefalina se gasesc la nivelul terminatiilor nervoase. Metionin encefalina este o pentaptida cu structura tirozil-glicil-glicil-fenilalanil-metionina :

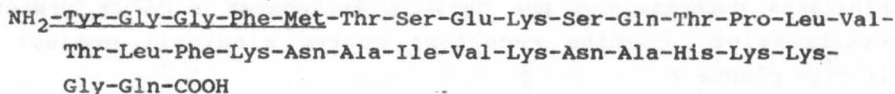


si are o actiune inhibitoare a senzatiei de durere datorita capacitatii de legare la receptorul morfinei.

Leucin encefalina are o structura similara :

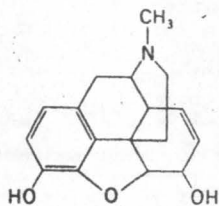


Un an mai tirziu, Roger GUILLEMIN a izolat peptide mai lungi, numite endorfine din lobul intermediar al glandei hipofize, care au o activitate similara morfinei. Prin injectare in ventriculii creierului β -endorfina induce o analgie profunda a intregului organism timp de citeva ore. Temperatura corpului este scazuta in timpul acestui interval. Aceste efecte dispar in citeva ore si animalul isi recapata comportamentul normal.

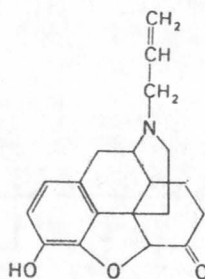


β -endorfina (β -END)

S-a pus in evidenta ca actiunea endorfinelor este reversata in citeva secunde dupa administrarea de naloxona, o substanta antagonista morfinei.



Morfina



Naloxona

Efectele comportamentale induse de endorfine sugereaza ca aceste peptide participa in mod normal la reglarea raspunsurilor emotionale.

β -endorfina are aceiasi secventa cu regiunea carboxil-termnala a β -lipotropinei (β -LPH), un hormon izolat din glanda hipofiza de CHOHLI. De fapt, β -endorfina este formata in vivo prin scindarea proteolitica a β -lipotropinei continuta in niste granule de stocare. Poliproteina : pro-opiomelanocortina (POMC), care la sobolan, este sintetizata atit in lobul anterior cit si in partea intermediara a hipofizei contine 7 hormoni polipeptidici diferiti (Figura 7). In ambele parti ale hipofizei, care au functii diferite, prelucrarea post-translationala a POMC conduce la separarea unui fragment N-terminal, a ACTH (hormonul adrenocorticotrop) si a β -LPH. La acest nivel, in lobul anterior prelucrarea post-translationala inceteaza. In partea intermediara, fragmentul N-terminal este scindat in continuare producind δ -MSH, (hormonul stimulator al melanocitelor), in timp ce ACTH este transformat in α -MSH si CLIP (corticotropin like intermediate lobe peptide) , iar β -LPH este scindat in δ -LPH si β -END. Acest prohormon (POMC) este format din patru regiuni similare, care probabil au evoluat prin duplicatii genetice succesive.

Majoritatea situsurilor de scindare din POMC sunt constituite din resturi bazice Lys-Arg, sugerind interventia unei enzime cu actiune catalitica similara tripsinei.

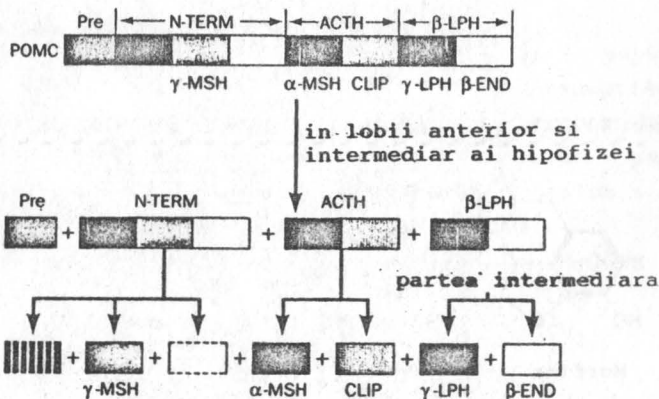


Figura 7.

Prelucrarea post-translatională , tesut- specifica a proopiomelanocortinei (POMC)

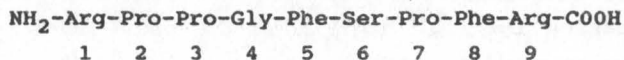
Acești hormoni au diferite activități care definesc funcțiile biologice ale celor doi lobi ai hipofizei. Astfel ACTH promovează creșterea cortexului glandei suprarenale și îl stimulează pentru a sintetiza un set de hormoni steroizi.

Bazându-ne pe acest exemplu concret vom defini o noțiune nouă introdusă în nomenclatura modernă a biochimiei proteinelor.

Poliproteinele sunt produsul translației la procariote și la eucariote, ce sunt supuse unor scindări post-tranlaționare pentru a conduce la produși cu activitate fiziologică. Un exemplu de poliproteina apare și în acest caz când dintr-un precursor sunt produși prin procese de proteoliză limitată mai mulți hormoni peptidici.

Bradikinina și kalikreinele

Bradikinina este o nonapeptidă aciclică produsă în sânge ce



dilata vasele de singe si le creste permeabilitatea. Ea este un efector fiziologic foarte puternic actionind in concentratii foarte mici (la cca 200 ng/Kg corp produce o scadere a presiunii singelui animalelor mici). Ea este, de asemenea, un constrictor al musculaturii netede, producind si dureri viscerale. Sunt date care atesta ca producerea bradikininei reprezinta mecanismul stimulării receptorilor durerii in timpul lezării tesuturilor. Ea este formata si intr-o varietate de conditii inflamatorii.

Bradikinină este sintetizată prin hidroliza unui numar de precursori mari, numiti kininogene. Enzimele care catalizeaza scindarea kininogenelor se numesc kalikreine. Toate kalikreinele scindeaza kininogenele la capatul C-terminal al secventei bradikininei, dar pozitia N-terminala variaza cu natura kalikreinei. Enzima din plasma sangvina elibereaza bradikinină, cea din tesuturile glandulare formeaza lizil-bradikinină. O polipeptida mai mare : Met-Lys-bradikinină apare in leucocite. Resturile N-terminale aditionale din acesti ultimi derivati sunt indepartate de aminopeptidazele din ficat si plamini, formind bradikinină (Figura 8).

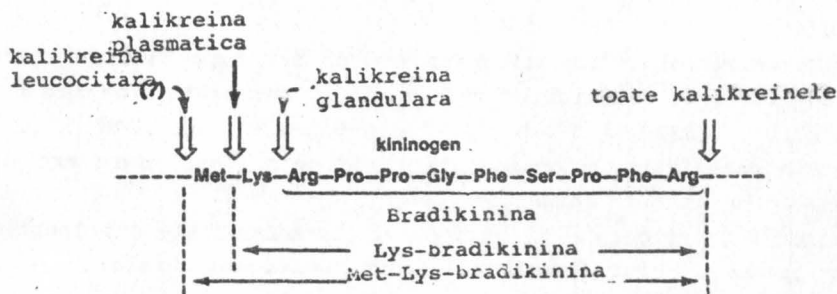
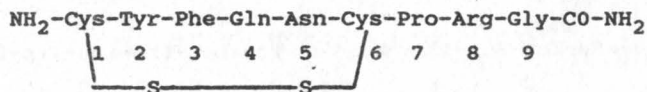


Figura 8

Activarea kininogenelor in singe si tesuturi

Procesul de activare al kininogenului sub actiunea kalikreinelor este corelat cu evenimentele ce activeaza liza cheagurilor de fibrina, pentru restabilirea circulatiei prin dilatarea vaselor concomitent cu indepartarea cheagului care le obstructioneaza. Actiunea kalikreinei este blocata de cel putin 3 inhibitori proteici din plasma sanguina.

Vasopresina este o nonapeptida ciclica, sintetizata de neuronii



localizati in hipofiza. Vasopresia sau hormonul antidiuretic permite reabsorbția apei la nivelul tubulilor renali, conducind la concentrarea urinei. In lipsa vasopresinei, se instaleaza diabetul insipid, stare patologica caracterizata prin faptul ca bolnavii au o urina foarte diluata (mai mult de 5 litri/zi).

Oxitocina este un hormon izolat din lobul posterior al hipofizei ce provoaca contractia musculaturii netede. Are o structura asemanatoare vasopresinei, deosebindu-se de aceasta prin doua resturi de aminoacizi. In pozitia 3, oxitocina prezinta un rest de izoleucina, iar in pozitia 8 - un rest de leucina.

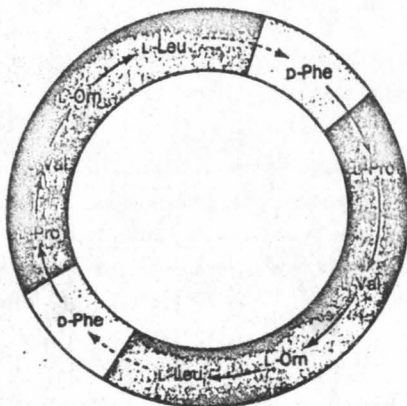
Antibioticele.

O serie de antibiotice au structuri peptidice ciclice, la care pot participa in mod exceptional aminoacizii seriei D.

De exemplu, gramicidina S este o decapeptida produsa de Bacillus brevis, care contine D-fenilalanina (Figura 9).

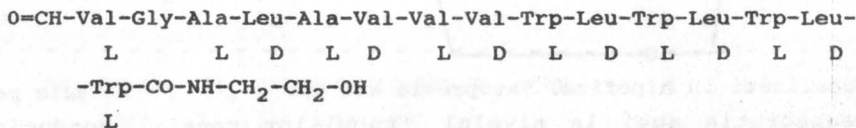
Figura 9

Secventa de aminoacizi
a gramicidinei S



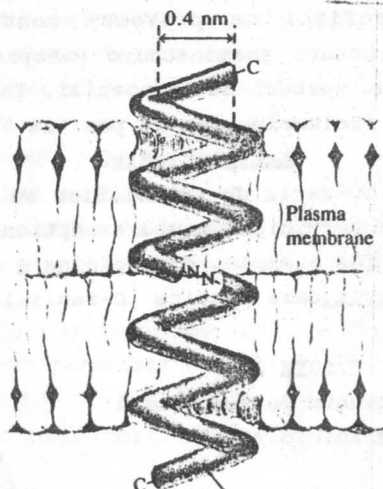
Din acelasi microorganism s-a separat gramicidina A, un antibiotic ionofor formator de canale trans-membranare ce permite trecerea protonilor si a cationilor alcalini, dar care este blocat de Ca^{2+} . Acest antibiotic este un polipeptid de 15 resturi de D si

L-aminoacizi, blocata la capatul N-terminal printr-o grupare formil si la cel C-terminal printr-un rest de etanolamina, legat printr-o

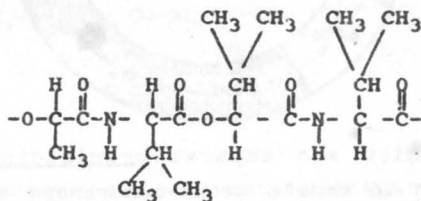


legatura amidica. De notat, ca toate aceste resturi sunt hidrofobe ce le permite distributia transmembranara. In cadrul canalului gramicidina A dimerizeaza intr-o maniera cap-cap (Figura 10).

Figura 10
Canalul transmembranar
format de gramicidina A



Valinomicina este un antibiotic de transport care utilizeaza energia rezultata din procesele redox mitocondriale pentru a face membranele penetrabile la anumiti ioni. Valinomicina are o structura ciclica, repetitiva (de trei ori), de tipul :

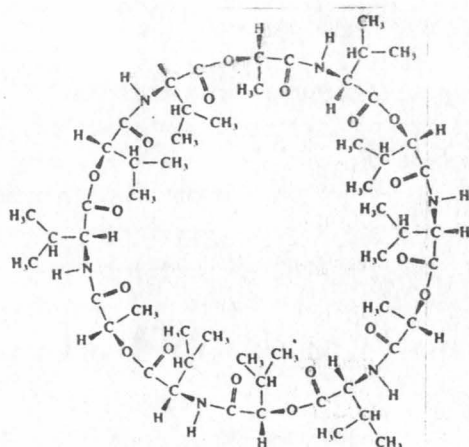


L-lactat L-Val D-hidroxi- D-Val
izovalerat

in care exista si doi hidroxiacizi.

In Figura 11 prezentam structura ciclica a valinomycinului.

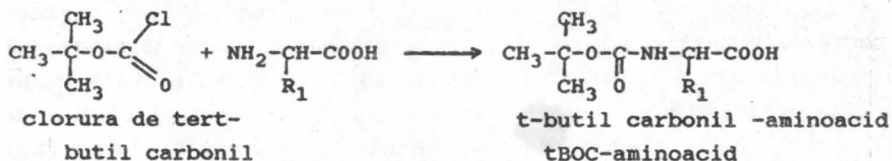
Figura 11
Structura antibioticului
ionofor valinomycin



2.2. Sinteza peptidelor

Peptidele pot fi sintetizate prin metode automate, in faza solida, dupa metoda descrisa de Bruce MERRIFIELD. Aminoacizii sunt activati la nivelul gruparii carboxil, iar gruparea amino este blocata pentru a se forma corect legatura peptidica. Aceste structuri ale aminoacizilor modificate chimic se adauga la o catena peptidica in crestere, legata covalent la un suport insolubil (perle de polistiren). Etapele acestei tehnici sunt urmatoarele :

1. Protectia gruparii amino a aminoacizilor:

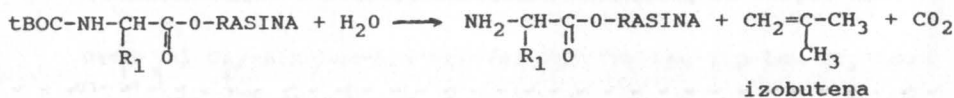


2. Legarea tBOC-aminoacidului 1 la o rasina (perle de polistiren) :

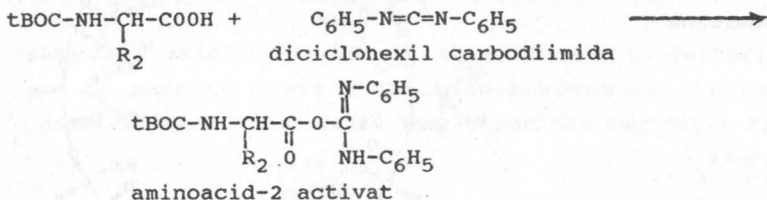


3. Deprotectia gruparii amino se realizeaza prin hidroliza acida

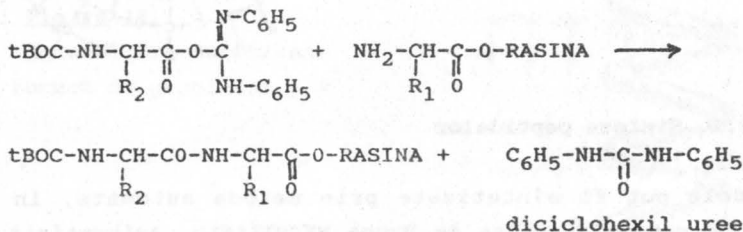
(in prezenta de acid trifluoracetic) :



4. Activarea aminoacidului 2 protejat cu gruparea tBOC, prin tratare cu diclohexilcarbodiimida (DCC):



5. Condensarea :



Diclohexil ureea se indeparteaza prin spalare.

Pentru condensarea altor aminoacizi se repeta etapele 3-5. Gruparea protectoare t-BOC poate fi indepartata succesiv prin hidroliza cu o solutie acida diluata, care nu afecteaza legatura peptidica (de exemplu cu acid trifloracetic).

In final, polipeptida este detasata de pe rasina prin tratare cu HF. Sinteza unei legaturi peptidice dureaza 3 ore. Prima sinteza realizata de MERRIFIELD a fost cea a bradikininei, ea a durat 27 ore si a fost realizata cu un randament de 85 %. A urmat sinteza celor doua catene ale insulinei (A de 21 resturi de aminoacizi si B - de 30 resturi de aminoacizi) si sinteza ribonucleazei (124 resturi). Ultima sinteza s-a realizat cu un randament de 18 %. Cea mai performanta sinteza a fost cea a unei proteine interferon, de 155 resturi de aminoacizi. Cu cit numarul de aminoacizi a proteinei este mai mare, cu atit randamentul procedurii este mai mic. Cel mai frecvent se sintetizeaza automat, peptide pina la 50 aminoacizi.

3.PROTEINE

Proteinele sunt polipeptide care contin un numar mare de aminoacizi (peste 50)

3.1.Clasificarea proteinelor

In literatura de specialitate exista mai multe sisteme de clasificare a proteinelor bazandu-se pe structura, proprietati fizico-chimice si rol biochimic.

Sistemul recomandat de American Society of Biological Chemists plaseaza proteinele in trei mari grupe: proteine simple, proteine conjugate si derivati proteici.

Proteine simple

a.Albumine : solubile in apa si in solutii saline (de exemplu albumina din serul sangvin, albumina din ou);

b.Globuline : putin solubile in apa, solubile in solutii saline (de exemplu,globulinele serice, multe globuline din seminte)

c.Prolamine : solubile in alcool 70-80 % si insolubile in apa sau etanol absolut (de exemplu,gliadina din griu, zeina din porumb)

d.Gluteline : insolubile in solventi neutri si solubile in solutii diluate de acizi sau baze (de exemplu, glutelina din griu)

e.Scleroproteinele : insolubile in solventi aposi (colagen, elastina, keratine).

Proteine conjugate

Aceste proteine au in structura grupari neproteice (prostetice) lipide,glucide,acizi nucleici,etc.

a.Nucleoproteine : sunt proteine bazice (histone si protamine) combinate cu acizii nucleici (se gasesc in nucleu, mitocondrii, microsomi).

b.Mucoproteine : sunt proteine combinate cu cantitati mari de glucide si aminoglucide (de exemplu,substantele de grup sangvin, gonadotropinele, mucinele).

c.Glicoproteinele : sunt proteine combinate cu cantitati mici de glucide si aminoglucide (de exemplu, globulinele serice).

d.Lipoproteinele : sunt proteine combinate cu lecitina,

colesterol, triacilgliceroli si alte lipide (se gasesc in principal in creier, tesutul nervos, fiind si componente structurale ale tuturor celulelor).

d. Cromoproteine : sunt proteine colorate (de exemplu, mioglobina, hemoglobina).

e. Metaloproteine : sunt proteine care contin metale (Cu-ceruloplasmina, Fe-feritina, un numar de enzime, etc.)

f. Fosfoproteine : sunt proteine care contin resturi ale acidului fosforic ce esterifica resturi de serina si treonina (de exemplu, cazeina din lapte, unele enzime).

Derivati proteici

Acesti compusi reprezinta derivati ai proteinelor, cu proprietati fizico-chimice modificate calitativ si/sau cantitativ.

Ca orice sistem de clasificare si acesta are o serie de deficiente. Astfel, o singura proteina poate fi inclusa in mai multe grupe particulare.

Un alt sistem de clasificare are la baza rolul functional al proteinelor. In functie de acest criteriu, proteinele pot fi incluse in doua mari clase .

Proteine cu rol structural

O serie de proteine (collagenul, elastina, keratinele) formeaza matricea sistemului osos si reprezinta componentul major al tesuturilor conjunctive conferind structura si forma organismului uman.

Proteine cu rol dinamic

Funcitiile dinamice ale proteinelor includ transportul, controlul metabolic, contractia, cataliza reactiilor biochimice etc.

a. Enzimele, catalizatorii tuturor reactiilor care au loc intr-un organism viu sint proteine fara exceptie .

b. Funcția de transport este realizata de un numar de proteine. Hemoglobina si mioglobina transporta oxigenul in sange si respectiv in muschi. Transferina transporta Fe prin sange. Alte proteine transporta hormoni de la situsurile lor de sinteza spre cele de actiune, prin sange. Multe medicamente si compusi toxici sunt transportate prin sange intr-o stare legata de anumite proteine.

c. Funcția de aparare este realizata de imunoglobuline si

interferon ce actioneaza contra infectiilor bacteriene si virale. Tot in aceasta categorie putem include fibrina care are rolul de a impiedica pierderile de sange din sistemul vascular.

d.O serie de hormoni au structura polipeptidica si proteica , ca de exemplu : insulina, glucagonul, tiotropina, somatotropina, hormonul luteinizant, hormonul foliculostimulator, etc.

e. Unele proteine au rol in mecanismul contractiei musculare, ca de exemplu actina si miozina.

f. Proteinele au roluri importante in controlul si reglarea transcriptiei si translatiei genelor. Printre acestea mentionam atit histonele, proteinele represor asociate cu DNA ce controleaza expresia genetica , proteinele ce fac parte din ribozomi cit si factorii transcriptionali si translationali.

g.Receptorii membranari sunt proteine care transmit semnalele extracelulare in interiorul celulei, reglindu-i activitatea fiziologica.

Exista si alte sisteme de clasificare la care vom apela pe parcurs. Analizind aceste sisteme de clasificare se reliefeaza rolul extrem de important al acestei clase de biomolecule in cadrul organizarii si functionarii materiei vii.

3.2. Proprietatile fizico-chimice ale proteinelor

Distinctia dintre polipeptide si proteine este de ordin cantitativ. In general, se considera ca proteinele au moleculele compuse din mai mult de 50 de aminoacizi.

Masa moleculara a proteinelor este cuprinsa intre 5000 daltoni (masa aproximativa a insulinei) si citeva milioane de daltoni. Un dalton reprezinta masa unui atom de hidrogen ce este egala cu 1.67×10^{-24} g. In prezent exista un numar de metode care permit determinarea masei moleculare a compusilor macromoleculari, bazate pe date analitice, microscopie electronica, presiune osmotica, tehnici de sedimentare, cromatografie, electroforeza, etc.

Presiunea osmotica este una din proprietatile coligative ale materiei vii care confera proteinelor proprietati speciale. Daca o solutie proteica este separata de o solutie tampon (fara proteine) printr-o membrana semipermeabila, solventul si componentele

tamponului vor strabate aceasta membrana care este total impermeabila pentru macromoleculele proteice conducind la o stare de nonechilibru. Activitatea chimica a apei din solutia proteica va fi mai scazuta decit in solutia din celalalt compartiment, apa avind tendinta de a trece din compartimentul cu solutia tampon spre cel cu solutia proteica. Marimea acestei tendinte se numeste presiune osmotica si poate fi determinata cu ajutorul unui osmometru care determina presiunea hidrostatica necesara pentru a preveni transportul apei prin membrana.

Pentru acest sistem cu doua compartimente, presiune osmotica este corelata cu concentratia solutiei m (moli/litru) prin legea lui VAN T'HOFF :

$$\lim_{m \rightarrow 0} \frac{\pi}{m} = RT \quad \text{sau} \quad \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{RTc} = 1/M$$

unde c - este concentratia in g/litru;

R - este constanta universala a gazelor ;

T - este temperatura in grade Kelvin.

Daca se fac determinari ale presiunii osmotice π la diferite concentratii c , valoarea masei moleculare M poate fi extrapolata la concentratia zero. Masuratorile trebuie realizate la pH izoelectric al proteinei deoarece π creste cind moleculele proteice sunt incarcate electric.

Cunoasterea presiunii osmotice a diferitelor compartimente celulare este importanta atit pentru intelegerea unor procese fiziologice cit si pentru evitarea unor accidente osmotice. Plasma sangvina si fluidul intracelular au concentratii mari de proteine. Fluidul interstitial ce reprezinta fluidul dintre celule si capilarele sangvine contine putine proteine. Deci plasma si fluidul intracelular au o presiune osmotica mai mare decit cea a fluidului interstitial. Aceasta presiune controleaza deplasarea apei intre aceste compartimente. Daca proteina predominanta din plasma, albumina (masa moleculara circa 65 Kd) scade in concentratie (ca in malnutritie, anumite maladii renale) apa trece in fluidul interstitial si apar edeme. In aceste procese, membranele celulare si peretii vaselor de singe functioneaza ca niste membrane semipermeabile. Efectuarea injectiilor cu medicamente dizolvate in ser fiziologic care are aceiasi presiune osmotica cu cea a plasmei

(sunt solutii izotonice) este un deziderat necesar a fi respectat pentru evitarea accidentelor osmotice.

Solubilitatea majoritatii proteinelor este in functie de taria ionica, pH si concentratia solventilor organici. Taria ionica este definita de relatia :

$$\mu = 1/2 \sum c_i z_i^2$$

in care c_i - sunt concentratiile speciilor ionice (i componente) din mediu, iar z_i sunt sarcinile acestor specii ionice. Solubilitatea unei proteine variaza cu taria ionica a mediului u dupa o curba gaussiana (in forma de clopot). In partea ascendenta a curbei - solubilitatea creste cu taria ionica a mediului, fenomen numit solubilizare (salting-in). In partea descendenta a curbei, la concentratii mari de sare, apare fenomenul de precipitare (salting-out). Fenomenul de salting-out, observat la tarii ionice mari, este rezultatul competitiei dintre gruparile ionice ale proteinei si ionii sarii pentru moleculele de apa care solvateaza macromoleculele proteice.

Solubilitatea proteinelor, la tarie ionica constanta, variaza cu pH dupa o curba in forma de U, cu un minimum de pH izoelectric-pI (pH la care suma sarcinilor pozitive este egala cu suma sarcinilor negative, sarcina neta fiind zero). La pI moleculele proteice precipita din solutie si nu migreaza in cimp electric. La $pH > pI$, moleculele proteice au o sarcina electrica neta negativa, iar la $pH < pI$ sunt incarcate pozitiv.

In Tabelul 5 prezentam valorile pI a unor proteine.

Tabelul 5. Valorile pI a unor proteine

proteina	pI
Pepsina	cca 1
Albumina serica (om)	5,8
α_1 -lipoproteina	5,5
Fibrinogen	5,8
Hemoglobina A	7,1
Ribonucleaza	7,8
Citocrom c	10,0
Timohistona	10,6

Proprietatile acido-bazice ale proteinelor sunt determinate de gruparile ionizabile din molecula. Deoarece pe fiecare catena polipeptidica exista o singura grupare α -amino si o singura grupare α -carboxil, majoritatea gruparilor ionizabile provin din gruparile R care substituie α -atomul de carbon. De exemplu, in cazul β -lactoglobulinei, proteina cu o masa moleculara de 40 KD exista 4 grupari imidazol (histidina), 27 grupari amoniu (lizina), 59 grupari γ -carboxil (acidul glutamic), 7 grupari guanidinium (arginina) si 30 grupari amidice.

Proteinele sunt polielectroliti complecsi, policationi in solutie acida si cind sunt titrate cu baze dau curbe dificil de interpretat datorita suprapunerii valorilor pK_a a multor grupari care disociaza. La titrarea cu baze, la un anumit pH se formeaza forma Z (zwitterion), dupa care apar formele anionice, ca in cazul titrarii unui aminoacid.

Chiar daca aceste curbe de titrare nu au o forma caracteristica, ele dau informatii asupra gruparilor ionizabile prezente. Trebuie notat ca proteinele au proprietati de solutii tampon (in special, hemoglobina) si joaca un rol important in controlul pH in sistemele biologice.

Valorile pK_a pentru gruparile titrabile din proteine difera cu cel putin o unitate de pH de valoarea pK_a a aminoacidului respectiv, singur in solutie. Daca, de exemplu, o proteina contine 10 resturi de acid aspartic, fiecare grupare β -carboxil are o valoare pK_a caracteristica ce variaza in domeniul de pH 3-6. Aceste modificari ale valorii pK_a unui aminoacid inserat in structura unei proteine sunt datorate a trei factori :

- (i) efectelor electrostatice rezultate din ionizarea altor grupari din proteina ;
- (ii) efectului mediului datorat vecinatatii unor resturi hidrofobe ;
- (iii) formarii unor puncti de hidrogen.

Proprietatile fizice ale unei proteine au valori minime la pI. La acest pH, mobilitatea in cimp electric, presiunea osmotica, capacitatea de hidratare, viscozitatea si solubilitatea sunt minime.

3.3. Metode de studiu a proteinelor

Metodele curente folosite in studiul proteinelor sunt electroforeza, cromatografia, ultracentrifugarea, cristalografia cu raze X, tehnologia DNA recombinant, etc.

Electroforeza

Este o metoda de separare intr-un gradient de potential a unor compusi (aminoacizi, peptide, proteine) incarcati electric.

Viteza de migrare v a unei proteine intr-un cimp electric depinde de taria cimpului electric E , de sarcina neta a proteinei z si de coeficientul frictional f :

$$v = E \cdot z / f$$

Viteza de migrare a moleculei incarcate electric spre polul de sens opus creste cu intensitatea cimpului electric E si cu sarcina electrica totala a proteinei si scade cu viscozitatea mediului care da nastere unor forte de frictiune. Coeficientul f depinde atat de masa si forma proteinei, cit si de viscozitatea mediului.

Suportul pe care are loc migrarea este un material poros : hirtie, poliacrilamida, agaroză, etc. si inert din punct de vedere al interactiilor cu proteinele de separat. In cazul in care suportul este poliacrilamida, separarea se face nu numai in functie de sarcina electrica neta (semnul si marimea ei) ci si de masa moleculara a proteinelor.

Sa luam in considerare separarea electroforetica a proteinelor serului uman la pH 8,6 cind majoritatea acestor proteine sunt incarcate negativ si migreaza catre anod. Dupa terminarea migrarii electroforetice, benzile proteice separate in cimp electric sunt vizualizate prin tratamente cu coloranti specifici ca Amidoblack, Comassie Brilliant, etc. Se observa cel putin 5 benzi proteice, colorate cu intensitati diferite, denumite in ordinea migrarii lor de la anod spre catod (Figura 12). Aceste zone nu corespund unor proteine unice, ci unui numar de proteine cu proprietati fizico-chimice apropiate, ce le permit sa migreze strins. Densitometrarea acestor geluri care poarta proteinele separate electroforetic arata ca picurile proteice nu sint simetrice, ceea ce indica heterogenitatea compozitiei lor. Prin optimizarea conditiilor de separare electroforetica in gel de poliacrilamida se pot evidentia

25-30 benzi proteice distincte.

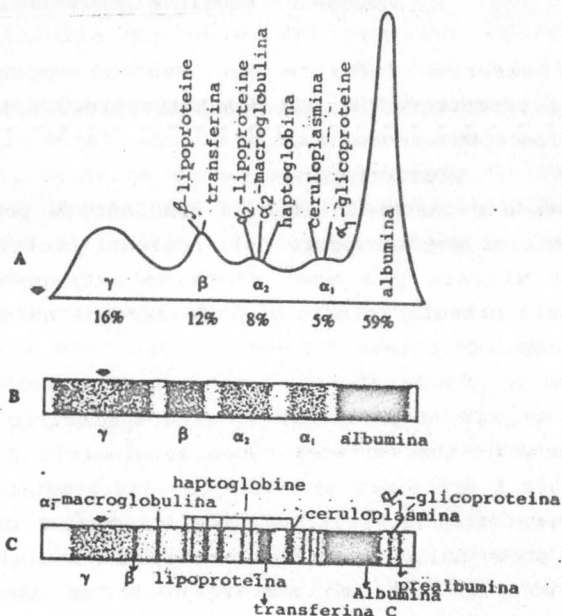


Figura 12. Reprezentarea schematica a rezultatelor separarii proteinelor din serul de om normal la pH 8.6. obtinute prin A) electroforeza zonala. B) electroforeza pe hartie si C) electroforeza in gel de amidon

In regiunea α_1 -globulinelor s-a identificat prezenta α_1 -glicoproteinei acide, α_1 T-glicoproteinei, α_1 -antitripsinei, transcortinei, α_1 -antichimotripsinei, a proteinei de legare a vitaminei D, a α_1 -lipoproteinelor, etc.

In regiunea α_2 -globulinelor s-au identificat : proteina de legare a retinolului, haptoglobina, protrombina, factorul antihemolitic, α_2 -macroglobulina, α_2 -glicoproteine, etc.

In regiunea α_1 - si α_2 -globulinelor s-au identificat : proteina de legare a tiroxinei, ceruloplasmina, transcobalamina I, Factorul X Stuart-Power, inhibitorul inter- α -tripsinei, Gc globulina, etc.

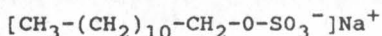
In regiunea β -globulinelor s-au identificat: hemopexina, proteina de legare a steroizilor, transferina, globulina insolubila la rece, factorii V, VII, IX de coagulare a singelui, plasminogenul,

β_1 -lipoproteine, etc.

In regiunea β_2 -globulinelor migreaza β_2 -macroglobulina, β_2 -glicoproteinele, fibrinogenul (ϕ), factorii XI, XII, XIII de coagulare a singelui, etc.

In regiunea γ -globulinelor migreaza imunoglobulinele G, A, D, E si M, precum si enzima amilaza. In regiunea α_2 -globulinelor s-a identificat properdina, iar cel mai putin migrate sunt anafilatoxina si enzima lizozim.

Proteinele pot fi separate pe baza masei lor prin electroforeza in gel de poliacrilamida in conditii denaturante. Amestecul de proteine este solubilizat intr-o solutie de dodecilsulfat de sodiu (SDS), un detergent anionic care distruge toate interactiile necovalente din proteinele native.



Mercaptoetanorul sau ditiotreitului este adaugat pentru a reduce punctile disulfurice. Anionii de SDS se leaga la catena polipeptidica, la un raport de cca o molecula SDS la fiecare 2 resturi de aminoacizi, formindu-se un complex al SDS cu proteina denaturata cu o sarcina electrica neta, care este proportionala cu masa proteinei. Complexele SDS-proteine denaturate sunt supuse electroforezei in gel de poliacrilamida (PAA) si vor migra de la polul (-) la polul (+) conform masei lor. Dupa separare, proteinele pot fi vizualizate cu un colorant (de exemplu, Coomassie blue). Mobilitatea catenelor polipeptidice este linear proportionala cu logaritmul masei lor.

Relatia nu este general valabila, unele glicoproteine si proteine membranare prezentind anomalii.

Separarea electroforetica a proteinelor pe gel de PAA-SDS este o metoda rapida si sensibila, 0,1 μg proteina (cca 2 pmoli) dind o banda distincta la colorare cu Coomassie blue si chiar mai putin (cca 0,02 μg) la colorare cu argint. Proteinele ce au o masa care difera prin cca 2 % (de exemplu, 40 si 41 kD) pot fi separate intre ele.

In Figura 13 prezentam separarea electroforetic a unor proteine cu diferite mase moleculare in gel de PAA-SDS (a) o curba de calibrare necesara studiului unei proteine a carei masa moleculara dorim s-o determinam (b).

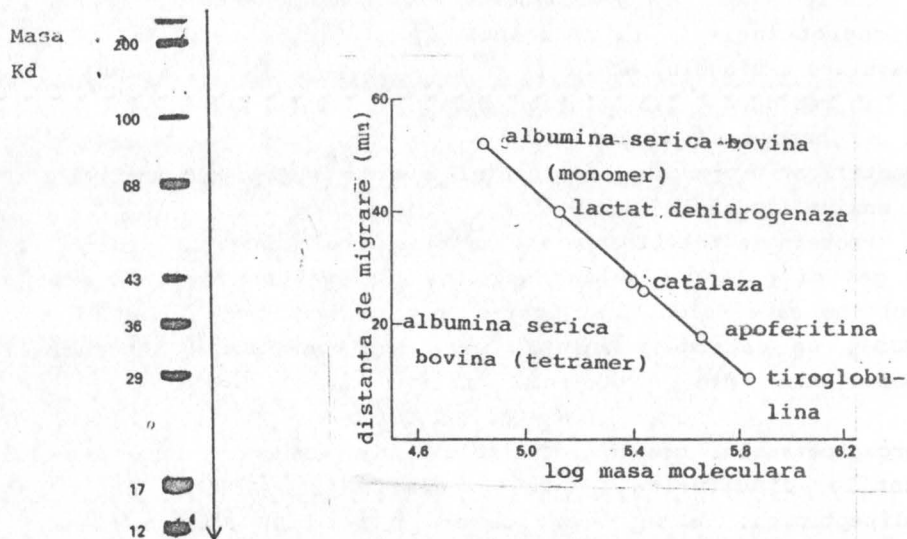


Figura 13. Migrarea electroforetica in PAA -SDS a unor proteine cu masa moleculara cunoscuta (a) si realizarea unei curbe etalon (b) in vederea determinarii de mase moleculare pentru proteine luate in studiu in acest scop.

Determinarea masei moleculare a unei proteine prin electroforeza PAA-SDS se realizeaza cu o precizie de 5 - 10 %.

Proteinele pot fi separate electroforetic pe baza punctului lor izoelectric (pI). Daca un amestec de proteine este separat electroforetic intr-un suport cu un gradient stabil de pH in care pH creste lent de la anod spre catod, fiecare proteina va migra pina la pozitia in care pH gradientului este egal cu pH ei izoelectric. Metoda poarta denumirea de focusare izoelectrica.

Gradientul de pH in gel este format prin separarea electroforetica a unui amestec de poliamfoliti (mici polimeri poli-

incarcati) ce au mai multe valori pI. Sub influenta unui cimp electric, un amestec din acesti poliamfoliti se va separa conform punctelor lor izoelectrice formind un gradient de pH ce poate fi stabilizat prin prepararea unui gradient de concentratie in zaharoza.

Focusarea izoelectrica poate separa usor proteinele ce difera prin pI cu cca 0,01 unitati, adica printr-o singura sarcina neta.

Aceasta metoda poate fi combinata cu PAA-SDS electroforeza obtinindu-se separari cu performante deosebite. Proba este supusa mai intii focusarii izoelectrice. Gelul rezultat este apoi plasat orizontal si supus electroforezei PAA-SDS verticale, obtinindu-se o schita bidimensionala de spoturi. Intr-un astfel de gel, proteinele au fost separate in directia orizontala pe baza punctului lor izoelectric si in directie verticala pe baza masei lor. De exemplu, printr-un astfel de procedeu s-au separat mai mult de 1000 proteine din E.coli.

Electroforeza permite separarea unor cantitati mici de proteine (micrograme), chiar daca se adapteaza unor conditii preparative.

Gel cromatografia

Una dintre tehnicile clasice, utilizata curent in separarea si caracterizarea proteinelor pe baza marimii lor este gel-cromatografia. Proba este aplicata la partea de sus a unei coloane cromatografice umpluta cu un material poros, insolubil, perlat format dintr-un polimer hidratat de tipul dextranului, agarozei sau poliacrilamidei, cum sunt preparatele comerciale: Sephadex, Sepharose, Bio-Gel - livrate de firmele Pharmacia, Bio-Rad, etc. Aceste preparate sunt constituite din perle cu un diametru de cca 100 μ m (0,1mm). Moleculele mici penetreaza in aceste perle, in timp ce moleculele mai mari nu pot intra putind fi eluate cu volume mici de eluant. Moleculele mici ce intra in perla de gel sufera un proces de repartitie intre faza mobila (eluantul) si faza stationara (lichidul care imbiba gelul).

Prin gel cromatografie proteinele se pot separa in ordinea inversa a maselor moleculare, in cantitati mult mai mari decit in cazul separarii electroforetice. Aceasta tehnica permite determinarea masei moleculare a unei proteine dintr-un amestec, daca este posibila evidentierea functiei ei biologice. O coloana

cromatografica este calibrata prin cromatografierea unui numar de proteine cu mase moleculare cunoscute (Figura 14). Se traseaza o

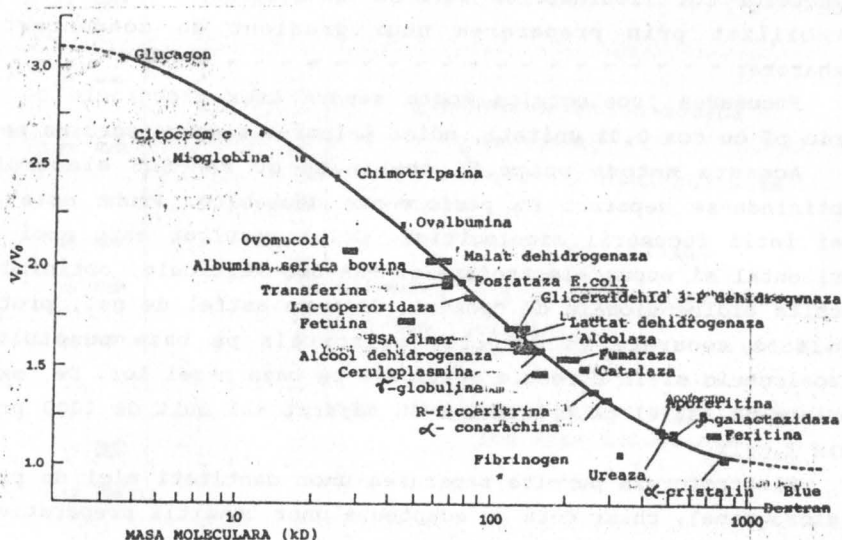


Figura 14. Curba de calibrare a unei coloane de Sephadex G-200

cromatograma indicind pe abscisa log masei moleculare a proteinelor standard si pe ordonata raportul V_e/V_0 . V_0 - este volumul de eluant care permite spalarea unei proteine de pe stratul cromatografic (de la sorbtia proteinei pina la atingerea concentratiei ei maxime), iar V_e este volumul spatiului gol, dintre perlele gelului (determinat experimental prin eluarea produsului Dextran Blue 2000 cu masa de 2 milioane, ce strabate liber stratul cromatografic).

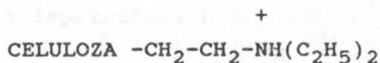
Pe aceiasi coloana se cromatografiază si proteina luata in studiu , se determina V_e si cu ajutorul curbei etalon se calculează masa moleculara.

Cromatografia de schimb ionic

Proteinele pot fi separate si pe baza sarcinii lor nete prin cromatografie pe schimbatori de ioni. Dacă o proteina are o sarcina electrica neta pozitiva la pH 7, ea se leaga la un schimbator de cationi, de tipul $R-COO^-Na^+$, in timp ce proteinele incarcate

negativ vor fi excluse de pe stratul cromatografic. Proteina incarcata pozitiv si legata pe coloana va fi eluata (eliberata) de pe aceasta, de exemplu prin cresterea concentratiei de NaCl in tamponul de elutie. Ionii de Na^+ vor competitiona cu sarcina pozitive a proteinei pentru situsurile negative ale schimbatorului. Proteinele cu o densitate scazuta a sarcinii nete pozitive vor parasi stratul cromatografic inaintea proteinelor cu o densitate a sarcinii pozitiva mai mare. Un exemplu, de cationit utilizat frecvent in separarea proteinelor cationice este CM-celuloza, ce are un suport hidrofil de celuloza, la care s-au legat covalent grupari $-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{Na}^+$.

Proteinele incarcate negativ (proteinele anionice) pot fi separate prin cromatografie pe DEAE-celuloza, schimbator incarcat pozitiv (anionit). De exemplu, DEAE-celuloza are structura :



Cromatografia de afinitate

O caracteristica a multor proteine este capacitatea de a recunoaste si de a lega necovalent dar specific - anumiti compusi (liganzi) pe baza unei complementaritati structurale. Aceasta proprietate a fost utilizata in tehnica cromatografiei de afinitate pentru purificarea proteinelor. Ligandul este atasat covalent la o matrice inerta si poroasa, constituind un suport cromatografic de afinitate. Cind un amestec de proteine este trecut printr-o coloana umpluta cu un astfel de suport de afinitate, numai proteina care recunoaste structura ligandului va fi retinuta, celelalte parasind stratul cromatografic. Ulterior, prin modificarea conditiilor de elutie, proteina este eliberata de pe suportul de afinitate.

Cromatografia de afinitate a fost folosita pentru purificarea enzimelor, anticorpilor, proteinelor de transport, receptorilor hormonal si chiar a celulelor intregi. De exemplu, receptorul insulinei- o proteina care se gaseste in concentratii extrem de mici pe suprafata unor celule, a fost purificat pe un suport de afinitate constituit din agaroz la care s-a atasat covalent insulina.

Un alt exemplu, il constituie suportul de afinitate format din perle de sticla la care s-a legat covalent glucoza. Cu acest suport

s-a purificat o proteina din plante concanavalina A (o lectina) care are o inalta afinitate pentru glucoza. Concanavalina A poate fi eliberata de pe coloana prin adaugarea unei solutii concentrate de glucoza , care dizlocuieste resturile de glucoza legate de suportul cromatografic .

Cromatografia de imunoafinitate utilizeaza anticorpi monoclonali legati la un suport cromatografic, permitind separarea proteinelor care au provocat aparitia acestor anticorpi.

Ultracentrifugarea

Centrifugarea este o metoda general aplicabila pentru separarea si analiza celulelor, organitelor si macromoleculelor biologice. O particula se misca circular cu o raza r la o viteza angulara intr-un cimp centrifugal egal cu $\omega^2 r$.

Fora centrifugala F_c exercitata asupra particulei este egala cu produsul dintre masa ei efectiva m' si cimpul centrifugal :

$$F_c = m' \omega^2 \cdot r = m(1 - \bar{v} \rho) \omega^2 r \quad (2)$$

Masa efectiva m' este mai mica decit masa m deoarece fluidul dizlocuit exercita o forta opusa. Factorul "buoyancy" este egal cu $(1 - \bar{v} \rho)$, unde \bar{v} este volumul partial specific al particulei, iar ρ densitatea solutiei. O particula se misca in acest cimp la o viteza constanta v cind F_c este egal cu curgerea viscoasa f , unde f este coeficientul frictional al particulei. Deci, viteza de migrare (viteza de sedimentare) a particulei este :

$$v = \frac{F_c}{f} = \frac{m(1 - \bar{v} \rho) \omega^2 r}{f} \quad (3)$$

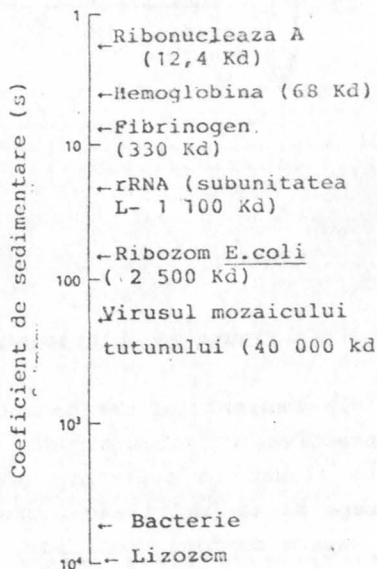
De notat ca aceasta expresie pentru deplasarea intr-un cimp centrifugal este analoaga cu ecuatia 1 pentru deplasarea in cimp electric.

Ecuatia 3 arata ca viteza de sedimentare este direct proportionala cu intensitatea cimpului centrifugal. Deci, este posibil a defini un parametru al sedimentarii ce depinde de proprietatile particulei si solutiei, fiind independent de viteza de rotatie. Coeficientul de sedimentare s , definit ca viteza raportata la cimpul centrifugal este egal cu :

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v} \rho)}{f} \quad (4)$$

Coeficientul de sedimentare se exprima in unitati Svedberg. Un Svedberg (S) este egal cu 10^{-13} secunde. In Figura 15 prezentam valorile coeficientilor de sedimentare a unor molecule si celule.

Figura 15. Scala coeficientilor de sedimentare a unor molecule si celule



O serie de concluzii importante pot fi trase din ecuatia 3 :

- viteza de sedimentare a unei particule este proportionala cu masa ei. O proteina de 200 Kd se deplaseaza cu o viteza de 1/2 din viteza unei proteine de 100 Kd de aceiasi forma si densitate.
- o particula densa se deplaseaza mai rapid decit una mai putin densa;
- forma particulei ,de asemenea, este importanta deoarece ea afecteaza viscozitatea. Coeficientul frictional al unei particule compacte este mai mic decit al unei particule extinse, pentru aceiasi masa.
- viteza de sedimentare depinde de asemenea de densitatea solutiei. Particule sedimenteaza cind $\bar{v}_f < 1$, plutesc cind $\bar{v}_f > 1$, si nu se deplaseaza cind $\bar{v}_f = 1$.

In centrifugarea zonala (band centrifugare) , prima etapa consta din formarea unui gradient de densitate intr-un tub de centrifuga prin amestecarea in diferite proportii a unei solutii cu densitate mica (5 % zaharoza) cu una cu o densitate mare (20 % zaharoza).

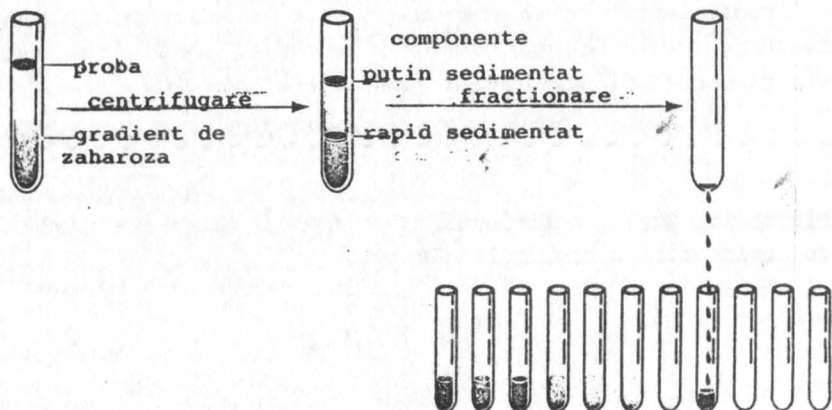


Figura 16. Ultracentrifugarea zonala

Rolul gradientului de densitate aici este de a preveni curgerea convectiva. Un volum mic din solutia continind amestecul de proteine este plasat la suprafata gradientului de densitate. Cind rotorul incepe sa se invirteasca, proteinele se deplaseaza prin gradient si se separa conform coeficientilor de sedimentare. Centrifugarea este stopata inainte ca cea mai rapida proteina sa ajunga la baza tubului. Benzile separate pot fi colectate prin practicarea unui orificiu la baza tubului, colectindu-se picaturi. Acestea sunt analizate din punct de vedere al concentratiei proteice sau a unei activitati catalitice (Figura 16).

Aceasta tehnica a vitezei de sedimentare permite separarea proteinelor care difera printr-un coeficient de sedimentare de cel putin 2.

Masa unei proteine poate fi determinata direct prin echilibrul de sedimentare, in care proba este centrifugata la o viteza relativ mica, la care sedimentarea contrabalanseaza difuzia. In aceste conditii, se formeaza un gradient lent al concentratiei proteinei. Dependenta concentratiei de distanta de la axul de rotatie permite determinarea masei particulei.

Masa m este data de ecuatie :

$$m = \frac{2 kT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \log_e c_2 / c_1 (r_2^2 - r_1^2) \quad (5)$$

unde c_1 si c_2 sunt concentratiile la distantele r_1 si r_2 de la axa de rotatie, K este constanta Boltzmann si T -temperatura absoluta.

Aceasta tehnica pentru determinarea masei este riguroasa si poate fi aplicata in conditii nedenanturante in care structura multimerica a unei proteine este mentinuta. In contrast, PAA-SDS electroforeza permite estimarea masei catenelor polipeptidice in conditii denaturante.

Cristalografia cu raze X

Intelegerea structurii si functiei unei proteine a fost posibila numai dupa introducerea cristalografiei cu raze X, o tehnica ce releva structura tridimensionala, pozitiile atomilor in molecula proteinei. Pentru a se realiza aceasta analiza este necesara obtinerea cristalelor proteinei, de regula prin adaugare de sulfat de amoniu la o solutie concentrata de proteina pentru a-i reduce solubilitatea. De exemplu, cristalizarea mioglobinei se realizeaza cu o solutie de sulfat de amoniu 3 M. Precipitarea lenta favorizeaza formarea de cristale inalt ordonate. In analiza cristalografica cu raze X sunt necesare : o sursa de raze X, un cristal de proteina si un detector. O fascicul de raze X cu lungimea de 1,54 Å este produs prin iradierea unei tinte de cupru cu un fascicul accelerat de electroni. Un fascicul ingust de raze X loveste cristalul de proteina. Parte din el trece prin cristal, restul este dispersat in diferite directii. Razele dispersate sau difractate pot fi detectate pe un film, inegrarea emulsiei fiind proportionala cu intensitatea razei X difractate (Figura 17).

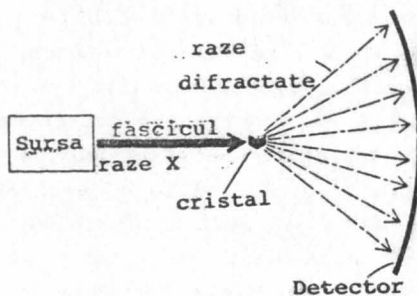


Figura 17. Principiul unui experiment de cristalografie cu raze X

Trasaturile de baza ale acestei tehnici sunt :

1. Electronii difracta razele X. Amplitudinea unei dispersate de un atom este proportionala cu numarul lui de electroni. Astfel, un atom de carbon va difracta de 6 ori mai puternic decit un atom de H un fascicul de raze X.

2. Undele dispersate se recombina. Fiecare atom contribuie la fiecare fascicul dispersat. Undele dispersate se intaresc una pe alta daca ele sunt in faza sau se anuleaza una pe alta daca sunt in afara fazei.

3. Modul in care undele dispersate se recombina depinde de aranjamentul atomic.

Cristalul proteinei este montat intr-un capilar si positionat cu o orientare precisa in raport cu fasciculul de raze X si cu filmul. Deplasarea cu precizie a cristalului are ca rezultat obtinerea unor fotografii a unui aranjament regulat al spoturilor numite reflexii. Este masurata intensitatea fiecarui spot. Aceste intensitati reprezinta datele experimentale de baza ale analizei cristalografice cu raze X. Urmatoarea etapa consta in reconstituirea unei imagini a proteinei din intensitatile observate. Imaginea este formata prin aplicarea unei relatii matematice numita transformarea Fourier. Pentru fiecare spot, aceasta operatiune produce o unda a densitatii electronice, a carei amplitudine este proportionala cu radacina patrata a intensitatii spotului observata. Fiecare unda este caracterizata printr-o faza, care indica daca ea intareste sau anuleaza undele ce contribuie la celelalte spoturi. Aceste faze pot fi deduse prin realizarea unor studii pe proteine modificate, la care s-au introdus markeri de referinta (atomi grei ca cei de U sau Hg la situsuri specifice ale proteinei). Urmatoarea etapa consta in calcularea unei hartii de densitati electronice, care da densitatea de electroni intr-un numar mare de puncte spatiate regulat in cristal. Distributia tridimensionala a densitatii de electroni este reprezentata de o serie de sectiuni paralele realizate de la un capat la altul. Fiecare sectiune este o folie transparenta din plastic pe care distributia densitatii de electroni este reprezentata de linii conturate, similare cu liniile geologice care indica altitudinea. Urmatoarea etapa este interpretarea hartii densitatilor electronice. Un factor critic este rezolutia analizei

cu raze X care este determinata de numarul intensitatilor dispersate utilizat in sinteza Fourier. O rezolutie de 6 Å evidentiaza modul de pliere al catenei polipeptidice , cu putine detalii structurale. Pentru a se determina grupe de atomi sunt necesare rezolutii de 2,8 - 4,0 Å, iar pentru atomi individuali - de 1,0 - 1,5 Å. Pentru proteine, rezolutia limita este de 2Å.

Structurile a peste 200 proteine au fost analizate prin cristalografie cu raze X, cunoscandu-se arhitectura lor moleculara in detaliu.

In ultimul timp, cristalografia cu raze X este completata cu studii de spectroscopie de rezonanta magnetica nucleara (RMN), microscopie electronica, cristalografie electronica,etc.

Studii imunochimice

Un anticorp este o proteina sintetizata de un animal ca raspuns la prezenta unei substante straine, numita antigen. Anticorpul (imunoglobulina) au o afinitate specifica pentru antigenele care le induc sinteza. Proteinele, polizaharidele si acizii nucleici sunt antigene efective. Anticorpul pot fi, de asemenea, formati ca raspuns la prezenta unor molecule mici, cum sunt peptidele sintetice, cu conditia ca ele sa fie atasate la un purtator macromolecular.

Gruparea recunoscuta de un anticorp este numita determinant antigenic (sau epitop). Animalele au un larg repertor de celule producatoare de anticorpi, fiecare producind anticorpi cu o singura specificitate. Un antigen actioneaza prin stimularea proliferarii unui numar mic de celule ce au deja formati anticorpii complementari. Tipul major de anticorp din plasma sangvina este imunoglobulina G.

Anticorpul ce recunosc o proteina particulara pot fi obtinuti prin injectarea proteinei intr-un iepure, de 2 ori la 3 saptamini distanta. Singele este colectat din animalul imunizat dupa citeva saptamini si este centrifugat. Serul rezultat, numit antiser contine anticorpul dorit. Din antiser poate fi purificata imunoglobulina G.

Molecula anticorpului specific poate fi purificata prin cromatografie de afinitate. Anticorpul produs in acest mod sunt policlonali- adica ei sunt formati de mai multe populatii diferite de celule producatoare de anticorpi , diferind prin specificitatea

si afinitatea pentru antigen.

In ultimii ani au fost produși anticorpi monoclonali cu o specificitate unica, omogeni fiind sintetizati de o clona (o populatie de celule identice) . Anticorpii monoclonali sunt obtinuti prin fuziunea unei celule producatoare a unui anticorp dorit cu o celula a sistemului imun dintr-o tumora (mielom). Celula rezultata (hibridoma) are capacitatea nelimitata de a se divide si in cultura produce cantitati mari de anticorpi monoclonali.

O proteina poate fi detectata si dozata direct prin precipitare cu anticorpii ei sau prin tehnici de radiciimunodozare (RIA) . In Figura 18 prezentam principiul tehnicii ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay).

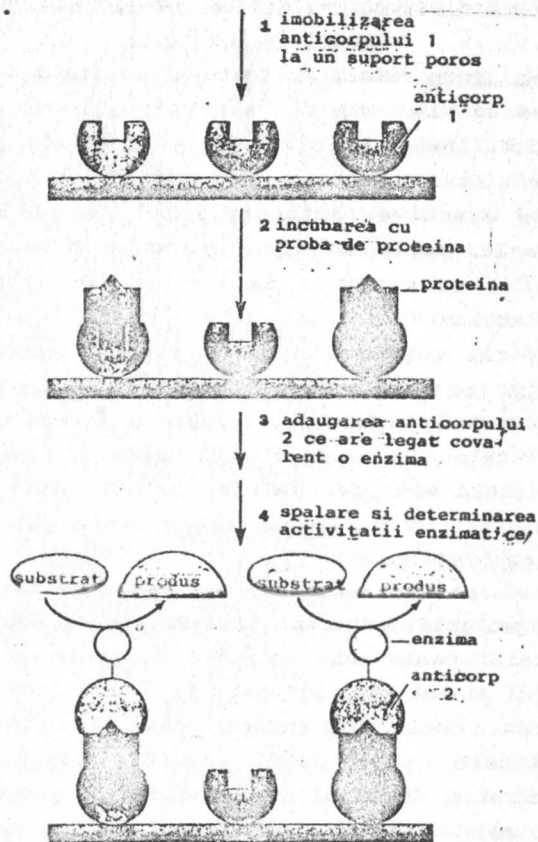


Figura 18. Principiul tehnicii ELISA

In cadrul acestei tehnici exista mai multe etape :

- anticorpii (1) contra proteinei X luate in studiu sunt imobilizati pe un suport solid, inert, de tipul polistirenului ;
- solutia proteinei de dozat X este aplicata la suprafata polistirenului care leaga anticorpul-1 ;
- complexul proteina X-anticorp-1 reactioneaza cu un al doilea anticorp (2) specific proteinei care are legata covalent o enzima E;
- dupa eliberarea prin spalare a speciilor nereactionate, complexul anticorp-1..proteina-X..anticorp-2..enzima E este dozat prin reactia catalizata de enzima E.

Atit tehnica RIA cit si tehnica ELISA sunt comun utilizate pentru detectarea unor cantitati mici de proteine sau de alti compusi imunogeni. De exemplu, cel mai modern test al graviditatii, care devine pozitiv la citeva zile dupa conceptie, utilizeaza tehnica ELISA de evidentiere in urina a gonadotropinei corionice , hormon proteic de 37 Kd produs de placenta.

Cantitati foarte mici dintr-o proteina dintr-o celula sau fluid celular pot fi detectate prin tehnica imunologica numita Western blotting (Figura 19) . In cadrul acestei tehnici se deosebesc 4 etape:

- separarea electroforetica a unui amestec de proteine pe un gel stabilizat (SDS-PAA , agaroză,etc)-fara fixare ;

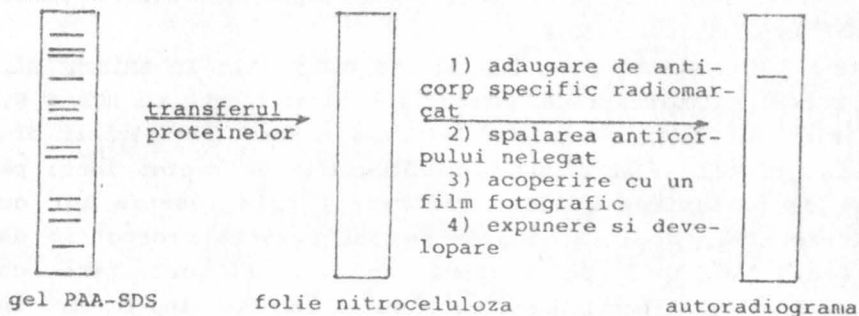


Figura 19 . Detectarea unei proteine dintr-un amestec prin tehnica Western-blotting

- proteinele separate pe gel sunt eluate si apoi transferate (blotting) pe un alt suport (azotat de celuloza, nitroceluloza, nylon, hirtie modificata chimic) . De regula elutia se realizeaza prin difuzie simpla bidimensionala sau prin capilaritate, in timp ce transferul se realizeaza electrolitic (electrotransfer);
- urmeaza adsorbtia pe cel de-al doilea suport ce depinde de proprietatile lui fizico-chimice ;
- evidentiarea proteinelor transferate, prin metode nespecifice sau specifice. Banda proteica poate fi vizualizata de exemplu prin tratare cu un anticorp radioactiv. O banda inchisa corespunde proteinei, pe autoradiograma.

Anticorprii sunt utilizati si in determinarea distributiei spatiale a antigenelor. Celulele pot fi colorate cu anticorpi marcati fluorescent si examinate prin microscopie de fluorescenta pentru a releva localizarea unei proteine.

O rezolutie mai mare este obtinuta utilizind anticorpi marcati cu substante electrono-dense, ca de exemplu, feritina- o proteina care contine un miez de hidroxid feric. Anticorprii pot fi , de asemenea, evidentiati prin microscopie electronica dupa conjugarea lor cu aur.

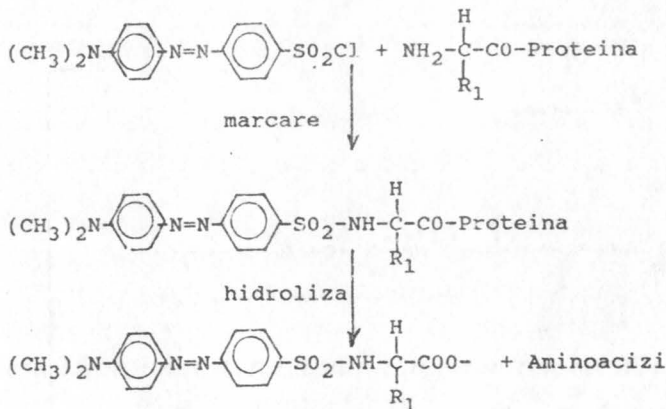
Determinarea secventei de aminoacizi

Elucidarea secventei de aminoacizi a unei proteine este un punct important in studiul acesteia.

Intr-o prima etapa, este determinata compozitia in aminoacizi. Proteina este hidrolizata la aminoacizii constituenti cu HCl 6 N, 110°C , timp de 24 ore. Dupa cum deja s-a aratat, aminoacizii din hidrolizat pot fi separati prin cromatografie de schimb ionic pe coloane de polistiren sulfonat si dozati prin reactia lor cu ninhidrina. Prin aceasta tehnica se pot detecta micrograme de aminoacid. Cantitati de ordinul ng pot fi detectate cu fluorescamina, care reactioneaza cu gruparea lor α -amino formind un produs fluorescent.

Restul din pozitia N-terminala poate fi identificat prin marcarea covalenta. Pentru prima data a fost folosit fluor dinitrobenzenul. Noul compus utilizat este insa clorura de dabsil care formeaza derivati colorati ce pot fi detectati cu o inalta sensibilitate. Acest compus reactioneaza cu gruparea α -NH₂

neincarcata formind un derivat sulfonamidic ce este stabil in conditii de hidroliza a peptidei :



Hidroliza dabsil-proteinei cu HCl 6 N produce dabsil-aminoacidul-1 ce poate fi identificat dupa separarea lui cromatografica. Desi metoda dabsil pentru determinarea aminoacidului N-terminal este deosebit de sensibila ea nu poate fi folosita repetitiv deoarece peptida este degradata total prin hidroliza acida.

Pehr EDMAN pune la punct o metoda pentru marcarea aminoacidului N-terminal fara ruperea legaturilor peptidice dintre ceilalti aminoacizi. Degradarea EDMAN indeparteaza secvential cite un rest de aminoacid aflat temporar in pozitia N-terminala . Fenil izotiocianatul reactioneaza cu gruparea amino terminala, neincarcata a peptidei formind un fenil-tiocarbamoil-derivat. Apoi, in mediu slab acid, este eliberat un derivat ciclic al aminoacidului terminal si peptida scurtata cu un aminoacid. Compusul ciclic este fenil-tiohidantoin (PTH)- aminoacid, care este identificat prin procedee cromatografice.

Degradarea Edman se repeta similar, determinindu-se secventa in aminoacizi a proteinei originale.

Analiza structurii proteinelor a fost accelerata prin dezvoltarea unor secventializatoare, care sunt instrumente automate pentru determinarea secventei de aminoacizi. Intr-un secventializator in faza lichida un film subtire a proteinei este

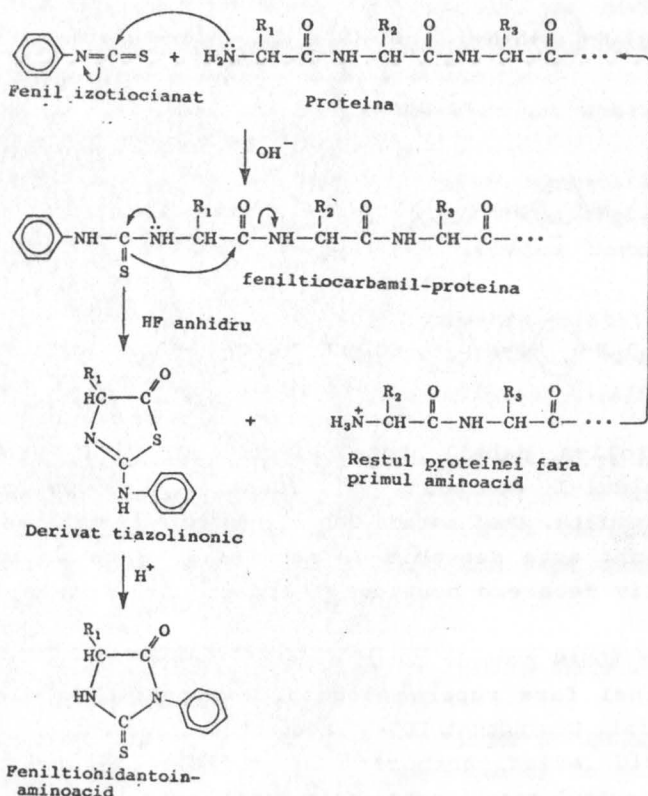
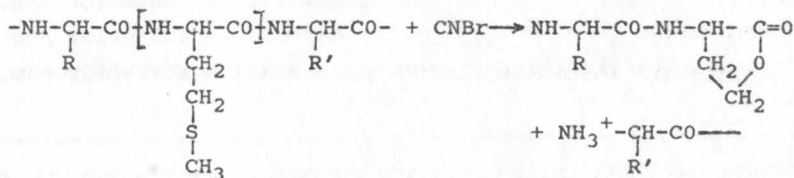


Figura 20 . Degradarea EDMAN

plasat intr-o cupa cilindrica si este supusa degradarii EDMAN. Reactivii si solventii de extractie sunt trecuti peste pelicula imobilizata a proteinei si PTH-aminoacizii sunt identificati prin HPLC. Un ciclul al degradarii EDMAN dureaza mai putin de 2 ore. Prin repetate degradari se pot determina secvente pina la 15 aminoacizi. A fost construit un secventializator in faza gazoasa ce poate analiza structura unor cantitati de proteina de ordinul picomolilor.

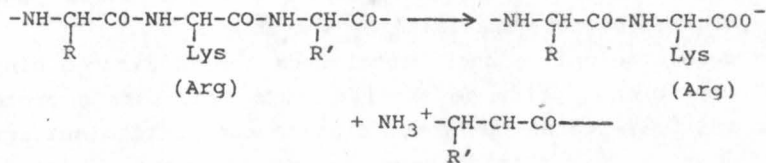
Peptidele mai mari de 15 aminoacizi nu pot fi secventializate prin metoda EDMAN. Dacă eficiența eliberării unui aminoacid prin secventializarea EDMAN este de 98 % în prima rundă, după 60 de runde ea este de 0,3 %. De aceea, proteina trebuie mai întâi scindată în peptide mai mici.

Scindarea specifică a unei proteine se realizează prin metode chimice sau enzimatice. De exemplu, WITKOP și GROSS au evidențiat că bromcianul (CNBr) scindează polipeptidele numai la partea carboxil a resturilor de metionina :



O proteină ce are 10 resturi Met va fi scindată în 11 peptide cu bromcian.

Tripsina scindează catenele polipeptidice la extremitățile carboxil ale resturilor de Arg și Lys :



O proteină ce conține 9 resturi Lys și 7 resturi Arg va produce 17 peptide la digestia cu tripsina. Fiecare din aceste peptide triptice cu excepția celei de la extremitatea C-terminală va fi terminată printr-un rest de Lys sau Arg.

În Tabelul 6 prezentăm câteva metode de scindare specifică a polipeptidelor.

Tabelul 6. Metode de scindare a proteinelor

Reactiv	Situs de scindare
Scindare chimica	
Bromcian	partea carboxil a resturilor Met
o-iodozo benzoat	partea carboxil a resturilor Trp
Hidroxilamina	legături Asn-Gly
2-nitro-5-tiociano benzot	partea amino a resturilor Cys
Scindare enzimatica	
Tripsina	partea carboxil a resturilor Lys.Arg
Clostripaina	partea carboxil a resturilor Arg
Proteaza stafilococica	partea carboxil a resturilor Asp, Glu

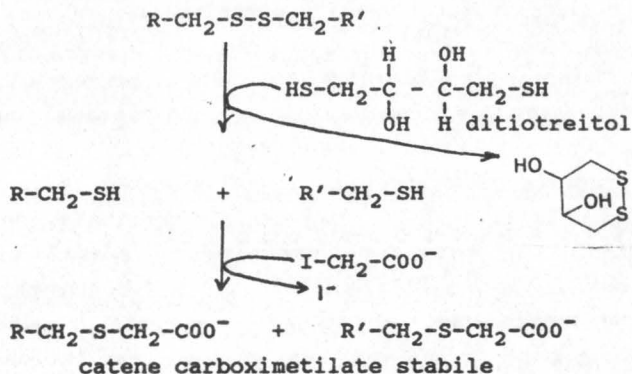
Peptidele obtinute prin scindare chimica sau enzimatica sunt separate prin cromatografie. Secventa fiecărei peptide purificate este apoi determinata prin metoda EDMAN.

Informatii suplimentare sunt obtinute prin suprapunerea partiala a peptidelor. O enzima diferita de tripsina este utilizata pentru a scinda catena polipeptidica la alte legaturi.

De exemplu, chimotripsina scindeaza preferential pe partea carboxil a unor resturi de aminoacizi aromatici. Deoarece aceste peptide chimotriptice se suprapun peste 2 sau mai multe peptide triptice, ele pot permite stabilirea secventei.

Aceste metode se aplica unei proteine ce consta dintr-o singura catena polipeptidica lipsita de puncti disulfurice. Daca o proteina consta din mai multe catene polipeptidice legate puncti disulfurice, determinarea structurii primare necesita si alte etape: scindarea acestor puncti si separarea catenelor componente.

Separarea punctilor disulfurice se realizeaza prin diverse procese redox: oxidare cu acid performic, reducere cu -mercaptoetanol sau ditiotreitol, etc. In cazul metodelor reductive, pentru a preveni reoxidarea resturilor de cisteina, acestea sunt alchilate cu iodacetat, formindu-se derivati S-carboximetil stabili:



Pozitia punctilor disulfurice poate fi determinata prin tehnica electroforezei diagonale. Mai intii proteina este scindata specific in peptide in conditii in care punctile disulfurice sunt intacte. Amestecul de peptide este supus electroforezei si folia rezultata este expusa vaporilor de acid performic, care scindeaza punctile disulfurice in resturi de acid cisteic. Peptidele initial legate prin puncti disulfurice sunt acum independente si mai acide datorita gruparilor SO_3^- . Acest amestec este supus electroforezei intr-o directie perpendiculara in aceleasi conditii ca prima electroforeza. Peptidele lipsite de puncti -S-S- vor avea aceiasi mobilitate electroforetica ca inainte, in contrast cu peptidele nou formate care migreaza diferit (Figura 21).

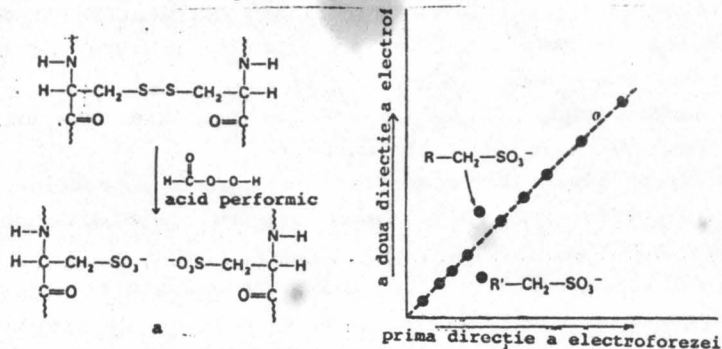


Figura 21. a. Oxidarea punctilor disulfurice cu acid performic. b. Detectarea peptidelor rezultate prin oxidarea punctilor disulfurice prin electroforeza bidimensionala.

3.4. Structura primara a proteinelor

Biochimistul danez Kay LINDERSTROM-LANG a propus utilizarea termenilor de structura primara, secundara , tertiara si cuaternara pentru a defini ierarhia structurala a proteinelor.

Ordinea resturilor de aminoacizi legati covalent prin legaturi peptidice, de la extremitatea N- spre cea C- terminala, se numeste structura primara. In structura proteinelor exista cei 20 ~~de~~ aminoacizi standard. In anumite cazuri, in structura proteinelor apar aminoacizi modificati chimic : acetilati, hidroxilati, fosforilati, etc. Aceste modificari survin post-tranzlational, deci dupa terminarea sintezei proteice. In aceste cazuri, resturile de aminoacizi modificate au un rol deosebit in stabilizarea conformatiei proteinei si/sau in functia ei biologica.

In 1955, F. SANGER si colab. de la Universitatea din Cambridge au reusit pentru prima data elucidarea structurii primare a unei proteine mici, a hormonului insulina, cu o masa de 5,7 Kd. Aceasta performanta incununata cu un premiu NOBEL (1957) reprezinta un moment de referinta in istoria biochimiei proteinelor deoarece SANGER a oferit un model de concepte si metode care pot conduce la elucidarea secventei de aminoacizi intr-o macromolecula proteica. In 1960, HIRS, STEIN si MOORE de la Universitatea Rockefeller, utilizind metodele propuse de SANGER reusesc elucidarea structurii primare a ribonucleazei, o enzima de 13,7 Kd.

Aceste doua performante au impulsionat cercetarile de acest tip si in momentul de fata cunoastem structurile primare ale unui mare numar mare de proteine.

Elucidarea structurii primare a unei proteine este un proces laborios care cuprinde mai multe etape:

1. purificarea pina la omogenitate moleculara a proteinei;
2. determinarea numarului de catene polipeptidice pe care-l contine proteina;
3. izolarea catenelor polipeptidice individuale ;
4. scindarea specifica a fiecarei catene polipeptidice in fragmente mai mici, mai usor de analizat ;
5. determinarea secventei de aminoacizi a fiecarui fragment individual ;

6. potrivirea fragmentelor individuale intr-o secventa unica a fiecarei catene polipeptidice initiale ;

7. identificarea situsurilor de legare a catenelor polipeptidice in cadrul proteinei native a carei structura primara se determina.

Metodele de determinare a structurii primare au fost in parte deja prezentate.

In cadrul structurii primare se evidentiaza o extremitate N-terminala (aminoacidul 1) si o extremitate C- terminala (aminoacidul n).

Insulina separata din pancreasul bovinelor are 51 resturi de aminoacizi, distribuiti in 2 catene: A- de 21 aminoacizi si B - de 30 aminoacizi. Cele doua catene sint legate prin doua puncti disulfurice intercatenare (Figura 22).

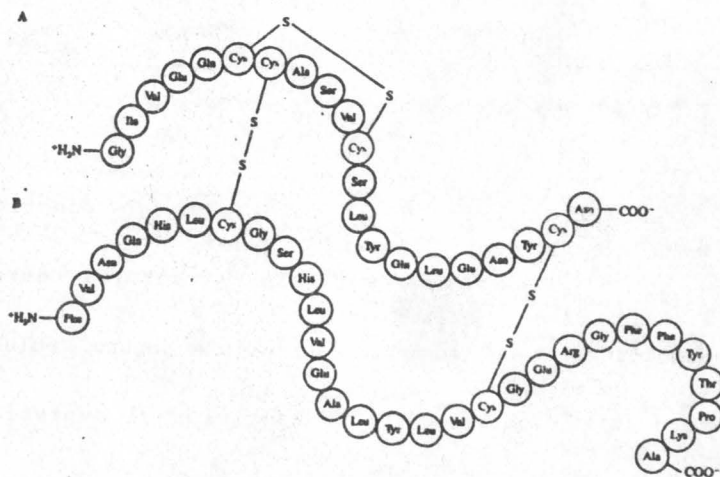


Figura 22. Structura insulinei

Aceste doua puncti disulfurice se formeaza prin oxidarea resturilor de cisteina Cys_7^A cu Cys_7^B si Cys_{20}^A cu Cys_{19}^B aduse in pozitii vicinale prin plierea structurii. Catena A are in pozitia 1 un rest de glicina, iar in pozitia 21 un rest de asparagina si posedă o punte disulfurica intracatenara stabilita prin oxidarea Cys_6 si

Cys₁₁. Catena B are in pozitia N-terminala (No.1) un rest de fenilalanina si in pozitia C-terminala (No.30) un rest de alanina.

Analiza structurilor primare a unor preparate de insulina izolate din diferite surse biologice arata ca ele difera prin patru pozitii, deci structurile proteinelor prezinta variatii cu specia (Tabelul 7).

Tabelul 7

Variatia cu specia a structurii primare a insulinei

Sursa	A ⁸	A ⁹	A ¹⁰	B ³⁰
bou	Ala	Ser	Val	Ala
porc	Thr	Ser	Ile	Ala
oaie	Ala	Gly	Val	Ala
cal	Thr	Gly	Ile	Ala
casalot	Thr	Ser	Ile	Ala
om	Thr	Ser	Ile	Thr
ciine	Thr	Ser	Ile	Ala
iepure	Thr	Ser	Ile	Ser

Compararea structurilor primare a proteinelor cu functii omoloage din diferite organisme este importanta pentru :

-cunoasterea gradului in care variatia structurii este compatibila cu o anumita functie biologica ;

-evidentierea secventelor de aminoacizi esentiale pentru rolul biologic indeplrit de proteina ;

-compararea relatiei dintre evolutia speciilor si evolutia structurii primare.

Structura primara a unei proteine este codificata genetic. Deosebiriile dintre structurile primare ale unor proteine omoloage reflecta modificari in aparatul genetic a unor specii biologice. S-a observat ca la speciile inrudite biologic, structurile primare ale unor proteine omoloage au un grad inalt de similitudine.

Observarea similitudinilor intre structurile primare ale unor proteine omoloage au permis construirea unor arbori filogenetici moleculari care permit stabilirea unor relatii evolutionare pe baze moleculare.

In cazul particular al insulinei, biosinteza acestui hormon se realizeaza sub forma unui precursor biologic inactiv, preproinsulina, in celulele β ale insulelor lui LANGHERHANS din pancreas. Preproinsulina se transforma in proinsulina, in reticulul endoplasmatic, sub actiunea unei enzime care indeparteaza hidrolitic un fragment de 23 aminoacizi de la extremitatea N-terminala. Prepeptida N-terminala are rolul de a facilita transportul proteinei prin sistemele membranare ale reticulului endoplasmatic. Molecula proinsulinei este substratul actiunii unei a doua enzime care catalizeaza indepartarea hidrolitica a unui segment de 30 aminoacizi (peptida C - connecting peptide) din interiorul structurii, in urma careia rezulta insulina activa.

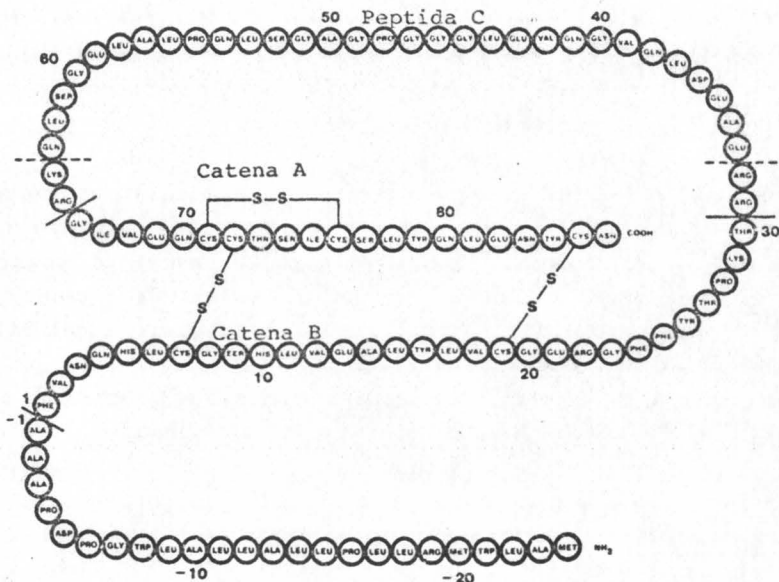


Figura 23. Structura preproinsulinei la om

Structura primara a proinsulinelor de la diferite specii contine de la 78 (ciine) la 86 (om, cal, sobolan) resturi de aminoacizi. Regiunea prepeptidei cuprinde secventa de la Met din pozitia -24 la Ala din pozitia -1. Peptida B reprezinta segmentul de la Phe-1 la Thr-30. Peptida C se intinde de la Arg-31 la Arg-65, iar peptida A de la Gly-66 la Asn-86. Punctile disulfurice din pozitiiile 7-72, 19-85 si 71-76 se gasesc si in proinsulina .

Compararea resturilor de aminoacizi care variaza cu specia din structura insulinei, precursorului ei, precum si a altor proteine permite evidentierea unor variati de tip conservativ cind un aminoacid este inlocuit cu un alt aminoacid cu aceiasi polaritate (Val-Ile), precum si a unor variati de tip neconservativ in care un aminoacid este inlocuit cu un altul cu un caracter acido-bazic diferit. Daca variatia de tip neconservativ afecteaza un aminoacid esential pentru functia biologica a proteinei pot apare variante moleculare patologice. Forma majora a hemoglobinei adultului uman este o proteina formata din doua catene polipeptidice α si doua catene polipeptidice β avind formula de structura $\alpha_2\beta_2$. Prin inlocuirea unui singur aminoacid in catena β in pozitia 6 (Val cu Glu) se formeaza forma patologica a hemoglobinei S care dezvolta anemia falcipara (sickl-cell anemia), in anumite cazuri mortala.

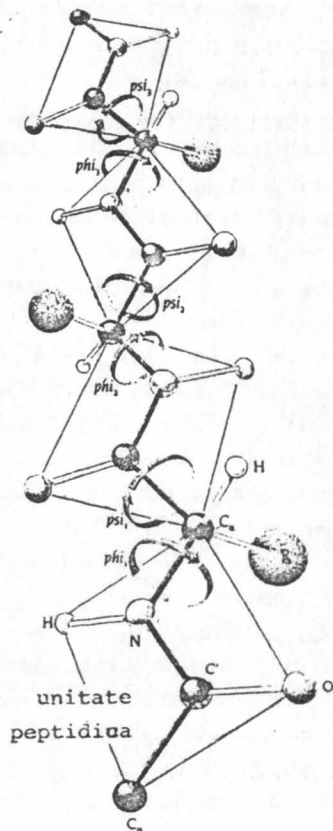
3.5. Conformatia proteinelor

Masuratorile fizice de diferite tipuri au sugerat ca proteinele globulare nu contin catene polipeptidice total extinse ci mai degraba structuri compacte inalt pliate. O descriere completa a moleculei unei proteine include o analiza detaliata a conformatiei catenei ei polipeptidice, a unghiurilor si lungimii legaturilor, a orientarii si marimii substituentilor.

Dupa cum s-a aratat , structura unitatii peptidice a fost stabilita de PAULING si COREY prin studii de difractie a razelor X asupra unor preparate de aminoacizi , di-, tri- si oligopeptide. Unghiurile si lungimea legaturilor α -atomului de carbon sint tipice unui atom de carbon tetraedric, hibridizat sp^3 . Atomii catenei principale sunt dispusi in unitati peptidice rigide, legate intre ele prin atomii de carbon α . Fiecare unitate are doua grade de

libertate, ea se poate roti in jurul legaturilor $N-C\alpha$ si $C\alpha-C'$ (Figura 24). Unghiul rotatiei in jurul legaturii $N-C\alpha$ este desemnat ϕ (ϕ), iar cel in jurul legaturii $C\alpha-C'$ este numit ψ (ψ). Conformatia atomilor catenei principale este determinata de valorile celor doua unghiuri pentru fiecare rest de aminoacid al catenei polipeptidice. Numai anumite combinatii ale acestor unghiuri sunt permise din cauza impiedicarii sterice dintre catena principala si catenele laterale R din fiecare aminoacid, cu exceptia glicocolului.

Figura 24
Schema unei catene
polipeptidice.
formata din unitati
peptidice rigide.
legate prin $C\alpha$.
Sunt indicate cele
doua grade de libertate
prin unghiurile de
rotatie ϕ (ϕ) si
 ψ (ψ).



Unghiurile de rotație, orientările structurilor planare adiacente sunt astfel stabilite încât să minimizeze fenomenele de împiedicare sterice și să mărească stabilitatea structurii.

Structura secundara reprezinta aranjamentul spatial al resturilor de aminoacizi dintr-o catena polipeptidica care rezulta din combinatiile unghiurilor ϕ si ψ intr-o forma stabila. Elementele de structura secundara sunt stabilizate prin puncti de hidrogen intre electronii neparticipanti ai unui atom de oxigen carbonilic al unei unitati peptidice si atomul de hidrogen al altei unitati peptidice.

Combinatii de citeva elemente de structura secundara, cu un aranjament geometric specific, se gasesc frecvent in structura proteinelor. Aceste unitati numite structuri supersecundare sau motive structurale pot fi asociate cu o functie particulara sau pot numai constitui parti ale unui ansamblu functional mai mare. Structurile supersecundare sunt considerate intermediari intre structura secundara si cea tertiara.

In prezent, structura tertiara a proteinelor trebuie conceputa ca un aranjament spatial de motive in domenii, care confera catenei polipeptidice pliate o forma tridimensionala.

Domeniile sunt clustere globulare compacte, in forma apropiata sferica, formate din 50 - 150 resturi de aminoacizi. Aceste domenii sunt de regula unite printr-un segment flexibil. Deci, unitatea fundamentala a structurii tertiare este domeniul. Un domeniu poate fi reprezentat de o catena polipeptidica sau numai de o parte din ea, ce se pliaza independent intr-o structura tertiara stabila. O proteina globulara formata din mai mult de 200 resturi de aminoacizi poate fi constituita din 2 - 3 domenii. Domeniile sunt, de asemenea, unitati de functie. Adesea, diferite domenii ale unei proteine sunt asociate cu anumite functii.

Structura tertiara reprezinta forma tridimensionala a proteinei si este stabilizata de interactiile care se pot stabili intre gruparile R care substituie α -atomul de C : puncti disulfurice, interactii de atractie electrostatica (saline), puncti de hidrogen, interactii van der Waals.

Termenul de conformatie acopera structurile secundare si tertiare ale unei proteine.

Structura cuaternara nu este comuna tuturor proteinelor caracterizand acele specii moleculare proteice constituite din mai multe catene polipeptidice. Fiecare catena in parte are o structura

primara, secundara si terciara proprie, deci o anumita conformatie. Intre subunitatile unei proteine cu structura cuaternara (oligomera) se stabilesc interactii slabe, necovalente, care-i confera intregului edificiu o flexibilitate moleculara. In Tabelul 8 prezentam compozitia subunitara a unor proteine.

Tabelul 8

Masele moleculare si compozitia subunitara a unor proteine

PROTEINA	MASA MOLECULARA	Nr.SUBUNITATI
Proinsulina	9 082	1
Insulina*	11 466	2
Citocrom c	12 900	1
Ribonucleaza	13 683	1
Mioglobina	17 000	1
Tripsina	23 800	1
Chimotripsina*	24 500	1
Carboxipeptidaza	34 300	1
Hemoglobina	64 500	2 α si 2 β
Albumina serica	66 500	1
Lactat dehidrogenaza	140 000	4
Catalaza+	232 000	4
Fosforilaza a	370 000	4
Miozina	468 000	2

- * - Insulina are 2 catene A si B, chimotripsina are 3 catene A,B,C - legate covalent prin puncti disulfurice
- + - Fiecare subunitate poate fi in continuare disociata intr-un numar de catene polipeptidice identice sau diferite

3.5.1. Structura secundara a proteinelor

Trei elemente de structura secundara se gasesc comun in proteine α -helixul, β -structura pliata si β -turns. Secventele fara o structura secundara organizata, care au o mare flexibilitate in solutie, se numesc random coils.

α -helixul

Acest element de structura secundara consta dintr-un segment din catena polipeptidica , rasucit spre dreapta (Figura 25) , ca in jurul unui cilindru imaginar, gruparile R fiind orientate spre exterior. α - helixul este stabilizat prin puncti de hidrogen, paralele cu axa structurii, formate intre gruparea NH a restului de aminoacid i si oxigenul carbonilic al restului i-4, care inchide o bucla de 13 atomi, motiv pentru care se numeste 3,6₁₃ α -helix. Fiecare rest este legat de urmatorul la o distanta de 1,5 Å, masurata de-alungul axei helixului, si sufera o rotatie de 100°.

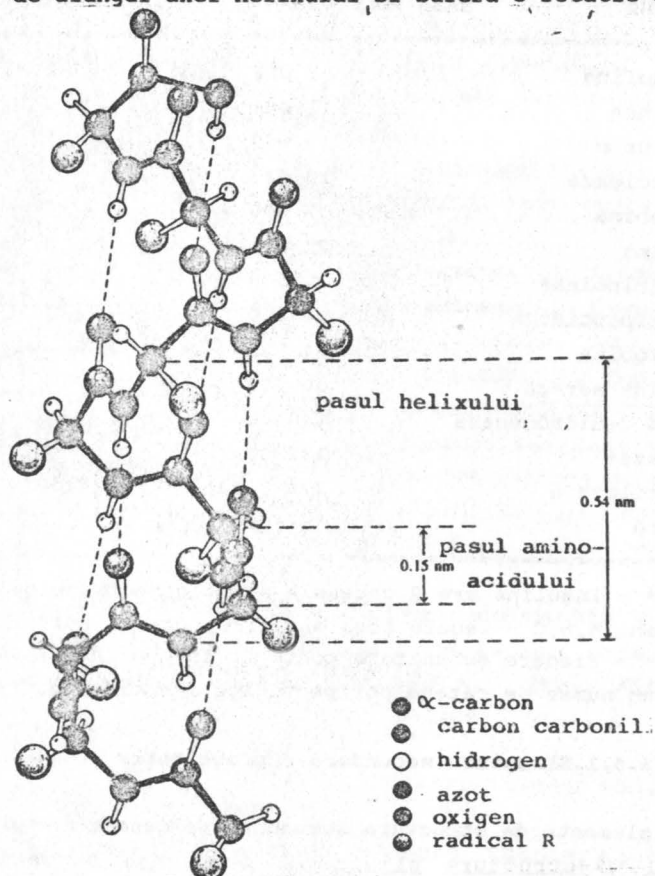


Figura 25. Un α -helix spre dreapta 3,6₁₃

Parametrii care caracterizeaza structura helicala sunt:

n - numarul de resturi de aminoacizi per tura de helix ;

d - cresterea helixului pentru fiecare rest de aminoacid ;

p - inaltimea unei ture complete de helix, de fapt periodicitatea care se observa in schitele de difractie a razelor X.

Pentru α - helix, acesti parametri au urmatoarele valori :

$$\psi - 57^\circ \text{ si } \phi - 47^\circ; \quad n = 3,6 \text{ A} ; d = 1,5 \text{ A} ; p = 5,4 \text{ A}.$$

Virtual orice aminoacid poate participa la formarea α -helixului, cu exceptia prolinei care este un iminoacid cu nucleu rigid care perturba regularitatea dispozitiei helicoidale. Cu toate acestea, unii aminoacizi participa la formarea acestui element de structura secundara mai frecvent decit altii. Un α -helix poate fi format din L-aminoacizi sau din D-aminoacizi dar niciodata dintr-un amestec de L- si D-aminoacizi. α -helixul a fost identificat intr-o varietate de proteine globulare si fibroase.

Alte tipuri de helix pot fi formate in cadrul aceleiasi catene polipeptidice, dar sunt mai putin stabile decit α -helixul. In Figura 26 prezentam alte tipuri de helix.

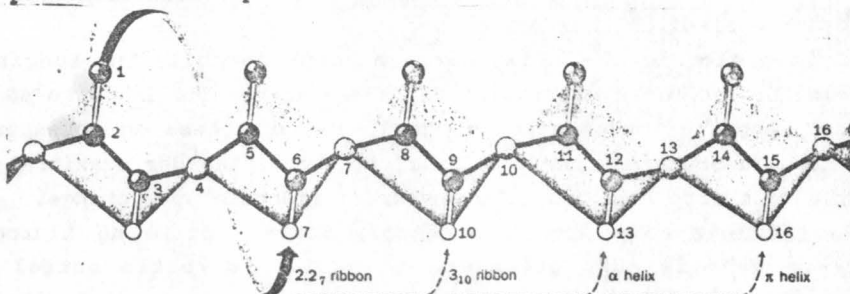
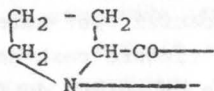


Figura 26. Diferite tipuri de helix

Primele doua : 2,2,7 ribbon si 3₁₀ ribbon au 2,2 si respectiv 3 resturi de aminoacizi per tura de helix. Helixul 3₁₀ spre dreapta are un pas de 6 A, este mai subtire si apare ocazional in structura proteinelor, in segmente scurte (1 - 2 ture) , distorsionate fata de modelul ideal. Helixul π (4,4₁₆) are o conformatie mai lata si mai alungita, aparind la sfirsitul unui α -helix normal.

Polipeptida artificiala poli-prolina nu poate adopta o structura



secundara comuna datorita constringerilor conformationale impuse de inelele pirolidinice si lipsei unui atom de hidrogen ca substituent al atomului de azot implicat in legatura peptidica. Aceste caracteristici exclud posibilitatea formarii, in cazul poli-prolinei, a unei configuratii stabilizate prin puncti de hidrogen. Cu toate acestea, in anumite conditii poli-prolina precipita din solutie ca un helix spre stanga, cu exact 3 resturi de aminoacizi per tura, cu $n=3$ si $p=9,4$. Acest fapt este interesant deoarece cea mai importanta proteina fibroasa, collagenul are un continut mare in prolina (12 %) si hidroxiprolina (9 %).

Continutul in α -helix al proteinelor este variabil. Hemoglobina si mioglobina au α -helixul ca principal motiv structural, dispus sub forma mai multor segmente de mai putin de 40 Å lungime. Structura α -helix se gaseste intr-un procent de circa 70 % in mioglobina, de 38 % in insulina, de 46 % in albumina serica a bovinelor, de 16 % in enzima ribonucleaza, etc, lipsind total din structura enzimei chimotripsina.

Segmentele de α -helix variaza considerabil in lungimea proteinelor globulare cuprinzind de la 4-5 aminoacizi la peste 40 de resturi. Lungimea medie este de cca 10 resturi, ceea ce corespunde la 3 ture. In proteine apar α -helixuri spre dreapta, dar ocazional se observa si scurte helixuri (3-5 resturi) orientate spre stanga.

α -helixul are un moment de dipol. Toate punctile de hidrogen dintr-un α -helix sunt orientate in aceiasi directie astfel ca unitatile peptidice au aceiasi orientare de-a lungul axei helicale. Deoarece o unitate peptidica are un moment de dipol ce ia nastere din polaritatea diferita a gruparilor NH si CO, aceste momente de dipol sunt de asemenea aliniate de-a lungul axei helicale (Figura 27). Efectul total este un dipol net semnificativ pentru α -helix cu o sarcina partiala pozitiva la capatul amino si cu o sarcina partiala negativa la capatul carboxil al α -helixului. Aceste sarcini pot atrage liganzi cu sarcina opusa. Liganzi incarcati negativ, in special cu grupari fosfat se leaga frecvent la capatul N-terminal al

segmentelor α -helix, in contrast cu liganzii incarcari pozitiv care se leaga rar la extremitatea C-terminala.

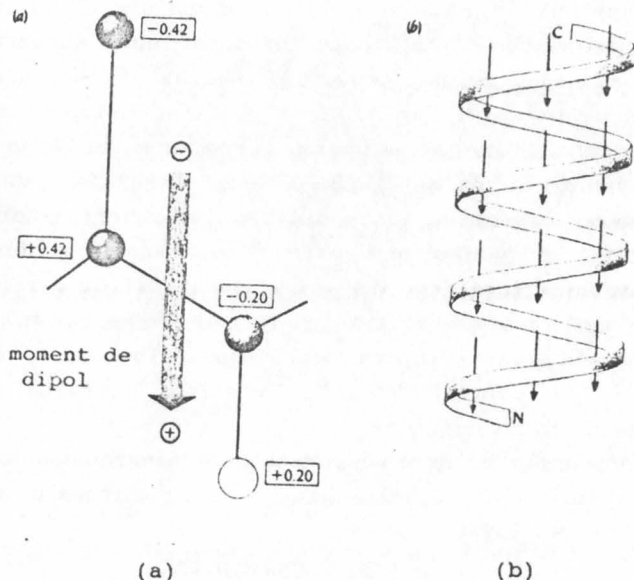


Figura 27 a) Dipolii unei unitati peptidice, cu indicarea sarcinilor fractionale aproximative. b) Dipolii unitatilor peptidice sunt alinai de-a lungul axei helicale care creiaza un moment de dipol total al α -helixului, pozitiv la capatul amino si negativ la capatul carboxil.

Proprietatile optice ale α -helixurilor. Capacitatea de a roti planul luminii polarizate este proprie compusilor cu asimetrie moleculara. Intr-o secventa de α -helix, asimetria totala a moleculei este suma dintre asimetria produsa de atomii de carbon asimetrici si cea datorata structurii elicoidale, care este asimetrica (putind fi orientata fie spre dreapta, fie spre stanga).

Proteinele in stare naturala sunt mai dextrogire decit suma rotatiilor individuale proprii fiecarui atom de carbon α - din resturile de aminoacizi. O astfel de putere rotatorie spre dreapta este maxima pentru structura α -helix, in timp ce catenele polipeptidice rasucite la intimplare prezinta o insumare simpla a

puterii rotatorii.

Puterea rotatorie inainte si dupa denaturare este utilizata in aprecierea procentului de α -helix dintr-o proteina.

Tendinta unei catene polipeptidice de a adopta o conformatie de α -helix depinde in mare masura de structura ei primara, deoarece anumiți aminoacizi faciliteaza formarea unor structuri α -helicate. Astfel, alanina, acidul glutamic, leucina si metionina prefera clar formarea α -helixului, in timp ce prolina, glicocolul, tirozina si serina destabilizeaza aceasta structura. Prolina se potriveste foarte bine in prima tura a unui α -helix, dar ulterior il tensioneaza, conducind la terminarea structurii α -helix.

Astfel de preferinte permit o orientare generala catre o structura secundara, dar nu permit preziceri de mare acuratete.

Cea mai comuna localizare a unui α -helix in structura unei proteine este cu o latura a α -helixului la nivelul suprafetei proteinei, in contact cu solutia si cu cealalta spre interiorul hidrofob al proteinei.

α -helixurile ce strapung structuri membranare se gasesc intr-un mediu hidrofob si majoritatea catenelor laterale a resturilor de aminoacizi sunt hidrofobe.

β -structurile pliate

Cercetarea β -keratinelor prin difractie cu raze X a condus la descoperirea altui tip de structura secundara: β structura pliata - stabilizata de puncti de hidrogen pozitionate aproape perpendicular pe axa structurii. Distanța axiala intre doi aminoacizi vecini este de 3,5 Å comparativ cu 1,5 Å din α -helix. Acest tip de element de structura secundara a fost gasit atit in proteinele fibroase cit si in cele globulare.

In structura β -pliata antiparalel, catenele polipeptidice (sau segmente ale aceleasi catene) au legaturile peptidice orientate in directii opuse in timp ce in structura β -pliata paralel, acestea sunt orientate in aceiasi directie (Figura 28). Gruparile R se gasesc de o parte si alta a planurilor generate de caracteristicile legaturilor peptidice si punctilor de hidrogen.

In formarea β -structurii, doua regiuni (de 5-10 resturi) se alineaza paralel sau antiparalel, stablindu-se punctile de hidrogen, cu formarea unei structuri mai extinse decit α -helixul.

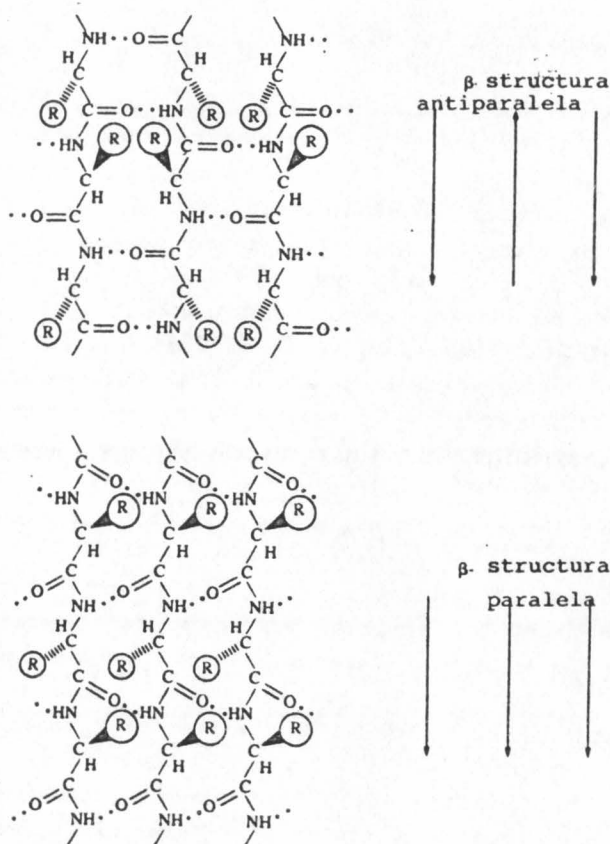


Figura 28. Ilustrarea schematica a β -structurilor pliate

β -structura a fost descoperita prima data in fibroina, proteina din matase, secretata de viermele de matase *Bombyx mori*. Aceasta proteina are 100 % β -structura pliata antiparalel si face parte din grupul β -keratinelor, proteine fibroase bogate in resturi de glicina si alanina, aminoacizi cu grupari R mici care nu dau nastere la fenomene de impiedicare sterica.

β -structura se gaseste si in proteinele globulare, fiind situata

intre segmentele de α -helix.

β turns

Reprezinta cel mai comun tip de structura "loop" gasita in proteinele globulare, care permite catenei polipeptidice sa-si schimbe brusc directia. Ele se mai numesc "reverse turns", " β -bends" sau "hairpin bends/loops" deoarece leaga adesea secvente succesive cu structura β -antiparalela. Sunt cunoscute trei tipuri generale de " β -turns". Toate trei contin patru resturi de aminoacizi, cu o punte de hidrogen ce apare intre oxigenul carbonilic al primului rest si azotul aminic al celui de al 4-lea rest. Tipul I poate contine orice rest, cu exceptia prolinei care nu poate exista in pozitia 3; tipul II, din contra, necesita prolina in pozitia 2 si glicocol- in pozitia 3; tipul III fiind o portiune dintr-un 3_{10} -helix.

Approape toate proteinele au mai mult de 60 resturi de aminoacizi, implicate in mai multe elemente "loop" de 6 - 16 resturi a caror lungime totala este mai mica de 10 Å.

In Figura 29 prezentam structuri "reverse turns". Tipul I (a) difera de tipul II (b) prin rotirea cu 180° a planului legaturii peptidice centrale din elementul "loop". Deoarece nucleul cu cinci atomi al prolinei are o mica mobilitate conformationala, este un model ideal pentru cel de al doilea rest de aminoacid din structura unui "reverse-turn".

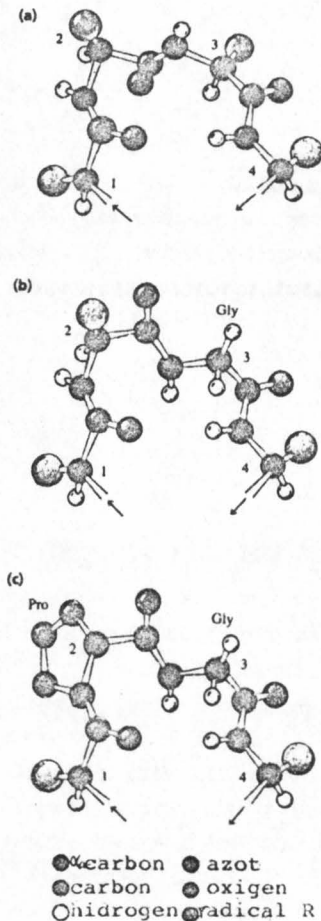
Majoritatea proteinelor sunt constituite din combinatii de elemente ale structurii secundare: α -helixuri si β -structuri legate intre ele prin regiuni loop de diferite lungimi si cu forme neregulate. O combinatie a elementelor structurii secundare formeaza miezul hidrofob stabil al moleculei. Regiunile "loop", fiind bogate in resturi de aminoacizi polari se gasesc la suprafata moleculei proteice. Gruparile CO si NH a legaturilor peptidice din aceste "regiuni loop" nu formeaza puncti de hidrogen intre ele, fiind expuse formeaza puncti de hidrogen cu moleculele de apa.

Cind secventele de aminoacizi omoloage de la diferite specii sunt comparate se constata ca cele mai multe insertii sau deletii apar in aceste "regiuni loop", in cursul evolutiei miezul hidrofob fiind mult mai stabil. Aranjamentul elementelor structurii secundare din miezul hidrofob este relativ insensibil la lungimea "regiunilor loop". La nivelul acestor "regiuni loop" se gasesc frecvent

situsurile de legare si centrele catalitic active a enzimelor. Astfel situsurile de legare a antigenului sunt constituite din 6 "regiuni loop" care variaza ca lungime si secventa de aminoacizi la diferiti anticorpi.

Figura 29

Structuri "reverse turns".
Tipul I (a), tipul II (b)
si structura unui reverse
turn din polipeptida
sintetica (Pro-Gly)_n.



Superstructura secundara

Studii recente asupra conformatiei, functiei si evolutiei proteinelor au relevat existenta unui nou nivel de organizare care consta din clustere de structura secundara (structuri/ motive

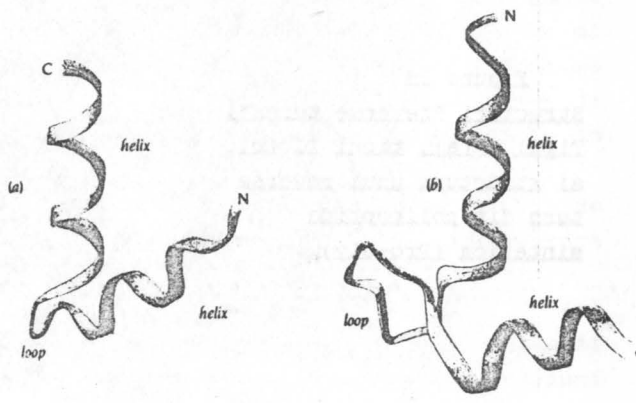
superstructurale).

Cel mai simplu motiv cu o functie specifica consta din doua segmente de α -helix unite printr-o regiune "loop". Un astfel de motiv, cu o geometrie caracteristica a fost observat ca parte a multor structuri proteice (Figura 30).

Figura 30.

Aranjamentul geometric helix-loop-helix in

a) motivul de legare al DNA; b) motivul de legare al calciului



Primul motiv (Figura 30 a) este gasit in structura proteinelor care recunosc si se leaga specific la regiuni reglatoare din DNA : proteine represor, proteina CAP ce activeaza operonii implicati in catabolismul glucidelor la E.coli. Acelasi motiv este regasit la proteinele care au afinitate pentru calciu : parvalbumina, calmodulina, troponina C,etc. (Figura 30 b).

Acest motiv structural de legare a calciului a fost pus in evidenta pentru prima data de KRETSINGER de la Universitatea din Virginia, cind s-a determinat structura parvalbuminei la o rezolutie de 1,8 Å. Parvalbumina este o proteina din muschi cu o catena polipeptidica de 109 aminoacizi, a carei functie este incerta , probabil legarea calciului la ea joaca un rol in relaxarea muschilor. Motivul structural helix-loop-helix apare de 3 ori in aceasta structura, in doua din ele existind si situsul de legare al calciului. Figura 31 arata acest motiv, numit si EF hand deoarece sunt implicate segmentele helix E si F din structura parvalbuminei. Configuratia acestui motiv aminteste de mina dreapta, in care

helixul F corespunde degetului mare, helixul E - degetului aratator, iar segmentul "loop" (constituit din 12 resturi de aminoacizi) - degetului mijlociu. KRETSINGER a studiat si alte proteine care leaga Ca printre care troponina C si calmodulina, care regleaza o varietate de functii celulare prin legarea calciului. In troponina C, regiunea loop dintre cele 2 regiuni helix leaga atomul de calciu care are un situs de legare constituit din sase atomi de oxigen apartinind resturilor de acid aspartic 9 si 13, asparaginei 11, acidului glutamic 20, gruparii carbonil peptidice a restului 5 din catena principala si unei molecule de apa.

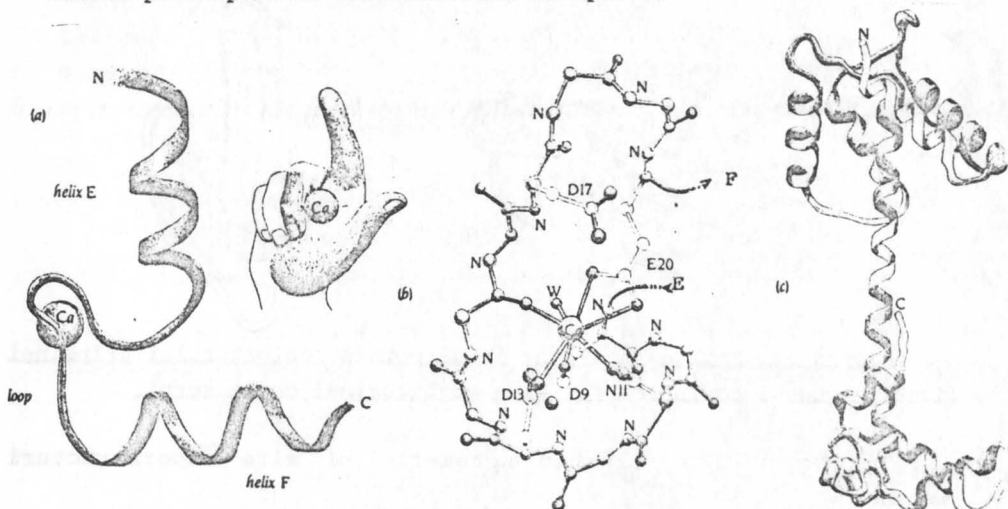


Figura 31. a) Motivul EF hand de legare a calciului ; b) Situsul de legare al calciului in troponina C ; c) structura troponinei C este constituita din 4 motive EF hand.

Acesta a fost unul dintre primele motive structurale recunoscute in structura unei proteine.

Cel mai simplu motiv structural ce implica elemente de β -structura, consta din doua secvente antiparalele vecine, unite printr-o regiune loop. Acest motiv, care este numit fie hairpin, fie unitate β, β este prezent frecvent, in majoritatea structurilor antiparalele atat izolat cit si ca o parte a unor structuri mai complexe. Lungimea regiunilor loop dintre segmentele β variaza, de

la 2-5 resturi lungime si nu este asociata cu vreo functie specifica. In Figura 32 prezentam motivul hairpin izolat din structura inhibitorului tripsinei (a) si cele doua motive hairpin din erabutoxina, proteina din veninul de sarpe.

Inhibitorul natural al tripsinei contine o unica catena polipeptidica de 58 aminoacizi ce inhiba activitatea hidrolitica a tripsinei. Erabutoxina se leaga si inhiba receptorul acetilcolinei din celulele nervoase. Miezul acestei structuri este constituit din cinci segmente de β -structura dintre care patru sunt implicate in doua motive de hairpin.

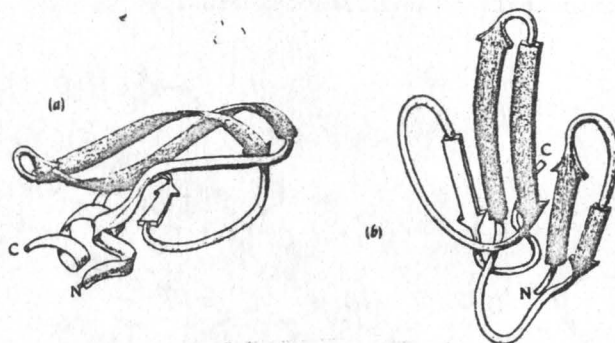


Figura 32. Motive "hairpin" in structura inhibitorului tripsinei din pancreasul bovinelor (a) si a erabutoxinei de la serpi.

In Figura 33 prezentam schematic si alte superstructuri secundare.

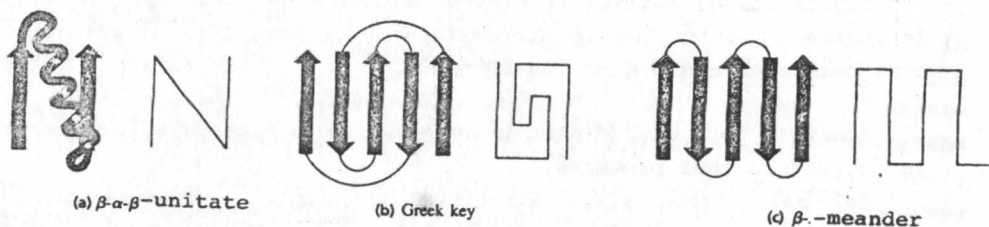


Figura 33. Alte structuri supersecundare

Motivul β - α - β este constituit din doua segmente cu structura paralela, conectare printr-o scurta regiune de α -helix. Enzima triozofosfat izomeraza este constituita din combinatii ale acestui

motiv.

Motivul "Greek key" este gasit in proteine a caror elemente de structura secundara sunt β - secventele antiparalele. Patru segmente β , adiacente, antiparalele, sunt aranjate ca o unitate repetitiva din vechile ornamentale utilizate in Grecia veche. Acest motiv a fost gasit in structura nucleazei din Staphylococcus, o enzima ce degradeaza DNA. Motivul Greek key nu este asociat cu vreo functie specifica, dar apare frecvent in structura proteinelor.

Dupa cum s-a mai afirmat unitatea fundamentala a structurii terciare este domeniul. Exista proteine constituite dintr-un singur domeniu , sau altele formate din citeva zeci de domenii. Adesea diferite domenii ale unei proteine sunt asociate cu diverse functii.

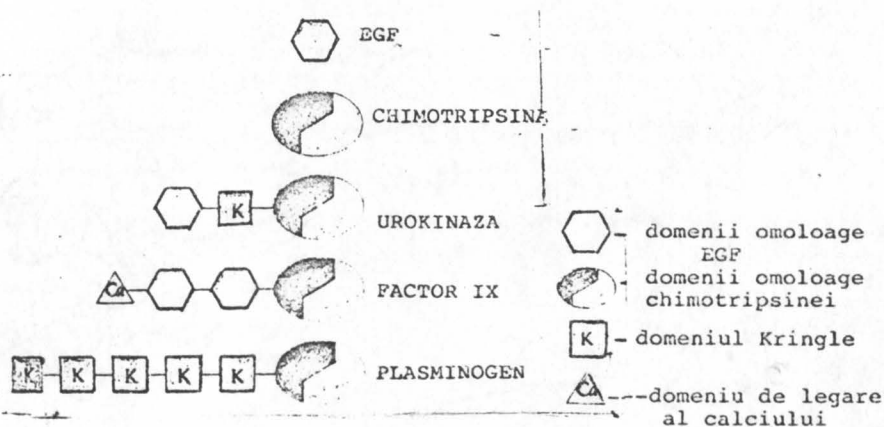


Figura 34 - Organizarea proteinelor in domenii.

Factorul de crestere epidermal (EFF) este constituit dintr-o singura catena polipeptidica de 53 aminoacizi, organizata intr-un singur domeniu. Serin-proteinazele de tipul chimotripsinei (enzima care are 245 aminoacizi) contin 2 domenii, care numai impreuna sunt functionale. Multe proteine implicate in coagularea singelui ca urokinaza, factorul IX si plasminogenul contin diferite combinatii de domenii omoloage cu EGF ,cu serin proteinazele, domenii de legare

a Ca si domenii Kringle. Domeniile Kringle constau dintr-o secventa de cca 85 aminoacizi cu 3 puncti disulfurice interne.

In cele ce urmeaza vom discuta structurile tridimensionale a patru oxidoreductaze : alcool dehidrogenaza (ADH), lactat dehidrogenaza (LDH), malat dehidrogenaza (MDH) si gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), enzime care catalizeaza oxidarea reversibila a unor substraturi cu grupari alcool - a caror marime si forma difera si care utilizeaza ca substrat obligatoriu NAD^+ . LDH si GAPDH au structura tetramera, fiind formate din patru catene polipeptidice , in timp ce ADH si MDH sunt dimeri. Exista un grad de omologie intre structurile primare ale catenelor polipeptidice a LDH si MDH, care se reflecta in faptul ca structurile tridimensionale

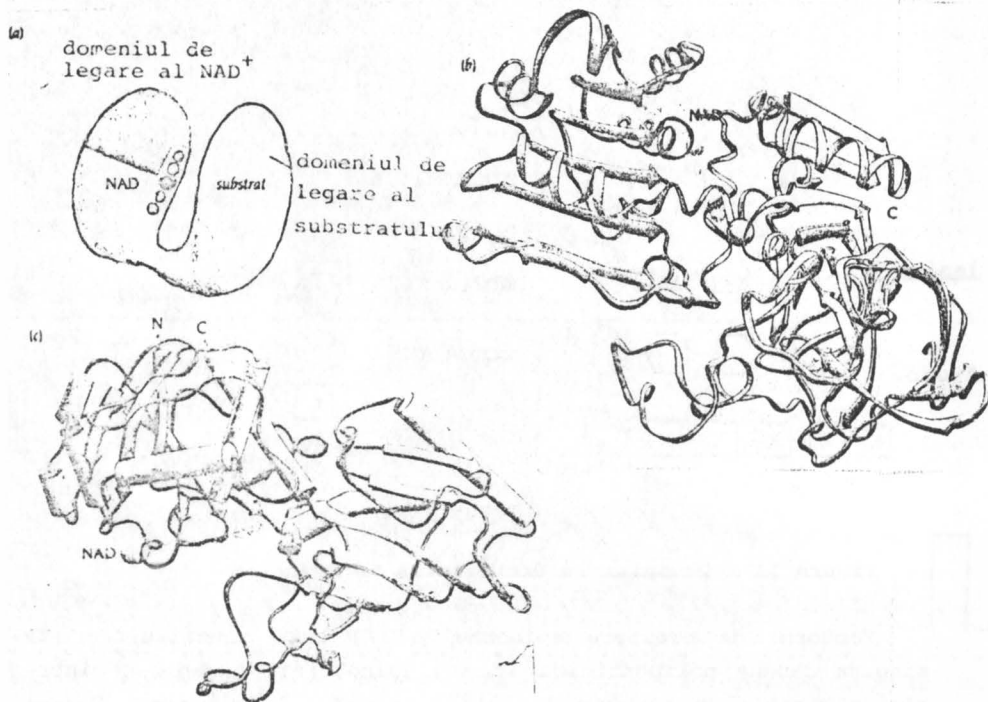


Figura 35. a) Digrama structurii tridimensionale a NAD^+ -dehidrogenazelor pliate in doua domenii ; b) Structurile tridimensionale a unei subunitati a alcool dehidrogenazei ; c) gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazei

ale subunitatilor lor sunt asemanatoare. Nu s-a observat nicio omologie in structurile primare ale LDH, GAPDH si ADH.

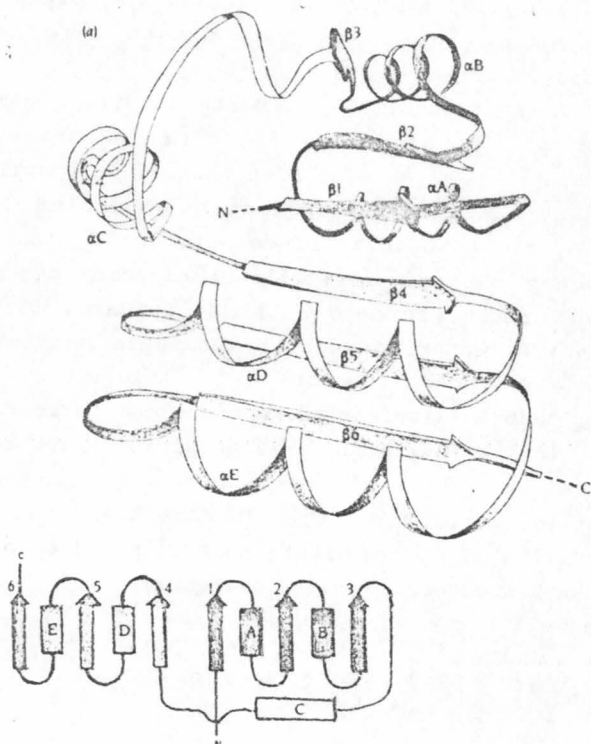
Catenele polipeptidice lungi ale acestor patru dehidrogenaze se pliaza in doua domenii, clar separate (Figura 35) - cu functii diferite. Unul dintre ele leaga NAD^+ , celalalt - recunoaste si leaga substratul. Domeniul de legare al NAD^+ din LDH si GAPDH sunt constituite din partea N-terminala a catenei polipeptidice, in timp ce domeniul omolog din ADH este format din partea C-terminala a catenei. Situsul catalitic activ se gaseste intr-o fanta, pozitionata intre cele doua domenii.

In ciuda absentei unei omologii intre structurile primare ale LDH, GAPDH si ADH - aceste enzime au si structuri tridimensionale asemanatoare. Domeniile catalitice au structuri complet diferite la cele trei enzime, au o topologie unica, care n-a mai fost observata la alte proteine.

Domeniul de legare a NAD^+ este deschis, format din sase secvente cu structuri α -helix la capete (Figura 36).

Figura 36.

Topologia domeniului de legare al NAD^+



Structura α/β este simetrica deoarece este construita din doua jumatați cu topologie identica si structura similara, conectate printr-un segment αC . Fiecare jumatațe este formata dintr-o pereche de motive $\beta-\alpha-\beta$ si este numit motivul de legare a mononucleotidului (mononucleotide-binding motif) deoarece leaga numai unul din cele doua nucleotide din structura NAD^+ . Acest motiv se gaseste si enzime care leaga FAD. Motivul structural care leaga NAD si FAD este $\beta_1-\alpha-\beta_2$ si leaga partea ADP a celor doua coenzime.

3.5.2. Structura terciara a proteinelor

Actual structura terciara a proteinelor reprezinta modul de pliere al catenei polipeptidice in unul sau mai multe domenii. Acest nivel de organizare superior structurii secundare este caracterizat prin interactiile dintre gruparile R care substituie -atomul de carbon din resturile de aminoacizi condensate in cadrul unei catene polipeptidice, interactii care conduc la plierea catenei la formarea unor structuri compacte. Pentru elucidarea structurii terciare a proteinelor se utilizeaza metode fizice sofisticate, cu o mare putere de rezolutie, dintre care cea mai folosita este cristalografia cu raze X .

Intre radicalii R se poate stabili o gama larga de interactii covalente si necovalente. Intre resturile de cisteina aduse in pozitii vicinale de plierea catenei polipeptidice survin reactii de oxidare catalizate enzimatic conducind la formarea de puncti disulfurice. Nu toate proteinele au in structura puncti disulfurice, dupa cum nu toate resturile de cisteina din structura unei proteine sufera acest tip de reactii de oxidare. In structura ribonucleazei exista 8 resturi de cisteina care se pot oxida dind nastere la 105 combinatii, daca procesul este intimplator. O singura combinatie, in care punctile disulfurice se stabilesc intre resturile de cisteina 26-84, 40-95, 58-110 si 65-72 (Figura 37) are activitate enzimatica (de hidroliza a RNA) si poarta numele de conformatie nativa. Prezenta punctilor disulfurice in structura unei proteine ii confera acesteia stabilitate si rigiditate moleculara, a caror intensitate creste cu numarul acestor legaturi covalente.

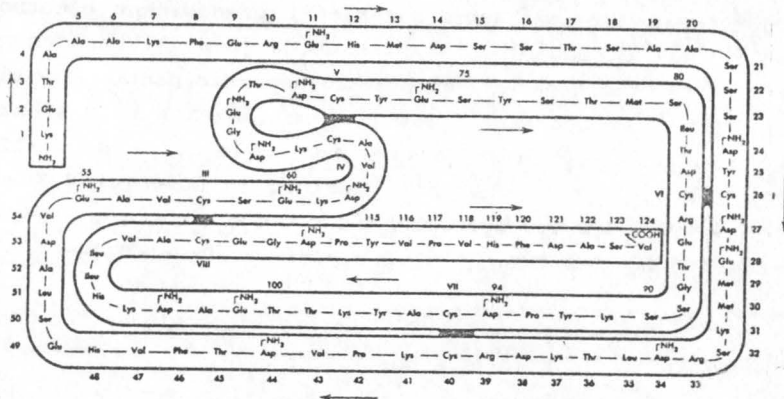
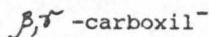
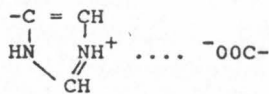
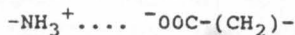
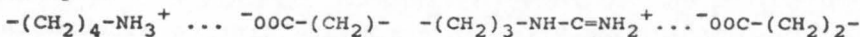


Figura 37. Structura bidimensională a ribonucleazei A din pancreasul bovinelor

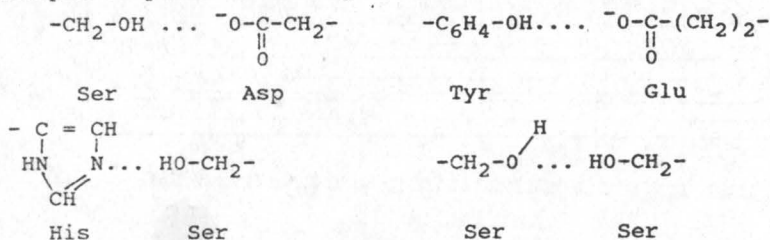
Hemoglobina din eritrocitele singelui uman este o proteină lipsită de punți disulfurice, în timp ce albumina serică are în structură 14 punți disulfurice.

Structura terțiară a tuturor tipurilor de proteine este stabilizată de interacții necovalente, stabilite între grupările R. Interacțiile salinice și punctele de hidrogen apar între grupările R polare, interacțiile hidrofobe și van der Waals se stabilesc între grupările nepolare. Deși interacțiile necovalente sunt slabe, datorită numărului lor mare și caracterului lor aditiv (cooperativ) fac ca proteinele native să fie niște entități deosebit de stabile în condiții fiziologice.

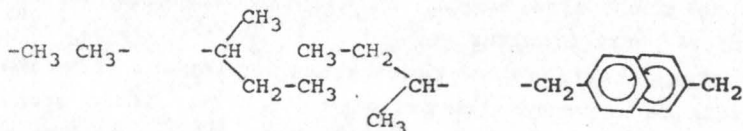
Interacțiile salinice se stabilesc între grupări R ionizate și cu sarcină opusă :



Punctile de hidrogen sunt interactiile predominant electrostatice si apar intre o grupare donator slab acida (D-H) si un atom acceptor (A) ce are o pereche de electroni neparticipanti. In sistemele biologice D si A sunt atomii electronegativi ai N si O si mai rar a S. Punctile de hidrogen au o energie de legatura de -12 - -30 KJ/mol, iar distanta D...A este cuprinsa in domeniul 2,7 - 3,1 Å. Exemplu de puncti de hidrogen sunt :



Interactiile de tip hidrofob se stabilesc intre gruparile R hidrofobe care au tendinta de a se asocia in solutii apoase:



fiind orientate spre interiorul structurii.

Toate aceste tipuri de interactii conduc la pliarea unei catene polipeptidice cu formarea unei structuri compacte. In functie de forma acestor structuri compacte, proteinele pot fi fibroase (fibrilare) sau globulare.

3.5.3. Structura cuaternara a proteinelor

Multe molecule proteice sunt formate dintr-o singura catena polipeptidica, acestea sunt proteine monomerice. Un numar mare de proteine insa sunt formate din mai multe catene polipeptidice identice sau diferite, asociate intr-o molecula multimerica cu o structura cuaternara. Aceste subunitati pot functiona independent sau cooperativ, in ultimul caz functia unei subunitati fiind dependenta de starea functionala a celorlalte.

In cadrul structurii cuaternare, fiecare catena polipeptidica are o conformatie proprie, intre subunitati stabilindu-se interactii

necovalente, aceleasi care stabilizeaza si structurile teritiare.

Structura cuaternara (oligomera) prezinta o serie de avantaje fata de proteinele cu structura monomera. In primul rind structura cuaternara confera flexibilitate moleculei proteice, proprietate care la nivelul enzimelor, de exemplu, se reflecta prin capacitatea lor de a raspunde la "modificarea" conditiilor de mediu. Enzimele cu structura cuaternara sunt enzime reglatoare, capabile de a controla viteza cu care decurg reactiile in cadrul metabolismului intermediar. In al doilea rind, proteinele oligomere ofera posibilitatea realizarii unei economii de material genetic. Pentru o proteina tetramera, formata din 4 catene polipeptidice identice de cite 100 aminoacizi, pentru fiecare este necesara existenta unei gene structurale de 300 nucleotide. Daca proteina ar fi monomera, pentru o catena corespunzatoare de 400 resturi de aminoacizi ar fi necesara o gena codificatoare constituita din 1200 nucleotide. In al treilea rind, aparitia proteinelor oligomere pe scara evolutiei moleculare a reprezentat o posibilitate de adaptare contra mutatiilor. Probabilitatea aparitiei mutatiilor si a unor erori in citirea mesajului unei gene de 300 nucleotide este mai mica decit in cazul unor gene mai mari, de exemplu de 1200 nucleotide. Pe de alta parte in cursul procesului de asamblare a subunitatilor in edificiul oligomer, catenele polipeptidice cu defecte nu sunt recunoscute.

3.5.4 .Corelatii intre structura primara si conformatia unei proteine

In 1973, Christian ANFENSEN a realizat un experiment celebru a carui rezultate au influentat considerabil evolutia cunoasterii in domeniul biochimiei proteinelor (Figura 38). El denaturaza in vitro un preparat de ribonucleaza prin tratament cu o solutie 8 M de uree si cu mercaptoetanol la pH 8. In aceste conditii structura enzimei este depliată si denaturata, fiind lipsita de activitate catalitica. Daca preparatul denaturat este dializat pentru indepartarea ureii din mediu si este supus oxidarii pentru refacerea punctilor disulfurice se constata replierea in forma conformatiei native si refacerea activitatii catalitice intr-un procent de 95 - 100 %.

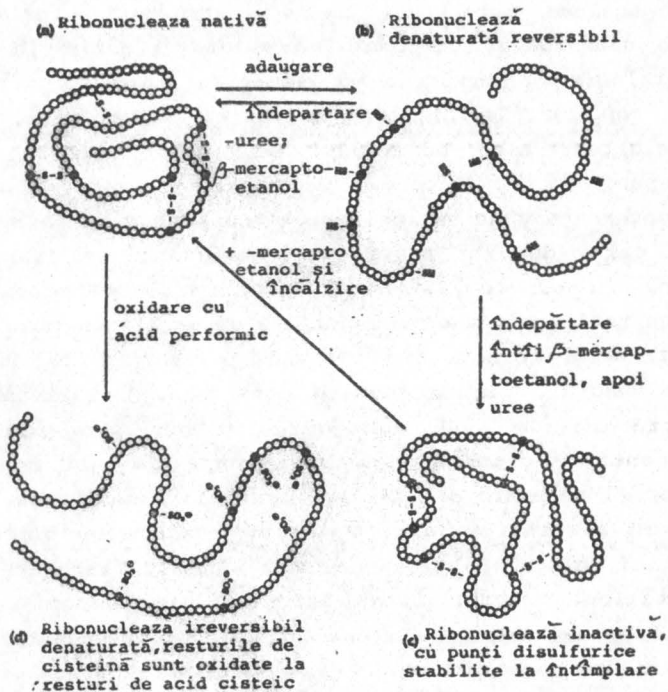


Figura 38. Denaturarea și renaturarea ribonucleazei

ANFINSSEN considera ca in vitro, proteinele pot fi denaturate, apoi renaturate fara participarea vreunui compus. Aceasta autostructurare nu necesita nici aport de energie, nici o informatie structurala extrinseca. Interactiile dintre aminoacizi sunt necesare si suficiente pentru a produce conformatia biologic functionala. De atunci a aparut dogma actuala din biochimia structurala a unei proteine care stipuleaza ca structura spatiala a unei proteine in conformatia ei activa nu depinde decit de secventa ei primara si trebuie sa corespunda starii termodinamice cea mai stabila in contextul celular.

Denaturarea unei proteine consta in disocierea interactiilor care permit mentinerea conformatiei native si se caracterizeaza prin deplierea structurii compacte. Proteinele pot fi denaturate prin tratamente termice (la temperaturi mai mari de 50-60°), prin

variatii de pH (se modifica distributia sarcinilor proteinei si deci posibilitatile de a stabili interactii saline sau puncti de hidrogen), sub actiunea unor detergenti (la concentratii mici de circa $10^{-6}M$ interfera in interactiile hidrofobe), a unor solventi organici miscibili cu apa (dezhidrateaza structura proteinei), a unor substante organice care in concentratii mari rup punctile de hidrogen. Din ultima categorie fac parte ureea si guanidina hidroclorica, care au o mare capacitate de a stabili puncti de hidrogen ce interfera cu cele ce stabilizeaza conformatia proteica.



Procesul poate fi urmarit datorita modificarii unor proprietati fizice ca: rotatia optica, viscozitatea, absorbtia in UV si scaderi pina la anulare a activitatii biologice. Denaturarea poate fi urmarita prin studiul dicroismului circular (spectre ale dispersiei rotatorii optice) , care permite si aprecierea cantitatii de elemente de structura secundara a unei proteine.

In continuare vom prezenta dovezi experimentale ca ordinea si natura aminoacizilor din catena influenteaza intr-un anumit grad modul de pliere al ei in spatiu. Se admite actual ca unii aminoacizi prefera un tip de conformatie, dar nu se poate prezice strict structura tridimensionala a unei proteine pe baza secventei ei de aminoacizi. Pentru prezicerea conformatiei unei proteine s-au utilizat, in biochimia proteinelor, metode matematice sofisticate bazate pe calculul energiilor minime ale unei conformatii, precum si metode empirice bazate pe scheme prezumtive rezultate din analizele unor structuri proteice cunoscute. Metodele empirice sunt mult mai simple. Se cunoaste ca anumite resturi de aminoacizi limiteaza conformatiile accesibile teoretic unei catene polipeptidice. Un exemplu in acest sens il constituie resturile de prolina care datorita incapacitatii de a stabili puncti de hidrogen destabilizeaza structurile secundare, in special α -helixul. Interactiile sterice dintre unele resturi de aminoacizi cu o catena ramificata la C (Ile,Thr) vor destabiliza, de asemenea, α -helixul.

In cele ce urmeaza vom prezenta schema empirica realizata de CHOU si FASMAN de prezicere a unei conformatii. In cadrul acestei

scheme, se definește frecvența f_{α} - cu care restul unui aminoacid apare într-un α -helix într-un set de proteine cu structura cunoscută,

$$f_{\alpha} = \frac{n_{\alpha}}{n}$$

unde n_{α} este numărul de resturi ale aminoacidului ce apare în α -helix iar n este numărul total de resturi ale aminoacidului respectiv din set. Tendința unui aminoacid particular de a apare într-un α -helix este definită astfel :

$$P_{\alpha} = \frac{f_{\alpha}}{\langle f \rangle}$$

unde $\langle f_{\alpha} \rangle$ este valoarea medie a lui f_{α} pentru toți cei 20 aminoacizi. Tendința P_{β} pentru un rest de aminoacid de a participa la o β -structură pliata se definește similar.

În Tabelul 9 prezentăm tendințele P_{α} și P_{β} calculate din analize cu rază X a 29 structuri proteice. Potrivit acestor valori, un rest de aminoacid poate fi clasificat ca înalt formator (H), formator (h), slab formator (I), indiferent (i), disturbator (b) sau puternic disturbator (B) de structura secundară (α -helix și β -structură). Utilizând aceste date, CHOU și FASMAN au formulat următoarele reguli empirice în prezicerea structurii secundare a unei proteine:

1) Un manunchi de patru resturi formatoare de helix (H_{α} sau h_{α}) provenit din șase resturi succesive reprezintă nucleul helixului. Segmentul de helix se propagă în ambele direcții pînă cînd valoarea medie P_{α} pentru un segment tetrapeptid scade sub 1,00. Un rest de Pro apare numai la extremitatea N-terminală a segmentului de α -helix.

2) Un manunchi de trei resturi formatoare de β -structură (H_{β} sau h_{β}) provenit din cinci resturi succesive reprezintă nucleul β -structurii. Structura β se propagă în ambele direcții pînă întîlnește un segment tetrapeptid a cărui valoare medie P_{β} scade sub 1,00.

3) Pentru regiuni ce conțin secvențe formatoare atât de α -helix cit și de β -structură, se formează un α -helix dacă valoarea P_{α} medie a lor este mai mare decît valoarea medie P_{β} ; altfel se formează o

β -structura.

Tabelul 2 Tendintele aminoacizilor de a participa la diferite structuri secundare

rest aminoacid	P_{α}	clasificare α -helix	P_{β}	clasificare β -structura
ALA	1,42	H	0,83	i
ARG	0,98	i	0,93	i
ASN	0,67	b	0,89	i
ASP	1,01	I	0,54	B
CYS	0,70	i	1,19	h
GLN	1,11	h	1,10	h
GLU	1,51	H	0,37	B
GLY	0,57	B	0,75	b
HIS	1,00	I	0,87	h
ILE	1,08	h	1,60	H
LEU	1,21	H	1,30	h
LYS	1,16	h	0,74	b
MET	1,45	H	1,05	h
PHE	1,13	h	1,38	h
PRO	0,57	B	0,55	B
SER	0,77	i	0,75	b
THR	0,83	i	1,19	h
TRP	1,08	h	1,37	h
TYR	0,69	b	1,47	H
VAL	1,06	h	1,70	H

* O valoare $P > 1$ indica faptul ca un rest apare cu o frecventa mai mare decit frecventa medie intr-o structura secundara (Chou, P.Y., Fasman, G.D., Ann.Rev.Biochem., 47, 258, 1978) .

Proteinele Chaperon

Dogma biochimiei structurale a proteinelor, conform careia structura primara determina conformatia unei proteine este astazi supusa unui numar de critici, datorita acumularii unor date experimentale care o infirma. De fapt, s-au constatat cazuri in care conformatia biologic activa nu corespunde starii cu cea mai mica

energie si ca adoptarea unor conformatii necesita prezenta in vivo a altor parteneri. Proteinele chaperon participa la asamblarea corecta a proteinelor, fara a face parte din structura lor biologic functionala. In vitro, proteinele chaperon maresc viteza si randamentul plierii proteinelor corect sintetizate . Exista dovezi experimentale ca proteinele chaperon se leaga la proteine cu conditia ca ele sa fie denaturate. Ele pot fi considerate ca enzime a caror functie este de a favoriza adoptarea unei structuri tridimensionale , ramaind neschimbate dupa reactie.

Notiunea de proteina chaperon, in sensul prezentat mai sus, apare in literatura de specialitate in 1978. El a fost utilizat, fara o definire precisa, pentru a descrie o proprietate a nucleoplasminei, proteina acido-solubila care este implicata in asamblarea histonelor in nucleozomi.

Primele cercetari care au fundamentat rolul proteinelor chaperon au fost realizate la Universitatea din Warwick privind biogeneza enzimei cheie din fotosinteza : RUBISCO (ribulozo bisfosfat carboxilaza oxigenaza). Ea este constituita din 8 subunitati mari sintetizate in cloroplast si 8 subunitati mici sintetizate in citoplasma. Pentru a dobindi structura lor, subunitatile mari trebuie sa se asocieze la o proteina specifica : o molecula chaperon apartinind familiei Hsp 60.

Astazi conceputul de molecula chaperon este corelat atit cu adoptarea unei conformatii cu functie biologica cit si cu proteinele de stres.

Identificarea proteinelor chaperon cu proteinele stresului o datoram lui Hugh PELHAM. Un organism viu supus unui stress fizic (marirea / scaderea temperaturii, etc), chimic (alcool, peroxid, pH, etc.) sau biologic (fagocitoza, lipsa de Ca^{2+} , etc) reactioneaza sintetizind un numar de proteine specifice, a caror rol este de a participa la renaturarea proteinelor sau la eliminarea lor. El a denumit aceste proteine de stres : Heat shock protein (Hsp). Evidentierea proteinelor chaperon este inca la inceput. Un studiu recent asupra proteinelor stres din E.coli releva 26 proteine de soc termic, in mare majoritate necunoscute. La mamifere, ele exista intr-un numar mai mare .

Trebuie subliniat faptul ca exista proteine cognate

sintetizate si in absenta stres-ului, indicind numeroase alte functii ale proteinelor chaperon in celula normala.

In Tabelul 10 prezentam o clasificare a proteinelor chaperon in functie de filogenia lor si de functia lor .

Tabelul 10. Proteinele chaperon cunoscute

Familia Proteine chaperon			Localizarea	Functia
Eucariote Procariote				
Hsp 90	Htp G	-	citoplasma	legarea hormonilor
	Grp 94		reticulum	insotire proteine
				repliere proteine
				proteine de stres
Hsp 70	Hsp 70/	Dna K/	citoplasma	inhibitia agregarii
	Hsp 10	Dna J	mitocondrie	repliere proteine
	Hsp 70/		reticulum	proteine de stres
	(Hsc 10)			transport membranar
	Bip			
	SSA,B si C			
Hsp 60	Hsp 60	GroEL/	citoplasma	inhibitie agregare
(chaperonine)	TCP I	GroES	mitocondrie	repliere proteine
				proteine de stres
				transport membranar
SecB	SecB	SecB	citoplasma	transport membranar
			membrana	
Nucleoplasmina	XLN0 38		nucleu	formare nucleozom
	Ch-NO 38			

Exista molecule chaperon sintetizate intr-o maniera constitutiva de celula, adica si in absenta stres-ului si care prezinta un foarte inalt grad de omologie cu Hsp 70, motiv pentru care se numesc Hsc 70.

Proteinele chaperon au o structura conservata in cursul evolutiei. Aceste proteine au aceiasi structura spatiala, avind trei domenii. Primul domeniu N-terminal poate lega ATP si prin analize cristalografice cu raze X s-a constatat ca este similar cu cel al actinei. Al doilea domeniu central ce permite asocierea cu alte proteine a fost modelat prin comparare cu cel al complexului major de histocompatibilitate (CMH). Al treilea domeniu C-terminal are secvente variabile specifice, bogate in glicina si prolina.

Anumite proteine chaperon, cum sunt cele din familia Hsp 60 si Hsp 70, au nevoie de energie. Pentru activarea unei singure proteine chaperon sunt necesare mai multe zeci de molecule de ATP. Daca functia secundara ATP-azica a proteinelor chaperon n-a fost stabilita cu precizie, este in general admis ca energia eliberata prin hidroliza ATP este necesara relaxarii proteinei. Cu toate acestea, alte proteine chaperon, ca Hsp 90 functioneaza in absenta ATP, printr-un mecanism de actiune diferit.

Printre functiile proteinelor chaperon mentionam :

1) Plierea catenei polipeptidice sintetizate pe ribozom. La biosinteza, plierea polipeptidiei pe ribozom implica sigur interventia proteinelor chaperon. Un studiu realizat in vitro sugereaza o cooperare intre diferitele proteine chaperon Hsp 70, Hsp 40, GroEL, GroES si Grp E. Asamblarea imunoglobulinelor necesita prezenta proteinei Bip. Recent, a fost pusa in evidenta o proteina necesara in vivo asamblarii receptorului celulei T (TCR).

2) Degradarea proteinelor denaturate de stres sau a celor pliate incurrect. Ubichitina, implicata in recunoasterea specifica a acestor proteine si proteazomii- care catalizeaza degradarea proteinelor denaturate sunt considerate chaperoni interni.

3) Asamblarea complexelor supramoleculare de tipul microtubulilor necesita participarea proteinelor chaperon. Tubulina trebuie sa fie asociata complexului TCP 1 pentru a putea dobindi conformatia necesara asocierii in microtubuli.

4) Recunoasterea originii replicarii. La fagul λ proteina Dna K (Hsp 70) detaseaza proteinele λO si λP care au recunoscut originea replicarii, intr-o maniera ce permite accesul DNA polimerazei.

5) Activarea receptorilor hormonilor steroidici. Acest tip de receptor este asociat unui chaperon din familia Hsp 90, ce-i asigura

mentinerea lui in forma inactiva. In prezenta hormonului steroid, acesta deplaseaza proteina chaperon si receptorul este activat. Activarea altor proteine importante, ca pp 60^{V-src} (proteina virusului sarcomului Roux) necesita asocierea cu proteina Hsp 90.

6) Transportul prin membrane este una din functiile esentiale ale proteinelor chaperon. Pentru a depasi aceasta bariera, proteinele trebuie sa fie sub forma depliată. Acesta este cazul, de exemplu, a proteinelor sintetizate in citoplasma care urmeaza sa fie exportate in mitocondrie. O serie de lucrari ale grupului lui Ulrich HARTL, care au aratat ca dupa sinteza ribozomala, proteina este captata de membrii ai familiei Hsp 70 care o mentin intr-o forma nestructurata. Partea N-terminala a proteinei este inserata pe membrana, fiind apoi recuperata de o alta proteina din familia Hsp 70, pe cealalta parte a membranei. Apoi o proteina Hsp 60 este implicata in repliere .

Avind in vedere rolul acestor proteine asupra functiei celulei, este foarte posibil ca ele sa fie asociate cu maladii. Proteinele de stres sunt prin structura lor, foarte conservate, omologia secventei intre om si bacterii depasind adesea 50 %. Se cunoaste ca infectia cu o bacterie patogena este insotita de o crestere a proteinelor de stres, in particular Hsp 60 si Hsp 70, atat la parazit cit si la gazda. De citiva ani s-au acumulat date ca reactia antigenica contra proteinelor stresului din parazit poate de asemenea exercita si asupra celulelor gazdei un fenomen de mimetism. Acest fenomen ar putea fi la originea anumitor maladii auto-imune (poliartrita reumatoida, scleroza multipla, etc), insa rolul proteinelor chaperon in maladiile imune nu a fost inca dovedit.

Exista posibilitatea ca insasi proteinele chaperon sa se plieze gresit. In acest caz proteinele tinta se pliaza defectuos si apoi sunt eliminate. Molecula chaperon pliată gresit poate fi eliminata fara a exista consecinte sau se poate acumula in celula. Ultima posibilitate sugereaza ca moleculele prion - sunt molecule chaperonn defectuos pliate. Se cunosc asa numitele maladii ale proteinelor prion - maladii neurodegenerative care se regasesc la om (maladia lui CREUTZFELDT-JACOB, maladia lui GERSTMANN-STRAUSSLER) ca si la animale (tremuriciul oilor, furia vacilor). Astazi este cunoscut ca

ele sunt datorate unui depozit, in creier, a unei izoforme patogene (PrP^{SC}) a unei proteine prion (PrP^{C}) prezente in creier, in stare normala. Proteina Prion se aseamana cu partea C-terminala a proteinei Hsp 70.

Proteinele se pliaza prin asocierea segmentelor

α -helicale si cu β -structuri pliate

Avind in vedere faptul ca procesul de pliere a proteinelor este foarte rapid (secunde, minute), se considera ca proteinele chaperon fixeaza structuri secundare locale a caror timp de viata este foarte scurt pentru a putea reactiona corect. Se considera ca mici segmente de structuri secundare (de cca 15 resturi) servesc ca intermediari in procesul de pliere, numiti unitati de pliere, ce actioneaza ca nucleii ce atrag si stabilizeaza structura secundara.

Acest model este suportat de o serie de dovezi experimentale. Prima este ca tendinta unei catene polipeptidice sa adopte o structura secundara regulata depinde de marimea ei. Formarea unui α -helix este favorizata de GLU,MET,ALA si LEU in timp ce formarea β -structurii este favorizata de VAL,ILE,si TYR. A doua dovada este ca tranzitia de la un random coil la un α -helix poate avea loc in mai putin de o μsec . Deci segmentele scurte de structura secundara pot fi formate foarte rapid. In al treilea rind, unitatile de pliere postulate sunt similare cu motivele structurale supersecundare discutate anterior.

2.8. Proteinele structurale fibroase

Proteinele fibroase au molecule alungite, caracterizate printr-un raport mare lungime/diametru si sunt dispuse sub forma de fibre ce se pot asocia intre ele.

Pielea contine astfel de proteine. Ea contine doua populatii de celule, separate de un strat subtire constituit dintr-o retea de fibre, membrana bazala. Intre membrana si suprafata celulelor se produce un agregat proteic insolubil, keratina. Aceste celule si produsii lor constituie epiderma. Sub membrana este derma, stratul profund al pielii in care celulele produc fibre de collagen, inalt inretelate. Distinctia clara intre derma si epiderma se realizeaza

atit prin diferentele dintre celulele celor doua straturi cit si prin localizarea separata a celor doua proteine : collagenul si keratina. Ambele proteine sunt insolubile, au capacitatea de a forma fibre cu o mare rezistenta mecanica. Ambele tipuri de fibre sunt incluse intr-o matrice amorfa care le confera proprietati avantajoase functiei lor structurale. Proprietatile fizice ale acestor combinatii biologice dintre fibre si matrice variaza cu structura componentelor celor doua faze (Tabelul 11). Aceste componente sunt proteine si/sau polizaharide. La om, in cazul keratinei din piele atit fibrele cit si matricea sunt proteine, in timp ce in tesutul conjunctiv fibrele sunt formate din proteina collagen, iar matricea - din polizaharide complexe.

Tabelul 11. Structura fibrelor si matricei in unele tesuturi

	Fibre	Matrice	Localizari
keratina	proteina (α -keratina)	proteina (keratohialina)	epiderma, unghii, par coarne, copite
tesut conjunctiv	proteina (colagen)	polizaharid (condroitin sulfat)	spatiu intercelular, cartilagii, oase, membrane bazale
lemn	polizaharid (celuloza)	polifenoli (lignina)	plante superioare
cochilie sau cuticula chitinoasa	polizaharid (chitina)	proteina (sclerotina)	exoscheletul crabilor, insectelor, paianjenilor

3.6.1. Keratinele

Keratina este o proteina rezistenta mecanic si nereactiva chimic care se gaseste la toate nevertebratele superioare. Este principalul component al epidermei si al formatiunilor inrudite : par, coarne, unghii si pene. Keratinele se clasifica in α -keratine care apar la mamifere si β -keratine, care au fost evidentiata la pasari si reptile.

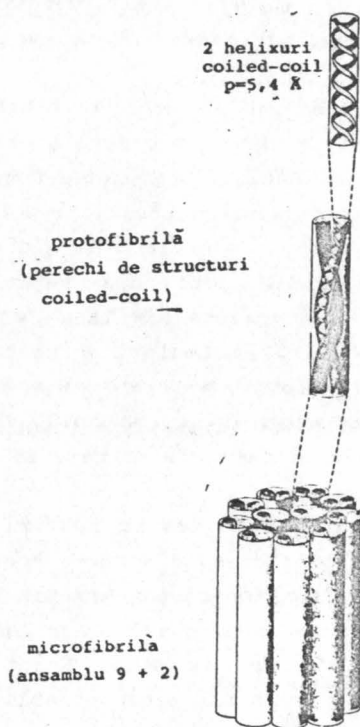
β -keratinele sunt relativ bogate in cistina si contin multe puncti disulfurice si majoritatea aminoacizilor cunoscuti. β keratinele nu contin cisteina, cistina, fiind bogate in aminoacizi cu masa moleculara mica ca :glicina, alanina si serina. β -keratinele se gasesc in firele de paianjen, in firul produs de viermii de matase, in solzii, ghearele si ciocurile reptilelor si pasarilor. O alta diferenta consta in aceea ca α -keratinele se intind la incalzire ; de exemplu, firul de par isi dubleaza lungimea cind este expus la caldura umeda si revine la lungimea normala prin racire. β -keratinele nu se intind in aceste conditii.

In 1930, ASTBURY realizeaza primele studii ale proteinelor prin difractie cu raze X. De exemplu, proteinele fibrilare din par, lina de tipul α -keratinei dau spectre de difractie de raze X asemanatoare, cu o periodicitate de 0,5-0,55 nm de-a lungul axei lor longitudinale. Acest aspect a fost interpretat de ASTBURY ca fiind rezultatul unei rasuciri regulate a catenei polipeptidice. Studiul fibroinei, β -keratina din fibrele de matase conduce la o schita de difractie cu un aspect total diferit, cu o unitate repetitiva de 0,7 nm.

Fibroina, proteina produsa de Bombyx mori are o masa moleculara de 350-415 KD, si o structura primara formata din secvente repetitive de tipul: (Ser-Gly-Ala-Gly)_n. Structura secundara consta din secvente pliate β -antiparalel. Fibroina este flexibila deoarece structurile pliate sunt tinute asamblat prin interactii van der Waals. Rezistenta fibrelor este rezultatul efectelelor cumulate ale punctilor de hidrogen si ale interactiilor van der Waals. Deoarece catenele polipeptidice ale fibroinei din matase sunt aproape complet extinse, ele rezista la forte de forfecare. Niciunul din resturile de aminoacizi din structurile β -pliate nu apar cu aceiasi frecventa. De exemplu, glicina din fibroina reprezinta aproximativ 1/2 din totalul aminoacizilor, proteina fiind bogata si in resturi de serina si alanina. Metionina si cisteina nu sunt prezente, iar aminoacizii ionizati sunt prezenti in cantitati mici.

Studiile de microscopie electronica realizate asupra firului de par arata ca este compus in principal din α -keratina si consta dintr-o ierarhie de structuri (Figura 39). Un fir de par are un diametru de aproximativ 20 μ m si este constituit din celule moarte,

Figura 39
Organizarea structurala
a firului de par



fiecare continind macrofibrile (cu un diametru de 2000 Å), strins impachetate si orientate paralel cu fibra firului de par. Fiecare macrofibrila este formata din microfibrile (diametrul 80 Å), ce sunt cimentate impreuna de o matrice proteica amorsa cu un continut inalt in sulf. Microfibrilele constau la rindul lor din protofibrile (diametru 20 Å) ce sunt organizate intr-un aranjament de 9 + 2 de protofibrile. Acelasi aranjament de 9+2 se gaseste si in cilii unor celule eucariote.

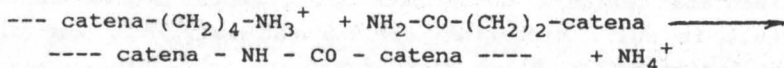
Schitele de difractie a razelor X pe α -keratina au aratat existenta unui α -helix cu o perioada repetitiva p de 5,1 Å (in loc de 5,4 Å din α -helixul lui PAULING si COREY). Aceasta observatie impreuna cu studiul unor proprietati fizice si chimice au aratat ca fiecare protofibrila a α -keratinei consta din doua perechi de α -helixuri strins asociate, in care fiecare pereche este rasucita

helicoidal spre stînga. Acest ansamblu se numeste structura coiled coil deoarece fiecare axa a α -helixului se rasuceste intr-o maniera helicoidala.

Conformatia coiled coil a α -keratinei este o consecinta a structurii ei primare. In cadrul acesteia se observa un segment de 7 resturi de aminoacizi a-b-c-d-e-f-g, pseudo-repetitiv, cu resturi nepolare predominant in pozitiile a si d. Deoarece un α -helix are 3,6 resturi/tura, resturile a si d din α -keratina se orienteaza pe o fata a α -helixului formind o suprafata hidrofoba prin care se asociaza cu o suprafata similara de pe un alt α -helix. Deosebirea fata de α -helixul normal (3,6 resturi/tura) consta in faptul ca suprafata hidrofoba a α -keratinei are 3,5 resturi/tura si este cauza formarii conformatiei coiled coil. Unghiul de inclinatie de 18° a helixelor, una fata de alta, le permite astfel de contacte hidrofobe.

α -keratina este bogata in resturi de cisteina, care inreteleaza catenele polipeptidice adiacente. Aceasta explica insolubilitatea si rezistenta la tensionare a α -keratinelor.

α -keratinele sunt clasificate in tari (hard) si moi (soft), dupa continutul lor in sulf. Keratinele tari, ca cele din par, unghii, coarne sunt mai putin pliabile decit cele moi (din piele si calus) deoarece punctile disulfurice rezista la actiunea unor forte deformatoare. In cadrul fibrei de α -keratina apar si niste legaturi peptidice intercatenare, formate prin substitutia enzimatica a gruparii ϵ -amino a unui rest de lizina de pe o catena polipeptidica cu gruparea amidica a unui rest de glutamina de pe alta catena :



Aceste ultime legaturi izopeptidice sunt relativ rare in piele, fiind comune in α -keratina firului de par, in special in celulele ce constituie partea medulara.

3.6.2. Colagenele

Tesutul conjunctiv al vertebratelor consta din celule specializate si dintr-o matrice extracelulara ce contine multe proteine si glucide complexe. Familia proteinelor fibroase, numite

colectiv collagen este componentul major al tesutului conjunctiv. Ele sunt cele mai abundente proteine de la vertebrate, reprezentind 25 % din totalul lor. Este o proteina extracelulara ce este organizata in fibre insolubile cu o mare rezistenta mecanica (o fibra cu un diametru de 1 mm poate sustine 10 Kg fara a se rupe !). Collagenul este elementul fibros major al pielii, oaselor, tendoanelor, cartilagiilor si dintilor. Este prezent in diferite proportii in toate organele servind la cimentarea celulelor. In afara rolului lui structural in tesuturile mature, collagenul are un rol direct in procesul complex de dezvoltare a organismului. Mai mult, structura de baza a collagenului poate fi modificata pentru a face fata necesitatilor specializate ale tesuturilor particulare.

O singura molecula de collagenul de tip I are o masa moleculara de circa 285 KD, o latime de circa 14 Å si o lungime de circa 3000 Å. Ea este compusa din trei catene polipeptidice. Mamiferele au cel putin 17 catene polipeptidice distincte genetic, gasite in 10 variante de collagen ce apar in diferite tesuturi ale aceluiasi individ.

Tabelul 12. Cele mai frecvente tipuri de collagen

Tipul	Compozitia catenelor	Distributia
I	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$	piele, oase, tendoane, vase singe, cornee
II	$[\alpha_1(II)]_3$	cartilagii, disc intervertebral
III	$[\alpha_1(III)]_3$	vase singe, piele fetus

Collagenul are o compozitie in aminoacizi distincta : contine 33-35 % glicina (in cadrul structurii primare, tot al 3-lea rest de aminoacid este glicina) , 20-24 % prolina si 4-hidroxi-prolina , avind si cantitati mai mici de 3-hidroxi-prolina si 5-hidroxi-lizina. Procesul de hidroxilare a resturilor de prolina si lizina are loc dupa terminarea sintezei catenei polipeptidice (este un proces post-tranzlational), sub actiunea catalitica a unei hidroxilaze, enzima care necesita prezenta vitaminei C pentru manifestarea activitatii ei catalitice. In cazul unor deficiente in vitamina C (scorbut), collagenul nu se poate matura si nu poate forma fibre, aparind

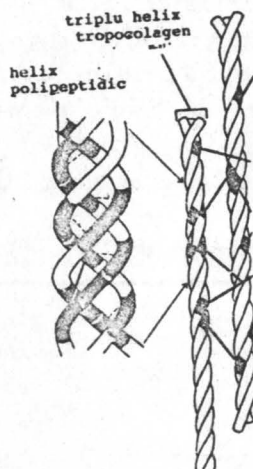
leziuni ale pielii (care se pot infecta), fragilitatea vaselor de sînge, etc.

Colagenul de tip I are in structura trei catene polipeptidice de aceiasi marime, doua fiind identice (α_1) si o a treia similara (α_2). O catena α_1 are un total de 1052 resturi de aminoacizi, dintre care secventa de la restul 17 la restul 1027 poate fi reprezentata schematic (GLY-X-Y)₃₃₇, unde X este frecvent prolina, iar Y este frecvent 3-hidroxi-prolina. In pozitia Y mai pot apare resturi de 5-hidroxi-lizina.

Studiile cu raze X indica faptul ca cele trei catene polipeptidice sunt dispuse paralel si se rasucesc una in jurul celeilalte, formind un triplu-helix (Figura 40).

Figura 40.

- a) Segment din triplu-helixul tropocolagenului
- b) o microfibrila de colagen



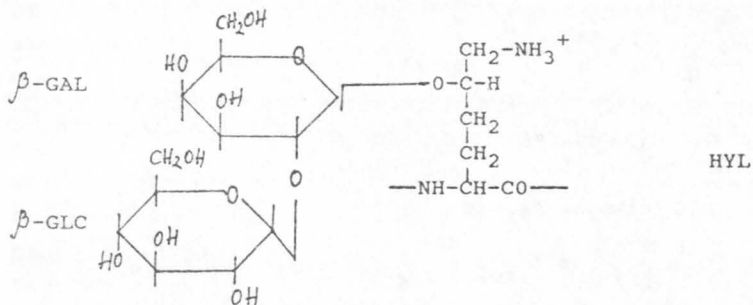
Fiecare catena are o conformatie helicala similara modelului obtinut in cazul polipeptidei sintetice: poli-L-PRO. Caracteristicile acestui superhelix sunt $n=3,3$ si $p=10 \text{ \AA}$. Factorul major in adoptarea acestei structuri este existenta unui rest de glicina in fiecare a treia pozitie a structurii primare, acest rest permitind rascucirea fiecărei catene cu o tura la fiecare trei resturi si aducind toate resturile de glicina spre interiorul structurii tip "cablu". Deoarece glicina are in catena laterala un singur atom de hidrogen, polipeptidele se pot apropia strins fara sa apara vreun fenomen de

impiedicare sterica. Rasucirea in interiorul catenelor se face spre stanga, iar edificiul supramolecular al celor trei catene este rasucit spre dreapta la fiecare 10 ture ale unei singure catene.

Legaturile peptidice sunt astfel orientate incit gruparea $-NH-$ a fiecarui rest de glicina formeaza o punte de hidrogen cu gruparea $C=O$ a legaturii peptidice apartinind restului X dintr-o catena vecina. Resturile X si Y sunt orientate spre exteriorul structurii cablu a triplu helixului.

Prin incalzirea unei solutii de collagen, viscozitatea scade, se modifica proprietatile optice rotatorii si in final se produce o structura dezorganizata (random coil), numita gelatina.

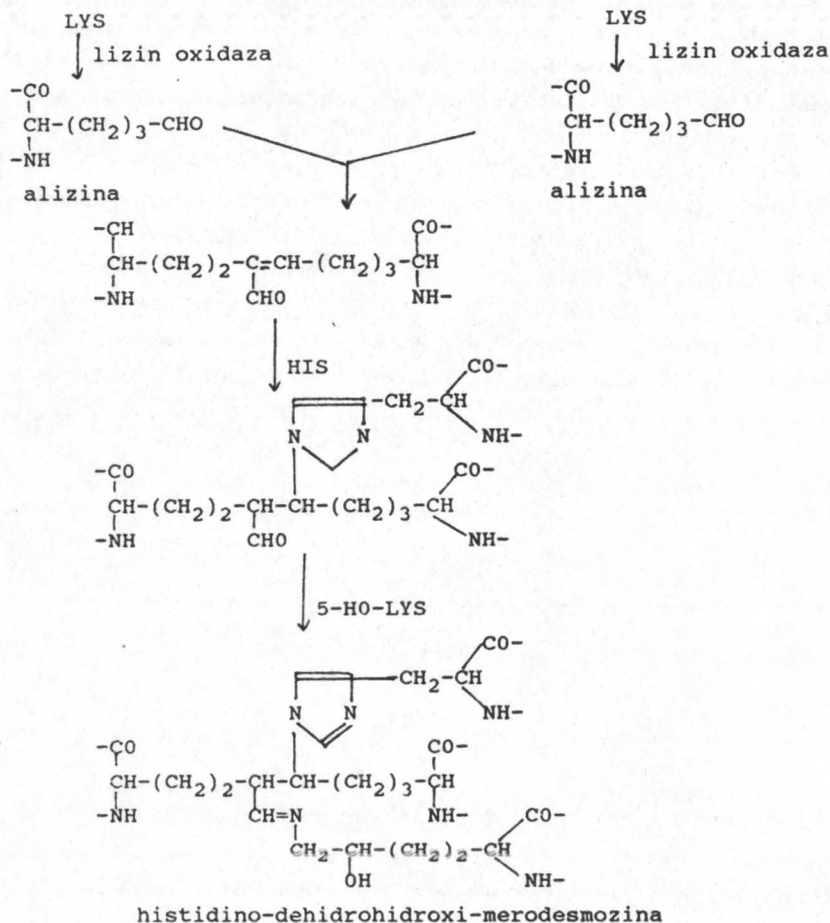
Colagenul contine glucide legate covalent, in cantitati variabile de la 0,4 la 12 % in greutate in functie de originea tisulara a collagenului. Glucidele (majoritar glucoza si galactoză sau dizaharidul lor) sunt atasate covalent la resturi de 5-hidroxilizină :



Numarul de unitati glucidice din collagen depinde de tesut. De exemplu, collagenul din tendoane contine sase unitati glucidice, in timp ce proteina din capsula cristalinului are 110. Rolul biologic al acestor unitati glucidice este necunoscut, unii autori considerind ca au probabil o functie de directionare a asamblarii.

Insolubilitatea collagenului este datorata unor legaturi covalente intramoleculare si intermoleculare ce se formeaza intre resturile de lizina si histidina. Stabilirea acestor legaturi covalente este promovata de o reactie de oxidare, catalizata de o Cu-enzima : lizil oxidaza care transforma lizina in alizina . Gruparea aldehidica libera a alizinei stabileste o legatura tip baza

Schiff, cu restul imidazolic al histidinei, în final existind posibilitatea stabilirii unor legături încrucișate între 4 catene laterale :



Aceste legături încrucișate nu se formează la întimplare, aparând în apropierea extremității N- și C-terminale. Importanța acestor legături încrucișate s-a evidențiat când s-a descoperit cauza moleculară a unei maladii - latirism, care apare la om și animale, ce are ca simptome : anomalii în structura oaselor,

ligamentelor, vaselor sanguine mari, datorate fragilitatii crescute a fibrelor de collagen. Simptomele apar la oamenii care consuma regulat mazarea dulce Lathyrus odoratus, leguma care contine β -aminopropio-nitril $\text{NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$ inhibitor al lizil oxidazei.

Gradul de inretelare al collagenului dintr-un tesut particular creste cu virsta organismului, de la animalele tinere putind fi extras, intr-o forma solubila, tropocolagenul care nu este inretelat.

Sinteza collagenului

In fibroblasti au loc primele etape ale sintezei collagenului:

a) in reticulul endoplasmatic rugos al fibroblastilor are loc sinteza catenelor polipeptidice pro- α ; urmeaza hidroxilarea (b) si glicozilarea (c) resturilor de prolina si lizina (proces post-tranzlational) d) cele trei catene pro- α sunt asamblate intr-un triplu helix, numit procolagen.

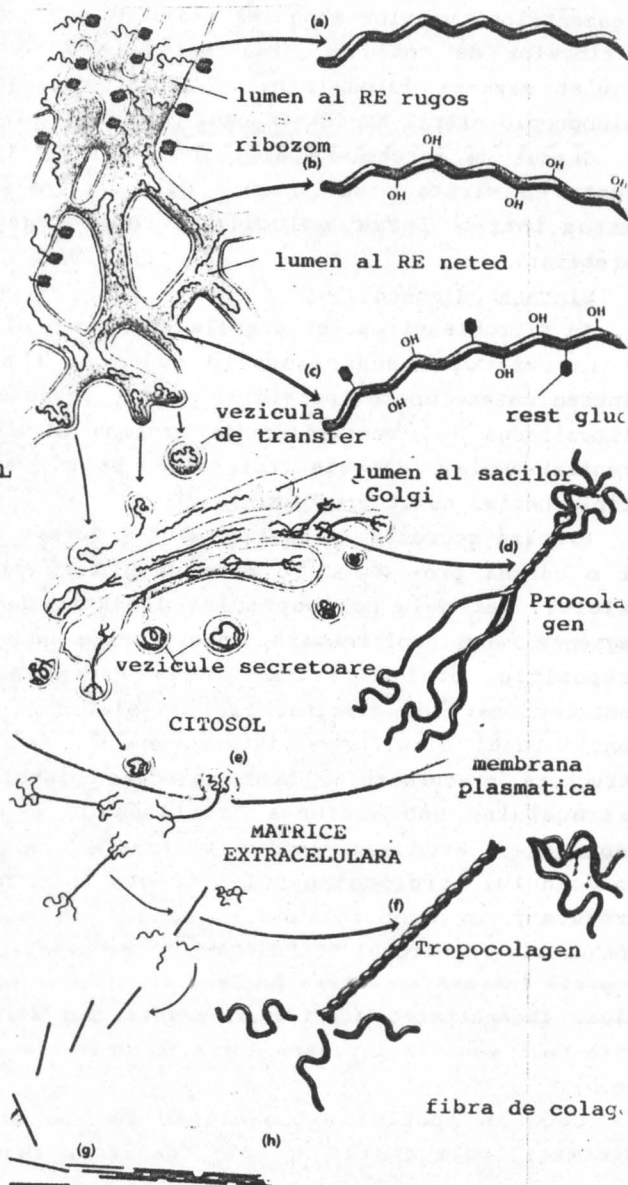
Urmeaza secretia procolagenului (format din 2 catene pro- α_1 si o catena pro- α_2 cu o masa de 120 KD fiecare) in exteriorul celulei. Catenele polipeptidice din structura procolagenului au segmente lungi, suplimentare, la extremitatea N- si C-terminala cu o compozitie total diferita de cea a centrului catenei (nu au cantitati mari de glicina, prolina si hidroxi-prolina , in schimb contin puncti disulfurice intercatenare). Peptidele aditionale din structura precursorului sunt scindate hidrolitic (f) in spatiul extracelular sub actiunea catalitica a unor enzime procolagen peptidaze. Produsul actiunii acestei enzime este monomerul collagenului ,tropocolagenul. Defecte in transformarea catenelor precursor in tropocolagen conduc la maladii ale tesutului conjunctiv (sindromul EHLERS-DANLOS, de exemplu) in care bolnavii au o piele intinsa si extrem de fragila, ligamente hipermobile, statura mica. Indepartarea acestor fragmente din structura procolagenului este deci esentiala pentru formarea ordonata a fibrelor de collagen (g,h).

Deci in spatiul extracelular au loc urmatoarele etape ale sintezei collagenului : f) transformarea procolagenului in tropocolagen ; g) autoasamblarea moleculelor de tropocolagen; h) formarea de legaturi incrucisate si constituirea fibrei de collagen.

In Figura 41 prezentam schematic sinteza si asamblarea fibrei de

colagen.

Figura 41.
Sinteza fibrei de colagen.



In cadrul etapei g moleculele de colagen se asociaza spontan intr-un mod specific formind fibra imatura de colagen (Figura 42).

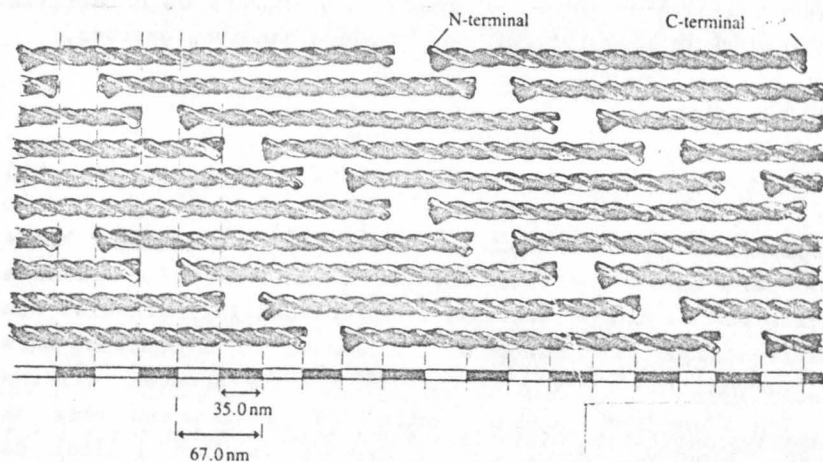


Figura 42. Aranjamentul moleculelor de tropocolagen
in structura unei fibre de collagen

Tipurile I, II si III de collagen formeaza fibrile distinct bandate ce au o periodicitate de 670 Å si un diametru de 100-3500 Å in functie de tipul de collagen si tesutul de origine. Moleculele de tropocolagen sunt organizate lateral dupa un aranjament precis stratificat ce lasa niste spatii libere de 400 Å, cu rol in formarea oaselor. Aceste spatii sunt umplute, in cazul structurii osului, de faza anorganica a acestuia: fosfatul de calciu in structura hidroxiapatitei :



Etapă h de maturare a collagenului este caracterizată prin formarea legăturilor covalente intramoleculare și intermoleculare, inițiate de lizil oxidază.

Degradarea collagenului

Catabolismul acestei proteine este realizat de proteinaze specifice numite collagenaze care scindează legăturile peptidice localizate în regiunile helicoidale ale acestuia. Collagenazele tisulare sunt implicate în procesele de creștere și remodelare ale unor țesuturi. De exemplu, refacerea mării uterului după naștere este datorată distrugerii enzimatică a unor cantități mari de

colagen. O collagenaza strict specifica este elaborata de o bacterie patogena Clostridium histolyticum care produce gangrena gazoasa.

2.8.3.Elastina

Multe tesuturi din organism, incluzind plaminii, peretii arterelor, unele ligamente, pielea trebuie sa fie elastice. O proteina specializata din tesutul conjunctiv numita elastina (MM 64 -66 KD) confera aceasta flexibilitate. In contrast cu catenele polipeptidice rigide ale α -keratinelor si collagenului, elastina are o conformatie neregulata, random-coil. Elastina are un continut mare in resturi de glicina (1/3 din resturi). Cu toate acestea, glicina nu apare intr-o maniera regulata astfel ca elastina nu este un triplu helix. Elastina, de asemenea, are un continut ridicat de alanina, prolina si valina , care impreuna cu glicina reprezinta 80 % din totalul resturilor de aminoacizi. Resturile de alanina sunt concentrate in jurul legaturilor incrucisate. Glicina alterneaza frecvent cu valina sau prolina , secvente tip -PRO-GLY-VAL-GLY-VAL- fiind repetate de cel putin 6 ori. Putine resturi prolina sunt hidroxilate.

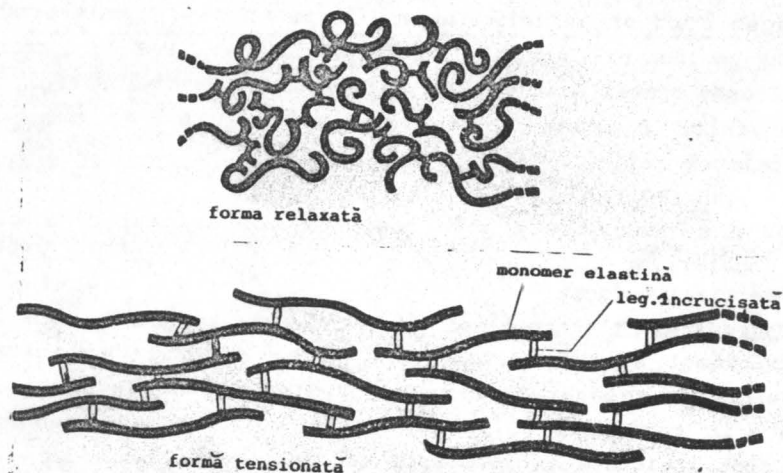


Figura 43. Diagrama structurii elastinei in stare relaxata si tensionata

Fibrele de elastina sunt formate cind catene polipeptidice adiacente devin legate covalent incrucisat. Inretelarea intre catene polipeptidice de elastina poate avea loc in doua feluri :

a) oxidarea catenelor laterale a unui rest lizina (cu lizin oxidaza), urmata de condensarea gruparii aldehidice cu gruparea ξ -amino a altui rest de lizina, ca in cazul collagenului ;

b) al doilea tip de inretelare major in elastina implica condensarea a trei resturi de alizina cu gruparea ξ -amino a unui rest lizina formind structura desmosinei care tine patru catene de elastina asamblat (Figura 43).

Desi structura elastinei nu este cunoscuta in detaliu, caracterul ei elastic este rezultatul retelei tridimensionale randomizate ce poate fi tensionata in orice directie.

3.7. Proteinele globulare

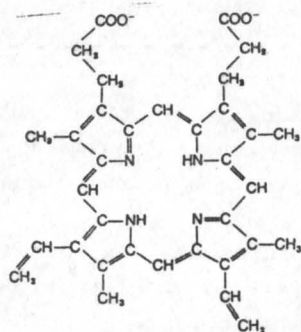
Proteinele globulare sunt compacte, mai mult sau mai putin sferice. Spre deosebire de proteinele fibroase care sunt insolubile in celula, proteinele globulare sunt solubile in citosol sau in faza lipidica a membranelor biologice.

Exista un numar enorm de proteine globulare care au cele mai diverse functii: enzime, proteine de transport, imunoglobuline, proteine receptor, etc. Forma compacta, globulara a acestor proteine este datorata orientarii diferite a resturilor de aminoacizi cu caracter electrochimic diferit. Resturile nepolare sunt orientate spre interior formind un miez hidrofoab stabilizat prin interactii van der Waals. Resturile polare, ionizate si neionizate sunt orientate spre exterior, stabilind cu apa din mediu interactii ion-dipol si dipol-dipol.

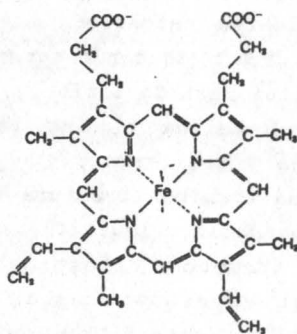
3.7.1. Mioglobina

Mioglobina reprezinta cca 8 % din totalul proteinelor musculare, avind rolul de stocare a oxigenului. Aceasta cromoproteina este constituita dintr-o singura catena polipeptidica de 153 resturi de aminoacizi si are o masa moleculara de 17,6 KD. Are un continut ridicat de α -helix (cca 77 %) si nu poseda puncti

disulfurice. Culoarea rosie a acestei cromoproteine este conferita de gruparea prostetica, hemul : o combinatie complexa a protoporfirinei IX cu Fe^{2+} .

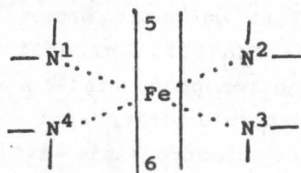


Protoporfirina IX



Hemul

Protoporfirina IX este constituita din 4 nucleee pirol , unite prin puncte $-CH=$ metinice, substituie cu grupari metil (pozitiile 2,4,5,8), cu grupari vinil $-CH=CH_2$ (pozitiile 1,3) si propionat $-CH_2-CH_2-COOH$ (pozitiile 6,7). Aceste trei tipuri de grupari pot fi aranjate in macrociclu tetrapirolic in 15 moduri diferite, dintre care numai izomerul IX este prezent in natura. Ionul Fe^{2+} este hexacoordinat. Primele 4 situsuri de coordinatie sunt ocupate cu perechile de electroni neparticipanti ai atomilor de azot pirolic, legaturile coordinative fiind coplanare. Situsurile 5 si 6 de coordinatie sunt situate de o parte si de alta a planului nucleului protoporfirinic. Situsul 5 de coordinatie este ocupat de o pereche de electroni a unui atom de azot apartinand unui rest de histidina din structura apoproteinei (numita globina). Situsul 6 este liber in forma neoxigenata a proteinei - deoximioglobina (deoxiMb) si este ocupat de oxigen in oximioglobina (oxiMb).



Partea proteica a acestei cromoproteine (apomioglobina) poate fi separata de gruparea prostetica prin scaderea pH sub valoarea de 3,5 si extractia hemului cu un solvent organic. Faza apoasa contine apomioglobina, care la pH neutru are un procent mai mic de α -helix (60 %) decit molecula nativa. In prezenta de uree 8 M, apoMb poate

fi depliată total, formându-se o catenă polipeptidică fără structuri α -helicate - care în urma dializei (pentru îndepărtarea ureei) se repliază parțial (60 % α -helix), iar la adăugarea hemului, se reface mioglobina nativă (77 % α -helix).

Studiile de difracție a razelor X prin cristale de mioglobina, realizate de KENDREW și colab. au demonstrat următoarele caracteristici ale acestei molecule proteice :

(i) molecula este compactă și conține în interiorul ei cel mult patru molecule de apă;

(ii) aproape toate grupările polare (LYS, ARG, GLU, ASP, HIS, SER, THR, TYR, TRP) se găsesc la suprafața moleculei, fiind expuse interacțiilor cu solventul apos ;

(iii) în interiorul structurii sunt concentrate resturi nepolare (LEU, VAL, MET, PHE) constituind un miez puternic hidrofob;

(iv) în mod excepțional, în miezul hidrofob sunt plasate două resturi de histidină , cu rol în funcția biologică a mioglobinei ;

(v) în structură există opt segmente de α -helix orientate spre dreapta, notate A, B, C, D, E, F, G și H, separate de regiuni scurte loop notate AB, BC... etc în funcție de poziționarea lor între două helixuri A și B, B și C , etc. Lungimea segmentelor de α -helix variază de la 7 resturi (helixul C) la 28 resturi aminoacizi (helixul H). În globina plierea α -helixurilor se face în jurul unui miez, din diferite direcții, astfel ca segmentele α -helix nu sunt adiacente. Această pliere nu rezultă din asamblarea unor motive structurale mai mici.

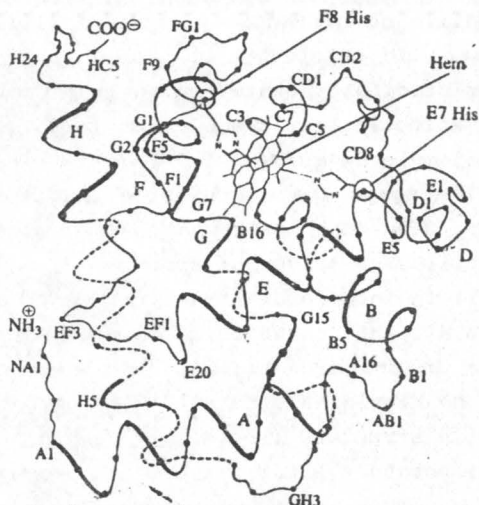
(vi) se evidențiază faptul că cele opt segmente de helix sunt întrerupte de resturi de aminoacizi care nu se pot acomoda cu o astfel de structură : patru resturi de prolina și patru resturi de serina și treonina (grupările hidroxil a ultimilor doi aminoacizi interacționează cu grupări carbonil din structură unor legături peptidice întrerupând α -helixul);

(vii) legăturile peptidice sunt coplanare, au gruparea carbonil într-o poziție trans față de gruparea -NH-, unghiurile și distanțele sunt aceleași ca în cazul peptidelor.

În Figura 44 prezentăm o schiță a structurii terțiare a mioglobinei, cu indicarea celor opt elemente structurale de α -helix. Resturile de histidină E 7 și F 8 coordonează atomul de fier al

hemului.

Figura 44.
Structura mioglobinei

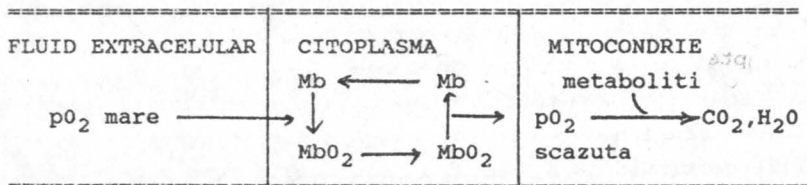


Funcția biologică a mioglobinei poate fi descrisă de curba de disociere a oximioglobinei :



Când concentrația oxigenului este mare, mioglobina leagă acest gaz vital, când concentrația lui este scăzută oximioglobina disociază eliberându-l în mediu (Figura 45). Transportul se realizează prin difuzie facilitată.

Figura 45. Funcția mioglobinei în metabolismul miofibrilei musculare



Concentratia O_2 se exprima prin presiunea partiala pO_2 a fazei gazoase in echilibru cu solutia. pO_2 se exprima in milibari, pascali sau torri : 1 torr = 1,333 mbari = 133,3 pascali.

Comportamentul mioglobinei fata de oxigen poate fi exprimata printr-o constanta de echilibru obisnuita:

$$\frac{[MbO_2]}{[Mb] \cdot [O_2]} = K_{ech}$$

La o concentratie fixa de mioglobina in celula, se poate calcula fractia de molecule de mioglobina ce vor fi oxigenate, la diferite concentratii de oxigen. Se poate obtine o curba de saturatie hiperbolica (Figura 46). Cind jumatate din moleculele de mioglobina sunt oxigenate, concentratiile de mioglobina si oximioglobina sunt egale - situatie care corespunde unei presiuni partiale $p_{50} = 2,75$ torri.

Saturatia fractionala S poate fi definita astfel :

$$S = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} = \frac{[O_2]}{[O_2] + 1/K_{ech}} = \frac{pO_2}{pO_2 + p_{50}}$$

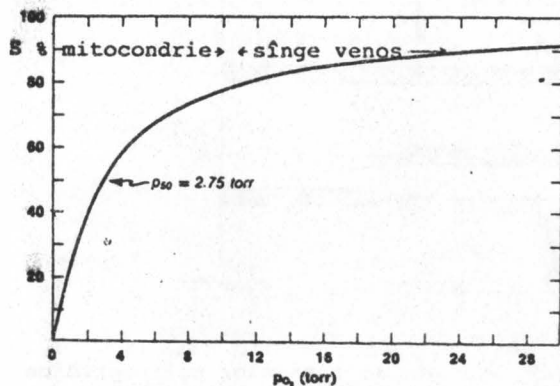


Figura 46
Curba de saturatie in oxigen
a mioglobinei

3.7.2. Hemoglobina

Aceasta cromoproteina este transportorul oxigenului, CO_2 si al protonilor - prin singe. Hemoglobina dintr-un litru de singe transporta intre 5 si 250 ml O_2 .

Spre deosebire de mioglobina, hemoglobina este o proteina

oligomera tipica, compusa din patru catene polipeptidice. De fapt, exista mai multe variante temporale ale hemoglobinei, la om. In acest caz exista gene structurale care produc cel putin sapte tipuri de catene polipeptidice ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ si ζ), care sunt exprimate in diferite perioade ale dezvoltarii omului.

Hemoglobinele embrionare sunt caracterizate prin prezenta catenelor polipeptidice ζ si ϵ .

Hemoglobinele fetale, HbF contin catene polipeptidice α (prezente si in organismul adult) combinate tetrameric cu catene γ sau δ , in forma $\alpha_2\gamma_2$. Catenele difera numai prin aminoacidul din pozitia 136 : alanina (γ) sau glicina (δ).

Hemoglobinele omului adult sunt reprezentate majoritar de HbA₁ (97-98,5 % din totalul hemoglobinei). Aceasta forma majora are o structura tetramera $\alpha_2\beta_2$. Forma minora a hemoglobinei omului adult (1,5 -3,2 %), notata HbA₂ are tot o structura tetramera, dar $\alpha_2\delta_2$. In Figura 47 prezentam secventa sintezei in timp a catenelor hemoglobinei. Este posibil ca in embrionii extrem de mici sa existe

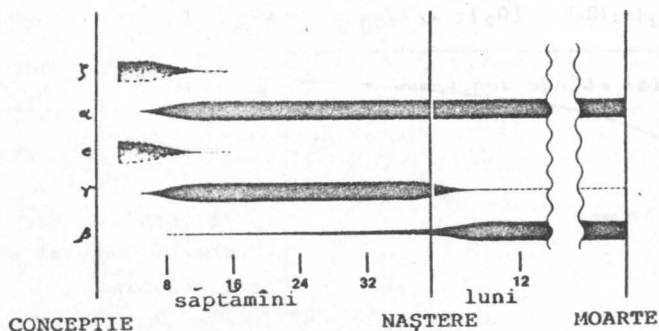
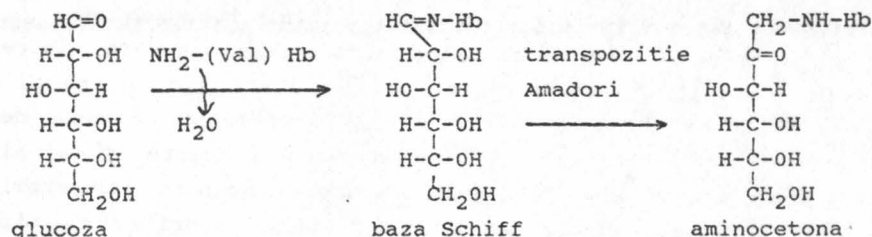


Figura 47 .Evolutia in timp a sintezei catenelor polipeptidice care intra in constitutia diferitelor variante temporale ale hemoglobinei

o hemoglobina cu structura $\zeta_2\epsilon_2$, dar primele forme demonstrabile sunt $\zeta_2\tau_2$ si $\alpha_2\epsilon_2$, care se suprapun peste forma HbF ($\alpha_2\gamma_2$), caracteristica vietii fetale. Continutul in HbF creste pina la jumatate din continutul total al hemoglobinei la un embrion de 2 luni si apoi la

90 % -la 2,5 luni. Formarea hemoglobinei adulte, HbA începe în a 8-a săptămână de la concepție și nu depășește 10 % din total până în a 30-a săptămână și 10-30 % la termen. După naștere, conținutul în HbA₁ și HbA₂ crește, iar cel în HbF scade, reprezentând 10 % din total la 6 luni după naștere și mai puțin de 2 % la 12 luni. La omul adult, conținutul în HbF este de 0,03 - 0,7 % din total. Aproximativ 10 % din moleculele de HbF sunt acetilate la gruparea N-terminală a catenelor .

Aproximativ 5-8 % din hemoglobina eritrocitelor omului adult are componente minore, notate A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}, etc. care apar în urma combinării cu alte componente celulare. De exemplu, forma A_{1c} este formată prin interacția grupărilor amino terminale cu glucoza :



Această formă este crescută în diabet , ajungând până la 12 % din conținutul total în hemoglobină. Hb_{1b} rezultă prin interacția HbA₁ cu esteri fosforici ai glucozei și gliceraldehidei. În Tabelul 13 prezentăm o serie de date privind hemoglobinele omului.

Tabelul 13. Hemoglobinele omului

Component	Compoziție	Masa moleculară	%	Observații
A ₁	$\alpha_2\beta_2$	64 450	97,5-98,5	are forme minore A _{1a} , A _{1b} , A _{1c}
A ₂	$\alpha_2\delta_2$	64 564	1,5-3,0	rol necunoscut
A _F	$\alpha_2\tau_2$	64 734	0,03-0,7	acetilată
G _F	$\alpha_2\epsilon_2$	64 706		
embrionară $\alpha_2\epsilon_2$				

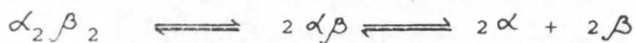
P₅₀ 26,6 torri la adult, 22,7 torri la nou născut

Concentrații : 13-16 g/100 ml sânge (2,0-2,5 mM) -la adult

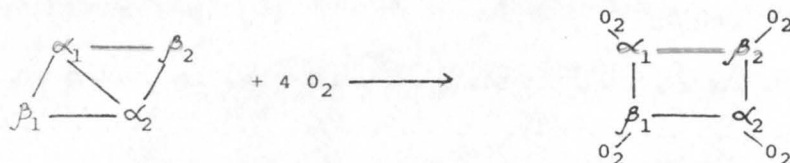
27-32 x10⁻¹² g (4,2-5,0 x 10⁻¹⁶ moli/eritrocit

Catena α contine 141 resturi de aminoacizi, celelalte catene (β , γ , δ) au cite 146 resturi de aminoacizi si o secventa primara similara. Fiecare catena are o conformatie tridimensionala similara, de tip globular ocupind in cadrul edificiului oligomer colturile unui tetraedru neregulat. De asemenea, fiecare catena are o conformatie asemanatoare mioglobinei, desi exista diferente intre structurile primare ale celor trei catene (α , β si mioglobina). Gruparile hem sunt localizate in fahte, spre exteriorul moleculei, una pe fiecare subunitate (Figura 48). Exista doua resturi de histidina : E_7 si F_8 ce interactioneaza cu hemul. Catena α a hemoglobinei este lipsita de segmentul D de helix, corespunzator structurii mioglobinei. Helixul C scurt din mioglobina este regasit ca un 3_{10} helix in ambele tipuri de subunitati ale hemoglobinei.

Ca si in cazul altor proteine cu structuri cuaternare, intre cele patru subunitati ale hemoglobinei se stabilesc interactii slabe, necovalente. Fiecare subunitate α stabileste o suma de contacte cu cele 2 subunitati β , existind putine contacte α - α si β - β . Contactul $\alpha_1 \beta_2$ implica interactiile dintre 110 atomi apartinind a 34 resturi de aminoacizi, fiind majoritar de tip hidrofob. Contactul $\alpha_1 \beta_1$ implica interactiile a 80 atomi apartinind la 19 resturi de aminoacizi. Din acest motiv, in mediu acid hemoglobina poate suferi disocieri de tipul :

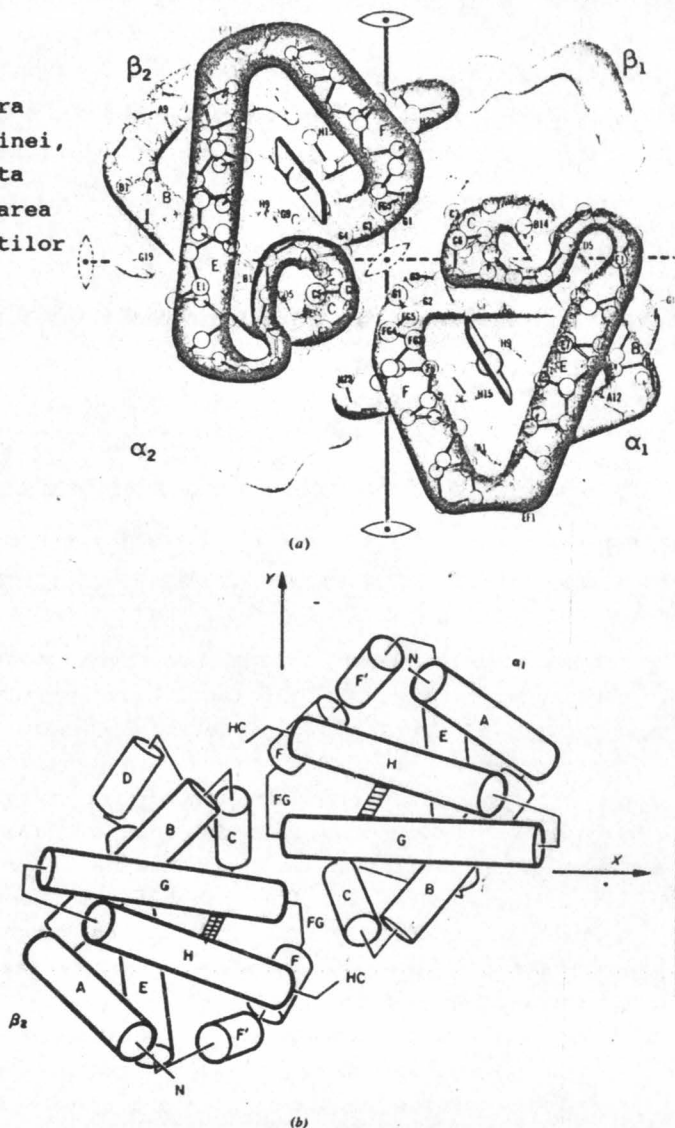


Hemoglobina prezinta patru situsuri de legare a oxigenului, la nivelul celor patru grupari hem din structura.



Ca si in cazul mioglobinei, in deoxihemoglobina - atomul de Fe din structura hemului are pozitia 5 de coordinatie ocupata de o pereche de electroni neparticipanti ai atomului de azot apartinind restului de histidina proximala F-8 , pozitia 6 de coordinatie fiind libera in deoxihemoglobina si ocupata cu O_2 in oxihemoglobina.

Figura 48. a) Structura cuaternara a hemoglobinei, contactele la interfata $\alpha_1\beta_2$. b) Reprezentarea cilindrica a subunitatilor α_1 si β_2 din molecula hemoglobinei.



Curba de oxigenare a hemoglobinei (Figura 49) are un aspect sigmoidal, deosebit de aspectul hiperbolic prezentat de mioglobina.

Forma sigmoidala este caracteristica situsurilor multiple de legare ce actioneaza cooperativ, legarea O_2 la o subunitate a tetramerului faciliteaza legarea acestui gaz la celelalte

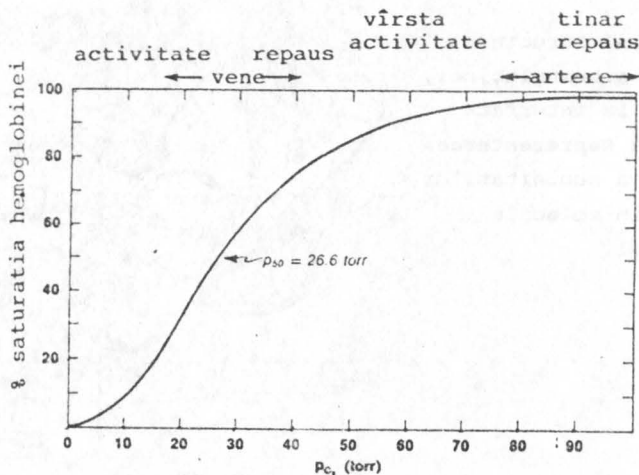


Figura 49 . Curba de saturatie in oxigen a hemoglobinei

subunitati. Similar, pierderea unei molecule de oxigen din purtatorul saturat $Hb(O_2)_4$ faciliteaza pierderea celorlalte.

Expunerea moleculelor de hemoglobina la $p_{O_2} = 100$ torri caracteristica plaminilor conduce la saturarea lor intr-un procent de 97 % corespunzind unei incarcari aproape totale a acestei proteine - $0,97 \times 4 = 3,88$ molecule O_2 /molecula Hb. In capilarele tesuturilor periferice cu un consum de oxigen moderat, $p_{O_2} = 30-40$ torri, aproximativ 1/4 din oxigenul transportat va fi eliberat. In tesuturile cu o activitate intensa, ca muschiul cardiac si muschii scheletici $p_{O_2} = 15$ torri - aproximativ 80 % din oxigenul transportat este eliberat.

Comparativ cu mioglobina, hemoglobina are o afinitate mai mica pentru oxigen. Pentru ca 50 % din situsurile proteinei transportoare de oxigen sa fie ocupate cu molecule de acest gaz ($S=0,5$) pentru mioglobina este necesara o presiune partiala $p_{50} = 2,75$ torri, iar

pentru hemoglobina - de 26,6 torri.

Studiile privind legarea oxigenului la hemoglobina au condus la descoperirea fenomenelor de cooperativitate si alosterie. Existenta unor interactii intre subunitatile unei proteine oligomere conduce la cooperarea lor in realizarea functiei biologice a acesteia.

Ecuatia saturatiei fractionale S (v.pag 118) poate fi prelucrta matematic astfel :

$$\frac{S}{1-S} = \frac{pO_2}{P_{50}} \quad \text{sau} \quad \log \frac{S}{1-S} = \log pO_2 - \log P_{50}$$

permitind o reprezentare grafica lineara (Figura 50). Panta acestor drepte poarta numele de coeficient HILL, dupa numele fiziologului englez A.V.HILL, laureat al premiului NOBEL, descoperitorul fenomenului de cooperativitate. Mioglobina are un coeficient Hill $n=1$, iar hemoglobina are $n=2,8$. Un coeficient Hill mai mare decit unitatea indica o cooperativitate in legarea oxigenului si se datoreste unor interactii hem-hem.

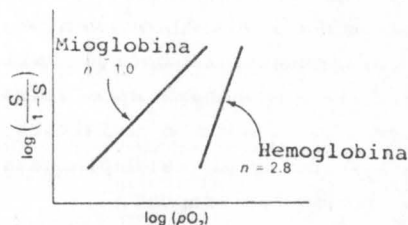


Figura 50
Schitele Hill pentru mioglobina
si hemoglobina

MONOD si JACOB au prezentat un model general pentru explicarea fenomenului de cooperativitate (Figura 51), conform caruia deoxihemoglobina prezinta o conformatie T (tense) care impiedica combinarea cu O_2 , in timp ce oxihemoglobina are o conformatie R (relaxed) care-i permite aceste interactii.

Se cunoaste ca accesul la hem in subunitatile β ale deoxihemoglobinei este blocat de prezenta unui rest de valina voluminos, care se deplaseaza in oxihemoglobina . De asemenea subunitatile α din deoxihemoglobina au o afinitate pentru oxigen mai mica decit in conformatia oxi. Etapele intermediare de tranzitie

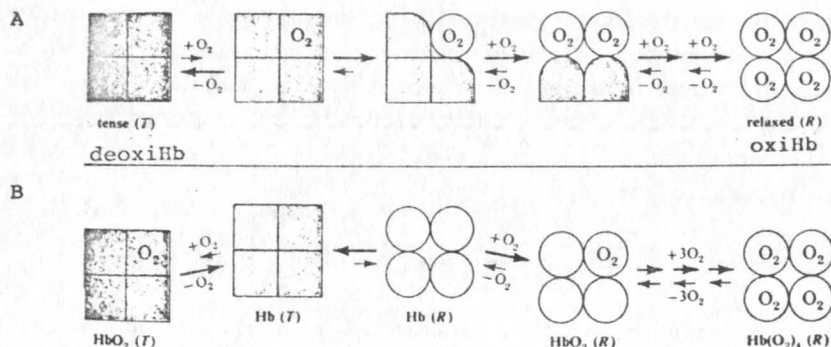


Figura 51. Modelul MONOD JACOB pentru explicarea cooperativitatii hemoglobinei

intre cele doua forme nu sunt cunoscute. MANOD si JACOB propun doua cai posibile. In cadrul caii A, prima molecula de O_2 se leaga cu dificultate la conformatia T a deoxihemoglobinei, promovind trecerea conformatiei acelei subunitatii la forma R. Aceasta din urma induce treptat modificarea conformatiei subunitatilor vecine, in final formindu-se starea R total oxigenata. In cadrul caii B, conformatiile T si R se afla in echilibru (deplasat spre forma T) chiar in absenta oxigenului. Conformatia R avind o afinitate mai mare pentru oxigen, cu cresterea pO_2 echilibrul se deplaseaza in favoarea acestei conformatii care se oxigeneaza treptat.

Studiile cristalografice au aratat ca formele oxi- si deoxi ale hemoglobinei au o conformatie diferita, oxihemoglobina fiind mai compacta. Legarea oxigenului se realizeaza la pozitia 6 de coordinatie si provoaca modificari conformationale in tot edificiul tetramer. Subunitatile hemoglobinei se deplaseaza unele fata de altele, modificandu-se contactele la interfetele $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_2\beta_1$ si $\alpha_1\alpha_2$. Intre subunitatile β nu exista contacte. Rezultatul total al acestor modificari este rotatia unei perechi $\alpha\beta$ fata de cealalta. Modificarea contactului dintre monomerii α_1 si β_2 de la oxigenarea hemoglobinei (forma T) este insotita de transformarea conformationala la forma R (Figura 52).

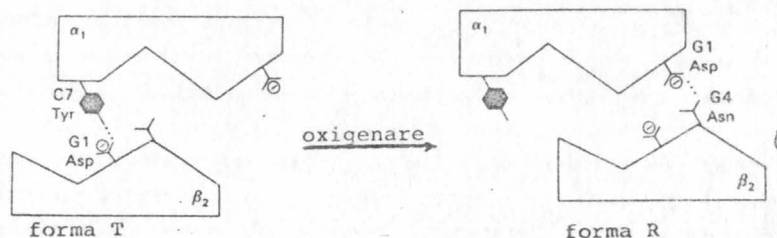


Figura 52. Modificarea interfetei $\alpha_1\beta_2$ la oxigenarea hemoglobinei

Spre deosebire de mioglobina care nu prezinta fenomenul de alosterie, hemoglobina este o proteina alosterica tipica la care legarea oxigenului este afectata de variatiile de pH, de concentratiile CO_2 si 2,3-difosfogliceratului. Efectul pH, numit si efectul BOHR (Figura 53) se caracterizeaza prin aceea ca

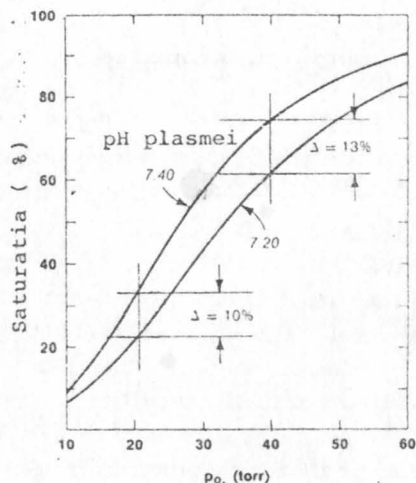
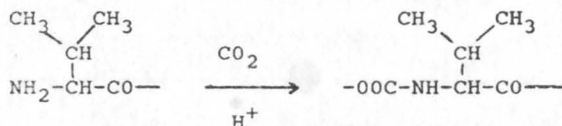


Figura 53. Scaderea afinitatii hemoglobinei fata de oxigen la concentratii mai mari de H^+

acidifierea singelui provoaca o descarcare de oxigen din eritrocite. O scadere a pH plasmei sangvine produce o deplasare spre dreapta a curbei de disociere a oxigenului, scazind afinitatea hemoglobinei pentru acest gaz. Similar, cresterea concentratiei de CO_2 in plasma sangvina scade afinitatea hemoglobinei pentru O_2 promovind

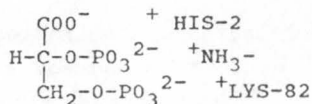
disocierea oxihemoglobinei . Atit H^+ cit si CO_2 sunt rezultate a unei activitati catabolice intense. Prezenta acestor efectori in concentratii mari in capilarele unui tesut cu un metabolism intens promoveaza eliberarea de O_2 , care ajuta tesutul in activitatea lui catabolica. Un efect invers se observa in capilarele alveolare ale plaminilor, unde concentratiile in H^+ si CO_2 sunt mici, favorizind preluarea oxigenului de catre hemoglobina. Dizlocuirea oxigenului din oxihemoglobina de catre protoni si situatia inversa este insotita de stabilirea si disocierea unor interactii saline intre subunitati. Aceste interactii saline prezente numai in deoxihemoglobina (si absente in oxihemoglobina) se stabilesc intre resturi incarcate pozitiv (de la histidina , de la grupari amino terminale de la grupari ϵ -amino ale lizinei) si resturi incarcate negativ (carboxil terminale, acid aspartic, acid glutamic) Cresterea concentratiei H^+ conduce la protonarea gruparilor amino, a resturilor de histidina , permitind formarea puntilor saline si a deoxihemoglobinei.

CO_2 se combina cu gruparile amino-terminale ale celor patru catene formind carbamati :



care stabilizeaza forma T a deoxihemoglobinei . Prin aceasta reactie, hemoglobina participa si la transportul CO_2 de la tesuturi la plamini. Oxihemoglobina omului leaga 0,15 moli CO_2 / mol hem, in timp ce deoxihemoglobina leaga 0,4 moli CO_2 /mol hem.

2,3-difosfogliceratul reactioneaza asemenea H^+ si CO_2 scazind afinitatea hemoglobinei pentru oxigen. Studiile stoichiometriei legarii acestui compus arata ca 1 mol 2,3-difosfoglicerat se leaga la 1 mol hemoglobina (tetramer), sugerind un singur situs de legare, existent in cavitatea centrala, intre cele patru subunitati. Situsul de legare al 2,3-difosfogliceratului este constituit din resturi incarcate pozitiv : gruparea α -amino terminala, LYS EF 6 si HIS H 21 situate pe ambele catene β ce interactioneaza cu cele patru sarcini negative ale efectorului alosteric, ionizat la pH fiziologic :



Faptul ca 2,3-difosfogliceratul promoveaza disocierea oxihemoglobinei se explica prin aceea ca acest efector stabilizeaza structura cuaternara a deoxihemoglobinei prin legarea catenelor β . La oxigenare, 2,3-difosfogliceratul este eliminat deoarece cavitatarea centrala devine prea mica. Deci legarea 2,3-difosfogliceratului (DPG) si a oxigenului la hemoglobina sunt mutual exclusive :



Este cunoscut faptul ca singele stocat pe medii conventionale (acid-citrat-dextroza) isi pierde in timp proprietatile necesare folosirii in transfuzii. De fapt afinitatea hemoglobinei pentru oxigen creste in timpul stocarii, odata cu scaderea continutului in 2,3-difosfoglicerat. Un singe cu o afinitate mare pentru oxigen, la transfuzie, nu poate ceda oxigenul tesuturilor periferice.

Se cunosc si o serie de mecanisme adaptative, la om, bazate pe efectul DPG asupra afinitatii hemoglobinei pentru oxigen. Astfel, bolnavii cu emfizem pulmonar obstructiv, datorita blocarii aerarii bronhiolilor, au o pO_2 in singele arterial mai mica (circa 50 torri). Prin cresterea concentratiei in 2,3-difosfoglicerat de la 4,5 mM la 8 mM in eritrocit este marita capacitatea de eliberare a oxigenului din oxihemoglobina. De asemenea, cind o persoana merge de la nivelul marii la altitudine, afinitatea hemoglobinei pentru oxigen scade datorita cresterii simultane a concentratiei de 2,3-difosfoglicerat. Aceste modificari adaptative sunt rapide (de ordinul orelor) si reversibile.

Deoarece 2,3-difosfogliceratul interactioneaza cu gruparile α -amino terminale ca si CO_2 , un efector dizlocuieste pe celalalt de la aceste situsuri.

Faptul ca HbF are o afinitate mai mare pentru oxigen decit HbA are o mare importanta pentru transferul acestui gaz de la mama la fat. Aceste afinitati diferite sunt datorate faptului ca HbF leaga DPG mai putin puternic decit HbA.

Dupa cum am mai aratat hemoglobina poate fi disociata in catenele ei componente. Catena α are proprietati similare mioglobinei: mare afinitate pentru oxigen, curba de disociere

hiperbolica si neinfluentata de modificarea concentratiei H^+ , CO_2 si 2,3-difosfogliceratului. Catena β izolata se agregă rapid intr-o forma tetramera β_4 , numita si HbH. Atit catena β singura, cit si forma β_4 este lipsita de proprietati alosterice. Deci proprietatile exceptionale ale hemoglobinei sunt datorate structurii ei oligomere formata din patru subunitati de doua tipuri diferite si interactiilor dintre acestea.

Forme patologice ale hemoglobinei

Substituirea unui singur aminoacid (GLU-6 cu VAL-6) din catena polipeptidica β conduce la hemoglobina S, caracteristica bolnavilor de anemie falcipara. Maladia, extrem de frecventa la negri (4 la 1000) are ca principal simptom anemia severa. Eritrocitele bolnavilor au forma unei secere (sickle-cell), aglutineaza pe peretii vaselor, impiedicind circulatia, sunt friabile si hemolizeaza usor. HbS, in forma deoxi are o solubilitate scazuta, formeaza un precipitat fibros care-i confera eritrocitului forma anormala.

Bolnavii care au mostenit aceasta gena anormala numai de la unul din parinti (heterozigoti) nu au simptomele bolii (au tara falcipara) si prezinta numai 1 % din eritrocite in forma de secera. Bolnavii care au mostenit aceasta gena anormala de la ambii parinti (homozigoti) au 50 % din eritrocite in forma de secera si maladia este extrem de grava, murind inainte de a ajunge la maturitate. Analizind raspindirea geografica a maladii se constata incidenta genei " sickle" in regiunile bintuite de malarie, indivizii cu tara falcipara fiind protejati fata de forma letala a malariei.

Se cunosc multe hemoglobine patologice, care sunt rezultatul unor defecte la nivelul genelor structurale care codifica catenele polipeptidice componente sau la nivelul genelor reglatoare ce determina viteza sintezei unui mRNA particular. Oamenii pot avea 1-2 gene structurale care codifica catena α pe un cromozom. Deci un individ poate avea un total de 2, 3 sau 4 gene, in functie de numarul de gene (1 sau 2) mostenite de la fiecare parinte. Toate aceste gene sunt identice la majoritatea oamenilor. Efectul mostenirii de gene defective depinde de proportia lor din totalul genelor existente. Lipsa totala a catenelor α previne formarea HbF, HbA₁ si HbA₂. Fetusii pot supravietui un timp datorita sintezei unor

cantitati crescute de hemoglobina embrionara (Hb Portland $\gamma_2\epsilon_2$), dar mor inainte de termen sau imediat dupa nastere, situatie denumita hydrops fetalis.

Genele care codifica catenele β, δ, ϵ si posibil ζ sunt legate pe un cromozom diferit si nu sunt afectate de defectele genelor α . Cind genele β sunt transcrise normal in timp ce catenele α sunt transcrise defectuos sau in cantitati insuficiente, se acumuleaza homotetramerii β_4, δ_4 sau ϵ_4 . Hemoglobina lui BART are structura ϵ_4 , iar HbH este β_4 . Dupa cum deja s-a amintit, homotetramerii au caracteristicile functionale ale mioglobinei (mare afinitate pentru O_2 , lipsa interactiilor cooperative), sunt instabili, tind sa precipite, scurtind viata eritrocitelor.

Efectele impiedicarii partiale a transcrierii genelor α depind de numarul genelor afectate. Daca numai una din cele 4 gene este afectata, simptomele sunt silentioase, situatia fiind detectabila prin prezenta hemoglobinei lui BART, intr-o proportie de 1-2 % in singele cordonului ombilical. Daca sunt afectate 2 gene dintr-un total de 4, sau 1 din 3 - apar simptome evidente dar moderate. In maladia hemoglobinei H, numai o gena din 4 este normala, 1/4 din hemoglobina singelui cordului fetal este hemoglobina lui BART, iar 4-30 % din hemoglobina singelui adult este HbH, aparind simptomele unei anemii severe.

Maladiile genetice datorate incapacitatii sintezei unei anumite catene polipeptidice din structura hemoglobinei se numesc talazemii, deoarece sunt comune in tarile Mediteraniene (Thalassa -mare). Exista α si β talazamii, in functie de tipul catenei afectate de lipsa genei structurale. In Tabelul 14 prezentam citeva talazemii comune.

Se cunosc maladii moleculare datorate unor mutatii care modifica secventa de aminoacizi din una sau mai multe subunitati ale hemoglobinei. Cele mai comune mutatii afecteaza o singura baza din structura DNA, ceea ce se traduce prin substituirea unui singur aminoacid dintr-un singur tip de subunitate. Efectul acestei mutatii punctiforme este dependent de natura aminoacidului substituit si de localizarea lui. Multe astfel de variante au proprietati total diferite (afinitate pentru oxigen, cooperativitate, stabilitate, solubilitate) conducind la hemoglobine sintetizate mai lent si

distruse mai rapid, astfel ca heterozigotul prezinta concentratii mici de hemoglobina mutant si concentratii mari de HbF. Homozigotii prezinta stari de anemie mai mult sau mai putin grave.

Tabelul 14. Mutante comune ale hemoglobinelor omului

I. TALAZEMIILE - datorate unor defecte ale genelor structurale

α - TALAZEMIILE , cu una sau mai multe gene defective, ale catenelor α

- toate genele afectate = hydrops fetalis , moartea fatului in uter sau imediat dupa nastere. Se acumuleaza Hb Portland ($\gamma_2\delta_2$) sau Hb lui Bart (γ_4).

- 3 gene afectate = maladia HbH , cu 5-20 % β_4 si γ_4 la adulti. Hb precipita, eritrocite anormale, anemie moderata

- 2 gene afectate = tara talazemica , cu 5 % HbH in singele cordului la nastere, anemie moderata, morfologia eritrocitelor la adulti modificata

- o gena afectata ,detectabila forma γ_4 in singele cordului la nastere, efecte nedetectabile la adulti

β -TALAZEMIILE , cu 1 -2 gene defective ale catenelor β , transcriere totala sau partiala a genei afectate

= o gena afectata - talazemie minora daca gena este total defectiva. Formarea crescuta de HbA₂

= 2 gene defective - anemia lui COOLEY , talazemia majora, 20-80 % HbF la adulti, o scadere a hemoglobinei totale la 2-3 g/100 ml

II.VARIANTE DE HEMOGLOBINE REZULTATE IN URMA UNOR SUBSTITUTII

PUNCTIFORME

S-S.Anemia falcipara. β 6GLU-VAL. Forma deoxi mai putin solubila decit A₁. Precipita in singele venos, cauzind deformarea eritrocitelor (forma de secera) si distrugerea lor rapida. Viata scurta.

S-A.Tara falcipara. Daca organismul este alimentat cu exces de oxigen nu apar efecte. DeoxiHb S are o solubilitate scazuta.

C-C,D-D. E-E .Maladia hemoglobinei C/D sau E. Substitutii β 6 Glu-Lys (C-C); β 121 Glu-Gln (D-D) ; β 26 Glu-Lys (E-E). Anemie moderata.

Aproape toate variantele de hemoglobine cu modificari la suprafata structurii sunt inofensive, HbS constituind o exceptie. Hemoglobinele mutante la care apar modificari in microrégiunea din vecinatatea hemului isi pierd capacitatea de a mai transporta O_2 . Mutatiile care afecteaza structura terciara a subunitatilor conduc la hemoglobine deosebit de instabile, iar cele care afecteaza contactele dintre subunitati conduc la pierderea proprietatilor alosterice.

Studiul hemoglobinelor mutante arata strinsa legatura dintre structura si functia proteinelor.

Evolutia moleculara a mioglobinei si hemoglobinei

Asa cum deja s-a aratat fiecare subunitate a hemoglobinei are o conformatie similara cu mioglobina, structurile tridimensionale ale subunitatilor α si β ale hemoglobinei diferind printr-o bucla in plus in subunitatea β .

Conformatia subunitatii β a hemoglobinei de cal se aseamana cu mioglobina casalotului si cu leghemoglobina -o proteina ce leaga oxigenul din plante. Toate aceste similaritati structurale reprezinta o dovada ca mioglobinele si hemoglobinele actuale deriva dintr-o proteina ancestrala comuna.

Au fost elucidate structurile primare ale mioglobinei si hemoglobinei din multe specii . Secventele catenelor α ale hemoglobinei din 60 specii sunt identice in 23 din cele 141 pozitii ; secventele catenelor β sunt identice in 20 din cele 146 pozitii. Din cele 153 resturi de aminoacizi din mioglobina, 27 sunt invariabile la toate speciile. Restul de histidina legat covalent la hem are aceiasi pozitie la toate mioglobinele cunoscute. Micromediul hidrofoab pentru hem este critic pentru functia mioglobinei si restul PHE CD 1, care este langa hem este de asemenea invariabil.

Similaritatea structurilor terciare indica faptul ca substituirea unui rest de aminoacid s-a realizat cu unul similar, astfel ca efectul asupra conformatiei si functiei proteinei este mic. Deci au survenit substitutiile conservative. de exemplu, substituirea restului de valina din E-11 cu unul de leucina , un aminoacid cu proprietati similare este conservativa. In schimb substituirea unui rest hidrofoab cu unul hidrofil este

neconservativa avind un efect major asupra conformatiei si functiei proteinelor.

Evolutia mioglobinei si hemoglobinei este rezultatul duplicarii unei gene. Initial a fost o gena pentru o proteina de legare a oxigenului, numita globina. Este posibil ca imperechierea aberanta a cromozomilor omologi si recombinaarea materialului genetic sa fi dat nastere unui cromozom cu 2 gene pentru globina .

Acumularea de mutatii in fiecare din genele duplicate a condus la evolutia unei familii de proteine ce deriva din globina ancestrala. S-a construit un arbore evolutionar pentru genele β -globinei.

In afara genelor pentru subunitatilor α si β ale hemoglobinei, primatele au o gena ce codifica catena δ . Oamenii au o gena ϵ ce codifica subunitatea ϵ ce apare in dezvoltarea embrionara si gene γ ce codifica subunitati care apar mai tirziu in dezvoltarea fetala.

3.7.3. Proteine contractile

Ne vom referi numai la proteinele implicate in contractia musculara : miozina si actina- in contractia musculara, dyneina si tubulina - in miscarile cililor si flagelilor, kinesina - in miscarea veziculelor prin microtubuli.

Proteinele contractiei musculare.

Muschii vertebratelor care se afla sub control voluntar prezinta la microscopul optic un aspect striat. Ei constau din celule multinucleate, legate printr-o membrana excitabila electric numita sarcolema. O celula musculara contine multe miofibrile paralele, fiecare cu un diametru de cea 1 μm . Miofibrilele sunt imersate intr-un citosol numit sarcoplasma, bogat in glicogen, ATP, creatin fosfat si enzime glicolitice. Multe mitocondrii spatiate regulat sunt gasite in celulele muschilor rosii, care au o capacitate contractila sustinuta.

Unitatea functionala a unei miofibrile este sarcomerul, care se repeta la fiecare 2,3 μm , de-a lungul fibrei axiale. Alterneaza regulat o banda A intunecata cu o banda I luminoasa. In regiunea centrala a benzii A este o zona H mai putin densa. In mijlocul zonei

H este linia M - intunecata. Banda I este impartita de linia Z, foarte densa (Figura 54) .

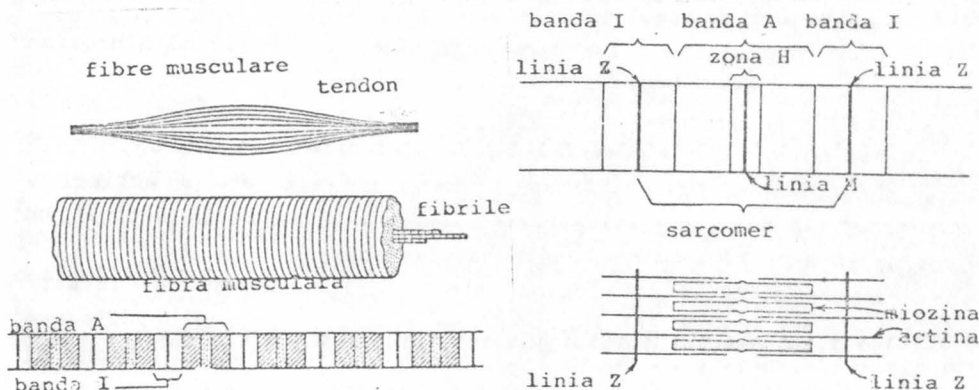


Figura 54. Reprezentarea schematica a a) fibrelor si miofibrilelor muschiului striat si a b) structurii unui sarcomer

Lungimea unei fibre musculare scade la aproximativ 20 % in timpul contractiei. Fiecare din cei circa 20 000 de sarcomeri ai unei miofibrile se scurteaza la fel.

Analiza sarcomerilor la microscopul electronic, arata ca ei sunt formati din filamente groase si subtiri a caror aranjamente conduc la aparitia benzilor alternante : luminoase-I si intunecate-A. In 1954, HUXLEY a indicat ca aceste filamente nu se scurteaza in timpul contractiei musculare, ci aluneca unele printre altele. Suprapunerea partiala a celor doua tipuri de filamente se realizeaza prin niste puncti incrucisate si sta la baza contractiei musculare.

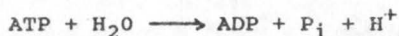
Filamentele groase, cu un diametru de 150 Å sunt formate din citeva sute de molecule de miozina, in timp ce filamentele subtiri (cu un diametru de 70 Å) au o structura mai complexa, fiind constituite din actina, tropomiosina si tropomiosina. α-actinina este prezenta in zona Z, proteinele titina si nebulina formeaza o mesa flexibila in jurul filamentelor. Banda I consta numai din filamentele subtiri, in timp filamentele groase pure se gasesc numai in zona H a benzii A. Linia M contine mai multe proteine, printre care enzima creatin kinaza, miomezina si proteina M.

Miozina

Aceasta proteina contractila are trei activitati biologice:

1) se asambleaza spontan in filamente in solutii cu pH si tarie ionica fiziologic normale;

2) are activitate enzimatica, ATP-azica , catalizind hidroliza ATP :



si furnizind energia libera necesara contractiei musculare;

3) stabileste interactii cu o forma polimerizata a actinei , constituentul major al filamentelor subtiri. Interactia actinei cu miozina este critica pentru contractia musculara.

Fiecare molecula de miozina este un oligomer (540 kd) format din doua catene polipeptidice identice : mari (heavy H) , fiecare de circa 200 kd si doua perechi de catene mici neidentice (light L) de 16 si respectiv 20 kd. Catenele H contin doua domenii cu structura si functie diferita. Domeniul C-terminal a celor doua catene H au structura α -helicoidala, fiind rasucite una in jurul celeilalte, cu formarea unei entitati fibroase coiled coil de 134 nm lungime si cu un diametru de 2 nm. Domeniul N-terminal al fiecărei catene H are o conformatie globulara. Fiecare regiune "cap" globulara a catenelor H leaga cite o pereche de catene L diferite. Intr-adevar micrografiile electronice arata ca molecula de miozina are o structura particulara constind din o entitate fibroasa formata din circa 1300 de resturi de aminoacizi de la partea C-terminala a celor doua catene si doua capete globulare formate din circa 820 resturi de aminoacizi din partea N-terminala a celor doua catene H si din cele patru catene L (Figura 55).

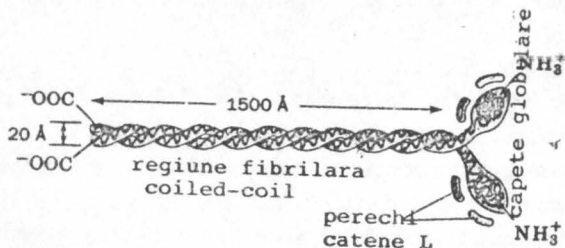


Figura 55. Reprezentarea schematica a structurii moleculii de miozina

O molecula de miozina contine , de asemenea, doua regiuni flexibile : una la jonctiunea dintre partea fibrilara si capetele globulare (swivel) si alta in constitutia partii fibrilare (hinge). Ambele regiuni sunt susceptibile la proteoliza datorita unor discontinuitati in structura helicoidala. Flexibilitatea acestor regiuni permite miozinei sa interactioneze cu filamentul de actina in cursul contractiei musculare.

Moleculele de miozina se asociaza in sistem coada-coada formind filamentele groase lungi de 1,5 um. Moleculele de miozina din fiecare jumătate de filament sunt orientate prin "capetele" lor in directii opuse, lasind in centru o zona goala (zona bare) lipsita de structurile "cap" si conferind filamentelor groase un caracter bipolar (Figura 56).

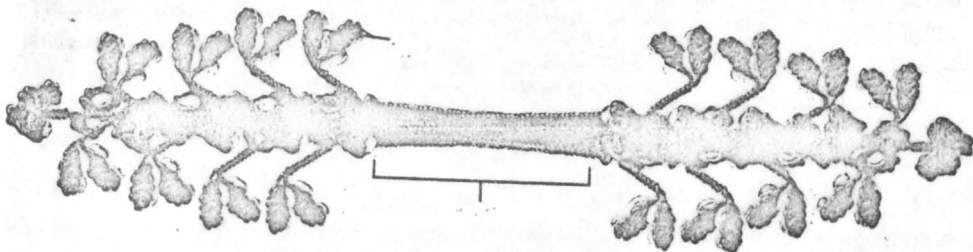


Figura 56. Structura unui filament gros de miozina

S-a evidentiat ca structurile primare ale moleculelor de miozina separate din diferite specii, au o serie de trasaturi comune :

(i) structura de baza a moleculei, constituita dintr-un capat globular N-terminal si o " coada" C-terminala.

(ii) secventa de aminoacizi din regiunea " coada" se caracterizeaza prin absenta prolinei si prin prezenta resturilor de aminoacizi formatoare de α -helix ca leucina, alanina si acidul glutamic, ceea ce faciliteaza formarea structurii coiled-coil α -helicoidale.

(iii) regiunea coada prezinta unitati de sapte resturi (ABCDEF) repetitive in care resturile A si D - nepolare, formeaza un miez hidrofob ,in timp ce resturile B,C si F sunt localizate la periferia structurii coiled coil.

(iv) in structura coiled coil exista unitati repetitive de 28 resturi de aminoacizi, care au radicali R ionizati ce constituie regiuni alternante incarcate pozitiv si negativ, la exteriorul structurii coiled coil

(v) exista o unitate repetitiva de 196 resturi de aminoacizi implicata in asamblarea moleculelor de miozina in structura filamentului gros, facilitind obtinerea unei structuri supramoleculare inalt ordonata si deosebit de rezistenta.

(vi) prezenta aceleasi secvente de aminoacizi:

Gly-Glu-Ser-Gly-Ala-Gly-LYS-Thr-

in situsul activ al ATP-azei, restul de lizina legind gruparea fosfat a ATP.

Miozina poate fi scindata enzimatic in fragmente ce au activitatile cheie ale moleculei intacte. In 1953, Andrew SZENT-GYORGYI a scindat miozina cu tripsina in doua fragmente, numite heavy meromyosin (HMM) si light meromyosin (LMM) (Figura 57).

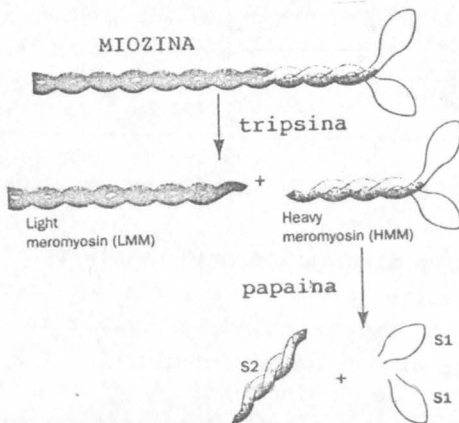


Figura 57. Scindarea enzimatica a miozinei

LMM poate forma filamente , dar a pierdut activitatea ATP-azica si capacitatea de se combina cu actina. Studiile de microscopie electronica si de difractie cu raze X au aratat ca LMM are o structura filiforma (lungime 850 Å) α -helicala dublu-catenara.

HMM nu se mai poate asambla in filamente, in schimb catalizeaza hidroliza ATP si leaga actina, fiind unitatea care genereaza forta contractila. HMM poate fi scindata mai departe in doua subfragmente globulare (S_1) si un subfragment in forma filiforma (S_2). Fiecare fragment S_1 contine cite un situs ATP-azic si cite un situs de legare al actinei, indicind faptul ca activitatile specifice sunt localizate in regiunile globulare "cap" ale moleculei de miozina.

Actina

Aceasta proteina contractila constituie componentul major (scheletul) al filamentelor subtiri, fiind larg raspindita la eucariote. In solutii cu o tarie ionica scazuta, actina are o structura monomera, de 42 kd - numita actina G, datorita formei sale globulare. De fapt, fiecare monomer de actina G consta din doua domenii globulare.

Cind taria ionica creste pina la nivelul fiziologic, actina G polimerizeaza la o forma fibroasa numita actina F, formata din doua catene care se rasuces una in jurul celeilalte, intr-un helix cu un pas p de 36 nm (Figura 58).

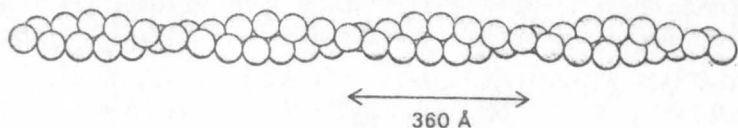


Figura 58 . Aranjamentul helical al unitatilor de actina G
(un monomer este reprezentat prin doua sfere) in
structura actinei F.

Dupa cum se cunoaste Ca^{2+} regleaza procesul complex al contractiei musculare : in stare de repaus , ionii de Ca sunt sechestrati in reticulul sarcoplasmatic, concentratia Ca^{2+} in citosol fiind de $< 1 \mu M$. Un impuls nervos conduce la eliberarea Ca^{2+} din sacii reticulului sarcoplasmatic , concentratia citosolica a acestor ioni crescind la $10 \mu M$ ceea ce promoveaza contractia musculara. Transportul ionilor de Ca^{2+} este realizat printr-o pompa de transport activ (o ATP- aza Ca^{2+} dependenta).

Actiunea fiziologica a Ca^{2+} este mediata de tropomiozina si complexul troponinei, care actioneaza asupra interactiei actinei cu miozina .

Tropomiozina este un dimer filiform de (70 kD) , a carui subunitati alungite se rasucesc una in jurul celeilalte formind un helix, dispus aproape paralel cu axa lunga a unui filament subtire. Fiecare molecula de tropomiozina are o lungime de aproximativ 40 nm, dimerii suprapunindu-se partial cap-coada.

Complexele troponinei din constitutia filamentelor subtiri sunt plasate la intervale de 385 Å , reprezentind aproximativ 1/3 din masa lor. Un astfel de complex este constituit din trei catene polipeptidice : TnC (18 KD), TnI (24 KD) si TnT (37 KD) (Figura 59). In timp ce TnC leaga ionii de Ca^{2+} , TnI se leaga la actina iar TnT - la tropomiozina. Fiecare complex troponinic regleaza interactiile a 7 unitati de actina.

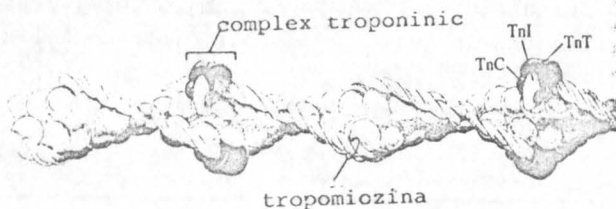


Figura 59. Structura filamentului subtire

Dupa cum s-a mai aratat troponina C, consta din doua domenii omoloage : un domeniu N-terminal si un altul C-terminal, conectate printr-un segment α -helix lung de 9 ture. Fiecare domeniu contine doua situsuri de legare pentru Ca^{2+} : cele din domeniul C-terminal au o inalta afinitate pentru ionii de Ca ($K_D=0,1 \mu\text{M}$), in timp ce acelea din domeniul N-terminal au o slaba afinitate ($K_D=10\mu\text{M}$).

Principalele proteine contractile : actina si miozina se gasesc in aproape toate celulele eucariote. Multe celule nemusculare se pot misca si pot suferi modificari de forma. Migrarea celulelor in dezvoltarea embrionilor, deplasarea macrofagelor spre celulele lizate, retractarea cheagurilor de singe- sunt numai citeva exemple privind universalitatea motilitatii celulare. Nu este de mirare ca actina este una dintre proteinele cele mai vechi la eucariote, avind

o structura înalt conservată . La majoritatea celulelor eucariote, actina reprezintă peste 10 % din totalul proteinelor. Miozina este o proteină mai puțin conservată evoluționar, secvențele de aminoacizi diferind considerabil cu specia biologică din care a fost izolată. De exemplu, miozina din multe celule nemusculare nu formează filamente groase de tipul celor din mușchii scheletici. Miozinele nemusculare formează filamente scurte bipolare.

3.7.4. Imunoglobuline

Sistemul imun al vertebratelor este o rețea de molecule și celule ce are proprietatea de a distinge substanțele străine. Funcția lui este de a proteja vertebratele contra microorganismelor virusuri, bacterii, paraziți. Acest sistem imun " învață din experiența și-și reamintește de aceste organisme străine dacă le reîntâlnește", deci prezintă specificitate, adaptare și memorie.

Există un răspuns imun umoral realizat de proteine solubile, numite imunoglobuline, produse de celule plasmatică. În răspunsul imun celular sunt implicate limfocitele T, celule ce omorâ organismele străine. Ele de asemenea stimulează răspunsul umoral prin celulele B, precursorii celulelor plasmatică.

Anticorpii (sau imunoglobulinele) sunt proteine sintetizate de un animal ca răspuns la prezența unei substanțe străine. Fiecare anticorp are o afinitate specifică pentru un material străin ce stimulează sinteza lui. O macromoleculă străină capabilă de a induce formarea unui anticorp este numită antigen (sau imunogen). Proteinele, polizaharidele și acizii nucleici sunt antigene eficiente. Afinitatea specifică a unui anticorp nu este pentru întreaga macromoleculă a antigenului ci pentru un situs particular numit determinant antigenic (sau epitop).

Sintetizați exclusiv de celulele B, anticorpii sunt produși în milioane de forme, fiecare cu o secvență de aminoacizi proprie și cu un situs de legare al antigenului diferit. Se numesc și imunoglobuline (Ig) deoarece constituie circa 20 % din totalul proteinelor din plasmă, migrând electroforetic în zona γ - globulinelor.

Conform teoriei selecției clonale, toate moleculele de anticorpi

sintetizate de o celula B individuala au acelasi situs de legare al antigenului. Primii anticorpi sintetizati de o celula B nou formata nu sunt secretati, ci sunt inserati in membrana plasmatica, unde functioneaza ca receptori pentru antigen. Fiecare celula B are aproximativ 10^5 astfel de molecule de anticorp in membrana ei plasmatica. Fiecare din aceste molecule de anticorpi este asociata necovalent cu un set invariabil de catene polipeptidice

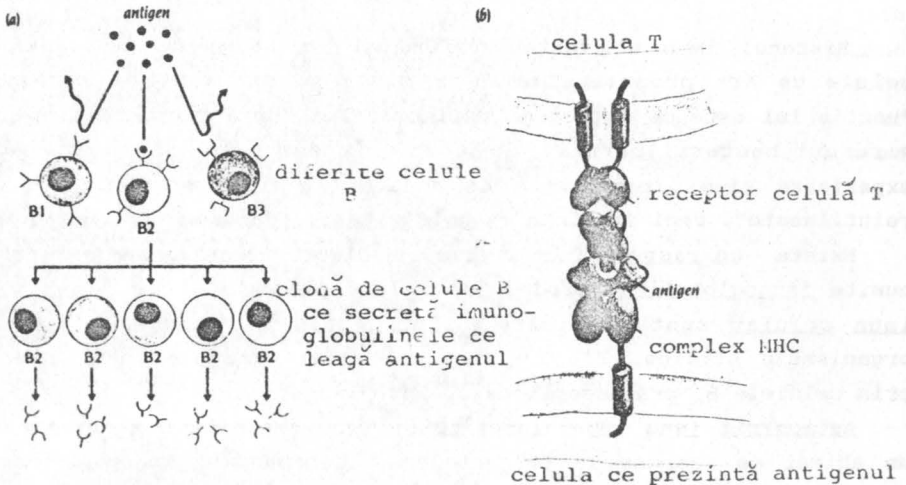


Figura 60. a) Teoria selectiei clonale. Un antigen activeaza acele celule B ce au pe suprafata lor moleculele de imunoglobuline ce pot recunoaste si lega antigenul. Aceasta legare induce productia unei clone de celule B identice ce secreta in fluxul sangvin anticorpii solubili de legare a antigenului ; b) celulele B recunosc antigene virale straine prin intermediul unui receptor de pe o celula T ce poate lega fragmente degradate ale antigenului cind ele sunt asociate cu o molecula a complexului major de histocompatibilitate (MHC). Catenele polipeptidice ale receptorilor de pe celulele T si ale MHC sunt pliate in domenii similare imunoglobulinelor.

transmembranare ce sunt implicate in transmiterea semnalelor spre interiorul celulei cind situsul de legare extracelular al antigenului este ocupat de antigen. Aceste polipetide invariante cupleaza receptorii antigenului de pe celulele B la unul sau mai multi membrii ai familiei Src a tirozin protein kinazelor, iar cind antigenul este legat, activeaza o cascada de fosforilari.

Fiecare celula B produce o singura specie de anticorpi cu un singur situs de legare al antigenului. Cind o celula B este activata de antigen (cu ajutorul celulelor T helper) ea prolifereaza, se matureaza, devenind o celula secretoare- producatoare de anticorpi. Celulele activate sintetizeaza si secreta cantitati mari de anticorpi solubili care au acelasi situs de legare al antigenului la suprafata celulei cu cel care a servit anterior ca receptor al antigenului (Figura 60). Celulele B activate pot incepe sa secrete anticorpi inca din stadiul de limfocite mici, dar in etapa finala a maturarii cind devine o celula plasmatica mare, ea poate secreta anticorpi cu o viteza de aproximativ 2000 molecule/ secunda. Avind in vedere ca celulele plasmatiche sintetizeaza masiv anticorpi ele sunt incapabile de a creste mai departe si a se diviza, majoritatea murind dupa citeva zile.

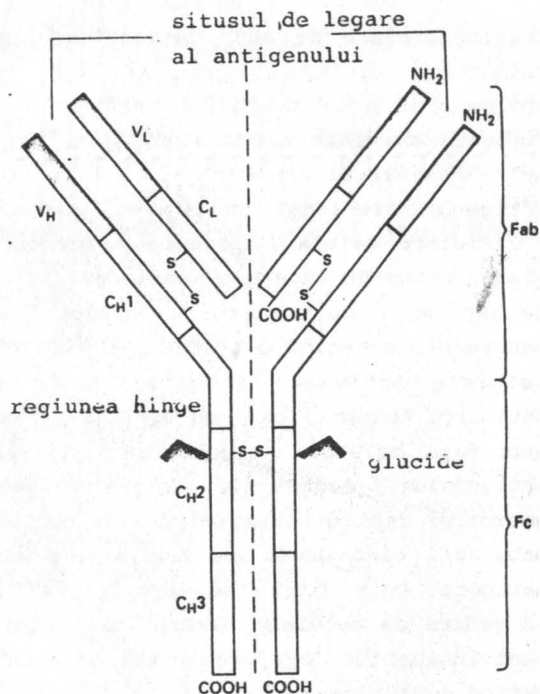
Structura generala a anticorpilor

Cei mai simpli anticorpi sunt molecule in forma literei Y cu doua situsuri de legare a antigenului, cite unul pe fiecare brat (Figura 61), motiv pentru care se numesc anticorpi bivalenti.

Cind un antigen are trei sau mai multi determinanti antigenici moleculele de anticorpi bivalenti ii pot lega incrucisat formind o structura inretelata (Figura 62), care este rapid fagocitata si degradata de macrofage. Eficienta legarii anticorpului si legarea incrucisata sunt favorizate de prezenta unei regiuni flexibile hinge care permite modificarea distantei dintre cele doua situsuri de legare ale antigenului.

Efectul protector al anticorpilor nu este datorat numai capacitatii lor de a lega antigene, ei putind realiza si o serie de alte activitati fiziologice prin intermediul regiunii " coada" a moleculei . De exemplu, structura acestei parti a moleculei hotaraste soarta complexului antigen-anticorp. Astfel, anticorpii cu aceleasi situsuri de legare ale antigenului dar cu diferite regiuni

Figura 61. Structura tetramera a unei molecule de anticorp (IgG).



V - domeniu variabil
C - domeniu constant

un determinant antigenic

doi sau mai multi determinanti antigenici

doi determinanti antigenici

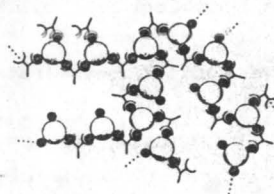
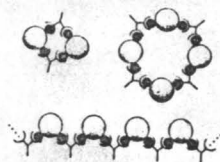


Figura 62. Interactii antigen-anticorp.

"coada" pot avea proprietati functionale diferite, ca de exemplu capacitatea de a activa sistemul complement sau de a se lega la celule fagocitice.

O molecula de anticorp contine o unitate structurala constituita din patru catene polipeptidice : doua catene L (light) de circa 220 resturi de aminoacizi fiecare si doua catene H (heavy) de circa 440 resturi de aminoacizi fiecare, avind configuratia tetramera H_2L_2 . Cele patru catene polipeptidice sunt asamblate prin interactii necovalente si prin legaturi covalente (punti disulfurice). Molecula este compusa din doua jumatați identice, fiecare cu acelasi situs de legare al antigenului, ambele tipuri de catene H si L cooperind in constituirea suprafetei de legare a antigenului (Figura 61).

Enzimele proteolitice papaina si pepsina scindeaza molecula unui anticorp in diferite fragmente. Papaina scindeaza imunoglobulinele G in doua fragmente identice Fab (fragment antigen binding), fiecare cu cite un situs de legare al antigenului si un fragment Fc (usor cristalizabil). Prin actiunea pepsinei se separa un fragment $F(ab')_2$ - desemnat astfel pentru ca are in structura doua fragmente Fab' (mai lungi decit Fab) legate covalent (Figura 63) . Deoarece fragmentul $F(ab')_2$ este bivalent - el poate lega incrucisat antigenele formind precipitate, spre deosebire de fragmentul univalent Fab. Niciunul dintre aceste fragmente nu prezinta celelalte proprietati biologice ale moleculelor intacte de anticorpi, fiind lipsite de regiunea Fc.

Diferite clase de imunoglobuline

La vertebratele superioare exista cinci clase de anticorpi : IgA, IgD, IgE, IgG si IgM, fiecare continind cite o clasa distincta de catene H : α , δ , ϵ , γ si μ . Moleculele IgA au catene $H\alpha$, moleculele IgG au catene $H\gamma$, etc. In plus, exista un numar de subclase la imunoglobulinele G si A; de exemplu sunt patru subclase de IgG : IgG1, IgG2, IgG3 si IgG4 avind catene H : γ_1 , γ_2 , γ_3 si γ_4 . Diferentele dintre catenele H apar la nivelul regiunilor hinge si "coada" ale anticorpului, conferind fiecărei subclase particularitati functionale.

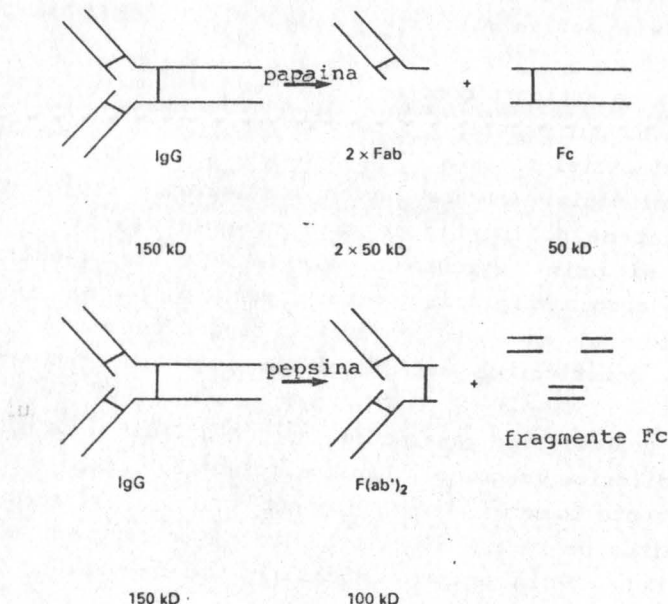


Figura 63. Scindarea IgG cu papaina si pepsina.

In afara celor cinci clase de catene H, vertebrele superioare au doua tipuri de catene L : κ si λ , fiecare fiind asociata cu oricare tip de catena H.

Un anticorp individual consta din doua catene L identice si doua catene H identice, deci cele doua situsuri de legare a antigenului sunt totdeauna identice. Aceasta simetrie este cruciala pentru functia de legare incrucisata a anticorpilor secretati. O molecula de imunoglobulina are fie catene κ , fie catene λ , niciodata combinatii ale lor. Nu s-a evidentiat nicio diferenta biologica intre cele doua catene L.

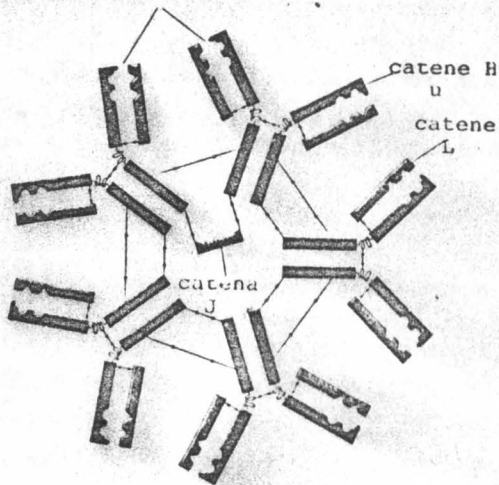
Imunoglobulinele M (IgM) si D (IgD). IgM care contin catene H μ sunt prima clasa de anticorpi produsa de o celula B in dezvoltare. Moleculele tetramere μ_2L_2 se insera in membrana plasmatica. Celula are acum la suprafata receptori cu ajutorul carora poate lega antigene. La acest stadiu, celulele B incep sa produca si molecule IgD (μ_2L_2) pentru suprafata, deoarece acestea au acelasi situs de legare al antigenului ca si moleculele IgM.

IgM nu este numai prima clasa de anticorpi ce apare la suprafata unei celule B in dezvoltare, dar este si clasa majora de imunoglobuline secretate in sange in stadiile timpurii ale unui raspuns imunologic primar. In forma ei secretata, IgM este un pentamer compus din cinci unitati a patru catene, avind in total 10 situsuri de legare a antigenelor. Fiecare pentamer contine o copie a unei alte catene polipeptidice, desemnata J (joining chain) ce este inserata covalent intre doua regiuni "coada" Fc vecine (Figura 64).

situsuri de legare ale antigenului

Figura 64.

Molecula pentamerica a IgM.
Cele cinci subunitati sunt
asamblate prin puncti disulfu-
rice.



legatura disulfurica

Legarea antigenului la regiunile Fab ale moleculei IgM pentamere conduce la legarea primului component al sistemului complement la regiunile Fc si la activarea acestui component. Cind antigenul este pe suprafata unui microorganism invadator, activarea sistemului complement are ca rezultat un atac biochimic care omoara microorganismul. Moleculele IgD sunt rareori secretate de o celula B activata si functiile lor sunt necunoscute.

Imunoglobulinele G (IgG) prezinta clasa majora de anticorpi din sange, produsa in cantitati mari in cadrul raspunsului imun secundar. In afara de activarea sistemului complement, regiunea Fc a unei molecule IgG are capacitatea de a se lega la receptori

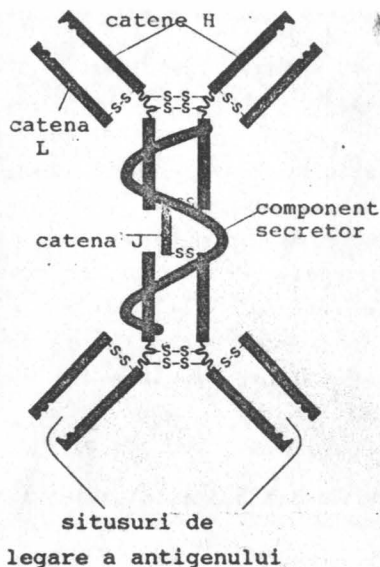
specificali de pe macrofage si neutrofile, avind ca rezultat faptul ca aceste celule fagocitice leaga ,ingera si distrug microorganismele infectante. Celulele din linia alba a singelui ce prezinta receptori Fc pot, de asemenea, omori celule eucariote straine, acoperite cu IgG, fara a le fagocita.

Moleculele IgG sunt unicii anticorpi care pot trece de la mama la fetus prin placenta. Celulele placentei ce sunt in contact cu singele matern au receptori Fc ce leaga moleculele IgG. Anticorprii sunt mai intii preluati din singele matern prin endocitoza mediata de receptor si apoi transportati prin celule sub forma de vezicule si eliberati prin exocitoza in singele fetal (proces numit transcitoza). Deoarece alte clase de anticorpi nu se leaga la acesti receptori, ele nu pot trece prin placenta. IgG este, de asemenea, secretat in laptele mamei si preluat din tubul digestiv al noului nascut in singe.

Imunoglobulinele A (IgA) sunt principala clasa de anticorpi din secretii (saliva, lacrimi, lapte, secretii respiratorii si intestinale). Acesti anticorpi sunt transportati prin intermediul altui tip de receptor Fc, care este unic in epiteliul secretor. In Figura 65 prezentam structura moleculei dimere a IgA gasita in secretii. In afara celor doi monomeri IgA mai exista o singura catena J si componentul secretor care protejeaza moleculele acestui anticorp de actiunea digestiva a enzimelor proteolitice din secretii.

Imunoglobulinele E (IgE) prin regiunile lor Fc leaga cu o mare afinitate o alta clasa de receptori Fc, localizati pe suprafata mastocitelor din tesuturi si a bazofilelor din singe. Moleculele IgE se leaga, apoi servind ca receptori pentru antigene. Legarea antigenelor face ca celula sa secrete o varietate de aminer biologice active, in special histamina , care produc dilatarea si cresterea permeabilitatii vaselor de singe, fiind responsabile pentru manifestarile clinice ale reactiilor alergice. Mastocitele, de asemenea, secreta factori ce atrag si activeaza o clasa speciala de celule albe din singe - eozinofilele - care pot omori diferite tipuri de paraziti, in special daca acestia sunt acoperiti cu molecule de IgE sau IgA.

Figura 65. Structura dimera a unei molecule IgA gasita in secretii



In Tabelul 15 prezentam clasele majore de imunoglobuline de la om.

Tabelul 15. Caracteristicile imunoglobulinelor de la om

Clasa	Concentratia in ser (mg/ml)	Masa (KD)	Coefficient sedimentare	Catene L H	Structura
IgG	12	150	7	k sau λ	$k_2\tau_2$ sau $\lambda_2\tau_2$
IgA	3	180-500	7,10,13	k sau λ	$\alpha(k_2\alpha_2)_n$ sau $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	18-20	k sau λ	$\mu(k_2\mu_2)_5$ sau $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	7	k sau λ	$k_2\delta_2$ sau $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,001	200	8	k sau λ	K_2e_2 sau λ_2e_2

$n=1,2$ sau 3. IgM si oligomerii lui IgA de asemenea contin catene J ce unesc moleculele imunoglobulinei. IgA din secretii mai are o piesa secretoare

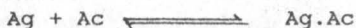
Interactii antigen- anticorp

Majoritatea moleculelor straine mici nu stimuleaza formarea unui anticorp. Cu toate acestea, ele pot induce formarea de anticorpi specifici daca ele sunt atasate la macromolecule carrier. Moleculele

mici se numesc haptene.; anticorpii formati de haptenele atasate vor lega si haptenele libere.

Studii pe haptene au demonstrat ca legarea unui antigen la un anticorp este reversibila, fiind realizata prin intermediul unei sume de interactii necovalente : hidrofobe, interactii Van der Waals, puncti de hidrogen sau de tip electrostatic. Aceste interactii slabe sunt eficiente numai cu conditia existentei unei complementaritati intre structurile celor doi parteneri care se leaga. Regiunile complementare sunt reprezentate de cele doua situsuri de legare a antigenului identice din structura imunoglobulinei si determinantul antigenic . Majoritatea moleculelor antigenice au mai multi determinanti antigenici diferiti, deci sunt multivalente.

Reactia de legare reversibila dintre un antigen cu un singur determinant antigenic (notat Ag) si un singur situs de legare al antigenului (notat Ac) poate fi redată de reactia :



Ecilibrul acestei reactii depinde de concentratiile Ag si Ac si de taria interactiei, fiind descris de valoarea constantei de afinitate K_a :

$$K_a = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ac}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ac}]}$$

Cind jumătate din situsuri sunt ocupate $[\text{Ag} \cdot \text{Ac}] = [\text{Ac}]$, iar $k_a = 1/[\text{Ag}]$.

Situsurile de combinare ale anticorpilor au anumite caracteristici:

- Constantele de afinitate pentru haptene sunt de 10^{-4} - 10^{-10} M, energiile libere standard de legare sunt -6 - -15 Kcal/mol, de acelasi ordin de marime cu cele de legare a substratelor la enzime, fiind caracteristice unor interactii necovalente . La valori $K_a < 10^4$ o molecula de imunoglobulina inceteaza a mai fi considerata ca un anticorp fata de un antigen particular.

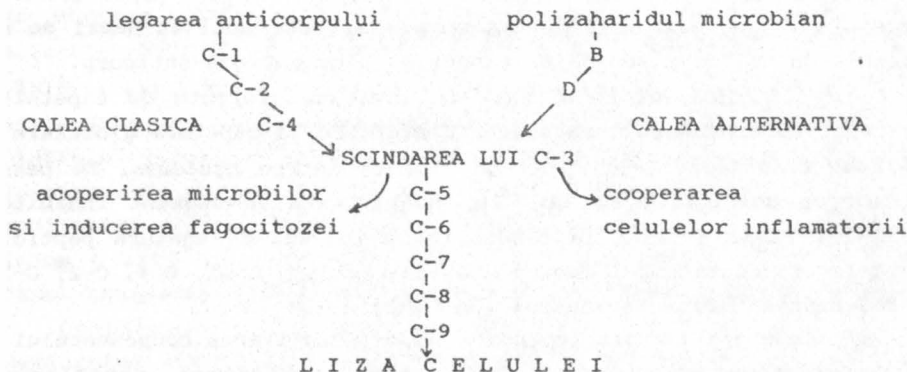
- Proprietatile spectroscopice ale unor haptene furnizeaza informatii asupra polaritatii situsului de combinare a anticorpului, evidentiind ca situsul de combinare este o nisa nepolara, de la care sunt excluse moleculele de apa. O asemenea situatie evita competitia pentru stabilirea punctilor de hidrogen si atenuarea interactiilor electrostatice.

- Specificitatea este inalta dar nu absoluta. Haptena se poate

leaga ferm la situsul de combinare, constanta de viteza fiind de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ valoare care sugereaza o etapa de legare controlata de difuzie.

Sistemul complement

Acest sistem constituit din aproximativ 20 de proteine solubile, sintetizate in principal in ficat, gasite in fluxul sangvin si in fluidul extracelular isi poarta numele de la faptul ca el completeaza si amplifica actiunea anticorpilor, contribuind la mecanismul complex de aparare a vertebratelor contra infectiilor bacteriene. In absenta unor atacuri microbiene componentele sistemului complement se gasesc in stare inactiva. Cind apare un raspuns imun are loc activarea sistemului complement, a carui rezultat final este asamblarea componentelor in agregate proteice numite complexe de atac a membranei (MAC) ce formeaza goluri in membrana microorganismului, soldate cu distrugerea lui. Activarea complementului poate avea loc printr-o cale clasica sau prin una alternativa:



In ambele cazuri, reactiile activarii sistemului complement au loc pe suprafata microorganismului, deoarece una din principalele functii ale acestuia este distrugerea membranei microbiene. C-1 ...C-9 si factorii B si D sunt componentele sistemului complement.

Calea clasica este activata de molecule de IgG si IgM legate la antigenele de pe suprafata unui microorganism. Aceasta cale incepe cu activarea componentului C-1, care consta dintr-o unitate de recunoastere q si doua zimogene r si s. C-1q este un hexamer format din trei tipuri de catene polipeptidice A, B si C, fiecare de

aproximativ 23 KD. Datorita continutului mare in resturi de prolina, C-1q are o structura neobisnuita, in care fiecare trimer ABC formeaza un helix triplu-catenar de tipul collagenului. In Figura 66

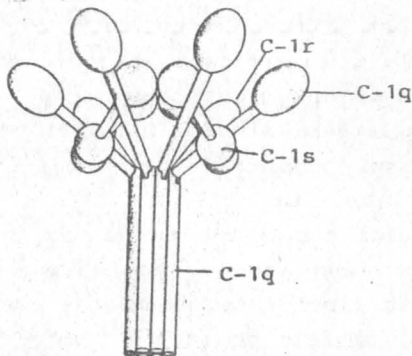


Figura 66.

Structura componentului C-1
a sistemului complement

prezentam structura componentului C-1 al sistemului complement, cu sase capete globulare care contin cite un situs de legare pentru partea Fc a unei molecule de anticorp. C-1 este activat numai de o molecula de anticorp sau de un singur complex antigen-anticorp.

C-1r si C-1s sunt localizate in cavitatea formata de capetele lui C-1q. Legarea simultana a unor unitati Fc la capetele globulare a lui C-1q transforma C-1r dintr-un zimogen intr-o proteaza. Se pare ca legarea unitatilor Fc la C-1q indeparteaza un segment inhibitor din C-1r. C-1r activat la rindul lui scindeaza o legatura peptidica din C-1s transformindu-l intr-o proteaza activa. Apoi, C-4, C-2, C-3 si C-5 sunt scindati secvential.

Primele etape ale ambelor cai conduc la activarea componentului pivot al acestui sistem C-3, care controleaza asamblarea complexelor MAC si captarea diferitelor celule din linia alba a singelui. Componentele initiale si C-3 sunt proenzime care sunt activate secvential prin reactii de proteoliza limitata; scindarea fiecărei proenzime generează o serin proteinaza care actioneaza asupra urmatorului component inactiv al secventei de activare in cascada. In felul acesta se produc multe componente active, incluzind si complexe MAC .

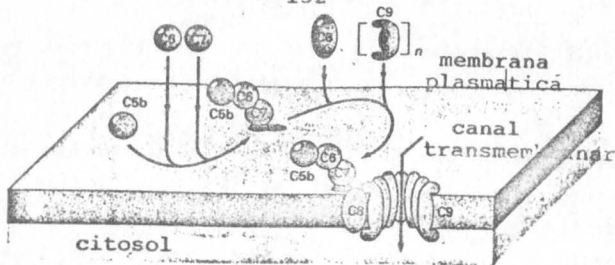


Figura 67. Asamblarea componentelor complement in complexe de atac a membranei

Componentul C-3 este scindat intr-un fragment mai mic (C-3a) si intr-un fragment mai mare (C-3b). C-3a actioneaza independent ca un semnal difuzibil ce induce un raspuns inflamator prin facilitarea celulelor albe de a migra catre situsul infectiei.

C-3b se leaga covalent la suprafata unei celule tinta, actionind ca o proteaza prin scindarea componentei C-5 in doua fragmente: C-5a si C-5b. C-5b se leaga rapid la C-6 si C-7 formind C-567, care se fixeaza puternic la membrana. La acest complex se adauga o molecula de C-8 formindu-se C-5678. Legarea unei molecule de C-9 la C5678 induce o modificare conformationala in C-9 ce conduce la expunerea unei regiuni hidrofobe si la inserarea lui C-9 in bistratul lipidic al celulei tinta. Este initiata o reactie, in lant in care C-9 modificat leaga o a doua molecula de C-9 care sufera o modificare conformationala si se, insera in bistratul lipidic, unde leaga o alta molecula de C-9, etc. In felul acesta se formeaza un canal transmembranar format dintr-un lant de 16 molecule C-9.

Complexele MAC din membrana formeaza pori prin aceasta, perturbind structura bistratului lipidic. Apa care intra in celula prin osmoza produce umflarea si distrugerea ei.

C-3b recunoaste, de asemenea, proteine receptor specifice de pe macrofage si neutrofile ceea ce mareste capacitatea acestor celule de a fagocita celula tinta.

Structura fina a imunoglobulinelor

Majoritatea anticorpilor ce apar natural, cu o anumita specificitate, nu sunt reprezentati de o singura specie moleculara, fiind heterogeni deoarece ei sunt sintetizati de multe diferite celule producatoare de anticorpi. Aceasta heterogenitate a

reprezentat un impediment serios in elucidarea bazei moleculare a actiunii anticorpilor. Anticorpii produsi de o singura celula sunt omogeni.

In mielomul multiplu (numit astfel deoarece se dezvolta multiple tumori in maduva osoasa sau in tesuturile mieloide), o forma de cancer al celulelor producatoare de anticorpi, un singur limfocit transformat se divide necontrolat, producindu-se un numar foarte mare de celule de un singur tip. Ele reprezinta o clona deoarece ele sunt descendente din aceiasi celula si au proprietati identice. Cantitati mari de imunoglobuline de acelasi tip sunt secretate de aceste tumori. Imunoglobulinele mielomului au o structura normala si sunt omogene. Mielomul apare si la soarece. Aceste tumori pot fi transplantate pe alt soarece, unde ele prolifereaza.

Imunoglobulinele mielomului prezinta avantajul de a fi omogene, dar antigenele lor normale nu sunt cunoscute. In 1975, MILSTEIN si KOHLER au descoperit ca pot fi obtinute cantitati mari de anticorpi omogeni cu o specificitate dorita prin fuzionarea unei celule producatoare de anticorpi cu o celula mielom. Celulele hibrid se numesc celule hibridoma si produc cantitati mari de anticorpi omogeni specificati de celula parentala (de exemplu un limfocit din splina). Prin metoda hibridomului se produc anticorpi monoclonali - ce servesc la studiul imunoglobulinelor.

In urina pacientilor cu mielom multiplu a fost descoperita de BENCE-JONES o proteina care precipita cind este incalzita la 50°C si devine solubila la fierbere si care s-a dovedit ulterior a fi un dimer al catenelor L al imunoglobulinei bolnavului de mielom.

In 1965 s-au determinat structurile primare ale catenelor L din imunoglobulinelor mielomului. S-a demonstrat ca proteinele BENCE-JONES de la diferiti pacienti au diverse structuri primare, diferentele fiind la extremitatea N-terminala a catenelor. Fiecare proteina Bence-Jones are o secventa unica de la aminoacidul 1 la 108, de la aminoacidul 109 existind de regula aceiasi structura primara. Deci, catena L consta dintr-o regiune variabila (1-108) si o regiune constanta (109-214). Cele doua tipuri de catene polipeptidice L : k si λ prezinta resturi de aminoacizi identice in 40 % din pozitii. Fiecare catena consta din 214 resturi de

aminoacizi, cu o jumătate N-terminală variabilă și cu o jumătate C-terminală constantă, fiind legată la catena H printr-o punte disulfurică la care este implicat restul de cisteină C-terminal. Toate catenele κ au aceiași regiune constantă, cu excepția restului 191 care poate fi Leu sau Val. Catenele λ au în poziția 191 un rest de Lys sau Arg. Pentru fiecare tip de catena L, această diferență alotipică este ereditară.

Compararea secvențelor de aminoacizi a diferitelor imunoglobuline din mielom a relevat că ambele catene L și H sunt constituite dintr-un segment variabil la capatul N-terminal și un segment constant la capatul C-terminal (Figura 68).

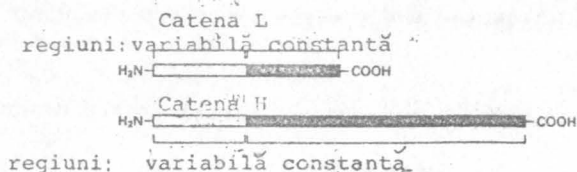


Figura 68. Regiunile variabile și constante ale catenelor din structura imunoglobulinelor

Catena polipeptidică H constă din 446 resturi de aminoacizi, segmentul variabil fiind constituit din primii 108 aminoacizi și având aceeași lungime cu regiunea variabilă a catenei L. Segmentul constant al catenei H este de aproximativ trei ori mai lung decât cel corespunzător din catena L.

Studiind secvențele de aminoacizi din segmentul variabil al catenelor L și H, din structura multor imunoglobuline s-a constatat existența unor regiuni hipervariabile (trei în catena L și patru în catena H) separate prin secvențe relativ constante. Aceste secvențe hipervariabile reprezintă regiunile de determinare a complementarității (CDR) - responsabile pentru specificitatea reacției antigen-anticorp.

Deci capetele N-terminale ale catenelor L și H care se assemblează pentru a forma situsul de legare al antigenului și variabilitatea secvențelor lor de aminoacizi reprezintă baza structurală a diversității anticorpilor. Situsul de legare al

antigenului este constituit din 5-10 aminoacizi din fiecare secventa hipervariabila, deci dintr-un total de circa 25 resturi de aminoacizi.

O alta caracteristica structurala a imunoglobulinelor este localizarea periferica a punctilor disulfurice intracatenare din catenele L si H. Regiunea variabila a catenei L (V_L) are o structura primara similara regiunii variabile a catenei H (V_H). Cele trei segmente C_H^1 , C_H^2 si C_H^3 au, de asemenea, o structura primara similara, prezentind similitudini si cu C_L . Aceste similitudini structurale conduc la plierea independenta a acestor segmente (de circa 110 resturi de aminoacizi) in domenii ca unitati functionale compacte.

O catena L consta dintr-un singur domeniu variabil (V_L) si un singur domeniu constant (C_L), in timp ce o catena H consta dintr-un domeniu variabil (V_H) si trei domenii constante (C_H^1, C_H^2 si C_H^3). Catenele μ si α au un domeniu variabil si patru domenii constante.

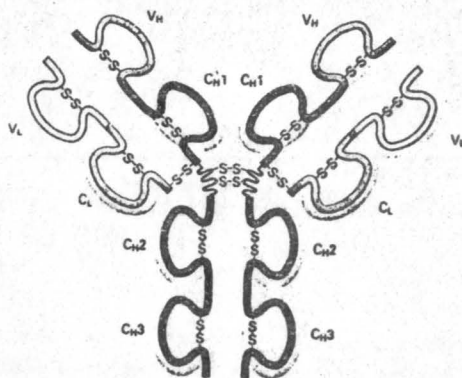


Figura 62. Domeniile imunoglobulinelor

Domeniile variabile sunt responsabile pentru legarea antigenului, in timp ce domeniile constante ale catenelor H (exceptie C_H^1) formeaza regiunea Fc. Fragmentul Fab consta dintr-un aranjament tetraedric a patru domenii V_L, V_H, C_L si C_H^1 . Similaritatea domeniilor sugereaza ca in cazul structurii tetramere, catenele imunoglobulinelor au luat nastere in cursul evolutiei dintr-o gena primordiala pentru un domeniu de 110 resturi de aminoacizi, ce a suferit duplicatii.

Fiecare domeniu al imunoglobulinelor are o structura tridimensională similară, numită immunoglobulin fold. Multe alte proteine de pe suprafața limfocitelor sau a altor celule, cu rol în transmiterea semnalelor intercelulare au domenii similare, fiind membrii superfamiliei imunoglobulinelor.

Toate domeniile constante din catenele L și H sunt constituite din șapte segmente cu β -structură, dintre care patru sunt aranjate în spațiu într-un plan A (în spate) și alte trei - într-un plan B (în față). Cele două planuri sunt apropiate și ținute asamblate printr-o punte disulfurică, stabilită între β -segmentul 6 din planul B și β -segmentul 2 din planul A. În Figura 70 a prezentăm topologia domeniului constant, denumită "Greek key barrel". Majoritatea resturilor de aminoacizi invariabile și puntea disulfurică sunt găsite în aceste segmente β , permițând atât stabilizarea conformației domeniului constant prin interacții hidrofobe ce constituie un miez hidrofob cât și interacțiile cu alte părți ale moleculei de imunoglobulină. Segmentele loop sunt în general scurte dar variază ca lungime la diferite clase de imunoglobuline, fiind constante la speciile moleculare aparținând aceleiași clase de anticorpi. Rolul segmentelor loop nu este cunoscut; ele, probabil, fiind implicate în funcțiile efector ale anticorpilor. Când se formează complexul antigen-anticorp sunt transmise semnale prin regiunea Fc diferitelor sisteme ca celulele fagocitice sau sistemul complement care vor distruge complexul. Aceste activități sunt mediate de interacțiunile specifice ale liganzilor cu domeniul constant al imunoglobulinelor.

Structura generală a domeniului variabil (Figura 70 b) este similară cu cea a domeniului constant, doar că are nouă β -segmente în loc de șapte. Cele două segmente β în plus sunt inserate în regiunea loop dintre β -segmentele 3 și 4. Funcțional, această parte a catenei polipeptidice este importantă deoarece conține regiunea hipervariabilă CDR-2. Cele două β -segmente suplimentare permit CDR-2 să se apropie de celelalte două segmente hipervariabile ale structurii.

Specificitatea imunoglobulinelor este determinată de secvența și mărimea regiunilor hipervariabile. Prin compararea secvențelor de aminoacizi din câteva sute de domenii variabile s-a constatat că

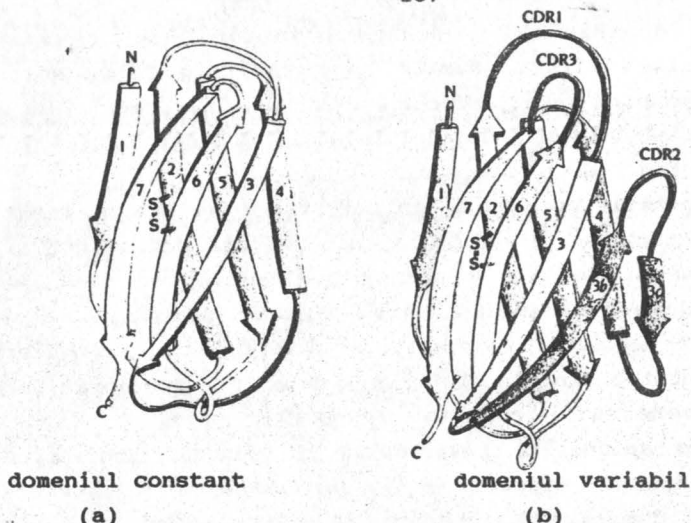


Figura 70. Domeniile de pliere ale imunoglobulinelor

aceste regiuni hipervariabile se gasesc la nivelul resturilor 24-34, 50-56 si 89-97 din catenele L si 31-35, 50-65 si 95-102 din catenele H. In structuri tridimensionale, aceste resturi ocupa regiunile loop ce leaga β -segmentele 2-3, 3b-3c si 6-7, grupate in spatiu la un capat a acestor β -segmente. Regiunile CDR-2 si CDR-3 au structuri hairpin loop intre β -segmentele 3b-3c si 6-7. A treia regiune hipervariabila CDR-1 este legata incrucisat intre β -segmentul 2 din planul A si β -segmentul 3 din planul B. Toate β -segmentele din planul B sunt conectate prin structuri loop cu regiuni hipervariabile, in timp ce un singur β -segment din planul A este implicat. Structurile loop in plus, dintre β -segmentele 4 si 5 din planul A nu au segmente variabile si nu participa la legarea antigenului.

Domeniile C_H^2 difera de celelalte prin aceea ca interactioneaza cu unitati glucidice legate prin asparagina.

3.8. Proteinele citoscheletului

Forma celulelor eucariotice este mentinuta datorita existentei unui suport interior numit citoschelet. Aceasta formatiune este

constituata predominant din filamente proteice , fiind implicata si in miscarile celulare. Pe baza dimensiunii si morfologiei lor aceste ansambluri filamentoase se clasifica in trei tipuri : filamente de actina sau microfilamente, filamente intermediare si microtubuli.

Filamentele de actina sau microfilamentele

Sunt componentele citoscheletului(cu un diametru de 70 Å) , cel mai bine studiate, jucind un rol dinamic in motilitatea celulara (de exemplu inelul contractil din timpul diviziunii celulare) si un rol static in structura celulara (de exemplu in structura microvililor intestinali) .

La eucariotele inferioare , ca drojdiile, exista o singura gena care codifica actina. La eucariotele superioare, exista mai multe izoforme codificate de o familie de gene ale actinei. La mamifere, sunt cel putin sase tipuri de actine, incluse in trei clase in functie de punctul lor izoelectric. α -actina este gasita in diferite tipuri de muschi, in timp ce actinele β si γ sunt principalii constituenti ai celulelor nemusculare. Desi exista mici diferente intre proprietatile diferitelor forme de actina, secventa de aminoacizi este inalt conservata in cursul evolutiei lor, astfel ca toate au capacitatea de a se asambla in filamente.

Si in cazul celulelor nemusculare exista actina G si actina F. Fiecare monomer de actina G leaga o molecula de ATP.

O alta similitudine este ca filamentele de actina, din celulele musculare si nemusculare au structuri polare, avind un capat minus relativ inert, cu crestere lenta (pointed end) si un capat plus, cu crestere rapida (barbed end). Filamentele de actina F din celulele nemusculare sunt , de asemenea, compuse din doua lanturi de monomeri G care se rasucesc unul in jurul celuilalt intr-un helix. Aceste structuri difera de filamentele de actina din fibrele musculare in ceea ce priveste proteinele asociate lor. O alta deosebire este ca filamentele de actina din celulele nemusculare sunt structuri dinamice, tranzitorii care se asambleaza si disociaza continuu si concomitent , in interiorul celulei. Asamblarea actinei G in actina F este un proces care are loc in doua etape: (i) una mai lenta in care trei molecule de actina G formeaza un nucleu, printr-un proces numit nucleatie ; (ii) alta mai rapida ,numita alungire , in cadrul

careia monomeri de actina G se adauga la extremitatile nucleului, pina cind este atinsa o concentratie critica la care viteza de asociere este egala cu viteza disocierii monomerilor.

Viteza de polimerizare este diferita la cele doua capete ale unui filament de actina, la capatul plus (+) procesul de polimerizare fiind de circa 10 ori mai rapid decit la capatul minus(-). Cind un monomer de actina G este incorporat intr-un filament , gruparea fosfat terminala a ATP este hidrolizata, lasind ADP , rezultat, inglobat in polimer. Molecula de actina are forma unei scoici, legind ATP intr-o fanta dintre cele doua valve care asemenea cochiliei poate fi deschisa sau inchisa. Cind actina polimerizeaza, " cochilia" este inchisa ceea ce conduce la hidroliza ATP si incorporarea unui monomer de actina G in filament, lasind inglobat ADP in interior (Figura 71).

Deoarece exista o perioada de "lag" inaintea hidrolizei, un filament in crestere va avea o regiune centrala constituita din monomeri de ADP-actina G si extremitati formate din ATP-actina G. Monomerul ATP-actina G va disocia din structura filamentelor mai lent decit monomerii ADP-actina G, deci viteza disocierii monomerilor din filamente va fi dependenta de tipul de actina G prezent la extremitatile filamentului. ATP-actina G are o tendinta mai pronuntata de a se agrega decit ADP-actina, concentratia critica fiind de 0,1 - 2 μM in conditii celulare. Concentratia tipica de actina G dintr-o celula nemusculara este de 200 μM , mult mai mare decit valoarea critica. In fibroblasti, 50 % din actina este in stare filamentoasa, iar 50 % - este in stare de monomer. Acest procent mare de actina nepolimerizata este datorat prezentei unor proteine control care leaga actina G.

Asamblarea si disocierea filamentelor de actina joaca un rol important in motilitatea celulara : miscarea ameboidala, fagocitoza, separarea celulelor fiice in ultimul stadiu al mitozei (citokineza), extinderea si retractarea diferitelor protuberante celulare ca microvilii si axonii neuronali. Acest caracter dinamic de asamblare-disociere a filamentelor de actina a fost studiat cu ajutorul citocalasinei B, un alcaloid fungic, care se leaga la capatul plus (in crestere) al filamentelor actinei , blocind adaugarea de monomeri si conducind la disocierea filamentelor. In

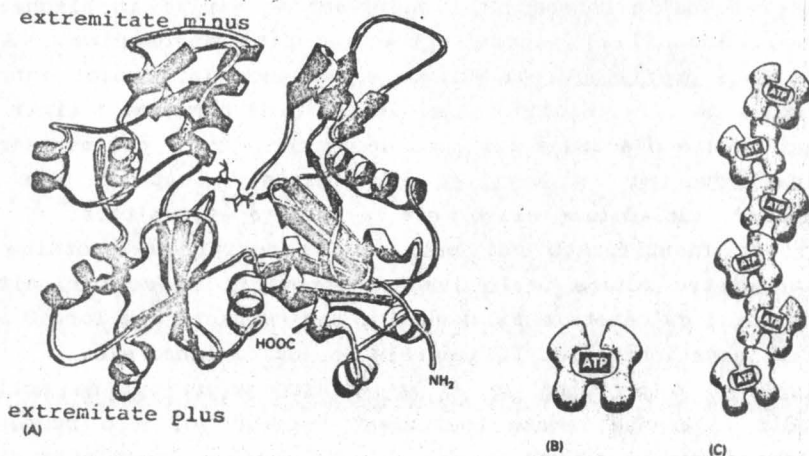
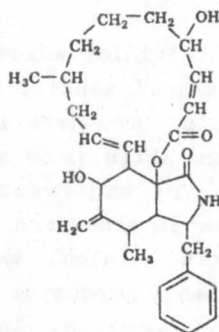
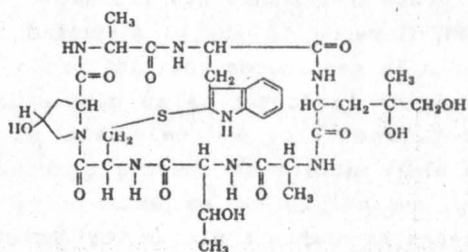


Figura 71. A) Structura tridimensională a unei molecule de actina; B) Reprezentarea schematică a celor două domenii ale actinei și situsului de legare al ATP; C) Modul de asamblare

contrast, faloidina, o heptapeptida biciclică produsă de ciuperca otrăvitoare Amanita phalloides blochează disocierea filamentelor prin legarea specifică la unitățile de actina G.



Citocalasina B



Faloidina

Asamblarea și disocierea filamentelor de actina este reglată de proteinele de legare a actinei. Cea mai abundentă proteină de legare a actinei G este timosina, cu o masă moleculară foarte mică (5 kd).

Ea este prezenta in concentratii suficient de mari (in plachetele sangvine, neutrofile) pentru a bloca actina monomerică. Alta proteina este profilina (16 kd) care se leaga la monomer intr-un raport molar de 1:1 , blocindu-i si impiedicind formarea actinei F . Profilactina are o actiune similara de impiedicare a polimerizarii. Gelsolina, severina si vilina - se leaga la capatul plus al filamentelor, impiedicind asamblarea la aceasta extremitate.

Au fost identificate mai mult de 50 astfel de proteine cu afinitate pentru actina unele leagind monomerii de actina, altele interactionind cu capetele filamentelor sau cu parti ale lor. O alta categorie leaga incrucisat filamentele de actina intre ele.

Gelsolina, o proteina de 95 kd transforma un gel de actina, format din filamente legate incrucisat intr-un sol - o suspensie fluida de filamente scurte de actina - disociind legaturile dintre monomerii G, activitate dependenta de ionii de Ca^{2+} (la concentratii mai mari de 10^{-6} M). Este probabil ca gelsolina sa fie implicata in reglarea proprietatilor viscoase si elastice ale citoplasmei si in remodelarea citoscheletului.

Tropomiozina este o alta proteina de legare a actinei. Ea stabilizeaza filamentele de actina, modulind activitatile altor proteine de acelasi tip. Este un inhibitor competitiv al gelsolinei fata de situsul de legare al actinei F.

Filamentele intermediare

Aceste componente stabile ale citoscheletului celulelor animale au un diametru de 70-110 Å jucind un rol predominant static, de exemplu in mentinerea pozitiei organitelor in celula. Denumirea lor provine de la faptul ca au dimensiuni intermediare intre cele ale microfilamentelor si cele ale microtubulilor. In majoritatea celulelor animale se observa o retea de filamente intermediare in jurul nucleului, ce se extinde si spre periferia celulei, unde se leaga la membrana plasmatica. Acest tip de filamente predomina in citoplasma celulelor supuse de regula stresului mecanic. Spre deosebire de actina si tubulina care sunt proteine globulare, monomerii proteinelor din filamentele intermediare sunt molecule fibroase, alungite, cu un cap N-terminal si cu o coadă C-terminala, separate printr-un domeniu central tip bagheta ("rod") (Figura 72). Acest domeniu central (constituit din circa 310 aminoacizi) consta

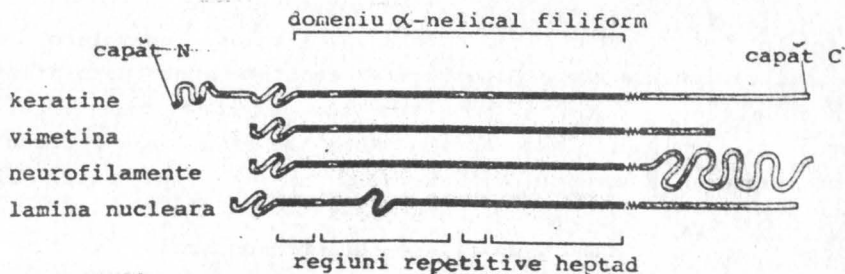
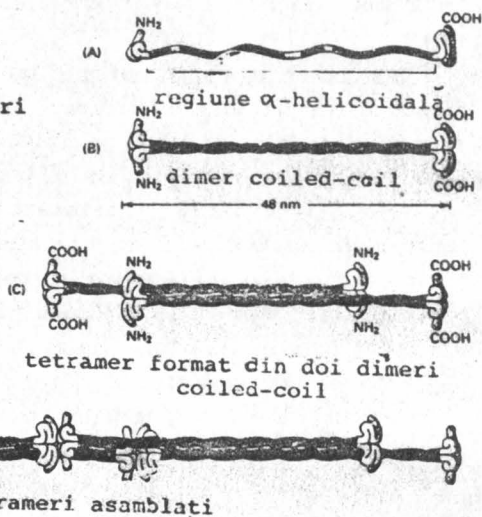


Figura 72. Organizarea pe domenii a monomerilor proteici din filamente intermediare

dintr-o regiune extinsa, helicoidala, ce contine o secventa de aminoacizi particulara ce se repeta in tandem, numita regiune repetitiva heptad. Acest motiv de sapte resturi de aminoacizi permite formarea de dimeri coiled-coil intre doua segmente α -helix paralele (Figura 73). In urmatoarea etapa de asamblare doi dimeri coiled-coil se asociaza intr-o maniera antiparalela formind o subunitate tetramera. Tetramerii solubili gasiti in cantitati mici

Figura 73. Asamblarea filamentor

intermediare. a) structura monomer; b) structura dimer in care domeniile centrale conservate sunt dispuse paralel intr-un coiled coil. c) doi dimeri se aliniaza antiparalel formind un tetramer; d) doi tetrameri sunt asamblati intr-o structura helicoidala.



in celule sunt subunitatile fundamentale de asamblare ale filamentelor intermediare. Structurile rezultate sunt nepolarizate fiind simetrice pe toata lungimea lor - spre deosebire de microtubuli si filamentele de actina. Stadiile finale ale procesului de asamblare a filamentelor intermediare sunt mai putin bine cunoscute .

Exista mai multe tipuri de filamente intermediare.

Filamentele de keratina se gasesc in cantitati mari in celulele epiteliale, fiind constituite din manunchiuri de α -keratine, cu un diametru de 8 nm. Acest tip de filamente formeaza tesatura densa proteica a celulelor epiteliale care le confera o rezistenta mecanica. In epiteliile organismului uman exista mai mult de 20 keratine distinte. In functie de structura lor primara, keratinele se pot clasifica in tipul I - keratine acide si tipul II - keratine neutre sau bazice. Numai heterodimerii keratinelor de tip I si II pot forma filamente intermediare.

Filamentele de desmina se gasesc in celulele muschilor netezi, a muschilor scheletici si cardiac. Discul Z al celulelor musculare este impartit in doua domenii, cel periferic continind filamentele de desmina. Acestea leaga lateral discurile adiacente Z si mentin alinierea lor perfecta in cadrul miofibrilelor fibrei musculare. Componenta majora a acestor filamente este desmina , o proteina de 50 kd.

Filamentele de vimetina se gasesc in special in celulele crescute in culturi tisulare, fiind implicate atat in mentinerea formei celulei cit si a pozitiei nucleului .Principalul component este vimetina, o proteina de 52 kd.

Neurofilamentele - filamentele intermediare din neuroni sunt compuse de trei tipuri de proteine, cu mase moleculare de 210, 160 si 68 kd. Neurofilamentele formeaza legaturi incrucisate cu microtubulii prin MAP 2, care are situsuri de legare pe ambele structuri. Ele confera rezistenta la tensionari axonilor si dendritelor neuronale.

Cel mai recent descoperit membru al familiei filamentelor intermediare sunt laminele, care formeaza lamina nucleara, o retea fibroasa ce exista pe latura nucleara a membranei reticulului endoplasmic din jurul nucleului.

Microtubulii

Componentele majore ale citoscheletului sunt microtubulii care reprezinta cel mai mare tip de filamente proteice gasit in majoritatea celulelor eucariote. Ei participa la multiple functii celulare, fiind si componentul major al aparatului contractil al celulei. In citosol, microtubulii sunt implicati in motilitatea componentelor interne ale celulei, ca de exemplu la deplasarea cromozomului spre polii opusi in timpul diviziunii celulare. De asemenea, microtubulii sunt unitatile structurale ale cililor si flagelilor celulelor eucariote. In timp ce microtubulii cililor si flagelilor sunt structuri stabile, cei din celelalte celule eucariote sunt structuri labile.

Microtubulii au structura unui cilindru gol cu diametrul exterior de 24 nm si cu cel interior de 14 nm. Ei au in structura doua tipuri de proteine globulare : α -tubulina si β -tubulina, cu mase moleculare de aproximativ 55 kd, ce se asociaza in dimeri $\alpha\beta$. Dimerul poarta numele de tubulina. In interiorul microtubulilor, dimerii $\alpha\beta$ se aliniaza cap-coada formind un protofilament. Acestia sunt formati din 13 dimeri dispusi concentric si stivuiti paralel formind un microtubul (Figura 74).

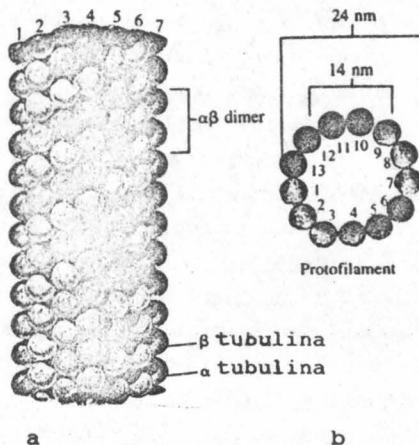


Figura 74. Structura unui microtubul. a) segment de microtubul ; b) Sectiune transversala printr-un microtubul care reprezinta configuratia protofilamentului.

Microtubulii au structuri polare, cu un capat plus la care are loc o asamblare rapida si cu un capat minus care are tendinta de a pierde subunitati daca nu este stabilizat. In majoritatea celulelor capetele minus ale microtubulilor sunt stabilizate prin legare la structura centrozomului, capetele plus fiind libere. Permanent, sute de microtubuli sufera atat asamblari de subunitati la capatul plus cit si depolimerizari concomitente, structura lor dinamica lungindu-se si scurtandu-se continuu. Polimerizarea si depolimerizarea microtubulilor este controlata de GTP. GTP se leaga la subunitatea -tubulinei din molecula heterodimera, dupa care o molecula de dimer se adauga la capatul unui microtubul. Hidroliza GTP dupa polimerizare destabilizeaza microtubulii. Anumiti microtubuli sunt stabilizati in celula prin asociere cu proteine specifice.

Cilii si flagelii, organitele microtubulare cel mai bine caracterizate, au structuri asemenea firului de par ce protubereaza de la suprafata multor celule. De exemplu, cilii celulelor care captusec tractusul respirator servesc la indepartarea particulelor straine prin miscari paralele cu suprafata celulelor. Celulele libere ca spermatozoizii si protozoarele au fie cili, fie flageli.

Unitatea functionala a unui cil sau a unui flagel este axonema care este inconjurata de o prelungire a membranei plasmaticice. Axonema prezinta un aranjament $9 + 2$, care consta din noua perechi de microtubuli legati intre ei si dispusi ciclic in jurul unei perechi centrale de microtubuli singlet. Fiecare pereche de microtubuli consta dintr-un tubul A (cilindric) si un tubul B (in forma de semiluna), ce sunt separati printr-un perete comun. Fiecare pereche de microtubuli contine doua proiectii plasate in aceiasi directie a acelor unui ceasornic: bratul intern al dineinei si bratul extern al dineinei. Perechile de microtubuli sunt conectate prin fibre subtiri de nexina, lungi de 30 nm si elastice. Perechile de microtubuli sunt unite prin spite radiale de cavitataea centrala - formata din doua perechi de proiectii provenite din microtubulii singlet centrali (Figura 75).

Tratamentul cililor cu detergenti si cu concentratii saline mari permite indepartarea membranei plasmaticice din jurul lor si solubilizarea unei ATP-aze numita dyneina - care este o proteina foarte mare (de circa 1500 kd) continind trei capete si un picior.

Situsurile ATP-azice sunt localizate in capete si actioneaza asemenea capetelor S_1 ale miozinei.

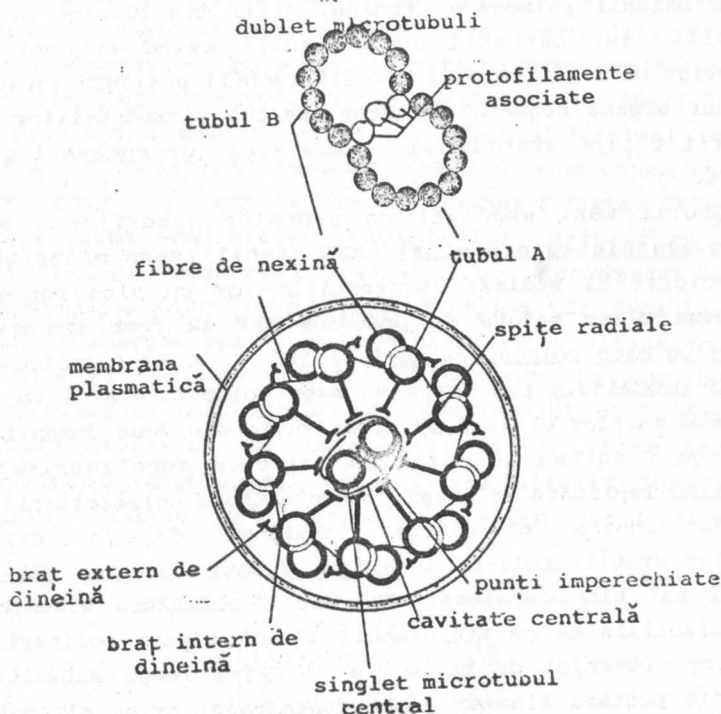


Figura 75. Reprezentarea schematica a axonemei,unitatea functionala a cililor si flagelilor

Energia motilitatii axonemei este generata de bratele dineinei ce sunt permanent legate la tubulul A al fiecărei perechi de microtubuli. In absenta ATP, aceste brate formeaza legaturi incrucisate cu tubulul B al perechii vecine. Cind ATP se leaga la bratele de dineina, bratele se detaseaza de tubulul B. Cind ATP este hidrolizat, bratele sufera o modificare si are loc reatasarea tubulului B la un situs mai apropiat decit inainte. Apoi bratele dineinei revin la forma lor originala.

Se cunoaste sindromul cililor imobili, ce apare din cauza unei varietati de leziuni moleculare, cea mai comuna fiind absenta

bratelor externe si interne de dineina. Alte defecte pot fi absenta spitelor, a legaturilor de nexina sau a microtubulilor centrali. Bolnavii au maladii pulmonare cronice, ciliii tractusului pulmonar fiind imobili, iar barbatii sunt sterili avind spermatozoizi imobili. Curios ca multi bolnavi cu cili imobili prezinta inversarea pozitiei unor organe sugerind ca aranjamentul microtubulilor joaca un rol critic in stabilirea asimetriei dreapta-stinga in embriogeneza.

Microtubulii sunt asociati cu proteine specifice : MAP (Microtubule associated proteins) care stabilizeaza microtubulii contra disocierii si mediaza interactiile lor cu alte componente celulare. Doua clase majore de proteine MAP au fost izolate din creier : una cu mase moleculare mari de 200 - 300 kd (includ MAP-1 si MAP-2) si proteinele tau care au mase moleculare mici de 55-62 kd. Proteinele ambelor clase sunt constituite din doua domenii prin care se leaga simultan la diferite molecule depolimerizate de tubulina, fiind implicate in etapa de nucleatie a polimerizarii. Ele de asemenea inhiba disocierea tubulinei de la capetele microtubulilor stabilizindu-le structura o data formata. MAP-2 - proteina cel mai bine caracterizata, are o structura alungita ce formeaza proiectiile de pe microtubuli si stimuleaza polimerizarea microtubulilor. Domeniul de proiectie al MAP-2 leaga subunitatile reglatoare ale protein kinazei C-AMP dependente, avind situsuri ce pot fi fosforilate ; domeniul de legare al microtubulului din MAP-2 leaga calmodulina si are, de asemenea, situsuri ce sunt fosforilate.

Proteina - MAP tau este un oligomer format din 3-6 polipeptide in functie de specia din care a fost izolata. Asemenea MAP-2, MAP tau are situsuri de fosforilare si leaga calmodulina. Se considera ca MAP tau are rol in initierea polimerizarii microtubulilor. Deoarece protein kinaza CAMP dependenta si calmodulina raspund la semnale hormonale si sunt implicate in transformari de semnale, ele pot juca un rol important in polimerizarea microtubulilor.

Alte proteine MAP sunt implicate in motilitatea organitelor celulare si veziculelor de-a lungul microtubulilor. Astfel, proteina MAP 1 C este o ATP-aza cu proprietati similare dineinei ce exercita o forta intr-o singura directie de-a lungul microtubulilor. Transportul veziculelor este deosebit de evident in neuroni, unde

are loc rapid si pe distante lungi. Traiectele pentru aceste deplasari sunt asigurate de microtubulii.

Recent, a fost reconstituit in vitro un sistem ce transporta vezicule cu ajutorul unei alte ATP-aze. Veziculele si organitele sunt transportate de kinesina, o proteina mare, solubila in apa ce consta din doua subunitati de 110 kd si alta de 65-70 kd. Kinesina este o proteina mult alungita, de 1000 Å lungime. Un capat al kinesinei se leaga la un receptor specific pe membrana unei vezicule si un altul se leaga la un microtubul (Figura 76).

Observarea deplasarii organitelor asimetrice de tipul mitocondriilor sugereaza ca ele se deplaseaza de-alungul microtubulilor. Cinci molecule de kinesina per organit furnizeaza suficienta energie pentru a il deplasa cu o viteza de 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Organitele si veziculele continind kinesina se deplaseaza de la capatul minus al unui microtubul spre capatul plus, aceasta uzual producind deplasarea de la centrul celulei spre periferia ei (transportul anterograd). Un mecanism diferit (un transportor retrograd) trebuie sa fie descoperit pentru deplasările in sens invers.

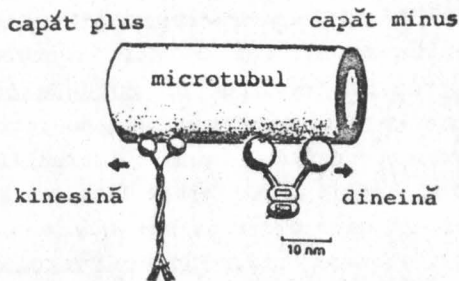


Figura 76. Legarea kinesinei si dineinei la un microtubul

3.10. Proteine membranare

Celulele animalelor si organitele lor intracelulare sunt delimitate de membrane, care sunt constituite in principal din lipide si proteine. Lipidele formeaza o structura bistratificata, cu doua suprafete hidrofile si cu un interior hidrofob. Continutul proteic al membranelor variaza mult in functie de rolul lor. Astfel, in timp ce membrana mielinica care serveste la izolarea electrica a axonilor celulelor nervoase are un continut mic in proteine (mai putin de 25 %), membranele care realizeaza transformari energetice (mitocondriile si cloroplastele) contin circa 75 % proteine din greutatea lor. O membrana plasmatica obisnuita are 50 % proteine si 50 % lipide.

Adesea proteinele membranare au atasate la suprafata lor catene oligozaharidice care constituie un invelis care se numeste glicocalix.

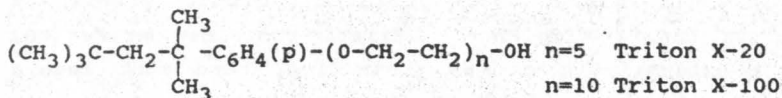
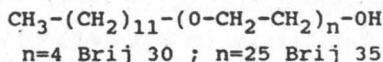
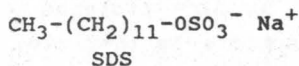
Proteinele membranare sunt responsabile pentru majoritatea proceselor dinamice care au loc la acest nivel, mediind aproape toate functiile membranelor. Astfel proteinele membranare asigura schimburi de informatii atat intre celula si mediu cit si intre interiorul unui organit si citosol . Deci, proteinele membranare sunt implicate in procesul complex de recunoastere celulara , actionind ca receptori ce "traduc" semnalele neurotransmitatorilor, factorilor de crestere, hormonilor, luminii, stimulilor tactili . Ele realizeaza transportul specific al metabolitilor si ionilor prin bariera de permeabilitate care o reprezinta membrana (pompe, pori).

Unele proteine membranare transforma energia luminoasa in energie chimica si electrica, cuplind transferul de electroni cu sinteza ATP. In membranele biologice exista multe enzime care catalizeaza diferite transformari.

Proteinele membranare pot fi clasificate operational conform gradului in care sunt asociate cu membranele in :

1. Proteine integrale sau intrinseci - puternic legate la sistemele membranare prin forte hidrofobe , care pot fi separate numai prin tratamente cu solventi organici, detergenti: dodecilsulfat de sodiu (SDS) , deoxicolat de sodiu, colat de sodiu,

compusi polietoxilati - Brij si Triton sau agenti caotropici (ioni care distrug structura apei).



Agentii caotropici cresc solubilitatea substantelor nepolare in apa, disociind interactiile hidrofobe intr-o maniera neelucidata. Ionii I^- , ClO_4^- , SCN^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} si Ba^{2+} , guanidinium (Gu) precum si ureea, in concentratii de 5 -10 M reprezinta agenti chaotropici deoarece denatureaza proteinele. Astfel GuSCN si GuCl denatureaza puternic proteinele in timp ce Gu_2SO_4 le stabilizeaza structurile .

Proteinele integrale tind sa agrege si sa precipite in solutii apoase in absenta detergentilor sau solventilor organici miscibili cu apa ca butanolul sau glicerolul. Unele proteine integrale leaga lipidele atat de puternic incit ele pot fi eliberate de acestea numai in conditii denaturante. Din aceasta cauza purificarea lor este extrem de dificila, foarte putine proteine membranare putind fi cristalizate.

2. Proteine periferice sau extrinseci pot fi disociate de pe membrane prin procedee relativ blinde , prin expunere la solutii saline (NaCl 1 M), agenti de chelatizare sau modificari de pH. Proteinele periferice, de exemplu, citocromul c, sunt stabile in solutii apoase si nu leaga lipidele. Ele se asociaza la o membrana prin legare la suprafata ei, prin interactii electrostatice sau puncti de hidrogen.

In cele ce urmeaza ne vom referi numai la proteinele integrale. Astfel in Figura 77 prezentam diferite tipuri de astfel de proteine. Ele contin regiuni hidrofobe-prin care interactioneaza cu lipidele membranare si regiuni hidrofile-expuse mediului apos de-o parte si de alta a membranei. Hidrofobicitatea acestor proteine transmembranare este marita prin legarea covalenta a unui acid gras prin intermediul caruia se integreaza in structura bistratului

lipidic (Fig.77 a). Fiecare tip are o orientare particulara in membrana, putind avea domenii citoplasmatiche sau/si extracitoplasmatiche, separate de segmente constituite din resturi hidrofobe care strapung membrana (Fig.77 a,b). Alte proteine membranare sunt localizate in citosol, fiind asociate la bistratul lipidic prin intermediul unor catene lipidice (grupari prenil sau resturi de acizi grasi) (Fig.77 c). Exista proteine periferice, expuse pe fata externa a membranei plasmatiche, care sunt legate covalent la un rest de fosfatidil inozitol din bistratul lipidic prin intermediul unui oligozaharid specific (Fig.77 d). Alt tip de proteine descrise in Fig.77 e si f nu penetreaza bistratul lipidic, legindu-se la acesta prin interactii necovalente - acesta este cazul proteinelor periferice.

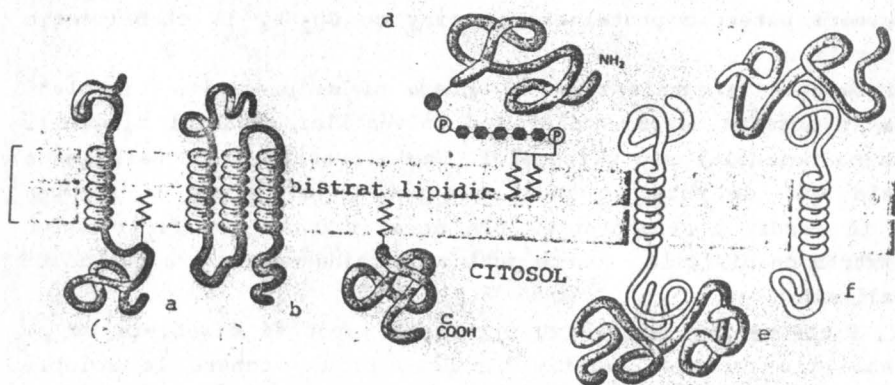


Figura 77. Posibilitati de asociere a proteinelor membranare la bistratul lipidic

Datorita lipsei moleculelor de apa, in segmentul polipeptidic transmembranar toate legaturile peptidice din bistratul lipidic formeaza intre ele puncti de hidrogen, care stabilizeaza diferite structuri secundare : α -helixul sau β -structura. In ultimul caz segmentele de β -structura formeaza o structura inchisa β -barrel.

Prima proteina membranara studiata in detaliu a fost bacteriorodopsina dintr-o bacterie arhaica Halobacterium halobium,

care necesita concentratii mari de NaCl pentru crestere (4,3 M) ca cele din lacurile sarate, fiind neviabila sub 2 M NaCl (salinitatea apei marii este de cca 0,6 M NaCl). Membrana purpurie a acestei bacterii contine 75 % proteine , 25 % lipide, si o regiune specializata bogata in bacteriorodopsina, proteina de 247 resturi de aminoacizi (25 KD) - capabila de a transforma energia luminoasa intr-un gradient transmembrantar de protoni, utilizat pentru sinteza ATP. Fiecare molecula de bacteriorodopsina contine o singura grupare cromofor, ce absoarbe lumina - retinalul, gasit si in celulele fotoreceptor ale ochiului vertebratelor. Aceasta se leaga la restul Lys-216 din apoproteina, printr-o legatura azometinica. La absorbtia unui foton de lumina, cromoforul excitat isi schimba forma, inducand si o serie de modificari conformationale in structura proteinei care promoveaza transferul de protoni din interiorul in exteriorul celulei. La lumina intensa, fiecare molecula de bacteriorodopsina poate pompa sute de protoni pe secunda. Transferul de protoni, indus de lumina realizeaza un gradient de protoni prin membrana plasmatica, care la rindul lui activeaza o alta proteina membranara, producatoare de ATP.

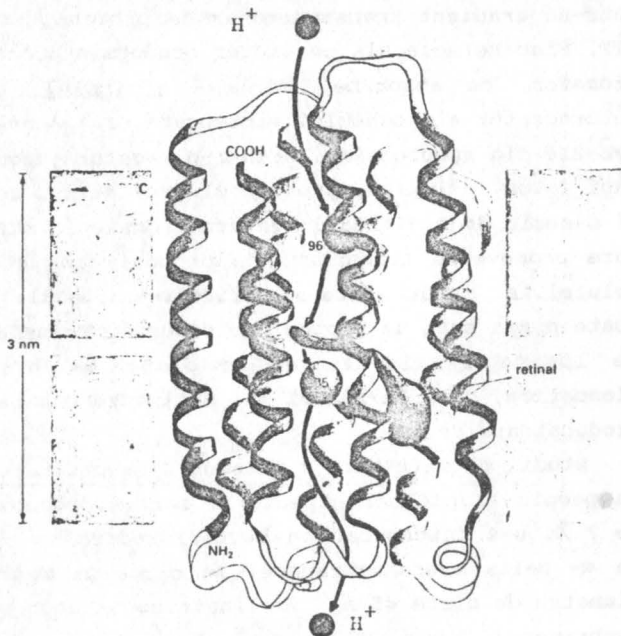
Studii de difractie a razelor X pe cristale tridimensionale mari au permis elucidarea structurii bacteriorodopsinei. La o rezolutie de 7 Å, s-a demonstrat ca bacteriorodopsina contine sapte segmente de α -helix transmembranare (de circa 25 resturi fiecare) , cu un diametru de circa 45 Å, inclinate cu un unghi de 20° fata de planul membranei (Figura 78). Spatiile de circa 20 Å dintre segmentele proteice sunt ocupate de bistratul lipidic. Prin cresterea capacitatii de rezolutie a metodei la 3 Å, s-au evidentiat conexiunile dintre aceste segmente de α -helix, precum si modul de legare al gruparii prosteice.

Analiza acestor segmente de α -helix transmembranare arata ca ele au un caracter hidrofob, sunt conectate cap-coada prin segmente loop scurte. Resturile incarcate electric se gasesc la suprafata membranei pentru a stabili contacte cu solventul apos sau pentru a stabili intre ele interactii de atractie electrostatica. Aranjamentul intern indica formarea unui canal hidrofob de trecere a protonilor, proces in care sunt implicate doua resturi de acid aspartic: Asp-85 si Asp-96 care sufera protonari si deprotonari

successive.

Bacteriorodopsina este un membru al unei superfamilii de proteine membranare cu structuri similare, dar functii diferite. Toate prezinta sapte segmente de α -helix, transmembranare, avind roluri de traducere a unor semnale extracelulare.

Figura 78. Structura tridimensională a bacteriorodopsinei



Un alt exemplu pe care îl vom prezenta este cel al porinelor, proteine transmembranare formatoare de pori, găsite în membrana externă a multor bacterii, ce au segmente cu structură β -barrel. Și în acest caz structura lor a fost elucidată în detaliu. Porina este constituită dintr-un trimer în care fiecare monomer formează un β -barrel tubular, ce traversează bistratul lipidic, formând un por umplut cu apă. Motivul β barrel este format din 16 segmente cu structuri β -antiparalele, care constituie peretii unui cilindru. Radicalii polari sunt orientați spre interior, interacționând cu moleculele de apă, iar cei nepolari - spre exterior, fiind în contact direct cu bistratul lipidic.

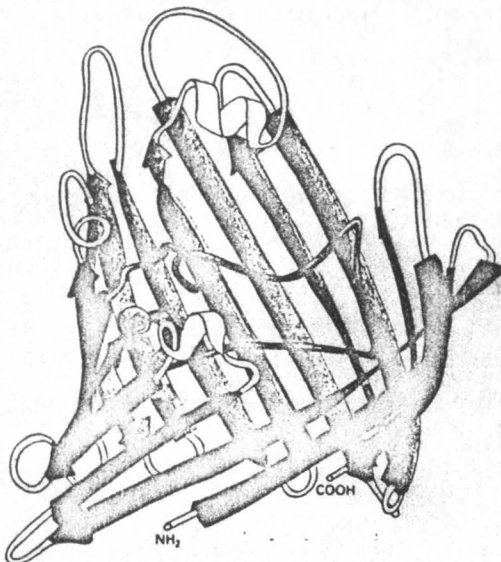


Figura 79. Structura tri-dimensională a unui monomer de porina de la Rhodobacter capsulatus

3.10.1. Proteinele membranei eritrocitare

Eritrocitele au fost alese ca obiect de studiu al proteinelor membranare. Prin eliberarea conținutului lor, prin hemoliza osmotica se separă fantomele eritrocitare. Ruperea membranei eritrocitare are loc într-un singur loc dînd naștere la fantome deschise. Este posibilă sudarea acestui orificiu și obținerea fantomelor eritrocitare închise. Există și tehnici care permit obținerea unor vezicule mici, închise, ale membranei eritrocitare cu poziția bistratului lipidic normală sau inversată. Aceste posibilități permit studiul diferențial al proteinelor membranare dispuse pe fața externă și internă (citoplasmatică) a eritrocitului. În plus, anticorpii marcați ce se leagă la o proteină situată caracteristic în membrană permit studierea poziției ei.

Din aceste fantome, proteinele sunt solubilizate cu SDS și separate electroforetic în gel de poli-acrilamidă și în prezența de SDS. Prin colorare cu Coomassie blue se evidențiază aproximativ

15 benzi proteice , numerotate in sensul scaderii masei lor moleculare, de la 250 kd la 15 kd (Figura 80) .

Figura 80. Proteinele separate electroforetic din membrana eritrocitului de la om.



Trei din aceste proteine - spectrina, glicoforina si proteina benzii 3 reprezinta mai mult de 60 % din totalul proteinelor.

Spectrina . In cursul vietii (120 zile)- un eritrocit este supus unor intense forte de forfecare, sufera modificari ale formei si parcurge distante mari. Rezistenta mecanica este asigurata de citoscheletul membranelor, a carui componenta majora este spectrina, o proteina periferica asociata cu fata citoplasmatica a bistratului lipidic. Spectrina este un heterodimer format din doua catene polipeptidice mari, similare α (260 KD) si β (225 KD), rascute una in jurul celeilalte, in mod antiparalel (Figura 81 a) .

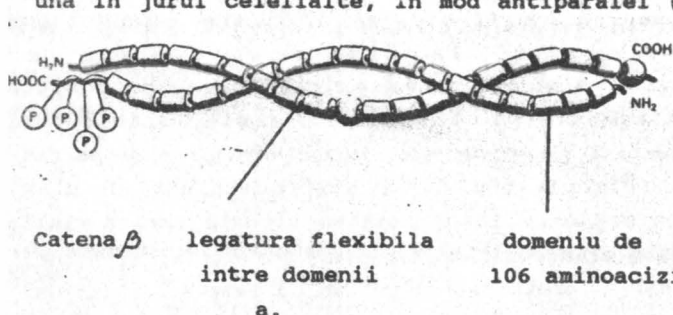


Figura 81. a. Molecula de spectrina dintr-un eritrocit de la om
b. Plierea unei unitati repetitive de 106 resturi de aminoacizi

glucidice; 2) al doilea format din 19 resturi hidrofobe si 3) al treilea domeniu - de 40 resturi la extremitatea C - terminala , bogat in resturi ionizate si polare. Domeniul transmembranar este comun multor proteine membranare integrale cu o secventa α -helix ce strapunge bistratul lipidic o singura data.

In ciuda numarului mare de molecule de glicoforina (aproape un milion) de pe suprafata eritrocitului, functia acestei proteine este neelucidata; oamenii care nu o au, fiind perfect sanatosi.

Proteina benzii 3 este o proteina transmembranara ce strabate membrana plasmatica a eritrocitului de 14 ori, avind rolul de a transporta anioni. Fiecare eritrocit contine circa 10^6 copii moleculare din aceasta proteina (1/3 din totalul proteinelor acestei membrane) , aranjata in membrana in forma dimera. Acest canal anionic are masa moleculara de 106 KD, fiind format dintr-o singura catena polipeptidica de 929 resturi de aminoacizi (Figura 83).

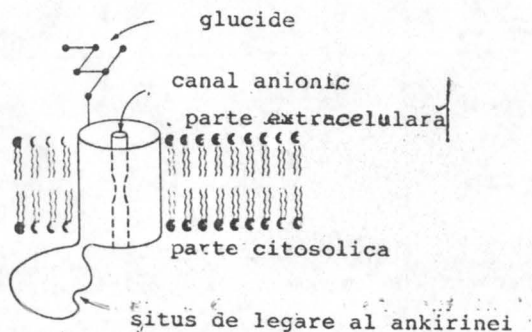


Figura 83. Structura canalului anionic din membrana eritrocitului

Proteina-canal este o glicoproteina care contine doua domenii :

1) un domeniu N-terminal (420 aminoacizi) localizat pe fata citosolica a membranei, ce contine situsuri de legare pentru ankirina - prin intermediul careia se ancoreaza la o membrana plasmatica de scheletul submembranar.

2) un domeniu C-terminal (509 aminoacizi) ce mediaza schimbul $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ si care consta din 14 segmente de α -helix ce strabat membrana. Asemenea, altor glicoproteine membranare integrate, are unitati glucidice pe fata extracelulara a membranei.

CO_2 intra in eritrocitele din capilarele tesuturilor, este transformat in H_2CO_3 sub actiunea carbonic anhidrazei, dupa care disociaza in H^+ si HCO_3^- . H^+ conform efectului Bohr transforma oxiHb in deoxiHb , eliberind O_2 . HCO_3^- paraseste eritrocitul prin canalul anionic, contra schimbului cu Cl^- (Figura 84).

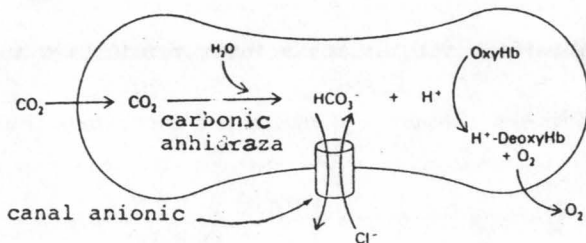


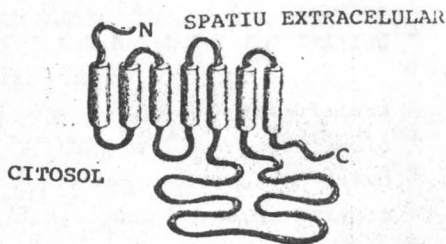
Figura 84. Rolul canalului anionic din membrana eritrocitara in transportul CO_2

3.10.2. Proteinele G

Majoritatea mesagerilor chimici (hormoni si neurotransmitatori circulanti) nu pot patrunde in interiorul celulelor tinta desi induc o gama de modificari metabolice. Receptorii acestor semnale sunt proteine transmembranare care strapung bistratul lipidic prin sapte segmente de α -helix (Figura 85) . Semnalele primite de la acesti receptori sunt amplificate de o familie de proteine, numite proteine G. Majoritatea acestor proteine G sunt heterotrimeri, avind in structura lor trei subunitati : α (45 kd), β (35 kd) si γ (7 kd). Ele se numesc proteine G datorita capacitatii subunitatii α de a lega guanin nucleotide : GTP si GDP. Subunitatile α au si o slaba activitate GTP-azica, hidrolizind lent GTP la GDP si fosfat anorganic. In timp ce fosfatul difuzeaza, GDP ramine legat puternic la situsul guanin nucleotidic. Forma proteina G-GTP este activa, in timp ce forma proteina G-GDP este inactiva. Disocierea GDP din forma

inactiva a proteinei G are loc numai prin interschimbul GDP cu GTP, soldat cu activarea proteinei G.

Figura 85. Structura schematica a unui receptor cu sapte segmente de α -helix, transmembranare, ca in cazul receptorului muscarinic M 2



In Figura 86 prezentam activarea unei proteine G si implicarea acesteia din urma in transformarea mesajului unui hormon (epinefrina) intr-un raspuns metabolic in interiorul celulei.

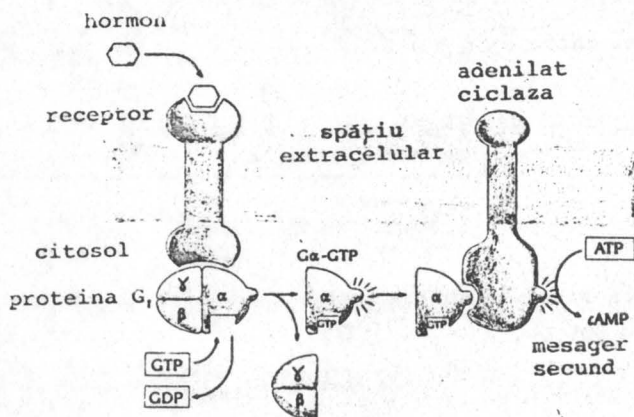
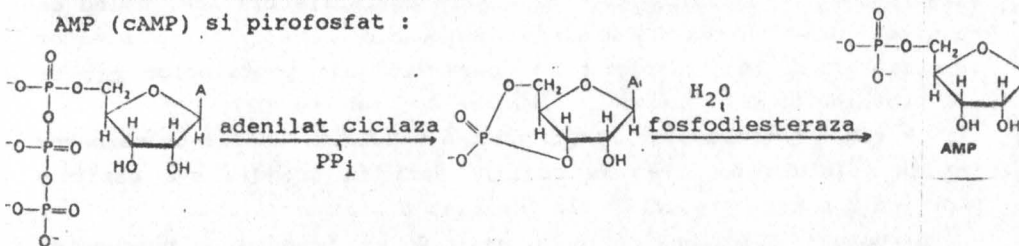


Figura 86. Activarea adenilat ciclazei , mediata de o proteina G in urma legarii unui hormon (epinefrina) la receptorul ei (adrenergic) de pe suprafata unei membrane plasmatic

Cind epinefrina (adrenalina) se leaga la receptorul ei adrenergic din membrana plasmatica, are loc o modificare conformationala a acestuia. Domeniul citoplasmatic al receptorului se leaga la proteina G inactiva, stimulind schimbul GDP-GTP si deci activarea acesteia. Subunitatea α a proteinei G, care are legat GTP,

disociaza din structura heterotrimeră și activează o enzimă membranară : adenilat ciclaza care hidrolizează ATP la 3',5'-ciclic AMP (cAMP) și pirofosfat :



cAMP este mesagerul secund al multor hormon, inducând o serie de efecte metabolice prin intermediul protein kinazei cAMP dependente. Această enzimă, numită și protein kinaza A catalizează fosforilarea unor resturi de serina din structura unor proteine tinta :



Fosforilarea poate conduce la inactivarea sau activarea proteinei tinta și deci a funcției ei biochimice.

cAMP poate fi hidrolizat de o fosfodiesterază la 5'-AMP, fără rol de mesager secund hormonal.

Cit timp hormonul rămâne legat la receptorul lui adrenergic, domeniul lui citoplasmatic permite producerea multor molecule de G_{α} -ATP. Fiecare moleculă activează mai multe molecule de adenilat ciclază. Fiecare moleculă de enzimă produce un număr mare de molecule de cAMP. Deci, o singură moleculă de hormon induce o cascadă de molecule de mesager secund. Activitatea G_{α} -azică a subunității G_{α} determină perioada de menținere a cascadei. După hidroliza GTP, GDP rămâne legat la subunitatea α , care se agregă în heterotrimer.

O comparație între secvența de aminoacizi a regiunii de legare a GTP din proteinele G cu alte proteine de legare a GTP, monomerice, cum sunt proteinele ras a arătat existența a trei regiuni mici cu secvențe conservate.

Oncogenele, izolate din tumorile omului, codifică proteinele ras p21 formate dintr-o singură catenă polipeptidică de 188 sau 189 resturi de aminoacizi și cu o structură primară similară. Diferența dintre protooncogenele ras (c-ras) din celulele normale

si oncogenele ras din celulele tumorale consta in modificarea unei singure baze nucleotidice la una dintre pozitiile critice, avind ca rezultat substituirea unui singur aminoacid . Majoritatea acestor substitutii au loc in regiunile conservate ale proteinelor ras si ale proteinelor G si anume in regiunea de legare a GTP.

In ciuda numeroaselor studii nu s-a stabilit functia proteinelor ras in celulele normale ale omului, desi in drojdie s-a gasit o proteina tip ras care activeaza adenilat ciclaza.

Structura tridimensionala a unei forme truate a produsului protooncogenei umane c-ras, complexate cu GTP este prezentata in Figura 87. Se observa o structura α/β comuna tuturor proteinelor de legare a nucleotidelor. Partea centrala are 6 segmente cu β -structura.

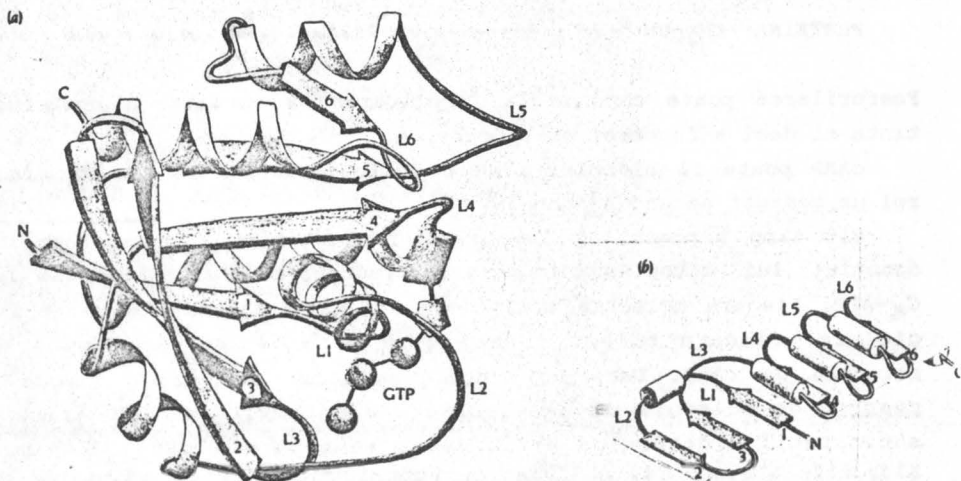


Figura 87. Structura tridimensională a proteinei c-ras 21 (a) si reprezentarea schematică (b)

pliata, dintre care 5 sunt paralele. Exista 5 segmente de α -helix pozitionate pe ambele laturi ale stratului cu β -structuri. GTP este legat intr-o cavitate de la capetele C-terminale ale segmentelor β . Regiunile loop L ce leaga segmentele cu β -structura si cu α -helix formeaza cavitatea de legare. Cinci din cele 6 regiuni loop (L1 - L6) formeaza situsul de legare al GTP. Trei din aceste regiuni loop : L1

(resturile 10-17), L3 (resturile 57-60) si L5 (116-119) contin regiuni cu structura primara conservata la toate proteinele mici de legare a GTP si la subunitatile ale proteinelor G mediate de receptori.

Intr-un numar mare de cazuri de diferite tumori ale omului, proteina ras p21 prezinta mutatii la nivelul aminoacizilor din pozitiile 12/13 sau 61. Aceste forme mutante prezinta modificari la nivelul afinitatii de legare a GDP/GTP si al activitatii GTP-azice in vitro. Sunt date experimentale care indica faptul ca activarea oncogenica este datorata mutatiilor din regiunile loop de legare a GTP.

Proteinele ras virale difera prin doua resturi de aminoacizi de proteina c-ras p 21 specificata de protooncogenul celular. Restul Gly-12 este inlocuit de un rest de Arg sau Ser, iar Ala-59 de un rest de Thr. Ultimul rest de aminoacid localizat in regiunea loop L3 se afla in apropierea gruparii γ -fosfat a GTP, ceea ce-i confera posibilitatea de a fi autofosforilat.

Forma activa a acestei proteine Ras are legat GTP, iar forma inactiva are in structura GDP. La activare, GDP este interschimbata cu GTP ca raspuns al unor semnale extracelulare, ca de exemplu legarea unor factori de crestere la membrana plasmatica. Proteinele ras, in forma lor activa stimuleaza fosforilarea in cascada a unor proteine, in interiorul celulei.

Activitatea proteinei ras este controlata de diferite proteine reglatoare. Astfel, proteina ras este inactivata de proteina de activare a GTP-azei (GAP) care se leaga la ras inducand hidroliza GTP legat. Proteina ras ramane in forma ei inactiva (cu GDP legat) pina intilneste o proteina de eliberare a guanin nucleotidului (GNRP) care induce eliberarea GDP. Situsul de legare al guanin nucleotidelor fiind acum liber este ocupat cu GTP, deci GNRP are o actiune indirecta de activare a proteinei ras. Receptorii cu activitate tirozin kinazica pot activa proteinele ras fie prin activarea lui GNRP fie prin inhibitia lui GAP.

3.10.3. Receptori membranari

Receptorii sunt proteine care leaga specific o molecula semnalizatoare , producind un raspuns metabolic intr-o celula tinta. De fapt exista receptori membranari cu o organizare modulara in membrana plasmatica si receptori nucleari, cu o structura diferita (receptorii steroizilor).

In aceasta sectiune, vom prezenta numai receptorii membranari care recunosc si leaga specific liganzi cum sunt factori de crestere, hormoni sau neurotransmitatori, complexul ligand-receptor transmitind semnale spre interiorul celulei soldate cu un raspuns specific. Aceste raspunsuri sunt in mod obisnuit cascade de reactii enzimactice ce au diferite efecte in interiorul celulei, inclusiv modificari in expresia genetica. Aparitia unor defecte la nivelul acestor sisteme receptor-semnalizare poate avea consecinte grave, cum ar fi pierderea controlului cresterii celulare, cauzata de produsi ai oncogenelor ce stimuleaza functia receptorilor sau a transmitatorilor lor de semnale.

Deoarece acesti receptori se gasesc in membrana plasmatica in concentratii foarte mici (mai putin de 0,01 % din masa totala a proteinelor dintr-o celula), purificarea lor este extrem de dificila. Clonarea genelor structurale a permis obtinerea unor cantitati suficiente de receptori pentru a fi caracterizati structural .

Studii recente au aratat ca multi receptori sunt inruditi structural si evolutionar, astfel ca ei pot fi grupati in citeva familii de receptori. Analiza structurii acestor familii de proteine a aratat existenta unui numar limitat de domenii diferite, care prin combinare au condus la receptori cu functii deosebite.

In general receptorii membranari pot fi clasificati in trei clase in functie de structura lor si de mecanismul de transmitere a semnalului.

1) Receptori legati de canale ionice, care sunt implicati in semnalizarea rapida sinaptica intre celule excitabile electric. Acest tip de semnalizare este mediat de un numar mic de neurotransmitatori care inchid si deschid tranzitoriu un canal ionic

format de proteina la care ei se leaga, modificind permeabilitatea membranei plasmatice pentru ioni si deci excitabilitatea celulei post-sinaptice. Acesti receptori sunt proteine care strabat membrana plasmatica de mai multe ori.

2) Receptori legati de proteinele G, care regleaza indirect activitatea unei alte proteine din membrana plasmatica, ce poate fi o enzima sau un canal ionic. Asa cum deja s-a aratat, interactia dintre acest tip de receptor si proteina tinta este mediata de o proteina G. Activarea proteinei tinta fie poate modifica concentratia unuia sau mai multor mediatori intracelulari (cind proteina tinta este o enzima), fie poate afecta permeabilitatea pentru ioni a membranei plasmatice (daca proteina tinta este un canal ionic). Mediatorii intracelulari actioneaza la rindul lor prin modificarea structurii si proprietatilor biologice a altor proteine din celula. Aceasti receptori constitie o superfamilie mare de proteine transmembranare omoloage care strabat membrana de sapte ori.

3. Receptori legati de enzime , care in stare activata fie functionaza direct ca enzime, fie sunt asociati cu acestea. Majoritatea acestor receptori sunt proteine transmembranare care strabat odata membrana plasmatica si au un domeniu de legare a ligandului pe fata exterioara a celulei si un domeniu catalitic pe fata interioara. Comparativ cu primele doua clase de receptori, reprezentantii acestei clase sunt structural heterogeni, fiind fie protein kinaze, fie sunt asociati la aceste enzime ce fosforileaza specific seturi de proteine din celula tinta.

In cele ce urmeaza ne vom concentra asupra ultimelor doua clase de receptori. Semnalele primite la suprafata celulei sunt dirijate spre nucleu unde ele afecteaza expresia genelor specifice si deci intregul comportament al celulei. Proteinele semnal intracelulare sunt fosforilate la activare si defosforilate la incetarea semnalului. Aceste proteine la rindul lor produc o cascada de fosforilari a altor componente proteice, prin intermediul serin/treonin kinazelor (care catalizeaza fosforilarea resturilor de serina si mai rar de treonina din proteina tinta) si a tirozin kinazelor (care fosforileaza resturi de tirozina). O celula a unui mamifer contine mai mult de 100 tipuri distincte din aceste protein

kinaze, majoritatea fiind Ser/Thr kinaze.

Receptorii legati de proteinele G.

Acestia reprezinta cea mai mare familie de receptori de pe suprafata celulelor, la mamifere numarind peste 100 de membri. Ei mediaza raspunsuri celulare la o mare diversitate de molecule semnalizator incluzind hormoni, neurotransmitatori si mediatori locali. Acelasi ligand poate activa mai multi membri ai acestei familii de receptori. Astfel, cel putin 9 receptori legati de proteine G sunt activati de epinefrina, cel putin 5 - de acetilcolina, cel putin 15 de serotonina, etc.

In ciuda diversitatii chimice si functionale a moleculelor semnal, receptorii legati de proteinele G, cunoscuti, au o structura similara si sunt inruditi evolutionar. Ei sunt constituiti dintr-o singura catena polipeptidica care strabate bistratul lipidic al membranei de sapte ori (v.Figura 85). Acesta este cazul rodopsinei, proteina activata de lumina din ochii vertebratelor si al receptorilor olfactivi din nas. Toti se leaga la proteinele G heterotrimere, care trebuiesc deosebite de proteinele de legare a GTP monomerice ce faciliteaza transmiterea intracelulara a semnalelor.

Receptorii legati de proteinele G heterotrimere activeaza un lant de evenimente celulare prin modificarea concentratiei unor mediatori intracelulari, numiti si mesageri secundari. Cei mai utilizati mesageri secundari sunt cAMP si ionii de Ca^{2+} ; modificarea concentratiilor lor stimulind cai distincte in majoritatea celulelor.

Un hormon catecolaminic (epinefrina sau norpinefrina) se leaga la un receptor β -adrenergic. Complexul hormon-receptor activeaza o proteina G stimulanta (G_s), care faciliteaza actiunea catalitica a adenilat ciclazei de producere a cAMP. Similar actioneaza hormonul stimulant al glandei tiroide, hormonul adrenocorticotrop, hormonul luteinizant, parathormonul, glucagonul si vasopresina.

Aceiasi molecula semnal poate creste sau scadea concentratia intracelulara de cAMP. Astfel, cind epinefrina se leaga la receptorii β -adrenergici- activeaza adenilat ciclaza, in timp ce in urma legarii la receptorii α_2 -adrenergici inhiba aceiasi enzima. Diferenta reflecta tipul de proteina G care cupleaza acest

receptor. In timp ce receptorii β -adrenergici sunt cuplati la adenilat ciclaza prin intermediul unei proteine G_s (stimulatoare), receptorii α_2 -adrenergici se leaga la o proteina G_i (inhibitoare). G_i contine acelasi complex $\beta\gamma$, dar are o subunitate α_i diferita de α_s .

cAMP este un activator al protein kinazei A, care catalizeaza fosforilarea unor resturi de serina sau treonina din proteine tinta. Substratele protein kinazei A difera in diverse tipuri de celule, ceea ce explica efectele variate ale cAMP. Aceasta enzima, in celulele musculare si in hepatocite activeaza prin fosforilare enzime implicate in catabolismul glicogenului si inhiba tot prin fosforilare enzime implicate in biosinteza acestui polizaharid. Deci hormonul initial, prin intermediul mesagerului sau secund are un efect hiperglicemiant, asigurand celula cu o cantitate maxima de glucoza.

In unele celule animale, o crestere in concentratia cAMP conduce la activarea transcriptiei unor gene specifice. In celulele ce secreta hormonul peptidic somatostatina, cAMP activeaza gena ce codifica acest hormon. Regiunea reglatoare a genei somatostatinei contine o scurta secventa de DNA numita cAMP response element (CRE) ce este gasita si in regiunea reglatoare a altor gene activate de cAMP. Aceasta secventa este recunoscuta de o proteina reglatoare numita CRE binding protein (CREB). Cind CREB este fosforilata de o protein kinaza A la un singur rest de serina, ea activeaza transcriptia acestor gene. In cazul unui mutant care afecteaza acest rest de serina, CREB este inactivat si concentratiile mari de cAMP nu mai stimuleaza transcriptia genei.

Efectul cAMP este temporar, celulele continind fosfoprotein fosfataze care hidrolizeaza legaturile fosfoesterice din proteinele tinta, actiune soldata cu stoparea functiei biologice indusa de fosforilare.

Concentratia ionilor de Ca^{2+} din citosolul unor celule este extrem de scazuta ($< 10^{-7}$ M), in timp ce concentratia in fluidul extracelular si in reticulul sarcoplasmatic este mai mare. Toate celulele eucariote contin in membrana plasmatica o Ca^{2+} -ATP-aza care pompeaza acesti ioni din citosol in reticul pe seama energiei ATP, contra gradientului de concentratie existent.

Cind celula este activata de un semnal extracelular, concentratia Ca^{2+} poate creste pina la circa 5×10^{-6} M. In celulele excitabile electric (celulele nervoase) cind membrana plasmatica este depolarizata de un potential de actiune ,ionii de Ca^{2+} intra intr-o terminatie nervoasa, prin canale de Ca^{2+} . In majoritatea celulelor eucariote, legarea unei molecule semnalizatoare extracelulare la receptori membranari produce eliberarea ionilor de Ca^{2+} din reticulul endoplasmatic. Evenimentele de la suprafata celulei sunt cuplate cu deschiderea canalelor de Ca^{2+} din reticulul endoplasmatic cu ajutorul unui alt mesager intracelular inozitol trifosfatul - un fosfolipid minor din membrana plasmatica. In acest caz, un receptor activat stimuleaza o proteina G heterotrimeră (G_q) care la rindul ei activeaza enzima fosfolipaza C- β ce catalizeaza reactia :



Ambele molecule formate au roluri importante in semnalizarea celulara.

Inozitol trifosfatul este o molecula mica, solubila in apa, care paraseste membrana plasmatica, difuzeaza rapid in citosol, se leaga la canalele de Ca^{2+} din sistemul membranar al reticulului endoplasmic inducind eliberarea de Ca^{2+} .

Diacilglicerolul poate interveni in doua cai de semnalizare. In cadrul primeia, este scindat restul de acid arahidonic din structura lui, acid care participa la sinteza eicosanoidelor. In cadrul celei de a doua cai, diacilglicerolul activeaza o protein kinaza C (Ca^{2+} - dependenta) care fosforileaza resturi de serina si treonina din proteine tinte (canale ionice din celulele nervoase carora le modifica excitabilitatea), induce o cascada de fosforilari a carui rezultat final este cresterea vitezei transcriptiei unor gene specifice prin activarea unor proteine reglatoare care se leaga la acestea, etc.

Calmodulina functioneaza ca un receptor intracelular al ionilor de Ca^{2+} mediind multe procese reglate de acesti ioni. Activarea calmodulinei cu Ca^{2+} este similara activarii protein kinazei A cu CAMP.

Majoritatea efectelor Ca^{2+} în celulă sunt mediate de reacții de fosforilare catalizate de Ca^{2+} /calmodulin protein kinaza (CaM kinaza) ce fosforilează resturi de serină și treonină din proteine țintă. Prima CaM kinază descoperită este kinaza catenei L a miozinei care prin funcția ei catalitică activează contractia musculaturii netede.

Proteinele G heterotrimerice nu acționează exclusiv prin reglarea activității enzimelor și prin modificarea concentrației cAMP sau Ca^{2+} din citosol. Sunt cazuri în care ele activează/inactivează direct canale ionice din membrana plasmatică a celulei țintă, modificându-i permeabilitatea pentru ioni și deci excitabilitatea. Acetilcolina eliberată de nervul vag, de exemplu, reduce atât viteza cât și forța contractiei inimii. Efectul este mediat de o clasă specială de receptori (muscarinici) ai acetilcolinei ce activează o proteină inhibitoare G_i . Subunitatea α a lui G_i inhibă adenilat ciclaza și acționează direct asupra canalelor de K^+ din membrana plasmatică a celulei musculare, deschizându-le, ceea ce contribuie la efectul inhibitor al acetilcolinei asupra cordului.

Alte proteine G heterotrimerice reglează activitatea canalelor ionice mai puțin direct. Astfel, canalele ionice ciclic nucleotid-dependente joacă un rol important în olfacție și vedere. La vertebrate, transformarea excitației luminoase în imagine pe retina este dependentă de canale ciclic-GMP dependente. c-GMP este sintetizat din GTP sub acțiunea guanilat ciclazei și hidrolizat la GMP de o ciclic GMP fosfodiesterază.

În Tabelul 16 prezentăm unii membri ai familiei proteinelor G.
Receptori de membrană legați la enzime

Asemenea receptorilor legați la proteinele G, cei legați la enzime sunt proteine transmembranare cu un domeniu de legare al ligandului pe suprafața externă a membranei plasmactice. În locul domeniului citosolic ce se asociază cu o proteină G, în cazul receptorilor de membrană legați la enzime - domeniul citosolic are o activitate enzimatică intrinsecă sau este asociat cu o enzimă. În timp ce un receptor legat la o proteină G are 7 segmente de α -helix transmembranare, în receptorii de membrană legați la enzime - subunitățile strabat membrana o singură dată.

Tabelul 16. Familii majore de proteine G heterotrimere

Familia	Membri	Subunitati	Funcții
I	G_s	α_s	activeaza adenilat ciclaza activeaza canale de Ca^{2+}
	G_{olf}	α_{olf}	activeaza adenilat ciclaza in neuronii olfactivi
II	G_i	α_i	inhiba adenilat ciclaza activeaza canalele de K^+
	G_o	α_o	activeaza canalele de K^+ inactiveaza canalele de Ca^{2+} activeaza fosfolipaza C- β
	G_t	α_t	activeaza cGMP fosfodiesteraza din fotoreceptorii celulelor bastonas de la vertebrate
III	G_q	α_q	activeaza fosfolipaza C- β

Exista cinci clase de receptori de membrana legati la enzime :

- 1) receptori guanidilat ciclaza care catalizeaza productia de cGMP in citosol ;
- 2) receptori tirozin kinaza care fosforileaza resturi specifice de tirozina dintr-un mic set de proteine semnal intracelulare ;
- 3) receptori asociati cu proteine care au o activitate tirozin kinazica;
- 4) receptori tirozin fosfataza care indeparteaza gruparile fosfat din resturile de fosfo-tirozina a unor proteine semnalizatoare intracelulare ;
- 5) receptori Ser/Thr kinaze care fosforileaza specific resturi de serina sau treonina din unele proteine intracelulare.

In continuare vom discuta structura si functia a trei receptori pentru factorul de crestere epidermal (EGFr), pentru factorul de crestere derivat din plachete (PDGFr) si pentru insulina (Ir).

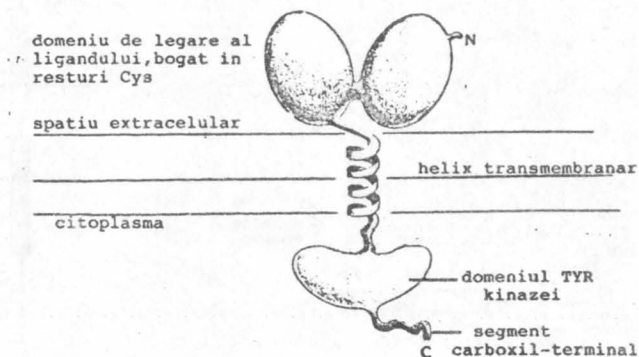
Acesti receptori membranari au in structura trei tipuri de domenii: extracelulare (glicozilate), transmembranare si intracelulare, avind o activitate tirozin kinazica, prin care este fosforilat un rest de tirozina dintr-o proteina tinta sau din

propria structura (autofosforilare) .

Controlul diviziunii celulare este esential pentru existenta organismelor multicelulare. In acest control sunt implicate proteine mici, numite factori de crestere. Astfel, EGF stimuleaza diviziunea celulelor epidermale, epiteliale si a celor din tesutul conjunctiv prin legarea la molecule receptor EGF specifice din membrana plasmatica a acestor celule. Exista dovezi ca molecula receptorului dimerizeaza la legarea EGF , dupa care transmite un semnal prin membrana plasmatica de la un domeniu extracelular de legare al factorului de crestere spre domeniul intracelular al receptorului. Domeniul citosolic, acum activat, este o enzima, cu actiune protein kinazica, ce catalizeaza fosforilarea resturilor de tirozina. Evenimentul primar este o autofosforilare a resturilor de tirozina din regiunea C-terminala a receptorului. Apoi, diferite molecule proteice din celula sunt fosforilate , avind ca efect activarea transcripției genelor specifice ce provoaca cresterea si diviziunea celulei.

Receptorul EGF are o catena polipeptidica de 1186 resturi de aminoacizi, ancorata in membrana printr-un helix transmembranar localizat in centrul catenei (Figura 88) . Acest helix consta din

Figura 88. Receptorul factorului de crestere epidermal



23 resturi, dintre care 22 sunt hidrofobi si unul singur polar (Thr). Partea extracelulara a moleculei, care leaga EGF, este formata din doua domenii omoloage, bogate in resturi de cisteina ce formeaza o retea de punți -S-S- ce stabilizeaza cele doua domenii si le face

rezistente la actiunea proteazelor. Domeniul Tyr kinazic are doua situsuri de legare pentru ATP si pentru proteina substrat care urmeaza a fi fosforilata. Segmentul C-terminal este situsul autofosforilarii.

O parte din receptorul EGF este aproape identic cu produsul oncogenei virale v-erb B, responsabil pentru capacitatea virusului eritroblastozei aviane de a induce eritroleucemia la puii de gaina si de a transforma eritroblastii si fibroblastii in vitro. Produsul genei v-erb B pierde majoritatea domeniului extracelular al receptorului EGF si o secventa de 34 aminoacizi de la capatul C-terminal care include unul din resturile de tirozina ce este autofosforilat. Ca o consecinta a acestor diferente, produsul genei v-erb B, odata inserat in membrana plasmatica a unei celule are o activitate tirozin kinazica constanta, diviziunea celulara este continua in urma infectiei cu virus.

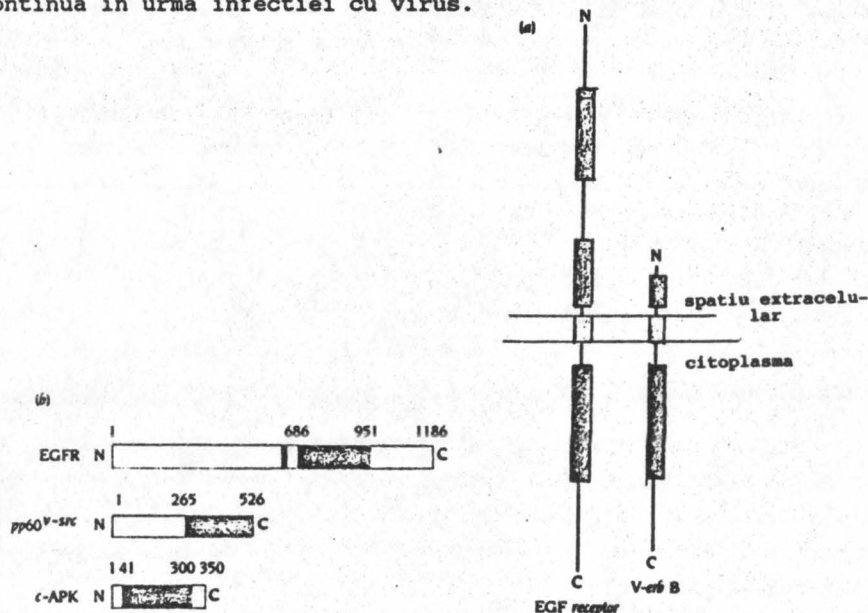


Figura 89. Aranjamentul produsului oncogenei v-erb B si a EGFr fata de membrana plasmatica (a); analogia structurala a EGFr, produsului genei de transformare a virusului sarcomului Rous (pp60^{v-src}) si a protein kinazei A (regiunea omoloaga este hasurata).

Exista date care indica faptul ca astfel de oncogene retrovirale au luat nastere din inserarea unor copii ale genelor celulei gazda in genomul viral. Mutatii in gena normala a celulei gazda din virus conduc la oncogene virale a caror produse proteice transforma celulele gazda normale in celule maligne ce sunt letale pentru organism.

Multe oncogene interfera cu activitatile tirozin kinazice, intracelulare , incluzind prima oncogena retrovirala descoperita, pp60^{v-src}, care este derivata dintr-o gena a unei tirozin kinaze celulare. Produsul acestei gene este o tirozin kinaza intracelulara care are o inalta omologie cu primii 260 resturi de aminoacizi din domeniile tirozin kinazice ale receptorilor factorului de crestere, Proteina codificata de gena virusului Rous sarcoma, numita pp60^{v-src} are o regiune omoloaga ca secventa de aminoacizi cu domeniul tirozin kinazic (resturile 686-951) al receptorului EGF si cu resturile 41-300 al subunitatii catalitice a serin protein kinazei cAMP dependente din muschiul cardiac.

Transmiterea semnalului prin fosforilarea unei protein kinaze, exemplificata in cazul receptorului EGF este o trasatura comuna si a receptorilor altor factori de crestere polipeptidici. Acesta este exemplul factorului de crestere like insulina, IGF-1. Acest factor de crestere are o secventa de aminoacizi omoloaga cu cea a insulinei, mai mult receptorul IGF-1 are o secventa omoloaga cu receptorul insulinei. Moleculele lor receptor, inrudite structural, mediaza raspunsuri complet diferite ale celulelor la IGF si insulina.

Insulina se leaga ferm la receptori de pe membrana plasmatica a celulelor tinta (adipocite, hepatocite), complexul hormon -receptor avind o constanta de disociere de 0,1 nM. Afinitatea inalta a receptorului pentru insulina este esentiala, deoarece acest hormon se gaseste in sange intr-o concentratie scazuta, de circa 0,1 nM. Pe suprafata adipocitelor exista o molecula de receptor pentru insulina la fiecare 1 μm^2 .

Purificarea receptorului este extrem de dificila datorita concentratiei lui scazute. De exemplu din 200 sobolani se pot separa 500 g ficat, din care se purifica 1 mg receptor. Dupa solubilizare cu detergenti neionici, receptorul insulinei a fost purificat prin cromatografie de afinitate pe o coloana cu insulina

imobilizata.

Receptorul insulinei este o glicoproteina integrata in membrana, formata din 2 catene α (135 KD) si 2 catene β (95 KD) unite prin 3 puncti disulfurice. Catenele α sunt positionate pe partea extracelulara, in timp ce catenele β strapung membrana. Fiecare dimer $\alpha\beta$ al receptorului insulinei provine dintr-un precursor monocatenar de 1382 resturi, care are structura :

NH₂- secventa-secventa -Arg-Lys-Arg-Arg- secventa -COOH

semnal subunitatii α

subunitatii β

In cadrul procesarii post-translationala a acestui precursor, este scindata initial peptida semnal, apoi cele doua subunitati α si β .

Receptorul insulinei are o activitate tirozin kinazica asupra resturilor de tirozina din multiple proteine tinta. Activitatea catalitica este initiata prin legarea insulinei la un situs specific, care se gaseste pe catenele α , in partea exterioara a receptorului, caracterizat printr-un procent mare de resturi de cisteina. Situsul enzimatic se afla pe partea citosolica, pe catenele β . Receptorul insulinei are capacitatea de a se autofosforila, catalizind fosforilarea a doua resturi proprii de tirozina de pe catena β . Autofosforilarea creste capacitatea enzimatica de fosforilare a altor proteine tinta si permite receptorului sa actioneze chiar cind insulina a disociat de pe el.

Receptorul IGF-1 (IGFr) are o structura similara Ir ambele fiind molecule tetramerice formate din doua copii ale doua catene diferite : α si β , unite prin puncti -S-S-. Moleculele IGFr si Ir sunt organizate diferit de receptorul EGF (EGFr) care este monomeric, desi exista omologii in secventele de aminoacizi pe parcursul catenelor lor polipeptidice.

Catena β a Ir si IGFr contine un domeniu citosolic tirozin kinazic, un helix transmembrantar si o regiune scurta extracelulara cu o punte -S-S- cu catena α . Domeniul tirozin kinazic al catenei β are o mare omologie cu domeniul corespunzator al EGFr. Catenele α ale celor doi receptori care leaga insulina si respectiv IGF-1 contin un domeniu bogat in resturi de cisteina cu un aranjament al acestora de-a lungul catenei polipeptidice similar cu fiecare din cele doua domenii extracelulare ale receptorului EGF. Nu exista aproape nicio omologie de secventa intre aceste domenii ale Ir si

ale EGFr fiind necesare un numar de insertii si deletii pentru a alinia resturile de cisteina. Cu toate acestea, pozitiile resturilor de cisteina sunt similare si probabil reflecta un mod comun de pliere a domeniilor. Aceasta reflecta existenta unei relatii evolutionare intre catena β a Ir ,a IGFr si domeniul citosolic tirozin kinazic al EGFr. Mai mult, catena α a Ir si IGFr si cele doua domenii extracelulare a EGFr sunt inrudite evolutionar.

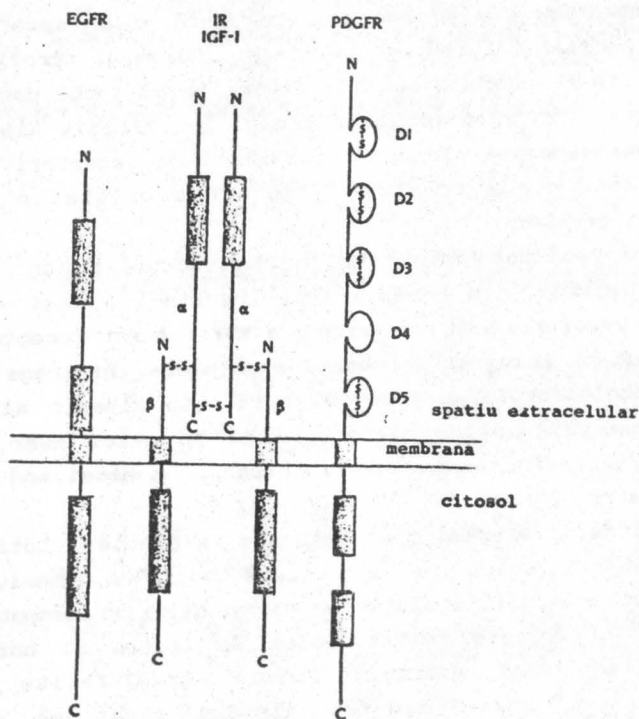


Figura 90. Comparatie intre organizarea domeniilor din structura receptorilor EGF, IGF-1, insulinei si PDGF.

Receptorii EGF si insulinei reprezinta doua subclase ale familiei de receptori tirozin kinazici. Receptorul factorului de crestere derivat din plachete (PDGFr) este un membru al unei a treia

subclase a acestei familii. O singura catena polipeptidica este organizata intr-un segment N-terminal, un helix transmembranar si un domeniul tirozin kinazic citosolic. Segmentul N- terminal, de legare a ligandului este total diferit de domeniile bogate in cisteina a celorlalte doua subclase. El contine aproximativ 500 aminoacizi si este organizat in 5 domenii, fiecare avind circa 20 % omologie cu domeniile imunoglobulinelor. Patru din aceste domenii ale PDGFr au o punte -S-S- interna, caracteristica si domeniilor imunoglobulinelor. Un domeniu receptor, D4, pierde aceasta punte -S-S- spre deosebire de membrii superfamiliei imunoglobulinelor. Domeniul tirozin kinazic al PDGFr contine o inserare de 100 resturi in mijlocul catenei, dar regiunile care ramin sunt omoloage domeniilor tirozin kinazice ale celorlalte doua subclase ale acestei familii de receptori. In timpul evolutiei moleculare a acestor receptori a existat o etapa de reamestecare a genelor.

ULLRICH a realizat prin tehnica DNA recombinat un receptor himeric. Subunitatea α a receptorului insulinei a fost sudata cu portiuni transmembranare si citosolice a EGFr. Acest receptor hibrid a fost exprimat si integrat in membrana celulara. El leaga insulina soldata cu autofosforilarea domeniului tirozin kinazic al EGFr si cu fosforilarea proteinelor citosolice ca in cazul EGFr activat. Acest receptor himeric raspunde la insulina in acelasi mod cum EGFr intact raspunde la EGF.

Deci in ciuda diferentelor structurale existente, toti membrii familiei receptor a factorilor de crestere contin un domeniu tirozin kinazic citosolic-inrudit evolutionar si un helix transmembranar ce este conectat la domeniul extracelular de legare al hormonului. Diverse subclase ale acestei familii au diferite domenii extracelulare. Cu toate acestea ele au mecanisme similare de transmitere a semnalului prin membrana prin fosforilarea unor proteine tinta conducind la activarea expresiei genetice.

BIBLIOGRAFIE

1. C.BRANDEN, J.TOOZE, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, Inc, New York and London, 1991
2. B.ALBERTS, D.BRAY, J.LEWIS, M.RAFF, K.ROBERTS, J.D.WATSON, Molecular Biology of the Cell, Third Edition, Garland Publishing, Inc, New York and London, 1994
3. D.VOET, J.G.VOET, Biochemistry, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1990
4. L.STRYER, Biochemistry, Third Edition, W.H.Freeman and Company, New York, 1988
5. A.L.LEHNINGER, Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers Inc, 1975

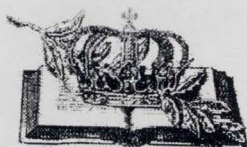


Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 134/1994
la Tipografia Editurii Universității București

DATA RESTITUIRII

09 FEB. 2003		
20 AUG. 2003		
6 NOV. 2004		
15 IAN. 2005		
2 MAI. 2005		
28 SEP. 2007		
18 IUN. 2014		
23 IUN. 2014		

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA „CAROL I”



DE CORPUS ET ANIMA

ISBN 973-9160-89-4

Lei 3120