

Macromoleculele biologice. Structură, morfologie și informație.

2

Astăzi există informații detaliate despre moleculele esențiale ale celulei. În unele cazuri se cunoaște precis structura lor chimică precum și modul în care se sintetizează sau se descompun. Se cunosc termenii generali cu privire la modul în care energia chimică pune în mișcare reacțiile biosintetice ale celulei, cum operează principiile termodinamicii în celulă pentru a crea ordine moleculară, precum și modul în care sunt controlate și coordonate nenumăratele modificări chimice care au loc tot timpul în celule.

Deosebirea dintre moleculele mici ale celulei (aminoacizii, nucleotidele, monozaharidele și lipidele) și moleculele gigantice, nu constă doar în mărime. Atât proteinele, cât și acizii nucleici și polizaharidele, sunt formate dintr-un repertoriu limitat de aminoacizi, nucleotide și respectiv, de monozaharide. Ele au o proprietate unică și cu totul deosebită: se deosebesc foarte mult de precursorii din care sunt constituite. Macromoleculele biologice sunt formate din mai multe mii, uneori milioane de atomi legați între ei și aflați în aranjamente spațiale precis definite. Fiecare din aceste macromolecule conțin o informație precisă. În structura lor se află încorporate mesaje biologice care pot fi "citite" ca urmare a interacțiunii cu alte molecule, ceea ce asigură și îndeplinirea unei funcții precise.

În acest capitol vom examina structura macromoleculelor, cu referire specială la proteine și acizi nucleici, principalele biomolecule informaționale, și vom explica cum s-au adaptat ele în cursul evoluției pentru a-și îndeplini funcțiile specifice. Vom parcurge principiile după care aceste molecule catalizează transformările chimice, cum contribuie la construcția structurilor multimoleculare complexe, cum generează mișcare și, aspectul cel mai important, cum înmagazinează informația ereditară.

Structura biomoleculor informaționale

Aminoacizii - subunități ale proteinelor

Aminoacizii comuni sunt variați din punct de vedere chimic deși toți conțin o grupare carboxil și o grupare amino legate la un singur atom de carbon (numit carbon α ; Figura 2-1). Ei reprezintă subunitățile **proteinelor** care sunt astfel, polimeri liniari lungi de aminoacizi legați "cap la coadă" prin *legături peptidice* dintre gruparea carboxil a unui aminoacid și gruparea amino a următorului (Figura 2-2). Deși există un număr mare de tipuri posibile de aminoacizi, în proteine există doar 20 de tipuri care diferă între ei prin radicalul atașat la atomul de carbon α . Toate proteinele, indiferent dacă provin de la bacterii, plante sau animale, sunt formate numai și numai din cele 20 de tipuri de aminoacizi. Deși se presupune că acești 20 de aminoacizi au fost reținuți în evoluție în mod întâmplător, proprietățile lor chimice foarte diferite sunt extraordinar de importante. De exemplu, 5 din cei 20 de aminoacizi au radicali cu sarcină electrică (Figura 2-3), iar ceilalți nu posedă o sarcină electrică dar prezintă reactivități specifice. Cum vom vedea în continuare, proprietățile radicalilor aminoacizilor determină proprietățile proteinelor pe care le formează precum și diversele și sofisticatele funcții ale acestora.

Nucleotidele - subunități ale ADN și ARN

În nucleotide, la un zaharid format din cinci atomi de carbon (*riboza* sau *dezoxiriboza*) care poartă și un radical fosfat, se leagă la un compus ciclic ce conține azot (denumit în mod obișnuit *bază azotată* deoarece se poate combina cu H^+ în soluții acide). Bazele azotate prezente în nucleotide sunt de două tipuri. *Citozina* (C), *timina* (T), și *uracilul* (U) sunt compuși *pirimidinici* pentru că ei sunt derivați simpli ai ciclului pirimidinic; *guanina* (G) și *adenina* (A) sunt compuși *purinici* la care sunt fuzionați

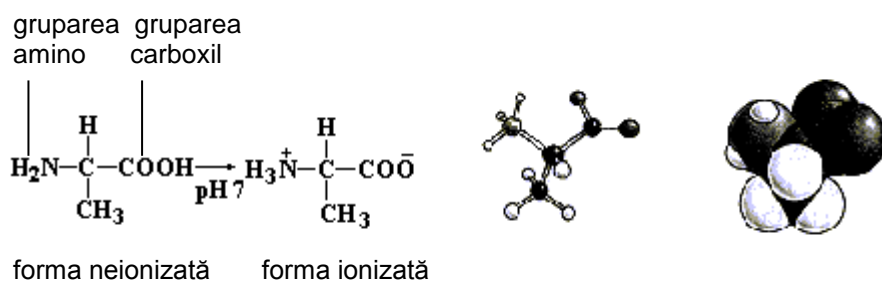


Figura 2-1 Aminoacidul alanina.

În celulă, unde pH-ul este apropiat de 7, un aminoacid liber există în formă ionizată; totuși, când este încorporat într-un lanț polipeptidic, sarcina grupării amino și carboxil dispăre. Modelele spațiale sunt prezentate în dreapta formulelor structurale. Pentru alanină, radicalul este gruparea $\bullet\text{CH}_3$.

doi compuși ciclici formați din șase atomi. Fiecare nucleotid este denumit în funcție de baza azotată unică pe care o conține.

Nucleotidele pot îndeplini funcția de purtători de energie chimică. Astfel, esterul trifosforic al adeninei, **ATP** (Figura 2-4), mai mult decât oricare alt compus, participă la transferul energiei în sute de reacții celulare. Gruparea fosfat terminală îi este adăugată prin folosirea energiei provenite din oxidarea substanțelor nutritive și, aceeași grupare fosfat, poate fi apoi ruptă ușor prin hidroliză, pentru a elibera energia ce pune în mișcare reacțiile biochimice nefavorabile energetic. După cum vom arăta mai jos, alți derivați direcți ai nucleotidelor servesc ca vectori pentru transferul de la o moleculă la alta a unor grupări chimice particulare, cum ar fi atomii de hidrogen sau unii radicali glucidici. Un derivat al adeninei ce conține fosfat ciclic, *AMP ciclic*, are rolul de moleculă universală de semnalizare între celule.

Semnificația specială a nucleotidelor constă însă în capacitatea lor de a stoca informație biologică. Ele reprezintă subunitățile din care se sintetizează **acizii nucleici**, polimeri lungi în care subunitățile nucleotidice sunt legate covalent prin formarea esterilor fosfat dintre

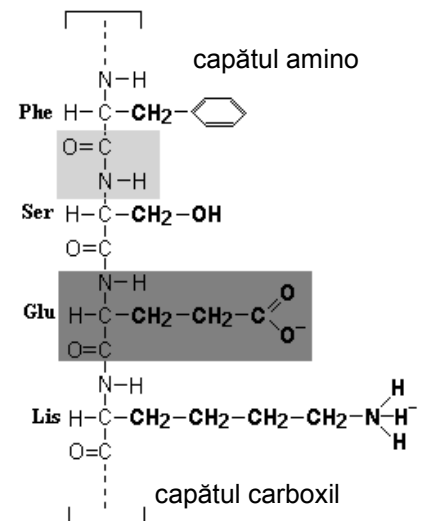


Figura 2-2 O mică porțiune a unei molecule proteice formată din patru aminoacizi.

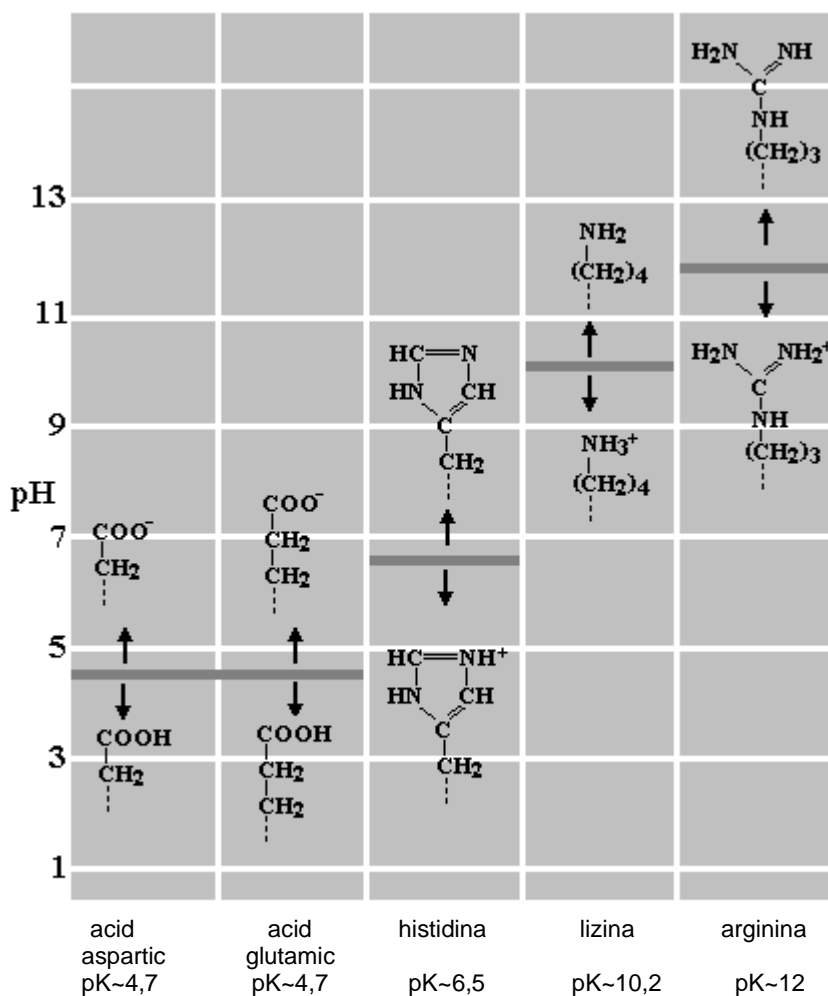


Figura 2-3 Sarcina radicalilor aminoacizilor depinde de pH. Acizii carboxilici pierd ușor H⁺ în soluție apoasă formând ioni negativi, care sunt denumiți cu sufixul "at", de exemplu, aspartat sau glutamat. O situație comparabilă există pentru amine, care în soluție apoasă leagă un H⁺ pentru a forma un ion pozitiv (care nu are un nume special). Aceste reacții sunt rapid reversibile, iar cantitatea celor două forme, cu sarcină și lipsite de sarcină, depinde de pH-ul soluției. La pH ridicat radicalul carboxil are tendința de a avea sarcină, iar amina, nu. La pH scăzut apare situația inversă. Valoarea de pH la care exact jumătate de radicalii carboxil sau amino au sarcină, se numește pK al acestor radicali. În celule pH-ul este apropiat de 7, astfel că majoritatea radicalilor carboxil și amino se află în forma lor încărcată electric.

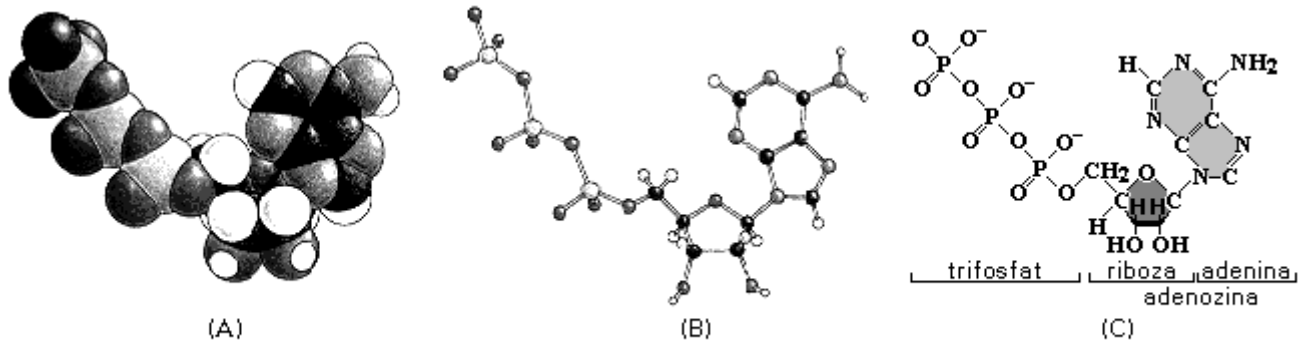


Figura 2-4 Structura chimică a adenozin trifosfatului (ATP). (A) și (B) reprezintă modelul spațial, iar (C) formula structurală.

gruparea 3'-hidroxil a pentozei unui nucleotid și gruparea 5'-fosfat a următorului nucleotid (Figura 2-5). Există două tipuri de acizi nucleici care diferă prin tipul de pentoză care formează lanțul polimeric. Acizii care conțin *riboză* se numesc **acizi ribonucleici**, sau **ARN**, și conțin bazele azotate A, U, G și C, iar cei care conțin *dezoxiriboză* (în care hidroxilul din poziția 2' a ribozei este înlocuit cu un hidrogen), se numesc **acizi dezoxiribonucleici**, sau **ADN**, și conțin bazele A, T, G și C. Secvența bazelor din ADN și ARN reprezintă informația genetică a celulelor vii. Capacitatea bazelor din diferite molecule de acizi nucleici de a se recunoaște între ele prin interacțiuni necovalente (numite **împerecheri de baze**) – G cu C și A cu T (în ADN) sau cu U (în ARN), determină toată ereditatea și evoluția.

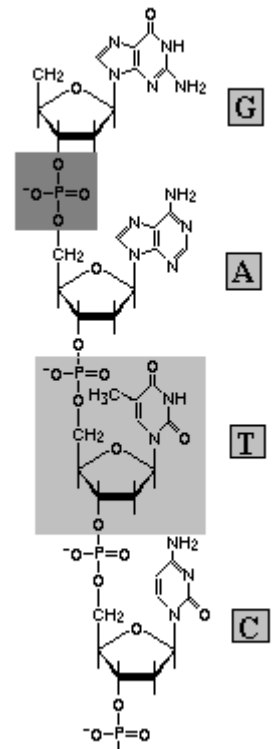


Figura 2-5 Un segment de ADN format din patru nucleotide.

Procesele de recunoaștere moleculară

Macromoleculele au o greutate moleculară cuprinsă în general între 10.000 și 1 milion, iar ca mărime se situează între moleculele organice dicutate mai sus și agregatele macromoleculare mari și organitele celulare (Figura 2-6). O moleculă mică, cum este apa, constituie 70% din masa totală a celulei, iar restul de masă este formată din macromolecule (Tabelul 2-1). O macromoleculă se assemblează din subunități cu greutate moleculară mică ce se adaugă în mod repetat la unul din capete pentru a forma un lanț lung polimeric. Pentru formarea unui lanț se folosește de obicei doar o familie de subunități: aminoacizii în cazul proteinelor, nucleotidele în cazul acizilor nucleici și monozaharidele în cazul polizaharidelor. Deoarece secvența precisă a secvențelor este crucială pentru determinarea funcțiilor macromoleculii, biosinteza sa necesită existența unor mecanisme care să asigure încorporarea fiecărei subunități într-o poziție precisă în polimer.

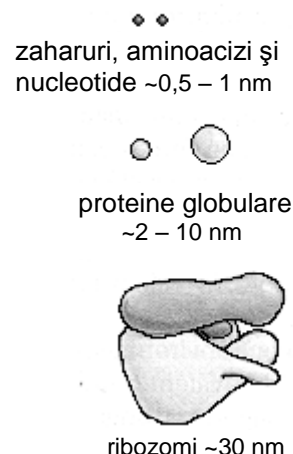


Figura 2-6
Mărimea moleculelor proteice prezentată comparativ cu alte componente celulare.

Tabel 2-1 Compoziția chimică aproximativă a unei bacterii și a unei celule tipice de mamifere

Componenta	Procentul din greutatea totală	
	E. Coli Bacterie	Celulă de mamifere
H ₂ O	70	70
Ioni anorganici (Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ etc.	1	1
Diferiți metaboliți mici	3	3
Proteine	15	18
ARN	6	1,1
ADN	1	0,25
Fosfolipide	2	3
Alte lipide	-	2
Polizaharide	2	2
Volumul celular total	2 x 10 ⁻¹² cm ³	4 x 10 ⁻⁹ cm ³
Volumul celular relativ	1	2000

Proteinele, polizaharidele, ADN și ARN sunt macromolecule. Lipidele, în general nu sunt considerate macromolecule deși posedă unele caracteristici ale acestora; de exemplu, unele se sintetizează ca polimeri formați din molecule mici (gruparea acetil a acetil CoA) sau se assemblează în structuri mari (membrane). De notat că apa și proteinele reprezintă cea mai importantă masă atât a celulei bacteriene, cât și a celulei eucariote.

Rolul legăturilor chimice slabe, necovalente, pentru stabilirea interacțiunilor specifice ale unei macromolecule

Un lanț macromolecular conține legături *covalente* puternice care au rolul de a prezerva secvența subunităților sale pentru perioade lungi de timp. Deși secvența subunităților determină conținutul de informație al unei macromolecule, utilizarea acestei informații depinde în general de legături chimice mult mai slabe, *necovalente*. Aceste legături slabe se formează între diferitele regiuni ale aceleiași macromolecule sau între macromolecule diferite. Ele joacă un rol major în determinarea atât a structurii tridimensionale a lanțurilor macromoleculare, cât și a modului de interacțiune a acestor structuri.

Legăturile necovalente existente la moleculele biologice sunt clasificate în trei tipuri: **legături ionice**, **legături de hidrogen**, și **atracții van der Waals**. O altă importantă forță slabă este creată de structura tridimensională a apei care determină ca grupările hidrofobe să se grupeze împreună pentru a micșora efectul lor de rupere a rețelei de legături de hidrogen dintre moleculele de apă.

Într-un mediu apos, fiecare legătură necovalentă este de la 30 până la 300 de ori mai slabă decât o legătură covalentă tipică moleculelor biologice (Tabel 2-2) și doar cu puțin mai puternică decât energia de coliziune termică la 37°C (Figura 2-7). O singură legătură

Tabel 2-2 Legăturile chimice covalente și necovalente

Tipul legăturii	Lungime (nm)	Energie (kcal/mol)*	
		În vid	În apă
Covalentă	0,15	90	90
Ionică	0,25	80	3
De Hidrogen	0,30	4	1
Atracții van der Waals (per atom)	0,35	0,1	0,1

*Energia unei legături poate fi măsurată prin energia necesară pentru a o rupe, reprezentată aici în kilocalorii per mol (kcal/mol). (O kilocalorie este cantitatea de energie necesară pentru a crește temperatura a 1000 g de apă cu 1°C. O altă unitate de măsură folosită uneori este kilojoul, kJ, egal cu 0,24 kcal). Energia legăturilor individuale variază mult, ea depinzând de atomii implicați și de mediu, de aceea, valorile prezentate mai sus sunt doar orientative. De notat că mediul apos dintr-o celulă slăbește foarte mult legăturile ionice și de hidrogen dintre molecule altele decât apa. Lungimea legăturii este distanța dintre centrele celor doi atomi aflați în interacțiune; lungimea prezentată aici pentru legătura de hidrogen este aceea dintre doi atomi alții decât hidrogenul.

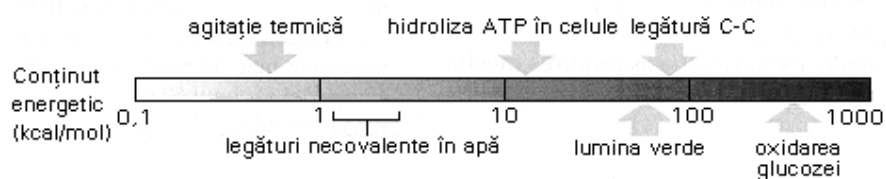
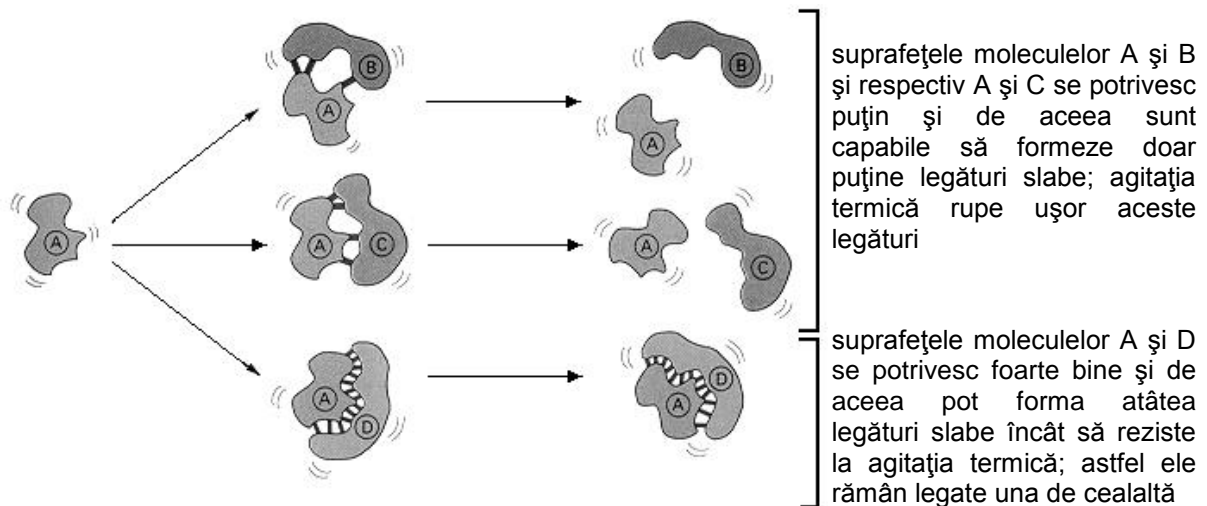


Figura 2-7 Energia unor evenimente moleculare importante din celulă. Energia este reprezentată pe scală logaritmică.



necovalentă – spre deosebire de legătura covalentă – este deci prea slabă pentru a rezista mișcării termice care tinde să despartă moleculele. Pentru legarea a două suprafețe moleculare este necesar un număr mare de legături necovalente, acestea putându-se forma între două suprafețe numai dacă un număr mare de atomi sunt suficient de apropiați unul de celălalt (Figura 2-8). Există deci condiții stricte pentru realizarea specificității proceselor de recunoaștere biologică cum este de exemplu, interacțiunea dintre o enzimă și substratul ei.

Dacă un atom este imaginat ca o sferă cu o rază definită (raza van der Waals), doi atomi nu pot depăși anumite limite ale valorii unghiului format de o legătură într-un lanț polipeptidic (Figura 2-9). Aceasta, precum și alte interacțiuni sterice limitează sever numărul posibil de aranjamente tridimensionale ale atomilor (sau **conformația**). Totuși, un lanț lung și flexibil, cum este o proteină, se poate împacheta într-un număr enorm de conformații. Fiecare conformație posedă un set diferit de interacțiuni slabe în cadrul lanțului, iar puterea totală a acestor interacțiuni determină care conformație să fie stabilă.

Majoritatea proteinelor din celule au doar o singură modalitate de împachetare stabilă: pe parcursul evoluției a fost selectată secvența subunităților de aminoacizi care fac ca o anumită conformație să posede cele mai multe interacțiuni favorabile în interiorul lanțului față de oricare alta.

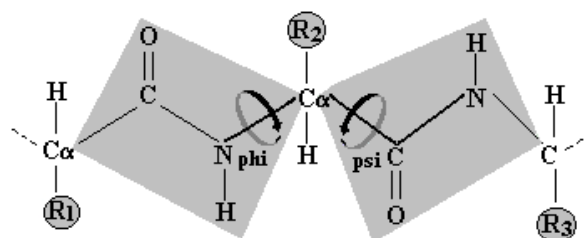


Figura 2-8

Legăturile necovalente. Modul în care legăturile slabe mediază recunoașterea dintre molecule.

Figura 2-9 Limitele sterice în cazul unghiurilor de legătură dintr-un lanț polipeptidic.

Fiecare aminoacid contribuie cu trei legături în lanțul polipeptidic. Legătura peptidică este plană și nu poate permite rotația. Totuși, rotația poate avea loc în cazul legăturii Cα-C al cărei unghi de rotație este numit unghi psi (ψ) și la nivelul legăturii N-Cα al cărei unghi de rotație se numește unghiul phi (ϕ). Gruparea R semnifică radicalul unui aminoacid.

aminoacizi

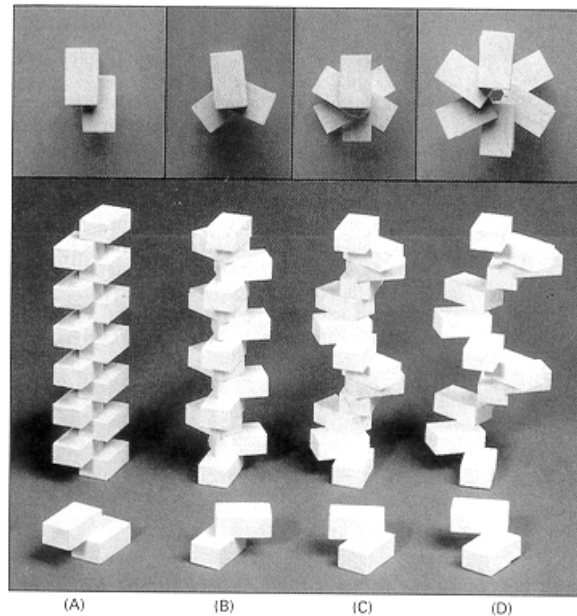


Figura 2-10 Un helix se formează atunci când subunitățile se leagă una la cealaltă într-un mod regulat. În partea de jos este prezentată legarea dintre două subunități; deasupra fiecăreia sunt helixurile care rezultă. Aceste helixuri au două (A), trei (B) și șase (C și D) subunități pe tură. Sus este prezentat aranjamentul subunităților dacă privim dinspre partea de deasupra helixului. De notat că helixul (D) este același cu (C), doar că este mai puțin împachetat.

Helixul - motiv structural comun în structurile biologice formate din subunități repetitive

Structurile biologice sunt deseori formate prin legarea într-un lanț lung, repetitiv a unor subunități foarte asemănătoare (cum sunt aminoacizii sau nucleotidele). Dacă toate subunitățile sunt identice, cele care sunt învecinate în lanț se dispun una față de alta într-o singură poziție, ajustându-se în așa fel încât energia liberă care asigură contactul dintre ele să fie minimă. În acest caz, fiecare subunitate se poziționează în exact aceeași poziție în relație cu subunitatea vecină. Astfel subunitatea 3 este poziționată față de subunitatea 2, la fel cum subunitatea 2 se află față de subunitatea 1 și așa mai departe. Deoarece este foarte rară posibilitatea ca subunitățile să fie poziționate în linie dreaptă, un asemenea aranjament generează de obicei o spirală (**helix**) (Figura 2-10). În funcție de direcția de desfășurare a spiralei, un helix poate fi orientat spre dreapta sau spre stânga (Figura 2-11). Această orientare nu afectează "pasul" spiralei, ci este doar reversată, ca imaginile într-o oglindă.

Conformațiile helicale sunt foarte frecvente în structurile biologice la care subunitățile sunt molecule mici legate covalent între ele (cum este molecula de ADN) sau la care moleculele proteice sunt legate prin forțe necovalente (filamentele de actină). Acest lucru nu este surprinzător. Un helix este o structură obișnuită generată prin simpla poziționare similară a subunităților una față de alta, fiecare în aceeași relație, strict repetată, față de vecina ei.



Figura 2-11 Comparare dintre un helix orientat spre dreapta și unul orientat spre stânga. Ca referință se consideră că orientarea standard spre dreapta este în sensul acelor de ceasornic.

Rolul difuziunii libere ca primă etapă în procesul recunoașterii moleculare

Înainte ca două molecule să se lege una de cealaltă, ele trebuie să vină într-un contact strâns. Acest lucru este asigurat de agitația termică ce determină mișcarea moleculelor, proces numit *difuziune*. Într-un lichid moleculele intră în coliziune și se resping continuu, generând o "mișcare la întâmplare" (Figura 2-12). Distanța medie la care fiecare moleculă se mișcă pornind de la un punct start, este proporțională cu pătratul timpului. Aceasta înseamnă că, dacă considerăm o moleculă care într-o secundă se mișcă pe o distanță de 1 μm , în 4 secunde ea se va deplasa cu 2 μm , în 100 de secunde cu 10 μm și așa mai departe. De aceea, difuziunea este o modalitate eficientă pentru mișcarea moleculelor pe distanțe limitate și ineficientă pentru ca ele să se deplaseze pe distanțe mari.

Experimentele efectuate prin injectarea în celule a unor coloranți fluorescenți sau a altor molecule marcate, au arătat că difuziunea moleculelor mici prin citoplasmă este aproape la fel de rapidă ca și prin apă. De exemplu, o moleculă de mărimea ATP, necesită aproximativ 0,2 secunde pentru a difuza pe o distanță de 10 μm – diametrul aproximativ al unei celule animale mici. Macromoleculele mari difuzează însă mult mai încet. Mișcarea lor este încetinită mai ales de frecvențele coliziuni cu alte macromolecule aflate în citoplasmă (Figura 2-13).

Apropierea și respingerea moleculelor datorată agitației termice

Ciocnirile dintre două macromolecule sau dintre o macromoleculă și o moleculă mică, se produc întâmplător datorită difuziunii. O ciocnire poate determina imediat formarea unui complex dintre cele două molecule, caz în care se spune că viteza de formare a complexului este *limitată de difuzie*. Pe de altă parte, viteza de formare a complexului poate fi încetinită pentru că ea necesită unele ajustări ale structurii uneia sau a ambelor molecule, înainte ca suprafețele de interacție să vină în contact. Astfel, cel mai frecvent, două molecule în coliziune sunt respinse fără a se asocia. În alte situații, dacă suprafețele de interacție se apropie suficient de mult, ele pot forma multiple legături slabe care rezistă agitației termice până ce, din cauza acesteia, cele două molecule se disociază din nou (vezi Figura 2-8).

În general, cu cât este mai puternică legarea moleculelor în complex, cu atât scade viteza lor de disociere. La una din extreme este cazul în care energia totală a legăturilor formate este mai mică decât cea a agitației termice și cele două molecule se disociază la fel de rapid cum au intrat în interacțiune. La cealaltă extremă se află cazul în care energia totală a legăturilor este atât de mare încât disocierea se produce foarte rar. Interacțiunile puternice apar în celule atunci când funcțiile biologice cer



Figura 2-12 Mișcarea la întâmplare (difuziunea liberă). Moleculele aflate în soluție se mișcă în mod întâmplător, fiind tot timpul respinse de ciocnirile cu alte molecule. Această mișcare face ca moleculele să difuzeze dintr-o parte în alta a celulei într-un timp surprinzător de scurt: asemenea molecule pot, în general să străbată o celulă animală tipică în mai puțin de o secundă.

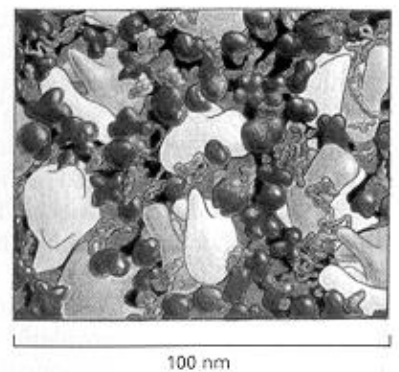


Figura 2-13 Macromolecule în citoplasma celulară. Desenul este în general raportat la scală și reprezintă aproximativ, "aglomerația" din citoplasmă.

ca cele două molecule să rămână strâns asociate mult timp – de exemplu, când o proteină reglatoare a unei gene se leagă la ADN pentru a debloca gena. Interacțiunile slabe apar când structura complexului trebuie să se schimbe rapid – de exemplu, când două proteine în interacțiune trebuie să își schimbe partenerul pe parcursul unei mișcări.

Gradul de interacțiune dintre două molecule măsurat prin constanta de echilibru

Cunoașterea precisă a intensității legăturilor dintre două molecule, oferă un indiciu util pentru aprecierea specificității interacțiunii dintre ele. Pentru a ilustra cum se măsoară intensitatea de legătură, să considerăm reacția dintre molecula A care se leagă de molecula B. Reacția se declanșează doar atunci când atinge *punctul de echilibru*, la care viteza de formare și, respectiv, cea de disociere, sunt egale (Figura 2-14). Concentrația lui A, B și a complexului AB, în acest moment, pot fi utilizate pentru a determina **constantă de echilibru (K)** a reacției, după cum este explicat în Figura 2-14. Uneori, această constantă este denumită

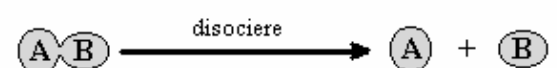
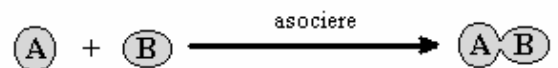
<div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: right;">(1)</p> <p>rata de disociere = $\frac{\text{constanta ratei de disociere}}{\text{concentrația AB}}$</p> <p>rata de disociere = $k_{\text{off}} [AB]$</p>	<p>EXEMPLU</p> <p>Concentrația unei molecule prezentă doar într-o singură copie într-o celulă (volumul de 2000 μm^3) este de aproximativ 10^{-12}M. Dacă o asemenea celulă conține 10^4 copii ale moleculei proteice A și 10^6 copii ale moleculei proteice B,</p> <p style="text-align: center;">$[A] = 10^{-8}\text{M}$ și $[B] = 10^{-6}\text{M}$</p> <p>să presupunem că proteina A se leagă la proteina B cu un $K = 10^7\text{M}^{-1}$. Raportul de A legat, per A nelegat este $[AB] / [A]$ și pentru că:</p> <p style="text-align: center;">$[AB] / [A] = K[B] = (10^7\text{M}^{-1})(10^{-6}\text{M}) = 10$</p> <p>putem presupune că o moleculă A este liberă, față de 10 molecule A care sunt legate de B în interiorul celulei.</p> <p>Repetând calculul pentru $K = 10^4\text{M}^{-1}$ obținem că doar aproximativ o moleculă A din o mie este legată la B.</p>
<div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: right;">2</p> <p>rata de asociere = $\frac{\text{constanta ratei de asociere}}{\text{concentrația A} \times \text{concentrația B}}$</p> <p>rata de asociere = $k_{\text{on}} [A] [B]$</p>	
<p>LA ECHILIBRU</p> <p style="text-align: right;">(3)</p> <p>rata de asociere = rata de disociere</p> <p style="text-align: center;">$k_{\text{on}} [A] [B] = k_{\text{off}} [AB]$</p> <div style="background-color: #e0e0e0; padding: 5px; margin-top: 5px;"> $\frac{[AB]}{[A] [B]} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = K = \text{constanta de echilibru}$ </div>	

Figura 2-14 Principiul echilibrului chimic. Echilibrul dintre moleculele A și B și respectiv complexul AB este menținut printr-un echilibru dintre cele două reacții opuse, prezentate în (1) și (2). După cum se vede în (3), raportul ratelor constantelor reacției de asociere și de disociere, este egal când reacția este în *constantă de echilibru (K)*. Moleculele A și B trebuie să se ciocnească pentru a reacționa, iar rata reacției (2) este de aceea proporțională cu produsul concentrațiilor lor individuale. Ca rezultat, produsul (A) x (B) apare în expresia finală pentru K, unde [] indică concentrațiile. După definiția tradițională, în ecuația constantei de echilibru, concentrația produșilor apare la numitor, iar concentrația reactanților la numărător. De aceea, constanta de echilibru din (3) este pentru reacția de asociere $A+B \rightarrow AB$. Pentru reacții de legare simple, aceasta este denumită *constantă de afinitate* sau *constantă de asociere* (în unități de litri per mol); cu cât este mai mare valoarea constantei de asociere (K_a), cu atât este mai puternică legătura dintre A și B. Reciproca lui K_a este *constantă de disociere* (în unități de moli per litru); cu cât este mai mică valoarea constantei de disociere (K_d), cu atât este mai puternică legătura dintre A și B.

constanta de afinitate și este de obicei utilizată pentru măsurarea gradului de legare dintre două molecule: cu cât este mai puternică legătura, cu atât este mai mare valoarea constantei de afinitate.

Constanta de echilibru a unei reacții în care două molecule se leagă una de cealaltă este în relație directă cu schimbarea de energie liberă standard pentru legătură (ΔG°), conform ecuației descrise în Tabelul 2-3. Tabelul dă lista valorilor ΔG° corespunzătoare la diferite valori K . Constantele de afinitate pentru o interacțiune simplă de legare în sistemele biologice, variază între 10^3 și 10^{12} litri/mol; aceasta corespunde la energii de legare între 4-17 kcal/mol, care necesită între 4 și 17 legături de hidrogen.

Atomii și moleculele se mișcă foarte rapid

Reacțiile chimice din celulă se desfășoară cu o viteză remarcabilă. O moleculă enzimatică obișnuită poate cataliza un număr de ordinul a 1000 de reacții pe secundă, iar reacții cu o rată de 10^6 pe secundă nu sunt ceva neobișnuit. Pentru că fiecare reacție necesită interacțiunea dintre o enzimă și o moleculă substrat, asemenea viteze sunt posibile doar dacă moleculele se mișcă rapid. Mișcările moleculare pot fi clasificate în trei categorii: (1) mișcarea moleculei de la un loc la altul (mișcarea de translație), (2) mișcarea rapidă de dute-vino a atomilor legați covalent unul față de altul (vibrații), și (3), rotația. Fiecare din aceste mișcări sunt importante pentru a aduce alături suprafețele moleculelor în interacțiune.

Viteza mișcărilor moleculare poate fi măsurată printr-o varietate de metode spectroscopice. Acestea indică faptul că o proteină globulară mare se rotește în mod constant în jurul axei sale de aproximativ un milion de ori într-o secundă. Ratele ciocnirilor produse prin difuziune datorită mișcării translaționale sunt proporționale cu concentrația moleculei. Dacă ATP este prezent într-o concentrație intracelulară obișnuită de aproximativ 1 mM, fiecare situs al unei molecule proteice este bombardat cu 10^6 coliziuni pe secundă de către această moleculă de ATP; pentru o concentrație de ATP de zece ori mai mică, numărul coliziunilor scade la 10^5 pe secundă și așa mai departe.

O reacție chimică dintre două molecule poate avea loc rapid doar atunci când moleculele aflate în coliziune au o orientare relativă corectă. Deși se apreciază că moleculele se mișcă și interacționează rapid, vitezele de cataliză enzimatică nu se arată a fi atât de eficiente.

Imperfecțiunea proceselor de recunoaștere moleculară

Toate moleculele posedă energie – energia cinetică a mișcării lor translaționale, vibrațiilor și rotațiilor, precum și energia potențială stocată în distribuția electronilor lor. În timpul coliziunilor moleculare, energia este distribuită întâmplător la toți atomii prezenți, astfel că majoritatea atomilor posedă valori energetice aproape de medie, dar o mică porțiune

Tabelul 2-3 Relația dintre diferențele de energie liberă și constantele de echilibru

Constanta de echilibru		Energia liberă
[AB]	$\frac{[AB]}{[A][B]}$ = K	a AB minus Energia liberă a A + B
(litri/mol)		(kcal/mol)
10^5		-7,1
10^4		-5,7
10^3		-4,3
10^2		-2,8
10		-1,4
1		0
10^{-1}		1,4
10^{-2}		2,8
10^{-3}		4,3
10^{-4}		5,7
10^{-5}		7,1

Dacă reacția $A+B \leftrightarrow AB$ ajunge la echilibru, cantitățile relative de A, B și AB depind de diferența de energie liberă, ΔG° , dintre ele. Valorile de mai sus corespund pentru 37°C și sunt calculate din ecuația

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[AB]}{[A][B]}$$

sau

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = e^{-\Delta G^\circ/RT} = e^{-\Delta G^\circ/(1,623)}$$

Aici ΔG° este exprimat în kilocalorii per mol și reprezintă diferențele de energie liberă în condiții standard (când toate componentele sunt prezente în concentrație de 1,0 mol/litru); T este temperatura în kelvin ($^\circ\text{K}$).

Un principiu similar se aplică și în cazul mai simplu al reacției $A \leftrightarrow A^*$, unde molecula este interconvertibilă între stările A și A^* care diferă în energia liberă cu ΔG° .

de atomi vor poseda valori energetice înalte. Deși conformațiile favorizate ale stării unei molecule apar la nivele energetice scăzute, stările energetice înalte apar doar în timpul coliziunilor violente. Ținând seama de temperatură, se poate calcula probabilitatea ca un atom sau o moleculă să se afle într-o stare energetică particulară (vezi Tabelul 2-3). Diferența de energie liberă dintre două molecule scade dacă probabilitatea stării energetice înalte raportată la starea de energie joasă devine mai mică. Ea ar atinge valoarea zero, doar dacă această diferență de energie devine infinită.

Din cauza factorului întâmplare, pot apare ocazional "reacții nepotrivite". În consecință, o celulă face continuu erori. Ocazional se pot desfășura reacții care sunt, energetic, foarte nefavorabile. De exemplu, doi atomi legați între ei prin legături covalente pot fi supuși eventual la o coliziune energetică specială și astfel se disociază. La fel, specificitatea unei enzime pentru substratul său nu poate fi absolută deoarece posibilitatea ca o moleculă să o recunoască pe alta, nu poate fi niciodată perfectă. Greșelile ar putea fi îndepărtate complet doar dacă celula și-ar dezvolta mecanisme cu diferențe infinite de energie între participanți. Pentru că acest lucru nu este posibil, celulele sunt forțate să tolereze un anumit nivel de imperfecțiune, ceea ce a dus la dezvoltarea diferitelor reacții de reparare cu rolul de a corecta erorile mai dăunătoare.

Pe de altă parte, erorile sunt esențiale pentru viață, așa cum o știm noi. Dacă, ocazional, nu ar fi apărut greșeli în menținerea secvențelor de ADN, evoluția nu ar fi putut avea loc.

Acizii nucleici

Genele sunt formate din ADN

Cu mult timp în urmă, de când omul a început să cultive plante și să crească animale, a devenit clar că orice sămânță semănată sau ou fertilizat conține un plan de dezvoltare a viitorului organism. În timpurile moderne, știința numită genetica, a emis premiza că elemente invizibile ce conțin informație, numite **gene**, sunt distribuite de la celula mamă la celulele fiice în timpul diviziunii. Pentru aceasta, înainte de diviziune, o celulă trebuie să-și facă o copie a fiecărei gene pentru a putea transmite un set complet din acestea la celulele fiice. Genele din semințe sau din celulele ou sunt purtătoarele informației ereditare de la o generație la alta.

Ereditatea caracterelor biologice trebuie să implice modele de atomi care să respecte legile fizicii și chimiei: cu alte cuvinte, genele nu pot fi formate decât din molecule. La început, natura acestor molecule a fost greu de imaginat. Ce tip de molecule pot fi depozitate în celulă și pot direcționa activitățile unui organism în dezvoltare și în același timp, pot fi capabile de o replicare exactă și nelimitată?

La sfârșitul secolului nouăsprezece, biologii au descoperit că purtătorii informației ereditare sunt cromozomii, care devin vizibili din structurile nucleului atunci când o celulă intră în diviziune. Faptul că acidul dezoxiribonucleic (ADN) din acești cromozomi este substanța care stă la baza structurii genelor, a devenit evident mult mai târziu, pe baza studiilor pe bacterii. În 1944 s-a arătat că, prin transferul de ADN purificat de la o tulpină de bacterii, la o altă tulpină, se pot transfera unele caracteristici ereditare ale primei tulpini la a doua. Deoarece până atunci exista convingerea că doar proteinele pot avea complexitatea conformațională pentru a fi purtătoare de informație genetică, descoperirea a fost o adevărată surpriză, și nu a fost general acceptată decât la începutul anilor 1950. Astăzi, ideea că ADN este purtătorul informației genetice în secvența sa de nucleotide, este atât de importantă sub aspect biologic, încât este încă dificil să anticipăm impactul enorm pe care îl va avea asupra viitorului omenirii.

Împerecherea de baze complementare în moleculele de ADN

Dificultatea inițială a geneticienilor de a accepta ideea că ADN-ul este substanța din care sunt formate genele, este de înțeles, având în vedere simplitatea chimismului acestor molecule. Un lanț de ADN este un polimer lung, neramificat, format doar din patru tipuri de subunități. Acestea sunt dezoxiribonucleotidele ce conțin bazele adenina (A), citozina (C), guanina (G) și timina (T). Nucleotidele sunt legate între ele prin legături fosfodiesterice covalente stabilite între carbonul 5' al unei

dezoxiriboze, cu carbonul 3' al celei următoare. Cele patru tipuri de baze sunt atașate la acest lanț fosfato-zaharidic la fel ca mărgelile într-un colier.

Cum poate un lanț lung de nucleotide să codifice informațiile pentru un organism sau cel puțin pentru o celulă? Și cum pot asemenea mesaje să fie copiate de la o generație celulară la alta? Răspunsul la aceste întrebări rezultă din însăși structura moleculelor de ADN.

Încă de la începutul anilor 1950, analizele de difracție cu raze X ale filamentelor de ADN, au sugerat că moleculele de ADN sunt polimeri helicoidali formați din două lanțuri. Structura helicală a ADN nu a fost o surpriză, deoarece, după cum am arătat deja, un helix se poate forma ușor dacă subunitățile învecinate ale unui polimer sunt orientate regulat. Dar descoperirea că ADN este un lanț dublu, a avut o semnificație crucială. Acest lucru a devenit evident când, în 1953, Watson și Crick au prezentat modelul lor conceput pe baza observațiilor în difracția cu raze X.

Un aspect esențial al acestui model a fost acela că bazele unei molecule de ADN sunt dispuse în interiorul dublului helix al moleculei. Aceasta presupune că bazele unui lanț sunt foarte apropiate de bazele celuilalt lanț, ceea ce face ca acestea să fie împerecheate, respectiv, fiecare bază purinică mare (A sau G, care au un dublu inel) de pe un lanț, se împerechează cu baze pirimidinice mai mici (T sau C, fiecare formate dintr-un singur inel) de pe celălalt lanț (Figura 2-15).

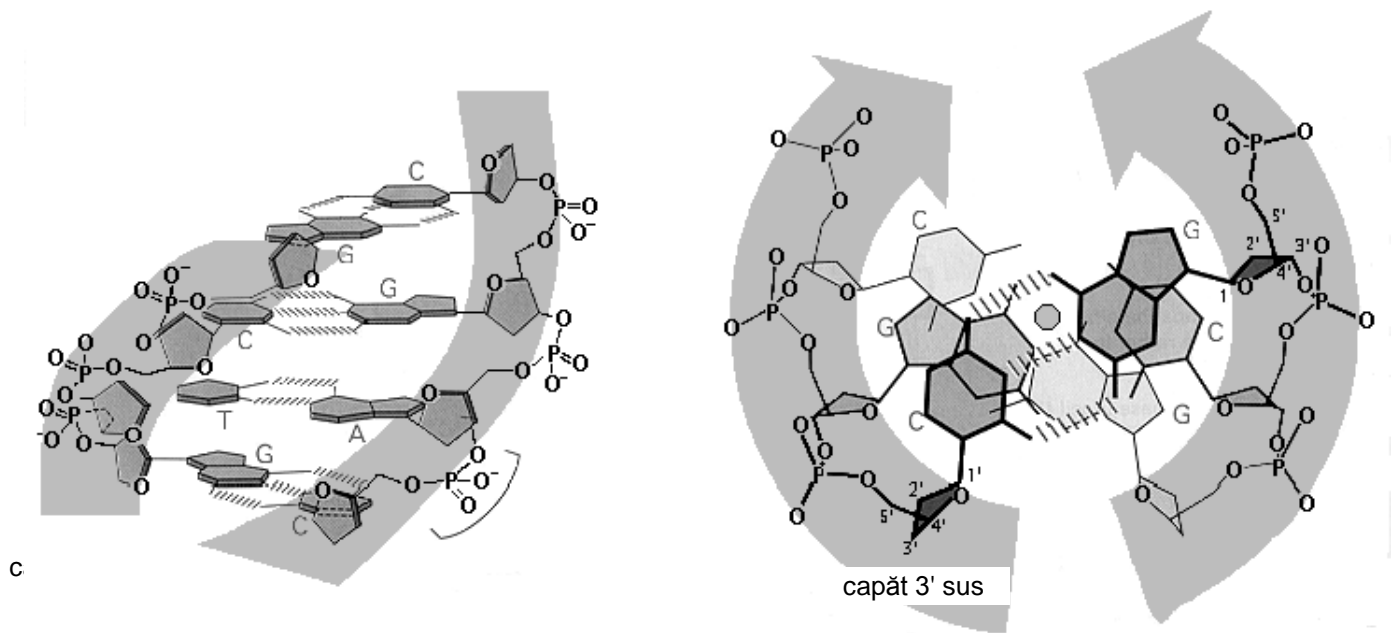


Figura 2-15 Dublul helix de ADN. (A) Un segment scurt al helixului, văzut lateral. Sunt prezentate patru perechi de baze. (B). Aspectul helixului, privit dinspre un capăt. De notat că cele două catene se desfășoară în direcții opuse, iar bazele din fiecare pereche sunt legate prin două sau trei legături de hidrogen.

Atât faptele evidente obținute din experiențe anterioare, cât și concluziile derivate din modelul ce sugerează **împerecherea complementară de baze**, au demonstrat că acestea se formează între A și T și respectiv între G și C. Analizele biochimice ale preparatelor de ADN provenite de la diferite specii au arătat că, deși compoziția în nucleotide a ADN diferă foarte mult (de exemplu, de la 13% A, la 36% A în ADN-ul diferitelor tipuri de bacterii), cantitativ este generală relația $[G] = [C]$ și $[A] = [T]$. Modelul molecular evidențiază că numărul de legături de hidrogen care se pot stabili dintre G și C și respectiv A și T, este cel mai mare față de orice altă combinație. Astfel, modelul dublu-helical al ADN respectă regulile biochimiei cantitative.

Structura ADN stă la baza explicării eredității

O genă este purtătoarea informației biologice într-o formă care poate fi precis copiată și transmisă de la o celulă la toate descendentele ei. Implicațiile descoperirii dublului helix de ADN au fost profunde din cauză că această structură a sugerat imediat modul în care se poate face transferul de informație. Deoarece fiecare lanț conține o secvență de nucleotide care este exact complementară cu secvența de nucleotide de pe celălalt lanț, ambele lanțuri conțin aceeași informație genetică. Dacă notăm cele două lanțuri cu A și A', lanțul A servește ca model sau *matriță* pentru sinteza unui nou lanț A', iar acesta, la rândul lui servește ca model pentru producerea unui nou lanț A. Astfel, informația genetică poate fi copiată printr-un proces în care catena A se separă de catena A' și fiecare astfel separată, servește ca matriță pentru producerea lanțului complementar nou.

O consecință directă a mecanismului de împerechere a bazelor este faptul că ADN poartă informația în secvența sa liniară de nucleotide. Fiecare nucleotid – A, C, T sau G – poate fi considerat ca o literă a unui alfabet ce conține aceste patru litere și care este utilizat pentru scrierea liniară a mesajelor biologice. Organismele diferă între ele din cauză că moleculele lor de ADN posedă secvențe nucleotidice diferite și deci, diferite mesaje biologice.

Pentru că numărul de secvențe posibile într-un lanț de ADN cu n nucleotide are valoarea de 4^n , varietatea biologică ce poate fi generată utilizând doar o lungime modestă de ADN, este enormă. O celulă animală tipică conține cam un metru de ADN (3×10^9 nucleotide). Dacă doar o genă umană neobișnuit de mică este scrisă liniar cu un alfabet format din patru litere, ea ocupă un spațiu de aproape jumătate de pagină (Figura 2-16). Informația genetică existentă într-o celulă umană ar trebui în acest fel să ocupe spațiul dintr-o carte cu mai mult de 500.000 de pagini.

Deși principiul de replicare al genelor este elegant și simplu,

```

CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCCTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAACT
CTGCCGTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTCTGATA
GGCACTGACCTCTCTGCTTATGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCCTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTCTCGGTGCCTTAGTGATGGCCCTG
GCTCACTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACCTGTGACAG
CTGCACGTTGATCCTGAGAATTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCOCTTGATGTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCAGTGAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAAATGGAAACAGACCAATGATTCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTGCTGTTCATACAAATGTTTTTC
TTTTGTTAATTCTTGTCTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTTGTATATAAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACATAAAA
AAAACCTTACACAGCTGCTTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTCTT
TTATTTTTAATGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGCCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTAAAAAATGCT
TTCCTCTTTAATATACTTTTTTGTATATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAAATGATCAT
GCCCTTTGACCCATTTCAAGAAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATG
CTAATAGCAGCTACAACTCAGCTACCATC
TGCTTTTATTTATGTTGGGTAAGGCTG
GATTATTTGAGTCCAAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTACATCTCTTATCTTCTC
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCATCACTTTGGCAAGAAT
CACCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGGCTAATGOCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCTTTGT
CCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGATA
TTATGAAGGGCTTGGACATCTGGATCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTCGAA
TGATGATTTAAATATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTTAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTC
AAACCTTGGGAAATACACTATATCTTAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGACATTTGGCAACGCCCTGATGC
CTATGCCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGATTTTACATTAATTTT
TGTTTTAGCTGTCTCAGAAATGCTTTTTT

```

Figura 2-16 Secvența ADN din gena β-globinei umane.

procesul existent în celule pentru această copiere este extrem de complicat și implică participarea unui complex de proteine care formează așa numitul "aparat replicativ". Reacția fundamentală este cea redată în Figura 2-17, în care enzima *ADN-polimeraza* catalizează adăugarea a câte unui dezoxiribonucleozid la capătul 3' al unui lanț de ADN. Fiecare nucleotid adăugat la catenă este un *dezoxiribonucleozid trifosfat*; eliberarea pirofosfatului de pe acest nucleotid activat și hidroliza sa ulterioară oferă energia pentru reacția de **ADN replicare** și o face să fie efectiv ireversibilă. Replicarea helixului de ADN începe cu o separare locală a celor două catene complementare. Fiecare catenă acționează apoi ca matriță pentru formarea unei noi molecule de ADN prin adăugarea secvențială a dezoxiribonucleozid trifosfaților. Nucleotidul care se adaugă la fiecare treaptă este selectat printr-un proces care necesită formarea unei complementarități de baze cu nucleotidul corespunzător de pe catena matriță parentală, generându-se astfel un nou lanț de ADN care are secvența complementară cu catena matriță (vezi Figura 2-17). Informația genetică este duplicată în întregime sa, astfel că se formează două helixuri dublu catenare de ADN, fiecare identic în secvența de nucleotide cu helixul de ADN parental care a servit ca matriță. Pentru că fiecare moleculă nouă de ADN conține o catenă originală și una nou sintetizată, mecanismul replicării ADN se spune că este *semiconservativ* (Figura 2-18).

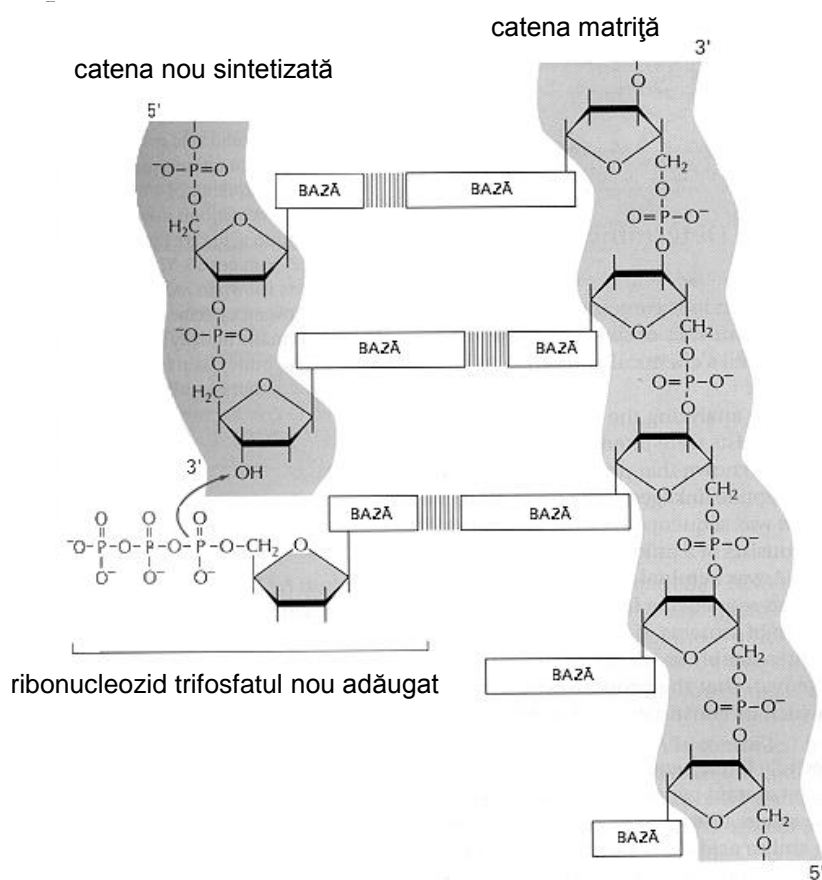


Figura 2-17 Sinteza (replicarea) ADN.

Mutațiile cauzate de erorile din replicația ADN

Una din cele mai importante caracteristici ale replicației ADN este acuratețea sa. Pentru a se elimina nucleotidele poziționate incorect sunt utilizate o serie de mecanisme de corectare; ca rezultat secvența de nucleotide dintr-o moleculă de ADN este copiată cu mai puțin de o greșeală la 10^9 nucleotide adăugate. Totuși, foarte rar, aparatul replicativ poate greși inserând nucleotide necomplementare, respectiv, acolo unde ar trebui să adauge T, va adăuga C, sau va adăuga A în loc de G. Orice modificare de acest tip în secvența de ADN reprezintă o greșeală genetică, numită **mutație**, care poate fi copiată la toate generațiile celulare viitoare deoarece secvențele "greșite" de ADN se vor copia drept "corecte". Consecința unor asemenea erori poate fi gravă, fiecare nucleotid modificat putând avea importante efecte asupra celulei, depinzând de locul în care a survenit mutația.

Geneticienii au demonstrat convingător încă din anii 1940 că genele specifică structura proteinelor individuale. Astfel, o mutație dintr-o genă, cauzată prin alterarea secvenței de ADN, poate determina inactivarea unei proteine esențiale, ceea ce ar determina moartea celulei, caz în care această mutație se pierde. Pe de altă parte, o mutație poate fi *silențioasă*, neafectând funcția vreunei proteine. Foarte rar, o mutație poate crea o genă cu o funcție modificată sau chiar nouă. În acest caz, organismele care o poartă pot dobândi un avantaj și gena mutantă poate eventual îndeprta din populație gena originală prin selecție naturală.

Determinarea secvenței de aminoacizi dintr-o proteină de secvența de nucleotide dintr-o genă

Din punct de vedere chimic, ADN este relativ inert. Informația pe care o conține este exprimată prin intermediul altor molecule: ADN direcționează sinteza de molecule specifice de ARN și proteine, care la rândul lor, determină proprietățile fizice și chimice ale celulelor. În aproximativ aceeași perioadă de timp în care biofizicienii analizau structura tridimensională a ADN prin difracție cu raze X, biochimiștii studiau intens structura chimică a proteinelor. Se știa deja că proteinele sunt lanțuri lungi de aminoacizi legați între ei prin legături peptidice. Totuși, doar în anii 1950, când s-a determinat secvența unei proteine mici, *insulina*, s-a descoperit că fiecare tip de proteină posedă o secvență unică de aminoacizi. Doar când a fost rezolvată problema structurii ADN, a apărut premiza înțelegerii bazelor moleculare ale geneticii și eredității, așa cum secvențierea insulinei a oferit cheia înțelegerii structurii și funcțiilor proteinelor. La fel cum insulina are o secvență definită, determinată genetic, așa trebuie să fie și celelalte proteine. A devenit astfel evidentă supoziția că proprietățile unei proteine depind de ordinea precisă în care sunt aranjați aminoacizii.

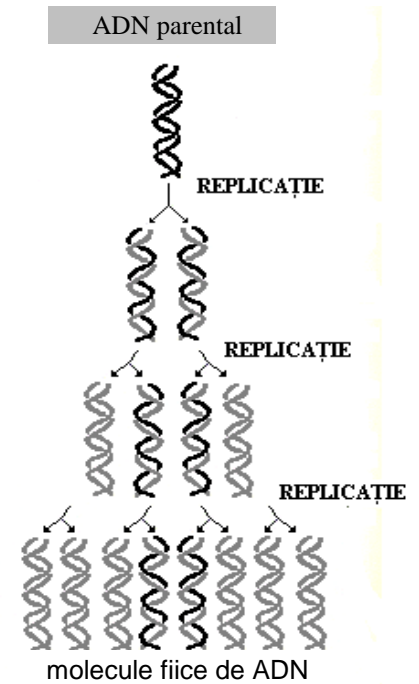


Figura 2-18 Replicația semi-conservativă a ADN.

Atât ADN, cât și proteinele, sunt formate dintr-o secvență liniară de subunități; eventual, analiza proteinelor provenite din gene mutante ar demonstra că secvențele celor două tipuri de molecule sunt *coliniare* – aceasta însemnând că nucleotidele din ADN sunt aranjate într-o ordine ce corespunde ordinii aminoacizilor din proteina pe care o codifică. A devenit evident că secvențele de ADN conțin informații codificate privind secvențele din proteine. Întrebarea centrală care s-a pus în biologia moleculară a fost, cum pot celulele să traducă secvența de nucleotide din ADN, într-o secvență de aminoacizi dintr-o proteină.

Copierea secvențelor de ADN în molecule de ARN care ghidează sinteza proteinelor

Sinteza proteinelor implică copierea unor regiuni specifice de ADN (*genele*) în polinucleotide de tip diferit chimic și funcțional, numite **acid ribonucleic**, sau **ARN**. ARN, la fel ca și ADN, este format dintr-o secvență liniară de nucleotide, care au unele mici diferențe chimice: (1) scheletul zaharido-fosforic al ARN conține riboză în loc de dezoxiriboză și (2), baza timina (T) este înlocuită cu uracilul (U) ce seamănă foarte mult cu ea și care, de altfel, se împerechează tot cu A.

ARN reține toată informația secvenței de ADN pe care a copiat-o pe baza aceluiași proprietăți de împerechere a bazelor. Moleculele de ARN sunt sintetizate printr-un proces numit **ARN-transcripție** (Figura 2-19), proces care este similar cu ADN-replicația prin aceea că unul sau cele două lanțuri de ADN acționează ca matriță pe care se împerechează bazele. În acest fel lanțul de ARN este alungit nucleotid cu nucleotid.

ARN transcripția diferă de ADN replicație prin mai multe aspecte. De exemplu, ARN nou produs nu rămâne atașat la lanțul de ADN pe care a fost sintetizat. Pe măsură ce se adaugă ribonucleotidele, helixul inițial al ADN se reface, eliberând lanțul de ARN. Astfel, moleculele de ARN sunt monocatenare. Pe de altă parte, moleculele de

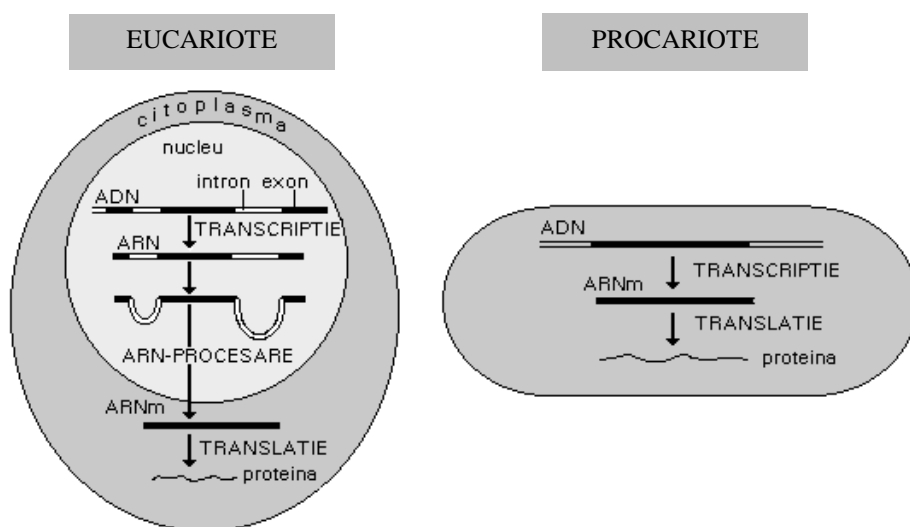


Figura 2-19 Transferul informației de la ADN la proteine.

ARN sunt relativ scurte comparativ cu moleculele de ADN, deoarece ele sunt copiate pe regiuni limitate ale ADN urmând a fi folosite pentru a forma una sau mai multe proteine. ARN transcris care direcționează sinteza unei molecule proteice se numește **ARN mesager (ARNm)**, pe când alte molecule de ARN transcris reprezintă *ARN de transfer (ARNt)* sau formează componenta de ARN a ribozomilor (ARNr) sau a unor particule ribonucleoproteice mici.

Cantitatea de ARN care se produce pe o regiune particulară de ADN este controlată de *proteinele reglatoare ale genelor* care se leagă la situsuri specifice de ADN de lângă secvențele de codificare ale unei gene. La un anumit moment dat, în orice celulă, anumite gene sunt utilizate pentru a produce ARN în foarte mari cantități, pe când altele nu sunt transcrise deloc. În cazul unei gene active, de pe același segment de ADN, se transcriu mii de molecule de ARN în fiecare generație celulară. Pentru că, la rândul ei, fiecare moleculă de ARNm poate fi tradusă în mai multe mii de copii ale lanțului polipeptidic, informația conținută în doar o mică regiune din ADN, poate direcționa sinteza a milioane de copii ale unei proteine. De exemplu, proteina numită *fibroina* este o componentă majoră din structura fibrei de mătase naturală. În fiecare celulă din glandele viermelui de mătase, o singură genă pentru fibroină produce 10^4 copii de ARNm, iar fiecare din acestea direcționează sinteza a 10^5 molecule de fibroină. Astfel se produc 10^9 molecule de fibroină în doar 4 zile.

Prelucrarea moleculelor de ARN eucariot pentru a fi îndepărtate secvențele *intron*

În celulele bacteriene toate proteinele sunt codificate de o secvență continuă, neîntreruptă de ADN, care este copiată fără modificări în molecule de ARNm. În 1977, specialiștii de biologie moleculară au fost uimiți de descoperirea conform căreia genele eucariote conțin secvențe de codificare (numite *exoni*) întrerupte de secvențe necodificante (numite *introni*). Pentru a produce o proteină, toată lungimea unei gene, incluzând atât intronii, cât și exonii, este transcrisă la început într-o moleculă foarte mare de ARN – *ARN transcris primar*. Înainte ca ARN să părăsească nucleul, un complex enzimatic de procesare a ARN îndepărtează toate secvențele intron, producând astfel o moleculă de ARN mult mai scurtă. După o asemenea prelucrare a ARN, numită **ARN-îmbinare ("RNA-splicing")**, molecula de ARN trece în citoplasmă ca moleculă de ARNm și direcționează sinteza unei anumite proteine (vezi Figura 2-19).

Se presupune că acest mod de transfer complicat al informației la eucariote s-a dezvoltat pentru a face mult mai eficientă sinteza proteinelor. De exemplu, ARN transcris primar al unor gene poate fi procesat în variate moduri pentru a produce diferite molecule de ARNm, în funcție de tipul de celule sau de stadiul de dezvoltare. Aceasta face ca

aceeași genă să poată produce diferite proteine. Pentru că prezența a numeroși introni facilitează evenimentele de recombinare genetică dintre exoni, acest tip de aranjamente ale genelor se pare că a avut profunde implicații în istoria timpurie a evoluției genelor prin creșterea vitezei procesului.

Codul genetic

Regula după care secvența de nucleotide dintr-o genă este tradusă într-o secvență de aminoacizi a unei proteine, așa numitul **cod genetic**, a fost descifrată la începutul anilor '60. Secvența de nucleotide din molecula de ARNm care acționează ca intermediar, este citită în serie, în grupe de câte trei. Fiecare triplet de nucleotide, numit **codon**, specifică un aminoacid. Pentru că ARN este un polimer liniar format din patru tipuri de nucleotide, există $4^3 = 64$ de triplete codon posibile. Totuși, în structura proteinelor intră doar 20 de tipuri de aminoacizi, ceea ce determină ca un aminoacid să fie specificat de mai mulți codoni; aceasta înseamnă că codul genetic este *degenerat*. Codul (prezentat în Figura 2-20) a fost foarte strict conservat pe parcursul evoluției; cu niște excepții minore, el este același la organisme foarte diferite cum sunt bacteriile, plantele sau omul.

În principiu, fiecare secvență de ARN poate fi tradusă în trei *șiruri de citire*, în funcție de locul de unde începe procesul de decodificare (Figura 2-21). În aproape fiecare caz, doar unul din aceste

	poziția 1	poziția 2	poziția 3			
	↓	U	C	A	G	↓
U		Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu	Ser	STOP	STOP	A
		Leu	Ser	STOP	Trp	G
C		Leu	Pro	His	Arg	U
		Leu	Pro	His	Arg	C
		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu	Pro	Gln	Arg	G
A		Ile	Thr	Asn	Ser	U
		Ile	Thr	Asn	Ser	C
		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met	Thr	Lys	Arg	G
G		Val	Ala	Asp	Gly	U
		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val	Ala	Glu	Gly	G

Figura 2-20 Codul genetic.

trei șiruri de citire poate produce o proteină funcțională. Pentru că nu există semne de punctuație, exceptând începutul și sfârșitul mesajului pe ARN, șirul de citire este stabilit în momentul inițierii procesului de traducere.

Rolul ARNt

Codonii dintr-o moleculă de ARNm nu pot recunoaște direct aminoacizii corespunzători așa cum o enzimă își recunoaște substratul. **Translația** (traducerea) ARNm într-o proteină depinde de o moleculă "adaptor" care recunoaște atât un aminoacid, cât și un grup de trei nucleotide. Acești adaptor constau dintr-un set de molecule de ARN numite **ARN de transfer (ATNt)**, fiecare cu o lungime de 80 de nucleotide.

O moleculă de ARNt are o conformație tridimensională care este astfel împachetată încât conține regiuni dublucatenare ținute laolaltă prin interacțiuni necovalente de baze perechi la fel ca și în lanțul dublucatenar de ADN. În molecula de ARNt, care este monocatenară, perechile de baze complementare se formează între nucleotidele aceluiași lanț, ceea ce face ca molecula să fie împachetată în mod particular, important pentru funcția de adaptor. Structura dublu helicală se află în patru zone ale moleculei. Tridimensional are forma literei "L" (Figura 2-22). O importanță specială pentru sinteza proteinelor o au două serii de nucleotide neîmperecheate, aflate la cele două extremități opuse ale moleculei. Una formează *anticodonul* care se împerechează cu tripletul complementar din molecula de ARNm (cu codonul), iar *secvența CCA* de la capătul 3' al moleculei leagă covalent aminoacidul specific (vezi Figura 2-22A).

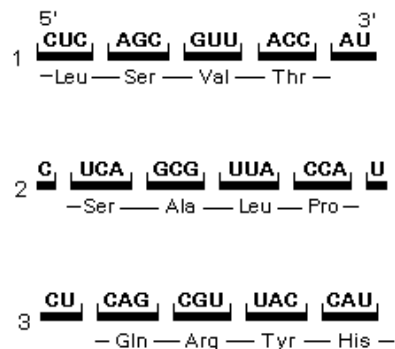
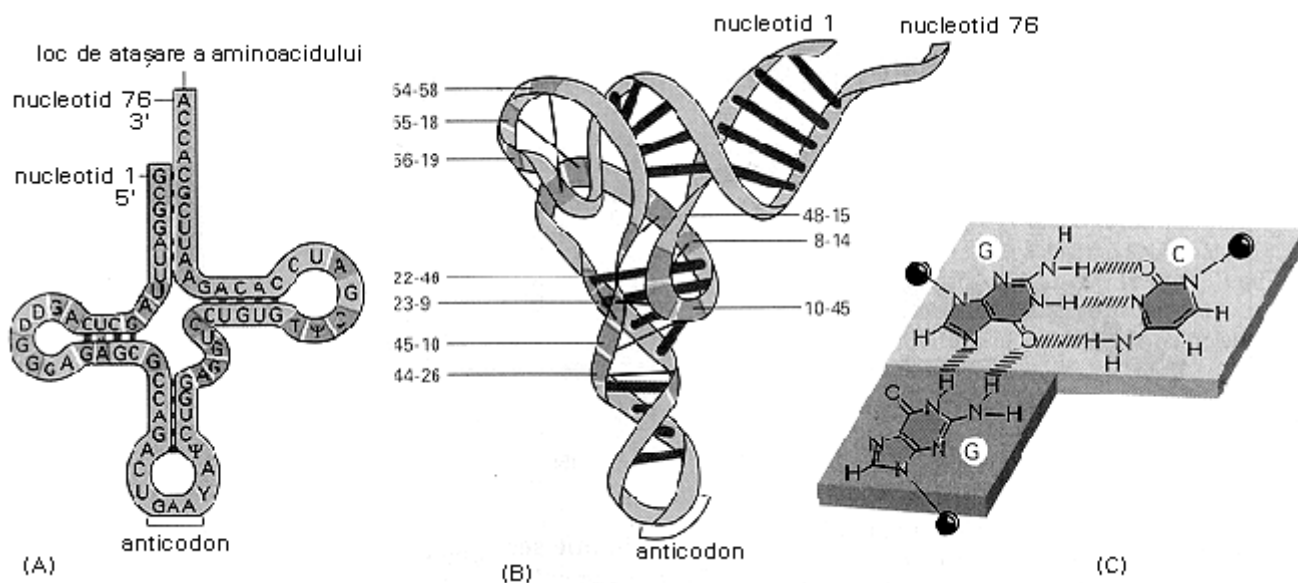


Figura 2-21 Trei ordini posibile de citire a codului genetic.

Figura 2-22 ARNt pentru fenilalanină. (A) Aspectul moleculei prezentat în plan. (B) Aspectul real al moleculei, bazat pe studiile de difracție cu raze X. (C) O interacțiune neobișnuită de baze perechi. Aici, o bază formează legături de hidrogen cu alte două; asemenea "triplete de baze" asigură împachetarea strânsă a moleculei de ARNt.



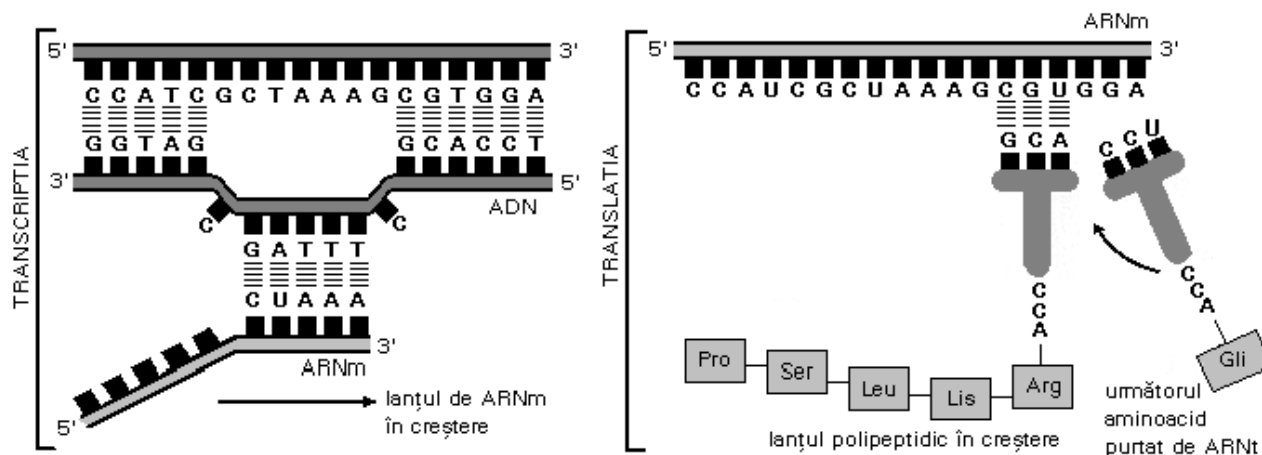


Figura 2-23 Transferul informației în procesul de sinteză a proteinelor. (A) Nucleotidele dintr-o moleculă de ARNm sunt legate una după cealaltă pentru a forma o copie complementară a unui segment de ADN. (B) Ele sunt citite apoi câte trei, de seturi complementare de trei nucleotide din regiunea anticodon a moleculelor de ARNt.

Citirea mesajului de pe ARN messenger la nivelul ribozomilor

Procesul de recunoaștere a codonului, prin care informația genetică este transferată de la ARNm, via ARNt, spre o proteină, depinde de același tip de interacțiuni între perechi de baze ca și în cazul transferului de informație genetică de la ADN la ADN, sau de la ADN la ARN. (Figura 2-23). Dar mecanismul de ordonare a moleculelor de ARNt pe ARNm, este complicat și necesită intervenția **ribozomilor**, complexe macromoleculare formate din mai mult de 50 de tipuri diferite de proteine asociate cu mai multe molecule de ARN structural (ARNr). Fiecare ribozom este o "mașină" de sintetizat proteine pe care moleculele de ARNt se poziționează în așa fel încât să citească mesajul genetic codificat de ARNm. În primul rând, ribozomul identifică situsul start pe molecula de ARNm care selectează șirul de citire și care determină capătul amino-terminal al proteinei. Apoi, pe măsură ce ribozomul se mișcă de-a lungul moleculei de ARNm, se face traducerea secvenței de nucleotide într-o secvență de aminoacizi, codon cu codon, utilizându-se moleculele de ARNt pentru adăugarea aminoacizilor la lanțul polipeptidic în creștere (Figura 2-24). Când ribozomul ajunge la sfârșitul

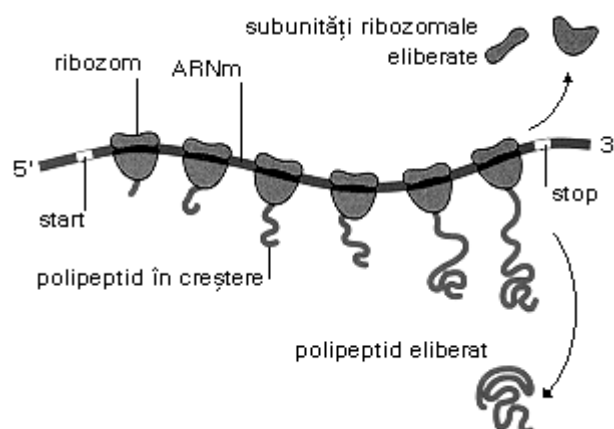


Figura 2-24 Sinteza unei proteine pe ribozomii atașați la o moleculă de ARNm.

mesajului, atât el, cât și capătul carboxil al proteinei nou sintetizate, sunt eliberate de pe capătul 3' al moleculei de ARNm.

Ribozomii operează cu o eficacitate remarcabilă: într-o singură secundă un ribozom bacterian adaugă aproximativ 20 de aminoacizi la un lanț polipeptidic în creștere. Structura ribozomilor și mecanismul sintezei proteinelor vor fi discutate într-un capitol separat.

Rolul de catalizatori al moleculelor de ARN

Moleculele de ARN au fost considerate ca niște lanțuri de nucleotide cu proprietăți chimice relativ puțin interesante. În 1981, această concepție a fost modificată datorită descoperirii unei molecule de ARN cu rol catalitic și cu o reactivitate chimică sofisticată, pe care până atunci, biochimistii o asociau doar cu proteinele. Moleculele de ARN ribozomal de la protozoarul ciliat *Tetrahymena* sunt sintetizate inițial ca precursori mai mari, din care apoi se produce un ARNr printr-o reacție de ARN-procesare. Surpriza a venit de la descoperirea că această procesare se poate face și *in vitro* în absența vreunei proteine. Ulterior s-a arătat că secvențele intron înseși au o activitate catalitică de tip enzimatic care determină reacția de două trepte ilustrată în Figura 2-25. Secvența intron, lungă de 400 de nucleotide, a fost apoi sintetizată în eprubetă și a fost descrisă ca fiind capabilă de a se împacheta, formând o suprafață

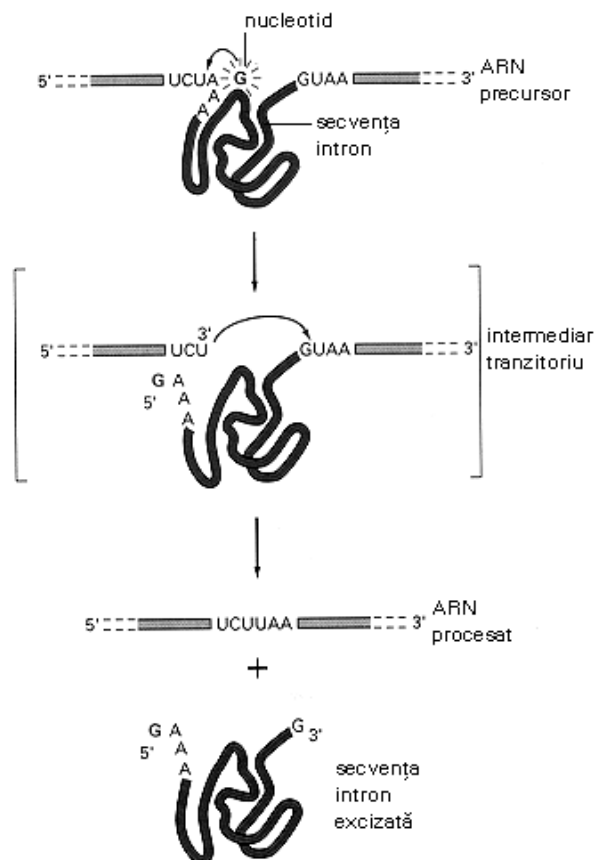


Figura 2-25 Auto-procesarea moleculei de ARN.

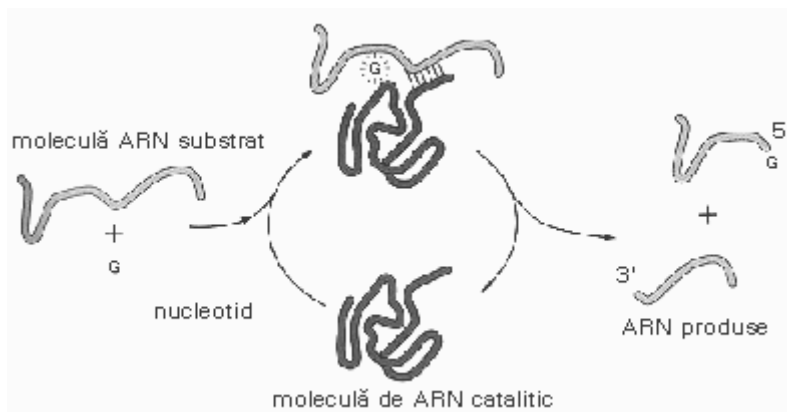


Figura 2-26 Reacție de tip enzimatic catalizată de o secvență intron purificată de la *Tetrahymena*. În această reacție, care corespunde cu prima etapă din Figura 2-25, atât substratul specific de molecule de ARN, cât și nucleotidul G, se leagă strâns la suprafața moleculei de ARN catalitic. Ulterior, nucleotidul este atașat covalent la molecula de ARN substrat, clivând-o la un situs specific. Eliberarea celor două lanțuri de ARN rezultate, eliberează și secvența intron pentru următorul ciclu de reacții.

complexă care funcționează ca o enzimă în reacțiile cu alte molecule de ARN. De exemplu, ea se poate lega strâns la două substraturi specifice – un nucleotid cu guanină și un lanț de ARN – catalizând atașarea covalentă și limitând astfel lanțul de ARN la un situs specific (Figura 2-26).

În acest model de reacție, care mimează prima etapă în Figura 2-25, aceeași secvență intron acționează repetat, pentru a rupe mai multe lanțuri de ARN. Deși în mod obișnuit procesarea ARN nu decurge prin reacții autocatalitice, mecanisme ca cel descoperit la *Tetrahymena*, în care secvențele intron produc o auto – procesare, au fost descoperite și la alte tipuri de celule, incluzând unele mușegaiuri și bacterii. Aceasta sugerează că asemenea secvențe de ARN au apărut înainte de divergența eucariotelor de procariote de acum 1,5 miliarde de ani.

Recent au fost descoperite și alte tipuri de ARN catalitic. Majoritatea ARNt, de exemplu, sunt inițial sintetizate ca precursori mai mari, iar procesarea acestor molecule este catalizată de complexe proteine-ARN care recunosc precursorii și îi clivează în situsuri specifice. Secvențe de ARN catalitic joacă de asemenea un rol important în ciclul de viață a unor virusuri la plante. Un fapt remarcabil, astăzi se suspectează că ribozomii funcționează în mare parte pe baza catalizei bazată pe ARN, în care proteinele joacă un rol de suport pentru moleculele de ARNr. De exemplu, moleculele de ARNr au activitate de peptidil-transferază, catalizând formarea legăturilor peptidice (Figura 2-27).

Cum este posibil ca o moleculă de ARN să acționeze ca o enzimă? Exemplul cu ARNt indică faptul că moleculele de ARN se pot împacheta într-o conformație spațială foarte specifică. Structura tridimensională a secvenței intron de autoprosesare de la *Tetrahymena* este prezentată în Figura 2-28. Interacțiunile dintre diferitele părți ale acestei molecule (analoage cu legăturile de hidrogen neobișnuite din moleculele de ARNt – vezi Figura 2-22) sunt responsabile pentru împachetarea care crează o suprafață tridimensională complexă cu activitate catalitică. Aproximativ apropierea neobișnuită a atomilor pune probabil în tensiune legăturile covalente, făcând astfel ca anumiți atomi din lanțul împachetat de ARN să fie neobișnuit de reactivi.

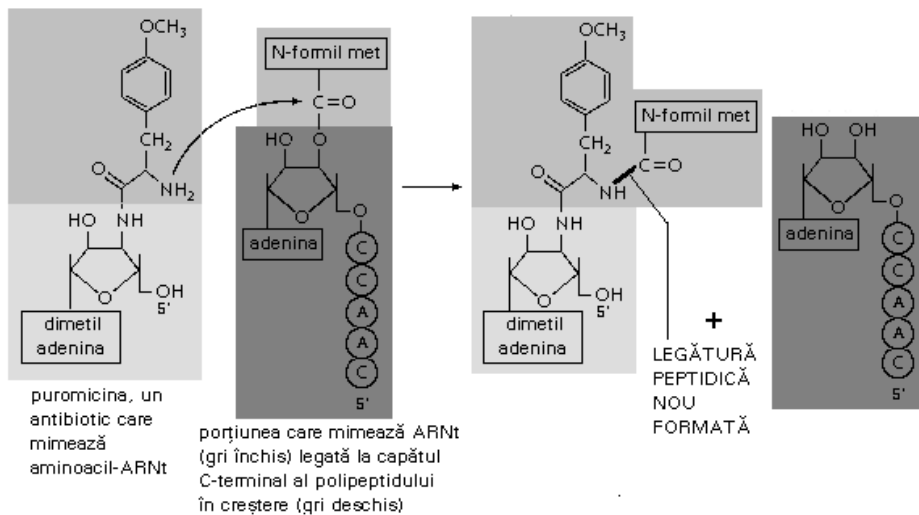


Figura 2-27 Reacție peptidil-transferazică ce este catalizată de o moleculă de ARN ribozomal deproteinizat. Molecula de puromicină mimează ARNt încărcat cu aminoacidul tirozina și acționează ca un puternic inhibitor al sintezei proteinelor în celule, prin legarea sa la capătul polipeptidului în creștere de pe ribozom. În acest model de reacție, capătul lanțului polipeptidic în creștere este înlocuit cu un hexanucleotid (reprezentând un ARNt, gri închis), care este legat covalent la N-formil-metionină (reprezentând polipeptidul). O moleculă înalt purificată de ARNt catalizează adăugarea puromicinii la N-formil-metionină, formând o nouă legătură peptidică și eliberând hexanucleotidul.

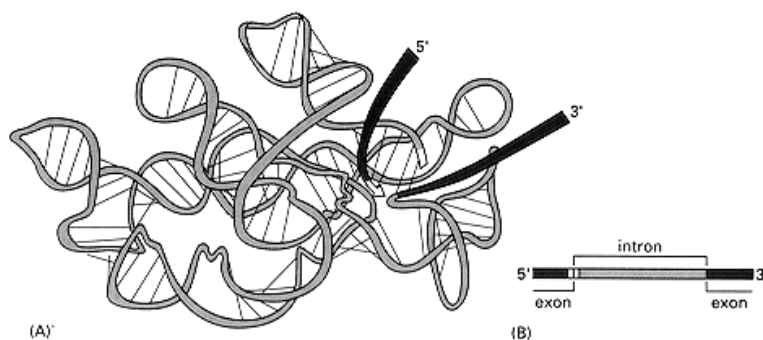


Figura 2-28 Aspect tridimensional al miezului catalitic al tipului de secvență intronică de ARN ilustrată în Figurile 2-26 și 2-27. (A) Molecula împachetată cu legăturile de hidrogen simbolizate prin linii subțiri, formată din aproximativ 240 de nucleotide, este reprezentată imediat după ruperea intronului la capătul 5' (gri). (B) Aspectul schematic al moleculei în starea sa neîmpachetată.

Conformația spațială a proteinelor

Celulele sunt alcătuite, în cea mai mare măsură, din proteine care reprezintă mai mult de jumătate din greutatea lor uscată (vezi Tabelul 2-1). Proteinele determină structura și aspectul unei celule, ele servind totodată ca instrumente pentru recunoașterea moleculară și pentru cataliză. Deși ADN stochează informația genetică necesară pentru alcătuirea unei celule, el are o foarte mică influență directă asupra proceselor celulare. De exemplu, gena pentru hemoglobină nu poate fi purtătoare de oxigen; aceasta fiind o proprietate a proteinei specificată de această genă.

ADN și ARN sunt lanțuri de nucleotide foarte similare chimic. În contrast, proteinele sunt formate prin asortarea a 20 de diferiți aminoacizi, fiecare cu o personalitate chimică distinctă. Această varietate determină o enormă diversitate de proprietăți chimice ale diferitelor proteine, ceea ce explică de ce în cursul evoluției, pentru catalizarea majorității reacțiilor celulare au fost selectate proteinele și nu moleculele de ARN.

Forma unei molecule proteice este determinată de secvența de aminoacizi din structura sa

O mare parte din legăturile dintr-un lanț lung polipeptidic, permit rotația liberă a atomilor pe care îi leagă, ceea ce face ca lanțul unei proteine să fie foarte flexibil. În principiu, orice moleculă proteică poate adopta un număr aproape nelimitat de aspecte spațiale (*conformații*). Totuși, majoritatea lanțurilor polipeptidice se împachetează doar într-o singură conformație particulară, determinată de secvența de aminoacizi. Aceasta se întâmplă pentru că radicalii liberi ai aminoacizilor se asociază între ei, precum și cu apa, pentru a forma diferite legături chimice slabe, necovalente. Dacă în pozițiile importante ale lanțului sunt dispuși radicali potriviți, se pot dezvolta forțe destul de puternice pentru ca conformația respectivă să fie stabilă.

Majoritatea proteinelor se împachetează spontan în conformația corectă. Prin tratamentul cu anumiți solvenți o proteină se poate despacheta, proces numit *denaturare*, ceea ce face ca ea să își piardă conformația nativă. Dacă solventul denaturant este îndepărtat, proteina se reîmpachetează spontan în conformația sa originală, acest fapt indicând că toată informația necesară pentru specificarea formei proteinei este conținută în secvența sa de aminoacizi.

Unul din cei mai importanți factori care guvernează împachetarea unei proteine, este distribuția radicalilor săi polari și respectiv nepolari. Radicalii hidrofobi din lanțul proteic tind să fie împinși spre interiorul moleculei pentru a evita contactul lor cu mediul apos. Din contră, radicalii polari tind să se aranjeze spre suprafața moleculei proteice, unde

pot interacționa cu apa și cu alte molecule polare (Figura 2-29). Pentru că legăturile peptidice sunt polare, ele tind să interacționeze reciproc sau cu radicalii polari, pentru a forma legături de hidrogen (Figura 2-30); aproape toți radicalii polari din interiorul proteinei sunt împerecheați în acest fel (Figura 2-31). Astfel, legăturile de hidrogen au un rol major în apropierea diferitelor regiuni ale lanțului polipeptidic dintr-o moleculă de proteină împachetată. Ele au de asemenea o importanță crucială pentru interacțiunile care se stabilesc pe suprafața proteinei.

Proteinele de pe suprafața celulară sau cele secretate, pot forma legături covalente adiționale în interiorul lanțului. Cele mai remarcabile sunt **legăturile disulfidice** (numite și legături S-S) care se formează între două grupări -SH din doi radicali apropiați ai cisteinei aflați într-un lanț polipeptidic. Aceste legături au rolul de a stabili structura tridimensională a proteinelor extracelulare (Figura 2-32). Ele nu sunt necesare pentru împachetarea specifică a proteinelor pentru că această împachetare se produce normal în prezența agenților reducători care previn formarea de legături S-S. În realitate, legăturile S-S se formează rar, posibil chiar niciodată, în moleculele proteice din citosol deoarece aici există o ridicată concentrație de agenți -SH reducători care rup asemenea legături.

Rezultatul net al interacțiunilor dintre aminoacizii individuali este acela că majoritatea moleculelor proteice se împachetează spontan într-o conformație precis definită. Cele care sunt compacte și globulare, au interiorul format din radicali hidrofobi împachetați într-un aranjament strâns, aproape cristalin, pe când suprafața exterioară neregulată și foarte complexă, conține majoritatea radicalilor polari. Poziționarea și proprietățile diferiților atomi pe această suprafață complexă face ca

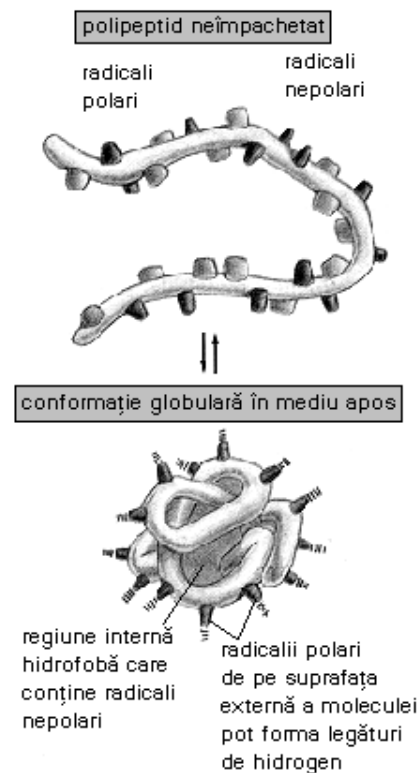


Figura 2-29 Împachetarea unei proteine într-o conformație globulară.

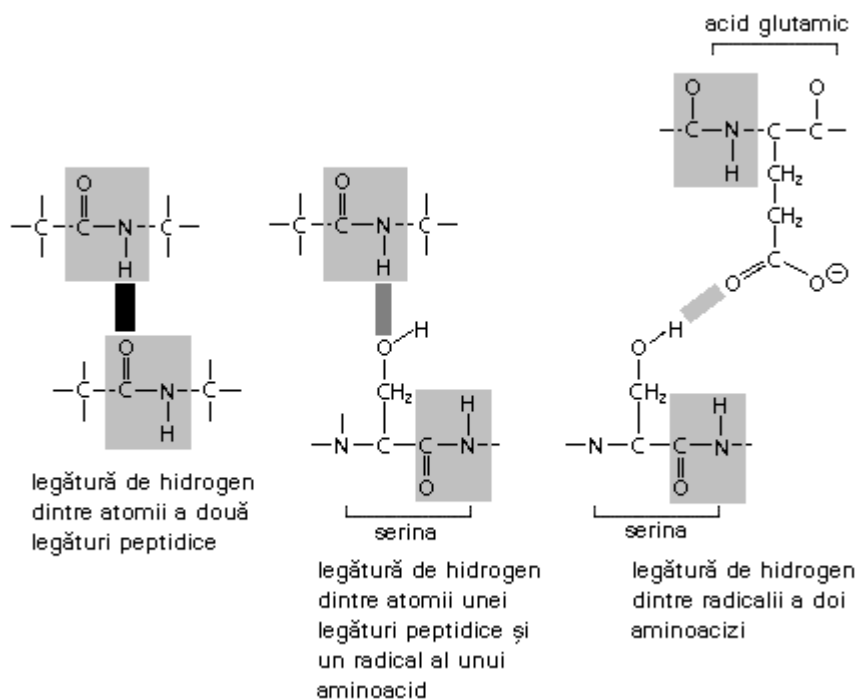


Figura 2-30 Legăturile de hidrogen formate între aminoacizii unei proteine. Legăturile peptidice sunt colorate în gri.

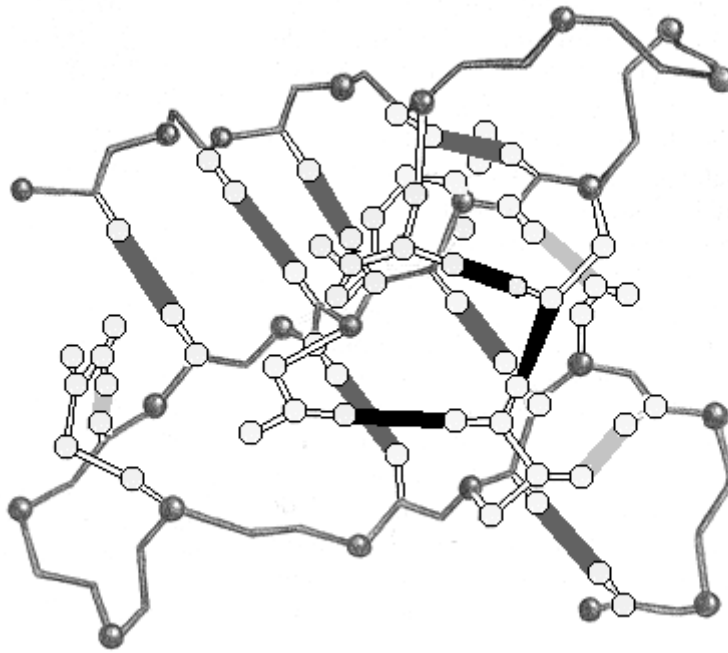


Figura 2-31 Detalii privind legăturile de hidrogen intra-moleculare dintr-o proteină.

această proteină să fie unică și îi asigură specificitatea de legare la alte suprafețe macromoleculare sau la anumite molecule mici. Atât din punct de vedere chimic, cât și structural, proteinele sunt cele mai sofisticate molecule cunoscute.

Modelele de împachetare comune

Deși toată informația necesară pentru împachetarea unui lanț proteic este conținută în secvența de aminoacizi, nu s-a putut elucidă cum să "citim" această informație pentru a putea să prevedem structura tridimensională detaliată a unei proteine a cărei secvență o cunoaștem. Deocamdată, conformația poate fi determinată doar prin *analize de difracție cu raze X* foarte complexe, pe proteine cristalizate, sau, dacă proteina este foarte mică, prin tehnici de rezonanță magnetică nucleară. În acest fel, au fost descrise conformațiile a doar aproximativ 100 de

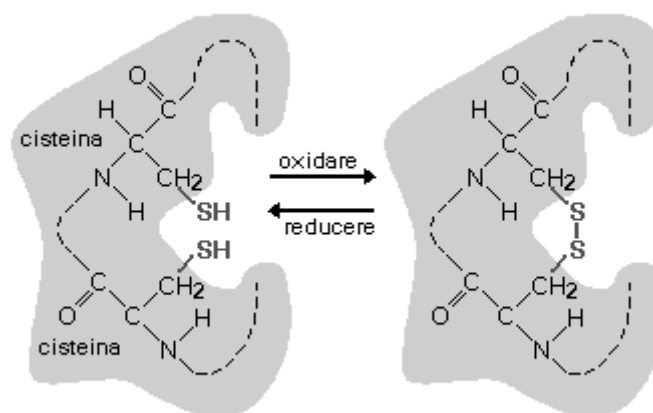


Figura 2-32 Formarea legăturii disulfidice.

tipuri de proteine. Fiecare proteină are o conformație specifică atât de complicată, încât pentru descrierea ei ar fi necesar un capitol întreg.

Dacă se compară structura tridimensională a diferitelor proteine, este clar că, deși conformația generală a fiecărei proteine este unică, în macromoleculă apar mai multe modele structurale care se repetă în diferite părți ale ei. Cele mai comune sunt două modele, pentru că acestea rezultă prin interacțiuni regulate de legături de hidrogen dintre legăturile peptidice și nu dintre radicalii aminoacizilor. Aceste modele au fost corect preconizate încă din 1951, pe baza studiilor de difracție cu raze X a structurii firelor de păr sau a firelor de mătase. Astăzi, aceste modele regulate sunt denumite *pachete β* , și apar în proteina fibroina din firele de mătase și, respectiv *α -helix*, existente în *α -keratină*, prezentă în păr, unghii și piele.

Miezul majorității (dar nu al tuturor) proteinelor globulare conține regiuni mari de **pachete β** . În exemplul din Figura 2-33, care prezintă o parte dintr-o moleculă de anticorp, se formează un *pachet β antiparalel*, în care lanțul polipeptidic extins se îndoaie înainte și înapoi cu fiecare porțiune orientată în poziție opusă față de cealaltă. Aceasta determină o structură foarte rigidă, stabilizată prin legături de hidrogen ce conectează legăturile peptidice din lanțurile vecine. Pachetele β antiparalele precum și *pachetele β paralele* (care se formează între regiuni ale unui lanț

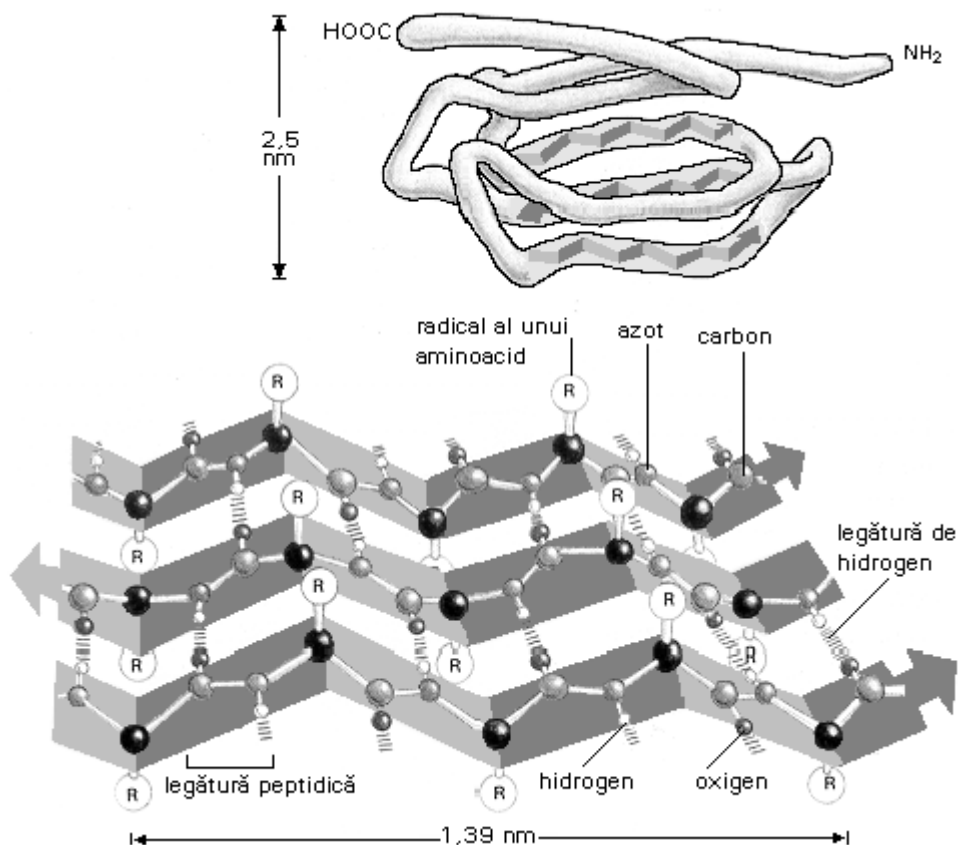


Figura 2-33 Pachetul β este o structură comună ce se formează în anumite părți ale unui lanț polipeptidic din proteinele globulare. În partea de sus este prezentat un domeniu de 115 aminoacizi al unei molecule de imunoglobulină. În partea de jos a figurii este prezentat în detaliu un pachet β antiparalel cu radicalii aminoacizilor notați cu R.

polipeptidic care se orientează în aceeași direcție) constituie frecvent modelele în jurul cărora sunt asamblate proteinele.

Un α -helix se formează atunci când un lanț polipeptidic se spiralizează regulat formând astfel un cilindru rigid în care fiecare legătură peptidică este asociată cu vecina sa prin legături de hidrogen. Asemenea porțiuni scurte de α -helix sunt conținute în diferite proteine globulare (Figura 2-34). De asemenea, porțiunile proteinelor transmembranare care traversează bistratul fosfolipidic sunt de obicei dispuse în α -helix datorită constrângerilor determinate de mediul hidrofob lipidic al acestor bistraturi.

Într-un mediu apos, un α -helix izolat nu este stabil. Două α -helixuri identice care posedă aranjamente repetate de radicali nepolari se pot împleti unul în jurul celuilalt pentru a forma o structură foarte stabilă denumită *spirală împletită* ("coiled-coil"). Asemenea structuri supraspiralate cu aspect de bastonaș există într-o serie de proteine fibroase, cum sunt fibrele intracelulare de α -keratină din piele și anexele acesteia.

Aspectul spațial al structurilor organizate în α -helix și pachete β care se formează în structura multor molecule proteice, este reprezentat în Figura 2-35.

Variabilitatea moleculelor de proteine

Datorită radicalilor din lanțul de aminoacizi, proteinele sunt foarte variabile în ceea ce privește tipurile de structuri pe care le formează. Această afirmație este susținută, de exemplu, de două proteine abundente secretate de către celule în țesutul conjunctiv – colagenul și elastina – ambele intrând în constituția matricei extracelulare. În moleculele de **colagen**, trei lanțuri polipeptidice separate, fiecare din ele bogate în aminoacidul prolina și conținând aminoacidul glicina la fiecare a treia

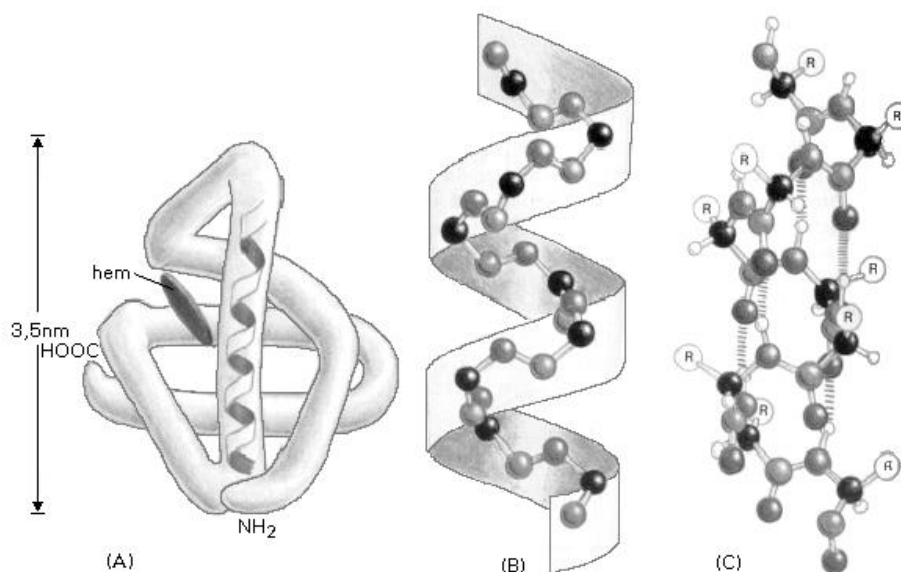


Figura 2-34 α -helixul este o altă structură comună ce se formează în anumite părți din lanțul polipeptidic al proteinelor. (A) Este prezentată molecula de mioglobină (lungă de 153 aminoacizi) cu regiunea de α -helix marcată. (B) Un α -helix perfect. (C) La fel ca și în cazul pachetelor β , fiecare legătură peptidică dintr-un α -helix este legată de vecina ei printr-o legătură de hidrogen.

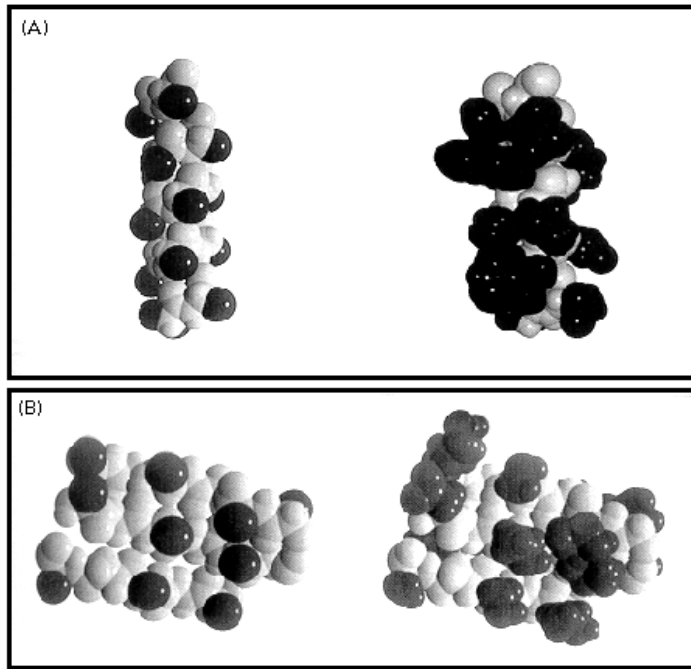


Figura 2-35 Modele spațiale ale unui α -helix și pachet β , cu (dreapta) și fără (stânga) radicalii aminoacizilor. (A) α -helix (porțiune a structurii mioglobinei). (B) Regiune a unui pachet β (porțiune din structura unei imunoglobuline). În fotografiile din stânga fiecare radical este reprezentat printr-o sferă neagră, iar în dreapta radicalii sunt prezentați cu toți atomii.

poziție, se înfășoară unul în jurul celuilalt pentru a forma un triplu helix regulat. Aceste molecule de collagen sunt împachetate împreună, în fibrile în care moleculele adiacente sunt strâns legate între ele prin punți covalente formate între lizine, ceea ce face ca fibrila să fie foarte rezistentă la forțele de tracțiune.

Elastina poate fi situată la cealaltă extremă. Lanțurile sale polipeptidice, relativ laxe și puțin structurate, sunt legate covalent între ele pentru a forma rețele elastice care fac ca țesuturile în care se află să suporte forțe mari de deformare fără a se degrada. După cum se vede în Figura 2-36, elasticitatea se realizează datorită abilității moleculelor proteice individuale de a se despiraliza reversibil atunci când asupra lor

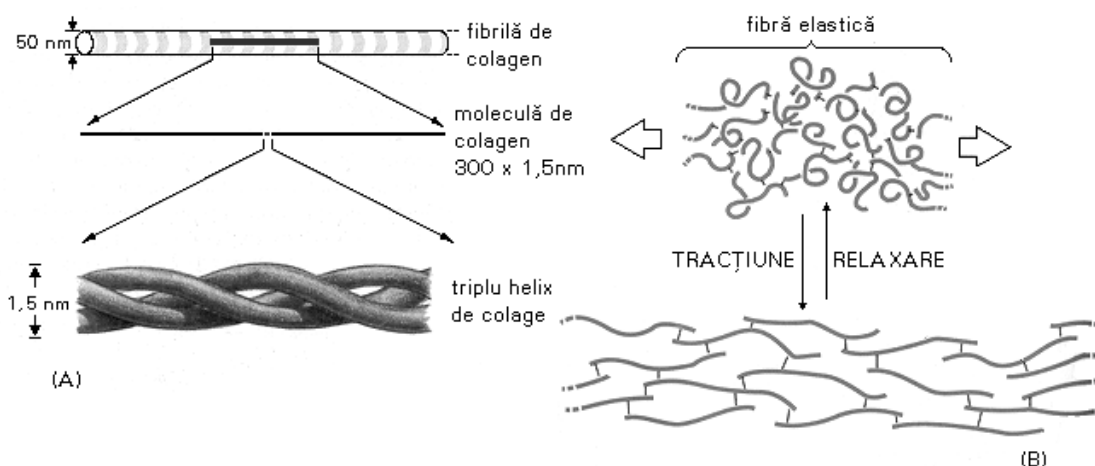


Figura 2-36 Diferențele structurale dintre collagen și elastină. (A) Collagenul; (B) Lanțurile polipeptidice de elastină

acționează o forță de tracțiune.

Este remarcabil cum o aceeași structură chimică de bază – lanțul de aminoacizi – poate forma structuri atât de diferite: o rețea elastică (elastina), un cablu neextensibil cu mare rezistență (colagenul) sau o foarte mare varietate de suprafețe catalitice de pe suprafața proteinelor globulare care funcționează ca enzime. Figura 2-37 ilustrează comparativ limitele de dimensiuni și conformații care, teoretic, pot fi adoptate de un lanț polipeptidic format din 300 de aminoacizi. După cum am explicat anterior, conformația adoptată la un moment dat depinde de secvența de aminoacizi.

Nivelele de organizare structurală ale proteinelor

Pentru descrierea structurii unei proteine, este foarte util să distingem mai multe nivele de organizare. Secvența de aminoacizi formează **structura primară** a proteinei. Interacțiunile regulate prin legături de hidrogen dintre segmentele polipeptidice aflate în contiguitate, care determină α -helixuri și pachete β , constituie **structura secundară** a proteinei. Anumite combinații de α -helixuri și pachete β , împachetate împreună pentru a forma unități globulare, alcătuiesc **domeniile** moleculei proteice.

Domeniile sunt de obicei formate din secțiuni ale lanțului polipeptidic ce conțin între 50 și 350 de aminoacizi și ele par a fi unitățile modulare din care sunt formate proteinele (vezi mai jos). Dacă proteinele mici pot conține doar un singur domeniu, proteinele mari conțin mai multe domenii care sunt conectate prin porțiuni relativ liniare de lanțuri polipeptidice. În sfârșit, polipeptidele individuale servesc ca subunități pentru formarea moleculelor mai mari, uneori denumite *ansamble proteice* sau *complexe proteice*, în care subunitățile sunt legate între ele printr-un mare număr de interacțiuni slabe, necovalente; în cazul proteinelor extracelulare, aceste interacțiuni sunt deseori stabilizate prin legături disulfidice.

Structura tridimensională a unei proteine poate fi ilustrată în mai multe moduri. Să considerăm o proteină neobișnuit de mică cum este *inhibitorul tripsinei pancreatice* (BPTI), care conține 58 de aminoacizi împachetați într-un singur domeniu. BPTI poate fi înfățișată ca un stereomodel care își expune toți atomii săi, în afara hidrogenului, sau ca un model spațial în care o mare parte din detalii sunt neclare. Pe de altă parte, ea poate fi înfățișată mult mai schematic cu toți radicalii nereprezentăți pentru a se putea urmări cursul lanțului polipeptidic (Figura 2-38). O proteină de dimensiuni medii conține aproximativ de șase ori mai mulți aminoacizi decât BPTI, iar multe proteine sunt chiar de 20 de ori mai mari. De aceea, reprezentarea schematică este foarte importantă pentru evidențierea structurii acestor proteine mari și este preferată reprezentării sub forma de stereomodel.

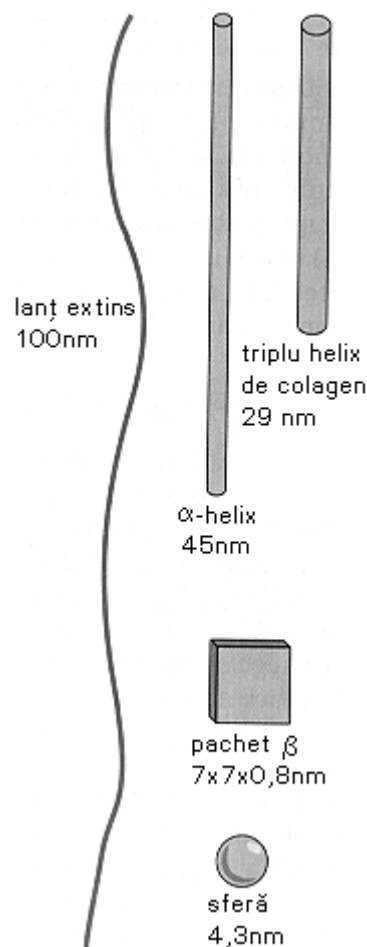


Figura 2-37 Mărimi și aspecte posibile ale unei molecule proteice formată din 300 de aminoacizi.

În Figura 2-39 se observă cum structura unei proteine mari poate fi subîmpărțită în mai multe nivele de organizare, fiecare nivel conținând nivelele inferioare din punct de vedere ierarhic. Aceste nivele cu complexitate de organizare crescătoare pot corespunde cu etapele prin care o proteină nou sintetizată se împachetează în structura sa nativă finală din celulă.

Structura domeniilor moleculare proteice

Un domeniu poate fi privit ca fiind unitatea structurală de bază a unei proteine. Miezul fiecărui domeniu este în mare parte format dintr-o serie de α helixuri, pachete β sau din ambele, strâns interconectate. Aceste structuri secundare regulate sunt favorizate din cauză că ele permit formarea extensivă de legături de hidrogen dintre atomii de bază ai lanțului, stabilizând interiorul domeniului unde moleculele de apă nu pot pătrunde pentru a ocupa prin legături de hidrogen oxigenul carbonilic polar sau hidrogenul amidic din legătura peptidică.

Deoarece există doar un număr limitat de posibilități de combinare a α -helixurilor și pachetelor β pentru a forma o structură globulară, anumite combinații ale acestor elemente, numite **motive** structurale, apar repetat în miezul multor proteine, chiar neînrudite între ele. Un exemplu este *motivul beta în ac de păr* existent în BPTI (marcat distinct în Figura 2-38A), care este format din două lanțuri β antiparalele cuplate printr-o "împletitură" formată de o buclă a lanțului polipeptidic. Un alt exemplu este *motivul beta-alfa-beta*, în care două lanțuri β paralele sunt conectate pe lungimea lor cu un α helix (Figura 2-40).

Variatele combinații ale motivelor formează domeniul însuși, în care lanțul polipeptidic tinde să se îndoie în față și înapoi de-a lungul întregii structuri, fie sub formă de α -helix, fie în pachete β , schimbându-și direcția și formând bucle strânse care pot acoperi suprafața domeniului. Ca rezultat, un domeniu tipic este o structură compactă a cărei suprafață este acoperită de bucle ale lanțului polipeptidic (Figura 2-41). *Regiunile în buclă*, care sunt variabile în lungime și neregulate ca aspect, formează cel mai frecvent situsuri de legare a altor molecule. Deoarece regiunile în buclă sunt expuse la apă, ele sunt bogate în aminoacizi hidrofilii și, pe această bază, poziția lor poate fi frecvent preconizată prin examinarea amănunțită a secvenței de aminoacizi a proteinei.

Proprietățile unice de împachetare a moleculelor proteice

Deoarece fiecare din cei 20 de aminoacizi este chimic distinct și, în principiu, fiecare poate ocupa orice poziție într-un lanț proteic, există $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160.000$ de lanțuri polipeptidice diferite posibile într-o proteină cu o lungime de 4 aminoacizi, sau 20^n de lanțuri polipeptidice posibile cu n aminoacizi. Pentru o lungime obișnuită, formată din 300 de aminoacizi, se pot forma 10^{300} tipuri de proteine.

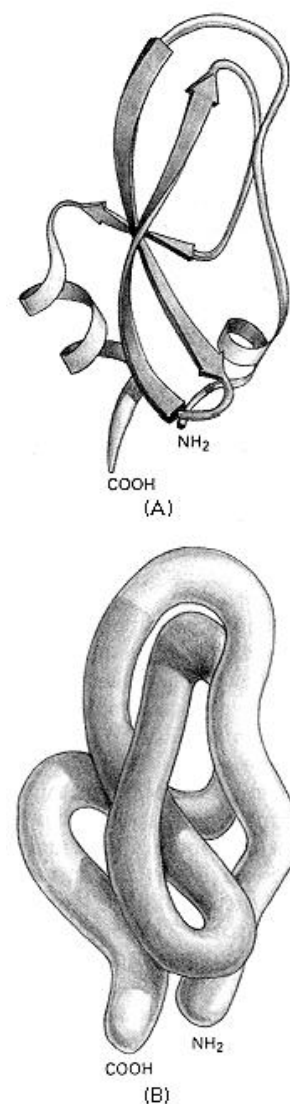
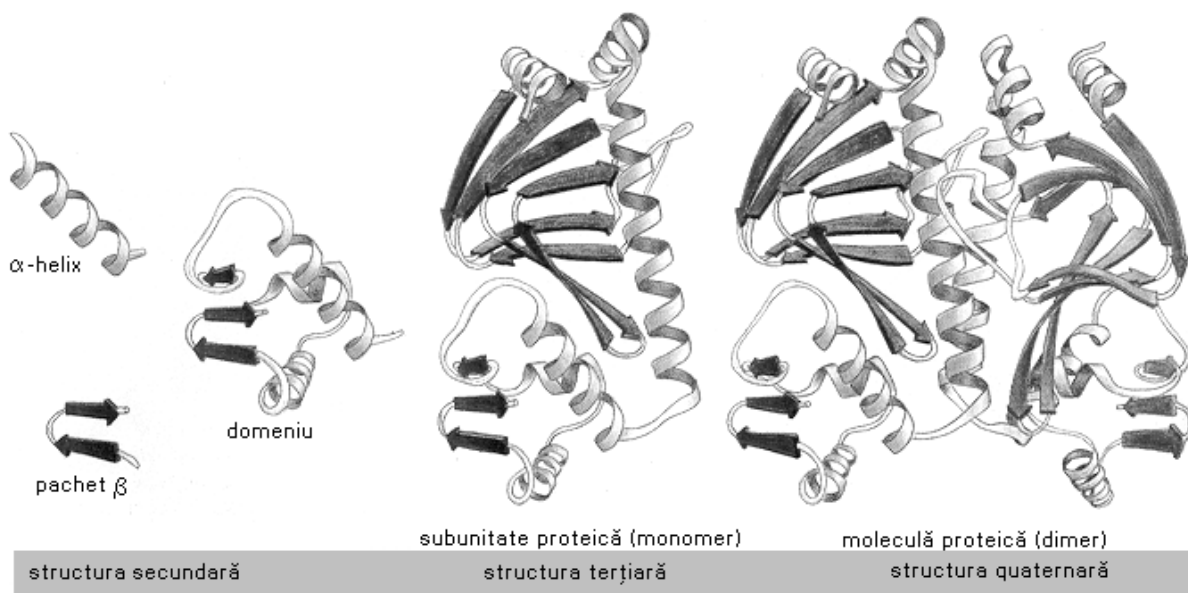


Figura 2-38 Inhibitorul tripsinei pancreatice (BPTI)
(A) modelul de bandă; (B) modelul "vermiform".



Totuși, doar o proporție foarte mică din acest număr enorm de proteine posibile poate adopta o conformație tridimensională stabilă. Marea majoritate pot avea multe alte conformații cu energia aproape egală, fiecare cu proprietăți diferite. Proteinele cu asemenea proprietăți variabile nu vor putea fi utile și vor fi eliminate prin selecție naturală pe parcursul evoluției. Proteinele actuale au structura și chimismul atât de sofisticate din cauza proprietăților lor unice de împachetare. Această conformație unică este extrem de stabilă nu doar datorită secvenței de aminoacizi, ci și datorită faptului că această conformație are proprietăți chimice particulare care permit proteinei să îndeplinească în celulă funcții catalitice și structurale precise. Proteinele sunt atât de exact structurate, încât modificarea doar a unui număr foarte mic de atomi dintr-un aminoacid, poate uneori să distrugă structura și să cauzeze modificări drastice în funcție.

Figura 2-39 Trei nivele de organizare structurală a unei proteine.



Figura 2-40 Exemplu al unui motiv proteic comun.

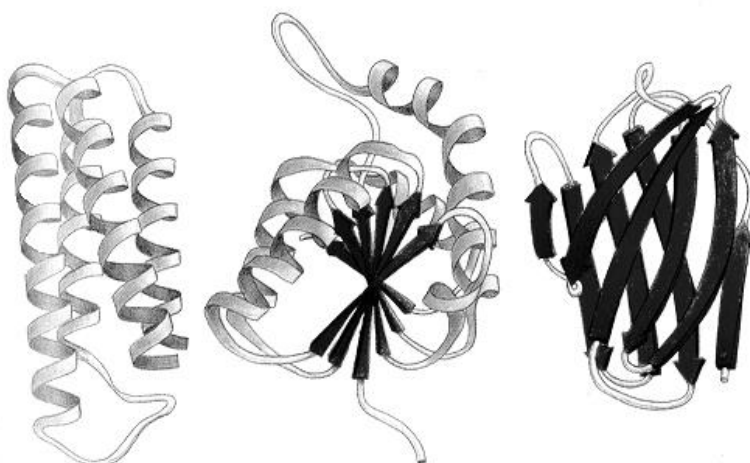


Figura 2-41 Modelul în bandă al structurii tridimensionale a diferitelor organizări ale domeniilor proteice.

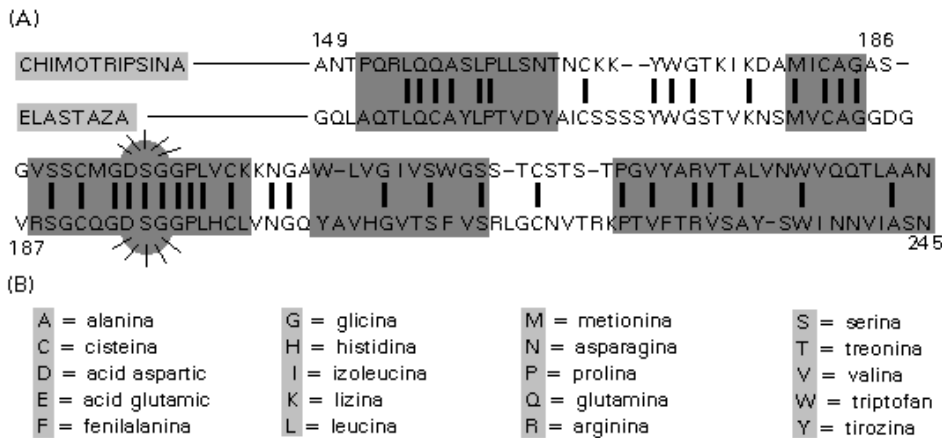


Figura 2-42 Comparație între secvențele de aminoacizi a doi membri ai familiei de serin proteaze. Serina din poziția 195 se află în situsul activ al proteinei și de aceea este marcată mai deosebit. Casetele gri semnifică faptul că fiecare aminoacid din acestea ocupă o poziție perfect echivalentă în structura tridimensională a acestor proteine. (B) Prescurtarea standard a aminoacizilor.

"Famiile" de proteine

Celulele posedă mecanisme genetice care produc duplicarea genelor, modificarea și recombinarea lor pe parcursul evoluției. Ca urmare, doar atunci când s-a format o proteină cu proprietăți de suprafață utile, structura sa de bază poate fi încorporată în alte proteine. În organismele actuale, proteinele cu funcții diferite, dar înrudite, au adesea secvențe de aminoacizi similare. Asemenea familii de proteine se presupune că au evoluat dintr-o genă ancestrală unică ce, prin duplicare în cursul evoluției, a dat naștere la alte gene în care s-au acumulat treptat mutații care produc proteine înrudite, dar cu funcții noi.

Să considerăm **serin proteazele**, o familie de enzime proteolitice din care fac parte enzimele digestive chimotripsina, tripsina și elastaza, precum și unele proteaze din cascada reacțiilor de coagulare a sângelui. Dacă comparăm două asemenea enzime, aproximativ 40% din pozițiile secvenței de aminoacizi, sunt ocupate de același aminoacid (Figura 2-42). Similaritatea conformației lor tridimensionale a fost determinată prin difracție cu raze X (Figura 2-43).

Situația evidențiată în cazul serin proteazelor este întâlnită la alte

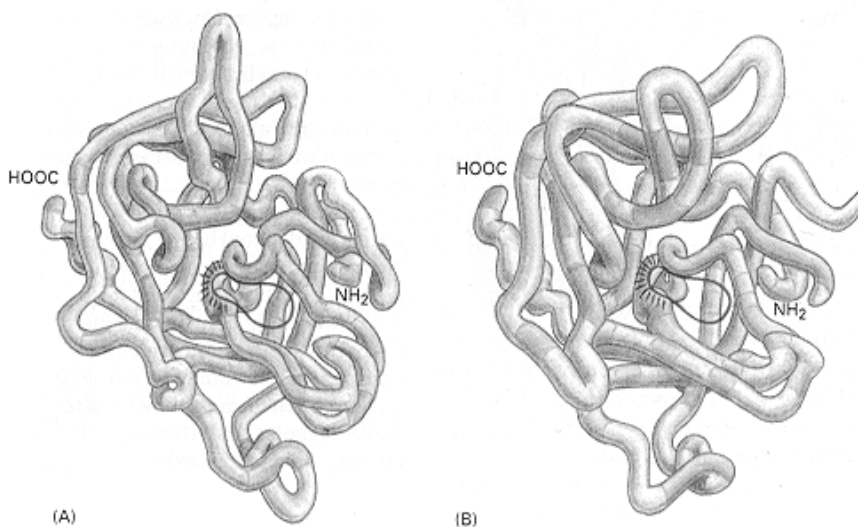


Figura 2-43 Comparație între conformațiile a două serin proteaze, prezentate în Figura 2-42. Elastaza este prezentată în (A), iar chimotripsina în (B). Situsul activ, care este încercuit conține o serină activată.

sute de familii de proteine. În unele cazuri, divergența în evoluție a secvenței de aminoacizi a intervenit mult mai devreme decât în cazul serin proteazelor, astfel că nu putem să confirmăm înrudirea dintre două proteine din cadrul familiei decât prin determinarea structurii lor tridimensionale. De exemplu, atât proteina $\alpha 2$ de la mușegaiuri, cât și proteina "de învelire" de la *Drosophila* sunt proteine reglatoare de gene din aceeași familie. Din cauză că ele sunt identice doar prin 17 din cei 60 de aminoacizi pe care îi conțin, înrudirea lor a fost dedusă doar prin compararea structurii tridimensionale (Figura 2-44).

Membrii variați ai unei familii mari de proteine, pot avea funcții distincte. Unele modificări de aminoacizi care fac ca aceste proteine să fie diferite au fost fără îndoială selectate în cursul evoluției deoarece ele au dus la modificări în activitatea biologică. Alte modificări de aminoacizi au putut fi "neutre", neavând nici un efect benefic și nici negativ asupra structurii de bază și a funcțiilor proteinei. Deoarece mutațiile sunt un proces întâmplător, ele pot avea uneori un efect ce duce la alterarea structurii tridimensionale a unei proteine suficient de mari pentru a o inactiva. Asemenea proteine inactive s-au pierdut deoarece organismul la care au apărut a fost eliminat prin selecție naturală. Nu este deloc surprinzător că celulele conțin seturi structural înrudite de lanțuri polipeptidice cu o moleculă ancestrală comună, însă care îndeplinesc diferite funcții.

Combinarea domeniilor polipeptidice preexistente

După ce un număr de proteine cu suprafața stabilă au fost produse în celule, din ele pot fi generate noi suprafețe, cu noi proprietăți, prin legarea prin interacțiuni necovalente a mai multor proteine preexistente, producându-se astfel *complexele proteice*. Această combinare a proteinelor pentru a rezulta molecule mai mari de tipul ansamblelor proteice funcționale, este frecvent întâlnită în celule. Unele complexe proteice au greutatea moleculară de peste un milion, față de greutatea

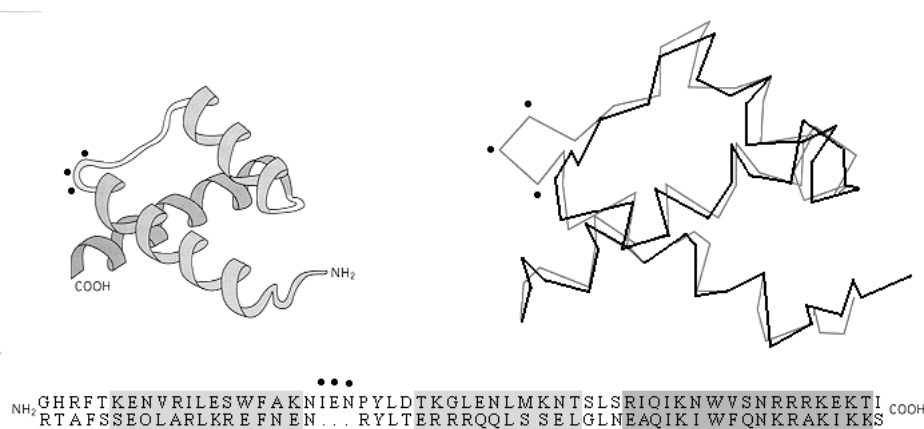


Figura 2-44 Comparatie între două domenii proteice de legare la ADN provenite de la două organisme separate prin mai mult de un miliard de ani de evoluție. (A) Structura schematică. (B) Poziția carbonului α . Structurile tridimensionale au fost determinate prin cristalografie cu raze X pentru proteina $\alpha 2$ de la mușegaiuri (gri) și proteina de "învelire" de la *Drosophila* (negru).

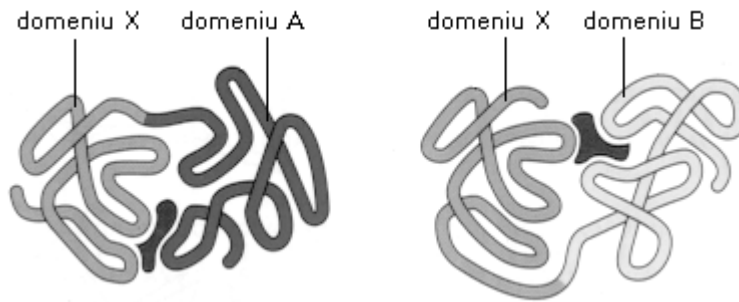


Figura 2-45 Evoluția unui nou situs de legare a ligandului.

moleculară a unui lanț polipeptidic obișnuit de 40.000 (cu 300-400 aminoacizi).

Un mod alternativ de producere a unei proteine noi din lanțuri preexistente este acela prin care se leagă alăturat secvențele de ADN corespunzătoare pentru a se crea o genă nouă ce codifică un singur lanț polipeptidic mai mare. Se presupune că în acest mod au evoluat proteinele la care diferitele porțiuni ale lanțului polipeptidic se împachetează independent în domenii globulare separate. Acestea au existat mult timp sub forma unor complexe proteice formate din polipeptide separate. Multe proteine au asemenea "multidomenii" structurale și, cum se poate presupune conform considerațiilor evoluționiste anterioare, situsurile de legare ale substratului au rezultat frecvent prin juxtapunerea domeniilor separate (Figura 2-45). Astfel, pentru proteina cu mai multe domenii a cărei structură tridimensională este prezentată în Figura 2-46, suprafața unui domeniu care leagă NAD^+ , este aparent combinată cu suprafața unui al doilea domeniu care leagă un zaharid. În acest proces se formează un situs activ care utilizează NAD^+ pentru a cataliza oxidarea glucidelor.

Un alt mod de reutilizare a unei secvențe de aminoacizi este cazul proteinelor fibroase lungi, de tipul colagenului (vezi Figura 2-36). În acest caz, structura se formează din repetări multiple ale unei secvențe ancestrale de aminoacizi. Pentru o celulă, această strategie de alăturare a

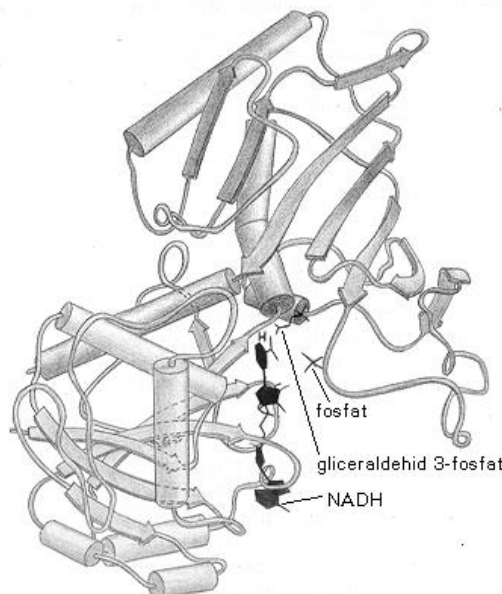


Figura 2-46 Structura enzimei glicolitice gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza. Proteina este formată din două domenii, cu regiunile de α -helix reprezentate prin cilindrii și pachetele β prin săgeți.

secvențelor de aminoacizi prin legarea secvențelor de ADN preexistente, este mult mai eficientă decât generarea de secvențe proteice noi prin mutații întâmplătoare.

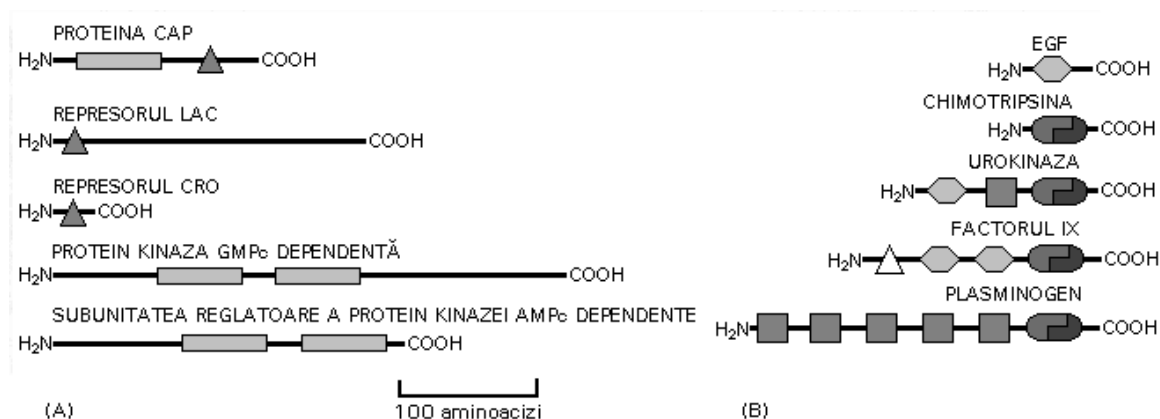
Deducerea funcțiilor unor proteine pe baza omologiilor structurale

Descoperirea tehnicilor pentru secvențierea rapidă a moleculelor de ADN a făcut posibilă determinarea secvențelor de aminoacizi ale proteinelor pe baza secvenței de nucleotide ale genelor respective. Creșterea rapidă a *bazei de date pentru proteine* a fost determinată și de faptul că biologii folosesc computerele pentru a stabili posibilele omologii de secvențe dintre proteinele nou secvențializate și cele studiate anterior. Deși până acum au fost determinate secvențele pentru un mic procent de proteine din organismele eucariote, s-a observat că este obișnuit faptul că o proteină nou secvențializată este omoloagă cu o alta deja cunoscută. Acest lucru ne indică faptul că multe proteine își au originea dintr-un număr relativ mic de tipuri ancestrale. După cum am arătat deja, secvențe din multe proteine mari prezintă indicii că au evoluat prin alăturarea în noi combinații a unor domenii preexistente – proces numit *amestecarea domeniilor* (Figura 2-47).

Aceste comparații între proteine sunt importante deoarece structurile înrudite determină deseori funcții înrudite. Prin descoperirea unei omologii în secvența aminoacizilor cu o proteină a cărei funcții sunt cunoscute, se pot economisi mulți ani de experimente. De exemplu, asemenea omologii de secvențe indică în primul rând că anumite gene de reglare a ciclului celular la celule de mușegaiuri și genele din celulele mamiferelor care determină transformarea lor în celule canceroase, sunt protein kinaze. În același mod, multe din proteinele care controlează dezvoltarea embrionară la *Drosophila* au fost recunoscute ca fiind proteine de reglare a genelor, pe când alte proteine din embriogeneza au fost identificate ca fiind serin proteaze.

Descoperirea omologiei domeniilor poate fi utilă și în alt mod.

Figura 2-47 Amestecarea domeniilor. (A) Proteina bacteriană CAP conține un domeniu (triunghiul) care se leagă la o secvență specifică a ADN, precum și un al doilea domeniu (dreptunghiul), care leagă AMP ciclic. (B) Serin proteazele de tipul chimotripsinei sunt formate din două domenii. La unele proteaze mult mai specializate, cele două domenii se conectează cu unul sau mai multe domenii omoloage, cum este cazul factorului de creștere epidermal (hexagonul), proteina de legare a calciului (triunghiul alb) sau cu domenii ce conțin punți disulfidice interne (pătratele).



Este mult mai dificilă determinarea structurii tridimensionale a unei proteine, decât determinarea secvenței sale de aminoacizi. Dar, conformația unui nou domeniu proteic secvențializat poate fi dedusă doar dacă acesta este omolog cu un domeniu al unei proteine a cărei conformație a fost deja determinată prin difracție cu raze X.

Asamblarea subunităților proteice în structuri mai mari

Aceleași principii care fac ca mai multe domenii proteice să se asocieze pentru a genera situsuri de legătură pentru molecule mici, operează și în cazul generării de structuri mult mai mari în celulă. Structurile supramoleculare cum sunt complexe enzimatice, ribozomii, filamentele proteice, virusurile și membranele nu sunt formate dintr-o singură moleculă gigantă, cu atomii legați covalent. Ele sunt de obicei formate din ansambluri moleculare legate necovalent, numite *subunități* ale structurii finale.

Există mai multe avantaje în utilizarea subunităților mici pentru construirea structurilor mari: (1) construirea unei structuri mari din mai multe subunități mici reduce cantitatea de informație genetică necesară; (2) atât asamblarea, cât și dezasamblarea poate fi ușor controlată pentru că subunitățile se asociază prin multiple legături cu energie relativ scăzută; (3) erorile în sinteza structurii pot fi mult mai ușor evitate deoarece mecanismele de corecție pot opera pe parcursul asamblării pentru a exclude subunitățile malformate.

Formarea ansamblelor geometrice regulate

Dacă o proteină are un situs de legătură care este complementar la o regiune din ea însăși, ea se poate asambla spontan pentru a forma o structură mai mare. În cel mai simplu caz, un situs de legătură se recunoaște pe el însuși și formează un *dimer* simetric. În acest fel, o serie de enzime sau alte proteine formează dimeri care constituie frecvent subunități pentru structurarea ansamblurilor moleculare mari (Figura 2-48).

Când un situs de legare al unei proteine este complementar la o regiune de pe suprafața sa care nu include și situsul de legare însuși, se poate forma un lanț de subunități. În funcție de o anumită orientare specială a două situsuri de legătură, lanțul poate forma un inel de subunități (Figura 2-49). Mai frecvent se formează un polimer extins de subunități în așa fel încât fiecare subunitate este legată de următoarea în mod identic. Astfel, polimerii pot fi aranjați într-un helix care se poate extinde indefinit (vezi Figura 2-10). De exemplu, un *filament de actină* este o structură helicală formată dintr-o singură subunitate proteică globulară numită *actină*; filamentele de actină sunt componente majore ale citosolului de la toate celulele eucariote (Figura 2-50). După cum

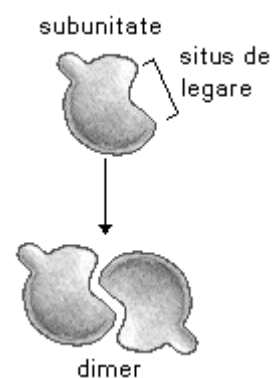


Figura 2-48 Formarea unui dimer din subunități proteice de același tip.

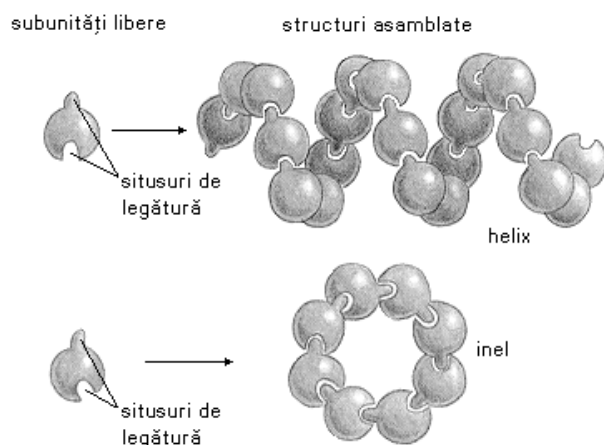


Figura 2-49 Prin interacțiunea repetată a unui singur tip de subunități proteice se pot forma inele sau spirale.

vom discuta mai jos, proteinele globulare se pot, de asemenea, asocia cu cele vecine, pentru a forma straturi extinse sau tuburi .

Formarea structurilor proteice alungite

Când forțele de tracțiune mecanică sunt de o importanță majoră, ansamblele supramoleculare sunt de obicei formate mai degrabă din subunități fibrilare decât globulare. Asemenea ansamble pot fi stabilizate pe regiuni extinse de contacte proteină-proteină în care subunitățile sunt înfășurate una în jurul celeilalte formând un helix multistratificat. O unitate structurală deosebit de stabilă, care este utilizată în mod repetat este cunoscută ca fiind o "**spirală spiralată**" (Figura 2-51). Ea se formează prin împerecherea a două subunități α -helicale care conțin aranjamente repetitive de radicali nepolari. Cele două subunități α -helicale sunt de obicei identice și se dispun paralel (adică în aceeași



Figura 2-50 Filamentul de actină.

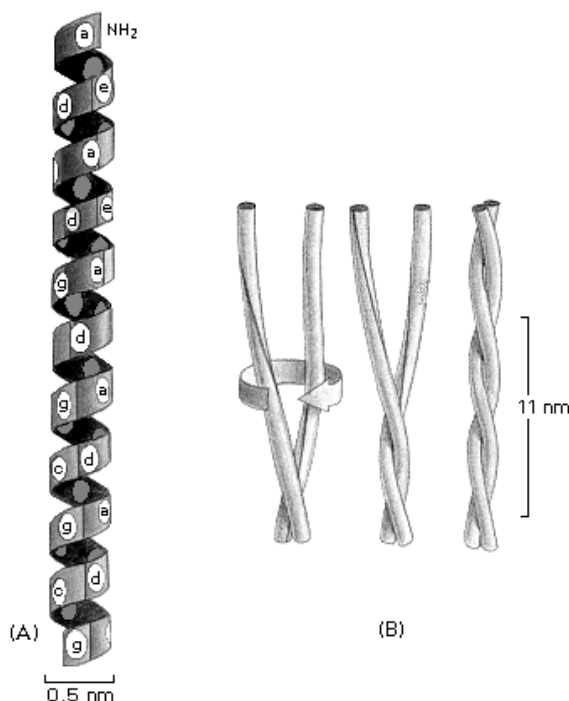


Figura 2-51 Structura unei "spirală spiralate". În (A) este înfățișat un singur α -helix cu catenele laterale ale aminoacizilor notate într-o secvență de șapte (abcdef, de jos în sus). (B), două helixuri se înfășoară unul în jurul celuilalt în așa fel încât aminoacizii hidrofobi ai unui α -helix să interacționeze cu aminoacizii hidrofobi ai celuilalt helix.

direcție, dinspre capătul amino spre capătul carboxil). Ele se înfășoară treptat, una în jurul celeilalte, pentru a produce un filament continuu, cu un diametru de aproximativ 2 nm. Deși "spiralele spiralate" servesc ca domenii de dimerizare pentru mai multe familii de proteine reglatoare de gene, în cele mai frecvente cazuri, asemenea structuri se pot extinde pe distanțe mai mari de 100 nm și servesc ca blocuri de construcție pentru o structură fibroasă mare, cum sunt filamentele groase de miozină din celulele musculare.

Asamblarea proteinelor în straturi, tuburi sau sfere

Unele subunități proteice se assemblează în straturi plate în care subunitățile sunt aranjate în formațiuni hexagonale. Uneori în asemenea aranjamente sunt structurate proteinele membranare specializate din bistratul fosfolipidic. Printr-o mică modificare a geometriei subunităților individuale, stratul hexagonal poate fi convertit într-un tub (Figura 2-52) sau, prin mai multe schimbări, într-o sferă. Tuburile proteice și sferile care cuprind molecule specifice de ARN sau ADN, formează învelișul virusurilor.

Formarea structurilor închise, cum sunt inelele, tuburile sau sferile, asigură o stabilitate adițională din cauză că cresc numărul de legături ce se formează între subunitățile proteice. Din cauză că o asemenea structură este mutual dependentă, interacțiunile cooperative dintre subunități pot determina asamblarea sau dezamblarea, prin modificări relativ mici ale subunităților individuale. Aceste principii sunt foarte evident ilustrate în *capsida* proteică a unor virusuri, care au forma unei sfere. Acest înveliș al virusurilor este format din sute de subunități proteice identice în care se află inclus și protejat acidul nucleic viral (Figura 2-53). O proteină, cum este cea din capsidă, trebuie să aibă o structură particular adaptabilă deoarece ea trebuie să permită mai multe modalități de contact și aranjamente care să asigure acizilor nucleici capacitatea de a iniția replicarea virală doar după ce virusul a intrat în celulă.

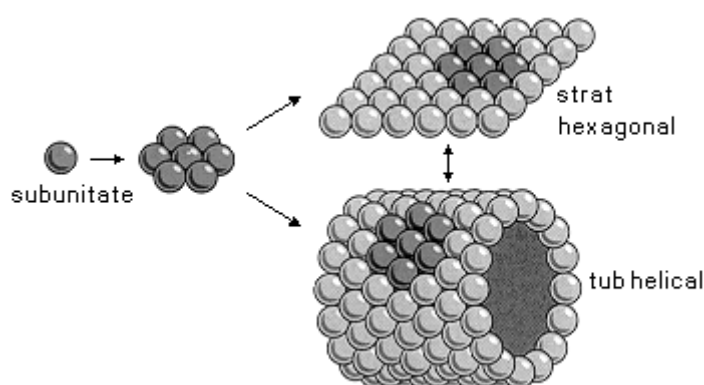


Figura 2-52 Proteinele globulare dispuse în formațiuni hexagonale pot forma atât straturi plane, cât și structuri tubulare.

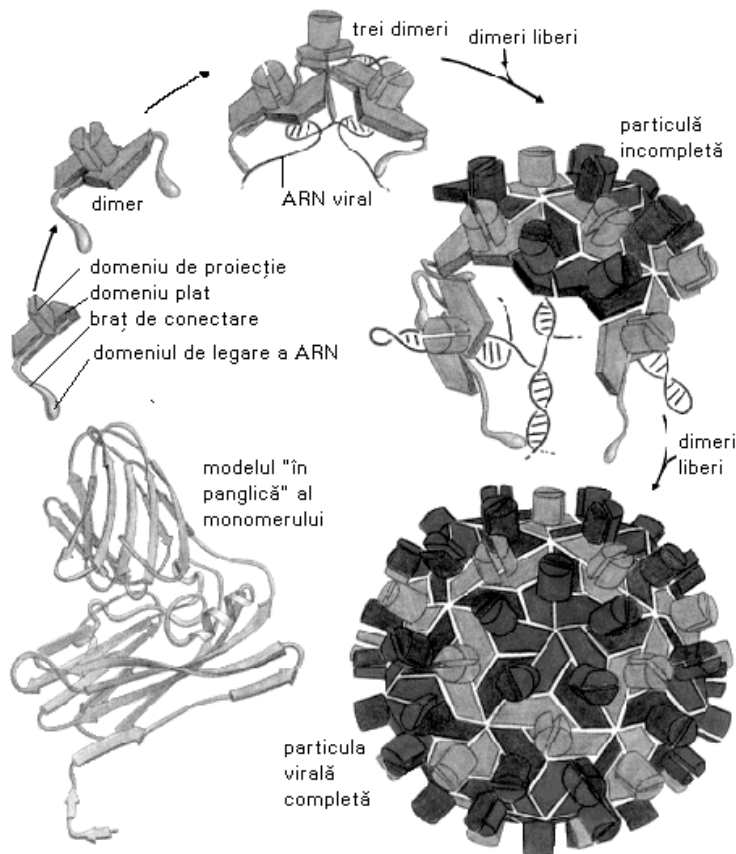


Figura 2-53 Structura unui virus sferic. Virusul TBSV.

Autoasamblarea structurilor proteice celulare

Informația necesară pentru formarea ansamblelor macromoleculare complexe trebuie să fie conținută în subunitățile înseși deoarece, în condiții favorabile, subunitățile izolate se pot asambla spontan în structura finală. Primul agregat macromolecular care s-a demonstrat că este capabil să se auto-asambleze din părțile sale componente, a fost *virusul mozaicului tutunului (VMT)*. Acest virus are forma unui bastonaș lung la care un cilindru proteic include în interior miezul de ARN helical (Figura 2-54). Dacă ARN disociat se amestecă cu subunitățile proteice în soluție, ele se recombina pentru a forma particula virală activă. Procesul de asamblare este neobișnuit de complex și include formarea de inele duble proteice care constituie intermediari la care se adaugă elementele învelișului viral.

Un alt agregat macromolecular care se formează din părțile sale componente este ribozomul bacterian. Asemenea ribozomi sunt compuși din aproximativ 55 de diferite molecule proteice și 3 molecule de ARNr diferite. Dacă componentele individuale sunt incubate în condiții corespunzătoare, ele refac spontan structura originală. Foarte important, asemenea ribozomi reconstituiți sunt capabili să producă sinteza proteinelor. După cum s-a presupus, reasamblarea ribozomilor urmează o cale specifică: mai întâi, anumite proteine se leagă la ARN, iar acest

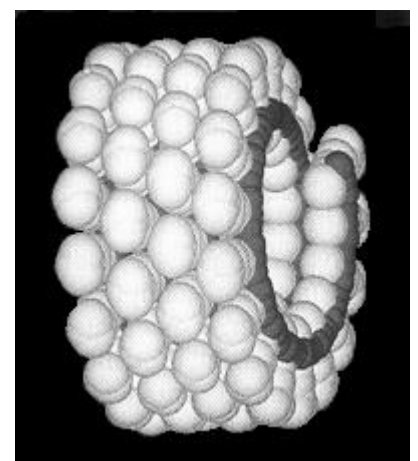


Figura 2-54 Structura virusului VMT.

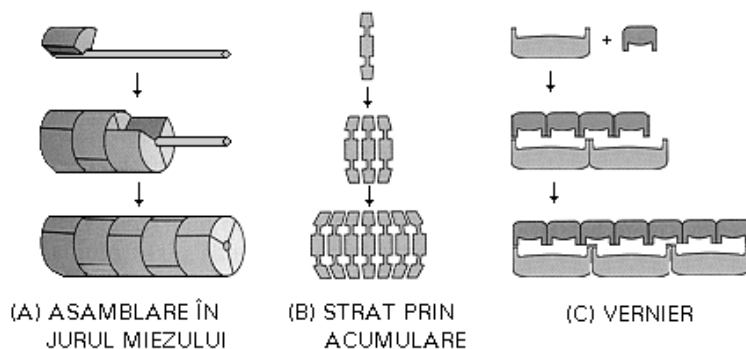


Figura 2-55 Trei ipoteze după care se presupune că este determinată lungimea unui ansamblu proteic. (A) Asamblarea de-a lungul unei proteine (miez) care este măsura lungimii. (B) Blocarea asamblării din cauză că la stratul care se constituie în structură polimerică nu se mai pot adăuga alte subunități deoarece energia necesară pentru legarea în structură a unei subunități noi este prea mare. (C) Asamblarea pe principiul "vernierului", în care, două tipuri de molecule diferite ca lungime formează un complex ce crește până apare o potrivire perfectă la capete.

complex este apoi recunoscut de celelalte proteine, până ce structura devine completă.

Nu este încă suficient de clar cum sunt reglate asemenea procese de auto-asamblare. De exemplu, unele structuri din celulă au o lungime precis definită, de câteva ori mai mare decât componentele sale macromoleculare. Este un mister în majoritatea cazurilor, cum este determinată această lungime. În Figura 2-55 sunt ilustrate trei mecanisme posibile. În cel mai simplu caz, mărimea finală a ansamblului este determinată de un miez proteic lung (sau o altă moleculă) în jurul căruia se agregă subunitățile. Acesta este mecanismul care determină lungimea particulei VMT, în care miezul este reprezentat de lanțul de ARN. Similar, o proteină miez determină lungimea filamentelor subțiri din mușchi, precum și corpul lung la anumite virusuri bacteriene.

Nu toate structurile se formează prin auto-asamblare

Unele structuri celulare stabilizate prin legături necovalente nu sunt capabile de auto-asamblare. De exemplu, o mitocondrie, un cil sau o miofibrilă, nu se pot forma spontan într-o soluție ce conține macromoleculele lor componente deoarece o parte a informației necesare pentru asamblare este adusă de enzime speciale și de alte proteine celulare, care îndeplinesc funcția de matriță, dar care nu apar în structura finală. Unor componente structurale le pot lipsi ingredientele pentru propria asamblare. De exemplu, în formarea unor virusuri bacteriene, structura capului, care este format dintr-un singur tip de unități proteice, este asamblată pe un suport temporar format dintr-o altă proteină. Această proteină este absentă din particula virală finală și astfel, structura capului nu se poate asambla spontan decât după ce ea a fost îndepărtată. Un alt exemplu îl constituie situațiile în care, în procesul de asamblare intervine ca etapă esențială și ireversibilă, degradarea proteolitică. Acesta este cazul învelișului unor virusuri bacteriene sau a unor ansambluri proteice mai simple cum este colagenul sau hormonul insulina (Figura 2-56). Foarte probabil, asamblarea structurilor complexe, cum sunt mitocondriile sau cilii, poate implica atât ordonarea temporală, cât și spațială determinată de celelalte componente celulare, dar și procesarea ireversibilă catalizată de diferite enzime degradative.

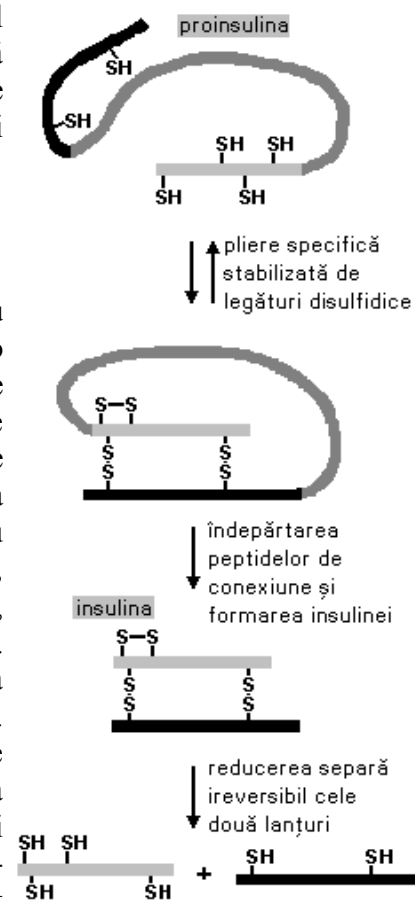


Figura 2-56 Hormonul polipeptidic insulina nu se poate reface spontan dacă legăturile sale disulfidice sunt rupte.

Rolul catalitic al proteinelor

Proprietățile chimice ale unei molecule proteice sunt determinate aproape în întregime de catenele laterale expuse la suprafața sa. Acestea sunt capabile să formeze legături slabe, necovalente, cu alte molecule. Când o moleculă proteică se leagă la altă moleculă, aceasta din urmă este de obicei denumită **ligand**. Deoarece interacțiunea efectivă dintre molecula proteică și ligand necesită formarea simultană a mai multor legături slabe între ele, liganzii care se leagă mai puternic la proteină sunt cei care se potrivesc cel mai precis la suprafața ei. Regiunea dintr-o proteină la care se asociază ligandul, cunoscută sub denumirea de **situs de legătură**, constă de obicei dintr-o cavitate formată de aranjamentul specific al aminoacizilor pe suprafața proteinei. Acești aminoacizi aparțin, cel mai adesea, unor regiuni distincte ale lanțului polipeptidic (Figura 2-57) și reprezintă doar o fracțiune minoră din totalul de aminoacizi ai moleculei. Restul moleculei proteice este probabil necesar pentru menținerea lanțului polipeptidic în poziția corectă, precum și pentru formarea situsurilor de legătură adiționale cu rol reglator; interiorul moleculei poate fi important doar dacă acesta determină ca molecula să aibă o suprafață de formă corespunzătoare și rigiditate.

Proprietățile chimice ale proteinelor sunt determinate de conformația lor

Radicalii laterali ai unei proteine interacționează uneori între ei în așa fel încât modifică reactivitatea chimică a anumitor catene laterale ale

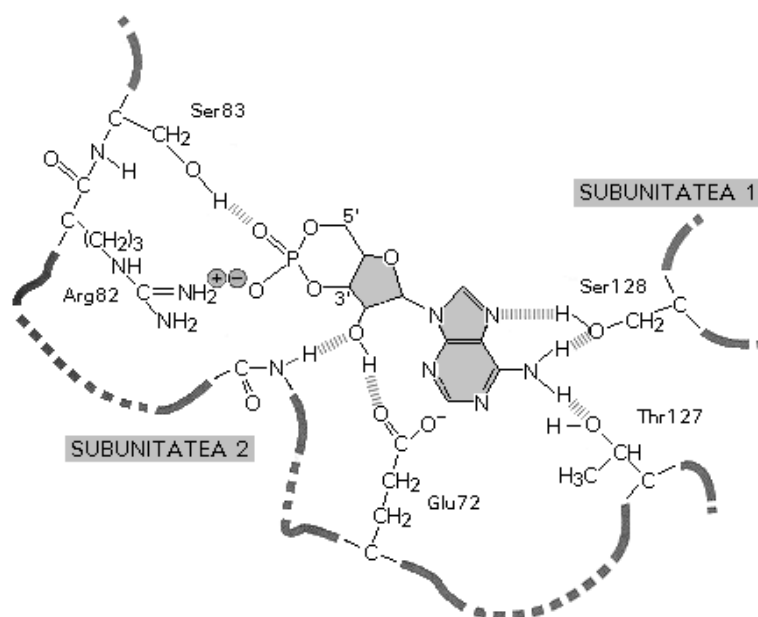


Figura 2-57 Situsul de legare a ligandului la proteina CAP ("catabolite gene activator protein"). Se observă legăturile de hidrogen dintre proteina CAP și ligandul său reprezentat de AMP ciclic (gri).

aminoacizilor. Aceste interacțiuni sunt de mai multe tipuri.

În primul rând, porțiunile vecine ale unui lanț polipeptidic interacționează în așa fel încât reduc accesul moleculelor de apă la anumite părți de pe suprafața proteinei. Pentru că moleculele de apă tind să formeze legături de hidrogen, ele intră în competiție cu liganzii pentru anumiți radicali de pe suprafața proteinei (Figura 2-58). Forța legăturilor de hidrogen (și a interacțiunilor ionice) dintre proteine și liganzii lor este de aceea, mult crescută dacă moleculele de apă sunt excluse. La prima vedere este greu de imaginat mecanismul prin care să fie exclusă o moleculă atât de mică cum este cea de apă, de pe suprafața proteinei, fără a fi afectat accesul ligandului. Datorită tendinței puternice a apei de a forma legături de hidrogen, moleculele de apă există sub forma unei rețele de legături de hidrogen, iar moleculele individuale pot manifesta o tendință foarte nefavorabilă energetic de a rupe această rețea pentru a pătrunde în adânciturile suprafeței proteinei.

În al doilea rând, aglomerarea radicalilor polari ai aminoacizilor învecinați poate altera reactivitatea lor. De exemplu, dacă un număr de radicali negativi sunt forțați de împachetarea proteinei să se apropie, în ciuda forței de repulsie mutuală, afinitatea acestui situs pentru ioni pozitivi, este mult crescută. Anumite catene laterale ale aminoacizilor pot de asemenea să interacționeze prin legături de hidrogen și să activeze în acest fel radicali care în mod normal sunt nereactivi (de exemplu gruparea $-CH_2OH$ a serinei, din Figura 2-59), sau pot intra în reacție pentru a rupe anumite legături covalente.

Suprafața fiecărei molecule proteice are o reactivitate chimică unică ce depinde nu numai de care catene laterale ale aminoacizilor sunt expuse, ci și de orientarea lor exactă. Datorită acestui considerent, două conformații doar cu puțin diferite ale aceleiași proteine, diferă foarte mult în ceea ce privește proprietățile lor chimice.

În situațiile în care reactivitatea radicalilor laterali este insuficientă, proteinele pot lega la suprafața lor anumite molecule neproteice. Asemenea liganzi au rol de **coenzime** în reacțiile catalizate enzimatic; uneori aceste coenzime sunt atât de strâns legate la proteină încât devin parte componentă a proteinei însăși. Ca exemplu putem da gruparea cu fier numită *hem* din hemoglobină și citocromi, *tiamin pirofosfatul* din enzimele implicate în transferul grupării aldehydice și *biotina* din enzimele implicate în transferul grupării carboxil. Unele

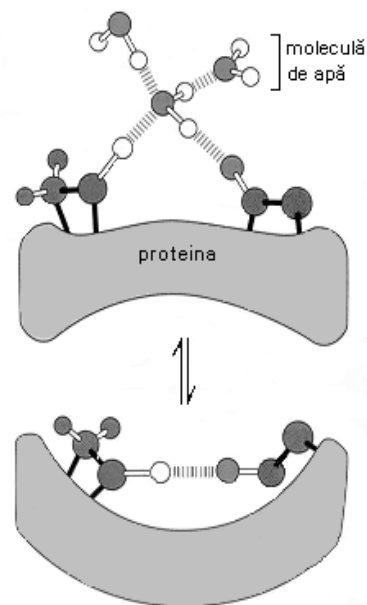
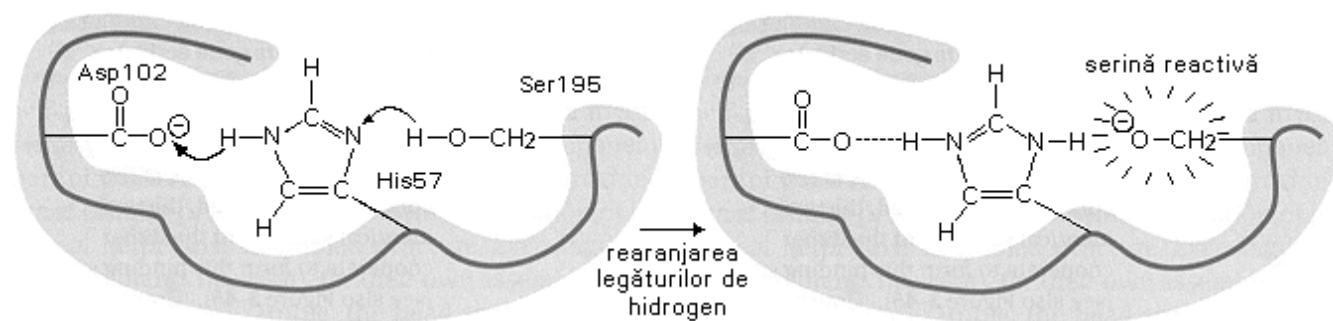


Figura 2-58 Competiția pentru legăturile de hidrogen.

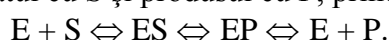
Figura 2-59 Un aminoacid foarte reactiv din situsul activ al unei enzime. Exemplul din figură este "triada catalitică" existentă în chimotripsină, elastază și alte serin proteaze. Radicalul acidului aspartic induce scoaterea unui proton din serina 195 de către histidina. Acest fapt activează serina pentru a forma o legătură covalentă cu substratul enzimei, hidrolizând legătura peptidică.



coenzime sunt molecule organice foarte complexe care au fost selectate datorită reactivității chimice unice pe care o posedă atunci când se leagă la suprafața unei proteine. Pe lângă centrul lor reactiv, asemenea coenzime posedă alți radicali necesari pentru legarea la proteina "gază" (Figura 2-60).

Prima etapă dintr-o cataliză enzimatică: legarea substratului

Una din cele mai importante funcții ale proteinelor este de a acționa ca enzime ce catalizează reacții chimice specifice. În acest caz, ligandul se numește **substrat**, iar legarea substratului la enzimă este un prelude esențial în reacția chimică. Dacă notăm o enzimă cu E, substratul cu S și produsul cu P, principala cale de reacție este:



Din această descriere simplă a reacției catalizate enzimatic, putem observa că există o limită în cantitatea substratului care poate fi procesată de o singură moleculă enzimatică, într-un anumit timp. Dacă crește concentrația substratului, crește de asemenea și viteza de formare a produsului, până la o valoare maximă (Figura 2-61). La acest punct molecula de enzimă este saturată cu substrat, iar viteza reacției (notată cu V_{max}) depinde doar de rapiditatea cu care poate fi procesată molecula de substrat. Această viteză, împărțită la concentrația enzimei, este numită **numărul de turnover** (numărul de prelucrare). Numărul de turnover este de aproximativ 1000 de molecule substrat prelucrate per secundă și per moleculă enzimatică, dar în cazuri extreme acest număr poate fi mult mai mare.

Un alt parametru cinetic utilizat frecvent pentru caracterizarea unei enzime este K_M , care reprezintă concentrația de substrat necesară ca reacția să se desfășoare la jumătate din viteza sa maximă (vezi Figura 2-61). Un K_M mic denotă că enzima atinge viteza sa catalitică maximă la o concentrație mică de substrat și indică în general că enzima prezintă mare afinitate pentru substrat.

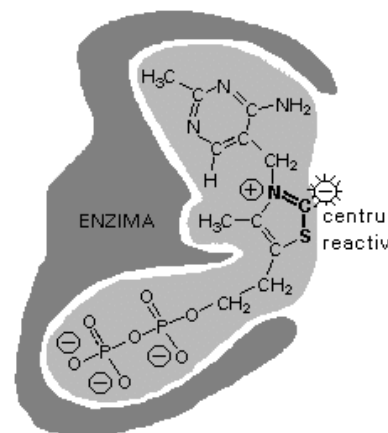


Figura 2-60 Coenzimele. Tiamin-pirofosfaftul (TTP) (gri deschis).

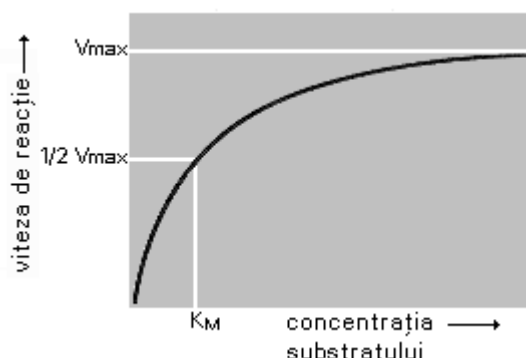


Figura 2-61 Cinetica enzimatică. Explicațiile în text.

Stabilizarea selectivă a stărilor de tranziție ale enzimelor

Enzimele produc reacții chimice cu viteze extrem de ridicate, mult mai ridicate decât orice catalizator sintetic. Această eficiență poate fi atribuită mai multor factori. În primul rând, enzima servește pentru creșterea concentrației moleculelor de substrat la situsul catalitic și de a aduce atomii potriviți în orientarea corectă pentru reacția ce urmează a se desfășura. Astfel, lucru mult mai important, unele energii de legătură contribuie direct la cataliză. Moleculele de substrat trec printr-o serie de forme intermediare ale geometriei alterate și distribuției electronilor, înainte de a se forma ultimul produs al reacției, iar energia liberă a acestor forme intermediare – în special cea a celor mai instabile **stări de tranziție** – este determinantul major al vitezei de reacție. Enzimele au o mult mai mare afinitate pentru aceste stări de tranziție ale substratului decât pentru formele sale stabile. Deoarece această interacțiune de legare scade energia principalelor stări de tranziție, enzima accelerează foarte mult o reacție particulară (Figura 2-62).

O demonstrație excelentă a modalității în care starea de tranziție stabilizată poate crește mult viteza reacției, este producția anticorpilor care acționează ca o enzimă. Să considerăm, de exemplu, hidroliza unei legături amidice, care este similară cu legătura peptidică ce leagă aminoacizii adiacenți dintr-o proteină. Într-o soluție apoasă, legătura amidică este hidrolizată foarte lent prin mecanismul ilustrat în Figura 2-63A. În starea intermediară, sau starea de tranziție, carbonul carbonil leagă patru atomi care sunt aranjați în colțurile unui tetraedru. Prin producerea de anticorpi monoclonali care se leagă specific la analogul stabil al acestui *intermediar tetraedric* foarte instabil, ilustrat în Figura

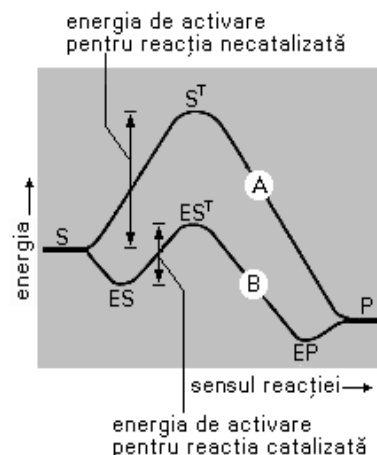
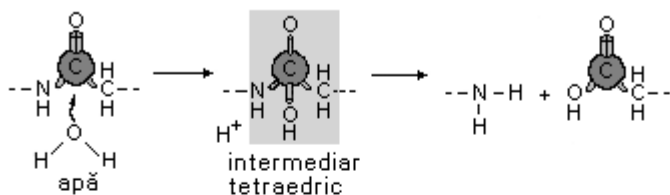


Figura 2-62
Enzimele accelerează reacțiile chimice prin scăderea energiei de activare. Atât reacția necatalizată (A), cât și reacția catalizată enzimatic (B), trec prin mai multe stări de tranziție. Acestea sunt stările de tranziție cu energie mare (S^T și ES^T) care determină energia de activare și limitează viteza de reacție (S = substrat; P = produs de reacție).

(A) HIDROLIZA UNEI LEGĂTURI AMIDICE



(B) STARE DE TRANZIȚIE ANALOGĂ PENTRU HIDROLIZA AMIDEI

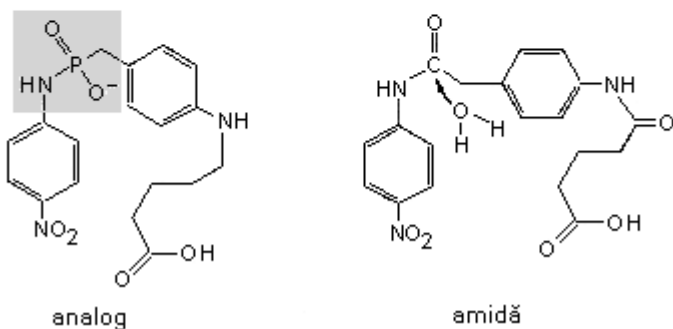


Figura 2-63 Anticorpii catalitici. (A) Desfășurarea reacției pentru hidroliza unei legături amidice trece printr-un intermediar tetraedric care reprezintă starea de înaltă energie a reacției. (B) Molecula prezentată în stânga a fost legată covalent la o proteină și utilizată astfel ca antigen pentru generarea de anticorpi specifici pentru regiunea moleculei marcată în gri. Pentru că acest anticorp se leagă și la starea de tranziție din (A), el are funcția unei enzime care catalizează hidroliza legăturii amidice din molecula prezentată în dreapta.

2-63B, se poate obține un anticorp care funcționează ca o enzimă. Acest *anticorp catalitic* leagă și stabilizează intermediarul tetraedric și astfel crește viteza spontană a hidrolizei legăturii amidice de până la 10.000 de ori.

Cataliza acidă și bazică simultană

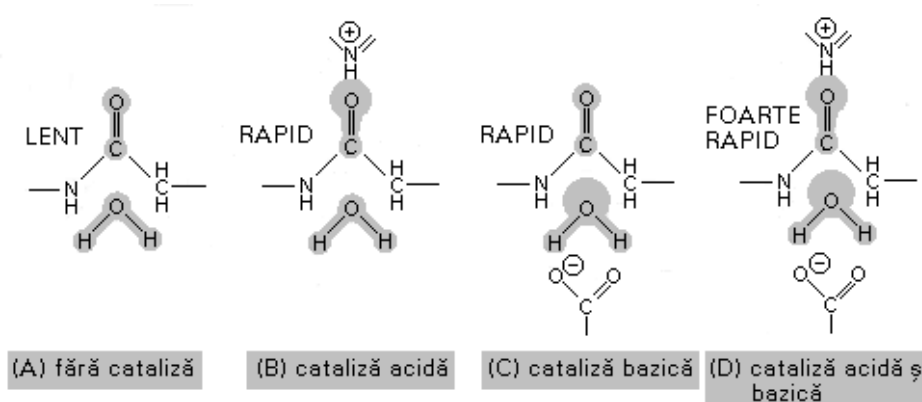
Enzimele sunt catalizatori mai buni decât anticorpii catalitici. Pe lângă faptul că prezintă mare afinitate pentru stările de tranziție, situsul activ al unei enzime conține atomi precis poziționați care susțin reacția prin alterarea distribuției electronilor în acei atomi care sunt implicați în formarea și ruperea legăturilor covalente. De exemplu, legăturile peptidice pot fi hidrolizate în absența unei enzime, prin expunerea polipeptidului la un acid puternic sau o bază puternică (Figura 2-64B și C). Enzimele sunt unice pentru că sunt capabile să utilizeze cataliza bazică sau acidă simultan, deoarece radicalii acizi și bazici necesari sunt împiedicați să se combine reciproc (cum o fac în soluție), fiind fixați pe rețeaua rigidă a proteinei (Figura 2-64D).

Contactul dintre enzimă și substrat trebuie să fie precis. Doar o schimbare mică introdusă prin inginerie genetică în situsul activ al unei enzime poate produce efecte profunde. De exemplu, înlocuirea acidului glutamic cu acidul aspartic la o enzimă, modifică poziția ionului carboxilat catalitic doar cu 1 Å (diametrul aproximativ al atomului de hidrogen), reducând astfel de mii de ori activitatea enzimei.

Creșterea vitezei reacțiilor prin formarea unor intermediarilor legați covalent la substratul lor

Pe lângă rolurile prezentate mai sus, enzimele pot accelera viteza reacțiilor prin cataliza formării de legături covalente dintre ele și substratul lor, de obicei prin atașarea substratului la un aminoacid sau la o moleculă de coenzimă. În general, un substrat intră în situsul de legătură, se leagă covalent și apoi reacționează cu o a doua moleculă de pe suprafața enzimei, ceea ce rupe legătura covalentă formată. La

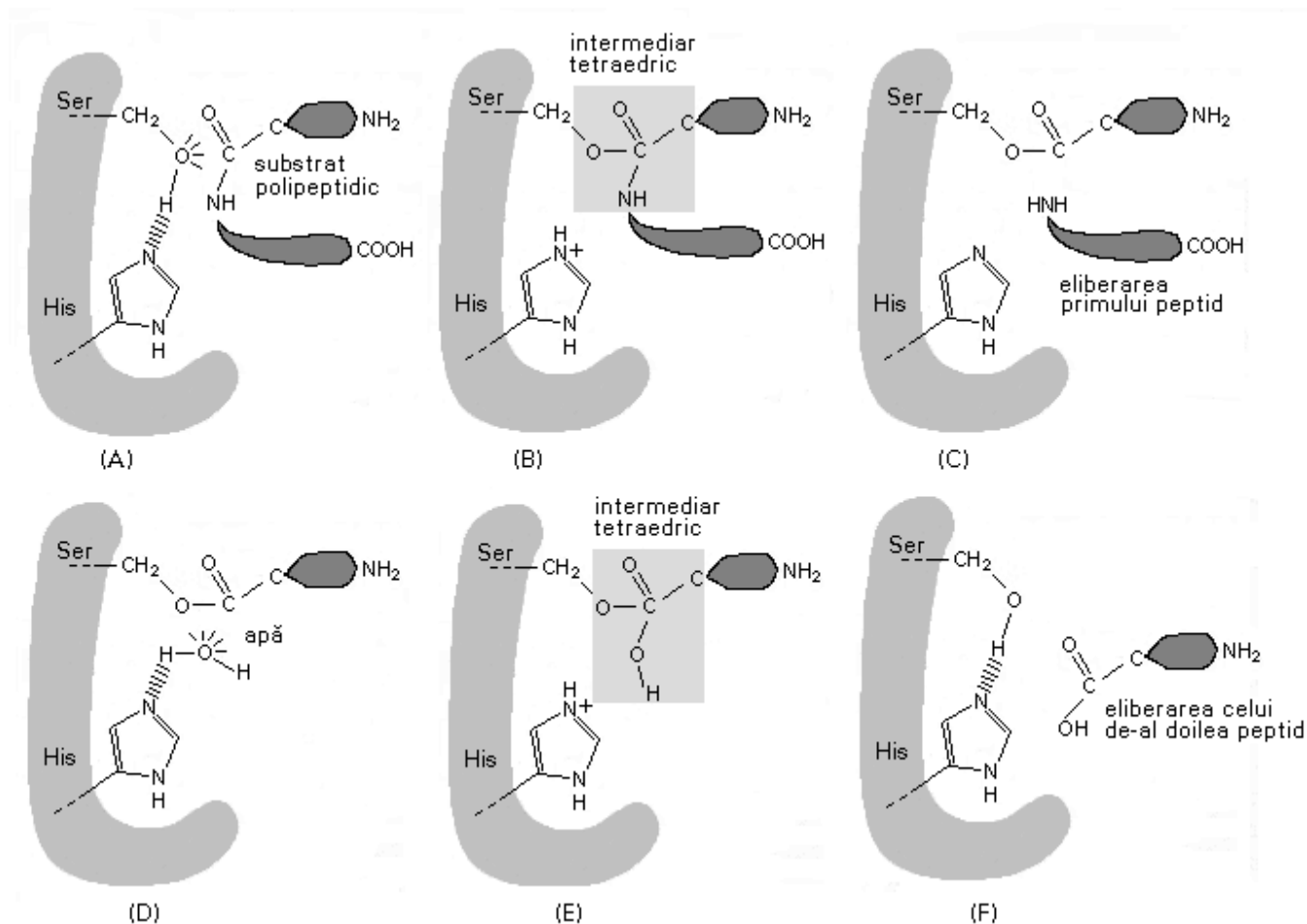
Figura 2-64 Cataliza acidă și cataliza bazică. (A) Inițierea reacției necatalizate din Figura 2-63A. Distribuția electronilor la apă și la legăturile carbonil este marcată cu gri. (B) Un acid tinde să doneze un proton (H^+) la alți atomi. Prin împerecherea cu oxigenul carbonilic, un acid determină îndepărtarea electronilor de la carbonul carbonilic, făcând astfel ca acest atom să prezinte o atracție mai mare pentru oxigenul electronegativ al unei molecule de apă. (C) O bază tinde să atragă H^+ ; prin împerechere cu un hidrogen din molecula de apă, baza face ca electronii să se deplaseze dinspre oxigenul apei, acesta devenind gruparea cea mai ușor atacabilă de carbonul carbonilic. (D) O enzimă, având atomii de pe suprafața sa în mod corespunzător poziționați, poate efectua o cataliză atât acidă, cât și bazică.



sfârșitul fiecărui ciclu de reacție, enzima liberă este regenerată.

Să considerăm, spre exemplu, mecanismul de acțiune al serin-proteazelor. Reacția pe care o catalizează aceste enzime, hidroliza legăturilor peptidice, este foarte mult accelerată de afinitatea enzimei pentru intermediarul tetraedric al reacției. Dar serin-proteazele pot face mai mult decât un anticorp catalitic: în loc să utilizeze un oxigen de la o moleculă de apă pentru a ataca un carbon carbonil, ele fac ca reacția să se desfășoare mult mai ușor prin utilizarea de la început a unui radical al unui aminoacid precis poziționat (serina activată din Figura 2-59). Această etapă rupe legătura peptidică, dar ea permite și legarea covalentă a enzimei la gruparea carboxil. Apoi, în a doua etapă, rapidă, acest intermediar covalent este distrus printr-o adădire catalizată enzimatic a apei, ceea ce completează reacția și regenerează enzima (Figura 2-65). Deși această reacție în două trepte este mai puțin directă decât cea care se desfășoară într-o singură treaptă (în care apa este adăugată direct la legătura peptidică), ea este mai rapidă pentru că fiecare etapă are nevoie de o energie de activare relativ scăzută.

Figura 2-65 Unele enzime formează legături covalente cu substratul lor. Explicațiile în text.



Enzimele accelerează reacțiile chimice dar nu le pot face mai favorabile energetic

Oricât de sofisticată ar fi o enzimă, ea nu poate face ca reacția chimică pe care o catalizează să fie mai favorabilă din punct de vedere energetic. Ea nu poate modifica diferența de energie liberă dintre substratul inițial și produsul final al reacției. La fel ca o interacțiune de legare simplă discutată deja, orice reacție chimică are un *punct de echilibru* la care fluxul înainte și înapoi al reacției este egal, neintervenind astfel nici o modificare (vezi Figura 2-14). Dacă o enzimă accelerează viteza reacției "înainte", $A + B \rightarrow AB$, cu un factor de 10^8 , ea trebuie să accelereze și viteza reacției "înapoi", $AB \rightarrow A + B$, tot cu factorul 10^8 . Rata vitezei reacțiilor "înainte" și "înapoi" depinde doar de concentrația lui A, B și AB. Punctul de echilibru rămâne exact același, ca și cum reacția nu ar fi fost catalizată de enzimă.

Determinarea direcției unei reacții prin cuplarea acesteia cu hidroliza ATP

Celula vie este un sistem chimic care nu se află deloc în echilibru. Produsul fiecărei enzime este folosit de obicei ca substrat pentru o altă enzimă din calea metabolică respectivă și astfel este rapid consumat. Fapt important, prin reacțiile în lanț care sunt determinate de enzime, este posibilă direcționarea lor într-un anumit sens prin cuplarea cu hidroliza energetic favorabilă a ATP în ADP și fosfat. Pentru ca această strategie să fie eficientă, stocul de ATP se menține la un nivel aflat foarte departe de punctul de echilibru, cu o ridicată rată de hidroliză a ATP. Acest stoc de ATP este ca o "baterie încărcată" ce face ca energia și atomii să fie direcționați spre căile de reacție determinate de enzimele prezente. Pentru un sistem viu, atingerea echilibrului chimic duce la distrugere și moarte.

Creșterea ratei metabolismului determinată de complexe multienzimatic

Eficiența enzimelor în accelerarea reacțiilor chimice este esențială pentru menținerea vieții. Ca urmare, celulele trebuie să "lupte" împotriva proceselor de neînălțur ale distrugerii care le împing spre atingerea echilibrului chimic. Dacă vitezele reacțiilor necesare nu ar fi mai mari decât cele ale reacțiilor inverse, celula ar muri. O oarecare informație cu privire la intensitatea cu care se desfășoară metabolismul se poate obține prin măsurarea vitezei de utilizare a ATP. O celulă obișnuită de mamifer își înnoiește total stocul de ATP (adică îl degradează total și îl înlocuiește cu altul) la fiecare 1-2 minute. Pentru orice celulă, acest turnover reprezintă utilizarea a 10^7 molecule de ATP pe secundă (pentru întreg corpul uman, aproximativ un gram de ATP în fiecare minut).

Vitezele reacțiilor celulare sunt mari din cauza eficienței catalizei enzimatice. Unele enzime importante au devenit atât de eficiente încât nu pot fi și mai mult îmbunătățite: factorul de limitare al vitezei reacției nu este mai mare decât viteza intrinsecă de acțiune a enzimei, adică frecvența cu care enzima intră în coliziune cu substratul ei. O asemenea reacție se spune că este *limitată de difuziune*.

Dacă o reacție este limitată de difuziune, viteza ei depinde atât de concentrația enzimei, cât și de cea a substratului. Pentru ca o secvență de reacții să se desfășoare rapid, fiecare intermediar metabolic și enzimă implicată trebuie să fie prezente în concentrație mare. Considerând însă că într-o celulă se desfășoară un număr enorm de reacții, există limite cu privire la concentrația substratului. În realitate, majoritatea metaboliților sunt prezenți în concentrații micromolare (10^{-6} M), iar concentrația enzimelor este și mai mică. În aceste condiții, cum este posibilă menținerea unei foarte mari rate de metabolism?

Răspunsul se găsește în organizarea spațială a celulei. Vitezele de reacție pot fi crescute fără a fi necesară creșterea concentrației substratului, prin apropierea spațială a enzimelor implicate într-o secvență de reacții și formarea unor ansamble proteice mari numite **complexe multienzimatice**. În acest fel, produsul enzimei A este trecut direct la enzima B și așa mai departe, până la produsul final, și astfel viteza de difuziune necesară nu apare ca o limită deși concentrația substratului este extrem de mică. Asemenea complexe enzimatice sunt foarte frecvente, ele fiind implicate în practic toate aspectele metabolismului, incluzând și procesele genetice centrale ale ADN, ARN și sinteza proteinelor. De fapt, doar puține enzime de la celulele eucariote pot difuza liber în soluție; majoritatea posedă situsuri de legare care le concentrează, împreună cu alte proteine cu funcție înrudită, în regiuni particulare ale celulei, crescând astfel viteza și eficiența reacțiilor pe care le catalizează.

Celulele posedă și o altă modalitate de a crește viteza reacțiilor metabolice. Aceasta este determinată de sistemul bogat de membrane intracelulare din celula eucariotă. Membranele segregă anumite substraturi și enzimele care acționează asupra lor în același compartiment mărginit de aceste membrane, cum este reticulul endoplasmic sau nucleul. Dacă, de exemplu, un compartiment ocupă un volum de 10% din volumul celulei, concentrația reactanților în acest compartiment poate fi de 10 ori mai mare decât în aceeași celulă fără compartimentalizare (Figura 2-66). Astfel, reacțiile, care altfel ar putea fi limitate în viteză din cauza difuziei, sunt accelerate cu același ordin de mărime.

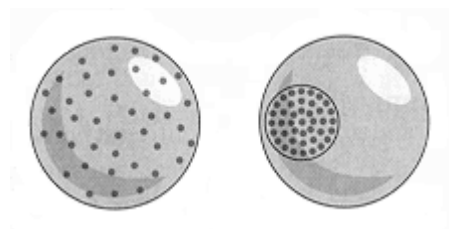


Figura 2-66 Compartimentalizarea.