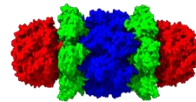


Introducere

Proteinele - suport material al funcțiilor biologice

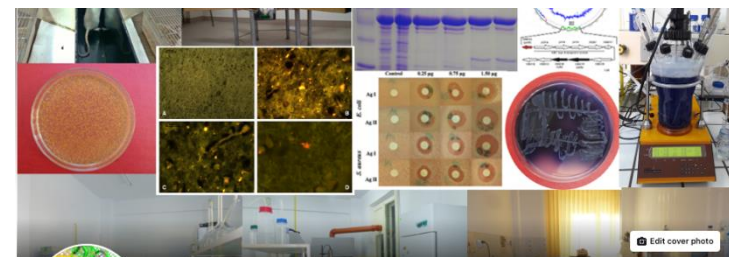


Titular cursuri săptămînile 8-14:
 Prof. Dr. Habil. Marius Mihășan, corp B, Facultatea de Biologie, demisol I, sala B228

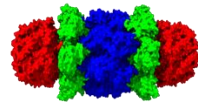
marius.mihasan@uaic.ro

Titular LP săptămînile 8-14:
 Asistent Dr. Răzvan-Ștefan Boianțiu, corp B, Facultatea de Biologie, demisol I, sala B226

<http://cercetare.bio.uaic.ro/grupuri/bioactive/index.html>




@BioActive.bio.uaic.ro



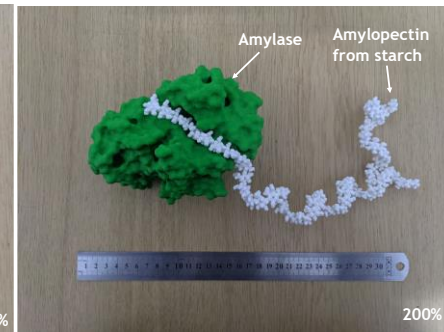
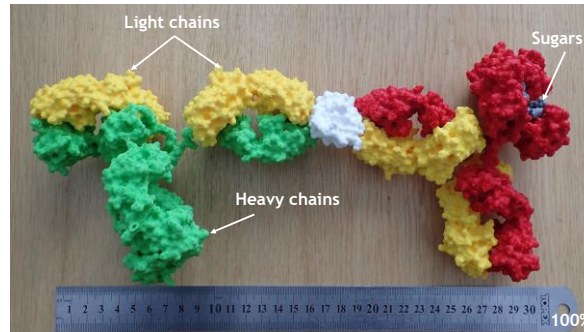
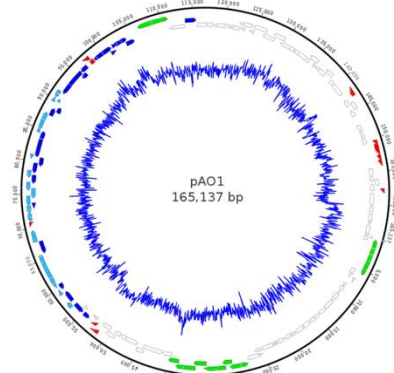
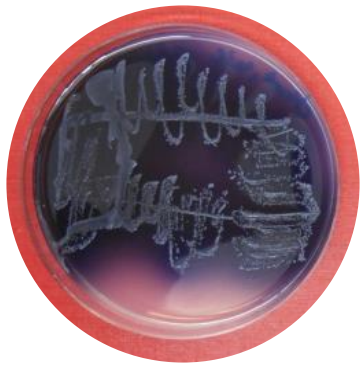
Experiența în cercetare și educație

Cercetător din 2004, cadru didactic din 2009;

Teme de interes:

- organizarea moleculara și biologia megaplasmidul pAO1, în special în legatură cu mecanismele de protecție împotriva stresului oxidativ generat de metabolizarea nicotinei, metabolismul glucidelor și aplicațiile biotehnologice ale acestor căi metabolice.

- fabricarea de modele moleculare folosind tipărirea 3D.



Lucrarea cea mai nouă:

Lucrarea cea mai importantă:

Lucrarea cea mai nouă:

Resurse educaționale dezvoltate:

SPRINGER NATURE Link

Find a journal Publish with us Track your research Search

Home > BMC Genomics > Article

Characterisation of the *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 genome and identification of several strains harbouring a highly syntenic *nic*-genes cluster

Research | Open access | Published: 11 September 2023
Volume 24, article number 536, (2023) | [View this article](#)

[Download PDF](#) | You have full access to this open access article

BMC Genomics

Aims and scope | [Submit manuscript](#)

Sections | Figures

Abstract | Background

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Proteomics based analysis of the nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1

Marius Mihasan^{1,2}, Cornelia Babii¹, Rehanak Astelebagh¹, Devika Chennaveerappa¹, Emrinayn Dogra¹ & Costel C. Davar¹

Paenarthrobacter nicotinovorans is a distantly diverging prokaryote that shows a promising biotechnological potential for the production of compounds with industrial and pharmaceutical importance. Its ability to catabolize nicotine was linked to the presence of the antibiotic-resistance plasmid pAO1. Although extensive work has been performed on the molecular biology of nicotine degradation in this bacterium, only half of the genes potentially involved have been experimentally linked to nicotine. In the current approach, we used nanoLC-MS/MS to identify a total of 803 proteins grouped in 121 non-redundant protein clusters when *P. nicotinovorans* was grown on citrate, nicotine and nicotine and citrate as the only carbon sources. The differences in protein abundance showed that denaturation is preferred when citrate is present. Several putative genes from the pAO1 megaplasmid have been shown to have a nicotine-dependent expression, including a hypothetical polyketide cyclase. We hypothesize that the enzyme would hydrolyze the N1-CE bond from the pyridine ring with the formation of *o*-hydroxy-glutarate. Two chromosomally-encoded proteins, a malate dehydrogenase, and a D-3-phosphoglycerate dehydrogenase were shown to be strongly up-regulated when nicotine was the sole carbon source and could be related to the production of *o*-hydroxy-glutarate. The data have been deposited to the ProteomeXchange with identifier PXD008716.

Received: 11 February 2018
Accepted: 24 October 2018
Published online: 02 November 2018

Received: 20 July 2020 | Revised: 4 January 2021 | Accepted: 17 February 2021
DOI: 10.1002/bmb.21493

ARTICLE

A beginner's guideline for low-cost 3D printing of macromolecules usable for teaching and demonstration

Marius Mihasan

BioActive Research Group, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi, Iasi, Romania

Correspondence: Marius Mihasan, BioActive Research Group, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi, 70000 Iasi, Romania. Email: marius.mihasan@uaic.ro

Abstract
The structure and function of biomolecules relationship is the hallmark of biochemistry, molecular biology, and life sciences in general. Physical models of macromolecules give students the possibility to manipulate these structures in three dimensions, developing a sense of quality and a better understanding of key aspects such as atom size and shape, bond lengths and symmetry. Several molecular model systems were developed specifically to represent particular classes or groups of molecules and hence lack the flexibility of a universal solution. Three-dimensional printing could nevertheless provide such a universal solution, as it can be used to create physical models of biomolecular structures based on the teacher's or demonstrator's needs and requirements. Here, insulin was used as a model molecule and several depiction and printing parameters were tested in order to highlight the technical limitations of the approach. In the end, a set of settings that worked is provided which could serve as a starting point for anyone wishing to print his or her own custom macromolecular model on the cheap.

KEYWORDS
3D printing, general public, insulin, molecular models

EXPLORAREA UNIVERSULUI MOLECULAR CU AJUTORUL MODELELOR IMPRIMATE 3D

Despre noi | Noutăți | Cum obținem modelele v | Modele noi | Modele gratuite

Modele fizice ale moleculelor pentru o mai bună educație în științele vieții

Un concept de bază în științele vieții este legătura dintre structura unei molecule și funcția acesteia. Formulele chimice nu pot reda eficient complexitatea structurală a moleculelor biologice și, prin urmare, nu sunt cel mai eficient mijloc de învățare pentru studenți și elevi ca simple imagini. Modelele fizice permit manipularea moleculelor în spațiul tridimensional, oferind o experiență de învățare multisenzorială și o mai bună înțelegere a relației dintre formă și funcție. Modelele fizice pot fi dezvoltate prin diverse metode, cum ar fi imprimarea 3D. În prezent, dimensiunea atomilor, unghiurile dintre legăturile chimice și relațiile dimensionale dintre diverse molecule.

[MAI MULTE DESPRE MODELELE FIZICE ALE MOLECULELOR](#)

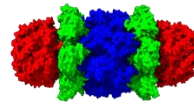
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-023-09644-3>

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-34687-y>

<https://doi.org/10.1002/bmb.21493>

<https://modelele.ro/>

https://mail.uaic.ro/~marius.mihasan/research/research_ro.html



<http://cercetare.bio.uaic.ro/cadre/pagini-personale/marius.mihasan/index.html>



Cursuri
BABS
SMMI
Biochimie
Chimie generala
Chimie anorg
Chimia mediului

Lucrari practice
Chimie generala
Chimia mediului
Chimie anorg.

Licenta/Master

Cursuri

Bioinformatică aplicată în Biologia structurală

Biochimie An III, Sem. II Fișa de prezentare a disciplinei

Curs 1	Curs 2	Curs 3	Curs 4	Curs 5	Curs 6	Curs 7
Curs 8	Curs 9	Curs 10	Curs 11	Curs 12	Curs 13	Curs 14

Seminarii

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14

Biochimie

Biochimie An III, Sem. II Fișa de prezentare a disciplinei

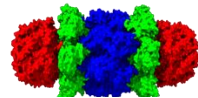
Curs 1	Curs 2	Curs 3	Curs 4	Curs 5	Curs 6	Curs 7
Curs 8	Curs 9	Curs 10	Curs 11	Curs 12	Curs 13	Curs 14

Structura și metabolismul macromoleculor informaționale

Master Genetică moleculară, [Fișa de prezentare a disciplinei](#)

- Definiții și valori esențiale pentru înțelegerea conținutului;
- Clasificări, valori și exemple importante;
- Informații accesorii, utile dar ne-esențiale pentru înțelegerea conținutului;
- Text în limba engleză util de a fi reținut

Resurse pentru acest curs – fișa de prezentare a disciplinei



	de electroporare, liofilizator, HPLC, Speed-Vac). Prezența la lucrările practice/seminar este obligatorie
--	---

6. Competențe specifice acumulate

Competențe profesionale	Operarea cu noțiuni, concepte, legături și principii specifice biologiei moleculare Enumerarea și descrierea metodelor de bază pentru secvențierea și analiza secvențelor acizilor nucleici Descrierea etapelor necesare clonării unei gene, într-un vector plasmidial. Enumerarea etapelor unui experiment de proteomică.
Competențe transversale	Realizarea responsabilă și eficientă a sarcinilor aferente profesiilor din domeniul biologie cu respectarea principiilor de etică profesională; Identificarea rolului într-o echipă și preluarea responsabilităților, corespunzătoare profilului profesional și personal; Dezvoltarea capacității de reflecție critic-constructivă asupra propriului nivel de pregătire profesională în raport cu standardele profesiei; Comunicarea orală și scrisă;

7. Obiectivele disciplinei (din grila competențelor specifice acumulate)

7.1 Obiectivul general	Inițierea studenților în cunoașterea metodelor de bază folosite în biologia moleculară, prin crearea deprinderilor necesare izolării și manipulării ADN-ului genomic și plasmidial. Un obiectiv secundar este consilierea studenților asupra importanței experimentului științific și a accesului nemijlocit la informația științifică.
7.2 Obiectivele specifice	După ce vor studia această disciplină, cursanții vor putea să: 1. Utilizeze corect terminologia specifică biologiei moleculare; 2. Explice legătura secvență-funcție prin prisma dogmei centrale a biologiei moleculare; 3. Utilizeze metode de analiză a acizilor nucleici. 4. Descrie alcătuirea unui vector molecular de expresie 5. Explice diferențele dintre diverse TAG-uri utilizate în codificarea proteinelor.

8. Conținut

8.1	Curs ROSU -GL, Albastru MM	Metode de predare	Observații (ore și referințe bibliografice)
1.	Structura ADN și ARN - GL	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 4, 5, 6, 16
2.	Ciclul celular și mecanismele de control Replicarea ADN - GL	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	4, 5, 6, 16
3.	Cromatina (eucromatina / heterocromatina) și epigenetica. Procese epigenetice	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	4, 5, 6, 16
4.	Mutații și modificări ale moleculelor de ADN Rata de fixare a mutațiilor și diversitatea genetică	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 16
5.	Transcripția și Translația. Modificări post-transcripționale, ale moleculelor de ARN	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	4, 5, 6, 16

6.	Mecanisme de reglare a expresiei genelor	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	4, 5, 6, 15, 16
7.	Proteinele ca suportul material al funcțiilor biologice – legătura structură-funcție.	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3
8.	Traducerea mesajului genetic și plierea proteinelor în structurile tridimensionale native	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3
9.	Modificări posttraducerea la nivelul proteinelor	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
10.	Modificarea moleculelor de ADN: abordări generale pentru clonarea fragmentelor de ADN în vectori, enzime de restricție și modificarea ADN-ului (ligarea, Klenow, fosforilare și defosforilare)	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3, 4, 8
11.	Producerea proteinelor recombinante – metode de expresie, tag-uri și tehnici de purificare a proteinelor recombinante	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3, 4, 8
12.	Analiza in-vitro a proteinelor – electroforeza IEF, Cromatografia FPLC și HPLC, metode imunologice - Western blot	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3, 4,
13.	Analiza globală a proteinelor sau proteomica. Spectrometria de masă ca principala tehnică în proteomică.	prelegerea interactivă; expunerea sistematică; conversația;	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Bibliografie

- Clark, David P. Molecular biology. Elsevier, 2005
- Elliot W. H., Elliot D. C., 2005 – **Biochemistry and Molecular Biology**, 3-rd edition, Oxford University Press
- Gorgan D. L., 2008 – Introducere în studiul filogeniei și biogeografiei moleculare, 187 p., Editura Bioflux, Cluj-Napoca. Online
- Klug W.S., Cummings M.R., 2000 – **Concepts of Genetics**, 6th ed., Prentice Hall, Inc., New Jersey, USA
- Lesk A., 2007 – **Introduction to Genomics**, Oxford University Press
- Lewin B., 2008 – **Genes**, 10th ed., Oxford University Press
- Mihăsan, Cornelia Babii, Roșbanak Aștebani, Devika Channaveerappa, Emmalyn Dupree, Costel C. Darie, Exploration of nicotine metabolism in *Escherichia coli* using proteomics – in **Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research** Eds. Dr. Alisa G. Woods, Dr. Costel C. Darie, Springer, in press
- Marius Mihăsan, Kelly L. Wormwood, Izabela Sokolowska, Umji Roy, Alisa G. Woods, and Costel C. Darie, Mass Spectrometry- and Computational Structural Biology-based investigation of proteins and peptides – in **Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research** Eds. Dr. Alisa G. Woods, Dr. Costel C. Darie, Springer, in press
- Mihăsan M., Olteanu Z., Stefan M., **Biologie moleculară – metode experimentale** Ed. Univ. „Al.I.Cuza”, Iași, 2012.
- Mihăsan, Marius. 2010. "Basic Protein Structure Prediction for the Biologist: A Review." *Archives of Biological Sciences* 62(4): 857–71.
- Nei M., Kumar S., 2000 - **Molecular Evolution and Phylogenetics**, Oxford University Press.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour, Laboratory Press.
- Smith T B., Wayne K., 1996 - **Molecular Genetic Approaches in Conservation**, Oxford University Press.
- Zanea, G., Popescu O. V., 2011 - **Dictionar de microbiologie generala si biologie moleculara**, Editura Academiei Romane.
- Zeno Garban, **Biologie Moleculară**, Editura Eurobit, Timisoara, 2005

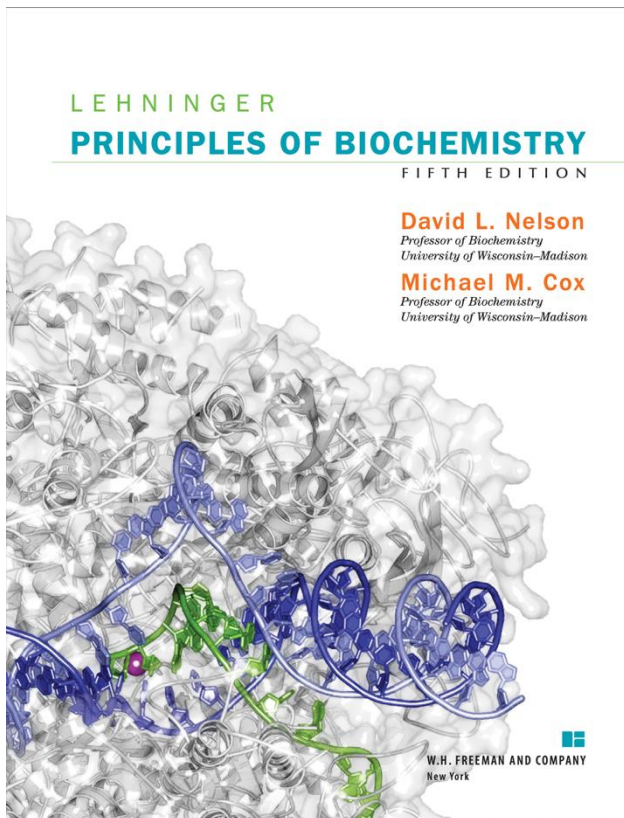
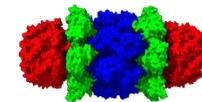
8.2	Seminar / Laborator	Metode de predare	Observații (ore și referințe bibliografice)
1.	Norme de protecția a muncii Introducere: Aspecte de management a activității în laborator, circuitul probelor, norme de biosiguranță în laboratorul de biologie genetică moleculară	expunerea, conversația euristică, observarea, demonstrația, exercițiul.	1, 3, 7, 8, 9
2.	Etapele analizei ADN din diferite surse: Probe - prelevare, conservare, izolarea și purificarea ADN și ARN din diverse surse	prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, exercițiul.	1, 2, 3, 4, 7
3.	Electroforeza – principiul Electroforeza, aplicații pentru acizi nucleici, în gel de agaroză. Analiza și interpretarea rezultatelor. Construirea matricilor de similitudine între probe	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1, 3, 6, 7
4.	PCR – principiul, etape, Tipuri de PCR: standard, RAPD; RFLP; AFLP; nested. Optimizarea. Etape – structură, mecanismele de identificare	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1, 3, 7, 11
5.	Secvențierea ADN/ARN și tipuri de secvențiere: Sanger, NGS. Principii, analiza și interpretarea rezultatelor	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	3, 11, 13
6.	Baza de date Baza de date utilizată în analiza secvențelor de ADN. BLAST. Alinierea de secvențe. Abord filogenetic. Taxonomie moleculară. Filogenie moleculară	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	3, 11, 13
7.	Norme de protecția a muncii în laboratorul de biologie moleculară. Metoda de biosiguranță. Metoda de cultură a bacteriei <i>Escherichia coli</i>	expunerea, conversația euristică, observarea, demonstrația, exercițiul.	1
8.	Izolarea ADN-ului plasmidial – izolarea plasmidei pH6EX3 din <i>Escherichia coli</i> . Separarea și evidențierea ADN-ului pe celule de gazdă	prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, exercițiul.	1, 2
9.	Enzimele de restricție și utilizarea lor – liniarizarea plasmidei pH6EX3. Morarea diferențiată a ADN-ului circular vs ADN-ului liniar pe celule de gazdă	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1, 2
10.	Supraexpresia în <i>E. coli</i> a proteinei ALDH provenite din <i>Escherichia coli</i> <i>nicotinivorans</i> . Detecția nivelului de supraexpresie prin electroforeză	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1-3
11.	Purificarea proteinei ALDH prin IMAC	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1-3
12.		experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	
13.	Analiza gradului de puritate a preparatului obținut.	experimentul, prelegerea interactivă, demonstrația, observarea, experimentul, exercițiul.	1-3

10. Evaluare

Tip activitate	10.1 Criterii de evaluare	10.2 Metode de evaluare	10.3 Pondere în nota finală (%)
10.4 Curs		Examen	70%
10.5 Seminar / Laborator		Colocviu	30%

10.6 Standard minim de performanță:

- să enunțe și să explice dogma centrală a biologiei moleculare
- să demonstreze diferența dintre catena de ADN întârziată și cea conducătoare
- să transforme o secvență ADN în una de aminoacizi având la dispoziție codul genetic;
- să enunțe principalele etape ale procesului de traducere a mesajului genetic;
- să explice implicațiile procesului de asamblare a ARNm (splicing)
- să enumere principalele modificări posttraducerea la nivelul proteinelor;
- sa explice avantajele și dezavantajele expresiei proteinelor în gazde heterologe
- sa enumere 5 tag-uri diferite utilizate pentru purificarea proteinelor.

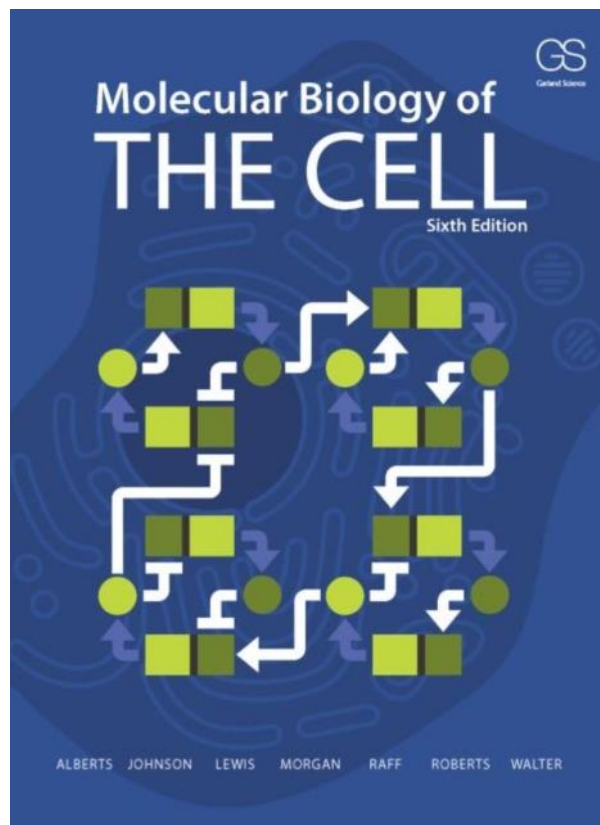


Lehninger Principles of Biochemistry

Sixth Edition | ©2008 David L. Nelson; Michael M. Cox

ISBN-13: 978-0716743392

ISBN-10: 0716743396



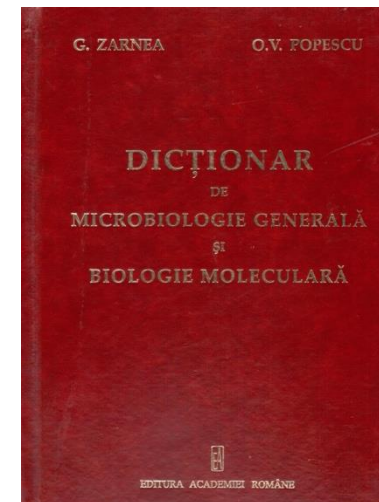
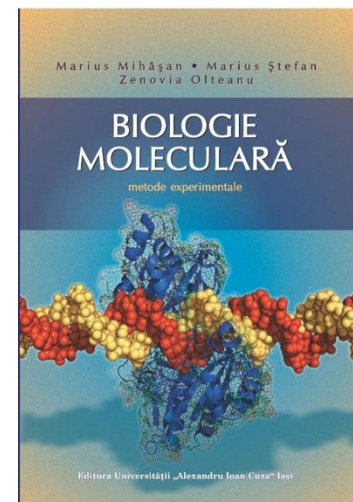
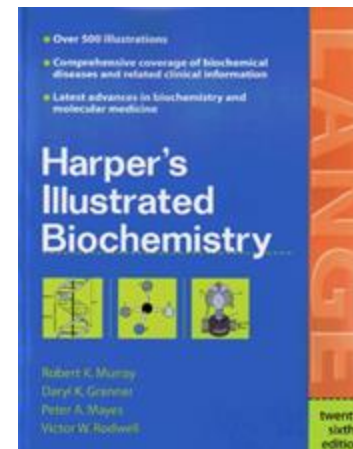
Molecular Biology of the Cell

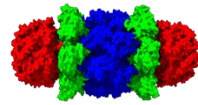
Sixth Edition | © 2014 Bruce Alberts, Alexander Johnson,

Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter

ISBN-13: 978-0815345244

ISBN-10: 0815345240

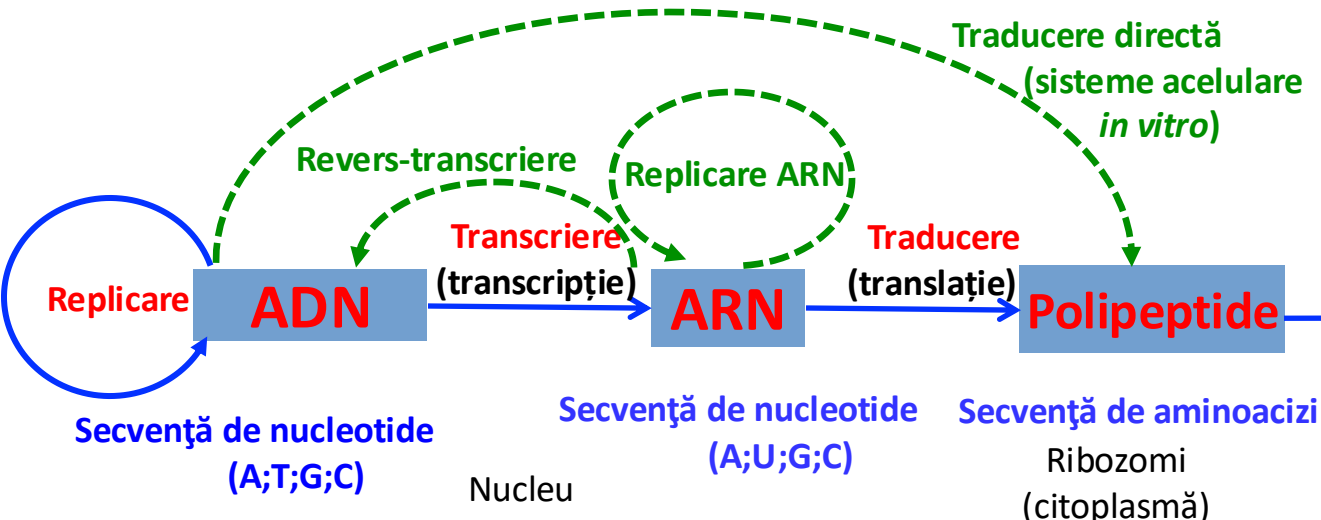




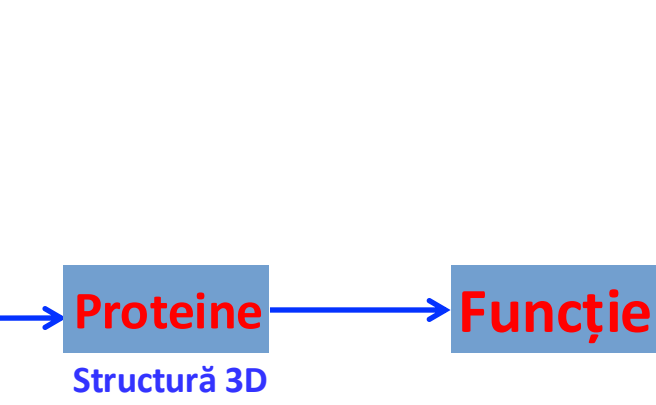
Dogma centrală a Biologiei Moleculare

precizează direcționalitatea informației genetice în celulă: ADN -> ARN-> Proteine

Transferul informației genetice



Expresia informației genetice



Nucleu

- Căi generale de transfer a informației de secvență
- - - Căi speciale de transfer a informației de secvență

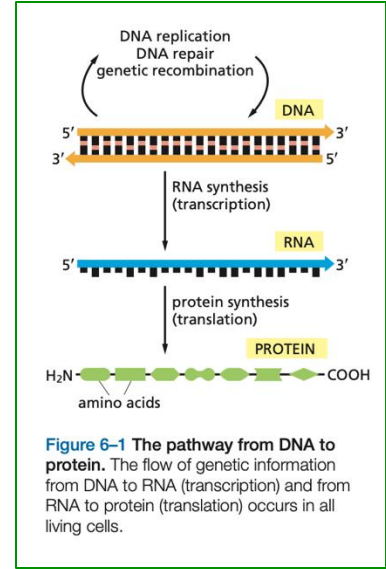
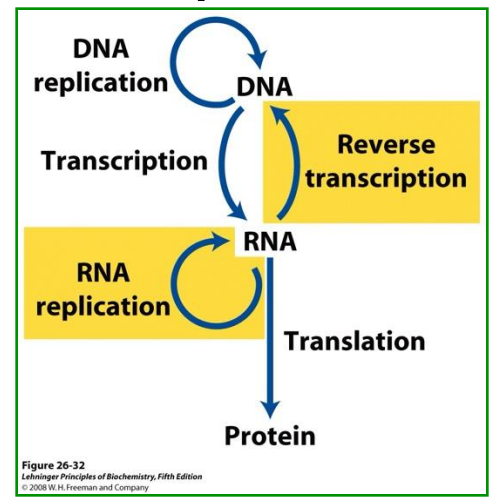
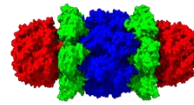


Figure 6-1 The pathway from DNA to protein. The flow of genetic information from DNA to RNA (transcription) and from RNA to protein (translation) occurs in all living cells.

Alberts - Molecular Biology of the Cell, p. 299

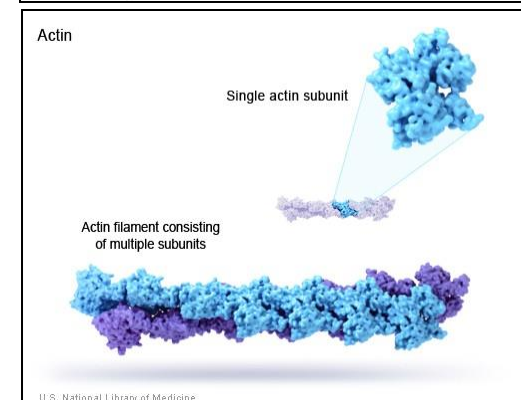
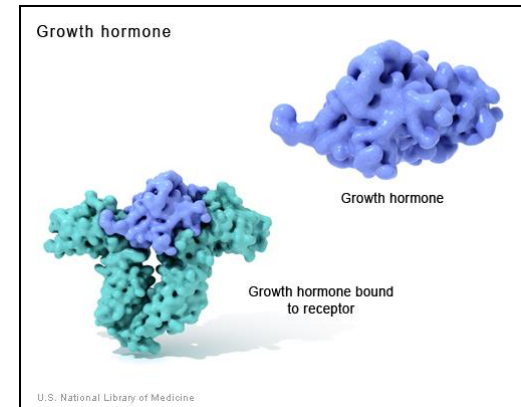
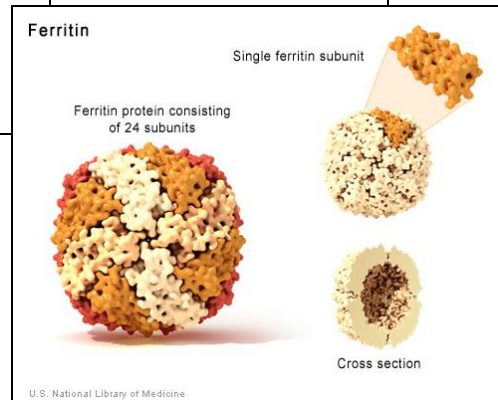
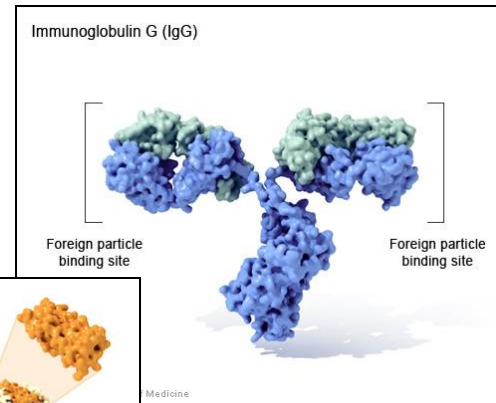
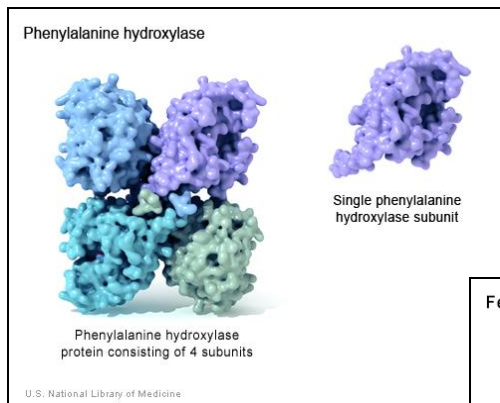
Figure 26-32
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



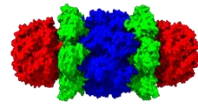
Principalele roluri ale proteinelor:

- 1) cataliza biologică** – enzimele – proteine globulare ce catalizează în mod specific reacțiile celulare și metabolice;
Ex: alcool-dehidrogenaza – dehidrogenarea alcoolului etilic în aldehydă acetică;
- 2) apărare** – anticorpii (imunoglobulinele) – proteine globulare ce recunosc potențialii agenți patogeni;
- 3) transport** – proteine globulare ce vehiculează molecule sau ioni în organism sau în celule – hemoglobina;
- 4) structural** – proteine fibrilare – cheratina din păr, colagenul din piele, ligamente;
- 5) mișcare** – proteinele fibrilare actina și miozina ce transformă energia chimică în mișcare;
- 6) reglare** – proteine de dimensiuni mici ce funcționează ca mesageri intercelulari;

Majoritatea structurilor și funcțiilor fundamentale celei vii sunt realizate de proteine.



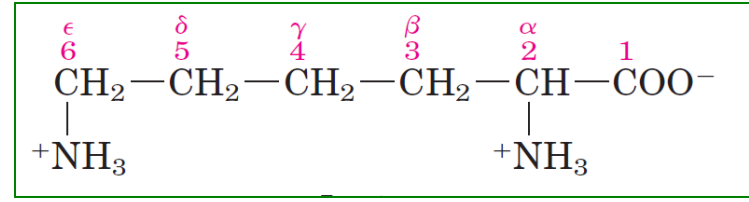
Structura proteinelor



Proteinele sunt **polimeri** rezultați în urma condensării unui număr mare de **L-aminoacizi** și formării de **legături peptidice**. Toate proteinele pot conține până la **20 aminoacizi proteinoși** diferiți. Acest număr limitat de aminoacizi nu poate explica varietatea foarte mare de funcții pe care proteinele le îndeplinesc.

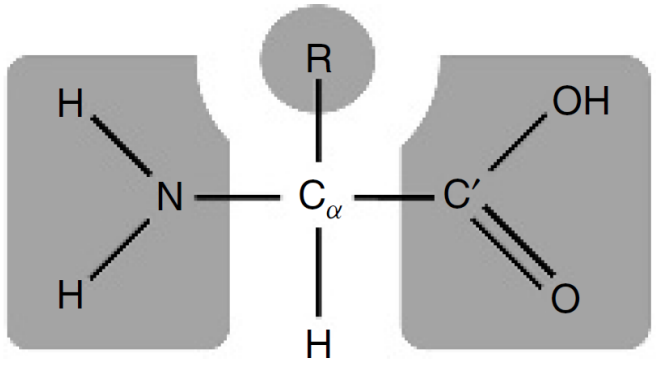
Funcția unei proteine nu este dată de tipul de aminoacizi conținuți, ci de forma tridimensională pe care o adoptă.

Aminoacidul lizină



Aminoacizii proteinoși

- conțin o grupare **amino**, o grupare **carboxil** și un **atom de H** legat de un atom de C central numit **C α**
- majoritatea (exceptând glicina) conțin o **catenă laterală R** legată de **C α** (atomul de C imediat vecin grupării Carboxil)



- deși **C α este asimetric**, aminoacizii proteinoși sunt toți **izomeri L**. În natură există și D-aminoacizi, dar aceștia nu intră în structura proteinelor

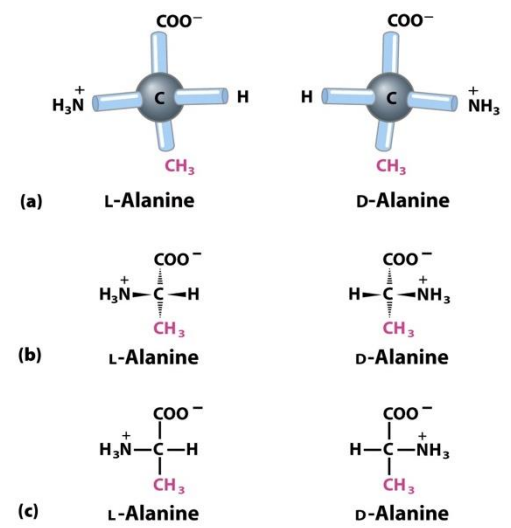
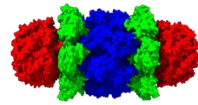


Figure 3-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

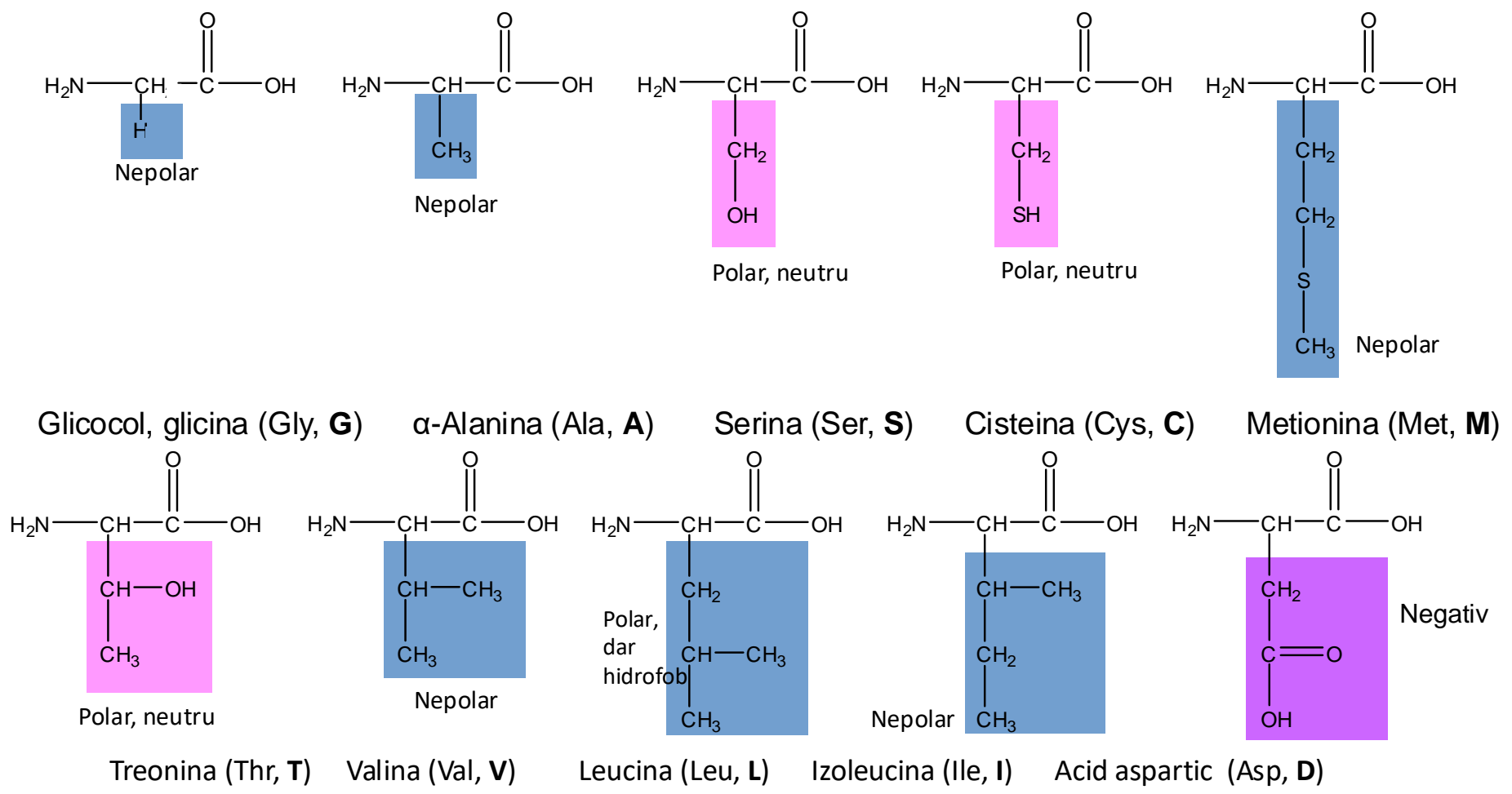


Aminoacizi – particularități structurale

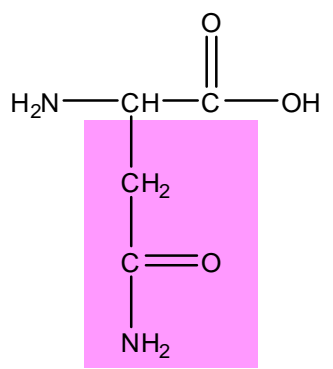
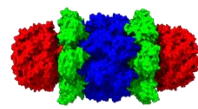
Catenă laterală R conferă aminoacizilor proprietăți specifice. Funcție de proprietățile specifice, aminoacizii proteinoageni se clasifică în:

A. După tipul de catenă R:

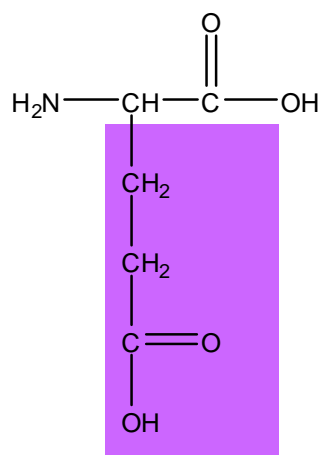
1. Aminoacizi alifatici



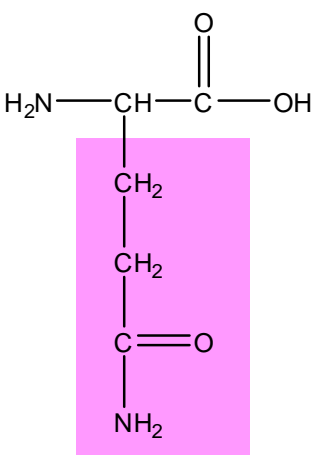
Aminoacizi – particularități structurale



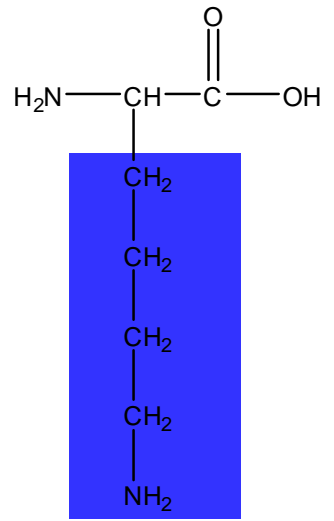
Polar, neutru



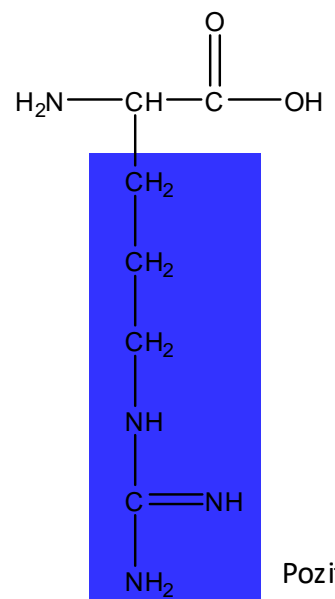
Negativ



Polar, neutru



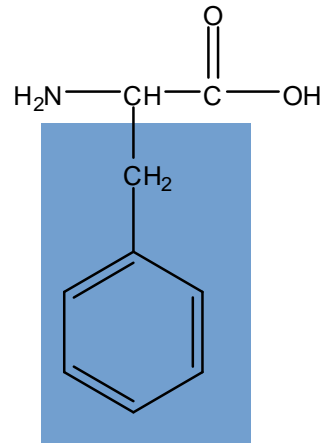
Pozitiv



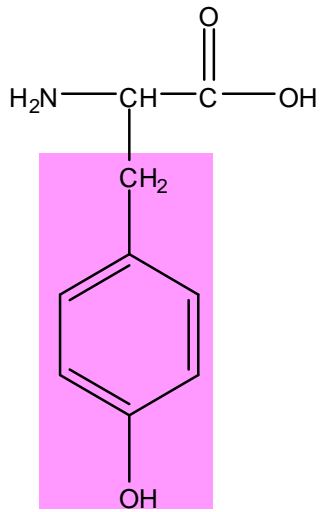
Pozitiv

Asparagina (Asn, **N**) Acid glutamic (Glu, **E**) Glutamina (Gln, **Q**) Lizina (Lys, **K**) Arginina (Arg, **R**)

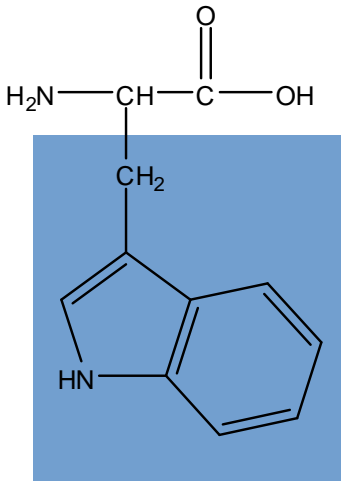
2. Aminoacizi aromatici:



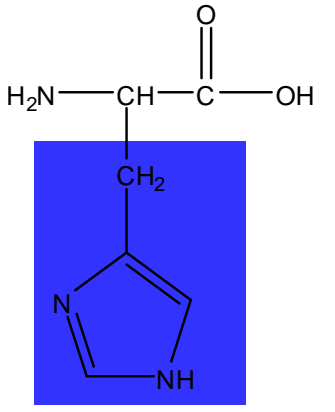
Fenilalanina (Phe, **F**)



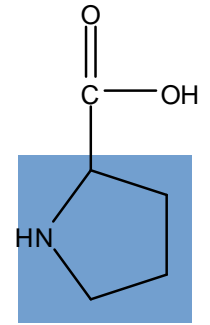
Tirozina (Tyr, **Y**)



Triptofan (Trp, **W**)

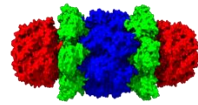


Pozitiv

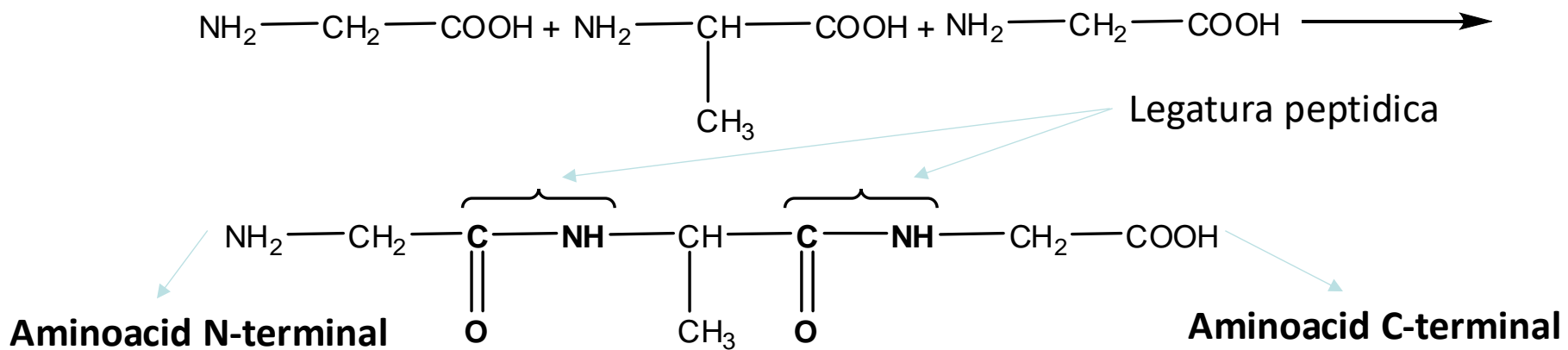


nepolar

Histidina (His, **H**) Prolina (Pro, **P**)

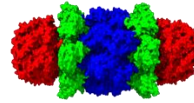


Aminoacizii pot realiza reacții de condensare cu eliminare de apă între grupele $-NH_2$ și $-COOH$, rezultând peptide sau proteine, în funcție de numărul de aminoacizi care participă la reacție. Legătura dintre aminoacizi se numește **legătură peptidică**. De exemplu, glicina și alanina se condensează formînd o tripeptidă numită glicil-alanil-glicina:



Reacția de condensare are loc în ribozomi. Aici, în medie **mai mult de 4 molecule NTP** sunt hidrolizate la NDP pentru a sintetiza 1 legătură peptidică dintr-o moleculă proteică. Bilantul energetic este de $4 \times 30,5 \text{ kJ/mol} = 122 \text{ kJ/mol}$ cheltuiți pentru a sintetiza o legătură peptidică ce conține 21 kJ/mol .

Acest cost energetic ridicat pentru sinteza unei legături peptidice se explică prin faptul că scopul în sine nu este de a sintetiza legături peptidice oarecare, ci de a **asambla aminoacizii într-o anumită ordine** (cine specifică ordinea?) pentru a forma un lant de aminoacizi clar definit. **Energia suplimentară are rol în a asigura inserarea corectă a aminoacizilor în procesul traducere a informației genetice.**



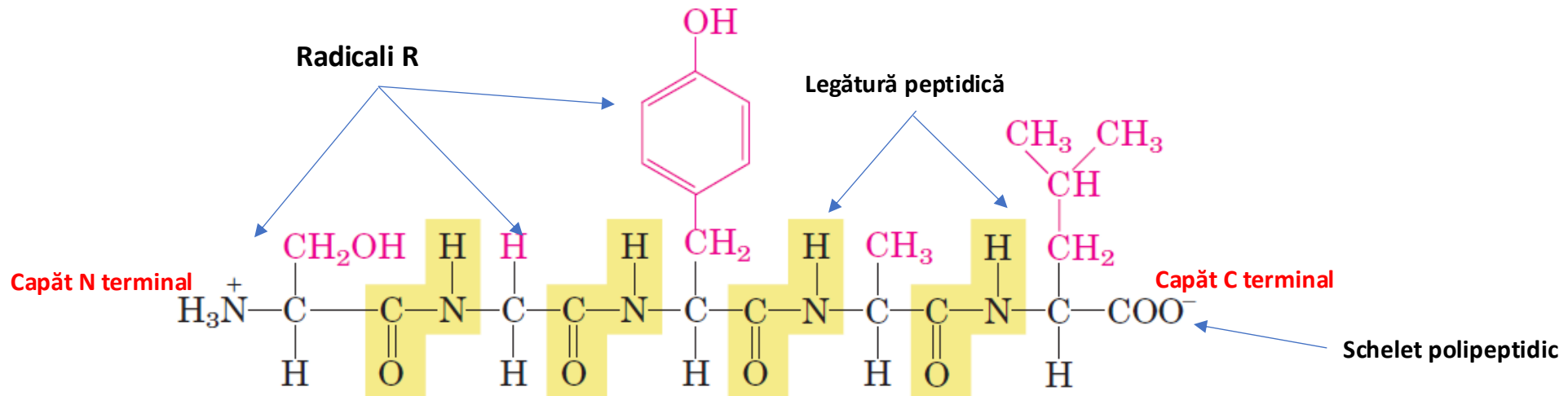
Lanțurile (catenele) de aminoacizi legați prin legături peptidice se pot clasifica **după numărul de aminoacizi** în:

Oligopeptide – conțin un număr mai mic de 10-20 aminoacizi;

Polipeptide - conțin un număr mai mare de 20 aminoacizi;

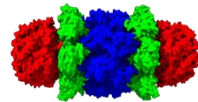
Proteine - conțin un număr mai mare de 50 aminoacizi;

Un aminoacid încorporat într-o catenă de aminoacizi este denumit **rest de aminoacid (aminoacid residue)**. Lanțul de aminoacizi este o înșiruire de unități **-NH-C α -CO-** conectate prin legături peptidice și poartă numele de **schelet polipeptidic (peptide backbone)**. Radicalii **R** specifici fiecărui aminoacid sunt **grefați pe C α** 'perpendicular' pe scheletul polipeptidic.



Pentapeptida Serilgliciltirosilalanilleucină sau Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu sau SGYAL.

Prin convenție peptidele se numesc și se notează de la stânga la dreapta, în sensul sintezei lor de la capătul N terminal spre cel C terminal.



Structura proteinelor

Electronii π ai dublei legături C=O intră în rezonanță cu atomul de N și **legătura peptidică capătă caracter parțial de dublă legătură**. Legătura peptidică dintre atomul de C și N devine mai scurtă decât legătura C-N din amine **iar cei 2 atomi nu se mai pot roti liberi unul față de celălalt**. **Toți atomii grupării peptidice devin co-planari**, atomul de O din CO fiind în trans față de atomul de H din NH.

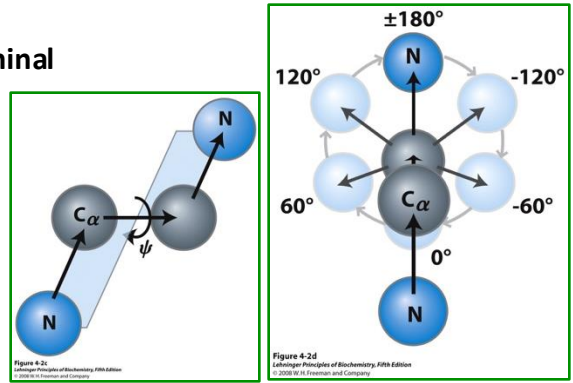
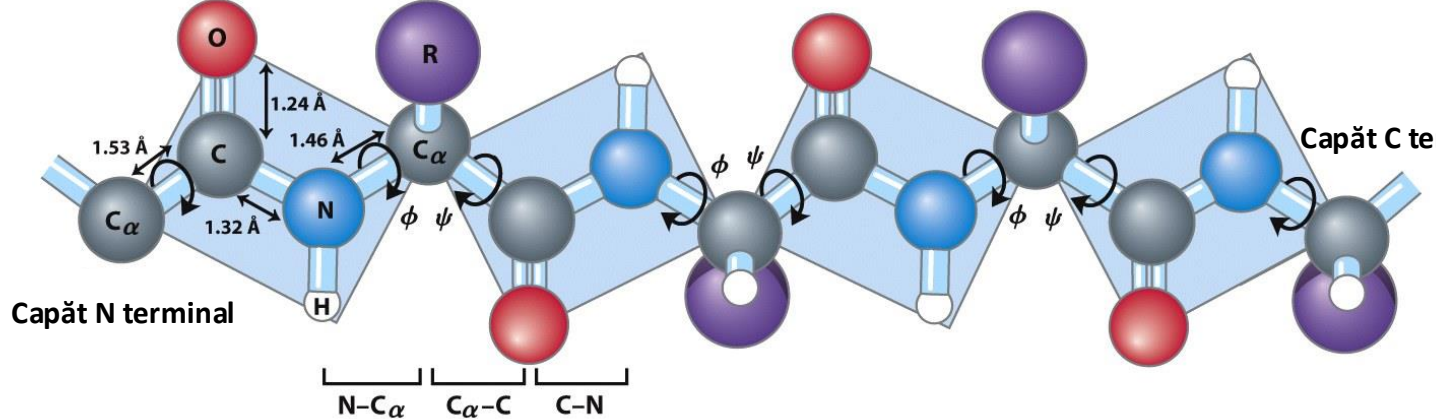


Figure 4-2b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Catenele polipeptidice sunt împachetate în **conformații tridimensionale specifice**. În general, **plierea unei proteine în forma tridimensională specifică se realizează spontan, pe baza principiilor de minimizare a energiei**. Plierea corectă a proteinelor este **aminoacizii nepolari hidrofobi în interior, iar cei polari la exterior**, însă poate fi controlată enzimatic și corectată atunci când este cazul de către proteinele **chaperone**.

Există **4 nivele de organizare a structurii proteinelor**:

A. Structura primară - numărul, natura și succesiunea resturilor de aminoacizi = **secvența de aminoacizi**.

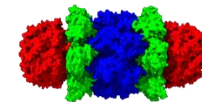
```

1  vlspadktnv kaawgkvgah ageygaeale rmflsfpttk tyfphfdlsh gsaqvkgghgk
61  kvadaltnav ahvddmpnal salsdlhahk lrvdpvnfkl lshclllvlla ahlpaeftpa
121 vhasldkfla svstvltsky r
  
```

Capăt N terminal Secvența unei subunități a hemoglobinei

Capăt C terminal

Câți aminoacizi are această catenă? Este o proteină sau o peptidă?



B. Structura secundară - este reprezentată de orientarea spațială locală a unei catenei peptidice, independentă de forma restului de catenă peptidică.

Caracterul parțial de dublă legătură al legăturii peptidice și legăturile de H dintre -C=O și -NH favorizează apariția unor conformații sau structuri spațiale specifice. Două tipuri de structuri secundare sau dovedit a fi majoritare:

α -helixul peptidic (α -helix)

Scheletul polipeptidic se poate curba și plia sub forma unui tirbușon. Plierea poate avea loc spre dreapta sau spre stânga. Deci helix-urile din proteine sunt orientate. Datorită unor restricții sterice, tirbușonul spre stânga se formează rar, **majoritatea helix-urilor din proteine sunt spre dreapta**.

Cel mai frecvent helix în proteine este α -helixul:

-Tirbușon răsucit spre dreapta, **o spiră completă are 3,6 resturi** de aminoacizi;

- **O din CO** al fiecărui rest aac formează o legătură de **H cu protonul din NH al celui de-al 4 rest aac**.

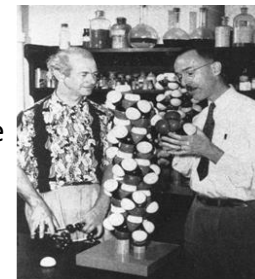
- **Toate legăturile de H posibile a fi realizate se formează**, structura secundară este stabilă. Doar în capetele helix-ului aminoacizii nu au parteneri pentru formarea de legături de H în cadrul aceluiași helix.

Alte tipuri de helix-uri întâlnite în proteine:

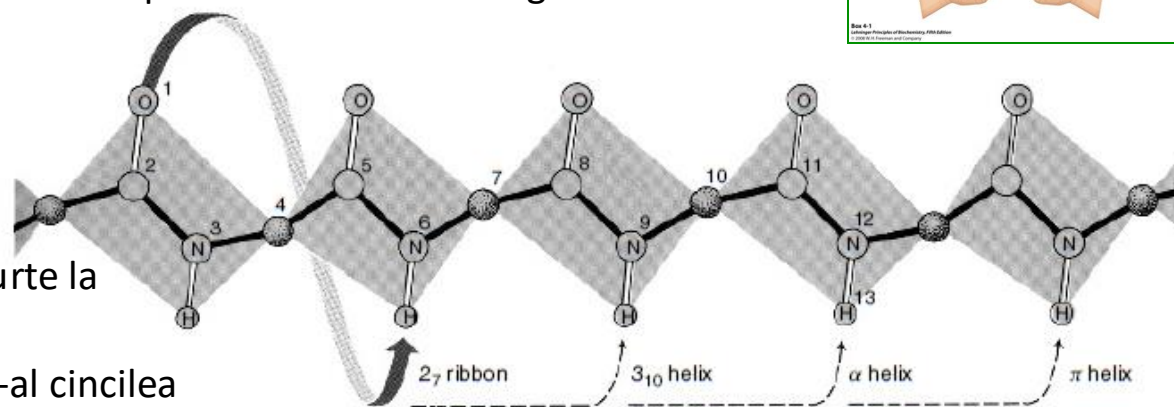
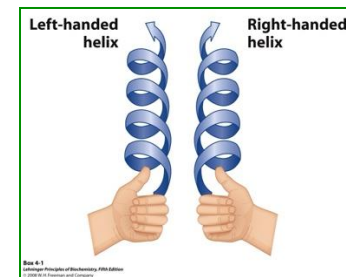
-**Helixul 2_7** – legătura de H se stabilește cu cel de-al doilea aminoacid;

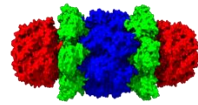
-**Helixul 3_{10}** – legătura de H se stabilește cu cel de-al treilea aminoacid, apare pe segmente scurte la capătul unui α -helix;

- **Helixul π** – legătura de H se stabilește cu cel de-al cincilea aminoacid, 4.4 aac pe spira, apare extrem de rar în proteine

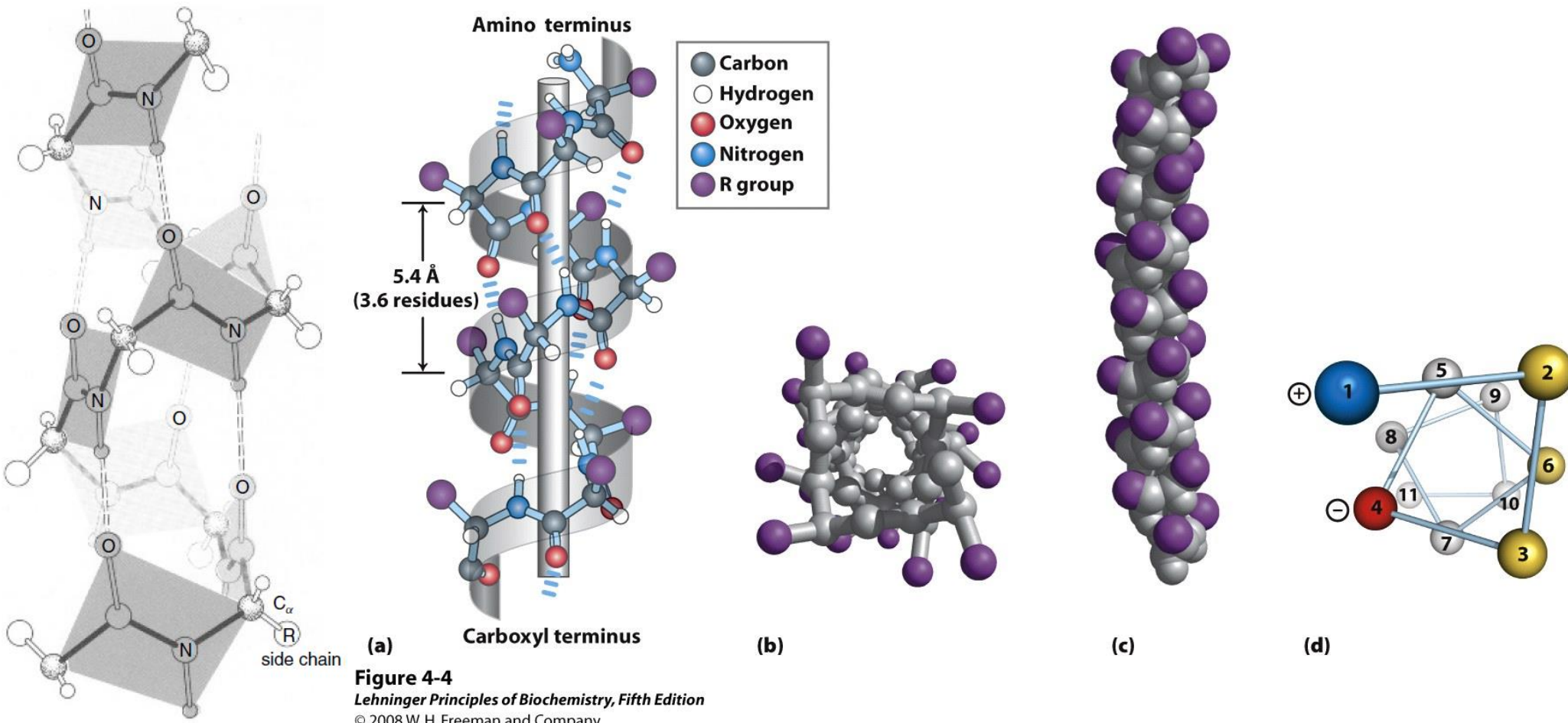


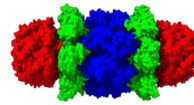
Linus Pauling, Robert Corey și Herman Branson în 1951





α -helixul peptidic poate fi imaginat ca un cilindru, radicalii R fiind orientați către exterior.



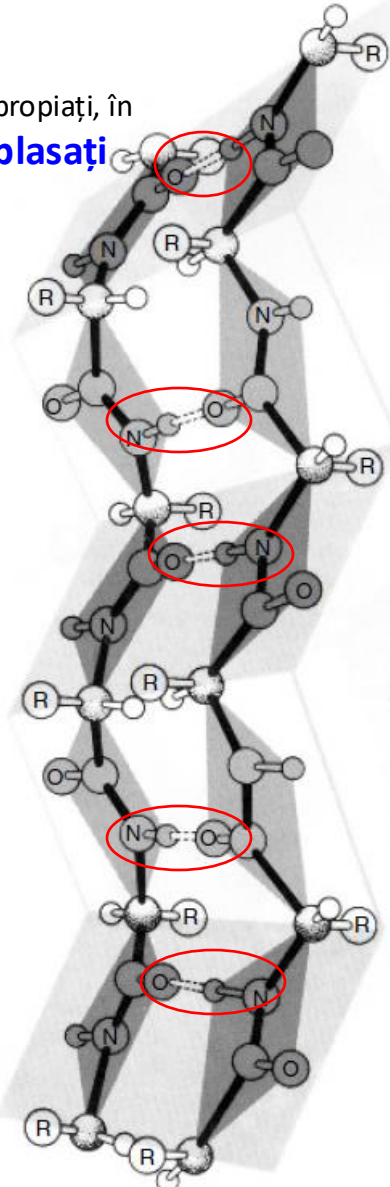
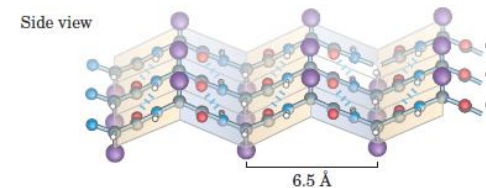
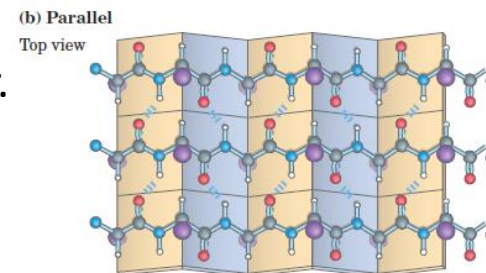
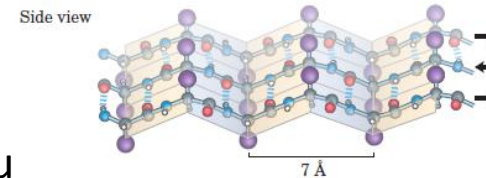
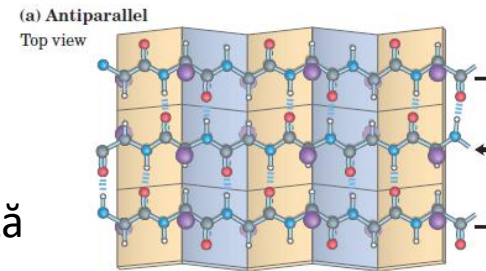


Structura β -pliată (β -sheets)

Dacă în cadrul structurilor helicale legăturile de hidrogen se formează în cadrul aceluiași schelet peptidic între aminoacizi apropiați, în cazul structurilor β -pliate **legăturile de H se stabilesc între NH și CO ai resturilor de aminoacizi amplasați fie pe catene diferite sau fie pe aceeași catenă dar la distanțe mari unul pe de celălalt.**

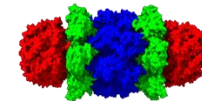
Funcție de direcția celor 2 catene diferite (sau porțiunile îndepărtate ale aceleiași catene) ce formează o zonă β -pliată s-au descris structuri β -pliate:

- Antiparalele** – o catena are orientarea N-C și cealaltă C-N, un pliu are 7Å;
- Paralele** – ambele catene au aceeași orientare, un pliu are 6,5 Å;
- Mixte** - ambele tipuri de orientări, apar extrem de rar.



Structura β -pliată pot fi imaginată ca o foaie pliată, Radicalii R fiind orientati alternativ către partea superioară și inferioară a planului foii.

Structura terțiară a proteinelor



c. Structura terțiară se definește ca structura tridimensională globală a unei catene polipeptidice.

- aranjarea, pliarea și înfășurarea segmentelor α -helicoidale și β -pliate pentru a forma structura spațială tridimensională complexă a proteinei per ansamblu.

Interacțiuni implicate în realizarea structurii terțiare:

- **Legăturile de H dintre resturile de aminoacizi** - au rol secundar și au importanță doar în acele zone ce nu sunt α -helicale, β -pliate sau ce formează bucle;

- **Interacțiunile dintre catenele laterale R ale aminoacizilor** – sunt esențiale în realizarea structurii terțiare. Amplasarea lor spre exteriorul α -helix-ului și perpendicular pe planul structurii β -pliate expune catenele laterale R și permite interacțiunea acestora. Aceste interacțiuni pot fi:

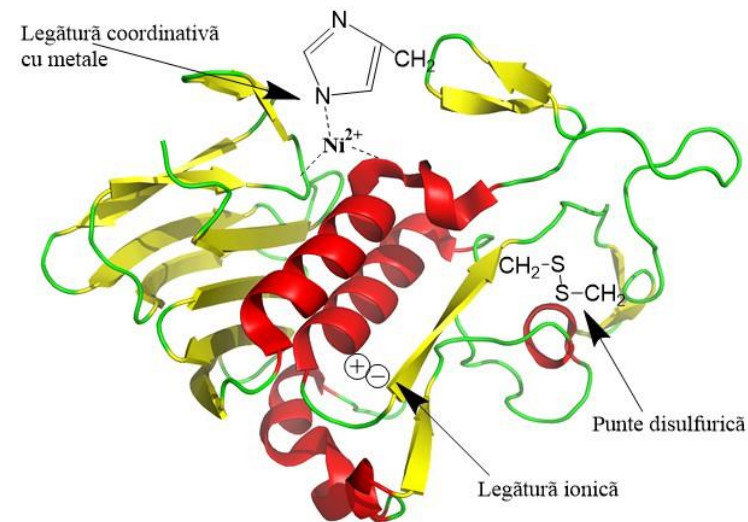
a. **legături de H** – între R aparținând la aminoacizi diferiți;

b. **interacțiunile hidrofobe** – critice pentru realizarea structurii terțiare - aminoacizii hidrofobi se vor grupa într-un **centru hidrofob**, departe de interacțiunile cu apa. Aminoacizii hidrofili se vor amplasa la exteriorul moleculei proteice;

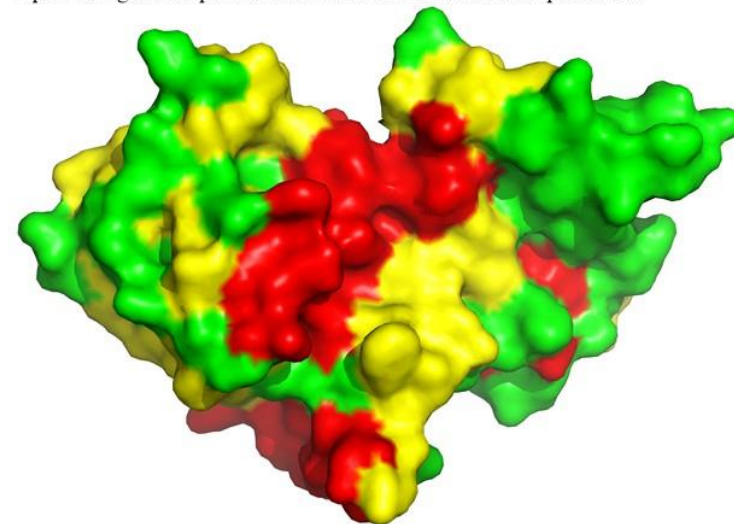
c. **interacțiuni ionice** – între doi aminoacizi încărcăți electric cu sarcini opuse (**ion pair** or **salt bridge**)

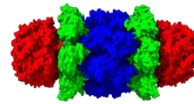
d. **legături covalente** – un singur aminoacid poate realiza legături covalente: Cys. Legătura formată între 2 resturi de C- legătură disulfidică (S-S). Nu toate resturile de C dintr-o proteină sunt implicate în formarea de legături disulfidice;

e. **interacțiuni cu molecule neproteice** – metale, grupe prostetice.



Tipuri de legături implicate în formarea structurii terțiare a proteinelor





D. **Structura cuaternară** reprezintă nivelul de organizare structurală cel mai înalt și este specifică unor proteine numite **proteine multimerice**. Aceste proteine conțin două sau mai multe lanțuri polipeptidice numite **subunități proteice sau protomeri**, fiecare cu structura sa primară, secundară și terțiară specifice. Protomerii se asociază necovalent pentru a forma un conglomerat spațial complex – proteină multimeră. Asocierea protomerilor este stabilă datorită interacțiunilor dintre radicalii R ai aminoacizilor aflați în zone de contact dintre protomeri și pot fi: legături de hidrogen, legături S-S sau interacțiuni hidrofobe.

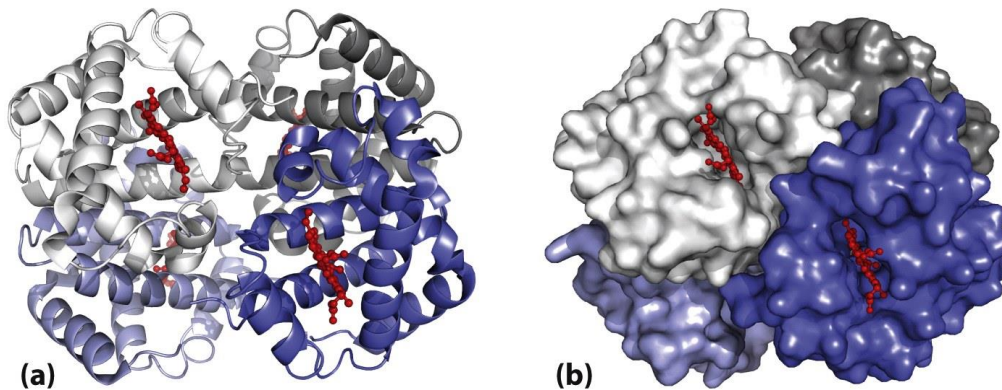


Figure 4-22
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



Max Perutz, 1914–2002 (left)
John Kendrew, 1917–1997 (right)

Unnumbered 4 p138
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Un exemplu de proteină multimeră este **hemoglobina**. Aceasta conține 4 catene polipeptidice, identice două câte două și numite **catene α** (conțin 141 de aminoacizi fiecare, de culoare gri în figura de mai sus) și **β** (146 aminoacizi fiecare, albastru în figură). Hemoglobina are o structură simetrică, o catenă α interacționează cu o catenă β , astfel încât despre hemoglobină se spune că este un **tetramer** sau un **dimer de protomeri $\alpha\beta$** . Suplimentar, hemoglobina conține și componente neproteice – 4 atomi de Fe^{2+} (Fe feros) în centrul unei molecule de hem.

Hemoglobina este prima proteină multimeră a cărei structură a fost stabilită experimental – M. Perutz și J. Kendrew.

Structura cuaternară a proteinelor

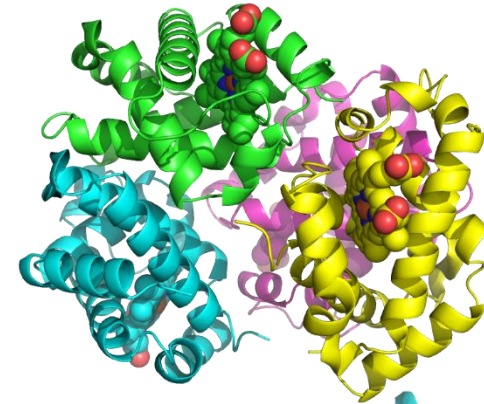
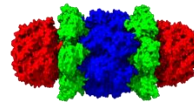
1. **Cooperarea în realizarea unei funcții.** Asocierea unor subunități ce au capacitatea de a lega un substrat duce la creșterea afinității proteinei pentru substrat peste afinitatea unui singur protomer;

Ex: Hemoglobina;

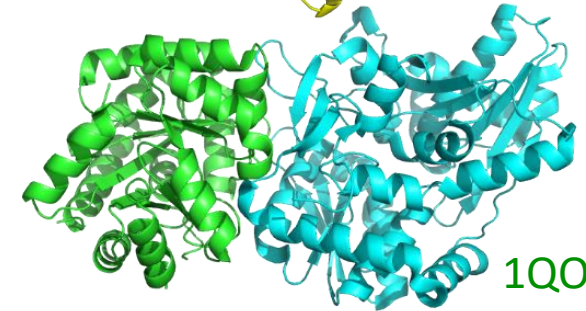
2. **Co-localizarea unor funcții.** Două subunități cu funcții diferite se pot asocia astfel cele două funcții vor fi realizate de aceeași proteină. Cel mai frecvent aceste funcții sunt legate de etape diferite de procesare a unui substrat; Ex: Triptofan sintaza;

3. **Modificarea unei funcții.** Funcția unei proteine se poate modifica de tipul de subunitate legată; Ex: Imunoglobulinele;

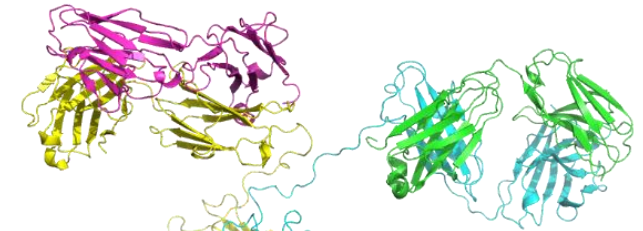
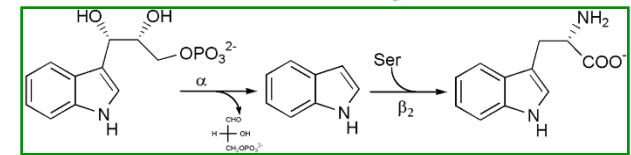
4. **Realizarea unor structuri moleculare de dimensiuni mari.** Ex: actina și miozina, microfilamentele de actină, microtubulii, filamentele intermediare;



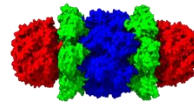
1A3N



1QOP



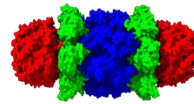
1IGT



Oricare ar fi funcția sa specifică (**rolurile proteinelor au fost detaliate la începutul acestui curs**), pentru a o îndeplini **orice proteină trebuie să interacționeze cu alte molecule**. Interacțiunea se realizează prin formarea permanentă sau temporară de legături chimice (legături de H, coordinative, ionice, interacțiuni hidrofobe sau Van der Waals) între catenele laterale R ale aminoacizilor din structura proteică și atomii moleculei cu care proteina interacționează.

Interacțiunile dintre o proteină și altă moleculă pot fi de 2 tipuri:

- 1. interacțiuni în urma căror structura sau conformația moleculei nu sunt alterate.** Aceste interacțiuni pot fi sau nu temporare și sunt extrem de importante din punct de vedere biochimic. Dacă interacțiunile sunt **tranzitorii** (temporare), molecula cu care o proteina interacționează reversibil se numește **ligand** (**termenul nu trebuie confundat cu ligandul din combinațiile complexe**). Dacă interacțiunile sunt **permanente**, molecula cu care o proteina interacționează reversibil se numește **grupare prostetică**. Zona specifică în care o moleculă se leagă de o proteină se numește **situs de legare**.
- 2. interacțiuni în urma căror structura sau conformația moleculei este alterată.** (Ex. alcoolul etilic este transformat în aldehydă acetică printr-o reacție de dehidrogenare). În acest caz molecula proteică funcționează ca un bio-catalizator și poartă numele de **enzimă**, iar molecula ce suferă o **reacție enzimatică** se numește **substrat enzimatic**. Zona specifică în care substratul enzimatic se leagă de enzimă și suferă transformarea se numește **situs catalitic**.



În situsul de legare sau situsul catalitic sunt amplasați acei aminoacizi din structura proteinei ce au grupările funcționale necesare pentru a interacționa cu ligandul sau substratul enzimatic. Mai mult decât atât, acești aminoacizi au o amplasare în spațiu bine definită în așa fel încât **situsul de legare sau cel catalitic** să fie **perfect complementar ca formă și proprietăți cu ligandul, respectiv substratul enzimatic**. Acest lucru face ca interacțiunea dintre moleculele proteice și alte molecule să fie extrem de specifice.

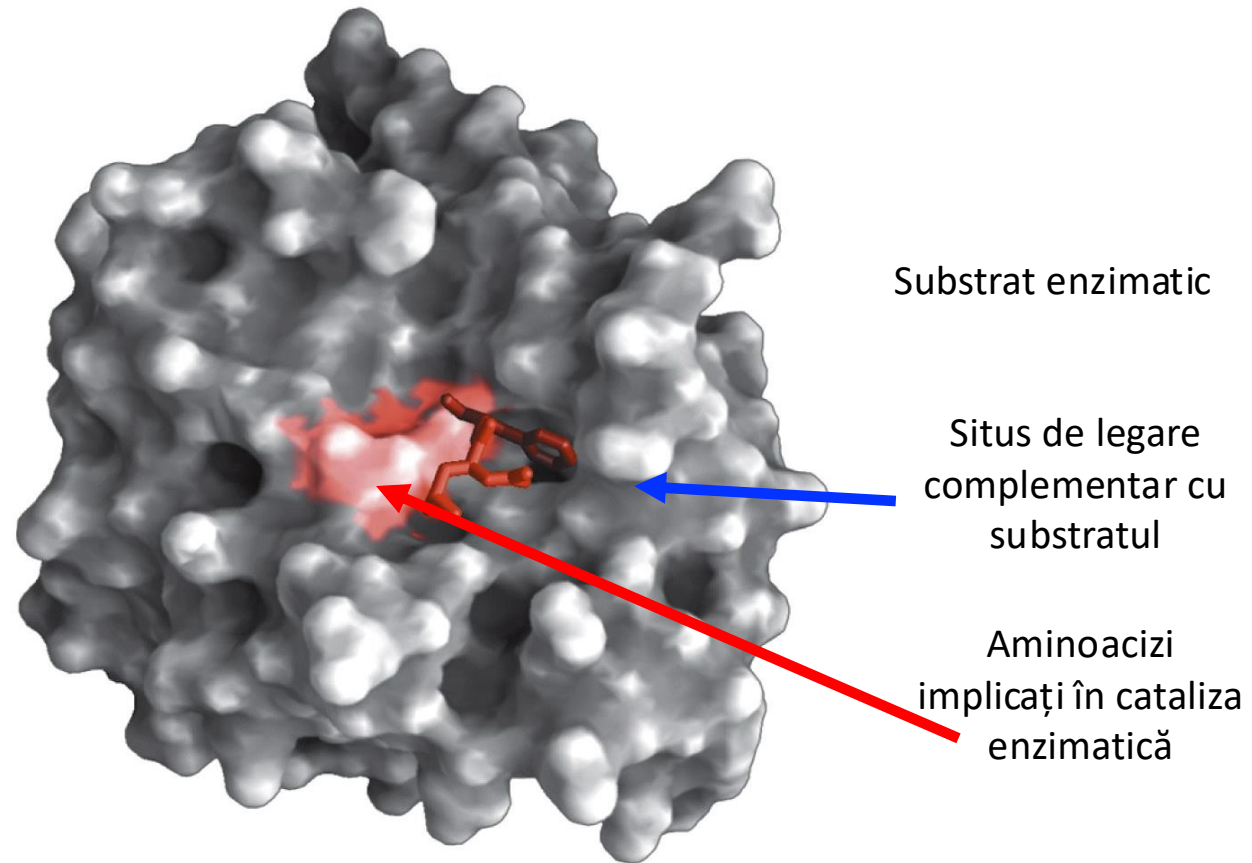
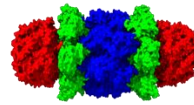


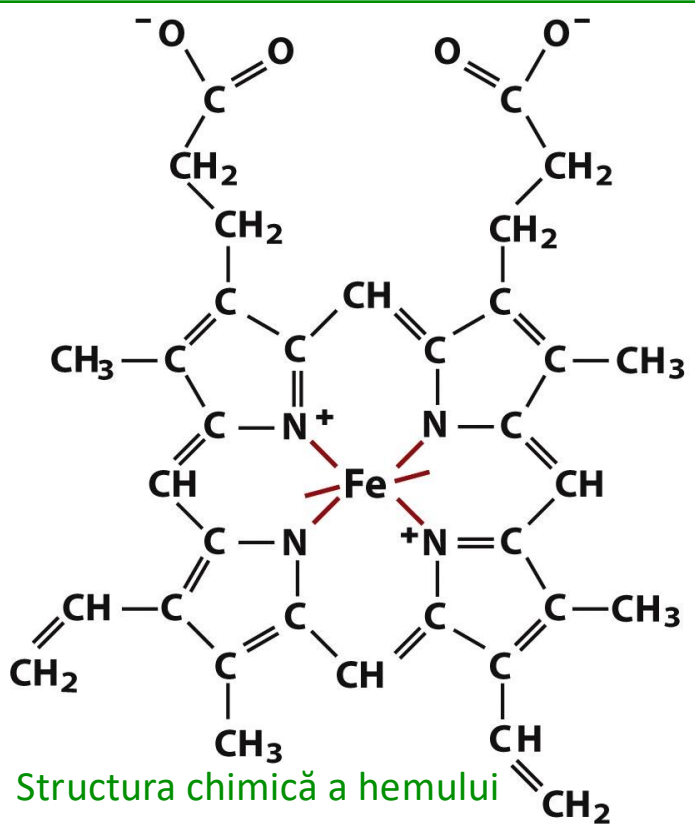
Figure 6-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



Interacțiuni în urma căror **structura** sau **conformația moleculei** legate nu sunt alterate:

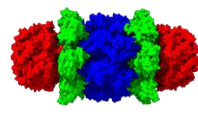
Legarea O_2 de Hemoglobină

Datorită faptului că O_2 este o moleculă nepolară, **solubilitatea sa în H_2O este relativ redusă** astfel încât cantitatea dizolvată în plasma sanguină nu este suficientă pentru funcționarea țesuturilor. De aceea **organismele multicelulare și-au creat mecanisme de transport** al acestui gaz sub forma unor proteine specifice, precum **hemoglobina (Hb)**.

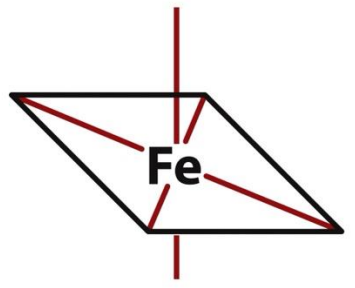


Nici unul însă din aminoacizii proteinogeni nu este capabil să interacționeze cu O_2 . Unele metale tranziționale precum Fe sau Cu au capacitatea interacționa puternic cu O_2 prin formarea de legături coordinative, însă duc la formare de compuși periculoși (**ioni superoxid sau apă oxigenată ce afectează moleculele de ADN**). Pentru a rezolva această problemă, în proteinele ce transportă O_2 folosind Fe^{2+} , metalul este chelat de ligandul **protoporfirină** ce îi reduce activitatea. **Fe^{2+} împreună cu protoporfirina formează gruparea prostetică numită hem**. În molecula tetramerică de hemoglobină există 4 molecule de hem câte una pentru fiecare dintre cele 2 subunități α și β .

Exemple de interacțiuni realizate de proteine



Fe feros (Fe^{2+}) are o geometrie octaedrală și deci poate forma 6 legături coordinative. Patru dintre acestea sunt saturate de către 4 inele porfirinice, însă cele 2 legături perpendiculare pe planul protoporfirinei rămân libere și ar putea reacționa cu O_2 , acest lucru ducând la reducerea Fe^{2+} (Fe feros) la Fe^{3+} (Fe feric). Fe^{3+} însă nu poate lega O_2 , și deci hem-ul nu și-ar putea îndeplini funcția.



În Hb, aminoacidul histidină din structura uneia dintre subunități este amplasat în spațiu în așa fel încât să satureze cea de-a 5-a legătură coordinativă pe care o poate forma Fe^{2+} și o blochează.

Transformarea $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ nu mai este posibilă, iar hem-ul poate lega O_2 prin intermediul celei de-a 6 coordinații. Fiecare moleculă de hem leagă câte o moleculă de O_2 . În alveolele pulmonare unde concentrația de O_2 este mare, echilibrul reacției de legare este orientat spre formarea complexului $HbHemO_2$, iar în țesuturi concentrația O_2 scade, astfel încât echilibrul reacției de legare este orientat spre desfacerea complexului și obținerea de $HbHem$ și O_2 .

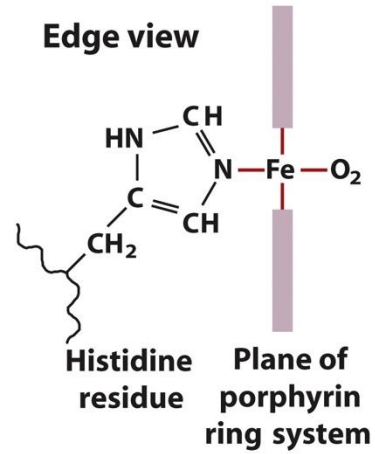


Figure 5-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

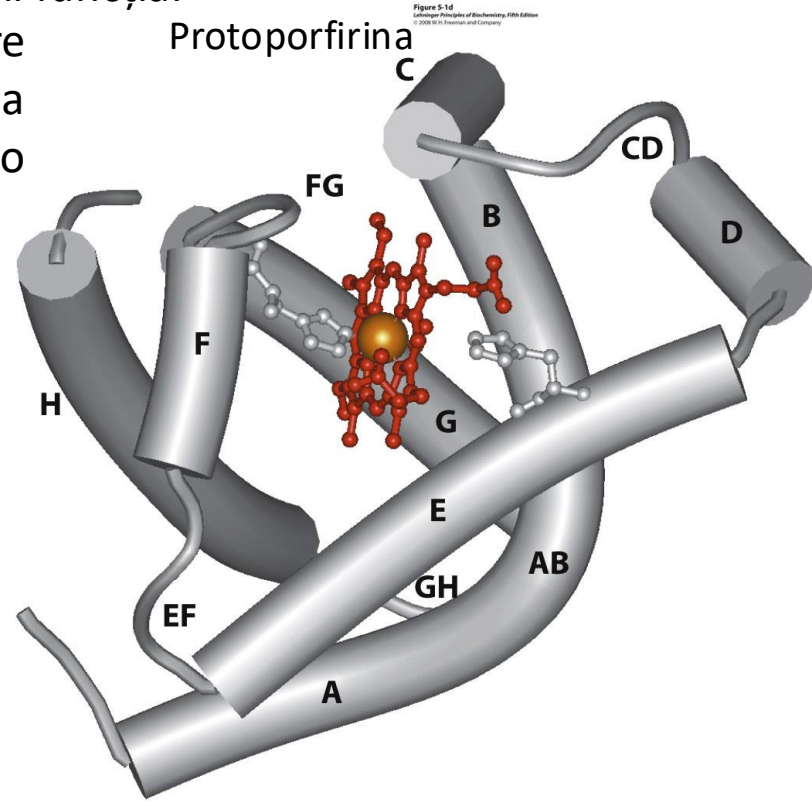
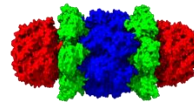


Figure 5-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Exemple de interacțiuni realizate de proteine



Interacțiuni în urma căror **structura** sau **conformația** moleculei legate **sunt** alterate:

Reacția de hidroliză ca catalizată de chimiotripsină

Enzima chimiotripsină este o proteină ce catalizează hidroliza legăturilor peptidice din apropierea unor aminoacizi ce conțin nuclee aromatice precum triptofanul, fenilalanina sau tirozina. Forma buzunarului în care se află **situsul catalitic** este complementară cu o serie de peptide ce conțin acești aminoacizi. În situsul catalitic există aminoacidul **Serină** amplasat în așa fel încât gruparea sa **hidroxil** să poată realiza o reacție de acilare cu peptida prin care legătura peptidică se rupe. Printr-o reacție de de-acilare cu apa, gruparea OH este refăcută și enzima poate să participe la o nouă reacție.

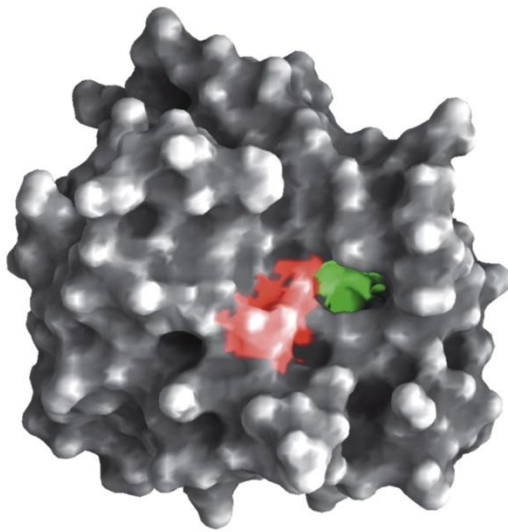


Figure 6-18b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

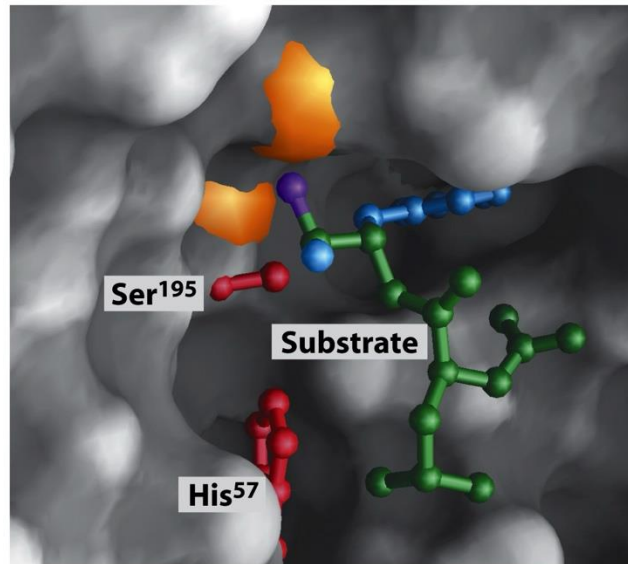


Figure 6-18d
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

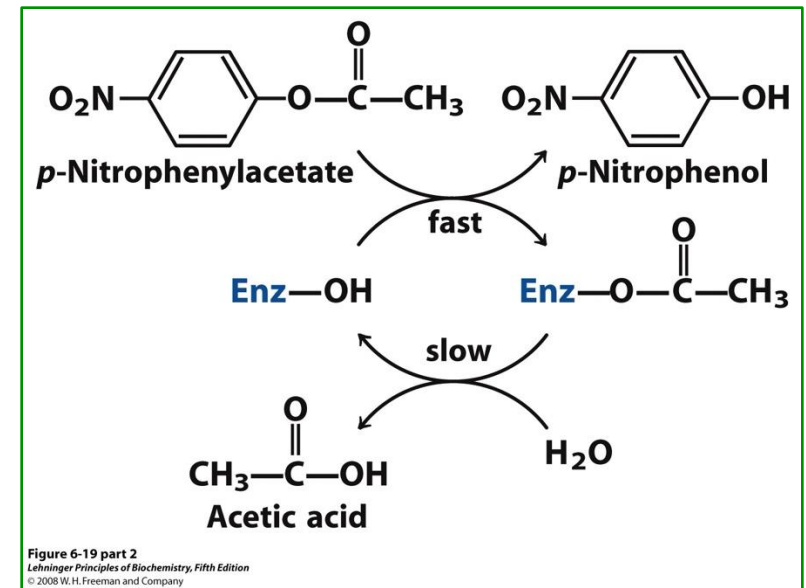
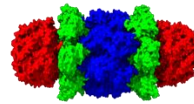


Figure 6-19 part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Mecanismul de reacție al chimiotripsinei cu analogul p-nitrofenilacetat

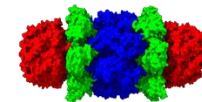


Cu câteva excepții, toate **enzimele ce catalizează reacțiile biochimice în organismele vii sunt proteine** (**Care sunt excepțiile?**). Reacțiile chimice catalizate de enzime au ca suport material catenele laterale ale unor aminoacizi cheie amplasați în **situsul catalitic** numiți **aminoacizi catalitici**. Activitatea catalitică a enzimelor depinde de structura tridimensională a situsului catalitic și de amplasarea optimă a aminoacizilor catalitici, deci de structura nativă a catenei polipeptidice pe ansamblu. Dacă aceasta este afectată (**ex. prin încălzire proteinele sunt denaturate – albumina din ou**), activitatea enzimatică dispare.

Însă, numărul de radicali disponibili pe catenele laterale ale aminoacizilor este limitat și nu este suficient pentru a putea realiza toate reacțiile biochimice necesare pentru a funcționa o celulă. De aceea, unele enzime conțin suplimentar în structura lor o moleculă ne-proteică ce participă la procesul catalitic și care este numită:

- 1. cofactor enzimatic** – orice moleculă neproteică legată necovalent de proteină. Poate fi un atom metalic (Ex: Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) sau o moleculă organică cu sau fără atomi metalici adică o:
- 2. coenzimă** - cofactor enzimatic de natură organică cu sau fără atomi metalici;
- 3. grupare prostetică** – dacă molecula este legată printr-o legătură covalentă de molecula proteică.

Enzima completă, activă din punct de vedere catalitic se numește **holoenzimă** și este alcătuită din partea proteică numită **apoenzimă (apoproteină)** și cofactor/coenzimă/grupă prostetică după caz.



Bază de date cu structuri proteice disponibilă la adresa:
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Peste 159000 de structuri proteice, pentru fiecare proteină fiind prezentate:

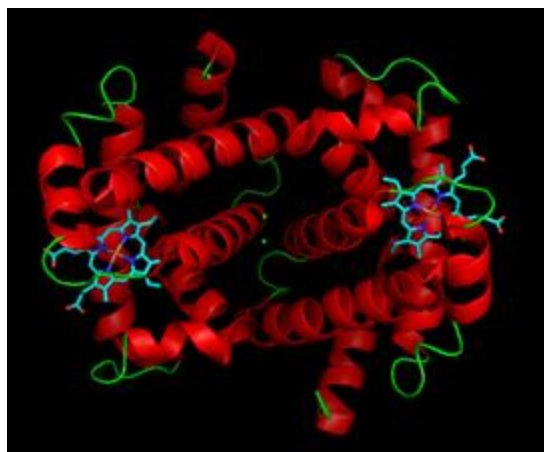
1. un cod de identificare unic (PDBID) alcătuit din 4 litere
2. referința bibliografică unde a fost descrisă acea structură
3. data la care structura a fost publicată în PDB
4. metoda prin care a fost stabilită structura: difracție cu raze X, NMR sau microscopie electronică
5. numărul de aminoacizi și eventualii leiganzi non-proteici (cofactor, metale, etc)
6. un fișier **.pdb** care conține pozițiile în spațiu a tuturor atomilor din structura moleculei

Hemoglobina - PDBID **2DHB**

ATOM	1	N	VAL	A	1	7.744	19.404	6.879	1.00	0.00	N
ATOM	2	CA	VAL	A	1	7.616	19.032	5.452	1.00	0.00	C
ATOM	3	C	VAL	A	1	9.076	18.660	5.064	1.00	0.00	C
ATOM	4	O	VAL	A	1	9.526	17.555	5.442	1.00	0.00	O
ATOM	5	CB	VAL	A	1	6.895	20.047	4.502	1.00	0.00	C
ATOM	6	CG1	VAL	A	1	6.258	19.382	3.284	1.00	0.00	C
ATOM	7	CG2	VAL	A	1	5.879	21.091	5.149	1.00	0.00	C
ATOM	8	N	LEU	A	2	9.832	19.736	4.849	1.00	0.00	N
ATOM	9	CA	LEU	A	2	11.285	19.833	4.079	1.00	0.00	C
ATOM	10	C	LEU	A	2	11.762	21.045	5.487	1.00	0.00	C
ATOM	11	O	LEU	A	2	11.194	22.153	5.350	1.00	0.00	O
ATOM	12	CB	LEU	A	2	11.749	19.087	3.199	1.00	0.00	C
ATOM	13	CG	LEU	A	2	12.143	18.420	2.616	1.00	0.00	C
ATOM	14	CD1	LEU	A	2	11.169	17.261	2.832	1.00	0.00	C
ATOM	15	CD2	LEU	A	2	12.482	18.587	1.135	1.00	0.00	C
ATOM	16	N	SER	A	3	12.387	20.667	4.601	1.00	0.00	N
ATOM	17	CA	SER	A	3	13.208	21.544	7.483	1.00	0.00	C
ATOM	18	C	SER	A	3	14.478	22.011	6.720	1.00	0.00	C
ATOM	19	O	SER	A	3	14.668	21.521	5.581	1.00	0.00	O
ATOM	20	CB	SER	A	3	13.548	20.738	8.754	1.00	0.00	C
ATOM	21	CG	SER	A	3	13.595	19.349	8.484	1.00	0.00	O
ATOM	22	N	ALA	A	4	14.985	23.194	7.087	1.00	0.00	N
ATOM	23	CA	ALA	A	4	16.300	23.755	6.593	1.00	0.00	C
ATOM	24	C	ALA	A	4	17.406	22.070	6.385	1.00	0.00	C
ATOM	25	O	ALA	A	4	17.502	22.226	5.219	1.00	0.00	O
ATOM	26	CB	ALA	A	4	16.793	24.905	7.485	1.00	0.00	C
ATOM	27	N	ALA	A	5	17.434	23.065	7.449	1.00	0.00	N
ATOM	28	CA	ALA	A	5	18.113	20.600	7.772	1.00	0.00	C
ATOM	29	C	ALA	A	5	17.788	19.415	6.824	1.00	0.00	C
ATOM	30	O	ALA	A	5	18.502	18.389	6.854	1.00	0.00	O
ATOM	31	CB	ALA	A	5	17.678	20.260	9.204	1.00	0.00	C
ATOM	32	N	ASP	A	6	16.577	19.491	6.281	1.00	0.00	N
ATOM	33	CA	ASP	A	6	16.623	18.620	5.293	1.00	0.00	C
ATOM	34	C	ASP	A	6	16.421	18.938	3.778	1.00	0.00	C
ATOM	35	O	ASP	A	6	17.476	18.335	3.472	1.00	0.00	O

Fișierul 2DHB vizualizat în pyMol

<https://pymol.org/>



Modelul 2D derivat din 2DHB și fabricat prin imprimare 3D <https://modeleleolare.ro/>

