

Bioške molekule

Bioške molekule so vse tiste organske molekule, ki jih proizvajajo živa bitja. Sestavljene so iz C, H, N, O, nekatere tudi iz P, S in drugih elementov.

Velike biomolekule: proteini, nukleinske kisline, polisaharidi.

Male molekule: metaboliti (primarni, sekundarni), naravni produkti.

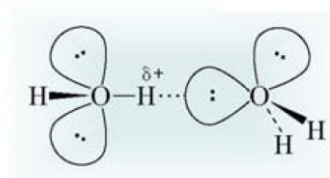
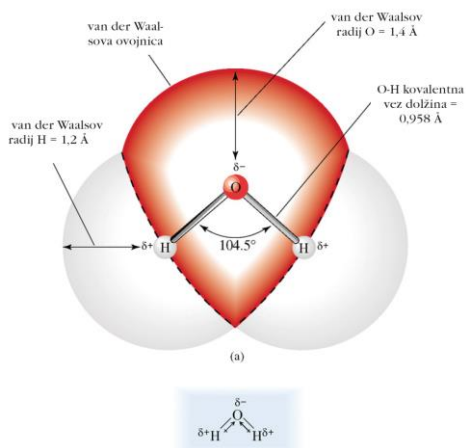
Metaboliti: intermediati in produkti metabolizma (presnove).

Primarni metaboliti: pomembni za rast, razvoj in razmnoževanje. vitamini, energetsko bogati fosfati (ATP, GTP), membranski lipidi, ...

Sekundarni metaboliti: ostale male molekule, pogosto pomembne za odnose z okoljem. antibiotiki, alkaloidi, toksini, barvila, ...

Voda

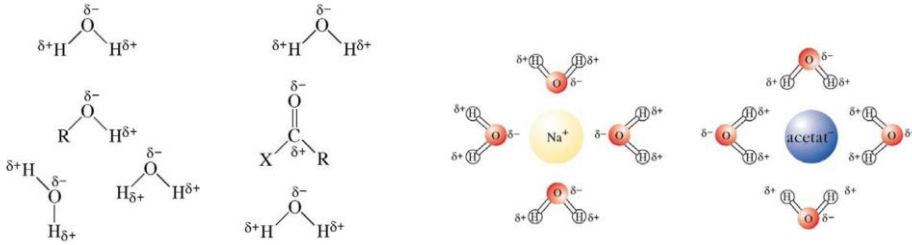
Biomolekule so v organizmu obdane z vodo in večina reakcij poteka v prisotnosti vode. V vodnem okolju poteka tudi večina biokemijskih reakcij.



Molekule vode so med seboj povezane z vodikovimi vezmi.

Voda kot topilo

Polarne in ionske spojine so v vodi dobro topne. Rečemo jim tudi hidrofilne.



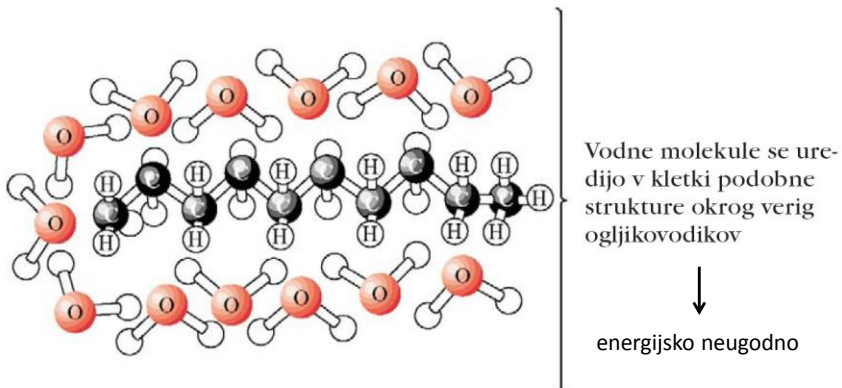
interakcije dipol-dipol

interakcije ion-dipol

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Voda kot topilo

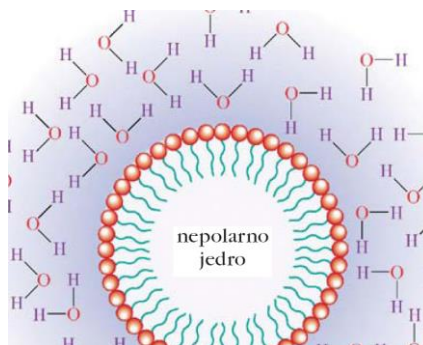
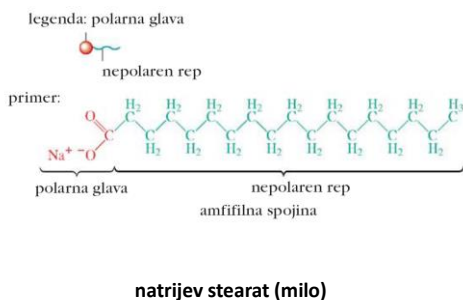
Nepolarne spojine so slabo topne, rečemo jim hidrofobne.



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Voda kot topilo

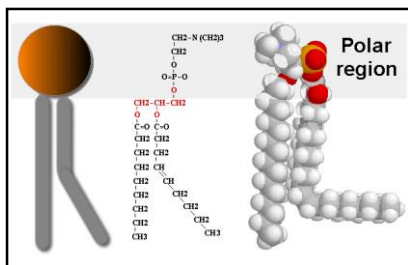
Nekatere biomolekule so amfililne oz. amfipatične. Sestavljene so iz hidrofilnega (polarnega oz. nabitega) dela in hidrofobnega (nepolarnega) dela. Take spojine v vodi tvorijo micelo ali dvosloj.



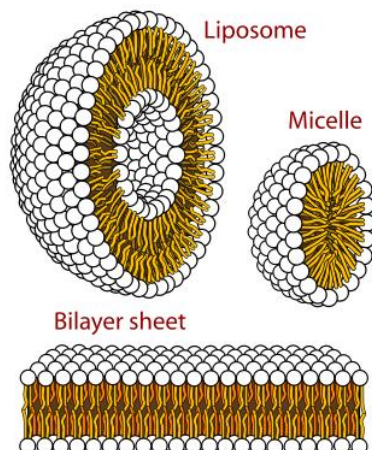
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Voda kot topilo

Nekatere biomolekule so amfililne oz. amfipatične. Sestavljene so iz hidrofilnega (polarnega oz. nabitega) dela in hidrofobnega (nepolarnega) dela. Take spojine v vodi tvorijo micelo ali dvosloj.



http://bioweb.wku.edu/courses/biol115/wyatt/biochem/lipid/Lipid_2.asp

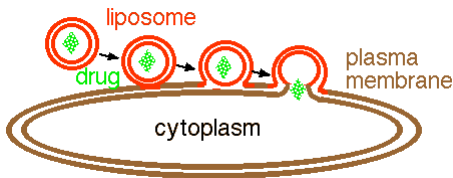


<http://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>

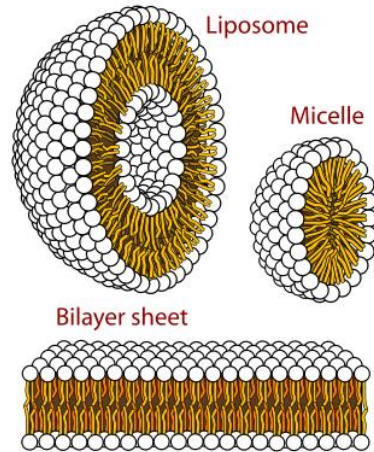
Voda kot topilo

Nekatere biomolekule so amfifilne oz. amfipatične. Sestavljene so iz hidrofilnega (polarnega oz. nabitega) dela in hidrofobnega (nepolarnega) dela. Take spojine v vodi tvorijo micelo ali dvosloj.

Liposome se uporabljajo kot dostavni sistem za vnos različnih spojin v celico (zdravila, v raziskovalne namene,...)



<http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/liposome.html>



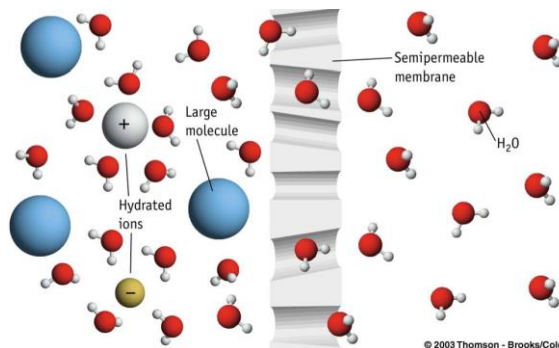
<http://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>

Osmoza

Osmoza: difuzija vode skozi celično membrano v smeri od nizke koncentracije topnenca (visok vodni potencial) proti visoki koncentraciji topnenca (nizek vodni potencial).

hipotonično okolje $\xrightarrow{\text{voda}}$ hipertonično okolje

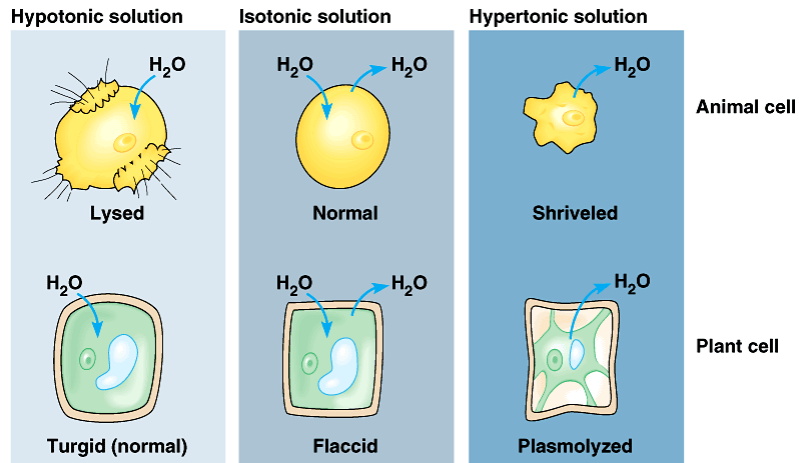
Osmozni tlak: tlak, ki je potreben za preprečitev vdiranja vode skozi membrano.



© 2003 Thomson - Brooks/Cole

Osmoza

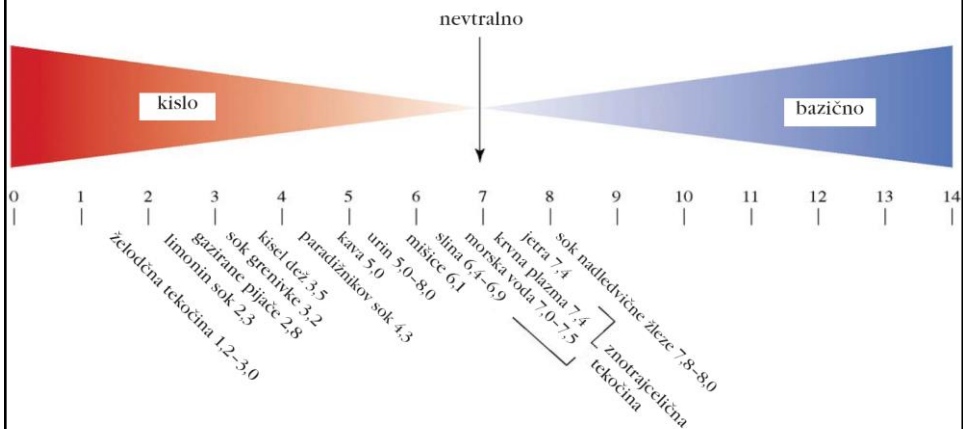
Osmoza različno vpliva na različne tipe celic.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

pH v bioloških sistemih

pH v bioloških sistemih je natančno uravnavan.



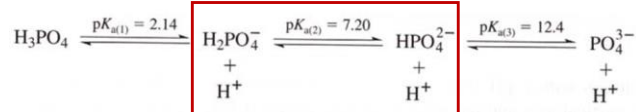
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

pH v bioloških sistemih

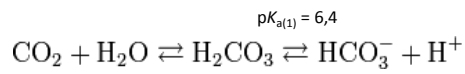
pH v bioloških sistemih je natančno uravnavan. Konstanten pH zagotavljajo biološki pufrji.

Najpomembnejši biološki pufrski sistemi:

fosfat – pomemben znotrajcelični pufer



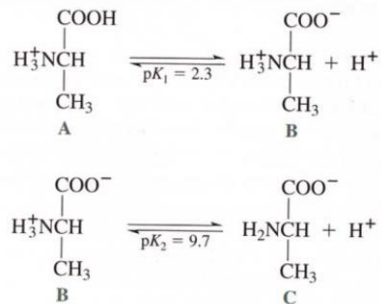
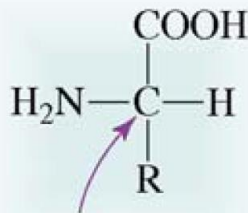
bikarbonat – pomemben zunajcelični pufer



proteini – znotrajcelični in zunajcelični pufer

Aminokisliline

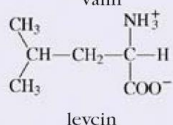
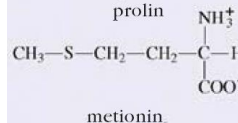
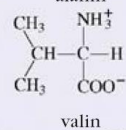
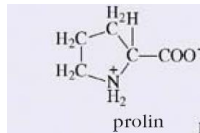
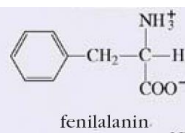
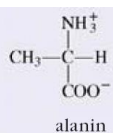
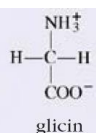
Proteini so zgrajeni iz 20 različnih α -aminokislin. Rečemo jim tudi proteinogene aminokisliline. Pri fizioloških pogojih (pH rahlo nad 7) so v dvakrat ionizirani obliki, t.i. obliki zwitteriona.



Aminokisljine

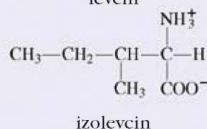
Proteini so zgrajeni iz 20 α -aminokisljin. Delimo jih glede na kemijsko naravo stranske skupine.

Skupina 1 – nepolarne stranske skupine (nepolarne aminokisljine)



aromske stranske skupine

alifatske
stranske
skupine

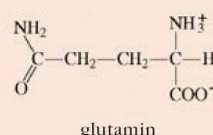
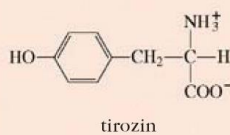
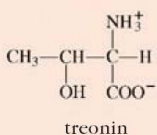
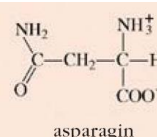
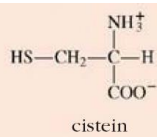
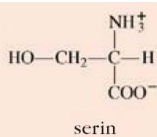


Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Aminokisljine

Proteini so zgrajeni iz 20 α -aminokisljin. Delimo jih glede na kemijsko naravo stranske skupine.

Skupina 2 – polarne stranske skupine (polarne aminokisljine)

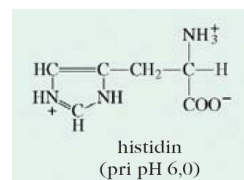
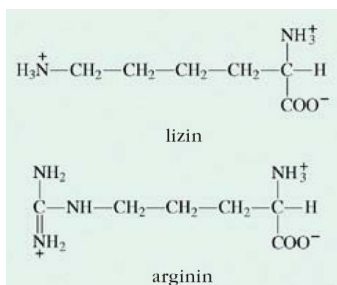
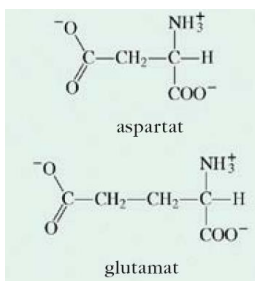


Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Aminokisljine

Proteini so zgrajeni iz 20 α -aminokisljin. Delimo jih glede na kemijsko naravo stranske skupine.

Skupina 3 – nabite stranske skupine (nabite aminokisljine)



Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Okrajšave imen aminokisljin

ime aminokisljine	enočrkovni zapis	tričrkovni zapis
glicin	G	Gly
alanin	A	Ala
valin	V	Val
levcin	L	Leu
izolevcin	I	Ile
metionin	M	Met
fenilalanin	F	Phe
prolin	P	Pro
serin	S	Ser
treonin	T	Thr
cistein	C	Cys
asparagin	N	Asn
glutamin	Q	Gln
tirozin	Y	Tyr
triptofan	W	Trp
aspartat	D	Asp
glutamat	E	Glu
histidin	H	His
lizin	K	Lys
arginin	R	Arg

Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Esencialne aminokisljine

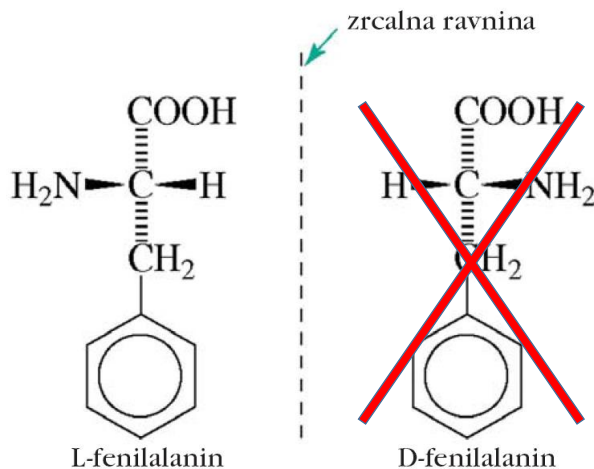
Za nek organizem so esencialne tiste aminokisljine, ki jih ne more sam sintetizirati in jih mora zato zaužiti s hrano.

Za odraslega človeka so esencialne: His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val

Za dojenčke in majhne otroke so esencialne tudi Cys, Tyr in Arg.

Aminokisljine

Vse aminokisljine razen Gly so optično aktivne. V naravnih proteinih najdemo le L-aminokisljine.



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

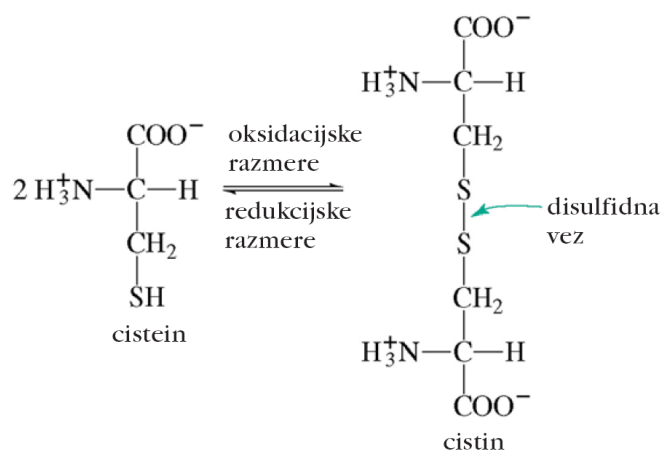
Aminokisljine

	ime	p <i>K</i> ₁	p <i>K</i> ₂	p <i>K</i> ₃
	cistein	2,4	9,8	
	tirozin	2,3	9,9	
	aspartat	2,3	9,6	
	glutamat	2,4	9,6	
	glicin	2,4	9,8	
	alanin	2,3	9,9	
	valin	2,3	9,6	
	levcin	2,4	9,6	
	izolevcin	2,4	9,7	
	metionin	2,3	9,2	
	fenilalanin	1,8	9,1	
	prolin	2,0	10,6	
	serin	2,1	9,2	
	treonin	2,6	10,4	
	cistein	1,8	10,8	8,3
	asparagin	2,0	8,8	
	glutamin	2,2	9,1	
	tirozin	2,2	9,1	10,9
	triptofan	2,4	9,4	
	aspartat	2,0	10,0	3,9
	glutamat	2,2	9,7	4,3
	histidin	1,8	9,2	6,0
	lizin	2,2	9,2	10,8
	arginin	1,8	9,0	12,5

* Vrednosti p*K*₁ se nanašajo na α-karboksilno skupino, vrednosti p*K*₂ na α-aminsko skupino in vrednosti p*K*₃ na skupine, ki lahko ionizirajo v stranski verigi [R].

Aminokisljine

Stranski skupini dveh cisteinov se lahko povežeta z **disulfidno vezjo**.

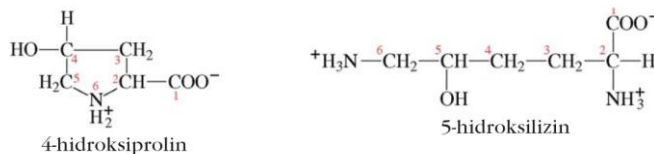


oksidacijske razmere: izven celic
redukcijske razmere: v celici (citosolu)

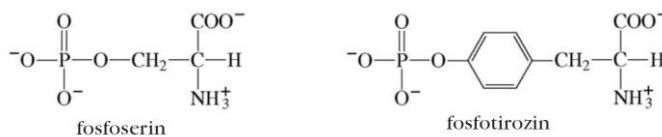
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Aminokisljne

V nekaterih proteinih najdemo modificirane oblike posameznih aminokislin.



Hidroksiprolin in hidroksilizin najdemo v strukturnem proteinu **kolagenu**.

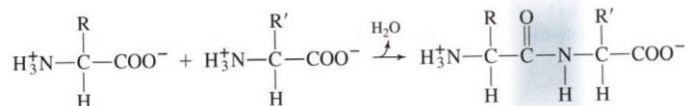


Fosforilacija serina in tirozina je pogost način uravnavanja aktivnosti encimov in drugih proteinov v celici.

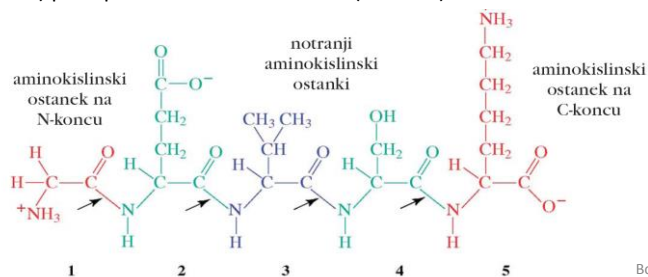
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Polipeptidi

Aminokisljne se med seboj povezujejo s **peptidno (amidno) vezjo**.

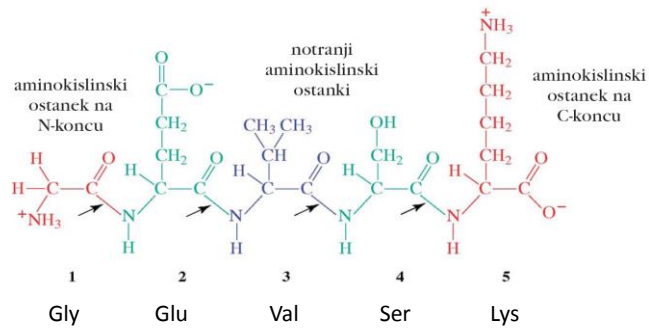


Posamezne aminokisljinske enote v polipeptidu imenujemo **aminokisljinski ostanki**. Ostanke v polipeptidih po dogovoru navajamo in številčimo v smeri od prostega amino konca (N-konca) proti prostemu karboksil koncu (C-koncu).



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Polipeptidi

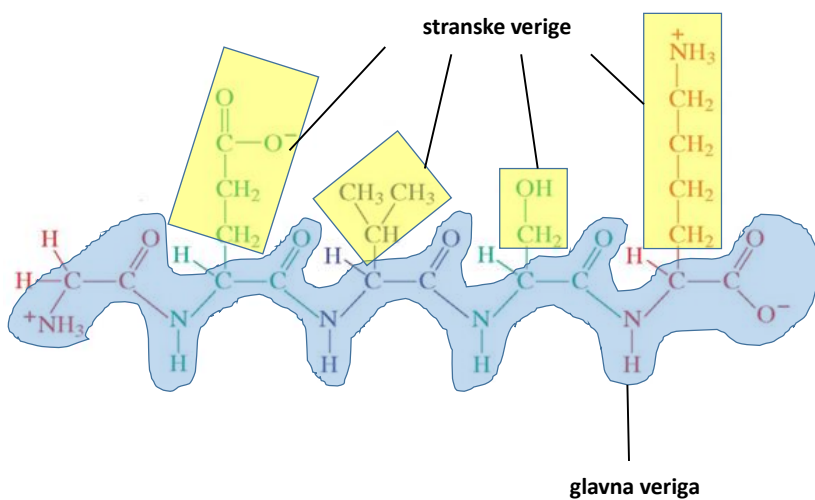


Zaporedje pentapeptida zapišemo: Gly-Glu-Val-Ser-Lys

ali z enočrkovnimi oznakami: GEVSK

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

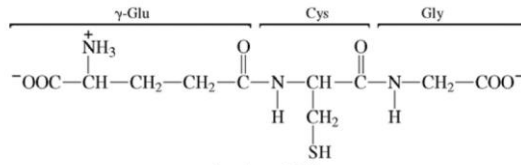
Polipeptidi



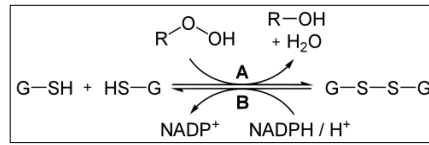
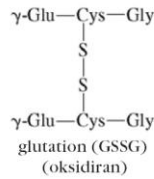
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Polipeptidi

Nekaj biološko pomembnih peptidov:



glutation (GSH)
(reduciran)

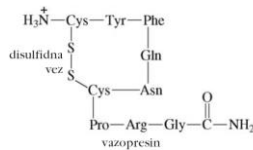
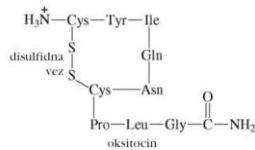


Glutation je pomemben pri znotrajceličnem uravnavanju redoks reakcij in nevtralizaciji reaktivnih spojin (npr. peroksidov).

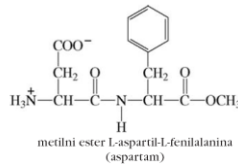
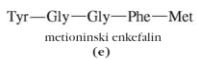
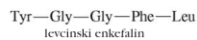
Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Polipeptidi

Nekaj biološko pomembnih peptidov:



Nonapeptida oksitocin in vazopresin sta hormona hipofize.



Enkefalini so hormoni v možganih, ki uravnavajo občutek bolečine.

Aspartam je umetno sladilo.

aminska konca



insulin je peptidni hormon, ki regulira koncentracijo glukoze v krvi.

Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Proteini

So polipeptidi, ki opravljajo večino bioloških funkcij.

Vrste proteinov glede na njihove vloge (po Boyer-ju):

Encimi (biološki katalizatorji)

Strukturni proteini

Obrambni proteini

Transportni in skladiščni proteini

Regulatorni in receptorski proteini

Gibalni proteini in proteini, ki omogočajo krčenje mišic

Primeri proteinov

protein	biološka vloga
	encimi
fosfofruktokinaza	encim katalizira prenos fosforilne skupine z ATP na fruktoza-6-fosfat; sodeluje v procesu glikolize pri metabolizmu ogljikovih hidratov
citrat-sintaza	encim, ki v procesu citratnega ciklusa poveže acetyl-CoA in oksaloacetat, pri čemer nastane citrat
tripsin	prebavni encim pri vretenčarjih; katalizira hidrolizo proteinov
ribonukleaza	hidrolitični encim, ki katalizira hidrolizo RNA; proizvajajo ga vsi organizmi
RNA-polimeraza	encim, prisoten v vseh organizmih; katalizira sintezo RNA, ki jo usmerja DNA
reverzna transkriptaza	encim virusa HIV (virus, ki povzroča AIDS); katalizira sintezo DNA, ki jo usmerja RNA
	strukturni proteini
kolageni	fibrilarni proteini, prisotni v vseh živalih; tvorijo nitaste preplete, ki služijo kot ogrodje tkivom in organom
elastini	fibrilarni proteini, prisotni v vezivnem tkivu pljuč in večjih žil (npr. aorta); so zelo prožni in se lahko raztegnejo za večkratnik svoje dolžine
keratini	mehansko zelo odporni fibrilarni proteini; pri vretenčarjih so glavna komponenta zunanjega sloja epidermisa in njegovih izrastkov, kot so lasje, nohti in perje

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Primeri proteinov

	obrambni proteini
protitelesa	globularni proteini, ki jih proizvaja imunski sistem višjih organizmov; sodelujejo pri uničevanju bioloških napadalcev
interferoni	proizvajajo jih višji organizmi in ovirajo podvojevanje virusov
	transportni in skladiščni proteini
hemoglobin	globularni protein, prisoten pri vretenčarjih; v strukturi ima hem, ki služi za prenos kisika od pljuč do tkiv
apolipoproteini	komponente lipoproteinov, kot so npr. lipoproteini z nizko gostoto (LDL); sodelujejo pri prenosu triacilglicerolov in holesterola
kazein	protein v mleku, ki je vir aminokislin za mladiče sesalcev
feritin	zelo razširjen protein, namenjen skladiščenju železa
mioglobin	protein, prisoten pri vretenčarjih; vsebuje hem, ki veže kisik

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Primeri proteinov

	regulatorni in receptorski proteini
Lac-represor	deluje kot stikalo in izključi bakterijske gene, ki nosijo zapis za proteine, ki sodelujejo pri razgradnji laktoze
inzulin	se pri višjih organizmih sintetizira v trebušni slinavki in se izloča pri povečanih koncentracijah glukoze v krvi
glukagon	se pri višjih organizmih sintetizira v trebušni slinavki in se izloča pri zmanjšanih koncentracijah glukoze v krvi
	gibalni proteini in proteini, ki omogočajo krčenje mišic
aktin	komponenta skeletne mišice
miozin	komponenta skeletne mišice
dinein	protein, ki sodeluje pri premikanju bičkov in migetalk ter tako omogoča gibanje spermijev in praživali

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Primeri proteinov - velikosti

protein	molekulska masa (Da)	število aminokislinskih ostankov	število polipeptidnih verig
inzulin (goveji)	5733	51	2
citokrom <i>c</i> (človeški)	13 000	104	1
ribonukleaza A (goveji pankreas)	13 700	124	1
lizocim (jajčni beljak)	13 930	129	1
mioglobin (konjsko srce)	16 890	153	1
kimotripsin (goveji pankreas)	21 600	241	3
hemoglobin (človeški)	64 500	574	4
serumski albumin (človeški)	68 500	550	1
imunoglobulin G (človeški)	145 000	1320	4
RNA-polimeraza (<i>E. coli</i>)	450 000	4100	5
ferritin	450 000	4100	24
glutamat-dehidrogenaza (goveja jetra)	1 000 000	8300	40

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Primeri proteinov - oblike

vrsta proteina	vloga
globularni proteini	
hemoglobin	transport kisika
mioglobin	skladiščenje kisika
ribonukleaza	hidroliza RNA
lizocim	hidroliza bakterijske stene
citokrom <i>c</i>	transport elektronov
imunoglobulin	obramba (protitelesa)
aktin	gibanje (mišični protein)
fibrilarni proteini	
kolagen	strukturni protein
keratin	strukturni protein
miozin	gibanje (mišični protein)
elastin	prožnost

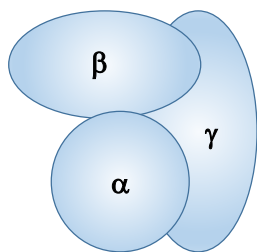
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Oligomerni proteini

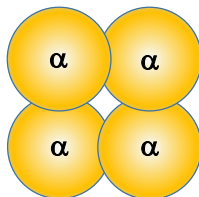
Mnogi proteini so zgrajeni iz več kot ene polipeptidne verige. Take proteine imenujemo **oligomere**, posamezne polipeptidne verige pa **podenote**.

protein iz 2 podenot	dimer
protein iz 3 podenot	trimer
protein iz 4 podenot	tetramer

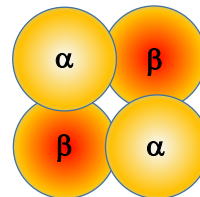
Oligomeri so lahko sestavljeni iz enakih podenot – **homooligomeri** ali različnih podenot – **heterooligomeri**. Oligomerno sestavo ponavadi označujemo z grškimi črkami.



heterotrimer s sestavo $\alpha\beta\gamma$



homotetramer s sestavo α_4



homotetramer s sestavo $\alpha_2\beta_2$

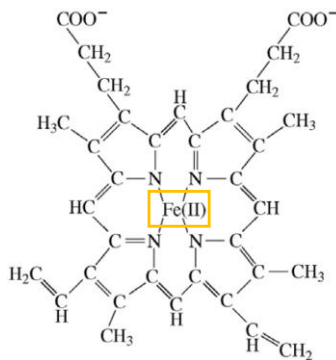
Konjugirani proteini

Enostavni proteini so sestavljeni le iz aminokislinskih ostankov.

Konjugirani proteini za svoje delovanje potrebujejo še neproteinsko komponento, imenovano **prostetična skupina**.

Prostetična skupina je lahko kovinski ion, manjša organska molekula, itd.

Primer: **hem** - protoporfirin IX z vezanim železovim(II) ionom deluje kot prenašalec kisika v hemoglobinu.

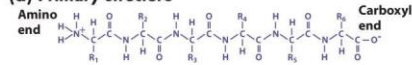


Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Nivoji strukture proteinov

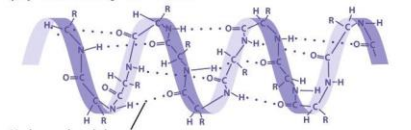
Primarna struktura – ak zaporedje

(a) Primary structure



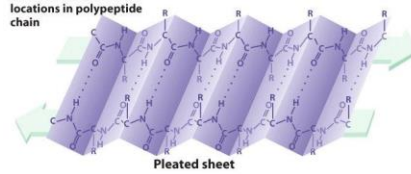
Sekundarna struktura – pravilni ponavljajoči se vzorci interakcij med N-H in C=O

(b) Secondary structure



Hydrogen bonds between amino acids at different locations in polypeptide chain

Terciarna struktura – prostorska organizacija (zvitje) proteina

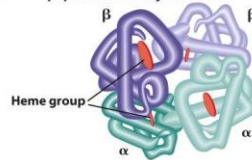


Kvartarna struktura – prostorska organizacija podenot v *oligomernih* proteinih.

(c) Tertiary structure



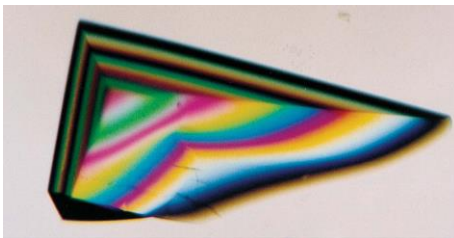
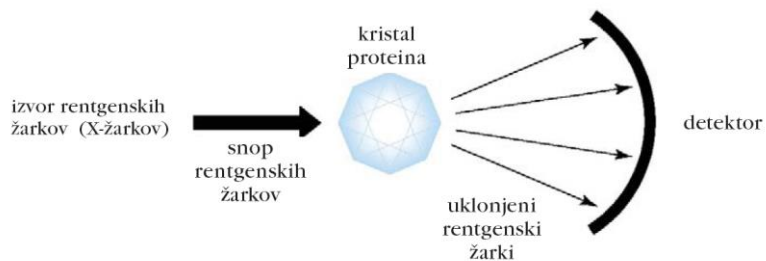
(d) Quaternary structure



http://sph.bu.edu/ott/mph-modules/ph/ph709_a_cellular_world

Določanje strukture proteinov

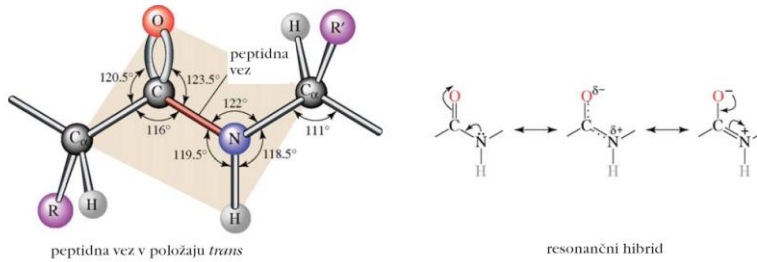
Tridimenzionalno strukturo proteinov najpogosteje določamo z rentgensko difrakcijo.



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura proteinov – peptidna vez

Peptidna vez je planarna – ima karakter delne dvojne vezi.

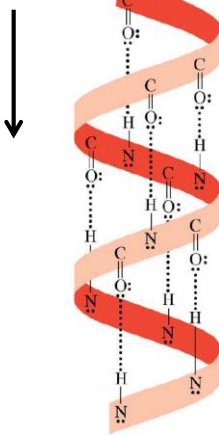


Struktura proteinov – elementi sekundarne strukture

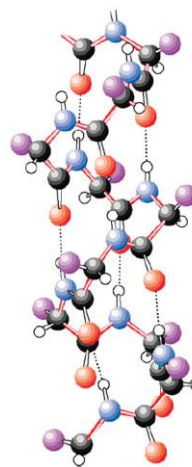
alfa vijačnica



desnosučna
vijačnica



Reden vzorec H-vezi
med C=O ostanka *i* in
N-H ostanka *i+4*



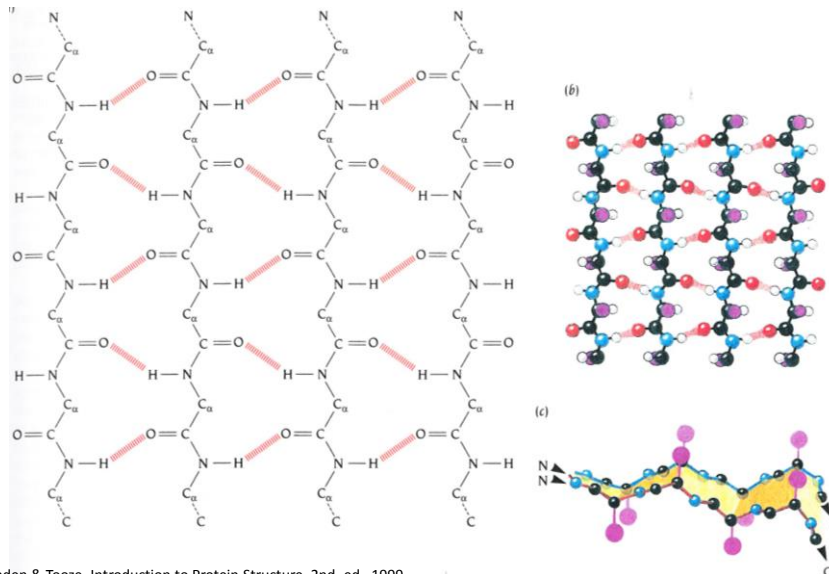
v enem obratu,
ki vključuje 3,6
aminokislinskih
enot, se vijačnica
dvigne za
0,54 nm

● ogljik
● kisik
● dušik
● stranska veriga
○ vodik

Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura proteinov – elementi sekundarne strukture

Paralelna beta ploskev



Branden & Tooze, Introduction to Protein Structure, 2nd. ed., 1999

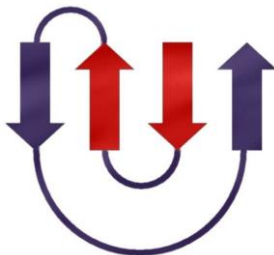
Struktura proteinov – elementi sekundarne strukture

Zanke in zavoji

Zanke in zavoji so deli polipeptidne verige brez ponavljajočega se vzorca vodikovih vezi in jih ne uvrščamo med elemente redne sekundarne strukture.

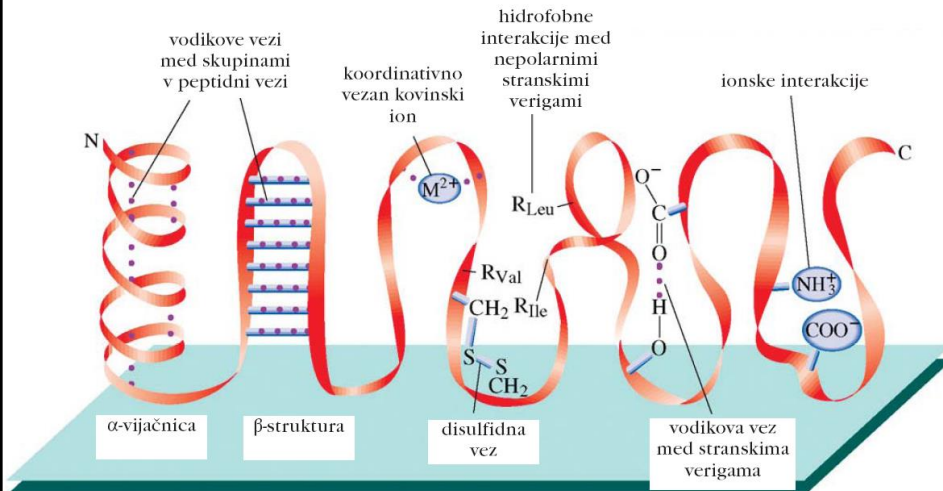
V proteinih pogosto služijo povezovanju elementov sekundarne strukture in temu, da se smer polipeptidne verige obrne.

Zavoji so ponavadi dolgi do 6 ostankov, zanke pa 6 do 16 ostankov.



Struktura proteinov – terciarna struktura

Pojem **terciarna struktura** opisuje položaje vseh atomov v proteinih. K nastanku stabilne terciarne strukture prispevajo različne vrste kemijskih interakcij:

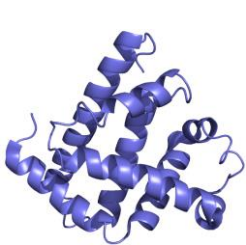


Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

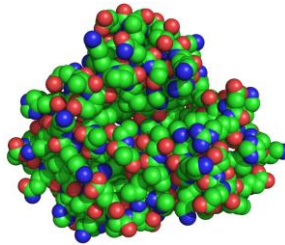
Struktura proteinov – terciarna struktura

Terciarno (tridimenzionalno) strukturo proteinov ponavadi prikazujemo v obliki trakov, ki kažejo potek glavne verige, ali v obliki kroglic (ki ustrezajo vdW radijem atomov) ali v obliki molekulske površine.

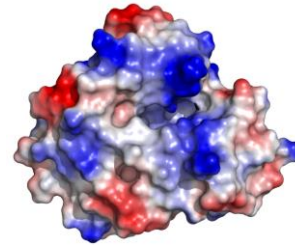
Primer: mioglobin



v prikazu trakov
(cartoon)



v prikazu kroglic



v prikazu molekulske površine
(pobarvane v skladu z
elektrostatskim nabojem)

Struktura proteinov – terciarna struktura

Primeri proteinskih struktur

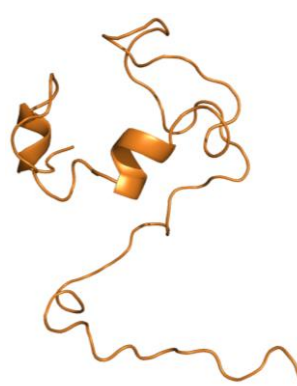


PDB 1EV6

inzulin



PDB 2RCT

retinol-vezavni
protein

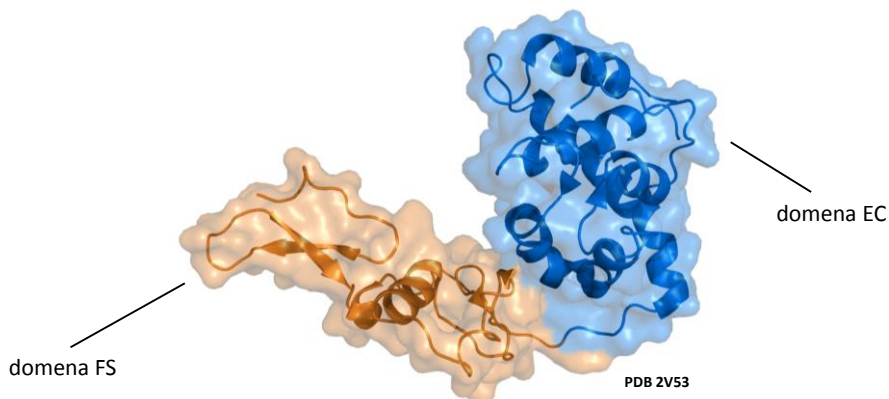
PDB 2JU4

podenota γ
G-proteina v očesu

Struktura proteinov – terciarna struktura – večdomenski proteini

Enoti znotraj proteina, ki ima samostojno prostorsko skupino oz. zvitje, rečemo **domena**. Proteini na prejšnjih straneh so bili sestavljeni vsak le iz ene domene. Večina proteinov v naravi pa je sestavljenih iz več kot le ene domene (2/3 pri prokariotih, 3/4 pri evkariontih) – rečemo jim **večdomenski proteini**. Vsaka domena ima samostojno zvitje in praviloma tudi svojo funkcijo.

Primer: regulatorni protein **SPARC**



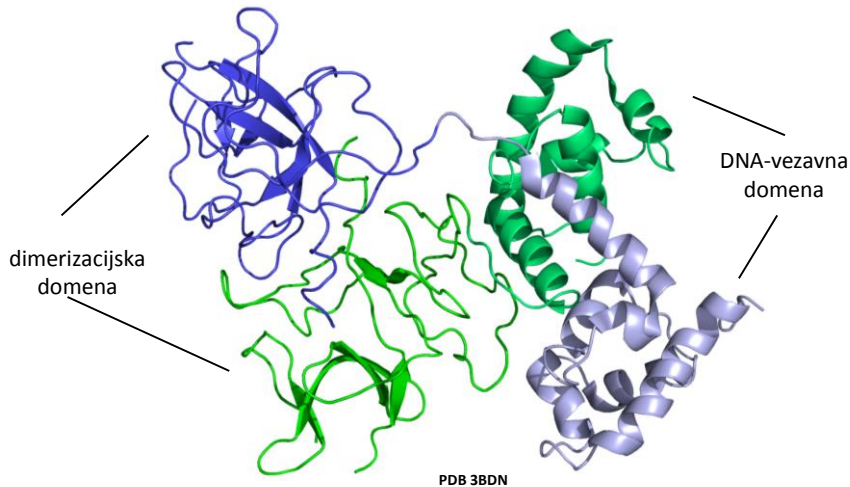
domena FS

domena EC

PDB 2V53

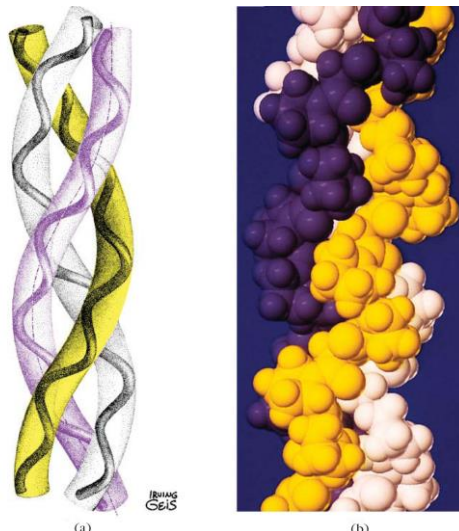
Struktura proteinov – terciarna struktura – večdomenski proteini

Primer: **represorski protein bakteriofaga lambda**, ki uravnava izražanje genov okužene celice *E. coli*. Aktivna oblika proteina je dimer. Vsaka polipeptidna veriga je sestavljena iz dveh domen.



Struktura proteinov – terciarna struktura – fibrilarni proteini

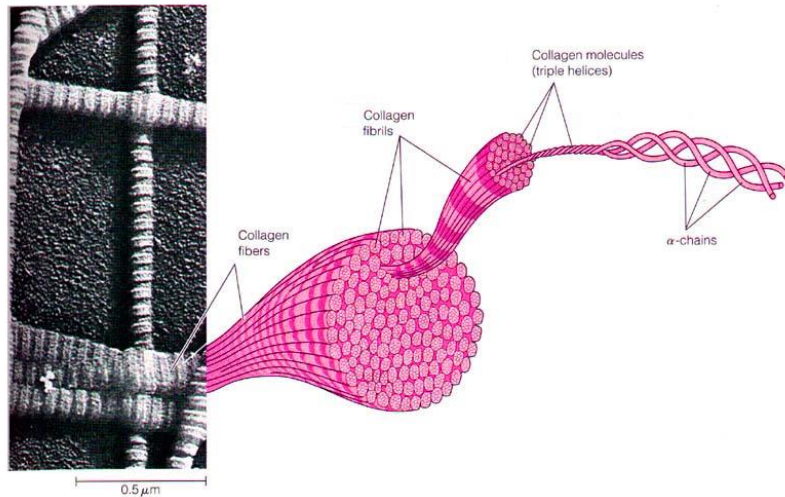
Kolagen: fibrilarni protein, ki daje natezno trdnost tkivom, kot so kosti in koža. Molekula kolagena je zgrajena iz treh polipeptidnih verig v obliki značilne trojne vijačnice. Verige so bogate s ponovitvami Pro-Gly-X (X je katerakoli ak) ali Hyp-Gly-X (Hyp je hidroksiprolin).



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

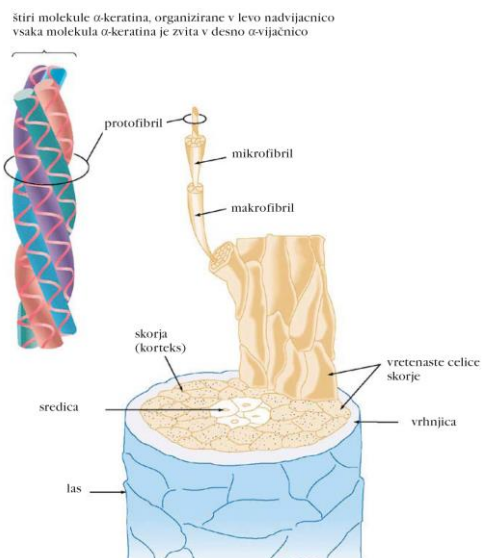
Struktura proteinov – terciarna struktura – fibrilarni proteini

Kolagen: molekule kolagena se med seboj povezujejo v fibrile, te pa dalje v vlakna, ki tvorijo prepletano omrežje.



Struktura proteinov – terciarna struktura – fibrilarni proteini

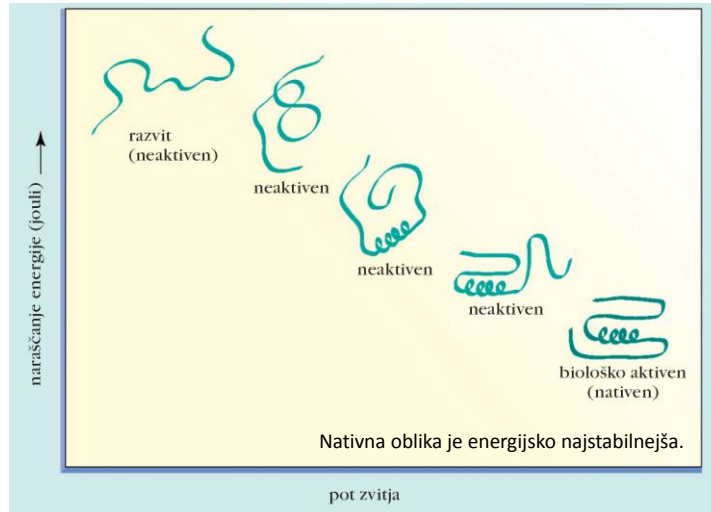
α-keratin: fibrilarni protein, ki ga najdemo v koži, perju, volni, luskah, kopitih, itd. Je pglavitna komponenta las.



Boyer: Temeljni biokemije / Studentska založba, Ljubljana, 2005

Zvijanje proteinov

Novo sintetizirani proteini se spontano zvijejo v v biološko aktivno (nativno) strukturo. Temeljno načelo zvijanja je, da **primarna struktura določa terciarno strukturo**. V celici lahko pri zvijanju proteinov pomagajo drugi proteini, imenovani **šaperoni**, prvotno poznani kot **proteini toplotnega stresa**.



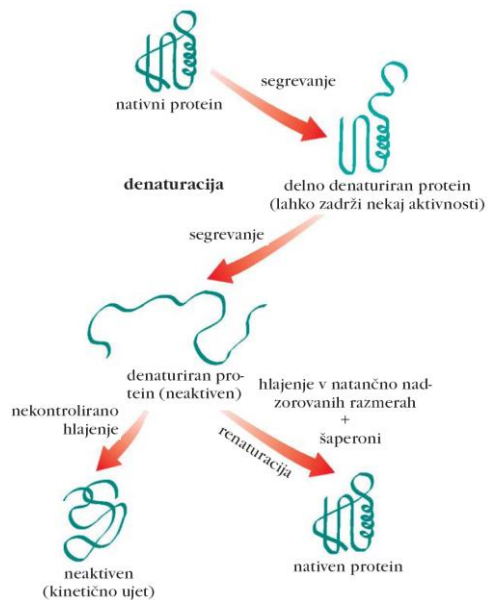
Boyer: Temelji biokemije / Studemska založba, Ljubljana, 2005

Zvijanje proteinov

Denaturacija pomeni popolno izgubo proteinske strukture.

Proteine lahko denaturiramo *in vitro* s segrevanjem, denaturanti (8 M urea, detergent NaDS), spremembo pH, itd.

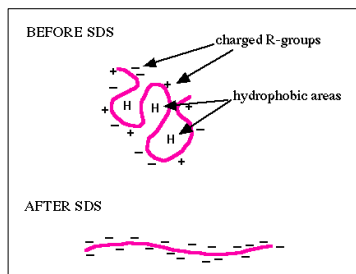
Pod kontroliranimi pogoji lahko denaturirane proteine tudi **renaturiramo**, t.j. zvijemo nazaj v nativno obliko.



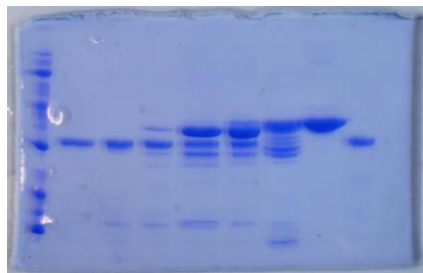
Boyer: Temelji biokemije / Studemska založba, Ljubljana, 2005

Elektroforetska analiza denaturiranih proteinov

Elektroforeza je metoda ločevanja molekul glede na hitrost potovanja skozi zamrežen gel v prisotnosti električnega toka. Za ločevanje proteinov se najpogosteje uporablja metoda **NaDS PAGE** - poliakrilamidne elektroforeze v prisotnosti anionskega detergenta NaDS. Detergent denaturira protein in se nanj veže v stehiometričnem razmerju, kar pomeni, da bo gostota negativnega naboja za vse proteine približno enaka. Posledično bo ločitev proteinov v poliakrilamidnem gelu potekla le na osnovi njihove velikosti (manjši proteini potujejo hitreje kot večji). Ponavadi vzorec pred nanosom na elektroforezo tudi reduciramo (z 2-merkaptoetanolom ali ditiotreitolum), da prekinemo kovalentne disulfidne vezi.



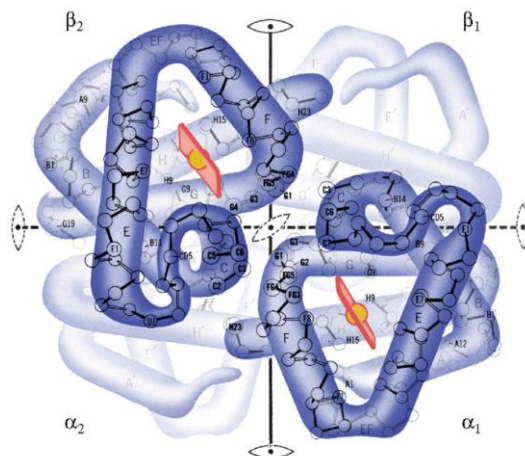
<http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>



Po končani elektroforezi lise proteinov v gelu vizualiziramo z barvanjem z barvilom Coomassie Brilliant Blue R250

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

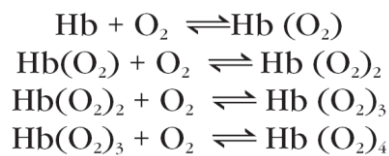
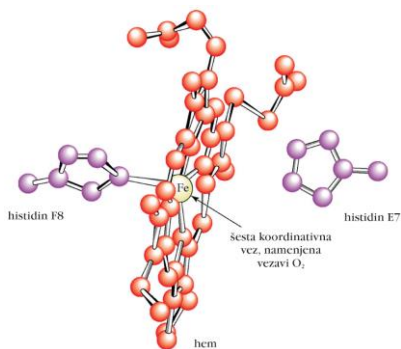
Hemoglobin je glavni prenašalec kisika pri človeku in ostalih vretenčarjih. Kisik se prenaša od pljuč do perifernih tkiv. Je heterotetramer s sestavo $\alpha_2\beta_2$.



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

Hemoglobin je glavni prenašalec kisika pri človeku in ostalih vretenčarjih. Kisik se prenaša od pljuč do perifernih tkiv. Je heterotetramer s sestavo $\alpha_2\beta_2$. Vsaka podenota vsebuje vezano molekulo hema – vsega skupaj so v hemoglobinu štiri vezavna mesta za kisik.



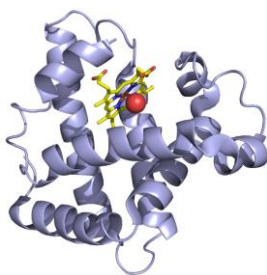
Hb je receptor (oz. protein),
O₂ je ligand.

protein + ligand = kompleks

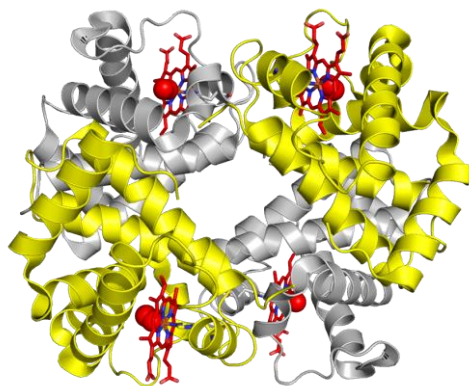
Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

Hemoglobin je glavni prenašalec kisika pri človeku in ostalih vretenčarjih. Kisik se prenaša od pljuč do perifernih tkiv. Je heterotetramer s sestavo $\alpha_2\beta_2$. Vsaka podenota vsebuje vezano molekulo hema – vsega skupaj so v hemoglobinu štiri vezavna mesta za kisik.



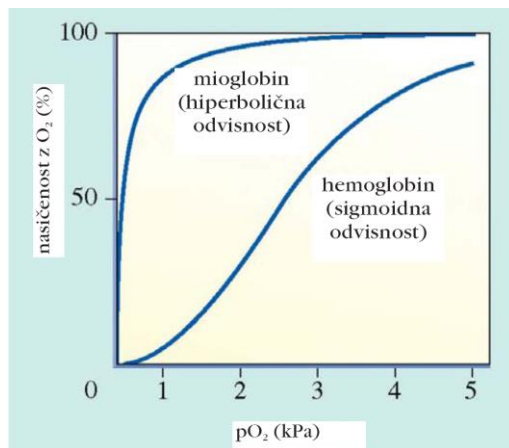
Myoglobin



Hemoglobin

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

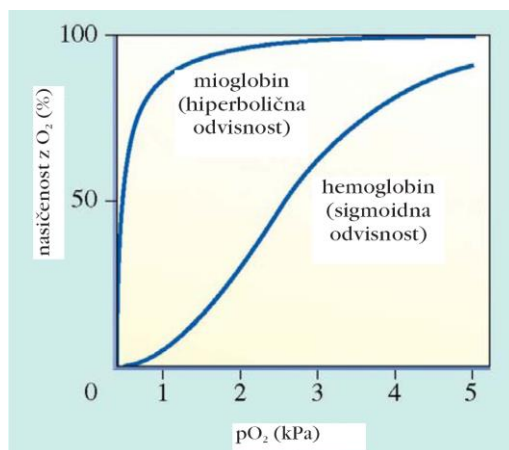
Stopnja nasičenosti mioglobina s kisikom je hiperbolično odvisna od koncentracije kisika, izraženega s parcialnim tlakom. Takšna oblika krivulje je značilna za vse sisteme vezave ene molekule liganda na eno molekulo proteina.



Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

V hemoglobinu je odvisnost nasičenosti od parcialnega tlaka kisika sigmoidna. Takšna oblika krivulje je posledica **kooperativnega efekta** vezave kisikovih molekul. Deoksihemoglobin ima nizko afiniteto do vezave kisika, ko pa se nanj veže prva molekula kisika, poteče vezava druge, tretje in četrte molekule z mnogo večjo afiniteto. Sporočilo o vezavi prve molekule se v obliki **konformacijskih sprememb** prenese po celotnem proteinu. Takemu načinu prenosa informacij v proteinih rečemo **alosterične interakcije**.



Boyer: Temeljni biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005

Struktura in funkcija proteinov – hemoglobin

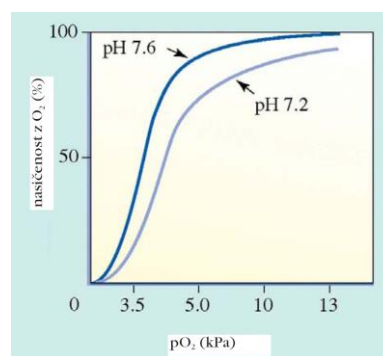
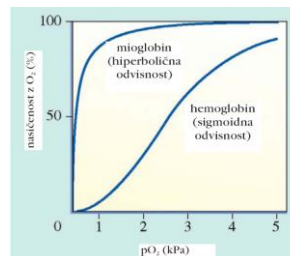
Pomen alosterične regulacije: olajšano sproščanje kisika v mišicah.

Pljuča $pO_2 = 15 \text{ kPa}$ nasičenost Hb > 95 %

Mirujoča mišica $pO_2 = 5 \text{ kPa}$ nasičenost Hb = 75 %

Aktivna mišica $pO_2 = 1-2 \text{ kPa}$ nasičenost Hb = 10 %

Dodatno se afiniteta hemoglobina do kisika v mišicah zniža zaradi Bohrovega efekta – H^+ in CO_2 , ki nastajata v aktivnih mišicah znižata pH in s tem vplivata na hemoglobin.



Boyer: Temelji biokemije / Študentska založba, Ljubljana, 2005