

BIOKEMIJA 1

Zapiski predavanj, 2010/2011

David Zupančič

RAZVOJ ŽIVLJENJA

Razmere na Zemlji pred 4 milijardami let - zelo vroče in močno reduktivno okolje (ni bilo kisika! Ker karkoli se stvori v kisiku z dovolj energije na razpolago se z njim veže, torej mnogih spojin ne bi moglo bit ker bi se prehitro oksidirale). Bilo je precej vode, CO₂ (več kot zdaj), dušika, H₂S, CH₄, NH₃, H₂. Na voljo je bilo zelo veliko energije - veliko vulkanov, UV in kozmičnih žarkov (ni bilo ozonskega plašča!), veliko neviht in bliskov (razelektritev), veliko višje temperature.

V teh razmerah naj bi nastale osnovne biomolekule. To je dokazal Stanley Miller, z **Millerjevim poskusom**. Vodo, ki mu je predstavljala ocean, je grel - voda se je segrevala, pare so se dvigale v večjo bučo (simulacijo atmosfere), v ta sistem je dodal amoniak, metan in vodik. Ta zadeva je torej bila čim bolj podobna pra atmosferi. Tu not je izvajal umetne bliske (dve elektrodi, dovolj blizu, da preskakuje iskra med njima) in pustil nekaj časa - stvar je bila v nekem stacionarnem stanju in je po določenem času v 'oceanu' dobil različne organske molekule, med drugim aminokislino, sladkorje, nukleotide, lipide. Če bi bil prisoten kisik, pa bi se use to oksidiralo!

Za spojine, ki jih je dobil Stanley Miller velja, da so se koncentrirale v različnih vodnih medijih. Kemična evolucija = razvoj osnovnih biomolekul v kompleksne makromolekulske in nadmolekulske strukture.

Glavni dve težavi sta kako doseži ustrezno hitrost teh reakcij (da bodo ustrezno tekle v realnem času) in kako posredovati informacijo za reprodukcijo (vsa živa bitja se razmnožujejo). Zato se vsi sprašujejo, katere makromolekule so bile prve; tiste, ki so omogočale katalitično aktivnost (encimi proteini) ali tisti, ki so pomagali zmožnosti hranjenja in prenašanja informacije.

Minerali, ki so prihajali v stik s temi molekulami, so lahko odigrali vlogo preprostih katalizatorjev - njihova površina namreč lahko deluje katalitično. Encimi, ki so danes katalizatorji so mnogo bolj učinkoviti. Vemo pa, da različne vrste RNA imajo katalitično aktivnost in hkrati nosijo informacijo! Zato mnogi raziskovalci štejejo RNA za primarno biološko molekulo, vendar je okrog tega še zelo veliko debate. V nekaterih virusih RNA še vedno prenaša informacijo, v bolj razvitih organizmih pa ne.

Če velja **teorija z RNA** je potekalo tako: V 'prajuhi' kjer so se po Millerjevem sistemu kopičile molekule so bili tudi nukleotidi, ki so se povezali v RNA. Nekatere RNA imajo katalitične lastnosti, te se selektivno namnožijo s podvajanjem. Nekatere od teh RNA katalizirajo tudi nastanek peptidnih vezi pri peptidih, te peptidi pa pomagajo pri replikaciji RNA in pri tem prevzemajo vedno pomembnejšo vlogo. Vsi te kompleksi so omogočali, da se je razvil nek pratranslacijski sistem - genomska RNA se je prepisovala v proteine. Z mutacijami nastajajo različni proteini, nekateri lahko katalizirajo prepisovanje genomske RNA v DNA.

Danes DNA prevzame vlogo genoma; v njej je informacija dosti bolj stabilna, saj je DNA, za razliko od RNA, dvojna vijačnica. Prepisi iz DNA v proteine pa potekajo s pomočjo različnih RNA in proteinskih molekul. Vlogo katalizatorjev prevzamejo posebni proteini - encimi, ki imajo veliko specifičnost.

Pot prvih molekul do prvih organizmov je zelo dolga. Dotok novih molekul, ki so vir energije, je postal premajhen, da bi oskrboval zelo veliko število molekul. Zato se razvije zaščita - lipidi se organizirajo v membrane. Če pride do pomanjkanja materiala pride do plenjenja! Hkrati pa se pojavi potreba po

učinkovitejši izrabi goriv (v reduktivni atmosferi ni bilo kisika!), zato se je razvila fotosinteza, ki je izkoriščala energijo Sonca in kot stranski produkt imela kisik. Tako naj bi se atmosfera spremenila iz reduktivne v oksidativno.

Prva celica (za katero je poleg biomolekul in makromolekul ter prametabolizma osnova MEMBRANA!)

Kronologija življenja na Zemlji (pred X giga leti)

X

4 - 4.6 KEMIČNA EVOLUCIJA

3.8 - 4.1 PRVE OBLIKE ŽIVLJENJA NA ZEMLJI (PROKARIONTI)

3.6 LOČITEV BAKTERIJ OD ARHEJ

2.1 PRVE EVKARIONTSKE CELICE (s fuzijo prokariotov in vključevanjem manjših prokariotov v večje)

2 KOLIČINA KISIKA V ATMOSFERI SE ZAČNE HITRO POVEČEVATI

1 PRVI VEČCELIČNI ORGANIZMI

(pred X mega leti)

X

545 'EKSPLOZIJA' ŽIVLJENJA V KAMBRIJU

475 RASTLINE NASELIJO KOPNO

400 PRVE DVOŽIVKE

300 PRVI PLAZILCI

250 PRVI SESALCI

65 DINOZAVRI IZUMREJO (padec velikega meteorita v srednji Ameriki)

4 AUSTRALOPITHECUS (pra-človek)

0.1 HOMO SAPIENS (moderni človek)

Predavanje 2 ; 22.2.2011 / Matjaž Zorko

VODA

Voda (H_2O v tekoči obliki) je posebnost planeta Zemlje (tako kaže), res pa je, da ne poznamo dosti planetov (detektirali smo jih manj kot 100) in tudi o tistih, ki so poznani zunaj našega osončja, ne vemo skoraj nič. Temperaturno okno mora biti od 0 do 100 stopinj C, da obstaja voda v tekoči obliki; to je zelo manjšno okno, ki ga na zvezdah / planetih zelo težko najdemo, saj je razpon temperatur v vesolju ogromen. Življenje se je razvilo v vodnem okolju. Vodo so zelo intenzivno iskali v našem osončju. Enceladus (Saturnova luna) vsebuje celo 91 procentov vode v svoji atmosferi.

Vsebnost vode v organih človeškega telesa se bolj ali manj vrti okrog 80 % - 80 % vsega živega je bolj ali manj voda. Vse življenje je odvisno od vode.

Voda ima nekatere posebne lastnosti. Najbolj ji je podobna molekula H_2S , saj smo samo kisik zamenjali z žveplom (ki je v isti skupini s kisikom in ima zelo podobne kemične lastnosti). Fizikalne lastnosti vode:

zmrzne pri 0 stopinjah, za razliko od vseh drugih (kvazi podobnih) spojin, ki imajo zmrzišče mnogo nižje. Vrelišče vode je 100 stopinj, pri mnogih drugih je tudi vrelišče bistveno nižje. Viskoznost vode je bistveno večja od večine podobnih molekul. Izparilna toplota je za vodo večja od mnogih ostalih - voda ima torej neke lastnosti, ki jo razlikujejo od podobnih molekul.

Struktura vode - med kisikom in vodikoma nastaneta dve molekulske orbitali s skupnimi elektronskimi pari. Kisik je mnogo bolj elektronegativen kot vodik, zato te pare potegne k sebi - voda je polarna molekula. V prvem približku so štiri orbitale, ki grejo iz centra (kisika) navzven, razporejene v tetraeder. Če imamo dve molekuli vode se lahko povežeta z **vodikovo vezjo**. Delta plus (elektropozitivno) od vodika pride v stik z delta minus od kisika. Vodikova vez je posebna van der Waalova interakcija med dvema atomoma. Ker je vodik tako majhen lahko sosedni kisik bolj potegne k sebi kot katere druge podobne elemente, zato je interakcija močnejša. Vodikove vezi so najmočnejše van der Waalove interakcije, ki so drugače zelo šibke. Vodne molekule so znotraj tekoče vode torej povezane z vodikovo vezjo med seboj. Teoretično je lahko ena molekula vode povezana s štirimi okoliškimi molekulami vode. Pri vodikovi vezi moramo vedeti, da obstaja donor vodika (vodik odda) in akceptor vodika (ki vodik sprejme). Vse štiri vezi so res vzpostavljeni samo v ledu, kjer se molekule vode povežejo v šesterokrako strukturo. Če se temperatura dviguje se začne dvigovati termična energija, molekule vode se začnejo bolj in bolj intenzivno premikati zato se vodikove vezi trgajo.

Splošno pravilo za vodikovo vez - vodikova vez (lahko nastaja med različnimi molekulami) nastane med skupino (molekulo), v kateri je vodik kolaventno vezan na močno elektronegativen atom (N, O ali F) in skupino (molekulo), ki ima tudi elektronegativen atom (N, O, F) in ki omogoča polarizacijo naboja; prva skupina je donor vodika, druga pa akceptor vodika.

Orientacija vodikove vezi vpliva na jakost vodikove vezi. Najmočnejša je vodikova vez, kjer so vsi elementi, ki sodelujejo v vezi, linearno razporejeni (delta plus in delta minus sta najdalj možno narazen, zato je odbijanje med njima minimalno). Torej - če je sistem linearen, je vodikova vez najmočnejša!

Vodikova vez je izjemnega pomena v bioloških molekulah; npr. pri alfa vijačnicah (če imamo dve peptidni verigi, vsako s svojo peptidno vezjo, se med njima lahko vzpostavi vodikova vez, ki stabilizira makromolekulo). Pomembna je tudi za nukleinske kisline (DNA), kjer se med baznimi pari pojavljajo po 2 ali po 3 vodikove vezi. Pomembno je, da so vezi dovolj močne (ker jih je mnogo), da stabilizirajo verigo; hkrati pa ne smejo biti tako močne, da jih ne bi bilo mogoče ločiti - nujno jih je treba ločiti pri podvajanju DNA in prepisovanju DNA v mRNA! Med vodikovimi vezmi je značilna kooperativnost (če se dva nukleotida povežeta, naslednja vodikova vez nastane lažje, naslednja spet lažje...)

Različne molekule se v vodi različno obnašajo. Lahko so polarne (imajo polarne skupine, npr OH skupine, glicin, glicerol) ali nepolarne (pretežno iz ogljikovodikov, nimajo polarnih skupin ali pa so te zanemarljive v primerjavi z nepolarnim delom). Lahko pa so tudi amfipatične (polarni in nepolarni del, značilno za maščobe). Te molekuli se v vodi različno obnašajo.

Voda je **polarno topilo**, torej se bodo v njej dobro topile polarne snovi. Osnova je vspostavljanje vodikovih vezi med molekulami vode in molekulami topljenca (npr med ketonom in vodo). Po drugi strani pa se alkan, ki je nepolaren, ne more povezati z molekulami vode z vodikovo vezjo.

Tudi ioni se raztapljajo v vodi - ioni so med seboj povezani z elektrostatskimi interakcijami, ki so lahko

dosti močne. Če pride kristal NaCl v vodo se delno pozitivno nabiti vodiki približajo negativno nabitemu kloru in delno negativno nabiti kisiki približajo pozitivno nabitemu natriju. Če je interakcija med vodo in ioni močnejša od interakcije med ioni v kristalu, se ionski kristal dobro topi v vodi; pri nekaterih soleh je obratno in se te v vodi slabo topijo, ali pa so celo praktično netopne (AgCl). Voda dobesedno odtrga ione od kristale NaCl ker je vodna interakcija med ioni vode in ioni NaCl močnejša kot interakcije med ioni Na in Cl v samem kristalu.

Tudi plini so lahko nopolarni ali polarni; tudi pri njih se izkaže, da je topnost drugačna. Bolj ko je molekula polarna (večji dipolni moment), bolj je topna v vodi.

Nepolarne biološke molekule pa se v vodi drugače obnašajo - prihaja do hidrofobnih interakcij. Dve nopolarni molekuli, ki z vodo ne gresta v vodikove vezi, potujeta po vodnem mediju zato morata na nek način organizirati vodo okrog sebe. Voda tega ne mara - ne mara, da se njene vodikove vezi prekinjajo (sploh če ne jih ne more nadomestiti!). Če se nopolarni molekuli srečata se zlijeta skupaj, da je voda organizirana samo enkrat okoli - manj molekul vode je torej organiziranih (ker jih ni treba organizirati med hidrofobnimi molekulami, ki sta zlitih), zato je voda manj urejena in sta hidrofobni molekuli bolj urejeni. Tako stanje je bolj stabilno (bolj stabilno je bolj neurejeno stanje), zato te dve nopolarni molekuli ostaneta skupaj, pravimo, da jih vežejo hidrofobne interakcije. Voda je tista, ki ju izključi iz svoje okolice in ju drži skupaj, da je manj molekul vode preprečenih v interakciji z drugimi molekulami vode. Večje nopolarne molekule se držijo skupaj tesneje.

Hidrofobna interakcija je izjemnega pomena v bioloških molekulah. Npr hemoglobin, sestavljen iz štirih verig. Nekatera področja na teh verigah, ki se sintetizirajo kot linearne molekule, so hidrofobna, in želijo izključiti vode iz svoje okolice. Da se to zgodi morajo ta hidrofobna področja skočiti skupaj in tako se pravzaprav zvije protein v neko globularno strukturo. V primeru hemoglobina dobimo tako štiri globule, ki se skupaj povežejo v končno strukturo.

Pomembno je tudi, ko se poveže substrat (molekula, katere kemično pretvorbo bo encim kataliziral) z encimom (proteinom, ki je tudi v vodnem okolju) - obe molekuli sta hidratirani, voda mora stran od vmesnega območja, da se lahko molekuli zlijeta. Če sta površini, ki naj bi se zlili, hidrofobna, ni problema (voda gre stran), če pa sta hidrofilni, potrebujemo posebne molekule na encimu/substratu, ki jih povežejo skupaj.

V **dvojni vijačnici DNA** so bazni pari tako močno skupaj, da voda ne more vmes - to je tudi razlog dvojne vijačnice. Vijačnici DNA se zvijeta zaradi hidrofobnih interakcij in voda je izrinjena ven; hidrofobna interakcija jo tudi tesno drži skupaj.

Amfipatične molekule pa so tiste, ki imajo delno hidrofilen in delno hidrofoben značaj. Če se znajdejo v vodnem mediju želijo hidrofobni deli izriniti vodo, medtem ko se hidrofilni deli obnašajo tako, da lahko grejo v interakcijo z vodo. Te molekule se zato organizirajo v micel (glava proti vodi, repi proti notranjosti) ali pa v dvosloj - dobimo neke vrste liposom, noter in zunaj je voda, ki ju ločuje plast lipidov (hidrofobni repi so združeni skupaj, voda je izključena). Liposomi so zelo pomembni pri zdravljenih in kozmetiki. Tudi biološko membrano skupaj drži hidrofobna interakcija.

Šibke medmolekulske vezi so poleg vodikovih in hidrofobnih vezi še Van der Waalove vezi.

Pomen vode za živi svet: topilo, omogoča šibke interakcije, del strukture molekul, medij, sodeluje v

reakcijah, posebne lastnosti vode (npr anomalija vode), toplotni pufer, ohlajevanje z izparevanjem (npr potenje).

Voda kot medij in transportno sredstvo - človek ima 2 glavna načina transporta; krvotok (voda omogoča, da je kri tekoča, da se po njej prenaša kisik) in medceličnina (pretežno iz vode, ki omogoča potovanje po citoplazmi in organelih).

Voda je lahko reaktant ali produkt.

Anomalija vode - molski volumen vode (obratno sorazmeren gostoti vode) raste od 4 stopinj proti 0 stopinjah in od 4 stopinj do višjih temperatur. Pri štirih stopinjah je gostota vode največja - led ima manjšo gostoto kot voda, zato plava na vodi. Ko naprej grejemo se led topi in se gostota veča. To omogoča, da lahko ribe pod ledom ribe preživijo, saj bi drugače led na vrhu zmrznil in ne bi ostal na površju ampak padel na dno. Ker pa je voda gostejša od ledu se zgodi obratno - led ostane na površini.

Voda je tudi toploten pufer. Zemlja, ki vsebuje ogromno vode v tekoči obliki, doživlja zelo malo količino toplotnih sprememb. Na Zemlji so temperaturni skoki relativno majhni (+ - 50 stopinj); na Luni, na primer, so dnevne migracije od -233 do +123 stopinj C. Za hladnokrvne organizme je voda pomembna, ker če je veliko vode v organizmu, se ta organizem zelo počasi ohlaja tekom noči. Nekateri dinosavri so bili zelo veliki prav zato, da se čez noč niso preveč ohladili. Večji ko je volumen, manj se pri isti toplotni razliki telo ohlaja.

Parni tlak vode - voda odhlapeva, ker ima dovolj energije, da nekatere molekule odidejo iz vodne faze v vodno paro. Oceani odparevajo (če ne bi bilo parnega tlaka ne bi mogli), zaradi tega imamo dež in zaradi tega sladko vodo. Pri teku se mišice zaradi mehanskega dela močno segrejejo, morajo se ohladiti, hladijo se s potom.

Voda je tudi (šibek) elektrolit. Pri sobni temperaturi disociira na proton in hidroksidni ion. V vodi imamo torej določeno količino protonov, ki sedejo na druge molekule vode, nastane oksonijev ion (H_3O^+).

Pri 25 stopinjah C je **ionski produkt vode** (konc protonov krat konc. OH minus ionov) $10^{-14} M^2$. Ionski produkt vode ima pri višjih temperaturah večjo številko. Koncentracija protonov je izjemno pomemben podatek, računa se z logaritmično enačbo. Definirali so pH in pOH, to sta negativna desetiška logaritma iz koncentracije H oz. OH. Vsota pH in pOH je 14.

Skala za pH - nevtralnno stanje je tam, kjer je koncentracija protonov enaka koncentraciji OH- ionov (pri 25 stopinjah celzije je to pri pH 7). Proti ničli narašča kislost, proti 14 pa bazičnost. pH je lahko tudi manjši od 0 ali večji od 14! Snovi imajo zelo različen pH. Krvna plazma ima pH 7,4 in se lahko spremeni samo za 0,2 pH gor ali dol.

Proton se lahko iz ene molekule vode seli na mnogo molekul vode - tunelski efekt. Zato so kljub malo disociacije (ena molekula disociirana na milijardo molekul) te protoni povsod na voljo.

RAZTOPINE, I. DEL (raztopine plinov v fizioloških raztopinah, Henryjev zakon)

V svoji okolici skoraj nikoli nimamo opravka s čisto vodo, ampak z vodo, v kateri je nekaj raztopljeno (raztopina). **Raztopine** so homogene zmesi dveh ali več molekulskih ali ionskih vrst. Vedno imamo dve fazi - ena je topilo (tega je navadno več), druga pa topljenec (snov, ki je v topilu raztopljena). Zanimajo nas vodne raztopine. Količino topljenca v topilu izrazimo s koncentracijo, ta koncentracija pa določa fizikalne lastnosti raztopin. Kemične lastnosti pa poleg koncentracije določa še: kaj je v vodi raztopljeno?

Koncentracijo lahko izrazimo na več načinov. Najbolj običajna v kemiji je molarnost, poznamo pa še molalnost, procentnost in molski ulomek.

Mol = osnovna kemična enota. V enem molu snovi je 6×10^{23} molekul (atomov, ionov,...).

Molarnost govori o tem, koliko molov topljenca je raztopljenih v enem litru raztopine. Simbol za molarnost je **c**. Enota je mol/liter raztopine.

Molalnost je druga oblika izražanja koncentracije (**m**). Gre za število molov, ki so raztopljeni v enem kilogramu topila (ne raztopine!). Koncentracija, ki jo izrazimo v molalnosti, ni podvržena spremembam, ki bi nastale zaradi spreminjanja temperature. To ima včasih določene prednosti. Enota je mol/kg topila.

Z **masnim deležem** lahko izrazimo procentne raztopine. Gre za maso topljenca deljeno z maso raztopine.

Molski ulomek je razmerje število molov topljenca deljeno s številom vseh molov, ki jih imamo. Lahko ga izrazimo tako za topljenec kot tudi topilo. Če seštejemo molski ulomek topljenca in topila je vsota 1. Masni delež in molski ulomek nista ista stvar, čeprav sta zelo podobna; razen če je konc. topljenca in topila enaka.

Vrste raztopin (tabela): običajno je trdni topljenec raztopljen v tekočem topilu, obstajajo pa tudi drugi primeri. Lahko raztopimo tudi plin v tekočini, trdno v trdnem (ponavadi ne smatramo kot raztopino, vendar obstajajo zlitine! Z zlitjem mehkih kovin lahko dobimo mnogo trše; npr. kositer raztopljen v bakru. Talina je tudi steklo - trdna talina različnih oksidov, pretežno silicijevega in natrijevega oksida), tekočina v trdnem (voda se raztaplja v keramiki), plin v trdnem (zelo majhni plini, npr. helij ali vodik, se v kovinah lahko raztapljajo. Helij in vodik se dobro raztapljajo v paladiju), trdno v plinu (aerosol; smog), tekočina v plinu (megla) in plin v plinu (zrak).

Raztopine plinov v tekočini - vsak plin se do neke mere raztaplja v vsaki tekočini.

Hitrost raztapljanja je odvisna od temperature (hitrost raztapljanja se z višanjem temp. povečuje, ker je gibanje molekul plina povečano), tlaka plina (parcialni tlak - večji ko je, bolj potiska molekule plina v tekočino) in od površine med plinsko in tekočo fazo (manjša površina pomeni počasnejše prehajanje molekul plina).

Količina raztopljenega plina je odvisna od temperature (večja ko je temperatura, manj plina se raztopi v tekočini; ker je plin pri nižji temperaturi manj gibljiv), tlaka plina (večji ko je tlak, več se ga raztopi - Henryjev zakon) in stopnje topnosti (odvisna od vrste plina in tekočine, v kateri ga raztapljamo). Stopnjo topnosti podaja absorpcijski koeficient (α); tista količina plina v litrih, ki pri standardnih razmerah nasiti 1 liter tekočine.

Henry-jev zakon - Količina plina, ki se pri določeni temperaturi raztopi v tekočini, je proporcionalna

parcialnem tlaku tega plina nad tekočino. Enačba je $S = \mathbf{K}ap$; kjer sta \mathbf{K} (karakteristika vsakega topila) in a (alfa; karakteristika vsakega plina) konstanti, p pa je parcialni tlak.

Henryjev zakon velja za idealne raztopine (nobenih interakcij med delci topljenca, med delci topila in med delci topljenca in topila!). Takih raztopin ni, vendar se zelo razredčene raztopine temu približujejo, ker so si delci topljenca daleč narazen (zelo redko in težje se srečujejo, zato z redčenjem raztopine drastično zmanjšano število interakcij). Če pridejo molekule blizu, se skoraj vedno pojavijo Van der Waalove interakcije. Torej je idealna raztopina vseeno zelo daleč od kakršnekoli realnosti. Če narašča tlak, bi se torej teoretično morala topnost spreminjati linearno. Realno pa je, da od idealne premice raztopine odstopajo (čez nekaj časa se lahko začne nekaj več topljenca plina raztapljati v vodi, ali pa nekaj manj). To razložimo tako: če so med delci topila in delci topljenca neke privlačne sile, bo topilo sprejelo več topljenca, kot bi ga po Henryjevem zakonu, ker gre v neko pozitivno interakcijo. Če pa obstajajo odbojne sile, se pojavijo negativna odstopanja.

Sestava zraka in parcialni tlak:

- 78 % dušika,
- 21 % kisika,
- 1 % ostalo (predvsem žlahtni plini (večina argona), nekaj malega ogljikovega dioksida)

Kjer je veliko prometa je precej dvignjena količina CO₂, predvsem pa je zraven še zelo veliko dušikovih oksidov. Vendar pa imajo zadnje čase veliko število avtomobilov katalizatorjev, ki spreminjajo dušikove okside v manj toksične spojine.

Parcialni tlak posameznega plina je proporcionalen njegovemu deležu v zmesi! Celotni tlak zraka pa je vsota parcialnih tlakov (Daltonov zakon). Na nadmorski višini 0 bi moral biti zračni tlak 1 bar. Sestavljen bi moral biti iz tlaka dušika, kisika, žlahtnih plinov, ogljikovega dioksida, vodne pare in še česa drugega (odvisno od tega, kjer smo; industrijske cone - SO₂). Z višino se ta tlak zmanjšuje, odvisno je tudi od vremena.

Če tlak povečamo za 4-krat se bo tudi parcialni tlak povečal za 4-krat; razmerje tlakov se ne bo spremenilo.

Topnost nekaterih plinov v vodi (tabela): Kisik je zelo malo topen, dušik še manj. CO₂ je bistveno bolj topen, amoniak in SO₂ pa sta mnogo bolj topna.

CO₂ izdihavamo, zato ga moramo raztapljati v krvi. Osnova pa je tudi pri fotosintezi, pri kateri se sprošča kisik. Ta je v vodi zelo slabo topen.

Topnost se zmanjša s povečano temperaturo (zato ribiči ulovijo največ rib v arktičnih vodah - tam so vode hladne, raztopljenega je veliko kisika in zato so tam ribe raje) in s povečano slanostjo (morska voda vsebuje 20 - 30 % manj O₂ kot sladka; tudi slanost je v arktičnih vodah manjša - eden od razlogov je dejstvo, da se led občasno raztaplja.).

Koncentracija kisika v povezavi z globino vode - z večjo globino se koncentracija kisika zmanjšuje. Tik pod gladino pa se vzpostavi ravnotežje v skladu s Henryjevim zakonom. Koncentracija v globini je odvisna od mešanja vode (temperatura, tokovi), količine in vrste organizmov (fotosintetski organizmi, ki povečujejo količino kisika v vodi, in aerobni organizmi, ki kisik samo trošijo) in dosega svetlobe (bolj ko je voda čista, dalj pride svetloba - pomembno za fotosintetske organizme, ki so ponavadi nekoliko višje v oceanu, da lažje pridejo do svetlobe). Posledica tega je področje najmanjše koncentracije O₂ med 500 in 1000 metrov.

Fiziološki plini v organizmu - organizmi (sesalci) vdihnejo zrak preko pljuč. Preko pljuč kisik vstopa v

kri in se prenese v celice. Pri tem kot posledica metabolizma v teh celicah nastaja CO₂, ki se preseli v kri in se prenese do pljuč, ter se tam izloči v zrak. Dušik vstopa pri vdihu, vendar je izredno inerten plin. Do določene mere se raztopi v krvi, ter pri izdihu izstopa - vedno je torej neka stalna količina dušika raztopljena v krvi.

V pljučih imamo dve pljučni krili. Da širimo volumen svojih pljuč v bistvu širimo alveole; pri izdihu pa jih stisnemo in iz njih iztisnemo pline. Alveol je približno 8 milijonov.

Pri dihanju torej mehanično potiskamo zrak v alveole, tam se kisik raztopi (po Henryjevem zakonu) najprej po površini tekočine v alveoli, potem pride v krvno plazmo, kjer je še vedno raztopljen po pravilu Henryjevega zakona. Tam preide v eritrocite, v katerih je hemoglobin, na katerega se kisik veže. Pomembna je difuzija, s katero se kisik prenese do hemoglobina. Kisik gre iz zraka v kri, CO₂ pa v obratni smeri. Difuzija je hitra, ker so vse površine tukaj velike (8 milijonov alveolov z določeno površino) in ker so razdalje znotraj alveol zelo majhne.

Plini v pljučih so nekoliko drugačne sestave kot plini zunaj. V alveolah je prisotna voda, ki v obliki vodne pare nasiči cel volumen alveole; zato je v pljučih veliko vlage. Plina je občutno manj v alveolarnem zraku kot zunaj.

Henry-jev zakon in fiziološki plini - dušik je zelo nereaktiven, zato je skoraj popolnoma njegovo raztapljanje v krvni plazmi podrejeno Henryjevem zakonu. To pa nikakor ne velja za kisik in CO₂, ki se bistveno bolj raztopita v krvi, kot bi to narekoval Henryjev zakon, ker se oba vežeta na hemoglobin. Kisik se v obliki O₂ s koordinativno vezjo veže na hemoglobin. Samo 0,3 ml od 20 ml kisika v 100 ml krvi je v skladu s Henryjevim zakonom raztopljenega v plazmi. 19,7 ml je vezanih na hemoglobin. Vseeno pa ima tu Henryjev zakon velik pomen - brez njega se kisik ne bi raztopil najprej na vodni površini alveol in ne bi prehajal v krvno plazmo, potem pa še v membrano eritrocita (kjer se šele veže na Hb). Mora obstajati raztapljanje kisika v vodi, če ne ta sploh ne bi mogel priti do hemoglobina (kisik mora biti najprej raztopljen)!

Bolnikom, ki imajo težave z dihanjem, dajo cevke skozi nos, skozi katere priteka čisti kisik. S tem dvignejo količino kisika, ki priteka v organizem. Parcialni tlak čistega kisika je petkrat večji od kisika v zraku, zato se ga tudi petkrat več raztopi v krvni plazmi - kisik v organizmu je torej na skrajni meri nasičenja, zato ima ta poseg majhen učinek (a kljub temu bolnikom pomaga).

Hemoglobin je protein iz štirih zelo podobnih podenot (po dve alfa in dve beta verigi sta enaki). V vsako verigo je vložen en hem. Železov ion (Fe²⁺) je pomemben za vezavo kisika, da se kisik lahko veže samo v obliki O₂! Če se železov ion oksidira v Fe³⁺ ne bo mogel več vezati kisika, zato je to za človeka zelo toksično (se zadušimo).

Zakaj dihamo - ker je kisik zelo pomemben pri dobivanju energije iz hranil. Popolna aerobna razgradnja glukoze poteka s pomočjo kisika. Glukoza se oksidira v ogljikov dioksid in vodo in iz 38 molekul adenozin di-fosfata (ADP) nastane 38 molekul adenozin-3-fosfata (ATP).

Anaerobna razgradnja glukoze nam da samo dve molekuli ATP, to ne bi bilo dovolj energije za razvoj kompleksnih večceličnih organizmov! S pomočjo aerobne razgradnje dosti bolj učinkovito izkoriščamo hranila za energijo.

Dihamo zato, da dobimo energijo (ATP), pri čemer pretvorimo glukozo v produkte (H₂O in CO₂), ki se jih lahko znebimo.

Ogljikov dioksid - v zraku ga je zelo malo, je pa tam vseeno neizmerno pomemben. Če bi vezali celoten CO₂ iz zraka, potem ne bi bilo več fotosinteze in bi usahnil vir kisika. Za ljudi je pomembno, da se CO₂

topi v tekočini - ker oksidiramo hrana in s tem ves čas proizvajamo CO₂, ki se ga moramo znebiti, zato se more raztopiti v krvni plazmi. Večine CO₂ v krvi je v obliki bikarbonatnega iona (HCO₃⁻), nekaj ga je raztopljenega, nekaj pa vezanega na hemoglobin (ne na isto mesto kot kisik! Vezava CO₂ torej nič ne moti vezave kisike, čeprav vezava enega čuti vezave drugega).

Transport CO₂: CO₂ se naredi v tkivih in se tam sreča z vodo. Z vodo se kemično spoji v ogljikovo kislino (H₂CO₃), ki disociira v teoriji v dveh stopnjah (v prvi stopnji nastane en proton in en bikarbonatni ion, ki lahko disociira naprej), v praksi pa v eni stopnji (ostane bikarbonatni ion v krvni plazmi). Da bi se CO₂ uspešno spojil s H₂O se je razvil encim karbonska anhidraza. Ta encim katalizira pretvorbo CO₂ in vode v H₂CO₃ - s tem je učinkovitejši prenos CO₂ iz telesa.

Parcialni tlak CO₂ vpliva na ravnotežje. Visok tlak CO₂ potiska ravnotežje proti H₂CO₃ in proti bikarbonatnemu ionu. To je ugodno, ker se v tej obliki večino CO₂ lahko transportira. V krvi potuje CO₂ pretežno v obliki HCO₃⁻ (deloma tudi vezan na Hb) v pljuča, kjer se ravnotežje pomakne nazaj. HCO₃⁻ se združi s protonom nazaj v H₂CO₃. Nizek tlak CO₂ v vdihanem zraku v alveolah pomakne ravnotežje nazaj; CO₂ se izloči iz tekočine in se preseli v vdihan zrak. S tem zrakom ga izdihamo.

Težave zaradi raztapljanja plinov v tekočinah

Pri potapljačih; pod vodo je večji tlak, zato moramo imeti tudi zrak, ki ga dihamo, pod ustreznim tlakom, če ne bi nam zunanji tlak preprečil razpeti naša pljuča. Iz tega izvirajo te tri vrste težav:

- kesonska bolezen
- dušikova pijanost
- kisikova toksičnost

Na večjih višinah, pa imamo višinsko bolezen; z višino se zmanjšuje tlak, zato je parcialni tlak kisika manjši, manj ga transportiramo v kri in manj se ga veže na hemoglobin.

Kesonska bolezen - v večjih globinah smo dihali zrak pod večjim tlakom. Zato se je raztopilo (po Henryjevem zakonu) nekaj več plinov. Pri kesonski bolezni je glavni problem dušik, ker ga je največ in se v celoti podreja Henryjevemu zakonu, zato se ga 5krat več raztopi v krvi. Če se moramo hitro dvigniti iz globin, se tlak okoli nas hitro zmanjša (pri manjših tlakih je dušik manj topen) in nismo mogli tako hitro spraviti dušika iz krvi, zato se v njej izloči v obliki mehurčkov. Tako nastopi klinično stanje, ki mu rečemo plinska embolija - mehurčki v kapilari izpodrinejo tekočino in jih na nek način zamašijo. Najbolj občutljivi so možgani.

Posledica kesonske bolezni so različne poškodbe tkiv, omrtvičenja udov, v nekaterih primerih pride do smrti.

Da bi to preprečili je pomemben čas potopa ter režim dviganja iz globine. Pri dovolj počasnem dviganju lahko N₂ izdihamo. Posebni potapljaški računalniki spremljajo potop in predlagajo režim dviga z ustreznimi postanki, kjer se izdiha odvečni dušik.

Če pride do tega, da se morajo potapljači hitro dvigniti, je najboljša rešitev hitra zamenjava dihalnega aparata in ponovni spust na globino, da se dušik, ki se je izločil v obliki mehurčkov, zopet raztopi - potem pa se vrniti na površje s pravilnim režimom. Če to ni mogoče je glavna rešitev hiperbarična komora (prostor, kjer lahko umetno ustvarimo večji tlak).

Dekompresijska komora ima tudi druge uporabe, npr za zdravljenje (poleg kesonske bolezni) plinske gangrene (ta nastane zaradi infekcije podkožnih ran z anaerobnimi organizmi - te potem izločajo različne pline, ki naredijo strahotno škodo in lahko vodi v smrt. Če človeka s plinsko gangreno damo v tako

komoro in povečamo kisik okoli njega na nekaj barov, to povzroči veliko boljše prodiranje kisika v tkiva. Te anaerobni organizmi so občutljivi na kisik in odmrejo), zastrupitve z ogljikovim monoksidom (iz hemoglobina, kamor se veže ogljikov monoksid, izbijemo ogljikov monoksid s pomočjo kisika - večji tlak poveča afiniteto za vezavo kisika), zdravljenje poškodb pri obsevanju, zdravljenje ran ki se počasi celijo (boljša oksigenacija pomaga). Pomembna je tudi za preizkave, preučuje se predvsem učinke prostih radikalov, ki so škodljivi za organizem, uporabna pa je tudi kot hipobarična (podtlačna) komora; npr. pri izravnavi pritiska pri posameznikih, ki so bili izpostavljeni prenizkemu tlaku, npr. na velikih višinah.

Dušikova pijanost - dušik se pri večjih globinah bolj raztaplja v krvi, hkrati pa se veže na nekatere receptorje, kar ima narkotični učinek. Več ko je raztopljenega dušika, večji je ta efekt. Posledica so napačne odločitve, izguba orientacije, evforija in posledično večja verjetnost utopitve.

Kisikova toksičnost - kisik je zelo močan oksidant. V večjih globinah je povečana količina raztopljenega kisika v krvi in v tkivih; pride do oksidacij, ki se pri normalnih tlakih ne dogajajo tako intenzivno (čeprav se dogajajo ves čas; zato imamo v celicah naravne antioksidante). Kisikova toksičnost je torej povečana.

Višinska bolezen - zračni tlak se spreminja z višino. V večjih višinah se močno zmanjša. Težave se pojavijo pri alpinistih na velikih višinah (pomaga adaptacija - več eritrocitov v krvi in/ali dodatni kisik iz bombe), ali pri dekompresiji v potniških letalih (pomagajo kisikove maske).

Pri dobro treniranih alpinistih se telo prilagodi tako, da proizvede več eritrocitov.

Predavanje 4 ; 28.2.2011 / Matjaž Zorko

RAZTOPINE, II. DEL - KOLIGATIVNE LASTNOSTI RAZTOPIN

So odvisne le od števila delcev na volumsko enoto raztopine, nič pa od narave delcev (ni važno, kakšen je topljenec; samo koliko je topljenca). Med koligativne lastnosti spadajo:

- znižanje parnega tlaka topila zaradi prisotnosti topljenca
- zvišanje vrelišča zaradi prisotnosti topljenca
- znižanje zmrzišča zaradi prisotnosti topljenca
- osmozni tlak

Znižanje parnega tlaka topila zaradi prisotnosti topljenca - poskus; v pokriti prostor so dali dve posodi. V eno so dali čisto vodo, v drugo vodo s topljencem. Po določenem času se čista voda iz prve posode v celoti preseli v drugo. Iz tega so sklepali, da lahko voda preide v parno fazo; zato more imeti parni tlak. Ta je odvisen od tega, s kakšnim topilom imamo opravka (kako je to topilo hlapno?). Parni tlak s temperaturo narašča.

V vodi so vodikove vezi pogostejše kot v etanolu, v etru pa jih sploh ni. Zato ima voda najnižji parni tlak (je najmanj hlapna).

S temperaturo raste število molekul, ki imajo dovolj veliko energijo, da premagajo kohozijske sile v tekočini in pobegnejo v plinsko fazo (parno fazo). Tlak te pare nad tekočino je parni tlak.

Ko parni tlak doseže vrednost zunanega tlaka, tekočina zavre - v plinski in tekoči vodi je isti tlak in ista temperatura. Vrelišče vode, ki je pri normalnih razmerah 100 stopinj C, se spreminja in je odvisna od zunanega tlaka.

Če imate čisto topilo ima parni tlak neko določeno vrednost. Če pa v to topilo vržemo nekaj nehlapnega (ali hlapnega, vendar je z nehlapnim manj problemov, ker se ne pojavlja v pari) pa lahko manj molekul topila izhaja iz tekoče faze in se parni tlak topila v raztopini zmanjša. Ta pojav lahko opišemo s kemijskim potencialom, ali pa s preprostim razmislekom - če imamo čisto topilo, potem vsaka molekula, ki preide ven, ima neko možnost, da pride nazaj (ker se giblje tako v plinski kot v tekoči fazi). Če pa imamo prisotne še topljenca, potem te hodijo po celotnem volumnu tekočine in nekaj jih je tudi na površini. Te, ki so na površini, ovirajo prehod topila ven, nič pa ne ovirajo vračanje tega topila nazaj. Molekule topljenca torej fizično zaradi zmanjševanja neto površine gladine topila preprečujejo izhod ven, ne pa vhoda nazaj noter - s tem zmanjšajo tlak v parni fazi na topilo.

Parni tlak čistega topila je torej večji kot parni tlak raztopine, v kateri je topljenec.

Parni tlak topila v raztopini je enak parnemu tlaku čistega topila krat molski ulomek topila - to je Raoultov zakon, ki pove, za koliko se zmanjša parni tlak topila v raztopini. Gre za limitno lastnost - zakon, ki drži samo v idealnih raztopinah (torej pri raztopinah, kjer interakcij med delci topila in topljenca ali topila in topila ni, ali pa so vse enake). Realne raztopine lahko približamo idealnim z razderčevanjem (zmanjšamo vsaj interakcije topilo-topljenec).

Če so pozitivne interakcije (topilo in topljenec se privlačita), potem topljenec zadržuje topilo v tekoči fazi. Če pa imamo odbojne sile, potem topljenec raje spušča topilo v plinsko fazo in zato imamo večji parni tlak.

Raoultov zakon je osnova za vse koligativne lastnosti.

Henryjev zakon o topnosti plinov je le posebna oblika Raoultovega zakona. Raoultov zakon velja za topilo, medtem ko Henryjev zakon velja za topljenec. Henryjeva konstanta je obratno sorazmerna absorpcijskemu koeficientu (alfa).

Zato, da lahko gledamo **zvišanje vrelišča / znižanje zmrzišča**, moramo poznati **trojni (fazni) diagram vode**. V diagramu tlak/temperatura imamo vodo v različnih agregatnih stanjih. Ob srednjih temperaturah in (na koncu lahko tudi zelo visokih) tlakih imamo tekočo vodo, na obeh straneh pa plinsko in trdno fazo. Trojna točka je točka, kjer se srečajo vsa tri agregatna stanja.

Raoultov zakon nam pove, da če vržemo v ta sistem topljenec, se bo parni tlak zmanjšal. Vse mejne črte v diagramu bodo zato nekoliko nižje.

Ko pridemo do zunanjega tlaka, voda zavre. Če je čista voda zavre pri 100 stopinjah C, če pa je zaradi Raoultovega zakona parni tlak znižan, bomo potrebovali več temperature, da voda zavre (zvišanje vrelišča), obratno pa je pri zmrzišču (znižanje zmrzišča), ker je temperatura zmrzišča definirana kot temperatura, pri katerem sta prehod iz tekočega v trdno stanje in prehod iz trdnega v tekoče stanje v ravnovesju. Z vidika neurejenosti (entropije) je ugodno za molekule, ki so v trdnem agregatnem stanju, da preidejo v tekoče (se stalijo), ker je v tekoči fazi nered večji. Ker pa imajo raztopine večji nered kot čista topila je ta prehod še bolj ugoden in se zgodi prej.

Zaradi znižanega parnega tlaka je potrebno več energije (višja temperatura), da tako znižan parni tlak doseže zunanji tlak - vrelišče se zato zviša. Zvišanje vrelišča je razlika med vreliščem raztopine in vreliščem čistega topila. Zvišanje vrelišča se izračuna tudi z zmnožkom molalnosti raztopine (ker se molalnost s temperaturo ne spreminja, molarnost pa se!) in ebulioskopske konstante.

Pri znižanju zmrzišča je podoben razmislek; bolj, ko dodajamo topljenec v topilo, bolj znižujemo zmrzišče. Znižanje zmrzišča je razlika med zmrziščem čistega topila in zmrziščem raztopine. Znižanje

zmrzišča izračunamo kot zmnožek molalnosti raztopine in krioskopske konstante. Bolj, ko je koncentrirana raztopina, bolj globoko zmrzne.

Zaradi Raoultovega zakona je parni tlak vode v raztopini nižji od parnega tlaka čiste vode. Ker pri zamrzovanju raztopine zmrzne samo čista voda, topljenci pa ostanejo v raztopini, imamo v ledu višji parni tlak vode kot v raztopini (kjer so tudi topljenci). Zato že pri nižji temperaturi v ledu dosežemo enak parni tlak vode kot je v raztopini - znižanje zmrzišča.

Kafra je zanimiva organska snov, ki deluje tudi kot topilo; če imamo enkrat molalno raztopino se zmrzišče zniža skoraj za 40 stopinj C! To je zato, ker so interakcije med kafro in topljenci zelo velike.

Fazni diagrami različnih snovi so različne - pri CO₂ je splošna slika podobna kot pri vodi, vendar je trojna točka nad 101,3 kPa (tlak atmosfere), zato nam v naših razmerah CO₂ ali direktno iz plinaste faze zmrzne v trdno fazo, ali pa direktno iz trdne faze preide v plinasto fazo (sublimira). Ne moremo dobiti (s tlakom naše atmosfere) tekoče faze!

Osmozni tlak - kadar imamo dva predelka z različnimi koncentracijami predeljena z membrano, ki je prepustna za topilnec in topilo, se bodo tekom časa zaradi trenda po izenačitvi kemijskih potencialov izenačili koncentraciji na obeh straneh.

Drugače pa je, kadar imamo namesto popolnoma prepustne membrane med dvema predelkoma polprepustne membrane - ta membrana prepušča topilo, ne prepušča pa topilneca (pore so premajhne). Če damo na eno stran U-cevke čisto topilo, na drugo stran pa raztopino (z nekim topilnecem) in to ločimo s polprepustno membrano, se bo v takem sistemu začel stolpec pri raztopini dvigovati - topilo se je začelo premeščati na stran, kjer je topilnec; topilnec pa ni mogel na drugo stran, ker ga polprepustna membrana ne prepušča. Raztopina ima osmozni tlak, ki "srka čisto topilo vase". Osmozni tlak lahko razberemo iz razlike višin vodnih stolpcev; ta tlak je enak tlaku, ki ga moramo dovesti na višji stolpec v U-cevki, da izenačimo višine stolpcev na osnovno stanje.

Osmozni tlak (označimo ga s črko **π**) je tisti tlak, ki ga moramo izvajati na raztopino, da jo držimo v ravnotežju z njenim čistim topilom, ki je na drugi strani polprepustne membrane.

Zaradi Raoultovega zakona je parni tlak vode v raztopini nižji od parnega tlaka čiste vode. Zato čisto topilo lažje prehaja preko por v raztopino kot nazaj v čisto topilo. Ravnotežje se vzpostavi, ker na sistem deluje dodatni tlak, ki ga izvajamo od zunaj, oz. ker se dvigne stolpec raztopine.

Vse koligativne lastnosti, ki izhajajo iz Raoultovega zakona, veljajo striktno za idealne raztopine! V realnih raztopinah veljajo samo pri zelo razredčenih koncentracijah.

Najbolj običajno so prikazovali osmozni tlak tako, da so v posodo s čistim topilom postavili raztopino, ki je v cevki zaprta s polprepustno membrano. Poravnali so gladini topila in raztopine in počakali, da je topilo prodrlo v cevko. Gladina raztopine se je zato dvignila in jo lahko izmerimo.

Biološka membrana je polprepustna membrana. Voda jo zlahka prehaja, ker so molekule tako majhne, da najdejo prostore med lipidi v dvolipidnem sloju. Vodo spuščajo še posebni transmembranski proteini, akvaporini.

Topljenci pa membrano prehajajo zelo zelo težko.

Osmoza omogoča napetost rastlinskih celic. Če damo rastlino v čisto vodo je voda v stiku s celicami rastline. V celicah so tekočine, ki so polne različnih topilencev, zaradi tega je koncentracija delcev v

celici veliko večja kot koncentracija delcev v čisti vodi - voda prodira v notranjost in vzdržuje napetost. Če tako rastlino damo namesto v čisto vodo v neko raztopino (npr slano vodo), kjer je konc. topljencev v raztopini večja kot konc. topljencev v celicah rastline, bo raztopina potegnila vodo iz celic ven. Voda potuje do vrha drevesa tudi zaradi osmoze.

Osmozni pojavi so pomembni pri transfuziji krvi. Človek, ki izgubi veliko količino krvi ima dva velika problema - manj eritrocitov (manj kisika se prenaša) in nižji krvni tlak (zelo oteži delo srcu kot črpalki). Naše membrane v celicah niso samo polprepustne, ampak so selektivno prepustne - prepuščajo topilo, pa tudi nekatere topljence. Zato ne govorimo o osmozni, ampak o toničnosti. Toničnost je del osmotskega tlaka zaradi delcev, ki ne morejo prehajati (delci, ki lahko prehajajo, nas ne zanimajo več, ker za njih predpostavimo, da se bomo čez čas razporedili na obe strani membrane enakomerno).

Osmoznost/toničnost velja za pasivno difuzijo. Ko pride do aktivnega transporta se zadeve močno zakomplicirajo.

Če imamo torej človeka, ki krvavi, mu moramo dvigniti tlak in zagotoviti zadostno število eritrocitov. Zaloga eritrocitov je pri človeku zelo velika, tako da je primarni problem zagotoviti osnovni tlak, da lahko srce normalno deluje. Če nimamo pri roki ustrezne krvi, mu v krvotok ne smemo naliti čiste vode - to bi v okolici eritrocitov razredčila raztopino krvne plazme in s tem bi razlika v osmolarnosti znotraj in zunaj eritrocitov velika. Zato bo voda vdiralna v notranjost eritrocita in eritrocit, ki je relativno fragilna celica, se bo napel in počil (hemoliza). Zato moramo ob odsotnosti krvi zagotoviti okolico, ki je izotonična glede na osmotsko eritrocita - uporabimo fiziološko raztopino (NaCl v sterilni vodi).

Če membrana nekatere delce prepušča, nekatere pa ne prepušča, vendar so nekateri delci nabiti in ne morajo čez membrano, govorimo o Donnanovem ravnotežju. Zanima nas, kako se te delci razporedijo. Sistem skuša pri takih predelkih ubogati dve pravili: želi izenačiti koncentracije na obeh straneh in naboje na vsaki strani posebej. Tega ne more narediti, zato je rezultat kompromis. Na eni strani se nabere več pozitivnih in na drugi več negativnih ionov; naboj je torej neenakomerno razporejen. Donnanovo ravnotežje je ena od osnov za transmembranski potencial.

Osmoza je povezana tudi z dializo, ki rešuje življenje bolnikom, ki so jim odpovedala ledvica. Bolnik, ki mu odpovedo ledvica, ne more odvajati škodljivih snovi iz krvi preko ledvic v urin. Njegov urin je skoraj čista voda (ni podoben urinu zdravih ljudi, ki vsebuje mnogo toksičnih snovi, med drugim sečnino - ta nastane z razgradnjo aminokislin), zato je treba umetno odstraniti strupene snovi iz krvi. Človeku se zabodeta dve igli v krvni sistem in kri se prečrpa preko dializnega aparata. Kri poteka v enem predelku, v drugem je dializna tekočina, vmes je polprepustna membrana, ki prepušča škodljive snovi (prepušča majhne snovi in zadržuje velike).

Glavni težavi dialize sta vprašanja, ali smo odstranili dovolj škodljivih snovi in ali so med odstranjenimi snovmi tudi take, ki jih ne bi smeli odstraniti?

Obratna ali reverzna osmoza - s tlakom lahko osmozo obrnemo. Najprej moramo uporabiti tako velik tlak, da ustavimo osmotski tlak, potem pa povečamo tlak in rinemo topilo iz raztopine v predelek s čistim topilom. Na ta način še naprej koncentriramo predelek raztopine; tako npr. lahko pridobivamo pitno vodo iz morske vode in to z manjšim vložkom energije kot pri izparevanju.

Koligativne lastnosti raztopin neelektrolitov so odvisne le od števila delcev, ne pa od narave teh delcev. Sem spada znižanje parnega tlaka, zvišanje vrelišča, znižanje zmrzišča in osmotski tlak. V enačbah nastopajo tri različne oblike koncentracij - molarna koncentracija (v enačbi za osmotski tlak),

molalna koncentracija (v enačbi vrelišča/zmrzišča) in molski ulomek (v enačbi za spremembo parnega tlaka).

Kadar pa imamo **koligativne lastnosti raztopin elektrolitov** elektrolit razpade v vodi na ione, zato imamo večje število delcev, ki jih moramo upoštevati. **Van't Hoffov faktor (i)** nam pove, na koliko delcev disociira elektrolit. Pri elektrolitih torej enačbe koligativnih lastnosti pomnožimo z Van't Hoffovim faktorjem.

Primer: Za NaCl je $i = 2$, za CaCl_2 je $i = 3$.

V 0.1 mol NaCl bo 0.2 mol ionov!

Pri popolni disociaciji elektrolitov dobimo cela števila za Van't Hoffov faktor in upoštevamo, da med delci ni nobenih interakcij.

1.3.2011

Vrednost Van't Hoffovega faktorja se da izmeriti in izračunati. Pri realnih raztopinah malo večjih koncentracij so izmerjeni Van't Hoffovi faktorji nekoli manjši od števil, ki jih teoretično pričakujemo.

Predavanje 5 ; 1.3.2011 / Matjaž Zorko

RAZTOPINE, III DEL (ELEKTROLITI - KONCENTRACIJA IN AKTIVNOST)

Elektroliti so snovi, ki v vodnih raztopinah razpadejo na ione, ki so vedno nabiti (pozitivni in negativni), zato njihove raztopine prevajajo električni tok. V zelo čisti vodi je prevodnost zelo majhna; če pa noter damo ione se prevodnost zelo poveča.

Močne in šibke elektrolite ločimo po kriteriju, kako dobro razpadejo na ione. Močni elektroliti dobro ali popolno disociirajo, medtem ko šibki elektroliti le šibko disociirajo in velik del ostane nedisociiran. Elektroliti so kisline, baze in soli.

MOČNI ELEKTROLITI - če smo neko koligativno lastnost sposobni izmeriti, hkrati pa jo lahko tudi izračunamo (in ne upoštevamo disociacije) bomo dobili tak kvocient, ki nam pove, na koliko ionov je ta elektrolit razpadel. Van't Hoffov faktor torej dobimo če delimo izmerjeno koligativno lastnost z izračunano koligativno lastnostjo.

S povečano koncentracijo dobimo vrednosti, ki odstopajo od Van't Hoffovega faktorja (Van't Hoffov faktor se manjša). Če opazujemo močan elektrolit bodo ta odstopanja relativno majhna, pri šibkih elektrolitih pa bo to padanje faktorja z naraščajočo koncentracijo mnogo bolj občutna. To je eden od kriterijev, s katerim lahko ločimo močne elektrolite od šibkih.

Če pa gremo proti koncentraciji 0 (zelo razredčene koncentracije) se vsi, tako močni kot šibki elektroliti, obnašajo tako kot v teoriji.

Odvisnost Van't Hoffovega faktorja od koncentracije ni linearna, je bolj eksponentna.

Disociacija se torej zmanjšuje s povečano koncentracijo raztopine.

Van't Hoffov faktor je lahko eden od faktorjev za presojo, ali je elektrolit šibek ali močan. Drug faktor je **aktivnostni koeficient**, ki ga označimo z grško črko γ . Če imamo koncentracijo nekih ionov, ki jo

pričakujemo pri neki koncentraciji (c), dobimo aktivnost tako, da c pomnožimo z **gamma**. Pri elektrolitih se aktivnost nanaša na ione, ne toliko na molekule. Vrednost aktivnostnega koeficienta je med 0 in 1. Če so vsi ioni prosti, je njihova aktivnost enaka in je aktivnostni koeficient 1. Pri močnih elektrolitih je torej blizu 1, pri šibkih pa je bolj oddaljen od 1.

Aktivnostni koeficient izračunamo analogno kot Van't Hoffov faktor, vendar pri računanju že upoštevamo disociacijo! Delimo torej izmerjeno koligativno lastnost z izračunano koligativno lastnostjo (pri kateri upoštevamo disociacijo - vse možne ione). Razmerje je vedno 1 ali nekoliko manjše od 1.

Debye in Hückel sta direktno izračunala aktivnostni koeficient; izračun velja le za močne elektrolite pri 25 stopinjah C v vodi. Konstanta **mi** v enačbi pomeni **ionska moč** - to je količina, ki nam skuša povedati, kako nek določen ion, ki je v raztopini, vpliva na vse ostale ione, ki so v raztopini prisotni (ali kako vsi ostali ioni vplivajo na nek določen ion, ki ga gledamo). Ionsko moč izračunamo na sledeč način: Za vsak ion vzamemo njegovo koncentracijo v raztopini in pomnožimo s kvadratom njegovega naboja.

Posamezne rezultate, ki jih dobimo za vsak ion posebej, seštejemo in delimo z dve. Če je ionska moč velika, je koncentracija velika; če je koncentracija velika, je povprečna razdalja med ioni majhna. Zaradi tega bo sila med delci večja in bo možnost, da bodo ti ioni med sabo v interakciji in s tem drug drugega močno privlačili večja in bo aktivnostni koeficient nekoliko manjši.

Če imamo torej vodno raztopino pri 25 stopinjah celzije in poznamo naboje ionov znamo izračunati **srednjo vrednost aktivnostnega koeficienta**.

Ta enačba velja le za močne elektrolite, ker sta Debye in Hückel upoštevala elektrostatske interakcije med delci, te pa nastanejo le pri nabitih delcih - ne pa tudi med delci brez naboja.

Pri neelektrolitih je Van't Hoffov faktor ista stvar kot aktivnostni koeficient.

Tretji kriterij, po katerem lahko prepoznavamo jakost elektrolitov, je njihova **disociacijska konstanta**. NaCl razpade na Na in Cl ione. Za takšen sistem lahko postavimo ravnotežno (disociacijsko) konstanto, ki upošteva aktivnost Na⁺ ionov, Cl⁻ ionov in pa aktivnost nedisociiranega NaCl. Aktivnost pa je zmnožek koncentracije in aktivnostnega koeficienta.

Vrednost te konstante je stalno enaka, ne glede na koncentracijo NaCl - za razliko od aktivnostnega koeficienta in Van't Hoffovega faktorja, ki se oba spreminjata s koncentracijo.

Vendar pa na disociacijsko konstanto vplivata tlak in temperatura, zato je ta konstanta konstantna samo pri stalno temperaturi.

MOČNI ELEKTROLITI - disociacijska konstanta bo zelo velika, ker je zelo veliko ionov. Pri zares popolni disociaciji bi bila K_d neskončno velika. Vendar pa se pri realni raztopini ioni stalno premikajo in ko pridejo dovolj blizu med njimi deluje elektrostatska sila in so nekaj časa povezani. Zato smatramo, kot da nobena raztopina zares ne disociira popolnoma.

ŠIBKI ELEKTROLITI - precej snovi ne disociira. Tudi tukaj lahko uporabljamo Van't Hoffov faktor in aktivnostni koeficient, vendar pa oba precej močno odstopata od osnovnih enot (celih števil za VH faktor in enke za aktivnostni koeficient). Bolj informativna sta v tem primeru disociacijska konstanta in pa stopnja disociacije.

Ocetna kislina je šibek elektrolit. Le delno disociira v acetatni ion in oksonijev ion. Če to ravnotežje izrazimo z disociacijsko konstanto dobimo v števcu aktivnost acetatnega iona in aktivnost H⁺ iona, v imenovalcu pa aktivnost očetne kisline. Za šibke elektrolite, kjer je disociiranih delcev malo, pričakujemo, da bodo vrednosti disociacijske konstante bistveno manjše kot pri močnih elektrolitih.

Stopnja disociacije (označimo jo z grško črko alfa) nam govori o razmerju med številom disociiranih delcev in številom vseh delcev. Če so vsi delci disociirani je vrednost alfa = 1. Vrednost stopnje disociacije je od 0 do 1. Pogosto se izraža v odstotkih.

Tako kot aktivnostni koeficient in Van't Hoffov faktor nista konstanti, tudi stopnja disociacije ni konstanta, ampak se s koncentracijo spreminja.

Disociacijsko konstanto in stopnjo disociacije lahko eksperimentalno določimo:

- iz pH (ker vemo, koliko je koncentracija ionov),
- s titracijo
- spektrofotometrično (če so produkti disociacije drugačne barve kot reaktant)
- konduktometrično (merimo, kakšna je prevodnost raztopine, ker je prevodnost odvisna samo od količine prisotnosti ionov)

Ker Van't Hoffov faktor, stopnja disociacije in disociacijska konstanta govorijo o isti stvari (deležu disociiranih in nedisociiranih delcev), pričakujemo, da so med seboj povezani.

Povezava med Van't Hoffovim faktorjem in stopnjo disociacije (glej slide)

Če imamo raztopino topljenca, ki je elektrolit, deloma razpade na ione, deloma pa ostane nedisociiran. Če $(1 - \alpha)$ pomnožimo s koncentracijo dobimo koncentracijo nedisociiranega dela, če pomnožimo alfa s koncentracijo pa dobimo koncentracijo disociiranega dela.

Izmerjena koligativna lastnost mora biti sorazmerna koncentraciji vseh delcev. Neznanka **n**, ki nastopa v enačbah, je dejansko število ionov, na katere ta elektrolit razpada (**i** se mu približuje - bolj ko je elektrolit močen in bolj ko je alfa blizu 1, bolj se **i** približa **n**).

Izrazimo lahko tudi **povezavo med disociacijsko konstanto, koncentracijo in stopnjo disociacije**.

Ne glede na to, kako šibek elektrolit imamo, če njegovo koncentracijo razredčujemo vedno bolj in bolj disociira - ob neskončno majhni koncentraciji bo popolnoma disociiral.

Šibki elektroliti - slabo disociirajo, K_d je majhna, pri večjih koncentracijah je stopnja disociacije bistveno manjši od ena in **i** precej odstopa od celega števila.

Močni elektroliti - dobro disociirajo, K_d je velika, tudi pri večjih koncentracijah je stopnja disociacije ~ 1 in je **i** skoraj celo število (malo odstopa).

DEFINICIJA KISLIN IN BAZ

Kislina so snovi, ki v vodni raztopini oddajajo protone (ione H^+), **baze** pa so snovi, ki protone sprejemajo. Zato imam vedno nek par:

- kislina in njena konjugirana baza
- baza in njena konjugirana kislina

To je Bronsted-Lowryjeva definicija.

Iz kisline dobimo njeno konjugirano bazo in proton. Konjugirana baza je sposobna proton vezati in dobimo nazaj kislino.

Po tej definiciji NaOH ni baza, ker ni sposoben vezati protona. Najprej mora kot močan elektrolit disociirati na Na in OH ione - te hidroksidni ioni so tisti, ki so sposobni vezati proton in imajo bazično lastnost.

Voda je lahko hkrati kislina in baza - **Amfoterna snov**.

V praksi največkrat srečamo baze, ki so podobne kot NaOH - baze so takrat, ko v raztopini sprostijo OH^- ione.

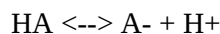
Jakost kislin in baz:

- močne kisline: slaba afiniteta do protonov, dobro disociirajo (sproščajo veliko protonov; te so zelo reaktivni in reagirajo s svojo okolico - na ta način so kisline agresivne. Včasih lahko tudi anioni reagirajo z okolico, da je še bolj agresivno - primer HF). Dobra disociacija pomeni, da kislina z lahkoto odda protone.

- šibke kisline: večja afiniteta do svojih protonov, slabo disociirajo (manj protonov spuščajo v okolico). Pri računanju disociacijske konstante pri kislinah vedno upoštevamo vodo, na katero proton skoči in dobimo oksonijeve ione ($HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$). Če želimo striktno obravnavati raztopine moramo obravnavati aktivnosti snovi v sistemu. Vendar pa je v določenih primerih aktivnost skoraj enaka koncentraciji, zato lahko obravnavamo pri ravnotežni konstanti samo koncentracije, ne pa tudi aktivnosti (čeprav bi jih morali pri striktnih računih upoštevati).

Konstanta kisline (Ka) je konstanta, pri kateri ravnotežni konstanti pomnožimo z vodo (vode je zelo veliko; jo torej odpravimo). Vrednost te konstante nam pove, ali je kislina močna ali šibka. Če je konstanta velika potem kislina močno disociira in je močna. Močne kisline se začnejo (po dogovoru) s kislinami, ki imajo $K > 10^{-2}$.

Pri 1 M koncentraciji mora kislina vsaj 10 % disociirati, da je **močna kislina**.



Koncentracija H^+ je 0,1 M, koncentracija A^- je 0,1M, ostane nam 0,9 M za koncentracijo HA. K_a za ta sistem je približno 10^{-2} - torej kislina, ki ima stopnjo disociacije vsaj 10 % pri 1 M koncentraciji, potem dobimo konstanto disociacije, ki je 10^{-2} molarna, pK_a pa je 2.

Pri bazah je stvar nekoliko bolj komplicirana. Baza vzame proton, nastane konjugirana kislina, ostane pa hidroksidni ion. Enačba za ravnotežno konstanto je ista kot pri kislinah, spet jo pomnožimo s koncentracijo vode in dobimo **konstanto baze**. Ta je enaka zmnožku koncentraciji produktov deljeno z koncentracijo reaktanta.

Če K_a pomnožimo z K_b dobimo K_w - ta je za isto snov, ki jo enkrat gledamo kot kislino in drugič kot bazo, enaka ionskemu produktu vode.

Računanje pH raztopin močnih kislin in baz - upoštevamo popolno disociacijo (dobili bomo toliko sproščenih ionov, kolikor imamo na začetku na voljo kisline). Če je torej HCl 0,1 M, potem je tudi koncentracija H_3O^+ ionov 0,1M. Potem uporabimo logaritemsko formulo za računanje pH.

Pri močnih bazah upoštevamo, da bomo dobili toliko OH^- ionov, kolikor imamo na voljo baze. pOH izračunamo analogno kot pH, le da uporabimo namesto koncentracije H_3O^+ ionov koncentracijo OH^- ionov. Če od 14 odštejemo pOH , dobimo pH.

Računanje pH za šibke kisline - rabimo neke predpostavke:

1. toliko, kolikor dobimo oksonijeve ionov, je tudi drugih ionov, ki jih dobimo iz kisline (HA razpade na enako razmerje H in A ionov).
2. šibka kislina zelo slabo disociira, torej je koncentracija nedisociirane kisline skoraj enaka koncentraciji kisline. Bolj, ko je kislina šibka, bolj drži ta predpostavka in bolj končna enačba ustreza realnosti. (za enačbo glej slide)

Računanje pH za šibke baze - predpostavke so iste kot pri šibkih kislinah in dobimo podobno enačbo za pOH kot smo jo dobili pri kislini za pH.

Na osnovi ionskega produkta vode naredimo skalo, ki poteka od 0 do 14 (pH); čeprav je pH lahko tudi manj kot 0 in več kot 15. Fiziološki pH se ne sme veliko spreminjati. V krvi se lahko spremeni samo $\pm 0,2$. V človeškem telesu torej morajo biti neki sistemi, ki zagotavljajo, da se pH ne spreminja (snov 6. predavanja).

Predavanje 6 ; 4.3.2011 / Matjaž Zorko

PUFRSKI SISTEMI

Titracija - imamo neko določeno količino kisline, pri kateri ne vemo, koliko je njena koncentracija. Če v tej kislini lahko merimo pH lahko ugotovimo koncentracijo tako, da dodajamo znano količino baze z znano koncentracijo in ko bo $\text{pH} = 7$, bomo dodali toliko baze kot je bilo na začetku prisotne kisline. Iz tega lahko izračunamo koncentracijo neznanega (kisline).

S titracijo dobimo titracijsko krivuljo. Ta nam kaže spreminjanje pH v odvisnosti od dodajanja baze spojini. Te krivulje so nekoliko različne, če imamo opravka z močnimi/šibkimi kisljinami.

pH se ob dodajanju baze kislini počasi dviga, dokler ne pridemo do točke, kjer je koncentracija baze in kisline izenači. Takrat pH močno skoči. Prišli smo do ekvivalentne točke, kjer smo dodali natanko toliko baze, kot je bilo na začetku kisline. Če naprej dodajamo bazo se bo pH višal proti 13.

Polekvivalentna točka je na sredini med izhodiščem koordinatnega sistema in ekvivalentno točko.

Krivulje šibke kisline, ki jo titriramo z močno bazo, se nekoliko spremeni. Začetek krivulje ni v 1, ker šibke kisline nimajo tako nizkih pH. Krivulja začne s konkretno strmino, potem pa se splošči (v območju polekvivalentne točke je najmanj strma), potem zopet strmina. Ekvivalentna točka dejansko ni točno pri 7, kot bi pričakovali. To je zato, ker nekaj acetatnih ionov šibke očetne kisline (ki ne disociira popolno) pobralo nazaj nekaj protonov iz vode, zato bomo imeli prebitek natrijevega hidroksida in bo pH nekoliko večji od 7.

Okrog polekvivalentne točke je strmina krivulje najmanjša. To pomeni, da se na tem območju sistem upira spremembi pH. Pravimo, da ima takšen sistem puferske lastnosti. Pufer je raztopina, ki se upira spremembi pH in omogoča, da se v neki raztopini pH drži bolj ali manj konstantno.

V pol ekvivalentni točki smo odtitrirali ravno pol kisline. Takrat imamo koncentracijo kisline in njene konjugirane baze 1:1. Pol ekvivalentna točka je za take sisteme vedno tam, kjer je pH enak pKa sistema. Sistem deluje kot pufer v pKa ± 1 območju. pKa torej določa, v katerem območju bo deloval ta sistem kot pufer.

Poliprotične kisline - kisline, ki oddajo na eno svojo molekulo več kot en proton (v več stopnjah; vsak proton za prejšnjim. Prvega drži najslabše, zadnjega najboljše in ga sprostijo na koncu). Primer je H_3PO_4 . Taka kislina ima več kislinskih konstant K_a - toliko, kot lahko sprostijo protonov. Kislina, ki disociira v treh stopnjah, je povezana v trojno ravnotežje. To pomeni, da obstajajo vse oblike hkrati; od pH pa je odvisno, kolikšna količina posamezne oblike obstaja.

Titracijska krivulja za H_3PO_4 je trisopenjska. Za vsako stopnjo imamo svojo konstanto ravnotežja. Tudi pKa so trije. Pri zelo nizkih pHjih bo pretežno H_3PO_4 . Pri prvi polekvivalentni točki bo koncentracija H_3PO_4 enaka koncentraciji H_2PO_4^- . Temu sledi prva ekvivalentna točka, potem pa druga stopnja, kjer

sta v drugi polekvivalentni točki konc. H_2PO_4^- in HPO_4^{2-} enaki. Sledi še tretja stopnja.

Lahko titriramo tudi baze s kislinami - je analogno titriranju kislin z bazami. pH pada, ob ekvivalentni točki pade zelo drastično, potem pa spet pada počasi.

Titriranje šibkih baz s kislinami je podobno titriranju šibkih kislin z bazami. Ekvivalentna točka je nekoliko nižje kot pri pH 7. Kjer imamo šibko bazo in njeno konjugirano kislino v isti koncentraciji (polekvivalentna točka) se spet obnača kot pufer. Sistem ima nek pK_b - plus/minus ena enota od tega pK_b nam da pufrsko območje.

Pufri so vodni sistemi, ki se upirajo spremembi pH. Sestavljeni so ali iz šibke kisline in njene konjugirane baze, ali pa iz šibke baze in njene konjugirane kisline.

Vse zgoraj naštetu mora biti v vodi! Voda je sestavni del pufrskega sistema - brez vode ni puфра.

Henderson-Hasselbalchova enačba opisuje, kakšen je pH, v odvisnosti od sestave puфра. Za izpeljavo te enačbe glej slide. Iz enačbe razberemo, da je v primeru enake koncentracije kisline in njene konjugirane baze, $\text{pH} = \text{pK}_a$.

Pufer pripravimo tako, da odmerimo neko kislino in njeno konjugirano bazo, ju zmešamo v ustreznem razmerju (če je 1:1 bo $\text{pH} = \text{pK}_a$) in dodamo ustrezno količino vode.

Lahko pa bi tudi vzeli šibko kislino in ji s titracijo dodajali močno bazo. S tem bi ustrezno količino kisline spremenili v njeno konjugirano bazo.

Kako se acetatni pufer upira spremembi pH? Poznati moramo dve stvari:

- dejstvo, da obstaja ionski produkt vode z neko določeno vrednostjo
- obstaja K_a za ta sistem z neko določeno vrednostjo

Imamo torej očetno kislino, ki se z dodatkom baze spreminja v konjugirano bazo (natrijev acetat), pri tem pa nastaja tudi voda. Če dodajamo H^+ , potem hočemo ohraniti konstanto kisline kot konstanto - te H^+ protoni morajo torej reagirati z acetatnim ionom v očetno kislino. Tako ohranimo K_a v stalni vrednosti. Namesto da bi torej protoni ostali v sistemu, jih pufrski sistem 'požre', zato je njihova koncentracija bistveno zmanjšana, kot bi bila drugače in je sprememba pH manjša.

Če pa dodajamo OH^- ione, nam pri razmisleku pomaga ionski produkt vode. Ta je neka konstantna vrednost. Če je konstanta, mi pa bomo od zunaj dodali v sistem nekaj OH^- ionov, se mora nekaj zgoditi, da se bo ohranila konstantnost te konstante. V tem primeru protoni, ki so na voljo v vodi, spremenijo OH^- ione v vodo; zato se pH mnogo manj spremeni, kot bi se v primeru, ko dodatne OH^- ione ne bi mogli nevtralizirati. Pomanjkanje protonov, ki nastane zaradi reakcije z OH^- ioni, pa nadoknadimo z nekaj več disociacije očetne kisline na H^+ in acetatni ion.

Pufrska kapaciteta in pufrska vrednost - pri pufrih je pomembno, koliko so učinkoviti (koliko ionov so sposobni 'požreti', da se pH ne spremeni veliko).

Pufrska kapaciteta je KVALITATIVNA MERA (nekaj, česar s številkami NE izražamo - rečemo samo, da je velika ali majhna) za sposobnost puфра, da se upira spremembi pH. Nekateri pufri se bolje upirajo spremembi pH, drugi slabše. Kjer je sprememba pH večja, tam je kapaciteta puфра slabša. Pove nam (primerjalno), če imamo dva puфра, kateri je boljši, ne pa tudi koliko boljši je-

Pufrska vrednost je KVANTITATIVNA MERA za pufrsko kapaciteto. Definirana je kot tista količina H^+ oz. OH^- ionov, ki jih moramo dodati 1 L puфра, da se mu spremeni pH za eno enoto. Izračujemo jo tako, da delimo količino dodane baze (kisline) z spremembo pH (v našem primeru je to 1). Pufrska vrednost

označimo z **beta**.

Ni nujno, da je pufrska vrednost in pufrska kapaciteta na obe strani pH skale enaka! Nek pufer lahko drugače kompenzira dodatek OH⁻ ionov in dodatek protonov. Če ima pufer enako količino šibke kisline in njene konjugirane baze, bo enako dobro kompenziral v kislino in v bazično smer. Če ima pufer več konjugirane baze, bo bolj kompenziral spremembo pH v kislino smer, in manj v bazično smer.

Fiziološki pufri:

- v celicah (intracelularno): glavni je fosfatni pufer
- izven celic (ekstracelularno): glavni je bikarbonatni pufer (za kri in intersticijsko tekočino v medceličnici - dve glavni tekočini zunaj celice)

Nekateri proteini imajo veliko pufrsko kapaciteto.

Pri 37 stopinjah C je nevtralna točka pH = 6,8. Bolj ko dvigujemo temperaturo, bolj voda disociira in je več protonov, pH bo torej z višjo temperaturo nižji.

Fosfatni pufer - osnova je fosforna kislina H₃PO₄. Za fiziološke razmere je pomembno samo srednje območje ekvivalenčne krivulje tega pufra (čeprav ima tri območja, ker disociira v treh stopnjah), ker se samo tisto giblje okoli pH 7 (samo ena pK_a je relevantna, pK_{a2} = 7,2).

Upoštevamo torej drugo stopnjo disociacije H₃PO₄. Imamo šibko kislino H₂PO₄⁻ in konjugirano bazo HPO₄²⁻. Teh dveh oblik je največ pri temu pH, nekaj malega pa je tudi H₃PO₄ (ker so v trojnem ravnovesju vedno prisotne vse tri vrste).

V krvi in intersticijski tekočini je glavni pufer **karbonatni pufer**. Ogljikova kislina H₂CO₃ predstavlja šibko kislino, karbonatni ion HCO₃⁻ pa njeno konjugirano bazo. pK_a je 6,1, kar je relativno daleč od 7,4. Če hočemo držati pH 7,4 moramo imeti torej razmerje med HCO₃⁻ in H₂CO₃ močno pomaknjeno v smer HCO₃⁻.

Ta pufer ni samo v krvi. Iz tkiv v kri zaradi metabolizma ves čas dovajamo CO₂, ta reagira z vodo v H₂CO₃. Ta sistem potuje po krvi, pride nazaj v pljuča, tam pa se zadeva obrne - parcialni tlak CO₂ je v pljučih zelo majhen, zato lahko CO₂ v parni fazi izdihamo. S tem se spremeni ravnotežje in se H₂CO₃ spreminja v CO₂ in vodo, potem tudi ta CO₂ izloči z izdihom.

Dihanje močno vpliva na to, kakšen bo pH krvi! Če zadržujemo dihanje, zadržujemo odstranjevanje CO₂ v zrak, CO₂ se kopiči in gremo v acidozo (povečanje kisline) in pH se zniža. Če pospešujemo dihanje pa gremo v alkalozo - intenzivno odstranjujemo CO₂ in posledično H₂CO₃.

Center v možganih za dihanje je občutljiv na pH - ko se pH zniža da signal, da hitreje dihamo in več CO₂ izločimo.

Ledvica zelo selektivno ali zelo intenzivno odvezemajo HCO₃⁻ iz krvi, ali pa ga manj intenzivno odvezemajo; s tem regulirajo pH v krvi, ker regulirajo razmerje med H₂CO₃ in HCO₃⁻.

Poleg tega v krvi delujejo še proteini, ki so pomembni za homeostazo protonov (pH). Sestavljeni so iz aminokislin, te aminokisliline so med seboj povezane s peptidno vezjo. Imajo mnogo skupin, ki lahko prispevajo k pufrskim lastnostim (lahko oddajo ali sprejmejo proton), vendar so nepomembne, ker so njihovi pK_a preveč oddaljeni od 7,4 - razen ene! To je histidin; njegov petčlenski obroč z dvema dušikoma je sposoben sprejeti proton ali ga oddati. pK_a histidinskega ostanka je 6, kar je zelo blizu značilnemu pK_a od ogljikove kisline; **histidin** torej lahko prispeva k pufrskim lastnostim. Tisti proteini, ki imajo veliko histidinskih ostankov, lahko veliko prispevajo k regulaciji pH. V krvi je veliko hemoglobina; ta ima 36 histidinov in je zato zelo učinkovit kot pufrski sistem.

Tudi v celici ni samo fosfatni pufer edini, ki skrbi, da se pH malo spreminja. Zelo odločujoče pomaga pretvorba kislin v metabolizmu (npr. sprememba kislin v estre). Pomaga pa tudi transport kislin in konjugiranih baz v in iz celice ter v in iz organelov. Vse to vpliva na pH v celici. Celotna pufrska kapaciteta vseh sistemov v celici je nekajkrat večja od pufrskih kapacitet vseh sistemov v krvi - narava je poskrbela za to, da je pH znotraj celice bolj ali manj stalen. Nekateri (večina) organeli imajo zelo dobro reguliran pH in v nekaterih organelih je pH bistveno drugačen kot pH v citosolu, vendar je tudi tam pufrsko vzdrževan. Velik del fosfata v celici je vezan na druge molekule (DNA, RNA, mnogi fosforilirani proteini, ATP). Zadeva je torej zelo kompleksna - več faktorjev skrbi za to, da se pH v celici ne bi spremenil.

Zakaj se pH ne sme spreminjati? Kaj je tako pomembno pri ohranjanju pH? Največji problem spremembe pH je, da so encimi zelo odvisni od tega, v kakšnem pH delujejo. Za encime obstaja **optimalni pH** in v tistem pH vsak od encimov najbolje deluje. Če se od tega pH oddaljimo je delovanje encimov bistveno slabše. Poleg encimov pa so na udaru še vse interakcije med molekulami, prvenstveno tiste, ki so elektrostatske narave (povezave med ioni). Če se pH spremeni se šibke kisline lahko spremenijo v konjugirane baze (ali obratno) in dobijo naboj, zato zelo različno reagirajo z okolico. Na udaru so torej nekatere interakcije med encimi in substrati, med hormoni in receptorji, antigeni in protitelesi,...

7.3.2011

pH lahko določimo na več načinov. Najbolj običajno je elektrometrično določanje pH (s pH metrom). Deluje na osnovi oksoredukcijskih reakcij. Merimo pa jih lahko tudi s pH indikatorji, ki so šibke kisline ali šibke baze, ki so asociirani oz. disociirani različne barve. Primer je fenolftalein, ki je v kisli obliki brezbarven, ko disociira in odda proton pa postane vijoličen. Za določanje pH raztopine moramo uporabiti več indikatorjev!

Predavanje 7 ; 7.3.2011 / Matjaž Zorko

TERMODINAMIKA

Energija se razume kot sposobnost sistema za opravljanje dela. V termodinamiki govorimo o sistemih - sistem j tisti del narave, za katerega se dogovorimo, da ga opazujemo. Vse, kar ni sistem, je njegova okolica.

Termodinamski sistem je lahko karkoli:

- celotno vesolje (vse kar obstaja; torej nima okolice - posebnost!)
- populacija predavalnice
- organizem
- celica
- kemična reakcija (reaktanti in produkti so deli sistema, čaša in okolica čaše pa je okolica sistema).

Sistemi so treh vrst:

1. *izolirani* - med sistemom in okolico ni nobenega prehoda, niti energije niti snovi. Tak sistem je samo teoretičen.

2. *zaprti* - med sistemom in okolico lahko izmenjujemo energijo (toploto), ne pa tudi snovi. Skoraj nikoli ne moramo tako dobro zaprti sistem, da bi nastal izolirani.

3. *odprti* - med sistemom in okolico se prosto izmenjuje energija in snov. Izoliranih ni, zaprti so pogosti, odprti pa so organizmi.

Sistem opišemo s **termodinamskimi spremenljivkami**. To so temperatura, tlak, volumen in množina snovi (mol). Pri konstantni vrednosti spremenljivk je sistem v določenem stanju.

T, p, V in količino snovi v sistemu so funkcije stanja - odvisne so le od začetnega in končnega stanja, ne pa tudi od poti, po kateri smo prišli do končnega stanja. Toplota je energija, NI pa funkcija stanja! Ker je odvisna od tega, kako pridemo v končno stanje (drugačna je za sisteme, kjer je stalni tlak, temperatura,...)

Termodinamika obravnava **makroskopske količine**. To so temperatura, tlak, volumen in količina snovi v sistemu. Podrobne zgradbe sistema ni treba poznati, zanima nas začetno in končno stanje.

Obravnava sistema je statistična. To, kar rečemo, da velja za nek sistem, velja statistično (gledamo povprečja) in ne velja za vsak posamezen del sistema - če je predavalnica sistem, je ena od spremenljivk velikost posameznika. Izračunali bi povprečno velikost, vendar je ljudi, ki so visoki natanko toliko, dejansko zelo malo.

Če hočemo, da statistični model deluje, moramo imeti dovolj veliko količino elementov; da lahko govorimo o statistični signifikanci. Pri kemijskih reakcijah to ni problem, saj je količina elementov v enem molu molekul ogromna (6 krat 10^{23}).

Enota za energijo je J/mol. Gre za energijo neke določene količine snovi, ki je v sistemu.

Notranja energija - v določenem stanju ima vsak sistem določeno notranjo energijo, ki je vsota kinetičnih energij vseh molekul v sistemu (upoštevati je treba translacijo, rotacijo in vibracijo) in vsota energij vezi med njimi.

Zaradi kompleksnosti sistema je notranjo energijo navadno zelo težko (ali nemogoče) izračunati. Izjema so žlahtni plini (ni molekul, le atomi, zato tudi ni rotacije in vibracije ter vezi med molekulami). Notranja energija 1 mola žlahtnega plina je $3/2 RT$.

Osnova termodinamike so **termodinamski zakoni**. Nastali so na osnovi izkušnje (opazovanj). Ni enačb, na kateri bi lahko določili osnovne termodinamske zakone, saj so tako fundamentalni, da izhajajo iz čistega opazovanja - ni bolj fundamentalnih pravil in z njimi povezanih enačb, iz katerih bi lahko izpeljali te zakone.

PRVI ZAKON TERMODINAMIKE - celotna energija izoliranega sistema je konstantna, lahko pa znotraj sistema spremeni svojo obliko. Na preprost način to pomeni, da energije ni mogoče ustvariti ali uničiti (torej **ohranitveni zakon**).

Pišemo ga $dE = Q + A$.

Če pride do spremembe notranje energije sistema (E), se to zgodi tako, da sistem okolici odda oz. odvzame toploto (Q), ali da sistem opravlja dela na okolici ali okolica na sistemu.

Predznake gledamo vedno s stališča sistema - če je toplota pozitivna pomeni, da je sistem dobil toploto, če je opravil delo na okolici, ga je zgubil in je delo negativno,...

1. *izolirani sistemi* - notranja energija je konstantna
2. *zaprti sistemi* - energijo, ki jo dobi sistem ali okolica, ga sistem/okolica izgubi
3. *odprti sistemi*

Entalpija - navadno gledamo zaprte sisteme, ki opravijo delo na okolici ($dE = q - w$). Če je naš sistem reakcija, nas zanima sprememba sistema. Toploto, ki se izmenjuje, lahko merimo (jo izračunamo), delo pa ne poznamo, zato nam merjenje toplote še ne pove veliko o energijskih spremembah v sistemu. Zato so uvedli novo funkcijo - entalpijo.

Če želimo nekaj uvesti moramo ponavadi postaviti neke predpostavke, v tem primeru: **T** in **p** sta konstantna, edino delo (**w**) ki se opravi, pa je povezano s spremembo volumna. Zato lahko prvotno enačbo zapišemo kot $dE = q(\text{pri stalnem tlaku}) - p \times dV$.

Reakcijo torej moramo izvesti pri stalnem volumnu (bombni kalorimeter). Če tam izmerimo T, dobimo **dE**.

Če izpostavimo **q**, potem to toploto, ki se spremeni pri stalnem tlaku, imenujemo **entalpija** in jo označimo z **H**. Če sistem preide iz enega v drugo stanje je tista sprememba poveza s spremembo entalpije. **dH** je toplota, ki jo sprejme ali odda zaprt izotermalni sistem, ki spri stalnem tlaku doživi spremembo stanja, pri kateri se ne opravi nobeno drugo delo kot tisto, ki je povezano s spremembo volumna.

Spremembo entalpije lahko izmerimo v kalorimetru, če delamo pri stalnem tlaku in temperaturi. Če je kalorimeter zelo močen lahko delamo tudi pri stalnem volumnu - potem smo izmerili tudi notranjo energijo.

Pri biokemiji uporabljamo reakcijo kot sistem. Če se toplota sprošča iz sistema je $H < 0$, to so eksotermne reakcije (primer: čaša, v kateri poteka eksotermne reakcije, se greje). Kadar pa gre za absorpcijo toplote iz okolice v sistem, je $H > 0$; to so endotermne reakcije (čaša, v kateri poteka endotermna reakcija, se hladi). Spremembe entalpije so povezane z vezmi. Pri eksotermnih reakcijah se vezi tvorijo, pri endotermnih reakcijah pa vezi razpadajo. Pri vsaki reakciji se vezi tako trgajo kot tudi razpadajo - pri eksotermnih se več vezi tvori (ali se tvorijo močnejše, kot razpadajo)-

Kalorična vrednost hrane - npr. 100g sladkorja zsreza 400 kcal = 1680 kJ.

V telesu energijo dobivamo z oksidacijo hranil (npr. glukoze). Glukoza in kisik nam da CO₂ in vodo, ter energijo.

To energijo zmerimo tako, da v kalorimetru sežgemo glukozo in izmerimo dH. Dobljeno vrednost imenujemo kalorično vrednost hrane.

Entalpija je funkcija stanja, torej je odvisna le od začetnega in končnega stanje. Sprememba entalpije mora biti torej za te dve reakciji enaka:

A ---> D

A ---> B ---> C ---> D

Seveda pa imamo tudi za vmesne reakcije (A--->B, B--->C) neke entalpije.

dH je aditivna količina, njena vrednost za celotno (sumarno) reakcijo je vsota **dH** posameznih delnih (vmesnih) reakcij. To se imenuje **Hessov zakon** in je včasih zelo uporaben.

DRUGI ZAKON TERMODINAMIKE - govori o entropiji. Pri vseh spontanah procesih, se entropija izoliranega sistema povečuj (izoliran sistem = zaprt (odprt) sistem + okolica). Entropija v vesolju narašča. Za razumevanje entropije moramo razlikovati med reverzibilnimi in ireverzibilnimi procesi. Opazovanje narave pokaže, da popolnoma reverzibilnih procesov ni. Primeri:

- kamen pade z višine na tla, nikoli se sam od sebe ne dvigne do izhodišča
- nihalo se sčasoma vedno ustavi, ne more večno nihati ali spontano ponovno zanihati

- če segrejemo en konec kovinske palice se temperatura sčasoma izenači po dolžini palice, nikol pa se spet spontano ne razdeli (da bi ponovno dobili konec palice toplejši kot drugi).
Zakaj ireverzibilnost? Ker tista energija, ki je bila razkopičena (npr v kamnu) se je na dnu razgubila in je ne moremo dobiti nazaj. Energija gre predvsem na račun nekih deformacij (npr. tal) in pa v obliki toplote.

Kljub temu, da povsem reverzibilnih procesov ne poznamo, si take procese lahko zamislimo. Če gre ta proces neskončno počasi, s čisto majhnimi spremembami, potem poteka proces skozi številna ravnotežna stanja, kakor brez izgub. Npr. če z batom zelo počasi stiskamo in spuščamo plin (gre sprememba tlaka proti 0) si lahko zamislimo, da se bližamo reverzibilnosti.

Toplota nasploh ni funkcija stanja (odvisna od tlaka in temperature); pri teh navidezno reverzibilnih spremembah pa je toplota funkcija stanja. Imenovali so jo **entropija**. Enota je **J/mol K**.

Za reverzibilne procese velja, da je sprememba entropije enaka spremembi entropije sistema + spremembi entropije okolice. V tem primeru je to nič.

Pri realnih procesih, ki so ireverzibilni, je celotna sprememba entropije vedno večja od nič. Entropija je tisti del energije, ki se pri realnih procesih izgubi, kar povzroči, da realni procesi niso spontani oz. reverzibilni.

Entropija vesolja, ki je izoliran sistem, se povečuje (spremembe v vesolju so spontane; nič od zunaj ne dovaja dodatno energijo). To vodi v entropijsko smrt vesolja - popolnoma enakomerna razporeditev vseh delov, torej bi bilo vesolje mrtvo.

Kljub temu se lahko lokalna entropija tudi zmanjša - npr. ko se lokalni delci združijo v delce, tam je ureditev zelo velika.

Boltzmann je povezal entropijo z verjetnostjo določenega stanja (urejenostjo sistema!). Tisto stanje, ki je manj urejeno, kjer je možno več različnih razporeditev elementov sistema, je bolj verjetno. To je formuliral tako, da je entropija funkcija od w (w = število vseh možnih različnih stanj).

Stabilni sistemi so **neurejeni sistemi!** Urejeno stanje je najmanj verjetno, torej tudi najmanj stabilno - spontano težimo k neurejenosti. Za urejanje sistema potrebujemo **energijo**, in sicer **enako količino energije, kot bi jo potrebovali sproti za ohranjanje urejenega stanja!**

Neurejeno stanje lahko definiramo tudi kot sistem, v katerem imajo vsi elementi sistema bolj ali manj enako okolico (moral bi imeti, v teoriji, popolnoma enako).

Splošni pogled na entropijo - entropija je meja za kaos, kaos pa je tisto, kar je spontano. Velika urejenost omogoča veliko informativnost in majhno entropijo (npr. močno urejena molekula DNA ali urejenost v povedih).

Zakaj so procesi ireverzibilni? Predvsem zato, ker se različne oblike energije spreminjajo v druge in na koncu se vse oblike (vsaj delno) spremenijo v toploto. Če stisnemo plin povečamo tlak in povečamo temperaturo (molekule zaradi impulza sile hitreje potujejo naokoli).

Če plin segrejemo z grelcem, lahko tudi povečamo temperaturo. Gibanje je torej večno, kaotičnost tega gibanja pa se ni nič zmanjšala (v primeru stiskanja plina se je kaotičnost nekoliko zmanjšala, saj smo premaknili molekule plina v nekoliko bolj urejeno pozicijo s stiskanjem).

Toplota je torej manj usmerjena (manj kaotična) energija in ima zato slabši učinek kot mehanska energija, ki je bolj usmerjena.

Drugi zakon termodinamike:

Left to themselves, things tend to go from bad to worse (Murphy).

When things just can not get any worse, they will. (Chisholm).

Everything put together falls apart sooner or later (Simon).

TRETJI ZAKON TERMODINAMIKE - entropija idealnega kristala pri absolutni nični je enaka nič. V gre le za razširitev 2. zakona - pri absolutni ničli dosežemo pri idealnem kristalu popolno urejenost. Nujno potrebujemo idealni kristal! Če je dipolni moment velik je možna samo razporeditev molekul v kristalu in je entropija nič (torej popolna urejenost).

Če pa kristal ni idealni je dipolni moment bistveno manjši in se lahko elementi razporedijo na različne načine in tretji zakon termodinamike zanj ne velja.

Spontanost procesov - procesi, pri katerih je $dS > 0$. Ta kriterij ni tako praktičen, ker moramo upoštevati sistem in okolico (ki je zelo neobvladljiva). Zato si želimo najti takšno obliko S, ki bi se nanašala samo na sistem (nadomestiti hočemo dS okolice z nečim, kar je značilno za sistem). To naredimo tako, da upoštevamo, da je dS okolice enaka dQ okolice, ta pa je enak $-dH$ sistema (toliko, kolikor je toplote okolica dobila, je je v obliki entalpije šlo iz sistema).

Dobimo, da je **dH sistema = $-T \times dS$ sistema**

Definiramo **dG sistema**, to je **sprememba proste entalpije sistema**. Ta je enaka spremembi entalpije sistema minus temperatura krat sprememba entropije sistema.

$dG(\text{sistema}) = dH(\text{sistema}) - T \times dS(\text{sistema})$.

V tej enačbi ni več okolice. Če je sprememba proste entalpije sistema manjša od 0, se prosta entalpija zmanjšuje, na koncu ima manj energije kot na začetku in je sistem spontan.

8.3.2011

Spontani procesi (tečejo sami od sebe oz. obstaja tendenca, da bi tekli sami od sebe) so tisti, pri katerih je sprememba proste entalpije manjša od nič (prosta entalpija se zmanjšuje). Te spontani težijo k manjši energiji. Prosta entalpija sistema je tisti del energije sistema, ki se lahko uporabi za neko delo (lahko jo izkoristimo - zato ji rečemo "prosta").

Če v nekem procesu preide sistem iz stanja 1 v stanje 2, velja **$G_2 - G_1 = dG$** . Pri tem imamo tri možnosti:

- $dG < 0$; prehod iz stanja 1 v stanje 2 je spontan in obraten proces ni spontan
- $dG > 0$; količina energije v sistemu se povečuje - energijo moramo dovajati v sistem, ker ta proces ni spontan. Obraten proces je spontan.
- $dG = 0$; nič več se ne dogaja. Energija v sistemu se ne spreminja in je sistem v ravnotežju (sistem je v ravnotežju takrat, ko ne obstaja tendenca za spremembo energije).

Spontan proces more voditi v zmanjševanje proste entalpije, dG mora biti torej negativna, dS pozitivna in dH negativna. Čim več toplote sistem izgubi in čim bolj se pri tem spremeni iz urejenega v neurejenega, vse to vodi v večjo stabilnost sistema.

dG ki je negativna pa še ne zagotavlja, da bo reakcija dejansko potekla z neko merljivo hitrostjo v smeri zmanjšanja G; pomeni zgolj, da obstaja tendenca, da se to zgodi, še vedno pa lahko obstajajo določene ovire, ki ta prehod preprečujejo.

Organizmi kot sistem - sistemi težijo k čim manjši energiji (entalpiji) in čim večji neurejenosti (entropiji). Organizmi pa so zelo urejeni! Gradijo kompleksne molekule, imajo visoko organizirano strukturo (tkiva, organi), porabijo veliko hrane (energija gre v sistem). Iz vsega tega lahko rečemo, da se entropija ne povečuje (kar je drugače značilno za spontane procese), ampak se spreminja v negativno smer (entropija se zmanjšuje), zato tak proces ni spontan.

Celotna termodinamika je postavljena za zaprte sisteme, organizem pa je odprti sistem - z okolico izmenjuje materijo in energijo. Kljub temu, da se entropija sistema organizma zmanjšuje, se dS in dH okolice povečujeta. In ker je organizem odprti sistem je pri obravnavanju treba vzeti organizem in njegovo okolico. Organizem postaja lahko bolj urejen, hkrati pa postaja okolica manj urejena. Na račun povečanja entropije okolice lahko sistemi dosežejo večjo organiziranost.

Tudi človek je na nek način stroj. Hrana pride noter ---> metabolizem ---> delo ven! Energija (hrana), ki pride noter, gre tudi ven (v degradirani obliki, večinoma v obliki toplote, ki je 'manjvredna' energija).

Entropija je pomembna pri **hidrofobnih interakcijah**. Hidrofobne molekule v vodi rade ostajajo skupaj. Zato, ker če sta hidrofobni molekuli ločeni, se mora voda urediti okrog vsake molekule posebej, kar zahteva od nje večjo urejenost. Če pa sta molekuli skupaj kot sistem, je urejenost vode manjša, ker se uredi manj molekul vode. Entropija vode je torej v primeru, ko sta hidrofobni molekuli skupaj, večja; čeprav je entropija nepolarnih (hidrofobnih) molekul v tem primeru manjša, vendar je prispevek vode večji kot prispevek nepolarnih molekul.

Kemijska reakcija kot sistem - reaktanti se spreminjajo v produkte. Vse reakcije ponavadi smatramo za reverzibilne, tudi tiste, katerih ravnotežje je močno pomaknjeno v eno smer.

Tri možnosti:

- $dG < 0$; reaktanti se spontano spreminjajo v produkte, v ravnotežju je produktov več kot reaktantov
- $dG > 0$; produkti se spontano spreminjajo v reaktante, v ravnotežju take reakcije je več reaktantov
- $dG = 0$; nič več se ne spreminja, sistem je v ravnotežju in ni tendence za spremembo. Vendar pa se moramo zavedati, da gre za dinamičen sistem in se reaktanti stalno spreminjajo v produkte in obratno. Reakcija torej še vedno teče, vendar v obe smeri enako hitro in se konc. reaktantov in produktov ne spreminja - pravimo, da smo v ravnotežju.

Velja tudi, da je sprememba entalpije reakcije enaka seštevku tvorbenih entalpij (**dH_f**) produktov minus seštevek vseh tvorbenih entalpij reaktantov. Sprememba entropije reakcije je enaka seštevku entropij produktov minus seštevek entropij reaktantov.

Če želimo dve reakciji primerjati, jih moramo izvesti pod istimi pogoji. Razmere moramo torej **standardizirati** - $T = 25\text{ C}$, $p = 101\text{ kPa}$, količina snovi = 1 mol/l .

Fiziološko standardno stanje - $pH = 7,0$. Če pri standardizirani kemijski reakciji dodamo proton (katerega konc. mora biti tudi 1 mol/l), se pH močno spremeni proti ničli. Zato spremenimo standardno stanje v fiziološko standardno stanje tako, da proton odvezamo.

Primer reakcije: $C + O_2 \leftrightarrow CO_2$

- $dH < 0$; sistem zgublja energijo, toplota gre iz sistema v okolico, reakcija je eksotermna, več vezi se tvori kot razbija
- $dS > 0$; entropija sistema se povečuje, urejenost se zmanjšuje - reaktanti so precej dobro ločeni med seboj, ker je en v trdnem (C) in drug v plinastem (O_2) stanju, je urejen sistem. Produkt (plin CO_2) pa je

bolj kaotičen sam po sebi, kar je v skladu s pozitivno entropijsko spremembo.

- $dG < 0$; reakcija je eksergonska - reakcija teče spontano iz reaktantov v produkte.

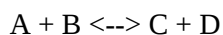
dH je povezana z vezmi. Nastanek vezi je vedno eksotermen proces, razpad pa endotermen.

dS je povezana z urejanjem sistemu. Praviloma se S povečuje, če gremo iz bolj kompleksnih spojin v preprostejše, iz manj spojin v več, povezano je tudi s spreminjanjem agregatnega stanja. V smeri trdno --> tekoče --> plinasto se entropija povečuje.

dG pove o spontanosti in smeri reakcije. Če je $dG < 0$, je reakcija eksergonska in spontano teče od reaktantov do produktov, tekla pa bo toliko časa, da se bo G zmanjšal do vrednosti 0 in bo sistem v ravnotežju ($G = 0$); v ravnotežju bo več produktov kot reaktantov. Če je $dG > 0$ je reakcija endergonska, spontano teče od produktov do reaktantov, dokler ne pridemo do ravnotežja, kjer bi imeli več reaktantov kot produktov.

To je glavna razlika med eksergonskimi in endergonskimi reakcijami - pri eksergonskih je v ravnotežnem stanju več produktov, pri endergonskih pa več reaktantov.

KEMIČNI POTENCIAL (mi - u)



V sistemu so štiri komponente, od katere vsaka prispeva svoj delež dG k celotni spremembi proste entalpije. Če se količina ene od štirih komponent spremeni, potem lahko definiramo kemijski potencial - $u = dG/dn$. Kemični potencial neke komponente je njen prispevek pri spremembi celotne G . Splošna enačba entalpije velja za standardizirane razmere in je odvisna od aktivnosti posameznih produktov (glej slide).

Uporaba splošne enačbe

a) Standardno stanje je tisto, pri katerem je aktivnost vseh komponent enaka 1.

b) Ravnotežno stanje - tam so v igri ravnotežne koncentracije, to so tiste, ki veljajo ob ravnotežnem stanju. V ravnotežju tudi, velja, da je $dG = 0$.

Velja tako kot prej:

- če je $dG < 0$ je $K > 1$ in je reakcija eksergonska. Štartamo z 1 mol/l reaktantov in produktov (standardne razmere), poženemo reakcijo, ki bo tekla do ravnotežja, dobili bomo več produktov kot reaktantov in bo K večji od 1.

- če je $dG > 0$ je $K < 1$ in je reakcija endergonska, v ravnotežju bo več reaktantov kot produktov.

- če je $dG = 0$ smo že v ravnotežju in je konstanta enaka 1.

dG nam pove, kako daleč so standardne koncentracije od ravnotežnih, kam bo reakcija tekla, da pridemo iz standardnega stanja v ravnotežno, če štartamo s koncentracijami 1 mol/l reaktantov in produktov.

Vpliv pH na dG in odnos dG (v standardnem) : dG_0 (v standardnem fiziološkem)

Pri fiziološkem stanju ne sme biti konc. H^+ enaka 1 mol/l, ker bi to močno znižalo pH.

Vpliv T na spremembo proste entalpije - pri majhnih temperaturnih spremembah spremembe dG niso velike, vendar so vseeno pomembne, ker vplivajo na ravnotežje.

dG je odvisna od predznaka dH :

1. Eksotermne reakcije - če je dH negativen je dG pozitiven in se ravnotežje pomakne v levo (nastaja manj produktov), v okolico se sprošča manj toplote.

2. Endotermne reakcije - če je dH pozitiven je dG negativen, ravnotežje se pomakne v desno (nastaja več produktov), v okolico se sprošča manj toplote.

To je v skladu z **Le Chatelier-jevim principom**: sistem se odzove na motnjo tako, da jo kompenzira (njen vpliv čim bolj zmanjša!). Če dvignemo temperaturo eksotermne reakcije, kjer se temperatura tako ali tako porablja; zato se sistem odzove tako, da generira manj toplote, ker se bo ravnotežje pomaknilo v levo.

Ravnotežno stanje - pri njem je $dG = 0$ in je G minimalna.

Sistem želi biti v ravnotežju v vseh svojih delih čim bolj enak. Razlog je zato, ker je entropija tako največja. To pomeni, da so tudi kemični potenciali v vseh delih sistema enaki. V ravnotežju je vsota dG produktov enaka vsoti dG reaktantov. Energija reaktantov je enaka energiji produktov.

Izenačijo se proste entalpije, ne pa količine reaktantov in produktov (potem bi imeli vedno v ravnotežju vse enako in sploh ne bi mogli govoriti o eksergonskih in endergonskih reakcijah).

Predavanje 8 ; 8.3.2011 / Matjaž Zorko

KEMIČNO RAVNOTEŽJE

Kemično ravnotežje ima kemične, kinetične in termodinamske lastnosti.

Kemične lastnosti kemičnega ravnotežja - Če imamo dve obliki glukoze, potem obstaja neko ravnotežno stanje, pri katerem je beta-D-glukoza približno dvakrat več kot alfa-D-glukoze. Ne glede na začetno stanje (razmerje med alfa in beta) se bo v ravnotežju vzpostavilo stanje, ko bo razmerje 2 : 1.

Pri računanju konstante dobimo neko številko, ki je le približna, če je v računu koncentracija, ne aktivnost udeležencev. Reakcije tečejo tako dolgo da pridejo v ravnotežje, oz. imajo tendenco, da bi prišli v ravnotežje.

Kinetične lastnosti kemičnega ravnotežja - ravnotežje nastopi, ko je hitrost pretvorbe reaktantov v produkte enaka hitrosti pretvorbe produktov v reaktante. Hitrost v desno je odvisna od količine reaktantov, in je enaka $(A) \times (B) \times k$ pri čemer je k hitrostna konstanta. Ravnotežna konstanta je enaka razmerju hitrostnih konstant reaktantov in produktov.

Ravnotežje NI statično, ampak je dinamično.

Termodinamske lastnosti kemičnega ravnotežja - $N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3$

Kjer imamo opravka samo z čistimi reaktanti je prosta entalpija sistema relativno visoka. Če bi vsi reaktanti zreagirali v čiste produkte (v teoriji), bi bila prosta entalpija še vedno visoka, ampak nekoliko nižja. Ob potekanju reakcije se G niža iz večje količine, ki velja samo za reaktante.

Sistem, ki ima čiste reaktante in čiste produkte je bolj urejen (s stališča entropije), stanje, kjer sta zmešana produkt in reaktant, pa je bolj kaotičen. Zato sistem ni linearen, ampak poteka po krivulji (glej slide). Ko

se reaktanti spreminjajo v produkte se prosta entalpija zmanjšuje, dokler ne pride do minimalne vrednosti - tam je entropija največja in energija sistema najmanjša.

Pričakujemo lahko da, ne glede kje štartamo reakcijo (bodisi s čistimi reaktanti ali s čistimi produkti), bo obstajala tendenca, da se sistem pomakne v stanje, kjer je entropija maksimalna in prosta entalpija minimalna.

Prehod reaktantov v produkte ponavadi ponazarjamo z **energijskimi profili reakcije**. Če ima reaktant večjo aktivacijsko energijo kot produkt je to endergonska reakcija.

Vpliv raznih dejavnikov na kemično ravnotežje

1. vpliv koncentracije (aktivnosti) - če spremenimo koncentracijo se morejo koncentracije produktov in reaktantov prilagoditi, da konstanta K ostane ista

2. vpliv pH (samo, če je proton v reakciji)

3. vpliv T - endotermne reakcije pomenijo, da K s T narašča in se ravnotežje ob naraščajoči T pomika v desno, pri eksotermnih pa je obratno (ravnotežje se pomika v levo).

Predavanje 9 ; 11.3.2011 / Damjana Rozman

SKLOPLJENE REAKCIJE IN PRETOK ENERGIJE V ŽIVEM SISTEMU

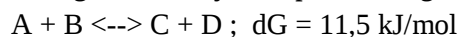
V organizmu sta dva glavna procesa, ki se dogajata ves čas življenja - **katabolični procesi** (razgradnja; glavni pomen je proizvodnja kemične energije, ki se v organizmu tvori in prenaša v obliki ATP in drugih energetsko bogatih spojin, npr. NADH) in **anabolični procesi** (izgradnja)

Osnova kataboličnih procesov je, da iz hranil proizvedemo produkte, ki jih porabimo v anaboličnih procesih za izgradnjo makromolekul.

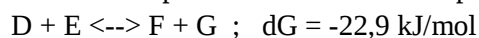
Kemična energija in vloga ATP - Če je prosta entalpija manjša od 0, je reakcija eksergonska (poteka spontano od reaktantov proti produktom), če je večja od 0 je endergonska.

Če breme vlečemo na hrib moramo dovajati energijo, če ga spustimo pa se sprošča.

Sklopljene reakcije - pogoj za uspešno sklopitev so skupni intermediat (D) in da reakciji potekata v istem kompartmentu (celice). Skupna reakcija mora biti eksergonska (reakcija, ki se sklopi, mora biti bolj eksergonska, kot je bila prva endergonska).

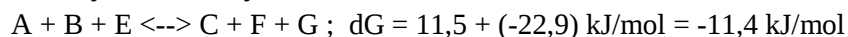


V istem kompartmentu ob istem času poteka:



Torej se bo D, ki bo v prvi reakciji nastajal, v drugi ves čas porabljal. Ker je spodnja reakcija pomaknjena v desno je to gonilna sila za zgornjo reakcijo, da se tudi pomika v desno (ker se D stalno porablja)

Reakciji lahko seštejemo:



Če imamo pozitivno vrednost konstante ravnotežja nam to pomeni, da imamo več produktov kot reaktantov in je torej reakcija pomaknjena v desno!

Še en primer:

Glukoza + Pi \leftrightarrow glukoza-6-fosfat + H₂O

ATP + H₂O \leftrightarrow ADP + Pi

Skupna reakcija: Glukoza + ATP \leftrightarrow glukoza-6-fosfat + ADP

Vsota je dovolj eksergonska in vrednost konstante je pozitivna (večja od 1; torej je reakcija pomaknjena proti produktom).

Konkreten pomen te reakcije: glukoza ne more vstopiti v metabolične reakcije, dokler se ne aktivira (fosforilira) in s tem pridobi neko kemično vezano energijo, s katero lahko vstopi v nadaljne katabolične procese.

Iz sklopljenih reakcij s skupnimi intermediati lahko glukoza tvori piruvat. Proces je eksergonski.

Hidroliza ATP - hidroliza ATP ne poteka po nepotrebem in ne poteka hitreje, kot to zahtevajo potrebe - za to poskrbi visoka energetska bariera. Razlika med prosto entalpijo reaktantov in produktov je približno 30 kJ/mol ($\Delta G = -30$ kJ/mol). To je močno eksergonska reakcija.

Kaj daje molekuli ATP lastnosti, da se pri njeni hidrolizi veliko proste entalpije sprosti? Na sredini molekule ATP je molekula riboze, nanjo je z N-glikozidno vezjo vezan adenin, na drugi strani pa fosfatni del, kjer imamo lahko adenozin monofosfat, difosfat ali trifosfat. Ni sama hidroliza ATP tisto, kar daje energijo, ampak je to tisti fosfat, ki se sprosti in se veže drugam - ta da energijo. Molekula ATP se tega fosfata rada znebi, ker ima štiri minus naboje, ki se odbijajo; molekula v bistvu komaj čaka, da bo razpadla, saj bo potem bolj stabilna kot zdaj, ko ima štiri negativne naboje na zelo majhni površini. Med ribozo in prvim fosfatom je estrska vez (fosfoestrška), vse ostale pa so anhidridne (fosfoanhidridne), ker so nastale z odcepom vode iz dveh fosforskih kislin.

Prosta entalpija hidrolize ATP ni negativne zaradi razcepa vezi P-O, ampak zaradi produktov reakcije, ki imajo nižjo entalpijo kot reaktanti.

V večini reakcij ATP ne sodeluje kot prost ATP, ampak v obliki magnezija MgATP(2-) (ker je v celici veliko Mg²⁺ ionov, zato kompenzirajo dva izmed štirih negativnih nabojev ATP⁴⁻ molekule).

Štirje vzroki za $\Delta G < 0$ pri ATP:

1. Resonančna stabilizacija fosfatnega iona - na fosfat so vezani štiri kisiki in vsi kisiki imajo enako količino negativnega naboja, zato je lahko H⁺ proton kjerkoli.
 2. Odboj nabojev na fosfatih
 3. Produkt sprošča H⁺, ki ga voda 'pobere' (koristno uporabi)
 4. Hidratacija produkta (anorganski fosfat Pi in ADP sta bolj obdana z vodo kot ATP - bolj hidratirana)
- Vseeno pa je pomembno, da vemo, da bistvo ni v hidrolizi ampak v prenosu fosfatne skupine.

Pi, ki je vezan v ATP ima manjšo število resonančnih oblik kot prost Pi, ker ga stabilizira dodatna vez. Več resonančnih oblik pri prostem Pi pa pomeni večjo stabilnost. Pi je tetraedrična molekula.

Molekule, ki so nekje v ravni ATP ali višje, so **visokoenergetske molekule**. Molekule, ki imajo nižjo prosto entalpijo (npr. glukoza-6-fosfat ali glicerol) pa **nizkoenergetske molekule**.

Če pri hidrolizi ATP sprostimo 30,5 kJ/mol energije, potem moramo za sintezo ATP dovesti 30,5 kJ/mol energije.

Fosfokreatin je pomemben pri nastanku ATP v delujoči progasti mišici. Pri tem nastane kreatin. Glavni pomen fosfokreatina za tvorbo ATP je v delujoči progasti mišici, ki zelo hitro porablja ATP. V mirujoči mišici je koncentracija ATP zelo velika (8 mmol), v primerjavi z eritrocitom (2,3 mmol) ali hepatocit (3,4 mmol). Ko se zaloge ATP v delujoči mišici začnejo porabljati pa je fosfokreatin tisti, ki lahko na ravni substrata tvori ATP iz ADP.

Nekateri organizmi (kresničke) pretvarjajo kemično energijo ATP v svetlobo. Bioluminiscenca se uporablja tudi v medicinski biokemiji, kjer potrebujemo veliko občutljivost substrata (ki ga je zelo mala). Ko reakcija poteče dobimo svetlobni signal, ki ga lahko z optičnimi čitalci odčitamo.

Fotosintetski avtotrofi izkoriščajo sončno energijo, da tvorijo organsko energijo. Heterotrofi se prehranjujejo tako z avtotrofi kot s heterotrofi.

ATP vklopimo na meji med kataboličnimi in anaboličnimi procesi. Katabolični ga tvorijo, anabolični pa porabljajo - ATP je torej nekakšna skupna valuta (ta izraz je Rozmanovi zelo všeč; uporabi ga na ustnem izpitu, če fašes njo!).

Količina ATP, ki se ustvari, pa ni uporabna samo za anabolizem, ampak tudi za različno delo (npr. aktivni transport, premikanje,...). Različni proteini lahko kemično energijo ATP pretvorijo v mehansko.

- ATP predstavlja kemično povezavo med katabolizmom in anabolizmom. Je kot energijska valuta živih celic. Eksergonska pretvorba ATP v ADP in Pi je sklopljena s številnimi endergonskimi reakcijami in procesi.

- čeprav je direktna hidroliza ATP lahko izvor energije pri nekaterih procesih, kot so konformacijske spremembe proteinov je običajno prenos fosfatne skupine tisti del procesa, ki poveže energijo razpada ATP z endergonskimi pretvorbami substratov.

- da ATP ohrani visok potencial prenosa fosfata morajo biti koncentracije ATP dosti nad ravnotežnimi koncentracijami.

Predavanje 9 ; 11.3.2011 / Damjana Rozman

TOPNOST

Veliko organizmov imajo trdna tkiva, ta trdna tkiva pa sestavljajo minerali. Funkcija teh tkiv je lahko drugačna: opora, gibanje, zaščita, grizenje, zaznavanje zvoka, težnosti in ravnotežja,...

Glavne vrste mineralov v živem svetu:

- kalcijev karbonat (CaCO_3)
- različni kalcijevi fosfati, predvsem apatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
- silicijevi in železovi oksidi (predvsem SiO_2 in Fe_2O_3)
- kovinski sulfidi, sulfati in oksalati

Apatit je prisoten pri zobeh, oklepu, ali rogih (nosorog), kalcijev karbonat (kalcit) pri morskih organizmih,...

Minerali v slušnih koščicah (apatit), v ravnotežnem organu (kalcit), za orientacijo - zaznavo električnega polja (magnetit) in pri shranjevanju železovih ionov (železov hidroksid).

Topnostni produkt - o njem govorimo takrat, kadar imamo dve fazi (dve snovi) - trdna, ki jo raztapljamo v tekoči. Obstaja tudi tretja (plinasta) faza. Če imamo snov, ki je prisotna v več fazah, lahko sistem opišemo kot v ravnotežju, če so kemijski potenciali v vseh fazah enaki (kemijski potencial = prosta entalpija na mol).

V raztopini so možne le koncentracije, ki so manjše ali enake koncentraciji, ki ustreza kemijskemu potencialu trdne snovi (ne moremo raztapljati v neskončnost). Če presežemo t. i. nasičeno koncentracijo se začne dodatna trdna snov, ki jo bomo v raztopino dodajali, usedati na dno posode in se ne raztaplja več.

Topnostni produkt natrijevega klorida je produkt med koncentracijo natrijevih ionov in koncentracijo klorovih ionov. Ta produkt je enostaven, ker je natrij $1+$ in klor $1-$.

Lastnosti topnostnega produkta:

- če je topnostni produkt presežen, se komponente ne raztapljajo več in tista snov (v našem primeru sol) kristalizira kot oborina. Če bomo dodajali sol, se bo količina oborine večala, če pa bomo dodajali vodo, bomo lahko nekaj dodatnega soli še raztopili.

- vrednost topnostnega produkta določa, koliko topljenca se lahko raztopi v neki količini topila

- organizem je sestavljen iz mineralov. Za snovi, ki so sestavljeni iz mineralov, mora biti topnostni produkt stalno presežen (da se kosti ne bi raztapljale). Če torej hočemo imeti v telesu stabilne minerale, mora biti v njihovi okolici koncentracija ionov, ki minerale sestavljajo taka, da ustreza topnostnemu produktu in se minerali niti ne obarjajo niti ne raztapljajo.

Primer hidroksiapatita in fluoroapatita v zobeh in kosteh

Molekula kalcijevega hidroksiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - bi razpadla na 10 Ca^{2+} ionov, 6 PO_4^{3-} in 2 OH- iona. Nato lahko napišemo topnostni produkt:

$$K_s = \text{Ca}^{10} \times \text{PO}_4^6 \times \text{OH}^2.$$

Za kalcijev apatit - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ - pa je topnostni produkt:

$$K_s = \text{Ca}^{10} \times \text{PO}_4^6 \times \text{F}^2$$

Vrednosti K_s sta zelo majhni, povesta pa, da je fluoroapatit 10 tisočkrat slabše topen (bolj stabilen) kot hidroksiapatit. Zato skušamo s tabletami natrijevega fluorida pri otrocih povečati količino fluoroapatita v zobeh in tako povečati stabilnost zob.

Mineralizacija je pomembna pri celjenju kosti, lahko pa je tudi patološka; npr. ledvični kamni (posledica napačne mineralizacije).

Biom mineralizacija v kosteh in zobeh - ko zaradi dovolj velike konc. ionov presežemo vrednost topnostnega produkta, se prične kristalizacija (obarjanje) mineralov.

Kritični radij kristala je specifična lastnost vsakega kristala. Ko dosega struktura kritični radij, od takrat naprej je kristalizacija spontan proces.

Kristalizacijsko jedro mora imeti take lastnosti, da bo rast kristala spodbudilo.

Primer EPITAKSE - urejene plasti natrijevega urata (sol sečne kisline) pri putiki.

Epitaksa: - naključno organizirane makromolekule lahko sprožijo rast kristala s tem, da privlačijo kovinske ione.

- kisli proteini lahko pomagajo pri orientaciji kristala in tako usmerjajo rast

- makromolekule, ki se lahko prilagajajo obliki površine rastočehga kristala, lahko tako zaustavijo njegovo rast.

Mineralna faza kosti:

- sestoji iz hidroksiapatit karbonata s heksagonalno kristalno strukturo,
- namesto karbonata je lahko tudi kakšen drugi ion
- pri ionih v okolici mora biti vedno dosežen ali presežen topnostni produkt, da se kosti ne raztapljajo.

Predavanje 10 ; 14.3.2011 / Matjaž Zorko

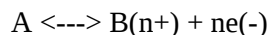
OKSIDOREDUKCIJA

Za oksidoredukcijske reakcije je pomembno, da se med partnerji v reakciji izmenjujejo elektroni. Gre za sklopljene reakcije, pri katerih so elektroni skupni intermediiati.

Kadar imamo sklopljene reakcije imamo opravka z dvema reakcijama, ki ju skupni intermediiat združuje.

Oksidacija je proces, pri katerem se oddajajo elektroni. Ne more biti ločen od **redukcije**, to je proces, kjer se sprejemajo elektroni - elektroni ne morejo izginiti v raztopino; če jih nekaj odda, jih nekaj sprejme.

Oksidacijo lahko opišemo s splošno enačbo:



A je reducent, B pa konjugirani oksidant, ki ima naboj $n+$, n pa je število oddanih elektronov.

Pri redukciji se isti elektroni oksidoredukcijskega para vežejo na neko snov, ki se imenuje oksidant in ga reducirajo v konjugirani reducent.

Imamo dva para - oksidoredukcijska para. En par elektrone odda, drugi pa elektrone sprejme
REDUCENT se oksidira v KONJUGIRANI OKSIDANT. Reducira pa oksidant s tem, da mu da elektrone.

OKSIDANT se reducira v KONJUGIRANI REDUCENT. Oksidira reducent, kateremu elektrone vzame.

Pri sklopljenih reakcijah vedno lahko združimo skupaj dve reakciji in izločimo skupni intermediiat.



V telesu so vse oksidoreduktivne reakcije zelo kompleksne. Zato ponavadi ponazarjamo te reakcije s kovinskimi ioni (npr. Fe in Cu).

Kako vemo, v katero smer teče reakcija? Pogledamo obe reakciji s stališča oddajanja elektronov.

Elektroni bodo tekli k tistemu, ki ima večjo afiniteto za elektrone, torej k tistemu, ki jih raje veže.

Izmerimo oksidoredukcijski potencial. To naredimo z elektrokemijsko celico (galvanskim členom), pri čemer moramo izbrati čim bolj inertne (nereaktivne) žlahtne kovine (tipična je platina) za elektrode, ki

služijo kot prevodniki elektronov. V en prostor damo raztopine Fe^{2+} in Fe^{3+} , na drugo stran pa damo drugo oksidoredukcijsko dvojico (prav tako potrebujemo en vodnik - elektrodo), npr. mešanico Cu^+ in Cu^{2+} ionov.

Reakcija teče samo, če lahko elektroni pridejo preko elektrod. Povežemo dva kompartmenta z električnim vodnikom, potrebujemo pa tudi elektrolitski ključ - to je cevka, običajno napoljena z geloznim polnilom, v katerem je običajno nasičena raztopina soli (ponavadi KCl). To rabimo zato, ker mora biti vsak električni krogotok sklenjen.

Ne sredino vodnika postavimo voltmeter. Povedal nam bo, ali elektroni potujejo in v katero smer bodo potovali.

Če imamo tak sistem in opazimo, da teče tok iz raztopine železovih ionov v raztopino bakrovih ionov, potem teče reakcija v tisto smer - železo oddaja ione in je reductent. Elektroni v tej elektrokemijski celici potekajo k tistemu paru, ki ima večji **oksidoredukcijski potencial** (večjo afiniteto do elektronov).

Dogovorjeno je bilo, da je standardni oksidoredukcijski člen **vodikov polčlen**. Torej če želimo vsak posamezni potencial oksidoredukcijske dvojice zmeriti, moramo narediti galvanski člen, kjer je na eni strani standardni vodikov polčlen, na drugi strani pa drugi oksidoredukcijski par, katerega potencial skušamo določiti. Po dogovoru je potencial vodikovega polčlena enak 0, to pa velja v standardnih razmerah ($T = 25$ stopinj C, $p = 1$ bar, koncentracija (aktivnost) protonov mora biti 1 mol/l in tlak plina, ki ga spuščamo noter, mora biti ravno 1 bar).

Vodik kot plin prihaja v raztopino, v kateri je enkrat molarna HCl - torej imamo 1 mol/l protonov na voljo, ker HCl popolnoma disociira. Zraven je platinasta elektroda, na kateri se lahko elektroni izmenjujejo. Takšen polčlen pod temi razmerami ima potencial nič.

Na drugi strani je druga oksidoredukcijska dvojica, katere potencial merimo. Če damo tja npr. baker (v koncentracij 1 mol/l, $p = 1$ bar, $T = 25$ stopinj C) smo v standardnih razmerah in merimo oksidoredukcijski potencial tega para. Označimo ga z veliko črko **E**, če gre za standardne razmere pa **E⁰** (E nič). Z voltmetrom izmerimo vrednost tega sistema.

Večji potencial pomeni večjo afiniteto za elektrone. Elektroni torej potujejo v smer večjega oksidoredukcijskega potenciala.

Če delamo v standardnih razmerah, dobimo standardne potenciale. V drugem primeru pa ne! Če bi imeli povsod $\text{pH} = 7$, potem bi izmerili v fizioloških standardnih razmerah in bi bi označili zadevo z **E^{0'}** (E nič črtica).

Izmerjeni oksidoredukcijski potenciali so lahko pozitivni ali negativni. To zato, ker tudi H elektroda, ki ima vrednost 0, pri nekaterih členih vleče elektrone k sebi.

Oksidoreduktivne dvojice lahko glede na njihove potenciale razvrstimo v tabelo glede na naraščujoče potenciale. Pri $\text{pH} = 0$ (ker je 1 mol/l protonov) je vodikov potencial enak 0; vsi z večjimi potenciali imajo pozitivne potenciale, vsi z manjšimi potenciali pa negativne potenciale. S spreminjanjem koncentracij se spreminja tudi potencial.

Standardni vodikov polčlen je edini pravi standard (ima vrednost potenciala 0), je pa njegova uporaba dokaj nepraktična (potrebujemo vodikovo bombo s tlakom 1 bar). Zato se uporabljajo tudi pomožni standardni polčleni, od katerih je najbolj znan **kalomelov polčlen**, ki ga sestavljata Hg_2Cl_2 (kalomel) in živo srebro v elementarni obliki (Hg). To je veliko preprostejši člen s stališča uporabe. Standardni potencial tega člena je 0,244 V.

Vsak oksidoredukcijski par, ki ima večji potencial od svojega predhodnika, ima večjo afiniteto do elektronov svojega predhodnika (je boljši oksidant). Tako točno vidim, kam bodo v standardnih razmerah elektroni tekli.

Kadar imamo oksidoredukcijsko reakcijo imamo dve oksidoredukcijski dvojici; elektroni tečejo od dvojice z manjšim potencialom do dvojice z večjim potencialom. Razlika potencialov torej mora govoriti o ravnotežju (eksergonske, ki dajo več produktov, ali endergonske, ki dajo več reaktantov).

Torej morata biti dG in dE povezana.

$dG = -n \times F \times dE$, pri čemer je n število elektronov ki se izmenjujejo, dE razlika med potenciali in F Faradayeja konstanta. Tako lahko izračunamo spremembo proste entalpije v standardnih razmerah. dG odraža delo - delo pri prenosu elektronov preko potencialne razlike dE .

Če smo najprej izračunali standardne potenciale za železo in za baker in ugotovili, da ima železo večji potencial od bakra, potem baker oddaja elektrone in jih železo jemlje. To drži v standardnih razmerah - v realnih razmerah pa se nam lahko potencial vsake od dvojic spremeni, če spreminjamo aktivnosti (koncentracije).

Če bomo količino, ki jemlje elektrone, močno povečali in količino, ki je produkt jemanja elektrone, močno zmanjšali, potem se bo potencial tega polčlena bistveno povečal (v skladu z enačbo).

Od tega, kolikor imamo na voljo oksidanta in konjugiranega reducenta bo odvisno, kam grejo elektroni.

Če drastično povečamo Cu^{2+} lahko dosežemo večji potencial od železa in bodo elektroni potovali od bakra k železu, čeprav v standardnih razmerah velja obratno (železo je reducent).

Vpliv pH na oksidoredukcijski potencial - vpliva samo pri oksidoredukcijskih parih, pri katerih so v reakciji udeleženi protoni. To je možno na dva načina: ali je H^+ direktno oksidant (to je značilno za vodikovo oksidoredukcijsko dvojico; $E = -0,059 \times pH$), ali pa H^+ sodeluje z drugim oksidantom, tako da dejansko v tem primeru reakcije med protoni ne vidimo. Sumarna reakcija za takšen sistem je, da imamo en oksidant (npr. piruvična kislina), ki bo z dvema elektronoma in dvema protonoma dal mlečno kislino (laktat). Oksidant se spreminja v reducent in tudi to je odvisno od pH. Potencial v fizioloških standardnih razmerah je $E_0 - 0,059pH$.

Zavedati se moramo, da je v organizmu ogromna količina oksidoredukcijskih reakcij, od katerih so nekatere ključne za življenje (npr. dihanje - uporabljamo kisik kot terminalni oksidant. Tisti, ki bo na koncu določene elektrone, ki se sproščajo v metabolizmu, prevzel in bo iz njega in teh elektronov nastala voda).

PRIMERI OKSIDOREDUKCIJSKIH REAKCIJ V ORGANIZMU:

1) pretvorba piruvične kisline v mlečno (laktat) pri glikolizi

Piruvat se reducira v laktat. Ta reakcija potrebuje še drug oksidoredukcijski par - v našem telesu imamo koencime, ki prenašajo elektrone; eden od njih je NADH (ali NAD^+ , v oksidirani obliki). Imamo torej dve dvojici, ki imata v fizioloških razmerah nek standardni potencial. Oba sta negativna, torej boljša reducenta od vodika.

NADH bo v standardnih razmerah oddajal vodik, ker je njegov potencial bolj negativen (boljši reducent). Zato bo NADH reducent, piruvat pa bo oksidant.

S spremembo koncentracij, pH ali temperature, se smer reakcij lahko spremeni v skladu z Nernstovo enačbo.

2) dihalna veriga

Pomemben oksidoredukcijski proces za aerobne organizme poteka v mitohondrijih. To je 'dihalna veriga'. Gre za kup proteinov, ki so vloženi v notranjo membrano mitohondrijev in so sposobni prenašati elektrone, nekateri od njih pa tudi protone. Vsak od teh prenašalcev je lahko v dveh oblikah - oksidirani ali reducirani. Vsak od teh prenašalcev torej predstavlja oksidoredukcijski par. V dihalni verigi jih je mnogo, ki si smiselno sledijo eden za drugim.

Naloga dihalne verige so prenašanje elektronov (od NADH ter FADH₂ do kisika) in črpanje elektronov iz matriksa v medmembranski prostor. Končni namen je, da se nastali gradient (razlika v konc. protonov) izkoristi za to, da iz ADP in Pi naredimo ATP in na ta način obnovljamo svoje zaloge ATPja.

Dihalna veriga je zelo kompleksen sistem. Glukoza se s procesom glikolize spreminja v piruvat. Poteče proces oksidativne dekarboksilacije - piruvat se za en C atom skrajša, ostane acetat, ki se združi s koencimom A (Ac-CoA), ta vstopi v Krebsov cikel. Na koncu dobimo NADH in FADH₂ (iz koencimov), ogljiki pa se sproščajo v obliki CO₂.

Te koencimi (NADH in FADH₂) potujejo v dihalno verigo - to so prenašalci elektronov, ki so vezani večinoma na proteine. Te prenašalci so organizirani v več kompleksov, vsak kompleks pa vsebuje več proteinov (vsak od teh proteinov na nek način lahko sprejme elektrone in jih tudi naprej oddaja). Vsak od členov verige ima določen oksidoredukcijski potencial in s tem določeno afiniteto do sprejemanja elektronov.

V verigi so členi razvrščeni po naraščajočem oksidoredukcijskemu potencialu - vsak naslednji člen v verigi ima večjo afiniteto za elektrone in ga zato lahko sprejme od prejšnjega člena. Na koncu pa se proton združi s kisikom (ki smo ga dobili z dihanjem) in nastane voda.

Ker elektroni spontano potujejo po verigi se energija izkorišča za črpanje protonov iz matriksa v medmembranski prostor. Razlika v pH je lahko tudi 3 - 4 enote.

Ti protoni silijo v skladu z gradientom nazaj v matriks. To je bistvo in to se izkorišča skozi ATP sintazo, kjer protoni spontano potujejo nazaj v matriks in s tem dovajajo energijo za sintezo ATP iz ADP in Pi. Samo citohrom a₃ je sposoben oddati (sprostiti) elektrone kisiku, da se združita v vodo.

Predavanje 11 ; 15.3.2011 / Matjaž Zorko

HITROST KEMIJSKIH REAKCIJ

Ravnotežje in vrste reakcij (dogodki pri reakcijah) smo lahko dobro pojasnili z energijskimi profili reakcije. Če poznamo energijske profile, ki predvsem kažejo, kako se spreminja prosta entalpija v sistemu, ko ta prehaja od reaktantov k produktom, vemo, kam bo tekla reakcija in kakšno bo razmerje koncentracij reaktantov in produktov v ravnotežju.

Poznamo eksergonske (produkti so na nižji energijski ravni kot reaktanti, zato obstaja tendenca, da se do ravnotežja reaktanti premikajo k produktom) in endergonske (za razliko od eksergonskih imamo v ravnotežju več reaktantov kot produktov).

Primer reakcije: $H_2 + O_2 \leftrightarrow 2H_2O$

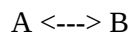
$dG = -460 \text{ kJ/mol}$ (močno eksergonska reakcija) ; $K = 1,7 \times 10^{80}$

Ta reakcija bo tekla do ravnotežja, kjer imamo praktično samo še vodo in skoraj nič več vodika in kisika (ker je tako zelo eksergonska). Reakcija zelo hitro (eksplozivno) steče do ravnotežja.

To, da je reakcija eksergonska (spontana), še ne pomeni, da bo res tekla. Pomeni, da obstaja tendenca, da

bi nastali produkti - v tem primeru vseeno potrebujemo vžigalico za aktivacijsko energijo. Hitrost reakcij in kaj vpliva nanjo je zato zelo pomembno poznati.

Definicija hitrosti reakcij:



Kadar imamo ravnotežno reakcijo in govorimo o hitrosti reakcij se moramo najprej odločiti, v katero smer bomo reakcijo gledali (ker hitrost v eni smeri ni nujno enako hitrosti v drugi smeri). Gledamo ponavadi od reaktantom k produktom.

Koncentracija A se zmanjšuje, koncentracija B narašča. Reakcija teče po krivulji in zdaj lahko izračunamo hitrost.

Hitrost je količina reaktanta, ki se spremeni v določenem času (to merimo v koncentracijah). Ker je A reaktant in izginja, mora biti spredaj predznak minus. $v = -d[A] / dt$.

V vsaki od časovnih točk na grafu pa je hitrost nekoliko drugačna. Hitrost se dejansko zmanjšuje tekom reakcije - se s časom spreminja (v večini primerov).

Hitrost lahko definiramo kot spreminjanje A po času, B po času, C po času ali D po času (če imamo sledečo reakcijo): $A + B \rightleftharpoons C + D$

Hitrost je odvisna od tega, koliko imamo reaktantov (če želita A in B med seboj reagirati morata priti v neposreden stik ena z drugo - se zaleteti. Če mora priti do trkov bo trkov toliko več, kolikor več bomo imeli A in B; večja ko bo torej koncentracija) in še od proporcionalnostne konstante, ki ji rečemo konstanta reakcijske hitrosti (pove, kako uspešni so te trki). Eksponentom **m** in **n** rečemo red reakcije - n je red reakcije z ozirom na reaktant A in m je red reakcije z ozirom na reaktant B.

Red reakcije je praviloma manjši od 3, ni pa nujno enak koeficientom pred reaktanti.

Kadar je zapis reakcije pravi odtis tega, kar se dogaja, rečemo, da so **elementarne**. V tem primeru so redi reakcij (eksponenti) enaki faktorjem, ki nastopajo pred vsakim od reaktantov. Reakcija med vodikom in jodom je reakcija drugega reda (vodik prvega reda + jod prvega reda).

Ko pa združimo H_2 in Br_2 v HBr se izkaže, da ta reakcija dejansko ne poteka tako, kot je napisano - ampak poteka kompleksno, v štirih delnih stopnjah. Zato so redi reakcije popolnoma drugačni in ne ustrezajo faktorjem pred reaktanti - red reakcije je treba torej eksperimentalno določiti. Dobimo kompleksno enačbo za hitrost.

Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije reaktantov za različne rede - hitrost reakcije se različno spreminja če je reakcija različnega reda.

Hitrost je enaka $-d[A]/dt = k [A]^n$.

- če je **n = 0** - pri reakcijah ničtega reda je hitrost neodvisna od aktivnosti oz. koncentracije reaktanta.

Odvisna je samo od konstante k, s koncentracijo pa se nič ne spreminja. Če bi to držalo bi pri koncentraciji 0 že morali imeti neko hitrost! To je problem - ugotovljeno je bilo, da so reakcije ničtega reda posebne reakcije, ki pri zelo majhnih koncentracijah ne ubogajo več pravil za ničti red. Niso torej več ničtega reda ampak nekega drugega reda. Pravila za ničti red veljajo od velikih koncentracij do majhnih, pri zelo majhnih pa ne več.

- če je **n = 1** (reakcija prvega reda) - $v = k[A]$. Odvisnost med hitrostjo reakcije in koncentracijo reaktanta je linearna. Če je konstanta zelo velika se premica dviga bolj ostro. Pri vseh reakcijah prvega reda dvakrat povečamo hitrost, če dvakrat povečamo koncentracijo (za razliko od ničtega reda, kjer lahko povečujemo koncentracijo in ne bo vpliva na hitrost reakcije).

- če je $n = 2$ (reakcija drugega reda) - v tem primeru je odvisnost hitrosti od koncentracije kvadratna (parabolična) in če tukaj povečamo koncentracijo reaktanta za dvakrat se bo hitrost povečala za štirikrat.

Če ne vemo, pod katerim redom reakcija je, potem to ugotovimo s **splošno določitvijo reda reakcije**. Izmerimo hitrost reakcije pri različnih koncentracijah reaktanta in opazujemo odvisnost hitrosti od koncentracije.

Enačbo logaritmiramo, vnesemo vse v diagram in izmerimo naklon premice, ki jo dobimo. Ta naklon je enak n , torej red reakcije. Določimo lahko tudi konstanto k .

Odvisnost koncentracije od časa za različne rede reakcije

- **prvi red** ; zanima nas, kako se s časom spreminja koncentracija reaktanta A. Vemo, da bo koncentracija padala. Napišemo enačbo za hitrost reakcije in jo intergriramo po času od 0 do nekega časa t in hkrati od koncentracije ob času 0 do koncentracije ob času t .

Če nas zanima koliko koncentracije je ob določenem času imamo eksponentno enačbo:

$$[A] = [A]' \times e^{-kt}$$

Pri čemer je $[A]'$ koncentracija ob času nič.

Za reakcijo prvega reda je še ena posebna značilnost - razpolovni čas je neodvisen od začetne koncentracije.

Razpolovni čas je tisti čas, v katerem celotna začetna količina reaktanta pade na polovico svoje začetne vrednosti. Če je začetna koncentracija 150, je razpolovni čas tisti čas, pri katerem je koncentracija 75. Ne glede na to, s kolikšno začetno koncentracijo reaktanta smo imeli opravka, bo koncentracija tega reaktanta pri reakcijah prvega reda padla na polovico začetne vrednosti v času $t = \ln 2/k$.

Vse kar smo naredili za reakcijo prvega reda lahko naredimo tudi za reakcijo ničtega reda ali reakcijo drugega reda.

Pri ničtem redu se količina reaktanta zmanjšuje linearno, medtem ko je razpolovni čas obratno sorazmeren začetni količini reaktanta - ni pa stalen! Več kot imamo reaktanta, daljši bo razpolovni čas. Če imamo pa reakcijo drugega reda je enačba nekoliko bolj kompleksna. Ni linearne odvisnosti, če pa jo prikažemo v recipročnih vrednostih, dobimo linearno odvisnost. Razpolovni čas je proporcionalen obratni vrednosti začetne koncentracije. Čim več je začetne koncentracije, hitreje bo padla ta koncentracija na polovično vrednost.

Molekularnost reakcije - pove, koliko molekul reaktantov mora dejansko sodelovati pri trku, da pride do pretvorbe v produkte. Molekularnost je vedno celo število (za razliko od reda, ki je lahko tudi ulomek).

Poznamo monomolekularne, bimolekularne in trimolekularne reakcije, medtem ko je za tetramolekularne tako majhna verjetnost, da niso znane.

Pri elementarnih reakcijah je molekularnost in red reakcije ista stvar. Če pa gre za drugačne reakcije, ki niso v skladu s tem, kaj napišemo (niso elementarne), to ni isto.

Bimolekularna reakcija je taka, pri kateri se moreta dva atoma (ali dve molekuli) zadeti. Če je elementarna je taka reakcija hkrati tudi reakcija drugega reda.

Reakcije psevdoprvega reda - hidroliza estra v kislino in alkohol bi morala biti reakcijadrugega reda, če bi se ravnali po enačbi. Vendar če to reakcijo analiziramo potem vidimo, da vsi eksperimentalni podatki kažejo, da gre za reakcijo prvega reda. To je zato, ker je koncentracija vode v raztopini tako zelo velika,

da se delež vode, ki se porabi za reakcijo, praktično ne pozna na ogromni količini vode, ki je prisotna. S stališče reakcije je torej reakcija glede na vodo ničtega reda.

V organizmih je veliko takih reakcij, kjer nastopa voda kot reaktant. Ker se to godi v okolju, kjer je veliko vode (do 80 % v celici) so te reakcije psevdo prvega reda.

Red reakcije nam pove, kako se bo hitrost reakcije spreminjala, če bomo spreminjali koncentracije reaktantov. Pri reakciji ničtega reda nič ne dosežemo, drugače pa se nam 'splača'. Pri elementarnih reakcijah nam red reakcije včasih pomaga da določimo, kakšen je mehanizem reakcije.

Če imamo tri reaktante lahko prehod iz reaktantov v produkte prehaja po različnih mehanizmih, na primer:

- vsi trije trčijo in dobimo produkta
- najprej morata reagirati A in B, potem pa trčiti s C, da nastaneta produkta
- najprej se mora reaktant A nekoliko spremeniti, potem pa reagira z B in C in dobimo produkta.

Pomembno je vedeti, kateri del reakcije je hiter in kateri počasen. Celotno hitrost procesa določa najpočasnejši del procesa. Vse ostalo ni pomembno (hitre dele lahko zanemarimo). Reakcija, pri kateri pa se A spremeni, se bo v celoti obnašala kot reakcija prvega reda.

TEORIJE O HITROSTI KEMIJSKIH REAKCIJ:

1. Arrheniusova teorija
2. Teorija trkov
3. Teorija o aktiviranih kompleksih

Arrheniusova teorija

Arrhenius je opazil, da se pri večini reakcij poveča hitrost za 2 - 3krat če se poveča temperatura za 10 stopinj. Pri tem ni bilo pomembno, če je povečal temperaturo iz 10 na 20 ali iz 1000 na 1010 stopinj.

To je strnil v pojem **q10**.

$$q_{10} = v(T_1)/v(T_1 - 10 \text{ st.}) = 2 - 3$$

Hitrost pri temperaturi T1 deljeno s hitrostjo pri 10 stopinj višji/manjši temperaturi.

Predpostavil je:

- zaradi spremembe temperature se spremeni konstanta k,
- molekule reaktantov med reakcijo morajo trčiti. Te trki niso vsi uspešni; obstajajo aktivne molekule (ob trku dajo produkte) in neaktivne (neaktivirane), ki lahko trčijo, a ne dajo produktov.
- le del molekul je v aktivnem stanju, ostale so pasivne. Pasivne in aktivne so v ravnovesju in če dvigne temperaturo bo premaknil ravnotežje proti aktivnim ter povečal število trkov

Empirično je prišel do enačbe $k = A \times e^{-E/RT}$, pri temu je E = aktivacijska energija, to je tista energija, ki premakne 1 mol pasivnih molekul v aktivne. A pa je proporcionalnostni faktor, ki je bil njemu še neznan (kasneje ugotovijo, da je $A = RT/Nh$, pri čemer je h = planckova konstanta.

Iz grafa je lahko določil aktivacijske energije. Hitro mu je postalo jasno da, večje kot so aktivacijske energije, počasneje grejo reakcije - ker pri določeni energiji imamo relativno malo aktivnih molekul in moramo zelo povečati temperaturo, da jih imamo več.

Teorija trkov

V glavnem temelji na opazovanju plinskih reakcij, ker pri plinih vemo, da je tlak odvisen od tega, kako hitro se plini gibljejo. S hitrostjo nekako povemo, kako hitro se bodo te plini (reaktanti) med seboj zaletavali. Večja, ko je hitrost plinskih molekul, večja bo njihova kinetična energija.

Predpostavke:

- molekule so elastične kroglice, ki med seboj trkajo in se potem po pravilih elastičnih trkov tudi odbijajo, če reakcija ni uspešna
- hitrost reakcije je sorazmerna številu trkov, ki so povsem elastični
- uspešni trki so le tisti, pri katerih imajo molekule dovolj veliko energijo. Samo takšni dajo produkt. Višja temperatura pa poveča delež molekul z dovolj veliko energijo. Pri visoki temperaturi imajo vse molekule dovolj veliko energijo in bodo vsi trki uspešni. V tem primeru je $e^{-E/RT}$ enak 1 in je $A = k$. Enačbo so morali še nekoliko popraviti, tako da so upoštevali še sterične razmere. Gre za to, da pri nekaterih reakcijah je vseeno kako se reaktanta zaletita (npr. ionske reakcije - orientacija iona ni pomembna). Drugje pa to je pomembno - če imamo dve veliki organski molekuli, ki reagirata samo z neko določeno funkcionalno skupino (npr. trk neke organske kisline in alkohola - morata se zaleteti karboksilna in hidroksilna skupina). Pri takih enačbah sterični faktor P , s katerim enačbo pomnožimo, ni več enak 1, ampak je manjši od 1. Sterični faktor je odvisen od velikosti molekul. Pri večjih temperaturah se bistveno poveča količina molekul, ki ima večjo energijo kot je aktivacijska energija (graf). Zato reakcija hitreje teče pri višjih temperaturah.

Teorija o aktiviranih kompleksih

Pri pretvorbi reaktantov v produkte nastane na poti od reaktantov do produktov neko vmesno, zelo nestabilno stanje, ki mu rečemo **aktivirani kompleks**. Ta aktivirani kompleks z enako verjetnostjo, če enkrat nastane, razpade nazaj v reaktante, ali pa v produkte. Aktivirane komplekse označimo z zvezdico - *

Aktivirani kompleks je energetsko neugoden. Vedno je na najvišji energijski ravni in je najbolj nestabilen. Bolj, ko je sistem nestabilen, več notranje energije in proste entalpije ima. Pričakujemo torej, da bo aktivirani kompleks nekje vmes med reaktanti in produkti, po energiji pa na najvišji ravni. Razlika energije reaktantov, ki jim je potrebna, da pridejo do aktiviranega kompleksa, je **aktivacijska energija**.

Večja ko je aktivacijska energija, manj reaktantov (produktov) lahko doseže to stanje, počasnejša je reakcija.

Če imamo reakcijo, pri kateri vmes nastane aktivirani kompleks, je hitrost odvisna od tega, koliko je aktiviranega kompleksa. Več, ko lahko dosežemo aktiviranega kompleksa, hitrejša je reakcija. Imamo dve aktivacijski energiji - če gledamo reakcijo od reaktantov k produktom ali če gledamo reakcijo od produktov k reaktantom.

Sprememba proste entalpije za reakcijo (tista, ki kaže, če bo reakcija endergonska ali eksergonska) je razlika med dvema aktivacijskima energijama.

Eksergonske so tiste, pri katerih je pri produktih potrebna večja aktivacijska energija, da pridejo do aktiviranega kompleksa, kot pri reaktantih (pri endergonskih pa obratno).

Majhne aktivacijske energije pomenijo hitre reakcije (velike konstante reakcijske hitrosti k).

18.3.2011

Aktivacijska energija je tista energija, ki jo potrebujejo reaktanti (produkti), da pridejo do aktiviranega kompleksa. Ko so enkrat v tem kompleksu pa je enako možnosti, da reakcija poteče proti produktom ali proti reaktantom.

Kvantnomehanske enačbe - gre za sisteme diferencialnih enačb zelo visokega reda. Zato so kvantnomehanski izračuni možni le za zelo preproste sisteme (npr. vodik in en atom devterija). Taki izračuni so pokazali: X in Y sta par, pride Z, nastane skupni produkt X-Y-Z, potem pa se lahko afiniteta Y-Z poveča in nastane tak par, X pa je izločen.

V tem primeru aktivirani kompleks razpade na Y-Z par in na samostojen X.

Za vse tri stopnje reakcije se da izračunati prosto energijo (potencialno energijo), ki se računa na osnovi razdalj med X in Y in med Y in Z. Cel dogodek se da prikazati na tridimenzionalnem diagramu.

Energijski profil reakcije pomeni pot reakcije do aktiviranega kompleksa in potem preidemo k produktom.

Hitrost reakcije & kemijsko ravnotežja

Da bi povezavo med hitrostjo reakcije in ravnotežjem malo bolje dojeli imamo primer:

Imamo preprosto reakcijo izomerizacije: $\text{CH}_3\text{NC} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{CN}$

Od A do B je reakcija eksergonska, vmes je (seveda) aktivacijska energija. Pričakujemo, da bo B v ravnotežju prevladoval in da je reakcija eksergonska.

Hipotetično rečemo, da ima polovica molekul A dovolj energije, da preide v B, po drugi strani pa vemo, da je aktivacijska energija od B (če bi želel nazaj na A) večja, zato bo manj molekul B sposobnih priti od B do A - 10 procentov. Če imamo večjo aktivacijsko energijo je torej manjši delež molekul, ki pridejo do aktiviranega kompleksa.

Če imamo 1000 molekul A in reakcija začne tečt, bo 50 % teh A prišlo do aktiviranega kompleksa. Pol molekul v aktiviranem kompleksu gre nazaj v A in pol naprej v B. Po prvem prehodu bo torej 250 iz aktiviranega kompleksa padlo nazaj v A in bo skupaj v A 750 reaktantov, 250 pa jih bo prišlo v B. V naslednji stopnji jih polovica od 750 pride v aktivirani kompleks od A in pa 25 od B (ker jih 10 % doseže aktivirani kompleks). Ta vrednost se spet razpolovi, ker imajo molekule v aktiviranem kompleksu 50 % šans da padejo v A ali v B.

V vsaki fazi se torej nekaj A pretvori v B.

Količina B narašča in če poteka reakcija dovolj dolgo pridemo do ravnotežnega stanja, kjer smo dosegli tako razmerje med reaktanti in produkti, ko od reaktantov do aktiviranega kompleksa pride isto število molekul kot od produktov do aktiviranega kompleksa (ki spet razpade 50-50; torej se ravnotežje ohranja). Večja, ko je razlika med E_a od A in E_a od B, večja bo tudi razlika v ravnotežni koncentraciji produktov in reaktantov.

VPLIVI NA HITROST REAKCIJE

1. Vpliv koncentracije reaktantov

Število trkov med reaktanti vpliva na hitrost in število trkov je povezana s koncentracijo. Če povečamo koncentracijo reaktantov, bomo pospešili reakcijo.

Če je reakcija ničtega reda, potem je vseeno, kako spreminjamo reakcijo, ker se hitrost ne bo nič spremenila. Pri ničtemu redu gre za fotokemijske reakcije, reakcije na površinah ali katalizirane reakcije.

2. Vpliv pH

Ta vpliv se kaže samo, če je H^+ v reakciji **reaktant**.

Proton je torej eden od reaktantov, zato njegova koncentracija vpliva na hitrost. In zato tudi pH vpliva na hitrost; pH je nenazadnje samo eden od načinov za izraz koncentracije H^+ ionov.

Če je pH nižji je torej hitrost večja.

3. Ionska moč

Ionska moč velja samo za nabite delce, torej vpliva samo na reakcije, kjer so reaktanti nabiti. Ionska moč pove, kako en ion vpliva na vse ostale ione (kako vsi ostali ioni vplivajo na en ion).

Če bi imeli v nekem plinu samo reaktante, potem bi povečali tlak plina in temperaturo plina, s tem bi šla reakcija hitreje. Če pa tako situacijo primerjamo s situacijo v raztopini, kjer imamo reaktante, ki so topljenci in okoli teh topljencev topilo potem pričakujemo, da bo topilo imelo nek določen vpliv na trke in bo vplivalo na hitrost reakcije. Pri reakcijah, kjer reaktanti niso nabiti, topilo praktično nič ne vpliva na to, kako hitro reakcije tečejo. Pride do tega, da topilo, ki je okrog, omogoči ponavljajoče se trke (če trk ni uspešen se molekule odbijejo nazaj od vode in tako se lahko trk ponovi). Zato topilo (v primeru, da reaktanti niso nabiti) ne zavira hitrosti kemijske reakcije.

Kadar so reaktanti nabiti je vprašanje ali so enako nabiti ali nasprotno nabiti. Če se odbijajo potem topilo omogoča, da reakcija nekoliko hitreje teče.

Če ionsko moč povečamo in sta reaktanta nasprotno nabita, se privlačita in jih voda ovira. Če pa sta enako nabita se odbijata, voda pa omogoči ponovne trke (kompenzira).

4. Vpliv temperature

Če bomo spremenili temperaturo ne bomo koncentracij nič spreminjali - hitrost pa se spreminja, torej s temperaturo spreminjamo **k**.

$\ln k$ (naravni logaritem od **k**) se s temperaturo spreminja v skladu z izrazom $dH^* + RT / RT^2$

Če bo logaritem pozitiven, bo diferencial pozitiven in $\ln k$ s temperaturo narašča. Pozitiven pa je samo takrat, kadar je $dH > 0$ (in dovolj velik). Takrat **k** s temperaturo narašča.

dH^* je za biokemične reakcije vedno pozitivna. Zato lahko zanesljivo trdimo, da bo ta izraz vedno pozitiven in bo torej **k** s temperaturo rasel.

Razlog je da, ker se poveča T , se poveča kinetična energija reaktantov (večja gibljivost). Posledici sta dve - **več trkov** (večkrat se molekule srečajo) in **močnejši trki** (srečajo se z večjo energijo). Glavna posledica je večja verjetnost za uspešno reakcijo in torej večja hitrost reakcije.

5. vpliv katalizatorjev

Katalizatorji znižajo aktivacijsko energijo tako reaktantov kot produktov in s tem povečajo hitrost reakcije. Katalizator se veže z reaktanti in produkti in vodi reakcijo po neki poti, zato je tudi energijski profil reakcije drugačen.

Katalizatorji pa nič ne vplivajo na del spremembe energije, ki govori o ravnotežju in naravi reakcije (eksergonska / endergonska). Katalizator **ne** vpliva na ravnotežje reakcije, ker vstopi vanjo in izstopi iz nje nespremenjen - v reakciji ničesar ne pusti, zato ne vpliva na ravnotežje reakcije.

Katalizator se torej obnavlja in lahko ponovno vstopi v reakcijo. Zato je ponavadi dovolj, da imamo majhno količino katalizatorja.

Katalizatorji so velikokrat specifični (vežejo se samo z nekim določenim reaktantom). Specifičnost ni vedno zelo ozka (celo ni nujno, da govorimo o neki specifičnosti, sploh pri industrijskih katalizatorjih), vendar pri živem organizmu, kjer so katalizatorji encimi, so te zelo specifični (en encim bo bolj ali manj kataliziral določeno reakcijo ali set določenih reakcij).

Katalizator ne sproži reakcije, ampak samo spremeni hitrost. Tista reakcija, ki ni eksergonska, tudi ob prisotnosti katalizatorja ne bo.

Katalizatorji so za organizme zelo bistveni, uporabljamo pa jih tudi drugje. Mehanizem katalize je, da se dva reaktanta ne srečata v trodimenzionalnem prostoru, ampak v 2D prostoru (na površini katalizatorja).

Hitrost reakcij in razmere v organizmu

1. koncentracije so stalne, niso pa ravnotežne (bodo ob smrti). Koncentracije so stacionarne. S spreminjanjem koncentracij ne moramo dosti vplivati na razmere v človeškem telesu.
2. pH je stalen in nadzorovan - ne moremo vplivati s pH na hitrosti reakcije v telesu.
3. ionska moč je stalna in nadzorovana
4. temperatura se le malo spreminja (je nadzorovana, bolj ali manj stalna), zato tudi s temperaturo ne moramo vplivati na reakcije v človeškem telesu.

Zaradi tega so encimi nujno potrebni kot katalizatorji, ki omogočijo ustrezno hitre reakcije v človeškem telesu, hkrati pa so encimi tudi sposobni regulirati te reakcije. Hitrost reakcij zato lahko zelo dobro nadzorujemo.

Ravnotežje ni tisto, kar si želimo doseči; je pa to, kar si želi vsaka reakcija doseči.

Predavanje 12 ; 18.3.2011 / Matjaž Zorko

TRANSPORT PREKO BIOLOŠKIH MEMBRAN

Čez membrane morajo določene snovi prehajati, ker membrane predstavljajo meje kompartmentov in celic. Snovi morajo torej preko zelo različnih membran.

Obstaja tendenca, da se preko membrane, skozi katero lahko gre snov, koncentracije na obeh straneh izenačijo.

Če želimo v kompartmentu nabrati snov v večji koncentraciji kot je v okolju moramo vložiti energijo (aktivni transport). Zato, ker snov spontano teče v skladu s koncentracijskim gradientom (od področja z večjo na področje z manjšo koncentracijo).

Vrst transporta čez membrano je več. Generalno gledano ločimo pasivni transport (poteka brez vložka energije, vedno od področja večja proti področju manjše koncentracije) in aktivni transport (potrebuje vložek energije, ker poteka s področja manjše koncentracije na področje večje koncentracije).

Pasivni transport

- preprosta difuzija; plini in majhne, dovolj hidrofobne molekule, ki lahko difundirajo preko lipidnega dvosloja
- olajšana difuzija; prenašalci (proteini) omogočijo prenos snovi, ki same ne morajo difundirati preko lipidnega dvosloja
- ionski kanali; v skladu z gradientu ioni potujejo proti področju z manjšo koncentracijo
- ionofori; snovi, ki lahko vežejo ione, same po sebi pa so sposobne preiti membrano, ker so hidrofobne. Na drugi strani spustijo ione - ioni imajo 'prevoz' preko membrane (ampak samo proti manjši koncentraciji!)

Aktivni transport

- primarni aktivni transport; tak transport, ki omogoča prehod snovi iz manjše v večjo koncentracijo, energija pa pride od hidrolize ATP.

- sekundarni aktivni transport (kotransport); ena snov se prenaša aktivno, z njo pa se prenaša še druga snov.

Kadar je prehod iz velike koncentracije proti manjši koncentraciji, govorimo o prehodu po koncentracijskem gradientu.

Preprosta difuzija

Masni tok je v skladu s Fickovim zakonom, kjer nastopa difuzijska konstanta (D), površina preko katere teče tok (A) in pa koncentraciji. Tok je večji, čim večja je difuzijska konstanta, razlika koncentracij in površina med dvema koncentracijama.

Snovi se morajo ob prihodu čez membrano na eni strani zgubiti svoj hidratacijski plašč, na drugi strani pa ga spet dobiti. To, da se ga znebijo, ponavadi ni spontana reakcija, pridobitev pa ponavadi je. Če namesto tega prehoda imamo nek transporter, potem je transporter narejen tako, da lažje omogoči izgubo hidratacijskega plašča, na drugi strani pa še olajša pridobitev plašča. Zato bo hitrost prenosa večja.

Vrste prenašalcev

Prenašalci so v glavnem transportni proteini, ki se generalno delijo na prenašalce (ki vežejo snovi) in kanale. Prenašalci so lahko primarni aktivni prenašalci, ali pa so kotransporterji. Kadar imamo prenašalce imamo vedno vezavo snovi, ki se bo prenesla iz ene strani membrane na drugo, najprej na te prenašalce. Zato hitrost prenosa ni več linearna v odvisnosti od koncentracije (kot je bila pri Fickovem zakonu), to pa zato, ker količina prenašalcev omejuje količino prenašanih molekul na časovno enoto.

Ko je prenašalec nasičen s prenašano molekulo je to reakcija ničtega reda (ker koncentracija ne vpliva več na hitrost).

Posredovani pasivni transport - ne porablja se nobena energija, zato lahko poteka samo v skladu s koncentracijskim gradientom.

Ionofori in kanali delujejo analogno prenašalcem - lahko delujejo samo dokler je koncentracija večja na eni strani (ker ni energijskega vložka).

Če želimo prenest neko snov iz enega dela v drug kompartment, kjer je koncentracija te snovi večja, to zahteva energijo. Če ni kemične reakcije, potem ni nobene spremembe v vezeh, strukturi, torej posledično ni spremembe dH' in dS' . Zato je $dG' = 0$.

Količina energije pri prenosu (dG) je kar proporcionalna $RT \ln(c_2/c_1)$. To velja samo za **nenabite snovi**.

Pri **nabitih delcih** pa moramo poleg razlike v koncentracijah premagati še razliko v nabojih. Pomemben je še **transmembranski potencial**. Prispevek naboje in prispevek koncentracij seštejemo, da dobimo skupno energijo, ki jo potrebujemo za prenos.

Primarni in sekundarni aktivni transport - pri primarnemu imamo prenašalca, ki omogoča, da se snov iz področja z manjšo koncentracijo prenese na področje z večjo koncentracijo. Pri tem potrebujemo energijo, dobimo jo tako, da se na prenašalec veže ATP, prenašalec se ponavadi še fosforilira.

Druga možnost pa je, da se skupaj prenašajo molekule. Prenášalec prenaša dve snovi - ena gre v skladu z gradientom (je spontana) in zraven gre še druga snov, ki pa gre proti svojemu koncentracijskemu gradientu. To je sekundarni aktivni transport (kotransport).

Prenašanje preko membrane ima tudi medicinske aspekte - eden je, da moramo poznati normalne prenose (da prepoznamo patološke), drug pa je, da želimo imeti prenos zdravilnih učinkovin v celico, obstajajo pa take, ki ne morejo same v celico. Takrat moramo tem učinkovinam pomagati, pogosto z liposomi ali z nano delci (iz različnih polimerov, noter ugradimo tiste snovi, ki jih želimo prenašati, na površino pa tiste snovi, ki bodo prepoznala določena tarčna tkiva. Lahko uporabimo tudi CPP zdravila (CPP = cell penetration particle).

Predavanje 13 ; 21.3.2011 / Radovan Komel

Bioelementi.

Biološko pomembni ioni.

Ogljik, kot osnova biomolekul.

Organske molekule.

...

Periodni sistem; pogosto zastopani elementi – SCHNOP (šnops), Na, K, Ca, Cl - (dietne potrebe; v gramih na dan) in elementi v sledvih (dietne potrebe v mg ali manj na dan); (lantanidi in aktinidi.)

Model atoma; Prekrivanje in skupna lastnina dveh zunanjih elektronov: kemijska vez. Težnja: popolna (stabilna) zunanja orbitala vsakega partnerja.

Kemijska vez: kompromis – skupen elektronski par. Reaktivni zunanji elektroni lahko sodelujejo v kemijskih vezeh. Posledično nastane kovalentna – sigma-vez.

Atomi, ki zelo težijo po tem da bi imeli oktet elektronov v zunanji ovojnici, je atom z veliko elektronegativnostjo (lastnost privlačenja elektronov).

Vodikova vez je elektrostatski privlak med električnimi dipoli.

OGLJIK

Na notranji orbitali s ima 2 elektrona, zunanji orbitali pa sta različni – krožna s ima tudi 2 elektrona, ima pa tudi tri p orbitale (na vsaki po en elektron)...ena p orbitala je bila prazna, vendar vanjo preskoči elektron iz s orbitale – sp³ hibridizacija! Oblikuje se energijsko povprečje. Ker se elektroni med seboj odbijajo skušajo biti čimbolj narazen. Orbitale prevzamejo tetraedrično obliko. V vzbujenem stanju se vse orbitale obložijo z enim elektronom, vsi so med seboj energijsko enakovredni.

Sigma vez je vez prek skupnega elektronskega para – prikritje dveh hibridnih orbital. Lahko pa tudi samo dve orbitali stopita v vzbujeno stanje in dobimo sp² hibridizacijo. En elektron v tretji p orbitali je tedaj energijsko drugačen od ostalih treh. Lahko pa tudi sp¹ hibridizacija. To je odvisno od zunanjih dejavnikov (termika,...).

Če imamo sp² hibridizacijo prosti p-elektron tvori pi-vez in poleg siceršnje sigma-vezi nastane še ena; dobimo dvojno vez. Pi-elektroni so sposobni preskakovanja med ovojnicami, zato jim pravimo nelokalizirani elektroni. Več možnosti da bolj stabilno stanje.

POGOSTE FUNKCIONALNE SKUPINE BIOMOLEKUL

Hidroksilna (alkoholi), **Karbonilna** (aldehidi, ketoni), **Karboksilna** (kislina), **Metilna**, **Etilna**, **Fenilna**, **Esterska** (alkohol + organska kislina - voda), **Eterska** (dva alkohola – voda) (*polacetalna vez), **Amino**, **Amido**, (Guanidino, Imidazolna), **Fulhidrilna** (-S-H), **Disulfidna** (-S-S-), **Fosforilna**,...

Nekatere biomolekule imajo v svoji zgrabi več enakih skupin ali pa tudi več različnih funkcionalnih skupin. (histidin; imadizol, amino in karboksilno,...)

AMINOKISLINE

Aminokislina se s peptidnimi vezmi povežjo v polimerno zgradbo (peptidi, proteini). Oblika proteinov je odvisna od zaporednja aminokislin. Zaporednje aminokislin pa je določeno z zaporednjem nukleotidov v DNA. Nепroteinski del makromolekule proteinske strukture je zelo pomemben za delovanje molekule.

KEMIJSKE REAKCIJE

Kemična reakcija $A + B \Rightarrow C + D$

Reakcije v človeškem telesu so katalizirane – katalizator je snov, ki zelo pospeši hitrost kemijske reakcije. Encimi so biološki katalizatorji. So proteinske molekule.

Če je reakcija katalizirana z encimom ji rečemo biokemična reakcija.

Encimi imajo poseben “žep” kamor prideta A in B, encim pa jima pomaga, da lažje zreagirata. Da reakcija poteče more priti do uspešnega srečanja (uspešni trki), katalizator pa ima posebno površino, ki ujame obe molekuli in ju združi – pripomore k uspešnemu sprečanju obeh molekul.

Ogljikove spojine se srečujejo z **IZOMERIJO** – molekule z enakim številom atomov (enako kemično formulo) so različno prostorsko urejene. Strukturne oblike teh molekul so lahko različne. Poznamo več vrst izomerij; omenili bomo predvsem optično in geometrijsko izometrijo.

Optična izomerija:

Kadar ima asimetričen C atom, ki ima vse štiri nanj vezane skupine različne. Število optičnih izomerov je 2^n , n pa je število nesimetričnih ogljikovih atomov.

Geometrijska izomerija:

Cis izomere, kadar sta na isti strani ravnine (obročča).

Trans izomere, kadar sta skupina na različnih straneh ravnine obroččev. Tistim nad ravnino obroččev rečemo, da so beta usmerjene, tistim pod ravnino obročča pa alfa usmerjeni.

Cis retinal (del skupine vitamina A; del vidnega pigmenta rodopsina) – pri padcu svetlobe preide iz cis stanja v trans stanje. Celotna oblika molekule se spremeni. Proteinski del molekule se odcepi preč in sproži kaskado drugih proteinov.

KONFIGURACIJA

O konfiguraciji molekule govorimo, kadar govorimo o njeni zgradbi – razporejenost funkcionalnih skupin.

KONFORMACIJA

Sprememba zaradi rotacije okoli enojnih vezi.

ALOSTERIJA

Če se zgodi, da na neko drugo mesto encima pride molekula, ki jo imenujemo efektor, deluje na konformacijo aktivnega centra encima tako, da encim neha biti aktiven. Pojava, ko neka molekula povzroči spremembo na nekem mestu, ki je oddaljeno od mesta vezave te dotične molekule – verižna reakcija – imenujemo alosterija.

Alosterija je torej takorekoč posredna aktivacija nečesa.

METABOLIZEM

Metabolizem je sestavljen iz anabolizma in katabolizma. Pri anabolizmu se energija porablja za izgradnjo. Katabolizem pa je razgradnja kompleksnih molekul (zlasti hranil, naših izrabljenih biomolekul,...), pri čemer se energija sprošča. Katabolizem poteka po “koščkih” - v večih stopnjah.

Anabolizem in katabolizem sta sklopljena. Energija, ki se tvori pri enem, se porablja pri drugem.

Predavanje 14 ; 22.3.2011 / Radovan Komel

Če so molekule naključne se težko ujamejo tako, da bi pasale ena na drugo. **Encim** (katalizator) pa s svojo površino, ki ustreza obliki molekul, pomaga pri orientaciji molekul in zato zniža potrebno aktivacijsko energijo ter posledično čas poteka reakcije.

Hierarhija organskih molekul:

1. enostavni gradniki (monomerne spojine); nukleotidi, aminokisljine,...
2. makromolekule; DNA, proteini,...

3. kompleksi različnih makromolekulskih spojin (proteini in nukleinske kisline = kromosom)
4. organizacija na celični ravni (npr. kromosomi v jedru)

AMINOKISLINE

Vsaka aminokislina ima en asimetričen C-atom in dve skupini, ki ji dajeta njeni značilnosti - karboksilna in amino skupina (zato amino kislina!). Ima tudi stransko verigo, po kateri se aminokislina razlikujejo. Te stranske verige dajejo aminokislinam specifične lastnosti.

Samo **glicin** nima asimetričnega C atoma, ker ima osrednji vodik dve enaki substituenti (dva vodika).

Pri razmerah, kjer bi bil pH višji od pKa, je aminokislina v disociiranem stanju - donor. Kadar pa je pH nižji od pKa, je aminokislina akceptor. Zato pišemo NH₃⁺ in COO⁻ namesto NH₂ in COOH (ker so fiziološki pH različni od pKa aminokislin).

Nekaj amino kislin je takih, da imajo poleg alfa COOH skupine globlje v skupini še dodatno amino ali karboksilno skupino. Zato jih poimenujemo glede na C atom, kjer je druga funkcionalna skupina (alfa-eta-aminokislina).

Molekule lahko pišemo v **L** ali **D** absolutni konfiguraciji. Zberemo neko referenčno funkcionalno skupino, katero bomo gledali, in pa referenčni kiralni C atom (asimetrični C atom). Kot referenco so vzeli D ali L gliceraldehid in z analizami določili absolutno konfiguracijo v prostoru.

Vse aminokislina, ki so naravne (v naših telesih) so v **L** konfiguraciji, obstajajo pa tudi nekatere, ki so **D**; te so bolj v eksotičnih organizmih (npr. v morskih spužvah ali strupih in celičnih stenah bakterij). Ko srečamo aminokislino, jo prebavimo - naši encimi so navajeni na L aminokislina, zato je neke vrste obramba dejstvo, da uživamo samo L aminokislina.

Razdelitev aminokislin glede na kemijske lastnosti stranskih verig

1. Nepolarne skupine;

- glicin; nima kiralnega centra, je najmanjša aminokislina. Če jih je veliko v proteinu je ta struktura zelo zvrta.

- alanin
- valin
- leucin

- metionin; je prva aminokislina, ki se pri sintezi proteinov vgradi. Ker jo kodira zaporedje nukleotidov AUG (adenin, uracil, guanin) v mRNA - to je start kodon! V biosintetskih reakcijah deluje kot donor metilne skupine.

- isoleucin

Vse so nepolarne (hidrofobne) in če se znajdejo skupaj v vrsti v nekem proteinu, ga lahko zviijejo in ustvarijo neko hidrofobno okolje.

2. Polarne (nenabite) skupine

- serin
- treonin
- cistein; ima žveplo. Lahko je izrazit proton donor ali proton akceptor. Dva lahko med seboj reagirata in se povežeta. Tako lahko sodeluje v redoks procesih. Če se dva cisteina povežeta rečemo tej aminokislini cistin. Mostički, ki nastajajo med dvema žveploma, so najmočnejše povezave v peptidni verigi (neke vrste kovalentna vez).
- prolin; aminokislina, kjer je NH₂ skupina kar del obroča. Če torej stopi v peptidno vez je ta del obroča precej rigiden. Če imamo teh aminokislinov veliko na kupu je torej protein precej tog.
- asparagin; amid kislinske aminokislina.
- glutamin; amid kislinske aminokislina.

Imajo neko izrazito polarnost; so hidrofilne. Če jih je prevladuje na proteinu, je ta protein hidrofilen.

3. Atomatske skupine

- fenilalanin
- tirozin
- triptopan

Te aminokislina so lahko udeležene tudi v biosintezi nekaterih drugih spojin (hormonskega značaja).

4. Pozitivno nabite

- lisin,
- arginin
- histidin; edina AK, ki ima eno od dveh pK vrednosti blizu fiziološkega pH - če je histidinov v proteinu veliko, je lahko protein dober pufer

Rečemo jim bazične amino kisline.

5. Negativno nabite

- aspartat
- glutamat

Rečemo jim kisle amino kisline.

Nekaj aminokislin je neobičajnih. Ponavadi nastajajo takrat, ko so običajne AK že sintetizirane, in sicer s kemijskimi modifikacijami ali združevanjem aminokislin. Desmosin, na primer, nastopa v elastinu.

Zwitterion - ion dvojček. Tak ion ima eno pozitivno nabito in eno negativno nabito skupino (NH₃⁺ in COO⁻). Lahko je torej proton akceptor ali proton donor. V fiziološkem pH prevladuje ion dvojček, navzoči pa so tudi sledovi drugih dveh oblik (NH₂ in COO⁻ ali NH₃⁺ in COOH). Obstaja točka na sredini med obema pK oblikama aminokislina, kjer se koncentraciji pozitivno in negativno nabitih skupin izenačita. Takrat ima aminokislina na ven naboj nič. Temu rečemo

izoionska točka.

Izoionska točka je tisti pH, pri kateri ima aminokislina naboj nič.

Izoelektrična točka - skoraj isto, kot izoionska točka, le da so jo, za razliko od izoionske točke, merili v različnih pufrih (izoionsko točko so vedno merili v vodi).

Pri **titraciji aminokislin** moramo titrirati dve skupini. Najprej bomo stitirali kislino skupino - do te točke je isto, kot da bi titrirali neko šibko kislino (npr. očetno). Potem pa moramo stitirati še NH₃ skupino. Titracijska krivulja aminokislina je torej sestavljena iz dveh titracijskih krivulj. Nekje na sredini med obema pK_a vrednostnima pa je izoionska točka, kjer je zunanji naboj enak nič. Matematično jo napišemo kot aritmetično sredino obeh pK_a vrednosti. Večina aminokislin ima svoje pK_a vrednosti daleč izven območij fiziološkega pH. Edina izjema je histidin. Stvar se zakomplicira pri kislinskih aminokislinah, ko imamo za stitirati npr. dve kislinski in eno bazično skupino. Najprej se stitira prva kislinska skupina, potem druga skupina in potem še NH₃ skupina. Krivulja je torej sestavljena iz treh krivulj. Izoionska točka je pri aritmetični sredini pK_a kislinske skupine in pK_a radikala - aritmetična sredina obeh kislinskih skupin. Pri bazičnih aminokislinah najprej stitiramo kislino skupino, potem radikalno skupino in na koncu še NH₃ skupino. Izoionska točka je vmesna točka - aritmetična sredina pK vrednosti obeh bazičnih skupin.

Nastanek peptidne vezi - aminokislina lahko med seboj stopijo v reakcijo. Prva izpostavi svojo karboksilno skupino, ta napade amino skupino druge AK. Odcepi se voda in nastane peptidna vez. Vez je bolj toga, kot bi pričakoval, ker sta možna dva strukturna izomera in dejansko stanje je kompromis med obema - neke vrste vmesno stanje.

Zaporedju aminokislin rečemo primarna zgradba oz. primarna struktura peptida oz. **proteina**. To zaporedje AK je določeno z zaporedji nukleotidov v DNA.

Stranske verige pa štrlijo gor in dol in opredeljujejo lastnosti peptidov - hidrofobnost, bazičnost, kislost,...

Med njimi prihaja do povezav - Van der Waalsove povezave, S-S mostički, hidrofobne interakcije,...

Vsak protein (peptid) ima eno prosto NH₃⁺ skupino (**N-terminal**) in eno prosto COO⁻ skupino (**C-terminal**). Tak peptid poimenujemo tako, da damo vsem razen zadnje aminokislina končnico -il (alanil, glutamil, glicil,...), zadnja pa je samo aminokislina (alanin, glutamin, glicin,...)

Npr: **alanil-glutamil-glicil-lizin**

Aminokislina se povežejo v **primarno strukturo** proteina. Šibke interakcije (Van der Waalsove vezi, vodikove vezi,...) zvijejo proteine v neko **sekundarno strukturo**. Te se med seboj povežejo s preostalimi prostimi ostanki v klobčičasto strukturo - trodimenzionalna ali **terciarna struktura** proteina. Več teh proteinov (ki imajo neko terciarno strukturo) se lahko poveže med sabo v neko večjo, multiproteinsko enoto - **kvartarna struktura**.

AMINOKISLINE V NAŠI PREHRANI - od dvajsetih, ki smo jih omenili, jih je samo 8 esencialnih; to so tiste, ki jih mi ne moremo sintetizirati iz drugih virov (nimamo encimov), zato jih moramo dobiti s hrano. To so izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan in valin. Nekaj jih je še semi-esencialnih; pri dojenčkih, ki nimajo popolnoma razvitega biosinteznega sistema v organizmu, so esencialni (cistein, glicin, prolin, serin, tirozin, arginin, histidin).

Praktična uporaba nekaterih aminokislin:

Glutaminska kislina - pospeševalec okusa. Glutamat se velikokrat dodaja prehranskim izdelkom.

Aspartamat - nizko kalorično sladilo (ester).

Hidroksi-triptofan - ena glavnih komponent zdravil proti depresiji

L-dihidroksi fenil alanin (L-DOPA) - v zdravilih proti parkinsonovi bolezni.

Predavanje 15 ; 25.3.2011 / Radovan Komel

NARAVNI PEPTIDI

Peptidi so krajše molekule - do nekaj 10 aminokislin. Če je teh aminokislin več govorimo o polipeptidih oz. o **proteinih** (beljakovinah), vendar pa ostra meja med peptidi in proteini ni določena.

GLUTATION - tripeptid, sestavljen iz glutamina, cisteina in glicina. Zanimivo je to, da se gama C atom veže v peptidno vez. To je neobičajno (ponavadi je v peptidni vezi udeležen alfa C atom).

Glutation ima eno reaktivno SH skupino in lahko deluje kot izrazit reducent. Z drugim glutationom se lahko sklopi v oksidoredukcijsko reakcijo, dva vodika se oddata in med dvema cisteinoma nastane S-S mostiček, ki smo ga že omenjali.

Glutation v svojih dveh oblikah je del uravnavanja našega oksidoredukcijskega stanja v celicah - je močan reducent in posledično lovilec reaktivnih kisikovih spojin (ROS), skrbi, da jih ni preveč, ker so močni oksidanti in lahko poškodujejo celične encime, membrane ipd. Hkrati pa tudi vzdržuje ostale močne antioksidante (vitamin E, vitamin C,...)

Ko pride do pretiranega povečanja prostih radikalov v organizem potem organizem reagira tako, da sintetizira več encimov, ki povrnejo izrabljeno obliko glutaciona v aktivno obliko.

INSULIN - sestavljen iz 51 aminokislin. Ima verigo A (21 AK) in verigo B (30 AK). Značilno je to, da sta verigi med seboj povezana z dvema disulfidnima mostičkoma, en disulfidni mostiček pa je interen (znotraj verige).

Sintetizira se v beta celicah pankreasa v obliki **preproinsulina**. Sestavljen je iz A in B verige, vmes pa je peptid C in neka signalna sekvenca - to je precej hidrofobno zaporedje aminokislin ki poskrbi, da pride insulin skozi membrano v lumen endoplazemskega retikuluma. V tem lumnu se signalna sekvenca odcepi in ostane **proinsulin**. To je skladiščna oblika insulina, ki ima še vedno C peptid. Ko insulin dozori oz. ko je izražena potreba po njemu, se ta C peptid odcepi.

C peptid je torej potreben zato, da je insulin zaščiten pred prezgodnjo razgradnjo in da je skladiščen, če se ga ne potrebuje.

V telesu se shranjuje insulin skupaj s cinkovimi ioni - povezuje se v heksamer. Aktivna oblika insulina pa

je monomer - A in B veriga povezana z disulfidnimi mostički.

Vloga insulina: skrbi za prevzem glukoze iz krvi. Veže se na receptor na celični površini in da signal, da celica poskrbi, da se iz krvi glukoza procesira v celico, kjer se porablja.

GLUKAGON - antagonist insulinu. Sestavljen iz 29 aminokislin, ki nam dajo nekakšno paličasto, linearno strukturo, ki je spet prepoznavna (peptidi morajo biti prepoznavni, ker se vežejo na receptorje). Vzdržuje raven glukoze v krvi; njegov primaren tarčen organ so jetra, kjer stimulira razgradnjo glikogena. Hkrati pospeši razgradnjo lipidov v jetrih, da se iz produktov te razgradnje sintetizira glukoza. Hkrati torej ustavi razgradnjo glukoza in vzpodbuja sintezo glukoze, prav tako posredno vzpodbuja sintezo insulina (ker je v krvi več glukoze).

Njegova sinteza poteka v alfa celicah pankreasa (trebušne slinavke). Nastane proglukagon, iz njega z razcepom nastane 6 peptidov, eden izmed njih je tudi glukagon.

Z insulinom in glukagonom je povezana bolezen diabetes - to je pomanjkanje insulina.

- diabetes 1. tipa: okvare celic pankreasa. Manj sinteze ali nič sinteze insulina, zato so te bolniki odvisni od zunanjega vnosa insulina.

- diabetes 2. tipa: insulinsko resistantne celice (npr. zaradi okvarjenih receptorjev na celičnih membranah)

Signaliziranje v sistemu - Hipotalamus - zbira in procesira impulze (občutke). Od vrste in obsega impulza je odvisno, kako hipotalamus reagira (kaj se tam sintetizira). Tam se tvorijo zelo majhni peptidi (liberini), ki jim rečemo nevro sekret. Te liberini delujejo na receptorji na hipofizi in odvisno od tega, na kateri receptor deluje, hipofiza različno odgovori. Spusti nekoliko večji peptid (trofični dejavniki - tropini), ki gre v krvni obtok in vpliva na različne druge žleze endokrinega izločanja. Ko se te tropini vežejo na receptorje endokrinih žlez te odgovorijo tako, da sprostijo hormone (večji peptidi ali steroidi). Hormoni delujejo na končne tarče - tkiva, kjer sprožijo ustrezen fiziološki odgovor. Signaliziranje lahko poteka tudi v vzvratni smeri (prepreči nadaljno stimulacijo).

Vsaka celica ima neke **receptorje**, vendar pa so te receptorji specifični. Hormoni oz. stimulatorji so lahko lipidotopni ali pa vodotopni. Lipidotopni so steroidne molekule in lahko grejo skozi membrane.

Vodotopni pa so biogeni amini in peptidne molekule.

Lipidotopni difundirajo čez membrano, potem potujejo v jedro in se tam vežejo na receptor, da sprožijo prepis genov in ustrezen odziv. Vodotopni pa ne morejo čez membrano, zato se vežejo na receptorje na celični površini in posredno sprožijo celični odziv preko kaskade molekul v citoplazmi.

Imamo dve vrsti **membranskih receptorjev**. Eni so 'vsajeni' v membrano (transmembranski), ki imajo vezavno mesto za vodotopen hormon. S to vezavo naredi konformacijsko spremembo - oblika molekule se nekoliko spremeni, kar vpliva na molekule v bližnji soseščini - na G protein. Tudi ta se spremeni, zgubi afiniteto za GDP in namesto tega se veže GTP. To zopet sproži konformacijsko spremembo - alfa podenota G-proteina disociira stran in se veže z drugo molekulo - encimom adenilatno ciklazo. Z vezano podenoto G-proteina postane encim adenilatna ciklaza aktivna in lahko iz molekule ATP-ja sintetizira cAMP (ciklični AMP).

Encim fosfodiesteraza razgradi cAMP. Hkrati se iz GTP-ja odcepi fosfor in zopet nastane GDP, alfa podenota G-proteina se združi z drugima dvema podenotama. Tako se ta dogodek ugasne (konča).

Druga vrsta membranskih receptorjev so iz večih podenot, na primer dveh, ki se ob vezavi hormona

dimerizirata. S tem se aktivira citosolni del proteina (pride do avtofosforilacije tirozina - nastane tirozinska proteinska kinaza). Ko je ta del fosforiliran lahko fosforilira druge proteine v celici.

Sporočanje z **lipidotopnimi hormoni** - lipidotopni protein potuje skozi membrano, ker je hidrofoben. Receptor ima ali v jedro, ali pa že v citosolu. Kadar ga ima v citosolu potem se z njim veže in skupaj s tem receptorjem potuje v jedro. V jedru se dimerizirata in se vežeta na določena zaporedja določenih genov.

Liberini - hormoni hipotalamusa. To so majhni peptidi; od 3 do 12 aminokislin, vseeno pa jih ustrezni receptorji lahko prepoznavajo, ker je njihova oblika nekoliko nenavadna. Zato pašejo na nek zelo specifičen receptor.

Primer: hormon iz hipotalamusa, kortikoliberin, sproži izločanje hormona kortikotropina iz hipofize.

Tropini - hormoni hipofize, so nekoliko večji od hormonov hipotalamusa.

Melatonin - uravnava našo percepcijo dnevno-nočnega cikla. Jemljejo ga ljudje, ki imajo zaradi letenja jet lagg.

Eritropoetin - dviga raven rdečih krvničk (povzroča sintezo)

Bradikinin - znižuje krvni pritisk

Hormone, ki jih dajemo kot zdravila, morajo biti rekombinantno proizvedeni. Kajti če bi jih vzeli iz tkiv ljudi bi lahko sprožili imunski odziv (prenos virusov).

Opioidni opiat (endorfini, enkefalini) - zelo majhni, iz parih aminokislin, vendar imajo zelo razpoznavno strukturo v prostoru. S svojo vezavo na opioidni receptor lahko prekinejo izražanje nekaterih nevrotransmiterjev in povečajo izražanje nekaterih drugih, sploh tistih za ugodje.

Blokirajo se fiziološke poti, ki bi imele za posledico (na primer) beg.

Zelo so podobni morfijem, ki delujejo na podoben način, vendar imajo veliko afiniteto do vezave, zato imajo močnejše učinke in tudi težje jih spravimo iz receptorjev.

PEPTIDNI ANTIBIOTIKI

Najbolj poznan antibiotik je **penicilin** - sestavljen je iz valina in cisteina, stranska veriga pa je odprta substituciji (npr. dodamo benzojsko kislino in dobimo benzilpenicilin).

Antibiotiki so se začeli s penicilinom. Naravni antibiotiki so del plesni in gliv, ki se borijo proti svojim 'konkurentom' v okolju. Antibiotiki delujejo na različnih ravneh - penicilin pri bakterijah preprečuje izgradnjo njihove celične stene, zato te bakterije osmotsko počijo.

Medicina se srečuje s problemom antibiotične resistance. Bakterije so prilagodljive, zato se navadijo na antibiotik. Bakterije imajo namreč poleg svojega DNA še majhne, krožne DNA (plazmidi), kjer so zelo variabilna področja - iz generacije v generacijo se spreminjajo, zato se lahko zgodi, da se genom bakterije spremeni tako, da sintetizirajo nek encim, ki antibiotik razgradi. Taki pojavi so slučajni.

Če za določen čas prenehamo dodajanje antibiotika potem lahko prekinemo to resistenco. Lahko pa tudi delamo hibridne antibiotike in tako zmanjšamo možnost resistance.

Tudi rastlinski in živalski strupi - **toksini** - imajo peptidne molekule (škorpijoni, gobe, kače,...). Zopet so strukture teh peptidov nenavadne. Amaitin je iz rdeče mušnice. Je zelo hud strup - zelo ovira sintezo

RNA! Če sinteze RNA ni potem ni proteinov in celice propadajo (začne se v jetrih, ker so glaven metaboličen organ). Faloidin pa je strup zelene mušnice. Interagira z aktinom in vzdržuje fibrilarno (povezano, togo) strukturo in celice to toge. Postanejo krhke in lahko počijo. Toksini so lahko nevrotoksini, lahko so krvni strupi,...

Predavanje 16 ; 28. 3. 2011 / Radovan Komel

BIOGENI AMINI

Nastanek - nastanejo z dekarboksilacijo aminokislin. CO₂ skupina zginje iz aminokislone in rezultat je biogeni amin. Aminokislone torej ne služijo le pri biosintezi proteinov, ampak imajo tudi druge namene (npr. nastanek biogenih aminov).

Histamin - nastane z dekarboksilacijo histidina. Je izraziti vazodilatator (deluje na gladko muskulaturo in širi kapilare, kar pomeni vdor krvi v periferna tkiva - posledica so otekline. Temu rečemo alergijska reakcija).

Histamin se lahko sprosti pod vplivom raznoraznih alergenov. Nastane oteklina, srbečica, lahko pa nastanejo otekline tudi v notranjih organih, kjer so lahko posledice zelo hude. V tem primeru zdravnik predpiše antihistaminike - teh je več vrst. Mnogi preprečujejo proteinsko sintezo (delujejo na ravni dekarboksilaze in preprečujejo sintezo histamina).

Serotonin - nastane iz triptofana v dveh stopnjah. Prva stopnja je pripojitev OH skupine na triptofanski obroč, potem pa sledi dekarboksilacija. Je bazokonstriktor; krči gladko muskulaturo (kapilare), posledično stimulira izločanje želodčnega soka. Ima pa še eno posebno vlogo - je nevrottransmitter v našem centralnem živčnem sistemu (možganih). Temu rečemo serotonergična sinapsa.

Adrenalin (noradrenalin) - učeni imeni sta norepinefrin in epinefrin. Reakcija poteka v večih stopnjah. Začne se s pripojitvijo OH skupine na tirozinski obroč, dopimo Dopa. Sledi dekarboksilacija - dobimo dopamin. Nato se pripne še ena OH skupina (nastane noradrenalin). Na koncu pa še metilacija na NH₂ skupini oblikuje adrenalin (epinefrin).

Splošen fiziološki učinek adrenalina - to je v bistvu hormon stresa (bega in boja); poveča srčni utrip, pospeši metabolizem, stimulira krčenje muskulature, hkrati pa ima še nevrottransmitterski učinek (utiša strah!).

Poliamini - nastanejo iz kombinacije več aminokislin. Karboksili zginjejo ven in aminokislone se nekako spojijo skupaj v dokaj čudne kombinacije. Ornitin (AK ki nastane iz arginina) zelo smrdi. Poliamini nasploh zelo smrdijo. To je obrambni mehanizem, saj nas smrad opozarja, da ne jemo nečesa, kar ni užitno.

Spermin in spermidin - so poliamini, delujejo podobno kot magnezijevi ioni na DNA. Sedejo na negativno nabit 'hrbet' DNA in drži molekulo v iztegnjeni obliki.

Hormoni ščitnice - Tironin (iz tirozina) in tiroksin (nastane iz tironinskih ostankov, ki se iodirajo). Tireoglobulin je protein v ščitnici, ki ima veliko tirozinskih ostankov, iz katerih najprej nastane tironin, nato pa se iodira in nastane tiroksin.

Te hormoni uravnavajo uravnoreženo delovanje našega metabolizma; pravimo, da so hormoni bazalnega metabolizma (= metabolizem v popolnem delovanju; ni pretiranega odstopanja v katerokoli smer).

Predavanje 17 ; 28. 3. 2011 / Radovan Komel

OGLJIKOVI HIDRATI: ZGRADBA IN BIOLOŠKA VLOGA

Spojine, zdrajene iz ogljika, vodika in kisika, v razmerju 1 : 2 : 1 (npr. glukoza - C₆H₁₂O₆).

Vloga:

1. oporna in zaščitna vloga; pri celičnih stenah bakterij in rastlin, tvorijo eksoskelet (zunanji skelet) pri žuželkah in rakah, pri človeku so v vezivnem tkivu in medceličnici
2. 'lepilo' in mazivo; pomembni so pri adheziji celic, podmažajo sklepe (da ne škripajo)
3. celično signaliziranje, sporočanje; informacijske so na ta način, da so razni drugi proteini z njimi glikozilirani. Služijo kot prepoznavna mesta (npr. antigenske determinante)
4. zaloge energije; metabolično gorivo (v vezeh je veliko energije - ta energija se postopoma sprošča, to se kaže v postopni sintezi ATPja).

Razdelitev ogljikovih hidratov:

1. monosaharidi; aldehidni (aldoze) in ketozni (ketoze) sladkorji
2. disaharidi; imajo dve monosaharidni enoti
3. oligosaharidi; tri ali nekaj monosaharidnih enot
4. polisaharidi; na stotine ali tisoče monosaharidnih enot

1. MONOSAHARIDI

Aldoza je sladkor, ki ima na prvem C-atomu aldehidno skupino. **Ketoza** pa ima karbonilno skupino na prvem C-atomu.

Fisherjeva projekcija - L ali D obliko določimo tako, da izberemo najbolj oddaljeni C atom (oddaljeni od funkcionalne skupine na koncu verige), potem pa gledamo, kje stoji OH glede na ta atom. Če je na desni je to D oblika, če je na levi pa je L oblika.

Aldoze - glede na to, koliko imajo C atomov, so lahko trioze, tetraze, pentoze, heksoze ali heptoze. Nekaj najbolj pomembnih sladkorjev - glukoza, manoza, galaktoza in riboza (ki je v ciklični obliki). Če se razlikujejo le po konfiguraciji enega samega C atoma, potem so to **epimerni sladkorji** (to so glukoza, galaktoza in manoza - so epimerni!).

Ketoze - ketonski sladkorji. Zopet imamo trioze, tetraze, pentoze, heksoze in heptoze. Pomembna heksoza je fruktoza.

Sladkorji so dejansko v **cikličnih oblikah** - **Haworthova projekcija**. Ta nastane tako, da pride do reakcije med OH skupino na zadnjem asimetričnem C-atomu in aldehidno skupino. Posledica tega je, da na prvem C atomu nastane nova OH skupina (rečemo ji polacetalna OH skupina), ker ta C atom sprejme en vodik. Če kakšen alkohol reagira s to OH skupino, potem pride do glikozidne povezave. Vsem OH skupinam, ki jih rišemo v krožni obliki navzdol, so v **alfa** položaju. Tiste, ki so navzgor, pa so

v **beta** položaju.

Alfa-D-glukoza in beta-D-glukoza se močno razlikujeta v optični sučnosti. Če pa zmešamo obe verziji potem opazimo neko vmesno vrednost sučnosti - to je posledica vzpostavljenega ravnotežnega stanja, ker te dve molekuli prehajata ena v drugo in se vzpostavi ravnotežje.

Neciklične oblike sladkorjev so reducenti, ker aldehidna skupina deluje kot reducent.

Pri **pentozah** pride do podobnega pojava. OH napade aldehidni C atom in se tvorijo peterini obroči (furanoze). Peterini obroč se lahko tvori tudi pri heksozah, in sicer pri ketozah (ker je en C atom izključen iz obroča).

Pri **ketozah** pride do reakcije med OH skupino in drugim C atomom. Nastane **hemiketal** in na drugem mestu gor 'štrli' CH₂OH.

Sladkorji realno obstajajo v obliki kadi ali v obliki stolov.

DERIVATI MONOSAHARIDOV

Monosaharidi so aldoze in ketoze. Fisherjeva projekcija jih prikaže v linearni obliki, Haworthova pa v ciklični obliki. Obroč je peteren (furanosa) ali šesteren (piranoza). Če je OH skupina prosta imajo reduktivne lastnosti. S to skupino lahko tudi tvorijo glikozidne vezi (O-glikozidne ali N-glikozidne). Če pri glukozi srečamo namesto OH skupino NH₂ skupino, potem je to aminoglukoza.

N-acetilglukozamin je derivat, ki mu je zelo podobna **N-acetilmuraminska kislina** (srečali jo bomo pri celičnih stenah bakterij). Od N-acetilglukozamina se razlikuje po tem, da ima eter mlečne kisline.

Tudi **deoksiriboza** je derivat. Namesto OH skupine ima samo H. Riboze so v RNA, deoksiriboze pa v DNA.

Sladkorji so lahko tudi **fosforilirani**, na primer glukoza-6-fosfat, gliceraldehid-3-fosfat ipd. Fosfati pomenijo aktivne oblike sladkorjev. S fosforilacijo se ogljikovi hidrati pripravijo (aktivirajo) za nadaljno razgradnjo. Fosforilacija lahko poteče na kateremkoli C atomu.

Aminski sladkorji imajo namesto ene OH skupine vezano NH₂ skupino. So večkrat deli različnih polisaharidov. Fukoza, N-acetilgalaktozamin in beta-D-galaktoza so sestavni deli naših krvnih skupin.

29.3.2011

Če se OH oksidira, potem dobimo **uronske kisline** (glukuronska, manuronska,...). Te pa se rade vežejo (s pomočjo encimov) na zelo hidrofobne, nepolarne ksenobiotike (= tujek, prišel od zunaj v telo). S tem naredi tak ksenobiotik bolj topen, da se lahko izloči iz celic in gre iz telesa z urinom. To je en način detoksifikacije.

2. DISAHARIDI

Nastanejo s povezovanjem monosaharidov. Ponavadi se povežeta z 1,4 glikozidno vezjo (maltozen tip povezave). Lahko pa se orientirajo tudi tako, da se obe polacetalni skupini povežeta z 1,1 glikozidno vezjo (trehalozen tip povezave). Obstajajo še drugi tipi povezave (1,3 in 1,6).

Nekaj primerov disaharidov: Maltoza in celobioza sta oba disaharida iz glukoze, ampak se razlikujeta v vrsti vezi (alfa, beta). Laktoza je mlečni sladkor (galaktoza + glukoza), saharoza pa sadni sladkor (glukoza, fruktoza).

N-glikozidi lahko nastanejo, če se aminska skupina veže na polacetalno.

Vloga insulina - če se glukoza pojavi v večjih koncentracijah v krvi (kar se zgodi - veliko je dobimo s prehrano) se mora prevzemati iz krvnega obtoka in se skladiščiti v jetrih v obliki glukagona, hkrati pa gre v celice, kjer se spodbuja metabolizem (gre v piruvat). Kadar nimamo dovolj zaloge sladkorja v krvi se glukagon sprosti v kri in se inhibira njegovo razgradnjo v krvi, pospeši se biosinteza insulina (da bo glukozo spravil v celice).

Diabetes,

tip I; nič ali skoraj nič insulina, ker so celice v pankreasu poškodovane, lahko zaradi avtoimunosti ali infekcije (virusa). Ta tip ni povezan z debelostjo in nastane že v otroštvu, je pa manjšinski. Razvije se hitro in nastane ketoza (če ni glukoze potem celice za energijo uporabljajo maščobo, ki pri tem razpade na ketozo, tudi aceton, ki daje sladkornim bolnikom značilen zadah). Zdravnimo z injekcijami insulina in dieto.

tip II; raven insulina je lahko normalna (ali celo povišana), temeljna okvara pa je manjša občutljivost celic na insulin (vendar je lahko vzrokov več - npr. premalo ali nič insulinskih receptorjev). Ta tip je bolj pogost, simptomi pa se razvijajo počasi. Glavni način zdravljenja je dieta.

Predavanje 17 ; 29. 3. 2011 / Radovan Komel

POLISAHARIDI

Imamo **homopolisaharide** (iz ene same vrste podenot; npr. samo glukoza) in **heteropolisaharide** (iz dveh ali večih vrst sladkorjev). Lahko so **linearni** (dolge verige, ki so lahko tudi zvite) ali **razvejane** (imajo razcepe).

ŠKROB

Je rastlinska rezervna snov v celicah. Sestavljena je iz linearnega dela (amiloza; same alfa 1,4 povezave. So pod kotom, tako da lahko encimi razgradnje pridejo zraven) in iz razvejanega dela (amilopektin alfa 1,4 in alfa 1,6 povezave). V škrobu sta amiloza in amilopektin prepletene. Grmičasta (razvejana) struktura je bolj kompaktna (prihrani se na prostoru), hkrati pa je veliko koncev izpostavljenih, tako da encimi lahko v nekem času veliko število glukoz odcepi.

GLIKOGEN

Je zelo podoben škrobu, vendar je razvejanost večja kot pri amilopektinu. Je rezervna snov v živalih. Shranjen je predvsem v jetrih in lahko zavzema tudi do 10 procentov teže vlažnega organa. Nahaja se tudi v mišicah, vendar ga je manj (~1 procent).

Te molekule so zelo ogromne in nimajo neke strogo definirane velikosti - odvisna je od razpologe podenot.

Encim glikogenska fosforilaza fosforilira glukozo in jo odcepi. Če pa pojemo glikogen imamo v

prebavnem traktu druge encime - prebava se začne že v ustih (slina). Potem pa se stvar ponovi v tankem črevesju, kjer encime izloča trebušna slinavka.

CELULOZA

V glukozi so povezave beta, ne alfa - so linearne. Nastane veriga glukoz, med posameznimi verigami se vspostavijo vodikove vezi in dobimo plast, potem pa se tudi med temi plastmi tvorijo vodikove vezi; dobimo snop, ki je zelo močen. Človek nima encimov za prebavo celuloze; imajo pa jih prežvekovalci in termiti.

LAKTOZA

Galaktoza in glukoza sta povezani z 1,4 beta povezavo. Je mlečni sladkor; od njega so zelo odvisni dojenčki. Za cepitev vezi v tem polisaharidu potrebujemo encim laktazo. Če tega encima ni, pride do laktozne intolerance. Laktoza zastaja v prebavnem traktu, kjer se jo loti črevesna flora, nastajajo toksični metaboliti, ki dražijo črevesno sluznico. Pride do hudih vnetij in diareje, velike dehidracije (izguba vode) in lahko tudi do smrti.

HITIN

Je zunanji skelet (eksoskelet) pri rakih. Je linearna veriga N-acetilglukozaminov; monomeri so povezani z beta 1,4 vezmi, plasti pa so med seboj povezane z vodikovimi vezmi

CELIČNA STENA PRI BAKTERIJAH

Na vsako molekulo N-acetilmuraminske kisline, ki so linearno povezane med sabo, je estrsko (preko mlečne kisline) vezan tetrapeptid (z nenavadnimi D amino kisljinami), tetrapeptide sosednjih verig pa povezujejo pentapeptidi (navadno iz glicinov). Tako nastane mrežasta plast celične stene. Imamo Gram pozitivne in Gram negativne bakterije (barvilo po Gramu). Pri pozitivnih bakterijah lahko barvilo prodira skozi celične stene in obarva notranjost bakterijskih celic. Gram negativne pa imajo še dodaten lipiden sloj na površini celične stene in ta preprečuje, da bi barvilo šlo čez celično steno. Antibiotik **penicilin** preprečuje izgradnjo pentapeptidnega mostička in povezavo; ni torej mrežaste strukture. Zato oklepa ni in čim bakterija pride v drugo osmolarnost, počí.

GLIKOZAMINOGLIKANI

So kisli mukopolisaharidi (mukus = sluz, predvsem v dihalnih poteh. Vanj se vjamejo bakterije, potem jih lahko skozi nos / s kihanjem izločimo).

- hialuronska kislina je sestavljena iz glukuronske kisline, povezane z N-acetilglukozaminom. Povezava med njima je beta 1,3, tak disaharid pa je povezan z naslednjim z beta 1,4 povezavo. Hialuronska kislina je zelo viskozna; je v medceličnini, pri sklepih preprečuje trenje, ker jih podmaže.

Nekatere bakterije imajo encim, ki hialuronsko kislino razgrajujejo (hialuronidaza), tako da se izognejo ujetju v sluzi in lahko nastane problem. V človeškem telesu ima encim hialuronidazo samo spermij, ki se more prebiti do jajčne celice.

- hondroitin-sulfat je spet glukuronska kislina, povezana preko beta 1,3 vezi s sulfuniranim N-acetilglukozaminom. Je ena izmed glavnih komponent hrustančevine.

- keratan-sulfat je sestavljen iz glukoze, povezane s sulfuniranim N-acetilglukozaminom (ni sulfuniran na istem mestu kot pri hondroitin-sulfatu).

- heparin je iz linearne verige različnih uronskih kislin, ki so dodatno sulfunirane, in je inhibitor strjevanja krvi; uporablja se pri kirurških posegih.

GLIKOPROTEINI

Imamo neko polipeptidno verigo, na katero je pripet nek monosaharid ali oligosaharid. Prevladuje torej proteinski del.

PROTEOGLIKANI

Pri njih prevladuje sladkorna komponenta. Večinski delež je polisaharid, poleg njega pa neko manjšo polipeptidno verigo.

GLIKOLIPIDI

Lipidni del je lahko v membrani, ven pa štrli proteinski del.

KRVNE SKUPINE

Sistem ABO. V membrani eritrocita je zasidran sfingolipid, nanj pa je pripet oligosaharid (substancia H - iz petih sladkorjev). Če se na to substanco H pritrjuje še N-acetilgalaktozamin je to A antigen, če pa se pritrjuje galaktoza je to B antigen.

Če imamo samo ceramidno osnovo (sfingolipid + maščobna kislina + 5 sladkorjev), je to krvna skupina nič. Če imamo antigen A je to krvna skupina A, pri antigenu B je krvna skupina B, lahko pa je tudi krvna skupina AB (antigen A in B).

Genetsko so določeni encimi transferaze, ki lahko dodajo bodisi N-acetilgalaktozamin bodisi galaktozo.

Predavanje 17; 1. 4. 2011 / Radovan Komel

LIPIDI

V maščobah (nepolarnih topilih) topne molekule, v polarnih pa ne (tam tvorijo micelle in dvosloje). Za lipide obstajajo številne razdelitve.

1. skladiščni lipidi
 - maščobe
 - voski
2. strukturni lipidi
 - glicero-fosfolipidi
 - sfingolipidi
 - steroli
3. biološko dejavni lipidi
 - steroidi
 - lipidotopni proteini (A, D, E, K)
 - eikozanoidi

1. Skladiščni lipidi: - maščobe

So derivati (estri) glicerola in maščobnih kislin, ki so ponavadi različne pri različnih lipidov. Obstaja široka pestrost maščobnih kislin. Če imamo mnogo dvojnih vezi, potem imamo olje (bolj tekoče), manj dvojnih vezi pa je manj tekoče.

Čim daljša je veriga v kislini, tem višje je tališče (večja trdnost masti). Maslo ima kratke, nasičene (brez dvojnih vezi) maščobnih kislin.

Pri nenasičenih so dvojne vezi ponavadi vedno konjugirane; med njimi je ena dvojna vez. Bistveno nižje bo tališče - več ko je dvojnih vezi, bolj je tekoče in nižje je tališče.

Nasičene maščobne kisline imajo večjo rigidnost, nenasičene pa večjo fluidnost, ker so 'prelomljene' na področju dvojne vezi. Če jih sestavimo skupaj so torej manj urejene (večji nered), zato je maščoba bolj tekoča.

Triacil glicerol - ester glicerola s tremi maščobnimi kislinami.

2. Strukturni (membranski) lipidi

So glicerofosfolipidi - dve maščobni kislini in ostanek fosforne kisline, ki ima možnost številnih povezav. Nanjo se zato veže nek alkohol in to nam ustvari polarno glavo.

Drugi membranski lipidi so sfingolipidi. Del jih je tudi fosforiliranih, del pa jih ni. Za osnovo ni glicerol, ampak sfingozin. Ima eno maščobno kislino vezano in pa fosfat, na katerega je vezan alkohol; lahko pa nima fosfata ampak je nanj direktno vezan nek mono ali oligosaharid.

Glicerofosfolipidi - Glede na skupino (spojino), ki je preko fosforja vezana na fosfoglicerid, dobimo različne spojine, ki jih različno poimenujemo (če je vezan serin = fosfatidilserin, če je vezan glicerol = fosfatidilglicerol, ipd).

Fosfatidilholin je zelo pogost membranski lipid, včasih ga poimenujejo lecitin.

Sfingolipidi - imajo na srednjem C atomu amino skupino, na njo je z amidno vezjo vezana maščobna kislina. Na OH skupino pa je vezan nek sladkor (lahko preko fosfatne skupine ali direktno). To je spet polarna glava. Spojini rečemo ceramid (če je vezan H).

Če je preko fosforne kisline vezan fosfoholin potem dobimo sfingomielin.

Če pa so vezani nanj neki monosaharidi, ki niso vezani preko fosforja, so to cerebrozidi. Če pa je vezan kompleksen oligosaharid, potem so to gangliozidi.

So glavne komponente celic centralnega živčnega sistema.

Strukturni lipidi so polarni lipidi; torej so amfipatične molekule. Zato lahko vzdržujejo različne oblike, npr. micelle ali dvosloje. Lahko pa oblikujejo tudi liposome, to je dvosloj, znotraj katerega je polarno okolje. Liposom naredimo tako, da men zamrzovanjem z visokimi frekvencami stresamo emulzijo. Liposome v medicini uporabljamo za ciljan vnos v tarčne celice (tarčo prepoznamo s pomočjo protiteles, ki so vgrajeni v membrano liposoma).

Lipidi se lahko po dvosloju gibljejo bočno (horizontalno) ali vertikalno, z obratom (flip-flop).

Encimi **lipaze** razgrajujejo maščobe.

Soli maščobnih kislin so **mila** ali **žajfe**.

Hidroliza maščob je razpad maščob ob prisotnosti vode.

Predavanje 18; 1. 4. 2011 / Radovan Komel

STEROIDI

Delitev:

1. steroli (vsaj ena OH skupina, ponavadi na mestu 3)
 - živalski in rastlinski steroli
 - saponini, digitaloidi, steroidni alkaloidi
 - ekdi-steroli (ekdizon)
2. žolčne kisline
3. vitamin D (D2 iz kvasovk, D3 mi sintetiziramo)
4. steroidni hormoni
 - kortikoidi (glukokortikoidi, mineralokortikoidi)
 - spolni hormoni (ženski: gestageni, estrogeni; moški: androgen)

Za **STEROLE** je značilno **steroidno jedro**, ki je iz obročnega sistema. Imamo tri šestčlenske obroče in enega petčlenskega, poleg tega pa daljšo ali krajšo nepolarno stransko verigo. Na mestu 3 je tudi OH skupina, ki je lahko samostojna, lahko pa tudi zaeterna ali zaesterna z različnimi spojinami.

Najprej preštejemo obročni sistem, potem dve CH skupini, ki sta na obročnem sistemu, šele potem štejeemo stransko verigo.

Vse kar je pod ravnino obroča je alfa, kar je nad ravnino obroča pa je beta. Referenca je CH₃ skupina (je zgoraj).

Pri steroidih je oblika zelo pomembna, ker veliko steroidov deluje kot hormoni, pri njih pa je zelo pomembno, da jih specifičen receptor prepozna. Od oblike steroida in skupin na površini je odvisno, kateri receptor jo bo prepoznal.

HOLESTEROL

Glavni sterol v našem organizmu. Dobimo ga tako s prehrano kot tudi z lastno sintezo (sintetizira se v zelo kompleksni verigi reakcij; ta sinteza je mrežno prepletena z sintezo raznih lipoproteinov). Fiziološka vloga holesterola - je zelo pomembna komponenta celičnih membran, daje jim neko trdnost; je dosti rigidna molekula. Je tudi prekursor za vse ostale steroide v našem organizmu.

Preko 70 % se ga izloča v obliki žolčnih kislin, manjša količina se pretvarja v steroidne hormone, velik del se vgrajuje v celične membrane, nekaj pa se ga tudi metabolično razgradi.

Pri kvasovkah je njegov analog **ergosterol**.

STEROIDNI GLIKOZIDI

Tretje mesto na obroču je lahko glikolizirano z ostankom (glikosaharidom). Npr. saponini (primer je digitonin). Te spojine so obrambni mehanizmi rastlin in živali, v majhnih količinah pa jih lahko uporabljamo kot zdravila; v velikih dozah pa so strupeni.

Sem spadajo tudi sterolski alkaloidi, npr. solanin (v krompirju) ali tomatin (v paradižniku).

Zanimiv je tudi ekdison; je rastlinskega porekla in preko čudne simbioze pride v žuželke - larve ga jejo, v njih pa je ekdison hormon, ki stimulira razvojni cikel larve v metulja. Ko se ta razvije v metulja pa lahko oprashi rastline - tako sta larva in rastlina povezana v neke vrste simbiozo.

ŽOLČNE KISLINE

Ima več OH skupin, vse so v alfa položaju (pod ravnino obroča). Torej ustvarjajo neko polarno površino, druga površina pa je hidrofobna. Na stranski verigi je 5 C atomov, na koncu pa konjugirana skupina. Če ja na koncu na COO- skupina vezan še kakšen ion (npr Natrij) govorimo o soleh žolčnih kislin.

Vloga: Žolčne kisline se s hidrofobnim delom vgradijo v membrano maščobe, polarni del pa veže vodo.

Pride do strižnih sil in kapljica se raztrga na manjše dele - pri teh manjših delih pa žolčne kisline delujejo kot aktivatorji lipaz.

Sekundarne žolčne kisline nastanejo iz primarnih z delovanjem črevesne flore. Tudi te se lahko reabsorbirajo nazaj v jetra.

Telo proizvaja okrog 80 mg holesterola na dan; več kot polovico se pretvori v žolčne kisline, ki se kopičijo v žolču. Teh je veliko! Približno 90 % teh žolčnih kislin se ponovno absorbira v žolčnik in v jetra. Tako se uravnoteži poraba.

Če imamo preveč holesterola v krvni plazmi je ena od terapij ta, da jemo zdravila, ki vežejo žolčne kisline; tako posredno prisilimo holesterol, da se pretvori v žolčne kisline, ki se izločijo.

Žolčni kamni - če je preveč holesterola in premalo žolčnih kislin lahko nastanejo v žolčniku žolčni kamni. Nastane kot posledica motenega metabolizma holesterola. Odpravljajo se večinoma kirurško, ali s peroralno aplikacijo nekaterih maščobnih kislin.

VITAMIN D

Nastaja iz holesterola. Najprej nastane dehidroholesterol (vspostavi se dodatna dvojna vez na mestu 7). To nastane v jetrih, potem pa se pod vplivom UV žarkov v koži se obroč B razcepi, zamenja se konformacija - temu rečemo kalciferol. Potem pa v jetrih in ledvicah poteče še ena dehidroksilacija, tako dobimo vitamin D.

Vitamin poimenujemo ponavadi spojine, ki jih potrebujemo v majhnih količinah, vendar so nujno potrebne in jih ne sintetiziramo sami (potrebujemo zunanji vnos; pri vitaminu D potrebujemo Sonce - UV svetlobo).

Vitamin D je lipidotopen, zato lahko gre v celice. Tam se veže na receptor, gre v jedro in tam sproži sintezo kalcija-prenašalnih proteinov, ki lahko pripeljejo kalcij preko črevesne bariere v krvni obtok. Zato je vitamin D zelo pomemben pri privzemu kalcija (poleg drugih pomembnih nalog, npr. protivnetnega delovanja).

Če ni vitamina D lahko obolimo z rahitisom - nepopolno in nepravilno zgrajeno okostje.

Predavanje 19; 4. 4. 2011 / Radovan Komel

STEROIDNI HORMONI

To so kortikoidi, ki se v glavnem proizvajajo v nadledvični žlezi, in spolni hormoni, ki se v glavnem sintetizirajo v gonadah (nekaj malega pa tudi v nadledvični žlezi).

1. kortikoidi

- glukokortikoidi (uravnavajo metabolizem glukoze; njihova glavna tarča je periferija in jetra)
- mineralokortikoidi (uravnavajo metabolizem mineralov; njihova glavna tarča so ledvice)

2. spolni hormoni

Steroidni hormon je vezan na plazemski prenašalni protein. Ta ga pripelje do membrane celice in difundira čez. V citoplazmi ali v jedru sreča receptor, z njim gre na genom, kjer sproži biosintezo RNA molekul. To aktivira sintezo novih proteinov.

Glukokortikoidni hormoni so hormoni stresa.

GLUKOKORTIKOIDI in MINERALOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi imajo steroiden obroč, značilna je zgradba obroča 1 (tri-keto-štiri-en), na mestu 11 pa je beta OH skupina - brez nje ne more delovati. Potem pa je še stranska veriga, ki je pri vseh glukokortikoidih.

Mineralokortikoidi imajo dodatno CHO skupino.

Glukokortikoidi sodelujejo v metabolizmu glukoze. Njihova primarna tarča so mišice periferije. Delujejo kot katabolni - pospešujejo razgradnjo proteinov in preprečujejo njihovo biosintezo (v celici sprožijo biosintezo encimov, ki razgrajujejo proteine). V periferiji se tako proteini razgradijo v aminokislino, ki grejo v krvi do jeter. V jetrih pa glukokortikoidi delujejo drugače - pospešujejo biosintezo proteinov, tako da iz teh aminokislin, ki so prisotne v jetrih, na novo izgradijo glukozo.

Delujejo torej katabolno na periferiji (sprožijo razgradnjo proteinov) in pa anabolno v jetrih (sprožijo sintezo glukoze). Temu rečemo glukokortikoidni učinek.

So hormoni stresa. Če smo stalno pod vplivom tega efekta je slabo, ker zavirajo delovanje imunskega sistema (proteinov). Medicina to uporablja pri zaviranju vnetnega odziva - lahko jih apliciramo lokalno s kakšnim mazilom, kjer so glukokortikoidi in pa antibiotiki. Sistemsko pa se uporabljajo za zmanjšanje preveč burnih imunskih odzivov - pri alergijah ali avtoimunskih boleznih. Uporablja se predvsem derivat kortizola.

Glukokortikoidi imajo tudi nekaj mineralokortikoidnega učinka (zadržujejo soli v telesu).

Mineralokortikoidi pa imajo za glavno tarčo ledvice. Tam uravnavajo vodno/ionsko ravnovesje soli in vode v organizmu. Držijo ravno pravšnjo raven soli v telesu.

SPOLNI HORMONI

Gestagen je ženski spolni hormon. Govorimo večinoma o progesteronu; ta nima neke posebne stranske verige in je relativno preprosta molekula. To so v bistvu hormoni nosečnosti, ki uravnavajo menstrualni cikel in vzdržujejo nosečnost.

Androgen je moški spolni hormon, podoben gestagenu. To je testosteron. Vpliva na razvoj spolnih organov in sekundarnih spolnih značilnosti (zorenje spermijev, delovanje pomožnih spolnih žlez, moški način vedenja). Ima anabolni sintetski učinek - stimulira biosintezo proteinov. Derivati teh so znani kot sredstva zlorabe v športu! Jemati steroidne hormone daljši čas je škodljivo, ker vplivaš na balans (ravnovesje) različnih hormonov v telesu in pride do negativnih posledic.

Estrogen je ženski spolni hormon, vendar se razlikuje od gestagena in androgena, saj imajo aromatski obroč. Androgen je predhodnik estrogena. Skrbijo za razvoj spolnih organov, razvoj prsne žleze, uravnavanje menstrualnega ciklusa in ženskega odziva (ženskega načina mišljenja). Imajo tudi sistemski učinek - zmanjšujejo koncentracijo lipidov v krvi in povečujejo podkožne maščobne zaloge, ki so enakomerno razporejene po celem telesu. Dolgotrajna prisotnost v prevelikih koncentracijah povezujejo s komplikacijami, npr. z razvojem kakšnih rakov (rak dojke).

BIOLOŠKO DEJAVNI LIPIDI

Lipidotopni vitamini so A, D, E, K. Vitamin D smo že omenili v prejšnjih predavanju. Te vitamini so topni v maščobah, nikakor pa ne v vodnih topilih. Te vitamini se torej nalagajo v maščevju, zato lahko pride do hipervitaminaz - predvsem A in D.

Pomanjkanje (hipovitaminoza ali avitaminoza) je tudi škodljivo.

Vitamine nasploh razdelimo v dve veliki veji - lipidotopni in vodotopni vitamini. Hipervitaminoz vodotopnih vitaminov ni, ker se te stalno izločajo z urinom.

Predhodnih lipidotopnih vitaminov je molekula beta-karotena, ki nastane iz mnogih enot izoprena. Različni encimi obdelajo in modificirajo beta karoten v vitamin A1 (retinol). Ta se oksidira v rodopsin (11-cis-retinal), ki je pomemben, ker se poveže s proteinom opsinom v rodopsin, to je vidni čepek. Ko svetloba pade na vidni čepek pride do fotokemične reakcije in se cis vez pretvori v trans konformacijo - dobimo all-trans-rodopsin. Retinal se odcepi in impulz potuje naprej do možganov.

Tudi vitamin E in vitamin K sta iz izoprenskih podenot, na koncu je ciklična struktura. Vitamin E je antioksidant rastlinskega razvoja. Lovi proste radikale kisikovih reaktivnih snovi in jih nevtralizira. S tem skrbi, da je raven drugih antioksidantov ohranjena, predvsem raven glutationa. Ščiti tudi celične membrane, ker se celični lipidi (nenasičene maščobne kisline) ne smejo oksidirati (če se dvojne vezi v membranskih lipidih spremenijo v enojne, postane membrana bolj rigidna!). Pomanjkanje vitamina E je zelo redko, kot posledico pa ima krhke rdeče krvne celice.

Vitamin K deluje kot ko-faktor pri strjevanju krvi. Njegov antagonist je varfarin, ki je antikoagulant - uporabljamo jih pri strupih za glodalce. V medicini se uporablja v majhnih koncentracijah pri operacijah.

Dolihol je pomemben pri glikolizaciji aminokislin (posttranslacijska modifikacija).

Eikozanoidi

Sem spadajo prostaglandini, prostacikini, tromboksani in leukotrieni. Vsi se sintetizirajo iz arahidonske kisline, to je maščobna kislina z 20 C atomi. Dobimo jo s hrano ali pa se odcepi iz naših fosfolipidov. To so tkivni (parakrini = delujejo na bližnje razdalje) hormoni - v tistih tkivih, kjer nastanejo, tudi delujejo; lokalno delovanje. Imajo različne vloge, sodelujejo pa z drugimi hormoni pri uravnavanju ("fine tuning") njihovega delovanja.

Prostaglandini so vpleteni v občutek bolečine (lajšajo ali povečajo), pomagajo pri krčenju mišic, Aspirin deluje inhibitorno na encim prostaglandin sintazo, tako zavira tvorbo prostaglandinov, zato se glavobol ob uporabi Aspirina zmanjša.

Prostaciklin nastanejo iz prostaglandinov in so vazodilatatorji (pomagajo pri sproščanju mišic).

Tromboksani sodelujejo pri strjevanju krvi. Tudi na njih deluje Aspirin, s tem da zavira strjevanje krvi.

Lipoproteini

Zgrajeni so iz polarnih lipidov, v njih je vgrajen tudi holesterol in proteini. V notranjosti so maščobe. Ločimo **LDL** (low density lipoprotein; nizko gostotni), **VLDL** (very low density) in **HDL** (high density lipoprotein). Low/High density pride iz centrifugiranja - če centrifugiramo epruveto z lipoproteini bodo bolj gosti plavali bolj na površju. High density imajo večji delež lipidov, low density pa manjši delež lipidov in večji delež proteinov. Obstajajo tudi **hilomikroni**, te se izoblikujejo samo pri zelo mastni hrani.

Na vrhu lipoproteina so apoproteini, ki služijo za prepoznavo (ko pridejo do tarčne celice, da se lahko zlijejo).

Važno je razmerje med HDL in LDL. Eni so namreč prinašalci holesterola, drugi pa odnašalci holesterola (iz jeter v celice in iz celic v jetra). Holesterol more priti do celic, ker se delijo in ga rabijo za biološke membrane. LDL prinašajo holesterol, HDL pa odnašajo, in če je LDL preveč, potem se holesterol nalaga v celicah in stimulira pretvorbo teh celic v spužvaste celice - nabite so z maščobami, s kristali holesterola. Zaradi tega se lahko začne ožati lumen žil. Bolezni vnetja in posledičnih poškodb žilnih sten, ki se začnejo širiti (zapirati lumen) in zmanjšujejo prožnost žil, imenujemo ateroskleroza.

Predavanje 21; 5. 4. 2011 / Radovan Komel

NUKLEOTIDI, KOENCIMI, PROSTETIČNE SKUPINE, VITAMINI

1. NUKLEOTIDI

Nukleotid je nukleozid + fosfat. Nukleozid pa je organska baza + sladkor (na slajdu je roza pobarvan nukleozid).

Organska baza je aromatski sistem z delokaliziranimi elektroni. S sladkorjem je povezan z N-glikozidno vezjo. To je nukleozid. Če je nanj z estersko vezjo povezan fosfat, potem temu rečemo nukleotid.

Obstajajo nukleotid-mono-fosfati (NMP), nukleotid-di-fosfati (NDP) in nukleotid-tri-fosfati (NTP). Prva vez je esterska, dodatni fosforji pa so vezani na molekulo z anhidridno vezjo. Rečemo, da sta ti anhidridni vezi energijsko bogati, predvsem zato, ker je na kupu mnogo negativnih nabojev, ki se odbijajo. Zato je molekula nestabilna in želi raspasti.

Drug razlog, za to željo po razpadu, je večja resonančna stabilizacija. Razpadno stanje ima več možnih alternativnih oblik kot izhodno stanje, ker ima izhodno stanje dodatno vez, ki ga omejuje. Oblika z več stanji je resonančno stabilizirana in energijsko ugodnejša.

Kako se lahko molekule aktivirajo s pomočjo ATPja?

Direktna fosforilacija - če se reakcija odcepa fosfata, ki je močno eksergonska, sklopi z endergonsko, potem lahko endergonska poteče.

Druga možnost aktivacije pa je, da je vmesen intermediat ADP, ki vsebuje še eno energijsko bogato vez in lahko še naprej tvori kovalentne vezi.

Primer je fosforilacija glukoze. Na glukozo se lahko veže tudi UDP (uridin di fosfat), dobimo UDP glukozo, ki se naprej oksidira v kislino.

Nukleotidi so torej **energijsko bogate molekule**, služijo prenosu energije. Imamo pa tudi **sporočilne molekule**, primer je adenzin-3' 5'-ciklični monofosfat (s črticami označimo položaj na sladkorjih, da jih ne mešamo s položaji na bazah). To je cAMP molekula, ki se tvori z encimom adenilatne ciklaze, razgrajuje pa z encimom fosfodiesteraze (cAMP ne sme biti stalno prisoten v velikih količinah). Fosfodiesterazo infibira kofein - zato smo ob kofeinu bolj živahni.

2. KOENCIMI IN PROSTETIČNE SKUPINE

V številnih primerih encimi ne delujejo kot samostojne molekule, ampak jih pomagajo neki kofaktorji. Takemu kofaktorju, v primeru, da lahko pride na encimsko mesto skupaj s substratom, rečemo koencim. Tak koencim je po encimski reakciji spremenjen, v prvotno stanje pa se bo lahko vrnil v obratni reakciji, ali pa s kakšnim drugim encimom (npr. če pride pri prvi reakciji do oksidacije koencima, more priti pri drugi do redukcije koencima).

Podobna je prostetična skupina - s to razliko, da je stalno (kovalentno) vezana na encim (je neproteinski del encima; podobno kot je hem v hemoglobinu). Substrat pride v encim, zgodi se povezava, substrat gre v produkt, prostetična skupina pa je spremenjena. V prvotno stanje se lahko povrne samo v tem istem encimu, v povratni reakciji.

3. VITAMINI

So esencialne spojine - nujno potrebne za življenje, vendar jih ne sintetiziramo sami. Vitamin je kemijsko aktivni del koencima.

Vodotopni vitamini

Hipovitaminoze so znane, hipervitaminoze pa ne (ker se vitamini topijo v vodi in izločajo z urinom).

NAD

To je koencim nikotinamid-adenin-nukleotid. Fosforilirana oblika je NADP. Morajo biti tako kompleksni, ker jih morajo prepoznati specifični receptorji. Aktivni center je vitamin (amid nikotinske kisline).

Reakcija pa je taka, da se veže vodik in prinese svoj elektron in enega vzame iz dvojne vezi, da nastane kovalentna vez. Dvojna vez se premakne na drugo mesto.

Podobno kot NAD delujeta FMN in FAD (to je koencim vitamina B2 - riboflavina).

Koencim A

Je zelo kompleksna spojina. Ima adenilni del (cel nukleotid adenzin), eno aminokislino (beta alanin), na koncu pa cisteamin (alkohol z SH). Ta SH je aktivni del, kjer se lahko acetilni ostanek veže (dobimo acetil-koencim A). Povezava žveplo-acetil je energijsko bogata vez, zato acil zlahka vstopi v neko reakcijo - temu rečemo aciliranje.

Piridoksal fosfat

Sodeluje pri prenosu amino skupin. Amino skupina se lahko prenese na keto skupino, prevzame se karboksil.

Folna kislina

Koencimska oblika je tetrahidrofolat (še štiri vodikovi atomi); gre za prenos skupin z enim vodikovim atomom. Je nujen rastni faktor pri bakterijah. Spojine, ki jim rečemo sulfonaidi, oponašajo strukturo te molekule, da jih vežejo bakterije - vendar pa potem bakterijski encimi ne morejo delovati, zato bakterija pogine.

Holin

Je važen del številnih molekul (npr. acetilholin, ki je nevrottransmitter). Ne pozna se koencimske oblike. Ob pomanjkanju se ne razvijejo pravilno možgani.

Kobalamin (vitamin B12)

Je podobna kot hem, le da je namesto železa noter kobaltov atom. Na eno valenco je lahko vezan cianid (cianokobalamin). Je zelo važen dejavnik pri zorenju eritrocitov - ob pomanjkanju imamo nezrele eritrocite in pojavi se značilno anemično stanje. Faktor, ki ga lahko prenaša (intrinzični faktor) se sintetizira v želodčni sluznici. Če tega faktorja ni (npr. ob poškodbi želodčne sluznice ali zaradi genetske okvare), potem ne moremo dobiti vitamina B12, tudi če ga je v prehrani dosti. Prenša razne skupine z enim ogljikovim atomom.

Askorbinska kislina (vitamin C)

Peteren obroč s kisikom, ima tudi OH skupine in keto skupino. Prenša hidroksile, lahko pa tudi prenaša redukcijske ekvivalente. Deluje kot močan antioksidant in nas varuje pred prostimi radikali.

Lipidotopni vitamini - vitamin A, D, E in K.

Vitamin A

Osnovne enote dobimo s hrane, tvorimo retinol, ki se spremeni v retinojsko kislino (glej prejšnje predavanje)

Vitamin D

Nastane iz holesterola. Najprej se uvede dvojno vez, potem pod vplivom UV svetlobe se spremeni v aktivno obliko. Gre v celice, se veže na receptor in potuje v genom, kjer vpliva na izražanje genov.

Pri vitaminih je bolj pomembno znati naloge vitaminov kot pa natančne strukture!

Predavanje 22; 8.4.2011 / Radovan Komel

GENOM IN NUKLEINSKE KISLINE

Genom se ponavadi gleda v haploidnem smislu - mi pa smo diploidni organizmi. Naš genom v čisto osnovnem smislu je en niz kromosomov plus oba spolna kromosoma plus 'mali mitohondrijski kromosom'. Mitohondrijev je lahko v celici veliko, vsak pa ima veliko kopij mitohondrijskih kromosomov (ampak so vsi enaki! Zato prispevajo manj kot 1 procent k celotnem genomu). Genom je torej niz 22 kromosomov plus dva spolna kromosoma.

Kromosom je ena molekula DNA, ki je zelo zvita in v kombinaciji z raznoraznimi proteini, predvsem histoni. Zvita more biti zato, da lahko pride v celično jedro. To je namreč veliko od 1 do 3 mikrometrov. Če pa bi raztegnili vse kromosome, bi bila skupna dolžina DNA 1,7 metra. DNA mora biti torej zelo zvita in organizirana, da paše v jedro.

Zgradbo DNA sta odkrila dva znanstvenika, Francis Crick in James Watson. Gre za dve verigi, ki se ovijeta ena okrog druge. Velika vrednost tega odkritja, poleg tega, da vemo, kakšna je zgradba, je da ta zgradba vsebuje informacijo (informacija = posledica zgradbe).

Osnova DNA je nukleotid (sestavljeno iz nukleozida plus fosfata). Baze pa so lahko purinske ali pirimidinske. Pri pirimidinih je šestčlenski obroč, pri purinih pa kombinacija šestčlenskega in

petčlenskega obroča. Preko N atomov v obročih poteka N-glikozidna povezava s sladkorjem. V nukleinskih kislinah nastopata dve vrsti sladkorjev - riboza in deoksiriboza (če namesto OH skupina nastopa samo vodik - H).

Purinski bazi sta adenin in gvanin, pirimidinske baze pa so citozin, timin in uracil. V DNA nastopa timin, v RNA pa namesto timina nastopa uracil.

Nukleotidi se med seboj povezujejo v smeri 5' proti 3' (prvi ima 5' prosto, 3' pa poveže z 5' naslednjega nukleotida - to je fosfodiesterska vez). Takšna iztegnjena molekula ima pri fiziološkem pH izrazit negativen naboj, ki ga kompenzira ponavadi predvsem magnezijev ion ali histidinski ostanki. To je torej kovalentno ogrodje verige DNA (RNA). Potem pa se dve taki verigi povežeta med seboj. Orientirata se antiparalelno in se povežeta preko svojih hidrofobnih baz, ki lahko tvorijo vodikove vezi. Vedno se vežejo pari **adenin - timin** in **guanin - citozin**. Med adeninom in timinom sta dve vodikovi vezi, med guaninom in citozinom pa tri vodikove vezi. Ta specifična povezava je kot posledica večje energijske stabilnosti - razdalje in koti med nukleotidi so enakomerni.

Tako molekulo DNA stabilizirajo vodikove vezi med baznimi pari, hidrofobne interakcije znotraj baznega okolja in pa elektronska resonanca. Hrbtenico pa tvorijo kovalentne povezave - fosfodiesterske vezi.

Dve verigi DNA se povežeta in se ovijeta, razdalje ostajajo enakomerne. To je najbolj stabilna zgradba te molekule. Znotraj te strukture obstaja velika brazda in mala brazda. Zaporedje nukleotidov je znotraj različnih brazd različno, lahko tudi specifično za posamezno vrsto brazde.

Enote za dolžine DNA je **bazni par** - bp.

Človeški genom je zelo velik. Če bi celotni človeški genom pisali s črkami te velikosti, bi potegnili črto od nas do Toronta. Vsebuje 3 milijarde nukleotidov.

VELEZVITJE DNA

Osnovna dvojna vijačnica DNA se ovije okoli nukleosomskih oktamerov (to so jedrni proteini, histoni). Potem pa pride do afinitete med temi nukleosomi in te se med seboj povezujejo v še bolj kompaktno zgradbo. Prisotni so tudi nekateri nehistski proteini, vendar to ni zelo pogosto.

Kromosome ponavadi pod mikroskopom ne vidimo. Vsi so združeni v neko maso, ki mu rečemo kromatin (včasih so mu rekli amorfen kromatin). Ta kromatin v bistvu ni amorfen - je zelo aktiven, tam se prepisujejo in uravnavajo geni. Kromosomi postanejo vidni pred delitvijo celice, ko se še dodatno kondenzirajo pod vplivom dodatnih proteinov, kondenzinov.

Zaporedje nukleotidov je informacija (npr. CGAAG..). Odsek v molekuli DNA, ki nosi zaključeno sporočilo, je **gen**. Geni imajo ponavadi na začetku in koncu zaporedja, ki uravnavajo njihovo delovanje. Produkt izražanja genov so vedno molekule RNA.

Delitev DNA

Kromosomska garnitura se podvoji (S-faza celičnega cikla). V mitozni kromosomi delitveno vreteno loči in dobimo dva genetska materiala, za vsako hčerinsko celico enega.

Kjer se začne replikacija, tam je **replikacijska točka DNA**. To točko poiščejo proteini, ki DNA razprejo kot zadrgo in tam se začne podvojevanje DNA (na templetu se sintetizira komplementarna veriga).

Na vodilni verigi poteka sinteza enovito, na drugi (lagging) verigi pa poteka s pomočjo Okazakijevih fragmentov (sodelujeta DNA ligaza in primaza) - glej celico :D

Posledica komplementarnosti baz je popolnoma enaka genetska informacija v obeh hčerinskih celicah po delitvi.

Pri prepisu pa je podoben začetek - spet se razpre dvojna vijačnica, vendar tokrat deluje RNA polimeraza (ne DNA polimeraza), ki iz ene verige sintetizira homologno RNA molekulo. Posledica je, da je molekula RNA komplementarna eni od obeh verig DNA. Ta molekula RNA je lahko končni produkt (npr. ribosomalne DNA), če pa je sintetizirana mRNA (messenger RNA) je to samo vmesnik - potuje iz jedra ven in grejo na ribosome. Tam se kodoni prevedejo v aminokislino. Specifično zaporedje teh aminokislin je rezultat genetskega zapisa.

Genetski kod je sestavljen iz **kodonov**. To so tripleti baz oz. nukleotidov. Zaporedje kodonov pa nam da zaporedja aminokislin.

Če se zgodi kakšna mutacija (se spremeni kakšen nukleotid), potem je triplet (kodon) drugačen! Torej sintetizira drugačno aminokislino, zato se protein drugače zviije ali napačno deluje. Če pa kakšen nukleotid izpade, potem se bo celoten genetski zapis čitan narobe in bo cel protein drugačen.

Na genu je področje, ki sproži prepisovanje. To je promotorsko področje (promotor). Na koncu pa je terminator. Vsak gen lahko izraža nek RNA.

Predavanje 23; 11. 4. 2011 / Radovan Komel

RNA

Pri DNA imamo deoksi nukleotide (nastopa deoksiriboza - namesto enega OH je samo H). Pri RNA pa je namesto deoksiriboze v nukleotidu riboza.

Imamo različne vrste RNA:

- mRNA (messenger, sporočilna RNA); večinoma gre za to RNA. Ta RNA gre iz jedra ven v ribosome, kjer poteče translacija. mRNA nosi informacije za sintezo proteinov.
- tRNA (transportne); prinašajo aminokislino v sintezo proteinov.
- rRNA (ribosomske); tvorijo mrežo, v katero se ujamejo majhni proteini. Tvorijo ogrodje ribosomov.

mRNA radi rišemo linearno, ker je lažje za predstavo, vendar ima ta molekula sekundarne strukture. Od te zgradbe je odvisna hitrost prevajanja in uravnavanje prevajanja,...

Sintezo RNA iz DNA izvaja RNA polimeraza.

RIBOSOMALNA RNA

To so precej velike RNA in jih je več vrst. Imajo zelo bogato sekundarno strukturo, v katero se ujamejo ribosomski proteini in tvorijo veliko ter malo podenoto ribosoma. Večinoma sta dve ali tri različne velike rRNA prepletene med sabo, v njih pa se potem ujamejo ribosomski proteini.

Ribosomski proteini so zelo mali in jih je v mreži okrog 60 - tvorijo veliko in majhno podenoto, ki se združita, ko naletita na mRNA. Delujejo eden na drugega - ko se veže kakšen mRNA pride do kaskadnih

reakcij med njimi (spreminja se zgradba, oblika,...) in ker jih je zelo veliko lahko branje poteka zelo 'fino', na 60 različnih točkah kontrole.

Mala in velika podenote ribosoma se združita, ko naletita na mRNA. Ribosom bere triplete, ko pa jih bere se na njem spreminjajo afinitete za različne tRNA, ki nosijo aminokislino.

Evkariontski ribosomi so večji od prokariontskih.

TRANSPORTNA RNA

To je majhna RNA. Veriga se oblikuje v značilno sekundarno strukturo, ki je podobna deteljici. Pri vseh tRNA je na koncu CCA (dva citozinska in en adeninski nukleotid). To je značilno mesto, ki veže aminokislino (to se zgodi encimsko, ob porabi ATPja). Nastane tRNA aminoacil.

Imamo tudi 'antikodonsko ročico', ki ima nek triplet. To mesto prepozna antiparalelen triplet na mRNA. Imamo še D ročico, T ročico in psevdouridinsko ročico. Te ročice so važne zato, ker se RNA zvijajo v terciarne strukture in zaradi teh ročic ima vsaka tRNA nekoliko drugačno obliko. To je pomembno zato, da bo encim, ki doda aminokislino na tRNA, prepoznal značilno obliko.

TRANSLACIJA

Na triplete v mRNA prihajajo antikodoni, ki nosijo aminokislino. Tako se postopoma nalagajo aminokislino, ki prepoznajo značilne kodone. Ko se veže druga tRNA na kodon se aminokislino povežejo in prvi tRNA se odcepi od ribosoma, na njeno mesto pa se premakne drugi tRNA (s tem spet sprost mesto za naslednji tRNA - v ribosomalni podenoti je namreč prostora za dve tRNA naenkrat; dva tripleta).

Sinteza se prekine na koncu mRNA, kjer je mesto, ki ne kodira nobene aminokislino. Tja lahko pride voda in prekine (konča) sintezo.

Startni kodon je vedno AUG, kar kodira aminokislino metionin. To je zato, ker ima mRNA še spredaj posebno zaporedje, ki interagira z rRNA in pravilno pozicionira AUG zaporedje kot prvo zaporedje na verigi.

Na eni mRNA je veliko ribosomov - ena mRNA se torej porablja za sintezo več kopij enega proteina.

KROMOSOMSKE MUTACIJE

Mutacije na kromosomski ravni. Lahko pride do izpada večjega segmenta, do podvajanja znotraj enega kromosoma... ponavadi pride do tega med mitozo, ko jih narazen vleče delitveno vreteno.

Prisotnosti nenormalnega števila kromosomov v celici rečemo aneuploidija.

TOČKASTE MUTACIJE

So substitucije, delecije in insercije.

Primer **substitucije** je zamenjava enega nukleotida oz. zamenjava enega tripleta. Vendar pa to ne pomeni vedno, da je napačna aminokislina v proteinu, saj eno aminokislino kodira več različnih tripletov (genetski kod je degeneriran). Če je aminokislina enaka, tečemo tej mutaciji tiha substitucija. Zadnje čase ugotavljamo, da lahko tudi te tihe mutacije škodujejo človeku in sicer v kombinaciji ena z drugo pospešujejo staranje.

Če pa je spremenjena oblika in aktivnost produkta kot posledica mutacije gena, je to substitucija. Te

mutacije so fenotipsko bolj izrazne, saj lahko povzročajo močno spremenjene in nefunkcionalne proteine. Mutacija lahko ustvari tudi prezgoden stop kodon. Tako se sinteza proteinov prezgodaj konča in imamo okrnjen, nefunkcionalen protein.

Če pride do **delecije**, potem pride do premika - celoten gen se bere narobe, ker so vsi tripleti zamaknjeni (drugačni). Torej od mesta delecije (ali **insercije**) so vse aminokisliline različne in to pomeni popolnoma drugačen protein, kar ima precej drastične posledice. Te posledice so najmanjše, če pride do insercije/delecije čim bližje koncu gena.

Vse mutacije pa niso škodljive - protein lahko z njimi tudi pridobi na lastnosti. Takrat ima mutant prednost pred ostalimi v svojem okolju. Zato so se tekom evolucije nekatere mutacije ohranile.

Predavanje 24; 15. 4. 2011 / Damjana Rozman

PROTEINI - SPLOŠNO

Proteine sestavljajo aminokisliline, povezane s peptidno vezjo. Ta je po svoji osnovi amidna vez, nastane pa pri kemijski reakciji med alfa karboksilno skupino prve aminokisliline in amino skupino druge aminokisliline. Povezava, ki nastane z odcepom vode, je amidna vez - izraz peptidna pa samo ponazarja, da je nastala med obema aminokislinama.

Ko se aminokisliline 'sestavljajo' v peptid ali polipeptid se to vedno dogaja v isti smeri - od N konca (N terminal) proti C koncu (C terminal). To je važno zato, ker ko se DNA prepíše v RNA in se protein začne tvoriti, se najprej doda aminokislina, ki je na N koncu - zaporedje se torej bere od N proti C.

Informacija je zakodirana v DNA nukleotidih. Potem pride na vrste prepisovanje (transkripcija) genetske informacije. Nastane rRNA, tRNA ali mRNA - ta nosi informacijo za sintezo proteina. Za transkripcijo pride na vrsto translacija - mRNA se prevede v protein.

Genetski kod je degeneriran - več različnih tripletov nukleotidov lahko kodira isto aminokislino.

AMINOKISLINE

Imajo COOH skupino (s kislinskimi lastnostmi) in NH₂ skupino (z bazičnimi lastnostmi). Lahko jih razdelimo na 4 podskupine - tiste z nepolarnimi stranskimi verigami, tiste z nenabitimi polarnimi stranskimi verigami, tiste s kislimi stranskimi verigami in tiste z bazičnimi stranskimi verigami.

Lastnosti radikalov aminokislin določajo, kako se bo protein zvil.

Aminokisliline lahko sodelujejo kot šibke kisline ali kot šibke baze. Delovanje šibkih kislin oz. njihove lastnosti v pufrskem okolju opišemo s Handerson-Hasselbachovo enačbo. Vsaka AK ima svojo pufrsko kapaciteto, ta pa je odvisna od tega, kakšen radikal ima aminokisliline. To pa zato, ker v polipeptidni verigi sta alfa karboksilne in pa amino skupine zasedene (razen prve in zadnje v verigi), zato pridejo pri pufrskih v poštev samo stranske verige.

SPLOŠNE LASTNOSTI PROTEINOV

Proteini so esencialni deli celic. So široko zastopani in jih je ogromno različnih vrst. Večina je sestavljena

iz 20 L-aminokislin. Imamo tudi D-aminokislino, ki se lahko včasih inkorporirajo v proteine. V proteinih so aminokislino povezane s peptidno vezjo.

Proteini imajo zelo različne molekulske mase in strukture. Glede funkcij jih razdelimo po skupinah - nekatere osnovne funkcije so kataliza (encimi), obrambni mehanizem (protitelesa), signalni procesi, transport (mnoge biomolekule se v celicah ne morejo prenašati same, zato potrebujejo posrednike ali prenašalce), opora (oporni proteini v veznem tkivu, kontraktilni proteini,...), skladiščni proteini (v človeku nekoliko manjšega pomena kot pri drugi živalih) in pa še druge funkcije (npr. svetloba pri kresničkah, ki je posledica reakcije, ki jo katalizira protein).

Proteini imajo izredno velik razpon velikosti. Večina se jih giblje med 100 in 600 aminokislinskih ostankov. Imamo pa tudi ekstreme - citokrom c (del dihalne verige) je zelo majhen protein. Največji protein pa je titin. Enota za izražanje mase proteinov je **dalton** (Da). Proteini so velikosti nekaj deset do nekaj tisoč kilodaltonov (kDa).

Nekateri proteini delujejo kot monomeri, nekateri pa imajo več podenot. Tiste, ki imajo več kot eno podenoto, imajo poleg terciarne še kvartarno strukturo.

Dalton - To je ena od enot za atomsko maso. To je masa enega vodikovega atoma.

Proteini imajo različne funkcije in različno število podenot. Vsebnost aminokislin med proteini je kar precej različna. Vsebnost in zaporedje aminokislin določa njihove strukture.

Če primerjamo citokrom c in kimotripsinogen je pri citokromu c največ lizina, veliko pa tudi glicina. Pri kimotripsinogenu pa je zastopanost aminokislin dosti bolj enakovredna.

Ne glede na to, da je proteinska sestava različna, pa obstaja približen način, kako iz znane mase proteina približno ocenimo, koliko aminokislin je dolg. Izhajamo iz izračuna povprečne molekulske mase aminokislin (138). Eksperimentalno je bilo dokazano, da je v proteinih več majhnih aminokislin kot večjih, zato je dejansko povprečna molekulska masa, z upoštevanjem te korekcije, 128. Upoštevati je treba še to, da se ob združitvi dveh aminokislin odcepi voda, zato od 128 odštejemo 18 - dobimo **110**. S tem podatkom lahko ocenimo število aminokislin v enem proteinu.

RAZDELITEV AMINOKISLIN GLEDE NA OBLIKO IN SESTAVO

1. po obliki molekule

- fibrilarni proteini (pretežno v nitasti obliki)
- globularni proteini (kot neke vrste stopljena krogla)

2. po kemijski sestavi

- enostavni proteini (vsebujejo samo aminokislinske ostanke)
- konjugirani proteini (sestavljene proteini; poleg aminokislinskih ostankov vsebujejo še neko neproteinsko komponento)

Včasih se je veliko govorilo še o apoproteinih in holoproteinih; ta izraza veljata za sestavljene proteine. Če je protein sestavljen in mu odcepimo prostetično skupino, govorimo o apoproteinu, drugače pa je holoprotein.

PEPTIDI IN PROTEINI - pregled

Sestavljeni so iz aminokislin, povezanih s peptidnimi vezmi. Imajo zelo različne velikosti. Meja med peptidom in proteinom je zabrisana, ampak načeloma tistemu, kar je pod 100, rečemo večinoma peptid. Lahko so preprosti ali sestavljeni, imajo eno ali pa več podenot (primer je multiproteinski kompleks - RNA polimeraza).

Od primarne strukture proteina do funkcije

1. zaporedje aminokislin določa tridimenzionalno strukturo proteina
2. struktura proteina določa njegovo funkcijo (zaporedje AK določa torej funkcijo preko strukture).
3. Protein je lahko teoretično v tisočih različnih konformacijah (oblikah) - v življenju pa proteinu dovoljuje samo eno ali zelo majhno število stabilnih struktur.
4. Za neko tridimenzionalno strukturo proteina so najpomembnejše sile šibke interakcije med aminokislinskimi radikali (nekovalentne povezave) - to velja za terciarno strukturo
5. Ne glede na to, da obstaja ogromno število različnih možnih struktur, ki jih lahko proteini tvorijo, pa najdemo znotraj proteinov neke vzorce, ki so najbolj pogosti.

Primarna struktura - aminokislinsko zaporedje.

Sekundarna struktura - gre za to, da imamo v polipeptidni verigi možnost za šibke sile. Kadar te nastopajo med aminokislinskimi radikali, gre za terciarno strukturo. Lahko pa tudi karbonilni kisik in amino dušik (ki sta v peptidni vezi) med seboj tvorita vodikove vezi, ker imajo proste elektronske pare. To se lahko dogaja znotraj ene peptidne verige, ali pa če imamo več polipeptidnih verig vzporednih. Tudi sekundarno strukturo torej vzdržujejo šibke interakcije, vendar so te vodikove vezi med aminokislinskimi ostanki.

Terciarna struktura - trak, ki nastane pri sekundarni strukturi, se še dodatno zvije v prostoru

Kvartarna struktura - o tej govorimo samo takrat, kadar ima protein več podenot.

Primarna struktura je ena sama (zaporedje polipeptida), sekundarnih pa je lahko več. Najpogostejše so:

- alfa heliks - je alfa desnosučna vijačnica (nima ničesar z dvojno vijačnico DNA!). Desno sučen je zato, ker imamo L-aminokislino, te pa vedno tvorijo desnosučno vijačnico.
- beta struktura - rečemo ji tudi beta naguban list. Lahko je paralelna, antiparalelna ali mešana.
- beta zavoj - sestavljen iz štirih aminokislin. Je zavoj in je pomemben del sekundarne strukture.

PRIMARNA STRUKTURA

Primarno strukturo proteinov določimo z zelo modernimi tehnikami, s katerimi lahko na enostaven in hiter način določimo zaporedje aminokislin. Temelji na hidrolizi (hidroliziramo peptidne vezi, ločimo aminokislinske ostanke in na podlagi kemijskih lastnosti določimo, katera AK je katera). Bolj znana za določevanje primarne strukture pa je **Edmanova razgradnja (degradacija)**. Temelji na tem, da se na N terminalen konec proteina kovalentno veže barvilo PHT. Ko se to barvilo veže se zgodi hidroliza, vendar se bo odcepila samo tista peptidna vez, ki je za tem barvilom - odcepljamo torej eno in po eno aminokislino. Tako počasi beremo AK zaporedje z N-terminalnega konca. Danes se uporabljajo druge metode, predvsem masno spektrofografijo.

Danes je določene na 10 tisoče primarnih struktur proteinov, od človeka do bakterije. Informacije o primarnih strukturah proteinov so dostopne v podatkovnih zbirkah. S primerjavo aminokislinskih zaporedij so ugotovili, da so si nekateri proteini po sestavi zelo podobni, zato so jih razdelili v **družine**.

Znotraj vsake **družine proteinov** so določena pravila, poleg podobnosti v vsebnosti aminokislin. Predvsem so si podobne v višjih strukturah (terciarne) in pa v funkciji. Lahko pride do tega, da sta strukturi dveh proteinov iste skupine navidezno iste, čeprav sta si podobni le v 25 % - to zato, ker so nekatere aminokisljive (imajo iste lastnosti) in privedejo do podobne (enake) strukture.

Razlika med družino in nadružino - **naddružina** je sestavljena iz večih družin.

Primarna struktura proteinov je zelo pomembna ravno tako, ker lahko napake v eni sami aminokislini privedejo do motenega delovanja proteina in do različnih bolezni. Pri velikem deležu dednih bolezni pripelje do usodne posledice zamenjava ene same aminokisljive (npr. srpasta anemija).

SEKUNDARNA STRUKTURA

1. desnosučna vijačnica (alfa heliks)

Vzdržujejo jo vodikove vezi med aminokislinskimi ostanki. Pravilo je, da je čisto vsak karbonilni kisik in čisto vsak vodik na dušiku povezan z vodikovo vezjo - vzpostavi se torej maksimalno število vodikovih vezi med peptidnimi ostanki.

Poleg vodikovih vezi k alfa heliksu pripomorejo tudi elektrostatske interakcije - aminokisljive, ki imajo pozitivne in negativne radikale lahko tvorijo med seboj interakcijo.

Nekatere aminokisljive ne marajo alfa heliksa - na primer glicin, ki je premajhen, da bi vzdrževal razdaljo, ali pa prolin, katerega alfa aminoskupina je v obroču in zato se ne more tvoriti maksimalno število vodikovih vezi.

Neke razdalje so fiksne - približno 0,5 nm med dvema zavojema.

Kaj vpliva na stabilnost desnosučne vijačnice?

- če so nabite aminokisljive (lizin, arginin, histidin kot pozitivno in glutamiska/asparaginska kot negativno nabite) potem imamo elektrostatski privlak, kar stabilizira vijačnico. Če bi bile preblizu skupaj ali isto nabite skupaj, potem bi se odbijale.
- za tri oz. štiri aminokisljive AK v zaporedju morajo biti takšni radikali, ki lahko ali tvorijo elektrostatske interakcije ali pa vodikove vezi
- glicin in prolin ne nastopata dostikrat v vijačnici
- na koncu polipeptidne verige imamo NH_3^+ , na drugem koncu pa COO^- . Nekaj aminokislin v bližini C terminala je ponavadi bazičnih (lizin, histidin, arginin), ker prinesejo dodatni pozitivni naboj, ki stabilizira ta minus. Na področju N terminala pa pogosto najdemo asparaginsko in glutaminsko kislino, ki s svojim minusom nevtralizirata plus na NH_3^+ terminalu.

2. beta struktura (beta konformacija, beta naguban list)

Pri beta strukturi gre za to, da imamo aminokisljivsko zaporedje, kjer lahko nastanejo vodikove vezi med aminokisljinami v drugačnih ravninah kot pri alfa vijačnicah, zato dobimo nekakšno ploskev. Tako kot pri alfa vijačnicah so gonilne sile vodikove vezi, le da niso točno določene razdalje med njimi (pri alfa vijačnicah je namreč vodikova vez v povprečju na 3,6 aminokislin).

Če verigi, med katerimi nastanejo vodikove vezi, tečejo v nasprotni smeri, potem je to **antiparalelna beta struktura**, če pa verigi tečeta v isti smeri je to **paralelna beta struktura**. Antiparalelna je bolj

stabilna, ker imamo pri njej vodikove vezi paralelne. Če pa obe verigi tečeta v isti smeri, bodo vodikove vezi nekoliko pod kotom.

Za glicin smo rekli, da ne mara v alfa heliks, gre pa rajši v beta strukturo. Keratini, ki so fibrilarni proteini, imajo veliko glicina in alanina.

Primeri beta strukture: svila, pajkove mreže, v človeškem telesu pa npr. beta keratin. Pri fibrilarnih proteinih, ki imajo velike ploskve sekundarne strukture, rečemo da imajo poudarjeno sekundarno strukturo.

Prioni - krajši proteini, ki povzročajo npr. bolezen norih krav. Pri tej bolezni ne pride do napake v dednem zapisu ampak zato, ker se protein narobe zvije. Na sliki vidimo patogeni prion (glej slide), ki ima isto aminokislinsko sestavo kot normalen prion, vendar je v drugem primeru velik del proteina v beta strukturi. To pomeni, da se je pod določenimi pogoji alfa heliks pretvoril v beta strukturo.

Pri prionskih boleznih je značilno, da osebek iz okolja pridobi nek napačno zviti protein. Ta protein inducira ostale, da se konformacijsko spremenijo. Prionske bolezni so torej inducirane - napačno zviti protein sproži kaskado napačno zvitih proteinov.

3. beta zavoje

Običajno so vključene štiri aminokisliline. Pogosto je v beta zavojih vključen zraven prolin. Prolin je lahko v trans ali cis konformaciji - ta določa, v katero smer bo tekla polipeptidna veriga (v trans smer ali v cis smer). Pri beta zavoju je velik delež prolina, ki je v cis konformaciji. Poleg prolina je v beta zavojih pogost tudi glicin, ki je majhen.

Določene aminokisliline imajo preferenco, da so v eni ali pa v drugi sekundarni strukturi. Glutaminska kislina je zagotovo najrajši v alfa heliksu, vendar mora biti čez štiri aminokisliline kompenzirana z bazično aminokislino. Prolin in glicin pa sta najmanj rada v heliksu in najraje v beta zavoju.

Kimotripsin - prebavni protein, ki ima skoraj 50 % beta strukture. Kot drugi ekstrem lahko izberemo **mioglobin** - eden od proteinov iz mišic, ki ima skoraj 80 % alfa heliksa.

TERCIARNA STRUKTURA

Gre za to, da se sekundarne strukture zvijejo dodatno še v tretji dimenziji.

Konformacija - iz ene v drugo lahko pridemo s prostorsko razporeditvijo radikalov, vendar pa se tu ne spremeni konfiguracija. Upoštevane so zgolj rotacije okoli enojnih vezi.

Konfiguracija - prekinitev kovalentne vezi.

Pri vsakem proteinu imamo teoretično možno ogromno konformacij, vendar pa so le nekatere energetsko ugodne ali encimsko relevantne.

Za stabilizacijo so najpomembnejše šibke interakcije, edina izjema je S-S mostiček, ki ga tvori cistein. Ta ni šibka povezava (je kovalentna), vendar vseeno prispeva k terciarni strukturi proteina.

Nativna konformacija

Hipotetičen globularni protein (glej slide), kjer je en del zviti kot alfa vijačnica, drugi del pa tvori beta strukturo. Nato sledi del neurejene strukture, kjer je npr. vezan noter en železov ion. Naprej po

polipeptidni verigi se najdeta na pravilni razdalji dva cisteina, ki tvorita S-S mostiček, hkrati pa se valin in levcin zvijeta v hidrofobno interakcijo. Naprej po polipeptidni verigi tvorita vodikovo vez med dvema radikali, kar ni isto, kot vodikove vezi v vijačnici / beta strukturi. Na koncu pa imamo še ionske interakcije.

Tridimenzionalno strukturo proteinov se določa z rentgensko kristalografijo, ali pa z NMR (jedrska magnetna resonanca). Omejitev rentgenske je, da moramo protein kristalizirati. Pri NMR pa lahko gledamo protein v raztopini, omejitev pa je ta, da NMR ni sposobna še gledati velikih proteinov.

PROSTORSKE OMEJITVE ZVIJANJA POLIPEPTIDNE VERIGE

Peptidna vez je rigidna - ima delni značaj dvojne vezi, zato rotacija tam ni možna.

Če bi bile vezi proste in ne bi bile vezane v verigo, je možna rotacija 360 stopinj - ker pa so povezane se ne morejo toliko rotirati, saj jih omejujejo sosedi, pa še radikali imajo različne velikosti - pri večjih aminokislin je prostorska stopnja dosti večja.

Upoštevati je treba še sterične ovire - različni atomi in funkcionalne skupine se lahko zblížajo samo do nekega določenega radija.

Zaradi vseh teh omejitev (poleg tiste, ki ji predstavlja peptidna vez) ima polipeptidna vez precej močno omejitev.

DELNI ZNAČAJ DVOJNE VEZI PRI PEPTIDNI VEZI

Če si želimo peptidno vez pravilno predstavljati, si moramo predstavljati, da je elektronska gostota med kisikom, dušikom in ogljikov enaka - elektroni so delokalizirani! To daje vezi delni značaj dvojne vezi, okoli dvojnih vezi pa rotacija ni možna. Ravno zato so peptidne vezi ravne.

Rotacije okrog psi in fi kota pa so možne ampak zelo omejene.

18. 4. 2011

Na podlagi primarne in terciarne strukture lahko na podlagi preiskovanja podatkovnih zbirk ugotovljamo, kako so si proteini evolucijsko sorodni.

Zelo zanimiva struktura je beta sodček - iz samih beta ploskev. Ta sodček imajo nekateri kanalčki. Od strukture proteina je odvisna njegova funkcija.

KVARTARNA STRUKTURA

Najmanj dve enoti proteina se morajo povezati. Večinoma so v kvartarni strukturi oligomeri, obstajajo pa tudi polimeri.

Kvartarna struktura ima lahko regulatorno vlogo. To ne velja le za encime, ampak za proteine na splošno. Primer je mioglobin, ki je monomer, in pa hemoglobin, ki je iz štirih mioglobinu podobnih enot - je popolnoma drugačen, ko pride do sposobnosti prenašanja kisika.

Če bi imel nek receptor kvartarno strukturo bi to pomenilo, da vezava liganda na eni podenoti sproži preko kaskad dogodkov spremembo na drugi podenoti.

Pri fibrilarnih strukturah je kvartarna struktura pomembna za večjo stabilnost in večje strukturne opore (več fibril skupaj). Pri encimskih reakcijah pa je izjemno pomembna za fino regulacijo katalize.

Primarna, sekundarna, terciarna in kvartarna struktura skupaj privedejo do **nativne konformacije**. To je tista oblika, pri kateri ima protein najmanjšo energijo.

Predavanje 25; 18. 4. 2011 / Damjana Rozman

DENATURACIJA IN RENATURACIJA (SAMOSESTAVLJANJE) PROTEINOV (Sestavljanje in razstavljanje strukture)

Tu ne govorimo o razcepu peptidne vezi! Primarna struktura pri teh procesih ostane nespremenjena in aminokislinskega zaporedja ne porušimo.

Ob kakšni pogojih nek aktiven protein svojo strukturo izgubi/spremeni?

1. ob povečani temperaturi; porušijo se šibke interakcije med radikali

Protein se pod vplivom temperature denaturira postopoma. Na začetku se relativno položno spreminja njegova aktivnost (če gledamo graf). Potem pa kar naenkrat encimska aktivnost drastično pade. To je zato, ker ob povišani temperaturi viša kinetična energija molekul in zato reakcija poteka hitreje. Vendar pa pri encimih dva procesa tekmujeta - poleg nižje aktivacijske energije s povišano temperaturo je vedno več molekul proteina delno denaturiranih. Ko so denaturirani pa njihova encimska aktivnost pade. Maksimalna katalitična sposobnost proteinov je pri 50 stopinjah celzija; vendar je tam že mnogo proteinov denaturiranih.

2. če spremenimo pH pa je slika drugačna kot pri temperaturi. Krivulja je simetrična. Ker aminokislinski radikali lahko delujejo kot šibke kisline ali šibke baze bo ob približevanju bolj kislem ali bolj bazičnem pH aktivnost sorazmerno padala.

3. proteinom dodamo organsko topilo; to bo porušilo hidrofobne interakcije

4. dodamo detergent (najbolj znana sta urea in gvanidin-hidroklorid)

Na ta način lahko protein razbijemo (denaturiramo). Pri temperaturi jih ne moramo renaturirati, ko enkrat gremo čez mejo - proces je ireverzibilen. Pri ostalih pa odstranimo razlog za denaturacijo - npr. odstranimo detergent / organsko topilo.

KAKO POTEKA ZVITJE POLIPEPTIDA?

Sinteza proteinov poteka ves čas. Za zvitje polipeptida obstajajo tri hipoteze, s tem da so vse tri pravilne; vendar za določene proteine je bolj primerna prva, za druge druga,...

Hipoteza 1

Kooperativno zvijanje. Neka polipeptidna veriga v celici nastaja in se takoj po nastanku začne ustvarjati lokalna sekundarna struktura

Hipoteza 2

Zvitje se začne s spontanim kolapsom. Na začetku, ko se začnejo ustvarjati interakcije, je energija največja. Vzpostavljjanje vezi je spontan proces (energetsko ugoden) in pri njem energija pada.

Hipoteza 3

Proteini se ne morejo pravilno zviti če nimajo pomočnikov, šaperonov. Šaperoni pomagajo pri pravilnem

zvijanju in so prisotni v vseh kraljestvih. Pri zvijanju s šaperoni je potreben ATP, za razliko od prvih dveh hipotez.

Zvijanje proteinov ni naključno!

Razlika med beta strukturo in alfa vijačnico je samo v zvitju. Če raztegnemo ostanke alfa vijačnice, potem lahko isti ostanki se povežejo v beta strukture. To se zgodi pri prionskih boleznih.

Ločimo **globularne** in **fibrilarne** proteine.

Pri fibrilarnih včasih rečemo, da imajo sekundarno strukturo poudarjeno in je terciarna manj pomembna. Pri njih je tudi bistvo, da hidrofobni niso samo v notranjosti ampak tudi zunaj. Kadar se povezujejo v kvartarno strukturo ponavadi tvorijo višje komplekse s hidrofobnimi interakcijami in S-S vezmi. Značilno je tudi to, da so fibrilarni proteini v višjih strukturah praviloma netopni.

Za globularne proteine je značilno, da imajo hidrofobne ostanke v notranjosti. Kar se kvartarne strukture tiče je podobna kot pri fibrilarnih.

GLAVNI FIBRILARNI PROTEINI V ČLOVEŠKEM TELESU

Keratini - imajo najbolj navadno alfa vijačnico, ki jo povezujejo vodikove vezi med peptidnimi ostanki. Povezujejo jih hidrofobne interakcije in S-S mostički. Značilnost je čvrstost in netopnost.

Kolagen - posebna kolagenska vijačnica, ki ni enaka alfa vijačnici. Struktura je netopna, vendar je nekoliko natezna (ima neko prožnost), čeprav ga ne moremo raztegniti tako kot elastin.

KERATINI

V povrhnjici kože, laseh, dlakah, nohtih, krempljih, perju,...

Njihova osnovna struktura je desnosučna alfa vijačnica, kjer prevladujejo hidrofobne aminokisljine.

Naslednja stopnja je keratinski dimer, ki tvori ovito vijačnico. V to vijačnico se ponavadi združita kisel tip in bazičen tip keratina. V sredini vijačnice moramo imeti hidrofobne ostanke, na površini pa bodisi negativno bodisi pozitivno nabite aminokisljine.

Tip 1 so kisli, tip 2 pa bazični keratini. Keratinski dimer nastane tako, da se dva keratina postavita paralelno eden ob drugem, aminokislinski ostanki posameznih keratinov pa omogočajo privlak.

Intermediarna vlakna so iz mnogo keratinskih osnovnih enot.

Pomen S-S mostičkov pri keratinih v laseh - tisti z več mostički so bolj skravžljani, tisti z manj pa imajo ravne lase.

Epidermolysis bulosa simplex - avtosomna dominantna bolezen. Vzrok je okvara v keratinu 5 ali 14 - intermediarni filamentni niso normalni in ne držijo celice v svoji fiziološki obliki. Zato celica ni obstojna v mehanski obliki. Zdravljenje je izredno težko.

Epidermolitična hiperkeratoza - gre za napako v keratinu K1 ali K10. Pojavi se takoj ob rojstvu, tako kot epidermolysis bulosa simplex. Ob rojstvu rdeča in občutljiva koža in mehurji, kasneje pa se odluščijo in je v kasnejših stanjih življenja bolezen bolj blaga - najhuje je ob rojstvu.

SPEKTRIN

Nitasti protein v membranah eritrocita. Obstaja v alfa in beta obliki. Dve taki verigi se antiparalelno združita v višje strukture.

Spektrin se v citoskeletu združi še z drugimi proteini. Stik z notranjim delom plazemske membrane ima preko ankirina. Odgovoren je za osnovno mrežo intermediarnih filamentov, ki dajejo eritrocitu pravilno obliko.

DISTROFIN

Napake v tem nitastem proteinu so povezane z boleznijo **Duchennova mišična distrofija**.

Ta protein je značilen za mišične celice. Ta protein kodira eden od največjih genov, ki jih človek ima. Zato že po statistični verjetnosti obstaja večja verjetnost, da pride do mutacije.

KOLAGEN

Ima drugačno sekundarno strukturo kot intermediarni filament. Od vseh proteinov imamo ljudje kolagena največ. Najdemo ga v vseh tkivih. Je predvsem pogost v hrustancu, kitah in koži. Glavni aminokislinski ostanki, ki v kolagen pašejo - glicin, prolin in hidroksiprolin.

Kolagenski heliks - značilnost so obroči - prolin in hidroksiprolin. Nastane trojna vijačnica iz treh kolagenskih heliksov. Te se povezujejo v vlakna, vlakna pa naprej v druge strukture.

Pri fibrilarnih proteinov, ki imajo strukturno vlogo, je povezovanje v kvartarne strukture ključno za njihove lastnosti (da dajejo oporo organizmu).

Potranslacijska modifikacija - pri kolagenu je to pretvorba prolina v hidroksiprolin. Hidroksiprolin ni AK, ki bi bila kodirana (nima svojega tripleta baz v genomu), ampak nastane posttranslacijsko. Če hidroksiprolina ni, potem kolagenska vlakna ne funkcionirajo pravilno. Poleg tega se morajo nekatere aminokisliline še glikolizirati.

Če je kaj narobe, pride do bolezni. Če pride do dedne napake se lahko tudi dedujejo. Vzrok je lahko tudi napačna prehrana, npr. skorbut - pomanjkanje vitamina C prepreči hidroksilacijo prolina, kar poruši strukturo kolagena. Od skorbuta ljudje umrejo od notranjih krvavitev, ker žilne stene nimajo pravilne zgradbe.

Presnova kolagena se spreminja s procesom staranja - dojenčki imajo lepo in napeto kožo, z leti pa se pojavljajo gube. Tudi vsa tkiva, v katerih je kolagen pomemben, se na nek način starajo. S staranjem se količina kolagena zmanjša in postane bolj krhek.

Predavanje 26; 19. 4. 2011 / Damjana Rozman

Vitamin C je antioksidant - ob pomanjkanju pride do motenja sinteze encima, ki tvori hidroksiprolin. Posledica je motnja v zgradbi kolagenskih vlaken, nastane skorbut.

Osteogenesis imperfecta - zaradi napake v kolagenskem delu ne pride do pravilne tvorbe kosti. Zato lahko že med nosečnostjo pride do zlomov. Praktično nemogoče je zdraviti to bolezen, razen tako, da se že v otroštvu ustavi v kosti mehanske opore.

Ehlers-Danlosov sindrom - hiperelastičnost. Kolagenski matriks nima pravilne strukture in ni pravilno fiksiran. Posledica je raztegljiva koža in pa pretirano gibljivi sklepi. Obstajajo lažje oblike, lahko pa so tudi smrtne, če bolezen prizadene notranje organe.

Ponovitev: Obravnavali smo keratin, ki ima ponavadi desnosučni alfa heliks. Te heliksi se ovijajo (kvartarna struktura), to strukturo pa stabilizirajo hidrofobne interakcije in S-S mostički. Kvartarna struktura se naprej zvija še v supramolekularne strukture. Keratini so pogosti v intermediarnih filamentih. Kolagen pa ima posebno kolagensko vijačnico, ki je levosučna (včasih ji rečemo kar prolinska). V kvartarni strukturi dobimo trojni heliks, ki je desnosučen. V trojnem heliksu pride do stabilizacije med glicini, prolini in hidroksiprolini. Naprej se kvartarna struktura povezuje v supramolekularni kompleks.

TRANSPORT / SKLADIŠČENJE MOLEKUL - LIGANDOV (Hb, Mb)

Mioglobin in hemoglobin sta odgovorna za transport oz. skladiščenje kisika. Sta zelo sorodna proteina, oba spadata v družino globinov. **Mioglobin** ima eno samo polipeptidno verigo (njegova struktura se konča pri terciarni strukturi), znotraj te verige pa je inkorporiran en hem. To je mesto vezave kisika. Funkcija mioglobina je, da skladišči kisik v mišicah.

Hemoglobin pa izgleda približno tako, kot bi bil iz štirih enot mioglobina, ker so njegove podenote po terciarni strukturi zelo podobni mioglobinu. Ima dve alfa in dve beta podenoti. Vezavnih mest za kisik je torej štiri; vsebuje štiri molekule hema. Glavna funkcija hemoglobina je prenos kisika po krvi od pljuč do tkiv.

Večji organizmi imajo potrebo po prenosu in shranjevanju kisika, ker je kisik nujno potreben za aerobne organizme. Kisik je nepolaren plin, zato se slabo raztaplja v vodi (raztaplja se v skladu s Henryjevim zakonom). Povečati je torej treba topnost kisika v krvi, zato se je razvil sistem, ki kisik veže. Za vezavo kisika so iz kemijskega vidika pomembni prehodni elementi, kamor spada tudi železo - to je glavni prehodni element, ki v organizmih prenaša kisik, saj je v hemu.

Med hemoglobinom in mioglobinom je okrog 20 % aminokislin enakih. Kljub temu je terciarna zgradba obeh zelo podobna.

Šele štiri podenote sta aktivna kombinacija hemoglobina. Potrebujemo dva tipa alfa in dva tipa beta podenot. Tak hemoglobin ima večina odraslih. Normalen hemoglobin pa je tudi, če sta prisotni dve alfa in dve delta podenoti - vendar pa je to mnogo bolj redko. Alfa in gama verige ima fetus, zelo hitro po rojstvu pa se gama podenote zamenjajo z beta podenotami.

Tako mioglobin kot hemoglobin vežeta kisik. Veže se na železov atom hema. Nujna za pravilno orientacijo hema (in posledično kisika), sta še dva histidina.

HEM

Osnova hema je porfirin. Porfirin je iz štirih imidazolnih obročev, menjajo pa se dvojna in enojna vez. Kadar imamo tako strukturo vemo, da gre za resonančno stabilizirano strukturo - imamo delokalizirani elektronski oblak zato je elektronska gostota zelo enakomerno razporejena (kot pri benzenu). V sredini

obročja so štirje dušikovi atomi. Železo se vstavi v center porfirinskega obroča in tvori z dušiki štiri koordinativne vezi.

Struktura hema je planarna.

Železo lahko tvori šest koordinativne vezi - od tega jih je štiri porabilo za vezavo v porfirinu, dve pa še ostanejo. Z eno koordinato (tisto, ki gleda navzdol) je železo povezano s histidinom, na drugo pa se veže kisik (ali kakšen drugi ligand). Takoj, ko se veže kisik, se približa še en histidin, ki ga fiksira - kisik torej ni prost na hemu ampak tvori dodatno vez še z enim histidinom.

Poleg kisika se lahko na šesto koordinato hema vežejo tudi drugi ligandi. Kisik je edini fiziološki ligand, lahko pa se veže tudi dušikov monoksid (NO), ki ni strup, ampak signalna molekula - ogljikov monoksid (CO), pa je hud strup. V primeru da to koordinato zasede ogljikov monoksid je to velik problem, ker ima CO mnogo večjo afiniteto za vezavo na hem kot kisik. Onemogoča torej privzem kisika! Edina terapija pri zastupitvi z ogljikovim monoksidom je kisikova komora.

NEKAJ ZAKONITOSTI VEZAVE LIGANDOV NA PROTEIN

Za vsak ligand je značilno, da ima neko vezavno mesto. Običajno si to predstavljamo kot nek prostor, ki se približno ujema z obliko liganda. Tisto mesto naj bi bilo precej specifično (obstaja podobnost med vezavnim mestom in ligandom). Bistveno za nadaljne razumevanje je, da to ni nek statičen proces. V molekuli proteina imamo aminokislino, zato struktura proteina ni fiksna. Ko se ligand približa svojemu vezavnemu mestu se bodo vzpostavile neke interakcije med ligandom in proteinom - inducirano prilaganje (primer je da, ko se veže kisik na hem, se primakne še distalni histidin).

Če ima protein več podenot potem ima vezava enega liganda na eno podenoto najprej lokalno konformacijsko spremembo, ampak ker so podenote povezane, bo to vplivalo tudi na druge podenote. Temu, da konformacijska sprememba na enem mestu spremeni konformacijo še na drugem mestu, rečemo **alsterični pojav (efekt, sprememba)**. O tem večinoma govorimo takrat, kadar imamo proteine iz večih podenot.

Protein + Ligand \leftrightarrow Kompleks Protein-Ligand

Imamo asociacijsko in disociacijsko konstanto. Cilj je, da bi razumeli, kako popišemo zasedenost vezavnih mest z ligandom - označimo z grško črko theta.

Za nastanek kompleksa protein-ligand napišemo asociacijsko konstanto (glej slajd). Delež zasedenih mest (v procentih) pa je **zasedena vezavna mesta/vsa vezavna mesta**. V tej formuli **[PL]** nadomestimo z **Ka** \times **[P]** \times **[L]** (iz asociacijske konstante). Po izpeljavi dobimo, da je theta enaka **[L]/([L] + Kd)**. Dve konstanti pa sta povezani med sabo po zvezi **Ka = 1/Kd**.

MIOGLOBIN

Je zelo kompaktna molekula - zelo dobro zvit, ker ima prostora samo za štiri molekule vode. Večinoma je v obliki alfa vijačnice. Ima hidrofobne radikale v notranjosti in hidrofilne odprte navzven (to je značilnost večine globularnih proteinov). Na mestu beta zavojev ima prolin. Značilno za vse proteine, ki imajo hem, so tople barve (rumena, rdeča, rjava,..).

Obstajajo raznorazni kisikovi radikali, ki so reaktivne kisikove spojine - mutagene, kancerogene spojine. Kisik torej mora zapustiti železo v obliki O₂ in ne v kakšni drugi. Kako to zagotovimo?

Kisik se mora vezati na železo, ki je v obliki Fe²⁺. V primeru, da bi kisik, ki je vezan na Fe²⁺, dobilo

dodaten elektron, potem bi se moral Fe^{2+} pretvoriti v Fe^{3+} , temu pa se mioglobin upira. Če je železo pri mioglobinu v obliki $3+$, potem temu rečemo metmioglobin in ne more vezati molekularnega kisika. To je motnja (ni fiziološko).

Mioglobin ni primeren za prenos kisika iz pljuč v tkiva. V pljučih je parcialni tlak $\sim 13,3$ kPa. V tkivih pa je parcialni tlak ~ 4 kPa. To je pri mioglobinu že v tistem področju, ko s povečevanjem tlaka ne moremo več povečati vezave - z drugimi besedami, tudi v tkivih bo kisik še vedno vezan na mioglobin in zato mioglobin ni primeren za prenos kisika v pljuča. Hemoglobin, ki je protein s kvartarno strukturo, pa se tej funkciji lepo prilagodi in je sposoben kisik v tkivih sprostiti.

HEMOGLOBIN

Sestavljen je iz štirih podenot (dve alfa in dve beta). Ker imamo štiri globinske verige (štiri heme) se lahko vežejo štiri molekule kisika. Zato, ker je hemoglobin sestavljen iz štirih globinskih verig, ki so med sabo povezane z nekovalentnimi povezavami, zanj ne velja neka linearna povezava (da bi se vse štiri molekule kisika vezale enako rade), ampak se vsaka naslednja molekula kisika veže z večjo afiniteto.

To, da vezava enega liganda na eno podenoto proteina povzroči konformacijske spremembe, ki se prenesejo na druge podenote in te podenote z drugačno afiniteto vežejo ligand, je alosterija. Prvi ligand je torej hkrati ligand in modulator. Modulatorji so dveh vrst - lahko so **aktivatorji** (vezava prvega pospeši vezavo drugega,...), in sicer homotropični (vezava kisika aktivira vezavo naslednjega kisika - gre za isto molekulo), lahko pa so tudi **inhibitorji**, gre ponavadi za heterotrofično modulacijo (vezava enega liganda v negativnem smislu spremeni vezavno afiniteto za drugi ligand). Primer je ogljikov monoksid kot negativni modulator vezave kisika na hem.

V tkivih parcialni tlak pade, zato se kisik sprosti in se veže CO_2 na hemoglobin.

Največ hemoglobina je v eritrocitih. Arterijska kri je lahko do 96 % nasičena s kisikom, venska pa okoli 64 % - v tkivih se torej okrog 30 % kisika sprosti.

V pljučih ne mioglobin ne hemoglobin nimata problema - parcialni tlak je dovolj visok, da oba vežeta kisik. Ko pridemo do tkiv pa je razlika. Mioglobin v tkivih še vedno drži kisik, hemoglobin pa ga lahko sprosti!

Hemoglobin je glavni prenosnik kisika v organizmu. Imamo dva procesa - hemoglobin veže kisik in nastane oksihemoglobin. Nato potuje v tkiva, kjer je parcialni tlak nižji in se lahko kisik sprosti. Tu poteka obratna reakcija - oksihemoglobin sprosti kisik in nastane deoksihemoglobin. Na vezavno afiniteto kisika na Hb imata vlogo tudi proton in CO_2 (sta heterotrofična negativna modulatorja). Podobno deluje tudi 2,3-bisfosfoglicerat. Nastaja ko se glukoza pretvarja v piruvat, kot vmesni produkt.

Ko se vzpenjamo v gore se poveča koncentracija fosfoglicerata. Eden izmed fizioloških procesov pri aklimatizaciji je tudi to, da damo organizmu dovolj časa, da naredi več fosfoglicerata. To je pomembno ker, če ni difosfoglicerata, se lahko pri nekem nižjem tlaku sprosti manj kisika v tkiva. To pomeni, da bi v gorah, kjer je tlak nižji, brez difosfoglicerata vzeli manj kisika v tkiva. Ta negativni heterotrofični modulator torej povzroči, da ima hemoglobin manjšo afiniteto do kisika in ga lažje sprosti v tkiva. Na velikih višinskih razlikah je ta sposobnost oz. učinek bistvenega pomena.

Pri aklimatizaciji ni dovolj, da naredimo več bifosfoglicerata (BFG), ampak moramo narediti tudi več hemoglobina. BFG se veže v hemoglobin in zniža afiniteto za vezavo kisika.

Poleg BFG imamo še dva negativna heterotrofična alosterična modulatorja - CO₂ in proton. CO₂ nastaja povsod pri aerobni razgradnji (v tkivih) in se iz tkiv prenaša v pljuča in ledvice. Po organizmu se prenaša z bikarbonatnim pufrskim sistemom (večji del - 85 %) in pa s hemoglobinom (iz tkiv v pljuča).

Niti CO₂ niti proton se ne prenašata na hemu, ampak na proteinskem delu hemoglobina! Na hemu se prenaša samo kisik. CO₂ ima eno samo vezavno mesto in sicer na N-terminalnem delu vsake globinske verige. Ker imamo globinske verige štiri se lahko iz tkiv v pljuča na eni molekuli hemoglobina v pljuča prenesejo štiri molekule CO₂.

Proton pa se lahko prenaša na histidinih.

Proton in CO₂ delujeta podobno kot BFG. To, da H⁺ vpliva na vezavo kisika ne hemoglobin, imenujemo Bohrov efekt.

Večja koncentracija protonov pomeni višji pH. Na grafu pa vidimo da, nižji ko je pH, lažje se sprosti kisik v tkiva.

Povzetek

- Obstajajo pozitivni in negativni modulatorji.
- Sigmoidna krivulja je značilna za vse alosterične proteine. Negativni modulatorji jo še poudarijo.

Vpliv CO na vezavo kisika

Če koncentracija CO doseže določeno koncentracijo, lahko praktično onemogoči normalno funkcioniranje in vezavo kisika. CO blokira vezavo kisika in, dokler je prisoten, je to ireverzibilno.

Ponovitev

Hemoglobin je sestavljen iz štirih podenot, tip alfa ali tip beta. Oboje morajo vezati hem, to je protoporfirinski obroč z železovim ionom, ki je v obliki ++. Pri vezavi kisika gre za pozitivno modulacijo.

Predavanje 27; 22. 4. 2011 / Damjana Rozman

Glavni protein pri odraslih je hemoglobin A, ki ima dve alfa in dve beta podenoti. Druga možna oblike je, da je namesto beta podenote delta podenote. Tisti hemoglobin, ki ima namesto beta podenote gama podenoto, je zelo pomemben pri fetalnem razvoju.

Skupne lastnosti vseh fetalnih hemoglobinov je, da imajo manjšo afiniteto za bifosfoglicerat in zato večjo afiniteto za kisik (ker je BFG negativni heterotrofični modulator).

Na hemoglobin je lahko vezana glukoza, lahko pa tudi ne. Glikolizacija nima pomena za funkcijo vezave kisika.

Hemoglobin pri embrionalnem razvoju

Takoj ko se embrio začne razvijati in pa prve tri mesece embrionalnega razvoja imamo eta verigo. Do prvega trimestra praktično izgine - takoj na začetku se začne razvijati tudi gama veriga. Do pol leta otrokovega življenja ta oblika izgine. Od rojstva pa do prvih šestih mesecev se začne tvoriti še delta podenota.

Eta in gama sta fetalna. Odrasla beta veriga pa se začne v večji količini tvoriti tri mesece pred rojstvom in v šestih mesecih po rojstvu nadomesti fetalne oblike hemoglobina. Pred tem pa je dojenčkov prenos kisika zelo podoben sistemu, s katerim je funkcioniral kot fetus v maternici.

Alfa veriga pa se ne razvija tako dramatično - že po prvem trimesečju nosečnosti prevladuje alfa podenota in jo imamo več ali manj celo življenje.

Hemoglobin A - dva beta dva alfa

Hemoglobin F - dva alfa dva gama

Če gledamo krivulje nasičenosti s kisikom, je pri fetalnem hemoglobinu pomaknjena bolj levo. To pomeni da, pri istem parcialnem tlaku, fetalni hemoglobin z večjo afiniteto veže kisik kot pa materin. Ker fetus, dokler je v materi (se razvija), ves kisik pridobiva preko matere, je to zelo pomembno - kajti če bi imel fetalni hemoglobin enake lastnosti kot materin, potem do privzema kisika iz matere v fetusa ne bi moglo priti.

Motnje v prenosu kisika s hemoglobinom

Nekatere motnje so okoljsko pogojene (npr. vezava ogljikovega monoksida), mnoge pa so genetsko pogojene.

1. vezava ogljikovega monoksida

Ima večjo afiniteto za vezavo kot kisik, zato preprečuje vezavo kisika.

2. oksidacija Fe²⁺ v Fe³⁺

Molekula kisika se lahko veže samo na Fe²⁺; če je železo v Fe³⁺ obliki, potem rečemo temu hemoglobinu methemoglobin in ne more vezati kisika. Bolezni, ki so posledica, se imenujejo methemoglobinemija - hemoglobin sicer je, vendar ima napačno nabito železo in ne more prenašati kisika, zato tkiva nimajo dovolj kisika.

Telo potrebuje reducente, ki bodo držali železo v Fe²⁺ obliki. Eritrociti so polni teh reductentov; pomemben je glutation, pripomore pa lahko tudi vitamin C. Obstajajo tudi določeni encimi, ki sodelujejo pri vzdrževanju pravega naboja hemoglobina (npr. methemoglobin reduktaza - posledica okvare je lahko methemoglobinemija).

3. mutacije v globinskem delu hemoglobina

- srpasta anemija: glutaminska kislina, ki ima COO- skupino (ta je rada na površini proteina), se zamenja z neko nepolarno aminokislino (npr. valin) in spremeni obliko in naboj molekule. Poruši se struktura eritrocita.

- talasemija: gre za mutacijo v regulatornih regijah, to pa povzroči, da neka vrsta verig hemoglobina ne deluje (se ne sintetizira), zato je razmerje med globinskimi verigami napačno.

Znanih je kar 1000 nenormalnih oblik hemoglobina (kombinacij je možnih več, ker imamo več genskih zapisov za hemoglobin). Ena od metod, s katero lahko določamo odsek lastnosti proteinov, je elektroforeza. Če hemoglobin A, ki je sestavljen iz dveh alfa in dveh beta verig, in pa hemoglobin S (sickle cell - mutacija) in hemoglobin C damo v gel in v električnem polju, bodo prepotovali v določenem času določene razdalje. V hemoglobinu A imamo glutaminsko kislino, zato bo potovala najhitreje, hemoglobin S ima namesto glutaminske kisline valin, zato bo počasnejši (valin ni nabit).

Anemija srpastih celic

Če pride do mutacije ene baze, potem se hidrofilna glutaminska kislina spremeni v hidrofobni valin. Ta mutacija je na ključnem mestu pri molekuli hemoglobina, zato se molekule nalagajo ena na drugo in tvorijo neke vrste fibrilo.

Hemoglobin S nima zaradi mutacije nič spremenjeno afiniteto do kisika - veže ga isto dobro, kot hemoglobin A. Problem je v tem, da se globinske molekule začnejo med seboj lepiti, kar poruši strukturo eritrocita. Taki eritrociti se težje gibljejo, še posebej čez manjše kapilare.

Ker je anemija srpastih celic avtosomno recesivno dedovanje bi pričakovali 25 % verjetnost, da otrok dveh prenašalcev zboli. Ampak v določenih področjih sveta je anemije srpastih celic bistveno več, kot bi pričakovali po Mendlovi genetiki. To pomeni, da se je en alel fiksiral v generaciji - heterozigot ima v teh regijah večje možnosti za preživetje kot pa tisti, ki ima normalni alel. Alel je fiksiran na nekaterih področjih Afrike, ker nudi resistenco na parazit malarije (ne preživi v eritrocitih, ki imajo hemoglobin S).

Srpasta anemija postane problem pri vseh aktivnostih, ki potrebujejo večjo prehrano tkiv s kisikom (npr. pri športu), drugače pa lahko ljudje s srpasto anemijo normalno živijo. Problem je lahko tudi mašenje kapilar, tako da pride do mikroinfarktov.

Talasemija

Zopet gre za avtosomni recesivni način dedovanja.

Delimo jih na talasemijo major (osebki, ki so homozigoti) in pa talasemijo minor (heterozigoti). Pri talasemijah je lahko strukturni del gena, ki zapisuje aminokislino, neokvarjen - pride pa lahko do napak v regulatornih genih (promotorji). Če je promotor okvarjen, potem ne more priti do prepisovanja alfa globinskega gena. Ker imamo alfa globinskih verig premalo potem pride do neravnovesja med alfa in beta globini.

Tisti, ki so heterozigoti (talasemija minor) imajo manj napačno sestavljenih hemoglobinov kot homozigoti (talasemija major).

Posledica je nezadostna oskrba s kisikom. Če se v odraslem namesto normalnega tvori fetalni hemoglobin, bodo tkiva manj preskrbljena s kisikom, ker ima fetalni hemoglobin večjo afiniteto do kisika in ga bo pri nekem določenem parcialnem tlaku manj sprostil v tkiva, kot bi ga normalni hemoglobin A.

URAVNAVANJE PROCESOV (DNA-vezavni proteini)

Glavnina DNA je spravljena v kromosomih. V kromosomu je kromatin, to je kompleks DNA in proteinov (histonov). Ko govorimo o uravnavanju izražanja genov, govorimo o vezavi proteina na DNA, kar povzroči izražanje genov.

DNA v celici ni prosta. Najdemo jo v obliki nukleosoma, osnovna enota tega nukleosoma pa je kromatin. Sestavljen je iz molekul DNA, vezanih na histonske proteine. Histoni so strukturni proteini - ne transkripcijski!

Histoni so bazični proteini - imajo veliko bazičnih aminokislin (arginin, lizin, histidin), kar je pomembno za vezavo na DNA, ki je nabita negativno. So relativno majhni proteini (nekje do 20 kDa). Evolucijsko so

zelo zelo ohranjeni, med mišjo in človekom so histoni 100 % identični - niti ena aminokislina v določenih histonih ni zamenjana, čeprav je med mišjo in človekom ogromno let.

Če želimo DNA začeti prepisovati, moramo najprej močne elektrostatske interakcije med histoni in DNA razbiti, da se DNA razvije. Razbijemo jih na ta način, da se pred translacijo histoni posttranslacijsko spremenijo. Pogosto se metilira lizin - z metilacijo izničimo pozitivni naboj, zato smo nek del elektrostatskega privlaka izničili. Bolj kot metilacija pa je pogosta acetilacija lizina. Lahko pa se tudi fosforilira serin - tako bo prišlo do odboja med negativno nabitim fosfatom in negativno nabito dvojno vijačnico.

Aktivator prepisovanja - transkripcijski faktor

Mora biti protein, ki je sposoben vezati DNA. To pomeni, da se protein z nekim svojim aminokislinskim zaporedjem veže na zaporedje baz na DNA, temu rečemo DNA prepoznavni element (te so večinoma v promotorskih regijah genov).

Hkrati se morajo vezati na DNA in pa s protein-protein interakcijami sodelovati z drugimi proteini (npr. RNA polimerazni kompleks), saj ne more sam izvesti transkripcijo. Pri procesu sodeluje nekaj 100 proteinov.

Transkripcijski faktor more biti sestavljen iz več funkcionalnih domen; ena izmed njim je DNA vezavna domena.

Lahko so monomeri, homodimeri ali heterodimeri. Na DNA se vežejo s šibkimi interakcijami, predvsem vodikovimi vezmi ali šibkimi elektrostatskimi interakcijami.

Mi imamo samo okoli 1000 transkripcijskih faktorjev - vendar pa različne kombinacije med njimi uravnavajo izražanje genov (za en gen potrebujemo faktor 1, 2 in 3, za drugega dimer faktorja 1, itd...).

Glavni domeni transkripcijskih faktorjev sta DNA vezavna domena, transaktivacijska domena (kjer proteini med sabo tvorijo šibke interakcije), imamo pa še druge domene.

Domena je nek splošen pojem pri proteinih. To naj bi pomenilo, da gre za neko zaporedje aminokislin, ki imajo samostojno (neodvisno) zvitje.

Cinkovi (Zn) prsti

Ena izmed DNA vezavnih domen. Imajo zelo poudarjeno sekundarno in terciarno strukturo. Gre za aminokislinsko zaporedje, kjer imamo v določenem področju simetrično razporejene aminokislinske ostanke cisteine ali histidina. Te so sposobne tvoriti koordinativne vezi z ionom cinka, ki je eden izmed esencialnih mikroelementov (eden izmed vzrokov, zakaj je esencialen, je ravno to, da je nujni del cinkovih prstov).

Sestavljen je iz alfa vijačnice, prevoja in pa antiparalelne beta strukture. Dva histidina in dva cisteina so blizu skupaj in lahko vežejo cink z močnimi, kovalentnimi (koordinativnimi) vezmi. Ker so te vezi zelo močne je cinkov prst močna struktura.

Če pride protein s cinkovim prstom do DNA ima to za posledico, da se dvojna vijačnica razpre (porušijo se vodikove vezi znotraj dvojne vijačnice) in lahko pride do prepisovanja. Primer transkripcijskih faktorjev, ki vsebujejo cinkove prste, so jedrni (steroidni) receptorji. Ti imajo kot svojo DNA vezavno domeno cinkove prste.

Homeodomena

Pomembna DNA vezavna domena, predvsem v embrionalnem razvoju. Takrat namreč ni pomembno le, kateri geni se izražajo, ampak tudi kje (tam, kjer bo glava, kjer bo noga,...). Homeodomena ima približno 60 aminokislin in ima tri vijačnice.

Levcinska zadruga

Gre za ponavljajoče zaporedje levcinov, ki so hidrofobne aminokisliline. Pri levcinski zadrugi je vsaka sedma aminokislina levcin. Te so poravnani, vzporedni in vstopajo v hidrofobne interakcije.

Levcinsko zadrugo imajo mnogi proteini, ki tvorijo dimere.

Vijačnica-zanka-vijačnica

Sestavljena iz alfa heliksa, loopa in še enega alfa heliksa (spodnji alfa heliks je tisti, ki vstopi v šibke interakcije z DNA).

OBRAMBA PRED TUJKI/INVAZIVNIMI ORGANIZMI (IMUNOGLOBULINI)

Imunski sistem v človeku ima ogromno specializiranih celic in proteinov znotraj teh celic. Prva črta obrambe so levkociti (makrofagi in limfociti).

Za te celice je značilno, da lahko migrirajo (preidejo v tkiva) in na ta način pomagajo pri obrambi. Celice imunskega odgovora vsi proizvajajo proteine imunoglobuline (Ig) in receptorje. Prepoznavanje tujkov in škodljivih snovi poteka na površini celic. Tak sistem imunskega odgovora je zelo dober, ima pa tudi svoje slabosti - danes poznamo mnogo avtoimunih obolenj.

Imamo veliko število različnih imunoglobulinov. Potrebujemo jih zato, ker v nobenem hipu ne vemo, kakšne vrste tujek nas bo napadel. Če imamo imunoglobulinov več je torej več možnosti, da bomo ustvarili tako protitelo, ki bo lahko uničilo tujek.

Antigenska determinanta je tisti del antigena, proti kateremu se je tvorilo protitelo.

Imunoglobulini

Njihova struktura je v obliki črke Y. Gre za heterodimerne proteine - imajo lahke verige in težke verige (dve lahki in dve težki).

Na N-terminalnih delih vstopata v interakcije ena lahka in ena težka veriga. Ta zgornji del proteina, kjer imamo interakcije med lahko in težko verigo, imenujemo FAB, spodnji del pa FC.

Zelo pomembni so disulfidni mostički. Na N-terminalnem delu se povezujeta z S-S mostičkom lahka in težka veriga. Potem pa se obe težki verigi med seboj povežeta z S-S mostičkom.

Imena imunoglobulinov so odvisna od vrst verig - lahko so **lambda** ali **kapa**, težke pa **alfa**, **gama**, **delta**, **eta** in **mi**. IgA ima alfa težko verigo, IgD ima delta težko verigo, IgG gama težko verigo, etc... težke verige torej določajo ime imunoglobulina.

IgD, IgE in IgG so običajno monomeri. Največ imamo IgG.

IgA delujejo kot dimeri.

IgM so pentameri in imajo še v sredini eno strukturo.

Protitelesa imajo zgoraj hipervariabilni del - s tem se lahko prilagodijo antigenom (je fleksibilen). Spodnji del proteina pa je iz beta struktur in je bolj rigiden.

Če imamo velik antigen (veliko molekulo), potem lahko več različnih protiteles tvori odgovor. Ta protitelesa so lahko enaka, lahko pa so tudi različna. Pri interakciji protitelo-antigen je zelo velika afiniteta vezave.

Kako organizem zagotovi, da imamo tako veliko diverzitetno protiteles, za prepoznavanje antigenov? Veliko zapisov imamo za proteine imunskega odgovora v naši DNA. Celice obrambnega sistema se ves čas delijo - so aktivne celo življenje in stalno nastajajo nove. Ko pride nek tujek v organizem se lahko organizem tudi prilagodi na ta tujek - najprej ga ni sposoben uničiti, potem pa se nauči delati pravilna protitelesa (npr. pri cepljenju). To je možno zato, ker se v somatskih celicah lahko s prepisovanjem določenih delov za antigenski odgovor sestavijo raznorazne kombinacije protiteles. Ko enkrat dobimo antigen in tvorimo protitelesa, potem protitelesa imamo in smo pri naslednji infekciji mnogo manj občutljivi na te antigene.

ELISA test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - temelji na tem, da se na in-vitro pogojih na določen antigen naredi primarna protitelesa. Če nas zanima neka infekcija, lahko dodamo pacientu protitelesa, ki so specifična za to infekcijo in pa sekundarna protitelesa, ki so označena z fluorescentnim sredstvom (za amplifikacijo) - če je reakcija pozitivna vemo, da je pacient obolel za to infekcijo.

Avtoimune bolezni nastanejo takrat, kadar telo tvori protitelesa proti sebi lastnim antigenom. Primer je revmatoidni artritis. Avtoimune bolezni je precej težko zdraviti, ker gre za endogeni odgovor telesa. Velikokrat se zdravi s kortikosteroidi.

Povzetek - Pri imunoglobulinih je zelo pomembna njihova terciarna struktura. Lahke verige so pri vseh imunoglobulinih enake, glede na težke verige (alfa, gama,...) pa se razlikujejo v imenu (IgA, IgG,...). Znotraj imunoglobulinske domene gre za dva para antiparalelnih beta ploskev, povezanih z disulfidnimi mostički. Hipervariabilne regije, ki so na N-terminalnih koncih, so odgovorne za prepoznavanje antigenov.

Predavanje 28; 3.5.2011 / Damjana Rozman

LIPOPROTEINI, POTREBNI ZA TRANSPORT LIPIDOV PO TELESU

Lahko jih štejemo kot proteine, ki imajo lipide za prostetično skupino. So v bistvu združba med lipidi in proteini in so razlog, da se lahko lipidi prenašajo po vodnem okolju. Prenášajo hidrofobne delce (triacilglicerole, holesterol,..)

STRUKTURA LIPOPROTEINA

Proteinom na površini lipoproteina rečemo apolipoproteini, njihova glavna naloga pa je prepoznavanje - vsak lipoproteinski delec od nekje izvira in je nekam namenjen. Tam morajo biti receptorji, ki bodo posamezne apolipoproteine prepoznali.

Apolipoproteini so vgnedženi v fosfolipidni sloj, v notranjosti pa so hidrofobne snovi, npr. triacilgliceroli.

Po velikosti se razlikujejo - največji so hilomikroni, sledijo VLDL (very low density lipoproteini), LDL in pa HDL.

Apoprotein od LDL je **ApoB-100**. Ta protein ima eno polipeptidno verigo z maso 513 kDa. Je globularen protein, ki ima notranjo stran hidrofobno, da se lahko prilega na lipidni del, medtem ko je zunanja površina hidrofilna.

SESTAVA LIPOPROTEINOV

Najnižjo gostoto imajo triacilgliceroli; in hilomikroni vsebujejo skoraj 90 % triacilglicerolov, majhen delež holesterola in njegovih estrov, 2 - 3 % pa proteinov in fosfolipidov.

VLDL imajo še vedno okoli 60 % triacilglicerolov, okoli 20 % holesterola in 11 % fosfolipidov.

LDL delci so tisti, ki naj bi po krvi prenašali holesterol. To je tisti holesterol, ki ga večinoma dobimo iz prehrane. LDL ima torej večinoma holesterol, triacilglicerolov pa je zelo majhen delež.

HDL pa imajo največ proteinov (kar 40 procentov - zato imajo veliko gostoto!), imajo približno enako gostoto holesterola in fosfolipidov. Vendar pa ta holesterol ni enak kot tisti, ki ga prenaša LDL. HDL holesterol nastaja z biosintezo v telesu in je zaščiten, ker pripomore k odstranjevanju holesterola iz telesa, medtem ko LDL obremenuje telo s holesterolom.

KROŽENJE LIPOPROTEINOV

Lipidi, ki pridejo s prehrano skozi prebavni trakt, najprej pridejo v obliki hilomikronov. Ko potujejo skozi žile imamo tam encime, katerih naloga je odcepljanje maščobnih kislin. Tako se hilomikron zgosti in nastane VLDL. Iz teh VLDL z nadaljnim odstranjevanjem maščobnih kislin nastane LDL. Ta lahko vstopa v jetra in tudi v ekstrahepatična tkiva. Več, kot bomo zaužili lipidov, bolj bomo organizem obremenili za LDL, kar lahko vodi v probleme.

V ekstrahepatičnih tkivih se ves čas sintetizira holesterol (za regeneracijo celičnih membran). Poleg tega pa lahko sprejmejo tudi LDL. V ekstrahepatičnih tkivih se LDL in novo sintetizirani holesterol lahko pretvorita v HDL delce. HDL, ki potuje iz ekstrahepatičnih tkiv spet v jetra, je zaščiten, saj nam pomaga odstranjevati holesterol - jetra so edini organ, ki je sposoben odstranjevanja holesterola.

Holesterol (predvsem LDL) je lahko zelo nevaren. Pri aterosklerozi gre za odlaganje holesterola in nekaterih drugih lipidov na žilnih stenah, pride še do poapnenja žil (nastaja kalcijev karbonat). Zato lahko v žilah pride do popolne zapore in do kapi.

Družinska hiperholesterolemija - okvara gena, ki kodira za LDL receptor. Zato se holesterol nabira v krvi.

Pri aterosklerozi pride do dodatne oksidacije lipoproteinov, kar je eden od sprožilcev (drugi je vnetje). Celice, ki so na udaru, so monociti, ki se običajno kotalijo po žilni površini. Če pa so tkiva poškodovana potem monociti spremenijo svojo obliko in se ne kotalijo več tako dobro - lahko se pritrdijo na žilno steno in vstopijo skozi. Monocit pa se lahko napolni z LDL (ker jih preveč fagocitira) in se napihne, rečemo jim foam cell. Take celice počijo, lipidna vsebina se razporedi zunaj in ta proces pritegne še kalcifikacijo.

KONTRAKTILNI PROTEINI (mišična kontrakcija, gibanje organelov)

Gibanje omogočajo molekularni motorji. Kemično energijo (npr. hidroliza ATP, GTP,...) pretvarjamo v mehansko (npr. kinetično) energijo. Proteini to lahko naredijo, morajo pa imeti določene strukturne lastnosti. Strukturna domena, ki jo imajo, je t. i. **NTPazna** (nukleotid-3-fosfat) s **P zanko** (P pride od

'fosfat' - tam se običajno zgodi hidroliza).

Za gibanje so ključne konformacijske spremembe. Vedno se en protein premika po neki površini - potrebujemo torej pare proteinov. Gibi, ki jih proteini izvajajo, morajo biti usmerjeni.

PRIMERI GIBANJA NA MOLEKULARNI RAVNI

Primer je premikanje miozina na aktinu. To omogoči krčenje ali raztezanje mišic. Konformacijska sprememba miozina povzroči premik aktina.

Trije glavni predstavniki motornih proteinov so **miozin**, **kinezin** in **dinein**. Uvrščeni so v isto družino, čeprav imajo aminokislinsko sestavo zelo različno. Vsi vsebujejo NTPazno domeno s P zanko (tako domeno imajo tudi G-proteini).

Primer: miozin - če je ATP vezan se miozin disociira od aktina. Cikel hidrolize in odcepa anorganskega fosfata spreminja konformacijo in povzroča nihanje miozinske ročice. Ta se premakne za približno 90 stopinj.

Pri **prečnoprogasti mišici** sodeluje cel kup proteinov, glavna sta miozin in aktin, ki interagirata in omogočata kontrakcijo in relaksacijo. Zraven sta še troponin in tropomiozin, ki uravnava kontrakcijo. Sodelujejo še titin (največja dosedaj znana polipeptidna veriga), distrofin (sidro, ki notranjo strukturo celice drži pritrjeno na membrano), in še mnogo drugih (dezmin, vimentin, nebulin,...)

Tako miozin kot aktin spadata med globularne proteine.

- miozin; ima dve lahki in dve težki verigi. Lahke verige predstavljajo miozinsko glavo, težke verige pa stebela. Aktivni del, kjer poteka vezava ATP, je na lahkih verigah na glavah.

- aktin - aktinske globularne monomere se samozdružujejo in razdružujejo. Monomere so namreč manj stabilne kot polimere, zato se odvisno od koncentracije G-aktina tvori ali razgrajuje F-aktin. Aktin tvori tanke filamente mišičnih vlaken. Ima NTPazno G domeno, vendar pa ATP, ki je vezan na aktin, nima pomena neposredno pri gibanju, ampak pri polimerizaciji. Strukturo F-aktina obdajajo še tropomiozini in troponini.

Vrednost konstante disociacije pri aktinu (včasih jo imenujemo kritična koncentracija - zato, ker se bo v primeru, da je Kd presežena, začela polimerizacija), je enaka koncentraciji aktinskih enot.

Poleg miozina je molekularni motor tudi kinezin. Lahko se premika po aktinu ali tubulinu. Je podobna molekula kot miozin. Razlika je v tem, da kinezin potrebuje ATP, da se prilepi na aktin / tubulin. Bistvo molekularnega motorja je konformacijska sprememba.

Par aktin-miozin je prisoten tudi v nemišičnih celicah. Aktin imajo npr. tudi mikrofilamenti, ki vzdržujejo strukturo citoplazme. Mikrotubuli pa imajo kot molekularni motor kinezin in kot ogrodje pa je tubulin. Mikrotubuli imajo veliko vlogo v znotrajceličnem transportu, pomembni pa so tudi pri migetalkah in bičkah.

Nekateri strupi vplivajo na stabilnost mikrofilamentov - citokalazin B ali faloidin.

MIKROTUBULI

Imajo kot svojo osnovo tubulin. Ta je lahko alfa ali beta. Važno je vedeti, da je tudi tubulin, tako kot aktin, zelo dinamičen - ves čas nastaja, se polimerizira in razgrajuje, kar je odvisno od koncentracije

monomernih enot tubulina. Glavna vloga mikrotubulov je transport, npr. razporejanje kromosomov med mitozo.

Žafranov strup kolhicin inhibira polimerizacijo tubulinov, zato je inhibitor mitoze - ne more nastati delitveno vreteno.

Molekule tubulina se razvrščajo krožno in tvorijo votle cevke. Te cevke so iz 13 monomernih enot na zavoj (13 protofilamentov).

Združevanje molekul tubulina - spet je pomembna hidroliza, tokrat hidroliza GTP. Ta je potrebna za polimerizacija - alfa in beta tubulin vežeta GTP in se približata (+) koncu, kjer tubulin raste.

Na tubuline so lahko vezani bodisi GTP bodisi GDP. To je pomembno zato, ker v odvisnosti od tega, ali je vezan GTP ali GDP, tubulinski dimeri rastejo ali se odstranjujejo (to nam pove, ali se bo mikrotubul gradil ali razpadal - če je vezan GTP potem tubul raste, če je vezan GDP potem se razgrajuje).

Spet ima vlogo konformacijska sprememba. Dimer alfa-beta tubulina ima drugačno konformacijo kadar je vezan GTP in kadar je vezan GDP. Ob vezanem GTP dimer lepo paše v mikrotubul.

Funkcija mikrotubulov: gibanje organelov znotraj celice (po njih hodijo kinezini).

MIGETALKE IN BIČKI

Veliko celic ima na plazmalemi migetalk; zato, ker jim to omogoča boljše gibanje. Bičke pa imajo v človeškem telesu samo spermiji.

Aksonema je sestavljena iz 9 parov mikrotubulov, plus enega para v sredini. To je fiksna struktura tako bičkov kot migetalk. Sodeluje dinein, ki ima glavo z NTP-azno aktivnostjo. Hidroliza ATP povzroči asociacijo dineina z vlaknom mikrotubula.

Motorični proteini ob vezavi nukleozid-tri-fosfata spremenijo konformacijo in pa afiniteto za vezavo na svoje strukturno ogrodje.

Predavanje 29; 6. 5. 2011 / Damjana Rozman

MEMBRANSKI PROTEINI, VKLJUČENI V TRANSPORT MOLEKUL/IONOV PREKO MEMBRANE

Membrana oz. vezikli imajo lahko enega ali več transportnih sistemov, ker morajo prenašati enega ali več različnih metabolitov hkrati.

Glavni sestavni deli membran so proteini, sfingolipidi, fosfolipidi in steroli. Nekatere membrane imajo celo do 75 % proteinov - so dejansko bolj bogate na proteinih kot na lipidih. To moramo upoštevati zato, ker vsa signalizacija čez celične membrane poteka preko proteinskih molekul! Različne membrane se lahko med seboj zelo razlikujejo v vsebnosti proteinov. Prav ta sestava proteinov je najbolj variabilni del membran različnih kraljestev.

Holesterol mora biti s svojo OH skupino obrnjen v vodni medij. Je glavni strukturni sterol pri sesalcih, rastline pa imajo sterol, ki mu je zelo podoben, imenuje se stigmasterol. Pri kvasovkah je ergosterol, bakterije pa nimajo sterolov v membrani. Imajo druge molekule, katerih struktura je podobna sterolom,

vendar jih ne uvrščamo med steroide.

V membrani imamo dve vrsti proteinov - integralne (potekajo čez celotno membrano) in periferne (ki so asociirani bodisi z zunanostjo bodisi z notranostjo - samo z enim delom membrane).

Ista celica ima različne sestave različnih membran - primer je hepatocit. V plazemski membrani je zelo veliko holesterola. Ima relativno malo fosfatidilholina, za razliko od nekaterih organelov (golgijev aparat, endoplazemski retikulum, mitohondrij), ki imajo veliko fosfatidilholina in manj holesterola.

Na sploh imajo notranje membrane manj holesterola in več fosfatidilholina, plazemska pa ravno obratno.

Nekatere lastnosti biološke membrane

- membrana je močno asimetrična - zunanja stran membrane je po strukturi biomolekul zelo drugačna od notranje strani membrane; tudi če imamo integralni protein, ima ta na zunanji strani drugačne lastnosti in naloge kot na notranji strani.

- omogočeno je lateralno gibanje lipidov in proteinov; pomembno je, da imajo proteini veliko lateralne gibljivosti, saj to pripomore k 'lovljenju' signalov. Tako gibanje je favorizirano, gibanje 'flip-flop' pa ni favorizirano (da bi se neka proteinska ali lipidna molekula premaknila iz zunanje na notranjo stran ali obratno)

V membrani so asimetrično razporejeni tako lipidi kot tudi proteini. Večinski del fosfatidilholina in sfingomielina je na zunanji strani membrane, medtem ko je fosfatidilserin pretežno na notranji strani membrane.

K asimetričnosti membrane prispeva tudi asimetrična razporeditev proteinov. Ločimo integralne in periferne proteine, obstaja pa tudi vmesna verjanta (amfitropični proteini), ki ima več svobode - so proteini, ki so lahko ali v membrani ali pa v citosolu. Membranski proteini omogočajo predvsem komunikacijo med celicami, ta komunikacija pa lahko poteka na različne načine (en način je transport - skozi membrano celice se prenašajo molekule. Drug način je signalizacija - signal se veže na receptor na membrani, integralni proteini ta signal sprejmejo, na notranji strani pa sprožijo kaskado signalnih molekul. Tretji način komunikacije med celicami pa je stik med celicami).

Primer integralnega proteina: **glikoforin** v membrani eritrocita. Membrano prečka samo enkrat. Vidimo, da ima v zunanem delu membrane zelo veliko polarnih aminokislin (da je protein topen v vodi). Ko vstopimo v membrano pa imamo pretežno nepolarne aminokislino (protein ni več vodotopen ampak lipidotopen). Na zadnjem delu proteina, ki spet gleda v vodni medij (na notranjo stran celice), pa so spet hidrofилne aminokislino. Značilnost integralnih proteinov je torej nek hidrofobni del, s katerim se vsidrajo v membrano.

Glikoforin je tudi glikoliziran. Ima neka oligosaharidna mesta, ki so zelo podobna tistim, ki smo jih spoznali pri krvnih skupinah.

Bakteriorodopsin je bakterijski protein, je integralni protein in membrano prečka večkrat. Amino terminalni del ima zunaj, C-terminalni del pa noter. Protein ima sedem alfa heliksov, alfa heliksi pa so na zunanji površini hidrofobni (torej pašejo v lipidno membrano). Proteini, ki večkrat prečkajo membrano, so zelo pogosti pri signaliziranju.

Tip I integralnih proteinov - imajo na zunanji strani NH skupino, na notranji pa COOH skupino. Enkrat prečkajo membrano.

Tip II imajo na zunanji strani C-terminalen konec in na notranji strani N-terminalen konec. Enkrat

prečkajo membrano.

Tip III - gre za eno samo polipeptidno verigo, ki večkrat prečka membrano.

Tip IV - ni le ene same polipeptidne verige, ampak jih je več. Taki proteini običajno tvorijo kanalčke (transportni proteini).

Tip V - tega včasih uvrščajo med periferne proteine. So pritrjeni na membrano (kovalentno povezani z lipidi).

Tip VI - ima eno transmembransko domeno, pa še dodaten del, ki ga na membrano kovalentno pritrudi (rečemo tudi, da ima 'lipidno sidro').

Za večino membranskih proteinov 3D strukture niso poznane, ker jih je zelo težko kristalizirati.

Potrebujemo hidrofolno okolje, zato potrebujemo pri eksperimentu neko umetno membrano. Zato je danes znano relativno malo kristalnih struktur hidrofolnih proteinov. Imamo pa sekvenciran človeški genom - znamo prevesti zaporedje nukleotidov v aminokislinska zaporedja. Tako si lahko ustvarimo predstavo, kako se nek protein zvije glede na vsebnost aminokislin (primerjajo s proteini, katerih zvitja so znana - podatke najdemo v podatkovnih zbirkah).

Aminokislinam so določili tudi **indeks hidrofolnosti**. Dali so jo v nepolarno topilo, potem pa so dali to topilo v stik z vodo in gledali energijske zakonitosti pri prehodu iz hidrofolnega okolja v vodo. Če je bil ta prehod spontan, potem to pomeni, da je ta aminokislina polarna. Če damo zaporedje aminokislin v računalnik, nam ta na podlagi indeksa hidrofolnosti izriše diagram. Če v tem diagramu dobimo neko aminokislinsko zaporedje, dolgo vsaj 20 aminokislin, ki je hidrofolno, je to z veliko verjetnostjo tisti del proteina, ki prečka membrano.

Pri delih, kjer se vodno in lipidno okolje v membrani stikata, je pri proteinih zelo veliko triptofanov in tirozinov. Tirozin ima nepolaren benzenski obroč, s katerim lahko vstopa v interakcijo z lipidnim delom, z OH skupino pa se lahko obrne proti vodi. Pri triptofanu je podobno - ima NH skupino, ki lahko tvori vodikove vezi z vodo, hkrati pa ima benzenske obroče, ki so hidrofolni in grejo lahko v interakcijo z lipidnim slojem.

Na notranji (citoplazemski) strani membrane so zelo pogoste bazične (pozitivno nabite) aminokislinske. Tudi te naboji delno prispevajo k temu, da ima membrana nek električni potencial.

Proteini **porini** membrano prečkajo v obliki beta strukture (beta lističa). Vendar ne v planarni obliki - planarnih beta verig v notranjosti membran ne najdemo! Zato, ker če so beta strukture v planarni obliki, lahko še vedno tvorijo vodikove vezi z vodo. Kadar pa se te beta strukture tridimenzionalno razporedijo v obliki obroča (sodčka) nimamo končnih površin, kjer bi bili NH ali OH radikali. Zato te strukture ne morejo tvoriti vezi z vodo in so lahko v lipidnem dvosloju.

Za te verige je značilno, da imajo ogromno transmembranskih domen. Ta beta sodček ima v termodinamskem smislu podobno stabilnost kot alfa heliks.

Membranski proteini, ki imajo lipidna sidra (tip V, VI)

V primeru povezave med karboksilno skupino palmitinske kisline in aminokislinskimi ostanki serina in cisteina nastane tioesterska vez. Poleg palmitinske in miristinske kisline se lahko vežejo tudi različne druge izoprenoidne molekule.

Druga možnost pa je, da se na aminokislinske ostanke vežejo različni glikozilirani derivati fosfatidil inozitola, in sicer na C konec proteina. To je klasična glikolizacija.

Dinamika membrane

Lateralno gibanje je običajno in se dogaja ves čas, na vsake toliko časa pa se zgodi tudi flip-flop (neka molekula se iz zunanje strani membrane premakne na notranjo). Lateralno gibanje nima energijskih omejitev, je spontan in hiter proces - pri flip-flopu pa dolgo traja, da se zgodi, hkrati pa je energijsko neugodno. Zato obstajajo tudi encimi, ki pomagajo lipidom se premikati iz notranje strani na zunanjo in obratno - te so flipaza (iz zunanje strani na notranjo stran), flopaza (iz notranje strani na zunanjo) in skramblaza. Skupna lastnost flipaze in flopaze je, da za prenos molekul potrebujeta energijo v obliki ATP. Skramblaza pa lahko lipid zamenja, ne da bi za to potrebovala energijo ATP.

Lipidni rafti (splavi)

So področja na membrani, ki imajo več holesterola in sfingolipidov (ki ga v običajnih delih membrane sploh ne najdemo). Tu so tudi koncentrirani proteini. Posebna oblika splavov so tudi kaveole, ki imajo poleg holesterola in sfingolipidov še protein kaveolin. Ta protein na eni strani membrano zategne, zato se membrana uviha.

TRANSPORT PREKO BIOLOŠKIH MEMBRAN

Lahko ga razdelimo glede na smer (kadar imamo več molekul, ki se prenašajo skupaj; ali je simport ali antiport) in glede na to, ali je energija potrebna ali ne. Kar pa se tiče energije je tako, da v primeru potovanja vzdolž koncentracijskega gradienta energija ni potrebna, pogosto pa je to olajšana difuzija - imamo nek protein, ki potovanje vzdolž koncentracijskega gradienta še olajša. Temu rečemo pasivni transport. Aktivni transport pa je vedno proti koncentracijskem gradientu in je potrebna energija!

Pri olajšani difuziji gre molekula vzdolž gradienta, ampak gre preko nekega prenašalca.

Pri ionskih kanalih gre za prenos ionov. Ione lahko prenašajo tudi ionofori, ki prenašajo ione čez membrano vzdolž koncentracijskega gradienta. To so pasivni prenosi.

Pri aktivnem transportu pa gre snov iz nižje koncentracije v višjo, pri čimer se porabi energija. Imamo primarni aktivni transport ali sekundarni aktivni transport.

Ko molekula preide membrano se mora najprej znebiti hidratacijskega ovoja, potem preiti membrano in potem spet pridobiti hidratacijski ovoj. Proces izgube in pridobitve hidratacijskega ovoja sta energijsko neugodna procesa. Zato je verjetnost za ta pojav majhna, potekel pa bo zelo počasi. V tem primeru prenašalci (olajšana difuzija) znižajo energijsko bariero, ki je potrebna za vstop molekule v lipidni dvosloj in za izhod. Olajšajo torej izgubo in pridobitev hidratacijskega ovoja.

Vsi transportni proteini so razdeljeni na dva dela - **prenašalci** in **kanali**. Znotraj prenašalcev jih lahko delimo naprej na **primarne aktivne**, **sekundarne aktivne** ali **pasivne**.

Prenašalci se obnašajo podobno kot encimi - za molekulo, ki jo prenašajo, se lahko nasičijo. Če je preveč molekul in premalo prenašalcev, potem lahko pridemo do reakcije ničtega reda. Pri kanalčkih pa to ne drži - nimamo krivulje zasičenja, ker lahko molekule stalno potujejo skozi njih. Prenos je torej hitrejši kot pri prenašalcih.

Če imamo nek prenašalni protein, je ta specifičen za vezavo svojega substrata (molekule, ki se prenaša). Na začetku je visoka hitrost prenosa, potem pa lahko pride do nasičenja. Prenašalci so večinoma monomerni proteini. Kanalčki pa nimajo neke stereo specifičnosti. Zelo hitro prenašajo ione, v večini primerov se ne nasičijo in v večini primerov so multimerni (več polipeptidnih verih). Uravnavani so

bodisi z napetostjo bodisi z ligandom.

Prenašalne proteine lahko delimo na porterje in transporterje.

Termodinamske zakonitosti transporta čez membrano

Čim večji je koncentracijski gradient, večja bo razlika v prosti entalpiji, kar lahko podamo z enačbo (glej slajd). Snov se bo pomikala spontano takrat, kadar bo šla vzdolž svojega koncentracijskega gradienta, iz predela višje koncentracije v predel z nižjo koncentracijo. Ravnotežje je doseženo takrat, kadar je $c_1 = c_2$. Lahko si pomagamo tudi s pomočjo drugega zakona termodinamike - premikanje vzdolž konc. gradienta je v skladu s tem zakonom, saj je naključna razporeditev molekul bolj kaotična, entropija se poveča.

PASIVNI TRANSPORT

Glukoza v eritrocit ne prehaja s preprosto difuzijo, ampak z olajšano difuzijo. Na začetku je torej prenos hiter, če pa se koncentracija poveča, lahko pride do nasičenja. Glukoza je glavni vir energije eritrocitov, ki iz nje z glikolizo pridobivajo ATP.

Struktura prenašalca GLUT1

Ima 12 transmembranskih regij. Na zunanji in notranji strani membrane ima nabite aminokisliline, znotraj lipidnega dvosloja pa hidrofobne. Če z vrha pogledamo ta prenašalec vidimo, da ima na eni strani hidrofobne aminokisliline, na drugi strani pa polarne aminokisliline. To je tipično za prenašalce - neenakomerna razporeditev aminokislin.

Privzem glukoze v celico je uravnavan preko insulina. Ko se insulin veže na svoj receptor je to signal, da se glukozni transporterji odprejo. Tako je omogočen privzem glukoze v celico iz krvi.

Antiporter

Primer je prenos klorida in bikarbonata. Temu rečemo tudi anionski izmenjevalni protein. Pri prenosu teh ionov je zelo odvisno, kaj celica potrebuje. Če se prenašata dva enako nabita iona v nasprotno smer, rečemo temu elektro-nevtralni prenos.

V pljučih CO₂ izdihamo - v pljuča torej vstopa HCO₃ in grejo kloridni ioni ven, za razliko od nekaterih drugih tkiv, kjer gre Cl v celico in HCO₃ ven.

AKTIVNI TRANSPORT

Sekundarni aktivni transport je prenos molekule proti konc. gradientu na račun druge molekule, ki gre v skladu s svojim konc. gradientom (simport). Pri primarnem aktivnem transportu pa gre za prenos molekule proti konc. gradientu s pomočjo hidrolize ATP.

Aktivni prenašalci morajo imeti nukleotid-vezavne domene in fosfat-vezavne domene. Te domene so na citosolni strani membrane. Pomembna je K/Na-ATPaza (glavi protein za vzdrževanje membranskega potenciala), Ca črpalka, črpalka protonov in K v želodcu,...

Značilnost ATPaz je tudi, da imajo asparaginski ostanek, ki se lahko fosforilira. Imajo večjo število transmembranskih domen.

SERCA - črpalka kalcijevih ionov sarkoplazemskega retikuluma, katere naloga je vzdrževanje visoke koncentracije kalcijevih ionov v retikulumu in majhne koncentracije kalcijevih ionov v okolju - to je pomembno pri regulaciji mišične kontrakcije.

Na/K ATP-aza

Gre za antiport natrijevih in kalijevih ionov proti koncentracijskem gradientu. Tri natrijeve ione črpa v ekstracelularni prostor in dva kalijeva noter. Gonilo je hidroliza ATP, kar povzroči konformacijsko spremembo.

ATP sintaza (F₀F₁ ATPaza)

Ta protein nam v notranji mitohondrijski membrani vzdržuje koncentracijski gradient vodikovih protonov. Zaradi njene aktivnosti se sintetizira ATP.

Tovrstni encimi, kot je F₀F₁ ATPaza, so neke vrste molekularni motorji. F₀ del je pripet na membrano, sredinski del pa je tista glava, ki lahko ATP bodisi sintetizira bodisi porablja. Ugotovili so, da je od smeri obračanja glave motorja odvisno, ali se kanalček za prenos protonov odpre v eno smer ali pa v drugo.

ABC prenašalci

ATP binding cassette transporters. ABC prenašalci prenašajo tako endogene snovi (metabolite) kot tudi eksogene snovi (npr. zdravila, ki prihajajo od zunaj). Teh ABC prenašalcev imamo ogromno, njihova genska oznaka je MDR (multi drug transporter). Znanih je veliko mutacij v genih za ABC prenašalce. Z vezavo ATP gre v eno konformacijo, ob hidrolizi ATP pa gre v drugo konformacijo.

Ionofori

Ionofor lahko elektrokemijski gradient poruši (v patološkem primeru) in lahko pride tudi do smrti.

Ionofor valinomycin je antibiotik, ki prenaša kalijeve ione čez bakterijsko membrano in posledično uniči bakterijo.

Nekateri toksini tvorijo pore; npr. gram pozitivna bakterija **Dyphtheria**. Ta bakterija se veže na molekulo v celici in vstopi skozi membrano ter se oblikuje tako, da tvori poro in skozi njo potegne še ostalo svojo strukturo (sam sebi naredi poro in se spravi v celico). V celici pa inhibira naše evkariontske proteine, ki so odgovorni za translacijo (sintezo proteinov). Po vstopu v celico je torej v tej celici inhibirana translacija proteinov. Tako pride najprej do lezije, potem pa do rane. Celice, ki so okužene, niso sposobne tega popraviti in preidejo v apoprozo, kar se pozna v ranah, ki se zelo težko celijo.

Predavanje 30; 9. 5. 2011 / Damjana Rozman

Prenos vode z akvaporinom - voda je povsod, vendar nima proste poti po organizmu, ker so celice zamejene z membranami. Zato so se za prenos vode razvili proteini akvaporini, ki imajo alfa heliks, v sredini katerega so polarni aminokislinski ostanki (His, Asn, Arg) - to omogoča, da molekule vode spolzijo čez ta kanalček. Hitrost prenosa vode je velika. Akvaporini so zelo različni po tkivih, pa tudi znotraj celic niso na enakih predelih celic.

Kanalčke potrebujejo praktično vsi ioni. **Kalijev kanalček** je specifičen za kalij; to pa zato, ker ima filter selektivnosti. Aminokislinski ostanki, ki so razporejeni na ustju kanalčka, so razporejeni tako, da favorizirajo prehod ionov z določenim radijem.

Vsi ioni so v vodni raztopini hidratizirani in ko vstopijo v kanalček morajo vodo oddati. Imamo torej proces dehidracije, ki zagotovo ni spontan.

Natrijev kanalček - njegova struktura je zelo kompleksna. Gre za eno samo polipeptidno verigo, ki ima štiri glavne domene. Membrano prečka šestkrat. Natrijev kanalček je eden od kanalčkov, ki deluje z

napetostjo. Ko je membrana polarizirana je kanalček zaprt. Ko pa pride do depolarizacije membrane se pozitivno nabiti del kanalčka konformacijsko premakne, kanalček se odpre in natrijevi ioni lahko vstopijo. Tako se membrana lahko spet polarizira - ko se, se kanalček zopet zapre.

Drug pomemben način uravnavanja kanalčkov je z ligandom. Primer je **nikotinski/acetilholinski receptor**. Na ta receptor se lahko vežeta dva liganda. Ta vezava povzroči konformacijsko spremembo receptorja, tako se kanalček lahko odpre. To je začetek živčnega impulza. Prenasa lahko različne ione (natrij, kalcij, kalij). Tudi struktura tega receptorja je zelo kompleksna. Ima pet podenot, ki tvorijo neko 'rožico'. Označimo jih z grškimi črkami. Če je kanalček zaprt, so levciinske stranske zadrge razporejene tako, da gledajo v sredino kanalčka, kar kanalček zapre. Če pa pride do konformacijske spremembe se vseh pet podenot zavrti (levcini se umaknejo v hidrofobni del strukture) in kanalček je odprt. Ko se acetilholin razgradi se kanalček zopet zapre.

Cistična fibroza (nekaj popolnoma novega!)

Ena najpogostejših avtosomnih recesivnih bolezní. Je tudi ena izmed zelo dobro študiranih genetskih obolenj. Gen je velik in dosti kompleksen, zato je tarča mnogih različnih mutacij (poznanih je že 1720 različnih mutacij tega gena).

Cistična fibroza je bolezen, ki prizadane predvsem pljuča. Že kot otroci so pacienti izredno neuporni na respiratorne infekcije; imajo zelo veliko sluzi. Če se neustrezno zdravi potem lahko smrt nastopi kar hitro. Treba jim je pomagati z dihalnimi aparati in antibiotiki. Zato, ker prizadane pljuča, ki so zelo ranljiv organ, je bil gen za cistično fibrozo eden prvih tarč genske terapije. Pri cistični fibrozi so poskušali popraviti škodo z adenovirusom, v katerega so vstavili popravljen gen za CFTR kanalčke, potem pa so organizem večkrat zapored okužili s tem virusom. Dejansko je pomagalo, je pa problem, ker je treba pri temu večkrat obremeniti organizem z virusom.

Obstajajo tudi nekateri strupi, ki vplivajo na ionske kanalčke. Te toksini dostikrat preprečijo deaktivacijo kanalčkov, da so stalno odprti, kar je smrtno nevarno.

Transport čez membrano - povzetek

Polarne molekule potrebujejo prenašalne proteine. Lahko se prenašajo bodisi proti bodisi vzdolž konc. gradienta. Omenili smo GLUT prenašalce kot uniporterje, Na/glukozni simporter je primer simporta, antiporterji pa prenašajo ione ali molekule v obratni smeri (primer je Na/K ATP-aza). Omenili smo tudi prenašalec sarkoplazemskega retikuluma (SERCA). ATPaze / ATP sintaze so ključne za ohranjanje energije mitohondrijev in kloroplastov.

Obravnavali smo ionofore (pasivni prenos ionov čez membrano; lahko porušijo elektrokemijski gradient), akvaporine (prenos vode) in pa splošno strukturo ionskih kanalčkov. Uravnavani so lahko bodisi z napetostjo bodisi z ligandi.

PROTEINI, VKLJUČENI V PRENOS SIGNALA (receptorji, G-proteini, kinaze)

Biološki signali so lahko antigeni, signalne komponente, rastni hormoni, svetloba, mehanski dotik... karkoli, kar na molekularni ravni sproži reakcijo. Sledi signal transduction - kako se informacija prenese do celičnega odgovora. Mehanizmi signaliziranja so evolucijsko zelo ohranjeni.

Signalizacija ima štiri glavne značilnosti:

1. signal mora biti **specifičen**
2. ena sama signalna molekula lahko sproži kaskadno reakcijo - pride do **ojačitve** signala
3. če je neka signalna molekula predolgo vezana na receptor pride do tako imenovane desenzitacije ali **adaptacije**
4. različni signali iz različnih signalnih poti se med seboj lahko združujejo - **integracija**.

1. Specifičnost

Za eno od signalnih molekul mora biti afiniteta za vezavo dosti večja kot za druge. Specifičnost se da matematično izraziti.

2. Ojačanje signala

Imamo nek signal, ki pride do prvega receptorja, ta aktivira encim, ki sintetizira sekundarni sporočevalec, ta lahko deluje na naslednji encim... en signal torej sproži kaskado reakcij, tako da je na koncu signal zelo ojačan.

3. Adaptacija

Če imamo receptor aktiviran dalj časa, lahko pride do negativne povratne zanke. Stalna aktivacija receptorjev povzroči, da se receptor zapre (deaktivira). Receptorji se lahko celo odstranijo od membrane in se razgradijo.

4. Integracija

Če imamo dva receptorja, ki sta aktivirana preko dveh različnih signalnih poti - lahko delujeta v isti smeri ali v nasprotni smeri, ampak končna vsota je rezultat obeh signalov.

Imamo **vodotopne** in **lipidotopne** signalne molekule. Oboji imajo svoj mehanizem signalizacije, ki je v določenih delih podoben, razlika pa je na začetku - vodotopni signali (vsi peptidni hormoni, npr. insulin) morajo imeti na membrani svoje receptorje, saj ne morejo čez lipidni dvosloj - tu pride ponavadi do velike ojačitve signala. Pri lipidotopnih signalih pa imamo dve možnosti. Ena je, da signal sam prečka membrano, se v citoplazmi veže na prenašalec in skupaj vstopita v jedro. Vendar pa tudi mnoge lipidotopne signalne molekule potrebujejo na membrani neke vrste prenašalne proteine.

Pri signalizaciji imamo lahko hiter ali počasen način delovanja. Hitro delovanje je takrat, ko signal sproži nek takojšen odgovor, počasno pa takrat, kadar se mora informacija signala prenesti do jedra, kjer sproži sintezo proteina, ki sproži naprej nek odgovor...

6 VRST MEHANIZMOV PRENOSA SIGNALA

Kar tri izmed šestih najpomembnejših načinov prenosa signala so povezani bodisi z G-proteini bodisi z fosforilacijo.

1. membranski receptorji, povezani z G proteini
2. receptorji tirozinskih kinaz - tirozinski ostanki so podvrženi avtofosforilaciji. Ko so fosforilirani so aktivni in sprožijo signalno kaskado.
3. receptorji gvanilatnih ciklaz - sorodnica adenilatne ciklaze. Tvori cGMP iz GTPja.
4. ionski kanalčki z zaporo (npr. Na kanalček, K kanalček, acetilholinski receptor)
5. receptorji, ki vežejo steroidne hormone, tiroidne hormone (prenašalci hidrofobnih, lipidotopnih molekul)

6. receptorji, ki posredujejo informacije med zunajceličnim prostorom in notranjostjo (npr. integrini). Ta skupina signalizacije je globoko udeležena v odgovor antigen/protitelo.

1. MEMBRANSKI PROTEINI, POVEZANI Z G PROTEINI

Receptor, ki ima 7 transmembranskih alfa vijačnic, je povezan z G proteinom, ki ima tri podenote (alfa, beta, gama). Na prvi podenoti (alfa) je vezavno mesto za GTP ali GDP. Bistvo G proteinov je, da alfa podenota G-proteina ni aktivna če je nanjo vezan GDP in se aktivira, če je nanjo vezan GTP. Če se ta podenota aktivira (da je nanjo vezan GTP) potem to povzroči, da se signal prenese na encim, ki je sposoben sintetizirati nek sekundarni sporočevalec. Ta je lahko ciklični AMP (cAMP) ali pa inozitol-3-fosfat (IP3) - to sta glavna dva sporočevalca, ki se sintetizirata na ta način.

V tem sistemu večinoma najdemo encim adenilatno ciklazo, ki tvori cAMP ali pa fosfolipazo C, ki tvori IP3.

Delovanje adrenalina - G protein je povezan z adrenalinskim receptorjem. Ko je aktiviran se alfa podenota G-proteina odcepi in se priključi adenilatni ciklazi, ki sintetizira cAMP. Ta lahko povzroči raznolik odgovor - lahko pride do fosforilacije drugih encimov, ali pa se odprejo natrijevi ali kalijeve kanalčki.

Ciklični AMP nastane iz ATPja, z znotrajcelično (intramolekularno) povezavo med OH skupino na 3' koncu riboze in OH skupino na 5' koncu riboze, vmes pa je fosfat - imamo torej dve fosfoestrste vezi.

Utišanje signala:

1. hidroliza cAMP z encimom fosfodiesterazo
 2. hidroliza GTP z endogeno GTPazno aktivnostjo alfa podenote
 3. pride zraven neka endogena molekula, ki desenzitira receptor (receptor postane na svoj signal neobčutljiv).
2. hidroliza GTP z endogeno GTPazno aktivnostjo alfa podenote - ta podenota je aktivirana, kadar je nanjo vezan GTP. Če želimo signal utišati je dovolj, da GTP hidroliziramo.
3. desenzitizacija signaliziranja beta adrenergičnega receptorja z arestinom - receptor se lahko umakne od membrane z endocitozo (receptor v veziklu čaka znotraj celice, na naslednji signal).

Inozitol-3-fosfat, ki ga tvori encim fosfolipaza C (ki jo aktivira G-protein) je molekula, ki se lahko veže naprej, npr. na kanalčke endoplazemskega retikuluma, kjer sproži sproščanje kalcija v citosol. Signalov, ki se prenašajo preko fosfolipaze C in IP3, je zelo veliko.

Primer signalizacije preko G proteinov: sprejem svetlobe v očesu vretenčarjev

Paličnice imajo določene diske, v katerih je rodopsin. To je transmembranski protein, v katerem je lipidna molekula (ena izmed oblik vitamina A, ki ima več konfiguracij - ta je lahko v obliki alkohola ali aldehida, in pa v obliki 11-cis ali pa all-trans. Za prehod iz ene oblike v drugo je potreben razcep vezi, energija za ta razcep pa pride v obliki fotona). Sprememba konfiguracije v vitaminu A povzroči spremembo konformacije molekule rodopsina.

Podoben protein rodopsinu je transducin. Tudi pri njem je važno, ali je nanj vezan GTP ali GDP.

Vitamin A nastane iz beta karotena. 11-cis-retinal je oblika vitamina A, ki ga smatramo za vidni pigment. Ko pride do absorpcije fotona pride do spremembe vezi v all-trans-retinal. To naprej pošlje vidni impulz

možganov.

Imamo opsin za zaznavanje zelene, rdeče in modre barve. Če so mutacije do katerekoli od teh treh genov lahko pride do različnih vrst barvnih slepot.

Zaradi različnih signalov pride do zaznavanja signalne molekule s strani receptorja, ki je povezan z G proteini. G proteini se aktivirajo, aktivirajo encime, ki aktivirajo sekundarne prenašalce, te sprožijo nadaljno kaskado reakcij.

Bakterijski toksini so strupi, ki nam kovalentno spremenijo alfa podenoto G proteina; nanjo vežejo nukleotid. Alfa podenota G proteina mora imeti zmožnost vezave GTP, da se aktivira. Če ta vezava ni možna, potem ne deluje.

2. RECEPTORJI TIROZINSKIH KINAZ

Primeri mehanizma prenosa signala: Vezava inzulina na receptor povzroči avtofosforilacijo tirozina. Ko je ta receptor fosforiliran začne takoj fosforilirati nadaljne molekule. Insulinski receptor je predstavnik tirozinskih kinaz. Inzulin je peptidni hormone, sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, A in B, ki sta povezani z dvema S-S mostičkoma, potem pa je še en S-S mostiček znotraj A verige. Inzulin ima lahko hiter, srednje hiter in pa počasen odziv.

Transporterji za glukozo so v veziklih shranjeni v celicah, kadar glukoze ni. Ko pride inzulinski signal (inzulin se veže na receptor in pride do fosforilacije tirozinskih kinaz) se začnejo glukozni transporterji vračati na plazemsko membrano - s tem je večja možnost za vstop glukoze v celico. To je hiter učinek inzulina.

3. RECEPTORJI GVANILATNIH CIKLAZ

Receptor, na katerega se veže signalna molekula, sam tvori sekundarni sporočevalec. Gvanilatne ciklaze so nekatere tudi topne v vodi, npr. tiste, ki zaznavajo dušikov monoksid (NO lahko difundira čez membrane, zato imajo lahko receptorje tudi v citosolu).

4. IONSKI KANALČKI Z ZAPORO

Ionski kanalčki, ki so vključeni v biosignalizacijo so odvisni od napetosti. Na ta način je uravnavan natrijev kanalček - odvisen je od polarizacije in depolarizacije membrane. Omenili smo tudi signalizacijo, odvisno od liganda - acetilholinski receptor.

Zaporedno odpiranje natrijevih in kalijevih kanalčkov v nevronih je odgovorno za akcijski potencial.

Predavanje 31; 10. 5. 2011 / Damjana Rozman

5. JEDRNI RECEPTORJI, KI VEŽEJO LIPIDOTOPNE MOLEKULE

To niso zgolj steroidni hormoni in vitamin D; sem spadajo tudi tiroidni hormoni (hormoni žleze ščitnice), derivati vitamina A in mnoga lipofilna zdravila.

Neka lipidotopna signalna molekula sproži biološki odgovor, ta pa se lahko sproži samo pri tistih celicah, ki imajo receptorje za sprejem te lipidotopne molekule. Med lipidotopnimi signalnimi molekulami so v veliki meri hormoni, ki imajo zelo striktno tkivno specifično delovanje.

Signali spadajo v družino androgenov (prepozna jih androgen receptor), estrogenov (estrogen receptor), progesteronov (progesteron receptor), kortikosteroidov (kortizol in aldosterol - prepoznajo jih glukokortikoidni receptorji in mineralokortikoidni receptorji), tiroidnih hormonov. Imamo še vitamin D in retinojsko kislino (na sliki je all-trans retinojska kislina. Ima dva receptorja - RAR, ki rajše veže all-trans verzijo in RXR, ki rajši veže 11-cis verzijo).

Najprej mora priti do spodbude (signala), zakaj se bo hormon sintetiziral. Nato se hormon veže na svoj receptor (pomembno je, da ima hormon visoko afiniteto za vezavo na receptor). Ob vezavi hormona mora priti do konformacijske spremembe proteinske (receptorske) molekule. Sledi prehod preko citoplazme in jedrne membrane, ko pa je receptor s hormonom v jedru, je ta vezava povzročila tako spremembo, da je DNA vezavno mesto na receptorju odprto in receptor se lahko veže na DNA. Vezava na DNA pa pomeni začetek prepisovanja. V končni fazi mi zaradi enega hormona dobimo celo paleto novih proteinskih molekul, ki so odgovor na signal.

Vsak receptor ne uravnava enega samega gena v genomu - to bi bilo potratno! En receptor lahko povzroči prepisovanje večih različnih tarčnih genov; tako tudi receptor lažje najde tarčne gene v množici genov, ki so v jedru.

Splošen mehanizem delovanja:

- sinteza hormona kot potreba fizioloških potreb
- vezava hormona na svoj receptor
- potovanje v jedro
- vezava na DNA in povzročitev prepisa genov

Mnogi jedrni receptorji imajo kot svojo DNA vezavno domeno cinkov prst. Vsi jedrni receptorji delujejo kot dimeri! Steroidni receptorji so homodimeri, receptorji za vitamin A in vitamin D pa so heterodimeri.

HRE - hormone responsive element (PRE = progesteron responsive element,...), območje na DNA, kamor se veže hormonski dimer. To povzroči prepisovanje genov.

POSLEDICE NAPAK V SIGNALIZIRANJU

Signalne molekule so pomembne pri uravnavanju celičnega cikla. Uravnavanje mehanizma mitoze je pri evkariontskih celicah zelo ohranjeno in ima ogromno kontrolnih točk, vendar te vseeno niso absolutne. Na začetku razvoja osebka in v embrionalni dobi se morajo celice zelo intenzivno deliti, že samo zaradi hitre rasti. V odraslem organizmu pa se nekatere celice (npr. nevroni) ne delijo več, druge pa se ves čas obnavljajo (npr. celice v koži). Ena izmed kontrol, ki uravnava celično delitev, so rastni faktorji. Proteini, ki so odgovorni za uravnavanje, pa so z G proteini povezani receptorji, ali pa proteinske kinaze.

Pri delitvi (mitozi) lahko pride do zelo veliko napak - lahko pride do somatskih kromosomskih aberacij (napačno število kromosomov).

Onkogeneza - eden od posledic motenj v biosignaliziranju.

Protoonkogen - normalen celični gen, ki se lahko pod določenimi pogoji spremeni v onkogen. To lahko povzročijo virusne infekcije, razne kancerogene kemikalije, UV žarki, dedne mutacije. Onkogeni lahko

kodirajo rastne faktorje, G proteine, proteinske kinaze (npr. tirozinsko kinazo) in pa transkripcijske faktorje.

Tumor supresorski geni delujejo v drugi smeri kot onkogeni - kodirajo proteine, ki delujejo v obratni smeri in zavirajo celične delitve. Ogromno je znanih mutacij, tako v onkogenih kot tudi v tumor supresorskih genih in v obeh primerih lahko pride do tumorske rasti. Tumor supresorski geni kontrolirajo, kdaj bo celica prešla iz G1 faze v S fazo celičnega cikla.

Virusi nosijo podobne gene kot mi - tudi protoonkogene. Posebaj za retroviruse je značilno da, ko izvedejo infekcijo nekega višjega organizma, se njihova dednina prepíše v DNA in inkorporira v človeški genom. Če se v genom ugradi nek retrovirus, ki ima protoonkogen, ki tudi lahko kodira proteine, ki uravnava celično rast.

Integracija retrovirusa v človeški genom je naključna. V primeru, da se dednina, ki vsebuje nek virusni protoonkogen, vključi v regulatorno regijo (ki je močno izražena), to pomeni, da se bo prepisovanje tega protoonkogenega zelo pospešilo.

Če pride do mutacije v EGF receptorju (epidermalni growth factor), potem ta receptorska molekula sploh ne odgovarja več na signal (na rastni faktor), ampak je signal ves čas vklopljen in se celice ves čas delijo.

Estrogeni stimulirajo delitev celic - ščitijo ženske pred kardiovaskularnimi obolenji in spodbujajo proliferacijo celic (za pravilno delovanje mlečnih žlez in uterusa). Vendar pa pretirana proizvodnja estrogenov lahko povzroči nekatere oblike raka, predvsem na dojki.

KATALIZA BIOKEMIJSKIH REAKCIJ (ENCIMI)

Encimom rečemo biokatalizatorji. Ker delujejo v živih sistemih morajo delovati pri blagih razmerah. Proces, v katerih sodelujejo encimi, so ponavadi večstopenjski (npr. sinteza holesterola). Obstaja tudi mnogo bolezni, povezanih z boleznimi encimov, in pa terapije za te bolezni (encim lahko z zdravili ciljamo). Encimi se uporabljajo marsikje, ne le v medicini, tudi v farmacevtski in živilski industriji, agronomiji,...

Encimi so polipeptidne verige. V polipeptidnih verigah in njihovi konformaciji imajo ključno vlogo aminokislinski ostanki radikalov. V 3D prostoru izoblikujejo **aktivno mesto encima** - to je nekaj radikalov, ki lahko vstopi v šibke interakcije s substratom, ko substrat pride na pravo razdaljo.

Encimi znižajo energetska bariero pri reakcijah, ne vplivajo pa na ravnotežje. Vplivajo samo na hitrost! Če reakcija brez prisotnosti encima poteka spontano v eno smer, se tudi ob prisotnosti encima ne bo spremenila - potekala bo v isto smer, ampak hitreje.

V enačbi za hitrost reakcije nastopa aktivacijska prosta entalpija; to je tista spremenljivka, ki jo je Arrhenius v svoji enačbi poimenoval **aktivacijska energija**.

Če imamo več stopenj v reakciji, z različnimi produkti, bo hitrost reakcije določal najpočasnejši del.

Zakaj potrebujemo tako velike bariere za prehod reaktantov v produkte? Zato ker, če teh barrier ne bi bilo, bi se molekule stalno spontano pretvarjale ena v drugo in bi bil kaos. Bariere pa omogočijo, da šele nek encim zniža to bariero in katalizira točno določeno reakcijo za nek specifičen produkt.

Kaj prispeva k energijski barieri?

Če želimo narediti pretvorbo substratov v produkte moramo substratom odvzeti nekaj svobode. Želimo torej entropijo zmanjšati, kar je neugodno - to je eden od dejavnikov, ki prispeva k nastanku energetske bariere. Drugi je tudi odvzemanje vodnega plašča - tudi to je energetska potratno. Dostikrat je treba narediti strukturno spremembo (deformacijo), za kar je treba dovesti silo. Vse to viša energijsko bariero med substrati in produkti.

Zakaj encim lahko to bariero zniža?

Vsako vzpostavljanje vezi je spontan proces. Med substratom in med encimom se vzpostavijo šibke interakcije (van der Waalsove, vodikove, hidrofobne,...) in to zniža energetska bariero (ravno zato, ker je to spontan proces!). Aktivni center encima ni komplementaren substratu, ampak je najbolj komplementaren prehodnemu stanju substrata (ko je dosežen vrh, kjer je možnost, da bo šla reakcija nazaj v substrat ali naprej v produkte). Gre torej za inducirano prilagajanje encima substratu. Aktivacijska energija se torej zniža zaradi sproščene vezavne energije ob nastanku šibkih interakcij med encimom in substratom.

Če bi veljal princip 'ključ-ključavnica', potem bi imel sistem najmanjšo energijo pri stanju encim-substrat. Ta princip torej ni ustrezen - encim se ne prilega substratu, ampak se prilega njegovemu vmesnemu (prehodnemu) stanju. Ta princip ustreza termodinamskim nazorom. Aktivni center encima je prilagojen prehodnemu stanju specifičnega substrata, ne kateregakoli substrata - specifičnost!

Primer encimske reakcije je razgradnja (hidroliza) peptida z encimom peptidazo. Ker gre za hidrolizo peptidne vezi mora vstopiti še voda. Peptid se s šibkimi interakcijami poveže z encimom. Ko so se te vodikove vezi vzpostavile, se je zaradi prerazporeditve elektronske gostote jakost peptidne vezi zmanjšala - bolj je primerna za razcep. Tako vstopi še voda, pride do hidrolize in dobimo produkta.

KOFAKTORJI, KOENCIMI, PROSTETIČNE SKUPINE

Encimi imajo dostikrat še neproteinski del. Celotni encim je holoencim, ta je sestavljen iz apoencima (proteinskega dela) in prostetične skupine (neproteinskega dela).

Kofaktor je bodisi koencim, bodisi prostetična skupina.

Prostetična skupina je kovalentno, z močnimi interakcijami vezana na encim, za razliko od koencima.

Vloga NAD in NADP pri oksidoredukcijskih reakcijah

Aktivni del molekule je nikotinska kislina - niacin. Vse ostalo (adenin dinukleotidni del) pa je radikal. Elektron se preneseta v obliki hidridnega iona, ki se veže na nikotinsko kislino. V primeru FMN in FAD pa se ravno tako preneseta dva elektrona, vendar v obliki vodikovih atomov.

Predavanje 32; 13. 5. 2011 / Matjaž Zorko

MEHANIZMI ENCIMSKE KATALIZE

Encimi delujejo po neki kinetični shemi - encim se najprej veže na substrat (ali substrat na encim; praviloma je substrat manjši od proteina, ampak ne vedno) in nastane kompleks ES. To NI še aktivirani

kompleks! Za tem nastanejo še neki vmesni kompleksi (mi pišemo samo EP), na koncu pa dobimo regeneriran encim, substrat pa se spremeni v produkt.

Kompleksi med ES in produkti pa so kompleksi, ki jim včasih rečemo Michaelisovi kompleksi, vendar obstajajo tako malo časa, da jih še nihče ni izmeril / popisal.

Kompleks ES stabilizirajo šibke interakcije. Sledi razcep preko različnih vmesnih stanj po različnih mehanizmih, ki vsebujejo med drugim tudi nastanek kovalentnih vezi, ki potem razpadejo. Mehanizmi so torej:

- približanje in orientacija
- splošna in specifična kislinsko-bazna kataliza
- kovalentna kataliza
- kataliza s kovinskimi ioni

Smisel vsake katalize je peljati reakcijo čez druge, bolj energijsko ugodne aktivirane komplekse, kot je aktivirani kompleks nekatalizirane reakcije.

Če se reaktanta naključno gibljeta po mediju se morata najti, pa še pravilno orientirati, potem je hitrost reakcije relativno majhna. Če takšno reakcijo primerjamo z reakcijo, ki teče znotraj ene molekule, vidimo, da se aktivna mesta ne moreta neskončno oddaljiti eden od drugega - stalno sta si blizu, zato ta reakcija gre mnogo hitreje (aktivni mesti se ne iščeta po celi raztopini ampak sta relativno blizu, zaradi vrtenja vezi pa se že po statistiki dosti hitro srečata). Zadeva se v drugem primeru obnaša, kot da bi bilo 10^5 več reaktantov, ki se srečujejo.

Če pa sta skupini znotraj ene molekule vezani na obroč, je njuna orientacija optimalna - aktivni mesti se namreč ne moreta oddaljiti ena od drugih. Reakcija se obnaša, kot da bi bilo 10^8 več reaktantov, ki se srečujejo; sistem namreč drži aktivna mesta zelo skupaj.

Podobno deluje encim! Dva substrata veže na točno določenih mestih, da sta dela reaktantov, kjer bo prišlo do reakcije, pravilno orientirana in približana. Tako znatno zmanjša čas, v katerem poteče reakcija.

Specifična / splošna kislinsko bazna kataliza - primer razcepa amida oz. peptidne vezi

Želimo razbiti peptidno vez - to se zgodi tako, da se noter vrine voda (če ni katalizatorja). Če pa imamo katalizator, potem elektroni katalizatorja (ki ima, na primer, OH skupino) napadejo ogljik peptida in nastane kratko živeča vez. Elektroni okoli C se reorganizirajo (ni več dvojne vezi s kisikom. Od te stopnje naprej pa nastopi t. i. kislinsko-bazna kataliza; proton more od kisika skočiti na NH skupino peptida (NH₂-R oblika je nestabilna, zato se rada odcepi - peptidna vez je podrt). Prehod je možen tako, da direktno preide (brez pomočnika), lahko pa OH⁻ ion, ki je v vodi vedno prisoten, odvzame proton s kisika, medtem ko H₃O⁺ ion, ki je tudi vedno prisoten v vodi, odda proton na NH skupino - protona se torej ne prenese, ampak se ga odvzame, medtem ko se drugi doda na drugem mestu.

Kadar je donator in akceptor protona voda rečemo, da gre za **specifično kislinsko-bazno katalizo**.

Namesto vode kot akceptorja/donorja protona imamo lahko na površini encima eno kislo in eno bazično skupino, ki delujeta kot akceptor in donator protona. To je **splošna kislinsko-bazna kataliza**. Ta kataliza je najbolj pogosta.

Bistvo kislinsko-bazne katalize je v tem, da je v teku te reakcije treba proton sprejeti in proton oddati, za to pa pomagajo skupine, ki so na encimu (ali pa voda). To vlogo lahko odigrajo različne aminokisliline.

Aktivna mesta morajo vsebovati take aminokislinske ostanke, ki so šibke kisline, šibke baze, ali oboje. Hitrost se s tem poveča od 100 do 100,000 krat.

Glu, Asp so šibke kisline, disociirane lahko delujejo kot šibke baze. Lys, Arg so šibke baze (disociirane kot šibke kisline), Cys, His, Ser (zelo šibka kislina sam po sebi, če pa ima v svoji bližini kakšno podobno skupino, lahko zaradi induktivnega efekta postane močnejši),...

Kovalentna kataliza

Med encimom in substratom nastane prehodna kovalentna vez, ki kasneje razpade.

Če razcepimo molekulo AB v molekuli A in B, potem se dostikrat izkaže, da nastopa v reakciji še ena skupina X, ki veže A ali B - tako odcepi enega od drugega. Kasneje pa se X odcepi in se lahko znova uporabi pri nadaljni katalizi.

Primer: **kimotripsin**. Prva stopnja je kovalentna kataliza, druga stopnja pa kislinsko-bazna kataliza. Hkrati pa seveda deluje tudi približanje in orientacija. Aktivni center od kimotripsina je sestavljen iz serina, katerega OH skupina pa je močno aktivirana zaradi dejstva, da je v bližini še ena baza, ki vleče proton k sebi (s tem močno poveča gostoto elektronov na tem kisiku, da ta lahko napade ogljik peptida, katerega peptidno vez bo cepil). Elektroni znotraj peptida se reorganizirajo in del molekule se preko C kovalentno veže na kimotripsin. V naslednji fazi vstopi voda, razcepi zadevo, proton gre ven in serin se regenerira - hkrati pa se tudi del, ki je bil kovalentno vezan, odcepi.

Zato, da serin lahko kovalentno veže en del polipeptidne verige v kimotripsinu, mora OH skupina od serina postati bolj aktivna. To se zgodi zato, ker je serinu v neposredni bližini dodan histidin in pa asparaginska kislina. Te aminokislinske si v sekvenci niso zelo blizu - v primarni strukturi si torej niso blizu, vendar pa jih je terciarna struktura zblížala! OH postane tako bolj reaktiven, ker je v bližini ena baza (histidin), ta vleče proton od OH k sebi - da bi bila ta baza še bolj učinkovita je zraven še asparaginska kislina, ki vleče proton od histidina bolj k sebi - tako dušik od histidina postane še bolj dovzeten za proton od serina in ga še močnejše vleče k sebi. Tako postane O od serina bolj reaktiven, ker je gostota elektronov na njem večja. Funkcionalnost tega koncepta lahko preprosto dokažemo tako, da histidin zamenjamo z drugo aminokislino, ki ni bazična, bomo dobili neaktivni encim.

Kataliza s kovinskimi ioni

Kovinski ioni so lahko na encim trdno vezani, lahko pa prihajajo iz okolice in se šibko vežejo. Ta ion vspostavlja ionske in koordinativne vezi s substratom - s tem premakne substrat v ustrezen položaj in zmanjša aktivacijsko energijo, lahko pa tudi aktivira določeno skupino substrata, da postane bolj aktivna (kot pri primeru s histidinom). Včasih lahko pride tudi do izmenjave elektronov med kovinskim ionom in substratom. Približno ena tretjina vseh encimov je takih, da potrebuje kovinski ion za svojo aktivnost; ta je zelo velikokrat cinkov ion.

Primer: metaloproteinaza. Voda bo delovala na ogljik v peptidu, katerega peptidno vez bomo cepili. Cinkov ion veže kisik od vode in jo aktivira - kisik postane bolj dovzeten za vezavo na ogljik. Ko se peptid približa se molekule reorganizirajo, pride do kovalentne povezave. Na koncu voda omogoči odcep od cinkovega iona in razcep peptidne vezi. Vse je analogno kot prej, ko je bil v igri OH od serina, s to razliko, da ima takšno vlogo tokrat voda, aktivirana s strani cinka.

KLASIFIKACIJA ENCIMOV

Če najdemo nek novi encim skušamo poiskati reakcijo, ki jo katalizira, na koncu pa damo končnico -aza (npr. ureaza - encim, ki katalizira razpad uree). Vseeno pa obstaja množica encimov, ki imajo drugačna imena in na koncu nimajo -aza; ta imena so **trivialna imena** in niso sistematična, ostala so zaradi zgodovinske vrednosti.

Encimska komisija je klasificirala encime v šest razredov, predvsem na vrsto reakcije, ki jo katalizirajo.

Te razredi so naprej razdeljeni v podrazrede, podpodrazrede, etc...

Vsak encim je klasificiran s štirimi številkami - začne se z EC (enzyme commission number), prva številka je ena od šestih razredov, sledijo številke podrazredov, zadnja številka pa je posamezna (individualna) številka encima znotraj tega podrazreda - primer: EC 2.7.1.1.

Komplikacije nastanejo predvsem tam, kjer imamo družine encimov in je v teh družinah zelo zelo veliko podobnih encimov, ki se znajdejo v zelo podobnih organizmih.

ŠEST RAZREDOV:

1. oksidoreduktaze - katalizirajo prenos elektronov v različnih oblikah (kot hidridni ion, čiste elektrone, ali vodikov atom). Iz enega substrata elektrone prenesejo na drugi substrat. Obstaja ogromno podrazredov: dehidrogenaze (prenos elektronov skupaj s protoni), klasične oksidaze (prenašajo se čisti elektroni), peroksidaze (naredijo peroksid), oksigenaze (vrinejo enega ali dva kisika ob izmenjevanju elektronov).

2. transferaze - katalizirajo prenos skupin iz ene na drugo molekulo. Gre za skupino, ki je vezana na eno molekulo - transferaze katalizirajo prenos te skupine na drugo molekulo. Tudi teh transferaz je veliko, iz imen pa ponavadi lahko razberemo, kaj prenašajo - npr. glikozil-transferaze, ki prenašajo ogljikove hidrate, amino-transferaze prenašajo amino skupine, ipd... fosfo-transferazam rečemo običajno tudi kinaze.

3. hidrolaze - prenos skupin na H₂O. Hidrolaze s pomočjo vstopa vode razcepijo molekulo na dva dela. So edine, ki nimajo nobenega koencima. Vseh ostalih 6 razredov ima koencime. Najbolj običajne so esteraze. Imamo še glikozidaze, peptidaze (razcepljajo peptidno vez), amidaze (odcepljajo amide).

4. Liaze, rečemo jim tudi sintaze, povežejo dve molekuli z različnimi vezmi.

5. Izomeraze - pravzaprav nekakšne transferaze, vendar se prenos skupin naredi znotraj ene molekule. Lahko pretvarjajo cis v trans ali obratno.

6. ligaze - katalizirajo nastanek kovalentnih vezi, podobno kot liaze, a so veliko bolj raznovrstne, poleg tega je vedno potrebna energija v obliki ATP. Liaze povežejo dve molekuli skupaj, rečemo jim sintaze. Ligaze tudi povežejo dve molekuli skupaj, ne rečemo jim sintaze, ampak sintetaze. Pomembno je, da se pri ligazah potrebuje dodatni vnos energije, kar more biti ATP ali kakšen drugi nukleotid-tri-fosfat. Lahko povežejo C-C, C-O, C-N ali C-S, vendar za razliko od liaz potrebujejo energijo.

ENCIMSKA KINETIKA

Govori o hitrosti encimskih reakcij - kako hitro se substrat spremeni v produkt ob prisotnosti encima. Hitrost podaja spremembo koncentracije substrata/produkta v časovni enoti. Hitrost encimske reakcije je merilo za **aktivnost encima**.

Enote za hitrost encimske reakcije so **unit [U] = 1 mikromol/min** ali **katal [kat] = 1 mol/s**; vendar pa je en katal nerealna količina, saj noben encim ne deluje tako hitro, da bi pretvoril 1 mol substrata na sekundo. Zato je unit bolj primerna.

Specifična aktivnost encimskega pripravka je hitrost na št. encimskih enot. Če imamo veliko encima bo šla reakcija hitreje, ob manj encima pa bo šla počasneje (gre za linearno odvisnost). Specifična aktivnost govori tudi o tem, koliko je naš vzorec 'čist' (koliko ostalih primesi/proteinov je v vzorcu, poleg encima in substrata).

Govorimo o **začetni hitrosti encimske reakcije**. To definiramo kot hitrost, ki jo izračunamo (določimo) v času 0, ko reakcija začne teči. Takrat je reakcija prvega reda - ko pa zasičimo vse encime, postane reakcija ničtega reda, saj z zviševanjem koncentracije substrata ne moremo več pospešiti reakcije. Začetno hitrost je zelo težko izmeriti.

Obstaja še en problem - substrat se lahko pretvarja tudi brez encima. Zato je najlažje meriti hitrost reakcije, ki je brez prisotnosti encima tako počasna, da praktično ne poteče v racionalnem času. Če pa ni tako počasna, potem moramo hitrost reakcije brez encima odšteti od hitrosti reakcije z encimom.

Začetna hitrost se približuje neki teoretični maksimalni hitrosti, ki je ne moremo preseči, lahko pa bi jo v teoriji dosegli ob neskončni koncentraciji substrata.

MICHAELIS-MENTENOVA KINETIKA

Ključnega pomena je kompleks ES. Stopnja $E + S \leftrightarrow ES$ je hitra, reverzibilna stopnja, medtem ko je $ES \leftrightarrow E + P$ počasna reverzibilna stopnja - razpad ES pa določa hitrost celotne reakcije. To sta predvidela Michaelis in Menten, vendar to ni vedno res.

Z večanjem konc. substrata se vse več encima nastaja v obliki ES; encim postaja nasičen s substratom, zato ne moremo hitrosti povečevati preko vse meje.

ES nastaja in razpada (razpada lahko proti produktom ali proti reaktantom). V stacionarnem stanju sta hitrosti razpada in nastajanja enaki. Izpeljemo enačbo za izračun [ES] (glej slajd), hkrati pa izraz za **K_m**.

K_m je konstanta, ker je sestavljena iz constant. Pove nam, pri kateri koncentraciji substrata bo hitrost enaka polovici maksimalne hitrosti (V_{max}); **V_{max}** pa ni konstanta, ker je odvisna od totalne koncentracije encima.

Če želimo s spremembo koncentracije substrata dosti vplivati na hitrost reakcije, lahko to naredimo samo na začetku, ko se sistem obnaša kot reakcija prvega reda - kasneje ne dosežemo več ničesar s spremembo koncentracije substrata, saj so encimi zasičeni in se sistem obnaša kot reakcija ničtega reda.

Velikost K_m je za različne encime različna. En encim ima lahko za različne substrate različen K_m - primer je heksokinaza, ki ima za D-fruktozo mnogo večjo K_m in torej manjšo afiniteto za vezavo, kot za D-glukozo.

Izoencimi so encimi iste vrste, ki katalizirajo isto reakcijo, vendar so na različnih genih zapisani in se lahko med seboj razlikujejo.

Katalitična konstanta - k(kat)

To je **k** najpočasnejše stopnje reakcije. Gre za št. molekul substrata, ki se pretvori v produkt na eni

molekuli encima v enoti časa. Meri se v razmerah, ko je encim s substratom nasičen. Pove nam torej, kako hitro pretvarja encim substrat v produkt, zato ga imenujemo **pretvorbena število (turnover number)**.

Pri katalazi je $k(\text{kat})$ zelo velik - 40 milijonov molekul se pretvori na sekundo, kar je izjemno ogromna številka.

Najboljši način za izražanje encimske aktivnosti je $k(\text{cat})/K_m$. K_m nam bo povedal, pri katerih koncentracijah bo encim sposoben katalizirati reakcijo, $k(\text{cat})$ pa nam bo povedal, kako hitro bo to naredil. Želimo, da encim katalizira že pri zelo majhnih koncentracijah (torej, da je K_m čim manjši), in da bi hkrati pretvarjal čim hitreje ($k(\text{cat})$ čim večji). To je torej pravi parameter da določimo, kateri encim je zelo dober.

Katalaza ima zelo velik $k(\text{cat})$, K_m pa je tudi zelo velik - hitro torej pretvarja, ampak šele takrat, ko se nabere že ogromno substrata. Na drugi strani pa **fumaraza** pretvarja počasi ($k(\text{cat})$ je majhen), vendar učinkovito deluje že pri majhnih koncentracijah substrata (K_m je majhen).

Predavanje 33; 16. 5. 2011 / Damjana Rozman

Michaelisova konstanta nam lahko pove afiniteto encima do substrata. Vendar nam to pove samo v primeru, da je encimski mehanizem zelo preprost ($E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$) in da veljajo določene predpostavke. Prva predpostavka je, da $k(-2)$ zanemarimo, ker je zelo zelo majhna. Druga predpostavka pa je; primerjamo med sabo pretvorbo kompleksa ES v produkte in razgradnjo ES v encim in substrat. Ker je tudi $k(2)$ zelo majhna to pomeni, da tudi produkti ne bodo nastajali zelo hitro - $k(2)$ je manjša od $k(1)$, zato je ta stopnja hitrost-odločujoča stopnja reakcije (hitrost reakcije vedno določi najpočasnejši faktor). V tem primeru lahko Michaelisovo konstanto 'pretvorimo' v stopnjo disociacije - v teh primerih K_m odraža afiniteto do substrata (večji K_m , manjša afiniteta encima do substrata).

Michaelisova kinetika velja za encime, ki imajo bodisi **en** aktivni center, bodisi **več neodvisno delujočih** aktivnih centrov!

Splošni pomen K_m

V resničnem življenju pa reakcije niso preproste! K_m bo torej odvisna od reakcijskega mehanizma (št. stopenj reakcije, hitrost ene stopnje na pram drugim,...). V realnih primerih K_m ne pove direktno afinitete encima do substrata - sploh takrat, kadar je stopenj reakcij več kot dve.

Splošni pomen V_{max}

Maksimalna hitrost je bila po Michaelis Mentenovi kinetiki definirana tako, da je dosežena takrat, kadar so vsa aktivna mesta na encimu zasedena s substratom (katerega koncentracija je bistveno večja kot koncentracija encima). Če imamo več stopenjsko reakcijo potem hitrost reakcije določa najpočasnejša stopnja.

Splošni pomen katalitične konstante

Prednost katalitične konstante je ta, da ni odvisna od mehanizma. Določa se jo pri saturacijskih pogojih (ko so vse molekule encima zasedene). Katalitična konstanta se lahko popiše tudi kot hitrostna konstanta najpočasnejše stopnje.

Če naredimo kvocient med K_m (ki približno opisuje afiniteto encima do substrata) in k_{cat} (ki opisuje koliko molekul substrata se obrne na encimu v časovni enoti) dobimo nek kvocient, ki je najboljše merilo za katalitično učinkovitost encimov - konstanto specifičnosti.

k_{cat}/K_m je **konstanta specifičnosti**. Zgornja omejitev za ta kvocient je hitrost difuzije; če imamo encim in substrat, ki se prosto gibljeta, je maksimalna hitrost, s katero se lahko srečata, 10^8 do 10^9 $M^{-1} s^{-1}$. Najboljši encimi imajo kvocient blizu vrednosti 10^8 oz. 10^9 .

MEHANIZMI ENCIMSKO KATALIZIRANIH BISUBSTRATNIH REAKCIJ

Primer je $ATP + \text{glukoza} \leftrightarrow ADP + \text{glukoza-6-fosfat}$. Če sta prisotna dva substrata je možnih več osnovnih reakcijskih mehanizmov.

1. Mehanizem, ki vključuje ternarni kompleks

To je kompleks, kjer sta obe molekuli substrata vezani na encim. Možen je naključen vrsti red (popolnoma vseeno je, ali se najprej veže substrat ena ali substrat dve), ali pa gre za urejen vrsti red (nujno, da se najprej veže substrat ena, šele potem se lahko veže substrat dva). Vendar pa je končni primer enak - dobimo regenerirani encim in dva produkta

2. Mehanizem, ki ne vključuje ternarnega kompleksa (ping-pong mehanizem)

Najprej imamo vezan en substrat, dobimo neko vmesno stanje. Produkt se more odcepiti, encim (ki je v aktiviranem stanju), pa veže substrat dve. Dobimo regeneriran encim in produkt substrata dve, produkt substrata ena pa se je odcepil že prej.

Nekatere reakcije potekajo delno po prvem in delno po drugem mehanizmu. To, po katerem mehanizmu je potekala reakcija, lahko eksperimentalno določamo z merjenjem začetne hitrosti. Če gre reakcija preko ternarnega kompleksa, ne glede na to, če gre za naključen ali usmerjen mehanizem, dobimo drugačen Lineweaver-Burkov diagram, kot kadar gre za ping pong mehanizem (takrat dobimo vzporedne črte).

Transaminacija poteka prek encima transaminaze.

Imamo alfa-ketoglutarat (glej slajd), kateremu je zelo podobna aminokislina glutamat (ima namesto keto skupine amino skupino - to je tipičen par; keto kislina, aminokislina). Ta par (alfa-ketoglutarat in glutamat) je obligatoren pri vseh transaminacijah.

Če se more aminokislina v metabolizmu pretvoriti v keto skupino se to zgodi s transaminacijo.

Sprememba aminokislina v ketoskupino poteče hkrati s pretvorbo alfa-ketoglutarata v glutamat. Gre za prenašanje skupin - primer je transaminacija s koencimom piridoksal-fosfat. Vstopi neka aminokislina, ki prenese na koencim amino skupino, potem disociira od encima; vstopi keto skupina in prevzame amino skupino. Skupaj torej vstopi ena keto kislina in ena aminokislina, izstopi pa ena aminokislina in ena keto skupina.

ENCIMSKA INHIBICIJA

Mnoge bolezni ciljamo na ta način, da želimo reverzibilne / ireverzibilne inhibitorje načrtovati tako, da bi ciljno spremenili aktivnost encima, ki povzroča nek bolezenski defekt.

REVERZIBILNA INHIBICIJA

S substratom je možno reverzibilni inhibitor spodriniti.

Vrste reverzibilnih inhibicij:

1. kompetitivna
2. akompetitivna
3. mešana (posebna oblika: nekompetitivna)

1. Kompetitivna inhibicija

Na isto mesto, kamor se veže substrat, se lahko veže tudi inhibitor, a nikoli sočasno. Če bomo večali koncentracijo enega, bomo drugega spodrivali, in obratno.

Če imamo kompetitivni inhibitor moramo pogledati, na katerega od parametrov v Michaelis Mentenovi enačbi, bo vplival. Če imamo zelo veliko substrata in malo inhibitorja, bo lahko substrat izpodrinil inhibitor iz vseh reaktivnih mest na encimu - maksimalna hitrost torej ne bo prizadeta. Drugače pa je pri Michaelisovi konstanti (K_m), ki lahko, v približku, predstavlja afiniteto encima do substrata. Ne glede na to, koliko substrata imamo, bodo nekatere molekule inhibitorja še vedno poskušale priti do aktivnega mesta, kar se bo poznalo na K_m . Ta se bo zaradi prisotnosti inhibitorja spremenila in nikoli ne bo mogla doseči vrednosti, ki bi jo imela, če inhibitorja ne bi bilo. Matematično to popišemo tako, da pred faktor, ki se pri inhibiciji spremeni, dodamo **alfa**. Ta je pri vseh vrstah inhibicije definiran enako: $1 + [I]/K_i$.

Na saturacijskem diagramu se krivulja ob dodatku inhibitorja pomakne v desno; vseeno pa je na koncu, ob zelo veliki koncentraciji substrata, maksimalna hitrost enaka. Ker pa inhibitor stalno nervira substrat, da ta težje pride do molekul encima, je hitrost na začetku ob prisotnosti kompetitivnega inhibitorja nekoliko manjša.

To se da prikazati tudi z obrnjenim Lineweaver-Burkovim diagramom.

2. Akompetitivna inhibicija

Na kompleks encim-substrat se veže še inhibitor, ampak ne na isto mesto, kot substrat. Dobimo kompleks ESI (encim-substrat-inhibitor). Inhibitor se lahko veže samo takrat, kadar je substrat že vezan. Bistvo inhibitorjev je, da zmanjšajo katalitično sposobnost encima. Ko se veže molekula inhibitorja na encim, bo hitrost reakcije nižja - ker pa se veže inhibitor na drugo mesto encima kot substrat, ga substrat ne more izriniti, zato pri akompetitivni inhibiciji nikoli ne bo dosežena maksimalna hitrost.

Ker pa ima inhibitor svoje vezavno mesto, se bo lahko substrat z enako afiniteto vezal na encim ob prisotnosti inhibitorja kot bi se, če inhibitorja ne bi bilo - K_m torej ostane enak. Vseeno pa vezava inhibitorja nekoliko vpliva na K_m , ker se zaradi šibkih interakcij protein (encim) nekoliko spremeni ob vezavi inhibitorja, tudi če je vezan na drug del encima - vendar pa je ta sprememba zanemarljiva, ključna je sprememba maksimalne hitrosti.

Če si v tem primeru pogledamo dvojni recipročni diagram vidimo vzporedne črte. S povečevanjem koncentracije inhibitorjev zmanjšujemo maksimalno hitrost, na nek način pa tudi afiniteto. Ta diagram je podoben diagramu ping-pong reakcij.

Akompetitivno inhibicijo lahko predstavljamo kot bisubstratno reakcijo - inhibitor je torej substrat 2.

3. Mešana inhibicija

Inhibitor se lahko veže bodisi na encim, bodisi na encim-substrat. Mešano inhibicijo se ponazori tako, da dobita tako maksimalna hitrost kot tudi Michaelisova enačba svoj alfa faktor, ker se oba (lahko) spremenita. Lineweaver Burkov diagram pa je podoben diagramu ternarnega kompleksa.

Poseben primer mešane inhibicije je, ko sta disociacijske konstante K_i in K_i' enaki. Takrat govorimo o **nekompetitivni inhibiciji**; edina razlika je torej, da sta K_i in K_i' enaki. Situacija se s tem poenostavi. Ker se bo inhibitor vezal bo maksimalna hitrost seveda manjša, K_m pa se ne bo spremenil.

IREVERZIBILNA INHIBICIJA

Encim bomo trajno uničili, ker bomo na aktivno mesto encima s kovalentno vezjo povezali neko molekulo. Primer je inhibicija acetilholin-esteraze (pomembna molekula za prevajanje signala na živčno-mišičnih stikih) z diizopropilfluorofosfatom (DIFP), ki je bil včasih uporabljen kot bojni strup. Ireverzibilni inhibitorji so tudi mnogi pesticidi.

Obstajajo še t. i. **samomorilski inhibitorji**. Pri njih je tako da, dokler se ne vežejo na aktivni center encima, niso reaktivni. Molekula torej ne inhibira takoj encima - veže se na njega, ga spremeni tako, da namesto substrata nastane neka reaktivna snov, ki ireverzibilno inhibira encim.

Imajo velik pomen v farmacevtski industriji, kjer želijo proizvesti molekule, ki same po sebi niso toksične, in začnejo delovati šele ko pridejo do nekega encima, ki ga želimo inhibirati.

Primer samomorilskega inhibitorja: pri terapiji raka. Gre za spojino 5-fluorouracil, ki je ireverzibilni inhibitor dihidrofolat reduktaze. Ko se na 5-fluorouracil na eno stran veže encim, na drugo stran pa koencim (dihidrofolat reduktaza), potem ta koencim ne more delovati. S tem preprečimo sintezo DNA hitro delečih rakavih celic.

Inhibitorji so lahko strupi!

Pri katerikoli vrsti reverzibilne inhibicije je dobro vedeti, kaj je človek zaužil (pogledati, kateri encim bo prizadet), da lahko zdravimo z vnosom ustreznega substrata. Pri ireverzibilnih pa je vse odvisno od časa. Dostikrat poti nazaj ni, včasih pa lahko poiščemo kakšen inhibitor, ki ima še večjo afiniteto do vezave kot prejšnji.

Poleg inhibitorjev na encimsko aktivnost vplivajo tudi zunanje razmere. Primer je ionska moč, ki lahko spremeni encimsko aktivnost.

Predavanje 34; 17. 5. 2011 / Damjana Rozman

Na encimsko aktivnost lahko vpliva tudi pH. Encimi imajo svoj 'optimalen pH delovanja', ki so od encima do encima zelo različni. Tisti proteini, ki imajo kisle ali bazične aminokislinske ostanke, imajo zvonasto krivuljo - najbolj so aktivni ob nevtralnem pH, kjer niso protonirani ali deprotonirani (primer je kimotripsin). Drugi primer je pepsin (glavni hidrolitičen encim v želodcu) - ker deluje v želodcu, kjer je veliko HCl, mora biti pepsin prilagojen delovanju v kislem pH. Tretji primer je holinesteraza, katere aktivnost se na določeni stopnji ne glede na povečevanje pH ne spreminja več. Posebni primer pa je papain, ki mu je med pH 4 in pH 8 popolnoma vseeno, kje je - njegova encimska aktivnost bo enaka. Večina encimov ima zvonasto krivuljo.

Zakaj ima peptidaza pH optimum med 7 in 8?

Ima kisle in bazične ostanke, ki se ob spreminjanju pH lahko protonirajo in deprotonirajo, kar povzroči neaktivnost encima.

Kvocient med katalitično konstanto in Michaelisovo konstanto najbolje popisuje katalitično učinkovitost encima. Matematično se zvonasto krivuljo (odvisnost hitrosti od pH) da razdeliti na dva dela - če izpostavimo katalitično konstanto vidimo, da do pH 8 pH vpliva na tisti del enačbe, ki jo predstavlja $k(\text{cat})$. Na drugem delu krivulje pa pH vpliva na afiniteto vezave substrata na encim (K_m). Če združimo krivulji $k(\text{cat})$ in K_m potem dobimo zvonasto krivuljo (glej slajd).

Razlike med vplivom pH in vplivom temperature na encimsko aktivnost

Pri pH dobimo zvonasto krivuljo, ki je večinoma simetrična (aminokislinski ostanki se nabijajo, ali pa se jim naboj odvzema). Če pa popisujemo vpliv temperature na aktivnost pa vedno dobimo diagram, pri katerem krivulja najprej položno narašča, potem pa hitro pade. Na začetku temperatura povečuje hitrost reakcij, saj povečuje hitrost gibanja posameznih molekul substratov - povečujejo število trkov in število uspešnih trkov. To velja tudi za encimske reakcije, vendar pa je ena omejitev; ker so encimi proteini obstaja neka meja, kjer temperatura začne denaturirati encimske proteine. Prvi del krivulje si torej lahko predstavljamo kot neko tekmo med pospeševanjem reakcije kot posledico dviga temperature in pa postopne denaturacije encima. Na vrhu krivulje je sicer hitrost reakcije največja, vendar je protein že na robu propada (mnogo molekul encima je že denaturiranih, ostale pa so v taki konformaciji, da lahko kadarkoli denaturirajo).

Encimi, ki so v človeškem telesu, delujejo optimalno pri 50 - 55 stopinjah celzija; vendar če bi bilo v človeškem telesu tako vroče bi bili encimi na robu denaturacije. Zato je pri 37 stopinjah bolj varno.

URAVNAVANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI (biokemijskih reakcij)

Niso vsi encimi regulatorni - potrebujemo neko kontrolo, da vse poteka v pravem času. Da je, na primer, ko se en encim sintetizira, na voljo že dovolj substrata, da encim ni odveč.

REGULATORNI ENCIMI

V vsakem momentu morajo odgovoriti na potrebe celice - encimska aktivnost se mora povečati ali zmanjšati, to se najbolj preprosto zgodi tako, da se količina encima poveča ali zmanjša. Vendar pa je to zelo počasen način (da se encimi sintetizirajo traja lahko tudi več ur).

Dosti hitrejši so ostali načini:

- v prebavnem sistemu in sistemu strjevanja krvi je pogosto, da so encimi prisotni kot proencimi ali preproencimi (encimska molekula je tam, vendar ni aktivna - potem se proteolitično razcepi in se aktivira)
- alosterična modulacija encimske aktivnosti
- kovalentna modifikacija encima je zelo pogosta (posebej pogosta v signaliziranju). Primer so fosforilacije, ki jih izvajajo kinaze

1. uravnavanje koncentracije encimov

Ta metoda je zelo počasna. Če pride signal, da je potrebno več encima, potem so potrebni vsi postopki, od transkripcije do migracije encima na pravo mesto - to je zelo zamudno. To uravnavanje poteka na nivoju celega organizma - npr. potrebujemo encim v mišici, signal pa pride od nekje druge (potrebujemo signalizacijo po celem telesu, da signal pride do tarčnega tkiva).

Konstitutivni so tisti encimi, ki se tvorijo ne glede na zunanje okoliščine (vedno so prisotni v določeni količini, njihova koncentracija pa ni odvisna od signalov). Sem spadajo 'vzdrževalni' ali 'housekeeping' encimi.

Inducibilni so odvisni od signalov - teh je večina.

2. aktivacija s proteolitičnim razcepom

Primer sta tripsin in kimotripsin. **Tripsinogen** (če je končnica **-inogen** nam pove, da gre za prekurzor encima) se lahko aktivira, ko se sprosti **enteropeptidaza** - to povzroči, da sprosti tripsinogen nekaj aminokislinskih ostankov, dobimo encimsko aktiven **tripsin**. Ta stopi naprej v kaskado in katalizira pretvorbo **kimotripsinogena** v **kimotripsin-pi**, ta avtokatalitično pretvori sebe v aktivno obliko **kimotripsin-alfa**.

Zakaj je ta kaskada potrebna? Ker so te encimi **proteolitični** in bi, če bi se sintetizirali aktivni, tam kjer bi nastali razgradili proteinske molekule. Za dodatno varnost je v pankreasu (kjer se sintetizira tripsinogen) še **tripsinski inhibitor**, ki onemogoči proteolitično delovanje tripsina, če bi se slučajno aktiviral že v pankreasu.

Če pa pride do napak (tripsinski inhibitor ni aktiven ali pa se sintetizira preveč tripsina, da bi ga inhibiral) lahko pride do akutnega pankreatitisa. Ni dovolj izločanja hormonov iz pankreasa v tanko črevo - hormoni se aktivirajo že v pankreasu. Lahko je tudi smrtno.

Da ne pride do prehitre aktivacije proteolitičnih encimov obstaja cel kup kontrolnih točk. Ena izmed njih je tudi, da mora biti uravnavano njihovo izločanje (poleg njihove aktivacije). Ko se tripsin aktivira, poleg kimotripsina aktivira še elastazo (iz proelastaze) in lipazo (iz prolipaze).

Zymogenske granule - vezikli; skladišče proteolitičnih encimov ki, dokler so v granulah, niso aktivni.

Primer aktivacije s proteolitičnim razcepom je tudi pri proteinih, ki sodelujejo pri strjevanju krvi. Zadnji del kaskade strjevanja krvi je pretvorba protrombina v trombin in fibrinogena v fibrin.

Če v katerikoli od stopenj v procesu strjevanja krvi pride do napake lahko pride do različnih bolezni, ki so povezane z napakami v strjevanju krvi. Najbolj znana je hemofilija, to je napaka v faktorju 9A. Je spolno vezana bolezen (vezana na X kromosom).

3. alosterična modulacija encimske aktivnosti

Rečemo ji 'fine tuning' regulacija, ker je zelo fina in zelo natančna (mora se odzivati na majhne stimuluse).

Alosterični encimi so lahko samo tisti, ki imajo več podenot (če ima eno samo podenoto je 'Michaelis Mentenov encim', če ima več podenot pa je lahko alosteričen protein). Imajo več vezavnih mest za svoje homotrofične in heterotrofične modulatorje. Njihove podenote morajo biti sposobne zavzemati različne konformacije (bolj ali manj aktivne - modulator je lahko pozitiven ali negativen, torej inhibitor ali aktivator). Kinetika alosteričnih encimov je sigmoidna (medtem ko je kinetika Michaelis Mentenovih encimov saturacijska). Sigmoidna krivulja je posledica dejstva, da vezava modulatorja ne spreminja aktivnosti encima linearno, ampak preko mnogih malih sprememb.

Alosterični proteini morajo imeti minimalno dve podenoti - od tega eno imenujemo katalitska podenota, na drugo pa se veže modulator (regulatorna podenota).

Primer alosteričnega encima je **aspartat transkarbamoilaza**. Sodeluje v zgodnjih stopnjah sinteze pirimidinskih nukleotidov. Je zelo kompleksen encim, zgrajen iz 12 polipeptidih enot in sicer iz regulatornih in katalitičnih.

Ta encim je lahko v dveh mejnih oblikah in sicer v T stanju in R stanju. T oblika je manj aktivna in bo slabše vezala substrat, R oblika pa je bolj aktivna in raje veže substrat. Substrat tega encima je aspartat, alosterični modulatorji tega encima pa so CTP (citidin-tri-fosfat) in pa ATP, ki s CTPjem sodeluje.

Encim združi karbamoil fosfat in aspartat - dobimo N-karbamoilaspartat. Ta sintetizira pirimidine, med

drugim citozin, ki se lahko spremeni v CTP, ki je alosterični negativni modulator (inhibitor), ki negativno vpliva na hitrost reakcije, medtem ko je ATP pozitiven alosterični modulator.

V celici moramo imeti približno enako purinov in pirimidinov. Če je purinov veliko je želja, da se tudi komplementarni pirimidini sintetizirajo - zato je ATP pozitiven alosterični modulator v sintezi pirimidinov; medtem ko če je pirimidinov preveč bo CTP zaviral lastno sintezo. Gre torej za inhibicijo s povratno zanko.

Imamo dve vrsti heterotropičnih alosteričnih modulatorjev. Nekateri lahko vplivajo na konstanto, ki nam vsaj na nek način definira afiniteto substrata na vezavno mesto ($K_{0,5}$ oz. K_m), zato je K_m različna, medtem ko je maksimalna hitrost enaka. Drugi pa vplivajo na maksimalno hitrost encima, K_m pa ostane enaka.

4. kovalentna modifikacija enima

Je zelo hiter način spremembe encimske aktivnosti (kot stikalo on-off). Pri alosterični modulaciji se je encimska aktivnost nekoliko zmanjšala ali povečala, medtem ko pri kovalentni modifikaciji encim deluje ali ne (on-off). Mnogo alosteričnih encimov je reguliranih tudi s kovalentno modifikacijo (še le ko so aktivirani s kovalentno modifikacijo lahko pridejo do njih različni alosterični modulatorji in njihovo delovanje fino uravnavajo).

Imamo nek alosterični encim, zgrajen iz dveh podenot, ki ima na svoji površini dva serinska ostanka (serin, treonin in tirozin so tri aminokisliline, ki imajo OH skupine v radikalni - te se zelo rade fosforilirajo!). Fosforilacija teh dveh serinov popolnoma spremeni konformacijo obeh polipeptidnih verig.

Poleg fosforilacij obstajajo še cel kup drugih kovalentnih modifikacij:

- **fosforilacija**; ob hidrolizi ATP nastane ADP in pa encim, ki je lahko fosforiliran bolj ali manj aktiven
- **adenilacija**; adeninmonofosfat (AMP) se veže na encim, ponavadi na tirozin
- **uridilacija**; vezava uridilmonofosfata (UMP) na encim, ponavadi na tirozin
- **ADP-ribozilacija**; na encim se veže riboza, fosfat, fosfat, riboza in adenin (kar kompleksen nukleotid - ADP in še ena riboza). Aminokisliline, ki se ADP-ribozilirajo so arginin, glutamin, cistein.
- **metilacija**

Ena izmed kovalentnih modifikacij encima je tudi ubikvitacija in pa acetilacija. Nekateri maščobne kisline (lipidi) lahko tudi kovalentno modificirajo encime.

En način kovalentne modifikacije smo posredno že spoznali, ko smo govorili o G-proteinih. Ko se nanj veže GTP se alfa podenota proteina odcepi in katalitično deluje na adenilatno ciklazo, ta pretvori ATP v cAMP. cAMP je sporočevalna molekula, ki aktivira protein kinaze - tu se začnejo kovalentne modifikacije, saj so kinaze proteini, ki lahko fosforilirajo naprej; med drugim fosforilirajo tudi druge kinaze, ki lahko potem fosforilirajo naprej.

cAMP je torej sekundarni sporočevalec, ki prenaša sporočilo, da se morajo kinaze aktivirati. V obratni smeri kot kinaze pa delujejo fosfodiesteraze, ki defosforilirajo - tudi za to je potreben nek signal. Fosfodiesteraze inhibira kofein.

Primer: razgradnja glikogena z glikogensko fosforilazo

Glikogenska fosforilaza tvori glukozo iz glikogena, kadar je to potrebno; skrajša namreč glikogen za eno enoto. Glikogenska fosforilaza je v dveh oblikah, od katerih je ena bolj in druga manj aktivna. Aktivira jo ATP. Ko se kinaze aktivirajo se fosforilirajo proteini, kar v končni fazi povzroči, da se glikogen

razgrajuje in se poveča raven glukoze v krvi. Ko ni več potrebe po sintezi glukoze se odcepijo fosfatne skupine iz aktiviranih encimov, tako jih pretvorijo v neaktivno obliko.

Vse proteinske kinaze imajo serine in treonine, ali pa tirozine. V odvisnosti od tega potem delimo proteinske kinaze na serin-treoninske kinaze in pa na tirozinske kinaze.

Mnogi encimi uporabljajo več regulatornih mehanizmov, ne le enega.

5. sinteza specifičnih encimskih inhibitorjev

Omenili smo že tripsinski inhibitor v pankreasu. Uravnavanje encimske aktivnosti s sintezo specifičnih inhibitorjev je zelo značilno za vse proteinaze, saj želi sistem preprečiti avtoprotolizo. Ta inhibicija je uravnavana na genski ravni s sintezo inhibitorjev v celici - več, ko je aktivnega tripsina v celici, več je tudi tripsinskih inhibitorjev - sproži se celoten proces, ki se začne s prepisom genov za sintezo tripsinskih inhibitorjev.

Predavanje 35; 20. 5. 2011 / Damjana Rozman

METODE ZA ŠTUDIJE MAKROMOLEKUL

Genom popisuje zbirko celotnega dednega materiala v organizmu. Končnica -om nam pove, da želijo na ravni celega organizma razumeti neko entiteto (npr. transkriptom - transkripcija na ravni celotnega organizma).

PROTEOMIKA

Velikost genoma lahko zelo natančno ocenimo, velikost proteoma pa je še nedoločena, ker vsak gen lahko kodira več proteinov. Poleg tega pa se vsak protein lahko še na mnogo načinov potranslacijsko spremeni (fosforilacije, metilacije,...).

Če želimo protein karakterizirati moramo najprej določiti njegovo strukturo (rentgenska kristalografija, metoda MNR) in ugotoviti, kako se protein izraža (ekspresija proteina v zdravem in v bolnem tkivu). Potem začnemo študirati interakcije med proteini; tako ugotovimo, kateri proteini imajo regulatorno vlogo.

Za ločevanje in določevanje strukture proteinov so včasih uporabljali **kolonske kromatografije**, ki so temeljile na prostemu padu. Kolonske kromatografije se danes še vedno uporabljajo, vendar pa je vse avtomatizirano. Poleg kolonskih kromatografij (uporabljanje sile prostega pada ali sile črpalke) poznamo še separacijo s pomočjo električnega toka - **gelska elektroforeza**:

- enodimenzionalna; lahko je nativna ali SDS. Pri nativni se proteini ločujejo glede na maso in

naboj, če pa imamo SDS (natrijev dodecil sulfat), potem se ta molekula enakomerno veže na proteine glede na njihovo maso in izniči naboj, ne vpliva pa na razmerje mas proteinov. Pri SDS elektroforezi torej potujejo proteini izključno glede na svojo molekulsko maso.

- dvodimenzionalna; imamo dve stopnji ločevanja. Prva je izoelektrično fokusiranje, pri katerem vzorci potujejo v odvisnosti od svoje izoelektrične točke - vsak protein se ustavi na tisti točki na traku, kjer je njegov neto naboj enak nič. Druga stopnja pa je SDS PAGE (SDS poliakril amidna gelska elektroforeza). Za analizo slik potrebujemo zelo dobre visoko ločljive skenerje.

Kako nek protein sploh izoliramo? Včasih so bili proteini izolirani izključno iz tkiv in naravnih materialov, danes pa jih veliko dobimo s pomočjo rekombinantne tehnologije. Če imamo proteine v nekem tkivu (celici), moramo najprej obariti proteine. Če celici dodamo amonijev sulfat, potem dobimo proteine v oborini. Sledi kup postopkov za izolacijo proteinov.

Če pa imamo rekombinantne proteine, potem tisto mRNA, ki nam kodira določen protein, ustavimo v nek plazmidni vektor. Tam pridobimo protein v velikih količinah (over-expression).

STOPNJE ČIŠČENJA IZ KOMPLEKSNE MEŠANICE PROTEINOV

Imamo nek celični ekstrakt z zelo velikim volumnom. Vsaka stopnja čiščenja nam to zelo krči. Na začetku imamo noter vse proteine, mi pa želimo izločiti tarčne proteine. Tako se volumen, količina proteinov in aktivnost zmanjšujejo s čiščenjem - mora pa se povečevati **specifična aktivnost**, to je aktivnost tistega proteina (encima), ki ga mi študiramo. Če se ta parameter ne bi povečeval, potem naša metoda ločevanja ni korektna.

Metode ločevanje:

1. Gelska filtracija - ločevanje proteinov na nekih molekularnih sitih. V sitih se bodo ujele majhne molekule in potovale počasneje, velike pa se v sita ne zapletejo (so prevelike) in potujejo hitreje. Gelska filtracija je metoda izbire, če želimo zelo na hitro določiti molekulsko maso nekega proteina.

2. Ionska izmenjevalna kromatografija - gre za ločevanje proteinov glede na njihove elektrostatske lastnosti. Če imamo nosilec, ki ima pozitivne naboje, mu rečemo anionski izmenjevalec, ker bomo pri takem nosilcu ločevali anione glede na količino njihovega naboja (se bodo vezali), medtem ko bodo kationi potovali samo skozi (saj se odbijajo od izmenjevalca). Obratno je pri kationskih izmenjevalcih. Nanesemo raztopino na ionski izmenjevalec, potem pa speremo z določenim pufrom. Najprej uporabimo raztopino nizke ionske moči, s katero bomo sprali najbolj šibko vezane ione. Potem pa povečujemo ionsko moč.

3. Afinitetna kromatografija - uporabimo jo lahko za čiščenje tistih proteinov, kjer imamo na razpolago nek ligand, ki s proteinom stopa v zelo močne interakcije. Potrebujemo nosilec, na katerega je vezan ligand - rečemo mu afinitant. Če imamo kompleksno proteinsko mešanico se bo na ligand vezal le specifičen protein (gre za inducirano prileganje, kot pri encimih!). Z afinitant očistimo specifičen protein od vsega ostalega, potem pa ga lahko študiramo naprej.

Primer je čiščenje proteinov z imunoafinitetno kromatografijo - kompleksno mešanico antigenov nanesemo v kolono, ki ima specifična vezavna mesta. Specifični antigeni se bodo vezali, ostali pa sprali skozi.

Evkariontska mRNA ima uporabno lastnost - ima poli-A rep (na koncu ima nekaj adeninov, rečemo, da je poliadenilirana). Če izoliramo neko kompleksno mešanico RNA, potem lahko s pomočjo oligo dT

matriksa v eni stopnji mRNA očistimo od vsega ostalega v mešanici. Kromatografski postopki so vsi avtomatizirani.

Danes obstajajo aparature, ki združujejo kromatografijo z masno spektrometrijo (LC/MS - liquid chromatography, mass spectrometry). Bistvo masnega spektrometra je, da vse proteine, ki potujejo v polju, pozitivno nabijemo. Potem v polju proteini potujejo glede na maso in naboj - se odklanjajo. Glede na to, da se odklanjajo, bodo prej ali kasneje prileteli na detektor na koncu. Tako da v prvi stopnji MS določamo maso peptidov, ki smo jih odcepili iz nekega globularnega proteina.

Z masno spektrometrijo lahko določimo vsebnost aminokislin nekega proteina, vendar pa ne moremo določiti zaporedja - to lahko dosežemo z **Edmanovo degradacijo**, pri kateri z N-terminalnega konca postopno odcepljamo aminokislino.

Proteomika popisuje sliko (skupek) proteinov, ki jih ima celica v določenem momentu.

Transkriptom popisuje sliko (skupek) RNA, ki jih ima celica v določenem momentu.

mRNA se z rezervno transkripcijo prepíše v **prvo verigo cDNA** - to transkripcijo opravi rezervna transkriptaza. Potem pa DNA polimeraza sintetizira še drugo verigo cDNA - temu rečemo **komplementarna DNA**. Z reakcijo PCR lahko mi na ta način pomnožimo katerikoli del genoma, ki se pomnožuje.

Poleg RNA molekul, ki smo jih že obravnavali, imamo v celicah še mikro RNA (mRNA), ki so pomembne za regulacijo izražanja genov.

Človeški genom je bil sekvenciran - kaj to pomeni? Čigav je ta genom bil in koliko je ta genom natančen? Vemo namreč, da so med nami razlike v nukleotidnih zaporedjih minimalno 1 procent. Razlike v eni sami bazi se označuje SNP (single nucleotide polymorphism).

TEHNOLOGIJA DNA ČIPOV

Ni metoda, ki bi nudila kvantitativno analizo DNA. Gre za semi-kvantitativno analizo; lahko določamo izražnost genov, gre pa za primerjalno merjenje.

Z DNA čipi lahko poleg transkriptoma študiramo tudi genom. Zato imamo na tržišču različne vrste čipov.

DNA Mikromreže lahko uporabljamo za osnovne raziskave (predvsem celostni pogled na izbrani biološki proces - zaobjamemo vse, kar je v genomu ali v transkriptomu), v farmacevtski industriji (ko farmacevtska industrija neko učinkovino preučuje imajo možnost pogledati, kakšen učinek ima ta učinkovina na ravni celega genoma - npr. če ciljajo jetrne celice lahko poleg tega pogledajo še, kakšen učinek je v ledvicah ali srcu). V kliniki pa so mikromreže zelo uporabne za genotipizacijo (odkivanje polimorfizmov, okvarjenih alelov,...)

Če na mikromreže dodamo normalno genomsko DNA in tumorsko genomsko DNA, ki sta različno obarvani, lahko ugotovimo, kateri geni so bolj izraženi v tumorskem in kateri bolj v zdravem tkivu, glede na barvo, ki jo dobimo na mikromrežah.

SEKVENCIANJE GENOMA

Klasično sekvenciranje je trajalo 10 let. Razrezani fragmenti DNA (po 100 kilobaz) so bili ustavljeni v bakterije in počasi sekvencirani.

Naslednja generacija sekvenciranja - gre za visoko zmogljivo paralelno čitanje genoma naenkrat. Celoten genom fragmentiramo, pomnožimo z PCR, potem pa se vsi te PCR fragmenti na kompleksnem matriksu paralelno sekvencirajo. Sedaj je možno v nekaj dneh sekvencirati genom enega posameznika.

23. 5. 2011

Naloga informatike ni le obdelovanje podatkov ampak tudi postavitev standardov, kako se te podatki shranjujejo.

Sistemska biologija - integrirane raziskave, ki poleg genoma, transkriptoma in proteoma preiskujemo še druge "-ome" in si skušamo z matematiko in informatiko pomagati pri celostnem razumevanju teh raziskav.

Glavni cilj bioinformatike naj bi bil razvijanje algoritmov - računska biologija naj bi bila pa bolj aplikativna (uporaba teh algoritmov).

Predavanje 36; 23. 5. 2011

PROTEINI, KI SO KORISTNI V MEDICINI

Kadar omenimo zdravila moramo omeniti še vedo **farmakologijo**. To je veda, ki se ukvarja z odkrivanjem, sestavo, kemijo, razpoznavanjem in fiziološkimi efekti zdravil.

Dve liniji pridobivanja zdravil:

1. imamo neko spojino, pri kateri predvidimo, da bi lahko bila uporabna kot zdravilo, vendar pa ne vemo, kaj točno cilja. Šele ko ugotovimo globalni efekt torej iščemo tarčo spojine.
2. imamo neko tarčo, za katero vemo, v kateri proces je udeležena, vemo tudi, da bi lahko zdravili, če bi to tarčo zadeli - iščemo torej neko spojino, ki ima najboljši efekt na željeno tarčo.

Molekularna tarča

Pri proteinu moramo vedeti zaporedje aminokislin (primarno strukturo), moramo pa vedeti tudi dosti o višji strukturi, kar je pogosto problem - mnogi proteini (encimi) namreč nimajo še določene 3D strukture. Dostikrat pravimo, da je dobra molekularna tarča tista, katere 3D strukturo poznamo. Lahko si pomagamo z modeliranjem proteinskih struktur, pri čemer na podlagi znane 3D strukture nekega proteina sklepamo o strukturi podobnih proteinov.

Ko imamo znano proteinsko tarčo iščemo molekulo, ki bi najbolj spremenila lastnosti te tarče (če je encim lahko, na primer, zmanjša njegovo aktivnost). Zbere se ligande in se naredi vrsta postopkov - reakcij med spojinami in našo tarčo. Dobimo analizo teh reakcij, **SAR** (structure activity relationship). To je povezava med strukturo in aktivnostjo. Vidimo namreč, da nekatere spojine dobro inhibirajo encim,

slabo inhibirajo encim, ga ne inhibirajo... potem pa izberemo izmed mnogih spojin tiste, ki so encim dobro inhibirali in jih analiziramo. Poiščemo skupne lastnosti teh spojin in ugotovimo, da imajo npr. vse ketonsko skupino - sklepamo, da je pri inhibiciji tega proteina ketonska skupina ključnega pomena.

Danes po številu zdravil, ki ciljajo posamezno proteinsko družino, še vedno vodijo z G-proteini povezani receptorji (so najbolj pogoste tarče). Sledijo raznorazne kinaze (serinske, tirozinske). Velikokrat so tarča tudi jedrni hormonski receptorji, raznorazne proteinaze in peptidaze in pa fosfodiEsteraze.

Pomen proteinov v diagnostiki (markerji)

Eno je, da so proteini tarče za zdravila, poleg tega pa sestavljajo tudi različne **markerje**. Če je nek protein (encim) povečan preko določene meje je to znak, da je prišlo do nekih obolenj.

"Druggable genome" - gre za zbirko človeških priroteinov, ki vežejo spojine vodnice (pri organskih molekulah lahko najdemo neko spojino, ki specifično zadane nek protein. Na podlagi te spojine lahko kasneje naredimo mnogo variacij in modifikacij - originalni spojini pa rečemo spojina vodnica). Največ tarč je danes encimov, sledijo z G proteini povezani receptorji.

Od vseh tarč le 1 procent predstavlja DNA. Vse ostalo so proteinske tarče. Zdravila, katerih tarča je DNA, so najbolj uporabna v onkologiji. Naredijo t. i. adukte z DNA - s šibkimi ali kovalentnimi interakcijami se na DNA povežejo. Vrinejo se med obe verigi DNA in zasedejo vodikove vezi med komplementarnimi baznimi pari, kar pomeni, da transkripcija na tem mestu ne more potekati (primer je etidijev bromid). Ta zdravila, ki ciljajo DNA, so strupi, vendar moramo pomisliti, da se rakave celice zelo hitro podvojujejo. Naša želja torej je, da bi celice, ki imajo sposobnost nesmrtnosti, ustavili (ubili), medtem pa zdrave celice ne poškodovali.

Cisplatin - zdravilo, ki targetira DNA. Gre za preproste molekule, ki vsebujejo platino. Med platino in amonijevo skupino je koordinativna vez (platina je na svojo orbitalo spravila celoten elektronski par dušika in zato amonijeva skupina NH₃ ni nabita). Cisplatinu se povežejo z dušikom na mestu 7 od gvanina. Na ta način nam na teh mestih porušijo normalno strukturo DNA in zato se DNA ne more podvojevati (kar je v rakastih celicah nujno), če pa slučajno vseeno pride do podvojevanja, potem ne more priti do prepisovanja. Posledica je apoptoza.

Ta zdravila se dajejo sistemsko, zato imajo negativne stranske učinke. Pri bolnikih, ki so zdravljeni s platini, se zelo poslabša krvna slika. Hude posledice so tudi na prebavnem sistemu (ker se celice črevesne sluznice stalno obnavljajo se inhibira tudi tovrstna obnova). Zato bolniki, ki imajo platinsko obravnavo, zelo oslabijo in potrebujejo mnogo mesecev za regeneracijo po prenehanju jemanja zdravil.

NEKAJ PRIMEROV ZDRAVIL

1. zdravilo je kompetitivni inhibitor encima; večkrat smo že omenili statine, zdravila, za zmanjševanje nivoja holesterola. Encim, ki ga statini inhibirajo, je eden od prvih v večstopenjski sintezi holesterola. Statini so po svoji strukturi komplementarni substratu encima (HMGCR-ju). Molekula se veže na encim in ta encim zaradi tega ne more delovati, končni rezultat pa je, da holesterola ne moremo sintetizirati.

2. molekule, ki inhibirajo različne komponente v razvoju virusa HIV; tarče so encimi HIVa, ne človeški encimi. HIV je retrovirus (ima v genomu RNA, ki se prepíše v cDNA). Najbolj so uporabljeni **inhibitorji nukleotidnih reverzних transkriptaz** - reverzna transkriptaza je encim, ki iz RNA naredi prvo verigo cDNA. Te inhibitorji se vgradijo v verigo RNA, tako ustavijo reverzno transkripcijo in virus ne more

svoje dednine več tvoriti. Druga skupina zdravil pa so **inhibitorji virusnih proteinaz** - inhibirajo encime, ki so vključeni v nastanek proteinskega plašča virusa. Tretja skupina so **inhibitorji integras** - spojine, ki preprečujejo, da bi se virusna DNA vključila v genom okuženih celic.

V prihodnjih letih raziskave naj bi zdravila prilagodili individualnim genomom posameznikov. Vendar pa je problem trenutno v tem, da v večini državah Evrope analiz genomov posameznikov ne krijejo zavarovalnice.

ENCIMI KOT DIAGNOSTIČNI MARKERJI

V telesnih tekočinah pacientov lahko določamo nek protein, kar nam pomaga pri diagnozi. Primer so markerji pri infarktu. Imamo tri encime - kreatinska kinaza, aspartatna transaminaza in laktatna dehidrogenaza (reakcija laktat-piruvat). Poznamo njihove aktivnosti po infarktu, zato lahko na podlagi merjenja aktivnosti teh encimov skozi čas ugotovimo, ali je pacient doživel infarkt ali ne. Vendar to niso specifični markerji; predvsem aspartatna transaminaza se pri mnogih obolenjih poveča.

Aktivnost se lahko določa bodisi elektroforetsko, s spektrofotometričnimi metodami...

ENCIMI KOT ZDRAVILA

Primer je streptokinaza. To je encim, izoliran iz bakterije, ki sodeluje v procesu strjevanja krvi, vendar v obratni smeri - pomaga, da se krvni strdki razgrajujejo. Zato pacientu, ki je doživel infarkt kot posledico strdka, dodamo streptokinazo in s tem poskušamo raztopiti strdke in preprečiti, da bi prišlo do nadaljnih infarktov. Pri tem ga moramo zelo kontrolirati ker, če se kri ne more strjevati, lahko pride do smrtno nevarnih notranjih krvavitev.

Drugi primer: pri kroničnih vnetjih so pogosto povečane tudi aktivnosti proteolitičnih encimov - te poskušajo razgraditi tisto, kar povzroča vnetje (zraven pa razgradi še vse ostalo!). Z zdravilom alfa-1-antitripsinom zmanjšujemo aktivnost naših proteolitičnih encimov, tako zmanjšamo vnetje.

Zelo pogosta proteinska zdravila v zadnjem času so monoklonska protitelesa. Biološka zdravila so v precejšnji meri protitelesa.

Zdravljenje raka na dojki - Herceptin

Herceptin je protitelo, ki se veže na protein HER2. To je gen, ki kodira istoimenski protein, gre pa za receptor človeškega EGF (epidermalni rastni faktor). Če se HER2 prekomerno izraža lahko povzroči proces onkogeneze; prekomerno je izražen na 25 % rakov na prsih. Danes se točno ve, katerim pacientkam se lahko da herceptin, katerim pa ne - da se samo tistim, katerim se dokaže prekomerno izražanje gena HER2 (to ugotovimo z navadnim qPCR). Če dodamo herceptin potem na površini celic zablokiramo HER2 receptor in EGF ne more posredovati svoje informacije - ni torej pospešene proliferacije.

“Tragedija biokemije je, da je vse preprosto, dokler ne začneš študirati.” (Matjaž Zorko).