

BIOKEMIJA 2

Zapiski predavanj, 2011/2012

David Zupančič

PODVAJANJE DNA - REPLIKACIJA

Gradniki DNA so nukleozid-mono-fosfati, za proizvodnjo DNA pa potrebujemo nukleozid-trifosfate, ker potrebujemo energijo, ki jo dobimo z odcepom pirofosfata. Nukleozidmonofosfati so povezani med sabo s fosfodiestersko vezjo.

Kovalentno ogrodje tvorijo fosfodiesterske vezi, ki nastanejo z interakcijo med hidroksilno skupino sladkorja in fosfatno skupino. Ker se tvorita dve esterski vezi so to fosfodiesterske vezi. Verigi DNA sta vedno antiparalelni - na 3' koncu DNA je prosta OH skupina sladkorja, na 5' koncu pa je vezan fosfat.

Najbolj značilni karakteristiki podvajanja DNA sta **semikonzervativnost** (pri podvajanju kot matrica služita obe verigi DNA, obe se podvojita - vsaka nova dvojna vijačnica je sestavljena iz ene začetne in ene novo sintetizirane) in **semidiskontinuirnost** - ena veriga se sintetizira hitreje kot druga, saj se ena podvaja kontinuirno, druga pa diskontinuirno; to pa zato, ker sinteza DNA vedno poteka iz 5' proti 3' koncu, saj potrebujemo prosto OH skupino, ta pa je na 3' koncu.

Komponente podvajanja DNA

- matične DNA; obe verigi DNA
- začetni oligonukleotidi; sestavljeni iz ribonukleotidov in NE iz deoksiribonukleotidov. RNA polimeraza, ki sodeluje pri transkripciji, ne potrebuje začetnih oligonukleotidov, DNA polimeraza pa jih potrebuje. Začetni oligonukleotid predstavlja neke vrste substrat, na katerega DNA polimeraza dodaja (veže) nukleotide. DNA polimeraza ima sposobnost vezanja nukleozidmonofosfatov in pa tudi odcepljanja zadnjega nukleotida v primeru nekomplementarne vezave. In ravno ta 'proof-reading' aktivnost je na voljo samo takrat, kadar je interakcija med matrico in novo nastalo verigo zadosti trdna. Kadar rastoča veriga še ni zadosti stabilna takrat polimeraza nima eksonukleazne aktivnosti. To je torej razlog, da se najprej sintetizira začetni oligonukleotid, kar omogoči dovolj stabilne interakcije, da potem DNA polimeraza razvije eksonukleazno aktivnost.
- prekurzorji (nukleotid tri fosfati)
- encimi; primaza sintetizira začetni oligonukleotid, polimeraza DNA, helikaza ločuje verigi, topoizomeraze pomagajo reševati topološke probleme (nastajajo zato, ker se verigi s helikazo ločujejo), nukleaze, ligaza
- drugi proteini, ki nimajo encimskih aktivnosti, ampak brez njihovega sodelovanja replikacija ne poteka.

Tvorba fosfodiesterske vezi - po principu komplementarnosti se veže nukleozidtrifosfat. Hidroksilna skupina deluje kot nukleofil, da se odcepi pirofosfat - gre za reakcijo transesterifikacije. Zato reakcija ne more potekati v drugo smer kot od 5' proti 3'.

Proces replikacije je zelo natančen. To natančnost zagotavljata dve ravni. Ena je vezava nukleozid-tri-fosfata v aktivno mesto polimeraze DNA; pravilna vezava pa bo samo takrat, ko sta se med sabo povezali komplementarni bazi. Takrat bo nukleozid-tri-fosfat v pravilnem položaju v

aktivnem mestu polimeraze DNA.

Druga pa je 3'5'-eksonukleazna aktivnost polimeraze DNA - to pomeni, da odceplja iz 3 proti 5 koncu. Če pa ima polimeraza DNA 5'3'-eksonukleazno aktivnost pa pomeni, da bo odcepljala nukleotide s 5 konca proti 3.

Zaradi teh sposobnosti je podvajanje zelo natančno – DNA polimeraza lahko namreč z 3'5'-eksonukleazno aktivnostjo odstranjuje napačno dodane nukleotide.

Ligaza pri podvajanju DNA deluje takrat, ko se povezujejo Okazakijevi fragmenti v sledilni verigi. Ker ta encim tvori kovalentno vez je potrebna energija, ki jo ligazi zagotavlja ATP pri evkariontih, NAD⁺ pri prokariontih. Te molekuli omogočata, da na mestih, kjer je zgolj še zareza v eni verigi in kjer ne manjka noben nukleotid več (manjka le še esterska vez, pa bo ogrodje DNA povezano s fosfodiesterskimi vezmi), poveže ogrodje DNA.

Vloga helikaze in proteinov SSB - helikaza ločuje verige tako, da se veže na enojno verigo DNA tako, da se premika od 3' proti 5'. Za to premikanje helikaze je potrebna energija. SSB proteini (single-strand binding proteins) pa se vežejo na tiste dele DNA, kjer sta verigi ločeni. Držijo DNA verigo v linearni obliki in preprečujejo neželjene povezave znotraj verige.

Topoizomeraze - Zaradi delovanja helikaze prihaja do tega, da se verigi ločujeta, vendar pa naprej v verigi zaradi pritiska prihaja do superzvitja; posledično bi lahko prišlo do prekinitve verige in replikacija bi se ustavila. Topoizomeraza tipa 1 rešuje ta problem. Ostati mora vezan! Topomeraza tipa 2 (DNA giraza) pa prekine obe verigi. Tudi ta ostane vezana, da se lahko tvori normalen heliks, po tem pa poveže verigi.

LASTNOSTI POLIMERAZ DNA pri PROKARIONTIH

Poznamo DNA polimerazo I, II in III. Ločijo se po številu podenot, po tem, katere encimske aktivnosti poleg osnovne imajo - 3'5' eksonukleazno aktivnost imajo vse tri, 5'3'eksonukleazno aktivnost pa ima samo polimeraza I. Največjo hitrost polimerizacije ima polimeraza III. Razlika pa je tudi v **procesivnosti** - običajen encim katalizira reakcijo in oddisociira, takemu encimu pravimo, da je distributiven. Pri podvajanju DNA pa so encimi procesivni - to pomeni, da lahko dodajo več nukleotidov, predno oddisociirajo. S tem se zagotovi optimalna hitrost podvajanja DNA.

Če primerjamo hitrost polimerizacije in procesivnost vidimo, da najbolj procesiven encim zagotavlja največjo hitrost polimerizacije.

Pri prokariontih polimeraza III opravi največ dela. Sodeluje pri podvajanju vodilne verige, poleg tega pa tudi sintetizira Okazakijeve frakmente. Za to je ta encim zelo kompleksno zgrajen in tvori asimetrični dimer. Vsebuje komponente, ki zagotavljajo vse lastnosti, ki jih polimeraza mora imeti za hitro in natančno replikacijo. Jedro tvorijo tiste podenote, ki imajo polimerazno aktivnost in tiste, ki imajo 3'5' eksonukleazno aktivnost. Da tak encim lahko deluje pa potrebuje še dodatne proteinske podenote. Ena od teh je t. i. drseča objemka, ki omogoča, da se encim veže na DNA.

Okazakijevi fragmenti se sintetizirajo, dokler ne pridejo do začetnega nukleotida predhodnega

Okazakijevega fragmenta. Ko DNA polimeraza III sintetizira fragment tako daleč, da je stik med koncem tega fragmenta in začetkom predhodnega fragmenta, pride do tega, da polimeraza III odpre objemko in se lahko veže DNA polimeraza I, ker ima **samo ta polimeraza 5'3' eksonukleazno aktivnost** in lahko poleg deoksiribonukleotidov odceplja tudi ribonukleotide. Odcepila bo RNA nukleotide iz začetnega oligonukleotida, hkrati pa bo s polimerazno aktivnostjo tisto mesto zapolnjevala z deoksiribonukleotidi. V principu bi ta encim lahko odcepljal tudi DNA nukleotide, vendar ker je distributiven, prej nastopi ligaza, preden bi se vezala polimeraza in odcepljala naprej. Ligaza poveže dva Okazakijeva fragmenta.

Polimeraza katalizira reakcijo: $(dNMP)_n + dNTP \rightarrow (dNMP)_{n+1} + PP_i$; ta reakcija je ireverzibilna, ker je pirofosfat, ki ga pirofosfataze takoj razcepijo, neuporaben za povratno reakcijo.

POLIMERAZE PRI EVKARIONTIH

Pri podvajanju DNA sodelujeta alfa in beta polimerazi. Vodilno verigo in večino sledilne verige sintetizira polimeraza delta.

Mnogo proteinov prokariotskih celic je komplementnih različnim proteinom evkariotskih celic. Namesto SSB proteinov imamo RPA proteine (replikacijski protein A), vlogo polimeraze III (prokarioti) prevzame polimeraza delta (evkarioti), polimeraze I pa polimeraza alfa. RFC (replication factor C) je pri prokariotih vsebovan v asimetričnem dimeru polimeraze III. Začetni oligonukleotid pri sledilni verigi je pri prokariotih odcepljala polimeraza I z eksonukleazno aktivnostjo; pri evkariotskih organizmih pa polimeraza alfa te aktivnosti nima, ampak te fragmente odstranjuje RNAza H - specifičen encim za odcepljanje ribonukleotidov, kadar so povezani z DNA molekulami. Tako kot pri prokariotih je tudi pri evkariotih za spajanje fragmentov zadolžena DNA ligaza, vendar je pri evkariotih odvisna od ATP.

PODVAJANJE SLEDILNE VERIGE PRI EVKARIOTSKIH ORGANIZMIH

Na sledilno verigo se veže kompleks primaza/polimeraza-alfa (pri prokariotih se je vezala polimeraza III). Primaza bo naredila začetni oligonukleotid, potem pa začne delovati polimeraza alfa. Ta encim sintetizira zelo kratek fragment DNA - od 15 do 30 nukleotidov. Ko se to sintetizira ta kompleks oddisociira in se veže objemka (PCNA) skupaj z replikacijskim dejavnikom RFC, ki omogoča sestavljenje in vezavo objemke na začetni oligonukleotid, poleg katerega je že sintetiziran začetek Okazakijevega fragmenta. To dvojje se more vezati zato, da se zagotovi vezava polimeraze delta. Ločene komponente, ki jih potrebujemo za transkripcijo, se torej pri evkariotih sestavljajo šele na DNA, ne pa prej.

Ko se Okazakijev fragment podaljšuje, takrat začne delovati RNAzaH in FEN1, ki odstranita RNA začetni oligonukleotid, poleg tega pa še del Okazakijevega fragmenta. To pa zato, ker če je slučajno na začetku fragmenta prišlo do napak, se bodo te napake odstranile - polimeraze namreč na začetku, ko še niso trdno vezane na verigo (niso stabilne, ker še ni mnogo nukleotidov - le nekateri ribonukleotidi in nekateri deoksiribonukleotidi) še nimajo zadovoljive eksonukleazne aktivnosti, zato lahko ta zataji - pride lahko do napak, ki se na ta način popravijo. Na koncu se veže ligaza in poveže Okazakijeva fragmenta.

Pri prokariotih se delitev začne na enem mestu, pri evkariotih pa na več mestih (origins of

replication), kar zagotovi, da replikacija poteče v sprejemljivem času. Nastajajo **replikacijski mehurčki**. Te se začnejo tvoriti v S fazi in so med seboj oddaljeni od 30,000 do 300,000 baznih parov. Pri prokariontih se mehurčki tvorijo raje na področjih, kjer je mnogo AT povezav.

Tisti mehurčki ki so bližje skupaj delujejo sinhrono, drugi pa v zamiku.

Mehurček se začne z vezavo ORC kompleksa (origin recognition complex), poleg tega se veže še MCM, ki ima delno helikazno aktivnost. Nato se veže helikaza, verigi se razpreta. Veže se kompleks primaze in polimeraze-alfa, ki začneta polimerizacijo. Ta kompleks disociira, pride do vezave polimeraze delta (za vezavo rabi drsečo objemko) in tako naprej.. začne se sinteza komplementarne verige.

Pri tej replikaciji nastaneta dve replikacijski vilici hkrati.

6.10.2011

PROBLEM PODVOJEVANJA KONCEV KROMOSOMOV

Problem nastane pri sledilni verigi - kako podvojiti 3' konce DNA. Tam so telomerne regije, dolge tudi do nekaj 1000 baznih parov. Problem nastane zato, ker na koncih ni prostora za vezavo začetnega oligonukleotida in tvorbo Okazakijevega fragmenta. Podvajanje telomer z encimi telomerazami prepreči intenzivno skrajševanje telomer, vendar pa do skrajševanja teh pri vseh delitvah celic vedno prihaja.

Področja telomer so bogata z gvanini.

Telomeraza je ribonukleoprotein. Je eden od mnogih encimov, ki je sestavljen tako iz nukleinske kisline kot tudi iz proteinskega dela. Nukleotidna komponenta predstavlja pomemben del encima, brez katerega encim ne bi funkcioniral.

Telomeraza vsebuje RNA molekulo (~150 nukleotidov dolge RNA molekule), znotraj te RNA molekule pa je nukleotidno zaporedje, ki je komplementarno ponovitvam v telomerni regiji. Zaradi te lastnosti telomeraza deluje kot obratna oz. reverzna transkriptaza - RNA molekula služi kot matrica, na osnovi katere se bo podaljševala telomerna regija. Telomerna regija služi kot začetni oligonukleotid (tudi reverzne transkriptaze jih potrebujejo) za delovanje encima. Sintetizira se komplementarna veriga, pride do premika telomeraze in veriga se zopet podaljša. V zarodnih celicah je aktivnost telomeraz velika, v diferenciranih celicah pa ta encim ni več aktiven.

Ko se zarodne celice podvojujejo se telomere krajšajo, ampak manj intenzivno kot bi se, če telomeraza ne bi delovala (graf). V celicah, ki telomeraze nimajo, pa se telomerne regije skrajšujejo - posledica je celično staranje, ki vodi v apoptozo.

Rakave celice se neskončno delijo - eden od razlogov je **tumorski supresor**. Ko je supresor aktiven in zdrav tvori kompleks s telomerazo in ostaja ravnotežje med telomerazami v jedrcih in v jedru. Ko pa tumorski supresor mutira ne more več zadrževati telomeraze v neaktivni obliki, poruši se ravnotežje med aktivno in neaktivno telomerazo.

PODOBNOŠTI EVKARIONTSKEGA PODVOJEVANJA DNA S PROKARIONTSKIM

- sinteza poteka v smeri 5' proti 3'
- potreben je začetni oligonukleotid RNA

- encimske aktivnosti proteinov so enaki

RAZLIKE EVKARIONTSKEGA PODVOJEVANJA DNA S PROKARIONTSKIM

- pri evkariontih je podvajanje DNA počasnejše (približno petkrat počasnejše kot pri prokariontih), ker lahko hkrati s podvajanjem DNA potekajo še določeni načini popravljanja

- natančnost polimeraz je večja pri evkariontskih organizmih. Razlika je tudi v strukturi polimeraz; bolj so kompleksne in imajo drugačno strukturo kot prokariontske

- 3' konci linearnih kromosomov se podvajajo drugače (s pomočjo telomeraz); takega načina podvajanja pri prokariontskih organizmih ni.

INHIBITORJI PODVOJEVANJA DNA

Delujejo na različne načine. Ciprofloksacin in novobiocin sta inhibitorja giraze (topoizomeraza tipa 2 - rešuje probleme, ki nastanejo zaradi ločevanja verig). Ta dva inhibitorja se uporabljata za bakterijske infekcije.

Citozin arabinozid (arabinozid = sladkor) pa deluje šele takrat, ko se v celicah fosforilira. Takrat je substrat za polimerazo alfa. To je polimeraza, ki sodeluje pri podvajanju sledilne verige in začne podvajanje. Sinteza se tako ustavi, ker se ne more vezati naslednji nukleotid. Uporablja se pri levkemijah.

Aciklovir in ganciklovir pa se uporabljata pri infekcijah s herpes simplex virusom in citomegalovirusom. Oba imata na gvanin vezan neciklični sladkor oz. sladkorno komponento. V inficiranih celicah prihaja do fosforilacije. Prvo omogočajo proteini samih virusov (monofosfat), za difosfat in trifosfat pa potrebujemo celične kinaze. Posledica tega je, da se po ugraditvi s polimerazami spet ustavi replikacija.

Pri drugih zdravilih pa poškodujemo DNA samo. Ciklofosfamid (po aktivaciji v jetrih) alkilira gvanin v DNA in pride do prelomov. Bleomicin deluje podobno - tudi povzroči zlome kromosomov, prav tako mitomicin. Cisplatin in karbiplatin pa se lahko povežeta z gvanini v DNA in se tvorijo adukti - kadar se tvori adukt je to kovalentna povezava nekega agensa z DNA molekulo (adukt = kovalentna povezava med dvema molekulama). To lahko počneta v rakastih ali nerakastih celicah, ampak ker je delitev v rakastih hitrejša, so te bolj prizadete.

Predavanje 2; 6. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

POPRAVLJANJE DNA

Proces podvajanja DNA je izredno natančen; v toku podvajanja DNA se na eno milijardo nukleotidov vgradi en napačen. V celicah pa se DNA lahko spontano poškoduje pri procesih v samih celicah ali pa pod vplivom zunanjih dejavnikov. Poznamo:

- deaminacije baz (potekajo spontano v celicah)
- depurinacije (odcep purina)
- oksidacije (lahko posledice dejavnikov v celici ali zunanjih dejavnikov)
- alkilacije (tudi nekatere alkilacije lahko potekajo v celicah, kjer je S-adenozin-metionin donor)

metilne skupine, lahko pa zaradi različnih spojin iz okolja, ki jim pravimo alkilirajoči agensi)
- tvorba timinskih dimerov (povzročajo jih UV svetloba)
- tvorba aduktov (s produkti peroksidacije lipidov, s kemoterapevtiki, z različnimi kancerogenimi snovmi)

DEAMINACIJE in DEPURINACIJE

Primer: če se deaminira citozin nastane uracil. To se dogaja v celicah pogosto - 100/genom/dan. Še pogostejši je proces depurinacije - do 10^4 purinov/dan/celico. Kadar se odcepijo purini nastane v DNA **AP mesto** - apurinsko mesto.

Če se citozin deaminira v uracil, potem se bo namesto C-G povezave vzpostavila U-G povezava, vendar to še NI mutacija! Po prvi delitvi bomo iz tega dobili T-A povezavo, to pa je mutacija, ker gre za napačen a komplementaren par.

Deaminira se lahko tudi metilcitozin (tega je veliko v promotorskih regijah). Iz tega ne bomo dobili uracila ampak timin. Pri prvi replikaciji bomo dobili namesto G-C para A-T par - to je mutacija. Če se deaminira adenin dobimo hipoksantin, če se gvanin pa dobimo ksantin.

TIMINSKI DIMER

Gre za tvorbo dimera med dvema timinoma, ki sta v isti verigi in si sledita en za drugim. Posledica tvorbe dimera je sprememba oz. nepravilna struktura dvojnega heliksa DNA. Gre torej za večjo napako v sami strukturi DNA.

V splošnem lahko popraviljanje DNA razdelimo v dve skupini. Eno je direktno popraviljanje, drugo pa z izrezovanjem.

1. DIREKTNO POPRAVLJANJE

Direktno popraviljanje pomeni da, če je neka baza metilirana, jo lahko encim popravi (**encimska demetilacija**) ali pa popraviljanje pirimidinskih dimerov (**fotoreaktivacija ciklobutanskih pirimidinskih dimerov**).

1. 1. Demetilacija z metiltransferazo - metiltransferaza omogoča, da iz metilgvanin nukleotida dobimo gvanin nukleotid. Reakcija je neobičajna - ponavadi namreč encim iz reakcije izstopi nespremenjen in lahko katalizira novo reakcijo, v tem primeru pa gre za kovalentno vezavo metilne skupine na cistidinski ostanek. Ta vezava je ireverzibilna - encim torej postane neaktiven in se razgradi. V energijskem smislu je to neugodno za celico, saj je zahteven proces (energija za prepis RNA za encim, energija za sintezo).

1. 2. Oksidativna demetilacija z dioksigenazo - gre za adilirana adenin ali citozin. Adenin se lahko metilira na mestu ena samo takrat, ko sta verigi ločena (torej pri replikaciji ali transkripciji). Podobno je pri citozinu, ki se lahko na mestu 3 adilirata samo takrat, kadar sta verigi DNA razklenjeni. Metiliran adenin ob sodelovanju alfa-ketoglutarata in encima, ki ima kot kofaktor železo (to je *alfaketoglutarat Fe-odvisna dioksigenaza*), bo prišlo do tvorbe nove spojine, za tem do odcepitve formaldehida in na koncu bo adenin takšen, kot mora biti. Sodelovati mora torej alfa-ketoglutarat, prisotni morajo biti še železovi ioni in kisik. Ta način popraviljanja deluje pri evkariontih in prokariontih.

1. 3. Fotoreaktivacija ciklobutanskih pirimidinskih dimerov s fotoliazno - ne poteka pri sesalcih, vendar poteka pri nekaterih evkariontih. Encim fotoliazna omogoča, da pride do direktne cepitve ciklobutanskega obroča, s katerim je ta dimer povezan. Energijo prispevata FADH- in folat, ki služita kot kromofora (sta sposobna absorbirati svetlobo v obliki fotona).

2. INDIREKTNO POPRAVLJANJE Z IZREZOVANJEM

Imamo tri načine. Osnovne stopnje pri vseh so:

- prepoznavanje poškodbe
- odstranitev poškodbe z izrezom dela ene verige
- zapolnitev vrzeli, uporabi se genetska informacija iz komplementarne verige - po izrezovanju mora polimeraza sintetizirati nov del verige, na koncu pa mora delovati še ligaza, ki bo tvorila estersko vez in povezala nukleotide med sabo.

2. 1. Popravljanje z izrezovanjem baze - metilirane, alkilirane, deaminirane, oksidirane baze. Na ta način se popravljajo tudi apurinska (AP) mesta.

Potek (pri prokariontih): prvi encim, ki pri popravljanju sodeluje, je glikozilaza - cepi glikozidno vez med sladkorjem in bazo. Naslednja stopnja je delovanje endonukleaze (imenujemo jo endonukleaza AP, saj imamo zdaj že apurinsko mesto - tudi če se je odcepil pirimidin).

Endonukleaza je cepila na ta način, da je na 3' koncu ostala fosforilirana riboza. Zato jo odcepi liaza in s tem se sprosti hidroksilna skupina - zdaj lahko deluje encim DNA polimeraza I pri prokariontih. Ko se vrzel zapolni in ostane zgolj še zareza proces konča ligaza.

Potek (pri evkariontih): endonukleaza cepi, potem pa lahko delujeta polimeraza DNA delta ali polimeraza DNA epsilon; ob tem potrebujemo še drsečo objemko. Potem deluje endonukleaza, ki bo cepila tako, da ne bomo dobili posameznih nukleotidov, ampak fragment (eksonukleaza odceplja posamezne nukleotide, endonukleaze pa lahko več skupaj). Proces s spajanjem konča ligaza.

Lahko sodeluje tudi DNA polimeraza beta - s polimerazno aktivnostjo doda manjkajočo bazo, hkrati pa še odcepi deoksiribozofosfat (deoksiribozofosfatazna aktivnost).

2. 2. Popravljanje z izrezovanjem nukleotidov - kadar se pojavi nepravilna struktura v DNA. Sem spadajo pirimidinski dimeri, večji adukti (cisplatin, aflatoksin, benzapirin - ponavadi v premoju, tudi v čikih!

Potek (pri prokariontih): Primer timinskega dimera. Prisotni morajo biti proteini, ki bodo omogočali prepoznavo mest, kjer je prišlo do tvorbe timinskih dimerom. Pri temu sistemu je uporaba energije večja kot pri izrezovanju baz, saj se proteini, ki bodo prepoznali mesto strukturne spremembe, premikajo do mesta napake in za to premikanje potrebujejo energijo. Poleg tega v tem primeru deluje več encimov. Eno je helikaza, ki po nastanku endonukleaznih cepitev (nastanejo pred in po mestu same napake) DNA odvijne in se bo fragment odstranil. Po tem začne delovati polimeraza DNA I ali II (tip II ne sodeluje pri podvajanju - samo pri popravljanju), na koncu pa spet s spajanjem proces konča ligaza.

Potek (pri človeku): Imamo proteine, ki imajo ATPazno in helikazno aktivnost - ATPazno za spremembo konformacije in helikazno za prekinjanje verig. Sodelujejo tudi proteini, ki se vežejo na enojno verigo in preprečujejo nastajanje sekundarnih struktur, in pa dodatni dejavniki. V naslednji fazi deluje spet endonukleaza, ki bo omogočila cepitev, pride do cepitve pred in za

napako, odstrani se fragment DNA. RFC (replikacijski faktor C) omogoči vezavo drseče objemke (PCNA) in DNA polimeraze delta/epsilon; na koncu deluje še ligaza.

2. 3. Popravljanje na mestih nekomplementarnih baz - gre za mesta, kjer je prišlo do napake med samim podvajanjem. To torej niso napake, ki bi se zgodile spontano kasneje, ampak so napake encimov med replikacijo DNA. Ta sistem torej mora delovati hkrati z replikacijo, ostali pa delujejo v večini primerov tudi takrat, kadar replikacija ne poteka. Popraviti mora takoj, ko se napaka zgodi, saj takrat še lahko ločujemo med matično DNA in novo-sintetizirano DNA.

Popravljanje pri evkariontskih organizmih je podobno kot pri prokariontskih, uporabljajo pa se drugačni encimi. V človeškem organizmu imamo tri tipe istih glikozilaz:

- UNG; odcepi uridin, ki se je naključno vgradil v DNA (napaka)
- hSMUG1; odstrani uridin iz enoverižne DNA med replikacijo ali transkripcijo
- TDG in MBD; odcepita uridin ali timin, ki sta povezana z gvaninom.

11. 10. 2011

Popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov pri človeku - ponovitev

Je bolj kompleksna kot pri prokariontih - imamo več proteinov, te proteini so iz večih podenot z različnimi funkcijami. Vsi popravljalni sistemi se začnejo s prepoznavanjem napake, zato se najprej veže en (ali dva) proteina, ki napako prepoznata. Sledi vezava večjega kompleksa - kompleks Z. Ta dva proteina imata omejeno helikazno aktivnost - ni torej optimalna (ne more ločiti DNA verigi na širokem področju), je pa prisotna. Ko pride do te vezave se proteini, ki so prepoznali napako, odstranijo, vežejo pa se dodatni proteinski dejavniki. Poleg teh proteinskih dejavnikov, ki so specifični za popravljanje napak z odstranjevanjem nukleotidov, se vežejo še proteini, ki smo jih srečali pri replikaciji - to so RPA proteini, ki se vežejo na enojno verigo DNA in preprečijo, da bi se verigi ponovno povezali ali bi se tvorila sekundarna struktura.

Potem se vežejo še dodatni proteini, ki imajo endonukleazno aktivnost in cepijo za in pred napako. Na ta način nastane vrzel, velika približno 30 nukleotidov. Helikaza odstrani verigo z napako, začne delovati bodisi polimeraza delta bodisi epsilon, oba ta encima pa potrebujeta drsečo objemko (PCNA) in replikacijski faktor C (RFC), ki omogoča, da se objemka sestavi. Ta kompleks bo zapolnil vrzel.

To popravljanje z izrezovanjem nukleotidov lahko poteka tudi hkrati s transkripcijo. Lastnost polimeraz RNA je da, če prepoznajo napako, se ustavijo. Takrat se vežeta dva proteina, ki pomagata polimerazi RNA, da oddisociira. Ko kompleks polimeraze oddisociira pride do vezave kompleksa transkripcijskega iniciacijskega dejavnika. Od tu dalje poteka popravljanje na enak način, kot v prejšnjem primeru. Razlika je torej samo v tem, kateri proteini zaznajo napako oz. kateri proteini zaznajo polimerazo RNA, ki je zastala - to je signal za transkripcijski iniciacijski dejavnik in z njim povezane proteine, da se začne popravljanje.

V primeru, da pride do napake pri podvajanju DNA in do mutacije (vgradi se napačna baza), pride do problema - kako naj sistem loči starševsko (zdravo) verigo DNA od na novo

sintetizirane, v kateri je mutacija.

Genetski material je **metiliran** na mestih, kjer te skupine ne motijo strukture (zato se ne popravlja). Tik po sintezi nove verige pri podvajanju DNA imamo hemimetilizirano DNA; takrat je čas, ko se lahko napaka popravi, saj je samo takrat sistem sposoben ločevanja med starševsko verigo in novosintetizirano verigo.

Popravljanje DNA na mestih nekomentarnih baz pri e. coli

Ker nova veriga pri podvajanju še ni metilirana, bo nekomentarno bazo prepoznal poseben protein (MutS), ki se bo vezal skupaj s proteinom, ki koordinira nadaljne stopnje (MutL). Ta proteina bosta omogočila, da se sestavi kompleks - veže se endonukleaza (MutH), ki cepi samo eno (novosintetizirano) verigo, ker je v matični DNA metiliran adenin. Če se novosintetizirana veriga metilira preden se popravi, govorimo o točkovni mutaciji.

Glede na to, pri kateri metilaciji je prišlo do cepitve novosintetizirane verige, sodelujejo različni encimi. Ker pa sodeluje polimeraza III, ki nima eksonukleazne aktivnosti, mora sodelovati še eksonukleaza, ki odstrani mutirani del.

Ta proces popravljanja je najdražji od vseh, saj so mesta, kjer je potekla mutacija, lahko zelo oddaljena med seboj (zaporedja baz, **palindromi**, so ločeni med seboj več tisoč nukleotidov) in ker se mora ta vrzel zapolniti je to drag proces - prekursorji za sintezo DNA so energijsko bogate molekule.

Torej: endonukleaza cepi na mestu, kjer ni metilacije. Eksonukleaza cepi nekaj sto nukleotidov z novosintetizirane verige, kjer je bila nekomentarna baza. To vrzel zapolni polimeraza III, na koncu spoji še ligaza.

To je bil proces pri prokariotih, vendar so homologne proteine našli že pri evkariotnih organizmih - tudi pri človeku, kjer je namesto MutS MSH2 in namesto MutL MLH1. Ni še jasno, kako pri evkariotih prepoznajo novosintetizirano verigo, je pa več teorij (velikokrat so metilirani citozini. Druga veranta je ta, da bi sistem prepoznal mesta med Okazakijevimi fragmenti, tretja veranta pa ta, da bi drseča objemka, ki skrbi za vezavo polimeraze, bila signal, ki bi omogočal, da pride do popravljanja).

Dejavniki, ki sodelujejo pri popravljanju DNA, imajo dostikrat kratico XP. To pa zato, ker ob okvari teh proteinov lahko pride do dedne bolezni (avtosomno recesivno dedovanje) kseroderma pigmentosum. Ta bolezen poveča tudi tveganje za raka.

Predavanje 3; 11. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

SINTEZA RNA - TRANSKRIPCija

Glavne skupine rna so tiste molekule, ki sodelujejo pri sintezi proteinov - informacijska (mRNA), transportna (tRNA) in ribosomalna (rRNA). Razlikujejo se po velikosti in funkciji. mRNA je adapter, ki omogoča, da se nukleotidno zaporedje prevede v aminokislinske. rRNA omogoča, da se ribosom sestavi in imajo tudi encimsko funkcijo.

Obstajajo določene podobnosti med transkripcijo in replikacijo. Mehanizem sinteze je enak kot pri replikaciji - poteka v smeri 5' proti 3'. Potrebujejo matično DNA in encimi so procesivni. Prav tako gre za komplementarnost dveh verig.

Reakcija sinteze RNA je analogna reakciji sinteze DNA, razlika je le v sladkorni komponenti nukleotidov (riboza namesto deoksiriboze).

Razlike med replikacijo in transkripcijo

- pri transkripciji kot matrica služi samo ena veriga DNA
- RNA se prepisujejo le z določenih področij ob določenih časovnih intervalih. Tam, kjer imamo diferencirane celice, bodo izražanja genov zelo različna (npr. celice v jetrih in celice v mišicah - sintetizirale bodo različen repertoar proteinov).
- začetek in zaključek določajo za transkripcijo specifična nukleotidna zaporedja; pri replikaciji ni bilo nukleotidnih zaporedij za konec, saj se je replikacija končala takrat, ko se je podvojila celotna starševska veriga.
- za začetek sinteze RNA ni potreben začetni oligonukleotid. Posledica tega je več napak, saj encimi začnejo že s povezovanjem prvih dveh nukleotidov; takrat je verjetnost nastajanja napak večja.
- encimi za transkripcijo nimajo 3' 5' eksonukleazne aktivnosti, kar pomeni, da bo napak še več. Predpostavljajo, da RNA polimeraza naredi napako na 1000 nukleotidov. Nekateri polimeraze so sicer sposobne odcepiti zadnji nukleotid, ki se je vezal, vendar ne gre za eksonukleazno (hidrolitično) odcepitev - točnih posledic tega še ne vedo.
- prvi nukleotid na 5' koncu primarnega prepisa RNA je trifosfat.

Transkripcija je mnogo manj natančna kot translacija zato, ker ni tako kritično, če pride do napak - možnost je razgradnje nepravilne RNA. Če pa pride do napake pri genetski informaciji je večji problem, saj se posreduje vsem hčerinskim celicam.

Vloga verig DNA pri transkripciji

Ena od verig je matična DNA. Tej matični DNA se bo antiparalelno sintetizirala RNA. Druga veriga pa je kodirajoča (nematična) DNA. Kodirajoča in matična veriga sta komplementarni, kodirajoča in prepis RNA pa sta **identični** (z razliko uracila namesto timina).

Prokarioti imajo samo eno vrsto polimeraze. Tvori jo jedro encima, ki ima katalitsko področje; na drugi strani so podenote, ki omogočajo sestavo encima in prepoznajo promotorja (to je področje, ki odloča o osnovni ravni transkripcije). Poleg tega pa je še dodatna sigma podenota, ki je zelo specifična za različne promotore.

Značilnosti najbolj običajnih promotorjev

Nekatera področja so ohranjena, vmes so povezovalna področja (spacer). Po dogovoru se področje, kjer se RNA začne, označi s **+1**.

Območja promotorjev so bogata z bazama A in T, ker lahko tako pride do cepitve vezi z manjšim vnosom energije (dve vodikovi vezi).

Primer: če pogledamo promotorsko področje gena polimeraze RNA je začetek translacije šele

~40 nukleotidov za +1 regijo. To pomeni, da bo imela mRNA kodirajočo regijo, pred njo pa bo nekodirajoč 5' konec. 3' koncu verige pa sledi poli-A rep.

Proces transkripcije pri evkariontskih organizmih

Promotor, ki zagotavlja osnovno raven transkripcij, je področje, ki ga prepozna sigma podenota. Veže se polimeraza RNA (njena značilnost je tudi ta, da ima največjo afiniteto na **dvoverižno** DNA, za razliko od polimeraze DNA). Najprej se tvori zaprt kompleks (verigi sta še vedno povezani, prekinitve vezi med bazami še ne poteče), ko pa se verigi razpeta s helikazno aktivnostjo, pridemo do odprtega kompleksa in začne se iniciacija same transkripcije. Ko je kratek del sintetiziran oddisociira sigma podenota, ki je omogočila vezavo polimeraze in veže se drug protein, ki omogoča prehod iz iniciacije v elongacijo (podaljševanje verige).

V toku sinteze RNA imamo krajši hibrid (DNA-RNA hibrid, dolg ~10 nukleotidov). Tudi pri transkripciji morajo sodelovati topoizomeraze.

Promotor odloča o tem, kje se začne transkripcija in katera veriga DNA bo matrična.

Kako se ta proces zaključi? Pri prokariontih je to raziskano: Obstajata dva načina. Eden je odvisen od proteina, drugi pa od primarne strukture matrične DNA, ki bo omogočila sintezo RNA s specifično sekundarno strukturo.

1. odvisen od proteina - rho protein ima helikazno in ATPazno aktivnost. Ta protein na nek način sledi polimerazi RNA. Aktivira se ob prisotnosti zaporedij s citozini in adenini in se premika po RNA, ki se je že sintetizirala. Citozini in adenini njegovo premikanje pospešijo, na ta način bo rho protein dohitel polimerazo RNA. Ko se tvori kompleks med polimerazo RNA in rho proteinom pa polimeraza RNA disociira.

2. odvisen od matrične DNA - V matrični DNA, ki se prepisuje, je neko zaporedje, iz katerega se bo prepisala RNA, ki je sposobna tvoriti lastnico. Sledi področje na matrici, ki je bogata z adenini. Struktura lasnice, ki se bo tvorila, bo vplivala na interakcijo polimeraze z dvoverižno DNA. Prepisal se bo samo še nekaj nukleotidov, potem pa se bo transkripcija končala.

12. 10. 2011

Značilnosti sinteze RNA pri prokariontih

1. začne se v promotorju, ki ga prepozna sigma podenota polimeraze RNA in konča pri signalu za zaključek
2. trifosfat prvega nukleotida se ne odcepi
3. poteka v smeri 5' proti 3', sintetizirana RNA je komplementarna in antiparalelna matrični DNA in identična (z izjemo timinov in uridinov) kodirajoči DNA
4. predhodno se tvorijo kratki hibridi DNA:RNA
5. poteka s hitrostjo 50 - 90 nt/sek
6. tako kot translacija je tudi transkripcija procesiven proces - polimeraza RNA je procesiven encim in če se odcepi, se transkripcija ustavi, saj za začetek polimeraza RNA potrebuje promotor.
7. sinteza poteka v citosolu.

PREPISOVANJE PRI EVKARIONTIH

Pri transkripciji delujejo tri različne polimeraze. **RNA polimeraza I** deluje v nukleolusu in sodeluje pri prepisovanju preribosomalne rRNA (vsebuje informacijo za sintezo podenot ribosoma). Druga polimeraza, **RNA polimeraza II**, prepisuje mRNA, **RNA polimeraza III** pa je odgovorna za prepisovanje transportne tRNA in 5S rRNA.

Te encimi so kompleksno zgrajeni, imajo pa določena področja, ki so skupna vsem trem polimerazam RNA. Določena področja so podobna tudi prokariontskim, sploh tisto, ki je odgovorno za proces polimerizacije.

Prva podenota in druga podenota sta podobni beta podenoti prokariontskim polimerazam; te so odgovorne za polimerizacijo.

Prepisovanje mRNA

Prva značilnost vseh polimeraz evkariontskih organizmov je ta, da same po sebi niso sposobne vezave na promotorsko regijo, ampak potrebujejo transkripcijske dejavnike. Te omogočajo, da se lahko polimeraza veže, poleg tega pa stabilizirajo kompleks, da se lahko vršijo nadaljne stopnje pri transkripciji. Osnovni transkripcijski dejavniki so tisti, ki omogočajo, da bo potekla osnovna transkripcija s polimerazo.

V promotorskih regijah, ki omogočajo sintezo RNA, so neka skupna nukleotidna zaporedja. Pri vseh promotorjih je s specifičnim nukleotidnim zaporedjem določen prvi nukleotid, ki se bo prepisal. Veliko promotorjev polimeraze II ima tudi 'TATA zaporedje', ki je pri nekaterih genih nujno za učinkovito prepisovanje, pri drugih pa zagotovi samo to, da se transkripcija začne na pravilnem mestu.

Promotor je lahko dolg tudi do 200 nukleotidov. V njem so določena nukleotidna zaporedja ohranjena in so relativno blizu začetka prepisovanja. Imamo pa še ojačevalna nukleotidna zaporedja; ta so lahko od samega promotorja oddaljena tudi po nekaj 1000 baznih parov. Na ta zaporedja se vežejo ojačevalci oz. aktivatorji. Ti aktivatorji morajo imeti vsaj dve strukturni značilnosti, da lahko izvršijo svojo funkcijo - interagirati oz. vezati se morajo na specifično nukleotidno zaporedje, poleg tega pa morajo biti sposobni stopiti v interakcijo z osnovnimi transkripcijskimi dejavniki oz. s samo polimerazo RNA.

Splošne transkripcijske dejavnike pri sintezi mRNA lahko razdelimo na iniciacijske in elongacijske;

1. iniciacijski; omogočajo, da se polimeraza veže na pravilno mesto in da nastane aktivni transkripcijski kompleks (sestavljen iz dejavnikov + polimeraze RNA). Poleg tega koordinirajo oz. omogočajo prehod iz iniciacije v elongacijo.

2. elongacijski; povečajo aktivnost polimeraze RNA, poleg tega pa preprečujejo, da bi se RNA polimeraza tokom sinteze ustavila, saj bi se v primeru disociacije polimeraze proces končan in se bo lahko ponovno začel samo v promotorju (še enkrat znova). Te dejavniki koordinirajo tudi interakcije s proteinskimi kompleksi in sicer s tistimi, ki bodo omogočili, da bo že med samo transkripcijo lahko potekalo zorenje mRNA in s tem nastanek funkcionalne informacijske RNA (mRNA), ki bo lahko služila za sintezo proteinov.

V sestavljanju iniciacijskega kompleksa se sestavlja vrsta iniciacijskih dejavnikov, ki se vežejo na promotorsko regijo. Ko se veže polimeraza nastane **zaprt kompleks**. S helikazno aktivnostjo

TFIIH dejavnika pride do tvorbe odprtega kompleksa (vezi med bazami so prekinjene). TFIIH pa ima poleg helikazne tudi kinazno aktivnost, kar pomeni, da lahko katalizira fosforilacijo. Na C koncu polimeraze II so aminokisliline, ki se lahko fosforilirajo - ta fosforilizacija C terminalne domene pa omogoči, da pride do konformacijskih sprememb in začne se sinteza RNA.

Sintetizira se kratka veriga RNA, sledi premik iz promotorja. Šele ko oddisociirajo vsi iniciacijski dejavniki se vežejo elongacijski. Te pospešijo proces na ta način, da omogočijo še dodatno fosforilacijo C terminalne domene. Fosforilacija C konca polimeraze II je torej nujna za aktivacijo encima. Ko se prepíše celotna mRNA se sinteza ustavi, ta terminacija pa pri evkariontih še ni raziskana.

Tudi polimeraza I, ki sintetizira rRNA, in polimeraza III, ki sintetizira tRNA, potrebujeata iniciacijske in elongacijske dejavnike. Polimeraza III se veže na ta način, da do neke mere prekriva področje, ki se bo prepisovalo. Značilnost polimeraze I pa je ta, da lahko sintetizira preribosomalne RNA iz velikega števila genov, ki si sledijo v specifičnih področjih kromosomov. Med temi področji so povezovalna področja, znotraj katerih je promotor, na katere se veže polimeraza I in zagotavlja, da se te geni lahko sočasno prepisujejo - gen za preribosomalno RNA je veliko področje, sestavljeno iz mnogih malih področij, ki si sledijo eden za drugim, med njimi pa so povezovalna področja, v katerih je promotor. Ta omogoča prepis preribosomalne RNA.

Da se vse to dogaja se mora pri evkariontih predhodno še nekaj zgoditi. Pri evkariontih so namreč DNA molekule zelo kondenzirane v kromosome - morajo torej poteči specifične reakcije, ki bodo omogočale, da se bo nek gen prepisal - zrahljati morajo vez med DNA in histonom. Pri tem sodeluje acetil transferaza, ki prenese acetilno skupino iz acetil koencima A. Poleg acetilacije potekajo še metilacije z metil transferazami in fosforilacije s kinazami (ob porabi ATPja). Te reakcije so potrebne, niso pa zadostne za vršitev procesa transkripcije. Mora se zgoditi še nekaj - to je povezano s promotorji. V promotorjih imamo pogosto nukleotidna zaporedja C in G. Citozin se lahko metilira in nastane 5-metil citozin (ta ne moti strukture DNA, zato ne pride do popraviljanj). Kadar je ta citozin metiliran se v promotorsko regijo vežejo proteini, ki prepoznajo metilcitozin. Dokler so te proteini vezani proces transkripcije ne more poteči. Ko pa demetilaze odcepijo metilne skupine se lahko proces transkripcije začne. Gre torej za dva procesa - transkripcija bo potekla takrat, ko bo na histonih potekla acetilacija (metilacija, fosforilacija), na promotorju pa demetilacija.

Razlike med sintezami RNA pri prokariontih in evkariontih

Pri prokariontih omogoča vezavo polimeraze njena sigma podenota, pri evkariontih pa potrebujemo transkripcijske dejavnike. Proces pri prokariontih poteka v citosolu, pri evkariontih v jedru (rRNA v jedrcu). Geni so pri prokariontih v večini kolinearni s prepisom (tisto, kar se prepíše, je lahko že funkcionalno), pri evkariontih pa sledi mnogo potranskripcijskih modifikacij. Zapis pri mRNA evkariontov je skoraj vedno monocistronski; kodira en sam produkt. Pri mRNA prokariontov pa je policistronski, torej se lahko iz njih sintetizira mnogo različnih produktov (to je zato, ker se morajo prokarionti izjemno hitro prilagajati okolju).

Inhibitorji sinteze RNA

- **Aktinomycin** in **akridin** sta molekuli, ki sta sposobni, da se vrineta med G-C pare aktivne

DNA in preprečena transkripcija tako pri evkariontskih kot pri prokariontskih organizmih. Polimeraza RNA se ustavi, ker je nastala strukturna nepravilnost. Če bi bilo inhibitorja premalo, bi lahko to inhibicijo preprečil sistem popravljanja napak z izrezovanjem nukleotidov.

- **rifampicin** deluje samo na prokariontske organizme in se veže na beta podenoto polimeraze. S tem prepreči njen premik iz promotorja.
- **streptolidigin** deluje samo na prokarionte, inhibira polimerazo RNA.
- **alfa-amanitin** v nižjih koncentracijah inhibira polimerazo II (sintezo mRNA), kadar pa je koncentracija strupa večja pa tudi polimeraze III. To je strup zelene mušnice.

Predavanje 4; 12. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

KO- IN POTRANSKRIPCIJSKE MODIFIKACIJE PRIMARNIH PREPISOV RNA

Večina evkariontskih RNA se modificira - delimo jih lahko na tiste, ki potekajo hkrati s transkripcijo in tiste, ki potekajo po transkripciji.

Zorenje primarnega prepisa mRNA pri evkariontih

mRNA se modificira tako na 5' kot na 3' koncu. Geni za mRNA so sestavljeni iz eksonov in intronov - introni pri višjih evkariontskih organizmih predstavljajo tudi do 2/3 eksonov. Eksoni so kratki (nekje do 60 aminokislin), introni pa tudi do 10000 baznih parov.

Sinteza kape pri evkariontskih mRNA

Na 5' koncu se nahajajo trije fosfati. Prva reakcija je hidroliza enega fosfata (fosfohidroliza) tako, da ostaneta vezana samo še dva fosfata. Potem se z gvanililtransferazo veže GTP, od katerega se ob vezavi pirofosfat odcepi. Kapa je vezana na nenavaden način - ni standardne 5'3' fosfodiesterske vezi, ampak je 5' 5' vez. Na ta način kapa prepreči razgradnjo. Vendar pa tu proces še ni končan - metilira se še gvanin z reakcijo gvanin-7-metiltransferaze, ker pa gre za transferazo potrebujemo donor metilne skupine; to je S-adenozil-metionin. Poleg tega lahko potečejo še metilacije riboze na prvem in drugem nukleotidu, ki sta nastala s prepisom DNA.

Sinteza kape naj bi bila povezana z veliko podenoto polimeraze RNA in sicer s tistim mestom, kjer je polimeraza fosforilirana. Proces transkripcija poteka dalje, vendar pa je kapa mRNA povezana z veliko podenoto RNA polimeraze preko kapo vezavnega kompleksa. Proces je torej **kotranskripcijski**.

IZREZOVANJE INTRONOV lahko poteka na več načinov. Imamo introne, ki se lahko sami izrezujejo in pa tiste, ki se izrezujejo s pomočjo izrezovalno-povezovalnega kompleksa (spliceosom).

1. samoizrezovanje intronov tipa I - niso potrebni nobeni proteinski dejavniki. Poleg tega tudi ni potrebna nobena energija. Tudi intron ima 5' in 3' konec. 5' včasih imenujemo tudi **donorski**, 3' pa **akceptorski** konec. Gre za dve reakciji transesterifikacije. Kot nukleofil lahko sodeluje bodisi

gvanozin, bodisi GMP/GDP/GTP. Ko pride do nukleofilnega napada se najprej cepi vez med 3' koncem eksona in 5' koncem introna. Na koncu eksona ostane hidroksilna skupina, ta hidroksilna skupina pa je nukleofil, da se lahko cepi še vez med 3' koncem introna in 5' koncem eksona. Gre torej za **dve transesterifikaciji** z dvema nukleofiloma. Intron se sprosti kot RNA molekula in se razgradi.

2. samoizrezovanje intronov tipa II - spet gre za dve transesterifikaciji. Zadeva je torej podobna, vendar pa tu kot nukleofil služi 2' OH skupina adenzinskega nukleotida (2', ne 5'; zato, ker je 5' OH skupina v vezi!). Sprosti se zankasta struktura, ostane prost OH radikal na 3' koncu eksona. Ta deluje kot nukleofil za cepitev vezi med 5' introna in 3' eksona. Na koncu se delca eksona povežeta, intron se sprosti in se razgradi.

3. izrezovanje z izrezovalno-povezovalnim kompleksom - ta proces ni samoizrezovalen, ker so potrebne specifične proteinske komponente (ribonukleoproteine - proteine z RNA), ki na eni strani omogočajo zaznavanje koncev intronov, poleg tega pa koordinirajo ves proces, da se lahko te introni izrežejo. Ta način je pri evkariontskih organizmih najbolj pogost. Na mejah med introni in eksoni je relativno dobro ohranjeno nukleotidno zaporedje. Poleg tega se znotraj introna nahaja 'razvejitevno mesto', podobno kot pri intronih druge skupine. Pri procesu sodelujejo mali jedrni ribonukleoproteini. Te so sestavljeni iz proteinske komponente in iz malih RNA molekul. Tvorijo se komplementarne vezave med malimi RNA (zelo so bogate z uridini in zato jih imenujemo U1, U2,...) na 5' introna in na mestu razvejitve (ta povezava je neobičajna, ker se lahko **izpostavi adenzinski ostanek** - ta bo imel hidroksilno skupino, ki bo delovala kot nukleofil).

Potek: Kompleks se začne sestavljati. Sestaviti se mora tako, da bo lahko prišlo do nukleofilnega napada in transesterifikacije med OH skupino adenzinskega nukleotida in 5' konec introna. Za to sestavljanje je potrebna energija v obliki ATPja. Tudi ko je kompleks sestavljen potrebujemo hidrolizo ATPja, da preide iz neaktivnega v aktivni kompleks. Takrat bosta dve omenjeni skupini dovolj blizu, da pride do cepitve vezi na 5' koncu introna. Tako se izpostavi OH skupina na 3' koncu eksona, ta deluje kot nukleofil za cepitev vezi na 3' koncu introna. Glavna razlika je torej da potrebujemo pri tem principu energijo - najprej za sestavljanje kompleksa, kasneje še za konformacijske spremembe v aktivno stanje encima.

Tudi ta proces pa je **kotranskripcijski** proces: z veliko podenoto polimeraze RNA naj bi bile povezane nekatere komponente izrezovalno-povezovalnega kompleksa. Te komponente naj bi dosegle približanje 5' in 3' introna (glavni problem je namreč, da so introni zelo veliki, za transesterifikacije pa moramo doseči neko razumno razdaljo med 5' in 3' koncem introna).

Obstajajo še **primeri alternativnega izrezovanja intronov in povezovanja eksonov**. Pri teh sodelujejo transdelujoči (zapis na nekem drugem kromosomu) in cisdelujoči (zapis na istem kromosomu) dejavniki.

MODEL DODAJANJA POLI-A REPA PRI SESALCIH

Imajo ga praktično vse evkariontske mRNA. 3' konec prepisa je nekodirajoč (kodirajoča regija je do stop kodona). Evkariontske polimeraze II prepisejo še določeno regijo, ki ji pravimo 3'-neprevedljiva regija. V tej regiji so specifična nukleotidna zaporedja. Na dveh regijah (poli-A signalih) se vežejo proteini, ki omogočijo cepitev na mestu poli-A. Po cepitvi pride do začetka

dodajanja poli-A repa. Dokler se ne doda nekaj adenozijskih nukleotidov rečemo, da gre za počasno poliadenilacijo; ko pa se veže že dosti adenozijskih nukleotidov se začne hitra poliadenilacija.

Te poli-A repi so dolgi od 80 do 250 adenzinov. Poli-A rep zaščiti RNA molekulo, poleg tega pa sodeluje pri translaciji - sintezi proteinov. Tiste mRNA, ki nimajo poli-A repov, se ne morejo prepisovati v proteine.

13. 10. 2011

Pri dodajanju poli-A repu torej sodelujejo endonukleaze, ki cepijo na specifičnem mestu in pa encim poliadenilat polimeraza. To je posebna polimeraza, ker ne rabi matrične DNA, kot substrat pa lahko služijo samo adenzin-3-fosfati.

Posttranskripcijska modifikacija baze v mRNA

Specifična tkiva (jetra, črevesje) sintetizirajo apolipoprotein D. To je membranska komponenta hilomikronov in LDL.

Prepiše se mRNA. Kodon CAA (kodon za glutaminsko kislino) se po deaminaciji pretvori citozin v uridin. Namesto kodona za glutaminsko kislino imamo torej na tem mestu stop kodon. Zato se lahko sintetizira komponenta hilomikronov - če pa ne pride do deaminacije se sintetizira komponenta LDL. Gen je torej enak v črevesju in v jetrih, razlike je le v tem, da se z deaminacijo citozina skrajša mRNA in nastane drugačen produkt.

Primeri modificiranih ribonukleozidov v rRNA in tRNA

- inosin; na ribozo je vezan hipoksantin (deaminacija adenzina)
- ribotimidin (namesto deoksiriboze vezana riboza)
- psevdouridin (riboza ni povezana z NH skupino ampak je vezana na mesto 5 uracila)
- dihidrouridin (prišlo je do redukcije in imamo reduciran uridin)

ZORENJE PRIMARNEGA PREPISA rRNA PRI PROKARIONTIH

Tako prokariontski kot evkariontski organizmi vsebujejo več zapisov, ki sledijo eden za drugim, in se prepišejo v ribosomalno RNA. Na tem primarnem zapisu so področja, ki kodirajo ribosomalno RNA - ta področja so na vseh genih enaka. Med temi področji pa so še nekatera področja - ta lahko variirajo pri različnih genih.

Pri prokariontih je med zapisom za 16S in 23S ribosomalno RNA zapis za transportno RNA. Različni geni, ki vsebujejo zapis za preribosomalno RNA, imajo lahko zapise za različne transportne RNA. Poleg tega nekateri geni vsebujejo zapis za dve različni transportni RNA. Po primarnem prepisu začnejo potekati modifikacije, zelo pogoste so metilacije baz, lahko se metilirajo tudi sladkorji. Dogajajo se pretvorbe uridinov v dihidrouridin in psevdouridin. Po modifikacijah baz in (delno) riboz pa pride do endonukleazne cepitve, pri katerih sodelujejo različne RNaze - RNaza P je ribocim, ki katalitsko funkcijo pri prokariontih izvaja s svojim RNA delom (proteinski del tega ribocima je zgolj zaščita za RNA). Po teh cepitvah nastanejo intermediati, pri teh intermediatih pa bodo eksoribonukleaze odstranile še dele na krajih - iz tega bomo dobili zrele rRNA in specifične tRNA.

Torej: metilacija -> endonukleazna cepitev -> eksonukleazna cepitev -> rRNA in tRNA

ZORENJE PRIMARNEGA PREPISA rRNA PRI VRETNČARJIH

Celoten proces pri prokariotih poteka v citoplazmi - pri evkariontskih organizmih pa imamo več polimeraz RNA, ki so specializirane za različne vrste prepisov, vse pa se nahajajo v jedru (polimeraza I, ki omogoča sintezo rRNA, se nahaja v jedrcu). Da se pri evkariontskih organizmih omogoči relativno hitro nastajanje ribosomov proces sinteze rRNA poteka istočasno kot proces sestavljanja ribosomov .

V **preribosomalnem kompleksu** imamo primarni prepis, poleg tega še ribosomalne proteine in male nuklearne RNA. Nekateri proteini imajo encimsko aktivnost in so z malo nukleolarno RNA povezani v male nukleolarne ribonukleoproteine.

Najprej se začnejo modifikacije baz. Pri teh veliko sodelujejo mali nukleolarni ribonukleoproteini. Ko te modifikacije potečejo začnejo delovati endonukleaze - v tem primeru samo ena, ki bo cepila tako, da bo lahko 18S rRNA prešla v **preribosomalno malo enoto**, medtem ko preostanek (5,8S in 28S) bosta povezani v **preribosomalno veliko podenoto**. Po tem delujejo pri mali podenoti še eksonukleaze, pri veliki pa še eksonukleaze IN endonukleaze. Poleg tega se bo v veliko podenoto priključila še tretja ribosomalna RNA, ki se je sintetizirala s polimerazo III.

Po teh cepitvah in modifikacijah imamo v zrelih ribosomalnih podenotah vse proteine, značilne za te podenote, poleg tega pa še funkcionalne ribosomalne RNA.

Omenili smo male nukleolarne RNA - **snoRNA** (small nucleolar RNA). Te RNA imajo v svoji strukturi področja, ki so komplementarna substratu - to je ribosomalna RNA. Strukturi se povežeta in tako snoRNA omogoči, da se bo na specifičnem mestu tvoril psevdouridin.

Nastanek funkcionalnih tRNA

Večina organizmov (pro in evkariontskih) lahko sintetizira od 50 do 60 različnih tRNA. Pri evkariontskih organizmih so lahko primarni zapisi tudi takšni, da vsebujejo zapis za dve transportni RNA. Pri vseh organizmih potekajo zelo podobne modifikacije, predvsem gre za to, da se primarni prepis skrajša na 3' in 5' koncu. Poleg tega se pri nekaterih prokariotnih in pri vseh evkariontskih doda tudi specifično nukleotidno zaporedje - CCA - kamor se bo v toku sinteze proteinov vezala aminokislina.

Skrajšanje primarnega prepisa poteka na 3' in 5' koncu. Na 5' deluje endonukleaza, na 3' pa eksonukleaza, med katerimi je tudi RNaza D. Po tem skrajšanju pride do modifikacije baz (metilacije, deaminacije, redukcije, tvorba pseudouridina). CCA konec doda tRNA nukleotidil-transferaza. Ta encim ima tri aktivna mesta; na dva se lahko vežeta citidinska trifosfata (CTP), na enega pa adenzinski trifosfat (ATP). Encim je sposoben v specifičnem vrstem redu vezati te tri nukleotide. Ta reakcija poteče pri vseh evkariontskih in nekaterih prokariotnih organizmih. Pri nekaterih evkariontskih tRNA se nahaja tudi intron, ki se mora izrezati. Za proces izrezovanja tega introna pa se potrebuje tudi energija; za izrezovanje poskrbi encimski sistem, ki ima endonukleazno in ligazno aktivnost (ligaze za procese potrebujejo energijo!)

Predavanje 5; 13. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

SINTEZA PROTEINOV - TRANSLACIJA

Sinteza proteinov je zelo komplicirana in energijsko zahtevna.

Genetski kod

Trije nukleotidi skupaj omogočajo 64 variant kombinacij. Na ta način se je razvil genetski kod. 61 kodonov ima informacijo za aminokislino, trije pa so taki, ki so signal, da se ustavi sinteza proteinov (stop kodoni). Značilnost je tudi to, da se sinteza vedno začne z metioninom, ki ima samo en kodon (AUG).

Genetski kod je degeneriran, saj za različne aminokislino obstaja različno število kodonov. Največ je takih, kjer sta za določeno aminokislino na voljo dva različna kodona.

Genetski kod je skoraj univerzalen - to pomeni, da so pri višjih evkariontih za aminokislino isti kodoni. Izjeme so mitohondrijski genetski zapisi in zapisi v kloroplastih.

Transportne RNA

tRNA ima adaptorsko vlogo pri sintezi proteinov. Ima ročico, kjer se bo vezala aminokislino in pa antikodonsko ročico, ki je komplementarna kodonu na informacijski RNA. Adaptor je zato, ker na osnovi antikodona se veže na mRNA, hkrati pa prinese še aminokislino. Sposobna je torej prevajati nukleotidno zaporedje v aminokislinsko zaporedje. Sta še dve ročici, ki pripomoreta k specifični tridimenzionalni strukturi in sta sposobni interakcije z RNA v večji podenoti ribosoma.

Antikodon in kodon v mRNA se povežeta antiparalelno, vendar se ne povežejo vsi trije nukleotidi po principu komplementarnosti; če bi se, bi bil proces prepočasen. Pri sintezi proteinov se uporablja 32 tRNA - 31 za aminokislino, ki se vgrajujejo vzdolž verige, in eno, ki se veže na prvi kodon informacijske RNA (kodon za metionin).

Prvi nukleotid na antikodonu določi, s koliko nukleotidi na kodonu se lahko poveže. Če je na prvem mestu citozin, se bo lahko povezal samo z gvaninom. Če pa je na prvem mestu uridin ali gvanin, se bo tak antikodon lahko povezal z dvema kodoni. Kadar pa je inozinski nukleotid se lahko poveže s tremi različnimi nukleotidi na kodonu. To je pomembno tudi zato, ker če bi se en nukleotid antikodona lahko povezal samo z enim specifičnim na kodonu, bi potrebovali za 61 kodonov 61 tRNA (imamo pa jih 31), zato je pomembno, da lahko ena tRNA 'oskrbi' več različnih kodonov, ki kodirajo isto aminokislino.

Samo na tretjem mestu kodona in prvem mestu antikodona ni potrebe po vezavi po principu komplementarnosti - ostali dve bazi **se morata povezati po principu komplementarnosti**.

Aktivacija aminokislino

Ko se bo tvorila aminoacil-tRNA bo lahko služila za sintezo proteinov. Ta reakcija je dvostopenjska. Prisotna sta dva tipa (razreda) sintetaz. Te sintetaze se med seboj razlikujejo tako po terciarni strukturi kot tudi po mehanizmu reakcije, ki jo katalizirajo. Za to reakcijo je potrebna energija - ATP se cepi v AMP in pirofosfat. Za vse te reakcije pravimo, da se uporabita dva ATPja; zato, ker za regeneracijo AMPja sta potrebna dva ATPja

Mehanizem sinteze aminoacil-tRNA

Reagirata aminokislina in ATP. V prvi stopnji se tvori anhidridna vez med AMP in aminokislino, odcepi se pirofosfat - nastane aminoacil-AMP. Nadalje en razred (skupina) sintetaz omogoči, da

se aminokislina z estersko vezjo veže s hidroksilno skupino na mesto 2' riboze. Drugi razred sintetaz pa omogoči povezavo aminokislina s hidroksilno skupino na 3' riboze. Odcepil se bo AMP in dobili bomo aminoacil-tRNA, kjer je aminokislina vezana z estersko vezjo. Če se veže na mesto 2' se potem s transesterifikacijo spremeni v drugo obliko, da je vezana na mesto 3'; aminokislina je torej vezana na ribozo adenozijskega nukleotida na 3' koncu.

Postavlja se vprašanje, kako sintetaza lahko poveže specifično aminokislino na specifično tRNA. Ko enkrat aminoacil-tRNA zapusti sintetazo ni več nobenega mehanizma, ki bi lahko prepoznal napako v primeru vezave napačne aminokislina. Študije so pokazale, da so sintetaze specifične za aminokislina in prepoznajo tudi tRNA, ki ima že vezano aminokislino in so sposobne prepoznati, če se je vezala nepravilna aminokislina. To pomeni, da imajo filter na ravni aminokislin in tudi na ravni transportnih RNA.

Filter na ravni aminokislin je že vezava same aminokislina na aktivno mesto. Ta se je najprej povezala z AMP. Sintetaze imajo dodatno mesto, kjer delajo selekcijo med aminokislinami, ki so vezane na AMP. Za vsako aminokislino je specifična sintetaza - obstaja torej 20 različnih sintetaz.

Filter na ravni transportnih RNA pa je tisto mesto, kjer se bo aminokislina prenesla na tRNA. Tu ni več specifičnosti za aminokislino ampak za njej odgovarjajočo transportno RNA. V primeru vezave neodgovarjajoče aminokislina je encim sposoben odcepiti nepravilno vezano aminokislino.

Pri prokariotih se sinteza začne z **N-formilmetionil-tRNA**. Celoten sistem ima dva filtra - en filter so bile sintetaze. Najprej se z sintetazo veže metionin na tRNA, ki je specifična za formilmetionin. Potem se s transformilazo, ki potrebuje kofaktor formiltetrahidrofolat, metionin spremeni v N-formilmetionin. Tudi encim transformilaza je specifičen - to je torej drugi filter: za metionin imamo dve transportni RNA. Sintetaza mora vezati metionin na tisto tRNA, ki ga bo dodala na prvi kodon. Če je to pravilna vezava bo transformilaza sposobna tvoriti formilmetionil. Če pa se metionin veže na drugo tRNA (tisto, ki omogoča vključevanje metionina **znotraj** verige), potem transformilaza ne bo izvršila reakcije.

18. 10. 2011

V ribosomu, kjer se sintetizirajo proteini, se lahko preveri samo povezava kodon-antikodon. Pri sintezi proteinov, podobno kot pri ostalih procesih, ki smo jih spoznavali, sodelujejo različni dejavniki, ki zagotavljajo, da sinteza poteka. Že pri sami iniciaciji sinteze (tvorbi iniciacijskega kompleksa) pri evkariontih sodeluje najmanj 9 iniciacijskih faktorjev.

Dejavniki iniciacije translacije

Pri **prokariotih** določeni preprečujejo da bi se tRNA narobe vezal, povečajo specifičnost določenih mest na ribosomih in prepreči, da bi se podenoti ribosoma prehitro povezali.

Pri **evkariontih** pa ti dejavniki na eni strani interagirajo z malo ribosomalno podenoto, poleg tega pa so sposobni interakcije s kapo in poli-A vezavnimi proteini. Imajo tudi helikazno aktivnost (ker se mora porušiti struktura mRNA). Eden teh dejavnikov pregleduje informacijsko RNA tako, da najde začetni metioninski kodon. Ta kodon se mora vezati na specifično mesto ribosoma.

Tvorba iniciacijskega kompleksa pri prokariontih

Proces sestavljanja kompleksa se začne na mali podenoti, ki ima aminoacilno (A) mesto in peptidilno mesto (P). Prvi dejavnik se veže na aminoacilno mesto in preprečuje, da bi se prva aminokislina vezala na aminoacilno mesto; drugi dejavnik pa preprečuje prehitro vezavo velike podenote z malo.

Pride do povezave aminoacil-tRNA z iniciacijskim dejavnikom, ki ima vezan ATP. Prva aminoacil-tRNA se veže na peptidilno mesto. To je **edina** aminoacil-tRNA, ki se v toku sinteze veže na peptidilno mesto. Ta dejavnik z vezanim GTPjem omogoči in pospeši vezavo prve aminokislinske tRNA; to je pri prokariontih formil-metionil-tRNA (pri evkariontih pa je to metionil-tRNA). Na ta način se tvori iniciacijski kompleks. V njem vidimo AUG kodon, ki kodira metionin in je na peptidilnem mestu. Aminoacilno mesto je prosto, poleg tega je v večini še mesto E (exit), na tem mestu izstopajo v toku sinteze proteinov transportne RNA, ki nimajo več vezane aminokislinske. Tega mesta evkariontski organizmi nimajo!

Kako je možno, da se je mRNA namestila na tak način, da je začetni kodon na peptidilnem mestu? Pravilno namestitev, poleg iniciacijskih dejavnikov, omogoča tudi specifično nukleotidno zaporedje, ki se pri prokariontskih mRNA nahaja pred začetnim AUG kodonom. To zaporedje je bogato s purini in se po principu komplementarnosti poveže s 3' koncem 16S ribosomalne RNA.

Tvorba iniciacijskega kompleksa pri evkariontih

Tvorba iniciacijskega kompleksa je edina stopnja v sintezi proteinov, kjer so velike razlike med evkariontskimi in prokariontskimi organizmi.

Za uspešno sestavljanje iniciacijskega kompleksa sta pomembna tako kapa kot tudi poli-A rep; ko se začne kompleks sestavljati se nanjo vežejo iniciacijski dejavniki in omogočijo, da se mRNA pravilno namesti na ribosom. Tiste mRNA, ki so izgubile kapo ali preveč skrajšale svoj poli-A rep ne morejo služiti kot matrica za sintezo proteinov in se bodo razgradile, ker se ne bo mogel sestaviti iniciacijski kompleks.

Te iniciacijski dejavniki imajo tudi helikazno aktivnost in pa funkcijo, da pregledujejo mRNA in poiščejo začetni metioninski kodon. Sposobni so tudi interakcije med seboj in z malo ribosomalno podenoto.

STOPNJE ELONGACIJE PRI PROKARIONTIH

1. stopnja - vezava druge aminokislinske

mRNA je na ribosomu pravilno postavljena takrat, ko je na P mestu začetni kodon (AUG) in se tja veže prva aminoacil-tRNA z metioninom. Sledi elongacija.

Naslednja aminoacil-tRNA je vezana z elongacijskim dejavnikom, ki ima vezan GTP. GTP se hidrolizira v GDP, ta pa oddisociira in se regenerira (lahko se ponovno veže z aminoacil-tRNA). Hidroliza GTPja v tem primeru skrbi za zadostno hitrost sinteze, na drugi strani pa za samo natančnost vezave oz. procesa na ravni povezave kodon-antikodon.

Ribosomi imajo torej sposobnost, da odcepijo aminoacil-tRNA v primeru, da vezava kodon-antikodon ni komplementarna.

2. stopnja - tvorba peptidne vezi

Pri tvorbi same peptidne vezi sodeluje peptidil transferaza. Za tvorbo ni potrebna nobena

dodatna energija, ker je aminokislina že bila aktivirana. Pri tem procesu gre za to, da se aminoacil, ki je bil vezan na tRNA, povezan s peptidilnim mestom, prenese na amino skupino ostanka aminokislina, ki je vezana na transportno RNA, ki se je povezala na aminoacilno mesto. Pri tem deluje peptidiltransferaza, ki torej prenese aminoacil iz prve aminokislina v peptidu na drugo aminokislino v peptidu. Ko je prišlo do te povezave sta tRNA, ki je vezana na P mestu in tRNA, ki je vezana na A mestu, v neki hibridni povezavi, saj se dipeptidil tRNA, ki je vezana na A mestu, premaknila delno na P mesto; aminokislina, ki je vezana na P mestu, pa se je pomaknila nekoliko proti mestu izhoda (E mestu).

3. stopnja - translokacija

Tu sodeluje še en dejavnik, ki ima spet vezan GTP. Ta lahko interagira z A mestom in na nek način 'porine' dipeptidil tRNA, ki je bila vezana na A mestu, na P mesto. Energija, ki se v tem primeru sprosti pri hidrolizi GTPja pa je potrebna za premik ribosoma. Ribosom se vedno pomika s 5' proti 3' konca mRNA.

Proces se ponavlja - naslednja aminokislina se bo spet vezala na aminoacilno mesto in tako naprej, dokler ne pridemo do zaključka sinteze.

4. stopnja - zaključek sinteze

Sodelujejo terminacijski ali sprostitveni dejavniki. Njihova funkcija je hidroliza esterske vezi med tRNA in poslednjo aminokislino tako, da se sprosti peptid (protein). Z drugimi dejavniki pa je omogočena disociacija podenot in sprostitve tRNA in mRNA.

Če se v celici zgodi takšna mutacija, da je mutiran stop kodon, je to smrtno za celico, ker povzroči ogromno število napak.

Zaključek sinteze proteinov pri evkariontih

Razlika je v tem, da se pri evkariontskem procesu porablja energija GTPja.

Model sinteze proteinov s polisomi pri evkariontih

Pri evkariontih lahko proteini sintetizirajo v **polisomih** - to pomeni, da je na informacijsko RNA vezanih več ribosomov, kar omogoča, da sinteza hitreje poteka. Ko je določen del mRNA že prepisan in je prost kodon za metionin in nekaj nadaljnjih kodonov, takrat se lahko že veže naslednji ribosom in je pospešena sinteza proteinov.

INHIBITORJI PROTEINSKE SINTEZE

Streptomycin, neomicin, gentamicin, tetraciklin, kiromicin - uporabljajo se pri bakterijskih vnetjih. Delujejo na različne načine; tetraciklin se veže na A mesto v ribosomu, tako da se sinteza ustavi; kiromicin deluje na elongacijski dejavnik in zaradi tega bo prišlo do inhibicije elongacijskega faktorja iz ribosoma, posledica bo konec sinteze proteinov.

Zanimiv je **puromicin**, ta deluje na prokariote in evkarionte, torej ga ne smemo uporabljati na človeku ob infekciji. Po strukturi je podoben transportni RNA; takšni, da ima možnost vezave peptida, ki se je že sintetiziral. Ta peptid se veže na puromicin, vendar pa ker tam ni esterske vezi, se celoten kompleks sprosti iz ribosoma.

Imamo tudi inhibitorje, ki inhibirajo peptidiltransferaze, npr. kloramfenikol, ki pa ne deluje le na prokariote ampak tudi na sintezo proteinov v mitohondrijih.

Cikloheksimid se uporablja za eksperimentalne namene, ko želimo inhibirati sintezo proteinov pri evkariontih.

Difterija toksin je bakterijski toksin, katerega ena podenota omogoči ADP ribozilacijo elongacijskega dejavnika 2 (dejavnik, ki omogoči translokacijo ribosoma).

Ricin se nahaja v semenih strupene rastline. Poteče depurinacija - odcepitev adenina v ribosomalni RNA, posledica je inaktivacija ribosoma.

Alfa-sarcin je tudi glivni strup - cepi rRNA v veliki podenoti ribosoma.

Inhibitorji so uporabni kot zdravila takrat, ko delujejo na transkripcijo prokariontov.

Predavanje 6; 18. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

KO- IN POTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE PROTEINOV

Ne morejo se vsi proteini po sintezi sami od sebe zviti v pravilno terciarno in kvartarno strukturo. Pomagajo jim lahko drugi proteini, npr **šaperoni**, ki se vežejo na proteine in omogočijo pravilno zvitje.

Modifikacije, ki se dogajajo, so pomembne zaradi več razlogov. Eden je funkcionalnost proteinov, poleg tega za transport iz celic, vgrajevanje proteinov v membrane, spremeni pa se lahko tudi aktivnost in stabilnost teh proteinov.

Proteini se večinoma sintetizirajo na granularnem endoplazemskem retikulumu - da ta sinteza poteče pa se mora v citosolu najprej sintetizirati signalni peptid. Ta nima specifičnega aminokislinskega zaporedja, ima pa aminokislino z nekimi skupnimi značilnostmi - hidrofobnost, hidrofilnost, pozitivni naboj.

Na ribosom se veže SRP (signal recognition particle - signal prepoznavni protein); kompleks ribosoma in mRNA se premakne na membrano endoplazemskega retikuluma, kjer je receptor za SRP - kompleks se veže in translacija se nadaljuje.

MODIFIKACIJE PROTEINOV V ENDOPLAZMATEM RETIKULUMU

Najprej se mora z endopeptidazo odcepiti signalni peptid. Poleg tega v ER potekajo tudi intra in interpeptidne povezave z disulfidnimi mostički, reakcijo katalizira disulfid izomeraza. Sestavljajo se tudi različne podenote proteina, prihaja do proteolitičnih cepitev in glikozilacij. Te glikozilacije so tiste, ki so zelo obsežne in potekajo tako v ER kot tudi v Golgijevem aparatu.

GLIKOZILACIJE

Začnejo se v ER. N-glikozilacije so pretežno kotranslacijski proces - potekajo takrat, ko protein še ni dokončno sintetiziran. Vplivajo na topnost in stabilnost proteinov.

Imamo različne tipe glikozilacij, saj zahtevajo primerno aminokislino v področju, ki je dostopno encimu. Tip in mesto zavisi tudi od količine in vrste encimov, ki pri tem sodelujejo (glikoziltransferaze), saj je zastopanost teh encimov različno v različnih celicah. Ker je zastopanost teh glikoziltransferaz različna bodo tudi proteini različno glikozilirani v različnih celicah.

Pri **N-glikozilaciji**, ki je predvsem kotranslacijski proces, mora biti v proteinu določeno aminokislinsko zaporedje, npr Asn-X(katerakoli AK; razen prolina ali asparaginske kisline)-Thr(Ser). Potrebujemo torej Asn-X-Thr ali Asn-X-Ser.

O-glikozilacije pa potekajo predvsem v Golgijevem aparatu. Tu ne potrebujemo AK zaporedja, dovolj je, da imamo serin ali treonin.

Specifičnost glikoziltransferaz

Teh encimov je veliko, njihova specifičnost pa je različna. O njej določa monosaharid, ki se bo vezal, pomembna je tudi struktura (zaporedje) akceptorske molekule. Kot akceptorsko molekulo se označuje tisti del oligonukleotida s končnim zaporedjem, ki se je že sintetiziral. To odloča o tem, ali bo glikozilacija še potekla, ali se bo ustavila, ker glikoziltransferaza ne bo našla pravilne akceptorske molekule. Specifičnost pa je tudi v tem, kako bosta dva sladkorja povezana in pa konformacija vezi (alfa ali beta).

Začetek N-glikozilacije v ER

Pri tem sodeluje dolihol, to je izoprenoid in je fosforiliran. N-glikozilacije se vedno začnejo tako, da se najprej vežeta na dolihol dva N-acetilglukozamina, po tem se vežejo manoze in na koncu še glukozne enote. Sladkorji v reakcijo redko vstopijo prosto, ponavadi je na njih vezan GDP ali UDP. Znotraj ER pa se polisaharidni del, ki je sestavljen iz N-acetilglukozaminov, manoz in glukoz, prenese na asparagin. Ta osnoven sladkorni drevesček je znak, da se je protein dovolj glikoliziral, da se prenese v Golgijev aparat, kjer bodo lahko potekle še O-glikozilacije; takrat je protein že dokončno sintetiziran. Kadar pa glikozilaze ne delujejo se bo v ER glikozilacija še nadaljevala.

Dve možnosti sta torej: da se bo na sladkornem jedru, ki se je že sintetiziralo, še nadaljevala glikolizacija v ERju; druga pa je, da se protein prenese v Golgijev aparat kjer se nadaljuje glikolizacija.

Modifikacije pri nastanku funkcionalnega človeškega inzulina

Inzulin se sintetizira v obliki **preproinzulina** v endoplazmatskem retikulumu, kjer se bo že kotranslacijsko odcepil signalni peptid. Poleg tega se bodo tvorili intra in interverzične povezave; ena znotraj alfa verige, dve med alfa in beta verigo, tako dobimo **proinzulin**. Ta se transportira v Golgijev aparat, tam pride še do odcepitve povezovalnega C-peptida, ki je povezoval alfa in beta verigo inzulina. Poleg tega, da se odcepi povezovalen C-peptid, pa pride še do delovanja karboksi peptidaz (to so eksopeptidaze; odcepljajo aminokislino iz C konca proteina).

Kaj je prednost takšne sinteze? Da se obe verigi sintetizirata istočasno je prednost v tem, da se sintetizirata v ekvimolarnih (enakih) količinah - če bi se verigi sintetizirali posebej iz svojih genov bi prišlo do odstopanja. Poleg tega pa C-peptid omogoča tako strukturo preproinzulina, da se med cisteini tvorijo pravilni disulfidni mostički.

Kovalentne modifikacije aminokislinskih ostankov

- fosforilacije; omogočijo jih kinaze, tako se lahko encimi aktivirajo/deaktivirajo
- karboksilacije glutamata; pomen imajo na primer pri dejavnih, vključenih v strjevanje krvi (npr. profimbrin)
- metilacije; metilirani so tudi nekateri lizini v mišičnih proteinih

- acetilacije; predvsem acetilacije lizina (npr. pri histonih)
- ADP-ribosilacije; vezava ADP ribozilnega ostanka na protein in sicer kot donor ADP ribozilnega ostanka služi NAD⁺
- hidroksilacije
- vezava izoprenilnih skupin; v telesu jih dobimo iz intermediatov v sintezi holesterola. Iz izoprenilnih skupin se sintetizira farnezilni ostanek, ki omogoča vgraditev proteinov v membrano.
- vezava prostetičnih skupin, npr. biotina, hema; biotin imajo vezan encimi karboksilaze, hem pa najdemo v hemoglobinu, citokromih p450 in citokromu c.

19. 10. 2011

KO- IN PO-TRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE KOLAGENA

Zapisi za kolagen se nahajajo na različnih kromosomih in so specifični - vsaka tretja aminokislina je glicin (z N-terminalnega proti C-terminalnem koncu sledi **Gly-X-Y**). V eni tretjini primerov je X prolin in Y hidroksiprolin.

Kolagen je ekstracelularni protein. Njegova sinteza se začne v citoplazmi, po tem, ko se sintetizira signalni peptid, pa pride do vezave specifičnega riboproteinskega kompleksa, ki se bo na to signalno sekvenco vezal in s tem ustavil sintezo polipeptida. Sledi transport na ER. Tam se bo sinteza nadaljevala, hkrati pa se bodo vršile najrazličnejše modifikacije. Ko se začne sintetizirati polipeptid je to alfa-veriga kolagena in je v prepro-obliki. Ko pa se odcepi signalni peptid dobimo prokolagenski polipeptid. Takrat se začnejo modifikacije; pri kolagenu predvsem prevladujejo hidroksilacije prolina in lizina. Pri tem se lahko prolin hidroksilira na 3' ali 4' mestu, odgovarjajoča pa so tudi imena encimov, ki pri tem sodelujejo. V ER deluje prolin-3'-hidroksilaza in prolin-4'-hidroksilaza, za lizin pa samo lizin-hidroksilaza.

Te hidroksilacije imajo ključen pomen za nadaljno tvorbo kolagenskih vlaken. Hidroksilacije prolina so odgovorne za stabilnost strukture, hidroksilacije lizina pa omogočajo interverzične povezave med peptidi in hkrati omogočajo še O-glikozilacijo. Poleg O-glikozilacije lahko potečejo tudi N-glikozilacije, ki potekajo na asparaginih.

V ER iz treh prokolagenskih polipeptidov nastane **kolagenska molekula**. Zvijati se začne iz C terminalnega konca, potem pa se začne zvijati še na N-terminalnem področju. Nastane zvitje (trojni heliks); tako nastane **prokolagenska molekula**. Ta preide v Golgijev aparat, kjer potečejo še nekatere modifikacije, potem pa se s sekretornimi vezikli prenese v zunajcelični prostor. Tam iz prokolagenskih molekul nastanejo **kolagenske molekule** in sicer tako, da se s peptidazami odcepita globularni področji na C in N koncu prokolagenske molekule. Tako nastane **kolagenski trojni heliks**, ki se sestavi v fibrile. Pri tem sodeluje še encim lizil-oksidadaza, ki omogoči reakcijo nastanka reaktivnih aldehydskih skupin na lizinu, kar omogoča povezavo kolagenskih molekul med seboj v fibrile.

Za hidroksilacijo prolina ali lizina potrebujemo še železove ione in vitamin C. Reakcija:

AK (lizin/prolin) + alfa-ketoglutarat + kisik ----> OH-AK + sukcinat + ogljikov dioksid

Ob pomanjkanju vitamina C se razvije skorbut.

URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV

Imamo gene, ki se konstitutivno izražajo v več ali manj vseh celicah. Njihovo izražanje se razlikuje zelo malo. V tem primeru sodelujejo osnovni transkripcijski dejavniki, ki imajo lahko do nekaterih zaporedij v promotorju večjo afiniteto, do drugih manjšo.

Druga vrsta genov pa je tako, katerih izražanje je inducirano, ali pa pride do zmanjšanja njihovega izražanja. Pri teh genih sodelujejo tudi specifični regulatorji, ki bodisi aktivirajo in pospešijo izražanje (vplivajo na osnovne transkripcijske dejavnike, pri prokariontih na polimerazo), drugi pa delujejo na ta način, da upočasnijo oz. ustavijo izražanje specifičnega gena.

Uravnavanje izražanja genov pri prokariontskih organizmih je v glavnem na ravni transkripcije - pri evkariontskih pa imamo več ravni, kjer se uravnava izražanje genov.

Značilni prokariontski operon

(operon = zapis, ki omogoča, da se bo RNA sintetizirala, torej informativni geni, področja, kamor se lahko vežejo represorji, itd.)

Organizacija genov za prepis je takšna, da imamo enoto prepisa, potem mesto operatorja (tja se lahko veže represor), potem imamo promotorsko mesto in vezavno mesto za aktivatorje. Možnosti negativne modulacije sta dve; ena je negativno uravnavanje nastajanja iniciacijskega kompleksa (ta pri prokariontih prevladuje) - tisti geni, ki se ne izražajo, imajo na operatorju vezan represor, zato se gen ne izraža. Ko pa pride neki molekularni signal (efektor), takrat represor oddisociira iz operatorja in lahko se sintetizira mRNA.

Druga možnost - za vezavo represorja je potrebna signalna molekula. Konformacija signalne molekule in represorja je taka, da se lahko veže na operator. Ko pa signalna molekula operator zapusti, takrat pride do konformacijske spremembe represorja in represor oddisociira. Takrat pride do izražanja mRNA.

Pozitivno uravnavanje iniciacije transkripcije deluje na istem principu, samo da ne govorimo o represorju ampak o aktivatorju. Spet imamo lahko bodisi samo aktivator, bodisi aktivator, ki potrebuje signalno molekulo.

Prokarionti imajo zelo preprost način uravnavanja izražanja genov, ker se morajo bakterije izjemno hitro prilagajati spremembam v okolju. Primer je razgradnja laktoze. Preferenčno bakterije kot vir energije uporabljajo glukozo. Če primankuje glukoze pa začnejo namesto glukoze uporabljati laktozo - omogočijo izražanje encimov, ki bodo lahko razgrajevali laktozo in na ta način dobili galaktozo in glukozo.

Laktozni operon E. coli

Ima **represor**, gen za **beta-galaktozidazo** (cepi laktozo v galaktozo in glukozo, včasih pa tudi samo spremeni konformacijo vezi v laktozi v vez 1-6; temu rečemo **alolaktoza**, ki je signalna molekula), **galaktozid permeazo** (omogoča vstop galaktozidov, tudi laktoze) in **tiogalaktozid**

transacetilazo, ki ima detoksifikacijsko aktivnost, kadar v celico vstopajo toksični galaktozidi, in z razgradnjo laktoze nima nič.

Negativno uravnavanje izražanja laktoznega operona

Dokler je represor vezan se mRNA za encime ne bo izražala. Ko se veže signalna molekula (v tem primeru alolaktoza) kompleks represorja in signalne molekule oddisociira in pride do izražanje genov na operonu.

Druga situacija pa je, kadar nimamo popolnega pomanjkanja glukoze, je pa prisotna v nizkih koncentracijah, ki so nezadostne za energijske potrebe bakterij. V teh primerih gre za posebno vrsto regulacije - **katabolita represija**. Na laktoznem operonu je vezan laktozni represor; na istem operonu pa je tudi mesto, kamor se lahko veže protein, kadar je nizka koncentracija glukoze (posledično visoka koncentracija cAMP; visoka je tudi koncentracija laktoze). Ker je visoka koncentracija laktoze se bo zaradi alolaktoze represor odcepil, hkrati se bo cAMP vezal na pozitivni regulatorni element in prišlo bo do izražanja. Kadar pa imamo visoko koncentracijo glukoze in laktoze pa bo lahko represor oddisociiral, vendar pa ker je veliko glukoze in zato malo cAMP, ne bo prišlo do močnega izražanja tega gena.

URAVNAVANJE IZRAŽANJE GENOV PRI EVKARIONTIH

Pri evkariontih gre v večini za pozitivno uravnavanje. Obstaja tudi več ravni izražanja genov kot pri prokariontih:

1. epigenetski nadzor izražanja genov (dedovan način uravnavanja izražanja genov, potekajo histonske modifikacije, remodeliranje kromatina, demetilacija promotorskih področij)
2. iniciacija sinteze mRNA
3. ko- in potranskripcijske modifikacije mRNA
4. stabilnost mRNA
5. prenos mRNA iz jedra
6. iniciacija sinteze proteinov

1. epigenetski nadzor

Na histonih potekajo acetilacije in metilacije lizina (mono-metil, dimetil in trimetil-lizin), ADP ribozilacije glutamata, fosforilacije serina in treonina.

Demetilacija - kadar je DNA demetilirana, takrat se geni lahko prepisujejo.

2. iniciacija sinteze mRNA

Gre za specifična nukleotidna zaporedja, ki lahko olajšajo vezavo posameznih iniciacijskih dejavnikov in omogočijo transkripcijo. Primer je regulacija sinteze LDL receptorja. Ta gen ima promotor, kamor se bodo vezali osnovni transkripcijski dejavniki. Ima tudi druga nukleotidna zaporedja, kamor se vežejo regulatorni proteini in so aktivatorji. Je pa še eno zaporedje, ki se imenuje 'element, ki odgovarja na sterole' (sterole response element - **SRE**). Aktivator, ki se veže na SRE ni vedno prisoten v celicah.

Ko je zadosti holesterola v celicah je protein, ki se bo vezal na SRE, v prekursorški obliki v membrani endoplazmatskega retikuluma. Poleg njega je v membrani tudi aktivatorski protein. Ta protein je neke vrste senzor za koncentracijo holesterola v celici. Ko se bo ta znižala bo prišlo

do transporta tega prekursorskega kompleksa v cis Golgijev aparat. Tam delujejo encimi (endopeptidaze), ki odcepijo eno področje prekursorskega proteina, ki bo prešel v jedro in se na ta način lahko vezal na sterol odgovorni element. Zapis za receptor se bo začel izražati. Poleg osnovnih transkripcijskih dejavnikov torej potrebujemo še polimerazo in aktivatorje, da se bo gen za LDL-receptorje izražal.

3. ko- in potranskripcijske modifikacije mRNA

V različnih tkivih gre za različne načine dodajanja poli-A repa in izrezovanja intronov.

Primer: imamo primarni transkript. V tiroidni žlezi se bo na nekem specifičnem mestu dodal poli-A rep, izrazil se bo hormon kalcitonin (hormon, ki znižuje konc. kalcija in fosfata v krvi; pomembna funkcija pri razvoju kosti). V perifernih in centralnih nevronih pa se bo prepoznal signal za poliadenilacijo, ki je na koncu šestega eksona. V tem primeru se bo en ekson izrezal in zrela mRNA bo drugačna, kot pri tiroidni žlezi.

Tudi sistem alternativne izbire poliadenilacijskega mesta in izrezovanja intronov lahko uravnava izražanje genov.

Potranskripcijska modifikacija baze - ko pride do deaminacije citozina v uridin (v črevesju) povzroči uvedbo stop kodona in sintezo proteinske komponente hilomikronov; v jetrih pa na istem primarnem transkriptu do deaminacije ne pride, sintetizira se proteinska komponenta LDL.

4. stabilnost mRNA

Zakaj se stabilnost RNA molekul lahko zmanjša (zakaj se razgrajujejo)? Rekli smo, da kapa in poli-A rep ščitita mRNA pred razgradnjo. Tik pred začetkom translacije pa sta kapa in poli-A rep nekaj časa izpostavljena, ker še nimata vezanih določenih proteinov. Tako da pri evkariontih odcepljanje poli-A repa in kape ves čas v majhnih intervalih deluje. Ko se enkrat skrajša do neke mere bo potekla intenzivna razgradnja.

Razgradnja pri sesalcih vedno poteka v smeri 3' proti 5', v smeri poli-A repa. Ena možnost je, da deluje deadenilat nukleaza (odstranjuje poli-A rep), lahko deluje tudi endonukleaza (cepi v bližini poli-A repa). Ta procesa v celici vrši **eksosom** - citosolni kompleks RNaz, ki razgrajujejo mRNA. K procesu odstranitve poli-A repa pa prispevajo tudi specifični nukleotidi, ki so na 3' neprevedljivi regiji mRNA.

Primer: transferin (za prenašanje železa). Ko je železa v celici veliko, ni potrebe po transferinskem receptorju. mRNA je v 3' neprevedljivem področju zaporedja bogata z AU-ji, ki so sposobni tvoriti lasnice. Tja se bodo vezali proteini, ki stimulirajo razgradnjo. Ko pa je nizka koncentracija železa pa pride do aktivacije specifičnih proteinov, ki prepoznajo te zanke, se vežejo nanje in tako preprečujejo razgradnjo mRNA. Ob primankovanju železa se bo torej receptor sintetiziral, da bo lahko celica sprejemala železo, ki je potrebno za sintezo hema in mnoge druge procese.

5. prenos mRNA v jedro

6. iniciacija sinteze proteinov

Primer: feritin; protein, ki znotraj celice lahko reverzibilno veže železove ione. Pri feritinu gre za regulacijo sestavljanja iniciacijskega kompleksa. Na 5' koncu tega proteina so specifične strukture. Če je v celici veliko železa, ki se bo moralo na nek način shraniti, te strukture ne

vplivajo na tvorbo iniciacijskega kompleksa, saj jih lahko helikaza poruši in iniciacijski dejavniki najdejo začetni kodon.. Kadar pa je koncentracija železa nizka, takrat ni potrebe, da bi se mRNA prepisovala v protein (sinteza proteina je energijsko zelo drag proces!). V tem primeru se aktivirajo specifični proteini, ki te zanke prepoznajo, se nanje vežejo in na ta način preprečijo helikazno funkcijo iniciacijskih dejavnikov - ne morejo porušiti zank in poiskati start kodon. Tako je translacija zavrta.

URAVNAVANJE SINTEZE GLOBINSKIH MOLEKUL HEMOGLOBINA S HEMOM

Če ni hema, potem ni potrebe po sintezi globinskih molekul hemoglobina. Kadar je prisoten hem, takrat je omogočena vezava metionil-tRNA. Pri iniciaciji sodelujejo trije dejavniki - dva imata funkcijo predvsem kar se ribosoma tiče, tretji pa se poveže z metionil-tRNA in z njo prihaja do metioninskega kodona. Pri tem pride do hidrolize GTP-ja v GDP. Ta GDP se mora pretvoriti nazaj v GTP, pri iniciaciji **to pretvorbo katalizira kinaza, ki je odvisna od hema.**

GLAVNE RAZLIKE URAVNAVANJA IZRAŽANJA GENOV PRI EVKARIONTIH V PRIMERJAVI S PROKARIONTI

- pri evkariontih je več ravni, prva je že dostopnost promotorjev
- prevladuje pozitivno uravnavanje
- sodeluje več kompleksov
- poteka na večih ravneh

Predavanje 8; 20. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

OSNOVE GENSKEGA INŽENIRSTVA - TEHNIKE REKOMBINANTNE DNA

Opomba: Zapiski tega poglavja so meni osebno delovali precej zmedeno. Seveda krivim profesoričino predavanje, ne mojega zapisovanja. Predlagam, da si pred izpitom snov o vektorjih za lažje razumevanje preberete v Lehningerju, če se vam zdi, da tu ni dovolj jasno.

Rekombinantne DNA pripravimo tako, da dele (fragmente) DNA povežemo v novo zaporedje. Tem molekulam rečemo, da so rekombinantne.

Z **genskim inženirstvom** lahko dosežemo:

- izolacija, pomnoževanje in analiza genov in drugih nukleotidnih zaporedij
- prenos genov iz enega organizma v drugega (gostiteljskega)
- določitev lege genov na kromosomih
- sinteza rekombinantnih proteinov (to so proteini, ki se v nekem gostiteljskem organizmu izražajo, njihov izvor pa je v drugem organizmu)
- diagnoza dednih bolezni

Restriksijski encimi

To so endonukleaze, ki cepijo dvovertižne molekule DNA in prepoznajo specifična nukleotidna zaporedja; to so **palindromi**.

Če beremo nukleotidne zaporedje od 5' proti 3' gre za antiparalelnost (zrcalna slika) nukleotidnega zaporedja obeh vijačnic. Restriksijski encimi se po seboj razlikujejo po tem, koliko nukleotidov prepoznajo, da pride do cepitve (štiri, šest,...). Obstaja tudi večja ali manjša specifičnost. Specifičnost je zelo velika, če so vsi nukleotidi natančno določeni - lahko pa tudi encim ne potrebuje točno določenega encima, ampak npr. samo katerikoli purin/pirimidin. Naslednja stvar, po kateri se encimi razlikujejo, je način cepitve; lahko ostanejo topi, ravni konci (obe verigi sta po cepitvi enako dolgi), drug način pa je, da nastanejo lepljivi konci - gre za to, da je po cepitvi ena veriga daljša od druge.

Odkritje restriksijskih encimov je bil eden od dejavnikov, ki je kasneje omogočil rekombiniranje DNA. Drug encim, ki je prav tako pomemben kot restriksijski encimi, pa je **ligaza DNA**. To so encimi, ki omogočijo zapolnitev vrzeli v eni in drugi verigi DNA po cepitvi z restriksijskimi encimi, ko je ostala vrzel (gap), ki nakazuje mesto, kjer manjka ena esterska vez. Ligaza za delovanje potrebuje energijo v obliki ATP. Ta dva encima sta torej omogočila tvorbo rekombinantne molekule DNA.

Vektorji

V večini primerov gre za molekule DNA, ki so bodisi enoverižne bodisi dvovertižne (prevladujejo dvovertižne). Med seboj se razlikujejo po tem, kateri organizmi so gostitelji oz. v katere organizme te vektorje lahko vnesemo. Poleg tega se razlikujejo po tem, kako velike fragmente tuje DNA bodo lahko prenesli v gostiteljsko celico.

V bakterijske celice lahko vnesemo **plazmide** (krožne dvovertižne molekule DNA), **bakteriofage** (linearne dvovertižne molekule DNA), **kozmid** (rekombinacija med lastnostmi plazmidov in bakteriofagov), **umetni bakterijski kromosom - BAC**. Najmanjši so fragmenti tuje DNA, ki jih lahko v gostiteljske celice prenesejo plazmidi. Večji so bakteriofagi, sledijo kozmidi, največ tuje DNA pa lahko prenese BAC.

Gostiteljske celice so lahko tudi kvasovke. To so primitivni evkariontski organizmi, ki so pri preučevanju replikacije, transkripcije in sinteze proteinov služili kot modelni organizmi. Vanj lahko vnašamo **plazmide**, **BAC** in **YAC** (umetni kromosom kvasovke). V teh organizmih je fragment tuje DNA velik tudi do 1,000,000 baznih parov.

Tretja skupina gostiteljskih celic so sesalske celice oz. tkiva. Kadar gre za celične linije se uporabljajo **plazmidi**, **BAC** in **YAC**.

Vektorji se uporabljajo pri genski terapiji, za popraviljanje genskih defektov. Kadar uporabljamo vektorje za gensko terapijo imamo dva tipa vektorjev - **virusni** (retrovirusi, adenovirusi, adenovirus-assosiated virusi AAV) in **nevirusni** (liposomi, lipopleksi in polipleksi).

Osnovne značilnosti vektorjev

- sposobnost podvajanja - morajo biti sposobni replikacije neodvisne od genoma
- omogočajo selekcijo med gostiteljskimi celicami, ki so sprejele vektor in tiste, v katere se vektor ni vnesel. More obstajati tudi možnost selekcije gostiteljskih celic, ki so sprejele le vektor in tistimi, ki so sprejele rekombinantni vektor
- vsebujejo specifična mesta, ki jih prepoznajo specifični encimi in cepijo točno na tem mestu.

Temu pravilo poliklonsko mesto (restriksijsko mesto).

- nekateri vektorji (ekspresijski) omogočajo še sintezo rekombinantnih proteinov. Te geni morajo imeti možnost za začetek nadzorovane transkripcije - promotor.

Poleg poliklonskega mesta in mesta začetka replikacije imajo vektorji še **seleksijski označevalec**, po katerem bomo vedli, v katerih celicah je. Če je ta seleksijski označevalec AMPR (ampicilin resistance gen), bodo celice s tem označevalcem lahko rastle v ampicilinskem mediju, tiste brez tega seleksijskega označevalca pa ne. Tako bomo ločili med celicami, ki bodo vektor privzele in tistimi, ki ga ne bodo (prevzame jih relativno malo).

Če je vektor ekspresijski ima še promotor, zapis za represor, zapis za del beta galaktozidaze (če govorimo o vektorju, ki ekspresira gen za cepitev laktoze), ampicilinska rezistenca in poliklonsko mesto, ki je v zapisu za del beta galaktozidaze.

Na tem delu bomo vektor cepili, vgradili fragment, transformirali gostiteljske celice in jih prenesli na gojišče. Proces transformacije poteka tako, da celice gostitelja inkubiramo pri 0 stopinj celzija skupaj s plazmidno DNA. Sledijo temperaturni šoki, hiter dvig temp. do 37 – 43 stopinj. Ni jasno zakaj, ampak ob takih pogojih nekatere celice privzamejo plazmidno DNA.

Gojišče bo poleg ampicilina vsebovalo še umetni substrat za beta galaktozidazo in induktor, ki bo onemogočil delovanje represorja. Kadar bo plazmid nerekombinantni bodo kolonije modre, ker se bo ob prisotnosti umetnega substrata in gena sintetizirala spojina, podobna indigu. Kadar pa bo zapis rekombinanten se bo zapis prekinil in kljub prisotni umetnega substrata in umetna signalna molekule, encim ne bo aktiven.

Priprava rekombinantnega plazmida

Cepimo DNA in dobimo fragment, cepimo tudi plazmidni vektor. Sledi ligacija obeh fragmentov in transformacija v gostiteljsko celico. Sledi gojenje celic v nekem mediju (ampicilinu) in zrastle bodo le tiste celice, ki imajo resistenco na ampicilin.

Kako vemo, kateri vektorji so rekombinantni in kateri ne? Na zapisu za del beta galaktozidaze bomo vektor cepili, vgradili fragment in jih prenesli na gojišče. To gojišče bo poleg ampicilina vsebovalo še umetni substrat za beta galaktozidazo in induktor, ki bo onemogočil delovanje represorja. Kadar bo plazmid nerekombinantni ne bo prišlo do cepitve, gen bo neokrnjen in se bo lahko prepisoval, zato se bo signalizirala spojina, podobna indigu - kolonije bodo modre. Kadar pa bo zapis rekombinanten se bo zapis prekinil in kljub prisotnosti umetnega substrata in umetna signalna molekule, encim ne bo aktiven; kolonije bodo brezbarvne (bele).

Uporaba plazmidnih vektorjev

S plazmidnimi vektorji so sintetizirali inzulin, rastni hormon, cepiva proti hepatitisu B, eritropoetin, interferone, faktor VIII (za hemofilike).

cDNA molekule so molekule, ki so komplementarne informacijski mRNA. Evkariontske mRNA se lahko ločijo od ostalih na osnovi svojih strukturnih značilnosti - te so poli A rep. Ostale RNA molekule poli A repa nimajo. Da se izolirana RNA molekula lahko prepíše v dvovertično DNA pa potrebujemo encim reverzno transkriptazo. Temu encimu kot matrica služi RNA, potrebuje pa tudi začetni oligonukleotid. Tako s tem encimom najprej pride do hibridne vezave vijačnice RNA-

DNA. Potem RNaza H (encim, ki cepi samo RNA v hibridu z DNA) razdradi RNA verigo in sledi sinteza komplementarne DNA s polimerazo DNA I (to je encim, ki ima 5' 3' eksonukleazno aktivnost).

Te molekule so torej komplementarne celotnemu prepisu mRNA.

PRC - verižna reakcija s polimerazo

S PCR lahko pomnožimo izbrani fragment na genu. Ta je določen z začetnim oligonukleotidom. PCR vedno poteka v treh stopnjah:

1. denaturacija
2. prileganje začetnih oligonukleotidov
3. polimerizacija

Temperature so lahko pri vsaki stopnji različne, lahko pa se izvede proces tudi samo z dvema različnima temperaturama - to dosežemo tako, da izberemo take oligonukleotide, ki se prilegajo na isti temperaturi, pri kateri poteka polimerizacija.

RT-PCR

PCR z reverzno transkriptazo. Začnemo pri mRNA, ki se prepiše v cDNA, nato pa s polimerazo pomnožujemo to. S tem lahko preverimo, ali se neka mRNA izraža ali ne. Lahko pa pogledamo tudi način izražanja (kostitutivno?) s spremljanjem časovnega izražanja, saj ni nujno, da se vsi geni ves čas izražajo (pod nekimi pogoji se lahko izražanje poveča, pod drugimi pa zmanjša - tipični primer so stresni proteini, ki se bodo sintetizirali le v specifičnih pogojih).

Taqman tehnologija - tehnika kvantitativnega PCR v realnem času

Ta tehnika je bolj občutljiva kot običajna RT-PCR. Uporablja se polimeraza DNA, ki ima 5' eksonukleazno aktivnost. Poleg začetnih oligonukleotidov pa se uporabljajo še Taqman sonde, ki se vežejo na področje med obema začetnima oligonukleotidoma - na fragment cDNA, ki se bo pomnoževal. Te sonde so označene s fluorescenčnimi barvili na 5' in na 3' koncu. Barvilo na 5' ima veliko resonančno energijo (reporter), barvilo na 3' pa nizko resonančno energijo (dušilec). Ko sta barvili blizu se energija iz reporterja prenaša na dušilec, tako da fluorescence ne zaznamo. Tekom polimeraze pa se bo barvilo iz reporterja odcepilo (ker poteka polimeraza 5' --> 3') in ker se ne bo več prenašalo na dušilec se z aparaturami lahko zazna fluorescenca. Predpogoj, da lahko uporabimo to tehniko, je da štartamo iz mRNA, ki jo prepišemo v cDNA. To cDNA denaturiramo in na eni strani poteka prileganje začetnih oligonukleotidov in taqman sonde, ki se bo vezala na območje, ki jih oligonukleotida omejujeta.

Detekcija komplementarnih nukleotidnih zaporedij

Pri tehniki **hibridizacije** gre za zaznavanje podobnih ali enakih nukleotidnih zaporedij. Med seboj se povežeta dve enoverižni molekuli nukleinskih kislin. Varianti sta lahko dve; dobimo hibride DNA-DNA (hibridizacija po Southernu), ali pa hibrid RNA-DNA (northern hibridizacija). Hibridizacijske tehnike so se zelo veliko uporabljale, vendar v današnjem času se uporablja ta tehnika le še v primerih, ko gre za velike delecije v genomih.

Pri teh tehnikah gre za dve vrsti molekul - ene so tiste, ki jih preiskujemo, druge pa sonde, s katerimi preiskovalne molekule preiskujemo. Te sonde morajo biti označene, da lahko hibrid prepoznamo.

Določanje nukleotidnih zaporedij

Teh tehnik je veliko, zato število sekvenciranih genomov z leta v leto narašča. Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja poteka tako, da imamo poleg gena, ki ga želimo sekvencirati, v zmesi za PCR še proste deoksiribonukleotide in dideoksiribonukleotide (nimajo OH na mestu 3', zato se ne nadaljuje sinteza v primeru vgraditve dideoksiribonukleotida, saj je ta skupina nujno potrebna za vezavo naslednjega nukleotida). Razmerje med njimi je takšno, da so deoksiribonukleotidi v prebitku, zato se dideoksiribonukleotidi po naključju vgrajujejo. Tako bomo dobili DNA fragmente, ki se bodo po mnogih podvojevanjih razlikovali le v enem nukleotidu v zaporedju. Ker so baze (adenin, gvanin, citozin, timin) označene z različnimi fluorescenčnimi markerji, bomo lahko razbrali zaporedje nukleotidov v DNA.

DNA mikromreže

Gre za več tehnik - RT-PCR, hibridizacija... na mrežah imamo vezane oligonukleotide dolžin do 100 baznih parov. Točno se ve, na katerem mestu je oligonukleotid in na osnovi česa je bil sintetiziran (običajno na osnovi eksonov genov). Če študiramo izražanje genov v rakastem in zdravem tkivu bomo iz enega in drugega tkiva izolirali mRNA in jo prepisali v cDNA - istočasno s prepisovanjem jo bomo tudi označevali. Sledi hibridizacija, pri njej se enoverižne molekule pri visoki ionski jakosti vežejo; potem speremo nespecifično vezane molekule (spiranje poteka pri nižji ionski jakosti kot komplementarna vezava). Rezultat hibridizacije analiziramo v napravah, ki bodo fluorescenco zaznale in videlo se bo, kateri geni so se intenzivneje izražali v rakastih tkivih in kateri v zdravih tkivih.

Prednost teh tehnik je, da lahko ogromno genov analiziramo hkrati. Tehnika je zelo draga.

Predavanje 9; 20. 10. 2011 / Bronislava Črešnar

UPORABA METOD GENSKEGA INŽENIRSTVA V MEDICINI

Diagnostika znanih točkovnih mutacij

Pri srpastih anemijah se ve, da je mutacija v mestu za restrikcijski encim. Ko mutacije ni to mesto prepozna specifičen encim; ko pa mutacija je se to mesto izbriše. Včasih se je uporabljala hibridizacija z genomsko DNA, dandanes pa določamo na ta način, da se z začetnimi oligonukleotidi omeji področje mutacije in pomnoži s PCR. Dobimo fragment kjer, v primeru zdravega gena, restrikcijski encim bo cepil molekulo, v primeru mutacije pa do cepitve ne bo prišlo.

Drugi način pa je ugotavljanje točkovnih mutacij s sekvenčno specifičnim pomnoževanjem. Ta način se lahko uporablja tudi takrat, ko mutacija ni na mestu za restrikcijske encime. Tudi tu se uporablja PCR; začetni oligonukleotidi bodo pripravljene na ta način, da imamo par primerjev, ki se natančno prilega zdravemu alelu. Če se zadnji nukleotid začetnega oligonukleotida zaradi

nekomplementarnosti ne more povezati z matrico polimeraza ne bo mogla delati in ne bo produkta podvojevanja.

Diagnostika delecij in insercij

Insercije in delecije so lahko različnih dolžin. Kadar gre za en ali nekaj nukleotidov se določa nukleotidno zaporedje. Kadar je delecija nekoliko večja (do nekaj 100 baznih parov) se jo določa s tehniko PCR. Kadar pa je ta delecija zelo velika (nekaj 1000 baznih parov) še vedno pride v poštev hibridizacija po Southernu.

DNA prstni odtis se analizira na podlagi področja GATA - to je zaporedje, ki se pri različnih ljudeh nahaja v različnem številu. Svetovna konvencija je določila, da se določa 13 lokusov na različnih kromosomih in fragmenti, ki nastanejo, se ločijo s kapilarno elektroforezo; na ta način se lahko na eni strani identificira krivca kaznivih dejanj ali sorodstvene vezi. Verjetnost, da se bo pri dveh ljudeh pojavil isti vzorec, je izjemno majhna.

Predavanje 10; 25. 10. 2011 / Vita Dolžan

MOLEKULARNA BIOLOGIJA RAKA

Pri raku celice zgubijo možnost kontrole nad celično rastjo, normalne celične mehanizme diferenciacije, apoptoze in staranja. Pridobijo pa sposobnost nekontrolirane proliferacije in invazije v oddaljena tkiva.

Rak je genetska bolezen; le 1 - 2 % je prirojenega, večino nastane kot mutacije v genomu somatskih celic. V celici se mora nakopičiti minimalno 4 - 7 mutacij, da pride do raka; do mutacij pride bodisi zaradi napak pri podvajanju, bodisi zaradi okoljskih dejavnikov. Če mutacije celični mehanizmi ne popravijo se te mutacije kopičijo in lahko vodijo do aktivacije onkogenov, inaktivacije tumor supresorskih genov ali okvare genov, ki uravnava apoptozo; to omogoči celici nekontrolirano rast, nastanejo klonske celice, ki so potomke prvotne celice, ki je dobila sposobnost nebrzdane rasti. Še nadaljno kopičenje mutacije omogoči invazijo in metastaziranje.

Za nastanek raka se mora nakopičiti več mutacij v celici:

- incidenca raka narašča s starostjo.
- pri rakah, ki so povzročeni z okoljskimi dejavniki, je časovni zamik od izpostavljenosti dejavnika do nastanka raka velik (pri kadilcu npr. 30 let); mutacije se morajo torej kopičiti preden izbruhne rak

Razvoj raka je večstopenjski proces, s kopičenjem mutacij se spreminja fenotip celice. Pri mnogih celicah so dokazali, da se rak razvije preko hiperplazije, adenoma v karcinom. Ponavadi je eden od prvih genov, ki je v tem večstopenjskem procesu mutiran (in s tem aktiviran), gen **APC**, kar privede do hiperplazije (omogoči mutiranim celicam proliferacijo), potem pride do hipermetilacija, aktivacije RAS onkogeno (s tem dobi tkivo sposobnost nastajanja polipov), za tem pa rakavo tkivo dobi še mnoge mutacije (izgube) tumorsko supresorskih genov; po izgubi

tumorsko supresorskega gena p53 pa preide adenom v **karcinom**.

Za **dedne rake** je značilno, da se pojavljajo pogosteje v določenih družinah in da se pojavljajo raje pri mlajših osebah. To pa zato, ker so te osebe že podedovali eno mutacijo in imajo več kot 85 % možnosti, da bo prišlo še do mutacije drugega alela, medtem ko pri osebi v populaciji, ki ni podedovala okvarjenega gena, more priti najprej do ene spontane mutacije, po tem pa še do druge spontane mutacije - zato je v naključni, zdravi populaciji ta rak zelo redek.

V tobačnem dimu je prisotnih več kot 60 različnih pro-kancerogenov, ki se ob vstopu v telo razvijejo v kancerogene dejavnike. Po približno 15 pokajenih cigaretah pride do ene mutacije, ki se vgradi v genom.

Če pride do okvar celice ob zmerni izpostavljenosti kancerogenom, lahko popravljajo te napake. Če pa so prisotne prirojene/pridobljene napake popravljanja se lahko razvije rak. Popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov lahko popravlja timinske dimere; zapis za ta mehanizem nosi 7 genov XP (kseroderma pigmentosum). Če so te geni mutirani lahko ob izpostavljenosti sončni svetlobi zgodaj pride do okvar. Če je okvarjen sistem za popravljanje napak po replikaciji lahko pride do raka širokega črevesja, BRCA1 in BRCA2 pa nosita zapis za popravljanje lomov verig DNA pri replikaciji; okvare teh genov povzročajo rak dojke.

Kopičenje mutacij lahko vodi v genomsko nestabilnost rakavih celic in vodi do novih mutacij, kot so preureditve kromosomov, delecije, duplikacije, translokacije, aneuploidije.. nekatere te mutacije so tipične za določene rake, npr. pri kronični mieloični levkemiji je tipičen **philadelphia kromosom**; translokacija med 9 in 22 kromosomom.

Za nastanek raka so torej ključne mutacije, ki prizadanejo popravljanje DNA in tiste mutacije, ki celici omogočijo, da uide nazdoru nad celičnim ciklom, prizadanejo nadzor celičnega komuniciranja in motijo uravnavanje apoptoze. Geni, ki so vključeni v te procese:

- **Protoonkogeni** nosijo zapis za transkripcijske faktorje, rastne faktorje, receptorje za rastne faktorje, hormonske receptorje, kinaze, ki sodelujejo pri signaliziranju in drugih proteinih v signalnih poteh. Če pride do aktivirajoče mutacije protoonkogenov bo iz njega nastal **onkogen**. Da se bo izgubilo uravnavanje nad temi celičnimi procesi zadostuje že mutacija v eni kopiji protoonkogenov - gre za dominanten fenotip.

- **Tumor supresorski geni** - nadzorujejo funkcijo protoonkogenov; imajo inhibitorni vpliv na celično proliferacijo, celični cikel. Pospešujejo apoptozo in sodelujejo pri popravljajo DNA. Če pride do inaktivacije tumor supresorskih genov potem bodo izgubili svojo funkcijo. Za razliko od onkogenov pa je tu potrebna mutacija v obeh kopijah tumor supresorskih genov, da se izgubi njihova funkcija - recesiven fenotip.

Uravnava celičnega cikla

Večina somatskih celic je v G0 fazi in se ne deli; šele, ko pride do tkivne poškodbe, se sprostijo rastni dejavniki, ki celici sporočijo, da mora preiti v celično delitev (vstopiti v G1 fazo). V celičnem ciklu so tri kontrolne točke, skozi katere mora celica iti, da se cikel nadaljuje. Prva je na prehodu iz G1 v S fazo, takrat celica preveri integriteto DNA (če so napake na DNA prisotne

se v tej fazi cikel ustavi, dokler se napake ne popravijo, da se ne bi podvojila poškodovana DNA). Druga kontrolna točka je po replikaciji, med G2 in M fazo; preveri se, če je prišlo do napak med podvajanjem DNA (oz. ali so te napake popravljene). Med mitozo pa je še zadnja kontrolna točka, to je nadzor nad tvorjenjem delitvenega vretena in pritrditvijo na kinetohore. Te kontrole nadzorujejo **ciklini** in **od ciklinov odvisne kinaze** (CDK). CDK so vedno prisotne v celici, vendar niso aktivne - aktivne postanejo šele po vezavi z ustreznim ciklinom, koncentracija ciklinov pa se spreminja v odvisnosti od faze celičnega cikla. Po vezavi ciklina se CDK aktivira in lahko fosforilira druge proteine; npr. vezava ciklina D na CDK4 kinazo aktivira izražanje proteinov, ki so potrebni za replikacijo DNA. Aktivnost še dodatno uravnavajo inhibitorni proteini in aktivacijske kinaze.

Mutacije, ki omogočijo aktivacijo protoonkogenov v onkogen

- mutacije, ki jih povzročijo dejavniki okolja - mutacije v kodirajočih ali promotorskih področjih
- podvojitve, amplifikacije genov, ki imajo za posledico več genskega produkta
- preureditve gena (ko pride protoonkogen pod vpliv močnega promotorja se njegovo izražanje poveča neodvisno od rastnih dejavnikov, ali ko pride do fuzijskega proteina, npr. Philadelphia kromosom)

Protoonkogen Ras

Skrbi za prenos signala celičnih receptorjev v jedro. Ras je v neaktivni obliki v celici, nanj je vezan GDP. Ko pride rastni faktor na receptor se ta avto fosforilira, spremeni GDP v GTP in Ras postane aktiven. Sproži kaskado in aktivira transkripcijskih faktorjev, ki regulirajo gensko izražanje. Če pride do mutacije bo Ras neodvisen od rastnih faktorjev in izražanje genov ne bo več uravnavanje.

Gen RB1 (retinoblastom 1)

Protein retinoblastom (pRB) je eden od proteinov, ki nadzira prehod celice iz G1 v S fazo. V citoplazmi je pRB nefosforiliran, veže transkripcijski faktor in ga inaktivira. Po prehodu iz G1 v S fazo pa ta kompleks CDK4/ciklin D privede do fosforilacije pRB in se iz aktiviranega proteina sprosti transkripcijski faktor, ki sproži transkripcijo več kot 30 tarčnih genov. Če mutacija inaktivira pRB se bo od njega transkripcijski faktor sprostil neodvisno od prehoda čez kontrolno točko, omogočena bo nekontrolirana rast.

Tumor supresorski gen p53 (varuh genoma)

Je transkripcijski faktor, ki uravnava prepisovanje več kot 50 genov. V celici se nenehno sintetizira in razgrajuje, ob poškodbi integritete DNA pa se zviša raven proteina p53, kar sproži več odzivov. Najbolj pomembna sta: če p53 zazna poškodbe na DNA se ustavi prehod iz G1 v S fazo, to omogoča indukcija prepisovanja tumor supresorskega proteina p21, ki inhibira CDK4/ciklin D kompleks. To da celici čas, da se DNA popravi; če se popravi celica nadaljuje s celičnim ciklom, če pa ni mogoče popravilo pa p53 sproži prepisovanje gena Bax, zavre prepisovanje gena Bcl-2 in celica gre v apoptozo.

Če je gen za p53 mutiran bo celica kljub mutacijam lahko nadaljevala s celičnim ciklom, zato se bodo mutacije začele kopičiti.

Produkti genov Bcl2 in Bax odločajo, ali bo prišlo do apoptoze ali ne. Povečana koncentracija p53 bo povišal raven BAX homodimera in promoviral apoptozo.

Tumor supresorski geni vzdržujejo tudi stike med celicami. Med te uvrščamo gene, ki nosijo zapis za adhezijske molekule, regulatorje citoskeleta in proteolitične encime. Izguba funkcij teh genov omogoča pretrganje stikov s celicami, razgradnjo komponent ekstracelularnega matriksa, to omogoči celicam invazivno rast preko bazalne lamine in metastaziranje.

Poznavanje vseh mehanizmov raka na molekularnem nivoju omogoča razvoj novih zdravil proti raku. To so tarčna oz. **biološka** zdravila. Primer:

Fuzijski protein BCR-ABL je pogost pri levkemijah nastane pri translokaciji kromosoma 22 na kromosom 9. **Imatinib** je zdravilo, majhna molekula, ki inhibira BCR-ABL kinazo.

Drugi primer je **herceptin**, ki je monoklonsko antitelo in se veže na HER2 receptor (receptor za rastni faktor EGRF, izražen je pri nekaterih tumorjih dojke). Herceptin tako blokira receptor in blokira pot, ki omogoča nebrzdano rast celice.

miRNA

Ne poznamo še celotne vloge miRNA, vendar pa vemo, da je njihovo izražanje pri rakavih tkivih deregulirano. Pride do prekomernega izražanja oz. inhibicije določenih miRNA.

miRNA na podlagi specifičnosti vezav s tarčnimi mRNA molekulami inhibirajo nastanek proteinov na ravni informativni mRNA.

Predavanje 11; 26. 10. 2011 / Ana Plemenitaš

PRENOS SIGNALA in HORMONI, KI URAVNAVAJO METABOLIZEM

1. PRENOS SIGNALA

Celice neprestano komunicirajo med sabo in se odzivajo na sleherno spremembo v okolici. Ravno zaradi sposobnosti prilagajanja različnim spremembam v okolju lahko preživimo. Živa celica lahko preživi v neverjetnih pogojih.

Celično signaliziranje ima posebno mesto v medicini - z motnjami v celičnem signaliziranju je povezanih mnogo bolezni, tudi AIDS, srčna obolenja, Alzheimer, diabetes, sploh pa rak - zdravila, ki jih uporabljajo za zdravljenje raka, dostikrat delujejo prav na signalne poti.

Osnovni principi prenosa signala

- celice komunicirajo med sabo na različno razdaljo (zelo daleč ali zelo blizu)
- obstaja izjemno veliko različnih signalnih molekul in receptorjev, kljub temu pa je število signalnih poti omejeno
- interakcija med signalno molekulo in med receptorjem je zelo specifična (sicer bi prišlo do popolne zmede)
- znotrajcelični signalni proteini, ki sodelujejo pri prenosu signala, delujejo kot molekularna stikala (on/off)

Komunikacije med celicami

Najbolj klasičen primer prenosa signala preučuje klasična endokrinologija - ta se ukvarja z delovanjem hormonov. Neke endokrine celice sintetizirajo in izločajo hormon, ki ga sprostijo v kri. Po krvi hormon potuje do tarčnih tkiv. To tkivo je lahko zelo oddaljeno od mesta sinteze hormona; temu rečemo endokrina metoda.

Parakrina metoda je posredovanje signala do bližnjih, sosednjih celic. Avtokrino pa pomeni, da celica sintetizira nek ligand in ima za ta ligand sama tudi receptor - tipičen primer so prostaglandini. Sintetizirajo jih celice, potem pa delujejo bodisi na lastno bodisi na sosedne celice.

STOPNJE O PRENOSU SIGNALA

1. sinteza signalne molekule v določenih celicah
2. sproščanje signalne molekule, bodisi v kri bodisi v okolico celico
3. transport signalne molekule do tarčnih celic
4. za zaznavanje je potreben receptor na tarčni celici. Vežava ligand-receptor je podobna vežavi encim-substrat; oboji so specifični, vendar pa je pri ligand-receptor afiniteta 1000krat večja, kar zagotavlja še večjo specifičnost.
5. začetek znotrajceličnega prenosa signala
6. sprememba v celici ali tkivu
7. prekinitev signala

Ponovitev o receptorjih

Za hormone in rastne faktorje sta bistvena dva tipa molekul. Hidrofilne molekule bodo slabo topne v membranah in bodo težko prehajale v celico - za take molekule so receptorji na površini celice (plazemski membrani) in ta ligand v celico sploh ne pride. Lipofilne (hidrofobne) molekule pa imajo receptorje v celici, bodisi v citosolu, bodisi v jedru. Takšni hormoni pridejo direktno v celico in sprožijo nek drugi odziv, kot hidrofilni.

Primer: Inzulin je ključni hormon, ki uravnava nivo glukoze v krvi. Je polipeptid, izločajo ga celice pankreasa. Adiponektin pa je prav tako polipeptidni hormon, sprosti se iz maščobnih celic. Oba imata receptorje na površini tarčnih celic, čeprav je njun izvor drugačen.

Lipofilni hormoni so vsi steroidni hormoni - spolni hormoni, ščitnični hormoni, vitamin D, retinojska kislina, nekateri prostaglandini.

Hormoni so lahko bodisi derivati aminokislin (izhodna AK se spremeni v hormonsko obliko, znana je tirozin, iz katerega nastane adrenalin in ščitnični hormoni), derivati lipidov (eikozanoidi - levkotrieni, prostaglandini, prostaciklini, tromboksani), veliko hormonov pa je tudi peptidne narave (glukagon, inzulin,..).

Delovanje hormonov, ki imajo receptor v notranjosti (npr. steroidni hormoni)

Za steroidne hormone imamo receptorji bodisi v jedru bodisi v citosolu. Za te receptorje je značilno, da imajo vezavno mesto za DNA in vezavno mesto za hormon. Ponavadi je tako, da ima receptor vezan nek protein, s katerim je v neaktivni obliki, dokler hormon tega proteina ne

izrine, se veže na receptor in ga aktivira. Hormoni, ki so slabo topni v vodi, se morajo nekako po krvi prenesti do tarčnih tkiv, tega pa so možni, ker so vezani na določene proteine.

Druga velika skupina so **receptorji, prisotni na plazemski membrani**.

Na plazemski membrani imamo množico različnih proteinov. Veliko jih je GPCR (G-protein coupled receptors) in takih receptorjev, ki imajo še encimsko aktivnost, ta je prisotna na proteinskem delu, ki je znotraj celice.

V glavnem bodo obravnavali prenašanje signala preko receptorjev, povezanih s heterotrimernimi G proteini (GPCR) in prenašanje signala preko tirozinskih kinaz (RTK).

Z G-proteini povezani receptorji

Ti receptorji sedemkrat prečkajo membrano. Amino konec gleda ekstracelularno, karboksilni konec intracelularno.

Osnovna definicija G-proteinov: G-proteini so proteini, ki lahko vežejo bodisi GTP bodisi GDP. Imamo dve verziji G-proteinov. Ena je heterotrimerna oblika, ki je iz alfa podenote (tista, ki veže GDP ali GTP), beta podenote in gama podenote (te dve podenoti sta tesno povezani med sabo). G-protein je vezan na membrano preko alfa in gama podenote, ki imata neko lipidno komponento (izoprenoid). Tudi encim, ki deluje naprej v reakcijski kaskadi, je vezan na membrano v bližini G-proteina.

Za G-proteine je značilno, da krožijo med aktivno in neaktivno obliko. Kadar je na alfa podenoto vezan GDP, je protein v neaktivnem stanju, ko pa se GDP zamenja z GTP je ta podenota aktivna. Preden se veže hormon na GPCR sta GPCR in G-protein ločena, po vezavi hormona pa se receptor konformacijsko spremeni in omogočena je interakcija z bližnjim G-proteinom. S tem, ko se G-protein poveže z receptorjem, ki ima vezan hormon, to izzove spremembe v G-proteinu: alfa podenota se loči od beta in gama podenot, poleg tega se namesto GDPja veže GTP. Ob tej vezavi se struktura alfa podenote spremeni, rečemo, da se je aktivirala; zdaj lahko interagira z encimom (najbolj pogosta sta fosfolipaza C ali adenilat ciklaza).

Signal je treba na koncu prekiniti. Koncentracija hormona se spreminja; njegovo izločanje se zmanjša, ko ga sistem več ne potrebuje. Poleg tega pa ima alfa podenota v sebi GTP-azno aktivnost, to pomeni, da se GTP hidrolizira znotraj podenote in nastane GDP. Ta aktivnost je izjemno nizka, zato obstaja vrsta pomožnih proteinov, ki vplivajo na to GTP-azno aktivnost (jo stimulirajo).

Vibrio cholerae je povzročitelj virusa kolere. Ta virus s sproščanjem toksinov preko reakcijske kaskade blokira intrinzično GTP-azno aktivnost, torej se G protein ne inaktivira.

Zelo znana tarča aktivirane alfa podenote je membranski encim **adenilat (adenilil) ciklaza**. Posledica je povečana koncentracija cAMP znotraj celic.

V povezavi z G-proteini imamo dve varianti - Gs in Gi proteini. S = stimulacija, I = inhibicija. Nekateri G-proteini torej inhibirajo, drugi stimulirajo nastanek cAMP. Stimulirajoči hormoni so adrenalin, glukagon, ACTH.. adrenalin ima zelo različne receptorji, najbolj znani so alfa ena, alfa dva in beta. Adrenalin lahko deluje preko različnih poti - bodisi preko Gs (stimulacija cAMP), preko Gi (inhibicija cAMP), lahko pa tudi preko fosfolipaze C.

cAMP

ATP je v celicah pomemben ne samo iz energetskega vidika ampak tudi za regulatorne namene. cAMP nastane z adenilat ciklazo iz ATPja. Encimi, ki razgradijo cAMP na AMP, se imenujejo fosfodiesteraze - tako se signal prekine.

Ko se naenkrat poveča količina cAMP, potem ta cAMP aktivira **kinaze**. To so encimi, ki fosforilirajo tarčne substrate. Protein kinaza A lahko aktivira fosfodiesterazo, ki bo razgrajevala ciklični AMP - na ta način smo znižali koncentracijo cAMP. To je 'feedback mehanizem'. Protein kinaza A je iz dveh regulatornih in dveh katalitskih podenot, ki sta brez cAMP povezana. Ko pa naraste količina cAMP se ta lahko veže na regulatorno podenoto, ki se bo posledično oddaljila od katalitskega dela in encim bo primerno aktiven za izvršitev svoje funkcije.

Protein kinaze prenašajo fosfatno skupino iz ATPja na določene aminokislino, kjer nastanejo fosforilirane kisline. Fosfat lahko tvori estre, estri pa nastanejo, če imamo OH skupino, zato se fosfat najraje veže na serin, treonin in tirozin. Imamo dve družini kinaz - serinske in treonin-tirozinske.

S tem, ko je protein fosforiliran, se spremeni njegova funkcija. Da fosfatno skupino odcepimo potrebujemo encim fosfatazo in vodo.

Pri kinazah torej potrebujemo **ATP**, pri fosfatazah pa **H₂O**.

Nekateri proteini so fosforilirani bolj aktivni, drugi so fosforilirani manj aktivni.

V celicah imamo glukozo in glikogen; če je glukoze v krvi premalo se glikogen razgrajuje, če je dovolj se skladišči v glikogenu. Jetrne celice imajo receptorje za razne signalne molekule. Ko se glukagon veže je to signal, da je glukoze premalo in jo moramo proizvajati. Razgraditi moramo torej glikogen, ne smemo pa ga sintetizirati. Za sintezo glikogena je pomembna glikogensintaza (GS), za razgradnjo pa glikogenfosforilaza (GP). Za proizvodbo glukoze moramo aktivirati GP in inhibirati GS. Ko se veže glukagon, bo aktiviral G podenoto, ta bo sintetizirala preko encima cAMP, ta pa aktiviral protein kinazo A. Ta kinaza fosforilira GS, ki je takrat, kadar je fosforilirana, neaktivna. Ko pa je GP fosforiliran je aktiven; protein kinaza A ga fosforilira preko glikogen fosforilaze kinaze.

Aktivacija transkripcije z od G-proteinov odvisne PKA

Katalitski del PKA se lahko premesti tudi v jedro. Na DNA so CRE elementi (cyclic-AMP response element). CRE binding protein se s katalitskim delom PKA fosforilizira, se dimerizira in omogoči transkripcijo. cAMP torej lahko deluje tudi na ravni transkripciji.

Primer fosfolipaze C

Fosfolipaze razgrajujejo lipide. Proizvede diacil glicerol in inozitol-3-fosfat (IP₃), ta dva aktivirata protein kinazo C. IP₃ ima receptorje na endoplazemskem retikulumu in omogoči sprostitvev kalcijevih ionov, kar posledično aktivira protein kinazo C. Diacil glicerol prav tako lahko aktivira protein kinazo C.

Adrenalin je stresni hormon in želi metabolično izzvati povišano koncentracijo glukoze. Ima različne receptorje - če se veže na beta receptor se poveča koncentracija cAMP in imamo podobno situacijo, kot smo jo imeli za glukagon. Če pa se poveže na alfa1 receptor je tarča

delovanja fosfolipaza C in pride do aktivacije protein kinaze C; v obeh primerih pa je z receptorjem povezan heterotrimerni G-protein.

Na jetrnih celicah najdemo oba tipa receptorjev, tako da lahko adrenalin deluje preko PKA ali PKC.

Adrenalin lahko deluje tudi inhibitorno, kadar se veže na alfa₂ adrenergične receptorje. Tokrat je alfa podenota G-proteina inhibitorna (G_i) in pride do inhibicije adenilat ciklaze. Končni efekt je, da je PKA neaktivna. To se dogaja v pankreasu, kjer lahko adrenalin zavre sproščanje inzulina (če želimo meti več glukoze je logično, da zavremo inzulin, ki bi glukozo skladiščil).

Ves čas smo govorili zgolj o alfa podenoti G-proteina, vendar pa imata tudi beta in gama podenoti svojo funkcijo, sodelujeta npr. pri odpiranju kalijevih kanalov.

RECEPTORJI Z ENCIMSKO AKTIVNOSTJO

Imajo zunajcelični del, ki veže različne ligande, transmembranski del, ki prenaša strukturne spremembe in znotrajcelični del. Različni receptorji imajo različne encimske aktivnosti; npr. gvanilat ciklazno aktivnost (nastanek cikličnega GMP, cGMP), največ pa je receptorjev, ki imajo kinazno aktivnost v znotrajceličnem delu (tirozin kinaze, serin/treonin kinaze) in prenašajo fosfatno skupino.

Dušikov oksid je zelo povezan z relaksacijo mišic in ima receptor znotraj celic. Sproži pretvorbo GMP v cGMP.

Tirozin in serin/treonin kinaze vežejo vrsto rastnih faktorjev, kar je povezano tudi z nastankom raka. Za te receptorje je značilno, da obstajajo v monomerni obliki, monomeri pa so v membrani zelo blizu skupaj.

Ob vezavi signalne molekule pride do dimerizacije, ta dimerizacija pa aktivira kinazno aktivnost, ki je prisotna v znotrajceličnem delu proteina (ta je iz različnih domen, en del je tak, ki ima kinazno aktivnost in lahko pride do avtofosforilacije serinske ali tirozinske ostanke). Ko pride do dimerizacije se najprej fosforilirajo ključni tirozinski ostanki. Vezava različnega liganda rezultira v fosforilaciji tirozinskih ostankih na različnih mestih znotrajcelične domene (zelo veliko je tirozinov). Po tem, ko se fosforilirajo ključni tirozinski ostanki pa lahko te prenašajo fosfate iz ATPja še na druge tirozinske ostanke.

Ker pride do fosforilacije ima ostanek kar naenkrat naboj (prej ga ni imel) in lahko interagira z različnimi proteini.

Vrsta receptorjev je takih, da znotrajcelični del nima kinazne aktivnosti ampak je povezan z nekaterimi drugimi proteini iz družin kinaz. Te proteini se aktivirajo, npr. JAK kinaza, ta lahko fosforilira ostanke na receptorju (namesto ključnih tirozinskih ostankov).

Eritropoetin stimulira nastanek eritrocitov. Je peptid, ki se sprošča na določen signal. Deluje preko receptorjem tirozinske kinaze, ki je povezan z JAK kinazo. Drugi primer je **leptin**, ki je peptiden hormon, povezan z debelostjo (izločajo ga maščobne celice) in tudi leptin deluje preko receptorja, povezanega z JAK kinazo.

Tudi **inzulin** je hormon, ki se veže na receptor tirozin kinaze. Bistvena razlika pri tem receptorju je v tem, da je inzulinski receptor že v neaktivnem stanju dimer, vendar je vseeno neaktiven, če

ni vezan inzulin. Ko pa se veže inzulin se aktivira kinazna domena znotraj celice in pride do fosforilacije različnih tirozinskih ostankov, ki omogočajo, da se receptor poveže z drugimi proteini.

Inzulin se sprošča iz pankreasa po hranjenju, ko imamo zadosti glukoze. Važno je, da iz metaboličnega vidika inzulin naredi tisto, kar mora; glukoza se lažje prenese iz krvi v celice, ker se izrazijo transporterji za glukozo na membrani (primer so mišične celice in maščobne celice). Transport v jetrne celice ni odvisen od inzulina, vendar pa inzulin močno vpliva na dogajanje v jetrnih celicah. Inzulin stimulira nastanek glikogena v jetrnih celicah, prav tako nastanek maščobnih kislin, če je sladkorja res preveč. Vsi te efekti so omogočeni preko interakcij z različnimi molekulami (zakaj v jetrih drugačen odziv kot v mišicah?).

V mišicah in v maščevnju se na fosforilirane tirozinske ostanke veže IRS1 (insulin responsive substrate 1), to pa omogoča aktivacijo PI3 kinazo, posledica je premestitev transporterjev za glukoze na površino (GLUT4).

V jetrih pa imamo GLUT2 transporterje, ki so prisotni na membranah tudi, kadar inzulina ni.

Prenos signala - signal se prenaša preko molekul (interakcij). Ker so proteini med seboj zelo različni to omogoča različne interakcije. Na fosforilirane tirozinske ostanke se vežejo proteini s PTB in SH2 domenami. Zlasti interakcija med proteini je bila izkoriščena za produkcijo zdravil, ki zdravijo raka. Pri raku ima zelo veliko vlogo protein, ki mu rečemo Ras. Ras protein je primer malega G-proteina (tista monomerna verzija, ki ni iz treh podenot, rečemo jim tudi male GTP-aze). Te monomerni G-proteini delujejo približno tako, kot alfa podenote, lahko vežejo GTP (aktivirani) ali GDP (neaktivirani). Tudi tu imamo celo vrsto proteinov, ki na to vplivajo. Primer prenosa signala preko Ras proteina: Rastni faktor se veže na receptor in aktivira kinazno aktivnost, fosforilirajo se tirozinski ostanki. Na njih se vežejo proteini (tisti, ki imajo SH2 domeno). Te proteini imajo tudi SH3 domeno, to je domena, ki se lahko poveže s proteini, ki imajo v strukturi veliko prolinov, tak protein je na primer Sos protein. To je tisti protein, ki na Ras proteinu zamenja GDP z GTPjem in ga na ta način aktivira. Ko se Ras protein aktivira potem aktivira Ras kinazo (gre za sistem treh kinaz, prva je MAP kinaza kinaza kinaza, druga MAP kinaza kinaza, tretja MAP kinaza. Prva fosforilira drugo, druga tretjo, tretja se premesti v jedro in aktivira tarčne gene). Rastni faktor ima torej preko ogromno proteinov posledico transkripcijo nekega gena.

Ras protein je farmesiliran; če ni, potem ne more delovati.

Prekinitev signala

- zmanjšamo število receptorjev
- inaktivacija receptorja z modifikacijo
- inaktivacija signalnih proteinov z modifikacijo (fosforilacija/defosforilacija kot najbolj pogosta)
- sinteza inhibitornih proteinov
- navskrižna inhibicija signalnih poti
- razgraditev znotrajceličnih posrednikov

JAK kinaza se aktivira s fosforilacijo, če pa pride v bližino SHP1 pa defosforilira JAK kinazo in jo deaktivira. Drugi način zavrtja je, da fosforilacija vodi do ubikvitinacije, to pa vodi v razgradnjo proteinov. Če pa se na fosforilirane ostanke veže arestin pride do endocitoze. Sekundarne

prenašalce (cAMP, cGMP) pa lahko razgradimo in jih na ta način inhibiramo.

Predavanje 12; 27. 10. 2011 / Ana Plemenitaš

HORMONI, KI URAVNAVAJO METABOLIZEM

To so hormoni, ki jih izloča pankreas (inzulin, glukagon), maščevje (leptin), ščitnični hormoni in hormoni nadledvične žleze.

Klasični endokrini sistem deluje kot hierarhija. Vse se začne v možganih, ki sprejemajo razne impulze, te pa vplivajo na endokrine celice, ki se nahajajo v hipotalamusu. Ta sprošča določene hormone (regulatorne), ki imajo to vlogo, da vplivajo na izločanje hipofiznih hormonov. Vsi hormoni hipotalamusa in hipofize so proteinski.

Hipotalamus ima dve vrsti hormonov. Eni so taki, da spodbujajo hipofizo, drugi taki, da inhibirajo hipofizo.

Hipofiza pa sprošča:

- TSH (tiroide stimulirajoči hormon – povzroča rast ščitnice in sintezo/izločanje ščitničnih hormonov),
- ACTH (adenokortikotropni hormon – povzroča rast nadledvične žleze in sintezo/izločanje glukokortikoidov in aldosterona),
- FSH (folikle stimulirajoči hormon – pri moških stimulira spermatogenezo, pri ženski zorenje jajčnih foliklov)
- LH (luteinizirajoči hormon – pri moškem spodbuja izločanje testosterona, pri ženski ovulacijo in tvorbo rumenega telesa).

Regulatorni hormoni se sprostijo v lokalni obtok, ki povezuje hipotalamus in hipofizo. Hipofiza pa hormone sprosti v krvni obtok, tarče teh hormonov so raznolike in oddaljene.

Izločanje hormonov je strogo nadzorovano - imamo povratne zanke. Ko je dovolj kortizola ta vpliva na hipotalamus, da prepreči, da bi ta še naprej stimuliral hipofizo. Tipični primer je tudi rastni hormon. En peptid stimulira izločanje rastnega hormona, drugi pa inhibira sproščanje rastnega hormona. Receptor za rastni hormon je tirozin kinaza, ki potrebuje še JAK kinazo. Tudi pri nadzoru tega hormona imamo povratno zanko.

Prednji režanj hipofize izloča različne hormone (vsi so peptidni), ki imajo različne tarče v našem telesu. Hormoni se izločajo v zelo majhnih količinah.

ACTH je tisti, ki vpliva na nadledvično žlezo, ki sintetizira različne hormone. Nadledvična žleza ima dva dela, ki sta ključna - skorja, ki sintetizira in izloča eno vrsto hormonov in pa sredica nadledvične žleze, ki sintetizira in izloča drugo vrsto hormonov.

Za **skorjo nadledvične žleze** vemo, da sintetizira in izloča različne steroidne hormone. Vsi nastanejo iz holesterola. Mineralokortikoidi vplivajo na raven mineralov. Glukokortikoidi so zelo pomembni iz metaboličnega vidika, najbolj pomemben je kortizol.

Glavne spremembe, da iz holesterola nastanejo različni steroidni hormoni (holesterol nima hormonske funkcije!) - progesteron je steroidni hormon, ki nastane iz holesterola tako, da se skrajša stranska veriga, pride pa še do oksidacije na mestu 3. Ta oksidacija je ključna. Holesterol se tudi hidroksilira na različnih mestih (npr. kortizol, ki je na mestu 11 in 17 hidroksiliran). Za estradiol pa vemo, da je edini hormon z aromatskim obročem.

Kako steroidni hormoni delujejo - preko receptorjev, ki so prisotni v notranjosti celicah, ker steroidi niso topni v vodi, so pa dobro topni v lipidih (nimajo problema prehajati preko celične membrane). Steroidni hormoni se vežejo na receptor, ta se dimerizira in pomaga pri transkripciji tarčnih genov.

Nadledvična žleza in stres

Kortizol se izloča v stresu (stresni hormon). Ko ga je zadosti je treba prekiniti signal. Zato ta kortizol vpliva negativno na hipotalamus (da ne izloča sprostitvenega hormona, ki spodbudi sintezo ACTH).

Kortizol je stresni hormon, torej želi povišati sladkor. Tarčna delovanja so jetrne celice, mišične celice in maščevje. V jetrih kortizol vpliva v to, da se nasintetizira glukoza iz drugih spojin (aminokislina, laktata,...), na mišičnih celicah pa vzpodbuja razgradnjo proteinov, da dobimo aminokislina, ki se v jetrih uporabljajo za sintezo glukoze. Na maščevju pa spodbuja lipolizo (ker je važno, da pridelamo maščobne kisline, iz katerih dobimo energijo za sintezo glukoze). Ključno njegovo delovanje je torej da spodbuja glukoneogenezo, ki vpliva na sintezo določenih encimov. Kadar imamo malo inzulina in veliko kortizola takrat lahko delovanje kortizola, ki spodbuja proteolizo spodrine funkcijo inzulina, ki sintetizira proteine.

Adrenalin je derivat aminokislina - tirozin. Potrebujemo nekaj encimov, ki vodijo do adrenalina (glej slajd). Iz L-tirozina dobimo aktivni hormon adrenalin, ki ne more prečkati plazemske membrane. Adrenalin spodbuja razgradnjo glikogena (tako kot glukagon). Za večino hormonov ima hormon en tip receptorja, pri adrenalinu pa imamo veliko različnih tipov receptorjev - adrenergični receptorji. Ključni so:

- beta adrenergični receptorji so povezani s heterotrimernim G-proteinom, to je povezano s stimulacijo adenilil ciklaze, ob tem se poveča koncentracija cAMP, to pa vodi do aktivacije protein kinaze A, ta pa lahko fosforilira tarčne encime.
- alfa ena adrenergični receptorji tudi delujejo preko heterotrimernih G-proteinov, vendar pa je tukaj tarčni encim za aktivno obliko alfa podenote fosfolipaza C (ne adenilil ciklaza), ki sintetizira inozitol tri fosfat (IP3) in diacil glicerol (DAG), oba aktivirata protein kinazo C.
- alfa dva adrenergični receptorji so tudi povezani s heterotrimernim G-proteinom, vendar gre v tem primeru za inhibicijo. Ob vezavi adrenalina na receptor alfa podenota G-proteina inhibira adenilil ciklazo, zato je koncentracija cAMP zmanjšana. V beta celicah pankreasa lahko adrenalin na ta način inhibira sintezo inzulina.

Stresni hormoni niso vedno prisotni, medtem ko inzulin/glukagon, ki sta **metabolna hormona**, sta vedno prisotna v določenih koncentracijah. Stresni hormoni so prisotni samo ob nuji.

Kortizol zelo spodbuja glukoneogenezo. Adrenalin preko beta receptorjev deluje identično kot

glukagon (preko aktivacije glukogen fosforilaze in inhibicije glukagen sintaze).

Ščitnični hormoni se sintetizirajo iz tirozinskih ostankov, vendar ne iz prostih ampak iz tiroglobulina (protein z mnogimi tirozinskimi ostanki), poleg tega so te ostanki jodirani. Potem se te di-jodo tirozinski ostanki med seboj povežejo.

Sinteza poteka delno v celicah, delno ekstracelularno. Tiroglobulin se sintetizira v celicah in se izloči. Na membranah je encim jodid peroksidaza, ki je potreben za to, ker jod zaužijemo kot I⁻ in ga je treba aktivirati tako, da nastane bodisi radikal bodisi I⁺. Šele v taki obliki se lahko veže na tirozinske ostanke.

Tudi ščitnični hormoni se morajo za potovanje po krvi vezati na proteine.

Hormona T3 in T4 - Ključni metabolični učinki, povezani s hormonoma **T3 in T4** so metabolični: povečana razgradnja OH, povečana razgradnja lipidov, določanje hitrosti bazalnega metabolizma.

Hormoni, ki uravnavaajo glukozo

Homeostaza glukoze - vzdrževanje glukoze v intervalu 3,4 do 6 mmolih. Glukagon in inzulin sta peptidna hormona, zato so receptorji za njiju na plazemski membrani. Količina teh dveh hormonov se zelo spreminja glede na to, ali se prehranjujemo ali ne. Takoj po obroku inzulin daleč prevaga nad glukagonom, kadar stradamo pa obratno. Če je veliko insulina se želimo glukoze znebiti iz krvi v tkiva - spodbujamo privzem in uporabo glukoze v tkivih. Inzulin ni potreben za privzem glukoze pri vseh tipih prenašalcev (v jetrih je privzem konstitutiven). V celicah se lahko glukoza razgrajuje ali skladišči. Inzulin spodbuja torej sintezo glikogena, vendar pa imamo omejene kapacitete, koliko glikogena se lahko sintetizira, odvečna glukoza pa se spremeni v maščobo.

Glukagon - Če glukoza v krvi pade moramo sladkor nadomestiti. Razgrajuje se glikogen – glikogenoliza. Glukagon spodbuja tudi glukoneogenezo.

Inzulin deluje preko tirozin kinaznega receptorja, ki je v membrani prisoten že kot dimer, tudi ko je neaktiven. Za povezavo s fosforiliranim tirozinom potrebuje protein SH2 domeno.

Glukagon deluje preko receptorja, povezanim s heterotrimernim G-proteinom. Aktivirana adenilil ciklaza poveča raven cAMP, ta aktivira protein kinazo A, ki aktivira glikogen fosforilazo, ki razgrajuje glikogen in inhibira glikogen sintazo, ki bi glikogen sintetizirala.

Predavanje 13; 27. 10. 2011 / Vita Dolžan

CENTRALNE POTI ENERGIJSKEGA METABOLIZMA 1

Vloga metabolizma je zagotoviti energijo celicam in tkivom. Vsaka celica posebej mora imeti energijo za opravljanje kemijskega dela (npr. nastanek novih vezi v procesu biosinteze), za transport molekul preko membran in telesnih barier, za mehansko delo (krčenje filamentov, mišično delo), za odstranjevanje celici tujih snovi in škodljivih snovi, ki nastanejo pri metabolizmu (detoksifikacija). Energija je potrebna tudi za vzdrževanje telesne temperature.

Energijo dobimo tako, da hranila razgradimo do osnovnih molekul. Posrednik med procesi, ki energijo porabljajo in tistimi, ki jo sintetizirajo, je ATP.

Hranila so tista metabolna goriva, ki jih v telo vnesemo s hrano. Energetsko bogata so zlasti ogljikovi hidrati, maščobe in proteini, hkrati pa s hrano vnašamo še vitamine, ki jih potrebujemo za koencime. Proces prebave je vse to, kar se s hranili dogaja v prebavnem traktu. Vse, kar se dogaja s prebavnimi predukti (prenos do tarčnih tkiv in nadaljna usoda) pa sodi v procese presnove. Produkti prebave predstavljajo metabolično gorivo. Kadar je teh v presežku se shranjujejo in se sproščajo, ko jih spet potrebujemo.

Pri metabolizmu nastajajo odpadni produkti, ki jih odstranimo.

Telesne zaloge metabolnih goriv

Najbolj pomembne so telesne zaloge ogljikovih hidratov, ki ga shranjujemo v obliki glikogena in pa maščob. Glikogen skladiščimo v mišicah in v jetrih. Jetra vsebujejo v obdobju sitosti ~10 % vlažne teže glikogena (zrnca glikogena so hidratirana). V skeletnih mišicah je približno 1 % vlažne teže mišice na glikogenu. Jetrni glikogen služi kot rezerva oz. vir glukoze za sproščanje v kri (homeostaza glukoze). Produkti razgradnje mišičnega glikogena pa ne morajo iti v kri, ker ne nastane prosta glukoza - vloga mišičnega glikogena je torej samo preskrba mišice z energijo.

V maščobnih kapljicah je v celicah lahko shranjeno več glukoze, ker niso topne v vodi.

Proteini imajo pomembno funkcijo in so pomembne strukturne molekule, kot metabolično gorivo pa jih uporabljamo samo v posebnih primerih (v začetnem obdobju stradanja, preden se začne sproščanje maščobnih kislin iz maščevja, razgradnja proteinov v mišicah zagotavlja glukoneogenezo).

Energetske vrednosti posameznih metaboličnih goriv

Ogljikovi hidrati in proteini imajo podobno energetsko vrednost, maščobe pa imajo več kot dvakrat večjo energetsko vrednost.

Maščobe imajo večjo kalorično vrednost, ker so bolj reducirane. Pri proceh razgradnje gre večinoma za procese oksidacije in če je spojina bolj reducirana se lahko pri oksidaciji iz nje sprosti več energije.

METABOLIZEM

Metabolni procesi so procesi, ki celici omogočajo preskrbo z energijo, rast, razvoj in funkcijo. Celoten metabolizem sestavlja več kot 1000 različnih reakcij. Reakcije so med seboj povezane v metabolične poti. Produkt ene reakcije lahko nastopa kot substrat drugih; govorimo o intermediatih metabolizma, zato govorimo tudi o intermediarnem metabolizmu.

Prva in bistvena razdelitev je na **katabolizem** in **anabolizem**. Za katabolne procese je značilno, da iz bolj kompleksnih spojin dobimo bolj preproste spojine, na koncu CO₂ in vodo. Za anabolne procese pa je značilno, da gre za procese izgradnje - iz bolj enostavnih v bolj kompleksne spojine. Za te procese potrebujemo energijo.

Pri katabolnih procesih gre večinoma za reakcije oksidacije in energija se sprošča. Ta energija se uporablja pri anabolnih procesih, kjer gre za nastajanje bolj kompleksnih spojin iz osnovnih spojin. Katabolni procesi so eksergonski, anabolski pa endergonski. Poleg energije pa

potrebujemo še redukcijske ekvivalente, ker gre za reakcije redukcije.

Pri metabolizmu kot najpogostejša prenašalca redukcijskih ekvivalentov sodelujeta NAD^+ in NADP^+ , encimi, ki sodelujejo, pa so dehidrogenaze. Dobimo bolj oksidiran produkt in reduciran prenašalec elektronov. Ta reduciran prenašalec mora svoje elektrone oddati, da lahko spet vstopi v reakcije - lahko jih prenese v dihalno verigo, nastane ATP, ali pa jih prispevajo anabolnim reakcijam.

Adeninski nukleotidi NAD^+ lahko prenaša redukcijske ekvivalente v obliki hidridnega iona - dva elektrona in en proton, drugi proton pa oddisociira v raztopino. Zato vedno pišemo disociirano obliko kot $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Flavinski nukleotidi so drugi prenašalec (FAD in FMN). Njihov obroč lahko sprejme en elektron in se delno reducira (semikvinonska oblika), ali pa sprejme še drugi elektron in se popolnoma reducira. Flavinski nukleotidi so v celicah večinoma vezani na flavo proteine.

Adeninski nukleotidi so topni, zato prihajajo in odhajajo v kemijske reakcije (pridejo do proteina in nato oddisociirajo), flavinski nukleotidi pa so vedno vezani na encim, ker niso topni v vodi, zato jih ne pišemo posebej v reakciji ker so že del encima.

ATP je posrednik med anabolnimi in katabolnimi procesi. Tudi drugi nukleotid tri fosfati so energetsko enakovredni ATPju - npr. GTP, UTP, CTP, vendar so prisotni v dosti manjši koncentraciji kot ATP in imajo druge specifične vloge v celicah. Z vezavo na druge nukleozid tri fosfate se lahko aktivirajo izhodiščne spojine za določene biosintetske procese; npr. z GTP se aktivirajo izhodiščne spojine za glukoneogenezo, sintezo proteinov; z UTP se glukoza aktivira (sinteza glikogena); s CTP pa se aktivirajo izhodiščne spojine za sintezo lipidov. Drugi nukleozidtrifosfati so torej energetsko ekvivalentni ATP, vendar so v celicah prisotni v manjših količinah in imajo druge vloge - predvsem za aktivacijo spojin.

ATP je energijsko bogata spojina, ker molekula ATP vsebuje dve fosfoanhidridni vezi, ki sta energetsko bogati. Bogati sta zato, ker ima odcepljena fosforilna skupina (pirofosfat) več resonančnih oblik kot jih je imel takrat, ko je bil vezan. Poleg tega ima ATP veliko več negativnih skupin kot ADP. Poleg tega se v spojino z nizko koncentracijo protonov sprosti še en proton, kar je spet ugodno.

Približno enako se energija sprosti tudi pri hidrolizi ADP, zadnja vez v ATPju pa ni energetsko bogata, ker je esterska. Pri metabolizmu imajo vlogo tudi druge energetsko bogate molekule, npr. fosfoenolpiruvat, 1,3-bisfosfoglicerat (po odcepu pirofosfata nastane karboksilna skupina, proton oddisociira in nastane karboksilatni ion - ionizacija in resonančna stabilizacija produkta potegneta reakcijo v smer nastajanja produkta.

Še ena pomembna energetsko bogata fosforilirana spojina je fosfokreatin. Pri prenosu fosforne skupine na drugo molekulo nastane kreatin, ki ima spet več resonančnih oblik.

Energijsko bogate nefosforilirane bogate so tioestri. Najbolj pogosto bomo srečali koencim A, ki ga sestavlja adeninski nukleotid, pantotenska kislina in reaktivna tiolna skupina. Če se ta tiolna skupina poveže s karboksilno skupino nastane tioesterska vez. Hidroliza te vezi je zelo

energetsko ugodna, ker imajo produkti te hidrolize več možnih resonančnih oblik.

ATP omogoča kemično delo. Ob sklopitvi z reakcijo hidrolize ATP lahko endergonske reakcije potečejo v smer produkta. Poleg tega omogoča aktivni transport (sprememba konformacije produkta) in tako omogoča mehansko delo.

Obnavljanje ATP

Zaloge ATPja so omejene. Večino ADP se fosforilira pri oksidativnih poteh. Fosforilacija je sklopljena s prenosom elektronov na kisik v dihalni verigi - oksidativna fosforilacija.

ATP se obnavlja tudi s sprejemom fosfata na ravni substrata. Iz substrata se prenese fosforilna skupina na ADP.

Z direktnim prenosom fosforilne skupine iz druge energetsko bogate spojine - s kreatin-kinazo se lahko iz kreatinfosfata prenese fosforilna skupina na ADP, tako se ATP obnovi.

Ob intenzivnem mišičnem delu in pomanjkanju ATPja lahko adenilat-kinaza prenese iz enega ADP na drugega pirofosfat, dobimo ATP in AMP.

Katabolni procesi so procesi razgradnje. Nastajajo oksidirani koencimi, ki lahko svoje redukcijske ekvivalente (elektrone) prenesejo na dihalno verigo. Kisik je končni akceptor elektronov, ki se prenašajo po dihalni verigi. Za to porabimo približno 90 % vsega kisika, ki ga vdihamo.

Predavanje 14; 2. 11. 2011 / Vita Dolžan

ATP in reducirani koencimi (NADH) so v celici pokazatelji energetskega stanja (energetska valuta - lahko posredujejo energijo med katabolnimi in anabolnimi procesi). Tudi nivo reduciranih koencimov torej odraža energetsko stanje celice.

NADH je bolj pomemben pokazatelj energetskega stanja celice kot FADH, čeprav sta oba reducirajoča koencima - razlog je, da je NADH (NAD) topen koencim in lahko v reakcije prihaja in odhaja, medtem ko je FADH (FAD) vezan na encim, deluje kot prostetična skupina in ni topen, zato svoje redukcijske ekvivalente takoj odda naprej. FAD lahko sprejme en vodikov atom in se delno reducira, v tej obliki je izredno reaktiven, ali pa sprejme dva vodikova atoma in se popolnoma reducira; zato, da se zmanjša reaktivnost, je vezan na encim in takoj odda elektrone naprej. NADH pa sprejme vedno hidridni ion.

Glavne poti **nastajanja ATP** so:

1. oksidativna fosforilacija - za ta proces nujno potrebujemo kisik
2. prenos fosforilne skupine iz energetsko bogatih substratov
3. prenos fosforilne skupine iz energetsko bogatih rezervnih spojin v celici (iz kreatin fosfata ali iz dveh ADPjev z adenilat kinazo).

CELIČNO DIHANJE

Lahko jo razdelimo na tri stopnje:

1. aktivacija in vstop v razgradnjo; celično dihanje predstavlja centralno pot dobivanja energije z oksidacijo in je skupna vsem gorivom - ogljikovim hidratom, aminokislinam, maščobi. Pri procesih aktivacije je skupni produkt vseh metabolnih poti acetil koencim A. Pri teh procesih se sprosti relativno malo energije (pri glukozi se do aktivaciji acetil koencima A sprosti samo 7 % celotne energije, ki jo ima molekula, sprosti se že nekaj CO₂).

2. citratni cikel, katerega vloga je predvsem pridobivanje energije in pa preskrba z določenimi intermedii. V tem ciklu se ogljikov skelet acetilnega ostanka popolnoma oksidira do CO₂ in nastanejo reducirani koencimi + ena molekula GTP. Zelo malo celične energije se torej v citratnem ciklu sprosti v obliki GTP, večina energije pa se sprosti v obliki reduciranih koencimov. Nastanejo tri molekule NADH in ena molekula FADH₂.

3. prenos elektronov po dihalni verigi in oksidativna fosforilacija, da lahko citratni cikel poteka in da iz teh reduciranih koencimov dobimo energijo v obliki ATP morajo te reducirani koencimi svoje elektrone prenesti na dihalno verigo, kjer se ta energija ob prehodu elektronov preko prenašalcev v tej verigi postopoma sprošča; na koncu se elektroni prenesejo na kisik.

Celično dihanje poteka v mitohondrijih, ki morajo biti funkcionalni. Večina encimov piruvatnega in citratnega cikla je v matriksu mitohondrijev, dihalna veriga pa je na notranji mitohondrijski membrani (tam poteka sinteza ATP).

Acetil koencim A (Acetil-CoA) je osrednji intermediat, ki vstopa v citratni cikel in je produkt oksidativne razgradnje vseh različnih metaboličnih gradiv.

Iz ogljikovih hidratov ga lahko dobimo ali iz glukoze ali iz zalog v telesu. Poteče glikoliza do piruvata, potem se ta spremeni v acetil-CoA.

Tudi nekatere AK se razgradijo do piruvata, druge direktno do acetil-CoA ali do ketonskih spojin. Maščobne kisline se z beta oksidacijo razgradijo direktno do acetil-CoA.

Tudi pri oksidaciji etanola dobimo acetil koencim A.

Iz vseh mogočih metaboličnih goriv dobimo torej acetil-CoA.

Oksidativna dekarboksilacija piruvata v acetil-CoA



Pri oksidativni dekarboksilaciji se odcepi CO₂. Ostaneta nam dva ogljikova atoma na piruvatu, tako da bi v teoriji dobili acetat; vendar pa ta acetat ne ostane prost ampak se zaestri na koencim A.

Ker gre za oksidativno dekarboksilacijo pride do neke oksidacije, zato mora v reakcijah nastopati še kisik, ki lahko v reakciji nastopa direktno, lahko pa gre samo za prenos elektronov; tokrat gre samo za prenos elektronov na NAD⁺. Ker gre za oksidacijo torej dobimo reduciran koencim.

Oksidoredukcije katalizirajo dehidrogenaze. Reakcijo oksidativne dekarboksilacije piruvata v acetil-CoA katalizira **piruvatno dehidrogenazni kompleks (PDH)**. To je kompleks treh encimov: *piruvat dehidrogenaze (E1)*, katere prostetična skupina je TPP (tiamin pirofosfat), *transacetilaze (E2)*, katere prostetična skupina je dihidrolipoat, ter *dihidrolipoil dehidrogenaze (E3)*, katere prostetična skupina je FAD.

Sodelujejo še trije koencimi, ki delujejo kot prostetične skupine treh encimov: kompleks, ki ga sestavljajo trije encimi se imenuje **piruvat dehidroksilaza (dehidrogenaza)**. Koencim prvega encima v kompleksu je **TPP** (tiamin piro fosfat). Prostetična skupina drugega encima, ki sodeluje pri prenosu acetilnega ostanka na koencim A, je **dihidrolipoat**, na tretji encim pa je vezan FAD. Te encimi tvorijo velik multiproteinski kompleks, ki si substrate podaja med seboj, da te ne oddisociirajo v spojino. Poleg katalitičnih podenot so v sistemu še dve regulatorni podenoti - PDH kinaza in PDH fosfataza.

Tiaminpirofosfat (TPP) je ključen encim za kataliziranje reakcij dekarboksilacije, ker ima reaktiven ogljikov atom, ki lahko cepi vez med ogljikom, ki nosi karboksilno skupino in ogljikom, ki nosi keto skupino. Karboksilna skupina se odcepi kot CO₂ (dekarboksilacija), preostanek pa se kot acetaldehid veže na tiaminpirofosfat, ki potem prenaša aldehidno skupino.

Lipoat prenaša lahko vodikove atome, lahko pa prenaša tudi acilno skupino. Zanj je značilna dolga veriga, ki omogoča lipoatu veliko fleksibilnost.

Reakcijski cikel piruvat-dehidrogenaznega (PDH) kompleksa

Prvi in ključni encim je piruvat dekarboksilaza, ki vsebuje TPP v aktivnem centru. TPP katalizira razcep vezi, odcepi se CO₂. acetilna skupina se veže na encim (na TPP). Potem pride do oksidacije hidroksietilnega ostanka in hkrati z oksidacijo se ostanek prenese na lipoat. Ta je oksidiran in se reducira in acetilira - v drugi stopnji gre torej za oksidacijo in prenos acetilnega ostanka na lipoat. Nato se iz lipoata prenese acetilna skupina na koencim A, dobimo reducirani lipoat.

Do zdaj smo že dobili CO₂ in nastal je acetil-koencim A; zdaj mora poteči še regeneracija reduciranega lipoata. Najprej se vodikovi atomi iz lipoata prenesejo na FAD, ki je del tretje encimske podenote (dihidrolipoil dehidrogenaze), nastane FADH₂ - potem pa se mora še FADH₂ regenerirati, zato se iz FADH₂ prenesejo elektroni na NAD(+), nastane reduciran NADH + H(+).

Uravnavanje PDH kompleksa

Zelo natančno je uravnavan na večih nivojih. Njegova vloga je predvsem preskrba z energijo, zato je uravnavan z energetskim stanjem v celici; kadar je visoka koncentracija ATP, NADH in acetil-CoA je alosterično inhibiran. Inhibiran je tudi s produktom - kadar se kopičijo produkti se substrati težje vežejo na encim. To potem inhibira (upočasni) potek reakcij.

Na transacetilazi (ko gre za prenos acetila na koencim A) bo prenos počasnejši, kadar je visoka koncentracija acetil-CoA. Kadar pa je visoka koncentracija NADH se bo NAD težje vezal na tretjo podenoto, da bi sprejel elektrone od FADH₂ - če je veliko produktov se torej substrati težje vežejo na encim.

Najpomembnejše in najbolj kompleksno je uravnavana prva podenota encima (piruvat dehidrogenaza). Uravnavana je preko regulatornih podenot (PDH kinaze in PDH fosfataze) encimskega kompleksa. PDH kinaza fosforilira prvo podenoto in že če se doda ena sama fosforilna skupina se aktivnost podenote zmanjša za 99 % (zelo močna inhibicija s fosforilacijo!).

Sama kinaza pa je tudi alosterično uravnavana, aktivira jo visoka koncentracija NADH in acetil-CoA (če je dovolj produktov reakcij bo kinaza aktivirana in bo piruvat dehidrogenaza zavrta). Če pa je visoka koncentracija ADP, kar kaže na potrebo po energiji, ali pa visoka koncentracija piruvata (če glikoliza hitreje poteka), potem bosta ADP ali piruvat zavrla (inhibirala) kinazo in piruvat dehidrogenaza bo ostala aktivna, nefosforilirana. PDH kinaza je glavni regulatorni encim; PDH fosfataza pa je pomembna za regulacijo samo takrat, kadar je visoka koncentracija kalcija (v mišični celici ob kontrakciji, ker je takrat veliko potrebe po ATP) ali magnezija. Ta encim lahko defosforilira encim v aktivno obliko. Regulirana je tudi hormonsko - v maščevju jo aktivira inzulin, v srčni mišici noradrenalin.

Zakaj je potrebno, da je uravnavanje tega kompleksa tako natančno? Zato, ker PDH kompleks predstavlja metabolično stikalo med metabolizmom ogljikovih hidratov in maščobnih kislin. Ogljikovo ogrodje lahko dobimo nazaj iz piruvata ali laktata, ko pa pridemo do acetil koencima A, je to ogrodje izglubljeno in ga ne moremo več dobiti nazaj.

Prirojeno pomanjkanje piruvat-dehidrogenaze

Imamo lahko prirojeno ali pridobljeno pomanjkanje PDH (pri pridobljenem gre predvsem za pomanjkanje koencimov, zlasti TPP). Pri prirojenem pa gre lahko za okvaro v genu za eno od treh podenot PDH kompleksa, ali pa v genih za katalitično/regulatorno podenoto. Najbolj so prizadeti možgani, ker potrebujejo največ energije. Prizadeta je tudi srčna mišica.

Če so okvare hude niso združljive z življenjem, blage okvare pa se kažejo z zvišano serumsko koncentracijo piruvata (ker se ne mora dekarboksilirat se pretvarja v laktat ali transaminira v alanin), laktata in alanina; to povzroča acidoza. Diagnozo dobimo z določanjem aktivnosti encimskega kompleksa.

Zdravimo z zmanjšanjem vnosa ogljikovih hidratov, da zmanjšamo nastanek piruvata.

Dikloroacetat je inhibitor protein kinazne podenote PDH kompleksa, tako da bo encim stalno aktiviran.

Pomanjkanje tiaminpirofosfata - tiamina (vitamin B1)

Zlasti so ogroženi kronični alkoholiki, ki svoje kalorične potrebe zadostijo z vnosom alkohola in imajo zelo enostransko, pomankljivo prehrano. Okvare se kažejo z nevrološkimi okvarami in srčnim popuščanjem. Pomanjkanje tiaminpirofosfata lahko določijo z določanjem encimske aktivnosti transketolaze v eritrocitih (to je encim, ki prav tako uporablja tiaminpirofosfat).

Zdravimo z vnosom vitamina B1 (tiamina).

Povzetek:

- Pri PDH kompleksu gre za tri katalitične podenote in dve regulatorni.
- najprej poteče dekarboksilacija s tiaminpirofosfatom, nanj se veže acetil
- acetil se prenese iz TPPja na transacetilazo, ta prenese na koencim A
- reducirani lipoat se reoksidira s pomočjo tretje katalitične podenote, ki katalizira prenos dveh vodikovih atomov najprej na FAD, nato pa iz FADH₂ na NAD

POTEK CITRATNEGA CIKLA

Gre za osem reakcij. Cikel se začne z nastankom citrata, po tem je dobil tudi ime, in pa po Hans Krebsu (Krebsov cikel).

Prva reakcija je torej prenos acetilnega ostanka na oksaloacetat in dobimo citrat, ki ima šest ogljikovih atomov. Poteče odcep in vezava vode, dobimo izocitrat (poteče izomerizacija). Nato pa poteče prva ključna reakcija - prva oksidativna dekarboksilacija; odcepi se CO₂ in nastanejo reducirani koencimi v obliki NADH, dobimo alfa ketoglutarat. Potem poteče druga oksidativna dekarboksilacije, spet se odcepi CO₂, nastanejo reducirani koencimi v obliki NADH, preostali ogljikov skelet pa se veže na koencim A in dobimo sukcinil koencim A. To je tioester in z razcepom te tioesterske vezi se sprosti toliko energije, da je mogoča fosforilacija GDP v GTP. Potem poteče še ena oksidoredukcija, vendar se pri tem vodikovi atomi (elektroni) prenesejo na FAD, nastane FADH₂ - to reakcijo katalizira sukcinat dehidrogenaza, ki je edini encim citratnega cikla, ki se nahaja na notranji mitohondrijski membrani (ostali encimi citratnega cikla so v matriksu mitohondriju). Zdaj se mora le še fumarat regenerirati v oksaloacetat.

V cikel vstopita dva ogljikova atoma v obliki acetata. Namen citratnega cikla je dekarboksilacija (nastanek CO₂) in pa oksidacija - da poteka oksidacija vidimo, ker nastajajo reducirani koencimi (poteka prenos elektronov na koencime).

Citratni cikel ne poteka brez kisika, ker v mitohondriju nimamo neomejeno količino koencimov in če je reduciranih koencimov preveč in ne morejo redukcijskih ekvivalentov nikamor prenesti (te elektrone navadno prenašajo na dihalno verigo, katere končni prejemnik je kisik; dihalna veriga ne funkcionira, kadar ni prisoten končni akceptor elektronov!) potem se bo proces ustavil, ker bo prišlo do pomanjkanja koencimov, ki lahko vežejo elektrone.

Produkti citratnega cikla imajo več kisikovih atomov, kot jih ima acetilna skupina - od kod torej pridejo kisikovi atomi, ki omogočajo nastanek CO₂? Dva kisikova atoma prideta iz vode, ta vstopa pri nastanku citrata. Poleg tega v stopnji 5 reakcije vstopa pirofosfat v obliki PO₄.

Prva reakcija - nastanek citrata

Encim citrat-sintaza se aktivira z vezavo oksaloacetata (koncentracija oksaloacetata v celici je relativno nizka). Katalizira vezavo acetil-CoA na oksaloacetat in kljub majhni koncentraciji oksaloacetata je energetsko ugodna in poteka v smer produktov, saj pride veliko energije od cepitve tioesterske vezi.

Druga reakcija - nastanek izocitrata

Poteče izomerizacija. Citrat ima na enem ogljikovem atomu OH in COO skupino. Ta ogljik se ne more naprej oksidirati. Da bo lahko potekla oksidacija se hidroksilna skupina prenese na drug ogljikov atom in dobimo izocitrat. Ta izomerizacija poteka preko vmesnega intermediata tako, da se najprej odcepi voda in nastane dvojna vez, potem pa poteče adicija vode na dvojno vez. Encim se imenuje po intermediatu - akonitaza (intermediat je cis akonitat).

Tretja reakcija - oksidativna dekarboksilacija izocitrata

Mehanizem je drugačen kot pri PDH kompleksu. Najprej poteče oksidacija hidroksilne skupina, nastane keto skupina - ta intermediat je nestabilen in pride do spontane dekarboksilacije,

dobimo alfa ketoglutarat. Gre torej za oksidativno dekarboksilacijo, ki jo katalizira encim izocitrat-dehidrogenaza. Ta reakcija je ena od hitrost omejujočih reakcij v citratnem ciklu.

Četrta reakcija - oksidativna dekarboksilacija alfa ketoglutarata

Druga oksidativna dekarboksilacija z alfa ketoglutarat dehidrogenaznim kompleksom. Gre za podoben mehanizem kot pri PDH kompleksu - samo prva katalitična podenota je drugačna (alfaketoglutarat dekarboksilaza, tudi ta ima vezan TPP). Koencim A se zaestri s sukcinilnim ostankom.

Peta reakcija - fosforilacija na ravni substrata, nastanek sukcinata in GTP

Sukcinil-CoA je tioester in pri cepitvi te tioesterske vezi se sprosti toliko energije, da je možen prenos fosforilne skupine na GDP, dobimo GTP in sukcinat.

Šesta reakcija - regeneracija oksaloacetata

Sukcinat se še naprej oksidira v fumarat s sukcinat dehidrogenazo, dobimo fumarat. Kot koencim za prenos redukcijskih ekvivalentov se uporablja FAD, ta prenese elektrone direktno v dihalno verigo. Fumarat se nato v treh stopnjah regenerira v oksaloacetat - najprej se oksidira, potem se doda voda na dvojno vez (dobimo malat), potem spet poteče oksidacija v oksaloacetat.

Reakcije so reverzibilne; zadnja reakcija celo raje poteka v smeri proti nastanku malata (substrata) kot proti nastanku oksaloacetata.

Katabolična vloga citratnega cikla

Najbolj pomembna vloga citratnega cikla je dokončna oksidacija ogljikovega skeleta (razgradnja metabolnih goriv), nastane CO₂. Če bi metabolna goriva zažgali v prisotnosti kisika bi dobili CO₂ in vodo, v citratnem ciklu pa dobimo nekaj GTPja, vsa ostala energija pa je shranjena v obliki reduciranih koencimov in se sprosti v dihalni verigi pri oksidativni fosforilaciji ter tako omogoči izgradnjo ATP.

Vloge so torej:

- razgradnja ogljikovega skeleta
- nastanek GTP
- nastanek reduciranih koencimov (posledično ATP)
- preskrba z intermediati drugih metabolnih poti - te intermediati lahko cikel zapustijo in se uporabijo v drugih metabolnih poteh; so pomemben izhodni vir za sintezo aminokislin, nevrottransmitterjev, hema v jetrih. Vendar pa če te intermediati citratni cikel zapuščajo jih je treba nadomeščati, reakcije s katerimi se nadomeščajo, pa so anaplerotične reakcije.

Anaplerotične reakcije

Pri tem so predvsem pomembne aminokisliline. V pogojih stradanja je citratni cikel pomemben za glukoneogenezo. Aminokisliline lahko nadomeščajo glukozo, ki jo izgubimo - z deaminacijo glutamata dobimo alfa ketoglutarat, s transaminacijo aspartata pa oksaloacetat.

Zelo pomembno je, da z oksidacijo piruvata dobimo oksaloacetat. Reakcijo katalizira piruvat karkoksilaza, ki katalizira prenos karboksilne skupine iz bikarbonata na piruvat.

Citratni cikel ima torej vlogo v katabolizmu in anabolizmu - **amfibolična vloga**.

Dihalna veriga je uravnavana s potrebo po ATP (koncentracijo ADP), zato bo tudi citratni cikel uravnavan s potrebo po ATP oz. zlasti s koncentracijo ADP. Poleg tega bo uravnavan tudi z razmerjem med reduciranimi in oksidiranimi koencimi. Obstajajo tri ključne regulatorne stopnje:

1. reakcija s citrat sintazo - ta je najbolj inhibirana ob visoki koncentraciji citrata.
2. reakcija z izocitrat dehidrogenazo - to je ključni regulatorni encim. Ta ogljikov skelet ireverzibilno usmeri v citratni cikel. Izocitrat dehidrogenaza je alosterično modulirana z ADP. Kadar je koncentracija ADP visoka je veliko hitrejša vezava izocitrata na encim.
3. ketoglutarat dehidrogenaza - ni alosterično uravnavan, ampak je inhibiran z visoko koncentracijo NADH in visoko koncentracijo kalcija.

Predavanje 15; 3. 11. 2011 / Vita Dolžan

PRENOS ELEKTRONOV PO DIHALNI VERIGI IN SINTEZA ATP (OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA)

Gradient protonov omogoča sintezo ATP. Pri oksidativni fosforilaciji torej ločimo dva procesa - fosforilacije brez oksidacije ni, lahko pa teče dihalna veriga brez fosforilacije. Dihalna veriga predstavlja prenos elektronov po ustreznih kompleksih do končnega akceptorja (kisika), oksidativna fosforilacija pa je sama sinteza ATP. Poteka v funkcionalnih mitohondrijih.

V katabolnih procesih nastajajo reducirani koencimi, te lahko svoje redukcijske ekvivalente prenesejo ali v anabolne procese, ali pa na dihalno verigo. Tisti koencimi, ki omogočajo pridobivanje energije, takrat gre predvsem za prenos redukcijskih ekvivalentov na NAD. 90 % vsega kisika, ki ga vdihamo, se porabi za procese oksidativne fosforilacije.

Kje nastajajo redukcijski ekvivalenti? NAD in FAD služijo kot prejemniki redukcijskih ekvivalentov; encimi, ki te reakcije katalizirajo, so dehidrogenaze.

Prenos elektronov na kisik poteka v večih stopnjah, postopoma; zato, da jo celica lahko uporabi in je ne raznese.

PROTEINSKI KOMPLEKSI V DIHALNI VERIGI

Dihalna veriga je sestavljena iz velikih proteinskih kompleksov; iz večih podenot, ki se nahajajo v notranji mitohondrijski membrani. Prvi kompleks je **NADH dehidrogenaza** (v tem procesu bo NADH oddal svoje protone kompleksu in se reoksidiral), drugi je **sukcinat dehidrogenaza**, to je encim iz citratnega cikla. Pri oksidaciji sukcinata v fumarat nastane reduciran FADH₂, ki takoj preda naprej svoje elektrone sukcinat dehidrogenazi in se s tem reoksidira. Tretji kompleks v dihalni verigi je **ubikvinon-citokrom c oksidoreduktaza**, ima hemske vezane in železo-žveplove proteine in omogoča prenos elektronov med dvema lipidotopnima prenašalcema v membrani - med ubikvinonom in citokromom c. Četrty kompleks pa je **citokrom c oksidaza**, tu

se elektroni prenašajo preko različno vezanih citokromov na končni akceptor kisik.

Te kompleksi so sestavljeni iz večih podenot, nekatere od njih so zapisane v mitohondrijskem genomu, druge v jedrskem genomu. Sodelujeta še dva lipidotopna prenašalca: **ubikvinon Q**, ki prenaša elektrone iz prvega na tretji kompleks in **citokrom c**, ki omogoča prenos elektronov iz tretjega na četrti kompleks.

UBIKVINON (KOENCIM Q)

Ubikvinon je oksidiran zelo topen zaradi stranske verige. Lahko sprejme en elektron in en proton, se delno reducira v semikvinon. Tak je izjemno reaktiven, ima pa veliko afiniteto za sprejemanje elektronov in se lahko tako popolnoma reducira v ubikvinol. Lahko tudi odda en ali dva elektrona in prenaša tudi protone.

CITOKROM C

Ima hemsko vezano železo. Hem je kovalentno vezan na apoprotein preko cisteinskih ostankov. Pri drugih citokromih hem ni kovalentno vezan ampak je povezan s koordinativnimi vezmi. V dihalni verigi sodelujejo citokrom A, B in C - citokroma A in B sestavljata multiproteinske transmembranske komplekse, citokrom C pa je topen in prenaša elektrone iz tretjega na četrti kompleks. Železo v hemu ima pomembno vlogo, saj lahko sprejme en elektron in se s tem reducira, potem pa odda elektron in se reoksidira.

Elektroni se prenašajo v dihalni verigi tudi preko proteinov, ki imajo železo-žveplov center.

Prenašalci elektronov so v dihalni verigi razporejeni tako, da afiniteta za elektrone vzdolž dihalne verige narašča - vsak naslednji prenašalec v verigi ima večjo afiniteto za elektrone, zato ga bo iztrgal predhodnjemu. Največjo afiniteto za sprejemanje elektronov pa ima kisik. To se kaže kot naraščujoč redoks potencial prenašalcev.

Potek elektronov po posameznih kompleksih - NADH odda svoje elektrone prvemu kompleksu. Najprej se prenesejo na FMN, potem na železo-žveplove centre in preko teh na koencim Q. Ta je v membrani topen in odda elektrone, ki jih je sprejel od prvega kompleksa, železo-žveplovim proteinom v tretjem kompleksu. Te sprejmejo samo elektrone, protone pa prečrpajo v medmembranski prostor. Elektroni potem potujejo preko citokromov na citokrom c, ki svoje elektrone odda naslednji verigi prenašalcev v kompleksu 4. Tu se elektroni prenašajo preko proteinov z bakrovimi centri, citokroma a, a₃, na kisik.

Pri vsakem od teh prenosov se energija sprošča. Porablja se za črpanje elektronov v medmembranski prostor. V prvem kompleksu se prečrpajo štirje protoni v medmembranski prostor, v tretjem kompleksu štirje protoni, v četrtem pa dva. Za vsak mol NADH, ki vstopi v dihalno verigo, se torej prenese 10 molov protonov.

Če elektroni pridejo preko FAD se prvi kompleks preskoči in grejo elektroni preko drugega kompleksa na koencim Q - tako se v tem primeru prečrpa samo 6 molov protonov.

Kemiosmozna teorija

Gradient elektronov ustvari razliko v pH (medmembranski prostor je bolj kisel, ima nižji pH, kot matriks), hkrati pa protoni nosijo tudi naboj in ustvari se električni gradient preko membrane. Ta

dva potenciala predstavljata **protonmotorno silo**, ta sila je tista, ki omogoča sintezo ATP. Pri sintezi ATP je ključna **ATP-sintaza**. Ta encim ima transmembranski del in neko 'glavico', oba sta sestavljena iz večih komponent. Glavica je iz treh alfa in treh beta podenot in je glede na membrano fiksna, nanjo je pritrjena preko delta podenote in dolge b2 ročice, ki se vsidra v membrano. Transmembranski del, ki ga sestavlja 12 c podenot, pa predstavljajo kanalček, ki se v membrani lahko vrti (rotor). Med podenoto a in rotorjem pa se nahaja kanalček, po katerem potujejo vodikovi protoni in vrtijo rotor. To vrtenje se prenaša na os, ki je iz gama in epsilon podenot, ki ustrezno spreminjata konformacijo podenot na glavici, te sintetizirajo ATP.

En mol NADH ustreza 10 molom H⁺, to ustreza sintezi 2,5 molov ATPja. Za en mol FADH₂ pa nastane le 1,5 mola ATPja, ker FADH₂ preskoči prvi kompleks v dihalni verigi in posledično prečrpa le šest molov H⁺.

Elektrokemijski gradient, ki se ustvari, ne služi le za sintezo ATP, ampak služi tudi za izmenjavo ionov. Sintetiziran ATP mora priti ven iz mitohondrija, ADP in Pi pa morata priti v mitohondrije. Gradient protonov se uporablja tudi za vnos anorganskega fosfata (simport preko **fosfatne translokaze**), ADP in ATP pa se zgolj zamenjata preko ustrezne **adenin nukleotid translokaze**.

Uravnavanje hitrosti oksidativne fosforilacije

Prvenstveno je uravnavana s potrebo po energiji. To nakazuje predvsem nivo ADP. Hitrost sinteze ATP in hitrost dihalne verige je torej uravnavana s koncentracijo ADP, ob pogojih da dihalna veriga funkcionira normalno in je nemotena preskrba z reduciranimi koencimi. Hitrost sinteze ATP se zmanjša če ni dovolj preskrbe z reduciranimi koencimi, če ni dovolj velik vnos ADP in Pi v mitohondrij ali če ni dovolj kisika (brez dihalne verige ni sinteze ATP!). Načeloma je hitrost oksidativne fosforilacije omejena s kapaciteto dihalne verige za prenos elektronov.

Kaj lahko ustavi dihalno verigo?

Lahko se ustavi zaradi metabolnih strupov, npr. **rotenon**, ki zmoti prehod elektronov iz železo-žveplovih proteinov na prenašalec v prvem kompleksu. **Malonat** inhibira drugi kompleks, **antimicin A** pa tretji kompleks, ker inhibira prehod elektronov iz citokroma b na c1. Askorbat in TMPD inhibirajo prehod elektronov po četrtem kompleksu. Najpomembnejši in najbolj pogost pa je **dušikov monoksid**, ta inhibira prenos elektronov preko citokrom-c oksidaze na kisik.

Druga skupina metabolnih strupov pa je delno lipidotopna, zato so te strupi sposobni vezati pozitivno nabite ione (npr. kalij) v medmembranskem prostoru, kjer je velika koncentracija protonov; ko pa se približajo matriksu mitohondrijev ta proton oddajo, ker je tam koncentracija protonov nizka - na ta način rušijo gradient, rečemo jim odklopniki (valinomycin!). Drugi inhibirajo ATP sintazo - dihalna veriga lahko poteka še nekaj časa, dokler ni gradient elektronov prevelik. **Termogenin** je eden od odklopnikov. (odklop = ko se ruši protonski gradient se energija sprošča kot toplota). Skrbi za termoregulacijo v rjavem maščevju, nahaja se v notranji mitohondrijski membrani.

Nektare podenote proteinov so kodirane v mitohondrijski DNA. Ta je zelo podvržena napakam, nima popravljalnih mehanizmov... če pride do napak bodo te komponente nefunkcionalne, posledično mitohondriji manj funkcionalni in tkiva ne bodo dovolj preskrbljena z energijo (najbolj prizadeti so možgani ali srčna mišica).

REAKCIJE, KI NISO POVEZANE Z DIHALNO VERIGO

Imamo dve glavni družini encimov - oksidaze in oksigenaze. Oksidaze katalizirajo direkten prenos elektronov iz substratov na kisik, tako da se kisik reducira do vode ali vodikovega peroksida (oksidazam, ki katalizirajo nastanek peroksida, pravimo tudi peroksidaze). Iz substrata se torej elektroni neposredno prenesejo na kisik, ta se reducira do vodikovega peroksida, substrat se oksidira.

Oksigenaze pa katalizirajo tiste reakcije, pri katerih se kisik vključi v substrat. V substrat se lahko vključi en atom iz molekule kisika, drugi pa se reducira do vode (te reakcije katalizirajo monooksigenaze), ali pa se oba kisikova atoma vključita v substrat (katalizirajo dioksidaze).

Citokromi p450 - monooksigenaze

Ne gre za iste citokrome, ki smo jih srečali v dihalni verigi. Citokromi p450 potrebujejo nek donor elektronov, to je NADPH. Elektroni se na citokrom p450 prenesejo preko citokrom p450 reduktaze (drugi encim), ta prenese samo en elektron na citokrom p-450, čeprav NADPH prenaša elektrone v obliki hidridnih ionov.

Citokromi p450 katalizirajo različen spekter reakcij. Svoje ime so dobili, ker so jih prvič izolirali iz jeter in so absorbirali svetlobo pri 450 nanometrih. Kratica za citokrom p450 je **CYP**. Geni se pišejo isto kot proteini, vendar ležeče (**CYP**). V eni družini so tisti, ki imajo 40 % homolognost (označujemo s številkami); v poddružinah pa tisti, ki imajo 55 % homolognost (označujemo s črkami).

Citokromi presnavljajo endogene substrate in eksogene substrate (ksenobiotike); posamezni citokromi so specifični za različne substrate, ker pa je ksenobiotikov ogromno, imamo ogromno število citokromov. Predvsem CYP1, 2 in 3 sodelujejo pri presnovi eksogenih substratov. CYP2C9 ni pomemben le za presnovo zdravil ampak tudi za prenoso vnetnih intermediatov. Nekatere družine pa sodelujejo pri presnovi endogenih substratov (sinteza steroidov, steroidnih hormonov, lipidotopnih vitaminov).

V skorji nadledvične žleze iz holesterola nastajajo glukokortikoidi in mineralokortikoidi, tudi adrenalni androgeni. Različni citokromi p450 (iz družin 11, 17, 21) sodelujejo pri tej biosintezi. Nekateri od njih se nahajajo v mitohondrijski membrani, večina pa jih je v membranah endoplazemskega retikuluma.

Faze presnove telesu tujih snovi

Telesu tuje snovi so mnogokrat lipofilne in če pridejo v naše telo (v celico) jih moramo pretvoriti v neko bolj vodotopno obliko, da jih lahko izločimo z urinom ali preko žolča v blato. Ta pretvorba v vodotopno obliko poteka v večih fazah.

Prvo fazo predstavljajo reakcije s citokromi p450. V lipofilno molekulo se uvede hidroksilna

skupina. Na ta način postane ta spojina bolj reaktivna. Taki metaboliti se lahko vežejo na DNA, povzročajo njene poškodbe, zato mora poteči druga faza presnove - reakcija konjugacije. Reaktivni metabolit je torej aktiviran samo zato, da se lahko v naslednji fazi konjugira z glutationom, glukuronsko kislino ali očetno kislino. Ta konjugacija naredi molekulo še bolj vodotopno, večinoma pa je ta produkt tudi manj reaktiven (toksičen). Takšen vodotopen metabolit se lahko potem prenese iz celice s prenašalci (ABC transporterji). Gre torej za tri faze presnove ksenobiotikov.

PRESNOVA ZDRAVIL

Več kot tri četrtine presnove vseh zdravil poteka preko različnih citokromov p450 (največ preko CYP3A4).

Odgovor na zdravila je lahko odvisen od citokromov p450

Za citokrome obstaja več alelov. Če se kateri okvarijo (delecija, sprememba mesta izrezovanja intronov) potem ljudje ne morejo presnavljati določenih zdravil. Tako so ljudje lahko počasni metabolizatorji - če bi jemali normalne odmerke zdravil, ki se preko teh citokromov inaktivirajo, bo koncentracija zdravil v krvi previsoka in bo naraščala, ker se zdravila ne bodo morala dovolj hitro odstranjevati preko urina (dobili bodo naslednji odmerek še preden se bo prejšnji metaboliziral).

Ljudje pa imajo lahko tudi več kopij alelov in bodo posledično prehitro presnavljali zdravila in bodo morali jemati večje koncentracije zdravil, saj bo drugače premalo zdravila v plazmi ker se bo prehitro izločal.

NOS - Sintaze dušikovega NO (sinteza dušikovega oksida)

Te encimi katalizirajo vgraditev enega atoma kisika v substrat, drugi pa se vgradi z dušikom v dušikov oksid. Reakcije potekajo preko dveh stopenj; NADPH predstavlja vir redukcijskih ekvivalentov. Substrat je arginin. Vanj se najprej vgradi en atom kisika, nastane hidroksiarginin. Potem pa pride do razcepa vezi in nastane dušikov oksid. En atom iz molekule kisika se torej vgradi v substrat, drugi pa se reducira do vode. Na hidroksiargininu potem poteče nadaljna oksidacija, odcepi se dušikov oksid.

Potek: En atom kisika iz molekule kisika se vgradi v arginin, odcepi se dušik, poteče nadaljna oksidacija in dobimo citrulin in dušikov oksid.

NO sintaze so podobne citokrom p450 proteinom; gre za podoben prenos elektronov kot pri citokromih p450, razlika je v tem, da citokrom p450 potrebuje svojo p450 reduktazo, medtem ko NO sintaze že nosijo zapis za lastno reduktazno podenoto.

Imamo štiri družine NO sintaz. Razlikujejo se po tem, ali je kalmodulin vezavna enote (CaM binding) del encima ali ne. NOS II vsebuje kot del encima že CaM podenoto, pri NOS I in NOS III pa se kalmodulin šele veže na encim, ko se zviša koncentracija kalcijevih ionov v celici. Ko se kalmodulin veže na NOS omogoči, da je konformacija podenot taka, da se lahko iz reduktazne domene encima elektroni prenesejo na hem oksigenazne domene encima.

NOS I in NOS III sta odvisni od koncentracije kalcija. Povečano koncentracijo kalcija sproži npr. prenos živčnega impulza (NOS I deluje kot nevrottransmitter), NOS III pa je vezana na

citoplazemsko membrano in sinteza NO povzroči vazodilatacijo, zato pravijo NOS III tudi endotena NO sintaza.

NOS II pa je neodvisna od kalcijevih ionov, vseeno pa ni stalno aktivna - je inducibilna (NOS I in NOS III sta stalno prisotni in je njuna odvisnost odvisna od konc. kalcijevih ionov), aktiven encim dobimo šele, ko se inducira prepisovanje DNA za NOS II - to inducirajo npr. vnetni citokini in bakterijski lipopolisaharidi. Omogoča torej citotoksično delovanje in obrambo pred mikroorganizmi. Hkrati je NO sintaza zaradi tega vpletena tudi v vnetne procese, ker je prekomerna sinteza NO (ki je tudi prosti radikal) toksična za celico.

Delovanje NO

NO aktivira topno gvanilin ciklazo v citosolu, s tem stimulira nastajanje cikličnega GMP. Ta potem deluje na ionske kanalčke, proteinske kinaze, odvisne od cGMP in na fosfodiEsteraze. To so tudi tiste, ki razgradijo ciklični GMP in prekinejo fiziološki učinek NO.

Predavanje 16; 8. 11. 2011 / Vita Dolžan

RAZGRADNJA OGLJIKOVIH HIDRATOV

Pot razgradnje glukoze se imenuje glikoliza. Vsi ogljikovih hidrati se morajo v celici razgraditi do glukoze, ali pa se drugi sladkorji pretvorijo v glukozo oz. intermediate glikolize. Vsi ogljikovi hidrati se torej posredno ali neposredno razgrajujejo po poti glikolize.

Viri glukoze

Večino jo vnesemo v telo z ogljikovimi hidrati iz hrane. V obdobjih ko ne jemo (stradamo) pa ima telo zaloge ogljikovih hidratov v obliki glikogena. Veliko ga je shranjenega v jetrih (v obdobju sitosti kar 10 % vlažne teže jeter predstavlja glikogen in 1 % vlažne teže mišic). Ta tkiva imajo torej lastno zalogo ogljikovih hidratov. Glikogen v mišici služi kot vir energije samo mišici, kajti glukoza se po vstopu v mišico fosforilira v glukozo-6-fosfat, ta pa se ne more sprostiti iz celice. V jetrih pa obstaja posebni encim, glukozo-6-fosfataza, ki omogoča, da nastane prosta glukoza in se sprosti v kri - zaloga glukoze v jetrih je torej pomembna za vzdrževanje ravni sladkorja v krvi med obroki (med stradanjem), zaloga pa le za 12 ur. Če pa ne jemo še dlje ali pa ne vnašamo ogljikovih hidratov, pa imajo jetra sposobnost glukoneogeneze.

Koncentracija glukoze v krvi po obroku

Je odvisna od količine zaužitih ogljikovih hidratov. Zelo redko zaužijemo prav glukozo; ponavadi jo dobimo v obliki škroba ali disaharidov.

Usoda zaužitih ogljikovih hidratov

1/10 se uskladišči v maščevju, slaba tretjina se uskladišči v jetrih v obliki glikogena. Možgani porabljajo glukozo kot neposredni in glavni vir energije, mišica pa jo bodisi uporablja kot vir energije, bodisi uskladišči.

Kako glukoza pride v celico?

GLUT-4 je od insulina odvisen prenašalec, ki je v mišici. Ostali prenašalci pa so od insulina neodvisni. GLUT-1 se nahaja zlasti na eritrocitih in na krvno-možganski barieri in ima visoko afiniteto za glukozo - prenašal jo bo v celico tudi takrat, ko je glukoze v krvi malo. To je pomembno, ker eritrociti in možgani potrebujejo glukozo. Obratno je v jetrih in beta celicah pankreasa, tam je prenašalec GLUT-2, ki ima nizko afiniteto za glukozo. Prevezemala se bo torej samo takrat, ko je koncentracija glukoze v krvi dovolj velika. V beta celicah pankreasa pa ima to še drugi pomen - ker prenašalec dovoljuje vstop glukoze samo takrat, ko je koncentracija visoka, je prenašalec hkrati glukozni senzor, ki signalizira, da je treba sintetizirati inzulin. V črevesnem epiteliju so različni transporterji. GLUT-5 je za transport fruktoze (neodvisno od insulina), SGLT1 pa je z natrijem sklopljen glukozni transporter.

Od insulina odvisni transport glukoze (GLUT-4)

Kako celica ve, da je koncentracija insulina visoka? Inzulin se veže na inzulinski receptor, pride do fosforilacije znotraj citoplazemske domene. Preko kinaz (kaskade fosforilacij) se signal posreduje v notranjost celic in sproži translokacijo membranskih veziklov, kjer se nahajajo transporterji. Pride do translokacije teh veziklov iz Golgijevega aparata do plazemske membrane, vezikli se zlijejo z membrano in transporterji lahko prenašajo glukozo. Signal se prekine, ko koncentracija insulina pade.

Pri vseh transportih glukoze gre za olajšan transport - po koncentracijskem gradientu. Če bi bila v celici enaka (višja) koncentracija glukoze kot v krvi, potem bi ta iz celice uhajala nazaj v kri. Da glukoza po vstopu ostane v celici, se takoj po vstopu fosforilira - v celični membrani ni prenašalca za glukozo-6-fosfat, zato ta ne more prehajati ven iz celice. Fosforilacija ima še dva pomen - z njo se ohranja koncentracijski gradient za glukozo (ker se v celici ne kopiči prosta glukoza in se ne zmanjša konc. gradient), poleg tega se glukoza s fosforilacijo aktivira (vsi intermedijati glikolize so fosforilirani).

Glukoza-6-fosfat

Ni intermedijat izključno glikolize ampak lahko vstopa tudi v druge metabolne poti (npr. sinteza glikogena, pentoza-fosfatna pot).

GLIKOLIZA

Poteka v vseh celicah - z glikolizo celice uporabljajo glukozo kot vir energije. Glikoliza poteka v citosolu. Za nekatera tkiva je edini vir energije - npr. pri eritrocitih. Pomemben vir energije je glikoliza tudi v malignih tumorjih, kjer hitre rasti tumorskega tkiva ne dohaja nastanek novih krvnih žil in preskrbo s kisikom.

Sestavlja jo deset reakcij, končni produkti pa so piruvat, 2 ATP in 2 NADH. Ker nastaja NADH vemo, da gre za oksidativno pot (oksidacija glukoze). Nadaljna usoda piruvata in NADH pa je odvisna od razmer v celici.

Deset reakcij glikolize lahko razdelimo v dve fazi - **pripravljalna** (prvih pet reakcij, ki omogočajo, da se glukoza aktivira in pripravi na razcep na dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata;

za to se porabita 2 molekuli ATP na eno molekulo glukoze) in **izplačilna faza** (pride do oksidacije tako, da se vezi in funkcionalne fosfatne skupine v molekuli razporedijo tako, da nastanejo energetsko bogate vezi in pride do fosforilacije na nivoju substrata. Iz vsake molekule gliceraldehid-3-fosfata dobimo štiri ATP in dva NADH).
Neto torej dobimo dva ATP in dva NADH.

V pripravljalni fazi gre za dve reakciji fosforilacije, dve izomerizaciji in en razcep. V izplačilni fazi pa poteče najprej oksidacija (encimi dehidrogenaze), potem pa ena fosforilacija na nivoju substrata. Potem se vezi znotraj molekule preuredijo (izomerizacija), sledi odcep vode in nastane enojni Ester. Ker je to energetsko bogata spojina lahko spet poteče fosforilacija na nivoju substrata.

1. reakcija glikolize - fosforilacija glukoze

Je ireverzibilen proces ki omogoča, da glukoza ostane v celici. Katalizirajo jo kinaze (heksokinaze). Heksokinaze fosforilirajo tudi druge ogljikove hidrate, vendar imajo za glukozo nizek Km. V jetrih in pankreasu pa imamo glukokinazo; ta ima visok Km za glukozo, zato jo bo fosforilirala samo takrat, ko je koncentracija glukoze visoka (za razliko od heksokinaze, ki fosforilira že pri majhni koncentraciji glukoze).
To je ireverzibilen proces, ker je sklopljen s hidrolizo ATP.

2. reakcija - fosfoglukoizomeraza

Pretvorba glukoze-6-fosfat v fruktozo-6-fosfat. Tako se olajša naslednja fosforilacija. Ta reakcija je v ravnovesju in lahko poteče v obe smeri (je reverzibilna).

3. reakcija - fosfofruktokinaza-1

Iz fruktoze-6-fosfata nastane fruktoza-1,6-bisfosfat. Ker encim katalizira nastanek fosfatne skupine na mestu 1 se imenuje fosfofruktokinaza-1. Ta reakcija je ireverzibilna in usmeri glukozo v glikolizo. Je regulatorna in hitrost omejujoča stopnja glikolize. Fruktoza-1,6-bisfosfat je molekula, ki se v naslednji stopnji razcepi.

4. reakcija - aldolaza

Pride do cepitve, katalizira jo encim aldolaza. S cepitvijo dobimo dihidroksiaceton fosfat (ketoza) in gliceraldehid-3-fosfat (aldoza). Najprej v izplačilno fazo vstopa samo gliceraldehid-3-fosfat.

5. reakcija - trioze-fosfat izomeraza

Iz dihidroksiaceton fosfata nastane gliceraldehid-3-fosfat. Encim trioze-fosfat izomeraza ima zelo nizko ravnotežno konstanto, zato je lahko gliceraldehid-3-fosfata tudi 100krat več pa bo reakcija vseeno tekla v njegovo smer. Razlog je v tem, da se v naslednji stopnji hidrolize gliceraldehid-3-fosfat zelo hitro odstranjuje.

Produkt pripravljalne faze sta torej dva gliceraldehid-3-fosfata.

Izplačilna faza

Za vsako molekulo gliceraldehid-3-fosfata dobimo dva ATPja in končni produkt, piruvat.

6. reakcija - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Gre za oksidacijo in fosforilacijo. Kot vir fosfatne skupine nastopa anorganski fosfat. Aldehidno skupino je zelo težko fosforilirati, vseeno pride do fosforilacije, vendar ne direktno. Najprej poteče oksidacija, da namesto aldehidne dobimo karboksilno skupino. Potem se ta zaestri z anorganskim fosfatom. Ker poteče oksidacija (katabolni proces) potrebujemo nek oksidirani koencim, ki bo izstopil iz reakcije kot reducirani koencim. V tem primeru gre iz NAD^+ v $NADH + H^+$.

Ta stopnja je zelo pomembna!

Če se namesto karboksilne skupine veže arzenat (strup), potem ne nastane energetsko bogata vez. Intermediat spontano razpade, dobimo fosfoglicerat - preskoči se ena stopnja glikolize in to tista, pri kateri dobimo ATP.

7. reakcija - fosfoglicerat-kinaza

1,3-bisfosfoglicerat je energetsko bogata molekula. Hidroliza energetsko bogate vezi omogoči nastanek ATPja in 3-fosfoglicerata.

8. reakcija - fosfoglicerat-mutaza

Fosforilna skupina se prenese iz C-3 na C-2. Gre za izomerizacijo, katalizirajo jo encimi mutaze. Na ta način nastane nov energetsko bogat fosfat. Poteka preko intermedija 2,3-bisfosfoglicerata, ki ga dobimo tako, da se iz encima prenese fosforilna skupina na 3-fosfoglicerat. V drugi stopnji pa se iz 3' skupine 2,3-bisfosfoglicerata prenese fosfatna skupina na encim in dobimo 2'fosfoglicerat.

Bisfosfoglicerat mutaza je encim, ki katalizira nastanek 2,3-bisfosfoglicerata. Ta encim tudi obide eno stopnjo glikolize (en ATP), vendar reakcija vseeno poteka, ker ima 2,3-bisfosfoglicerat pomembno vlogo v celicah - v nekaterih tkivih se veže na hemoglobin in modulira vezavo kisika na hem. Premakne krivuljo saturacije hemoglobina na desno, to pomeni, da hemoglobin v tkivih lažje oddaja kisik. To je predvsem pomembno ob hipoksiji.

Do 1/3 vse glukoze se porabi za sintezo 2,3-bisfosfoglicerata.

9. reakcija - enolaza

Še vedno nimamo energetsko bogate vezi. Če pa se oscepi voda dobimo fosfoenolpiruvat, ki je enojni ester. To je energetsko bogata spojina, ker po hidrolizi (prenosu fosforilne skupine na ADP) nastane enolpiruvat, ki ima več tautomernih oblik.

10. reakcija - piruvat-kinaza

Fosfoenolpiruvat omogoča fosforilacijo na nivoju substrata in sintezo ATP. To je druga pomembna regulatorna stopnja glikolize, je alosterično uravnavana.

Gre torej za **katabolno pot** in za **oksidacijo** (to vidimo zato, ker nastane reducirani koencim).

Nadaljna usoda končnih produktov (piruvata in NADH) je odvisna od razmer v celici, medtem ko se ATP porabi za energijo.

Da lahko glikoliza poteka se mora NADH regenerirati (reoksidirati). To se lahko zgodi v dihalni verigi, ki poteka v intaktnih mitohondrijih ob prisotnosti kisika. Takrat bo NADH predal elektron

dihalni verigi in se s tem reoksidiral. Če je potrebna energija bo piruvat vstopil v citratni cikel in se dekarboksiliral v CO₂.

Ker pa glikoliza poteka v citosolu, mora NADH priti v mitohondrij - mitohondrijska notranja membrana ni prepustna za NADH. NADH, ki nastane v citosolu, lahko preda v dihalno verigo na dva načina:

1. preko glicerolfosfatnega prenašalnega sistema. NADH odda elektron dihidroksiaceton fosfatu, nastane glicerol-3-fosfat (reakcijo katalizira citosolna glicerol-3-fosfat dehidrogenaza). Potem pa se iz glicerol-3-fosfata prenesejo elektroni na FAD, nastane FADH₂. Iz FADH₂ se elektroni prenesejo na koencim Q in direktno na tretji kompleks dihalne verige.

2. malat-aspartat prenašalni sistem. Iz NADH se elektroni prenesejo na oksaloacetat in dobimo malat - poteče obratna reakcija, kot v matriksu mitohondriju. V notranji mitohondrijski membrani imamo dva prenašalca; prvi katalizira antiport alfa-keto kislin, drugi pa antiport aminokislin. Oba prenašalca sta pomembna. Prvi omogoča izmenjavo malata z alfa-ketoglutaratom - preko njega malat, ki je nastal v citosolu, pride v matriks mitohondrijev in se oksidira v oksaloacetat. Ta se more potem še regenerirati:

Oksaloacetat se lahko v mitohondriju transaminira v aspartat. Amino kislino dobi iz glutamata, ki se pretvori v alfa-ketoglutarat. Aspartat se lahko prenese v citosol preko drugega prenašalca, ki prenaša aminokislino. Ko pride v citosol se spet transaminira v oksaloacetat - svojo amino skupino preda alfa-ketoglutaratu, da nastane glutamat.

Če gre malat v mitohondrij bo torej ven prišel aspartat.

Na ta način iz citosolnega NADH dobimo NADH v matriksu, ne da bi se sam koencim moral prenesti v matriks. NADH svoje redukcijske ekvivalente preda v dihalno verigo.

Glikoliza do laktata je edini način pridobivanja energije, v anaerobnih pogojih (in pri eritrocitih, ki nimajo mitohondrijev).

NASTANEK LAKTATA (reoksidacija NADH v anaerobnih pogojih)

Imamo različne izoencime, laktat dehidrogenaze. Imamo srčni izoencim (**izoencim H**) in mišični izoencim (**izoencim M**). Laktat dehidrogenaza je tetramer in ima lahko različno kombinacijo izoencimov.

Mišični izoencim ima visok K_m za piruvat. Katalizira nastanek laktata iz piruvata in prevladuje v anaerobnih tkivih (skeletalni mišici), omogoči potek glikolize tudi v anaerobnih pogojih. Laktat, ki nastane v mišicah, se prenese v kri in do jeter, srca,...

Srčni izoencim pa ima nizek K_m za piruvat, tako da lahko, kadar je dovolj kisika (aerobni pogoji) zaradi tega encima srčna mišica uporablja laktat iz krvi kot vir energije - pretvori ga v piruvat in usmeri naprej v metabolizem. Seveda pa se v primeru pomanjkanja kisika lahko piruvat pretvarja v laktat.

Laktat, ki nastane pri anaerobni glikolizi, gre v kri. Lahko ga prevzame srčna mišica, lahko pa ga prevzamejo jetra in s procesom **glukoneogeneze** naredijo glukozo. Kot gorivo za glukoneogenezo se porabi šest molekul ATP. Ta glukozo lahko potuje do mišic, ki jo potrebujejo. To kroženje laktata in glukoze imenujemo **Korijev** ali **glukozo-laktatni cikel**.

SUMARNA ENAČBA GLIKOLIZE

Gre za oksidativno razgradnjo glukoze to piruvata; kadar pa so pogoji anaerobni pa hidroliza poteče do laktata.

pod aerobnimi pogoji:

Glukoza + 2NAD(+) + 2ADP + 2Pi --> 2NADH + 2 piruvata + 2ATP + 2H₂O + 4H(+)

pod anaerobnimi pogoji:

Glukoza + 2ADP + 2Pi --> 2 laktata + 2ATP + 2H₂O + 2H(+)

Zakaj je pomembna glikoliza? Kljub temu, da se sprosti z molekule glukoze relativno malo energije (dve molekuli ATPja), je pomembna kot proces pridobivanja energije. Predvsem zato, ker je zelo hiter proces (mnogo hitrejša od oksidativne fosforilacije). Zadošča za eritrocite, metabolno manj aktivna tkiva (očesna leča, steklovina,...).

Glikoliza omogoča tudi pridobivanje energije v mišicah, ki se hitro krčijo. To pridobivanje pa omogoča samo kratek čas - omogoča kratke pulze, ko dobimo veliko ATP. To so npr. mišice šprinterjev.

Anabolna vloga glikolize

Glukoza-6-fosfat (prvi intermediat glikolize) lahko vstopa v različne metabolne poti. Iz nje lahko dobimo glicerol, ki je potreben za sintezo 3-acilglicerolov. Spoznali smo tudi proces, ko iz 1,3-bisfosfoglicerata dobimo 2,3-bisfosfoglicerat, ki je pomemben regulator afinitete hemoglobina za kisik. Dobimo lahko tudi serin, piruvat pa se lahko transaminira v alanin.

Uravnavanje encimske aktivnosti

- transkripcijsko; na nivoju DNA. Če nastane več prepisa nastane več produkta.
 - na nivoju translacije; preko stabilnosti mRNA. Ta način uravnavanja je relativno počasen.
- Najhitrejši način uravnavanja omogočajo alosterično uravnavanje in kovalentne modifikacije.

Veliko procesov je uravnavanih z AMP, ne z ATP. To pa zato, ker so odstopanja v koncentraciji AMPja večja, kot odstopanja v koncentraciji ATPja. Če se koncentracija ATP zniža za 10 % se bo konc. AMP povečala za štirikrat. AMP je pomemben regulator tudi pri procesu glikolize.

Predavanje 17; 9. 11. 2011 / Vita Dolžan

Glikoliza:

- Končni produkt glikolize je odvisen od prisotnosti kisika; če je kisik prisoten, je končen produkt piruvat (dihalna veriga poteče), če ni prisoten pa je končen produkt laktat.
- eden od glavnih namenov glikolize je pridobivanje energije, nekateri intermediiati glikolize pa imajo tudi druge funkcije v metabolizmu (celici)

Metabolni procesi so uravnavani zlasti na tisti stopnji, ki nek substrat ireverzibilno usmeri v določeno metabolno pot, ali na tisti stopnji, kjer se metabolna pot razveji. Gre torej ponavadi za termodinamsko ireverzibilne stopnje. Aktivnost encimov, ki uravnavajo metabolne procese, pa je uravnavana na različnih nivojih - nekateri, npr. alosterična modifikacija, omogočajo takojšen

odziv, medtem ko nekoliko počasnejši procesi (npr. kovalentna modifikacija) so lahko rezultat hormonskega uravnavanja

Obstajajo še drugi načini hitre regulacije - npr. da se encim odtegne v nek del celice, kjer je neaktiven, ali pa se veže z neko drugo molekulo, ki ga bodisi aktivira, bodisi deaktivira.

Najpočasnejši proces uravnavanja je na ravni transkripcije - DNA se more prepisati v mRNA, ta se more sintetizirati v protein.

Namen vseh teh regulatornih procesov je predvsem energetska homeostaza - procesi so torej uravnavani glede na energetska stanje v celici, pokazatelji tega pa so ATP in NADH. Ker pa ima celica številne mehanizme za vzdrževanje ATP (npr. oksidativna fosforilacija, fosfokreatin) se njegova koncentracija ne spreminja drastično tudi ob povečani potrebi po energiji; zato je boljši pokazatelj energetskega stanja v celici koncentracija ADP, še boljši pokazatelj pa je AMP.

Katere stopnje glikolize so pomembne za regulacijo?

Tri stopnje v glikolizi so takšne, da so reakcije termodinamsko ireverzibilne. To so tudi regulatorne stopnje. Prva je reakcija s heksokinazo (glukokinazo) ki omogoča zadrževanje glukoze v celici. Glavna regulatorna stopnja pa je fosfofruktokinaza; rekli smo, da glukoza-6-fosfat ni izključni intermediat glikolize ampak lahko vstopa tudi v druge metabolne procese. Zato je reakcija s fosfofruktokinazo tista stopnja, ki glukozo ireverzibilno usmeri v razgradnjo (proces glikolize). Tretja pomembna stopnja pa je piruvat kinaza.

1. HEKSOKINAZA

Glede na tkiva imamo štiri različne tipe heksokinaze. Heksokinaza ima nizek K_m za glukozo, kar pomeni, da bo fosforilirala glukozo že pri nizkih koncentracijah. Glukokinaza (heksokinaza 4) pa ima stokrat višji K_m za glukozo, zato bo glukokinaza aktivirana samo, kadar bo visoka koncentracija glukoze. Ker ta deluje v jetrih to pomeni, da bodo jetra privzemala glukozo iz krvi samo takrat, kadar bo koncentracija v krvi velika (ker je heksokinaza tisti encim, ki fosforilira glukozo in jo na ta način zadrži v celici).

Različen je tudi način uravnavanja vseh encimov. Heksokinaza je alosterično inhibirana z glukozo-6-fosfatom. Kadar je koncentracija glukoza-6-fosfata velika (ne vstopa dovolj hitro v nadaljne metabolne poti) se bo encim ustavil. Glukokinaza je za razliko od heksokinaze specifična za glukozo in ni inhibirana z glukozo-6-fosfatom.

Uravnavanje glukokinaze z vezavo na regulatorni protein

Ta protein odtegne encim od citosola, kjer deluje, v jedro. Regulatorni encim ima zlasti visoko afiniteto za glukokinazo, kadar je visoka koncentracija glukoze-6-fosfata, ta afiniteta pa se zmanjša, kadar je visoka koncentracija glukoze v celici. Visoka koncentracija glukoze v celici torej poveča aktivnost glukokinaze.

Kadar je visoka koncentracija glukoze velika se encim veže v aktivno mesto glukokinaze. Glukokinaza ima zaprto (omogoča katalitično aktivnost) in odprto konformacijo. Ko se glukozo veže na odprt encim, se ta zapre, lahko se veže ATP in pride do fosforilacije glukoze. Po oddisociaciji glukoze-6-fosfata se encim vrne v odprto obliko. Kadar pa je nizka koncentracija glukoze se lahko encim spremeni v 'super odprto' obliko, kar povzroči vezavo regulatornega proteina, ki ga odtegne v jedro. Šele vezava glukoze na 'super odprto' obliko encima odtegne regulatorni protein in omogoči, da se encim vrne v citosol, kjer pa se mora še spremeniti iz

super odprte v odprto obliko.

2. FOSFOFRUKTOKINAZA

Nepovratno usmeri glukozo v razgradnjo. Obstajajo različni tkivno specifično proteini (jetra, mišice, eritrociti,...), gre pa za heterotetramere. Encim je alosterično uravnavan, ker ima poleg dveh vezavnih mest za substrat (fruktoza-6-fosfat in ATP) še štiri regulatorna mesta. Encimska aktivnost fosfofruktokinaze je torej uravnavana tako, da če je koncentracija ATP tako visoka, da se nasiti vezavno mesto za substrat, potem se ATP lahko veže še na regulatorno mesto. To je znak, da je ATPja zadosti. Vezava ATP na regulatorno mesto spremeni konformacijo encima in ga inhibira. Z vezavo ATP na regulatorno (alosterično) mesto se torej zniža afiniteta encima za substrat. Podobno encim inhibira tudi visoka koncentracija citrata. Citrat nastane v citratnem ciklu, v matriksu mitohondrija. Kadar je citratni cikel upočasnen (tudi citratni cikel je uravnavan v skladu s potrebami po energiji, glavni regulatorni encim je izocitrat dehidrogenaza) potem se kopiči citrat, ki ima svoj prenašalec in lahko gre iz mitohondrija v citosol. Visoka koncentracija citrata v citosolu je torej znak, da je dovolj energije.

Najmočnejši aktivator fosfofruktokinaze je AMP. Poleg tega jo aktivira tudi fruktoza 2,6 bisfosfat. Fosfofruktokinazo inhibira tudi visoka koncentracija protonov. To je vzrok, da ob anaerobnih pogojih ne moremo neomejeno količino časa dobivati energijo brez kisika.

3. PIRUVAT KINAZA

To je encim, ki katalizira drugo fosforilacijo na nivoju substrata v izplačilni fazi glikolize. Ta encim je v vseh tkivih alosterično uravnavan, spet glede na potrebe po energiji. Visok nivo ATP in visok nivo acetil-koencima A ali dolgoverižnih maščobnih kislin bo inhibiral piruvat kinazo. Produkt fosfofruktokinaze pa bo aktiviral piruvat kinazo.

Ko je nizka koncentracija glukoze v krvi in se sprošča glukagon, takrat glukagon preko membranskih receptorjev in kinazne kaskade aktivira proteinsko kinazo A, ki fosforilira piruvat kinazo. Ta oblika je neaktivna. Ko pa se koncentracija glukagona zniža pa fosfataze defosforilirajo piruvat kinazo v aktivno obliko. Namen tega uravnavanja je, da se ob nizki koncentraciji glukoze v krvi zniža poraba jeter, da ostane dovolj glukoze za druga tkiva. Jetra v tem primeru uporabljajo maščobe.

INTEGRACIJA GLIKOLIZE IN RESPIRACIJE

Povezana sta prvič preko NADH, ker se ta reoksidira tako, da odda elektrone dihalni verigi (dve različni poti), poleg tega piruvat, končni produkt glikolize, vstopi v mitohondrij, se oksidativno dekarboksilira v koencim A, ki vstopi v citratni cikel. Ta je vir reduciranih koencimov, ki prenesejo svoje elektrone dihalni verigi.

Če poteka glikoliza pod anaerobnimi pogoji in ne teče dihalna veriga, potem je končni produkt glikolize laktat in dobimo 2 molekuli ATP. Če pa glikoliza poteče pod aerobnimi pogoji, pa se do konca razgradi tudi piruvat, NADH odda elektrone dihalni verigi in lahko dobimo veliko več ATP.

Kako pri respiraciji dobimo energijo iz piruvata in NADH

Preko prenašalcev v membrani mitohondrija, ki prenesajo elektron iz reducirane koencima na dihalno verigo. Pri glikolizi dobimo dva NADH in dva ATP, poleg tega dobimo piruvat. Ta se oksidativno dekarboksilira v dva acetil koencima A (ker ima glukoza 6, piruvat pa 3 ogljikove atome, torej iz ene glukoze dobimo dva piruvata in s tem dva koencima A). Spet dobimo dva NADH. Koencim A vstopi v citratni cikel. Dobimo tri NADH za vsak koencim A, en FADH₂ za vsak koencim A in en ATP (GTP) za vsak koencim A.

Od prenosa elektronov iz citosolov dobimo, odvisno od tega, kako pridejo elektroni na dihalno verigo, 3 ali 5 ATPjev, plus 2 plus 5.

V mitohondriju pa dobimo 15 + 3 + 2 ATPjev.

Dobimo torej 32 ATPjev, na pram dvem, ki bi jih dobili z anaerobno razgradnjo glukoze.

Kako je uravnavana glikoliza in respiracija?

Na hitrost dihalne verige vpliva koncentracija ADP - potreba po energiji. To je tisto, kar narekuje hitrost dihalne verige (respiracije). ADP pospeši dihalno verigo in tudi fosforilacijo - celo respiracijo. Če dodajo inhibitor ADP sintaze pa se inhibira fosforilacija, prav tako pa tudi dihalna veriga! Ker če ni fosforilacije, potem se protoni kopičijo, gradient protonov preko notranje mitohondrijske membrane se poveča, ko je tako velik, se protoni ne morejo več črpati proti takšnemu gradientu. Dihalna veriga se ustavi. Če pa dodajo dinitrofenol (DNP), ki prenese elektrone iz medmembranskega prostora, pa bo dihalna veriga lahko potekala, čeprav se ATP ne bo mogel sintetizirati - gre torej za **odklopnik** (loči oba procesa).

Kaj se zgodi ob zmanjšani preskrbi tkiva s kisikom

Sintetizira se manj ATP. To pomeni, da bo glikoliza morala potekati hitreje (15krat), da bo zadoščena potreba celic po energiji. Pri dolgoročni hipoksiji to hitrejšo glikolizo omogoča povečano izražanje glikolitičnih encimov in transporterjev za glukozo. Znižan parcialni tlak kisika pospeši dimerizacijo HIF (hipoksično inducirani faktor), ta dimer potuje v jedro in sproži prepis glikolitičnih faktorjev, transporterjev glukoze in rastnih faktorjev, ki omogočajo nastanek novih krvnih žil.

Ali lahko dobijo tkiva dovolj energije z anaerobno glikolizo?

Nekaterim tkivom, ki niso metabolno tako zelo aktivna, to zadošča; npr. eritrociti, tudi nekatera slabše prekrvavljena tkiva (steklovina, kjer ni mitohondrijev, saj bi razpršili svetlobo).

Tkivom, ki pa imajo veliko potrebo po kisiku (aerobnem metabolizmu), pa anaerobna glikoliza omogoča preskrbo samo za določen čas. To so predvsem možgani, ker nimajo zalog glikogena (ne more preko krvno-možganske bariere), poleg tega imajo veliko potrebo po kisiku. Če nehamo dihati (se prekine pretok) imajo možgani za manj kot pol minute ATPja.

Vpliv ishemije na glikolizo

Sčasoma bo visoka koncentracija protonov inhibirala tudi anaerobno glikolizo (protoni nastanejo pri razgradnji laktata).

Kaj se zgodi, ko v tkivu spet prevladajo aerobni pogoji?

Takrat glikoliza začne potekati pod aerobnimi pogoji. Spet poteka dihalna veriga, dobimo več

ATP iz ene molekule glukoze, ta zvišan nivo ATP je signal, da se lahko zavre glikolitične encime, glikoliza se upočasni. Temu rečemo Pasteurjev efekt.

Aerobna in anaerobna glikoliza lahko potekata hkrati, npr. pri mišici ob intenzivnem naporu. Posledica je kopičenje laktata, ki se izplavlja v kri in pride do laktatne acidoze. Če pride do nje po mišičnem naporu, potem ni nič hudega, če pa je prisotna tudi takrat, ko ni intenzivnega mišičnega napora, je to znak, da je nekaj narobe z dihalno verigo. Katerakoli napaka v dihalni verigi, njenih kompleksih, pomanjkanje encima citratnega cikla... vse to privede do laktatne acidoze.

Predavanje 18; 9. 11. 2011 / Vita Dolžan

RAZGRADNJE DRUGIH OGLJIKOVIH HIDRATOV

Da lahko izkoristimo hranila mora najprej poteči prebava v prebavni cevi. Da lahko zaužite ogljikove hidrate telo uporabi kot metabolno gorivo, morajo produkti prebave teh ogljikovih hidratov priti v kri. Prebava disaharidov poteka in je omejena na površino črevesne sluznice, kjer so disaharidaze. Prebava škroba in kompleksnih ogljikovih hidratov pa se začne v ustih (alfa amilaza) in nadaljuje v tankem črevesju s pankreatično amilazo. Vse amilaze so hidrolitični encimi - gre za cepitve vezi s pomočjo vode. So endoglikozidaze, torej cepijo ogljikove hidrate znotraj verige. Dobimo neke oligosaharide, ki se z oligosaharidazami in disaharidazami cepijo naprej na površini črevesne sluznice.

Laktozna intoleranca

Je najbolj pogosta motnja v prebavi disaharidov - pomanjkanje laktaze. Lahko je fiziološka (starost), pridobljena (vnetni procesi črevesne sluznice), posledica je nezmožnost cepitve laktoze na glukozo in galaktozo. Pride do diareje.

Vstop produktov prebave ogljikovih hidratov v glikolizo

Produkti prebave laktoze so glukozo in galaktozo. Glukoza direktno vstopi v glikolizo, galaktoza pa se aktivira z UDP in vstopa v glukolizo na mesto glukoze-1-fosfata. Trehaloza se nahaja v določenih stročnicah in se cepi v glukozo (direkten vstop). Saharoza se cepi na glukozo in fruktozo - ta se najprej fosforilira v fruktozo-1-fosfat, potem pa se cepi z izoencimom (aldolazo B) in dobimo gliceraldehid in dihidroksiaceton fosfat; gliceraldehid se more pred vstopom v glikolizo še fosforilirati.

Vstop galaktoze v glikolizo

Galaktoza se najprej fosforilira z galaktokinazo v galaktozo-1-fosfat. Pretvorba galaktoze-1-fosfata v glukoze-1-fosfat pa ne poteka direktno, ampak preko UDP-glukoze, to pa tako, da se najprej fosfatna skupina zamenja za UDP (dobimo UDP-galaktozo in glukozo-1-fosfat; funkcionalni skupini se zamenjata). UDP-galaktoza pa se epimerizira v UDP-glukozo. Pretvorbe galaktoze-1-fosfata v glukozo-1-fosfata torej poteka preko intermediatov, na katere je vezan uridin di fosfat (UDP).

Ne epimerizirajo se fosforilirani sladkorji ampak sladkorji, ki so aktivirani z UDP. Glukoza-1-fosfat še ni intermediat glikolize, ampak se fosforilna skupina z encimom fosfoglukomutazo prenese na šesti atom; glukoza-6-fosfat pa lahko vstopi v glikolizo.

Kako pa nastane UDP-glukoza? Z aktivacijo glukoze-1-fosfata. Nanjo se prenese UMP (iz UTPja; pirofosfat se odcepi). UDP-glukoza nastopa tudi v drugih procesih (sinteza glikogena; na ta način aktivirana glukoza je izhodna spojina za sintezo glikogena).

Če je kateri od teh encimov ukvarjen pride do motenj v presnovi galaktoze. Če je okvarjena galaktokinaza, potem bo motena fosforilacija - ne bo fosforilacije galaktoze, zato bo lahko šla iz celice nazaj v kri; motnjo bomo zasledili kot visoko koncentracijo galaktoze v krvi (**galaktozemija**). Taka galaktoza se izloča tudi z urinom - zaznali jo bomo tudi v urinu. Ta motnja povzroči nastajanja očesne katarakte, sicer ni hujših okvar. Če pa je okvarjena galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza bo motena pretvorba galaktoze v glukozo. Če ob taki okvari še vedno vnašamo laktozo, potem se bo kopičil galaktoza-1-fosfat - ta pa ne more iz celice in je za celico toksičen! Bolezenske okvare bodo hude, zlasti bo prizadeto centralno živčevje. Po ugotovitvi motnje se lahko prekine vnos laktoze, vendar pa se klinična slika ne izboljša (možganske okvare se ne popravijo). Problem je tudi pri okvari epimeraze, vendar je klinična slika nekoliko milejša.

Znaki teh bolezní se pokažejo že takoj pri novorojenčkih, ker je njihov glavni vir prehrane mleko. Če se okvare, zlasti pri klasični obliki bolezní, ne prepozna dovolj zgodaj, so nepopravljive. Simptomi so hipoglikemija, slabo jejo, bruhanje, so zlatenični, povečana vranica.

Vstop fruktoze v glikolizo (produkt saharoze)

Prehod fruktoze v celico ni odvisen od inzulina (uporablja GLUT 5 prenašalec). Visok vnos fruktoze v celico ni dober.

Fruktoza v glikolizo vstopa po različnih poteh. V mišicah po drugi poti kot v jetrih. V mišici je heksokinaza, ki fosforilira vse heksoze (tudi fruktoze) in jo fosforilira v fruktozo-6-fosfat. To je direkten intermediat glikolize. Vstop fruktoze v mišico ni odvisen od inzulina. Reakcija s heksokinazo je izredno hitra in se bo porabljal ATP. Če veliko fruktoze vstopi se torej veliko ATP porabi in se zniža koncentracija ATP, posledica je višja hitrost glikolize. Če ta preseže kapacitete dihalne veriga za sprejem protonov, bo posledica laktatna acidoza.

V jetrih pa ima glukoza specifičen heksoencim (heksokinazo 4 - glukokinazo). Tudi za fruktozo obstaja specifičen encim, fruktokinaza, ki pa fosforilira fruktozo na prvem C atomu; dobimo fruktozo-1-fosfat, ki ni direkten substrat glikolize. Aldolaza jo razcepi v dve triozi; *dihidroksiaceon fosfat*, ki vstopi v glikolizo in *gliceraldehid*, ki se more še fosforilirati, da dobimo intermediat glikolize. Reakcija z aldolazo je počasna, kar ima za posledico kopičenje fruktoze-1-fosfata. Posledica je spet kopičenje ADP in spet se poruši uravnavanje glikolize.

Produkti fruktoze vstopajo v glikolizo na stopnji gliceraldehid-3-fosfata; v jetrih torej fruktoza **obide glavno regulatorno stopnjo glikolize**, kar ima spet za posledico neravnovesje med glikolizo in respiracijo - laktatna acidoza.

Tudi encimi, ki sodelujejo v metabolizmu fruktoze, so lahko okvarjeni. Če je pomanjkanje fruktokinaze, potem bo imelo to za posledico samo dvig koncentracije fruktoze v krvi in urinu. Ta

motnja je relativno benigna (ni hujših kliničnih znakov). Hujša pa je okvara aldoaze B, ki povzroči, da se v celici kopiči fruktoza-1-fosfat (ta fruktoza ne more več iz celice!). Fruktoza-1-fosfat je toksičen - v molekuli je vezan anorganski fosfat, zato se zmanjša celična zaloga anorganskega fosfata, ki ga rabimo še za nastanek ATPja pri oksidativni fosforilaciji. Fruktoza-1-fosfat tudi inhibira glikolizo, prav tako tudi glukoneogenezo, ker bi lahko intermediati, ki bi nastali, vstopali tudi v glukoneogenezo. Motena je torej preskrba z glukozo, motena razgradnja glikogena.. motnja se pokaže z znižano koncentracijo glukoze v krvi, ker pride do inhibicije razgradnje glikogena in inhibicije glukoneogeneze.

Gre za prirojeno motnjo. Bolezenski znaki se pojavijo takrat, ko v prehrano uvedemo sadje.

Klinični primer 1 - odgovor B

Klinični primer 2 - odgovor A

Predavanje 19; 10. 11. 2011 / Vita Dolžan

GLUKONEOGENEZA

To je proces, ki omogoča sintezo novih molekul glukoze iz prekursorjev, ki niso ogljikovi hidrati. Potrebujemo ga takrat, kadar bodisi zaužijemo premalo ogljikovih hidratov, bodisi stradamo (ne jemo). Zaloge glikogena v jetrih sicer so, vendar se te zaloge izčrpajo v 12 do 24 urah stradanja. Takrat je edini proces, ki omogoča vzdrževanje koncentracije glukoze v krvi, glukoneogeneza.

Homeostaza glukoze v krvi je potrebna za nujne porabnike glukoze, to sta predvsem dva porabnika: možgani in srce. Nujen porabnik glukoze so tudi eritrociti, ki ne morejo uporabljati drugih goriv.

Glukoze pa ne potrebujemo samo kot vir energije. Intermediati glikolize sodelujejo tudi pri glikolizaciji različnih proteinov, lipidov, ter še pri drugih anabolnih procesih.

Kako se giblje koncentracija glukoze v krvi ob različnih obdobjih hranjenja? Normalne vrednosti so med 3,6 in 6,1 mmol/l. Večina glukoze, ki je prisotna v krvi, izvira iz prehrane. Približno štiri ure po obroku koncentracija (delež glukoze, ki izvira iz hrani) glukoze v krvi že pade, ker se privzame v celice, hkrati se shranjuje tudi v jetrih. Po približno štirih urah, če ne jemo, se začne razgradnja glikogena v jetrih. Ta jetrni glikogen omogoča vzdrževanje koncentracije v krvi. Če se postimo še naprej izčrpamo še zaloge jetrnega glikogena, tako nam kot edini proces za vzdrževanje ravni glukoze v krvi ostane glukoneogeneza.

Kateri izvori ogljika so prekursorji za sintezo glukoze? Laktat (proizvajajo ga eritrociti in mišice ob naporu), glicerol (če stradamo se začnejo sproščati maščobne kisline, porabijo se za oksidacijo, glicerol pa se uporabi kot prekursor za glukoneogenezo), aminokisline (najpomembnejši vir ogljikovega skeleta; dobimo jih predvsem iz mišičnih proteinov).

Glukoneogeneza poteka predvsem v jetrih, ob podaljšanem stradanju poteka tudi v ledvični skorji, vendar večino glukoze, ki nastane na ta način, uporabi ledvična sredica. V celici poteka

delno (začetna stopnja) v mitohondrijih, nadaljni procesi pa v citoplazmi. Prosta glukoza se sprosti (nastane) v ER.

Izvori ogljikovega skeleta

Eden od pomembnih virov je laktat (sproščajo ga predvsem eritrociti; ta laktat se ne porabi vedno za glukoneogenezo; v srčni mišici se lahko porabi kot metabolno gorivo, ker se tam lahko pretvori v piruvat). Ob hudem mišičnem naporu nastaja laktat, tega lahko jetra uporabijo za glukoneogenezo, s tem pomagajo mišici, da pride do dodatne energije (glukoze) za delo. Iz dveh molekul laktata lahko nastane ena molekula glukoze, porabi se šest ATPjev, ki jih jetra dobijo iz maščobe.

Mišične aminokisliline se sprostijo pri razgradnji mišičnih proteinov. Ne sprostijo se vse direktno v kri, ampak se po njej večinoma prenašajo kot alanin ali glutamin. Pride do transaminacije tako, da se aminska kislina prenese na alfa ketoglutarat in dobimo glutamat. Iz glutamata pa se prenese skupina na piruvat, nastane alanin; večino aminokislin se tako prenese v jetra v obliki alanina. Ko se ta v jetrih spet transaminira dobimo piruvat (to je ustrezna alfa-keto analog alanina).

Veliko aminokislin se razgradi do piruvata. Imamo pa tudi aminokisliline, ki se razgradijo do oksaloacetata, fumarata, alfa-ketoglutarata... vse aminokisliline, ki se zgradijo v intermediate citratnega cikla, omogočajo, da se iz piruvata izgradi glukoza - rečemo, da so te aminokisliline **glukogene**. Vstopajo lahko preko intermediatov citratnega cikla, potem pa se pretvorijo v oksaloacetat, ki je izhodiščna spojina za glukoneogenezo.

Acetil-CoA pa ni vir ogljikovega skeleta za glukoneogenezo. To pa zato, ker acetil-CoA prinese v citratni cikel dva C atoma, iz cikla tudi izstopita dva C atoma; torej ni neto vnosa ogljikovih atomov - za vsaka dva ogljika, ki vstopita, dva ogljika tudi izstopita.

Tudi **glicerol** lahko služi kot substrat za glukoneogenezo. Nastane pri hidrolizi maščob. Ko pride glicerol po krvi v jetra ga glicerol kinaza fosforilira. Nastane glicerol-3-fosfat, ki se potem oksidira v dihidroksiaceton fosfat. To molekulo poznamo že iz glikolize; v glikolizi se pretvori (izomerizira) v gliceraldehid-3-fosfat. Ta lahko vstopi v glukoneogenezo.

Po kakšnih poteh poteka glukoneogeneza?

Je obratna pot kot glikoliza. So pa vseeno tri reakcije v glikolizi takšne, ki so termodinamsko ireverzibilne. Teh reakcij ni mogoče preprosto obrniti in jih je treba obiti. V glukoneogenezi so tri stopnje, ki obidejo reakcije glikolize:

1. reakcija s piruvat kinazo; iz piruvata ne moremo dobiti fosfoenolpiruvata samo z obratno reakcijo.
2. fosfofruktokinaza; najpomembnejša regulatorna stopnja glikolize.
3. reakcija z gluko kinazo

1. obvoz: pretvorba piruvata v fosfoenolpiruvat

Poteka v dveh stopnjah. Piruvat se najprej karboksilira, vir ogljika za to karboksilacijo je bikarbonat (ta se najprej aktivira s fosforilacijo). Karbonilna skupina se torej prenese na piruvat,

dobimo oksaloacetat. V drugi stopnji pa se oksaloacetat dekarboksilira, dobimo fosfoenolpiruvat. Tudi za odcep tega CO₂ potrebujemo energijo; eno molekulo ATP rabimo torej za karboksilacijo, eno molekulo GTP pa za drugo stopnjo reakcije.

Piruvat karboksilaza se nahaja samo v mitohondrijih, fosfoenolpiruvat karboksikinaza pa se nahaja v mitohondrijih in v citosolu. Kje bo potekala druga stopnja reakcije bo torej odvisna od tega, kaj se uporablja kot substrat.

Piruvat karboksilaza kot koencim uporablja **biotin**, ta prenaša karboksilne skupine, vezane na dušik. Kovalentno je vezan na encim preko lizinskih ostankov. Sodeluje pri prenosu karbonylnih skupin. V prehrani je biotina ponavadi dovolj, sintetizirajo ga tudi črevesne bakterije. Če pa zaužijemo surov beljak, ki vsebuje avidin, lahko pride do pomanjkanja biotina, ker avidin z visoko afiniteto veže biotin.

Začetna stopnja (karboksilacija piruvata) poteka samo v mitohondrijih, medtem ko druga stopnja (dekarboksilacija oksaloacetata) pa lahko v mitohondrijih ali citosolu. V notranji mitohondrijski membrani ni prenašalca za oksaloacetat, zato se ta za izstop iz mitohondrija mora pretvoriti bodisi v malat (preko malatnega prenašalca v citosol), bodisi transaminira v aspartat (preko aspartatnega prenašalca v citosol). Za oksaloacetat imamo torej **malat-aspartatni prenašalni sistem**, ki omogoča, da oksaloacetat pride v citosol in se tam lahko nadaljuje glukoneogeneza. Za fosfoenolpiruvat pa imamo prenašalec - zakaj se torej v mitohondriju ves oksaloacetat ne pretvori v fosfoenolpiruvat, če ta lahko preprosto zapusti mitohondrij?

Rekli smo, da je to, kje bo druga stopnja reakcija potekala, odvisna od izhodne spojine za glukoneogenezo. Glikoliza je oksidativni proces, nastaja NADH v citosolu; ker gre pri glukoneogenezi za obratni proces, bomo potrebovali veliko NADH. Tega je v citosolu malo, v mitohondriju pa veliko. Če se kot substrat za glukoneogenezo uporabi laktat, potem se mora najprej laktat pretvoriti v piruvat. Pri tem nastane citosolni NADH. Tako da kadar se uporablja laktat, nastane citosolni NADH, v tem primeru v mitohondriju poteče samo karboksilacija piruvata in karboksilacija oksaloacetata, fosfoenolpiruvat pa se prenese v citosol, kjer imamo že NADH. Če pa se kot substrat uporabi npr. alanin, ki se pretvori v piruvat, potem nam primanjkuje citosolnega NADH. Takrat se v mitohondrijih piruvat pretvori samo do oksaloacetata, ko pa se ta reducira v malat, ta preide v citosol in se tam nazaj oksidira v oksaloacetat, kar sprosti NADH. Malat torej dobesedno prinese s seboj v citosol redukcijske ekvivalente, ki so potrebni za nadaljevanje glukoneogeneze.

2. obvoz: hidroliza fruktoza-1,6 bisfosfata v fruktoza-6-fosfat

Odcepi se fosforilna skupina iz prvega ogljikovega atoma, s hidrolizo. Ta reakcija je termodinamsko zelo ugodno, katalizira jo fruktoza-1,6-bisfosfataza.

3. obvoz: hidroliza glukoza-6-fosfata v glukozo

Pride do hidrolize, nastane prosta glukoza, ki se lahko sprosti v kri. Encim glukoza-6-fosfataza je prisotna samo v jetrih in ledvični skorji, ne v mišicah! Glukoza nastane v ER, se sprosti preko ER membrane in nato preko plazmaleme v kri.

Če pogledamo proces glikolize in proces glukoneogeneze vidimo, da potekata v obratni smeri in da je glukoneogeneza energetsko bolj potraten proces.

Sedem reakcij glikolize je enakih, kot v glukoneogenezi, samo da potekajo v nasprotni smeri. Morajo biti uravnane recipročno - tako, da če bo potekala glikoliza ne bo potekala glukoneogeneza.

V katero metabolno pot se bo usmeril piruvat?

Uravnavanje poteka na nivoju piruvat karboksilaze. Tudi dekarboksilacija piruvata je natančno uravnavana, ker se na ta način zgublja ogljikovo ogrodje za glukoneogenezo. Eden od alosteričnih regulatorjev piruvat dehidrogenaznega kompleksa je acetil-CoA; kadar je njegova koncentracija velika je to znak, da ne potrebujemo dodatnega ogljikovega ogrodja. Zavrl bo piruvat dehidrogenazo in aktiviral piruvat karboksilazo.

Encim, ki določa hitrost glikolize, je **fosfofruktokinaza**. Reakcijo v obratni smeri pa katalizira **fruktoza-1,6-bisfosfataza**. Ta encim, kadar je visoka koncentracija AMP in fruktoze-2,6-bisfosfata, je močno zavrt.

Uravnavanje aktivnosti fruktoze-1,6-bisfosfataze

Močno je zavrt z AMP (znak potrebe po energije) in fruktoze-2,6-bisfosfata; ob istem času sta ti molekuli močni aktivatorji za fosfofruktokinazo.

Poleg fosfofruktokinaze 1 imamo tudi **fosfofruktokinazo 2**, ki iz fruktoze 6 fosfata naredi fruktozo-2,6-fosfat; to je alosterični modulator zgornjih dveh encimov. Fosfofruktokinaza 2 je bifunkcionalni encim - lahko deluje kot kinaza ali kot fosfataza in uravnava glukoneogenezo glede na koncentracijo glukoze v krvi.

Ko je visoka koncentracija glukagona se aktivirajo od cikličnega AMP odvisne proteinske kinaze in fosforilirajo encim, tako da je neaktivna kinazna aktivnost in aktivirana fosfatazna aktivnost; zmanjša se koncentracija fruktoze-2,6-bisfosfata, kar aktivira glukoneogenezo. Obratno - ko so visoke koncentracije inzuline, se aktivirajo fosfoproteinske fosfataze, ta bifunkcionalni encim se defosforilira, aktivira se njegova kinazna aktivnost, poveča se koncentracija fosfofruktokinaze, zavrla se bo glukoneogeneza.

Seminar; 14. 11. 2011 / Ana Plemenitaš

METABOLIZEM FRUKTOZE

Razlike med fruktozo in glukozo

- Fruktoza ne represira hormona za lakoto. Zato lahko pridobimo več kalorij in hkrati tudi več pojemo (smo lačni)
- Fruktoza ne stimulira inzulina, ker ni receptorjev na beta celicah pankreasa.
- Jetrni metabolizem fruktoze je popolnoma različen od metabolizma glukoze.

Debelost, hipertenzija in diabetes tipa II so t. i. **metabolični sindrom**.

Glukoza pri metabolizmu naredi nekaj VLDL - to je very low density lipoprotein, ki je slab. Vendar pa se ga naredi zelo malo.

Zaužita saharoza razpade na fruktozo in glukozo. Medtem ko glukoza vstopa v celice po celem telesu in je samo del vstopi v jetra (za pretvorbo v glikogen ali glikolizo) pa lahko fruktozo prevzamejo skoraj izključno samo jetra. Tako bodo jetra privzela celotno zaužito fruktozo. Fruktoza se v celici fosforilira s fosfofruktokinazo, nastane fruktoza-1-fosfat. Pri tem se porabi ATP; ker je substrata mnogo več (vsa fruktoza gre v jetra, za razliko od glukoze) bomo porabili zelo veliko fosfatov. V procesu nastane sečna kislina, ki je sicer produkt razgradnje purinskih nukleotidov. Ker je sečne kisline preveč lahko pride do putike, poleg tega sečna kislina inhibira NO, ki je naravni zniževalec krvnega pritiska (vazodilatator).

Ob zaužitku glukoze se skoraj nič glukoze ne spremeni v maščobe. Ob zaužitku fruktoze se 30 % pretvori v maščobe. Fruktoza je skoraj dvakrat bolj sladka od glukoze in močno redi.

Glikoliza je regulirana na podlagi potrebe po energiji (glavni regulatorni encim je fosfofruktokinaza). Fruktoza pa to regulacijo preskoči; poteka razgradnja ne glede na potrebe po energiji.

Predavanje 20; 15. 11. 2011 / Vita Dolžan

OKSIDATIVNA RAZGRADNJA MAŠČOBNIH KISLIN IN METABOLIZEM KETONSKIH SPOJIN

Maščobne kisline so eno od pomembnih metabolnih goriv. Glavni porabnik maščobnih kislin so srčna mišica ali jetra.

Maščobne kisline večinoma pridejo iz telesnih rezerv. V telesne rezerve pa pridejo iz prehranskih maščob, poleg tega pa vse kalorične viške (ne glede ali izvirajo iz vnešenih proteinov, maščob ali ogljikovih hidratov) lahko spremenimo v maščobe in v telesu skladiščimo v obliko maščob.

Prebava maščob se začne v želodcu. Večina in najpomembnejši del prebave maščob poteka v tankem črevesju s pankreatično lipazo. Delno poteka vnos maščobnih kislin v enterocite s prosto difuzijo, delno pa s prenašalci. V enterocitih se maščobne kisline ponovno zaestrijo, se povežejo z apolipoproteini in večina lipoproteinov, ki gre po hranjenju iz enterocitov v limfo, je v obliki hilimikronov, ki so bogati s triacilgliceroli. V perifernih tkivih lipoprotein lipaza cepi triacilglicerole na maščobne kisline, tako lahko grejo v mišične celice kjer se shranijo.

Mobilizacija maščob iz telesnih rezerv

Razgradnja maščobnih rezerv je hormonsko posredovana. Maščobe so shranjene v obliki lipidnih kapljic, zaščitene s perilipinskim ovojem, zato jih lipaza v celicah ne more razgrajevati. Ko se zniža koncentracija glukoze v krvi se dvigne koncentracija glukagona. Ta aktivira receptor, povezan z adenilil ciklazo, poveča se koncentracija cAMP, aktivirajo se proteinske kinaze, odvisne od cAMP; te fosforilirajo hormonsko senzitivno lipazo in jo aktivira, hkrati se fosforilira perilipinska plast, tako je omogočen dostop aktivirane lipaze do lipidnih kapljic.

Maščobne kisline se sprostijo, po krvi potujejo vezane na albumine. Pridejo do jeter, ki jih lahko uporabljajo kot vir energije.

Tudi po obroku bogatem z maščobami telo ne uporablja maščobe kot vir energije! Večina tkiv uporablja glukozo, šele ko koncentracija te pade, se začnejo sproščati maščobe iz telesnih rezerv.

Triacilgliceroli niso le prehranski, sintetizirajo se tudi endogeno v jetrih. Sintetizirajo se iz vseh metabolnih viškov (ogljikovih hidratov, proteinov).

Metabolizem glicerola

Pri razgradnji triacilglicerola se sprostijo maščobne kisline in glicerol. Odvisno od potreb je ali se bo glicerol usmeril v glikolizo ali v glukoneogenezo. Podobno kot pri glukozi se glicerol vedno po vstopu v celico najprej fosforilira z glicerol kinazo v glicerol-3-fosfat. Ta se potem oksidira z glicerol-3-fosfat dehidrogenazo. Sprostijo se redukcijski ekvivalenti v obliki NADH. Sprosti se dihidroksi acetonfosfat, ki je intermediat glikolize.

Če pa je potreba po glukozi lahko služi glicerol kot substrat za glukoneogenezo.

Aktivacija maščobnih kislin pred razgradnjo

Aktivirajo se podobno kot acetat - z vezavo na koencim A in nastankom energetsko bogate tioesterske vezi. Maščobne kisline se po vstopu v celico zaestrijo s koencimom A, reakcijo katalizira acil-CoA-sintetaza. Da ta reakcija lahko poteče je potrebna hidroliza dveh energetsko bogatih fosfatnih vezi, kar pa omogoča razcep pirofosfata. Nastane acil-CoA, AMP in dva pirofosfata.

Encimi, ki reakcije katalizirajo, so specifični glede na dolžino maščobne verige, poleg tega pa so tkivno specifični in specifični za posamezne znotrajcelične kompartmente.

Aktivacija zelo dolgih MK (več kot 22 ogljikovih atomov) poteka samo na peroksisomih.

Aktivacija dolgih MK pa poteka na endoplazemskem retikulumu, zunanji mitohondrijski membrani in na peroksisomih. Aktivacija srednjeveržnih MK pa poteka v mitohondrijskem matriksu v jetrih in ledvicah.

Oksidativna razgradnja maščobnih kislin

Razgradnja maščobnih kislin poteka po oksidativni poti. **Beta oksidacija** je glavna pot razgradnje maščobnih kislin - oksidacija poteka na beta ogljikovem atomu in potečeta dve oksidaciji tako, da nastane keto skupina in se vez med alfa in beta atomu cepi.

Oksidacija lahko poteka tudi na alfa atomu, poteče hidrosilacija. Poteka zlasti v mitohondrijih pri srednjeveržnih maščobnih kislinah in pri tistih maščobnih kislinah, ki vstopajo v izgradnjo sfingolipidov.

Oksidacija lahko poteka še na omega ogljikovem atomu. Takrat nastane nova karboksilna skupina, nastanejo dikarboksilne maščobne kisline. **Omega oksidacija** poteka v endoplazemskem retikulumu in predstavlja pomembno pot za odstranjevanje s prehrano vnešenih telesu tujih maščobnih kislin. Kadar je motena beta oksidacija se lahko več MK usmeri v omega oksidacijo, dikarboksilne maščobne kisline se izločijo z urinom.

Ko so maščobne kisline vstopile v celico so se aktivirale z vezavo koencima A. Beta oksidacija maščobnih kislin poteka v mitohondrijih. Celica ima ločene zaloge mitohondrijskih koencimov in citosolnih koencimov - tudi koencima A, ker imata različno vlogo (v citosolu koencim A sodeluje predvsem v sintezah, v mitohondrijih pa pri oksidativnih procesih in pridobivanju energije). Acil-CoA torej ne more preiti v mitohondrij, ker ni takega prenašalca. Zato je na zunanji mitohondrijski membrani protein karnitin acil transferaza 1. Maščobna kislina se prenese iz koencima A prenese na karnitin. Koencim A se sprostí, dobimo acil karnitin, za katerega je v notranji mitohondrijski membrani prenašalec, ki omogoča, da acil karnitin vstopa v matriks, prosti karnitin pa gre ven (prosti karnitin nastane tako, da karnitin acil transferaza 2 v matriksu mitohondrija katalizira obratno reakcijo kot transferaza 1 in sprostí maščobno kislinski ostanek in prosti karnitin).

Karnitin acil transferaza 1 določa hitrost vstopa maščobnih kislin v mitohondrij in tako odloča o hitrosti beta oksidacije.

POTEK BETA OKSIDACIJE

Poteka po spiralni poti - nikoli se ne vrnemo na začetno stanje, ker je veriga vedno za dva ogljikova atoma krajša.

Potek: acil-CoA se najprej oksidira, kar pomeni, da se nekam prenesejo redukcijski ekvivalenti - nastane FADH₂. S to oksidacijo nastane trans dvojna vez. Na to vez se doda voda tako, da je na beta ogljikovem atomu OH skupina, na alfa ogljikovem atomu pa ogljik. Potem poteče še ena oksidacija, hidroksilna skupina na beta ogljikovem atomu se oksidira v keto skupino, spet se sprostijo redukcijski ekvivalenti in se prenesejo na NADH. Potem poteče cepitev (tioliza - ker koencim A katalizira razcep vezi ob keto skupini). Tako se dva vodikova atoma odcepita v obliki acetil-koencima A, na koencim A, ki je vstopil v reakcijo, pa se prenese preostali acilni ostanek in spet gre v cikel, samo da je zdaj za dva ogljikova atoma krajši.

Encimi:

Encimi, udeleženi v beta oksidacijo, so specifični za MK z določeno verigo, zato ob poteku po spirali se encimi menjajo glede na dolžino verige.

Prvo oksidacijo katalizira **acil-CoA dehidrogenaza**. Na produkt encim **enoi-CoA hidrataza** doda vodo, produkt tega pa **L-hidroksiacil-CoA-dehidrogenaza** oksidira. Razcep, ki sledi katalizira **tiolaza**.

Če želimo dobiti iz acetil-CoA energijo mora poteči citratni cikel. Vendar pa tudi, če citratni cikel ne poteka, lahko dobimo iz beta oksidacije maščobnih kislin energijo, ker dobimo v poteku NADH in FADH₂. Ta dva preneseta elektrone na dihalno verigo.

Beta oksidacija z lihimi številom ogljikovimi atomi poteka enako. Edina razlika je, da na koncu

namesto acetil-koencima A nastane propionil koencim A. Ta se v treh stopnjah pretvori direktno v sukcinil-koencim A: najprej se propionil-CoA karboksilira (pri reakcijah karboksilacije za koencim potrebujemo biotin), potrebujemo tudi energijo. Nastane metilmalonil-CoA, ki se iz D oblike izomerizira v L-metilmalonil-CoA. Ta se pretvori v sukcinil-CoA

BETA-OKSIDACIJA NENASIČENIH MAŠČOBNIH KISLIN

Nenasičene maščobne kisline imajo cis dvojne vezi (prej smo imeli trans), zato potrebujemo dodaten encim, ki cis vez preuredi v trans vez. To so izomeraze - **enoil-CoA-izomeraza**, če je več dvojnih vezi pa potrebujemo še reduktazo.

Enkrat nenasičena maščobna kislina

Beta oksidacija poteka v spirali, dokler ne pride do mesta dvojne vezi. Takrat enoil-CoA-izomeraza to cis dvojno vez preuredi v trans dvojno vez, takšna vez pa je že intermediat beta oksidacije - na njo se doda voda.

Dvakrat nenasičena maščobna kislina

Potečejo cikli beta oksidacije. Potem izomerza preuredi prvo dvojno vez v trans, poteče še en cikel beta oksidacije. Po prvi oksidaciji v naslednjem ciklu pa nastane ena cis in ena trans vez. Tu encim **2,4-dienoil-CoA-reduktaza** katalizira redukcijo ene dvojne vezi. Nato zopet deluje enoil-CoA izomeraza in preostalo dvojno vez preuredi v trans.

Uravnavanje razgradnje maščobnih kislin

V prvi stopnji je uravnavano že sproščanje maščobnih kislin iz telesnih rezerv - hormonska uravnava, posredovana z glukagonom, adrenalinom, stresnim hormonom kortizolom. V drugi stopnji uravnava karnitin acil transferaza 1, encim, ki prenaša v mitohondrij. Aktivnost tega encima močno zavira malonil-CoA, ki je prvi intermediat v sintezi maščobnih kislin. Če bo torej potekala sinteza maščobnih kislin potem se te ne bodo uporabljale za beta oksidacijo. Tretji omejitveni dejavnik pa je dihalna veriga oz. sposobnost reoksidacije reduciranih koencimov. Če se ti ne morejo ponovno oksidirati v dihalni verigi bo upočasnjena beta oksidacija. Hitrost dihalne verige je določena z razmerjem med ATP in ADP.

Poznamo okvare, ki prizadenejo beta oksidacijo. Najpogostejše so pomanjkanje karnitina, ki je lako primarno ali prirojeno. Najbolj so prizadeta tkiva, ki uporabljajo veliko maščobnih kislin; srce, skeletne mišice, jetra. Pomanjkanje zdravimo z večjim vnosom karnitina s prehrano. Hujše pa so okvare karnitin-palimotil-transferaze 2. Prizadete so predvsem skeletne mišice. Pri vseh motnjah je pomembno, da se prepreči stradanje z večjim vnosom ogljikovih hidratov, zmanjša pa se vnos dolgoverižnih maščobnih kislin.

KETONSKE SPOJINE

Kot ketonske spojine sta najbolj pomembna acetoacetat in beta-hidroksibutirat. Nastaja tudi aceton, ki je topen in ga izdihamo z zrakom. Če v telesu nastajajo ketonske spojine torej lahko zavohamo prisotnost v dihu.

Nastajajo v jetrih in so vir energije za druga tkiva (jetra jih ne morejo uporabljati). Zlasti jih uporabljajo srce, skeletna mišica, maščevje.

Ketonske spojine nastanejo, kadar se pojavi neravnovesje med metabolizmom ogljikovih hidratov in metabolizmom maščob:

- post, stradanje, pospešena oksidacija MK
- prehrana s premalo ogljikovih hidratov
- motena uporaba ogljikovih hidratov (npr. slabo vodena sladkorna bolezen, pomanjkanje inzulina)

Kdaj poteka sinteza ketonskih spojin?

Primarno je stradanje (pomanjkanje ogljikovih hidratov). V takšnih razmerah se vklopi glukoneogeneza, poglavitni substrat zanjo je oksaloacetat, ki se na ta način odstranjuje iz citratnega cikla. Če je nizka koncentracija glukoze v krvi je aktivirana tudi lipoliza - sproščanje maščobnih kislin. Začne potekati beta oksidacija maščobnih kislin in nastane veliko acil-CoA oz. acetil-CoA. Veliko nastane tudi reduciranih koencimov. Če se oksaloacetat iz citratnega cikla usmeri v glukoneogenezo potem acetil-CoA ne more vstopiti v citratni cikel in poveča se njegova koncentracija. Prav ta prebitok acetil-CoA se usmeri v sintezo ketonskih spojin - kondenzirajo se tri molekule acetil-CoA, sprostita se dve molekuli CoA (tako se olajša tudi nadaljna beta oksidacija). To je pomembno iz dveh razlogov - ketonske spojine lahko grejo v kri in služijo kot metabolno gorivo v drugih tkivih, hkrati pa se olajša nadaljna beta oksidacija ker dobimo nove molekule koencima A.

Sinteza ketonskih spojin

Dve molekuli koencima A se kondenzirata. V končni fazi nastane acetoacetat, ki se lahko dekarboksilira v aceton, ali pa se hidroksilira v beta hidroksi butarat. Razmerje med tema dvema je odvisno od razmerja med NADH in NAD.

Uporaba ketonskih spojin

Ketonske spojine grejo iz jeter in se pojavljajo v perifernih tkivih (srcu, mišicah, možganih). Da se lahko uporabijo se beta hidroksi butirata najprej oksidira nazaj v acetoacetat, potem pa se acetoacetat prenese na koencim A, na ta način se acetoacetat aktivira. Vendar pa ta koencim A ni prosti, ampak v obliki sukcinil-CoA. Dobimo sukcinat in acetoacetil-CoA. Jetra ne morejo uporabljati ketonskih spojin, ker je zelo nizka koncentracija sukcinil-CoA, ker v Krebsovem ciklu poteka fosforilacija na nivoju substrata, sukcinil-CoA se pretvori v sukcinat in nastane GTP. Poleg tega jetra nimajo beta ketoacil CoA transferaze.

Pri **oksidaciji beta-hidroksibutarata** dobimo 22,5 ATP minus 1, ker je mitohondrij prikrajšan za en GTP. Dobimo torej **21,5 ATP**. Pogoj je oksidativni metabolizem

Poraba goriv v različnih obdobjih hranjenja

Ko smo dobro prehranjeni (štiri ure po obroku) večina tkiv uporablja glukozo. Uporablja se tako za sintezo glikogena kot tudi za pridobivanje energije. Ko koncentracija v krvi pade in se začne sproščati glukagon, ki stimulira razgradnjo jetrnega glikogena in sproščanje maščobnih kislin. Ob zgodnjem stradanju se začnejo uporabljati ketonske spojine, jetra predvsem uporabljajo maščobne kisline. Začne potekati glukoneogeneza, mišični proteini se razgrajujejo, amino

skupine pa se odstranijo z urinom. Pri dolgem stradanju se večino energije dobi s ketonskimi spojinami.

Ketonske spojine in nezdravljena sladkorna bolezen tipa I

Zaradi pomanjkanja inzulina ima telo signal, da strada, kljub visoki koncentraciji glukoze v krvi. Sproščale se bodo torej maščobne kisline, potekala bo glukoneogeneza, zmanjšan bo privzem glukoze v periferna tkiva. To spet vodi v isti metabolni substrat, ki je posledica presežka acetyl-CoA - ketonske spojine. Pri slabo vodeni ali nezdravljeni sladkorni bolezni tipa I se poveča koncentracija ketonskih spojin.

Redko ob hipoglikemiji najdemo še nizko koncentracijo ketonskih spojin - **hipoketotična hipoglikemija**. Ob tem bi pomislili na motnje v beta oksidaciji, kar je lahko posledica pomanjkanja karnitina, okvare karnitin-acil-transferaze 2 ali motenj encimov, udeleženih v beta oksidaciji.

Obstajajo prirojene okvare acil-CoA hidrogenaz. Pomanjkanje srednjeveržnih acil-CoA dehidrogenaz se kaže predvsem pri novorojenčkih, ko se jih začne bolj redko dojeti.

Predavanje 21; 16. 11. 2011 / Petra Kudler

TOKSIČNOST KISIKA IN VLOGA PROSTIH RADIKALOV

V našem telesu obstaja fino ravnotežje med nastajanjem in odstranjevanjem reaktivnih kisikovih spojin. Pri nekaterih patoloških stanjih pa lahko pride do prevelike količine ROS; govorimo o oksidativnem stresu.

Kisik v osnovnem stanju (kot ga dobimo v telo) ima v zunanjih orbitalah dva prosta elektrona, ki imata enak spin. Da kisik v našem telesu reagira so potrebni katalizatorji.

Pri redukciji kisika (prejme en elektron) nastane superoksidni anion, pri nadaljni redukciji pa vodikov peroksid (močan oksidant, topen v lipidih, zato lahko prehaja iz kompartmenta v kompartment - tako je eden izmed nevarnejših ROS). Pri nadaljni redukciji nastane hidroksilni prosti radikal, ki je najbolj reaktiven prosti radikal v našem telesu. Vse to se dohaja na encimu v dihalni verigi

Nastajanje ROS

Okrog 90 % kisika, ki ga vdihnemo, se porabi v dihalni verigi. Približno 3 - 5 % tega kisika se pretvori v proste radikale. V dihalni verigi najpogosteje nastaja pri prenosu elektronov z ubikvinonom (koencimom Q). Če kompleks 3 ne more dovolj hitro sprejeti elektronov in če je v membrani prisoten kisik, potem lahko semikvinonska (radikalska) oblika odda elektron kisiku in nastane superoksidni anion. Ta način nastajanja superoksidnega aniona ni fiziološki.

ROS nastaja tudi v drugih vrstah oksidativnega metabolizma. Pri nekaterih teh reakcijah je neka

ROS končni produkt. To so predvsem reakcije z oksidazami, oksigenazami in peroksidazami. Ena od najbolj izrazitih je nastajanje superoksidnih radikalov ob delovanju citokroma P450 (vnašanje ksenobiotikov!). Drugi encim je ksantinska oksidaza, ki razgrajuje purinske baze in nastaja vodikov peroksid.

Iz vodikovega peroksida in superoksidnega aniona lahko ob encimskih reakcijah nastaja najnevarnejši radikal - **hidroksilni radikal**. Ta reakcija ob fiziološkem pH poteka zelo počasi. Če pa so prisotni prosti kovinski ioni, potem ta reakcija poteka zelo hitro.

ROS lahko nastajajo tudi pod vplivom okolja - cigaretni dim, toksini, alkohol, UV žarki, pesticidi, herbicidi, določeni konzervansi...

Pomemben vir prostih radikalov je tudi vnetni odziv, kjer so ROS končni produkt. Fagocitne celice se aktivirajo ob infektu in porabljajo veliko kisika. Tujek objamejo z membrano, v kateri so encimi, ki proizvajajo proste radikale. Te se izločajo v notranjost fagolizosoma in uničijo tujek.

Vpliv ROS na celice in celične strukture

- Prosti radikali lahko oksidirajo nukleotide v DNA in povzročajo različne oksidativne poškodbe baz.
- v DNA povzročajo dvojne ali enojne prelome verig; posledica so mutacije (insercije, delecije, translokacije,...), kar lahko vodi do bolezni
- oksidirajo proteine ali pa se neposredno vežejo na funkcionalne skupine (predvsem na Pro, His, Arg, Cys, Met). Posledica je, da se proteini lomijo (fragmentirajo), koščki proteinov se začnejo med seboj povezovati, agregirati, lahko nastanejo netopni kompleksi proteinov, ki jih celični sistemi težko odstranijo, zato se kopičijo v celici.
- na lipidnih membranah povzročajo verižne reakcije lipidne peroksidacije. Nek prosti (hidroksilni) radikal lahko odvzame elektron iz dvojne vezi v lipidu in nastane lipidni radikal. Ta je zelo reaktiven, lahko reakcijo nadaljuje, nastane lipidni peroksidni radikal. Tudi ta reagira naprej... v končni fazi so lipidi tako poškodovani, da začnejo razpadati, nastanejo nekateri aldehidi, ki se izločajo v kri, lahko jih merimo kot indikatorje oksidativnega stresa. Te reakcije lahko končajo naši lipidotopni vitamini, npr. vitamin E.

Dušikov monoksid

Relativno reaktiven prosti elektron. Ker je plin lahko prosto prehaja v celici, v telesu pa ima v nizkih koncentracijah pomembno vlogo - je nevrottransmitter, vazodilatator in zavira agregacijo trombocitov. Pri visokih koncentracijah pa je zelo toksičen - veže se s kisikom ali kisikovim peroksidom, nastanejo novi prosti radikali, ki se lahko neposredno vežejo na proteine ali lipide. Poznamo tri **NO sintaze**, ki smo jih že spoznali. NOS II je tista, ki lahko škodi sistemu, ker je inducibilna; deluje pri imunskem odzivu. Ko se močno aktivira lahko nastajajo ogromne količine prostih radikalov.

Nastajanje RNS iz NO

Nitrat se lahko v našem telesu (prebavni cevi) pretvori v nitrit, ki je močen oksidant.

Reaktivne dušikove spojine na telo vplivajo zelo podobno kot reaktivne kisikove spojine.

Predvsem pri mitohondrijih lahko pride do inhibicije dihalne verige zaradi poškodb proteinov. Zaradi poškodb membrane se lahko uniči elektronski gradient (ustavi se metabolizem!), poškoduje se tudi DNA, kar ima za posledico mutacije.

OBRAMBA PRED REAKTIVNIMI KISI KOVIMI SPOJINAMI: ANTIOKSIDATIVNI SISTEM

Telo proizvaja različne spojine, ki lahko delujejo antioksidativno in lahko nevtralizirajo proste radikale. Sečna kislina v pljučih nas ščiti pred ozonom, koencim Q lahko tvori ali nevtralizira proste radikale, imamo še glutation, tioreduksin, melatonin,...

S hrano dobimo eksogene zunanje dejavnike, najbolj pomembni so vitamini A, C in E.

Naše telo preprečuje še nastajanje hidroksilnega radikala tako, da zmanjša koncentracijo prostih kovinskih ionov (ferritin in transferin za železo, ceruloplazmin za bakrove ione). Glavni sistemi, ki odstranjujejo superoksid in vodikov peroksid, pa so encimski sistemi.

Celična lokacija obrambnih mehanizmov

Največ prostih radikalov nastaja v mitohondriju in v peroksisomih, zato je v teh predelkih veliko obrambnih mehanizmov. V peroksisomih je veliko katalaze in superoksid dismutaze; v mitohondrijih je katalaze manj, imamo pa zato druge encime (glutacion peroksidaze,...). V citosolu imamo tudi te encime.

Encimski antioksidativni sistemi

S superoksidno dismutazo se superoksidni anion pretvori v kisik in vodikov peroksid; ta se lahko odstrani bodisi s katalazo, bodisi z glutationsko peroksidazo. Pri tem nastane glutacion disulfid, ki se mora regenerirati. Regenerira se lahko na več načinov; npr. z glutacion reduktazo (nastane NADP(+)). Vodikov peroksid se mora odstraniti preden reagira ob prisotnosti kovinskih ionov v hidroksilni radikal.

Vitamin E, vitamin C - ta je vodotopen, njegova glavna naloga je regeneracija vitamina E, bodisi v membranah bodisi v krvi (v krvi vitamin E preprečuje oksidacijo LDL delcev).

Pri poškodbah je ponavadi prisoten oksidativni stres, ker poškodovane celice sproščajo proste kovinske ione.

Model vpliva ROS in RNS pri Parkinsonovi bolezni

Za to bolezen je značilno pomanjkanje dopamina. Dopamin se fiziološko v živčnih celicah inaktivira, nastaja vodikov peroksid. Pri posameznikih, ki so bolj dojemljivi za oksidativni stres, pa se ta vodikov peroksid ne odstranjuje tako učinkovito, zato lahko nastaja hidroksilni radikal (peroksidacija lipidov, oksidativne poškodbe proteinov, poškodbe DNA, ...). Izločati se začnejo vnetni citokini, začnejo delovati fagocitne celice, ki še dodatno prispevajo k sproščanju prostih radikalov. Tako te celice nimajo možnosti in bolezen se nadaljuje.

Predavanje 22; 16. 11. 2011 / Vita Dolžan

Metabolizem etanola

Večino zaužitega alkohola se presnovi v etanol, potem pa v aldehyd. Največjo afiniteto za etanol ima alkohol dehidrogenaza (ADH).

Če nastaja več aldehyda kot ga uspe aldehyd dehidrogenaza pretvoriti v acetat je problem, ker je aldehyd toksičen.

Za metabolne poti je značilno, da so uravnavane; tako, da se v telesu ohranja homeostaza. Metabolizem etanola pa ni reguliran, zato ne gre za normalno metabolno pot pridobivanja energije, ampak gre za proces detoksifikacije.

Alkohol (ADH) in aldehyd (ALDH) dehidrogenaze

Največji delež presnove alkohola v jetrih poteka preko ADH1. V drugih delih želodca je prisotna še ADH4 in ADH2, vendar imajo manjšo afiniteto za alkohol.

Mitohondrijska ALDH2 ima zelo veliko afiniteto za aldehyd, ga zelo hitro pretvori v acetat. ALDH1 pa deluje v citosolu in ima 10krat manjšo afiniteto kot mitohondrijski izoenzim.

Alkoholiki se pogosto zdravijo z disulfiramom, ki inhibira ALDH. Tako se že ob manjših količinah uživanja alkohola pojavijo toksični učinki, kar naj bi odvrnilo pivca od nadaljnega pitja.

Uporaba acetata v perifernih tkivih

V reakcijah nastajajo reducirani koencimi (NADH). Acetat se more pred vstopom v nadaljne metabolne poti aktivirati. Aktivira se na podoben način kot maščobne kisline; z acetyl-CoA sintetazo nastane acetyl-CoA. Potrebujemo energijo in koencim A.

Ta acetat je v mitohondrijih, v jetrih pa je izooblika acetyl-CoA sintetaze v citosolu. V normalnih pogojih ta encim v citosolu ne bo zelo aktivna. Problem je, da je acetat v mitohondrijih, ne v citosolu. Gre v kri in do perifernih tkiv.

Končni produkti

Acetyl-CoA in velike količine reduciranih koencimov. Energetsko stanje v celici je torej bogato (nastane veliko NADH, acetyl-CoA). Kako ti vpliva na metabolične procese?

Vpliv presnove etanola na metabolizem v jetrih

NADH, ki nastaja, gre lahko naravnost v dihalno verigo. Če pa energije ne potrebujemo, potem se dihalna veriga upočasni in imamo višek reduciranih koencimov, to pa lahko obrne smer nekaterih reakcij (npr. upočasnitev beta oksidacije maščobnih kislin, obrnitev različnih reverzibilnih reakcij z dehidrogenazami). Obrnila se bo tudi reakcija malata v oksaloacetat in se bo oksaloacetat pretvoril v malat; to bo upočasnilo citratni cikel, poleg tega ne bo na bolje oksaloacetata za glukoneogenezo. Tudi piruvat se bo reduciral v laktat, da se koencimi oksidirajo. Glukoneogeneza se bo torej upočasnila, povečana koncentracija laktata pa vodi v acidozo.

Ker je upočasnjena beta oksidacija maščobnih kislin se te raje zaestrijo. Poveča se nastajanje triacilglicerolov, te se v jetrih kopičijo --> zamaščenost jeter. Dobimo tudi ketonske spojine.

Hepatotoksičnost etanola

Acetaldehyd je toksičen, veže se na aminokisline in povzroči poškodbe. Zmanjša tudi sintezo

proteinov v jetrih. Hkrati se acetaldehid veže tudi na mikrotubule in okvari transport proteinov iz jeter. Kopičijo se tudi triacilgliceroli in proteini. V prvi fazi torej pride do zamaščenosti jeter. Inducira se še sistem s citokromi p450, pri teh reakcijah nastanejo reaktivne kisikove spojine, te okvarjajo lipide. Za detoksifikacijo teh spojin potrebujemo glutation; acetaldehid pa reagira tudi z glutationom, zato je za te procese detoksifikacije premalo.

Glukoneogeneza je torej inhibirana zato, ker se zaradi presežka NADH obrne smer reakcij z dehidrogenazami in ni več substratov za glukoneogenezo.

FOSFOGLUKONATNA ALI PENTOZEFOSFATNA POT

Posebna metabolna pot, za katero potrebujemo glukozo. Namen te poti ni pridobivanje energije ampak preskrba z ribozo-5-fosfatom, ki je izhodna spojina za mnogo biosintez.

Pot ima dva dela. Prvi je **oksidativni** del, potekajo reakcije oksidacije. Je uravnavan in poteka samo takrat, kadar je potreben NADPH. Reakcije potekajo v eni smeri, ker je prva oksidacija ireverzibilen proces. Produkt je predvsem NADPH, ki ga potrebujemo za oksidativne fosforilacije in reduktivne sinteze. V tem procesu se fosforiliran sladkor s šestimi ogljikovimi atomi spremeni v fosforiliran sladkor s petimi ogljikovimi atomi; gre za dekarboksilacijo.

Drugi del pa je **neoksidativni** in ga predstavljajo reverzibilne reakcije (poteka v eno ali drugo smer), ni reguliran, njegov potek pa je odvisen izključno od potreb (stanja) v celici. Ta del omogoča, da iz dveh sladkorjev s petimi ogljikovimi atomi dobimo na koncu **gliceraldehid-3-fosfat** in **fruktoza-6-fosfat**. To sta intermediata glikolize in lahko vstopata ali v glikolizo ali v glukoneogenezo.

OKSIDATIVNA FAZA

Najbolj pomembna je prva reakcija, ki je ireverzibilna. Ta stopnja je uravnavana preko NADPH. Visoka koncentracija NADPH zavre encim glukozo-6-fosfat dehidrogenazo. Glukoza-6-fosfat se s tem encimom oksidira in nastane NADPH. Na obroč se veže voda in obroč se razpre, pride torej do **hidrolize**. Nastane 6-fosfo glukonat, ta se **oksidativno dekarboksilira** in nastane NADPH, dobimo ribulozo-5-fosfat.

Ribuloza-5-fosfat se lahko bodisi izomerizira v ribozo-5-fosfat, bodisi epimerizira v ksilulozo-5-fosfat. Če se riboza-5-fosfat porablja, potem se bo več ribuloze-5-fosfata izomeriziralo.

NEOKSIDATIVNA FAZA

Riboza-5-fosfat in ksiluloza-5-fosfat lahko reagirata. Encim **transketolaza** lahko prenese ostanek iz ksiluloze na ribozo, dobimo gliceraldehid-3-fosfat in reduciran sladkor s sedmimi ogljikovimi atomi. Potem pride do transcelulaze, dobimo C6 in C4 intermediate. Končni produkt oksidativne poti je gliceraldehid-3-fosfat in fruktoza-6-fosfat.

NADPH je namenjen detoksifikaciji in reduktivni biosintezi.

Oksidativni del je uravnavan glede na potrebo po NADPH, neoksidativni del pa ni uravnavan.

URAVNAVANJE FOSFOGLUKONATNE POTI

1. potrebna NADPH in riboza-5-fosfat

Neoksidativni del v takih razmerah ne poteka, ker se riboza-5- fosfat porablja

2. potrebnega več riboze-5-fosfata kot NADPH

Oksidativni del ne bo potekal, bo pa potekal neoksidativni del tako, da bo nastala riboza-5-fosfat.

3. potrebnega več NADPH kot riboze-5-fosfata

Potekal bo oksidativni del poti. Z glukoneogenezo bo lahko nastal glukoza-6-fosfat, ki bo spet lahko vstopal v oksidativni del poti

4. potrebna NADPH in ATP, ne riboza-5-fosfat

Potekal bo oksidativen del poti. Riboza-5-fosfat se bo pretvorila v intermediate glikolize, ki se bodo uporabljali za sintezo energije.

NADPH je potreben za redukcijo oksidirane glutationa, ki deluje v telesu kot antioksidant.

Pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze

Je relativno pogosto v sredozemlju. Motena je sinteza NADPH, pri težjih oblikah ali pri vnosu oksidantov v telo se ta motnja najprej izrazi v eritrocitih, ker te nimajo zmožnosti sinteze novih proteinov. Pomanjkanje NADPH zmanjša učinkovitost detiksofikacije vodikovega peroksida. ROS poškodujejo proteine, membrane,.. takšni eritrociti hemolizirajo. Pride do hemolitične anemije.

Predavanje 23; 17. 11. 2011 / Vita Dolžan

METABOLIZEM GLIKOGENA

Glikogen je glavni rezervni ogljikov hidrat. Je polisaharid, shranjen v obliki glikogenskih zrn v jetrih, predstavlja pa tudi pomembno zalogo metabolnih gradiv za mišice.

Med seboj so glukozne enote povezane z alfa 1->4 glikozidnimi vezmi, na približno 8 do 10 enot pa pride do razvejitve - alfa 1->6 glikozidne vezi. Reducirajoči konec ni prost, ampak je vezan na nek protein (glikogenin), ki predstavlja jedro glikogenskega zrnca. Na obstoječe verige se dodajajo nove verige, to omogoča, da je veliko prostih nereducirajočih koncev. Vsi encimi, ki sodelujejo v razgradnji glikogena, delujejo na te nereducirajoče konce. Več ko je teh koncev, hitrejši je lahko proces izgradnje in razgradnje glikogena. Hkrati razvejanost omogoča večjo hidrofobnost zrnca in večjo dostopnost encimov.

Kot substrat za sintezo glikogena v obdobju sitosti služi glukoza-1-fosfat. Med stradanjem pa se glikogen razgrajuje, da se vzdržuje koncentracija glukoze v krvi. Po prenehanju stradanja se začne proces glukoneogeneze, iz laktata ali prehranskih aminokislin - zato, da se s sintetizirano glukozo izpolnijo glikogenske rezerve. Izhodna spojina za nastanek glikogena pa ni prosta

glukoza ampak glukoza-6-fosfat, ki se s fosfoglukomutazo pretvori v glukoza-1-fosfat; to je izhodna molekula za sintezo glikogena.

Sladkorji se lahko aktivirajo z vezavo nukleotidov. Vsi monosaharidi, ki vstopajo v biosintetske procese, se aktivirajo z vezavo UMP.

SINTEZA GLIKOGENA

1. Aktivacija glukoze-1-fosfata

Glukoza-1-fosfat encim uridinfosfataza prenese na UMP, pirofosfat pa se odcepi. Tako dobimo UDP-glukoza, to je tista spojina, ki vstopa v polimerizacijo glikogena.

2. Glikogenin - začetnik sinteze glikogena

Glikogen sintaza, encim, ki dodaja UDP-glukoze na glikogen, potrebuje že krajši oligonukleotid, da lahko deluje. Ne more kar tako začeti. Protein glikogenin je protein, ki obstaja v dimerni obliki in katalizira glikozilacijo tirozinskega ostanka druge molekule v dimeru. Na tem aktivnem mestu se torej glukoza iz UDP-glukoze prenese na tirozinski ostanek (avtoglikozilacija). Tako lastna katalitična aktivnost glikogenina naniza na tirozinski ostanek verigo osmih glukoznih enot. Na nereducirajoči konec te verige pa potem začne dodajati nove UDP-glukoze glikogen sintaza.

3. Dodajanje glukoznih enot - glikogen sintaza

Prenaša UDP-glukoza na nereducirajoči konec obstoječe glikogenske verige. Energijo za nastanek nove glikozidne vezi dovede razcep energetske bogate vezi. UDP se refosforilira na račun ATP v UTP, tako lahko zopet vstopa v reakcijo.

Reakcija sinteze glikogena:



4. Glikogen-razvejitevni encimi

Ko je glukozni konec dolg ~11 glukoznih enot, takrat razvejitevni encim odcepi zadnjih šest do osem glukoz in jih prenese na šesti ogljikov atom predhodnega konca. Tako na tem mestu nastane alfa 1,6 glikozidna vez. Encim se imenuje glikozil-(4,6)-transferaza.

RAZGRADNJA GLIKOGENA

1. Glikogen fosforilaza

Glukozne enote se odcepljajo iz nereducirajočega konca - ne gre za hidrolizo ampak za fosforolizo. V reakcijo vstopa anorganski fosfat in ta je tisti, ki omogoča ceplenje vezi, produkt pa je glukoza-1-fosfat. Če bi v reakcijo vstopala voda, pa bi dobili prosto glukoza; ker vstopa fosfat pa dobimo glukoza-1-fosfat. Prednost je v tem, da dobimo že aktivirano glukoza, ki se lahko pretvori v glukoza-6-fosfat in vstopa v nadaljne procese, zato ne bomo porabljali ATPja za aktivacijo.

Glikogen fosforilaza lahko katalizira le cepitev alfa 1,4 vezi.

2. Derazvejitevni encim

Razvejitev sterično ovira glikogen fosforilazo. Potrebujemo torej drug encim, da lahko poteče ob

mestu razvejitve razgradnja. To je derazvejitveni encim, ki omogoča, da razgradnja glikogena napreduje. Ta encim razcepi alfa-1,4-glikozidno vez tik ob razvejitvi in prenese ta kratek oligosaharid na daljši nereducirajoči konec. Deluje torej kot transferaza: 4-alfa-glukanotransferaza.

En glukozni ostanek pa ostane povezan z 1,6 glikozidno vez. Isti encim ima še alfa-1,6-glikozidazno aktivnost, cepil bo še alfa 1,6 vez in sprostila se bo sprosta glukoza.

Na vsakih 8 do 10 molekul glukoze se torej zaradi delovanja derazvejitvenega encima sprosti ena prosta (nefosforilirana) glukoza.

3. Nastanek glukoza-6-fosfata

Najprej se veže fosforilirani encim, dobimo vezano glukozo-1,6-bisfosfat. Potem se encim z enim fosfatom odcepi, dobimo glukozo-6-fosfat. Samo v jetrih se izraža encim glukoza-6-fosfataza, ki katalizira hidrolizo fosfata, sprosti se prosta glukoza v lumen endoplazemskega retikuluma.

Preko prinašalcev pride v citosol, GLUT 2 pa omogoča, da prosta glukoza ob nizki koncentraciji v krvi pride iz celic. (za podrobnost glej glukoneogenezo/glikolizo)

Primerjava prebave glikogena v prebavnem traktu s katabolizmom glikogena v celicah

V prebavnem traktu poteka prebava z alfa-amilazo, najprej v ustih, potem pa še v tankem črevesju. Ta amilaza je endoglukozidaza, torej odceplja krajše oligosaharide znotraj glikogena, ne cepi pa na mestih razvejitve. Tam cepi derazvejitveni encim. Gre za reakcije glikolize, prebava glikogena ni uravnavana.

Katabolizem glikogena pa poteka na površini granul glikogena v citoplazmi. Imamo encim, ki odceplja alfa 1,4 vezi (glikogen fosforilaza), na mestih razvejitve pa deluje derazvejitveni encim. Produkt razgradnje glikogena je pretežno glukoza-1-fosfat. Razgradnja glikogena mora biti uravnavan proces. Sproži se ob potrebi po energiji (to prepozna celica po višji količini AMP, z visoko koncentracijo kalcija pa mišična celica ve, da se mišica zelo krči) ali ob padcu koncentracije glukoze v krvi (jetra).

V lizosomih pa poteka še posebna pot razgradnje glikogena, ki sodi v sklop metabolnega obračanja znotrajceličnih sestavin. V lizosomih se lahko razgradi glikogen s hidrolizo.

Okvare encimov v razgradnji ali nastanku glikogena

Veliko je okvar encimov, ki razgrajujejo glikogen. Dokaj malo pa je okvar povezanih s sintezo glikogena - samo dve glikogenozi sta takšni, tip O in tip IV.

Motnja tipa O je okvara glikogen sintaze, ki se izraža v jetrih. Je huda motnja, ki se že takoj po rojstvu pokaže s hipoglikemijo, ketoacidozo in zgodnjo umrljivostjo.

Motnja tipa IV pa je motnja razvejitvenega encima, izražena tako v jetrih kot v mišicah. Dovolj glukoze se ne more sprostiti, mišice so hipotonične, jetra pa začnejo odmirati zaradi kopičenja glikogena.

Tip I je okvara glukoza-6-fosfataze; tista glukoza, ki nastane z glukoneogenezo, se ne more sprostiti v kri.

Tip II je okvara lizosomske glukozeidaze. Okvara se kaže predvsem z mišično in srčno simptomatiko.

Tip III je okvara derazvejitvenega encima, jetra so povečana, ker se glikogen kopiči.

Okvarjeni pa sta lahko tudi jetrna glikogenfosforilaza ali mišična glikogenfosforilaza (tip V in tip

VI).

V jetrih glikogen služi predvsem za ohranjanje homeostaze glukoze v krvi. V mišicah pa se glukoza-6-fosfat porabi, takoj vstopi v glikolizo in se pretvori bodisi v piruvat bodisi v laktat (anaerobni pogoji).

Če vstopi glukoza iz glikogena v glikolizo se je že sprostila aktivirana glukoza, zato bi morali dobiti 3 molekule ATP, vendar pa smo dve energetsko bogati vezi razcepili, tako da dobimo neto 1 molekulo ATPja. To se mišici ne splača; razen, če se sprosti veliko enot - glikogen je zelo razvejan in se lahko v zelo kratkem času sprosti zelo veliko glukoza-6-fosfatov.

Metabolizem glikogena je uravnavana hormonsko. Encima glikogen sintaza in glikogen fosfataza sta uravnavana s fosforilacijo in alosterično modulacijo. Glikogen fosforilaza se s fosforilacijo aktivira, glikogen sintaza pa se s fosforilacijo inaktivira.

Pri glikogen sintazi opazimo še oznako I ali D - independent/dependent, ali je odvisna od alosteričnih modulatorjev ali ne.

Alosterična modulacija glikogen fosforilaze v jetrih

Omogoča zelo hiter odziv na razmere v celici. Z vezavo glukoze se lahko glikogen fosforilaza intaktivira. Manj je torej aktivna, hkrati pa je še lažja defosforilacija. Na ta način je v jetrih glikogen fosforilaza senzor za glukozo.

Aktivacija glikogen fosforilaze ob mišični aktivnosti

Sproščanje kalcija ob mišični kontrakciji aktivira glikogen fosforilazo; aktivira jo tudi visoka koncentracija AMP, ki nastane ob napornem mišičnem delu.

Regulacija glikogen sintaze s kovalentno modifikacijo

Poleg protein kinaze A, ki jo aktivira glukagon, lahko glikogen sintazo fosforilirajo tudi druge molekule. Najbolj pomembna je glikogen-sintaza kinaza 3, ki fosforilira tri OH ostanke in na ta način inaktivira glikogen sintazo. Inzulin pa doseže defosforilacijo glikogen sintaze (ker aktivira proteinske fosfataze), hkrati pa deaktivira glikogen-sintazo kinazo 3. Hkrati torej zmanjša fosforilacijo in pospeši defosforilacijo.

V jetrih je glikogen sintaza tudi alosterično modificirana - glukoza-6-fosfat se veže na glikogen sintazo in ta se aktivira.

b pomeni neaktivna oblike, **a** pomeni aktivna oblika.

Uravnavanje presnove ogljikovih hidratov v jetrih in mišici

Razgradnja glikogena ne poteka takrat, ko poteka sinteza, in obratno. Takrat, ko poteka razgradnja glikogena, poteka tudi glukoneogeneza, ker glukagon uravnava obe metabolni poti. Glukagon deluje samo na jetra (na mišici ni receptorja zanj), medtem ko adrenalin uravnava presnovo ogljikovih hidratov tako v mišici kot v jetrih. Učinki glukagona in adrenalina na jetra: sproži glikogenolizo, glukoneogenezo, zavre pa glikolizo. Glukoza se torej defosforilira in sprosti v kri. V mišici pa vezava adrenalina sproži razgradnjo glikogena, glukoza-6-fosfat pa vstopa v oksidativno pot (ali anaerobno pot) razgradnje - glikolizo. Razlika med učinkom teh hormonov v jetrih in v mišici je v učinku na glikolizo - v jetrih se zavre glikoliza, v mišicah pa pospeši

glikoliza, kar je povezano z različno metabolno vlogo glikogena v teh tkivih.

Obstaja tudi **recipročno uravnavanje** s razmerjem med glukagonom in inzulinom. En hormon procese zavira, drugi hormon pa procese aktivira.

BIOSINTEZE NEKATERIH POMEMBNIH SLADKORJEV

BIOSINTEZA GLUKOZE

Najpomembnejši disaharid, ki se sintetizira v našem telesu, je laktoza. Nastaja le v mlečni žlezi v obdobju laktacije (po porodu). Laktoza je disaharid iz glukoze in galaktoze.

Iz glukoze-1-fosfata lahko nastane UDP-glukoza, ki se lahko epimerizira v UDP-galaktozo. Ta aktiviran galaktozni ostanek pa se lahko prenese na molekulo glukoze, ki služi kot akceptor; dobimo disaharid laktoze. Encimi, ki prenašajo galaktozne ostanke, se imenujejo galaktozil transferaze. Katalizirajo nastanek glikozidne vezi in so zelo specifične glede na sladkor, ki se aktivira in na to, kam se ta sladkorni ostanek prenaša.

Encim, ki sodeluje v biosintezi laktoze

Gre za dimer - galaktozil transferaza, ki je normalno prisotna v celicah, ima zelo nizko afiniteto za glukozo. Pretežno prenaša galaktozne ostanke iz UDP-galaktoze na N-acetilglukozamin. Ta je najboljši prejemnik aktivirane galaktoze. V mlečni žlezi pod vplivom hormona prolaktina (po porodu), pride do izražanja proteina laktalbumina. Ko se ta protein veže na galaktozil transferazo, se poveča afiniteta tega encima za glukozo. Razlika je zelo velika; prej je K_m 1200 mM, zdaj je 1 mM. Glukoza bo tako postala preferenčni prejemnik aktiviranega galaktoznega ostanka, zato bo nastala laktoza.

BIOSINTEZA IN VLOGA GLUKURONSKE KISLINE

Glukuronsko kislino dobimo tako, da se aktivirana glukozo (UDP-glukoza) oksidira v dveh stopnjah. V teh dveh stopnjah iz hidroksilne skupine dobimo karboksilno skupino - aktivirano glukuronsko kislino. Ta aktivirana glukuronska kislina se potem lahko veže na substrat tako, da se UDP zamenja s substratom. Substrati so npr. telesu tuje snovi, ki imajo hidroksilno skupino. Hidroksilno skupino je v telesu tuje lipofilne molekule uvedel citokrom p450, to pa omogoča konjugacijo z glukuronsko kislino. S tem postanejo te snovi vodotopne in se lahko izločijo z urinom ali žolčem. Na ta način poteka npr. konjugacija bilirubina. Nanj se vežeta dve molekuli glukuronske kisline, dobimo diglukoronid. Na ta način poteka tudi vezava steroidov (steroidnih hormonov), to je mehanizem, ki omogoča, da se telo znebi steroidov.

UDP-glukuronska kislina je tudi izhodna spojina za sintezo glikoproteinov, glikolipidov in proteoglikanov.

Nastanek modificiranih sladkorjev

Kateri sladkorji so izhodiščne spojine za sintezo sladkornih ostankov glikoproteinov in proteoglikanov? Predvsem aktivirana glukozo, lahko tudi aktivirana galaktoza, aktivirana glukuronska kislina.. izjema je le manoza, ki se aktivira z GDP (vsi ostali sladkorji se aktivirajo z

vezavo UDP). Iz glukoze dobimo tudi s transaminacijo, preko več stopenj, glukozamine in vse iz tega izhajajoče acetilirane sladkorje. Vsega tega **ni treba znati**.

Pri vseh sintezah sladkornih ostankov glikoproteinov in proteoglikanov sodelujejo **glikoziltransferaze**, ki prenašajo sladkor iz sladkornih nukleotidov na aminokislinske ostanke proteinov - predvsem na serin (O-glikozidne vezi) in asparagin (N-glikozidna vez). Te glikozil transferaze so specifične tako glede na sladkorne nukleotide kot tudi na akceptor teh aktiviranih sladkorjev. Glikoziltransferaze torej prenašajo sladkorne ostanke.

Glikoproteini imajo na aminokislinske vezane kratke oligosaharide, večinoma gre za razvejane oligosaharide. Značilno je, da se ne ponavljajo zaporedno vezani disaharidi. V teh oligosaharidnih ostankih pretežno nastopajo N-acetil nevraminska kislina, galaktoza, N-acetil glukozamin, manoza in fukoza (ki jo dobimo iz manoze). Glikoproteini so prisotni na hormonih, proteinih, ki se izločajo v kri (npr. faktorji strjevanja krvi), proteinih, ki se transportirajo iz celice in se vsidrajo v celično membrano s hidrofobnim delom, antigenih, receptorjih.

Proteoglikani pa imajo daljše polisaharidne in oligosaharidne verige. Značilno je, da se te verige (zaporedja oligosaharidov) ponavljajo. Proteoglikani so pomembna komponenta izvenceličnega matriksa, dajejo mu trdnost/elastičnost.

Glikozilacije potekajo v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu. Te glikozilirani proteini pa se potem lahko ali izločijo iz celice ali vključijo v celično membrano. Tudi lizosomalni encimi so glikozilirani.

Peptidoglikani dajejo tudi trdnost bakterijski steni. Prisotni so v celični steni gram pozitivnih in gram negativnih bakterij, razlika pa je v tem, da gram negativne bakterije nimajo pentaglicinov, ki bi med seboj povezovali aminokislinske stranske verige. Pri gram negativnih bakterijah so te stranske verige povezane direktno med seboj, pri gram pozitivnih bakterijah pa so povezane med seboj s petimi glicini. Razlika je tudi v tem, da imajo gram negativne bakterije še zunanjo membrano.

Osnovno enoto peptidoglikana predstavljajo N-acetilmuraminska kislina in N-acetilglukozamin. Na N-acetilmuraminsko kislino je vezan pentapeptid (pet aminokislin), na lizinski ostanek te verige aminokislin pa je vezanih pet glicinov.

Najprej poteče sinteza osnovne enote, potem pa se en UDP na osnovni enoti zamenja z doliholom. Ta osnovna enota, ki je aktivirana z alkoholom doliholom, se veže na nereducirajoči konec verige, transpeptidaza katalizira nastanek peptidne vezi med pentapeptidom predhodne verige in glicinskim ostankom novonastajajoče verige. Na ta način nastane navzkrižna povezava, kar daje čvrstost peptidoglikanom.

Osnovna enota, aktivirana z doliholom, se veže na obstoječo polipeptidno verigo, transpeptidaza pa katalizira nastanek peptidne vezi, ki kovalentno poveže novo enoto z obstoječo verigo. To transpeptidazo lahko inhibiramo z antibiotiki - tako deluje penicilin.

Vsi penicilini imajo beta laktamski obroč. Ta omogoča, da se penicilin veže na transpeptidazo in

jo s to vezavo inhibira. Ker je inhibirano zamreženje peptidoglikanske celične stene, so bakterije manj odporne na osmotski stres in to je princip antibakterijskega delovanja. Tiste bakterije, ki so rezistentne na penicilin, pa izločajo encim beta laktamazo. Ta se veže na beta laktamski obroč in ga razcepi.

Predavanje 24; 22. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

BIOSINTEZA MAŠČOBNIH KISLIN

Maščobne kisline lahko razgrajujejo jetra, mišice (kadar je dovolj kisika), srčna mišica... pogoj za beta oksidacijo je prisotnost kisika, prisotnost koencimov in prisotnost mitohondrijev, kjer poteka beta oksidacija in citratni cikel (ko dobimo po beta oksidaciji acetil koencim A se mora ta naprej razgraditi!).

Biosinteza maščobnih kislin poteka predvsem v jetrih, tudi v maščevju in mlečni žlezi med laktacijo. Izhodna spojina je acetil koencim A, ki se more še spremeniti v malonil-CoA (aktivirana oblika acetil koencim A). Potem teče proces biosinteze na encimu FAS (fatty acid synthase - kompleks sintaze maščobnih kislin), to je tipičen biosintetski proces (redukcije, od koencimov potrebujemo NADPH, potrebujemo pa tudi energijo - ATP potrebujemo ob pretvorbi acetil-CoA v malonil-CoA). Glavni končni produkt je **palmitat**, odcepi se od sintaze maščobnih kislin. V nadaljni stopnji se palmitat lahko aktivira, dobimo palmitoil-CoA, nadaljne maščobne kisline pa lahko dobimo še v procesu elongacije in desaturacije.

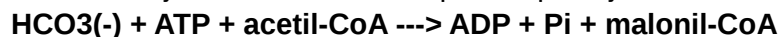
Za biosintezo maščobnih kislin torej potrebujemo izhodni spojini (acetil-CoA in malonil-CoA), redukcijske ekvivalente v obliki NADPH, energijo v obliki ATP, encime (acetil-CoA karboksilaza in FAS).

Biosinteza maščobnih kislin teče v citoplazmi celic. Osnovni substrat je acetil-CoA, ta pa nastaja v mitohondrijih. Problem nastopi, ker se acetil-CoA ne more prenesti preko notranje mitohondrijske membrane. Zato se acetil-CoA mora pretvoriti v drugo spojino, ki v notranji mitohondrijski membrani ima prenašalec.

Poteče reakcija med acetil-CoA in oksaloacetatom, nastane citrat. Ta lahko preko mitohondrijskega prenašalca gre v citosol. Tu potrebujemo encim citrat liaza, ki nam omogoči, da iz citrata spet dobimo acetil-CoA in oksaloacetat. Nadaljni del ciklusa je potreben zato, da dobimo oksaloacetat spet v mitohondriju. Oksaloacetat se najprej reducira v malat z malat dehidrogenazo, ta se nadaljno pretvori v piruvat z maličnim encimom (sprosti se NADPH). Piruvat potem preide v mitohondrijski matriks in se s piruvat karboksilazo pretvori nazaj v oksaloacetat.

Pri tem ciklu dobimo tudi en NADPH, ki je tudi potreben za biosintezo maščobnih kislin. Vir NADPH je v tem primeru malični encim.

Poleg acetil-CoA pa v citosolu potrebujemo tudi malonil-CoA. To je derivat acetil-CoA, priti mora do karboksilacije. Osnovni substrat je acetil-CoA, produkt je malonil-CoA; teče reakcija karboksilacije in ker se molekula pri tem podaljša za C atom je potrebna energija v obliki ATP.



Reakcije karboksilacije ponavadi potrebujejo koencim; koencim, ki sodeluje pri karboksilacijah, je biotin. V tem primeru ga potrebuje acetil-CoA-karboksilaza.

Kompleks sintaze maščobnih kislin - FAS

Kompleks nastopa kot dimer iz dveh polipeptidnih verig, ki ležita antiparalelno. Gre za multifunkcionalen protein - ena polipeptidna veriga ima sedem encimskih aktivnosti, zato je hitrost reakcije večja, saj substratu ni treba oddisociirati in iskati naslednjega encima.

Vsaka polipeptidna veriga je organizirana v tri domene. Prva je odgovorna za to, da se acetil-CoA in malonil-CoA vežeta. Nastane beta-keto produkt. Druga domena je odgovorna za to, da se beta-keto produkt reducira. Naslednja domena, tioesteraza, pa je odgovorna za to, da se končni produkt odcepi od proteina.

ACP je acil-carrying protein (acil prenašalni protein), ki ima ročico z SH skupino. Velik del reakcij se dogaja, ko je substrat vezan na ta SH. Domnevajo da, ko teče proces, poteka med domeno 1 ene polipeptidne verige in domene 2 in 3 druge polipeptidne verige. Na SH delčku poteka proces kondenzacije.

STOPNJE SINTEZE MAŠČOBNIH KISLIN

Ključna dela FAS sta ACP in pa beta-ketoacil sintaza (tista, ki podaljša verigo). Vsaka molekula, ki vstopa v ta kompleks, se naprej veže na ACP. Proces se začne tako, da se acetilni ostanek veže na ACP. V naslednji stopnji se acetilni ostanek mora prenesti iz ACP na beta-ketoacil sintazo. V tretji stopnji vstopi malonil-CoA; zdaj imamo na beta-ketoacil sintazo vezan acetilni ostanek in malonil-CoA vezan na ACP. V naslednji stopnji pride do reakcije kondenzacije.

Dobimo beta keto produkt, odcepi se CO₂.

V naslednjih stopnjah se mora beta keto skupina reducirati - keto skupina se mora reducirati do hidroksilne skupine, potem se odcepi voda in dobimo dvojno vez. V sedmi stopnji pa se dvojna vez reducira in dobimo dve CH₂ skupini.

Ciklus teče sedemkrat, da dobimo na koncu na ACP vezan palmitat. Ko dobimo palmitat, ki ima 16 C atomov, se ta odcepi; to katalizira tioesteraza.

Neto reakcija - začnemo z acetil-CoA, potrebujemo pa še 7 malonil-CoA, 14 NADPH in 14 H⁺. Dobimo palmitat, sedem CO₂, 14 NADP⁺, 8 CoA in 6 H₂O.

Uravnavanje biosinteze maščobnih kislin

Pomembno je uravnavanje acetil-CoA karboksilaze - na ravni aktivacije/inhibicije, fosforilacije/defosforilacije in na ravni sinteze/razgradnje encima. Ker je ta encim uravnavan na toliko načinov lahko sklepamo, da je uravnavanje aktivnosti tega encima zelo pomembno.

Uravnavan je tudi FAS s sintezo/razgradnjo tega encima.

Citrat nastopa kot pozitivni modulator acetil-CoA-karboksilaze, palmitoil-CoA pa kot negativni modulator (končni produkt, zato je logično, da negativno vpliva na sintezo, če ga je preveč).

Aktivnost acetil-CoA karboksilaze stimulira inzulin tako, da pride do defosforilacije (inzulina je

veliko, kadar je energetsko stanje organizma ugodno in lahko se uporabi energijo za sintezo maščobnih kislin). Glukagon in cAMP pa deaktivirata encim s pomočjo fosforilacije (preko kinaz). Encim je uravnavan tudi na ravni sinteze - sintetiziral se bo, kadar bomo jedli veliko sladkorja.

Kadar teče sinteza maščobnih kislin, se poveča v celici koncentracija malonil-CoA. Ta deluje kot negativni modulator za razgradnjo maščobnih kislin.

Primerjava med biosintezo in razgradnjo maščobnih kislin

Prva razlika je že glede na lokacijo, kjer procesa potekata. Biosinteza maščobnih kislin poteka v citosolu, beta oksidacija pa v mitohondrijskem matriksu. Razlika je tudi v tem, na kaj je maščobna kislina vezana - pri beta oksidaciji na koencim A, pri biosintezi pa na ACP. Razlika je tudi v tem, kateri koencimi sodelujejo pri procesih - pri beta oksidaciji FAD in NAD⁺ sprejmeta elektrone, medtem ko je sinteza reduktiven proces in potrebuje NADPH. Pri beta oksidaciji se sprošča acetyl-CoA, pri sintezi maščobnih kislin pa potrebujemo malonil-CoA.

Endogena sinteza maščobnih kislin

Palmitatu se lahko dodajo še dodatni C atomi v procesu elongacije (dobimo stearat in daljše maščobne kisline), lahko pa se v procesu desaturacije dodajo še dvojne vezi.

Elongacija maščobnih kislin

Maščobna kislina ni več vezana na ACP ampak na koencim A. Proces teče v mitohondrijih ali v ER.

S kompleksom sintaze maščobnih kislin nastane palmitat. Ta se prenese v ER, kjer poteka elongacija. Donor je malonil-CoA, veriga se podaljša za 2 C atoma. V ta proces elongacije lahko vstopajo tako tiste maščobne kisline, ki jih sami sintetiziramo kot tudi tiste, ki jih dobimo s hrano.

Desaturacije

Dvojno vez lahko uvedemo na 9, 6, 5 in 4 mesta. Šteje se od karboksilne skupine. Nekaterih maščobnih kislin nismo sposobni sami sintetizirati, so esencialne - te esencialne maščobne kisline imajo dvojne vezi na mestih, kjer jih naši encimi (desaturaze) niso sposobni uvesti. Te esencialne maščobne kisline so linolna in linolenska.

Uvedba dvojnih vezi

Uporabimo encim desaturazo in pa citokrom b5 in citokrom b5-reduktazo.

Imamo neko nasičeno maščobno kislino. Ob uvajanju dvojne vezi se dva vodikova atoma odstranita, torej gre za proces oksidacije. To omogoči, da v reakcijo vstopa kisik. Dobimo vodo in maščobno kislino, ki ima eno dvojno vez. Za reduciranje maščobne kisline potrebujemo en atom kisika, drugi atom kisika pa prav tako moramo reducirati do vode. Zato potrebujemo NADPH.

Povzetek

Glavno mesto sinteze maščobnih kislin so jetra. Tam se maščobne kisline aktivirajo, nastane acil-CoA. Potem se spremenijo v triacilglicerole, ki se v obliki VLDL delcev prenesejo do

perifernih tkiv.

BIOSINTEZA TRIACILGLICEROLOV

Poteka predvsem v jetrih, tudi v maščevju in mlečni žlezi. Spet gre za biosintetski proces, torej moramo vložiti energijo (ATP) za aktivacijo substratov. Pri biosintezi triacilglicerolov potrebujemo dva aktivirana prekursorja - prvi je maščobna kislina v obliki acil-CoA, drugi pa aktivirana oblika glicerola - glicerol-3-fosfat.

Za aktivacijo maščobnih kislin potrebujemo ATP in koencim A. Dobimo AMP in pirofosfat, torej potrebujemo še več energije. Encim, ki katalizira, je acil-CoA-sintetaza.

Za aktivacijo glicerola v glicerol-3-fosfat je več možnosti. Ena je direktna fosforilacija z glicerol kinazo, pri čemer potrebujemo ATP - ta proces teče v jetrih. Glicerol kinaze pa maščevje nima, tako da mora tam nastati na drugačen način. Lahko ga dobimo iz dihidroksiacetonfosfata, ki je intermediat glikolize, ob stradanju pa v procesu gliceroneogeneze. Ta dva načina lahko potekata tudi v maščevju.

Sinteza triacilglicerolov

Izhajamo iz glicerol-3-fosfata. V reakcijo vstopi acil-CoA in prva acilna skupina se doda na C1 tega glicerol-3-fosfata. To reakcijo katalizira glicerolfosfat aciltransferaza. V drugi stopnji se doda še en acilni ostanek - encim je acilglicerolfosfat aciltransferaza. Kot produkt dobimo spojino, ki ji rečemo tudi fosfatidat (1,2-diacilglicerol fosfat). V naslednji stopnji mora fosfatidat fosfataza odcepiti fosfat, dobimo diacilglicerol. Ko se doda še ena acilna skupina dobimo triacilglicerol.

Kdaj poteka biosinteza triacilglicerolov?

Kadar je energijsko stanje ugodno. Ko pa je energijsko stanje neugodno poteka lipoliza; sprosti se prebitek maščobnih kislin, da imajo tkiva dovolj na razpolago. Sprostijo se torej maščobne kisline in glicerol; glicerol gre v jetra in se porabi. Maščobne kisline pa se sprostijo v kri, vendar se sprosti več maščobnih kislin, kot jih v tem trenutku potrebujemo. Te neporabljene maščobne kisline vstopajo v jetra, kjer se spet sintetizirajo v triglicerole. Te se v obliki lipoproteinov (VLDL) pošljejo po telesu. V perifernih tkivih imamo pri mišicah in maščevju na plazmalemi lipoproteinlipazo, ki razgrajuje triacilglicerole in te lahko vstopijo v celice, kjer se lahko spet sintetizirajo v triacilglicerole.

Gliceroneogeneza

Poteka v maščevju. Piruvat preko mnogih stopenj pride do dihidroksiaceton fosfata. Ta se reducira do glicerol-3-fosfata.

Glukokortikoidi stimulirajo fosfoenolpiruvat karboksikinazo (PEPCK) v jetrih.

Uravnavanje gliceroneogeneze

Nekatera zdravila stimulirajo PEPCK v maščevju, tako mu omogočijo, da zaestri tiste maščobne kisline, ki se sprostijo v krvi, zato se koncentracija teh zniža.

Vloga maščobnih zalog

Služijo kot zaloga energije, toplotna izolacija... maščevje pa je tudi endokrino tkivo! Sprošča torej biološko aktivne molekule, ki sodelujejo pri uravnavanju organizma.

Zakaj so maščobe primerne za skladiščenje energije?

- so reducirane; na gram torej dajo več energije kot glikogen
- niso topne v vodi, zato niso hidratizirane
- počasneje dobivamo energijo kot od glikogena, prav tako od njih ne moremo dobiti glukoze; zato torej še vedno potrebujemo glikogen!

Maščobno tkivo kot endokrino tkivo

Maščevje sprošča več različnih hormonov. Leptin zmanjša apetit in poveča uporabo energije, prav tako se sintetizirajo adipocitokini. Količina sintetiziranih hormonov je odvisna od maščobnih zalog, kar vpliva tudi na zdravje. Spremenjena količina izločenih adipocitokinov vodi lahko do zdravstvenih težav.

Predavanje 25; 23. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

OSNOVE URAVNAVANJA IN INTEGRACIJA METABOLNIH GORIV

Metabolična goriva potrebujemo, ker vsaka celica potrebuje gorivo. Ključna metabolična goriva so glukoza, maščobne kisline, ketonske spojine. Tudi iz aminokislin načeloma lahko dobimo energijo, vendar ob normalnem vnosu aminokislin ne bo glavna metabolična pot pridobivanje energije, ampak biosinteza proteinov - od njih torej lahko dobimo energijo, vendar to ni njihova primarna naloga.

Celice (tkiva) v našem organizmu so različna

Tkiva in organi se razlikujejo glede na potrebe po gorivu. Pri tem igra pomembno vlogo tudi kri, ker je kri tista, ki prinaša metabolična goriva in odnaša produkte. Kri tudi prinaša kisik, kar je pomembno, ker je večina procesov v našem telesu aerobnih.

Med seboj organi sodelujejo, npr. **Corijev cikel**, kjer sodelujeta jetra in mišica. Smisel tega ciklusa je, da se v mišici glukoza pretvarja v laktat, tako mišica pridobiva energijo. Laktat se prenese v jetra, kjer se pretvori v glukozo. Mišica torej energijo dobi, jetra pa nosijo energetske breme.

Glukoza je ključno metabolično gorivo, ki ga lahko uporabljajo čisto vse celice. Nekatere celice lahko uporabljajo izključno glukozo (npr. eritrociti). Dodatno gorivo so lahko maščobne kisline, vendar jih ne uporabljajo vse celice. Bolj metabolično uporabna so ketonska telesca.

Beta oksidacija, glikoliza, sinteza acetil-CoA.. vsi so aerobni procesi, zato nastajajo reducirani koencimi. Kisik potrebujemo zato, da se te reducirani koencimi regenerirajo v svojo prvotno

obliko. Posebnost je anaerobna glikoliza - to je edini proces v telesu, ki daje energijo in poteka tudi v anaerobnih pogojih in lahko za kratek čas omogoči pridobivanje energije tudi ob patoloških pogojih. Tudi v tem primeru se more koencim reoksidirati, vendar pa se reoksidira tako, da se elektroni predajo piruvatu in nastane laktat.

Glavne zaloge metabolnih goriv v telesu so glikogen, maščevje in pa tudi proteini - te lahko predstavljajo zaloge goriv, vendar ta ni zelo uporabna, ker ne obstajajo proteini, ki bi bili izključno zaloga aminokislin. Proteini torej opravljajo telesu neko vlogo in če se (pretirano) razgrajujejo, potem to škodi telesu. Ob podaljšanem stradanju lahko privede tudi do smrti.

Energijska in kalorična homeostaza

Koncentracija glukoze se more gibati v ozkih mejah, medtem ko so meje za ketonska telesca in maščobne kisline večja.

V spremenjenih pogojih se tkiva in organi prilagodijo. Ob stradanju poteka lipoliza v maščevju, jetra bodo tvorila ketonske spojine. Ključni prejemnik ob tem stanju so možgani, ki porabljajo večinoma ketonske telesce in čim manj glukoze, saj se na ta način zmanjša razgrajevanje proteinov.

Kako je uravnavan metabolizem goriv v posamezni celici?

Celica (metabolične poti) se odzove glede na spremembe v celici - glede na to, kakšne so potrebe in energijsko stanje v celici. Lahko pa se odzove tudi na stanje organizma. Metabolizem je v posamezni celici uravnavan na različnih ravneh - razpoložljivost substratov, količina aktivne oblike encimov, razpoložljivost goriv (metabolizem lahko poteka samo ob razpoložljivosti substratov!). Metabolično gorivo se mora tudi znajti v celici, v pravem predelku.

Metabolizem v možganih

Možgani so (izključno) aerobno tkivo. Ker imajo možganske celice mitohondrije bi lahko uporabljale maščobne kisline, vendar te ne morejo preko krvno-možganske bariere.

Za uspešen metabolizem je potrebna tudi ustrezna količina aktivnega encima. Razlikovati moramo med spremembami v količini in spremembami v aktivnosti encima. Na količino aktivne oblike encima lahko vplivamo s sintezo encima in njegovo razgradnjo. Encim moramo imeti v pravem celičnem razdelku, aktivnost pa je lahko uravnavana tudi z regulatornim proteinom, alosteričnimi modulatorji ali kovalentno modifikacijo.

Maščevje nima encima glicerol kinaze. Zato ne more uporabiti glicerola kot prekursor za sintezo triacilglicerolov - aktiviran glicerol mora dobiti bodisi od jeter, bodisi iz dihidroksiacetonfosfata z encimom glicerol-3-fosfat dehidrogenazo. Poleg tega, da je prisoten pravilen encim, pa mora biti prisoten v pravilnem kompartmentu (citosol, mitohondrijski matriks,..)

Alosterična regulacija

Z izooblikami lahko uravnavamo encimske aktivnosti. Za telo je ugodno, da imamo različne izoencimske oblike - izoencimi sintetizirajo isti produkt vendar se razlikujejo po zgradbi, inhibitorjih.. tako se lahko prilagodijo delovanju v različnih celicah.

Modulatorji se vežejo na neko mesto encima, ki ni aktivni center, tako spremenijo njegovo aktivnost.

Glikoliza

Tekom glikolize se kot negativni modulator pogosto pojavljajo ATP, NADH in citrat. Te molekule sporočajo celici, da je veliko energije. Zato niso potrebni procesi, ki dajejo energijo in glikoliza bo zavrta. Pozitivni modulatorji pa so AMP, ADP in NAD⁺.

Citratni cikel

Spet je negativni modulator ATP in NADH. Pozitivni modulator pa je ADP. Razlogi so enaki kot pri glikolizi.

Oksidacija maščobnih kislin

Reakcija s palmitil acil transferazo 1 je tista, ki prenese acil-CoA v matriks mitohondrija, kjer se uporabi za beta oksidacijo maščobnih kislin. Ta prenos zavre malonil-CoA.

AMP

AMP lahko nastopa v dveh vlogah. Lahko nastopa kot alosterični modulator, se veže na encim in spremeni njegovo aktivnost. Lahko pa nastopa kot aktivator za AMP odvisne protein kinaze. AMPK (od AMP odvisna protein kinaza) je aktivirana z AMP - aktivirala bo procese, ki pridobivajo energijo in inhibirala procese, ki potrebujejo energijo.

Reakcija s fosfofruktokinazo 1 v glikolizi je zelo dobro regulirana. AMP aktivira fosfofruktokinazo 1, hkrati pa inhibira bisfosfataze, ki katalizira reakcijo v obratni smeri (glukoneogeneza) - kadar bo aktivirana glikoliza bo torej zavrta glukoneogeneza.

Tudi fruktoza-2,6-bisfosfat nastopa hkrati kot aktivator glikolize in inhibitor glukoneogeneze.

Uravnavanje metabolizma na ravni celice - celični metabolizem je reguliran glede na potrebe celice.

Uravnavanje metabolizma na ravni organizma - v nekaterih tkivih potekajo metabolični procesi zato, ker je to potrebno za druga tkiva in organe. Primer je lipoliza v maščevju. Tistih maščobnih kislin, ki se sprostijo, jih maščevje samo ne uporablja, ampak se sprostijo v kri in se uporabi v drugih tkivih.

Hormonsko uravnavanje metabolizma goriv

Inzulin je hormon sitosti, glukagon pa se sprošča takrat, ko je koncentracija glukoze v krvi nizka. Njegova glavna tarčna tkiva sta jetra in maščevje. Adrenalin se sprosti kot odgovor na stres.

Učinek hranjenja in stradanja na metabolizem

Če jemo, potem se mora hrana nekako porazdeliti in porabiti. Posledica hranjenja (povišane koncentracije glukoze) je višja koncentracija inzulina in nižja koncentracija glukagona. Posledično so stimulirani procesi, ki omogočijo skladiščenje goriv - tvorba glikogena, sinteza maščob in sinteza proteinov. Kot posledica delovanja hormonov pade koncentracija glukoze, aminokislin, maščobnih kislin in ketonskih telesc v krvi.

Kadar pa ne jemo pride do spremembe razmerja med inzulinom in glukagonom, koncentracija glukagona bo narasla. Kot posledica sporočanja s hormoni bo prišlo do hidrolize zalog gradiv, stimuliran bo tudi proces glukoneogeneze in ketogeneze. V krvi se bo zato povečala koncentracija glukoze, aminokislin, maščobnih kislin in ketonskih telesc. Goriva, ki so se sprostila, torej niso namenjena celicam, ki so jih sprostile, ampak ostalim telesom in organom.

Najpomembnejši mehanizem uravnavanje je s pomočjo kovalentne modifikacije (fosforilacije in defosforilacije). Glukagon ima receptor na membrani. Aktivirajo se G proteini, potem pa še adenilil ciklaza. Poviša se koncentracija cAMP, aktivira se protein kinaza. Posledica delovanja glukagona na tarčno celico bo torej fosforilacija ključnih encimov. Inzulin pa aktivira fosfataze, tako da pride do defosforilacije ključnih encimov.

Na količino aktivne oblike encima vpliva tudi to, koliko encima se **sintetizira** in koliko encima se **razgrajuje** . Lahko prihaja do spremembe koncentracije glukokinaze (inzulin stimulira izražanje gena za glukokinazo v jetrih). Inducibilni so tudi encimi, ki sodelujejo pri sintezi maščobnih kislin. Ta način uravnavanja je počasnejši od kovalentne modifikacije.

Recipročno uravnavanje PDH in piruvat karboksilaze

Acetil-CoA je obenem substrat za sintezo maščobnih kislin, hkrati pa je tudi modulator, ki uravnava razgradnjo piruvata (negativni modulator piruvat dehidrogenaze in pozitivni modulator piruvat karboksilaze).

Dolečene celice, tkiva in organi, lahko izberejo različne metabolične poti. Kot goriva lahko uporabljajo bodisi glukozo, bodisi maščobne kisline. Takšno tkivo so npr. mišice. V normalnem stanju, če je organizem dobro prehranjen, se bo lahko uporabljala glukozna za metabolično gorivo. Ko smo slabo prehranjeni pa se more glukozna ohraniti za tiste celice, ki jo nujno potrebujejo. Zato bo to uravnavano - takrat, ko hrane ni veliko, glukozna ne bo morala v veliki meri vstopati v celice mišic, tista, ki pa bo prisotna, se ne bo morala razgrajevati! To pa zato, ker bo mišica začela razgrajevati maščobne kisline, tako bo v celici več acetil-CoA, ki bo negativno vplival na razgradnjo glukoze, saj nastopa kot negativni modulator piruvat dehidrogenaze.

Predavanje 26; 23. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

METABOLIZEM FOSFOLIPIDOV IN GLIKOLIPIDOV

Fosfolipide in glikolipide najdemo v membranah. Služijo strukturi membrane in pa prepoznavanju celic.

Strukture fosfo in glikolipidov

Prva molekula je triacilglicerol; en glicerol s tremi maščobnimi kislinami. Druga spojina je glicerofosfolipid, tretja pa sfingolipid; razlika med njima je v tem, da v glicerofosfolipidu kot osnovni alkohol nastopa glicerol, pri sfingolipidu pa sfingozin. Oba pa imata zaestrene maščobne kisline, pri glicerofosfolipidu dve, pri sfingolipidu ena. Četrta molekula pa je

glikosfingolipid; na mestu, kjer je vezan ponavadi fosfat in alkohol polarne glave, je vezanih ena ali več sladkornih komponent.

Glicerofosfolipidi

Glede na alkohol polarne glave dobimo različne glicerofosfolipide, ki se razlikujejo tudi po fizikalnih lastnostih glede na naboj.

Pomemben skupni intermediat v biosintezi triacilglicerolov in glicerofosfolipidov je **fosfatidat**.

Dve možni poti za priključitev alkohola polarne glave

1. Najprej se aktivira fosfatidat s CTP. Dobimo CDP-diacilglicerol. V naslednji stopnji se bo CMP odcepil in dodal alkohol polarne glave.

2. Iz fosfatidata se fosfat odcepi, dobimo diacilglicerol; alkohol polarne glave se aktivira posebaj s CTP, dobimo aktiviran alkohol polarne glave. Poteče reakcija med tema dvema, dobimo glicerofosfolipid.

Skupno tem potem je potreba po dodatni aktivaciji (potreba po energiji) ene od obeh komponent - ali se s CTP dodatno aktivira fosfatidat, ali pa se s CTP dodatno aktivira alkohol polarne glave. Za tiste glicerofosfolipide, ki imajo dušike v skupini (fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin) se CTP veže na alkohol polarne glave, medtem ko pri drugih se CTP raje veže na triacilglicerol.

V celici ves čas obstaja metabolično obračanje. Molekule se v celici sintetizirajo, obenem pa poteka še njihova razgradnja. Encimi, ki omogočajo razgradnjo glicerofosfolipidov, so fosfolipaze. Na mestu ena odceplja maščobno kislino fosfolipaza A1, na mestu dva pa fosfolipaza A2. Imamo še fosfolipazo C in fosfolipazo D.

Fosfolipaza A2 ni pomembna le za razgradnjo fosfolipidov ampak omogoči tudi to, da se maščobna kislina na mestu 2 sprosti s specifičnim namenom - vstop v sintezo eikozanoidov.

Predavanje 27; 24. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

SFINGOLIPIDI

So še vedno fosfolipidi, vendar pri njih namesto glicerola nastopa sfingozin. Maščobna kislina se ne veže na OH skupino, ampak je v ceramidu povezana preko dušika.

X je lahko holin ali etanolamin; tako dobimo **sfingomielin**. Lahko pa se vežejo tudi sladkorji; en sam sladkor (najpogostejša sta glukoza ali galaktoza), tako dobimo spojine, ki jih imenujemo cerebrozidi. Če pa se veže kompleksni oligosaharid, ki vključuje tudi sialno kislino, se te strukture imenujejo gangliozidi.

Sfingozin lahko sintetiziramo v našem telesu. Substrata sta serin in palmitoil-CoA. Iz tega dobimo sfingozin, ki se acilira (vir je acil koencim A), dobimo ceramid.

Biosinteza sfingolipidov iz ceramida

Fosfolipinska skupina se preda iz fosfatidilholina - to ni edina možna pot sinteze sfingomielina, ampak je najbolj pogosta. Dobimo preko fosfata vezan holin. Pri sintezi glikosfingolipidov pa

moramo dodati sladkorne enote. Ena možnost je, da se doda samo ena glukoza, kot vir pa nastopa UDP-glukoza (UDP-glukoza predstava aktiviran vir glukoze za biosintetske procese).

Cerebrozidi nastanejo z vezavo ene sladkorne enote - ponavadi glukoza ali galaktoza. Če se veže več monosaharidnih ostankov rečemo temu globozidi. Cerebrozide večinoma najdemo v živčevju, kjer predstavljajo sestavni del mielinske ovojnice.

Gangliozidi pa so precej kompleksnejše strukture - vezano je večje število sladkorjev, med njimi mora biti vključena tudi sialna kislina (NANA - N-acetilnevraminska kislina). Razlikujejo se glede na to, katere sladkorje imajo vezane v strukturi. Najdemo jih na celični membrani in so pomembni pri celičnem razpoznavanju.

Sinteza gangliozidov

Sladkorji se postopoma dodajajo v strukturo. Pri tem sodelujejo specifični encimi, ki se imenujejo glikozil transferaze. Poteka na endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu. Ponavadi kot donorji nastopajo UDP-sladkorji, izjema je sialna kislina.

Za gangliozide velja podobno kot za fosfolipide; po sintezi se vključijo v membrano, opravljajo svojo nalogo in se po nekem času razgradijo. Tudi eritrociti imajo gangliozide, vendar imajo eritrociti zelo kratko življensko dobo; razgradijo se z retikuloendotelialnim sistemom (sistem makrofagov in fagocitov).

Pri razgrajevanju gangliozidov poteka postopno odcepljanje sladkornih enot (hidroliza), dokler ne pridemo do ceramida, ki je še vedno vezan na sladkor, tako da se še ta poslednji sladkor odcepi. Potrebna je cela vrsta encimov, da se komponente odstranjujejo počasi in postopoma. Če pa kateri encim ne bi delal, ali pa bi njegova aktivnost bila premajhna, potem bi se nek substrat kopičil - organizem bi gangliozid razgradil do neke točke, naprej pa ne! Kjer je zmanjšana aktivnost heksozaminidaze A je Tay-Sachsova bolezen, ko manjka aktivnost sfingomielaze je Niemann-Pickova bolezen, ko je okvarjen encim glukocerebrozidaza pa pride do Gaucherjeve bolezni.

MOTNJE V METABOLIZMU SFINGOLIPIDOV - BOLEZNI SKLADIŠČENJA LIPIDOV

- Tay-Sachsova bolezen; dedna bolezen z motnjo v razgradnjo gangliozidov, ki se akumulirajo v vranici in možganih. Vodi do zaostanka v razvoju, paralize, zgodnje smrti. Je relativno redka bolezen.

- Niemann-Pickova bolezen; motnja v razgradnji sfingomielina, ki se akumulira v možganih, vranici in jetrih. Otroci umrejo ponavadi do 4 leta.

- Gaucherjeva bolezen; v tej skupini še najpogostejša. Gre za zmanjšano aktivnost encima glukocerebrozidaze, ki katalizira reakcijo sfingolize, iz katere dobimo acilsfingozin (ceramid) in glukoza. Glukocerebrozid se kopiči v vranici, jetrih, možganih. Bolezen je precej pogosta v židovski populaciji.

Gangliozide najdemo tudi v eritrocitih, makrofagi retikuloendotelialnega sistema jih razgrajujejo, produkti pa se sprostijo v okolico. Če pa encim ni aktiven, potem intermediati, ki bi se morali razgraditi, ostajajo v lizosomih!

To bolezen bi dokazali z določanjem aktivnosti encima, ali pa na genski ravni z metodami molekularne biologije. Zdravimo z gensko terapijo, ki pa ni zanesljiva za vse posameznike; zato večinoma zdravimo z vnosom encima. Pri tem je problem, v kolikšni meri bo encim prišel na pravo mesto, vendar pa to zaenkrat pomaga.

EIKOZANOIDI

Te molekule so derivati C20 maščobnih kislin (eikoza pomeni v grščini dvajset). Nastajajo predvsem iz esencialnih maščobnih kislin.

Eikozanoidi so derivati C20 polinenasičenih maščobnih kislin. Gre za skupino molekul, ki je zelo bogata; nastane mnogo različnih produktov (prostanoidi, levkotrieni,...). Za njih je značilno, da so fiziološko zelo aktivni, že pri nizkih koncentracijah delujejo na najrazličnejše načine. So kratkoživi, delujejo na mestu sinteze ali na sosednje celice (parakrino ali avtokrino).

Učinki prostaglandinov in levkotrienov

Učinkov je zelo veliko, učinki pa so si pogosto nasprotni.

- sodelujejo pri vnetnem odgovoru v sklepih (arthritis) in koži
- sodelujejo pri nastanku bolečine in vročine
- sodelujejo pri uravnavanju krvnega tlaka (vazokonstriktorji / vazodilatatorji) in strjevanju krvi (lahko jo pospešujejo ali zmanjšujejo)
- zmanjšujejo sekrecijo želodčne kisline
- sodelujejo pri uravnavanju reproduktivnih funkcij (krčenje gladkih mišic - indukcija poroda)
- sodelujejo pri ciklusu spanja/budnosti

Kateri substrati so lahko prekursorji za sintezo eikozanoidov?

Kvantitativno najpomembnejša maščobna kislina za substrat je **arahidonska kislina**. Eden od razlogov, da potrebujemo esencialne MK je ta, da iz njih dobimo arahidonsko kislino. Ta ima v strukturi štiri dvojne vezi. Poleg arahidonske kisline lahko kot prekursorja nastopata še dve drugi maščobni kislini, ki se od nje razlikujeta po številu dvojnih vezi - **eikozatrienojska** ima dvajset C atomov in tri dvojne vezi, **eikozapentaenojska** pa ima pet dvojnih vezi.

Produkti, ki jih dobimo iz teh kislin, se razlikujejo predvsem po številu dvojnih vezi. Iz eikozatrienojske dobimo PGE1 (ena dvojna vez), iz arahidonske PGE2 (dve dvojne vezi) in iz eikozapentaenojske PGE3 (s tremi dvojnimi vezmi).

Če izhaja eikozanoid iz ene ali druge prekursorske maščobne kisline se ne razlikuje v učinku ampak v intenziteti tega učinka.

SINTEZA EIKOZANOIDOV

Signal za sintezo je lahko sproščanje citokinov, mehanična poškodba,... v tem primeru se arahidonska kislina sprosti iz membranskih fosfolipidov (to omogoči fosfolipaza A2). Poznamo dve poti sinteze 'klasičnih' eikozanoidov; eno pot katalizira encim ciklooksigenaza (pravimo ji tudi ciklična pot, ker po delovanju tega encima pride do nastanka nekih obročev), drugo pot pa

lipooksigenaza (pravimo ji linearna pot; pride do modifikacije nenasičenih maščobnih kislin, nastanejo eikozanoidi, vendar do ciklizacije ne pride). Pri ciklični poti nastanejo prostaglandini, tromboksani in prostaciklini. Pri linearni pa levkotrieni in lipoksini.

Pretvorba arahidonske kisline po ciklični poti

Pri sintezi eikozanoidov potrebujemo intermediat prostaglandin H₂ (PGH₂). Katalizira encim prostaglandin endoperoksid sintaza; ima ciklooksigenazno in hidroperoksidazno aktivnost. Ciklooksigenazna aktivnost omogoči nastanek prostaglandina G₂. V drugi stopnji se s hidroperoksidazo PGG₂ reducira v PGH₂. Z medicinskega vidika je pomembna prva stopnja, ker jo inhibirajo številni anti-inflamatorni agensi.

Pri reakciji s ciklooksigenazo se v molekulo uvedeta dva kisikova atoma. Ta molekula je zelo reaktivna, vendar v naših celicah vedno nastaja. Ta vmesni intermediat se reducira (glutation je vir elektronov) do PGH₂.

Encim Ciklooksigenazo najdemo v membrani ER (in jedrni membrani), najdemo ga več ali manj v vseh celicah. Vsidravanje v membrano omogoča hidrofoben del strukture encima.

Ciklooksigenaza 1 in ciklooksigenaza 2 se malo razlikujeta v aktivnem centru.

V biosintetski poti smo od arahidonske kisline prišli do PGH₂ kot centralnega metabolita. Od tega moramo priti do končnih produktov, ki jih je veliko. V vseh celicah nikakor ne nastanejo vsi produkti - so torej celično specifični glede na to, katere sintaze se izražajo v katerih celicah.

Pretvorba arahidonske kisline po linearni poti

Po tej poti nastanejo levkotrieni, ki so fiziološko zelo aktivni. Vključeni so v bronhokonstrikcijo. Encim je spet oksigenaza, nastane intermediat, ki ima peroksilno skupino. V naslednji stopnji nastane levkotrien A₄.

Primerjava med ciklično in linearno potjo

V obeh slučajih je izhodna spojina arahidonska kislina, prav tako v obeh primerih omogoča oksidacijo substrata molekularni kisik. Uvedemo neko peroksidno skupino (intermediati so reaktivne spojine!), razlika pa nastane pri končnih derivatih. Pri ciklični poti nastane ciklična spojina, pri linearni poti pa se derivat ne ciklizira.

Izhodne spojine za sintezo eikozanoidov

Če je substrat linolna maščobna kislina, se ta v procesu elongacije in desaturacije pretvori v arahidonsko kislino. Ta lahko vstopa v ciklično pot, kjer dobimo dve dvojni vezi, ali v linearno pot, kjer dobimo štiri dvojne vezi. Pomembno je, da imata prostoglandin (PGI₂) in tromboksan (TXA₂) podobno intenziteto, ker eden deluje za strjevanje krvi, drugi proti strjevanju krvi.

Če pa je izhodna spojina alfa linolejska kislina, potem dobimo z elongacijo in desaturacijo eikozapentaenojsko kislino. Pridemo do 3 serije prostaglandinov in do 5 serije levkotrienov. V tem primeru so prostaglandini (PGI₃) močno aktivni, tromboksani (TXA₃) pa šibko aktivni. Z nadaljnjimi modifikacijami pa lahko nastane dokozaheksaenojska kislina, ki je pomembna sestavina mleka matere ob dojenju.

Mehanizem delovanja eikozanoidov

Klasični hormoni se sintetizirajo v endokrinih žlezah, se sprostijo v kri, prenesejo do tarčnih tkiv, ki imajo receptorje, tako dosežejo svoj učinek. Eikozanoidi pa so kratkožive, tako da bi se lahko razgradile še pred preходом do tarčnih tkiv - endokrino delovanje torej ne pride v poštev. Delujejo avtokrino (nase) ali parakrino (na sosednje celice). V širšem pogledu pa jim lahko rečemo hormoni, ker imajo svoje receptorje - lahko jih imajo v membrani (povezani z G proteini), ali pa znotraj celice (PPAR receptorji - peroxisom proliferation activated receptors)

Eikozanoidi so biološko aktivne snovi in zato zanimi za klinično prakso

- alprostadil (PGE1) se lahko uporablja za zdravljenje impotence
- misoprostol (analog PGE1) preprečuje nastanek peptičnega ulkusa
- dinoprostone (PGE2) za pospešitev poroda
- epoprostenol (PGI2) za zdravljenje pljučne hipertenzije

Spojine pa poleg zaželenih učinkov povzročijo tudi nekatere nezaželene učinke, zato je pomembno, da jih lahko inhibiramo. Inhibiramo jih lahko na dveh ravneh:

1. inhibicija fosfolipaze A2 s kortikosteroidi. S tem inhibiramo sintezo vseh eikozanoidov, ker preprečimo odcep arahidonske kisline iz membrane.
2. inhibicija z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili na ravni ciklooksigenaze (COX); ta inhibicija je bolj specifična.

Mehanizem delovanja aspirina

Eno od najbolj znanih nesteroidnih protivnetnih sredstev. Deluje pretežno na ciklooksigenazo 1, do neke mere tudi na ciklooksigenazo 2. Ostanek acetilsalicilne kisline se prenese na serinski ostanek encima - encim se je torej kovalentno modificiral na tistem delu, ki je pomemben za aktivnost encima. Šlo bo torej za ireverzibilno inhibicijo in celica bo lahko aktivnost obnovila samo tako, da na novo sintetizirajo ciklooksigenazo. Vendar pa trombociti, ki nimajo jedra, ne morejo na novo sintetizirati ciklooksigenaz, ampak se morajo tvoriti novi trombociti.

Aspirin je lahko škodljiv, če se uporablja dlje časa. Pogoste težave so predvsem na želodcu; lahko pride do nastanka razjede, krvavitve, celo do smrti. Zato so preučili delovanje aspirina na ciklooksigenazo 1 in 2 (COX1, COX2) v želodcu.

Predpostavili so, da je COX-1 encim, ki je konstitutiven in ima predvsem homeostatsko funkcijo (vključenje v fiziološke procese - sinteza prostaglandinov, ki uravnavajo izločanje želodčne kisline). Njegova inhibicija naj bi bila nezaželjena. COX-2 pa se ob normalnem stanju izraža le ob določenih razmerah (je inducibilne narave – sodeluje predvsem pri sintezi prostaglandinov, ki so odgovorni za vročino, vnetje in bolečino). Zato so prišli do ideje, da bi naredili zdravila, ki bi inhibirali samo COX-2, ne pa COX-1 (izkorišča se majhna razlika v aktivnem mestu obeh encimov). Vendar pa so se ob uporabi teh zdravil prišlo do stranskih učinkov, zdravilo so morali umakniti iz tržišča. COX-1 ni vedno konstitutivna, COX-2 pa tudi ni vedno inducibilna. Zato stalna uporaba inhibitorjev lahko vodi do težav.

Inhibitorji sinteze eikozanoidov

1. inhibicija fosfolipaze A2 - kortikosteroidi

2. inhibicija COX - NSAID (nesteroidna protivnetna zdravila)
3. inhibicija lipoksigenaze - Zylflo
4. antagonist levkotrienskih receptorjev; veže se in ne povzroči učinka, hkrati pa prepreči, da bi se vezali levkotrieni na receptorje

BIOSINTEZA NEKLASIČNIH EIKOZANOIDOV

Spet je substrat arahidonska kislina, ki se sprosti z membranskih fosfolipidov. Obstaja še pot z epoksigenazo (sodi v skupino encimov citokrom P450), nastanejo pa spet biološko aktivne molekule (epoksieikozatrienojske kisline). Nastanejo pa lahko tudi izoprostani; biološko aktivne molekule, ki povečajo vnetje in nastanek bolečine, nastajajo pa neencimsko (v oksidaciji, do katere pride po radikalskem mehanizmu).

Zakaj se astmatikom odsvetuje jemanje aspirina?

Arahidonska kislina se inhibira lahko po ciklooksigenazni ali lipooksigenazni poti. Levkotrieni so pomembni modulatorji ob astmatičnem napadu. Če bomo zavrli eno pot, potem bo več substrata in manj produkta.

Predavanje 28; 29. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

METABOLIZEM HOLESTEROLA

Tudi holesterol se sintetizira iz acetil-CoA (poleg maščobnih kislin, ketonskih telesc,...). Holesterol je molekula, ki je nujno potrebna za naše telo, potrebna pa je homeostaza holesterola, tako za celico kot za organizem. Rastline imajo fitosterole, glive ergosterole.. pri človeku je glavni sterol holesterol.

Vloga holesterola

- komponenta membran
- prekursor žolčnih kislin (v obliki žolčnih kislin se izloča iz organizma)
- prekursor steroidnih hormonov
- prekursor vitamina D

Pridobivanje holesterola

Bodisi s hrano, bodisi z endogeno sintezo. Večina celic je sposobna sintetizirati holesterol, glavno mesto, kjer poteka sinteza holesterola, pa je v jetrih. Kvantitativno je pomembnejša sinteza holesterola kot vnos s hrano.

Celice uporabijo holesterol, ki se sintetizira v jetrih (tja pride tudi holesterol, ki ga dobimo s hrano), ta se v lipoproteinih prenese do celic. To je najbolj običajna pot. Če pa ta dostava ni mogoča so sposobne celice holesterol sintetizirati tudi same.

BIOSINTEZA HOLESTEROLA

Je tipičen biosintetski proces - potrebujemo energijo (ATP), proces reduktivne narave (potrebujemo redukcijske ekvivalente, NADPH), potrebujemo acetil-CoA kot izhodno spojino,

proces je natančno uravnavan in poteka v citoplazmi (citosolu ali na endoplazemskem retikulumu)

Biosinteza holesterola poteka preko številnih reakcij, biosintetsko pot pa lahko razdelimo v štiri stopnje. V prvi dobimo iz acetata (vstopa kot acetil-CoA) mevalonat. V drugi stopnji iz mevalonata dobimo aktivirani izopren. V tretji stopnji poteče kondenzacija izoprenov, dobimo še zadnjo neciklizirano strukturo, ki se imenuje skvalen. V četrti stopnji sledi ciklizacija skvalena, dobimo holesterol.

1. stopnja

Iz acetil-CoA dobimo mevalonat, intermediat s šestimi C atomi. Iz dveh acetil-CoA s tiolazo dobimo acetoacetyl-CoA. Potem vstopi v reakcijo še en koencim A, reakcijo katalizira HMG-CoA sintaza. Dobimo HMG-CoA (smo spoznali že pri sintezi ketonskih telesc!). Ta HMG-CoA lahko z encimom HMG-CoA liazo vstopa v sintezo ketonskih spojin, z encimom HMG-CoA reduktazo pa lahko vstopa v sintezo holesterola. Biosinteza ketonskih telesc poteka v mitohondrijih, biosinteza holesterola pa v citosolu - tako bo določeno, kdaj se bo HMG-CoA pretvoril v ketonska telesa in kdaj v holesterol.

HMG-CoA vstopi v pretvorbo do mevalonata. Reakcijo katalizira HMG-CoA reduktaza - to reakcijo si moramo zapomniti, ker gre za glavno regulatorno stopnjo v biosintezi holesterola! Poteče redukcija substrata, torej potrebujemo vir elektronov. Običajno jih prinese NADPH. Potrebujemo dva NADPH, ker se v prvi stopnji reducira do aldehida, šele v drugi pa do alkohola.

2. stopnja

Preko večih reakcij iz mevalonata dobimo aktivirani izopren. Značilnost izoprenskih enot je, da se rade kondenzirajo (povezujejo) med sabo.

3. stopnja

Izoprenske enote se združujejo med sabo. Iz aktiviranega izoprena preko drugih izoprenskih derivatov pridemo do skvalena (s kondenzacijo šestih izoprenskih enot s petimi C atomi dobimo skvalen s 30 ogljikovimi atomi). Skvalen je torej izoprenoid in še ni cikliziran.

4. stopnja

Poteče ciklizacija skvalena, za to je potreben molekularni kisik. Proces je zelo kompleksen. Prvi intermediat, ki ima že steroidno jedro, se imenuje lanosterol. Iz njega potem preko večih reakcij pridemo do holesterola.

Povzetek

Biosinteza poteka preko štirih stopenj. Izhodna spojina je acetyl-CoA. V prvi stopnji (moramo poznati bolj natančno) se acetyl-CoA pretvori v mevalonat, posebej pomembna je reakcija s HMG-CoA reduktazo, ki je glavna regulatorna stopnja. V naslednji stopnji se mevalonat pretvori v aktivirane izoprene, ta pa se naprej preko drugih intermediatov pretvori v skvalen. Ta se ciklizira, iz njega preko večih reakcij dobimo holesterol.

Proces je tipičen biosintetski, je precej dolg in zapleten. Iz sumarne reakcije (ki se je ni treba zapomnit) vidimo, da potrebujemo ATP, NADPH in acetyl-CoA.

Holesterol je nujno potrebna sestavina celic

Ključno je, da se vključi v membrane in uravnava njihovo fluidnost, je pa tudi izhodna spojina za različne biosinteze. Iz njega se v steroidogenih tkivih sintetizirajo steroidni hormoni. Pretvarja se tudi v žolčne kisline (jetra), ki predstavljajo obliko odstranjevanja holesterola iz organizma. Skladiščno obliko holesterola pa predstavljajo holesterolni estri (sam holesterol se ne more skladiščiti, ker je OH skupina polarna! Če pa se OH skupina zaestri postane struktura precej bolj nepolarna in primerna za skladiščenje).

Ni pomemben le končni produkt biosinteze holesterola, ampak so potrebni tudi nekateri intermediati. Izoprenov je več, eden od njih je geranil pirofosfat in farnezil pirofosfat; ta dva lahko vstopata v sintezo **preniliranih proteinov** (na protein se lahko obesi tokom potranskripcijske modifikacije tudi izopren - to pomeni, da se bo protein s tem hidrofobnim ostankom lahko vključil v membrano).

URAVNAVANJE BIOSINTEZE HOLESTEROLA

Proces je zelo natančno uravnavan, glavna regulatorna stopnja je reakcija s HMG-CoA reduktazo. Ta je uravnavana na ravni količine encima in na ravni aktivnosti encima.

- količina encima je uravnavana na ravni transkripcije, na ravni stabilnosti mRNA, na ravni translacije in na ravni stabilnosti encima.

- aktivnost encima; pomembna je predvsem kovalentna modifikacija encima. Glukagon povzroči fosforilacijo in inaktivacijo encima, inzulin pa povzroči defosforilacijo in aktivacijo encima

Kako je uravnavana količina HMG-CoA reduktaze

V sintezo je vključen SREBP. Ta dejavnik je poseben v tem, da ni prost v celici, ampak ga najdemo kot del večjega proteina v membrani Golgijevega aparata. Poleg SREBP so zraven še drugi proteini, katerih bistvo je, da začitijo količino holesterola v membrani. Do aktivacije procesa in sprostitve transkripcijskega faktorja bo prišlo, če bo koncentracija holesterola premajhna. Ko se to zgodi se interakcije med proteini spremenijo, del pogleda v Golgijev lumen, kjer proteolitični encimi cepijo protein, sprostijo se transkripcijski faktor SREBP. Ko je prost lahko deluje na proces transkripcije v jedru - aktivira gene encimov, ki so vključeni v sintezo holesterola.

Če je holesterola veliko, potem bo transkripcija zavrta, če ga bo malo, bo transkripcija potekla. Poleg tega bo intenzivnejše potekala razgradnja proteina HMG-CoA reduktaze takrat, ko bo holesterola veliko.

Uravnavanje metabolizma holesterola

Celica lahko holesterol sintetizira sama, ali pa ga prevzame iz krvi. Če je holesterola veliko je zavrt tudi vnos holesterola preko LDL.

Količina HMG-CoA reduktaze se uravnava s transkripcijskih faktorjem, ki se sprosti ob določenih

pogojih. Na aktivnost encima pa vplivajo hormoni - inzulin in glukagon. Če je glukagona veliko (energijsko stanje slabo) potem bo HMG-CoA reduktaza fosforilirana in inhibirana, ker biosinteza holesterola potrebuje energijo! Če pa je prisotno veliko inzulina, potem je energijsko stanje v celici ugodno, aktivirane so fosfataze, pride do defosforilacije HMG-CoA reduktaze in posledične aktivacije.

Holesterol v telesu se lahko torej poviša tudi, če ne vnašamo direktno holesterola - če vnašamo veliko sladkih stvari bomo stimulirali sintezo holesterola.

HMG-CoA reduktaza je zavrta tudi takrat, ko je koncentracija AMP visoka. V fosforilirani obliki je aktivna; če je AMP veliko, potem fosforilira encim in ga zavre.

Statini (zdravila) delujejo na ravni HMG-CoA reduktaze. Vendar pa holesterola ne smemo zavreti preveč, ker lahko pride do propada celic.

Potrebujemo tudi **pot, po kateri bomo holesterol odstranjevali**. Steroidnega jedra namreč človek ne more razgraditi. Edina možna pot, s katero odstranjujemo holesterol, je ta, da holesterol pretvorimo v žolčne kisline in ga izločimo iz organizma.

DERIVATI HOLESTEROLA

Produkti holesterola so žolčne kisline, steroidni hormoni in holesterolni estri.

Biosinteza holesterolnih estrov

Namen procesa je, da se OH skupina zaestri (gor se veže acilna skupina - ostanek maščobne kisline). Encim, ki to katalizira, je acil-CoA-holesterol aciltransferaza (ACAT). Ta encim prenaša acilni ostanek iz acil-CoA na holesterol.

Biosinteza žolčnih kislin

Struktura žolčne kisline se od izhodne spojine (holesterola) razlikuje v dodatnih hidroksilnih skupinah. Razlika je v stranski verigi - pri procesu sinteze žolčnih kislin se stranska veriga holesterola skrajša. Razlike je tudi v obroču A - tam ima holesterol dvojno vez, žolčna kislina pa ne. Poleg tega je lega vseh hidroksilnih skupin žolčne kislina alfa - na ta način se hidrofobni del jasno loči od hidrofilnega.

Začne se s hidroksilacijo žolčnih kislin na mestu 7. V reakcijo vstopa kisik, en atom se uvede v molekulo, drugi pa se reducira do vode - zato potrebujemo še en vir elektronov, NADPH. Iz 7-hidroksiholesterola pa dobimo primarne žolčne kisline (primarne so tiste, ki se sintetizirajo v jetrih). Reakcija s 7 α -hidroksilazo določa hitrost sinteze žolčnih kislin, uravnavana je na ravni transkripcije. Holesterol stimulira sintezo encima, če pa je holesterola premalo (veliko žolčnih kislin), se zmanjša sinteza encima.

Na karboksilno skupino žolčnih kislin se lahko vežeta taurin (dobimo tauroholat) ali glicin (dobimo glikoholat). Te spojine so še boljši detergenti.

Primarne žolčne kisline se po konjugaciji izločajo v **žolč**. Glavne komponente, ki sestavljajo

Žolč, so žolčne kisline, holesterol in fosfatidilholin (lecitin). Pomembno je tudi razmerje med temi komponentami. Žolč se shrani v žolčniku in se ob stimulaciji sprošča v dvanajstnik, sodeluje pri prebavi. Ko se žolčne kisline sprostijo v prebavila se lahko reabsorbirajo. Nekaj jih pretvarjajo črevesne bakterije, lahko jih reducirajo ali dekonjugirajo. Iz primarnih dobimo nekaj sekundarnih žolčnih kislin. Ta zmes se potem reabsorbira (vrne nazaj v jetra) in se ob potrebi ponovno sprosti. Govorimo o **enterohepatični cirkulaciji**, kroženju žolčnih kislin med črevesjem in jetri.

Biosinteza steroidnih hormonov

Izhodna spojina je holesterol. Biosinteza steroidnih hormonov poteka v klasičnih steroidogenih tkivih (skorji nadledvične žleze, spolnih žlezah, placenti). Razen v teh tkivih pa poteka biosinteza tudi v nekaterih neklasičnih endokrinih tkivih, npr. v maščevju iz prekurzorjev adrenalnega izvora.

Kortizol je glavni predstavnik glukokortikoidov, aldosteron mineralokortikoidov. Za oba, prav tako za testosteron, je značilni tri-keto štiri-en obroč. Za estradiol je značilna struktura v obroču A, potrebujemo encim aromatazo.

Kako iz holesterola dobimo steroidne hormone? Mora se skrajšati stranska veriga. Zelo značilne so reakcije hidroksilacije, tu sodelujejo encimi iz družine citokromov p450. Ko se hidroksilne skupine uvajajo je zelo pomembno, da se uvedejo na pravo mesto (pravi C atom), pomembna pa je tudi lega te OH skupine - od tega tudi zavisi biološka aktivnost steroidnega hormona. Intermediat v biosintezi je pregnenolon.

Izhodna spojina je torej holesterol, intermediat je pregnenolon. Prva stopnja v biosintezi steroidnih hormonov omogoča krajšanje stranske verige na C17. Iz pregnenolona dobimo progesteron, iz njega pa naprej druge steroidne hormone (gluko ali mineralokortikoide, androgene).

Steroidni hormoni so lipofilni, zato lahko preidejo membrano in vstopijo v kri. V krvi se vežejo na proteinske prenašalce (albumini ali specifični vezavni proteini). Več kot 90 % teh hormonov je vezanih na prenašalce; za vstop v celice pa je pomembna predvsem prosta oblika hormona.

Steroidni hormoni delujejo na proces transkripcije. Sintetizirajo se v relativno majhnih količinah, po tem, ko opravijo svojo vlogo, pa se tudi deaktivirajo. Če govorimo o razgradnji moramo imeti v mislih, da steroidnega obroča ne moremo razgraditi. Iz organizma se izločajo predvsem kot glukuronidi ali sulfati.

V sami biosintezi steroidnih hormonov je možnih več napak na večih mestih, če je zmanjšana aktivnost določenega encima. Ena od teh napak je **kongenitalna adrenalna hiperplazija**, okvarjen je encim Cyp21A2. Zato je zavrta pot, ki vodi do sinteze gluko in mineralokortikoidov in se v pretirani meri sintetizirajo adrenalni androgeni!

Tudi sinteza vitamina D poteka iz holesterola. Poteka iz 7-dehidroholesterola, pod vplivom sončne svetlobe nastane vitamin D (holekalciferol).

Nevrosteroidi

Rekli smo, da je glavna pot, po kateri celice perifernih tkiv dobijo holesterol ta, da se prenese iz jeter. Možgani pa so, kar se tiče biosinteze holesterola, samostojni. Poleg tega v možganih nastajajo tudi steroidni hormoni, ki jim pravimo nevrosteroidi. Biosinteza teh nevrosteroidov poteka bodisi iz holesterola, ki je nastal in situ, ali pa nastane iz prekursorjev steroidnih hormonov, ki jih dobi iz perifernih tkiv. V možganih delujejo kot avtokrini oz. kot parakrini hormoni. Delujejo preko receptorjev, npr. GABA receptor. Vplivajo na delovanje možgan.

Predavanje 29; 30. 11. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

LIPOPROTEINI

Posebnost lipidov je, da so hidrofobni. Zato se mora organizem prilagoditi - potrebne so žolčne kisline za emulgacijo in absorpcijo lipidov, poseben pa je tudi sistem za prenašanje lipidov po krvi.

Maščobne kisline se v krvi praviloma ne prenašajo proste ampak vezane na albumine; v obliki triacilglicerolov pa se prenašajo v obliki lipoproteinov. Tudi steroidni hormoni, ki se sintetizirajo v relativno majhnih količinah, se ne prenašajo prosto (vezava na albumin), prav tako holesterol (lipoproteini - hilomikroni do jeter, LDL do tkiv). Posebnost so ketonska telesca, ki so topna. Večina lipidov torej potrebuje pomoč za potovanje po krvi.

LIPOPROTEINI so iz lipidnega in proteinskega dela. Lipidni del sestavljajo tri skupine lipidov - triacilgliceroli, prosti holesterol in njegovi estri, ter fosfolipidi. Vsi lipoproteini vsebujejo vse tri skupine, ampak v različnih vsebnostih. Poleg tega potrebujemo še specifične proteine - apolipoproteine.

Sestava glavnih lipoproteinov

To so hilomikroni, VLDL, LDL in HDL. Po sestavi se močno razlikujejo. Hilomikroni vsebujejo daleč največ lipidov in najmanj proteinov. Ker imajo največ lipidov so tudi najmanj gosti. Na drugem koncu vidimo HDL, vsebujejo največ proteinov in najmanj lipidov, posledično so najbolj gosti. VLDL in LDL sta nekje vmes.

Lipidi se med seboj razlikujejo v gostoti (proteinski del proti lipidnemu), tudi v velikosti - HDL so najmanjši, hilomikroni pa največji. V vsaki posamezni skupini lipoproteinov pa so različni delci (tudi znotraj HDL je več različnih delcev). Razlikujejo se tudi v potovanju v električnem polju, kar omogoča ločevanje s pomočjo elektroforeze.

Vloga proteinskega dela (apolipoproteinov)

Gre za specifične proteine. Te interagirajo z lipidnim delom in pomagajo pri solubilizaciji lipidov. Lahko so tudi aktivatorji oz. inhibitorji določenih encimov. ApoAI aktivira LCAT, apoCII pa aktivira lipoprotein lipazo. Poleg tega apolipoproteini omogočajo tudi vezavo na specifične receptorje.

Med seboj se glavne skupine lipoproteinov razlikujejo po glavni lipidni komponenti (v hilomikronih in VLDL je največ triacilglicerolov), prav tako po apolipoproteinih. Za hilomikrone je značilen apoB48. Za HDL je značilen apoA1.

Hilomikroni prenašajo eksogene triacilglicerole. Hilomikroni nastajajo v prebavilih (črevesni sluznici), prenašajo eksogene lipide. VLDL se sintetizirajo v jetrih, prenašajo endogene triacilglicerole od jeter do perifernih tkiv. LDL nastanejo sicer v krvi, vendar prenašajo holesterol v periferna tkiva (tudi v jetra). HDL pa prenašajo holesterol iz perifernih tkiv v jetra.

Zgradba lipoproteinov

So iz lipidnega in proteinskega dela. Tisti lipidi, ki so na površini lipoproteinov, so fosfolipidi (ker imajo amfipatsko strukturo - hidrofilen in hidrofoben del. S hidrofilnim delom gledajo proti vodnemu mediju, hidrofoben del pa zgleda proti notranjosti. Na površini je tudi holesterol, ki je prav tako amfipatičen (hidrofobna struktura z izjemo OH skupine na mesto 3; ta OH skupina gleda proti vodi). V notranjosti lipoproteina pa bodo najbolj hidrofobne komponente - triacilgliceroli in holesterolni estri.

Strukture posameznih lipoproteinov

Za vse velja, da je na zunanosti enojen plašč fosfolipidov, med katerimi je holesterol, katerega OH skupina gleda proti vodi. V to plast so vsidrani različni apolipoproteini. Notranjost pa se precej razlikuje glede na vsebnost posameznih lipoproteinov. Hilomikroni bodo imeli veliko triacilglicerolov in nekaj holesterolnih estrov, LDL in HDL pa veliko holesterolnih estrov.

Lipoproteini se torej razlikujejo med sabo glede na sestavo lipidnega dela, glede na prisotne apolipoproteine, vlogo in razmerjem med proteini in lipidi. Razlikujejo pa se tudi glede na mesto nastanka in glede na to, kako predajo lipide, ki jih prenašajo, tkivom.

Glavna mesta nastanka

- črevesna sluznica - enterociti. Tukaj nastanejo hilomikroni in pa prvotna oblika HDL (lahko tudi v jetrih).
- jetra - tu nastajajo VLDL (prenašajo endogeni sintetizirane triacilglicerole v tkivo).
- kri - tu nastane LDL iz prekurzorjev, ki se sintetizirajo v jetrih.

Kako lipoproteini predajo lipide tkivu?

Pri lipoproteinih, katerih naloga je prenos triacilglicerolov (maščobnih kislin), ima pomembno vlogo encim lipoprotein lipaza. To je encim, ki razgrajuje lipoproteine hilomikronov ali VLDL. Nahaja se na stenah žil ob mišicah, maščevju,... (perifernih tkivih). Osiromaši torej lipidni del lipoproteinov.

Drugi način predaje pa je preko receptorjev. LDL prenašajo holesterol perifernim tkivom in tudi jetrom. Tu igra pomembno vlogo LDL receptor, na katerega se veže apoB100, temu sledi receptorsko posredovana endocitoza. Če v prejšnjem primeru encim samo spremeni delec, ki ostane v krvi, se v tem primeru ves delec privzame v tkivo.

Tretji primer je prenos holesterola iz tkiv. Pomemben način je SRB1 receptor, s katerim se

selektivno samo določeni delci prenesejo v celice.

Prenos lipoproteinov

Eksogeni prenos lipidov se začne v črevesni sluznici, poteka mimo kapilar perifernih tkiv in se konča v jetrih.

Endogeni prenos lipidov se začne v jetrih, gre mimo perifernih tkiv. Te delci se v krvi spreminjajo, del se jih vrne v jetra, del pa pride do perifernih tkiv.

- prenos hilomikronov; nastajajo v črevesni sluznici, preko limfe se spustijo v vensko kri. Na stenah žil se nahaja encim lipoprotein lipaza, ki hidrolizira triacilglicerole. Sprostijo se maščobne kisline, lahko monoacilgliceroli oz. kar glicerol. Maščobne kisline bodo stopile v tkiva (mišice bodo porabile kot goriva, maščevje bo skladiščilo). Ostanke hilomikronov pa prevzamejo jetra. Hilomikroni prenašajo največ triacilglicerolov, vanje pa je vseeno vključen tudi eksogeni holesterol. Razpolovni čas za hilomikrone je 30 minut.

Lipoproteini, ki se iz nekega tkiva sprostijo v kri, še niso zreli. V krvi potekajo še izmenjave in modifikacije - lahko dobijo še nekatere apolipoproteine od drugih lipoproteinov.

- endogeni prenos; začne se v jetrih, kjer nastaja VLDL. Tista oblika VLDL, ki nastane, še nima vseh apolipoproteinov (nekateri dobi še od HDL). VLDL potuje po jetrih mimo perifernih tkiv, kjer je spet pomembno delovanje lipoprotein lipaze, ki omogoči, da del maščobnih kislin preide v tkivo. Nastane IDL (ostanki VLDL), del jih prevzamejo jetra, del pa se spremeni v LDL - to so delci, ki vsebujejo največ holesterola. Njihova naloga je prenos holesterola do perifernih tkiv (nekaj tudi do jeter). Razpolovni čas je 3 - 4 dni.

LDL holesterol preda celicam tako, da se apoB100 veže na LDL receptor, sledi receptorska endocitoza LDL delca. Nastanejo vezikli, iz njih se izločijo receptorji, ki se lahko vrnejo na membrano, vezikli pa se zlijejo z lizosomom in sledi razgradnja (hidroliza) lipidov na osnovne delce. Holesterol smo prinesli v glavnem v obliki holesterolnih estrov (in nekaj prostega holesterola). Pričakujemo lahko, da se bodo holesterolni estri hidrolizirali, sprostil se bo prost holesterol.

Kaj se v celici zgodi, ko se sprostijo vsebina LDL?

Poviša se koncentracija prostega holesterola. Celica je to sposobna začutiti. Zmanjša se aktivnost ključnega encima v biosintezi holesterola - HMG-CoA reduktaze (aktivnost se zmanjša na dva načina - zmanjša se sinteza encima in hkrati poveča razgradnja encima). Poleg tega se aktivira proces tvorbe zaloga holesterolnih estrov - aktivira se encim ACAT (acilholesterol aciltransferaza). Četrty učinek pa je, da se zmanjša privzem holesterola iz krvi - vnos holesterola iz krvi v celice je uravnavan s količino LDL receptorjev v membrani celice. Od količine teh receptorjev zavisi, koliko holesterola lahko vstopi v celico. Zmanjšala se bo transkripcija gena za LDL receptor, zato se bo zmanjšal privzem LDL. Celica torej poskrbi za to, da ima ravno dovolj holesterola, tudi če ga je v krvi preveč.

Obratni transport holesterola

HDL nastaja bodisi v jetrih bodisi v črevesni sluznici. Pobira holesterol iz perifernih tkiv in makrofagov. Pomemben je encim lecitin holesterol acil transferaza (LCAT). Katalizira pretvorbo diskoidnih HDL v sferične HDL. Eden od pomembnih načinov predaje holesterola je preko SRB1 receptorjev, druga možnost pa je izmenjava med lipoproteini; s pomočjo CETP se lahko

holesterolni estri prenesejo iz HDL v VLDL, v zameno HDL dobi več triacilglicerolov.

Ves čas se spreminja lipidni del hilomikronov, VLDL in HDL. Pri vseh je potrebna lipoprotein lipaza (jetrna in endotelijska). S tem, ko se lipidni del spreminja, se spreminja tudi sam delec; nastajajo ostanki. Obenem potekajo še izmenjave med lipoproteini.

Homeostaza holesterola v organizmu

Lipoproteini so v organizmu potrebni, vendar morajo obstajati v primernih koncentracijah. Pomembna je homeostaza; v tej homeostazi pa igrajo pomembno vlogo jetra. To zato, ker so jetra tista, v katerih holesterol nastaja oz. tja prihaja (prinesejo ga ostanki hilomikronov, tudi HDL iz perifernih tkiv). V njih poteka tudi de novo sinteza holesterola. Jetra tudi sproščajo holesterol - vključi se v VLDL in v prvo obliko HDL. So pa tudi zelo pomembno mesto za izločanje holesterola iz telesa - tam poteka sinteza žolčnih kislin in njihovih soli, v žolč pa se vključi tudi nekaj prostega holesterola.

Rizični faktorji za razvoj ateroskleroze

Motnje v lipidnem metabolizmu so eden od rizičnih dejavnikov za razvoj ateroskleroze. Je eden od spremenljivih dejavnikov (na njih lahko vplivamo).

Ko se viša koncentracija holesterola se povečuje relativna nevarnost za bolezni srca in ožilja. Na kliniki nas zanima koncentracija celokupnega holesterola, količina LDL in HDL, mogoče tudi količina triacilglicerolov (tudi pri tem so lahko motnje).

Razmerje LDL/HDL

Je pomembno - LDL je "slab" holesterol, HDL "dober" holesterol. To poimenovanje ni povsem korektno zaradi dveh razlogov; prvič, holesterol je vedno holesterol, ne more biti slaba ali dobra molekula (škodljiva ali ne je zaradi delovanja, ne zaradi strukture), drugič pa tudi LDL delci niso sami po sebi slabi, ker jih potrebujemo. Ne sme pa jih biti preveč ali HDL premalo, zato je pomembno razmerje.

Do motenj v metabolizmu holesterola pride lahko zato, ker je vnos lipidov (predvsem holesterola) prevelik. Druga možnost je, da je prevzem holesterola iz krvi nepravilen (ni dovolj velik). Tretja možnost pa je, da odstranjevanje holesterola ne uspe doseči tistega, kar bi bilo potrebno.

Holesterol vnašamo s produkti živalskega izvora. Če jemo več mastne hrane se sintetizira več hilomikronov, njihovi ostanki končajo v jetrih. Če jemo veliko sladkarij (ogljikovih hidratov) organizem poviša nivo inzulina. Glukoza se prenese do jeter, kjer se sintetizira glikogen, hkrati pa poteka proces glikolize do piruvata in nastane acetyl-CoA. To je pomembna izhodna spojina za biosintetske procese! Ker je energije dovolj bo tekla sinteza triacilglicerolov in maščobnih kislin, nastajali bodo VLDL, iz njih pa v krvi LDL. Tudi če pretiravamo pri vnosu ogljikovih hidratov to ni zdravo.

Prevzem LDL delcev v tkiva

Za to je zelo pomembno, da imajo celice dovolj LDL receptorjev. Če jemo zelo veliko ogljikovih

hidratov se tvori veliko VLDL, iz njih veliko LDL. Na začetku celice prevzemajo LDL, potem pa ga imajo dovolj - količina receptorjev na membranah se zmanjša, holesterola ne bodo več privzemale in količina holesterola v krvi bo narasla. Druga možnost pa je, da z rojstvom dobimo okvarjene gene za LDL receptor - **družinska hiperholesterolemija**. V tem primeru je okvarjen bodisi gen za LDL receptor, bodisi za apoB100. To pomeni, da interakcija z LDL ni več takšna, kot bi morala biti, zato ne poteka uspešen privzem LDL. Za heterozigotno obliko to pomeni, da bo funkcionalnih receptorjev ~50 %. Pri homozigotnih pa privzema skorajda ni; celice vseeno preživijo, ker lahko holesterol sintetizirajo samo, vendar pa bo v krvi mnogo preveč holesterola. Večina bolnikov s homozigotno obliko bolezni umre v otroštvu.

Če je količina LDL v krvi previsoka ni dobro, ker vodi v razvoj ateroskleroze. Hipoteza pravi, da ob okvari žilnega epitelija lahko v žilno steno vstopi LDL - hitreje vstopajo manjši, gosti LDL, kot pa HDL. Tam je tudi okolje, ki je bolj primerno za to, da pride do oksidacije lipidov (ni več mnogo antioksidantov). Zato se LDL v žilnih stenah oksidira. Pritegnejo se monociti, ki se spremenijo v makrofage - te imajo posebne receptorje na celični membrani in lahko v celico sprejmejo samo tiste LDL, ki so oksidirani. Značilnost prevzema s strani makrofagov je ta, da ne poteka neka povratna zanka. Nastanejo penaste celice, ki propadejo; vse to vpliva na žilno steno.

Proces ateroskleroze se začne že v rani mladosti, na razvoj pa lahko vplivamo sami z zdravim prehranjevanjem in fizično aktivnostjo. Če zdrav način življenja ne pomaga pa se poskusi tudi z zdravili.

Nekaj ravni, na katerih lahko vplivamo na količino holesterola v krvi

Morali bi zmanjšati vnos holesterola - zdrava prehrana. Poleg tega je dobro, če pospešimo privzem holesterola s strani celic, ali če bi nam uspelo pospešiti odstranjevanje holesterola iz telesa. Obstajajo določena zdravila, ki pri tem pomagajo. Nekatera zdravila preprečujejo vnos prevelike količine holesterola v celice. Določene smole lahko vežejo žolčne kisline in preprečujejo enterohepatično cirkulacijo, zato se več holesterola sprosti iz telesa. Poleg tega lahko dodamo zdravila, ki bodo preprečevala sintezo holesterola znotraj celic in bodo zato prisiljene, da privzamejo več holesterola iz krvi.

- preprečevanje vnosa holesterola; ena od možnosti je dodatek rastlinskih sterolov, fitosterolov. Sterolno jedro je podobno kot pri holesterolu, razlike pa so pri stranski verigi. Holesterolni estri se hidrolizirajo, dobimo prost holesterol; do sluznice enterocitov se prenese v mešanih micelih z žolčnimi kislinami. Če pa imamo prisotne fitosterole, se bodo tudi te vključili v micelle. Če jih bo veliko potem bodo izpodrinili holesterol iz micelov in se ga bo absorbiralo manj. Črevesna sluznica ima transporter, ki lahko fitosterole izvrže nazaj v lumen prebavil; ne bo jih torej preveč v organizmu, le manj holesterola bo vstopilo v telo.

- inhibicija vstopa holesterola v enterocite, uporablja se zdravilo ezetimib. Ta preprečuje vnos holesterola, pri katerem je pomemben NPC1L1 protein. Ta protein se z ezetimibom inhibira.

- smole, ki preprečujejo reabsorpcijo žolčnih kislin; s tem dosežemo, da telo izloči več holesterola. Telo izloča holesterol predvsem v obliki žolčnih kislin. Ideja je v tem, da bi preprečili reabsorpcijo žolčnih kislin. Dodajajo se smole, ki imajo nabite skupine - te skupine vežejo žolčne kisline, zato se te izločijo iz organizma in je procent, ki se reabsorbira, manjši. Hkrati se

bo torej vrnilo manj žolčnih kislin, kar pa bo vodilo v pospešeno pretvorbo holesterola v žolčne kisline. Vendar pa če se bo več holesterola v jetrih pretvorilo v žolčne kisline, potem se bo v jetrih pospešila biosinteza holesterola; učinek torej ni zelo velik.

- inhibicija biosinteze holesterola (HMG-CoA reduktaze), snovi, ki delujejo kot inhibitorji biosinteze holesterola, se imenujejo statini (simvastatin, prevastatin, lovastatin,...). Vsi imajo značilni del strukture - delujejo kot kompetitivni inhibitorji HMG-CoA reduktaze. Dobro je, da so kompetitivni, ker lahko zato uravnavamo inhibicijo glede na količino dodanega inhibitorja. Ko dodamo inhibitorje biosinteze holesterola s tem vplivamo na proces, ki poteka v celici - želimo pa doseči spremembo procesa v krvi. Če dodamo inhibitor biosinteze holesterola se zmanjša aktivnost HMG-CoA reduktaze in nastane manj holesterola v celici. Posledično se manj holesterola zaestri, najpomembnejša lastnost pa je, da celica v primeru majhne količine holesterola stimulira gen za LDL receptor. Posledica je, da se v membrani znajde več LDL receptorjev. Tako se bo privzelo več LDL iz krvi in bo raven holesterola v krvi padla.

Mi smo se zde v glavnem osredotočili na LDL. Videli smo, da je velika količina LDL v krvi lahko škodljiva, to je dokazano, če se zniža LDL v krvi se preprečuje razvoj bolezni srca in ožilja. HDL pa tudi vpliva na to; vendar pa je to dober vpliv. Prvotna oblika HDL nastaja v jetrih ali črevesni sluznici, potreben je ABC a1 transporter, da delec lahko iz tkiv privzema holesterol. Če bi bil ABC a1 transporter okvarjen, potem privzem ne bi bil možen, količina HDL pa bi bila nizka. HDL so nujno potrebni za zdravje; posledica pomanjkanja je Tangierova bolezen.

Bilo bi koristno dobiti zdravila, ki bi povišala raven HDL v krvi, vendar pa jih zaenkrat še ni; zato skušamo HDL do neke mere povišati sami - gibanje poviša HDL.

Predavanje 30; 1. 12. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

ZNOTRAJCELIČNA RAZGRADNJA PROTEINOV

Aminokislina se od ogljikovih hidratov razlikuje predvsem po tem, da vključuje dušik. Velik del metabolnih poti se ukvarja z odstranjevanjem tega dušika, saj je amonijak toksičen za telo.

Vsebnost proteinov v telesu

Ženske imajo več maščob in nekoliko manj proteinov kot moški, glavna komponenta v telesu pa je voda.

Viri aminokislin

Vsekakor je to prehrana; pomembno je, da uživamo dovolj aminokislin in da jih dobimo v pravilnem razmerju. Lahko jih dobimo tudi pri znotrajceličnem obračanju (razgrajevanju) proteinov, v poštev pa pride tudi biosinteza aminokislin, vendar samo za tiste aminokislina, ki niso esencialne.

Dušikova bilanca

Ocenimo vnos dušika (glavni vnos poteka preko proteinov) in izgubo dušika iz telesa. Eden izmed pomembnih načinov izločanja je preko sečnine. Razmerje med vnosom in izgubo je dušikova bilanca. Pri normalnem organizmu je vnos oravnavežen z izgubami dušika.

Vnos dušika bo moral biti višji kot je izguba dušika pri otrocih v fazi rasti ali pri ženskah v fazi nosečnosti.

Negativna dušikova bilanca pa je lahko zaradi prevelikega vnosa proteinov ali prevelikih izgub proteinov.

Travma

Lahko gre za poškodbe, operacijo, opekline... za travme je značilno, da je telo v stresu, poveča se količina stresnih hormonov (adrenalin, kortizol), zniža pa se količina inzulina in stimulirajo se določeni katabolični procesi, med njimi tudi razgradnja proteinov. Sintetizirajo se določeni proteini akutne faze, ki potrebujejo točno določene aminokisliline; zato dobimo neuravnoteženo zalogo AK (porabimo samo nekatere!).

Pregled metabolizma aminokislin

Aminokisliline lahko dobimo s hrano, s proteolizo znotrajceličnih proteinov ali samostojno sintezo neesencialnih aminokislin. Te AK se lahko usmerijo v različne metabolične poti. Ena izmed pglavitih je sinteza proteinov, pri kateri potrebujemo vse aminokisliline. Imamo pa še procese, kot je npr. razgradnja proteinov, pri katerih lahko aminokisliline služijo kot vir energije.

Posamezne aminokisliline lahko stopajo v različne biosintetske procese (sinteza purinskih ali pirimidinskih nukleotidov, sinteza hema, adrenalina, tiroidnih hormonov,...).

Vprašanje je, kako bo organizem v določeni situaciji vedel, v katero pot naj se te aminokisliline usmerijo. Prednost bo imela biosinteza proteinov pred razgradnjo proteinov. To bo določeno z afiniteto posameznih encimov do aminokislin:

aminoacil tRNA sintetaza so vključene v aktivacijo aminokislin pred vstopom v sintezo proteinov. Tudi takrat, ko smo lačni, bo lahko do neke mere tekla proteinska sinteza.

aminotransferaza ima vrednost K_m v minimalnem območju; to pomeni, da bo proteoliza potekala samo takrat, ko bomo stradali.

Prebava proteinov

Proteine, ki jih vnesemo v telo, moramo v prebavnem traktu razgraditi, ker samih proteinov (razen redkih izjem) ne moremo absorbirati. Pri tem sodelujejo encimi, ki se imenujejo proteaze (proteinaze), ki hidrolizirajo peptidne vezi. Številni encimi, ki so proteolitične narave, se sintetizirajo kot prekurzorji - ko se sintetizirajo še niso aktivni, šele ko se sprostijo v črevesni lumen se aktivirajo. Če bi bili prej aktivni bi lahko razgrajevali že celične proteine!

Proteolitične encime delimo na endopeptidaze (cepijo znotraj verige) in eksopeptidaze. Glavna mesta razgradnje so v želodcu, kjer delujejo endopeptidaze. Da hidroliza uspešno poteka je namreč dobro, da se protein denaturira, saj je tako manj zvit in bolj dostopen za encime; to je posledica HCl, ki je v želodcu. Z delovanjem endopeptidaze dobimo krajše fragmente, potem pa se prebava nadaljuje v tankem črevesju, kjer je spet veliko endopeptidaz in ena sama eksopeptidaza - karboksipeptidaza. Ker prevladujejo endopeptidaze še ne bomo prišli do

končne razgradnje. Dokončna razgradnja bo potekala na sluznici tankega črevesja, kjer imamo eksopeptidaze. V enterocite se absorbirajo aminokislina in grejo preko njih v kri

Aminokislina v enterocitih

Tudi enterociti potrebujejo energijo. Del goriv, ki vstopijo v celice, porabijo tudi zase; kadar smo siti, to ni problem, kadar stradamo, pa bodo dobili metabolična goriva iz krvi.

Nek majhen del aminokislina, ki se absorbirajo v enterocite, se torej porabi že znotraj njih, bodisi za energijo bodisi za sintezo proteinov.

PRIDOBIVANJE AMINOKISLIN IZ ZNOTRAJCELIČNIH PROTEINOV - ZNOTRAJCELIČNO OBRAČANJE PROTEINOV

To obračanje je veliko bolj intenzivno kot pri metabolizmu triacilglicerolov in ogljikovih hidratov. Sinteza proteinov je energijsko zelo potratna.

Razpolovna doba nekaterih proteinov

To je čas, v katerem količina molekul pade na polovico. Razpolovni časi za različne proteine v telesu so zelo različni.

Proces razgradnje proteinov je vključen tudi v uravnavanje določenih procesov; npr. celični cikel, pri katerem se razgrajujejo ciklini. Prav tako se hitro razgrajujejo različni transkripcijski faktorji (uravnavanje transkripcije), prav tako pri stresu teče katabolizem proteinov.

Znotrajcelična razgradnja proteinov

Poteka lahko v lizosomih, kjer imamo cel spekter različnih encimov. Proteini lahko vstopajo na različne načine (fagocitoza,..). Imamo tudi sistem kalpain-kalpastatin; kalpain je cisteinska proteaza, aktivirajo jo kalcijevi ioni; kalpastatin pa je inhibitor tega sistema.

Kvantitativno je zelo pomembna znotrajcelična razgradnja z ubikvitin proteosomskim sistemom. Označitev z ubikvitinom je tista, ki vodi proteine v razgradnjo - ubikvitin je krajši peptid, karboksilni konec se veže na lizinsko skupino na proteinu. Na molekulo se veže večje število ubikvitinov, kar usmeri protein v razgradnjo.

Kako je z lizosomsko razgradnjo?

V lizosomih je kisel pH in encimi, ki lahko delajo pri tem pH. Pomembne proteaze so katepsini. Encimi so sposobni razgradnje številnih molekul. Če bi se pretrgala membrana in bi se encimi sprostili v citosol pa vseeno ne bi naredili velike škode, ker v citosolu ni dovolj kislega pH za njihovo delovanje.

V lizosomih se razgrajujejo predvsem zunajcelični, membransko vezani in nekateri dolgoživi znotrajcelični proteini. Proteini lahko vstopajo v lizosom na različne načine - receptorsko posredovana endocitoza, fagocitoza,...

Sistem kalpain-kalpastatin

Kalpain - gre za nelizosomsko cisteinsko proteazo; cepi proteine kot odgovor na kalcijeve ione. Sodeluje pri različnih procesih.

Če pa je prisoten kalpastatin se na poseben način veže na kalpain in ga inhibira.

Ubikvitin-proteasomski sistem

C-konec tega peptida je vključen v vezavo na protein. V proces je vključen ATP; vendar ni vključen v samo hidrolizo (ta poteka znotraj proteosoma), ampak je potreben zato, da se ubikvitin lahko veže na protein. Pri tem sodelujejo trije encimi - encim 1, encim 2 in encim 3.

Kaj usmerja proteine v razgradnjo?

Dušikovo pravilo - pomembna je končna skupina na N koncu proteina. Aminokisliline, kot so lizin, triptofan in aspartat vplivajo na krajši razpolovni čas. Na to lahko vpliva tudi določeno zaporedje na proteinu - PEST (prolin, glutamin, serin, treonin). V razgradnjo se bodo usmerjali tudi proteini, ki bodo poškodovani.

Kako se označi protein pred vstopom v razgradnjo s proteasomom

Proces poteka preko več stopenj. Potrebujemo tri encime - encim 1, encim 2 in encim 3. V prvi stopnji poteka reakcija z ubikvitinom, v reakcijo vstopi encim 1 in potrebujemo ATP. Ubikvitin se preko karboksilne skupine veže na encim 1. V drugi stopnji je vključen encim 2, ubikvitinski ostanek se iz encima 1 prenese na encim 2. V tretji stopnji se vključi še encim 3; ta ne bo vezal nase ubikvitina, ampak katalizira reakcijo prenosa ubikvitinskega ostanka z encima dva na protein. Po treh stopnjah torej šele dobimo protein, ki ima vezan en ubikvitinski ostanek. Ta proces se lahko večkrat ponovi (protein potrebuje več ubikvitinskih ostankov), potem pa protein vstopi v proteasom.

Proteasom

Ima jedro in dve kapi. Jedro izgleda približno tako, kot da bi se štirje obroči naložili eden na drugega, tvorijo tulec. Vsak obroč je iz sedem enot. Proteolitična enota je vsebovana v osrednjem delu jedra. Imamo še dodatni del, 'pokrovček'.

Potek razgradnje s proteasomom: najprej se mora označeni protein vezati na proteasom. Potem se mora protein razviti. Pride do translokacije proteina - polipeptidna veriga mora vstopiti v notranji kanal sodčka. V osrednjem delu poteka hidroliza, polipeptidna veriga se razcepi na krajše peptidne ostanke, sprosti se prosti ubikvitin in peptidni fragmenti.

Proteasomov je v celici veliko, najdemo jih praktično v vseh celičnih področjih (razdelkih), kjer lahko opravljajo različne vloge - v citoplazmi omogočajo razgradnjo delno oksidiranih proteinov, v endoplazemskem retikulumu razgrajujejo nepravilno zvite proteine, v jedru se razgrajujejo transkripcijski faktorji, histoni,...

Razgradnja proteinov je normalen celični proces. Pri proteinih, ki imajo krajši razpolovni čas, teče bolj intenzivno, pri drugih počasneje. Patološko pa je, če je razgradnja pospešena in se proteini razgrajujejo prehitro. Narobe je tudi, če je razgradnja prepočasna - določeni proteini, ki za celico niso dobri, se ne razgrajujejo.

Predavanje 31; 6. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

Povzetek katabolnih in anabolnih poti

(zapisoval: Rok Amon)

Osrednji metabolit je acetylCoA. Posredno se lahko vsi metaboliti razgradijo do njega.

Telesni proteini

Vir AK v nasih celicah nastanejo iz produktov prehrane in s proteolizo telesnih proteinov, kar smo obravnavali že prejšnji teden. AK lahko tudi sintetiziramo iz drugih spojin - sinteza de novo. Lipidi in OH so ključni vir energije, AK pa so ključni za izgradnjo celic in lastnih proteinov.

Kaj se dogaja z AK v katabolizmu? Voden faktor je odprava dušika.

AK so pomembne kot izhodne spojine v našem telesu. So glavni donator dušika. Vstopajo v različne biosinteze (karnitin, hormoni, nukleotidi,...).

AK dobimo s prehrano vsak dan. Dušik moramo dovajati, saj vsak dan doživljamo njegove izgube. Zlasti pri travmah so izgube dušika lahko velike.

Obracanje proteinov pomeni, da se ves čas sintetizirajo in razgrajujejo. Ob ta procesa sta različno uravnavana. Sinteza proteinov je energetsko zelo potratna, saj so to velike molekule in za tvorbo peptidne vezi je potrebna energija. Zaradi tega je njihovo obracanje mnogo bolj intenzivno kot pri OH in lipidnimolekulah.

Za potranslacijske modifikacije prav tako potrebujemo energijo (recimo fosforilacija).

Razgradnja proteinov

Razgradnja je vpletena v ključne metabolične procese. Če je razgradnja motena, lahko pride do pomankanja ali pa kopičenja določenega proteina. Encimi, ki služijo pri prebavi in encimi, ki sodelujejo pri znotrajcelični razgradnji so zelo različni, čeprav občasno gre za proteaze (isto velja za OH in lipide).

Vsak protein, ki je napacno zviti, se mora spraviti v pravilno 3D strukturo, sicer gre v razgradnjo. Proteini se lahko razgradijo tudi zaradi izgube aktivnosti ali pa zaradi oksidativnega stresa.

Znotrajcelična razgradnja proteinov (glej slajd)

Lizosomalne proteaze, sistem kalpain-kalstatin (aktivirajo kalcijevi ioni, kalstatin inhibira proteazo), od ATP odvisen sistem (ubikvitin-proteasomski sistem; ubikvitin je majhen peptid, ki označi proteine za razgradnjo proteinov v proteasomu, ki pa je ogromen proteinski kompleks; ubikvitin označi protein z mono - veze se samo en ubikvitin, vendar tedaj protein ne gre v proteasomsko razgradnjo, ali poliubikvitinacijo - veze se več ubikvitinov in protein gre v proteasom).

Proteasomski sistem

Najmanj 30.000 proteasomov imamo v vsaki celici. Lahko so v citoplazmi, na ER ali v jedru. Slednji so ključni za uravnavanje transkripcije in vplivajo na razgradnjo transkripcijskih faktorjev, kar je povezano tudi s histoni. Tisti v citoplazmi pa so ključni za razgradnjo napacno zvityh proteinov. Tisti v ER pa zaznajo napacno sintetizirane proteine.

V medicini najdemo bolezni, ki so povezani z motnjami proteasomskega sistema. Zlasti je to pogosto pri nevrodegenerativnih boleznih. Do bolezenskega stanja vodi prekomerna razgradnja ali pa kopičenje proteinov (alzheimer, parkinsonova bolezen,...).

Proteoliza je razgradnja proteinov. Kaj se zgodi v primeru ko stopijo amino kisline v katabolne

processe? Tja vstopajo ko je proteinov prevec. Ljudje, ki zauzijejo ohromno proteinov (in tudi druge stvari) (in si ne pomagajo s hormoni, kot nekateri bodybuilderji) te AK skladiscijo v mascobah. AK se ne morejo skladisciti kot vir energije - skladiscijo se kot vir AK. Ce jih je prevec pa grejo v mascobo. AK so kljucne izhodne spojine za biosintezo glukoze. Metabolni procesi potekajo tako, da vzdrzujemo homeostazo glukoze. Iz AK se glukoza zacne delati ze zelo kmalu.

Esencialne AK

So tiste, ki jih ne moremo sintetizirati. Zauziti jih moramo s hrano in vzdrzujemo dusikovo ravnotezje.

Ne-esencialne AK

Nase telo jih lahko sintetizira iz drugih metabolitov, dokler je telo preskrbljeno z zadostnimi kolicinami dusika.

Za nase telo je kljucnih 20 amino kislin, ki vstopajo v biositezo proteinov v nasem telesu. V tabeli so v rdecem zapisane absolutno esencialne Ak, v modrem pa tiste, ki jih lahko naredimo brez problema. Semiesencialne, pa lahko tvorimo v odvisnosti od zivljenjskega obdobja v katerem se nahajamo (rumeno oznacene).

Katabolizem Amino Kislin

Ak imajo karboksilno in amino skupino. Ko stopijo v razgradnjo se moramo na nek nacin znebiti amino skupin, tisto kar ostane pa imenujemo ogljikovo ogrodje. Dusik se v urei izloci iz telesa. C-ogrodje pa vstopa v TCA (ciklus trikarboksilnih kislin) intermediati pa lahko gredo tudi v glukoneogenezo.

Znacilno za cikluse je, da intermediati v njih krozijo.

Ciklus uree

Iz AK dusik odstranjujemo

Ena prvih reakcij je odstranitev dusika (ne velja pa to vselej). Deaminacija oznacuje odstranjevanje dusika. Iz 29 razlicnih AK dobimo 20 razlicnih C-ogrodij. Za odstranjevanje dusika poznamo razlicne encime. Eden je dehidrataza. Tu gre za neoksidativno razgradnjo. Dehidrataza odstranjuje vodo. Na tak nacin se dusika znebita serin in treonin (ker imata karboksilno skupino). Najoprej se odcepi voda in dobimo intermediat. Nato se hidrolitico odcepi amino skupina in iz serina dobimo direktno piruvat. Treonin pa se razgradi v ketoglutarat(na slajdu je napaka) in sprosti se amoniak. V obeh promerih dobimo alfa-keto kislino inamonijak. ??

Drug nacin je oksidativna deaminacija. Za njo obstajata dva tipa encimov. Eden so oksidaze, kamor vstopa tudi molekularni kisik. Iz AK se sprosti amoniak, vodikov peroksid in alfa-keto kislino. Iz glicina dobimo glioksilat. Encim je glicin oksidaza.

Drugi tip encima pa so dehidrogenaze. To pomeni da gre za procese v katere so vkljuceni redukcijski ekvivalenti. Eden najpomembnejseh encimov tu je glutamat-dehidrogenaza, ki oksidativno deaminira Glutamat. Pride do odcepa aminacije in oksidacije. Ta reakcija je izrazito reverzibilna, kar je kljucno za biosintezo amino kislin. Amoniak se s to reakcijo lahko vgradi v glutamat.

Dalec najpomembnejše za odstranjevanje dusika so transaminacije. Transaminaze = aminotransferaze. Aminokislina se nekam prestavi za to potrebujemo donorja AK in akceptorja AK. (V biosinteze vstopajo L amino kisline)

Vstopi alfa keto kislina in L-aminokislina. Iz ene AK dobimo drugo AK. V procese transaminacije vstopa alfa-ketoglutarat, dusik se vedno nabere v obliki ene same AK - L-glutamata. Pri transaminacijah je kljucen koencim pirodoksil fosfat???

Poglejmo si transaminacije bolj podrobno: (glej slajde)

Tudi pri mnogih drugih reakcijah je kljucen piridoksin, ki lahko pretvorimo v piridoksil fosfat (PLP). Zato je ključna zadostna količina vitamina B6.

Metabolizem PLP ni treba znati na pamet, služi le za boljše razumevanje.

Sciffova baza???

Ko pride AK, ki se hoče znebiti dusika, se veže na mesto schiffove baze in se poveže. AK je tako povezana s koencimom, potem pa se hidrolitično odcepi tako, da izstopi kot keto kislina, ostane pa amino skupina. PLP nosi amino skupino. Vstopi alfa keto kislina, ki dusik pobere s PLP in koencim je tako regeneriran za nov lrog. Temu sistemu pravijo tudi ping pong mehanizem.

Aminotransferaze so v medicini zelo pomembne in se uporabljajo v diagnosticne namene.

Alanin se v eni sami sopnji ze pretvori v piruvat. Aspartat daje oksaloacetat, ki je intermediat krebsovega cikla. Glutamat daje alfa-ketoglutarat, iz glivina pa dobimo glioksilat. Opazamo, da je katabolizem AK pomemben donor intermediativ krebsovega cikla. Krebsov cikel ima amfibolni značaj in AK so ključneza dovajanje teh intermediatov.

Najprej se osredotocimo na prvi dve, za diagnosticne namene pomembni, reakciji.;

Aminotransferaze, pomembne v medicinski diagnostiki, so znotrajcelicni encimi. Uporabljajo pa se za določanje stanja seruma. Pri prvem testu nastane glutamat, piruvat in ...???. Mal krneki zmedeno

Kadar pri pacientih opazimo povisane transaminaze, je nekaj narobe. Najdemo jih pri cerozi jeter ali srcnem infarktu. V obeh primerih namrec pride do razpada tkiva. Povisane transaminaze najdejo tudi pri ljudeh, ki delajo z organskimi topili ali pa pri pacientih, ki uzivajo statine (vsa zdravila se prebavljajo v jetrih in nekatera zdravila so za njih skodljiva???)

Najpomembnejše so transaminacije, ki AK pretvorijo do glutamata, ki se nato razgradi do amoniaka in alfa keto glutarata. Dva tipa reakcij pri razgradnjah AK so za opravljanje izpita nujna: transaminacije in reakcije z glutamat dehidrogenazo. (glej slajd na katerem sta prikazani obe reakciji hkrati).

Glutamat dehidrogenaza je zelo pomemben encim v mitohondrijih jeternih celic. Amonijak, ki se sprosti se v ciklusu uree mora pretvoriti v ... -to se dogaja uglabnem v jetrih!

V mitohondrijih jeter nastajata tako alfa ketoglutarat, amoniak pa se sprosti. Alfa ketoglutarat v visokih koncentracijah pospesi hitrost krebsovega cikla. Tam se pretvori v oksaloacetat, ta pa je v citosolu izhodna spojina za glukoneogenezo. Alfa ketoglutarat pa lahko seveda vstopa tudi v sinteze novih aminokislin. Tedaj reakcija potece v obrtani smeri.

Tako pomemben encim, kot je glutamat dehidrogenaza, je seveda uravnavan. Reakcija bo pospesena z visoko koncentracijo ADP, reakcija pa je zavrtta, ce je zadosti GTP-ja.

Pri amino kislinah se srečamo se z dodatnim problemom. Proteini se razgrajujejo večinoma v mišicah, dušik pa se odstranjuje v jetrih. Glutamat ni primeren za transport po krvi, saj je kisel. Glutamin in alanin pa sta primerna za to nalogo. Glutamat se v glutamin pretvori z encimom glutamin sintetazo, potrebujemo pa se amoniak in ATP. Veže se amino skupina na stransko verigo glutamata in dobimo glutamin. V jeternih celicah pa reakcija poteče v obratno smer. Glutaminaza je encim, ki iz glutamina naredi glutamat. Glutaminaza je običajna hidrolaza. Glutamat se z glutamat dehidrogenazo pretvori v aminoak in alfa-ketoglutarat. Glutamin je zelo pomembna AK tudi pri metabolčni acidozi. To pomeni da imamo preveč kislin. Pri tem stanju so pomembne reakcije v ledvicah. Tedaj tam sproščamo amoniak, ki ima bazične lastnosti. Z glutamat dehidrogenazo poteka reakcija v smer nastanka alfa-ketoglutarata, ki se razgradi do CO₂. Iz tega dobimo HCO₃⁻, ki je pufer. Amoniak se poleg tega lahko poveže z organskimi kislinami, ki se v obliki soli nato izločijo z urinom. Druga AK, ki je zelo pomembna za transport dušika po krvi pa je alanin.

Amoniak nastane na različne načine. Nastane iz proteinov in nukleinskih kislin.

Urea ali sečnina NI ENAKO kot sečna kislina (uric acid). Sečna kislina pri človeku nastane iz purinskega obročnega sistema.

Ribe izločajo amoniak skozi skrge direktno v vodo, ptice pa iz AK tvorijo sečno kislino. Sesalci iz amoniaka delamo sečnino ali ureo.

Se nekaj dušikovih kislin, ki se izločajo iz našega metabolizma:

Glej slajd. Dalec največ se izloči uree in sečne kisline.

Ciklus uree poteka v večji meri v jetrih in v manjši meri v ledvicah. Za razliko od krebsovega ciklusa, kjer so vsi encimi v mitohondriju, so tu nekateri encimi v citosolu, drugi v mitohondriju.

Dušik se mora aktivirati v karbamoil fosfat in aspartat.

Karbamoil fosfat sintetizata 1 je prisotna v mitohondrijih, 2 pa je prisotna v citosolu. 1 je praktično neaktivna brez n-acetilglutamata, 2 od njega ni odvisna.

Ornitiin ima enako vlogo kot oksaloacetat pri krebsovem ciklu. Amoniak, ki nastane z glutamat dehidrogenazo se mora pretvoriti v karbamoil fosfat.

Za njegovo sintezo potrebujemo amoniak, ki vstopi v biosintezo s CO₂ in nastane karbamoil fosfat. Za to se porabi dva ATPja. Reakcija poteče, kadar imamo dovolj glutamata iz katerega se tvori n-acetilglutamat.

Vsake posamezne reakcije ni potrebno poznati. Karbamoilfosfat --> citrulin --> argininosukcinat --> fumarat --> arginin --> ornitiin --> karbamoilfosfat. Odcepi se urea, porablja pa aspartat.

Karbamoilfosfat in ornitiin s karbamoiltransferazo tvorita citrulin. Aspartat pride iz transaminacije z oksaloacetatom iz krebsovega cikla. V krebsovem ciklu pa se nato vrne fumarat. Iz aspartata in citrulina nastane argininosukcinat. Iz tega nastane arginin in fumarat. Fumarat se nato vrne v krebsov ciklus. Krebsov ciklus in ciklus uree sta med sabo torej zelo močno povezana. Nato pride do hidrolitičnega odcepa uree in spet dobimo ornitiin, ki vstopa v naslednji ciklus.

V ciklus uree vstopajo trije ATPji, HCO₃⁻, amoniak in aspartat, nastanejo pa dva ADP, AMP, fumarat in urea in dva Pi in en P_i.

Ornitiin gre v mitohondrij, citrulin pa iz mitohondrije. Stanje dušika se tako ne spreminja, saj gre

enkrat not, drugič ven.

Zapomnit si je treba biosintezo, nastanek amoniaka s karbonat dehidrogenazo in reakcijo karbamoilfosfata, ki je paralelna reakcija oksaloacetatu in acetylCoA v krebsovem ciklu.

toksicnost NH₄⁺

Amoniak je lahko toksičen. Mora se pretvoriti v ureo, ki je njegova netoksična oblika. Zastrupetve z amoniakom povzročijo komo. Jetra ne morejo več proizvajati uree. Najbolj je amoniak toksičen za možganske celice, saj možgani potrebujejo veliko ATPja. Ob prisotnosti amoniaka se zmanjša sinteza ATPja - potek glutamat dehidrogenazne reakcije. Alfa ketoglutarat. Zmanjšanje hitrosti krebsovega cikla.

Nastanek glutamina z glutamin sintetazo je druga pomembna reakcija. Zaradi odvečnega glutamina lahko pride do privzemanja vode in nabrekanja (mozganov).

Iz glutamata dobimo nevrottransmitter GABA, katerega pomanjkanje povzroči motnje signaliziranja v možganih.

Sinteza ATPja je zmanjšana. ATP je v možganih tako vreden, ker morajo ti ves čas sintetizirati peptide (intenzivno kroženje peptidov).

Predavanje 32; 7. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

KATABOLIZEM AMINOKISLIN

Pomembno je, da imamo dve veji, kar se dogaja s posameznimi atomi. Treba se je znebiti dušika, potem pa ogljikovega ogrodja. Dušik vstopi v ciklus uree (v obliki amoniaka), ogljikovo ogrodje pa v drugo pot.

Oksidativna deaminacija - odstranjevanje dušika

Tri različni sistemi, ki so vključeni v odstranjevanje dušika. Za dve aminokislini, ki vsebujeta OH skupino (serin, treonin), smo omenili dehidratazo. Iz serina dobimo piruvat; gre za odstranitev vode in hidrolitičen odcep amoniaka.

Dva različna encimska sistema pa imamo za oksidativno odstranjevanje dušika. V glavnem zaužijemo L aminokislino, lahko pa se zgodi, da s prehrano dobimo tudi D aminokislino. Če nam manjka esencialna aminokislina, potem lahko oksidaze oksidativno deaminirajo tudi D aminokislino, dobimo alfa-keto kislino. Ta lahko vstopi v biosintezo s transaminacijo, dobimo L aminokislino, ki je sicer nebi.

Daleč najpomembnejši sistem pa je sistem s transaminazami. Največ aminokislin se dušika znebi s transaminacijo, kjer vstopa v reakcijo aminokislina z alfa-ketoglutaratom. Iz te aminokislino dobimo keto skupino, dušik pa se premesti na alfa-ketoglutarat, dobimo aminokislino glutamat. Iz različnih aminokislin torej skoncentriramo dušik v obliki ene same aminokislino. Potem pa poteče reakcija z glutamat dehidrogenazo.

Amoniak je v večjih koncentracijah toksičen, zato se odstranjuje - vstopi v ciklus uree (v aktivirani obliki, kot karbamoil fosfat, porabimo še dva ATPja, Pi se vežejo na karbamoil fosfat).

Ta karbamoil fosfat vstopi v biosintezo prvega intermediata v ciklusu uree - citrulin (nastane iz ornitina). Ta citrulin se izloči iz mitohondrijskega matriksa v citosol. V naslednji fazi potrebujemo še en dušik (urea ima dva dušika) - ta pride iz aspartata. Dušik gre v molekulo arginina, ki se razcepi do sečnine in ornitina, medtem ko fumarat (C atomi) se vrača v ciklus karboksilnih kislin. Ciklus uree torej poteka preko aspartata in fumarata. Aspartat nastane s transaminacijo iz oksaloacetata, C atomi pa se v Krebsov cikel vračajo v obliki fumarata.

Toksičnost amoniaka

Amoniak je toksičen, predvsem za možganske celice. Preveč ga je lahko, če je nekaj narobe s ciklusom uree. Odstranitev odvečnega amoniaka, če ga naenkrat nastane veliko več, je možno na način, da se z glutamat dehidrogenazo združi z alfa-keto glutaratom in dobimo glutamat. Če je več amoniaka potem bo reakcija potisnjena v desno in bomo potrebovali več alfa-keto glutarata, ki ga črpamo iz Krebsovega cikla, posledica je manj ATPja (možgani ga potrebujejo!). Druga možnost je, da z glutamin sintetazo iz amoniaka tvorimo glutamin. Če je preveč glutamina potem pride do nabrekanja celic zaradi osmotskega tlaka (delcev je preveč). Če imamo zelo veliko amoniaka pa se lahko glutamat še poveže z amoniakom in dobimo produkt, ki je toksična aminokislina. Je torej kar nekaj razlogov, zakaj moramo amoniak čim bolj učinkovito izločati iz telesa.

Hiperamoniemije

Razlogov za to je več, ker imamo veliko encimov, ki sodelujejo pri pretvarjanju amoniaka v sečnino. Hiperamoniemije so lahko posledica pridobljenih dejavnikov (disfunkcija jeter; ciroza, rak,...), ali pa so dedne. Okvare karbamoil fosfat sintetaze 1 ali ornitin transkarbamoilaze vodijo do hudih hiperamoniemij.

Zdravljenje:

- dializa,
- dieta z alfa-keto kislinami; te se porabijo zato, da sintetiziramo aminokislino, ki jih rabimo, poleg tega lahko alfa-keto kisline vstopijo v glukoneogenezo
- omejen vnos proteinov; dieta mora biti bogata z ogljikovimi hidrati. Preprečiti je treba razgradnjo aminokislin.
- zdravila: benzoat in fenilacetat, ki ireverzibilno vežeta glutamin - zato ta ne bo šel v jetra v katabolizem, kjer bi kot produkt dal amoniak, ampak ga bomo odstranjevali.

METABOLIZEM OGLJIKOVEGA OGRODJA

V primeru, da je potrebna energija, pride do oksidacije do CO₂ in vode, pri tem se sprosti energija. Ogljikovo ogrodje je zelo pomembno za biosintezo glukoze. Poleg tega se iz ogljikovega ogrodja lahko nasintetizirajo ketonska telesa. Glede na to, v kaj stopajo te ogljiki iz ogrodja, ki je ostalo po odstranitvi dušika, delimo 20 aminokislin v **ketogene** in **glukogene** aminokislino. Iz ketogenih dobimo ketonska telesa (razgradijo se do acetyl CoA ali acetoacetyl CoA), iz glukogenih pa glukozo (razgradijo se do piruvata ali različnih intermediatov Krebsovega cikla).

Ogljikov skelet, ki vstopa v TCA

Pri glukogenih fobimo pet produktov - oksaloacetat, fumarat, sukcinil CoA, alfa-ketoglutarat, citrat.

Izoleucin, triptofat in fenilalanin lahko del C atomov dajo v acetyl-CoA in acetoacetyl-CoA, iz drugih pa nastanejo intermediati Krepovega cikla - lahko prispevata v obe smeri, torej sta ketogeni in glukogene.

Aminokislina, iz katerih dobimo piruvat - alanin, triptofat, cistein, treonin, serin, glicin (Piruvat se pretvori v oksaloacetat, ki je intermediat Krepovega cikla)

Piruvat nastane iz alanina z glukozo-alaninskim ciklom. Potrebna je ena sama reakcija - transaminacija: alanin + alfa-ketoglutarat z alanin aminotransferazo dobimo piruvat, pri tem se alfa-ketoglutarat pretvori v glutamat. Piruvat pa nastane lahko tudi iz cisteina; pri tem je treba odstraniti tudi žveplo. Ta se porabi v biosintezah, odcepi pa se lahko v obliki različnih produktov - H₂S, SO₃(²⁻),...

Piruvat dobimo iz serina v eni stopnji - s serin dehidratazo.

Glicin se pretvarja v piruvat, vendar ima glicin dva C atoma - to ni zadosti za piruvat! Zato se mora najprej pretvoriti v serin, potrebujemo nek donor ogljikovega atoma (to je N₅,N₁₀ metilen tetrahidrofolna kislina). Poznamo dva sistema, kako se glicin metabolizira; eden je tak, da dobimo serin (potrebujemo donor ogljika), drugi pa tak, da se sprosti CO₂ in amoniak - ta reakcija lahko poteče tudi v obratno smer, v smer sinteze. Če se glicin cepi na CO₂ in NH₄ pa nam ostane še en ogljik, ta se prenese na H₄ folat in dobimo metilen tetrahidrofolno kislino, ki jo potrebujemo, za pretvorbo glicina v serin.

Tetrahidrofolna kislina nastane v našem telesu. Na dva dušika (N₅ in N₁₀) se lahko veže npr. fragment, ki ima en C atom - metil, nastane N₅ tetrahidrofolna kislina.

Tetrahidrofolna kislina sodeluje tudi v metabolizmu histidina, ki se pretvarja v glutamat.

GLUTAMAT

Bodisi nastane z glutamat dehidrogenazo iz alfa-keto glutarata in amoniaka, bodisi s transaminacijo - če se aspartat združi z alfa-ketoglutaratom dobimo oksaloacetat in glutamat.

Aspartat in asparagin dajeta obe oksaloacetat (pomembna molekula, ki lahko vstopa v glukoneogenezo). Kako pa se aspartat razgradi do CO₂ in vode? Transaminacija do oksaloacetata, ta se potem pretvori v glukozo. Glukoza se pretvori do acetyl-CoA, dobimo CO₂ in vodo.

Tudi asparagin daje oksaloacetat. Asparagin se z asparaginazo pretvori v aspartat.

Aminokislina, ki dajejo sukcinil-CoA - metionin, valin, izoleucin

Preko propionil-CoA (srečali smo ga pri beta oksidaciji maščobnih kislin z lihimi številom C atomov). Pretvorba iz propionil-CoA v sukcinil-CoA je kompleksna, potrebujemo vitamin B₁₂. Propionil-CoA se najprej karboksilira v spojino D-metilmalonil-CoA; sodeluje propionil-CoA karboksilaza, potreben je koencim biotin. Iz C₃ dobimo C₄ molekulo. Problem je, da je metilna skupina na asimetričnem C atomu na desni strani (imamo D-metilmalonil-CoA), zato ta ni substrat za pretvorbo v sukcinil-CoA in jo je potrebno pretvoriti v L-metilmalonil-CoA; to pa je substrat za mutazo, ki ga pretvori v sukcinil-CoA. Za to je spet potreben vitamin B₁₂.

Vitamin B12 je zelo kompleksna skupina. Ker ima vezan kobalt mu rečemo tudi kobalamin; glede na to, kaj je vezano na kobalt, govorimo o cianokobalaminu (CN), hidroksikobalaminu (OH), metilkobalaminu (CH₃) ali adenzinkobalaminu (5'-deoksiadenozin). Ta vitamin se absorbira v želodcu, zato je potrebno pacientom, ki jim operativno odstranijo želodec, dodajati vitamin B12.

Z napakami v mutazi ali s pomanjkanjem vitamina B12 so poznane bolezni - kopiči se namreč L-metilmalonil-CoA. Celica ima različne encime, ki lahko molekule, ki se začnejo kopičiti, pretvarjajo v druge produkte. V tem primeru se odcepi koencim A in nastane metilmalonska kislina, ki je zelo močna, zato ni dobro, da se kopiči.

Iz metionina lahko dobimo **s-adenosil-metionin (SAM)**. To je zelo pomembna spojina, ker služi kot donor metilne skupine. Metilacije v našem telesu so izjemno pomembne - pri biosintezi biološko aktivnih skupin (npr. sinteza adrenalina, pretvorba fosfatidiletanolamina v fosfatidilholin) ali pri uravnavanju izražanja genov. Metionin se pred pretvorbo mora aktivirati z ATPjem. Ko SAM oddaja metilno skupino se pretvori v S-adenozil-homocistein, ta pa se nadaljno pretvori v homocistein; kopičenje te aminokislina je spet povezano z boleznimi (ateroskleroza).

Poleg tega so sposobne oddajati metilno skupino tudi druge spojine, npr. metil-koencim B12 in N⁵-metil-tetrahidrofolat.

Metabolizem aromatskih aminokislin - fenilalanin in tirozin

Obe se pretvarjata v fumarat in acetoacetat. Gre torej za gluko in ketogeni aminokislina. Fenilalanin se lahko pretvori v tirozin (pomen kot izhodna spojina v biosintezi različnih bioloških molekul) z eno samo reakcijo hidroksilacijo (encim fenilalanin hidroksilaza). Gre za princip monooksigenaze - vstop molekularnega kisika, eden od atomov se veže na substrat, drugi pa se izloči v obliki vode. Za to, da nastane voda, potrebujemo donor redukcijskih ekvivalentov - tetrahidrobiopterin. Da bo tega vedno zadosti, se mora obnavljati.

Tetrahidrobiopterin se torej pretvori v dihidrobiopterin, ta se nazaj pretvori z redukcijo, donor redukcijskih ekvivalentov je NADPH. Zato je lahko v reakciji kot donor napisan NADPH, ampak je to posredno (potrebujemo ga za regeneracijo dihidrobiopterina):
fenilalanin + O₂ + NADPH + H⁺ --> tirozin + H₂O + NADP⁺

Katabolizem tirozina

Preko raznih intermediatov se pretvori v fumarat in acetoacetat. Na dveh stopnjah spet vstopa molekularni kisik; vendar v tem primeru ni monooksigenaza ampak dioksigenaza, torej se oba atoma kisika vgradi v substrat (ne izloči se voda).

Tirozin ni esencialna aminokislina, dokler imamo fenilalanin (ki pa je esencialna aminokislina). Je pa vseeno dobro, da tirozin dobimo s proteini, ker je tirozin izhodna spojina pri več biološko pomembnih spojinah. Iz njega nastaja adrenalin in melanin.

Motnje, povezane z metabolizmom aromatskih aminokislin

- če je defektna hidrosilaza (manj aktivna ali moten dostop do tetrahidrobiopterina) govorimo o fenilketonuriji.

- če so moteni encimi, ki razgradijo tirozin do fumarata in acetoacetata, govorimo o tirozinemijah.

- če ni zadosti tirozina, potem se ne more pretvoriti v melanin in lahko pride do albinizma.

Fenilketonurija

Blokirana je pretvorba fenilalanina v tirozin. Če te pretvorbe ni potem se kopiči fenilalanin. Pri vseh reakcijah katabolizma aminokislin je najprej prišlo do odstranitve amino skupine, pri fenilalaninu pa ne! Ta se je najprej pretvoril v tirozin, potem pa šele transaminiral. To pa zato, ker imajo transaminaze, ki transaminirajo fenilalanin, višji Km (zahtevajo prisotnost večjih količin fenilalanina, da se lahko transaminira). Če pa se kopiči fenilalanin potem se transaminira in dobimo fenilpiruvat. Ta se lahko naprej pretvarja v fenilacetat, fenilaktat,... te produkte najdemo pri fenilketonuriji, ker se vsi kopičijo. Fenilpiruvat, fenilacetat in fenilaktat so kisline in so lahko toksične za možganske celice.

Če pri novorojenčku ne vemo, da ima fenilketonurijo, lahko to vodi do nepopravljivih motenj. Zato ga moremo pri rojstvu testirati in ob pozitivni diagnozi omejiti vnos proteinov. Na razpolago imamo tudi posebno obdelane proteine, kjer je zmanjšana količina fenilalanina (nekaj pa ga vseeno mora biti, ker potrebujemo tirozin).

Motnje v metabolizmu aminokislin, ki imajo razvejano stransko verigo

Te aminokisliline se vse najprej transaminirajo v svoje alfa-keto kisline. V naslednji stopnji gre za oksidativno dekarboksilacijo (alfaketokislinska dehidrogenaza; podobna piruvat dehidrogenazi). Če je ta dehidrogenaza okvarjena, potem se kopičijo keto skupine, boleznim pravimo **bolezen javorjevega sirupa**.

Motnje v metabolizmu aminokislin, ki vsebujejo žveplo

Dve aminokislini - cistein in metionin. Prej smo že omenjali homocistein; ta se začne kopičiti ob motnjah v tem krogu (če je defektna metionin sintaza, če je pomanjkanje tetrahidrofolne kisline). Homocistein pa je dejavnik tveganja za srčna obolenja:

- ob prisotnosti kovinskih ionov nastajajo reaktivne kisikove spojine, zato pride do oksidativnih poškodb LDL.

- reakcija SH skupine z apolipoproteini, ki imajo v strukturi cistein

- inhibicija antikoagulantov

- aktivacija prokoagulantov

- povečana količina homocisteina je povečana z nepravilnostmi v vezivnem tkivu (motena biosinteza kolagena)

- povečana sulfatacija proteoglikanov

Predavanje 33; 8. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

BIOSINTEZE AMINOKISLIN

Za razliko od kisika, dušika ne moremo pridobiti z dihanjem (tistega, ki ga dobimo, ne moremo uporabiti, ker je molekularen). Potrebujemo enostavne bakterije, ki ga pretvorijo v 'uporabno' obliko.

Vir dušika v organizmu

V našem telesu najdemo dušik v reducirani obliki. Glavnina dušika v naravi pa je bodisi v molekularni bodisi v oksidirani obliki (nitrati). Da bi lahko dušik v celicah uporabili za biosinteze aminokislin, ga je potrebno reducirati do amoniaka, ki ga lahko vgradimo v biološke molekule. Da bi te reakcije lahko izvedli potrebujemo pomoč N-fiksirajočih mikroorganizmov, ki so v simbiozi z rastlinami (v koreninah).

Krog dušika v naravi

Moramo dobiti amonijeve ione, ki jih lahko vgradimo - te za nas 'pripravijo' dušik fiksirajoče bakterije (poteče redukcija). Ta amoniak pa se potem z drugimi bakterijami v zemlji pretvori v nitrite in nitrato, tako da je ponovno potrebna pretvorba v dušik in amoniak; krog je torej sklenjen.

Mi torej dušik dobimo z uživanjem hrane rastlinskega izvora, tako dobimo tiste aminokislino, ki so neesencialne.

Fiksacija atmosferskega dušika

Iz ene molekule dušika (N₂) dobimo dva amoniaka. Za reakcijo potrebujemo kar precej ATPja, zato je energetska zelo potratna reakcija. Za umetno sintezo amoniaka potrebujemo reakcijo pri tlaku 100 atmosfer in 500 stopinj celzija - to nam ilustrira, kako energetska potratna je sinteza amoniaka.

Redukcijo dušika v amoniak opravlja **nitrogenaza**. Gre za dimerni protein. V teh dimerih so zelo pomembni kovinski joni. Nitrogenaza je občutljiva na kisik; zato fiksacija poteka v zemlji (kisik je toksičen za nitrogenazo), poleg tega obstaja še ena varovalka; rastline imajo leghemoglobin, to je molekula, ki veže kisik v primeru, da ta prodre v zemljo. Zadnja dva odstavka sta bolj za 'ilustracijo' in vseh podrobnosti ni treba znati.

Aminokislino

Neesencialnih je devet, pa tudi tirozin v primeru, da je prisoten fenilalanin.

Arginin in histidin sta semiesencialni; lahko jih naredimo v telesu, vendar ne v zadostni količini. Večina AK, ki jih znamo mi narediti, je znatno manj kompliciranih od esencialnih.

Izhodne spojine za vseh 20 aminokislin

To so piruvat, intermediati glikolize in intermediati Krebsovega cikla.

Oksaloacetat je izhodna spojina tudi za metionin, treonin in lizin, ki so esencialne aminokislino in jih mi ne znamo nasintetizirati.

Iz piruvata v našem telesu nastane samo alanin; ne znamo narediti valina, levcina ali izolevcina. Fosfoenolpiruvat in eritroze-4-fosfat sta izhodni spojini za aminokislino, ki jih ne znamo sintetizirati (razen tirozina, pod pogojem, da je prisoten fenilalanin).

BIOSINTEZE AMINOKISLIN V ČLOVEŠKEM TELESU (NEESENCIALNE AMINOKISLINE)

1. Iz **trifosfoglicerata** nastane **serin**, ki je izhodna spojina za **glicin** in **cistein**.

Izhodna spojina je torej trifosfoglicerat. Biosinteza serina poteka v treh stopnjah. V prvi poteče oksidacija hidroksilne skupine v keto skupino, dobimo 3-fosfohidroksipiruvat. Encim se imenuje fosfoglicerat dehidrogenaza (redukcijske ekvivalente prevzamejo oksidirani koencimi). 3-fosfohidroksipiruvat je primer alfa keto kisline, te pa lahko vstopijo v transaminacijo. V transaminacijo vstopi z glutamatom, iz glutamata nastane alfa keto glutarat, dobimo pa 3-fosfoserin. Fosfatne skupine pa lahko hidrolitično odcepljajo fosfataze - encim fosfoserin fosfataza odcepi fosfatno skupino in pridelali smo serin.

Serin se lahko pretvori v glicin, pri tem mora oddati en ogljikov atom. C1 fragmente lahko sprejema tetrahidrofolna kislina. Ob pretvorbi serina v glicin dobimo metilentetrahidrofolno kislino. Encim je serin hidroksimetil transferaza, koencim je piridoksal fosfat (PLP), ki izhaja iz vitamina B6.

2. **Glicin** lahko nastane tudi iz **amoniaka** in **CO₂**. Deluje encim glicin sintaza, potrebujemo CO₂ in amoniak, pa še dodaten C atom, ki ga prinese metilen tetrahidrofolna kislina. Ker je to biosinteza potrebujemo reducirane koencime (splošen princip - razgradnje so oksidacije, biosinteze so redukcije, v razgradnje vstopa oksidirani koencim, v biosintezo reducirani koencim).

3. **Glutamat** je osrednja aminokislina, ki sodeluje tako pri katabolizmu kot pri biosintezah; pri katabolizmu je tisti, ki odda končno amino skupino v obliki amoniaka, pri biosintezah pa nastane s sprejemom amino skupine od alfa keto glutarata. Alfa keto glutarat torej veže amoniak: $\text{alfaketoglutarat} + \text{NH}_4(+) + \text{NADPH} + \text{H}(+) \rightarrow \text{glutamat} + \text{NADP}(+) + \text{H}_2\text{O}$, reakcijo katalizira glutamat dehidrogenaza.

Glutamat je lahko donor amino skupine za vse ostale aminokislino, ki jih sintetiziramo v našem telesu. Poleg tega lahko iz glutamata v celicah naproduciramo še prolin in arginin, ta biosinteza pa je veliko bolj kompleksna, zato nas tega ne bodo spraševali na izpitu. Glutamat je tudi izhodna spojina za glutamin, glutamin pa je izjemno pomembna aminokislina, ker je to tista aminokislina, s katero se dušik prenaša med tkivi. Poleg tega je glutamin pomemben kot donor dušika pri biosintezah drugih biološko pomembnih molekul, npr. nukleotidih - ne oddaja alfa amino skupine ampak amino skupino na stranski verigi, ki je vezana v obliki amida.

4. **Glutamin sintetaza**, ki katalizira **sintezo glutamina**, je zelo natančno uravnavan. Njegovi modulatorji so aminokislino in pa še mnogi drugi (AMP, karbamoil fosfat, glukozamin 6 fosfat,...). Ti so modulatorji zato, ker glutamin vstopa v biosintezo teh molekul.

Biosinteza glutamina poteka v dveh stopnjah, encim pa je uravnavan alosterično in tudi s kovalentno modifikacijo.

Glutamin sintetaza ima dvanajst podenot, s tem je omogočena alosterija. Aktivna je takrat, kadar ni modificirana kovalentno, če pa se nanj veže AMP (donor je ATP) se inaktivira. Če jo hočemo spet aktivirati je potrebna deadenilacija (AMP je potrebno odcepiti), ki je spet natančno uravnavana tako, da je encim, ki jo povzroči, uravnavan z UMP. Nukleozid fosfati (AMP, ATP, UTP) delujejo kot modulatorji encima, to pa zato, ker glutamin sodeluje v sintezi nukleozidov.

5. Za **ostale aminokisliline** pa so pomembne **transaminacije**. Kot donor amino kisline vedno vstopa glutamat, alfa-keto kislina pa je lahko različna. Če vstopi v transaminacijo piruvat bomo dobili **alanin**, če vstopi oksaloacetat bomo dobili **aspartat**. Iz aspartata lahko dobimo **asparagin** tako, da kot donor dušika vstopi glutamin:

aspartat + glutamin --> asparagin + glutamat

6. Za **biosintezo cisteina** potrebujemo žveplo, to pa izhaja iz esencialne aminokisliline metionina. Pri metabolizmu te aminokisliline dobimo homocistein (je podobna cisteinu).

Homocistein se pretvori v cistein v dveh stopnjah.

Cistein torej **dobimo iz metionina preko homocisteina!**

Aminokisliline v serumu

Aminokisliline, ki jih sintetiziramo ali zaužijemo, krožijo po telesu - nekatere proste, nekatere vezane na albumin (triptofan in cistein).

Koncentracija v serumu je relativno konstantna, lahko je uravnavana tudi s katabolizmom; če je aminokislilin več, ali pa jih potrebujemo za sintezo sladkorja, lahko vstopajo v druge katabolne procese.

Aminokisliline v tkivih

Jetra so ključno tkivo in imajo glavno vlogo nadzora nad usodo aminokislilin. Večina jih torej ostane v jetrih, z izjemo BCAA aminokislilin (branch chain amino acids - aminokisliline z razvejano stransko verigo), ki gredo v mišice - tam poteče transaminacija, potem se v keto obliki vrnejo v jetra.

Encimski nadzor katabolizma - neesencialne so tiste, ki jih lahko sami sintetiziramo; ni indukcije s koncentracijo nad določenim pragom. Če pa imamo esencialne moramo paziti, da jih imamo vedno zadosti za pomembne biosinteze - encimi, ki so potrebni za razgradnjo teh aminokislilin, se bodo aktivirali šele nad neko določeno koncentracijo in jih ne bodo razgrajevali vedno.

Hormonsko uravnavanje metabolizma aminokislilin

- Inzulin se sprošča takrat, kadar imamo zadosti hranil. Glavni induktor sprošljanja je glukoza, vendar k sproščanju pripomorejo tudi aminokisliline - vpliva na povečano proteinsko sintezo.

Stimulira se transport AK v mišico in njihov privzem v mišice.

- Glukagon stimulira razgradnjo proteinov in poveča privzem v jetrnih celicah. Stimulira glukoneogenezo in katabolizem glukogenih aminokislilin. Poveča hitrost ciklusa uree.

- Adrenalin, glukokortikoidi, hormoni ščitnice imajo podobno vlogo kot glukagon; kortizol pa je hormon, ki deluje na mišične celice in spodbuja razgradnjo proteinov preko proteosomskega sistema.

- Rastni hormoni delujejo podobno kot inzulin.

Predavanje 34; 8. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

PREGLED METABOLIZMA AMINOKISLIN

Iz aminokislin se sintetizira mnogo pomembnih spojin, npr. hem (najpomembnejši purfirin), purini in pirimidini - brez DNA in RNA ne moremo funkcionirati, zato so aminokislina zelo pomembne (so donorji vseh dušikov v purinskem in pirimidinskem obroču).

SINTEZA HEMA

Hem ima koordinativno vezano železo. Štirje dušiki pa prihajajo iz najmanjše aminokislina, glicina. Poleg glicina potrebujemo še sukcinil koencim A.

Hem je nujen kot kofaktor pri hemoglobinu za vezavo kisika, pri mioglobinu v mišicah, pri citokromih (predvsem v jetrih), nekaterih katalazah in nekaterih peroksidazah.

V hemoglobinu je železo zmeraj v obliki 2+, če je stanje fiziološko; v citokromih pa deluje kot donor in akceptor elektronov, zato se mu naboj lahko spreminja.

Hem vsebuje železo in štiri pirollove obročje, ki so med seboj povezani z metilenskimi skupinami. Železo je nujno potrebno v našem telesu, poleg tega je nujno potrebno, da je vezano na proteine - nevezano železo lahko povzroča nastanek reaktivnih kisikovih spojin, predvsem hidroksilni radikali. V hrani lahko dobimo železo v obliki 2+ ali 3+; če ga dobimo v 3+, potem se še pred absorpcijo pretvori v 2+. Zelo pomemben je prenašalni protein transferin; v tarčnih celicah so receptorji za transferin, tako se sprosti v tkiva, kjer spet čakajo različni proteini, ki železo vežejo (npr. feritin).

Biosinteza hema

Iz vidika biosinteze hema so najpomembnejše tkivo jetra in pa nezreli eritrociti (ker zreli eritrociti nimajo več mitohondrijev!).

Sintetizira se iz glicina in sukcinil-CoA. Poteka delno v mitohondrijih, delno v citosolu. Poleg tega začetna faza poteka v mitohondrijih, potem pa se premesti v citosol, zadnja faza (vezava železa) pa spet poteka v mitohondrijih.

Začetna in končna faza torej potekata v mitohondrijih.

Prva faza je sinteza aminolevulinata. Gre za reakcijo med sukcinil-CoA in glicinom, poteka pa v dveh stopnjah. Najprej se odcepi koencim A, potem pa še ogljikov dioksid. Sintaza je regulirana! Aminolevulinat lahko dobimo tudi iz glutamata, vendar je ta pot dosti manj pomembna.

Encim ALA sintaza je prisotna v organizmu v dveh izooblikah. ALA 2 je prisotna v eritrocitih in je uravnavana predvsem drugače kot ALA 1, ki je v glavnem prisotna v jetrnih celicah.

Nastala aminolevulinska kislina (aminolevulinat) se transportira iz mitohondrijev v citosol. Tam iz dveh takih molekul s porfobilinogen (PBG) sintazo nastane porfobilinogen. PBG sintazo imenujemo tudi ALA dehidrataza, ker se pri reakciji odcepi voda. To je metalo encim in za delovanje potrebuje cinkove ione. Je prva stopnja v biosintezi hemoglobina, ki je inhibirana s svinčcem (toksična težka kovina).

Porfobilinogen je prvi intermediat s pirolnim obročem. Iz štirih porfobilinogenov nastane preuroporfirinogen, ta pa se spremeni v uroporfirinogen 3 - prva molekula, ki po obliki spominja na hem.

Na koncu iz uroporfirinogena 3 dobimo protoporfirin; to je tista molekula, na katero se veže železo. Encim, ki je za to potreben, je ferokelataza (ta reakcija poteče v mitohondrijih), encim je tudi inhibiran s svinčevimi ioni.

Biosinteza hema v eritrocitih je uravnavana na ravni ferokelataze in porfobilinogen deaminaze (regulatorne stopnje torej niso na začetku ampak v nadaljnjem procesu), za razliko od jetrne sinteze, kjer je glavna regulatorna stopnja ALA sintaza.

Jetra so drugo najpomembnejše mesto biosinteze hema. Tako pomembna so zato, ker v jetrih potekajo detoksifikacije zdravil in raznih endogenih molekul, v teh procesih pa imajo ključno vlogo citokromi p450. V jetrih je sinteza hema uravnavana na ravni ALA sintaze; reakcija z ALA sintazo je v jetrih hitrost omejujoča reakcija. Hem, ki nastane v jetrih, se vključi v citokrome.

Uravnavanje sinteze hema v jetrih (uravnavanje ALA sintaze)

Kadar je zadosti hema se biosinteza zaključí - negativna povratna zanka. Poleg hema je inhibitor tudi hemin. Ta je podoben hemu, vendar ima vezano Fe(3+) namesto Fe(2+). Sintezo stimulirajo nekatera zdravila, kot so barbiturati - lahko se modificirajo v oblike, ki se izločijo z vezavo na citokrome p450, zato se stimulira sinteza hema, da je na razpolago za nove citokrome p450 (tako delujejo tudi steroidi, ki so za razliko od barbituratov endogeni produkt).

Metabolizem hema je medicinsko relevantna zadeva, ker je z biosintezo in razgradnjo hema povezanih celo vrsto bolezni. Z biosintezo so povezane raznorazne **porfirije**. Če je encim na poti sinteze defekten, potem se kopičijo intermediati. Za vse porfirije je značilno, da ni veliko hema, zato ni alosterične blokade sinteze, ker je ALA sintaza aktivna in je kopičenje še povečano (celica misli, da je premalo hema, zato aktivira sintazo, to pa nič ne pomaga).

Razgradnja hema

Hem se razgrajuje v jetrih, nezrelih eritrocitih, vranici. Eritrociti imajo kratko življensko dobo in ko pride do lize, se hemoglobin razgradi do proteinskega dela in do hema. Hem izgubi železo, preostali del se pretvori v bilirubin, ki se mora izločiti iz telesa.

Pri zdravem človeku na dan nastane 250 do 300 mg bilirubina, normalna plazemska koncentracija pa je manj kot 1 mg / ml. Bilirubin je zelo slabo topna molekula in jo moramo čim hitreje odstranjevati iz telesa. Bilirubin se v topno obliko pretvori v jetrih, če je ta pretvorba motena, potem pride do težav. Pri razgradnji hema se sprosti ogljikov monoksid.

Ponovitev: Hem se torej razgradi z encimom hem oksigenazo, gre za oksidativno razgradnjo.

Sprosti se železo in ogljikov monoksid in pa produkt - biliverdin, ki se reducira v bilirubin.

Problem bilirubina je, da je slabo topen v vodi in dobro topen v membranah, zato je v povečanih koncentracijah škodljiv. Da ne pride do škodljivih učinkov bilirubina se ta po krvi prenese do jetrnih celic, kjer pride do detoksifikacije (pretvarjanje bilirubina v topno, neškodljivo obliko).

Biliverbin je bolj topen od bilirubina. Zakaj torej telo uporablja bilirubin, ne biliverbin? Zato, ker lahko bilirubin v krvi deluje kot antioksidant.

Ko bilirubin pride do membrane celice difundira v celico, ker je dobro topen v membranah. Ob zelo povečani koncentraciji bilirubina se lahko zato lastnosti membran spremenijo in so transportni sistemi moteni.

V jetrnih celicah moramo narediti bilirubin bolj topen. Gre za konjugacijo z dvema molekulama

glukuronske kisline (glukuronska kislina nastane z oksidacijo glukoze), ki vstopa v aktivni obliki kot UDP glukuronska kislina. Ta modificirani bilirubin se potem preko žolča izloči v prebavni trakt. Tam se odcepi UDP glukuronska kislina, dobimo urobilinogen, ki ga lahko bakterije prebavnega trakta pretvorijo v sterkobilin in se izloči z blatom; urobilinogen pa se lahko pretvori tudi v urobilin, ki se izloči z urinom preko ledvic.

Hiperbilirubinemija

Če je koncentracija bilirubina nad 3mg / 100 ml. Razlogov je lahko preveč. Če je hemoliza pospešena potem jetra ne zmorejo odvajati bilirubina. Razlog je lahko tudi v tem, da je kaj narobe z jetrnim tkivom (hepatitis, alkohol,..), ali pa je moten transport iz jeter v tanko črevo. Razlogi so lahko tudi genetskega izvora.

Pri veliko novorojenčkih se po rojstvu pojavi zlatenica, ker imajo neučinkovit sistem za konjugacijo. Obseva se jih z svetlobo določene valovne dolžine, ki spremeni vezi v bilirubinu in ga naredi bolj topnega.

Če je zlatenica prehepatična je z jetri vse v redu, povečana je hemoliza. Zato v jetrih ne bomo našli povečanega bilirubina. Kadar pa je nekaj narobe z jetri imamo povečane transaminaze (AST in ALT - alkalna fosfataza), ker nam povečane transaminaze v krvi povejo, da nekje propada tkivo. Če pogledamo, kaj se nahaja v urinu, potem vidimo, da urobilinogen (ki se ne nahaja v urinu! Preko ledvic se izloča v obliki urobilina, ne urobilinogena) je prisoten, kar tudi kaže na okvaro.

Predavanje 35; 13. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

KREATIN

Poznamo ga po tem, da je to neposredna zaloga energije. V mišicah se skladišči v obliki kreatinfosfata (fosfokreatina). Fosfokreatina imamo zadosti samo za nekaj sekund, da dobimo ATP.

Nastane iz dveh aminokislin - glicina in arginina. V sintezo posredno vstopa tudi metionin, ker vmes pride do metilacije in metionin vstopi kot S-adenozil metionin, kot donor metilne skupine. Potrebne so torej tri aminokisliline, da se nasintetizira molekula kreatina. Kreatin zaužijemo tudi z mesom.

GLUTATION

Tripeptid iz glutamata, cisteina in glicina. Pomemben je kot antioksidant. Njegova biosinteza je omejena z razpoložljivostjo cisteina - če ga ni zadosti, potem biosinteza poteka počasneje. Peptidi se običajno sintetizirajo na ribosomih, pri glutationu pa imamo primer neribosomalne sinteze peptida. Za nastanek peptidne vezi je potreben vnos energije. Za biosintezo ene molekule glutationa potrebujemo dva ATPja. V prvi stopnji v reakcijo vstopata glutamat in cistein, nastana gama-glutamat cistein (encim: gama glutamil cistein sintetaza; gama pa zato, ker gre za reakcijo med gama karboksilno skupino glutamina in amino skupino cisteino; ponavadi je namreč v peptidno vez vključena alfa karboksilna skupina aminokisliline). Priključni se še glicin, dobimo reduciran glutation, ki ima tiolno (SH) skupino. Ta se lahko oksidira. Glutation sodeluje pri zaščiti membran - pretvarja lipidne perokside v neškodljivo obliko. Zato

imamo glutation peroksidazo, ki ob pretvorbi reduciranega glutationa v oksidirani glutation pretvori vodikov peroksid v vodo. Zato je ključno, da je v celici tudi glutation reduktaza, ki pretvarja glutation nazaj v reducirano obliko.

Pomembno je, da uživamo **selen** (pomemben mikroelement). Zato, ker je v glutation reduktazi namesto žvepla na določenih aminokislinah selen. Selenoproteini so ključni za aktivnost določenih encimov, ne zgolj glutation reduktaze.

Gama glutamilni cikel

Glutation je pomemben tudi za prenašanje aminokislin v celici. Glutation se sintetizira v celicah, te vsebujejo transporter, ki lahko reduciran glutation prenesejo iz celic. Na površini membran imamo encim - gama glutamil transpeptidaza. Ta encim cepi glutamat od dipeptida (iz glicina in cisteina). Zdaj se lahko glutamat poveže z aminokislino, ki jo želimo transportirati v celico. V celici deluje dipeptidaza, ki aminokislino odcepi, gama glutamilno ostanek pa se spet lahko poveže v glutation, če imamo zadosti cisteina in glicina.

DEKARBOKSILACIJA AMINOKISLIN VODI DO BIOLOŠKO AKTIVNIH AMINOV

Poznani so histamin (iz histidina), serotonin (iz triptofana), GABA (gama amino butirat). Iz triptofana lahko v našem telesu nastane tudi nikotinat (niacin), pomembna molekula, ki je del NAD oz. NADP. Vseeno pa niacin štejemo med vitamine, kar pomeni, da ga moramo zaužiti s hrano - to pa zato, ker potrebujemo ogromno količino niacina (ker potrebujemo ogromno količino NAD in NADP), poleg tega triptofan ni prvenstveno namenjen sintezi niacina v našem telesu.

Metionin je izhodna spojina za spermine; spermiji so poliamini, ki imajo svoje funkcije v jedru. Vse molekule, ki vsebujejo dušik, dobijo ta dušik od aminokislin.

Sinteza dušikovega monoksida iz arginina

To je signalna molekula; plin, ki z lahkoto difundira v celice. Lahko aktivira gvanilil ciklazo. Ob vezavi signala se aktivira katalitska aktivnost, poveča se koncentracija cikličnega GMP. Dušikov monoksid je poznan po svojem delovanju na ožilju - za angino pectoris se uporabi nitroglicerol, iz nitroglicerina nastane dušikov oksid, ta deluje na endotelij in širi žile.

V biosintezi NO sodelujejo encimi monooksigenaze - en kisik se veže na hidroksilno skupino arginina, drugi se izloči v obliki vode, donor redukcijskih ekvivalentov je NADPH, poleg tega potrebujemo molekularni kisik. Tako iz arginina nastane citrulin (ta je intermediat v ciklusu uree).

KARNITIN

Srečali smo jo že pri prenosu maščobnih kislin v mitohondrij. Karnitin vnašamo s hrano, lahko pa ga tudi sintetiziramo. Donor dušika ni lizin, ampak trimetil-lizin (mora se metilirati).

SINTEZA KATEHOLAMINOV

Tirozin je zelo pomembna v sintezi dveh vrst hormonov - hormon adrenalina in noradrenalina in

pa ščitničnih hormonov (T3, T4). Tirozin lahko proizvedemo sami, če imamo dovolj fenilalanina in nimamo fenilketonurije.

V biosintezi kateholaminov (sem spadata tudi adrenalin in noradrenalin) pride najprej do hidrosilacije, dobimo DOPA - dihidroksi fenil alanin. Tej reakciji sledi dekarboksilacija in dobimo dopamin. Iz dopamina nastane noradrenalin, ta molekula pa služi predvsem v centralnem živčnem sistemu. Če pa se pretvori v adrenalin potem se uporablja kot stresni hormon, v smislu uravnavanja metabolizma. Adrenalin zviša raven glukoze v krvi; ima več tipov adrenergičnih receptorjev, ki delujejo preko G proteinov.

TIROIDNI HORMONI

Tudi tu je izhodna spojina tirozin.

Tiroksin (T4) ima na aromatskih obročih vezane štiri jodide, trijodotriionin (T3) pa tri.

Tirozin kot izhodna spojina ni prosta, ampak je vezan na protein, ki se imenuje tiroglobulin. To je molekula, ki ima mnogo tirozinskih ostankov. Te se morajo še jodirati. Jod dobimo v telo s soljo, kot I(-).

Biosinteza je dokaj kompleksna. Poteka deloma v celicah ščitnice, kjer se nasintetizira tiroglobulin, deloma pa v ekstracelularnem prostoru. Jod pride do ščitnice po krvi in na bezneskem obroču tiroglobulina zamenja vodikove atome - te imajo pozitiven naboj, jod pa dobimo v telo v obliki I(-), to je anion! Zato se mora jod najprej pretvoriti v aktivno obliko, ki je sposobna zamenjati vodike. Na celični membrani imamo encim tiroid peroksidazo, ki I(-) pretvori v obliko, ki se je sposobna vezati na benzenski obroč in zamenjati vodikove katione.

Potem se dva tirozinska ostanka med seboj povežeta, dobimo T3 in T4, ki sta vezana na tiroglobulin. Vse skupaj se prenese v celice, kjer deluje določena peptidaza in sprosti T3 in T4. Kar se tiče aktivnosti T3 in T4 je poznano, da je T3 bolj aktivna oblika od T4. Prenašata se do tarčnih tkiv vezana na določene proteine.

Ščitnični hormoni delujejo na bazalni metabolizem. Receptorji za T3 in T4 so v celicah; deloma v mitohondrijih, deloma v jedru.

Predavanje 36; 13. 12. 2011 / Marija Žakelj-Mavrič

BIOSINTEZA NUKLEOTIDOV

Vloga nukleotidov

- substrati v biosintezi nukleinskih kislin, koencimov, sekundarnih obveščevalcev
- ATP oblika kemijske energije (donor fosforilne skupine)
- GTP/GDP sodelujeta pri signaliziranju (vezava na G proteine) in pri sintezi proteinov
- CTP je vključen v sintezo sestavljenih lipidov
- UTP je vključen v biosintezo polisaharidov (aktivirana UDP-glukoza, ki se polimerizira v glikogen)

Nukleotidi so sestavljeni iz baze, sladkorja in fosfata. Ribonukleotid ima OH skupino tam, kjer

ima deoksiribonukleotid H.

Dušikove baze

Za te strukture je značilno, da gre za heterociklične obročne strukture (ciklična struktura, ki ima razen ogljikovih atomov še druge atome - dušikove). Gre za aromatske strukture, ki so praktično planarne. Purinski obroč je iz enega šestčlenskega in enega petčlenskega, pirimidinski pa iz enega šestčlenskega obroča.

V DNA namesto uracila nastopa timin. Razlika med uracilom in timinom je v eni metilni skupini.

Aminokislina kot izhodne spojine za biosinteze

Velik del obroča nastane iz aminokislina aspartata. Od aspartata dobimo tudi en dušikov atom; drugega dobimo od glutamina.

Purini

To sta bazi adenin in gvanin. Razlikujeta se po substituentih. Dušikovi atomi izvirajo iz glicina, aspartata in glutamina (daje dva). Vključeni so torej glicin, aspartat in glutamin. Potrebujemo še C atome - dobimo jih od aktivirane folne kisline.

Značilnosti biosinteze nukleotidov

Sinteza poteka tako, da ne nastanejo proste dušikove baze, ampak v obliki nukleotidov. V celici bi sicer našli nekatere proste baze (adenin, gvanin,..) vendar ne izvirajo iz biosintetskih procesov ampak iz procesov razgradnje.

Sinteza lahko poteka de novo (obroč izgradimo na novo), lahko pa uporabimo proste baze, ki se sprostijo v procesih razgradnje (reciklažna pot).

BIOSINTEZA DUŠIKOVH BAZ DE NOVO (iz osnovnih sestavin)

Med sintezo purinskih in pirimidinskih nukleotidov obstaja neka ključna razlika - na kateri stopnji se vključi sladkor. Sama riboza ne vstopa kar taka, ampak mora biti posebno aktivirana: 5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP).

- pri **purinskih nukleotidih** je osnova PRPP; nanj se postopno, v posameznih segmentih, začne graditi purinski obroč
- pri **pirimidinskih nukleotidih** pa najprej nastane pirimidinski obroč arotata, ta se poveže na PRPP in se pretvori v nukleotide, ki jih potrebujemo

Sinteza PRPP

Po fosfoglukonatni poti dobimo ribozo-5-fosfat. Ta se mora aktivirati v PRPP - potrebujemo encim PRPP sintetazo in pa energijo v obliki ATP. Dobimo PRPP in AMP.

1. BIOSINTEZA PURINSKIH RIBONUKLEOTIDOV

SINTEZA PURINSKIH NUKLEOTIDOV DE NOVO

PRPP vstopi v prvo reakcijo (z glutaminom), odcepi se glutamat in dobimo 5-fosforibozilamin in pirofosfat. Sledi vrsta reakcij, po katerih dobimo prvi nukleotid - inozinmonofosfat (IMP). Iz njega v dveh stopnjah lahko dobimo AMP oz. GMP.

Prva reakcija, sinteza fosforibozilamina, je glavna regulatorna stopnja v sintezi purinskih nukleotidov.

V proces vstopajo dodatne aminokisliline kot vir dušikovih atomov - glicin, glutamin in aspartat. Poleg tega potrebujemo še ATP; biosinteza purinskih nukleotidov je energijsko potraten proces. Prvi nukleotid, ki nastane, je IMP.

IMP se po ločenih poteh pretvori v AMP in GMP

- da dobimo **AMP** moramo uvesti v bazo še dodatno amino skupino. Vir tega dušika je aminokislina aspartat, potreben je tudi GTP - dobimo adenilosukcinat. Od tega se v naslednji stopnji odcepi fumarat, dobimo AMP.

- pri poti sinteze **GMP** sta prav tako potrebni dve stopnji; v prvi gre za oksidacijo, dobimo ksantozinmonofosfat, v drugi stopnji pa moramo spet dodati amino skupino, donor je glutamin, potrebujemo energijo v obliki ATP.

Pri sintezi AMP kot donor energije nastopa GTP, pri sintezi GMP pa kot donor energije nastopa ATP. Če teče biosinteza AMPja potrebujemo GTP; zato se bo ob upočasnitvi ene sinteze tudi druga upočasnila. To omogoča, da nastajata AMP in GMP v ustreznem razmerju.

V celici potrebujemo tudi difosfate in trifosfate. Nukleozid mono fosfat se ob prisotnosti ATP pretvori v nukleozid di fosfat in ADP, ta se lahko še nadalje pretvori v nukleozid tri fosfat. Encima sta **nukleozidmonofosfat-kinaza** in **nukleoziddifosfat-kinaza**.

Mesta uravnavanje purinske biosinteze

Glavna mesta uravnavanja so že v sami sintezi PRPPja s PRPP sintetazo. Uravnavana je torej že stopnja, v kateri dobimo ključno izhodno spojino. Kot alosterični inhibitorji nastopajo produkti - GMP, GDP, AMP, ADP. Proces je natančno uravnavan.

RAZGRADNJA PURINSKIH NUKLEOTIDOV

V celici obstaja stalno metabolično obračanje nukleotidov.

- **GMP** je nukleotid, v prvi stopnji razgradnje preide v ustrezen nukleozid. Odcepita se riboza in fosfat, dobimo gvanin, ta se pretvori v ksantin. Ksantin se s ksantin oksidazo pretvori v urat; v reakcijo vstopa molekularni kisik, kot produkt nastaja vodikov peroksid. Produkt je urat ali sečna kislina. Ta je lahko problematična za zdravje, ker je slabo topna. Sečno kislino lahko razen v keto obliki napišemo še v enolni obliki (enol = en alkohol). To je šibka kislina, ki lahko vodikov proton odcepi in dobimo urat.

- razgradnja **AMP** poteka podobno; najprej dobimo nukleozid, potem prosto bazo, potem ksantin in iz njega sečno kislino.

Proste baze imajo dve možnosti - ena je ta, da se razgradijo do končnega produkta (sečne kislina). Vendar pa je sečna kislina slabo topna, zato si je ne želimo v veliki količini. Zato je

druga možnost da, da se baze ponovno uporabijo, namesto da bi šle v dokončno razgradnjo. Gvanin se lahko s PRPPjem znova pretvori v GMP, hipoksantin pa se s PRPPjem lahko pretvori v IMP. Obe reakciji katalizira encim hipoksantin/gvanin fosforibozil transferaza.

SINTEZA PURINSKIH NUKLEOTIDOV - RECIKLAŽNA POT

Omogoča pretvorbo dušikovitih baz v nukleotide. Potrebujemo encim hipoksantin/gvanin fosforibozil transferazo (HGPRT), ali pa encim adeninfosforiboziltransferazo (APRT). Potrebujemo dušikovo bazo (npr. hipoksantin), aktivirano ribozo (PRPP) in ustrezne encime (HGPRT ali APRT).

Reciklažna pot je v nekaterih celicah bolj pomembna kot v drugih - v eritrocitih ni možna de novo sinteza, zato so odvisni od reciklažne poti.

Prednosti reciklažne poti:

- ne nastane preveč sečne kisline, ki je lahko za organizem toksična
- biosinteza nukleotidov je energijsko potraten proces; z reciklažno potjo se prihrani veliko energije

Bolezni, povezane z razgradnjo purinskih nukleotidov

- protin (putika, gout); v telesu nastane preveč sečne kisline, ki je slabo topna in se bo lahko nabirala v tkivih ali sklepih. V velikem številu primerov se protin začne tako, da pride do vnetja sklepov, predvsem prst na nogi (topnost snovi je odvisna od temperature; deli, ki so najbolj oddaljeni, so bolj mrzli, zato tam raje pride do kristalizacije). Nastane lahko iz različnih razlogov (nastaja preveč sečne kisline zaradi povečane aktivnosti PRPP-sintetaze ali zaradi zmanjšane aktivnosti HGPRT).
- Lesch-Nyhanov sindrom; močna hiperurikemija, pride do mentalne zaostalosti

Predavanje 37; 14. 12. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

PROTIN (putika)

1. povečana aktivnost PRPP sintetaze

Aktivnost se poveča, poleg tega encim lahko neha odgovarjati na signale končnih produktov, ki bi encim morali inhibirati. Tako nastaja več PRPPja, ta pa je pozitiven modulator PRPP amidotransferaze. Pospeši se biosintezna pot de novo.

2. okvara HGPRT

Kadar je aktivnost encima zmanjšana, takrat nastopi protin. Ko pa je aktivnost zelo zmanjšana oz. je skoraj ni, potem govorimo o Lesch-Nyhanovem sindromu.

Če encim ne deluje se baze ne bodo porabljale in jih bo več šlo v smeri razgradnje proti sečni kislini. Nastalo bo več PRPPja, ta pa spet stimulira amidotransferazo.

Zdravljenje putike

- skušamo blažiti vnetje
- povečamo odstranjevanje sečne kisline preko ledvic
- preprečimo pretirano sintezo sečne kisline

Uporablja se zdravilo alopurinol. To je strukturni analog hipoksantina (zelo sta si podobni). V

nastanku sečne kisline je pomemben encim ksantin oksidaza - alopurinol je negativni modulator (inhibitor) ksantin oksidaze. Posledica njegovega delovanja bo zmanjšano nastajanje sečne kisline in večje nastajanje ksantina in hipoksantina; ta dva sta bolj topna.

2. SINTEZA PIRIMIDINSKIH RIBONUKLEOTIDOV

Kot donor dušika nastopata glutamin in aspartat. Začetek sintezne poti je reakcija med aspartatom in karbamoil fosfatom. Tega smo spoznali že pri ciklusu uree.

Sinteza karbamoilfosfata

Reakcija s karbamoil fosfat sintetazo 1 - vir dušika je amoniak, reakcija poteka v mitohondrijskem matriksu. Pri reakciji s karbamoilfosfat sintetazo 2 pa je vir dušika glutamin, biosinteza poteka v citosolu. Encim karbamoilfosfat sintetaza 1 potrebuje N-acetilglutamat za svojo aktivnost.

Potek biosinteze pirimidinskih nukleotidov

Najprej poteče reakcija s karbamoilfosfat sintetazo 2, dobimo karbamoil fosfat. V naslednji stopnji poteče reakcija z aspartatom, dobimo karbamoil aspartat (encim aspartat transkarbamoilaza). Sledi več stopenj, v katerih nastane orotat. Ta se združi s PRPP in dobimo OMP. Z UMP sintazo dobimo UMP (ta encim ima dve aktivnosti, transferazna in dekarboksilazna). Iz UMPja dobimo UTP, potem pa iz tega CTP.

Uravnavanje biosinteze pirimidinskih nukleotidov

Glavna regulatorna stopnja je na ravni karbamoilfosfat sintetaze 2. Encim je uravnavan s končnimi produkti, kot negativna modulatorja nastopata UTP in UDP. Kot pozitivni modulator nastopa ATP; če je koncentracija ATP v celici visoka potem je energijsko stanje ugodno, zato lahko poteka energetsko zahtevna sinteza. Poleg tega je ATP purinski nukleotid, tako se uravnava razmerje med pirimidinskimi in purinskimi nukleotidi. Proces stimulira tudi PRPP, ker ga v biosintetski poti potrebujemo, zato stimulira biosintezo, ko ga je dovolj. Na ta način se prepreči kopičenje PRPP-ja in se ta porabi.

Razgradnja pirimidinov

Po tem ko se pirimidinski nukleotidi sintetizirajo se porabijo v različnih procesih. Tudi pri njih obstaja metabolično obračanje - ves čas teče sinteza in razgradnja. Če se razgrajujejo nukleinske kisline pride najprej do razgradnje do ustreznih nukleotidov. Te se pretvorijo v ustrezne nukleozide in te naprej v ustrezne baze. Razgradnja pirimidinskih nukleotidov je drugačna kot razgradnja purinskih nukleotidov - pri razgradnji pirimidinskih nukleotidov se obroč lahko odpre, dobimo manjše produkte (beta alanin, CO₂, amoniak), medtem ko se pri purinskih nukleotidih obroč ni mogel odpreti, zato je lahko nastajal toksičen, slabo topen produkt (sečna kislina).

Motnje v de novo pirimidinski biosintezi lahko privedejo do bolezni - Orotska acidurija

Gre za okvaro v genu za UMP sintazo. To je encim, ki ima dve encimski aktivnosti in omogoči,

da iz orotata in PRPP dobimo UMP. Encimski aktivnosti sta orotat fosforiboziltransferaza in OMP dekarboksilaza.

Če je encim premalo aktiven oz. neaktiven, potem se bo kopičil substrat, v tem primeru orotat. Znaki so anemija in motnje v rasti. Zdravimo z dodajanjem uridina in citidina, ker te nastopajo kot negativni modulatorji karbamoilfosfat sintetaze 2 in je zavrta de novo sinteza pirimidinskih nukleotidov.

Predavanje 38; 14. 12. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

BIOSINTEZA DEOKSIRIBONUKLEOTIDOV

Najprej se sintetizirajo ribonukleotidi, iz njih nato v procesu redukcije nastanejo deoksiribonukleotidi. Ribonukleotidi nastanejo v de novo ali v reciklažni poti.

Treba je reducirati ribozo na mesto 2 - iz OH dobimo H. Encim, ki reakcijo katalizira, se imenuje ribonukleotid reduktaza. Reducirajo se nukleotidi na ravni difosfata - nukleozid difosfati vstopajo v reakcijo z ribonukleotid reduktazo. Na razpolago imamo ADP, GDP, UDP in CDP, iz njih dobimo ustrezne deoksiribonukleotide. Potrebujemo tudi NADPH; gre za posreden prenos elektronov do substrata, o tem kasneje.

Timin nastane nekoliko drugače - iz dUMP v reakciji s timidilat sintazo dobimo dTMP.

Prenos elektronov z NADPH do ribonukleotid reduktaze (RNR)

Vir elektronov je NADPH, elektroni morajo priti do nukleotid di fosfata, ki se reducira v deoksinukleotid di fosfat. RNR ima v svoji strukturi SH skupine.

Potek prenosa elektronov: Prva možnost - NADPH reducira oksidirani glutation (GSSG), dobimo dve molekuli reducirane glutationa. Glutation nato reducira glutaredoksin, reducirani glutaredoksin pa potem reducira ribonukleotid reduktazo.

Druga možnost - donor elektronov je spet NADPH. Reducira se tioredoksin, ta v reducirani obliki reducira ribonukleotid reduktazo.

Značilnosti encima RNR

Zgrajen je iz štirih podenot (dimer - dve enoti sta si enaki). Katalitsko mesto je med R1 in R2 podenoto, v njem je tirozinski ostanek z radikalom in pa SH skupine. Na katalitsko mesto bo moral vstopiti substrat.

Vsaka od podenot ima dve vezavni mesti. Eno od njih omogoča uravnavanje aktivnosti encima, drugo pa omogoča uravnavanje specifičnosti encima. To je pomembno zato, ker je več substratov za ta encim - štirje. Vsak od njih lahko vstopi v reakcijo redukcije, vendar pa je pomembno, da so deoksiribonukleotidi v celici v določenem razmerju, saj če bi bilo enega dosti več kot drugega, potem bi bila večja možnost, da se polimeraza zmoti pri podvojevanju DNA. Potrebujemo torej nek način uravnavanja, kateri ribonukleotid se bo reduciral.

1. uravnavanje aktivnosti; ne glede na substrat bo encim bolj aktiven, če se na to mesto veže ATP in manj aktiven, če se veže eden od produktov (deoksi nukleotid; npr. dATP).

2. uravnavanje specifičnosti; različni nukleotidi uravnavajo afiniteto za druge substrate; primer: ATP aktivira redukcijo CDP in UDP. Nukleotid, ki se veže na to mesto, torej lahko pospeši redukcijo enega in inhibira redukcijo drugega nukleotida.

Nastanek timinskega nukleotida

Nastane iz dUMP. Večina nukleotidov nastane z redukcijo na ravni **difosfatov**, medtem ko timinski nukleotid nastane iz deoksiribonukleotid**monofosfata**. Reakcijo katalizira encim timidilat sintaza. Na uracilu mora poteči metilacija, donor je metilentetrahidrofolna kislina.

dTMP lahko dobimo iz UDPja, ki se pretvori v dUDP in nadaljno v dUMP. Druga možnost pa je, da dUMP dobimo iz dCMP, v tem primeru mora poteči deaminacija, potreben je encim, ki se imenuje deaminaza. Odcepi se amoniak in dobimo dUMP; tudi ta proces je uravnavan - dCTP stimulira proces, dTTP pa ga inhibira.

Encim se imenuje timidilat sintaza, potreben pa je koencim N5, N10 metilen tetrahidrofolna kislina. V reakciji dobimo dihidrofolat, ki se mora nazaj pretvoriti v metilen tetrahidrofolno kislino. To poteče tako, da se dihidrofolat najprej reducira do tetrahidrofolata, vir elektronov je NADPH, encim pa je dihidrofolat reduktaza. Potem pa je treba dodati še C atom, ta pride od serina, ki se ob tem pretvori v glicin; encim je serin-hidroksimetil transferaza. V tem procesu dobimo N5, N10 metilentetrahidrofolat.

Inhibicija encimov nukleotidnega metabolizma

Te inhibitorji preprečujejo sintezo DNA, zato so zelo škodljivi za naš organizem. Lahko pa bi jih uporabili pri rakastih obolenjih - rakaste celice se hitro delijo, zato se potrebuje več substratov za sintezo DNA in je pospešena sinteza nukleotidov. Cilja se na to, da se bo veliko bolj škodovalo tumorskim celicam kot zdravim, čeprav bomo zdrave tudi poškodovali.

Inhibitorje delimo v tri skupine:

1. antifolati, strukturni analogi folne kisline. Primer je metotreksat, deluje na ravni dihidrofolat reduktaze. Ker je ta encim inhibiran se ne bo mogel regenerirati dihidrofolat.
2. antimetaboliti, strukturni analogi purinskih in pirimidinskih baz. Pretvorijo se v ustrezne nukleotide in inhibirajo reakcijo na ravni timidilat sintaze - direktno reakcijo, ki omogoča nastanek dTMP. Primer je 5-fluorouracil.
3. antagonisti glutamina, primer je azaserin, ki je podoben glutamin in ga inhibira v reakcijah, kjer je glutamin donor dušika; delujejo torej na različnih ravneh

Sulfonamidi tudi vplivajo na metabolizem folne kisline. Bakterije imajo, za razliko od človeka, sposobnost, da folno kislino sintetizirajo sami. Folna kislina je iz treh gradnikov - osrednji del predstavlja paraaminobenzojeva kislina (PABA). Sulfonamidi so kompetitivni inhibitorji encima dihidropteroat sintaze, zato folna kislina ne bo mogla nastajati; sulfonamidi pa na človeka ne bodo vplivali, ker ljudje folno kislino tako ali tako morajo dobiti s hrano.

Bolezni kot posledica okvar v purinskem metabolizmu

- protin
- Lesch-Nyhanov sindrom
- imunska pomankljivost; SCID (severe combined immunodeficiency). Do te bolezni med

drugim lahko privede mutacija v genu za encim ADA (adenozin deaminaza). Posledica okvare tega encima je kopičenje intermediatov pred to reakcijo, v tem primeru se bo povečala koncentracija dATP. To je edina možna pot za razgradnjo dATP, zato ga celica na noben način ne bo mogla odstranjevati. Povišana koncentracija dATP inhibitorno deluje na ribonukleotid reduktazo, kar pomeni, da se ne morejo tvoriti ustrezni deoksiribonukleotidi in se ne more tvoriti DNA. Poleg tega je metabolit dATP toksičen za limfocite in pride do okvare imunskega sistema.

Klinični primer

Pri von Gierkejevi bolezni pride do prekomerne sinteze sečne kisline. Bolezen povzroči prirojeno pomanjkanje glukoza-6-fosfataze.

Glukoza-6-fosfataza odceplja fosfat, torej sprošča prosto glukozo iz jeter v kri. Zato v jetrih ostaja več glukoze-6-fosfata in je bo več vstopalo v metabolne poti tega substrata, tudi v fosfoglukonatno pot. Posledično bo nastalo več riboze-5-fosfata in zato bo lahko nastalo več PRPPja. PRPP je pozitivni modulator glutamin amidotransferaze (encim, ki omogoči reakcijo med PRPP in glutaminom in omogoči, da dobimo prvi dušik bodočega purinskega obroča) zato je pospešena sinteza nukleotidov. Ker nastane več nukleotidov, kot jih potrebujemo, se tudi hitreje razgrajujejo in nastane več sečne kisline.

V jetrih bo glikogen nastajal, uspešna razgradnja tega pa ne bo mogla potekati, ker ne pridemo do končnega produkta (glukoze), zato bo zavrta in v jetrih bo povečana količina glikogena in jetra bodo povečana. Motena bo tudi glukoneogeneza, ker tudi pri njej dobimo glukoza-6-fosfat in ključno je, da se ta glukoza defosforilira, saj drugače ne more priti v kri. Pričakujemo torej motnje v homeostazi glukoze.

Predavanje 39; 15. 12. 2011 / Ana Plemenitaš

PRIDOBIVANJE METABOLNE ENERGIJE

Acetil koencim A lahko nastane iz aminokislin, ogljikovih hidratov in maščob. Vstopa v biosinteze maščob, ketonskih spojin... ne moremo pa iz njega dobiti ogljikovih hidratov, ker je pri človeku reakcija iz piruvata v acetil-CoA izrazito ireverzibilna.

Večina metabolnih procesov je uravnavana tako, da je raven glukoze v krvi v ravni med 3,6 in 6,1 mmol. Glukozo zaužijemo z ogljikovimi hidrati, ko pa hrane ne dovajamo so jetrne celice ključne za vzdrževanje ravni glukoze v krvi. Iz odvečne glukoze delamo maščobe, ki se skladiščijo v adipocitih.

Aminokisline pa so absolutno najvažnejši donator ogljikovih atomov v procesu glukoneogeneze, torej ko ne zaužijemo dovolj ogljikovih hidratov in nam zmanjka glikogena.

Pregled metabolnih procesov po tkivih

- jetrno tkivo je iz vidika metabolizma osnovno tkivo. V njih poteka glikogeneza (delamo glikogen iz ogljikovih hidratov, ki smo jih zaužili s hrano), glikogenoliza (takrat, ko ne dobivamo glukoze iz hrane, je to neposredni vir glukoze), glukoneogeneza (proizvajanje glukoze iz drugih molekul; poteka tudi v ledvicah pri dolgotrajnem stradanju. Za glukoneogenezo potrebujemo

energijo), lipogeneza (odvečni ogljikovi hidrati in maščobne kisline gredo v sintezo triacilglicerolov), lipoliza (ko ne dovajamo hrane so lahko triacilgliceroli vir maščobnih kislin, ki vstopijo v beta oksidacijo), beta oksidacija (pridobivanje energije iz maščobnih kislin, energijo potrebujemo za glukoneogenezo), ketogeneza (ob še podaljšanem stradanju sintetiziramo ketonske spojine, ki so predvsem pomembne za možgane, saj te ne morajo koristiti maščobnih kislin). Včasih v jetrih poteka tudi glikoliza, vendar zelo malo.

- maščevje; ključna je lipogeneza, torej biosinteza triacilglicerolov, bodisi iz eksogenih virov (maščobni obrok - kilomikroni lipide prenesejo do maščevja) bodisi endogenih virov. Poleg tega poteka lipoliza (razgradnja triacilglicerolov), ko potrebujemo energijo.

- mišice (skeletne in srčne), skladiščenje glukoze v obliki glikogena ima za samo mišico velik pomen, za razliko od jeter, ki glikogen delijo s celotnim telesom - mišica glikogen razgrajuje takrat, ko na hitro potrebujemo energijo (mišično delo). Poteka torej glikogeneza, glikogenoliza, glikoliza in beta oksidacija maščobnih kislin.

Tudi če ne stradamo vedno nastaja nekaj ketonskih spojin v jetrih. Porabi jih srčna mišica (ta mišica uporablja vse možne vire za energijo; celo laktat!). Možgani pa, za razliko od srčne mišice, trošijo ketonske spojine šele pri dolgotrajnem stradanju. To pa zato, ker je potrebna večja koncentracija ketonskih spojin, da pridejo v možgane, medtem ko pridejo v srčno mišico že ob nizkih koncentracijah (različni transporterji).

Glukagon in inzulin uravnavata krvno glukozo

Tkiva imajo receptorje, ki vežejo hormone. Te hormoni ukažejo, katera reakcija bo potekla, ker vplivajo na aktivnost različnih encimov. Glukagon in inzulin sta ključna za raven glukoze v krvi. Kadar je glukoze v krvi preveč jo je treba spraviti v tkivo, kjer se skladišči. Ko pa je glukoze v krvi premalo se mora sprostiti iz zaloga. Na to vplivata glukagon in inzulin. Receptor za glukagon je povezan z G proteini, receptor za inzulin pa tirozinska kinaza.

Če je v krvi veliko glukoze, jo je treba čimprej iz krvi spraviti v tkiva. Transport poteka preko transporterjev družine GLUT, med seboj pa se posamezni transporterji razlikujejo. V nekaterih tkivih je transport glukoze neodvisen od inzulina (eritrociti, možgani, jetra; GLUT-1 in GLUT-2 transporter), v nekaterih tkivih pa je transport glukoze odvisen od inzulina (skeletna mišica, maščevje; GLUT-4 transporter).

Pomembno je, da so glukozni transporterji na eritrocitih in možganih neodvisni od inzulina, saj bi drugače pri diabetesu vsi pacienti pomrli. Tako pa lahko možgani in eritrociti privzamejo glukozo neodvisno od hormonskega signala. Pri eritrocitih je to pomembno, ker je edino gorivo za njih glukoza.

Tudi v jetrih inzulin vpliva na dogajanje z glukozo, vendar pa so transporterji neodvisni od inzulina.

Inzulin in glukagon uravnavata metabolizem hranil

Ne uravnavata le metabolizem glukoze. V krvi sta vedno prisotna oba hormona. Ko dodajamo hranila se poveča sproščanje inzulina in razmerje se pomakne k inzulinu. Ta hormon vzpodbuja metabolne procese, ki glukozo lahko izrabljajo (oksidacijo glukoze, sintezo glikogena, sintezo maščob in sintezo proteinov). Po nekaj urah pa raven glukoze pade. To spet zaznajo celice

pankreas in začne sproščati več glukagona; ta bo spodbujal tiste procese, ki bodo skrbeli za to, da se bodo ostala tkiva lahko prehranjevala (glikogenolizo, glukoneogenezo in ketogenezo).

Adiponectin

Najpomembnejša hormona za metabolizem sta inzulin in glukagon; imamo tudi adrenalin in kortizol, ki se sproščata ob stresu. Adiponectin pa je hormon, ki ga izločajo maščobne celice. Je peptid, ki se sprosti, ko imamo dovolj maščobnih zalog in deluje preko AMPK (od AMP odvisna kinaza); ta kinaza je pomembna v mišičnih in jetrnih celicah. Če je ta kinaza aktivna se bo povečal prizvem maščobnih kislin v mišicah. V jetrih se bo začela glikoliza - imamo dovolj maščobnih zalog, poleg tega je AMP indikator, da je potrebna energija. Glukoneogeneza in sinteza maščobnih kislin pa bosta zavrti.

AMPK fosforilira encime; s tem jih v določenih primerih aktivira, v drugih inhibira.

Biosinteza in razgradnja maščobnih kislin je uravnavana na različnih ravneh. Biosinteza poteka v citosolu, razgradnja v mitohondrijih. Če želimo maščobno kislino present v mitohondrije potrebujemo prenašalni sistem. Encim acetil-CoA karboksilaza (ki ga tudi inhibira AMPK) je prvi encim v biosintezi maščobnih kislin, pri reakciji z njim nastane malonil-CoA, ki ovira prehod maščobnih kislin v mitohondrije. Če torej zavremo acetil-CoA karboksilazo potem ne bo malonil-CoA in bodo maščobne kisline lahko vstopile v mitohondrije - potekala bo beta oksidacija.

Dodatne vloge jetrnega tkiva

- izločanje dušika in drugih končnih produktov (holesterol se izloča kot žolčne kisline, prav tako se izloča bilirubin)
- detoksifikacija spojin, ki jih uvajamo od zunaj (etanol, zdravila, druge molekule, ki jih telo ne more uporabiti kot vir energije - ksenobiotiki)
- iz obtoka odstrani večino glukoze (2/3) in jo pretvori v glukoza-6-fosfat z encimom glukokinazo (ta izooblika heksokinaze nastopa samo v jetrih in deluje samo takrat, ko imamo veliko glukoze). Na ta način zadržimo glukozo v jetrih, kjer lahko gre v zelo raznolike procese; eden od najpomembnejših je skladiščenje v obliki glikogena (iz glukoze-6-fosfata najprej dobimo glukoza-1-fosfat, potem se ta poveže z UDP, ker je substrat za glikogen sintazo UDP-glukoza). Del glukoze gre v fosfoglukonatno pot; to je pomembno, ker v tej poti dobimo NADPH.

Glukoneogeneza

Je izjemno pomembna - poteče že ponoči, ko ne dovajamo hranil. To je biosinteza glukoze iz dveh piruvatov, ta pa lahko nastane iz različnih poti (aminokislin, laktata).

So različni načini uravnavanja. Jetra so ključna tudi v metabolizmu maščob. V njih poteka biosinteza VLDL (v sitem stanju). Ob stradanju pa se iz maščob ne sintetizirajo VLDL ampak ketonske spojine.

Lipoprotein lipaza na membranah endotelnih celic razgradi triacilglicerole v proste maščobne kisline, ki grejo v mišice in v adipocite. S tem, ko so delci VLDL oddali večino triacilglicerolov, dobimo IDL. Ko izgubimo večino apolipoproteinov (razen B100) dobimo LDL delce; te so ključni za transport holesterola v celice.

TKIVNI METABOLIZEM

JETRA

- Ogljikovi hidrati se skladiščijo v jetrnem tkivu. Jetra lahko glukozo, ki se sprošča ob razgradnji glikogena, deli z ostalimi tkivi. Zato je jetrno tkivo ključno za homeostazo glukoze. - Ključna je tudi glukoneogeneza v jetrih (poteka tudi v ledvicah, vendar je tam pomembna le v obdobju stradanja).
- Jetra so pomembna pri metabolizmu maščob - triacilglicerolov. V njih poteka biosinteza maščobnih kislin iz odvečnih metabolnih substratov.
- Pomembna so tudi za metabolizem aminokislin, predvsem ciklus uree - jetra so najpomembnejše tkivo za odstranjevanje dušika preko ciklusa uree. V jetrih se tudi sintetizirajo albumin, globulini in nekateri dejavniki strjevanja krvi.
- Detoksifikacija endogenih in eksogenih spojin, ki bi bile toksične, če bi jih kopičili v telesu.

Sinteza in izločanje žolčnih kislin

Sinteza žolčnih kislin poteka v jetrnih celicah. Imajo dodatne OH skupine, kar jim poveča hidrofiliteto (topnost v vodi). V biosintezi je ključna hidroksilacija na mestu 7. Ker uvedemo OH skupino gre za citokrome p450 (monooksigenaze; potrebujemo molekularni kisik, en atom tega kisika se vgradi v substrat, drugi se izloči v obliki vode). Poleg tega pride še do modifikacij na stranski verigi.

Žolčne kisline svojo hidroksilno skupino ne pustijo prosto, ampak pride do konjugacije z aminokislino. Z njo se lahko povežeta glicin ali taurin (aminokislina, ki nastane iz cisteina). Soli žolčnih kislin se po sintezi izločajo v žolč z ABC transporterji. Razmerje med lipidi v žolču mora biti pravilno; če se poruši (zlasti med fosfolipidi in holesterolom) lahko pride do žolčnih kamnov.

V črevesju pride s pomočjo črevesnih bakterij do nekaterih sprememb; dekonjugacije (odstranitev aminokislina) in dehidratacije. Večina teh žolčnih kislin se nato reabsorbira; to je **enterohepatično kroženje žolčnih kislin**. Danes obstajajo zdravila, ki preprečijo enterohepatično cirkulacijo; s svojim pozitivnim nabojem se vežejo na negativno nabite soli žolčnih kislin - če soli žolčnih kislin odstranjemo se bo večji delež holesterola porabil za sintezo novih žolčnih kislin, vendar na ta način lahko zmanjšamo raven holesterola za največ 10 %. Celice namreč sintetizirajo več holesterola kadar ugotovijo, da ga 'primanjkuje'.

Biosinteza hema

Jetrne celice so pomembna pri biosintezi hema in odstranjevanju produkta, ki nastane ob razgradnji hema. Biosinteza hema pa poteka tudi v eritrocitih. Hem najdemo v citokromih in v hemoglobinu v eritrocitih. Nasintetizira se iz glicina in sukcinil-CoA preko raznih porfirinskih substanc, potrebnih je cela vrsta encimov - zato je tudi dosti možnosti, da je kakšen od teh encimov okvarjen ali manj aktiven.

Glavna regulatorna stopnja je sinteza aminolevulininske kisline z encimom ALA sintazo.

Razgradnja hema

Hem se razgradi s pomočjo hem oksigenaze; nastane biliverdin, ta se reducira do bilirubina. Bilirubin se, vezan na albumin, prenese do jetrnih celic. Tam so transporterji, ki prenesejo bilirubin v jetrne celice.

V procesu konjugacije so zelo pomembni encimi **bilirubin glukuronil transferaze**; pretvorijo bilirubin v topno obliko, da se lahko izloči iz telesa.

V jetrih poteka tudi **inaktivacija steroidnih hormonov**. Hormoni so način prenašanja signala, vemo pa, da je treba ta signal tudi prekiniti. To dosežemo tako, da se ligand pretvori v obliko, v kateri nima več hormonske aktivnosti (peptidi se razgradijo s peptidazami,...).

Kar pa se tiče **detoksifikacije** imajo v jetrih najpomembnejšo vlogo citokromi p450. Te encimi so locirani v endoplazemskem retikulumu. Gre za inducibilne encime - če ni potrebe po njih, potem ne bo potekala njihova sinteza.

Reakcija s citokromi p450 (pomembno!): $X-H + O_2 \rightarrow X-OH + H_2O$; je tipičen primer monooksigenaz. Vstopi kisik, en atom se vgradi v substrat, drugi pa se pretvori v vodo. Če želimo dobiti vodo potrebujemo redukcijske ekvivalente, v tem primeru **NADPH** (potrebujemo ga veliko, zato je pomembna fosfoglukonatna pot, ki poteka v jetrnih celicah in oskrbuje jetra z NADPH!).

Citokromov p450 je veliko; različni citokromi se vključujejo v različne reakcije. Niso pomembni zgolj pri detoksifikacijah.

Med citokromi p450 so zelo pogosti polimorfizmi - individualne razlike v aktivnosti in količini izražanja citokromov p450. To je pomembno, ker so citokromi p450 povezani z detoksifikacijo (odstranjevanjem) zdravil, zato bo doziranje zdravila ključno glede na aktivnost encima. Če je encim zelo aktiven potem moramo dati večjo dozo, da bo sploh kakšen učinek, če pa je encim premalo aktiven, potem lahko prehitro predoziramo.

Prva faza detoksifikacije je **uvedba OH skupine**, ker ta lahko reagira z veliko spojinami in tvori konjugat. Druga faza je **konjugacija**, pride do vezave glukuronske kisline, sulfatne skupine, glutationa,... lahko pride tudi do metilacij (donor pogosto S-adenozil metionin) ali acetilacij.

Etanol

Jetrne celice etanol prepoznajo kot strup in ga razgradijo. Sodelujeta alkohol dehidrogenaza in aldehid dehidrogenaza. Prisoten je tudi MEOS (mikrosomalni etanol oksidirajoči sistem; tisti, ki deluje pri večjih dozah alkohola), ki troši citokrome p450, zato se vmešava tudi v detoksifikacijo zdravil.

MIŠICA

Mišica lahko troši različna goriva - glukozo, ketonska telesa, maščobne kisline,... v njej lahko poteka tudi anaerobni metabolizem, torej lahko pridobivamo energijo tudi ob primanjko vanju kisika. Posledica anaerobnega metabolizma je nastanek laktata.

Tudi v mišici poteka skladiščenje glukoze v obliki glikogena, vendar pa se tu skladišči za lastne

potrebe. Glavna oblika skladiščenje energije pa je v obliki fosfokreatina - vendar pa je te zaloge zelo malo, dovolj za okoli štiri sekunde.

Poznamo dva glavna **tipa mišičnih vlaken**:

- **tip I** so počasna rdeča mišična vlakna. Rdeča barva pride od železa. Ta vlakna imajo veliko mitohondrijev in veliko mioglobina. V njih poteka aerobni (oksidativni) metabolizem, zato se ta vlakna ne utrudijo tako hitro, je pa ta metabolizem počasnejši.

- **tip II** so bela, glikolitična mišična vlakna. Imamo manj mitohondrijev in manj mioglobina, ker vlakna niso tako odvisna od kisika - poteka predvsem anaerobni metabolizem, vendar samo nekaj časa. Ne more potekati v nedogled, ker bi bilo laktata preveč. Ta vlakna imajo velik sarkoplazemski retikulum, kjer se skladiščijo kalcijevi ioni. Ta vlakna se hitro utrudijo.

Metabolni procesi, ki potekajo v mišici

- Mišica lahko uporablja glukozo, ki se bodisi razgradi do CO₂ in vode, bodisi pretvori v laktat. V tem primeru pride v poštev Corijev cikel, pri katerem se mlečna kislina v jetrnih celicah spet pretvori v piruvat, ki lahko gre v glukoneogenezo. Gre torej za kroženje glukoze in laktata.

- Kreatinfosfat se pri krčenju mišice pretvori v kreatin in iz ADPja dobimo ATP - to je najhitrejši način pridobivanja ATP.

Metabolizem v mišici - hitro pridobivanje energije

V mišicah je poznana miokinaza (adenilat kinaza). Ta iz dveh ADPjev naredi ATP in AMP. Ta AMP se pogosto deaminira v IMP in izloči iz telesa.

V mišicah je tudi kreatin kinaza, ki iz kreatinfosfata in ADPja naredi kreatin in ATP. Kadar potreb po energiji ni pa se lahko iz ATP in kreatina spet tvori kreatinfosfat in se energija na ta način skladišči.

Za mišice je tudi značilno **intenzivno obračanje mišičnih proteinov**. Gre za razgradnjo in ponovno sintezo proteinov, procesa pa sta nadzorovana. Nadzorovana sta že s stanjem sitosti, ključna hormona pa sta inzulin (preprečuje razgradnjo mišičnih proteinov) in kortizol (stresni hormon, deluje predvsem kadar dolgo časa ne zaužijemo hrane in potrebujemo aminokislino). Zato v mišičnih celicah vspodbuja razgradnjo proteinov s procesom ubikvitinacije, v jetrih pa spodbuja glukoneogenezo).

Glukoza alaninski cikel

Povezan je z obračanjem proteinov in z glukoneogenezo. Proteini se razgradijo v različne aminokislino, ne sprostijo se vse v kri, ampak je primerna aminokislina alanin.

Vpliv inzulina na mišične celice

Vzpodbuja privzem glukoze, biosintezo glikogena, glikolizo. Inhibira glikogenolizo, poleg tega inhibira proteolizo (zato je zelo pomembno razmerje med inzulinom in kortizolom!).

Atrogeni

Poleg inzulina, ki je ključni metabolni hormon, razni peptidi vplivajo na uravnavanje metabolnih procesov - atrojeni. To so peptidni ligandi, ki imajo na površini celic svoje receptorje in vplivajo

na različne procese:

- inducirajo gene, vključene v razgradnjo proteinov (kortizol, atrogini). Kortizol ima receptor znotraj celice, atrogini pa imajo receptorje na celičnih površinah.
- preprečujejo izražanje genov, ki so udeleženi v produkcijo energije
- preprečujejo izražanje genov, ki kodirajo proteine ekstracelularnega matriksa
- aktivirajo stresne odgovore

SRČNA MIŠICA

To je izrazito aeroben organ. Približno polovico volumna citoplazme predstavljajo mitohondriji. Glavno gorivo so maščobne kisline, kadar ni stradanja lahko uporablja tudi ketonska telesa. Imajo manj glikogena kot skeletne mišice (nekaj ga vseeno je) in malo fosfokreatina. Lahko koristijo tudi laktat.

MOŽGANI

Tudi možgani so izrazito odvisni od kisika. Tu se glukoza ne skladišči v obliki glikogena ampak se kar naprej metabolizira. Odvisni so od glukoze, predsvem zato, ker lahko uporabljajo samo kratkoverižne maščobne kisline (dolgoverižne ne pridejo v možganske celice), ob dolgotrajnem stradanju pa lahko koristijo tudi ketonske spojine.

Možgani porabljajo energijo, ker kar naprej nastajajo novi nevrotransmiterji. Metabolizem aminokislin je v njih zelo intenziven.

Ko astrociti prevzamejo glukozo iz krvi, se ta pretvori v laktat. Ta gre v nevrone, te pretvorijo laktat v piruvat, iz katerega dobimo energijo v obliki ATP.

Pri dolgotrajnem stradanju se pospešeno razgrajujejo maščobne kisline. Teh možgani ne morejo uporabljati; uporabljajo pa ketonske spojine, ki nastanejo v jetrih. Jetra jih ne uporabljajo, ker ni prisotnega encima, ki bi iz acetoacetata in sukcinil-CoA naredil acetoacetyl-CoA. V možganih pa je ta encim (sukcinil-CoA transferaza) zelo aktiven.

MAŠČEVJE

Ni le tkivo, kjer se shranjujejo zaloge maščob, ampak je tudi pomembno za produkcijo peptidov, ki uravnavajo telesni metabolizem. Metabolična aktivnost adipocitov je zelo visoka; triacilgliceroli se obračajo (razgrajujejo in ponovno sintetizirajo) na nekaj dni.

V adipocite prihajajo maščobe, ki jih pojemo in tiste, ki prihajajo iz drugih spojin. Lipoprotein lipaza razgrajuje triacilglicerole, proste maščobne kisline se privzamejo v maščobne celice.

Inzulin je pomemben tudi za metabolizem v maščevju. Stimulira privzem glukoze (na maščobnih celicah imamo GLUT-4 transporterje, tako kot na mišičnih celicah, torej so odvisni od inzulina). Stimulira privzem glukoze in glikolizo - to je pomembno! Substrat za biosintezo

triacilglicerolov je glicerol-3-fosfat, ki ga dobimo iz dihidroksiaceton fosfata; zato torej inzulin spodbuja glikolizo, ker brez nje ne bi dobili dihidroksiaceton fosfat.

Endokrina vloga adipocitov

Leptin, rezistin in adiponektin so ključni v metabolizmu hranil.

- Leptin uravnava apetit; možganom daje signal, da smo siti in ni treba več dovajati hrane.
- Rezistin zmanjša občutljivost za inzulin.
- Adiponektin ima receptor na jetrnih celicah, kjer aktivira oz. zavira cel kup encimov.

LEDVICA

Glutamin ima tu vlogo uravnavanju pH, če pride do acidoze. Poleg tega so ledvice pomembna pri proizvodnji eritropoetina in kalcitriola (aktivne oblike vitamina D). Kalcitriol nastane iz holesterola, pod vplivom UV svetlobe pride do odprtja obroča. Potem se mora še na dveh mestih hidroksilirati. Vpliva na nivo kalcija in fosfata v naših celicah.

Drugi pomemben protein, ki tudi nastaja v ledvičnih celicah, je **renin**. To je proteaza, ki tvori angiotensin 2; ta ima pomembno vlogo pri reabsorpciji natrijevih ionov. Če je njihova koncentracija manjšna se angiotensin veže na svoj receptor (povezan z G proteini), aktivira fosfolipazo C in sprosti triacilglicerol in inositol-3-fosfat. Posledica je sprostitvev kalcijevih ionov, te aktivirajo protein kinaze, ki fosforilirajo tarčne proteine. Končna posledica pa je povečana sinteza **aldosterona**, to je steroidni hormon (mineralokortikoid), ki vpliva na reabsorpcijo natrijevih ionov.

ERITROCITI

V eritrocitih poteče anaerobna glikoliza, ker v njih nimamo mitohondrijev. Pri tem nastane laktat, ki se prenese do jetrnih celic. Pomembna je produkcija NADPH (fosfoglukonatna pot), saj v eritrocitih NADPH vzdržuje glutation v reducirani obliki, poleg tega se uporablja tudi pri biosintezi 2,3-bisfosfoglicerata, ki vpliva na hemoglobin in spremeni afiniteto do kisika.

V eritrocitih poteka tudi biosinteza hema, ker ga potrebujemo za hemoglobin.

Predavanje 41; 21. 12. 2011 / Marija Žakelj Mavrič

INTEGRACIJA METABOLIZMA

OSNOVNE NALOGE METABOLIZMA

- zagotavljanje metaboličnih goriv vsem celicam
- odstranjevanje odpadnih produktov
- zaščita organizma
- integracija procesov, ki v organizmu potekajo

1. Zagotavljanje metaboličnih goriv celicam

To funkcijo opravljajo maščevje, jetra, mišice, tanko črevo in pankreas (pomemben zaradi sproščanja hormonov). Pomembna metabolična goriva so glukoza (najpomembnejši), maščobne kisline, ketonske kisline in glutamin. Poleg tega moramo zaužiti še vodo, vitamine, minerale in esencialne aminokisline.

Glukoza je najbolj univerzalno metabolično gorivo, ki ga lahko uporabijo praktično vse celice. Precej manj uporabne so maščobne kisline, ki sicer dajejo več energije (so bolj reducirane), ampak jih ne morejo uporabiti vse celice. Za metabolizem maščobnih kislin je potreben kisik, poleg tega morajo biti prisotni funkcionalni mitohondriji (da poteka beta oksidacija maščobnih kislin).

Ketonska telesca lahko uporabljajo tudi možgani v posebnih situacijah.

Pomembno metabolično gorivo je tudi glutamin. Po uporabnosti se sicer ne more kosati z glukozo, če pa ga primerjamo z maščobnimi kislinami potem opazimo podobnost.

Zakaj je glutamin pomembno metabolično gorivo?

Je relativno majhna molekula ki nima naboja; to je pomembno za prehajanje preko membran. Je topna v plazmi. Metabolizem glutamina lahko poteka v različnih celicah in tkivih - v možganih (ciklus glutamina in glutamata), ledvicah, jetrih (amidni dušik se sprosti, vstopa v ciklus uree), celicah imunskega sistema, enterocitih.

Razgradnja glutamina (glutaminoliza) poteka v različnih tkivih do različnih produktov:

- v ledvicah je pomembno, da se sprosti amoniak, ki pomaga pri pufranju. Oksoglutarat (alfaketoglutarat) lahko vstopi v glukoneogenezo.

- v črevesni sluznici je končni produkt, ki se sprošča, alanin. To pomeni, da se glutamat ne bo razgradil do konca ampak samo delno. Alfaketoglutarat tokrat vstopi v Krebsov cikel, pretvori se v oksaloacetat, iz njega v fosfoenolpiruvat in naprej v piruvat. Pri tem se sproščajo reducirani koencimi in tako sistem dobi energijo.

- v celicah imunskega sistema spet nastopa glutamin kot substrat in se pretvori v alfaketoglutarat (oksoglutarat). Končni produkt pa ni alanin ampak aspartat. Alfaketoglutarat gre po mnogih reakcijah do oksaloacetata, ta se pretvori v aspartat.

Razgradnja glutamina torej poteka do različnih produktov, celice na ta način dobijo nekaj energije. Koncentracija glutamina v krvi je relativno visoka in se ne spreminja bistveno pod različnimi pogoji. Je reda velikosti koncentracije maščobnih kislin (z glukozo je ne moremo primerjati, ker je glukoze mnogo več). Glutamin večinoma prihaja iz mišic, v katerih se poleg proteinov nahaja tudi nekaj prostih aminokislin; od teh prevladuje glutamin. Kadar bodo torej pogoji takšni, da potrebujemo v krvi aminokisline, potem se bodo najprej sproščale proste aminokisline iz celic, šele za tem se bodo razgrajevali proteini.

Kadar koncentracija glutamina pade pod fiziološko, pride do težav - npr. slabo delovanje imunskega sistema. Zato v nekaterih kliničnih situacijah dodajajo glutamin v prehrano. Glutamin v telo lahko dobimo s hrano, ali pa ga sami sintetiziramo. Glavno mesto metabolizma aminokislin z razvejano stransko verigo so mišice. V mišicah lahko tudi iz glukoze dobimo

alfaketoglutarat; nanj se iz aminokislin z razvejano stransko verigo prenese amino skupina in dobimo glutamat, iz tega pa z glutamin sintetazo dobimo glutamin.

Zaloge metaboličnih goriv

Največje so zaloge triacilglicerolov. Glutamin pa se shranjuje v mišicah, vrednosti so nekatere primerljive s količino (zalogo) glikogena.

Kadar pride do metaboličnega pomanjkanja v telesu, takrat skuša organizem prvenstveno poskrbeti za možgane. Samozadostnost možganov je zelo slaba; proteinov, ki bi se lahko uporabljali, praktično ni, prav tako ni triacilglicerolov. Glikogena nekaj malega sicer je, vendar ta minimalna količina za praktično uporabo ne pride v poštev.

Povzetek

V procesih razgradnje so najpomembnejše reakcije oksidacije; to so tiste, ki dajejo energije. V vse te reakcije oksidacije pa kisik ne vstopa direktno, ampak se spojine reducirajo s pomočjo reduciranih koencimov, ki prinese elektron.

Nekatere metabolne poti se prepletajo preko pomembnih centralnih metabolitov

- glukoza-6-fosfat; dobimo ga lahko s fosforilacijo glukoze, ali pa se sam pretvori v glukozo (z defosforilacijo). Lahko vstopa v sintezo glikogena ali pa se pridobi z razgradnjo glikogena. Vstopa lahko v glikolizo ali pa nastane v procesu glukoneogeneze. Prav tako lahko vstopi v fosfoglukonatno pot, vendar pa ta veja ni reverzibilna.

- piruvat in acetil-CoA; piruvat lahko dobimo v procesu glikolize, vstopa lahko tudi v proces glukoneogeneze. Lahko se pretvarja v laktat, lahko ga dobimo iz laktata, reverzibilno se tudi pretvarja v alanin. Kadar teče proces pridobivanja energije se pretvori v acetil-CoA. Tega lahko dobimo iz ogljikovih hidratov, maščobnih kislin, ketonskih telesc in aminokislin (vseh - ketogenih in glukogenih!). Acetil-CoA je pomemben prekursor za biosintetske procese: ireverzibilna sinteza holesterola, reverzibilna sinteza ketonskih telesc, razgradnja do končnih produktov (CO₂).

- fosfatidat nastopa v biosintezi triacilglicerolov in biosintezi fosfolipidov.

- HMG-CoA nastopa pri sintezi ketonskih telesc in holesterola

- karbamoilfosfat nastopa pri sintezi sečnine in pirimidinskih nukleotidov

Če lahko gre nek metabolit v več različnih poti potem se bo za smer odločil glede na potrebe organizma, koncentracije alosteričnih modulatorjev, lokacije (v katerem tkivu poteka).

2. Odstranjevanje odpadnih produktov

Pri tem igrajo pomembno vlogo jetra in ledvica.

3. Zaščita organizma

V tej vlogi sodelujejo mišice (da se odstranimo iz nevarne situacije), kri (strjevanje), koža in sluznice (preprečujejo vdor tujkov), imunski sistem, jetra in ledvica (detoksifikacija).

4. Integracija procesov, ki v organizmu potekajo

To je zelo pomembno, ker nekateri organi delajo le zase, drugi pa so na voljo celemu telesu (jetra). Pomembno je, da te organi na nek način dobijo sporočilo, kakšne so potrebe (stanje) v organizmu. Tu igra pomembno vlogo centralni živčni sistem, ki je preko živčevja in hormonov povezan z ostalimi deli telesa.

Integracija ob stresu

Poveča se koncentracija kortizola, na katerega celice ustrezno odgovorijo in v krvi se poviša koncentracija sladkorja. To je pomembno, da imamo v stresni situaciji dovolj energije za reakcijo.

Telo bo osnovne naloge metabolizma skušalo opravljati tudi ob patoloških situacijah.

“I’ve never let my schooling interfere with my education” (Mark Twain)