

## VPRAŠANJA IN ODGOVORI ZA IZPIT BIOKEMIJE

### **Aminokislina, proteini: kaj so, njihove lastnosti, vpliv posamezne AK na protein, razdelitev AK po skupinah, metode za določevanje AK, metode za določevanje zaporedja AK, posamezne ravni in sestava proteinov.**

Aminokislina so kompleksne organske spojine z dvema funkcionalnima skupinama: amino ( $\text{NH}_3$ ) in karboksilno ( $\text{COOH}$ ) skupino. Na sobni temperaturi so bele kristalne snovi. Imajo visoko tališče, saj se združujejo z ionskimi vezmi, ki so precej močne. Njihova zanimiva značilnost je, da vsebujejo tako pozitivno kot negativno nabite dele in tako lahko tvorijo (sicer v različnih pogojih) + ali - ione. Takšne molekule imenujemo zwitterion oz. ion dvojček, obstajajo v raztopinah, pa tudi v trdni obliki. To jim omogoča, da lahko reagirajo kot kisline ali baze. So tudi kirali, kar pomeni, da imajo AK svoje zrcalne oblike. Obstajajo v dveh oblikah in sicer L-orientirane (amino skupina je na L strani kiralnega C atoma) in D-orientirane. Raztopine prevajajo električni tok.

Glede na strukturo radikalne skupine jih delimo na:

- Polarne, nabite - radikalna skupina je polarna, tvori vodikove vezi, kar jo naredi topno v vodi. Da so nabite pomeni, da stranska veriga vsebuje ali kislo ali bazično nabite dele, kar vpliva na celotno spojino. Stranska veriga s karboksilno skupino oddaja protone pri  $\text{pH}=7$  (ali več?), to je zanje energetsko boljše. Tako v raztopini z tako AK nastajajo hidroksilni ioni ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) oz. soli?, sama AK pa postane negativno nabita ( $\text{COO}^-$ ). Sta dve: asparaginska kislina oz. asparagin (Asp) in glutaminska kislina (Glu). Aspartat in Glutamat sta aniona obeh kislin. Bazično nabita AK predstavlja AK z aminske stranske verige ter lastnost, da je zanje energetsko lažje sprejeti proton kot ga oddati. Pri določenem  $\text{pH}$  (pri 7 ali manj?) tako nastanejo  $\text{OH}^-$  ioni ali soli, AK pa je pozitivno nabita ( $\text{NH}_3^+$ ). Take AK so tri: lizin, arginin in histidin. Raztopine polarnih, nabitih AK prevajajo el. tok.
- Polarne, nenabite - radikalna skupina je polarna, tvori vodikove vezi, kar jo naredi stabilno, z visokim vreliščem in topno v polarnih topilih (voda). Nima nabitih stranskih verig, ne prevajajo el. toka. Takih AK je 9, nekatere: serin, cistein, prolin
- Nepolarne - njihove stranske verige imajo enakomerno razporejeno elektronegativnost, ni prevelikih razlik med molekulami, (atomi) znotraj spojine. Npr. glicin, alanin, levcin.
- Nekateri delijo tudi na aromatske - z aromatskim obročem.. ali pa je posebna skupina, ki imajo vključene tudi druge elemente (npr. S)

Obstaja veliko vrst AK, za nas je najbolj pomembnih 20 proteinogenih, L-orientiranih in alfa AK. To pomeni, da sestavljajo proteine, imajo na prvem, kiralnem C atomu tako aminske kot karboksilno skupino in da je aminska skupina na levi strani. Vsaka od AK ima tudi D-orientirano izomero, glede na položaj amino in karboksilne skupine pa obstajajo tudi beta in gama AK. Vse te lastnosti vplivajo na strukturo in funkcijo proteina.

AK se s peptidno vezjo (močna kovalentna vez) povezujejo v dipeptide, oligopeptide (do 100) in polipeptide oz. proteine (>100 AK). Peptidna vez je tudi amidna vez ( $R'R''-N-CO-$ ). Njihov nastanek določa genom vsakega posameznika. Geni v genomu so kodirani zapisi zaporedja AK ter tako recept za izdelavo proteinov. Zaporedje AK (primarna struktura) določa tako funkcijo kot strukturo proteina v terciarni strukturi, v kateri so proteini najbolj razširjeni. Sekundarna struktura pa predstavlja (2D) obliko vezave AK: največkrat se povezujejo v obliki alfa-vijačnice (spiralasto) ali pa beta-strukture (cik-cak), saj sta precej stabilni obliki. Obstaja tudi kvartarna struktura, ki predstavlja povezavo več enot proteinov v večjo strukturo – kot hemoglobin, sestavljen iz 4 podenot-hemov.

Proteini so kompleksni polimeri, znotraj katerih nastaja tudi veliko različnih medmolekulskih vezi – Van der Waalsove disperzijske, sulfidne, vodikove.. Funkcije proteinov: oporna (strukturna), prenašalna, signalna, encimska, gibalna, shrambena, zaščitna, receptorska. Proteine po dogovoru začnemo pisati iz aminskega konca.

So lahko monomerni ali oligomerni, glede na število polipeptidnih verig. Lahko so enostavni ali sestavljani, glede na to ali za funkcioniranje potrebujejo še dodatne, neproteinske komponente ali ne. Npr. določeni encimi za delovanje potrebujejo kofaktorje, prostetične skupine.

So globularni ali fibrilarni. Prvi so bolj urejeni, dinamični, spremenljivi, topni v vodi. Njihova funkcija je signaliziranje, prenašanje, katalizatorska, gibalna, skladiščna. Npr. hemoglobin, mioglobin, ribonukleaza). Fibrilarni proteini pa so bolj togi, težje spremenljivi, čvrsti, topni v vodi. Ti so torej gradniki orgonomno celičnih struktur, imajo pa tudi zaščitno vlogo (keratin, kolagen)

Zaporedje AK v proteinu ugotavljamo z metodo Edmanove degradacije (direktno) ali s sekvencioniranjem gena (indirektno, bolj natančno, vendar problem, ker se protein s časom modificira). Pri Edmanovi degradaciji najprej protein fragmentiramo, potem pa označimo AK ostanek na N-koncu. Ta derivat izoliramo in identificiramo (z HTCL ali ionsko kromatografijo). Potem spet nov AK ostanek.

AK lahko torej identificiramo oz. prečujemo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti – HPLC ali z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

3D strukturo proteina lahko določimo s pomočjo jedrske magnetne resonance NMR ali X – žarkovno kristalografijo.

### **Encimi: princip delovanja encimov, pomen Michaelis Mentonove enačbe in vezava substrata ter delovanje encimov**

Encimi so globularne proteinske strukture, s funkcijo kataliziranja reakcije. To pomeni, da reakcije ne spreminjajo v ravnotežju, koncentraciji produktov, edina razlika je hitrost reakcije (npr. 100 milijonkrat hitreje). Princip delovanja je zmanjšanje aktivacijske energije, potrebne za začetek reakcije s tem, da spremeni okoliščine reakcije (izhodišče reakcije) Pri tem se encim ne spremeni in ne obrablja. Encimi so specifične molekule, kar pomeni, da se le nekaj specifičnih substratov lahko veže nanj in tvori kompleks. Substrat se veže na aktivno mesto na encimu, kjer poteka reakcija. To aktivacijsko mesto je bilo v začetku raziskovanja (v 19.stol) mišljeno kot natančno določeno, rigidno mesto, na katero

se substrat prilega kot ključ ključavnici (zato model ključ-ključavnica), danes se ve, da je to mesto precej fleksibilno, spremenljivo, sposobno spreminjanja tako po velikosti, obliki kot polarnosti. Lahko tudi prepozna substrat, ga pravilno usmeri in aktivira za pretvorbo (model analoga prehodnega stanja).

Substrat ali več substratov se veže na encim in tako tvori kompleks encim-substrat. Ko reakcija poteče dobimo kompleks encim-produkt, ki se ob pomoči drugih komponent loči na encim in produkt. Druge komponente, ki pomagajo encimu imenujemo kofaktorji in niso proteini. Ti so lahko druge organske kompleksnejše molekule, ki jih imenujemo koencimi (so šibko vezane na encim in niso venomer prisotne, npr. določeni vitamini, NAD, FAD, koencim A) ali pa prostetične skupine. Te so vezane močnejše, s kovalentnimi vezmi. Lahko so organske molekule ali kovinski ioni ( $Fe^{2+}$ ). Ti kofaktorji jim pomagajo na način, da prepoznajo molekule, privlačijo ali odbijajo določene substrate ali produkte. Kofaktor skupaj z encimom (apoencim) se imenuje holoencim.

\*\*Klasifikacija encimov: ligaze (katalizira nastanek C-C, C-N, C-O in C-S vezi s pomočjo ATP), liaze (katalizira adicijo na ali nastanek dvojne vezi), izomeraze (prenos skupin znotraj molekule), hidrolaze (razcep vezi s hidrolizo, nastane voda), oksidoreduktaze (prenos elektronov), transferaze (prenos funkcionalnih skupin iz ene molekule na drugo).

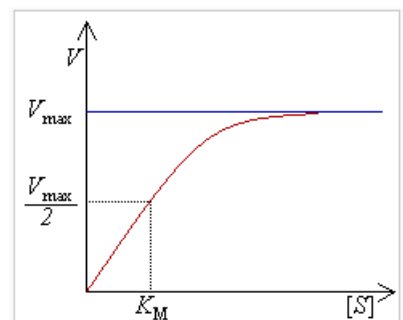
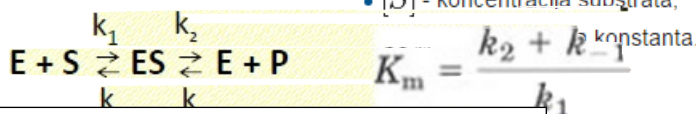
Michaelis Mentenova enačba je enačba, ki prikazuje odvisnost začetne hitrosti encimsko katalizirane reakcije od koncentracije substrata. Je enostaven model, prikazuje splošno kinetiko mnogih encimov (iz tega razloga pa ni najbolj natančna, manjkajo vplivi alosterije, kooperativnosti..)

Osnovno enačbo zapišemo kot:

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Predpostavka, da se celotna koncentracija encima in intermediarnega kompleksa spreminjata.

- $V_0$  - začetna hitrost, ne spreminjata.
- $V_{max}$  - maksimalna hitrost,
- $[S]$  - koncentracija substrata,



Michaelis-Mentenova krivulja prikazuje odvisnost hitrosti reakcije  $v_0$  od koncentracije substrata  $[S]$ .

### SATURACIJSKA KRIVULJA

- 1)  $[S] > K_m$  potem je hitrost odvisna le od koncentracije encima. Pomembno je le, kako hitro kompleks ES pretvori vezan substrat v produkt in ne kako pogosto se E in S srečata. ( $d[P]/dt \sim V_{max}$ )
- 2)  $[S] = K_m$  potem je hitrost nastajanja produkta  $0,5 \cdot V_{max}$ .
- 3)  $[S] < K_m$  potem nastane zelo malo kompleksa ES.  $d[P]/dt \sim V_{max} \cdot [S]/K_m$

Merilo za aktivnost encima ( $U$ ) je hitrost reakcije ( $v$ ).

Enota za  $U$  je  $\mu\text{mol}/\text{min}$  ali  $\text{mol}/\text{s}$ .

$K_m$  = Michaelisova konstanta: če je  $K_m$  velik pomeni, da je majhna afiniteta encima do substrata, če je  $K_m$  majhen, potem je velika afiniteta encima do substrata. Velja, da je  $K_m$  enak koncentraciji substrata, ko je

začetna hitrost enaka  $\frac{1}{2} V_{\max}$ . Hitrost nastajanja produkta je torej odvisna tako od koncentracije encima kot tudi substrata.

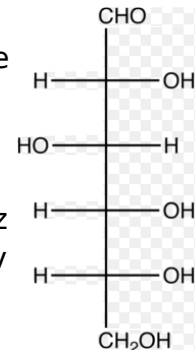
$V_{\max}$  = največja možna začetna hitrost encimsko katalizirane reakcije pri določeni koncentraciji E [E].

k=pretvorbena število=Št. molov substata, ki se pretvorijo v produkt na mol encima v časovni enoti.

**Ogljikovi hidrati: Osnovna struktura glukoze (Fischerjeva projekcijska formula), značilnosti monosaharidov, pomen optične izomerije, kako nastanejo ciklične strukture aldov in katoz, vez med disaharidi (pomen alfa in beta oblike), pomen disaharidov (maltoza, celebioza, laktoza, saharoza), značilnosti glikogena in škroba.**

- Fischerjeva projekcija D-glukoze

□



- Značilnosti monosaharidov:

Monosaharidi so monomomeri ogljikovih hidratov. Sestavljeni so iz več hidroksilnih skupin (-OH) ter funkcionalne skupine aldehydov (potem so aldeze) ali pa ketonov (ketoze).

- Njihova formula je  $(CH_2O)_n$
- Monosaharide poimenujemo splošno tako, da dodamo končnico -oza.
- Imajo med 3-7 C atomov (treoza, tetraoza, pentoza..)
- So kiralni, imajo veliko optičnih izomer (glukoza jih ima 16), velikokrat se razlikujejo samo po konfiguraciji enega samega C atoma. Ogljikove hidrate z isto molekularno formulo, a različno konfiguracijo okoli enega kiralnega centra imenujemo epimere (npr. D-manoza in D-glukoza). Prikazujemo jih z Fischerjevo projekcijo. L-oblika predstavlja položaj substituenta (hidroksilne skupine) na kiralnem C atomu, ki je najbolj oddaljen od karbonilnega ali aldehidnega C atoma. Center kiralnosti je C-atom, na katerega so vezane 4 različne skupine. Pomen: imajo drugačno biološko aktivnost, prav tako se razlikujejo v sučenju ravnine polarizirane svetlobe (ravno v nasprotno smer)
- Nad 5 C atomov se po navadi v raztopinah povezujejo v ciklične oblike. Nastanejo iz aldehida oz. ketona in alkohola (-OH skupine). Karbonilna (—CHO) skupina na prvem ogljikovem atomu lahko reagira s hidroksilno (—OH) skupino na petem ogljikovem atomu. Pri reakciji med hidroksilno in karbonilno skupino nastane **hemiacetal**. Pri reakciji med hidroksilno in ketonsko (—CO) skupino pa nastane **hemiketal**. Ko se obroč zapre nastaneta dva stereoizomera (ali anomera): alfa in beta oblika ogljikovih hidratov. Alfa označuje spojino, ki ima na kiralnem C atomu (prvi C atom v ciklu) -OH skupino obrnjeno navzdol, beta pa skupino z OH navzgor.
- So glavni vir metabolne energije, glukoza je začetni reagent pri celičnem dihanju, njena razgradnja se imenuje glikoliza. Glukoza nastane z razpadom polisaharidov, npr. z glikogenolizo (razpad glikogena). Odvečna glukoza v krvi se shrani (za največ 24 ur) v jetrih in mišicah v obliki glikogena (poteče glikogeneza). Poleg zaloge energije, so pomembne tudi za gradnike različnih struktur (DNA), za oporo in zaščito (gradniki c. sten, skeleta) kot signalne, sporočevalne molekule, kot koencimi, sestavljajo vezivna tkiva za sklepe.

Di-, oligo- in polisaharidi nastanejo tako, da se molekule monosaharidov povezujejo preko glikozidnih (etrskih oz. acetalnih) vezi med anomernimi

hidroksilnimi skupinami (predstavlja hidroksilno skupino na C1 atomu ter hidroksilno na C4 atomu).

Pomembni disaharidi so

Saharoz: namizni sladkor, v prehrambeni industriji (fruktoza+glukoza)

Maltoza: produkt hidrolize škroba, slad uporabljen v prehrambeni industriji (2xglukoza; alfa)

Laktoza: mlečni sladkor v mleku in mlečnih izdelkih, hranilo (glukoza+galaktoza)

Celobioza: produkt hidrolize celuloze (2x glukoza; beta vez)

Polisaharidi se povezujejo z raznovrstnimi O-glikozidnimi vezmi (ali acetalne oz. tudi etrske vezi) Glikogen je razvejani homopolisaharid, sestavljen iz D-glukoze. Zelo veliko ga je v jetrih, mišicah, eritrocitih, pomemben za zalogo energije. Škrob je homopolisaharid in je lahko v dveh oblikah: kot amilopektin (razvejani) in amiloza (nerazvejani). Oba tvorita glikozidne vezi z monomeri D-glukoze.

### **Lipidi: definicija lipidov, vrste lipidov, lastnosti in struktura maščobnih kislin, triacilglicerolov in fosfolipidov, biološka vloga membran, zgradba membran in načini transporta skozi membrane.**

Lipidi so raznovrstne kompleksne molekule, ki jih združuje lastnost hidrofobnosti. Se težko ali sploh ne topijo v polarnih topilih (kot je voda), se pa topijo v nepolarnih (benzen).

Lipide lahko delimo na več načinov, najpogostejša sta po sestavi in polarnosti lipidov. Po sestavi jih delimo na i) maščobne kisline ter ii) steroide. Prvi vsebujejo karboksilno funkcionalno skupino in vsaj štiri C atome. Običajno imajo sodo število C atomov. Maščobne kisline redkokdaj najdemo samostojne, po navadi so vezane v različne enostavne ali sestavljene lipide. Med enostavne lipide spadajo maščobe (živalske masti in rastlinska olja) ter voski, med sestavljene pa fosfolipidi in sfingolipidi. Steroidi se po sestavi precej razlikujejo od maščobnih kislin, mednje spadajo nekateri v maščobah topni vitamini, nekateri hormoni (kot testosteron, progesteron), holesterol.

Po polarnosti delimo lipide na polarne in nepolarne. Vloga slednjih je predvsem skladiščenje energije v obliki maščob, zaščita strukturam. To so masti, olja, voski in steroidi. Strukturirajo se v micelne oblike ali v plasti. Polarni lipidi so fosfolipidi

Prve so sestavljene iz alkohola in nanj pripetih maščobnih kislin.

Biološka vloga membran je predvsem zaščita, selektivna prepustnost (črpalke, pore, kanali zapore), oblika, sporazumevanje z okolico (receptorji, hormoni), lahko je sistem za prenos E.

Transport preko membrane:

- **Pasivni:** topljenec iz območja z večjo konc. na območje z manjšo.
  - o Enostavna difuzija (direktno skozi membrano; le nepolarne, majhne molekule)
  - o Olajšana pa poteka s pomočjo proteinov

- o Ionski transporterji (ioni se vežejo nanje in grejo z njimi preko membrane)
- o Ionski kanal (glede na elektrokemični gradient)
- **Aktivni:** proti elektrokemičnemu gradientu, proti višji koncentraciji
  - o Primarni: potrebna je energija (hidroliza ATP)
  - o Sekundarni: s pomočjo ionov

Kanali so lahko uniport, simport ali antiport, glede na to ali gre lahko skozi ena vrsta molekule v eno smer, dve vrsti molekule v eno smer ali pa prehod dveh različnih molekul iz obeh smeri.

Prenos info skozi celične membrane:

- o **Hormoni** - proizvajajo jih žleze z notranjim izločanjem, do tarčnih celic se prenesejo po krvnem obtoku. So počasnejši od živčnega sistema. Lahko so steroidni hormoni (estrogen androgeni), lahko peptidi (inzulin, glukagon) ali derivati AK. Hormoni se neposredno vežejo na proteine, encime in nukleinske kisline znotraj celice. Proces, kjer se preko membrane namesto snovi prenese le kemično sporočilo, ki povzroči spremembe v celici se imenuje celično signaliziranje oz. koncept prenosa signalov.
- o **Prostaglandini** delujejo le v bližnji okolici celice, ki jih izloča

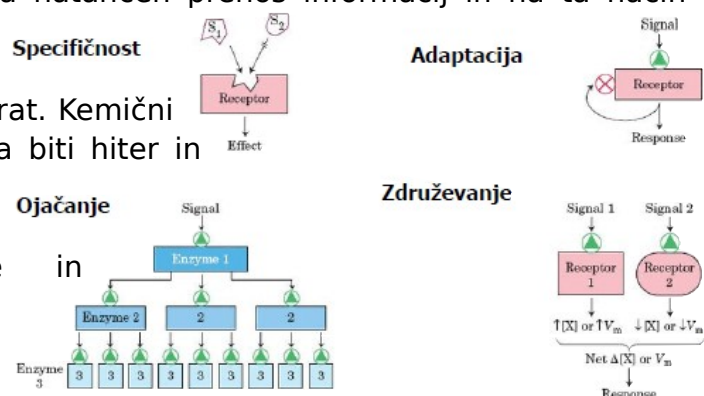
### Koncept prenosa signalov:

Receptorji za vodotopne hormone so sestavljeni iz zunanega predela, kamor se veže hormon, transmembranskega predela in predela, ki kakor rep moli v citoplazmo celice. Hormon aktivira metabotropne receptorje, ti aktivirajo sekundarne obveščevalce (secondary messengers; npr. G-protein, cAMP, Ca<sup>2+</sup>) in sproži se kaskada dogodkov, glede na sporočilo. Znotrajcelični encimi lahko kaj aktivirajo ali pa inhibirajo.

Glavne značilnosti prenosa signala:

Receptorji so tesno vezani na membrano, skupaj jih držijo tudi proteini citoskeleta, ki sestavljajo mrežo za natančen prenos informacij in na ta način pospešujejo prenos signalov. Po vezavi ene molekule hormona se signal lahko ojača tudi do več stokrat. Kemični signal, ki ga prinese hormon mora biti hiter in začasen. Iz istega razloga so po navadi sekundarni obveščevalci pogosto reaktivne, nestabilne krakožive molekule.

Tudi 



## CELIČNI METABOLIZEM

Razlike v avtotrofih in heterotrofih. Slednji so lahko aerobi ali anaerobi. Vsi pa razgrajujemo polimere na podoben način. Metabolizem v vseh organizmih poteka kot niz zaporednih encimsko kataliziranih reakcij. V vsaki reakciji nastane

produkt, ki je v naslednji reakciji spet reaktant. Metabolična pot predstavlja zaporedje reakcij, ki poteka z določenim namenom. Ta je lahko linearna, razvejana, ciklična ali spiralna. Metaboliti so metabolični intermediati v metabolični poti do končnega produkta.

Človeška celica lahko vsebuje več 1000 encimov, ki katalizirajo različne reakcije.

Metabolizem je sestavljen iz dveh uravnoveženih procesov: KATABOLNE IN ANABOLNE FAZE. Katabolna faza predstavlja razgradno bioloških molekul, ob tem pa se sprošča kemijska energija iz hrane in se zbira v obliki molekul ATP. Kemijski proces v celoti je oksidacija, pri kateri nastajajo reducirani koencimi, kot so NADH, FADH<sub>2</sub>.

Anabolna faza predstavlja fazo izgradnje, sinteze bioloških molekul. Kemijski proces v celoti je redukcija, pri kateri nastanejo oksidirani koencimi (npr NAD<sup>+</sup>, FADH<sup>+</sup>). Pri tem se energija porablja za opravljanje dela.

Anabolične in katabolične reakcije se razlikujejo tudi po tem, kje v celici in v kateri vrsti potekajo.