

Funkcije proteina

Boris Mildner
Osnove biokemije

Vlaknati i globularni proteini

- Prema topljivosti, proteine možemo grubo podijeliti u netopljive vlaknate proteine, i globularne topljive proteine.
- Za razliku od globularnih proteina, vlaknati proteini nemaju "standardne" pravilne sekundarne strukture.
- Funkcija vlaknatih proteina je da daju strukturu i čvrstoću stanici i oni obično ne vežu ligande.
- Funkcija globularnih proteina je da provode reakcije proteina i različitih liganada (enzimi i transporteri).

Funkcija proteinskih vlakana

- Funkcija proteinskih vlakana je da daju čvrstoću i strukturu stanici.
- Proteinska vlakna (fibrilarni proteini) **ne vežu ligande.**

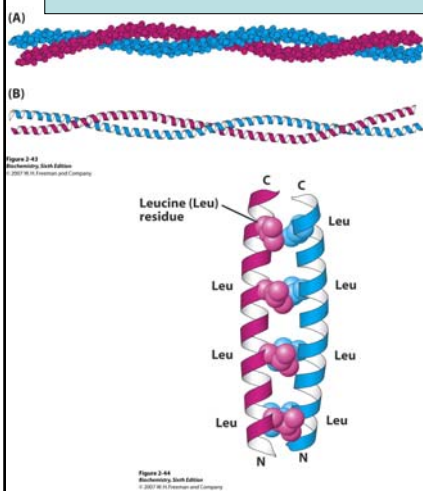
Vlaknati proteini daju strukturu i čvrstoću stanicama i tkivima

- **Specijalne vrste zavojnica nalaze se u dva vrlo zastupljena proteina: α -keratinu i kolagenu.**
- Ovi proteini stvaraju dugačka vlakna koja daju strukturu stanici.
- α -keratin, koji izgrađuje vunu i kosu sadrži dvije desne “standardne” α -zavojnice koje su međusobno opletene tako da zajedno čine lijevu super-zavojnicu koja se često naziva i “opletena zavojnica.”
- Kolagen, najzastupljeniji protein u ljudskom tijelu, a nalazi se u koži, kostima, tetivama, hrskavici i zubima. Kolagen je izgrađen od tri zavojnice, a glicin je svaka treća aminokiselina koja se pojavljuje u svakoj zavojnici, a vrlo zastupljena aminokiselina je i prolin.

Sekundarne strukture proteinskih vlakana

α -keratin od kojeg su uglavnom izgrađene vuna i kosa izgrađen je od dvije desne α -zavojnice koje zajedno čine super-zavojnicu lijevog navoja. α -keratin je član porodice proteina koji grade **super-zavojnice**. Proteini ove porodice grade proteine čija duljina može biti veća od 1000 Å. U središnjem dijelu molekule nalazi se segment od 300 aminokiselina koje imaju tzv. "heptadičko ponavljanje". Dodatno, lanci keratina povezuju se disulfidnim mostovima.

modeli super-zavojnica α -keratina



Dvije desne α -zavojnice međusobno su povezane van der Waalsovima silama i grade lijevu super-zavojnicu. Ove interakcije su omogućene jer stvaranje lijeve super-zavojnice mijenja strukturu α -zavojnica tako da puni okreti zavojnice dolaze nakon 3,5 aminokiselinska ostatka a ne nakon 3,6 aminokiselinskih ostataka kao što je to u α -zavojnicama topljivih globularnih proteina. Zbog toga je moguće da hidrofobni bočni ogranci aminokiselina međusobno reagiraju nakon svakog sedme aminokiseline.

"heptadičko" ponavljanje u super-zavojnici α -keratina. Svaka sedma aminokiselina zavojnice je leucin. Dvije zavojnice se međusobno povezuju van der Waalsovima silama, poglavito između leucinskih bočnih ograna.

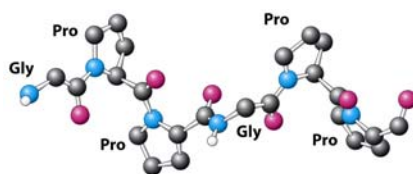
Struktura proteinskih vlakana: zavojnica kolagena

Kolagen je najzastupljeniji protein sisavaca. To je štapičasti protein duljine 3000 Å i 15 Å u promjeru. Izgrađen je od tri polipeptidne zavojnice. U kolagenskoj sekvenci, glicin je svaka treća aminokiselina a često se pojavljuje i slijed glicin-hidroksiprolin.

```

31
-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-
22
-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-
31
-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hyp-
40
-Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-
49
-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-
58
-Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn-Gly-Asp-Asp-

```



Konformacija jednog lanca kolagenske trostruke zavojnice.

Aminokiselinski slijed dijela kolagenskog lanca. Svaka treća molekula je glicin, a često su zastupljeni prolin i hidroksiprolin

Kolagenska zavojnica koju čine tri međusobno obavijena kolagenska lanca nema nikakve sličnosti s α -zavojnicom. Kolagenski lanci su lijevog navoja, a kolagenska super-zavojnica je desnog navoja. Puni okret čine 3 ak, a udaljenost između zavoja je 9 Å.

Proteinska vlakna

kolagen

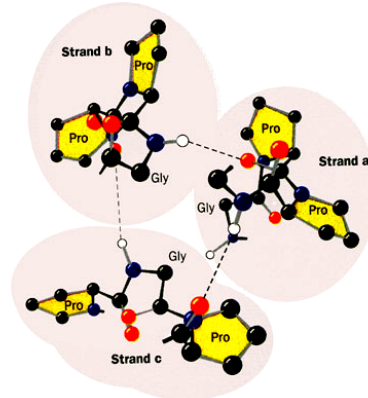
Sekvon Gly-X-Y se ponavlja

X najčešće Pro (Ser i Leu)

Y najčešće Hyp (Arg i Ala)



Primarna struktura C-kraja trostruke zavojnice kolagena



Pogled na os trostruke zavojnice

Proteinska vlakna

kolagen

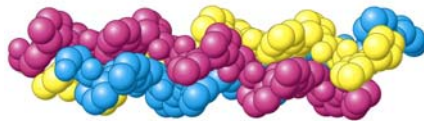


Figure 2-47a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman & Co.

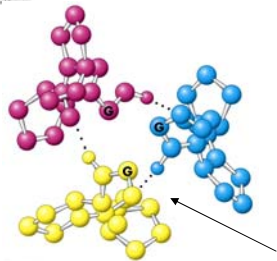


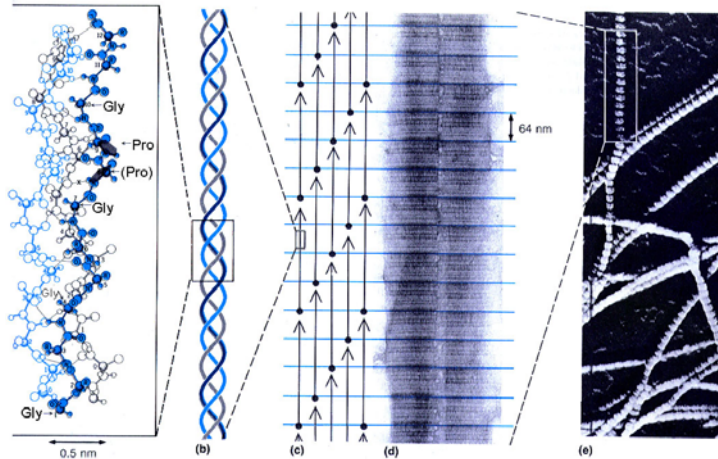
Figure 2-47b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman & Co.

Tri zavojnice kolagena omataju se jedna oko druge. Svaka zavojnica prikazana je drugom bojom. Trostruka kolagenska zavojnica često se naziva tropokolagen.

Vodikove veze između zavojnica stabiliziraju trostruku super-zavojnicu. Vodikove veze nastaju između NH skupine glicina na jednom lancu i karbonilne skupine glicina u okosnici drugog lanca. Hidroksilne skupine hidroksiprolina također stvaraju vodikove veze. Kada nema dovoljno hidroksilnih skupina dobiva se skorbut.

α -C atom glicina obilježen je s G. Svaki treća aminokiselina mora biti glicin jer inače ne bi bilo dovoljno prostora u unutrašnjosti zavojnice. Bočni ostaci prolina i hidroksiprolina nalaze se na vanjskoj strani zavojnice.

kolagen



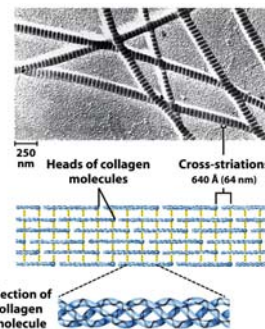
Sekundarna
Struktura tropokolagena
(oko 1000 ak po lancu)

Združene molekule
tropokolagena

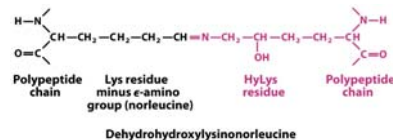
Elektronska mikrograf. ukriženih
vlakana kolagena uz vidljivu
periodičnost strukture

Proteinska vlakna

Funkcija proteinskih vlakana je da budu čvrsta. Zbog toga fibrilarni proteini kao što su α -keratin i kolagen grade ove superstrukture. Ove superstrukture su isključivo izgrađene samo od jedne vrste polipeptidnih lanaca i vlaknasti (fibrilarni) proteini obično ne vežu ligande.



molekule tropokolagena međusobno su povezane u superstrukturu. Povezivanje trostrukih zavojnica je pravilno, ali dozvoljava svakom tropokolagenu određenul slobodu..



Kolagenske zavojnice su međusobno povezane neuobičajenim vezama. Ovisno o vrsti kolagena ovisi i povezivanje podjedinica pa tako i o nastanku dipeptida koji povezuje pojedine lance.

Globularni proteini

Za razliku od fibrilarnih proteina, funkcija većine globularnih proteina ovisi o njihovoj interakciji s drugim proteinima i/ili ligandima.

ligand = molekula koja se reverzibilno veže na protein.

Funkcije globularnih proteina

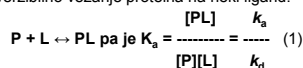
Funkcija većine proteina je da reverzibilno vežu druge molekule, tj. ligande. **Ligand** je bilo koja druga molekula, uključujući i protein. Ligand se na protein veže u **vezno mjesto** koje je komplementarno ligandu (po veličini, obliku, naboju, hidrofobnim ili hidrofilnim svojstvima).

Interakcije proteina i liganda **su specifične** jer protein može između tisuću drugih spojeva odabrati željeni ligand. Ujedno, jedan protein može imati i po nekoliko odvojenih veznih mjesta za različite ligande.

Interakcijom proteina i liganda, protein često mijenja konformaciju kako bi vezno mjesto postalo što komplementarnije ligandu. Ovu strukturnu promjenu nazivimo **induciranom promjenom konformacije proteina** (induced fit).

Interakcija proteina i liganda

Reverzibilno vezanje proteina na neki ligand:



gdje su k_a i k_d konstante brzine,
a K_a je konstanta vezanja koja odražava afinitet liganda prema proteinu.

K_a je jednaka omjeru brzine nastajanja (k_a) PL kompleksa i brzine disocijacije (k_d) tog kompleksa. Kada reakcija uključuje jednu molekulu, kao što je to disocijacija $PL \rightarrow P + L$, kažemo da je reakcija *prvog reda* i konstantu disocijacije izražavamo u (s^{-1}). Kada reakcija uključuje dvije molekule, kao što je nastajanje kompleksa, tj. $P + L \rightarrow PL$ reakcija je *drugog reda* i njezina konstanta brzine ima jedinicu $\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Ako malo preuredimo jednadžbu (1) dobivamo: $K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (2)$

Kada je koncentracija liganda L daleko veća od broja mjesta vezanja tog liganda, vezanje liganda na protein ne mijenja značajno koncentraciju slobodnog, tj. nevezanog liganda, pa možemo smatrati da [L] ostaje konstantna, što je vrlo česti slučaj u stani.

Ako promatramo na koji se dio veznih mjesta vezao ligand

$$Y = \frac{\text{broj zauzetih veznih mjesta}}{\text{ukupni broj veznih mjesta}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad (3)$$

Interakcija proteina i liganda

$$Y = \frac{\text{broj zauzetih veznih mjesta}}{\text{ukupni broj veznih mjesta}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad (3)$$

ako u jednadžbu (3) supstituiramo izraze iz jedn. (2),

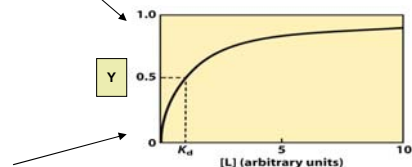
dobivamo:

$$Y = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + 1/K_a} \quad (4)$$

kako je $1/K_a = K_d$, tj. konst. disocijacije, možemo pisati:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \text{ odnosno } [PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \text{ pa je } Y = \frac{[L]}{[L] + K_d} \text{ ovo je opća jednadžba za pravokutnu hiperbolu}$$

kada je $[L] = K_d$, polovica veznih mjesta liganda su zauzeta.

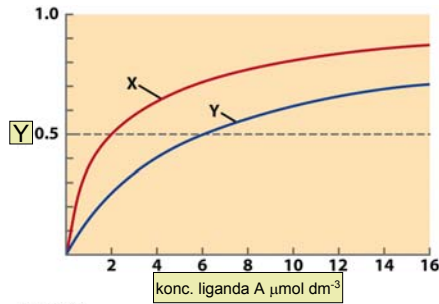


kako je $K_a = 1/K_d$, konstanta vezanja, K_a liganda na kompleks će biti veća kada je brojčana vrijednost konstante disocijacije, K_d , manja.

Grafički prikaz vezanja liganda. Sva vezna mjesta su popunjena kada se povuče asimptota kod vrijednosti $Y = 1$. Kada je $Y = 0,5$, polovica broja raspoloživih veznih mjesta jednaka je konstanti disocijacije kompleksa (K_d).

Interakcija proteina i liganda

primjer vezanja istovrsnog liganda
na dva različita proteina X i Y



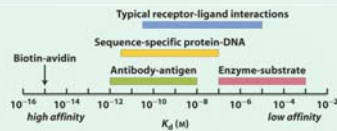
Ako se neki ligand A veže na dva proteina, afinitet vezanja proteina X za ligand je veći ($K_d = 2 \mu\text{mol dm}^{-3}$) nego što je to afinitet proteina Y ($K_d = 6 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Unnumbered 5 p137
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Interakcija proteina i liganda (konstante disocijacije nekih protein – ligand kompleksa)

primjeri konstanti disocijacije nekih proteina

Protein	Ligand	K_d (M) ^a
Avidin (egg white) ^b	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) ^c	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) ^d	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}



The range of dissociation constants for interactions in biological systems. Colors denote the range for each class of interaction. A few interactions, such as that between the protein avidin and the enzyme cofactor biotin, fall outside the normal ranges. The avidin-biotin interaction is so tight it may be considered irreversible. Sequence-specific protein-DNA interactions reflect proteins that bind to a particular sequence of nucleotides in DNA, as opposed to general binding to any DNA site.

^aA reported dissociation constant is valid only for the particular solution conditions under which it was measured. K_d values for a protein-ligand interaction can be altered, sometimes by several orders of magnitude, by changes in the solution's salt concentration, pH, or other variables.

^bThis immunoglobulin was isolated as part of an effort to develop a vaccine against HIV. Immunoglobulins (described later in the chapter) are highly variable, and the K_d reported here should not be considered characteristic of all immunoglobulins.

^dCalmodulin has four binding sites for calcium. The values shown reflect the highest- and lowest-affinity binding sites observed in one set of measurements.

Table 5-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Proteini koji vežu kisik

Kisik je slabo topljiv u vodenim otopinama pa same molekule otopljene u krvi ne mogu doprijeti do tkiva. Isto tako, difuzija kisika u tkiva je malog dometa (svega nekoliko milimetara). Zbog toga je bilo potrebno da multicelularni organizmi razviju proteine koji transportiraju i pohranjuju kisik.

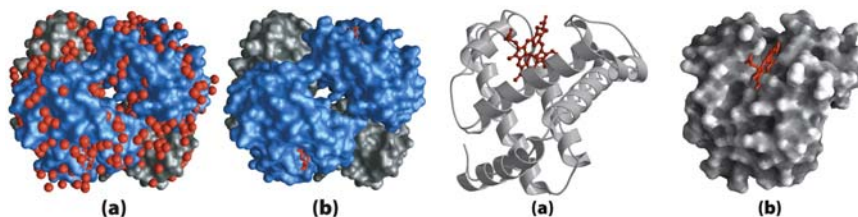


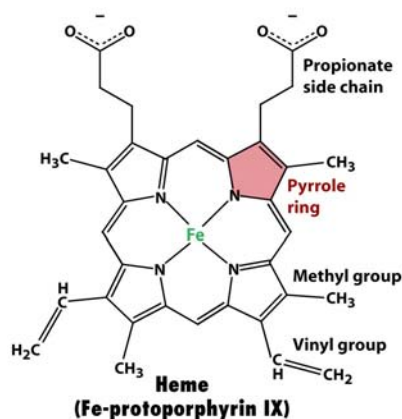
Figure 2-9
Lehninger Principles of Biochemistry, 6th Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Kristalna struktura hemoglobina. Hemoglobin je $\alpha_2\beta_2$ tetramer i svaka podjedinica ima vezanu prostetsku skupinu hem. U (a) molekule vode, crvene kuglice, čvrsto se vežu za protein. Dvije α podjedinice obojene su plavo, a dvije β podjedinice označene su sivom bojom. (b) prikaz hemoglobina bez vode. Vezani hem je obojen crveno.

Figure 4-13ab
Lehninger Principles of Biochemistry, 6th Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Shematski prikaz mioglobina (a) i njegova kristalna struktura (b). Mioglobin je jedan polipeptid na koji je vezana jedna prostetska skupina hema, označena crveno.

Proteini koji vežu kisik (hem)



Niti jedna funkcionalna skupina aminokiselina ne može reverzibilno vezati kisik. Transport i vezanje kisika mogu obavljati tranzicijski metali kao što su Fe i Cu. Kako slobodni metali sa slobodnim kisikom stvaraju vrlo reaktivne hidroksilne radikale, u multicelularnim organizmima željezo je u kompleksu sa prostetskom skupinom, hem, koja je vezana za protein.

U slobodnoj prostetskoj skupini, tj. kada hem nije vezan za protein, Fe^{2+} ireverzibilno prelazi u Fe^{3+} i kisik se više ne može vezati. U proteinima koji sadrže hem, ova reakcija se ne događa jer je hem skupina zakrivljena u strukturi proteina.

Struktura protoporfirina IX, jednog od porfirina. Fe^{2+} ima šest koordinacijskih veza. Četiri veze su u ravnini i vežu se s pirolnim prstenovima, a još druge dvije koordinacijske veze Fe^{2+} okomite su na ovu ravninu.

Vežanje kisika za mioglobin

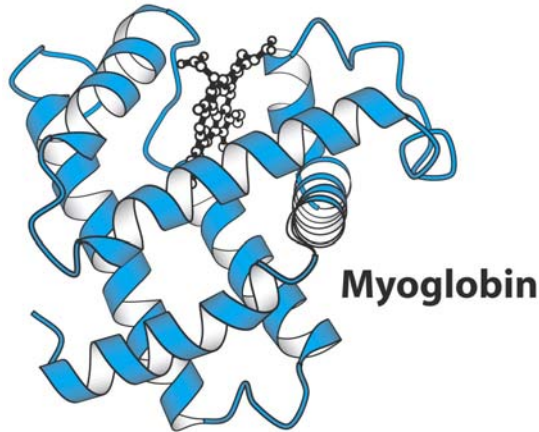


Figure 7-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2006 W. H. Freeman and Company

Mioglobin, $M_r = 16\ 700$, mali je transportni protein koji veže i transportira kisik u tkiva, tj. omogućava difuziju kisika prvenstveno u mišice. Pripada u veliku porodicu **globina**. Svi globini imaju vrlo slične primarne i tercijarne strukture. Mioglobin ima 8 α zavojnica koje su povezane zavojima. Oko 78% aminokiselina mioglobina su α -zavojnice. Mioglobin ima jednu prostetsku skupinu te veže jednu molekulu kisika.

Promjene položaja Fe^{2+} prilikom vežanja kisika u hemoglobinu

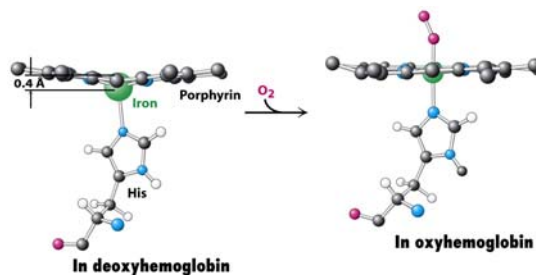
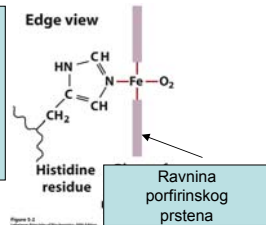


Figure 7-2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2006 W. H. Freeman and Company

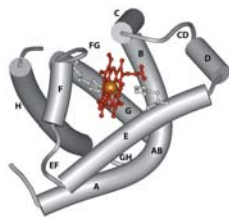
Kada se kisik veže za željezo porfirinskog prstena hemoglobina, elektronska struktura željeza u hemu se mijenja pa je to razlog da je venska krv koja nema kisika tamo crvena, dok je arterijska krv, koja je bogata kisikom, svjetlo crvena.

hem i mioglobin (Mb)

Bočni pogled na porfirinski prsten, te vezanje histidina i kisika na koordinacijska mjesta željeza.



Na jedno koordinacijsko mjesto željeza koje je okomito na porfirinski prsten veže se dušik iz imidazolnog prstena histidina, a na drugo okomito koordinacijsko mjesto Fe^{2+} veže se molekula kisika.



α -zavojnice mioglobina označene su slovima A – H. Hem je vezan u žlijeb kojeg rade E i F zavojnice, a bočni ogranci drugih zavojnica također pridonose vezanju hema.

Vežanje kisika za hem mioglobina možemo računati

Krivulja vezanja hipotetskog liganda na neki protein

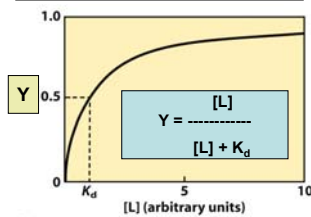
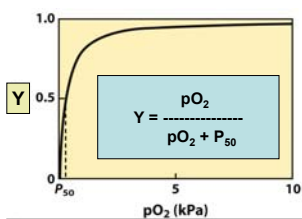


Figure 5-4a
© Garland Science 2015



Krivulja vezanja kisika za mioglobin

Vežanje kisika možemo kvantitativno pratiti istom jednačbom vezanja liganda na protein, tj.

$$Y = \frac{[L]}{[L] + K_d} = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + K_d}$$

Kako za bilo koji ligand K_d je jednaka $[\text{O}_2]$ kada je $\frac{1}{2}$ dostupnih mjesta vezanja zauzeto, odnosno

$K_d = [\text{O}_2]_{0,5}$, to možemo pisati:

$$Y = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + [\text{O}_2]_{0,5}}$$

Kako je kisik plin, lakše je mjeriti parcijalni tlak kisika ($p\text{O}_2$) u plinskoj fazi nego mjeriti koncentraciju kisika u otopini. **Koncentracija plina u otopini proporcionalna je parcijalnom tlaku plina.** Ako definiramo parcijalni tlak kisika kada je $[\text{O}_2]_{0,5}$ kao P_{50}

$$Y = \frac{p\text{O}_2}{p\text{O}_2 + P_{50}}$$

Proteini koji vežu kisik

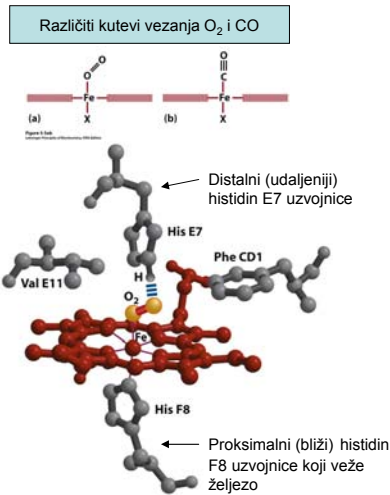
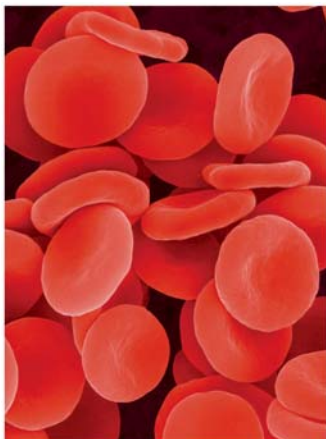


Figure 5-5c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

CO se veže za slobodni hem 20 000 puta jače nego što se veže kisik. Međutim kada je hem vezan u mioglobinu, vezanje CO za hem svega je 200 puta jače nego što je vezanje kisika. Razliku u ovom vezanju možemo djelomično objasniti steričkim smetnjama. U mioglobinu distalni His E7 tvori vodikove veze s kisikom, što nije moguće s CO. Isto tako, na vezanje O₂ djeluje "disanje" tj. molekularno gibanje strukture proteina. Zbog gibanja proteinske strukture kisik se može vezati i otpustiti s hema. Da je struktura kruta, to ne bilo moguće.

Proteini koji vežu kisik - hemoglobin



Chapter 7 Opener part 1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Kisik u krvi životinja transportira hemoglobin koji je u eritrocitima. Eritociti su male bikonkavne stanice promjera 6 – 9 μm. Nastaju iz matičnih stanica, stanica preteča tj iz **hemocitoblasta**. Tijekom sazrijevanja matične stanice proizvode velike količine hemoglobina, a nakon toga izgube vlastite intracelularne organele (jezgru, mitohondrij i endoplazmatski retikul). Eritrociti se prema tome ne mogu razmnažati i njihov životni vijek iznosi oko 120 dana.

U arterijskoj krvi 96% hemoglobina je zasićeno kisikom, dok je u venskoj krvi oko 64% hemoglobina zasićeno kisikom.

Mioglobin, monomerni protein, kojem je krivulja vezanja kisika pravokutna hiperbola relativno je neosjetljiv na male promjene koncentracija otopljenog kisika, ali zato dobro funkcionira kao protein za skladištenje kisika u mišićima.

Za razliku od mioglobina, hemoglobin je tetramerni protein i veže kisik na svakoj od podjedinica, te je prikladniji za transport kisika.

U multimernom proteinu, konformacijska promjena u jednoj podjedinici često dovodi do konformacijskih promjena u drugim podjedinicama, što nazivamo **kooperativnost**.

Interakcija proteina i jednog liganda često je regulirana interakcijom tog proteina s jednim ili više drugih liganada. Interakcije s ovim drugim ligandima može dovesti do konformacijskih promjena na proteinu koje utječu na vezanje prvog liganda – **alosterička regulacija**.

(Kod enzima, ligande nazivimo reakcijskim supstratima, a mjesto vezanja supstrata na enzim naziva se katalitičkim ili aktivnim mjestom).

Struktura hemoglobina

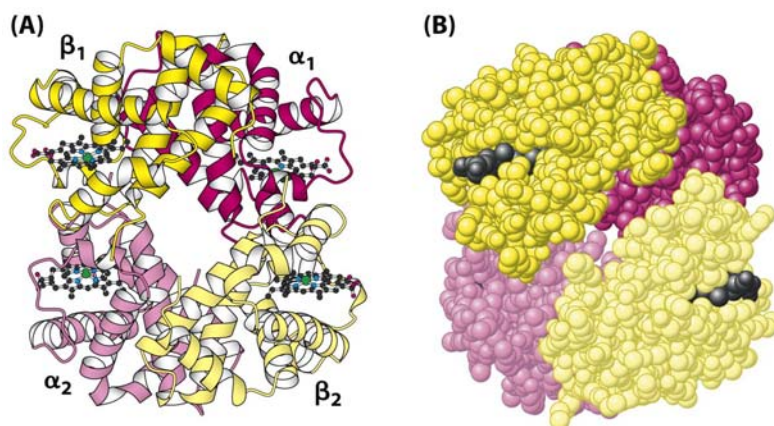
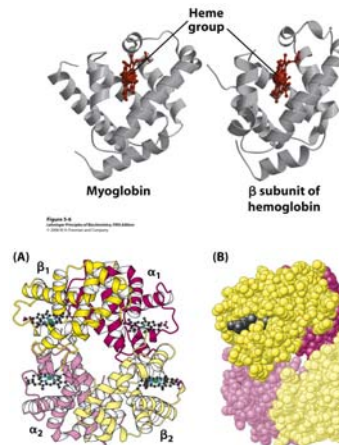


Figure 7-5
Biochemistry, Sixth Edition
© 2006 W. H. Freeman and Company

Strukture lanaca mioglobina i hemoglobina vrlo su slične i zadržavaju gotovo identični raspored α -uzvojnica



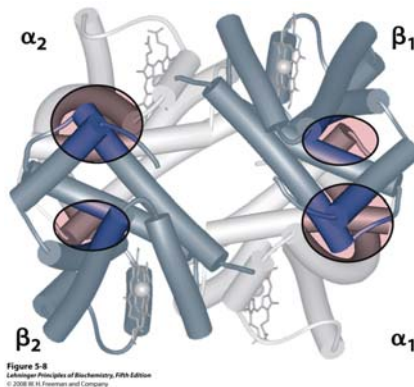
Usporedbe tercijskih struktura mioglobina i β -podjedinice hemoglobina.

Većina globina imaju slične tercijske strukture jednog polipeptida iako su im primarne strukture različite (24 - 25% podudarnosti aminokiselina između mioglobina kita i α i β podjedinica humanog hemoglobina).

Hemoglobin je tetramerni protein izgrađen od dvije α i dvije β podjedinice. Svaka podjedinica veže prostetsku skupinu – hem.

Kvaterni struktura deoksihemoglobina

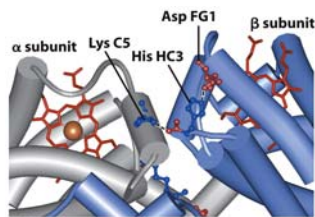
Podjedinice hemoglobina su u međusobnoj interakciji



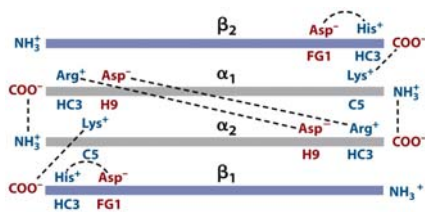
Do najjačih interakcija dolazi između nesrodnih podjedinica. Kada se veže kisik, mala je promjena konformacije između $\alpha_1\alpha_2$ podjedinica, ali dolazi do značajne promjene u konformaciji između $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_2\beta_2$ uzvojnica.

Prema rendgenskoj strukturalnoj analizi dvije su konformacije hemoglobina. Ove se konformacije nazivaju **T** (eng. tense) i **R** (eng. relaxed) stanja hemoglobina. Kisik se može vezati na hemoglobin bez obzira u kojoj je konformaciji, ali afinitet vezanja kisika na hemoglobin je daleko veći kada je hemoglobin u R stanju (oksihemoglobin). Deoksihemoglobin (hemoglobin na kojeg nije vezan kisik) obično je u T stanju.

Ionske veze između α -uzvojnica stabiliziraju T stanje hemoglobina

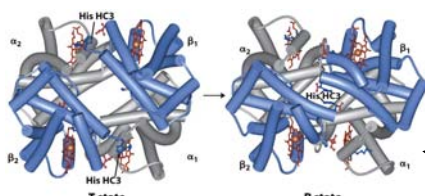


Prikazan je dio molekule hemoglobina koji je u T stanju. Prikazane su interakcije između His (u HC3) i Asp (u FG1) na β lancu, te interakcije između Lys (u C5) α lanca i karboksilne skupine His (HC3) β lanca.

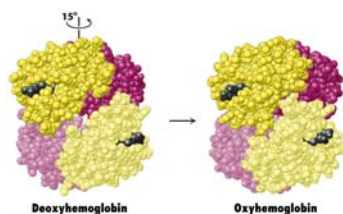


Shematski prikaz ionskih veza između ioniziranih bočnih ogranaka aminokiselina u pojedinim α -zavojnima istovrsnih ili različitih hemoglobinskih lanaca kada je hemoglobin u T stanju (deoksihemoglobin).

Vežanjem kisika mijenja se konformacija hemoglobina, tj. hemoglobin iz T stanja prelazi u R stanje



Pozitivno nabijeni bočni ogranci aminokiselina prikazani su crvenom, a negativno nabijeni bočni ogranci prikazani su plavom bojom. Vežanjem kisika dolazi do promjena u rasporedu ionskih veza. Najznačajnija promjena je na karboksilnom kraju lanca (HC3 α -uzvojnica) koji se rotira u središte molekule i više ne radi ionske veze kao što je to bilo moguće u T stanju. Druga vidljiva promjena je u smanjenju pukotine između β podjedinica.



Vežanjem kisika jedan $\alpha\beta$ dimer rotira se za 15° obzirom na drugi $\alpha\beta$ dimer.

Usporedba krivulja vezanja kisika za mioglobin odnosno za hemoglobin

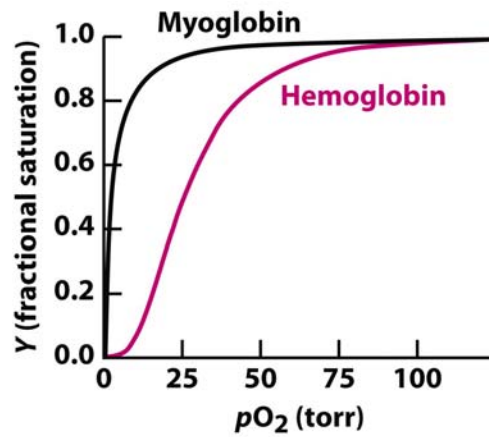


Figure 7-7
Biochemistry, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Shematski prikaz strukturnih promjena u proteinu izgrađenom od dvije podjedinice kod kojeg dolazi do kooperativnog vezanja liganda

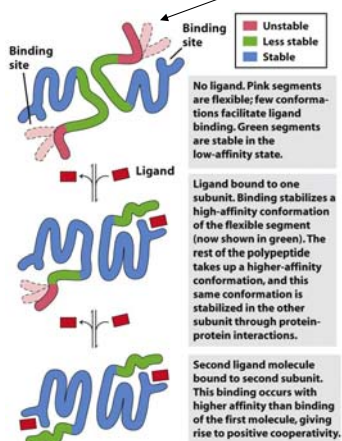


Figure 5-13
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Alosterički protein je protein kod kojeg vezanje liganda ili modulatora na jedno mjesto utječe na svojstva vezanja liganda na drugim veznim mjestima tog istog proteina.

Konformacije alosteričkih proteina se mijenjaju vezanjem liganda ili modulatora. Interakcije proteina i liganda i modulatora su **homotropne** (ligand i modulator su identične molekule) ili **heterotropne** ako su ligand i modulator različite molekule.

Kooperativne konformacijske promjene ovise o varijacijama u stabilnosti strukture različitih dijelova molekule proteina.

Kooperativno vezanje liganda možemo kvantitativno opisati

Hilлови dijagrami vezanja kisika na mioglobin i hemoglobin

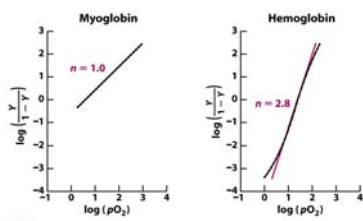
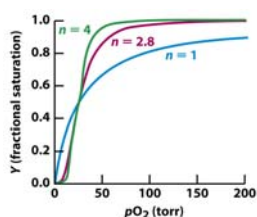
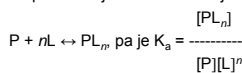


Figure 7-16
Biochemistry, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



Vežanje kisika s različitim Hillovim koeficijentima. Krivulja, gdje je $n = 2.8$ vjerno opisuje vežanje kisika na hemoglobin

Za protein koji ima n veznih mjesta možemo pisati:



Isto tako možemo izraziti stupanj zasićenja:

$$Y = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d^n} \text{ odnosno } \frac{Y}{1-Y} = \frac{[L]^n}{K_d^n}$$

Ako ovaj izraz logaritmiramo dobivamo **Hillovu** jednačbu:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n(\log[L] - \log K_d)$$

1-Y

Obzirom na ovaj izraz, n bi bio nagib pravca. Međutim, eksperimentalno određeni nagib ne odgovara broju mjesta vezanja, već n predstavlja stupanj interakcije između broja vezanih mjesta. U Hillovom dijagramu n označavamo kao n_H , tj. kao **Hillov koeficijent** koji je **mjera kooperativnosti**. Ako je

$n_H = 1$, vežanje liganda nije kooperativno. Ako je $n_H > 1$, kooperativnost je pozitivna, a za $n_H < 1$, kooperativnost je negativna.

Kada je $n_H = n$, vežanje bi bilo u potpunosti kooperativno, sva vezna mjesta bi se simultano popunila i niti jedno drugo stanje osim vezanog liganda na proteinu ne bi postojalo.

Kooperativnost se može objasniti s nekoliko modela

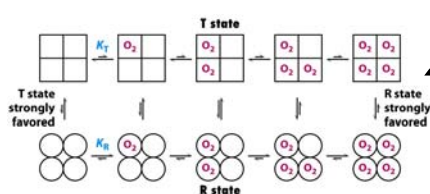


Figure 7-11
Biochemistry, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Zajednički model. Sve molekule hemoglobina su ili u T ili u R stanju. Kako se veže kisik uvijek postoji ravnoteža između T i R stanja. Ravnoteža se pomiče od ravnotežnog stanja gdje je favorizirano T stanje, kada niti jedna molekula kisika nije vezana, do ravnotežnog stanja gdje je favorizirano R stanje kada je hemoglobin u potpunosti zasićen kisikom.



Figure 7-13
Biochemistry, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Sekvencijski model. Vežanjem liganda na jednu podjedinicu dolazi do promjene konformacije podjedinice na koju se vezao kisik. Promjenom konformacije jedne podjedinice dolazi do promjena konformacija drugih podjedinica.

Modeli predstavljaju idealizirane granične slučajeve koji se u stvarnosti mogu dogoditi, ali ta događanja su vrlo rijetka.

Vežanjem kisika mijenja se i konformacija hemoglobina

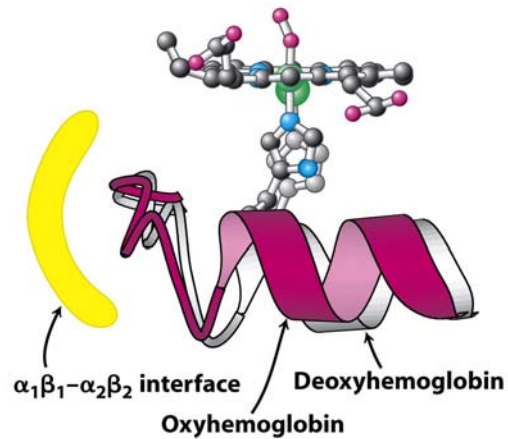


Figure 7-14
Biochemistry, Sixth Edition
© 2006 W. H. Freeman and Company

Kooperativno vezanje kisika za hemoglobin

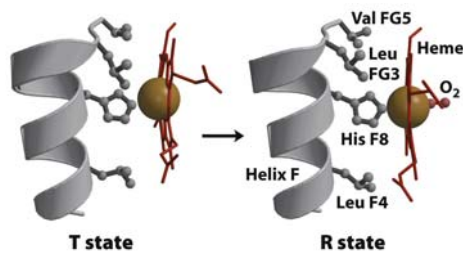


Figure 5-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Vežanje kisika uzrokuje promjene položaja Fe^{2+} obzirom na ravninu porfirinskog prstena hema kao i promjene konformacija bočnih aminokiselinskih ostataka i peptidne okosnice.

Hemoglobin mora efikasno vezati kisik u plućima gdje je pO_2 13,3 kPa (100 torr), a mora otpustiti kisik u tkivima gdje je pO_2 oko 4 kPa (20 torr).

Hemoglobin prelazi iz stanja gdje veže kisik slabim afinitetom (T stanje) u stanje gdje se kisik veže jakim afinitetom (R stanje). Do promjena stanja dolazi kako se što više kisika veže. Zbog toga je krivulja vezanja kisika na hemoglobin **sigmoidna**, a ne pravokutna hiperbola kao što je to npr. za mioglobin. Vežanjem kisika na jedan lanac mijenja se afinitet za vezanje kisika na drugim lancima (podjedinicama). Sigmoidna krivulja vezivanja prikazuje **kooperativno vezivanje**.

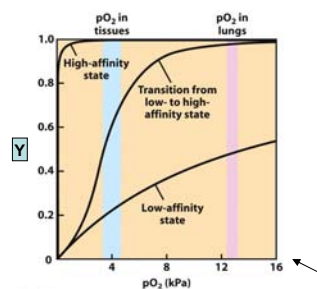
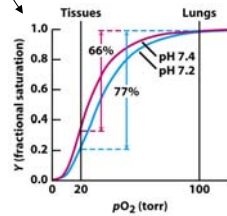


Figure 5-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

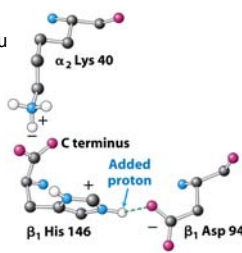
Osim što prenosi kisik, hemoglobin prenosi i H⁺ i CO₂

Utjecaj pH na afinitet vezanja kisika.

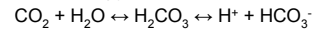
Snižavanjem pH dolazi do lakšeg otpuštanja O₂ s hemoglobina.



Protoni se vežu na bočne ogranke aminokiselina i time se učvršćuju ionske veze. Ionske veze brojnije su u T stanju.

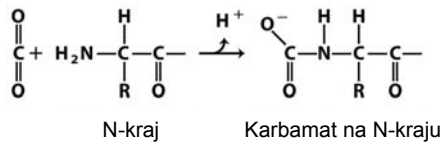
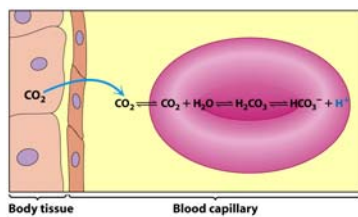


CO₂ koji nastaje oksidacijama u mitohondrijima se hidratizira, a reakciju katalizira ugljikova anhidraza:



Hemoglobin transportira oko 40% ukupne količine H⁺ i oko 15 – 20% CO₂. Vežanje H⁺ obratno je proporcionalno vežanju kisika što se događa kod relativno niskog pH i visoke CO₂ koncentracije kakve su u perifernom tkivu. Afinitet hemoglobina za kisik se smanjuje kako se H⁺ i CO₂ vežu za hemoglobin, pa u perifernom tkivu dolazi do otpuštanja O₂ s hemoglobina. Obratno, u plućima gdje dolazi do otpuštanja CO₂ a time i do povećanja pH, kisik se bolje veže na hemoglobin pa se može ponovno transportirati u periferna tkiva. **Efekt pH i koncentracije CO₂ na vežanje kisika nazivamo Bohrovim efektom.**

Vežanjem CO₂ na hemoglobin, afinitet vezanja kisika dodatno se smanjuje



Vežanjem CO₂ nastaju negativno nabijene karbamatne skupine na N-krajevima lanaca pa to dodatno stabilizira T stanje jer dolazi do stvaranja ionskih veza.

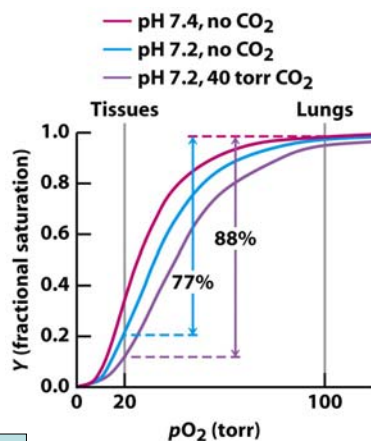
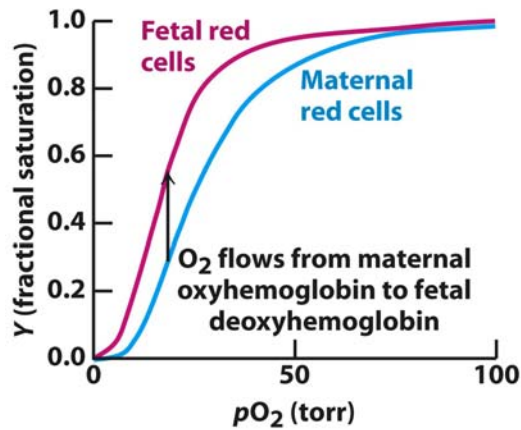


Figure 7-21
Biochemistry, Sixth Edition
© W. H. Freeman and Company

Fetalni hemoglobin ima veći afinitet za kisik nego majčin hemoglobin



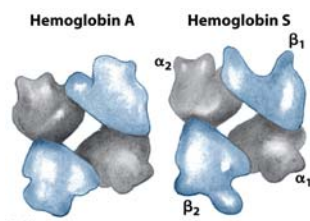
Fetalni hemoglobin slabije veže 2,3-bisfosfoglicerat, pa je afinitet vezanja kisika fetalnog hemoglobina veći nego što je to za majčin hemoglobin

Figure 7-17
Biochemistry, Sixth Edition
© 2005 W. H. Freeman and Company

Mutacija u genu hemoglobina uzrokuje srpastu anemiju

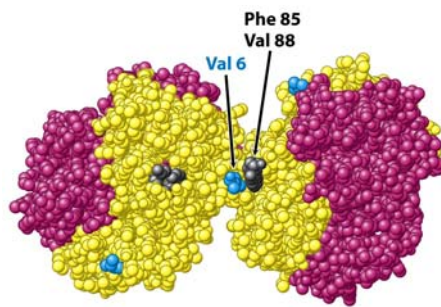


Srpasta anemija javlja se kad pojedinci nasljeđuju alele za srpasti hemoglobin od oba roditelja, tj. obje alele za β -podjedinicu hemoglobina su mutirane. Kad se srpasti hemoglobin (hemoglobin S) deoksigenira, on postaje netopljiv, za razliku od normalnog hemoglobina A.



Srpasti hemoglobin nastaje zbog ugradnje aminokiseline **Val** umjesto **Glu** na poziciji 6 β podjedinice hemoglobina. Ugradnja ove hidrofobne aminokiseline razlog je da dolazi do promjene konformacija β podjedinica.

Prikaz interakcija dvije molekule deoksigeniranog srpastog hemoglobina (hemoglobin S)



Interakcija između Val 6 na β podjedinici jedne molekule hemoglobina s hidrofobnim bočnim ograncima aminokiselina Phe 85 i Val 88 koje su na β podjedinici jedne druge molekule hemoglobina S dovodi do agregacije molekula. Val 6 ostaci koji su na površini druge β podjedinice sudjeluju u sličnim interakcijama.

Phe 85 i Val 88 na površinu hemoglobina dolaze samo kada kod deoksi-hemoglobina (hemoglobina koji nema vezani kisik)

Hidrofobnim interakcijama između hemoglobina S nastaju netopljivi agregati

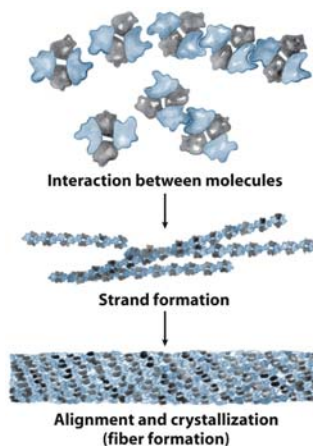


Figure 5-20b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Netopljivi agregati hemoglobina S deformiraju oblik eritrocita. Broj srpastih eritrocita se povećava kako se krv deoksigenira.