

## Funkcije proteinov (pogojene s strukturo)

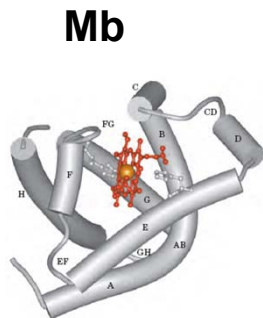
- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- **Transport/skladiščenje določenih molekul (ligandov, npr. Hb, Mb)**
- Uravnavanje procesov (DNA-vezavni proteini)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (Imunoglobulini)
- Lipoproteini, potrebni za transport lipidov po telesu
- Kontraktilni proteini
- Membranski proteini, vključeni v transport molekul/ionov preko membrane
- Proteini, vključeni v prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)



# Proteini, ki vežejo kisik

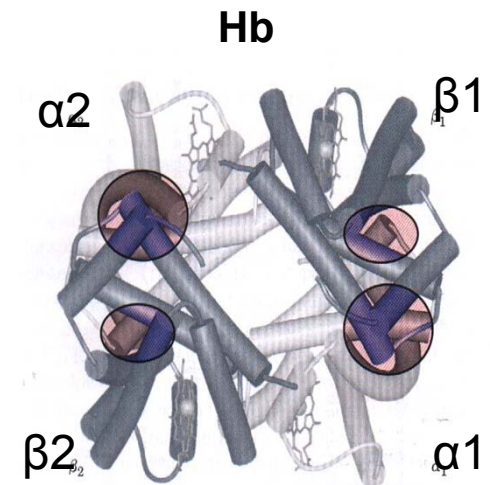
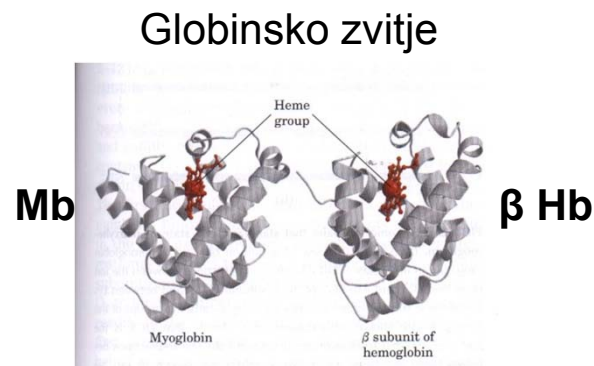
## Mioglobin (Mb)

- 1 polipeptidna veriga
- Vsebuje 1 prostetično skupino hem
- Hem – mesto vezave kisika ( $O_2$ )
- Funkcija: skladiščenje kisika v mišicah



## Hemoglobin (Hb)

- 4 podenote 2  $\alpha$  in 2  $\beta$  ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>
- Vsebuje 4 prostetične skupine hem
- Hem – mesto vezave kisika ( $O_2$ )
- Funkcija: prenos kisika po krvi od pljuč do tkiv



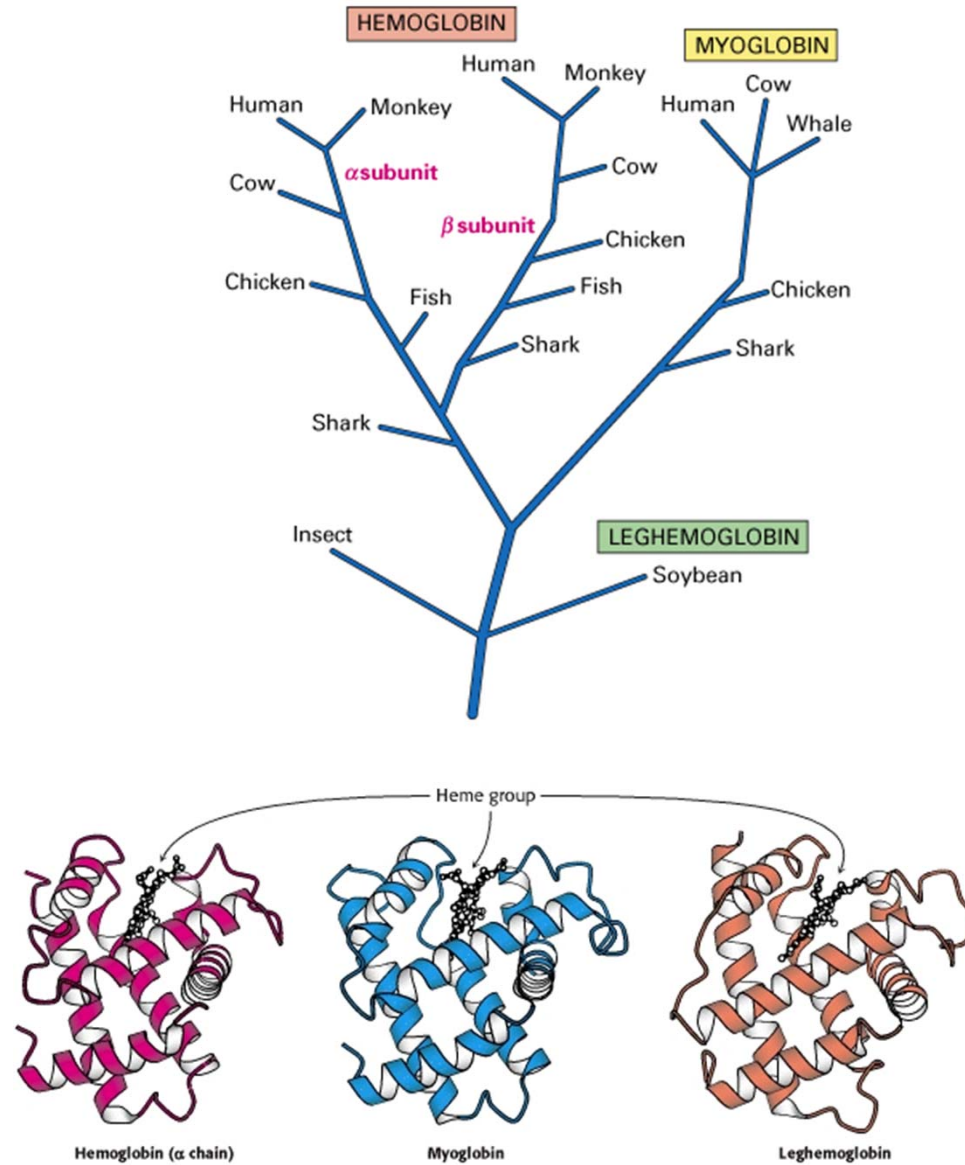
## Nepolarni plini se v krvi prenašajo na proteinih

**TABLE 2-3** Solubilities of Some Gases in Water

Gas	Structure *	Polarity	Solubility in water (g/L) <sup>†</sup>
Nitrogen	$\text{N}\equiv\text{N}$	Nonpolar	0.018 (40 °C)
Oxygen	$\text{O}=\text{O}$	Nonpolar	0.035 (50 °C)
Carbon dioxide	$\begin{array}{c} \delta^- \quad \delta^- \\ \longleftarrow \quad \longrightarrow \\ \text{O}=\text{C}=\text{O} \end{array}$	Nonpolar	0.97 (45 °C)
Ammonia	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad   \quad \diagup \\ \text{N} \\ \downarrow \delta^- \end{array}$	Polar	900 (10 °C)
Hydrogen sulfide	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \\ \downarrow \delta^- \end{array}$	Polar	1,860 (40 °C)

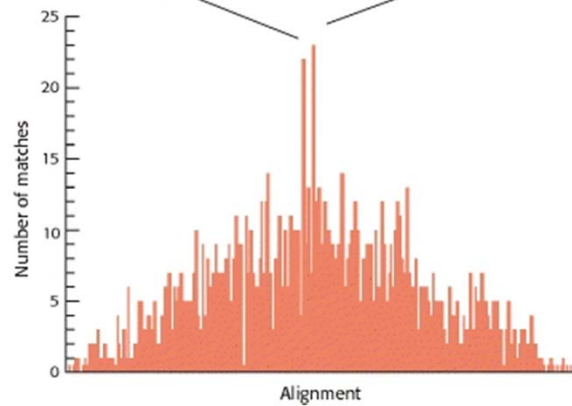
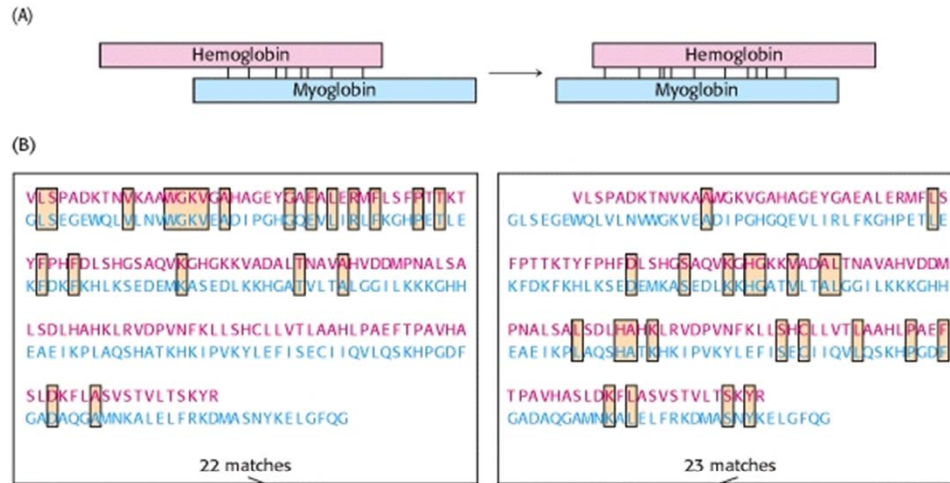
- Večje živali – potreba po sistemu, ki prenaša in shranjuje kisik
- Za vezavo kisika primerni prehodni elementi – železo **Fe**

# Proteini, ki prenašajo kisik - družina globinov



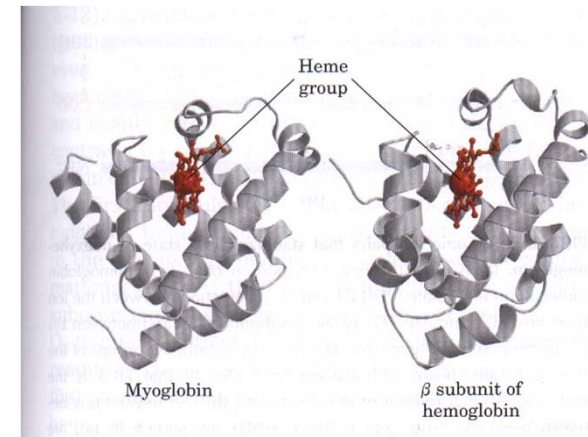
# Mioglobin in hemoglobin spadata v družino globinov

Velika sorodnost hemoglobinov z mioglobinom



Podobnost aminokislinskega zaporedja

Globinsko zvitje

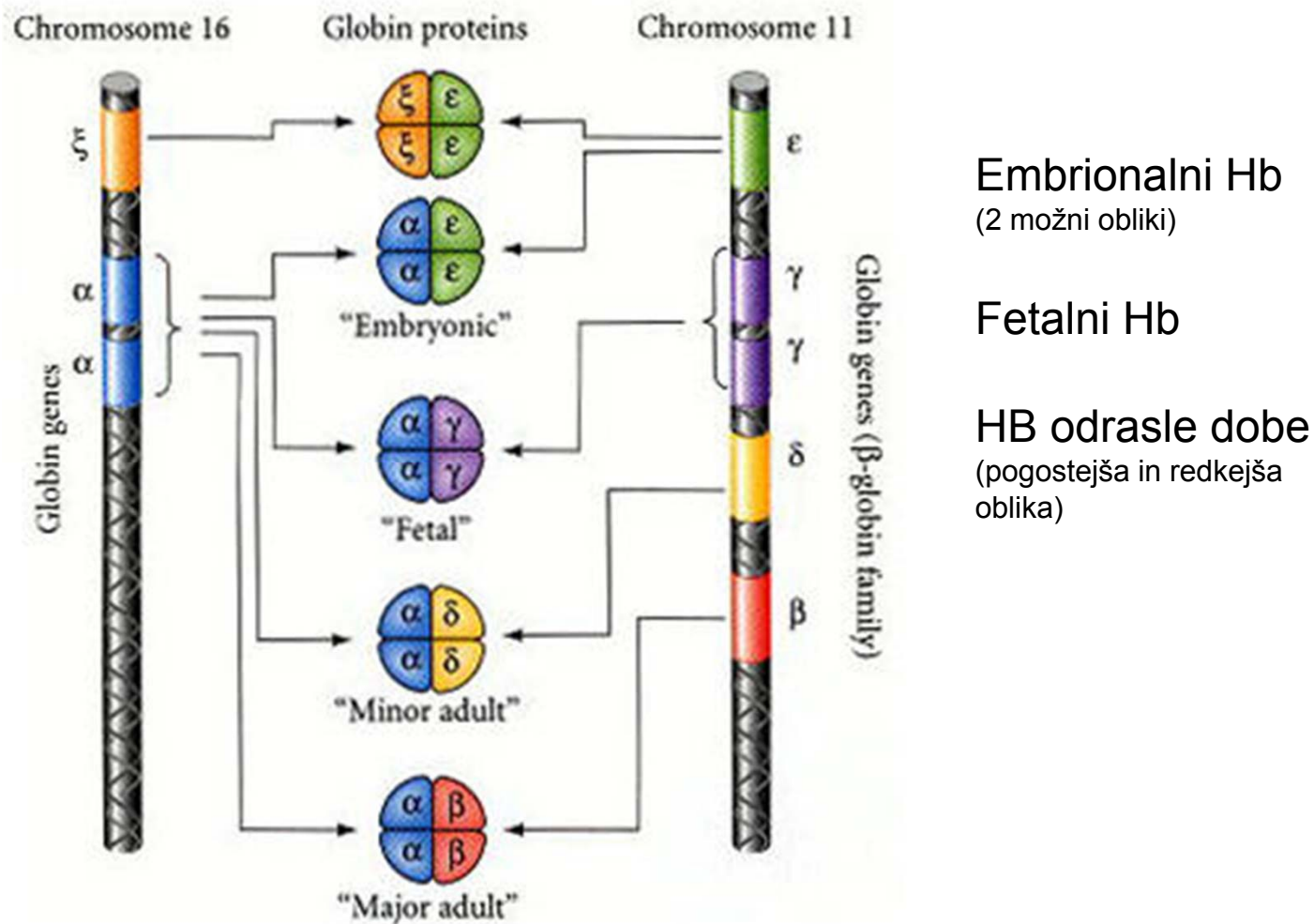


Mb

$\beta$  podenota Hb

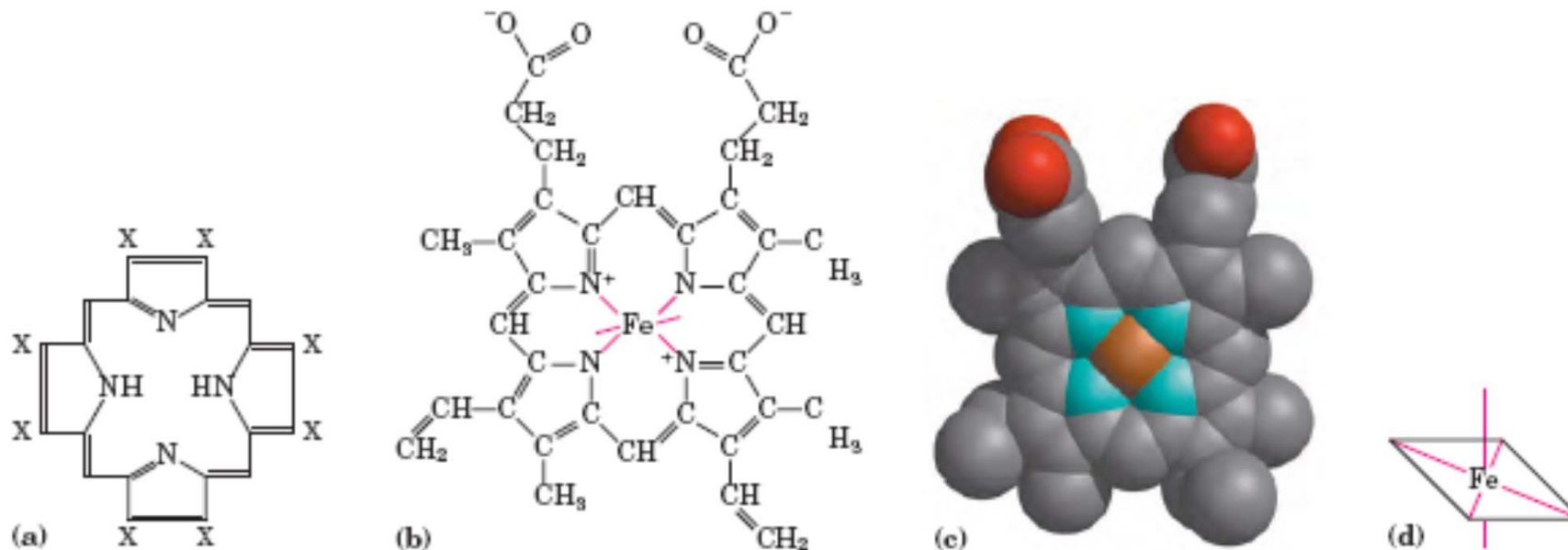
Podobnost 3D strukture - zvitja

# Hemoglobini pri človeku se tekom razvoja osebka spreminjajo



Različne oblike Hb imajo različne značilnosti vezave kisika (saturacijske krivulje)

## Prostetična skupina v proteinih, ki vežejo kisik, je hem



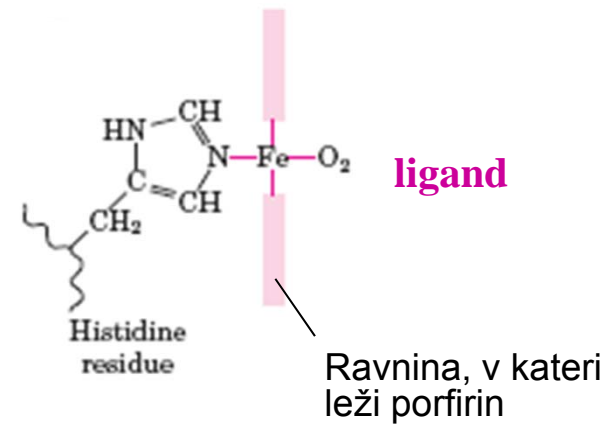
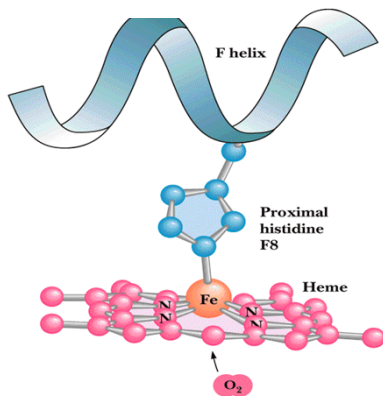
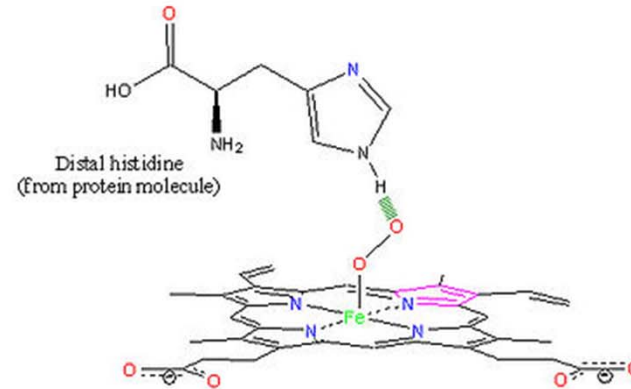
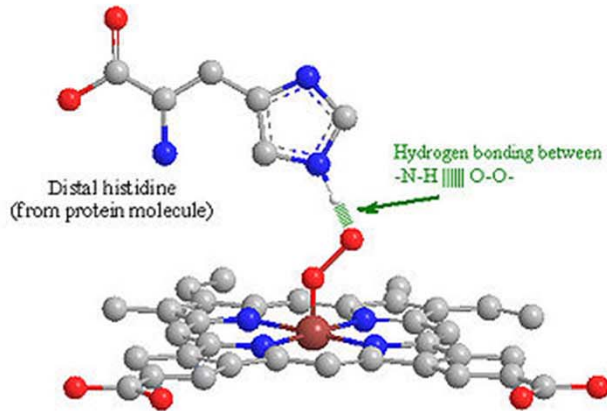
porfirin

- protoporfirin IX - hem
- Fe vezano s 4 koordinativni vezmi na N pirolovih obročev (vsi atomi ležijo v isti ravnini)
- 2 vezi sta prosti

Fe s šestimi koordinativnimi vezmi

# Umestitev hema v protein (globin)

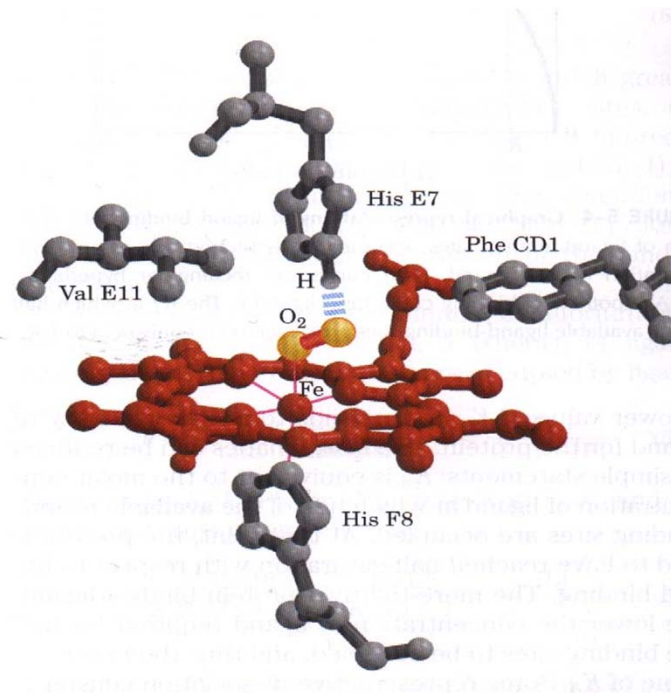
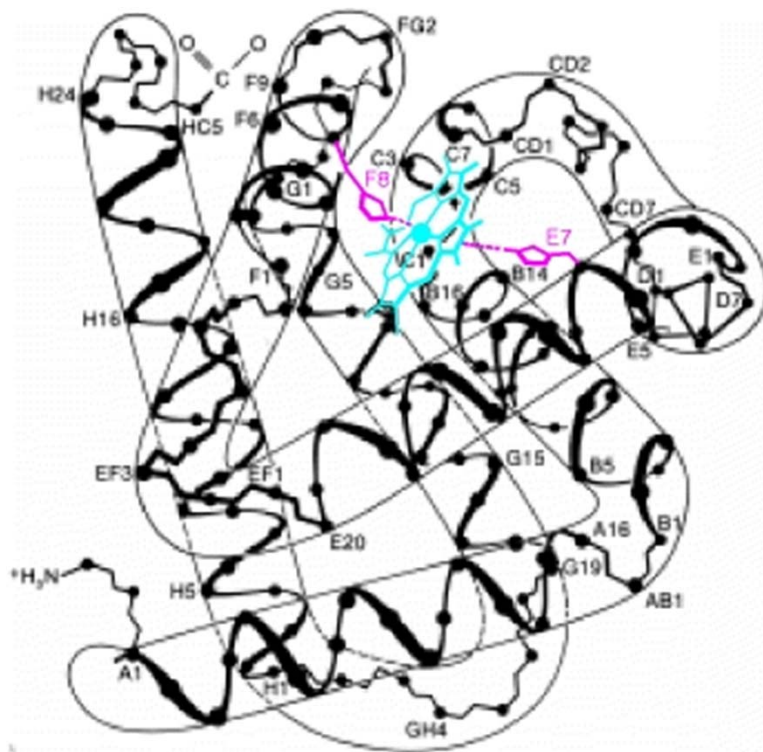
Fe tvori 4 koordinativne vezi s pirolnimi obroči v hemu



Vodikova vez s His ostankom vijačnice (F) verige globina

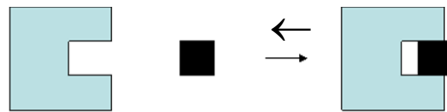
Ena koordinata ostane prosta za ligande: O<sub>2</sub>, NO, CO

**Kisik je ligand hema v hemoglobinu in mioglobinu:  
kisik se veže preko železovega atoma (Fe 2+) v hemu**



## Vezava ligandov na protein

- Molekula – ligand se reverzibilno veže na protein
- Ligand se veže na vezavno mesto proteina, ki je komplementarno glede velikosti in oblike liganda, naboja, hidrofobnih in hidrofилnih interakcij

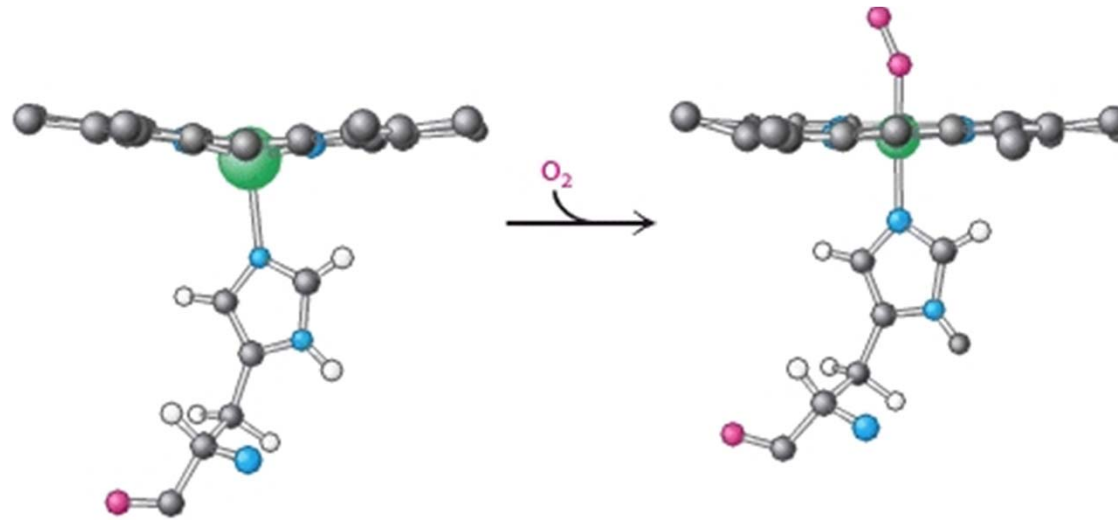


- Vezavno mesto je selektivno, torej specifično za določen ligand
- Vezava liganda povzroči konformacijsko spremembo proteina, ki vodi k močnejši vezavi; strukturna adaptacija med proteinom in ligandom – inducirano prilagajanje



- Pri multimernih proteinih povzroči vezava liganda na eno podenoto konformacijsko spremembo drugih podenot (alosterični efekt)  
vezava ligandov ( $O_2$ ) na mioglobin (**Mb**) in hemoglobin (**Hb**)

**Vezava kisika na hem mioglobina in hemoglobina povzroči spremembo položaja Fe (2+) iona  
(konformacijska sprememba)**



deoksihemoglobin

oksihemoglobin

## Reverzibilna vezava liganda na protein



P – protein

L – ligand

PL – kompleks protein-ligand

$$K_a = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]}$$

Delež zasedenih  
vezavnih mest

$$\theta = \frac{\text{zasedena vezavna mesta}}{\text{vsa vezavna mesta}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}$$

$$\theta = \frac{K_a \cdot [L] \cdot \cancel{[P]}}{K_a \cdot [L] \cdot \cancel{[P]} + [P]} = \frac{\cancel{K_a} \cdot [L]}{\cancel{K_a} \cdot [L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}}$$

$K_a$  – asociacijska konstanta  
za nastanek kompleksa PL

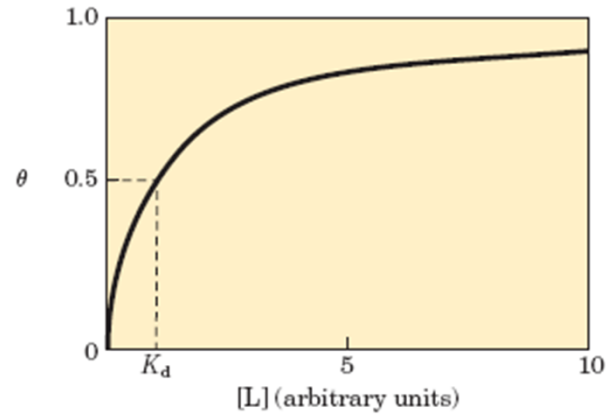
$K_d$  – disociacijska konstanta  
kompleksa PL

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

## Vezava liganda (L) na protein: enačba in grafična predstavitev

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$



## Vezava kisika na Mb: $\text{Mb} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{MbO}_2$

Ligand L –  $\text{O}_2$

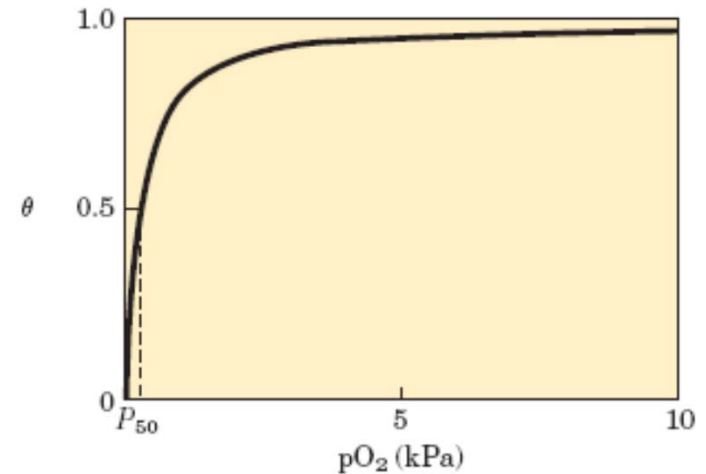
$\theta$  – delež zasedenih vezavnih mest

$K_d$  – disociacijska konstanta kompleksa  $\text{MbO}_2$

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

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

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

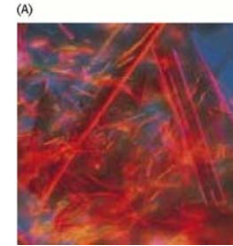
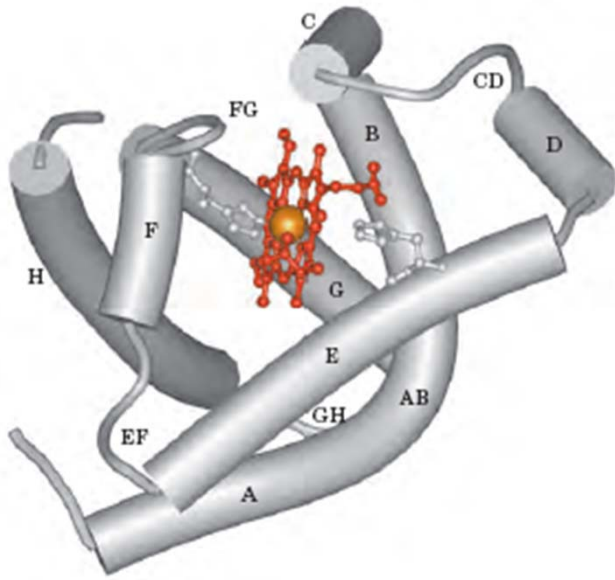


Koncentracijo plinov izražamo s parcialnim tlakom plinov - p

$p\text{O}_2$  – parcialni tlak kisika

$P_{50}$  – parcialni tlak kisika, kjer je 50% vezavnih mest zasedenih

# Mioglobin



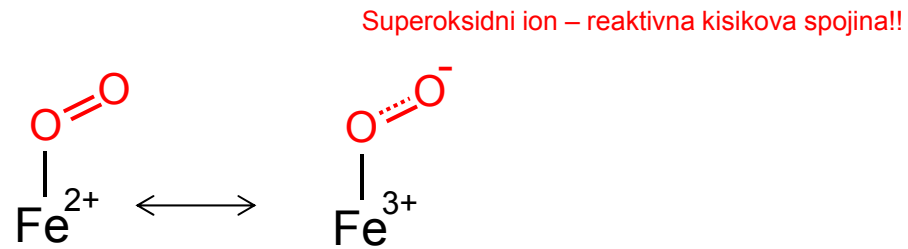
- kompaktna molekula, v notranjosti le 4 molekule  $H_2O$
- 8 segmentov (A-H)  $\alpha$ -vijačnic (7-23 ak)
- 75% strukture:  $\alpha$ -vijačnica
- hidrofobni –R v notranjosti, hidrofilni –R proti vodnemu okolju
- Pro na mestih  $\beta$ -zavojev
- prostetična skupina hem vezan v žep med E in F vijačnicama

•Mb se nahaja v mišičnih celicah, rdeče/rjave barve

• $M_r = 16\ 700$ , 1 polipeptidna veriga, 153 ak

•3D strukturo ugotovil l. 1950, John Kendrew s sod. z Rtg kristalografijo

# Struktura mioglobina prepreča sproščanje reaktivnih kisikovih spojin

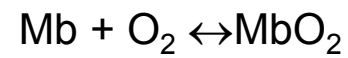
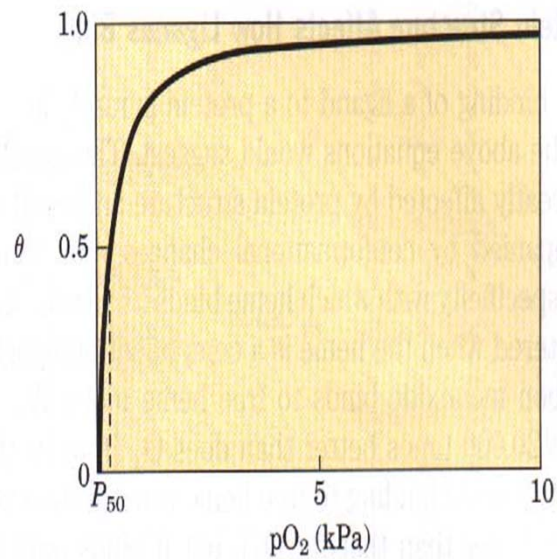


Resonančna struktura vezave kisika na hem

- Kisik mora zapustiti železo v obliko  $\text{O}_2$  in ne v obliki superoksidnega aniona!
- Če kisik zapusti železo v obliki  $\text{O}_2^-$ , dobimo metmioglobin z  $\text{Fe}^{3+}$  (*feri* železo)
- Metmioglobin ne more prenašati kisika – mioglobin izgubi sposobnost shranjevanja kisika
- Za prenos kisika mora železo ostati  $\text{Fe}^{2+}$  (*fero* železo)

## Mb ni primeren za prenos kisika iz pljuč v tkiva

Vezava O<sub>2</sub> na Mb



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

- Razmere v pljučih: PO<sub>2</sub> 13,3 kPa oz. 90 mm Hg
- Razmere v tkivih: PO<sub>2</sub> 4 kPa oz. ~30 mm Hg
- Glede na vezavno krivuljo bi bil O<sub>2</sub> stalno vezan na Mb

## Hemoglobin (Hb) – sestavljen iz štirih mioglobinu podobnih enot (kvartarna struktura)

- Hb odrasle dobe: tetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) kroglaste oblike, Mr 64 000
- $\alpha$  veriga: 141 ak ostankov,  $\beta$  veriga 145 ak ostankov
- Hemi se nahajajo v vdolbinah na zunanosti molekule
- Ak zaporedje verig Hb in Mb ni enako, samo 27 ak ostankov identičnih, terciarna struktura zelo podobna (globinsko zvitje)
- Hb veže 4 molekule  $O_2$ , vezava je kooperativna.

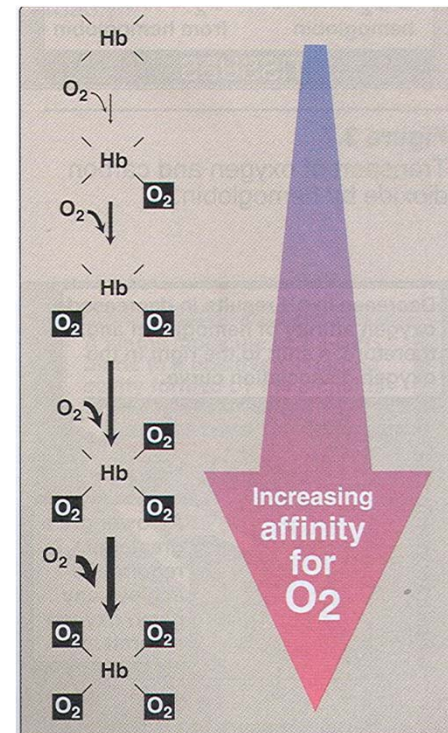
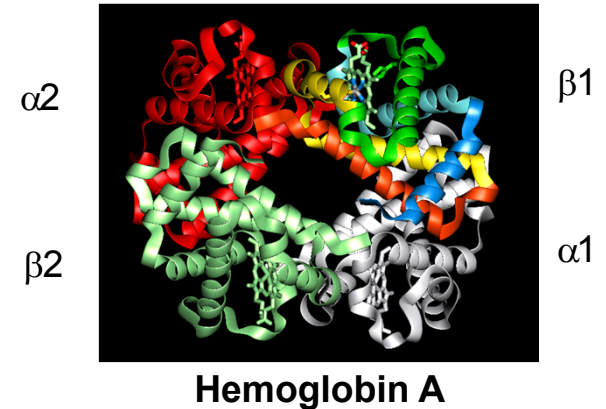
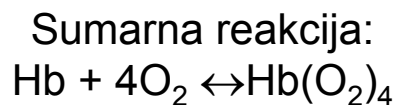
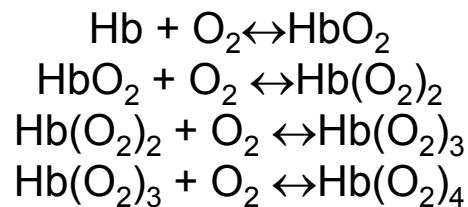


Figure 3.6

Hemoglobin (Hb) binds oxygen with increasing affinity.

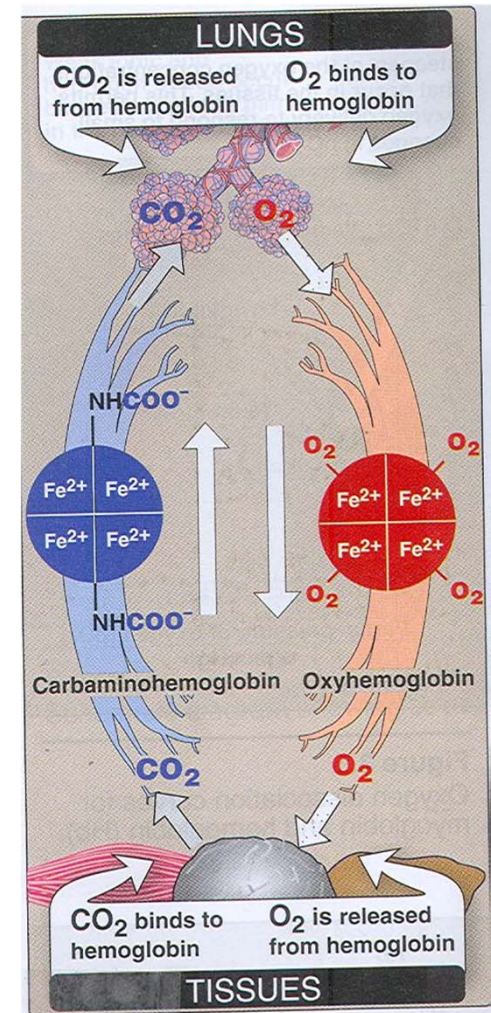
## Hemoglobin je alosterični protein

- Vezava liganda (modulatorja) na eno vezavno mesto spremeni vezavne lastnosti drugih vezavnih mest
- Konformacijska sprememba, povzročena z vezavo modulatorja: manj aktiven protein v bolj aktiven protein (ali obratno)
- Modulatorji: inhibitorji ali aktivatorji
- **Aktivator  $O_2$  - pozitiven homotropični modulator (kooperativna vezava, značilna sigmoidna krivulja)**
- **Inhibitorji:  $CO_2$ ,  $H^+$ , BPG negativni heterotropični modulatorji—vsi se vežejo na Hb z obratno afiniteto kot  $O_2$**

## Hem v hemoglobinu **veže kisik** in ga prenaša po krvi iz pljuč do perifernih tkiv

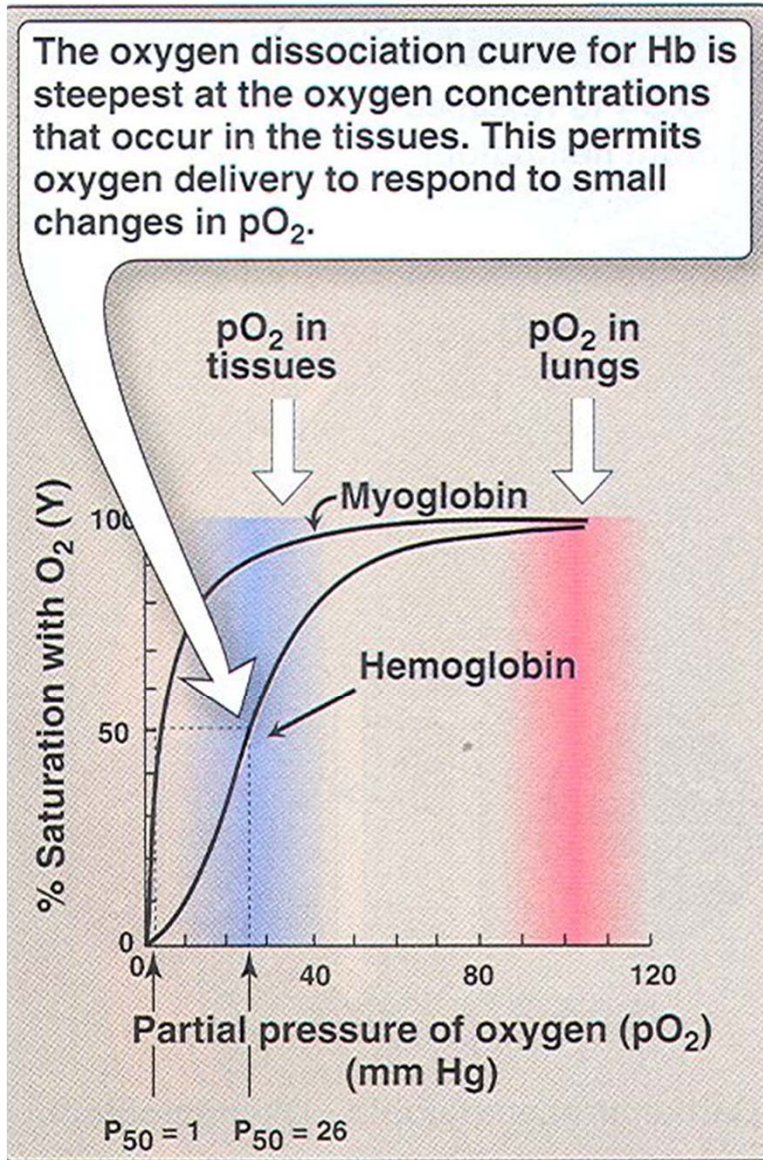


- Hb se nahaja v eritrocitih
- Eritrociti so celice brez jedra, namenjene prenosu  $\text{O}_2$
- V citosolu vsebujejo ~34% Hb
- Arterijska kri ~96% zasičena s kisikom, venska ~64% →  $\text{O}_2$  se sprosti v tkivih, kjer se porabja za oksidacijo hranil
- $\text{CO}_2$  in  $\text{H}^+$  se prenašata iz tkiv v pljuča
- Hb prenese v telesu ~500 g  $\text{O}_2$ /dan = 15,6 molov  $\text{O}_2$ /dan



Hb prenaša  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}^+$

$\text{CO}_2$  in  $\text{H}^+$  se v na periferiji vežeta na proteinski del hemoglobina in se preneseta do pljuč



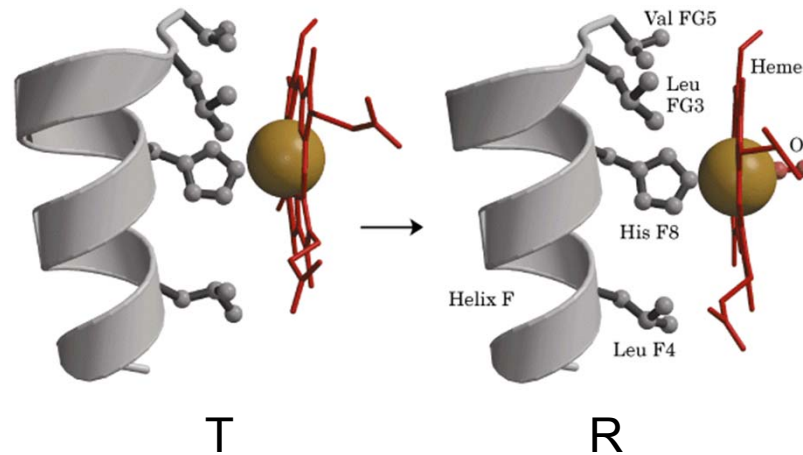
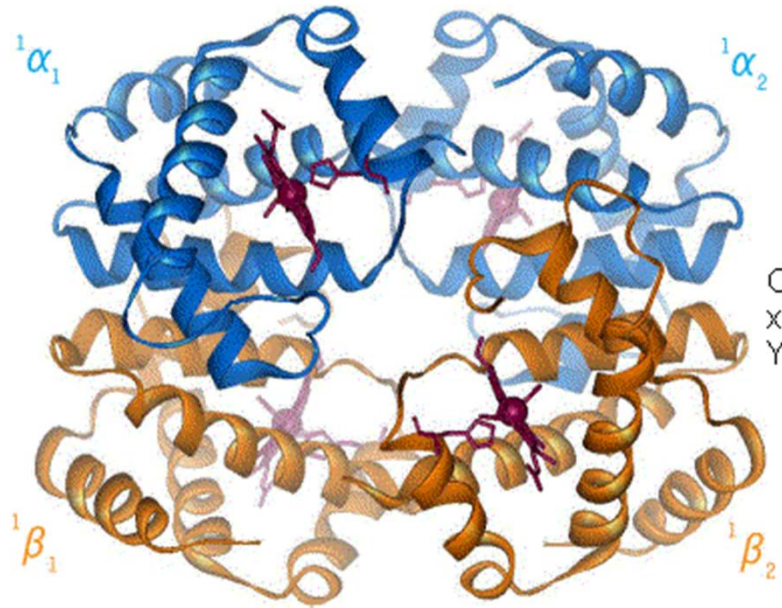
Razmere v pljučih:  $pO_2$  13,3 kPa oz. 90 mm Hg

Razmere v tkivih:  $pO_2$  4 kPa oz. ~30 mm Hg

**Figure 3.5**

Oxygen dissociation curves for myoglobin and hemoglobin (Hb).

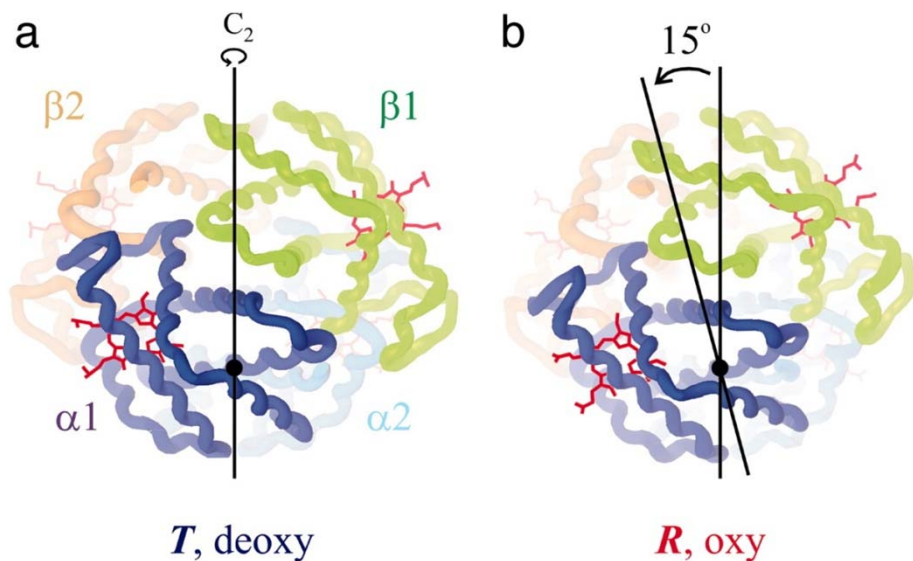
# Konformacijska sprememba Hb ob vezavi kisika



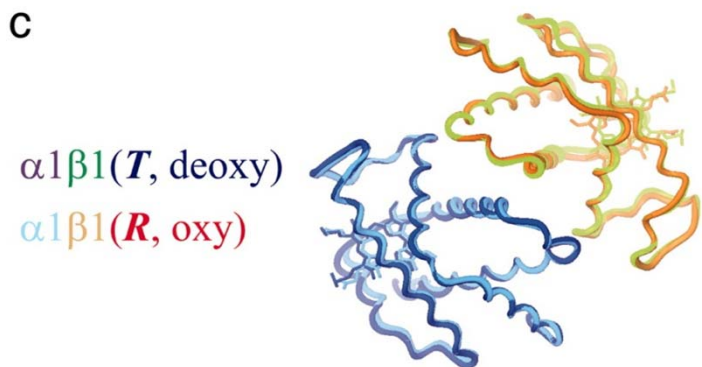
T(tense) = deoksi

R (relaxed) = oksid

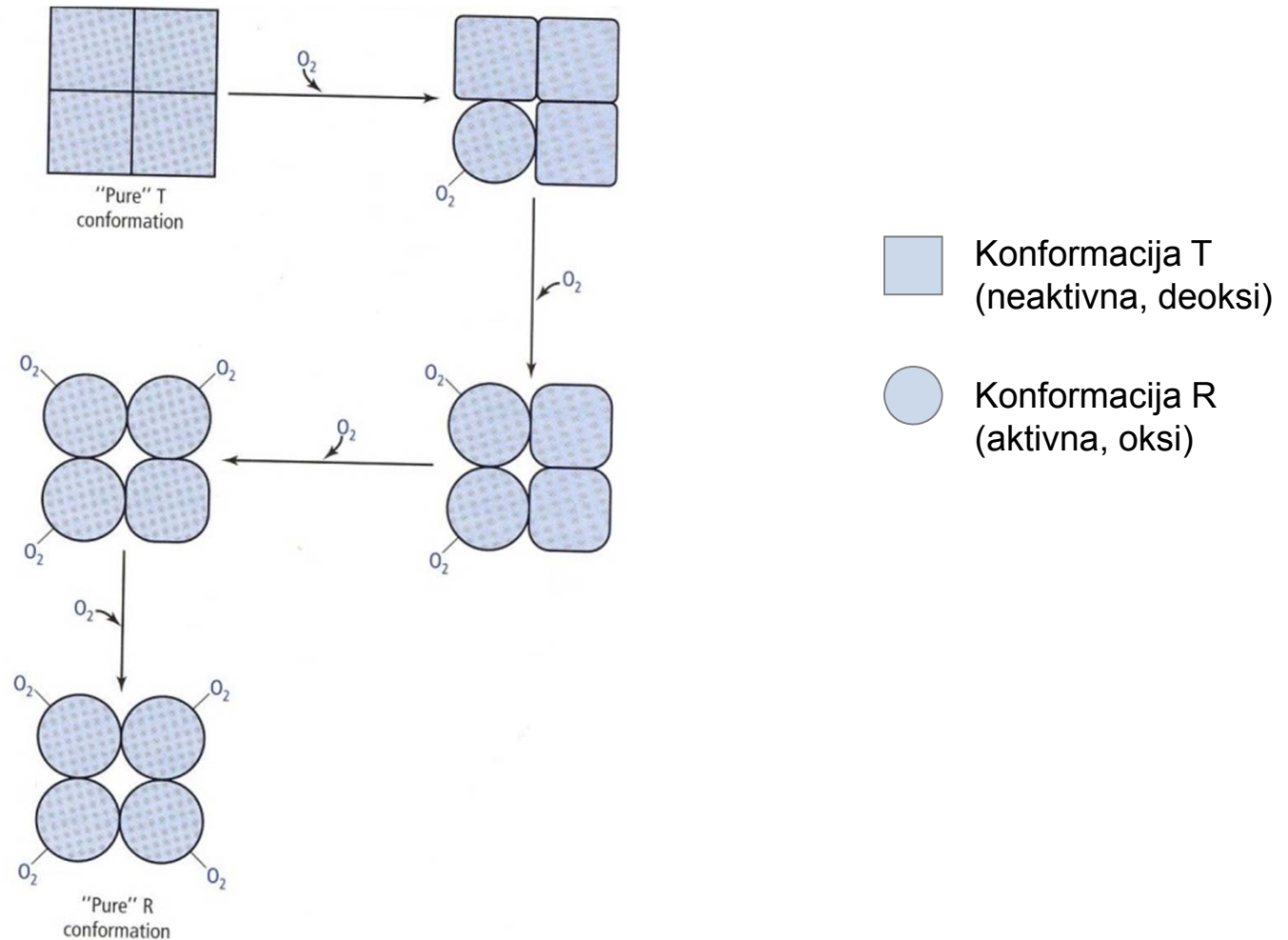
## Interakcije med podenotami Hb ( $\alpha\beta$ )



- Hb obstaja v 2 različnih konformacijah: R in T
- $O_2$  ima večjo afiniteto do stanja R
- Stanje T (deoksihemoglobin) je stabilizirano, če ni kisika
- $O_2$  povzroči konformacijsko spremembo T  $\rightarrow$  R



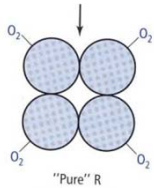
## Model prehoda T → R ob vezavi O<sub>2</sub>



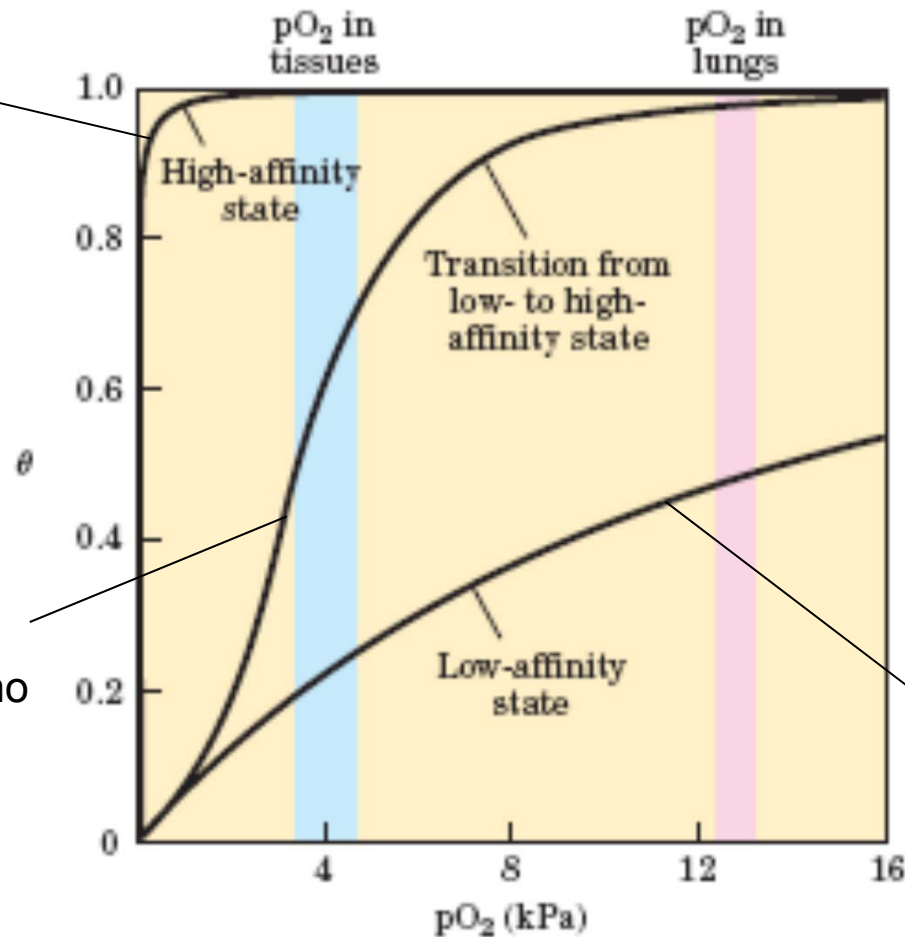
- Vezava kisika na Fe v hemu spremeni 3D strukturo hema (sploščenje molekule)
- Sprememba 3D strukture hema se odraži na proteinskem delu molekule, ki je povezan s hemom preko his ostanka → konformacijska sprememba prve podenote se prenese na sosednjo podenoto. Proces je kooperativen.

# Pozitivna kooperativna vezava O<sub>2</sub> na Hb – sigmoidna krivulja

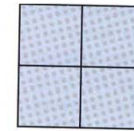
Stanje R - visokoafinitetno stanje



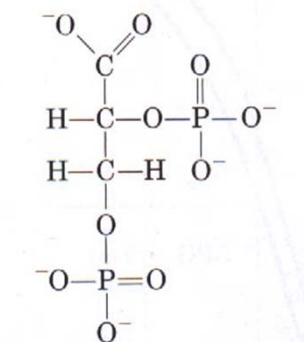
Prehod iz nizko v visokoafinitetno stanje



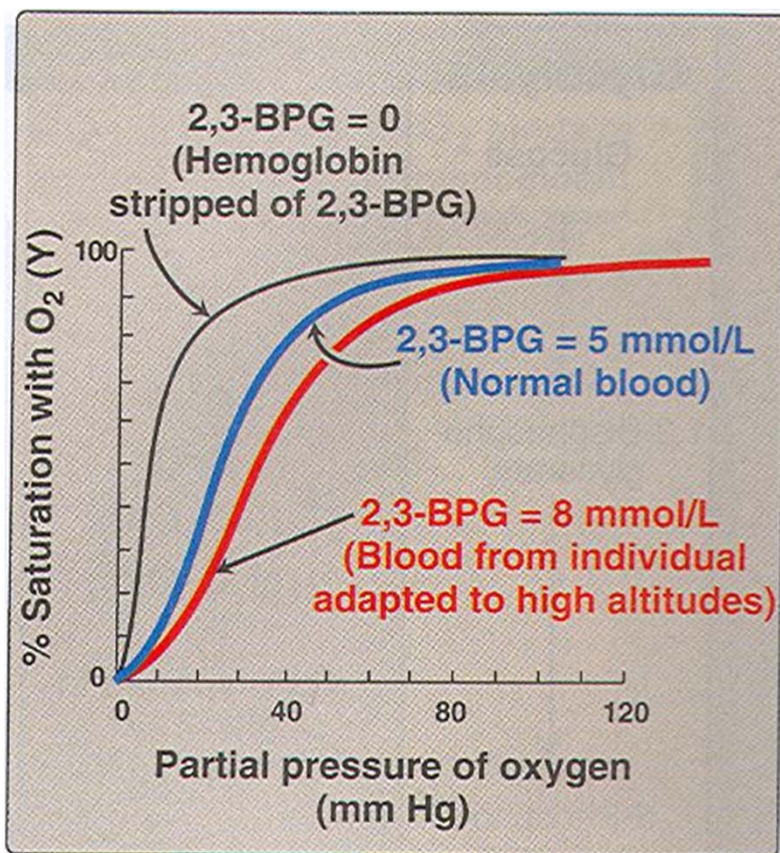
Stanje T – nizkoafinitetno stanja



## 2,3-bisfosfoglicerat (BPG) vpliva na oksigenacijo/deoksigencijo Hb

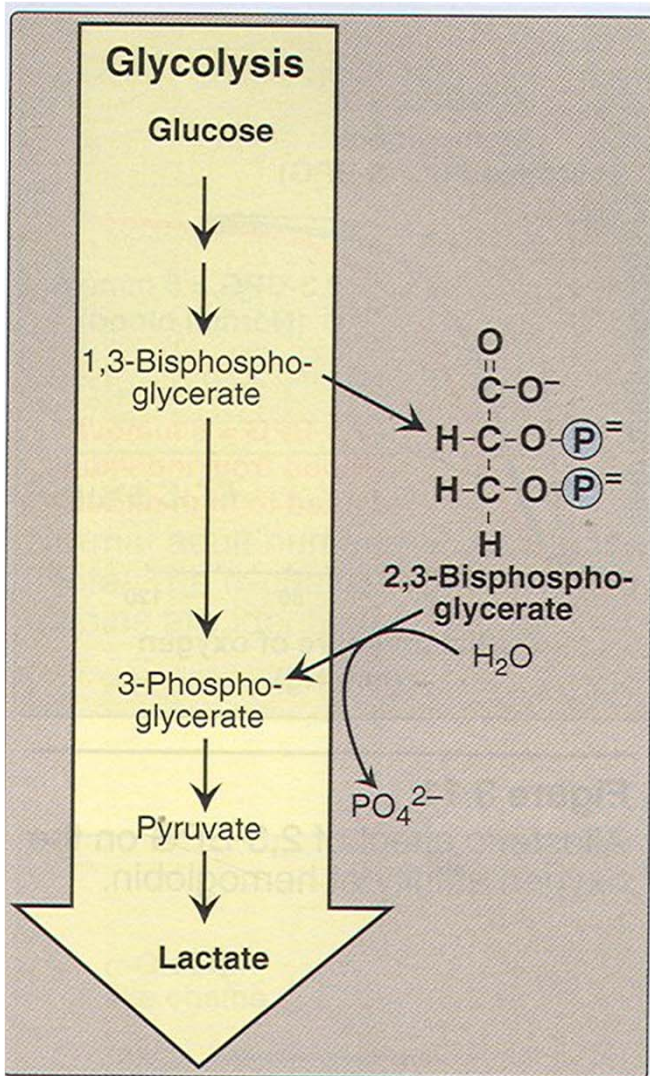


2,3-Bisphosphoglycerate



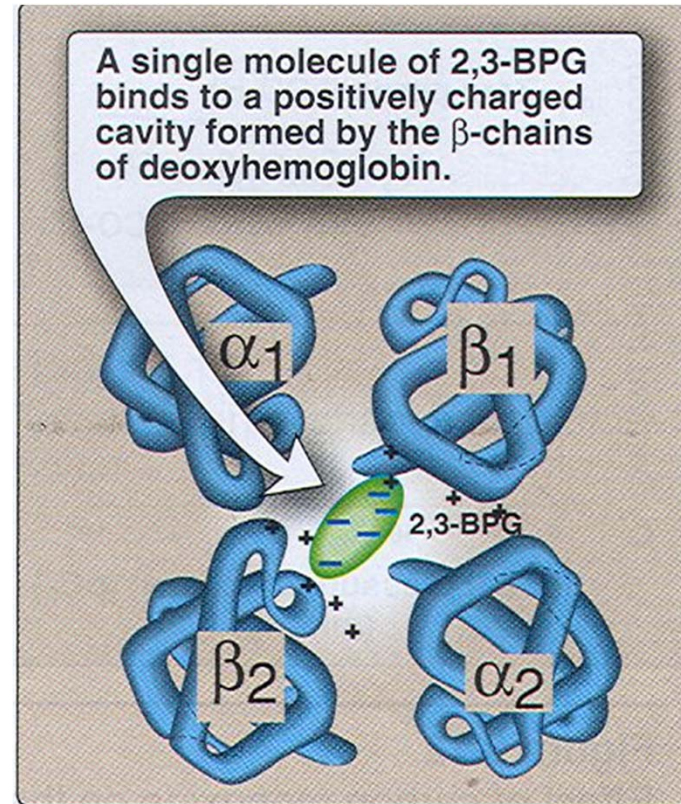
**Figure 3.11**

Allosteric effect of 2,3-BPG on the oxygen affinity of hemoglobin.



**Figure 3.9**

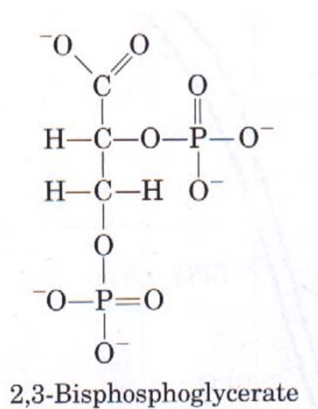
Synthesis of 2,3-bisphosphoglycerate. [Note:  $\text{P}$  is a phosphoryl group.]



**Figure 3.10**

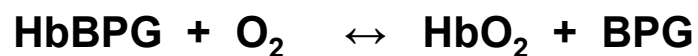
Binding of 2,3-BPG by deoxyhemoglobin.

## 2,3-bisfosfoglicerat (BPG) vpliva na oksigenacijo/deoksigencijo Hb



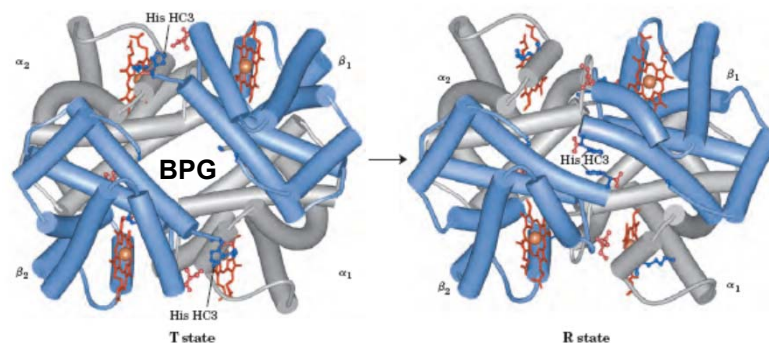
- Visoka koncentracija BPG (5 mM) v eritrocitih
- BPG se veže v centralni žep med  $\beta$  podenotami v stanju T
- 1 molekula BPG se veže na 1 molekulo Hb
- BPG zniža afiniteto do  $O_2$ , stabilizira T stanje Hb
- Vezavni žep za BPG izgine po prehodu T  $\rightarrow$  R stanje

BPG



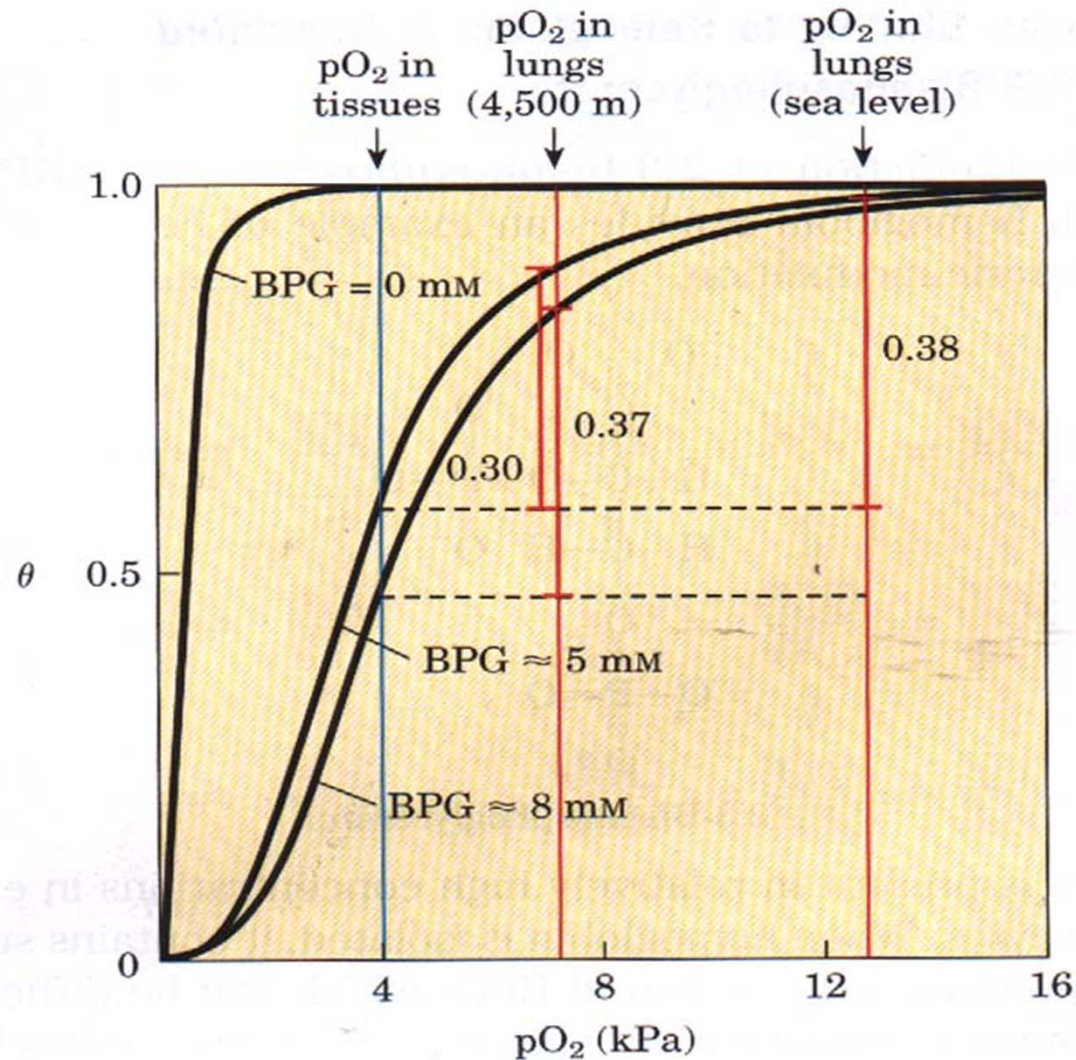
T stanje

R stanje



2,3-bisfosfoglicerat (BPG) - heterotropični alosterični modulator vezave  $O_2$  na Hb

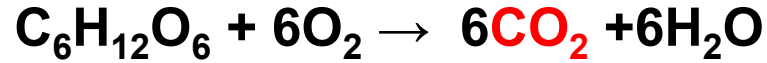
# Vpliv koncentracije BPG na vezavo O<sub>2</sub> na Hb



- Normalna konc. BPG v krvi na višini morske gladine ~ 5 mM
- Konc. BPG v krvi na nadmorski višini 4500m ~ 8 mM

# Hb prenaša tudi CO<sub>2</sub> in H<sup>+</sup>

oksidacija organskih hranil, npr glukoza

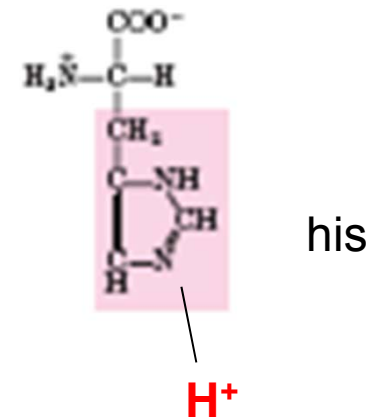
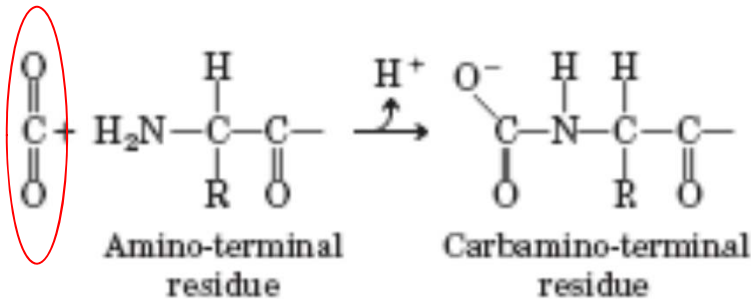


Prenos **CO<sub>2</sub>** iz tkiv  
v pljuča in ledvice

**15-20%** s Hb      80-85%  
kot bikarbonatni pufrski sistem  
In kot raztopljen CO<sub>2</sub>

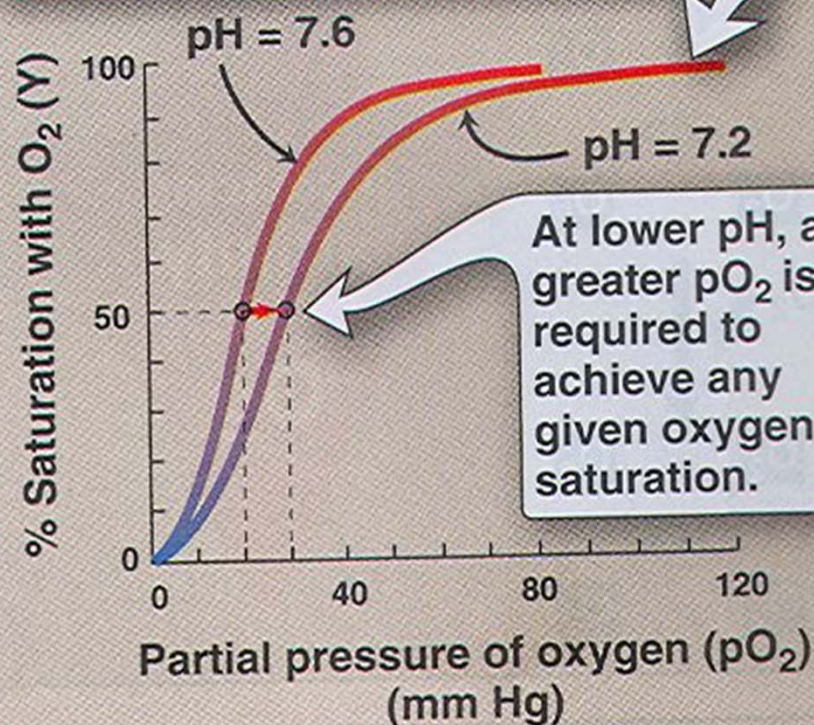
Prenos **H<sup>+</sup>** iz tkiv  
v pljuča in ledvice

**40%** s Hb      60% kot  
plazemski  
pufrski sistemi





Decrease in pH results in decreased oxygen affinity of hemoglobin and, therefore, a shift to the right in the oxygen dissociation curve.

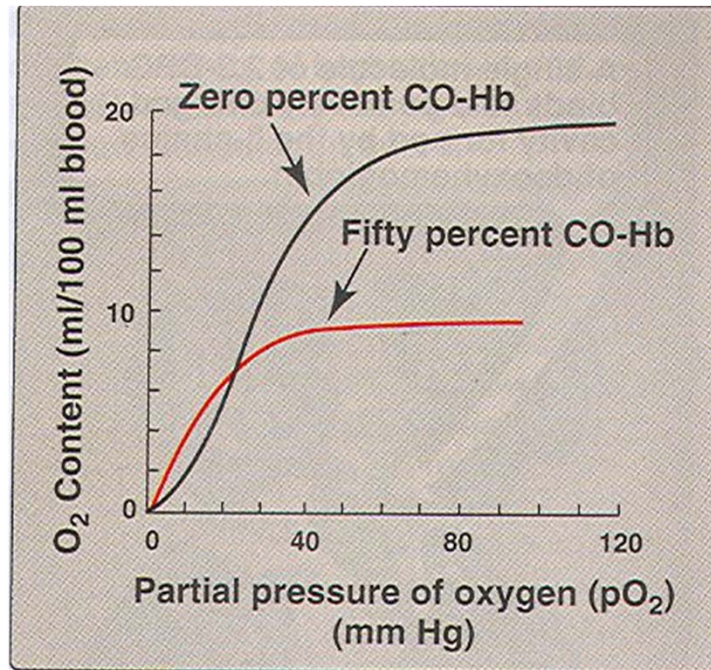


**Figure 3.8** Effect of pH on the oxygen affinity of hemoglobin. Protons are allosteric effectors of hemoglobin.

# Alosterični proteini

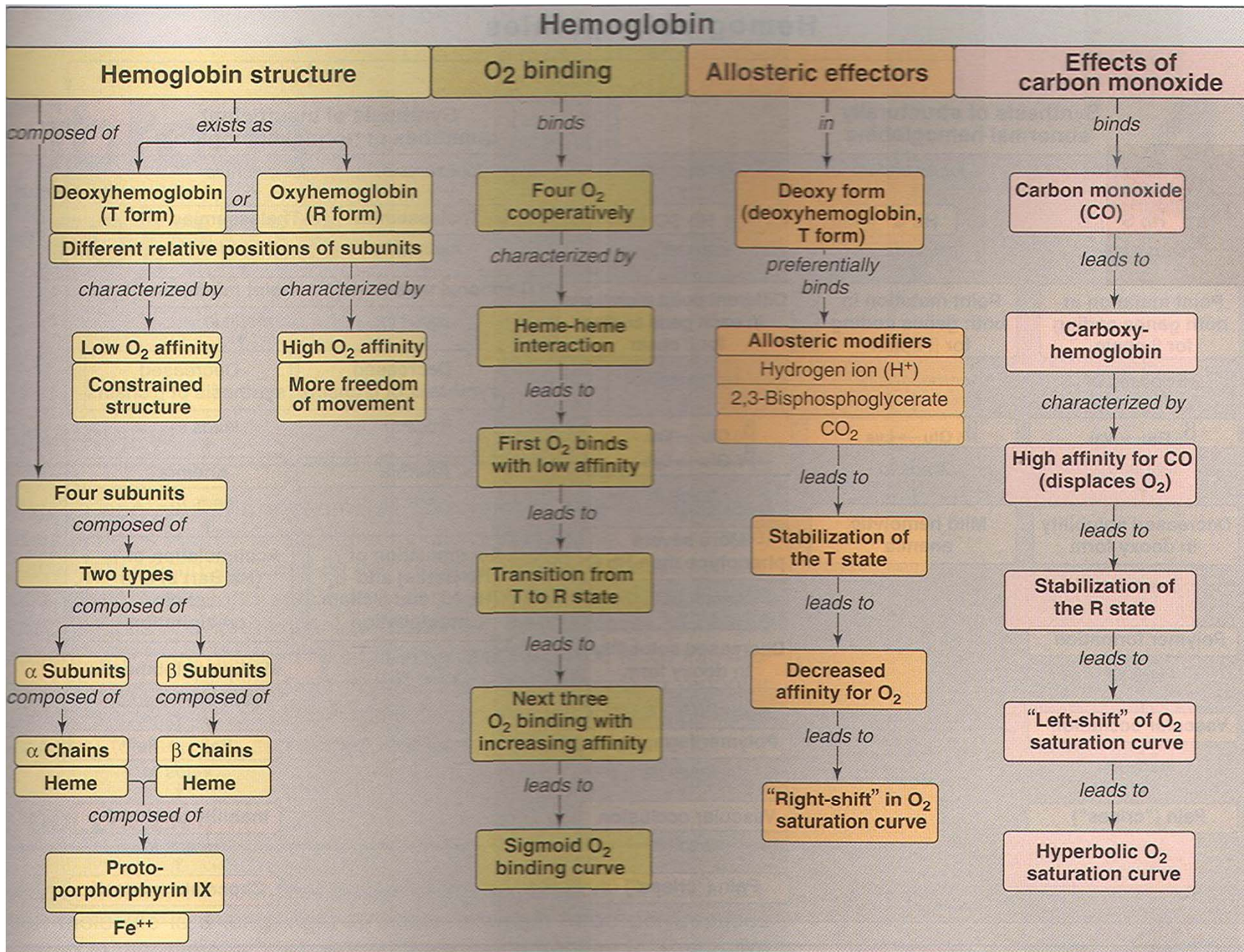
- Vezava liganda (modulatorja) na eno vezavno mesto spremeni vezavne lastnosti drugih vezavnih mest.
- Konformacijska sprememba, povzročena z vezavo modulatorja: manj aktiven protein v bolj aktiven protein (ali obratno).
- Alosterični modulatorji so inhibitorji ali aktivatorji.
- $O_2$  - pozitivni homotropični modulator vezave  $O_2$  na Hb (kooperativna vezava, značilna sigmoidna krivulja)
- $CO_2$ ,  $H^+$ , BPG negativni heterotropični modulatorji vezave  $O_2$  na Hb – vsi se vežejo na Hb z obratno afiniteto kot  $O_2$

## Vpliv CO na afiniteto hemoglobina za vezavo kisika



**Figure 3.12**

Effect of carbon monoxide on the oxygen affinity of hemoglobin. CO-Hb = carbon monoxy-hemoglobin.



**Figure 3.24**

Key concept map for hemoglobin structure and function.