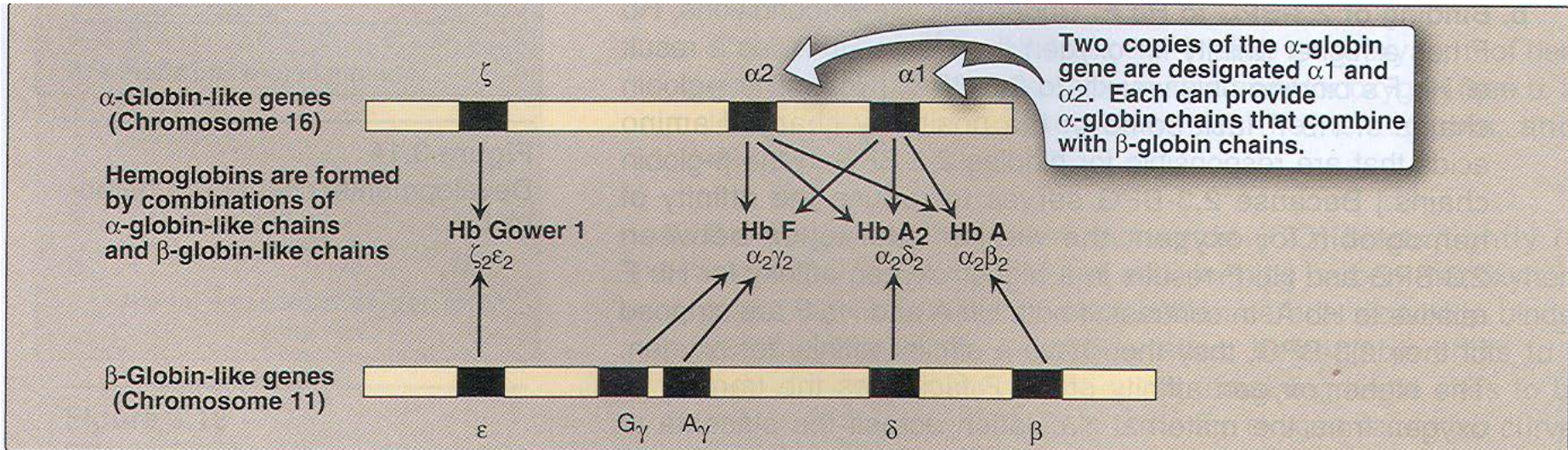


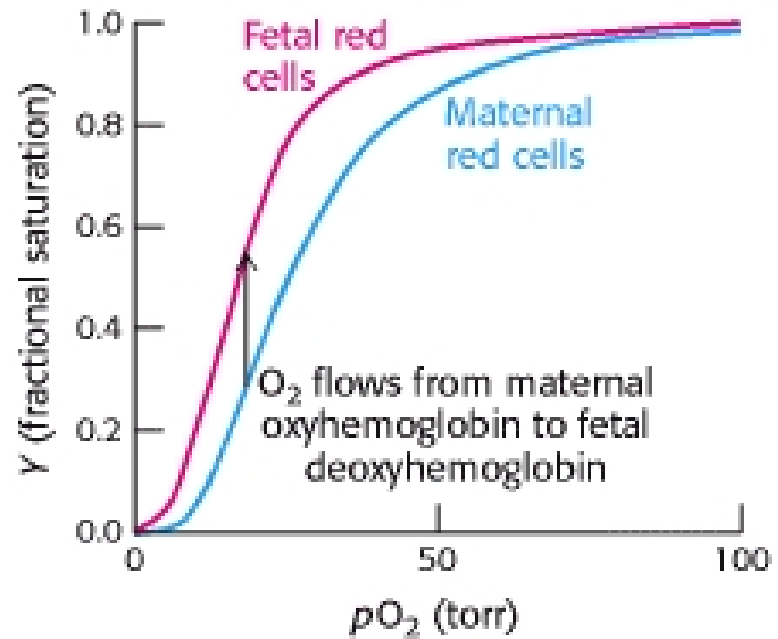
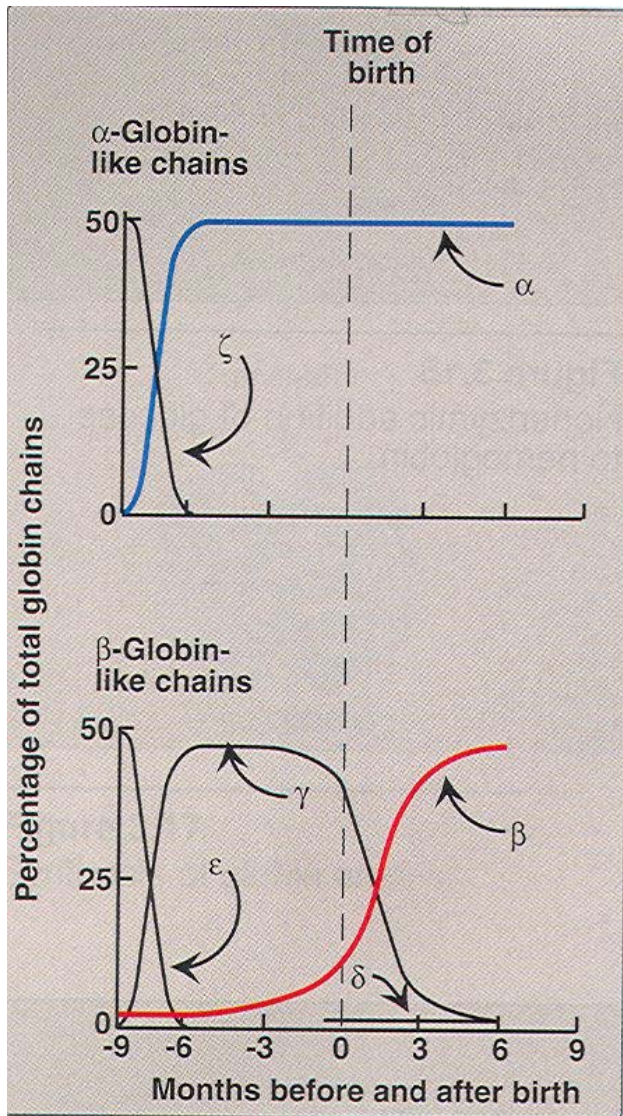
Najpomembnejši človeški Hb

Vrsta	Struktura podenot	Razširjenost
HbA (odrasli)	$\alpha_2\beta_2$	90% Hb odraslih
HbA ₂ (odrasli)	$\alpha_2\delta_2$	2-5% Hb odraslih
HbF (fetalni)	* $\alpha_2\gamma_2$	Najpomembnejši Hb v 3. trimestru nosečnosti. Cca 2% Hb odraslih
HbA1c (odrasli)	A ₂ β ₂ -glucose	3 – 9%

Človek ima dve kopiji gena za globin alfa in le eno kopijo za globin beta



Hemoglobin pred in po rojstvu



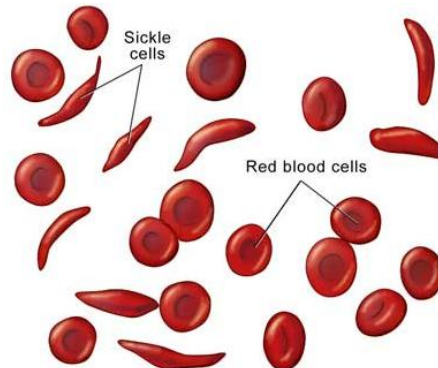
* $\alpha_2\gamma_2$ veže z manjšo afiniteto BPG → večja afiniteta fetalnega Hb do O_2

Motnje pri prenosu kisika s Hb

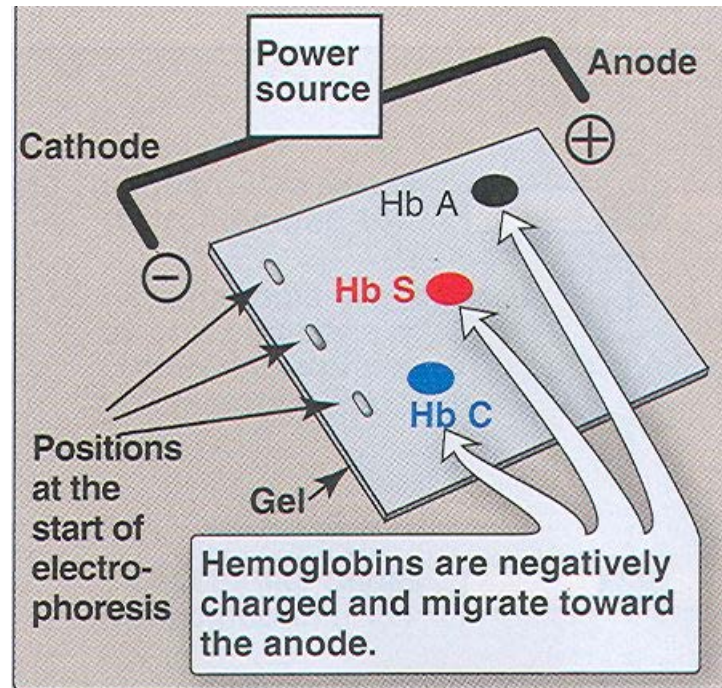
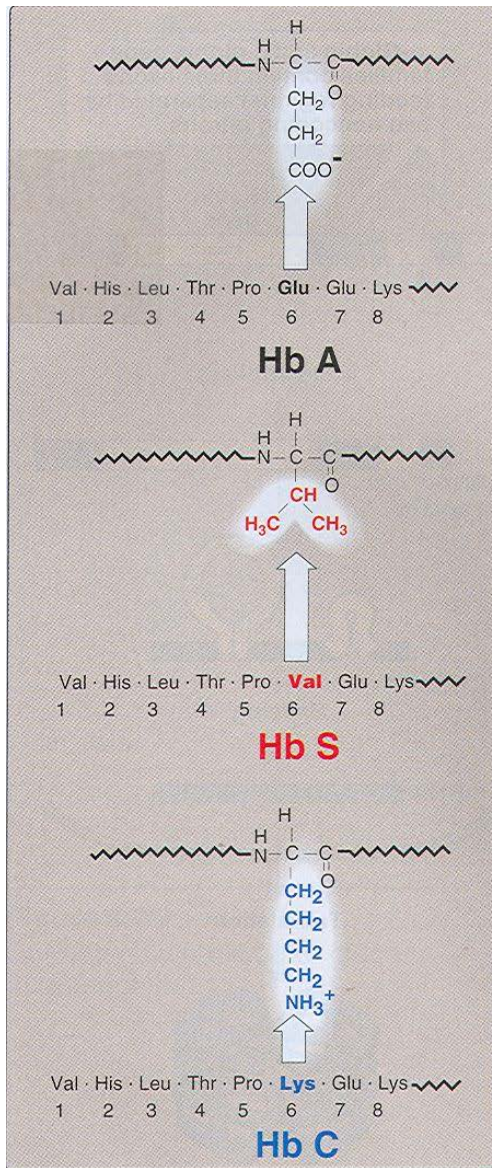
- **Vezava CO** (CO se veže s ~ 200x večjo afiniteteto kot O₂ na hem)
- **Oksidacija Fe²⁺ v Fe³⁺ - methemoglobinopatije** (methemoglobin ne veže O₂)
 - eritrociti vsebujejo reducente (askorbinska kislina, glutation), ki preprečijo oksidacijo do Fe³⁺
 - eritrociti vsebujejo encim methemoglobin-reduktazo, ki prepreči oksidacijo do Fe³⁺ (redka dedna bolezen: pomanjkanje encima)
 - dedna bolezen methemoglobinemija: okvara vezavnega žepa za O₂
vzrok: mutacija his → tyr
 - zdravila: antioksidanti
- **Mutacije v globinskem delu Hb** (Fe²⁺)
 - anemija srpastih celic – vzrok: mutacija 6glu → 6val (veriga β)
- **Napaka v regulatornem delu globinskega gena**
 - talasemija α: napake pri nastajanju α verig
 - talasemija β: napake pri nastajanju β verig

Hb in bolezni

- Cca 7% ljudi na svetu je prenašalcev za eno od nepravilnosti hemoglobina
- Znanih je ~ 1000 nenormalnih Hb
- **Hemoglobinopatije** – nastanek nenormalnih globinskih verig (primer **srpasta anemija - HbS**)
- **Talasemije** – globinske verige so strukturno normalne, nastajajo pa v manjši količini ali določene verige sploh ni - napaka v regulatornem delu globinskega gena (primer **talasemija α** , **talasemija β**)

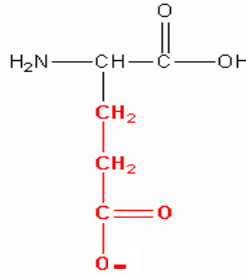
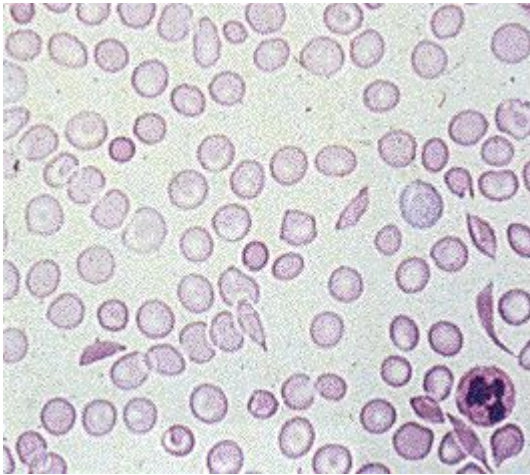


Elektroforetske lastnosti različnih vrst hemoglobinov

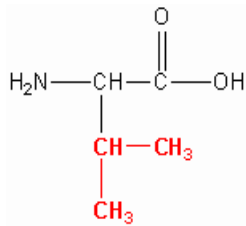


Anemija srpastih celic

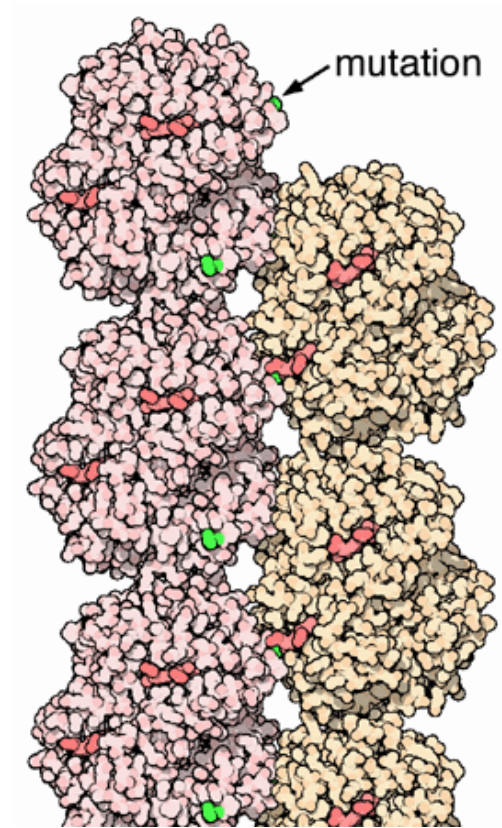
vzrok za nastanek HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) – mutacija v β verigi Hb: Glu \rightarrow Val



Glu



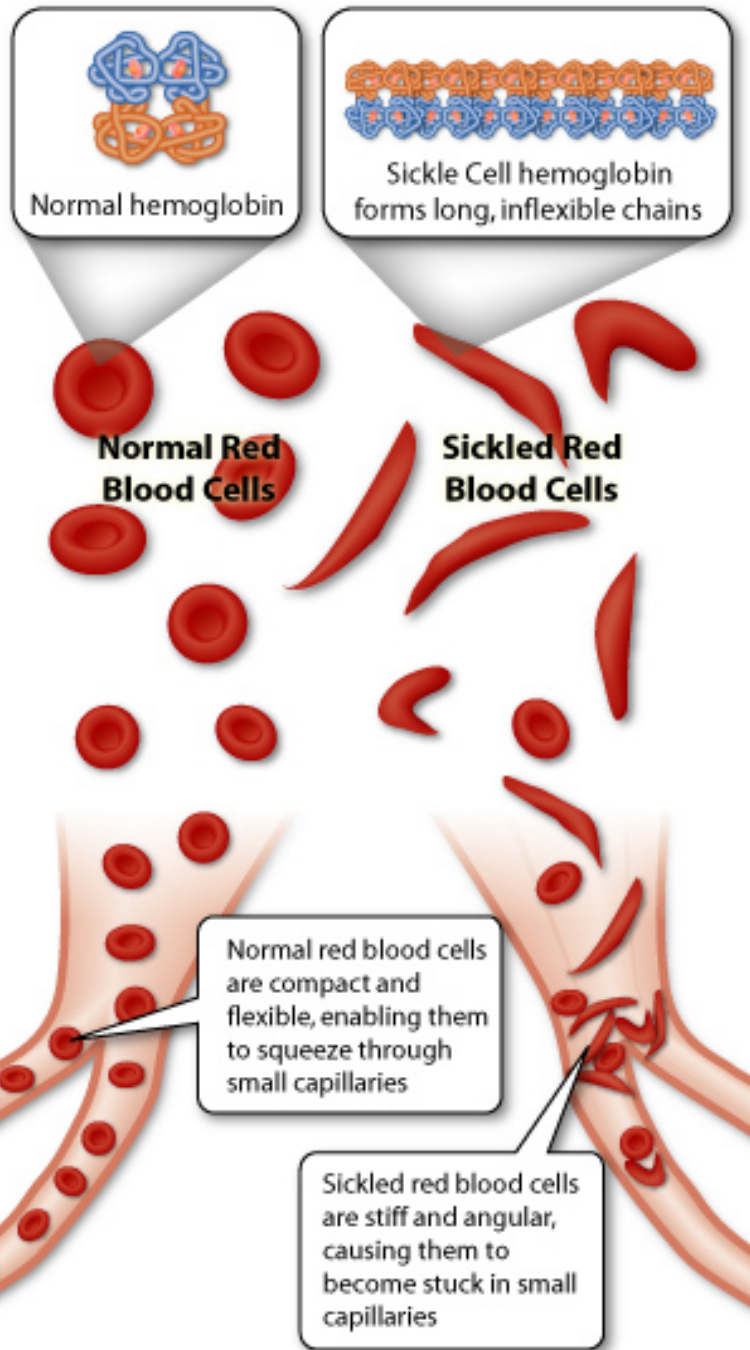
Val



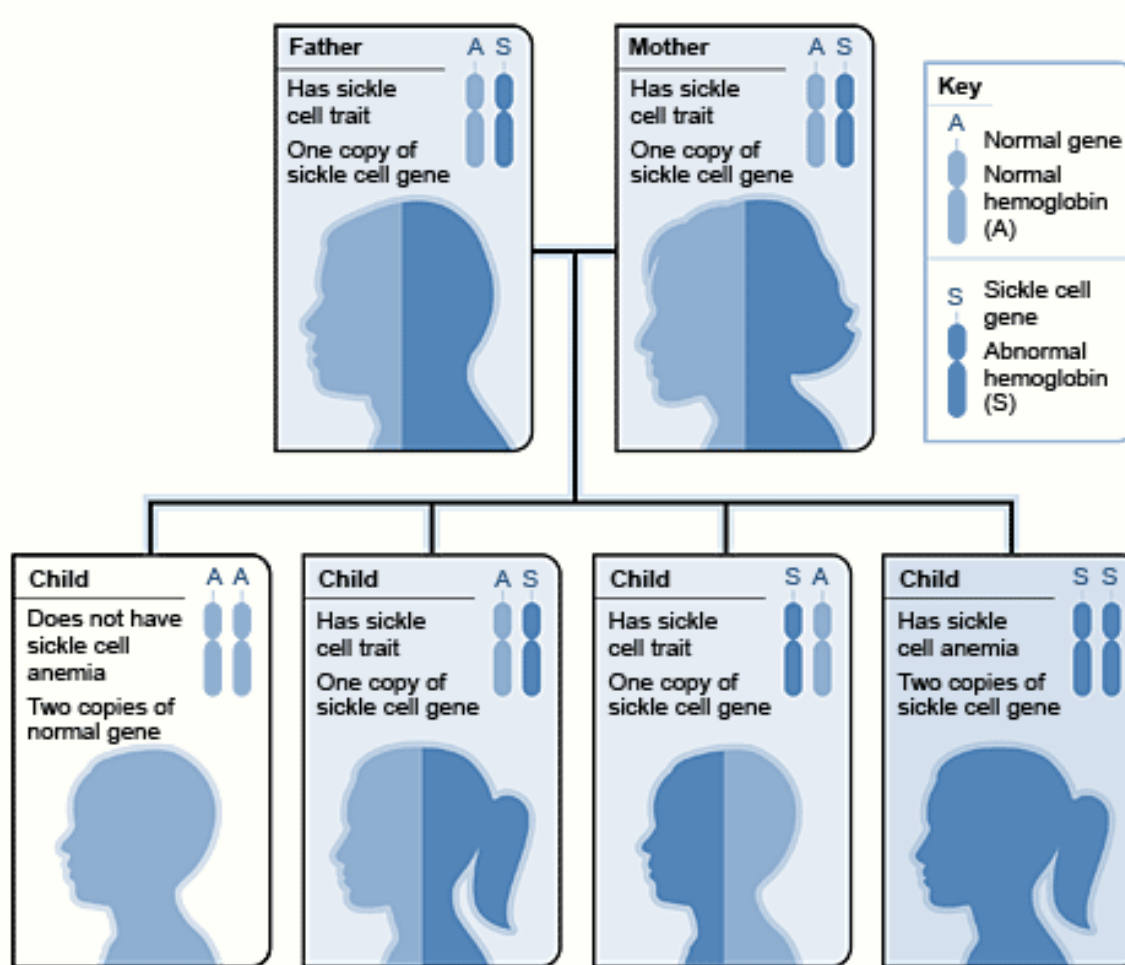
(a) normalni eritrocit vsebuje HbA

(b) okvarjeni eritrocit vsebuje HbS:

- nespremenjena hitrost sinteze Hb
- nespremenjena afiniteta do O_2
- **hidrofobne interakcije med Val na površini β verige Hb \rightarrow zlepljanje molekul HbS**
- **zmanjšana topnost HbS** v deoksigenirani obliki
- netopni skupki HbS preprečujejo normalen pretok krvi v kapilarah
- Skrajšana življenjska doba eritrocita iz 120 na 20 dni! (anemija)



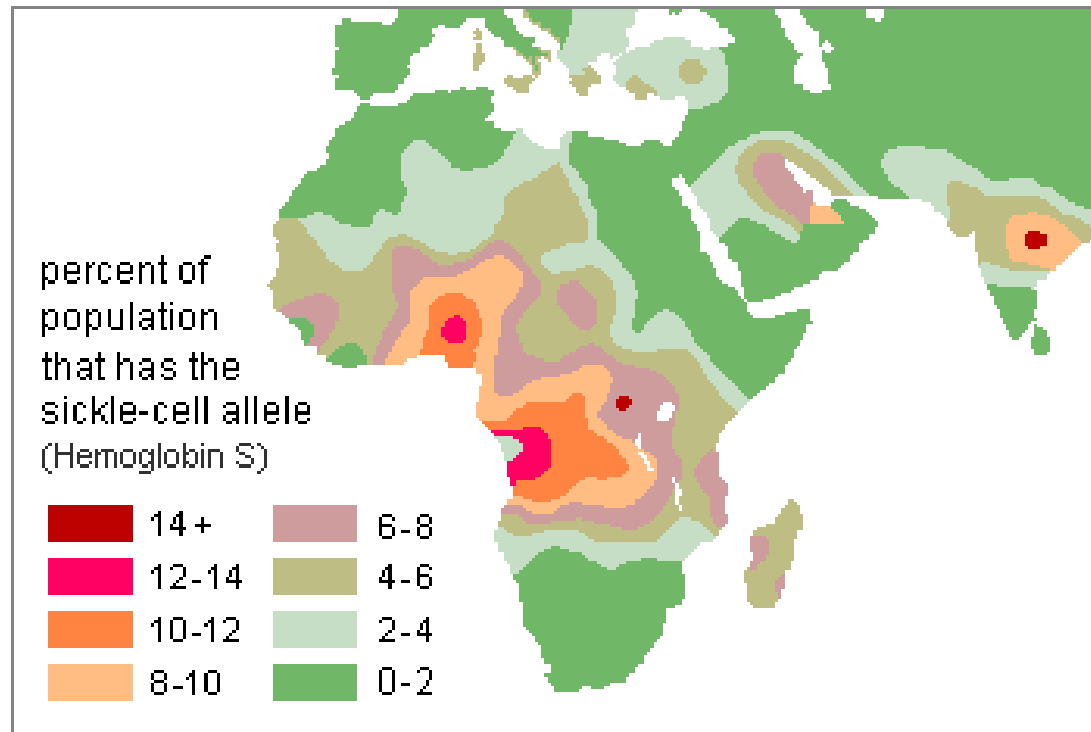
Avtosomno recesivno dedovanje anemije srpastih celic



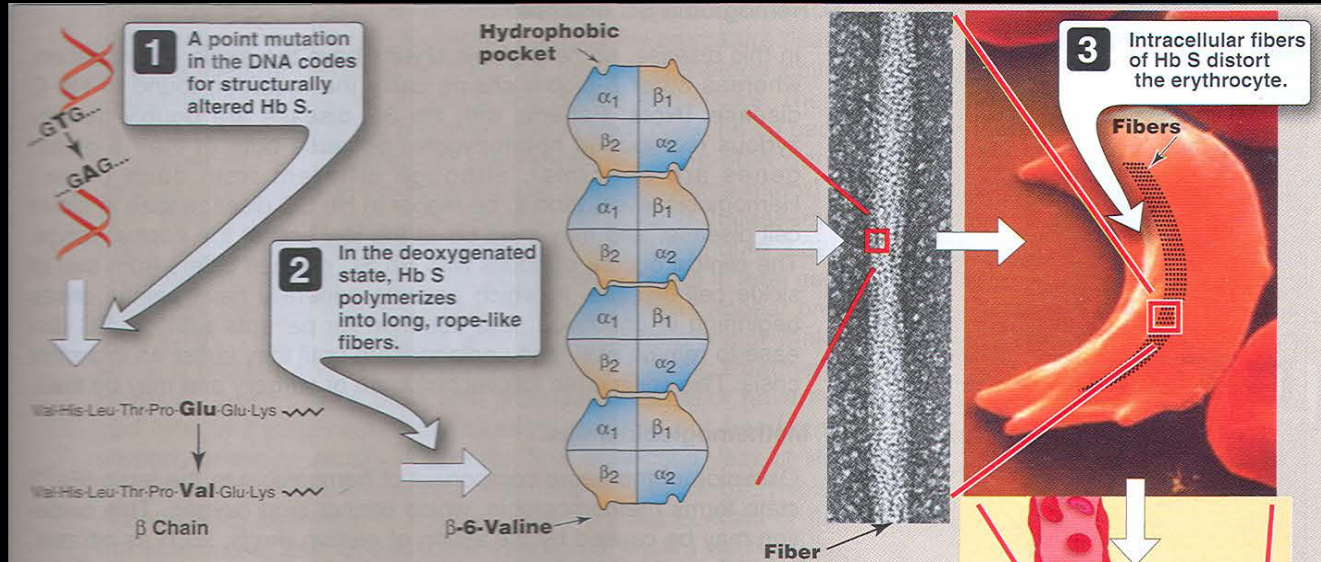
Srpasta anemija – “fiksiranje” alela HbS v populaciji, kjer je nevarnost okužbe z malarijo (prednost heterozigota)

- prisotnost HbS se pri normalnih razmerah sploh ne pokaže
- težave v velikih višinah (znižan P_{O_2}) in pri intenzivni obremenitvi
- rezistentni na malarijo – parazit malarije (*Plasmodium falciparum*) ne preživi v srpastih eritrocitih

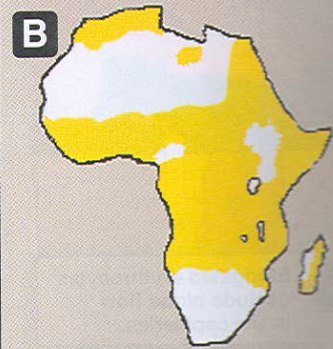
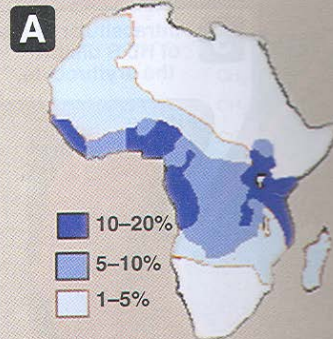
Geografska pojavnost srpaste anemije



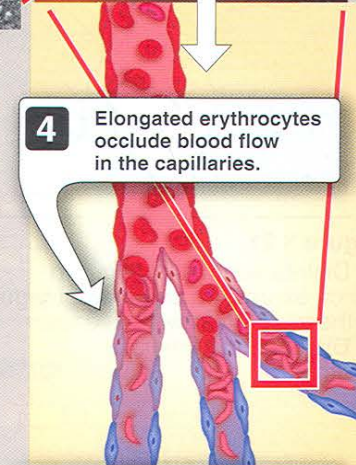
Anemija srpastih celic



Anemija srpastih celic

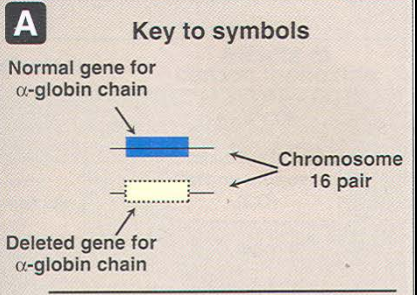


Malarija

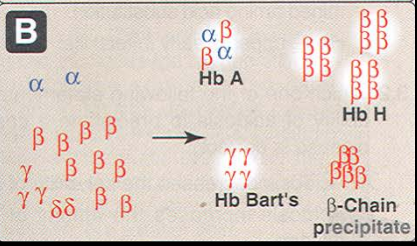
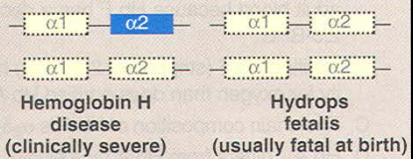
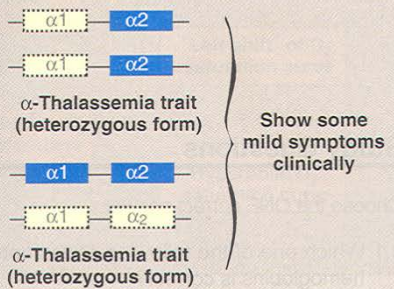
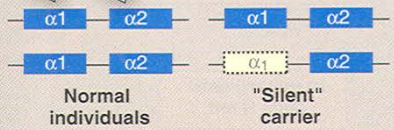


5 Microinfarcts produce tissue anoxia, resulting in severe pain.





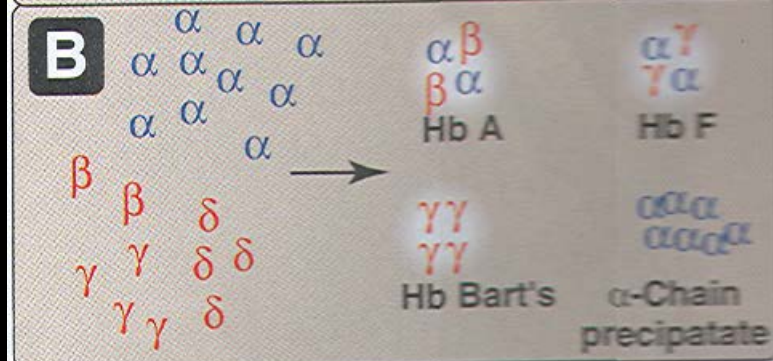
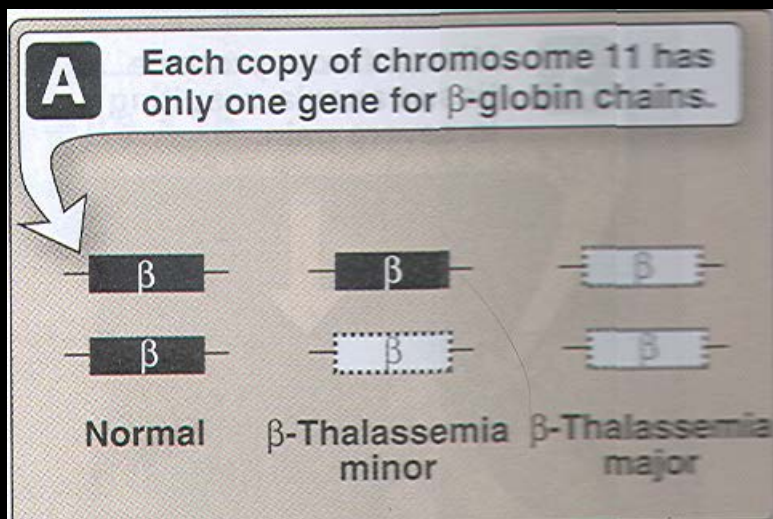
Each copy of chromosome 16 has two adjacent genes for α -globin chains.



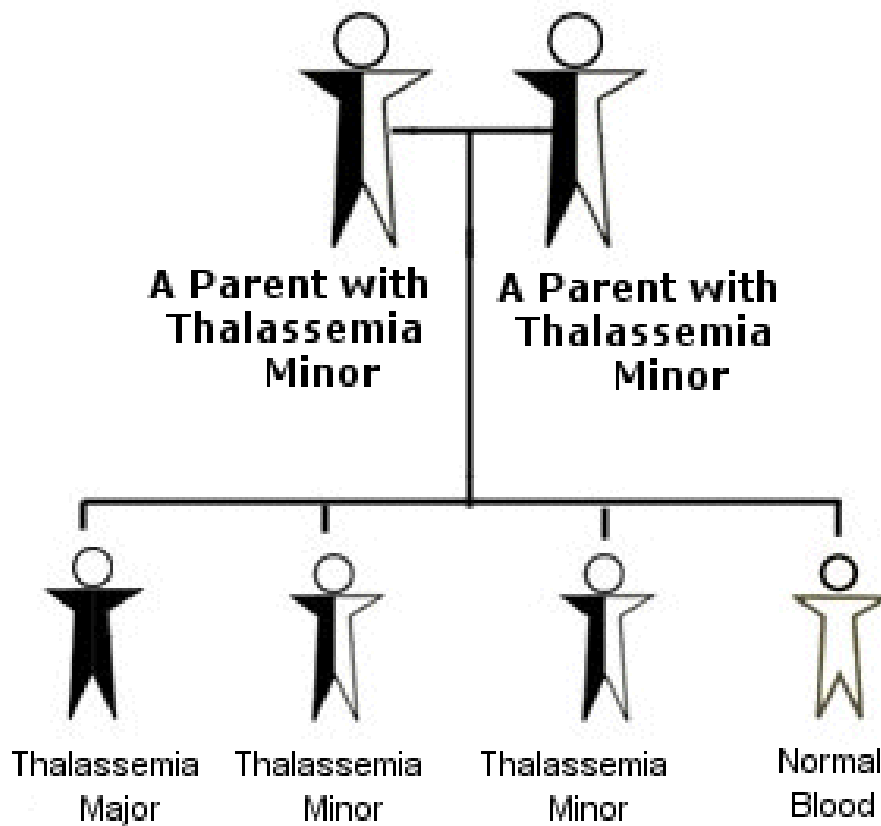
Talasemije so napake v sestavi hemoglobina.

α -talasemija – pomanjkanje α verige hemoglobina
 β -talasemija - pomanjkanje β verige hemoglobina

Mutacije so v regulatornih regijah globinskih genov in ne v kodirajočem zaporedju.



Talasemija se deduje avtosomno recesivno



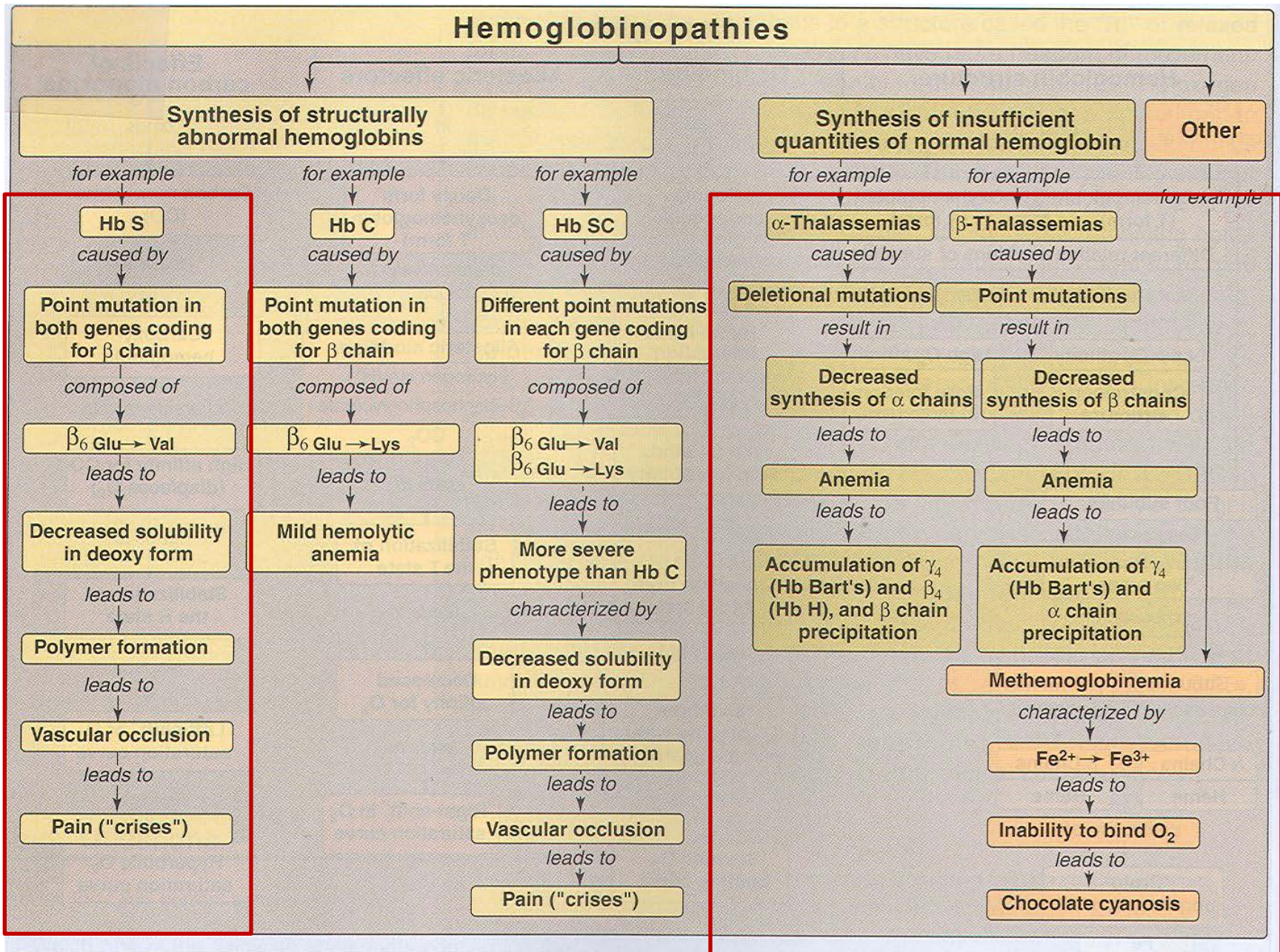


Figure 3.25

Key concept map for hemoglobinopathies.

Funkcije proteinov (pogojene s strukturo)

- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- Transport/skladiščenje molekul (ligandov, npr. O₂ v **Hb, Mb**)
- **Uravnavanje - DNA-vezavni proteini** (histoni, **transkripcijski faktorji**)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (**Imunoglobulini**)
- Transport lipidov (lipoproteini)
- Gibanje: kontraktilni proteini
- Transport molekul/ionov preko membrane (membranski proteini)
- Prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)

V
E
Z
A
V
A

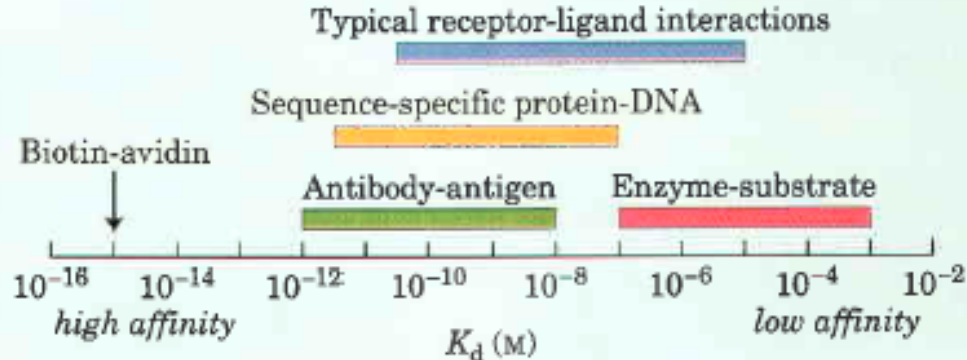
L
I
G
A
N
D
A

Proteini vežejo ligande z različnimi afinitetami

TABLE 5-1

Some Protein Dissociation Constants

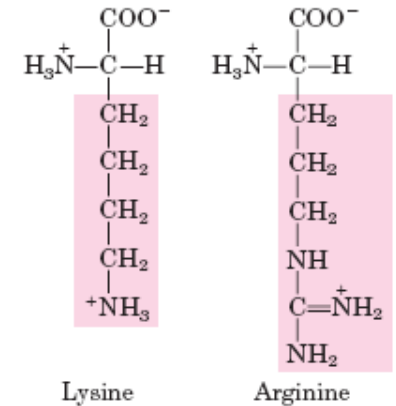
Protein	Ligand	K_d (M)*
Avidin (egg white)	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) [†]	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) [‡]	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}



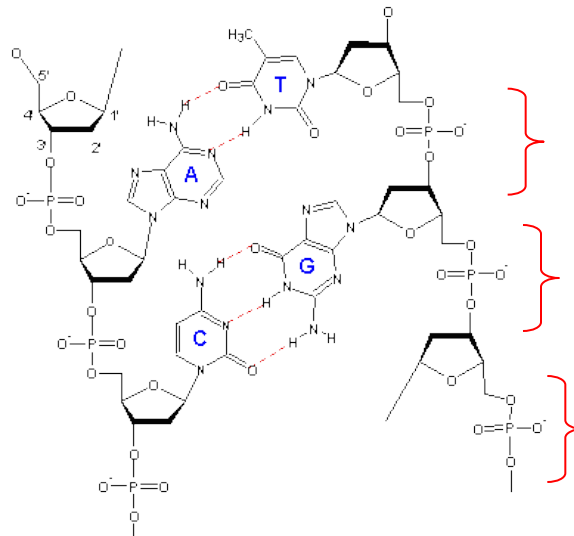
Nekatere interakcije med proteinom in ligandom padejo izven “normalnih” razmerij. Npr. interakcija med avidinom in biotinom je tako močna, da jo lahko obravnavamo kot ireverzibilno. Transkripcijski faktorji prepoznajo specifična DNA zaporedja in se ne morejo vezati na katerokoli zaporedje DNA.

Histoni – majhni bazični proteini v jedru. Na DNA se vežejo nespecifično

- 5 različnih vrst pri evkariontih - H1, H2, H3, H4, H5 (M_r od 11 - 21 kDa)
- So dobro ohranjeni med različnimi vrstami
- ~1/4 aminokislin histonov predstavljata Arg in Lys
- Bazični (pozitivno nabiti) histoni se z elektrostatskimi interakcijami vežejo na negativno nabito ogrodje DNA



pozitivni naboji na radikalu lizina in arginina



fosfodiestrna vez med 2-deoksi-ribozo in fosfati v DNA – negativni naboji na fosfatih

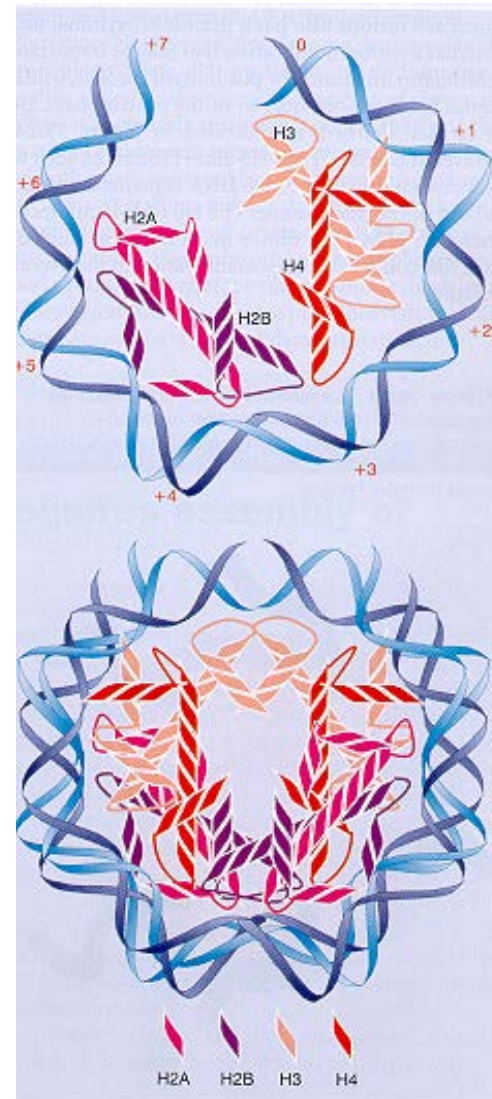
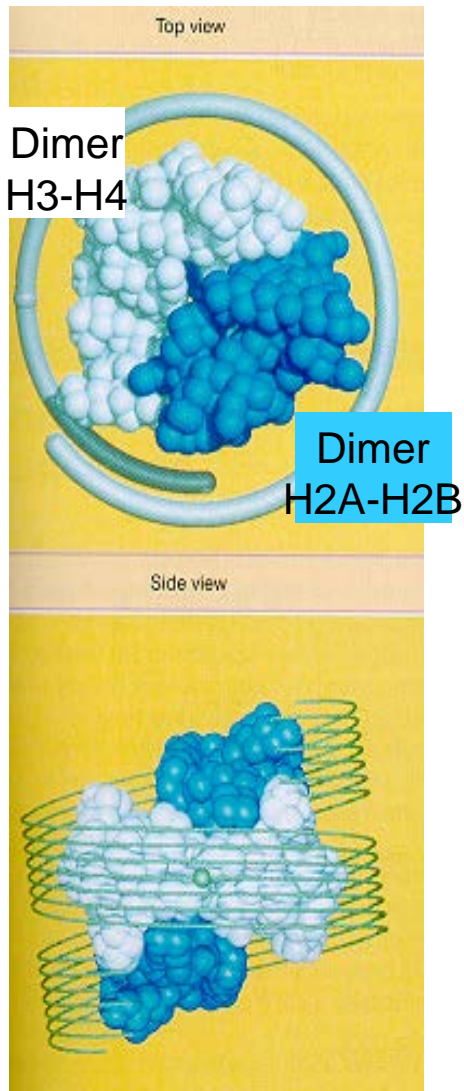
Histoni vsebujejo od 25 – 40% bazičnih aminokislin lizina in arginina

TABLE 24-3 Types and Properties of Histones

<i>Histone</i>	<i>Molecular weight</i>	<i>Number of amino acid residues</i>	<i>Content of basic amino acids (% of total)</i>	
			<i>Lys</i>	<i>Arg</i>
H1*	21,130	223	29.5	11.3
H2A*	13,960	129	10.9	19.3
H2B*	13,774	125	16.0	16.4
H3	15,273	135	19.6	13.3
H4	11,236	102	10.8	13.7

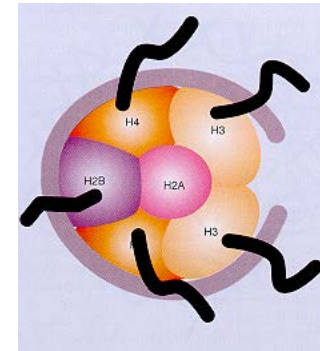
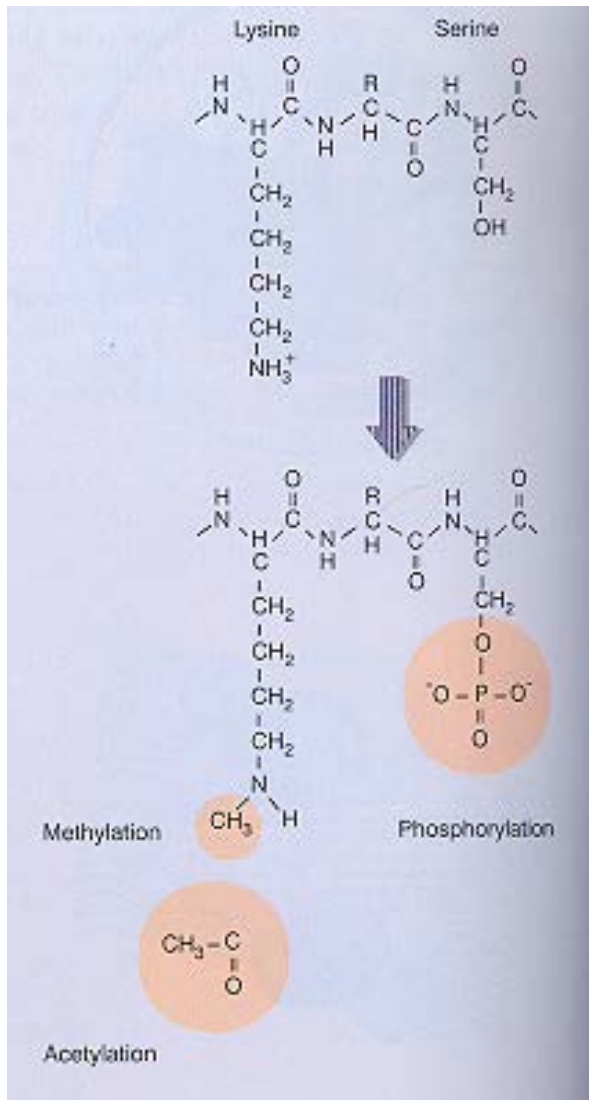
*The sizes of these histones vary somewhat from species to species. The numbers given here are for bovine histones.

Histoni so del nukelosoma, ki predstavlja osnovno enoto kromatina evkariontske celice



Bazični proteini (histoni) so z elektrostatskimi interakcijami vezani na DNA

Pottranslacijske spremembe histonskih repkov so ključne za pričetek prepisovanja

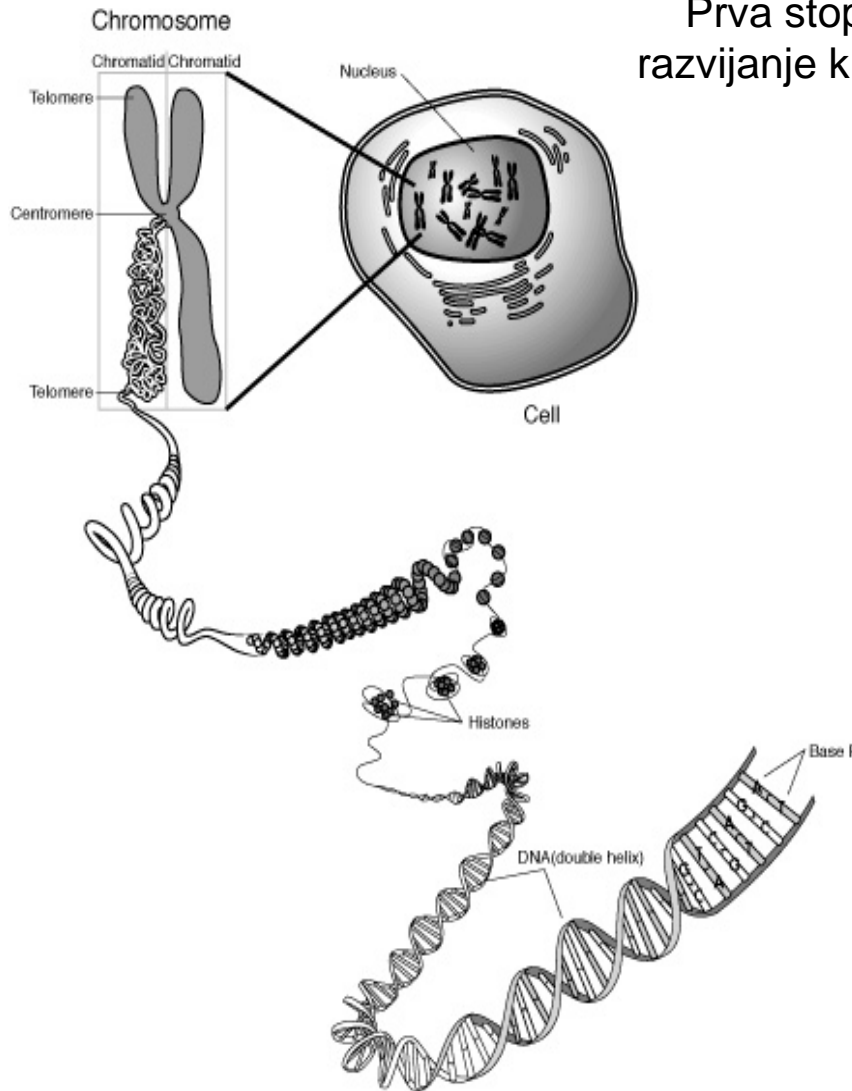


Najpogostejše pottranslacijske spremembe so:

- Acetilacija lizina
- Metilacija lizina
- Fosforilacija serina

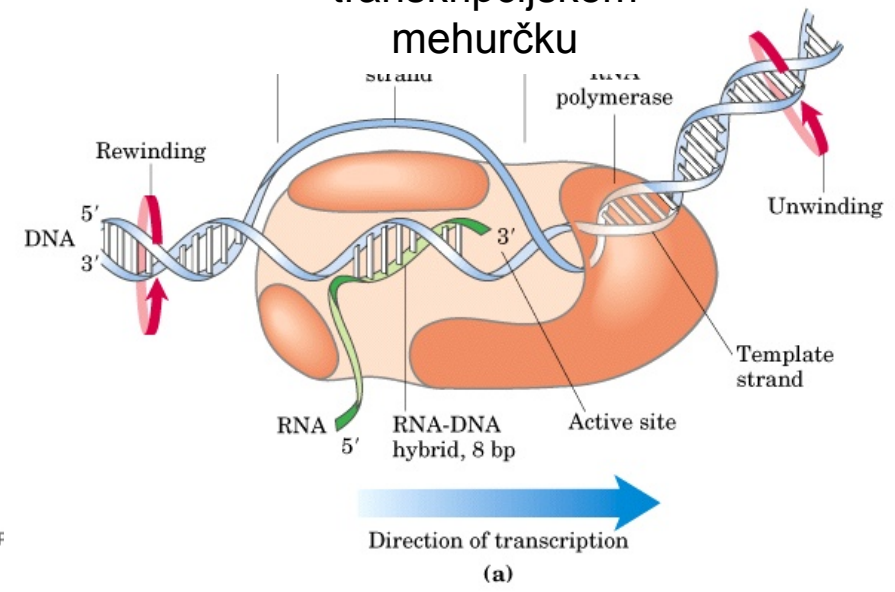
Te modifikacije spremenijo naboj histonov (ni več toliko + naboja). To oslabi interakcije med histoni in DNA. DNA se tako razvije in je lažje dostopna za specifične DNA vezavne proteine - transkripcijske faktorje

Proteini, ki prepoznajo specifična zaporedja na DNA (transkripcijski faktorji) sodelujejo v večstopenjskem procesu prepisovanja (transkripcije)



Prva stopnja je razvijanje kromatina

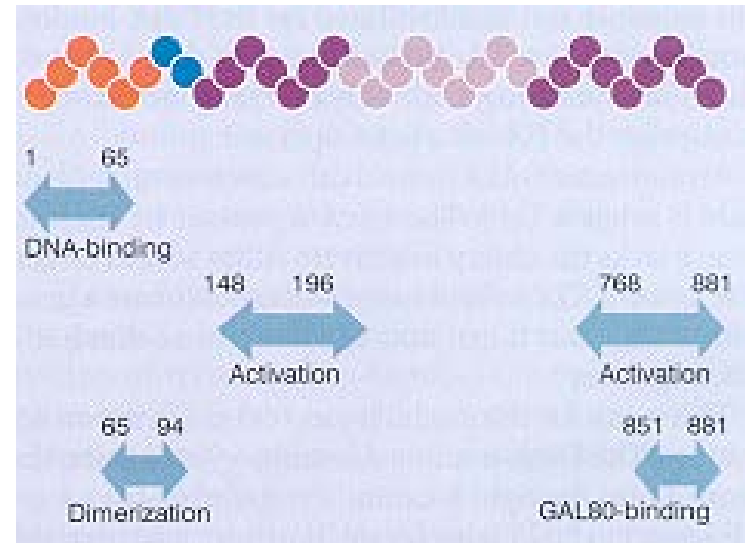
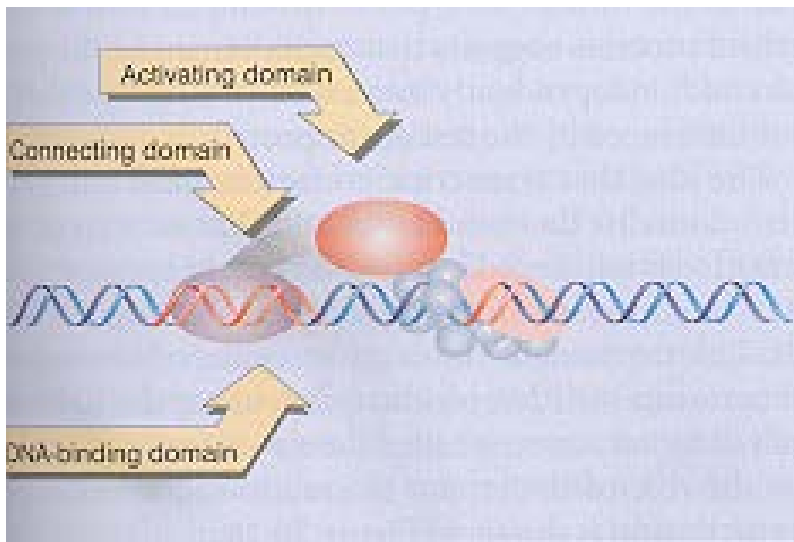
Prepisovanje gena v transkripcijskem mehurčku



Transkripcijski faktorji so ključnega pomena za prepoznavanje mesta na DNA

Glavne funkcijske domene transkripcijskih faktorjev:

- DNA vezavna domena,
- transaktivacijska domena,
- domena za povezovanje z drugimi transkripcijskimi faktorji,
- dimerizacijska domena.



Domena proteina - aminokislinsko zaporedje z neodvisnim vzorcem zvijanja, ki se pojavi v različnih proteinih

Najpogostejše DNA vezavne domene transkripcijskih faktorjev:

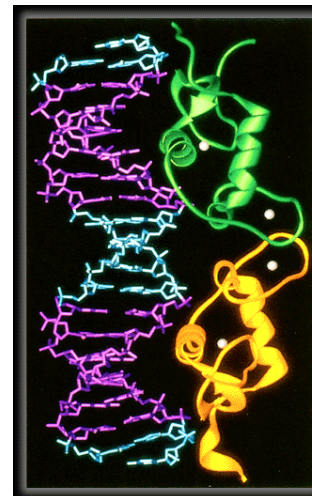
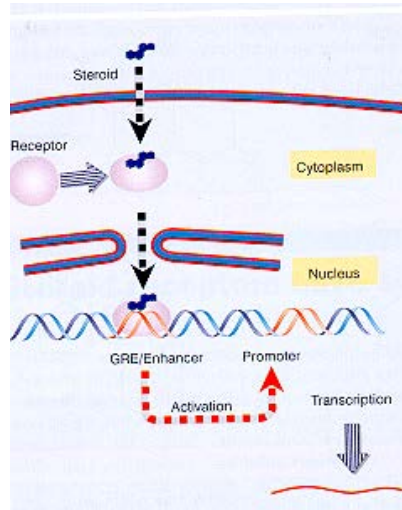
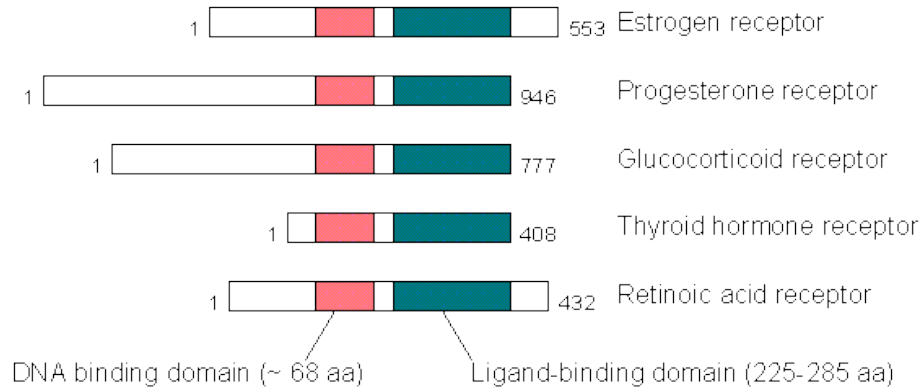
- Cinkov prst,
- Homeodomena (vijačnica-zavoj-vijačnica (helix-turn-helix)).

Pogoste transaktivacijske domene (za interakcije z drugimi proteini)

- Levcinska zadrga
- Bazične vijačnica-zanka-vijačnica (helix-loop-helix)

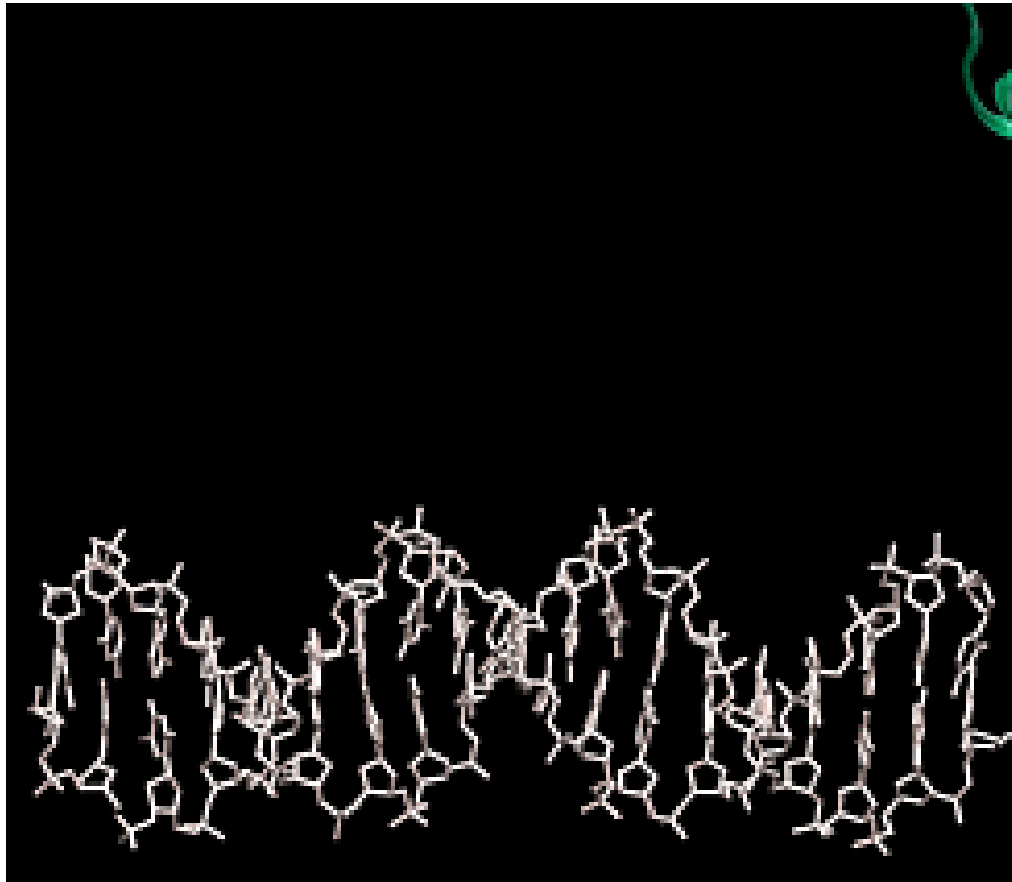


Jedrni (steroidni) receptorji vsebujejo Zn prste



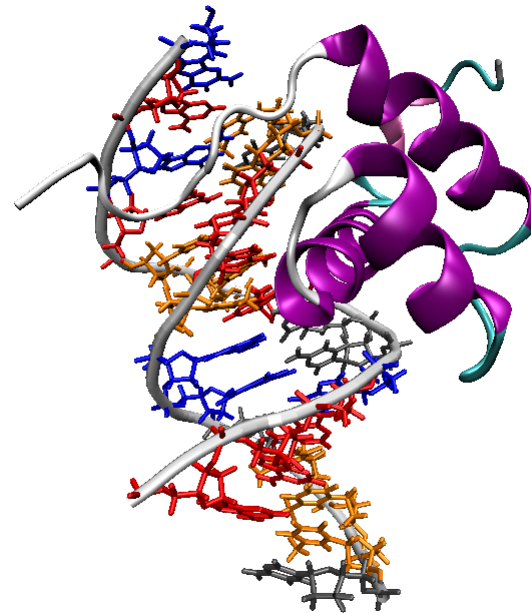
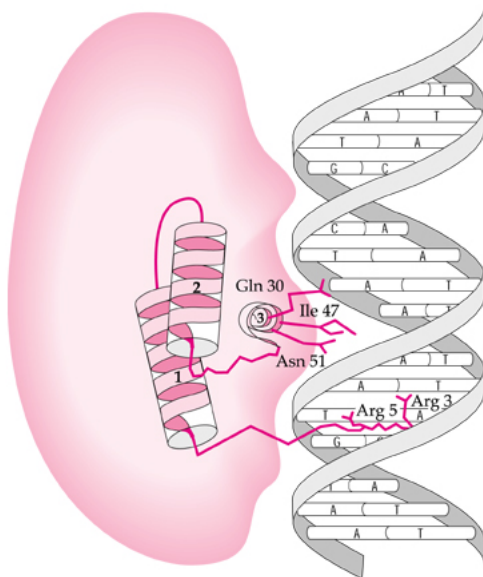
Cys-X(2)-Cys-(X13)- Cys-(X2)- Cys

Vezava človeškega estrogenskega receptorja na DNA

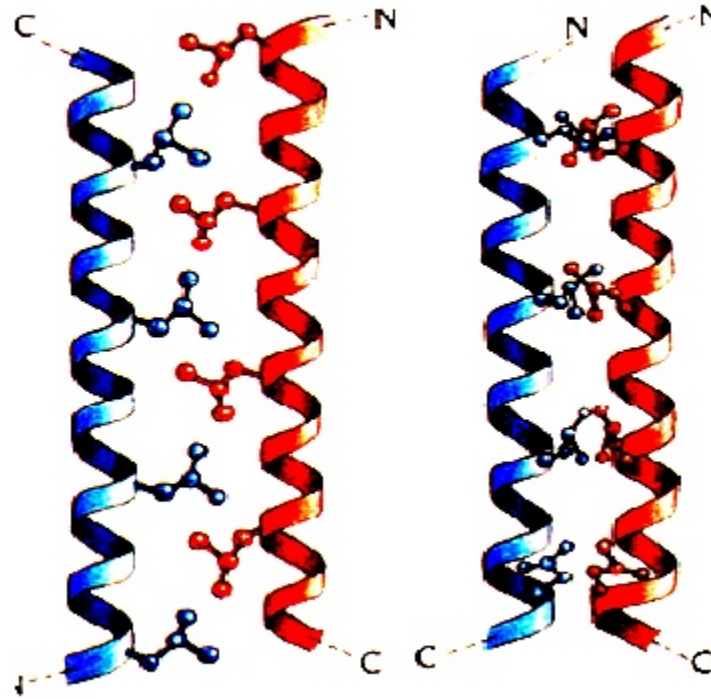


Homeodomena

Homeodomeno sestavlja 60 aminokislin s tremi α -vijačnicami, v obliki vijačnica-zavoj-vijačnica. Vijačnica 3 je v stiku z baznimi pari velik brazde. N-terminalni konec homeodomena je v stiku z malo brazdo.

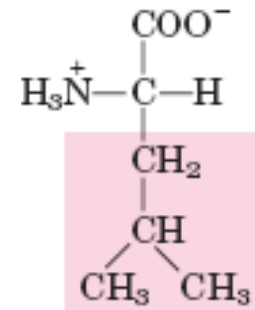


Levcinska zadruga



Originalni koncept

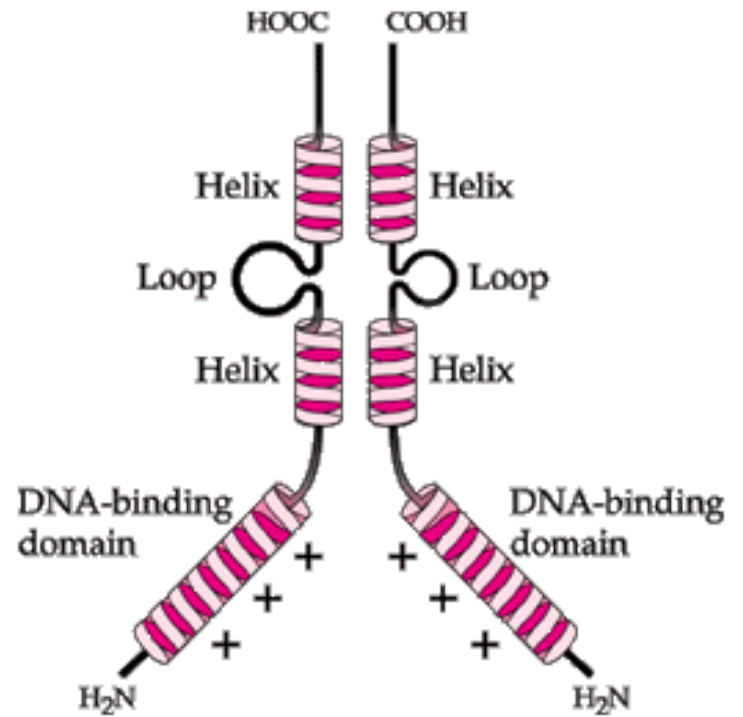
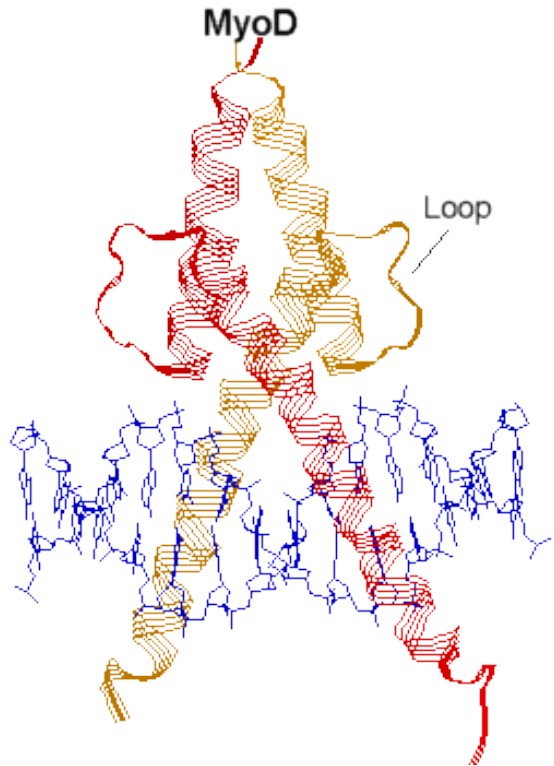
Bolj pravilno



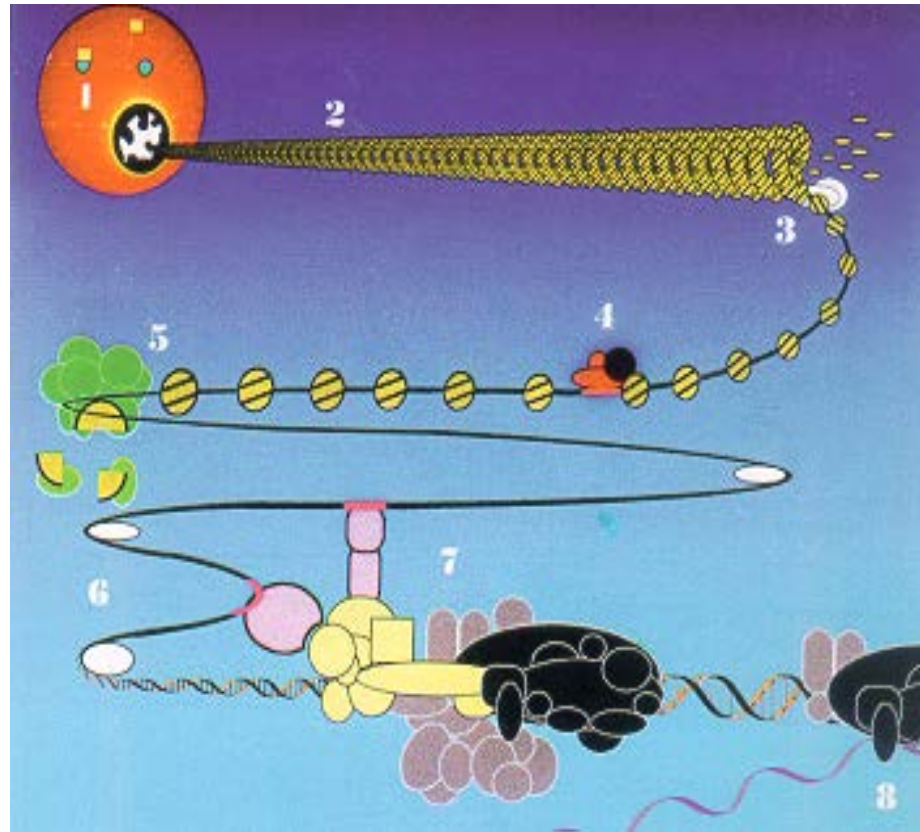
Leucine

- Ak zaporedje v levcinski zadrugi -Leu-(X)6-Leu-(X)6-Leu(X)6-Leu-
- (vsaka 7. ak je levcin)
- Leu povezan z Leu sosednje vijačnice - 2 prilegajoči se α -vijačnici
- strukturo vzdržujejo hidrofobne interakcije

Vijačnica-zanka-vijačnica



Transkripcijski faktorji omogočijo nastanek kompleksa, ki sproži transkripcijo (prepisovanje)



DNA-vezavni proteini (transaktivatorji, transkripcijski faktorji) imajo DNA vezavno in transaktivacijsko domeno.

Funkcije proteinov (pogojene s strukturo)

- Oporna funkcija (strukturni proteini, npr keratini, kolagen ...)
- Transport/skladiščenje molekul (ligandov, npr. O₂ v **Hb, Mb**)
- **Uravnavanje - DNA-vezavni proteini** (histoni, **transkripcijski faktorji**)
- Obramba pred tujki/invazivnimi organizmi (**Imunoglobulini**)
- Transport lipidov (lipoproteini)
- Gibanje: kontraktilni proteini
- Transport molekul/ionov preko membrane (membranski proteini)
- Prenos signala (receptorji, G-proteini, kinaze ...)
- Kataliza biokemijskih reakcij (encimi)

V
E
Z
A
V
A

L
I
G
A
N
D
A

Imunski sistem vključuje vrsto specializiranih celic in proteinov

- Celice - levkociti: **makrofagi in limfociti**
 - **Limfociti B** – kostni mozeg; proizvajajo topne imunoglobuline
 - **Limfociti T** ali citotoksične T celice **Tc**, celice ubijalke - timus
prepoznavanje tukov preko receptorjev na površini T celic
TH – T celice pomagalka – proizvajajo topne citokine (npr. interleukine)
Sodelujejo z makrofagi, stimulirajo delitev limfocitov B in Tc
- Levkociti lahko zapustijo krvni obtok, preidejo v tkiva.
- Limfociti B proizvajajo proteine, **imunoglobuline (Ig)** in receptorje (**Rp**)
 - prepoznajo tuje molekule (delce) in jih uničijo
- Imunski sistem včasih prepozna tudi svoje lastne molekule (**avtoimunske bolezni**)
- Človek: 10^8 različnih Ig - velika verjetnost, za prepoznanje vseh tujih molekul – **antigenov** (vsaka molekula, ki vzpodbudi imunski odgovor: virus, bakterija, protein ... $M_r > 5000$)
- Ig ali Rp se veže na določen del antigena – **antigena determinanta (epitop)**

Imunski odgovor

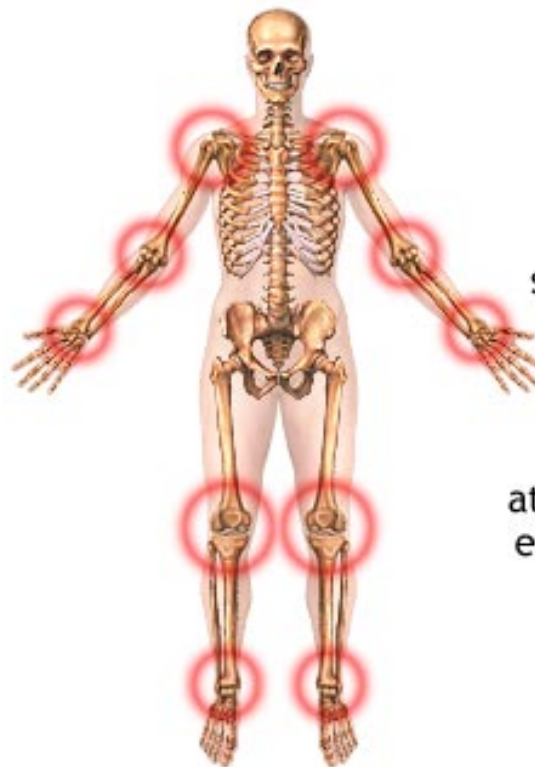
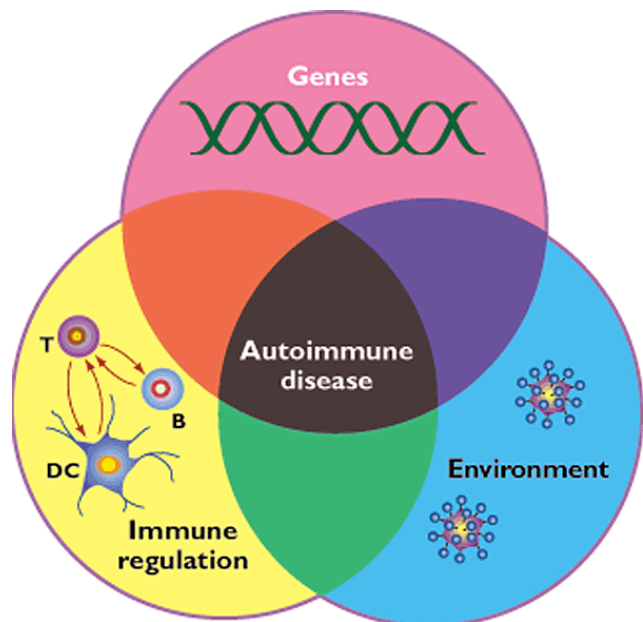
- **Humoralni** – v telesnih tekočinah (proti bakterijskim infekcijam in izvenceličnim virusom); **osnova so imunoglobulini (protitelesa).**
- **Celični** – uniči celice gostitelja, ki jih je napadel virus, uniči zajedalce in tuja tkiva; osnova so T limfociti (T celice)

TABLE 5-2

Some Types of Leukocytes Associated with the Immune System

Cell type	Function
Macrophages	Ingest large particles and cells by phagocytosis
B lymphocytes (B cells)	Produce and secrete antibodies
T lymphocytes (T cells)	
Cytotoxic (killer) T cells (T_C)	Interact with infected host cells through receptors on T-cell surface
Helper T cells (T_H)	Interact with macrophages and secrete cytokines (interleukins) that stimulate T_C , T_H , and B cells to proliferate.

Avtoimune bolezni



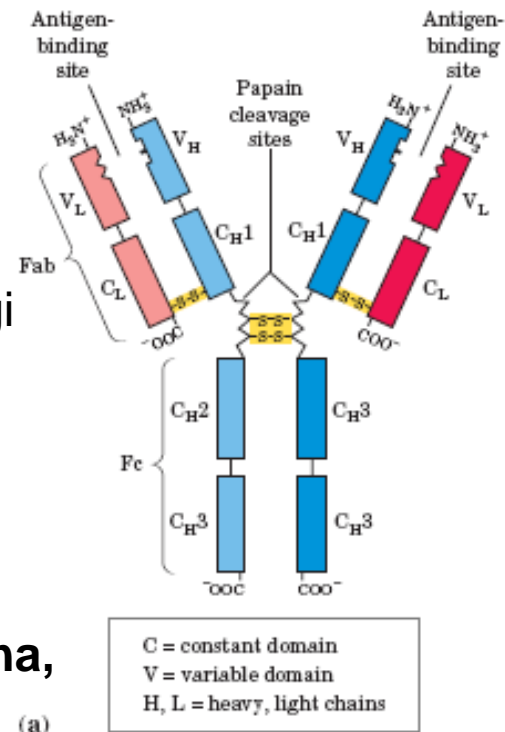
Rheumatoid arthritis usually affects joints symmetrically (on both sides equally), may initially begin in a couple of joints only, and most frequently attacks the wrists, hands, elbows, shoulders, knees and ankles

 ADAM.

Avtoimune bolezni nastanejo kot posledica pretiranega odziva imunskega sistema na celice, lastne organizmu.

Immunoglobulini

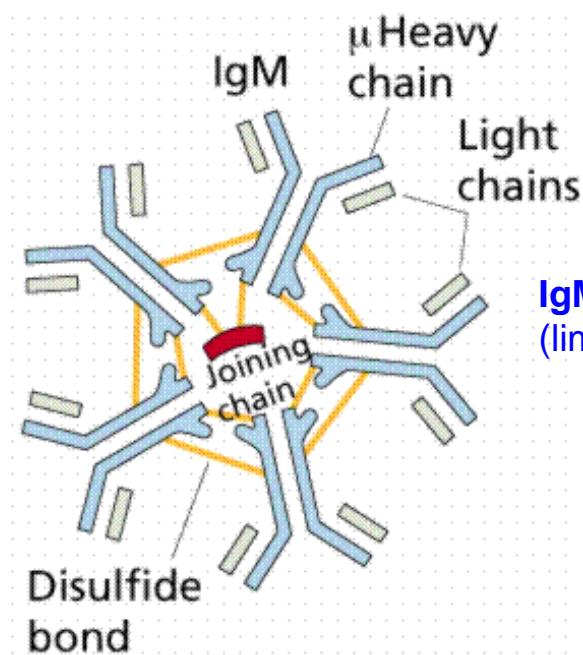
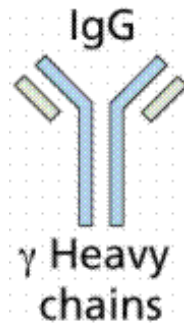
- Heteromerni proteini v obliki črke Y
- Vsebujejo 2 lahke ($M_r = 25$ kDa) in 2 težki ($M_r = 55$ kDa) verigi
- Lahke verige vstopajo v interakcije z **N-terminalnim delom** težkih verig – dobimo dve ročici (*arms*) – **Fab del** – ki vsebuje mesto za vezavo antigena
- **C-terminalni del** težkih verig se poveže v steblo – **Fc domena**, ki vstopa v interakcije z receptorji na celicah.
- Sesalci imamo 5 vrst imunoglobulinov: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM.
- **Imunoglobulini sesalcev imajo enake tipe lahkih verig (λ, κ)** razlikujejo se po tipu težke verige ($\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$)
- Težke in lahke verige so vedno v razmerju 1 : 1.



Vrste imunoglobulinov

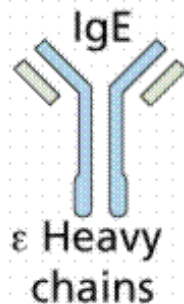
IgA- V solzah, slini, mleku – obramba proti bakterijam in virusom

IgG- Največja koncentracija v krvnem serumu



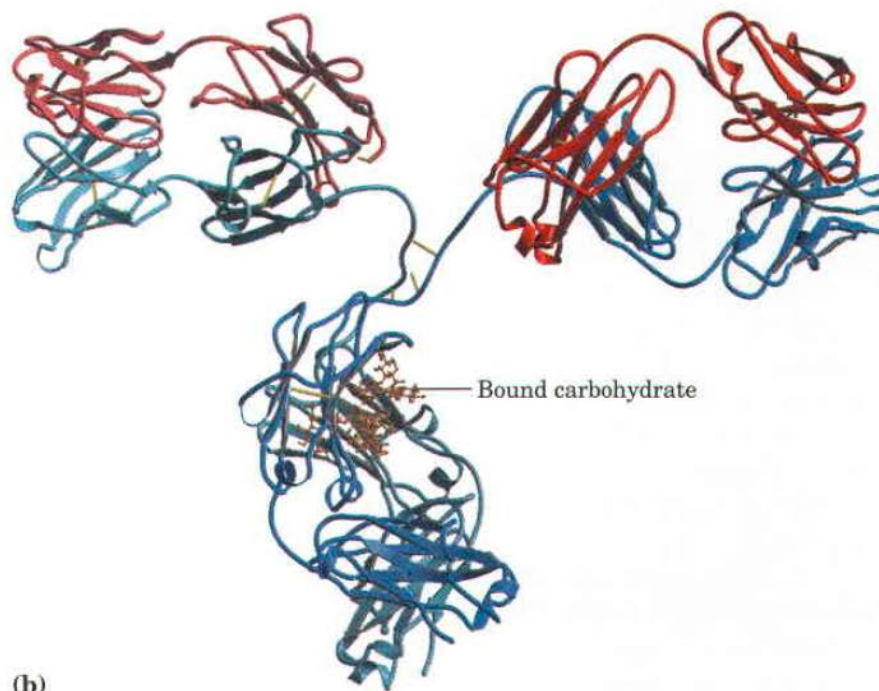
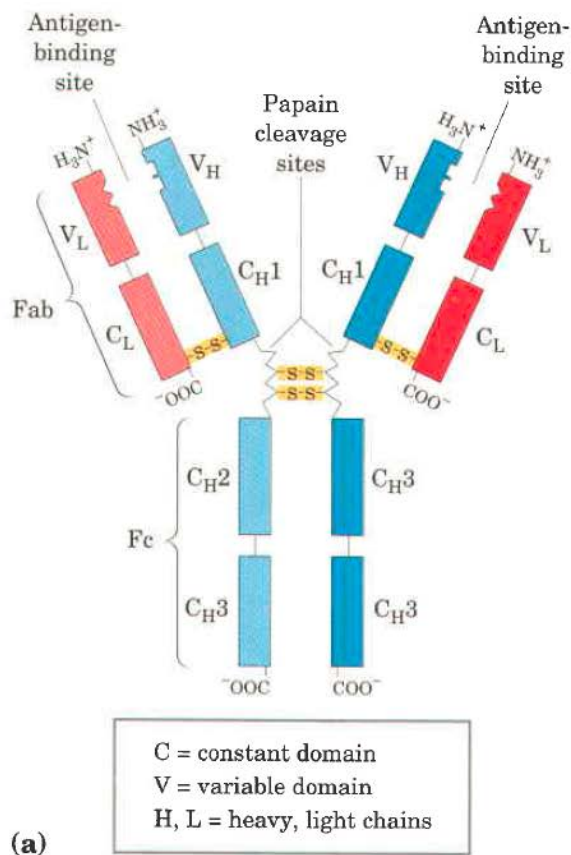
IgM- Prvi v obrambi (limfociti B)

IgE – zaščita proti parazitom, vloga v alergijskih reakcijah



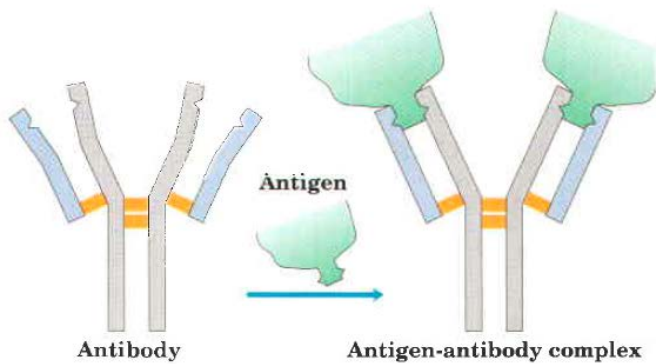
IgD- prepoznajo iste antigene kot IgM, manj znana funkcija

Struktura imunoglobulina G (IgG) – imunoglobulinski zvitje

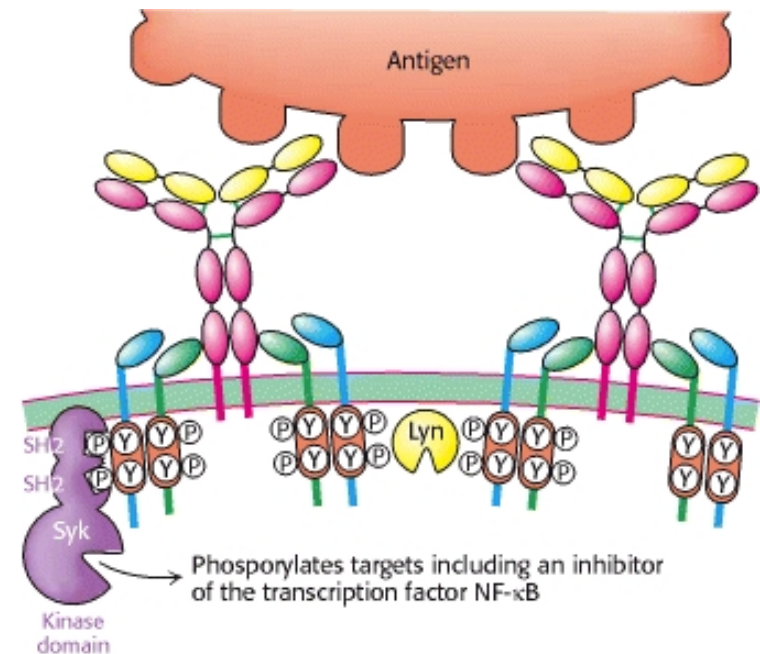


Imunoglobulinsko domeno sestavljata **dva para antiparalelnih beta ploskev**, ki so povezane z disulfidnimi mostički in hidrofobnimi interakcijami.

Protitelesa preko hipervariabilnih zank vežejo specifične molekule (antigene)



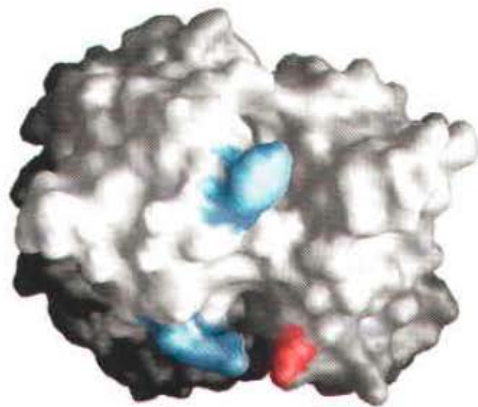
- Inducirano prilagajanje
- Visoka afiniteta ($K_d \sim 10$ nM)
- Prepoznavanje določenih struktur znotraj antigena – antigenska determinanta oz. epitop.



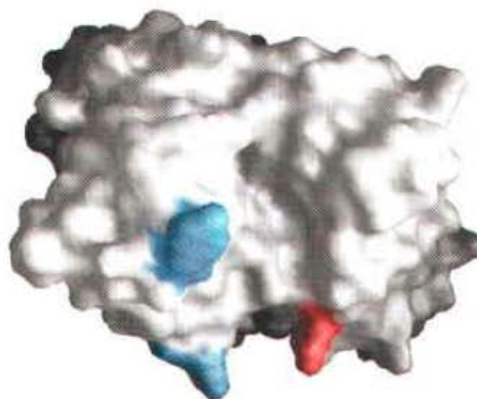
Majhne molekula (Mw manj kot 5 kDa) običajno niso antigeni.

Hapteni – majhne molekule, ki jih vežemo na proteine in proti njim umetno naredimo protitelesa (npr. katalitska protitelesa).

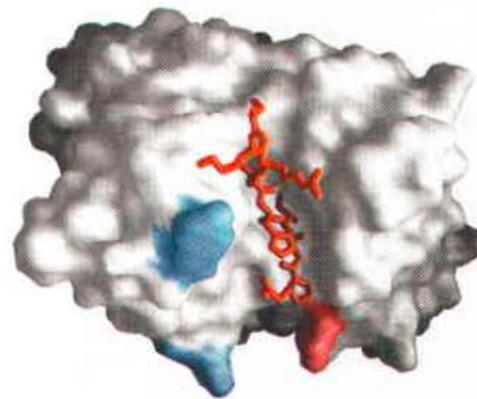
Inducirano prilagajanje protitelesa antigenu



(a) Conformation with no antigen bound

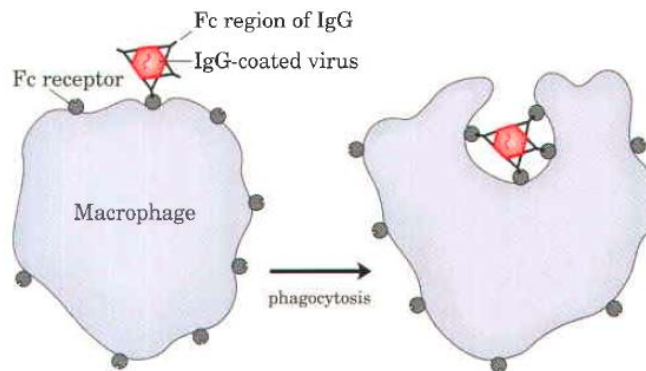


(b) Antigen bound (but not shown)



(c) Antigen bound (shown)

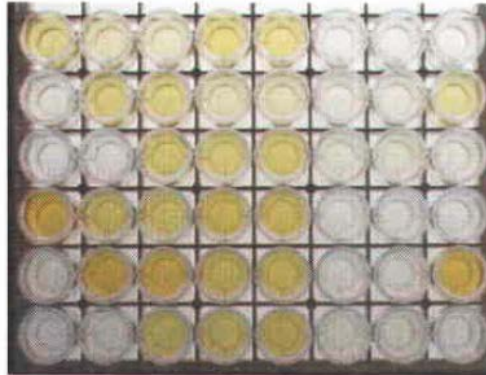
Makrofag: fagocitoza virusa, ki se je vezal na protitelo



Reakcije med protitelesi in antigeni so osnova za številne za medicino pomembne analitske metode

Poliklonska protitelesa – imunski odgovor različnih vrst limfocitov B na isti antigen (pridobivanje prek imunizacije živali). Taka protitelesa prepoznajo različne epitope antigena.

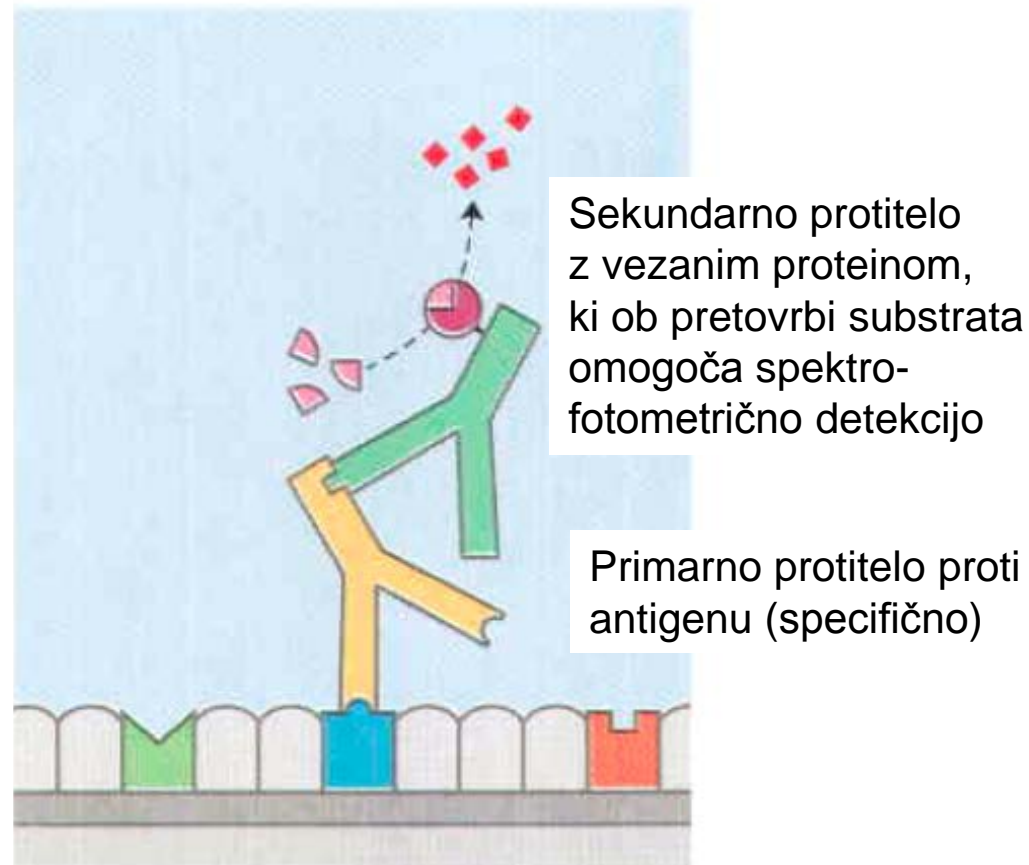
Monoklonska protitelesa – tvorijo jih kloni (enake celice) limfocitov B v kulturi.



Detekcija antigenov v mikrotitrski ploščici s 96 luknjami. To omogoča določanje prisotnosti antigena sočasno pri večih pacientih.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay):

Metoda se veliko uporablja za določanje bolezenskih antigenov (klinična biokemija, mikrobiologija z imunologijo)



ELISA kompleti za določanje virusnih in bakterijskih okužb in kateregakoli proteina, ki lahko služi kot diagnostični marker



Imunski sistem in imunoglobulini - poveztek

- Imunski odgovor predstavlja sodelovanje med vrsto specializiranih levkocitov in z njimi povezanih proteinov (imunoglobulinov in površinskih receptorjev).
- Imunoglobuline proizvajajo limfociti B; Limfociti T proizvajajo receptorje T celic.
- Človek ima 5 vrst imunoglobulinov, vsak s svojo biološko vlogo.
- Sestavljeni so iz lahkih in težkih verig, povezanih z S-S mostički. Imajo hipervariabilno in konstantno regijo. Najpogostejši je IgG.
- Fab domena – vezava antigena; Fc domena – interakcije z receptorji.
- Imunoglobulinsko zvitje – dve antiparalelni beta verigi, ponekod povezani z S-S mostički.
- Imunoglobulin običajno veže le en del antigena – epitop. Vezava povzroči konformacijsko spremembo protitelesa- inducirano prilagajanje.