

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Uputstva za vežbe iz biohemije za studente
hemije smera istraživanje i razvoj

Pripremila
Profesor Vesna Niketić

Beograd, 2007.

Sadržaj

Predgovor, 2

Pravila za rad sa biološkim materijalom humanog porekla, 3

1 Nivoi organizacije živih bića, 5

UVODNA VEŽBA : Sistemi organa, 5

UVODNA VEŽBA : Osnovno o ćeliji, 8

2 Poznavanje osobina osnovnih biomolekula, 11

VEŽBA: Identifikacija nepoznate prirodne supstance, 11

3 Proteini, 12

3.1 Proteini krvi, 12

Krv

Plazma

Proteini plazme: albumin

Uobličeni krvni elementi: eritrociti, leukociti i trombociti

Proteini eritrocita: membranski proteini i hemoglobin

Membranski proteini

Hemoglobin i glikozilovani hemoglobin

VEŽBA: Proteini krvi, 19

Odvajanje plazme i izolovanje eritrocita iz krvi

Hemoliza eritrocita i izolovanje hemoglobina i membrana

SDS elektroforeza proteina plazme i membrana eritrocita

Određivanje albumina iz plazme afinitetnom hromatografijom

Određivanje molekulske mase hemoglobina gel filtracijom

Određivanje hemoglobinske, HbA₁ frakcije

3.2 Ponašanje proteina, 27

3.2.1 Konformacioni prelazi (denaturacija) proteina, 27

3.2.2 Protein - ligand interakcije, 28

VEŽBA: Ponašanje proteina, 28

Reverzibilna denaturacija albumina

Odvajanje hema od globina

Interakcije hemoglobina (Hb) sa kiseonikom

Dodatak: Metodologija rada sa proteinima, 33

Opšti principi izolovanja proteina: ekstrakcija i taloženje

Hromatografske metode

Gel-filtracija

Jonoizmenjivačka hromatografija

Afinitetna hromatografija

Ispitivanje homogenosti proteina

Gel elektroforeza (PAGE)

SDS gel elektroforeza

Određivanje koncentracije proteina

Biuretska metoda

Lowry-jeva metoda

Bradford-ova metoda (vezivanje boje)

4. Enzimi, 50

4.1 Podsetnik iz kinetike, 50

4.1.1 Brzina hemijske reakcije

4.1.2 Termodinamika i kinetika: teorija prelaznog stanja

Prelazno stanje

Energija aktivacije i konstanta brzine reakcije

Katalizatori ubrzavaju reakciju snižavanjem energije aktivacije

4.2 Glavne karakteristike enzima kao katalizatora, 55

4.2.1 Enzimi koriste energiju vezivanja enzima i supstrata u katalizi

4.2.2 Aktivno mesto enzima komplementarno je tranzitnom stanju supstrata

4.2.3 Specifičnost enzima

4.3 Kinetika enzimskih reakcija, 59

4.3.1 Osnovne jednačine enzimske kinetike, 60

Značenje konstante K_m

Karakteristike Michaelis-Mentenove jednačine

Grafičko prikazivanje Michaelis-Menten-ove jednačine

4.3.2 Eksperimentalno određivanje K_m i V

4.4 Inhibicija enzima, 68

Kompetitivna inhibicija

Nekompetitivna inhibicija

4.5 Uticaj pH na aktivnost enzima, 70

4.6 Određivanje (aktivnosti) enzima, 72

Početna brzina kao funkcija $[E]$

*Enzimске jedinice i specifična aktivnost enzima-određivanje [E]
Određivanje aktivnosti i izolovanje i prečišćavanje enzima*

4.7 Sigmoidna kinetika, 76

4.8 Zadaci i problemi, 77

VEŽBA: Osnovno o kinetici enzima, 83

VEŽBA: Određivanje aktivnosti enzima, 83

Određivanje aktivnosti tripsina

Određivanje aktivnosti katalaze u eritrocitima

Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze u plazmi/serumu

5. Nukleinske kiseline, 93

5.1 Principi izolovanja DNK iz biološkog materijala, 93

5.2 Spektralna karakterizacija DNK, 95

VEŽBA: Izolovanje i karakterisanje DNK, 96

6. Bioenergetika i metabolizam, 99

6.1 Podsetnik iz termodinamike, 99

Toplota, rad i energija - prvi princip termodinamike

6.2 Entropija, slobodna energija i ravnoteža, 102

ΔG i konstanta ravnoteže reakcije

ΔG i elektrohemijski potencijal

6.3 Primena koncepta ΔG u metabolizmu, 111

6.3.1 Opšti principi

6.3.2 Endergoni i egzergoni procesi

Kuplovane reakcije. Zajednički intermedijer

Struktura i osobine adenozin trifosfata (ATP)

Drugi, biološki važni derivati fosfata

ATP i biosinteza

Aktivni transport

Egzergoni procesi

Glikoliza

Respiracija

Fotosinteza

ZADACI I PROBLEMI, 125

PRILOG: STANDARDNI REDUKCIONI POTENCIJALI, OKSIDO-REDUKCIONIH REAKCIJA U BIOHEMIJI, 126

VEŽBA: Glikoliza/Fermentacija, 127

Predgovor

Ovaj Praktikum je nastao na osnovu višegodišnjeg iskustva autora u izvođenju nastave (predavanja i vežbi) iz biohemije za studente hemije smera istraživanje i razvoj na Hemijskom fakultetu. Biohemija je eksperimentalna nauka i vežbe treba da pomognu studentima da bolje razumeju osnovne koncepte iz biohemije, te da steknu osnovne predstave o radu i ponašanju u biohemijskoj laboratoriji. Nastava iz biohemije na Hemijskom fakultetu se izvodi od ranih 70-tih godina prošlog veka. Neke od vežbi koje su tada uvedene izdržale su test vremena i još uvek se izvode, dok je većina zamenjena novim vežbama. Eksperimentalne vežbe koje su uvrštene u ovaj (osnovni) kurs iz biohemije ne odstupaju po izboru, obimu i nivou od onoga što studenti u svetu rade na elementarnim kursevima iz opšte biohemije. Specifičnost ovog praktikuma je da su u njega uključene teme potrebne za razumevanje biohemije, a koje studentima hemije nisu (dovoljno) bliske (obnavljanje elementarnih znanja iz biologije, podsetnik iz kinetike i termodinamike, eksperimentalni rad sa proteinima). S obzirom na preopterećenost studenata na trećoj godini u praktikumu je koncizno dat uvodni deo u eksperimentalne vežbe, koji se može naći opširno obrađen u udžbenicima iz biohemije. Predviđeno je da studenti prorade ovaj materijal sa asistentima i/ili predmetnim nastavnikom kroz teorijske/pripremne vežbe.

Biohemija predstavlja deo osnovnog ("jezgra") obrazovanja diplomiranog hemičara. Hemičari se sve više sreću sa biohemijom u svojoj profesionalnoj praksi. Pored toga, poznavanje biohemije veoma mnogo doprinosi razumevanju hemije. Nadam se da će ovaj praktikum zajedno sa celim kursom doprineti da naši studenti hemije dobiju kvalitetno obrazovanje iz biohemije.

Na ovom mestu želim da se zahvalim mlađim kolegama, asistentima, mr Milanu Nikoliću i mr Dragani Stanić koji su mi pomogli oko koncipiranja nekih vežbi, te dipl. biohemičaru Milošu Filipoviću koji je pripremio uputstva za rad sa biološkim materijalom.

Februar, 2007
U Beogradu

Profesor Vesna Niketić

Pravila za rad sa biološkim materijalom humanog porekla

Svi uzorci krvi za vežbe biće dobijeni ili od testiranih donora (negativna serološka/virološka reakcija na sifilis, Hepatitis B i C, kao i HIV), ili će se raditi sa životinjskom krvlju. Životinjska krv, po pravilu, ne sadrži patogene opasne po život (gore pomenuti HIV, Hepatitis, sifilis, prioni i sl.). Ovo, kako bilo, ne znači da ne mogu postojati neki drugi elementi opasnosti u uzorku krvi. Zato je neophodno poznavati i pridržavati se pravilne procedure rada sa biološkim materijalom, koja će biti u daljem tekstu opisana! Studenti koji budu izrazili želju moći će da rade sa svojom krvlju i za te potrebe biće obezbeđeno stručno lice da im izvadi krv.

NB: SVI HUMANI BIOLOŠKI UZORCI TREBA DA BUDU UVEK TRETIRANI KAO INFEKTIVNI!!!

Univerzalne mere opreza formulisane od strane Centara za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, USA) i Službenog Glasnika Republike Srbije (br. 42/91, 53/93, 48/94, 42/98, 66/91, 83/92, 53/93, 67/93, 48/94, 44/95 i 53/95) služe da spreči kontakt sa inficiranom krvlju i drugim potencijalnim infektivnim materijalima. Ova uputstva važe za sve osoblje koje radi sa biološkim materijalom i podrazumevaju sledeće:

1. Uzorci krvi moraju biti obeleženi i čuvani na odgovarajući način. Frižider/zamrzivač u kojem se čuvaju uzorci krvi/seruma/plazme ne koristi se za druge potrebe.
2. Sve osobe moraju da zaštite kožu i sluznice od izlaganja krvi, ili bilo kojoj telesnoj tečnosti, što podrazumeva upotrebu zaštitnih (hiruških) rukavica. Zaštita očiju zaštitnim naočarima kao i zaštita lica su preporučljive, jer se time sprečava izlaganje sluzokože usana, nosa i očiju od potencijalnih faktora rizika. Ove zaštitne mere su neophodne u situacijama u kojima je moguće prskanje iz uzoraka pri radu.
3. Ako koža ili sluznica dođu u kontakt sa uzorkom krvi, ili nekim drugim materijalom, moraju odmah biti isprani **HLADNOM** vodom (topla voda dovodi do širenja pora na koži, a može i da olakša rastvorljivost nekih opasnih materija). Sa ruku se prvo skidaju rukavice, zatim se ruke ispiraju vodom, a potom i 76% etanolom.
4. Radne površine na koje se prosuo biološki materijal **ODMAH** se čiste ispiranjem jakim rastvorom natrijum-hipohlorita (sa oko 0,5% dostupnog hlora), posle čega sledi ispiranje 76% etanolom. Mantili kontaminirani biološkim tečnostima moraju biti dekontaminirani, npr. potapanjem u rastvor varikine, pre normalnog pranja u mašini. Materijal korišćen za čišćenje, mora prvo biti dekontaminiran, npr. hemijskom sterilizacijom ili autoklaviranjem.
5. Nakon ispitivanja, uzorci krvi, kao i otpadni materijal, tretiraju se 3% rastvorom natrijumhipohlorita, najmanje 1 sat, i potom odlivaju na za to predviđenom mestu u kanalizaciju.
 - a) Igle i špricevi za vadenje krvi koriste se samo jednokratno, i nakon upotrebe pakuju se u namensku posudu za bezbedno odlaganje.
 - b) Plastični nastavci za pipete koriste se samo jednokratno, a nakon upotrebe se odlažu u posudu sa sredstvom za dezinfekciju i bacaju.

- c) Stakleno posudje (epruvete i ostalo) koje je bilo u kontaktu sa infektivnim materijalom mora se pre pranja potopiti u rastvor dezinfekcionog sredstva, zatim se autoklavira i nakon toga pere.
6. Posebna pažnja se treba posvetiti pri radu sa oštrim predmetima kao što su igle, skalpeli i makaze da ne bi došlo do povređivanja i oštećivanja zaštitnih rukavica čime bi se povećao rizik od infekcije. **Intaktna koža prva je linija odbrane organizma od patogena.**
 7. Osobe sa lezijama na koži kao i osobe sa izraženim dermatitisom treba da izbegavaju kontakt sa biološkim materijalima. Osobe alergične na lateks treba da se jave asistentu.
 8. Trudnice se posebno upozoravaju da se pridržavaju gore pomenutih pravila.

Ostale mere opreza pri radu podrazumevaju sledeće:

1. Uzorci krvi i drugih potencijalno infektivnih materijala moraju biti transportovani u nepropusnim sudovima. Posebna briga se vodi da bi se sprečila kontaminacija spoljašnosti suda.
2. Laboratorijski postupci koji mogu dovesti do prskanja (snažno mućkanje, sonikacija, usitnjavanje...) se izvode uz prisustvo asistenta i uz gore opisane mere opreza.
3. Pipetiranje ustima je zabranjeno - mehanički uređaji se koriste za pipetiranje svih tečnosti.
4. Unošenje hrane i pića, pušenje, upotreba kozmetike i balzama za usne, kao i nameštanje sočiva u toku rada sa biološkim materijalom su najstrožije zabranjeni.
5. Jedino studentima je dozvoljeno da rade u laboratoriji. Posete u radnoj prostoriji nisu dozvoljene.
6. Laboratorijski instrumenti koji se koriste u radu treba da budu isprani nakon rada sa biološkim materijalima na način na koji to propisuje proizvođač.
7. Pažnja pri pranju ruku je esencijalni deo dobre prakse. Po završetku rada ruke se ispiraju vodom i tečnim sapunom. Upotreba hidratantnih krema se preporučuje kod frekventnog pranja ruku, kao i kod upotrebe zaštitnih rukavica. Duga kosa treba da je vezana ili na neki drugi način imobilisana.

Asistent zadržava pravo da sa vežbi ukloni svakog studenta koji se ne pridržava navedenih pravila.

1. Nivoi organizacije živih bića

Za živa bića je karakteristično da su enormno kompleksna. Čak i relativno jednostavna ćelija bakterije *Escherichia coli* (*E.coli*) sadrži 3 do 6 hiljada **različitih** jedinjenja, od kojih je većina jedinstvena za *E.coli*. Za više organizme je karakteristična proporcionalno veća kompleksnost. ***Homo sapiens*** (čovjek) sadrži možda 100 000 različitih vrsta molekula, od kojih je manji deo okarakterisan. Kako je cilj biohemije razumevanje/izučavanje živog sveta na molekulskom nivou mogli bismo pomisliti da je cilj beznađan. Međutim, to nije slučaj. *Živa bića poseduju unutrašnju pravilnost koja potiče iz činjenice da su izgrađena na hijerarhijski način (hijerarhijska organizacija živih bića)*. Organizam je najviši nivo organizacije – u našem slučaju, čovek. Anatomska i citološka ispitivanja su pokazala da čovekov organizam predstavlja organizaciju sistema organa. Svi sistemi organa u telu funkcionišu zajedno da bi održali život i zdravlje. Organski sistemi se sastoje iz organa, organi od tkiva, tkiva iz ćelija. *Ćelija predstavlja osnovnu jedinicu građe živih bića i predmet izučavanja biohemije*. Ćelije se sastoje iz subcelularnih organela, a one iz **supramolekulskih struktura**, kao što su membrane i vlakna, koje se sastoje iz makromolekula. Niži nivo organizacije određuje karakteristike i funkcionisanje viših nivoa. Sve što narušava sistem neminovno će uticati na sve njegove komponente.

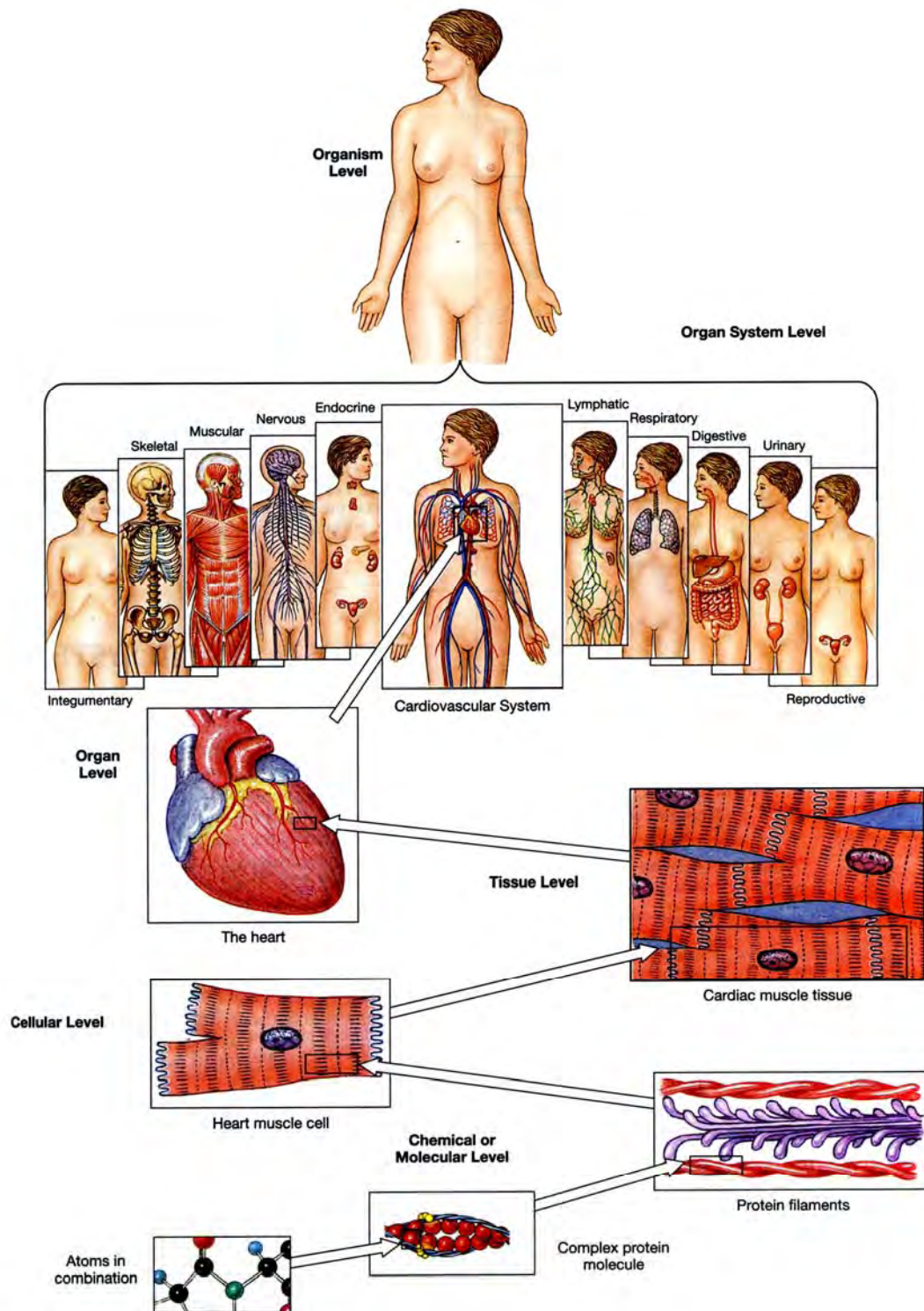
CILJ (teorijskih) vežbi koje slede je da osvežite/obnovite/dopunite dosadašnja (elementarna) znanja o građi i funkcionisanju (a) čovečijeg organizma i (b) ćelije. Razmatranja će obuhvatiti sisteme organa (Odeljak 1.1) i osnovne strukturne i funkcionalne karakteristike prokariotskih ćelija (Odeljak 1.2).

UVODNA VEŽBA Sistemi organa

Na slici 1-1 prikazana je hijerarhijska organizacija ljudskog tela i 11 sistema organa iz kojih se ono sastoji. Sistemi organa su međusobno zavisni, povezani i spakovani u relativno malom prostoru koji međusobno dele (kao stanovnici u velikom gradu!) . Postoji niz mehanizama koji sprečavaju potencijalno štetne promene u okruženju unutar tela. **Homeostaza** se odnosi na postojanje stabilnog unutrašnjeg okruženja. Da bi opstao svaki živi sistem mora da održava homeostazu. *Homeostatska regulacija* predstavlja podešavanje živog sistema da sačuva homeostazu.

PRIPREMA VEŽBE: Za pripremu ove vežbe možete koristiti po svom izboru knjige iz biologije, fiziologije, medicinske priručnike koje su vam poznate/bliske, a u kojima je na elementaran način prikazana organizacija ljudskog tela. U biblioteci Hemijskog fakulteta takođe možete naći niz knjiga koje vam mogu biti od koristi.

ZADATAK: Posmatrajte pažljivo sliku 1-1, zajednički je uz pomoć asistenta (i dodatne literature koju će asistent doneti!) prodiskutujte, a zatim rezimirajte njen sadržaj uz pomoć tabele 1-1. Uz tabelu dodajte svoje komentare. Rezime, najvažnije zaključke, podatke o literaturi koja vam se najviše svidela unesite u belu svesku.



Slika 1.1 Nivoi organizacije (hijerarhijska organizacija) živih bića na primeru čoveka; Sistemi organa kod čoveka (Martini FM, Fundamentals of Anatomy and Physiology, Prentice Hall, 1998)

Tabela 1-1 Pregled sistema organa i njihovih osnovnih funkcija

Organ System		Major Functions
	Integumentary system	Protection from environmental hazards; temperature control
	Skeletal system	Support; protection of soft tissues; mineral storage; blood formation
	Muscular system	Locomotion; support; heat production
	Nervous system	Directing immediate responses to stimuli, generally by coordinating the activities of other organ systems
	Endocrine system	Directing long-term changes in the activities of other organ systems
	Cardiovascular system	Internal transport of cells and dissolved materials, including nutrients, wastes, and gases
	Lymphatic system	Defense against infection and disease
	Respiratory system	Delivery of air to sites where gas exchange can occur between the air and circulating blood
	Digestive system	Processing of food and absorption of nutrients, minerals, vitamins, and water
	Urinary system	Elimination of excess water, salts, and waste products
	Reproductive system	Production of sex cells and hormones

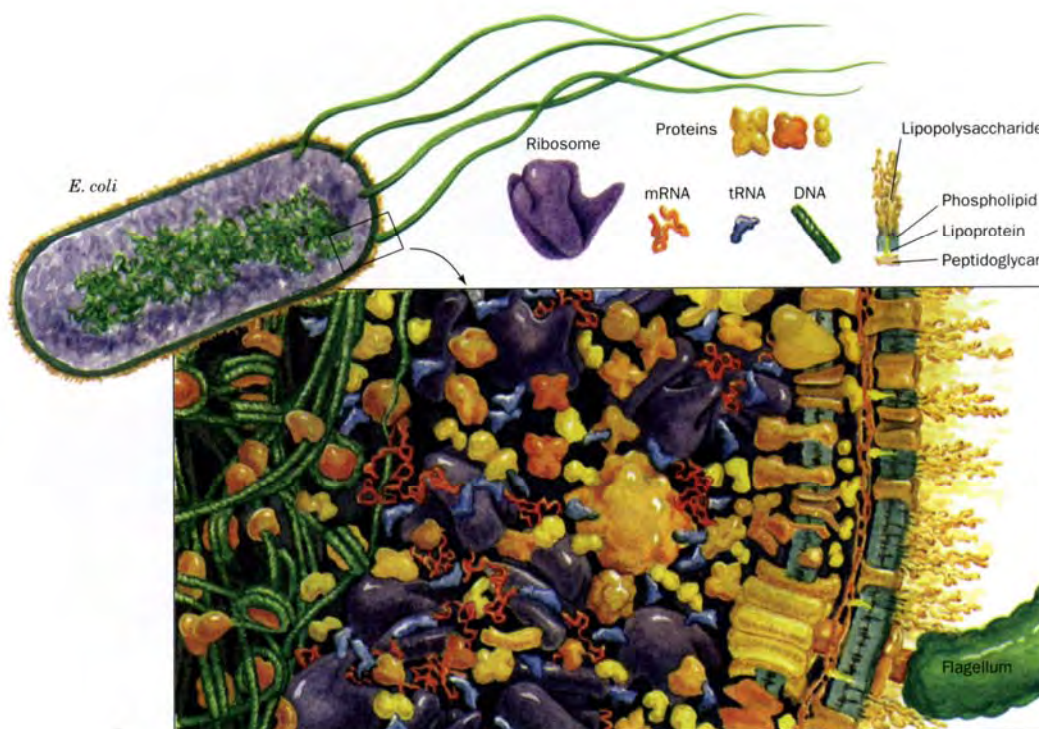
UVODNA VEŽBA Osnovno o ćeliji

Odavno je poznato da se život zasniva na morfološkoj jedinici koja se naziva ćelija. Postoje dva tipa ćelija: **eukariote**, koje sadrže jedro (**nukleus**) u kojem se nalazi DNK; i **prokariote** u kojima nedostaje ova organela. Prokariote, koje obuhvataju razne vrste bakterija, imaju relativno просту strukturu i bez razlike su jednoćelijski organizmi. Procenjuje se da prokariote predstavljaju polovinu biomase na Zemlji. Eukariote, koje mogu biti jednoćelijske i višećelijske, mnogo su kompleksnije od prokariota.

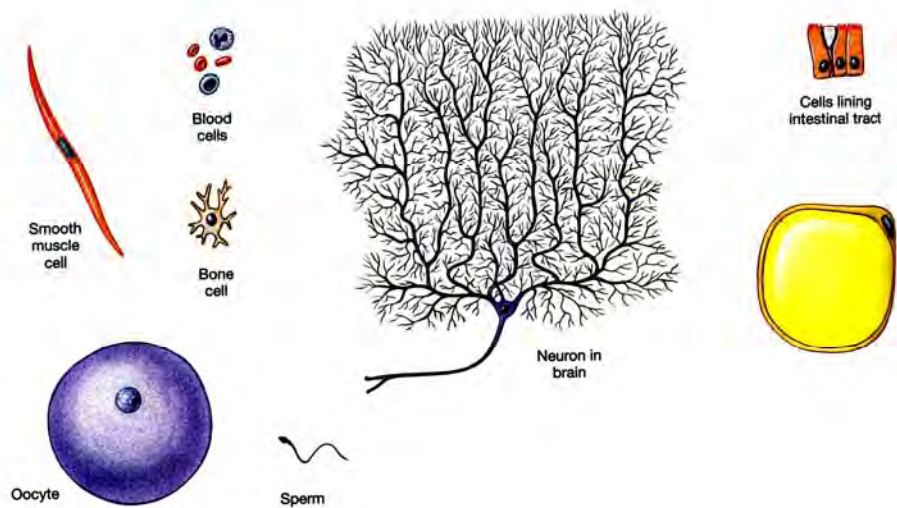
Ćelije su najmanje jedinice koje mogu da izvedu sve vitalne fiziološke funkcije. Ćelije nastaju deobom postojeće ćelije. Svaka ćelija održava homeostazu na ćelijskom nivou. Homeostaza na nivou tkiva, organa, organskih sistema i organizma reflektuje kombinovanu i koordinovanu aktivnost mnogih ćelija. Ćelije imaju različite forme i funkcije.

PRIPREMA VEŽBE: Za pripremu ove vežbe možete koristiti po svom izboru knjige iz biologije, fiziologije i biohemije koje su vam poznate/bliske. U knjigama iz biohemije (Lehninger; Voet, ali i u drugima koje su sve dostupne u biblioteci Hemijskog fakulteta) ćelija je lepo obrađena.

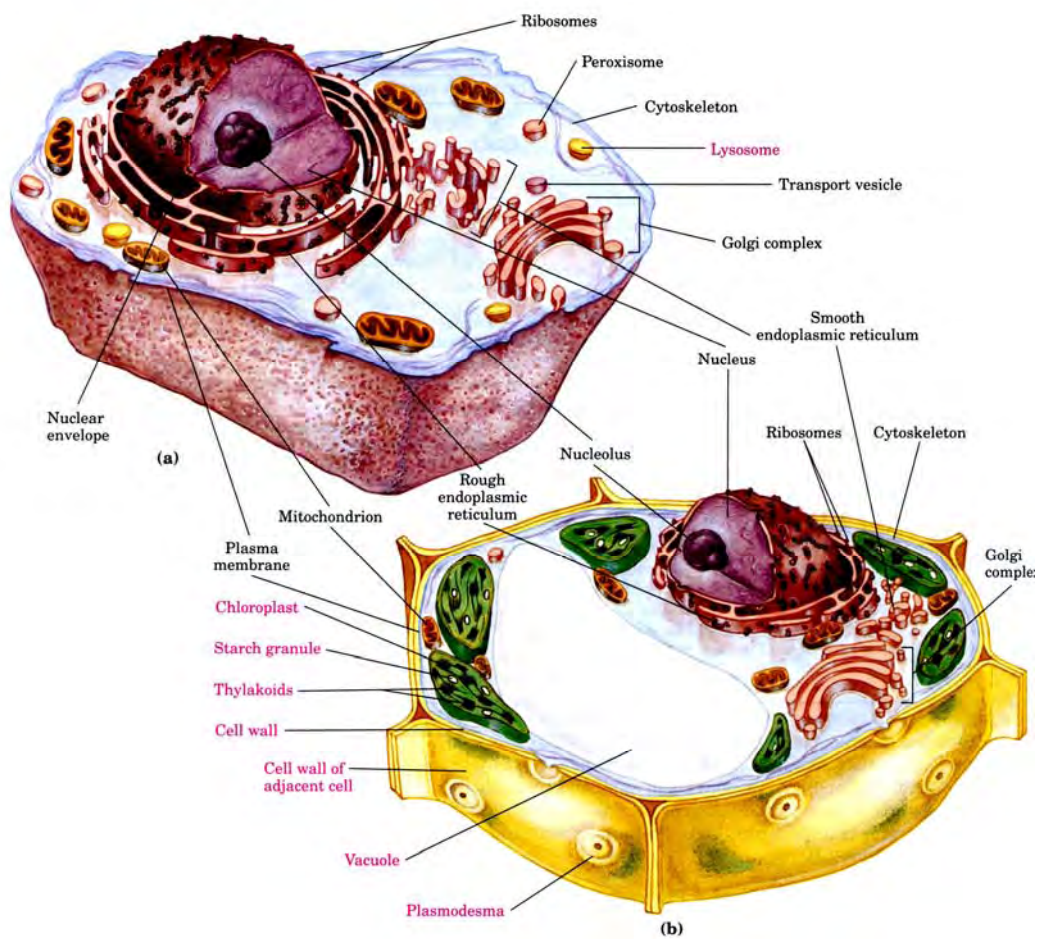
ZADATAK: Uz pomoć asistenta i materijala koje će asistent doneti, a koristeći slike i tabele koje su date u ovom praktikumu prodiskutujte i rezimirajte osnovne strukturne i funkcionalne karakteristike **prokaritotske** ćelije, proučite i opišite **diverzitet ćelija** u ljudskom telu, rezimirajte osnovne strukturne i funkcionalne karakteristike **eukariotske, životinjske i biljne** ćelije.



Slika 1-2 Simulirani presek kroz ćeliju *E. Coli* uvećan milion puta (Voet&Voet, 2004)



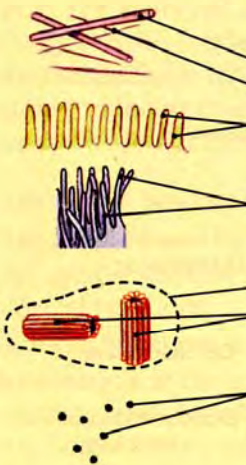
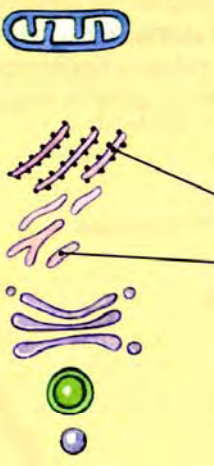
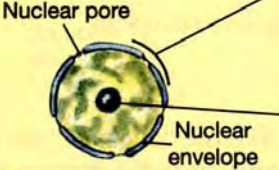
Slika 1-3 Diverzitet humanih ćelija



Slika 1-3 Presek tipične animalne i biljne ćelije

Tabela 1-2 Pregled organela tipične (reprezentativne) ćelije

TABLE 3-1 Organelles of a Representative Cell

Appearance	Structure	Composition	Function
	CELL MEMBRANE	Lipid bilayer, containing phospholipids, steroids, and proteins	Isolation; protection; sensitivity; support; controls entrance/exit of materials
	CYTOSOL	Fluid component of cytoplasm	Distributes materials by diffusion
NONMEMBRANOUS ORGANELLES 		Proteins organized in fine filaments or slender tubes Membrane extensions containing microfilaments Membrane extensions containing microtubule doublets in a 9 + 2 array Cytoplasm containing two centrioles, at right angles; each centriole is composed of 9 microtubule triplets RNA + proteins; fixed ribosomes bound to endoplasmic reticulum, free ribosomes scattered in cytoplasm	Strength and support; movement of cellular structures and materials Increase surface area to facilitate absorption of extracellular materials Movement of materials over cell surface Essential for movement of chromosomes during cell division; organization of microtubules in cytoskeleton Protein synthesis
MEMBRANOUS ORGANELLES 		Double membrane, with inner membrane folds (cristae) enclosing important metabolic enzymes Network of membranous channels extending throughout the cytoplasm Has ribosomes bound to membranes Lacks attached ribosomes Stacks of flattened membranes (sacculs) containing chambers (cisternae) Vesicles containing powerful digestive enzymes Vesicles containing degradative enzymes	Produce 95% of the ATP required by the cell Synthesis of secretory product; intracellular storage and transport Modification and packaging of newly synthesized proteins Lipid and carbohydrate synthesis Storage, alteration, and packaging of secretory products and lysosomal enzymes Intracellular removal of damaged organelles or of pathogens Neutralization of toxic compounds
		Nucleoplasm containing nucleotides, enzymes, nucleoproteins, and chromatin; surrounded by double membrane (nuclear envelope) Dense region in nucleoplasm containing DNA and RNA	Control of metabolism; storage and processing of genetic information; control of protein synthesis Site of rRNA synthesis and assembly of ribosomal subunits

2. Poznavanje osobina osnovnih biomolekula

Poznavanje osobina/svojstava osnovnih biomolekula proteina, lipida i ugljenih hidrata neophodno je, kako za razumevanje/učenje biohemije, tako i za svakodnevnu biohemijsku praksu. Poznavanje svojstava nukleinskih kiselina, pre svega DNK neophodno je za razumevanje fundamentalnih pojmova iz kursa iz biohemije (odnos proteina i nukleinskih kiselina!!!), a biće korisno onima koji se u svojoj profesionalnoj karijeri usmere ka savremenim biotehnologijama zasnovanim na tehnikama rekombinantne DNK.

VEŽBA Identifikacija nepoznatog prirodnog proizvoda

CILJ ove vežbe je da osvežite znanja/iskustva koja ste stekli na vežbama iz Hemije prirodnih proizvoda (HPP) o svojstvima/ponašanju osnovnih biomolekula, proteina, lipida, šećera i nukleinskih kiselina, a što će vam biti od koristi i/ili neophodno za dalji rad u okviru biohemije.

*ZADATAK: Identifikovati nepoznatu supstancu koju ćete dobiti od asistenta ili tehničkog saradnika. Supstanca će biti u čvrstom stanju ili u rastvoru. Obrazložiti odgovor sa najmanje dva dokaza (osobine). U obzir dolazi **jedna** od sledećih supstanci: neki protein, neka aminokiselina, triglicerid, fosfolipid, masna kiselina, holesterol, nukleinska kiselina ili nukleotid.*

PRIPREMA VEŽBE: Obnovite šta ste naučili i ZAPAZILI o napred navedenim prirodnim proizvodima (i njihovim konstituentima!) na kursu iz Hemije prirodnih proizvoda. Koristite svoje “bele sveske” i materijale (Praktikum i dopunske materijale, ako ih je bilo) sa vežbi iz Hemije prirodnih proizvoda. Na pripremnoj vežbi (ukoliko dodete spremni!!!) možete da napravite plan i šemu rada, polazeći od svojih znanja, iskustava, ideja, a uz konsultaciju sa predmetnim nastavnikom/asistentom. Tom prilikom možete da napravite i spisak svega što bi vam moglo biti potrebno za izvođenje vežbe. Time ćete sebi olakšati posao, jer će tehnički saradnici moći da pripreme sve što se dogovorite.

Pitanja za pripremu vežbe:

Koje su hemijske strukture gore navedenih supstanci?
Kako izgledaju navedene supstance? Da li mi je nešto potrebno da ih bolje razgledam? Kakva je rastvorljivost navedenih supstanci? U čemu se rastvaraju? A kako se talože iz rastvora? Koje se od navedenih supstanci (i kako?) denaturišu? Kako najjednostavnije ovo mogu da utvrdim? Koje od navedenih supstanci apsorbuju u vidljivoj/UV oblasti? Koje supstance pokazuju karakterističan (i kakav?) apsorpcioni spektar? Koje dokazne reakcije bih mogao/la da koristim za navedene supstance? Za identifikaciju kojih od navedenih supstanci bi se mogla primeniti hromatografija na tankom sloju?

.....

.....

3. Proteini

Proteini su najzastupljeniji biomolekuli u ćeliji (oko 70% od suve težine ćelije čine proteini), najveći deo energije (ATP-a) se troši za biosintezu proteina. Proteini obavljaju najrazličitije funkcije u ćeliji i organizmu. Dobro poznavanje proteina neophodno je za razumevanje (učenje) biohemije. Rad sa proteinima je deo svakodnevne biohemijske laboratorijske prakse. U okviru ove vežbe dopunićete vaša dosadašnja znanja i iskustva o svojstvima i ponašanju proteina, upoznaćete osnovne tehnike i metode rada sa proteinima. U ovom radu ćemo koristiti krv i upoznati proteine prisutne u krvnoj plazmi (ukupni proteini i albumin) i proteine iz eritrocita (membranski proteini i hemoglobin).

3.1 Proteini krvi

Krv je biološki materijal sa kojim se često srećemo, kako u istraživačkoj, tako i u rutinskoj, biohemijskoj praksi. Proteini krvne plazme, kao što su albumin i imunoglobulini spadaju u najviše izučavane i korišćene proteine u biomedicinskoj praksi. Hemoglobin, koji je (zajedno sa mioglobinom) prvi protein čija je trodimenzionalna struktura određena, jedan je od najviše, ako ne i najviše izučavani (bio)molekul. Membrana eritrocita je model za izučavanje plazmine membrane. U odeljku koji sledi daćemo prvo kratak osvrt na sastav, funkciju i proteine krvi. Ovaj deo treba pročitati (proučiti) da biste razumeli vežbe koje slede. Deo koji se odnosi na tehnike i metode koje se primenjuju u izolovanju i prečišćavanju proteina dat je u Dodatku na kraju ovog poglavlja i po potrebi ga možete takođe konsultovati.

Krv

Krv je specijalizovano *tečno* vezivno tkivo koje sadrži ćelije suspendovane u tečnom matriksu. Temperatura krvi je oko 38°C, ona je pet puta viskoznija od vode, a pH krvi iznosi 7,4. Kardiovaskularni sistem odraslog čoveka sadrži 5-6 (muškarci) i 4-5 (žene) litara krvi.

Funkcije krvi uključuju:

- ▶ *transport rastvorenih gasova, hranljivih sastojaka, hormona i otpadnih proizvoda metabolizma*
- ▶ *regulaciju pH i sastava elektrolita u intersticijalnim tečnostima (tečnost između tkiva (na primer neutralizacija mlečne kiseline nastale u mišićima)*
- ▶ *sprečavanje gubitka tečnosti usled povrede (koagulacija krvi)*
- ▶ *odbrana organizma od toksina i patogena (leukociti; antitela!)*
- ▶ *održavanje telesne temperature (apsorbuje toplotu iz mišićnog tkiva i redistribuiru je u druga tkiva)*

Krv ima karakterističan i jedinstven sastav (Slika 3.1). To je tečno vezivno tkivo sa ekstracelularnim matriksom koji se naziva **plazma**. Plazma se sastoji iz *plazma proteina* koji se nalaze, za razliku od drugih proteina u vezivnim tkivima koji grade vlakna, u rastvoru. **Uobličeni elementi** krvi su ćelije i ćelijski fragmenti koji su suspendovani u plazmi. **Crvene krvne ćelije** ili **eritrociti** su najzastupljenije ćelije u krvi. Slede, mnogo manje zastupljene **bele krvne ćelije** ili **leukociti i trombociti**. Plazma i uobličeni elementi se nazivaju **puna krv**. Komponente krvi se mogu razdvojiti (frakcionisati) što ćemo uraditi u okviru jedne od vežbi koje slede.

Krv se po pravilu vadi iz vene (Slika 3.1). Vena na ruci se lako locira, zidovi vena su tanji od zidova arterija, a pritisak u venama je relativno nizak, tako da rana brzo zaraste. Krv iz perifernih arterija se vadi iz prsta (obično) ili (ređe) iz uva.

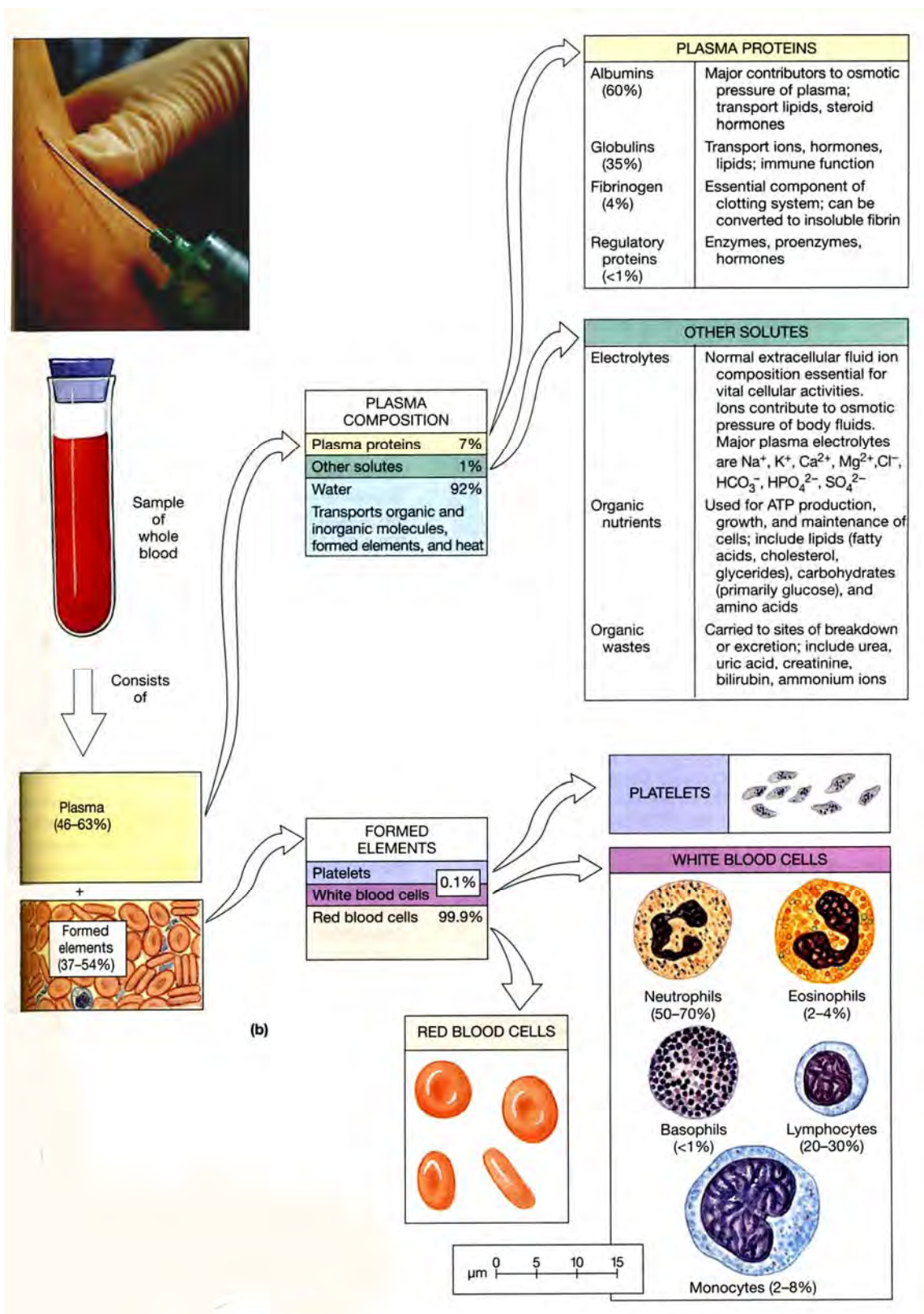
Plazma

Plazma predstavlja 46-63% zapremine pune krvi, sa vodom koja čini oko 92% zapremine plazme (Slika 3.1). Plazma sadrži značajnu količinu rastvorenih proteina (prosečno 7.6 g na 100 ml plazme). Više od 100 različitih proteina se smatra tipičnim (karakterističnim) za plazmu. Pored ovih u plazmi se nalazi i niz drugih proteina i peptida, kao što su na primer hormoni koji potiču iz endokrinih žlezda. Raznolikost proteina prisutnih u plazmi ilustruje slika 3.1 na kojoj je prikazana 2-D elektroforeza proteina iz uzorka normalne plazme. Najzastupljeniji proteini plazme su *albumin(i), globulini i fibrinogen*.

Albumin predstavlja 60% od ukupnih proteina plazme. Sa slike 3.2b na kojoj je predstavljena trodimenzionalna struktura humanog albumina vidi se da se molekul albumina sastoji iz 3 domena: I, II i III (svaki sadrži 2 subdomena). Kao najzastupljeniji protein u plazmi albumin najviše doprinosi održavanju osmotskog pritiska plazme. Albumin je važan za transport u vodi nerastvornih supstanci kao što su masne kiseline (Slika 3.2b), steroidni i tiroidni hormona, kao i za transport metalnih jona. Za albumin je karakteristično da interaguje sa nizom supstanci, uključujući i mnoge lekove (razni ligandi se vezuju za različite domene!).

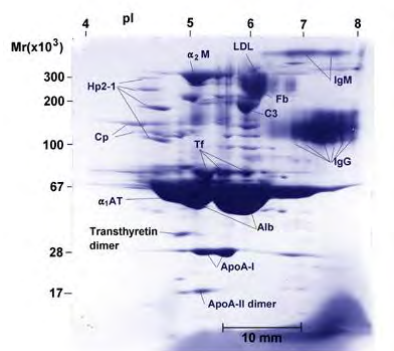
Globulini predstavljaju oko 35% proteina plazme. Primeri važnih imunoglobulina su *imunoglobulini* i *transportni globulini*. *Imunoglobulini*, koji se nazivaju i antitela interaguju sa stranim telima (proteini, patogeni) i stoga imaju važnu ulogu u odbrambenom sistemu. *Transportni globulini* transportuju jone, hormone i druge supstance koje bi inače bile izlučene preko bubrega ili koje nisu rastvorne u vodi. Ovde spadaju: *globulin koji vezuje tirodne i steroidne hormone*, *transferin* koji transportuje gvožđe (Fe^{2+}), *apolipoproteini* koji transportuju trigliceride i druge lipide u krvi. Kada vežu lipide *apolipoproteini* postaju *lipoproteini*.

Fibrinogen predstavlja oko 4% od ukupnih proteina plazme. Pod određenim uslovima molekuli fibrinogena interaguju gradeći velike, nerastvorne lance *fibrina*. Ova vlakna predstavljaju osnovu za *zgrušavanje (koagulaciju)* krvi. *Ako se pri uzimanju krvi (Slika 3.1) ne doda antikoagulans doći će do nastajanja fibrina u plazmi što će izazvati koagulaciju. Centrifugovanjem ovakvog uzorka dobiće se talog koji će sadržati eritrocite sa fibrinom i drugim sastojcima i supernatant koji se naziva serum*. U biohemijskoj praksi se uvek naglašava da li se radi analiza u *serumu (S)* ili u *plazmi (P)*.

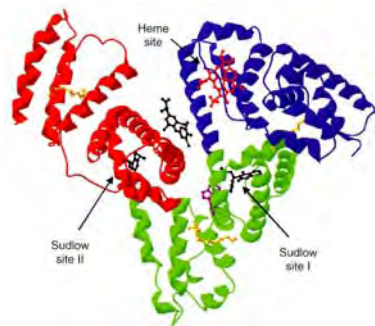


Slika 3.1 Sastav pune krvi. (a) Vađenje krvi iz vene. (b) Sastav tipičnog uzorka pune krvi.

a)

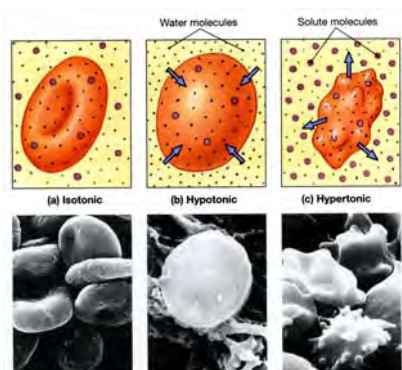


b)



Slika 3.2 Proteini plazme: 2-D elektroforeza proteina plazme (a); struktura albumina sa vezanim masnim kiselinama (b).

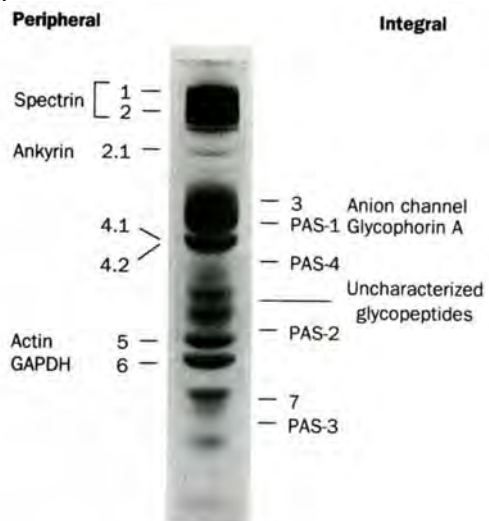
a)



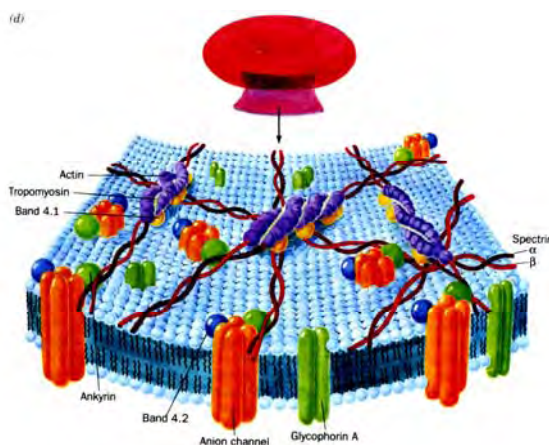
b)



c)



d)



Slika 3.3 Proteini eritrocita: Efekat osmotskog pritiska na eritrocite (a); hemoglobin (b) SDS-elektroforeza membranskih proteina (c); šematski prikaz membrane eritrocita (d).

Uobličeni krvni elementi: eritrociti, leukociti i trombociti

Najzastupljenije ćelije u krvi su crvene krvne ćelije (eritrociti) i bele krvne ćelije (leukociti). Krv sadrži trombocite (pločice) koje ne predstavljaju ćelijske elemente. U odeljku koji sledi biće detaljnije reči o eritrocitima i proteinima iz eritrocita, a osvrnućemo se na leukocite i trombocite.

Eritrociti sadrže hemoglobin od kojeg potiče njihova karakteristična crvena boja. Eritrociti su najzastupljenije ćelije krvi jer predstavljaju 99.9% uobličениh krvnih elemenata. Uobičajeno je u kliničkoj praksi da se sadržaj eritrocita u krvi izražava kao broj ćelija po mikrolitru (μl) pune krvi. Jedan mikrolitar, ili jedan *kubni milimetar* sadrži 4.5-6.3 miliona eritrocita kod muškaraca i 4.2-5.5 miliona kod žena. Eritrociti čine oko jednu trećinu svih ćelija u našem telu.

Hematokrit predstavlja % ćelijskih elemenata u punoj krvi. Normalni hematokrit iznosi prosečno 46% (opseg 40-54) kod odraslih muškaraca i 42% (opseg 37-47) kod žena. Hematokrit se određuje centrifugovanjem pune krvi, tako da svi uobličени elementi padnu na dno. Puna krv sadrži oko 1000 eritrocita na jedan leukocit (Slika 3.1). Nakon centrifugovanja leukociti i trombociti se nalaze kao vrlo tanak, pahuljičast talog nad eritrocitima. Pošto hematokrit predstavljaju praktično samo eritrociti, hematokrit se naziva i zapremina spakovanih eritrocita („volume of packed red cells“ VPRC). Mnogi faktori mogu da promene hematokrit, na primer pri povećanoj sintezi eritrocita (policitemija) ili običnoj dehidraciji hematokrit će biti povećan. Promene u hematokritu su indikacija za dodatna medicinska ispitivanja pacijenta.

Eritrociti su jedna od najspecifičnijih ćelija u našem telu, koja se veoma razlikuje od „tipične“ ćelije koju smo upoznali u prethodnoj vežbi. Svaki eritrocit je bikonkavni disk, tanji na sredini i deblji pri krajevima (Slika 3.1 i Slika 3.3). Ovakav oblik eritrocita je izuzetno važan za njegovu funkciju, transporta kiseonika i ugljen dioksida. On omogućuje relativno veliku površinu ćelije što olakšava brzu razmenu gasova u plućima, odnosno u tkivu. Ovakav oblik omogućuje da se eritrociti slažu jedan na drugi („kao tanjiri“) što im omogućuje da tako spakovani lako prođu kroz krvne sudove čiji je prečnik samo nešto malo veći od njihovog. Ćelije koje ne bi imale ovu osobinu udarale bi u zidove krvnog suda i pravile zastoj u protoku krvi!!!. Eritrociti zbog svog oblika mogu da se savijaju i deformišu što im omogućuje da prođu i kroz najuže kapilare.

Tokom diferencijacije eritrociti čoveka i drugih sisara gube većinu organala uključujući i jedro; ove ćelije zadržavaju samo citoskelet (eritrociti nekih kičmenjaka, ali ne sisara zadržavaju jedro!). Pošto im nedostaje jedro i ribozomi eritrociti ne podležu deobi i ne vrše sintezu proteina i enzima. Zbog toga, ukoliko dođe do oštećenja eritrociti ne mogu „izvršiti popravke“ i njihov život je kratak (normalno manje od 120 dana). Eritrociti imaju male energetske zahteve (male potrebe za ATP-om) koje zadovoljavaju glikolizom (glukozu uzimaju iz plazme!). Odsustvo mitohondrija omogućuje da se sav kiseonik apsorbovan u eritrocitima prenese do perifernih tkiva („da ne bude ukraden od strane mitohondrija“)

Bele krvne ćelije (leukociti) (Slika 3.1) imaju jedro i druge organele, a nedostaje im hemoglobin. Tradicionalno se na osnovu bojenja pod mikroskopom leukociti dele na *granulocyte* (neutrofili, eosinofili i bazofili) i *agranulocyte* (monociti i limfociti) (Slika 3.1). Granule predstavljaju sekretorne vezikule i lizosome koji su kod agranulocyte suviše mali da bi se videli pri bojanju pod mikroskopom. U jednom mikrolitru se nalazi prosečno 6000-9000 leukocita. Većina leukocita se nalazi u vezivnom tkivu i u organima limfnog sistema, tako da cirkulišući leukociti predstavljaju samo manji deo leukocita kojima raspolaže naš čovečiji organizam. Nasuprot eritrocitima, leukociti cirkulišu samo u toku manjeg dela svog života. Oni mogu da se kreću kroz vezivno tkivo, a koriste krv primarno da dodju od jednog do drugog organa ili da brzo stignu do mesta povrede ili napada patogena. Leukociti imaju odbrambenu (zaštitnu) ulogu u odnosu na patogene, a takođe otklanjaju toksine, sporedne proizvode i oštećene ćelije. Neutrofili, eosinofili, bazofili i monociti doprinose takozvanoj *nespecifičnoj odbrani* organizma. Ova odbrana se aktivira pod uticajem raznih stimulusa i oni ne prave razliku između različitih napada. Nasuprot ovome, *limfociti* su odgovorni za *specifični imunitet*: sposobnost tela da napadne specifični patogen ili strano telo (na primer strani protein).

Trombociti (“platelets”-pločice) su mali paketići citoplazme (Slika 3.1) okruženi membranom koji sadrže enzime i druge sastojke potrebne za koagulaciju krvi.

Proteini eritrocita: membranski proteini i hemoglobin

Membranski proteini

Ukoliko se izolovani eritrociti prenesu iz *izotonog* (*iso*, isti + *tonos*, pritisak, misli se na osmotski pritisak) u *hipotoni* rastvor, voda će ulaziti u ćeliju koja će bubriti „kao balon“ (Slika 3.2a). Na kraju će ćelijska membrana popucati i oslobodiće se sadržaj ćelije u rastvor. Ovaj proces se naziva *hemoliza* (*hemo-*, krv + *liza*, rastvaranje). Ćelija stavljena u *hipertoni* rastvor će ispuštati vodu u okolinu, smežuraće se i dehidrirati (Slika 3.2a). Hemolizat eritrocita će sadržavati delove plazmine membrane i sadržaj citosola, čija je glavna komponenta kao što smo videli hemoglobin. Centrifugovanjem hemolizata istaložiće se membrane, koje kada se isperu izgledaju prozračno beličaste („ghost“ – duhovi), a u supernatantu zaostaju rastvorni proteini, od kojih više od 95% otpada na hemoglobin.

Zbog svoje relativne jednostavnosti, dostupnosti i lakoće sa kojom se izoluje membrana eritrocita je najviše ispitivana i najbolje upoznata biološka membrana. Stoga je membrana eritrocita model za kompleksnije membrane drugih ćelija.

Membrana eritrocita ima sličan sastav kao i druge membrane: polovina proteini, nešto manje lipidi i ostatak ugljeni hidrati. Membranski proteini se mogu razdvojiti *SDS elektroforezom* (videti Dodatak ovom odeljku!) ukoliko se prethodno *solubilizuju* u puferu koji sadrži 1% SDS. Na dobijenem elektroforegramu obojenom „Coomassie brilliant blue“ (CBB) bojom vidi se nekoliko većih i veći broj manjih traka. Ukoliko se

bojenje izvrši reagensom za ugljene hidrate („periodic acid-Schiff reagent“ PAS) mogu se uočiti četiri takozvane PAS-trake (Slika 3.2c). Polipeptidi koji odgovaraju trakama 1, 2, 4.1, 4.2, 5 i 6 lako se izoluju iz membrana promenom pH i jonske sile što ukazuje da su ovi proteini periferni. Ovi proteini su locirani sa unutrašnje strane membrane eritrocita (Slika 3.3d). Nasuprot njima, traka 3, 7 i sva 4 PAS proteina su integralni proteini koji se mogu ekstrahovati iz membrane samo primenom detergenata i organskih rastvarača. Transport CO_2 zahteva da je membrana eritrocita propustljiva za HCO_3^- i Cl^- (da bi se očuvao elektrolitički balans ulazak jednog HCO_3^- jona zahteva izlazak jednog Cl^- jona!). Traka 3 (*anjonski kanal*) omogućuje transport HCO_3^- i Cl^- . Specifičan bikonkavni diskoidni oblik eritrocita (Slika 3.1), fluidnost, fleksibilnost, deformabilnost i elastičnost eritrocita, koji su kao što smo videli izuzetno važni za funkciju eritrocita potiče od mreže proteina koja čini ćelijski citoskelet. Najzastupljeniji protein citoskeleta eritrocita je spektrin koji se sastoji iz 2 polipeptidna niza (traka 1 i 2 na elektroforegramu sa slike 3.2c i α i β nizovi sa slike 3.2d). Ova dva polipeptidna niza se uvijaju jedan oko drugog dajući $\alpha\beta$ heterodimere spektrina koji se dalje organizuju u heterotetramere. Ovi tetrameri se uzajamno povezuju pomoću trake 4.1 i trake 5 (za koju je pokazano da predstavlja protein *aktin*, čest sastavni deo citoskeleta i kod drugih ćelija). U umrežavanju spektrina učestvuje i tropomiozin, protein koji i u mišićima interaguje sa aktinom. Spektrin takođe interaguje sa proteinom *ankirinom* koji ga povezuje sa trakom 3 (Slika 3.2d).

(Više o membranama, a posebno o membrani eritrocita možete pročitati u Voet-u)!

Hemoglobin i glikozilovani hemoglobin

Eritrocit tokom svog razvića gubi sve intracelularne komponente koje nisu vezane za njegovu primarnu funkciju: transport respiratornih gasova. Hemoglobin čini više od 95% intracelularnih proteina u eritrocitima. Obično se kaže da je eritrocit kao neka vrećica u kojoj se nalazi hemoglobin. Sadržaj hemoglobina u punoj krvi se izražava kao broj grama u 100 ml pune krve (g/dl). Normalan opseg vrednosti je 14-18 g/dl kod muškaraca i 12-16 g/dl kod žena. Hemoglobin je odgovoran za sposobnost eritrocita da transportuju kiseonik i ugljen dioksid.

O strukturi (Slika 3.3b) i funkciji hemoglobina možete pročitati u bilo kom udžbeniku iz biohemije (konsultovati literaturu za pripremu ispita). Zato o tome u ovom odeljku neće biti reči. Osvrnućemo se na jednu manje poznatu osobinu molekula hemoglobina, a to je da hemoglobin u eritrocitima podleže u maloj meri hemijskim reakcijama sa glukozom i njenim metabolitima iz glikolize (glukoza-6-fosfatom i fruktozo-1,6-difosfatom). Ovako modifikovani hemoglobin može da se odvoji od glavne hemoglobinske frakcije (HbA₀) jonoizmenjivačkom hromatografijom, u obliku takozvane HbA₁ frakcije. Ova frakcija kod zdravih osoba iznosi oko 7 % ukupnog Hb. Koncentracija HbA₁ frakcije proporcionalna je koncentraciji glukoze u krvi, tako da kod ljudi obolelih od šećerne bolesti (dijabetesa) može da bude povišena. Određivanje HbA₁ frakcije nalazi veliku primenu u dijagnostici i praćenju terapije kod pacijenata obolelih od ove bolesti.

Glukoza reaguje sa N-terminalnim amino grupama β -nizova molekula hemoglobina, pri čemu nastaje aldimin (Šifova baza), koji Amadori premeštanjem prelazi u stabilni ketoaminski derivat. N-terminalne grupe u β -nizu molekula Hb imaju nižu pK_a vrednost od ϵ -amino grupe lizina, čime se objašnjava njihova veća reaktivnost. Modifikacija krajnjih amino grupa još više snižava njihove pK_a vrednosti, tako da HbA₁ frakcija može da se odvoji od nemodifikovanog Hb. Utvrđeno je da i ϵ -amino grupe lizina u molekulu Hb reaguju sa glukozom, ali da ova reakcija ne utiče na naelektrisanje molekula Hb. *Predstavite hemijskom jednačinom reakciju glukoze sa hemoglobinom i obeležite na slici 3.3b vezivanje glukoze za N terminal β -niza molekula hemoglobina. Kakve posledice očekujete da će ova modifikacija imati na strukturu i funkciju hemoglobina?*

VEŽBA: Proteini krvi

CILJ ove vežbe koja se sastoji iz nekoliko delova je da se upoznate sa pravilima rada u biohemijskoj laboratoriji, da se upoznate sa biološkim sistemom kao što je krv koji se često sreće u (istraživačkoj i primenjenoj) biohemijskoj praksi, da se upoznate sa svojstvima rastvornih, globularnih proteina na dobro poznatim primerima albumina iz plazme i hemoglobina, te da obnovite principe i upoznate se sa nekim od osnovnih biohemijskih tehnika i metoda (određivanje koncentracije proteina, centrifugiranje, hromatografske tehnike i elektroforeza).

PRIPREMA Obnavite ono što ste o radu sa proteinima naučili na kursu iz Hemije prirodnih proizvoda. Pročitajte prethodni odeljak o krvi i proteinima krvi. Pogledajte relevantna predavanja iz biohemije (i tamo datu literaturu). Krv je lepo obrađena u knjigama iz fiziologije i medicinske biohemije.

ZADATAK : Odvojiti plazmu i izolovati eritrocite iz uzorka humane krvi. Identifikovati proteine plazme primenom SDS elektroforeze, poređenjem elektroforegrama sa onim iz literature. Odrediti sadržaj albumina u uzorku primenom afinitetne hromatografije i odrediti njegovu homogenost primenom SDS elektroforeze. Hemolizovati eritrocite i izolovati membrane i hemoglobin. Identifikovati proteine iz membrane primenom SDS elektroforeze, poređenjem elektroforegrama sa onim iz literature. Utvrditi homogenost (čistoću) izolovanog hemoglobina. Odrediti molekulsku masu hemoglobina primenom gel-filtracije i uporediti je sa vrednostima iz literature. Odrediti sadržaj glikozilovanog hemoglobina (HbA₁ frakcija) primenom jonoizmenjivačke hromatografije i uporediti dobijene vrednosti sa literaturnim. Sve dobijene rezultate komentarisati i na osnovu njih izvući odgovarajuće zaključke.

Odvajanje plazme i izolovanje eritrocita iz krvi

Pridržavajte se Uputstava za rad sa humanim materijalom! Asistent ili tehnički saradnik će Vam pokazati kako se dole opisane operacije pravilno izvode.

Uzmite iz frižidera krv koja sadrži antikoagulans (3,8 % citrat), a potom je centrifugujte u laboratorijskoj centrifugi na 2 - 3000 o/min, tokom 5 - 10 minuta. Plazmu, koja se nalazi nad eritrocitima, prenesite pomoću Pasterove pipete u čistu epruvetu i koristite je u daljim eksperimentima gde je to predviđeno. *Plazmu koju niste upotreбили čuvajte duboko zamrznutu.* Staložene eritrocite isperite 2 - 3 puta sa po 2 zapremine ohlađenog 0,9 % NaCl (ne zaboravite da smešu promešate pomoću staklenog štapića ili blago među dlanovima). Eritrocite odvojite centrifugovanjem na 2 - 3000 obr/min., u laboratorijskoj centrifugi, a supernatante odbacite (koristeći Pasterovu pipetu). Ovako dobijene eritrocite koristite za izolovanje membrana i dobijanje rastvora hemoglobina (hemolizata). *Obratite pažnju da sav materijal i korišćeno posuđe odložite u poseban sud, kako je to Pravilima predviđeno.*

Hemoliza eritrocita i izolovanje hemoglobina i membrana

Hemoliza eritrocita se vrši dodatkom destilovane vode ili pufera male jonske sile. Ukoliko nam je potreban koncentrovani rastvor hemoglobina, a membrane nam nisu potrebne hemolizu vršimo dodatkom manje količine vode ili pufera male jonske sile (1-3 zapremine na 1 zapreminu eritrocita), a membranski proteini se talože dodatkom organskih rastvarača (toluol, ugljentetrahlorid – *OPREZ kancerogen!*) koji ne denaturišu hemoglobin. Ukoliko su nam potrebne membrane hemoliza se vrši dodatkom veće zapremine pufera niske jonske sile, a potom se membrane odvajaju centrifugovanjem. U tekstu koji sledi opisaćemo oba postupka. Za eksperimente u kojima je potreban hemoglobin koristićemo prvi, a za eksperimente u kojima su nam potrebne membrane koristićemo drugi postupak.

Hemoliza eritrocita i izolovanje hemoglobina: Hemolizu eritrocita pripremljenih na napred opisani način izvršite dodavanjem 1 - 3 zapremine vode i 1 zapremine toluola (ili ugljentetrahlorida) na 1 zapreminu (1 - 2 ml) eritrocita, uz snažno mućkanje na "Vorteks-u". Ostavite hemolizat 1 sat u frižideru, nakon čega ga centrifugujte, 25 minuta na 3000 o/min. Organski sloj i međusloj u kojem se nalaze istaloženi proteini (uglavnom iz membrana) odbacite. Rastvor hemoglobina (*u kom je obliku ovaj Hb?*) prenesite u čistu epruvetu. Dobijeni rastvor hemoglobina razblažite tako da $A_{500\text{ nm}}$ iznosi oko 0,5.

Hemoliza eritrocita i izolovanje membrana: U jednu zapreminu eritrocita, pripremljenih na napred opisani način, dodajte 15 zapremina hladnog pufera za hemolizu (10 mM natrijum fosfatni ili 10 mM Tris·HCl pufer, pH 7,4). Uzorak ostavite na 4° C tokom 30 minuta. Nakon hemolize, membrane eritrocita staložite centrifugovanjem na 10 000 o/min tokom 15 minuta. Membrane isperite dva puta istim puferom i istaložite ih posle svakog ispiranja centrifugovanjem pod navedenim uslovima. Suspendujte membrane u maloj zapremini (0.1 – 0.5 ml) istog pufera i odmah koristite za dalji rad, ili ih zamrznite i liofilizujte.

U "belu svesku" unesite opis vežbe prema Uputstvu. Zabeležite šta ste zapazili o izolovanim proteinima.

SDS elektroforeza proteina plazme, hemoglobina i membrana eritrocita

U okviru ove vežbe ćete uraditi SDS elektroforezu ukupnih proteina plazme i membrana eritrocita i identifikovati ih poredjenjem sa podacima iz literature (Slika 3.2). Takođe ćete odrediti homogenost izolovanog hemoglobina i albumina (videti dole). Prvo odredite koncentraciju proteina u vašim uzorcima (koristite u dogovoru sa asistentom neku od metoda za određivanje proteina kpoje su date u Dodatku na kraju ovog odeljka). Alikvot uzorka prenesite u pufer za rastvaranje uzorka (videti u odeljku Materijal) tako da koncentracija uzorka koji ćete nanositi na elektroforezi iznosi 1 mg/ml.

Postupak za SDS-gel elektroforezu (SDS-PAGE)

Potreban materijal:

Aparatura za vertikalnu elektroforezu (Slika 3.4)

Monomerni rastvor (30 % akrilamid, 2,7 % bisakrilamid) / Pažnja: kancerogen !!!

Pufer gela za razdvajanje (1,5 M TRIS pH 8,8),

Pufer gela za nadslojavanje (0,5 M TRIS pH 6,8),

Rastvor za iniciranje reakcije (10 % amonijum persulfat),

N,N,N',N' tetrametiletilendiamin (TEMED),

Rastvor SDS-a (10 % SDS),

Tank pufer (0,025 M TRIS, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pH 8,3),

Pufer za rastvaranje uzorka (0,0625 M TRIS pH 6,8, 2 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β -merkaptotanol, 0,03 % bromfenol plavo),

Rastvor za fiksiranje (40 % metanol, 10 % sirćetna kiselina),

Rastvor za bojenje (0,125 % Coomassie Blue R-250, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina),

Rastvor za obezbojavanje (7 % sirćetna kiselina).

Zapremine rastvora potrebnih za SDS-elektroforezu:

Rastvor	Gel za razdvajanje	Gel za nadslojavanje
Monomerni rastvor (1)	5 ml	0,66 ml
Pufer gela za razdvajanje (2)	3,75 ml	/
Pufer gela za nadslojavanje (3)	/	1,25 ml
10 % SDS (4)	0,15 ml	50 μ L
H ₂ O	6 ml	3,05 ml
Amonijumpersulfat (5)	75 μ L	25 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L
Ukupna zapremina	15 ml	5 ml

Priprema rastvora za SDS-PAGE:

(1) Monomerni rastvor:

Akrilamid 58,4 g

Bisakrilamid 1,6 g

Destilovana voda do 200 ml

Čuvati na 4° C u tamnoj boci.

(2) 4x pufer gela za razdvajanje (1,5 M Tris·HCl pH 8,8):

Tris 36,3 g

Podesiti na pH 8,8 pomoću 6 M HCl

Destilovana voda do 200 ml

(3) 4 x pufer gela za nadslojavanje (0,5 M Tris·HCl pH 6,8):

Tris 3,0 g
Podesiti na pH 6,8 pomoću 6 M HCl
Destilovana voda do 50 ml

(4) 10 % SDS:

SDS 10,0 g
Destilovana voda do 100 ml

(5) Inicijator (10 % amonijum-persulfat):

Amonijum-persulfat 0,5 g
Destilovana voda do 5 ml

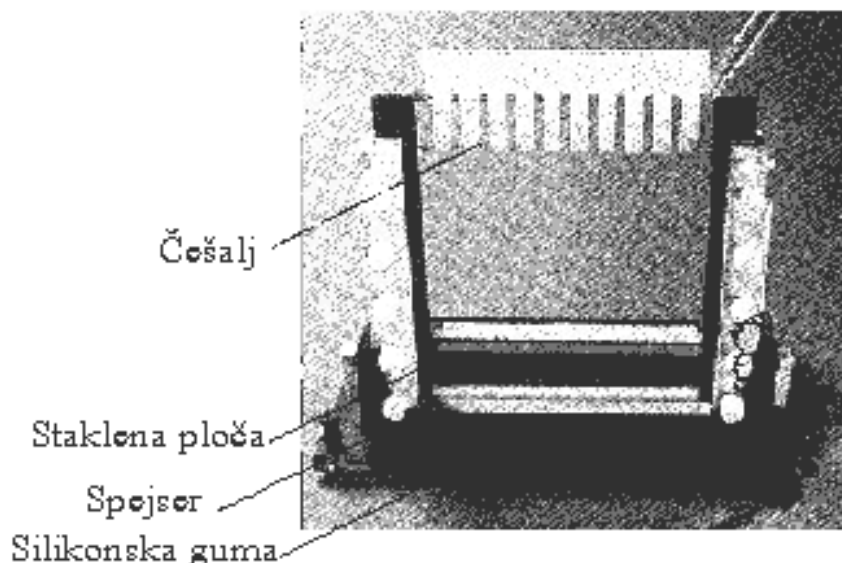
(6) Tank Pufer (0,025 M Tris pH 8,3, 0,192 M Gly, 0,1 % SDS):

Tris 6,0 g
Glicin 28,8 g
SDS 20 ml rastvora (4)
Destilovana voda do 2 L

(7) 2x Pufer za uzorke (0,125 M Tris·HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % 2-merkaptoetanol):

Tris 2,5 ml rastvora (3)
SDS 4,0 ml rastvora (4)
Glicerol 2,0 ml
2-merkaptoetanol 1,0 ml
Destilovana voda do 10,0 ml
Podeliti u alikvote i zamrznuti.

Gel za razdvajanje ("running gel") se priprema u vakuum boci (100 ml) dodavanjem rastvora monomera, pufera gela za razdvajanje, vode i TEMED-a u količinama navedenim u tabeli. Boca sa rastvorom se zatvori gumenim zapušačem (koji se okrene „naopačke“ da bi se brže uklonio ukoliko je to potrebno!) i rastvor dezaeriše 10 do 15 minuta na vodenoj vakuum pumpi uz povremeno mućkanje. Nakon dezaeracije dodaje se rastvor SDS-a i amonijumpersulfata. Rastvor se dobro promeša i odmah naliije u već pripremljeni sendvič staklenih ploča, razdvojenih 0,75 mm "spejserima" (Slika 3.4). Gel za razdvajanje se lagano nadsloji rastvorom n-butanola zasićenog vodom. Dok traje reakcija polimerizacije (30 - 60 minuta) može da se počne sa pripremom gela za nadslojavanje. Ovo se radi na istovetan način kao kod gela za razdvajanje (Tabela).



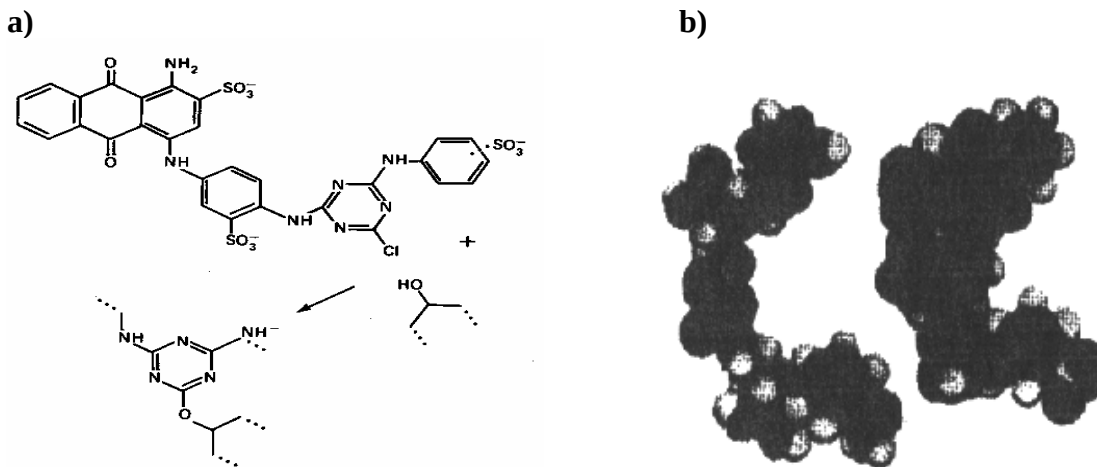
Slika 3.4 Aparatura za vertikalnu elektroforezu.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Skenirajte dobijene elektroforegrame, odstampajte slike i zalepite ih u svesku, obeležite pored slike proteine koje ste identifikovali. Komentarišite izgled vašeg elektroforegrama u odnosu na one iz literature (Slika 3.2) i ukoliko ima razlika dajte moguće objašnjenje. Komentarišite homogenost (čistoću) preparata albumina i hemoglobina.

Određivanje albumina iz plazme afinitetnom hromatografijom

Albumin iz plazme se izoluje i kao preparat prodaje za istraživačku i biomedicinsku praksu. Postoji veći broj postupaka razrađenih za izolovanje albumina iz plazme. Najčistiji albumin se izoluje afinitetnom hromatografijom. Količina albumina u plazmi se određuje u nekim patološkim stanjima. Za određivanje albumina u plazmi se takođe primenjuje afinitetna hromatografija. U vežbi koja sledi ćete odrediti sadržaj albumina u uzorku humane plazme i primenom SDS-elektroforeze odrediti homogenost izolovanog albumina.

Kao nosač u ovom postupku za afinitetnu hromatografiju albumina koristi se plava boja poznata pod nazivom Cibacron Blue F3GA (Slika 3.5) koja je vezana za nosač Sepharose 4B. Većina enzima koji vezuju purinske nukleotide (posebno dehidrogenaze) pokazuju veliki afinitet za ovu boju. Ovo se može razumeti poređenjem modela za NAD^+ i Cibacron boje (Slika 3.5). Od proteina plazme afinitet za ovu boju pokazuje jedino albumin, što se i koristi za njegovo izolovanje.



Slika 3.5 (a) Formula boje Cibacron Blue F3GA i (b) model molekula boje (desno) u poređenju sa modelom NAD⁺ (levo).

Potrebni materijal:

Plazma 1 - 2 ml,
 Cibacron Blue F3GA Sepharose (Sephacryl),
 Pufer A: 20 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,2,
 Pufer B: 20 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,2, koji sadrži 1,5 M NaCl ili 0,5 M NaSCN,
 5 M guanidinhlorid ili 6 M urea,
 Kolona 1 x 5 cm,
 UV spektrofotometar.

Postupak:

Napakujte kolonu prethodno ekvilibrisanom i dezaerisanom suspenzijom Cibacon Blue F3GA Sepharose u puferu A. Posle propuštanja 2 - 3 zapremine pufera A kroz kolonu, na kolonu nanosite određenu (izračunatu) zapreminu plazme (zabeležite ovu vrednost). Kapacitet vaše kolone je 10 mg albumina/ml. Kolonu eluirajte puferom A, sve dok se ne eluiraju celokupni proteini koji se ne zadržavaju na koloni (proverite merenjem A₂₈₀ eluata - hvatajte frakcije od po 4 ml). Albumin eluirajte sa kolone na isti način puferom B. Na kraju kroz kolonu propustite 2 zapremine rastvora 6M uree ili 5M guanidinhlorida.

Nacrtajte hromatogram i na osnovu njega sakupite odgovarajuće frakcije. Odredite koncentraciju proteina u polaznoj plazmi, u frakciji koja sadrži albumin i (*u dogovoru sa asistentom*) u svakoj od frakcija eluiranih sa kolone. Odredite procenat albumina u odnosu na ukupne proteine plazme. Odredite (*u dogovoru sa asistentom*) i procentualnu zastupljenost drugih proteina eluiranih sa kolone. Koncentraciju (humanog) albumina možete odrediti na osnovu A₂₈₀(0,1 mg/ml) = 0,531. *Kako ćete odrediti koncentraciju ukupnih proteina u plazmi i koncentracije protena u ne-albumionskim frakcijama eluiranim sa kolone? Odredite homogenost preparata SDS elektroforezom.*

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Komentarišite kako se vaše određivanje albumina slaže sa vrednošću iz literature (videti gornji odeljak o plazmi). Objasnite zašto se afinitetna kolona eluira na kraju sa rastvorom uree ili guanidiniumhlorida. Zalepite u svesku SDS-elektroforegram sa kojeg se može videti homogenost vašeg preparata albumina – komentarišite dobijeni elektroforegram!

Određivanje molekulske mase hemoglobina gel filtracijom na Sephadex koloni

Gel filtracija je jedna od najčešće korišćenih tehnika za razdvajanje proteina i određivanje njihovih molekulskih masa. O principima gel filtracije i parametrima koji je karakterišu možete više pročitati u Dodatku na kraju ovog poglavlja. U okviru ove vežbe kalibrisaćete kolonu Sephadex G-100 pomoću molekula velike (plavi dekstran) i male (kalijum-dihromat) mase i uz pomoć literaturnih podataka datih na slici 3.6 odrediti molekulsku masu hemoglobina.

Potrebni materijal:

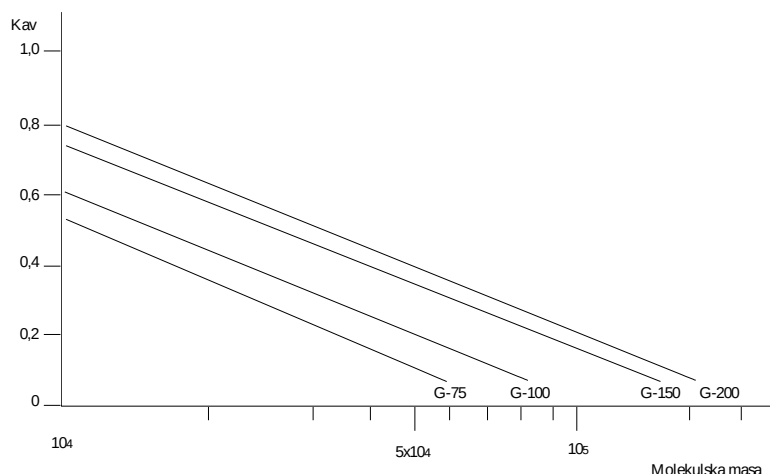
Staklene kolone dimenzija oko 1 x 50 cm,
Sephadex G-100 u 0,05 M natrijum fosfatnom puferu pH oko 7,
Rastvor plavog dextrana i rastvor kalijum-dihromata (10 mg/ml),
Frakcioni kolektor,
VIS Spektrofotometar.

Postupak:

Suspenziju Sephadex-a G-100 u puferu pažljivo dezaerišite (primenite postupak opisan kod SDS-elektroforeze!), a zatim napakujte i ekvilibrišite kolonu (operaciju će Vam pokazati asistent ili tehnički saradnik). Gornji sloj pufera sa kolone pomoću pipete odstranite, a zatim nanesite pažljivo po 0,1 - 0,2 ml rastvora plavog dextrana, hemoglobina i kalijum-dihromata, pazeći da je pre nanošenja sledećeg rastvora prethodni ušao u sloj gela. Posle nanošenja rastvora dihromata nanesite 0,2 - 0,5 ml pufera, a kada je i on ušao u sloj gela napunite kolonu do vrha puferom (pažljivo da se sloj gela ne poremeti (*zašto je ovo važno?*) i spojite kolonu sa bocom u kojoj se nalazi pufer za eluiranje kolone.

Čim ste počeli eluiranje kolone počnite i sa sakupljanjem eluata sa kolone u frakcijama od po 2 ml. Za ovu operaciju možete koristiti i frakcioni kolektor. Protok podesite na oko 0,4 ml/min. Posmatrajte kolonu tokom hromatografije - šta zapažate? Kada je hromatografija završena, odredite u kojim epruvetama se nalaze elucioni maksimumi (ako je potrebno pomognite se spektrofotometrom!) i odredite elucione zapremine svake od nanetih supstanci (*kako ćete to da uradite?*).

Nacrtajte hromatogram na kojem ćete prikazati zavisnost stepena eluiranja od broja frakcije, odn. elucione zapremine. Iz dobijenih elucionih zapremina izračunajte K_{av} i pomoću kalibracione prave prikazane na slici 3.6 odredite molekulsku masu Hb.



Slika 3.6 Kalibracione prave za određivanje molekulske mase proteina na Sephadex-kolonama

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Opišite kako je izgledala hromatografija. Zalepite hromatogram koji ste dobili. Uporedite dobijenu vrednost za molekulsku masu hemoglobina sa literaturnom (64 000 Da) i ukoliko se vrednosti razlikuju ponudite objašnjenje.

Određivanje HbA₁ frakcije jonoizmenjivačkom hromatografijom

Frakciju HbA₁, koja sadrži frakciju glikozilovanog hemoglobina HbA_{1c} (videti gornji odeljak o hemoglobinu!) odvojicemo od glavne frakcije hemoglobina (HbA₀) hromatografijom na slabom katjonskom jonoizmenjivaču Bio-Rex 70. Primenicemo postupak koji se primenjuje u biomedicinskoj praksi i koji se zasniva na razdvajanju hemolizata pod tačno definisanim (standardizovanim) uslovima. *Pošto postupak zahteva vrlo pažljivu pripremu pufera i ekvilibrisanje kolona, što zahteva dosta vremena i veštine u ovoj vežbi ćete koristiti unapred pripremljene kolone i pufere koje ćete dobiti od asistenta.*

Postupak

Hromatografija hemolizata se radi na 0,6 x 5,5 cm koloni, napunjenoj jonoizmenjivačem Bio-Rex 70, koji je prethodno ekvilibrisan sa 41 mM kalijumfosfatnim puferom pH 6,83 ± 0,02. Kolona se pažljivo ekvilibriše istim puferom (dok se ne postigne da je pH na ulazu i izlazu kolone istovetno), a potom se na kolonu nanese 50 µL hemolizata

razblaženog puferom (tako da je koncentracija hemoglobina u uzorku koji se nanosi na kolonu 5 puta razblažen u odnosu na koncentraciju hemoglobina u krvi!). Kada je uzorak ušao u kolonu, nanese se pažljivo 0,2 ml pufera, da bi se sprali eventualno zaostali tragovi uzorka sa kolone, a potom se kolona prenese nad čistu epruvetu i HbA₁ frakcija eluira sa 4 ml pufera. Kada je HbA₁ frakcija eluirana, HbAo frakcija zaostala na koloni se eluira sa 4 ml 1,5 M KCl i ovaj eluat razblaži 4 puta destilovanom vodom. U oba rastvora izmeri se apsorbanca na 415 nm (*zašto?*), na osnovu čega se izračuna % HbA₁ frakcije.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Opišite kako je izgledala hromatografija. Unesite vrednost koju ste dobili za %HbA1 frakciju. Ukoliko se dobijena vrednost razlikuje od normalne (oko 7%) komentarišite vaš rezultat.

3.2 Ponašanje proteina

Pod ponašanjem proteina podrazumevamo dinamičke aspekte strukture proteina, pre svega konformacione prelaze (uvijanje-razvijanje proteina) kao protein-ligand interakcije. O ovim temama detaljno smo govorili na predavanjima iz biohemije, te se stoga čitalac upućuje na materijal sa predavanja i tamo datu literaturu. Stoga ćemo u okviru ovog poglavlja dati samo mali podsetnik.

3.2.1 Konformacioni prelazi (denaturacija) proteina

Razvijanje (denaturacija) proteina nastaje pod uticajem temperature, promenom pH, na ekstremnim pH vrednostima (jako kisela ili jako alkalna sredina), pod uticajem sredstava za denaturaciju (urea, guanidinhlorid, razni detergensi - mi smo koristili kod elektroforeze SDS!). Kod proteina koji sadrže disulfidne veze razvijanje proteina je olakšano posle njihove redukcije (*Zašto?*).

Razvijanje proteina prati se metodama koje mogu da detektuju promene koje se u molekulu proteina dešavaju pri razvijanju. Koje su to promene? Od njih zavisi i koje ćemo metode koristiti. U donjoj tabeli su navedene neke od promene koje nastaju pri razvijanju (denaturaciji) molekula proteina. Dopunite tabelu navođenjem uzroka ovih promena i navođenjem metoda koje se mogu koristiti za njihovo detektovanje (merenje). Razmislite kakvi se rezultati dobijaju primenom svake od metoda koju ste naveli i kako dobijeni rezultati mogu da se tumače i međusobno kombinuju? Pokušajte, na osnovu dosadašnjih saznanja, da date odgovarajuće (može i hipotetične) primere.

Promena pri razvijanju proteina:	Uzrok	Metoda za merenje
Viskoznost		
Izloženost ostataka aminokiselina		
Rastvorljivost		
Optička rotacija		

3.2.2 Protein - ligand interakcije

Proteini imaju osobinu da specifično interaguju sa malim molekulima, koje jednim imenom nazivamo ligandima. U nekim slučajevima ligandi mogu biti i makromolekuli. Podsećanja radi, u donjoj tabeli su dati primeri interakcija proteina sa ligandima

Protein	Ligand
Enzimi	Kofaktori
Receptori	Supstrati Hormoni Vitamini Faktori rasta
Antitela	Antigeni
Glikoproteini	Lektini
Specifični proteini	Nukleinske kiseline

Ispitivanje interakcija proteina sa ligandima izuzetno je važno za upoznavanje aktivnosti i funkcije proteina, a ima i određenu praktičnu (biomedicinsku) primenu. Na osnovu ovih podataka mogu se izvesti i zaključci o strukturi datog proteina.

VEŽBA: Ponašanje proteina

U okviru vežbe “Ponašanje proteina” upoznaćemo se sa reversibilnom denaturacijom proteina (praktično ćemo reprodukovati Anfinsen-ov ogled. Protein-ligand interakcije ćemo upoznati na primeru vezivanja hema za globin u hemoglobinu, te na osnovu ispitivanja interakcija hemoglobina sa kiseonikom.

Reverzibilna denaturacija albumina

CILJ ove vežbe je da se bliže i detaljnije upoznate sa fenomenom reversibilne denaturacije proteina.

PRIPREMA: Da biste se pripremili za ovu vežbu pored uvodnog dela iz ovog poglavlja o reversibilnoj denaturaciji proteina ponovite što ste naučili o Anfinsenovom ogledu (izvođenje ovog eksperimenta i njegov značaj) i pogledajte šta smo na predavanjima o ovoj temi govorili. Pogledajte strukturu molekula humanog albumina iz plazme (Slika 3.2) i zapazite njene osnovne karakteristike.

ZADATAK: Izvršiti reversibilnu denaturaciju humanog ili goveđeg albumina iz plazme (u dogovoru sa asistentom) pomoću uree. Proces pratiti na polarimetru.

Potrebni materijal

Humani ili goveđi albumin

Urea
Polarimetar

Dobro operite (npr. u hrom-sumpornoj kiselini) i isperite destilovanom vodom posuđe koje ćete da koristite za izvođenje ove vežbe.

Postupak:

Pripremite 10 ml rastvora albumina u destilovanoj vodi, koncentracije 10 mg/ml. U čašicu od 25 ml odmerite količinu uree koja je potrebna za pripremanje 10 ml 6 M rastvora uree. Izmerite na polarimetru α vodenog rastvora albumina, zabeležite ovu vrednost (u donjoj tabeli), a potom rastvor proteina prenesite u čašicu sa ureom. Nakon rastvaranja uree (zabeležite koje je vreme za ovo bilo potrebno) izmerite ponovo α dobijenog rastvora (i zabeležite je u tabeli). Posle merenja, rastvor proteina u 6 M urei razblažite dodatkom iste zapremine vode i ponovo izmerite α . Posmatrajte da li se α menja sa vremenom i dobijene vrednosti zabeležite u tabeli.

α rastvora proteina u vodi		
α rastvora proteina u 6 M urei		
α rastvora proteina u urei posle razblaživanja sa vodom		

Na osnovu optičke rotacije rastvora (α) izračunajte specifičnu rotaciju $[\alpha]_D^t$.

$$[\alpha]_D^t = \alpha / C \cdot l$$

l – dužina polarimetarske cevi u dm,
 C – koncentracija proteina u g/ml,
 α - izmerena optička rotacija.

Dobijene rezultate uporedite sa literaturnim podacima.

Literatura:

1. M.D. Stermann, J.F. Foster, JACS, **78**: 3652-3656 (1956)
2. W. Kauzmann, R.B. Simpson, JACS, **75**: 5154-5157 (1953)

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Polazeći od strukture albumina objasnite na čemu se zasniva praćenje njegove denaturacije/renaturacije pomoću polarimetra. Unesite naziv polarimetra na kojem ste radili. Navedite da li je albumin u potpunosti bio renaturisan. Navedite da li se vaši rezultati slažu sa literaturnim, te ukoliko ima neslaganja ponudite objašnjenje.

Odvajanje hema od globina

Odvajanje hema od globina u hemoglobinu vrši se ukapavanjem rastvora hemoglobina u aceton, koji sadrži malo hlorovodonične kiseline. Pri ovome se globin iz hemoglobina taloži (kao beo pahuljičasti talog), a hem zaostaje u acetonskom rastvoru (koji postaje crven). Na odvajanje hema od globina utiče koncentracija hemoglobina i jonska sila rastvora u kojem se hemoglobin nalazi.

CILJ ove vežbe je da vidite kako se eksperimentalno može ispitivati priroda vezivanja proteina i liganda (hidrofobni efekat!).

PRIPREMA: Da biste se pripremili za ovu vežbu, kao i za vežbu koja sledi pogledajte strukturu molekula hemoglobina. Obratite posebnu pažnju na prirodu vezivanja hema i globina (komplementarnost površina). O ovome je bilo reći na predavanjima iz biohemije, a može se lepo uočiti posmatrajući model ispunjenih sfera molekula hemoglobina. Obratiti pažnju na prirodu aminokiselina koje se nalaze u dodiru sa hemom.

ZADATAK: *Naći optimalne uslove za odvajanje hema od globina iz humanog hemoglobina. Ispitati uticaj koncentracije hemoglobina i jonske sile rastvora na odvajanje hema od globina.*

Potrebni materijal

Sveže pripremljen rastvor hemoglobina (hemolizat) koncentracije 10 %, 5 %, 2 %, 0,2 %, 0,02 % Hb u vodi,
1 % NaCl i 10 % NaCl,
Aceton koji sadrži 3 ml 2 M HCl na 1 litar, ohlađen na -18° C,
Kivete za centrifugu od 10 - 12 ml,
Pasterove pipete,
Laboratorijska centrifuga,
VIS spektrofotometar

Postupak:

Odredite koncentraciju hemoglobina u rastvoru (koristeći ekstinkcioni koeficijent na nekom od karakterističnih apsorpcionih maksimuma: konsultovati sledeću vežbu). Napravite gore navedena (ili slična) razblaženja rastvora hemoglobina koji ste pripremili po gore navedenom postupku.

Odmerite 10 ml ohlađenog acetonskog rastvora u kivetu od laboratorijske centrifuge i dodajte pažljivo, u malim kapima, 0,5 ml najkoncentrovanijeg rastvora hemoglobina u vodi. Posmatrajte kako pada talog globina. Kivetu prenesite u zamrzivač, a postupak ponovite sa razblaženim rastvorima hemoglobina koje ste pripremili. Ostavite kivete u zamrzivaču, dok se globin lepo ne istaloži (maksimalno 1 sat), a potom odvojite talog globina, centrifugovanjem u laboratorijskoj centrifugi. Acetonski supernatant odbacite, a talog globina isperite ohlađenim acetonom, ponovo odvojite centrifugovanjem, zatim rastvorite u 1 - 2 ml destilovane vode i dijalizujte, po potrebi, naspram 0,1 % sirćetne kiseline. Rastvor globina može da se čuva zamrznut, a može i da se liofilizuje. Odredite koncentraciju globina u rastvoru na osnovu merenja apsorbanca na 280 nm, a njegovu čistoću na osnovu merenja apsorbanca koja potiče od hema na 405 nm (A_{405}/A_{280} oko 0,1 znači da je 1 % hema prisutno).

Kada ste našli optimalno razblaženje hemoglobina za taloženje globina, postupak ponovite sa rastvorima Hb u 1 % i 10 % NaCl.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Istaknite koji su uslovi optimalni za odvajanje hema i globina. Ukratko komentarišite i objasnite dobijene rezultate.

Interakcije hemoglobina (Hb) sa kiseonikom (apsorpcioni spektri hemoglobina)

Vezivanje liganda za protein izaziva niz većih ili manjih promena, kako u molekulu proteina, tako i u molekulu liganda, koje se mogu detektovati. Izučavajući strukturu hemoglobina zapazili smo da vezivanje određenih liganda utiče na konformaciju hemoglobina. U okviru ove vežbe videćemo kako se to jednostavno može videti na primeru vezivanja kiseonika i hemoglobina.

CILJ ove vežbe je da se upoznate sa apsorpcionim spektrima hemoglobina, te da tako vidite jedan od načina za eksperimentalno praćenje protein-ligand interakcija.

PRIPREMA: Obnovite strukturu oksid- i deoksid- hemoglobina, obraćajući naročito pažnju na razlike u njihovoj strukturi i molekulski mehanizam prelaza jedne u drugu konformaciju. O ovome smo govorili na predavanjima, a detaljno je opisano u literaturi koja je data uz predavanje.

ZADATAK: Pripremiti oksid-, deoksid- i me- hemoglobin i snimiti njihove apsorpcione spektre. Uporediti spektre sa literaturnim

Potrebni materijal

Koncentrovani rastvor hemoglobina (hemolizat eritrocita),
Stoksov reagens (2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 g vinske kiseline rastvoriti u 0,1 L vode),
28 % amonijak,

0,2 % kalijumfericijanid.

OksiHb: 5 ml rastvora Hb (iz hemolizata) i 1 ml vode.

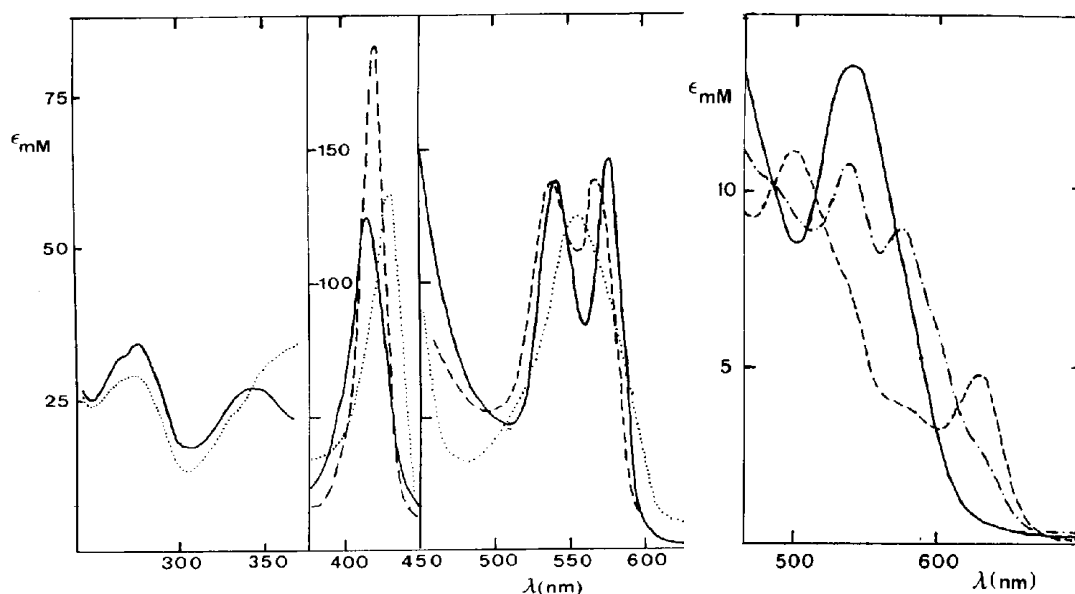
DezoksiHb: U 5 ml rastvora oksiHb dodajte 1 ml amonijačnog Stoksovog reagensa (pravi se tako što se u 2 ml Stoksovog reagensa dodaje amonijak u kapima dok se ne dobije jasno zelena boja, koja se pri daljem dodavanju amonijaka ne menja), koji je prethodno razblažen istom zapreminom vode. Ovaj rastvor dobro promućkajte i ostavite u zatvorenoj epruveti tokom 30 minuta, pre nego što počnete da snimate spektar.

MetHb: U 5 ml rastvora oksiHb dodajte 1 ml 0,2 % kalijumfericijanida i dobro promućkajte.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Fotokopirajte dobijene spektre i zalepite ih u svesku. Uporedite dobijene spektre sa literaturni ()videti dole). Navedite da li su spektri identični ili ima nekih razlika. Ukoliko ima razlika komentarišite ih i dajte (moguće) objašnjenje.

Tabela spektrofotometrijskih podataka nekih humanih hemoglobinskih derivata:

	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)		$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (mM)	$\Delta \lambda_{\max}$ (nm)
DeoxyHb	555	12.5	—	—	430	133	—	—	—	—	Hb ⁺ (OH ⁻)	575	9.2	540	11.0	35
OxyHb	541	13.5	576	14.6	415	125	344	27	276	34.4	Hb ⁺ (CN ⁻)	—	—	540	12.5	—
HbCO	540	13.4	569	13.4	419	191	344	28	—	—	Hb ⁺ (N ₃ ⁻)	575	9.9	540	12.8	35
HbNO	545	12.6	575	13.0	418	130	—	—	—	—	Hb ⁺ (imidazole)	560	12.5	534	14.7	26
HbEIC	530	14.4	559	17.3	428	193	—	—	—	—	Hb ⁺ (formate ⁻)	620	12.5	496	9.2	124
HbNB	562	14–15	542	13.1	422	154	—	—	—	—	Hb ⁺ (H ₂ O)	631	4.4	500	10	131
											Hb ⁺ (F ⁻)	605	10.9	483	10.3	122



Apsorpcioni spektri humanog:

Oksihemoglobina —————
 Dezoksihemoglobina
 Karbonilhemoglobina - - - - -

Apsorpcioni spektri humanog:

kiselog methemoglobina - - - - -
 alkalnog methemoglobina ······
 cijanmethemoglobina —————

Dodatak: Metodologija rada sa proteinima

Jedan od uobičajenih poslova sa kojima se srećemo u biohemijskoj laboratorijskoj praksi je izolovanje, prečišćavanje i ispitivanje proteina. U tekstu koji sledi dat je kratak osvrt na principe izlovanja i prečišćavanja proteina, potom su ukratko opisani principi najčešće primenjivanih hromatografskih tehnika koje služe za prečišćavanje proteina i elektroforetskih tehnika *koje služe za određivanje (čistoće) homogenosti uzorka (preparata) proteina*. Na kraju je dat osvrt na metode za određivanje koncentracije proteina koje se koriste u biohemijskim laboratorijama.

Opšti principi izolovanja proteina: ekstrakcija i taloženje

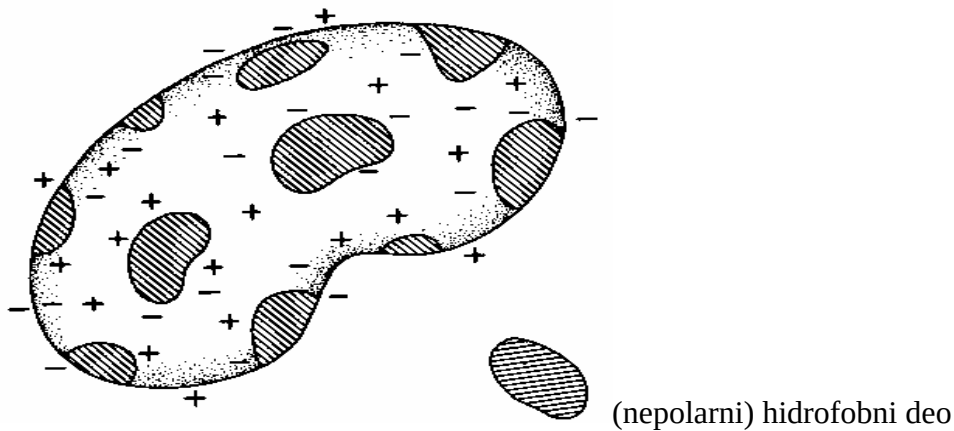
U bilo kojem biološkom materijalu nalazi se veliki broj različitih proteina, koji su naravno i različito zastupljeni. Problem koji se obično pred istraživača postavlja je izolovanje jednog, određenog, od ovih proteina, pri čemu je cilj da dobijemo **HOMOGEN (ČIST), BIOLOŠKI AKTIVAN PREPARAT PROTEINA U ŠTO BOLJEM PRINOSU**. Kako se to postiže? Pošto se proteini razlikuju po rastvorljivosti, prva faza u kojoj može da se izvrši grubo frakcionisanje, a izuzetno i izolovanje određenog proteina

je ekstrakcija (ako je polazni materijal čvrst), ili taloženje (ako je polazni materijal tečan). Tako se iz ekstracelularnih tečnosti proteini talože, a ukoliko se protein izoluje iz čvrstog materijala (organ, tkivo, mikroorganizmi) prva faza je dezintegracija i homogenizacija, a potom se proteini iz homogenizata ekstrahuju pomoću odgovarajućih pufera. Kako se i ovde dobija smeša proteina, dalje sledi njihovo frakcionisanje, takođe taloženjem. *Taloženjem*, proteini koji su bili u rastvoru prelaze u agregate, koji su dovoljno veliki da se mogu lako odvojiti centrifugovanjem.

Različita rastvorljivost proteina bila je zapažena još u najstarijim danima proteinske hemije. Tako su proteini koji se rastvaraju u vodi nazivani albumini, a proteini koji se ne rastvaraju u vodi, već u razblaženim rastvorima soli, globulini. Ovi nazivi su se još uvek zadržali (npr. albumin iz seruma, ovalbumin iz belanceta, imunoglobulini).

Proteini iz rastvora mogu da se talože podešavanjem pH, dodatkom soli ili organskih rastvarača. Kada je pH rastvora blisko pH vrednosti koja predstavlja izoelektričnu tačku proteina - pI, rastvorljivost proteina je najmanja (*zašto?*). Proteini se rastvaraju u prisustvu manjih koncentracija soli, dok se u prisustvu većih koncentracija soli proteini talože. Rastvorljivost proteina se smanjuje i pri njihovoj denaturaciji, što se u nekim slučajevima može koristiti za odstranjivanje neželjenih proteina iz smeše.

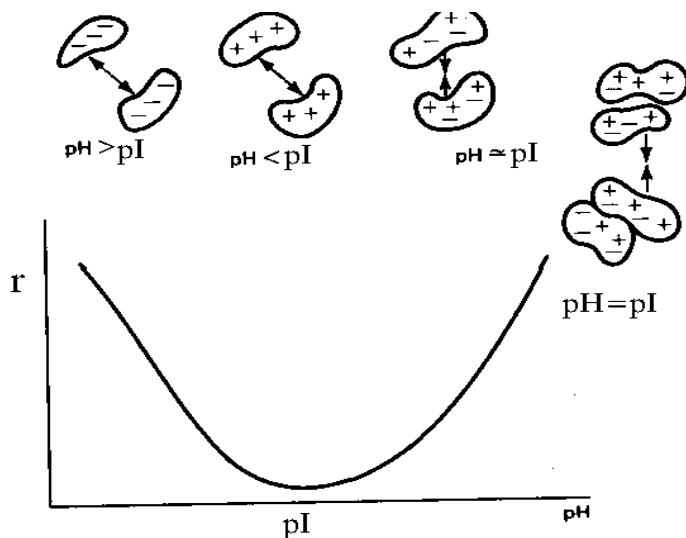
Rastvorljivost nativnog proteina zavisi od prisustva i rasporeda hidrofilnih (polarnih: naelektrisanih i nanaelektrisanih) i hidrofobnih (nepolarnih) delova na površini molekula proteina (Slika 1.1). Na površini molekula proteina nalazi se većina polarnih ostataka, od kojih su pojedini (*koji?*) pozitivno ili negativno naelektrisani na određenom pH. Većina nepolarnih ostataka aminokiselina nalazi se u unutrašnjosti proteina, ali se izvestan broj, koji naravno varira od proteina do proteina, nalazi i na površini (Slika 1.1).



Slika 1.1 Na površini molekula globularnih proteina nalaze se polarni (nanaelektrisani i naelektrisani) aminokiselinski ostaci, kao i delovi u kojima dominiraju nepolarni aminokiselinski ostaci.

Molekuli proteina se nalaze u rastvoru jer njihovi bočni ostaci (*koji?*) grade vodonične veze sa molekulima vode i elektrostatičke interakcije sa jonima soli iz rastvora, kao i što se molekuli proteina, usled istoimenog naelektrisanja koja nose, međusobno odbijaju.

Taloženje proteina na pI : Kada je ukupno naelektrisanje molekula proteina blisko nuli (kada je pH rastvora $\approx pI$ datog proteina) odbijanje među molekulima proteina je najmanje, dolazi do interakcija (privlačenja) među molekulima proteina i nastajanja agregata koji se talože (Slika 1.2). Ovaj efekat se povećava pri smanjenju jonske sile rastvora (zašto?).



Slika 1.2 Rastvorljivost (r) proteina u blizini njihove izoelektrične tačke (pI)

Taloženje proteina solima: Taloženje proteina iz rastvora pri povišenim koncentracijama soli može se objasniti na više načina. Najjednostavnije objašnjenje je da usled solvatacije jona soli u rastvoru dolazi do odstranjivanja molekula vode sa površine molekula proteina, što omogućuje nastajanje interakcija među nepolarnim delovima susednih molekula proteina.

Najpodesnija so (osim ako treba da se koristi u alkalnoj sredini) za taloženje proteina je amonijumsulfat (AS). Amonijumsulfat je vrlo rastvorljiv u vodi (533 g/L - 4,05 M; za zasićeni rastvor treba uzeti 761 g za 1 litar vode na 20° C), rastvorljivost mu se ne menja mnogo sa temperaturom i što je takođe važno koncentrovani rastvor AS (2 - 3 M) stabilizuje proteine. Taloženje proteina iz rastvora amonijumsulfatom vrši se dodavanjem čvrstog (sprašenog) AS, ili dodavanjem zasićenog rastvora AS.

Uobičajeno je da se rastvor proteina koji je zasićen sa AS obeležava kao zasićenje 100 %, a koncentracije AS pri kojima se pojedini proteini talože izražavaju se kao procenat od 100 % zasićenja. Tako npr. ako se neki protein taloži pri zasićenju 33 % to odgovara koncentraciji AS jednako 33 % od zasićenog rastvora AS. Količinu čvrstog AS u gramima (g) koju treba dodati u 1 litar rastvora određenog zasićenja (% S1) da bi se postiglo neko više zasićenje (% S2) može se izračunati iz formule:

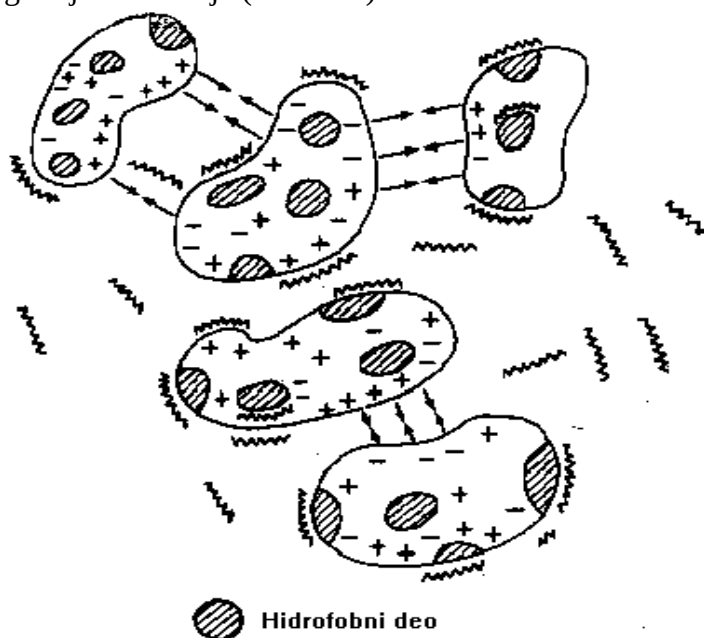
$$g = \frac{533 \cdot (S2 - S1)}{100 - 0,3 \cdot S2}$$

Umesto čvrstog AS, da bi se obezbedilo bolje i brže mešanje, kada je to moguće, dodaje se zasićeni rastvor AS. Zapremina (V) zasićenog rastvora AS koju treba dodati u rastvor koji već sadrži C1 % (v/v), da bi se dobila C2 % iznosi (za 1 litar rastvora):

$$V \text{ (ml)} = \frac{10 \cdot (C2 - C1)}{100 - C2}$$

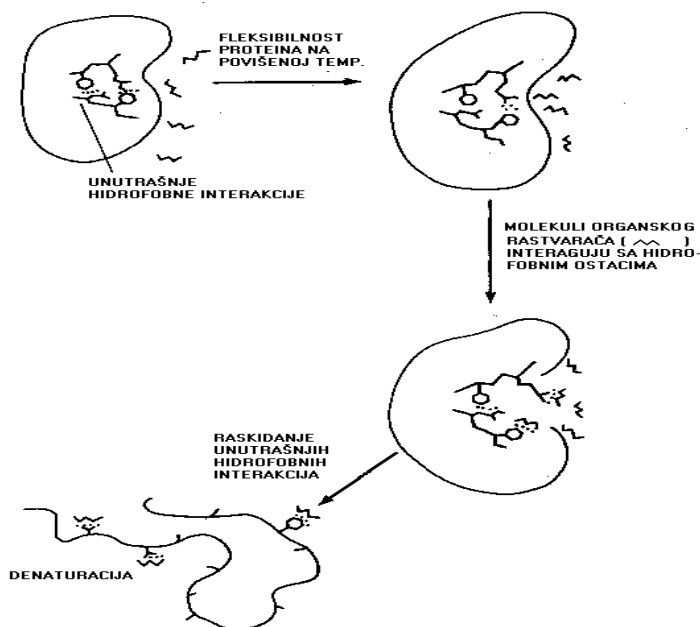
Kako je rastvor AS slabo kiseo (*zašto?*), taloženje se obično izvodi u fosfatnom puferu (50 mM) pH 6-7.

Taloženje proteina iz rastvora organskim rastvaračima (na primer etanolom ili acetonom), zasniva se na smanjenju aktiviteta vode kojom je okružen molekul proteina. Kako je time dielektrična konstanta rastvora smanjena, povećavaju se elektrostatičke interakcije među polarnim delovima različitih molekula proteina, što dovodi do njihovog agregiranja i taloženja (Slika 1.3).



Slika 1.3 Agregiranje proteina u smeši voda /organski rastvarač

Na višim temperaturama organski rastvarači izazivaju denaturaciju proteina (Slika 1.4), što se izbegava ako se radi na hladno. Denaturacija proteina može se, kao što ćemo videti, izazvati i na druge načine: toplotom, drastičnim promenama pH rastvora, dodatkom nekih agenasa (urea, detergents). Pri denaturaciji dolazi do razvijanja proteinske globule, pri čemu nepolarni ostaci, koji su bili u unutrašnjosti proteina, dolaze u dodir sa vodom. Denaturisani proteini manje su rastvorni od nativnih, osim ako se u rastvoru ne nalaze pomenuti agensi za denaturaciju (*pokušajte ovo da objasnite!*).



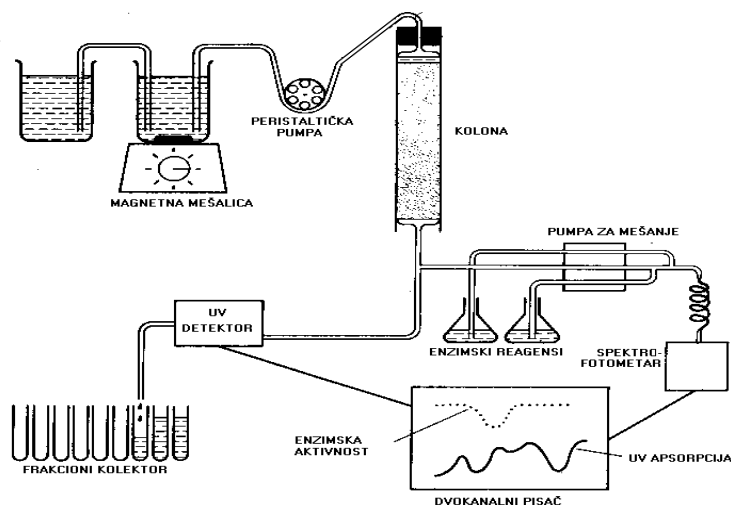
Slika 1.4 Denaturacija proteina organskim rastvaračima

Hromatografske metode za izolovanje i prečišćavanje proteina

Vrlo je mali broj proteina koji se iz biološkog materijala mogu izolovati u čistoj formi, samo primenom taložnih metoda sa kojima smo se upoznali u prethodnoj vežbi. Po pravilu, primenom taložnih metoda postiže se grubo frakcionisanje, a protein koji želimo da izolujemo se izdvaja dalje iz odgovarajuće frakcije primenom hromatografskih metoda. U nekim slučajevima se i cela polazna smeša može direktno (bez prethodnog frakcionisanja taloženjem) hromatografski razdvajati. Sa principima metoda hromatografskog razdvajanja ste se upoznali na kursevima iz analitičke hemije, ovde ćemo se samo ukratko osvrnuti na one hromatografske metode koje se najčešće koriste u biohemiji.

Za *hromatografsko razdvajanje proteina* koriste se razlike u njihovim svojstvima: veličini i obliku molekula (gel-filtracija), naelektrisanju molekula (jonoizmenjivačka hromatografija), biološkoj aktivnosti (afinitetna hromatografija) i rastvorljivosti (neke od HPLC).

Jedna tipična i kompletna aparatura za hromatografiju proteina prikazana je na slici 1.5. Naravno, u zavisnosti od primene, pojedini delovi (*šta mislite koji?*) mogu da se izostave.

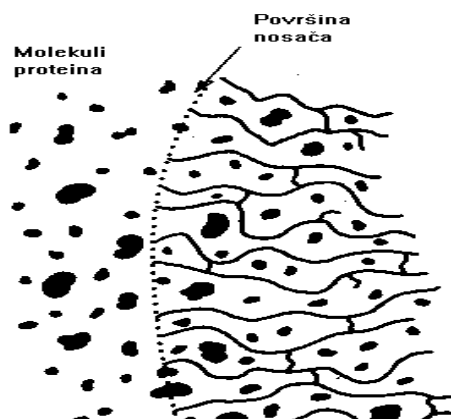


Slika 1.5 Kompletna aparatura za hromatografiju proteina

Gel-filtracija

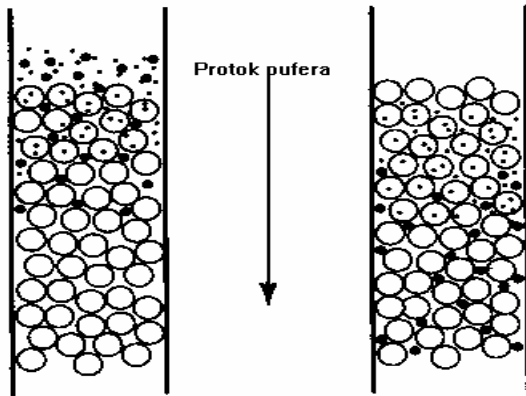
Naziv gel-filtracija za ovu metodu, iako najbolje ne odgovara, u najširoj je upotrebi, pa ćemo ga i mi primenjivati. Metoda se naziva i gel hromatografija, molekulsko prosejavanje, gel permeaciona hromatografija. Metoda se primenjuje za razdvajanje proteina, rasoljavanje (odvajanje veće količine soli od proteina), za izmenu pufera (npr. za pripremu uzoraka za jonoizmenjivačku hromatografiju), kao i za određivanje nepoznate molekulske mase proteina.

Osnovni princip na kojem se zasniva metoda jednostavan je: gel se sastoji iz otvorene trodimenzionalne molekulske mreže, koja je napravljena u obliku kuglica da bi se obezbedio bolji protok pufera kroz kolonu. Pore unutar mreže takvih su dimenzija da, pri eluiranju kolone puferom, manji molekuli iz smeše koju smo naneli na kolonu mogu, dok veći ne mogu u njih da uđu (Slika 1.6).



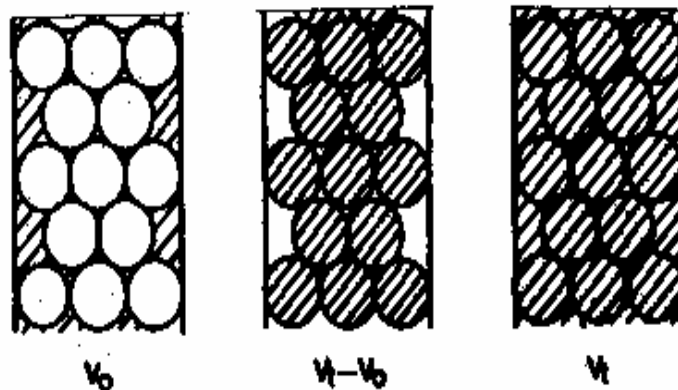
Slika 1.6 Dvodimenzionalni prikaz materijala za gel filtraciju: vidi se dostupnost različitih delova gela za molekule različite veličine

Shematski prikaz principa gel-filtracije, koji uzima u obzir i odnose između dimenzija molekulskih vrsta koje učestvuju u procesu, dat je na slici 1.7.



Slika 1.7. Princip razdvajanja molekula različite veličine gel-filtracijom: molekuli koji ne ulaze u pore gela kreću se brzo kroz kolonu "ispred fronta rastvarača"

Veličine koje karakterišu gel-filtraciju su elucione zapremine: V_0 , V_t (Slika 1.8) i V_e (Slika 1.9). V_0 ("void volume" ili "dead volume": "početna" ili "mrtva" zapremina) predstavlja zapreminu između pora gela i odgovara elucionoj zapremini supstance velike molekulske mase, koja bez zadržavanja prolazi kroz kolonu. V_t odgovara ukupnoj zapremini kolone i odgovara elucionoj zapremini supstance male molekulske mase, koja se najviše zadržava u porama gela. V_e je eluciona zapremina datog molekula (proteina), koja se nalazi između V_0 i V_t (Slika 1.8).



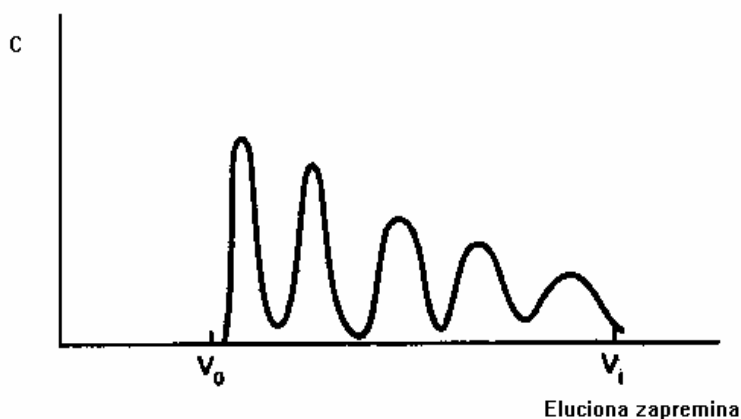
Slika 1.8. Shematski prikaz V_t i V_0

Ponašanje datog molekula pri gel-filtraciji karakteriše se elucionom zapreminom V_e , odnosno preciznije (Zašto?) podeonom konstantom K_{av} :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$$V_t - V_o$$

Molekuli proteina koji se dovoljno razlikuju po veličini, a istog su oblika, imaju različite elucione zapremine V_e , pri čemu će redosled eluiranja biti obrnuto srazmeran njihovim molekulskim masama (Slika 1.9).



Slika 1.9 Idealno razdvajanje gel-filtracijom pet proteina čije se molekulske mase međusobno razlikuju za faktor 2. Sa slike se vidi da se pikovi koji odgovaraju proteinima manje mase šire, pošto je difuzija manjih molekula veća.

Poznavajući elucione zapremine (V_e , odn. K_{av}) proteina poznatih molekulskih masa može se odrediti nepoznata molekulska masa proteina na osnovu određivanja njegove elucione zapremine.

Postoji veći broj materijala koji se koriste za gel-filtraciju. Najstariji i još uvek mnogo korišćeni materijal je Sephadex, koji se zasniva na umreženim dekstranima. Takođe se mnogo primenjuju i materijali koji se dobijaju polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida u različitim odnosima. Lista materijala koja se koristi za gel-filtraciju, kao i njihov opseg frakcionisanja za globularne proteine dat je u tabeli 1.1.

Tabela 1.1 Materijali koji se koriste za gel-filtraciju

Proizvođač	Oznaka gela	Tip gela	Opseg molekulskih masa globularnih proteina (Da)
Bio-Rad Biogels	P-2	Polyacrylamide	100 - 1800
	P-4	Polyacrylamide	800 - 4000
	P-6	Polyacrylamide	1000 - 6000
	P-10	Polyacrylamide	1500 - 20000
	P-30	Polyacrylamide	2500 - 40000
	P-60	Polyacrylamide	3000 - 60.000
	P-100	Polyacrylamide	5000 - 100.000
	P-150	Polyacrylamide	15.000 - 150.000
	P-200	Polyacrylamide	30.000 - 200.000
	P-300	Polyacrylamide	60.000 - 400.000
Bio-Rad Biogels	A-0,5m	Agarose	1000 - 500.000
	A-1,5m	Agarose	2000 - 1.500.000

	A-5,0m	Agarose	4000 - 5.000.000
	A-15m	Agarose	60.000 - 15.000.000
	A-50m	Agarose	200.000 - 50.000.000
	A-150m	Agarose	1.000.000 - 150.000.000
LKB Ultragels	AcA22	Agarose/polyacrylamide	60.000 - 1.000.000
	AcA34	Agarose/polyacrylamide	20.000 - 400.000
	AcA44	Agarose/polyacrylamide	12.000 - 130.000
	AcA54	Agarose/polyacrylamide	6000 - 70.000
LKB Agaroses	A2	Agarose	120.000 - 20.000.000
	A4	Agarose	55.000 - 9.000.000
	A6	Agarose	25.000 - 2.400.000
Pharmacia Sephadex	G-10	Dextran	50 - 700
	G-15	Dextran	50 - 1500
	G-25	Dextran	1000 - 5000
	G-50	Dextran	1500 - 30.000
	G-75	Dextran	3000 - 70.000
	G-100	Dextran	4000 - 150.000
	G-150	Dextran	5000 - 300.000
	G-200	Dextran	5000 - 600.000
Pharmacia Sepharoses	6B	Agarose	10.000 - 4.000.000
	4B	Agarose	60.000 - 20.000.000
	2B	Agarose	70.000 - 40.000.000

Jonoizmenjivačka hromatografija

Jonoizmenjivači su čvrsti nerastvorni nosači (celuloza, Sephadex i dr.), za koji su kovalentno vezane naelektrisane grupe, koje mogu da izmenjuju katjone i anjone (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Funkcionalne grupe koje se koriste u jonoizmenjivačima:

Anjonski jonoizmenjivač:

Aminoetil (AE-)
Dietilaminoetil (DEAE-)
Kvartenarni aminoetil (QAE-)

funkcionalna grupa:

$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

Katjonski jonoizmenjivač:

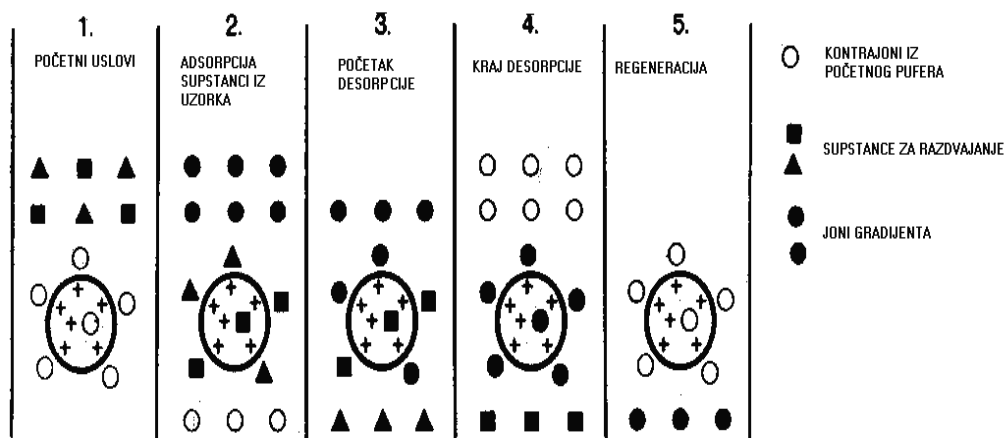
Karboksimetil (CM-)
Fosfo
Sulfopropil

funkcionalna grupa:

$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
 $-\text{PO}_4\text{H}_2^-$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

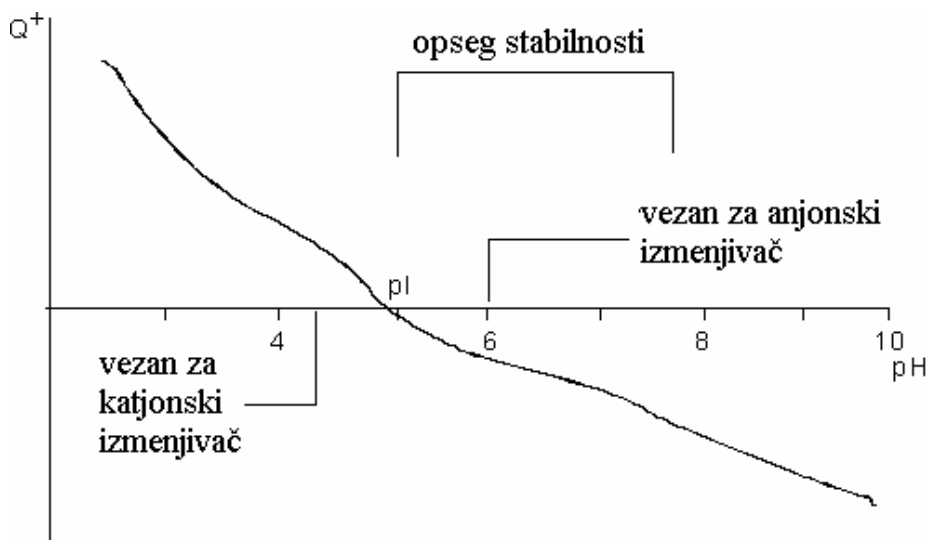
Razdvajanje proteina na jonoizmenjivačkoj koloni prikazano je na slici 1.10.

Na kolonu jonoizmenjivača, koja je ekvilibrisana puferom odgovarajućeg pH i jonske sile, nanese se rastvor smeše proteina koji želimo da hromatografišemo. Proteini koji se ne vezuju za kolonu, pod datim uslovima, eluiraju se sa početnim puferom, dok se proteini koji se zadržavaju na koloni potom eluiraju sa većom zapreminom istog pufera, ili sa puferom čija se jonska sila postepeno povećava (gradijent).



Slika 1.10. Princip razdvajanja proteina na jonoizmenjivačkoj koloni

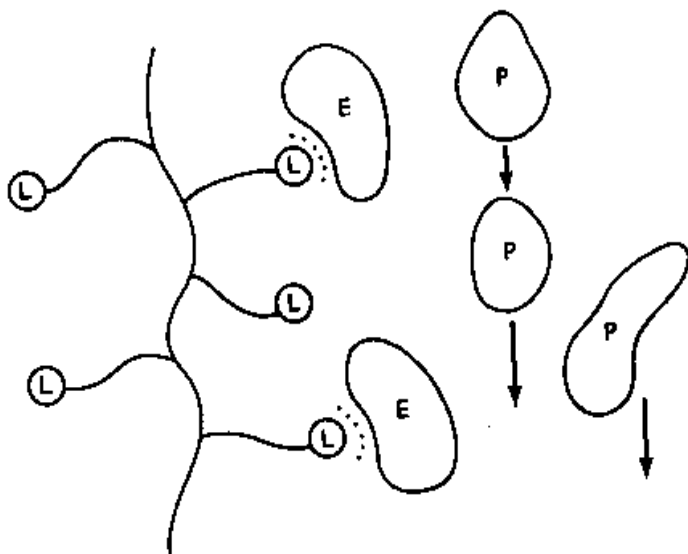
Eluiranje proteina koji su se vezali za kolonu može se postići i promenom pH pufera (kontinualnom ili diskontinualnom). Kako svaki protein može da ima pozitivno i negativno naelektrisanje, u zavisnosti od svoje izoelektrične tačke i pH pufera (Slika 1.11), za razdvajanje proteina mogu se koristiti i katjonski i anjonski jonoizmenjivači.



Slika 1.11 Naelektrisanje proteina u zavisnosti od pH: opseg u kojem je protein vezan za katjonski, odnosno anjonski jonoizmenjivač i opseg u kojem je hipotetični protein stabilan

Afinitetna hromatografija

U afinitetnoj hromatografiji ligand je kovalentno vezan za čvrsti nosač (Sephadex, agarozu i slično). Kada se kroz kolonu, napunjenu takvim nosačem, propušta smeša proteina na njoj će se zadržavati (u idealnom slučaju!) samo protein koji specifično interaguje sa datim ligandom, dok će se ostali proteini eluirati bez zadržavanja na koloni (Slika 1.12).



Slika 1.12 Princip afinitetne hromatografije: ligand (L) vezan je za nosač (matricu) i samo protein (E) sa specifičnim afinitetom za ligand se vezuje, dok se ostali proteini (P) ne vezuju.

Vezani protein se nakon toga eluira sa kolone puferom koji sadrži određenu koncentraciju slobodnog liganda. Tako, npr., ako se neki glikoprotein vezuje za lektin specifičan za glukozu, desorpcija i eluiranje ovog glikoproteina sa kolone vršiće se puferom koji će takođe sadržati glukozu. Eluiranje vezanog proteina može se postići i nespecifično, puferom koji sadrži agense (na primer soli) koji će raskidati interakcije između proteina i liganda vezanog za kolonu.

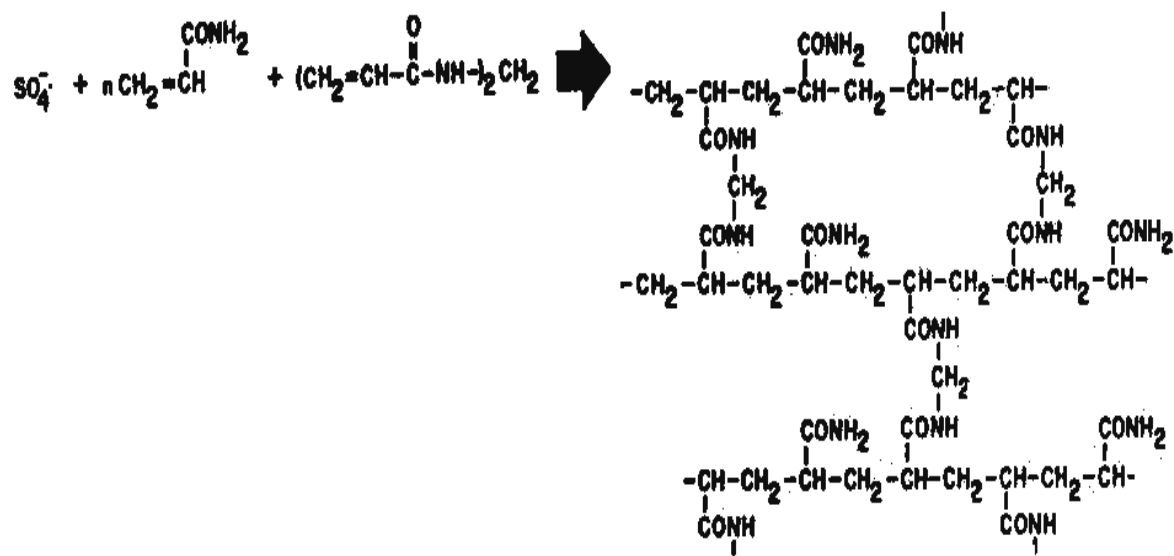
U afinitetnu hromatografiju ubrajaju se i metode u kojima se kao ligand koriste određene boje ("Dye Ligand Chromatography"). Najčešće se koristi boja zvana "Cibacron" plavo, čija je struktura slična strukturi molekula nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD^+), koji je kofaktor (u ćeliji vrlo zastupljenih) enzima - dehidrogenaza. Kako albumin iz plazme (seruma) takođe vezuje NAD^+ , ovaj nosač može da se koristi i za izolovanje albumina.

Ispitivanje homogenosti proteina

Posle izolovanja potrebno je odrediti čistoću (homogenost) izolovanog proteina. To se jednostavno i pouzdano postiže elektroforetskim tehnikama i metodama. Elektroforetski se prati i proces izolovanja i prečišćavanja proteina, od početne do krajnje faze. Princip elektroforeze proteina je jednostavan, mada savremene elektroforetske tehnike i metode, koje omogućuju visoko razlaganje kompleksnih smeša proteina primenom male količine uzorka, mogu biti i vrlo sofisticirane. Proteini koji se nalaze u rastvoru na određenom pH razlikuju se po naelektrisanju, tako da će u električnom polju pokazivati različitu pokretljivost, što će omogućiti njihovo razdvajanje. O principima elektroforeze treba da pročitate iz priloženog materijala iz knjige V. Niketić, Biohemijska izračunavanja. Ovde ćemo se ukratko osvrnuti na eksperimentalne aspekte osnovnih elektroforetskih tehnika i metoda: gel elektroforezu (poliakrilamidna gel elektroforeza - PAGE) i SDS gel elektroforezu.

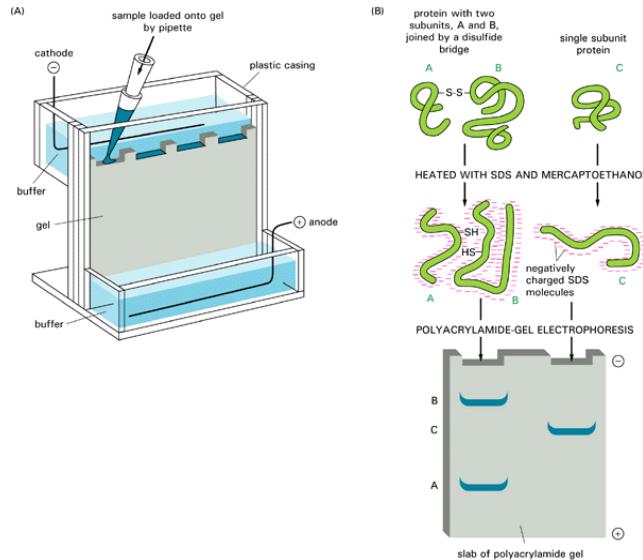
Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Elektroforeza proteina se radi u gelu, koji se nalazi između dve staklene ploče, koji se priprema polimerizacijom akrilamida i N,N-metilen-(bis)akrilamida:



Stepen umreženja gela zavisi od količine dodatog N,N-metilen-(bis)akrilamida. Za proteine čije su molekulske mase milion i veće koriste se manje umreženi gelovi (3 - 4 %), dok se za većinu proteina koristi akrilamidni gel 7 - 10 % umreženja. Za analizu je dovoljno 5 - 25 µg proteina. Šema aparature za elektroforezu data je na slici 1.13.

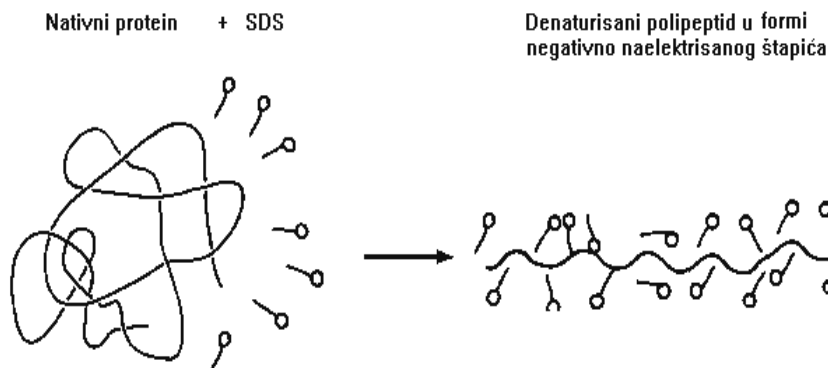
Ova elektroforeza se obično radi u puferu alkalnog pH, jer je pri tim uslovima većina proteina negativno naelektrisan, te se kreću od katode ka anodi. Posle završene elektroforeze, kada negativno naelektrisan boja - "tracking dye" dođe do kraja gela, gelovi se izvade, razdvojeni proteini "fiksiraju", obično taloženjem pomoću trihlorsirćetne kiseline, a potom boje. Višak boje se ispere, a trake razdvojenih proteina vide se na osnovu boje koja se na njima adsorbovala (Slika 1.13).



Slika 1.13 Skica aparature za elektroforezu i primer elektroforegrama (SDS-PAGE)

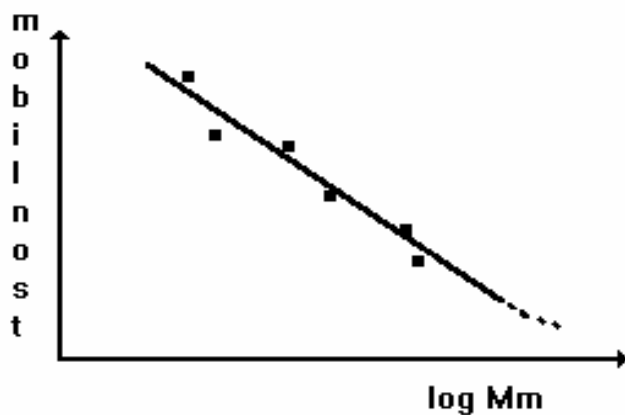
SDS gel elektroforeza

Ova metoda se koristi za razdvajanje proteina koji su nerastvorni u puferima koji se koriste za elektroforezu (npr. membranski proteini), kao i za određivanje molekulskih masa proteina. Jedina razlika, u odnosu na napred opisani postupak za PAGE, je dodatak (nekoliko %) SDS-a ("sodium dodecylsulfat"), koji se vrlo čvrsto vezuje za molekule proteina, denaturišući ih pri tome (Slika 1.14).



Slika 1.14 Denaturacija proteina u prisustvu SDS-a

Utvrđeno je da se 1 molekul SDS-a vezuje prosečno na 2 aminokiselinska ostatka u molekulu proteina. Uzimajući da je prosečna masa aminokiselinskog ostatka 110 Da proizilazi da će protein čija je molekulska masa 40 000 Da vezati 180 molekula SDS-a. "Kompleksi" molekula proteina i SDS-a su negativno naelektrisani, sa istim odnosom naelektrisanje/masa molekula. Stoga će se proteini pri SDS elektroforezi razdvajati samo na osnovu veličine (mase) molekula. Između pokretljivosti molekula proteina u SDS-elektroforezi i logaritma njihovih molekulskih masa postoji linearan odnos (Slika 1.15).



Slika 1.15 Dijagram pokretljivosti proteina u SDS elektroforezi u zavisnosti od njihove molekulske mase.

Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, rastvor n-butanola i vode se odlije, površina gela se ispere vodom i nali je rastvor za polimerizovanje gela za nadslojavanje ("Stacking gel"). Pre dodatka ovog rastvora umetne se "češalj" (Slika 1.17) između staklenih ploča, sa ciljem da se naprave udubljenja u gelu (bunarčići za nanošenje uzorka).

Pre početka elektroforeze potrebno je odrediti koncentraciju proteina u ispitivanim uzorcima i podesiti koncentraciju proteina na oko 1 mg/ml. Jedna zapremina ovog rastvora proteina pomeša se sa istom zapreminom pufera za rastvaranje uzorka i tako dobijen rastvor zagreva se 5 - 6 minuta na 100 °C (ključalo vodeno kupatilo).

Nakon polimerizacije gela za nadslojavanje, izvuče se češalj iz staklenog sendviča i površina gela ispere destilovanom vodom. Pufer za elektroforezu nali je se do vrha staklenog sendviča i pripremljeni uzorci se nanese u odgovarajuće bunarčiće, uz pomoć mikrošprica. Nanošenje uzoraka treba izvesti što je moguće brže, u cilju sprečavanja difuzije već nanetih proteinskih uzoraka. Zatim se prethodno montirani rezervoari (tank) za pufer napune tank puferom i uronjene elektrode spoje sa ispravljačem. Na ispravljaču se podesi napon na oko 80 V i proveri jačina struje (oko 20 mA).

Tok elektroforeze se prati kretanjem boje bromfenol plavo, koja ide ispred svih prisutnih proteina. Kada boja stigne do jednog centimetra od kraja gela, isključi se ispravljač, gel izvadi iz staklenog sendviča, prenese u odgovarajući sud i ispere vodom. Zatim se proteini u gelu fiksiraju potapanjem gela u rastvor fiksira, u trajanju od 20 minuta. Nakon

odvajanja upotrebljenog fiksira, gel se boji potapanjem u rastvor boje (Coomassie Blue R-250), oko 60 minuta. Obojeni gel obezbojava se rastvorom za obezbojavanje.

Određivanje koncentracije proteina

Određivanje proteina rutinski se i veoma često primenjuje u biohemiji. Postoji više metoda i postupaka za određivanje proteina. Izbor metode, između ostalog, zavisi i od prirode materijala, količine uzorka i koncentracije proteina u njemu, kao i vrste informacije koju na osnovu ovog podatka želimo da dobijemo. Najčešće se primenjuju sledeće metode:

a) *Gravimetrijske metode*: direktno merenje izolovanog proteina posle liofilizovanja i sušenja na 60° C u vakuumu nad P₂O₅ do konstantne težine. Potrebno je 1 - 2 mg uzorka.

b) *Određivanje azota po Kjeldalu*: zasniva se na određivanju azota na osnovu količine amonijaka u prethodno mineralizovanom (do amonijumsulfata) uzorku. Potrebno je 1 - 2 mg uzorka. Metoda se još primenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

c) *Aminoanaliza*: određivanje se zasniva na određivanju aminokiselina prisutnih u hidrolizovanom uzorku pomoću aminoanalizatora. Potrebno je 5 - 10 nmola uzorka, mada se u specijalizovanim laboratorijama aminoanaliza može uraditi i sa 50 - 100 pmola uzorka. *U okviru ove vežbe ćete raditi određivanje koncentracije ukupnih aminokiselina u hidrolizatu (kako biste to uradili?).*

d) *Spektrofotometrijske metode*: određivanje se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti proteina u UV oblasti. Većina proteina ima apsorpcioni maksimum na 280 nm koji potiče od tirozina i triptofana. Ukoliko apsorptivnost (ekst. koeficijent) proteina koji određujemo nije poznat, uzima se kao srednja vrednost $A_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0,91$. Nukleinske kiseline, koje su često prisutne u preparatu proteina, apsorbuju takođe na 280 nm, ali im je maksimum na 260 nm. Koncentracija proteina može da se dobije merenjem apsorbance rastvora na 260 i 280 nm i primenom tablica (videti kod vežbe iz nukleinskih kiselina) ili iz jednačine:

$$\text{Koncentracija proteina (mg/ml)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

e) *Kolorimetrijske metode*: određivanje se zasniva na (inter)reakciji proteina sa odgovarajućim reagensom, pri čemu nastaje obojeni proizvod čija je koncentracija ("jačina" boje) proporcionalna koncentraciji proteina. Određivanje se vrši na osnovu standardne prave (krive) koja se pravi sa proteinom poznate koncentracije. Za standard se obično uzima goveđi serum albumin (BSA), koji se prethodno osuši na 60° C u vakuumu nad P₂O₅ do konstantne mase, ili se alternativno koncentracija albumina određuje na osnovu A_{280} (1 mg/ml) = 6,6 za BSA. Najviše primenjivane kolorimetrijske metode (kao i metode za određivanje proteina uopšte) su: *Buretska*, *Lowry-jeva* i *Vezivanje boje (Bradford-ova metoda)*. Rad u kojem je opisana Lowry-jeva metoda (J. Biol. Chem. (1951), **193**:265) najviše je citirani naučni rad u istoriji. Opisaćemo detaljnije ove metode.

Biuretska metoda

Ova metoda zasniva se na osobini peptidne veze da u jako alkalnoj sredini gradi ljubičasti kompleks sa Cu(II) koji ima apsorpcione maksimume na oko 545 nm i na oko 260 nm. Intenzitet boje, pod određenim eksperimentalnim uslovima, proporcionalan je koncentraciji peptidnih veza (odnosno proteina). Merenje se po pravilu vrši u vidljivoj oblasti. Pri povećanju pH dolazi do deprotonovanja NH grupe iz peptidne veze (jer je iz poznatih razloga ovaj proton slabo kiseo) i tako se deprotonovani azot koordinuje sa Cu(II), dajući karakteristični ljubičasto obojeni kompleks, kvadratno planarne geometrije. *Da li biste umeli da prikazete ovu reakciju i predložite moguću strukturu kompleksa?* Azot iz peptidne veze može da se koordinuje samo ako je deprotonovan. Vezivanje protonovanog azota (NH grupe) zahtevalo bi promenu valentnog stanja azota iz sp^2 u sp^3 , što bi dovelo do (nepovoljnog) narušavanja karaktera peptidne veze.

Biuretski reagens:

Rastvorite 1,5 g kuprisulfata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 6,0 g natrijum-kalijumtartarata i 30 g NaOH u 500 ml destilovane vode. Ako dodate 1 g kalijumjodida, reagens može da traje beskonačno u dobro zatvorenoj plastičnoj flaši.

Postupak:

U 0,5 ml rastvora (koji sadrži do 3 mg proteina) dodajte 2,5 ml reagensa. Posle 20 - 30 minuta merite apsorbancu na 540 nm naspram slepe probe ili fiziološkog rastvora (na isti način kao kod pripreme standardne prave). Koncentraciju proteina odredite na osnovu standardne prave koju ćete pripremiti pomoću albumina poznate koncentracije (5 - 6 mg/ml). Standardna prava se priprema na sledeći način: pripremite 6 epruveta u koje stavite rastvore kao što je predviđeno u tabeli:

Broj epruvete		1	2	3	4	5	6
ml 0,9 % NaCl	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	
ml rastvora albumina	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
ml biuretskog reagensa		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Posle 20 - 30 minuta merite apsorbancu na 540 nm u svakoj probi. Merenje vršite naspram epruvete broj 1 (slepa proba) ili naspram fiziološkog rastvora (destilovane vode), u kojem slučaju oduzmite vrednost za slepu probu.

Lowry-jeva metoda

Ova metoda zasniva se, pored nastajanja kompleksa biuretskog tipa sa Cu(II), na redukciji Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina)

pomoću bočnih ostataka tirozina i triptofana. Metoda je vrlo osetljiva: lako se određuje 5 µg proteina.

Reagensi:

Rastvor A: Rastvorite 0,5 g kuprisulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i 1 g natrijumcitrata u 100 ml destilovane vode. Rastvor je neograničeno stabilan.

Rastvor B: Rastvorite 20 g Na_2CO_3 i 4 g NaOH u 100 ml destilovane vode.

Rastvor C: U 50 ml rastvora B dodajte 1 ml rastvora A.

Rastvor D: U 5 ml Folin-Ciocalteu fenolnog reagensa dodajte 5 ml vode.

Postupak:

U 0,5 ml uzorka (koji sadrži do 0,5 mg proteina) dodajte 2,5 ml rastvora C, izmešajte i ostavite 5 - 10 minuta. Zatim dodajte 0,25 ml rastvora D. Dobro promešajte i ostavite 20 - 30 minuta da se boja razvije. Merite na talasnoj dužini između 600 i 750 nm (kako ćete izabrati talasnu dužinu na kojoj ćete vršiti merenje?). Koncentraciju odredite na osnovu standardne prave, koju pripremate po analogiji sa postupkom opisanim kod Biuretske metode.

Vezivanje boje

Bradford-ova metoda (vezivanje boje)

U ovim metodama određivanje proteina se zasniva na vezivanju boje za molekul proteina, pri čemu dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma vezane, u odnosu na apsorpcioni maksimum slobodne nevezane boje. Vezivanje molekula boje i proteina ostvaruje se elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama. Metode su jednostavne i osetljive, ali se stepen vezivanja boje veoma razlikuje od proteina do proteina. Pri većim koncentracijama proteina dolazi do taloženja kompleksa protein-boja.

Bradfordov reagens:

60 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rastvori se u 1 litru 3 % perhlorne kiseline i rastvor procedi da bi se odvojila nerastvorena boja. Apsorbanca ovog rastvora na 465 nm treba da je između 1,3 i 1,5.

Postupak:

U 1,5 ml rastvora proteina (koji sadrži do 50 µg proteina) dodajte 1,5 ml Bradfordovog reagensa i posle 20 - 30 minuta čitajte apsorbanu na 595 nm. Ukoliko dolazi do taloženja, pripremite novu, razblaženu probu. Praktičnije je da odmah pripremite razblaženje 1:10 i 1:100. Koncentraciju proteina odredite na osnovu standardne prave koju pripremate po analogiji sa napred opisanim postupkom.

4. ENZIMI

Dobro poznavanje enzima je neophodno kako za razumevanje gradiva iz biohemije tako i za svakodnevnu biohemijsku praksu. Zato ćemo se potruditi da enzime temeljito obradimo, ne samo u okviru predavanja nego i u okviru teorijskih i eksperimentalnih vežbi. Prvo ćemo u okviru teorijskih vežbi kroz razgovor i izradu zadataka razjasniti osnovne pojmove iz teorije enzimske katalize i enzimske kinetike, a potom ćemo se upoznati sa aktivnošću i određivanjem aktivnosti enzima. Za određivanje aktivnosti enzima korist ćemo komercijalne enzimske preparate i biološke tečnosti (serum/plazma, hemolizat eritrocita).

Enzimi su obrađeni u svim udžbenicima iz biohemije i čitalac se naravno upućuje na ove knjige. Tekst koji sledi treba da pomogne studentima da bolje razumeju enzime i eksperimentalni rad sa njima, te da im olakša razumevanje poglavlja o enzimima iz udžbenika iz biohemije. U odeljku koji sledi prvo ćemo obnoviti neke od pojmova potrebnih za razumevanje enzima (osnovni pojmovi iz kinetike, teorija prelaznog stanja), a potom ćemo dati kratak osvrt na teoriju enzimske katalize, osnove enzimske kinetike, obradimo tipične zadatke probleme iz oblasti enzima.

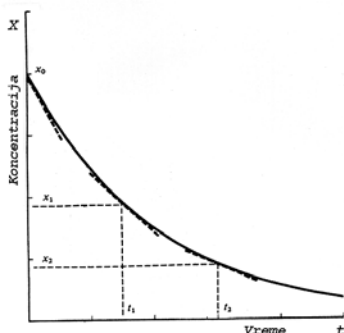
4.1 Podsetnik iz kinetike

4.1.1 Brzina hemijske reakcije

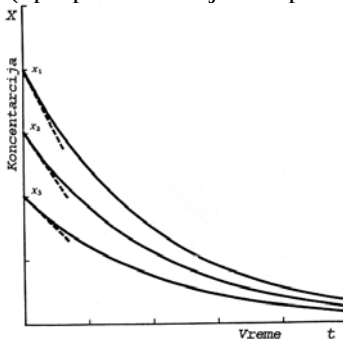
Pod brzinom hemijske reakcije ($v = dx/dt$) podrazumeva se promena koncentracije reaktanta ili proizvoda (x) sa vremenom reakcije (t). Brzina reakcije koju posmatramo proporcionalna je koncentraciji, tj. u opštem slučaju biće:

$$v = dx/dt = k \cdot x^n$$

gde je k = konstanta brzine, x = koncentracija reaktanta ili proizvoda, n = red reakcije. Merenje brzine hemijske reakcije zasniva se na određivanju koncentracije reaktanta ili proizvoda u određenim vremenskim intervalima od početka reakcije. Koncentracija se određuje direktno ili na osnovu neke od osobina koje su proporcionalne koncentraciji (npr. pH, apsorbanca, fluorescencija). Ako grafički predstavimo promenu koncentracije reaktanta (x) u zavisnosti od vremena (t) tokom kojeg se izvodi reakcija dobićemo krivu kao na slici 4.1. Nagib krive sa slike 4.1 za različite vrednosti x predstavljaće brzinu (dx/dt) koja odgovara koncentracijama (x) reaktanta. Ovi nagibi se mogu određivati grafički (npr. pomoću lenjira ili pomoću ogledala).



Slika 4.1 Promena koncentracije reaktanta (x) s vremenom (t). Tangenta (dx/dt) je prikazana za početnu koncentraciju (x_0 , na $t=0$) i za konc. x_1 i x_2 u t_1 i t_2 .



Slika 4.2 Dijagram koji pokazuje određivanje početnih brzina na $t=0$ za tri različite koncentracije reaktanta (x).

Drugi način za određivanje brzina za različite koncentracije reaktanata, koji se više preporučuje, jeste preko *početnih (inicijalnih) brzina*. Pod početnom brzinom podrazumeva se brzina reakcije koje odgovara vrlo kratkom vremenskom intervalu od početka reakcije (nagib krive u tački x_0 , t_0). Postupak određivanja početnih brzina se ponavlja sa nekoliko različitih početnih koncentracija x (videti sliku 4.2). Ako je količina utrošenog reaktanta manja od 5% može se uzeti da je $dx/dt = \Delta x/\Delta t$, gde je Δt vremenski interval od početka reakcije do izvršenog merenja promene koncentracije, Δx . Na slikama 4.1 i 4.2 to je deo krive od početka reakcije koji se može smatrati linearnim. U kinetici enzima zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata skoro isključivo se određuje na osnovu početnih brzina. Na taj način se brzine najtačnije određuju, jer se uticaj faktora kao što su povećana koncentracija proizvoda, promena pH do koje je eventualno pri reakciji došlo, denaturacija enzima, i slično u najvećoj meri izbegava.

4.1.2 Termodinamika i kinetika: teorija prelaznog stanja

Da bi do neke hemijske reakcije došlo treba da budu ispunjena dva uslova:

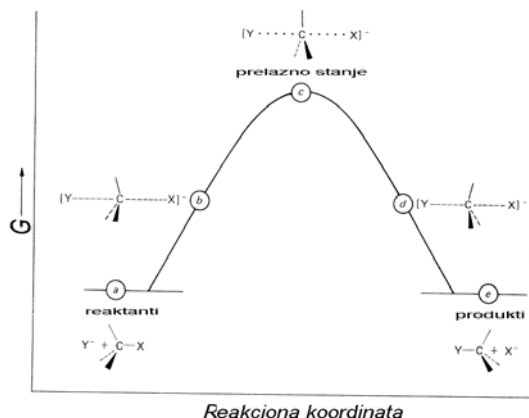
- (1) Termodinamički: promena slobodne energije pri prelasku reaktanata u proizvod treba da je manja od nule ($\Delta G < 0$) (Poglavlje 6).
- (2) Kinetički: brzina reakcije treba da je dovoljno velika da bi se prelazak reaktanata u proizvode mogao primetiti.

Kod mnogih reakcija prvi uslov je zadovoljen pa se ipak one pod normalnim uslovima ne dešavaju. Tako na primer glukoza je na vazduhu na sobnoj temperaturi potpuno stabilna iako je ΔG za oksidaciju glukoze sa kiseonikom $-2\ 800$ kJ/mol, do hidrolize polipeptida u vodi na sobnoj temperaturi ne hidrolizuju iako je ΔG za hidrolizu peptidne veze (npr. za diglicin) -20 kJ/mol. Drugim rečima, brzina ovih reakcija je pod navedenim uslovima toliko mala da se one praktično ne dešavaju. Da bismo ove pojave razumeli pomažemo nam teorije hemijske kinetike. Za razumevanje kinetike organskih reakcija, za analizu odnosa strukture i reaktivnosti molekula, najpogodnija je *teorija prelaznog (tranzitnog) stanja*. Podsetićemo se ukratko ove teorije.

Prelazno stanje

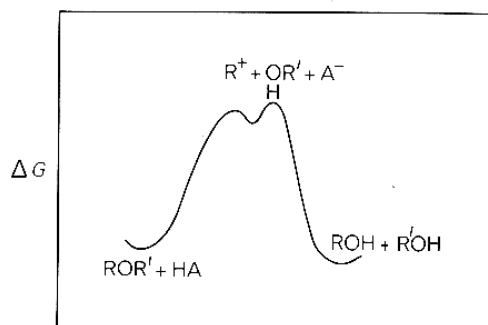
Zamislimo tok jedne jednostavne reakcije supstitucije grupe X u RX sa Y^- (Slika 4.3). Na slici 4.3 prikazan je energetski dijagram za ovu reakciju koji se naziva i *dijagram prelaznog stanja* ili *dijagram reakcione koordinate*. Reakciona koordinata predstavlja tok reakcije, od polaznih reaktanata preko niza među-stanja do krajnjih proizvoda. Na ordinati se prikazuje energija (slobodna ili potencijalna) ovih stanja. Reakciona koordinata predstavlja reakcioni put najmanje energije. Opisaćemo ukratko tok reakcije prikazan na slici 4.3. Polazni reaktanti i proizvodi reakcije imaju nižu energiju od među-stanja: u među-stanjima su veze u fazi formiranja i raskidanja, veza između grupe koja napada i centralnog atoma ugljenika jača, veza ovog atoma sa grupom koja odlazi slabi, preostale tri veze na ugljenikovom atomu postepeno se ispravljaju. Pošto je odbijanje među atomima u među-stanjima veliko, potencijalna energija ovih stanja će biti velika, zbog čega će se ona najčešće raspadati. Međutim, ukoliko sistem ima dovoljno kinetičke energije među-stanje će opstati i proces će se dalje nastaviti, pri čemu će nastajati među-stanja koja će imati sve veću (potencijalnu) energiju, jer će u njima veza C-X biti sve slabija (duž!),

veza C-Y sve jača (kraća!), dok će se preostale tri veze na centralnom C atomu sve više ispravljati. Kao rezultat ovog procesa nastaje među-stanje najviše energije u kojem će se obe grupe X i Y nalaziti na podjednakom rastojanju od centralnog C atoma (podjednako slabo vezane za ovaj C atom), a preostale tri veze će se nalaziti u ravni koja je normalna na ravan obe veze. Za ovo stanje je podjednako verovatno da će reakcija da se nastavi u smeru nastajanja proizvoda ili da će doći do njegovog raspadanja u polazne reaktante. Zato se za sistem u ovom stanju kaže da se nalazi u tranzitnom (prelaznom) stanju i da zbog toga predstavlja aktivirani kompleks. Štaviše, pošto je koncentracija aktiviranog kompleksa mala, raspadanje ovog kompleksa određivaće brzinu reakcije.



Slika 4.3 Dijagram tranzitnog stanja za reakciju izmene X sa Y^- u RX. Polazni reaktanti i proizvodi imaju istu energiju zbog čega je dijagram tranzitnog stanja simetričan. Ukoliko su proizvodi niže energije od polaznih reaktanata dijagram će biti asimetričan (Slika 4.5)

Kakva je struktura tranzitnog stanja? Na reakcionom putu nekih reakcija formiraju se nestabilni **intermedijeri** koji se mogu identifikovati tehnikama i metodama organske hemije. Za razliku od tranzitnog stanja u kojem su hemijske veze u fazi formiranja i raskidanja u *intermedijerima* su veze formirane. Intermedijeri zauzimaju mala udubljenja pri vrhu energetskog dijagrama (Slika 4.4). Po Hammondovom¹, ako se na reakcionom putu nalazi nestabilni intermedijer, tranzitno stanje će po strukturi biti slično ovom intermedijeru. Na ovaj način možemo da pretpostavimo strukturu tranzitnog stanja, te da predvidimo kako bi se ono moglo stabilizovati. Tako na primer kao intermedijer u hidrolizi acetala kiselinama javlja se karbonijum jon (Slika 4.4), tako da je i struktura prelaznog stanja slična strukturi ovog jona.



¹ G.S.Hammond, *J.Am.Chem.Soc.* 77, 334 (1955).

Slika 4.4 Transitno stanje za hidrolizu acetala kiselinama ima strukturu sličnu intermedijeru-karbonijum jonu koji zauzima malo "udubljenje" pri vrhu energetskog dijagrama

Energija aktivacije i konstanta brzine reakcije

Mada je transitno stanje u odnosu na polazne reaktante i proizvode reakcije nestabilno (metastabilno), teorija tranzitnog stanja polazi od toga da se ono nalazi u stanju (brze) ravnoteže sa polaznim reaktantima. Na primer, za jednu prostu reakciju kao što je monomolekulska reakcija raspadanja supstance X u proizvode: $X \rightarrow$ proizvodi, osnovno (X) i tranzitno ($X^\#$) stanje reakcije biće u ravnoteži, koja će se karakterisati konstantom ravnoteže:

$$K^\# = \frac{X^\#}{X}$$

Ako je $K^\#$ konstanta ravnoteže važiće odnos (Poglavlje 6):

$$\Delta G^\# = -RT \ln K^\# \text{ odnosno } [X^\#] = [X] \cdot e^{-\Delta G^\# / RT}$$

gde $\Delta G^\#$ predstavlja razliku između slobodne energije aktiviranog kompleksa i osnovnog stanja i naziva se *energija aktivacije* (*aktivaciona energija*). Energija aktivacije $\Delta G^\#$ se sastoji iz entalpijskog i entropijskog dela:

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\#$$

$\Delta H^\#$ (aktivaciona entalpija) i $\Delta S^\#$ (aktivaciona entropija) predstavljaju promenu entalpije, odnosno entropije pri prelasku reaktanata iz osnovnog u tranzitno stanje reakcije. U ovom procesu $\Delta S^\# < 0$ (jer pri prelazu iz osnovnog u tranzitno stanje uredenost sistema raste!), a $\Delta H^\# > 0$ odgovara radu potrebnom da se savlada odbijanje među atomima i deformacija uglova do kojih dolazi u tranzitnom stanju (Slika 4.3).

Postoji više načina izvođenja kojima se dovodi u vezu konstanta brzine reakcije i energija aktivacije. Opisaćemo na primeru navedene monomolekulske reakcije jedan od njih. Veze karakteristične za aktivirani kompleks su tako slabe da će se pri prvoj vibraciji raspasti. Zbog toga će učestanost kojom se prelazno stanje raspada biti jednaka vibracionoj frekvenci veze koja se raskida. Izjednačavanjem energije ekscitovanog oscilatora izražene preko kvantne ($E = h\nu$) i klasične ($E = kT$) fizike dobija se:

$$\nu = kT/h = RT/Nh \quad k - \text{Boltzmanova konstanta } (1,4 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1})$$

Brzina raspadanja supstance X biće:

$$-dx/dt = \nu[X^\#] = RT / Nh [X^\#] = RT / Nh \cdot e^{-\Delta G^\# / RT} \cdot [X]$$

Kako je $\nu = k \cdot [X]$ sledi da će konstanta brzine k biti:

$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

Iz navedenog odnosa (koji se naziva i Arrheniusova jednačina) vidimo, da što je aktivaciona energija veća, konstanta brzine date reakcije biće manja, te da će sa povećanjem temperature i konstanta brzine da se poveća. Obrnuto, smanjenje aktivacione energije i povećanje temperature dovešće do povećanja konstante brzine reakcije.

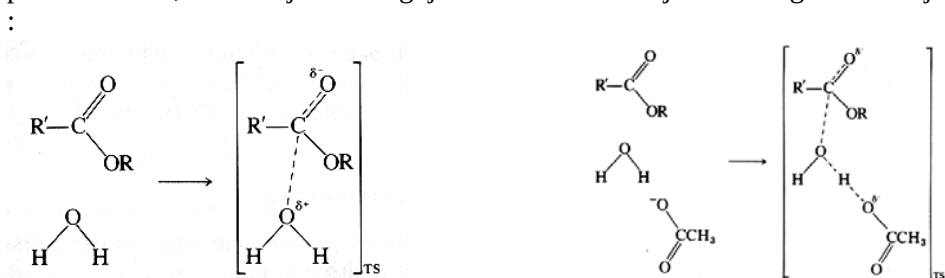
Katalizatori ubrzavaju reakciju snižavanjem energije aktivacije

Kako je odnos između konstante brzine reakcije i aktivacione energije eksponencijalan, svako smanjenje aktivacione energije izazvaće znatno povećanje konstante brzine (Tabela 4.1). Iz tabele 4.1 vidimo, da ako se aktivaciona energija neke reakcije dejstvom katalizatora smanji, sa na primer 100 kJ/mol na 60 kJ/mol, konstanta brzine (a time i brzina!) te reakcije će se povećati 20 miliona puta!

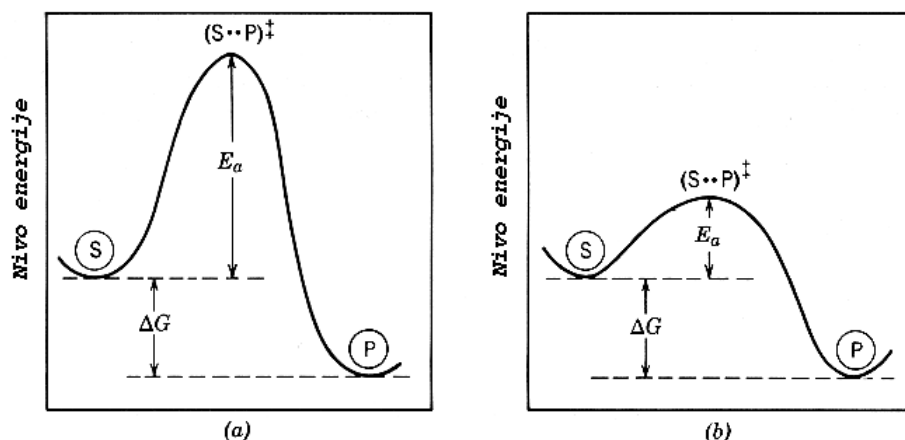
Tabela 4.1 Odnos između aktivacione energije ($\Delta G^\ddagger$) i konstante brzine reakcije (k)

$\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)	100	80	60	40
20				
k (mol ⁻¹ t ⁻¹)	$3,2 \cdot 10^{-6}$ $1,33 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	6,4	$2,9 \cdot 10^5$

Kataliza se definiše kao stabilizacija tranzitnog stanja reakcije bez odgovarajuće stabilizacije osnovnog stanja. Razmotrićemo efekat katalizatora na dobro poznatom primeru reakcije hidrolize estera. U nekatalizovanoj reakciji pri napadu vode na ester nastaje tranzitno stanje u kojem se javlja pozitivno naelektrisanje na molekulu vode, a negativno na atomu kiseonika iz karbonilne grupe, što je vrlo nepovoljno, dok u mehanizmu opšte bazne katalize, uz pomoć na primer acetata, acetatni jon interaguje sa tranzitnim stanjem i time ga stabilizuje:



Stabilizacija tranzitnog stanja dovešće do sniženja aktivacione energije (zbog smanjenja aktivacione entalpije) što će za posledicu imati povećanje konstante brzine reakcije. Efekat katalizatora na dijagram tranzitnog stanja koji dovodi do smanjenja energije aktivacije prikazan je na slici 4.5.



Slika 4.5 Dijagram prelaznog stanja nekatalizovane (a) i katalizovane (b) reakcije. Razlika u energiji aktivacije ($E_a = \Delta G^\ddagger$) između katalizovane i nekatalizovane reakcije: $\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta G^\ddagger_{\text{nekatal.}} - \Delta G^\ddagger_{\text{katal.}}$.

4.2 Glavne karakteristike enzima kao katalizatora

Enzimi katalizuju hemijske reakcije koje se dešavaju u živim sistemima, pokazujući pri tome ogromnu katalitičku moć. Oni ubrzavaju hemijsku reakciju najmanje milion puta. Čak i tako prosta (i brza) reakcija kao što je reakcija CO_2 i vode u eritrocitima katalizovana je enzimom koji se naziva karbonska anhidraza.

Glavne karakteristike enzima kao katalizatora su **efikasnost**, **specifičnost** i **regulacija**.

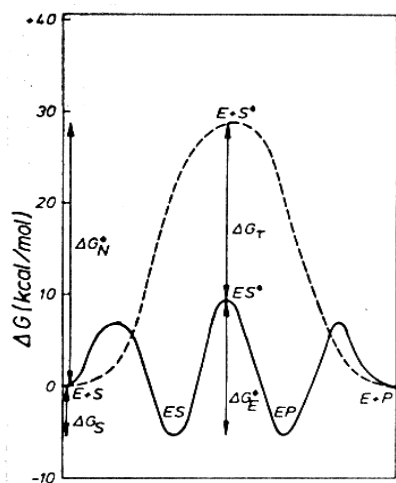
Enzimi ubrzavaju reakcije 10^6 - 10^{20} puta u odnosu na nekatalizovane reakcije, a pri tome mogu da budu i 10^9 puta efikasniji od sintetičkih, nebioloških katalizatora, iako deluju pod fiziološkim uslovima koji su neuporedivo blaži od onih koji se primenjuju pri hemijskoj katalizi. Tako na primer mnogi enzimi koriste mehanizam opšte kiselo-bazne katalize koji je sličan napred opisanom primeru hidrolize estara, ali je brzina enzimom katalizovane reakcije mnogo veća od one katalizovane malim molekulima.

Enzimi su specifični jer deluju samo na jedan (ili nekoliko) supstrata pri čemu dolazi samo do jedne reakcije, znači, nema sporednih reakcija. Specifičnost pojedinih enzima je apsolutna. Tako na primer pri biosintezi proteina na ribozomima nastaju bez greške i polipeptidni nizovi koji se sastoje od više od 1000 aminokiselina, dok nizak prinos i sporedne reakcije onemogućavaju organsku sintezu polipeptidnih nizova dužih od 50 aminokiselinskih ostataka.

Aktivnost mnogih enzima se reguliše mehanizmima alosterne kontrole, kovalentnim modifikacijama enzima i variranjem količine sintetizovanog enzima u ćeliji.

U ovom odeljku ćemo se ukratko osvrnuti na efikasnost i specifičnost enzima.

Primer energetskog dijagrama za hipotetičnu nekatalizovanu i odgovarajućim enzimom katalizovanu reakciju koji ilustruje efikasnost enzima dat je na slici 4.6. U tekstu ispod slike 4.6 dati su podaci na osnovu kojih je dijagram konstruisan.



Slika 4.6 Energetski dijagram za (hipotetičnu) nekatalizovanu (----) i enzimom (E) katalizovanu reakciju supstrata (S) (—)



U ovom primeru je $k_{-1} = k_{-2} = 10^4 \text{ s}^{-1}$; $k_{cat} = 10^2 \text{ sec}^{-1}$
 $k_n = 10^{-8} \text{ sec}^{-1}$ (konstanta brzine za nekatalizovanu reakciju)
 $K_{asoc} = 10^4 \text{ M}^{-1}$ (konstanta vezivanja za ES i EP)

$$[S] = [P] = 1 \text{ M}$$

$$\Delta G_S = -RT \ln K_{asoc} = -RT \ln 10^4 = -23 \text{ kJ/mol}$$

ΔG_T za prelazak $E, S^{\#}$ u $ES^{\#}$

$\Delta G_E^{\#}$ za prelazak ES u $ES^{\#}$

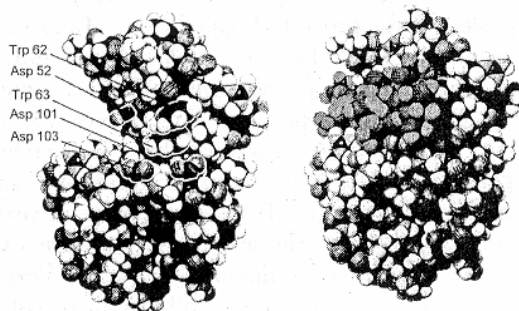
$\Delta G_N^{\#}$ za prelazak S u $S^{\#}$

U primeru sa slike 4.6 konstanta brzine reakcije nastajanja proizvoda ($k_{cat} = 10^2$) veća je 10^{10} puta u odnosu na konstantu brzine nekatalizovane reakcije ($k_n = 10^{-8}$). Kako enzimi postižu ovako veliko povećanje konstante brzine (smanjenje energije aktivacije)?

Do sada je izolovano i okarakterisano preko 2 000 raznih enzima, a ovaj broj se takoreći svakodnevno uvećava. Sve je veći broj enzima za koje je utvrđena i detaljna kristalna struktura i mehanizam dejstva. Svi enzimi su proteini određene tercijarne i kvaternarne strukture. Neki od njih sadrže i kofaktore, koji mogu biti joni metala ili organski molekuli-koenzimi. Kofaktori daju

proteinima svojstva koja ne poseduju bočni ostaci aminokiselina i na taj način proširuju aktivnost (funkciju) proteina.

Prva faza u dejstvu enzima je vezivanje supstrata za aktivno mesto (centar) enzima, pri čemu nastaje takozvani **enzim-supstrat kompleks**. Aktivno mesto može da se definiše kao deo molekula enzima u kojem bočni ostaci aminokiselina stvaraju udubljenje u koje supstrat može da se uklopi. Vezivanje enzima i supstrata zasniva se kao i u drugim primerima vezivanja proteina i liganda na komplementarnosti površina supstrata i aktivnog (vezivnog) mesta na molekulu enzimu (Slika 4.7). Detaljnija analiza pokazuje kao što ćemo videti, da komplementarnost supstrata i vezivnog mesta na molekulu enzima nije maksimalna.



Slika 4.7 Model ispunjenih sfera molekula enzima lizozima pre (levo) i posle (desno) vezivanja supstrata. Obeležene aminokiseline su esencijalne za vezivanje supstrata i za katalizu

Usled komplementarnosti površina supstrata i vezivnog mesta na molekulu enzima, odgovarajući atomi dolaze na rastojanje van der Waals-ovih poluprečnika, što omogućuje nastajanje međumolekulskih interakcija među njima. Ovde se radi o istim interakcijama koje stabilizuju nativnu strukturu proteina. Smatra se da vodonične veze, zbog svoje prirode, omogućuju orijentaciju liganda dok hidrofobni efekat znatno doprinosi energiji vezivanja supstrata za aktivno mesto u molekulu enzima koji sadrži i nepolarne ostatke aminokiselina.

4.2.1 Enzimi koriste energiju vezivanja enzima i supstrata u katalizi

Mehanizmi enzimske katalize, kao što je na primer napred opisani mehanizam opšte kiselo-bazne hidrolize, slični su mehanizmima katalize uz pomoć malih molekula. Pa ipak, enzimi su mnogo efikasniji katalizatori nego što su to mali molekuli, kao na primer napred opisani acetat. Šta razlikuje enzime od katalizatora-malih molekula? *Smatra se da je fundamentalna razlika u sposobnosti enzima da koristi u katalizi vezivne interakcije (energiju) između molekula enzima i supstrata.* Ove interakcije obuhvataju ne samo grupe koje učestvuju u katalizi nego i udaljene grupe koje učestvuju u vezivanju enzima i supstrata. Ukratko (i krajnje uprošćeno) ćemo opisati teoriju enzimske katalize koja najpotpunije objašnjava efikasnost enzima kao katalizatora i koja je primenljiva za sve enzime.

Vezivanje enzima (E) i supstrata (S) karakteriše se konstantom vezivanja (asocijacije) K_{asoc} :



Promena slobodne energije pri prelasku slobodnog enzima i supstrata u enzim-supstrat kompleks naziva se **vezivna energija** i može se izračunati iz odnosa $\Delta G_s = -RT \ln K_{asoc}$. Na primer ΔG_s u primeru sa slike 5-6 iznosi -23 kJ/mol.

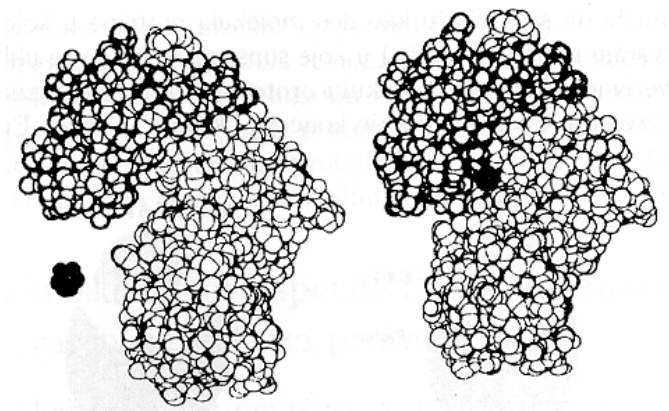
Teorija enzimске katalize dokazuje da se vezivna energija enzima i supstrata ($\Delta G_s < 0$) koristi za snižavanje energije aktivacije ($\Delta G^\# > 0$), tj za katalizu. Od kako je Haldane pretpostavio da se vezivna energija koristi za deformaciju supstrata, teoretičari su istraživali kako se ova energija može koristiti za snižavanje aktivacione energije enzimске reakcije. Vrednosti za ΔG_s izračunate na osnovu Michaelisove konstante K_m , koja se dobija na osnovu kinetičkih merenja, (videti naredni odeljak) iznosi obično 20-30 kJ/mol, dok eksperimentalno nađeno snižavanje aktivacione energije koju neki enzim postiže odgovara znatno većim vrednostima ΔG_s (40-80 kJ/mol). Da bi se ova nesaglasnost između očekivanih i eksperimentalno određenih ΔG_s vrednosti objasnila pretpostavljeno je da je energija vezivanja enzima i supstrata veća od eksperimentalno nađene (polazeći od K_m), ali da se deo ove energije troši u katalizi, tako da je deo koji se određuje preko K_m , ono što je preostalo posle toga. Uvođenjem koncepta korišćenja energije vezivanja enzima i supstrata u katalizi, dve tradicionalno razdvojene faze u dejstvu enzima, vezivanje supstrata i sam katalitički proces koji se opisuje hemijskim mehanizmom enzimске reakcije stapaju se u jednu zajedničku fazu.

Kako se vezivna energija koristi u katalizi? Vezivne interakcije mogu dovesti molekule supstrata u međusobno povoljniji položaj, kao i u povoljan položaj u odnosu na grupe koje učestvuju u katalizi (efekti blizine i orijentacije molekula koji reaguju). Vezivne interakcije mogu da dovedu do desolvatacije supstrata (nalaženje grupa koje reaguju u nepolarnoj unutrašnjosti molekula proteina, a ne u okolnoj vodenoj sredini može da poveća brzinu i do 5000 puta), a mogu i da destabilizaciju molekul supstrata (uglovi i dužine veza se deformišu kada se molekul supstrata vezuje za enzim).

4.2.2 Aktivno mesto enzima komplementarno je tranzitnom stanju supstrata

U dosadašnjem razmatranju pošli smo od vezivne energije i komplementarnosti površina molekula supstrata i vezivnog mesta na enzimu. Međutim, enzim vezuje supstrat (u osnovnom i prelaznom stanju), i proizvode reakcije. Aktivno mesto enzima naravno ne može da bude podjednako komplementarno sa svim ovim stanjima, iz čega proizilazi da će se vezivanje i vezivne energije osnovnog i prelaznog stanja supstrata i proizvoda reakcije za aktivno mesto na molekulu enzima međusobno razlikovati. Utvrđeno je da je aktivni centar enzima ili *komplementaran prelaznom stanju* ili (kod enzima sa mehanizmom "indukovanog slaganja") pri približavanju i vezivanju supstrata, aktivni centar postaje komplementaran prelaznom stanju. U prvom slučaju, koji srećemo na primer kod enzima himotripsina i lizozima, supstrat se u tranzitnom stanju najbolje (najjače) vezuje za aktivno mesto u molekulu enzima, čime se postiže potpuno iskorišćenje vezivne energije u katalizi. Kod enzima sa mehanizmom indukovano slaganja, aktivni centar nije komplementaran prelaznom stanju supstrata. Međutim, enzim je fleksibilan a supstrat rigidan, tako da pri vezivanju supstrata dolazi do konformacionih promena u

enzimu pri kojima aktivni centar postaje komplementaran prelaznom stanju. Aktivni i neaktivni oblik enzima se nalaze u ravnoteži, pri čemu se bez vezanog supstrata enzim skoro kvantitativno nalazi u neaktivnom obliku (Slika 4.8).



Slika 4.8 Model ispunjenih sfera enzima heksokinaze pre (levo) i posle (desno) vezivanja supstrata (heksoze)

4.2.3 Specifičnost enzima

Osvrnucemo se na kraju i na *specifičnost enzima*. Termin specifičnost enzima koristi se u više značenja. Značenje koje bi bilo relevantno za žive sisteme bilo bi: *diskriminacija između nekoliko supstrata koji su u kompeticiji za aktivni centar na istom enzimu* (na primer specifičnost određene aminoacil-tRNK sintetaze za određenu aminokiselinu i za određenu t-RNK u ćeliji u kojoj su prisutne sve aminokiseline i sve t-RNK). Ukoliko podjemo od činjenice da je za vezivanje supstrata i za katalizu potrebno da su supstrat i aktivno mesto na enzimu komplementarni nije teško objasniti specifičnost enzima u odnosu na supstrat koji je većih dimenzija od dimenzija aktivnog mesta na molekulu enzima, ili je pak "pogrešne" stereohemije. Kako molekul enzim razlikuje supstrate koji su manji od njegovog specifičnog supstrata? Specifičnost enzima se može meriti na osnovu poređenja brzina reakcija sa ovim supstratima. *Prema tome specifičnost enzima će zavisiti od vezivanja supstrata i katalitičke brzine, i može se stoga meriti i izraziti preko konstanti koje karakterišu ove veličine: tj. Michaelisove konstante (K_m) i katalitičke konstante ($k_p=k_{cat}$) (videti sledeći odeljak).*

4.3 Kinetika enzimskih reakcija

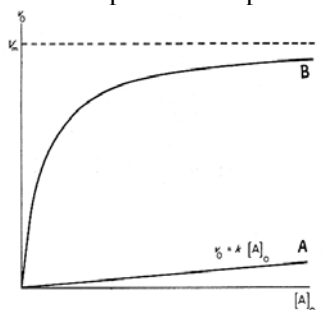
Kinetika enzima se bavi izučavanjem uticaja raznih faktora (koncentracije supstrata i enzima, inhibitora, kofaktora, pH, jonske sile, temperature i sl.) na brzinu enzimom katalizovane reakcije. Na ovaj način dolazi se do polaznih podataka za strukture i mehanizma dejstva enzima na

³ Poznavanje jednog enzima uključuje poznavanje njegovog mehanizma i njegove funkcije. Ukratko treba dati odgovor na tri pitanja: Šta (enzim) radi? Kako radi? i Zašto radi?

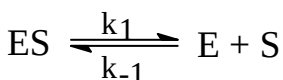
primer: kojim redom se vezuju supstrati i nastaju proizvodi, da li nastaje kovalentni enzim-supstrat kompleks, koje se funkcionalne grupe nalaze u aktivnom centru (što se može utvrditi i ispitivanjem uticaja pH na enzimsku reakciju) i slično. Na osnovu kinetičkih parametara može da se proceni aktivnost i koncentracija enzima i supstrata *in vivo*. Pri izolovanju i prečišćavanju novog enzima praćenje eksperimentalnih operacija kao i polazno karakterisanje enzima vrši se određivanjem njegovih kinetičkih parametara.

4.3.1 Osnovne jednačine enzimске kinetike

Ako pratimo početne brzine reakcije u zavisnosti od koncentracije supstrata dobićemo pravu kao na slici 4.9 (A), a ako se ista reakcija odvija u prisustvu određene količine enzima ta zavisnost će biti kao na slici 4.9 (B). Vidimo da kod katalizovane reakcije brzina raste do izvesne koncentracije supstrata posle čega ostaje konstantna (horizontalni deo krive B na slici 4.9). Ovakvo ponašanje koje je zapaženo još u ranoj istoriji enzimologije je objasnio nastajanjem enzim-supstrat "kompleksa" (ES) koji je u ravnoteži sa polaznim enzimom (E) i supstratom (S):



Slika 4.9 Zavisnost početnih brzina od početnih koncentracija reaktanata za nekatalizovanu (A) i enzimom katalizovanu (B) reakciju



$$K_S = [E][S]/[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

Konstanta ravnoteže za ovaj proces koja se obeležava sa K_S predstavlja konstantu disocijacije "kompleksa" ES. Velika vrednost za K_S znači da je ravnoteža pomerena u desno, tj. da se supstrat slabo vezuje za enzim. Obratno, mala vrednost K_S znači da je molekul supstrat čvrsto vezan za molekul enzima. Brzina nastajanja proizvoda proporcionalna je koncentraciji kompleksa ES:

$$v = k_p \cdot [ES]$$

Konstanta brzine prvog reda, k_p , naziva se *katalitička konstanta* (obeležava se i sa k_{cat}). Kada je koncentracija supstrata dovoljno velika, ravnoteža je pomerena na stranu ES tako da je ukupna koncentracija enzima, E_t , praktično jednaka koncentraciji ES, a brzina nastajanja proizvoda postaje konstantna:

⁴ L. Michaelis & M.L. Menten, *Biochem.Z.* **49** (1913) 333.

$$v = k_p \cdot [E_t] = V_m = V$$

i pri daljem povećanju koncentracije supstrata ne može da se poveća (horizontalni deo krive B na slici 4.5). Ova brzina se naziva maksimalnom i obeležava se sa V_{max} , V_m ili samo sa V . Odnos između v , V , K_s i $[S]$ može da se dobije na sledeći način:

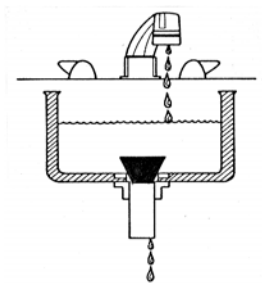
$$[E]_t = [E] + [ES] \quad \frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]} \quad K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \therefore [ES] = \frac{[S]}{K_s} [E]$$

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{K_p \frac{[S]}{K_s} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_s} [E]} \quad \frac{v}{k_p [E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad \frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

$$\boxed{\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}}$$

Uokvirena jednačina koja se naziva *Michaelis-Menten-ova jednačina* predstavlja osnov za izučavanje kinetike enzimskih reakcija.

Koncept stvaranja ravnoteže između E, S, i ES kritikovali su Briggs i dokazujući da se prelazak ES u E i P dešava tako brzo da se ne može, osim u izuzetnim slučajevima, uspostaviti ravnoteža $ES \rightleftharpoons E + S$. Ono što mi vidimo kao stanje ravnoteže ustvari je tzv. **postojano (stacionarno) stanje** (engl. "steady state") kada kompleks ES nastaje istom brzinom kojom se i troši, tako da koncentracija ES, kao nivo vode na slici 4.10, ostaje konstantna. Ovo stanje se dostiže posle svega nekoliko milisekundi od momenta kada enzim i supstrat dođu u dodir (Slika 4.11). Tehnikama i metodama za brzu kinetiku moguće je pratiti i ove procese (takozvana "presteady" state kinetika).

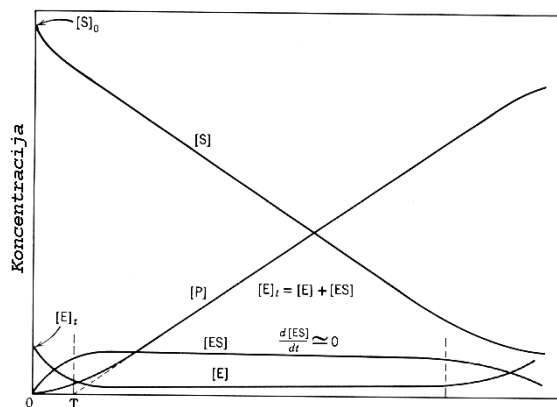


Slika 4.10 Model za postojano stanje. Pošto je brzina kojom voda kaplje u sud ista kao brzina kojom voda odlazi iz suda nivo vode ostaje nepromenjen.

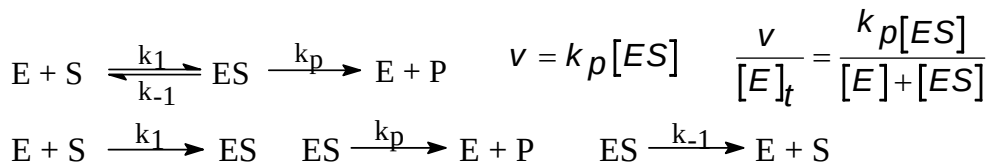
U ovom tekstu ćemo razmatrati samo kinetiku koja polazi od postojanog stanja ("steady state" kinetika). Na slici 4.11 su prikazane promene koje nastaju kada mala količina enzima dođe u

⁵ G.E.Briggs & J.B.S.Haldane, *Biochem.J.* **19** (1925) 338.

dodir sa znatno većom količinom supstrata.



Slika 4.11 Promene koje se dešavaju pri enzimskoj katalizi kada je početna koncentracija supstrata znatno veća od koncentracije enzima (T: nastajanje postojanog stanja). Opisane procese možemo predstaviti na sledeći način:



brzina stvaranja ES je $= k_1[E][S]$

brzina razgradnje ES je $= k_{-1}[ES] + k_p[ES] = (k_{-1} + k_p)[ES]$

$$d[ES]/dt = 0 \quad k_1[E][S] = k_{-1} + k_p[ES] \quad [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_p}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \quad \therefore [ES] = \frac{[S]}{K_m}[E]$$

Količnik iz konstanti brzina $(k_{-1} + k_p)/k_1$ je pseudo-ravnotežna konstanta koja se u čast Mlichaelisa obeležava sa K_m i ima dimenzije koncentracije (kao i K_s), a obično se izražava u molovima. K_m predstavlja prividnu (engl. "apparent") konstantu disocijacije jer govori o odnosu koncentracija E, ES i S u postojanom stanju koje nije i stanje ravnoteže. Jedino u slučaju kada je $k \ll k_{-1}$ može da bude $K_m = K_s$, inače je uvek $K_m > K_s$. Iz Michaelis-Menten-ove jednačine

vidimo da je K_m ekvivalentno koncentraciji supstrata za koju je brzina jednaka polovini maksimalne brzine. Po analogiji sa prethodnim izvođenjem, biće:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

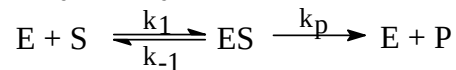
Značenje konstante K_m

K_m i V (odnosno V po jediničnoj koncentraciji enzima, V/E_t) su fundamentalne karakteristike enzima koje se eksperimentalno određuju. K_m je prividna konstanta disocijacije za ES kompleks, što treba imati u vidu pri ispitivanju uticaja raznih faktora na njenu vrednost, jer promena u K_m ne mora da znači promenu u vezivanju supstrata za enzim nego promenu u nekoj od konstanti brzina koje učestvuju u K_m . Koje se informacije mogu dobiti na osnovu posmatranja K_m ?

K_m približno odgovara koncentraciji supstrata u ćeliji: ako bi $[S] \ll K_m$ brzina bi bila vrlo osetljiva na promene koncentracije supstrata, a veći deo enzima ne bi bio iskorišćen. Ako bi $[S] \ll K_m$ nepotrebno bi se nagomilala količina supstrata i enzim ne bi bio ni najmanje osetljiv na promenu koncentracije supstrata. Kao numerički parametar, K_m nam služi za poređenje enzima iz raznih organa i organizama koji katalizuju istu reakciju, iz čega možemo da zaključimo da li se radi o istovetnim enzimima ili ne. Suvviše visoka vrednost za K_m u in vitro ispitivanju ukazuje na prisustvo aktivatora u in vivo uslovima. Poznavajući K_m možemo da podesimo eksperimentalne uslove tako da se reakcija odvija maksimalnom brzinom.

Primer:

Data je reakcija



gde je $k_1 = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$, i $k_p = 3 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$. Izračunati K_s , K_m . Da li k_p može da bude veće od k_1 ?

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}}{1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}} = 1 \cdot 10^{-5}$$

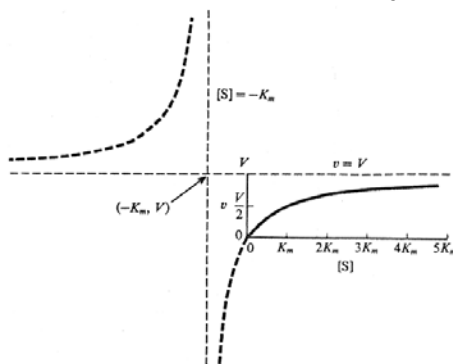
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} = \frac{1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} + 3 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}}{1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}} =$$
$$= \frac{4 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}}{1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

k_p može da bude veće od k_1 , prvo, zato što ove dve konstante imaju različite dimenzije tako da se ne mogu direktno porediti, a drugo, treba uvek imati u vidu da su to konstante brzina, a ne brzine. Iako je $k_p > k_1$ i brzina nastajanja proizvoda iz ES ne mora da bude veća od brzine nastajanja samog ES, jer je brzina nastajanja proizvoda proporcionalna $k \cdot [ES]$.

Karakteristike Michaelis-Mentenove jednačine

Michaelis-Menten-ova jednačina predstavlja pravouglu hiperbolu sa asimptotama $S = -K$ i $v = V$ (Slika 4.12). Centar koničnog dela je na $(-K_m, V)$. Deo krive koji je relevantan za kinetiku enzima je onaj koji odgovara pozitivnim vrednostima $[S]$. Za velike koncentracije S , brzina v se približava V , tj. brzina postaje konstantna i nezavisna od koncentracije supstrata što znači da

reakcija pripada *kinetici nultog reda*. Kada je $[S] > 100 \cdot K_m$ odstupanje od kinetike nultog reda je manje od 1%. Ako je $[S] \ll 100 \cdot K_m$ (uzima se obično $[S] < 0,01 \cdot K_m$) tada je $v = V \cdot [S] / K_m$, odnosno, $v = k \cdot [S]$, gde je $k = V / K_m$, znači reakcija pripada kinetici prvog reda sa konstantom brzine $k = V / K_m$. Kada je koncentracija supstrata, $[S]$, između $0,01 K_m$ i $10 K_m$ reakcija je između nultog i prvog reda. Osobine Michaelis-Menten-ove jednačine su prikazane u tabeli 4.1.



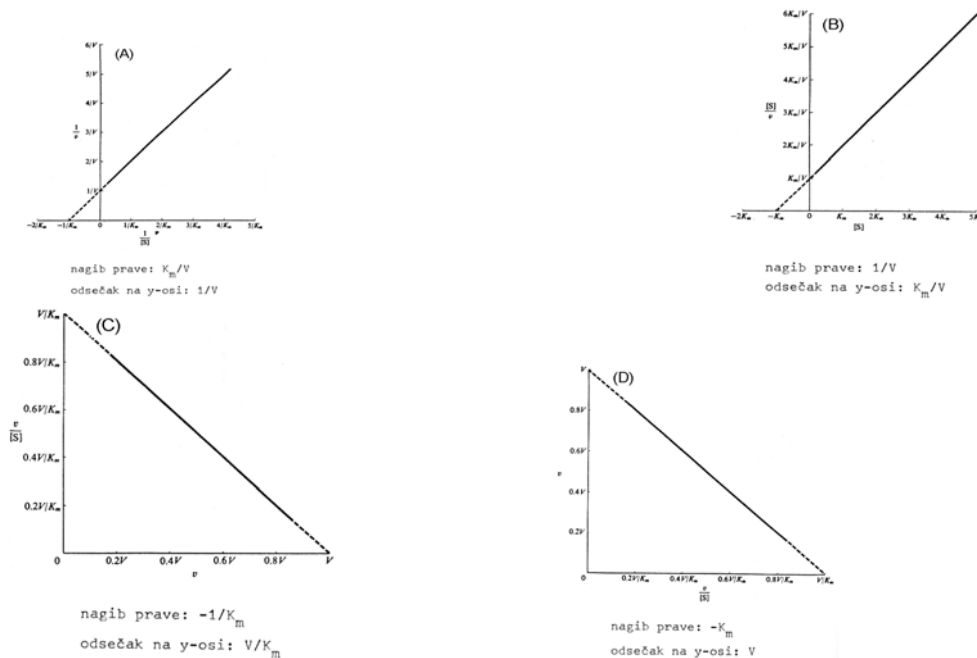
Slika 4.12 Grafičko predstavljanje Michaelis-Mentenove jednačine s karakteristikama pravougla hiperbole

Tabela 4.1 Osobine Michaelis-Menten-ove jednačine $v = V \cdot [S] / (K_m + [S])$

[S]	v
1000 K_m	0,999 V
100 K_m	0,99 V
10 K_m	0,91 V
3 K_m	0,75 V
K_m	0,50 V
0,33 K_m	0,25 V
0,10 K_m	0,091 V
0,01 K_m	0,01 V

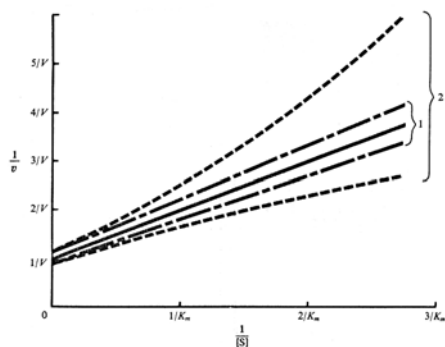
Grafičko prikazivanje Michaelis-Menten-ove jednačine

Jednačina hiperbole nije pogodna za određivanje V i K_m , te se zato Michaelis-Menten-ova jednačina, algebarskim transformacijama pretvara u linearan oblik. Pored toga, iz linearnog oblika se može bolje uočiti eventualno odstupanje enzima koji ispituje od Michaelis-Menten-ove kinetike. Postoji više načina za linearno predstavljanje Michaelis-Menten-ove jednačine, od kojih navodimo one koji se najčešće primenjuju. Svaka od datih jednačina predstavljena je i grafički (Slika 4.13). Sa ovih grafika može da se vidi kako se dolazi do vrednosti za K_m i V .



Slika 4.13 Grafičko prikazivanje Michaelis-Menten-ove jednačine u linearnom obliku. (A): Lineweaver-Burk-ova jednačina, $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$ (B): Hanes-ova jednačina, $\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{[S]}{V}$ (C): Eadie-Hofstee-ova jednačina, $\frac{v}{[S]} = \frac{V}{K_m} - \frac{v}{K_m}$ (D): Wolf-ova jednačina $v = V - \frac{vK_m}{[S]}$

Nedostatak Eadie-Hofstee-ove i Wolf-ove metode je da se brzina (v), pri čijem se određivanju pravi najveća greška, nalazi na obe strane jednačine. Nedostatak Lineweaver-Burk-ove metode, koja se inače najviše primenjuje, jeste gomilanje vrednosti $1/[S]$ blizu $1/v$ ose. Ovo se izbegava ako se za relativne koncentracije supstrata uzmu, sledeće vrednosti: 1,00 1,11 1,25 1,43 1,67 2,00 2,50 3,33 5,00 i 10,00. Drugi nedostatak je, što greške, koje su pri određivanju manjih brzina veće (zbog uzimanja recipročnih vrednosti), mnogo utiču na rezultujuću pravu (Slika 4.14).



Slika 4.14 Grafički prikaz greški u određivanju brzina enzimom katalizovane reakcije za različite koncentracije supstrata pri upotrebi Lineweaver-Burk-ove jednačine. 1: konstantna greska, 2: greške proporcionalni brzini reakcije.

Najbolje je, da se eksperimentalni podaci obrade metodom najmanjih kvadrata (str.1-20), ali uzimajući u obzir i statističku težinu za svaku vrednost. Ukoliko je greška u određivanju brzine velika, bolje je koristiti metode koje uzimaju direktne, a ne recipročne vrednosti za v (npr. Eadie-Hofstee-ova ili Wolf-ova jednačina).

4.3.2 Eksperimentalno određivanje K_m i V

Eksperimentalni postupak za nalaženje K_m i V sastoji se u tome da se za nekoliko koncentracija supstrata (na primer preporučuje interval od $0,2 K_m$ do $5 K_m$) odrede početne brzine reakcije i predstave pomoću metode najmanjih kvadrata na jedan od opisanih linearnih načina (uzimajući pri tome u obzir sve njihove prednosti i nedostatke). Za određivanje početnih brzina može da se koristi brzina nestajanja supstrata ili brzina nastajanja proizvoda. Najbolje je da se tako dobijeni podaci koriste kao početni za "fitovanje" u originalnu Michaelis-Menten-ovu jednačinu pomoću odgovarajućih računarskih programa.^{7,8}

Primer 1:

Neki enzim katalizuje reakciju hidrolize supstrata S. Količina hidrolizovanog supstrata merena je za različite početne koncentracije svakih 30 sekundi tokom 3 minuta. Kolike su početne brzine za svaku koncentraciju supstrata? Dobijeni podaci (preračunati na $\mu\text{mol/L}$) dati su u tablici 5-2. U prvoj koloni dato je vreme u minutima, u koloni 0S vrednosti za slepu probu (bez enzima i supstrata), a u poslednjem redu su date početne koncentracije preračunate na mmol/L .

Prvo treba od svake vrednosti u kolonama $^1S - ^6S$ oduzeti odgovarajuću vrednost za slepu probu, a zatim tako dobijene vrednosti predstaviti grafički. Na slici 5-15 prikazan je linearni deo krivih zavisnosti koncentracije izreagovanog supstrata od vremena za različite početne koncentracije supstrata. Vidimo da je u svim slučajevima taj odnos linearan u prvoj minuti od početka reakcije. Prema tome, ove vrednosti možemo da uzmemo za izračunavanje početnih brzina.

Tabela 4.2 Podaci za primer

Vreme (min)	Utrošen supstrat ($\mu\text{mol/L}$)						
	0S	1S	2S	3S	4S	5S	6S
0,5	0,00	0,49	0,56	0,71	1,10	1,36	1,45
1,0	0,10	1,05	1,23	1,52	2,24	2,74	3,04
1,5	0,20	1,66	1,93	2,36	3,48	4,10	4,20
2,0	0,30	2,23	2,61	3,18	3,80	4,80	4,90
2,5	0,40	2,81	3,30	4,00	4,30	5,00	5,10
3,0	0,50	3,40	4,00	4,40	5,00	-----	----
--							
Početna	0,00	2,32	3,00	4,55	12,66	38,50	200,00

⁷ W.Clealand: ADVANCES IN ENZYMOLOGY, Vol **29**, (Editor F.F. Nord), Wiley, New York, 1967

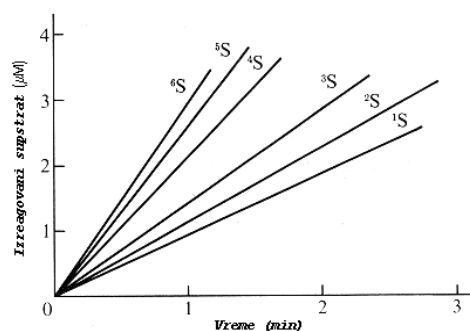
^{7,8} J.L.Hogg, J.Chem.Educ. **51** (1974) 109.

konc. (mmol/l)

Početne brzine će, prema tome, biti:

$[^1S]$	$2,32 \cdot 10^{-3} M$	$^1v = 0,95 \mu mol \min^{-1}$
$[^2S]$	$3,00 \cdot 10^{-3} M$	$^2v = 1,13 \mu mol \min^{-1}$
$[^3S]$	$4,52 \cdot 10^{-3} M$	$^3v = 1,42 \mu mol \min^{-1}$
$[^4S]$	$12,66 \cdot 10^{-3} M$	$^4v = 2,14 \mu mol \min^{-1}$
$[^5S]$	$38,5 \cdot 10^{-3} M$	$^5v = 2,64 \mu mol \min^{-1}$
$[^6S]$	$200,0 \cdot 10^{-3} M$	$^6v = 2,94 \mu mol \min^{-1}$

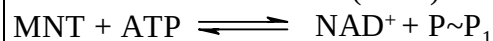
Ako ove vrednosti predstavimo u zavisnosti od početnih koncentracija supstrata dobićemo krivu kao na slici 4.16.



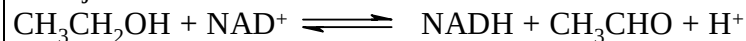
Slika 4.15. Zavisnost koncentracije izreagovanog supstrata od vremena

Primer 2:

Nikotinamid mononukleotid (NMN)-adenil-transferaza katalizuje reakciju:



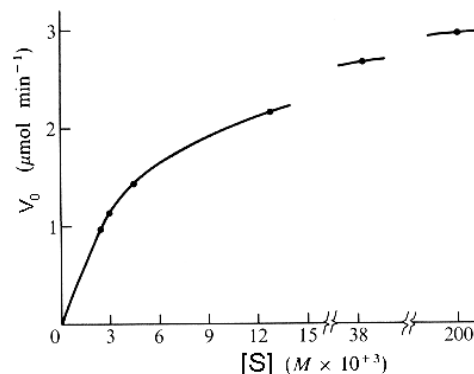
Brzina formiranja NAD^+ merena je na osnovu količine $NADH$ nastale u sledećoj reakciji:



Količina $NADH$ kontinualno je određivana spektrofotometrijski na 340 nm, a dobijeni podaci prikazani su u tabeli 4-3. Odrediti K_m i V primenom nekoliko grafičkih metoda.

Tabela 4.3 Eksperimentalni podaci

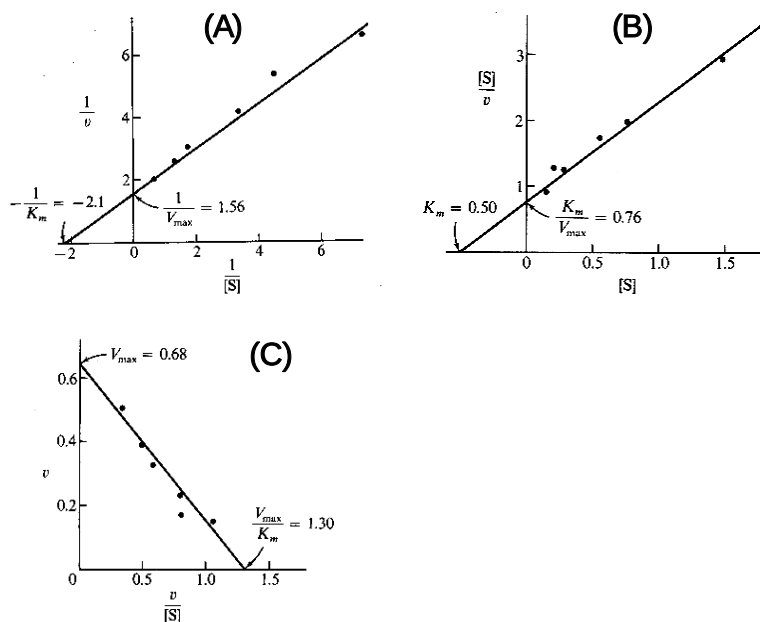
[S]	v	$\frac{1}{[S]} \left(\frac{1}{mM} \right)$	$\frac{1}{v} \left(\frac{3 \min}{\mu mol} \right)$	$\frac{v}{[S]} \left(\frac{\mu mol}{M \cdot 3 \min} \right) \cdot 10^{-3}$	$\frac{[S]}{v} \left(\frac{M \cdot 3 \min}{\mu mol} \right) \cdot 10^3$
$M \cdot 10^3$ NMN	μmol NAD^+ (za 3 min sa 1mg enzima)				
0,138	0,148	7,25	6,76	1,07	0,93
0,220	0,171	4,55	5,85	0,78	1,29



Slika 4.16 Zavisnost početnih brzina od početnih koncentracija supstrata

0,291	0,234	3,44	4,27	0,81	1,25
0,560	0,324	1,79	3,09	0,58	1,73
0,766	0,390	1,31	2,56	0,51	1,96
		0,68	2,03	0,34	2,96

Grafičko rešenje problema dato je na slici 4.17 (A, B, i C).



Slika 4.17 Grafičko rešenje problema: Lineweaver-Burk-ova metoda (A), Hanes-ova metoda (B) i Woolf-ova metoda (C)

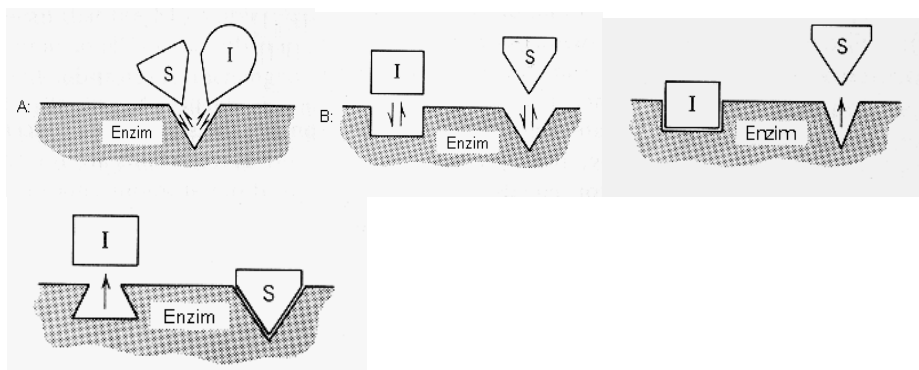
4.4 Inhibicija enzima

Svaka supstanca koja smanjuje brzinu enzimom katalizovane reakcije može da se smatra inhibitorom. Inhibicija enzima malim molekulima ili jonima predstavlja važan kontrolni mehanizam u ćeliji. Mnogi lekovi i toksični agensi deluju kao inhibitori određenih enzima. Izučavanjem inhibicije enzima dolazi se do saznanja o mehanizmu dejstva enzima. Inhibicija enzima može da bude reversibilna ili ireversibilna. U prvom slučaju inhibitor može da se na neki način odstrani, dok se u drugom slučaju inhibitor vezuje kovalentno ili tako čvrsto da je disocijacija vrlo spora (primer nervnih bojnih otrova koji ireversibilno inhibiraju holinesterazu). Ireversibilna inhibicija se karakteriše brzinom inhibicije, a reversibilna konstantom disocijacije enzim-inhibitor "kompleksa" (K_i). Postoje četiri osnovna tipa reversibilne inhibicije: *kompetitivna*, *nekompetitivna*, *protiv-* ili *antikompetitivna* i *mešovita*. O kojem se tipu inhibicije radi zaključuje se isključivo na osnovu kinetičkih parametara. Osvrnu'emo se samo na primer kompetitivne inhibicije.

Kompetitivna inhibicija

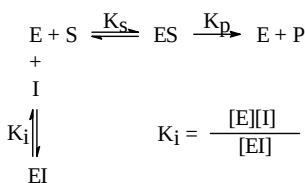
Kompetitivni inhibitor je supstanca koja se vezuje za enzim tako da je vezivanje supstrata sprečeno. Znači, inhibitor i supstrat ne mogu istovremeno da budu vezani za enzim. Inhibitor

može da bude supstanca slična supstratu, tako da njeno vezivanje za aktivni centar enzima onemogućuje vezivanje supstrata. Klasičan primer ove vrste je inhibicija dehidrogenaze ćilibarne kiseline pomoću malonske kiseline. Inhibitor može da se veže za drugi deo molekula enzima izazivajući takvu promenu konformacije da supstrat ne može da se veže za aktivni centar. Ova dva slučaja su šematski prikazana na slici 4.18. Na ovaj način mogu da deluju krajnji ili skoro krajnji proizvodi metabolizma inhibirajući početne enzime u metaboličkom putu ("feedback" inhibicija). Ove supstance se u tom slučaju nazivaju *efektori, modulatori ili regulatori*.



Slika 4.18 Šematski prikaz kompetitivne inhibicije. A: inhibitor je slične strukture kao supstrat. B: inhibitor je različite strukture od supstrata i ne vezuje se sa aktivni centar enzima

Reakciona šema za kompetitivni inhibitor je sledeća:



Pošto su svi procesi reversibilni, V se u prisustvu inhibitora može dostići ukoliko se poveća koncentracija supstrata. Michaelis-Menten-ova jednačina za brzinu reakcije u prisustvu kompetitivnog inhibitora može da se izvede na već ranije opisan način:

$$v = k_p[ES] \quad \frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

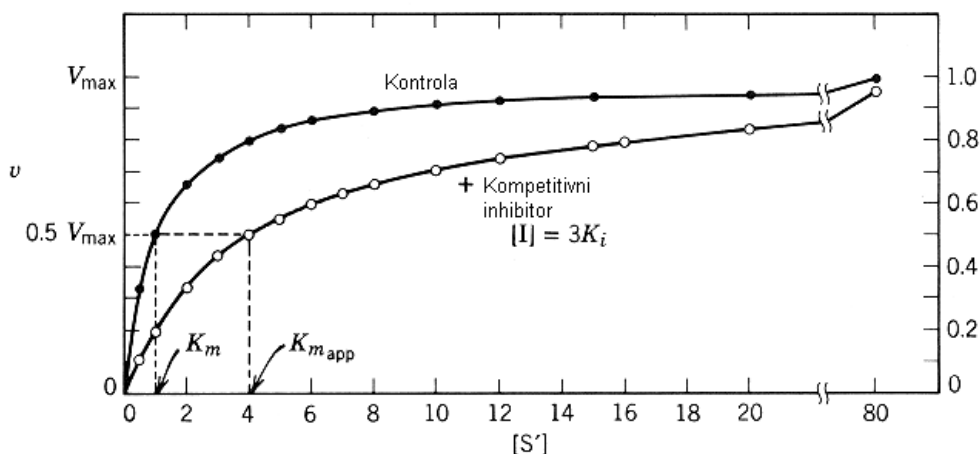
$$[ES] = \frac{[S]}{K_s}[E] \quad [EI] = \frac{[I]}{K_i}[E] \quad \therefore \frac{v}{K_p[E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_s}[E]}{[E] + \frac{[S]}{K_s}[E] + \frac{[I]}{K_i}[E]}$$

$$\therefore \frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

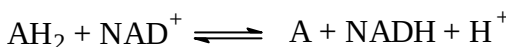
Ova jednačina je grafički prikazana na slici 4.19. Vidimo da se u prisustvu kompetitivnog inhibitora konstanta K_m koju merimo ("apparent") uvećava za faktor $(1 + [I]/K_i)$ dok V ostaje nepromenjeno.



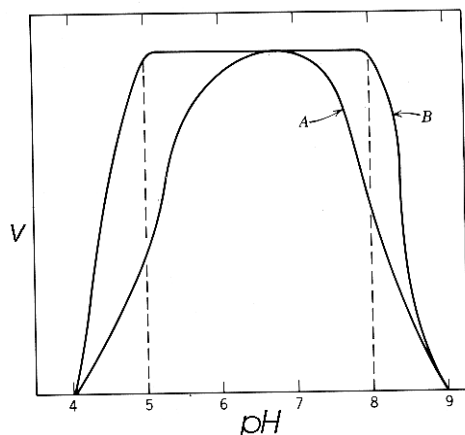
Slika 4.19 Grafičko predstavljanje Michaelis-Menten-ove jednačine za reakciju sa i bez prisustva kompetitivnog inhibitora (Kontrola)

4.5 Uticaj pH na aktivnost enzima

pH rastvora može da utiče na aktivnost enzima na više načine. Protoni mogu da učestvuju u reakciji, ili da kao u primeru dehidrogenaze nastaju u reakciji:



Ukoliko supstrat sadrži grupe koje mogu da disosuju, a koje učestvuju u vezivanju za aktivno mesto na molekulu enzima (ili u katalizi!) aktivnost enzima će zavistiti od pH. pH sredine utiče i na sam enzim. Određivanjem aktivnosti enzima u zavisnosti od pH obično se dobija kriva zvonastog oblika kao u *primeru* sa slike 5-25 A. Sa slike vidimo da je na određenom pH, koje nazivamo optimalnim, brzina najveća. Do smanjenja aktivnosti enzima sa promenom pH dolazi zbog promena u aktivnom centru i (eventualno) zbog njegove denaturacije. Uticaj pH na stabilnost enzima se proverava preinkubiranjem enzima na različitim pH, a zatim, ispitivanjem njegove aktivnosti na optimalnom pH (Slika 4.20, kriva B). Iz primera sa slike 4.20 vidi se da je do denaturacije došlo u oblasti pH 4-5 i 8-9, dok je u intervalu pH 5-8 enzim stabilan. U primerima koji slede podrazumeva se da su ovakva proveravanja urađena. Znači, smanjenje aktivnosti enzima na krivoj A u oblasti pH 4 - 5 i 8 - 9 potiče od denaturacije enzima, a u oblasti pH 5 - 6,8 i 6,8 - 8 od reversibilnih promena u aktivnom centru molekula enzima.



Slika 4.20 Uticaj pH na aktivnost enzima (A). Kriva B predstavlja rezultate određivanja aktivnosti istog enzima na optimalnom pH nakon prethodnog preinkubiranja na pH u intervalu 4 – 9.

Ovo se objašnjava na sledeći način. Pri povišenju pH sve grupe u molekulu datog enzimu koje mogu da disosuju, u zavisnosti od svojih pK_a vrednosti, postaju deprotonovane, a pri smanjenju pH postaju protonovane. Promena jonizacionog stanja grupa koje se nalaze na površini molekula enzima neće uticati na njegovu aktivnost. Ukoliko se u aktivnom centru enzima nalaze ostaci naelektrisanih aminokiselina koje treba da su u određenom (protonovanom ili neprotonovanom obliku) obliku da bi enzim bio aktivan, pH sredine će uticati na aktivnost enzima, a efekat će biti izražen u oblasti $pH = pK_a \pm 1$.

Primer:

Neka aktivnost enzima kontrolišu dva aminokiselinska ostatka u aktivnom centru enzima (A_1 i A_2), od kojih A_1 treba da bude u deprotonovanom, a A_2 u protonovanom A_2H^+ obliku, i neka je $pK_a(A_1) = 5,5$ i $pK_a(A_2) = 8,0$. Iz Henderson-Hasselbach-ove jednačine može da se izračuna koncentracija aktivnog oblika ovih aminokiselinskih ostataka na bilo kojem pH. Na pH 4,5 A_1 i A_2 će biti protonovane ($A_1 + H^+ \rightleftharpoons A_1H^+$) i stoga enzim neće biti aktivan. Pri povišenju pH koncentracija A_1 raste u odnosu na $[A_1H^+]$ i aktivnost enzima se povećava. Kada je $pH = pK_a(A_1) = 5,5$ biće i $[A_1] = [A_1H^+]$ tako da će brzina enzimske reakcije biti jednaka polovini brzine na optimalnom pH. Pri daljem povišenju pH, aktivnost će rasti sve do pH 6,8 kada će istovremeno $[A_1]$ i $[A_2H^+]$ biti najveće. Pri daljem povećanju pH počinje neutralizacija A_2H^+ ($A_2H^+ + OH^- \rightleftharpoons A_2 + H_2O$) i pošto će koncentracija A_2H^+ opasti i aktivnost enzima će se smanjiti. Kada se dostigne $pH = pK_a(A_2) = 8$ brzina će ponovo biti jednaka polovini maksimalne brzine (na optimalnom pH), a pri daljem povećanju pH aktivnost enzima će se još više smanjiti.

Iz primera sa slike 4.20 vidi se kako se kriva zavisnosti brzine enzimske reakcije od pH može svesti na titracionu krivu aminokiselinskih ostataka koji se nalaze u aktivnom centru molekula enzima. Na osnovu dobijenih pK_a vrednosti možemo da pretpostavimo koji se aminokiselinski ostaci nalaze u aktivnom centru enzima što je vrlo važan podatak za proučavanje enzimskog mehanizma, pa i strukture datog enzima. Napominjemo da se na ovaj način dobijaju samo

orijentacione vrednosti za pK_a aminokiselinskih ostataka u aktivnom centru enzima i da su mogući i pogrešni zaključci. Da bismo došli do pouzdanijih vrednosti primenjujemo složeniji postupak u koji nećemo zalaziti

Eksperimentalni postupak za ispitivanje uticaja pH na aktivnost enzima sastoji se u tome da se za svako pH nađu vrednosti K_m i V . Ako se K_m menja sa pH znači da se u slobodnom enzimu nalaze grupe koje kontrolišu vezivanje supstrata: tada će K_m da raste i na većim i na manjim pH od optimalnog. Ako se sa promenom pH istovremeno menja i K_m i V , znači da se u enzim-supstrat kompleksu nalaze grupe koje kontrolišu vezivanje supstrata i oslobađanje proizvoda: K_m će u ovom slučaju biti manja od vrednosti koja odgovara optimalnom pH. Ako se sa promenom pH, K_m malo ili uopšte ne menja, a V se menja, znači da se i u enzimu i u enzim-supstrat kompleksu nalaze grupe koje mogu da jonizuju, ali se njihove pK_a vrednosti ne menjaju mnogo pri vezivanju supstrata.

4.6 Određivanje (aktivnosti) enzima (“enzyme assay”)

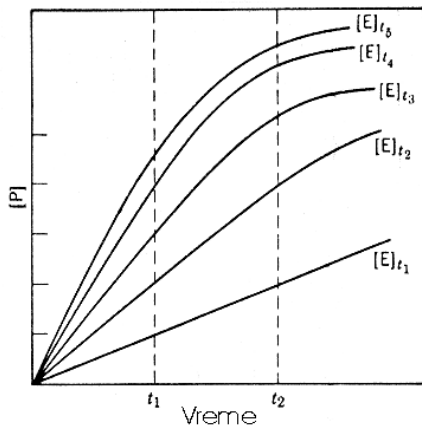
Vrlo često se u biohemijskoj praksi javlja potreba da se odredi (izmeri) količina datog enzima u uzorku. Uzorak može da bude komercijalni preparat enzima ili preparat enzima koji smo sami izolovali i prečistili. Enzimski preparati pored datog enzima mogu da sadrži i druge proteine i/ili druge sastojke, uključujući i soli i supstance dodate za stabilizaciju enzima. U biohemijskoj/biomedicinskoj praksi se često javlja potreba da se odredi količina određenog enzima u uzorcima kao što su na primer telesne tečnosti (serum/plazma, cerebrospinalna tečnost), eritrociti ili (u radu sa eksperimentalnim životinjama) homogenizati raznih tkiva. Naravno, u ovim uzorcima su pored datog proteina prisutne na stotine/hiljade raznih drugih proteina i enzima. Enzimi su vrlo retko prisutni u biološkom materijalu u tako visokim koncentracijama da bi se mogli odrediti na primer gel elektroforezom (primer karbonske anhidraze u eritrocitima). Čak i primenom mnogo osetljivijih, imunohemijskih metoda koje se zasnivaju na interakciji datog enzima sa odgovarajućim antitelom nije uvek moguće detektovati (a time i odrediti) dati enzim. Pored toga primenom navedenih metoda nećemo uvek dobiti zadovoljavajuće/pouz dane rezultate. Na primer ukoliko je u sistemu prisutan inhibitor, zbog čega će aktivnost datog enzima biti znatno smanjena, primenom navedenih metoda to nećemo detektovati. Isto tako, ukoliko je pri stajanju došlo do denaturacije/inaktivacije enzima primenom imunohemijskih tehnika ćemo dobiti vrednost koja se neće razlikovati od prvobitne. Genetske bolesti mogu da dovedu do izmene samo nekih aminokiselinskih ostataka u datom enzimu što neće bitno uticati na prepoznavanje enzima antitelima u imunohemijskom određivanju, ali može znatno da utiče na aktivnost enzima. *Zbog svega navedenog određivanje enzima se u biohemijskoj praksi vrši na osnovu određivanja njegove aktivnosti. Ovo određivanje se zasniva na činjenici (koja proizilazi iz enzimске kinetike) da je pri ma kojoj koncentraciji supstrata početna brzina enzimom katalizovane reakcije proporcionalna koncentraciji prisutnog enzima.* Podsetimo se da je za bilo koju koncentraciju supstrata, početna brzina data izrazom:

$$v = \frac{[S]V_{\max}}{K_m + [S]} = \frac{[S]k_p[E]_t}{K_m + S} = \frac{k_p}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}[E]_t$$

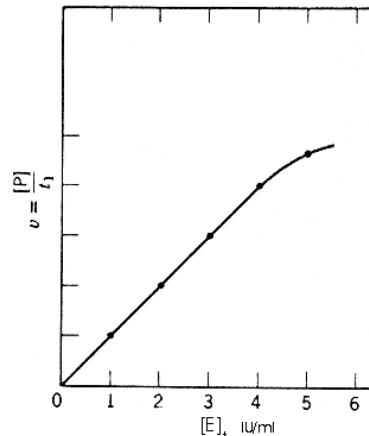
Kao što vidimo v je uvek proporcionalno koncentraciji enzima i zato ova veličina može da se koristi za određivanje enzima prisutnog u uzorku (veća brzina – veća količina prisutnog enzima!). Treba istaći da je odnos između v i koncentracije enzima linearan samo ukoliko merimo stvarno početnu brzinu. Pošto v zavisi i od $[S]$ period merenja mora biti kratak tako da se obezbedi da manje od 5% supstrata izreaguje. Ovo se (lako) postiže kao što ćemo videti ako se merenje vrši sa koncentracijama supstrata iz oblasti V_{max} !!!

Početna brzina kao funkcija $[E]$

Pri određivanju enzimске aktivnosti može da se koristi ili brzina nestajanja supstrata ili brzina nastajanja proizvoda. Obično je lakše meriti nastajanje (malih) količina proizvoda, nego (malo) smanjenje koncentracije supstrata u prisustvu velike polazne koncentracije supstrata!!! Slika 4.21 pokazuje kako izgleda merenje nastalog proizvoda za različite koncentracije enzima, a pri istoj koncentraciji supstrata. Za izračunavanje početne brzine uzimaju se samo linearni delovi krivih (na primeru sa slike 4.21, do t_1). Brzina će tada biti $[P]/t_1$. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije enzima prikazana je na slici 4.22. Ta zavisnost je u našem primeru linearna za sve koncentracije enzima koje su manje od koncentracije $[E]_{t4}$, što znači da ukoliko uzmemo koncentracije enzima koje su veće od $[E]_{t4}$ zavisnost neće biti linearna u bilo kojem vremenskom intervalu t . Tako, prva stvar koju treba uraditi pri određivanju enzima ili u kinetičkim studijama uopšte, je utvrditi opseg linearnosti, odnosno utvrditi maksimalne koncentracije proizvoda koje mogu da se akumuliraju pre nego što odnos $[P]$ naspram t , kao i v naspram $[E]$ postane nelinearan.



Slika 4.21 Određivanje enzima: nastajanje proizvoda u funkciji od vremena pri različitim koncentracijama enzima



Slika 4.22 Određivanje enzima: početna brzina (kao $[P]/t$) u funkciji od koncentracije enzima

Enzimске jedinice i specifična aktivnost enzima: određivanje $[E]$

Iz napred izloženog smo videli da se količina aktivnog enzima prisutnog u nekom uzorku može izraziti jedino preko njegove aktivnosti. Do 1960-tih svaki autor je definisao način izražavanja aktivnosti enzima. Da bi se nekako standardizovalo izražavanje aktivnosti enzima Internacionalna Unija za Biohemiju (IUB) je 1964, definisala standardnu, internacionalnu, jedinicu:

Jedna internacionalna jedinica (IU, ili samo U od engl. "International Unit") enzima je ona količina enzima koja katalizuje nastajanje 1 μ mola proizvoda u minuti pod definisanim uslovima (primenjenim u datom eseju).

Važno je imati u vidu da će dobijena vrednost za aktivnost enzima zavistiti od primenjenih uslova pri merenju/eseju (na primer prisustva aktivatora, pH pufera, temperature, supstrata koji se koristi za određivanje aktivnosti). Zbog toga je izuzetno važno da se uslovi merenja (eseja) tačno navedu, ili ako se koristi metoda opisana u literaturi da se postupak pažljivo reprodukuje, uz navođenje odgovarajuće literature.

Specifična aktivnost preparata enzima se izražava kao broj jedinica po miligramu proteina. Što je preparat enzima čistiji to će biti veća njegova specifična aktivnost (do granice koja odgovara potpuno čistom enzima. Koncentracija enzima u rastvoru se izražava kao broj jedinica/ml. Pošto v zavisi od $[S]$ i $[E]$, pH, jonske sile rastvora, temperature i slično, dati preparat bi mogao da ima beskonačan broj specifičnih aktivnosti. Zbog toga se specifična aktivnost obično izražava pri optimalnim uslovima, na određenoj temperaturi (25, 30 ili 37°C) i u prisustvu zasićujućih koncentracija supstrata (kada je $v = V_{max}$).

Katal (nova jedinica predložena za aktivnost enzima) je ona količina enzima koja katalizuje prelazak 1 mola supstrata u proizvod u jednoj sekundi. 1 IU = 1/60 μ katala = 16,67 nkatala. Jedan katal = $6 \cdot 10^7$ IU. Molarna aktivnost enzima se izražava kao broj katala po molu proteina i ima dimenzije s^{-1} .

Broj ciklusa - prometni broj (engl. "turnover number") predstavlja broj mola supstrata koje transformiše 1 mol enzima u minuti pod optimalnim uslovima. Kod oligomernih enzima definiše se i aktivnost katalitičkog centra, koja predstavlja broj mola supstrata koje transformiše 1 mol aktivnog centra u minuti pod optimalnim uslovima:

$$K_p = V/[E] = \mu\text{mol (S} \rightarrow \text{P)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} / \mu\text{mol(E)} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{broj ciklusa (min}^{-1}\text{)}$$

Katalitička konstanta, k_p varira od 50 do 10^6 min^{-1} . Najveći broj ciklusa ima karbonska anhidraza: $36 \cdot 10^6 / \text{min}$. Recipročna vrednost ove veličine predstavlja vreme potrebno za jedan katalitički ciklus. Za karbonsku anhidrazu to vreme iznosi 1,7 μ sekundi.

Primer :

Jedan mikrogram čistog enzima ($M_m = 92\,000$ daltona) katalizuje reakciju brzinom od 0,50 μ mola u min pod optimalnim uslovima. Izračunati: (a) specifičnu aktivnost enzima u IU/mg proteina i IU/molu; (b) broj ciklusa, i (c) vreme trajanja jednog ciklusa.

(a) Specifična aktivnost =

$$\frac{V_{\max}}{\text{mg}} = \frac{0,5 \mu\text{mol} / \text{min}}{10^{-3} \text{mg}} = 500 \text{ IU} / \text{mg proteina}$$

$$= (5 \cdot 10^5 \text{ IU} / \text{g proteina}) (9,2 \cdot 10^4 \text{ g} / \text{mol}) = 4,6 \cdot 10^{10} \text{ IU} / \text{mol enzima}$$

(b) Broj ciklusa = $(4,6 \cdot 10^{10} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol enzima}^{-1}) \cdot (10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}) = 4,6 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1}$

$$\text{ili } 1 \mu\text{g} = \frac{10^{-6} \text{ g}}{9,2 \cdot 10^4 \text{ mol / g}} = 1,09 \cdot 10^{-11} \text{ mola enzima}$$

$$\text{Broj ciklusa} = k_p = \frac{V_{\max}}{[E]_t} = \frac{0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol S} \rightarrow \text{P / min}}{1,09 \cdot 10^{-11} \text{ mol enzim}} = 4,6 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1}$$

$$(c) \text{ Vreme potrebno za jedan ciklus} = 1 / 4,6 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} = 2,17 \cdot 10^{-5} \text{ min}$$

Određivanje aktivnosti i izolovanje i prečišćavanje enzima

Kod prečišćavanja enzima vodi se računa o **stepenu prečišćenosti** (o čemu se zaključuje na osnovu povećanja specifične aktivnosti prečišćenog u odnosu na neprečišćen preparat) i o **prinosu** enzima (o čemu govori *ukupna* aktivnost prečišćenog u odnosu na *ukupnu* aktivnost neprečišćenog preparata). Eksperimentalne uslove podešavamo prema tome da li želimo čist preparat u nižem prinosu ili pak želimo veći prinos na račun čistoće preparata. Jedan od načina za proveravanje homogenosti (čistoće) izolovanog enzima je poredjenje hromatograma dobijenog na osnovu merenja apsorbance frakcija eluiranih sa kolone sa hromatogramom koji je dobijen na osnovu određivanja aktivnosti enzima u eluiranim frakcijama. Uzorak je homogen, ukoliko se odgovarajući pik na hromatogramu dobijen na osnovu merenja apsorbance, poklapa (simetričan je) sa pikom dobijenim na osnovu merenja aktivnosti. Specifična aktivnost kroz ceo pik treba da je istovetna.

Primer:

Sirovi ćelijski ekstrakt skeletnih mišića sadrži 32 mg/ml proteina. Pod standardnim, optimalnim uslovima, 10 μL ekstrakta katalizuje reakciju brzinom od 0,14 $\mu\text{mol/min}$. Količina od 50 ml ekstrakta je frakcionisana taloženjem sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frakcija koja se taložila između 20 i 40% zasićenja (Odeljak 4-1) ponovo je rastvorena u 10 ml pufera. Ovaj rastvor je sadržavao 50 mg/ml proteina. Deset μL ove prečišćene frakcije katalizovalo je reakciju brzinom od 0,65 $\mu\text{mol/min}$. Izračunati prinos i stepen prečišćenosti postignut pri frakcionisanju.

Sirovi ekstrakt sadrži $(0,14 \mu\text{mol/min}) / 0,01 \text{ ml} = 14 \text{ IU/ml}$. $14 \text{ IU/ml} \cdot 50 \text{ ml}$ ukupne zapremine = 700 IU ukupno.

Količina proteina = 32 mg/ml proteina $\cdot$ 50 ml ukupne zapremine = 1600 mg proteina.

Specifična aktivnost sirovog ekstrakta je:
 $(14 \text{ IU/ml}) / (32 \text{ mg/ml proteina}) = 0,4375 \text{ IU/mg proteina}$.

Prečišćena frakcija sadrži: $(0,65 \mu\text{mol/min}) / 0,01 \text{ ml} = 65 \text{ IU/ml}$, ili ukupno 650 IU u 10 ml.

Količina proteina = 50 mg/ml $\cdot$ 10 ml = 500 mg proteina u prečišćenoj frakciji.
 Specifična aktivnost prečišćene frakcije je: $(65 \text{ IU/ml}) / (50 \text{ mg/ml proteina}) = 1,30 \text{ IU/mg proteina}$.

Prinos = $(650/700) \cdot 100\% = 93,8\%$ Stepen prečišćenosti = $(1,30/0,4375) = 2,97$.

4.7 Sigmoidna kinetika

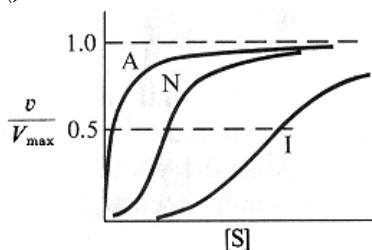
Mnogi enzimi imaju oligomernu strukturu, što znači da se sastoje iz više sub-jedinica ili monomera. Sub-jedinice mogu biti iste strukture tako da svaka poseduje katalitički centar. Vezivanje supstrata za jedan centar nema uticaja na vezivanje sledećih molekula supstrata za susedne centre. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata biće predstavljena hiperbolom kao kod klasične Michaelis-Menten-ove kinetike. Samo na osnovu kinetičkih merenja neće se moći utvrditi da li se radi o jednom enzimu sa n aktivnih centara ili o n molekula enzima sa po jednim aktivnim centrom. Iako nema interakcije između aktivnih centara izolovani monomeri su česti neaktivni.

Kod alosternih enzima, koji se takođe sastoje iz više subjedinica, vezivanje supstrata ili efektora za jedan centar utiče na vezivanje sledećih molekula supstrata za susedne centre ili pak na brzinu nastajanja proizvoda na susednim centrima. Do ovih efekata dolazi usled toga što vezivanje svakog molekula supstrata izaziva strukturne promene u molekulu enzima usled kojih se povećava afinitet susednih aktivnih centara prema molekulima supstrata. Ova pojava je slična dobro poznatom primeru vezivanja kiseonika za hemoglobin. Objašnjenje pojave alosterije na molekulskom nivou vrlo je složeno te se čitalac za dodatna obaveštenja upućuje na savremene udžbenike iz biohemije.

Kinetika alosternih enzima *ne odgovara* Michaelis-Menten-ovoj. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata kod ovih enzima predstavljeno je *sigmoidnom krivom* te se ova kinetika i naziva *sigmoidna kinetika*. Sigmoidna kriva (Slika 4.23) je karakteristična za **kooperativno vezivanje liganada** za protein koji ima više centara vezivanja. Na ovaj način se ponašaju takozvani regulatori ili kontrolni enzimi u metaboličkim procesima. Njihova aktivnost se menja pod uticajem "feedback" inhibicije ili aktivacije. Naziv alosteran (grčki $\alpha\lambda\omicron\sigma$ = drugi, $\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\omicron\sigma$ = prostor) potiče otuda što efektori (aktivatori i inhibitori), iako se vezuju na drugom, a ne u aktivnom centru enzima, utiču na njegovu aktivnost. Brzina reakcije kod alosternih enzima može da se izrazi Hill- jednačinom:

$$v = \frac{[S]^m V_{\max}}{[S]^m + K'} \quad \frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]^m}{[S]^m + K'}$$

gde je m = Hill-ov koeficijent koji govori o stepenu kooperativnosti. Kada je $m = 1$, Hill-ova jednačina prelazi u Michaelis-Menten-ovu (m predstavlja i broj centara na enzimu koji vezuju supstrat). K' se razlikuje od Michaelis-ove konstante, jer kada je koncentracija supstrata tolika da je $v = 1/2V$ tada će K' biti $(S)^m$.



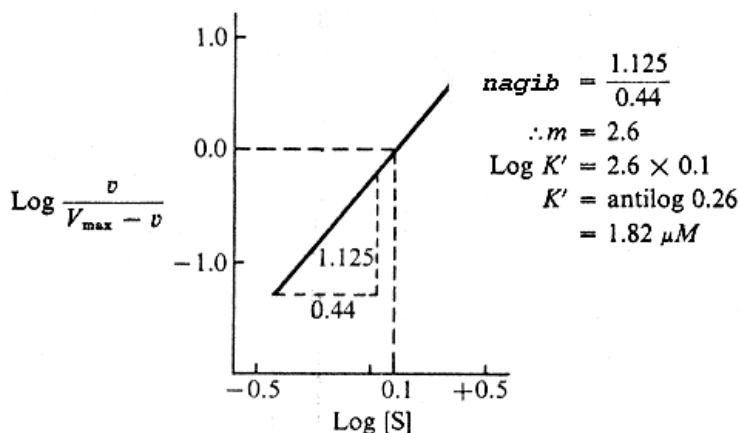
Slika 4.23 Sigmoidna kinetika: (samo) u prisustvu supstrata (N); u prisustvu aktivatora (A); u prisustvu inhibitora (I)

¹¹ R.Hill, *Proc.Roy.Soc.B100* (1925) 419.

Sa slike 4.23 se vidi potencijalna prednost sigmoidne u odnosu na Michaelis-Menten-ovu kinetiku. Za koncentraciju supstrata od 1 brzina kod hiperbole iznosi $v = 0,8 \cdot V$, dok kod sigmoidne krive iznosi samo $0,2 \cdot V$. Ali, da bi se brzina povećala sa $0,2V$ na $0,8V$ kod hiperbole je potrebno povećati koncentraciju supstrata 10 puta ($S_{0,8}/S_{0,2} = 1/0,1$), dok se kod sigmoidne kinetike isto povećanje brzine postiže porastom koncentracije supstrata od svega 2,8 puta ($S_{0,8}/S_{0,2} = 2,8/1$). Znači, kod sigmoidne kinetike može da se postigne osetljivija kontrola brzine reakcije (sa manjim promenama koncentracije supstrata) nego što je to slučaj kod Michaelis-Menten-ove kinetike. Parametri m i K' iz Hill-ove jednačine nalaze se na sledeći način:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = m \log[S] - \log K'$$

Ako predstavimo zavisnost $\log(v/V-v)$ od $\log[S]$ dobićemo pravu kao na slici 4.24.



Slika 4.24 Linearni oblik Hill-ove jednačine

Alosterni aktivator (pozitivni efektor) je supstanca (ligand) koja utiče na smanjenje vrednosti S_0 i tako približava sigmoidnu, klasičnoj Michaelis-Menten-ovoj kinetici. Alosterni inhibitor (negativni efektor) je supstanca koja deluje obrnuto povećavajući K' , tako da kriva dobija sve izraženiji sigmoidni karakter (Slika 4.23).

4.8 ZADACI I PROBLEMI

- Alanin-racemaza katalizuje prelazak L-alanina u D-alanin. Brzina reakcije je merena na osnovu brzine stvaranja D-alanina tokom jednog eksperimenta. Dobijeni su sledeći podaci:

D-alanin (mmol/l)	Vreme (min)
4,06	0,5
5,94	1,0
8,05	2,0

9,10	3,0
9,55	4,0
9,80	
ravnoteža	

Koja je početna brzina?

2. Reakcija izomeraze je praćena određivanjem apsorbance u datim vremenskim intervalima. Apsorbanca je proporcionalna koncentraciji proizvoda reakcije. Kolika je početna brzina u eksperimentu čiji su podaci dati u sledećoj tabeli?

Apsorbanca	Vreme (min)
0,00	0
0,46	1
0,74	2
0,89	3
0,97	4
1,00	5
1,07	10
1,10	
ravnoteža	

3. Ako su početne brzine merene u $\mu\text{mol/min}$ a koncentracije supstrata u mmol/L , u kojim jedinicama treba obeležiti ose $1/v$, $1/[S]$, $[S]/v$, i $v/[S]$?

4. Brzina dekarboksilacije β -keto kiselina pri različitim koncentracijama supstrata određivana je na osnovu brzine izdvajanja CO_2 . Izračunati iz sledećih podataka K_m i V primenom dve grafičke metode:

Konc. keto-kiseline	
$(\mu\text{mol CO}_2 / 2 \text{ min})$	(mM)
0,588	2,500
0,500	1,000
0,417	0,714
0,370	0,526
0,256	0,250

5. Početne brzine nastajanja kiseline pri hidrolizi različitih koncentracija estera date su u tabeli. U svaku probu je dodato po 1,3 mg esteraze. Količina kiseline je merena automatskom titracijom sa 0,01 M NaOH na konstantnom pH. Odrediti K_m i V . Kolika je specifična aktivnost enzima?

Na OH (μl dodato u prvoj min): 500 400 333 278 196

Koncentracija estra (u mM): 5,00 1,43 0,83 0,59 0,31

6. Odnos između koncentracije supstrata i v za neku reakciju $S \rightleftharpoons P$ dat je u tabeli. Izračunati K_m , V , i konstantu brzine prvog reda za datu koncentraciju enzima.

[S] M $^1 \cdot \text{min}^{-1}$)	v (nmol $\cdot\text{l}^{-1}$
$2,50 \cdot 10^{-6}$	24
$3,33 \cdot 10^{-6}$	30
$4,0 \cdot 10^{-6}$	34
$5 \cdot 10^{-6}$	40
$1 \cdot 10^{-5}$	60
$2 \cdot 10^{-5}$	80
$4 \cdot 10^{-5}$	96
$1 \cdot 10^{-4}$	109
$2 \cdot 10^{-3}$	119
$1 \cdot 10^{-2}$	120

7. Enzim katalizuje reakciju $S \rightleftharpoons P$. Maksimalna brzina stvaranja proizvoda je $V = 22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, a maksimalna brzina reversne reakcije je $V = 14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. U kom smeru i kojom brzinom će reakcija teći ako je $[S] = 2 K_{ms}$, a $[P] = 7 K_{mp}$?

8. Tkivo jetre embriona sadrži enzim koji katalizuje reakciju $S \rightarrow P$. Jetra odraslih organizama takođe sadrži enzim koji katalizuje istu reakciju. Kinetički podaci su dati u sledećoj tabeli. Da li se radi o istom enzimu?

S ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (M)	Početna E_1	brzina E_2
$1,67 \cdot 10^{-5}$	1,05	5,00
$2,5 \cdot 10^{-5}$	1,54	6,66
$3,33 \cdot 10^{-5}$	1,98	8,00
$5,0 \cdot 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0 \cdot 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0 \cdot 10^{-4}$	5,00	13,33
$1,5 \cdot 10^{-4}$	6,67	15,0
$1,67 \cdot 10^{-4}$	7,15	15,4
$2,0 \cdot 10^{-4}$	8,00	16,0
$3,0 \cdot 10^{-4}$	10,00	17,1

E_1 = podaci za ekstrakt jetre odrasle osobe.

E_2 = podaci za ekstrakt jetre embriona.

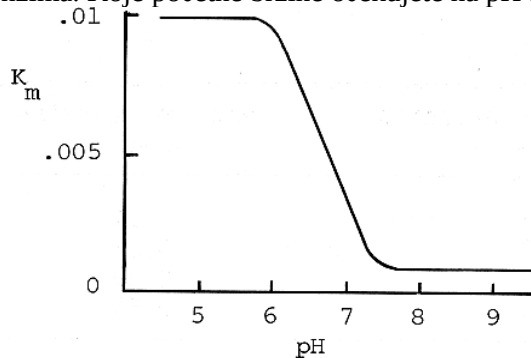
9. Pri ozbiljnom oštećenju jetre enzim E_1 iz prethodnog zadatka prelazi i u krv. Posle intenzivnog vežbanja, u krvi se nalazi enzim E_3 koji potiče iz mišića i koji katalizuje istu reakciju. Analizom enzima u uzorku krvi bolesnika koji je u nesvesti dobijeni su sledeći podaci:

[S] (M) seruma ⁻¹ ·min ⁻¹	v μmol·ml
$5 \cdot 10^{-5}$	43
$7 \cdot 10^{-5}$	57
$1 \cdot 10^{-4}$	75
$1,5 \cdot 10^{-4}$	100
$2 \cdot 10^{-4}$	120
$3 \cdot 10^{-4}$	150
$6 \cdot 10^{-4}$	200

Da li bolesnik pati od oštećenja jetre ili je samo preterano mnogo vežbao?

10. (a) Kolika treba da je koncentracija kompetitivnog inhibitora da bi se postiglo 75% inhibicije pri koncentraciji supstrata od $1,5 \cdot 10^3$ M, ako je $K_m = 2,9 \cdot 10^4$ M, i $K_i = 2 \cdot 10^5$ M. (b) Kolika treba da je koncentracija supstrata da bi se dostigla prvobitna aktivnost enzima?

11. Enzim katalizuje reakciju $A \rightarrow B$. Utvrđeno je da pH nema uticaja na V, ali utiče na K_m (videti sliku). $V = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$. Određivanje je vršeno u prisustvu 0,01 M supstrata i 1 μg enzima. Koje početne brzine očekujete na pH 5,7 i 7,7? Objasnite odgovor.



12. Brzina hidroliza p-nitrofenilacetata direktno je proporcionalna $[H^+]$. Kolika je brzina hidrolize na pH 6 u odnosu na brzinu na pH 8?

13. Supstrat za neki enzim je A^- jon slabe kiseline ($pK_a = 4,5$). Aktivni centar enzima sadrži ostatak His ($pK_a = 6,5$) koji mora da bude protonovan da bi enzim bio aktivan. Koliko je optimalno pH za ovu enzimsku reakciju?

14. Aktivni centar esteraze (E) sadrži ostatak kisele i bazne aminokiseline. Supstrat se vezuje samo za oblik $HN-E-COO^-$. pK_a vrednosti ovih aminokiselinskih ostataka su 4,0 i 7,0. Koliko je optimalno pH za ovu enzimsku reakciju?

15. Ćelijski ekstrakt *E.coli* sadrži 24 mg/ml proteina. 20 μL ovog ekstrakta dodatog u 0,1 ml rastvora katalizuje ugrađivanje glukoze- C^{14} iz glukozo-1-fosfata- C^{14} u glikogen brzinom od 1,6 nmola/min. Izračunati brzinu reakcije u (a) $\mu\text{mol}/\text{min}$, (b) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, (c) $\mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, (d) IU/ml, i (e) IU/mg proteina.

16. Ćist enzim ima specifičnu aktivnost 120 IU/mg proteina. Izračunati broj ciklusa (“prometni broj”) i vreme potrebno za jedan ciklus (molekulska masa enzima 360 000 daltona).

17. Koliko jedinica (IU) heksokinaze treba dodati u 1 ml reakcione smeše da bi reagovalo 95% od $8\cdot 10^3$ M glukoze u 25 minuta? ($K_m = 4,7\cdot 10^4$ M) Koliko bi vremena bilo potrebno da jedna jedinica (IU) izvrši transformaciju iste količine glukoze?

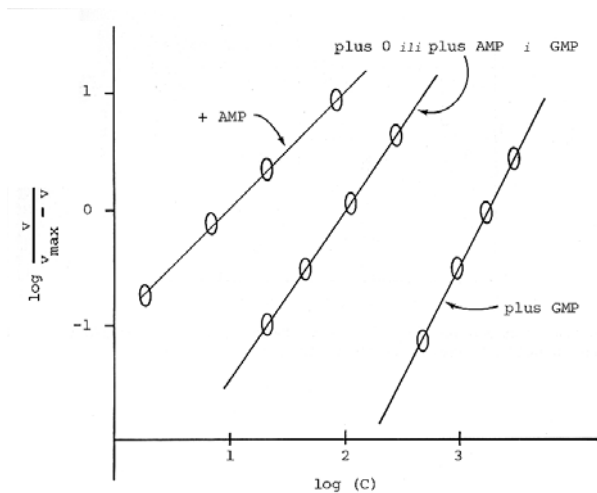
18. Za neku reakciju katalizovanu enzimom dobijeni podaci su prikazani u tabeli. Odrediti kojoj kinetici pripada ova reakcija i izračunati odgovarajuće kinetičke konstante.

Početna koncentracija supstrata ($\text{M}\cdot 10^4$)	Početna brzina ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
6,25	1,54
12,5	5,88
25,0	20,0
50,0	50,0
100,0	80,0
200,0	94,12
400,0	98,46
800,0	99,61

19. Dehidrogenaza katalizuje reakciju redukcije supstrata S sa NADH. Početne brzine reakcije određene preko promene apsorbance na 340 nm date su u sledećoj tabeli. V_{max} je 10 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Koji je ovo tip kinetike? Izračunati odgovarajuće konstante.

[S] μM	v $\mu\text{mol}/\text{min}$
1,0	0,10
2,0	0,74
3,0	2,13
6,0	6,84
8,0	8,37

20. Enzim katalizuje reakciju $\text{C}\rightarrow\text{D}$. Hill-ove prave za brzine dobijene u prisustvu i u odsustvu AMP i GMP date su na sledećoj slici.



Šta se može zaključiti iz ovih pravih? Ako se enzim brzo inkubira na 70°C pa zatim ohladi, uticaj GMP na kinetiku reakcije prestaje. U analitičkoj centrifugi su dobijeni sledeći sedimentacioni koeficijenti za enzim:

Enzim + AMP	
Čist enzim	8,0 S
Enzim zagrejan na 70° C + GMP	3,3 S
Enzim + GMP	3,3 S

Dati objašnjenje za opisane rezultate.

21. U prvoj koloni u sledećoj tabeli dati su podaci određivanje enzima u sirovom homogenizatu, a u drugoj, podaci za isti enzim koji je prethodno više puta taložen sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Objasniti i interpretirati ove rezultate.

Koncentracija Početna brzina supstrata (mM)	1	2
1	0,2	0,002
4	0,5	0,01
20	0,83	0,10
40	0,91	0,40
80	0,95	0,90
100	0,96	
0,96		

VEŽBA: Osnovno o kinetici enzima

CILJ ove (teorijske) vežbe je da ovladate (na nivou razumevanja) enzimima i to posebno kinetikom enzima.

PRIPREMA: Pre početka vežbe proraditi materijal sa predavanja i prethodno poglavlje o enzimima iz ovog praktikuma. Konsultovati (po želji) i predloženu literaturu u okviru predavanja i/ili druge knjige iz biohemije po izboru. Ponoviti (po potrebi) osnovne pojmove iz kinetike i teorije prelaznog stanja iz kurseva fizičke odnosno organske hemije. Pripremiti pitanja koja treba sa asistentom i predmetnim nastavnikom razjasniti.

ZADATAK: Ponoviti osnovne pojmove iz kinetike (početna brzina, odnos konstante brzine i energije aktivacije), teorije prelaznog stanja (pojam, primeri), katalize hemijske reakcije (stabilizacija prelaznog stanja. Upoznati se sa osnovama, enzimске kinetike (izvođenje MM kinetike, određivanje osnovnih parametara MM kinetika, inhibitori), teorije enzimске katalize, principima sigmoidne kinetike. Samostalno rešavati (jednostavne) zadatke i probleme iz ove oblasti.

U belim sveskama ukratko rezimirajte pitanja i odgovore koje ste razmatrali. Unesite zadatke koje ste na vežbama (i za domaći zadatak-ako ga bude!) rešavali.

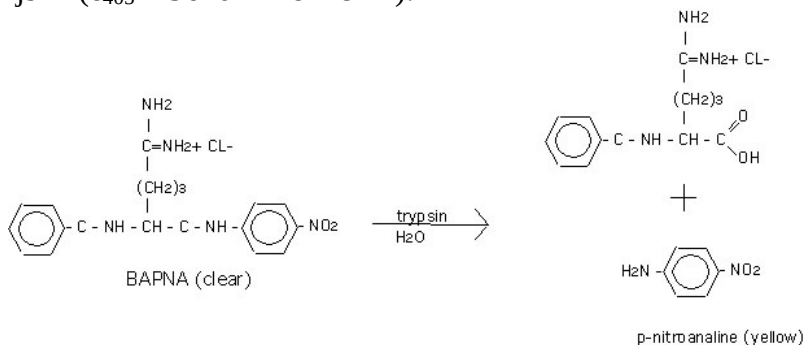
VEŽBA: Određivanje aktivnosti enzima

U okviru ove vežbe ćete se upoznati sa principima određivanja aktivnosti enzima korišćenjem komercijalnog preparata tripsina, a potom ćete odrediti aktivnost enzima u biološkom materijalu i to aktivnost katalaze u eritrocitima i aktivnost laktat dehidrogenaze u serumu.

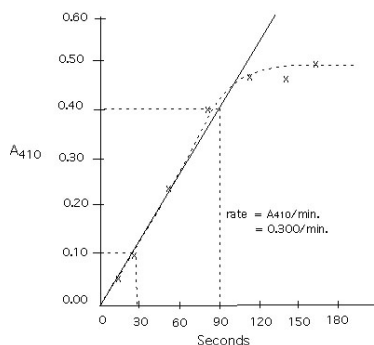
Određivanje aktivnosti tripsina

Tripsin je hidrolitički enzim kojeg luče ćelije pankreasa u formi neaktivnog prekursora (zimogena) tripsinogena, koji u tankom crevu (hidrolizom heksa-peptida sa N-terminalnog kraja tripsinogena) prelazi u aktivni tripsin. Tripsin katalizuje specifično hidrolizu peptidne veze u proteinima na karboksilnom kraju lizina i arginina. Tripsin pripada grupi hidrolitičkih enzima poznatih kao **serin-protease**. Ovi enzimi se tako nazivaju jer u aktivnom mestu sadrže izuzetno (neobično!) aktivan ostatak serina koji je esencijalan za enzimsku aktivnost (Slika 4.26). Serin-protease spadaju u najbolje proučenu familiju enzima, jer su intenzivno izučavane poslednjih 50 godina primenom hemijskih, fizičkih i genetskih tehnika. Tripsin je zajedno sa himotripsinom i elastazom najbolje izučena serin-proteaza. O strukturi i katalitičkom mehanizmu tripsina možete više pročitati u savršenim udžbenicima iz biohemije.

Aktivnost tripsina može da se određuje korišćenjem proteinskih supstrata, kao što je to u starijoj literaturi opisano. Međutim, u novije vreme se aktivnost tripsina (kao i drugih enzima) određuje korišćenjem sintetičkih supstrata. U ovoj vežbi ćete koristiti N^α-Benzoil-DL-arginin-4-nitroanilid hidrohlorid (DL-BAPNA). BAPNA sadrži ostatak arginina, a pri hidrolizi oslobađa p-nitroanilin, žutu supstancu koja može da se meri spektrofotometrijski ($\epsilon_{405} = 9620 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$):



Početna brzina hidrolize BAPNA se određuje na osnovu merenja hidrolize BAPNA u prisustvu tripsina sa vremenom (videti i sliku 4.21):



CILJ ove vežbe je da se upoznate sa elementima enzimske kinetike i principima određivanja enzima.

PRIPREMA: Dobro proučiti gornji Odeljak 4.6 o određivanju aktivnosti enzima i samu vežbu. Upoznati se (u glavnim crtama) sa katalitičkim mehanizmom tripsina (konsultovati sliku 4.26 i udžbenike iz biohemije). Pripremiti pitanja za asistenta/predmetnog nastavnika o onome što nije jasno.

ZADATAK: Odrediti koncentraciju preparata tripsina koja će katalizovati BAPNA sa najpogodnijom brzinom (koncentracija koja će dati A_{410} od oko 0.4 za jednu do dve minute: videti gornju sliku). Da biste to postigli treba da odredite (početne) brzine hidrolize BAPNA sa različitim koncentracijama preparata tripsina. Na osnovu dobijenih podataka odrediti specifičnu aktivnost enzima i uporediti je sa vrednošću datoj na bočici.

Potrebni materijal

40 mM Tris pufer, 50 mM CaCl_2 , pH 8

0.1M BAPNA (87 mg rastvoriti u 2 ml DMSO)

DMSO

Preparat tripsina rastvoren u 1 mM HCl (čuvati na ledu)

(Vodeno kupatilo zagrejano na 37°C)

Spektrofotometar (sa rekorderom ili štoperica)

Postupak

Pripremiti slepu probu, tako što ćete dodati direktno u kivetu dole navedene zapremine rastvora i smešu blago promešati (**pažljivo**) okretanjem kivete:

40 µl rastvora BAPNA

1560 µl Tris pufera

400 µl 1 mM HCl

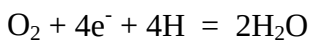
Polazeći od specifične aktivnosti tripsina navedene na bočici **i konsultujući asistenta o tome koliko je dati preparat mogao da izgubi od svoje prvobitne aktivnosti (navedene na bočici)**, pripremite „stok“ rastvora tripsina u najpogodnijoj koncentraciji za ovaj eksperiment. **Odredite koncentraciju proteina u preparatu (Zašto je ovo potrebno proveriti?!)**

Pripremite unapred smešu Tris.HCl pufera (1560 µl) i 1 mM HCl (0 – 380 µl) u kiveti spektrofotometra u koju neposredno pre merenja apsorbance dodajte po 40 µl rastvora BAPNA i rastvora tripsina (400 – 20 µl). Kivetu poklopite i sadržaj kivete pažljivo promešajte okretanjem kivete. Merite apsorbancu u zavisnosti od vremena kao što je napred opisano. Vaš postupak i dobijene vrednosti (ukoliko merenje nije automatsko!) prikazite u tabeli. Prikazite dobijene podatke grafički i na osnovu njih izračunajte početne brzine. Prikazite početne brzine u zavisnosti od koncentracije enzima i odredite specifičnu aktivnost preparata tripsina.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Komentarišite zašto se za određivanje tripsina koristi BAPNA, a ne neki proteinski supstrat. Navedite da li se u ispitivanom preparatu proteina nalaze isključivo proteini ili još neki drugi sastojci. Ukoliko je dobijena vrednost za specifičnu aktivnost tripsina manja od one navedene na bočici komentarišite moguće uzroke za smanjenje aktivnosti preparata tripsina i kako biste vaše pretpostavke proverili.

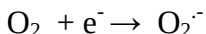
Određivanje aktivnosti katalaze u eritrocitima

Respiratorni lanac u mitohondrijama igra ključnu ulogu u ćeliji. U njemu se, uz učešće kompleksnog sistema proteina i enzima (citohroma) koji se nalaze na unutrašnjoj strani membrane mitohondrija vrši redukcija kiseonika prema jednačini:

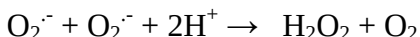


Posledice ove aktivnosti mitohondrija su paradoksalne. S jedne strane mitohondrija snabdeva ćeliju energijom, jer pri redukciji kiseonika nastaje ATP. S druge strane oko 0.4

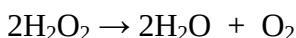
do 4% kiseonika ne prelazi u vodu, nego delimičnom (nepotpunom) redukcijom primanjem samo jednog elektrona nastaje superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$):



Superoksid anjon radikal podleže reakciji disproporcionisanja (dismutacije) koja je katalizovana enzimom superoksid dismutazom (SOD). U ovoj reakciji nastaje H_2O_2 :



Superoksid anjon radikal i vodonik-peroksid spadaju u takozvane reaktivne vrste kiseonika (ROS) koje mogu da izazovu razna oštećenja u ćeliji pošto su vrlo reaktivne u odnosu na ćelijske konstituente (lipidi u membranama, DNK, modifikacije proteina). U živim sistemima postoji sistem antioksidativne zaštite koji se sastoje od enzima i antioksidanasa male molekulske mase (na primer vitamin E, vitamin C). Od enzima u ovaj sistem spada već spomenuta SOD. Raspadanje (dismutaciju) H_2O_2 u živim sistemima katalizuje enzim katalaza:



Pored mitohondrija ROS mogu da nastanu i drugim biološkim sistemima. U eritrocitima je izvor nastajanja $O_2^{\cdot -}$ prelazak jednog elektrona sa Fe^{2+} u oksihemoglobinu na molekul vezanog O_2 pri čemu se hemoglobin oksiduje u methemoglobin (*prikažite ovu reakciju*). S obzirom na količinu kiseonika koja je stalno u dodiru sa hemoglobinom u eritrocitima ove reakcije bi bilo vrlo izražene. Međutim, prisustvom antioksidativnih enzima kao što su SOD i katalaza, kao i methemoglobin reduktaze koja katalizuje redukciju methemoglobina u hemoglobin, ovi procesi su svedeni na najmanju meru (svega 0.5% od ukupnog hemoglobina u eritrocitima je u obliku methemoglobina). Eritrociti su uz hepatocite, ćelije sa najvišim nivoom katalazne aktivnosti u organizmu čoveka.

Katalaza je tetramerni protein koji se sastoji iz četiri subjedinice (struktura jedne subjedinice prikazana je na slici 4.27a) od kojih svaka sadrži molekul hema sa Fe^{3+} jonom i po jedan molekul NADPH. Katalitički mehanizam katalaze dat je na slici 4.27b.

CILJ ove vežbe je da se upoznate sa određivanjem aktivnosti enzima u biološkom materijalu.

PRIPREMA: Dobro proučiti gornji Odeljak 4.6 o određivanju aktivnosti enzima i samu vežbu. Upoznati se (u glavnim crtama) sa katalitičkim mehanizmom katalaze. Pripremiti pitanja za asistenta/predmetnog nastavnika o onome što nije jasno.

ZADATAK: Odrediti aktivnost katalaze (jednim od dole navedenih postupaka u dogovoru sa asistentom) u nekoliko uzoraka krvi dobrovoljaca iz grupe. Uporediti i prodiskutovati dobijene rezultate i metode.

Određivanje aktivnosti katalaze spektrofotometrijskim praćenjem raspadanja H₂O₂

Potrebni materijal:

1 M Tris pufer pH 8, koji sadrži 5 mM EDTA,
10 mM vodonik-peroksid u 1M Tris puferu (dobija se razblaživanjem 30% rastvora H₂O₂ Tris puferom, pri čemu se tačna koncentracija vodonik-peroksida određuje na osnovu njegovog milimolarnog ekstinkcionog koeficijenta, koji na 230nm iznosi 0,071)

Uzorak hemolizata: U epruvetu se doda 50 µl hemolizata (1:1), 50 µl 95% etanola i 5 ml vode. Sadržaj se dobro promeša na Vorteksu i potom inkubira 10 minuta na 37°C.

Spektrofotometar (sa rekorderom ili štoperica)

Postupak:

Odrediti koncentraciju hemoglobina u polaznom hemolizatu (konsultovati vežbu o hemoglobinu!). Metoda za određivanje aktivnosti katalaze koju ćete koristiti zasniva se na spektrofotometrijskom praćenju raspadanja vodonik-peroksida pod dejstvom katalaze, na talasnoj dužini od 230 nm, na kojoj apsorbuje vodonik-peroksid. U kvarcnu kivetu zapremine 3 ml sipa se (uz zidove kivete) 50 µl 1M Tris pufera pH 8, a zatim doda 5 do 50 µl pripremljenog uzorka hemolizata (zapremina zavisi od aktivnosti katalaze, videti dalje). Reakcija počinje dodatkom 1 ml 10mM rastvora vodonik-peroksida. Na spektrofotometru se prati promena (pad) apsorbance na λ_{230} nm svakih 30 sekundi, tokom 3 minuta. Srednja vrednost promene apsorbance (ΔA) po minuti treba da bude 0,030 - 0,060. Ukoliko su dobijene vrednosti izvan ovog opsega treba smanjiti ili povećati polaznu zapreminu uzorka (razblažen hemolizat).

Aktivnost katalaze (u jedinicama aktivnosti) izračunava se pomoću formule:

$$CAT = \frac{100 \cdot R \cdot \Delta A}{Hb \cdot V \cdot 0.071}$$

gde je:

ΔA - srednja vrednost promene apsorbance u minuti;

R - faktor razblaženja (101);

Hb - količina hemoglobina (u g/100 ml lizata);

V - zapremina uzorka (u ml);

0,071 - milimolarni apsorptivni koeficijent vodonik peroksida.

Aktivnost katalaze u eritrocitima se izražava kao broj µmola redukovano vodonik-peroksida u minuti, po gramu hemoglobina.

Određivanje aktivnosti katalaze praćenjem raspadanja H₂O₂ titracijom

Potreban materijal:

0,02 M fosfatni pufer pH 7,0

0,05 M H₂O₂ u 0,02M fosfatnom puferu pH 7,0

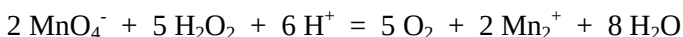
3M H₂SO₄

5 mM KMnO₄

Postupak:

Stavi se 10 ml hladne destilovane vode u erlenmajer od 50 ml koji treba da bude okružen ledom. Sterilnom iglom ubode se prst i uzme se 10 µl krvi pomoću posebne pipete. Krv se prenese u erlenmajer sa ohlađenom vodom ispiranjem pipete nekoliko puta. Erlenmajer treba zatim lagano promućkati da bi se dobio homogen rastvor. Eksperiment se izvodi na hladno (4°C) da bi se sprečilo inaktiviranje enzima.

Pripremi se 5 epruveta kao što je naznačeno u tabeli. Svi rastvori treba da budu ohlađeni u ledu. Nakon dodavanja reagensa treba svaku epruvetu dobro promućkati. Aktivnost katalaze se određuje na osnovu određivanja količine neizreagovanog H₂O₂ koji se određuje titracijom sa KMnO₄:



Pre odredjivanja aktivnosti enzima treba izračunati koliko rastvora kalijum permaganata treba da se utroši za titraciju 2ml 0,05 M H₂O₂. Ukoliko eksperimentalno dobijena vrednost ne odgovara (približno) izračunatoj vrednosti, H₂O₂ se u rastvoru raspao pa treba pripremiti svež rastvor.

Prva epruveta je slepa proba i u nju se pre enzima dodaje 2ml 3M H₂SO₄. Inkubiranje se vrši tokom 5 min u ledu. Reakcija u epruvetama 2-5 se prekida dodavanjem 2ml 3M H₂SO₄ tačno 5 minuta nakon početka inkubacije. Zatim se sadržaj epruveta prenese u erlenmajere i titruje sa 5mM KMnO₄ do postojane ružičaste boje.

Tabela Rezultati određivanja aktivnosti katalaze

Reagens	Broj epruvete				
	1	2	3	4	5
0,02M fosfatni pufer pH 7,0, (ml)	10	10	10	10	10
0,05M H ₂ O ₂ u 0,02M fosfatnom puferu pH 7,0 (ml)	2	2	2	2	2
destilovana voda (ml)	1	1	1	0,5	-
3M H ₂ SO ₄ (ml)	2	-	-	-	-
Rastvor krvi (ml)	0,5	0,5	-	0,5	0,5
3M H ₂ SO ₄ , (ml)	-	2	2	2	2
V(ml) KMnO ₄ utrošena za titraciju					
Preostali H ₂ O ₂ , (ml)					
Razloženi H ₂ O ₂ , (ml)					
Aktivnost katalaze					

Jedna jedinica katalaze se definiše kao ona količinu enzima koja katalizuje razlaganje 1 mmola H₂O₂ tokom 5 minuta na 0 °C. Izraziti aktivnost katalaze po l krvi

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Ukoliko se vrednosti za aktivnost katalaze kod kolega međusobno razlikuju prodiskutujte/pretpostavite uzroke i posledice dobijenih razlika. Uporedite metode i rezultate dobijene svakom od njih.

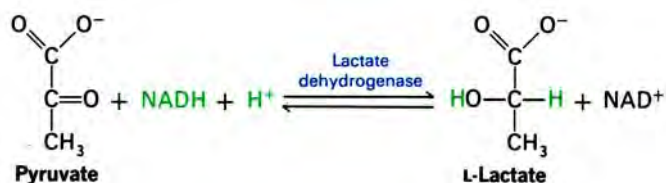
Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze u plazmi/serumu

Na stotine enzima koji su prisutni u čovečijem telu sintetizuju se intracelularno i tamo obavljaju svoje funkcije. Neki enzimi (kao što je napred pominjani tripsin) se izlučuju iz ćelija u svom aktivnom ili inaktivnom obliku u ekstracelularne tečnosti gde obavljaju svoje funkcije. *Sa nekoliko izuzetaka u kliničkoj praksi se određuje aktivnosti intracelularnih enzima koji se kod zdravih osoba nalaze u malim koncentracijama u plazmi, ali čiji se nivo u u raznim patološkim stanjima povećava ili (ređe) smanjuje. Merenjem promene nivoa ovih enzima može se locirati lokacija i priroda patološke promene u tkivu.* Kod zdravih osoba koncentracija (nivo) ovih enzima u plazmi je rezultat razlike u brzini kojom oni (u maloj meri) prolaze kroz plazminu membranu u cirkulaciju i brzine kojom se iz plazme odstranjuju/inaktiviraju. Međutim, ukoliko iz bilo kog razloga dođe do oštećenja plazmine membrane, povećaće se izlazak intracelularnih enzima u cirkulaciju. Tako će do oštećenju plazmine membrane doći ukoliko su narušeni procesi u kojima nastaje energija (ATP), ili je ćelija (što se često dešava u slučaju jetre) napadnuta virusima ili organskim supstancama. Smanjeno snabdevanje kiseonikom (hipoksija) dovodi do oštećenja plazmine membrane u bilo kojem tkivu. Inflamacija, alkohol, povreda će dovesti do na primer do oštećenja mišićnih ćelija. Nivo nekog intracelularnog enzima u plazmi može da bude povećan i zbog njegove povećane sinteze (indukcije) što se dešava u nekim patološkim stanjima. Nivo enzima u plazmi koji potiču iz ćelija može da bude i smanjen u odnosu na normalnu vrednost (smanjena sinteza u nekim bolestima, genetski nedostatak datog enzima). U kliničkoj praksi se češće sreće povećanje, nego smanjenje aktivnosti enzima.

Nisu svi intracelularni enzimi podjednako pogodni za biomedicinsku praksu. Izbor enzima čija aktivnost će da se meri u plazmi u cilju dijagnoze i prognoze bolesti zavisi od više faktora čime se bavi medicinska (klinička) biohemije. U kliničkoj praksi je ustanovljena lista glavnih enzima čija se aktivnost određuje u serumu/plazmi kao i poremećaji na koje ukazuje povećanje/smanjenje aktivnosti ovih enzima u serumu/plazmi. O ovome se može više pročitati u knjigama koje se bave kliničkom hemijom i medicinskom biohemijom. U okviru ove vežbe ćemo određivati aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) što se često radi u kliničkoj praksi.

Molekul LDH je tetramer, sastavljen od 4 istovetne subjedinice u kojima se nalazi koenzim NADH (NAD^+). Napominjemo da LDH sadrži karakteristični NADH-vezujući domen koji se javlja i kod drugih dehidrogenaza (konsultovati predavanja i udžbenike iz biohemije). LDH katalizuje redukciju piruvata (krajnjeg proizvoda glikolize) u laktat, proces koji se dešava u mišićima, naročito za vreme intenzivnog vežbanja kada su potrebe za ATP-om velike, a kiseonik potrošen (videti Odeljak 6, koji sadrži deo o

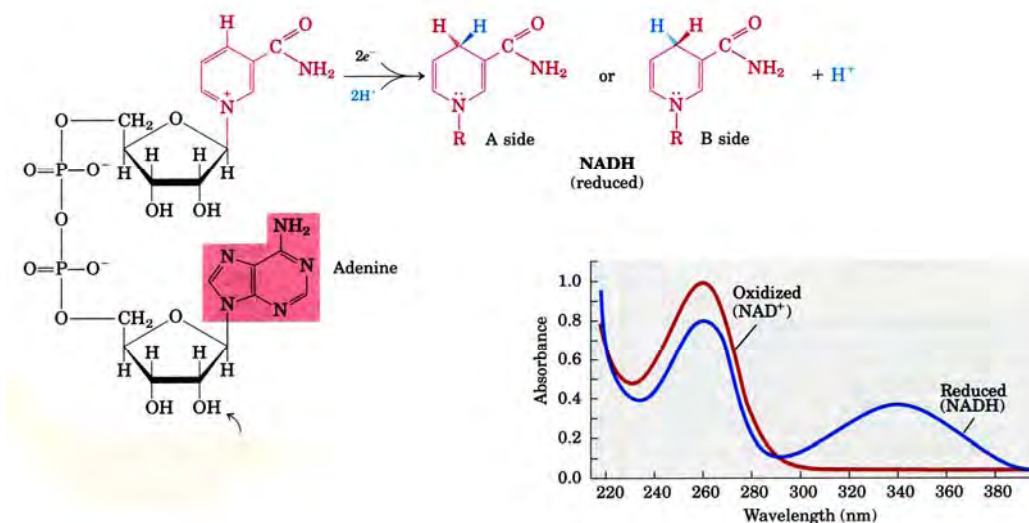
glikolizi). Optimalno pH za navedenu reakciju je 7.2 – 7.8. Na višem pH (8.8 – 9.8) LDH katalizuje (uz učešće NAD^+) reversnu reakciju, oksidaciju LDH u piruvat:



Struktura i enzimski mehanizam LDH prikazani su na slici 4.28.

LDH je prisutna u citosolu svih ćelija. Ukupna aktivnost LDH koja se meri u serumu potiče od 5 izo formi. Pošto je koncentracija LDH u tkivima 500 puta veća od one u plazmi, to i najmanja oštećenja tkiva dovode do porasta aktivnosti ovog enzima u plazmi/serumu. Znači i najmanje povećanje aktivnosti LDH u serumu u odnosu na normalnu vrednost ukazuje na značajna oštećenja tkiva. Visoka specifična aktivnost LDH karakteristična je za jetru, srčani mišić, skeletne mišiće, bubrege i eritrocite. Zbog toga se povećanje nivoa LDH u serumu dovodi u vezu sa oštećenjima ovih tkiva. Određivanje aktivnosti LDH nalazi primenu u dijagnozi infarkta miokarda kada se vrednost za aktivnost LDH u serumu povećava i 34 puta. Određivanje aktivnosti LDH je pogodno i za detektovanje i praćenje hemolize kod pacijenata sa ovim poremećajem.

Određivanje aktivnosti LDH se zasniva na činjenici da pri redukciji NAD^+ (koja nastaje primanjem hidridnog jona sa supstrata koji se oksiduje) nastali NADH, za razliku od NAD^+ , pokazuje apsorpcioni maksimum na 340 nm ($\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):



Tako ako se aktivnost LDH u nekom uzorku određuje korišćenjem piruvata kao supstrata u reakcionu smešu se dodaje NADH, a aktivnost LDH se meri na osnovu smanjenja apsorbanse rastvora na 340 nm. Obrnuto, ako se za određivanje aktivnosti koristi laktat

dodaje se NAD^+ i prati se povećanje apsorbance na 340 nm u prisustvu uzorka u kojem određujemo LDH.

CILJ ove vežbe je da se upoznate sa određivanjem aktivnosti enzima u kliničkoj praksi.

PRIPREMA: Dobro proučiti gornji Odeljak 4.6 o određivanju aktivnosti enzima i samu vežbu. Upoznati se (u glavnim crtama) sa katalitičkim mehanizmom LDH. Eventualno pogledati u udžbenicima biohemije metabolizam piruvata i laktata. Pripremiti pitanja za asistenta/predmetnog nastavnika o onome što nije jasno.

ZADATAK: *Odrediti aktivnost LDH u serumu iz uzoraka krvi dobrovoljaca iz grupe. Uporediti i prodiskutovati dobijene rezultate.*

Potrebni materijal:

60 mM Tris pufer pH 7.4

20 mM natrijum piruvat u 60 mM Tris puferu pH 7.4

0.2 mM NADH u 60 mM Tris puferu pH 7.4 (rastvor napraviti neposredno pre upotrebe i proveriti koncentraciju NADH u njemu! Zašto? Kako ćete to uraditi!)

Sve rastvore čuvati u frižideru na 4°C .

Vodeno kupatilo 30°C

Spektrofotometar (sa rekorderom ili štoperica)

Postupak:

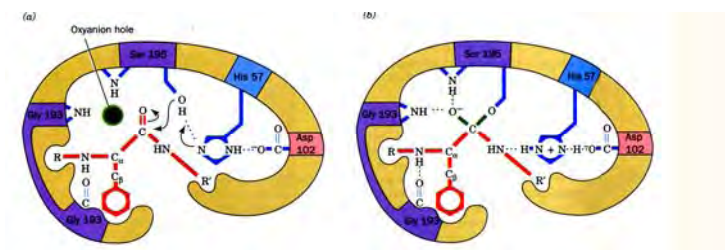
U epruvete odmeriti po 2 ml rastvora NADH, dodati u njega 50 μl seruma i inkubirati na vodenom kupatilu 30 minuta. Dodati 100 μl rastvora piruvata, blabo promešati i preneti u kivetu spektrofotometra. Meriti na rekorderu ili uz pomoć štoperice pad apsorbance na 340 nm svakih 30 sekundi tokom 3 minute (po mogućnosti na 30°C). Ako je $\Delta A/\text{min}$ veće od 0.1 merenje treba ponoviti sa serumom koji treba prethodno razblažiti 5 ili 10 puta pomoću 0.9% NaCl

Aktivnost LDH u serumu u internacionalnim jedinicama (U/L) možete izračunati prema formuli:

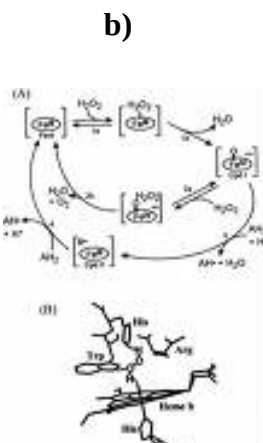
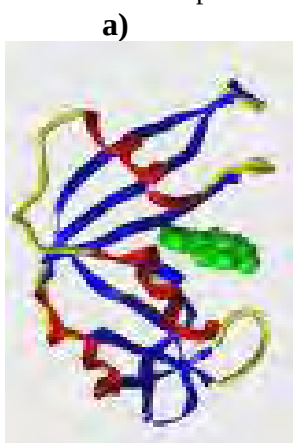
$$\text{U/L} = (\Delta A/\text{min}/\epsilon \times 1) \times 2.15/0.05 \times 10^6$$

Referentna vrednost (30°C) je 150 do 310 U/L.

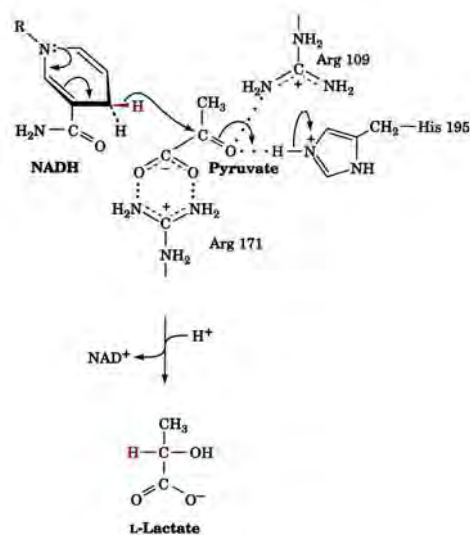
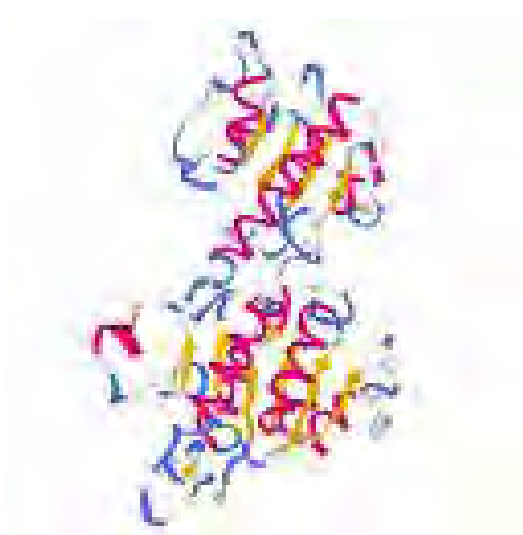
U "belu svesku" unesite opis vežbe prema Uputstvu. Ukoliko ste određivali LDH u većem broju uzoraka statistički obradite rezultate. Naglasite da li vaši rezultati odgovaraju referentnim vrednostima.



Slika 4.26 Stabilizacija prelaznog stanja kod serin proteaza. (a) Kompleks enzima i supstrata (konformacija supstrata je takva da je vezivanje trigonalnog karbonilnog ugljenika iz peptidne veze koja će se hidrolizovati sprečeno!!). (b) nastali tetraedarski intermedijer/prelazno stanje (oksianjon) ulazi u oksianjonski otvor, te se stabilizuje vodoničnim vezivanjem za NH grupe peptidnih veza Gly193 i Ser 195. Serin proteaze stoga jače vezuju tetraedarski intermedijer (prelazno stanje). Napadom molekula vode dolazi do hidrolize peptidne veze i vraćanja aktivnog mesta enzima u prvobitno stanje.



Slika 4.27 Model jedne (od četiri istovetne) subjedinice katalaze (a) i enzimski mehanizam dismutacije vodonik-peroksida.



Slika 4.28 Struktura i enzimski mehanizam laktat dehidrogenaze (LDH)

5. NUKLEINSKE KISELINE

Odnos proteina i nukleinskih kiselina predstavlja samu suštinu fenomena koji nazivamo život. Proteini obavljaju najrazličitije funkcije u ćeliji i živim sistemima, dok se informacija za strukturu proteina (aminokiselinsku sekvencu proteina) nalazi u molekulu dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i uz pomoć molekula ribonukleinskih kiselina (RNK) se u procesu biosinteze (ekspresije gena) prenosi u protein. Sa razvojem tehnologije rekombinantne DNK ("genetski inženjering") DNK je prisutna u svakodnevnoj biohemijskoj praksi. Zbog toga je poznavanje strukture i svojstava molekula nukleinskih kiselina, posebno molekula DNK esencijalno kako za razumevanje biohemije tako i za eksperimentalni rad u biohemijskim laboratorijama. Da bismo upoznali svojstva molekula DNK treba pripremiti, a potom ispitati dobijeni preparat DNK iz biološkog materijala. U ovom poglavlju ćemo se stoga prvo osvrnuti na principe izolovanja DNK, a potom na specifičnosti karakterisanja ovog biomakromolekula.

5.1 Principi izolovanja DNK iz biološkog materijala

Polazni materijal za izolovanje DNK su ćelije (tkivo) ili prethodno izolovana jedra. Opšti principi izolovanja DNK su isti kao i kod proteina (videti Dodatak uz Poglavlje 3). To su:

- 1) razaranje membrane, odnosno ćelijskog zida (kod bakterija i biljaka), da bi ekstrakcija makromolekula bila moguća,
- 2) rad pod uslovima pri kojima će doći do inhibicije ili denaturacije hidrolitičkih enzima, koji se oslobađaju pri razaranju ćelije,
- 3) frakcionisanje ekstrakta postupkom koji će dati željeni makromolekul.

Ukratko ćemo opisati neke od specifičnosti ove opšte šeme kada se primenjuje za izolovanje DNK.

Pri izboru polaznog materijala treba imati u vidu da svaki sistem nije podjednako pogodan za ekstrakciju DNK. Neka tkiva imaju visok sadržaj dezoksiribonukleaze, što zahteva uvođenje posebnih predostrožnosti da bi se sprečila hidroliza DNK tokom procesa izolovanja. U nekim tkivima je sadržaj proteina, RNK i polisaharida u odnosu na DNK visok, a u nekim su interakcije između proteina i DNK tako jake da je ekstrakcija DNK znatno otežana. Za mikroorganizme je karakteristično prisustvo ćelijskog zida koji treba prethodno razoriti, da bi liziranje ćelije i izolovanje ćelijskih komponenti i/ili nukleinskih kiselina uopšte bilo moguće. Za biljna tkiva je pored ćelijskog zida karakteristično i prisustvo celuloznih vlakana, što takođe komplikuje homogenizaciju. Izolovanje DNK iz biljaka otežano je i prisustvom fenolnih jedinjenja, koja reaguju i interaguju sa proteinima i DNK, te ih stoga treba, primenom specifičnih postupaka, odstraniti u najranijim fazama izolovanja. Za izolovanje DNK kao najpogodniji materijal pokazao se timus (i to goveđi koji je lako dostupan), jer ima nizak sadržaj dezoksiribonukleaze, kao i visok odnos sadržaja DNK prema drugim ćelijskim komponentama. Za izolovanje DNK iz drugih tkiva (npr. jetre pacova) najbolje je koristiti izolovana jedra (pazeći da se pri izolovanju jedara spreči dejstvo dezoksiribonukleaze).

Osnovni problem kod izolovanja DNK je veličina odn. dužina ovog molekula (setimo se kolika je i kako izgleda hromozomska DNK), koji se u postupku izolovanja, pod uticajem fizičke sile (homogenizacija tkiva, energičnije mešanje u raznim fazama izolovanja, pipetiranje i sl.), cepa na manje fragmente. Stoga je postupcima koji se uobičajeno koriste za izolovanje DNK (koje ćemo i mi koristiti), praktično nemoguće dobiti intaktni (ceo) molekul DNK, ali se pažljivim radom mogu dobiti fragmenti velike molekulske mase (oko 10^7 Da), koji su sasvim pogodni za niz istraživanja. Posebnim postupcima, koji su opisani u literaturi, moguće je dobiti i veće fragmente. Pored toga treba imati u vidu i uslove pod kojima je ovaj molekul stabilan: sekundarna struktura DNK je stabilna u rastvoru čiji je pH u intervalu 4 - 10, a koncentracija soli najmanje 0,1 M. Fosfodiesterne veze su stabilne u intervalu pH 3 - 12. Izvan tog intervala dolazi do hidrolize.

Prva faza u izolovanju DNK je homogenizacija tkiva i liziranje ćelija (ako se prethodno ne izoluju jedra). Kod bakterija i biljaka potrebno je razoriti i ćelijski zid, što se postiže dejstvom mehaničke sile, ultrazvuka (sonifikacija), ili dejstvom specifičnih enzima (npr. lizozima, koji hidrolizuje ćelijski zid mikroorganizama). Kada je ćelijski zid razoren ("oslabljen") ćelije se lako liziraju u hipotonom rastvoru. Liziranje se dovršava (pospešuje) dodatkom SDS-a, koji razara ćelijsku membranu. SDS istovremeno denaturiše nukleaze i time ih čini neaktivnim. Aktivnost nukleaza sprečava se i dodatkom EDTA (etilendiamin-tetrasirćetne kiseline), koja se kompleksira sa dvovalentnim katjonima potrebnim za aktivnost nukleaza. Neki autori predlažu i ispiranje svih staklenih sudova sa kojima će da se radi sa 1 mM rastvorom EDTA. Aktivnost nukleaza sprečava se i radom na hladno (4°C) i visokim pH rastvora.

Hromozomska DNK se nalazi u hromatinu u obliku složenog kompleksa sa baznim proteinima (histonima), kao i sa drugim proteinima, koji imaju određene funkcije u složenim procesima vezanim za DNK. Disocijacija proteina od DNK postiže se pomoću visoke koncentracije anjona (1 M NaClO_4 ili 1 M NaCl) i dodatkom SDS. Treba imati u vidu da se disocijacija proteina iz hromatina i DNK kod svih ćelija ne odvija sa podjednakom lakoćom. Proteini se potom denaturišu i koagulišu dodatkom fenola i/ili smese hloroform-izoamilalkohol i odvajaju centrifugovanjem. Hloroform vrši denaturaciju, a izoamilalkohol sprečava penušanje i omogućuje da se dobije bolji sloj denaturisanih proteina, koji se lakše odvajaju centrifugovanjem. Treba imati u vidu da u ovoj fazi (zbog mućkanja i mešanja) najviše dolazi do fragmentacije DNK.

DNK se iz preostalog rastvora (posle odvajanja proteina) taloži pomoću etanola što treba naročito pažljivo (i sa ljubavlju!) izvesti, jer ako se etanol nepažljivo doda dobija se nerastvorni talog DNK i propušta se sva lepota eksperimenta. Taloženje DNK vrši se naročitom tehnikom tako što se vodeni rastvor DNK pažljivo presloji sa 2 zapremine etanola, a potom se pažljivim mešanjem pomoću staklenog štapića na međufazi izaziva namotavanje končića DNK na štapić. I u ovoj fazi može doći do fragmentacije DNK.

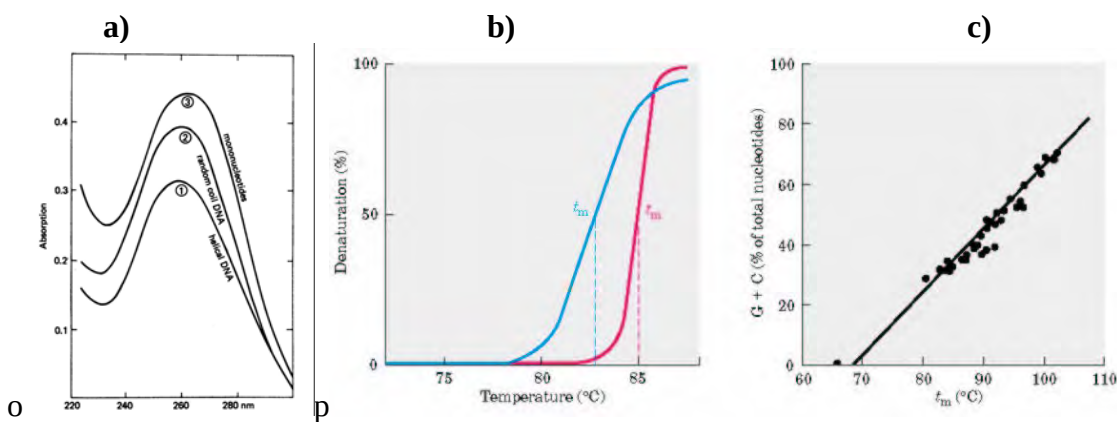
Ovako se dobija sirovi preparat DNK, koji se ispere etanolom, a potom rastvori u puferu (voda je slab odnosno nikakav rastvarač za DNK!), ili se čuva u etanolu. Dalje prečišćavanje DNK (odstranjivanje RNK i proteina) postiže se dejstvom ribonukleaze (koja hidrolizuje RNK) i pronaze (smesa bakterijskih nespecifičnih proteolitičkih enzima, koji hidrolizuju ostatke eventualno prisutnih proteina). I pored pažljivog prečišćavanja, u

preparatima ovih enzima zapaženo je i prisustvo DNK-aza. Njihovo dejstvo se sprečava (DNK-aze se deaktiviraju) tako što se rastvori ovih enzima pre dodavanja u rastvor DNK preinkubiraju pod određenim uslovima.

Određivanje tragova RNK u preparatu DNK zasniva se na osobini RNK da se mnogo lakše hidrolizuje u alkalnoj sredini od DNK (setite se mehanizma ove reakcije). Posle završene hidrolize, DNK se taloži dodatkom jake kiseline, a u supernatantu zaostaju hidrolitički proizvodi RNK, čija se koncentracija lako određuje spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm.

5.2 Spektralna karakterizacija DNK

Zbog prisustva purinskih i pirimidinskih baza sve nukleinske kiseline, nukleotidi i nukleozidi intenzivno apsorbuju u UV oblasti. Apsorpcioni maksimum za nukleinske kiseline je na 260 nm (Slika 5.1a). Na absorptivnost (ekstinkcioni koeficijent) utiče malo pH rastvora. Rastvor nukleinske kiseline, u kojoj ne postoji sekundarna struktura, koncentracije 1 mg/mL, na neutralnom pH, imaće apsorbancu 25 na 260 nm, u kiveti od 1 cm. U nativnom obliku (sa ekstenzivnom sekundarnom strukturom) ovaj rastvor će imati apsorbancu 20. Drugim rečima, pri denaturaciji DNK dolazi do povećanja apsorbance (hiperhromni efekat), a pri njenoj renaturaciji do ponovnog smanjenja apsorbance (hipohromni efekat) (Slika 5.1a). Na osnovu ove osobine prati se razvijanje (denaturacija) sekundarne strukture DNK, što se postiže zagrevanjem rastvora DNK. Praćenjem zavisnosti hiperhromnog efekta od temperature dobijaju se takozvane krive topljenja DNK (Slika 5.1b). Iz krive topljenja se određuje tačka topljenja (T_m) koja je u korelaciji sa % G+C parova u preparatu DNK (Slika 5.1c).



Slika 5.1 Spektralna karakterizacija DNK: (a) UV spektar native DNK (1), denaturisane DNK (2) i nukleotida (3); (b) Denaturacija DNK toplotom (desna kriva) i renaturacija (leva kriva); (c) Zavisnost tačke topljenja (T_m) preparata DNK od sadržaja G+C parova.

VEŽBA: Izolovanje i karakterisanje DNK

CILJ ove vežbe je da izolujete DNK iz datog biološkog materijala kako biste mogli da upoznate i dobro uočite svojstva ovog važnog biomolekula.

PRIPREMA: Ponovite sve što znate o strukturi (hemijska struktura, konformacija) i konformacionim prelazima DNK. Za ovo možete da koristite materijal sa predavanja o nukleinskim kiselinama i literaturu datu uz predavanja.

ZADATAK: Izolovati preparat DNK, odrediti sadržaj proteina u njemu, uraditi spektralnu karakterizaciju dobijenog preparata (krivu topljenja i T_m).

Izolovanje DNK iz biljaka

Potrebni materijal:

5 g biljnog tkiva (mlade biljke pšenice, ili suvih pšeničnih klica),
Pufer za homogenizaciju (0,1 M NaCl i 50 mM EDTA u 10 mM Tris.HCl, pH 7,8),
10 mM Tris.HCl, pH 7,4,
5 M NaClO₄,
20 % SDS,
Predestilovani fenol zasićen vodom ili puferom kome je dodato 0,2 % 8-hidroksihinolina,
Smeša hloroforma i izoamilalkohola 24:1 (v/v),
96 % etanol,
Rastvor RNK-aze (1,5 mg/mL pufera), preinkubiran 10 minuta na 90° C,
Rastvor pronaze (5 mg/mL pufera), preinkubiran 2 sata na 37° C,
Suvi led ili tečni azot,
Mlin ("Waring blender"), magnetna mešalica, mućkalica, centrifuge (laboratorijska i Sorvall), avan sa tučkom, epruvete, pipete, erlenmajeri.

Postupak:

Biljno tkivo, zaleđeno u tečnom azotu ili suvom ledu, homogenizuje se u avanu sa tučkom, uz povremeno dodavanje tečnog azota ili suvog leda, ili se sprasi u mlinu "Waring blender", uz dodavanje istih količina azota ili suvog leda. Mlin se uključuje 3 puta po 1 minut. Prekidi se prave da ne bi došlo do pregrevanja homogenata. Kada azot ili suvi led potpuno ispare dodaje se pufer za homogenizovanje (2,5 mL/g tkiva) i što brže, ali dobro, tkivo suspenduje u njemu. U suspenziju se dodaje rastvor za liziranje (8,2 mL/g tkiva) koji sadrži 7 delova pufera za homogenizovanje, 0,33 mL rastvora pronaze i 0,83 dela 20 % SDS-a. Ova suspenzija se meša na magnetnoj mešalici ili na mućkalici tokom 1 sat na 37° C. U suspenziju se zatim doda rastvor NaClO₄ (1/10 od ukupne zapremine) i sve se dobro promućka.

Deproteinizacija ovog rastvora vrši se prvo mućkanjem sa jednakom zapreminom fenola zasićenog vodom (ili puferom) tokom 15 minuta, a zatim se dodaje ista zapremina smese hloroforma i izoamilalkohola, mućkanje nastavi tokom još nekoliko minuta i slojevi odvoje centrifugovanjem, tokom 5 minuta, na 10.000 obr./min. (u centrifugi Sorvall).

Gornja vodena faza odvoji se pipetom i prenese u sud u kojem se već nalazi ista zapremina rastvora hloroforma i izoamilalkohola. Postupak deproteinizacije ponavlja se, kao što je to napred opisano, najmanje 4 puta, ili dok se u međufazi više ne nalaze denaturisani proteini. Na kraju se ovaj rastvor ohladi u ledu i organski rastvarači ekstrahuju se, nekoliko puta, ohlađenim etrom.

Jedan deo rastvora odvoji se za spektralnu karakterizaciju DNK, a iz preostalog rastvora DNK se taloži pažljivim preslojavanjem sa 2 zapremine 96 % etanola i namotavanjem končića DNK na štapić u međufazi. DNK može da se čuva u obliku taloga u etanolu, ili u rastvoru nekog pogodnog pufera, uz dodatak par kapi hloroforma (u oba slučaja u frižideru).

Odvajanje prisutne RNK i proteina vrši se inkubiranjem sa RNK-azom (150 µg/mL) tokom 1 sata i pronazom (250 µg/mL) tokom 2 sata. Postupak deproteinizacije i taloženja DNK zatim se još jednom ponovi.

Izolovanje DNK iz luka

Dole opisani postupak za izolovanja DNK iz luka je modifikacija takozvanog “Marmur” postupka, koji se koristi u svim svetskim biotehnološkim laboratorijama.

Potrebni materijal

1 M Tris pufer, pH 7,5-8,0
0,5 M rastvor EDTA
5 M rastvor NaCl
10 % rastvor SDS-a
Crni luk
95 % etanol (ohlađen)
Pronaza ili sveži sok od ananasa ili papaje

Postupak

Pripremiti 100 ml pufera za degradaciju ćelija luka: pomešati 5 ml 1 M Tris-pufera, pH 7.5, 5 ml 0.5 M EDTA, 6 ml 5 M NaCl i 84 ml destilovane vode. Samleti jedan manji luk (da se dobije otprilike 50-75 ml homogenizata). Pomešati pufer i luk. Homogenizovati u blenderu oko 45 sekundi. Staviti filter papir u levak, levak nad čašu od 250 ml i profiltrirati homogenizat luka.

Taloženje DNK: Odmeriti 10 ml filtrata luka u čašu od 50 ml i dodati 1 ml 10% SDS-a. Dodati 4 ml rastvora proteolitičkog enzima i ostaviti smešu u ledu tokom 5 minuta. Preslojiti sa 15-20 ml ledenog etanola (dodavati ohlađeni etanol pažljivo pipetom niz zidove suda). Nakon oko 5 minuta počće da se talože bela vlakna DNK. Da bi se postigli najbolji rezultati, trebalo bi ostaviti smešu da stoji u frižideru preko noći. Vlakna DNK se mogu izvaditi iz smeše namotavanjem pomoću Pasterove pipete sa zakrivljenim vrhom ili pomoću staklenog štapića.

Ispitivanje kontaminacije preparata DNK sa zaostalim proteinima i RNK

Kontaminaciju DNK sa proteinima odrediti kao što je to u odeljku 5.1.1 opisano. Za određivanje kontaminacije preparata DNK sa RNK preparat DNK se tretira sa 0,3 M NaOH tokom 60 minuta na 37° C. Zatim se DNK taloži dodatkom 10 % HClO₄ i talog odvoji centrifugovanjem. U supernatantu se meri apsorbanca na 260 nm ($A_{260}=1,0$ odgovara koncentraciji RNK od 32 µg/mL). Na osnovu dobijenih rezultata izračunajte količinu RNK u rastvoru DNK i približni % RNK od prisutnih nukleinskih kiselina.

Spektralna karakterizacija izolovane DNK

Pripremite rastvor DNK čija će apsorbanca na 260 nm biti 1,0 ili malo manja. Snimite spektar ovog rastvora, uočite njegove karakteristike i izračunajte odnos A_{260}/A_{280} . Uporedite ih sa odnosom za čistu DNK i procenite koncentraciju proteina u vašem preparatu. *Podaci na osnovu kojih ćete ovo moći da uradite nalaziće se u laboratoriji.* Pretpostavljajući da apsorbanca vašeg rastvora na 260 nm potiče samo od native DNK, izračunajte koncentraciju DNK u Vašem rastvoru. Pretpostavljajući da se u polaznom tkivu nalazi 80 % vode (i da je prinos DNK koju ste izolovali kvantitativan) izračunajte % DNK u polaznom materijalu (na suvu težinu).

Zagrejte Vaš rastvor DNK na ključalom vodenom kupatilu tokom 15 minuta, naglo ga ohladite i ponovo izmerite A_{260} . Opišite i objasnite rezultate ovog eksperimenta, polazeći od strukturnih osobina DNK. Alternativno (u dogovoru sa asistentom) uradićete krive topljenja za izolovane preparate DNK i odrediti njihove T_m vrednosti.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Detaljno opišite izgled dobijenog preparata. Navedite njegovu čistoću (sadržaj proteina u njemu). Fotokopirajte i zalepite sliku spektra i krive topljenja. Komentarišite navedene slike. Koristeći podatke sa slike 5.1c odredite % G+C parova u vašem preparatu DNK. Ukoliko ste u mogućnosti uporedite vaše podatke sa podacima iz literature.

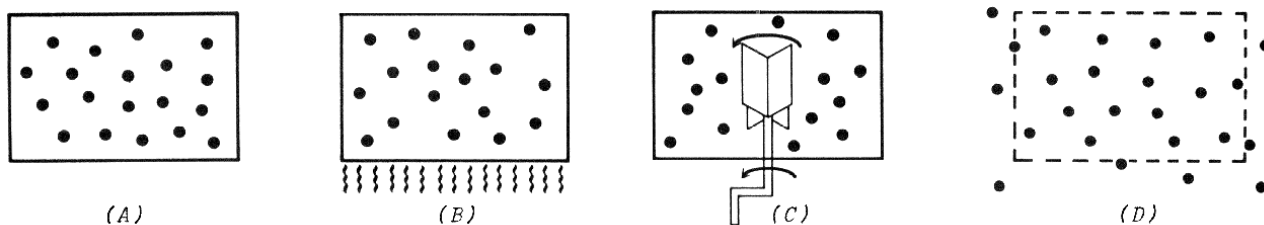
6 Bioenergetika i metabolizam

Metabolizam obuhvata mrežu hemijskih reakcija koje se dešavaju u ćeliji i organizmu, a koje se odigravaju kroz serije enzima-katalizovanih reakcija koje čine metaboličke puteve. **Katabolizam** obuhvata degradativnu fazu metabolizma u kojoj se organske hranjive materije pretvaraju u manje, prostije krajnje proizvode (na primer, mlečna kiselina, CO_2 , NH_3). Katabolički procesi oslobađaju energiju koja je konzervirana u stvaranju ATP i redukovanih koenzima (NADH, NADPH i FADH_2); ostatak se gubi u obliku toplote. U **anabolizmu**, koji se naziva i biosinteze, izgrađuju se kompleksni biomakromolekuli (proteini, nukleinske kiseline lipidi) iz malih molekula. Anabolički procesi zahtevaju utrošak ATP i redukovanih koenzima. Bioenergetika podrazumeva kvantitativna ispitivanja energetske odnose i konverzije energije u biološkim sistemima. Zbog toga je poznavanje i razumevanje osnovnih koncepata iz termodinamike neophodno za njihovu primenu u razumevanju/izučavanju metabolizma. Ove teme se obrađuju u svim udžbenicima iz biohemije. Odeljak koji sledi bi trebalo da olakša/dopuni izučavanje ovih tema iz udžbenika biohemije.

6.1 Podsetnik iz termodinamike

Toplota, rad i energija - prvi princip termodinamike

Sistem je deo univerzuma koji smo izabrali za ispitivanje. Biohemijski sistem može da bude, na primer, reakcija, mitohondrija, ćelija, srce, miš, itd. Sistem je ograničen u prostoru i odvojen od okoline.



Slika 6.1 Izolovan sistem (A); zatvoren sistem (B i C); otvoren sistem (D)

Sistem može da bude *izolovan* (ne razmenjuje materiju i energiju sa okolinom), *zatvoren* (razmenjuje samo energiju sa okolinom), i *otvoren* (razmenjuje i materiju i energiju sa okolinom). Ćelija, na primer, predstavlja otvoren sistem. Navedeni slučajevi šematski su prikazani na slici 6.1.

Ravnoteža: Sistem je u ravnoteži kada se ni jedna njegova osobina ne menja sa vremenom.

Stanje sistema: Termodinamičko stanje sistema jasno se može definisati samo za sistem koji se nalazi u ravnoteži. U tom slučaju definisanje izvesnog broja promenljivih (dve od tri promenljive - temperatura, pritisak i zapremina - plus mase i identiteti hemijskih supstanci u sistemu) definisaće stanje sistema. Ako je stanje definisano, sistem se može u bilo koje doba reprodukovati. Takođe, ako je stanje sistema definisano i njegova svojstva (osobine) su data. Svojstva sistema mogu biti dvojaka. Definisanje *ekstenzivnih* svojstava, kao što su zapremina i

energija, zahteva definisanje stanja sistema uključujući i količine svih supstanci u sistemu. *Intenzivna svojstva*, kao to su viskoznost i gustina, mogu se definisati sa manje podataka - potrebne su samo *relativne* količine različitih supstanci. Na primer gustina 1 M NaCl je nezavisna od veličine uzorka, mada zavisi od temperature T, pritiska P, i koncentracije NaCl.

*Sve veličine koje su jednoznačno definisane u stanju ravnoteže nazivaju se **funkcije stanja***. Njihova promena zavisi samo od početnog i krajnjeg stanja, a ne i od puta - načina na koji se prelaz vrši. Centralni problem termodinamike je nalaženje ovih funkcija stanja. Temperatura, zapremina, koncentracija - kao funkcije stanja su veličine koje se lako mere, ali su one sa stanovišta termodinamike i najmanje korisne. One funkcije stanja koje su, kao što ćemo videti, najkorisnije, skrivene su i o njihovom postojanju se može zaključiti samo indirektnim putem.

Termodinamika se obično bavi prelazima između ravnotežnih stanja. Ovi prelazi (proces) mogu biti *reversibilni ili ireversibilni (spontane)*. Ako je prelaz reversibilan, put od početnog do krajnjeg stanja vodi kroz niz stanja koja su blizu ravnoteže. Sistem je uvek tako blizu ravnoteže da se smer procesa može izazvati beskonačno malom promenom u okolini. Postoji više načina za ilustraciju pojma ireversibilnosti, od kojih navodimo jedan. Zamislamo da film na kojem smo snimili neki proces od početka do stanja ravnoteže posmatramo unazad. Ukoliko nam sekvence događaja izgledaju neverovatne, proces koji smo posmatrali je ireversibilan. Znači, ireversibilan proces može da se dešava samo u jednom smeru. Koji je to smer, kao i dokle će proces teći, govore nam nove funkcije stanja čiji su odnosi definisani drugim principom termodinamike.

Toplota¹ q , je energija koju sistem apsorbuje ili otpušta zbog razlike u temperaturi između sistema i okoline.

Rad w , obuhvata svaki drugi oblik razmene energije između sistema i okoline izuzev toplote. Razlikujemo $P\Delta V$ rad i takozvani koristan rad (w') koji obuhvata sve ostale vrste rada kao što su električni, mehanički, itd.:

$$W = W' + P\Delta V$$

Unutrašnja energija E , predstavlja ukupnu energiju unutar sistema. U hemiji razmatramo samo one vrste energije koje se mogu menjati u hemijskim procesima (na primer, energija atomskog jezgra se ne razmatra). Uzima se da unutrašnja energija sistema uključuje: translacionu, vibracionu i rotacionu energiju molekula, energiju hemijskih veza i energiju nevezivnih interakcija među molekulima. Nevezivne interakcije utiču na strukturu i stabilnost biomakromolekula.

Unutrašnja energija je funkcija stanja sistema. To znači da, ako je stanje sistema definisano, unutrašnja energija sistema ima određenu vrednost, bez obzira na način na koji je sistem došao u to stanje. Pošto se obično bavimo energetske promenama, unutrašnja energija se definiše u odnosu na neko proizvoljno izabrano standardno stanje.

Entalpija $H = E + PV$, predstavlja zbir unutrašnje energije sistema i proizvoda iz zapremine sistema i spoljašnjeg pritiska na sistem. Entalpija je takođe funkcija stanja.

¹ Oznake za termodinamičke veličine u ovom poglavlju su u saglasnosti sa preporukama IUPAC-a.

Polazeći od napred definisanih pojmova, definisaćemo *prvi zakon termodinamike, zakon o održanju energije*. Pri promeni stanja, promena unutrašnje energije sistema jednaka je količini absorbovane toplote umanjenoj za rad koji sistem vrši:

$$\Delta E = q - W$$

Za male promene biće:

$$dE = dq - dw$$

Crta kroz simbol za diferenciranje nas podseća da, dok je E funkcija stanja i dE ne zavisi od puta kojim se prelaz vrši, q i w zavise od puta.

Odnosi koji proizilaze iz prvog principa termodinamike sumirani su na slici 6.2. Za promene pri konstantnoj zapremini biće:

$$dE = dq$$

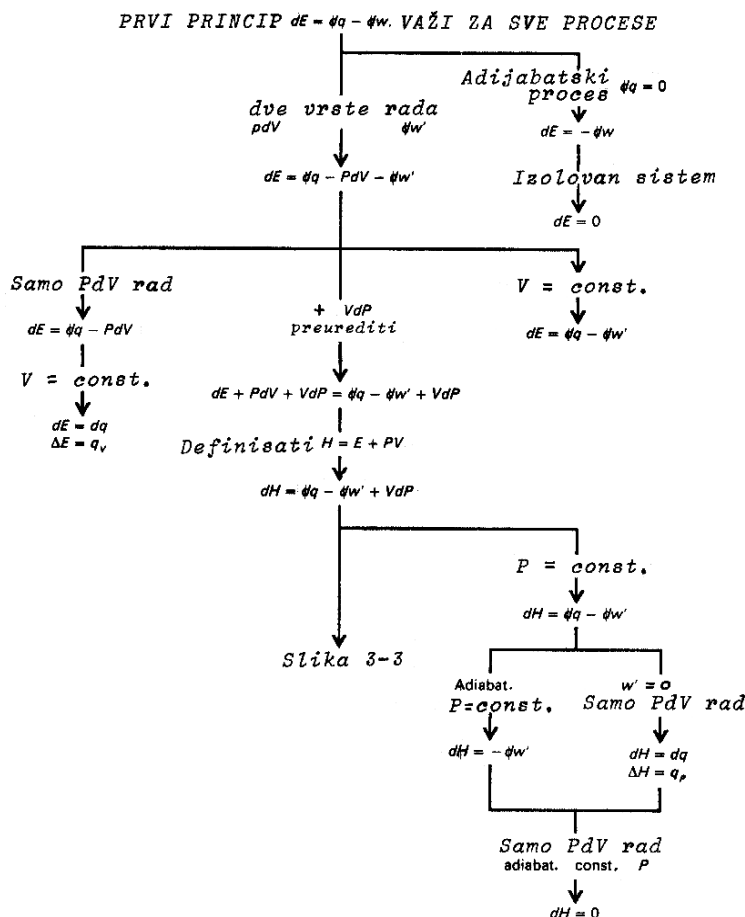
$$\Delta E = q, \text{ za konačnu promenu stanja}$$

dok, za procese koji se dešavaju pri konstantnom pritisku, biće

$$dH = dq$$

$$\Delta H = q, \text{ za konačnu promenu stanja}$$

To znači, da toplota apsorbovana u procesu koji se dešava na konstantnoj zapremini predstavlja meru ΔE , a toplota absorbovana u procesu koji se dešava na konstantnom pritisku predstavlja meru ΔH . Pošto se većina bioloških procesa dešava na konstantnom pritisku, u biohemiji se koristi ΔH . Međutim, pošto se većina ovih procesa dešava u tečnom ili čvrstom stanju, u kojima su promene zapremine zanemarljive, može se uzeti da promena u entalpiji sistema odgovara promeni u unutrašnjoj energiji ($\Delta E \approx \Delta H$). Znači, količina toplote koja se apsorbuje ili oslobađa u nekom biološkom procesu direktna je mera promene unutrašnje energije sistema i može da se meri izvođenjem datog procesa u kalorimetru.



Slika 6.2 Odnosi koji proističu iz prvog zakona termodinamike

6.2 Entropija, slobodna energija i ravnoteža

U dosadašnjem izlaganju bilo je reči samo o energetskim promenama koje prate hemijske i fizičke procese. Namerno je izostavljen važan faktor - *smer* u kojem će proces teći. Tako, prvi zakon termodinamike nam omogućuje da razmatramo promene toplote i rada koje prate neku hemijsku reakciju, kao što je na primer hidroliza ATP do neorganskog fosfata:



ali nam ne pruža mogućnost da zaključimo da li će ATP spontano da hidrolizuje u vodenom rastvoru. Intuitivno ćemo pretpostaviti da će pod datim uslovima nastati ravnoteža između H_2O , ATP, ADP i neorganskog fosfata, ali nema načina da na osnovu prvog zakona termodinamike nađemo gde se ta ravnoteža nalazi.

Posmatrajući razne ireverzibilne procese, uočićemo da ravnotežno stanje u odnosu na početno stanje karakteriše veća *neuređenost* i *veća verovatnoća*. Ako se radi o sistemu s velikim brojem čestica (na primer, hemijski sistem atoma ili manjih molekula) i koji stoga može statistički da se tretira, videćemo da u stanju ravnoteže postoji veći broj načina na koje čestice mogu da se

rasporede (neuređenost je veća). Zbog toga definišemo novu funkciju stanja koju nazivamo *entropija* (S):

$$S = k \ln W$$

gde je k = Boltzman-ova konstanta, a W = broj načina na koji se čestice mogu rasporediti. Promena entropije pri prelasku iz nekog stanja (1) u ravnotežno stanje (2) biće:

$$\Delta S = S_2 - S_1 = k \ln W_2 - k \ln W_1$$

Pošto je, kao što smo već pomenuli, $W_2 > W_1$, entropija će u ravnotežnom stanju imati maksimalnu vrednost.

Razmotrimo i beskonačno male promene u stanju sistema. Pretpostavićemo da se radi o reversibilnim promenama, što znači da pri ovome sistem ne odstupa znatno od stanja ravnoteže. U tom slučaju, može se dokazati, da je:

$$dS = dq_{rev}/T$$

Ovo je klasična definicija za promenu entropije. Za dati izotermalni proces biće:

$$\Delta S = q_{rev}/T$$

Iz gornjeg odnosa proizilazi da ako želimo da izračunamo promenu entropije pri prelasku sistema iz stanja 1 u stanje 2, potrebno je jedino razmatrati reversibilni put između ova dva stanja i odrediti absorbovanu ili oslobođenu toplotu.

Definisanje promene entropije u (infinitesimalnim), reversibilnim procesima kao $dS = dq_{rev}/T$ omogućuje nam da preformulišemo prvi zakon termodinamike za reversibilne procese:

$$dE = dq - dw = TdS - PdV$$

Ovo nam omogućuje da precizno definišemo kriterijum za sistem u ravnoteži. *Ako i samo ako je sistem u ravnoteži, beskonačno male promene će biti reversibilne.* Ako se energija i zapremina sistema održavaju konstantnim, za reversibilnu promenu biće:

$$dS = 0$$

Ovo znači da S mora da bude ili u maksimumu ili u minimumu da bi sistem sa konstantnom E i V bio u ravnoteži. Bliža analiza pokazuje da se radi o prvom slučaju. U izolovanom sistemu (održava se E i V konstantnim), sistem će biti u ravnoteži samo kada entropija dostigne maksimum, tj sistem dotigne stanje maksimalne neuređenosti. Ovo je najčešći način na koji se izražava *drugi zakon termodinamike*.

Izolovani sistemi koji se održavaju na konstantnoj zapremini nisu mnogo interesantni za biohemiju. Većina biohemijskih sistema odgovara uslovima konstantne temperature i pritiska. Za ove uslove važi nova funkcija, *Gibbs-ova slobodna energija*, G :

$$G = H - TS$$

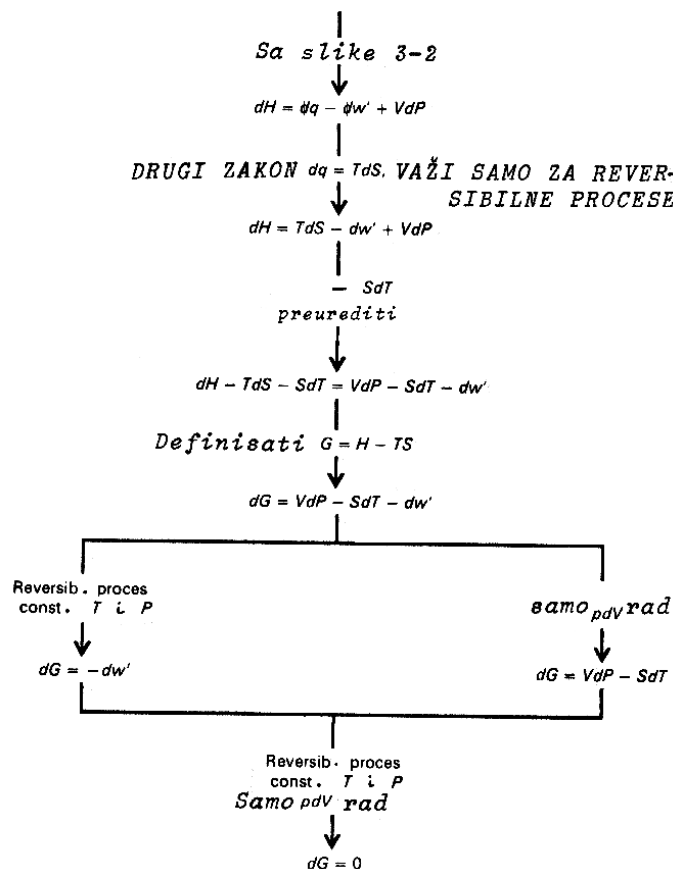
Izraz za promenu dG se dobija diferenciranjem gornje jednačine (videti sliku 6.3). Ako je dati proces reversibilan, i ako je T i P konstantno biće:

$$dG = 0$$

Ovo može da se interpretira na isti način kao što smo to napred učinili.

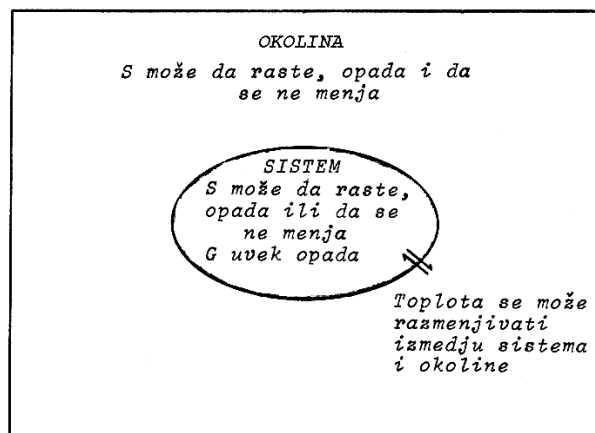
Za sistem koji je u ravnoteži i u kojem su P i T konstantni, G ima ekstremnu vrednost, ali u ovom slučaju to će biti minimum. Neke od posledica drugog zakona sumirane su na slici 6.3.

Gibbsova slobodna energija je od ogromne važnosti za određivanje smera procesa i položaja ravnoteže u biohemijskiom procesima. Ako je promena slobodne energije za neki proces negativna, taj proces će biti spontan, jer vodi u smeru uspostavljanja ravnoteže. Štaviše, ΔG je kombinacija ΔH i ΔS , što ukazuje da i smanjenje energije i povećanje entropije (neuređenosti) imaju važnu ulogu u određivanju položaja ravnoteže.



Slika 6.3 Odnosi koji proističu iz drugog zakona termodinamike

Odnosi između G , H i S za otvoren sistem prikazani su na slici 6.4.



Univerzum = sistem + okolina

Prvi princip: ukupna energija univerzuma je konstantna

Drugi princip: Entropija univerzuma stalno raste

Slika 6. 4 Odnosi između entropije (S) i slobodne energije (G) u sistemu i okolini na konstantnom pritisku i temperaturi

Na osnovu dosadašnjeg izlaganja zaključujemo da ravnotežno stanje karakterišu minimalna entalpija i maksimalna entropija (ali entropija univerzuma!).

ΔG i konstanta ravnoteže reakcije

Posmatrajmo hemijsku reakciju $aA + bB + \dots \rightleftharpoons mM + nN + \dots$ koja nije u stanju ravnoteže i gde je koncentracija A jednaka c_A , koncentracija B c_B , itd.. Promena slobodne energije pri prelasku reakcionog sistema iz početnog u neko krajnje, ravnotežno stanje biće:

$$\Delta G = G_{\text{krajnje}} - G_{\text{početno}}$$

Izraz za ΔG izveden preko hemijskih potencijala glasi:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(c_M^m \cdot c_N^n \dots / c_A^a \cdot c_B^b \dots) + RT \ln(\gamma_i)$$

Prvi član, ΔG° , *standardna slobodna energija*, označava promenu slobodne energije koja nastaje kada se i reaktanti i proizvodi nalaze u nekom proizvoljno izabranom "standardnom" stanju. U hemijskim reakcijama se uzima da to odgovara stanju u kojem se koncentracije reaktanata i proizvoda održavaju na 1M:

$$\Delta G = \Delta G^\circ \text{ ako je } c_i = 1M \text{ i } \gamma_i = 1 \text{ za sve } i$$

Drugi član u gornjoj jednačini govori o uticaju koncentracija reaktanata i proizvoda na ΔG , a treći član govori o uticaju aktiviteta. U biohemijskim izračunavanjima treći član se obično zanemaruje jer se radi o razblaženim rastvorima pa se može uzeti da su aktiviteti reaktanata i proizvoda jednaki jedinici. Za sistem u ravnoteži $\Delta G = 0$, iz čega sledi:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln(c_M^m \cdot c_N^n \dots / c_A^a \cdot c_B^b \dots) = \Delta G^\circ + RT \ln K$$

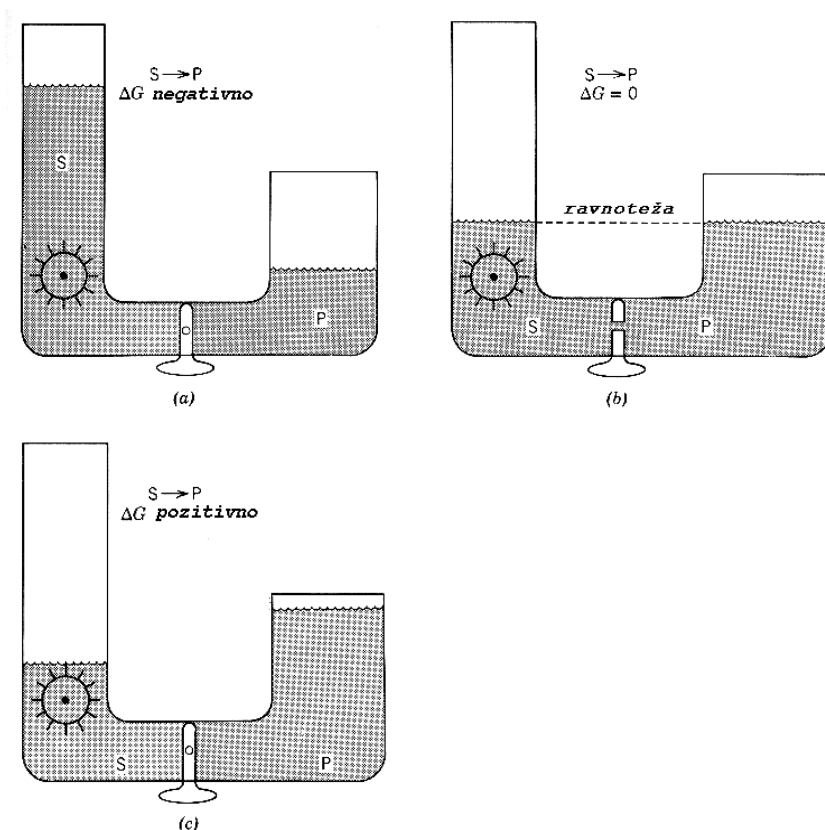
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

gde je K = konstanta ravnoteže. Na temperaturi od 25°C biće $\Delta G^\circ = -5707 \log K$. Ukoliko u reakciji učestvuje i voda (kao na primer, pri hidrolizi) u vrednost za ΔG° uključuje se i koncentracija vode (55.5M, za razblažene rastvore). U biohemijskim reakcijama ΔG° se određuje na 25 °C i pH 7 i u tom slučaju se obeležava sa ΔG° ili $\Delta G'$. ΔG za bilo koje drugo stanje (na primer, za različite koncentracije reaktanata i proizvoda) može da se izračuna polazeći od ΔG° ili $\Delta G'$ vrednost. Odnosi između ΔG i koncentracija reaktanata i proizvoda slikovito su prikazani na slici 6.5. Odnosi između konstanti ravnoteže (K) i ΔG° na različitim temperaturama dati su u tabeli 6.1.

Tabela 6.1 Odnosi između K i ΔG° na različitim temperaturama

K	$\log K$	$\Delta G^\circ(25^\circ\text{C})$	$\Delta G^\circ(30^\circ\text{C})$	$\Delta G^\circ(37^\circ\text{C})$
0,001	-317 108	17 422	17 824	
0,01	-211 406	11 606	11 883	
0,1	-15 707	5 803	5 941	
1,0	0	0	0	0
10,0	1	-5 707	-5 803	-5 941
100,0	2	-11 414	-11 606	-11 883
1000,0	3	-17 121	-17 422	-17 824

Iz tabele 6.1 vidimo da čak i male vrednosti za K odgovaraju velikim vrednostima za ΔG° . Za reakciju za koju je $K > 10^4$ (koja će biti praktično potpuno pomerena udesno) biće $\Delta G^\circ > 20$ kJ/mol. Ilustracije radi, u tabeli 3-2 date su ΔG° vrednosti za neke hemijske reakcije.



Slika 6.5 (a) Odnos reaktanta S i proizvoda P na početku reakcije je veći nego u stanju ravnoteže: reakcija će teći spontano ako je zapušač otvoren; (b) Stanje ravnoteže; (c) Odnos reaktanta S i proizvoda P je manji nego u stanju ravnoteže: reakcija će teći spontano u pravcu nastajanja reaktanta S, ako je zapušač otvoren

Tabela 6.2 ΔG° za neke hemijske reakcije na 25°C i pH 7

	ΔG° kJ/mol
Oksidacija	
glukoza + 6O ₂ → 6CO ₂ + 6H ₂ O	-2870
laktat + 3O ₂ → 3CO ₂ + 3H ₂ O	-1393
palmitat + 23O ₂ → 16CO ₂ + 16H ₂ O	-9782
Hidroliza	
saharoza + H ₂ O → glukoza + fruktoza	-30
glukozo-6-fosfat + H ₂ O → glukoza + H ₃ PO ₄	-14
glicilglicin + H ₂ O → 2 glicin	-9,2
Premeštanje	
glukozo-1-fosfat → glukozo-6-fosfat	-7,1
fruktozo-6-fosfat → glukozo-6-fosfat	-1,7
Eliminacija	
malat → fumarat + H ₂ O	+3,1

Primer:

ΔG° za hidrolizu ATP je $-32,2$ kJ/mol. Izračunati ΔG za hidrolizu ATP pri uslovima koji vladaju u ćeliji: koncentracija ATP = 10^{-3} M, koncentracija ADP = 10^{-4} M, a P_i = 10^{-2} M, (P_i = neorganski fosfat), pH = 7, i t = 25°C .

$$\begin{aligned}\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} &\rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i \\ \Delta G &= \Delta G' + 5,708 \log \frac{(\text{ADP})(\text{P}_i)}{(\text{ATP})} \\ &= -32,217 + 5,708 \log(10^{-4} \cdot 10^{-2} / 10^{-3}) \\ &= -32,217 - 17,124 = -49,341 \\ \Delta G &= -49,341 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

 ΔG i elektrohemijski potencijal

ΔG se može odrediti i merenjem elektrohemijskih potencijala (stvarnih ili hipotetičkih):

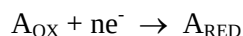
$$-W^* = \Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ \quad F = 9,6487 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$$

gde je W^* = elektrohemijski rad, n = broj primljenih ili otpuštenih elektrona, F = Faraday-eva konstanta i E° = elektrohemijski standardni potencijal. Dakle, poznavajući ΔG° , možemo za svaku reakciju da izračunamo odgovarajući elektrohemijski potencijal, i obrnuto. Izračunavanje ΔG° preko elektrohemijskih potencijala koristi se kod oksido-redukcionih reakcija koje, kao što ćemo videti, imaju ključnu ulogu u procesima metabolizma.

Oksido-redukcione reakcije se zasnivaju na prelasku elektrona s jednog molekula na drugi. Tendencija prelaska elektrona, a time i mogućnost da se data oksido-redukciona reakcija odigra, zavisi od promene slobodne energije, odnosno, prema gornjoj jednačini, od elektrohemijskog potencijala. Standardni elektrohemijski potencijali (E°) se mere u odnosu na tzv. standardnu vodoničnu elektrodu ($2\text{H}^+/\text{H}_2$ na pH = 0) pri čemu se uzima da je potencijal ove elektrode jednak nuli:



Standardni redukциони potencijali (E°) u odnosu na vodoničnu elektrodu odnose se na reakciju:



pri uslovima $[\text{A}_{\text{RED}}]/[\text{A}_{\text{OX}}] = 1$, pH = 7, t = 25°C . E° vrednosti za sisteme od biološkog interesa dati su u prilogu I.

Ako u reakciji $\text{A}_{\text{OX}} + \text{ne}^- \rightarrow \text{A}_{\text{RED}}$ sposobnost A_{OX} da primi elektrone od H_2 izrazimo potencijalom E° koji ima pozitivnu vrednost, iz odnosa $\Delta G' = -nF E^\circ$ sledi da je $\Delta G' < 0$, tj. reakcija može da teče kao što je napisana (u odnosu na vodoničnu elektrodu). Reakcija u suprotnom smeru bi bila: $\text{A}_{\text{RED}} - \text{ne}^- \rightarrow \text{A}_{\text{OX}}$, što bi značilo da A_{RED} predaje elektrone H^+ jonu sa

vodonične elektrode. U tom slučaju bi $E^{\circ'}$ imalo istu vrednost, ali suprotan znak ($-E^{\circ'}$), a odnos između elektrohemijskog potencijala i slobodne energije bio bi: $\Delta G' = -n F(-E^{\circ'})$.

U gornjem primeru reakcija je bila kuplovana s reakcijom na vodoničnoj elektrodi. U opštem slučaju, svaka oksido-redukciona reakcija obuhvata oksidaciju jedne i redukciju druge supstance. Ako odgovarajuće standardne potencijale označimo na sledeći način:



a ukupnu reakciju predstavimo jednačinom: $A_{OX} + B_{RED} \rightleftharpoons B_{OX} + A_{RED}$

ukupni potencijal će biti: $\Delta E^{\circ'} = (E^{\circ'})_1 + (-E^{\circ'})_2$

odnosno: $\Delta G' = -n F \Delta E^{\circ'}$

Dakle, pod standardnim uslovima, kada je $\Delta G' < 0$, odnosno kada je $\Delta E^{\circ'} > 0$, reakcija će teći spontano s leva na desno. Kako je $\Delta G' = -RT \ln K = -n F \Delta E^{\circ'}$

sledi da je (na 25°C):

$\Delta E^{\circ'} = (RT/nF) \ln K = (0,06/n) \log K$
gde je:

$$K = [A_{RED}][B_{OX}]/[A_{OX}][B_{RED}]$$

$[A_{RED}]$, $[B_{OX}]$, $[A_{OX}]$, $[B_{RED}]$ predstavljaju koncentracije reakcionih vrsta i proizvoda u stanju ravnoteže.

Za sistem koji se ne nalazi u stanju ravnoteže elektrohemijski potencijal je po Nernst-ovoj jednačini:

$$\text{za } A_{OX} \rightarrow A_{RED} \text{ (na 25°C)} \quad E_1 = (E^{\circ'})_1 - (0,06/n) \log [A_{RED}]/[A_{OX}]$$

$$\text{za } B_{RED} \rightarrow B_{OX} \text{ (na 25°C)} \quad E_2 = (E^{\circ'})_2 - (0,06/n) \log [B_{OX}]/[B_{RED}]$$

$$\Delta E = E_1 + E_2 = (E^{\circ'})_1 + (-E^{\circ'})_2 - (0,06/n) \log [A_{RED}][B_{OX}]/[A_{OX}][B_{RED}]$$

$$\Delta G = -n F \Delta E$$

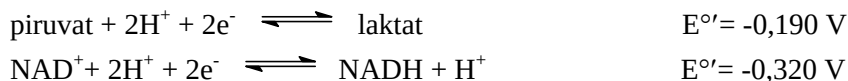
Dakle, ΔG za oksido-redukcione reakcije zavisi od standardnih redukcionih potencijala i od koncentracija supstanci koje učestvuju u reakciji.

Primer:

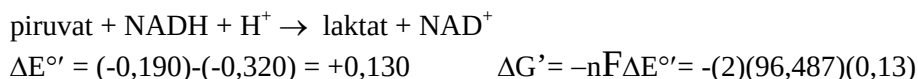
Napisati jednačinu i izračunati ΔG za reakciju koja nastaje kada se enzim laktat-dehidrogenaza doda rastvoru koji sadrži laktat, piruvat, NAD^+ i $NADH$: (a) pod

standardnim uslovima, kada je $[laktat]/[piruvat]=1$ i $[NAD^+]/[NADH]=1$, i (b) kada je $[laktat]/[piruvat]=1000$, i $[NAD^+]/[NADH] = 1000$.

(a) Iz tablica standardnih redukcionih potencijala nalazimo:



Da bi ukupno ΔE bilo pozitivno, reakcija piruvat/laktat će teći kao što je napisano a reakcija NAD^+/NADH će teći u suprotnom smeru (kao oksidacija):



$$\Delta G' = -25,1 \text{ kJ/mol}$$

$$\begin{array}{ll} E_1 = -0,190 + 0,0295 \log 1/1000 & E_2 = -0,320 + 0,0295 \log 1000 \\ = -0,190 - 0,0295 \log 1000 & = -0,320 + 0,0295(3) = - \\ 0,320 + 0,089 & \\ = -0,190 - 0,0295(3) = -0,190 - 0,089 & \end{array}$$

$$E_1 = -0,279 \text{ V}$$

$$E_2 = -0,231 \text{ V}$$

Pri ovim uslovima reakcija NAD^+/NADH će teći kao što je napisano dok će reakcija piruvat/laktat teći u suprotnom smeru (kao oksidacija):



$$\begin{array}{l} \Delta E = (0,231) - (-0,279) = -(0,231) + (0,279) \\ \Delta E = +0,048 \text{ V} \quad \Delta G = -nF\Delta E = - \\ (2)(96,487)(0,048) \end{array}$$

$$\Delta G = -9,2 \text{ kJ/mol}$$

Eksperimentalno određivanje ΔG° , ΔH° , i ΔS°

ΔG° za neku reakciju može da se izračuna polazeći od konstante ravnoteže koja se eksperimentalno određuje na osnovu određivanja ravnotežnih koncentracija reaktanata i proizvoda. ΔH° se može odrediti i kalorimetrijski. Kalorimetrijska merenja nisu precizna u slučajevima u kojima su toplotne promene suviše male, ili se proces sporo odvija. Entalpijske i entropijske promene u nekom procesu mogu se odrediti i indirektno primenom Van't-Hoff-ove jednačine:

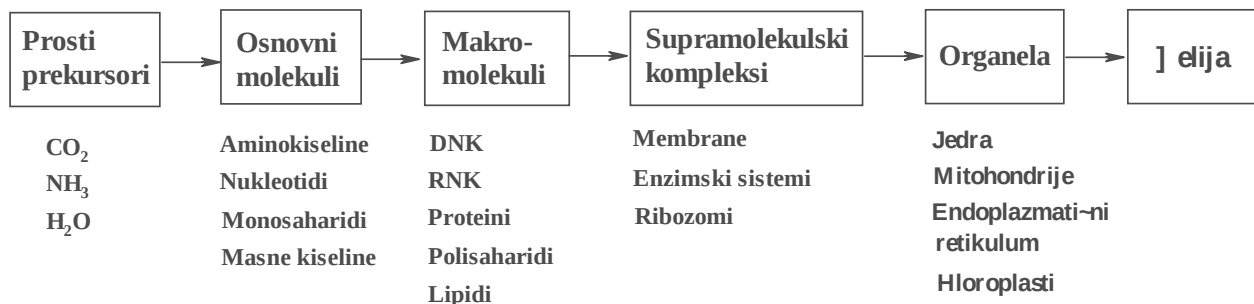
$$\begin{array}{l} \Delta G^\circ = -2,3RT \log K = \Delta H^\circ - T\Delta S \\ \log K = -(\Delta H^\circ/2,3R)(1/T) + (\Delta S^\circ/R) \end{array}$$

Zavisnost $\log K$ od $1/T$ predstavlja pravu sa nagibom $-(\Delta H^\circ/2,3R)$ i odsečkom na ordinati od $(\Delta S^\circ/R)$.

6.3 Primena koncepta ΔG u metabolizmu

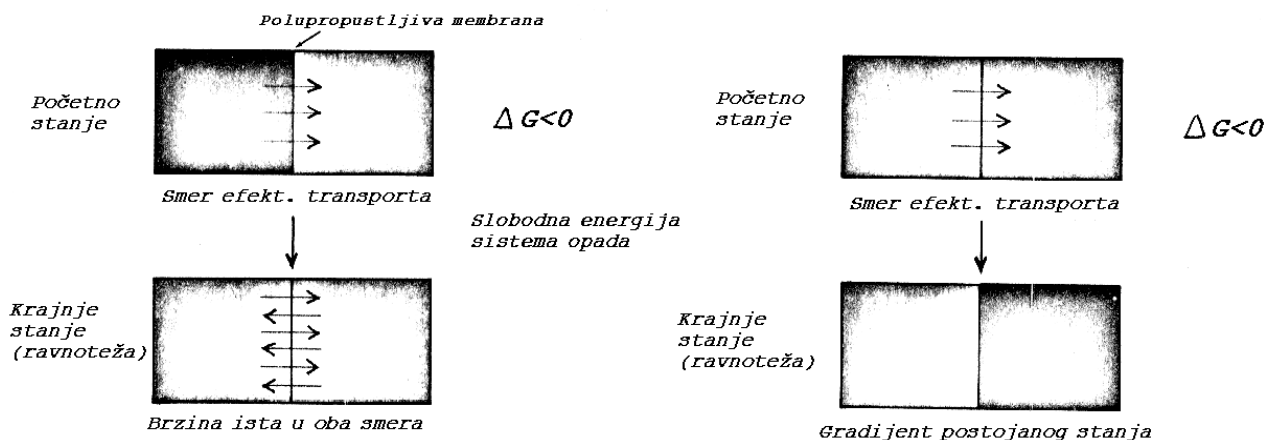
6.3.1 Opšti principi

Veliki broj hemijskih reakcija koje se odvijaju u ćeliji može da se svede na nekoliko osnovnih tipova, a principi na kojima se one zasnivaju mogu da se objasne opštim zakonitostima koje vladaju u fizičkom svetu. Pomenućemo osnovne procese koji se dešavaju u ćeliji: svaka ćelija iz malih biomolekula sintetizuje makromolekule iz kojih mogu da nastanu i više supramolekulske strukture (Slika 6.6). Makromolekuli se sintetizuju, ne samo za vreme rasta i razmnožavanja organizma, već i u zrelim ćelijama.



Slika 6.6 Glavne etape u biosintezi ćelijskih konstituenata

Da bi obavljala metaboličke procese ćelija mora da vrši transport raznih supstanci. Taj proces je dvojak. U ćeliju ulaze pojedine supstance iz okoline (na primer glukoza, K⁺ jone) iako je koncentracija tih supstanci u ćeliji znatno veća nego u okolini. Obrnuto, neke supstance se izlučuju iz ćelije iako je njihova koncentracija u okolini veća nego u unutrašnjosti ćelije (Slika 6.7). Opisani procesi se nazivaju *aktivni transport*. Živi sistemi vrše i mehanički rad. Najočigledniji primer je kontrakcija mišića (Slika 6.8), ali i skoro sve druge ćelije vrše mehanički rad (na primer, pri deobi).



Slika 6.7 Šematski prikaz pasivnog i aktivnog transporta

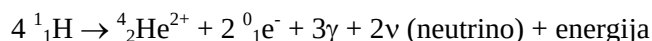
Prema našem dosadašnjem razmatranju svi ovi procesi ne bi bili mogući jer je za njih $\Delta G > 0$. Na primer, iz tabele 6.2 vidimo da je hidroliza makromolekula spontan proces jer se vrši sa $\Delta G < 0$. Znači, sinteza makromolekula, koja predstavlja obrnut proces ne bi trebalo da je moguća. Difuzija teče od veće ka manjoj koncentracije, jer se pri tome entropija sistema povećava ($\Delta G < 0$). Znači, suprotan proces ne bi trebalo da se dešava. Slična razmatranja važe i za mehanički rad.

Međutim, iz tabele 6.2, vidimo da se, na primer, oksidacija glukoze ili masti do CO_2 i H_2O vrši sa $\Delta G \ll 0$. Ako bi na neki način mogli da se povežu procesi oksidacije ovih molekula sa napred navedenim procesima za koje je $\Delta G > 0$, ukupno ΔG bi moglo da bude manje od nule i procesi bi mogli spontano da teku. U ćeliji se, kao što ćemo videti, upravo to i dešava.

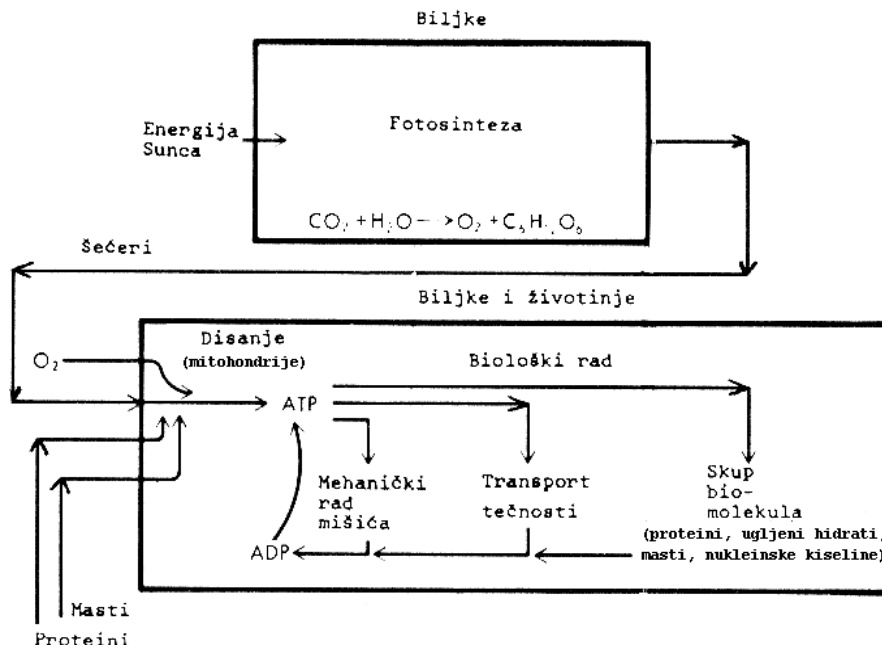
 16,7 kJ 30 min	 293 kJ 5 min	 1130 kJ 1 h
 125 kJ 10 min	 753 kJ 10 min	 1000 kJ 1 h

Slika 6.8 Približna količina energije potrebna za razne aktivnosti čoveka od 70 kg

Postavlja se još i pitanje kako organizam dolazi do ugljenih hidrata. Za proces sinteze glukoze iz CO_2 i H_2O $\Delta G'$ je 2 870 kJ/mol. Taj proces se dešava u zelenim biljkama a izvor energije je Sunce, odnosno, reakcija:



Opisana razmatranja sumirana su na slici 6.9.



Slika 6.9 Stvaranje i korišćenje hemijske energije u biološkim sistemima

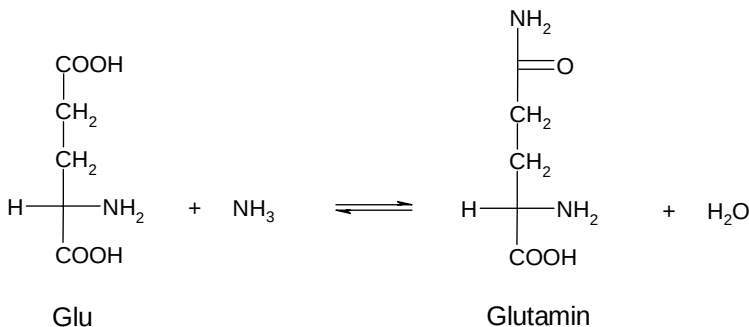
Entropija sistema pri procesima sa slike 6.9 opada jer sistem ide ka uređenijem stanju. Međutim, entropija okoline pri tome raste, jer se jedan deo energije pretvara u toplotu, a energija uložena u biosintezu se na kraju rasipa ("randomizuje") jer, kada ćelija ugine, njen sadržaj se rasipa po okolini. Tako, visoko kvalitetna energija Sunca prelazi u energiju organskih molekula "srednjeg kvaliteta" koja se na kraju rasipa i randomizuje u okolini. To znači da je protok energije u biološkom svetu jednosmeran i ireversibilan jer kada se energija jednom randomizuje više nikada ne može da se upotrebi za biološki rad.

6.3.2 Endergoni i egzergoni procesi

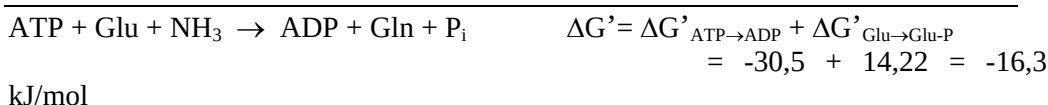
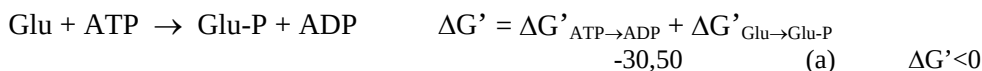
Da bismo olakšali kvantitativna razmatranja, procese koji se dešavaju u ćeliji razdvojicemo na **endergone** (za koje je $\Delta G' > 0$) i **egzergone** (za koje je $\Delta G' < 0$). Opšti princip kojim egzergoni procesi omogućuju enderogene objasnićemo na jednom jednostavnom primeru biosinteze.

Kuplovane reakcije. Zajednički intermedijer

Posmatrajmo sintezu amida iz glutaminske kiseline i amonijaka. $\Delta G'$ za hidrolizu ovog amida je -14,22 kJ/mol, pa prema tome direktna sinteza (za koju bi bilo $\Delta G' = +14,22$ kJ/mol) nije moguća. Međutim, ako ova reakcija može da se poveže (kupluje) sa reakcijom hidrolize ATP, koja se vrši sa



$\Delta G' = -30,5$ kJ/mol (videti niže), ukupno $\Delta G'$ bi bilo negativno i reakcija sinteze amida bi bila omogućena. Iz zbirne reakcije izgleda kao da je došlo do hidrolize ATP u ADP i neorganski fosfat i istovremene sinteze glutamina. Kako je G funkcija stanja možemo prostim sabiranjem odgovarajućih vrednosti da dodamo do ukupne promene, $\Delta G'$, iako znamo da se stvarni proces ne dešava na taj način. Reakcije koje se dešavaju pri ovoj sintezi se mogu opisati na sledeći način:



Vidimo da ATP reaguje sa glutaminskom kiselinom pri čemu nastaje mešoviti anhidrid. Za ovu reakciju $\Delta G' < 0$. Zatim anhidrid reaguje sa NH_3 dajući amid. I za ovu reakciju je $\Delta G' < 0$. Znači, ATP je u ovom procesu izvršio aktivaciju glutaminske kiseline, prevodeći je u anhidrid, i na taj način je omogućio da sve reakcije budu egzerogene. Treba imati u vidu da se izračunate promene u slobodnoj energiji odnose na standardno stanje ($\Delta G'$). U ćeliji su koncentracije reaktanata znatno manje i promene slobodnih energija (ΔG) će se znatno razlikovati od ovih vrednosti.

Treba naglasiti da je ovo opšti način na koji se hemijska energija sadržana u ATP koristi za ostvarivanje endergonih procesa u živim sistemima. I ove, kao i druge reakcije koje se odigravaju u ćeliji katalizovane su specifičnim enzimima (Poglavlje 4).

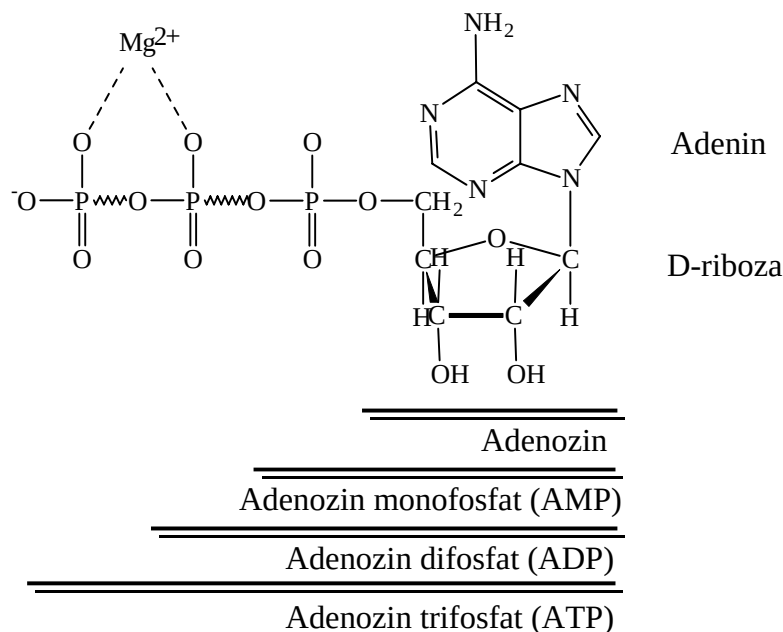
Struktura i osobine adenozin trifosfata (ATP)

Adenozin trifosfat (Slika 6.10) je izolovan 1929. godine, a njegova centralna uloga u procesima metabolizma objašnjena je na osnovu niza eksperimentalnih zapažanja² od kojih navodima neka: nastajanje ATP iz ADP u tkivu za vreme oksidacije, sinteza glikogena iz glukoze *in vitro* u prisustvu ATP, hidroliza ATP pomoću miozina - glavnog proteina mišića. ATP se nalazi u svakoj ćeliji u koncentraciji od 0,001 - 0,01 M, odnosno, od 0,5-5,0 mg/mL. Standardna slobodna

² F.Lipmann, Adv.Enzymol. XVIII (1941) 99.

energija za hidrolizu ATP u ADP i P_i ($\Delta G' = -30,5$ kJ/mol) određena je na osnovu konstante hidrolize ATP u prisustvu enzima. U ćeliji, gde su koncentracije ATP znatno manje i gde nastajanje kompleksa favorizuje hidrolizu, $\Delta G'$ hidrolize se procenjuje na oko -50 kJ/mol. Pošto je $\Delta G'$ za hidrolizu drugih derivata fosfata koja se nalaze u ćeliji znatno manje (Tabela 6.3), ATP se naziva "fosfat visoke energije". Treba imati u vidu da se ovo ne odnosi na energiju veze nego samo na promenu slobodne energije pri hidrolizi, što samo znači da je slobodna energija krajnjeg stanja (G_{ADP}) znatno manja od slobodne energije početnog stanja (G_{ATP}): $\Delta G = G_{ADP} - G_{ATP}$, odnosno da je ADP znatno stabilniji od ATP. Zašto je za hidrolizu ATP $\Delta G \ll 0$?

(1) Na pH 7 linearni fosfatni deo molekula ATP ima četiri negativne šarže koje su međusobno vrlo blizu i koje se stoga odbijaju. Kada se jedna fosfatna grupa hidrolizuje odbijanje među preostalim grupama se smanjuje. (2) Kod oslobođenog neorganskog fosfata dolazi do povećanja rezonancione stabilizacije u odnosu na vezani fosfat u ATP.



Slika 6.10 Struktura ATP na pH 7 (cik-cak linija označava vezu visoke energije)

Primer:

Adenilatni "pul" u kulturi limfosarkoma se sastoji od 10^{-3} M ATP, $3 \cdot 10^{-4}$ M ADP, i 10^{-4} M AMP. (a) Izračunati "energetsku šaržu" ćelije. (b) Pretpostavljajući da je reakcija, katalizovana adenilat kinazom, u ravnoteži izračunati K reakcije.

(a) Energetska šarža se definiše na sledeći način:
$$= \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

$\frac{1}{2}[ADP]$ je jednaka $[ATP]$ zbog reakcije: $2ADP \xrightleftharpoons{\text{adenilat kinaza}} ATP + AMP$
($2[ADP] \approx 1[ATP]$; $1[ADP] \approx \frac{1}{2}[ATP]$)

$$\therefore \text{energetski faktor} = \frac{(10^{-3}) + \frac{1}{2}(3 \cdot 10^{-4})}{(10^{-3}) + (3 \cdot 10^{-4}) + (10^{-4})} = \frac{1,15 \cdot 10^{-3}}{1,4 \cdot 10^{-3}} = \boxed{0,82}$$

$$K' = \frac{[ATP][AMP]}{[ADP]^2} = \frac{(10^{-3})(10^{-4})}{(3 \cdot 10^{-4})^2} = \frac{10^{-7}}{9 \cdot 10^{-8}} = \boxed{1,11}$$

Primer:

Odnos ATP/ADP u ćeliji kvasca je oko 10. Koliki bi trebalo da bude odnos 3-fosfoglicerat/1,3-difosfo-glicerat da bi reakcija katalizovana fosfoglicerat-kinazom tekla u smeru nastajanja 1,3-difosfo-glicerata:



$$\Delta G' = +18 \text{ kJ/mol}$$

$$K' = 7,039 \cdot 10^{-4}$$

Pozitivna vrednost za $\Delta G'$ ukazuje da reakcija nije termodinamički moguća pod uslovima standardnog stanja, Pošto pravac reakcije zavisi od ΔG , koje pak zavisi od koncentracija reaktanata i proizvoda, biće:

$$K'_{eq} = \frac{[ADP][1,3\text{-DiPGA}]}{[ATP][3\text{-PGA}]} = 7,039 \cdot 10^{-4}$$

$$\frac{[3\text{-PGA}]}{[1,3\text{-DiPGA}]} = \frac{[ADP]}{[ATP]K'_{eq}} = \frac{(1)}{(10)(7,039 \cdot 10^{-4})} = \boxed{142}$$

Znači, ako je odnos ATP/ADP = 10, i odnos 3-PGA/1,3-DiPGA = 142, reakcija će biti u ravnoteži. Povećanje ma kog od ovih odnosa izazvaće stvaranje 1,3-DiPGA i ADP.

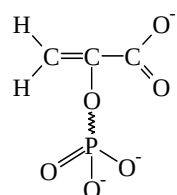
Drugi, biološki važni, derivati fosfata

Pored ATP u ćeliji se nalazi i niz drugih derivata fosfata. Za neka od ovih jedinjenja $\Delta G'$ hidrolize još je negativnije od vrednosti karakteristične za ATP (znači, hidroliza je još više favorizovana), dok se druga nalaze ispod ATP po svojim $\Delta G'$ vrednostima. Strukture nekih od ovih važnih bioloških fosforilovanih jedinjenja date su na slici 6.11. ATP po svojoj $\Delta G'$ vrednosti za hidrolizu zauzima srednje mesto među ovim jedinjenjima. Ovo znači da ADP može da reaguje sa jedinjenjima koja se nalaze iznad njega u nizu dajući ATP, dok ATP pak može da fosforiluje molekule koji se nalaze ispod njega u nizu. Sve ove reakcije su katalizovane odgovarajućim enzimima. Mada je termodinamički moguć, transfer fosfatnih grupa na molekule akceptore pomoću energetski bogatijih jedinjenja od ATP u ćeliji se ne dešava, jer ne postoje enzimi koji bi katalizovali ove reakcije. Ovo je jedan od načina na koji ćelija kontroliše protok energije.

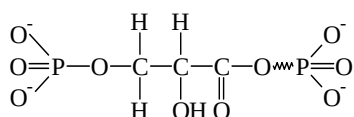
Tabela 6.3 Standardne slobodne energije hidrolize derivata fosfata

	$\Delta G^{\circ'}$ kJ/mol	
Fosfoenolpiruvat	-61,92	
1,3-Difosfoglicerat	-49,37	
Fosfokreatin	-43,09	
Acetil-fosfat	-42,26	
ATP	-30,54	
Glukoza-1-fosfat	-20,92	
Fruktoza-6-fosfat	-15,90	
Glukoza-6-fosfat	-13,81	
3-fosfoglicerat	-10,04	
Glicerol-3-fosfat	-9,20	

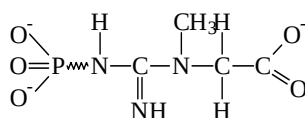
Smer
transfera
fosfatne
grupe



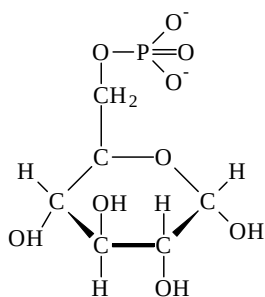
Fosfoenolpiruvat



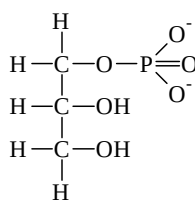
1,3-difosfoglicerat



Fosfokreatin



Glukoza-6-fosfat



Glicerol-3-fosfat

Slika 6.11 Neki, biološki važni derivati fosfata

ATP i biosinteza

U tabeli 6.4, ilustracije radi, odabrali smo glavne procese biosinteze u ćeliji *E. coli*.

Tabela 6.4 Biosintetički kapacitet jedne ćelije *E. coli*

Hemijski satojak	Procenat Procenat suve težine ukupne	Približna molekulska masa u ćeliji nastaje potrebnih za biosintetičke sekundi	Broj molekula	Broj mole- kula koji sintezu	Broj kula u sekundi	mole- ATP
DNK	5	2000000000	1	0,00083	60000	25
RNK	10	1000000	15000	12,5	75000	3,1
Protein	70	60000	1700000	1400	2120000	28,0
Lipid	10	1000	15000000	12500	87500	3,7
Polisaharidi	5	200000	39000	32,5	65000	2,7

Kao što smo već pomenuli, biosintetički procesi se dešavaju, ne samo pri razmnožavanju ćelija, već i u postojećim, zrelim ćelijama, u kojima je brzina sinteze jednaka brzini razgradnje proizvoda ("steady state"). Ovo je jedna ključna osobina živih sistema koja se može objasniti na osnovu termodinamike ireversibilnih procesa. Naime, ćelija predstavlja otvoren sistem tako da se u njoj ne može uspostaviti ravnoteža u smislu ravnoteže u klasičnoj termodinamici. Ali, ravnoteža kod reversibilnih procesa odgovara postojanom stanju ("steady state") kod ireversibilnih procesa. U postojanom stanju ireversibilnih procesa je isto kao u ravnotežnom stanju reversibilnih procesa proizvodnja entropije najmanja. Kao što sistemi u klasičnoj termodinamici teže ravnoteži, otvoreni sistemi teže postojanom stanju, ili kako A.Katchalsky, jedan od pionira primene termodinamike ireversibilnih procesa u biologiji, kaže:

"This remarkable conclusion. . . sheds new light on "the wisdom of living organisms." Life is a constant struggle against the tendency to produce entropy by irreversible processes. The synthesis of large and information-rich macromolecules, the formation of intricately structured cells, the development of organization - all these are powerful anti-entropic forces. But since there is no possibility of escaping the entropic doom imposed on all natural phenoma under the Second Law of thermodynamics, living organisms choose the least wil - they produce entropy at a minimal rate by maintainig "steady state".³

³ Prevod: "Ovaj značajan zaključak... baca novu svetlost na "mudrost živih organizama". Život je stalna borba protiv težnje da se ireversibilnim procesima proizvede entropija. Sintaza velikih i informacijama bogatih makromolekula, stvaranje ćelija zamršene strukture, razvoj organizovanosti - sve su to snažne protiv-entropijske sile. Ali, pošto ne postoji mogućnost da se izbegne entropijska propast koju je drugi zakon termodinamike namenio svim prirodnim pojavama, živi organizmi biraju najmanje zlo: oni proizvode entropiju minimalnom brzinom održavajući "postojano stanje".

A. Katchalsky, "Nonequilibrium Thermodynamics", *Modern Science and Technology*, (R. Colbern, editor), Van-Nostrand, New York, 1965, p.194.

Aktivni transport

Drugi važan endergoni proces u ćeliji koji ćemo razmatrati jeste aktivni transport. Za procese transporta nenaelektrisanih molekula važi:

$$\Delta G = RT \ln(c_1/c_2)$$

U stanju ravnoteže $c_1 = c_2$, pa je $\Delta G' = 0$. Kod transporta naelektrisanih supstanci pored gradijenta mase postoji i gradijent naelektrisanja:

$$\Delta G = RT \ln(c_1/c_2) + z F \Delta \Psi$$

U gornjoj jednačini z = šarža jona, F = Faraday-eva konstanta, a $\Delta \Psi$ = razlika u električnom potencijalu, tzv. *membranski potencijal*. Membranski potencijal može, zbog kompenzirajućeg efekta drugih jona, da bude veoma mali. Ovaj potencijal ima važnu ulogu u funkcionisanju nervnih i mišićnih ćelija, u membranama mitohondrija i u hloroplastima. Ukoliko je $c_1 < c_2$, biće $\Delta G < 0$ i proces difuzije će spontano teći dok se koncentracije sa obe strane membrane ne izjednače (Slika 3-11). Sistemi za aktivni transport koji se nalaze u ćelijskim membranama mogu da vrše transport pojedinih supstanci nasuprot veoma velikim koncentracionim gradijentima. Pošto je za ove procese $\Delta G > 0$, oni mora da se kupluju sa egzergonim procesima, tj. sa utroškom ATP (ATP→ADP).

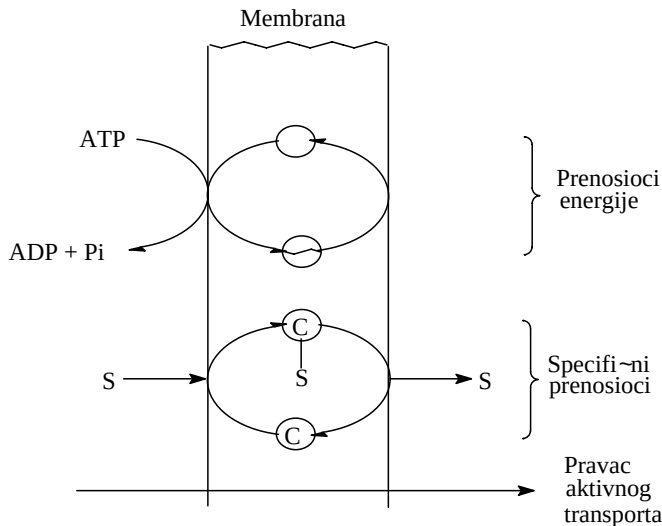
Primer:

Jedan od najimpresivnijih procesa aktivnog transporta dešava se pri izlučivanju H^+ jona iz ćelija (pH 7,4) u stomahni sok sisara (pH 1). Koncentracioni gradijent u ovom slučaju je $10^{-1}/10^{-7} = 10^6$ ili 1000000:1! Promena slobodne energije za ovaj proces, ako zanemarimo membranski potencijal, iznosi:

$$\Delta G = RT \ln(10^{-1}/10^{-7}) = 33,64 \text{ kJ}$$

što odgovara potrošnji najmanje dva mola ATP.

Pored toga što je endergon, aktivni transport je i specifičan u smislu da za svaku supstancu koja se transportuje postoji specifični protein - prenosilac u membrani. Kinetika ovih procesa je vrlo slična kinetici enzima (Poglavlje 4). Ova dva osnovna, uzajamno povezana, procesa koji se dešavaju pri aktivnom transportu prikazani su na slici 6.12.

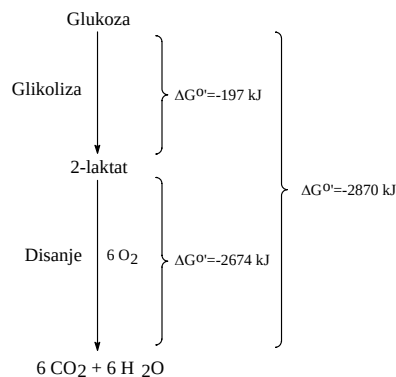


Slika 6.12 Šematski prikaz procesa aktivnog transporta

Napominjemo da je molekulski mehanizam za aktivni transport nekih supstanci donekle utvrđen. Ovdje se misli na aktivni transport K^+ i Na^+ jona (što je naročito mnogo proučavano), transport Ca^{2+} , transport nekih šećera i aminokiselina u bakterijskim i životinjskim ćelijama. Dok se transport alkalnih jona vrši uz direktno učešće ATP, transport šećera i aminokiselina kroz bakterijske membrane uslovljen je membranskim potencijalom koji nastaje pri prenosu elektrona za vreme oksidativne fosforilacije.

Egzergoni procesi

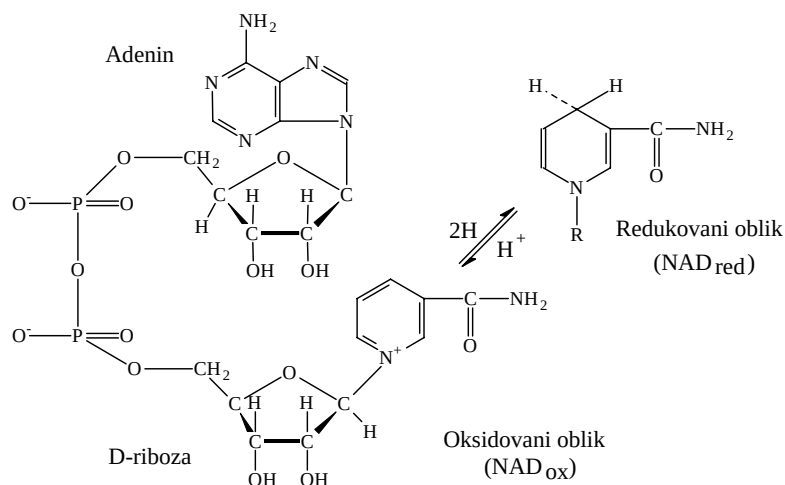
Na početku izlaganja o principima metabolizma pomenuli smo da je za proces oksidacije glukoze do CO_2 i H_2O , $\Delta G' = -2\,810\text{ kJ/mol}$. Kako je $\Delta G'$ za nastajanje ATP iz ADP i fosfata jednako $+30,54\text{ kJ/mol}$, zaključujemo da bi oksidacija glukoze mogla da obezbedi stvaranje većeg broja molekula ATP. Proces oksidacije glukoze u ćeliji nije direktan nego se vrši postepeno preko niza intermedijera uz učešće većeg broja enzima i enzimskih sistema. Na taj način je omogućena maksimalna efikasnost procesa. Oksidacija glukoze se vrši u dve osnovne faze: prva je pod anaerobnim uslovima (glikoliza), a druga je u prisustvu kiseonika (respiracija) (Slika 6.13).



Slika 6.13 Energetski bilans oksidacije glukoze: glikoliza i respiracija

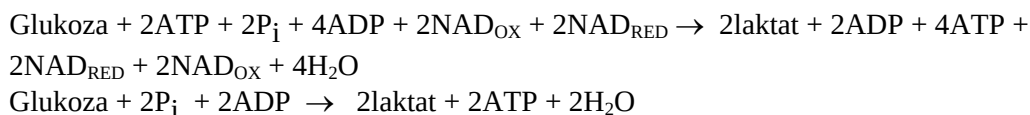
Glikoliza

U glikolizi se molekul glukoze fragmentiše tako da se jedan deo redukuje a drugi oksiduje. Da bi se to postiglo molekul glukoze se prvo fosforiluje pomoću ATP, a zatim preko niza reakcija dolazi do stvaranja gliceraldehid-trifosfata, koji se oksiduje pomoću NAD_{OX} (Slika 6.14) i istovremeno reaguje sa fosfatom dajući 1,3-difosfoglicerat, tj. jedinjenje koje se nalazi iznad ATP u energetsom nizu (Tabela 6.3).



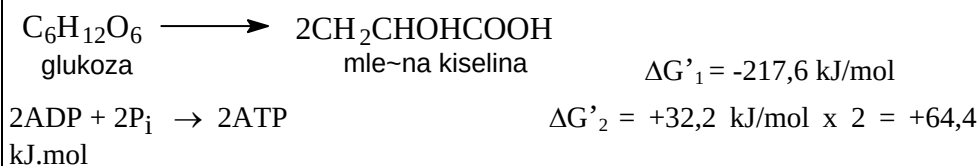
Slika 6.14 Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) i njegova uloga kao prenosioca vodonika

Nastali 1,3-difosfoglicerat fosforiluje molekul ADP u ATP, a sam, daljim transformacijama, prelazi u fosfoenolpiruvat koji fosforiluje još jedan molekul ADP (videti tabelu 6.3). Oslobođeni piruvat se redukuje pomoću NAD_{RED} (videti Prilog) i prelazi u laktat, dok je NAD_{OX} spreman da ponovo učestvuje u ciklusu. Ukupni procesi pri glikolizi mogu se predstaviti zbirnom jednačinom:



Primer:

Prelaz glukoze u mlečnu kiselinu ima $\Delta G' = -220 \text{ kJ/mol}$. Pod anaerobnim uslovima ovo pretvaranje je kuplovano sa nastajanjem 2 mola ATP po molu glukoze. Izračunati $\Delta G'$ za ukupnu reakciju. Kolika je efikasnost procesa?



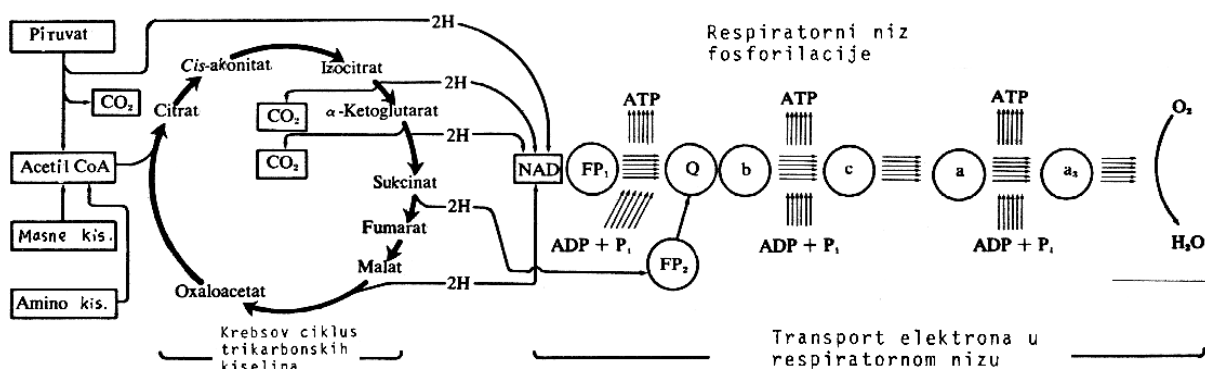
(Zbir) glukoza + 2ADP + 2P_I → 2 mlečna
kis. + 2ATP

$$\Delta G'_3 = -153,2 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Efikasnost} = (\text{Sačuvana energija})/(\text{Utrošena energija}) \times 100\% = 64,4/217,6 \times 100\% = 29,6\%$$

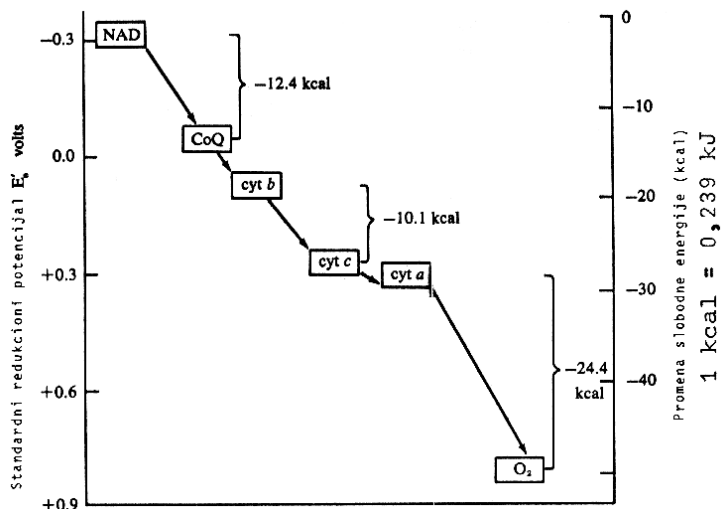
Respiracija

Respiracija obuhvata procese oksidacije ne samo glukoze nego i drugih molekula (aminokiselina, masnih kiselina). Enzimski sistemi koji katalizuju respiratorne reakcije i konzervaciju respiratorne energije u obliku ATP vrlo su komplikovani. Za razliku od glikolitičkih, respiratorni procesi su skoncentrisani u mitohondrijama. Da bi učestvovala u respiratornim procesima sve supstance treba da pređu u acetil-CoA koji se zatim uključuje u ciklus trikarbonskih kiselina (Slika 6.15). Co-A ima strukturu sličnu NAD i ATP, a $\Delta G'$ za hidrolizu acetil grupe je -31,4 kJ/mol. Ovo znači da je acetil grupa aktivirana i da pomoću enzima može da pređe na razne akceptore.



Slika 6.15 Oksidacija glukoze, masnih kiselina i aminokiselina u ćeliji.

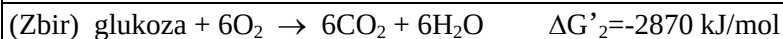
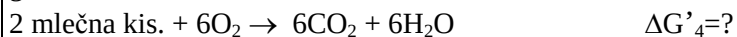
U jednom ciklusu trikarbonskih kiselina nastaju tri molekula NAD_{red} iz NAD_{ox} koji se nalaze kao koenzimi u odgovarajućim dehidrogenazama i jedan molekul FAD_{red} iz FAD_{ox}. NAD_{red} i FAD_{ox} predaju svoje elektrone drugoj seriji enzima (odnosno, njihovim koenzimima) koji obrazuju respiratorni niz. Na slici 6.16 prikazane su razlike potencijala među ovim koenzimima, kao i njima odgovarajuće promene u $\Delta G'$. Posebno su obeležene one promene $\Delta G'$ pri kojima može da dođe do sinteze ATP.



Slika 6.16 Oslobađanje energije prelaskom e^- sa NAD_{red} na kiseonik.

Primer:

Izračunati na osnovu sledećih podataka $\Delta G'$ za potpunu oksidaciju mlečne kiseline u CO_2 i H_2O . Koliko mola ATP može da nastane u ovim procesima pri efikasnosti od 40%?



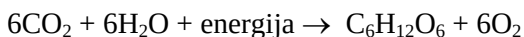
$$\Delta G'_2 = \Delta G'_1 + \Delta G'_4 \Rightarrow \Delta G'_4 = -2652,7 \text{ kJ/mol}$$

$$\therefore \Delta G'_3 = -2652,7/2 = -1326,3 \text{ kJ/mol}$$

Za efikasnost od 40%: $0,40 \times 1326 = 531,4 \text{ J}$ $\therefore 531,4/32,2 = \sim 16 \text{ mol ATP}$

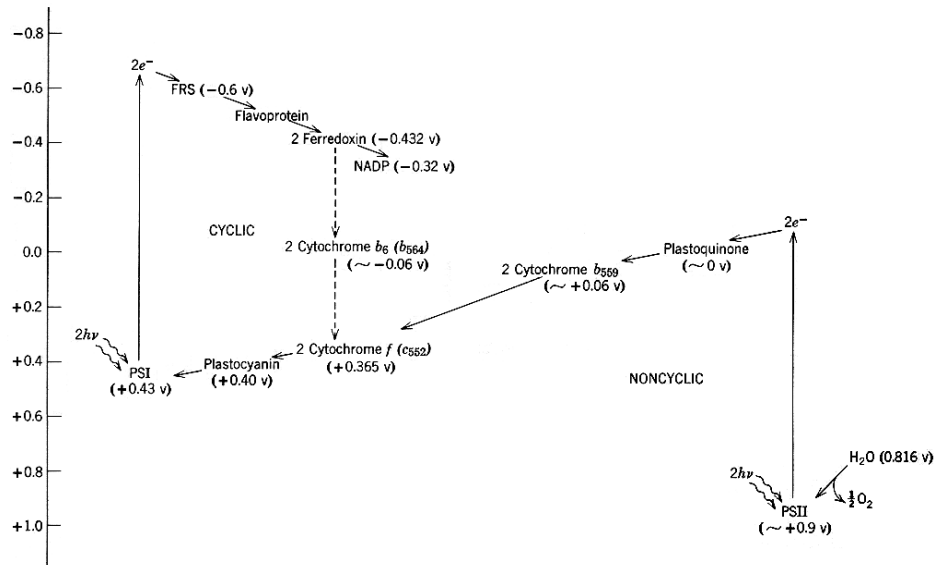
Fotosinteza

Ukupna reakcija koja se dešava pri fotosintezi može da se predstavi na sledeći način:



Fotosinteza obuhvata reakcije koje se odigravaju na svetlosti i u mraku. Pod uticajem svetlosti elektroni hlorofila se ekscituju a zatim prenose preko niza pigmenata (slično kao kod respiracije). Postoje dva ciklusa u kojima se ovo dešava: u cikličnoj fosforilaciji ekscitovani elektroni se vraćaju posle završenog ciklusa, dok se u necikličnoj fosforilaciji "elektronska rupa" u hlorofilu popunjava elektronom iz OH^- jona iz vode pri čemu se oslobađa kiseonik ($2\text{OH}^- - 2e^- \rightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 +$

H₂O). U oba procesa nastaje ATP (ADP + P_i + energija → ATP + H₂O), a u procesu neciklične fosforilacije vrši se i redukcija NADP_{ox} u NADP_{red}. Ove reakcije su prikazane na slici 6.17. Nastali ATP i NADP omogućuju sintezu glukoze iz CO₂ i H₂O u reakcijama *Calvin-ovog ciklusa*.



Slika 6.17 Reakcije svetle faze fotosinteze

Primer :

Koliko mola ATP može da se sintetizuje u fotosintetičkom organizmu koji apsorbuje 1 einstein (ajnstajn = 1 mol fotona = $N_A h\nu$) crvene svetlosti talasne dužine 700 nm pri 100% efikasnosti? Koliko molekula ATP nastaje na račun jednog fotona? Kolika je efikasnost konverzije energije pri kojoj na dva mola elektrona eksitovanih crvenom svetlošću nastaje 1 mol ATP?

Energija jednog einsteina je : $E = Nh\nu = Nhc/\lambda$ cal/einstein $E = 12/\lambda$ J/einstein

gde je $N = 6,023 \times 10^{23}$ fotona/einstein, $h = 6,627 \times 10^{-27}$ erg·s = $6,61 \times 10^{-34}$ J·s

Broj mola ATP/einstein: $E = 12/\lambda = 12/7 \cdot 10^{-6} = 170$ kJ/einstein

$170,65/32,21 = \boxed{5 \text{ mol ATP/einstein}}$

Na račun jednog fotona nastaje isti broj elektrona koliko nastaje mola ATP na račun jednog mola (einsteina) fotona: $\therefore \boxed{5 \text{ molek.ATP/foton}}$

Utrošena energija: $E = (2)(170) = 341,3$ kJ

Konzervirana energija: $E = (1)(32,21) = 32,21$ kJ

Efikasnost: $(32,21/341,3) \cdot 100 = \boxed{9,4\%}$

ZADACI I PROBLEMI

1. Odgovoriti na sledeća pitanja sa *tačno* ili *pogrešno*. Ako je odgovor *pogrešno* dati obrazloženje.

- (a) Energija se prenosi od fototrofa ka heterotrofama, dok materija kruži između njih.
- (b) U živim organizmima rad može da se ostvari prelaskom toplote sa toplijih na hladnije delove.
- (c) Sistem je u termodinamičkoj ravnoteži kada je njegova entropija u minimumu.
- (d) $\Delta G' = 0$ označava da je reakcija u stanju ravnoteže.
- (e) Elektroni se prenose sa redukovanoг člana oksido-redukcionog para na oksidovani član sa negativnijim standardnim potencijalom.

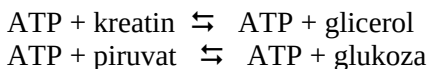
2. Poređajte vrednosti za entropiju od manjih ka većim vrednostima za: (a) čvrsto, tečno i gasovito agregatno stanje supstance; (b) za led i vodu.

3. Drugi princip termodinamike kaže da za sistem i okolinu entropija mora kontinualno da se uvećava. Živi organizmi stalno stvaraju vrlo uređene strukture iz manje uređenih "sirovina". Da li živi sistemi narušavaju drugi princip termodinamike?

4. Koje su zajedničke strukturne karakteristike ATP, FAD, NAD, i CoA ?

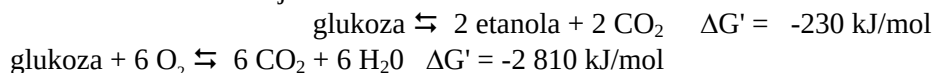
5. Izvesti odnos između pK_a i ΔG° . Koliko je ΔG° za sirćetnu kiselinu ($pK_a = 4,8$)?

6. Napisati proizvode i smer sledećih reakcija pod pretpostavkom da se reaktanti i proizvodi na početku nalaze u ekvimolarnim količinama:



7. Koliko molova glukoze treba da se potpuno oksiduje pri 40% efikasnosti za obavljanje rada iz primera na slici 6.7? Koliki bi taj broj bio da se oksidacija glukoze vrši samo u procesu glikolize?

8. Date su sledeće reakcije:



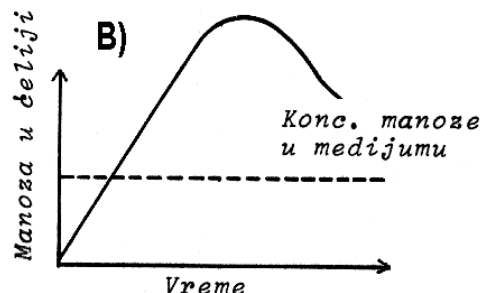
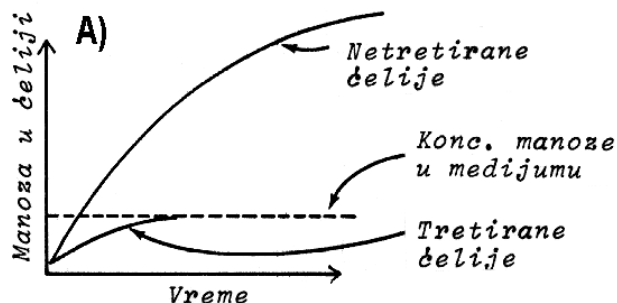
Izračunati koliko mola ATP nastaje iz ADP pri potpunoj oksidaciji etanola pod pretpostavkom da je efikasnost procesa 44% pod uslovima postojanog ("steady state") stanja.

10. Izračunati minimalan odnos $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^{+}]$ koji je potreban za redukciju oksalacetata (OxA) u malat kada je: $[\text{OxA}] = 10^{-4}$ i $[\text{malat}] = 10^{-4}$. Koji odnos treba da bude ako je: $[\text{OxA}] = 10^{-6}$ i $[\text{malat}] = 10^{-4}$?

11. Krv sadrži oko 0,1 M Cl^- , a tkivo mozga 0,04 M Cl^- . Izračunati: (a) ΔG za transport Cl^- iz krvi u mozak, (b) energiju potrebnu za transport Cl^- iz moždanog tkiva u okolinu.

12. Koliki rad izvedu bubrezi pri ekskreciji 1 litra urina pod pretpostavkom da urin sadrži samo ureu čija je koncentracija u plazmi 0,005 M, a u urinu 0,333 M?

13. Neka plesan može da vrši aktivni transport manoze, ali ne može da metabolizira šećere. Posle tretiranja ćelija natrijum-azidom i jod-acetatom dobijeni su rezultati na slici A. Posle inkubiranja ovih ćelija sa 2-deoksiglukozom tokom 30 minuta ćelije su isprane i ponovo prenete u medijumu koji je sadržavao manozu. Dobijeni su rezultati na slici B. Objasniti ove rezultate.

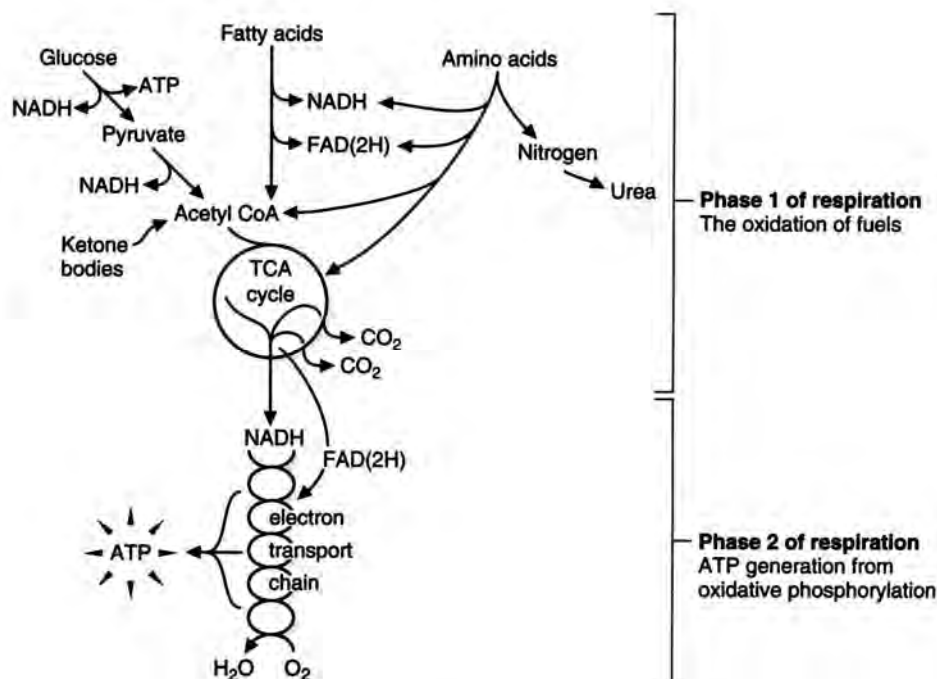


PRILOG: STANDARDNI REDUKCIONI POTENCIJALI OKSIDO-REDUKCIONIH REAKCIJA U BIOHEMIJI

Polureakcija (napisana kao redukcija) E° na pH 7 (V)	Polureakcija (napisana kao redukcija) E° na pH 7 (V)
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$ 0,816	$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$ -0,180
$Fe^{3+} + 1e^- \rightarrow Fe^{2+}$ 0,771	$Piruvat + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{laktat}$ -0,190
$SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow SO_3^{2-} + H_2O$ 0,480	$Riboflavin + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{Riboflavin-}H_2$ -0,200
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$ 0,420	$Cistin + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{cistein}$ -0,220
$2I^- + 2e^- \rightarrow I_2$ 0,536	$GSSG + 2H^+ + 2e^- \rightarrow GSH$ -0,230
$\text{Citohrom } a_3\text{-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{Citohrom } a_3\text{-Fe}^{2+}$ 0,550	$S^0 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2S$ -0,230
$\frac{1}{2}O_2 + H_2O + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ 0,300	$1,3\text{-Difodfoglicerna kis.} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$
$\text{Citohrom } a\text{-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{Citohrom } a\text{-Fe}^{2+}$ 0,290	$GAP + P_i$ -0,290
$\text{Citohrom } c\text{-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{Citohrom } c\text{-Fe}^{2+}$ 0,250	$\text{Acetoacetat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \beta\text{-hidroksibutirat}$ -0,290
$2,6\text{-Dihloro-fenolindofenol}_{(ox)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$	$\text{Lipoat}_{(ox)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{lipoat}_{(red)}$ -0,290
$2,6\text{-Dihloro-fenolindofenol}_{(red)}$ 0,220	$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H^+$ -0,320
$\text{Krotonil-S-CoA} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{butiril-S-CoA}$ 0,190	$NADP^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADPH + H^+$ -0,320
$Cu^{2+} + 1e^- \rightarrow Cu^+$ 0,150	$\text{Piruvat} + CO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{malat}$ -0,330
$\text{Methemoglobin-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{hemoglobin-Fe}^{2+}$ 0,139	$\text{Urna kis.} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{ksantat}$ -0,360
$\text{Ubihinin} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{ubihinin-}H_2$ 0,100	$\text{Acetil-S-CoA} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{acetaldehid} + CoA$ -0,410
$\text{Dehidroaskorbat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{askorbat}$ 0,060	$CO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{format}$ -0,420
$\text{Metmioglobin-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{mioglobin-Fe}^{2+}$ 0,046	$H^+ + 1e^- \rightarrow \frac{1}{2}H_2$ -0,420
$\text{Fumarat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{sukcinat}$ 0,030	$\text{Feredolsin-Fe}^{3+} + 1e^- \rightarrow \text{feredoksin-Fe}^{2+}$ -0,432
$\text{Metilensko plavo}_{(ox)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$	$\text{Glukonat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{glukoza} + H_2O$ -0,450
$\text{Metilensko plavo}_{(red)}$ 0,011	$3\text{-fosfoglicerat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$
$\text{Piruvat} + NH_3 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{alanin}$ -0,130	$\text{gliceraldehid-3-fosfat} + H_2O$ -0,550
$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_3 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$	$\text{Metilviologen}_{(ox)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{Metilviologen}_{(red)}$ -0,550
$\text{glutamat} + H_2O$ -0,140	$\text{Acetat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{acetaldehid}$ -0,600
$\text{Acetaldehid} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{etanol}$ -0,163	$\text{Sukcinat} + CO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarat} + H_2O$ -0,670
$\text{Oksalacetat} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{malat}$ -0,175	$\text{Acetat} + CO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{piruvat}$ -0,700

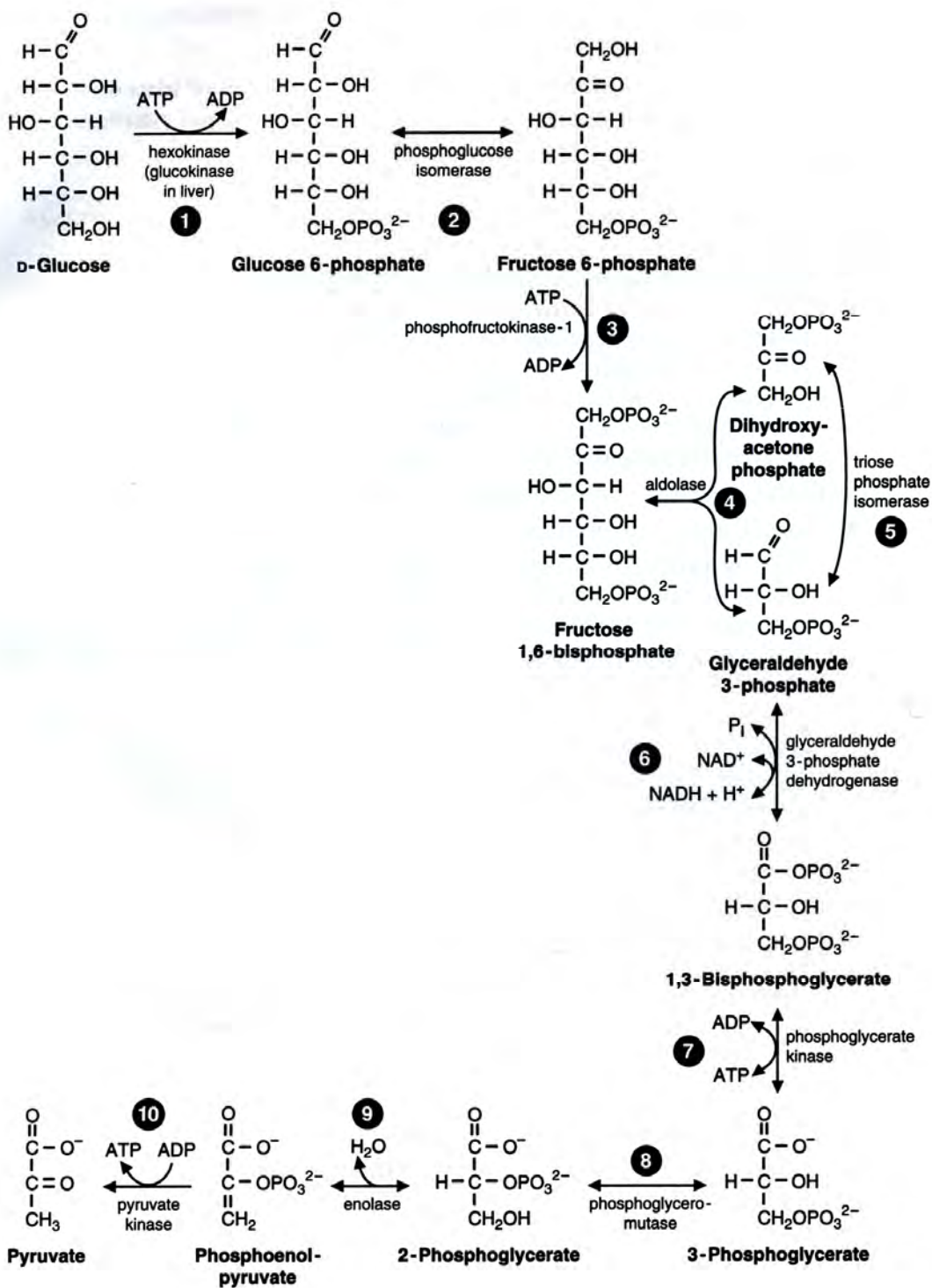
VEŽBA: Glikoliza/Fermentacija

ATP nastaje u procesima oksidacije hranjivih sastojaka, ugljenih hidrata, masti i aminokiselina. U prvoj fazi oksidacije ovih organskih supstanci nastaje *acetyl CoA* i ATP (u procesu glikolize) (Slika 6.17). Acetyl CoA se oksiduje u ciklusu trikarbonskih kiselina (TCA) pri čemu se koenzimi NAD^+ i FAD redukuju u NADH i FADH_2 . Redukovani koenzimi predaju elektrone O_2 u procesu oksidativne fosforilacije u kojem nastaje značajne količine ATP (Slika 6.15 i 6.17).

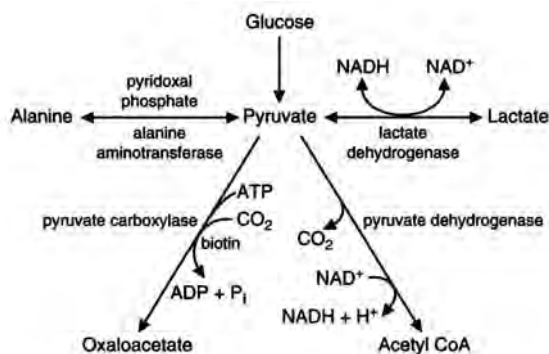


Slika 6.17 Generisanje ATP iz metaboličkog goriva iz hrane.

Glikoliza je metabolički put u kojem se glukoza oksiduje do piruvata, pri čemu nastaje ATP (iz ADP) i NADH (iz NAD^+). Glikoliza se dešava u citosolu svake ćelije. Reakcije glikolize su date na šemi na slici 6.18, a sudbina piruvata u na primer organizmu čoveka je prikazana na slici 6.19.

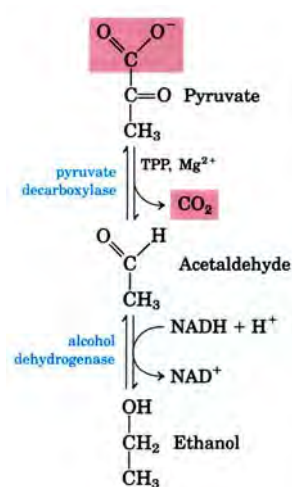


Slika 6.18 Reakcije glikolize. Brojevima su označene reakcije koje treba prokomentarisati.



Slika 6.19 Sudbina piruvata u organizmu čoveka.

U kvascima i drugim mikroorganizmima piruvat *ne prelazi u laktat nego daje etanol i CO₂ u procesu alkoholnog vrenja (fermentacije)* (Slika 6.20).



Slika 6.20 Prelazak piruvata u etanol u procesu alkoholne fermentacije; TPP (tiamin pirofosfat koenzim piruvat dekarboksilaze)

CILJ ove vežbe je da proradite osnovne principe (strategiju) metabolizma, te da se (kroz eksperimentalnu) vežbu bliže upoznate sa glikolizom i nekim od principa u ispitivanju procesa metabolizma

PRIPREMA Ponoviti sa predavanja o strategiji metabolizma, strukturi i funkciji ATP, upoznati se (Poglavlje 6 ili neki od udžbenika iz biohemije) sa osnovnim principima bioenergetike.

ZADATAK: Na teorijskim vežbama rezimirati osnovne karakteristike metabolizma, principe bioenergetike, strukturu i funkciju ATP i koenzima (NADH, FADH₂), uz pomoć knjiga iz biohemije i šema sa slika 6.17-6.20 diskutovati osnovne karakteristike glikolize

i sudbinu piruvata u metabolizmu čoveka i kvasca. Dokazati nastajanje piruvata i acetaldehida u fermentaciji glukoze kvascom.

Vežba je teorijskog tipa, tako da je akcenat na razgovoru, razjašnjavanju osnovnih pojmova, izradi problema i zadataka. Osnovne teme koje će se obrađivati su: anabolizam, katabolizam i njihov međusobni odnos, osnovi bioenergetike, uloga ATP-a, pojam i principi regulacije metaboličkih procesa, glikoliza. Posle teorijskog dela sleda eksperimentalna vežba – demonstracija nekih efekata glikolize.

Ni jedan od metabolita u ćeliji se pri normalnim fiziološkim uslovima ne nagomilava. Međutim, ako blokiramo aktivnost određenog enzima, doći će do nagomilavanja metaboličkog intermedijera-supstrata za ovaj enzim. Ovaj pristup se dosta koristi u izučavanju metaboličkih puteva. Aktivnost enzima se blokira dodavanjem inhibitora ili promenom uslova pod kojim se ćelija gaji. (Enzimatska) transformacija metaboličkih intermedijera može se sprečiti i ako se oni reakcijom sa nekim reagensom prevedu u proizvod koji nije podložan daljim promenama.

U ovoj vežbi ćete demonstrirati nastajanje proizvoda glikolize u kvascu: piruvata i acetaldehida. Piruvat i acetaldehid su pri normalnim uslovima prisutni u veoma niskim koncentracijama u ćelijama kvasca, tako da ćemo, da bismo ih dokazali, izvršiti njihovo “nagomilavanje”.

Dokazivanje nastajanja piruvata u glikolizi

Potreban materijal:

- 0,5 M dinatrijum fosfat
- 0,5 M kalijum monofosfat
- 10% suspenzija kvasca u 0,5 M dinatrijum fosfatu
- 10% suspenzija kvasca u 0,5 M kalijum monofosfatu
- 10% suspenzija kvasca u vodi
- 10% rastvor glukoze
- Sveže pripremljen 5% rastvor natrijum nitroprusida
- Koncentrovani amonijak
- 10% rastvor natrijum hidroksida
- zasićen rastvor 2,4-dinitrofenilhidrazin hidrohlorida u 2 M hlorovodoničnoj kiselini
- 3% rastvor piperidina
- 10% rastvor trihlor sirćetne kiseline (TCA)

Postupak:

Odmerite 5 ml 10% rastvor glukoze u dve epruvete (obeležene sa A i B). Dodajte zatim u epruvetu A 5 ml suspenzije kvasca u dinatrijum fosfatu, a u epruvetu B 5 ml suspenzije kvasca u rastvoru kalijum monofosfata. Epruvete inkubirajte 1 h na 37°C. Prekinite reakciju dodatkom 2 ml rastvora TCA u svaku epruvetu, pažljivo promešajte i

centrifugujte 10 minuta na 25000 x g. Supernatant odvojite i u njemu ispitajte prisustvo piruvata bilo reakcijom sa natrijum nitroprusidom, bilo reakcijom sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom.

Reakcija sa natrijumnitroprusidom za dokazivanje piruvata:

U 2 ml ključalog supernatanta dodajte 0,5 g čvrstog amonijum sulfata, 2 kapi sveže pripremljenog rastvora natrijumnitroprusida, dobro promešajte pa niz zid epruvete pažljivo sipajte koncentrovani amonijak tako da se stvore dva sloja. U prisustvu piruvata će se na dodirnoj površini dva sloja stvoriti plavi ili zeleni prsten. Ružičasti prsten dokazuje prisustvo tiolnih grupa i ponekad se pojavljuje pre plavog ili zelenog prstena.

Reakcija sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom za dokazivanje piruvata:

U 2 ml supernatanta dodajte 1 mL reagensa, rastvor pažljivo promešajte, prenesite 2 ili 3 kapi ovog rastvora u drugu epruvetu u koju se zatim dodajete 1 ml 10% rastvora natrijum hidroksida. Razblažite sadržaj u epruveti vodom do 5 ml. Crvena boja je dokaz za piruvat.

Dokazivanje acetaldehida u fermentaciji

Potreban materijal:

- 10% suspenzija kvasca u destilovanoj vodi
- 10% rastvor glukoze u dest.vodi
- Sveže pripremljen 5% rastvor natrijum nitroprusida u dest. vodi
- Čvrst natrijum sulfit
- 3% rastvor piperidina u dest. vodi

Postupak:

Otpipetirajte 5 ml rastvora glukoze u dve epruvete, obeležene sa C i D i dodajte po 5 ml suspenzije kvasca u vodi u svaku epruvetu, a zatim u epruvetu D dodajte 0,5 g natrijum sulfita. Suspenziju pažljivo promešajte i inkubirajte obe epruvete na 37°C u termostatiranom vodenom kupatilu tokom 1 sata. Nakon toga, odvojite talog centrifugovanjem, prenesite supernatante u čiste epruvete i sačuvajte ih. U 2 mL supernatanta dodajte 0.5 mL sveže pripremljenog rastvora natrijum nitroprusida, pa zatim 2 mL vodenog rastvora piperidina, promešajte i posmatrajte da li će se pojaviti plava boja koja je dokaz za prisustvo acetaldehida.

U “belu svesku” unesite opis vežbe prema Uputstvu. Unesite rezime teorijskih vežbi. Polazeći od šema prikazanih na slikama 6.18 – 6.20 i znanja iz organske hemije o reakciji aldehida sa sulfitom objasnite na čemu se zasnivaju eksperimenti koje ste izveli i komentarišite rezultate koje ste dobili .