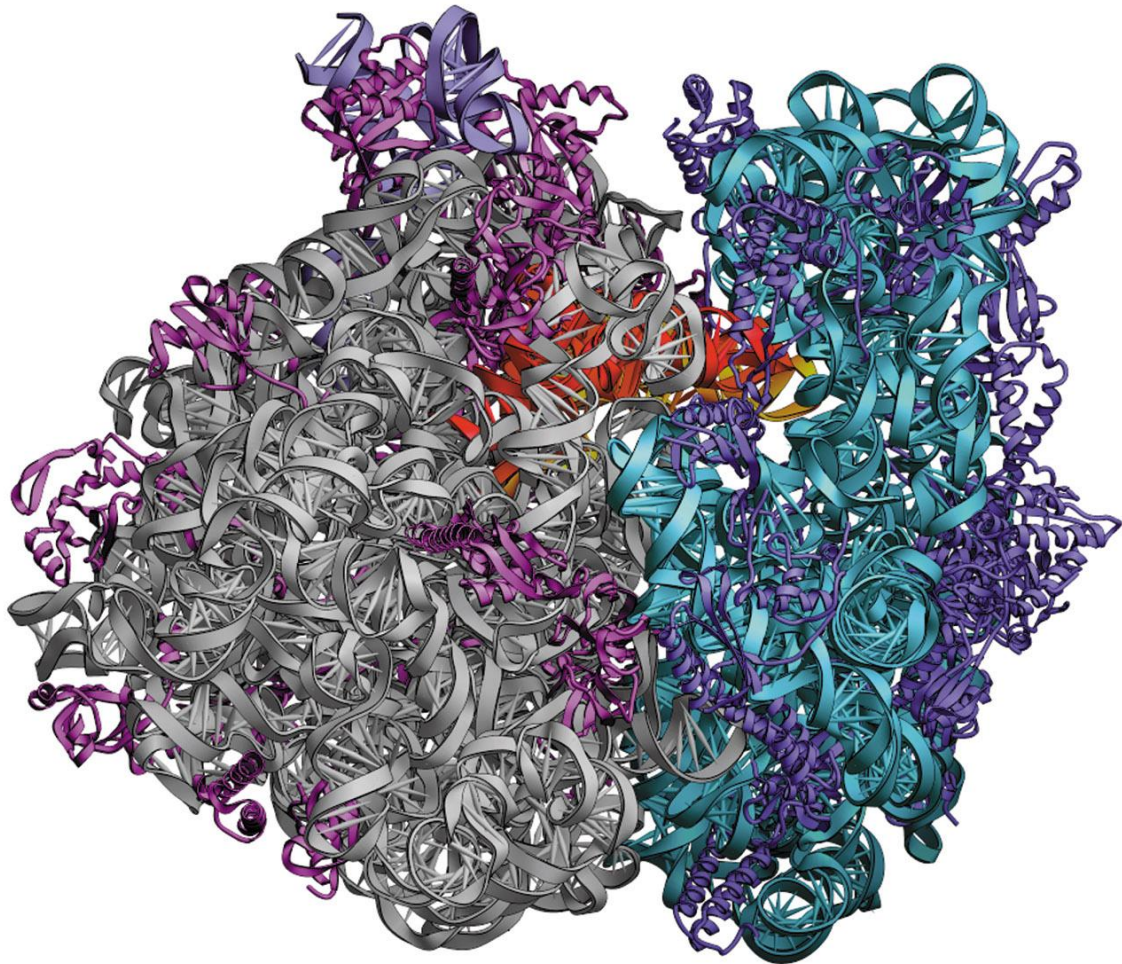


Biokjemi for biofysikere



En kort innføring

Karbohydrater

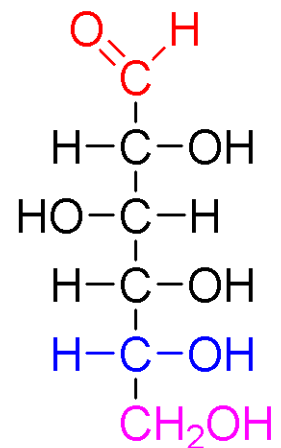
Funksjon

- **Energilager:** I de fleste ikkefotosyntetiske celler er oksidasjon av karbohydrater den viktigste energiressursen.
- **Byggesteiner:** Polymerer av karbohydrater bygger opp cellevegger.
- **Strukturelement** som i cellulose.
- **På celleoverflater** gjør karbohydrater en viktig rolle ved å bestemme egenskaper som blodtype. Karbohydrater utgjør en viktig del av cellenes gjenkjennelsessystem.

Definisjon og oppdeling

- Aldehyd eller keton i gruppe med to eller flere hydroksylgrupper.
- Vanlig form $(CH_2O)_n$ Dette er ikke et krav, men vanlig.
- Asymmetriske karbonatomer (kirale)
- Tre hovedgrupper; Monosakkarider som består av én polyhydroksy aldehyd eller ketonenhet, oligosakkarider (noen) og polysakkarider (20+).
- "Sakkarid" er gresk og betyr sukker.
- Monosakkarider med flere enn fire karbonatomer danner gjerne ringstruktur.
- Vanligste er D-Glukose (mono), sukrose (disakkarid, bestående av D-fruktose og D-Glukose)
- 1 asymmetrisk senter \rightarrow 2 former (sterioisomere).
- N asymmetriske senter \rightarrow 2^n sterioisomere.

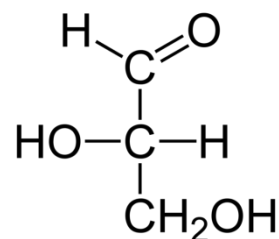
På figuren til høyre er den røde toppen en aldehydgruppe, -OH er en hydroksylgruppe. Den blå gruppen lengst fra aldehydet er asymmetrisk senter, og siden denne har -OH gruppen på høyre i fishertegningen så er dette en D i D-glukose. Alternativet er L om -OH gruppen hadde vært på venstre side. Det vanligste i levende organismer er D-isomerer.



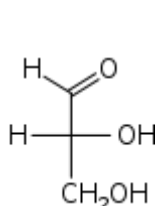
Monosakkarider

- Uten farge og luft, typisk søt smak. Løsbare i vann.
- Er en **aldose** hvis =O sitter på enden (som et aldehyd), eller **ketose** hvis den sitter midt inne i karbonkjeden.
- Tre, fire fem seks og syv karbonatomer i sammen danner henholdsvis; trioser, tetroses, pentoser, hexoser og heptoser.
- Heksosene mest vanlig, derunder D-glukose og D-fruktose.

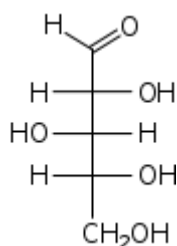
- **Enantiomerer** er to forskjellige optiske isomerer, som den tre karbon lange glycerinaldehyd det er bilde av til høyre. Denne har lik struktur, men forskjellig speilbilde.
- I **Fischerprojeksjonen** er horisontale bindinger ut av planet, vertikale innover i planet.
- **Epimerer** er to sukkerer som kun er forskjellig rundt ett karbonatom.
- Begynner nummerering av karbonatomer fra toppen og nedover. For en D-glukose betyr det at karbonet i aldehydgruppen er 1, asymmetrisk senter 5 og CH₂OH er 6.



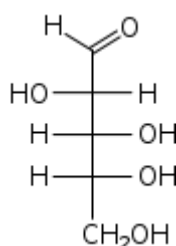
Strukturer som er viktige



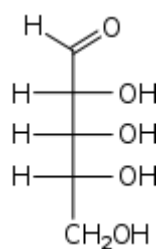
D-Glyseraldehyd



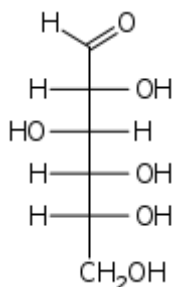
D-Xylose



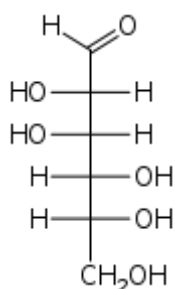
D- Arabinose



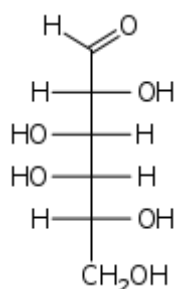
D-ribose



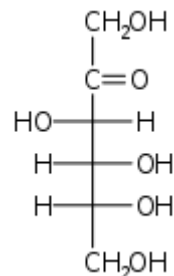
D-Glukose



D-Mannose



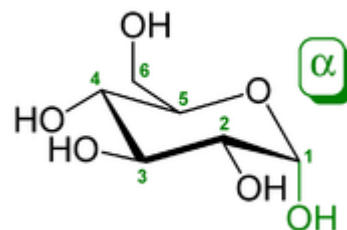
D-Galactose

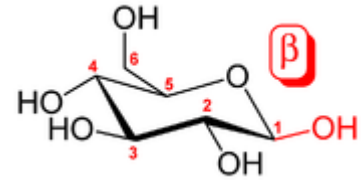


D-fruktose

Ringdannelse

- I vann består monosakkarider med flere enn fem karbonatomer av ringer. Det er karbonylgruppen, =O som åpner seg, og danner en binding til en –OH gruppe. Det dannes da et hemiacetal fra aldoser og hemiketal fra ketoser. Denne kan binde seg til en ny –OH gruppe, og blir da et acetal.
- Dette blir da to mulige utgaver, **α** og **β**.
- **α** har –OH gruppe motsatt vei fra karbon nr 6, **β** har samme vei.





- Seksringer kalles **pyranoser**. β -D-glucopyranose
- Femringer kalles **furanoser**. α -D-fructofuranose
- **Anomerer** skiller seg bare ut ved at de er forskjellige rundt hemiacetal/hemiketal gruppa. (α vs β)
- I vann dannes en likevekt mellom α og β anomerene, ca 1/3 α og 2/3 β . Denne reaksjonen kalles **mutarotasjon**.
- **Haworth** perspektiv av ringform, ettersom naturlig er strukturen en stolform.
- **O-glykosid binding**: bindingen mellom to monosakkarider. Danner acetal fra hemiacetal ved å sette sammen hemiacetal med $-OH$ gruppe.
- **Maltose** består av to D-Glukose som bindes sammen mellom C1 og C4. $Glc(\alpha 1 \rightarrow 4)Glc$
- **Laktose** $Gal(\beta 1 \rightarrow 4)Glc$. Vanlig i melk
- **Sukrose** ikke reduserende $Fru(2\beta \leftrightarrow \alpha 1)Glc$ eller motsatt Glc og Fru . Vanlig bordsukker.
- **Trehalose** Viktige energilagere i insekter. Ikke reduserende. $Glc(1\alpha \leftrightarrow \alpha 1)Glc$

Polysakkarider

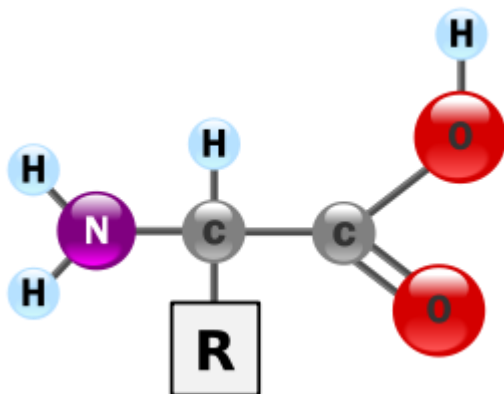
- **Glukaner** annet navn på polysakkarider.
- **Homopolysakkarider** bygget opp av én monosakkarid i lange tråder. Eks homo: cellulose og kitin, glykogen og stivelse. Bygger opp cellevegger og skall hos insekter.
- **Amylose** er en lineær serie av D-glukose med $1 \rightarrow 4 \alpha$ bindinger. Kan bestå av mange tusen Glc . Mellom 24 og 30 enheter mellom hver ($\alpha 1 \rightarrow 6$) binding.
- **Amylopectin** er som amylose (lange maltoser), men med mange forgreininger.
- **Hetropolysakkarider** består av to eller flere forskjellige monosakkarider. Bidrar som ekstrastøtte til celler hos alle dyr og mennesker, og gir spesielle egenskaper.
- Polysakkarider settes sammen ved enzymreaksjoner, men det er ingen mal som med RNA i proteiner.
- **Glykogen hovedenergilagring i celler hos dyr og mennesker**. D-glukose med $1 \rightarrow 4 \alpha$ bindinger og $1 \rightarrow 6 \alpha$ sidebindinger. Tett forgreinet, 8-12 mellom forgreiningene. Dette er likt som Amylopectin, men tettere forgreinet. Forbrukes ved at ett og ett glukosemolekyl fjernes fra de ikke-reduserende endene.
- **Stivelse** lange rekker i planter som glykogen, men lengere(24-30) mellom knutene.
- **Dextran** polysakkarider i bakterier med glukose og ($\alpha 1 \rightarrow 3$) bindinger.
- **Cellulose** er lange lineære glukosekjeder som amylose, men med **β -binding**. Danner cellevegger i alt av trær og planter. $[Glc(\beta 1 \rightarrow 4)]_n$ Hvor n kan være 10000-15000. De fleste dyr har ikke enzymer som kan bryte ned ($\beta 1 \rightarrow 4$) bindinger, og kan derfor ikke spise cellulose.
- **Kitin** ligner på cellulose, men har byttet ut $-OH$ gruppe på karbon nr 2 med aminogruppe. Danner skall i alle skaldyr og insekter.
- **Hydroksylgruppene** i polysakkarider utgjør en viktig rolle i stabilisering av molekylet med svake hydrogenbindinger. Vinkelen mellom to monosakkarider avgjør bindingsstyrke og vinkel, og avhenger av hvilket polysakkarid det er. Cellulose danner 180grader binding, som gjør det veldig sterkt.

Aminosyrer, peptider og proteiner

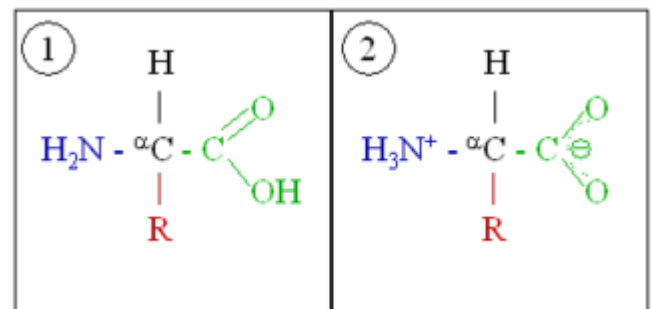
Funksjon

- Proteiner finnes i alle celler og i alle deler av celler av alle verdens organismer. Det kan være flere tusen forskjellige proteiner i en celle. Mennesket har ca 100000 forskjellige proteiner.
- Genetisk informasjon er lagret i form av proteiner.
- Alle proteiner består av en oppbygning av 20 aminosyrer, bundet med kovalente bindinger i lineære serier.
- Størrelse fra peptider med noen aminosyrer til lange kjeder med tusener. Normale proteiner består av 100-200 enheter.
- Proteiner bygger opp alt mulig, muskelfibere, **enzym**, transport og lagring av oksygen, antistoffer, øyeglass, edderkoppspinn, hår, osv.
- **Enzymer** katalyserer tilnærmet alle cellereaksjoner, og enzymer er bygget av proteiner.

Oppbygning



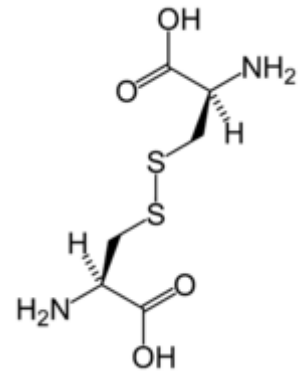
Figur 1. Nøytral aminosyre, denne finnes egentlig ikke.



Figur 2. Aminosyre i nøytral form(1) og som et zwitterion(2)

- De 20 vanlige aminosyrene består av et α -karbon bundet til en karboksyl- og en aminogruppe. Normalt vil dette være i form av **et zwitterion**.
- Zwitterion- fungerer som både en syre og base på en gang. Aminoenden reagerer som syre, mens karboksylenden som base. Nøytral ladning totalt, og har et isoelektrisk punkt. Syre-Base delen gjør de amfoteriske, og kalles ofte **amfolyter**.
- Et α -karbon er regnet som det første karbonatomet i en funksjonell gruppe, det neste β -karbon etc. α -karbon er også aminosyrens kirale senter.
- Siden α -karbon gir to stereoisomere, som kun skiller seg fra hverandre ved speilbilde, så er det en **enantiomer**. Dette gir aminosyrer i D- og L-form. I naturen finner vi nesten kun aminosyrer i L-form, av ukjent årsak.

- Egenskapene, og spesielt polariteten, til sidegruppen R avgjør egenskapene til aminosyren.
- R gruppene deles inn i fem grupper, som står i [boka side 75](#). Dette er ved pH 7.0. Deles inn i:
 - Upolare, alifatiske sidegrupper: hydrofobe. 7stk
 - Polare, uladete sidegrupper: har sidegrupper som danner hydrogenbindinger med vann. 5stk. To Cystein kan danne cystin med en disulfidbinding. Cystin er sterkt upolart.
 - Aromatiske sidegrupper: upolare -> hydrofobe. 3stk.
 - Positivt ladete sidegrupper: Sterkt hydrofile. 3 stk
 - Negativt ladete sidegrupper: Sterkt hydrofile. 2 stk, begge med karboksylgruppe.
- **Alifatisk forbindelse** er betegnelse på organiske forbindelser som *ikke inneholder* aromatiske ringer.
- **Aromatiske forbindelser** er organiske forbindelser med ringer, som benzenring osv.
- Utover de 20 vanlige aminosyrene, kan proteinene bestå av modifiserte enheter som har viktige egenskaper, her er navn ikke forventet å kunne. Det er funnet over 300 andre aminosyrer i cellene.



Figur 3. Cystin, bestående av to Cystein med disulfidbinding

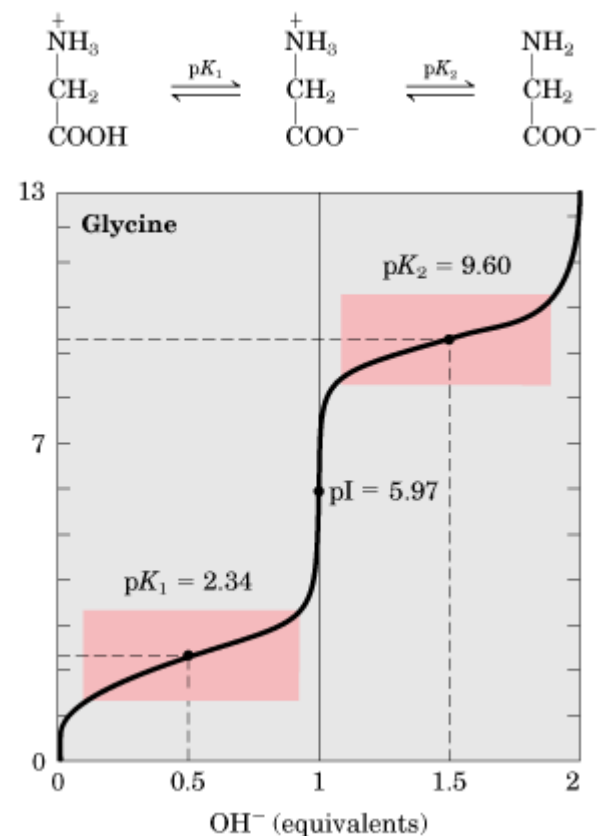
Syre/baseegenskaper hos aminosyrer

- Aminosyrer er **zwitterion** dvs. **amfolyter** bestående av en svak syre- og basedel. En kan også si at en aminosyre er toprotolytisk.
- Dette gir aminosyren to områder som fungerer som buffer.
- Først reduseres karboksylgruppa, deretter aminogruppa.
- **Henderson-Hasselbach likningen** kan brukes for å lage en buffer, se [side 60 i boka](#).
- Midt mellom de to bufferområdene har finnes et **isoelektrisk punkt**. Her er den totale ladningen nøytral. **Isoelektrisk pH, pI**, er snittet av de to pK_a -verdiene rundt.

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

- En viktig konsekvens av pI er at over pI er aminosyren totalt sett negativt ladet, og vil bevege seg mot positiv anode i et elektrisk felt, og motsatt

for positiv ladning. Jo større netto

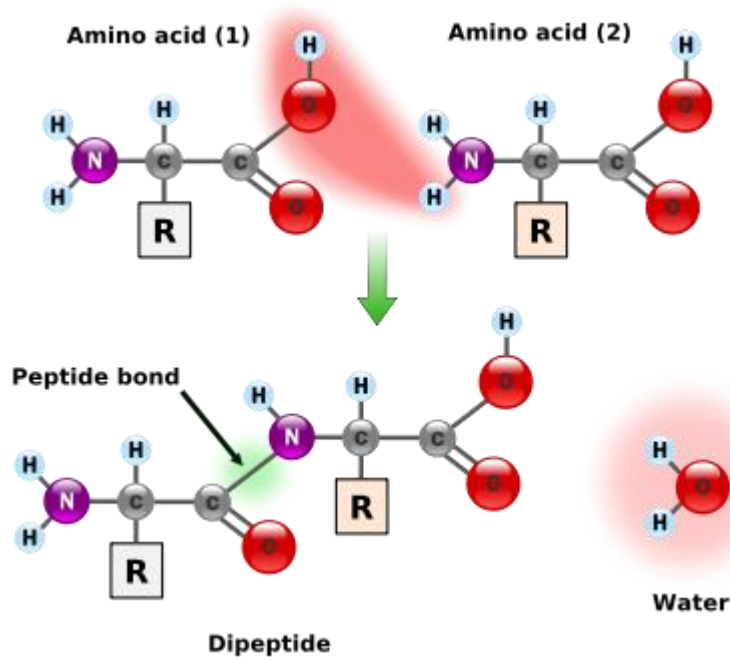


Figur 4. Titreringskurve Glysin. Først gir karboksylgruppa fra seg H^+ ved $pH = 2-4$, deretter aminogruppa ved $pH = 8-10$

ladning, jo sterkere kraft. Dette gjelder alle aminosyrer.

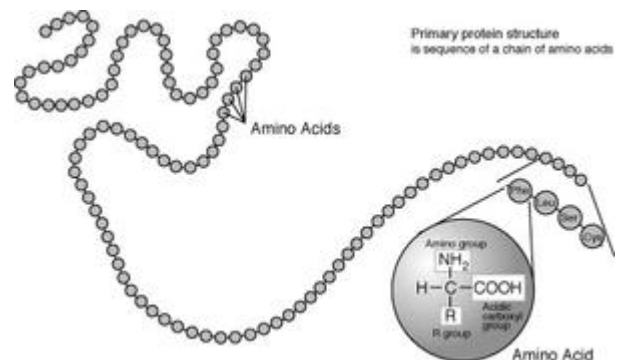
- For aminosyrer med sidegruppe uten ladning er pK_a verdiene og titerkurvene ganske like. Sidegrupper med ladning gir tre pK_a verdier, og tre steg i kurven (tre ioniseringsfaser.)

Peptider og proteiner



Figur 5. Dannelse av peptidbinding. Aminoenden reagerer med karboksylenden i en annen aminosyre, og vann spaltes av.

- Dannelsen av peptidbinding er godt illustrert over.
- Danner også lange kjeder, tripeptid(3), tetrapeptid(4), pentapeptid(5), oligopeptid(få/noen), polypeptid (mange, men under 10000 i molekylvekt/80 enheter), protein(> polypeptid). Polypeptid og protein brukes litt om hverandre, og er egentlig det samme.
- Leses, og tegnes med åpen aminoterminal på venstre side, og åpen karboksylterminal på høyre. (Og selvsagt leser vi fra venstre mot høyre.)
- Peptidbindinger er stabile med halveringstid på 7 år, grunnet høy aktiveringsenergi.
- Dannes normalt i celler fra RNA, men kan også lages av visse enzymer.
- I peptider er ikke bindingene mellom enhetene ionisert lenger. Dette fører til at kun de to åpne terminalene, og sidegruppene avgjør titerkurve, pK_a og en del egenskaper. Det er også flere andre faktorer som spiller inn på pK_a etter hvert som kjedene blir lange og komplekse.
- Mange viktige peptider er små, eks hormoner, antibiotika, kunstig søtningsmiddel(to enheter), gift i sopp. Titin i musklene våre er 27000 enheter langt.

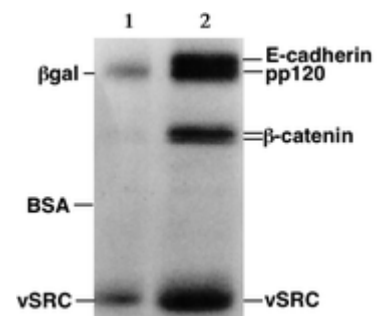


Figur 6. Oppbygningen av proteiner fra aminosyrer.

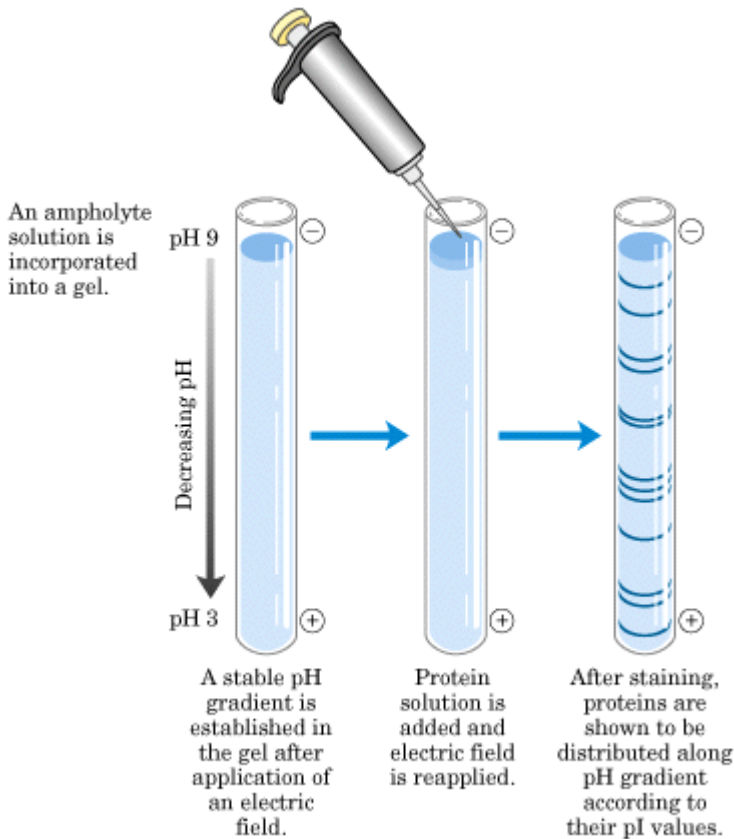
- Proteiner kan bestå av flere polypeptider, bundet sammen med ikke-kovalente bindinger. Disse kalles *subenheter*. Bygget opp av to heter *oligomeric*, flere heter *protomers*. Eks er hemoglobin, som er en viktig enhet i blodet vårt.
- Noen få proteiner kan også bestå av flere polypeptider bundet sammen med kovalente bindinger, som disulfidbinding. Eks insulin. Dette er ikke subenheter, men heller kjeder med aminosyrer.
- En kan ta et polypeptid å dele vekten på 110 for å få ca antall enheter. Gjennomsnittvekten av aminosyre er 138, men det er overvekt av de små aminosyrene, og det spaltes av vann på 18 for hver peptidbinding.
- De fleste proteiner består av kun aminosyrer, men noen består også av andre kjemiske forbindelser. Disse kalles *konjugerte proteiner*, og ikke-aminosyredelen kalles *prostetisk gruppe*. Dette kan være lipider (lipoproteiner), glucoproteiner med sukkergrupper, eller metalloproteiner med metallforbindelser.

Arbeid med proteiner

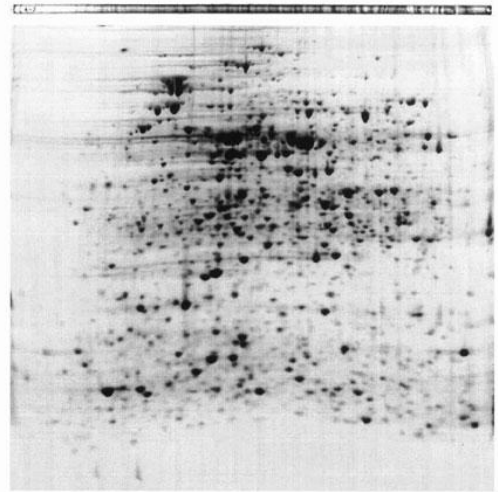
- Svært viktig med rene proteiner for å studere aktiviteter og egenskaper.
- En deler opp proteiner i fraksjoner ved hjelp av:
 - Løslighet. Her kan en tilsette salt i løsningen for å redusere løseligheten av proteinet, og er kjent som "*salting out*".
 - Størrelse, ved hjelp av dialyse. Her blir proteinene stoppet av en membran pga stor størrelse.
 - Ladning
- Mest brukt er *kolonne kromatografi*, som skiller ved hjelp av størrelse, ladning, bindingsaffinitet og andre egenskaper. Mer detaljer finnes på side *87 i boka*.
- Vanlig å benytte flere metoder i rekkefølge, og dette baserer seg på empirisk testing.
- En annen viktig metode er *elektroforese*, og baserer seg på vandringshastighet av proteiner i en gel i elektriske felt. Denne er mest brukt analytisk, og gir skiller på størrelse og form.
- Ved elektroforese er det normalt å bruke *sodium dodecyl sulfat (SDS)*. Dette binder seg til proteinet i mengder tilnærmet proporsjonalt med vekten til proteinet, og "bretter ut" proteinet. Disse to egenskapene gjør det langt enklere å skille ved hjelp av *elektroforese*.
- *Isoelektrisk fokusering* brukes for å avgjøre pI for proteiner. Se figur 8 på neste side.
- Mest awesome er selvsagt *2D elektroforese*, som kombinerer isoelektrisk fokusering og SDS elektroforese i en matrise. Figur 9.



Figur 7. Elektroforese av protein med SDS



Figur 8 Isoelektrisk fokusering.

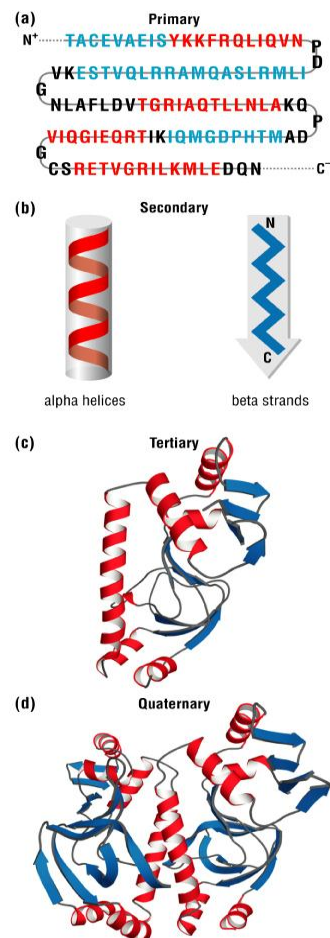


Figur 9. Todimensjonal elektroforese.

Proteinenes primærstruktur

- Proteinenes struktur deles opp i fire deler som i figur 11.
- **Primærstrukturen** beskriver rekkefølgen av alle kovalente bindinger mellom aminosyrene, peptidbindinger og disulfidbindinger.
- Ethvert protein har en unik aminosyresekvens, og en unik 3D-struktur.
- Tusenvis av gensykdommer skyldes at proteinene bygges feil, alt fra én feil enhet, til større rekker.
- 20% - 30% av menneskes proteiner er **polymorfiske**, noe som betyr at aminosyresekvensen i proteinet varierer i befolkningen.
- Frederick Sanger utviklet en metode for å skille korte peptider ved å tilsette 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), som binder seg til den åpne aminoenden. Deretter ble polypeptidet hydrolysert med 6M HCl, og aminosyren kan bestemmes. Hydrolysen ødelegger riktignok polypeptidet, så en kan ikke bestemme aminosyresekvensen, men aminosyrene det inneholder.
- **Edman-nedbrytning** brukes for å bestemme sekvensen til peptider. En merker først av aminoenden og spalter av denne. Denne kan da identifiseres, og en ny aminosyre kan

From **Protein Structure and Function**
by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe



© 1999-2004 New Science Press

Figur 11. Proteinenes struktur.

spaltes av. Andre peptidbindinger i polypeptidet påvirkes lite, men moderne sekvensatorer kan bestemme opp til 50 aminosyrer i et polypeptid.

- Lengre proteiner må brytes i kortere peptider for å bestemme sekvens. Først må alle disulfidbindinger brytes. Deretter stykkes det opp i mindre biter ved hjelp av enzymer/kjemiske reaksjoner. De sekvenseres nå med Edman-nedbrytning, før de til slutt setter sammen peptidfragmentene ved å sammenlikne med peptider brutt ned på en annen måte. Disulfidbindinger bestemmes også sist.
- Det er fullt mulig å syntetisere proteiner opp til 100enheter. Syntetisere 100 enheter langt protein kan gå på 2 dager, mens en bakterie gjør det samme på 5 min. Effektiviteten går raskt ned, lettere med korte kjeder.

Proteinenes tredimensjonale struktur

Innledning

- Proteiner består av en rygggrad av kovalente bindinger, som tillater et enormt antall konfigurasjoner ved rotasjon.
- En kan krystallisere proteiner (bla hemoglobin, ca. 1920), noe som betyr at de har samme form.
 - Tredimensjonal form er bestemt av aminosyresekvensen.
 - Proteinets funksjon avhenger av strukturen
 - Et isolert protein består av én eller noen få strukturer.
 - Viktigste stabilisator for strukturen er ikke-kovalente bindinger.
 - Finnes mønster i strukturen hos mange proteiner.

- Proteinets mulige struktur uten å bryte kovalente bindinger kalles *konformasjon*.

- Under gitte forhold er proteinstrukturen normalt den termodynamisk mest stabile, dvs lavest Gibbs fri energi (G).

- Strukturer til proteinet som er funksjonelle kalles *native protein*.

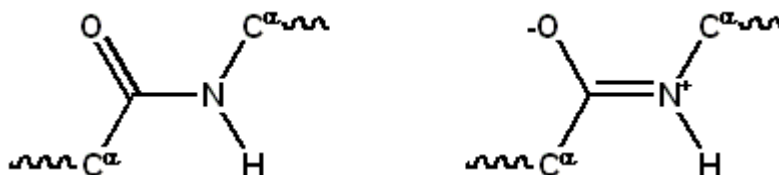
- Både kovalente bindinger (krever 200-460kJ/mol å bryte), (disulfidbindinger), og svake bindinger (krever 4-30kJ/mol å bryte) bidrar til å stabilisere. Ofte er svake bindinger (hydrogenbinding) viktigst, siden de er flest. Ionereaksjoner kan både stabilisere og destabilisere

strukturen.

- Vann danner en struktur ved hjelp av hydrogenbindinger rundt et hydrofobt molekyl, noe som fører til at hydrofobe sidegrupper brettes inn i proteinstrukturen. Hydrogenbindinger i andre sidegrupper kan da igjen frastøte den hydrofobe kjernen, og virke destabiliserende.
- Ergo; mest stabilt er protein med hydrofob del i midten, og så mange bindinger innad som mulig, så ikke frie bindinger kan støte ut.



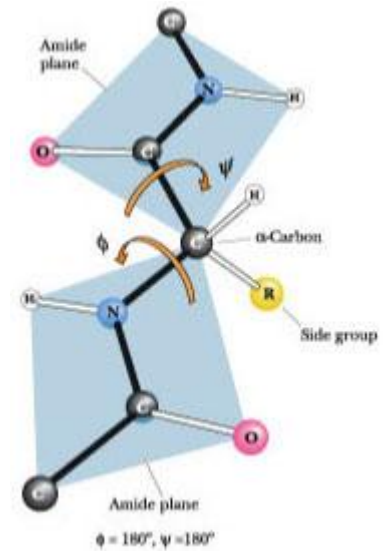
Figur 10. Proteinet Myoglobin med α -helixer



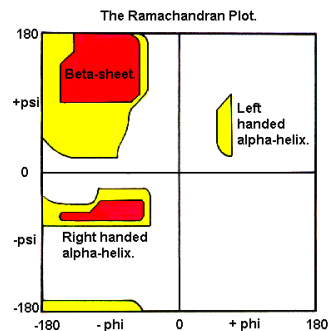
Figur 11. Peptidbinding hvor den ene kovalente bindingen bytter mellom Nitrogen og oksygen. Dette gir en sterkere binding.

- I en peptidbinding deler oksygen og nitrogen på to elektronpar. Dette gir en kortere, sterkere og ikkedreibar binding mellom C og N. Figur 2.

- Dette gir at peptider kan bevege seg som plan, og dreie om C_{α} . Figur 3.
- Vinklene som bindingen N- C_{α} og C_{α} -C kan danne betegnes med ψ og ϕ , og kalles *dihedralvinkler*.
- Dihedralvinklene har verdier $\pm 180^{\circ}$, men mange, inkludert begge lik 0° er ikke mulig av stabilitetsgrunner.
- Mulige dihedralvinkler kan en finne i et *Ramachandran plot*. Figur 4.



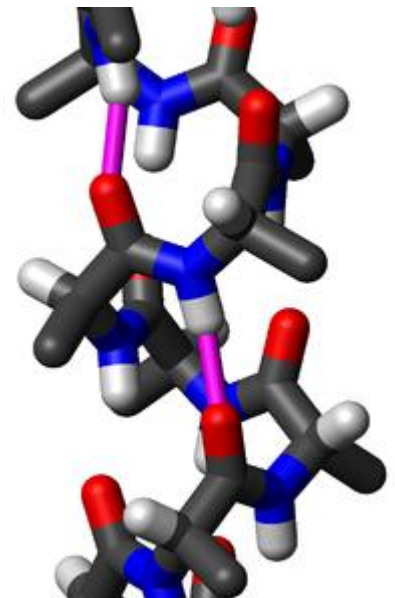
Figur 12. Peptidbindinger er stive, og danner plan.



Figur 13. Ramachandran plot.

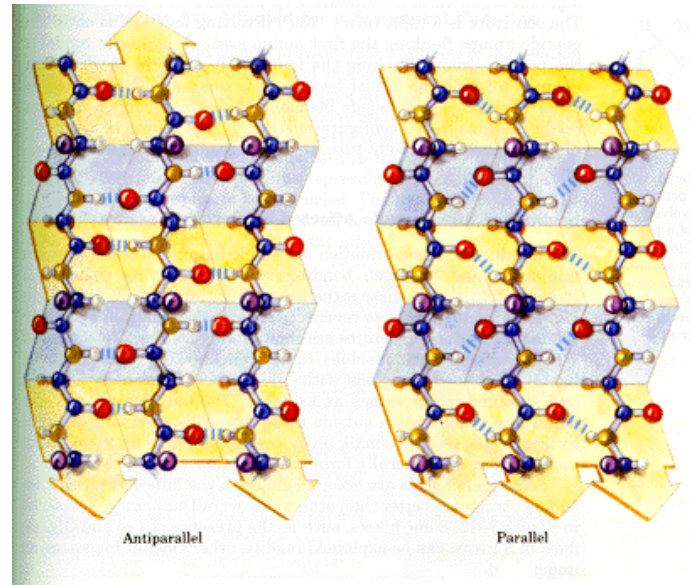
Proteinenes sekundærstruktur

- Sekundærstrukturen beskriver den romlige strukturen til et polypeptid uten å tenke på sidegrupper.
- Dihedralvinklene er tilnærmet like i hele segmentet.
- Vanlige former er *α-helix*, *β-sheet* og *β-turn*. Tilfeldige strukturer uten system kalles *random coil*.
- *α-helixen* gjentar seg selv for hver 5,4Å, og hver runde består av 3,6 aminosyreenheter. De har sidegruppene pekende utover. Høyredreide *α-helixer er mest stabile, og det eneste vi finner i proteiner. (Høyredreid - høyrehåndsregel). Typiske dihedralvinkler er $\psi = -45^{\circ}$ og $\phi = -60^{\circ}$.*
- *Ca ¼ av alle aminosyreenheter i proteiner finnes i α-helixer.*
- *α-helixer stabiliseres av hydrogenbindinger mellom hydrogenatomet på nitrogen(amino) og oksygen(karboksyl) en omdreining fra hverandre, som begge er elektronegative. Det er tre-fire slike bindinger per turn i helixen. Se Figur 5.*
- *Ikke alle polypeptider danner stabile α-helixer. Sidegruppene kan stabilisere eller destabilisere en helix. Den negative frastøtningen til Glutaminsyre danner ikke helix ved pH 7.0. Alanin danner stødige helixer.*
- *En α-helix får dipolegenskaper grunnet ladning fra aminoenden og karboksylenden.*



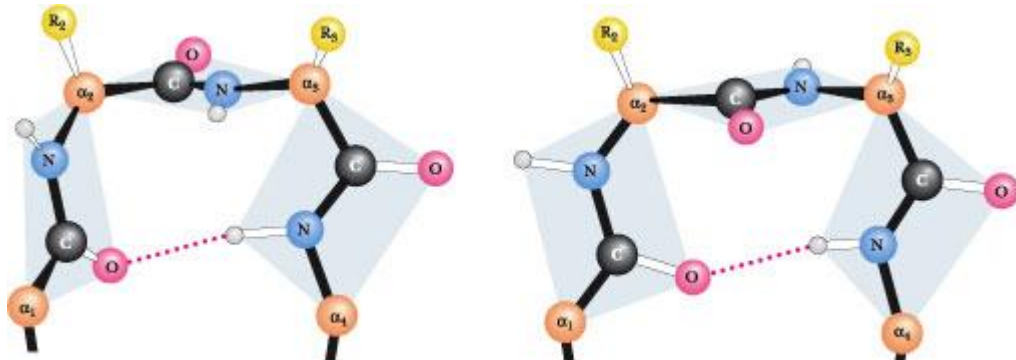
Figur 14. *α-helix* med hydrogenbinding mellom amino-terminal hydrogen og karboksylets oksygenatom, som begge er elektronegative.

- Figur 6 viser typiske ***β*-sheets**. De dannes normalt av stykker nærme hverandre i et peptid, men kan også dannes av forskjellige polypeptider. Hydrogenbindinger er viktige til å støtte opp, og danner hhv antiparallele og parallelle *β*-sheets. **Typiske dihedralvinkler** er $\psi = +120^\circ$ og $\phi = -130^\circ$.
- Normalt vil *β*-sheets bygges opp av aminosyreenheter med små sidegrupper, gjerne Glysin og Alanin.
- Avstanden mellom hver "periode" i en *β*-sheet er 6,5Å og 7Å for parallel og antiparallell.



Figur 15. *β*-sheet. I antiparallell og parallel.

- I proteiner er nærmere 1/3 av enhetene bundet i turns og loops. Den mest vanlige er ***β*-turns**, som gir en 180° vinkel, og brukes på enden av *β*-sheets. Glysin og Prolin utgjør ofte *β*-sheets, Glysin pga liten og fleksibel, Prolin pga den er spesielt egnet til denne vinkelen.



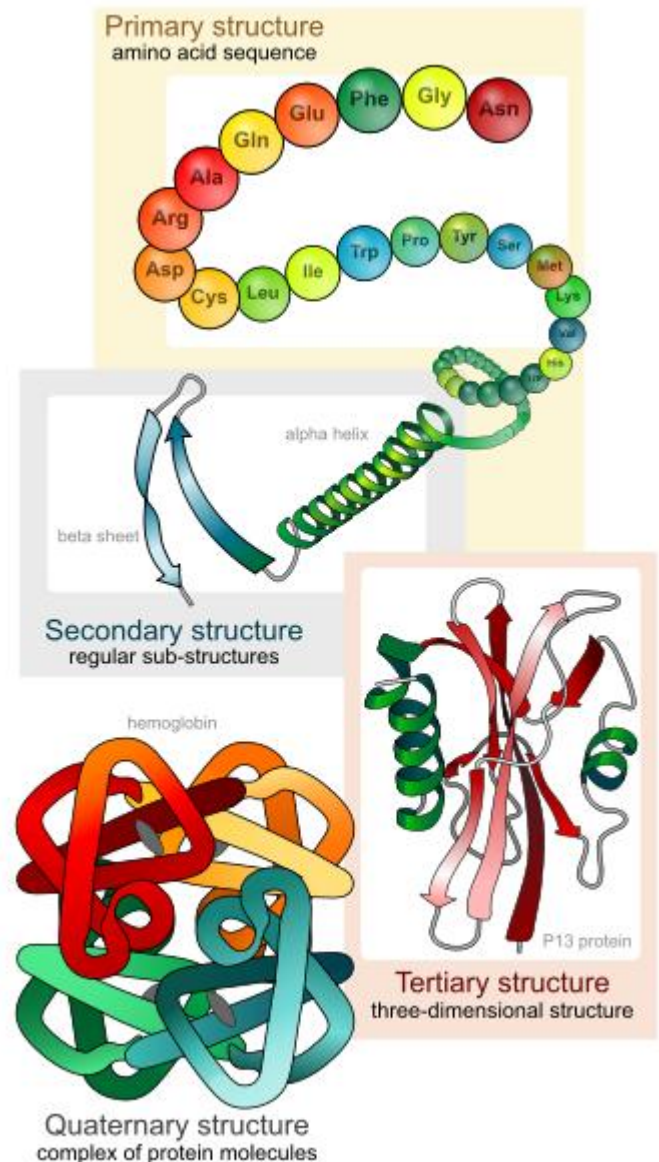
Figur 16. *β*-turns. Type I til venstre og Type II til høyre. I type I er R₂ prolin, mens i type II er R₃ glysin.

- Nesten alle er proteiner bygges opp av ***α*-helix**, ***β*-sheet** og ***β*-turn**.
- Enhver sekundærstruktur kan beskrives av dihedralvinklene ψ og ϕ . Eneste unntaket er Glysin, som er med på det meste. Dette vises i et Ramachandran plot.
- Ved hjelp av ***circular dichroism***, CD, dreies planpolarisert lys etter å ha gått igjennom en prøve. Ved å plote dreining mot bølglengde kan en avgjør innhold av *β*-sheets osv. En kan også finne ut om proteinet er foldet skillelig, overvåke folding osv.

Tertiær proteinstruktur

- Tertiærstruktur*** inneholder lengre kjeder med sekundærstruktur, som kan reagere med seg selv.
- Kvartærstruktur*** beskriver to eller flere polypeptider som er bundet sammen med svake bindinger.

- Deler opp proteinstrukturen i to grupper;
 - **Fiberproteiner** (strukturelle proteiner). Lange kjeder eller sheets. Ofte stor sekundærstruktur, enkel tertiærstruktur. Bygger opp, utgjør form og beskyttelse.
 - **Globulære proteiner**. Foldet sammen til kuleform. Består av flere typer sekundærstruktur. Vanlig i enzymer og reguleringsproteiner.
- En rekke proteiner har polypeptid **subenheter**. Disse har ofte en regulerende rolle, og kan endre proteinets aktivitet ved små forandringer, (konsentrasjon av substrat eller reguleringsmolekyler).
- Et protein med flere forskjellige subenheter kalles **multimer**. Dersom det bare har noen subenheter kalles det **oligomer**.
- En enkelt subenhet eller en gruppe subenheter kaller **protomer**.
- Ofte kommer multimerer med en type, eller gjentakende protomer. Det er også mye symmetri, som rotasjonssymmetri, dihedralsymmetri, syklisk symmetri osv.
- Resten av kap 4.3 er stort sett lesestoff.



Figur 17. Proteinenes struktur.

Røntgendiffraksjon

- Bølgelengden til synlig lys blir for lang (400-700nm) for å studere proteiner, størrelsen på det en vil studere må være over halve bølgelengden.
- Bruker røntgen, men bølgelengde 0,7-1,5Å. Danner et bilde av elektrontettheten i prøven.
- Proteinene må være krystallisert, noe som er vanskelig å få til. Trenger svært godt strukturerte proteiner i krystallet.
- Gir et stillbilde av proteinene, men fungerer på større proteiner enn med NMR.

NMR, kjernemagnetisk resonans

- Kan gi bilde av makromolekyl i løsning, og vise proteinstruktur, reaksjon med andre molekyler med mer.

- Baserer seg på kjernespin, opp og ned, som finnes i ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Dette danner en magnetisk dipol, som studeres i magnetiske felt. Det tilføres en kort magnetisk puls som kan endre spinnretningen til kjernen, og dette gir et absorpsjonsspektrum.
- 1D spektre blir for kompliserte, og bruker da noen fancy metoder for å gi 2D.

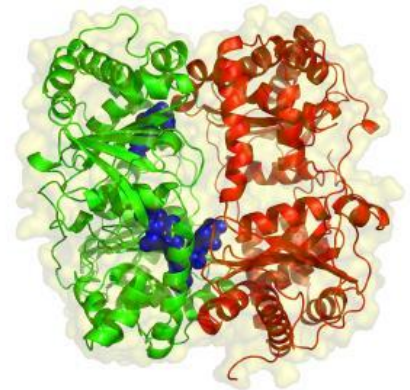
Protein denaturering og folding

- Alle proteiner starter som lineær sekvens på ribosomene, og foldes deretter til *nativ* konfigurasjon.
- Endring i tredimensjonal struktur som fører til at proteinet taper sin funksjon kalles *denaturering*. Dette trenger ikke bety at proteinet er fullstendig rettet ut. Det er flere måter å denaturere proteiner på;
 - Varme: Bryter ned de svake bindingene i proteinet. Denatureringen skjer over et lite temperaturintervall ved oppvarming.
 - pH: Stor forandring i pH endrer proteinets totale ladning, og fører til frastøtning/tiltrekning nye steder.
 - Organiske løsemidler, alkohol og aceton, urea, detergenter: forstyrrer hydrogenbindinger.
- Ingen av metodene over bryter kovalente bindinger.
- Dersom et denaturert protein ikke lenger er i kontakt med denatureringsmiddelet, så vil det i mange tilfeller returnere til nativ konfigurasjon. Dette kalles *renaturering*.
- Viktig eksempel på renaturering: Christian Anfinsens eksperiment med ribonuclease A. Det gikk ut på å ha funksjonelt ribonuclease A, tilsette urea og mercafoetanol. Da ble alle disulfid- og svake bindinger brutt, og proteinet var inaktivt. Ved å fjerne urea og mercafoetanol dannet igjen proteinet aktiv form, og ble funksjonelt. Ettersom disulfidbindingene kan dannes på 105 måter med lik sannsynlighet, må det være svake krefter som danner det på samme måten igjen.
- Foldingen av polypeptider går veldig fort, men ville tatt 10^{77} år ved random prosess.
- Flere modeller på folding, sannsynlig brukes en blanding.
 - Hierarkisk: Først foldes sekundærstrukturer som helixer og sheets. Deretter påvirker disse hverandre.
 - Molten globule: Hele kjeden kollapser, deretter ordnes ved hydrofobiske reaksjoner.
- Termodynamisk vil foldingen av proteiner være som en brønn, hvor energien synker ettersom tilstandene blir færre. Dette ender i én eller noen få stabile tilstander på bunnen.

Enzymer

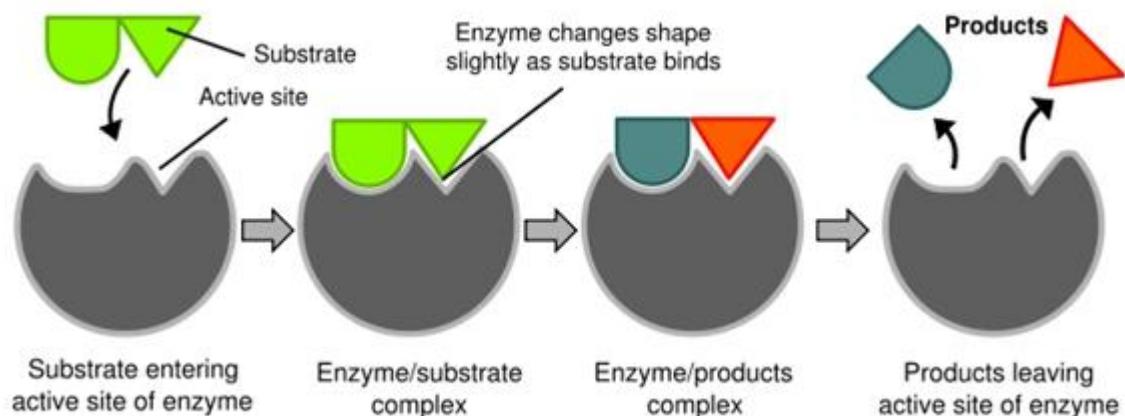
Innledning til enzymer

- Enzymer har en ekstraordinær evne til å katalysere reaksjoner. Reaksjonshastigheten øker med mellom 5. og 17. potens. De akselerer reaksjoner noe enormt, og fungerer i vannløsning med moderat pH og temp.
- Både mangel på, og overaktivitet hos enzymer bidrar til en rekke sykdommer.
- Med unntak av noen RNA-molekyler er alle enzymer proteiner.
- For å fungere, krever et enzym at både primær-, sekundær-, tertiær- og kvarternærstruktur er korrekt.
- Noen enzymer krever hjelp for å katalysere. Enten i form av et uorganisk ion som Fe^{2+} , Mg^{2+} eller andre. Dette kalles **kofaktor**. Andre kan trenge et kompleks organisk molekyl, som kalles **koenzym**.
- Er enten koenzymet eller kofaktoren svært tett knyttet til enzymet, kalles dette en **prosthetic group**.
- Et helt aktivt enzym med en kofaktor eller koenzym kalles **holoenzym**.
- Enzymer kan deles inn i seks klasser med underklasser, etter funksjon.



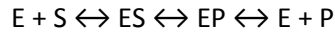
Figur 19. Enzym som bryter ned insulin i kroppen.

Enzymenes virkemåte



Figur 20. Enzymreaksjon.

- En enzymkatalysert reaksjon foregår i en "lomme" i enzymet, som kalles **active site**.
- **Substrat** kalles det molekylet som blir katalysert av enzymet i active site.
- Ofte lukkes substratet helt inn, og blir katalysert av aminosyreenheter i enzymet.



- ES og EP er overgangstilstander i reaksjonen. Enzymer påvirker IKKE likevekten i reaksjonen, men den reduserer aktiveringsenergien, slik at raten(hastigheten) reaksjonen går i øker.

- I figur 3: første fase kalles **ground state**.

Energibarrieren kalles **transition state**.

- **Aktiveringsenergien** er ΔG^\ddagger , og er energidifferansen mellom transition state og ground state.

- Biokjemisk standard fri energi endring $\Delta G'^\circ$, er standard frigitt energi ved pH 7,0.

- Enzymet brukes ikke opp i reaksjonen, det kun øker hastigheten/raten som reaksjonen går i.

- Likevekt som $S \leftrightarrow P$ er bestemt av likevektskonstanten K'_{eq} , og er gitt ved

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq}$$

- Reaksjonshastigheten er gitt ved en hastighetskonstant, k. Første og andreordens hastighetslikning er gitt som:

$$V = k[S]$$

$$V = k[S_1][S_2]$$

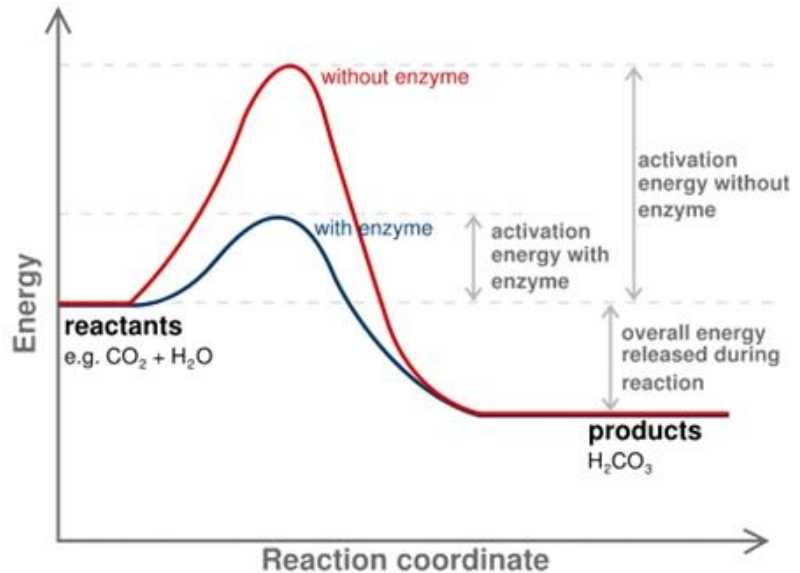
Kun konsentrasjonen av reaktant(ene) er aktuelt. Konstanten k har enhet 1/s.

- Fra transitions-state teori har man at hastighetskonstanten er gitt ved:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Hvor **k** er Boltzmanns konstant, h er Planckkonstanten, og ΔG^\ddagger aktiveringsenergi. Det er verdt å merke seg at aktiveringsenergien og hastighetskonstanten er inverst og eksponentielt avhengige. → lav aktiveringsenergi, høy hastighet.

- Katalysatorreaksjonene støttes på to måter. Rearrangering av kovalente bindinger reduserer aktiveringsenergien. Deretter dannes ikke-kovalente bindinger mellom enzymet og



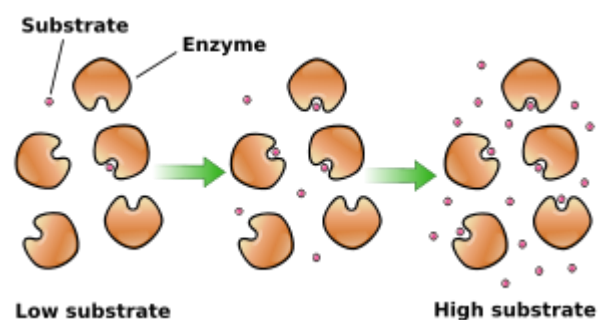
Figur 21. En typisk enzymkatalysert reaksjon.

substratet, som frigir en liten mengde energi. Denne energien frigitt fra enzym-substrat reaksjonen kalles **bindingsenergi ΔG_B** .

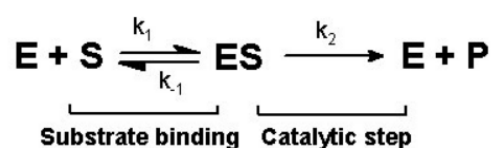
- Bindingsenergien går til å redusere aktiveringsenergien, dvs, dannelse av svake bindinger reduserer aktiveringsenergien.
- En enzym-substrat reaksjon foregår som etter et "key-lock" prinsipp. "Activation site" på enzymet er formet for å passe substratet i transitions state, da dette er energimessig gunstig. Her dannes en rekke svake bindinger mellom substrat og enzym, som frigir energi til å senke aktiveringsenergi.
- Enzymer krever en viss størrelse for å holde alle gruppene som skal reagere mot substratet på riktig plass. Se figur 2.
- **Specificity** er et enzyms spesifikke evne til å kun reagere med et molekyl. Dette skyldes energien fra svake bindinger.
- Fire prosesser hjelper en reaksjon å gå:
 - **Entropireduksjon**: Det er energisk gunstig for enzymet og et molekyl å binde seg sammen. Dette alene kan øke reaksjonshastigheten med mange potenser.
 - **Desolvation**: Svake bindinger brytes fra molekylet med vann, og dannes med enzymet.
 - Svake bindinger redistribuerer elektronene på en måte som er gunstig for reaksjonen.
 - **Induced fit**: Enzymet endrer selv litt av sin form, for å passe bedre til molekylet og reagere bedre. Dette nye enzymet har forbedret katalytiske egenskaper.
- I tillegg til katalysering fra bindingsenergi er det andre katalyseringsmekanismer som hjelper til. Dette kommer fra syre-base katalyse, kovalent katalyse og metallion katalyse. Disse innebærer alle ofte kovalente reaksjoner mellom enzymet og substratet.

Enzymkinetikk

- **Enzymkinetikk** går ut på å se på reaksjonshastigheter og hvordan disse følger parametere, som substratkonsentrasjon. Dette er den viktigste delen for å forstå enzymreaksjoner.
- Ser på **starthastighet V_0** for å unngå effekten av endret konsentrasjon ettersom produkt dannes.
- **Maks hastighet V_{max}** ved der økning i $[S]$ ikke lenger gir økning i V_0 .
- $ES \leftrightarrow E + P$ er den seneste reaksjonen, og derfor begrenser denne reaksjonshastigheten.
- Starthastigheten (V_{max}) er størst når $[E]$ er tilnærmet null, og alt blir bundet i $[ES]$.
- Reaksjonen deles i **pre-steady state** hvor $[ES]$



Figur 22. Enzymkinetikk. Reaksjonshastigheten går raskere ved høyere substratkonsentrasjon, helt til en viss grense ved V_{max} .



Figur 23. Enzymreaksjon.

bygges opp(ms), og **steady state**, hvor [ES] er konstant over en kort stund.

- **Michaelis-Mentens likning:** forholdet mellom [S], V_0 , V_{max} og k_1 , k_{-1} og k_2 . Hvor K_m er Michaelis konstant. Utregning står på side 196 og er svært relevant.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

- **Michaelis-Mentens likning holder i mange tilfeller selv om reaksjonsmekanismene varierer.**

- $K_m = [S]$ når $V_0 = 1/2V_{max}$ Figur 6.

- K_m og V_{max} kan variere mye fra enzym til enzym, og også for samme enzym.

- Har reaksjonen flere steg, så kan en bestemme en mer generell hastighetskonstant k_{cat} fra den begrensende reaksjonen. I det vanlige

tilfellet er $k_2 = k_{cat}$.

- I mange enzymreaksjoner inngår to eller flere forskjellige substrater som binder seg til enzymet. Dette beregnes også med Michaelis-Menten.
- Enzym inhibitorer reagerer med katalyseprosessen og kan bremse denne. Et eksempel er aspirin, som fungerer for inhibitor for enzymer som syntetiserer prostaglandins, som blant annet produserer smerte.
- Inhibitorer deles i reversible og irreversible.
- Blant reversible inhibitorer er competitive inhibitor. Denne har en form som er relativt lik substratet, og opptar active site på enzymet, uten å katalysere. Et eksempel er etanol som competitive inhibitor for metanol ved metanolforgiftning. Siden den er reversibel, vil en stor konsentrasjon av substrat igjen gå mot V_{max} .
- For competitive inhibitor blir Michaelis-Mentens likning:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

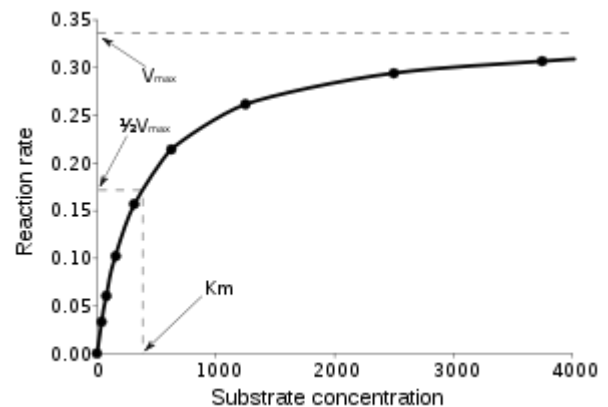
- **Uncompetitive inhibitor:** Reversibel. Binder seg til ES-kompleks, og reduserer derfor V_{max} .

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

- **Mixed inhibitor:** Reversibel. Binder seg til både E og ES.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]}$$

- **Noncompetitive inhibitor:** $\alpha = \alpha'$



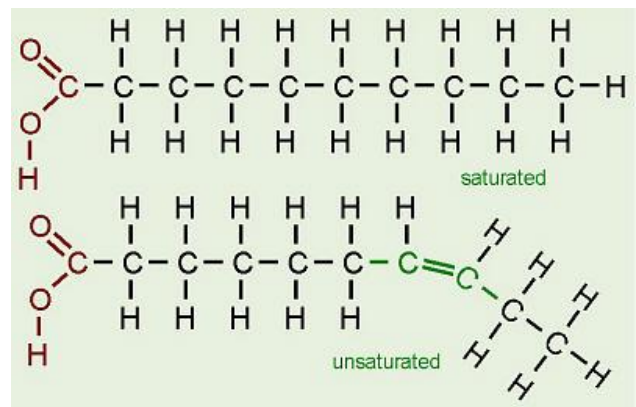
Figur 24. Figur som viser $K_m = [S]$ når $V_0 = 1/2V_{max}$

- Mixed og uncompetitive inhibitors binder seg normalt kun til enzymer med to eller flere substrater, og reagerer forskjellig deretter.
- **Irreversible inhibitorer:** Binder seg kovalent til, eller ødelegger en essensiell(funksjonell) del av enzymet.
- **Suicide inhibitorer:** Molekyler som er lite reaktive før de binder seg til den aktive siden av et enzym. Der begynner de å katalysere normalt, men ødelegger kjemisk enzymet. Dette kan være effektive medisiner uten bivirkninger, ettersom de ikke reagerer før enzymet er tilstede.
- Enzymer har en ideell pH. For lavere og høyere pH reduseres aktiviteten. Dette skyldes at aminosyrene som bygger opp enzymet er reaktive for pH. Til en viss grad kan pH-nivået et enzym er aktivt på si noe om aminosyrerekkefølgen.

Lipider

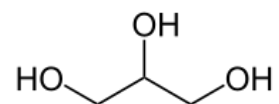
- Lipider karakteriseres ved deres uløselighet i vann.
- Fungerer som:
 - Energilager (fett og oljer)(mye energi/g).
 - Fosfolipider og steroler. Viktige strukturelement i membraner.
 - Enzym kofaktorer, ladningsbærere, lysabsorberende pigmenter, hormoner ++. (mindre roller)
 - Vannavstøtning for hud, fjær og pels.
 - Varmeisolasjon
 - Hormoner

- **Fettsyrer** er karboksylsyrer(COOH), med en hydrokarbonkjede som er typisk 4-36 karbon lang. De er lavt oksidert(sterkt redusert), og oksidasjon til CO₂ og H₂O er en sterk eksoterm reaksjon.
 - Mettet fett: kjede uten dobbeltbindinger
 - Umettet fett: Med én dobbeltbinding
 - Flerumettet fett: flere dobbeltbindinger
 - Kan også ha sidekjedder, og andre sidegrupper.

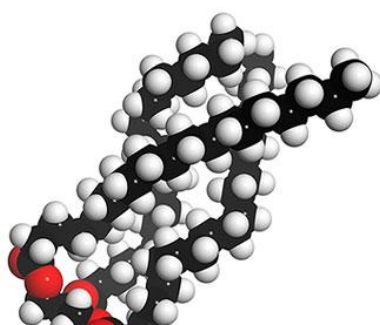


Figur 25. Mettet og umettet fettsyre

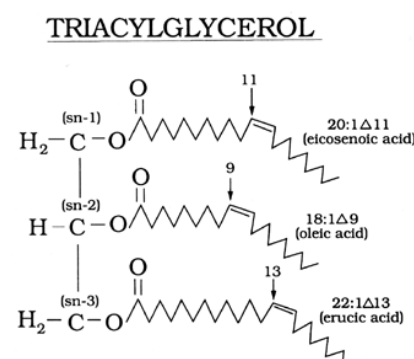
- Navnsetting: AntallKarbon:AntallDobbeltbinding($\Delta^{\text{Dobbeltbinding,Dobbeltbinding}}$), eks 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$)
- Dobbeltbindinger i umettet fett forekommer stort sett alltid i cis-konfigurasjon.
- Lengden og graden av umetning avgjør løseligheten i vann, men de er stort sett svært lite løselige pga lang upolar kjede. Karboksylsyre-enden(COO⁻) er polar ved pH7 og bidrar til at korte kjeder får noe løselighet i vann.
- Smeltepunktet avgjøres i stor grad av metningen. Mettet fett danner rette kjeder og kan stables tett. Dette gir høyt smeltepunkt. Derimot umettet fett har en eller flere knekker, som gjør stabling vanskeligere -> lavere smeltepunkt. (Smeltepunkt ~ sunnhetsgrad)
- **Triacylglycerol** er bygget opp av tre fettsyrer. Disse er bundet sammen med esterbinding til et glycerol.
- Er de tre fettsyrene like kalles det **simple triacylglycerol**. Mest vanlig er forskjellige fettsyrer.
- Triacylglycerol er upolart og hydrofobt.



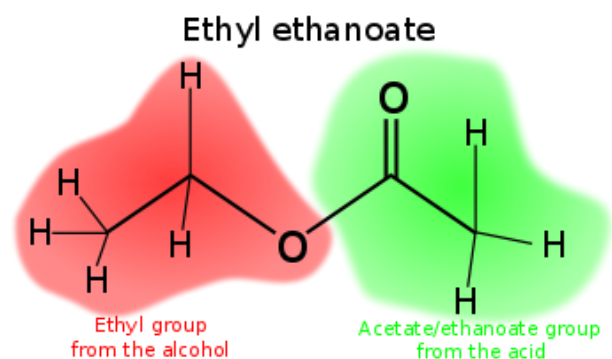
Figur 26. Glycerol.



Figur 27. Triacylglycerol 3D struktur.



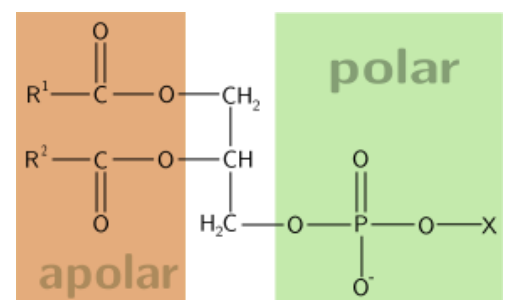
- Adipocytter, også kjent som fettceller, er celler som lagrer store mengder triacylglycerol som fettdråper.
- To fordeler med triacylglycerol fremfor polysakkarider som glukose og stivelse:
 - Over dobbelt så mye energi grunnet sterkt redusert.
 - Det er uhydrert og bærer derfor ikke med seg vann slik karbohydrater gjør (2g pr gram i polysakkarid)
- Det meste av matfett er en miks av enkle- og mixed triacylglycerol.
- For å øke holdbarhet på vegetabilsk fett gjennomføres en delvis hydrogenisering. Dette gjør dobbeltbindinger til enkeltbindinger, og gjør enkelte cis-bindinger til trans-bindinger. Trans-fett er svært skadelig for kosten, og har blitt forbudt på alle restauranter i Danmark og New York.
- Voks er ester av en lang fettsyre og en lang alkohol.



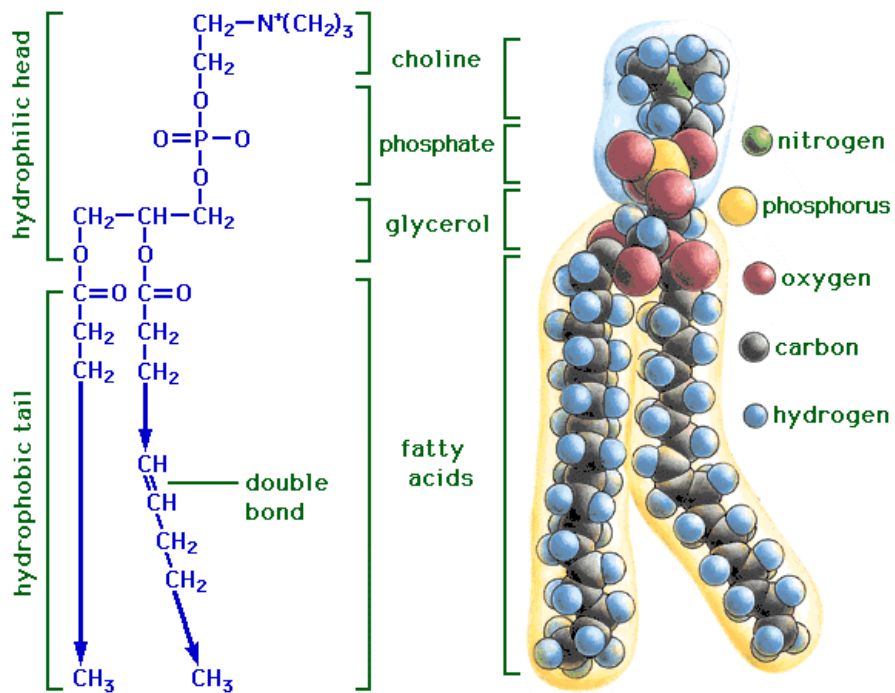
Figur 28. Ester, alkohol og syre bundet sammen. Lengere alkohol og fettsyre danner voks.

Strukturlipider i membraner

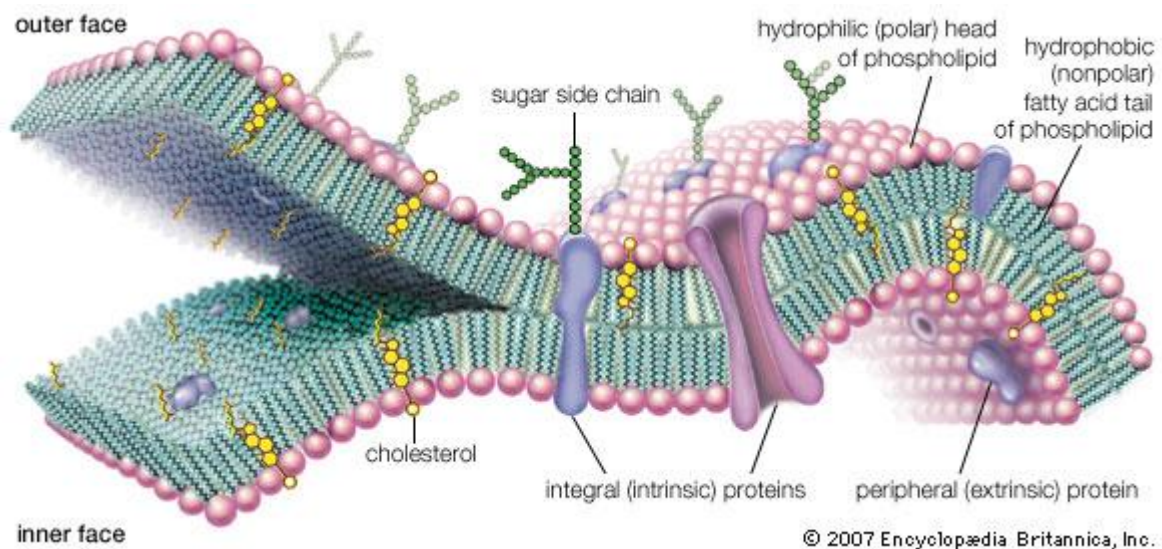
- Biologiske membraner er bygget opp av et dobbelt lag lipider, og regulerer gjennomstrømningen av molekyler og ioner.
- **Amfifatiske**; et molekyl med en polar og en upolar del.
- Skal bare kunne detaljer og fosfolipider.
- **Forsfolipider** er en består av glycerofosfolipider og sfingolipider.
- **Glycerofosfolipider** er som en triacylglycerol hvor den ene fettsyren er byttet ut med $-PO_4 - \text{Alkohol}$.
- Dette gir de et polart hode, og en upolar kropp. Se figur 5 og 6.
- Steroler forekommer i membraner i de fleste eukaryoter og består av 4 ringer, én med 5 og tre med 6 karbonatomer, og en hydroksylgruppe. Dette er et viktig strukturelement.



Figur 29. Glycerofosfolipid. X er en alkohol, R_1 og R_2 er fettkjeder.



Figur 6. Glycerfosfolipid.



Figur 7. Cellemembran med Fosfolipider og kolesterol(sterol).

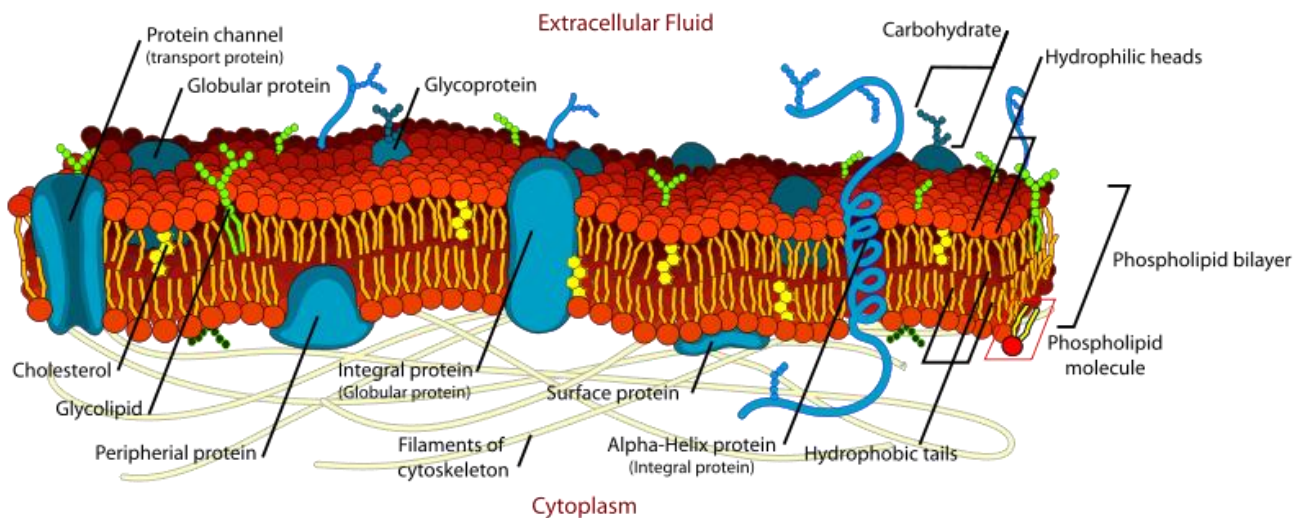
Biologiske membraner og transport

- **Eukaryoter** (*Definisjon*) er én eller flercellede organismer som kjennetegnes ved mange celleorganer som *prokaryote celler ikke har*. Viktigst er *cellekjernen, endoplasmatisk retikulum, golgiapparatet, celledskelettet, mitokondrier, kloroplaster og flimmerhår*.

Introduksjon til membraner

- Membraner definerer grenser for celler, og regulerer trafikken av molekyler over denne.
- I eukaryotiske celler deler membraner opp i mindre deler.
- Membraner reagerer med andre celler, og driver celle-til-celle kommunikasjon.
- Membraner er fleksible, og tåler at cellen vokser og beveger seg. De kan bygges opp igjen om de sprekker, slå seg sammen, dele seg.
- Over membranveggen selekteres noen molekyler til å passere, mens andre ikke kan.
- En membran er ikke passiv, men består av et nett av proteiner som katalyserer reaksjoner.
- De er veldig tynne (5-8nm), to molekyler tykk.
- Kan noe krysse inn i cellen er cellen død.

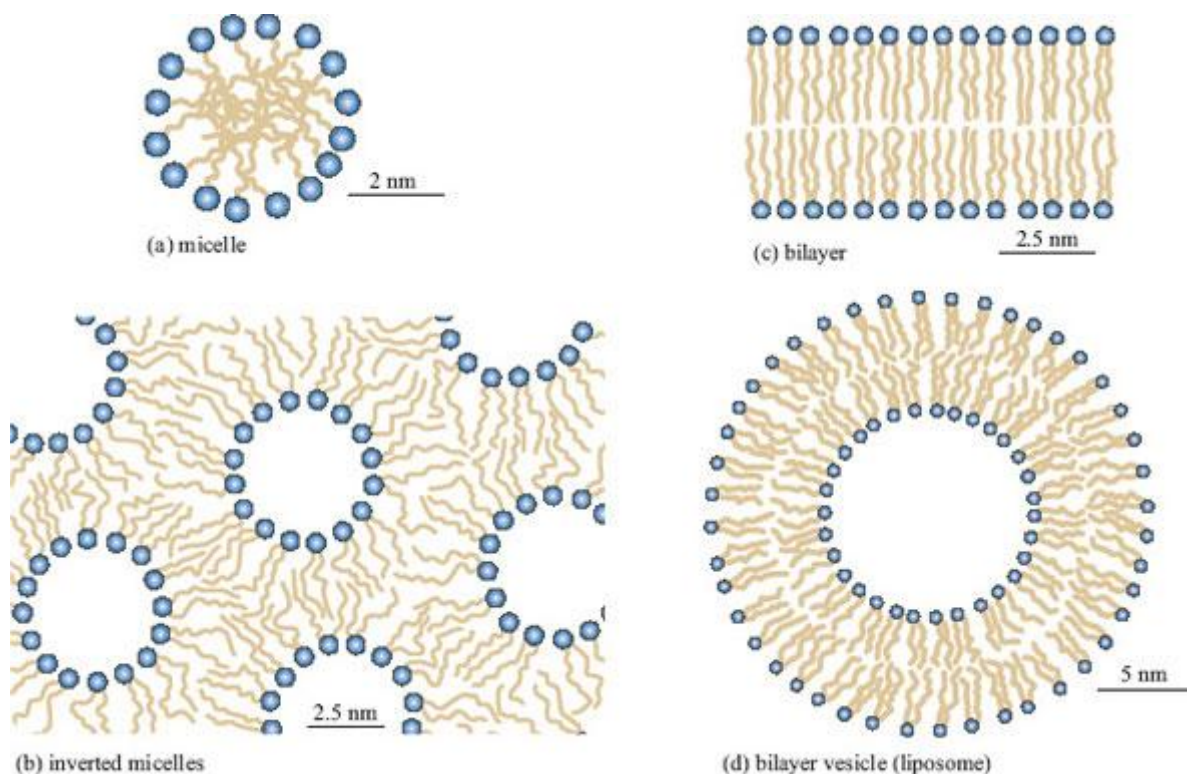
Oppbygningen av membraner



Figur 30. Cellemembran. Legg merke til fosfolipider, α -helix protein, sterol og karbohydrat (i form av glykoproteiner og glykolipider).

- Oppbygningen av membraner avhenger i stor grad av hva den er satt sammen av. Dette er i hovedsak proteiner og polare lipider, men forholdet mellom de varierer sterkt.
- Celler har mekanismer som syntetiserer og regulerer de forskjellige forholdene av lipider til membranen. Enhver art, vevtype, celletype og deler av cellen har forskjellig sammensetning av membranlipider.
- Proteinsammensetningen varierer enda mer enn lipidsammensetningen, og reflekterer membranens og cellens funksjon. I noen tilfeller er proteiner bundet til oligosakkarider.

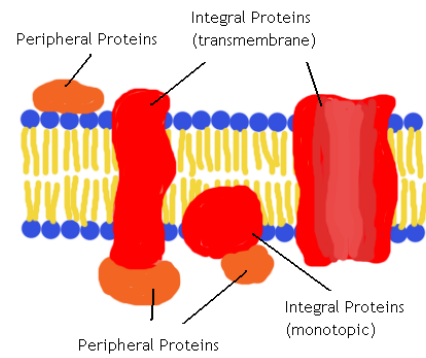
- Noen membranproteiner er bundet til lipidet, som hydrofobe ankere.
- En celledmembran er **permeabel** (gjennomtrengelig) for upolare molekyler, men ikke-permeabel og polare/ladete molekyler.
- Fosfolipidene danner to polare lag med et upolart lag i midten, ”**bilayer**” (Figur 1), og reagerer med en vannfase på begge sider. Proteiner er innegrodd i dette tre-delte tverrsnittet, holdt på plass av hydrofobiske krefter.
- Membranen er asymmetrisk mhp proteiner og deres funksjon. Noen proteiner kan eksistere bare på én side, mens noen går igjennom og formes forskjellig på hver side.
- Membranen beskrives av en **fluid mosaikk modell**, og er helt fleksibel ettersom den holdes sammen av svake krefter, ikke kovalente bindinger.



Figur 31. Micelle, bilayer, vesicle og inverts micelle.

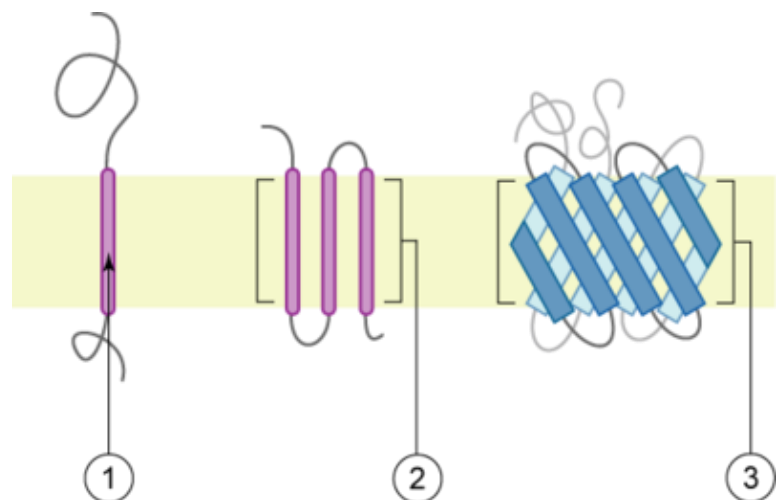
- Figuren over viser forskjellige lipidkonfigurasjoner. Entropien øker når et lipid alene kommer i kontakt med vann, ettersom den stort sett er hydrofob. Det er derfor energimesseig gunstig å danne figurene ovenfor.
- **Miceller** dannes når lipidhodet er større enn sidegruppen, typisk for frie fettsyrer og fosfolipider som mangler en fettsyre. (a)
- **Bilayer** er gunstig når hodet er like stort som sidegruppene. Men, denne vil raskt omdannes til en **vesicle** (d), i kontakt med vann. (c) Vesicle danner en lomme for vannfase i midten.
- Tre typer proteiner virker forskjellig rundt et lipid bilayer:
 - **Integral membran protein**: Sitter godt inne i membranen, og kan kun fjernes med kraftige hydrofobe løsemidler.

- **Peripheral membrane proteins:** Knytter seg til de delene av integral membran proteinene som stikker ut. Dette gjør de vet svake, hydrofile bindinger. Kan også danne bindinger med lipidhodene. Kan løses enkelt, eks, karbonat ved høy pH.
- **Amfitropiske proteiner:** Ikke-kovalente bindinger med lipid eller membranprotein.

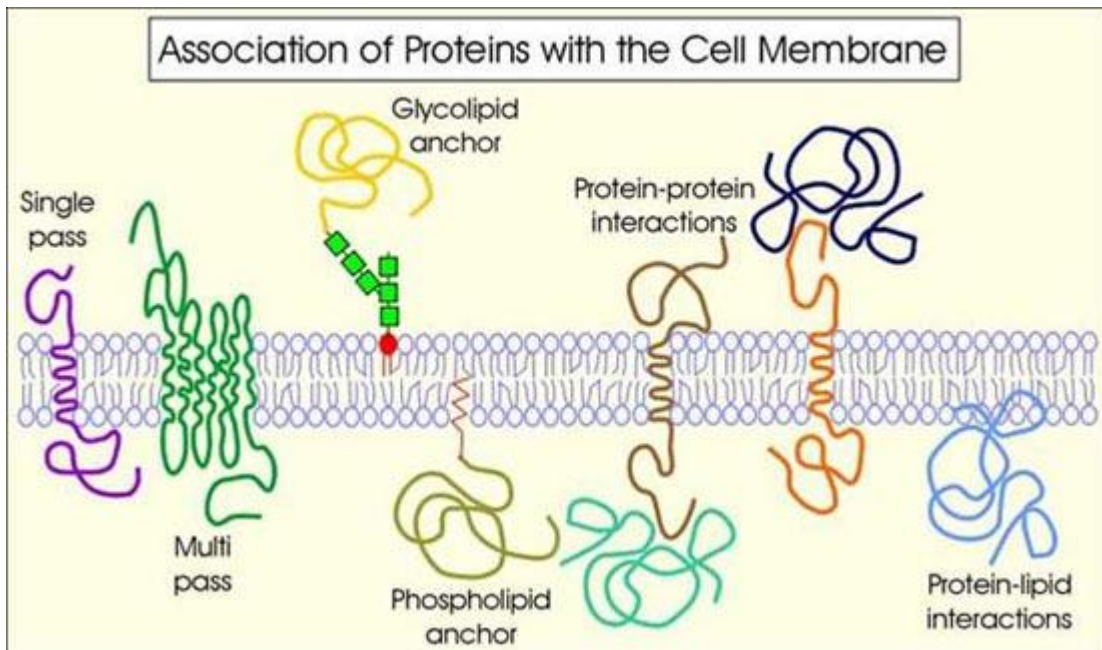


Figur 32. Integral membrane proteiner.

- Integral membran proteiner har ikke ladede sidegrupper igjennom membranen, noe som resulterer i en hydrofob del av proteinet. Utenfor membranen er proteinet hydrofilt, med polare sidegrupper. Den hydrofobe delen er avgjørende for at proteinet skal feste seg slik det gjør.
- Et hvert integralprotein vil være orientert på samme måte, enten med aminoenden inn eller ut.
- Den asymmetriske oppbygningen av membranproteiner fører til en asymmetrisk funksjon. Eks så vil noen kun frakte ioner én retning.
- Proteiner danner ofte en α -helix igjennom membranen, med ca 20 enheter. De kan krysse flere ganger, som bacteriorhodopsin, som krysser syv ganger.
- Vanskelig å bestemme 3D struktur utenfor membranen.
- En kan bestemme polariteten til enhver aminosyre i et protein ved å studere energioverføring ved kontakt med vann. Dette gir en **hydropathy index**.
- Hydropathy index for et helt protein gir en graf med hydrofil/hydrofob på y-aksen og aminoenhet på x-aksen. Områder med over 20 aminoenheter som er hydrofobe tyder på at det er en helix som krysser membranen.
- Aminosyre Tyr og Trp er ofte ved overgangen fra hydrofob til hydrofil, og fungerer som et anker til membranen.
- Ofte forekommer aminosyrer med positive sidegrupper inne i membranen.
- **β -barrel** forekommer der 20 eller flere β -sheet segmenter danner en sylinder igjennom membranen.
- **Poriner** er proteiner som tillater enkelte polare molekyler å passere membranen.
- Enkelte membranproteiner er kovalent bundet til et lipid, og fungerer som et hydrofobt anker for proteinet. Denne ankerkraften er ikke spesielt sterk, så en annen mer spesifikk oppgave er å plassere proteinet på riktig plass på membranen.



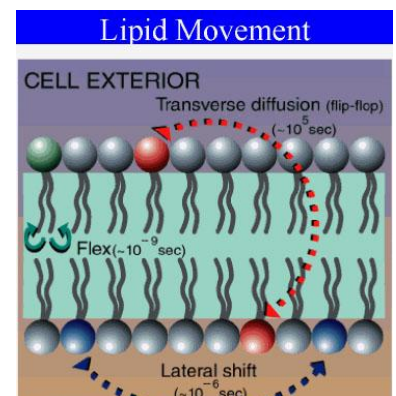
Figur 33. 1. a single transmembrane α -helix (bitopic membrane protein) 2. a polytopic α -helical protein 3. a transmembrane β barrel



Figur 34. Cellemembran. Legg merke til ankerlipidet.

Membran dynamikk

- En biologisk membran er svært fleksibel, og kan endre form uten å begynne å lekke.
- Membranens struktur og fleksibilitet avgjøres av oppbygningen (av lipider) og temperatur. I forhold til normal biologisk temperatur er det tre faser som gjelder:
 - **Gel fase:** Kaldere; lipidenes bevegelse er sterkt redusert.
 - **Liquid-disordered-state:** varmere; konstant bevegelse i bilayeret, og svært veskete.
 - **Liquid-ordered-state:** Normal temp; mindre bevegelse, men sidelengs bevegelse i bilayeret forekommer fortsatt.
- Steroler i membranen reduserer "flytbarheten" til midten av membranen.
- Celler regulerer lipidsammensetningen i membranen sin slik at den er godt tilpasset temperaturen den lever i, og har ønsket fleksibilitet.
- **"flip-flop"** eller **transbilayer** er lipidbevegelse fra den ene siden av membranen til den andre. I utgangspunktet er dette en svært sen prosess (dager).
- Sidelengs forflytning av lipider på en side av membranen går svært raskt (μs).
- Tre grupper proteiner bidrar til transbilayer forflytning av lipider.
 - **Flippase:** flytter utenifra og inn. Viktig å fjerne lipider som markerer celledød. Krever en ATP pr forflytning.
 - **Floppase:** Flyttet innenifra og ut. Trenger også tilføring av én ATP.



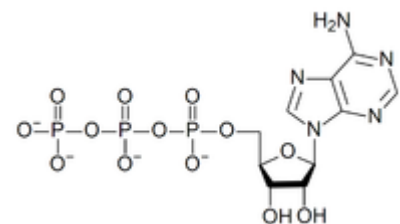
Figur 35. Lateral og transbilayer bevegelse.

- **Scramblase:** Flytter lipider over membranen langs dens konsentrasjonsgradient. Jevner ut lipidene. Krever ikke energi.
- Sidelengs bevegelse (lateral) i en membran foregår som en Brownsk bevegelse. Denne diffusjonsprosessen går svært fort.
- **FRAP** er en metode for å måle sidelengs diffusjon i membraner.

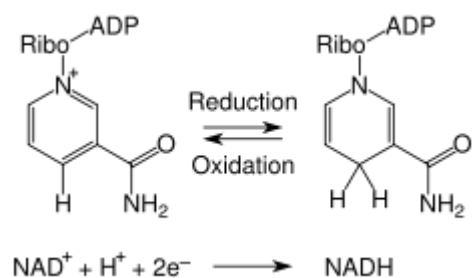
Glykolysen og Glukoneogenesisen

Definisjoner (orientering)

- **Glykolysen:** Prosessen hvor glukose omdannes til energi (ATP)
- **Glukoneogenesisen:** Den motsatte prosessen av glykolysen, hvor glukose dannes.
- **Catabolic:** Katabolsk: metabolsk nedbrytning av komplekse molekyl til enklere molekyl. Frigjør ofte energi.
- **Catabolism:** Katabolisme er en stoffskifteprosess der molekyler i levende organismer nedbrytes. Den motsatte prosess er anabolisme, der større molekyler bygges opp fra mindre. Samlet er disse prosessene kjent som metabolisme.
- **Metabolism:** Metabolisme: Den kjemiske prosessen som foregår i en levende celle eller organisme som er nødvendig for liv. Dette innebærer å bryte ned enkelte substanser for å frigjøre energi, mens andre livsnødvendige substanser er syntetisert.
- **ATP:** Adenosine -5-triphosphate. Brukes som korttidslager for energi inne i cellene. Produseres av cellerespirasjon og fotosyntese fra ADP, adenosine diphosphate. Brukes av enzymer og en rekke celleprosesser. Dannes ved bruk om tilbake til ADP. Mennesket omgjør hele sin vekt til ATP hver dag.
- **NAD⁺:** *Nicotinamide adeninedinucleotide. Finnes i alle celler. Involvert i redoks reaksjoner, og frakter elektroner fra en reaksjon til en annen. Finnes i to utgaver. NAD⁺, oksiderende form. Denne tar imot elektroner fra andre molekyler og blir redusert til NADH. NADH kan da selvsagt virke reduserende.*
- **Cytosol:** Flytende delen av cytoplasmaen der mye av cellenes metabolisme foregår.



Figur 36. Adenosine-5-triphosphate, ATP.

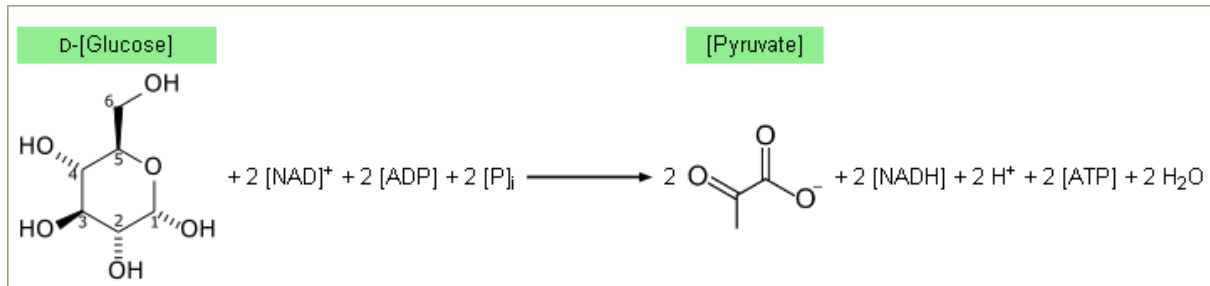


Figur 37. Redoksreaksjonen av NAD⁺.

- Glukose er rikt på potensiell energi, fullstendig oksidasjon til CO₂ og vann frigjør 2840 kJ/mol.
- I cellene kan glukose lagres i store mengder i form av glykogen og stivelse. Når energibehovet melder seg kan glukose frigjøres fra disse lagringsmolekylene, og omdannes til ATP enten aerobt eller anaerobt.

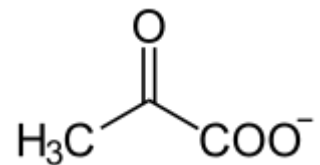
- **Aerobt** er en reaksjon for foregår med tilstrekkelig med oksygen. Ved en **anaerob** reaksjon er det ikke oksygen tilstedet, og melkesyre dannes.
- Organismer som ikke har tilgang til glukose må lage dette. Fotosyntetiske organismer lager dette fra CO₂, ikke fotosyntetiske celler danner dette fra mindre karbonkjeder ved hjelp av glukoneogenesen.

Introduksjon Glykolysen



Figur 38. Totalreaksjon Glykolysen

- I glykolysen omdannes et glukosemolekyl til to pyruvatmolekyler ved hjelp av en rekke enzymkatalyserte reaksjoner. Igjenom denne serien reaksjoner frigjøres energi i form av ATP og NADH.
- Glykolysen er universal, og står for den største strømmen av karbon i cellene.
- I mange vevstyper og celler er glykolytisk nedbrytning av glukose eneste energikilde. Eks hjernen og sperm.
- **Fermentation** er et fellesnavn på anaerob nedbrytning av glukose.
- Etersom det ikke var oksygen på jorda i starten, så må de første organismene levd anaerobt.
- En forstår godt glykolysen, og har gjort det siden 1906.
- Glykolysen er den samme for alle arter, eneste forskjellen er regulering og hva som skjer med pyruvatet.

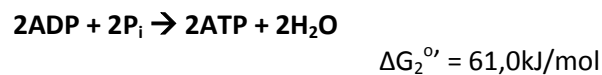


Figur 39. Pyruvat

- Glykolysen foregår i 10 trinn.
- De fem første trinnene kalles **investeringsfasen**, eller **preparatory phase**. Her investeres ATP som øker fri energi. Vi ender da opp med glyceraldehyd-3-forsfat.
- Energigevinsten kommer i de fem neste trinnene, **the payoff phase**.
- Alle ni leddene mellom glukose og pyruvat er fosforelert. Dette innebærer at det er tilknyttet PO₄. Dette ser ut til å ha tre funksjoner:
 - Forforkomplekset kan ikke forlate cellen.
 - Fosfor-grupper er essensielle komponenter i enzym oppbevaringen av metabolsk energi.
 - Binding av fosfatgrupper til active site i et enzym reduserer aktiveringsenergi og øker spesifiktiviteten til enzymet.
- Alle 10 enzymene til glykolysen finnes i cytosolen.
- Alle 10 delreaksjonene av glykolysen består av 3 eller 6 karbonatomer, og er phosphorylated.

Energiregnskapet i glykolysen

- Under glykolysen frigjøres noe energi i form av ATP, men det meste av kjemisk energi er igjen i produktet pyruvat. Dette kan frigjøres ved videre oksidasjon i sitronsyre syklusen (kap 16) og oksidativ fosforilasering (kap 19).
- For hvert molekyl pyruvat som dannes, så dannes det to ATP molekyler fra ADP og P_i. Det dannes også to molekyler NADH fra NAD⁺
- Kan dele opp reaksjonen fra glukose til pyruvat i to deler:

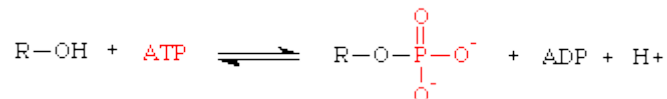


- Dette gir en totalreaksjon med $\Delta G_s^{0'} = -85\text{kJ/mol}$, som er eksoterm og avgir energi. Denne kan også drive motsatt vei ved tilføring av energi.

Reaksjoner i Glykolysen

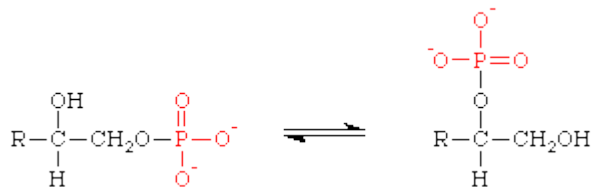
- Alle reaksjoner i glykolysen kan bygges opp av disse.

1. Fosforelering (phosphoryl transfer): Kinase



- Her går en fosforylgruppe fra ATP til en alkohol.

2. Fosforskiift (phosphoryl shift): Mutase



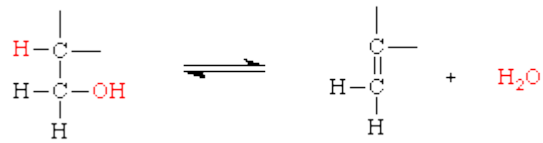
- Fosforylgruppen flytter seg fra oksygen til en alkohol. Hydrogenet på alkoholen bytter plass. Dette har store konsekvenser.

3. Isomerisering (isomerization): Isomerase



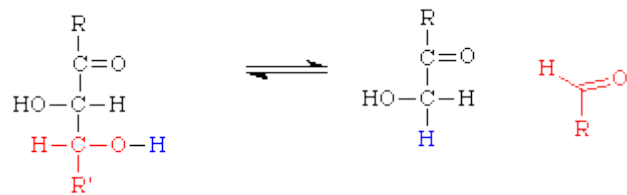
- Konvertering mellom katose og aldose.

4. **Dehydrering** (dehydration): **Dehydratase**



- Spalter et vannmolekyl av en alkohol.

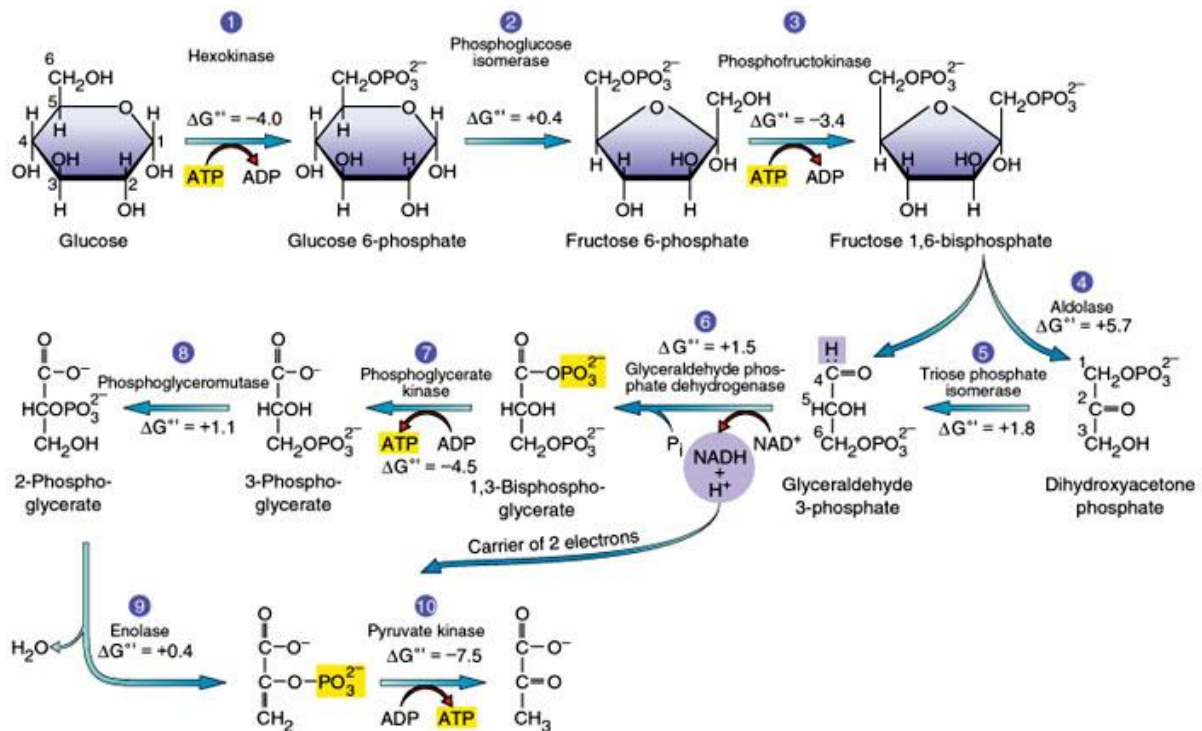
5. **Adol-spalting** (adol cleavage): **Aldolase**



- Bryter opp en karbon – karbon binding, og danner et aldose og ketose.

Selve Glykolysen

- Deler opp i investeringsfase og payoff phase. Investerer to ATP i glukose, får dannet to glyceraldehyd-3-phosphate, som hver danner to pyruvat og to ATP.
- Netto overskudd 2 ATP.
- Les/se boka side 529.



Figur 40. Hele glykolysen.

- De to NADH molekylene som dannes under glykolysen omdannes ved oksidasjon til NAD^+ .

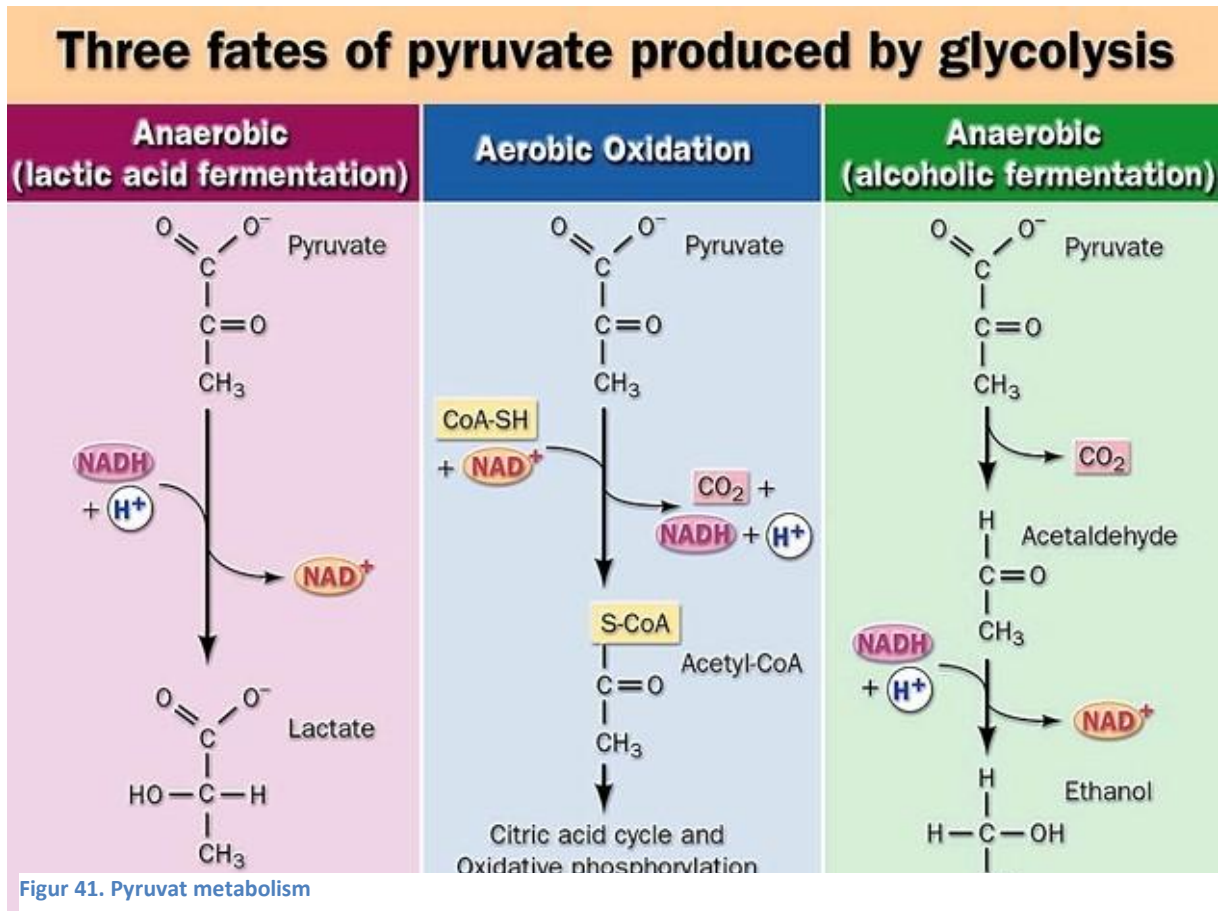
$$\text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$$

Omsetning av andre sukkerer enn glukose i glykolysen

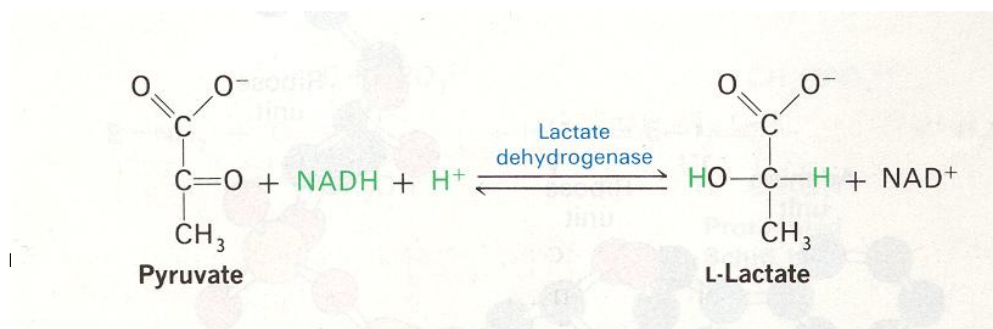
- Det meste dyr og mennesker spiser må kunne omsettes i glykolysen.
- Hovedinntaket av karbohydrater er for det meste i form av stivelse.
- Enzymet *α -amylase* i magen hydrolyserer ($\alpha 1 \rightarrow 4$) bindingene i stivelse, så en får kortere kjeder, og etter hvert D-glukose.
- I kroppsvevet finnes glykogen, som lagring for glukose. Her brytes ett og ett glukose-1-fosfat av ved hjelp av et enzym. Dette omdannes til glukose-6-fosfat, og er klart for glykolysen.
- Disakkarider som sukrose, og laktose må brytes opp (hydrolyseres) før de kan gå inn i cellene.
- De fleste andre hexoser enn glukose kan omdannes på en måte slik at de kommer inn i glykolysen.
- Fruktose omdannes til fruktose-1-fosfat eller fruktose-6-fosfat og går inn i glykolysen. Begge danner glyceraldehyd-3-fosfat.
- Galaktose-1-fosfat omdannes til glukose-1-fosfat ved hjelp av et hjelpemolekyl, UDP.

Videre skjebne for pyruvatet

- Det finnes tre videre ruter for pyruvatet. Se figur 6.



- **Aerobt:** Oksidering videre acetat, som går inn i sitronsyresyklusen (kap 16.), og ender opp som CO_2 og H_2O .
- **Anaerobt:** Dersom ikke NADH kan omdannes til NAD^+ , så vil glykolysen stoppe opp. NAD^+ må derfor omdannes på en annen måte. Dette skjer ved å omdanne pyruvat til lactate (melkesyre), som katalyseres av *lactate dehydrogenase*. L-Lactate dannelse er fordelaktig med $\Delta G'^{\circ} = -25 \text{ kJ/mol}$

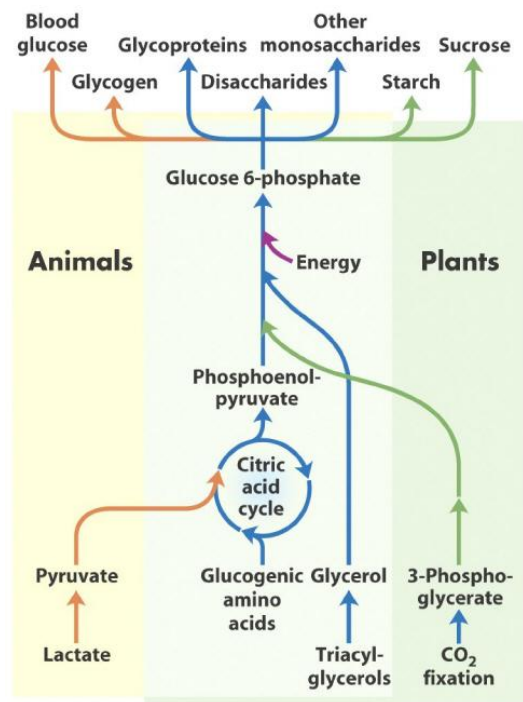


Figur 42. Lactatdannelse.

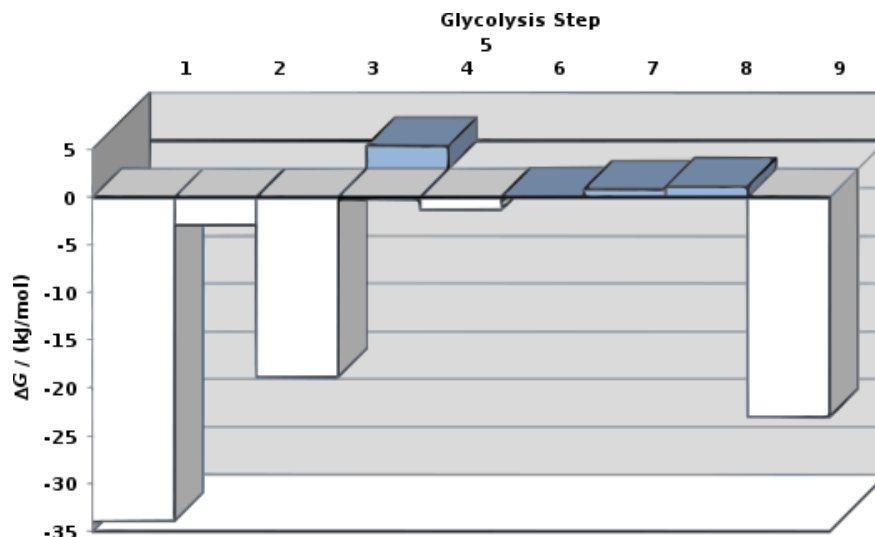
- Melkesyre kan omdannes i leveren til glukose.
- **Omdannelse til etanol:** Mikroorganismer og gjær omdanner glukose til etanol og CO_2 .

Glukoneogenesisen

- Flere organer bruker bare glukose som næring, hjernen alene forbrenner 120g glukose om dagen.
- Kroppen har lagre av glukose i form av glykogen i leveren og i musklene, men etter trening eller mellom måltider er ikke dette nok.
- I Glukoneogenesisen syntetiseres glukose fra pyruvat og tilsvarende tre-fire karboner. Mennesker kan ikke lage glukose fra fett, men fra proteiner og aminosyrer.
- I pattedyr skjer glukoneogenesisen i leveren, og glukose fraktes derfra igjennom blodet.
- Det meste er likt som i glukosen, men tre reaksjoner er annerledes og trenger en by-pass. Disse tre stegene kontrollerer glukoneogenesisen.



Figur 43. Glukoneogenesisen.

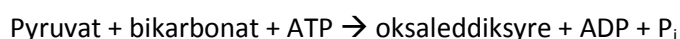


Figur 44. Fri energi ved reaksjonene i glykolysen. Som en ser er nr 1, 3 og 9 svært lite reversibler, og trenger derfor en by-pass.

Trinn 1:

Pyruvat \rightarrow Phosphoenolpyruvate(PEP)

- Dette skjer i mitokondrien, og ved hjelp av pyruvat karboksylase.



Oksaleddiksyre → malat

Malat → phosphoenolpyruvat

Trinn 2:

- Katalyseres av enzymet fruktose -1,6-bifosfatase

Fruktose 1,6 bi-fosfat → fruktose-6-fosfat + fosfat

Trinn 3:

- Katalyseres av enzymet glukose-6-fosfatase

Glc-6-fosfat → Glc + fosfat

Prinsipper for metabolsk regulering

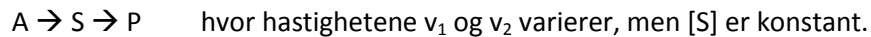
Definisjoner fra wikipedia

- **Metabolism** is the set of [chemical reactions](#) that occur in living [organisms](#) to maintain [life](#). These processes allow organisms to grow and reproduce, maintain their structures, and respond to their environments.
- Metabolism is usually divided into two categories.
 - **Catabolism** breaks down organic matter, for example to harvest energy in [cellular respiration](#).
 - **Anabolism**, on the other hand, uses energy to construct components of cells such as [proteins](#) and [nucleic acids](#).
- **A metabolic pathway** is a series of [chemical](#) reactions occurring within a [cell](#). Eks glykolyse.
- Bakterier finnes i alle former og utgaver, men de består av én celle. (Eksempel på hva én celle kan være i stand til.)

Regulering av Metabolske pathways

- Det foregår tusenvis av enzymkatalyserte reaksjoner i hver av cellene våre. Alle er regulerte.

- **"Pathways"** eller **biokjemisk spor**, er en enkelt metabolsk reaksjon. Det kan være hendig å se på de hver for seg, men i cellen kan en ikke dele de sånn.
- Eksempelvis kan bakterien *Escherichia coli* lage flere tusen molekyler ut av glukose.
- Regulering er helt essensielt for å tilpasse cellens behov ved forandringer. Eks nedbrytningen av det forskjellige innholdet i forskjellige typer mat.
- Den metabolske fluxen igjennom en celle kan være høy og variere mye, men konsentrasjonen av substrat i cellen er konstant.



- Denne varierende metabolske fluksen med konstant substratreaksjon kalles **dynamisk steady state**.
 - Et eksempel er at nivået av glukose i blodet ca 5mM og konstant. Opptaket fra glukose til blodet reguleres med v_2 . Dette kaller **homeostasis**, og feil her er årsak til mange sykdommer.
 - Fluxen igjennom en enzymkatalysert reaksjon kan kontrolleres ved å endre:
 - Antallet enzymmolekyler
 - Den katalytiske aktiviteten til ethvert enzym.
 - Signaler utenifra cellen for å regulere en pathway kan være igjennom hormoner eller nervesignaler.
 - Syntetiseringshastigheten i en celle endres ved aktivering av en **transkripsjonsfaktor**.
 - Transkripsjonsfaktorer er proteiner som binder seg til spesifikke DNA områder, som aktiverer eller svekker syntetiseringen av det tilhørende proteinet.
 - En annen måte cellene regulerer enzymaktivitet er å skille substrat og enzym i forskjellige rom, med membraner imellom.
 - Alle enzymer er følsomme for substratkonsentrasjon (ref Michaelis Menten).
 - En **allostetisk effector** øker enzymets følsomhet for substrat.
 - **Metabolsk kontroll** refererer til en prosess som styrer en metabolsk pathway, med forskjellige metoder
-
- For reaksjoner nærme likevekt vil en liten endring av enten produkt eller reaktant drastisk endre reaksjonsfluksen. En gjenkjenner slike nær-likevektsreaksjoner ved at de har en **"mass action ratio, Q" som er innen 10^2 ifra likevektskonstanten K'_{eq} for reaksjonen**.
 - Reaksjoner med høy likevektskonstant vil gå i en retning, og tilnærmet null den andre veien.
 - Cellene kan ikke la disse reaksjonene gå fritt, de må kontrolleres. Får den andre reaksjonen i glykolysen gå fritt vil all ATP forbrukes til å danne fruktose-6-fosfat, og det vil ikke være ATP igjen for å drive reaksjoen videre.
 - Det er reaksjonene langt fra likevekt som brukes til å regulere metabolismen.
 - En av cellenes viktigste oppgaver er å holde ATP konsentrasjonen tilstrekkelig høy og konstant. Ved for lav konsentrasjon vil hundrevis av reaksjoner som trenger ATP reduseres, og cellen vil ikke overleve dette.
 - Derfor, viktig å opprettholde [ATP]/[ADP] ratio, samt tilsvarende andre ratioer (NADPH/NADP⁺).
 - Konsentrasjonen av AMP er et sensitivt tegn på cellens energiske tilstand, mer sensitiv en [ATP].

Regulering av Glykolysen og Glukoneogenesen

- Regulering av glykolysen og glukoneogenesen henger sammen.
- I glykolysen og glukoneogenesen er 7 av reaksjonene reverserbare, og derfor de samme.
- De tre resterende reaksjonene er forskjellige, og har hhv stor negativ $\Delta G'$ i sin retning.
- Summen av begge reaksjonene er energi omgjort til varme, derfor kan ikke begge tillates å gå samtidig.
- De reguleres ved de tre forskjellige reaksjonene.

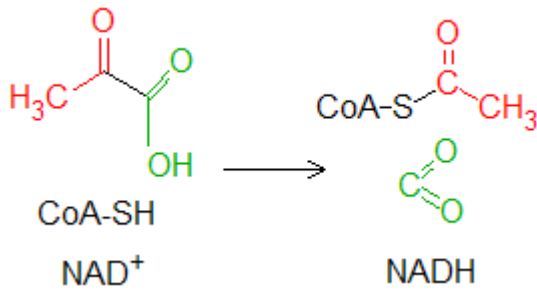
Her er det viktig å få med seg at det er enzymene som katalyserer reaksjonene i glykolysen og glukoneogenesen som regulerer metabolismen. Disse enzymene og tilhørende reaksjoner er det viktig å lære.

The Citric Acid Cycle

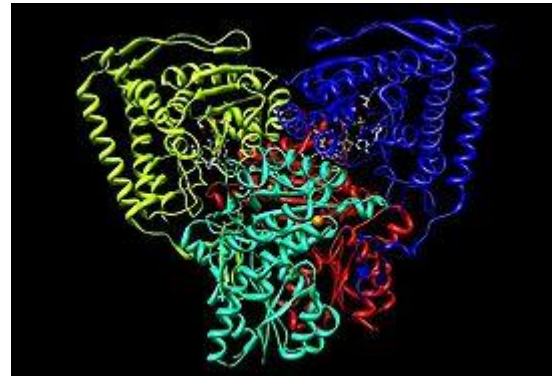
- Pyruvat reduseres videre til CO_2 og vann.
- **Respirasjon** er prosessen hvor glukose og oksygen ender i produktene over.
- **Cellerespirasjonen** er et snevrere uttrykk, og omhandler omdannelsen fra O_2 til CO_2 i cellene.
- Cellerespirasjonen foregår i tre steg
- Sitronsyresyklusen har kommet mye senere enn glykolysen og er mer avansert. Krever selvsagt oksygen, som det ikke var på jorda i tidlig alder.

Produksjon av Acetyl-CoA

- Glukose og andre sukker, fettsyrer og aminosyrer ender til slutt opp som CO_2 og H_2O igjennom sitronsyresyklusen. Før de kommer inn i sitronsyresyklusen degraderes de til acetyl-CoA for å aksepteres i syklusen.
- Noen aminosyrer degraderes på andre måter, og entreer syklusen et annet sted.
- Degenereres av **pyruvat dehydrogenase (PDH) kompleks**, som er en samling med enzymer.



Figur 45. Oksidativ dekarboksylisering. Katalysert av pyruvat dehydrogenase.

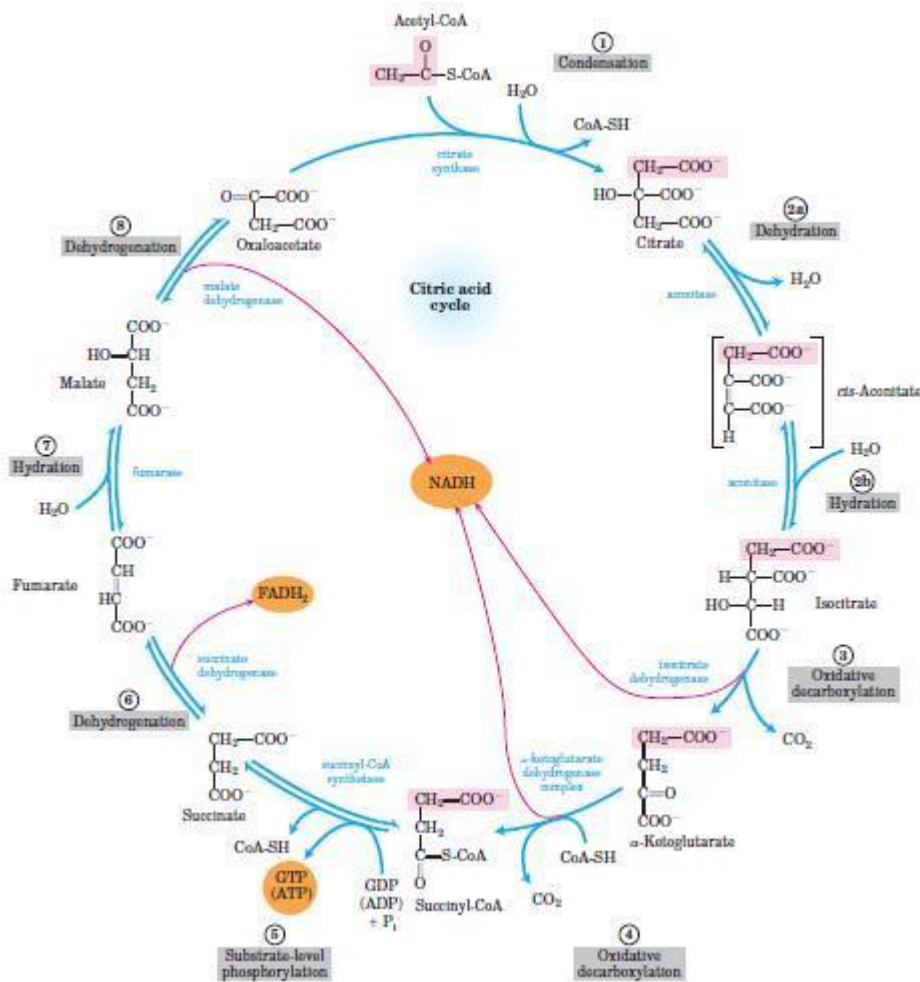


Figur 46. Pyruvat dehydrogenase.

- Den totale reaksjonen for oksideringen av pyruvat vises i figur 1. Den er irreversibel.
- I reaksjonen frigjøres to elektroner, som går til oksygen. Overføringen av elektroner fra NADH til oksygen frigjør 2,5 ATP pr par elektroner.
- Pyruvat dehydrogenase består av tre enzymer, som gjør forskjellige ting, samt 5 koenzymer.

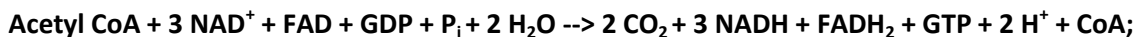
Selve sitronsyresyklusen

- I hver runde av syklusen går en acetylgruppe inn (med to karboner), og to CO_2 molekyler forsvinner.
- For hver runde brukes et oxaloacetate molekyl til å danne citrate, og et molekyl oxaloacetate gjendannes.
- Alle reaksjonene foregår i mitokondrien.
- Syklusen har åtte steg.
- Energi lagres i redusert NADH og FADH_2



Figur 47. Sitronsyresyklus. Større figur i boka.

- De to karbonatomene i karbondioksid er ikke de samme som entrer syklusen. Det går flere runder før disse kommer ut.
- Energi frigjøres ved å reusere tre NAD^+ og en FAD , samt produksjon av en ATP .
- Selv om det bare dannes én ATP , så bidrar elektronstrømmen til at det lages mange ATP under oxidative phosphorylation (kap 19).
- Dannes totalt 32 ATP per glykosemolekyl.

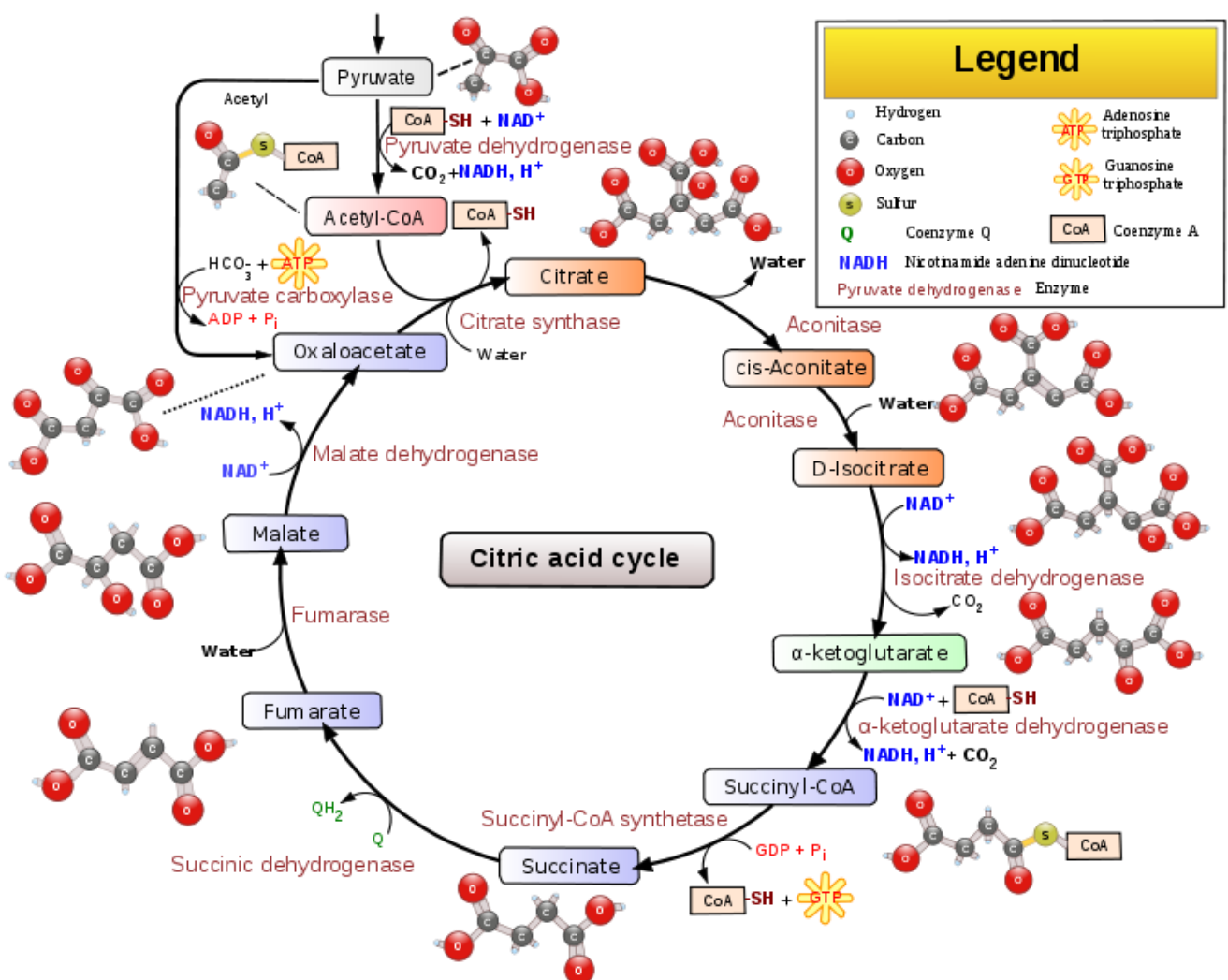


- Sitronsyresyklusen er en *amphibolic pathway*, noe som betyr at den kan bidra med molekyler i både catabolske og anabolske reaksjoner.
- Pyruvate carboxylase reaksjonen krever vitaminet biotin for å fungere.

Regulering av sitronsyresyklusen

- Regulering av metabolske spor er viktig for å opprettholde stabil drift i cellen, og unngå overproduksjon.
- Regulering av sitronsyre syklusen foregår mest på to viktige områder:
 - Produksjon av acetyl-CoA fra pyruvat (vha pyruvate dehydrogenase) og regulering av acetyl-Coa inn i sirkelen.
 - Fluksen igjennom syklusen, les de exergoniske stegene under.

- PDH komplekset som danner acetyl-CoA er kraftig inhibert av ATP, acetyl-CoA og NADH. Dette betyr at når det finnes mye "fri energi" i cellene vil PDH stoppe å produsere acetyl-CoA. Ved høyt energibehov vil enzymer katalysere igjen.
- **Allosteric feedback inhibition**: Allosteric inhibitor fester seg i enzymets active site ved overproduksjon.
- Strømmen av metabolitter igjennom sitronsyresyklusen er regulert på tre områder:
 - Substrattilgjengelighet
 - Inhibisering av produkter (eks citrate blokkerer for citrat synthase)
 - Allosteric feedback inhibition
- Begrensende steg i syklusen er de sterkt exergoniske stegene, de som er katalysert av:
 - Citrate synthase (inhibiteres av ATP og deinhibiteres av ADP)
 - Isocitrate dehydrogenase
 - α -ketoglutarate dehydrogenase
- Normalt går like mye D-glukose igjennom glykolyesen som pyruvat behøves til citronsyresyklusen. Eks er citrate inhibitor for phosphofruktokinase-1 i glykolyesen.
- Mye tyder på at enzymene som inngår i reaksjonene i sitronsyresyklusen ikke er alene, men foreligger i store enzymkomplekser, kalt **metabolons**. Dette sikrer effektiv overføring fra et produkt til neste reaksjon.



Figur 48. Sitronsyresyklusen. PUGG!!!

Fatty Acid Catabolism kap 17

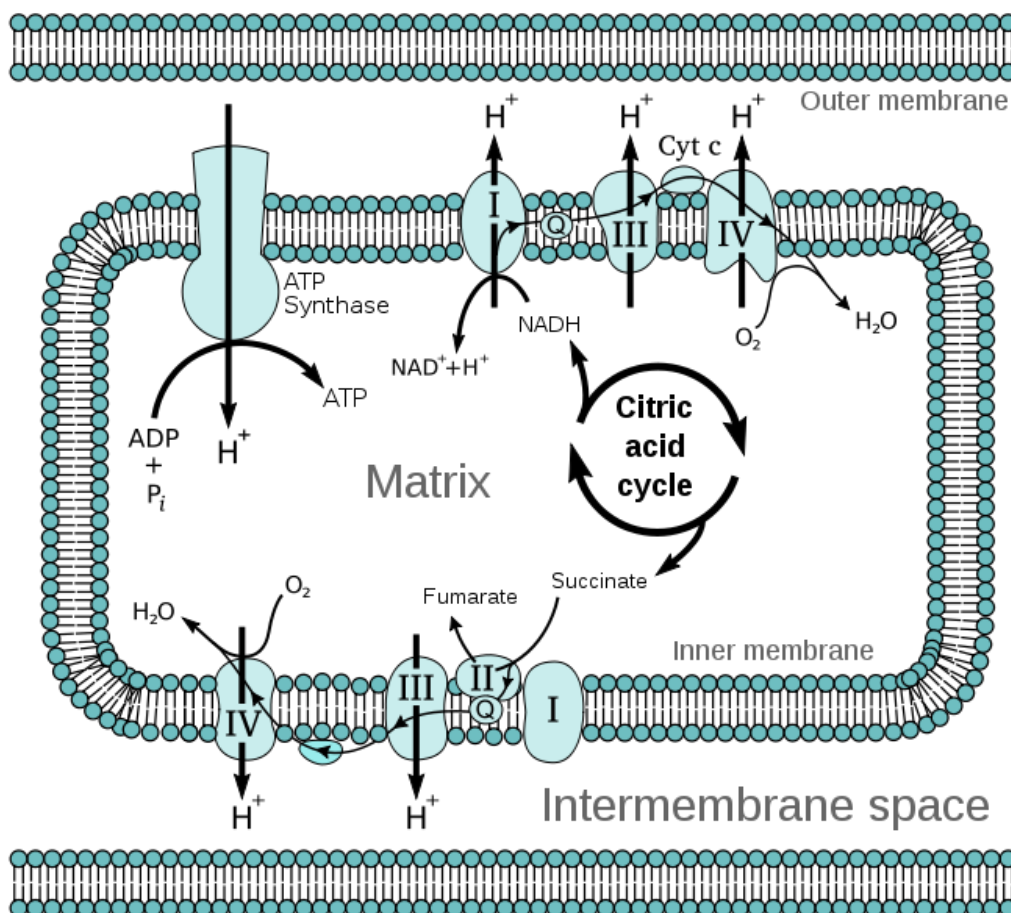
- En fettsyre er sterkt redusert.
- Oksidasjon av en slik fettsyre til acetyl-CoA er viktig i mange organismer og vev.
- Acetyl-CoA som dannes fra fettsyrer kan omdannes helt til CO₂ i sitronsyresyklusen.
- Omdannelsen fra fettsyre til acetyl-CoA er en firestegs prosess, som kalles ***β-oksidasjon***.
- Etersom enzymreaksjoner foregår i vann og trioglyceroler er upolare, må de gjøres vannløslige.
- Oppsummert bindes karbonatom 1 i fettsyren til CoA, deretter oksideres gruppen ved karbon 3, β-posisjonen.
- ***Chylomicrons*** brukes til å frakte trioglyceroler i blodet. De er lipoprotein aggregater.
- ***Apolipoproteiner*** er lipidbindende proteiner som sitter på chylomicronene i blodet. De binder til seg fosfolipider, trioglyceroler og kolesterol.

Denne var mangelfull. Var aldri på øving. Les i boka, pugg ***β-oksidasjon***.

Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation kap 19

- **Oksidativ fosforelering** foregår i alle aerobe organismer, og er siste steget for syntetisering av ATP. Dette foregår i mitokondriene i cellene. Her reduseres O_2 til H_2O , med elektroner fra NADH og $FADH_2$
- **Fotofosforelering** er hvordan fotosyntetiske organismer omdanner energien fra sollys til ATP. Denne prosessen foregår i chloroplasten. Her oksideres H_2O til O_2 .
- Dette bygger på en teori fra 1961, **chemosmotic theory**, og bygger på at transmembranforskjeller i protonkonsentrasjon fungerer som energilager.
- Oksidativ fosforelering og fotofosforelering er like i tre steg:
 - Begge innebærer en strøm av elektroner over cellemembraner.
 - Den frigjorte energien av denne elektronstrømmen veies opp i en protonstrøm igjennom en proton-uigjennomtrengelig membran.
 - Transmembranstrømmen av proteiner igjennom spesielle proteinkanaler frigjør energi til ATP syntese i membrankompleksen ATP syntase.

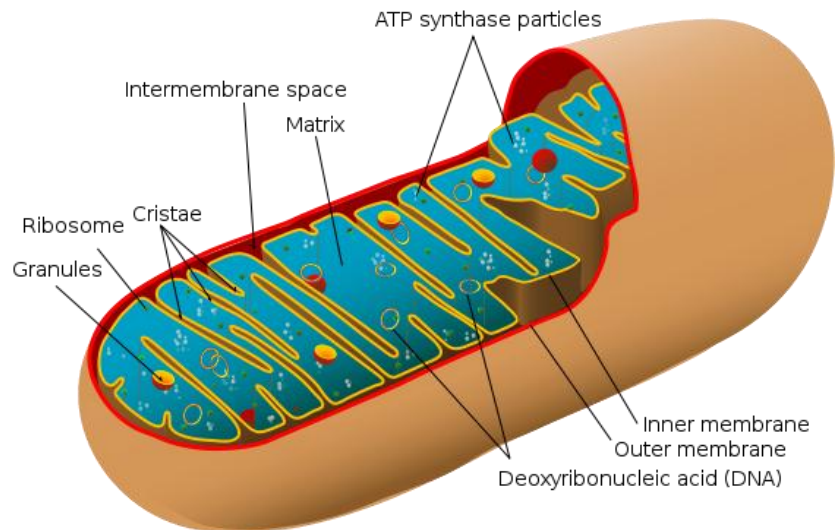
Oppsummert kommer elektronbærere i redusert form, NADH og $FADH_2$, inn i elektronoverføringskjeden. Her omdannes $ADP + P_i$ til ATP og O_2 til H_2O .



Figur 49. Reaksjonen i mitokondriene

Oksidativ fosforelering

- Alle reaksjonene bortsett fra glykolysen (som foregår i cytosolen), foregår i mitokondriene.
- Mitokondriene består av to membraner. En ytre membran som er lett gjennomtrengelig for små molekyler (molar vekt < 6000), og en indre membran som kun selektivt gjennomtrengelig.
- Området innenfor indre membran kalles mitochondrial matrix, og inneholder pyruvat dehydrogenase kompleks og enzymene i sitronsyresyklusen, fettsyre β -oksidasjon, og aminosyreoksidasjon.
- Alt som skal inn må transporteres inn, inkludert ADP og P_i , og tilsvarende ut.
- Elektroner kommer fra div dehydrogenase reaksjoner i forskjellige pathways. De



Figur 50. Mitokondrien.

kommer i universelle

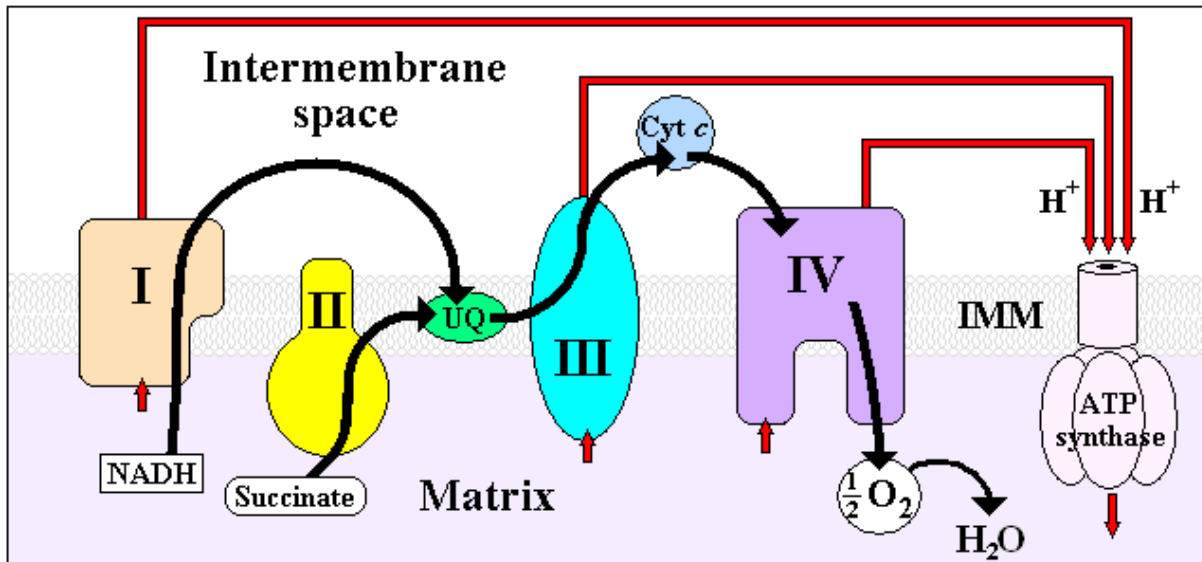
elektronbærere, NAD^+ , $NADH^+$

og FAD, og settes av i respirasjonskjeden.

- $NADH$ og $NADPH$ er vannløslige elektronbærere, og er de sterkeste oksiderende midlene en har i naturen. $NADPH$ brukes i anabole reaksjoner.
- **Flavoproteiner** er FAD og brukes som elektronbærer ved at den har et høyere reduksjonspotensial enn andre oksiderte komplekser.
- I tillegg til NAD og FAD finnes tre elektronbærere til; **ubiquinone** (aka **Coenzyme Q** eller **Q**), **cytochromer**, og **jern-sulfat-proteiner**.
- **Q** er lipidløslig, og binder seg til både elektroner og protoner. Den er liten og hydrofob, og transporterer elektroner og H^+ igjennom lipid bilayeret.
- **Cytochromer** er proteiner som har sterk absorpsjon av synlig lys. Mitokondrien har tre forskjellige typer cytochromer, a, b og c. Disse er forskjellige mhp hvilken bølgelengde av lys de fanger opp.
- **Iron-sulfur proteins** er den siste typen elektronbærer. De frakter ett og ett elektron ved å redusere/oksidere Fe.
- Oppsummert kommer et elektron fra $NADH$ eller en annen elektrondonor, og overføres igjennom flavoproteiner, Q, jern-sulfid proteiner og cytochromer, og ender opp i O_2 .
- Elektroner gis i rekkefølge etter potensial, og begynner nederst ved oksygen.

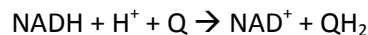
Elektronoverførere i multienzymkompleks

- Elektronoverføringen i respirasjonskjeden foregår i fire separerbare supermolekylkomplekser. Hver av disse fire tar med elektronet en liten bit, i veien fra $NADH$ eller succinate, til O_2 .



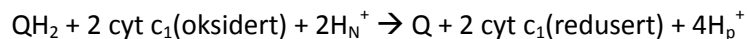
Figur 51. Elektronoverføringen fra de fire kompleksene.

- **Complex I:** NADH til Ubiquinone(Q). Kalles også **NADH dehydrogenase**. Stort enzym bestående av 42 forskjellige polypeptidkjeder!



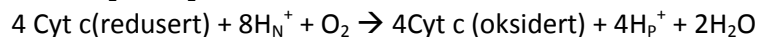
NADH dannes som kjent i sitronsyresyklusen inne i matrixen i mitokondrien, og kommer med protoner derifra. Disse overføres ut av matrixen i reaksjonen, så den fungerer som en protonpumpe. QH₂ oksideres i Kompleks III til Q, hvor H⁺ flyttes ut.

- **Complex II:** Succinate til Q. Dette er det samme enzymet som i **succinate dehydrogenase** i sitronsyresyklusen, og er det membranbundne enzymet i sitronsyresyklusen.
- **Complex III:** Q til Cytochrome c. Overfører elektroner fra QH₂ til cytochrome c, og transporterer protoner fra matrixen og inn i intermembranområdet. Måten dette skjer på en kompleks, kalt Q syklusen.

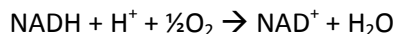


Etter reaksjonen beveger Cytochrome c seg til Complex IV for å donere bort elektronet sitt til en toatomig kobberkjerne.

- **Complex IV:** Cytochrome c til O₂, som blir redusert til H₂O. Også kalt cytochrome oxidase. Elektronene overføres igjennom Complex IV fra cytochrome c til en kobberkjerne Cu_A, deretter til heme a, videre til heme a₃-Cu_B og til slutt til O₂. Når fire elektroner passerer igjennom forbrukes fire H⁺ for å omdanne O₂ til 2H₂O.

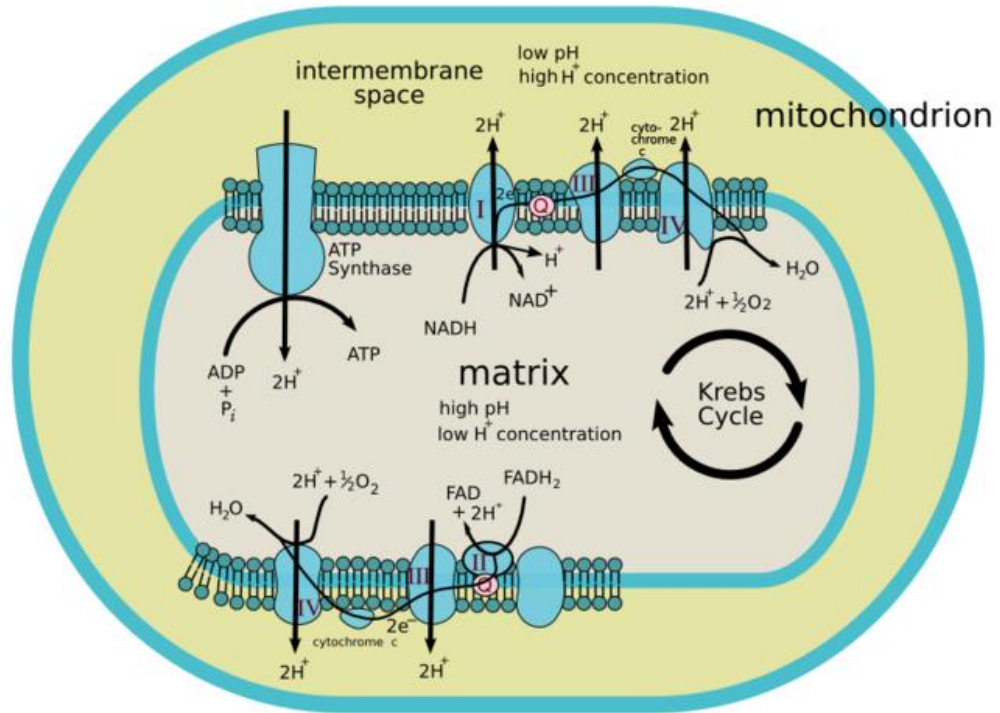


Totalreaksjon



- Denne reaksjonen er svært eksergon (frigjør energi), og har $\Delta G^{\text{or}} = -220 \text{ kJ/mol}$
- Mye av denne energien brukes til å pumpe protoner ut av matrixen.
- Det pumpes ut 10 protoner pr elektronpar som reduserer O₂.
- Energien lagres i en **proton-motive force**, som kan deles i to deler:
 - Kjemisk potensiell energi; protonkonsentrasjonen er høyere utenfor enn inni.
 - Elektrisk potensiell energi; ladningen separeres.
- Denne energien frigjøres når protonene strømmer ned deres elektrokjemiske gradient, og gjøres tilgjengelig for arbeid. I mitokondriene utnyttes denne energien til å omdanne ADP + P_i til ATP.
- Under oksygenreduksjonen kan det dannes frieradikale som er svært skadelige. Heldigvis finnes et enzym som hindrer dette.

Mitochondrial Electron Transport Chain



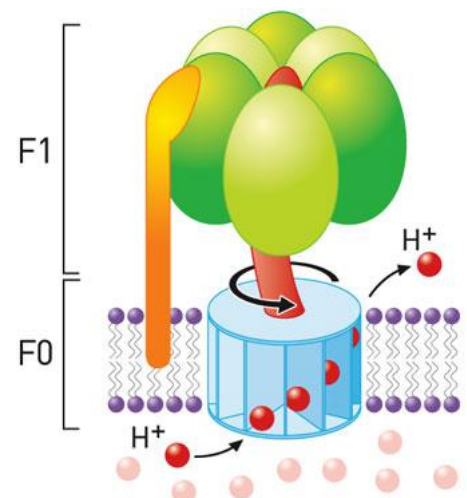
Figur 52. Elektrontransportkjeden i mitokondriene.

ATP Syntese 19.2 Hvordan omdannes protongradient til ATP?

- Det frigjøres ca 200kJ/mol ved elektronoverføring, og dannelse av ATP krever 50kJ/mol. Altså, det er mer enn nok fri energi.
- Den **kjemosmotiske modellen** beskriver hvordan proton-motive force driver syntese av ATP ettersom protoner driver tilbake inn i matrixen igjennom **ATP syntase**.
- Den kjemosmotiske prosessen er altså både en transportprosess og en kjemisk reaksjon.
- Elektronoverføring og ATP syntese er koblet, den ene går ikke uten den andre.
- Dersom ikke protonene kan overføres tilbake, (ATP syntase kanalen er blokkert), vil etter hvert motstanden for å føre protoner ut bli så stor at prosessen, og elektronstrømmen stopper.
- En kan lage en kunstig protongradient, og denne alene er nok til å drive ATP syntese.

Oppbygningen til ATP syntase

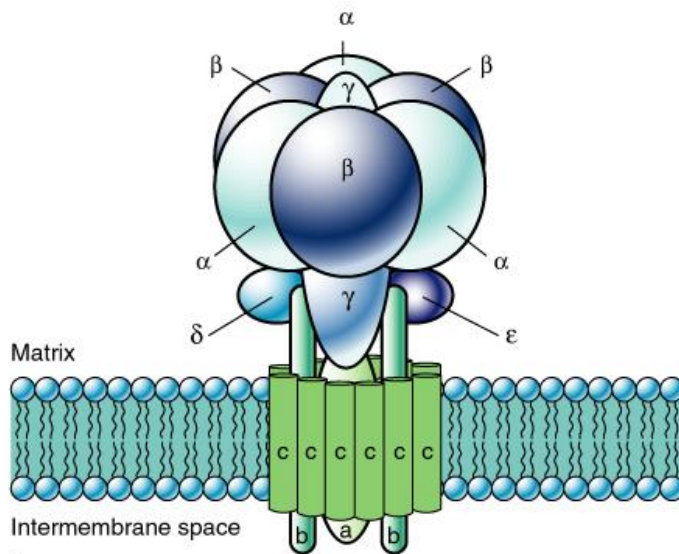
- ATP syntase er et stort enzymkompleks, og har to forskjellige deler:



by M. Dittrich, S. Hayashi & K. Schulten, "ATP hydrolysis in the β P and β DP catalytic sites of F1-ATPase," Biophysical Journal, 87, 2954-2967 (2004).

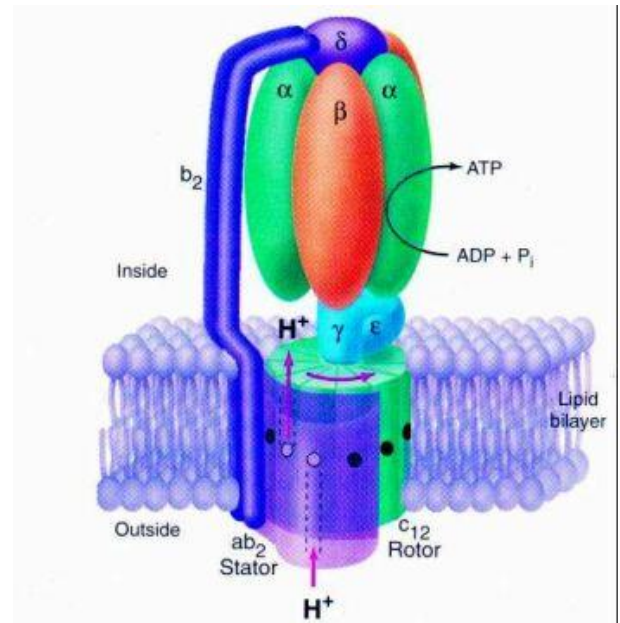
Figur 53. ATP syntase

- F_1 : et membranoverflateprotein. Katalyserer ATP Hydrolyse.
- F_0 : et integralprotein. Har en proton-pore som proteinene slipper igjennom.
- Reaksjonen $ADP + P_i \leftrightarrow ATP + H_2O$ ved enzymoverflaten har en likevektskonstant rundt null ($\Delta G^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$, likevekt), mens uten enzym er likevektskonstanten 10^5 . Dette skyldes bindingsenergi mellom ATP syntase og $ADP + P_i$.
- ATP syntase frigjør ikke ATP fra overflaten uten noen protongradient.
- F_1 i mitokondriene består av ni subenheter, fem forskjellige typer. Det er $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Hver av de tre β subenhetene har en katalytisk side for ATP syntese.
- F_1 ser ut som en skuffeknott, med annenhver α og β i "hodet" og et "skaft" i γ .



(b)

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



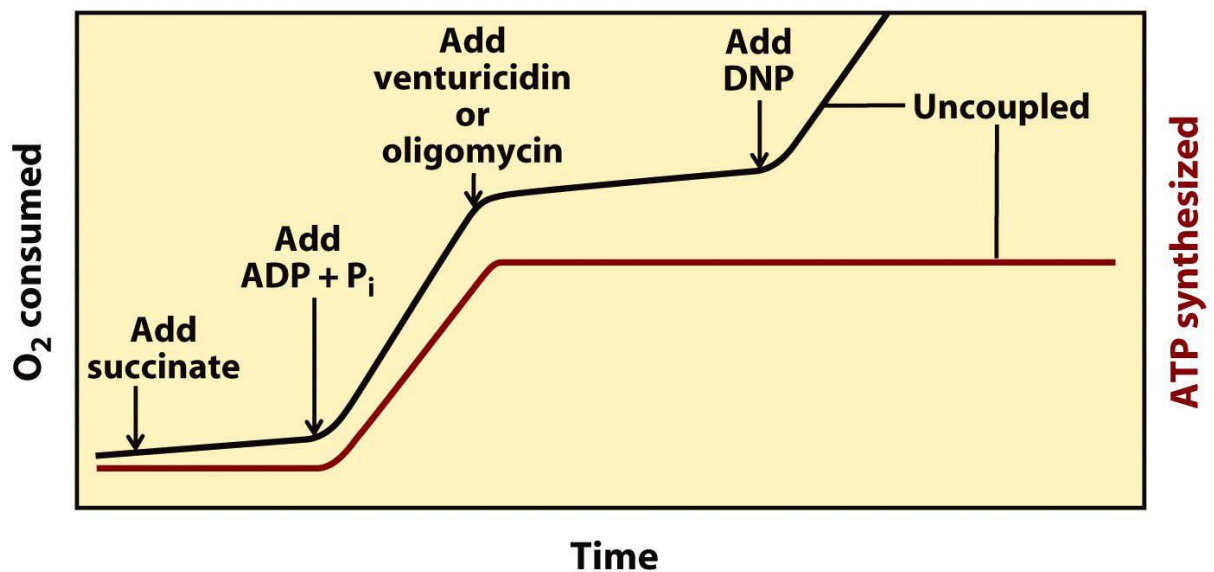
Figur 54. ATP syntase. Legg merke til intermembrane space og matrix, a,b og c

- Aminosyrestrukturen til β -ene er like, mens konfigurasjonen deres varierer.
- F_0 , som er porekomponenten (se Figur 5), er bygget opp av a, 2b og 10c. Se figur 6. C'ene er små og svært hydrofobe, og trives i membran bilayeret.
- δ og ϵ til F_1 danner en "legg og fot" som binner membranen til F_1 .
- Omdannelsen fra $ADP + P_i$ til ATP foregår ved en **rotasjonskatalyse**. Dvs, F_1 roterer ved katalyse. Dette foregår i tre steg.
 - ADP + P_i binder seg til β i β -ADP konfigurasjon. Deretter dreier F_1 120° , og β får β -ATP form, som danner og binder ATP. Etter nye 120° er det " β -empty" konfigurasjon, hvor bindingen er svak, og ATP frigjøres.
- Fun facts:
 - Etter 360° er $ADP + P_i$ omdannet til ATP.
 - Bytte av β -konfigurasjon tvinges frem av γ .
 - Rotasjonen drives av protonstrømmen igjennom F_0 , tre protoner overføres pr 120° .
 - Til en hver tid foreligger alle tre konfigurasjonsformene.
 - For hver hele rotasjon dannes 3 ATP.
- I denne prosessen kommer protoner, H^+ , tilbake inn i matrixen, hvor de kan binde seg til NAD^+ i sitronsyresyklusen, og moroa starter på nytt.

- Hovedrollen til protongradienten er å drive ATP syntese, men "the proton-motive force" brukes også til transport av
 - ADP/ATP
 - Transport av NADH inn i matrixen. Dette skjer på to måter:
 - Via *malate-aspartate shuttle* i leveren, nyrene og hjertemitokondriene.
 - Via *glycerol 3-phosphate shuttle* i musklene og hjernen.

Uncoupling

- Hvis mitokondriemembranen enten blir ødelagt av fysisk rift eller løsemiddel, kan fortsatt respirasjon, dvs reaksjonen fra NADH til H₂O foregå, men ATP produksjonen stopper.
- Uncoupling kan også forårsakes av kjemikalier, uten av membranstrukturen endres. Eks, 2,4-dinitrophenol.
- De kan ta med seg protoner over membranen for å deretter slippe de av. Dette utlikner protongradienten.



Figur 55. Uncoupling.

Regulering av ATP-produserende pathways

- De viktigste metabolske sporene; glykolysen, sitronsyresyklusen, elektronoverføringskjeden og pyruvatoksidasjonen har alle et system så de samkjører med hverandre.
 - Når ATP behovet øker, så øker elektronoverføringen og den oksidative fosforeleringen. Dette fører til at pyruvatoksidasjonen i sitronsyresyklusen øker for å dekke elektronbehovet. Dette vil igjen føre til økt fart i glykolysen, for å danne mer pyruvat.
 - Når ADP konsentrasjonen synker, bremses glykolysen og sitronsyresyklusen av deres allosteric inhibitor, ATP.
 - Respirasjonen (forbruk av O₂) er regulert av tilgjengelig ADP.
 - *Mass/action ratio*, $[ATP]/[ADP][P_i]$ er normalt høy.
 - ATP dannes ved behov i cellen.
- Se figur på neste side.

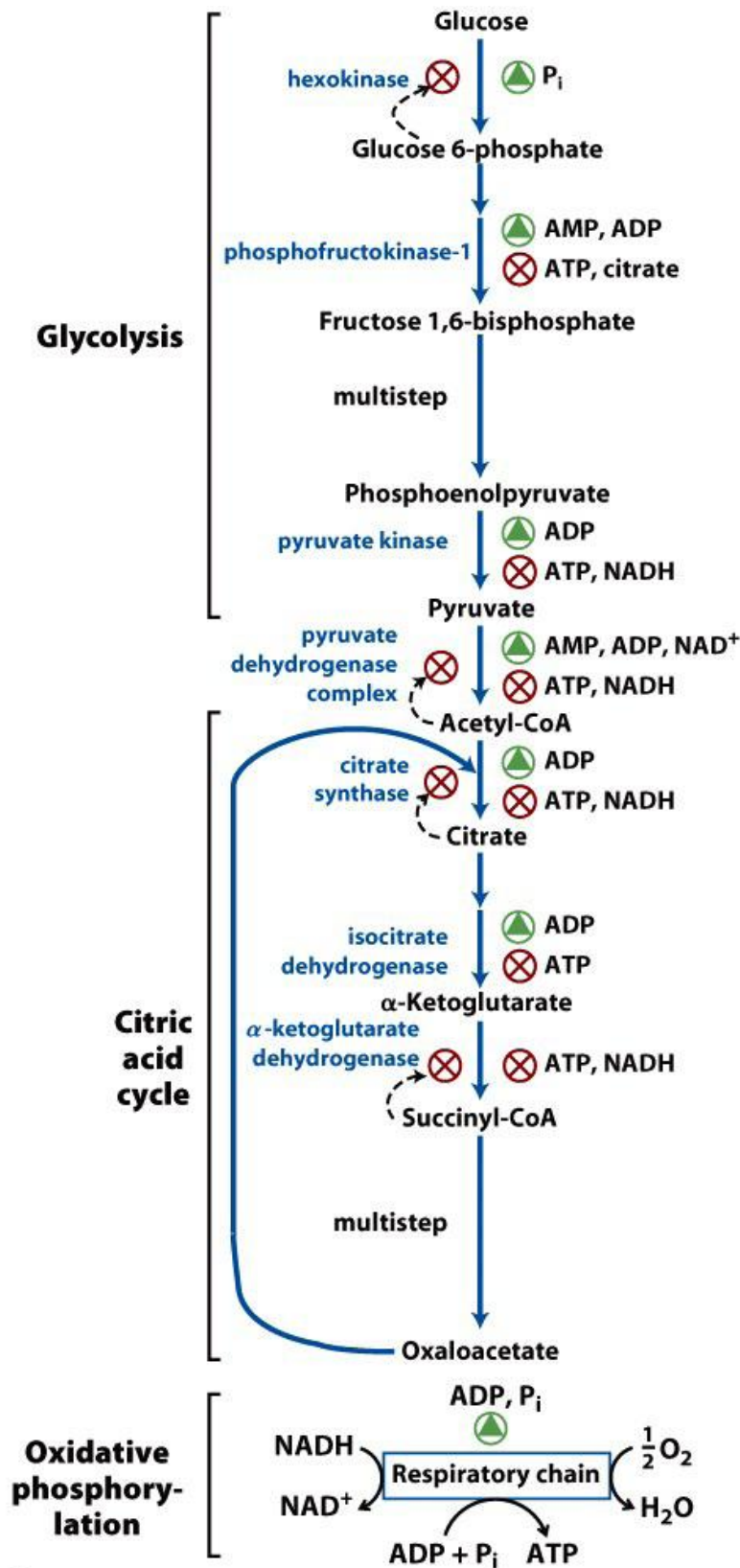


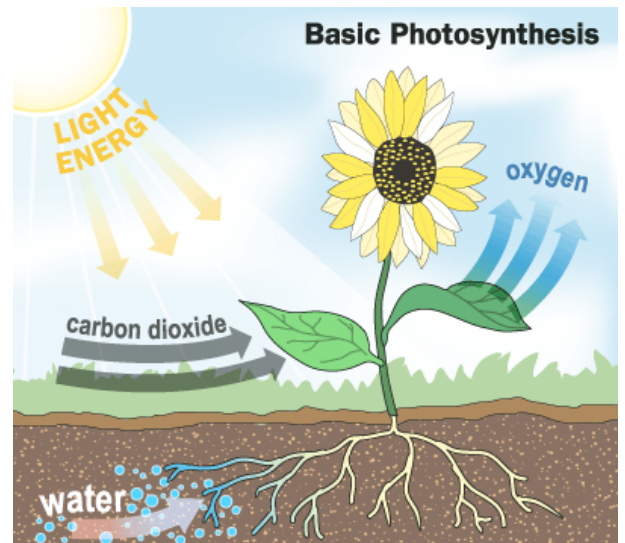
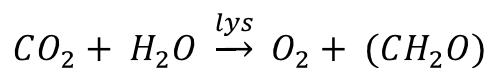
Figure 19-33
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Figur 56. De metabolske sporene som ender i ATP-produksjon.

Photophosphorylation 19.6-

Innledning fotosynten

- Omdannelsen av solenergi til kjemisk energi i form av reduserte organiske komponenter (les hydrokarboner), er kilden til omtrent all biologisk energi.
- Fotosyntetiske organismer bruker solenergi til å danne ATP og NADPH, som de bruker til å danne karbohydrater++ fra CO₂ og H₂O. Samtidig, så frigjør de O₂.
- Fotosynten foregår i en rekke bakterier, encellede eukaryoter(alger) og i planter.



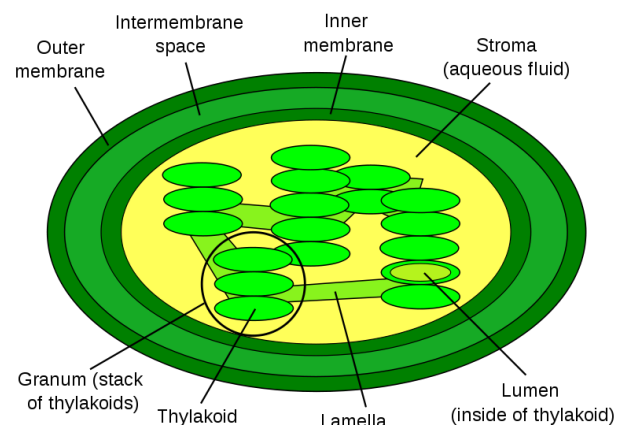
Figur 57. Basic photosynthesis. No surprise here.

Photophosphorylation

- H₂O er en dårlig elektrondonor sammenliknet med NADH. (NADH har standard reduksjonspotensial -0,32V, H₂O har 0,816V). Dette fører til at fotofosforeleringen krever energi fra lys for å lage en god elektrondonor og elektronakseptor.
- I fotofosforeleringen strømmer elektronene igjennom en rekke membranbærere, mens protoner pumpes over membraner for å danne elektrokjemisk potensial.
- Elektrokjemisk potensial er som i den oksidative fosforeleringen brukt til å danne ATP fra ADP + P_i, og med et ATP syntase-kompleks som er ganske likt.
- Fotosynten i planter er delt i to prosesser:
 - **Lysreaksjonen, (light-dependent reactions):** Foregår når planten er belyst. Klorofyll og andre lyspigmenter absorberer lysenergi og lagrer det som ATP og NADPH, samtidig er O₂ frigitt.
 - **Mørkereaksjonen, (carbon-assimilation reactions):** Drives av produkter av lysreaksjonen. ATP og NADPH reduserer CO₂ og danner triosefosfater, stivelse og sukrose med mer.
- I fotosyntetiske celler foregår både lysreaksjonen og mørkereaksjonen i kloroplasten.

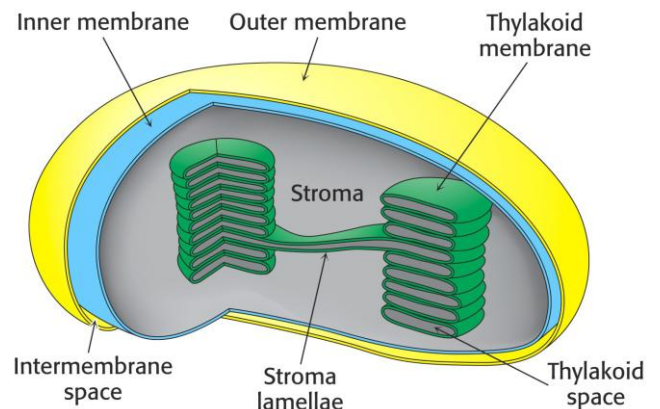
Oppbygning av kloroplast

- Som mitokondrien har de to membraner, en yttermembran som små molekyler kan trenge igjennom, og en innermembran som er "tett".
- Rommet innenfor den indre membranen inneholder membran-omgitte **tylakoider**.



Figur 58. Kloroplast.

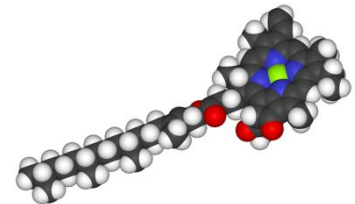
- Tylakoider befinner seg i tette stabler kaldt **grana**.
- Tylakoidmembranene er kjent som **lamella**.
- I lamellaen finnes fotosyntetiske pigmenter og enzymkomplekser som utfører lysreaksjonene og ATP syntese.
- **Stroma** er vannfasen rundt tylakoidene. Her finnes de fleste enzymene for mørkereaksjonene.



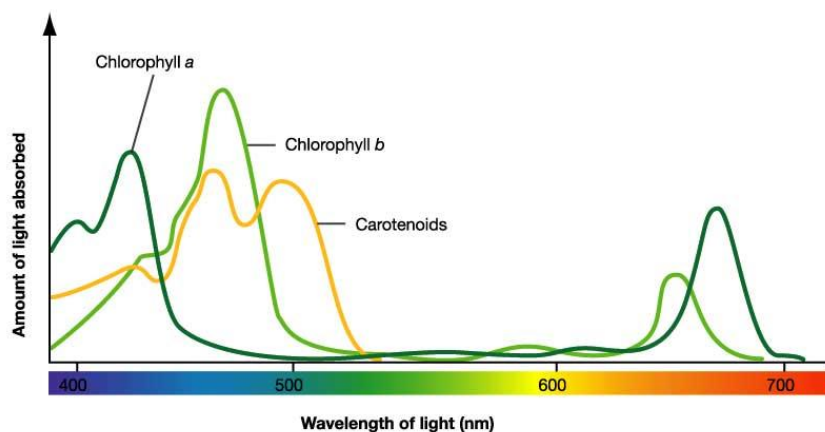
Figur 59. Mer kloroplast.

Lysabsorpsjon 19.7

- Energi kommer som kjent for fysmattere i fotoner, energikvant. Et foton blir absorbert, og eksiterer et energinivå hos absorpsjonsmolekylet.
- Energien til overs i det eksiterte molekylet kalles **exciton**, og overføres til et annet molekyl i en prosess kalt **exciton transfer**.
- Viktigste lys-absorberende molekylene i tylakoidmembranene er **klorofyll**. Klorofyllet er grønt. (*← dette er en setning jeg har skrevet ordrett en gang tidlig i mitt liv.*) Alle klorofyll har en lang **fytyl** sidekjede.
- Kloroplast inneholder både **klorofyll a** og **klorofyll b**. De er begge grønne, men har forskjellig absorpsjonsspektrum.
- Klorofyll er assosiert med spesielle bindingsproteiner, som danner "**lys-høstende**" **komplekser**, (light-harvesting complexes, LHCs). Dette kan være 7 klorofyll a, 5 klorofyll b, og 2 lutein.
- I tillegg til klorofyllet, har tylakoidmembranene andre lys-absorberende pigmenter, **carotenoids**.
- Carotenoids kan være røde (**β -carotene**), gule (**lutein**) eller lilla. Disse absorberer bølgelengder som klorofyll a og klorofyll b ikke absorberer.
- Lysabsorpsjon av de forskjellige komponentene i tylakoidmembranene kan tegnes i et action spectrum.

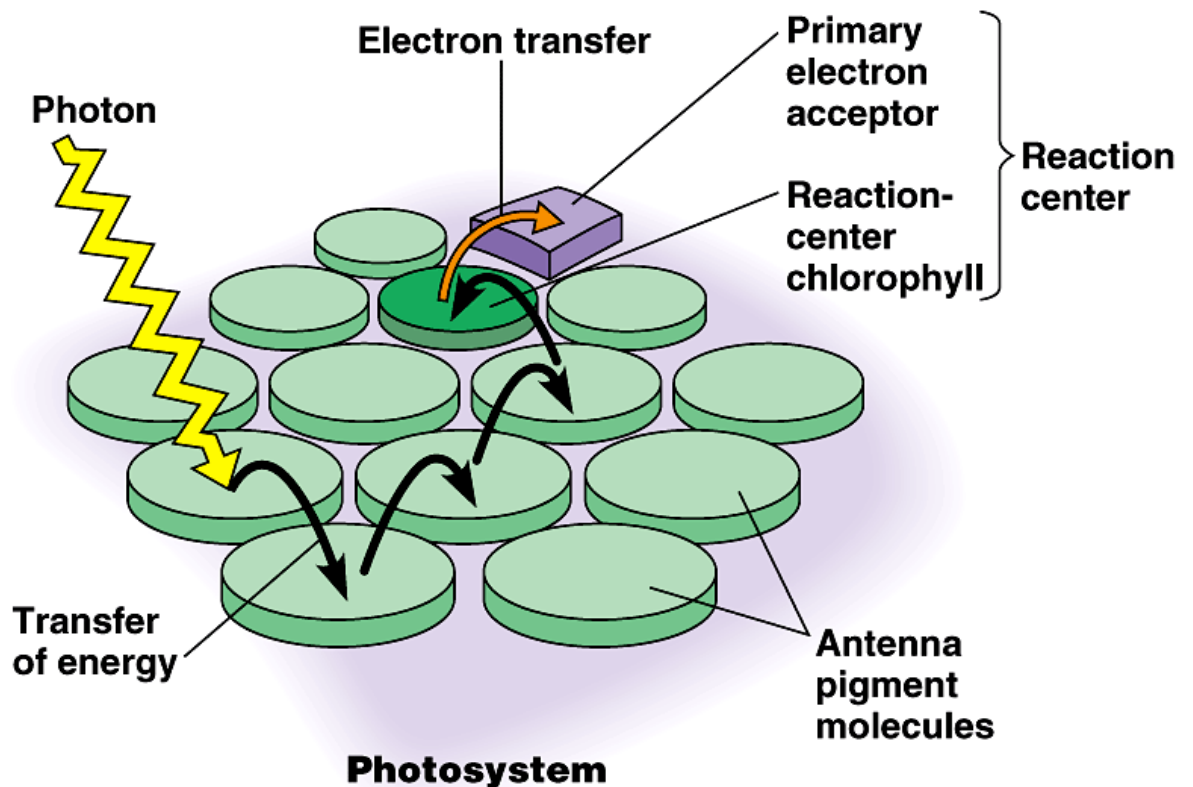


Figur 60. Klorofyll



Figur 61. Action spectrum. Dette forklarer lilla lys i vekstrom.

- Lysabsorberende pigmenter i tylakoid/bakterie membraner er gruppert i arrays, kalt *photosystems*. Dette kan typisk være 200 klorofyll og 50 carotenoidmolekyler.
- Alle pigmentmolekylerne i et fotosystem kan absorbere lys, men kun noen ved *the photochemical reaction center* kan omdanne til kjemisk energi.
- De andre pigmentene er kjent som *light-harvesting* eller *antenna molecules*.
- Antenna molekules overfører energi ved å eksitere naboen, som igjen eksiterer naboen osv, helt til en kommer til photochemical reaction center, hvor det omdannes til kjemisk energi. Denne overføringstypen kalles resonansoverføring. Se figur 6.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

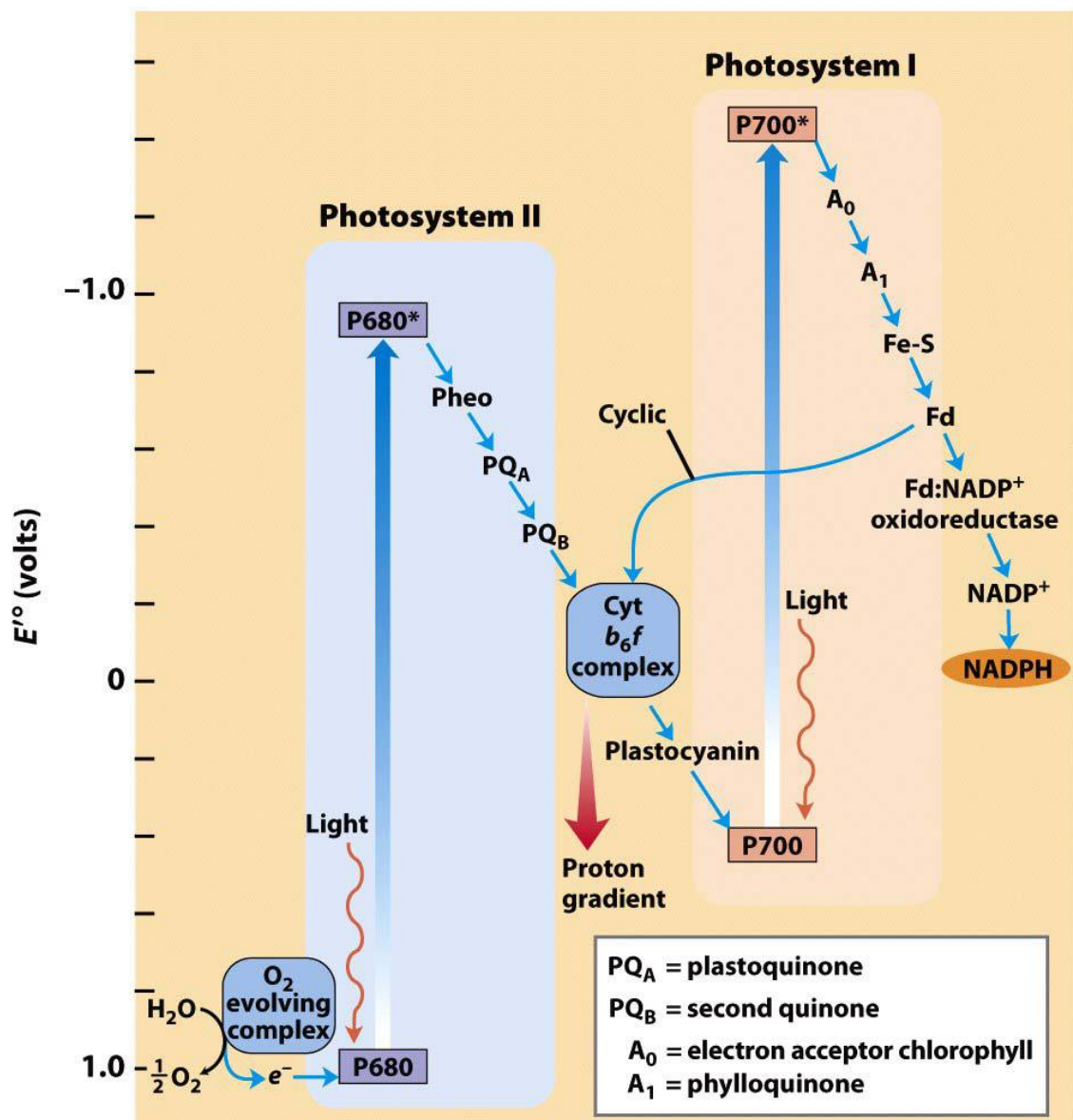
Figur 62. Antenna molekules, photochemical reaction center, energioverføring. Utsnitt av et fotosystem i en tylakoidmembran. Antenna pigment molekules er klorofyll a eller b, eller carotenoids.

- I reaksjonscenteret blir ladningen separert, og en får en sterk elektrondonor og stekt elektron akseptor.

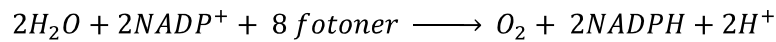
Lysdrevet elektronstrøm 19.8

- Lysdrevet elektronoverføring i kloroplast er drevet av enzymer i tylakoidmembranen.
- Tidlige studier viste at med pulsbelysning ved en spesifikk bølgelengde fikk midlertidig redusert absorpsjonen. Pigmentene var "bleket".
- Denne blekingen av pigmentene skyldes tap av et elektron fra den fotokjemiske reaksjonskjernen. Pigmentene fikk navn etter bølgelengden for maksimal blekning, P870, P680, P700.

- Det er to typer reaksjonskjerne (Type I og Type II), som passerer elektronene forskjellige videre:
 - Passerer igjennom *pheophytin* til quinone,
 - Passerer elektron igjennom quinone til jern-sulfat center.
- I planters tylakoidmembraner finnes to typer fotosystemer, med hver sin type kjerne og antennemolekyler. De to typene fotosystemer har forskjellige og komplimentære oppgaver.
- **Oppsummert; i PSII (photosystem II)** vil eksitasjon av reaksjonscenteret P680 drive elektroner igjennom cytochrome b_6f kompleks, med en tilhørende pumping av protoner over tylakoidmembranen.
 - I PSI vil eksitert P700 sende elektroner til Fe-S proteinet ferredoxin, og videre til NADP^+ , og få dannet NADPH.
- En normal tylakoidmembran har hundrevis av PSII og PSI.
- Elektronene bæres mellom PSI og PSII av *plastocyanin*, en ét-elektronbærer, tilsvarende cytochrome c i mitokondriene.
- For å erstatte elektronet tatt fra PSII til NADP^+ , oksideres H_2O og det dannes O_2 .
- Et system uten både PSI og PSII (bakterier) kan ikke danne O_2 .
- Den fulle veien til elektronene fra H_2O til O_2 beskrives i et z-diagram.



Figur 63. Z-diagram. Fotosystem I og II i kloroplast, dvs i tylakoidmembranen.



- For hvert par fotoner som blir absorbert, overføres ét elektron fra H₂O til NADP⁺

Type II reaksjonskjerne: Pheophytin-Quinone reaksjonskjerne

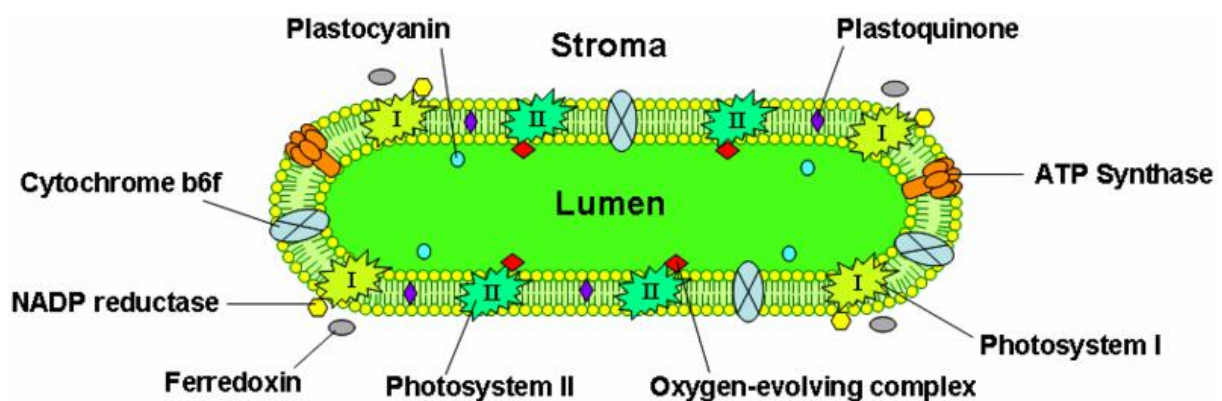
- **Pheophytin** er klorofyll som mangler et sentralt Mg²⁺ ion.
- Under er reaksjonene i photosystem II
 - P680 eksiteres til P680*, som innen pikosekunder overfører et elektron til feofytin, og gir det en negativ ladning(Pheo⁻). P680* mister da et elektron og blir P680⁺.
 - Pheo⁻ overfører elektron til plastoguinone PQ_A
 - PQ_A overfører elektron til PQ_B, som binder elektronet løsere.
 - Når PQ_B har fått to elektroner, tar det to protoner fra vannet og danner PQ_BH₂.



- Elektronene i PQ_BH₂ overføres til b₆f komplekset.
- Elektronet opprinnelig fjernet fra P680 er erstattet fra oksidasjon av vann. → O₂ blir produsert + H⁺ frigjort i lumen.

Type I reaksjonskjerne: Fe-S senter

- Målet er å overføre elektroner til NADP⁺. Det skjer etter reaksjoene under.
- Temmelig likt som for PSII.
 - Den eksiterte reaksjonskjernen P700 danner P700*
 - Frigir så elektron til A₀, og blir selv P700⁺
 - P700⁺ tar et elektron fra plastocyanin, et elektronbærerprotein.
 - A₀⁻ overfører elektron til A₁.
 - A₁⁻ overfører til Fe-S.
 - Fe-S til ferredoxin, Fd.
 - Ferredoxin overfører til slutt til Fd:NADP⁺ oxideoreduktase, som overfører elektronet til NADP⁺ → det dannes NADPH.

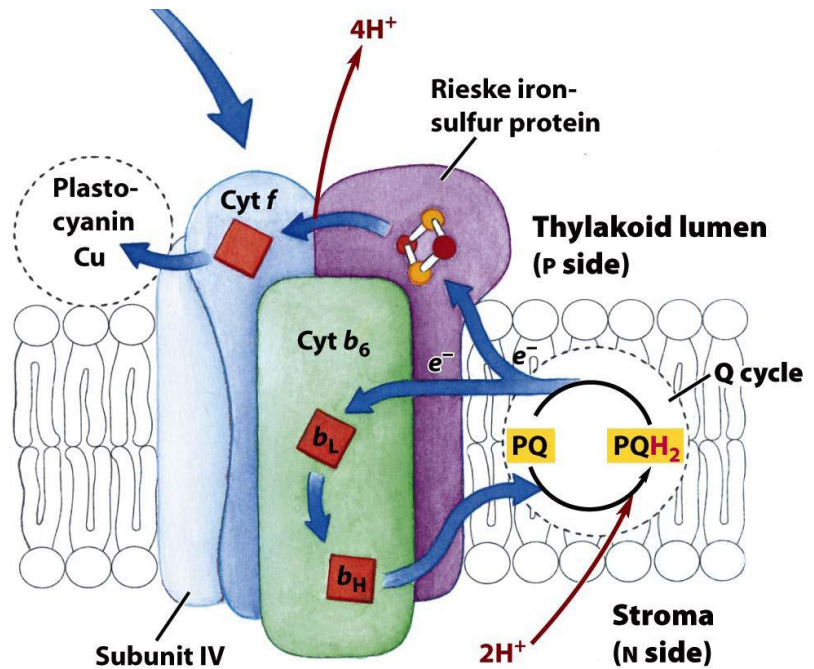


Figur 64. Tylakoid. Se PSII og PSI, Lumen og stroma.

- b₆f ligner Complex III i mitokondriene.
- Elektronstrømmen igjennom b₆f fører til at det pumpes elektroner fra stroma og inn i lumen.
- Det pumpes opptil fire protoner pr. elektronpar.

- Grunnet liten strørrrelse kan en måle en pH opp hhv 5 og 8, noe som antyder en konsentrasjonsforskjell på 1000. Dette er en god motor for å drive ATP syntese!

- Vann er den ultimate kilden til elektroner og protoner. Uten et elektron vil ikke $P680^+$ kunne ta reduseres, og elektronoverføringen stopper opp.
- Vann splittes som $2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$.
- Denne reaksjonen krever fire protoner.
- $P680^+$ kan kun ta imot ett og ett elektron. Derfor finnes *oxygen-evolving complex* (*water splitting complex*), som deler vannet, og donerer ett og ett elektron til $P680^+$.



Figur 65. b₆f. Pumper protoner inn i lumen ettersom elektroner strømmer fra PSII til PSI.

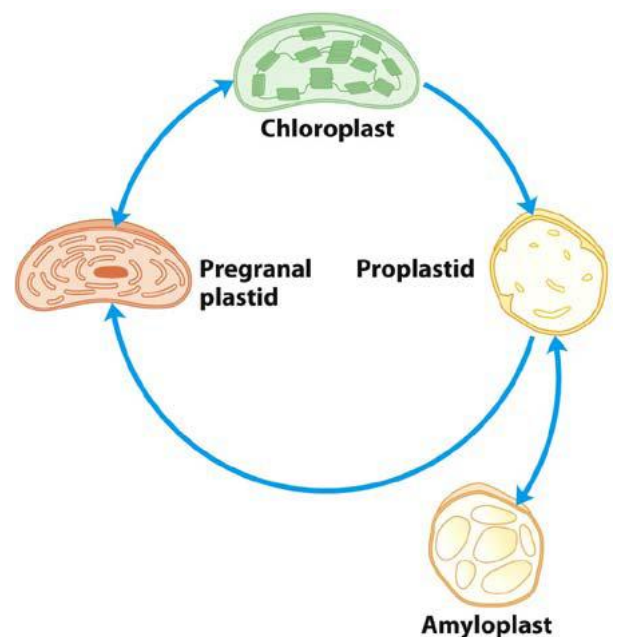
ATP syntese i fotosforeleringen

- Mye tyder på at protongradienten spiller samme rolle som i motokondriene når det kommer til syntese av ATP. Generelt er det veldig mange likhetstrekk, ATP syntase er likt osv.
- En pH-gradient kan fjerne drivkraften til ATP syntese.
- Som i mitokondriene er ATP produksjon drevet kun av protongradienten.
- $\Delta pH = 3$ gir 1000 ganger forskjell i konsentrasjon av protoner i lumen og stroma.
- Det dannes ca 3ATP pr O_2 .
- ATP syntase enzymet er svært likt som i mitokondriene. F_0 og F_1 betegnes CF_0 og CF_1 for å henvise til reaksjonen i kloroplasten. Ellers er det likt med knott som roterer med β osv.

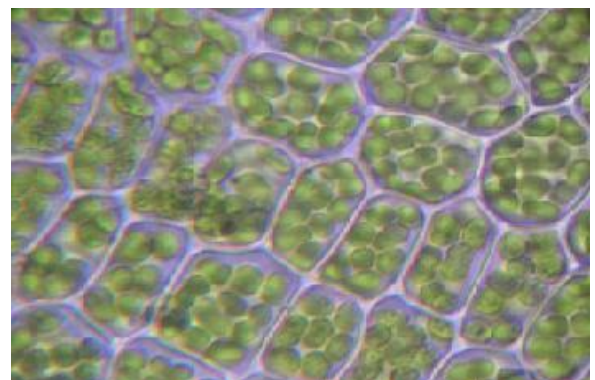
Karbohydrat biosyntese i planter

- Syntese av karbohydrater i dyreceller starter alltid med et karbonskjelett med minst tre karboner, som alle er redusert mer enn CO_2 .
- Planter syntetiserer karbohydrater fra CO_2 og vann, med energi fra ATP og NADPH fra fotofosforeleringen.
- Planter kan bruke CO_2 som eneste kilde til karbonatomer, og kan bygge stivelse, sukker, cellulose, proteiner, lipider med mer fra det.
- **CO_2 assimilation** kalles prosessen i kloroplasten som katalyserer omdannelsen fra CO_2 til organiske komponenter. Her dannes phosphate 3-phosphoglycerate, som danner grunnlaget for mer komplekse biomolekyler.
- CO_2 forbrukes via en syklisk pathway, kjent som **Calvin cycle**, eller **photosynthetic carbon reduction cycle**.
- Hele denne prosessen er langt mer kompleks enn glykolyse, som må reguleres nøye for å fungere skikkelig. To viktige reguleringspunkt er:
 - Redusere disulfidbindinger med elektroner fra PSI
 - Endre pH og Mg^{2+} konsentrasjon som resultat av belysning.

- Den biosyntetiske aktiviteten i planter foregår i **plastider**.
- Plastider har en dobbel membran og inneholder et lite gen.
- I **kloroplast** foregår det **CO_2 assimilation**. Enzymene som katalyserer prosessen finnes inne i stroma.
- **Amyloplast** har ikke klorofyll, og fungerer som lager for stivelse i planter.
- Kloroplast kan omdannes til **proplastider** ved å miste indre membraner og klorofyll.
- Både proplastid og amyloplast kan regenereres til kloroplast.
- Typisk inneholder grønne blader mye kloroplast, mens poteter er rike på amyloplast.



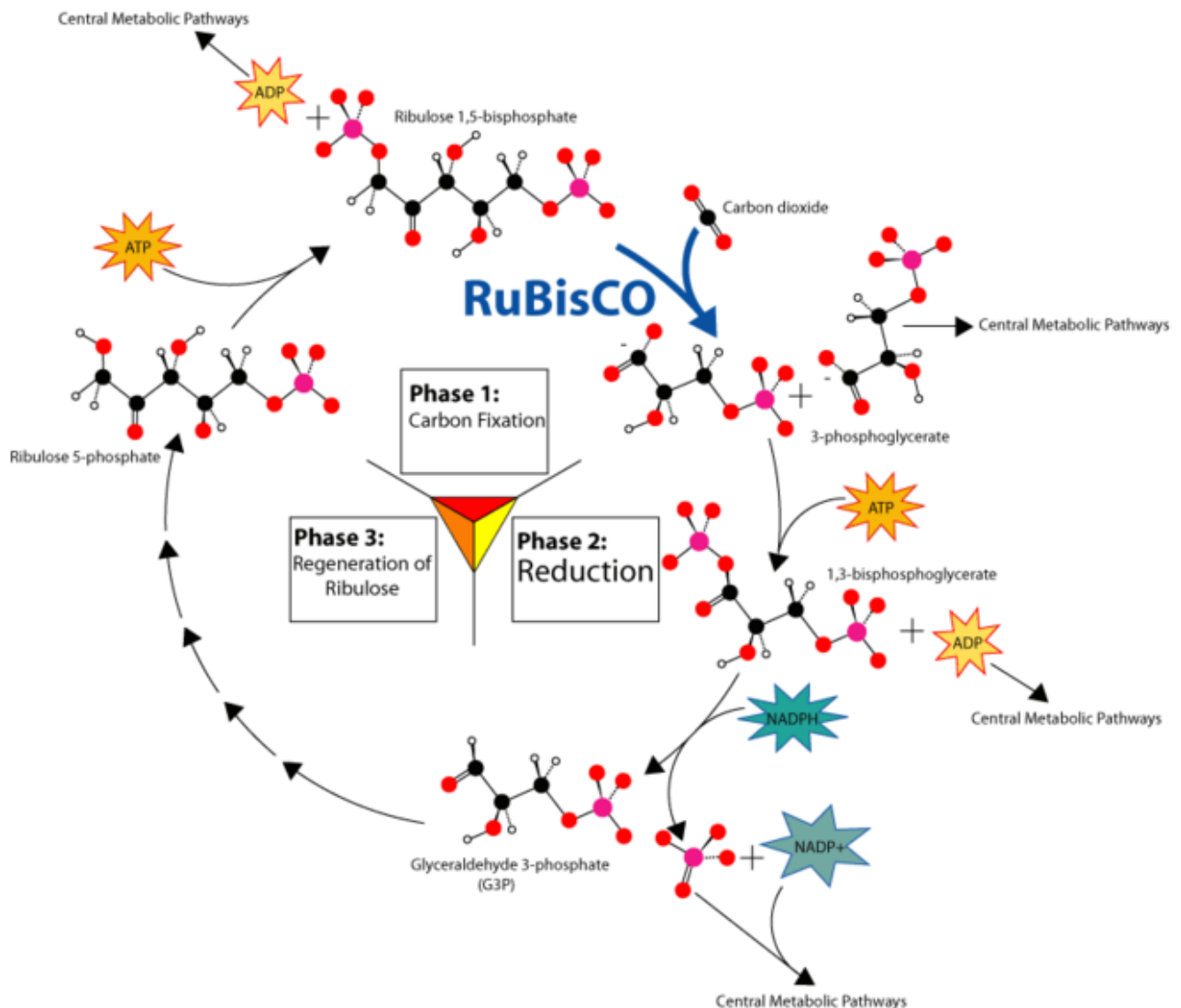
Figur 1. Plastider: Kloroplast, proplastid og amyloplast



Figur 2. Planteceller med synlig kloroplast.

- Karbondioksid assimilering foregår i tre steg.

Stegene i karbohydratsyntese



Figur 3. Oversikt over reaksjonen.

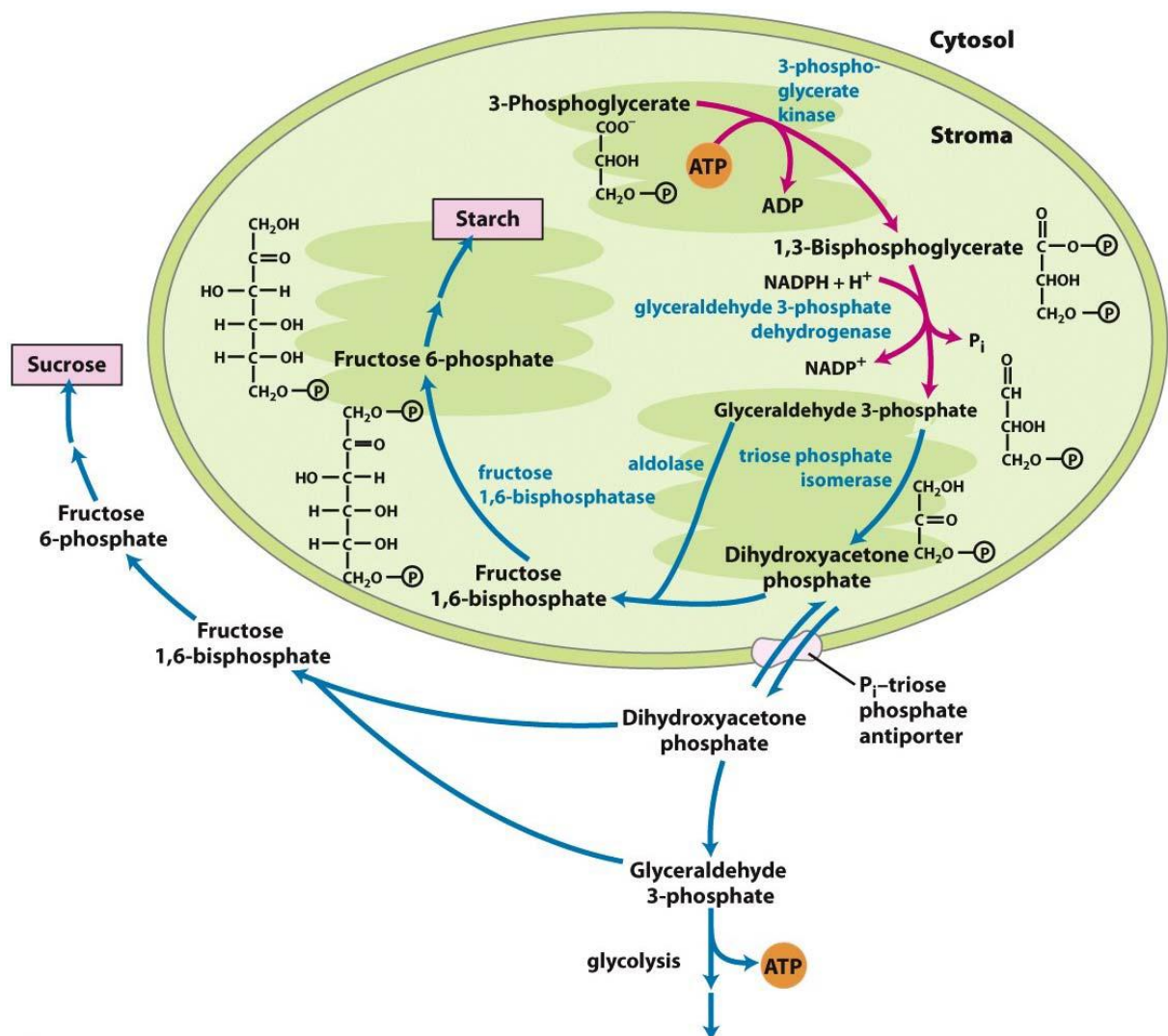
- **Triose phosphate** er *glyceraldehyd 3-phosphate*, *3-phosphoglycerate* eller *dihydroxyaceton phosphate*

Første steg: karbon fiksering

- Et CO_2 molekyl festes kovalent til *ribulose 1,5-bisphosphate*, i en reaksjon katalysert av *ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, forkortet til *rubisco*.
- Videre deler rubisco det nye seks-karbon molekylet til to molekyler *3-phosphoglycerat*. CO_2 -molekylet er nå i et av disse to.
- Rubisco er svært tregt, og tar kun tre CO_2 i sekundet. Dette kompenseres ved enorme mengder av det.
- Etersom rubisco katalyserer første steget i karbondioksid assimileringen, så er dette et naturlig sted for regulering.

Andre steg: Reduksjon

- 3-phosphoglycerate fra første steg konverteres til **1,3-biphosphoglycerate**. Denne reaksjonen katalyseres av *3-phosphoglycerate kinase*, og forbruker én ATP.
- 1,3-biphosphoglycerate konverteres til **glyceraldehyd 3-phosphate**. Dette er katalysert av *glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase*, og omdanner NADPH + H⁺ til NADP⁺.
- Disse reaksjonene er akkurat det samme som i glykolysen.
- Som i glykolysen kan *glyceraldehyd 3-phosphate* omdannes til *dihydroxyacetone phosphate* ved *triose phosphate isomerase*.
- Det meste av triose fosfatene brukes til å regenerere ribulose 1,5-biphosphate, resten konverteres enten til stivelse i stromaen, eller sukrose i cytosolen.



Figur 4. Andre steg, og videre omdannelse.

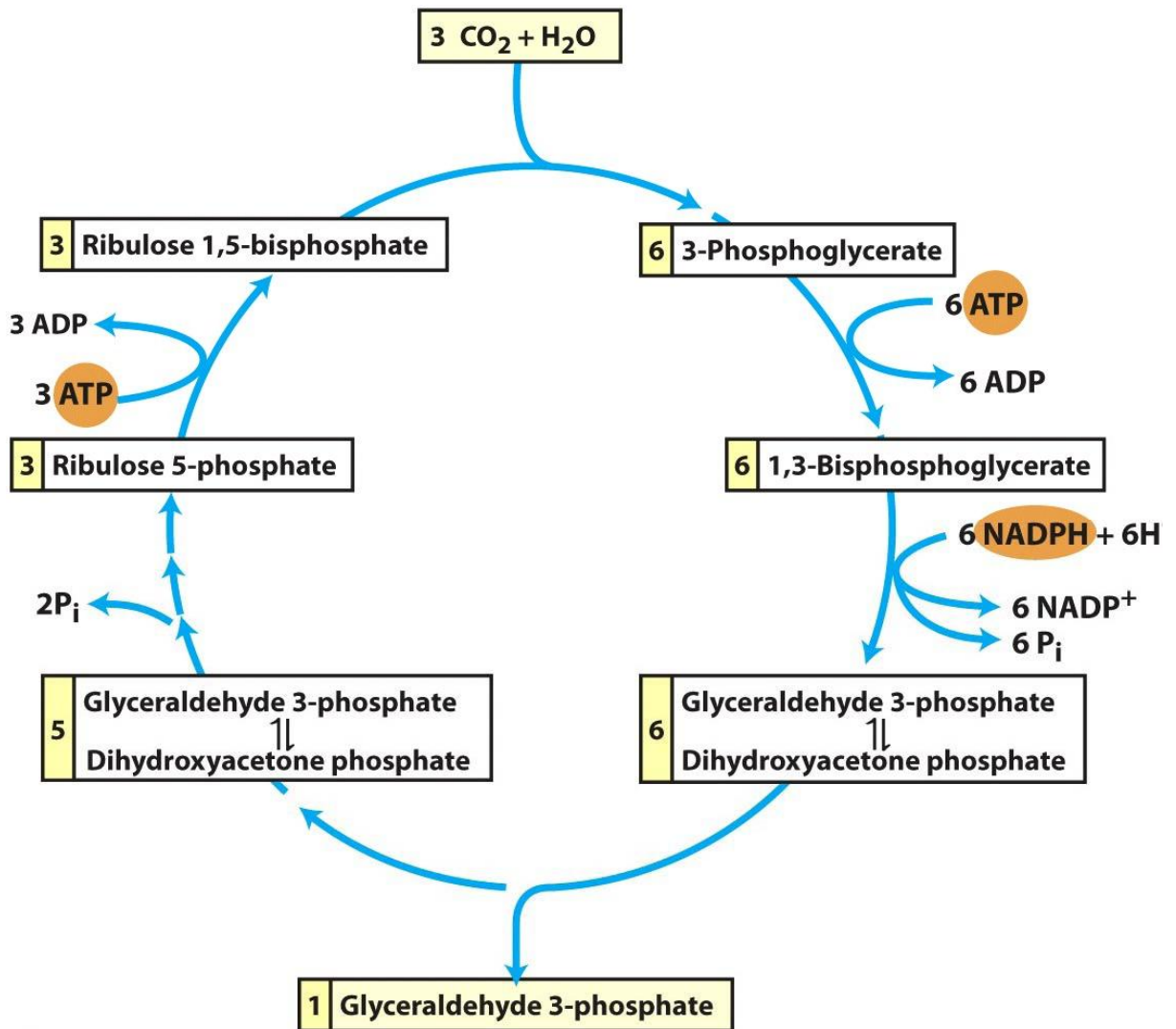
Tredje steg: Regenerering av ribulose

- Etersom det første steget bruker ribulose 1,5-biphosphate, så må det regenereres.
- Dette skjer igjennom en rekke reaksjoner, som begynner med glyceraldehyd 3-phosphate. På veien har det vært innom både 3,4,5,6 og 7 karbonatomer i molekylet.

- Detaljer her er stygt og grisete, kan ikke være pensum.
- I det neste siste steget dannes ribulose 5-phosphate. Deretter forbrukes et ATP molekyl, slik at ribulose 1,5-biphosphate dannes.

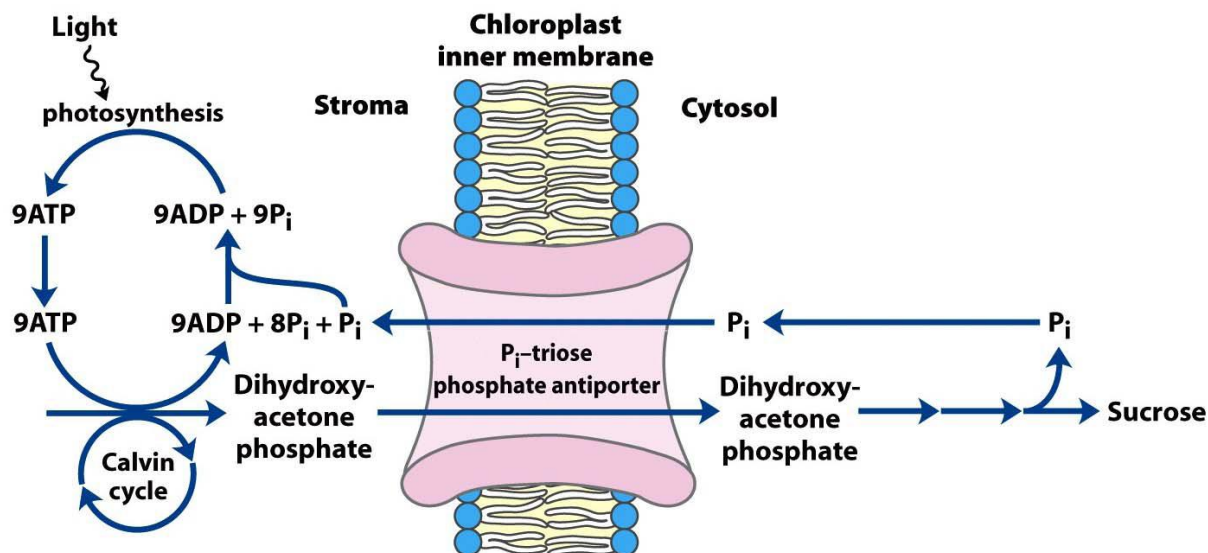
Energiregnskap

- Tre runder i calvin syklusen forbruger tre molekyl CO₂, danner et molekyl triose phosphate, bruker 9 ATP molekyl og 6 NADPH + 6H⁺. Se figuren under:



Figur 5. Totalregnskap for Calvinsyklusen. 9 ATP, 6 NADPH, 3CO₂ og 1 glyceraldehyde 3-phosphate.

- ATP forbrukes i samme hastighet som det dannes i fotofosforeleringen.
- Den innerste kloroplast membranen er uigjennomtrengelig for fosforelerte komponenter.
- En spesifikk antiporter transporterer ut et triose fosfat, i bytte mot et molekyl P_i. Eks; fire triose fosfater fraktes ut for å danne et molekyl sukrose. De tar med seg fire molekyl P_i ut, og derfor må fire fraktes inn igjennom antiporterens.



Figur 6. Transport av triose fosfater i bytte mot P_i .

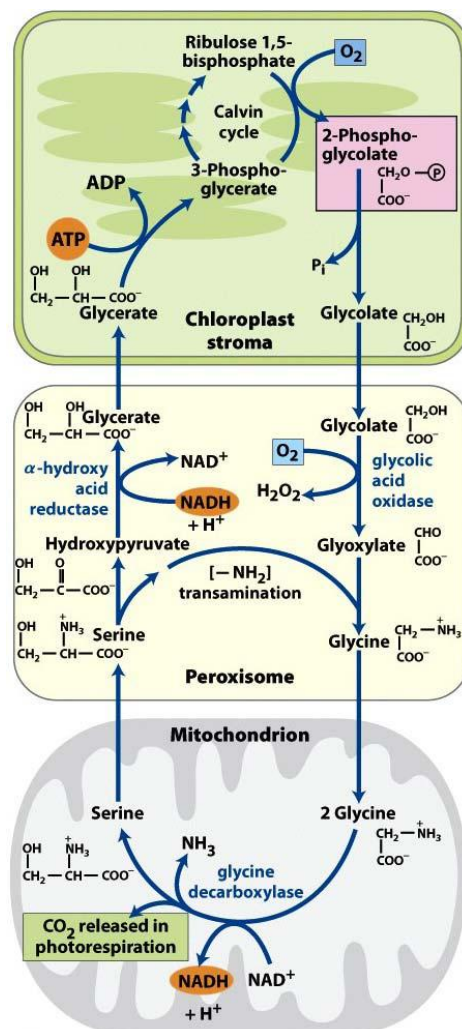
- Elektroner fra PSI regulerer calvin syklusen etter lyset. ATP brukes nå ikke til CO_2 assimilering.
- Om natten degraderes stivelse laget om dagen til glukose, som brukes som brensel om natten.

Fotorespirasjon 20.2

- I mørket driver plantene med *fotospirasjon*, hvor substrater oksideres til CO_2 , og O_2 dannes om til H_2O . Dette er en skitten bransje, en møkkete bransje.
- Fotorespirasjon skyldes at ribusco ikke kan skille mellom O_2 og CO_2 .
- For ca hver 3-4 runde i calvinsyklusen fester O_2 seg til active siden hos ribusco fremfor CO_2 . Det dannes da 3-phosphoglycerate og 2-phosphoglycerate, et komplett ubukelig produkt.
- Denne mangelen på spesifiktivitet kommer fra evolusjonen.
- 2-phosphoglycerate må gå igjennom the *glycolate plathway* for å til slutt komme tilbake i calvinsyklusen.

Stegene i glycolate pathway

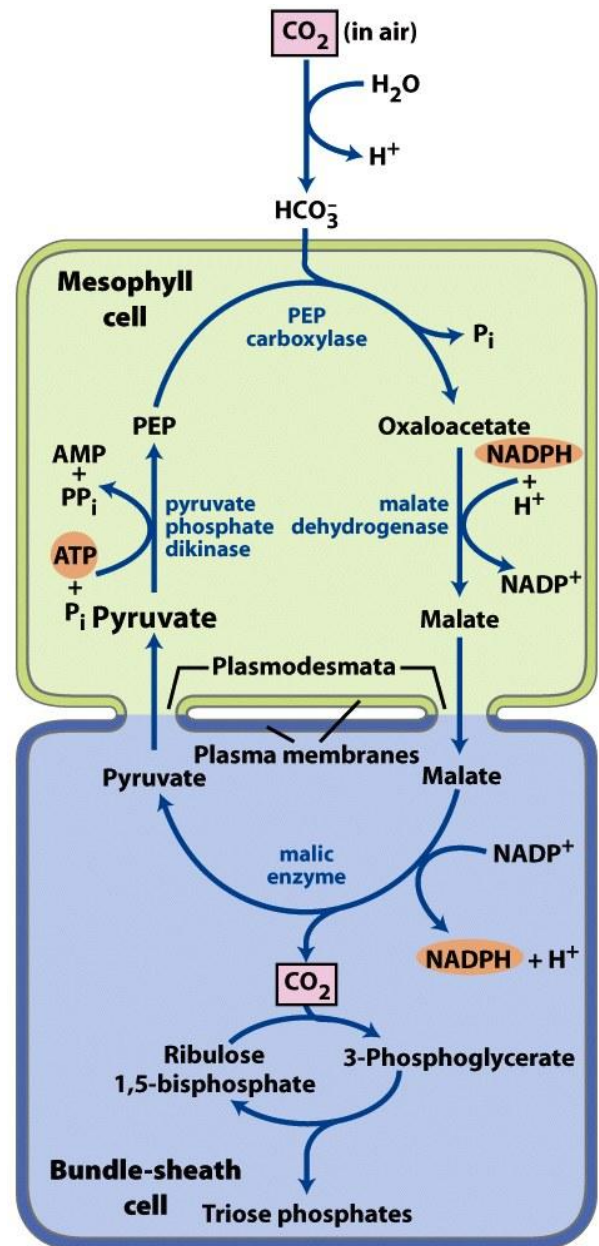
- 2-phosphoglycerate defosforeleres og danner glycolate.
- Glycolat omdannes til glycine
- To stk glycine blir fraktet inn i mitokondriene, og omdannes til serin. Denne reaksjonen katalyseres av *glycin decarboxylase complex*. Det frigjør et molekyl CO_2 .
- Serine fraktes ut i peroxisome, og omdannes til glycerate.



- Glycerate omdannes til 3-phosphoglycerate i stroma, på bekostning av 1 ATP.
- Totalt brukes fire O₂ molekyler og 1 ATP molekyl for å omdanne to molekyler 2-phosphoglycerate.

C₄ pathway

- Planter som vokser i tropiske strøk har utviklet en mekanisme for å forhindre dette tapet i fotorespirasjonen.
- Her fikseres CO₂ i et firekarbons-kompleks, derav C₄ plante. Denne assimileringprosessen kalles derfor C₄ pathway.
- Typisk for C₄ planter er høy fotosyntetisk rate, stor vekst, lite fotorespirasjon, lite vanntap og en spesifikk bladstruktur.
- Dette involverer to typer celler, Mesophyll celler og bundle-sheath celler.

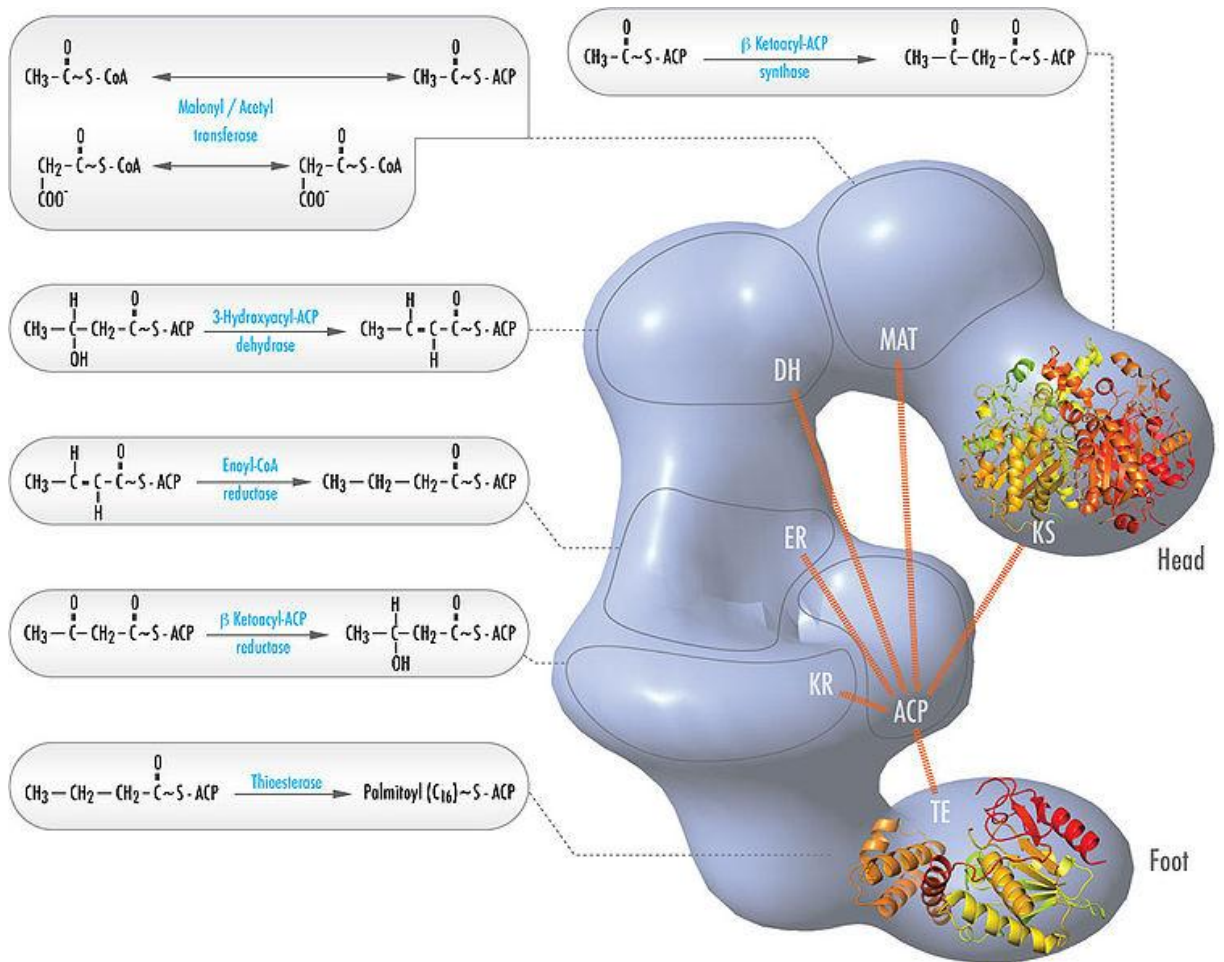


Figur 7. CO₂ pathway i C₄ planter.

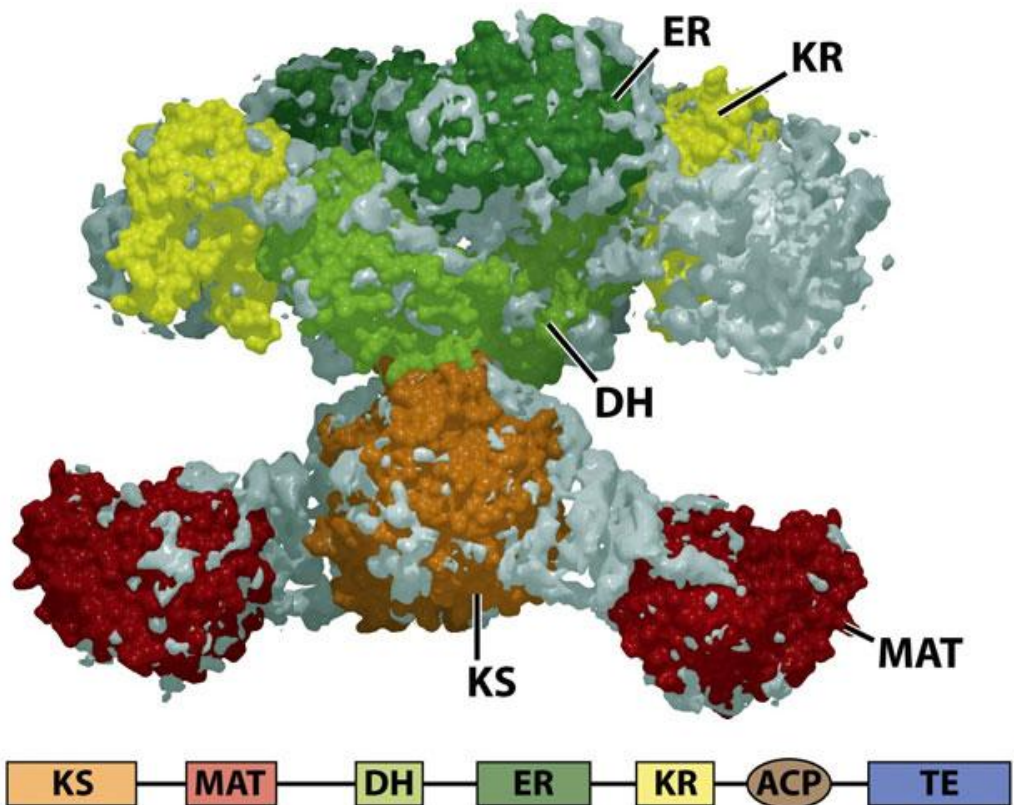
- Først kommer CO₂ til mesophyll-cellene, og binder seg med phosphoenylpyruvate og danner oxaloacetate.
- Oxaloacetate omdannes til Malate ved å forbruke NADPH + H⁺.
- Malate overføres til bundle-sheath-celler.
- Malate dekarboksyleres, og omdannes til pyruvate. Her frigjøres CO₂, og entrer calvin syklusen på normal måte.
- Ettersom dette skjer fysisk adskilt skjer det ingen fotorespirasjon.
- Det er det samme CO₂ molekylet som fraktes inn som frigjøres til ribusco i bundle-sheath cellen.
- Pyruvate omdannes med ATP til PEP. End of cycle.
- CO₂ assimileringen har her større kostnad enn i C₃ planter, og går derfor bare ved temperaturer 28-30°. Dette har en sammenheng med ribuscos temperaturavhengighet for carboksylering/oksidasjon.
- Kaktuser og i veldig varme klima bruker den samme funksjonen for å redusere vanntap om dagen. De fanger CO₂ om natten, og lagrer det i malate. Om dagen dettes "porene" i planten, og ikke noe vann får unnslippe, mens CO₂ frigjøres fra malate.

Biosyntese av sukrose og stivelse 20.3

- Ikke merket som viktig på foiler
- I godt lys dannes mye stivelse i plastidene. Stivelse er D-glucose som glycogen
- Sukrose dannes i noen planter.
- Konvertering av triose fosfater til stivelse og sukker er sterkt regulert.



Figur 68. FAS, med syv domener.



Figur 69. Nok en fremstilling av FAS.

- **KS** – β -ketoacyl-ACP synthase
- **MAT** – malonyl/acetyl-CoA-ACP transferase
- **DH** – β -hydroxyacyl-ACP dehydratase
- **ER** – enoyl-ACP reductase
- **KR** – β -ketoacyl-ACP reductase
- **TE** – thioesterase

- I FAS systemer slippes det ikke ut noen mellomprodukter. Når karbonkjeden blir på 16 karboner, forlater **palmitate, 16:0**, syklusen.
- I palmitate er Carbonatom 15 og 16 fra det startende acetyl-Coa, resten har blitt tilført igjennom malonyl-CoA.
- Under hele reaksjonen er produktet kovalent festet til enzymet, via **Acyl carrier protein, (ACP)**. Dette kan sees på som en lang fleksibel arm.

Reaksjonene

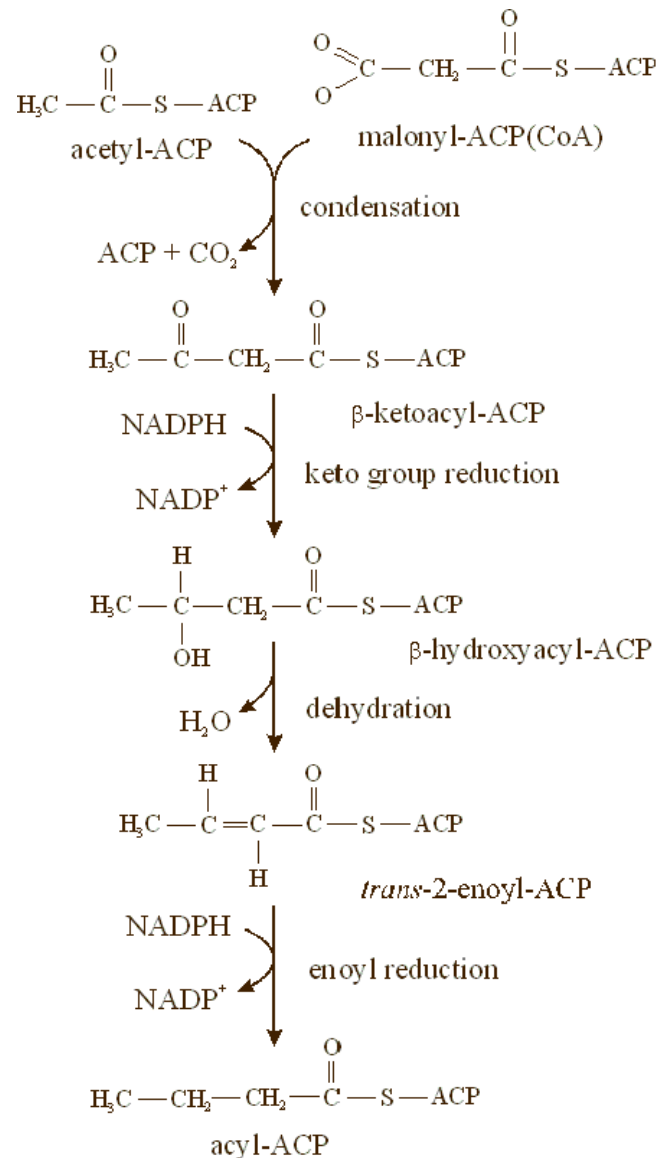
- Før reaksjonene kan begynne må acetyl-CoA og malonyl-CoA festes på FAS.
- Enzymet som gjør dette er **malonyl/acetyl-CoA-ACP transferase, MAT**.
- Først spaltes CoA av Acetyl-CoA, og bindes til **β -ketoacyl-ACP syntase, KS**.
- Deretter festes malonyl-CoA til ACP.

Første reaksjon: Kondensering

- De aktiverte acetyl og malonyl-gruppene danner **acetoacetyl-ACP**, altså, en acetoacetylgruppe bundet til ACP igjennom SH.
- Reaksjonen katalyseres av β -ketoacyl-ACP (KS).
- Et molekyl CO_2 produseres. Dette er det samme CO_2 molekylet som tilføres acetyl-CoA og danner malonyl-CoA, og kommer fra HCO_3^- . CO_2 er kun med midlertidig i reaksjonen, ettersom det frigjøres igjen. Dette er for å gjøre kondenseringen mer termodynamisk gunstig. Dette karboksylering/dekarboksyleringsreaksjonen tilsvarer den i glukoneogenesen fra pyruvat til phosphoenolpyruvate. Energien som "spares" kommer fra tilføringen av ATP når malonyl dannes.

Andre reaksjon: Reduksjon av karbonyl gruppa

- Acetoacetyl-ACP som dannes i reaksjon én reduseres nå ved karbon 3, og danner **D- β -hydroxybutyryl-ACP**.
- Denne reaksjonen katalyseres av **β -ketoacyl-ACP reduktase, (KR)**.



Figur 70. Etter gjentatte runder i denne så dannes palmitate. Dette er en runde, og to carbonatomer har blitt festet på acyl-gruppa.

- Elektron donoren er NADPH.

Tredje steg: dehydrering

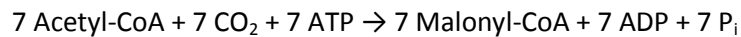
- Vann fjernes fra C-2 og C-3 fra D-β-hydroxybutyryl-ACP og danner *trans-Δ²-butenoyl-ACP*.
- Dette er katalysert av *β-hydroxylacyl-ACP dehydratase* (DH)

Fjerde steg: reduksjon av dobbeltbinding

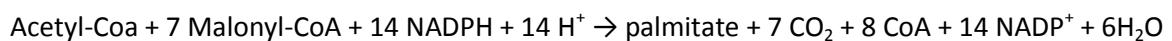
- Dobbeltbindingen i *trans-Δ²-butenoyl-ACP* reduseres, (saturated), til *butyryl-ACP*.
- Katalysert av *enoyl-ACP reductase* (ER).
- Igjen er NADPH generøs elektron donor. ($NADPH \rightarrow NADP^+ + H^+$).

- Den fire karbon lange butyryl gruppa overføres nå fra ACP til β-ketoacyl-ACP syntase (KS), samme startposisjon som acetyl gruppa hadde.
- En ny malonyl gruppe festes nå til ACP, og kondensasjon av butyryl begynner akkurat som tidligere.
- Etter syv tilsvarende runder dannes den 16-karbon lange palmitoyl-gruppa.
- Palmitoyl-gruppa frigjøres når den er 16-karboner lang av ukjent årsak.
- Totalt sett trengs kjemisk energi i to former;
 - ATP for å binde CO₂ til acetyl-CoA og danne malonyl-CoA
 - NADPH for å bryte dobbeltbindinger.

Acetyl-CoA carboksyrase



Fettsyre syntese



Totalreaksjon

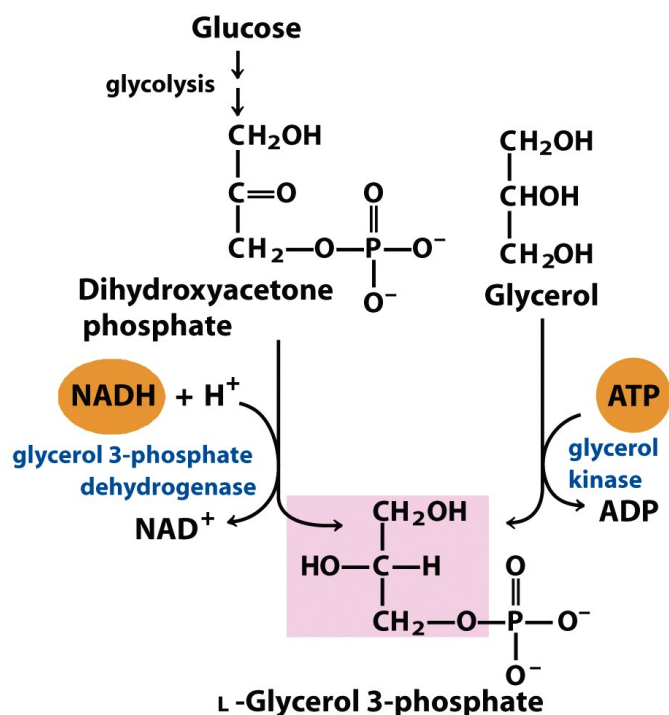


- I eukaryoter, fettsyresyntese skjer i cytosolen. Dette skiller reaksjonen fra de nedbrytende reaksjonene, som stort sett skjer inne i mitokondriematrixen.
- NADPH til fettsyresyntesen kommer fra *pentose phosphate pathwayen* (ikke pensum), og av *malic enzymet*.
- I planteceller skjer den i kloroplast stroma. Her er det mye NADPH fra fotofosforeleringen.
- I eukaryoter dannes acetyl-CoA i mitokondriematrixen, under pyruvateoksidasjon. Dette er første steget i sitronsyresyklusen.
- Ettersom fettsyresyntesen foregår utenfor mitokondrien er det her en syklus over membranene. Oppsummert dannes citrate som fraktes over membranen, og det forbrukes to ATP pr Acetyl-CoA som leveres ut.
- Om en celle har mer enn nok energi, dannes resten om til lipider og triaglyceroler.

- Reaksjonen acetyl-CoA carboxylase er begrensende på fettsyresyntetiseringen, og er derfor et naturlig reguleringspunkt. Palmitoyl-CoA, produkt av fettsyresyntesen, er feedback inhibitor for acetyl-CoA carboxylase, slik at ikke malonyl-CoA dannes.
- Hvis β -oksidasjon og syntese av fettsyrer hadde kunnet gå samtidig ville det først til stort energitap.
- Palmitate 16:0 kan forlenges til lengere fettkjeder via *fatty acid elongation systems*, her kan en merke seg Stearate 18:0.
- De vanligste fettsyrene i dyrevæv er palmitoleate 16:1(Δ^9) og oleate 18:1(Δ^9). Disse har en dobbeltbinding mellom C-9 og C-10.
- Dobbeltbindingen, (som gjør det til en enumettet fettsyre), er katalysert av *fatty acyl-CoA desaturase*. Denne driver av NADPH, og reduserer O_2 til H_2O .

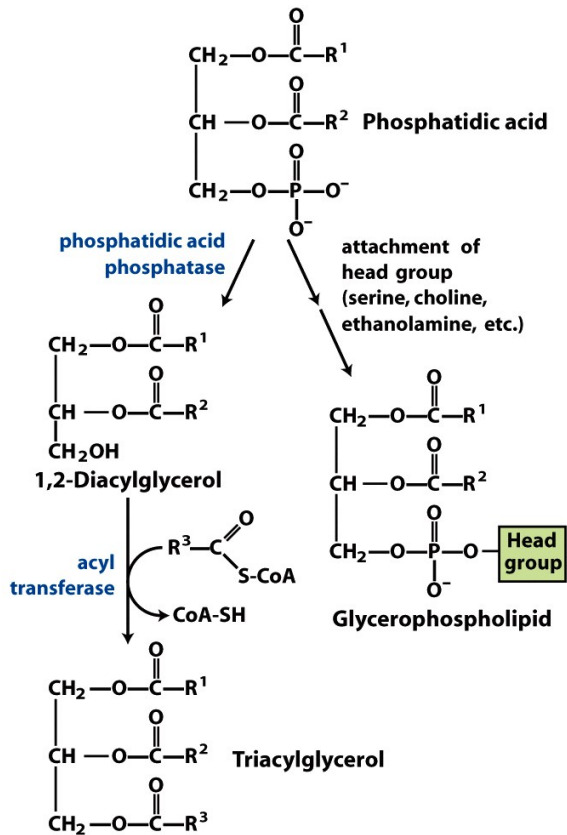
Biosyntese av triaglyceroler 21.2

- Fettsyrer en spiser eller syntetiserer har to sjebner:
 - Lagres i triaglyceroler som "fett", og energilager.
 - Omdannes til fosfolipider og brukes i membraner.
- Store mengder energi kan lagres i form av triaglyceroler.
- *L-Glycerol 3-phosphate* er et av to utgangspunkt for å danne *phosphatidic acid*.
- Phosphatidic acid er utgangspunkt for å lage triaglyceroler.
- Den største delen av L-Glycerol 3-phosphate kommer fra glykolysen, og *dihydroxyacetone phosphate*. Reaksjonen katalyseres av *glycerol 3-phosphate dehydrogenase*.
- Noe L-Glycerol 3-phosphate kommer også fra glycerol igjennom leveren, katalysert av *glycerol kinase*.
- Det andre som brukes for å danne phosphatidic acid er *acyl-CoA*, katalysert av *Acyl-CoA synthases*.
- Phosphatidic acid hydrolyseres til 1,2-Diacylglycerol som videre omdannes til triaglycerol.
- Dette er viktig pensum! Se figurene 6 og 7.

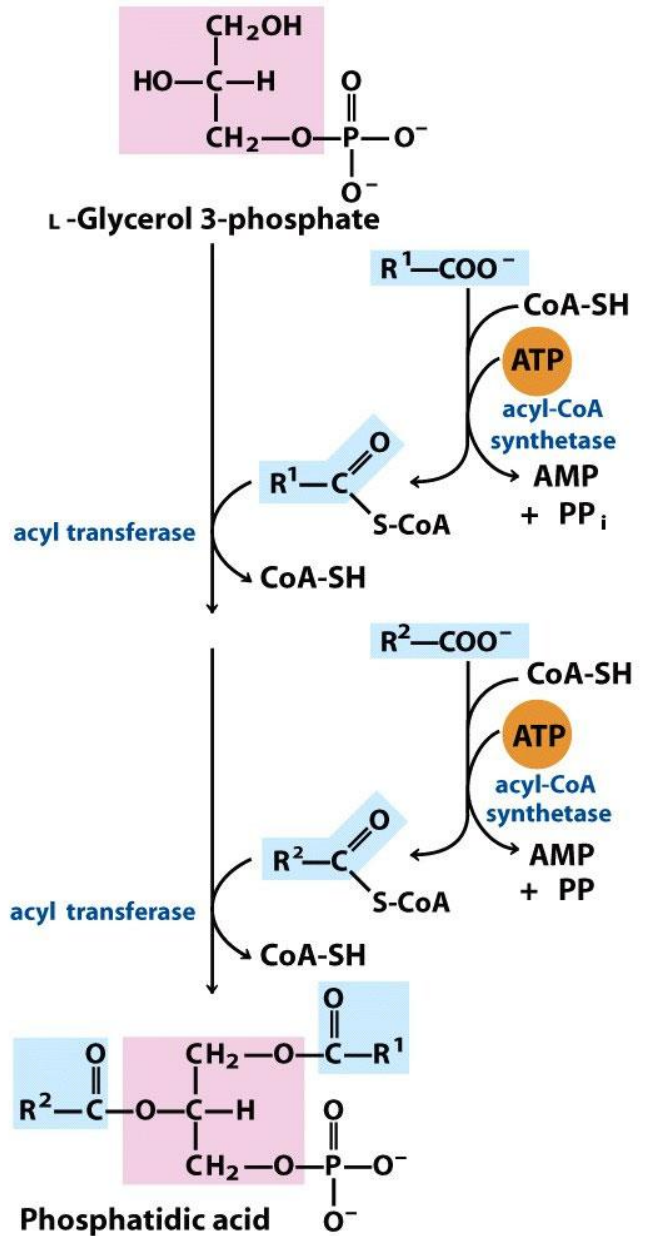


Figur 71. Første steget i dannelsen av phosphatidic acid og triaglyceroler.

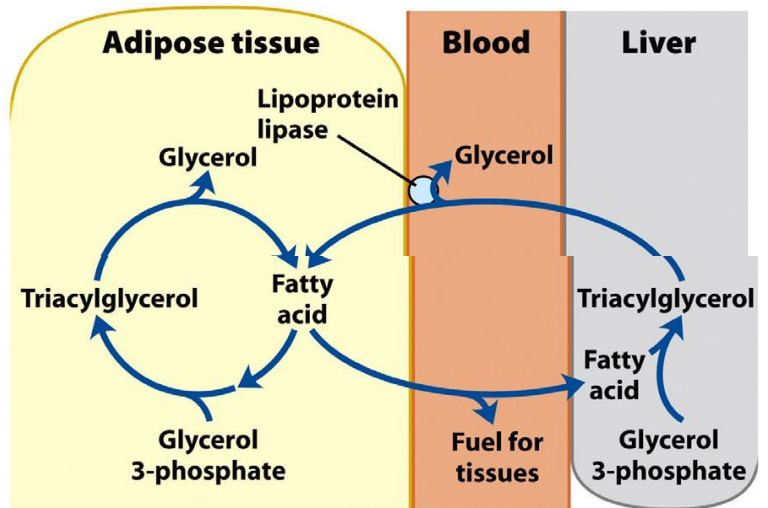
- Glycerphospholipider dannes ved å feste på en "head group". Disse brukes i membraner.



Figur 73. Phosphatidic acid til triacylglyceroler.



Figur 72. Resten av dannelsen av phosphatidic acid og triacylglyceroler.

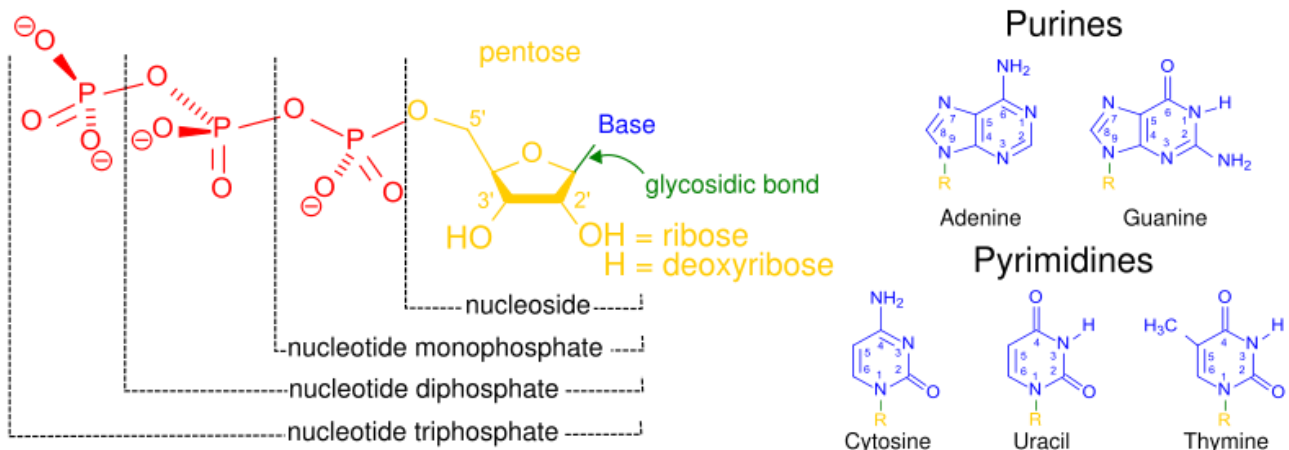


Figur 74. Triacylglycerol sirkelen.

- Fats in adipocytes are hydrolyzed to glycerol and fatty acids
- Glycerol can be converted to glycerol 3-phosphate and used for synthesis of fats. Fatty acids can be either transported out and used as fuel, or re-used for synthesis of new fats in both adipocytes and liver
- Fats from the liver are degraded to glycerol and fatty acids, the latter are transported to adipocytes for synthesis of fats

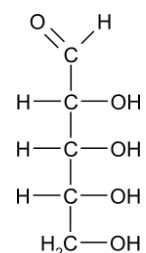
Nukleotider og nukleinsyrer

- **Nukleotider** bindes sammen og danner **nukleinsyrer**: **deoxyribonucleic acid (DNA)** og **ribonucleic acid (RNA)**.
- Nukleotider brukes også til cellemetabolisme, Eks:
 - Energienhet i metabolske overføringer
 - Kjemisk link mellom cellen stimuli utenifra fra hormoner eller andre kilder
 - Strukturelement i enzym kofaktorer og andre biokjemiske mellomprodukter
- Aminosyresekvensen til ethvert protein i en celle, og nukleoidrekkefølgen til ethvert RNA er spesifisert av nukleoidrekkefølgen i DNA.
- Et **gen** er en bit av et DNA molekyl som inneholder informasjon for syntese av et funksjonelt biologisk produkt.
- En celle har typisk mange tusen gener.
- DNA har ingen andre funksjoner enn å lagre biologisk informasjon.
- RNA finnes i flere utgaver i cellene:
 - **Ribosomal RNAs (rRNAs)**, komponent i ribosomene som syntetiserer proteiner.
 - **Messenger RNAs (mRNAs)**, bærer informasjon fra gener til ribosomene.
 - **Transfer RNAs (tRNAs)**, overfører informasjon fra mRNAs til en aminosyresekvens.
 - I tillegg finnes en rekke RNA med spesielle funksjoner.
- Nukleotider består av tre komponenter:
 - Nitrogeninnholdig base, bundet i en N-β-glycosylbinding til 1'-carbon i pentosen.
 - Pentose (β-furanose, en lukket femring)
 - En fosfatgruppe, bundet til 5'-karbonet på pentosen.



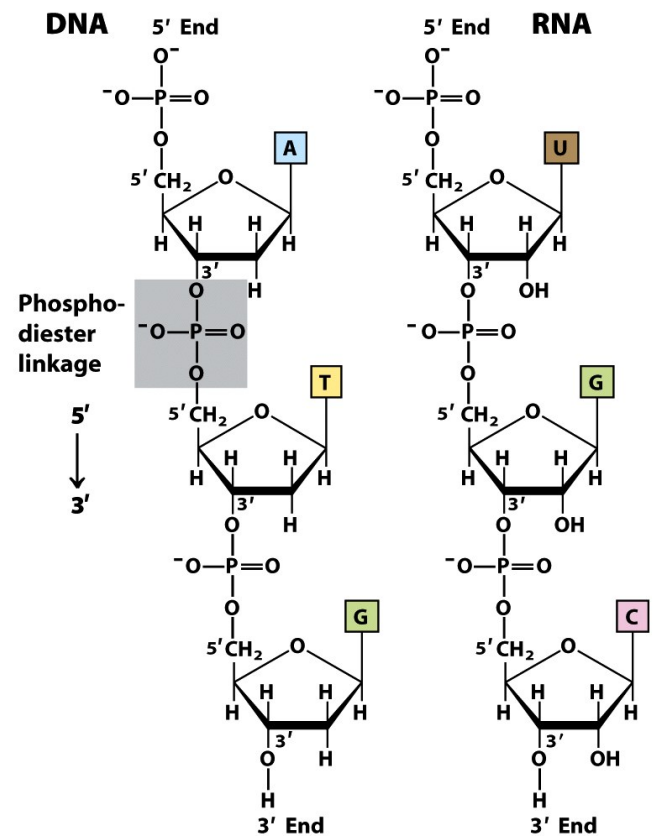
Figur 75. Strukturen til nukleotider.

- Uten fosfatgruppe kalles nukleotiden en **nukleoside**.
- Nitrogenbasene deles inn i **pyrimidine** og **purine**.
- Purine: **adenine (A)** og **guanine (G)**. De er felles for både RNA og DNA.
- Pyrimidine: **cytosine (C)**, og enten **thymine (T)** om i DNA eller **uracil (U)** i RNA.
- Nukleotidene har to typer pentoser, og disse definerer om det er RNA eller DNA. **2'-deoxy-D-ribose** → DNA pr def. RNA har **D-ribose**.

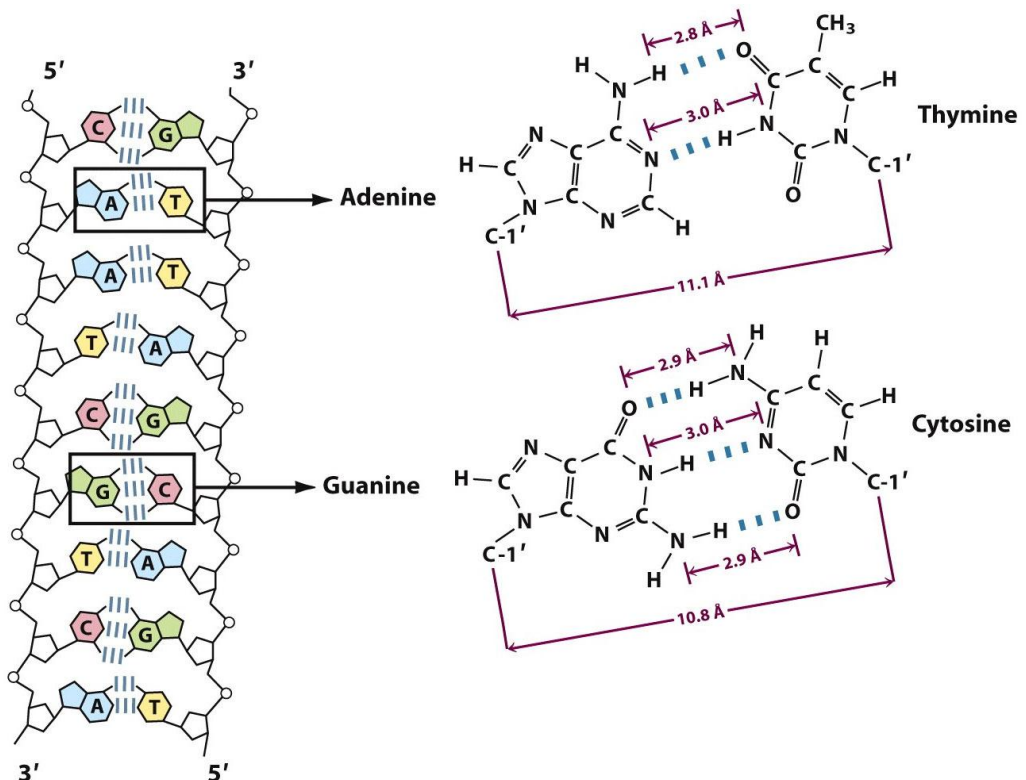


Figur 76. D-ribose, Danner pentose i ringform.

- Både RNA og DNA består også av noen mindre nitrogenbaser. De har en funksjon for å beskytte og regulere den biologiske informasjonen i DNA.
- Nukleotider i både DNA og RNA er sammenkoplet i broer mellom 5'-phosphate – gruppen og 3'-hydroxyl på neste nukleotid. Dette kalles **phosphodiester linkage**.
- Dette danner en kovalent kjede som annehver gang består av fosfat og pentoser.
- Nukleinsyrer er vannløslige. Fosfatgruppen har en $pK_a = 0$.
- Konvensjon er at en tegner fra 5' enden til 3' enden.
- Korte og lange (50) nukleinsyrer kalles oligonukleotid og polynukleotide.
- Purinene og pyrimidene i DNA og RNA er aromatiske(ringformede) molekyler. De får en spesiell elektronfordeling som gir de dobbeltbindingskarakter, og fører til at de er tilnærmet plane.
- Alle nukleotidbaser absorberer uvlys rundt 260nm.
- Nukleotidbasene er hydrofobe, og uløselige i vann.
- Basene plasseres i stacker med parallelle plan. Dette minimerer kontakten med vann, og stabiliserer den tredimensjonale strukturen.
- Hydrogenbindinger er svært viktige mellom basene i to nukleinsyrer. A binder seg til T (eller U) og C til G.



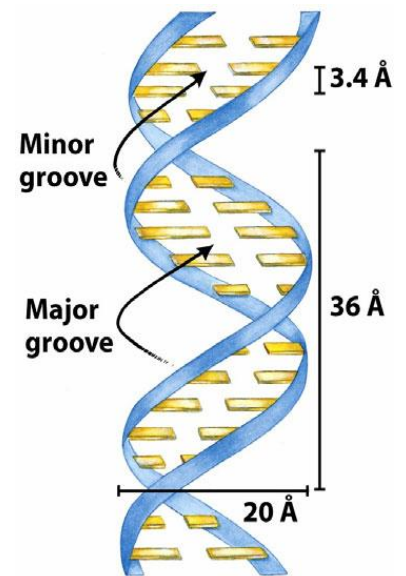
Figur 77. phosphodiester linkage.



Figur 78. Hydrogenbindinger mellom G og C, A og T.

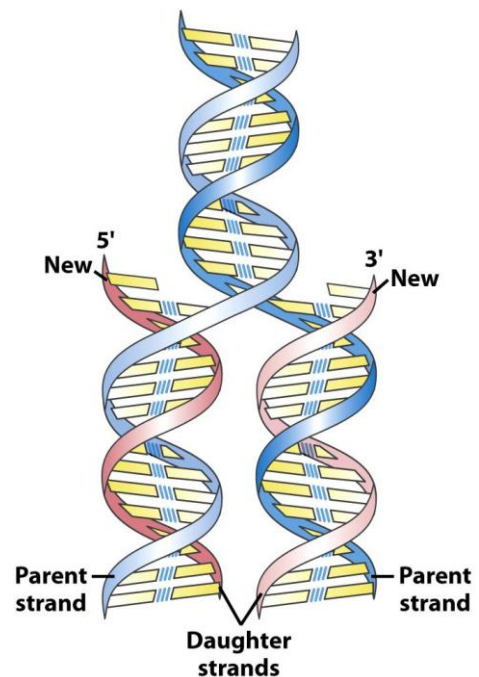
Nukleotidsyresstruktur

- Strukturen deles opp som for proteiner:
 1. Primærstruktur: kovalent struktur og nukleotidsekvens.
 2. Sekundærstruktur: Stabil struktur med alle nukleotidene i en nukleinsyre.
 3. Tertiærstruktur: Kompleks folding av store kromosomer.
- DNA er en dobbel, right handed, helix, periodisk for hver 36Å.
- De to helixene er antiparallelle.
- De hydrofile delene av deoxyribose og fosfatgruppene peker ut mot vannet rundt, pyrimidine og purine peker inn, stacket langs aksen.
- To og to baser er matchet, med A og T, G og C.
- DNA dobbelhelixen holdes sammen av hydrogenbindinger mellom baseparene og "base-stacking" vekselvirkninger.
- For å kopiere DNA åpner den seg, og det syntetiseres et komplimentær sekvens.



Figur 79. DNA.

- Chargraffs regler:
 1. Basesammensetningen av DNA varierer fra art til art.
 2. DNA fra forskjellige steder på samme dyr har lik basesammensetning.
 3. Basesammensetningen endres ikke med alder, næring eller miljø.
 4. A = T og C = G
- DNA er svært fleksibel.
- Standardstrukturen for DNA er *B-form DNA*. Denne er mest stabil. Finnes også i A-form og Z-form.
- Noen typer sekvenser av DNA danner spennende former. Seks A etter hverandre gir 18° knekk.
- *Palindrome* er en sekvens som skrives likt begge veier. Siden den da er kompliment til seg selv kan den danne *krusifiks* og *hairpins*.



Figur 80. Kopiering av DNA.

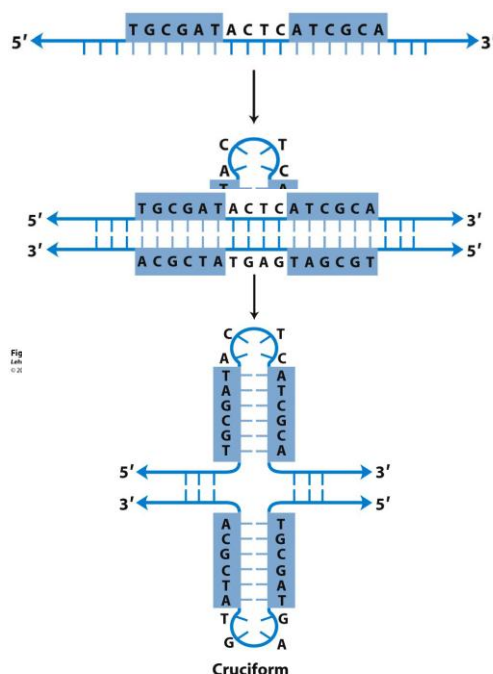


Fig 8-19b

RNA

- Sukkeret i RNA er ribose. (dexyribose i DNA)
- Uracil er byttet ut med Thymin
- RNA er en enkel høyredreid helix, mens DNA er en dobbel helix.
- RNA finnes i både cellekjernen og i ribosomene i cytoplasten. DNA er kun i cellekjernen.
- mRNA bærer med aminosyrerekkefølgen for å danne proteiner.
- Prosessen hvor det dannes mRNA på DNA kalles **transkripsjon**.
- mRNA kan bære med informasjon for både én(monocistronic) og flere(polycistronic) polypeptider. Det er vanlig med kun én.

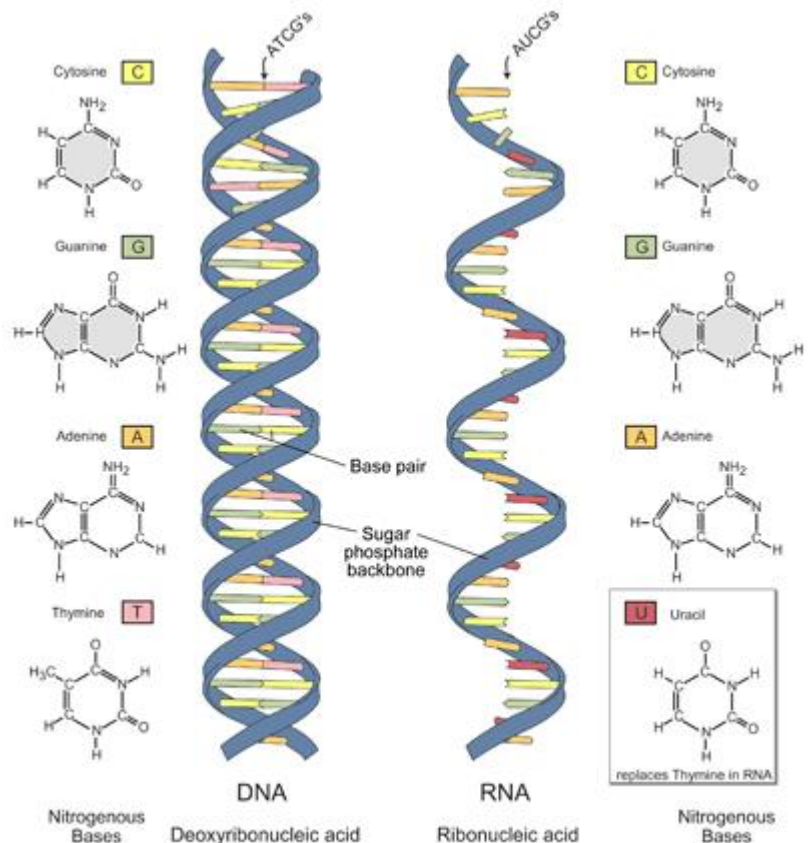
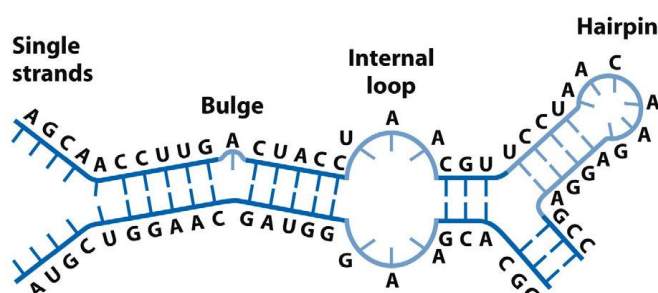


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

- Tre nukleotider bestemmer én aminosyre. Derfor kreves litt over 300 for å danne et polypeptid på 100 enheter.
- Transfer RNA, tRNA, binder seg til mRNA og aminosyrer, og sørger for at aminosyrene settes sammen i rett rekkefølge.
- Ribosom RNA, rRNA er også inblandet i syntesen av proteiner.
- Ribozymmer er små RNA med enzymevner.
- RNA kan danne base-par med både DNA og RNA.
- RNA har komplekse og stygge tredimensjonale strukturer, likner på proteiner.



Figur 81. Ribosom RNA, rRNA.



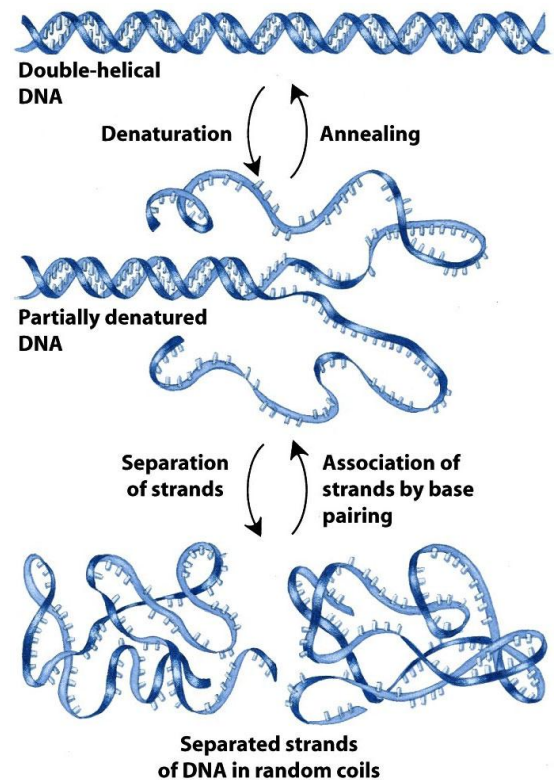
Figur 82. RNA med stoff.

Nukleinsyrekjemi

- Siden DNA lagrer biologisk info er det viktig at det er stabilt.
- Ekstremer av pH og høye temperaturer kan føre til denaturering eller smelting av DNA. Forstyrres hydrogenbåndene mellom basene kan to single helixer dannes.
- "splittet" DNA regenereres fort om det ikke er helt splittet. Er det helt splittet tar det tid å finne igjen riktig posisjon, deretter går det fort.
- A = T har to hydrogenbindinger, mens G = C har tre hydrogenbindinger. G = C vil derfor holde lengere sammen.
- Dette kan en bruke til å avgjøre forholdet mellom puriner og pyrimidier.
- En kan finne likheter mellom to typer DNA ved å denaturere de helt vha høy temp. Deretter kjøles blandingen ned, og DNA vil bygges opp igjen.
- Evolusjonslike arter vil ha flere likheter, dette

kalles *hybrid duplexes*.

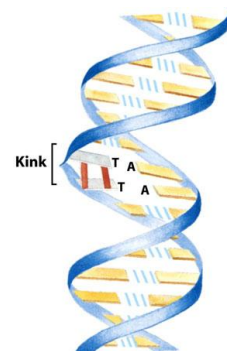
- En spesifikk DNA sekvens kan oppdages blant mange andre dersom en har komplementær-DNA. Dette kan da være syntetisert eller fremstilt på andre måter.



Figur 83. Denaturering av DNA.

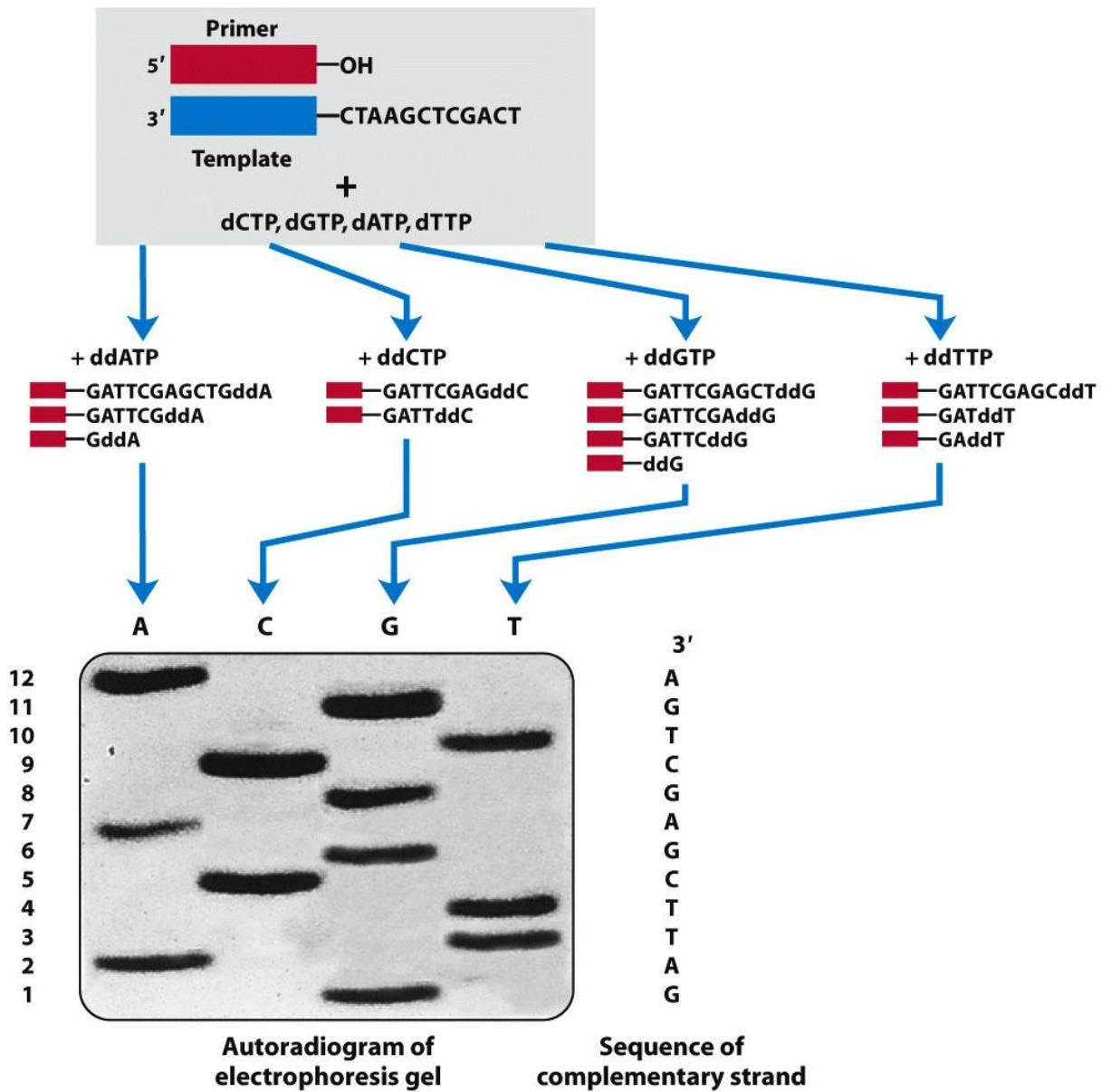
Mutasjoner

- Vanligvis skjer det svært sakte endring av DNA.
- Mutasjoner er endringer i DNAstruktur som endrer den genetiske informasjonen som er lagret der.
- Noen typer er:
 - Deamination: Nukleotidbaser mister exocyclic amino gruppe.
 - Deputination: En base forsvinner, (oftest puriner)
 - Stråling er viktig kilde til endringer.
 - Reaktive kjemikalier kan endre DNA.
 - Alkylering: en alkylgruppe bindes til en base, oftest methyl. Dette forhindrer normal paring av DNA.
 - Pyrimide dimers: Covalent binding mellom C eller T over eller under hverandre. Fører til knekk i helixen.
 - Oksidativ skade: Forårsaket av radikalier som hydrogen peroksid. Dette er den viktigste kilden til skade av DNA.
 - Ioniserende stråling: Fører til dannelsen av frie radikalier. De er svært reaktive, og kan føre til endring/brudd i basene. Se figurer og eksempler i foiler.



Figur 84. Pyrimide dimers. Knekk i helixen.

- Sekvensering av DNA er viktig ettersom rekkefølgen bestemmer egenskaper. Dette foregår ved elektroforese, tilsvarende som for proteiner.
- Målet er å dele opp i merkede lengder, for å så sjekke de.



Figur 85. Sekvensering av DNA. i dag kan en ta lange DNA svært raskt.

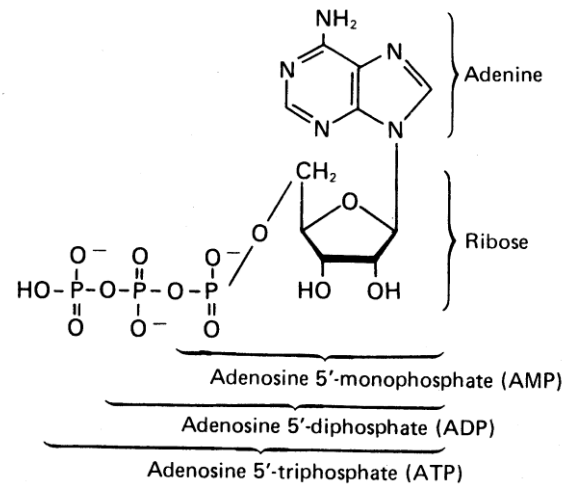
Nukleotiders andre funksjoner

- Nukleotider brukes også i alle celler som energibærere, enzym-kofaktor komponenter og kjemiske messengers.

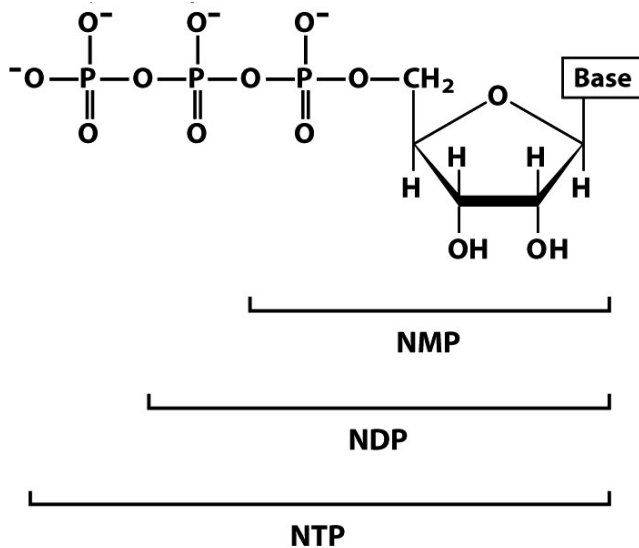
Nukleotider som energibærere

- En fosfatgruppe kovalent bundet til 5'-hydroxyl på et ribonucleotide kan ha en eller to fosfatgrupper til bundet på seg.
- Hydrolyse av nucleoside triphosphater har energi til mange cellereaksjoner.

- Vanligst er *Adenosine 5'-triphosphate, ATP*.
- Finnes også UTP, GTP, og CTP.



Figur 86. ATP.



Abbreviations of ribonucleoside 5'-phosphates			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenine	AMP	ADP	ATP
Guanine	GMP	GDP	GTP
Cytosine	CMP	CDP	CTP
Uracil	UMP	UDP	UTP

Abbreviations of deoxyribonucleoside 5'-phosphates			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenine	dAMP	dADP	dATP
Guanine	dGMP	dGDP	dGTP
Cytosine	dCMP	dCDP	dCTP
Thymine	dTMP	dTDP	dTTP

Figur 87. Mer energibærere fra nukleotider.

Nukleotider som enzym-kofaktorer

- En rekke enzym-kofaktorer inneholder adenosine i sin struktur.
- Adenosine er ikke direkte en del av primærfunksjonen, men fjernes adenoside endres reaktiviteten med en faktor 10^6 .

Nukleotider som reguleringsmolekyler

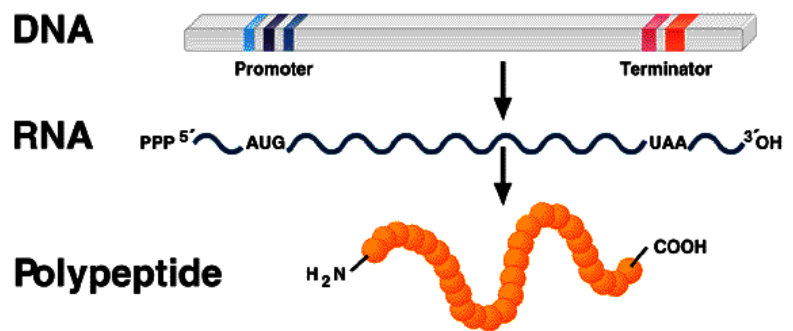
- Celler reagerer på signaler utenifra, i form av hormoner eller andre signaler.
- Dette kreves en sekunder "messenger" på innersiden av cellen.

- Ofte er denne sekundære messengeren et nukleotid.
- Mest vanlig er *adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, cyclic AMP, cAMP*.

Gener og kromosomer

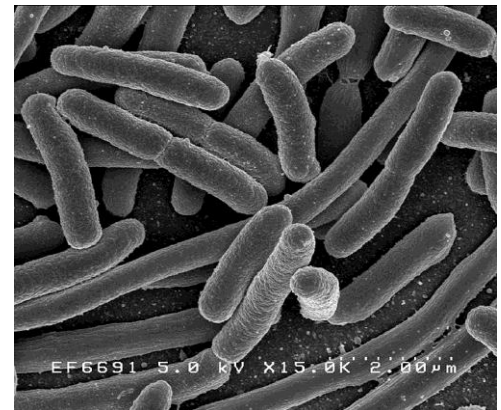
- DNA er veldig store, og i tertiærstruktur pakkes DNA til kromosomer.
- Et gen var før definert som det som bestemte én egenskap, som hårfarge. Senere har dette blitt utviklet til et gen -> et enzym, videre et gen -> et polypeptid.
- Dagens **definisjon av gener**: Et gen er all DNAen som koder primærsekvensen til et ferdig genprodukt. Dette kan være enten katalytisk, RNA eller polypeptid.
- **Reguleringssekvenser** i DNA inneholder signaler om start og slutt til gener og påvirker kopieringen av gener.

- En DNA sekvens kan tolkes på forskjellige måter, og dermed danne flere gener fra samme DNA sekvens.
- En aminosyre er beskrevet av 3 nukleotider i DNA.
- Mennesket har ca 3,1 millioner basepar, som utgjør 29000 gener på 24 kromosomer.
- Gener starter med **promoter** og ender med **terminator**.

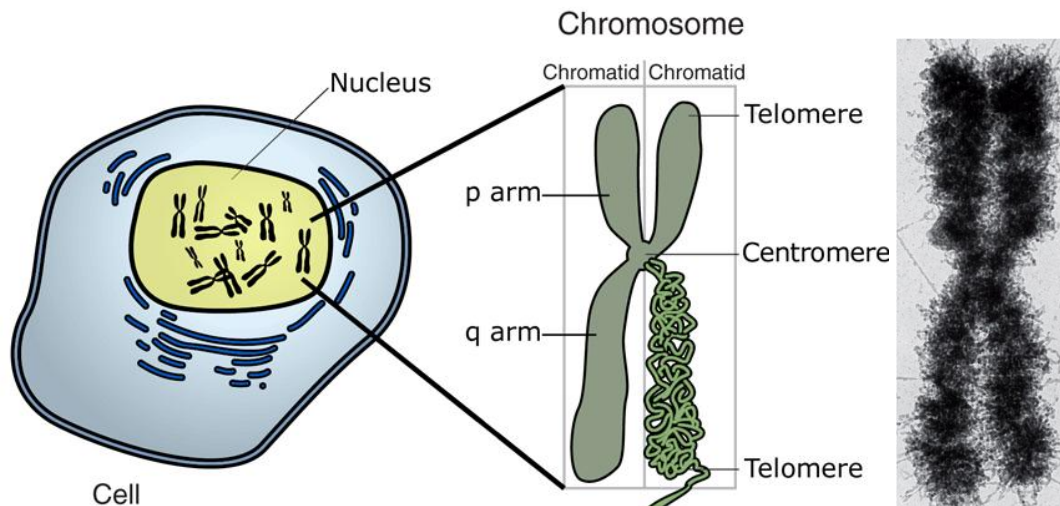


Figur 88. Et gen.

- Virus er infiserende parasitter som bruker ressursene til bæreren for å utføre det de ønsker. De består ofte bare av et lite gen, omgitt av en proteinkappe. HIV-viruset er 9000 nukleotider langt, og består av et enkelt RNA.
- Bakterien E. coli har 4639675 basepar, i et enkelt, sirkulært, dobbeltråds DNAmolekyl.
- Enkelte bakterier har små, sirkulære DNA i cytosolen, **plasmids**.
- Plasmids har ofte ikke noe bidrag til bæreren(bakterien), mens i andre tilfeller har plasmidene gener for å gjøre bakterien motstandsdyktig mot antibakteriemidler, som penicillin.
- DNA i et menneskets genom består av 22 kromosomer, pluss X og Y eller to X kromosomer. Den totale lengden er ca en meter, strukket ut.
- En **somatisk celle** har to kromosomsett, dvs 46. Alle menneskeceller bortsett fra kjønncellene er somatiske.
- Dette betyr at det er 2m DNA i hver av de 10^{14} cellene i et voksent menneske. $\rightarrow 2 \cdot 10^{14}$ m DNA i mennesket, og $1,5 \cdot 10^{11}$ m til sola.
- MitokondrieDNA, mtDNA, er mye mindre enn cellekjernechromosomene. Dette er 16569 basepar hos mennesker.



Figur 89. Bakterien E. coli.



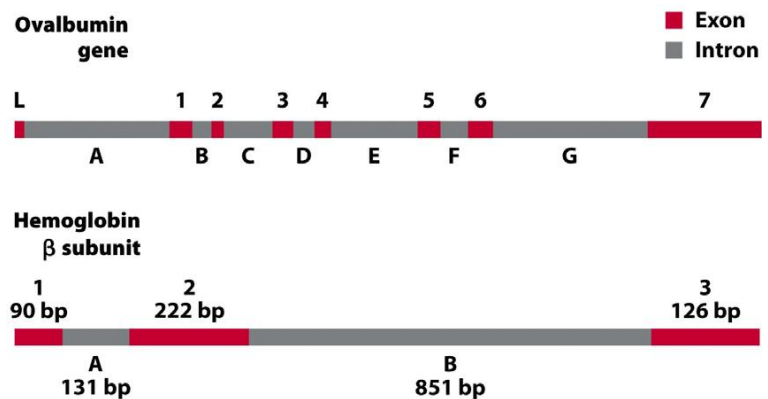
Figur 90. Menneskets kromosom.

- Bakterier har ofte bare et kromosom per celle, og hvert kromosom har bare en kopi av hvert gen.
- Organiseringen av menneskets gener er langt mer kompleks.

Menneskets gener

- Nukleotidsekvensen inneholder områder som ikke koder aminosyresekvens. Slike ikkeoversatte DNAsekvenser kalles *intervening sequences* eller *introns*.

- Det motsatte er *exons*, som bærer informasjon som blir oversatt til aminosyresekvens i polypeptid.



Figur 91. Introns og exons.

- Kun 1,5% av menneskets DNA er exons! Dette betyr at at mye av DNA i menneskets genom er noe annet.

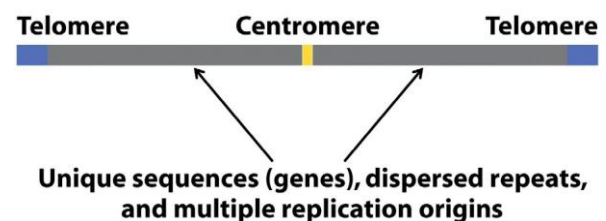
- Halvparten av menneskets genom består av delvis gjentakende sekvenser, som kan flytte seg fra et sted til et annet. De kalles *transposable elements*, *transposons*.

- Transposable elements koder normalt ikke aminosyrer, men har spilt en viktig rolle i evolusjonen.

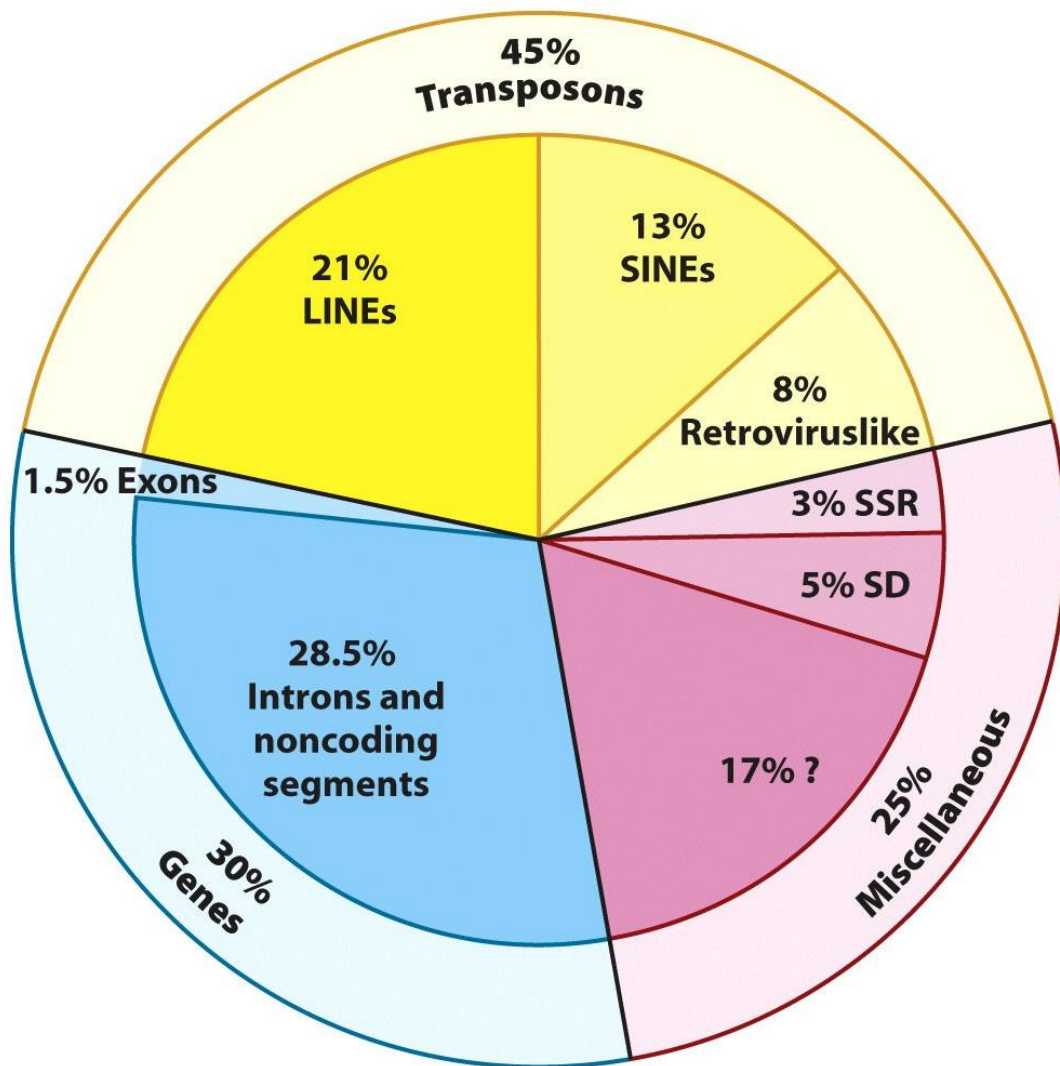
- 3% av genomet består av svært repeterende følge, *simple sequence repeats*, eller *simple sequence DNA*. De er normalt under 10 basepar, men repitert millioner av ganger.

- *Centromere* er en sekvens av DNA som er ankerpunkt for celledeling.

- *Telomere* er sekvenser i enden av kromosomet, som stabiliserer kromosomet.



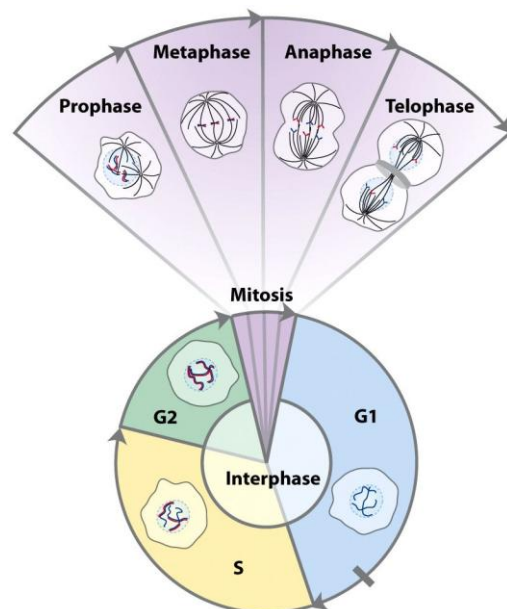
Figur 92. Figur som viser centromere og telomere.



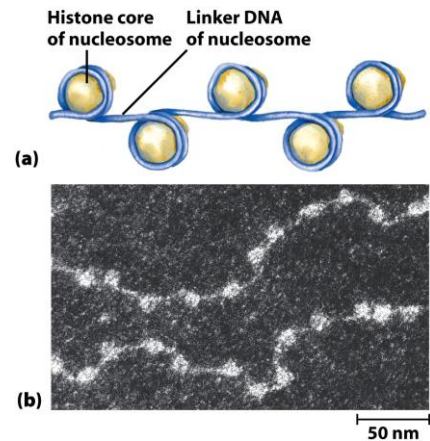
Figur 93. Fordelingen av menneskets genom. Merk at kun 1,5% er nyttige exons, men at gener totalt utgjør 30%. Transposable elements er ikke gener, de bare er der.

Strukturen av kromosomer

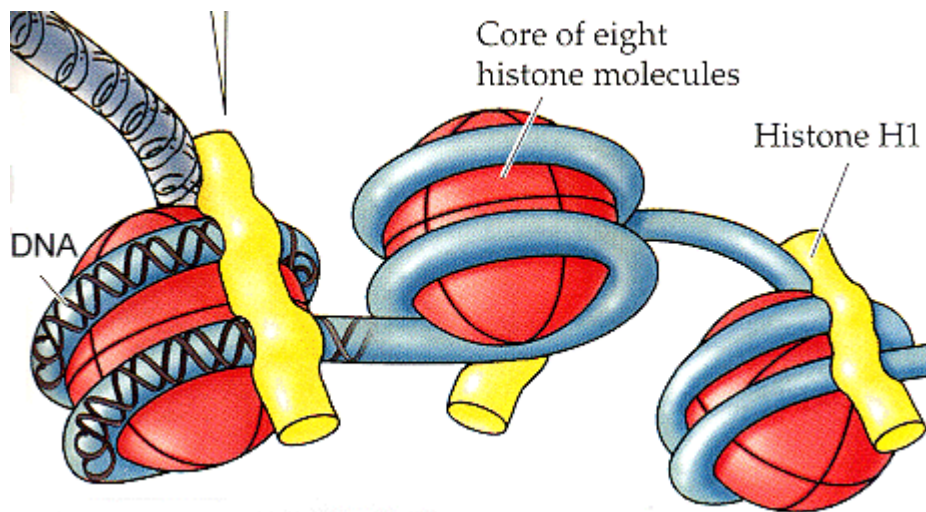
- **Eukaryotic cell cycle** er selve celledyklusen til eukaryotiske celler. Den er delt opp:
 - G1: Størst vekst av cellen. Proteiner, karbohydrater, og lipider syntetiseres.
 - S: syntese: fase av DNA-replikasjon.
 - G2: mer vekst før celledeling.
 - Mitosis: her foregår chromatide separasjon og celledeling.
- Celledyklusen endrer kromosomstrukturen dramatisk.



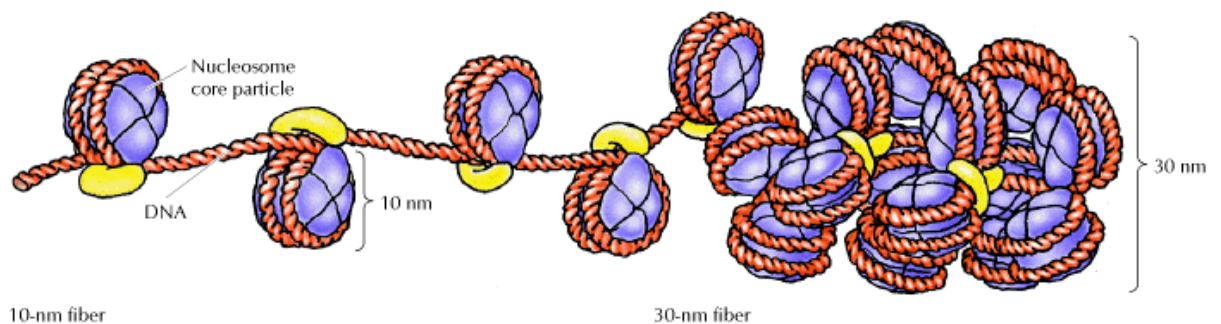
- **Chromatin** er det materialet kromosomer er bygget opp av. Dette består av fibre som inneholder protein og DNA i like mengder.
- DNA i chromatin er tett knyttet til proteiner kalt **histones**, som pakker DNA i strukturenheter kalt **nucleosomes**.
- Nucleosomes pakkes sammen i strukturer, og danner til slutt kromosomer vi kan se med lysmikroskop. Nucleosomer er klumpen vi ser på snora.
- Histoner er små basic proteiner, og inneholder mye Lys og Arg. Histoner kommer i 5 hovedklasser.
- Histonekjernen består av H2A, H2B, H3 og H4, to av hver.
- DNAtården, ca 150basepar binder seg tett rundt histonekjernen.
- Histonekjernen bindes til DNAtården med H1.
- Alle histoner kan påvirkes av enzymer til å endre ladning, form, struktur med mer. Dette spiller en rolle i transkripsjon.
- Histonekjerner binder seg ikke randomly til DNA, de fester seg helst på visse områder. Et område med litt flere A=T basepar gir DNA helixen et knekk, som hjelper å kompensere for bøyen i rundt histonekjernen.



Figur 94. Chromatin, som eukaryotiske kromosomer bygges av, består av histones, som sammen med DNA ukovalent danner nucleosomes. Nucleosomes i chromatin er bundet sammen av linker-DNA.

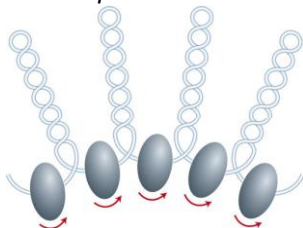


Figur 95. Histonekjerner og linker-DNA som danner nucleosomer.

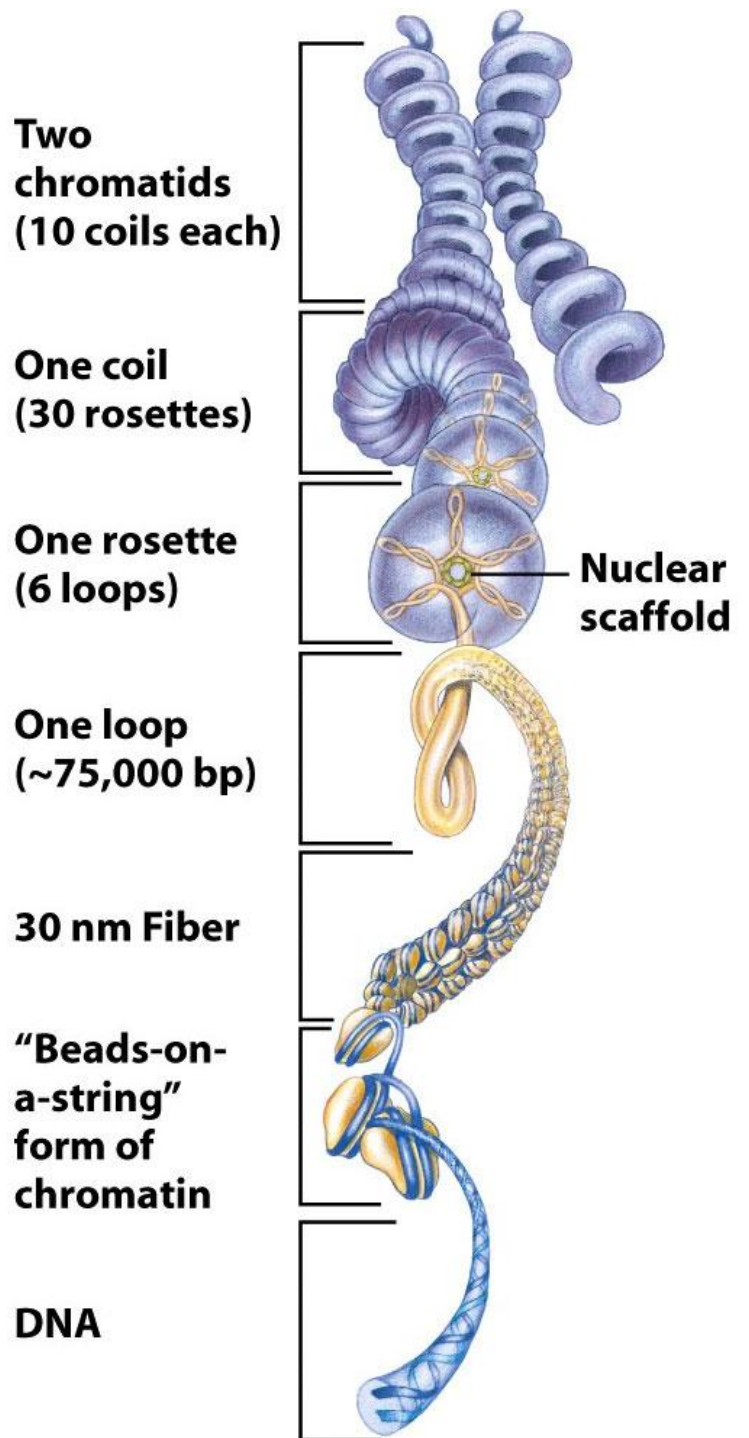


Figur 96. Nucleosomes, linker-DNA, og 30nm fiber.

- Nucleosomer blir organisert i **30 nm fibere**. Dette gjelder ikke over hele kromosomet, men finnes en del steder.
- Oppsamlingen i 30 nm fibere forkorter DNA-lengden med 100ganger, men det er fortsatt langt igjen til 10000ganger som en ser i kromosomer.
- Videre folding er ikke helt forstått, men det er normalt med oppsamling rundt **scaffolds**.
- Scaffolds er satt sammen av proteiner, H1 og topoisomerase II. Topoisomerase II opprettholder strukturen ved celledeling, og er et normalt punkt for inhibitering ved cellegift.
- I tillegg finnes ytterligere former for folding. Ingen enkel modell holder her, men generelt dannes krøll på krøll på krøll.
- I tillegg til histoner og topoisomeraser er **SMC proteiner**, (structural maintenance of chromosomes), viktige, og finnes i alle celler.
- Eukaryoter har to typer SMC:
 - **Cohesins**: Linker sammen chromatider etter celledeling.
 - **Condensins**: essensielle i kondenseringen av kromosomer før celledelingen.
- *Bakterie DNA pakkes i strukturer som blir kalt **nucleoid**.*
- *DNA festes her til membranen, og danner scaffold-aktige løkker.*
- *Disse løkkene er ikke festet, men i konstant bevegelse.*
- *Nucleoider har ingen likalstruktur tilsvarende kromosomer, og har ikke histone-proteiner.*



Figur 98. Nucleoid.



Figur 97. Folding av DNA. Heklinga til mor mister litt susen nå.

DNA metabolisme

- Nukleotidsekvensen i DNA koder RNA, proteiner og dermed enzymer. Dermed kan en naturlig si at overgangen fra DNA til RNA og proteiner danner form og egenskaper til alt som lever.
- **DNA metabolisme** beskriver kopiering av DNA (replication), og prosessene som reparerer og rekonstruerer DNA (siste ikke pensum)
- Feilkodet DNA gir skikkelig fuckups, ettersom de ikke bare er permanente, men også er arvbare. Derfor er DNA er det eneste makromolekylet som har reparasjonssystemer.
- Celler kan stokke om i deres genetiske informasjon, i en prosess som kalles recombination. Informasjonen er ivaretatt, og dette spiller en konstruktiv rolle i DNA kopiering, DNA reparasjon og kromosomdeling.

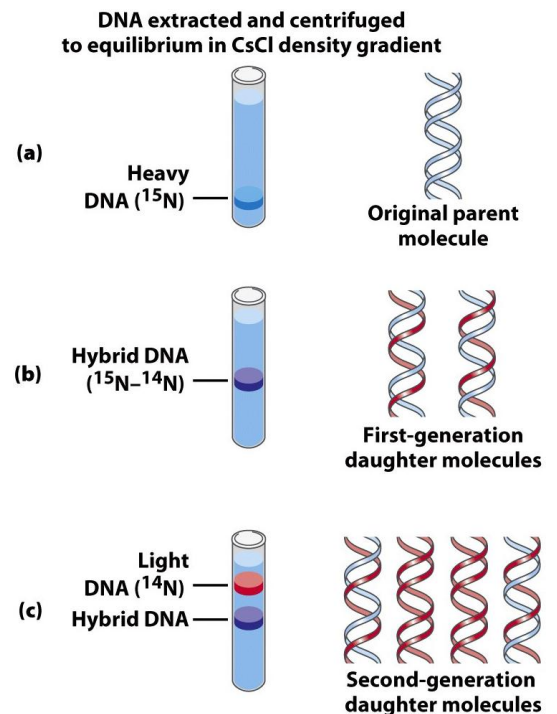
DNA replication

- Helt basic for DNA replikasjon er at en string er komplement til den andre.
- Fundamentale prosesser i DNA replikasjon er tilsvarende for alle arter.

Under kommer fundamentale regler for replikasjon:

DNA Replication is semiconservative

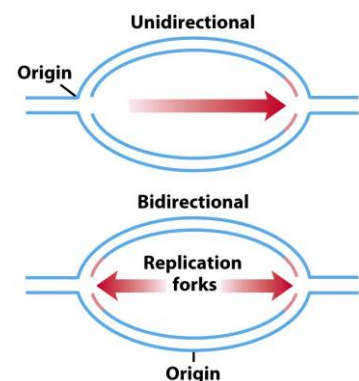
- Begge strengene i DNA står som mal for hver sin nye streng, dette danner to nye DNAmolekyler, med en gammel og en ny streng.
- Dette er vist i Meselson-Stahl eksperimentet. Dette gikk ut på å la å dyrke DNA med kun N^{15} isotopen tilstede. Dette gjorde cellene 1% tyngre, og de kunne skilles ved tetthetsgradient. Se figur 1.
- I steg to dannes nye DNA med N^{14} isotop. I tredje steg er fortsatt N^{15} strengene ivaretatt.



Figur 99. Meselson-Stahl eksperimentet. Det første DNA'et er bundet med nitrogen 15 isotop. Dette er eksempel på semiconservative replication.

Replication begins at Origin and Usually Proceeds Bidirectionally

- Replikasjon er en svært koordinert prosess, hvor en molekyl er unwound og kopiert.
- Kopiering av DNA begynner i **Origin**, og kopieres videre derifra. Selve kopieringen skjer ved dynamiske punkter, **replication forks**.
- Begge strengene er kopiert samtidig. I de fleste celler kopieres det **bidirectionally**, dvs begge ender av loopen har replication forks. For sirkulære DNAmolekyl møtes replication forks på

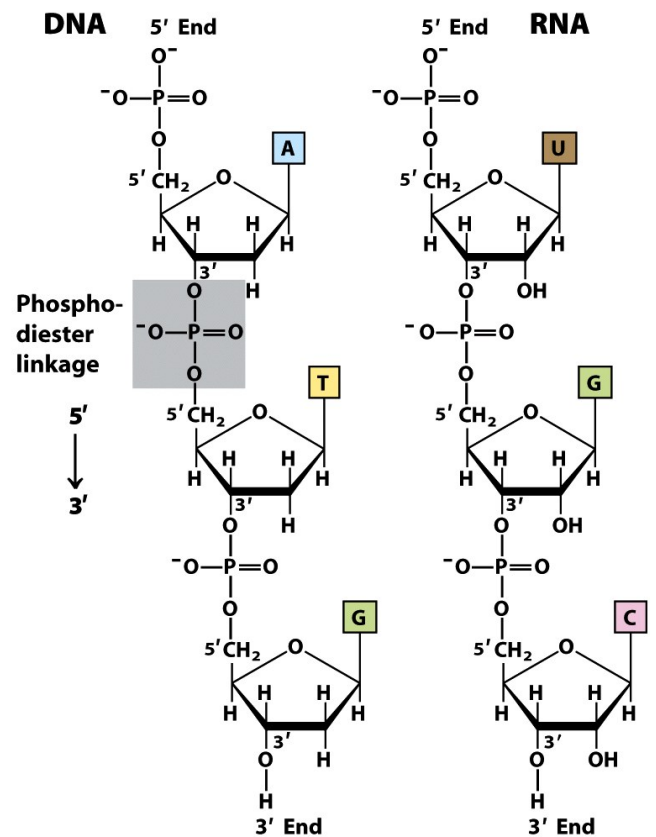


Figur 100. Replication forks.

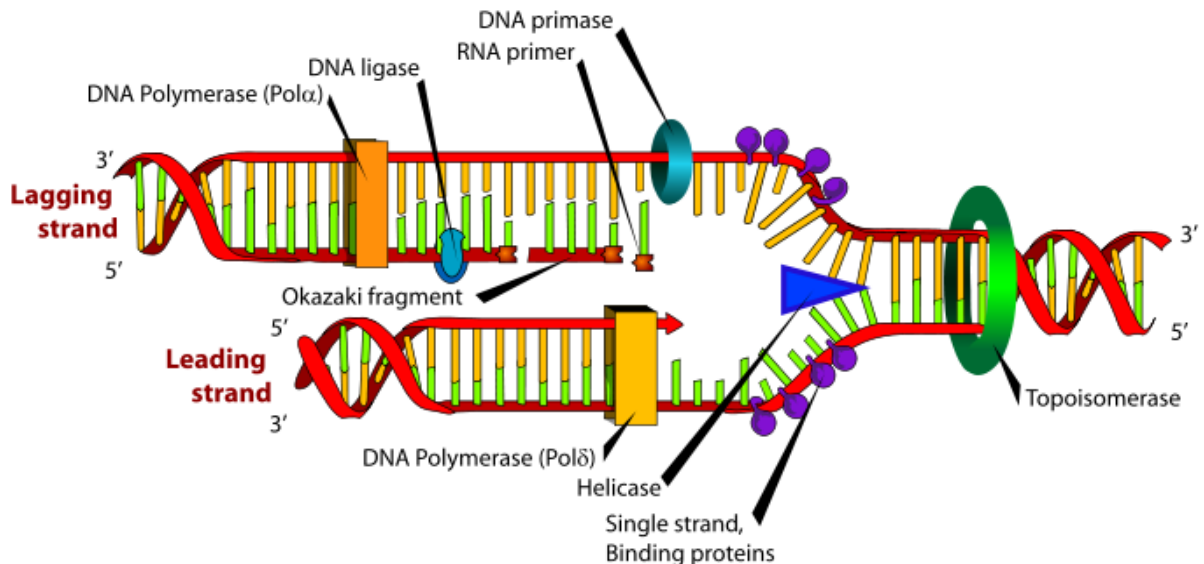
motsatt side av origin.

DNA syntese går 5'→3' vei og er semidiskontinuerlig

- En DNAstreng blir alltid syntetisert i 5' til 3' retningen. Se figur 3.
- Ettersom strengene er antiparallelle, hvordan kan de da kopieres 5' til 3' begge to? Hvis kopieringen var kontinuerlig ville en replication fork gjort 3' → 5' syntese.
- Reiji Okazaki fant ut at den ene måtte foregå diskontinuerlig, i stykker kalt **Okazaki fragments**.
- Den kontinuerlige biten, 5' → 3' kalles **leading strand**. Der går replication fork og syntesen samme vei.
- Den diskontinuerlige biten kalles **lagging strand**.
- En **okazaki strand** er fra noen hundre til noen tusen nukleotider lang.



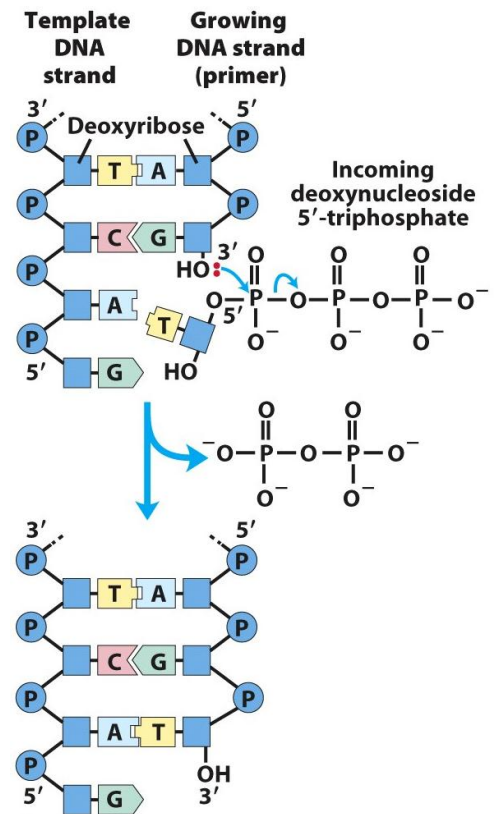
Figur 101. Nukleoinsyre. Merk 5' ende.



Figur 102. Replication fork. Legg merke til Okazaki fragments på lagging strand.

- Nucleaser eller DNaser, er enzymer som bryter ned DNA. De deles inn i to klasser;
 - Exonucleaser som bryter ned fra den ene enden til den andre.
 - Endonucleaser som kan begynne å bryte ned hvor som helst.
- Enzymer som syntetiserer DNA heter **DNA polymerase**.
- Det stilles to helt sentrale krav til DNA polymerase:

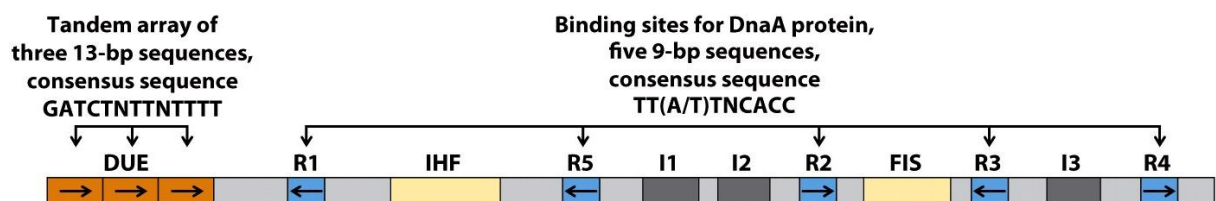
- DNA polymerase trenger en mal. Polymeriseringsreaksjonen er styrt av at baseparet på malen, og komplementærbasen dannes.
- DNA polymerase trenger en **primer**. En primer er en del av en streng, med en ledig 3' ende. Den ledige 3' enden kalles **primer terminus**. Dette betyr at DNA isomerase ikke kan starte fra scratch.
- Etter at DNA polymerase har lagt til et nukleotid på en voksende DNA streng kan den enten legge til en til (og en til osv,) eller droppe av. Jo flere samme legger til, jo raskere går det.
- I E.coli gjøres det feil for hver 10^{10} nukleotid som festes. Dette skyldes delvis at base-parene kun passer sammen A=T og C=G grunnet hydrogenbindinger og geometri.
- I tillegg har DNA polymerase I en 3' → 5' exonuclease aktivitet som dobbeltsjekker om det er gjort riktig. Dersom det er mismatch, inhiberes DNA syntetiseringen til feilen er rettet. Dette kalles **proofreading**.
- Polymerisering og proofreading har to forskjellige active sites innen samme polypeptid.
- DNA polymerase er ikke nok til å kopiere DNA, det trengs over 20 enzymer og proteiner, som gjør hver sin jobb. Sammen kalles komplekset **DNA replicase system** eller **replisome**.
- **Helicases** separerer de to strengene i DNA, og bruker ATP i prosessen.
- Separasjonen skaper topologisk stress (tvist)i strengene, noe som forhindres av **topoisomerases**.
- De separerte strengene er stabilisert av **DNA binding proteins**.
- **Primaser** er enzymer som syntetiserer korte segmenter av RNA, som fungerer som primer for DNA syntase.
- **DNA ligases** fjerner knekken i lagging part av DNA.
- Syntese av DNA foregår i tre steg: **initiation**, **enlongation** og **termination**. De har alle egne reaksjoner og enzymer. Alt under gjelder E.coli, men kan oversettes til Eukaryoter.



Figur 103. Addisjon av nukleotid.

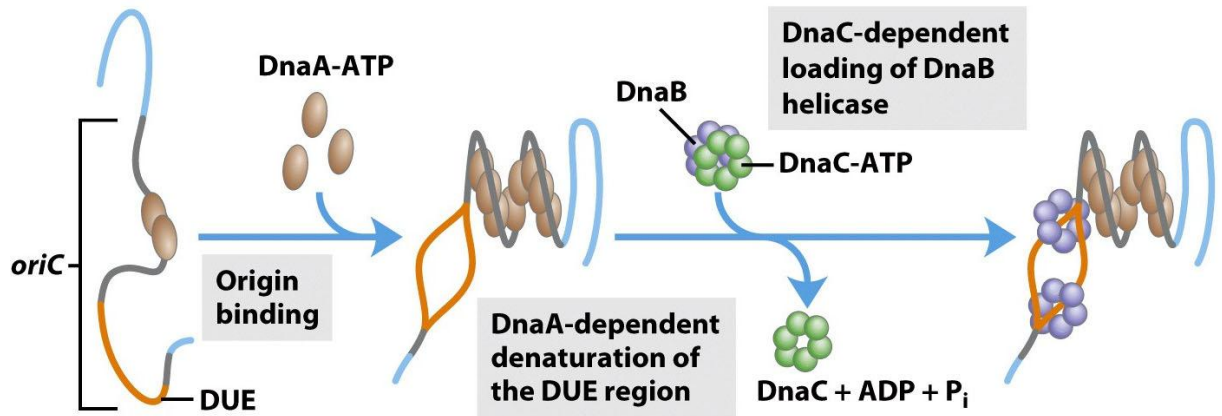
Initiation

- **R sites** og **I sites** er bindingsområder for DnaA. **DnaA** er et nøkkelprotein i initiaion.
- **DUE, DNA unwinding element** er et område med A=T bindinger, hvor DNA denatureres ved binding til DnaA protein.



Figur 104. Områder hvor DnaA binder seg er I og R.

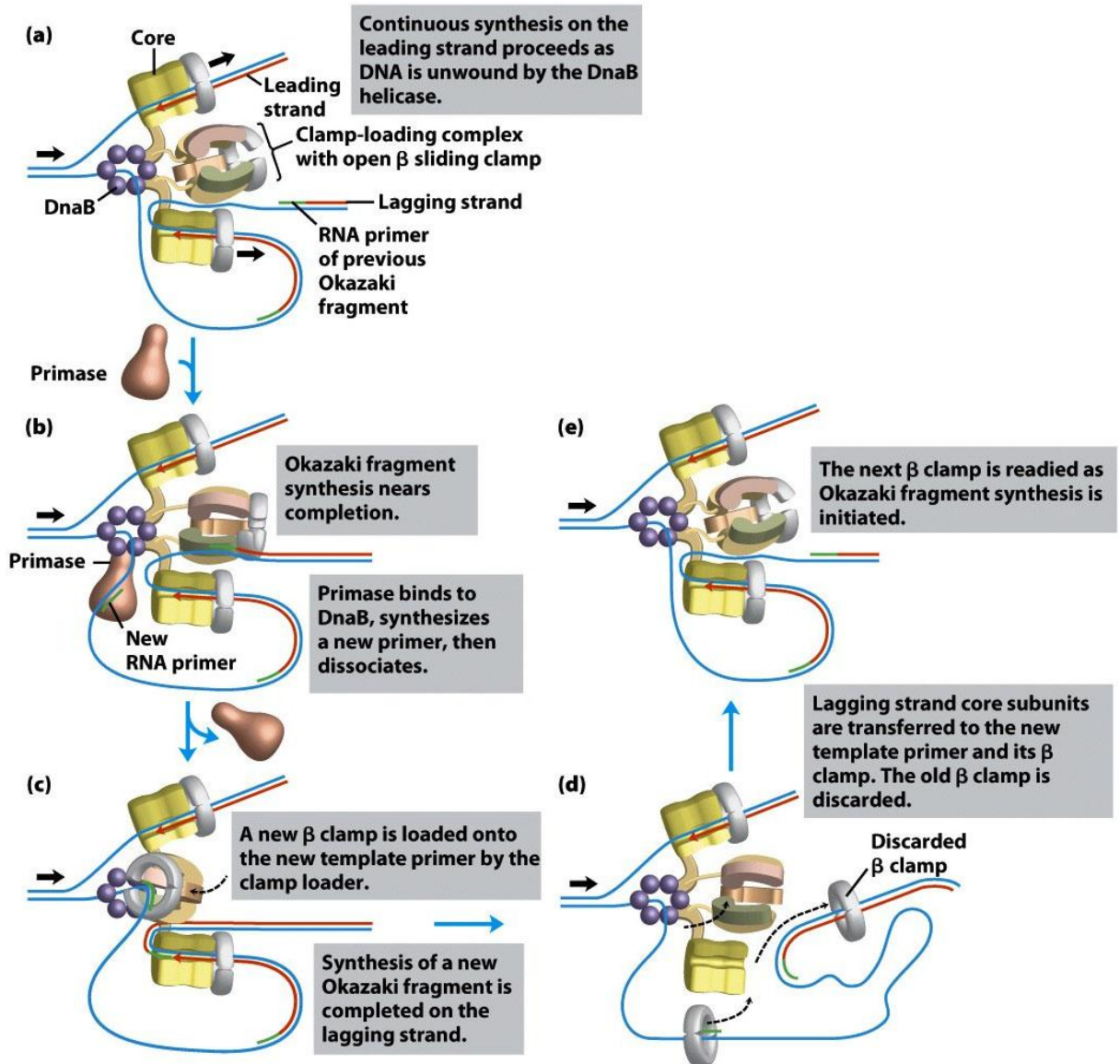
- oriC er omtådet på E.coli hvor DNA kopieres.
- DnaA binder ATP. Deretter binder åtte DnaA-ATP molekyler seg på oriC, ved R og I sites.
- Formasjon av DnaA-ATP-DNA kompleks fører til separasjon ved DUE.
- DnaC protein fester *DnaB* på DNA i det denaturerte området. DnaC bruker ATP, DnaB er ringformet. Deretter forsvinner DnaC, og DnaB begynner å unwinde DNA strengen i det den farer nedover i 5'→3' retning.
- Det lastes et DnaB på hver streng, og disse farer derfor hver sin retning. Dette danner to replication forks som går hver sin vei.



Figur 105. Initiation av DNA replikasjon.

Elongation

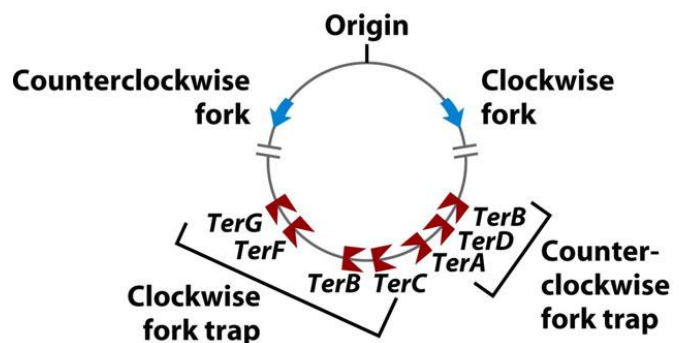
- Består av to prosesser som er ganske like. *Leading strand synthesis* og *lagging strand synthesis*.
- Leading strand synthesis begynner med syntese av primase(DnaG), som danner en kort RNA primer.
- Deoxyribonucleotides festes til denne primeren av DNA polymerase III kompleks.
- Leading strand synthesis fortsetter kontinuerlig, og holder følge med unwinninga av DNA ved replication fork.
- Lagging stand synthesis foregår i Okazaki fragments. Som i leading strand syntese dannes en RNA primer av primase, DNA polymerase binder seg til primeren og legger til deoxyribonucleotider.
- Dette virker enkelt, men er egentlig kompleks. Dette er fordi begge strengene lages av et enkelt DNA polymerase III. For å få til dette må lagging strand loops, se figur 8.
- DnaB helicase er bundet til fronten av DNA polymerase III, og unwinds DNA ved replication fork, mens den beveger seg i 5'→3' retning.
- Replisome(hele syntesekomplekset) jobber raskt, 1000 nukleotider legges til på begge strengene i sekundet.



Figur 106. DNA elongation.

Termination

- Terminus region av DNA, inneholder mange sekvenser kalt Ter.
- Ter sekvensen binder seg med proteinet Tus, og sammen stopper Tus-Ter komplekset en replication fork. Når replication fork nr 2 kommer fra andre veien stopper den når den kommer hit den også.

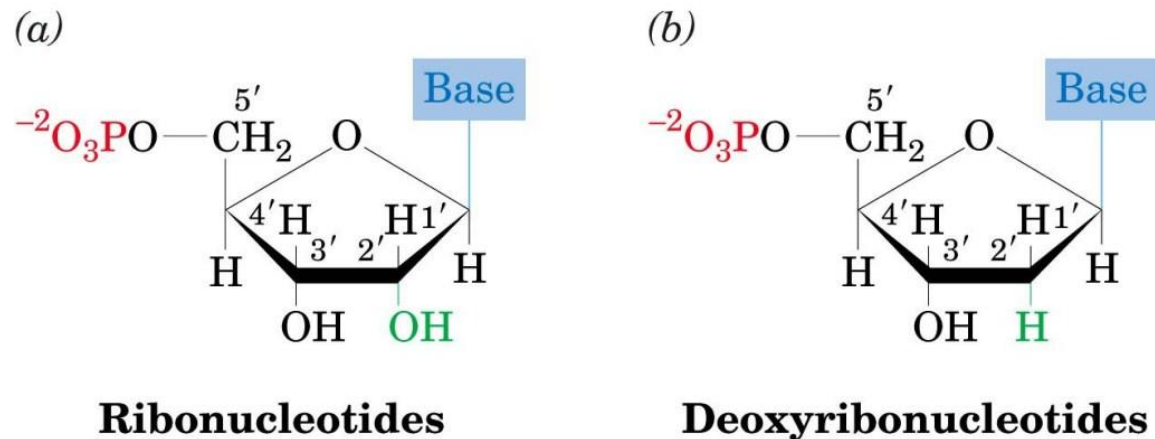


Figur 107. Termination. Tus-Ter trap.

For eukaryoter er prosessen emr kompleks enn for E.coli. Dette er bla grunnet cellesyklusen, men mange av prinsippene er de samme.
Eukaryoter har flere origins, ettersom syntetiseringen egentlig er langt tregere.

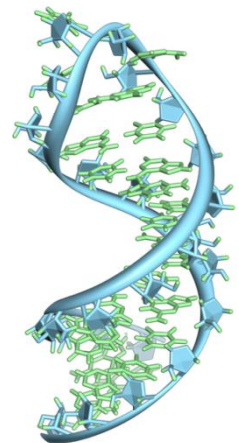
RNA metabolisme

- RNA sammenliknet med DNA har en hydroxylgruppe ved 2' posisjonen, og uracil fremfor thymine. RNA jobber også som single strengene. Disse single strengene folder tilbake på seg selv, og danner er langt mer kompakt form.



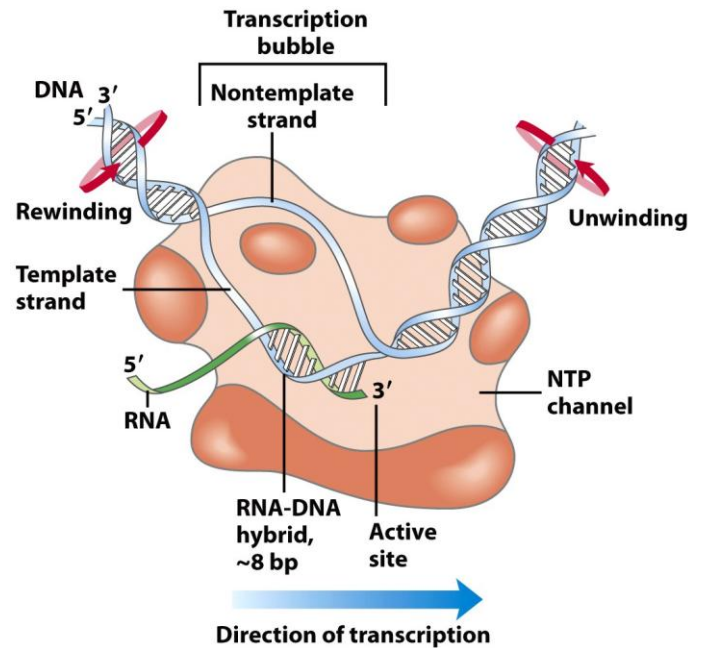
Figur 108. RNA vs. DNA.

- RNA har en rolle ved både lagring og overføring av informasjon, og i katalyse.
- Katalytiske RNA kalles *ribosomer*, sammen med proteinkomplekser.
- All RNA dannes fra informasjon lagret i DNA.
- **Transkripsjon:** prosessen hvor et enzymesystem overfører informasjon fra DNA til RNA, med en basesekvens komplementær til én av strengene i DNA.
- Tre hovedtyper av RNA. Les om nukleotider og nukleinsyrer.
- I tillegg finnes en rekke spesialiserte RNA. De er ikke minst like viktige som hovedtypene, og ikke undergrupper.
- Kopiering av DNA skjer over hele fjøla, transkripsjon av RNA er en selektiv prosess, og tar bare en eller noen gener.
- Syntese av DNA og RNA foregår i samme retning, og begge bruker en mal. Transkripsjon har også initiation, elongation og termination.
- Forskjeller er at transkripsjon ikke trenger en primer, og kopierer normalt bare deler av DNAet.
- **DNA-dependent RNA polymerase**, forlenger RNA-strengen ved å legge til nukleotider i 3'-hydroksyl-enden. Dette gjør at RNA bygges 5'→3', slik som DNA.
- DNA strengen som kopieres ligger da i 3'→5' retning, antiparallell til RNA. Nukleotider på RNA-strengen velges etter Watson-Crick reglene (A=U), (C=G).
- I kontrast til DNA polymerase trenger ikke RNA polymerase en primer. Initiation starter når RNA binder seg til visse sekvenser på DNA, kalt promotors.
- DNA åpnes som en boble der transkripsjon, hvor ca 17basepar er unwound. Inni her dannes en DNA-RNA-dobbel-helix i ca 8 basepar, før RNA flettes av.
- Transkripsjon foregår i 50-90 nukleotider/sekund i E.coli.

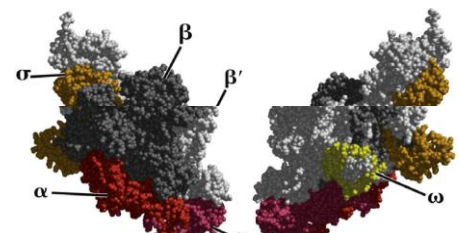


Figur 109. Et fint og fargerikt bilde av en Hairpin loop fra mRNA.

- Topological problemer løses av topoisomeraser.
- Etter konvensjon er DNA-strengen som kopieres **template strand**, og DNA-strengen som ikke kopieres **coding strand**. (RNA blir lik coding strand med U fremfor T). Pr. def er reguleringssekvensene som styrer transkripsjon coding strand.
- DNA-dependent RNA polymerase i E.coli er et stort kompleks med fem kjerneenheter 2 α , β , β' og ω . ($\alpha_2\beta\beta'\omega$)
- Med en siste subenhet σ har vi **RNA polymerase holoenzyme**. Ettersom ω kan være forskjellig finnes mange RNA polymerase holoenzymer.
- RNA har ikke proofreading slik som DNA polymerase, så det gjøres mer feil ($1/10^5$ er feil). Dette gjør ikke så mye ettersom RNA brytes ned, og dannes på nytt.



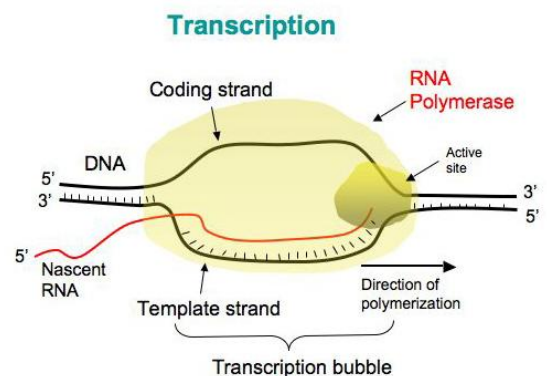
Figur 110. Transkripsjon.



Figur 111. RNA polymerase II holoenzyme.

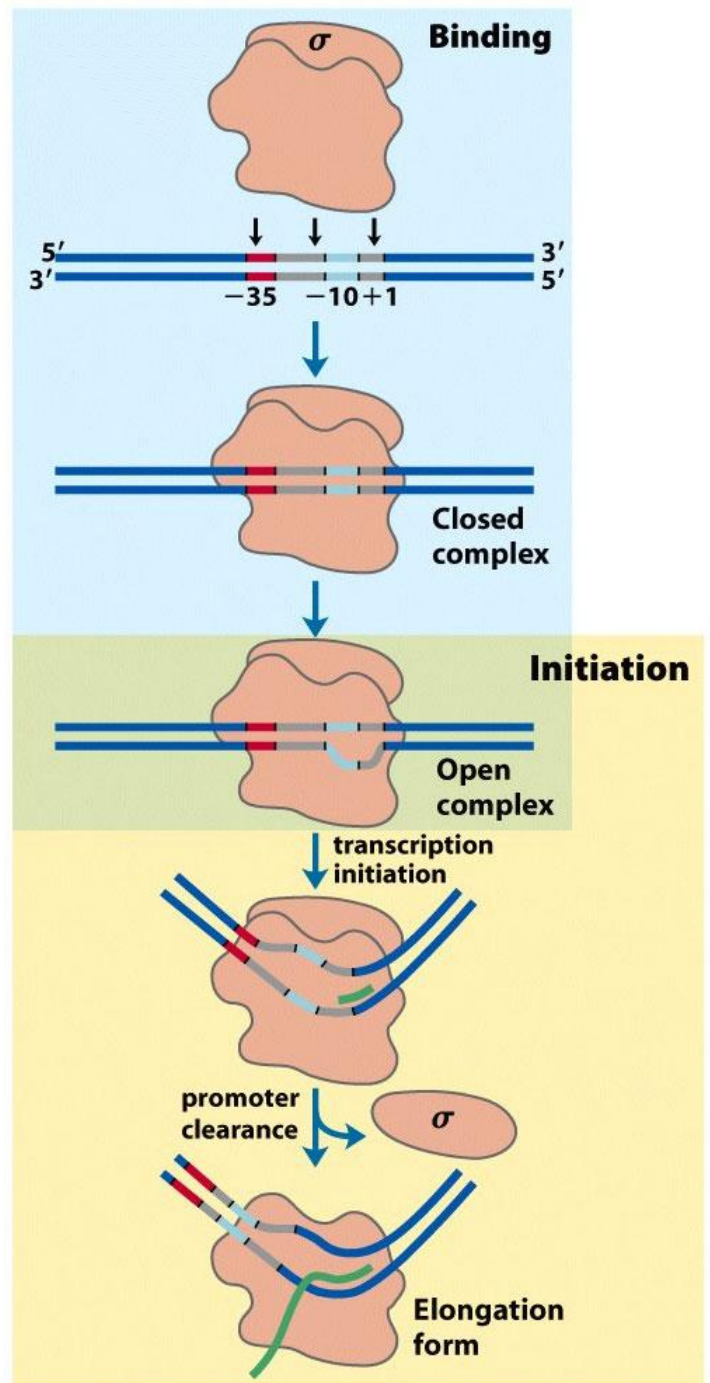
- Syntetiseringen av RNA begynner ved spesifikke sekvenser i DNA, kalt **promoters**. Dette styrer transkripsjonen direkte av forskjellige gener.
- I E.coli strekker dette området RNA polymerase bindes til fra 70basepar før transkripsjonsstart til 30 etter. Ved konvensjon skrives dette -70 og +30.
- Ved -10 og -35 er det **viktige** reaksjonsområder for σ^{70} , som styrer RNA polymerase på plass.
- Et tredje område som lokaliserer startområde er UP, mellom -40 og -60.
- Disse rekke kan variere noe i forskjellige bakteriepromoters, men nukleotider som er felles for hver posisjon kalles **consensus sequence**. Eks er consensus sequence for -10 (5')TATAAT(3'), og -35 (5')TTGACA(3').
- Kun en endring på et basepar i en consensus sequence vil endre syntetiseringsraten flere ordner.

- Først: RNA polymerase binder seg til promoteren, styrt av σ . Dette danner et lukket kompleks hvor DNA er intakt, og et åpent kompleks hvor DNA er unwound (rundt -10).
- Deretter starter transkripsjonen inne i komplekset, og det omdannes til elongation form, etterfulgt av bevegelse av transkripsjonskomplekset vekk fra promoteren. σ faller av tilfeldig, mens polymerasen fortsetter i elongation phase av transkripsjon. Se figur 6.



Figur 112. Transkripsjon av RNA.

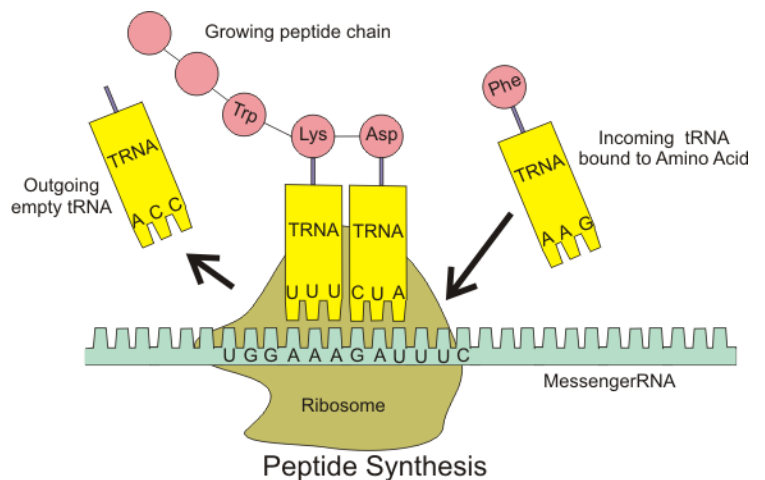
- **σ syklusen:** RNA polymerase binder seg til σ , og binder seg til promoter sequence. Deretter forsvinner σ , og erstattes av NusA. Når RNA polymerase når terminator sequence, frigjøres NusA og polymerasen. Polymerasen kan nå binde seg til en tilfeldig σ , som avgjør hvilken promoter den binder seg til neste gang.
- Behov for genprodukter varierer, og derfor er transkripsjon nøye regulert. Hoveddelen av reguleringen skjer ved binding og initiation av polymerase.
- **Repressors** er proteiner som blokkerer syntese av RNA ved spesifikke gener. Skikkelig kjipt å ha repressors på skjønnhetsgenet (for det er ét gen).
- Transkripsjon er første steget i den energikrevende og lange veien til proteinsyntese.
- Ved visse sekvenser i DNA pauser RNA syntese.
- I E.coli finnes to typer terminalsignaler:
 - **ρ :** Et protein som følger DNA strengen i 5'→3' retning. Når den møter et pauset transkripsjonskompleks, frigjør en dette.
 - **ρ -independent:** Et område som er selv-kompliment, slik at en hairpin dannes, deretter stopper syntesen.
- Transkripsjon i eukaryoteriske celler er langt mer komplekse enn for bakterier, og mye er ikke forstått. Inneholder RNA polymerase I, II og III.
 - RNA polymerase I: Syntetiserer pre-ribosomal RNA.
 - RNA polymerase II: Syntetiserer mRNA og noen spesial RNA
 - RNA polymerase III: Syntetiserer tRNA og noen mindre spesial RNA.



Figur 6. Promoter og initiation av transkripsjon.

RNA processing

- **Ribozymet:** Katalytiske RNA.
- **Ribosomet:** Produserer proteiner fra aminosyrer. Koden kommer fra mRNA.
- Nesten all RNA blir prosessert etter syntese, og dette er en interessant prosess. Ofte foregår prosesseringen ved ribozymet fremfor enzymer, the irony of it all.
- Ny-syntetisert RNA kalles **primary transcript**.

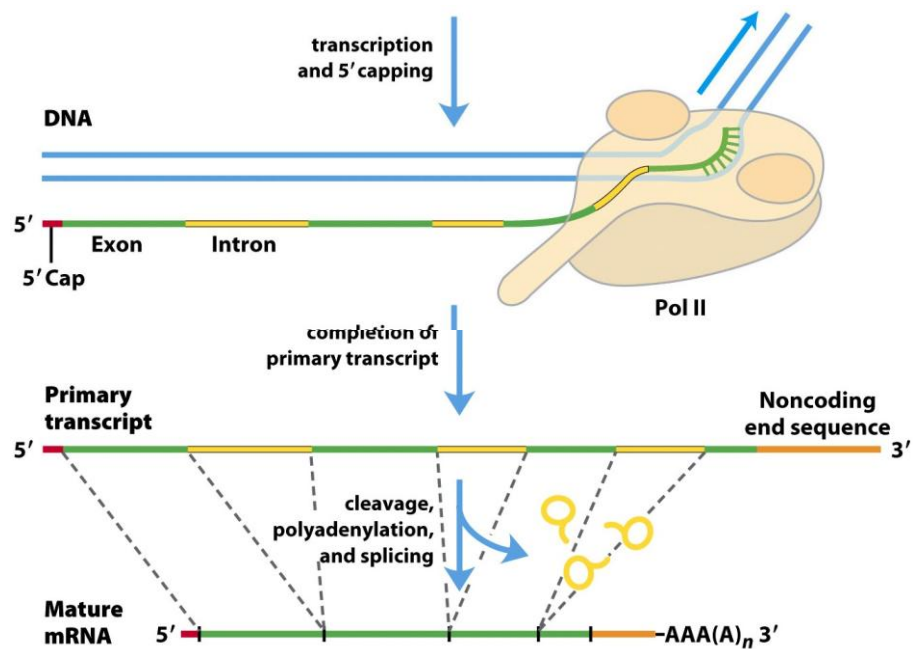


Figur 113. Proteinfabrikken.no ta deg en bolle. Dette er en ekte proteinfabrikk, og den ligger i ribosomene.

- For mRNA inneholder primary transcript både noncoding tracks (introns), og coding segments (exons).
- Introns inneholder jo ingen nyttig informasjon, og fjernes i en prosess kalt **splicing**. Dette danner en fullstendig rekke som kan syntetisere et funksjonelt polypeptid.
- Eukaryotisk mRNA blir også

behandlet i endene: Det får i **5' cap** i 5'-enden, og i 3'enden legges det til 80-250 A enheter. (Danner en **Poly(A)-tail**)

- En 5' cap består av metylguanose og beskytter mRNA fra ribonukleaser. Den hjelper også til med bindingen til ribosomene.



Figur 114. Splicing, 5' cap og A tail.

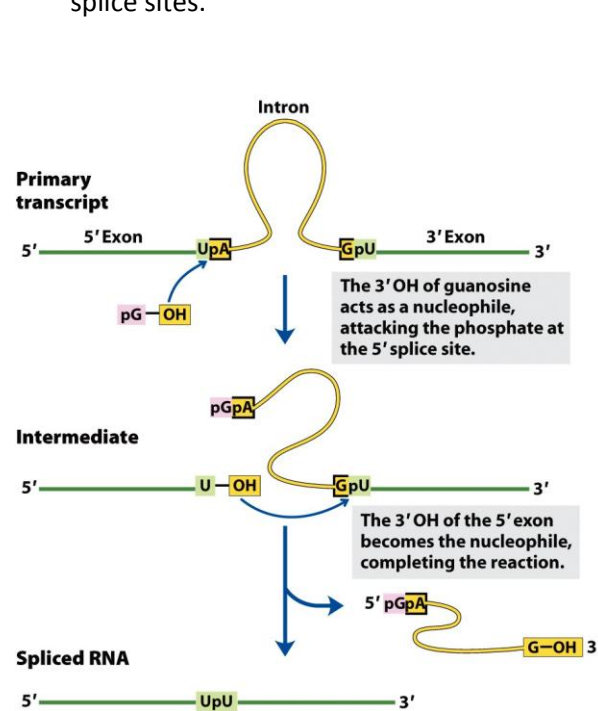
- Cleavage signal sequence (CSS), er punktet hvor RNAet "slutter". 20-30 enheter nedenfor dette cleavaes RNAet, og det syntetiseres på en Poly(A) tail.
- Poly(A) tail binder flere proteiner, og sammen forhindrer dette enzymdeleggelse av mRNA.
- tRNA blir prosessert ved å fjerne enheter i endene, og i noen tilfeller splicing.
- Til slutt blir all RNA kontrollert brutt ned.
- All DNA i et gen blir alltid kopiert, selv om store deler er introns. Splicing fikser dette. Exons er typisk mindre enn 1000 nukleotider lange, mens introns kan bli 20000 nukleotider lange.

Splicing av introns

- Det er fire klasser av introns

Group I og group II introns:

- **Self-splicing introns:** De trenger ikke noe protein enzym for å katalysere splicingen.
- Finnes i mRNA, tRNA og rRNA.
- Vanlig i mikroorganismer, alger og planter. Finnes også i noen bakterier.
- Trenger ikke ATP for å drive splicing.
- Disse er svært presise, og baserer seg på "splice sites."



Figur 116. Group I introns.

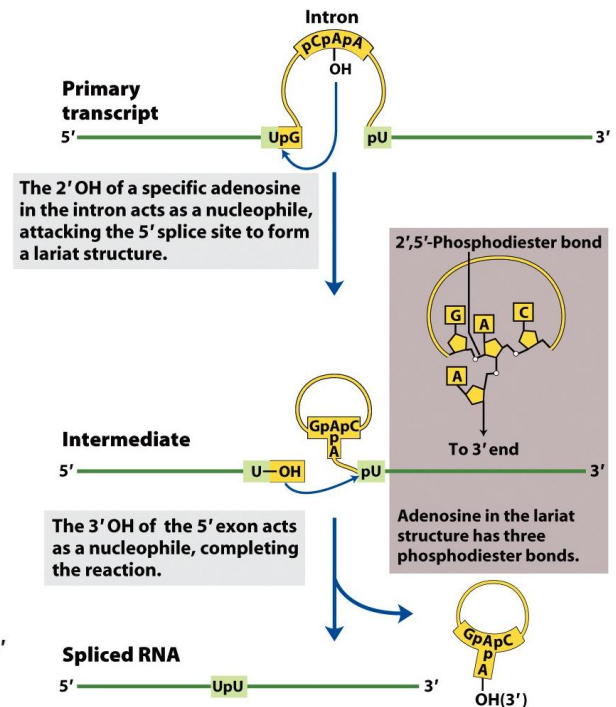
Se på figurene over hva som skjer i introns.

Spliceosomal introns

- Største klassen av introns, bla de i mRNA.
- Splicingen foregår inne i et stort proteinkompleks, **spliceosome**.
- Inne i spliceosomen skjer samme prosessen som med group II introns.
- Spliceosomal introns har normalt en dinucleotidesevens GU ved 5' enden, og AG ved 3' enden. Disse sekvenene markerer hvor det skal splices.
- Reaksjonen krever ikke ATP.

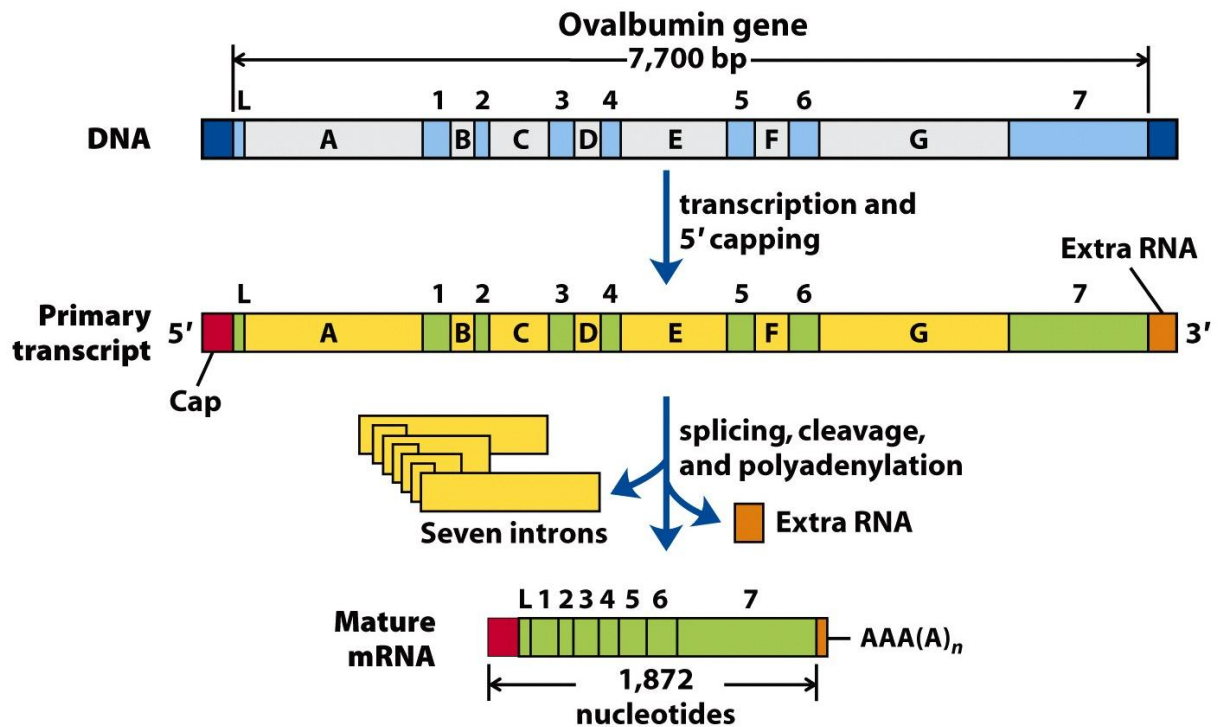
Fjerde intron gruppen

- Finnes i tRNA, og skiller seg fra de andre ved at den forbruker ATP og endonuclease.



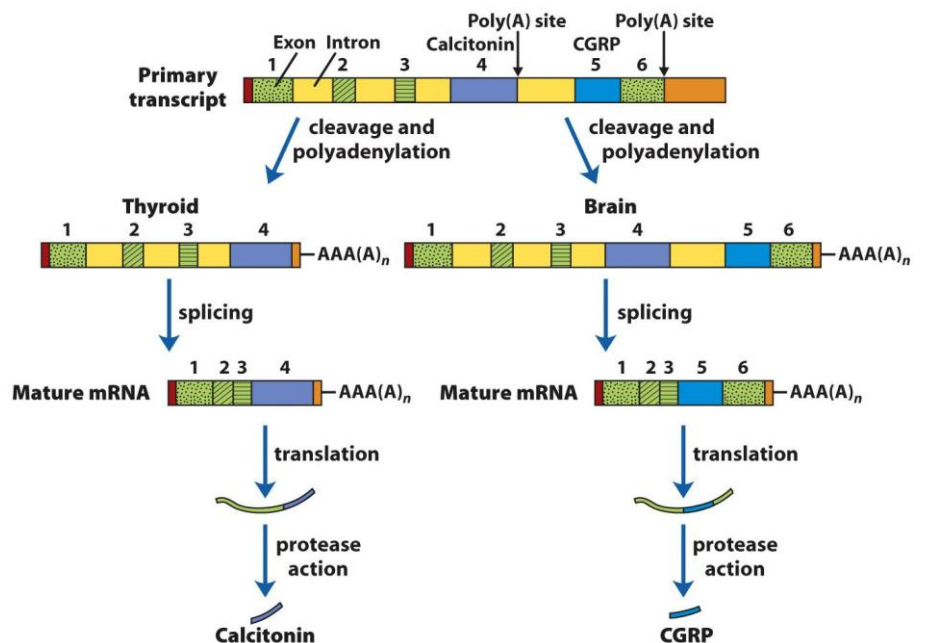
Figur 115. Group II introns.

- The "splicing endonuclease" cleaves phosphodiester bonds at both ends of the intron, and join them together in a reaction similar to the DNA ligase reaction.



Figur 117. Fullstendig oversikt over processing av eukaryotic RNA .

- Et paradoks i genetik er at det ikke er nok DNA, selv om en regner med alle introns som exons, til å matche en organismes kompleksitet.
- Dette løses ved at transkripsjonsprosessen også er svært kompleks, og kan lage flere forskjellige polypeptider ut at et mRNA. mRNA kan også prosesseres på forskjellige måter som gir forskjellig polypeptider.
- Et komplekst transkript (les mRNA) kan ha flere splicing områder, og/eller områder for cleavage og polyadennylation.
- Eks kan ett enkelt RNA transkript produsere to forskjellige hormoner, et kalsiumregulerende protein i rotteadamseplet, og et calcitonin-gene-relatert protein i rottehjernen. God stemning.



Figur 118. Flere proteiner fra samme gen. Thyroid er visstnok skoldbruskkjertelen på norsk, ligger under adamseplet, og regulerer kroppens stoffskifte.

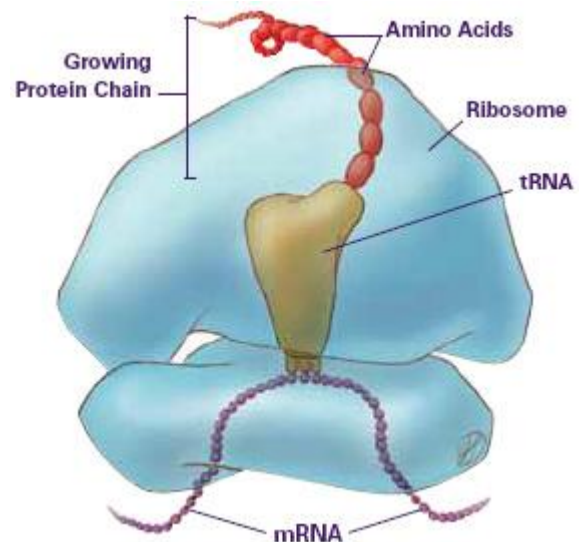
Protein metabolisme

Innledning

- Proteiner er slutten for de fleste informasjons-pathwayene.
- En typisk celle trenger tusener av proteiner til en hver tid. Dette må reguleres nøye, og syntetiseres ved behov.
- Proteinsyntesen er mest kompleks: over 300 makromolekyler med avansert 3D struktur samarbeider for å syntetisere et polypeptid.
- Denne komplekse prosessen foregår i **ribosomene**. FAIL hvis du lærte dette først nå.
- Proteinsyntese står for 90% av energiforbruket i en celle.
- Med 15000 ribosomer, 100000 molekyler i proteinsyntesen og 200000 tRNA i en typisk bakteriecelle står dette for 35% av tørr vekt.
- Proteiner syntetiseres i høy hastighet, i E.coli 100aminosyrer/5sek.
- Dette er nøye regulert, og beregnet å matche cellens behov. Targetting og nedbrytning må følge med syntesen.
- Proteiner er synteisert i et gigantisk RNA enzyme.

The genetic code

- Tre viktige oppdagelser:
 - Proteiner syntetiseres i ribosomene.
 - Aminosyrer blir "aktivert" av ATP i cytosolen, og bindes til tRNA, og danner **aminoacyl-tRNA**. Denne reaksjonen er katalysert av **aminoacyl-tRNA synthetases**.
 - tRNA "adapteren" oversetter nukleotidsekvensen i mRNA til aminosyresekvens i polypeptidet. Denne mRNA-styrte proteinsyntesen refereres til som **translation**.
- Tre og tre nukleotider danner et **codon**, hvor et codon koder en spesifikk aminosyre.
- Fire mulige nukleotider (purinene Adenine og Thymin, samt pyrimidiner Guanin, Cytosin), og tre av de gir $4^3 = 64$ mulige koder for aminosyrer.
- Translasjon foregår ved at disse codonene leses i en sammenhengende, ikkeoverlappende følge.
- Første codon i sekvensen etablerer **reading frame**, og etter den leses alle sammenhengende.



Figur 119. Ribosome med tRNA adapter, mRNA, osv.

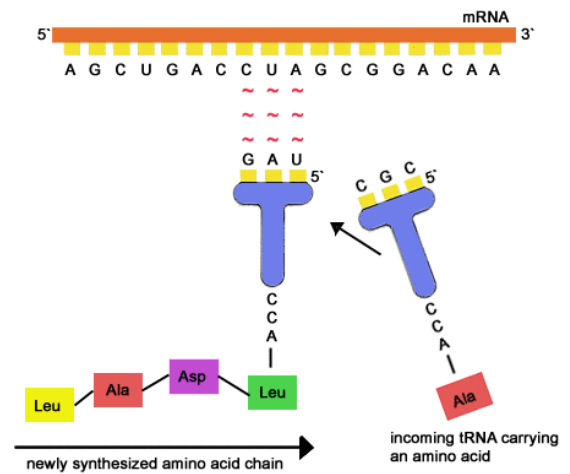
Reading frame 1 5' --- **UUC** | **UCG** | **GAC** | **CUG** | **GAG** | **AUU** | **CAC** | **AGU** --- 3'

Reading frame 2 --- **U** | **UCU** | **CGG** | **ACC** | **UGG** | **AGA** | **UUC** | **ACA** | **AGU** ---

Reading frame 3 --- **UU** | **CU** | **CG** | **GA** | **CCU** | **GG** | **AG** | **AU** | **UCA** | **CAG** | **U** ---

Figur 120. Reading frames.

- mRNA har muligheten for tre forskjellige reading frames, hvor kun én vil gi et protein. Proteinet vil også bli ubrukelig dersom et nukleotid hoppes over i translasjonen.
- Ved konvensjon skrives aminosyren spesifisert av tRNA slik: tRNA^{Ala}, eller tRNA^{Gly}.
- Mange forsøk gav etter hvert en spesifikk aminosyre for 61 av de 64 mulige codonene. De tre siste ble identifisert som **termination codons**, (UAA, UAG, UGA).
- Sekvensen AUG markerer starten av polypeptid, og kalles **initiation codon**.
- Random vil $3/64 = 1/20$ være termination codon. En reading frame med over 50 følgende codons som ikke er termination frame kalles **open reading frame**, og er ofte proteiner. Et typisk protein krever open frame med 500 codons +.
- Ethvert codon bestemmer spesifikk én aminosyre, men flere codoner kan beskrive den samme aminosyren.
- Den genetiske koden er universal, den er lik for mennesker, E.coli, virus osv. Dette tyder på at alle livsformer har en felles bestefar i evolusjonen.



Figur 121. tRNA med aminosyrer.

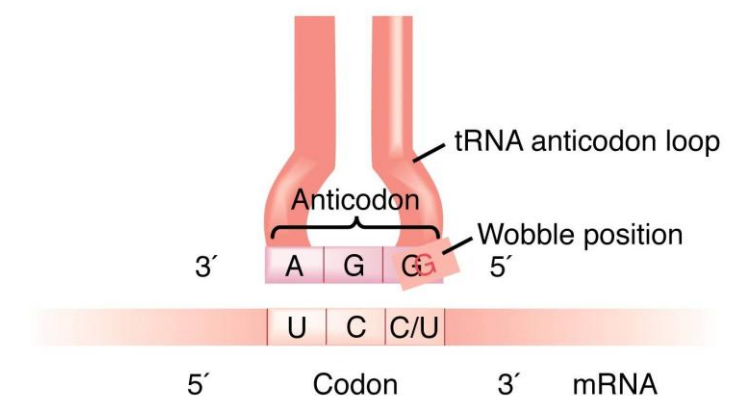
Wobble

- Flere forskjellige codoner spesifiserer én aminosyre, med forskjell i tredje baseposisjon, ved 3' enden. Eks er Alanine kodet av GCU, GCC, GCA, GCG.
- Transfer RNA base-parrer med mRNA codoner i en tre-base-sekvens kalt **anticodon**.
- Enkelte anticodoner inneholder **inosinate, I**, som binder seg løst til U, C og A. Dette er svakere bindinger enn hydrogenbindingene i Watson-Crick basepar. (G=C) osv.
- Dette førte til at to basepar er tett knyttet til hverandre, og et wobbles. Dette førte videre til **wobble hypothesis**:

- De første to baseparene fra mRNA danner sterke baseparbindinger. (Watson-Crick).
- Første basen på anticodon i 5'-3' retning parer med tredje base av codon, og bestemmer det bestemmes om tRNAet passer med codonet.
- Når aminosyrer er kodet av flere codons, så vil forskjell i en av de to første basene kreve ny tRNA.
- Minimum 32 tRNA trengs for å translate alle 61 codons.

- Siden den wobbelig tredje basen på codonet binder seg løst til korresponderende base på anticodonet, fører dette til hurtig

dissosiasjon av tRNA. Sterk Watson-Crick binding mellom alle tre baser



Figur 122. Pairing of the tRNA anticodon with the mRNA codon proceeds from the 5' end of the codon. Once the first two positions are paired, exact base pairing of the third position is less critical. The third (5') base of the anticodon can typically pair with either member of the purine or pyrimidine pair in the codon as appropriate: it "wobbles". In this example, the double-ringed G can pair with either a single-ringed U or C. This allows mRNA to be translated with fewer than the 64 tRNAs that would be required without wobble. Some wobble positions can pair with any of the four bases.

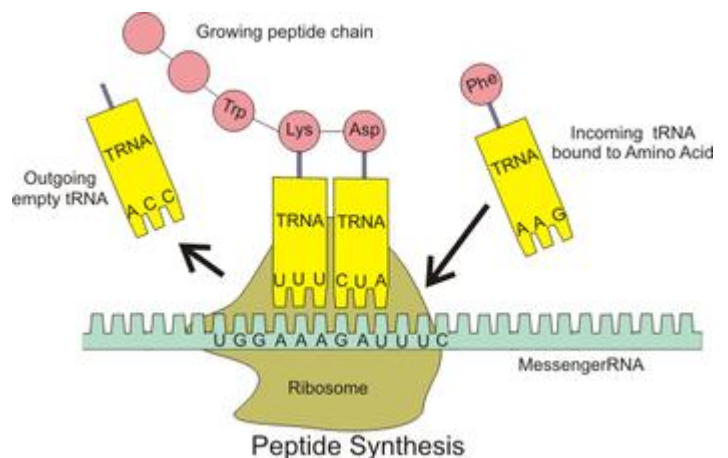
hadde bremset syntetiseringen kraftig. Det tillates uvanlig baseparing mellom tredje base på mRNA og første på tRNA, som U= G, I=A etc.

- En "hiccup" i lesingen av mRNA vil endre reading framen, og i visse tilfeller gi brukbart protein. Dette kalles *translational frameshifting*.
- Enkelte mRNA er endret før translasjon. Dette kalles *RNA editing*, og innebærer addition, deletion or alternation av nukleotider i RNAsekvensen.
- RNA editing foregår ved en spesiell klasse av RNA molekyler, *guide RNA*. Disse fungerer som templates for RNA editing.
- Det finnes flere konkrete eksempler på RNA editing.
- RNA editing ved alternering av nukleotider er mest vanlig, og innebærer deamination av adenosine eller cytidine enheter, og danner inosine I eller uradine U. A->I, C->U

Protein syntese

Innledning

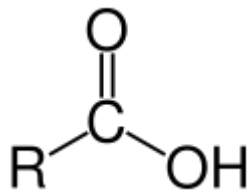
- Syntese av biomolekyler er delt inn i tre prosesser: initiation, elongation og termination. I tillegg skjer aktivering av komponenter før syntesen, og postsyntetisk prosessering (etterbehandling) av det ferdige polymeret.
- I proteinsyntese skjer det på akkurat samme måte, og spesielt steg 1 og steg 5 er viktig for et stabilt protein.
- Syntesen av proteiner foregår i fem steg, watch me:p



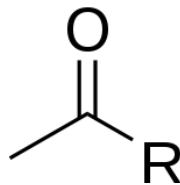
Figur 123. Kortversjonen av proteinsyntese. Svært feil på mange måter, men viser tegninga.

- **Steg 1, aktivering av aminosyrer:** For å syntetisere et polypeptid av aminosyrer må karboksylenden av aminosyren være aktivert for å danne en polypeptidbinding, og det må dannes en link mellom aminosyren og mRNA som koder den. Begge deler løses ved å binde aminosyren til tRNA. Dette skjer i cytosolen, ikke på ribosomen. Hvert av de 20 aminosyrene er bundet til et spesifikt tRNA. Dette bruker ATP, og Mg^{2+} -avhengige aktiveringsenzymer kjent som aminoacyl-tRNA synthases.
- **Steg 2, initiation:** mRNA med koden for proteinet binder seg til den minste ribosomdelen, og *initiating aminoacyl-tRNA*. Den store ribosomdelen fester seg på, og det dannes initiation kompleks. Initiating aminoacyl-tRNA binder seg til start codonet (AUG) på mRNA, og starten av polypeptid dannes. Prosessen krever GTP og *initiation factors* i cytosolen.

- **Steg 3, elongation:** Polypeptidet forlenges ved at flere aminosyrer kommer til, bundet til tRNA, som base-parer med mRNA. Elongation krever hjelp fra *elongation factors* i cytosolen, og krever hydrolyse av GTP.
- **Steg 4, termination og ribosome recycling:** Fullføring av polypeptidet skjer ved termination-codon i mRNA. Polypeptidet frigjøres, ved *release factors*, og ribosomet "recycles" for en ny runde syntese.
- **Steg 5, Folding og posttranslational processing:** Proteinene må foldes i 3D struktur for å bli aktivt. Før dette kan polypeptidet behandles av enzymer. Vanlig er: fjerning av aminosyrer, legge til acetyl, phosphoryl, methyl, carboxyl, eller andre grupper; cleavage, og/eller legge til oligosaccharider eller andre grupper.



Figur 124. Carboxyl.

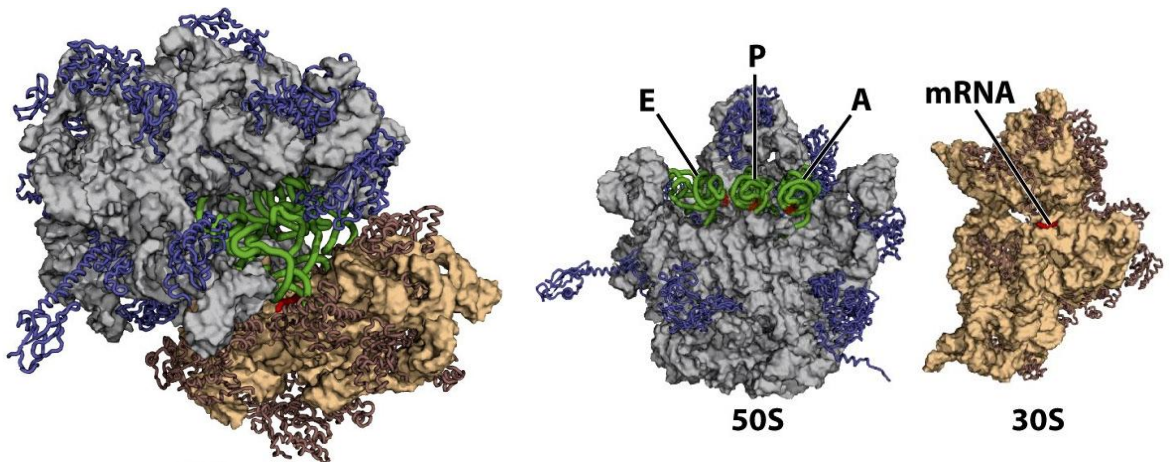


Figur 125. Acetyl.



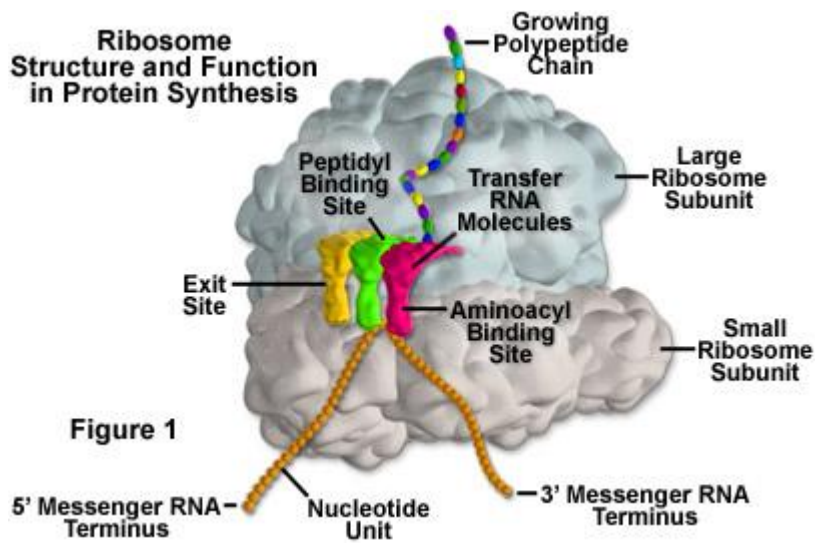
Figur 126. Methyl.

- I E.coli er det 15000 ribosomer i hver celle, og står for 1/3 av tørrvekt. Ca 65% er rRNA og 35% protein.
- Ribosomer består av to subunits, som er enorme RNA molekylar. Proteinene pynter bare på overflaten, og er IKKE i nærheten av active siten hvor polypeptid dannes. Derfor, ribosomer er ribozymmer! Subunitsene skilles ved deres *sedimentation* koeffisient (måles i S, svedberg.)

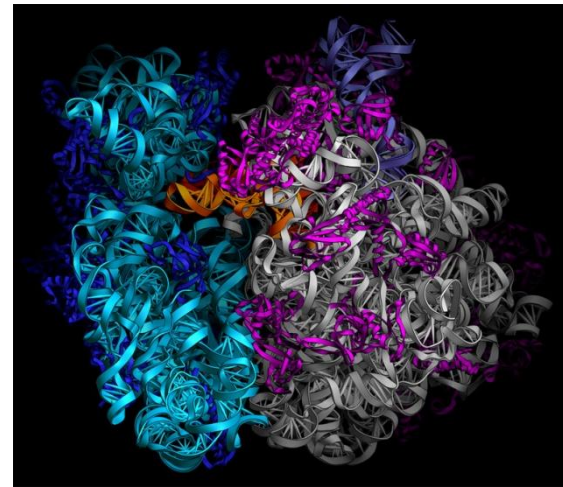


Figur 127. Ribosom. Stor og liten subenhet. Se skilles ved sedimentation coefficient på hhv 50S og 30S.

- De to irregulært formede subunitsene passer sammen, og danner en kløft, som mRNA passerer igjennom ettersom ribosomet beveger seg langs det under translasjonen.
- Ribosomene til eukaryoter er langt mer større og komplekse.
- Se animasjon på <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Translation.gif>



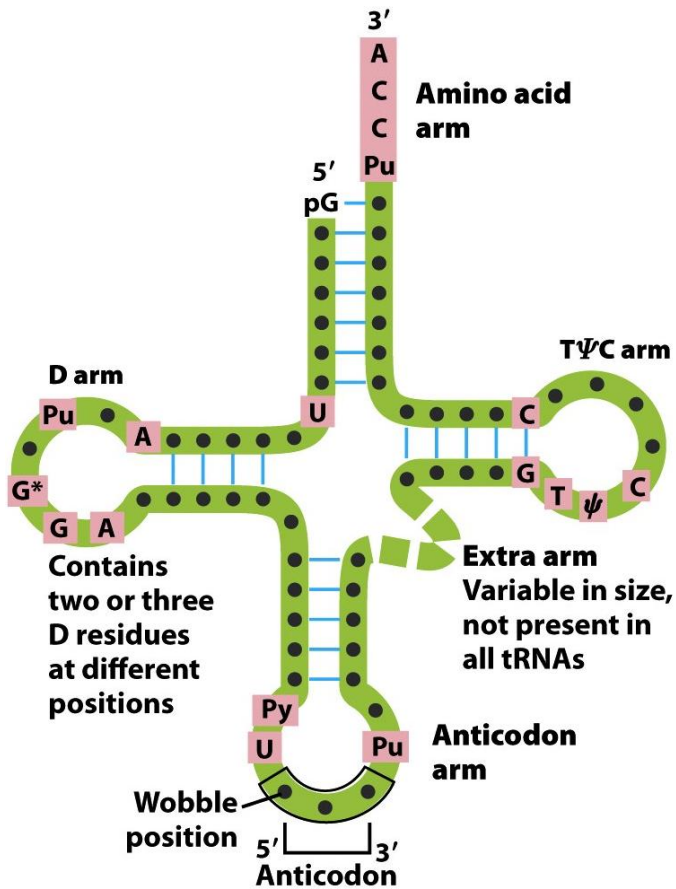
Figur 128. Ribosome.



Figur 129. Et skikkelig tøft bilde av et ribosom.

- tRNA består av en RNA streng med ca 80 enheter, foldet i en 3D struktur.
- Celler inneholder en type tRNA for hver aminosyre, minst 32 tRNA kreves for å kjenne igjen alle aminosyrene, men normalt har cellen flere.
- tRNA er felles for mange arter.
- Tegnet i 2D ser tRNA ut som en firkløver, i 3D som en twisted L.
- tRNA har guanylate (pG), ved 5' enden, og sekvensen CCA(3') ved 3' enden.
- To av armene til tRNA er avgjørende for adapterfunksjonen.
- The *amino acid arm* binder til seg spesifikke aminosyrer. Aminosyrens karboksylgruppe bindes til 2' eller 3'-hydroxylgruppen på A nukleotiden på 3' enden av tRNA.
- The *anticodon arm* har anticodon.

- De to siste armene er *D arm* og *TψC arm*, som folder tRNA og reagerer med den store subenheten av rRNA.



Figur 131. tRNA.

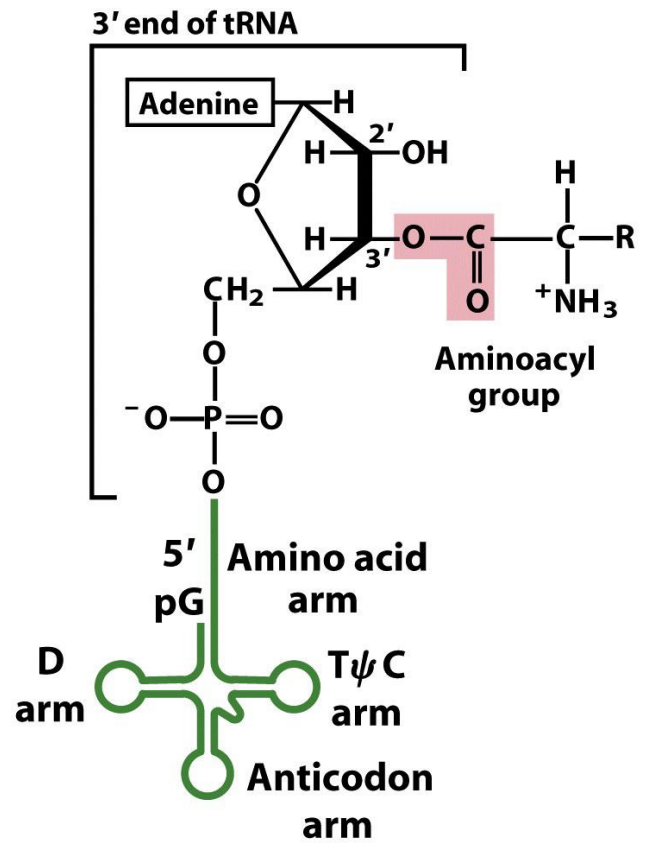


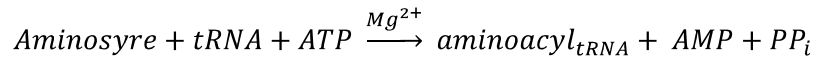
Figure 27-20
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Figur 130. tRNA med adenine ytterst. Her binder aminosyren seg til 3'-beinet via en acyl- gruppe. Dette er en ester binding.

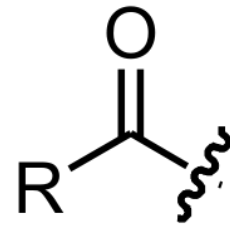
- Aminosyre esteren av tRNA kalles *aminoacyl-tRNA*.

Steg 1: Aktivering

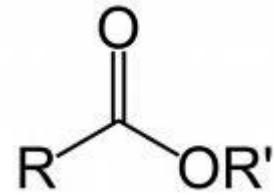
- Første steg foregår i cytosolen. Aminoacyl-tRNA synthase danner en esterbinding mellom aminosyren og tilhørende tRNA.
- Det er normalt én aminoacyl-tRNA synthase for hver aminosyre.
- Reaksjonen katalysert av aminoacyl-tRNA synthase er:



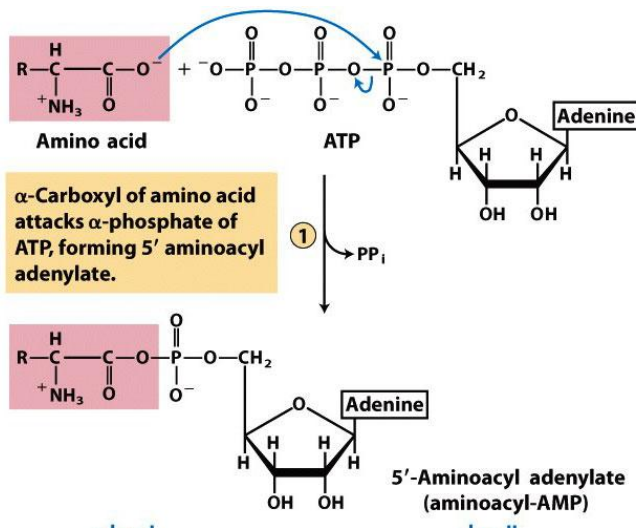
- Denne Reaksjonen foregår i to steg:
 - Aminoacyl adenylate dannes i active site på enzymet.
 - Aminoacyl gruppen fraktes til sin spesifikke tRNA. Denne reaksjonen avhenger hvilken klasse enzymet er.
- Denne esterbindingen mellom tRNA og aminosyren har høy negativ standard fri energi.
- To høyenergi fosfatbinding brytes i denne reaksjonen, og gjør den irreversibel.



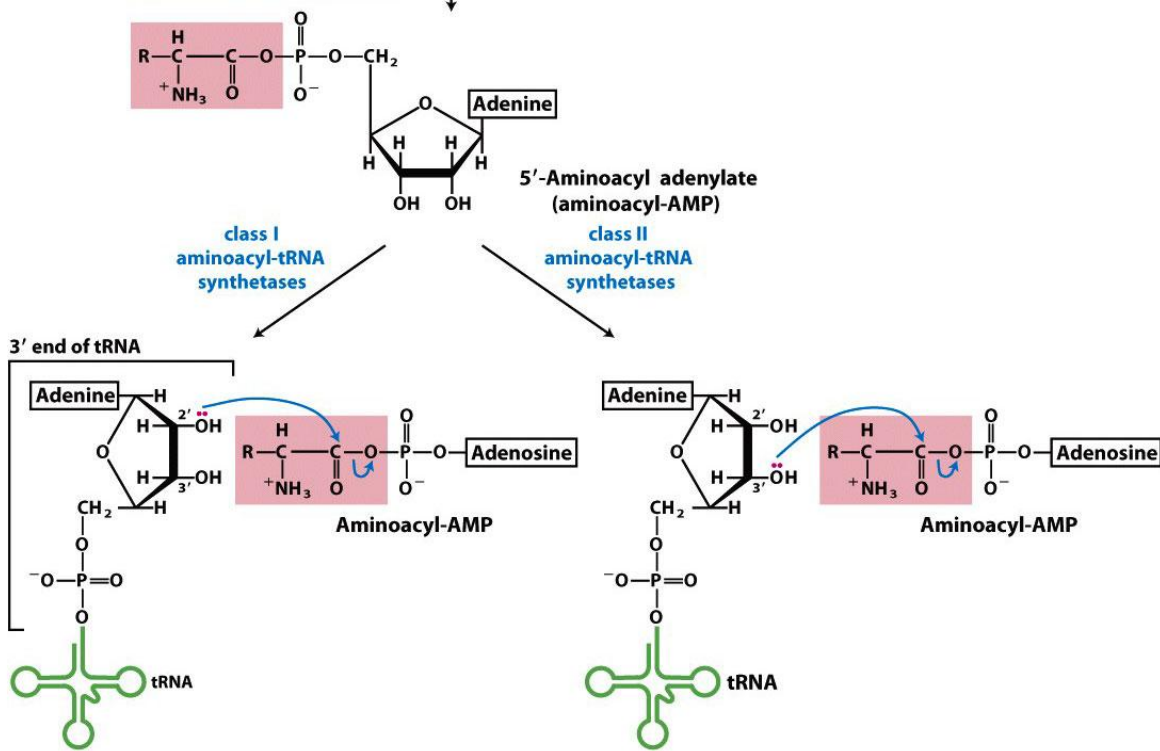
Figur 132. Acyl gruppe.



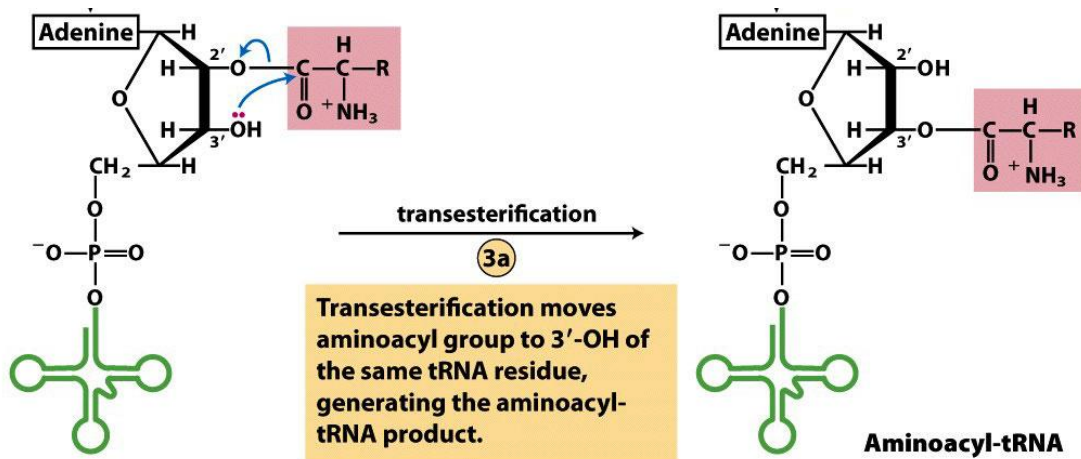
Figur 133. Ester.



Figur 134. Aminosyren festes med esterbinding til aminoacyl adenylate.



Figur 135. Reaksjonen deles etter hvilken gruppe aminoacyl-tRNA synthase det er.

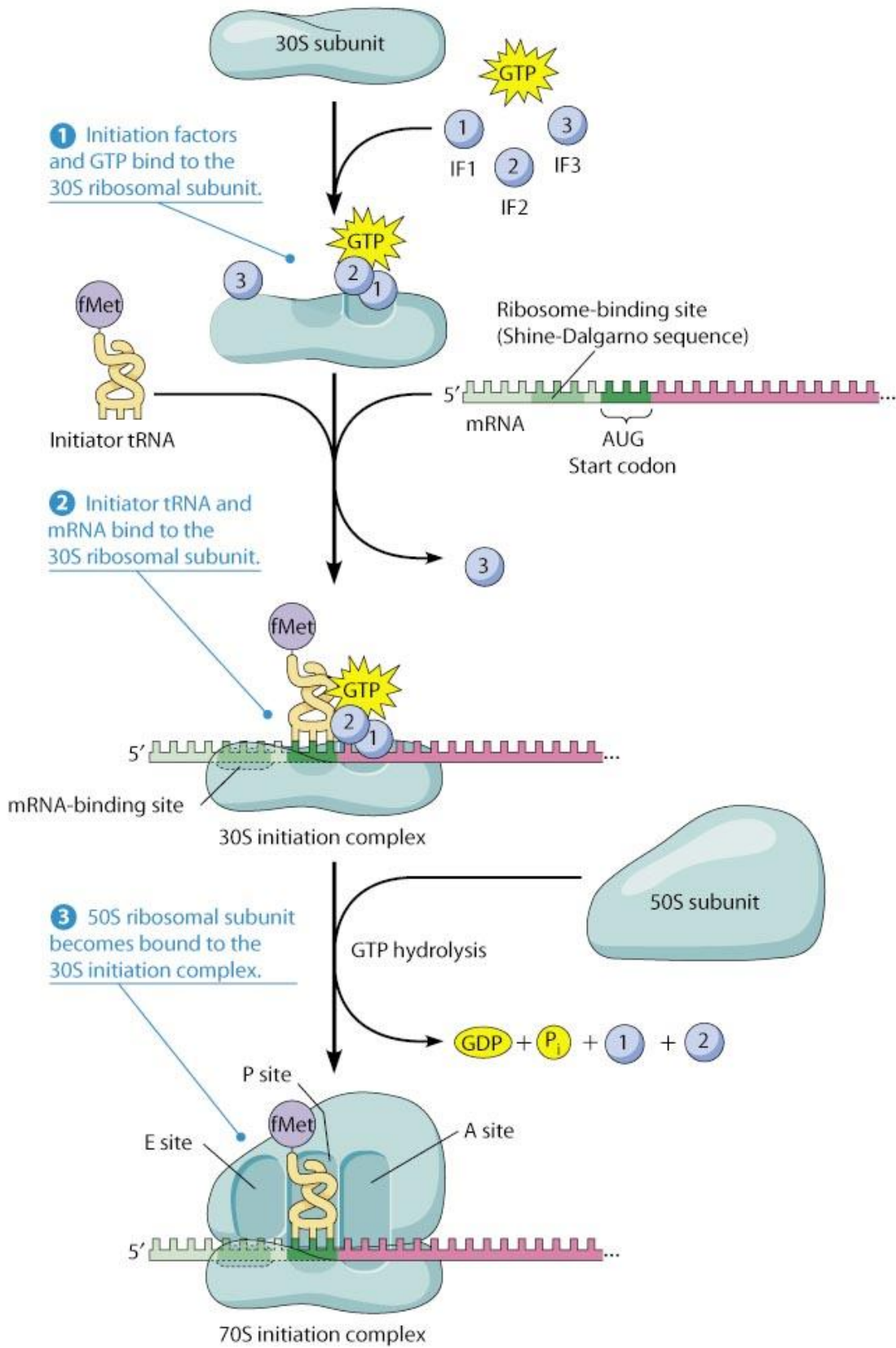


Figur 136. Siste del.

- Aminoacyl-tRNA synthase driver med proofreading, akkurat som DNA polymerase. Ribosomene gjør ikke dette, så det er viktig at rett aminosyre sitter på rett tRNA. Dette gjøres på to måter:
 - Bindingen mellom aminosyren og enzymet, og aktivering til aminoacyl-AMP er kontrollert.
 - Feil aminosyre passer godt i en "editing active site" på enzymet, og vil da hydrolyseres og fjernes.
 - I tillegg kan enzymet hydrolysere esterbindingen, en reaksjon som går mye lettere for feil aminosyre.
- Aminoacyl-tRNA synthase må være spesifikk for tRNA så vel som aminosyre. Reaksjonen mellom aminoacyl-tRNA synthase og tRNA refereres til som *second genetic code*.
- Nukleotidene som skiller mellom tRNA finnes i amino acid arm og i anticodon arm.
- Kun noen få nukleotider skiller mellom tRNA.
- FAEN SOM JEG HATER MS WORD!!!

Steg 2: initiation

- Proteinsyntese starter på aminoenden av polypeptidet, og ettersom polypeptidet vokser, så legges aminosyrer til på carboxyl-enden.
- AUG initiation codon svarer til en methionine-aminosyre, Met.
- Met har bare én codon, men to tRNA-er. Den ene, tRNA^{fMet}, for initiation (5')AUG. Den andre, tRNA^{Met}, for Met inne i polypeptidet. fMet står for formylmethionine.
- Initiation (5')AUG Met kommer til ribosomet som fMet-tRNA^{fMet}.
- Initiation av polypeptidsyntese i bakterier krever:
 - 30S og 50S ribosom subenheter.
 - mRNA
 - initiating fMet-tRNA^{fMet}
 - tre proteiner, initiation factors, IF-1, IF-2, IF-3
 - GTP
 - Mg²⁺
- Videre foregår initiation i tre steg (se figur):
 - 1) 30S subenheten binder IF-1 og IF-3. mRNA binder seg til 30S, (5')AUG guides på rett plass i en prosess kalt *Shine-Dalgarno sequence*. Bakterieribosomer har tre områder som binder tRNA; *aminoacyl site(A)*, *peptidyl site(P)* og *exit site(E)*. E binder bare *uncharged tRNA*, her forsvinner tom tRNA ved elongation. A og P binder *aminoacyl-tRNA*. Alle inkommende *aminoacyl-tRNA* binder seg først til A, med unntak av fMet-tRNA, som binder seg direkte til P.
 - 2) 30S subenheten, IF-3 og mRNA binder seg sammen med fMet-tRNA^{fMet} sammen med GTP. Anticodon og codon matcher nå.
 - 3) Komplekset binder med 50S subenheten, GTP omdannes til GDP + P_i, og alle initiation factors frigjøres.
- Totalt er det nå dannet et 70S *initiation complex*, og det er duket for elongation.
- De tre initiation factorene er:
 - IF-1: forhindrer tidlig binding mellom tRNA og A site.
 - IF-2: Ordner binding mellom fMet-tRNA^{fMet} og 30S subenheten.
 - IF-3: Forhindrer tidlig binding mellom 30S og 50S.
- I eukaryote celler er initiation langt mer kompleks, og inneholder minst ni initiation factors.

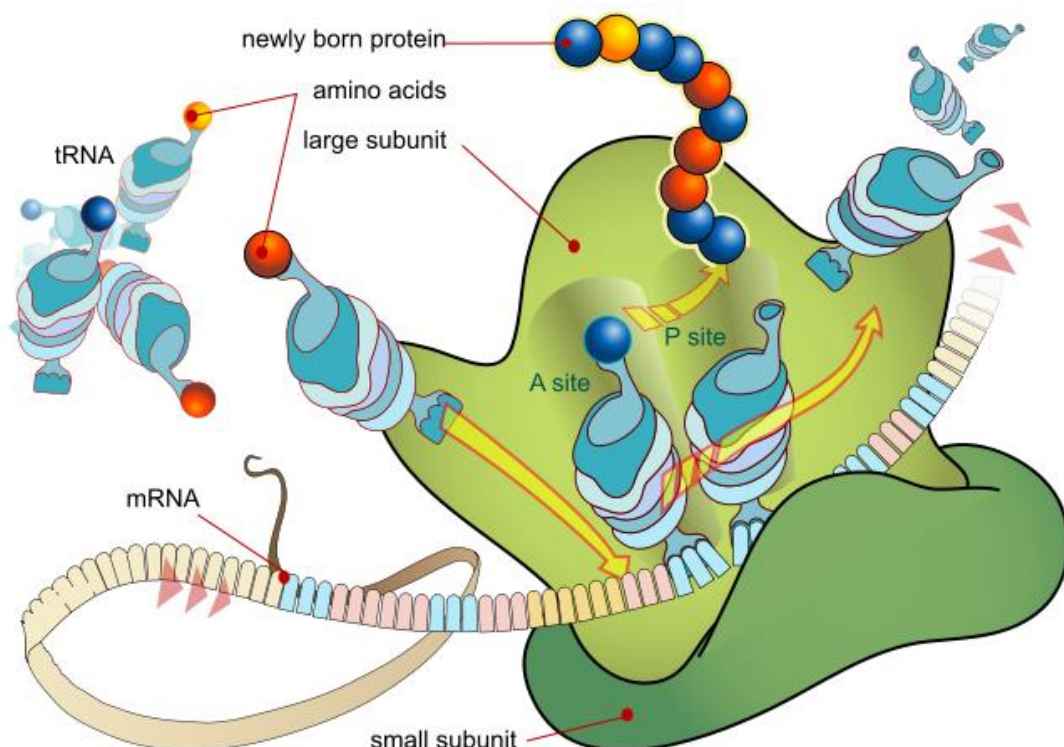


Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

Figur 137. Initiation av translasjon.

Steg 3, Elongation:

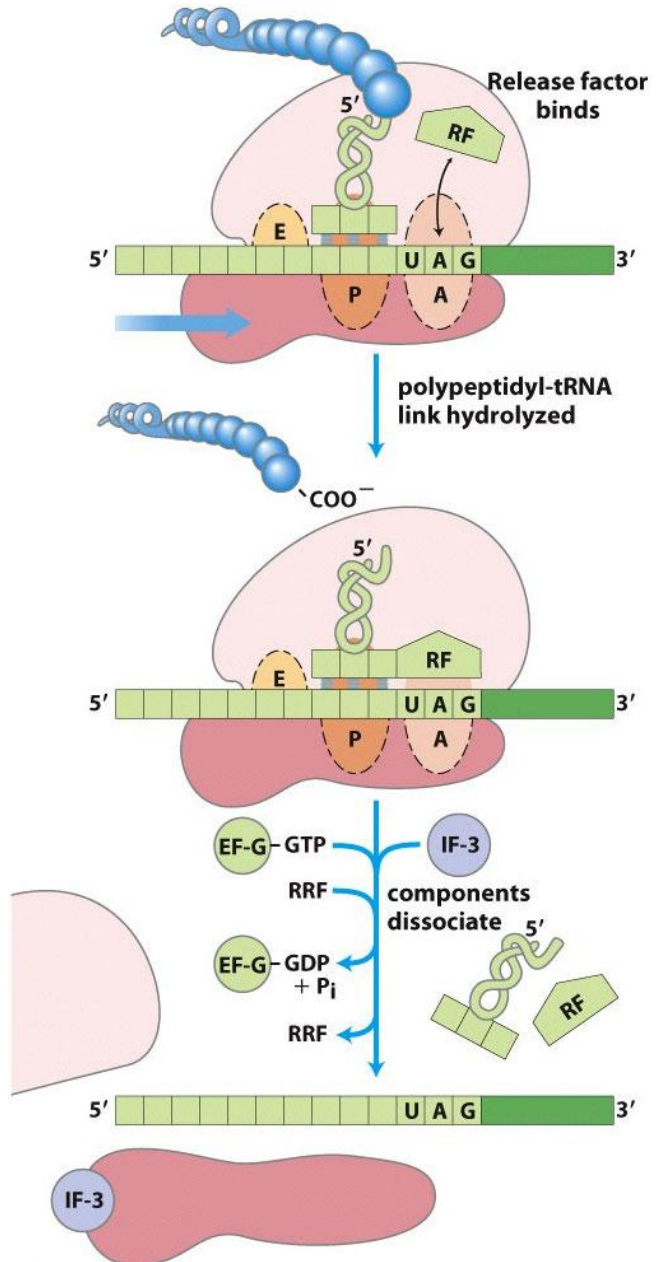
- Elongation krever:
 - Initiationkomplekset fra steg 2
 - Aminoacyl-tRNA'er
 - Tre elongation factors, EF-Tu, EF-G og EF-Ts
 - GTP
- Elongation foregår i tre steg:
 - 1) Passende innkommende aminoacyl-tRNA binder seg med EF-Tu og GTP, og danner et aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP kompleks. Dette komplekset binder seg til A(aminoacyl) siten, GTP hydrolyseres, og EF-Tu-GDP forlater 70S ribosomet.
 - 2) Det dannes en peptidbinding mellom aminosyrene i P og A site. Aminosyren på tRNA i P-siten overføres til aminosyren i A-siten. Reaksjonen katalyseres av 23S rRNA.
 - 3) Ribosomet beveger seg én codon nedover på mRNA, mot 3' av mRNA. Dette flytter dipeptyl-tRNA fra A siten til P siten, og uncharged tRNA fra P siten til E siten, hvor den forsvinner i cytosolen. Bevegelse langs mRNA krever EF-G, og energi i form av hydrolyse av en ny GTP.
- Denne syklusen fortsetter for å lage lange lengere polypeptider.
- To GTP går med for hver aminosyre festet på; én til å danne aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP og en til å bevege ribosomet på mRNA.
- Polypeptidet er alltid bundet med esterbinding fra siste tRNA til ribosomet.
- I eukaryoter er prosessen mer eller mindre lik, med unntak av at ikke E site finnes.
- Proofreading skjer ikke, er feil aminosyre bundet til korrespondere tRNA blir det bøll.



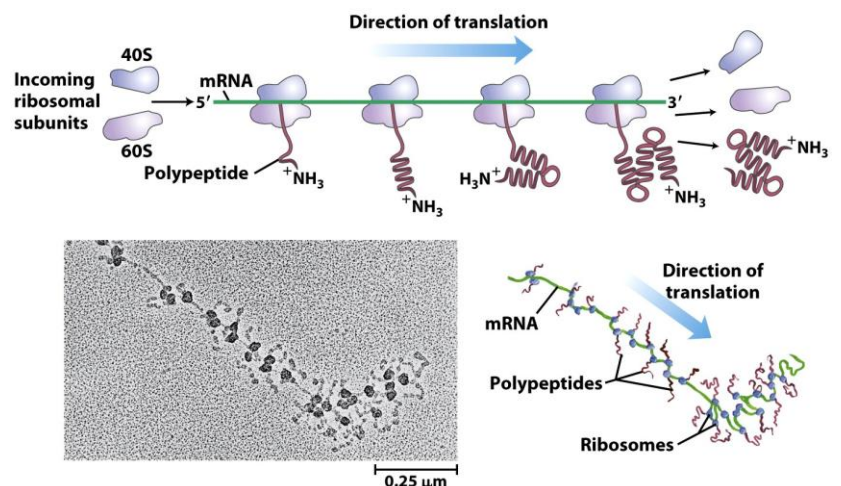
Figur 138. Bilder av robosomer er stilige!

Steg 4, termination

- De tre codonene UAA, UAG, UGA i mRNA signaliserer slutten på syntese, og er tett fulgt av en siste aminosyre.
- Når en termination codon kommer til A-siten, så begynner tre *release factors*, RF-1, RF-2 og RF3, å arbeide. De:
 - Hydrolyserer siste bindingen mellom tRNA og polypeptidet.
 - Slipper løs polypeptidet og det siste tRNA.
 - Deler 70S ribosomet i 30S og 50S subenheter, klare for å starte på nytt.
- Ribosome recycling dissosierer komponentene som har vært med i translasjonen, og danner kompleks med IF-3 og 30S for å starte en ny runde.
- Totalt omdannes fire NTP til NDP + P_i for hver aminosyre som legges til polypeptidet. (To GTP i elongation, to ATP/GTP i dannelsen av aminoacyl-tRNA + eventuelt ett ATP ved feil aminosyre plassert på tRNA.)
- Dette fører til et push i retning syntese; $4 \times 30,5 \text{ kJ/mol} = 122 \text{ kJ/mol}$ i phosphodiesterbond energi frigjøres.
- I bakterier danner ribosomene cluster, kalt *polysomer*. Her brukes den samme mRNA tråden mange ganger i ribosomer tett inntil hverandre, og vi har en skikkelgi proteinfabrikk med samlebånd.
- Transkripsjon og translasjon er tett koblet; Ribosomene begynner å syntetisere fra mRNA før translasjonen fra DNA er ferdig.
- I eukaryoter går ikke dette, da mRNA må fraktes ut av cellekjernen først.



Figur 139. Termination.



Figur 140. Samlebånd i polysomer.

- Bakterie mRNA lever vanligvis noen minutter før det blir brutt ned.

Steg 5, posttranslational processing

- Siste steget i proteinsyntesen, og av pensum i biokjemi, hvor proteinet foldes inn i sin biologiske aktive form.
- Noen "nylagde" proteiner danner ikke deres aktive form før de er alternert i *posttranslational modifications*.
 - *Endringer på aminoterminalen og carboxylterminalen: Den første aminosyren er formylmethionine i bakterier og methionine i eukaryoter. Denne må ofte fjernes. Samme med karboksylenden.*
 - Fjerning av signalsekvenser.
 - Modifikasjon av individuelle aminosyrer
 - Legge til grupper, trekke fra grupper,
 - Danne disulfidbruer
 - Diverse som må til for å danne aktivt protein.

Ferdig.

Nå hvordan var nå denne peptidindinga?