



TARTU ÜLIKOOL

M. Zilmer, E. Karelson, T. Vihalemm

ÜLDINE BIOKEEMIA (I)

Tartu 1993

TARTU ÜLIKOOL

M. Zilmer, E. Karelson, T. Vihalemm

ÜLDINE BIOKEEMIA (I)

Tartu 1993

Kinnitatud üldise biokeemia õppetooli koosolekul 15. veebruaril 1993.

Kujundanud: M. Zilmer ja A. Allmann

Vastutav toimetaja: K. Zilmer

Nüüdisaegsetest teadmistest lähtudes käsitleb antud raamat biomolekulide struktuuri, inimorganismi elutegevuse ja selle häirete molekulaarseid mehhanisme ning haiguste diagnostika ja ravi biokeemilisi aluseid. Selgitatakse ka ksenobiootikumide (ravimite) biotransformatsiooni põhiradasid. Esitatav materjal on toodud üldistatud põhiseisukohtadena, s.t. lugejat püütakse mitte koormata biokeemia erikursuste valdkonda kuuluvate küsimustega. Biokeemiaalase info mahukus on tingitud ka mõnede teemade teatud lihtsustamisest. Raamatu põhieesmärk on oluliselt suurendada biokeemiateadmiste kliinilis-praktilist orientatsiooni.

Raamatu esimeses osas käsitletakse biomolekule, teises osas toitumise biokeemiat ja inimorganismi ainevahetust ning kolmandas osas haiguste biokeemilise skriiningu küsimusi. Antud raamat on mõeldud eeskätt arstiteaduskonna üliõpilastele.

Mihkel Zilmer, Ello Karelson, Tiiu Vihalemm
ÜLDINE BIOKEEMIA (I)
Tartu Ülikool
EE2400 Tartu, Ülikooli 18
16,44. 26,75. T. 71. 800
TÜ trükikoda. EE2400 Tartu, Tiigi 78

© Mihkel Zilmer, Ello Karelson, Tiiu Vihalemm, 1993

Sisukord

Biomolekulid

Biokeemia mõiste, objekt ja põhisuunad	6
Raku struktuurne organisatsioon	9
Väikesed ja suured orgaanilised molekulid	14
Elava ja elutu põhierinevused. Raku üldehitus	15
Aminohapped	19
Füüsiko-keemilised omadused	21
Bioloogiliselt tähtsamad reaktsioonid	23
Peptiidid	24
Peptiidsideme loomus	24
Mõiste, klassifikatsioon ja omadused	25
Aminohappelise koostise määramine	25
Aminohappelise järjestuse määramine	26
Süntees ja looduslikud peptiidid	27
Valgud	29
Üldiseloomustus	29
Sisaldus ja jaotumine organismis	31
Struktuuritasemed	31
Ehitustasemete uurimine	48
Füüsiko-keemilised omadused	50
Lahustuvuse sõltuvus mitmesugustest faktoritest	62
De- ja renaturatsioon	65
Individaalsete valkude eraldamise ja puhastamise meetodid	68
Klassifikatsioon	81
Biofunktsioonid	86
Ligandide sidumine ja struktuuride assambleerumine	87
Süsivesikud	93
Mõisteid ja lühendeid	93
Klassifikatsioon	94
Monoosid	94
Oligosahhariidid	101
Polüosid	104
Biofunktsioonid	108
Lipiidid	110
Mõisted ja üldiseloomustus	110
Lipiidide ehitusüksused	110

Struktuurne klassifikatsioon	114
Füüsiko-keemiline ja füsioloogiline klassifikatsioon	120
Biofunktsioonid	121
Nukleiinhapped	122
Põhimõisteid	122
Ehituskomponendid	123
Struktuuritasemed	127
Geenid	137
Füüsiko-keemilised omadused	138
Nukleiinhapped ja viirused	140
Isoleerimise tüüpmenetlus	142
Ensüümid	143
Mõiste	143
Nomenklatuur ja klassifikatsioon	144
Üld- ja eriomadused	146
Ehitus ja vitamiinid	148
Koensüümid	175
Aktiivtsenter	183
Toimemehhanismi üldarusaamad	185
Ensüümreaktsiooni kineetika	187
Ensüümreaktsiooni pöördumus	192
Kvantitatiivne määramine	192
Aktiivsuse regulatsioon	193
Molekulaarsed erivormid	195
Multiensüümsüsteemid	196
Praktiline kasutamine	196
Segamakromolekulid	198
Mõiste	198
Põhilised esindajad	198

SISSEJUHATUS

Bioloogiline keemia (biokeemia) on kiiresti arenev fundamentaalteadus. Tema kiire areng ja tähtsuse kasv tulenevad sellest, et (1) biokeemia on tuvastanud rea tähtsate bioprotsesside keemilis-molekulaarsed alused (valgu süntees, metabolismi põhiraajad, makromolekulide funktsioonid jne.), (2) biokeemia osa teiste meditsiini teadusharude (füsioloogia, farmakoloogia, farmaatsia, endokrinoloogia jt.) arengus on oluliselt suurenenud, (3) nüüdisbiokeemia tase on võimaldanud asuda biomeditsiini põhi-probleemide **molekulaarsete aluste** uurimisele (rakkude diferentseerumine, kantserogenees, närvitegevus, immuunsus, mälu, biomembraanide funktsioneerimine, pärilikud haigused jne.).

Kiirelt arenevaid fundamentaalteadusi iseloomustab terminite ja faktide tulv. See loob vajaduse selekteerida välja olulised üldistused (põhitõed), mis on hädavajalikud biokeemia efektiivseks integreerumiseks teiste teadusharudega ning meditsiini-üliõpilastele kvaliteetse baashariduse andmiseks. Taoliste põhitõdede omandamine loob ka kindla baasi biokeemia teadmiste rakendamiseks tulevase meediku praktilises tegevuses ning garanteerib uute teaduskontseptsioonide süsteemse vastuvõtu. Kõigele sellele püüabki käesolev raamat kaasa aidata.

BIOMOLEKULID

BIOKEEMIA MÕISTE, OBJEKT JA PÕHISUUNAD

Biokeemia uurib elutegevuse molekulaarseid aluseid. **Biokeemia** on seega teadus elava keemilisest koostisest, koostisosade muundumistest ja nende muundumiste seostest elusorganismide struktuuride spetsiifiliste funktsioonidega. Järelikult hõlmab **üldine biokeemia** järgmisi põhisuundi: 1) **staatiline biokeemia** (SB) - uurib elava komponentide ehitust ja omadusi, 2) **dünaamiline biokeemia** (DB) - uurib mahukaima suunana metabolismi ja energiavahetust organismides, 3) **funktsionaalne biokeemia** (FB) - uurib biomolekulide ja nende muundumiste seoseid füsioloogiliste funktsioonidega. Loomulikult on need suunad läbipõimunud.

Biokeemia põhisuundade individuaalses arengus võib tinglikult eristada etappe, mis SB puhul oleksid järgmised:

I ORGAANILISTE ÜHENDITE ISOLEERIMINE JA ESMASÜNTEES.

1770-86 Scheele - glütserooli ja orgaaniliste hapete isoleerimine

1828 Wöhler - karbamiidi süntees anorgaanilistest ühenditest.

See lükkas ümber vitalismi, mis väitis, et organismis olevaid orgaanilisi ühendeid toodab mingi jumalik elujõud "vis vitalis"

II ALGAS MAKROMOLEKULIDE ISOLEERIMINE JA PUHASTAMINE.

1890 Hofmeister - esimene kristalne valk (muna albumiin)

1926 Sumner - esimene kristalne ensüüm (ureaas)

III BIOPOLÜMEERIDE EHITUSE SELGITAMINE JA NENDE SÜNTEES. Saavutused rajanevad eeskätt kõrgselektiivsete meetodite (ultratsentrifuugimine, kromatograafia jt.) ning arvutitehnika arengul.

1951 L. Pauling - valgu sekundaarstruktuuri põhitüüp (α -heeliks)

1943-53 Sanger - insuliini primaarstruktuur

1953 Watson, Crick, Wilkins - DNA kaksikspiraal (kaksikheeliks)

1957 Ochoa - RNA ensümaatilise süntees

1967 Kornberg - bioaktiivse DNA ensümaatilise süntees.

1985 Shull jt., Kawakami jt. - Na-pumba primaarstruktuur.

DB tekkis SB ja füsioloogilise keemia arengu põimumise tulemusena ning siin võiks eristada järgmisi arenguetappe.

I BIOLOOGILISE OKSÜDATSIOONI ESMASUURIMUSED.

1770-74 Priestly - avastas hapniku ja näitas, et loomad neelavad, aga taimed eritavad hapnikku

1780-89 Lavoisier - toidu "põlemine" organismis annab vett, CO₂ ja soojust nagu tema organismiväline põletaminegi

II KÄÄRIMISPROTSESSI SEADUSPÄRASUSTE NING BIODKATALÜSAATORITE (ENSÜÜMIDE) AVASTAMINE (vt. ensüümid).

III METABOOLSETE RADADE AVASTAMISE ALGUS (Neuberg - termin "biokeemia" 1903.a.).

1905 Knoop - avastas rasvhapete β - oksüdatsiooni

1931 Engelhardt - hingamine ja ATP süntees on omavahel seotud

1933 Krebs, Henseleit - ornitiinitsükkel (karbamiidi biosüntees)

1937 Krebs - Krebsi-tsükkel (tsitraaditsükkel, trikarboksüülhapete tsükkel).

1937 Braunstein, Kritzman - avastasid aminohapete transamiinimise

1955-60 Metaboolsete skeemide koostamise algus

IV ALGASID FUNDAMENTAALSED TÖÖD BIOSÜNTEESI (VALGUD, NUKLEIINHAPPED), METABOLISMI REGULATSIOONI JA ENERGIAVAHEHETUSE ALAL.

1939-41 Lipmann - ATP keskne roll raku energeetilises tsükklis

1947-50 Lipmann, Kaplan - koensüüm A iseloomustamine

1952-54 Zamenick jt. - ribosoomide avastamine (valgusüntees)

1961 Nirenberg, Ochoa - geneetilise koodi tõestus

1961 Monod, Jacob, Changeux, Pardue - allosteerilise regulatsiooni põhiprintsiibid

1957-65 Sutherland - tsükklilistel nukleotiididel on sekundaarsete ülekandjate roll hormoonide toimemehhanismis

1975-76 Köhler, Milstein - monoklonaalsete antikehade saamine

FB tinglikud arenguetapid oleksid järgmised:

I ESMASTÕENDID FÜSIOLOOGILISTE FUNKTSIOONIDE JA ÜHENDITE MUUNDUMISTE VAHELISTE SEOSTE KOHTA.

1850-60 C. Bernard - IV ajuvatsakese põhja mehhaanilisel ärritamisel eraldub maksa glükogeenist verre glükoos, st. närvisüsteemi erutuvus ja keemiline reaktsioon on seotud

1892-96 Pavlov, Nencki - värativeeni ja alumise õõnesveeni vahelise fistuli abil näitasid, et maksast möödajuhitud ammoniaak on toksiline KNS-le ja tema detoksikatsioon toimub maksas

II SEOSTE AVASTAMINE FÜSIOLOOGILISE FUNKTSIOONI JA KONKREETSETE

MOLEKULIDE EHITUSE NING ÜLESANNETE VAHEL.

1939-42 Engelhardt, Ljubimova - müosiin on nii lihaste kontraktilne kui ka ensümaatiline valk, mis võimaldab ATP energiat kasutada lihaskontraktsiooniks

III (nüüdisaegne) FÜSIOLOOGILISTE FUNKTSIOONIDE AVALDUMISEGA SEOTUD KASKAADSETE MEHHAANISMIDE AVASTAMINE.

1957-65 Sutherland - hormoonide toimemehhanism CAMP vahendusel

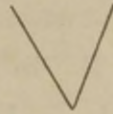
Biokeemia kui fundamentaalteadus kujunes välja füsioloogia ja orgaanilise keemia põimunud arengu resultaadina (vt. skeem).

FÜSIOLOOGIA (Bioloogia, Meditsiin)

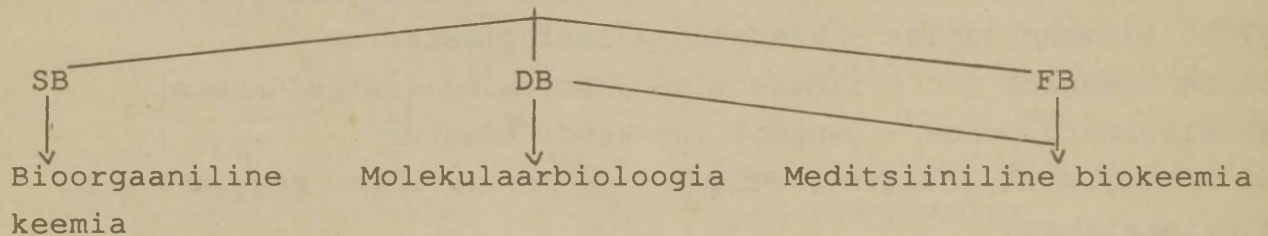
Füsioloogiliste funktsioonide seostamine keemiliste muutustega organismides

ORGAANILINE KEEMIA (Füüsika)

Elavates objektides olevate keemiliste ühendite iseloomustamine ja organismiväline süntees



Füsioloogiline keemia (19 saj. keskel)



Uurimisobjekti metabolismi iseärasuste (näit. fotosünteesivõime jne.) alusel kasutatakse termineid inimese- ja loomabiokeemia, taimebiokeemia ja mikroobibiokeemia. Kitsale rakenduslikule aspektile viitavad mõisted meditsiiniline (kliiniline) biokeemia, farmatseutiline biokeemia jt. Kõigi nende harude **baasiks** on aga **kaasaegne üldine biokeemia** oma põhiseisukohtadega.

Üldise biokeemia põhisuundade seostunud areng viis välja selle teadusharu nüüdisaegsete spetsiifiliste suundade tekkele. **Bioorgaaniline keemia** uurib elutegevuse keemilis-füüsikalisi aluseid biomolekulide tasemel (alguseks 20 saj. 70-d aastad). **Molekulaarbioloogia** (tekkis 20 saj. 50-1 aastatel) tegeleb biopolümeeride (eeskätt nukleiinhapped) struktuuri ja funktsioneerimise

mise, st. biofunktsioonide molekulaarsete aluste uurimisega. Nüüdisaegne molekulaarbioloogia tegeleb ka geneetilise informatsiooni ülekandemehhanismide süvauurimisega (**molekulaargeneetika**) ja geenide isoleerimise ning kasutamisega fundamentaalsetel ja rakenduslikel eesmärkidel (**insenergeneetika, biotehnoloogia**).

Meditiiniline (kliiniline) biokeemia on SB, DB ja eriti FB arengu resultaat. Meditsiiniline biokeemia kasutab biokeemiat nii teoreetilistel kui ka rakenduslikel eesmärkidel. Esimesel juhul on biokeemia ülesandeks raku ehituskomponentide koosseisu, ehituse ning funktsioonide iseloomustamine molekulaartasemel ning selle info seostamine organismi normaalse ja patoloogilise seisundiga. Biokeemia praktiline tähtsus seisneb eeskätt järgmises: 1) haiguste patogeneesi molekulaarsete mehhanismide tuvastamine; 2) haiguste diagnostika ja kulu jälgimine biovedelike ning kudede keemilis-ensümaatiliste muutuste alusel; 3) ravi (näit. ensümo- ja kemoteraapia) teadusliku baasi loomine; 4) uute ravimite efektiivsuse ja toksilisuse hindamine nende metabolismi, toime- ja detoksikatsioonimehhanismide detailse tuvastamise alusel (**farmatseutiline biokeemia**); 5) tervisliku toitumise põhimõtete välja töötamine organismi erinevate seisundite ja arengustaadiumite jaoks; 6) biokeemia uusimate fundamentaalsete kontseptsioonide ja meetodite rakendamine kliinilises töös.

RAKU STRUKTUURNE ORGANISATSIOON

Raku koostemolekulid määravad tema konkreetse struktuurse organisatsiooni. Kuna viimane on aluseks raku funktsioonidele, on raku koostisosade igakülgne tundmine esmajärgulise tähtsusega.

BIOELEMENTID. 27 elementi on hädavajalikud elava erinevate vormide elutegevuseks (**bioelementid**). NB! Kõik 27 ei pruugi esineda kõigis organismides ja üldse on elavast leitud üle 70 elementi. Keskne bioelement on süsinik, kuna: 1) ainult C aatomite vahel tekib stabiilne kovalentne side (C-C); 2) side C-C ning C ja teiste bioelementide (O, N, S) vahelised sidemed on aluseks funktsionaalsete rühmade (NB! ühendite) rohkusele; 3) C "tetraedrilisus" on aluseks orgaaniliste molekulide konformatsiooni-

dele.

Ligikaudu 99% inimorganismi bioelementide hulgast moodustavad H, C, O, N (vastavalt 62, 26, 10 ja 2%). Nende evolutsiooniline "eelistatus" biofunktsioonide täitmiseks tuleneb sellest, et: 1) nad annavad kergesti kovalentseid sidemeid välimise elektronikihi iseärasuste tõttu; 2) nende võime moodustada kaksiksidemeid (O,C,N) või kolmiksidemeid (C) loob ühendite tohutu mitmekesisuse; 3) neist moodustunud anorgaanilised ühendid on veeslahustuvad ja elutegevuses utiliseeritavad (CO₂, NH₃).

Bioelemente rühmitatakse tavaliselt järgmiselt:

1. Orgaanilistes molekulides aatomitena esinevad bioelemendid (H, C, O, N, P, S). 2. Organismis ioonidena funktsioneerivad bioelemendid (Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cl⁻). 3. Mikroelemendid (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, I, Mo, V, Ni, F, Cr, Se, Si, Sn, B, As). Levinud on ka jaotamine vastavalt sisaldusele. 1) makrobiogeensed e. põhielemendid (organismis üle 1%) - H, C, O, N, Ca²⁺, P; 2) oligobiogeensed (0,1-1,0%) - Na⁺, S, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Fe; 3) mikrobiogeensed (alla 0,1%) - Mn, Co, Cu, Zn, F, B, I; 4) ultramikrobiogeensed (alla 0,0001%) - Mo, V, Ni, Cr, Se, Si, Sn, As.

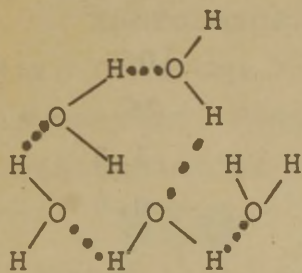
Rakkude (kudede) **funktsioonidest** tulenevalt on bioelementide jaotus neis erinev (luukude -Ca, P; hambad - F; kilpnääre - I; pankreas - Zn; maks - Cu; erütrotsüüdid - Fe; mitokondrid - Se jne.). Kuna merevesi oli elusorganismide tekkimise keskkonnaks, siis on peaaegu kõigi enamsisalduvate elementide sisaldus inimese vereplasmas ja merevees praktiliselt samasugune (evolutsioon!).

BIOMOLEKULID. Keskmise molekulaarkoostis on toodud alljärgnevalt.

ANORGAANILISED	INIMORGANISM (70 kg)		RAKK	
	Sisaldus(%)	Kaal(kg)	Sisaldus(%)	Molekule DNA molekuli kohta
Vesi	60	42	75	120 000 000
Mineraalained	5	3,5	1,4	70 000
ORGAANILISED				
Valgud	18	13	15	750
Süsivesikud	0,8	0,6	2	2500
Lipiidid	15	10,8	4	7000
Nukleiinhapped	0,8	0,6	0,94	45 (RNA)
Ülejäänud	0,8	0,6	0,35	450 000

Anorgaanilised ained

Vesi. Molekuli polaarsusest (dipool, $\overset{+}{\text{H}}\text{O}\text{H}^{-}$) tulenevalt on veemolekulid liitunud, vähemalt viiemolekulilisteks assotsiaatideks. Assotsieeritus annab veele, võrreldes teiste vedelikega, rea unikaalseid omadusi (tal on suhteliselt kõrge pindpinevus, külmumistemperatuur, keemistemperatuur, polaarsus, soojusmahtuvus jne). Seetõttu on vesi organismis eluks sobivatel temperatuuridel vedelas olekus ning täidab järgmisi biofunktsioone:



- 1) biomolekulide ja ioonide lahusti ja stabilisaator (hüdraatkiht) ; 2) termoregulaator (organismis soojuse säilitamine, jaotamine ja äraandmine); 3) energiadoonor e. elektronide doonor fotosünteesil; 4) hüdrolüütiline (kataboolne) funktsioon (teiseks substraadiks sidemete hüdrolüüsil); 5) transpordifunktsioon (toitainete transport taimedes); 6) ehituslik funktsioon (näit. biomembraanide koostises); 7) anaboolne funktsioon (mitmetes biosünteesides üks vajalikest substraatidest); 8) mehhaaniline funktsioon (rakusise rõhu ja rakkude vormi/ kuju säilitamine, turgor).

Mineraalained. Esinevad organismides ioonidena (v.a. suur osa Ca- ja P-ühendeid) ning jaotuvad erinevalt raku (rohkesti K^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{2-}) ja rakuvälise keskkonna (rohkesti Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) vahel. Kõiki organisme iseloomustab teatud põhiioonide (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) **kontsentratsiooni gradient** raku ja rakuvälise keskkonna vahel (vt. tabel). Gradiendi (erinevuse) tekke tingimuseks on plasmamembraani valikuline läbitavus ioonidele. Elusraku iseloomustab ka isoosmootsus, s.t. raku ja rakuvälises keskkonnas on võrdne osmootse rõhu tase. Kui raku muutub ioonne koosseis, toimub veemolekulide transmembranne ümberpaigutumine uue osmootse rõhu kujunemisega.

Mineraalainete (ioonide) tähtsamad funktsioonid on:

- 1) ehitus-funktsionaalne- kofaktorina mitmetes ensüümides; 2) bioelektriline- ioonsed gradiendid loovad raku puhkepotentsiaali (plasmamembraani sisepind laadub negatiivselt välispinna suhtes), mis on aluseks närvi- ja lihaskoerakkude elektrofüsioloogilistele funktsioonidele; 3) osmootne- ioonne koostis reguleerib osmootset

	RAKK	RAKUVÄLINE KESKKOND	VEREPLASMA
KATIOONID (mmool/l)			
K^+	150	4,1	4,2
Na^+	12	140	140
Ca^{2+}	4,5	3,5	5
Mg^{2+}	22	2	2
ANIOONID (mmool/l)			
Cl^-	4	120	106
HCO_3^-	8	27	26
HPO_4^{2-}	40	1,5	1,5
SO_4^{2-}	12	0,9	0,8
Orgaanilised happed ⁻	7,5	5	5
Valgud ⁻	30	0,8	13

rõhku; 4) regulatoorne- mitmete hormoonide toimemehhanismis osalevad ioonid; 5) transpordi- raud osaleb hapniku sidumises ja transpordis hemoglobiini poolt; 6) ehituslik-mehhaaniline- luukoe mehhaaniline tugevus tuleneb kaltsiumfosfaadist ja hüdroksüapatiidist; 8) detoksikatsiooni- sulfaatide vajalikkus ksenobiootikumide detoksikatsioonil.

Sõltuvalt raadiusest võib ioon paigutada vee assotsiaatisse ja muuta vee struktuursust (näit. Na^+ muudab, K^+ ei muuda). Lähedase raadiusega ja sarnaste omadustega ioonid saavad teineteist vähesel määral asendada (vanaadium molübdeeni, koobalt rauda, strontsium kaltsiumi, liitium kaaliumi).

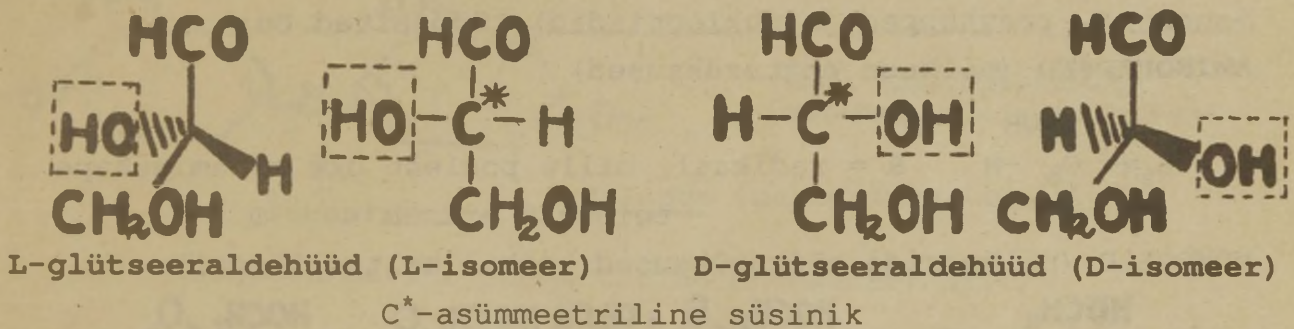
Orgaanilised ained.

Organismis (rakus) esinevaid orgaanilisi aineid võib kõiki nimetada **biomolekulideks**. Tegelikult kasutatakse järgmist tinglikku jaotamist: 1) **lihtsad biomolekulid** - väikesed orgaanilised molekulid; nende põhiesindajad on molekulid-ehitusüksused; 2) **oligomeersed biomolekulid** - koosnevad mitmest ehitusüksusest (näit. di- ja oligonukleotiidid, oligosahhariidid jne.); 3) **biomakromolekulid e. makromolekulid**- (nukleinhapped, valgud jne.).

Lihtsaid biomolekule iseloomustab: 1) nad on ehitusüksused suuremate molekulide jaoks; 2) konformatsioon (ruumiline kolmemõõtmeline kuju); 3) stereoisomeersus (konfiguratsioonilisus); 4) nende vastastikuse toime alus teiste molekulidega on komplementaarsus; 5) mitmekesisus.

Ehitusüksused. Lihtsate biomolekulide ühinemisel moodustuvad suuremad orgaanilised molekulid. Polümerisatsiooni puhul moodustub makromolekul (vt. vastav teema).

Konformatsioon ja stereoisomeersus. Mõlemad tulenevad eeskätt C aatomi tetraedrilisusest. Enamik biomolekule on stereoisomeersed. Peegelisomeersete stereoisomeeride konfiguratsioonilise etalonina vaadeldakse glütseeraldehüüdi molekuli.



Skeemil esitatud molekulid on peegelisomeerid (hiraalsed molekulid, enantiomeerid). Üldbiokeemiliselt on see oluline põhjusel, et kuna ensüümide molekulid on ka hiraalsed, siis on biosünteesid organismis reeglina stereospetsiifilised, s.t. sünteesil kasutatakse substraadi vastavat isomeeri.

Komplementaarsus (ruumiline vastavus-sobivus). Tuleneb biomolekulide konformatsioonist (ruumilisest struktuurist) ja ka stereoisomeersusest. Nii peavad näit. ensüümi- ja substraadimolekul olema komplementaarsed, s.t. ensüümi aktiivtsentri ja substraadi ruumilised parameetrid peavad sobima seostumiseks.

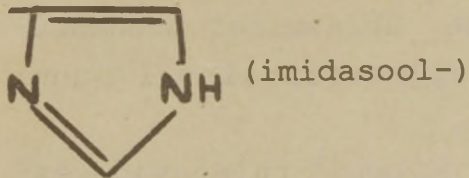
Mitmekesisus. Tuleneb funktsionaalsetest gruppidest (vt. tüüploetelu). Paljud biomolekulid on polüfunktsionaalsed.

-OH (hüdrosüül-, alkoholid)	-CHO (aldehüüd-, aldehüüdid)
>C=O (karbonüül-, ketoonid)	-COOH (karboksüül-, karboonhapped)
-NH ₂ (amino-, amiinid)	NH ₂
	-C=O (amido-, amiidid)
-SH (tiool- e. sulfhüdrüül-, tioolid)	

-C=O ("ester-", estrid)

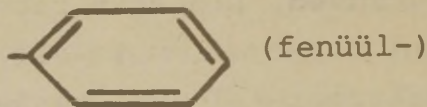
- O - (eeter-, eetrid)

$\begin{matrix} H & NH \\ | & // \\ -N & -C-NH_2 \end{matrix}$ (guanidiin-)



-S - S- (disulfiid-, disulfiidid)

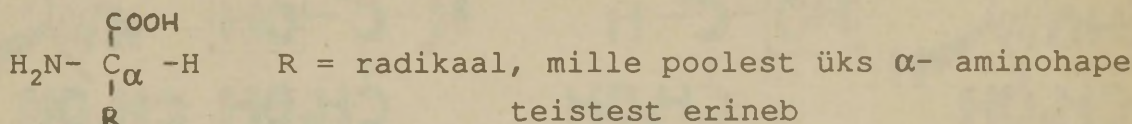
$\begin{matrix} OH \\ | \\ -O-P-OH \\ | \\ OH \end{matrix}$ e. - (P) (fosfaat-, fosfaadid)



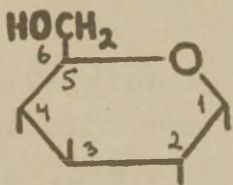
VÄIKESED JA SUURED ORGAANILISED MOLEKULID

Ehitusüksustena tuntud lihtsate biomolekulide (aminohapped, monoosid, rasvhapped ja nukleotiidid) tüüpnäited on:

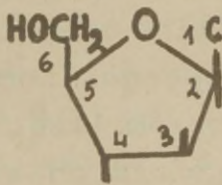
AMINOHAPPED (valkude ehitusüksused)



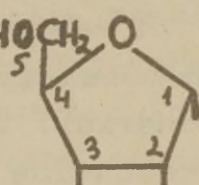
MONOOSID (polüooside ehitusüksused; põhiliselt glükoos)



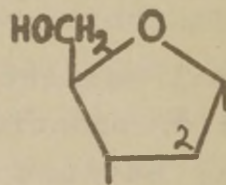
glükoos



fruktoos



riboos



2-desoksüriboos

RASVHAPPED, GLÜTSEROOL (enamiku lipiidide ehitusüksused)

$H_3C-(CH_2)_{14}-COOH$ palmitiinhape

$H_3C-(CH_2)_{16}-COOH$ steariinhape

$H_3C-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ oleiinhape

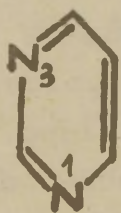
1 H_2C-OH

2 $HC-OH$

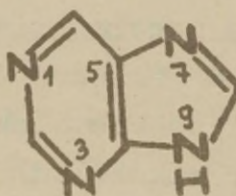
3 H_2C-OH

glütserool

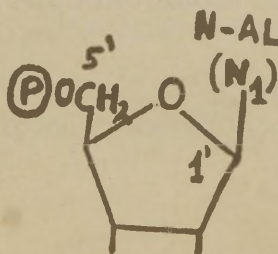
NUKLEOTIIDID (nukleiinhapete ehitusüksused)



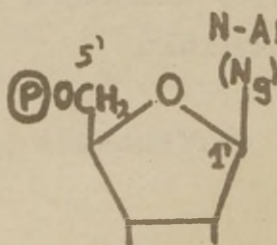
pürimidiinalus



puriinalus

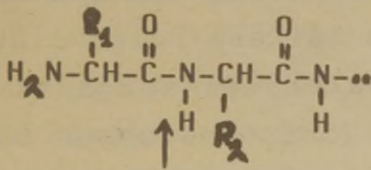


pürimidiin-nukleotiid



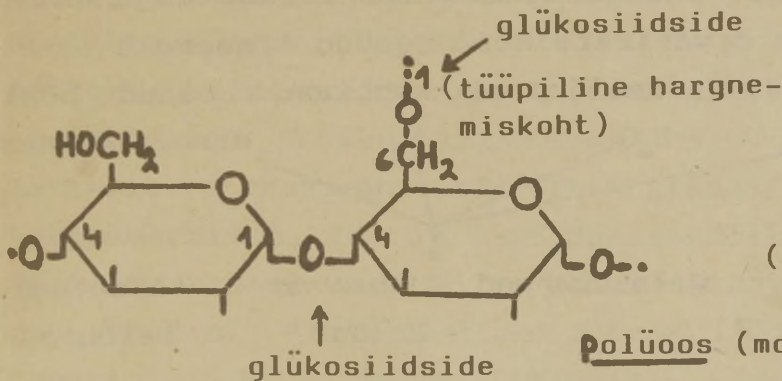
puriin-nukleotiid

Ehitusüksuste (monomeeride) polümerisatsioonil moodustuvad **kova-**
lentsete sidemete abil **makromolekulid**.



peptiidside

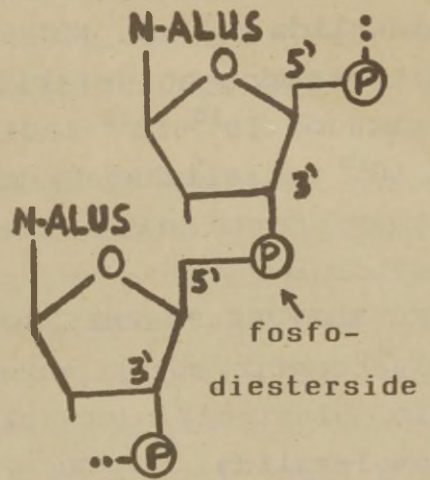
Valk, polüpeptiid
(monomeeriks aminohape)



glükosiidside

Polüoos (monomeeriks monoos)

Biopolümeeride skemaatiline primaarstruktuur



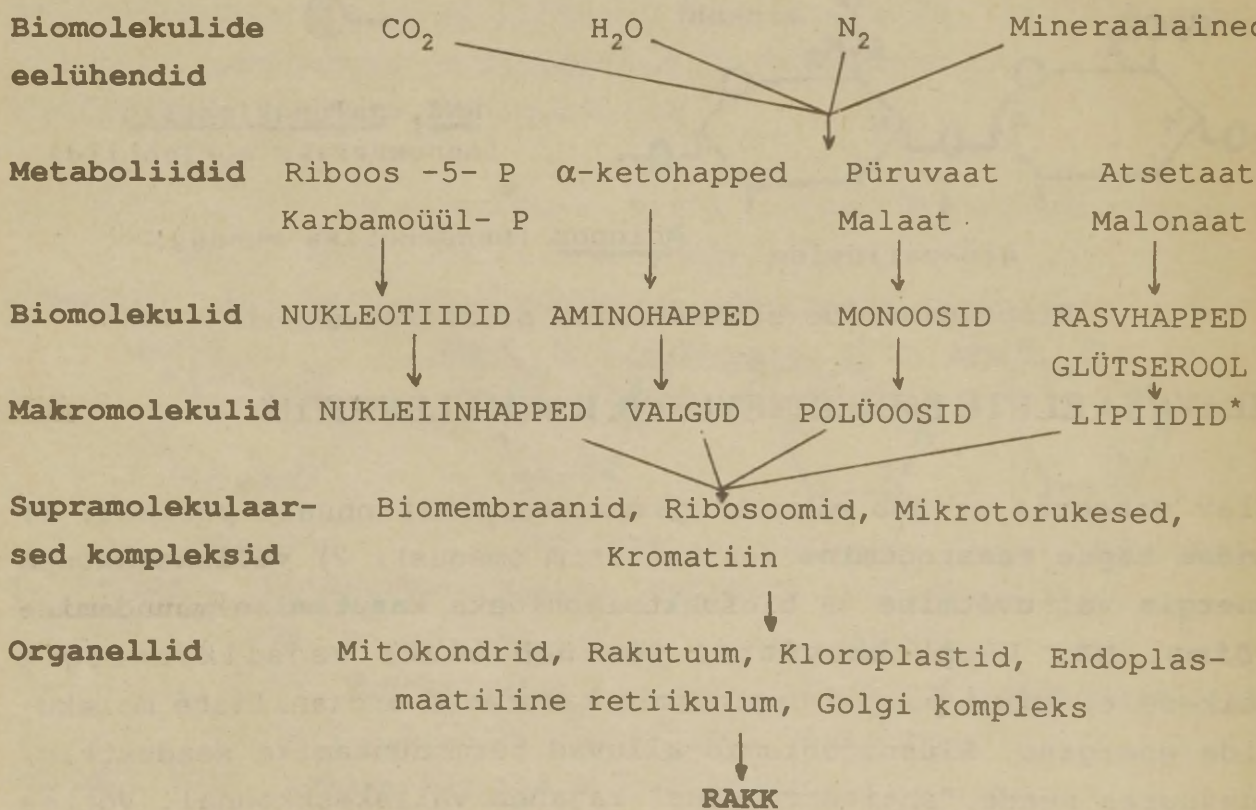
RNA, polünukleotiid
(monomeeriks nukleotiid)

ELAVA JA ELUTU PÕHIERINEVUSED. RAKU ÜLDEHITUS

Elav materia erineb elutust järgmiste põhitunnuste poolest: 1) **enese täpne taastootmine** (unikaalseim omadus); 2) **väliskeskkonna energia vastuvõtmise** ja biofunktsioonideks **kasutamise-muundamise võime**. NB! Lõppkokkuvõttes pärineb eluks vajalik energia päikeselt, kuigi paljud organismid kasutavad orgaaniliste molekulide energiat. Elusorganismid alluvad termodünaamika seadustele, kusjuures nende "antientroopsus" rajaneb väliskeskkonnal. Võttes sealt "kasulikku" energiat oma struktuurse korrastatuse tagamiseks, tõstavad nad soojuse eraldamisega väliskeskkonda selle entroopiat. 3) elusorganismi **iga molekulaarne komponent täidab vähemalt üht funktsiooni**: mida lihtsam on biomolekul, seda enam on tal erinevaid funktsioone (näit. aminohapped on valkude monomeerideks, energiasubstraatideks, teatud hormoonide, mediaatorite, alkaloidide eelühendeiks; nukleotiidid on nukleiinhapete monomeerideks, koensüümide komponentideks, energia akumulierija-

teks ja ülekandjateks); 4) **molekulaarse organisatsiooni tasemelisus** (vt. allpool); 5) **ehituse keerukus ja individuaalsete makromolekulide rohkus**. NB! see tagatakse aga väikese hulga lihtsate ehituskomponentide abil. Nii on kogu maakera elusorganismides ligikaudu 10^{10} - 10^{12} individuaalset valku (inimeses umbes 50000) ja 10^{10} nukleiinhapet, mis luuakse vastavalt 20 aminohappest ja 5 põhinukleotiidist. See viitab ka elusorganismide ühtsele päritolule.

RAKU EHITUSE TASEMELISUS. Raku ja tema komponentide kujunemist illustreerib struktuurse organisatsiooni teatud "tasemelt tasemele üleminek" (vt. skeem). Sealjuures kehtivad teatud põhi-**Biomolekulide eelühendid**



* funktsionaalsed makromolekulid

printsiihid: 1) **makromolekulide** ehitusüksused seostuvad **kovalentsete sidemete** abil, makromolekulidest **kõrgemad tasemed** luuakse **nõrkade sidemete** abil; 2) makromolekulide **primaarstruktuur** kannab "baasinfot" kõrgemate struktuursete tasemete kujunemiseks: 3) **komplementaarsus** (vt. biomolekulid) on makromolekulide, organelide (sisuliselt ka rakkude) **assambleerumise aluseks**. Tänu

komplementaarsusele (aga ka "seostumisprintsibiile" - nõrgad sidemed komponentide vahel) formeeruvad spontaanse "kokkupakkimise" abil terviksüsteemid/kompleksid (näit. subühikutest formeerub valgumolekul, üksikensüümidest multiensüümkompleks, nii formeeruvad ka biomembraanid jne.).

RAKU ÜLDISTATUD EHITUS. Elusrakk peab omama: 1) süsteemi energia tootmiseks-salvestamiseks, 2) pärilikkuseaparaati, 3) membraanide süsteemi biokeemiliste protsesside toimumiseks vajalikus ruumilises eraldatuses (**kompartmentalisatsioon**) ja 4) regulatsioonisüsteeme. Nende tingimuste olemasolul on rakk võimeline teatud eneseregulatsiooniks, aga ka taastootmiseks ja oma komponentide spontaanseks "kokkupakkimiseks", s.t. rakk on sel juhul elava materia lihtsaim ehituslik-funktsionaalne üksus.

Plasmamembraan. See on lipiidne kaksikkiht, milles paikneb rohkesti transmembraanseid ja lokaalseid valke (pumbad, ülekandjad, retseptorid). Plasmamembraan on valikuline difusioonibarjäär, ta tagab ionide ja metaboliitide passiivse ja aktiivse transpordi ning raku elektrofüsioloogilised talitlused. **Tuumamembraan.** Koosneb välis- ja sisemembraanist ning ümbritseb tuumamaterjali (tuumake, kromatiin, karüoplasma). Omab poore, mille kaudu liiguvad RNA ja valgud. Tuumakeses sünteesitakse rRNA ning siin toimuvad ribosoomide sünteesi algetapid. Kromatiin on kromosoomide koostisaine, mis koosneb DNA, RNA ja spetsiifilistest valkudest ning on otseses seoses DNA replikatsiooni, mRNA ja tRNA sünteesiga.

Mitokondrid. Neid on rakus ligikaudu 1000. Omavad välismembraani, tugevalt liigendatud (kristad) sisemembraani ning geelitaolist sisu (maatriks). Mitokondrites toimub metaboliitide lõplik lõhustumine, mistõttu neis toodetakse enamik rakule vajalikku ATP. Mitokondrites on vähesel määral RNA, DNA ja ribosoomid. See DNA on vajalik teatud spetsiifiliste sisemembraani valkude kodeerimiseks. **Endoplasmaatiline retiikulum (EPR).** Membraaniga ümbritsetud kanalikeste võrgustik rakuplasmas, mis kohati ühildub Golgi kompleksi ja plasmamembraaniga. EPR kanalikeste sisemust nim. tsisternideks. EPR üldfunktsioon on ainete transport raku kompartmentide vahel. Siledapinnalises EPR-s toimub ka ksenobiootikumide detoksikatsioon, fosfolipiidide, prostaglandiinide

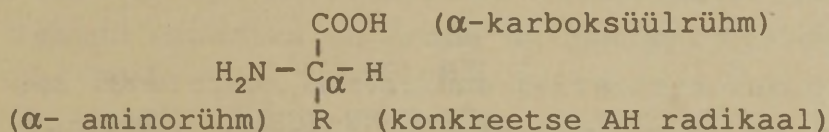
ja steroidide biosüntees. Lihaskoe rakkude puhul ka kaltsiumi reabsorptsioon lihaste lõõgastumisel. Karedapinnaline (tema välispinnal lokaliseeruvad ribosoomid) EPR on seotud valgusünteesiga. Ribosoomidel sünteesitud valgud satuvad tsisternidesse ning transporditakse raku kompartmentidesse. **Golgi kompleks**. Membraaniga ümbritsetud, liigendatud sisemusega põiekesed (nim. ka Golgi aparaadiks), mis täidavad EPR-st saabunud valkude, lipiidide, süsivesikute kogumis(säilitamis)- ja transpordifunktsiooni. Siin pannakse kokku ka liitvalgud glükoproteiinid, s.t. valgulisele osale liidetakse süsivesikuline komponent. Golgi kompleksi põiekesed ühilduvad plasmamembraaniga, mistõttu nende kaudu viiakse membraani välispinnale (eksotsütoos) teatud komponente (näit. lokaalseid membraanseid valke). **Lüsoosoomid**. Membraaniga ümbritsetud põiekesed (rakus ligikaudu 250), kus toimub mittevajalike ("vananenud") makromolekulide ja teiste biomolekulide hüdrolyüs. Osalevad ka fagotsütoosis. Nende marker-ensüüm on happeline fosfataas. Neis on leitud üle 60 ensüümi (hüdrolaasid, oksüdaasid). **Peroksüsoomid**. Membraaniga ümbritsetud põiekesed (mikrokehakesed), mis sisaldavad ensüüme (katalaas jt.) rakus tekkiva toksilise H_2O_2 lõhustamiseks. Rakus on peroksüsoome ligikaudu 500. **Mikrotorukesed, Mikrofiibrillid**. Mikrofiibrillid on niitjad moodustised, mikrotorukesed aga torujad. Esimesi on mitut liiki ja kõige peenemad neist on identsed peenikeste aktiininiitidega lihaskoe rakkudes. Mikrotorukesed tekivad glükoproteiinse valgu (tubuliini) spontaanse kokkupakkimise teel. Mikrofiibrillidest ja torukestest moodustub raku tsütoskelett, mis on ühildunud plasmamembraaniga. Seetõttu takistab ta raku mahu järske muutusi ja plasmamembraani fosfolipiididel võtmast selliseid lokaalseid struktuure, mis "lõhuksid" lipiidset kaksikkihti. Tsütoskelett ei ole jäik süsteem, kuna mikrotorukeste teke ja lammutumine on dünaamiline koordineeritud protsess. Mikrotorukesed on seotud ka mitoosiga. **Tsütoplasma**. See on raku vedel keskkond, milles lokaliseeruvad glükogeeni süntetaas (süntaas), glükogeeni fosforülaas, aga ka glükolüüsi, aminohapete katabolismi ja anabolismi ning rasvhapete sünteesi ensüümid.

Lisagem, et peale ülalnimetatud komponentide iseloomustab

taimerakke: 1) homo- (peamiselt tselluloos) ja heteropolüoosidest koosnev tugev rakukest, millel on sisuliselt ehitus-kaitsefunktsioon; 2) plastiidide (näit. kloroplastid) ning suurte vakuoolide (sisaldavad rakumahla) olemasolu. Prokarüootsetes rakkudes puuduvad tuum, mitokondrid ja EPR.

AMINOHAPPED

Aminohapped (AH) on karboksüülhapete derivaadid, mis sisaldavad vähemalt ühte amino- ja karboksüülrühma. Elavast leitud aminohapetest (umbes 200; inimorganismis umbes 60) suurem osa on α -AH, mida iseloomustab üldvalem (NB! L-stereomeer):



C_{β} , C_{γ} jne juures olev aminorühm viitab β -, γ - jne AH-le.

AH jagunevad kahte rühma: 1) valkudes esinevad e. **proteino-geensed** (siia kuuluvad vaid α -AH-te L-stereomeerid; vt. üldvalemit ja glütseeraldehüüdset etaloni) ja 2) **aproteino-geensed** e. valkudes mitteesinevad. Proteino-geensete AH puhul eristatakse põhilisi (20 tk.) ja harvaesinevaid e. minoorseid. Levinuim on põhiliste proteino-geensete AH **struktuurne klassifikatsioon** R ehituse ja dissotsiatsiooni baasil füsioloogilise pH (ligikaudu 7) juures.

I ATSÜKLILISED AH

1. Alifaatsed AH

	Radikaal	Lühend	Tähis
Glütsiin	H-	Gly	G
Alaniin	H ₃ C-	Ala	A
Valiin	H ₃ C-CH- CH ₃	Val	V
Leutsiin	H ₃ C-CH-CH ₂ - CH ₃	Leu	L
Isoleutsiin	H ₃ C-CH ₂ -CH- CH ₃	Ile	I

2. Hüdroksüaminohapped

Seriin	$\text{HO}-\text{CH}_2-$	Ser	S
Treoniin	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-$	Thr	T

3. Tioaminohapped

Tsüsteiin	$\text{HS}-\text{CH}_2-$	Cys	C
Metioniin	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Met	M

4. Dikarboksüülised AH

Asparagiinhape (aspartaat)	$-\text{OOC}-\text{CH}_2-$	Asp	D
Glutamiinhape (glutamaat)	$-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Glu	E

5. Dikarboksüülsete AH amiidid

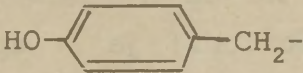
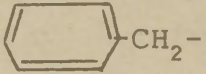
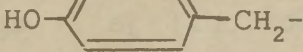
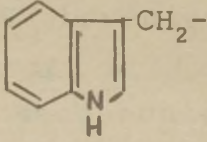
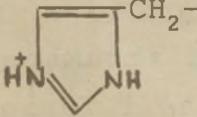
Asparagiin	NH_2 $\text{O}=\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\text{CH}_2-$	Asn	N
Glutamiin	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Gln	Q

6. Diaminohapped

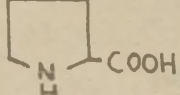
Lüsiin	$\text{H}_3^+\text{N}-(\text{CH}_2)_3-$	Lys	K
Arginiin	$\text{H}_3^+\text{N}-\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{NH}}-(\text{CH}_2)_2-$	Arg	R

II TSÜKLILISED AH

1. Aromaatsed AH

Fenüülalaniin			Phe	F
Türosiin			Tyr	Y
Trüptofaan			Trp	W
Histidiin			His	H

2. Tsükliline iminohape

Proliin (NB! Täielik valem)		Pro	P
-----------------------------	--	-----	---

Teine põhiliste proteinoogeensete AH klassifikatsioon on **happelis-aluseline klassifikatsioon** R dissotsiatsiooni ja loomuse alusel. Selle kohaselt jagunevad AH happelisteks (Asp, Glu), aluselisteks (Lys, Arg, His) ja neutraalseteks (kõik ülejäänud AH). Happelised, aluselised ja osa neutraalsetest AH-st (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Gly) on polaarsed (hüdrofiilsed). Teised on apolaarsed (hüdrofoobsed).

Bioloogiline (füsioloogiline) klassifikatsioon eristab: 1) asendamatuid AH - organism peab neid täies ulatuses saama toiduga (kõik loomorganismid ja inimene: Val, Leu, Ile, Thr, Met, Lys, Phe, Trp); 2) osaliselt asendamatuid AH - ebapiisav biosüntees

organismis nõuab osalist saamist toiduga (inimene: Arg, Tyr, His); asendatavad AH - sünteesitakse organismis piisavalt asendamatu AH ja teiste ühendite baasil. Organismid, kes sünteesivad ise kõiki AH, kulutavad ligikaudu 15 % energiat rohkem kui asendamatu AH kasutavad organismid. Liike iseloomustab auksotroofsus, e. vastav asendamatu AH koosseis (His on täielikult asendamatu rotile, inimesele on ta aga osaliselt asendamatu).

Harvaesinevad proteinoogeensed AH moodustuvad polüpeptiidahelatesse lülitunud põhilistest AH-test (näit. Pro \rightarrow hüdroksüproliinid; Lys \rightarrow hüdroksülüsiin; Cys \rightarrow tsüstiin jne). Seetõttu neid ei kodeerita. Neil baseerub tavaliselt antud valgu mingi spetsiifiline funktsioon. Nii näiteks tuleneb elastiini mitmesuunaline venivus Lys derivaatidest desmosiinist ja isodesmosiinist.

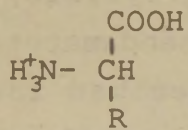
Teatud erandiks on nende hulgas aga Cys derivaat tsüstiin, mille üks funktsioon on valkude tertsiaarstruktuuri stabiliseerimine. Tsüstiini sümbol on Cys-Cys, s.t. ta moodustub kahest tsüsteiini jäägist. Tema radikaal on seega $\text{H}_2\underset{|}{\text{C}}-\text{S}-\text{S}-\underset{|}{\text{C}}\text{H}_2$.

Aproteinoogeensed AH esinevad rakus vabalt või mittevalgulist ühendite koostises. Nende tüüpesindajad on: ornitiin, tsitrulliin (Arg ja karbamiidi eelühendid); β -Ala ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) on vitamiin B₃ eellane; γ -aminovõihape on neuromediaator. NB! On ka mürgiseid AH (näit. taimede β -tsüanoalaniin ja kanavaniin on inimesele mürgised ksenobiootikumid).

FÜÜSIKO-KEEMILISED OMADUSED

AH füüsiko-keemilistel omadustel rajanevad nende isoleerimise, identifitseerimise ja kvantitatiivse määramise meetodid. Teisalt määravad AH omadused (eeskätt happelis-aluselised omadused) ära valkude omadused.

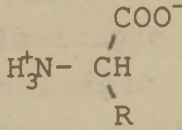
Happelis-aluselised omadused. AH on amfoteersed elektrolyüüdid, s.t. neil on happe ja aluse loomus. **Happena** käituvad nii $-\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$ kui ka **protoneeritud** $-\text{NH}_2$, s.t. $-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2 + \text{H}^+$. **Alusena** käituvad $-\text{COO}^-$, s.t. $-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COOH}$ ning $-\text{NH}_2$, s.t. $\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3^+$. Keskkonna pH tingib AH ioniseeritud vormide järgmised üleminekud:



(käitub happena)

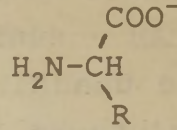
AH katioon

(happeline keskkond,
H⁺ liig)



AH amfioon

(bipolaarne ioon,
tsvitter-ioon)



(käitub alusena)

AH anioon

(aluseline keskkond,
OH⁻ liig)

Vesilahustes on neutraalsed AH valdavalt amfioonses vormis, seetõttu antakse ka AH üldvalem sellisena. Inimorganismi rakkudes ja biovedelikes (pH on ligikaudselt neutraalne) on happelised AH (Asp, Glu) negatiivse ja aluselised AH (Lys, Arg, His) positiivse summaarse laenguga. Ülejäänud AH on amfioonses vormis. **pH väärtust**, mille juures anioonsed laengud = katioonsed laengud, s.t. AH **summaarne laeng on null**, nim. antud **AH isoelektriliseks punktiks** (pH₁ või pI). AH selle pH juures elektriväljas ei liigu ning tal on vähim lahustuvus vees. pI on AH üks olulisemaid parameetreid, peegeldades AH erinevate funktsionaalsete rühmade happelis-aluselisi omadusi. Kuna pI puhul on α-COOH ja α-NH₂ dissotsiatsioon võrdne, siis pI leitaksegi tavaliselt α-COOH ja α-NH₂ happeliste dissotsiatsiooni konstantide kaudu. Konstante tähistatakse vastavalt pK₁ ja pK₂ ja nad peegeldavad pH väärtusi, mille juures vastavalt α-COOH ja α-NH₂ on 50 % dissotsieerunud. Konstandid ja antud AH pI väärtus leitakse tiitrimiskõvera abil.

AH-te lahustuvus. AH lahustuvad vees üldiselt hästi, hüdrofoobsete radikaalidega AH mõnevõrra halvemini. Vähepolaarsetes lahustites (etanol, dietüleeter jt.) lahustuvad AH halvasti.

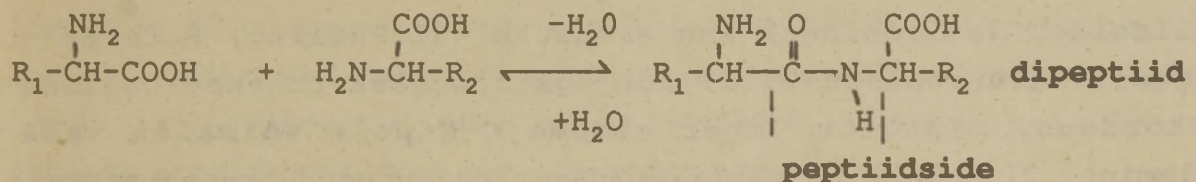
AH-te neeldumisspektrid. Selget neeldumisspektrit, maksimumiga 280 nm, omavad Trp ja Tyr. Kuna need AH on valkudes üsna levinud, saab 280 nm juures määrata valguga ligikaudset hulka lahuses. Nõrka neeldumismaksimumi omab 260 nm juures Phe.

AH-te stereoisomeeria. Proteinogeensed AH (v.a. Gly) võivad olla L- ja D-isomeeridena (vt. üldvalemit glütseeraldehüüdse etaloni alusel). Kahe C* korral (Thr, Ile) annab AH diastereomeere, mis pole peegelisomeerid (näit. L- ja D- allotreoniinid).

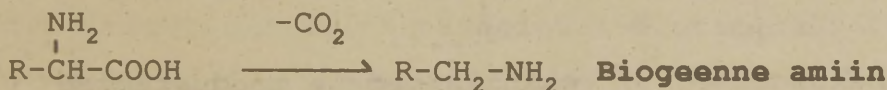
Valkudes on leitud vaid L-AH. Bakterite kapslite peptiidides on vähesel määral D-Ala ja D-Glu. D-AH on ka mikroorganismide produtseeritud antibiootikumides (etamütsiinis D-Leu; gramitsidiinis D-Val ja D-Phe; polümüksiinis D-Ser ja D-Val).

BIoloogiliselT Tähtsamad Reaktsioonid

Peptiidsideme tekkel ühe AH α -COOH ja teise AH α -NH₂ ühinevad veemolekuli eraldumisega. Reaktsiooni tasakaal on nihutatud tugevalt hüdroolüüsi suunas, mistõttu peptiidsideme sünteesiks vajatakse energiat.



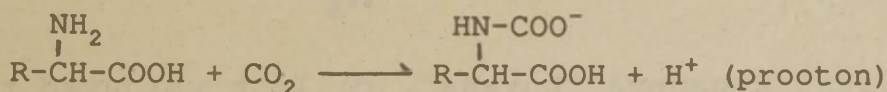
Dekarboksüülimine toimub elusrakus dekarboksülaaside toimel biogeensete amiinide (vt. hormoonid) moodustumisega.



Desamiinimisel eraldub aminorühm (NH₃-na) ja tekib antud AH ketoanaloo. Inimorganismis on keskne tähtsus Glu oksüdeerival desamiinimisel α -ketoglutaraadiks (Glu ketoanaloo).

Amiidide teke on seotud toksilise NH₃ sidumise ja transpordiga. AH-te amiidid, Gln ja Asn (vt. tabel), sünteesitakse vastavalt Glu ja Asp baasil ATP ja NH₃ osavõtul.

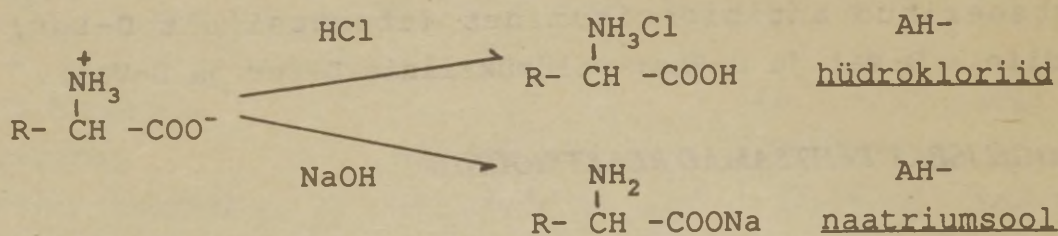
Karbaminohemoglobiin tekib kui hemoglobiini (Hb) ja CO₂ kompleks CO₂ transpordiks. See on Hb valgulise osa globiini Lys- või Arg-jäägi ja CO₂ vaheline reaktsioon.



AH aktivatsioon (vt. valgusüntees).

Imiini teke (Schiffi alus) (vt. transamiinimine).

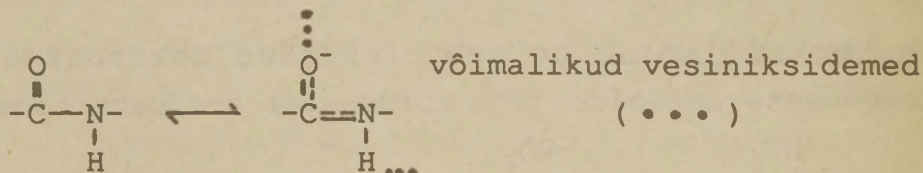
Soolade teke reageerimisel happe või alusega.



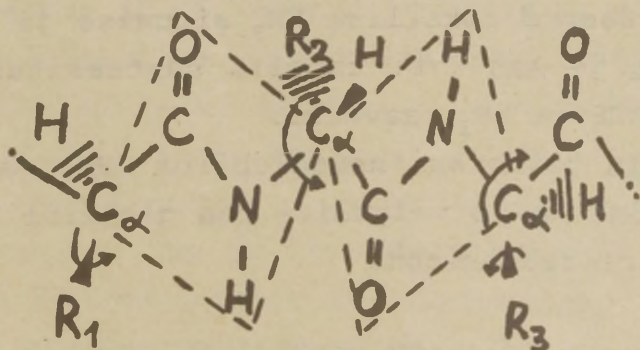
PEPTIIDID

PEPTIIDSIDEME LOOMUS

Peptiidsidet (amiidsidet) iseloomustab (L.Pauling, R.Corey - röntgenstruktuuranalüüs): 1) konjugatsioonist tulenev osaline **kahekordsus**, mistõttu ümber sideme C-N pole võimalik vaba pöörlemine; 2) O ja H on peptiidsidemes paigutunud **transasendisse**



(NB! sideme kahekordsus); 3) **vesiniksidemete moodustamise** võimalus; 4) **peptiidgrupi aatomite** paigutumine ühele tasapinnale e. **koplanaarselt** peptiidsideme kahekordsuse ja C aatomi sp^2 -hübriidoleku tõttu. Seega on peptiidid vaadeldavad korduvatest

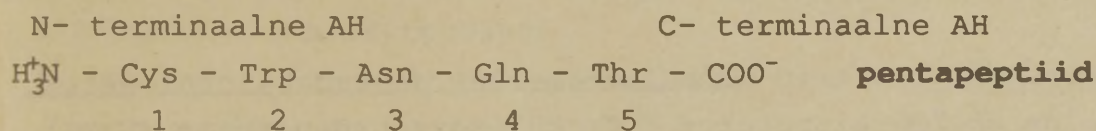


peptiidgruppidest koosneva "**tüvena**", millest väliuvad teatud nurga all AH radikaalid. Kuna molekuli teatud osade vaba pöörlemine on võimalik (vt. joonis) tekivad peptiidide mitmesugused konformatsioonid. Nende hulka piirab aga peptiidsideme jäikus.

MÕISTE, KLASSIFIKATSIOON JA OMADUSED

Peptiidid on oligomeersed biomolekulid. Eristatakse oligopeptiide (2-20 AH-jääki; kr. k. oligos= vähe) ja polüpeptiide (20 kuni 50 AH-jääki). Taoline liigendus on loomulikult tinglik. Näit. 25-50 AH-jääki sisaldavat molekuli nim. tihti ka pikaks oligopeptiidiks. Teisalt, nende kõigi puhul kasutatakse ka ainult üldterminit "peptiidid". Samuti on tinglik polüpeptiidide ja valkude vaheline piir. Kokkuleppeliselt nimetatakse valguks polüpeptiidahelat, milles on üle 50 AH-jäägi.

Peptiidile süstemaatilise nimetuse andmisel alustatakse vaba $-NH_2$ omavast AH-jäägist (N-lõpuline, N-terminaalne, amino-lõpuline AH). Aminohapped, mille $-COOH$ võtab osa peptiidsideme tekkest, kannavad peptiidi nimetuses lõppu -üül. Peptiidi nimetus lõpeb vaba karboksüülrühma omava AH-jäägi (C-lõpuline, C-terminaalne, karboksüüllõpuline AH) muutumatu nimega:



Tsüsteinüül-Trüptofanüül-Asparaginüül-Glutaminüül-Treoniin

Peptiididel on AH-ga sarnaseid ja neist erinevaid omadusi. AH-ga sarnaselt käituvad nad happe ja alusena, esinevad organis- mis amfioonidena, omavad pI ja annavad $\alpha-COOH$ ja $\alpha-NH_2$ reakt- sioone. **AH-test eristab neid:** 1) peptiidsidemele iseloomulik biureedireaktsioon vasksulfaadiga aluselises keskkonnas (tüüpilise sinakasvioletse värvuse annab juba tetrapeptiid); 2) peptiidsideme hüdrolüüs H_2O eraldumisega (vt. peptiidsideme tekkereaktsiooni); 3) pikemate peptiidide vesilahuste kolloidne loomus ja koagulatsioon (kalgendumine); 4) nende optiline aktiiv- sus on AH-jääkide optilise aktiivsuse ja peptiidi konformatsioo- nist tuleneva optilise aktiivsuse summaarne väärtus.

AMINOHAPPELISE KOOSTISE MÄÄRAMINE

Peptiid hüdrolüüsitakse AH-teks happeliselt (6 N HCl, 110°, 28

tundi), aluseliselt (2-4 N NaOH, 100°) või ensümaatilisel (proteaasid, 37°). Reeglina kasutatakse neid hüdroolüüsi korraga, kuna happeline lõhustab Trp ning muudab Gln Glu-ks (Asn Asp-ks), aluseline aga lõhustab Cys, Cys-Cys ja Thr. AH-te hüdroolüsaat kantakse ioonivahetuskromatograafia kolonnile, mida soovutatakse tõusvat pH väärtust omavate puhvritega. See tingib AH-te väljumise kolonnist kindlas järjekorras: esimesena elueerub tugevalt happelises keskkonnas Asp ja viimasena elueerub nõrgalt happelises keskkonnas Arg. Saadud AH-te fraktsioone ilmutatakse ninahüdriiniga, mis annab reaktsioonis α -NH₂ rühmaga intensiivse sinise (Pro kollase) värvuse. Uuritava peptiidi AH-lise hüdroolüsaadi elueerumisspektri võrdlemine aminohapete testsegu elueerumisspektriga lubab identifitseerida peptiidi AH-lise koostise. Kogu protsess on automatiseeritud (AH- analüsaator).

AMINOHAPPELISE JÄRJESTUSE MÄÄRAMINE

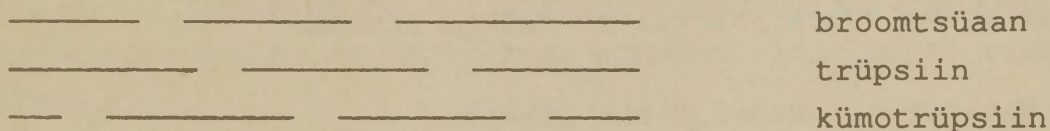
Keskseks meetodiks on siin Edmani astmeline degradatsioonimeetod. N-terminaalne AH "märgistatakse" fenüülsotiotsüanaadiga (FITS). Fenüülhüdantoinaminohape eraldatakse mõõduka happelise hüdroolüüsiga ja identifitseeritakse kromatograafiliselt. Siis "märgistatakse" FITS-ga järgmine N-terminaalne AH ja protseduur kordub. Spetsiaalse aparraadi (sekvenaatori) abil võib sellise astmelise meetodiga N-terminaalsest otsast määrata vähemalt 30-50 AH-t.

Peale Edmani meetodi kasutatakse N-terminaalse AH määramiseks-eraldamiseks veel lühiajalist hüdroolüüsi aminopeptidaasidega, dansüülmärgistamist dansüülkloriididega (AH identifitseeritakse fluorestsentsi alusel) ja reaktsiooni Sangeri reaktiiviga (2,4-dinitrofluorobenseen, DNFB). N-terminaalne aminohape annab DNFB-ga 2,4-dinitrobenseenaminohape, mis peale peptiidi täieliku hüdroolüüsi identifitseeritakse.

Primaarstruktuuri määramist C-terminaalse AH kaudu kasutatakse harvemini. Hädavajalik on see näit. N-terminaalse AH α -NH₂ atsetüülituse korral. Sel puhul kasutatakse C-terminaalse AH eraldamist karboksüpeptidaasidega, redutseerimist boorhüdriidiga või peptiidi hüdroolüüsi hüdrasiiniga (Akabori meetod). Redut-

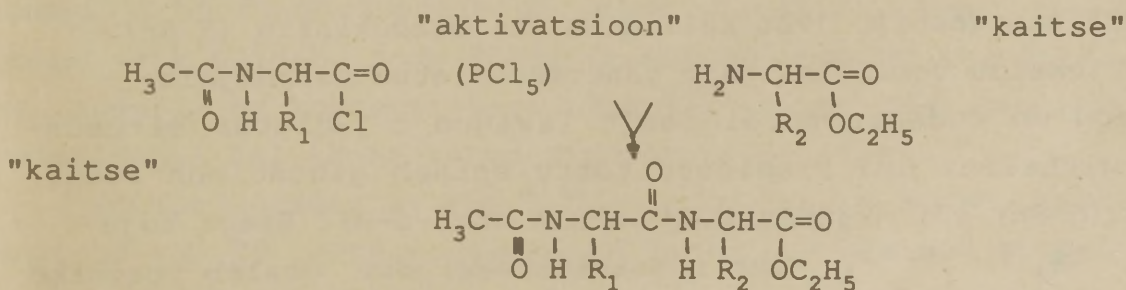
seerimisel tekib vaid C-terminaalsest AH-st aminoalkohol või hüdrasiinolüüsil AH-hüdrasiinderivaat. Vastav aminoalkohol või hüdrasiinderivaat identifitseeritakse hüdroolüsaadist.

Ülaltoodud võtted on vajalikud ka valkude primaarstruktuuri määramisel. Lisanduvad veel : 1) terminaalsete AH-te arvu määramine, st. polüpeptiidahelate arvu määramine; 2) mitme ahela puhul nad eraldatakse ja kui nad on seotud disulfiidsildadega, siis need lõhutakse (näit. redutseeritakse); 3) ahelate identsuse kontroll: reeglina nende osalise hüdroolüüsi produktide elektroforeetilise liikuvuse, kromatograafilise "pildi" jne. abil; 4) individuaalse polüpeptiidahela hüdroolüüs faktorite abil, mis lõhuvad ahelat erinevatest kohtadest (broomtsüaan, trüpsiin, kumotrüpsiin jne.). Määrates nende faktorite toimel tekkinud peptiidide primaarstruktuuri ülaltoodud võtete abil ja kõrvutades neid primaarstruktuure omavahel, saavad "kaetuks" ka erinevad lõhustumiskohad (vt. skeem), st. saame kokku panna kogu polüpeptiidahela primaarstruktuuri.



SÜNTEES JA LOODUSLIKUD PEPTIIDID

Tagamaks peptiidsideme teket just vastavate AH-te α -NH₂ ja α -COOH vahel ühe AH α -NH₂ kaitstakse atsüülimisega, teise AH α -COOH aga



esterdamisega ja üks AH-st aktiveeritakse. Kui peptiidside on tekkinud eemaldatakse "kaitsev" atsüüljääk. Järgneb uue AH-jäägi liitmine, mille α -COOH on "aktiveeritud" ja α -NH₂ "kaitstud". Süntees on automatiseeritud (süntesaatorid). Nii on sünteesitud

rida peptiidhormoone (näit. AKTH, vasopressiin jt.), mida kasutatakse ka ravimitena.

Looduslikud peptiidid. Sõltuvalt toime iseloomust ja päritolust grupeeritakse bioaktiivseid peptiide reeglina järgmiselt: a) peptiidid kui tüüpilised hormoonid (AKTH, hüpotaalamuse "releasing factors", vasopressiin, oksütotsiin, glükaagoon jt.); b) gastrointestinaalsed peptiidhormoonid (gastriin, sekretiin, VIP jt.); c) vasoaktiivsed peptiidid (kuuluvad vere-seerumi α_2 -globuliinsesse fraktsiooni ja on seotud veresoonte toonuse ja vererõhu regulatsiooniga: angiotensiin, kallidiin, bradükiniin); d) mitmesugused neuropeptiidid (pentapeptiidid enkefaliinid, mida sünteesitakse KNS-s; endorfiinid jt., vt. närvikoe biokeemia).

Mitmed peptiidid aktiveeruvad alles posttranslatsioonelt, s.t. bioaktiivne vorm tekib inaktiivsest eellasest (polüpeptiidid, oligopeptiidid) proteolüütiliste ensüümide toimetel:

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-polüpeptiidahel
angiotensinogeen (vere inaktiivne valk) Reniin



Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
angiotensiin I (inaktiivne) Karboksükatepsiin



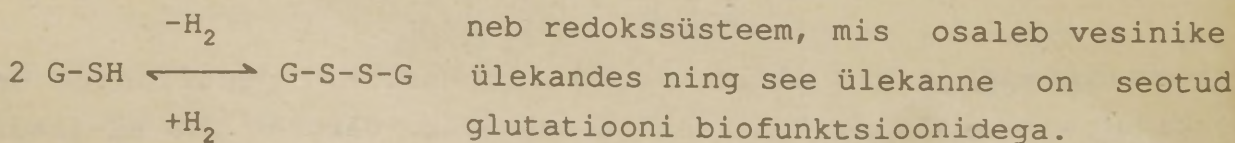
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe → aldosterooni sekretsioon
angiotensiin II (aktiivne peptiid) veresoonte ahenemine

Reniin-angiotensiin-aldosteroon süsteem

Sisuliselt samamoodi tekib kallikreinogeenist kallidiin (10 AH) ja bradükiniinogeenist (või kallidiinist) bradükiniin (9 AH).

Vaatleksime veel mõningaid vähemkäsitletud esindajaid.

Glutatioon on kudedes laialdaselt levinud : γ -glutamüül-tsüsteinüül-glütsiin. Cys sisalduse tõttu esineb glutatioon redutseeritud (G-SH) või oksüdeeritud vormis (G-S-S-G). Seega kuju-



Atriopeptiidid on südamekoja (lad.k. atrium) koest isoleeritud peptiidide (23-100 AH) perekond, mida iseloomustab veresooni

laiendav toime (NB! vastupidine toime süsteemile reniin-angiotensiin-aldosteroon). Nende bioaktiivsus baseerub tsüstiini (disulfiidsildade) abil moodustunud 17-lülilisel ringstruktuuril ja realiseerub tsüklilise GMP vahendusel (vt. hormoonide toimemehhanismid). **Karnosiin** (β -alanüülhistidiin) ja **anseriin** (β -alanüülmetüül-histidiin). Nad on lihaskoe peptiidid, millel on antioksidantide roll ja teatud puhverdusfunktsioon. **Amanitiin**, kui roheline kärbseseene peptiidne mürk.

VALGUD

ÜLDISELOOMUSTUS

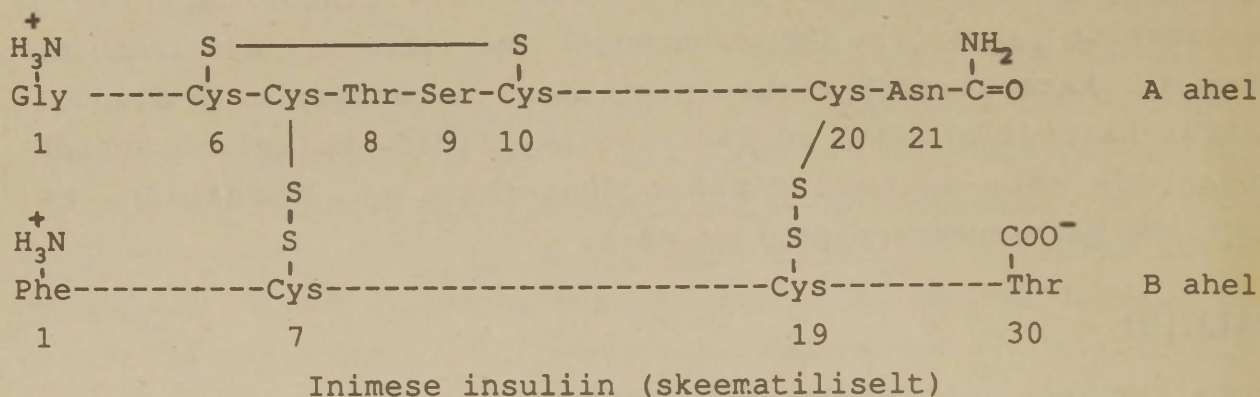
Valgud e. proteiinid (kr. k. protos = esmane, tähtsaim; termini "proteiinid" võttis kasutusele Mulder 1938.a.) on ühest või mitmest polüpeptiidahelast koosnevad makromolekulid. Neid iseloomustab: 1) koosnemine AH-jääkidest ja sellest tulenev individuaalsus; 2) peptiidside AH-jääkide vahel; 3) kõrgmolekulaarsus; 4) mitmetasemeline struktuurne organisatsioon; 5) lämmastiku sisaldus.

AH kui valkude monomeerid. Kuna valgud on geneetilise info realiseerumise vahendid, siis on nad arvukaimad individuaalsed makromolekulid mitmesuguste funktsioonidega. Sisuliselt on selle kõige aluseks AH-te järjestus ja koosseis antud valgus, mis tagabki valkude individuaalsuse. Teisisõnu, AH-te koosseis ja järjestus määravad antud valgu struktuuritasemed, füüsiko-keemilised omadused ja biofunktsiooni(-id). Mida spetsiifilisemat funktsiooni antud valk täidab, seda "ühekülgssem" on tema AH koosseis. (näit. kollageenis on rohkesti Gly). Tegelikult aga just see ühekülgsus võimaldabki tal täita antud kitsast funktsiooni.

Inimorganismis on üle 50000 individuaalse valgu. Teoreetiliselt on aga 20 proteinoogeense AH (tuletame meelde, et need on L-rea α -AH) baasil võimalik $2,4 \times 10^{18}$ erineva valgu teke.

Peptiidside. Antud kovalentne side seob AH-jääke valgumolekuli polüpeptiidahelas. Mõningates valkudes esineb ka teist tüüpi kovalentne side nn. disulfiidside (vt. insuliini skemaatilist

ehitust), mis on kas ahelasisene või ahelatevaheline (viimane seob polüpeptiidahelaid omavahel).



Kõrgmolekulaarsus. Tulenevalt valgu funktsioonidest võib valgumolekulis olla erinev arv polüpeptiidahelaid (ribonukleas-1, insuliin-2; hemoglobiin-4 jne.). Mitmeahelalisuse nn. "füüsiliseks" põhjuseks loetakse seda, et ühes polüpeptiidahelas ei saa olla üle 600 AH. Valk võib koosneda ka identsetest polüpeptiidahelatest. Valkude molekulmassi (M_r) ühikuks on dalton (1/12-dik nukliidi ^{12}C massist) ja valkude M_r on 4-5 tuhandest miljoniteni daltoniteni. (NB! M_r alumine piir on kokkuleppeline). Mõned valkude M_r näited: glükagoon - 4000, insuliin - 5734, trüpsiin - 23800, interferroon - 26000, hemoglobiin - 64000, seerumi albumiin - 66500, transferrin - 88000, α_2 -makroglobuliin - 720000, fibrinogeen - 341000, immunoglobuliin (IgM) - 950000, glutamaadi dehüdrogenaas - 1000000, tubaka mosaiigi viiruse valk - 40590000 (koosneb ligikaudu 2200 identsest polüpeptiidahelast).

Struktuurse organisatsiooni mitmetasemelisus. Valke iseloomustatakse nelja struktuurse organisatsiooni tasemega: primaar-, sekundaar-, tertsiar- ja kvaternaarstruktuur (vt. allpool). Kõrgematest struktuuritasemetest tulenevalt valgud denatureeruvad.

Elementaarne koostis. Valk sisaldab keskmiselt 51-55 % C, 21-23 % O, 15-17 % N ja 6-7 % H. Mõnedes valkudes on veel 0,3-2,5 % S ja 0,6 % P (protsendid on valgu kuivmassi kohta). N sisaldus paljudes valkudes on üsna stabiilselt 16 %, millel baseerub valkude kvantitatiivne määramine Kjeldahli meetodil.

SISALDUS JA JAOTUMINE ORGANISMIS

Inimorganismis on valke umbes 40-45 % kuivkaalust. Taimedes on valgusisaldus väiksem (seemnetes 8-13 %, päevalilleseemnetes 30-35 %), bakterites kõrgem. Kudede (organite) valgusisaldus sõltub

VALGUSISALDUS

KOED, ORGANID (%, kuivkaalust)		RAKK (%, kogu valgust)		TOIDUAINED (%, kuivkaalust)	
Põrn, kopsud	82-84	Tsütoplasma	40	Kuivad herved, oad	20
Lihased	80	Mitokondrid	20	Pähklid	16
Neerud	70	EPR	20	Lahja kohupiim	15
Süda, nahk, maks	57-62	Rakutuum	12	Taine sealiha	15
Närvikude	45	Peroksüsoomid	2,5	Muna	12
Luud, hambad	18-24	Lüsoosoomid	2,0	Juust	9-49
Rasvkude	14	Plasmamembraan	1,5	Leib	5-6
Vereplasma	7,5	Ülejäänud	2,0	Piim	3,2

nende funktsioonidest (näit. lihastes - kontraktiilsed valgud, maksas - rohkesti ensüüme, rasvkoes - transport- ja struktuurvalgud) ning see muutub organismi individuaalse arengu jooksul ning haiguste korral (NB! diagnostika, vt. raamatu kolmas osa).

STRUKTUURITASEMED

PRIMAARSTRUKTUUR. See on peptiidsidemete abil moodustunud kovalentne struktuur, mis tähendab **AH-te kindlat järjestust** ja hulka antud valgu polüpeptiidahelas(-tes). Valkude ehituse polüpeptiidteooriast (E. Fischer, 1901-1906 a.) ja röntgenstruktuuranalüüsist (L. Pauling, R. Corey) tulenevalt on primaarstruktuuri-alased põhiseisukohad järgmised: 1) korduvate peptiidgruppide baasil moodustub hargnematu "tüvi", millest ulatuvad välja AH radikaalid; 2) pole reegleid disulfiidsidemete esinemises; 3) kuigi üldiselt pole reegliparaseid AH järjestusi, on siiski teatud kohti,

millede AH järjestus on sarnane (näit. ensüümide trüpsiini ja kumotrüpsiini aktiivtsentrid; mitmete ligandide sidumistsentrid jne.). Selline AH-te järjestuse kattuvus (homoloogia) esineb lähedase toime ja iseloomuga valkude korral.

Primaarstruktuur on aluseks **valkude spetsiifilisusele, kõrgemate struktuuritasemete kujunemisele** ning tema muutused põhjustavad mitmeid nn. **molekulaarseid haigusi**.

Spetsiifilisus on valkude olulisim tunnus. Ta on ka sisuliselt aluseks valkude kesksetele biofunktsioonidele (katalüütiline, regulatoorne jt.). Nii näit. vastavat substraati muundab vaid spetsiifiline ensüümvalk, antikeha kui valk seostub spetsiifiliselt vastava antigeeniga jne. Kasutatakse termineid "liigispetsiifilisus" - antud liigile iseloomulike valkude koosseis, "organismispetsiifilisus" - sama liigi erinevate organismide valguline koosseis ja "koespetsiifilisus" - kudede valgud erinevad immunoloogiliselt teineteisest, s.t. funktsionaalselt erinevad valgud kutsuvad teise koesse sattumisel esile antikehade tekke. Juba ühe AH-jäägi muutus konkreetsetes valgus tingib selle valgu spetsiifilisuse olulise muutuse. Illustreerimiseks toome insuliini primaarstruktuuri liigilised erinevused. Näit. inimese ja sea insuliini primaarstruktuur erineb vaid ühe AH-jäägi poolest.

	A-ahel			B-ahel
	8	9	10	30
Inimene	-Thr	- Ser	- Ile-	- Thr
Siga	-Thr	- Ser	- Ile-	- Phe
Hobune	-Thr	- Gly	- Ile-	- Phe

Iga valgumolekuli primaarstruktuur on "baasinformatsiooniks" kõrgemate struktuuritasemete kujunemisel. Seetõttu võib väita, et geneetiliselt determineeritud primaarstruktuur määrab sisuliselt ära antud valgu kõrgemad struktuuritasemed. (vt. ka allpool).

Geneetilise päritoluga haiguste põhjuseks on tihti mõne AH-jäägi asendumine normaalses primaarstruktuuris (näit. sirprakulise aneemia korral Hb molekuli β -subühikus). See on nn. "molekulaarne haigus" (vt. III osa).

Nüüdisajaks on tuvastatud primaarstruktuur ligikaudu 1500 valgu puhul. Esimesena leiti insuliini primaarstruktuur (Sanger, 1954), mille lihtsustatud variant on toodud eespool.

SEKUNDAARSTRUKTUUR. See on sisuliselt vesiniksidemete abil (NB! nõrgad sidemed) fikseeritud konfiguratsioon. Kuna iga vesiniksideme teke vabastab energiat, tõuseb moodustuva struktuuri stabiilsus. Teke on põhimõtteliselt iseeneslik, sest "tekkeprogramm" on sisuliselt olemas primaarstruktuuris. Eristatakse sekundaarstruktuuri kahte põhivormi: α -heeliks (α -spiraal) ja β -struktuur (β -konformatsioon, kihilis-volditud struktuur).

α -Heeliksit iseloomustab (Pauling, Corey, 1951; röntgenstruktuurianalüüs):

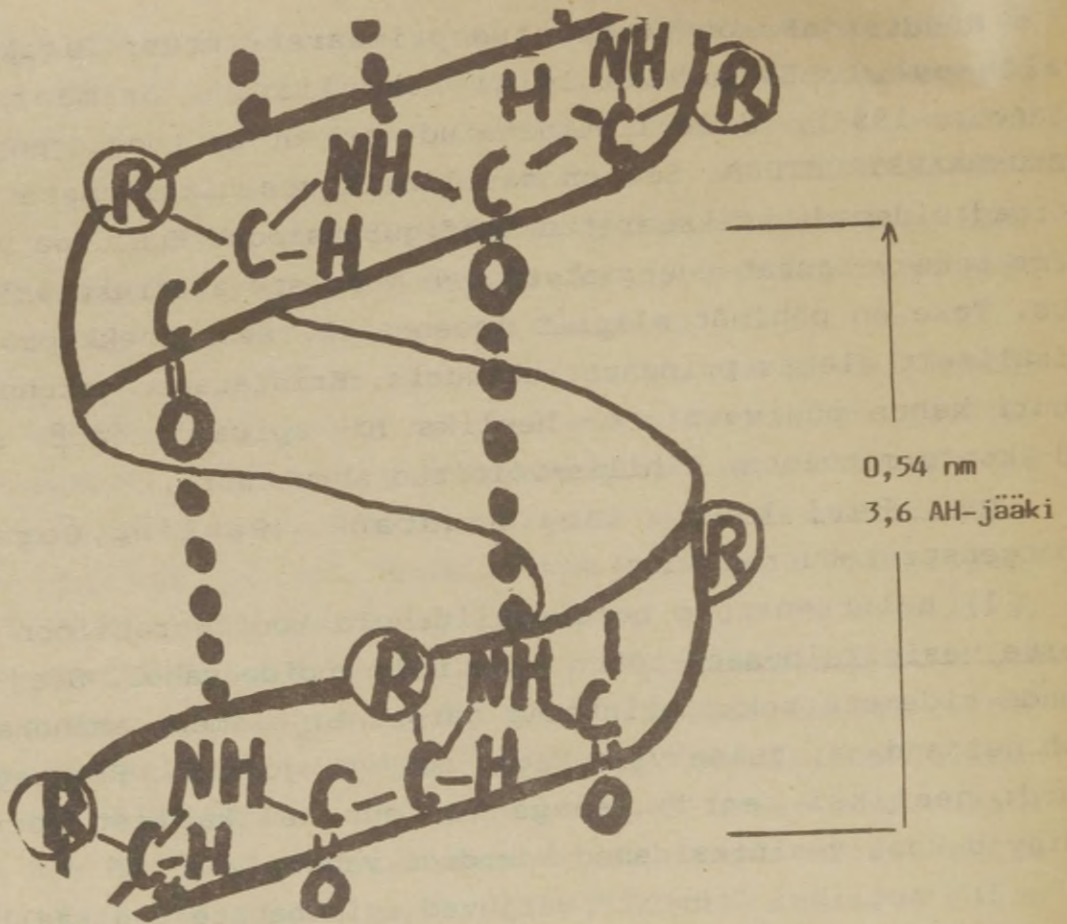
1) helitseerunud polüpeptiidahela konfiguratsioon ahelasiseste vesiniksidemete tõttu peptiidgruppide vahel. Seejuures on nende sidemete tekke printsiip järgmine: esimene aminohape seostub neljandaga, teine viiendaga jne. (vt. joonis). Rõhutagem veelkord: heeliksi keerde (seega ka kogu helikaalset struktuuri) hoiavad koos vesiniksidemed keerdude vahel;

2) heeliksi "tüvest" väljuvad aminohapete radikaalid (R);

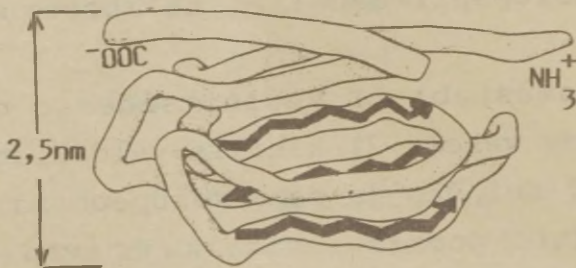
3) vesiniksidemete mõõtmed määravad heeliksi parameetrid (näit. heeliksisamm e. ühe keeru kõrgus on 0,54nm ja ühes keerus on 3,6 aminohapet jne.);

4) L-aminohapped annavad eelistatult α -heeliksi, mis on paremale pöörduv (kellaosuti liikumissuund). Lisagem, et L- ja D-aminohapetest koosnev polüpeptiidahel ei helitseeru α -heeliksiks.

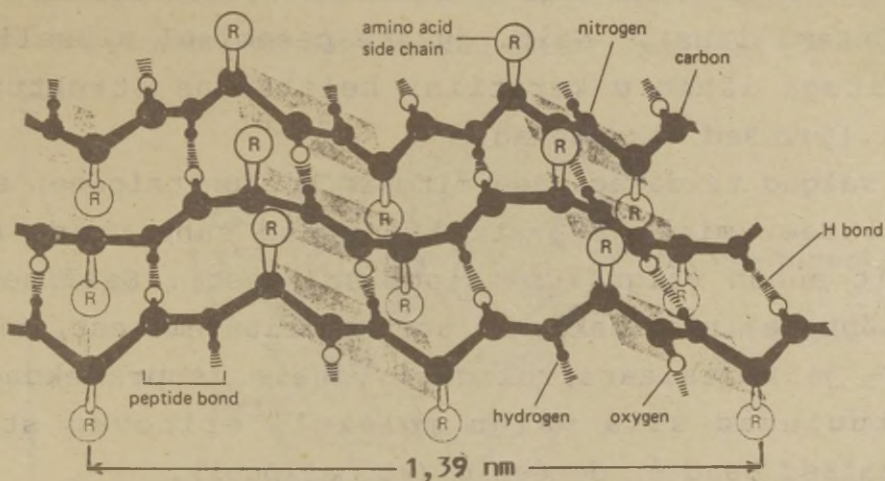
β -struktuuri iseloomustab: 1) Vesiniksidemed on kõrvuti asetsevate peptiidgruppide vahel; 2) kihilis-voldiliste konfiguratsioonide moodustumine. Kui üks ja sama polüpeptiidahel voltub (käändub) edasi-tagasi (vt. joonis), siis kujunevad vesiniksidemed vastassuunaliste ahelalõikude vahel. Seda β -struktuuri nim. antiparalleelseks (ristine e. lühike β -struktuur). Kui kihilis-volditud β -struktuur moodustub mitmest kõrvuti paiknevast polüpeptiidahelast, siis on see paralleelne β -struktuur (ulatuslik e. täielik β -struktuur). Vesiniksidemed on seal naaberahelate peptiidgruppide vahel (vt. joonis).



α - Heeliks



Immunoglobuliini β - struktuur (NB! antiparalleelsus)



β - Struktuur (paralleelne)

Alberts et al., 1983, Molecular Biology of the Cell

Valgud ei oma 100%-list α -helikaalset või β -struktuurset ehitust. Nii on müoglobiin (vt. joonis) helitseerunud umbes 80%, Hb α - ja β -ahelad -75%, insuliin -52%, laktaadi dehüdrogenaas-45%, lüsotsüüm -42%, pepsiin -30%, tubuliin -22%, kümotrüpsiin ja trüpsiin-14%. Molekuli ülejäänud osa on kas mittehelitseerunud ja/või β -struktuuris. Näit. lihaskoe tropomüosiinil (millel on kõrgeim helitseerumisaste, 95%) on ülejäänud osa mittehelitseerunud, müoglobiinil samuti. Insuliinis on β -struktuuri 6%, laktaadi dehüdrogenaasis -20%, tubuliinis -30%, kümotrüpsiinis ja trüpsiinis -45%.

Järelikult pole üldine arusaam, et globulaarsed valgud on α -heeliksi vormis ja fibrillaarsed β -struktuuris täpne. Korreksem oleks selgitus, et paljude globulaarsete valkude molekulis moodustab valdavama osa α -heeliks ja paljusid fibrillaarseid valke iseloomustab β -struktuursus. Viimaste valkude hulka kuuluvad eeskätt mitmed spetsiifilised valgud nagu keratiinid (näit. β -keratiinide hulka kuuluv loodusliku siidi ja ämblikuvõrgu valk fibroiin). Täpsemalt vaatleme seda allpool.

Vesiniksidemete ümberpaigutumise tõttu on võimalik ka α -heeliksi ja β -struktuuri teatud üleminek üksteiseks (NB!. elava looduse dünaamilisus). Näit. juuste pesemisel aluseliste pesemisvahenditega läheb α -keratiini helikaalne struktuur üle β -struktuuri (juuksed sirgenevad).

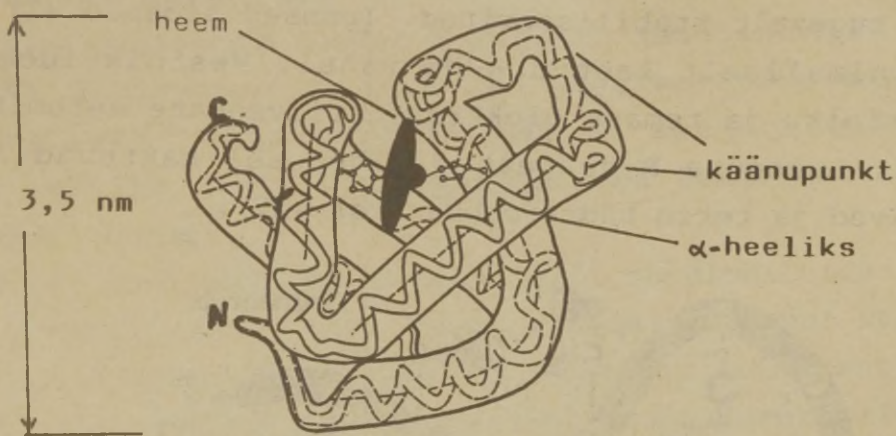
Kuna valgud täidavad väga mitmeid biofunktsioone, siis tuleneb α -helitseerumise ja β -struktuursuse suhe nende molekulis loomulikult antud valgu funktsioonist(-dest). Sellisest vaatepunktist lähtudes räägitakse ka struktuuritasemetest, mis jääksid sekundaar- ja tertsiaarstruktuuri vahele (suprasekundaarsed). Eeskätt kuuluvad siia valgu molekuli erinevad struktuur-funktsionaalsed osad e. domeenid (vt. allpool).

TERTSIAARSTRUKTUUR. See on kerajas-ellipsoidne (gloobul) või niitjas (fibrill) konformatsioon, mis tekib polüpeptiidahela spetsiifilisel, spontaansel, ruumiliselt kompaktsel kokkupakkimisel (self-assembly). Tertsiaarstruktuuri konformatsiooniline väliskuju jagab seega valgud laias plaanis globulaarseteks (valkude enamik, näit. praktiliselt kõik ensüümid) ja fibrillaarseteks (katte- ja tugikudede spetsiifilised valgud, näit. kollageenid, mitmed lihaskoe valgud jt.).

Tertsiaarstruktuuri formeerumise alused oleksid: 1) geneetiliselt determineeritud (kodeeritud) aminohapete järjestus polüpeptiidahelas (primaarstruktuur) ja 2) aminohapete radikaalide (R) komplementaarsus ja vastastikused toimed. Primaarstruktuur on seega aluseks-eelduseks antud valgu kindla ruumilise kuju tekkeks (NB! sisuliselt uus infotasand - konformatsioon), milles molekuli osad on vastavas paigutuses. Konkreetsemalt väljendudes määravad tertsiaarstruktuuri polüpeptiidahelas olevate aminohapete jääkide radikaalide mõõtmed, kuju, struktuur ja nende hüdrofiilsus-hüdrofoobsus. Kokkupakkimise (assambleerumise) põhiline liikumapanev jõud on aminohapete radikaalide vastaktoimed vee jt. molekulidega, aga ka R-de omavahelised toimed. Selgitagem!

Helitseerunud polüpeptiidahel käändub (ligikaudu 130°) Pro ja Hyp asukohal ahelas. See on tingitud Pro ja Hyp jäigast struktuurist ning võimest anda **vaid ühte vesiniksidet** (teiste peptiidgruppidega). See destabiliseerib α - helikaalsust ja

soodustab tertsiaarstruktuuri kujunemist. Käänupunktide teket (vt. joonis) soodustavad (teisisõnu α -heeliksit aga ka β -struktuuri häirivad) ka lähestikku paiknevad suurte ja/või sama-



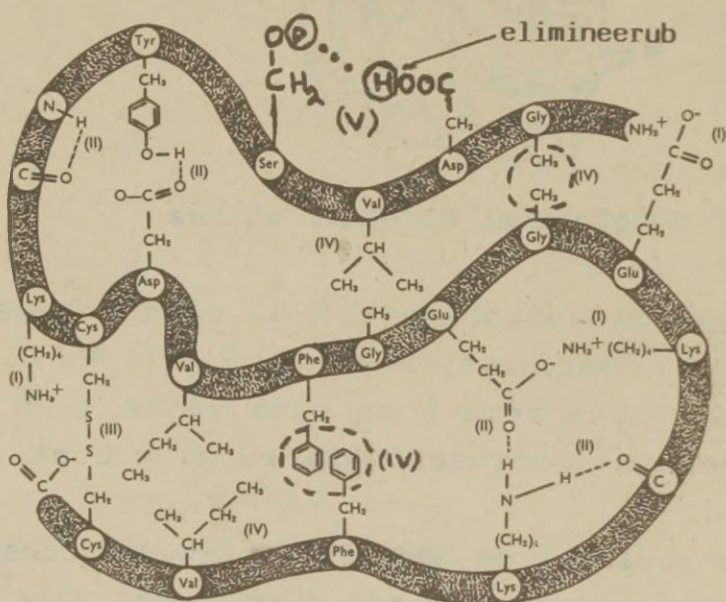
Müoglobiini molekuli ehitus

nimeliste laengutega aminohapete R-d: need segavad-tõukavad üksteist (näit. Glu, Asp, Lys, Arg, Ser, Ile). Ka Gly soodustab ahela käändumist. Kuna tema R on väga väike ($-H$), püüavad teiste aminohapete R-d hõivata vaba ruumi glütsiini asukohas polüpeptiidahelas.

Aminohapete radikaalide hüdrofiilsus-hüdrofoobsus on tertsiaarstruktuuri kujunemisega seotud järgmiselt. Valk püüab võtta energeetiliselt sobivat kuju, s.t. vaba energia miinimumi omavat kuju (see on maksimaalse stabiilsusega). Selleks "pakitakse" hüdrofoobsed (apolaarsed) R-d tertsiaarstruktuuri sisemusse vältimaks nende kokkupuutumist vee molekulidega. Hüdrofiilsed (polaarsed) R-d paigutuvad pinnale, kus nad hüdratiseeruvad. Näit. müoglobiin on tertsiaarstruktuuris niivõrd kokku pakitud, et molekuli "sisemuses" arvatakse olevat seostunud ≈ 4 vee molekuli. Lisagem, et müoglobiini tertsiaarstruktuur tuvastatigi valkudest esimesena (Kendrew, põhiliselt röntgenstruktuuranalüüs).

Tertsiaarstruktuuri stabiliseerivad (vt. joonis) põhiliselt nõrgad (mittekovalentsed) sidemed (ioonsed e. elektrostaatilised, vesiniksidemed, hüdrofoobsed vastaktoimed). NB! Tänu mittekovalentsetele sidemetele on tertsiaarstruktuuri teke äärmiselt kiire, spontaanne, kooperatiivne protsess, nõrkade vastaktoimete-

ga polüpeptiidahela teatavate osade vahel. See teeb hõlpsaks ka tertsiaarstruktuuri "lahtipakkimise". Teisalt, kuna nõrku sidemeid on ahela erinevate osade vahel väga palju, on struktuur tegelikult tugevalt stabiliseeritud. Ionsed sidemed (I) kujunevad vastasnimeliselt laetud R-de vahel. Vesiniksidemed (II) tekivad vesiniku ja temast elektronegatiivsemate aatomite (O, N jt.) vahel. Laenguta R-de teatud lähedusel kattuvad aatomite elektronpilved ja tekib hüdrofoobne side (IV).



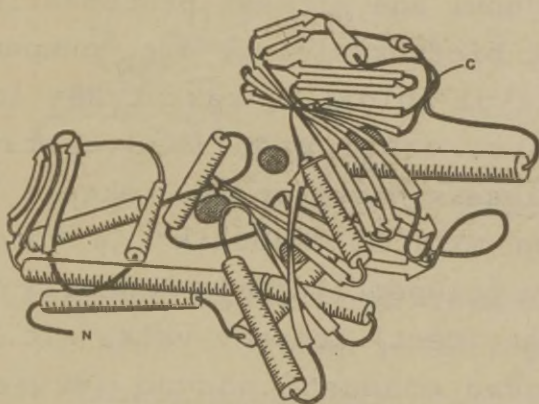
Tertsiaarstruktuuri stabiliseerivad ka disulfiidside(-med) (III), harvemini fosfodiesteriside (V), "pseudo- e. isopeptiidne" side Lys, Arg radikaali $-NH_2$ ja Asp, Glu radikaali $-COOH$ vahel ning esterside ühe AH radikaali $-COOH$ ning teise AH $-OH$ vahel.

Tertsiaarstruktuuri bioloogiline sisu seisneb selles, et antud tasemel leiab väljundi valkude funktsionaalsus. Selle struktuuritaseme tekke ja säilumisega on seotud valkude kesksed biofunktsioonid (katalüütiline, reguloorne jt.). Selgitagem!

Kuigi alates sekundaarstruktuurist kasutatakse tihti mõistet "konformatsioon", pole see päris korrektne. Nimelt, valkude funktsiooni(-de) aluseks on sisuliselt tertsiaarstruktuur (teatud valkudel koguni kvaternaarstruktuur). Reaalses funktsioneerimis-

keskkonnas (vastav pH, kehatemperatuur, vastaktoimed vee jt. molekulidega) omandab valgumolekul funktsionaalse 3-mõõtmelise natiivse konformatsiooni (nimet. ka "bioaktiivseks" struktuuriks). See ongi aluseks tema funktsioonile(-dele). Näit., vaid natiivses konformatsioonis suudab ensüümvalk täielikult täita oma katalüütilist funktsiooni - muundada reguleeritava kiirusega kindlat substraati vajalikes hulkades. Seejuures kujuneb ensüümvalgu selline konformatsioon mitmete faktorite (NB! ka substraadi enda) toimel.

Lisagem, et erinevate imetajateliikide müoglobiinide konformatsioon on praktiliselt sarnane, sest primaarstruktuur varieerub mitteolulistest lõikudes. Teisalt, mutatsioonid primaarstruktuuris, mis lõhuvad-muudavad konformatsiooni stabiliseerivaid sidemeid, põhjustavad valkude bioaktiivsuse osalise või täieliku kadumise. Esitaksime veel ühe tertsiaarstruktuuri illustratsiooni süsivesikute metabolismi võtmeensüümi (heksokinaas) baasil.



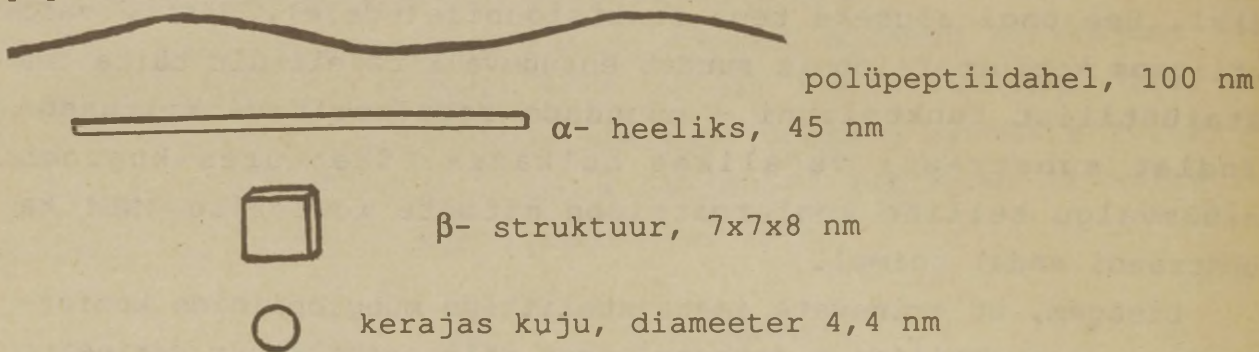
Heksokinaas
(silindrid = α -heeliks;
nooled = β -struktuur)

Loomulikult on kompaktsel kokkupakkimisel ka nn. "mehhanistlik" roll, s.t. suured molekulid püütakse paigutada minimaalsesse ruumi (NB! raku mõõtmed on ju piiratud). Illustreeriksime seda allpool oleva skemaatilise joonisega (mõõtmed ja ehitus!).

KVATERNAARSTRUKTUUR. Kuna seda probleemi käsitletakse vastavas loengus, peatuksime siinkohal vaid põhiarusaamadel.

Ühe polüpeptiidahelaga valgu kõrgeim ehitustase on tertsiaarstruktuur. Kui ahelaid on üle ühe (võivad olla ka identsed)

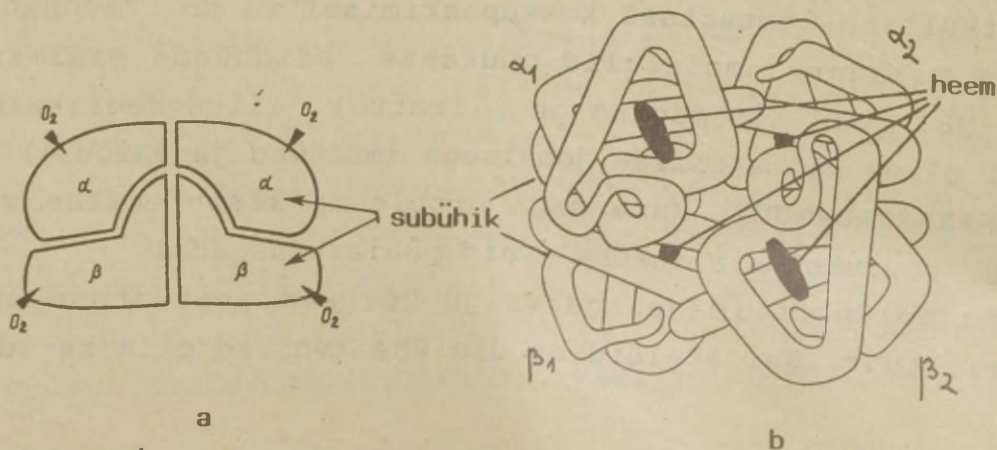
on valk oligomeerne ja kasutatakse järgmisi mõisteid:
subühik - kindla tertsiaarstruktuuriga individuaalne polüpeptiidahel oligomeerses valgus (lühend SU);



Molekuli mõõtmete ja ehituse võrdlus

protomeer - tähistab üksust oligomeerses valgus, millel on juba teatud bioaktiivsus. Näit. plasmamembraanis paikneval, Na^+ ja K^+ pumpaval ensüümsüsteemil (Na-pump) on kahte tüüpi subühikud: suur SU (α) ja väike SU (β). Nende kompleks ($\alpha\beta$) omab juba substraadi (ATP) hüdroolüüsivõimet, s.t. teda saab nimetada protomeeriks. Ensüümkompleks koosneb antud juhul aga mitmest protomeerist ja on võimeline täitma spetsiifilist biofunktsiooni, s.t. pumpama liigset Na^+ rakust välja ja vajalikul hulgal K^+ raku. See loob närviraku ja rakuvälise matriksi vahel vajalikud naatriumi ja kaaliumi gradiendid, mis on aluseks närviimpulsi tekkele ja levikule. Mõnede valkude puhul on mõisted "subühik" ja "protomeer" kattuvad, s.t. kehtivad üksiku polüpeptiidahela kohta.

oligomeerne valk- SU (protomeeridest) koosneb valk, s.t. ta omab kvaternaarstruktuuri. SU seovad enamasti nõrgad (vt. eespool) sidemed. Reeglina on valgud M_r -ga üle 50000 oligomeersed. Tüüpnäide on HB, mis koosneb kahte liiki SU (α ja β).



Hemoglobiin (a-lihtsustatult, b- detailsemalt)

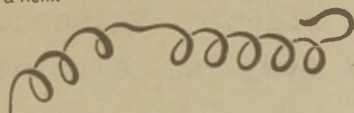
Valkude puhul eristatakse primaar-, sekundaar-, tertsiaar- ja kvaternaarstruktuuri. Kasutatakse aga ka pisut teistsugust liigendamist, milles esineb mõiste "domeen" (domain). Domeenid on teatud struktuursed alad, millest formeerub globulaarse valgumolekuli. Kuna globulaarsed valgud on organismis tihti agregeerunud, siis kasutatakse ka mõistet "valgumolekuli agregaat" (vt. joonis).

sequence of amino acids

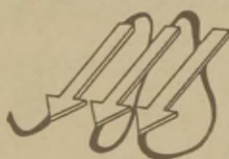
— Glu — Asp — Val — Ser — Lys — Gly — Pro —

1. secondary structure

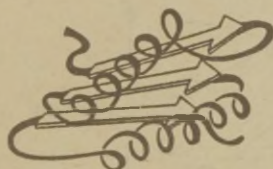
α -helix



β -sheet



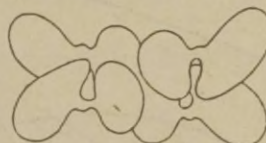
2. domain



3. protein



4. protein aggregate

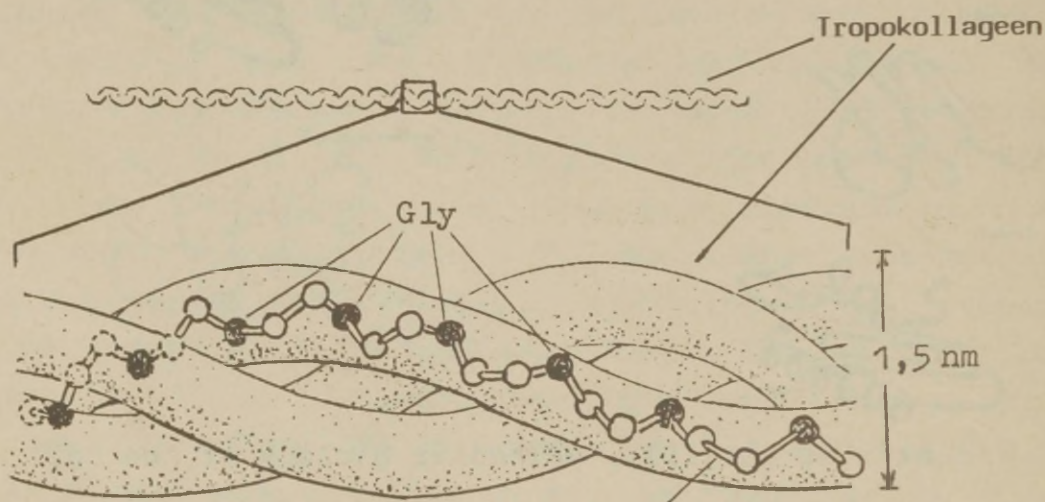


Alberts et al., 1983, Molecular Biology of the Cell

FIBRILLAARSETE VALKUDE EHTUSISEÄRASUSED. Konformatsioonist tulenev väliskuju jaotab valgud globulaarseteks (gloobulikujulised) ja fibrillaarseteks (niitjad). Esimeste puhul pole ülaltoodud ehitustasemetest eristamine probleemiks, teiste korral aga küll. Põhjuseks on fibrillaarsete valkude ehitusiseärasused, mis on vajalikud spetsiifiliste funktsioonide (peamiselt kaitse- ja ehitusülesanded) täitmiseks. Vaatleksimegi järgnevalt rakuvälise matriksi fibrillaarsete valkude (kollageenid, elastiinid, α -keratiinid ja β -keratiinid) ehitustasemeid.

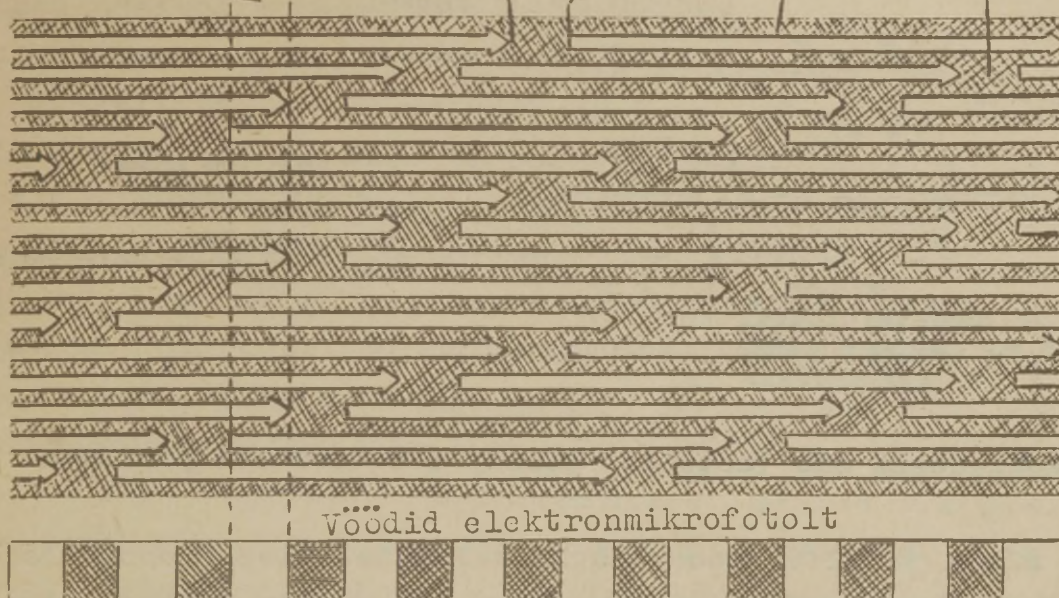
Kollageenide (vt. joonised) primaarstruktuur on AH-jääkide järjestus α -ahelas (on leitud 7 geneetiliselt erinevat α - ahe-

lat; ≈ 1000 AH-jääki ahelas). Sekundaarstruktuur pole neil klassikaline α -heeliks vaid helikaalne käänpunktiderohke ruumikujund antihelikaalsete AH kõrge sisalduse tõttu (30-34% Gly, 20% Pro ja Hyp ja 10% Ala). Reeglina kordub neis kolmikjärjestus Gly-A-B, mil-les A ja B on tihti Pro ja Hyp. Tertsiaarstruktuur e. tropokollageen on 3 α -ahelast koosnev vasakkeerdunud "kõisheeliks" pikkusega 300 nm ja paksusega 1,5 nm. Kõigi α -ahelate N-terminaalsed lõpud on molekuli ühes otsas. Naaberahelaid seovad põhiliselt vesiniksidemed (peptiidgruppide vahel) aga ka ioonsed, hüdrofoobsed ja omapärased kovalentsed sidemed. Viimased tekivad naaberahelate Lys R-de vahel. Ühe ahela Lys $-\text{NH}_2$ elimineerub sideme tekke protsessis ($-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$).



Tropokollageen praktiliselt ei veni kolmikahelalisuse ja ristsidemete tõttu. Tema molekul sisaldab Hyl -OH kaudu seotud oligosahhariidseid külghelaid (näit. $-\text{O}$ -galaktoos-glükoos). NB! Tropokollageen on sisuliselt kollageeni mikrofibrillide subühik. Kvaternaarstruktuur (kollageeni mikrofibrill) moodustub tropokollageeni molekulidest (subühikutest). Subühikud paigutuvad ühendusprintsibil "pea - saba" piki mikrofibrilli teineteise suhtes nihutatuna 67 nm võrra (vt. skeem). See teeb mikrofibrilli ristikstruktuuri perioodiks 5 molekuli: 1. ja 6. rea tropokollageeni molekulid asetsevad täpselt kohakuti. Molekulide vahelisi alasid täitev kontrastaine paistab elektronmikrofotol tumedate triipudena. Mikrofibrilli kokkupakkimise info sisaldub α -ahelate pri-

maarstruktuuris. Osa Lys- ja Hyl-jääke kollageeni mikrofibrillides on oksüdeerunud (näit. Lys -NH₂-st tekib aldehüüdrühm; nihkefaas tropokollageeni pea ja saba tropokollageen kontrastaine



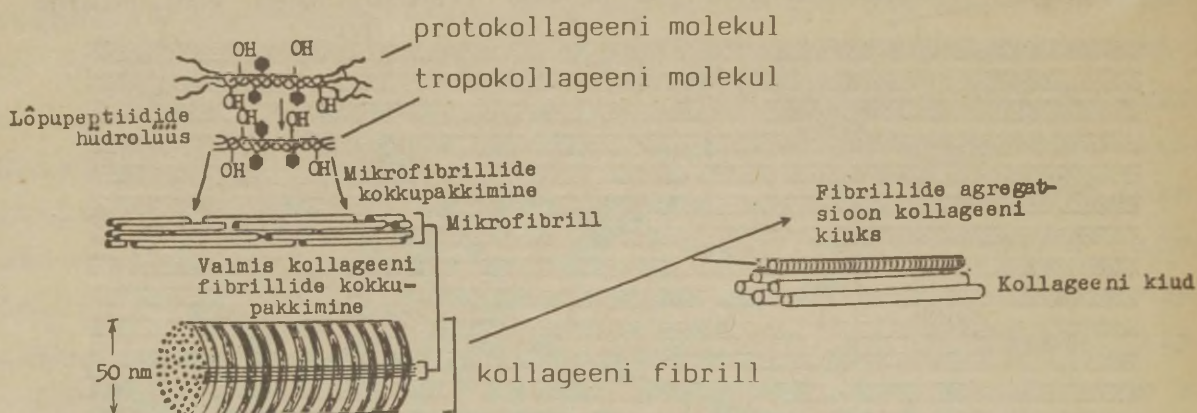
Kollageeni mikrofibrill (kvaternaarstruktuur)

ensüümiks on lüsiini oksüdaas) allüsiiniks ja hüdroksüallüsiiniks. Viimaste R-de arvel moodustuvadki kovalentsed ristsidemed (ristliited) kas nende endi vahel või Lys ja Hyl-ga. Sellised ristliited esinevadki tropokollageeni molekulide vahel mikrofibrillides ja mikrofibrillide vahel kollageeni fibrillis.

Kollageeni fibrill moodustub mikrofibrillidest (vt. skeem). Ristsidemed mikrofibrillide vahel tugevdavad fibrilli ja nende arv sõltub koest (näit. tugevat Achilleuse kõõluse kollageeni iseloomustab ristsidemete rohkus). Vananedes kasvab taoliste ristliidete arv tropokollageenis ja tema molekulide vahel fibrillides. See muudab vähese venivusega kollageeni fibrillid jäigemaks ja hapramaks (NB! luude hapramaks muutumise üks põhjusi). Ristliidete arvu kasv vähendab aga ka silma sarvkesta läbipaistvust. Teisalt, kui aga blokeerida ristliidete normaalne teke, muutuvad nahk, kõõlused ja veresoonte seinad hapraks. NB! Selliseid ristliiteid leidub ainult kollageenides ja elastiinides.

Kollageeni kiud, mis on nähtavad juba tavalises mikroskoobis, moodustuvad fibrillide agregatsioonil (vt. skeem).

Kollageene kui rakuväliseid valke toodavad kõigis organites leiduvad sidekoerakud. Geneetiliselt erinevad 7 α -ahelat: $\alpha 1(I)$ -



Kollageeni kiu (collagen fiber) moodustumise protsess

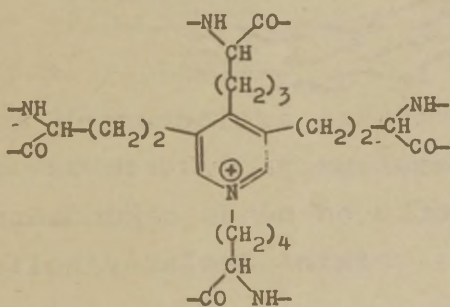
$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(I)$ ja $\alpha 2(V)$ moodustavad kolmeahelalise tropokollageeni 5 põhitüüpi (vt. tabel). Kollageenid on levinuim valkude perekond (moodustavad imetajatel umbes 30% üldvalgu massist), mis lokaliseerub sitketes, väga väikese venivusega kudedes (luud, kõhred, nahk, hambad jt.). Kollageene, elastiine ja proteoglükaane sünteesivad fibroblastid ja kondrotsüüdid. Nad on sidekoe rakuvälise maatriksi 3 molekulaarset põhikomponenti.

Kollageeni tüübid ja nende omadused

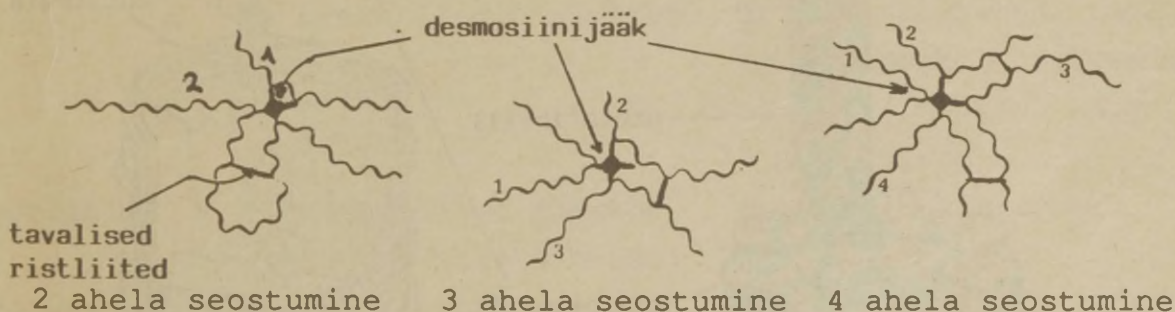
Tüüp	Tropokollageeni tähis	Polümeerne kuju	Tüüpomadused	Levik
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Fibrill	Paksud fiibrillid, vähe Hyl ja SV	Nahk, kõõlused
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrill	Peenemad kui I tüübi fiibrillid, palju Hyl ja SV	Kõhr, selg-roodiskid, silma klaaskeha
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrill	Vähe Hyl ja SV, palju Hyp	Nahk, veresoones, siseorganid
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$?	Rohkesti Hyl, SV, ilmselt säilinud protropokolageeni terminaalsed peptiidid (vajalikud "kõie" tekkel)	Basaalmembraanid
V	$[\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)]$	Teadmata	Palju Hyl ja SV	Vähesel määral paljudes kudedes

Märkused: 1) SV = süsivesikud; 2) sõltumata fibrillide paigutusest rakuvälises ruumis iseloomustab neid "vöödilisuus" (vt. ülalpool); 3) sidekoos täidavad kollageenid oma funktsiooni seotuna süsivesikutega (NB! tropokollageeni glükosüülimine); 4) mitu kollageeni tüüpi võib esineda ka koos (agregatsioon).

Elastiinid. Nende valkude ehituses pole kõik veel selge. Neil on Gly-, Ala-, Lys- ja Pro-rikkad polüpeptiidahelad. Viimastest kujunevad tropoelastiini molekulid ($M_r \approx 72\ 000$, umbes 800 AH). Tropoelastiini e. elastiini fibrilli subühiku ehituses vahelduvad Gly-rikkad helikaalsed osad Lys ja Ala sisaldavate lühikeste lõikudega. Viimaste osavõtul moodustuvad omapärased tsüklilised struktuurid desmosiin ja isodesmosiin. Kolme Lys aldehydseks oksüdeerunud R-grupid ühinevad 4-nda Lys R-grupiga (vt. valem). Desmosiin ja isodesmosiin seovad ristsidemetega (ristliidetega) nii polüpeptiidahelaid tropoelastiinis kui ka tropoelastiinide molekulid elastiini fibrillis, mis võimaldabki



Desmosiini ehitus

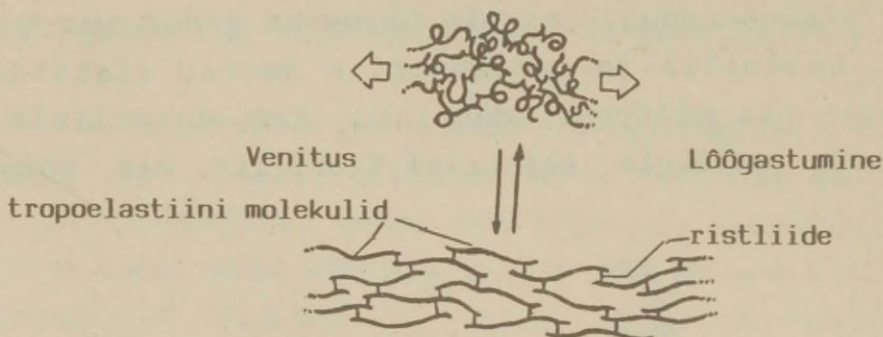


Tropoelastiini molekulide (2-4) seostumine elastiini fibrillis

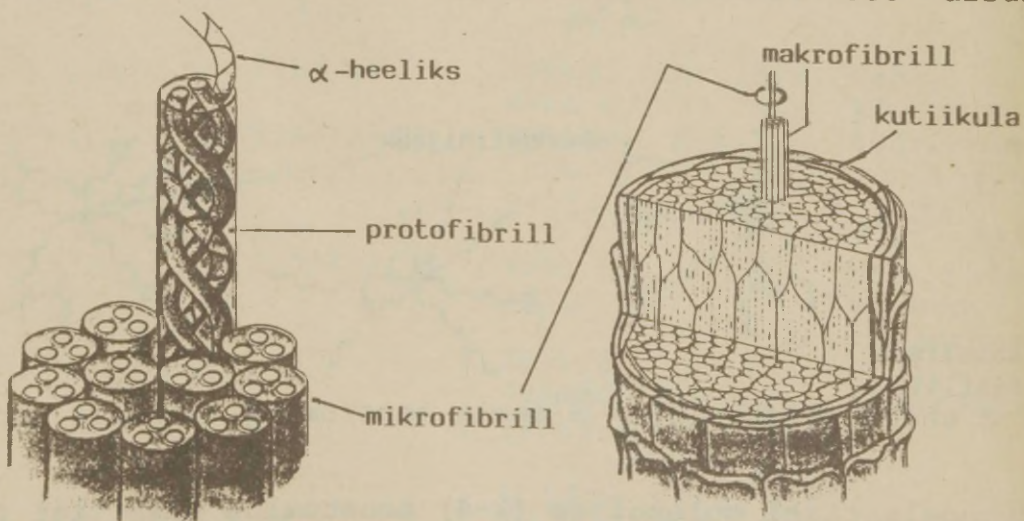
tropoelastiinil ja elastiini fibrillil elastselt venida neljas

suunas. Gly-rikkad tropoelastiini helikaalsed osad võimaldavad venida pikisuunas.

Tropoelastiini molekulide ning elastiini fibrillide seostumine kovalentsete ristliidetega loob ulatusliku võrgustiku (vt. joonis). Kuna nii iga molekul kui ka võrgustik on võimeline venimiseks-kokkutõmbeks (NB! erinevalt kollageenidest), siis elastiinide rikkad on just perioodiliselt venivad/lõõgastuvad koed (veresoonte seinad, kopsud, mitmed sidemed). Elastiinid tagavad nende kudede suure elastsuse koos samaaegse tugevusega. NB! Oma biofunktsioone täidavad elastiinid kompleksides süsivesikutega.



α -keratiinid. Primaarstruktuuri iseloomustab antihelikaalsete AH-jääkide (Pro jt.) minimaalsus ja Cys rohkus (NB! ahelatevahelised -S-S- sidemed). Seetõttu on nende sekundaarstruktuuriks α -heeliks. α -heeliksita baasil tekib ahelatevaheliste disul-



Juukse keratiin

Juuksekarva ehitus

Lehninger, 1982

fiidsidemete abil "köietaoline" protofibrill. 11 protofibrillist moodustub omakorda mikrofibrill (vt. joonis) ja viimastest juukse makrofibrill. Makrofibrillide sadadesse ulatuv kogum, ümbritsetuna kutiikulaga, ongi juuksekarv.

α -keratiinid on juuste, küunte, epidermise fibrillaarsed valgud.

β -keratiinid. Neid valke, millede tüüpesindajad on loodusliku siidi ja ämblikuvõrgu valk fibroiin, iseloomustab Gly- ja Alarohke primaarstruktuur. Nende AH R-d on väikesemõõtmelised, mistõttu fibroiini sekundaarstruktuur on antiparalleelne kihilisevolditud β -struktuur (vt. valkude sekundaarstruktuur).

Juuste lokkimine ongi α -keratiini heeliksi üleminek β -keratiinile iseloomulikuks β -struktuuriks. Rullidele keeratud juustele toimitakse redutseeriva lahusega ja soojendatakse: -S-S- ja vesiniksidemed lõhutakse ning helikaalne struktuur muutub kihilisevoldituks. Eemaldades redutseeriva lahuse ja pestes juukseid oksüdeerijaga, taastuvad uuesti -S-S-, kuid nüüd juba rullide poolt loodud võimaluste järgi, s.t. juuksed omandavad uue α -helikaalse vormi (lokid).

Üldistaksime fibrillaarsete valkude kohta käiva info:

	Iseloomustus	Põhiline levik
Kollageenid	Taluvad suuri koormusi ja praktiliselt ei veni	Sidekoed (tugikoed): kõhred, kõõlused, nahk, selgroodiskid, sidekude kitsamas mõttes, näit. kiudsidekude.
Elastiinid	Mitmesuunaline elastne venivus (kokkutõmbuvus)	Sidemed, veresoonte seinad
α -keratiinid	Tugevad, lahustumatud, kaitsefunktsioonid	Juuksed, suled, küüned
β -keratiinid	Painduvad, niitjad	Looduslik siid

Loomulikult leidub ka väga olulisi rakusiseseid fibrillaarseid valke. Nende hulka kuuluvad eeskätt lihaskoe müosiin ja aktiin. Nende valkude puhul pole aga tegemist nii öelda 100%-liselt fibrillaarsete valkudega (vt. täpsemalt lihaskude).

EHITUSTASEMETE UURIMINE

Valk puhastatakse (vt. isoleerimine) ning tema struktuuritasemeid selgitatakse põhiliselt järgmiste meetodite/võtete abil:

primaarstruktuur - hüdrolüüs, kromatograafia, sekveneerimine;

sekundaarstruktuur - spektropolarimeetria, ultraviolettspektrofotomeetria, infrapunane spektroskoopia, isotoopvahetus;

tertsiaarstruktuur - elektronmikroskoopia, röntgenstruktuuranalüüs, ringdikroismi registreerimine;

kvaternaarstruktuur - elektronmikroskoopia, röntgenstruktuuranalüüs, elektroforees;

Vaatleksime nende meetodite põhiolemust ja rakenduseesmärke. Hüdrolüüsi abil lõhutakse polüpeptiidahel AH-te seguks (vt. peptiidid). Ioonivahetuskromatograafiat kasutatakse valgu AH-se koostise määramiseks. Meetod rajaneb AH-te happelis-aluseliste omaduste erinevustel (vt. peptiidid). Sekveneerimine tähendab AH-te järjestuse automatiseeritud määramist, kusjuures AH eemaldatakse polüpeptiidahelast üksteise järel ja identifitseeritakse (vt. peptiidid). Spektropolarimeetria on polariseeritud valguse pöördenuga (eripöörangu) määramine spektropolarimeetriga. Meetod baseerub valkude optilisel aktiivsusel (vt. ülalpool), kusjuures α -heeliks ja β -struktuur pööravad polariseeritud valguse paremale. Mida suurem on korrapäraste struktuuride (α -heeliks, β -struktuur) osa antud valgu molekulis, seda suurem on eripöörangu väärtus. Ultraviolettspektrofotomeetria puhul testitakse spektrofotomeetri abil 190 nm juures (peptiidgruppide neeldumismaksimum) antud valku. Meetod rajaneb hüpokroomsusel, s.t. võrrelduna reeglipäratu kujuga, langeb α -helikaalse struktuuri valguse neeldumistase 190 nm juures. Järelikult saab määrata α -helikaalsuse suhtelist osa valgu molekulis - mida suurem on hüpokroomsus,

„seda kõrgem on α -heeliksi osa molekulis. Infrapunane spektroskoopia on valgu neeldumisspektri mõõtmise infrapunases spektri osas spetsiaalse spektrofotomeetriga. Meetod baseerub polariseeritud infrapunase kiirguse neeldumiserinevuste mõõtmisel piki ja risti valgu molekuli orientatsioonitelge. Kuna meetod baseerub AH R-de orienteeritusel peptiidgruppide suhtes, lubab ta selgitada regulaarsete struktuuride olemasolu valgus. Isotoopvahetuse meetod põhineb sellel, et mida rohkem on valgus deuteeriumiga aeglaselt vahetuvat peptiidsidemete (iminogrupi) vesinikku, seda kõrgem on valgu molekuli helikaalsuse aste. Elektronmikroskoopia rajaneb kontrastaineid sidunud valgu molekuli osade (elektrontiheduse tõus; tumedad alad) ja molekuli "puhaste" osade (heledad alad) kvantitatiivsel arvutianalüüsil. Meetod lubab määrata valgu molekuli ja tema fragmentide helikaalsust, kokkupakitust ja subühikute olemasolu. Röntgenstruktuuranalüüs võimaldab määrata aatomite ruumilist paigutust valgu molekulis, kuna röntgenikiirte lainepikkused sobivad aatomitevaheliste kaugustega. Just seetõttu difrakteerivad aatomituumad ümbritsevad elektronid röntgenikiiri. Analüüsiks vajatakse kristallilisi, raskmetalli aatomit (näit. Hg) sisaldavaid valgu derivaate (isomorfsed derivaadid). Raskmetallid difrakteerivad röntgenikiiri rohkem oma suure elektrontiheduse tõttu. Röntgenikiirguse langemisel kristallile tekib tema taha paigutatud fotoplaadile difraktsioonipilt, mida iseloomustab suurema (raskmetall) ja väiksema tihedusega punktide kogum. Pildistades röntgenikiirte hajumist/peegeldumist valgukristalli erinevatelt tasapindadelt, saadakse erinevad difraktsioonipildid. Viimaste raalanalüüs (pidepunktiks on raskmetalli aatom) võimaldabki hinnata valgumolekuli ruumilist ehitust. Ringdikroism (circular dichroism) on dikroisminähtuse kasutamine valgu tertsiaarstruktuuri selgitamiseks. Dikroism (kr. k. dichroos = kahevärviline) on kaksikmurdva kristalli värvuse sõltuvus talle langeva valguse suunast. Mõõtes valgukristallis erinevate kiirte, nn. ring-polariseeritud kiirte, neeldumisspektrite kuju ja amplituudi (viimased sõltuvad peptiidsideme neeldumisvõimest 190-240 nm juures ja Trp ning Tyr R-de neeldumisvõimest 280-290 nm juures), saame selgitada valgu molekuli kon-

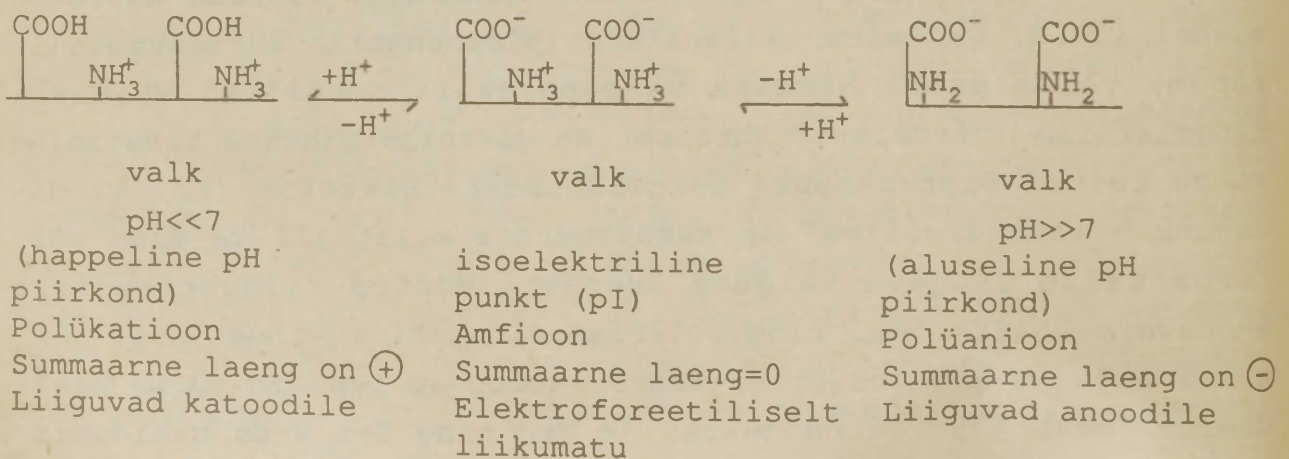
formatsiooni. Elektroforees on sobiv eeskätt isoensüümide vormide võrdlemiseks, s.t. erinevate SU-te lahutamiseks ja kindlakstegemiseks isoensüümides. Kuna SU laengud on erinevad, siis on erinevate isoensüümide liikuvus elektriväljas erinev.

Loomulikult kasutatakse valgu ehitustasemete analüüsil mitut erinevat meetodit.

FÜÜSIKO-KEEMILISED OMADUSED

Füüsiko-keemilised omadused tulenevad valgus sisalduvate AH-jääkide R-de loomusest, molekuli konformatsioonist ja suurest molekulmassist. Valkude põhiomadused on amfoteersus (happelisusaluselisus), puhverdusvõime, kolloid-osmootsus (onkootsus), optiline aktiivsus, makromolekulaarsus ja adsorptsioonivõime.

AMFOTEERSUS. Valgud on amfoteersed polüelektrolüüdid, s.t. neil on happe ja aluse loomus. Erinevalt AH-test (vt. AH) pole terminaalseste α -COOH ja α -NH₂ roll valgu amfoteersuses märkimisväärne. Selle määravad polüpeptiidahela AH-jääkide ioniseeruvad R- d (M_r-le 100 000 vastab 50-70 ioniseeruvat rühma): Asp ja Glu vaba -COOH; Asn, Gln ja Lys vaba -NH₂; His imidasooltuum ja Arg guanidiinigrupp (nõrgalt dissotsieeruvad Cys -SH ja Tyr -OH amfoteersust oluliselt ei mõjuta). Seega annavad happelised AH (Asp, Glu) valgule happelised omadused, aluselised AH (Lys, Arg, His) aga aluselised omadused. Lähtudes põhilistest ionogeensetest rühmadest (-COOH ja -NH₂), võime valgu dissotsiatsiooni sõltuvust pH-st illustreerida järgmise skeemiga:

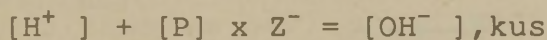


Valke iseloomustab kindel pI arvuline väärtus (vt. AH), mis

tuleneb happeliste ja aluseliste R-de suhtest molekulis: mida suurem on suhe happelised/aluselised, seda madalam on selle valgu pI. Happeliste valkude $pI < 7$, neutraalsetel on pI 7 lähedal ja aluselistel $pI > 7$. Füsioloogilise pH juures (7-7,4) on rakusisesed valgud negatiivse laenguga (valdavalt anioonses vormis), mida tasakaalustavad anorgaanilised katioonid. Enamike koevalkude pI on 5,5-7,0 (erandid tulenevad töökeskkonna pH-st: näit. pepsiini $pI=1,0$; tsütokroom c $pI=10,7$; lüsoosüümi $pI=11,0$).

pI juures on valgud minimaalse lahustuvusega (lahus on minimaalse stabiilsusega). Summaarse nulllaengu tõttu valgu osakesed agregeeruvad ja valk sadeneb välja. Valkude summaarse laengu ja pI alusel toimub valkude lahutamine/puhastamine elektroforeesi jt. võtete abil (vt. allpool).

Valkude keemias kasutatakse ka lahuste isoioonsuse mõistet. See on valgulahus, milles on vaid valk ja ioonid. Valgu isoioonse lahuse pH-d nim. antud valgu isoioonseks punktiks ja seda väljendatakse võrdusega:



[P] - valgu molaarne kontsentratsioon;

Z^- - molekuli keskmine laeng.

Seega sõltub isoioonne punkt (NB! pI aga mitte) valgu kontsentratsioonist. Valgulahusest teiste ionide elimineerimiseks lastakse lahus läbiioonivahetajaid sisaldavast kolonnist.

Valkude amfolüütsusel on ka füsioloogiline aspekt. Nii seovad mitmed valgud katioone ja anioone. Näit. Na-pump seob Na^+ ja K^+ ; lihaskoe valkude poolt Ca^{2+} sidumine on lihaskontraktsiooni aluseks; terve rida valke on füsioloogiliselt aktiivsed vaid kompleksis metallidega (vt. näit. metalloproteiinid).

PUHVERDUSVÕIME. Valgud võivad töötada puhvritena (s.t. seovad pöörduvalt H^+) tänu dissotsieeruvatele rühmadele (polüelektrolüütsusele). Siiski on nende puhverdusvõime füsioloogilise pH väärtustel tagasihoidlik. Erandi moodustavad His-rikkad valgud, sest His imidasooltuuma puhverdusvõime sobib füsioloogilise pH väärtustega. Histidiinirikkeid valke on organismis vähe. Siiski on üks neist, nimelt Hb (sisaldab umbes 8% His), võimas rakusene (erütrotsüüdid) puhver. Hb-l ongi kaalukas osa vere pH

säilitamises (lisagem, et vere pH-d aitavad säilitada veel vereplasma valgud ning fosfaat- ja bikarbonaatpuhver).

KOLLOID-OSMOOTSSED OMADUSED. Enamik valke on hüdrofiilsed, mistõttu nad lahustuvad kergesti vees. Valgu lahustumisele eelneb pundumine (NB! pundumine on iseloomulik kõigile hüdrofiilsetele kõrgmolekulaarsetele ühenditele). Pundumine on vee molekulide tungimine valgu kuivmassi, seostumine polaarse gruppidega, mis viib tihedalt kokkupakitud polüpeptiidahela(-te) lõdvestumisele. Kui järgmiste vee molekulide tungimine valgukristalli eemaldab valgu molekuli üldmassist, toimubki valgu lahustumine. See tähendab, et valgu molekul orienteerib laetud osakesena enda ümber vee dipoolide hüdraatkihi (solvaatkihi). Valgu molekuliga seotud vett tervikuna nimetatakse hüdraatveeks (struktureeritud veeks) ja seda iseloomustab:

suur hulk - valgu molekul on veest läbi imunud (1 g valku seob 0,3-0,4 g H₂O);

vee molekulide pindmine seostumine pole adsorptsioon (nõrk seostumine) vaid elektrostaatiline (vee molekulid seostuvad valgu polaarsete, s.t. hüdrofiilsete rühmadega: -SH, -OH, -C=O, -COOH ja -NH₂). See on pindmine hüdratatsioon);

suur osa seostuvast veest (umbes 2/3) seostub aga vesinikside-mete abil valgu **peptiidgruppidega** (sisemine hüdratatsioon). Järelikult, ka rohket apolaarse R-gruppidega valgud seovad sel moel tegelikult rohkesti vett. Näit. kollageenid punduvad oluliselt, kuid ei lahustu. NB! Lahustumist takistavad ka ahelatevahelised sidemed, mille lõhkumine kuumutamise annab peptiidideks hüdroolüüsunud ja lahustunud kollageeni e. želatiini(-id). Želatiini vesilahuseid kasutatakse meditsiinis vereplasma asendajate-
na ning ravimite kapslite tegemiseks farmaatsiatööstuses;

mõõtmete sõltuvus valgust: näit. albumiinid seovad vett kergemini, nende hüdraatkiht on märksa suurem kui globuliinidel;

eriomadused (näit. külmumine -40°C jne.).

Valkude kui kõrgmolekulaarsete ühendite lahused kuuluvad tõeliste (molekulaarsete) lahuste hulka. Lahustunud osakeste mõõtmed (1-100 nM) vastavad aga kolloidlahuste dispersiooniastmele. Seetõttu evib valgulahus kolloid-süsteemide omadusi:

1) püsivus - nad ei koaguleeru seismisel (ei sadene täielikult), kuna nende kolloidolekut stabiliseerivad valgu molekuli laengud (ioniseeruvad rühmad) ja hüdraatkiht, 2) väike difusioonikiirus, nad ei läbi biomembraane, 3) madal osmootne rõhk, 4) kõrge viskoossus ja võime moodustada soole või geele ja 5) optilised eriomadused (lahuste opalestsents ja võime hajutada nähtavat valgust).

Väike difusioonikiirus. Difusioon on lahustunud aine molekulide liikumine lahuses madalama kontsentratsiooni suunas. Difusiooni tingib põhiliselt kontsentratsioonierinevus (NB! oluline on loomulikult soojusliikumine) ning ta toimub kuni tasakaalu saabumiseni, s.t. lahustunud aine molekulide ühtlase jaotumiseni lahuses. Valkude väikese difusioonikiiruse (võrreldes väikeste molekulidega) peapõhjused on molekuli kuju ja mõõtmed (näit. globulaarsete valkude difusioonikiirus on suurem fibrillaarsete valkude omast). Difusioonikiirust mõjutab ka molekulmass. Valkude difusioonikiirus on üks limiteerivatest protsessidest rakufunktsioonide reguleerimisel/tagamisel (näit. ensüümvalkude difusioonikiirus ribosoomidelt nende toimekohta).

Madal osmootne rõhk. Kõrge molekulmassi tõttu ei difundeeru valgud läbi biomembraanide. See tingibki osmoosi, s.t. vee molekulide difundeerumise läbi poolläbilaskva membraani (näit. ka tsellofaan) valgulahusesse. Vee liikumine valgulahusesse põhjustab seal hüdrostaatilise rõhu (veesamba rõhk) tõusu, mis takistab vee molekulide edasist difusiooni valgulahusesse. Sellist hüdrostaatilist lisarõhku (jõudu), mida tuleb rakendada, takistamaks lahusti difusiooni (osmooset tungimist) läbi poolläbilaskva membraani suurema rõhu suunas, nim. osmootseks rõhuks. Väga lahjades valgulahustes sõltub osmootne rõhk otseselt valgu molaarsest kontsentratsioonist.

Kuna valgud ei läbi biomembraane (tsütoplasma on aga kolloidne süsteem), siis on osmootne rõhk oluline organismide elutegevuses (näit. turgor taimerakkudes). Valkude hüdrofiilsusest tingitud kolloid-osmootne rõhk e. onkootne rõhk on NB! aluseks vee vahetusele vereplasma (täpsemalt plasmavalkude) ja koevedeliku vahel (vt. vere biokeemia).

Osmoosil, s.t. sisuliselt sellel, et poolläbilaskvad membraanid pole valkudele läbitavad, rajaneb valgulahuse puhastamine lisandeist dialüüsi abil. Nimelt madalmolekulaarsed lisandid difundeeruvad poolläbilaskvast materjalist kotikeses olevast valgulahusest kotikest ümbritsevasse lahustisse. Lahusti korduv vahetamine lubabki lisandeid eemaldada. NB! Kotikeses olev valgulahus lahjeneb tugevasti, seetõttu on vajalik tema kontsentreerimine.

Kõrge viskoossus ja võime moodustada soole ja geele. Kõrge viskoossus tuleneb: kõrgmolekulaarsusest, molekuli kujust (fibrillaarsete valkude lahused on kõrgema viskoossusega) ja kontsentratsioonist (kontsentratsioonist kasv suurendab molekulidevahelisi haakumisi). Viskoossust mõjutavad elektrolüüdid ja temperatuur. Näit. viskoossus suureneb Ca-soolade lisamisel Ca-sildade tekkimise tõttu valgu molekulide vahel. Temperatuuri tõusuga viskoossus väheneb.

Kõrge viskoossuse tõttu annavad valgulahused soole (voolavust ja Browni liikumist omavaid kolloidsüsteeme); globulaarsed tsütoplasmaatilised valgud on reeglina "sool-olekus" (soolidena). Kui viskoossus ületab teatud piiri, tekib sisemise struktuuriga, voolavuse kaotanud süsteem e. geel. "Geel-olekul", mis on iseloomulik just fibrillaarsetele valkudele, on organismide elutegevuses väga oluline füsioloogiline tähtsus: a) kontraktilise funktsiooniga seotud lihaskoe valk aktomüosiin on geel-olekus; naha, kõõluste, kõhrede ja luude kollageenid omavad elastsust/vastupidavust, olles geel-olekus, b) on organisme, kelle kogu keha on geel-olekus (meduusid).

Lisagem, et toiduks kasutatavad tarretised on sisuliselt fibrillaarsete valkude geel-olekud.

Rakus eksisteerib teatud üleminekuid "sool-geel"., Näit. tsütoplasma on soolitaoline viskoosne vedelik, kus lokaliseeruvad mitmed geel-olekus olevad struktuurid. Olekud sool ja geel esinevad rakus ka üheaegselt.

Optilised eriomadused. Valgu molekulide mõõtmete ja nähtava valguse lainepikkuse ühtivuse tõttu hajutab/peegeldab valgulahus valgust. Alates teatud kontsentratsioonist on see nähtav: külvalgustatud valgulahuses näeme helenduvat (opalestseeruv) koonust

(Tyndalli efekt). Standardlahuse ja tundmatu valgu lahuse valguse hajutamisintensiivsuse mõõtmisega (nefelomeetria) saab määrata valgu hulka lahuses.

OPTILINE AKTIIVSUS. Valkude optiline aktiivsus (vt. AH) on nende koosseisus olevate AH-jääkidest ja valgu konformatsioonist tulenevate optiliste aktiivsuste resulteeriv suurus.

MAKROMOLEKULAARSUS. Valkude M_r on 4000-5000 kuni mitu miljonit daltonit (vt. ülalpool). Valkudel, mille primaarstruktuur on teada (umbes 3000 valku), saab tema M_r arvutada. Kui AH-line koosseis pole teada, tuleb M_r määrata eksperimentaalselt. Korrektse tulemuse annab mitme meetodi kasutamine. Adekvaatsemad on siin: ultratsentrifuugimine (sedimentatsioonanalüüsi meetodid), elektroforees ja kromatograafia, millede põhisisu käsitleksimegi.

Ultratsentrifuugimine. Nüüdisajal on loodud tsentrifuugid, mille vaakumis oleva rootoriga on saavutatud tsentrifugaaljõud, mis ületab umbes 600000 korda maa külgetõmbejõu. Nii saab erineva M_r -ga (ka tihedusega) komponente lahutada nende sedimentatsioonikiiruse alusel (preparatiivsed ultratsentrifuugid) või määrata sedimentatsiooni parameetrite optilise registreerimisega valkude jt. kõrgmolekulaarsete ainete molekulmassi (analüütilised ultratsentrifuugid). M_r leidmise võtted oleksid:

a) Sedimentatsioonikiiruse meetod. Piisav tsentrifugaaljõud tekitab küvetis liikuva piirjoone sadenevaid valguosakesi sisaldava lahuse ja puhta lahusti vahel. Piirjoone liikumiskiirus võimaldab leida sadeneva valgu sedimentatsioonikoefitsiendi (s), mis sisuliselt peegeldabki sedimentatsioonikiirust:

$$s = (dx/dt) / w^2 x, \text{ kus}$$

s - omab ajalist mõõtu jõuühiku kohta, ühikuks on Svedberg = 1S. (1S = 10^{-13} sekundit; valke iseloomustab 1-200 S, s.t. 1×10^{-13} - 200×10^{-13} sekundit, ühiku nimi pärineb ultratsentrifuugi looja Svedbergi nimest); x - komponendi kaugus rootori pöörlemisteljest, cm; t - aeg, s; dx/dt - sedimentatsioonikiirus; w - rootori pöörlemise nurkkiirus, radiaan/s.

M_r arvutatakse Svedbergi valemi järgi:

$$M_r = sRT/D(1 - \bar{v}\rho), \text{ kus}$$

S - sedimentatsioonikoefitsient; R - universaalne gaasikonstant,

erg/(moolx kraad); T - absoluutne temperatuur (Kelvini skaalas); D - difusioonikoefitsient, cm^2/s , $\bar{\gamma}$ - valgu osakese partsiaalne erimaht (s.o. mahu suurenemine 1g kuivaine lisamisel lahusti suurele, kindlale hulgale; valkudel on see 0,74); ρ - lahusti tihe-
dus, g/cm^3 . Valemi kõik suurused on leitavad eksperimentaalselt.

b) Sedimentatsiooni tasakaalu meetod. Rakendades tsentrifugaaljõudu, mille puhul sedimentatsioonikiirus ja sadenemisele vastassuunas toimiv difusioonikiirus on võrdsed, saame M_r leidmiseks D elimineerida. Määrates optiliselt komponendi kontsentratsiooni (c) rootori pöörlemisteljest kaugusel x, saame arvutada M_r :

$$M_r = 2RT \ln \cdot c / w^2 x^2 (1 - \bar{\gamma} \rho)$$

See meetod on märksa mugavam, nõuab aga homogeenset valgulahust.

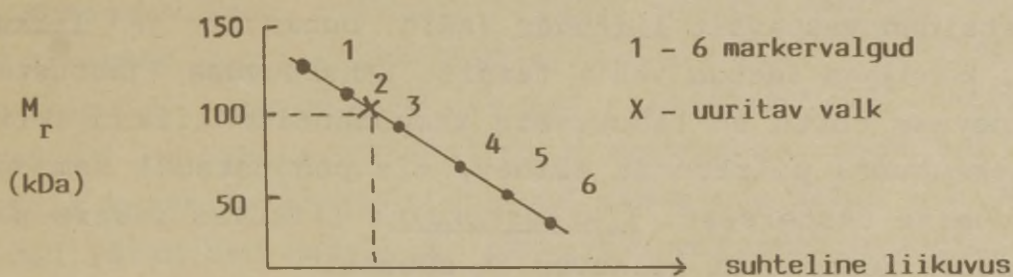
Elektroforees. (Tiselius, 1937) See on menetlus, mille aluseks on laetud osakeste liikuvus alalisvoolu elektriväljas. Nimelt, komponendi elektroforeetiline liikuvus elektriväljas sõltub otseselt komponendi summaarsest laengust (tuleneb komponendi ionisatsioonist, puhvri pH-st ja ioontugevusest). See lubabki lahutada erinevaid komponente. Elektroforeesi alaliigid on läbiviimise tehnika järgi:

a) frontaalne (vaba) elektroforees - puudub tahke kandja, mistõttu lahutatavad komponendid liiguvad vabalt U-kujulistes torukestes. Kandja puudumine ei luba aga elektroforeesida kiirelt difundeeruvaid väikesi molekule (näit. aminohappeid).

b) tsonaalne elektroforees tahkel kandjal - selle levinuima alaliigi konkreetne nimetus tuleneb tahkest kandjast (näit. paber = paberelektroforees; tärklisgeel, agar-agargeel, polüakrüülamiidgeel = geelelektroforees jne.). Lahutatavad komponendid jaotuvad (liikuvuse alusel) kandjal kitsaste tsoonidena, mis värvituna või elueerituna identifitseeritakse. Eelistatumad on geel-kandjad, kuna nende poorne struktuur tagab lahuse suure "vaba mahu" tõttu elektroforeesi kiiruse ja lahutuvuse olulise kasvu (võrreldes näit. paberiga). Agar-agargeeli kasutatakse läbipaistvuse ja osakeste kiire difusiooni tõttu tavaliselt valkude immunoelektroforeesil. Meetodi nimetus tuleneb sellest, et kandjal elektroforeesiga lahutunud valke identifitseeritakse (saadakse nn. elektroforeogramm) antikeha-antigeen reaktsiooniga (pretsipitatsiooni-

reaktsioon). Levinuim on aga polüakrüülamiidgeel (PAAG), mille lahutuvus oluliselt ületab teiste geelide lahutuvuse. See geel asetseb tavaliselt vastavates klaastorukeses (menetluse töönimetus on diskelektroforees).

Diskelektroforeesi PAAG-l kasutatakse ka valkude jt. kõrgmolekulaarsete ainete M_r määramiseks. Menetlus on lihtsustatult järgmine. Markervalkudega (M_r teada) ja tundmatu valguga sooritatakse diskelektroforees. Markervalkude liikuvuse alusel tehakse kalibreerimisgraafik: M_r versus suhteline liikuvus. Sellelt saamegi leida uuritava valguga M_r (vt. joonis; antud valguga puhul oli see ligikaudu 100 kDa).



Elektroforeesi tehakse detergendi Na-dodetsüülsulfaadi (SDS) juuresolekul. SDS sidunud valgud on negatiivse laenguga, mistõttu nende liikuvus sõltub praktiliselt molekulmassist. SDS lõhub oligomeerse valguga ka subühikuteks, mistõttu saab määrata ka üksikute subühikute M_r . Täpsemaid tulemusi annab PAAG-elektroforeesi puhul sfäärilisema kujuga valk. Seetõttu lõhutakse eelnevalt mittesfäärilise valguga konformatsioon. Igal juhul aga elimineeritakse disulfiidsillad.

c) isoelektriline fokuseerimine - laetud komponente lahutatakse nn. amfoliinidel pH-gradiendi abil. Komponent liigub pH-gradiendis kohani, kus komponendi pI saab võrdseks pH-ga (s.t. tema elektriline laeng kaob). Järelikult komponendid jagunevad pI alusel tsoonidesse, mida järgnevalt värvitakse ja identifitseeritakse võrreldes markervalkude liikuvusega.

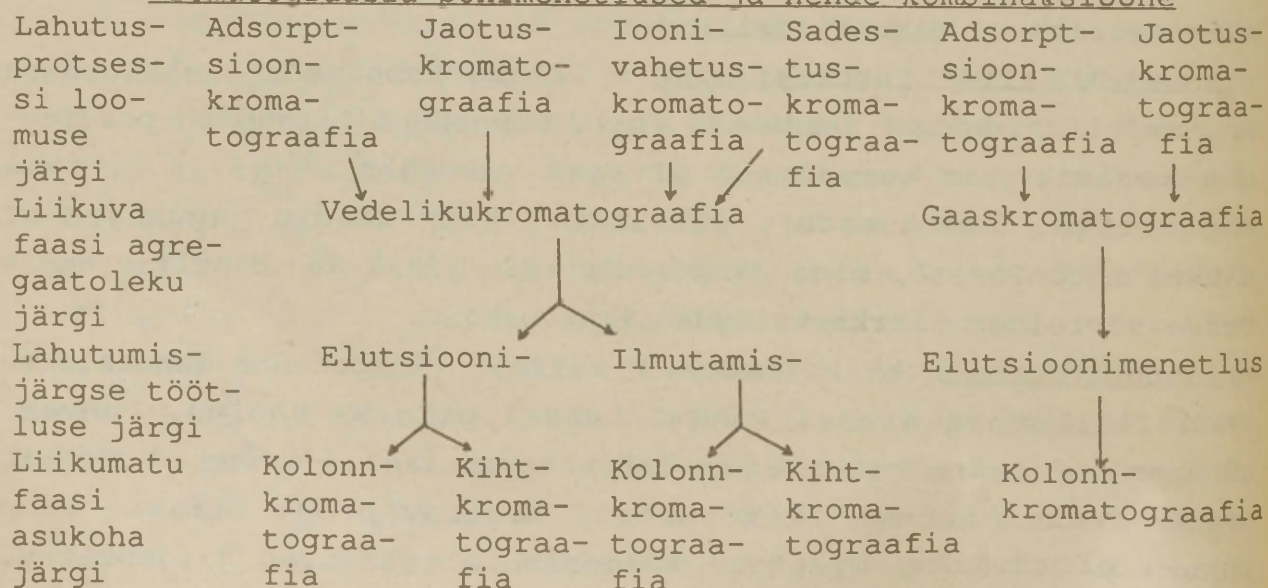
d) isotahhforees (kr.k. tachys = kiire) - komponente lahutatakse nende liikuvuse alusel PAAG-l puhvri pidevas voolus. Puhversüsteem valitakse selline, et lahutatavad laetud osakesed oleksid märgatavalt erineva liikuvusega. Uuritav proov viiakse kahe puhvri piirimaale, mistõttu komponendid reastuvad järjestikku,

elektroforeetilise liikuvuse alusel. Järgnevalt liiguvad komponendid (säilitades omavahel kindla vahe) elueerimiskambrisse, millest nad elueeritakse puhvri pideva vooluga.

Kromatograafia. See on segus olevate erinevate komponentide füüsikalise-keemiline lahutamine, mis põhineb komponentide paljukordsel ümberjaotumisel liikuva ja liikumatu faasi vahel. Liikuva faasi voolus edasikantavad komponendid siirduvad liikumatusse faasi, kust nad toob uuesti välja pealevoolav puhas liikuv faas. Ümberjaotumise paljukordsus ongi menetluse kõrgselektiivsuse sisuline põhjus. Kõiki lahutatavaid komponente iseloomustab ka jaotustegur (K). Näit. $K = c_1 / c_2$, kus c_1 ja c_2 on komponendi kontsentratsioon vastavalt liikuv (näit. butanool) ja liikumatu (näit. kandjaga seotud vesi) faasis. Lahustuvuse (jaotusteguri) erinevuse tõttu on lahutuvate komponentide liikumiskiirus faaside kokkupuute piirkonnas erinev, mis põhjustabki komponentide eraldumise üksteisest. Lihtsustatult: liikuv faasis paremini lahustuva komponendi liikuvus on suurem.

Kromatograafia menetlusi võib liigendada lahutusprotsessi loomuse järgi (adsorptsioon-, jaotus-, ionivahetus- ja sadestuskromatograafia); liikuva faasi agregaatoleku järgi (vedeliku- ja gaaskromatograafia); komponentide lahutumisjärgse töötlemise järgi (elutsiooni- ja ilmutamismenetlus) ja liikumatu faasi (näit. adsorbent + vesi) asukoha järgi (kolonn- ja kihtkromatograafia).

Kromatograafia põhimenetlused ja nende kombinatsioonid



Adsorptsioonkromatograafia (Tsvett, 1903). Komponentide lahutamise aluseks on nende erinev adsorptsioon kolonnis või plaadil oleva teralise või kiudja adsorbendi pinnal nõrkade sidemete abil. Adsorbent koos temale kantud vedelikuga on liikumatu faas, vooluti (näit. butanool) aga liikuv faas. Kolonnkromatograafia puhul kantakse lahutatav segu kolonnis olevale adsorbendile ja voolutatakse eluendiga. Toimub (ülalkirjeldatud) lahutumine faaside vahel ja komponendid väljuvad kolonnist kindlas järjekorras: kõige nõrgemini adsorbeerunud komponent väljub esimesena. Liikuva faasi voolus väljuvate komponentide registreerimine toimub detektoriga vastava parameetri(-te) alusel (optiline aktiivsus, u/v neeldumismaksimum, murdumisnäitaja, elektrijuhtivus jt.). Mõõtmistulemused registreeritakse kromatogrammina (tavaliselt graafikuna), mille maksimumide ehk nn. piikide kaugus graafiku alguspunktist iseloomustab eraldunud komponenti kvalitatiivselt ja pindala kvantitatiivselt. Toodud menetluse kohta sobivad eespool toodud järgmised terminid: adsorptsioonkromatograafia, vedeliku-kromatograafia, kolonnkromatograafia, elutsioonimenetlus. Lisagem, et elutsioonimenetluses väljutatakse lahutunud komponendid liikuva faasi vooluga üksteise järel. Elutsiooni efektiivsust suurendatakse liikuva faasi koostise ja/või pH sujuva (gradientelutsioon) või siis järsu (astmeline elutsioon) muutmisega.

Kui adsorbendi õhuke kiht on kantud mingile alusele (näit. klaasplaadile), on tegemist (õhukese) kihtkromatograafiaga. Tüüpimenetlus on sel puhul järgmine. Lahutatav segu kantakse plaadi serva läheduses olevale stardijoonele. Plaat asetatakse kaldu voolutusnõusse nii, et stardijoonega serv oleks voolutis. Voolutusnõu suletakse tihedalt. Vooluti liigub üle stardijoone, haarab lahutatavad komponendid kaasa ja toimub ülalkirjeldatud paljukordne ümberjaotumine faaside vahel. Voolutamine lõpetatakse, kui vooluti front on jõudnud 2-3 cm kaugusele stardijoone vastasservas, plaat kuivatatakse ja piserdatakse ilmutiga (ilmutusmenetlus). Faaside piirpinnale jäänud lahutunud komponendid muutuvad ilmuti toimel värvilisteks laigukesteks. Nende identifitseerimine

toimub komponendi frondisuhte e.liikumiskiiruse koefitsiendi (R_f) võrdlemisel markerkomponentide R_f -ga. Lisagem, et $R_f = a/b$, kus a on lahutatava segu komponendi liikumiskaugus (mõõdetakse laigu keskpunktist stardijooneni) ja b on vooluti frondi liikumiskaugus stardijoonest (mm). Ülaltoodud menetluse kohta sobiksid terminid adsorptsioon-kromatograafia, vedelikukromatograafia, kihtkromatograafia ja ilmutusmenetlus.

Jaotuskromatograafia (Martin, Sing, 1961). See menetlus rajaneb komponentide paljukordsel jaotumisel (vt. jaotustegur) voolava vedeliku või gaasi ja inertsel kandjal kilena seotud vedeliku vahel. Tüüpmenetlused oleksid järgmised.

Lahutatava segu ja testsegu mikrokogus kantakse kromatograafiapaberile (eriline filterpaberi liik) tõmmatud stardijoonele. Paberiga, täpsemalt tselluloosiga seotud vesi on liikumatu faas ja vooluti (butanool-äädikhape-vesi või fenool-vesi-ammoniaak jt.) on liikuvaks faasiks. Paber pannakse hermeetilisse kambrisse stardijoonega servapidi voolutivannikesse. Kui see on kambri ülalosas, liigub vooluti ülalt alla (langev voolutus), vastupidisel juhul on tegemist aga tõusva voolutusega. Vooluti frondi jõudmisel stardijoonest vastasservast 3-4 cm kaugusele, voolutamise lõpetatakse, paber kuivatatakse ja rakendatakse ilmutusmenetlust. Lahutatavad komponendid identifitseeritakse, võrreldes nende R_f markerkomponentide R_f -ga. Antud menetluse käibetermin on paberikromatograafia. Sõluvalt menetluse tehnilistest tingimustest, iseloomustavad teda ka terminid jaotuskromatograafia, vedelik-vedelikkromatograafia (s.t. süsteem on vedelik-vedelik), ilmutusmenetlus.

Liikuvaks faasiks võib olla ka mingi inertgaas (argoon, heelium jt.), liikumatuks faasiks aga mittelenduv vedelik (glütserool, polüetüleenglükool jt.), mis on fikseeritud kolonnis asuval tahkel kandjal. Lahutatav segu viiakse gaasina (või auruks) liikuvasse faasi ja lastakse läbi kapillaarkoloni. Toimub paljukordne ümberjaotumine süsteemis gaas/vedelik. Gaasivoolus väljuvad komponendid registreeritakse detektoriga ja identifitseeritakse kromatogrammi alusel (vt. ülalpool). Sellist menetlust iseloomustavad terminid jaotuskromatograafia, gaasi-vedelikkro-

matograafia, kolonnkromatograafia ja elutsioonimenetlus. Igapäevane töötermin on gaaskromatograafia (Martin et al, 1958).

Kui liikumatuks faasiks on mingi adsorbent (tavaliselt kaetud vedelikuga), siis kasutatakse gaaskromatograafia täpsemaks iseloomustamiseks terminit gaas-adsorptsioonikromatograafia (NB! See on adsorptsioonikromatograafiline menetlus).

Ioonivahetuskromatograafia. Komponentide lahutumise aluseks onioonivahetus vedela liikuva faasi ja ioonide (kationide e. kationivahetaja või anionide e. anioonivahetaja) kui liikumatu faasi vahel. Tüüpmenetlus toimub järgmiselt. Kationide negatiivselt laetud rühmade külge viiakse eeltötlusega kationid. Pealekantava uuritava lahuse katioonid komponendid asendavad kationidel ekvivalentse hulga katioone (kationivahetus). Komponendid elueeritakse kolonnist astmelise elutsiooniga (vt. ülalpool). Kui on tegemist anioonivahetusega on anionide positiivselt laetud rühmade külge eelnevalt viidud anioonid.

Seda kromatograafiamenetlust rakendatakse biokeemias eeskätt aminohapete, valkude ja nukleiinhapete lahutamisel.

Sadestuskromatograafia. Komponentide lahutumise aluseks on nende tsonaalne sadestumine liikumatu faasi pinnale ja sademete erisugune lahustuvus liikuvast faasist.

Eelnev oli kromatograafia menetluste tüüpiliigendamise. Biokeemiaalastes töodes on levinud aga ka menetlus, mis rangelt võetuna ei kuulu nimetatud klassikaliste menetluste hulka, kuigi sisaldab neile iseloomulikke momente. See on geelkromatograafia, mis põhineb makromolekulide erineval jaotumisel (sõltuvalt molekuli suuruselt ja kujult) polümeerse geelmatriitsi graanulites oleva lahusti (liikumatu faas) ja liikuva lahusti vahel. Geelmatriitsina kasutatakse sünteetilisi vaike või tugevasti hüdratiseerunud polüsahhariide (dekstraane e. sefadekse, agarosi). Geeli graanulitel on kindla läbimõõduga poorid (sõltub polümeerse aine ehitusest, polümerisatsiooni tingimustest ja polümeriseeruva aine kontsentratsioonist). Vooluti paigutub seega nii graanulite sisse, kui ka nende vahele. Lahutatav segu kantakse kolonnist olevale geelile. Pooridest suuremad molekulid läbivad vooluti voolus vaid graanulite vahelise tee ning väljuvad kolonnist

kiiremini, kuna pooridest väiksemad molekulid peavad läbima nii graanuleid kui ka graanulitevahelise tee. Seega töötavad sellised geelid molekulaarsõeltena lahutades komponente (valgud, polü-nukleotiidid, ensüümid, antikehad jne.) molekulide mõõtmete järgi. Seetõttu nim. seda menetlust ka geel-filtrimiskromatograafiaks e. lihtsalt geelfiltratsiooniks (Porath, Flodin, 1959).

Kui geeli struktuuri on viidud bioloogilist spetsiifilisust omav fragment (nim. ka afiant), siis lahutatava segu kolonnist läbilaskmisel seob afiant (keemiliselt) kõrge spetsiifilisusega vaid talle komplementaarse molekuli (näit. paljude valkude hulgast vaid teatud valgu isovormi). Ülejäänud komponendid väljuvad voolutiga. Seotud komponent elueeritakse hiljem teistsugustes tingimustes. Geelkromatograafia seda alaliiki nim. afiinsuskromatograafiaks. Menetlust kasutatakse vajalike komponentide tuhandekordseks kontsentreerimiseks/puhastamiseks (näit. fruktoosi tööstuslik tootmine; antikehade isoleerimine jne.).

Geelfiltratsiooni kasutatakse kõrvuti ultratsentrifuugimise ja diskelektroforeesiga ka valkude M_r määramiseks. Eelnevalt kalibreeritakse sefadeksi sisaldav kolonn, lastes sealt läbi testvalgud (M_r teada) ja konstrueeritakse lineaarne graafik: $\log M_r$ versus testvalgu elutsioonimaht (ml). Lastes nüüd kolonnist läbi uuritava valgu, saame tema elutsioonimahu järgi graafikult leida tema orienteeruva M_r . Menetlus on kiire ja lihtne.

VALKUDE ADSORPTSIOONIVÕIME. See on tähtis just bioloogilisest aspektist. Nimelt, valgud võivad oma pinnale adsorbeerida mitmesuguseid aineid ja ioone (hormoone, vitamiine, rasvhappeid, bilirubiini, rauda, vaske, ravimeid jt.). See muudab nad lahustuvateks või blokeerib nende toksilisust. Valgud transpordivad neid vere vahendusel kudedesse, kus nad lülituvad metabolismi või tehakse kahjutuks.

LAHUTUVUSE SÕLTUVUS MITMESUGUSTEST FAKTORITEST

Valkude lahustuvust me käsitlesime ka nende füüsiko-keemiliste omaduste raames (vt. kolloid-osmootsus). Kuna aga valkude lahustuvus ja väljasadestamine on seotud mitmesuguste biokeemiliste

(biomeditsiiniliste) küsimustega, vaatleksime valkude lahustuvust aktsendiga just nendele aspektidele. Kuna enamik valke on veeslahustuvad (on aga ka rasvlahustuvaid ja raskelt lahustuvaid valke), puudutab järgnev info valkude vesilahuseid.

Iga faktor, mis mõjutab valgu molekuli summaarset laengut ja hüdratatsiooni, mõjub tema lahustumisele vees. Valkude lahustuvus sõltub seega: valgu **molekuli ehitusest, keskkonna temperatuurist, pH-st, lahusti ioontugevusest ja polaarsusest.**

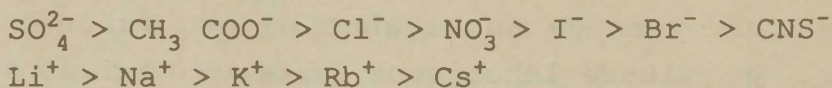
VALGU EHITUS JA LAHUSTUVUS. Mida rohkem sisaldab valgu molekul hüdrofiilseid gruppe, seda parem on tema lahustuvus vees. Teisalt, kui valgus on palju vastasnimeliselt laetud rühmi, siis ioonsete sidemete rohkus vähendab antud valgu lahustuvust (vt. fibrillaarsed valgud). Näit. kollageenid seovad vett rohkem kui paljud hästilahustuvad globulaarsed valgud, kuid nad ei lahustu puhtas vees.

TEMPERatuur JA LAHUSTUVUS. Temperatuuri tõusuga kasvab valgu lahustuvus. Selline sõltuvus pole aga absoluutne (näit. temperatuuri tõstmisel pepsiini, lihaste fosforülaasi lahustuvus suureneb, Hb lahustuvus vees ja soolalahustes aga väheneb). Siiski võib üldistada, et valkude lahustuvus suureneb teatud temperatuurini (umbes 40°C) ning hakkab kõrgematel temperatuuridel järsult vähenema denaturatsiooni ja koagulatsiooni tõttu.

KESKKONNA pH JA LAHUSTUVUS. Valgu lahustuvus ja tema lahuse püsivus on minimaalne selle valgu pI juures. Summaarne null-laeng võimaldab valgu osakestel kleepuda ja sadeneda. Mõõdukalt happelises või aluselises keskkonnas on valk kation (või anioon) ja reeglina ta ei sadene (ekstreemsete pH väärtuste juures toimub denaturatsioon ja koagulatsioon, vt. allpool).

LAHUSTI IOONTUGEVUS, POLAARSUS JA LAHUSTUVUS. Soolalahuste mõju valgu lahustuvusele sõltub nende ioontugevusest. Teisisõnu, valgu lahustuvus sõltub soola kontsentratsioonist lahuses, soola loomusest ja lahuses olevate ionide laengust. Soolalahuse ioontugevust väljendab valem $I=1/2 \sum_i m_i z_i^2$, kus m_i on i-ndat liiki ionide kontsentratsioon ja z_i nende laengusuurus. Lihtsamalt võib aga valgu lahustuvuse sõltuvust soolalahuste ioontugevusest iseloomustada järgmiselt.

Madalal kontsentratsioonil (ioontugevus madal) suurendavad neutraalsoolad $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , Na_2SO_4 , NH_4Cl jt. valkude lahustuvust. Seda nim. sissesoolamiseks (salting-in). Näit. valgud, mis puhtas vees ei lahustu, lahustuvad taoliste soolade nõrkades lahustes. Sissesoolamise põhjused on järgmised: soolaioonid lisavad vett valgu hüdraatkihti; soolaioonide interaktsioon valguioonsete gruppidega vähendab valgu molekulis ioonsidemete tekke võimalusi. Kõrgel kontsentratsioonil (ioontugevus kõrge) sadestavad neutraalsoolade lahused valke pöörduvalt ja seda eriti efektiivselt nende valkude pI-de juures. Seda nim. väljasoolamiseks (salting-out) ja selle põhjused on järgmised: soolaioonid (katioonid, anioonid) seovad endaga hüdraatkihi vett (dehüdreerimine) ja neutraliseerivad valguioonide laenguid. Kui lisada valgu sademele vett, siis valk lahustub (NB! väljasoolamise pöördumus), kusjuures valgu natiivsed omadused säiluvad. Anioonid on reeglina tugevamad väljasoolajad kui katioonid. Neid mõlemaid saab selle efekti järgi ka reastada lüotroopsesse ritta.



Vettsiduvad neutraalsed orgaanilised lahustid (vähempolaarsed) nagu etanool, atsetoon, metanool jt. sadestavad valke nende vesilahustest. Sisuliselt on see väljasoolamisele analoogne protsess. Molekuli polaarsusest tingituna valgud reeglina orgaanilistes lahustites ei lahustu. Mitmed solvendid (dimetüülsulfoksiid, diklooräädikhape) on aga head valkude lahustajad.

VALKUDE SADESTAMINE PRAKTILISEL EESMÄRGIL. Valkude sadestamisega on seotud ka praktilised probleemid, mistõttu on oluline teada valkude kvantitatiivse sadestamise üldisi võtteid. Nimelt, kõrvaldada tuleb valgu osakest stabiliseerivad faktorid - laengud ja hüdraatkiht. Summaarse laengu kõrvaldamiseks viiakse keskkonna pH vastavusse valgu pI-ga. Järgnevalt eemaldatakse hüdraatkiht, kasutades sõltuvalt eesmärgist pöörduvat sadestamist $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga või pöördumatut sadestamist mineraalhapestega, raskmetallide sooladega või alkaloididega. Alkaloidide või raskmetallisoolade puhul lisatakse eelnevalt pisut hapet või alust, viimaks valgu

molekuli sadestava iooni suhtes vastasmärgiliseks (kiirendab summaarse laengu neutraliseerimist). Kui sadestamiseks kasutatakse etanooli või atsetooni, tuleb valgu denaturatsiooni vältimiseks kasutada külmi lahuseid (0° kuni +4°C).

Valkude sadestamist rakendatakse: 1) valkude puhastamisel, näit. ka antiseerumite (globulaarsed valgud) saamisel (vt. ka valkude puhastamine); 2) biovedelike (veri, uriin, liikvor) vabastamiseks valkudest, mis segavad mitmesuguseid teisi kliinilis-laboratoorseid uuringuid; 3) kiireks valgu olemasolu tuvastamiseks (näit. haige uriinis); 4) ensüümreaktsiooni peatamiseks ensüümide aktiivsuse määramisel; 5) haavade primaarsel töötlemisel pindmiste koevalkude kalgendamiseks tanniini jt. vahenditega, vältimaks koevalkude lagunemist toksilisteks produktideks.

DE- JA RENATURATSIOON

Denaturatsioon e. denativatsioon on valgu bioaktiivsuse kadumine füüsiko-keemiliste omaduste järsu muutumise tõttu. Kuna lõhutakse nõrgad (mittekovalentsed) sidemed, kaob valgu natiivne konformatsioon (NB! peptiidsidemed säiluvad). Denaturatsioon põhjustab järgmisi muutusi:

- primaarstruktuurist kõrgemate ehitustasemetete sisuline kadumine, mis tingib ka bioaktiivsuse kadumise (näit. ensüümaktiivsuse kadumine): NB! kui on tegemist oligomeerse valguga, siis toimub kõigepealt dissotsiatsioon subühikuteks;
- peptiidsidemete kerge kättesaadavus proteolüütilistele ensüümidele võimaldab valke hõlpsasti hüdrolüüsida;
- hüdrofoobsed R-d paigutuvad molekuli pinnale, mistõttu valgu lahustuvus oluliselt väheneb;
- vabade tioolrühmade hulga kasv;
- suureneb valgulahuse viskoossus, väheneb valgu difusioonikiirus ja elektroforeetiline liikuvus;
- valgu optiliste omaduste oluline muutumine (näit. optiline aktiivsus, Tyndall'i efekt, adsorptsioonispektrid jne.).

Denaturatsiooni faktorid võivad olla füüsikalised ja keemilised. Nii näit. denatureerivad soojusenergia (50-60°C juures

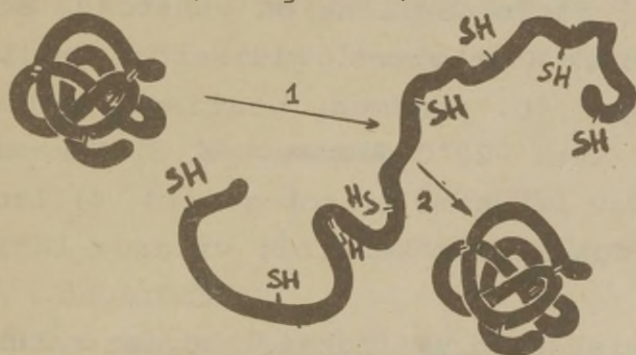
denatureerub enamik valke), vibratsioon (näit. muna kloppimine), ultraheli ja ioniseeriv kiirgus valke eelkõige vesinik- ja ioon- sidemete lõhkumise tõttu. Keskkonna pH on väga oluline keemilis- bioloogiline faktor, sest valgud on reeglina bioaktiivsed üsna kitsas pH-vahemikus. Väljaspool seda alluvad nad kergesti denatu- ratsioonile. Alkaloidid (pikriinhape, tanniin jt.) ja raskmetal- lide soolad denatureerivad valke, andes nn. valkhapetega komp- lekssooli, mis on lahustumatud. Mineraalhapped lõhuvad vesinik- ja ioon- sidemeid. Väheneb ka valguosakeste hüdrofiilsus, toimub nende agregatsioon ja sadenemine. Kui võtta hapet liias, siis valk lahustub hüdroolüüsi tõttu (konts. HNO_3 puhul hüdroolüüsi ei esine). Tugevas aluses omandab valk negatiivse laengu. Tekkivate valkhapete soolade tõttu ei toimu sadenemist (vaatamata denatu- reerumisele). Orgaanilised happed (CCl_3 , COOH , sulfosalitsüülhape) dehüdreerivad valke ja elimineerivad laenguid ning valk denatu- reerub/sadeneb efektiivselt. Etanool jt. orgaanilised lahustid moodustavad valgu molekuliga vesiniksidemeid ning mõjuvad hüdrofoobsetele AH-jääkide R-le. Detergendid (näit. SDS) moodus- tavad lõhutud sidemete asemele uusi (põhiliselt vesiniksidemeid), kusjuures tekivad püsivad detergent-valk struktuurid. Karbamiid (8-10 M) ja guanidiinkloriid (2M) on efektiivsed oligomeerse valgu subühikuteks lõhkujad (täiendavate vesiniksidemete moodus- tamise kaudu).

Denaturatsiooni biomeditsiinilised aspektid. Bakterite sur- mamine desinfitseerimisel piiritusega on nende valkude/ensüümide denaturatsioon. Raskmetalli mürgistuse puhul antakse kannatanule suur portsjon toorest munavalget või piima. Nende valgud denatu- reeruvad/sadenevad raskmetallide kompleksidena maos. See blokee- rib raskmetallide imendumise verre ja neid saab valkseotuna maost eemaldada.

Palavik on organismi kaitsereaktsioon denatureerimaks (kõr- ge temperatuuriga) haigust tekitanud mikroorganismide valke. Haavade primaarse töötlemise võtete kompleksis on ka pindmiste koevalkude denatureerimine, vältimaks valkude mürgiste lagupro- duktide teket. Maomahl (HCl !), aga ka liha keetmine denatureeri- vad (käänavad lahti) valkude ehitustasemeid, muutes peptiidsi-

demed proteolüütilistele seedeensüümidele kättesaadavamaks. Ensüümteraapias, organite siirdamisel jne. tuleb vältida kasutatava biomaterjali denatureerumist. Tavaliselt kasutatakse selleks aeglast külmutamist ja järgnevat hoidmist -20°C juures, jahutamist ja hoidmist mitte üle $+2^{\circ}\text{C}$, külmas küllastatud sahharoosi või glütserooli lahuses hoidmist, lüofiliseerimist, töötlus- ja säilitamislahuste vastava pH valimist, ensüümvalgu säilitamislahusesse tema substraadi lisamist jne.

Renaturatsioon. Valgu väljasoolamise puhul taastub pärast vastava faktori elimineerimist valgu natiivsus. Kuidas on see aga denaturatsiooni puhul? Lühiajalise pehmetes tingimustes toimuva denaturatsiooni puhul (näit. karbamiidiga) järgneb denaturatsioonifaktori eemaldamisel valgu esialgse konformatsiooni ja tema bioaktiivsuse spontaanne taastumine. See ongi renaturatsioon e. renativatsioon (vt. joonis). Järelikult pole denaturatsioon alati



1- denaturatsioon
2- renaturatsioon

pöördumatu. Pöördumatus sõltub sisuliselt denaturatsiooni sügavusest. Oma osa on ka lisafaktoritel (näit. denatureeriva faktori toime kestvusel jne.).

Renaturatsiooniprotsessi tähtsus seisneb järgmises: 1) ta on sisuliselt kaitsevõimalus, tänu millele organismis toimuvad lühiajalised tingimuste muutused ei vii valke/ensüüme kohe "rivist" välja; 2) tõestab, et primaarstruktuuris on põhiline info kõrgemate ehitustasemetete loomiseks (NB! renaturatsiooni spontaansus); 3) kuna taastub just natiivne konformatsioon, siis on see ka kõige stabiilsem konformatsioon.

Biokeemias ja meditsiinis kasutatakse tihti mõistet "koagulatsioon" (kalgendumine). Koagulatsioon on denaturatsioon + aggregatsioon + sademe teke. NB! Denatureerunud valk aga ei pruugi alati esineda sademe vormis (vt. aluste denatureeriv toime).

Enamik valke koaguleerub 70-100°C juures või ka alkaloidide, mineraalhapete, raskmetallide soolade toimel (tekivad lahustumatud kompleksid valkudega).

INDIVIDUAALSETE VALKUDE ERALDAMISE JA PUHASTAMISE MEETODID

Valgu füüsiko-keemiliste ja bioloogiliste omaduste ning tema koostise ja ehituse uurimiseks tuleb isoleerida ta homogeense individuaalse valguna. See on üsna töömahukas, järgmisi nõudeid arvestav protseduur. 1) Orgaanilise keemia klassikalised meetodid (destillatsioon jt.) valkude puhastamiseks ei sobi, kuna paljud reagentid, kõrge temperatuur jt. faktorid denatureeriks/koaguleeriks natiivse valguga. 2) Isoleerimisprotseduur peaks toimuma nn. pehmetes ning jahedates tingimustes: temperatuur 2...4°C (ideaalne oleks külmtuba), füsioloogiline pH piirkond, stabiliseerivate agentide juuresolek (sahharoos, glütserool jt.), jahutusseadmetega tsentrifuugid jt. seadmed, osaliselt puhastatud materjali säilitamine -18° kuni -20°C juures jne. 3) Rakendatavad selektiivsed meetodid peavad lahutama mikrokoguseid. 4) Isoleeritud valguga puhtuse (individuaalsuse) kontroll viidagu läbi mitme erineva meetodiga.

Konkreetsed isoleerimisvõtted valitakse lähtudes antud valguga koelisest (rakulisest) **lokalisatsioonist** (struktuurne või lahustuv valk), füüsiko-keemilistest **omadustest** (pI, M_r jt.) ja tema **ehitustasemetest**. Tinglikult koosneb valguga puhastamismenetlus järgmistest protseduuridest: homogeniseerimine, diferentsiaal-tsentrifugimine, ekstraheerimine, fraktsioneerimine, puhastamine lisandest, kõrgselektiivne puhastamine, homogeensuse kontroll.

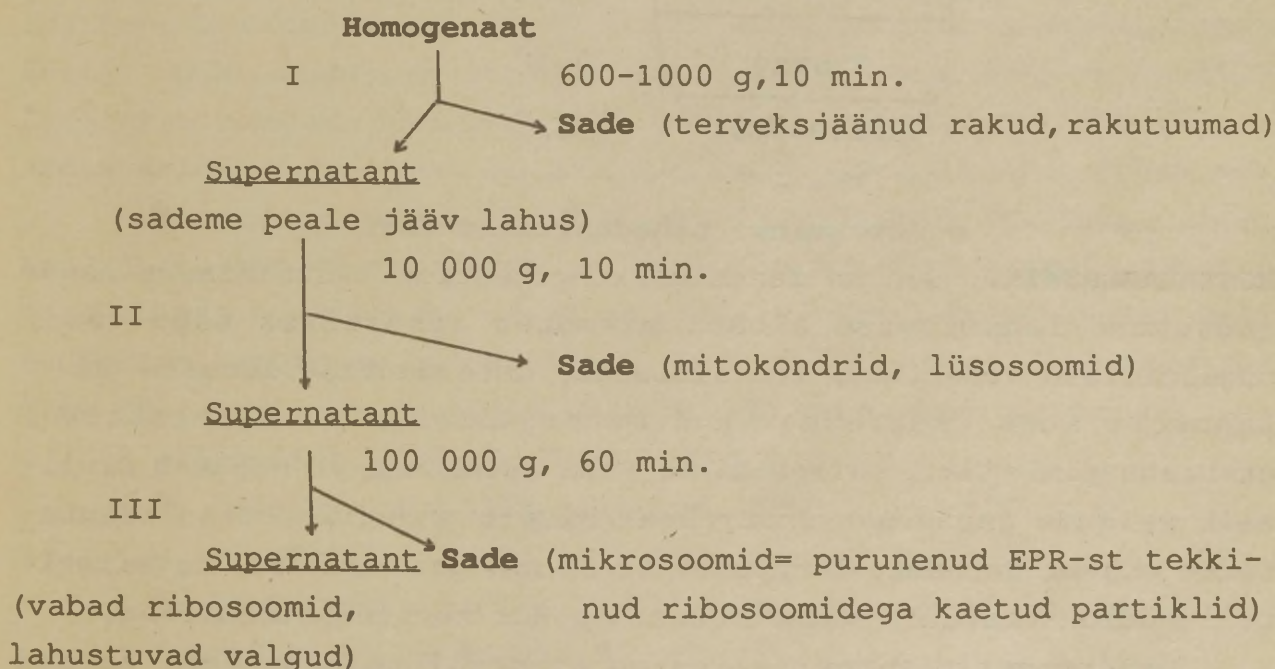
HOMOGENISEERIMINE. See on bioloogilise materjali (organid, koed, rakud) peenestamine/purustamine ühtlaseks massiks rakuliste struktuuride lõhkumisega. Levinuim on klaasist või plastikust kolviga silinderjas homogenisaator (vt. joonis). Tugeva materjali homogeniseerimiseks kasutatakse löikenugadega homogenisaatoreid, harvem kuulveskeid. Mikroorganismide rakud purustatakse ultrahe-



Kolbhomogenisaator (1- kolb, 2- korpus)

li, osmootse šoki või pressiga. Homogeniseerimise tüüpsegu on: 1 osa materjali + 10 osa 0,25 M sahharoosi lahust (isotoonilisena rakuorganellidele ja puhvrina pH-ga tavaliselt 6,5-7,4). Enamasti lisatakse veel stabiliseerimiseks $MgCl_2$, raskmetallide sidumiseks etüleendiamiintetraatsetaati (EDTA) ning tihti ka detergente (SDS, DOC jt.). Osalise puhtusastmega rakuorganellide fraktsioonide saamiseks homogeneaati tsentrifugeeritakse.

DIFERENTSIAALTSENTRIFUUGIMINE (vt. skeem) on tsentrifugaaljõu astmeline tõstmine komponentide lahutumiseks sedimentatsioonikiiruste alusel (vt. eespool). Järgnev on levinud tüüpskeem.



Saadud lõppsupernatant allutatakse tavaliselt ekstraheerimisele (vt. allpool). Sadet võib ka iga astme järel resuspendeerida puhvril (nim. pesemiseks) ja korrata tsentrifugeerimist samades tingimustes. Nii saab antud organellide fraktsioonist veelgi rohkem elimineerida teisi komponente. Nüüdisajal kasutatakse

laialdaselt aga ka ultratsentrifuugimist tihedusgradiendis. See menetlus lubab ühekordse tsentrifuugimisega lahutada (üsnagi puhtalt) subtsellulaarseid fraktsioone (vt. joonis). Gradiendis tsoonidena lahutunud (sisuliselt oma tiheduse alusel) komponendid eemaldataksegi tsoonidena (fraktsioonidena) tsentrifuugi rootori küvetist. Levinuim on sahharoosilahuse tihedusgradient. Antud menetlust saab kasutada ka mingi poolpuhta fraktsiooni puhtusastme tõstmiseks. Siis viiakse gradiendile vaid puhastatav fraktsioon ning gradient tehakse astmeline.

Tsütosool	1,05	
Golgi aparaat	1,10	sahharoosilahuse
Mikrosoomid	1,15	tihedus (g/l)
Mitokondrid	1,20	
Lüsosoomid	1,25	
Tuumad	1,30	
Ribosoomid	1,59	

Jaotumine tihedusgradiendis

EKSTRAHEERIMINE. See on menetlus komponentide lahutamiseks nende jaotuvuse/lahustuvuse alusel mitmetes lahustites nagu vesi, orgaanilised vedelikud, soolalahused, detergentide lahused jt. Lahustit koos ekstraheerunud materjaliga nim. ekstraktiks, ekstraheerimisjääki rafinaadiks. Kuna keskkonna pH mõjutab oluliselt valkude jaotuvust ekstraheerimisprotseduuris, siis kasutatakse puhversüsteeme. Tüüpjuhviks on nn. Tris-puhver, tavaliselt tris(hüdrosümetüül)-aminometaani ja HCl kombinatsioonidena.

Ekstraheerimismaterjaliks on tsentrifuugimise teel saadud rakuorganellide fraktsioonid ja lahustuvate valkude heterogeensed segud (seedenõred, aga ka tsentrifuugimise nn. lahustuvad fraktsioonid). Intaktseid rakke ja koetükke kasutatakse harva.

Ekstraheerimisega püütakse saada valkude lahustuv fraktsioon, mis sisaldaks olulisel määral meid huvitavat valku. Tei-

sisõnu, saavutatakse isoleeritava valgu osaline puhastumine, kuna halvemini ekstraheeruvad valgud elimineeruvad. Levinud on detergentide (SDS, DOC, Triton X-100 jt.) lisamine ekstraheerimissegusse. Pindaktiivsetena lõhuvad nad lipiid-valk komplekse ja valk-valk sidemeid. See soodustab membraansete valkude eraldumist membraanidest. NB! Detergendid tingivad aga oligomeersete valkude dissotsiatsiooni subühikuteks. Ekstraheerimisele järgneb enamasti konkreetse valgufraktsiooni eraldamine.

FRAKTSIONEERIMINE. Valkude ekstraktist püütakse eraldada fraktsioon, milles oleks ka isoleeritav valk. See pole küll kõrgselektiivne meetod, kuid rajanedes valkude hüdratatsiooniastme, pI ja laengulistele erinevustele, võimaldab ta vabaneda enamikest lisavalkudest. Tüüpvõtted on: väljasoolamine (fraktsioneeriv, isoelektriline), fraktsioneerimine orgaaniliste lahustitega ja selektiivne denaturatsioon.

Fraktsioneeriv väljasoolamine. See on sisuliselt sadestamine erineva ioontugevuse toimetel. Näit. lisades $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ poolküllastuseni, sadenevad globuliinid (vereseerumist, munavalgulahusest). Sade elimineeritakse tsentrifuugimisega. Supernatandile lisatakse ammooniumsulfaati täisküllastuseni albumiinide väljasadestamiseks. Nii saab ka antiseerumeid (globuliinid) puhastada.

Fraktsioneerimine orgaaniliste lahustitega (etanool, atsetoon jt.). See on sisuliselt sadestamine dehüdrateerivate ainete-ga. Valkude hüdraatkihi erinevus võimaldab neid fraktsioneerivalt sadestada. Tooksime illustratsiooniks vereplasma valkude sadestamise (NB! madal temperatuur väldib valkude denatureerumise).

- * albumiinid (40% piiritus, pH=4,8 ja -5°C)
- * α_1 -globuliinid (18% piiritus, pH=5,2 ja -5°C)
- * α_2 -globuliinid (40% piiritus, pH=5,8 ja -5°C)
- * β - ja γ -globuliinid (25% piiritus, pH=6,9 ja -5°C)
- * fibrinogeen (8% piiritus, pH=7,2, -3°C)

Isoelektriline sadestamine. Kuna valgu väljasadestamine toimub tema pI juures (stabiilsus minimaalne !), välditakse valdava osa ballastvalkude kaasasadenemine.

Selektiivne denaturatsioon. Temperatuuri tõstmine 50-65°C või pH viimine kuni 5-ni denatureerib enamiku valkudest. Kui aga

isoleeritav valk neis tingimustes ei denatureeru, saab selle menetlusega lahusest eemaldada osa ballastvalke.

PUHASTAMINE LISANDEIST. Kui eelnevad menetlused on taganud juba suhteliselt puhta isoleeritavat valku sisaldava lahuse, järgneb reeglina eelneva, s.t. nn. jäme puhastusreagentide jääkide (soolad jt.) ja natiivsete madalmolekulaarsete lisandite eemaldamine. Selle eesmärk on tagada edaspidi rakendatavate kõrgselektiivsete meetodite maksimaalne efektiivsus täiesti puhta valgu isoleerimiseks. Lisandeid eemaldatakse ultrafiltratsiooni, dialüüsi* ja geelfiltratsiooniga* (* vt. valkude omadused).

Ultrafiltratsioonil filtreeritakse valgulahus rõhu all läbi spetsiaalse nõu ("cell") põhjas olevast nn. molekulaarsest (membraansest) filtrist. Filtrile jäävad pooridest suuremad makromolekulid.

KÕRGSELEKTIIVSED MEETODID. Neid meetodeid iseloomustab see, et puhastatavat materjali vajatakse väga väike kogus, nad on kõrge lahutusvõimega ja nad ei kahjusta biostruktuure. Tänu kõrgele lahutusvõimele võimaldavad nad praktiliselt madalmolekulaarsete lisandite vabast valgulahusest isoleerida individuaalse valgu. Need meetodid on reeglina paljuastmelised (kaskaadsed), s.t. puhastatav materjal allutatakse paljudele lahutamise üksikstaadiumidele. Selgitagem!

Liikugu valkude A ja B segu läbi kolonni (kandja jne.). Kuna neid liikumapanevate ja kinnihoidvate jõudude resuldeeruv suurus on erinev, toimub A ja B järk-järguline lahutumine kuni täieliku eraldumiseni. Kolonni üht löiku saab vastaval ajamomendil vaadelda lahutumise üksikstaadiumina. Selle paljukordsus lahutabki komponendid.

Kõrgselektiivsete menetluste hulka kuuluvad ultratsentrifuugimine, kromatograafia, elektroforees, immunokeemilised meetodid.

1. Ultratsentrifuugimine. Ultratsentrifuugimisel (diferentsiaaltsentrifuugimine, tihedusgradiendis tsentrifuugimine jne.) on homogeense valgu fraktsiooni saamise aluseks erinevate valgulistele komponentide mõõtmete, M_r ja tiheduse erinevus. Tsentrifugaaljõud on liikumapanev, difusioon aga vastassuunaline (takistav) jõud (vt. ka valkude omadused ja diferentsiaaltsentrifuugimine).

2. Kromatograafia. Põhiinfo on toodud valkude omaduste juures. Siin esitaksime vaid konkreetsete menetluste lahutusvõimet määravad põhitegurid: adsorptsioonkromatograafia - adsorbendi adsorptsioonivõime antud valguga; jaotuskromatograafia - antud valguga jaotuvus/lahustuvus mittesegunevais vedelikes; ioonivahetus-kromatograafia - valguga amfioonsus; lisagem, et valkude puhul kasutatakse tavaliselt DEAE-tselluloosi (anioniit) ja KM-tselluloosi (kationiit), mis on vastavalt tselluloosi dietüülaminoetüül- või karboksümetüülderivaadid; geelkromatograafia - M_r ja molekuli mõõtmete erinevused; afiinsuskromatograafia - valguga spetsiifiline seostumine kandjal oleva vastava ligandiga.

3. Elektroforees. Põhiinfo on toodud valkude omaduste juures, seetõttu piirdume vaid konkreetse menetluse lahutusvõime põhifaktorile viitamisega: frontaalne elektroforees - valkude erinev ionisatsioon; tsonaalne - erinevused laengu märgis ja laengu suurus; NB! menetluse lahutusvõime sõltub ka kandjast, seda illustreerib vereseerumi valkude näide (vt. allpool); isoelektriline fokuseerimine - valkude erinevast ionisatsioonist tulenev pI erinevus; isotahhforees - M_r , laengu märgi ja laengu suuruse erinevused.

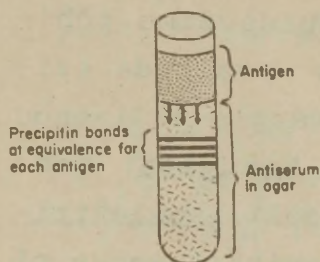
4. Immunokeemilised meetodid. Need on kiired kõrgselektiivsed meetodid, mis baseeruvad immuunreaktsioonil antikehade (Ab) ja antigeeni (Ag) vahel. Ab on antiseerumi ehk immuunseerumi immunoglobuliinid, Ag on aga näit. uuritav valk. Biokeemilise spetsiifilisuse alusel (vt. valkude primaarstruktuur) toimivas Ab ja Ag reaktsioonis tekib kompleks Ab-Ag (pretsipitaat). Pretsipitatsioonireaktsiooni intensiivsus sõltub: Ag kontsentratsioonist, temperatuurist, pH-st, keskkonna ioontugevusest. Immuunseerumi madalaimat lahjendust, mis veel annab Ag toimel pretsipitaadi, nim. seerumi tiitriks.

Antikehade enamlevinud kasutamisevõtte on sadestamine geelis ja määrgistatud ainete sidumine.

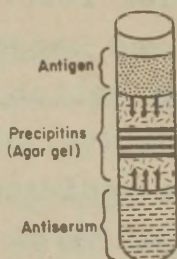
A) **Sadestamine geelis.** Geeli kohas, kus Ab ja Ag sisaldus on ekvivalentne, tekib nähtav sademe tsoon (band). Selle paksus, kuju ja paigutus näitab Ag suhtelist hulka ja homogeensust. Kui antigeeniks on puhastatav valk, saame hinnata tema homogeensust

või seda valku puhastada, isoleerides tema bandi. Geelis sadestamise tüüpmenetlused on immunodifusioon ja immunoelektroforees, millede põhivariante üldistatult vaatlemegi.

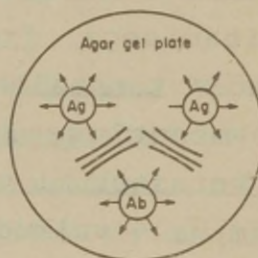
Immunodifusioon (vt. joonis) toimub agar-agargeelis, mis on torukeses või Petri tassil (Petri tassi puhul viiakse geeli ühte väljalõikesse Ab, teistesse Ag). Kasutatakse liht- ja kaksikdifusiooni. Viimast saab teha ühemõõtmelise või kahemõõtmelise immunodifusioonina Ouchterlony järgi (vt. joonis). Kõigi nende menetluste puhul näitab pretsipitatsioonibandide arv erinevate Ag-de arvu uuritavas lahuses. Kui isoleerime järgnevalt ühe konkreetse bandi, saab menetlust käsitleda puhastamisena.



ONE DIMENSION-SINGLE IMMUNODIFFUSION (OUDIN TUBE) (Antigen diffuses from overlay into agar containing antiserum where precipitin lines form at the equivalence points for each separate antigen)



ONE DIMENSION-DOUBLE IMMUNODIFFUSION (Antigen diffuses into agar from overlay while antibody diffuses from below. Precipitin bands form at equivalence points for each separate antigen)

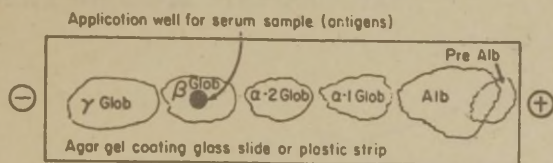


TWO DIMENSION-DOUBLE IMMUNODIFFUSION OUCHTERLONY (Antigens and antibody diffuse radially into agar. Precipitin bands form at equivalence points for each separate antigen. Location and arrangement of wells in agar can vary to compare a variety of antigens and antibodies)

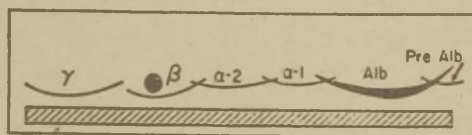
J.B. Henry, 1991, Clinical diagnosis management (W.B. Saunders Company)

Immunoelektroforees on elektroforeetilise lahutamise ja kahe-
mõõtmelise immunodifusiooni kombinatsioon. Esmalt sooritatakse agar-agargeeli augukujulises väljalõikes oleva uuritava lahuse elektroforeetilise lahutamise liikuvuse alusel (vt. vereseerumi näidet, aste 1). Järgnevalt viiakse geeli rennikujulisse väljalõikesse multivalentne antiseerum (erinevate Ab segu) ning teostatakse elektroforeetilisele liikumisele (jooniselt vasakult paremale) ristisuunaline immunodifusioon. Tekivad valkudele (Ag-le) vastavad pretsipitatsioonibandid. Nende suhteline suurus

vastab antud valgu suhtelisele hulgale. Bandi elektroforeetilise migratsiooni järgne asend peegeldab valgu identsust (individuaalsust). Kui kasutada monovalentset süsteemi (ühete tüüpi Ag), saame vaid ühe bandi, mille isoleerimine annab individuaalse valgu.



Step 1: Separation of serum protein fractions by electrophoresis in agar gel



Step 2: Precipitin lines form following two dimensional immunodiffusion reaction in agar after application of specific antiserum in trough. (Incubate in moist chamber overnight)

Immunoelektroforeesi üldistatud skeem

J.B. Henry, 1991, Clinical diagnosis management (W.B. Saunders Company)

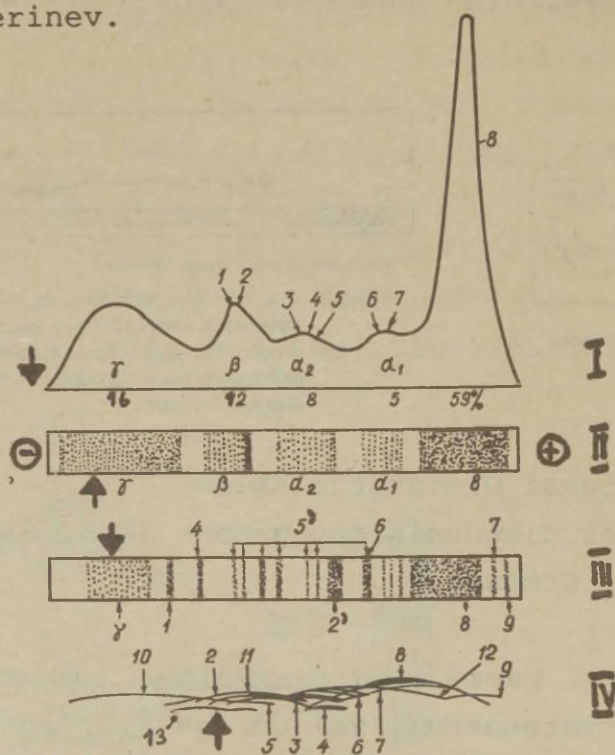
Lõpetaksime elektroforeesi teema lahutusvõimet iseloomustava üldise joonisega (inimese vereseerumi valgud, pH 8,6, ioontugevus 0,1 ühikut). Stardipunkti näitab joonisel vasakul olev must nool, s.t. migratsioon toimub vasakult paremale (anoodile).

I - frontaalse elektroforeesi elektroforeogramm (saadud optilise tiheduse alusel). Vereseerumi valgud on lahutunud viieks fraktsiooniks: albumiin, α_1 -, α_2 -, β - ja γ -globuliinid. Näeme, et albumiinil on suurim, γ -globuliinil aga väikseim liikumiskiirus. Fraktsiooni all olev arv näitab fraktsiooni %-ti seerumi koguvahust. NB! Vereplasma annab seerumiga identse pildi v.a. fibrinogeeni band β - ja γ -globuliinide vahel;

II - tsonaalse paberelektroforeesi ilmutatud elektroforeogramm. Menetlus (8-18 tundi) lahutab vereseerumi valgud samuti 5-6 fraktsiooniks;

III - tsonaalse tärglisegeeli kasutamisel saadud elektroforeogramm on aga 8-10 bandi. Seega annab lühike (4 tundi) protseduur oluliselt parema lahutumise kui eelmised menetlused. NB! 2-3 tunnine tsonaalne elektroforees PAAG-il annab aga kuni 30 bandi (patoloogilise seerumi korral isegi kuni 35-40 bandi);

IV - immunoelektroforegrammil agar-agargeelil on 15-20 bandi, mis on mõnevõrra selgepiirilised ja laiemad kui teiste menetluste puhul. Ka on mõnede valkude migreerumine (võrreldes teiste menetlustega) erinev.



Elektroforeesimenetluste võrdlus: 1- β -lipoproteiin; 2- transferrin (2'-transferrin C); 3- α_2 -lipoproteiin, 4- α_2 -makroglobuliin; 5- haptoglobiin (5' erinevad haptoglobiinid); 6- tseruloplasmiin; 7- α_1 -glükoproteiin; 8- albumiin; 9- prealbumiin; 10- IgG; 11- β_1 -lipoproteiin; 12- α_1 -lipoproteiin; 13- IgM

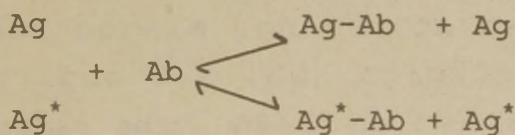
B) **Märgistatud ainete sidumine.** Meetodi põhimõisted on:

- 1) siduv valk, tüüpjuhul on see Ab (võib olla aga mõni muu valk, näit. transkortiin, kui transportvalk kortisooli määramiseks);
- 2) märgistamata ligand, näit. Ag (käibetermin on "külm" ligand);
- 3) sama ligand märgistatult, näit. Ag* (nn. "kuum" ligand). Märgis on **radioaktiivne, ensümaatilise, fluorestseeruv**. Tüüpmenetlused oleksid järgmised.

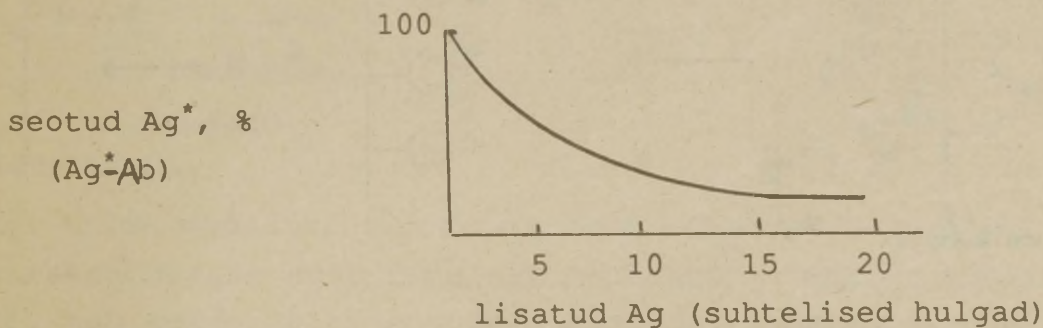
RADIOIMMUNOLOOGILINE MÄÄRAMINE (radioimmunoassay = RIA). Sünonüümid on saturatsioonianalüüs ja konkurentse sidumise meetod. RIA-s ühendub immuunreaktsioon radioisotoopide määramistund-

likkusega. RIA aluseks on Ag ja Ag* konkurents Ab kindla arvu sidumiskohtade pärast. Selgitagem!

Kui Ag+Ag* võtta ülehulgas, siis Ab sidumiskohtadest ei piisa kogu Ag ja Ag* samaaegseks sidumiseks. Kuna aga Ab seob mõlemat ligandi (s.t. Ag ja Ag*) võrdse sugulusega, siis sõltub seostuva Ag või Ag* hulk otseselt suhtest $[Ag]/[Ag^*]$. Seda kõike saab väljendada järgmiselt:



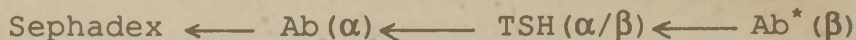
Reaktsioonide tasakaalustumisel on keskkonnas olemas seega Ag-Ab ja Ag*-Ab. Standardtingimustes on Ab-ga seotud Ag* hulk pöördvõrdelises sõltuvuses konkureeriva Ag kontsentratsioonist (NB! uuritav valk). Järelikult Ag kontsentratsiooni suurendamisel väheneb kompleksi Ag*-Ab lülituva Ag* hulk. Kasutades fikseeritud kogust Ab ja Ag* ning uuritava Ag erinevaid hulki, saame teha kalibreerimisgraafiku (Ag*-Ab hulk vs Ag hulgad). Selle graafiku abil saame edaspidistes katsetes leida antud Ag hulka (see võib olla ka puhastatav valk) tundmatus uuritavas lahuses.



Menetluse üheks võtmemomendiks on sidumata jäänud Ag ja Ag* eksaktne eemaldamine keskkonnast spetsiifiliste sorbentidega (aktiveeritud süsi, silikageel, sephadex jt.).

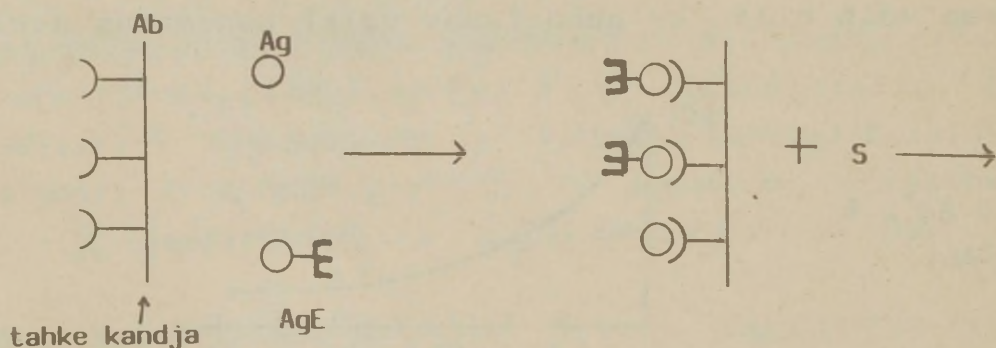
RIA modifikatsioonidest on levinuim IRMA (immunoradiometric assay). Selle puhul kasutatakse hoopis puhastatud märgistatud antikehi (Ab*). Inertsele kandjale (Sephadex) viiakse türeotroop-

se hormooni α - subühikule komplementaarsed Ab. Sellele seostub TSH, mille hulka saab määrata TSH β - subühikule komplementaarsete Ab abil (Ab*).



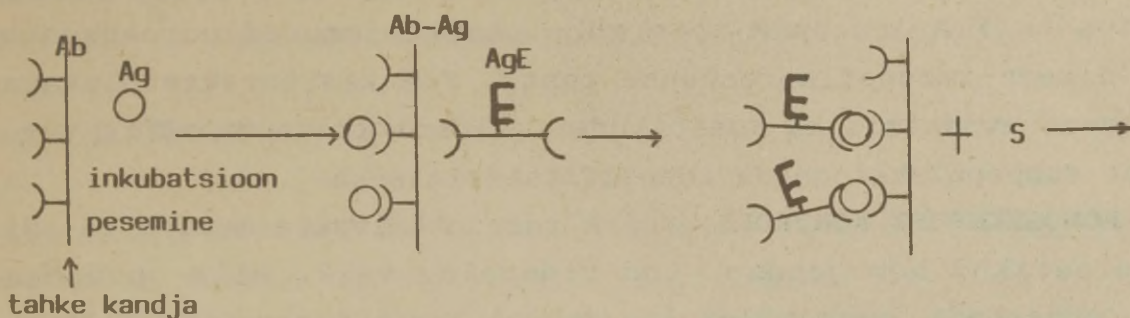
ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA). Sünonüümid on "enzyme immunoassay" ja määramine immunosorbendiga seotud ensüümi kaudu (IgE või AgE). ELISA-s ühendub Ab spetsiifilisus ensüümaktiivsuse määramisega. Kasutatakse Ab või Ag, mis on konjugeeritud hõlpsasti määratava ensüümiga (NB! see ongi nn. ensüüm-märgistamine). Võrreldes RIA-ga on ELISA vaba radioaktiivsusest ja lihtsamini automatiseeritav. ELISA kasutab Ag määramiseks konkurentsi meetodit või kaksikantikehade meetodit. Spetsiifiliste Ab määramiseks rakendatakse ELISA kaudset meetodit.

Konkurentsi meetodi puhul lisatakse määramissegusse kindel hulk ensüümmärgistatud Ag (AgE) ja teadmata hulk Ag. AgE ja Ag konkureerivad spetsiifiliste Ab-de sidumiskohtade pärast (vt. skeem). Järgneb inkubeerimine ja sidumata jäänud jääkide väljapesemine puhvriga.

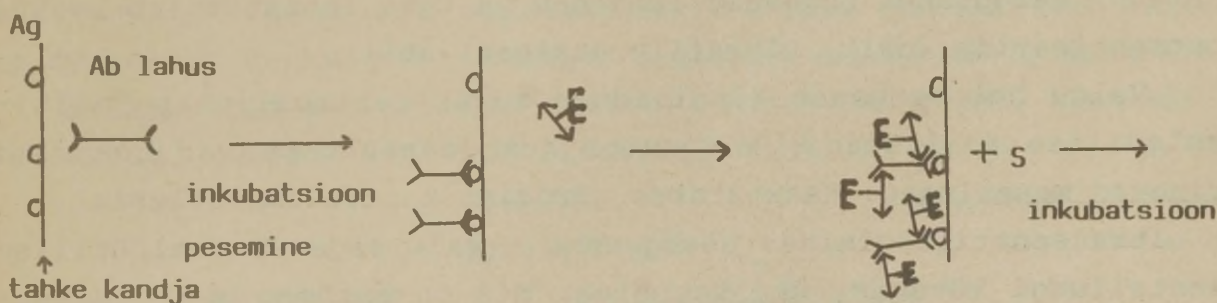


Järgnevalt lisatakse ensüümi substraat (S) ning määratakse ensüüm-aktiivsus, mis standardtingimustes korreleerub Ab-ga seostunud AgE hulgaga. Seega: AgE + Ag lisamisel ja ainult AgE lisamisel saadud näitude vahest saab kalibreerimisgraafiku alusel arvutada Ag hulka. Meetodi põhipuuduseks on see, et iga Ag võib vajada E sidumiseks erinevat meetodit. See on välistatud kaksik-antikehade meetodi puhul, kus kandjal olevate Ab-ga pannakse

reageerima tundmatu kontsentratsiooniga uuritava Ag lahus (vt. skeem). Tekib spetsiifiline Ag-Ab. Siis lisatakse AgE, inkubeeritakse, pestakse ja peale S lisamist määratakse ensüümaktiivsus. Standardtingimustes korreleerub see spetsiifilise Ag hulgaga proovis.



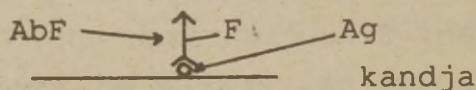
Spetsiifilise Ab hulga määramiseks kasutatakse ELISA kaudset (mitteotsesest) meetodit, kus eeldatavat Ab sisaldav lahus (näit. seerum) pannakse reageerima tahkele kandjale viidud spetsiifiliste Ag-ga (vt. skeem). Spetsiifiline Ab seostub, võõrmolekulid pestakse välja ning järgneb ensüümmärgistatud anti-Ig sidumine, pesemine ja S lisamine. Standardtingimustes määratud ensüümaktiivsus korreleerub Ab hulgaga uuritavas lahuses.



Kõigi ELISA modifikatsioonide tundlikkust saab oluliselt tõsta, kui rakendatakse ensüümide amplifikatsiooni (enzyme amplification). Näit. AgE küljes olev ensüüm muudab oma substraadi produktiks, mis on mingi teise ensüümi jaoks katalüütiline päästikmolekul (aktivaator), s.t. vallandab selle teise ensüümi toime. See teine ensüüm on valitud aga selline, et tema produkt on eriti intensiivse värvusega. NB! Tõuseb meetodi tundlikkus ning teise ensüümi aktiivsust pole vaja määrata vahetult ELISA süsteemis.

FLUORESTSENTSIMMUNOLOOGIA (fluorescence immunoassay, FIA) puhul ühendub immuunreaktsioon fluorestsentsiga. Kandjale seotud Ag

seostatakse (vt. skeem) fluorofoor-märgistatud Ab-ga (AbF). Järg-



neb töötlus ultravioletkiirgusega ja uuritava antigeeni olemasolu sedastamine fluorestsentsi intensiivsuse registreerimisega. See menetlus on FIA levinuim võtte ehk otsene immunofluorestsentsi test (direct immunofluorescence test). FIA kasutatakse oletatavate Ag-de avastamiseks koelõikudes, elusrakkudes ja näit. vererakkude subpopulatsioonide identifitseerimiseks.

VALGU HOMOGEENSUSE KONTROLL. Kui kõrgselektiivsete meetodite abil on isoleeritud homogeenne individuaalne valk, siis püütakse teda puhastada madalmolekulaarsetest lisanditest ultrafiltratsiooni*, geelfiltratsiooni*, dialüüsi*, kristalliseerimise, lüofiliseerimise abil (* vt. valkude omadused ja puhastamine).

Kristalliseerumine on antud aine üleküllastatud lahusest selle aine kristallide eraldumine. Lahusesse jäävad ballastained. Lüofiliseerimine on aine kontsentreerimine lahusti eraldamise teel (makromolekulide puhul madalal temperatuuril) vaakuumi tekitamisega. Lisandite eraldamise mõnede meetodite puhul (näit. dialüüs) valgulahus tugevalt lahjeneb ja tema lahust tuleb uuesti kontsentreerida (näit. ultrafiltratsiooni abil).

Valgu homogeensust (individuaalsust) kontrollitakse multi-meetodilise analüüsiga, kusjuures homogeensust peavad tõendama erinevad menetlused. Kasutatakse järgmisi kontrollmenetlusi:

- 1) ultratsentrifuugimine- homogeenne valk sadeneb analüütilise tsentrifuugi küvetis ühe tsoonina, mis on automaatselt registreeritav vastava optilise seadeldise abil;
- 2) isoelektriline fokuseerimine- isoleeritud valgu pI peab ühtima teoreetiliselt arvutatud (või käsiraamatust leitud) pI-ga;
- 3) katalüütilise või hormonaalse aktiivsuse test- kui tegemist on ensüümvalguga või hormonaalse valguga, siis määratakse vastavalt tema ensüümaktiivsus või hormonaalne aktiivsus ja püütakse seejärel teda veelgi puhastada. Kui aktiivsused täiendaval puhastamisel ei muutu, võib valku lugeda homogeeneks;
- 4) kaksik-immunodifusioon (vt. immunokeemilised meetodid)- ainult ühe pretsipitatsioonibandi teke tõendab individuaalset valku;

5) kristallisatsioon - NB! kristallide teke atsetooniga, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jt. ainetega ei näita veel alati homogeensust, sest kristalle annab ka valk, milles on 2-4% lisandeid.

Kui puhastatud valk pole veel täiesti individuaalne (homogeenne), tuleb teda sobiva kõrgselektiivse meetodiga täiendavalt puhastada ja teha uus multimeetodiline homogeensuse analüüs.

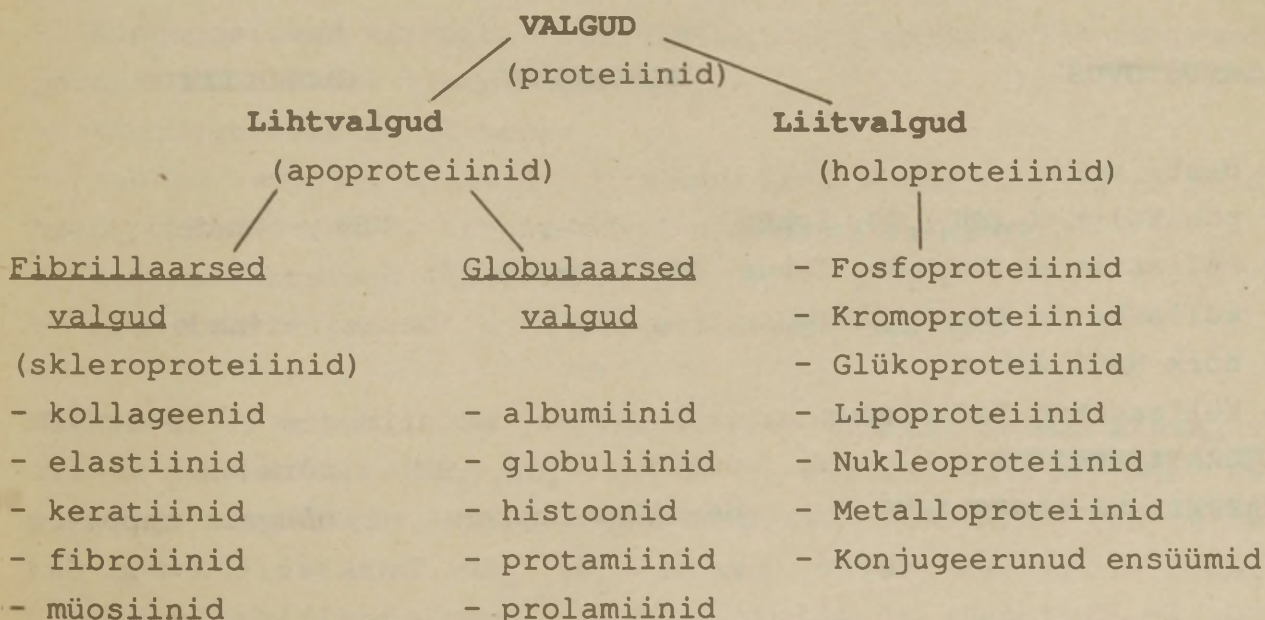
KLASSIFIKATSIOON

Struktuurse klassifikatsiooni kohaselt eristatakse lihtvalke (koosnevad ainult AH-jääkidest) ja liitvalke (sisaldavad peale AH-jääkide ka mittevalgulist komponenti e. prosteetilist rühma; kr.k. prostheto = lisa). Lihtvalke liigendatakse põhiliselt konformatsiooni järgi, arvestades aga ka nende lahustuvust. Liitvalke eristab prosteetilise rühma loomus (vt. skeem).

LIHTVALGUD.

1. **Fibrillaarsed valgud** (skleroproteiinid= "kõvad" valgud) on niitjad, enamasti kõrvutiste polüpeptiidahelatega valgud. Reegli-na iseloomustab neid: mehhaaniline vastupidavus, kaitse- ja tugi-funktsioon, lahustuvus hapetes mitte vees, AH-jääkide (Gly, Pro, Hyp, Ala) ühekülgne sisaldus, vastupidavus denaturatsioonile.

Kollageenid on kõõluste, kõhrede, luude, dentiini, naha fib-rillaarsed valgud (vt. fibrillaarsete valkude ehitus ja side-



kude). Keetmisel annavad kollageenid osalise hüdrolüüsi produktina želatiine. Elastiinid on arteriseinte, kõõluste, kõhrede valgud (vt. fibrillaarsete valkude ehitus ja sidekude). Keratiinid on epidermise, juuste, villa, küünte jt. epidermaalsete rakkude sünteesiproductide valgud, mida iseloomustab kõrge Cys sisaldus (vt. fibrillaarsete valkude ehitus). Fibroiinid on spetsifunktsioonidega valgud nagu verehübimisfaktor fibrinogeen või siidikiudude valk fibroiin. Fibroine, kollageene, elastiine ja keratiine nim. varem ka proteinoide (valgutaolisteks).

2. **Globulaarsed valgud** on ellipsoidse kujuga, arvukaim valkude rühm (siia kuuluvad sisuliselt kõik lihtensüümid, praktiliselt kõikide konjugeerunud ensüümide ja paljude teiste liitvalkude valguline osa, valgulised hormoonid jne.).

Globulaarseid valke iseloomustab reeglina lahustuvus füsioloogilises lahuses, nende lahuste kolloid-olek, denatureeruvus, sekundaarstruktuuris α -heeliksi prevaleerumine, isovormide rohkus. Nende liigendamine baseerub põhiliselt lahustuvusel, arvestatakse aga ka lokalisatsiooni ja funktsioone.

Albumiinide ja globuliinide, kui globulaarsete valkude põhirühmade võrdlev iseloomustus on toodud alljärgnevalt.

LAHUSTUVUS	ALBUMIINID	GLOBULIINID
- dest. vesi	+	-
- poolkül-tud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahus	+	NB! - (sade)
- küllastatud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahus	NB! - (sade)	-
- küllastatud Na_2SO_4 lahus	+	- (sade)
- nõrk NaCl lahus	+	+
- küllastatud NaCl lahus	+	-
HÜDRATISEERITUS	tugev	nõrk
HAPPELISUS-ALUSELISUS	enamikus happe-	nõrgalt happe-

lised, pI=4,6-4,7; polüanioonid füsiol. pH juures	lised või neut- raalsed, pI=6-7,3
---	---

ELEKTROFOREES

- liikuvus	kiire liikumine anoodile (polü- anioonsed, pH 8)	aeglane, anoodile (pH 8)
- põhifraktsioonid (vereseerumi kui mudeli puhul)	1 homogeneenne albumiinide fraktsioon	4 fraktsiooni: α_1 -, α_2 -, β -, γ - globuliinid
MOLEKULMASS	15 000-80 000	100 000 ja üle
ESINDAJAID	vereseerumi albu- miinid, laktalbumiin, ovoalbumiin	vereseerumi globuliinid, laktoglobuliin, ensüümid

PÕHIFUNKTSIOONID

Albumiinid

- vere kolloid-osmootse rõhu tagamine umbes 75% ulatuses ning vee vahetus kudede ja vere vahel;
- rasvhapete, vitamiinide, kolesterooli, ravimite jne. transport kõrge adsorptsioonivõime tõttu;
- vere pH säilitamine (puhverdusvõime).

Globuliinid

- konjugeeruvad kergesti lipiididega, s.t. osalevad nende transpordis (näit. vere lipoproteiinid);
- konjugeeruvad ka SV-tega;
- seovad spetsiifiliselt mitmesuguseid komponente ja on nende transportijad (näit. transferrin transpordib rauda);
- kaitsefunktsioon (näit. Ab);
- rida teisi ülesandeid (näit. ensüümkatalüüs jt.)

Märkused: 1) Albumiinide ja globuliinide eristamise põhiaspekt on erinev lahustuvus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahuses ja destilleeritud vees. See pole aga absoluutne. Näit. veres on β -laktoglobuliin, mis lahustub poolküllastatud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahuses. Siiski aktsepteeritakse toodud klassifikatsiooni. 2) Albumiinide ja globuliinide suhe

veres on normaalses organismis püsiv suurus (nn. valgu koefitsient). Kuna suhe muutub haiguste korral, omab valgu koefitsiendi määramine kliinilist tähtsust (vt. vere biokeemia).

Histoone iseloomustab: 1) madal M_r (11 000-22 000); 2) Lys ja Arg rohkusest tulenev aluselisus ($pI=9,5-12,0$); 3) omapärane lokalisatsioon kudedes (kr. k.histos = kude), täpsemalt hulkrakuliste organismide rakutuumas, kus nad esinevad nukleoproteiinidena: positiivselt laetud histoonid (polükatioonid) on elektrostaatiliselt seostunud negatiivselt laetud kromatiini DNA-ga (suhe histoon/DNA on ühe lähedane). Histoonitaolisi valke esineb ka ribosoomides ja viirustes. Bakterites tüüpilised histoonid puuduvad; 4) osalemine genoomi aktiivsuse regulatsioonis.

Loomorganismides esineb histoonide 5 põhitüüpi. Nad erinevad sisuliselt Lys/Arg poolest ja neid tähistatakse "H"-ga.

H_1	Lys/Arg = 19	Lys rohkesti	(28%)
H_{2a}	Lys/Arg = 1,9	Lys mõõdukalt	(11%)
H_{2b}	Lys/Arg = 1,1	Arg mõõdukalt	(10%)
H_3	Lys/Arg = 0,7	Arg rohkesti	(14%)
H_4	Lys/Arg = 0,7	Arg ja Gly rohkesti	(Arg=13%)

Histoonide struktuurne funktsioon väljendub nukleosoomide moodustamises (v.a. H_1). Nukleosoomidena stabiliseerivad/säilitavad nad DNA kompaktset konformatsiooni ja seega ka kromatiini ning kromosoomide ehitust. Histoonide regulatoorne funktsioon väljendub geneetilise info DNA-lt RNA-le ülekande reguleerimises-blokeerimises (vt. nukleiin happed ja matriitssünteesid).

Histoonide üks tüüp (H_5) esineb lindude, amfiibide ja kalade erütrotsüütide teatud vormides.

Protamiinid on tugevalt aluselised (kuni 85% Arg), suhteliselt madala M_r (4000-12 000) valgud, mis polükatioonidena stabiliseerivad spermatoosoidide DNA kompaktset konformatsiooni (nukleoproteiinid!). Struktuurse funktsiooni analoogia histoonidega viitab võimalusele, et protamiinid on histoonide teatud asendajad. See on enam-vähem kindel teatud kalade piimja sperma kohta (näit. salmiin, skumbriin, truttiin, klupeiin vastavalt lõhe, skumbria, forelli ja heeringa puhul). Regulatoorset funktsiooni pole protamiinidel tõestatud.

Prolamiinid ja gluteliinid on taimsed valgud (nisu-, rukki-, riisi-, maisi- jt. terades), mida iseloomustab vees ja soolalahustes lahustumatus, AH-jääkide sisalduse suhteline ühekülgsus (rohkesti Glu, Asp, Pro ja vähe Lys). Prolamiinid on gliidiin (nisu), hordeiin (oder), zeiin (mais); gluteliinid - gluteliin (nisu), glutaliin (mais), orüseriin (riis).

LIITVALGUD.

Kommentaar: Struktuurses klassifikatsioonis, mis jagab valgud liht- ja liitvalkudeks, on siiski ka vastuolusid: 1) nn. puhtaid lihtvalke organismis sisuliselt pole, kuna nende valkude funktsioneerimiseks on vaja reeglina kompleksi teke mingi faktoriga; 2) liitvalke, näit. lipoproteiine võib vaadelda valgu ja lipiidi kompleksidena või lipiidi ja valgu kompleksidena, s.t. nad võivad ehituslikult kuuluda nii valkude kui lipiidide hulka. Sama probleem on ka teiste nn. liitvalkudega. Seetõttu kasutataksegi üha enam "segamakromolekulide" mõistet, mis hõlmab ka liitvalke, (vt. vastav teema).

Levinud on ka valkude funktsionaalne klassifikatsioon.

Valkude klass funktsiooni alusel	Tüüpesindajad
* ensüümid	pepsiin, trüpsiin, laktaadi dehüdrogenaas
* transportvalgud	hemoglobiin, müoglobiin, transferrin, vereseerumi albumiinid,ioonpumbad
* struktuursed valgud	kollageenid, elastiinid, keratiinid, fibroiinid, histoonid
* kontraktiilsed valgud	müosiin, aktiin, tropomüosiin, tubuliin, düneiin
* regulatoorsed valgud	insuliin, histoonid
* retseptorvalgud	rodopsiin, kolinoretseptorid, LDL-retseptor
* kaitsevalgud	Ig, fibrinogeen, trombiin
* toite- ja varuvalgud	piima kaseiin, ovoalbumiin

Mõnikord kasutatakse ka valkude füüsiko-keemilist klassifikat-

siooni, mis eristab: 1) polaarseid (hüdrofiilseid) valke (vees lahustuvad valgud); 2) apolaarseid (hüdrofoobseid) valke (praktiliselt vees lahustumatud valgud); 3) amfifiilseid (amfipaatsid) valke - molekulis polaarset ja apolaarset osa omavad valgud (reeglina mitmed biomembraanide valgud).

BIOFUNKTSIOONID

Ensümaatiline (katalüütiline) - kõik senini tuvastatud ensüümid (biokatalüsaatorid) on valgud. Antud funktsioon väljendub biokeemiliste protsesside kiirendamises (vt. ensüümid).

Regulatoorne - ainevahetuse (metabolismi) regulatsioon valguliste hormoonide poolt (näit. pankrease insuliin reguleerib süsivesikute metabolismi kaudu veresuhkru taset). See on hormonaalne regulatsioon. Eksisteerib aga ka genoomi aktiivsuse regulatsioon (geenide regulatsioon) histoonide poolt (vt. ka nukleinhapped).

Transpordifunktsioon - a) ainete transport biovedelike kaudu e. humoraalne transport rakkude ja kudede vahel (vere albumiinid transpordivad rasvhappeid; kudede vaheline lipiidide transport lipoproteiinide abil; vere hingamisfunktsiooni aluseks on O_2 ja osa CO_2 transport Hb poolt; müoglobiin transpordib O_2 lihastes; transkortiin transpordib kortikosteroide; transferriin transpordib rauda jne.); b) transport läbi biomembraanide neis paiknevate valkude-ülekandjate abil (näit. plasmamembraani Na, K-ATPaas ehk Na-pump pumpab liigse Na^+ rakust välja, tuues samaaegselt vajaliku koguse K^+ rakku; Na-pump loob seega Na^+ ja K^+ gradiendid raku ja rakuvälise keskkonna vahel, mis on ka närviimpulsi tekke ja leviku aluseks).

Struktuurne - biomembraanide, tsütoskeleti (tubuliin), kõõluste (kollageenid), veresoonte seinte (elastiinid), küünte, karvade, juuste, sulgede (keratiinid), nukleosoomide (histoonid) ehituskomponendid on valgud. Viiruste struktuurikomponent on valguline kate (kapsiid).

Kaitsefunktsioon - a) aktiivne kaitse (võõrvalke siduvad antikehad; valgulised verehüübimisfaktorid; vere pH ja osmootse rõhu regulatsioonis osalevad valgud; bakterite toksiinid nagu botulis-

mitoksiin, mis mõjub KNS-le või difteeriatoksiin, mis pärsib valgusünteesi; maomürgid jt.); b) passiivne kaitse, mis samastub teatud määral struktuurse funktsiooniga (nahavalgud, juuste, küüniste, villa valgud jt.).

Kontraktsioonifunktsioon (mehhanokeemiline) - keemilise energia (põhiliselt ATP) kasutamine valkude abil lihaskontraktsiooniks. (näit. lihaskoe valgud müosiin, aktiin jt.).

Retseptoorne - retseptorite baasstruktuuriks ja spetsiifilisuse aluseks on valk (näit. nägemisaistingu tekkes osaleb silma võrkkesta retseptorvalk rodopsiin).

Varufunktsioon (troofiline) - valkude kui varuainete kasutamine arenevate rakkude toiduks (ovoalbumiin, prolamiinid ja gluteliinid, piima kaseiin jt.).

Energiasubstraadi funktsioon - 1 g valgu täielik oksüdatsioon (CO_2 ja H_2O -ni) annab 4,3kcal (17,5 kJ) energiat (samastub teatud mõttes varufunktsiooniga).

Elektroosmootne funktsioon - ioongradientide ja elektrokeemiliste potentsiaalide loomine (näit. Na-pump loob Na^+ ja K^+ kontsentratsioonilise erinevuse plasmamembraani sise- ja väliskülje vahel).

Detoksikatsioonifunktsioon - albumiinid seovad funktsionaalsete rühmade ($-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) abil raskmetalle ja alkaloide, neutraliseerides nende toksilisuse.

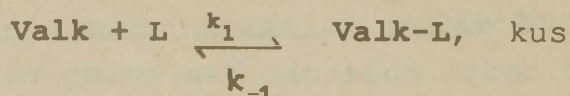
NB! Kõikide nende biofunktsioonide realiseerumine baseerub lõppkokkuvõttes antud valgu molekuli võimel spetsiifiliselt siduda mitmesuguseid teisi molekule (ka teisi valke), fragmente jne., mida nim. ligandideks.

LIGANDIDE SIDUMINE JA STRUKTUURIDE ASSAMBLEERUMINE

Igal valgu molekulil on kindlasti olemas nn. aktiivala (NB! ensüümvalgu puhul nim. seda aktiivtsentriks), millega seostub vastav ligand. Tuletagem veelkord meelde, et 1) ligand on üldnimetus valgu poolt seotava molekuli, fragmendi, iooni jne. kohta ja 2) just võime spetsiifiliselt siduda vastavaid ligande garanteeribki selle või teise biofunktsiooni täitmise antud valgu

poolt. Näit. hormooni (või mediaatori) spetsiifilisest seostumisest retseptorvalguga algab hormonaalsele regulatsioonile viiv sündmuste jada (saab teoks antud valgu retseptorne funktsioon). Teisalt, just spetsiifilised vastastikused toimed (NB! seostumised) valkude vahel ning valkude ja teiste biomolekulide vahel on aluseks ensüümkomplekside, rakustruktuuride jne. iseeneslikule kokkupakkimisele e. assambleerumisele (self-assembly), s.t. teostub valkude struktuurne funktsioon ja selle kaudu ka mitmed muud funktsioonid. Kõige selle tõttu pööratakse suurt tähelepanu valgu ja ligandi seostumise uurimisele.

Mis siis määrab valgu ja ligandi (L) vahelise spetsiifilise interaktsiooni? Selleks on valgu molekuli aktiivala ja seostuva ligandi komplementaarsus. Teisisõnu, valgu molekuli aktiivala ja ligandi vaheline ehituslik, laenguline (+ ja -) ja konformatsiooniline sobivus. Seejuures tagab valgu molekuli konformatsioon aktiivala funktsionaalsete rühmade just sellise ruumilise paigutuse, mis on komplementaarne ligandi vastavate rühmadega. NB! Valgu molekuli aktiivala rühmade ruumiline paigutus on aga **dünaamiline**, s.t. aktiivalale lähenev ligand saab valgu aktiivala funktsionaalseid rühmi teatud määral orienteerida enda kiireks ja adekvaatseks sidumiseks. Valku molekuli ja ligandi vahel tekivad reeglina nõrgad sidemed (vt. tertsiaarstruktuur) ja L sidumine on põhimõtteliselt pöörduva iseloomuga protsess (vt. skeemi):



L- ligand; Valk-L - valk-ligand kompleks; k_1 - kompleksi assotsiatsiooni ja k_{-1} kompleksi dissotsiatsiooni kiiruskonstant Tasakaalu tingimustes (otse- ja pöördreaktsiooni kiirused on võrdsed) saab massitoime seaduse alusel ligandi sidumisprotsessi iseloomustada 2 parameetri abil:

- kompleksi moodustumise tasakaalulise konstandi (K_f, K_a , kompleksi assotsiatsiooni tasakaaluline konstandi) kaudu.

$$K_f = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{Valk-L}]}{[\text{Valk}] [\text{L}]}$$

Mida suurem on K_f arvuline väärtus, seda tugevam (efektiivsem) on komponentide interaktsioon.

- kompleksi dissotsiatsiooni tasakaalulise konstandi (K_d) kaudu.

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\text{Valk}] [L]}{[\text{Valk-L}]}$$

Mida väiksem on K_d arvuline väärtus, seda suurem on valgu molekuli afiinsus L suhtes.

Valgu ja L interaktsioone võib kvantitatiivselt iseloomustada ka valgu sidumistsentrite küllastatuse alusel. Lähtutakse sellest, et valk omab mingi maksimaalse (kindla) arvu spetsiifilisi sidumistsentreid ja seda maksimaalset arvu tähistatakse vastavalt B_{\max} . Antud juhul saame kirjutada võrrandi:

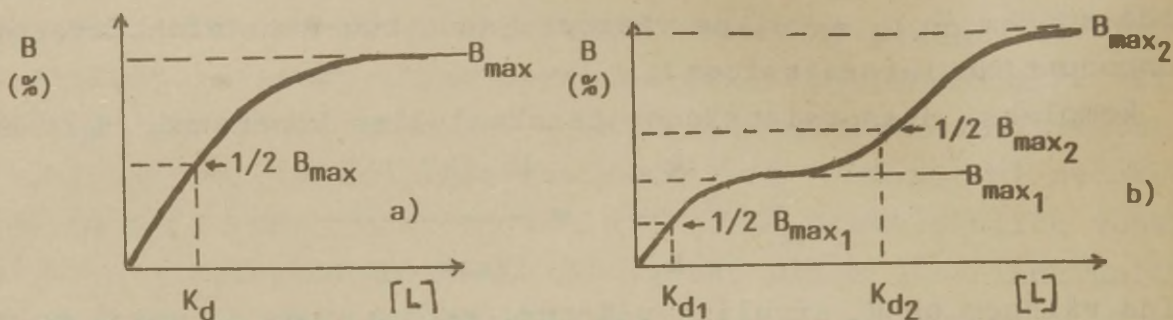
$$[\text{Valk-L}] = \frac{B_{\max} [L]}{K_d + [L]}$$

Võrrand vastab Langmuir'i isotermile adsorptsiooni teoorias ja Michaelis-Menteni võrrandile ensüümkatalüüsi jaoks. Retseptorvalkude jaoks kasutatakse eeskätt võrrandi alljärgnevat teisendust.

$$B = \frac{B_{\max} F}{K_d + F}$$

Antud teisendus tuleneb järgmistest arusaamadest. Defineeritakse, et $[\text{Valk-L}] = B$, täpsemalt $[\text{Retseptorvalk-L}] = B$ (s.t. retseptoriga spetsiifiliselt seostunud ligandi kontsentratsioon; B tuleneb sõnast "binding") ja et sidumisjärgselt vabaks jäänud ligandi kontsentratsioon on F (sisuliselt on F sidumiseelse vaba ligandi ning sidumisjärgse tekkinud vaba ligandi kontsentratsioonide vahe). Antud võrrandit saame kirjutada ka $B/F = B_{\max} - B/K_d$, mida nim. Scatchardi võrrandiks.

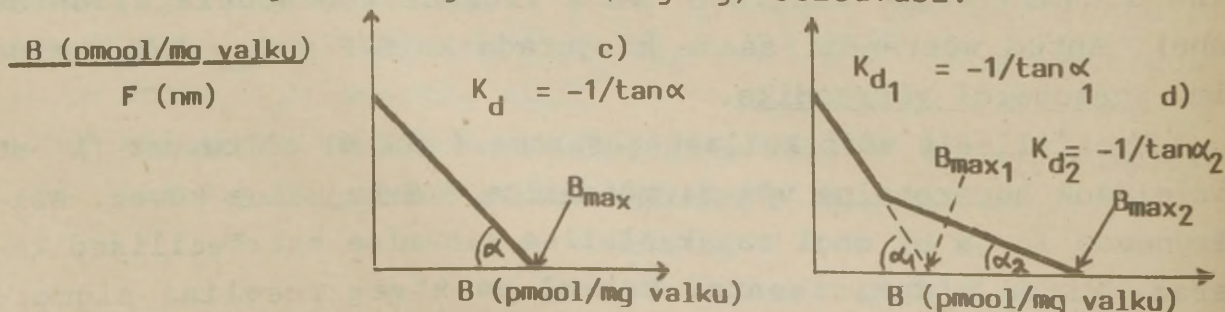
Graafiliselt võib küllastatusastme (ehk B) sõltuvust [L]-st kirjeldada hüperboolne või sigmoidaalne e.S-kujuline kõver. Alljärgnevad (a ja b) ongi tasakaalulise sidumise teoreetilised kõverad. Mitme sidumistsentri korral on kõver reeglina sigmoidaalne.



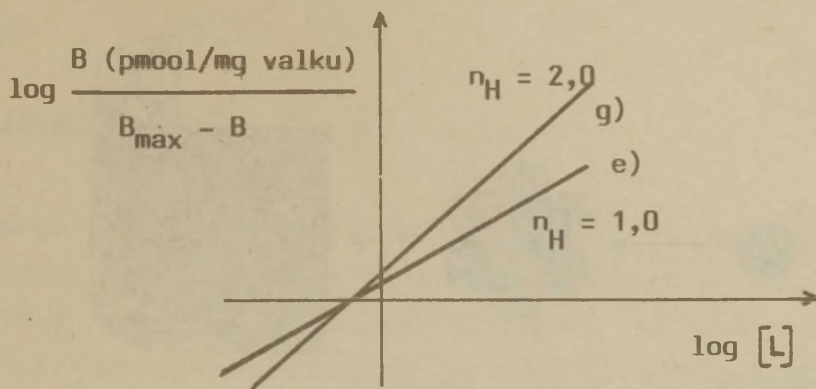
Ligandi tasakaaluline sidumine (teoreetiline): ühe- (a) ja kahetsentriline (b). B- sidumine %-des B_{max} -st (s.o. 100%-st)

Sidumise sigmoidaalsus on eriti omane oligomeersetele valkudele (Hb, ioonpumbad jt.) ja see on olulise bioloogilise sisuga. Nimelt, vastava sidumisparameetri sigmoidaalne sõltuvus ligandi kontsentratsioonist peegeldab sidumistsentrite **kooperatiivsust**. See tähendab, et ligandi esimes(t)e molekuli(-de) sidumisel muutub valgumolekuli subühiku konformatsioon selliseks, et ligandi järgmiste molekulide seostumine teiste subühikute sidumistsentritega on oluliselt kergendatud (sisuliselt momentaalne). Nii toimubki O_2 seostumisprotsess Hb neljale subühikule kopsukapillaaris. Seega tänu kooperatiivsusele võimaldab O_2 partsiaalrõhu väike muutus Hb molekuli imelühikese aja kestel kopsukapillaaris küllastada O_2 -ga. Koekapillaaris toimub O_2 vabanemisel HbO_2 -st vastupidine protsess. Esimese O_2 molekuli vabanemisega kaasnev Hb konformatsiooni muutus tagab "kergendatud" (väga kiire) teiste hapniku molekulide vabanemise. (NB! seda ongi aga vaja koekapillaaris kindlustada).

Tasakaalulisi sidumisi saab iseloomustada ka lineaarsete graafikute abil (võimaldavad protsessi täpsemalt kirjeldada). Vt. Scatchard'i (c ja d) ning Hilli (e ja g) sõltuvusi.

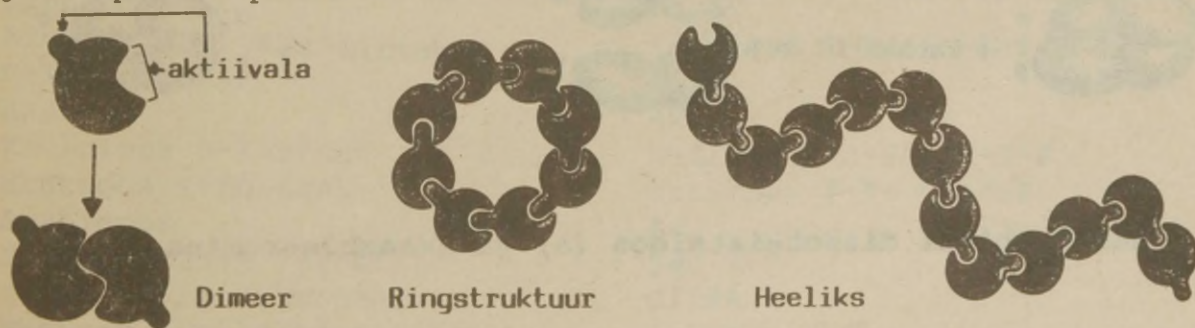


Ligandi ühe- (c) ja kahetsentriline (d) tasakaalulise sidumise Scatchard'i sõltuvus. B- spetsiifiline sidumine, ühikuks on Valk-L hulk (pmol) mg koevalgu kohta; F- vaba ligandi kontsentratsioon

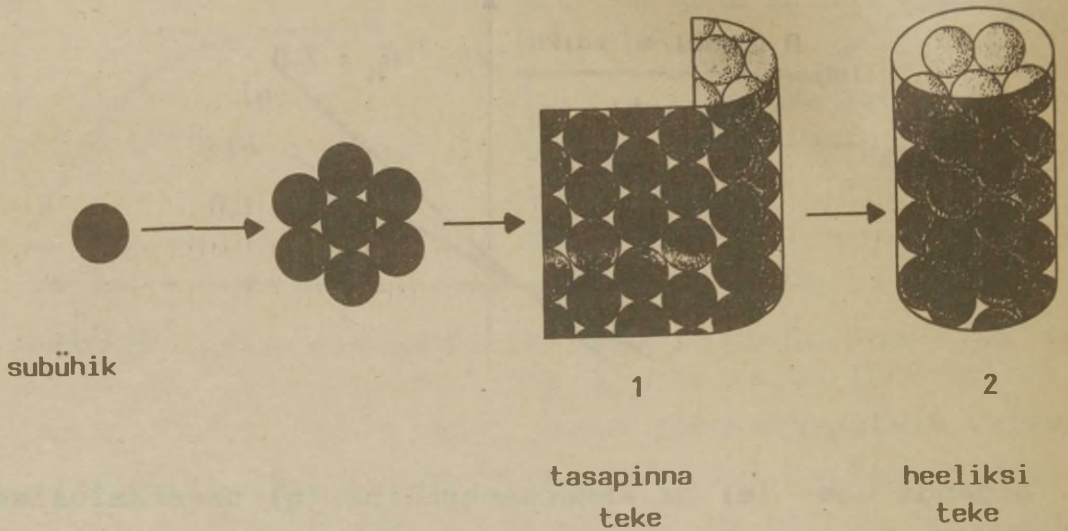


Ligandi ühe- (e) ja kahetsentriline (g) tasakaalulise sidumise Hilli sõltuvused. B- spetsiifiline sidumine; n_H - sirge tõusunurga tangens e. Hilli koefitsient. Kui $n_H > 1$, omab ligand positiivset kooperatiivset toimet valgu molekuliga (näit. hapniku sidumisel Hb subühikutega kopsukapillaaris $n_H = 3,3-3,6$)

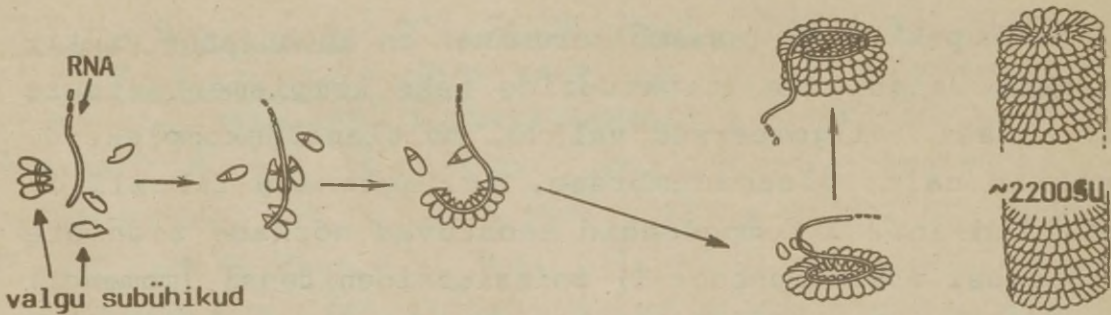
Iseeneslik kokkupakkimine (assambleerumine) on spontaanne multi-molekulaarsete valgulistest struktuuride teke komplementaarsuse printsiibi alusel (oligomeersed valgud, multiensüümkompleksid, rakuorganellid näit. plasmamembraan, kollageensed fibrillid, viiruspartiklid jne.). Komponentid seostuvad nõrkade sidemete abil ja protsessi iseloomustab: 1) initsiatsioonifaasi (momendi) olemasolu; järgnev osa protsessist kulgeb juba spontaanselt, ilma ensüümide osavõtuta; 2) komponentide ühinemine moodustuvasse struktuuri on järjestatud (vt. jooniseid); 3) vee molekulide oluline orienteeriv mõju; kokkupakitud kompleksi hüdrofoobsed osad paigutuvad tihedalt kompleksi sisemusse, hüdrofiilsed osad aga kompleksi pinnale. Mõned assambleerumise illustratsioonid:



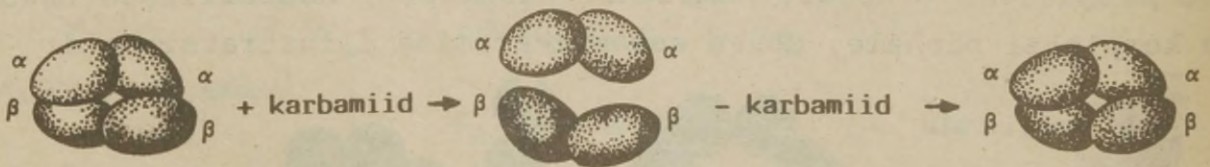
Dimeeri, ringstruktuuri ja heeliksi teke valgu subühikutest



Heksagonaalse tasapinnalise (1) struktuuri ("a flat sheet") ning silinderja (2) struktuuri (helikaalstruktuur) kokkupakkimine



Tubaka mosaiikviiruse valgu ($\sim 2200 \text{ SU}$) spontaanne kokkupakkimine RNA molekuli ümber ($\text{SU } M_r \approx 17500$, kompleksi $M_r \approx 40\,000\,000$)



Hemoglobiini dissotsiatsioon (a) ja assambleerumine (b)

SÜSIVESIKUD

MÕISTEID JA LÜHENDEID

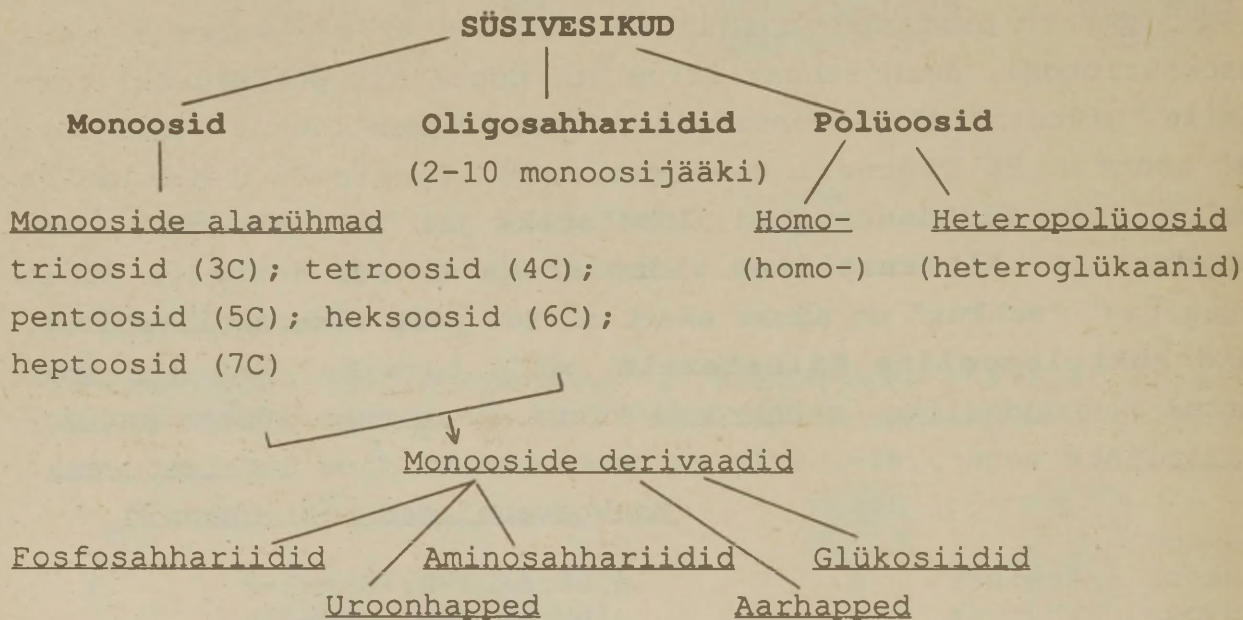
Võimalus vaadelda ühendite gruppi formaalselt süsiniku hüdraatidena valemiga $C_m(H_2O)_n$ tingis mõiste "süsivesikud" (1844.a., C.Schmidt, TÜ professor). Hilisem tõdemus, et see valem ei sobi desoksüriboosi, aminosahhariidide jt. puhul oli põhialuseks terminile "glütsiidid" (Rahvusvaheline Keemia Nomenklatuurikomisjon). NB! rõhutab ka glükoosi tsentraalsust. Termin ei leidnud aga toetust ning üldtunnustatud üldmõisteks jäi "süsivesikud" (carbohydrates). Alternatiivse üldmõistena mõnede autorite poolt pruugitav "suhkur" on sügav eksitus. See pole alternatiivmõiste, vaid kokkuleppeline käibetermin, mida tarvitatakse kitsamas mõttes kaubandusliku sahharoosi kohta ja laiemas mõttes magusamaitseteliste mono-, di-, tri- ja tetrasahhariidide üldnimetusena.

Rahvusvahelised põhilühendid

Glükoos	Glc
Glükoos 1-fosfaat	glükoos 1-P; Glc-1-P
Glükoos 6-fosfaat	glükoos 6-P; Glc-6-P
Fruktoos	Fru
Fruktoos 6-fosfaat	fruktoos 6-P; Fru-6-P
Fruktoos 1,6-difosfaat	fruktoos 1,6-diP; Fru-1,6-diP
Galaktoos	Gal
Galaktoos 1-fosfaat	galaktoos 1-P; Gal-1-P
Galaktoos 6-fosfaat	galaktoos 6-P; Gal-6-P
Mannoos	Man
Mannoos 1-fosfaat	mannoos 1-P; Man-1-P
Mannoos 6-fosfaat	mannoos 6-P; Man-6-P
Riboos	Rib
Riboos 5-fosfaat	riboos 5-P; Rib-5-P
Ribuloos	Ru
Ribuloos 5-fosfaat	ribuloos 5-P; Ru-5-P
Desoksüriboos	dRib
Ksüloos	Xyl
Ksüluloos 5-fosfaat	ksüluloos 5-P; Xy-5-P
Erütroos 4-fosfaat	erütroos 4-P; Er-4-P
Arabinoos	Ara
Seduheptuloos 7-fosfaat	Sed-7-P
N-atsetüülglükoosamiin	GlcNAC
N-atsetüülgalaktoosamiin	GalNAC
N-atsetüülneuramiinhape	NeuNAC ehk NANA

KLASSIFIKATSIOON

Süsivesikute (SV) tunnustatuim klassifikatsioon on **struktuurne**, mis eristab looduslike SV kolme põhirühma: monosahhariidid (monoosid), oligosahhariidid ja polüsahhariidid (polüoosid).

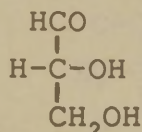


Füüsiko-keemiline klassifikatsioon jagab SV neutraalseteks (omavad hüdroksüülrühmi ja karbonüülrühma), happelisteks (sisaldavad -COOH) ja aluselisteks (sisaldavad aminorühma).

MONOOSID

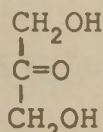
Monoosid on värvitud, veeslahustuvad, reeglina magusamaitse- lised, kristallilised, empiirilise valemiga $(CH_2O)_n$, kus $n=3-7$. Alarühmade valemid oleksid süsinike arvu järgi: trioosid = $C_3H_6O_3$, tetroosid = $C_4H_8O_4$, pentoosid = $C_5H_{10}O_5$, heksoosid = $C_6H_{12}O_6$, heptoosid = $C_7H_{14}O_7$. **Keemiliselt** on monoosid **polühüdroksükarbonüülised** ühendid. Monooside lihtsaim esindaja (NB! ka lihtsaim SV) peab omama **vähemalt kahte -OH ja ühte aldehüüd- või ketorühma** (teisisõnu karbonüülrühma). **Lihtsaimad monoosid** on seega **trioosid** - glütseeraldehüüd ja dihüdroksüatsetoon. Kui karbonüülrühma hapnik on seotud primaarse C-ga, on monoos aldoos

(C arvu järgi aldotriooos jne.). Monoosi, milles karbonüülrühma hapnik pole seotud primaarse C-ga, nim. ketoosiks (vastavalt siis ketotriooos jne.).



glütseeraldehüüd

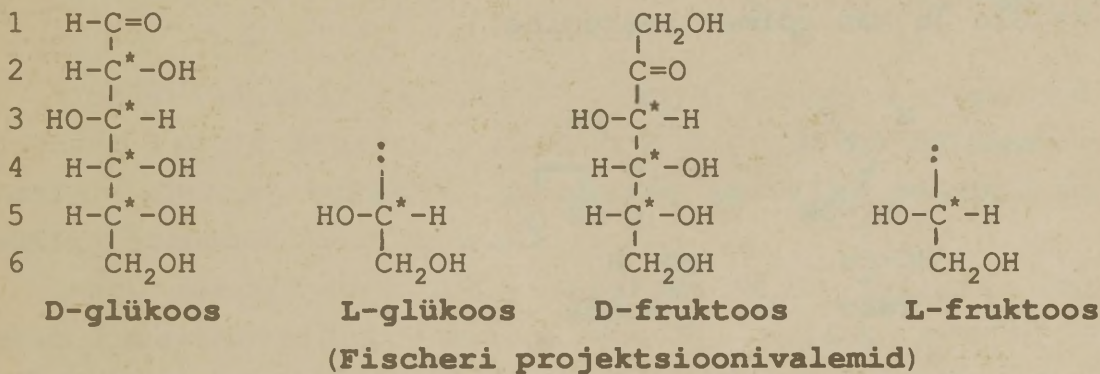
(aldotriooos)



dihüdroksüatsetoon

(ketotriooos)

Monooside stereoisomeeria. Monoosid (v.a. dihüdroksüatsetoon) omavad 2ⁿ optilist isomeeri (n= C* arv). Nende kuuluvust D- või L-rea ühendite hulka hinnatakse **karbonüülrühmast kaugeima C* konfiguratsiooni järgi** glütseeraldehüüde etaloniga (vt. biomolekulide stereoisomeeria).



Looduslike vormidena (vt. loetelu) on ülekaalus D-monoosid.

Aldo-

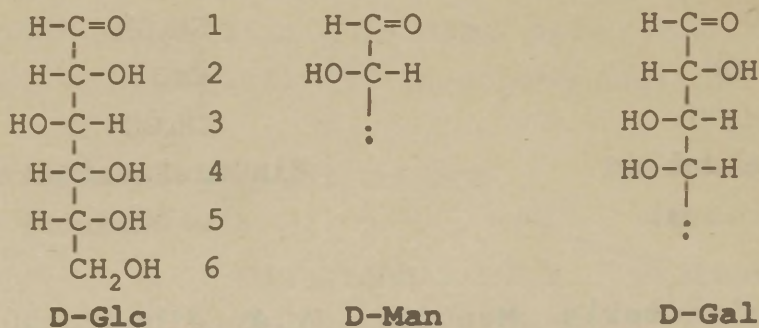
Keto-

-heptoosid		D-Sed
-heksoosid	D-Glc, D-Man, D-Gal, L-Gal	D-Fru
-pentoosid	D-Rib, D-Xyl ^a , D-Ara ^a , L-Ara ^a	D-Ru, D-Xy, L-Xy
-tetroosid	D-Er	
-trioosid	D-glütseeraldehüüd	Dihüdroksüatsetoon ^b
	(D-glütseroos)	

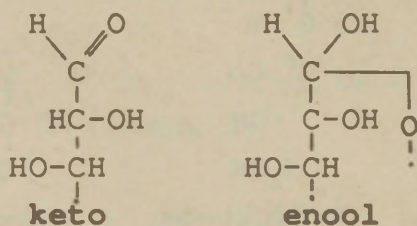
^a pole leitud loomorganismides, ^b ainult ketovormis

Kommentaariid: 1) Looduses on D-Glc eripööranguga +52,7° ja D-Fru -92,4°, 2) D-rea ühendite ülekaaluka levi tõttu nimetuses tavaliselt tähti D ja L ei kasutata, 3) D- ja L-isomeeride ekvimolaarset, optiliselt inaktiivset segu nim. ratsemaadiks.

Epimeerid. Need on monoosid, mis erinevad ühe C konfiguratsioonilt (näit. D-Glc ja D-Man C₂ alusel; D-Glc ja D-Gal C₄ alusel).



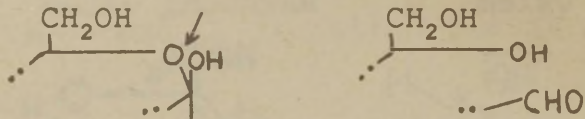
Antud projektsioonivalemid näitavad monooside okso- e. ketovorme, mis on lahustes tasakaalus enoolvormiga. Tasakaal on enoolvormi suunas ja see on keto-enoolne tautomeeria. Üle enoolvormi saab toimuda ka Glc ja Man epimeriseerumine.



Lineaarsed ja tsüklilised valemid. Fischeri lineaarsed projektsioonivalemid sobivad triooside ja tetraoside jaoks. Alates pentoosidest on võimalikud ka **tsüklilised struktuurid**, mis ongi tegelikult kõrgemate monooside **põhistruktuurideks**. Nimelt, kristallilised (tahked) monoosid on tsüklilises vormis. Vesilahuses püstitub aga tasakaal erinevate tsükliliste vormide (enamik) vahel üle lineaarse struktuuri (vähemus). Tasakaalu püstitumisprotsessi peegeldab värskelt valmistatud glükoosilahuse optilise aktiivsuse aeglane muutumine e. mutarotatsioon.

Tsüklilised vormid tekivad molekulisisesel reaktsiooni tõttu aldehüüdrühma (või ketorühma) ja alkohoolse -OH vahel ja nad on 5-lülilised (furanoos) või 6-lülilised (püranoos) poolatsetaalid. Glc puhul on eelistatum püranoostsükkel, Fru ja Rib puhul furanoostsükkel. Tsüklilist D-Glc võib seejuures kujutada Kolli-

avaneb ja poolatsetaalne -OH oksüdeerub aldehüüdrühmaks jne.).

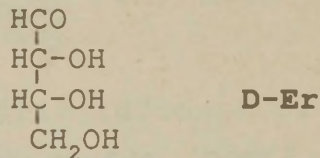


Monooside tsüklilised vormid esinevad tegelikult vastavates konformatsioonides ("tugitool", "vann" jt.). Nii on näit. Glc puhul "tugitool" konformatsioon stabiilsem ja sellisena esineb ta enamikes looduslikes ühendites. Konformatsioonide küsimused on aga bioorgaanilise keemia temaatika. Biokeemia õpikud lähtuvad visuaalsest lihtsustamisest, mistõttu SV konformatsioonilist ehitust reeglina välja ei tooda.

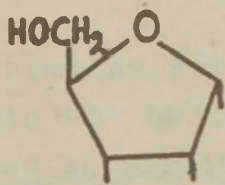
MONOOSIDE ALARÜHMAD JA LOODUSLIKUD ESINDAJAD

Trioosid: glütseeraldehüd ja dihidroksüatsetoon (vt. ülal).

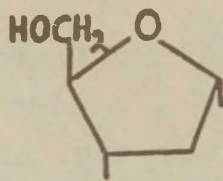
Tetroosid: erütroos.



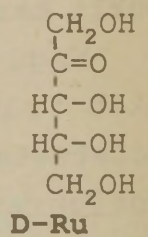
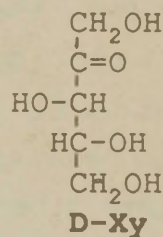
Pentoosid: riboos ja desoksüriboos ning D-Xy ja D-Ru kui SV metabolismi vaheühendid.



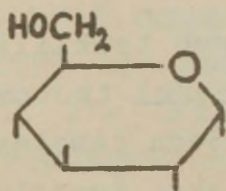
Rib



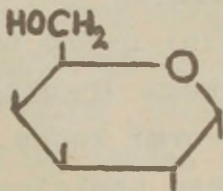
dRib (2-dRib)



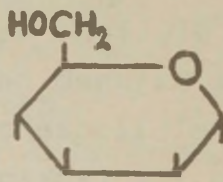
Heksoosid: keskne on kahtlemata glükoos, mis on ka tsentraalne monoos. Heksoosid on ka galaktoos, mannoos ja fruktoos.



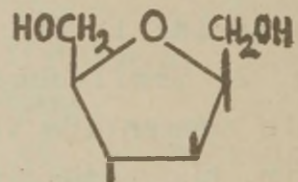
Glc



Gal



Man



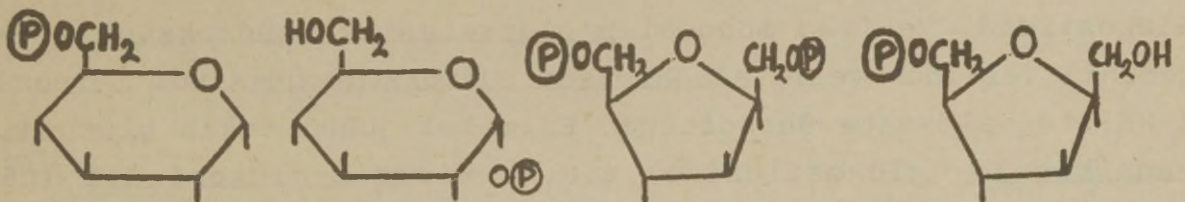
Fru

Heptoosid: D-seduheptuloos, mille fosfoderivaat on SV-te oksüdatsiooni vaheprodukt (vt. SV metabolism).

MONOOSIDE DERIVAADID

Bioloogiliselt olulisemad derivaadid on:

Fosfosahhariidid. Monooside -OH rühmad annavad fosforhappega fosfoestreid (fosfosahhariide): Glc-1-P, Glc-6-P, Fru-6-P, Fru-1,6-diP, Rib-5-P, Er-4-P, glütseeraldehüüd 3-P (GAP), di-hüdroksüatsetoonfosfaat (DAP) jt. Nad on SV metaboliidid. Rib-5-P ja dRib-5-P on ka olulised nukleotiidide ehituskomponentidena.

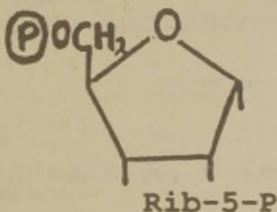


Glc-6-P

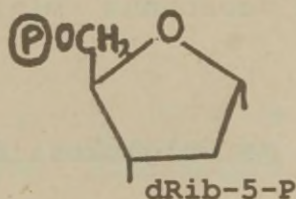
Glc-1-P

Fru-1,6-diP

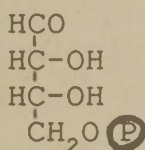
Fru-6-P



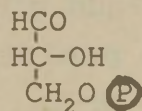
Rib-5-P



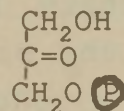
dRib-5-P



Er-4-P

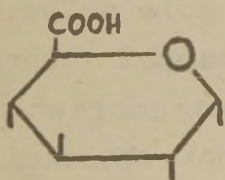


GAP

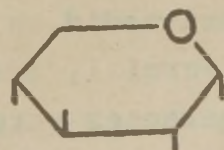


DAP

Uroonhapped. Ensüümide toimel võib oksüdeeruda kuuenda süsiniku juures olev -OH ja tekib vastav uroonhape (näit. glükoos → glükuroonhape). D-glükuroonhape on väga oluline ühend toksiliste ühendite (ka ravimite) detoksikatsioonis. Tema dekarboksü-



glükuroonhape

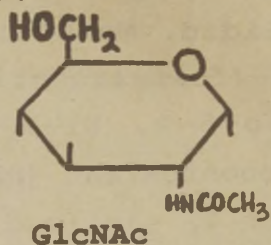
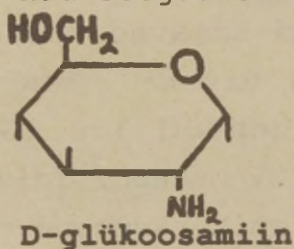


D-ksüloos

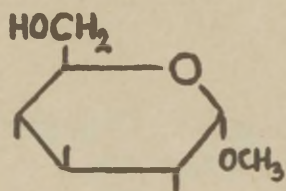
limisel tekib D-Xyl (reaktsioon seob heksoose geneetiliselt pentoosidega). Uroonhapped on ka heteropolüooside ehituskomponendid (vt. segamakromolekulid).

Aminosahhariidid. Levinuimad esindajad on glükoosamiin ja galak-

toosamiin, mis on heteropolüooside olulised ehituskomponendid (tihti on nad seejuures atsetüleeritud).



Glükosiidid. Tekivad monoosi poolatsetaalse hüdroksüüli reaktsioonil (eraldub vesi) alkohoolset hüdroksüülrühma või iminorühma (-NH-) sisaldavate ühenditega. Esimesel juhul tekib glükosiidne hapnikusild (glükosiidside), s.t. tekivad O-glükosiidid (näit. metüülglükosiid, aga ka disahhariidid jt.). Teisel juhul toimub liitumine N aatomi kaudu, s.t. tekivad N-glükosiidid (näit. nukleosiidid). SV-ga seostunud mittersahhariidset osa nim. glüko-



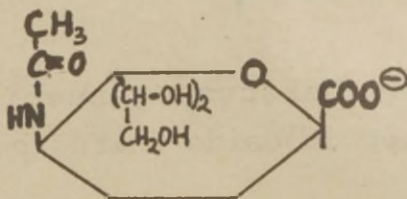
metüülglükosiid (atsetaal = täisatsetaal)

siidis aglükooniks. NB! Paljud glükosiidid on olulised ravimid.

NB! Kui ühe monoosi poolatsetaalne -OH reageerib teise monoosi mingi alkohoolse -OH-ga, tekivad sisuliselt ka O-glükosiidid (atsetaalid). Seega võib kõiki disahhariide, tinglikult ka teisi oligosahhariide ning polüoose vaadelda glükosiididena: monoosijäägid on seostunud glükosiidsidemetega (vt. allpool).

Aarhapped. Kui karboksüülrühmaks oksüdeeruvad nii poolatsetaalne -OH kui ka primaarne alkoholrühm, tekivad aarhapped e. sukurhapped (glükoos → glükaarhape). Nende täpne roll pole selge.

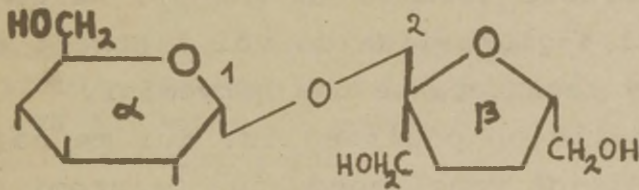
Monooside **derivaadid** on sisuliselt ka **siaalhapped** (tuntud on nad just NeuNAC vormis), mis on olulised plasmamembraanis jt. segamakromolekulaarsetes struktuurides (vt. segamakromolekulid).



NeuNAC e. NANA

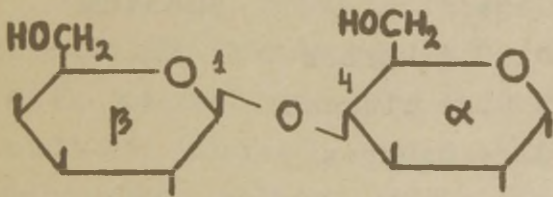
OLIGOSAHHARIIDID

Need on SV, mis sisaldavad 2-10 monoosijääki. Monoosijääkide seostumise üldprintsip on kahesugune. Esiteks, monoosijääke siduv glükosiidside tekib mõlema monoosi poolatsetaalse hüdroksüülrühma arvel. Kuna sel puhul puudub tekkinud ühendis vaba poolatsetaalne -OH, on selline SV mitteredutseeriv. (NB! poolatsetaalne -OH annab SV-le, eeskätt just monoosidele tugevad redutseerivad omadused). Tüüpiliseks mitteredutseerivaks oligosahhariidiks on disahhariid **sahharoos**.



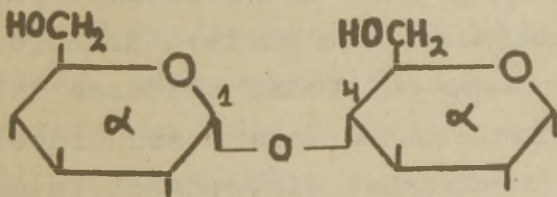
sahharoos (α -Glc + β -Fru)

Teiseks, monoosijääke siduv glükosiidside moodustub ühe monoosi poolatsetaalse -OH ja teise monoosi alkohoolse -OH arvel. Tekib redutseeriv ühend, kuna teise monoosijäägi poolatsetaalne -OH jääb vabaks. Tüüpilised redutseerivad oligosahhariidid on disahhariidid **laktoos** ja **maltoos**.



β -Laktoos = β -Gal + β -Glc

α -laktoos (β -Gal + α -Glc)



β -Maltoos = α -Glc + β -Glc

α -maltoos (α -Glc + α -Glc)

NB! Sõltumata tekkevariandist eraldub ühe glükosiidsideme moodustumisel alati üks molekul vett.

Oligosahhariidide nomenklatuuri reeglid on: 1) vasakpoolset monoosijääki vaadeldakse asendajana (nimetuse lõpuks -osüül) parempoolse monoosijäägi suhtes. NB! Mitteredutseerivates disahhariidides kannab parempoolne monoosijääk lõppu "-osiid" (viitab glükosiididele); 2) glükosiidsidet tähistatakse teineteisega seotud C-de äranäitamiseega; näit. "1,4" tähendab, et glükosiidsidemega on seotud esimese monoosijäägi C₁ ja teise monoosijäägi C₄. Täpsemal üleskirjutamisel viidatakse ka vasakpoolse (või mõlema) monoosijäägi anomeersele vormile (α või β). Näit. maltoosi puhul kirjutatakse α 1,4-glükosiidside või lihtsalt α 1,4. Alternatiivset varianti α 1 \rightarrow 4 rakendatakse üha harvemini.

Kommentaari: Ülaltoodud reeglid on põhireeglid. Kui me näitame veel ära, et side monoosijääkide vahel moodustub O-aatomi abil, algab oligosahhariidi nimetus sümboliga "O".

Ülaltoodud reeglite kohaselt oleksid olulisemate disahhariidide (sahharoosi, laktoosi ja maltoosi) süstemaatilised nimetused järgmised:

Sahharoos: O- α -D-glükopüranosüül-(1,2)- β -D-fruktofuranoosiid

α -Laktoos: O- β -D-galaktopüranosüül-(1,4)- α -D-glükopüranooos

α -Maltoos: O- α -D-glükopüranosüül-(1,4)- α -D-glükopüranooos

Lihtsustatud nimetused oleksid aga:

sahharoos = glükoos α 1,2 fruktoos

laktoos = galaktoos β 1,4 glükoos

maltoos = glükoos α 1,4 glükoos

TÄHTSAMAD OLIGOSAHHARIIIDID

Disahhariidid koosnevad kahest monoosijäägist ja nende empiiriline valem on C₁₂H₂₂O₁₁. Keskised esindajad on järgmised:

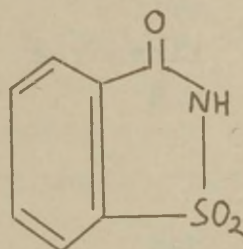
Sahharoos (roosuhkur, peedisuhkur), mida sünteesitakse paljudes taimedes (kõrgemates loomorganismides aga mitte). Sahharoos on SV transportvorm taimelehtedest taime teistesse osadesse (NB! vastupidav oksüdeerijatele). Loomorganism ei omasta sahharoosi, vaid lõhub ta seedetraktis töötava sahharoosi (invertaas) toimel glükoosiks ja fruktoosiks, mis imenduvad hõlpsasti. NB! Glükosiidsidemed hüdrolüüsuvad kergesti happelises keskkonnas. Sahha-

roosi in vitro hüdrolüüsi tulemusel saadud glükoosi ja fruktoosi ekvimolaarset segu nim. invertsuhkruks (pr.k. inversion=pööre; sahharoosilahuse eripöörang enne ja pärast hüdrolüüsi on erinev).

Sahharoos on oluline toiduaine (toidusuhkur). Tema magusus on kõrgem kui Glc ja ka teistel disahhariididel.

Suhteline magusus

Sahharoos	100
Laktoos	16
Maltoos	30
Glc	70
Fru	170
Sahhariin*	40 000



sahhariin

* levinuim sünteetiline magus ühend, mida inimorganism ei omasta, mis aga stimuleerib keele maitseretseptoreid. Kasutatakse diabeedi, rasvumise puhul.

Laktoos, mida leidub piimas (3-6%; piimasuhkur). Teda sünteesivad vaid imetajate piimanäärmete rakud laktatsiooniperioodil. Laktoos on oluline Gal allikas inimorganismile. Osa inimesi on intolerantsed laktoosile, s.t. geneetilise defekti tõttu on seedetrakti laktaasi aktiivsus väga madal. Hüdrolüüsumata laktoos aga ei imendu (kuhjub), tekivad kõhuvalud ja meteorism, oksendus. Tüüpiline sümptom on kõhulahtisus.

Maltoos, mida leidub just taimedes tärklise hüdrolüüsi-produktina (linnasesuhkur). Sülje α -amülaasi toimel tärklisele tekib ka maltoos (α -maltoos), maltoosi tekib ka pankrease amülaasi toimel amüloosile. Seedetrakti maltaasi toimel hüdrolüüsub maltoos imenduvateks monoosijääkideks.

Disahhariidid on ka trehaloos, (kaks α -Glc jääki; α 1,6; mitteredutseeriv, seente varuaine) jt.

Trisahhariidid koosnevad 3-st monoosijäägist ja on taimsed varuained (rafinoos= Fru-Glc-Gal, melesitoos= Glc-Fru-Glc jt.).

Tetra-, pentasahhariidid on spetsiifilised taimsed SV nagu näit. tetrasahhariidid stahhüoos (nõgesed), skorodoos (sibul, küüslauk) või pentasahhariid verbaskoos (üheksavägise lehed).

NB! Rakkudes ja biovedelikes on oligosahhariidid reeglina kompleksis valkudega (vt. segamakromolekulid).

POLÜOOSID

Polüoosid (glükaanid) on biopolümeerid. Nad erinevad monoosidest ja disahhariididest järgmistelt üldomadustelt.

Omadus	MONOOS	DISAHHARIID	POLÜOOS
M_r	madal-	madal-	kõrgmolekulaarne
Ehitus	lineaarne	lineaarne	enamasti hargnenud
Lahustuvus (vees)	hea	hea	tekib viskoosne kol- loidlahus (osa ei lahustu)
Kristalluvus	jah	jah	ei teki selgeid kristalle
Redutseerimis- võime	jah	jah (laktoos, maltoos) ei (sahharoos)	sisuliselt puudub
Magusus	magus	magus	reeglina mittemagus

Polüooside käsitus võib lähtuda erinevatest aspektidest (ehituslik, päritolu, funktsionaalne).

POLÜOOSID

<u>Ehituslik</u>	<u>Päritoluline</u>	<u>Funktsionaalne</u>
-Homopolüoosid (glükogeen)	-Taimsed (tselluloos, tärklis)	-Struktuursed (rakukestas tselluloos või rakuvälises maatriksis hüaluroonhape)
-Heteropolüoosid (dermataan- ja heparaansulfaadid, hüaluroonhape jt.)	-Loomsed (glükogeen)	-Varupolüoosid (reeglina rakus graanulitena- tärklis, glükogeen)

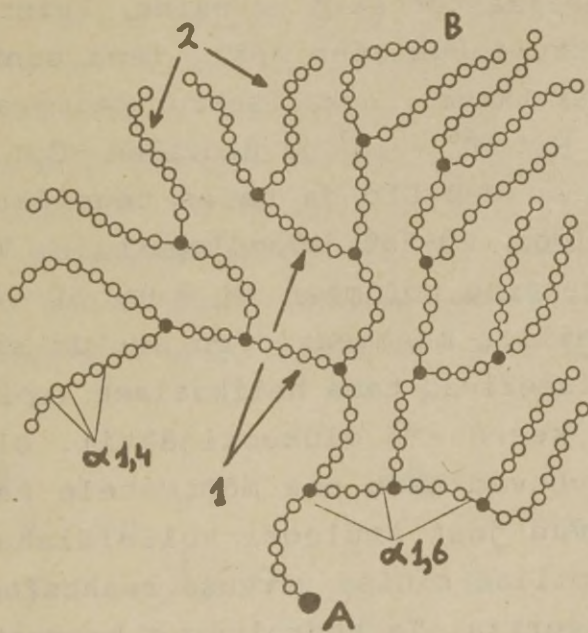
Levinuim käsitus on **ehituslik**, mida ka meie kasutame.

Polüoosides seostuvad monoosi või nende derivaatide jäägid glükosiidsidemete abil (vt. biopolümeeride üldehitus). **Homopolüoosid** (homoglükaanid) koosnevad **üht tüüpi monoosijääkidest** (harva erandina üht tüüpi monoosi derivaadi jääkidest). **Heteropolüoosid** (heteroglükaanid) koosnevad reeglina aga **korduvatest disahhariidsetest ehitusüksustest**, mis koosnevad enamasti

erinevate monooside derivaatidest. Taoliste derivaatide tüüpesindajad on glükuroonhape, GlcNAC, GalNAC. GlcNAC ja GalNAC on tihti sulfaadi vormis (vt. segamakromolekulid).

HOMOPOLÜOOSID (HOMOGLÜKAANID)

Kesksed on siin varupolüoosid glükogeen (loomarakkudes) ja tärklis (taimerakkudes) ning struktuursed polüoosid tselluloos (rakusein) ja kitiin (putukate, krabide, homaaride eksoskelett). **Glükogeen** on loomne biopolümeer, mille graanulid (30-40 nm) loomarakus on glükoosi reserv. Tema monomeer on α -D-Glc, mida **seob ahelateks side α 1,4**, ahela **hargnemispunkte** (iga 5-6 glükoosijäägi järel) tagab **side α 1,6**. Hargnemispunktide rohkuse tõttu nim. glükogeeni rohkesti hargnevaks homopolüoosiks ja tema molekulis eristatakse: 1) tsentraalset e. peaahelat (ahel A \rightarrow B), mille ühes otsas (A ots) on ainus redutseeriv glükoosijääk; 2) sisemised külghelad (1) ja 3) välimised külghelad (2), mis liituvad sisemiste külghelate külge (vt. joonis).



Glükogeeni skemaatiline ehitus (α 1,4 on glükosiidsidemeks ahelates, α 1,6 loob hargnemispunkti)

NB! Glükogeeni molekuli suurus on dünaamiline ("regulatiivne"), s.t. välimiste külghelate pikkus varieerub sõltuvalt organismi glükoosi vajadustest, organist, kus ta sisaldub jne. Seetõttu

kõigub tema M_r ($1-16 \times 10^6$) ja üldvalem antakse $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot xH_2O$. Polühargnevuse tõttu on glükogeen vees hästi lahustuv. Tema vesilahus on madala viskoossusega (jooditest on punakasvioletne). Glükogeeni molekuli välimiste külghelateta osa nim. **dekstriiniks (jääkdekstriiniks)**. See suhteliselt lühike oligosahhariid tekib näit. glükogeeni osalisel ensümaatilisel hüdroolüüsil.

Glükogeeni ja tärklise vahel on rida analoogiaid: 1) ehitusprintsip on sarnane); 2) nende hargnemispunkte võib vaadelda isomaltoosse fragmendina (side $\alpha 1,6$); 3) nende osaline hüdroolüüs annab dekstriine; 4) mõlemad on seotud tsütoplasma valkudega ja osaliselt ka rakusiseste membraanstruktuuridega; 5) nad on reservpolüoosid. Kõige selle tõttu nim. glükogeeni ka loomseks tärkliseks. Erinev on aga nende hargnevus (glükogeenimolekul on ligikaudu 2 korda rohkem hargnenud ja suurem kui tärklise põhikomponent amülopektiin; vt. allpool). Glükogeeni kui varupolüoosi esineb ka mikroobides.

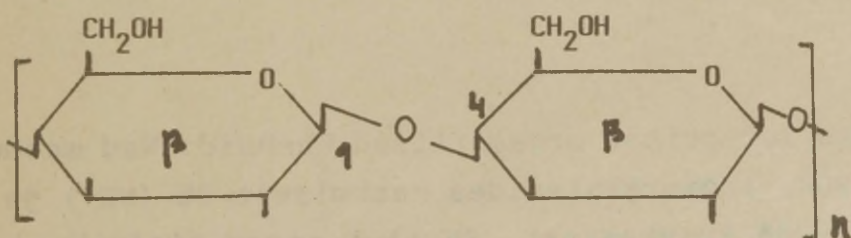
Tärklis on taimede maailma tähtsaim varuaine, inimitoidu olulisim SV (jahus 75-80%; kartulimugulates 25%). Tema sünteesivõime on peaaegu kõikidel taimerakkudel. Lokaliseerub taimerakus graanulitena (40-50 nm). Tema $M_r = 10^6 - 10^7$ ja üldvalem $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot xH_2O$. Tärklise monomeeriks on α -D-Glc ja ta on tegelikult kahe biopolümeeri segu (α -amüloos, 10-25% ja amülopektiin, 75-90%).

α -amüloos on lineaarne polümeer (M_r kuni 50 000, s.t. kuni 300 glükoosijääki), milles monomeerid on seotud sidemega $\alpha 1,4$. Vesiniksidemed stabiliseerivad tema helikaalset (spiraliseerunud) konformatsiooni (üks keerd = 6 glükoosijääki). Oletatakse, et joodi molekulid paigutuvad tänu oma mõõtmetele heeliksi sisse. Seetõttu annavad just amüloosi kolloidlahuse mitsellid tärklise lahusele tüüpilise sinise värvuse reaktsioonis joodiga. Amüloos ei ole redutseerija. Ta hüdroolüüsib kergesti maltoosiks süljenäärmete ja pankrease amülaasi toimel.

Amülopektiin on hargnenud biopolümeer (M_r umbes 1 000 000), mille ehitus on sarnane glükogeeniga. α -D-glükoosijääkidest moodustub peaahele, sisemised külghelad jne. Tema molekul on ainult väiksem kui glükogeenil, sest ta on vähem hargnenud (hargnemispunktid esinevad iga 12-15 glükoosijäägi järel).

Amülopektiin annab veega väga viskoosse kolloidsüsteemi (kliisterjas), mille jooditest on punakasvioletne. Kartulite keetmisel ekstraheerub α -amüloos (vesi opalestseerub), keedetud kartul sisaldab põhiliselt amülopektiini.

Tärklise 2 polümeeri astmelisel hüdrolüüsil tekivad kõigepealt amülodekstriinid (tärklise vähehüdrolüüsunud vorm, jooditest on sinakasvioletne), siis erütrodekstriinid (jooditest punane) ja akrodekstriinid (madalmolekulaarsed, jooditest kollane, s.t. negatiivne). Edasi tekivad juba maltoos ja vaba Glc. **Tselluloos** on taimemaailma (ja üldse eluslooduse) levinuim struktuurne polümeer ($M_x=300\ 000-750\ 000$, s.t. kuni 5000 monoosijääki. Iga maakera elaniku kohta sünteesitakse umbes 50 kg tselluloosi ööpäevas). Tema monomeer on β -D-Glc, mida lineaarseks ahelaks seovad sidemed $\beta 1,4$ (vt. joonis). Tulenevalt monoosijääke siduva sideme β -konfiguratsioonist erineb tselluloos lineaarsest amüloosist põhimõtteliselt: 1) sideme $\beta 1,4$ geomeetrilised iseärasused tingivad polümeersete üksikahelate väljavenivuse, mistõttu üksikahelad paigutuvad teineteise kõrvale, seostudes vesiniksidemete abil (tekivad ühe ahela C_2 ja teise ahela C_6 vahel). Seega tselluloos esineb pikkade, vees lahustumatute mikrofibrillidena. NB! side $\alpha 1,4$ soodustab aga spiraliseerumist, mistõttu α -amüloos, sisuliselt ka tärklis ja glükogeen, esinevad tihedate graanulitena; 2) side $\beta 1,4$ ei hüdrolüüsu α -amülaasi toimel, s.t. tselluloos ei seedu inimese ja enamike imetajate seedetraktis.



Nurksulgudes on **tselluloosi disahhariidne ehitusüksus** tsellobioos (looduses omaette ei ole leitud).

Tselluloosi mikrofibrillid tsementeerituna fibrillidevaheliste

hemitcelluloosidega ja/või ligniiniga? moodustavadki taimeraku rakukesta. Selline struktuur lubab taimerakul taluda rakusisese vee rõhku kuni 20 atmosfääri lisagem, et hemitcelluloosid on polümeersed ksülaanid, arabaanid, mannaanid, galaktaanid, mis esinevad vaid koos tselluloosiga. Ligniin on mittesüsi-vesikuline, sisuliselt fenoolne polümeer.

Kitiini monomeeriks on GlcNAc. Sidemed monomeeride vahel on β 1,4. Ta on krabide, homaaride, putukate eksoskeleti materjal, mida homaaride ja krabide puhul tugevdab kaltsiumkarbonaat.

Nimetagem veel mõned homopolüoosid: **dekstraanid** - pärmirakkude, bakterite varupolüoosid, mida kasutatakse dekstraangeelide (Sephadex) valmistamiseks, vt. geelelektroforees (monomeer on α -D-Glc, seotuna sidemetega α 1,6, α 1,2 või α 1,3 nii ahelates kui hargnemispunktides); **inuliin** - 20-30 monoosijäägist koosnev taimerakkude polümeer. Kasutatakse näit. diabeetikute toidus (monomeer on β -D-Fru, lineaarne, side β 1,2; terminaalne SV-jääk võib olla ka Glc); **agar-agar** - vetikate polümeer, mida kasutatakse geelmaterjalina marmelaadi valmistamisel, geelelektroforeesis jm. (keemiliselt: galaktoosi- ja C_6 - sulfureeritud galaktoosijääkidest, mis moodustavadki monomeerse ühiku; side β 1,3).

HETEROPOLÜOOSID (HETEROGLÜKAANID)

Nende nüüdisaja nimetus on **proteoglükaanid**. Kesksed esindajad on kondroitiinsulfaadid, dermatansulfaat, kerataansulfaat, hepariin ja heparaansulfaat ning hüaluroonhape. Kuna nad on funktsionaalselt segamakromolekulid, käsitletakse neid vastavas peatükis.

BIOFUNKTSIOONID

SV-kud on looduses levinuimad orgaanilised ühendid. Nad moodustavad taimedes 75-90%, loomorganismides keskmiselt 2% (NB!) ja mikroorganismides 12-28% kuivkaalust. SV olulisemad biofunktsioonid:

Energeetiline - see on SV-te keskne funktsioon, millel on evolutsiooniline sisu (NB! fotosüntees). Glükoosi täielik oksüdatsioon CO_2 -ks ja H_2O -ks katab umbes 55% inimorganismi energiavajadustest. Energeetilised (varu)ained on tärklis ja glükogeen. 1 g SV-te täielik oksüdatsioon annab 17,1 kJ (4,1 kcal) energiat.

Varuaine - näiteks tärklis, mis moodustub fotosünteesi produktidest ja talletatakse klastritena ning graanulitena; suhkruuroo ja suhkrupeedi sahharoos; maksa ja lihaste glükogeen.

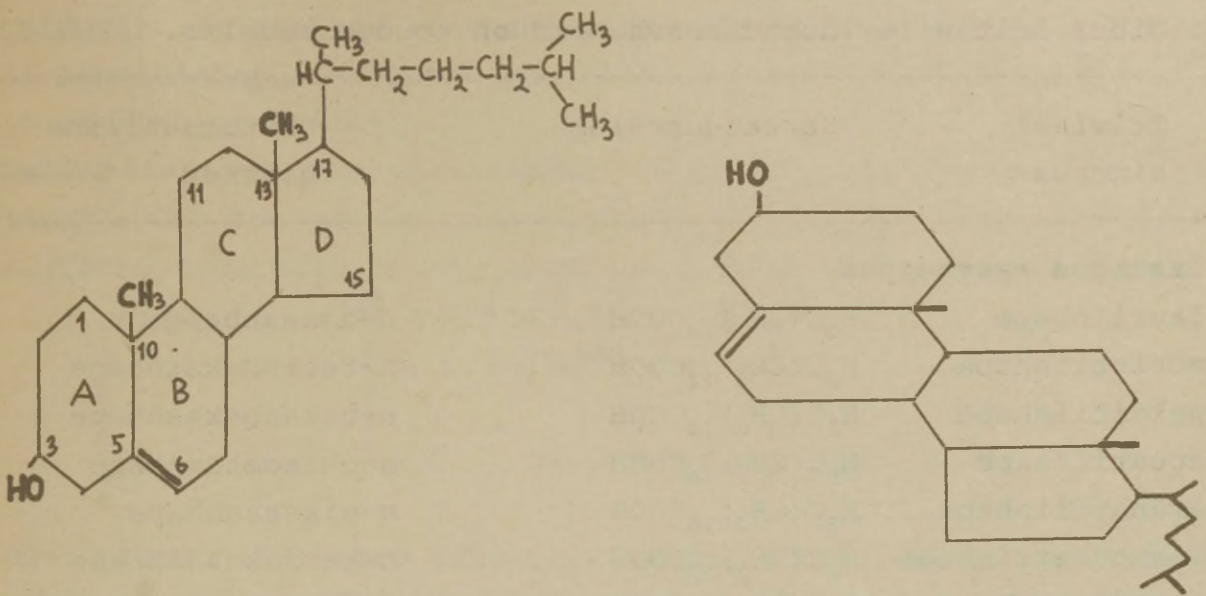
Struktuurne - monoosid ja nende derivaadid on polüooside monomeerideks. SV-kuid sisaldavad segamakromolekulid on biomembraanide pinnakomponendid, sidekudede komponendid. Tselluloos on taimeraku rakukesta komponent (kuni 40%), kitiin on lüljalgsete eksoskeleti baaskomponent.

Kaitse - glükoosi derivaat glükuroonhape on seotud toksiliste ainete kahjutuks tegemisega. Kaitseelime, antikehade, mitmete verehübimisfaktorite (segamakromolekulide) ehituses on ka SV-ne komponent. Tärklise hüdroolüüsil toimuv rakumahla "suhkrustamine" kaitseb taimi külmade vastu.

Biosünteesiline - SV-te metaboliidid laktaat, püruvaat jt. on rasvhapete, asendatavate AH-te jt. ühendite C-skeleti aluseks. Rib-5-P on vajalik nukleotiidide sünteesiks. Pentoos Ru-1,5-diP on CO₂ aktseptoriks fotosünteesi biokeemilises faasis.

Bioregulaatorne - SV-d on mõningate hormoonide ja koensüümide komponentideks.

Atraktiivne e. ligimeelitav - putuktolmlejate taimede nektar on 15-75%-ne SV-te vesilahus (peamiselt Glc, Fru, sahharoos).



Kolesterool

(loomorganismi steroolide e. tsükliliste alkoholide tüüpnäide)

2. RASVHAPPED. Need on karboksüülhapped ja nende mõningad derivaadid, mille kohta oleva info võiks üldistada järgmiselt:

1) Neil on prevaleeriv ehitusüksuse roll (lipiidides on leitud üle 200 rasvhappe) ning vabana esineb neid vaid vähesel määral lipiidide metabolismi vaheühenditena.

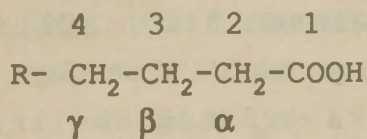
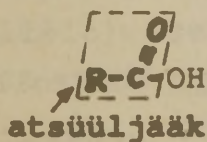
2) Lipiidides esinevad enamasti "kõrgemad" rasvhapped (üle 12 C-ku aatomi ehk $> 12C$), kusjuures looduslikes rasvhapetes on üldse 4C - 24C).

3) Lipiidides on enamasti **paarisarvu C** sisaldavad rasvhapped (levinuimad on 16C ja 18C).

4) Rasvhapetel on **enamasti hargnemata süsinikahel** ja üks -COOH.

5) Rasvhapped esinevad liipides **atsüüljääkidena**.

6) Rasvhapete C-ku aatomeid tähistatakse mitmeti (vt. skeem).



Lipiidides leitud levinumad rasvhapped on toodud tabelis.

C arv	Triviaal-nimetus	Struktuurvalem	Süsteemaatiline nimetus
-------	------------------	----------------	-------------------------

Küllastatud rasvhapped

12	lauriinhape	$H_3C(CH_2)_{10}COOH$	n-dekaanhape
14	müristiinhape	$H_3C(CH_2)_{12}COOH$	n-tetradekaanhape
16	palmitiinhape	$H_3C(CH_2)_{14}COOH$	n-heksadekaanhape
18	steariinhape	$H_3C(CH_2)_{16}COOH$	n-oktadekaanhape
20	arahhidiinhape	$H_3C(CH_2)_{18}COOH$	n-eikosaanhape
24	lignotseriinhape	$H_3C(CH_2)_{22}COOH$	n-tetrakosaanhape
24	tserebroonhape	$H_3C(CH_2)_{21}CH(OH)COOH$	2-hüdroksütetrakosaanhape

Küllastamata rasvhapped

monoküllastamata

16	palmitooleiinhape	$H_3C(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	9-heksadetseenhape
18	oleiinhape	$H_3C(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	9-oktadetseenhape
24	nervoonhape	$H_3C(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	15-tetrakoseenhape
24	hüdroksünervoonhapse	$H_3C(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{12}CH(OH)COOH$	2-hüdroksü-15-tetrakoseenhape

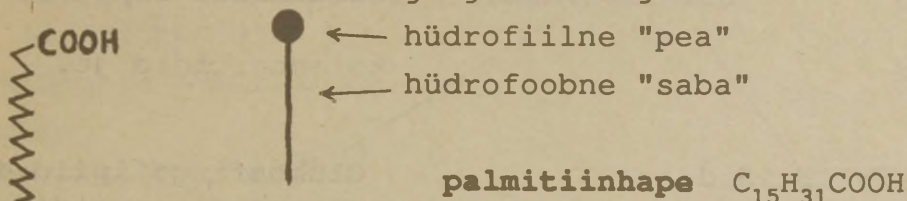
polüküllastamata

18	linoolhape	$H_3C(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	9,12-oktadekadienhape
18	α -linoleenhape	$H_3CCH_2(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	9,12,15-oktadekatrienhape
	γ -linoleenhape		6,9,12-oktadekatrienhape
20	arahhidoonhape	$H_3C(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	5,8,11,14-eikosatetraeenhape

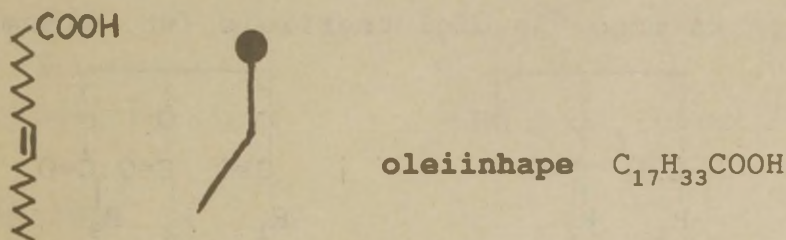
Kommentaariid. 1. Tahkeid rasvu (näit. seapekk) iseloomustab küllastatud rasvhapete (palmitiin- ja steariinhape) ning vedelaid rasvu (näit. taimsed õlid) küllastamata rasvhapete (oleiin-, linool- ja linoleenhape) sisaldus. 2. Arahhidoonhappe põhiroll on olla eelühendiks prostaglandiinide sünteesil. 3) Linool- ja linoleenhape on inimesele asendamatud (ei sünteesi, peab saama

toiduga). 4) Kesksed rasvhapped on palmitiin-, steariin-, linool- ja linoleenhape. Seetõttu käsitleme rasvhapete ehitust palmitiin- ja oleiinhappe näitel.

Palmitiinhappe süsivesinikahel (16C) on ruumiliselt "sik-sakiline" (NB! see on energeetiliselt eelistatud konformatsioon), mistõttu teda esitatakse järgmisel kujul.

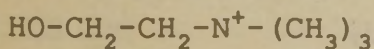


Oleiinhape (18C) omab ühte kaksiksidet, mille cis-konfiguratsioon põhjustab süsivesinikahela käändumise. NB! Looduslike rasvhapete kõik kaksiksidemed on reeglina cis-konfiguratsioonis ja et iga kaksiksideme juures alifaatne ahel käändub, siis on nende rasvhapete C-ahelad jäigemad, kui küllastatud rasvhapete omad. Oleiinhapet tähistatakse järgmiselt, kusjuures kaksiksideme asukohta tähistatakse kas $\Delta^{9,10}$ või 18:1w9. Esimene tähistusviis näitab, mitmenda C-ku juures (alates -COOH) asub kaksikside. Teine tähistus annab C-ku aatomite arvu, kaksiksidemete arvu ja kaksiksideme asukoha maksimaalpikkusega ahela terminaalse C suhtes (C_{24}). Näit. arahhidoonhappe puhul oleks see tähistus 20:4w6.

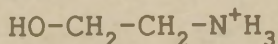


3. FOSFORHAPPEJÄÄK. Esineb ehitusüksusena fosfolipiidides (s.t. fosfoglutseriidides ja fosfosfingosiidides, vt. allpool).

4. N-ALUSED, SV-jäägid. N-alused (koliin, etanoolamiin jt.) esinevad teatud fosfoglutseriidides ja fosfosfingosiidides. SV-jäägid (ja nende derivaadid) esinevad glükosfingolipiidides (tserebroosiidid, gangliosiidid, sulfolipiidid, vt. allpool).



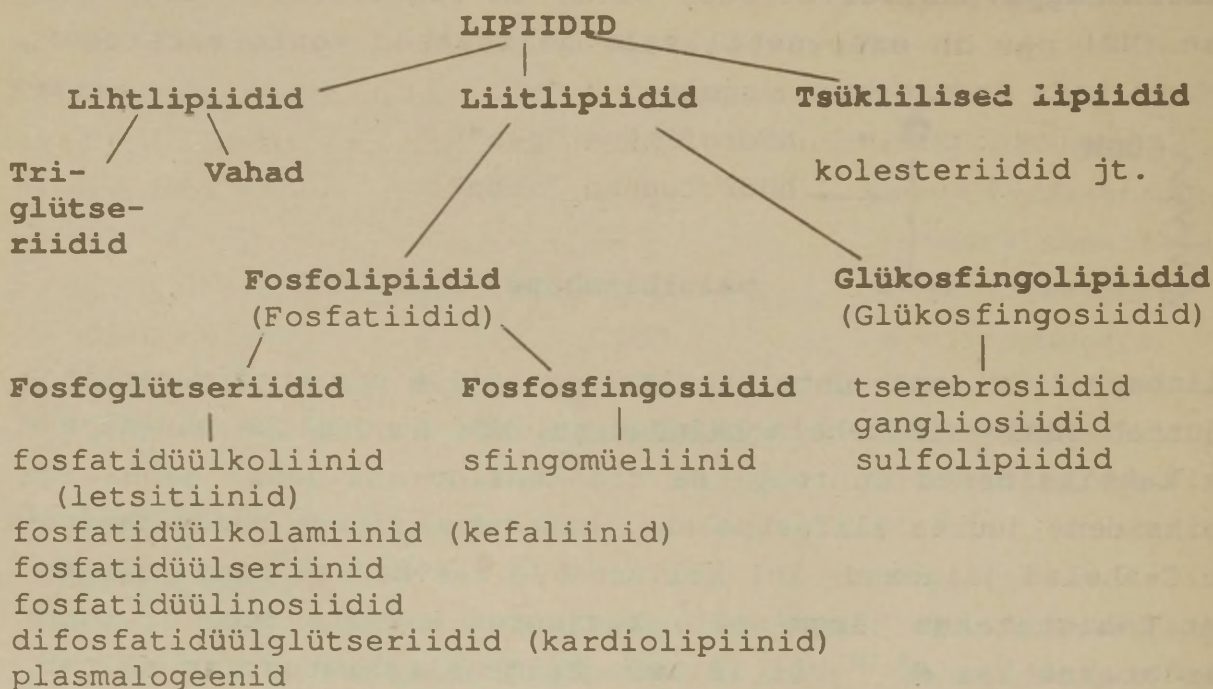
koliin



etanoolamiin (kolamiin)

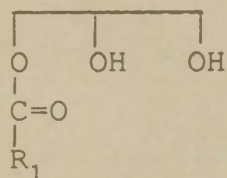
STRUKTUURNE KLASSIFIKATSIOON

See klassifikatsioon (levinuum) liigendab lipiide järgmiselt:



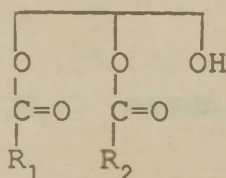
Lihtlipiidid

Triglütseriidid on glütserooli ja rasvhapete (atsüüljäägid) estrid. Võimalikud on ka mono- ja diglütseriidid (vt. skeem). Ku-



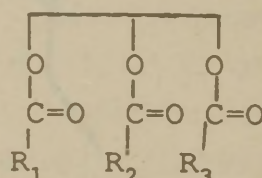
monoatsüül-

(monoglütseriid, MG)



diatsüül-

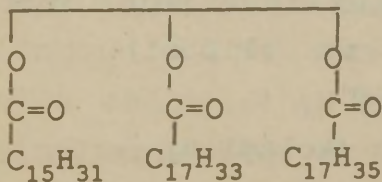
(diglütseriid, DG)



triatsüülglütseriid

(triglütseriid, TG)

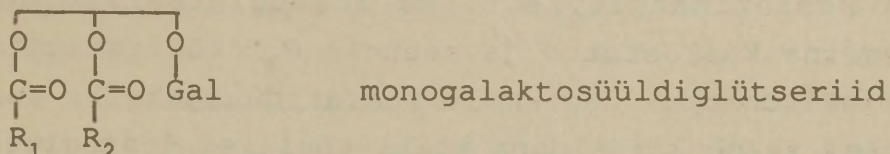
na looduslikud rasvad on segatriglütseriidide (rasvhappejäägid on erinevad) segud, siis sünonüümsed on terminid "triatsüülglütseriidid", "triglütseriidid", "neutraalarasvad" (vt. näide).



segatriglütseriid e. neutraalarasv
(triglütseriid)
palmitooleosteariin

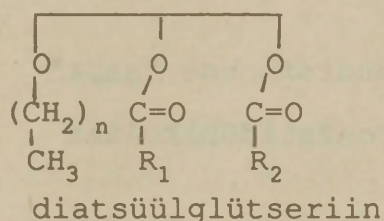
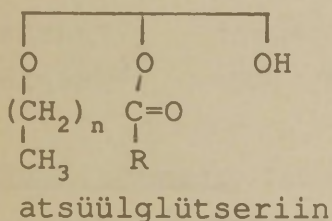
Neutraalrasvad on organismis tsütoplasmaatilise rasvana (raku ehituskomponendid) ja varurasvana (energeetiline ja kaitseroll). Inimorganismi rasvad, mis sulavad 15°C (kehatemperatuuril on nad vedelas olekus), sisaldavad 65% oleiinhapet. Leeliste toimel TG seebistuvad (hüdrolüüsuvad), andes glütserooli ja rasvhapete Na- või K-sooli (seebid).

Diglütseriidid esinevad organismis lipiidide metaboliitidena. Biomembraanidest on leitud siiski ka DG, milles Gal on seotud C₃ kaudu.



Vahad on kõrgemate (pikaahelaliste) alkoholide ja rasvhappe(-te) estrid. Näit. tsetüülalkoholi (C₁₆H₃₃OH) ja palmitiinhappe ester spermatseet (kašeloti ajust). Loomsed vahad on mesilasvaha, lanoliin (villa, sulgede vaha), taimsed vahad on puuvilju kattev vaha jt. Vahade baasil valmistatakse salve ja kreeme.

Kommentaar: Lihtlipiidide hulka loetakse ka mono- või diatsüülgütseriine, kus asendis C₁ on eetersideme abil alkoholijääk (monoalküülsed ühendid). Neid on leitud inimese vähkkasvajatest.

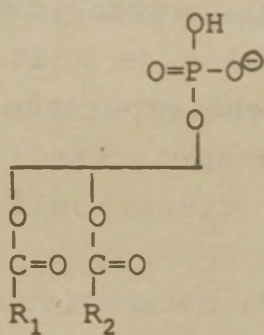


Liitlipiidid

I. Fosfolipiidid e. fosfatiidid

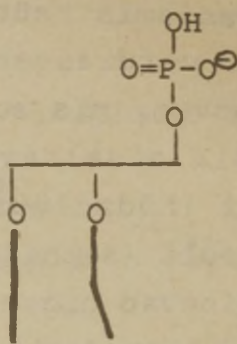
Need on multikomponentsed lipiidid, mis sisaldavad fosforhappejääki. (Baas)alkoholi alusel jagatakse nad fosfogütseriidideks ja fosfosfingosiidideks. Käibelühend on neil PL.

FOSFOGLÜTSERIIDID - baasalkohol on glütserool ning sünteesi eelühend on **L-fosfatiidhape e. fosfatidaat**. Viimane erineb TG-st asendisse C₃ estersidemega seostunud fosforhappejäägi poolest.



fosfatidaat

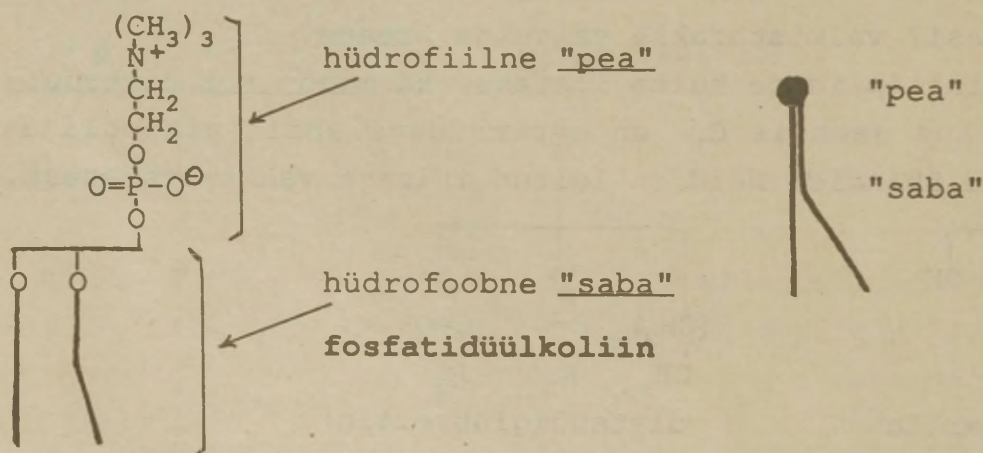
ehk



fosfatidüüljääk

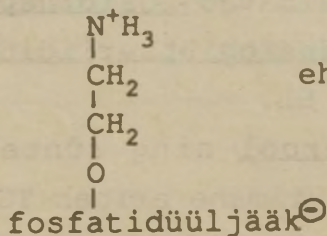
NB! Fosfatidaadis, s.t. ka fosfoglutseriidides on asendis C₁ reeglina küllastatud ja asendis C₂ küllastamata rasvhappejääk. Fosfatiidhape (täpsemalt fosfatidüüljäägi), kui baasstruktuuri alusel saame kirjeldada kõiki põhilisi fosfoglutseriide:

fosfatidüülkoliinid (koliinfosfatiidid, letsitiinid) on koliini (metüleeritud aminoalkohol) ja fosfatiidhappe estrid. Nad on biomembraanide põhilised lipiidid. Rohkesti leidub neid ajukoos,

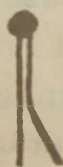


neerupealistes, munakollases (kr.k. leцитos = munakollane). Esinevad ka vere lipoproteiinide koosseisus.

fosfatidüületanolamiinid (kefaliinid) on etanoolamiini (kolamiini) ja fosfatiidhappe estrid. Nad on samuti biomembraanide lipiidid, neid on ka kõikides kudedes ja vere lipoproteiinides.



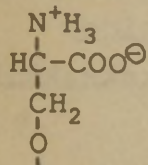
ehk



fosfatidüületanolamiin

fosfatidüülseriinid on Ser ja fosfatiidhappe estrid. Neid on

leitud ajukoos, aga ka teistes kudedes.



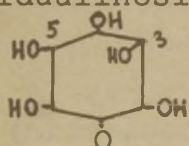
ehk



fosfatidүүлseriin

fosfatidүүлжääк[⊖]

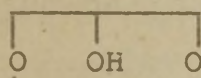
fosfatidүүлinosiidid (-inositoolid) on alkohol inosiidi e. inosi-tooli ja fosfatiidhappe estrid. Nad esinevad ajus (müeliinkestas), maksas, kopsudes. NB! Inosiidi -OH võivad fosforүүлuda ja tekivad olulised sekundaarsed vahendajad plasmamembraanis (näit. fosfatidүүлinosiit-4,5-diP e. 4,5-PiP₂).



fosfatidүүлinosiit

fosfatidүүлжääк[⊖]

difosfatidүүлglütseriinid e. kardiolipiinid on estrid glütserooli ja fosfatiidhappe kahe molekuli baasil. Nad on mitokondrite sisemembraani peamised fosfoglütseriidid.



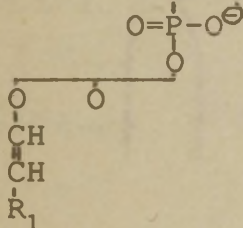
kardiolipiin

fosfati-
dүүлжääк[⊖]

fosfati-
dүүлжääк[⊖]

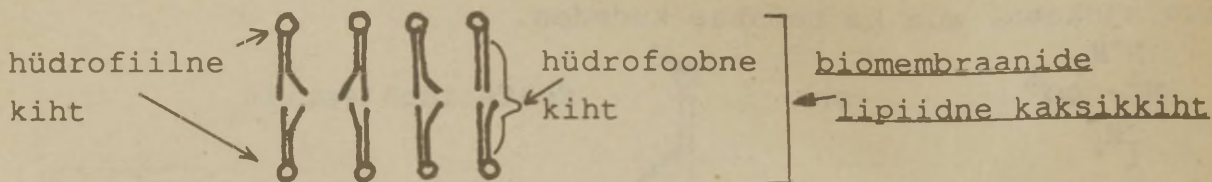
plasmalogenid (atsetaalfosfatiidid) on koliini (etanoolamiini, seriini) ja **fosfatidaalhappe** estrid. Neid on rohkesti ajukoos (seljaajus moodustavad nad 40-50% lipiididest), erütrotsüütides.

Koliin (või etanoolamiin, või seriin)

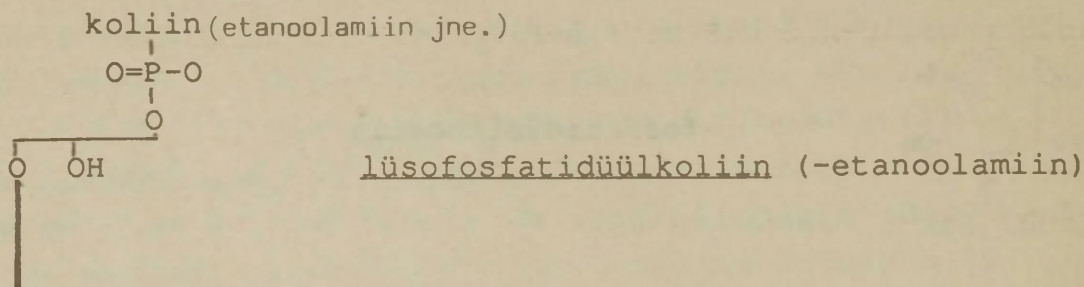


fosfatidaalkoliin (-etanoolamiin, -seriin)
NB! Asendis C₁ on eetersidemega seostunud küllastamata alkohol.

Kommentaariid. 1. Fosfoglütseriidid on amfifiilsed molekulid ja seetõttu sobivad nad biomembraanide ehitusüksusteks (nn. lipiidne kaksikkiht) ning võivad moodustada mitselle. NB! Füsioloogilise pH väärtuste juures omavad nad laetud gruppe. 2. Fosfoglütseriide hüdrolüüsivad (vt. seedimine) fosfolipaasid. Maomürgi fosfolipaas

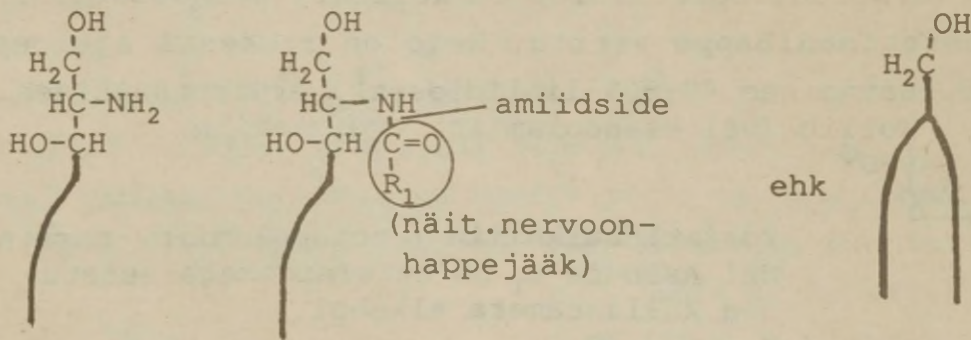


A₂, mis eemaldab asendist C₂ küllastamata rasvhappejäägi, tekitab lüsofosfolipiide. Viimastel on väga tugev hemolüütiline (erütrotsüütide lagunemine) toime. 3. Väikestes hulkades on leitud ka nn.



dioolseid fosfolipiide (nendes on alkohoolseks komponendiks diool), milles asendis C₁ on estersidemega rasvhappejääk, asendis C₂ aga fosforhappejäägi kaudu koliin või etanoolamiin. Need PL-did mõjuvad immuunreaktsioonidele ja omavad kolinolüütilist toimet (võtavad maha atsetüülkoliini toime).

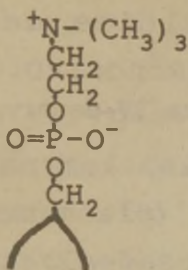
FOSFOSFINGOSIIDID - baasalkoholi **sfiingsiini** kaudu moodustub fosfosfiingsiidide eelühend - **tseramiid**. Tseramiid on atsüülitud sfiingsiin, milles rasvhape on enamasti nervoon-, tserebroon- või palmitiinhappejäägina. Atsüüljääk liitub sfiingsiini -NH₂ kaudu.



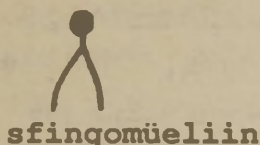
sfiingsiin

tseramiid

Olulisemad fosfosfiingsiidid on sfiingomüeliinid, mis on tseramiidi ja fosfokoliini estrid. Neid on biomembraanides, veres ja eriti rohkesti närvikiudude müeliintuppides. Mõningate esindajate baasalkohol on dehüdrosfiingsiin (reduktseerunud sfiingsiin).



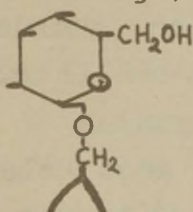
ehk



II. Glükosfingosiidid (glükosfingolipiidid, glükolipiidid)

Need on liitlipiidide teine grupp, milles puudub fosforhappejääk ja esineb süsivesikuline komponent (-did).

Tserebroosiidid on Gal (harvem Glc) sisaldavad tseramiidide derivaadid. Neid on rohkesti suuraju närvikiudude müeliintubed (lad. k. cerebrum = suuraju).

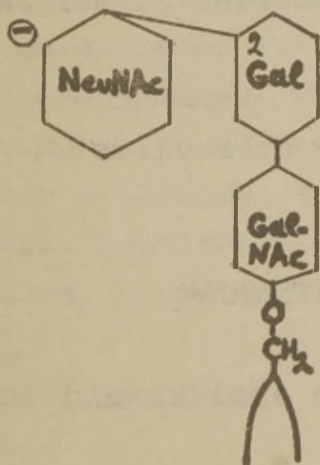


(galakto)tserebrosiid

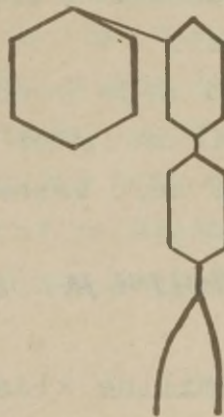
Tserebrosiidi konkreetne nimi tuleneb rasvhapest: nervoonhape = nervoon; lignotseriinhape = kerasiin; tserebroonhape = frenosiin. Üksikutes tserebroosiidides on leitud mitu heksoosijääki.

Sulfolipiidid on sisuliselt tserebroosiidide sulfoderivaadid, s.t. SV-jääk on reeglina asendis C₃ esterifitseerunud väävelhappejäägiga (tähistatakse näit. Gal-SO₃H). Seetõttu on nad tugevalt happelised ja seovad kergesti katioone (vajalikud KNS normaalseks elektrofüsioloogiliseks aktiivsuseks).

Gangliosiidid on sisuliselt tseramiidoligosahhariidid, s.t. tseramiid on glükostülunud oligosahhariidse fragmendiga. Viimane sisaldab Gal, Glc, GalNAc, NeuNAc jt. NB! Gangliosiidid sisalda-



gangliosiid G_{M3}

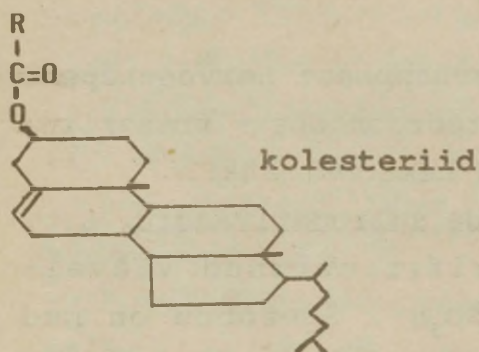


vad vähemalt ühe NeuNAC-jäägi. Gangliosiidide levinuimas tähistuses: G_{M1} ; G_{D2} ; G_{T1} jne. viitavad M (mono), D (di) ja T (tri) NeuNAC arvule; indeksid 1,2,3 jne. on 5 - laenguta SV-de arv.

Gangliosiidid on levinud eeskätt ajukooses, kus nad lokaliseeruvad põhiliselt närvirakkude membraanides (plasmamembraanide pinnal). Kuna gangliosiidid läbivad hemato-entsefaalset barjääri ja soodustavad närvirakkude diferentseerumist, siis peetakse neid perspektiivseteks terapeutilisteks vahenditeks.

Tsüklilised lipiidid

Nende baasalkoholiks on tsüklilised alkoholid. Reeglina on need steraantuuma sisaldavad alkoholid, nn. steroolid. Põhiline sterool loomorganismis on kolesterool, mille esterifitseerumine atsüüljäägiga annab lipiidi - kolesteriidi.



Veres on kogu kolesteroolist 1/3 vabalt ja 2/3 kolesteriididena. Rohkesti on teda võis, munakollases, ajukoos, vere lipoproteiinides. Kuna kolesterooli steraantum on jäik ja tasapinnaline, on ta oluline teatud jäikuse tagamiseks biomembraanides (eeskätt plasmamembraanis).

Kommentaar. Analoogiliselt kolesteroolile võib paljusid steraantuuma ja -OH sisaldavaid molekule (vitameerid D, sapphapped, steroidhormoonid, südameglükosiidid jt.) sisuliselt vaadelda lipiidide baasalkoholina, mille esterifitseerimine atsüüljäägiga annab lipiidi.

Märkus: Lipiidide hulka võiks paigutada ka lipoproteiine. Kuna nad funktsioneerivad sisuliselt segamakromolekulidena, siis käsitletakse neid vastavas peatükis.

FÜÜSIKO-KEEMILINE JA FÜSIoloogiline klassifikatsioon

Füüsiko-keemiline klassifikatsioon eristab apolaarseid (neut-

raalsed, laenguta) ja polaarseid (laenguga) lipiide. Füsioloogiline klassifikatsioon jaotab lipiidid: reservlipiidideks (deponeeritakse energiavajadusteks 98% ulatuses rasvkoos, on sisuliselt triglütseriidid; inimorganismis on keskmiselt 11 kg lipiide, millest reservlipiide on 7-8 kg) ja struktuurseteks lipiidideks (biomembraanide lipiidid; umbes 40% biomembraanide kuivmassist; tsütoplasma lipiidid). Siia kuuluvad eeskätt fosfolütseriidid, aga ka glükosfingolipiidid ja kolesteriidid. NB! Biomembraanides (eriti plasmamembraanis) esineb rohkesti ka vaba kolesterooli.

BIOFUNKTSIOONID

Energeetiline. Rasvhapete oksüdatsioon toimub olulise energiasaagisega. Näit. 1g TG täielik oksüdatsioon (CO_2 -ni ja H_2O -ni) annab 38,9 kJ (9.1 kcal) energiat (NB! 1g SV annab 17,1 kJ). See tuleb rasvhapete C-ke kõrgest küllastatusest vesinikega.

Struktuurne. Biomembraanide lipiidne kaksikkiht koosneb PL-dest (plasmamembraanis 50-60% lipiididest), kolesteriididest ja vabast kolesteroolist), sfingomüeliinidest; tsütoplasma rasv kuulub tsütoplasma ehitusse.

Transport. Näit. sulfolipiidid osalevad katioonide transpordis läbi biomembraanide lipiidse kaksikkihi.

Kaitse. Nahaalune rasvkude ja siseorganite ümbrised (rasvpadjandid) on olulised mehhaanilises kaitstes ja termoregulatsioonis; sfingomüeliinid ja tserebrosiidid on bioelektrilise isolatsiooni materjaliks müeliintuppedes; gangliosiidid ja kardioliipiinid on seotud immuunreaktsioonidega; gangliosiidid seovad bakteriaalseid toksine (kuuluvad retseptorite struktuuri).

Bioregulatoorne. Steroidhormoonid ja hormonaalse toimega lipiidid (prostaglandiinid) reguleerivad aju bioelektrilist ärritavatavust; biomembraanide PL-de seisundid (vedelam/tahkem) reguleerivad membraansete valkude (retseptorid, ülekandjad) funktsioneerimist.

Lahusti. Rasvlahustuvate vitamiinide omastamine/deponeerimine.

Varuaine. Loomorganismide rasvkoe TG-d ja õlid taimedes.

NUKLEIINHAPPED

Põhimoisteid

Nukleiinhapped (NH) on **lineaarsed** polümeerid, mille monomeerid seostuvad 3',5'-fosfodiesterisidemetega. NH on seega mononukleotiidjääkidest koosnevad **polünukleotiidid**. Struktuurierinevused jagavad NH kaheks liigiks:

DNA	RNA
-kaheaahelaline (NB! reeglina)	-üheaahelaline
-desoksüribonukleotiidijääkidest	-ribonukleotiidijääkidest
-sisaldab tümiini	-sisaldab uratsiili

RNA puhul eristatakse järgmisi **põhitüüpe**: "**messenger**"RNA e. **informatsiooni** RNA (mRNA), ribosoomi RNA (rRNA) ja **transpordi** RNA (tRNA). Eukarüootsed rakud sisaldavad ka heterogeenset tuuma RNA-d (heterogeneous nuclear RNA = hnRNA) ja väikesemolekulilist tuuma RNA-d (small nuclear RNA = snRNA). Kõrgemate organismide rakkudes esinevate NH üldiseloomustus on antud tabelis.

	LEVIK	FUNKTSIOON	SISALDUS
DNA	tuum	geneetilise info säilitamine ja edasiandmine "tütar"DNA-dele (raku jagunemisel) ja mRNA-le (valgusünteesis)	97-99% kogu raku DNA-st
	mk, kpl	geneetiline info MK teatud komponentide sünteesiks	1-4% kogu raku DNA-st
mRNA	tuum, ts	valgusünteesiks vajaliku geneetilise info ülekanne DNA-lt ribosoomidele	2-6% kogu raku RNA-st
tRNA	ts, rs, (mk)	AH-jääkide transport ribosoomidele ja osalemine nende lülitumises polüpeptiidahelasse	10-20% kogu raku RNA-st
rRNA	rs	moodustavad nukleiinhappelise osa tsütoplasma (mitokondrite) ribosoomides ja osalevad AH-jääkide lülitumises valgumolekuli	82% kogu raku RNA-st
5S			
16S			
23S			
28S			
hnRNA	tuum	mRNA eelvorm	jäljed
snRNA	tuum, ts	geenide aktivatsioon ja ribonukleoproteiinsete osakeste skeleti moodustamine tRNA transpordiks tsütoplasmasse	0,01% kogu raku RNA-st

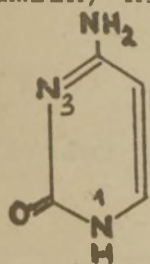
Kommentaariid. 1. Tabelis toodud lühendid on: mk= mitokondrid, kpl= kloroplastid, ts=tsütoplasma, rs= ribosoomid. 2. Väljapakutud

M_r (nukleotiidi jääkide ligikaudne arv) on: DNA - tinglikult 10^{11} , mRNA - $25-100 \times 10^4$ (750-3000), tRNA - $25-30 \times 10^3$ (73-93), 5SRNA - 35×10^3 (100), 16SRNA - 60×10^4 (1500), 23SRNA 110×10^4 (3100), 28SRNA - 160×10^4 (4300), hnRNA - 150×10^5 (?), snRNA - $20-35 \times 10^4$ (?). 3. Loomulikult DNA ja RNA sisaldus varieerub sõltuvalt organismi liigist, koest, rakust. Näit. spermatoosoidides on DNA sisaldus 50-60% raku kuivmassist, aga enamikes teistes rakkudes 1-9%. RNA/DNA suhe on 4-10 (tagasihoidliku valgusünteesiga rakkudes 0,3-2,8). 4. rRNA puhul on tabelis tema tuntumad variantid ribosoomides (5S, 16S, 23S, 28S). 5. Prokarüootide kromosoom on pikk kaksikahelaline DNA molekul, mis paikneb tsütoplasma spetsiifilises kromosoomses tsoonis (nukleoidis). Kui see nukleoid seotub plasmamembraaniga nim. teda mesosoomiks. DNA fragmente, mis asuvad väljaspool nukleoidi nim. plasmiidiks e. episoomiks. 6. Eükarüootsetes rakkudes DNA molekulid on põhiliselt valkude ja RNA-ga seotuna nn. kromatiinina rakutuumas. Kromatiin on raku tuumaaine, millest formeeruvad kromosoomid (igas kromosoomis on üks DNA hiidmolekul).

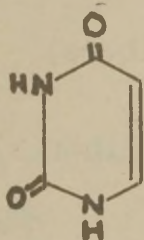
EHITUSKOMPONENDID

NH-te ehituskomponentidest rääkides kasutatakse järgmisi mõisteid: **N-alused**, **nukleosiidid**, **nukleotiidid**.

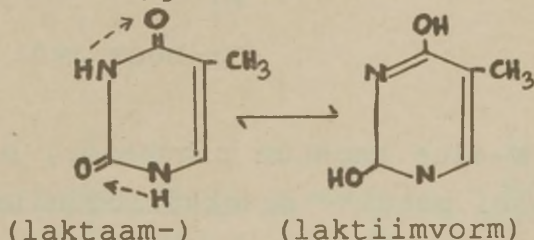
N-alused NH-tes on pürimidiini derivaadid (tsütosiin, uratsiil ja tümiin) ning puriini derivaadid (adeniin, guaniin)



tsütosiin (C)



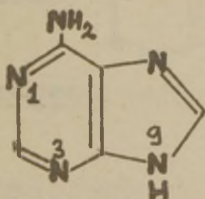
uratsiil (U)



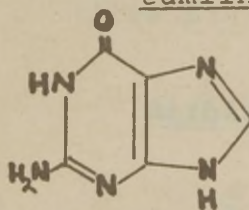
(laktaam-)

(laktiimvorm)

tümiin (T)

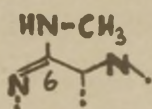


adeniin (A)

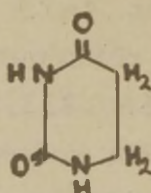


guaniin (G)

Kommentaariid. 1. Oksogruppe sisaldavad N-alused (C,U,T,G) on NH-tes laktaamvormis (vt. tümiini näide). 2. Peale viie põhilise N-aluse leidub NH-tes ka nn. minoorseid (harvaesinevaid) N-aluseid, mis on enamasti põhiliste N-aluste metüülitud vormid (näit. 5-metüültsütosiin, 1-metüüluratsiil, 2-metüüladeniin, N₆-metüüladeniin, 3-metüülguaniin, N₂-metüülguaniin jt.). Metüül derivaate on leitud DNA-st ja RNA-st (eriti tRNA-st). tRNA-st on leitud ka



N₆-metüüladeniin

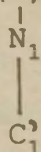


5,6-dihüdrouratsiil

5,6-dihüdrouratsiili. Mõningate viiruste DNA-st on leitud glükosüülitud derivaate (glükosiid jääk on seostunud glükosiidsideme abil tsütosiinis 5-hüdroksümetüülrühmaga). Minoorsete N-aluste (nukleotiidide) põhifunktsioon on NH struktuuri stabiliseerimine (vt.allpool).

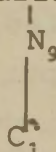
Nukleosiidid on glükosiidid. NH puhul on nad reeglina N-glükosiidid, sest β-glükosiidside (N-glükosiidside) seob N-alust ja pentoosijääki. Sideme variandid on: N₁-C_{1'} ja N₉-C_{1'} (vt. skeem).

pürimidiinalus (C,U,T)



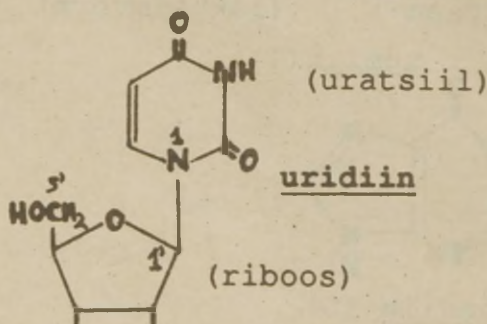
NUKLEOSIID

puriniinalus (A,G)

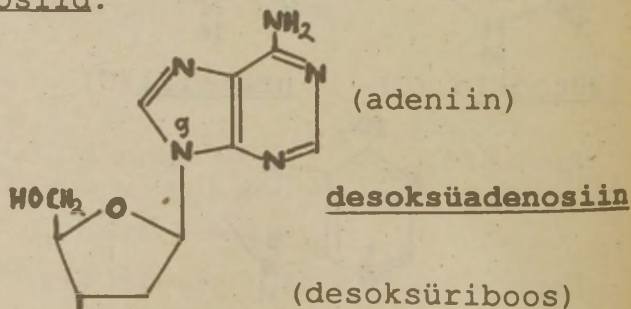


riboos (või desoksüriboos)

Kui N-alus seostub riboosiga, moodustub ribonukleosiid, desoksüriboosi puhul - desoksüribonukleosiid.



uridiin



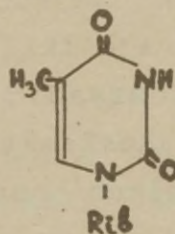
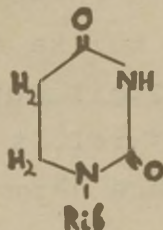
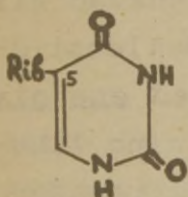
desoksüadenosiin

Järgnev tabel annab üldinfo N-aluste ja nukleosiidide kohta.

N-alus	nukleosiidi üldnimi	N-aluse ja nukleosiidi sümbol	desoksünukleo- siidi sümbol
--------	------------------------	----------------------------------	--------------------------------

adeniin	adenosiin	A	dA
guaniin	guanosiin	G	dG
tsütosiin	tsütidiin	C	dC
uratsiil	uridiin	U	
tümiin	tümidiin	T	dT

Kõrvuti põhinukleosiididega esineb ka minoorseid nukleosiide nagu pseudouridiin, dihydrouridiin, ribotümidiin (vt. tRNA). Ka mitmed antibiootikumid on nukleosiidse ehitusega (spongosiin, nebulasiin, puromütsiin jt.).

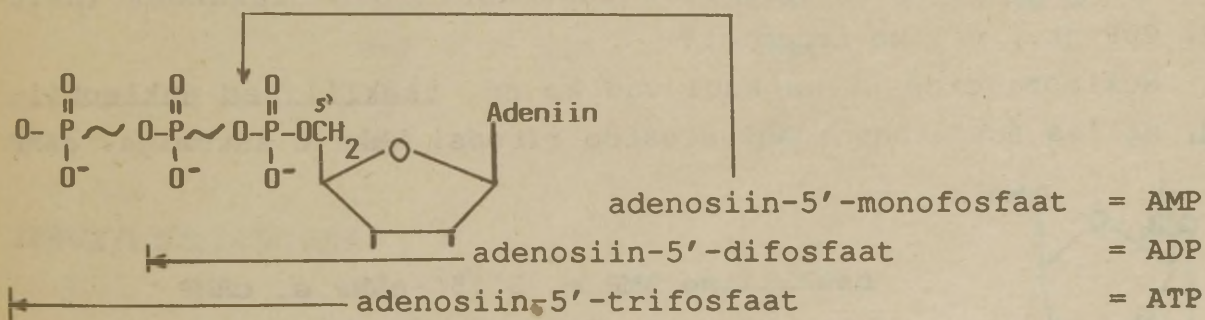


Pseudouridiin (Ψ)
(NB! side C₅-C₁)

Dihydrouridiin
(DHU)

Ribotümidiin
(T)

NUKLEOTIIDID. Nukleotiidid on nukleosiidide fosfoestrid. Vastava nukleotiidi nimi tuleneb vastava nukleosiidi ja fosforhappesääkest arvust (vt. AMP, ADP ja ATP).

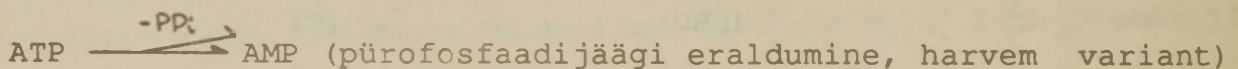
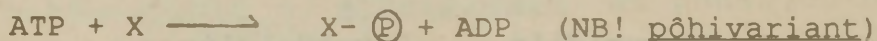


(dRib puhul vastavalt desoksüadenosiin-5'-monofosfaat= dAMP jne.)

Kommentaariid. 1. Kuna fosfaatgrupp(-pid) on reeglina C₅, juures, siis käibelühend on AMP (5'-AMP asemel). 2. Nukleotiide tähis-

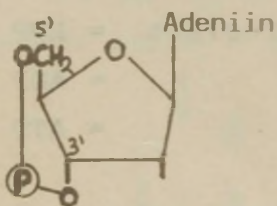
tatakse kolmetäheliste sümbolite kõrval ka lihtsalt A, G jne. Lisandit "d" kasutatakse harva ja kahel eesmärgil: a) dA, dG, dC ja dT, viitamaks desoksüribonukleotiididele DNA koosseisus ja 2) dAMP, dGMP, dCMP, dTMP jne., viitamaks desoksüribonukleotiidide vabadele vormidele. 3. Rakus ($\text{pH} \approx 7,0$) on nukleotiidid anioonidena (näit. ATP^{4-}), s.t. nad on happed ja neid saab ka vastavalt nimetada (seega: AMP = adenüülhape = adenülaat). 4. Nukleotiidide neeldumismaksimum on 260-280 nm juures.

Nukleotiidide ja nende derivaatide funktsioonid. Nukleotiidijäägid on NH monomeerideks. RNA koosneb ribonukleotiidijääkidest RNA ja DNA desoksüribonukleotiidijääkidest. Nukleosiidtrifosfaadid on seejuures vastavate mononukleotiidijääkide eelühenditeks NH sünteesil (NB! seega ATP, GTP jne. annavad nii sünteesiks vajalikku energiat kui ka ehitusüksusi). Nukleosiidtri- ja difosfaadid on makroergilisuse tõttu olulised energia ülekandjad. Keskseks on selles rollis kahtlemata ATP ning lihtsustatult toimub energia ülekanne järgmiselt:



Mononukleotiidid ja nende derivaadid on vaadeldavad ka mitmesuguste koensüümidena, mis liitensüümide komponentidena osalevad mitmesuguste rühmade, gruppide ensümaatilises ülekandes (näit UDP, CDP jt., vt. koensüümid).

Nukleotiidide hulka kuuluvad ka nn. tsüklilised nukleotiidid, milles fosforhappejääk seostub riboosi kahe C aatomiga. cAMP



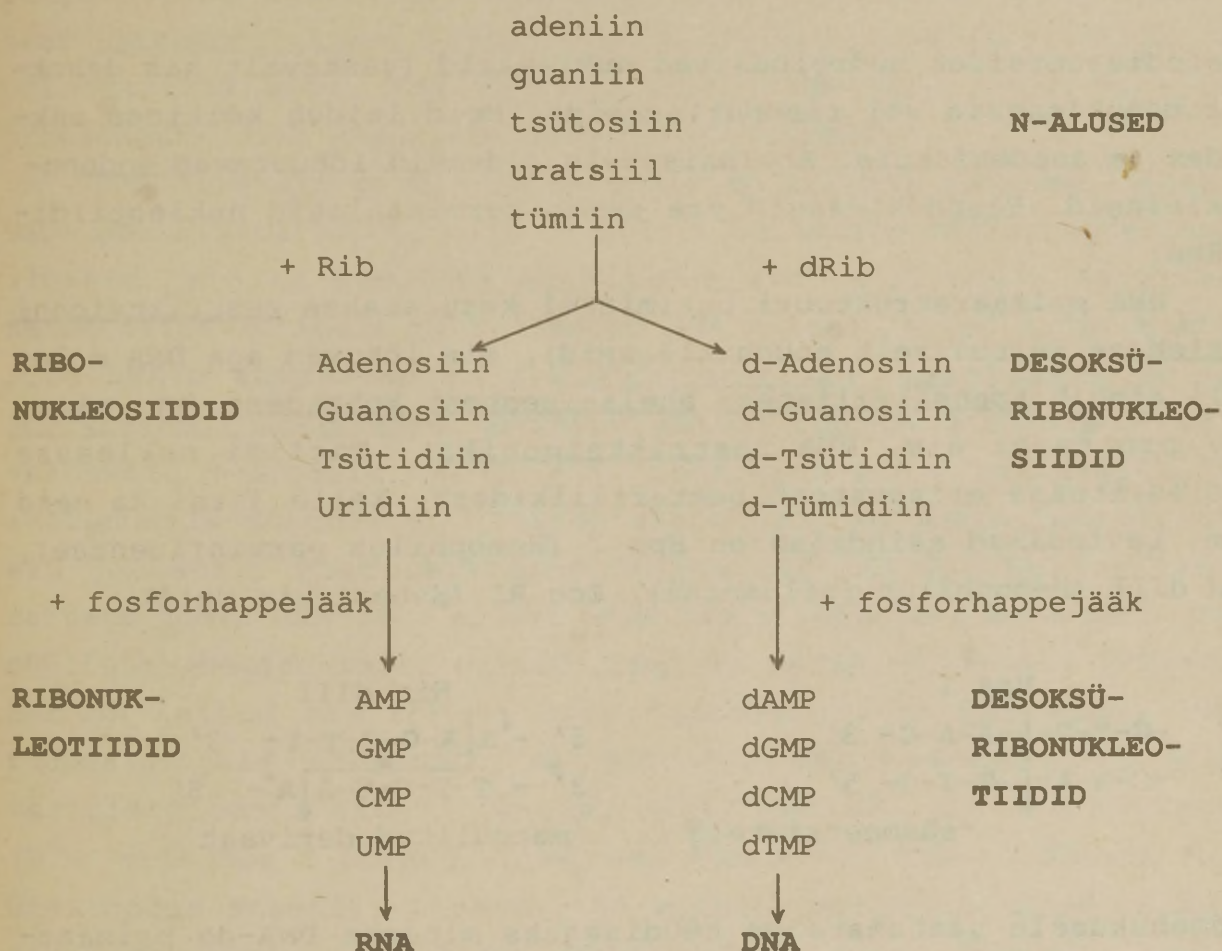
tsükliline AMP e. 3',5'-cAMP e. cAMP
(leitud on ka 2',3'-cAMP)

ja cGMP on olulised hormoonide regulatoorse toime vahendajad. Teiste taoliste nukleotiidide roll on paljuski veel ebaselge.

Di- ja oligonukleotiidid. Kahe nukleotiidijäägi ühinemisel tekib

dinukleotiid, vähem kui 10 nukleotiidijärgist koosnevat molekuli nim. oligonukleotiidiks (NB! taoline liigendus on loomulikult tinglik). Nukleotiidijärgid seostuvad 3',5'-fosfodiesteridemetega abil (vt. biopolümeeride ehitusprintsipiibid). Ka mitmed koensüümid (NAD, NADP, FAD) on dinukleotiidid, kuid (NB!) nendes pole 3',5'-fosfodiesteridemetet (vt. koensüümid).

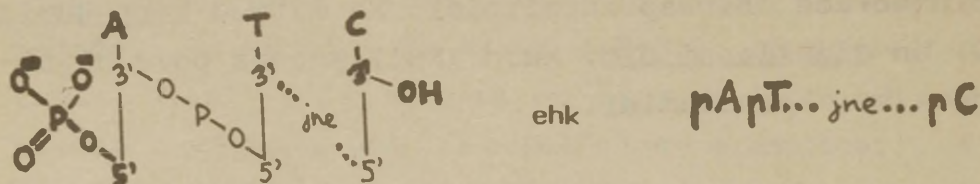
Nukleosiidide ja nukleotiidide moodustumise üldskeem.



STRUKTUURITASEMED

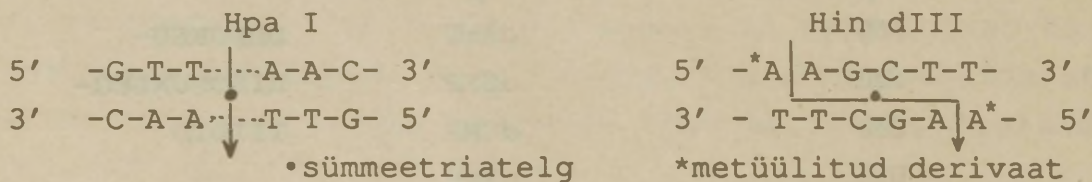
DNA PRIMAARSTRUKTUUR. See on 3',5'-fosfodiesteridemetega seotud desoksüribonukleotiidijääkide järjestus polünukleotiidahelas. Korduvad fosfaat- ja pentoosgrupid moodustavad kovalentse polaarset hargnemata "tüve", millest ulatuvad välja hüdrofoobsed N-alused (vt. biopolümeeride ehitusprintsipiibid). Ahel algab vaba

5'-otsaga ja lõpeb vaba 3'-otsaga (ahelas sideme suund 5'→3'). Lisagem, et eukarüootide DNA sisaldab massiliselt teatud korduvaid nukleotiidseid järjestusi.



Fosfodiesterisideti hüdroolüüsivad **nukleaasid** (vastavalt kas desoksüribonukleaasid või ribonukleaasid). Neid leidub kõikides rakkudes ja seedetraktis. Ahelasiseseid sidemeid lõhustavad endonukleaasid. Eksonukleaasid eraldavad terminaalseid nukleotiidijääke.

DNA primaarstruktuuri uurimistel kasutatakse restriktsiooni nukleaase (sisuliselt endonukleaasid), mis lõhuvad aga DNA molekuli ainult spetsiifilistest ahelasisestest kohtadest (vt. skeemi; protsessi nim. DNA restriktsiooniks). Taolisi nukleaase isoleeritakse erinevatest bakteriliikidest, kelle järgi ka neid nim. Levinuimad esindajad on Hpa I (Hemophilus parainfluenzae), Hin dIII (Hemophilus influenzae), Eco RI (Esherichia coli).



Töömahukusele vaatamata on nüüdisajaks mitmete DNA-de primaarstruktuur määratud. Esimene oli bakteriofaagi ϕ X174 üheaahelaline ringikujuline DNA (Sanger, Barell jt. 1977), milles on 5386 nukleotiidijääki. (NB! See on aga üks väiksemaid DNA molekule).

DNA primaarstruktuuri lihtsustatud määramisprotseduur on järgmine. Lähte-DNA kindel kogus fragmenteeritakse restriktsiooni nukleaasiga erineva pikkusega restriktsioonifragmentideks. Igas fragmendis määratakse nukleotiidijääkide arv fragmendi elektroforeetilise liikuvuse alusel (spetsiaalsed võtted lubavad elektro-

foreetiliselt lahutada kuni 200-jäägilisi fragmente ja isegi siis, kui nad erinevad vaid ühe jäägi võrra). Iga fragmendi 5'-ots märgistatakse radioaktiivselt, sekveneeritakse lühemateks fragmentideks ning saadakse viimaste elektroforegrammid. Järgnevalt võetakse uuesti kindel kogus lähte-DNA, lõhutakse see fragmentideks mingi teise restriksiooni nukleaasiga ja järgneb ülalkirjeldatud protseduur. Võrreldes esimese protseduuri restriksiooni kaarti (restriction map) teise protseduuri omaga, saab kattuvuse alusel järjestada fragmendid ja seega tuvastada ka primaarstruktuuri. Kui vaja, rakendatakse veel 3-dat ja 4-dat protseduuri uute restriksiooni nukleaasidega.

DNA molekuli primaarstruktuuris on kümnete tuhandete korduvate põhialuste (A, T, G ja C) kõrval ka teatud määral minoorseid aluseid, mis on reeglina metüülitud (vt. ülalpool). Selgitame nende kaitsvat rolli bakteriaalse DNA näitel. Antud liigi bakterite DNA-d kaitsevad teda modifitseerivad metülaasid ja restriksiooni nukleaasid. Esimesed metüülivad spetsiifiliselt vaid vastavaid N-aluseid DNA-s, s.t. moodustub antud bakteriliigile iseloomulik metüülitud jääkide kaart (see ei muutu bakteriraku elu jooksul). Restriksiooni nukleaasid lõhuvad bakteriraku sattuva võõra DNA (see ei saa enam replitseeruda), kuna selle metüülitud jääkide kaart erineb reeglina peremehe omast. Bakterites on leitud üle 150 erineva restriksiooni nukleaaasi (vt. tüüpesindajaid ülalpool). NB! Kui näit. Hpa I lõhkumiskoha (nim. restriksiooni "site") lähedal oleks kas või üks A metüülitud (A^{*}), siis Hpa I poleks võimeline seda kohta DNA-s lõhkuma (vt. ülaltoodud skeemi). Lisagem, et enamik metüülimise/restriksiooni fragmente DNA ahelas omavad teist järku sümmeetriatelge (vt. ülaltoodud skeeme), s.t. kui skeemil toodud DNA lühikesi lõike pöörata joonise tasapinnal 180°, jääb ta samasuguseks nagu lähteasendis.

Bakteriviiruste DNA on aga erinev ja seetõttu kaitstud bakteriraku (peremeesraku) restriktiivse aktiivsuse suhtes. Näit. viiruslik DNA on modifitseeritud (näit. glükosüülitud või hüdroksümetüülitud või metüülitud) sellistest kohtadest, et peremeesraku restriksiooni nukleaaasidel ei ole võimalik temaga

seostuda ega lõhkuda. Viiruslik DNA võib sisaldada ka teatud järjestusi, mida peremeesraku nukleaasid ei suuda "ära tunda".

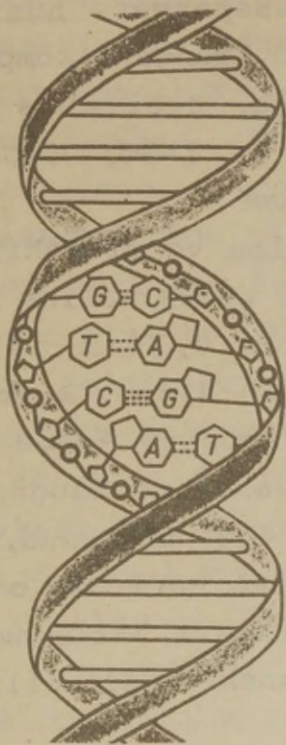
Restriktsiooni nukleaase kasutatakse geenide väljalõikamiseks ja järgnevaks asendamiseks teise organismi geenidega (insenergeneetika, biotehnoloogia) ja näit. kromosoomide kaartide koostamiseks. Osa neist ensüümidest lõhub DNA biheeliksi nii, et lahutatud otsad jäävad erineva pikkusega (vt. Hin dIII skeemi). Kuna need vabad otsad võivad komplementaarselt seostuda samasuguse järjestusega otsadega mujal DNA molekulis, siis nim. neid kleepuvateks otsadeks (cohesive ends).

DNA SEKUNDAARSTRUKTUUR. Põhieeldused selle avastamiseks olid Chargaffi reeglid ja röntgenstruktuuranalüüsi andmed. Nimelt postuleeris Chargaff (1949-50), et : 1) igas DNA-s (sõltumata organismi liigist) adeniinijäägid = tümiinijäägid ning guaniinijäägid = tsütosiinijäägid, s.t. **A = T ja G = C**; 2) puriinijäägid = pürimidiinijäägid, s.t. **A + G = C + T**. Teisalt, röntgenstruktuuranalüüs (Wilkins, Franklin, 1950-53) näitas DNA-s **korduvate ehitusüksuste** esinemist, s.t. tõenäoline on spiraliseerumine.

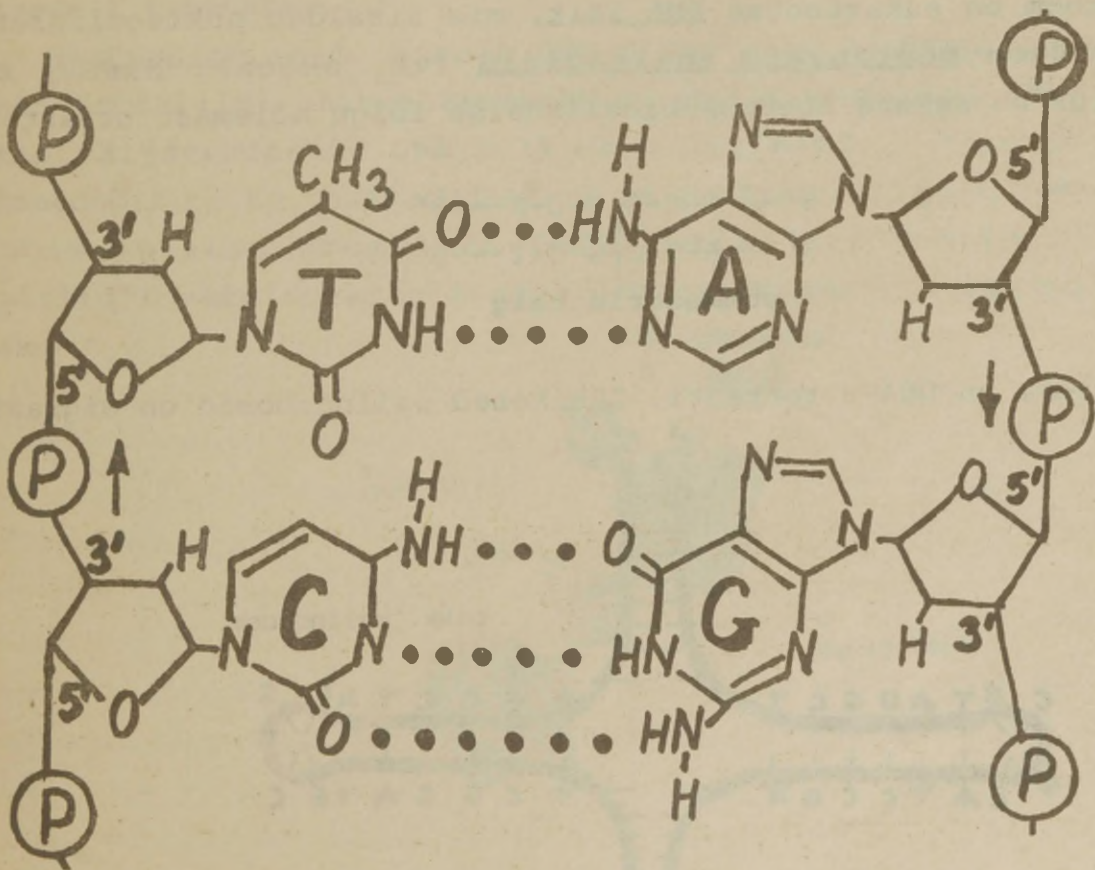
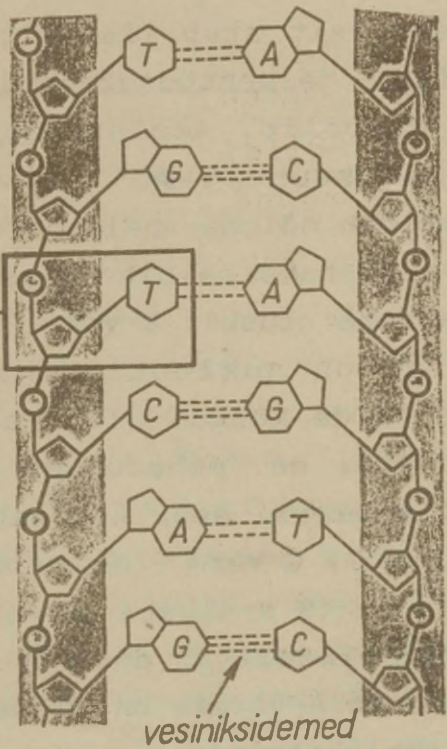
1953.a. **Watson, Crick** üldistasid kogu info, postuleerides: DNA on kaksikspiraalse ehitusega, s.t. tema molekul koosneb kahest lineaarsest komplementaarsest polünukleotiidselt ahelast, mis on ümber näiva ühise telje paremale spiraliseerunud ja on antiparalleelsed (vt. skeemid).

Naaberahelate komplementaarsus, s.t. ahelatevaheline paardumine on "lubatud" vaid nii, et A seostub T-ga ja G seostub C-ga (NB! Chargaffi reeglite tõestus), mis tagabki: 1) naaberahelate võrdse kauguse teineteisest kogu molekuli ulatuses (näit. paar A-G ei mahuks suurte mõõtmete tõttu biheeliksi sisemusse); 2) optimaalse arvu maksimaalse stabiilsusega vesiniksidemeid N-aluste vahel (näit. paaris C-T oleksid N-alused teineteisest liiga kaugel stabiilsete vesiniksidemete tekkeks).

Biheeliksit (**sekundaarstruktuuri**) hoiavadki vesiniksidemed (vt. joonis) komplementaarsete N-aluste vahel ning hüdrofoobsed vastaktoimed biheeliksi sisemusse paigutatunud hüdrofoobsete N-aluste vahel (NB! N-alused ei liida vee molekulile).



nukleotiidi-
jääk

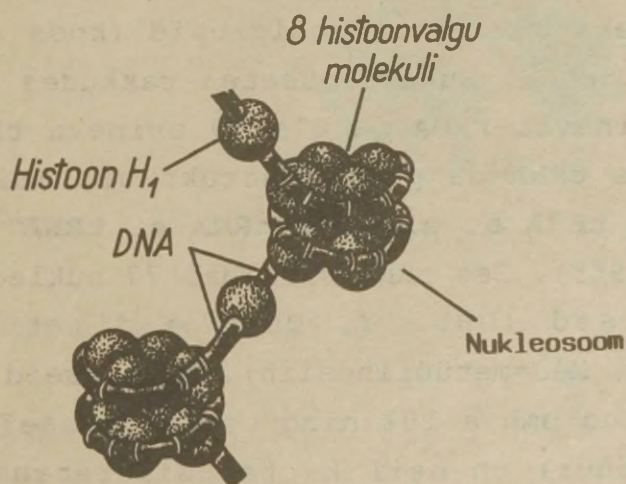


kohaks vastavate regulatoorsete valkude jaoks kromosoomselt DNA-lt info transkripteerimise alustamiseks. Pikad palindroomid (tuhanded N-aluste paarid) võivad moodustuda ka biheeliksi ühe ahela N-aluste paardumisel. Tekivad nn. riststruktuurid (vt. skeemi ülal), mis on samuti seotud teatud signaalfunktsioonidega.

DNA TERTSIAARSTRUKTUUR. Valgud histoonid seostuvad oma positiivsete laengute abil DNA biheeliksi negatiivsete laengutega. See ongi oluliseks aluseks DNA biheeliksi kokkupakkimisel tertsiaarstruktuuriks. Selgitagem seda lähemalt, alustades kromosoomist.

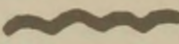


Kromosoomide arv sõltub organismi liigist (kana 78, inimene 46, küülik 44, rott 42 jne.). Kromosoomidel on keerukas ehitus, ja neis paikneb üks gigantne DNA molekul. Kromosoomi moodustab kromosoomne materjal e. kromatiin. Kromatiin koosneb peenikestest niitidest, milles on 60% valku, 35% DNA ja 5% RNA (arvud on loomulikult ligikaudsed). Valkude põhihulga moodustavad histoonid (30-45%). Kromatiini ehitus on selline, et antud liigile omane ühesugune DNA-s olev geneetiline info on spetsiifilistes rakkudes erinevalt kasutatav.

Histoonide roll seisneb DNA biheeliksi korrastatud pakkimises kromatiini ehitusüksusteks e. nukleosoomideks (näit. kui võtta väljavenitatud DNA pikkuseks ligikaudu 2 meetrit, siis kromosoomis on ta pakitud umbes 5 nm pikkuseks). Elektronmikroskoobis paistab kromatiin "pärlikeena", kus nukleosoomid ("pärlid") vahelduvad niitjate ("pärlivabade") lõikudega (vt. skeem).



DNA molekulist 80-90% langeb nukleosoomide arvele, niitjad osad moodustavad seega 10-20%. Nukleosoomis on pakkunud umbes 250 N-aluste paari, nukleosoomidevahelistes osades on 20-120 N-aluste paari (sõltuvalt organismi liigist ja rakkude tüübist). H₁ nukleosoomi moodustamises ei osale. Ta on seotud hoopis transkriptsiooni regulatsiooniga. Lisagem, et kromatiin seostub tuuma mittehistsoonsete valkudega (neid on leitud sadu), mis moodustavad tuuma maatriksi.

DNA terstiaarstruktuuri näiteid:

- | | | |
|-----------------------------|--|---|
| lineaarne üheaheelaline |  | (bakteriofaag ϕ X174 ja mõned teised viirused) |
| ringikujuline üheaheelaline |  | (DNA viirused ja mitokondriaalne DNA; mitokondritest on leitud ka nn. <u>katenaatseid</u> vorme |
| ringikujuline biheeliks |  | (viiruste replikatiivne vorm) |

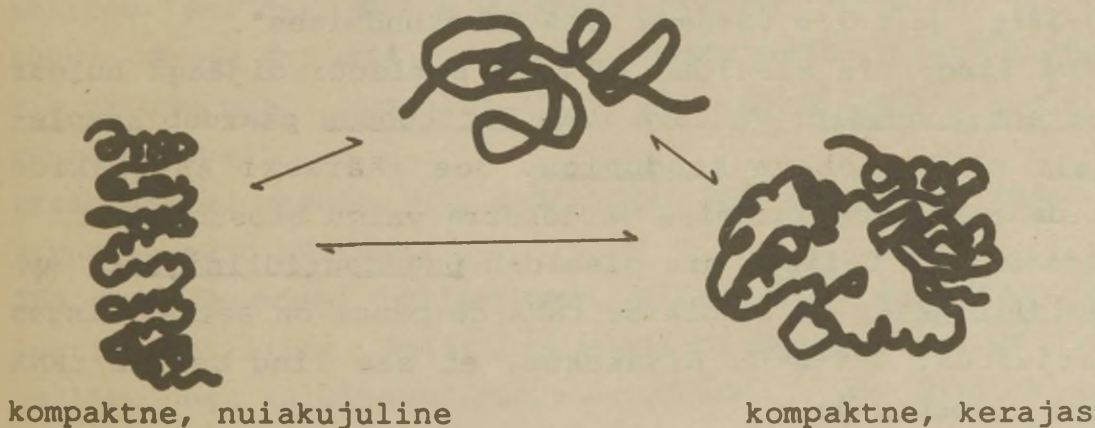
RNA PRIMAARSTRUKTUUR. Selle ehitusprintsip on analoogiline DNA omale, s.t. ta on 3',5'-fosfodiesterisidemetega seostunud ribonukleotiidijääkide järjestus polünukleotiidahelas. Erinevalt DNA-st on kovalentseks tüveks riboosigrupid (koos fosfaatgruppidega) ning T asemel on U. Eukarüootsetes rakkudes on üle 1000 erineva mRNA, 3-5 erinevat rRNA ja üle 70 erineva tRNA. Nüüdisajaks on teada enamike tRNA-de primaarstruktuur. Esimesena määrati Ala transportiva **tRNA e. alanüül-tRNA e. tRNA^{Ala}** primaarstruktuur (Holley jt. 1965). See tRNA sisaldab 77 nukleotiidijääki, millest 7 on minoorseid (DHU, Y, DMeG = dimetüülguaniin, MeG = metüülguaniin, MeJ=metüülinosiin). Minoorseid nukleotiidijääke on tRNA-des leitud umbes 10% ning peale kaitsefunktsiooni (vt. DNA primaarstruktuur) on neil ka tertsiaarstruktuuri moodustumist soodustav roll (nad ei paardu, s.t. nende asukohal ahelas on

sekundaarstruktuur häiritud). Vaata illustratsiooniks näit. tRNA^{Phe} sekundaarstruktuuri joonist.

RNA SEKUNDAARSTRUKTUUR JA TERTSIAARSTRUKTUUR. Vaatleksime seda kõigepealt mRNA näitel. Kuna mRNA sisaldab DNA palindroomide koopiaid, siis tema **sekundaarstruktuur** sisaldab pre-mRNA vormis (mRNA eelvorm) nii "riststruktuurseid" osi (vt. DNA sekundaarstruktuur), kui ka lineaarseid osi. Protsessingu ("küpsemise") käigus "riststruktuursed" osad eemaldatakse ensümaatilisel ja moodustub mRNA ahel, mis koosneb spiraliseerunud ja sirgetest lõikudest. mRNA tertsiaarstruktuur meenutab niidirullile (rulliks on transportvalk informeer) keritud niitjat ruumikujundit. (vt. ka matriitssünteesid).

rRNA sekundaarstruktuur tähendab üheaahelalise molekuli spiraliseerunud ja käärdunud lõikudest ruumikujundit. rRNA tertsiaarstruktuur on nuiakujuline või kerajas sõltuvalt keskkonna tingimustest (vt. joonist). Tertsiaarstruktuurne rRNA on ribosoomide skeletiks, millega seostuvad ribosoomi valgud.

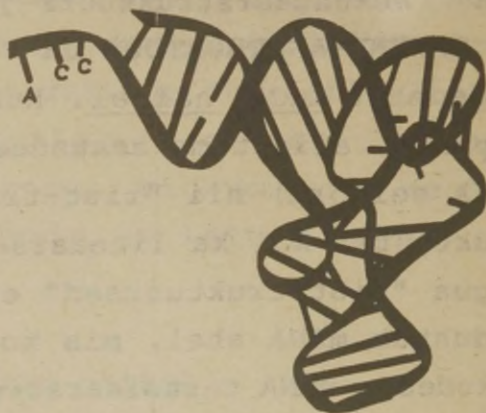
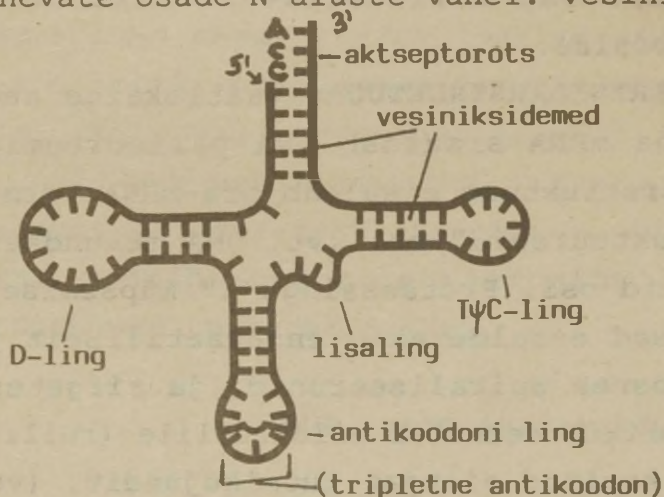
osaliselt lahtihargnenud ahel



rRNA tertsiaarstruktuur

tRNA sekundaarstruktuuri iseloomustamiseks kasutatakse "ristikulehe" mudelit (vt. joonis). Tegelikult muidugi pole tRNA molekul selline ühetasapinnaline. Nagu näha jooniselt, on selline "ristikulehelisus" tagatud komplementaarse paardumisega tRNA ahela

erinevate osade N-aluste vahel. Vesiniksidemete vabasid elastseid



sekundaarstruktuuri
lihtsustatud näide

tRNA sekundaarstruktuur

tRNA (tRNA^{Phe})

osi tRNA molekulis nim. lingudeks ("loop"), mis tavaliselt sisaldavad minoorseid (modifitseeritud) nukleotiidijääke. Eristatakse järgmisi lingusid:

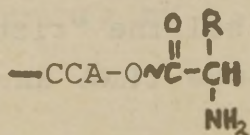
dihüdrouridiini e. D-ling, mis sisaldab vähemalt ühte DHU-jääki (tüüpjärjestus on DHU-DHU-G-A). Lingu pikkus on 8-10 nukleotiidijääki. D-ling seob aminoatsüül-tRNA-süntetaasi. Viimane osaleb AH-jäägi ja talle vastava tRNA "äratundmises".

antikoodoni ling, mis sisaldab seitsme nukleotiidijäägi hulgas tripletset antikoodonit. Vastava tRNA antikoodon paardub komplementaarselt mRNA vastava koodoniga. See määrabki AH-jääkide polüpeptiidahelasse paigutumise järjekorra valgu biosünteesil.

pseudouridiini e. T C-ling, mis sisaldab pseudouridiini jääki (Ψ) ja riboümidini jääki (T). Kõikide tRNA-de puhul on selles lingus olemas järjestus: G-T- Ψ -C. Arvatakse, et see ling osaleb tRNA seostumises ribosoomiga.

lisaling - on varieeruva pikkusega.

Kõikide tRNA-de 3'-otsa nim. **aktseptorotsaks**. See ots lõpeb järjestusega C-C-A. Adnosiini 3'-OH kaudu liitub siia transportitav AH-jääk. tRNA ahela 5'-ots on reeglina G- \textcircled{P} (harvem C- \textcircled{P}). Iga põhiainohappe jaoks on olemas vähemalt üks tRNA.



aminoatsüül-tRNA

tRNA tertsiaarstruktuuri tekkel seostuvad ahela osad täiendavate hüdrofoobsete vastastikuste toimete abil (vt. rRNA). Paardumatud minoorsed komponendid on selle struktuuritaseme tekkes ja püsimises väga olulised.

GEENID

Käsitleksime lühidalt ka mõningaid DNA ja RNA funktsioonidega seotud põhimõisteid nagu matriits, geen jt.

MATRIITS. DNA nukleotiidne järjestus kannab geneetilist infot. Kuna DNA üks ahel määrab komplementaarsuse alusel täielikult ja täpselt ära tema baasil sünteesitava materjali (selleks on replikatsioonil antud ahelale tekkiv komplementaarne DNA ahel või transkripteeritav RNA), siis võime öelda: DNA nukleotiidne järjestus on replikatsiooni ja transkriptsiooni matriitsiks. mRNA nukleotiidne järjestus on järelilikult matriitsiks sünteesitava valgu molekuli suhtes. Siit tulenebki termin "**matriitssünteesid**".

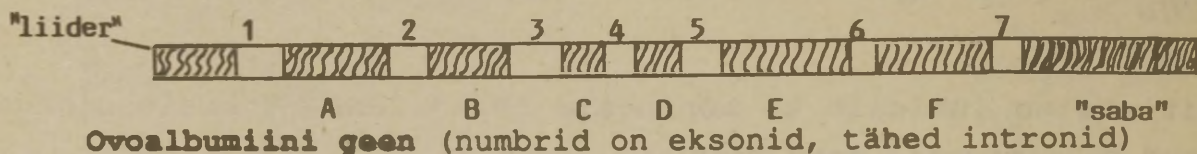
GEENID. DNA on geenide materiaalne kandja. Kuigi geeni mõiste on ajalooliselt mitmeti muutunud ("üks geen → üks ensüüm"; "üks geen → üks valk" jne.), peetakse nüüdisajal otstarbekaks kasutada mõistet "üks geen → üks polüpeptiidahel". Näit. Hb koosneb kahte tüüpi (α - ja β -tüüpi) polüpeptiidahelatest, mida mõlemat kodeerib erinev geen. Loomulikult on ülaltoodud geeni mõiste tinglik, kuna esinevad:

struktuursed geenid, mis kodeerivad RNA-sid ja polüpeptiide (s.t. struktuurseid süsteeme);

DNA regulatoorsed järjestused, millel pole kodeeriv vaid reguleeriv funktsioon. Neist osa määrab struktuursete geenide alguse ja lõpu, osa käivitavad/peatavad struktuursete geenide tegevuse; **geenide kattuvused** kromosoomis, s.t. üks ja sama järjestus DNA molekulis määrab ära rohkem kui ühe polüpeptiidahela; mõningad geenid esinevad arvukate funktsionaalsete koopiatena;

geenide mittetransleeruvad ja transleeruvad osad. Esimesi nim. **introniteks**, teisi **eksoniteks** (vt. skeem). Intronid katkestavad seega range kolineaarse vastavuse geeni osade ja selle geeni

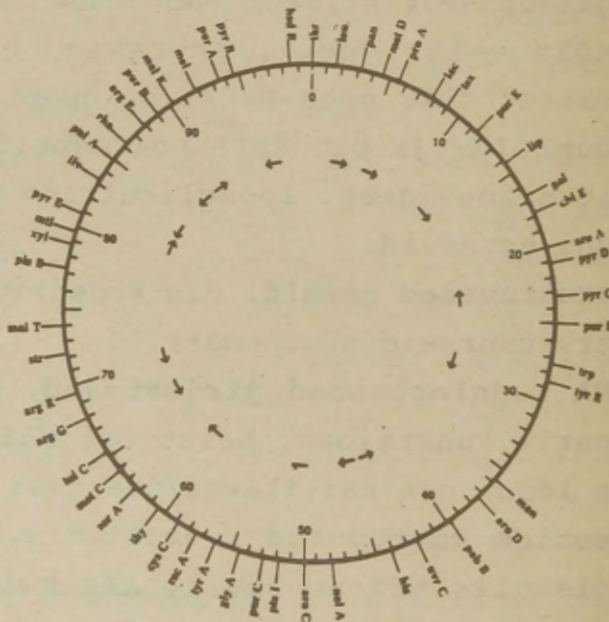
poolt kodeeritava polüpeptiidi AH-se järjestuse vahel. NB! Intronite summaarne pikkus ületab tunduvalt eksonite summaarse pikkuse. Intronite arv geenides varieerub (näit. kollageeni geenis on neid üle 50) ja nende funktsioon pole üheselt selge.



Geene on kromosoomis tuhandeid. Kui võtta keskmise geeni suurusks väga tinglikult 1000 nukleotiidipaari, siis näit. E.coli DNA sisaldab vähemalt üle 3000 geeni. Kui võtta nukleotiidipaari keskmiseks molekulmassiks 650, siis ühe E.coli keskmise geeni $M_r = 650\ 000$. Lisaksime üldistavaks illustratsiooniks E.coli kromosoomikaardi. Ringikujulise kaardi välisküljel on nende 52 geeni töönimetused, mille suhteline paigutus kromosoomis on teada. Numbrid (minutites) vastavad ajale, mis kulub kromosoomi ülekandeks emasrakku (vastavalt nooltega näidatud suundadele).

E.coli kromosoomikaart

(geen thr on aja tinglik algus)



FÜÜSIKO-KEEMILISED OMADUSED

Need omadused tulenevad eeskätt NH kõrgmolekulaarsusest ja struktuurist. NH iseloomustab: 1) lahuste happelisus, 2) lahuste kolloid-osmootsus ja spetsiifilised omadused, 3) lahuste kõrge

tihedus ja viskoossus, 4) denatureeruvus.

Happelisus. NH on polüaluselised happed, mis pH 7 juures on polüanioonid (fosfaatgruppide negatiivne laeng!). Seetõttu seovad nad katioone, polüamiine (spermiin, spermidiin). NB! Negatiivsete laengute ja histoonvalkude Arg- ja Lys-jääkide positiivsete laengute interaktsioon on nukleoproteiinide moodustumise aluseks.

Kolloid-osmootsus. Need omadused on tüüpilised kõrgmolekulaarsete biomolekulide lahustele (vt. valgud). NH omavad neeldumismaksimumi 260 nm juures. Võrreldes aga nukleotiidide neeldumismaksimumiga 260 nm juures, on NH oma oluliselt väiksem. Seda optilise tiheduse langust nim. **hüpokroomefektiks** ja see tuleneb DNA ja RNA struktuurset organisatsioonist ning G-C suurest hulgast molekulis (NB! 3 vesiniksidet).

Lahuste tihedus ja viskoossus. Kõrge M_r ja molekuli selge asümmeetria tingivad NH lahuste kõrge viskoossuse. DNA lahuse tihedus korreleerub paari G-C sisaldusega (3 vesiniksidet, s.t. mida suurem on selle paari sisaldus, seda kõrgem tihedus).

Denatureeruvus. DNA denaturatsioonil lõhustuvad vesinik- ja hüdrofoobsed sidemed ning biheeliks keerdub lahti üheaheelaliseks polünukleotiidseks struktuuriks. Denatureerivad ekstreemne pH (<3 ja >12), etüülpiiritus, ioonjõud, kõrge temperatuur (80-90°C) jt. DNA denaturatsioon on üldjoontes sarnane valkude denaturatsioonile. Erinevalt valkudest on aga DNA denaturatsioon **väga järsk** s.t. toimub kitsas temperatuuride vahemikus (80-90°) ning seda temperatuuride vahemikku nim. **sulamistemperatuuriks**. DNA natiivsuse kadumisega tõuseb hüppeliselt neeldumine 260 nm juures (**hüperkroomefekt**), mistõttu saab natiivsuse muutust sellel lainepikkusel tuvastada. Kui denaturatsioonil jääb DNA biheeliksist vähemalt 15 nukleotiidipaari sisaldav lõik komplementaarselt seotuks, saab füsioloogiliste optimaalsete tingimuste taastamisega esile kutsuda renaturatsiooni (taastub biheeliks). Kui biheeliksi ahelad on täiesti eraldunud, kulgeb **renaturatsioon** raskemini ja tal on tinglikult kaks etappi: esimeses aeglases etapis ahelate tekiavad juhuslike kokkupuudete käigus lühikesed komplementaarsed alad; teine etapp on väga kiire - ülejäänud N-aluste

paarid ühinevad järsult komplementaarsuse printsiibi alusel. Kui erinevate bioloogiliste liikide (inimene,hiir) DNA denatureerida, siis aga segada polünukleotiidahelad omavahel ning hoida 65° juures vajalik aeg, paarduvad erinevatest allikatest (hiir, inimene) DNA üksikud ahelad ulatuslikult. Tekivad nn. **hübriidsed** biheeliksid, kus üks ahel on hiire ja teine inimese DNA-st. Hübridiseerumine toimub nendes ahela osades, kus hiire ja inimese DNA üksikahelate nukleotiidijääkide järjestus on komplementaarne. Seda nim. **molekulaarseks hübriidisatsiooniks** ja see näitab NH-te **struktuurset homoloogiat** (sugulust). Näit. inimese DNA annab DNA-DNA hübriide hiire DNA-ga kergemini (liigiline lähedus), kui pärmide DNA-ga. Hübridisatsiooni kasutatakse korduvate nukleotiidijääkide järjestustega lõikude selgitamiseks antud DNA-s (neid on DNA-s tuhandeid). DNA-RNA-hübriidiseerimine lubab aga selgitada, kas see DNA on komplementaarne selle või teise RNA-ga.

NUKLEIINHAPPED JA VIIRUSED

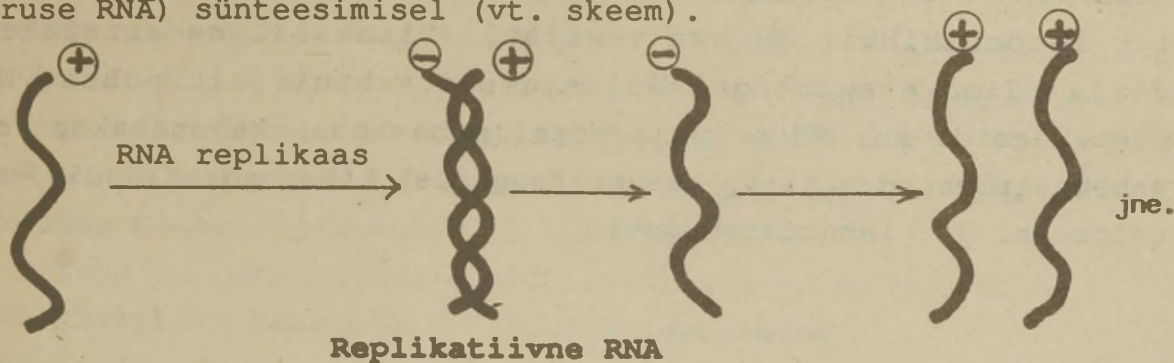
Kõigepealt pisut genosüsteemast. Nimelt, antud liigi ja konkreetse indiviidi DNA nukleotiidne koosseis ei muutu organismi kasvuga ja ei sõltu toitumisest. Teisisõnu, DNA omab liigilist spetsiifilisust. Seetõttu võib DNA nn. **spetsiifilisuse koefitsiendi** (ehk G+C/A+T) kasutada organismide geneetilises süsteemastikas (genosüsteemastika). Kuigi see koefitsient varieerub 0,35-2,70, on ta taksonoomiliselt lähedastel liikidel lähedane. Näit. mikroorganisme iseloomustab põhiliselt G-C tüüp, inimest ja ahvilisi aga A-T tüüp. Hübridisatsioon on samuti näidanud, et inimese ja simpansi DNA erinevad koostiselt vaid 2-4%.

Viirustele on iseloomulik: 1) NH sisaldus; 2) subühikutest (kapsomeeridest) koosnev valguline ümbris e. kapsiid; 3) parasitism -mitokondrite, ribosoomide puudumisel ei saa nad iseseisvalt eksisteerida/paljuneda. Viirusega nakatatud peremeesrakk sünteesib viiruse NH, mis sisaldab infot kapsiidi sünteesiks.

Viiruste liigendamine arvestab NH (DNA või RNA) sisaldust: **DNA-viirused** - bakteriofaagid (ϕ 174, jt.), loomade viirused (papilloomiviirus, herpeseviirus jt.);

RNA-viirused - HIV (e. human immunodeficiency virus) jt. ning taimede viirused (tubaka mosaiigiviirus jt.)

Viirustes, kus puudub DNA, täidab viiruse RNA vähemalt kahte funktsiooni: ta on nii geneetilise info kandja kui ka mRNA. Nimelt, viiruse RNA replitseerub RNA replikaasi toimel ning tekib talle komplementaarne ahel, s.t. tekib **RNA replikatiivne vorm**. Viimase uus ahel (tähistatakse \ominus) on matriitsiks algse RNA (viiruse RNA \oplus) sünteesimisel (vt. skeem).



Viiruste puhul on näidatud ka pöörduva transkriptaasi e. RNA-sõltuva DNA polümeraasi eksisteerimist. Viiruse RNA alusel sünteesitakse DNA, see lülitub peremeesraku kromosoomi ja kujutab endast matriitsi viiruse RNA järgnevaks sünteesiks. Sel viisil kasutatakse RNA-d (teatud vahevormide abil) geenide paljundamiseks. Ilmselt toimub selline protsess peale viiruste ka embrüonaalsetes rakkudes. Nähtust nim. geenide amplifikatsiooniks. Viiruste puhul kasutatakse ka terminit "onkoviirused". Onkoviirused (e. onkogeensed viirused) on viirused, mis võivad nakatatud peremeesrakke transformeerida vähirakkudeks. Nende viiruste DNA lülitub peremeesraku DNA-sse. Järgnevalt ta replitseerub koos peremeesraku DNA-ga. Kujunenud hübriidse viirusliku NH alusel sünteesitakse peremeesrakus onkoproteiine, mis indutseerivad rakkude pidurdamatut kasvu.

NH puhul kasutatakse ka mõistet "transduktsioon". Näit. bakteriofaag võib kahe bakteri järjestikulisel nakatamisel tükikese esimese bakteri DNA fragmenti üle kanda teise bakteri DNA-sse. Kanduvad üle uued pärilikud omadused.

Viiruste teema puhul tekib loomulikult küsimus ka arvutiviirustest. Sellel teemal peatume raamatu teises osas.

ISOLEERIMISE TÕÜPMENETLUS

NH isoleerimine on lihtsustatult järgmine. Biomaterjali homogeenaati töödeldakse fenooliga, milles sisaldub SDS või Na-salitsülaat. Fenool lõhub nukleoproteiinides ioonsidemed, SDS või Na-salitsülaat denatureerivad valgud. Denatureeritud valk difundeerub fenoolikihti, NH aga veekihti. Viimasest sadestatakse NH välja külma etanooliga. Nii saamegi suhteliselt puhtad NH-tepreparaadid. Kui NH on vaja edasi puhastada, kasutatakse ioonivahetuskromatograafiat, tsentrifuugimist tihedusgradiendis, elektroforeesi jt. lahutusmeetodeid.

ENSÜÜMID

MÕISTE

Aineid, millel on bioregulaatorne toime metaboolsetele protsessidele, nim. bioaktiivseteks. Tinglikult on nad kas endogeensed (organismis sünteesitud) - ensüümid, hormoonid või eksogeensed (seedetrakti kaudu omastatavad) - vitamiinid, mikroelemendid. **Ensüümid (E)** on bioaktiivsed, endogeensed, spetsiifilised liht- ja liitvalgud, mis on katalüsaatorid. Teisisõnu, elutegevuse aluseks olevate ainete muundumisprotsesside kiiruse ja suuna määravad **biokatalüsaatorid** e. ensüümid.

E-de uurimise ajalugu võib käsitleda kolme aspektina.

I Vitalistliku käärimisteooria likvideerimine

- 1783 Spallanzani - toidu lõhustumine maos on keemiline protsess
1814 Kirchof - nisuterades on tärklis suhkrustav amülaas
1837 Berzelius, - fermendid on käärimise (NB! gaasi eraldumisega protsess) katalüsaatorid. Võttis kasutusele mõiste "ferment" (lad.k. fermentum = käärollus, juuretis)
1853-65 Pasteur - pidas ekslikult identseks käärimise fermente ja terveid pärmirakke, nimetades viimaseid "organiseeritud fermentideks"
1850-70 Liebig - absolutiseeris käärimise keemilist külge: käärimine ei vaja mikroorganisme, s.t. on puhtalt keemiline nähtus
1878 Kühne - pani ette nimetada "organiseeritud fermente" lihtsalt fermentideks ja nn. "organiseerimata fermente" **ensüümideks** (kr.k. en = sees, zyme = pärm, s.t. enzyme = pärmirakus). Sisuliselt tekkis sel perioodil vitalistlik ensüümi ja fermendi vastandamine. Põhjus: puudus seletus, miks seedeensüümid on rakuvabad, aga käärimine vajab rakke (mikroorganisme)
1897 Buchner, E. - valmistas pärmirakkudest pärmimahla, mis oli võimeline kääritada. Järelikult, käärimine ei vaja mitte pärmirakku kui sellist, vaid pärmirakku koos temas olevate ensüümidega (likvideeris vitalistliku käärimisteooria). Seega: ensüüm ja ferment on sünonüümid. Maailmakirjandus eelistab terminit "ensüüm".

II Ensüümide toimemehhanismi uurimine

1843 Ostwald - fermendid on katalüsaatorid (NB! neil on ühisjooned anorgaaniliste katalüsaatoritega)

1894-98 Fischer - E ja substraat (S) sobivad nagu "lukk" ja "võti"

1913 Michaelis, Menten - ensüümreaktsioonis tekib vaheühend e. nn. ensüüm-substraatkompleks ES

1921 Warburg - S muundub E-mi aktiivtsentris

1952-64 Jacob, Monod - osadel E-l on ka regulatoorne tsenter

III Ensüümide keemilise loomuse selgitamine

1878 Traube ja 1909 Sørensen - oletasid, et E on valgud (vastavalt termoinaktivatsiooni ja pH mõju uurimiste alusel)

1900-10 Pavlov - seedeensüümid (trüpsiin) omavad inaktiivset eelühendit e. proensüümi (näit. trüpsinogeen)

1926 Sumner - sai esimese ensüümi (ureaas) kristallid, mis osutusid valguliseks (seega **E = valk**)

1957 Viland jt. - paljudel E-del esinevad molekulaarsed vormid e. isoensüümid

Nüüdisajaks tuntakse vähemalt 2700 E-mi. Kõik nad on valgud. Ensüümidel on keskne roll biomeditsiinis (ravimite toimemehhanismide väljaselgitamine, ensüümteraapia, ensüümdiagnostika, toitumise biokeemia ja füsioloogia, molekulaarsed haigused jne.).

NOMENKLATUUR JA KLASSIFIKATSIOON

Nomenklatuur. E nimetamise üldprintsip on järgmine: substraadi nimetus omandab lõpu **"-aas"**. Tavaliselt kasutatakse lihtsaid töönimetusi. Näit., substraadiks on sahharoos, E nimetus on sahharaas; tärklis (lad. k. "amylum") lõhustava ensüümi nimi on amülaas. Käibenimetus antakse enamasti aga siiski S ja katalüüsitava reaktsiooni tüübi järgi. Näit. laktaat + dehüdrogeenimine + aas = laktaadi dehüdrogenaas. Multiensüümkomplekside puhul kasutatakse lisandit kompleks (näit. püruvaadi dehüdrogenaasne kompleks). Töönimetusena lubatakse kasutada ka ajaloolisi nimetusi: pepsiin, trüpsiin, kumotrüpsiin jt.

Igale korrektset kindlaks tehtud E-le on Rahvusvaheline Nomenklatuurikomisjon andnud ka täpse, üheselt mõistetava süste-

maatilise nimetuse. Näit. laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) süste-
maatiline nimetus oleks: L-laktaat: NAD^+ -oksüdoreduktaas. L-lak-
taat oleks esimene S, NAD^+ (on koensüüm, sisuliselt ka teine
substraat). Oksüdoreduktaas viitab katalüüsitavale reaktsioonile.

Klassifikatsioon. Selle aluseks on katalüüsitavad reaktsioonid.

Klassi number **Katalüüsitavad reaktsioonid**
ja nimetus

- | | |
|---------------------|---|
| 1.Oksüdoreduktaasid | Redoksreaktsioonid (H^+ , e^- ülekanne) |
| 2.Transferaasid | Funktsionaalsete gruppide ülekanne |
| 3.Hüdrolaasid | Sidemete (v.a. C-C) hüdroolüüs vee liitmisega |
| 4.Lüaasid | Mittehüdroolüütiline sidemete C-C (aga ka C-O,
C-N ja C-S) lõhustumine, tihti kaasneb kak-
siksidemete teke või liitumine neile |
| 5.Isomeraasid | Isomerisatsioonireaktsioonid (funktsionaal-
sete rühmade molekulisisene ülekanne) |
| 6.Ligaasid | Sünteesireaktsioonid |

Iga üksiku E täpseks määratlemiseks on koostatud nende kuue
klassi põhjal rahvusvaheline nimestik (EC). See hõlmab nüüdis-
ajaks 2442 erinevat E, kusjuures igat E-mi tähistab neljanumbri-
line šiffer. Näit. on pepsiini šiffer EC 3.4.4.1. Number 3 viitab
hüdrolaaside klassile, 4 - kuulumist alaklassi, mis hüdroolüüsib
valkude peptiidsidemeid, järgmine 4 näitab ala-alaklassi, mis
lõhub neid peptiidsidemeid, mille moodustavad aromaatsed Ahd (ta
on endopeptidaas), 1 näitab aga pepsiini järjekorranumbrit ala-
alaklassis. EC on toodud iga E-mi töönimetus ja süstemaatiline
nimetus, katalüüsitav reaktsioon ning täiendavad märkused.

Oksüdoreduktaaside hulka kuuluvad **anaeroobsed dehüdrogenaasid** (H^+/e^- ülekanne mittehapnikulisele lõppaktseptorile: laktaadi dehüdrogenaas, alkoholi dehüdrogenaas jt.); **aeroobsed dehüdroge-
naasid e. oksüdaasid** (H^+/e^- ülekanne O_2 -le, s.t. substraadi
oksüdeerimine O_2 -ga: aminohapete oksüdaasid jt.); **tsütokroomid**
(ainult e^- ülekanne); **katalaasid,peroksüdaasid** (vesinikperoksiidi
lõhustumine). Kõik nimetatud E-mid on nii või teisiti olulised
bioloogilises oksüdatsioonis.

Transferaasid on funktsionaalseid gruppe ülekandvad E-d.

Metüültransferaasid ($-\text{CH}_3$ ülekanne), **aminotransferasid** ($-\text{NH}_2$ ülekanne) jne. Bioloogiliselt väga olulised on **fosfotransferasid** hulka kuuluvad kinaasid, mis enamasti katalüüsivad fosfaatjäägi ülekannet ATP-lt. See on väga oluline biomolekulide aktiveerimiseks. Näit. glükoos + ATP \rightarrow glükoos 6- P + ADP. Selles reaktsioonis glükokinaasi toimel tekivad glükoos 6- P on glükoosi aktiivne vorm, millena glükoos muutub metaboolset kasutatavaks.

Hüdrolaasid hulka kuuluvad põhiliselt estersidemeid (**lipaasid**, **koliinesteraasid** jt.), peptiidsidemeid (näit. seedeensüümid **trüpsiin**, **pepsiin** jt.), glükosiidsidemeid (**glükosidaasid**) lõhustavad ensüümid.

Lüaasid hulka kuuluvad **dekarboksülaasid** ($-\text{CO}_2$ eraldumine), **dehüdrataasid** (vee molekuli eemaldamine), **aldolaasid** (aldehüüdide teke sideme C-C lõhkumisega), **desaminaasid** ($-\text{NH}_2$ eraldamine), **hüdrataasid** (vee liitumine kaksiksidemele) jt.

Isomeraasid nimetused viitavad isomerisatsioonireaktsiooni variandile: **mutaasid**, **tautomeraasid** jne.

Ligaasid (nim. ka süntetaasid) on sünteesireaktsioonide E-mid (näit. glutamiini süntetaas).

ÜLD- JA ERIOMADUSED

Valkude ja katalüsaatoritena on ensüümidele iseloomulikud mõlemate üldomadused. **Valkudena** on E-mid: kõrgmolekulaarsed (M_r on näit. ribonukleaasil 13700, pepsiniil 32000, laktaadi dehüdrogenaasil 140000, püruvaadi dehüdrogenaasil kompleksil 4500000), hüdrofiilsed, amfoteersed polüelektrolüüdid, denatureeruvad ja kristalliseeruvad. **Katalüsaatorite üldomadused** (ei muuda reaktsiooni suunda, katalüüsivad vaid termodünaamiliselt võimalikke reaktsioone, ei muuda liikuva tasakaalu seisundit vaid kiirendavad selle saabumist, ei lõhustu reaktsioonikäigus jne.) kehtivad loomulikult ka E puhul. Toonitaksime siinkohal eriti seda, et katalüsaator (seega ka E) katalüüsib vaid termodünaamiliselt võimalikku reaktsiooni ja tema toime sisu seisneb reaktsiooni kiirust limiteeriva energeetilise barjääri alandamises. Lisagem, et reaktsiooni termodünaamilise võimalikkuse määrab reageerivate

ainete ja produkti(-de) energeetiline erinevus. Teisõnu, reaktsiooni energeetilise võimalikkuse määrab vaba energia muut (ΔG) ja see ei sõltu katalüsaatorist (vt. ka biokeemiliste reaktsioonide energeetika).

Ensüümidel (seega ka ensüümkatalüüsil) on tulenevalt E orgaanilisest loomusest rida **eriomadusi**:

1. Toime kõrge spetsiifilisus. Sisuliselt tuleneb see valgulisest loomusest ja seekaudu ensüümi aktiivtsentri ja substraadi ehituslikust ja elektrokeemilisest komplementaarsusest. Spetsiifilisus sisuliselt määrabki protsesside kulgemise vajalikus koordineerituses ja suunas, s.t. antud ühendi muundumise just antud metaboolses rajas ja antud hetkel, lähtudes organismi vajadustest. On ju muundumisvõimaluste hulk tegelikult tohutu.

Laias mõttes eristatakse :

substraadi spetsiifilisust, s.o. spetsiifilisus substraadi või substraatide suhtes. Näit. lipaasid katalüüsivad lipiidide lõhustumist, mitte aga süsivesikute või valkude lõhustumist;

reaktsioonispetsiifilisust - erinevad E-d katalüüsivad erinevaid reaktsioonitüüpe (hüdrolaasid - hüdrolüüsireaktsioone, ligaasid - sünteesireaktsioone); teisalt, erinevad E-d katalüüsivad ühe ja sama S erinevat muundumist (histidiini dekarboksülaas muundab His histamiiniks, histidaas aga urokaniinhappeks).

Kitsas mõttes eristatakse järgmisi spetsiifilisusi:

-absoluutne: E toimib sisuliselt vaid ühele S-le (näit. arginaas muundab Arg, kuid mitte metüülarginiini);

-stereokeemiline: E muundab substraadi ühte stereoisomeeri (näit. L-aminohappe oksüdaasid toimivad vaid L-AH-le). Lisagem, et ensüümsünteesid on stereospetsiifilised (ensüümid on ju valgud paljude asümmeetriliste tsentritega);

-sidemespetsiifilisus: näit. saharaas lõhub vaid glükoosijäägi ja fruktoosijäägi vahelist glükosiidsidet;

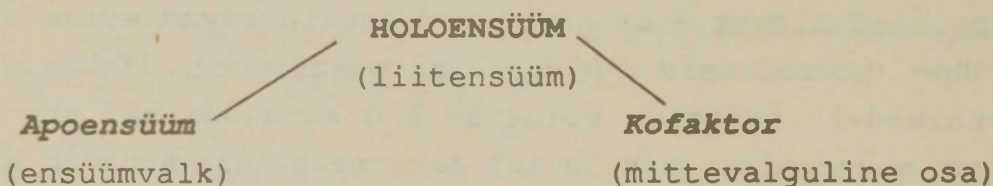
-rühmispetsiifilisus (suhteline spetsiifilisus): pepsiini toime on hüdrolüüsiv valkude peptiidsidemele(-gruppidele);

2. Katalüütilise aktiivsuse reguleeritavus. Organismi hetkevajadustest tulenevalt saab ensüümide katalüütilist aktiivsust, seega ka muundumisprotsesside kiirust, reguleerida.

3. Ülikõrge molekulaarne aktiivsus praktiliselt neutraalses keskkonnas ja madalal temperatuuril (37°). Näit. katalaasi üks molekul lõhub ≈ 5 miljonit H_2O_2 molekuli minutis. E on tavaliselt 10^5 - 10^6 korda aktiivsemad, kui anorgaanilised katalüsaatorid.
4. Ensüümreaktsioonide kulg ja suund elusorganismides on omavahel koordineeritud (vastavad E lokaliseeruvad vastavates raku osades, s.t. kompartmentides; ühe E produkt on teise E substraat jne.);
5. Ensüümide süntees on geneetilise kontrolli all.

EHITUS JA VITAMIINID

Ensüüme liigendatakse **liitensüümideks** (ühekomponendilised) ja **liitensüümideks** (kahekomponendilised, konjugeerunud). Liitensüümid on lihtvalgud (pepsiin, amülaas, ribonukleaas, aldolaas jt.). Liitensüümid, mis moodustavad E-de suurema osa, sisaldavad ka mittevalgulist osa. Nende ehituskeem on järgmine:



Apoensüüm määrab liitensüümi toime spetsiifilisuse (NB! valk), mängib põhirolli S sidumises ja potentseerib kofaktorit. Kofaktor stabiliseerib ensüümvalku, osaleb S sidumises ning vahetult ka katalüüsiprotsessis. Eraldi võetuna pole apoensüüm ja kofaktor katalüsaatori aktiivsusega (või on väheaktiivsed). Vaid nende kompleks töötab funktsionaalse ja struktuurse liitensüümina.

Kofaktor on üldmõiste. Ta hõlmab ioone ja anorgaanilisi ühendeid (Cl^- sülje amülaasile, Cu^{2+} tsütokroomi oksüdaasile, Mg^{2+} ja K^+ püruvaadi kinaasile, Mg^{2+} glükoosi kinaasile, HCl pepsiinile jne.) ning madalmolekulaarseid orgaanilisi ühendeid (koensüümid, $cAMP$ proteiini kinaasidele jne.). NB! Kuna **koensüümid** on kofaktorite arvukamad ja tüüpilisemad esindajad, siis tihti öeldakse, et liitensüüm koosneb ensüümvalgust (apoensüüm) ja koensüümist (**koensüümi sümbol on Co**).

Enamik koensüüme tuleneb **vitamiinidest**. Järelikult, vitamiinide bioloogiline roll realiseerubki liitensüümis Co või selle reaktiivse osa moodustamise kaudu. Sellest tulenevalt on õigustatud ensüümide üldehituse teema raames vitamiinide käsitlemine.

Vitamiinid.

Vitamiinide avastamise ajaloo olulisemad momendid.

1880 Lunin - teaduslike eksperimentidega (Tartu Ülikoolis) hiirtel näitas esimesena, et peale teiste toidukomponentide (süsivesikud, valgud, lipiidid, vesi ja mineraalained) on organismide elutegevuseks vajalikud veel mingid asendamatud ained.

1911 Funk - isoleeris riisikestadest preparaadi, millel oli raviv efekt beri-beri suhtes. Kuna see ühend sisaldas aminorühma, nimetas Funk teda "vitamiiniks" (lad.k. vita = elu; seega elu amiin). Kuigi mitmetes vitamiinides pole $-NH_2$, on termin säilunud.

1912 Hopkins, Funk - postuleerisid vitamiinide teooria: teatud spetsiifilised haigused (beri-beri, skorbuut, rahhiit) tekivad spetsiifiliste faktorite (vitamiinide) puudumisel toidus.

Vitamiinid on bioaktiivsed, heterogeensed, madalmolekulaarsed, valdavalt eksogeensed orgaanilised ained. Nad on liitensüümide ehituslik-funktsionaalsete osadena hädavajalikud ensüümkatalüüsis ja seeläbi ka organismi elutegevuses. Selgitagem vitamiinide määratluse märksõnu lähemalt. Bioaktiivsuse ja eksogeensuse mõisteid on eespool käsitletud. NB! vitamiinide puhul on eksogeensus teatud määral suhteline, kuna: 1) mõningaid vitamiine sünteesib inimese seedekanali mikrofloora kas osaliselt või piisavalt (näit. B_3 , B_5 , K jt.); 2) teatud vitamiini suudab inimorganism ka vajadusel ise sünteesida (näit. trüptofaanist sünteesitakse B_5); 3) kui toidus on piisavalt antud vitamiini eelühendit (**provitamiini**), suudab organism ennast ise vastava vitamiiniga varustada (näit. taimsetest karotinoididest sünteesitakse vitamiin A); 4) eksogeensuses on erinevused ka liigiti: näit. koer ja rott ei pea saama toiduga vitamiin C, inimene, merisiga ja ahv aga peavad.

Vitamiinid on toidu minoorsed komponendid, s.t. organism vajab neid ööpäevas väga väikestes kogustes - mikrogrammidest

kuni milligrammideni . **Põhiliselt vitamiiniallikad** inimorganismile on: **toit** (taimne toit annab valdava osa), **seedekanali mikrofloora tegevus**, sünteetilised **vitamiinpreparaadid**.

Vitamiinide puhul kasutatakse sageli määratlust asendamatud toidukomponendid. Tegelikult on siingi teatud suhtelisus. Näit. asendamatu AH, mida inimorganism ei sünteesi, ei peeta ju vitamiinideks. Vitamiinidest nad ka erinevad. Esiteks, inimene vajab neid suurel hulgal (grammides). Teiseks, neid kasutatakse rakus energiasubstraadidena ja tüüpiliste ehitusüksustena struktuuride ülesehitamisel.

Vitamiinide klassifikatsioon.

Nüüdisajal tuntakse üle 20 vitamiini. Neid tähistatakse ladina alfabeedi suurtähtedega. Rasvlahustuvate vitamiinide puhul tähistab üks ja sama täht tervet ühendite gruppi, millel on väga sarnane ehitus ja sama toime. Grupi üksikliiget nim. **vitameeriks** e. isoteeliks (näit. vitameer A₁, A₂ jne.).

Vitamiinide määratluse teatud suhtelisus ja nende ehituse heterogeensus on peamisteks põhjusteks, miks vitamiinide klassifikatsioon põhineb just lahustuvusel (vt. tabelit).

Vitamiinide klassifikatsioon, põhiterminoloogia, põhiallikad

Tähis Keemiline põhinimetus Olulisemad allikad

Rasvlahustuvad

A	retinoolid	kala- ja loomamaks, või, karotinoidid
D	kaltsiferoolid	kalarasv, munakollane, või, pärm
E	tokoferoolid	porgand, kapsas, taimsed õlid
K	naftokinoonid	kalasaadused, spinat, kapsas, herned
Q	ubikinoon (CoQ)	taimsed produktid
F	linool- ja linoleen- hape	taimsed õlid

Veeslahustuvad

B ₁	tiamiin	kuivpärm, kaerahelbed, tatratangud, täisteravilja saadused
B ₂	riboflaviin	maks, neerud, pärm, kaunviljad, spinat
B ₃	pantoteenhape	pärm, maks, piim, munad, kapsas, kartul, tomat
B ₄	koliin	liha, kroovimata jahust leib
B ₅ , (PP)	niatsiin, nikotiin- hape, nikotiinamiid	maks, pärm, kalasaadused, jäme nisu- jahu
B ₆	püridoksiin	maks, munakollane, porgand

B ₈	inosiit (müoinosiit)	neerud, süda, kartul
B ₁₀ , (B ₁₁)	foolhape	pärm, rohelised taimeosad, maks, neerud, liha
B ₁₂	kobalamiin (eriti (tsüanokobalamiin)	veri, maks, tailiha, juust, pärm, seened
B ₁₃	oroothape	loomsed produktid
B ₁₅	pangaamhape	paljudes loomsetes ja taimsetes produktides (eriti seemnetes)
B _T	karnitiin	lihasaadused
C	askorbiinhape	mustsõstra marjad, kibuvitsa marjad, kapsas, kartul, tsitruselised
H	biotiin	maks, neerud, piim, oad, tomat, munarebu
N	lipoehape	pärm, piim, liha
U	S-metüülmetioniin	kapsas
pAB	p-aminobensoehape	maks, piim, munad, pärm
P	bioflavonoidid	värsked puu- ja juurviljad

Vitamiinide defitsiidi põhjused. Hüpo- ja avitaminoosid.

Koensüümse rolli tõttu peab inimorganism vitamiine saama pidevalt (NB! E uuenevad). Veeslahustuvaid vitamiine peab inimorganism saama iga päev. Põhimõtteliselt kehtib see ka rasvlahustuvate vitamiinide kohta, ehkki rasvlahustuvuse tõttu deponeeruvad nende lühiajalised varud maksa. Vitamiinide defitsiidi põhjused on: esiteks, toitumuslik-olmelised - mittebalansseeritud toit, alkoholismist tulenevad imendumishäired. Teiseks, organismi teatud haiguslikud seisundid ja ravimid - deponeerumishäired maksas; sapphapete vähesust põhjustavad haigused mõjutavad rasvlahustuvate vitamiinide imendumist; maksahaiguste puhul häirub rasvlahustuvate vitamiinide talletumine ning vitamiin A biosüntees vastavast provitamiinist; soole mikrofloora kahjustused antibiootikumidega; ravimite toime võib mõjutada vitamiinide metabolismi (näit. mitmed tuberkuloosivastased ravimid tingivad B- grupi vitamiinide kõrgenenud vajaduse). Kolmandaks, füsioloogilised - mõningate vitamiinide kõrgenenud vajadus väikelastel ja rasedatel. Neljandaks, majanduslik-tehnoloogilised - toiduainete defitsiit ja ühekülgusus ning toiduainete vale töötlustehnoloogia.

Vitamiinide osalise defitsiidi korral tekivad hüpovitamiinoosid. NB! Need ei ole sisuliselt võttes vitamiini defitsiidile spetsiifilised seisundid. Nad ilmnevad sõltumata sellest, millist

vitamiini <u>ei</u> saaorganism piisavalt. Teisisõnu, need on üldisemat		
Füsioloogi-	Põhitoime(kohad)	Hüpo- ja <u>avitamiin</u>oos
ne nimetus		
antikse- roftalmi- line (A)	nägemisprotsess, kasvamine, dife- rentseerumine, (antioksidant)	nägemishäired hämaruses (kanapime- dus e. hemeraloopia), kuivsilmsus (<u>kseroftalmia</u>), naha <u>keratomalaat-</u> <u>sia, platsenta arengu häired</u>
antirah- hiitiline (D)	Ca ²⁺ metabo- lism, luude ja hammaste kaltsi- fikatsioon	<u>rahhiit</u> , kaltsiumi ja fosfori me- tabolismi häired, lihaste hüpotoo- nia (punnkõht), <u>osteomalaatsia</u> (luu- de pehmenemine)
antiste- riilne (E)	antioksidant	<u>spermatogeneesi häired</u> , <u>hemolüüti-</u> <u>line aneemia</u> , ülemäärane lipiidi- de peroksüdatsioon
antihemo- raagiline (K)	mitmete verehüü- bimisfaktorite süntees	<u>hüübimishäired</u> , <u>verevalumid</u>
(Q)	rakuhingamine	inimesel pole kirjeldatud
antikera- toosne (F)	naha epiteeli areng, lipiidide ja PG metabolism	follikulaarne <u>hüperkeratoos</u>
antineu- riitne (B ₁)	närvitegevus, SV metabolism	närvitegevuse häired (<u>beri-beri</u> e. polüneuriit), SV metabolismi häired
antistoma- tiitne, -glossiitne (B ₂)	redoksreaktsioo- nid	keele ja suu limaskesta põletikud (<u>stomatiit</u> , <u>glossiit</u>), valgusepel- gus (fotofoobia)
antiderma- tiitne (B ₃)	atsüüljääkide ülekanne (kogu metabolism)	<u>dermatiidid</u> , juuste depigmentat- atsioon, jalgades põletuse tunne (burning feet syndrom)
(B ₄)	lipiidide me- tabolism	inimesel pole kirjeldatud
anti- pellagri- line (B ₅)	redoksreaktsioo- nid	<u>pellagra</u> (naha sümmeetriline lai- gulisus, jäikus), aneemia, derma- tiidid
antiderma- tiitne (B ₆)	aminorühma üle- kanne	<u>krambid</u> , <u>dermatiidid</u>
antiskleroo- tiline (B ₈)	lipiidide meta- bolism	lipiidide metabolismi häired, juus- te väljalangemine

antianeemi- line (B ₁₀)	NH ja AH biosün- tees	suur-punalible <u>aneemia (megaloblastiline aneemia)</u>
antianeemi- line (B ₁₂)	CH ₃ - ülekanne (AH ja ketohape- metabolism)	<u>pernitsioosne</u> (pahaloomuline) ja megaloblastiline aneemia, neuropaa- tia
(B ₁₃)	nukleotiidide metabolism	inimesel pole kirjeldatud
antianoksi- line (B ₁₅)	CH ₃ - doonor	maksa <u>rasvinfiltratsioon</u>
(B _T)	rasvhappejääkide ülekanne	<u>lihaskoe düstroofia</u>
antiskor- buutne (C)	redoksprotsessid	<u>skorbuut</u>
antisebor- roiline (H)	karboksüülimis- reaktsioonid	spetsiifiline dermatiit (rasuvoo- lus = <u>seborröa</u>)
(N)	redoksprotsessid	inimesel pole kirjeldatud
antihaavan- diline (U)	CH ₃ - doonor	lipiidide metabolismi häired
(P)	kapillaaride seinu tugevdav	<u>verevalumid</u>
antibakte- riaalne (pAB)	foolhappe sün- tees soole mikrofloora poolt	<u>soole mikrofloora arenguhäired,</u> pigmentatsioonihäired

laadi nähud: väsimus, kehakaalu ja töövõime langus, vastuvõtlikkus nakkushaigustele, tihti ka peavalud, lihaste ja liigeste valulikkus, südamepekslemine jne. Avitamiinos (vt. tabel) on aga reeglina ühe konkreetse vitamiini kestval, täielikul puudumisel välja kujunev haigus. Näit. vitamiin C puhul skorbuut, B₁ puhul beri-beri jne. (vt. tabel).

Tekkepõhjustest tulenevalt võib hüpo- ja avitamiinose jagada kolme rühma: 1) alimentaarsed (toitumuslikud) - tekivad vitamiinivaese toidu puhul, alkoholismi korral (NB! B-grupi vitamiinide avitamiinosisid tekivad tegelikult suhteliselt harva ja eeskätt ongi nende põhjused alimentaarsed); 2) sekundaarsed - tulenevad vitamiinide metabolismi häiretest; 3) polühüpo- ja avitamiinosisid - esinevad harva, põhjuseks mitme vitamiini samaaegne defitsiit.

Vitamiinide praktiline kasutamine. Tooksime kõigepealt kaks üsna levinud arusaama. Esimene, vitamiinpreparaatide kasutamine on alati ja igati õigustatud nii profülaktilisest kui ka ravi aspektist mistahes häirete korral (töövõime langus, väsimus, lihaste valud jne.). Teine, vitamiinide kasutamine on lausa kahjulik, sest vähimgi ülehulk kahjustab oluliselt organismi. Mõlemad kategoorilis-mehhanistlikud arusaamad on tegelikult väga ühekülgsed ja näivusutavad. Vitamiinide praktilise kasutamise vajaduse hindamisel tasuks siiski arvesse võtta nüüdisajaks korrektselt tõestatud biokeemilis-füsioloogilisi baasteadmisi. Selgita-gem neist olulisemaid.

Esiteks, terve ning tasakaalustatud segatoitu tarbiv tervisliku eluviisiga inimene ei vaja täiendavaid vitamiinpreparaate. NB! See on **põhireegel**, mida tuleb alati arvestada. Nimelt, nende tingimuste olemasolul või ka taastamisel pole vitamiinidega probleeme. Teiseks, NB! põhireeglit iseloomustab aga ka dünaamilisus, s.t. reegli korrektne täitmine ei taga ju seda, et meie organism saaks mingis kindlas ajavahemikus täpselt võrdseid vitamiinide koguseid. Ometi ei tekita see häireid organismi talitluses. Miks? Nimelt seepärast, et organismis eksisteerivad vitamiinide lühiajalised varud (NB! need aga aitavad salvestada ka antud vitamiini ajutist liigset hulka). Rasvlahustuvate vitamiinide puhul on nendeks varudeks teatud depood, veeslahustuvate vitamiinide puhul võiks nendeks lugeda antud vitamiini kogust, mis on seotud transportvalkudega. Teisalt, konkreetse vitamiini hetkevajadus on tegelikult muutuv suurus, kuna ka liitensüümi hulk, mille koensüümsesse osasse antud vitamiin kuulub, sõltub organismi füsioloogilistest vajadustest. Seega, kui vitamiini satub toiduga või soole mikrofloora tegevuse tõttu organismi hetketi pisut rohkem, kui teda vajatakse, ei põhjusta see (eespoolnimetatud põhjustel) mingeid häireid inimorganismi talitluses. See kõik selgitabki, miks hüpervitaminoosid (nn. vitamiinsed intoksikatsioonid) esinevad ülimalt harva ja kestvate suurte dooside manustamise puhul. Nii näiteks on konkreetset tõestatud vaid vitamiin A võimalik hüpervitaminoos (luuvalud, naha sügelemine, limaskestade põletik) ja vitamiin B₆ puhul

sensoorne neuropaatia. Lisagem, et samal ajal on avitaminoosi täheldatud aga kõigi seni tuntud vitamiinide puhul. See on eelnevaga väga heas kooskõlas, kuna kõik senituntud vitamiinid on nii või teisiti vastavate liitensüümide ehituse ja funktsioneerimise hädavajalikud komponendid. See tähendab, et kui organism saab antud vitamiini pidevalt alla vajaliku miinimumkoguse, siis häirub vastav ensüümreaktsioon, mis üsna varsti väljendub konkreetsetes haiguspildis. Eelnevast tuleneb, et: a) vitamiinpreparaadi(-de) raviotstarbeline kasutamine on õigustatud väljakujunenud avitaminoosi efektiivseks likvideerimiseks; b) reeglina tuleks eelistada antud vitamiini koensüümset preparaati; c) avitaminoosi sümptomite kadumisel tuleks koheselt lõpetada kunstlike preparaatide kasutamine (NB! taastada normaalne seisund: normaalne toit jne., vt. ülaltoodud põhireeglit). Teisisõnu, vitamiine ei tohiks organism kestvalt saada üle tema koensüümse vajaduse, kuna sel juhul võivad ilmned vitamiinide mittespetsiifilised nn. koensüümivälised toimed metabolismile.

Summeerides ülaltoodu, võib postuleerida: vitamiinid on inimorganismi elutegevuseks (liitensüümide ehituseks-funktsioneerimiseks) hädavajalikud biomolekulid, mille kasutamine ravimitena tuleb kõne alla avitaminooside korral. Väga oluline on aga ka sel puhul: a) õigete dooside ja ravi kestvuse determineerimine; b) vitamiinide vastastikuste mõjustuste arvestamine (vt. allpool); c) avitaminoosi tekkepõhjuse kõrvaldamine (NB! enamasti tuleb arvestada ülaltoodud põhireeglit).

Vitamiinide vastastikune toime. Vitamiinide vastastikune toime avaldub järgmises: 1) üks vitamiin mõjutab teise(-ste) vitamiini(-de) katabolismi - näit. vitamiin F "kulutab" organismi antioksidatiivset potentsiaali, s.t. vitamiin F võib esile kutsuda vitamiin E defitsiidi; teisalt, vitamiin E takistab vitamiin A ja F peroksüdatsiooni, mistõttu nende tarve on väiksem; vitamiin B₂ suurendab B₅ ja B₆ katabolismi organismis; 2) üks vitamiin osaleb teise vitamiini koensüümse vormi tekkes - vitamiin C ja B₁₂ mõjutavad foolhappe muundumist koensüümiks; vitamiin B₂ koensüümised vormid on liitensüümides, mis katalüüsivad B₆ koensüümse vormi teket; 3) ühe ja sama protsessi mõjutamiseks on sa-

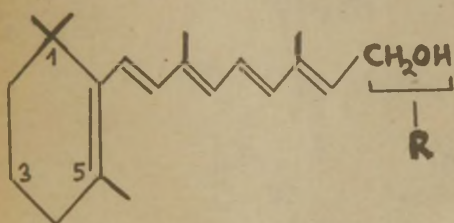
maaegselt vajalikud mitu vitamiini (sünergism) - näit. vitamiini C ja P koosvajadus kapillaaride seinte läbilaskvuse vähendamiseks; vitamiini A, B₂, B₆ ja B₅ vajalikkus rodopsiini moodustamiseks ja regeneratsiooniks.

Vitamiinide vajadus. Tabelis on toodud keskmised ööpäevased hulgad, mida organism vajab.

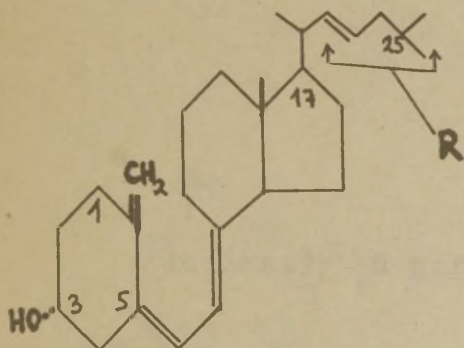
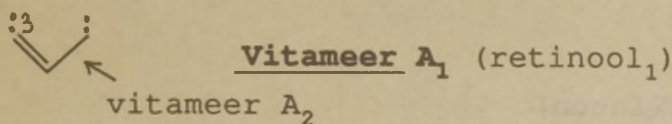
	Mees	Naine (mg)	Laps	Kommentaariid
A	3,3	2,7	1,4	Organism ka sünteesib teda β -karoteenist
D	0,005	0,005	0,010	
E	10	8	8	Tavaliselt lisavajadusi pole
K	0,4	0,4		Vajaduse rahuldab soolemikrofloora
F	9	7		
Q				Konkreetsset vajatavat kogust pole kirjeldatud
B ₁	1,2	1,0	0,5	
B ₂	1,5	1,5	0,5	
B ₃	4-7	4-7	2-5	Põhiosa annab soole mikrofloora
B ₄	350	310		Osaliselt toodab teda soole mikrofloora
B ₅	25	25	10	
B ₆	2,2	2,0	0,6	Sisulise vajaduse rahuldab soole mikrofloora
B ₈	1(?)			Konkreetsset vajatavat kogust pole kirjeldatud
B ₁₀	0,5	0,4		Sisulise vajaduse rahuldab soole mikrofloora
B ₁₂	0,020			Suures osas toodetakse soole mikrofloora poolt
B ₁₃				Konkreetsset vajatavat hulka pole kirjeldatud
B ₁₅				
B _T				Sünteesitakse organismis
C	75	65	35-45	
H	0,15	0,15	0,04	
N				Konkreetsset vajatavat hulka pole kirjeldatud
U				
P	30	25		
pAB				


Märkused. 1. Toodud keskmised väärtused sõltuvad loomulikult organismi seisundist (rasedus, alkoholism jne).

Vitamiinide valemid.



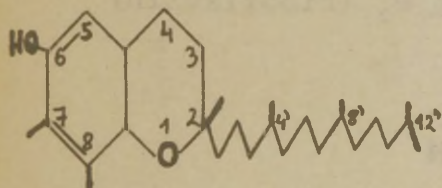
R= CHO = retinool
 R= COOH = retineenhape
 R= CH₂OOR₁ = retineenhappe-
 ester (näit.
 palmitiinhappega)



R=  = vitameer D₃
 (kolekaltsiferool)
 kui D₃ puhul on asendis 1
 ja 25 -OH saame 1 α ,25-
dihüdoksükolekaltsiferooli

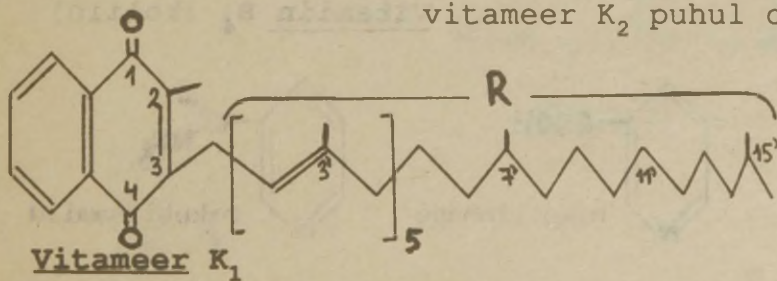
Vitameer D₂ (ergokaltsiferool)

β -tokoferool: asendis 7 pole CH₃
 γ -tokoferool: asendis 5 pole CH₃
 δ -tokoferool: asendites 5,8 pole CH₃
 kui külgahelas on asendites 3',7',
 11' kaksikside, on tegemist α -, β -
 γ ja δ -tokotrienoolidega

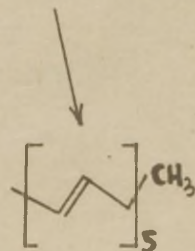


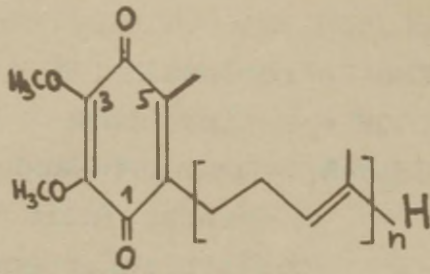
Vitamiin E (α - tokoferool)

R= H = vitameer K₃ (menadioon)
 vitameer K₂ puhul on R järgmine:



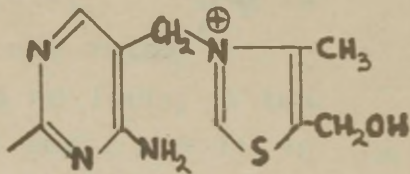
Vitameer K₁



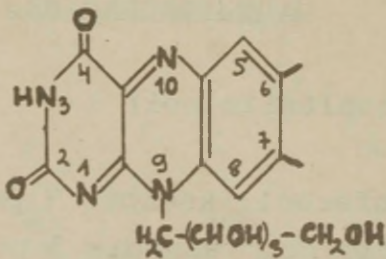


$n = 6-10$

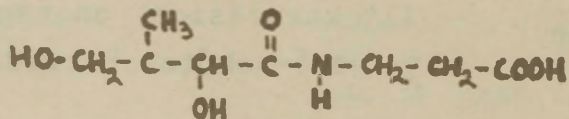
Vitamiin Q (ubikinoon)



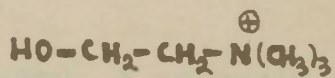
Vitamiin B₁ (tiamiin)



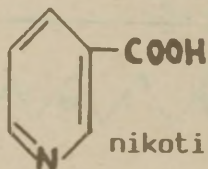
Vitamiin B₂ (riboflaviin)



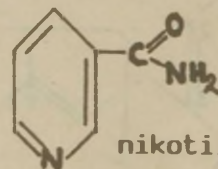
Vitamiin B₃ (pantoteenhape)



Vitamiin B₄ (koliin)

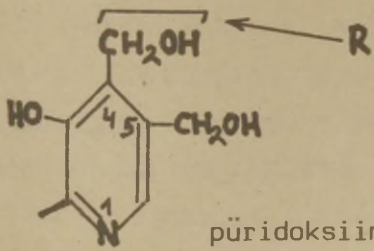


nikotiinhape



nikotiinamiid

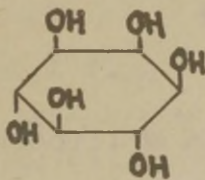
Vitamiin B₅



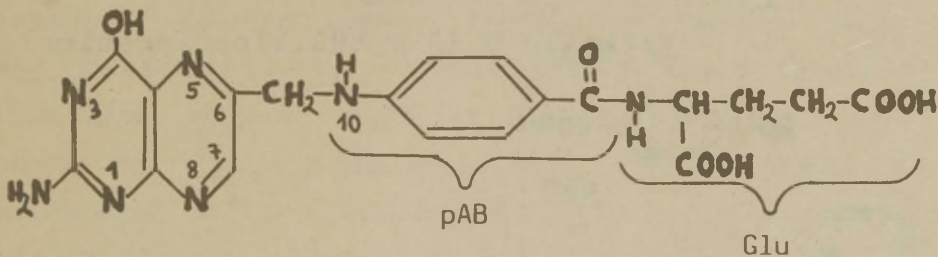
R = CHO = püridoksaal

R = CH₂NH₂ = püridoksamiin

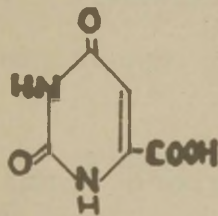
Vitamiin B₆



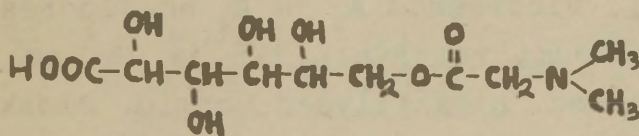
Vitamiin B₈ (müoinosiit)



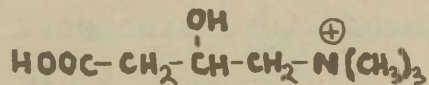
Vitamiin B₁₀ (foolhape)



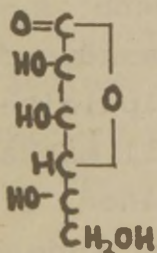
Vitamiin B₁₃ (oroothape)



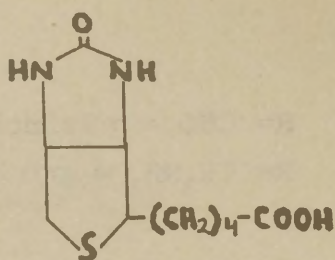
Vitamiin B₁₅ (pangaamhape)



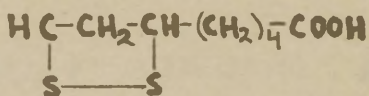
Vitamiin B_T (karnitiin)



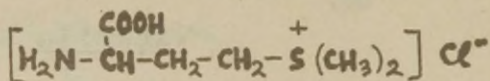
Vitamiin C (L-askorbiinhape)



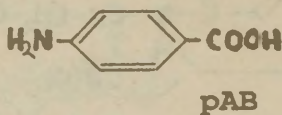
Vitamiin H (biotiin)



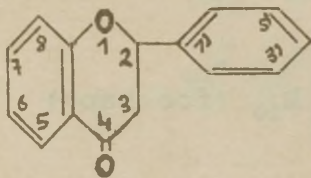
Vitamiin N (lipoehape)



Vitamiin U (S-metüülkloriidmetioniin)



pAB



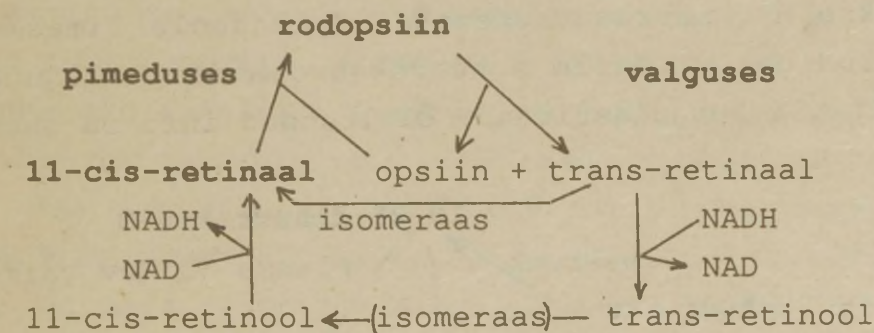
Flavoon (vitamiin P põhistruktuur)

Individuaalsed vitamiinid.

VITAMIIN A. Terminoloogia. Naturaalsed vormid on vitameer A₁ (retinool₁) ja vitameer A₂ (retinool₂ ehk 3-dihüdroretinool). Füüsiko-keemilisi omadusi. Vitameerid A₁ ja A₂ on fluorestseeruvad, omavad neeldumismaksimumi vastavalt 325 ja 351 nm juures. Nad pole optiliselt aktiivsed. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivsed on retinool, retinaal, retineenhape ja tema estrid (retinüülpalmiit ja retinüülatsetaat). Neis vormides on kaksiksidemed transasendis. Imendumine, transport ja metabolism. Taimsetest karotinoididest (provitamiinid) tekib soole mikrofloora karoteeni oksügenaasi toimel retinool (β-karoteen annab 2 A₁ molekuli, α- ja γ- karoteen aga ühe). Vitameer A₁ dehüdrogeenub A₂-ks. Vitamiin A imendumine vajab sapphapete osavõttu. Imendunud retinool esterifitseerub peensoole limaskestas (retinüülpalmiit, retinüülstearaat). Estrid viiakse külomikronite abil maksa, kus nad deponeeruvad. Osa estritest hüdroolüüsuvad ja retinool transportitakse retinoolsiduva valgu abil (α₁-globuliin) kudedesse. Osa retinooli oksüdeerub maksas üle retinaali retineenhappeks, mis

sisuliselt väljutatakse sapiga glükuroniididena. Silma võrkkesta "kepikestes" retinool oksüdeerub retinaaliks (vt. allpool). Biofunktsioonid. Retinool ja tema derivaadid (retinaal, retineen-happe estrid) on vajalikud: a) embrüo ja noororganismi rakkude normaalseks arenguks/ diferentseerumiseks; b) kõhre ja luukoe arengu regulatsioonis; c) platsenta ja spermatoosoidide arengus; d) limaskestade ning naha epiteeli arengus; d) nägemise fotokeemilises protsessis.

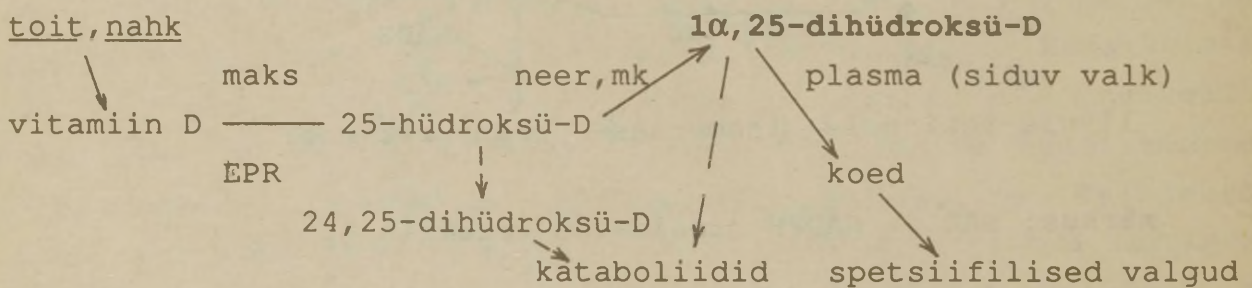
Vitamiin A osaleb nägemise fotokeemilises protsessis retinaalina. Retinaal moodustab nimelt **nägemispurpuri rodopsiini** (lipoproteiin) **vitamiinse** komponendi. Üldjoontes toimub silma võrkkestas järgmine protsess. Rodopsiin neelab valguskvante, mis põhjustab 11-cis-retinaali fotoisomeerumise trans-retinaaliks. Sellega kaasub rodopsiini dissotsiatsioon opsiiniks ja trans-retinaaliks, mis on aluseks valgusenergia transformeerumisprotsessile nägemisfunktsioonis (fotoretseptioon). Nägemisfunktsiooniks on vajalik rodopsiini, s.t. ka tema aktiivse vormi (sisaldab 11-cis-retinaali) taastumine. Viimane võib toimuda isomeraasi abil trans-retinaalist või 11-cis-retinoolist alkoholi dehüdrogenaasi (NB! vajab vitamiin B₅) toimetel (vt.skeem).



märkus: NAD ja NADPH sisaldavad vitamiin B₅

Rodopsiini taastumine ja ka 11-cis-retinaali teke toimub põhiliselt pimeduses. Vitamiin A defitsiidi korral, kui on rodopsiini teke aeglustunud, kujuneb välja nn. kanapimedus. Meditiinilised preparaadid. Tuntumad on sünteetilised retinüülatsetaat ja retinüülpalmitaat.

VITAMIIN D. Terminoloogia. Eristatakse põhilisi vitameere D_2 (ergokaltsiferool) ja D_3 (kolekaltsiferool). Vitameerid D_4, D_5, D_6, D_7 moodustuvad ultraviolettkiirguse toimel taimsetest eelühenditest (ergosteroolidest). Füüsiko-keemilisi omadusi. Vitameerid D_2 ja D_3 on suhteliselt stabiilsed oksüdatsiooni suhtes. Nende neeldumismaksimum heksaanis on 264,5 nm. Bioaktiivsed vormid. Vitameer D_2 tekib taimsest provitamiinist ergosteroolist ja D_3 nahas olevast provitamiinist 7-dehüdrokolesteroolist u/v-kiirguse toimel. Esialgselt pakutud vitameer D_1 osutus hiljem teiste vitameeride (D_2 ja D_3) seguks. NB! D_2 ja D_3 pole sisuliselt veel hormonaalselt aktiivsed (vt.allpool). Imendumine, transport ja metabolism. Imendumine sõltub sapphapetest ja pankrease funktsioneerimisest. Imendunud vitamiin D transporditakse külomikronites maksa. Maksarakkude EPR-s toimub oksüdeerumine vastavateks vitamiin D vormideks e. 25-hüdrosü-D. Selline oksüdatsioon toimub hapniku, NADH (NB! vitamiin B_5) ja kaltsiferooli 25-hüdrosülaasi toimel. D_2 oksüdeerub 25-hüdrosü-ergokaltsiferooliks ja D_3 25-hüdrosükolekaltsiferooliks. 25-hüdrosü-D transporditakse kaltsiferoolsiduva valgu abil (α -globuliin) neerudesse, kus neist tekivad vastava 1-hüdrosülaasi toimel hormonaalse aktiivsusega $1\alpha,25$ -dihüdrosükaltsiferoolid. Viimased viiakse nn. märklaudkudedesse (peensoole limaskest ja luukude). Teatud osa vitamiin D hüdrosüvormidest väljutatakse kas muutumatu või konjugaatidena. Ülaltoodud info on summeeritud skeemil.



Biofunktsioonid. Neerudes tekkivad $1\alpha,25$ -dihüdrosü-D seostuvad spetsiifilise vitamiin D-siduva valguga ja transporditakse põhilistesse märklaudkudedesse: luukude ja peensoole limaskest. Luukoes nad mobiliseerivad Ca^{2+} luukoest. Peensoole limaskestas seostub $1\alpha,25$ -dihüdrosü-D tsütoplasmas oleva retseptorvalguga.

Lülitub sisse sündmuste ahel, mis viib NH mõjutamisele ning spetsiifilise kaltsiumsiduva valgu sünteesile. See valk kergendab Ca^{2+} difusiooni (s.t. imendumist) **peensoolest**. Oletatakse, et selles Ca^{2+} imendumises osalevad ka Ca-ATPaas, Na^+ , parathormoon ja kaltsitoniin. $1\alpha,25$ -dihüdroksü-D toimib ka **neerudes**, reguleerides kaltsiumi ja fosfori reabsorptsiooni neerukanalites. Eelnevast selgub, et rahhiit on tingitud väga erinevatest põhjustest nagu: vitamiin D puudumine toidus, imendumishäired peensooles, neerude haigestumine. Rahhiidi allumatus vitamiin D ravile on tihti põhjustatud neerude võimetusest sünteesida vajalikul määral $1\alpha,25$ -dihüdroksü-D. Viimast on sel juhul vaja viia organismi. Meditiinilised preparaadid. Levinumad on kalamaksa õli ja sünteetlised preparaadid (D_2 ja D_3). Nüüdisajal ka 25-hüdroksü-D. NB! Vajalikud on samaaegne fosfaatide tarbimine, et märklaudkudedes ei tekiks $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$ tõusu.

VITAMIIN E. Terminoloogia. Termin vitamiin E hõlmab mitmeid tokoferoole ja tokotrienoole. Tsentraalne on α -tokoferool, mida tavaliselt samastataksegi vitamiin E-ga. Füüsiko-keemilisi omadusi. Vitameerid E õlilahused on kollase varjundiga vedelikud, mis on labiilsed hapniku ja u/v-kiirguse suhtes. α -tokoferooli neeldumismaksimum on 294 nm. Bioaktiivsed vormid. Kõik vitameerid E on bioaktiivsed, kuid aktiivseim on α -tokoferool. Imendumine, transport ja metabolism. Vitamiin E imendub koos teiste lipiididega sapphapete osavõtul. Peensoolest imendununa satub ta verre, lülitub külomikronitesse ning väga madala tihedusega lipoproteiinidesse. Osa vitamiin E salvestub rasvkoe ja maksa rakkudes. Teda esineb ka teistes kudedes. Osa vitamiin E-st lülitub plasma-membraani ja vere lipoproteiinidesse. Vereplasma lipoproteiinide ja erütrotsütaarmembraani lipoproteiinide vahel toimub kiire α -tokoferooli vahetus. Imendumata jäänud vitamiin E väljutatakse. Tema katabolismi produktid väljutatakse uriiniga glükuroniididena. Biofunktsioonid. Vitamiin E on **antioksidant**, s.t. ta pärsib biomembraanide lipiidides olevate küllastumata rasvhapete peroksüdeerumist (nim. lipiidide peroksüdatsiooniks). Seega kaitseb ta biomembraanide ehituslik-funktsionaalset homöostaasi. Vitamiin E kopereerub selles kaitsefunktsioonis askorbiin-

happega ja seleeniga (viimane on peroksüdatsiooni pidurdava glutatiooni peroksüdaasi kofaktoriks). Vitamiin E kaitseb ka vitamiin A küllastumata külgahelat peroksüdatsiooni eest, s.t. tõstab tema bioaktiivsust ja ladestumist maksas. Meditiinilised preparaadid. Levinuimad ravimpreparaadid on sünteetiline α -tokoferoolatsetaat õlilahuses ja tokoferoolide õliekstraktide segud.

VITAMIIN K. Terminoloogia. Vitameeri K_1 nim. füllokinooniks, K_2 aga menakinooniks. Vitamiin K kannab ka antihemorraagilise vitamiini nimetust. Sünteetilistest derivaatidest on tuntum vitameer K_3 (menadioon) ja tema derivaadid. Füüsiko-keemilisi omadusi. Vitamiin K on tundlik u/v-kiirgusele. Bioaktiivsed vormid. K_2 bioaktiivsus on umbes kaks korda kõrgem kui K_1 . K_3 ja K_1 aktiivsus on sisuliselt võrdne. Imendumine, transport ja metabolism. Vitamiin K imendumine peensooles toimub sapphapete ja pankrease lipaasi osavõtul. Imendunud K_1 ja K_2 transporditakse külomikronites maksa. Vitamiin K transporditakse kudedesse ilmselt mingi spetsiifilise valgu (lipoproteiini) abil. Vitamiin K ladesub maksa, põrna ning südame- ja skeletilihastesse. Enamik taimseid ja soole mikrofloora naftokinoone muundub organismis vitameeriks K_2 . Vitamiin K kataboliidid väljutatakse sulfaatide ja glükuroniididena. Biofunktsioonid. Vitamiin K on oluline verehüübimisfaktorite (II, VII, IX, X) sünteesis maksas. Ta stimuleerib protrombiinis glutamiinhappejäägi γ -karboksüülimist. See muudab protrombiini Ca^{2+} siduvaks, mille järgselt protrombiin läheb üle trombiiniks. Trombiin on põhiline faktor fibriinkämbu moodustumises (veri hüübib). Vitamiin K on vajalik ka γ -karboksüülglutamüüli sisaldava valgu tekkes luukoes. See luukoe valk (osteokaltsiin) võib osaleda mineralisatsioonis. Selle valgu sünteesi reguleerib $1\alpha,25$ -dihüdrosü-D₃. Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on K_1 preparaadid ja K_3 analoog vikasool.

VITAMIIN F. Terminoloogia. Vitamiin F on linool- ja linoleenhappe segu. Füüsiko-keemilisi omadusi. Nad on vedelad polüküllastamata rasvhapped, mis alluvad kergesti oksüdeerumisele. Imendumine, transport ja metabolism. Vitamiin F imendub peensoolest ja transporditakse külomikronites maksani, sealt kõikidesse organitesse.

Biofunktsioonid. Vitamiin F on vajalik prostaglandiinide sünteesiks, ta alandab vere kolesterooli taset ja soodustab vitamiin B₆ sünteesi. Vitamiin F peroksüdatsiooni kaitseb α -tokoferool. Meditiinilised preparaadid. Levinuim on linetool.

VITAMIIN Q. Terminoloogia. Kasutatakse ka nimetusi ubikinoon ja koensüüm Q. Füüsiko-keemilisi omadusi. Kinoonina on ta võimeline osalema redoksreaktsioonides. Imendumine, transport ja metabolism. Kuna vitamiin Q sünteesitakse inimorganismis mevaloonhapest ja Phe ning Tyr metaboliitidest, siis tema konkreetset vajadust pole kirjeldatud. Siiski on täheldatud tema vajaduse kasvu mõningate aneemiatega, lihaste düstroofia ja müokardi kontraktsioonihäirete korral. Vitamiin Q lokaliseerub peamiselt mitokondrite sisemembraanis. kuid teda on leitud ka EPR-s ja tuumas. Biofunktsioonid. Vitamiin Q on rakuhingamist tagavate süsteemide hulgas kesksel kohal (vt. koensüümid).

VITAMIIN B₁. Terminoloogia Nimetus tiamiin viitab S ja -NH₂ sisaldusele. Käibel on ka nimetus aneuriin. Füüsiko-keemilisi omadusi. Tiamiin on termolabiilne. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivseim vorm on tiamiindifosfaat e. TPP (vt. koensüümid). Teatud bioaktiivsus on ka tiamiinmonofosfaadil ja -trifosfaadil. Imendumine, transport ja metabolism. Tiamiini imendumine peensoolest on ilmselt kandja-vahendatud aktiivne protsess. Imendunud tiamiin läheb varataveeni kaudu maksa, kus osa tiamiini fosforüülub TPP-ks (tekib ka mono- ja trifosfaate). Osa tiamiinist transporditakse maksast kudedesse ja fosforüülub seal. Ligikaudselt võetuna on tiamiin organismis 80% TPP-na, 10% trifosfaadina ja 10% moodustab vaba tiamiin pluss monofosfaat. Seejuures on vaba tiamiin põhiliselt veres, TPP aga rakkudes. Umbes 50% TPP sisaldub skeletilihastes, umbes 40% langeb maksa, südamelihase, neerude ja ajukoe arvele. Vitamiin B₁ väljub organismist nii vaba tiamiinina kui ka viimase mitmete kataboliitidena. Biofunktsioonid. TPP on koensüümiks kesksetesse ensüümkompleksidesse (püruvaadi dehüdrogenaasne kompleks, α -ketoglutaradi dehüdrogenaasne kompleks) kuuluvates ensüümides. Lisagem, et erütrotsüütide transketolaasi aktiivsust loetakse tiamiini funtsionaalse taseme peegeldajaks. B₁ puudus tingib ka mao limaskestast transketolaasi aktiiv-

suse languse ja NADPH taseme languse. Seeläbi häirub näit. ka HCl teke ja sekretsioon. Meditiinilised preparaadid Levinuimad on tiamiini ja TPP preparaadid. Viimast nim. kokarboksülaasiks. Kuna TPP veres üsna kiiresti hüdrolüüsub, pole selge kas B₁ koensüümne ravimvorm rakkudesse satubki või on ta ainult vaba tiamiini allikaks.

VITAMIIN B₂. Terminoloogia. Kasutatakse ka nimetusi riboflaviin ja laktoflaviin (viitab piimale). Füüsiko-keemilisi omadusi. Riboflaviin on redutseeriv-oksüdeeriv ja fluorestseeruv. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivsed on riboflaviini koensüümsed vormid, s.t. FMN ja FAD (vt. koensüümid). Imendumine, transport ja metabolism. Toidus on riboflaviin valdavalt valguga seotud FMN ja FAD vormis. Seedeensüümide toimele vabaneb riboflaviin, mis imendub peensoolest (sapphapped soodustavad imendumist). Koerakkudes fosforüülub riboflaviin ATP-ga FMN-ks, millest ATP toimele tekib FAD. FMN ja FAD teket stimuleerivad kilpnäärme hormoonid. FMN ja FAD on dehüdrogenaaside koensüümid (teatud ensüümides seostub FAD ensüümvalguga kovalentselt, näit. suktsinaadi dehüdrogenaasis). Flavoproteiinide uuenemisel vabaneb riboflaviin ja selle kataboliidid väljutatakse uriini ja fekaalidega. Biofunktsioonid. Riboflaviini biofunktsioonid realiseeruvad koensüümide (FMN, FAD) rollina flaviinsetes dehüdrogenaasides (vt. koensüümid). Need ensüümid kuuluvad raku hingamise kesksete ensüümide hulka. Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on FMN preparaat ja flavinaat (FAD preparaat) ning riboflaviin (mitmete ravimvormidena).

VITAMIIN B₃. Terminoloogia. Kasutatakse ka nimetust pantoteenhape (pantothen=kõikjal olev). Füüsiko-keemilisi omadusi. Pantoteenhape on termolabiilne ühend. NB! Tema keemilisse koostisse kuulub β-alaniin. Pantoteenhape annab Na- ja Ca-sooli (Ca-pantotenaat). Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivsed on B₃ koensüümsed vormid (vt. allpool). Imendumine, transport ja metabolism. Enamik pantoteenhapet satub organismi toidus oleva koensüüm A koostises. Viimane hüdrolüüsub peensooles ning vaba pantoteenhape imendub. Koerakkudes toimub pantoteenhapest koensüümsete vormide (4-fosfopantoteiini → difosfokoensüüm A → koensüüm A) süntees. Tsentraalne vorm on koensüüm A (sisaldab umbes 80% loomorganismi kudedes

olevast pantoteenhapest). Koensüümsete vormide peamine katabooliit on vaba pantoteenhape, mis valdavalt eraldub uriiniga. Biofunktsioonid. Pantoteenhappe biofunktsioonide tähtsusele viitab juba see, et ta kuulub raku tsentraalse koensüümi (koensüüm A) ehitusse (vt. koensüümid). Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on Ca-pantotenaat, pantetiin ja koensüüm A.

VITAMIIN B₄. Terminoloogia. Nimetatakse ka koliiniks. Füüsiko-keemilisi omadusi. Koliin on värvitu vedelik, mis lahustub hästi vees. Ta on metüleeritud aminoetüülalkohol. Bioaktiivsed vormid. Bioloogiliselt on tähtsaim fosfokoliin, mis on oluline mitmetes sünteesides. Imendumine, transport ja metabolism. Koliin imendub peensoolest aktiivse transpordi abil. Enterotsütide membraanides ta fosforüülub fosfokoliiniks ja kasutatakse fosfolipiidide (fosfatidüülkoliinide) sünteesiks. Koliini transpordivad vere lipoproteiinid. Kudedesse satuvad fosfokoliin ja vähesel määral ka koliin. Mõlemad lülituvad metabolismi. Biofunktsioonid. Koliini saab inimorganism toiduga, seedetrakti mikrofloora toodanguna ja organismis toimuvast sünteesist. Koliin on vajalik teatud fosfolipiidide ja väga tähtsa neuromediaatori asetüülkoliini sünteesiks. Koliin on ka oluline -CH₃ doonor transmetüleerimisreaktsioonides. Meditiinilised preparaadid. Levinuim on koliinkloriidi preparaat, mida kasutatakse hepatiidi ja maksa tsirroosi ravimisel.

VITAMIIN B₅. Terminoloogia. Kasutatakse nimetusi niatsiin, nikotiinamiid, nikotiinhape, vitamiin PP (it.k. preventive pellagra = pellagrat vältiv). Füüsiko-keemilisi omadusi. Niatsiin on redoksomadustega koensüümide NAD ja NADP reaktiivne osa. Nende koensüümide redutseeritud vormid (NADH ja NADPH) omavad neeldumismaksimumi 339 nm juures. Bioaktiivsed vormid. Kesksed bioaktiivsed vormid on ülalnimetatud koensüümsed vormid (vt. koensüümid). Imendumine, transport ja metabolism. Toiduga saadud NAD ja NADP hüdrolyüsuvad seedetraktis ning vabanev nikotiinhape või nikotiinamiid imenduvad põhiliselt lihtsa difusiooni abil. Imendunud nikotiinhape ja nikotiinamiid viiakse verrega kudedesse. Koerakkudes nad osalevad NAD ja NADP sünteesis. Kui organismi satub liigselt niatsiini, eraldub uriiniga nikotiinhapet. B₅

kataboliidid on glükuroniidid ja metüülitud produktid. Antud vitamiini sünteesib ka inimorganism Trp baasil. Umbes 60 Trp molekuli kohta moodustub üks nikotiinamiidi molekul. Seetõttu Trp rikkad produktid (piim, munad) kõrvaldavad vitamiin B₃ vajaduse. Biofunktsioonid. B₃ biofunktsioonid on seotud tema koensüümsete vormidega (vt. koensüümid). Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on nikotiinhape ja nikotiinamiid.

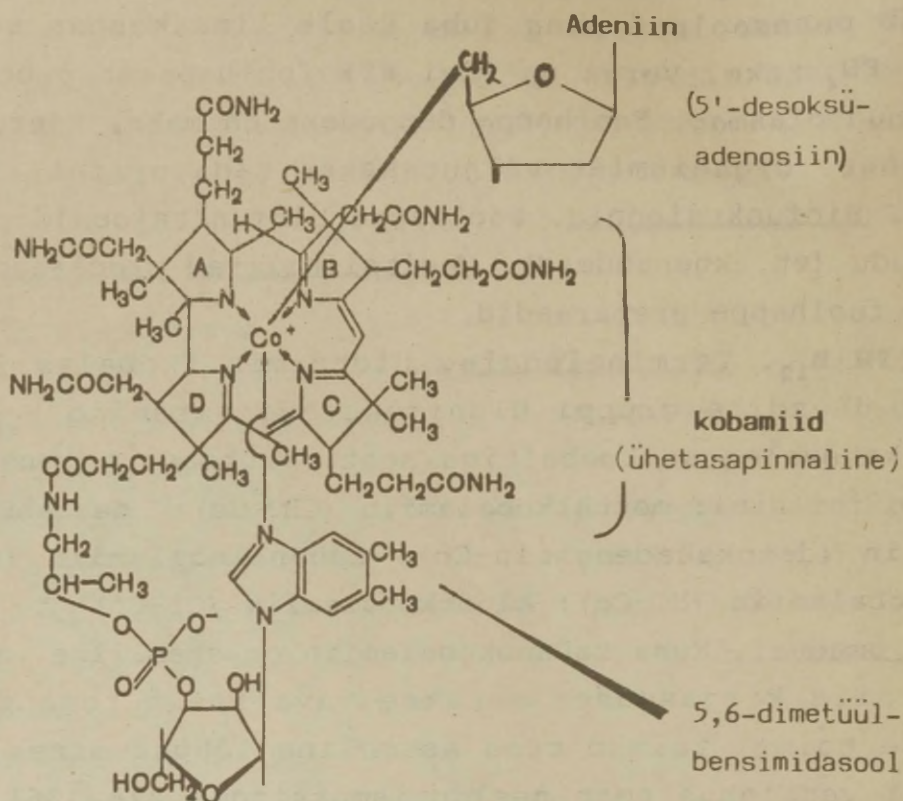
VITAMIIN B₆. Terminoloogia. Kasutatakse termineid püridoksiin, püridoksamiin ja püridoksaal. Füüsiko-keemilisi omadusi. B₆ laguneb valguse käes ning aldehüüdrühma reaktiivsus kaob kuumutamisel. Bioaktiivsed vormid. Vitamiinse aktiivsusega on kõik vormid. Sisuliselt võib neid nimetada vitameerideks. Imendumine, transport ja metabolism. Kõik vitamiin B₆ vabad vormid imenduvad peensoolest lihtsa difusiooni abil. Fosforüülnud vormid defosforüüluvad eelnevalt seedetraktis. Püridoksiin transporditakse verrega kudedesse, kus ta muundub koensüümideks: püridoksaalfosfaat ja püridoksamiinfosfaat. Vitamiin B₆ põhikataboliit on 4-püridoksüülhape, mis väljutatakse uriiniga. Biofunktsioonid. B₆ biofunktsioonid on seotud tema koensüümse vormiga (vt. koensüümid). Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on püridoksaalfosfaadi ja püridoksiini preparaat.

VITAMIIN B₉. Terminoloogia. Kasutatakse nimetusi inosiit, mü- inosiit ja inositol. Füüsiko-keemilisi omadusi. B₉ on optiliselt aktiivne. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivne on inosiit ja tema fosforüülitud derivaadid. Imendumine, transport ja metabolism. Inosiit imendub peensoolest. Kudedes võib ta esineda inosiidina ja inositolfosfaatidena. Inosiidi oksüdeerumisel saab tekkida ka glükuroonhape. Biofunktsioonid. Inosiit on vajalik fosfolipiidide e. fosfatidüülinositiidide sünteesil. Inositolfosfaadid on olulised sekundaarsete vahendajatena (vt. hormoonid). Meditiinilised preparaadid. Tuntuim on inosiidi preparaat.

VITAMIIN B₁₂. Terminoloogia. Kasutatakse nimetusi foolhape (lad.k. folium = leht; rohkesti taime lehtedes), folatsiin, pteroüülglutamiinhape. Füüsiko-keemilisi omadusi. Foolhape laguneb valguse toimel ja lahustub halvasti külmas vees. Bioaktiivsed vormid. Foolhappe keskne vorm on koensüümne vorm tetrahüdro-

foolhape e. FH_4 . Imendumine, transport ja metabolism. Foolhape imendub peensoolest ning juba soole limaskestas toimub teatud määral FH_4 teke. Veres on ligi 85% foolhapest erütrotsüütides, ülejäänud plasmas. Foolhappe depoodeks on maks, neerud, peensoole limaskest. Organismist väljutatakse teda uriini, fekaalide ja higiga. Biofunktsioonid. Foolhappe biofunktsioonid realiseeruvad FH_4 kaudu (vt. koensüümid). Meditiinilised preparaadid. Levinuid on foolhappe preparaadid.

VITAMIIN B_{12} . Terminoloogia. Üldtermin "kobalamiinid" hõlmab tervet ühendite gruppi üldnimetusega vitamiin B_{12} . Molekulis oleva kahevalentse koobaltiga seotud rühmast tuleneb konkreetse kobalamiini nimi: **metüülkobalamiin** ($\text{CH}_3\text{-Co}$); **desoksüadenosiinkobalamiin** (desoksüadenosiin-Co); **tsüanokobalamiin** (CN-Co); **hüd-roksükobalamiin** (HO-Co); **kloorkobalamiin** (Cl-Co) jt. Füüsiko-keemilisi omadusi. Kuna tsüanokobalamiin on stabiilne kobalamiinide vorm, siis kirjanduses antakse tavaliselt tema parameetrid. Valguse toimel toimub tema astmeline lõhustumine. Tsüanokobalamiini vesilahus omab neeldumismaksimume 278, 361 (suurim) ja 550 nm. Kuna ta vesilahus on stabiilne, saab kindla kontsentratsiooniga tsüanokobalamiini standardlahuseid kasutada seerumi kobalamiinide määramiseks. Vähem-stabiilseid seerumi kobalamiine saab eelnevalt tsüanokobalamiiniks üle viia. Bioaktiivsed vormid. Seerumi domineeriv füsioloogiline vorm on **metüülkobalamiin** ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$), tsütoplasmas aga **desoksüadenosiinkobalamiin** (dA-B_{12}). Imendumine, transport ja metabolism. Toidus olevate kobalamiinide imendumine vajab mao parietaalrakkudes produtseeritavat nn. sise-mist faktorit (Casle faktor, intrinsic factor = IF). IF on glükoproteiin ($M_r = 50\ 000$), mille **sekretsiooni** stimuleerib toit, histamiin ja gastriin. Kobalamiinide imendumine toimub järgmiselt: a) moodustub kompleks vitamiin B_{12} -IF; b) B_{12} -IF seostub Ca^{2+} juuresolekul peensoole (niudesoole) epiteelirakkude pinnal olevate retseptoritega; c) B_{12} -IF transporditakse endotsütoosi abil epiteelirakkudesse, kus kompleks dissotsieerub (IF täpne saatus pole selge) ja B_{12} satub kapillaaride kaudu väärtiveeni. Vitamiin B_{12} transportvormiks on veres hüd-roksükobalamiin e. HO-B_{12} (selleks muutub ka ravimina kasutatav tsüanokobalamiin)



* desoksüadenosiinijäägi asendumisel -CH₃-ga saame (CH₃-B₁₂); asendumisel -CN-ga saame CN-B₁₂.

ja seda transpordivad kaks plasmavalku: transkobalamiin I (TC I) ja transkobalamiin II (TC II). TC I on tegelikult liitvalkude rühm (M_r-ga 60 000 - 150 000) nimetusega kobalafiinid ja need valgud on sisuliselt veres ringlevaks B₁₂ varuks. TC II (β-globuliin) on peamine transportvalk, mis viib kobalamiine kudedesse. Maksas ja neerudes läheb HO-B₁₂ koensüümsetesse vormidesse -metüül-B₁₂ ja dA-B₁₂, mis viiakse teistesse kudedesse. Normaalselt on maksas salvestatud ≈1 mg B₁₂ (NB! depoo). Kobalamiine väljutatakse põhiliselt uriiniga. Biofunktsioonid. Biofunktsioonid on seotud vitamiin B₁₂ koensüümse rolliga (vt. koensüümid). Lisagem, et näit. pernitsioosne aneemia on reeglina tingitud mitte vitamiin B₁₂-st vaid IF sekretsioonihäiretest. Meditisiinilised preparaadid. Levinuimad on tsüanokobalamiin ja dA-B₁₂.

VITAMIIN B₁₃. Terminoloogia. Levinuim on nimetus oroothape. Füüsiko-keemilisi omadusi. Ta on aromaatses loomuses ja uratsiili modifikatsioon. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivne on oritidiin-5'-fosfaat (OMP) e. orotidüülhape. Imendumine, transport ja metabolism. Oroothapet sünteesib inimorganism Asp ja karbamoüülfosfaadist. Biofunktsioonid. OMP on eelühendiks pürimidiinnukleotiidide biosünteesis. Oroothape mõjub ka teatud ensüümide (näit. ksantiini oksüdaas) aktiivsusele ning soodustab regeneratsiooniprotsessi (lihaste düstroofia ravimine jne.). Meditiinilised preparaadid. Levinuim on kaaliumorotaat.

VITAMIIN B₁₅. Terminoloogia. Levinud on ka nimetus pangaamhape (kr.k. pan = kõikjal, gami = seemned). Füüsiko-keemilisi omadusi. Pangaamhape on glükoonhappe ja dimetüülglütsiini ester. Ta on väga ebapüsiv. Bioaktiivsed vormid. Pangaamhape ise ongi bioaktiivne vorm. Imendumine, transport ja metabolism. Pangaamhape imendub peensoolest. Biofunktsioonid. Ta on "liikuvate" -CH₃ doonoriks koliini, fosfatidüülkoliinide, kreatiini jt. sünteesis. Kuna B₁₅ tõstab organismi O₂ tarbimist (väheneb glükolüüs ja piimhappe liigne kuhjumine), siis antud vitamiini on kasutatud füüsilise taastumise kiirendamiseks. B₁₅ on ka lipotroopne toime (näit. pidurdab rasvinfiltratsiooni maksas). Meditiinilised preparaadid. Levinuim on Ca-pangamaat.

VITAMIIN B_T. Terminoloogia. Levinuim on nimetus karnitiin. Imendumine, transport ja metabolism. Karnitiini sünteesib ka maks ning sünteesi aktiveerivad Fe²⁺ ning vitamiin C. Biofunktsioonid. Karnitiin transpordib pikaahelalisi rasvhappejääke (atsüüljääke) läbi mitokondrite sisemembraani. Oletatakse, et karnitiin võib olla ka metüülrühmade allikaks. Meditiinilised preparaadid. Karnitiini on kasutatud lihastegevuse ja pankrease eksokriinse funktsiooni parandamiseks.

VITAMIIN C. Terminoloogia. Kasutatakse ka nimetust L-askorbiinhape. Füüsiko-keemilisi omadusi. Askorbiinhape on üsna tugev hape, mille bioaktiivsus kaob kergesti kuumutamisel. Askorbiinhape on redutseerivate omadustega. Bioaktiivsed vormid. Vitamiinse aktiivsusega on L-askorbiinhape. Imendumine, transport ja metabolism. Askorbiinhape imendub kergesti peensoolest pas-

siivse difusiooni teel. Veres on askorbiinhape vabana ja valkseo- tuna (viimast nim. askorbigeeniks). Koerakkudesse ja vere- rakkudesse viiakse askorbiinhapet aktiivse transpordi ja difu- siooniga. Rakkudes on askorbiinhape valkseotuna. Rohkesti on askorbiinhapet neerupealistes, maksas ja kopsudes. Liigne vaba askorbiinhape ja tema kataboliidid (diketoguloonhape, oblikhape jt.) väljutatakse uriiniga. Biofunktsioonid. Askorbiinhape on protropokollageeni hüdroksülaasi koensüümiks (vt. ka koensüümid). See ensüüm tagab proliini- ja lüsiinijääkide hüdroksüülimise (vt. fibrillaarsete valkude ehitus), mis on vajalik protropokollageeni ja kollageeni normaalseks sünteesiks, s.t. ka sidekoe normaalseks kujunemiseks. Askorbiinhape on oluline veel mitmetes hüdroksüü- limistes (serotoniini, noradrenaliini, karnitiini, mitmete ste- roidide süntees). Askorbiinhape on ka oluline antioksidant (näit. takistab Hb oksüdeerumist). Askorbiinhape mõjutab ka ravimite biotransformatsiooni, indutseerides tsütokroom P₄₅₀ biosünteesi EPR-s. Askorbiinhape stimuleerib Fe²⁺ imendumist (taandab Fe³⁺ Fe²⁺-ks) ja raua vabanemist (NB! seega ka kasutamise võimalust) transferriniinist. Meditiinilised preparaadid. Kasutatakse L-askorbiinhappe preparaate.

VITAMIIN H. Terminoloogia. Levinuim termin on biotiin (kr.k. bios = elu). Sümbol H tuleneb saksakeelsest sõnast haut = nahk. Füüsiko-keemilisi omadusi. Biotiin on stabiilne ühend. Bioak- tiivsed vormid. Bioaktiivne on nii biotiin kui ka tema oksüderivaat e. oksübiotiin (molekulis on S asemel O). Biofunkt- sioonid. Vaba biotiin seostub kovalentselt ensüümvalguga Lys- jäägi ε-NH₂ kaudu. Lys on biotiinsete liitensüümide aktiivtsen- tris. Need ensüümid on olulised karboksüülimisreaktsioonides (vt. koensüümid). Imendumine, transport ja metabolism. Valk- seotud biotiin vabaneb valkude proteolüüsil lüsiin-biotiin komplek- sina. Kompleksi nim. biotsütiiniks (ε-N-biotinüüllüsiin). Bio- tsütiin nagu ka kompleks biotiin-avidiin ei allu seedetrakti ensüümide toimele (avidiin on glükoproteiin, mida on eriti paju toores munas). Biotsütiin ja vaba biotiin imenduvad kergesti seedetraktist. Vereplasma ja erütrotsüütide biotsütinaas lõhustab biotsütiini biotiiniks ja Lys. Vaba biotiini transport veres

toimub albumiinide abil. Meditiinilised preparaadid. Meditsiinilises praktikas pole biotiini ravimina kasutatud.

VITAMIIN N. Terminoloogia. Levinuim on nimetus lipoehape. Bioaktiivsed vormid. Bioaktiivne on vitamiin N koensüümne vorm lipamiid. Biofunktsioonid. Kudedesse sattuv lipoehape seostub ensüümvalguga tema aktiivtsentris oleva Lys-jäägi ϵ -NH₂ kaudu. Need liitensüümid osalevad dekarboksüülimisreaktsioonides (vt. koensüümid). Meditiinilised preparaadid. Levinumad on lipoehape ja tema amiid.

VITAMIIN U. Terminoloogia. Levinuim nimetus on S-metüülmetioniin. Sümbol U viitab selle ühendi seedetrakti haavandtõve vastasele toimele (lad.k. ulcus = haavand). Meditiinilised preparaadid. Kasutamist on leidnud vitamiin U kloriid.

pAB. Terminoloogia. Ta on mikroobide kasvufaktor nimetusega p-aminobenseenhape. Biofunktsioonid. pAB ongi tegelikult vitamiiniks mikroorganismidele, kes vajavad teda foolhappe sünteesiks. pAB on vajalik naha, juuste jne. normaalseks pigmentatsiooniks (aktiveerib pigmentatsiooni keskset ensüümi türosinaasi). Ka inimorganismi foolhappega varustavatele seedetrakti mikroorganismidele on pAB vajalik foolhappe sünteesiks.

VITAMIIN P. Terminoloogia. Termin "vitamiin P" hõlmab tervet ühendite gruppi nimetusega bioflavonoidid. Sümbol P viitab permeaabluse regulatsioonile. Tuntuim esindaja on rutiin, mis sisaldab disahhariidi rutinoosi. Imendumine, transport ja metabolism. Bioflavonoidid imenduvad peensoolest. Organismis nad kataboliseeruvad fenoolseteks ühenditeks, mis väljutatakse konjugaatidena. Biofunktsioonid. Bioflavonoidid inhibeerivad hüaluronidaasi, proliini oksüdaasi jt. sellelaadseid ensüüme. Nii nad takistavad sidekoe oluliste komponentide (hüaluroonhape, kollageen) lõhus-tumist, mis on sisuliselt nende kapillaariseinu tugevdava toime aluseks. Bioflavonoidid aktiveerivad koehingamist. Oma efektides on nad funktsionaalselt koostöös vitamiin C-ga. Meditiinilised preparaadid. Levinuimad on kompleksne vitamiinide P ja C prepaaraat askorutiin ja galaskorbiin.

Antivitamiinid. Need on antud vitamiini struktuursed analooigid. Nad asendavad vitamiini tema koensüümses vormis, kuid ei

suuda täita tema rolli ensüümatalüüsis. Seega antivitaamiinid toimivad sisuliselt antikoensüümidena. Tabelis on toodud tuntumad antivitaamiinid ja nende meditsiiniline kasutamine.

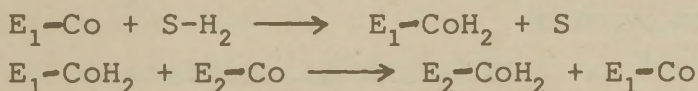
	Antivitaamiinid	Toimemehhanism	Kasutamine
K	kumariinid (dikumarool, tromeksaan jt.)	blokeerivad vähemalt nelja verehüübimisfaktori sünteesi	trombooside profülaktika ja ravi
B ₁	hüdroksütiamiin, püritiamiin	blokeerib TPP teket, tõrjub TPP väljalitensüümidest	eksperimentaalse avitaminoosi tekitamine
B ₂	flaviinid (iso-, dietüül- ja galaktoriboflaviin)	blokeerivad FMN ja FAD tööd liitensüümid	eksperimentaalse avitaminoosi tekitamine
B ₄	trietüülkoliin	pidurdab atsetüülkoliini sünteesi	?
B ₅	isoniaziid, 3-asetüülpüridiin, 6-aminonikotiinamiid jt.	asendab normaalseid koensüüme dehüdrogenatsioonides	tuberkuloosi ravi
B ₆	desoksüpüridoksiin	asendab normaalseid koensüüme ensüümid	eksperimentaalse avitaminoosi tekitamine
B _c	pteridiinid (aminopteriidiin jt.)	konkureerivad foolhappega vastavate liitensüümid tekkes	leukooside ja vähi ravi
C	glükoaskorbiinhape	konkureerib L-askorbiinhappega teatud ensüümid tekkel	?
pAB	sulfaniilamiidid ja nende derivaadid	lülituvad pAB asemel mikroobide sünteesitavasse foolhappesse	antimikroobiline ravi

KOENSÜÜMID

Väga paljude liitensüümide mittevalguliseks osaks on koensüümid. **Koensüümid** (lühend **Co**) on madalmolekulaarsed orgaanilised ühendid, mis on apoensüümiga enamasti mittekovalentselt seostunud. Järelikult liitensüümi kujunemise lihtsustatud skeem on:



Koensüüm võib olla ka mitme E vaheline siduv lüli e. kosubstraat. Näit. esimene ensüüm toimib S-le ja selle E koensüüm võtab S-lt ära ülekantavad komponendid (näit. vesinikuaatomid). Teine ensüüm atakeerib seda koensüümi, võttes temalt eelnevalt seotud komponendid. NB! Seega on esimese E-ga seotud koensüüm teise E substraadiks (vt. reaktsioonid).

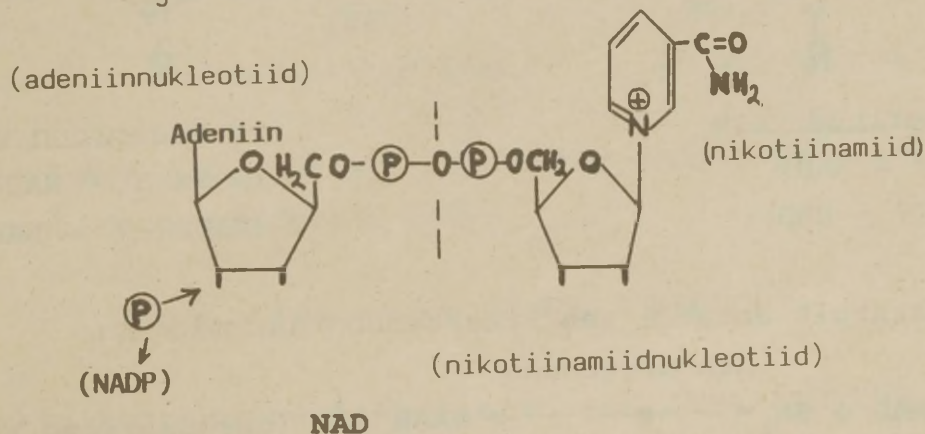


NB! Enamike koensüümide reaktiivseks osaks (või baasstruktuuriks) on vastav **vitamiin**.

KOENSÜÜMIDE KLASSEFIKATSIOON. Klassifikatsiooni aluseks on ensüümide klassid. NB! Mitmed Co võivad olla koensüümiks ka erinevatesse klassidesse kuuluvates liitensüümides. Funktsionaalne klassifikatsioon jaotab koensüümid:

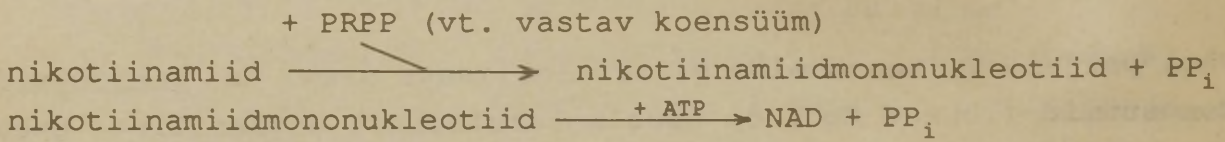
1. **Redutseerivate ekvivalentide ülekandjad** (koensüümid oksüdoreduktaasidele).

NAD ja NADP. Nad on nikotiinamiidsed Co (nende reaktiivne osa on nikotiinamiid e. B₅). Ehituselt on nad dinukleotiidid (vt. valem)

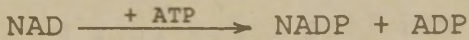


NAD = nikotiinamiidadeniindinukleotiid

NAD tekib järgmiselt:

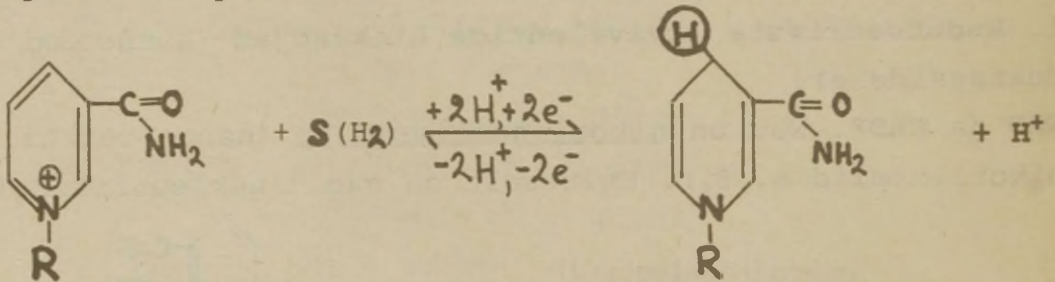


NADP e. nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat, tekib NAD baasil:

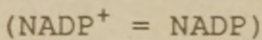
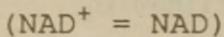


Mõlemad koensüümid võivad esineda oksüdeeritud ja redutseeritud vormis. Korrektne oksüdeeritud vormi tähistus on NAD^+ ja NADP^+ , redutseeritud vormide puhul $\text{NADH} + \text{H}^+$ ja $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Lihtsustatud tähistused on: **NAD**, **NADP** (oksüdeeritud vormid) ja **NADH**, **NADPH** (redutseeritud vormid).

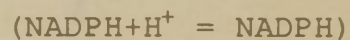
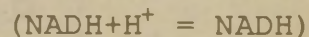
NAD ja NADP on dehüdrogenaaside koensüümid. Dehüdrogenaasid on ensüümid, mis võtavad substraatidelt ära vesinikuaatomeid. Et otsesed äravõtjad on NAD ja NADP, siis ongi nende Co tsentraalne roll: redutseerivate ekvivalentide, s.t. elektronide ja prootonite (e^- ja H^+) ülekanne. Sisuliselt eemaldatakse substraadilt 2 vesiniku aatomit, millest 2 e^- ja 1 H^+ seotakse koensüümi reaktiivse osaga. Teine prooton läheb keskkonda (vt. skeem).



oksüdeeritud vorm

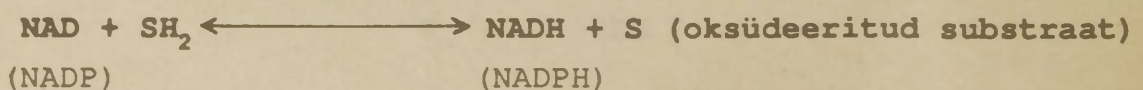


redutseeritud vorm



Lihtsustatult antakse see reaktsioon järgmiselt:

dehüdrogenaas

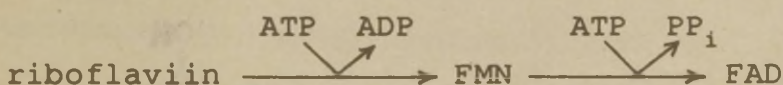


Dehüdrogenaase, mille koensüümiks on NAD (või NADP), nim. **NAD-sõltuvateks dehüdrogenaasideks** (või vastavalt **NADP-sõltuvateks dehüdrogenaasideks**).

NADH-lt ja NADPH-lt võetakse redutseerivad ekvivalendid järgmise aktseptori (koensüümi) poolt, s.t. toimubki nende ekvivalentide ülekanne. Taastub NAD, või vastavalt NADP, (vt. reaktsiooni pöörduvust) ja substraadi uute molekulide dehüdrogeenimine võib jätkuda. NAD ja NADP taastumist nim. reoksüdeerumiseks.

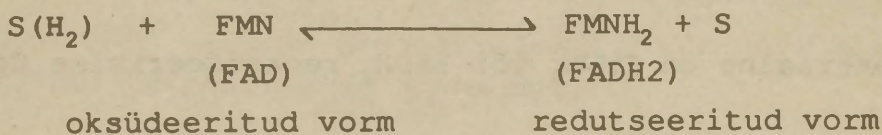
Nikotiinamiidsed Co täidavad ka mõningaid teisi funktsioone. Näit. on NAD substraadiks kromatiini valkude polü-(ADP)-ribosüülimises vajaliku polü-(ADP)-riboosi sünteesis (vt. matriitsünteesid ja nende regulatsioon). NAD on substraadiks ka DNA-ligaasidele, s.t. NAD normaalne tase on oluline DNA replikatsiooniks ja reparatsiooniks. Funktsionaalses mõttes on NAD ja NADP ka allosteerilised regulaatorid (vt. Krebsi tsükkel).

FMN ja FAD. Antud flaviinsed, nukleotiidsed Co-d sünteesitakse riboflaviini (B₂) baasil.

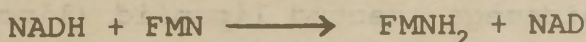


FMN = flaviinmononukleotiid; FAD = flaviinadeniindinukleotiid

FMN ja FAD on vastavate dehüdrogenaaside (FMN- ja FAD-sõltuvad dehüdrogenaasid) koensüümideks ja nad kannavad üle kahte vesinikuaatomit:

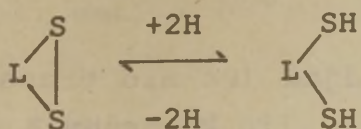


Keskne on reaktsioon, milles FMN võtab redutseerivaid ekvivalente ära, s.t. reoksüdeerib NADH.



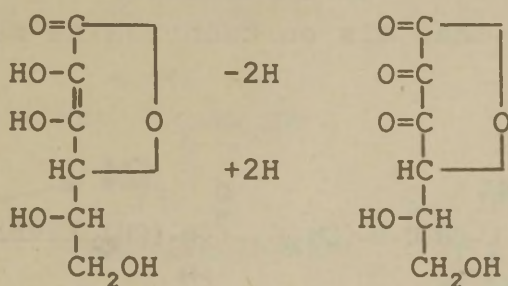
Kõigis vesinikuaatomite ülekannetes seotakse nad FMN või FAD

Lihtsustatult oleks reaktsioon järgmine:



Lipamiid on oluline ensüümides, mis kuuluvad dekarboksüülimisega seotud ensüümkompleksidesse (püruvaadi dehüdrogenaasne kompleks, α -ketoglutarraadi dehüdrogenaasne kompleks; vt. Krebsi tsükkel).

Vitamiin C. Täidab koensüümi rolli mitmetes redoksreaktsioonides, s.t. osaleb redutseerivate ekvivalentide ülekandes (näit. tsütokroom P_{450} süntees, foolhappe taandamine FH_4 -ks, Fe^{3+} redutseerimine peensooles Fe^{2+} -ks).

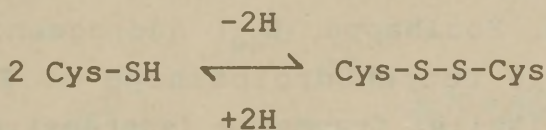


askorbiinhape dehüdroaskorbiinhape

Mittevitamiinsed Co. Mitmed redokssüsteeme moodustavad ühendid võivad reaktsioonides üle kanda redutseerivaid ekvivalente.

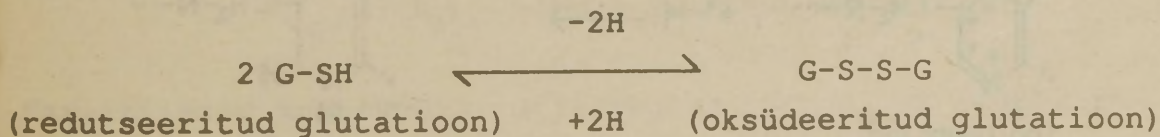
Metalloporfüriinne süsteem. Inimorganismis töötab see süsteem elektronide ülekandjana hingamisahelas (aga ka EPR-s) toimivas oksüdeerimises. Elektronide ülekande aluseks on molekulis oleva raua aatomi valentsi muutus ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$; vt. hingamisahel).

Tsüsteiin-tsüstiin süsteem. See on aminohappeline süsteem, mis on võimeline vesinikuaatomite pöörduvaks ülekandeks.



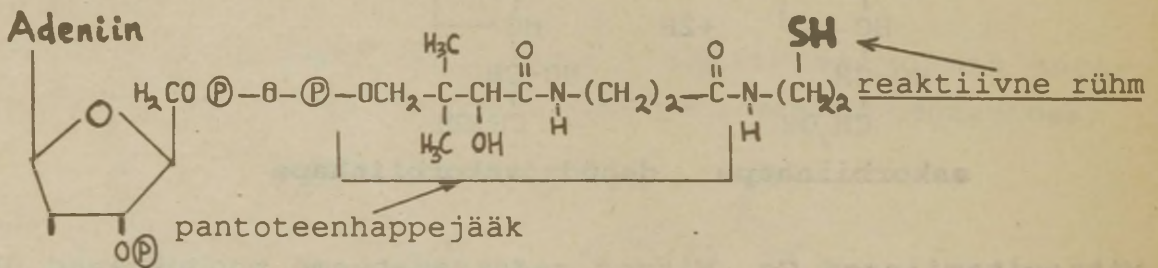
(redutseeritud) (oksüdeeritud)

Glutatioonne süsteem. See on tripeptiidne süsteem.



NB! Korrektsemalt võetuna on kaks viimast süsteemi tegelikult klassikalised kofaktorid.

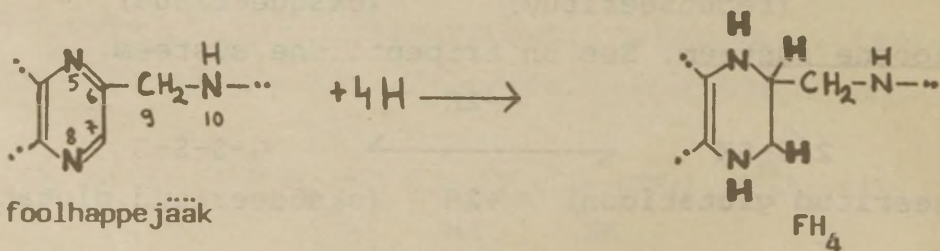
1. **Radikaalide, gruppide ülekandjad** (Co-mid transferaasidele). **Pantoteensed koensüümid**. Keskne on siin koensüüm A e. **CoA-SH**, mis nagu 4-fosfopantotenaat ja difosfo-CoA-SH, on pantoteenhappe (B_3) derivaadid. 4-fosfopantotenaat on Co-ks atsüüljääke ülekandvale ensüümile rasvhapete süntetaases kompleksis. Defosfo-CoA-SH on tsitraadi lüaasi ja atsüüljääkide mitmete muundumisreaktsioonide Co-ks. **Tsentraalne on aga CoA-SH**. See on on üldse kogu metabolismi tsentraalne koensüüm. **CoA-SH on atsüüljääkide ülekandja**. Neist atsüüljääkidest on keskne atsetüüljääk. Atsetüüljääki kandvat CoA-SH nim. **atsetüül-CoA**, mis on tsentraalne metaboliit.



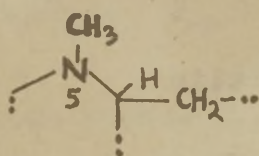
CoA-SH

CoA-SH osavõtul toimub: 1) rasvhapete ja atsetaadi aktiveerimine; 2) rasvhapete oksüdatsioon; 3) ketokehade ja steroolide/steroidide süntees; 4) atsetüülkoliini süntees; 5) biogeensete amiinide kahjutuks tegemine (atsetüülimine); 6) püruvaadi ja α -ketoglutaaraadi oksüdatiivne dekarboksüülimine jm. reaktsioonid.

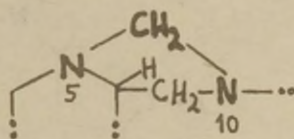
Tetrahydrofoolhape. Foolhape (B_{10}) hüdrogeenimine annab tema koensüümi: 5,6,7,8 tetrahydrofoolhape e. **FH₄**. See koensüüm kannab üle ühesüsinikulisi fragmente (sünteesireaktsioonid!).



Transporditavad fragmendid on formüül ($-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{H}$), metüül ($-\text{CH}_3$), metüleen ($-\text{CH}_2-$), metiin ($=\text{CH}-$) ja formimino ($-\text{HC}=\text{NH}$). Fragmendid seotakse N_5 või N_{10} külge (või nende vahele, näit. $-\text{CH}_2-$ ja $=\text{CH}-$ ülekandel).

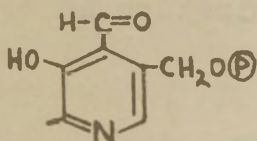


N_5 -metüül- FH_4

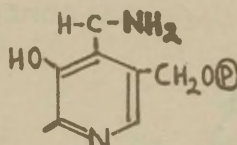


$\text{N}_5, \text{N}_{10}$ -metüleen- FH_4

Püridoksiinsed koensüümid. Need on püridoksiini (B_6) derivaadid. Tsentraalne Co on püridoksaal- P , mis tekib B_6 fosforülimisel.



püridoksaal- P

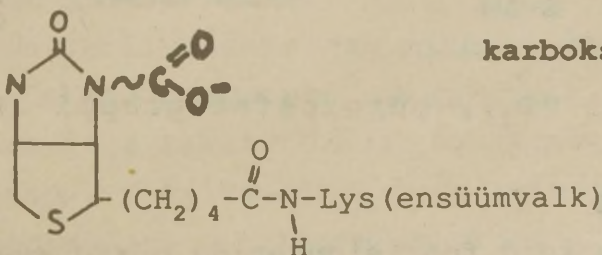


püridoksamiinfosfaat

Seda Co on leitud paljudes ensüümides. Põhiliselt on ta aga aminotransferaaside Co, tagades püridoksamiinfosfaadina aminorühma ülekande.

Kobalamiidsed koensüümid. Need on vitamiin B_{12} derivaadid. Metüül- B_{12} osaleb metüüljäägi ülekandel N_5 -metüül- FH_4 -lt homotsüsteiinile Met sünteesis. dA- B_{12} on mutaasi koensüümiks, mis kindlustab propionüül-CoA lülitumise Krebsi tsükliks

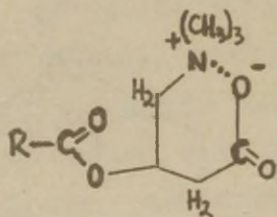
Biotinne koensüüm. Biotiini koensüümne vorm biotsütiin osaleb aktiivse CO_2 ülekandes (karboksübiotsütiin) karboksüülimisreaktsioonides. Seega on ta karboksülaaside koensüüm.



karboksübiotsütiin

Karnitiinsed koensüümid. Siia kuulub karnitiini tsükliline vorm,

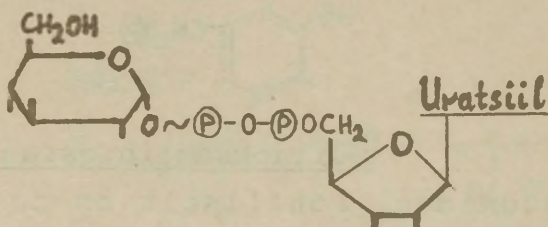
mis kannab üle atsüüljääke. Ilmselt võib atsüüljääke teatud juhtudel üle kanda ka lineaarne vorm.



atsüülkarnitiin

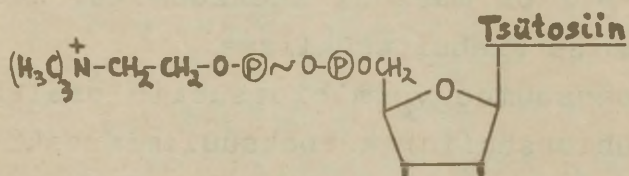
Mittevitamiinsed transferaaside koensüümid.

UDP-glükoos kannab üle glükoosijääki glükogeeni sünteesil. UDP-glükuroonhape kannab üle glükuroonhappejääki ksenobiotikumide detoksikatsioonil. CDP-koliin kannab üle fosfokoliinijääki fosfolipiidide biosünteesil. S-adenosüülmetioniin e. S-AM kannab

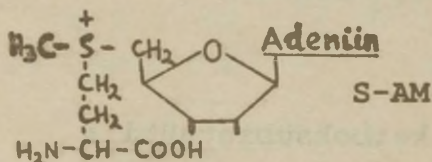


UDP-glükoos

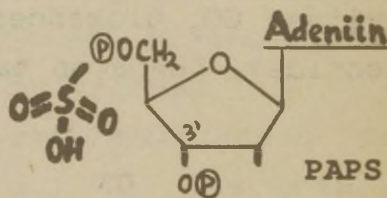
üle $-CH_3$ mitmetes sünteesides (koliini, kreatiini, B_{12} süntees jt.) Fosfoadenosiin-5-fosfosulfaat e. PAPS kannab üle aktiivset sulfaatrühma fenoolsete ühendite detoksikatsioonil. ATP võib vaa-



CDP-koliin



S-AM



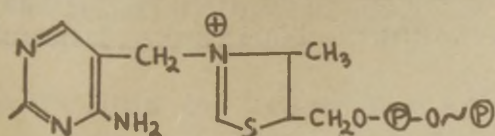
PAPS

delda fosfaatgruppi (P_i), pürofosfaatgruppi (PP_i) või AMP ülekandjana.

3. Lüaaside koensüümid.

Lüaaside Co-na võivad funktsioneerida püridoksaal- P, pantoensed ja kobalamiidsed Co-d. Lüaaside spetsiifiliseks Co-ks on aga ka tiamiinpürofosfaat (TPP), mis osaleb α -ketohapete

oksüdatiivsel dekarboksüülimisel ja aldehüüdrühma ülekandel.



TPP (kokarboksülaas)

4. Ligaaside koensüümid.

Ligaaside Co-na võivad funktsioneerida karboksübiotsütiin, FH₄, nukleotiised koensüümid (UDP-glükoos, CDP-koliin jt.).

Märkus. Hüdrolaasidel spetsiifilisi koensüüme pole.

AKTIIVTSENTER

Ensüümi tertsiaarstruktuuri ruumilist ala, millega substraat seostub ja kus toimub substraadi katalüüs, nim. aktiivtsentriks. Lihtensüümi aktiivtsenter formeerub ensüümvalgu AH-jääkide radikaalidest, lihtensüümi puhul lisandub radikaalidele ka koensüüm või mõni muu kofaktor.

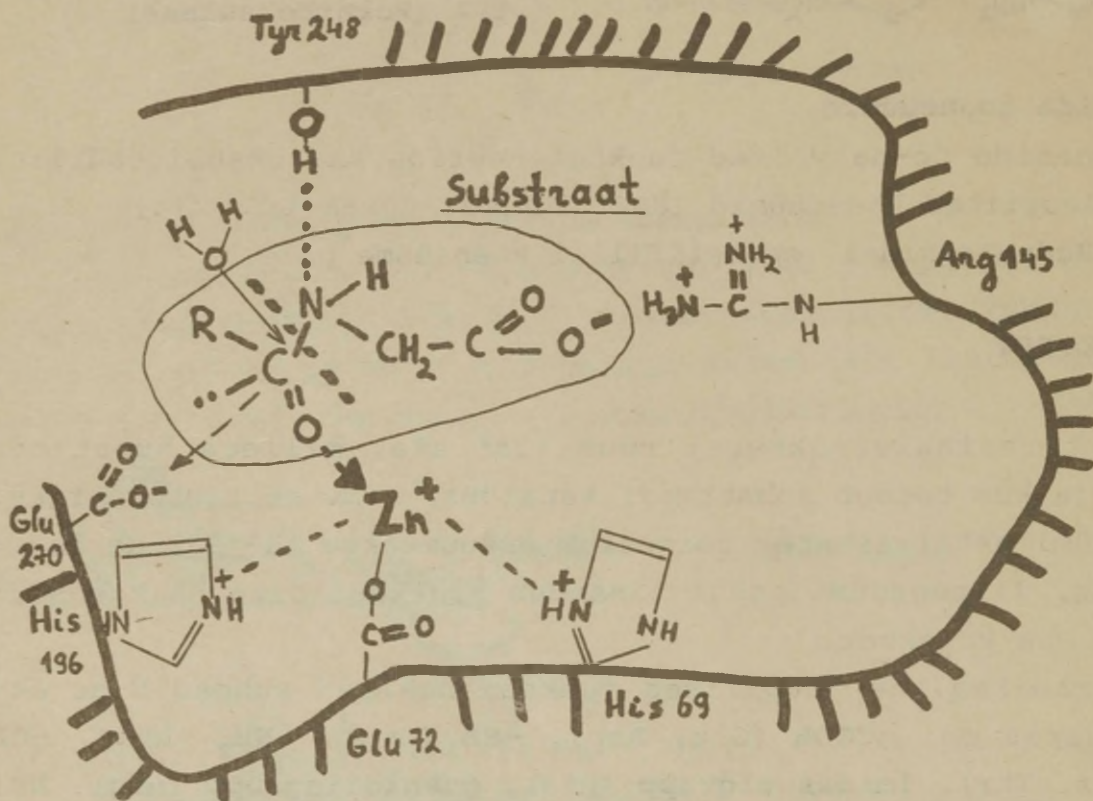
AH radikaalide tüüpilised funktsionaalsed rühmad E-de aktiivtsentris on: **-COOH** (Glu, Asp), **-SH** (Cys), **-NH₂** (Lys), **-OH** (Tyr, Ser, Thr), **imidasoolgrupp** (His), **guanidiingrupp** (Arg). NB! Aktiivtsentrisse funktsionaalseid rühmi andvad AH-jäägid pole polüpeptiidahelas kõrvuti. Nende ruumilise läheduse (seega ka aktiivtsentri formeerumise) tagab biofunktsiooniks vajalik konformatsioon (vt. joonis). Karboksüpeptidaas A on seedeensüüm, mis katalüüsib AH-jääkide vabanemist peptiidide C-lõpulisest otsast. Ta koosneb 307 AH-jäägist ja sisaldab metalloensüümina aktiivtsentris Zn.

Aktiivtsentrit iseloomustab:

1) S kinnitub aktiivtsentrisse mitmest kohast. See tagab S katalüüsiks vajaliku paigutuse. Tinglikult eristataksegi aktiivtsentris siduvat ja katalüütilist tsentrit. Esimene tagab S spetsiifilise sidumise, teine astub S-ga otsesesse keemilisse vastaktoimesse. Joonisel on S karboksüpeptidaas A aktiivtsentris seotud Tyr 248, Zn, Arg 145 jt. abil.

2) S seostumisel E-ga ja S katalüüsil muutub ensüümvalgu ja ka S

enda konformatsioon. Selgitagem! S mõjul muutub E aktiivtsenter väga täpselt sobivaks just antud S-le (see on isosteeriline regulatsioon). Seda nim. ka aktiivtsentri lõplikuks formeerumiseks. NB! S j E komplementaarsus.



karboksüpeptidaas A

3) S ja E konformatsiooni muutustel on vähemalt kaks sisulist mõtet: a) S ja E aktiivtsentri funktsionaalsete rühmade lähedus muutub maksimaalseks, s.t. tõuseb tohutult ES tekke ja seega ka reaktsiooni kiirus; b) toimub S sidemete "pingestumine", mis kergendab S lõhustumist/muundumist produktiks (produktideks). Viimast illustreerib ka joonis! Arg 145 tõmbab ioonsideme tekkega peptiidi otsmist AH-jääki enda poole, mis pingestab peptiidsideme ja hõlbustab selle hüdrolyüsi. Seda kergendab ka Zn, mis tõmbab enda poole selle peptiidsideme karbonüülset hapnikku

4) Kuna tekkivad produktid pole komplementaarsed aktiivtsentri funktsionaalsete rühmadega, siis nad väljuvad aktiivtsentrist, kusjuures selle esialgne konformatsioon taastub.

TOIMEMECHANISMI ÜLDARUSAAMAD.

Ensüümkatalüüs on keeruline protsess. Siiski võib temas tinglikult eristada järgmisi põhimomente (vt. reaktsiooni):

1) Substraadi difusioon E aktiivtsentri juurde, S komplementaarne seostumine E-ga ning ensüüm-substraat kompleksi (ES) teke. See faas on väga kiire ja ES teke on praktiliselt silmapilkne. Siin toimub ka E-mi aktiivtsentri lõplik sobitumine antud S jaoks (nn. indutseeritud sobivus, isosteeriline regulatsioon). ES tekkes osalevad vesiniksidemed, vastastikused hüdrofoobsed ja elektrostaatilised toimed. Teatud juhtudel ka kovalentsed, koordinaatiivsed sidemed. See faas on reeglina pöörduv.



2) Esimene ES muundub aktiveeritud ensüüm-substraat kompleksideks (ES^* , ES^{**}), millede arv on väga varieeruv. Tänu aktiveeritud ES tekkele alanebki reaktsiooni aktivatsioonienergia. Seetõttu on see faas kogu reaktsiooni kiirust limiteeriv. Selles faasis toimub S molekulis sidemete pingestumine, mõnede sidemete lõhustumine ja uute tekkimine tänu S vastaktoimele E-mi aktiivtsentri funktsionaalsete gruppidega.

3) S muundumine produktiks (-tideks). Viimase (-ste) vabanemine aktiivtsentrist ja difusioon keskkonda. See on kiire faas, mida limiteerib põhiliselt vaid produktide difusioonikiirus.

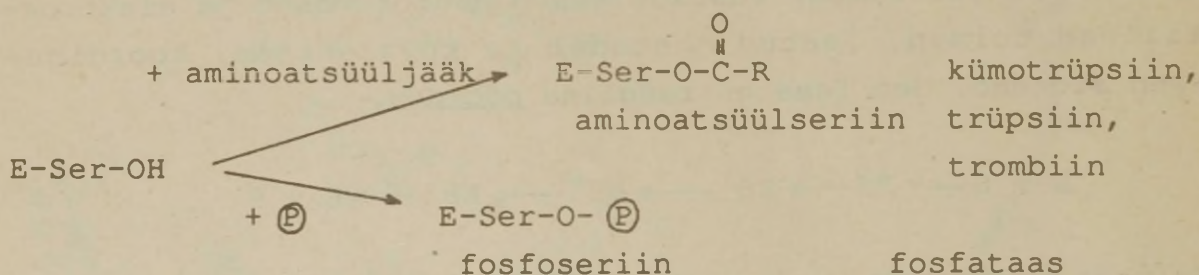
Ensüümkatalüüs on väga keeruline. Seetõttu on ensüümide toime molekulaarsetes mehhanismides veel palju ebaselget. Eristatakse siiski: reagentide orienteerimise efekti, substraadi deformatsiooni efekti, happelis-aluselist katalüüsi ja kovalentset katalüüsi.

Reagentide orienteerimise efekt seisneb E aktiivtsentri ja S sellise läheduse ja paigutuse tekkes, mis loob tingimused katalüütiliste (funktsionaalsete) rühmade efektiivseks mõjuks. Tõuseb reaktsioonikiirus, kuna langeb aktivatsioonienergia.

Substraadi deformatsiooni efekt seisneb S molekuli defor-

matsioonis/pingestumises peale E aktiivtsentriga seostumist. S pingestunud sideme(-te) lõhkumiseks vajalik energia langeb. Selline mehhanism on tüüpiline hüdrolaasidele ja lüaasidele.

Happelis-aluseline katalüüs esineb E-del, millel on aktiivtsentris hapete-alustena (H^+ doonori-aktseptorina) käituvaid funktsionaalseid gruppe (näit. His imidasoolgrupp). Mõjustades S molekule aktiivtsentri elektrofiilsete/nukleofiilsete rühmadega, põhjustatakse elektrontiheduse ümberjaotumine S molekuli vastavates osades. See tingib sidemete lõhustumise hõlbustumise. Selline katalüüs on näit. iseloomulik E-le, mille aktiivtsentris on Ser (vt. skeem).



NB! Enamike E-de puhul on ülaltoodud erinevad mehhanismid kombineerunud, mis tagab E kõrge katalüütilise aktiivsuse.

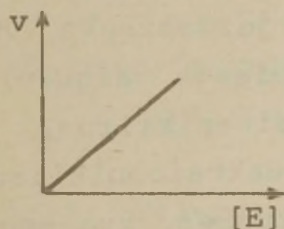
Aktivatsioonienergia ja ensüümkatalüüs. Aktivatsioonienergia (E_a) on energia, mis on vajalik anda osakestele muutmaks nad reaktsioonivõimeliseks. Katalüsaatorita toimuks aga keemiline reaktsioon ülimalt aeglaselt (E_a oleks suur). Reaktsiooni E_a vähendamine, s.t. tema energeetilise barjääri alandamine ongi katalüsaatori toime aluseks. Ensüümid on tugevad E_a alandajad, kusjuures E_a vähendamine saavutatakse ES^* moodustumiste kaudu. Teisisõnu, üks väga aeglaselt kulgev reaktsioon asendatakse sisuliselt mitme kergesti toimuvaga tänu ES^* tekkele. Järelikult, mida kergemini ja rohkem S molekule moodustab aktiveeritud ensüüm-substraat komplekse, seda madalamaks muudetakse antud reaktsiooni energeetiline barjäär ja seda enam kasvab reaktsioonikiirus. Näit. H_2O_2 katalüsaatorita lõhustumise $E_a = 75\ 000$ J/mool, plaatina kui katalüsaatori puhul on see 52 000 J/mool, ensüüm katalaasi puhul aga vaid 8300 J/mool. Seega on katalaasi puhul reaktsioonikiirus tohutult suurem, kui ilma biokatalüsaatorita.

ENSÜÜMREAKTSIOONI KINEETIKA

Iga ensüümreaktsioon kulgeb teatud kiirusega. Reaktsioonikiirust väljendatakse (möödetakse) muundunud S huljana ajaühikus (tavali- selt $\mu\text{mooli/ minutis}$) või produkti hulga kasvuna ajaühikus. Ensüümreaktsiooni kiirus sõltub: 1) E ja S loomusest (struktuu- rist); 2) [E] ja [S]-st; 3) keskkonna temperatuurist; 4) keskkon- na pH-st; 5) aktivaatori ja inhibiitori olemasolust ja kontsen- tratsioonist; 6) keskkonna ioontugevusest. Ensüümreaktsioonide kineetika uuribki ensüümreaktsioonide kiiruse sõltuvust nimetatud faktoritest. Kineetiliste uuringute eesmärgid on E toimemehhanis- mi kindlakstegemine ja selgitamine, kuidas organism reguleerib antud ensüümreaktsiooni kiirust.

E ja S keemiline struktuur ja reaktsioonikiirus. Illustreeriksime seda vaid ühe näitega. Nimelt, proteolüütiline E lõhub valke erineva kiirusega, sõltuvalt antud valgu keemilisest sruktuurist (loomusest).

[E] ja reaktsioonikiirus. Reaktsioonikiiruse sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist on lineaarne, kui substraadi kontsentratsioon on küllastav ja teised tingimused (temperatuur, pH, ioontugevus jne.) on konstantsed ja optimaalsed. Teisalt, ainult sellise li- neaarse sõltuvuse tagamisel on kogu ensüüm ES vormis (kõik E molekulid on S-ga küllastatud).



$$[E] \ll [S]$$

$$[S] = \text{konstantne}$$

$$v = k[E],$$

kus v on reaktsiooni-
kiirus ja k on kiirus-
konstant

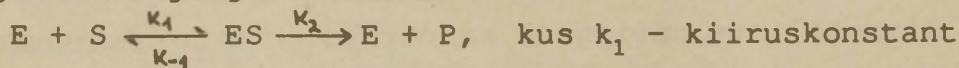
Reaktsioonikiiruse sõltuvus [E]-st

Lineaarsuse momenti on oluline alati silmas pidada. Nii näit. tuleb mistahes ensüümi aktiivsuse määramisel leida kõigepealt ajavahemik, mille kestel kasutatavates tingimustes (reaktsioo- nisegu koostis, pH, temperatuur) eksisteerib kindlasti lineaarne

sõltuvus lisatud E koguse ja tekkiva P hulga vahel e. muundunud S hulga vahel. NB! Kui me muudame kas või ühte katsetingimust, tuleb alati uuesti leida õige inkubatsiooni aeg.

Lineaarsuse aspekt eksisteerib aga ka organismis. Kui vastavad E on ebapiisavalt (näit. häiritud on tema süntees), siis on tema poolt katalüüsitava reaktsiooni kiirus piiratud. Ensüümi molekulide arvu taastamine kas loodusliku stimulatsiooni kaudu või ravimpreparaatidega taastab ka katalüüsitava reaktsiooni normaalse kiiruse ja biokeemiliste protsesside normaliseerimise.

[S] ja reaktsioonikiirus. Ensüümreaktsioon on lihtsustatult väljendatav järgmise skeemina:



otse- ja pöördreaktsiooni (-) puhul

Kui me k_2 ei arvesta (võtame, et $ES \rightarrow E + P$ on väga aeglane) saame **ES dissotsiatsiooni konstandi** ehk **substraadi konstandi** (K_s) avaldada järgmiselt (NB! analoogia valk-ligand tekkega):

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

Mida väiksem on K_s arvuline väärtus (langenud on k_{-1} või tõusnud on k_1), seda suurem on antud substraadi sugulus E-le. Teisisõnu, seda aeglasemalt toimub ES dissotsiatsioon E-ks ja S-ks.

Lähtudes K_s võrrandist ja sellest, et ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus [S]-st on hüperboolne, avaldasid Michaelis ja Menten (1913.a.) võrrandi selle hüperbooli kirjeldamiseks (vt. ka järgnevat graafikut). (NB! Analooogia L seostumisega valgule).

v - mõõdetav reaktsioonikiirus,

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

V_{\max} - maksimaalne reaktsioonikiirus, s.o. kiirus-tingimustes, kus kogu E on ES vormis ja [S] suurenemine enam ei tõsta reaktsioonikiirust

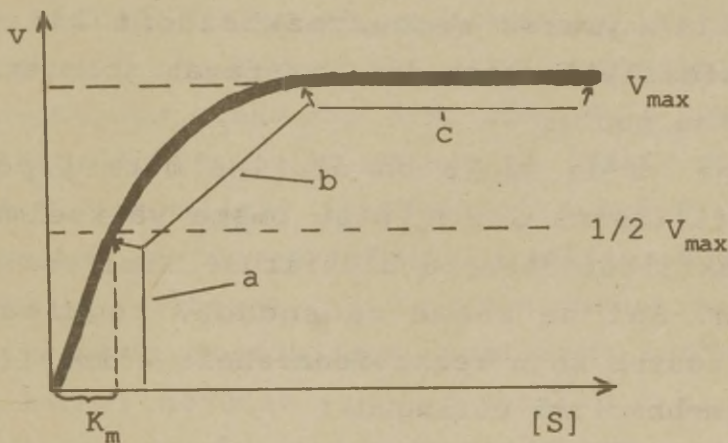
Võttes arvesse aga ka k_2 , avaldasid Haldane, Briggs (1925.a.) **Michaelise konstandi** (K_m). Asendades Michaelis-Menteni võrrandis K_s K_m -ga, said nad Michaelis-Menteni võrrandi lõpliku kuju:

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

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menteni võrrand} \\ \text{(lõplik vorm)}$$

See on **ensümaatilise kineetika põhivõrrandeid**, mis peegeldab v ja $[S]$ vahelist sõltuvust kogu hüperbooli ulatuses.

Nagu näemegi teoreetiliselt graafikult, on reaktsioonikiiruse v ja $[S]$ vaheline sõltuvus hüperboolne, kui $[E] = \text{konstant}$. (NB! Analogia valgu ja ligandi interaktsioonidega). Substraadi väikestel kontsentratsioonidel on v sõltuvus $[S]$ lineaarne. (I järku reaktsioon, lõik a). Substraadi kontsentratsiooni edasisel tõusul kaob lineaarne sõltuvus (segajärku reaktsioon, lõik b). Teatud $[S]$ alates saavutab reaktsioon maksimaalse kiiruse (nulljärku reaktsioon, v ei sõltu enam $[S]$ -st, lõik c).



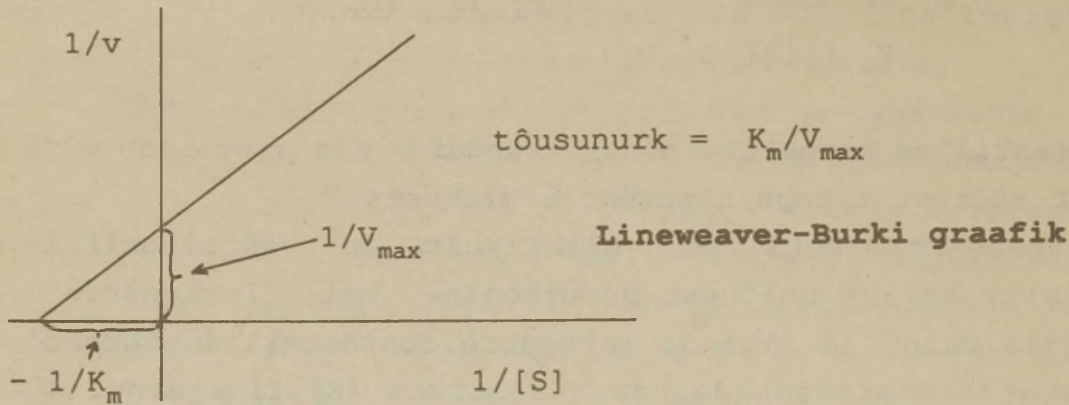
Reaktsioonikiiruse hüperboolne sõltuvus $[S]$ -st (Michaelis-Menteni võrrandi graafiline väljendus)

V_{\max} ja K_m . Mõlema parameetri arvulise väärtuse leidmiseks kasutatakse enamasti Michaelis-Menteni võrrandi lineariseeritud variante, milledest levinuim on **Lineweaver-Burki võrrand**:

$$1/v = K_m / V_{\max} [S] + 1/V_{\max}$$

Selle sõltuvuse graafiline väljend on sirge koordinaatides $1/v$ versus $1/[S]$. See tähendab, määrates vastavate $[S]$ juures vastavad v väärtused, saame selle graafiku abil leida nii V_{\max} kui ka

K_m arvulise väärtuse.



Avaldades Michealis-Menteni võrrandi alusel K_m saame, et $K_m = [S](V_{max}/v - 1)$. Selgub, et kui reaktsioonikiirus võrdub poolega reaktsiooni maksimaalsest kiirusest ($v = 1/2V_{max}$ ehk $V_{max}/v = 2$), siis $K_m = [S]$. Seega: **Michaelise konstant on sisuliselt S kontsentratsioon mille juures ensüümreaktsiooni kiirus on pool reaktsiooni maksimaalkiirusest** (vt. vastavat joonist). Lisagem, et K_m väljendatakse mool/l.

K_m määramine S-de jaoks on oluline mitmel põhjusel: 1) antud E spetsiifiliseima S-i K_m peab omama väikseimat arvulist väärtust; 2) reaktsioonideahela üldkiiruse limiteerib aeglaseim üksikreaktsioon. Kui me saame vähendada/ reguleerida selle reaktsiooni K_m , tõuseb kogu reaktsiooniahela kiirus (NB! hormoonide täpse toimemehhanismi uuringud).

Kommentaariid. 1) Nüüdisajal leitakse K_m ja V_{max} arvutisse sisestatud katseandmete alusel vastavate programmide abil. 2) Loomulikult pole võimalik kõiki ensüümreaktsioone (näit. mitmesubstraadilised, allosteerilised ensüümid jne.) klassikalise Michealis-Menteni võrrandi alusel täielikult kirjeldada. Seda teemat käsitleb aga juba ensüömoloogia spetsiaalkursus.

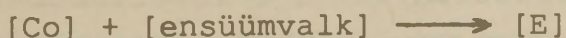
Temperatuur ja reaktsioonikiirus. Temperatuuri, mille juures ensüümreaktsiooni kiirus on maksimaalne, nim. ensüümreaktsiooni temperatuurioptimumiks. Loomorganismide enamike E-de puhul on see 37-40°. Kõrgematel temperatuuridel langeb reaktsioonikiirus ensüümvalgu denatureerumise tõttu, madalamatel temperatuuridel aga põhiliselt E ja S interaktsioonide vähenemise tõttu. Taimede

ja mikroobide E-de temperatuurioptimum on enamasti 25-30° (on ka erandeid, näit. linnaste amülaasil on see 50-60°). E-de temperatuurisõltuvus oleneb [S]-st, keskkonna pH-st jt. tingimustest. Temperatuuri toimet ensüümreaktsioonidele tuleb arvestada mitmetel põhjustel. Näiteks, 1) palavik tõstab ensüümreaktsioonide kiirust 20-35%, s.t. tõuseb ka endogeensete substraatide kiire kulutamine ja järelikult tuleb silmas pidada vajadust liigselt kulutatud substraatide eksogeenseks kompenseerimiseks; 2) kunstlik jahutamine alandab organismis toimuvate ensüümreaktsioonide kiirust, mis vähendab aine- ja energiakulu ja pikendab rakkude eluvõimet ekstreemsetes tingimustes (operatsioonide sooritamine madalate temperatuuride juures); 3) toiduainete säilitamine madalatel temperatuuridel pärsib nii nendes olevate ensüümide kui ka riknemist põhjustavate mikroorganismide aktiivsust.

Keskkonna pH ja reaktsioonikiirus. Ensüümreaktsiooni kiirus on maksimaalne teatud kitsas pH väärtuste piirkonnas. Seda nim. ensüümreaktsiooni pH optimumiks. Loomorganismides on enamike ensüümide pH-optimum vahemikus 6-8. Sõltuvalt koelisest (rakulisest) lokalisatsioonist on ka erinevusi. Näit. pepsiini pH-optimum on 1,5-2,5, happelisel fosfataasil 4,5-5,0, arginaasil 9,5-9,9. pH põhitoime ensüümreaktsioonile seisneb E aktiivtsentri ja S funktsionaalsete rühmade ionisatsiooni muutmises.

Ioontugevus ja reaktsioonikiirus. Keskkonna ioontugevus (ioonide koosseis ja laeng) mõjutab ensüümreaktsiooni kiirust põhiliselt järgmiselt: 1) ta muudab ensüümvalgu hüdratatsiooni; 2) ioonid võivad soodustada ensüümvalgu katalüütiliselt aktiivse konformatsiooni kujunemist.

Koensüümid ja reaktsioonikiirus. NB! Vajaliku hulga liitensüümi tekkeks on tarvis vastava koensüümi teatud kontsentratsiooni, seega ka vastava vitamiini teatud kontsentratsiooni inimorganismis (NB! vitaminoteraapia, vt. ka vitamiinid ja koensüümid). Lihtsustatult illustreeriks liitensüümi teket järgmine skeem:



Inhibiitorid, aktivaatorid ja reaktsioonikiirus. Inhibiitorite ja aktivaatorite olemasolu mõjutab samuti oluliselt ensüümreaktsiooni kiirust. Hinnates eeskätt nende faktorite bioregulaatorset

aspekti, vaatleme inhibiitoreid ja aktivaatoreid ensüümide aktiivsuse regulatsiooni teema juures.

ENSÜÜMREAKTSIOONIDE PÖÖRDUVUS

Organismis esineb rohkesti ensüümreaktsioone, kus üks ja seesama ensüüm katalüüsib nii otse- kui ka pöördreaktsiooni. Näit. lipaasid lõhustavad neutraalrasvu glütserooliks ja rasvhapeteks. Viimaste kontsentratsiooni kasvamisel hakkab suurenema aga pöördreaktsiooni (rasvhapetest ja glütseroolist neutraalrasvade süntees) kiirus lipaasi toimel. Ideaalsel juhul otse ja pöördreaktsiooni kiirus võrdsustuvad.

Taoline pöörduvus on loomulikult lihtsustus ja pole kindel reegel. Kui organismi vajadustest sõltuvalt kasutatakse vabanev glütserool ja rasvhapped energia saamiseks ära, siis ei pruugi pöördreaktsioon antud hetkedel toimuda. Või näit. seedetraktis on selle reaktsiooni tasakaal nihutatud hüdrolyüüsi suunas, neutraalrasvade resünteesis soole limaskestas aga sünteesi suunas.

Kui produktide vaba energia väärtus ületab aga substraadi vaba energia väärtuse, katalüüsib otsereaktsiooni üks ja pöördreaktsiooni teine ensüüm. Neid reaktsioone on küll oluliselt vähem, kuid NB! nad on reeglina metaboolsete protsesside võtmereaktsioonid.

KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Biomaterjalis ~~oleva~~ ensüümi kvantitatiivne määramine on komplitseeritud, kuna 1) E kui valgu määramist segavad teised valgud ja 2) E hulka biomaterjalis on väga väike. Seetõttu määrataksegi E hulka kaudselt, s.t. tema aktiivsuse määramise kaudu. Teisisõnu, E hulka määratakse S hulga vähenemise või P hulga suurenemise kaudu ajaühikus. Rakustruktuurides lokaliseeruvaid ensüüme on enamasti vajalik määramiseks isoleerida ensüümpreparaatidena. Kasutatakse tüüpilisi valkude puhastamise võtteid (vt. vastav teema). Võtmemomendiks on ensüümivalgu denatureerumise vältimine. Vereseerumis ja teistes biovedelikes on ensüümid lahustunult,

mistõttu neid saab koheselt kasutada ensüümide kvantitatiivseks määramiseks. Ensüümvalku pole kaudselt vaja määrata, kui meil on isoleeritud homogeenne, kristalne ensüüm. Bioaktiivsuse mõttes võib määramine ka sel puhul kaudseks jääda, kuna ensüümvalgu hulk ei pruugi tegelikult olla ensüümaktiivsuse 100% kriteerium (näit. osa molekulide võib olla denatureerunud jne.).

Ensüümaktiivsuse väljendamisega ühikud. Ensüümaktiivsuse rahvusvaheliseks ühikuks on ensüümi hulk, mis muundab 1 μ mooli substraati minutis (E või U = unit). Kasutatakse ka eriaktiivsuse mõistet, mis on substraat μ moolides/min üldvalgu mg-de kohta. Teisisõnu, on see U arv mg üldvalgu kohta e. U/mg valk. Eriaktiivsuse mõistet tarvitatakse sageli osaliselt puhaste ensüümide korral, sest ta näitab sisuliselt antud ensüümvalgu hulka üldvalgu kohta.

On soovitatud kasutada ka teist rahvusvahelist aktiivsuse ühikut e. katal (kat). See oleks E hulk, mis muundab 1 mooli S sekundis (seega 1kat = 6×10^7 U e. 1U = 16,67 nkat). Ensüömoloogia kasutab ka terminit "molekulaarne aktiivsus". See on S molekulide arv, mida üks ensüümi molekul muundab minutis.

Ensüümaktiivsuse määramise tingimused. Vastava ensüümi jaoks luuakse optimaalsed tingimused: küllastav [S], optimaalne keskkonna pH ja temperatuur, kofaktori küllastav kontsentratsioon. Tingimused peavad tagama lineaarse sõltuvuse reaktsioonikiiruse ja keskkonda lisatud E hulga vahel (vt. kineetika).

S ja/või P hulga määramine. Analüütilised tüüpmeetodid on kolorimeetrilised ja spektrofotomeetrilised, harvem radiomeetrilised. S või P hulga registreerimine toimub kas peale ensüümreaktsiooni katkestamist või pidevalt ensüümreaktsiooni kestel. Viimane on tüüpiline just kineetilistele eksperimentidele.

AKTIIVSUSE REGULATSIOON

Ensüümid on reguleeritava aktiivsusega katalüsaatorid. Seetõttu on nende regulatsiooniprobleemid väga olulised nii biokeemilises kui ka puhtpraktilises mõttes. Regulatsiooni käsitletakse detailsemalt spetsiaalsetes loengutes. Siinkohal esitame vaid

põhiliste regulatsioonivariantide loetelu koos vastavate põhimõistetega.

1. **Ensüümide aktivatsioon ja inhibitsioon.** Aktivaatorid on ensüümreaktsiooni kiirust oluliselt tõstvad faktorid. Inhibiitoriteks nim. faktoreid, mis pidurdavad osaliselt või täielikult ensüümreaktsiooni. NB! Paljude ravimite toime realiseerub vastava(te) ensüümreaktsiooni(de) inhibeerimise kaudu.

2. **Ensüümvalgu modifitseerimine.** Mitmete metabolismi võtmeensüümide aktiveerimine - desaktiveerimine (s.t. regulatsioon) toimub organismis fosforüülumise - defosforüülumise süsteemina. Seda nim. ensüümi biokeemiliseks modifitseerimiseks.

3. **Autokatalüütiline aktivatsioon.** See on protsess, milles ensüümide inaktiivne eelühend (proensüüm) muudetakse aktiivseks alles antud ensüümi toime kohas. Selles osaleb ka juba olemasolev antud ensüümi aktiivne molekulaarne vorm. Aktivatsiooni käigus eraldub proensüümist tavaliselt oligopeptiidne fragment.

4. **Allosteeriline regulatsioon.** Metabolismi nn. võtmeensüümid omavad peale aktiivtsentri ka regulatoorset ehk allosteerilist tsentrit. Viimase kaudu toimub nende E-de funktsioneerimise väga täpne reguleerimine mitmete efektorite abil. (Näit. hemoglobiinile O₂ sidumise kiirust reguleeritakse Hb subühikute regulatoorsete tsentrite kaudu; Na-pumba allosteeriline regulatsioon toimub Na⁺ ja K⁺ abil). NB! Paljud ravimid ongi teatud E-de allosteerilised regulaatorid.

5. **Regulatsioon ensüümi sünteesi tasemel.** Vastava ensüümi sünteesi stimuleerimine/indutseerimine või pärssimine on samuti regulatsioonimehhanism. Faktoreid, mis indutseerivad E sünteesi nim. induktoriteks e. derepressoriteks, pärssivaid faktoreid nim. aga repressoriteks. Vaata valgu biosünteesi regulatsioon.

6. **Kompartmentsatsioon kui regulatsioon.** See on vastavate E-de lokaliseerimine raku teatavates kindlates osades/struktuurides ehk nn. kompartmentides. Näit. rasvhapete oksüdatsiooni E-d lokaliseeruvad mitokondrites, aga rasvhapete sünteesi E-d tsütoplasmas. Kompartmentsatsioon tagab ensüümreaktsioonide eraldatuse ja kindla järjestuse.

MOLEKULAARSED ERIVORMID

Antud termin tähendab ensüümide perekondi, mille üksikensüümid erinevad molekulaarselt struktuurilt ja füüsiko-keemilistelt omadustelt, kuid **katalüüsivad sama reaktsiooni**. Tekkemehhanismi alusel eristatakse: 1) isoensüüme (isosüüme) ja 2) ülejäanud molekulaarseid erivorme.

Isoensüümid on erineva geneetilise tekkemehhanismiga molekulaarsed vormid. Võib eristada isoensüümide järgmisi konkreetseid variante: a) kombineerunud on varieeruva geneetilise päritoluga subühikud (näit. laktaadi dehüdrogenaas, vt. allpool); b) geneetiliselt erinevad ensüümvalgu isovormid (näit. rakuplasma ja mitokondriaalne malaadi dehüdrogenaas); c) geneetilised (allo-morfsed) ühe ensüümvalgu variandid, milles AH-jääkide teatud ümberpaigutumine (erinev primaarstruktuur) pole muutnud E-mi spetsiifilist funktsiooni (glükoosi kinaas, heksoosi kinaas).

Ülejäänud molekulaarsete erivormide aluseks on mittegeneetilised tekkemehhanismid. Eristatakse järgmisi variante :a) üks ja sama ensüümvalk on konjugeerunud erinevate aatomirühmade või gruppidega (fosforülaas a ja b); b) ühe ja sama subühiku (monomeeri) erinevad homopolümeerid (glutamaadi dehüdrogenaasi erivormid).

Isoensüümide tähtsus. Antud ensüümi isoensüümne koostis (spekter) erinevates kudedes ja rakkudes võib olla erinev. See lubab erinevatel kudedel ja rakkudel adekvaatselt täita oma spetsiifilisi funktsioone. Kuna isoensüümid erinevad suguluselt substraatidele ja katalüüsi efektiivsusest, siis tagavad isoensüümide variatsioonid otse- ja pöördreaktsioonide erineva kiiruse. See lubab biokeemilisi protsesse suunata, kuna muundumiste suuna määrab raku antud kompartmendis ülekaalus olev isoensüüm.

Isoensüümide määramine on kliiniliselt olulise tähtsusega. Näit. laktaadi dehüdrogenaas (LDH) sisaldab 4 subühikut (jagunevad H ja M tüüpi: H = heart e. süda ja M = muscle e. lihas), mis kombineeruvad 5 isovormiks:

LDH₁ - 4 H tüüpi subühikut (ülekaalus südamekoos)

LDH₂ - 3 H ja 1 M tüüpi subühikut

LDH₃ - 2 H ja 2 M tüüpi subühikut

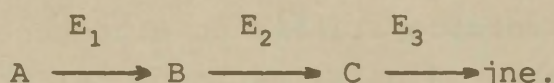
LDH₄ - 1 H ja 3 M tüüpi subühikut

LDH₅ - 4 M tüüpi subühikut (ülekaalus skeletilihases)

Kui näit. vereseerumi elektroforegrammil tuvastatakse LDH₅, viitab see südamelihase patoloogiale (vt. raamatu kolmas osa).

MULTIENSÜÜMSÜSTEEMID

Need on ensüümide erinevad organisatsioonilised süsteemid. Eristatakse järgmisi organisatsiooni tasemeid: 1) **funktsionaalselt seotud ensüümid** - sel juhul ei ole üksikensüümid struktuurses kontaktis. Substraadimolekulid difundeeruvad vastava E juurde, kusjuures esimese E-i produkt on teise E-i substraadiks (näit. glükolüüs).



2) **Struktuurselt-funktsionaalselt seotud ensüümid** - üksikensüümid on otseses kontaktis ja moodustavad kompleksi, mis viib läbi terve reaktsioonide ahela või tsükli (näit. rasvhapete süntees).

3) **Segatüüpi seotud ensüümid** - nendes multiensüümsüsteemides on mõlema eelmise süsteemi elemente (näit. hingamisahela E-d mitokondrite sisemembraanis).

Multiensüümsüsteemide **bioloogiline tähtsus** on: a) energiaökonoomia (substraatide difundeerumise tee vastava üksikensüümi juurde on minimaalne); b) luuakse ajalised ja ruumilised tingimused erinevate protsesside järjestikuliseks toimumiseks; c) efektiivse regulatsiooni võimalikkus (NB! võtmeensüümid).

PRAKTILINE KASUTAMINE

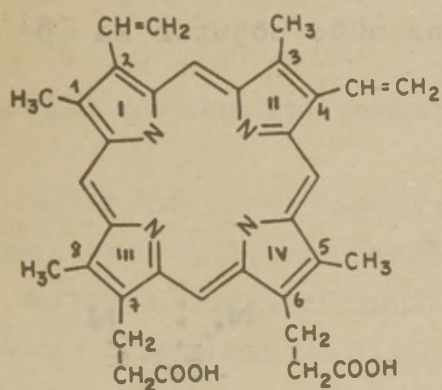
Ensüümid kui spetsiifilise ja selektiivse iseloomuga valgud on

praktilises elus laialdaselt kasutusel. Tooksime mõned näited. Teatud ensüümpreparaate tarvitatakse haljasmassi sileerimisliandina (parandab sööda toiteväärtust). Amülaasi preparaatidega hüdrolüüsitakse tärklisist leiva tootmisprotsessis. Ensüümi pektiinaasiga lõhutakse toiduainete tööstuses taimerakkude kesti, et suurendada mahlasaagist ja isoleerida parfümeeriatoodeks vajalikke eeterlikke õlisid. Proteolüütilisi E-me sisaldavad pesemisevahendid on väga head "valguplekkide" eemaldajad riidetelt. Väga mitmetel eesmärkidel kasutatakse nn. immobiliseeritud E-me (lahustumatud, fikseeritud ensüümid). Viimased on kompleksid, milles on E kovalentselt seostatud mingile kandjale (klaas, silikageel, tselluloos, PAAG, nailon, agaros jt.). Immobiliseeritud E säilitab oma kõrge aktiivsuse ja spetsiifilisuse ning teda on võimalik korduvalt puhastada reaktsiooniproduktidest ja uuesti kasutada. Need ensüümid on aluseks uuele teadusharule- tööstuslik ensüömoloogia ja eriti selle kitsale osale nn. insenerensüömoloogia. Viimane rakendab immobiliseeritud E-me väga mitmetel eesmärkidel. Näiteks, β -galaktosidaas, mis on immobiliseeritud magnetsegaja magnetpulgale hüdrolüüsis piima segamise käigus piimasuhkru, s.t. vähendab laktoosi seedimatusest tulenevaid/tekivaid probleeme. Kasutades mitmete immobiliseeritud E-de kombinatsioone on konstrueeritud ensüümreaktoreid farmatseutiliste preparaatide jt. produktide sünteesiks. Nii näiteks toodetakse magusamaitselisi suhkru asendajaid, millel puudub aga veresuhkrut tõstev toime ja liigne kalorsus. Tuntuim on siin aspartaam (Asp-Phe), mis on ≈ 300 korda suhkrust magusam ja mida lisatakse näit. dieet-kokakoolale. See molekul laguneb organismis Asp ja Phe-ks, andmata märgatavalt juurde kaloreid. Nüüdiskirurgias kasutatakse mädaste haavade puhastamiseks tampoone ja mähiseid, millele on immobiliseeritud proteolüütilisi ensüüme. Effektiivne võtte on immobiliseeritud E-de sisestamine organismi vastavatesse koerakkudesse liposoomide abil. Loomulikult kasutatakse E-me ka ensüümdiagnostikas (vt. raamatu kolmas osa).

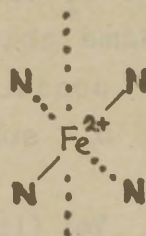
(pigmentiks vitamiin B₁₂, vt. vitamiinid). Heem-, klorofüll- ja kobamiidproteiinid on seejuures porfüriini sisaldavad kromoproteiinid. Lähtudes inimorganismist, käsitleb järgnev materjal põhiliselt heemproteiine.

Heemproteiinid jaotuvad funktsionaalselt **ensüümseteks** (tsütokroomid, katalaas, peroksüdaas) ja **mitteensüümseteks** (hemoglobiin, müoglobiin). Ensüümsed heemproteiinid kuuluvad konjugeerunud ensüümide, kui segamakromolekulide hulka, vt. allpool. Siikohal käsitleme aga klassikalisi mitteensüümseid heemproteiine.

Heemproteiinide pigmendiks on **heem**. Heem on kahevalentse raua ja protoporfüriini kompleks. Levinuim on **heem IX**, milles Fe²⁺ on seotud protoporfüriin IX-ga (see on üks protoporfüriini isomeeridest). Heem annabki hemoglobiinile (Hb) punaka värvuse.



Protoporfüriin (IX)



(lihtsustatult)

Heem (IX)

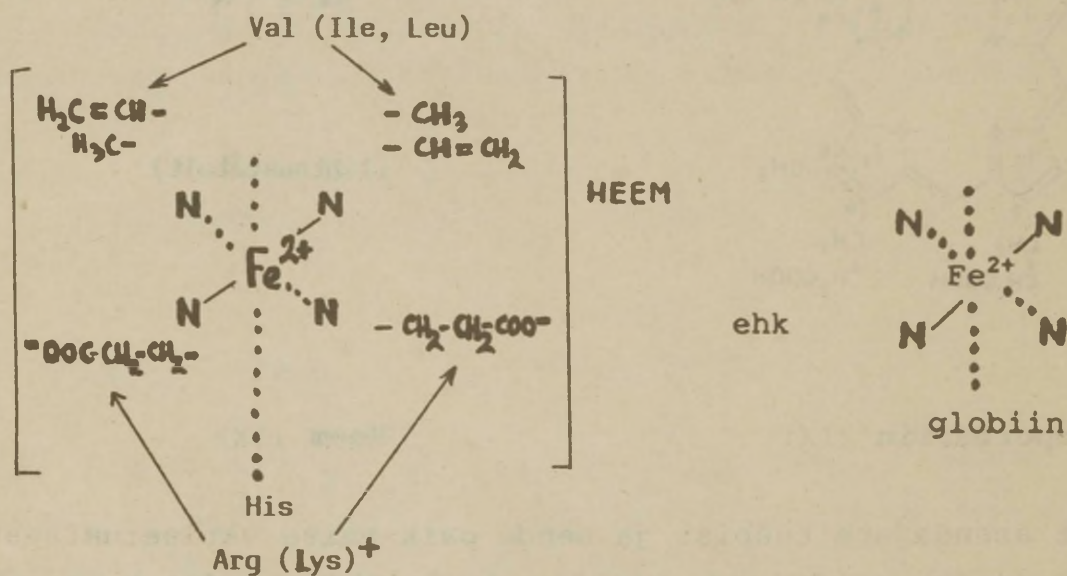
Tulenevalt asendajate tüübist ja nende paiknemise varieerumisest protoporfüriinis (alküülsed, vinüülsed, formüülsed jne.) esineb ka teisi heeme (heem a, c, d). Tsentraalne on siiski heem IX, mis esineb Hb-s.

Jooniselt näeme, et Fe²⁺ on seotud protoporfüriiniga kahe kovalentse ja kahe koordinatiivse sidemega. Kaks koordinatiivset sidet jääb vabaks. NB! Ühega neist seostub valk globiin, teisega

hapnik (vt. allpool). Kui raud oksüdeerub heemis 3-valentseks, moodustub hemiin e. ferriprotoporfüriin.

Hemoglobiini valguline osa globiin koosneb 4 subühikust (2α ja 2β). α -subühikud sisaldavad 141 AH-jääki, β -subühikud aga 146. Igal subühikul on "tasku" heemi jaoks. Järelikult: Hb = globiin + 4 heemi. Heemi hoitakse subühikute taskus hüdrofoobsete sidemete, ioonsete sidemete ja koordinatiivse sideme abil. Koordinatiivne side on globiinis oleva His imidasoolgrupi ja heemi Fe^{2+} vahel, ioonsed sidemed on Arg, Lys ja heemi propioonhappejääkide vahel (vt. joonis).

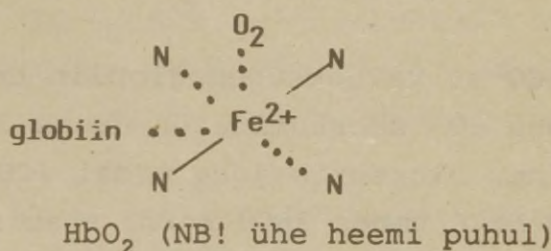
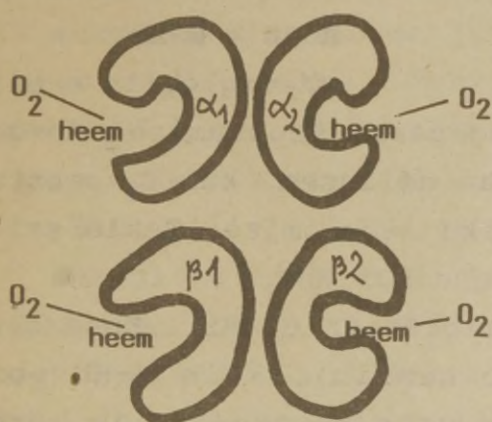
Hemoglobiini põhifunktsioon on O_2 sidumine ja transport kopsudest kudedesse. Hb sisaldus 100 ml vere kohta on 13-16 g, s.t. ühes erütrotsüüdis on ligikaudu 300 miljonit Hb molekuli. (1g Hb seob umbes 1,34 ml O_2). Hapniku sidumine toimub järgmiselt (vt. joonis). Esimene O_2 seostub α_1 -subühiku heemiga (Fe^{2+} vaba koordinatiivse sideme abil). Muutub α_1 konformatsioon, seega ka α_1 ja α_2 vaheliste ioonsete sidemete arv, mis oluliselt kergendab teise O_2 ühinemist α_2 -subühiku heemiga. Kuna nüüd mõjutub ka β -sub-



Hemoglobiin (globiini ja heemi seostumine)

ühikute konformatsioon, on kolmanda O_2 seostumine β_1 -subühiku heemiga veelgi kiirem. Kaasneb β_1 ja β_2 vaheliste ioonsete side-

mete arvu muutus, mistõttu neljas O_2 seostub β_2 -le ülikiiresti (500-600 korda kiiremini, kui seostus esimene O_2). Sellist subühikute (heemide) vastastikust mõju nim. kooperatiivsuseks. Kooperatiivsus teeb võimalikuks Hb küllastamise O_2 -ga juba hapniku partiaalarõhu (pO_2) vähesel muutumisel alveolaarõhus.

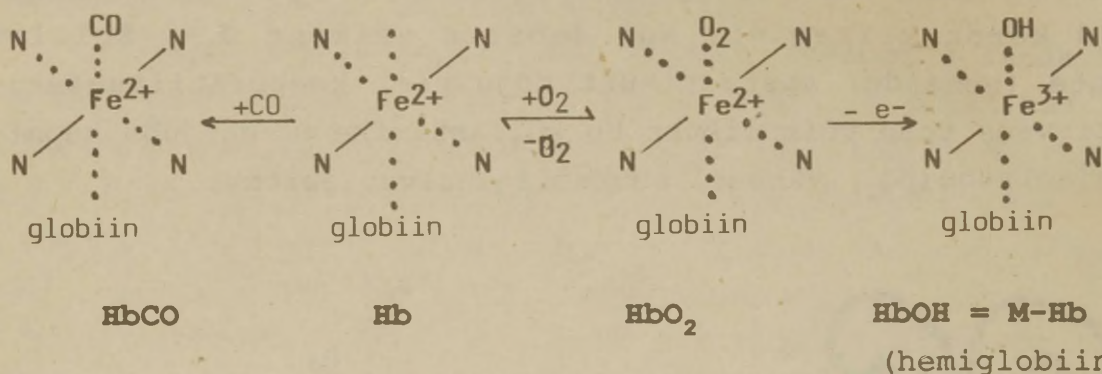


Hapniku seostumine heemidega

Subühikute vastastikust toimet (seega ka hapniku seostumist) reguleerivad ka 2,3-difosfoglütseraat, $[H^+]$, $[CO_2]$. NB! Hemoglobiini molekul (desoksühemoglobiin) seob seega 4 molekuli hapnikku. HbO_2 (oksühemoglobiin) teke pole oksüdatsioon, kuna raua oksüdatsiooniate ei muutu. Hapniku sidumine on **pöörduv**.

Hapniku molekulide vabanemine koekapillaaris HbO_2 -st on samuti kooperatiivne, s.t. peale esimese O_2 vabanemist vabanevad järgmised hapniku molekulid järjest kiiremini. Seega: O_2 partiaalarõhu ainult 4-kordne langus koekapillaaris vabastab oksühemoglobiinilt kuni 80% hapnikku. Kui protsess poleks kooperatiivne, siis peaks partiaalarõhku langetama umbes 85 korda. See pole organismis aga võimalik.

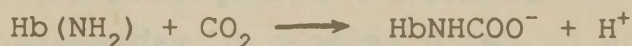
Hemoglobiini derivaadid. Heem võib siduda mitmesuguseid ligande. Järgneval skeemil näemegi Hb derivaatide teket.



HbCO e. karboksühemoglobiin tekib vingugaasi seostumisel Hb-ga. Kuna CO seostumine on umbes 300 korda afiinsem, kui O₂ seostumine, blokeerib juba madal [CO] hapniku seostumise. Peale selle on HbCO umbes 3500 korda stabiilsem ühend kui HbO₂.

HbOH e. **M-Hb** on methemoglobiin (ka hemiglobiin e. Hi). Kuna raud on oksüdeerunud 3-valentseks (tekib hemiin), siis M-Hb pole võimeline O₂ siduma. Kui M-Hb tekib suures koguses, siis sureb organism hapnikunälga. Tavaliselt väldib M-Hb teket ensümaatiline M-Hb redutseerimisfaktor, mille hulga vähenemisega kaasneb methemoglobinopaatia. Kuna M-Hb seob kergesti CN⁻ (asendab -OH), siis tekib mittetoksiline tsüaanmethemoglobiin e. tsüaanhemiglobiin (HiCN). See lubab sinihappe mürgistuse raviks kasutada M-Hb tekitajaid (näit. naatriumnitritit).

HbCO₂ e. karbohemoglobiin. Osa väljhingatavast CO₂-st (10-17%) transpordib kudedest kopsudesse Hb. CO₂ ei seostu heemiga, vaid globiiniga AH-jääkide vabade -NH₂ kaudu ning tekib HbCO₂.



Nimetatud derivaate saab määrata neeldumismaksimumide alusel.

Hb füsioloogilised ja anomaalsed vormid. **Füsioloogilised** vormid on järgmised:

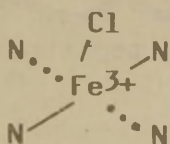
HbP - primitiivne Hb, mis ilmneb embrüo arengu algfaasis ning kaob kolmandal kuul. Koosneb algselt 4 γ-ahelast, hiljem 2α- ja 2 γ-ahelast. NB! HbP vormide esinemine vastsündinul viitab üsasisese arengu häiretele.

HbF - feetuse (loote Hb), mis koosneb 2α- ja 2γ-ahelast. Vast-sündinu hemoglobiinist on 70% HbF, ülejäänul on HbA ja HbA₂.

HbA - täiskasvanud organismi (lad.k. adultus = täiskasvanu) tavaline HB, milleks muutub enamik HbF sünnijärgse 3-4 kuu jooksul. Täiskasvanu puhul on 95-96% HbA (nim. ka HbA₁), 2-3% HbA₂ ja 0,1-2% HbF. HbA₂ koosneb 2 α - ja 2 δ -ahelast. HbA₂ ja HbF sugulus O₂-le on suurem kui HbA. Vananedes ilmub erütrotsüütidesse ka pisut HbA₃, mille β -subühikute ehitus on mõnevõrra muutunud.

Anomaalseid Hb on leitud ligikaudu 150 ning neis on tavaliselt muutunud AH-jääkide järjestus subühikutes ning koos sellega ka sugulus O₂ suhtes. Tüüpiline näide on HbS (erütrotsüüdid on kõverdunud sirbikujulisteks, sirprakuline aneemia), kus β -subühikute kuuendas asendis Glu asemel Val. On ka anomaalseid Hb-ne, näit. HbH, millel on 4 β -subühikut.

Hemoglobiinist vabanenud heem võib oksüdeeruda hematiiniks e. hüdroksühemiiniks (Fe³⁺ kannab -OH) või anda kolmevalentse raua vahendusel sooli (näit. hemiinkloriid). Hemiinkloriidi kristallid on aluseks vere tuvastamisel (näit. vereplekkide tuvastamisel kohtumeditisiinilises ekspertiisis).



hemiinkloriid

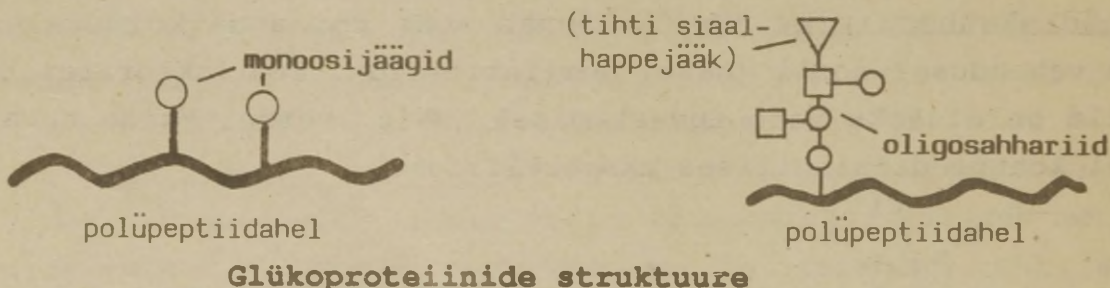
Heemproteiin on ka lihaskoe punane pigment **müoglobiin (Mb)**, mis on O₂ lühiajaline deponeeriija lihastes. Mb omab ühte polüpeptiidahelat ja heemi, s.t. ta meenutab Hb ühte subühikut. Mb molekul seob ühe hapniku molekuli, kusjuures sidumise iseloom on hüperboolne (vt. ligandide seostumine valkudega). See on füsioloogiliselt oluline, sest Mb asub lihases kus on suhteliselt madal hapniku osarõhk. Teisalt, tema küllastumine O₂ ei tohigi sigmoidaalselt sõltuda hapniku osarõhust nagu Hb-nil (ta on ju O₂ depoo). Oksümüoglobiin (MbO₂) on sinakasmust (hülgeleha ongi seetõttu sinakasmust). Kui 75kg kaaluva inimese O₂ tagavara on umbes 2500ml, siis ligikaudu 350ml (14%) on seotud Mb-ga.

Klorofüllproteiinides (klorofüllid, bakterioklorofüllid) on pigmendiks üldjoontes heemi meenutav struktuur, kuid raua asemel on selles Mg²⁺.

3. **SÜSIVESIK-VALK KOMPLEKSID.** Need on kompleksid, kus valgulise molekuliga on seostunud süsivesikuline komponent. Tinglikult eristatakse seejuures glükoproteiine ja proteoglükaane.

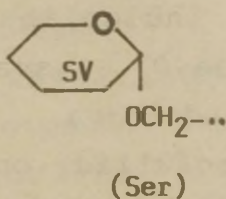
Glükoproteiinides on SV-ne osa enamasti 5-20%, kuigi on ka glükoproteiine süsivesikulise sisaldusega alla 1% või kuni 80%. Viimase näiteks on veregrupe determineerivad glükoproteiinid. NB! erinevalt proteoglükaanidest pole glükoproteiinide molekulis SV-jääkide paigutus reeglipäraselt korduv.

SV-komponent on glükoproteiinides monoos, monoosi derivaat või oligosahhariid. Levinumad on hargnenud oligosahhariidijäägid, mis sisaldavad enamasti Man, GlcNac, GalNac, siaalhapet. Reeglina on taolises oligosahhariidijäägis alla 15 monoosijäägi.

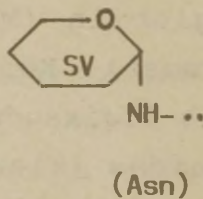


SV-se ja valgulise komponendi kovalentne side glükoproteiinides on põhiliselt: 1) O-glükosiidside - näit. Ser või Thr -OH kaudu (veregrupside glükoproteiinid, sülje mutsiinid) või Hyl ja Hyp -OH kaudu (kollageensete valkude puhul); 2) N-glükosiidside - näit. Asn amiidgrupi kaudu (glükoproteiinsed E-d ja hormoonid, immunoglobuliinid) või Arg ja Lys aminorühma kaudu; 3) esterside - näit. Glu ja Asp vaba -COOH kaudu.

O-glükosiidside



N-glükosiidside



Glükoproteiinides esinevate sidemete näiteid

Glükoproteiinsed on peaaegu kõik loomrakkude plasmamembraani

välispinna valgud, suur osa rakkude poolt sekreteeritavaid valke ja paljud vereplasma valgud. Seega, suur osa väljaspool rakku lokaliseeruvaid ja funktsioneerivaid valke esineb glükoproteiinsete segamakromolekulidena. SV-komponent annab valgule täiendavaid funktsioone ja kaitseb teda proteolüütiliste E-de vastu.

Glükoproteiinide kesksed biofunktsioonid on: 1) kaitsefunktsioon - sülje mutsiinid (suuõõne kaitse); seedetrakti mutsiinid (seedetrakti kaitse); immunoglobuliinid; verehüübimisfaktorid (protrombiin, fibrinogeen), antifriissed valgud (rakuvälised valgud Arktika kalade veres, mis takistavad jääkristallide teket); interferoonid (gripiviiruse teatud tüve neutraliseerijad), termostabiilsed valgud (ei denatureeru kergesti kuumaveelike mikroorganismide plasmamembraanis); 2) transpordifunktsioon - transferrin (raua transport), tseruloplasmiin (vase transport), transkortiin (kortisooli transport), haptoglobiin (Hb sidumine ja transport); 3) regulatoorne funktsioon - mitmed hormoonid on glükoproteiinid (kortikotropiin, gonadotropiinid); paljud retseptorid on samuti glükoproteiinsed; 4) katalüütiline funktsioon - mitmed E-d on glükoproteiinid (koliini esteraas jt.); 5) struktuurne funktsioon - loomarakkude plasmamembraani pinnal on õhuke elastne rakuümbris, mis moodustub plasmamembraani glükoproteiinide oligosahhariidsetest jääkidest (vähesel määral on selles ka glükolipiide). Tuntumad taolised segamakromolekulid on glükoforiin (erütrotsüütide membraanis) ja fibronektiin. Fibronektiin (lad.k. fibra = niit, nector = ühendama) ja teised membraanide pinna glükoproteiinid on rakkudevaheliste spetsiifiliste kontaktide aluseks. Nimelt, enamasti on oligosahhariidkomponendi terminaalsete otsaks siaalhape (vt. eespool), mis täidab teatud signaali osa antud glükoproteiini õiges paigutamises plasmamembraanis. NB! See kõik on aga ka väga oluline adekvaatseteks rakkudevahelisteks kontaktideks.

Soolelimaskestas mikrohõõrte epiteelirakkude valendikupoolne rakuümbris on suhteliselt paks võrkjas oligosahhariidijääkidest moodustis ja seda nim. glükokaaliksiks (sünonüüm on "kohev ümbris" = fuzzy coat, vt. seedimine ja imendumine).

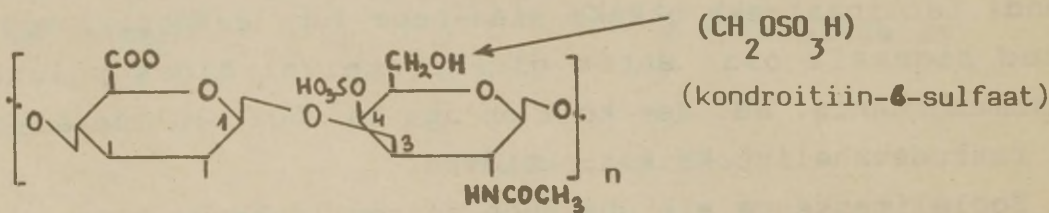
Proteoglükaanid on segamakromolekulid, milles glükoosaminoglü-

kaanid on kovalentselt seotud valkudega. NB! Glükoosaminoglükaanid on nüüdisaja termin! Varasemad nimetused olid heteropolüoosid e. mukopolüoosid. Proteoglükaanide kohta kasutatakse ka nimetust glükoosaminoproteoglükaanid. Kuigi süsivesik-valk komplekside liigendamine glükoproteiinideks ja proteoglükaanideks on tinglik, eristab proteoglükaane glükoproteiinidest siiski: 1) SV-komponent on heteropolüoos ja ta moodustab olulise osa molekulist (reeglina üle 95%) ja 2) SV-komponent on molekulis reegli-pärase (korduva) paigutusega. Toonitagem siinkohal veelkord, et kuna heteropolüoosid esinevad ja funktsioneerivad vaid seostunult valkudega, s.t. proteoglükaansete kompleksidena rakkudevahelises keskkonnas, siis pole õige neid käsitleda SV-te hulgas, vaid segamakromolekulidena.

Proteoglükaanid lokaliseeruvad geelitaolises rakkudevahelises matriksis ning sünoviaalvedelikus, kus nad täidavad "määrdeaine" funktsiooni.

Proteoglükaanide glükoosaminoglükaansed komponendid on: kondroitiin-4-sulfaat ja -6-sulfaat, dermatansulfaat, kerataansulfaat, hepariin ja heparaansulfaat, hüaluroonhape. Neid kõiki (NB ! polümeerid) saab vaadelda korduvatest disahhariidsetest ehitusüksustest (monomeeridest) kokkupanduna. Need disahhariidsed monomeerid on seejuures kokkupandud enamasti monooside derivaatidest (glükuroonhape, glükoosamiin, galaktoosamiin, GlcNAc, GalNAc, siaalhape), harvemini sisaldavad nad Man, Xyl, fukoosi. Vaatleksimegi alljärgnevalt proteoglükaanide glükoosaminoglükaanseid komponente:

Kondroitiinsulfaadid. Nende disahhariidne ehitusüksus koosneb



D- glükuroonhappe- GalNAc-4-sulfaadi
jääk jääk

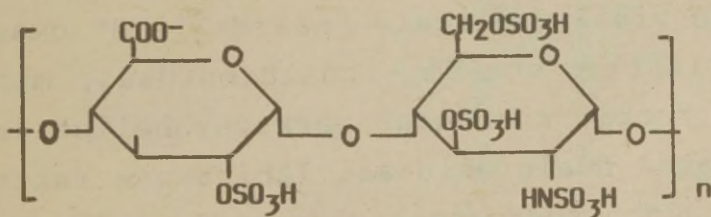
Kondroitiin-4-sulfaat (endine nimetus kondroitiinsulfaat A) glükuroonhapest ja GalNAc-4-sulfaadist (või -6-sulfaadist), mis

on seotud β -1,3 sidemega. Disahhariidsed üksused seostuvad aga β -1,4 sidemega. Nende M_r on 10 000- 60 000. Nad on luude, silma sarvkesta (kondroitiin-4-sulfaat) ja naha, kõõluste, häälepaelte, südameklappide (kondroitiin-6-sulfaat; vana nimi kondroitiinsulfaat C) proteoglükaanide heteropolüoosseks osaks. Neid mõlemaid leidub ka kõhredes. NB! Valku on vastavates proteoglükaanides 15-22% ja tema, kui teatud "tüve" külge kinnituvad SV-sed osad.

Dermataansulfaat (vana nimetus kondroitiinsulfaat B). Ta on kondroitiin-4-sulfaadi analoog, kusjuures glükuroonhappejäägi asemel on iduroonhappejääk. Sisaldub põhiliselt aordi seintes, aga ka nahas, selgroo diskides, kõhredes, kõõlustes. Erinevalt teistest kondroitiinsulfaatidest on ta vastupidav hüaluronidaaside toimele ja omab antikoaguleerivat efekti.

Kerataansulfaat. Tema disahhariidne ehitusüksus koosneb β -Gal ja β -GlcNAc-6-sulfaadist, mis seostuvad β -1,4 sidemega. Disahhariidsed ehitusüksused seostuvad omakorda sideme β -1,3 abil. Tema nimi tuleneb esmaleiust silma sarvkestas. Nüüdisajal eristatakse kerataansulfaat I (seostub polüpeptiidahela Asp jäägiga), mis on koos kondroitiiniga silma sarvkesta põhilisteks aineteks ja mis määravad ka sarvkesta optilise läbilaskvuse ning kerataansulfaat II (seostub polüpeptiidahela Ser või Thr jäägiga) ning teda leidub kõhres ja luudes.

Hepariin, heparaansulfaat. Korduv disahhariidne ehitusüksus hepariinis koosneb glükuronaat-2-sulfaadist ja N-sulfaatglükoosamiin-



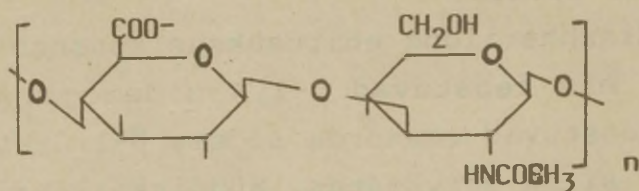
glükuronaat-2-sulfaadi jääk N-sulfaatglükoosamiin-6-sulfaadi jääk

Hepariin ($M_r \approx 16\ 000 - 20\ 000$)

6-sulfaadist. Heparaansulfaadi disahhariidne ehitusüksus koosneb

glükuronaat-2-sulfaadist ja GlcNac-6-sulfaadist (või on viimase asemel lihtsalt GlcNac). Hepariin ja heparaansulfaat ei kuulu erinevalt teistest glükoosaminoglükaanidest rakuvälise matriksi ehituskomponentide hulka. Neid toodavad sidekoe nuumrakud ja nad difundeeruvad vereringesse. Hepariini kompleks vereplasma glükoproteiinidega on tugev antikoagulant (parenteraalselt manustatuna takistab ka trombide teket). Hepariin kompleksis E lipoproteiinlipaasiga hüdrolüüsib aga lipiide (vt. lipoproteiinide metabolism).

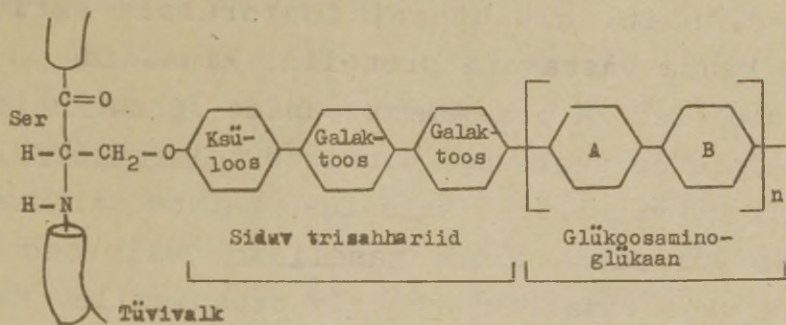
Hüaluroonhape (hüaluronaat). Korduv disahhariidne ehitusüksus koosneb glükuroonhapest ja GlcNac-st, mis on seostunud β -1,3 sideme abil. Disahhariidsed ehitusüksused seostuvad omavahel β -



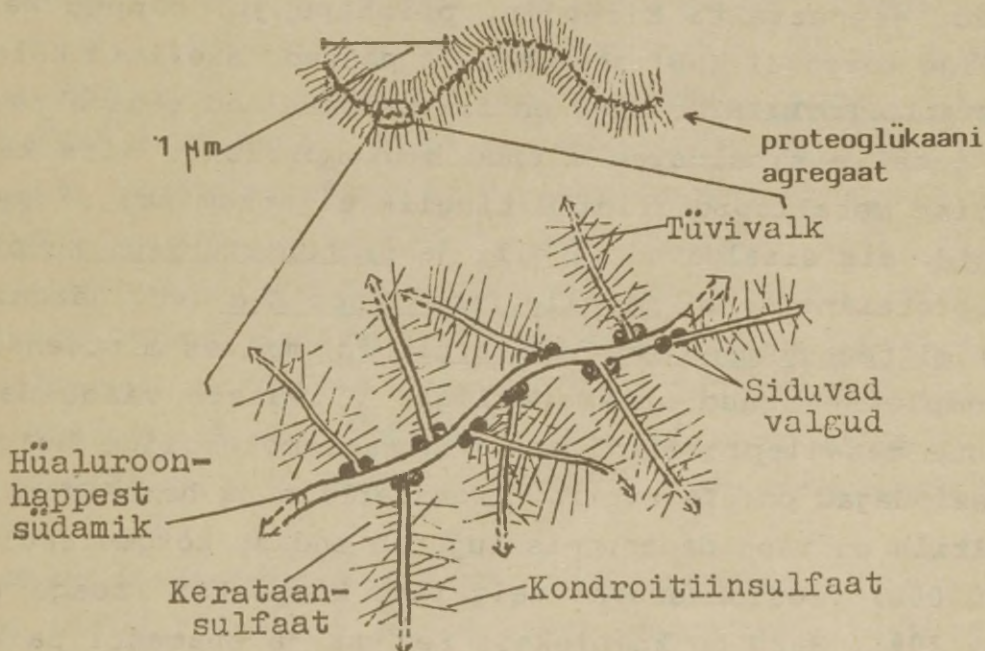
Hüaluronaat ($M_r \approx 20\ 000-500\ 000$)

1,4 sideme abil. Hüaluronaati esineb rohkesti kõhredes, sünoviaalvedelikus, silma klaaskehas, nahas. Hüaluronaat on rakuvahealise ruumi "biotsement". Ta takistab mikroobide, suurte molekulide ja kahjulike ainete tungimist kudesse, kuna ta sidudes vett muutub rakkude vahelises ruumis võrkjaks geeliks. Hüaluronaat annabki sünoviaalvedelikule "määrdelised" omadused. Rakkudes esineb spetsiifiline ensüüm - hüaluronidaas, mis sat- tudes rakkudevahelisse ruumi, suurendab rakkudevahelist läbita- vust. Seetõttu nimetatakse hüaluronidaasi läbitavuse faktoriks. Ka viljastamisel hüdrolüüsib spermatoosoidide hüaluronidaas muna- raku proteoglükaane, tehes võimalikuks nende tungimise munarakku. Juhul, kui hüaluronaadis hakkavad lagunema β -1,4 sidemed, hüa- luronaat depolümeeriseerub. Häirub rakkudevaheline filtersüsteem, rakkude vahele tungivad suured hüdofiilsed molekulid (kuhjub vesi) ja tekib turse.

Proteoglükaanide ehitus. Esimesel joonisel on näha, kuidas SV-komponent seostub tüvivalguga. Teisel joonisel on kõhre gigantne proteoglükaanne kompleks. See nn. pudeliharja taoline kompleks koosneb hüaluroonhappelisest südamikust (≈ 4200 nm), millele siduvate valkude abil kinnituvad proteoglükaansed fragmendid. Viimased koosnevad tüvivalgust (**core protein**) ja sellele korrapäraselt kinnitunud sadadest glükoosaminoglükaanijääkidest (kondroitiinsulfaat, kerataansulfaat jt.).



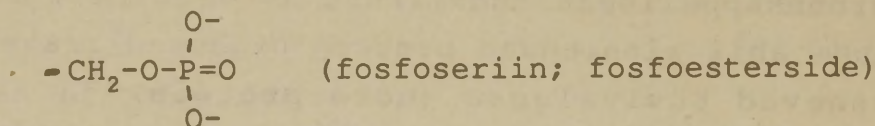
Glükoosamiinglükaanse ahela seostumine tüvivalguga



Gigantne proteoglükaanne kompleks

4. **FOSFOPROTEIINID.** Valgu fosforüülimine annab talle uued omadused ja funktsiooni(-d). Mitmete ensüümvalkude puhul on fos-

forüülimine/defosforüülimine nende aktiivsuse regulatsioonimehhanism (vt. E-d). Fosfoproteiinides seostub ortofosforhappejääk reeglina valgu Ser-jäägi -OH kaudu (vahel ka Thr -OH kaudu).



Paljud fosfoproteiinid täidavad katalüütilist funktsiooni. Fosfoproteiinsed E-d, näit. glükogeeni fosforülaas aktiveeritakse fosforüülimise kaudu vastavate proteiini kinaaside abil. Fosfoproteiinid on olulised ka plasmamembraanide struktuurielementidena. Fosfoproteiinid on veel väga olulised toitematerjalina, näit. munakollase valk ovovitelliin (sisaldab teiste valkude hulgas ka fosfoproteiine) või piimavalgud kaseiinid. Viimased on fosfori sisalduse tõttu väga vajalikud noorele organismile. Kaseiinid on piimas lahustuva Ca-soolana e. Ca-kaseinaatidena (NB! vabas vormis nad vees ei lahustu) ja nad ei kalgendu keetmisel. Noorloomade seedetrakti E reniin, piimhape jt. happed kalgendavad kaseiine kergesti (NB! seedumiseks peavad kaseiinid kalgenduma).

5. **METALLOPROTEIINID.** Need on funktsionaalsed segamakromolekulid. Kuna metalle sisaldavad mitmed biokompleksid, siis kasutatakse järgmist metalloproteiinide tinglikku jaotamist: a) metalloproteiinid, mis sisaldavad metalli ja protoporfüriini kompleksi (vt. kromoproteiinid); b) metalloproteiinsed E-d (vt. järgmine punkt) ja c) mitteensüümsed metalloproteiinid, milles mitteensüümne valk on komplekseerunud raskmetalliga. Viimaseid vaadeldaksegi nn. puhaste metalloproteiinidena segamakromolekulide hulgas. Nende tüüpesindajad on: ferritiin, transferriin ja hemosideriin.

Ferritiin on raua depoo, mis kujutab endast kõrgmolekulaarset ($M_r = 400\ 000$) veeslahustuvat valgulist kompleksi rauaga (rauda on umbes 20%). Raud on kompleksis Fe^{3+} -na ja enamasti paikneb anorgaanilise polümeeri koostises ($\text{O}=\text{Fe}-\text{OH}\dots\text{O}=\text{Fe}-\text{OH}$), seotuna koordinatiivselt peptiidgrupi lämmastiku aatomiga. Ferritiin on koondunud põrna, maksa ja luuüdise (organismi rauadepood).

Transferriin on raua transportiv veeslahustuv vereplasma glükoproteiin ($M_r = 90\ 000$). Sisaldab umbes 0,10% raua, mis on

Fe^{3+} . Transferrini molekul seob kaks raua aatomit.

Hemosideriin on ilmselt samuti raua depoovalk. Nimelt, kui ferritiini nn. rauda deponeeriv maht on ammendatud, moodustuvad põrna- ja maksarakkude mitokondrites vees mittelahustuvad hemosideriini graanulid. Hemosideriinses kompleksis sisaldub ka nukleotiide ja süsivesikuid.

6. KONJUGEERUNUD ENSÜÜMID KUI SEGAMAKROMOLEKULID. Konjugeerunud E-d on vaadeldavad nii liitensüümidena (vt. ensüümide ehitus) kui ka funktsionaalsete segamakromolekulidena. Viimasel puhul eristatakse: a) konjugeerunud E, mis sisaldavad metalli mingis mittevalgulises kompleksis ja b) konjugeerunud E, milles metall on vahetult, reeglina ka dissotsieeruvalt, seotud ensüümvalguga. Esimese rühma tüüpesindajad on heemproteiinsed E-d, mille puhul ensüüm-valk on konjugeerunud heemiga (**tsütokroomid, katalaasid, peroksüdaasid**; vt. bioloogiline oksüdatsioon). Teise grupi puhul on metalliioonid vajalikud aktivaatoritena/regulaatoritena, aga ka aktiivtsentri formeerumisel/ehituses (enamasti S sidumisaktis). Näit. Na^+ , K^+ -ATPaas (vajab S sidumiseks Mg^{2+} , aktiveerimiseks Na^+ ja K^+); alkoholi dehüdrogenaas (Zn^{2+}), arginaas (Mg^{2+}), türosinaas (Cu^+ , Cu^{2+}), ksantiini oksüdaas (Mo^{2+}) jne.

7. LIPIID-VALK KOMPLEKSID. Need on funktsionaalsed segamakromolekulid, mida jagatakse tinglikult kahte gruppi: a) struktuursed, rasvlahustuvad proteolipiidid ja b) veeslahustuvad vabad lipoproteiinid. **Struktuursed proteolipiidid** (nendes on valgu osakaal 65-85%) kuuluvad biomembraanide koostisesse ja nad on fosfolipiidide ning membraansete valkude kompleksid (vt. biomembraanid). **Vabad lipoproteiinid** (e. lipoproteiinid) on vereplasma, piima jt. biovedelike lipoproteiinid. Neid lipoproteiine me vereplasma näitel vaatlemegi.

Lipoproteiinide klassifikatsioon. Lipoproteiine võib klassifitseerida mitmeti: keemilise koostise järgi (näit. lipiidse ja valgulise komponendi sisalduse alusel), patogeneetiliste omaduste, s.t. aterosklerootilise riski järgi, immunoloogilise reaktiivsuse järgi spetsiifiliste antiseerumite suhtes (antiapoproteiinide suhtes), füüsikaliste parameetrite (elektroforeetiline liikuvus, tihedus jne.) alusel. Tunnustatuim on lipoproteiini-

nide klassifikatsioon, mis baseerub nende flotatsiooni omadustel ultratsentrifuugimisel (vt. tabel). Selle alusel lahutuvad lipoproteiinid 4 põhiklassi: **külomikronid** (chylomicrons), väga madala tihedusega lipoproteiinid (**VLDL**), madala tihedusega lipoproteiinid (**LDL**) ja kõrge tihedusega lipoproteiinid (**HDL**). Elektroforeetilise fraktsiooni nime järgi on: VLDL = pre- β -lipoproteiinid, LDL = β - lipoproteiinid ja HDL = α - lipoproteiinid.

Põhiklass	Tihedus (g/ml)	Diameeter (nm)	M_r	Elektroforeesi fraktsiooni nimi
Chylomicrons	<0,94	100-1000	5×10^9	chylomicrons
VLDL	0,94-1,006	30-80	$7,5 \times 10^6$	pre- β
LDL	1,006-1,063	15-25	$2,5 \times 10^6$	β
HDL	1,063-1,21	6-14	$2,5 \times 10^5$	α

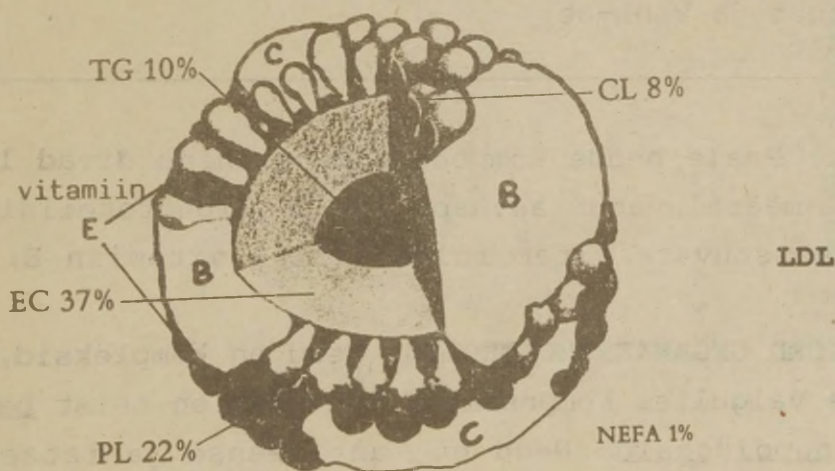
Kommentaariid. 1) LDL klass jaguneb tegelikult kaheks: a) vahepealse tihedusega lipoproteiinid (LDL₁ ehk IDL=intermediate-density lipoproteins, $d = 1,006-1,019$), mis tekivad VLDL muundumisel ja b) LDL₂ ($d = 1,019-1,063$), mis tekivad IDL katabolismis. NB! Just LDL₂ on olulise patogeneetilise efektiga metaboolsete häirete/haiguste korral. 2) HDL klass jaguneb kolmeks osaks: HDL₁ ($\approx 1,063$), HDL₂ (1,063-1,125) ja HDL₃ (1,125-1,21); 3) Peale nelja põhiklassi esineb vähestes hulkades veel väga kõrge tihedusega lipoproteiine (VHDL; 1,21-1,25) ja ainult patoloogiliste seisundite puhul ilmutavaid lipoproteiine. Viimaste hulka kuulub näit. lipoproteiin-X (see on fosfolipiidirikas LDL, mis ilmub verre kroonilise sapipaisu puhul) ja Lp(a) lipoproteiin (nim. ka vajuvaks pre-beeta lipoproteiiniks kuna tema tihedus on 1,055-1,085 ja elektroforeesil jääb ta pre-beeta fraktsiooni).

Lipoproteiinide keemiline koostis. Lipoproteiinides leidub: fosfolipiide (PL või FL), triglütseriide (TG), kolesteriide (EC), vaba kolesterooli (CL) ja vabu e. esterifitseerumata rasvhappeid (NEFA = nonesterified or free fatty acids). Lipoproteiinide valgulisi komponente nim. apoproteiinideks. Need on üheaahelalised valgud ja senini on leitud 7"primaarset"apoproteiini: apoproteiin A (sisaldab apoAI ja AII), apoproteiin B, apoproteiin C (sisaldab

apoCI, CII ja CIII), apoproteiin D, apoproteiin E (sisaldab apoEI, EII ja EIII), apoproteiin F ja apoproteiin G. NB! Mõned "primaarsed" apoproteiinid võivad lipoproteiinides kombineeruda, andes "sekundaarseid" apoproteiine. Lipoproteiinide üldistatud keemiline ehitus on toodud järgnevas tabelis.

Põhiklass	CL	EC	PL	TG	NEFA	Apoproteiinid	Lipiidide % Valkude %
Chylomicrons	3	5	7	83	?	AI, AII, B, CI, CII, CIII	98/2
VLDL	7	12	18	51	2	B, E, CI, CII, CIII	90/10
LDL	8	37	22	10	1	B, C	78/22
HDL	3	14	24	6	1	AI, AII, CI, CII, CIII	48/52

Lipoproteiinide üldistatud ehitus. Lipoproteiinsete osakeste üldistatud ehitust iseloomustame LDL skemaatilise joonise alusel. Hüdrofiilsed PL "peakesed" ja CL hüdrofiilne osa (-OH rühm) ning hüdrofiilsed valgu molekulid paigutuvad kompleksi pinnale. Hüdrofoobsed komponendid (TG ja kolesteriidid) või nende osad (PL hüdrofoobsed osad) on kompleksi sisemuses. NB! Selline üldehitus



kehtib täiesti ka HDL jaoks. NB! Nii LDL kui ka HDL sisaldavad vitamiin E, β -karoteeni ja ilmselt ka lükopeeni. Külomikronite ja VLDL komponentide koosseis on mõnevõrra teistsugune.

Lipoproteiinide sünteesikohad ja funktsioon. Järgnevas tabelis on antud lipoproteiinide sünteesikohad ja funktsioon.

Põhiklass	Sünteesikoht	Valdav komponent	Funktsioon
Chylomicrons	peensool	TG (83%)	formeeruvad toidulipiidide imendumise käigus; eksisteerivad rikkalikult veres just söögijärgselt, eksogeensete lipiidide ja nende komponentide transportijad
VLDL	maks, peensool	TG (51%)	endogeensete lipiidide (eriti TG) transport perifeersetesse kudedesse
LDL	intravas- kulaarne: VLDL lagu- produkt	EC (37%)	kolesterooli transport perifeersetesse kudedesse
HDL	maks, peen- sool, intra- vaskulaarne: külomikroni- test ja VLDL-st	PL (24%)	kolesterooli tagasitransport kudedest maksa (seal osa kolesterooli muundub ja väljutatakse sapiga)

Kommentaariid. 1) Peale nende komponentide transpordivad lipoproteiinid vähesel määral vabu rasvhappeid. 2) lipoproteiinid on ka olulised rasvlahustuvate vitamiinide (eriti vitamiin E) transportijad.

8. MITTEVALGULISED SEGAMAKROMOLEKULID. Need on kompleksid, millede koosseisus pole valgulisi komponente. Tuntumad on neist bakterite membraanide lipopolüoosid. Need on antigeense ja retseptoorse funktsiooniga ning permeaabelsust reguleeriva ja toksikogeense toimega.