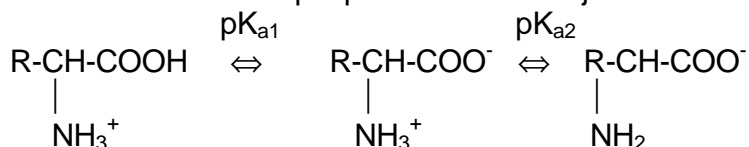


A. AMINOKYSELINY, PEPTIDY A BÍLKOVINY

Chování disociabilních skupin podstatně ovlivňuje vlastnosti aminokyselin a bílkovin:



Tabulka I. Disociační konstanty aminokyselin				
	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _a boční řetězec protonovaný	-> deprotonovaný
Ala	2,3	9,9		
Gly	2,4	9,8		
Phe	1,8	9,1		
Ser	2,1	9,2		
Val	2,3	9,6		
Asp	2,0	10,0	3,9 -COOH	-> -COO ⁻
Glu	2,2	9,7	4,3 -COOH	-> -COO ⁻
His	1,8	9,2	6,0 -imidazolium ⁺	-> -imidazol
Cys	1,8	10,8	8,3 -SH	-> -S ⁻
Tyr	2,2	9,1	10,9 -fenyl-OH	-> -fenyl-O ⁻
Lys	2,2	9,2	10,8 -NH ₃ ⁺	-> -NH ₂
Arg	1,8	9,0	12,5 -guanidinium ⁺	-> -guanidin
Asn	2,0	8,8		
Gln	2,2	9,1		
Trp	2,4	9,4		
Leu	2,4	9,6		
Ile	2,3	9,6		
Met	2,3	9,2		
Thr	2,2	9,1		
Pro	2,0	10,6		

IZOELEKTRICKÝ BOD (pI) AMINOKYSELIN

-odpovídá hodnotě pH, při které je aminokyselina elektroneutrální

Výpočet pI

Obečně: $\text{pI} = 1/2 (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2})$
pI je aritmetickým průměrem pK_a kyselých a bazických skupin

Bazické aminokyseliny: $\text{pI} = 1/2 (\text{pK}_{a2} + \text{pK}_{a3})$
pI bazických aminokyselin je průměrem pK_a obou bazických skupin

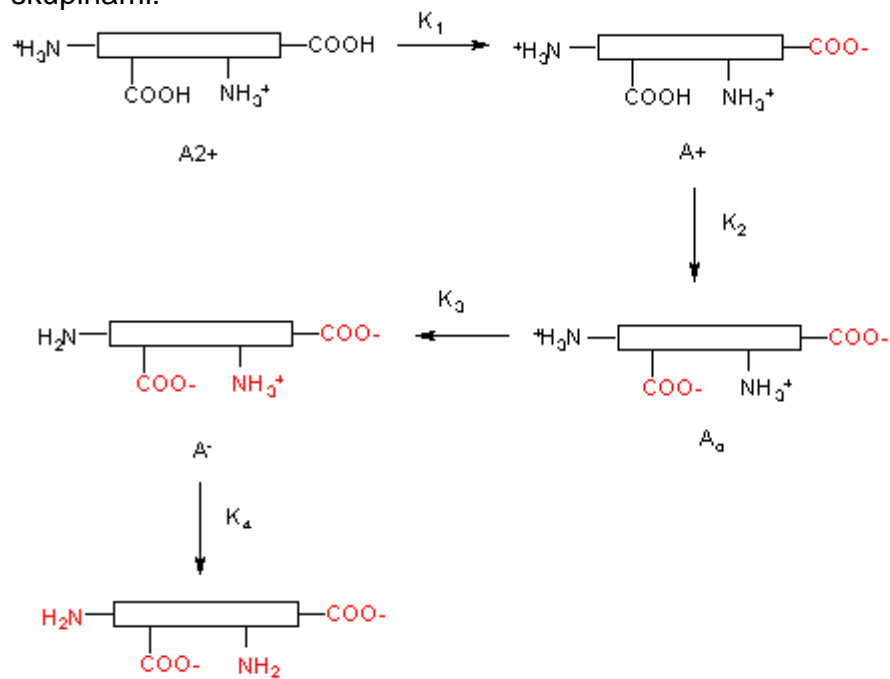
Kyselých aminokyselin: $\text{pI} = 1/2 (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a3})$
pI kyselých aminokyselin je průměrem pK_a obou kyselých skupin

Velmi slabě kyselých AK (Tyr, Cys) $\text{pI} = -1/2 \log(\text{K}_{a1} \cdot \text{K}_{a2} + \text{K}_{a1} \cdot \text{K}_{a3})$
Při výpočtu pI pro Tyr, Cys je třeba zohlednit příspěvky všech disociabilních skupin

PEPTIDY

Peptidy a bílkoviny zapisujeme zleva od N-konce k C-konci.

Disociace peptidů s více disociabilními skupinami:



Výpočet pI peptidů a bílkovin:

internetové algoritmy např. na <http://www.expasy.org> -> pI/MW tool
-zde také další nástroje pro analýzu primární struktury bílkovin

BÍLKOVINY

Primární struktura bílkovin a její studium

Enzymy a činidla štěpící peptidové vazby:

Enzym/činidlo	Místo hydrolýzy
Trypsin	Lys, Arg (C strana)
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr (C strana)
Bromkyan	Met (C strana)
Aminopeptidáza	odštěpení N-terminální aminokyseliny
Karboxypeptidáza	odštěpení C-terminální aminokyseliny

Další reagens:

LiBH_4 – redukce $-\text{COOH} \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH}$

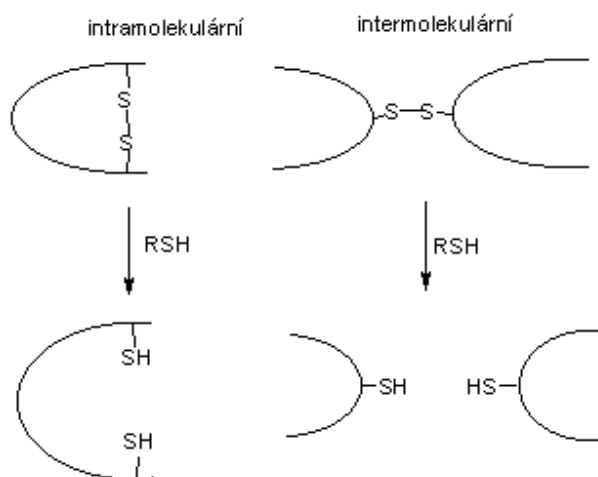
ninhydrin – reakce s $-\text{NH}_2 \rightarrow$ fialové zbarvení (důkaz bílkovin), s Pro žluté zbarvení

močovina – chaotropní činidlo

SDS – detergent

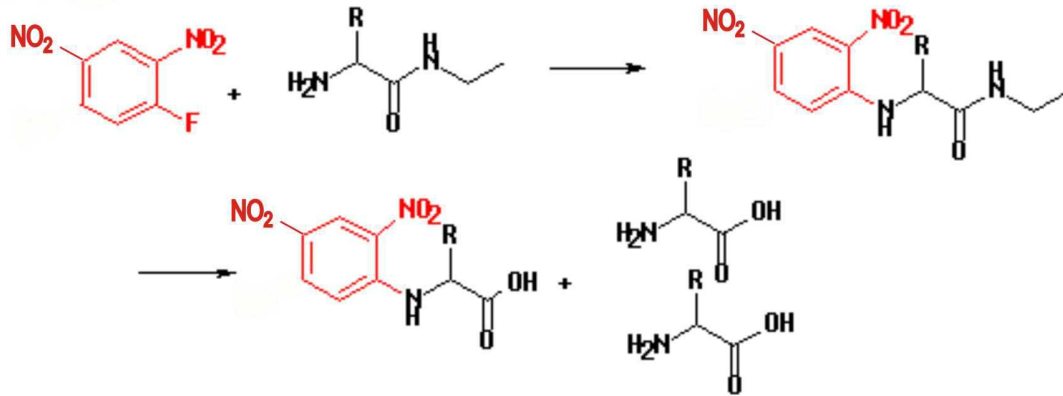
merkptoethanol, dithiothreitol- redukční činidla (viz obrázek)

Redukce disulfidických můstků merkptoethanolem



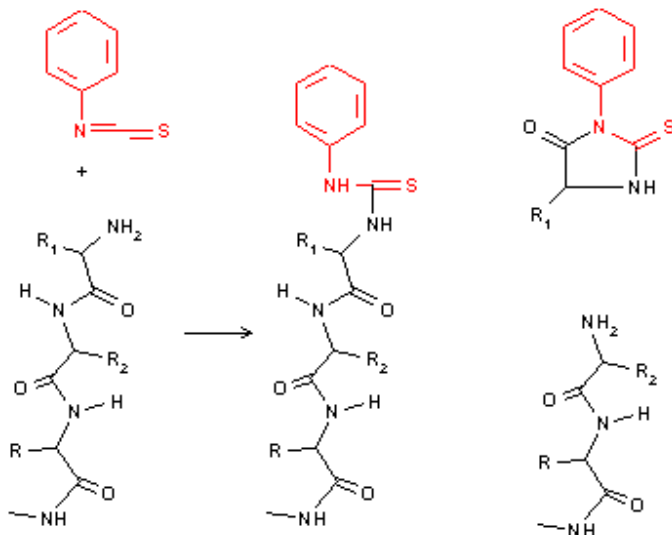
Sangerova reakce

Sangerovo činidlo (2,4-DNFB)



Edmanovo odbourávání

Fenylisothiokyanat



Hmotnostní spektrometrie

- rutinní identifikace a kvantifikace proteinů na základě sekvenace (fragmentace) peptidů vzniklých štepením trypsinem ("bottom-up" proteomika)
- sekvenace intaktních proteinů ("top-down" proteomika, technická omezení)

Sekundární struktura bílkovin

Sekundární struktura bílkovin je důsledkem její primární struktury. Sekundární strukturu bílkoviny proto lze předpovědět ze znalosti primární struktury např. pomocí počítačového modelování.

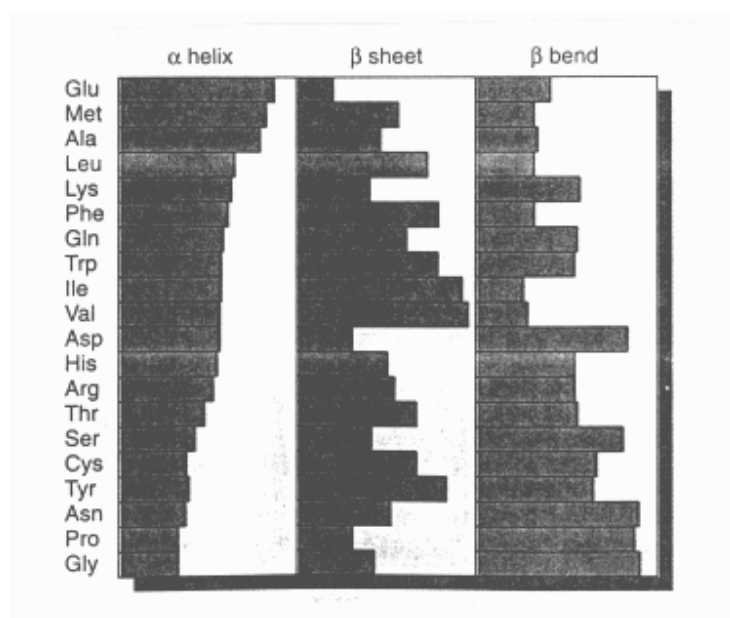
K základním typům sekundární struktury bílkovin patří:

helikální struktury: α -helix, další helixy,...

β -struktury: skládaný list (paralelní x antiparalelní),...

reverzní smyčka (β -otočka),...

Relativní pravděpodobnost, že se daná aminokyselina vyskytne v α -šroubovici, skládaném listu nebo v reverzní smyčce je udána v následujícím grafu:



Terciární struktura bílkovin

-fibrilární a globulární proteiny

-studium: rentgenová strukturní analýza

Kvarterní struktura bílkovin

-funkční enzym je tvořen více polypeptidovými podjednotkami

Stabilita proteinů

-elektrostatické síly

-vodíkové můstky

-hydrofobní interakce

-disulfidové vazby

ÚLOHY

1. Napište vzorce aminokyselin

- majících aromatické jádro
- obsahujících síru
- majících při pH 7 celkový kladný náboj
- majících při pH 7 celkový záporný náboj
- majících alifatický řetězec
- kteřá aminokyselina nemá žádný asymetrický uhlíkový atom a která má dva asymetrické atomy?

2. Zakreslete titrační křivku a popište inflexní bod

- slabé kyseliny (kys. octové)
- aminokyseliny (glycinu)

3. Vypočítejte procentuální obsah disociované formy karboxylové skupiny a NH_3^+ skupiny glycinu při pH: 3,0 a 11,0.

($\text{pK}_{a1}=2,4$, $\text{pK}_{a2}=9,0$)

4. Peptidová vazba mezi glycinem a threoninem může vzniknout dvěma způsoby. Napište vzorce obou variant. Analýzou bylo zjištěno, že izoelektrický bod jednoho z peptidů je při pH 6,38. O který peptid se jedná? Disociační konstanty glycinu:

$\text{pK}_{a1}=2,34$, $\text{pK}_{a2}=9,60$

Disociační konstanty threoninu:

$\text{pK}_{a1}=2,63$, $\text{pK}_{a2}=10,43$ (Při výpočtu zanedbáme fakt, že disociační

konstanty koncových skupin dipeptidu se mohou po kondenzaci změnit)

5. Odhadněte celkový náboj peptidu při pH 5 a při pH 9.

Arg-His-Gly-Phe-Gly-Glu-Lys-Tyr-Cys-Ala

Hodnoty pK_a koncových disociabilních skupin jsou:

$\text{pK}_{a1}=3,6$, $\text{pK}_{a2}=7,9$

6. Jakého pH je nutno použít, aby se každý z peptidů pohyboval při elektroforéze na opačnou stranu. A. Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Gly

B. Val-Cys-Phe-Glu-Ala-Lys-Leu-Gln-Gly

Hodnoty pK_a koncových disociabilních skupin jsou:

$\text{pK}_{a1}=3,6$, $\text{pK}_{a2}=7,9$

7. Následující směs aminokyselin byla podrobena elektroforéze.

Rozdělte aminokyseliny podle směru migrace při pH 3 a při pH 7:

Gly, Ala, Glu, Lys, Arg, Ser, Asp, Asn

8. Směs aminokyselin byla nasazena na katex v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl. Napište, které aminokyseliny se pravděpodobně zachytí a které z kolony vytečou. Poté byla kolona promývána pufrům o pH 6. Které aminokyseliny se uvolní a které zůstanou vázány: Gly, Ala, Glu, Lys, Arg, Ser
9. Směs aminokyselin byla nasazena na anex při pH=11
Arg, Ala, Glu, Tyr, Ser
- a) Jaký bude celkový náboj každé z aminokyselin? Které aminokyseliny se zachytí na koloně a které vytečou?
- b) Poté byl na kolonu nasazen pufr o pH=8. Jaký bude celkový náboj každé aminokyseliny a které aminokyseliny z kolony vytečou?
10. Směs aminokyselin byla nasazena na katex v $0,1 \text{ M HCl}$. Vypočítejte izoelektrický bod každé z aminokyselin. Napište pořadí, v jakém se budou tyto látky z kolony eluovat při postupném zvyšování pH:
Glu, Ala, His, Lys, Tyr
11. Směs aminokyselin byla nasazena na anex při pH 10. Které aminokyseliny se nezachytí a které zůstanou vázány: Cys, Glu, Ser, Ala, Lys, His
12. Jaké musí být pH pufru, aby bylo možno od sebe oddělit tyto dva peptidy:
- a) na sloupci katexu: $\text{NH}_2\text{-Ala-Glu-Gly-Tyr-Lys-COOH}$ (I)
 $\text{NH}_2\text{-Gly-Asp-His-Tyr-Lys-COOH}$ (II)
- b) na sloupci anexu: $\text{NH}_2\text{-Ser-Tyr-Met-Glu-His-Phe-Arg-Gly-COOH}$ (III)
 $\text{NH}_2\text{-Val-Cys-Phe-Glu-Ala-Lys-Leu-Gln-Gly-COOH}$ (IV)
- Jaký bude náboj každého peptidu při tomto pH? Popište, zda se peptid zachytí na koloně nebo vyteče.
13. Směs aminokyselin byla nasazena na katex při pH 1,0. Eluce byla provedena gradientem rostoucího pH. Odhadněte pořadí eluce aminokyselin: Gly, Asp, Tyr, Ala, His, Arg
14. Tetrapeptid byl zpracován 2,4-DNFB a hydrolyzován. Značenou aminokyselinou byl 2,4-DNFB-valin a lysin. Hydrolyza trypsinem dala dva štěpy, z nichž první obsahoval aminokyselinu, která po redukci LiBH_4 dává $\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$ a navíc obsahuje aminokyselinu, která se ninhydrinem barví žlutě. Určete sekvenci tohoto peptidu.
15. Napište, jak byste stanovili sekvenci následujícího peptidu pomocí selektivní hydrolyzy trypsinem a 2,4-dinitrofluorbenzenem.
 $\text{NH}_2\text{-Ala-Lys-Glu-Gly-COOH}$
Při dělení meziprojektu hydrolyzy trypsinem použijte metodu iontoměničové chromatografie, popište její podmínky.

16. Určete primární strukturu peptidu P na základě následujících reakcí:

- a) redukce β -merkptoethanolem poskytně dva peptidy B a C
- b) Po působení DNFB na peptid P a kyselá hydrolyze v přítomnosti β -merkptoethanolu získáme následující aminokyseliny: DNP-Asp, DNP-Leu, 2 Lys, 2 Cys, 1 Gly, 1 Glu, 1 Met, 1 Phe, 1 Ala
- c) peptid B je podroben působení chymotrypsinu, získáme Ala, hydrolyza trypsinem dává 2 tripeptidy. Sangerova metoda aplikovaná na tyto 2 tripeptidy prokázala přítomnost DNP-Leu, DNP-Cys
- d) působením bromkyanu na peptid C získáme Glu, trypsinolýza dává jeden dipeptid a jeden tripeptid: Sangerova metoda aplikovaná na tento tripeptid prokázala přítomnost DNP-Asp

Jaká je struktura, B, C a P?

17. Složení heptapeptidu P je následující:

Glu, Ala, Lys, Arg, Cys, Met, Tyr

- a) aminopeptidáza a karboxypeptidáza nemají žádný účinek
- b) po působení chymotrypsinu vzniká jeden hexapeptid, který po Sangerově reakci dává DNP-Cys
- c) po působení trypsinu vznikají dva peptidy: Jeden tripeptid, který po Sangerově reakci a hydrolyze dává DNP-Glu a DNP-Lys a dále jeden tetrapeptid, který působením aminopeptidázy uvolní nejdříve Met a potom Tyr

Určete sekvenci peptidu P

18. Polypeptid byl redukován β -merkptoethanolem a výsledkem reakce byly dva peptidy o následující sekvenci:

Asn-Cys-Phe-Thr-Lys-Lys-Trp-Cys-Arg-Ala-Val-Cys

Cys-Thr-Pro-Tyr-Cys-Phe-Pro-Cys

Nativní peptid byl hydrolyzován thermolysinem: Za experimentálních podmínek hydrolyzuje tento enzym peptidové vazby v místě aminoskupiny následujících aminokyselin: Leu, Phe, Trp, Tyr, Val. Byly získány 4 peptidy o tomto složení:

- A) Asn, 2 Cys, Val
- B) 2 Lys, Phe, Thr
- C) Arg, Ala, Trp, Tyr, 2 Cys
- D) 2 Cys, Thr, 2 Pro, Phe

Udejte polohu disulfidických můstků nativního peptidu.

19. Po tryptické hydrolyze určitého proteinu byl izolován oligopeptid P o následujícím složení:

1 Lys, 1 Asp(n), 1 Thr, 1 Glu(n), 1 Val, 1 Ile, 1 Phe, 1 Leu

Sumární náboj peptidu P při pH 6,5 je negativní. Po reakci peptidu s DNFB byl získán DNP-Thr. Karboxypeptidáza uvolňuje postupně tyto aminokyseliny: Lys, Leu, Ile, Val. Jestliže je peptid P hydrolyzován chymotrypsinem, byl získán oligopeptid o následujícím složení: 1 Asp, 1 Val, 1 Leu, 1 Ile, 1 Lys
Udejte sekvenci P.

20. Primární struktura bílkoviny, jenž obsahuje prolin a úseky, ve kterých následuje několik aminokyselin se stejným nábojem, znemožňuje tvorbu α -šroubovice. Odhadněte, které úseky následující bílkoviny by mohly mít sekundární strukturu α -šroubovice:

- Leu-Ala-His-Thr-Tyr-Gly-Pro-Phe-Glu-Ala-Ala-Met-Cys-His-
- Glu-Glu-Asp-Pro-Asp-Gly-Met-Gly-Cys-Ala-Phe-His-

Jak by vypadala situace v případě poklesu pH pod oblast disociační konstanty karboxylových skupin?

21. Určitý peptid je silným inhibitorem vedení nervového vzruchu. Analýza prokázala následující aminokyselinové složení: 5 Ala, Lys, Phe. Reakce intaktního peptidu s 2,4-DNFB prokázala po hydrolyze přítomnost DNF-alaninu. Štěpení pomocí trypsinu dalo tripeptid o (Lys, 2 Ala) a tetrapeptid (3 Ala, Phe). Štěpení pomocí chymotrypsinu poskytlo hexapeptid a volný fenylalanin. Napište sekvenci tohoto peptidu.

22. Určitý protein o sekvenci Met-Ala-(Leu-Phe-Ala)₃-(Leu-Met-Phe)₃-Pro-Ans-Gly-Met-Leu-Phe je zakotven svým NH₂ koncem v hydrofobním sektoru cytoplasmatické membrány. Pokuste se předpovědět jeho sekundární strukturu. Po mutaci byly všechny Leu zbytky nahrazeny Asp. Může to způsobit změnu sekundární struktury?

23. Při denaturaci bílkovin dojde vždy

- a) ke změně primární struktury
- b) " sekundární struktury
- c) " terciární struktury
- d) " kvarterní struktury
- e) " molekulové hmotnosti

24. Jaká je délka bílkovinného řetězce obsahujícího 153 aminokyselin,

a) pokud byl zcela ve formě α -šroubovice a zcela ve formě β -skládaného listu

b) celková délka molekuly určité bílkoviny (153 aminokyselin) obsahující pouze α -šroubovici a β -skládaný list je $4,2 \cdot 10^{-6}$ cm. Vypočítejte, jaká frakce molekuly obsahuje α -šroubovici.

25. Jeden vlas roste průměrnou rychlostí 20 cm za rok. Vlas je tvořen α -keratinem složeným z α -šroubovice. Vypočítejte rychlost syntézy peptidových vazeb za jednu vteřinu.

26. Buňka *E. coli* obsahuje 25 000 ribosomů. Pokud by strukturální proteiny ze všech těchto ribosomů byly nataženy do maximální délky (β -šroubovice), kolikrát by mohly ovinout buňku *E. coli*. Předpokládejte průměr ribosomů 18 nm o specifické hmotnosti 1, obsahující 40% hmotnosti strukturálních proteinů. Průměrná molekulová hmotnost aminokyseliny je 120. Buňka *E. coli* je sférická o průměru 1 μ m.

27. Vypočítejte specifickou hmotnost molekuly tropokolagenu, kterou lze považovat za válec o délce 0,28 μ m a o průměru 1,4 nm. Obsahuje 3 polypeptidické řetězce se 1000 aminokyselinovými zbytky. Průměrná molekulová hmotnost 1 aminokyseliny je 120.

28. Následující látky jsou velmi často používány při studiu bílkovin :

- 1/ BrCN (bromkyan)
- 2/ močovina
- 3/ merkaptoethanol
- 4/ karboxypeptidáza
- 5/ 6 M HCl
- 6/ ninhydrin
- 7/ 2,4-dinitrofluorbenzen

- a) Která z nich se používá označení N-konce bílkoviny?
- b) Která by byla použita pro štěpení peptidické vazby na C-straně methioninu?
- c) Která by byla použita pro štěpení intermolekulárních nebo intramolekulárních disulfidických můstků?
- d) Která látka se používá pro potlačení vodíkových vazeb?

9. 3-O- α -D-mannopyranosyl- α -D-glukopyranosa byla methylována pomocí dimethylsulfátu a pak hydrolyzována zředěnou HCl. Napište vzorce výsledných produktů.

10. 6-O- α -D-galaktopyranosyl- α -D-glukopyranosa byla methylována pomocí dimethylsulfátu a pak hydrolyzována zředěnou HCl. Napište vzorce výsledných produktů.

11. Po methylaci disacharidu dimethylsulfátem a jeho hydrolyze zředěnou HCl byly získány následující sacharidy:

2,3,4,6-tetra-O-methylgalaktopyranosa

2,3-di-O-methylribofuranosa

Napište vzorec tohoto disacharidu

12. Při úplné metylaci disacharidu a hydrolyze ve zředěné HCl byly získány následující produkty:

a) 1,3,6-tri-O-metyl- α -D-fruktofuranosa

2,3,4,6-tetra-O-metyl- α -D-galaktopyranosa

Napište vzorec tohoto disacharidu.

b) kys. 2,3,4-tri-O-methylmannuronová

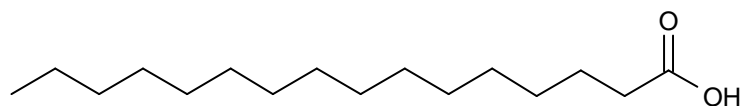
2,3,4,6-tetra-O-metyl- α -D-glukopyranosa

Napište vzorec tohoto disacharidu. (Předpokládejte, že eventuální methylester kyseliny se při hydrolyze v HCl zcela hydrolyzoval)

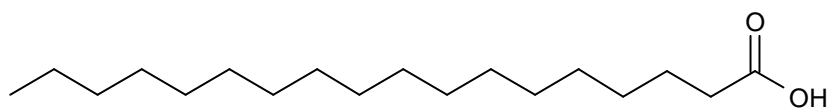
13. Napište vzorec: 3-O- β -D-mannopyranosyl- β -D-fruktofuranosy. Tento disacharid byl methylován pomocí metyljodidu a hydrolyzován v slabé HCl. Napište vzorec produktu.

C. LIPIDY

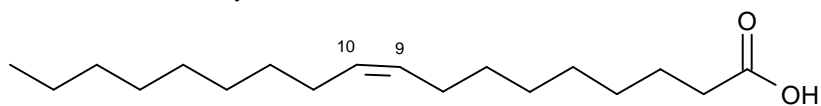
Nejdůležitější přirozené mastné kyseliny:



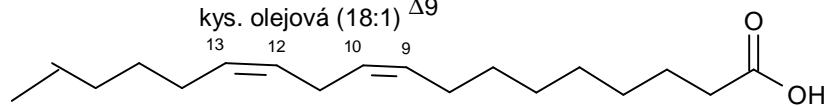
kys. palmitová



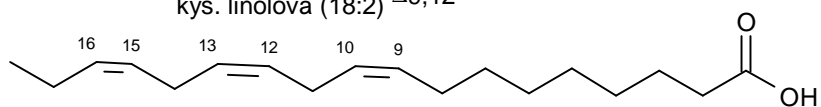
kys. stearová



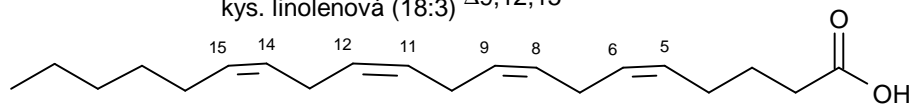
kys. olejová (18:1) Δ^9



kys. linolová (18:2) $\Delta^{9,12}$

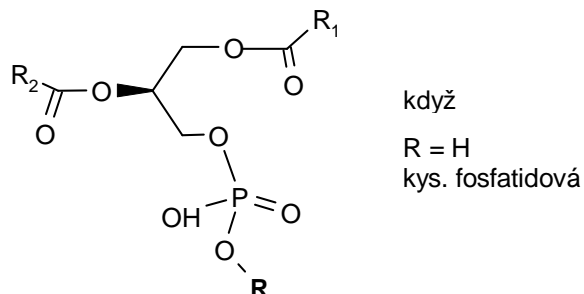


kys. linolenová (18:3) $\Delta^{9,12,15}$

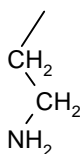


kys. arachidonová (20:4) $\Delta^{5,8,11,14}$

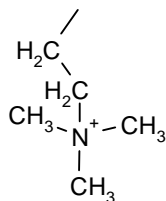
FOSFOLIPIDY



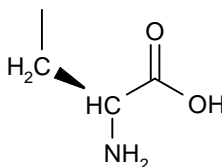
když R =



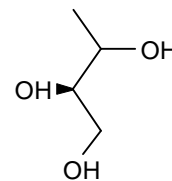
ethanolamin



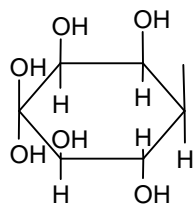
cholin



serin



glycerol



myoinositol

ÚLOHY

- Všechny lipidy jsou po chemické stránce
 - amidy
 - estery
 - etery
 - acetaly
- Tekutost lipidů je úměrná obsahu
 - vody
 - volného glycerolu
 - nasyčených mastných kyselin
 - nenasyčených mastných kyselin
- Napište vzorce těchto mastných kyselin:

kys. olejová (18:1)^{Δ⁹}, kys. linolová (18:2)^{Δ^{9,12}}
 kys. palmitolejová (16:1)^{Δ⁹}, kys. linolenová (18:3)^{Δ^{9,12,15}}

4. Napište vzorce těchto fosfolipidů:

- kys. dipalmitoylfosfatidová
- 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin
- dipalmitoylfosfatidylethanolamin
- 1-stearoyl-2-palmitoylfosfatidylglycerol
- diolelylfosfatidylserin
- 1-stearoyl-2-linolylfosfatidylserin
[kys. linolová: (18:2)^{Δ9,12}]
- 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylglycerol
[kys. olejová (18:1)^{Δ9}]

Jaký bude celkový náboj fosfolipidů při pH 7,5?

Hodnoty pK_a:

1x substituovaný fosfát pK_{a1}= 6,8, pK_{a2}=12,3

2x substituovaný fosfát pK_{a1}= 6,8

serin: pK_{a1}=2,1, pK_{a2}=9,2

5. Napište vzorec cholesterolu a očísľujte jej.

6. Fosfolipidy jsou důležitými složkami biomembrán, kterým uděľují kladné nebo záporné náboje. Jaký bude celkový náboj jednotlivých fosfolipidů a)-c) v úloze 4, bude -li pH prostředí 5 a 8. (pK_a fosfátové skupiny je v oblasti 6-7).

7. Vaječný lecithin je heterogenní směs diacylfosfatidylcholinů, z nichž 70% má v poloze 1 kys. palmitovou a 61% v poloze 2 kys. olejovou. Tento lecithin je dostupným zdrojem při syntéze definovaných fosfolipidů. Navrhněte metody syntézy:

- dipalmitoylfosfatidylcholinu
- 1-palmitoyl-2-stearoylfosfatidylcholinu
- distearoylfosfatidylethanolaminu

Použijte těchto údajů:

1. Selektivního odštěpení acylu v poloze 1 lze dosáhnout fosfolipázou A₁, v poloze 2 fosfolipázou A₂.

2. Chemicky lze obě mastné kyseliny odštěpit mírnou alkalickou hydrolyzou za katalýzy tetrabutylamonium hydroxidem.

3. Acylace glycerolu se provádí příslušnými acylchloridy.

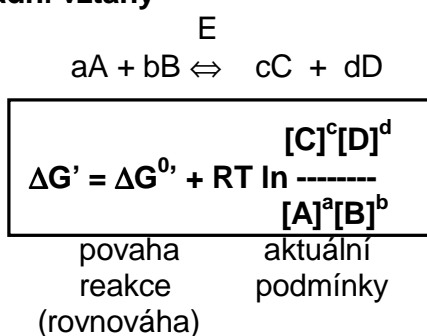
4. Hydrolyzu vazby mezi fosfátem a bazí katalyzuje fosfolipasa D. Rovnovážná konstanta této reakce je rovna 1.

D. TERMODYNAMIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Standardní stav v biochemii:

- $t=25^{\circ}\text{C}$
- $p=0,101\text{ MPa}$
- **pH=7** (koncentrace $[\text{H}^+]$ a iontové stavy disociabilních látek)
- jednotkové koncentrace látek
- koncentrace H_2O zahrnuta do hodnoty rovnovážné konstanty

Základní vztahy



V rovnovážném stavu platí $\Delta G'=0$, proto

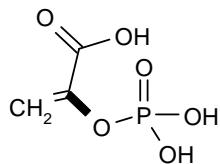
$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K'_{eq}$$

$\Delta G < 0$... exergonická reakce, samovolně probíhá v daném směru
 $\Delta G = 0$... reakce v rovnováze
 $\Delta G > 0$... endergonická reakce, samovolně probíhá v opačném směru

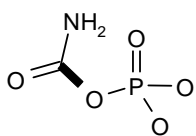
Hodnoty $\Delta G^{0'}$ hydrolýzy důležitých makroergických vazeb

	$\Delta G^{0'} [\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$
fosfoenolpyruvát \Leftrightarrow pyruvát	-61,8
karbamoylfosfát \Leftrightarrow karbamát	-51,4
acetylfosfát \Leftrightarrow k.octová	-43,0
kreatinfosfát \Leftrightarrow kreatin	-43,0
difosfát \Leftrightarrow fosfát	-33,4
acetylCoA \Leftrightarrow acetát	-31,3
ATP \Leftrightarrow ADP	-30,5
ADP \Leftrightarrow AMP	-30,5
glukosa-1-fosfát \Leftrightarrow glukosa	-20,9
glukosa-6-fosfát \Leftrightarrow glukosa	-12,5
(glycerol-3- fosfát \Leftrightarrow glycerol	-8,4)

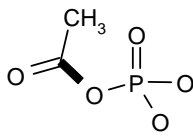
Struktury některých makroergických sloučenin



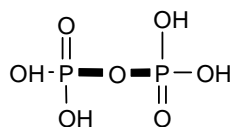
Fosfoenolpyruvát



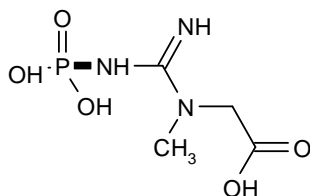
Karbamoylfosfát



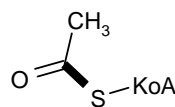
Acetylfosfát



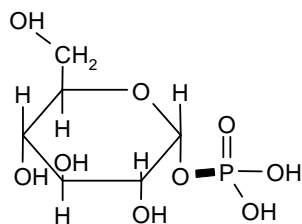
Difosfát



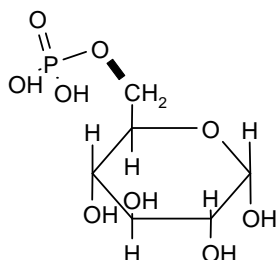
Kreatinfosfát



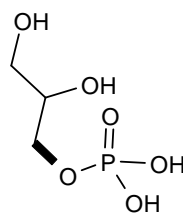
Acetyl-KoA



Glukosa-1-fosfát



Glukosa-6-fosfát



Glycerolfosfát

Spřažené reakce

Podle zákona zachování energie nezávisí energetická bilance změny systému na cestě, kterou tato změna nastala. Aditivita změn volné energie umožňuje, aby endergonické reakce byly za jistých podmínek poháněny reakcemi exergonickými.

ÚLOHY

1. Vypočítejte ΔG° reakce přeměny dihydroxyacetonfosfátu na glycerinaldehydfosfát, je-li $K'_{eq} = 0,0475$ při 25°C . Vypočítejte $\Delta G'$ reakce, je-li koncentrace dihydroxyacetonfosfátu $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ a glycerinaldehydfosfátu $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

2. Vypočítejte $\Delta G'$ hydrolýzy ATP na ADP a P_i , jsou-li koncentrace ADP a ATP ekvimolární a koncentrace fosfátu při 25°C : a) 1 mol.l^{-1} , b) $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$.

c) Jaká je $\Delta G'$ hydrolýzy za aktuálních podmínek hydrolýzy ve svalu, kde je koncentrace $[\text{ATP}] = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{ADP}] = 0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{P}_i] = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ při 25°C .

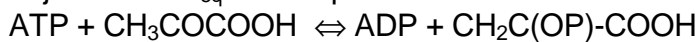
3. Vypočítejte $\Delta G'$ hydrolýzy difosfátu na fosfát, je-li aktuální koncentrace difosfátu 1 mmol.l^{-1} , koncentrace fosfátu 150 mmol.l^{-1} . ΔG° reakce je $-33,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$, teplota 25°C . Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce.

4. Jaká musí být koncentrace malátu, aby reakce:



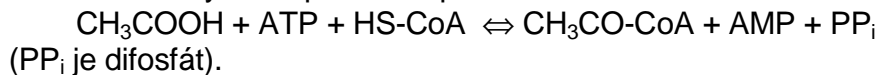
byla v rovnováze, je-li koncentrace fumarátu 1 mmol.l^{-1} , ΔG° reakce je $+3,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $t = 25^{\circ}\text{C}$?

5. Vypočítejte ΔG° a K_{eq} reakce při 25°C :



Jaký je rovnovážný poměr koncentrací $[\text{pyr}]/[\text{PEP}]$, je-li poměr $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] = 10$?

6. Tvorba acetyl-CoA probíhá v přítomnosti ATP:



Vypočítejte ΔG° reakce (předpokládejte, že ΔG° hydrolýzy $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{PP}_i$ je stejné jako při vzniku ADP a P_i ; PP_i je hydrolyzován pyrofosfatázou). Vypočítejte celkové ΔG° reakce při 25°C . Jaký je vliv hydrolýzy difosfátu?

7. Vypočítejte ΔG° izomerace:



Jaký je rovnovážný poměr koncentrace obou látek při 25°C . Jaké je $\Delta G'$ reakce, je-li koncentrace glukosa-6-fosfátu 10 mmol.l^{-1} a koncentrace glukosa-1-fosfátu 2 mmol.l^{-1} ?

8. Kreatinfosfát je hlavní zásobní látkou svalů. Jaké je ΔG° reakce:



Jaký je rovnovážný poměr kreatin- fosfát /kreatin při 25°C , jsou-li koncentrace ADP a ATP ekvimolární?

9. Koncentrace glukosy v buňce je 1 mmol.l^{-1} , koncentrace glukosa-1-fosfátu $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Jaký musí být poměr koncentrací ATP/ADP, aby reakce:

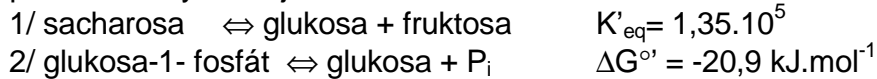


byla při 25°C v rovnováze?

10. Vypočítejte ΔG° reakce při 25°C :



K dispozici máte tyto údaje:

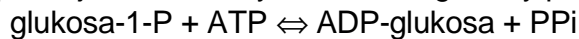


Jaká bude volná energie reakce $\Delta G'$ za aktuálních podmínek:

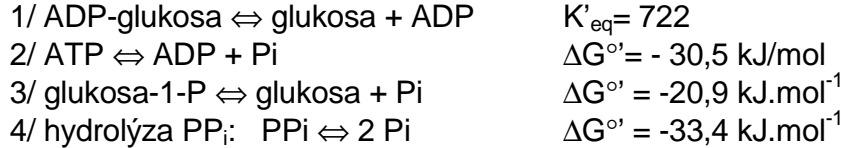
Koncentrace $[\text{P}_i] = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{sacharosa}] = 0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{glukosa-1-fosfát}] = [\text{fruktosa}] = 4 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Je možno glykosidovou vazbu sacharosy počítat mezi makroergickou vazbu, pokud mezi makroergické vazby počítáme vazby se standardní volnou energií hydrolýzy nižší než -10 kJ.mol^{-1} ?

11. Vypočítejte ΔG° tvorby aktivované glukosy při 25°C :

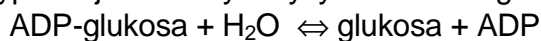


K dispozici máte tyto údaje:

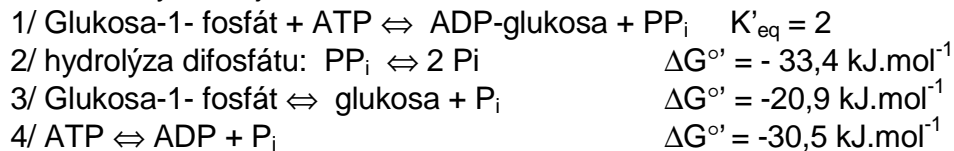


Vypočítejte $\Delta G'$ hydrolýzy difosfátu za aktuálních podmínek koncentrace při 25°C : $[\text{P}_i] = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{PP}_i] = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$.

12. Vypočítejte ΔG° hydrolýzy aktivované glukosy při 25°C :



K dispozici máte tyto údaje:



E. ÚVOD DO ENZYMOLOGIE

TŘÍDY ENZYMŮ A JEJICH SYSTEMATICKÉ NÁZVOSLOVÍ

1. Oxidoreduktasy

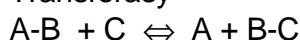


donor:akceptor-oxidoreduktasa

např. glukosa:O₂-oxidoreduktasa, triviálně glukosaoxidasa

Pozor: U reakcí s NADH jako donorem resp. NAD⁺ jako akceptorem se upřednostňuje systematický název donor:NAD⁺-oxidoreduktasa před NADH:akceptor-oxidoreduktasa

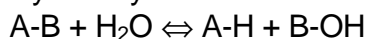
2. Transferasy



donor:akceptor-skupinatransferasa

např. ATP:glukosa-6-fosfotransferasa, triviálně glukokinasa či hexokinasa

3. Hydrolasy



substrát-skupinahydrolasa

např. protein-amidohydrolasa, triviálně proteasa

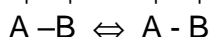
4. Lyasy (synthasy)



substrát-skupinalyasa

např. citrát-oxalacetátlyasa, triviálně citrát-synthasa

5. Isomerasy



komplikované názvosloví, enzym může končit názvem:

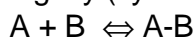
racemasa (katalyzuje stereochemické změny substrátu, např. alaninracemasa)

epimerasa (např. UDP-glukosa-4-epimerasa)

isomerasa (obecně substrát-děj-isomerasa, např. maleinát-cis-trans-isomerasa)

mutasa (např. chorismátmutasa)

6. Ligasy (synthetasy)



substrát:substrát-ligasa(tvořící nukleotid)

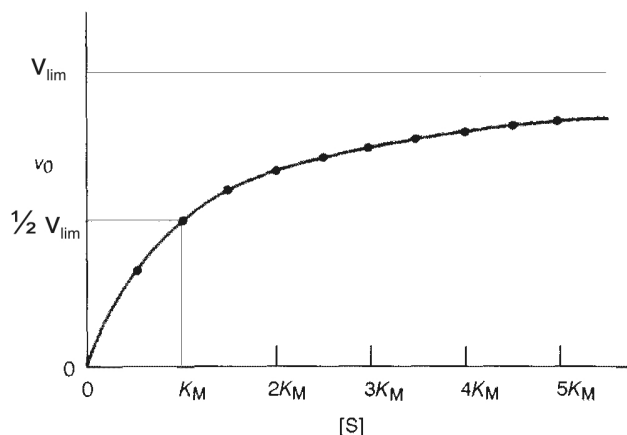
např. alanin:tRNA^{Ala}-ligasa(tvořící AMP), triviálně alanyl-tRNA-synthetasa

KINETIKA ENZYMŮVÝCH REAKCÍ

v_0 ... počáteční rychlost enzymové reakce (odpovídá počáteční koncentraci substrátu)

K_M ... Michaelisova konstanta: Koncentrace substrátu, při níž enzymová reakce probíhá rychlostí rovnou $1/2 v_{lim}$

v_{lim} ... limitní počáteční rychlost



$$v_0 = \frac{v_{lim} [S]}{K_M + [S]}$$

Rovnice Michaelise-Mentenové

Jestliže platí $[S] \rightarrow \infty$ a enzymová reakce probíhá za optimálních podmínek (teplota, pH), pak

$$v_0 = v_{lim} = k_{kat}[E]_t$$

(limitní počáteční rychlost je za těchto podmínek přímo úměrná koncentraci enzymu $[E]_t$).

Limitní rychlost lze tedy za podmínek $[S] \rightarrow \infty$, teplotní a pH optimum ztotožnit

s enzymovou aktivitou.

Jednotky enzymové aktivity:

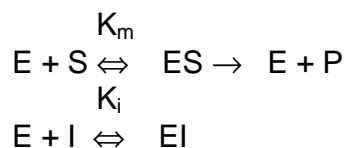
$$1 \text{ katal} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ (IU=Mezinárodní jednotka)}$$

Konstanta $k_{kat} [\text{s}^{-1}]$ vyjadřuje **molekulární aktivitu enzymu** (dříve označována jako číslo přeměny)=počet molekul (resp. molů) substrátu přeměněných za jednu sekundu jednou molekulou (resp. jedním molem) enzymu.

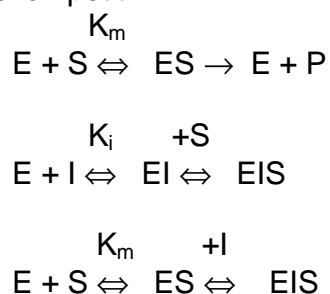
ENZYMOVÁ INHIBICE

Inhibice kompetitivní:

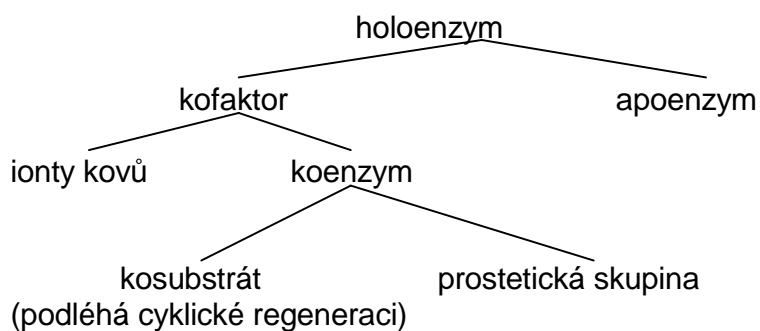


Jestliže $S \rightarrow \infty$, pak $[EI] \rightarrow 0$, a $v_o = v_{lim}$

Inhibice nekompetitivní:



BÍLKOVINNÉ A NEBÍLKOVINNÉ SLOŽKY ENZYMŮ



ÚLOHY

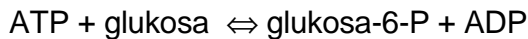
1. Enzymy v uzavřeném systému

- posunují rovnováhu reakce ve směru tvorby produktu
- neovlivňují rovnovážný stav reakce
- zvyšují $\Delta G^{o'}$ reakce
- snižují "

2. Pojmenujte enzymy katalyzující následující reakce a zařadte je podle enzymové nomenklatury (tj. hydrolasa, transferasa, oxidoreduktasa, apod.):

- a) oxalacetát + NADH + H⁺ → malát + NAD⁺
- b) glutamát + pyruvát → 2-oxoglutarát + alanin
- c) škrob + nH₂O → n(maltosa)
- d) formaldehyd + NADH + H⁺ → methanol + NAD⁺
- e) fruktosa + ATP → fruktosa-6-fosfát + ADP
- f) močovina + H₂O → amoniak + CO₂
- g) glukosa-6-fosfát → glukosa-1-fosfát
- h) D-alanin + D-alanin + ATP → D-alanyl-D-alanin + ADP + P_i

3. Glukokinasa a hexokinasa jsou enzymy katalyzující tutéž reakci:



Glukokinasa z jater má K_M pro glukosu 10 mmol.l⁻¹, enzymová aktivita je 1,5 μmol.min⁻¹. Hexokinasa má K_M 0,1 mmol.l⁻¹, enzymová aktivita je 0,1 μmol.min⁻¹. Vypočítejte počáteční rychlost přeměny glukosy při její následující koncentraci (ATP je v nadbytku) a srovnejte hodnoty pro oba enzymy.

- a) 0,1 mmol.l⁻¹
- b) 1 mmol.l⁻¹
- c) 5 mmol.l⁻¹ normální hodnota
- d) 30 mmol.l⁻¹ diabetes

4. Aktivita enzymu v roztoku je 0,2 μmol.min⁻¹, Michaelisova konstanta enzymu pro daný substrát je 0,2 mmol.l⁻¹. Vypočítejte, jakou počáteční rychlostí bude enzymová reakce probíhat, je-li koncentrace substrátu 0,005 mmol.l⁻¹.

5. Na základě měření vypočítejte kinetické parametry enzymu, tj. K_M a limitní počáteční rychlost. Použijte např. grafické vynesení podle Lineweaver-Burka.

konc. substrátu (mol.l⁻¹) v_o (μmol.min⁻¹)

0.3,10 ⁻⁵	10,4
0.5,10 ⁻⁵	14,5
1.10 ⁻⁵	22,5
3.10 ⁻⁵	33,8
9.10 ⁻⁵	40,5

6. Jak byste eliminovali působení a) kompetitivního b) nekompetitivního inhibitoru?

7. Při kinetickém měření závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu byly zjištěny následující hodnoty:

[S] (mmol.l ⁻¹)	v _o (mmol.min ⁻¹)
0,1	0,046
0,2	0,086
0,4	0,150
1,0	0,270
2,0	0,370

Vypočítejte Michaelisovu konstantu enzymu pro tento substrát.

8. Určete K_M a aktivitu enzymu na základě kinetických měření. Použijte např. grafické vynesení podle Lineweaver-Burka.

[S] (mol.l ⁻¹)	v _o (μmol.min ⁻¹)
0,0003	0,026
0,001	0,054
0,002	0,070

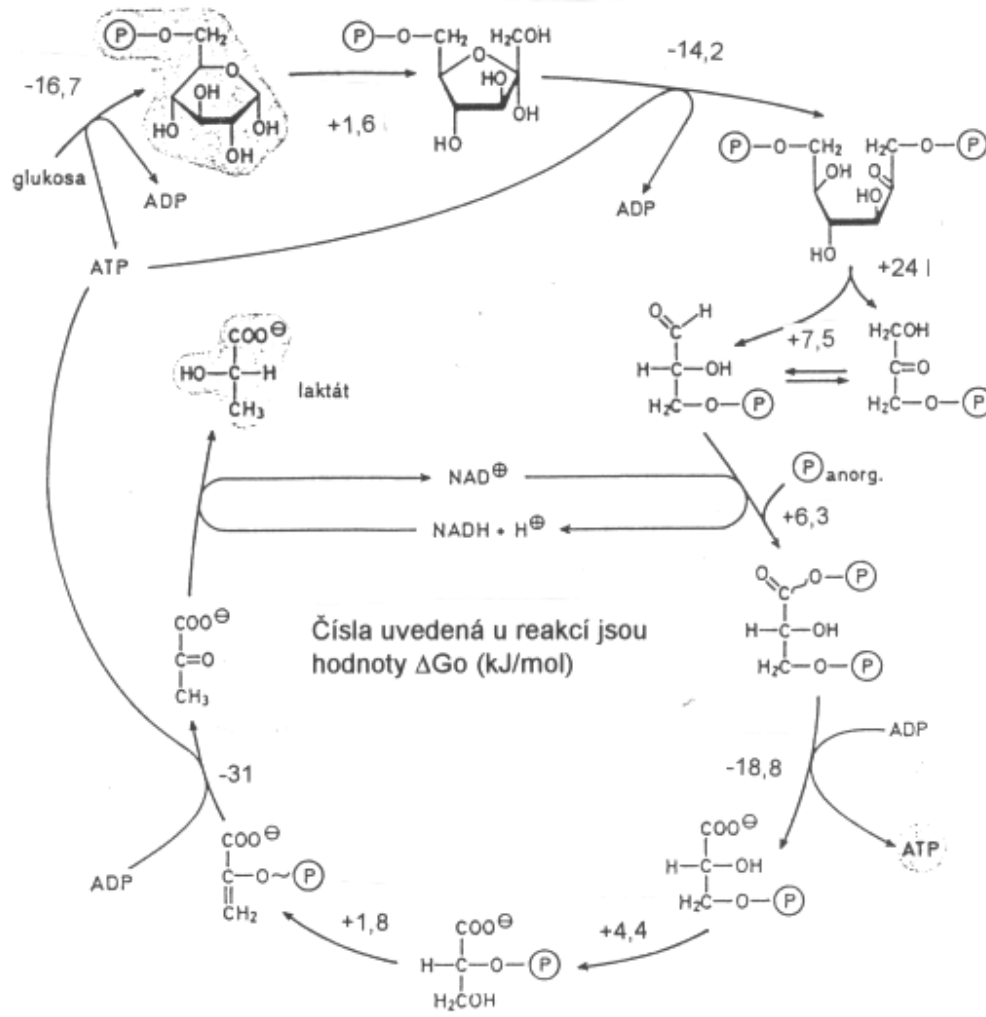
9. Vypočítejte Michaelisovu konstantu a maximální rychlost reakce na základě kinetických měření. Použijte např. grafické vynesení podle Lineweaver-Burka.

[S] (mol.l ⁻¹)	počáteční rychlost (nmol.s ⁻¹)
1.10 ⁻⁴	0,45
5.10 ⁻⁴	2,3
2.10 ⁻³	5,3
4.10 ⁻³	6,5

10. Vypočítejte, jakou aktivitu (μmol/min) bude mít 2,5.10⁻⁴ mg zcela čistého enzymu o molekulární hmotnosti 400 000, je-li molekulární aktivita (číslo přeměny) 2500 s⁻¹.

11. Vypočítejte molekulární aktivitu enzymu, jestliže 5.10⁻⁴ mg zcela čistého enzymu má aktivitu 20 mezinárodních jednotek. Molekulová hmotnost enzymu je 240000.

F. GLYKOLÝZA, METABOLISMUS SACHARIDŮ

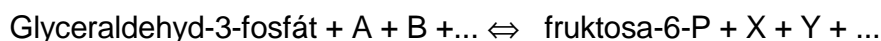


1. Napište vzorce: kys. 1,3 bis fosfoglycerové, fosfoenolpyruvátu. K aldolase byl přidán fruktosa 1,6 bis fosfát značený na C2. Jaká bude distribuce radioaktivity ve vzniklé triose?

2. K enzymům anaerobní glykolisy byla přidána kys. 3-fosfoglycerová značená na uhlíku C2. Zvratem anaerobní glykolisy byl z této kyseliny syntezován fruktosa-1,6-bis fosfát. Jaká bude distribuce radioaktivity v tomto fruktosa-1,6 bis fosfátu?

3. Fruktosa 1,6-bisfosfát byl značen fosfátem ^{32}P na uhlíku číslo 1. Prokažte, zda se tento značený fosfát objeví ve formě ATP, pokud anaerobní glykolýza proběhla do stadia kys. 3-fosfoglycerové.

4. Napište bilanční rovnici přeměny glyceraldehyd-3-P na fruktosa-6-P v procesu glukoneogeneze:



5. Napište bilanční rovnici přeměny fruktosa-6-fosfátu na kys. 3-fosfoglycerovou v procesu anaerobní glykolýzy.



6. Látka A je produktem anaerobní glykolýzy. Její redukcí NADH vzniká látka B. Transaminací látky A vzniká látka C. Napište názvy a vzorce látek A,B,C.

7. Napište bilanční rovnici přeměny fruktosy na pyruvát v procesu anaerobní glykolisy za předpokladu: a) fosforylace fruktosy hexokinasou



b) fosforylace fruktosy fruktokinasou



8.. Napište bilanční rovnici přeměny fruktosa-1,6-bisfosfátu na fosfoenolpyruvát při anaerobní glykolýze

a) v přítomnosti NAD, P_i a ADP

b) v přítomnosti NAD^+ , ADP, arseničnanu

9. Glukosa byla značena ^{14}C . Jaká bude distribuce značeného uhlíku v pyruvátu po přeměně značené glukosy v procesu anaerobní glykolýzy.

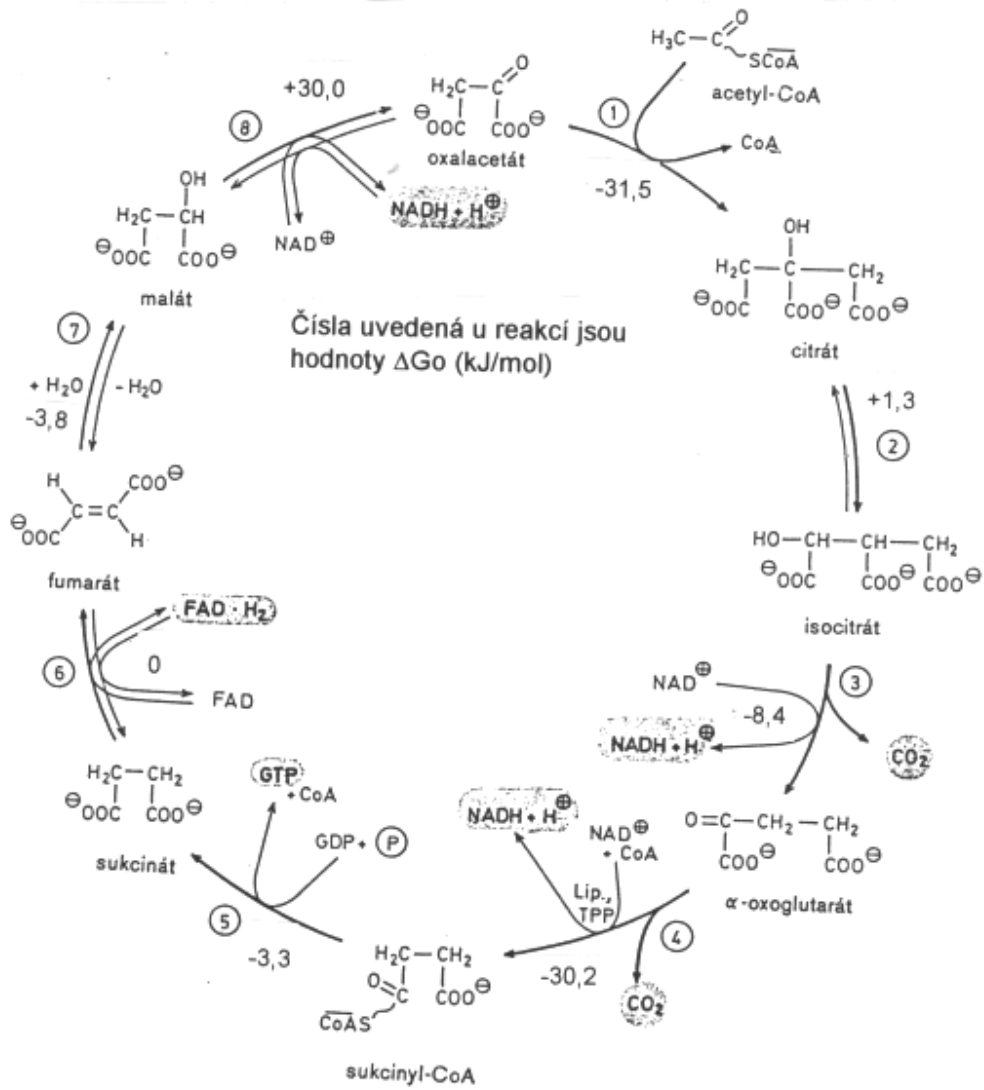
a) v případě značení na C1

b) v případě značení na C6

(izomerace glyceraldehydfosfátu na dihydroxyacetonfosfát je velmi rychlá vzhledem k následujícímu kroku).

10. Jaká bude rovnovážná koncentrace fruktosa-1,6-bisfosfátu, glyceralddehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu, jestliže fruktosa-1,6-bisfosfát 1 mmol.l^{-1} byl inkubován s aldolase ($\Delta G^{\circ} = + 24 \text{ kJ.mol}^{-1}$).
11. Zdůvodněte, proč při anaerobní glykolyse musí být glukosa-6-fosfát izomerován na fruktosa-6-fosfát. Vezměte v úvahu reakční mechanismus aldolase reakce. Proč tato reakce probíhá s fruktosa-1,6-bisfosfátem a nikoliv s glukosa-1,6-bis fosfátem?
12. Glukosa značená ^{14}C na C1 byla přidána do směsi obsahující enzymy pentosového cyklu. Jaký je osud radioaktivně značeného uhlíku při přeměně na dvě molekuly triosy ?
13. K enzymům anaerobní glykolysy byla přidána kys. 3-fosfoglycerová značená na uhlíku karboxylové skupiny. Zvratem anaerobní glykolysy byl z této kyseliny syntezován fruktosa-1,6-bisfosfát. Jaká bude distribuce radioaktivity v tomto fruktosa-1,6-bisfosfátu.
14. Na základě velikosti ΔG° odhadněte, které reakce nemohou při glukoneogenezi probíhat zvratem anaerobní glykolysy. Jakým způsobem jsou tyto reakce obcházeny? (Jedna z reakcí probíhá přes nepříznivé ΔG° . Odhadněte proč.)
15. Určité bakteriální mutanty mají nefunkční triosafosfát izomerázu. Vysvětlete, proč je tato mutace letální pro organismus fermentující glukosu výlučně cestou anaerobní glykolýzy.
16. Vysoké koncentrace pyruvátu inhibují izoenzym laktátdehydrogenasy srdečního svalu, nikoli však izoenzym ze svalu kosterního. Jaké by byly důsledky tohoto efektu, kdyby srdeční sval obsahoval pouze izoenzym totožný s izoenzymem kosterního svalu. Jaké by byly obrácené důsledky, kdyby kosterní sval obsahoval izoenzym totožný s izoenzymem srdečním?
17. Při glukoneogenezi je termodynamická bariéra tvorby fosfoenolpyruvátu obcházena tvorbou oxalacetátu (koenzym biotin). Napište obě dvě rovnice použité k obchvatu pyruvát kinázové reakce a vypočítejte ΔG° souhrnné reakce. (Předpokládejte, že GTP je termodynamicky ekvivalentní ATP).

G. CITRÁTOVÝ CYKLUS



1. Srovnajte $\Delta G^{\circ'}$ reakcí citrátového cyklu. Které reakce mají tendenci probíhat obráceným směrem a jakým způsobem dochází k posunu reakcí žadoucím směrem?

2. V kterém místě citrátového cyklu dochází k dekarboxylaci :

Přeměna: a) citrátu na akonitát, b) isocitrátu na oxoglutarát, c) malátu na oxalacetát, d) oxalsukcinátu na 2-oxoglutarát ,e) 2-oxoglutarátu na sukcinyl-CoA

3. V kterém místě citrátového cyklu dochází k oxidaci substrátu

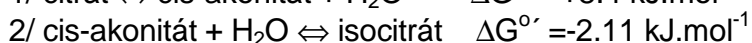
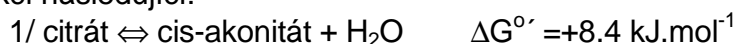
Přeměna

a) sukcinátu na fumarát b) 2-oxoglutarátu na sukcinyl-CoA

c) fumarátu na malát d) oxalacetátu na citrát e) acetylkoenzym A na citrát

4. Napište bilanční rovnici přeměny oxoglutarátu na sukcinát v citrátové, cyklu.

5. Jaké jsou rovnovážné relativní koncentrace isocitrátu, citrátu a cis-akonitátu, je-li $\Delta G^{\circ'}$ reakcí následující:



6. Napište bilanční rovnice přeměny těchto látek v Krebsově cyklu do stadia oxalacetátu:

a) citrát

b) jantaran

c) malát

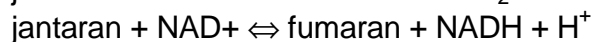
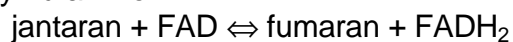
Napište vzorce uvedených karboxylových kyselin.

7. Jaká je distribuce uhlíku ^{14}C na oxalacetátu po přidání pyruvátu značeného na a) C1, b) na C2, c) na C3

k enzymům Krebsova cyklu a k pyruvát dekarboxylase?

8. K enzymům Krebsova cyklu byla přidán acetylCoA značený ^{13}C na methylové skupině. Dokažte, jaká bude distribuce radioaktivity ve vzniklém citrátu a jaká ve vzniklém isocitrátu

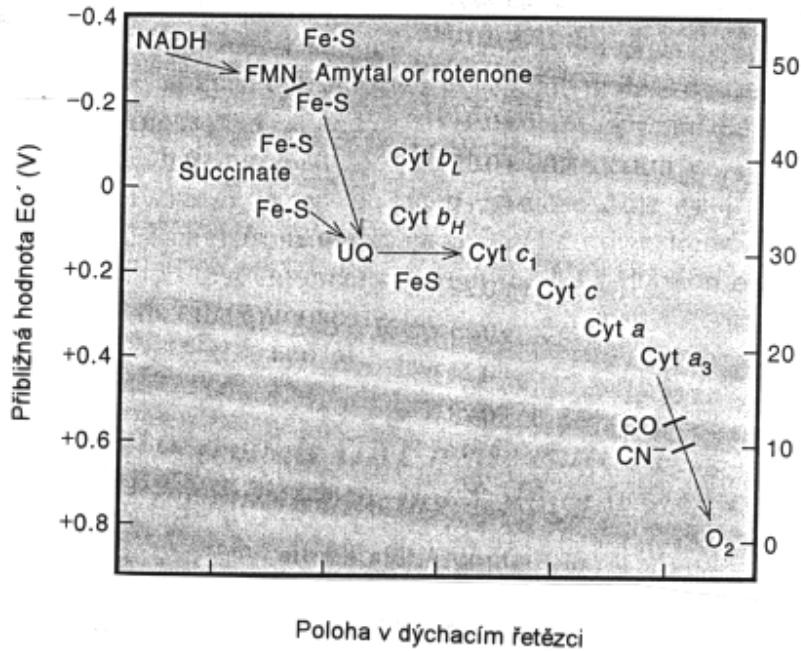
9. Na základě hodnoty $\Delta G^{\circ'}$ vypočtené ze standardních redoxpotenciálů zdůvodněte, proč oxidace jantaranu na fumaran v Krebsově cyklu probíhá za účasti FAD jako koenzymu a nikoliv NAD^+ .



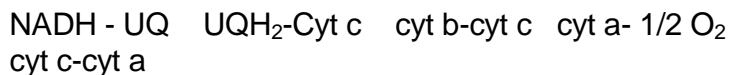
$$E^{\circ'} (\text{FAD}/\text{FADH}_2) = 0,000 \text{ V}$$

10. Navrhněte hypotetický cyklus analogický Krebsově cyklu, kde by jako počáteční krok byla reakce acetylCoA s oxoglutarátem namísto s oxalacetátem.

H. RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC



1. Rozdělte jednotlivé složky respiračního řetězce na jednoelektronové a dvouelektronové přenašeče. Napište redoxní rovnice mezi uvedenými partnery a všimněte si, kde vystupuje jako reakční partner H^+ .



2. Vypočítejte $\Delta G^{\circ'}$ reakce mezi:

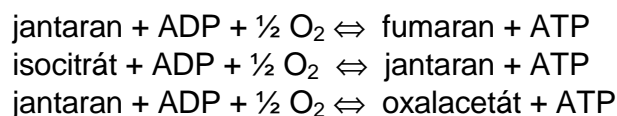
- NADH + UQ
- jantaran + UQ
- cyt b(red) + cyt c(ox)
- cyt c(red) + $\frac{1}{2} \text{O}_2$

Na základě velikosti $\Delta G^{\circ'}$ odhadněte, při které reakci je kryta energetická spotřeba vzniku jedné molekuly ATP ($\Delta G^{\circ'} = -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$).

3. Vypočítejte $\Delta G^{\circ'}$ oxidace NADH kyslíkem v respiračním řetězci. Kolik molů ATP by teoreticky vzniklo za standardních podmínek ($\Delta G^{\circ'} = -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Jestliže namísto kyslíku

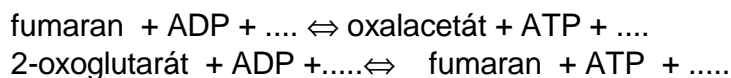
použijeme umělého akceptoru hexakvanoželezitanu ($E^{\circ} = +0,360 \text{ V}$), jaká bude změna standardní volné energie reakce a kolik molů ATP vznikne?

4. Doplňte bilanční rovnici přeměny následujících látek v Krebsově cyklu a v respiračním řetězci:

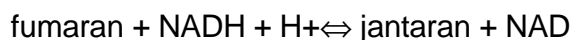


5. Po přidavku inhibitoru respirace antimycinu k systému respiračního řetězce mitochondrií byla zjištěno úplné zredukování ubichinonu, cytochromu b a úplné zoxidování cytochromů c, aa₃. Zakreslete místo zásahu tohoto inhibitoru.

6. Doplňte bilanční rovnici přeměny fumaranu na oxalacetát za spolupráce enzymů Krebsova cyklu a respiračního řetězce:



7. Vypočítejte ΔG° reakce při 25°C



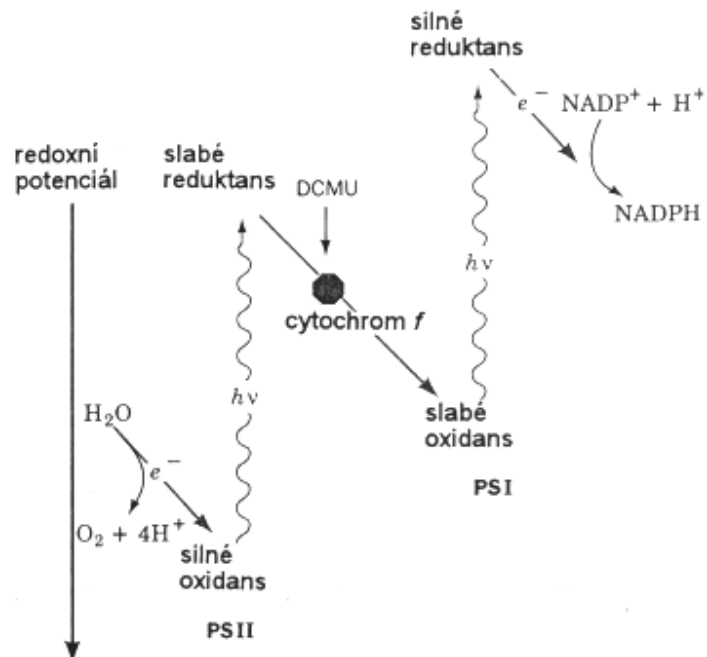
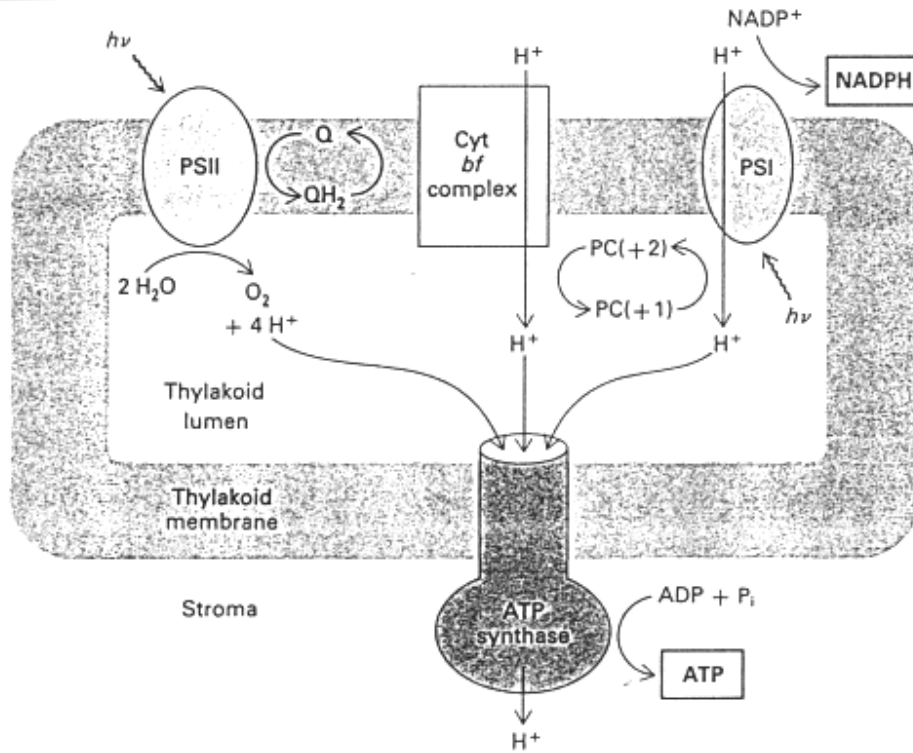
víte-li, že: $E^{\circ} (\text{NAD}/\text{NADH}) = -0,320 \text{ V}$, $E^{\circ} (\text{fum}/\text{jan}) = +0,030 \text{ V}$

Bylo by možné, aby za standardních podmínek byla tato reakce využita k syntéze ATP? (hydrolýza ATP: $\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ/mol}$)

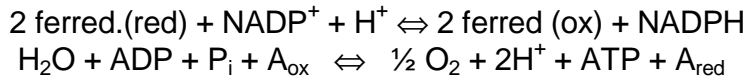
Zakreslete úseky respiračního řetězce, které se podílejí na této oxidaci NADH.

I. FOTOSYNTÉZA

Světelná fáze



Souhrnná rovnice:

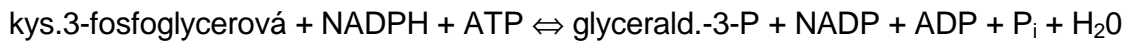


Temnostní fáze (Calvinův cyklus)

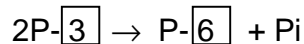
fixace:



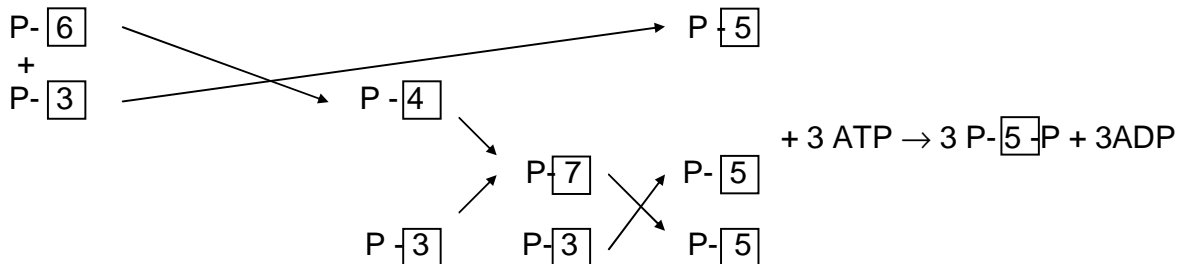
redukce:



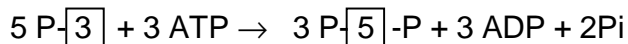
syntéza hexózy:



regenerace:



souhrnná rovnice:



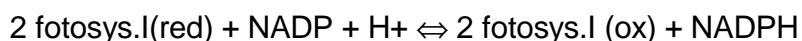
1. Napište souhrnnou rovnici světelné fáze fotosynthesy ve fotosystému I, fotosystému II a souhrnnou rovnici při propojení obou fotosystémů. Pokuste se napsat souhrnnou rovnici temné fáze fotosynthesy s oxidem uhličitým na jedné straně a s triosofosfátem na straně druhé. Vodu nutnou pro hydrolýzu ATP zanedbejte.

2. Vypočítejte E_0 a ΔG° reakce mezi redukováným ferredoxinem a NADP při fotosynthese (E° ferredoxinu = -0,43 V).

3. K enzymům temné fáze fotosyntézy (fixace CO_2) byl přidán ribulosa-1,5-bisfosfát a $^{14}\text{CO}_2$. Jaká bude distribuce radioaktivity v kyselině 3-fosfoglycerové? Jaká bude distribuce radioaktivity v tomtéž případě, pokud byl přidán neznačený CO_2 a ribulosa-1,5bisfosfát značený na C5?

4. Srovnajte proces redukce kys. 3-fosfoglycerové na glyceraldehyd-3-fosfát při fotosyntéze a vratný proces oxidace glyceraldehyd-3-fosfátu při anaerobní glykolyse. V čem se oba procesy liší?

5. Fotosystém I má v základním stavu standardní redox potenciál $E^{\circ'} = +0,460 \text{ V}$. Po absorpci světelného kvanta se jeho potenciál změní na $E^{\circ'} = -0,600 \text{ V}$. Vypočítejte rovnovážný poměr koncentrací NADPH/NADP v reakci:



s fotosystémem I v základním a excitovaném stavu. Poměr koncentrací oxidovaného a redukovaného fotosystému je roven 1, $t = 25^\circ\text{C}$.

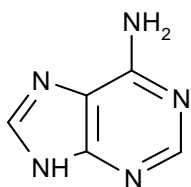
6. Dokažte výpočtem ΔG , zda redukovaný ferredoxin ($E^{\circ'} = -0,430 \text{ V}$) je při fotosyntéze schopen redukovat NADP ($E^{\circ'} = -0,324 \text{ V}$), pokud poměr koncentrací NADPH/NADP je při 25°C roven 100. Výchozí poměr redukovaného a oxidovaného ferredoxinu je roven 1. Napište rovnici této reakce.

7. Jeden z používaných herbicidů diuron je známým inhibitorem fotosyntézy. Tento inhibitor blokuje syntézu NADPH v chloroplastech, přičemž plastochinon se zcela zredukuje. Zakreslete pravděpodobné místo zásahu.

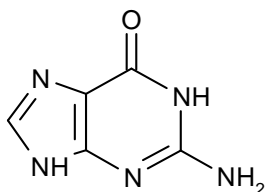
8. Určité primitivní fotosyntetizující bakterie žijící poblíž podmořských sopek obsahují bakteriochlorofyl a fotosystém II. Produktem této fotosyntézy je síra. Vysvětlete pomocí schématu rovnice.

J. NUKLEOVÉ KYSELINY

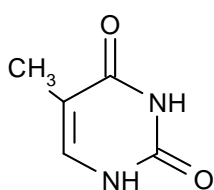
Nukleové baze



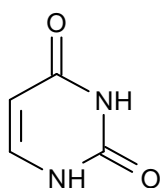
Adenin



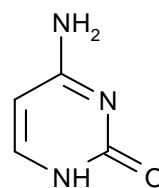
Guanin



Thymin

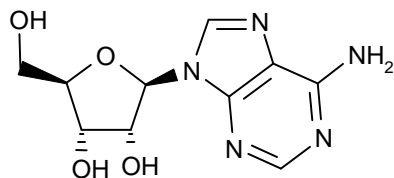


Uracil

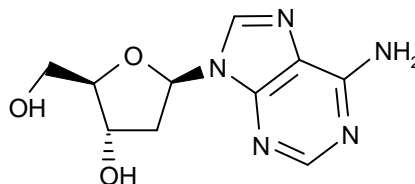


Cytosin

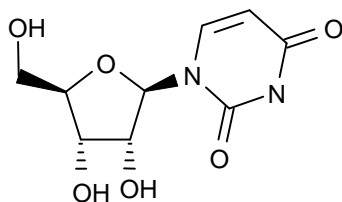
Nukleosidy



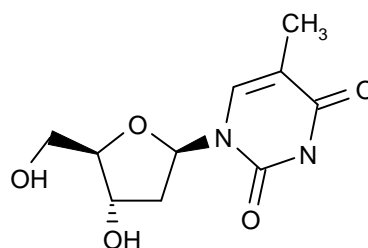
Adenosin



Deoxyadenosin



Uridin



Deoxythymidin

Primární struktura nukleových kyselin

-struktura vazby nukleotidů: viz prezentace

Metody studia sekvence nukleových kyselin:

Enzymy používané k hydrolýze nukleových kyselin (mohou být specifické na DNA, RNA, nebo bez specifity):

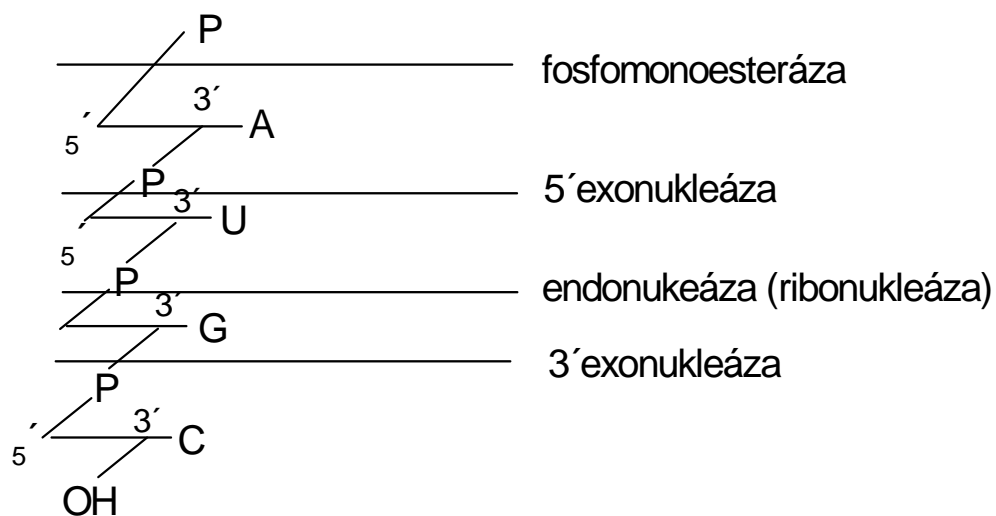
-Fosfomonoesterázy -
hydrolyzují terminální fosfátovou skupinu

-Fosfodiesterázy:
hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu:

 exonukleázy (5'- exonukleázy uvolňují 3'P nukleosidy, 3'- exonukleázy uvolňují 5'P nukleosidy)

 endonukleázy uvolňují oligonukleotidy, jsou obvykle substrátově specifické (deoxyribonukleáza, ribonukleáza)

-Polynukleotidkináza: Fosforyluje volnou 5'OH skupinu pentózy pomocí ATP



Maxam-Gilbertova metoda sekvenace nukleových kyselin:

1. Označení konce nukleové kyseliny pomocí ATP (^{32}P)
2. Specifická chemická hydrolyza v místě:
 - G: působením DMS za tepla
 - G + A: působením kyseliny a DMS
 - C: působením hydrazinu v prostředí 5 M NaCl
 - C + T: působením hydrazinu
3. Elektroforéza získaných fragmentů za denaturačních podmínek (rychlost migrace je nepřímo úměrná počtu nukleotidů)
4. Skenování gelů na fosfoimageru (detekce radioaktivity)

Dnes již automatické sekvenátory v servisních laboratořích (kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí)

Sekundární struktura DNA

Základní strukturou DNA je dvojitá šroubovice stabilizovaná vodíkovými vazbami mezi A-T a G-C.

Základní dvojitá šroubovice (**B-DNA**) obsahuje 10 pb na jednu otáčku a vzdálenost mezi dvěma následujícími pb je 0,34 nm.

Méně běžné typy:

A-DNA šroubovice obsahuje 11 pb/otáčka a vzdálenost mezi sousedními bazemi je 0,23 nm.

Z-DNA šroubovice obsahuje 12 pb/otáčka a vzdálenost mezi sousedními pb je 0,38 nm.

Genetický kód mRNA prokaryot:

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP
UUG		UCG		UAG		UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC		CCC		CAC		CGC	
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC		ACC		AAC		AGC	
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG		AAG		AGG	
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC		GCC		GAC		GGC	
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG		GCG		GAG		GGG	

1. Napište vzorce adeninu, nukleosidu a nukleotidu od něho odvozeného.

2. Roztok obsahující AMP a GMP měl absorpenci $A_{260} = 0.652$ a $A_{280} = 0.284$, vypočítejte koncentraci AMP a GMP v roztoku, jestliže pro AMP je ϵ při 260 = $15.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ϵ při 280 = $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Pro GMP ϵ při 260 = $11.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ϵ při 280 = $7.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3. Napište úplnou strukturu ribodinukleotidu a deoxyribodinukleotidu složeného z A a C.

4. Vypočítejte průměrnou molekulovou hmotnost jednoho nukleotidového zbytku DNA a RNA, za předpokladu, že baze jsou přítomny v ekvimolárních koncentracích. Nezapomeňte na kondenzaci vody při vytvoření esterové vazby! (Molekulové hmotnosti složek: A = 135, G = 151, C = 111, U = 112, T = 126, ribóza 150, kys. fosforečná = 98).

5. Schematické znázornění sekvence RNA (zapsáno od volného 3' konce k 5' konci) je následující:

UpCpUpApGpAp

Napište produkty hydrolýzy této RNA pomocí následujících enzymů:

- fosfomonoesteráza
- fosfodiesteráza hadího jedu (3'- exonukleáza)
- fosfodiesteráza ze sleziny (5'- exonukleáza)
- ribonukleáza T1 (hydrolýza v místě G, vznik 3'P oligonukleotidu)
- ribonukleáza U2 (hydrolýza v místě A nebo G, vznik 3'P oligonukleotidu)

6. Oligonukleotid pocházející z DNA má následující sekvenci (zapsáno od volného 5' konce k 3' konci):

pApCpTpTpApG

5' terminální nukleotid byl označen ^{32}P . Jaké oligonukleotidy získáme po působení fosfodiesterázy hadího jedu (viz výše). Které z nich budou značeny ^{32}P ? Které oligonukleotidy získáme hydrolyzou pomocí deoxyribonukleázy II a které z nich budou značeny ^{32}P (deoxyribonukleáza II je endonukleáza uvolňující 3'P oligonukleotidy).

7. Oligoribonukleotid X je složen z následujících bazí: 2A, 2C, U, G.

a) po působení fosfodiesterázy z hadího jedu se po krátké době uvolní pC.

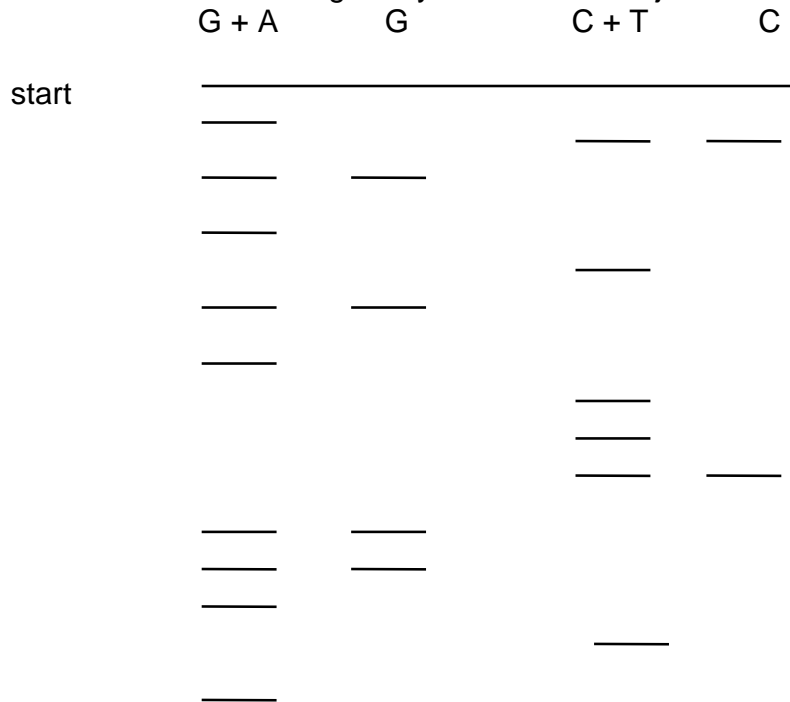
b) hydrolyzou pomocí pankreatické ribonukleázy získáme C, dinukleotid obsahující A a C a dále trinukleotid obsahující A, G a U.

(pankreatická ribonukleáza je endonukleáza a působí v místě C a U za vzniku 3'P oligonukleotidů).

c) hydrolyzou pomocí ribonukleázy T2 (hydrolyza v místě A za vzniku 3'P oligonukleotidů) získáme pAp, dinukleotid obsahující U a C a trinukleotid obsahující A, G a C.

Určete sekvenci oligoribonukleotidu

8. Udejte sekvenci oligodesoxyribonukleotidu stanovovanou Maxam-Gilbertovou metodou. Na fosforimageru byl získán následující obraz:



9. Při replikaci řetězce DNA --AGCGTAG-- byl vytvořen komplementární řetězec. Napište jeho sekvenci. Jaká bude sekvence mRNA vytvořená při transkripci?

10. Napište sekvenci komplementární k uvedenému řetězci DNA, vyhledejte úseky obsahující palindrom.

a/ GATCAA, b/ TGGAAC, c/ GAATTC, d/ ACGCGT, e/ CGGCCG, f/ TACCAT

11. Vypočítejte molekulovou hmotnost jednoho průměrného páru bazí (molekulová hmotnost A = 135, T = 126, G = 151, C = 111, deoxyribóza 134, kys. fosforečná 98. Nezapomeňte na odštěpení vody při tvorbě esterové vazby). Jaká je molekulová hmotnost molekuly DNA o délce 1 μm v Da a hmotnost v gramech? (vzdálenost mezi dvěma následujícími pb je 0,34 nm, relativní molekulová hmotnost jednoho páru bazí je v průměru 617,5)

12. Jaterní buňka krysy obsahuje 10^{-11} g DNA. Tato DNA je rovnoměrně rozdělena do 42 chromosomů buňky.

a) Jaká je molekulová hmotnost DNA (1 chromosom obsahuje jednu molekulu DNA).
b) Vypočítejte počet párů bazí DNA obsažené v jednom chromosomu a jeho délku (vzdálenost mezi dvěma následujícími pb je 0,34 nm, molekulová hmotnost jednoho páru bazí je v průměru 617,5).

13. Molární složení guaninu + cytosinu v DNA určité bakterie je 67,2%. Jaký je poměr mezi purinovými a pyrimidinovými bazemi? Jaké je molární složení v procentech jednotlivých bazí této DNA.

14. Při analýze byla zjištěna změna v aminokyselinovém složení bílkoviny, jejíž gen byl mutován. Vyberte z následujících změn ty případy, které jsou výsledkem mutace provedené změnou jedné base.

Phe \rightarrow Leu Lys \rightarrow Ala Ala \rightarrow Thr Phe \rightarrow Lys Ile \rightarrow Leu
His \rightarrow Glu Pro \rightarrow Ser

15. DNA fága lambda vzniklá deleční mutací má délku 13,6 μm namísto 16,49 μm .

a) Vypočítejte, kolik pb tomuto mutantovi chybí
b) Jaký je rozdíl v molekulové hmotnosti a hmotnosti v gramech obou DNA
c) Část, u které byla provedena delece odpovídá sekvenci kódující protein P. Jaká je molekulová hmotnost tohoto proteinu. Průměrná molekulová hmotnost aminokyseliny je 140.

16. Směs nukleosidtrifosfátů značených ^{32}P na γ -fosfátu byla inkubována s RNAPolymerázou: Po určité době byla zjištěna inkorporace 100 molekul značeného fosfátu do výsledného produktu. Tentýž pokus byl proveden se směsí nukleosidtrifosfátů značených na fosfátu α . Byla zjištěna inkorporace $3 \cdot 10^4$ molekul fosfátu do značeného produktu.

Jaký počet řetězců RNA byl syntezován a jaká je jejich průměrná délka?

17. Aminokyselinová sekvence C-terminální oblasti bílkoviny a odpovídající kódující sekvence DNA jsou následující:

Phe –Glu –Ile –Leu –Glu –Arg –Arg

TTT GAG ATT CTG GAG CGG CGG

Popište mutace, které by mohly vnést do této sekvence restriční místo TT/CGAA a jiné restriční místo A/GATCT a to za podmínky, že nedojde ke změně sekvence aminokyselin ve vzniklém peptidu.

18. DNA bakteriofága má následující složení bazí: C 19%, A 25%, T 33% a G 23%.

a) Co je na této DNA neobvyklé a čím se dá její struktura charakterizovat

b) Tato DNA byla použita jako matrice *in vitro* při reakci katalyzované DNA polymerázou. Jaké bude složení bazí této nově syntezované DNA?

c) pokud by množství nasintezované DNA bylo stejné jako je množství matrice, jaké je celkové složení bazí (to je DNA matrice + DNA syntezované *in vitro*)

d) mRNA syntezovaná jakožto odpověď na infekci fágem má následující složení: C 18%, A 25% U 34% G 23%. Který řetězec DNA byl použit pro syntézu RNA?

19. Byla provedena syntéza polynukleotidu mRNA *in vitro* za použití 90% UTP a 10% CTP. Tyto polymerní molekuly byly poté použity pro syntézu polypeptidu za přítomnosti všech 20 t-RNA. Syntezované polypeptidy byly hydrolyzovány a jejich celkové aminokyselinové složení bylo následující: 81% Phe, 1% Pro, 9% Ser, 9% Leu.

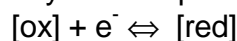
Vypočítejte frekvenci všech kodonů a zdůvodněte odpovídající aminokyselinové složení polypeptidů.

20. Při pokusu byla enzymově připravena glutaminyl-tRNA značená na glutaminu. Poté byla tato látka chemicky desaminována za vzniku glutamyl-tRNA. Tato tRNA byla přidána do bezbuněčné směsi připravené z *E. coli* a zbavené mRNA. Ke směsi byl přidán uměle připravený polymer obsahující ekvimolární koncentraci G a A. Kolik procent glutamátu bude obsahovat syntezovaný polypeptid?

21. Při stanovení primární struktury enzymu bylo zjištěno, že se skládá z 250 aminokyselin. Jaký je minimální počet nukleotidů strukturálního genu tohoto enzymu? Při bodové mutaci tohoto strukturálního genu došlo k náhradě jednoho serinu glutamátem. Tento fakt se projevil ztrátou enzymové aktivity. Co z tohoto faktu lze vyvodit?

K. REDOXNÍ REAKCE

Pro redukci látky obecně platí



tento děj charakterizuje redoxní potenciál E' (v biochemii definován při pH 7)

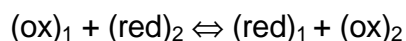
$$E' = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}$$

standardní redox pot. aktuální koncentrace složek

Pravidlo: Tabulková hodnota redoxního potenciálu vždy odpovídá směru **redukce** dané složky. Hodnota redoxního potenciálu pro směr **oxidace** má opačné znaménko.

$$F = 96500 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}; R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Reakce mezi dvěma redoxními systémy:



Pokud je systém **v rovnováze**, platí $\Delta G' = 0$ a $E_1 = E_2$

$$E^{\circ'}_1 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_1]}{[\text{red}_1]} = E^{\circ'}_2 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_2]}{[\text{red}_2]}$$

$$E^{\circ'}_1 - E^{\circ'}_2 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_2][\text{red}_1]}{[\text{red}_2][\text{ox}_1]}$$

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{ox}_2][\text{red}_1]}{[\text{ox}_1][\text{red}_2]} \Rightarrow E^{\circ'}_1 - E^{\circ'}_2 = \frac{RT}{nF} \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K_{\text{eq}}$$

$$E^{\circ'}_1 - E^{\circ'}_2 = \frac{\Delta G^{\circ'}}{nF}$$

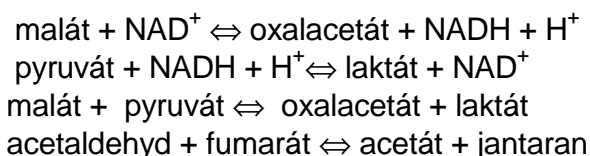
$$\Delta G^{\circ'} = -nF \Delta E^{\circ'}$$

Tabulka. Hodnoty standardních redoxpotenciálů některých důležitých redoxních párů při pH 7:

oxidovaná/redukovaná forma	E° [V]
acetát/acetaldehyd	-0,580
NAD ⁺ /NADH	-0,320
NADP ⁺ /NADPH	-0,324
acetaldehyd/ethanol	-0,197
pyruvát/laktát	-0,185
oxalacetát/malát	-0,166
ubichinon/ubihydrochinon	+0,100
2cyt b(ox)/2cyt b(red)	+0,030
fumarán/jantaran	+0,031
2cyt c(ox)/2cyt c(red)	+0,235
2cyt a(ox)/2cyt a(red)	+0,385
$\frac{1}{2}$ O ₂ /H ₂ O	+0,816

1. Vypočítejte redoxní potenciál E' směsi NAD/NADH, je-li koncentrace NAD 1 mmol.l⁻¹, NADH 10 mmol.l⁻¹.

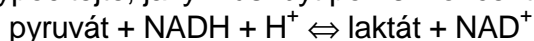
2. Srovnáním standardních redox potenciálů určete, zda reakce bude mít tendenci probíhat doleva nebo doprava:



3. Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce ze standardního redox potenciálu E° (t=25°C)

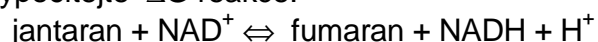


4. Vypočítejte, jaký musí být poměr koncentrací NAD/NADH, aby reakce:



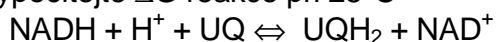
byla při 25°C v rovnováze, je-li poměr koncentrací pyruvát/laktát = 1.

5. Vypočítejte ΔG reakce:



je-li koncentrace NAD 10 mmol.l⁻¹, NADH 1 mmol.l⁻¹, jantaranu 10 mmol.l⁻¹, fumaranu 5 mmol.l⁻¹, t=25°C.

6. Vypočítejte ΔG reakce při 25°C



je-li koncentrace NAD 100krát vyšší než koncentrace NADH a koncentrace UQH₂ 2krát vyšší než koncentrace UQ.

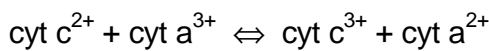
$$E^{\circ'}(\text{UQ/UQH}_2) = +0,104 \text{ V}, E^{\circ'}(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0,320 \text{ V}$$

7. Určete $\Delta G^{\circ'}$ reakce:



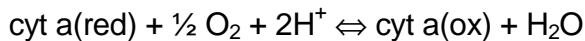
$E^{\circ'}(\text{acetát/acetaldehyd}) = -0,580 \text{ V}$, $E^{\circ'}(\text{jantaran/fumarán}) = 0,030 \text{ V}$. V jakém směru bude reakce probíhat?

8. Určete $\Delta G^{\circ'}$ reakce:



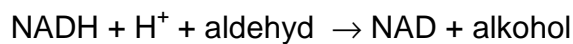
$E^{\circ'}(\text{cyt } c^{3+} / \text{cyt } c^{2+}) = +0,235 \text{ V}$, $E^{\circ'}(\text{cyt } a^{3+} / \text{cyt } a^{2+}) = +0,385 \text{ V}$. V jakém směru bude reakce probíhat?

9. Vypočítejte $\Delta G^{\circ'}$ reakce:



$E^{\circ'}(\text{cyt } a(\text{ox})/\text{cyt } a(\text{red})) = 0,385 \text{ V}$, $E_o(\frac{1}{2} \text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}) = 0,816 \text{ V}$. Je-li $\Delta G^{\circ'}$ syntézy ATP z ADP a P_i +30 kJ.mol⁻¹, kolik molekul ATP může vzniknout při této reakci za standardních podmínek?

10. Vypočítejte, jaký je poměr koncentrací NAD/NADH u ethanolického kvašení v rovnováze, pokud by koncentrace ethanolu byla 5% a koncentrace acetaldehydu 0,5 mmol.l⁻¹. Hustota roztoku alkoholu = 1 g.ml⁻¹.



$$E_o(\text{acetaldehyd/ethanol}) = -0,197 \text{ V}; E_o(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0,320 \text{ V}.$$

11. Dokažte pomocí výpočtu $\Delta G^{\circ'}$, zda při oxidaci acetaldehydu na acetát je vhodnějším koenzymem NAD nebo FAD.



Při výpočtu berte v úvahu situaci, kdy poměr reduk. koenzym/oxid. koenzym = 1/100 a koncentrace acetaldehydu a acetátu je ekvimolární.

$$E^{\circ'}(\text{acetát/acetaldehyd}) = -0,580 \text{ V}, E^{\circ'}(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0,320 \text{ V}, E^{\circ'}(\text{FAD}/\text{FADH}_2) = 0,000 \text{ V}.$$

VÝSLEDKY ÚLOH

A. AMINOKYSELINY, PEPTIDY A BÍLKOVINY

1. a) Phe, Tyr, Try, His
b) Cys, Met
c) His, Lys, Arg
d) Ala, Gly, Phe, Ser, Val, Asp, Glu, Cys, Tyr, Asn, Gln, Try, Leu, Ile, Met, Thr, Pro
e) Gly, Ala, Leu, Ile, Val
f) žádný asymetrický uhlíkový atom: Gly
dva asymetrické uhlíkové atomy: Ile, Thr

2.

3. postupná disociace glycinu: $A^+ \rightarrow A \rightarrow A^-$

$$K_1 = [A] \cdot [H^+] / [A^+]$$

$$K_2 = [A^-] \cdot [H^+] / [A]$$

Vztahy pro disociační konstanty se pak využijí k výpočtu procenta disociované formy (po dosazení za jednotlivé formy glycinu se $[A]$ nakonec vykrátí):

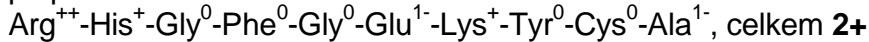
$$[A] \cdot 100 / ([A^+] + [A] + [A^-]) = 79.9\% \text{ disociované formy karboxylové skupiny při pH=3}$$

$$[A] \cdot 100 / ([A^+] + [A] + [A^-]) = 0.99\% \text{ NH}_3^+ \text{ při pH 11}$$

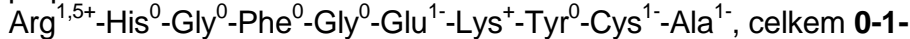
4. $\text{NH}_2\text{-Thr-Gly-COOH}$; $pI=6,385$ (pro $\text{NH}_2\text{-Gly-Thr-COOH}$ by byl $pI=6,115$)

5. Přibližný náboj jednotlivých aminokyselin v peptidickém řetězci lze určit na základě disociačních konstant postranních skupin. Pokud je uvažované pH roztoku vyšší než hodnota pK_3 postranní $-\text{COOH}$ skupiny, pak proběhne její disociace na $-\text{COO}^-$. Pokud je pH roztoku nižší než pK_3 postranní aminoskupiny, pak tato skupina přejde na formu $-\text{NH}_3^+$.

při $pH=5$:



při $pH=9$:



Z výše uvedeného vyplývá, že pI tohoto peptidu se nachází mírně pod $pH=9$. Hodnotu pI lze spočítat pouze přibližně, protože nemáme možnost brát v úvahu vliv sekundární struktury peptidu, vliv ostatních aminokyselinových zbytků na hodnoty disociačních konstant apod. Při porovnání disociačních konstant jednotlivých disociabilních skupin peptidu zjistíme, že nejvíce se $pH9$ přibližují: disociační konstanta argininu $pK_2=9,0$ a disociační konstanta cysteinu $pK_3=8,3$. Právě disociace $-\text{SH}$ skupiny cysteinu bude hrát významnou úlohu ve změně náboje peptidu při hodnotách pH blízkých pI . Při poklesu pH pod $8,3$ by se měl ztratit záporný náboj cysteinu a tím by měl peptid dosáhnout elektroneutrality.

$pI \leq 8,3$

Pokud je izoelektrický bod přibližným aritmetickým průměrem pK_A neutrální formy, pak bude první uvažovanou disociací deprotonace cysteinu ($pK_3=8,3$) při pH vyšším než pI a druhou reakcí bude protonace koncové skupiny o $pK_{a2}=7,9$ při pH nižším než pI .

Výsledný izoelektrický bod: $pI=8,1$.

6. disociabilní skupiny v peptidech A a B:

- A) Ser-NH₂(9,2), Tyr-OH(10,9), Glu-COOH(4,3), His-NH(6,0), Arg=NH(12,5), Gly-COOH(2,4)
B) Val-NH₂(9,6), Cys-SH(8,3), Glu-COOH(4,3), Lys-NH₂(10,8), Gly-COOH(2,4)
náboje při pH 9: A) Ser¹⁺-Tyr⁰-Ser⁰-Met⁰-Glu¹⁻-His⁰-Phe⁰-Arg¹⁺-Gly¹⁻ **0**
B) Val¹⁺-Cys¹⁻-Phe⁰-Glu¹⁻-Ala⁰-Lys¹⁺-Leu⁰-Gln⁰-Gly¹⁻ **1-**
náboje při pH 5: A) Ser¹⁺-Tyr⁰-Ser⁰-Met⁰-Glu¹⁻-His¹⁺-Phe⁰-Arg¹⁺-Gly¹⁻ **1+**
B) Val¹⁺-Cys⁰-Phe⁰-Glu¹⁻-Ala⁰-Lys¹⁺-Leu⁰-Gln⁰-Gly¹⁻ **0**
Elektroforézu lze provést např. při pH=5.

7. Izoelektrické body: Gly(6,1), Ala(6,1), Glu(3,25), Lys(10,0), Arg(10,75), Ser(5,65), Asp(2,95), Asn(5,4).

Aminokyseliny mají v prostředí o vyšším pH než je jejich pI náboj záporný, při nižším pH náboj kladný.

pH 3: anoda: Asp

katoda: Arg, Lys, Ala, Gly, Ser, Asn, Glu

(Glu a Asp mají izoelektrické body jen málo odlišné od 3, budou migrovat menší rychlostí než ostatní aminokyseliny)

pH 7: anoda: Asp, Glu, Asn, Ser, Gly, Ala

katoda: Arg, Lys

(Gly a Ala budou díky svým izoelektrickým bodům migrovat pomaleji než ostatní aminokyseliny)

8. Izoelektrické body: Gly(6,1), Ala(6,1), Glu(3,25), Lys(10,0), Arg(10,75), Ser(5,65).

Při pH=1 se díky svému kladnému náboji zachytí všechny. Při pH=6 se eluují Glu, Ser a také Gly, Ala, neboť jsou téměř v izoelektrickém bodě.

9. Izoelektrické body: Arg(10,75), Ala(6,1), Glu(3,25), Tyr(5,65), Ser(5,65)

a) pH=11: Arg⁰, Ala¹⁻, Glu²⁻, Tyr²⁻, Ser¹⁻ (hodnota náboje určena na základě jednotlivých pKa). Vyteče Arg, ostatní aminokyseliny se zachytí na koloně.

b) pH=8: Ala¹⁻, Glu¹⁻, Tyr¹⁻, Ser¹⁻. Žádná aminokyselina nevyteče.

10. Izoelektrické body: Glu(3,25), Ala(6,1), His(7,6), Lys(10), Tyr(5,65)

Pořadí eluce: Glu, Tyr, Ala, His, Lys.

11. Izoelektrické body: Cys(5,05), Glu(3,25), Ser(5,65), Ala(6,1), Lys(10,0), His(7,6).

Nezachytí se Lys, ostatní se zachytí.

12. a) disociabilní skupiny peptidu (I): Ala-NH₂(9,9), Glu-COOH(4,3), Tyr-OH(10,9), Lys-NH₂(10,8), Lys-COOH(2,2)

disociabilní skupiny peptidu (II): Gly-NH₂(9,8), Asp-COOH(3,9), His-NH(6), Tyr-OH(10,9), Lys-NH₂(10,8), Lys-COOH(2,2)

Podstatný rozdíl je v přítomnosti histidinu v peptidu(II) na rozdíl od peptidu(I).

Pro dosažení kladného náboje histidinu zvolíme např. **pH=5**:

Ala¹⁺-Glu¹⁻-Gly⁰-Tyr⁰-Lys⁰ **0**

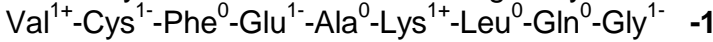
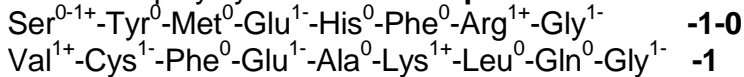
Gly¹⁺-Asp¹⁻-His¹⁺-Tyr⁰-Lys⁰ **1+**

Peptid(II) se na katexu zachytí.

b) disociabilní skupiny peptidu (III): Ser-NH₂(9,2), Tyr-OH(10,9), Glu-COOH(4,3), His-NH(6), Arg=NH(12,5), Gly-COOH(2,4)

disociabilní skupiny peptidu (IV): Val-NH₂(9,6), Cys-SH(8,3), Glu-COOH(4,3), Lys-NH₂(10,8), Gly-COOH(2,4)

Nemůžeme využít rozdíl v přítomnosti histidinu ke zvýšení náboje peptidu(III) o +1, neboť potřebujeme dělit anionty. Využijeme rozdíl disociačních konstant OH skupiny tyrosinu a SH skupiny cysteinu. Zvolíme **pH=9**:



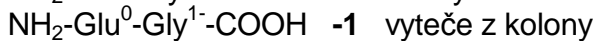
Pokud je pK blízké zvolenému pH, pak je přibližně polovina molekul v disociovaném stavu a druhá polovina v nedisociovaném stavu. Peptid s nábojem -1 až 0 nakonec vyteče, neboť se postupně naprotonují všechny aminoskupiny serinu. Peptid s nábojem -1 se na anexu zachytí.

13. Izoelektrické body: Gly(6,1), Asp(2,95), Tyr(5,65), Ala(6,1), His(7,6), Arg(10,75)

Pořadí eluce: 1.Asp, 2.Tyr, 3.Ala, Gly, 4.His, 5.Arg

14. $\text{NH}_2\text{-Val-Lys-Pro-Gly-COOH}$, popř. $\text{NH}_2\text{-Val-Lys-Gly-Pro-COOH}$

15. Po označení 2,4-dinitrofluorbenzenem a úplné hydrolyze získáme ve směsi (Ala+Lys+Glu+Gly) značený alanin a značený lysin, víme také o přítomnosti Glu a Gly. Alanin je tedy na N-konci. Trypsinovou hydrolyzou získáme dva dipeptidy, které rozdělíme iontoměničovou chromatografií při pH=5:



Každý z těchto oddělených dipeptidů pak označíme 2,4-dinitrofluorbenzenem a hydrolyzujeme. První peptid poskytne značený alanin a lysin ($\text{NH}_2\text{-Ala-Lys-?-?}$). Druhý peptid poskytne značenou kyselinu glutamovou. Výsledná sekvence je tedy: Ala-Lys-Glu-Gly.

Určení sekvence peptidu lze rovněž provést v sekvenátoru za použití Edmanova odbourání (fenylisothiokyanátová metoda).

Pro určování primární struktury peptidů lze využít i reakce s LiBH_4 (redukce -COOH skupiny na $-\text{CH}_2\text{OH}$), nebo hydrazinolýzy (všechny aminokyseliny se objeví ve výsledné směsi jako hydrazidy, kromě C-koncové aminokyseliny).

16. a) merkptoethanol: $\text{B-S-S-C} \rightarrow \text{B-SH} + \text{C-SH}$

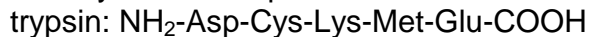
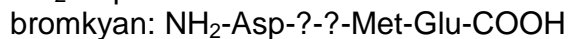
b) N-konce: Asp, Leu

c) peptid B: ?-?-?-?-Phe-Ala (chymotrypsin)

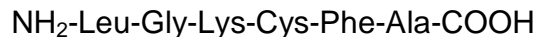
?-?-Lys-?-Phe-Ala (trypsin)

$\text{NH}_2\text{-Leu-?-Lys-Cys-Phe-Ala-COOH}$ (Sangerova metoda)

d) peptid C: aminokyseliny připadající v úvahu: Asp, Lys(?), Cys (určitě, S-S můstek), Gly(?), Glu(?), Met(?)...jedna z aminokyselin(?) bude součástí peptidu B



peptid B je tedy:



struktura peptidu P:



SS



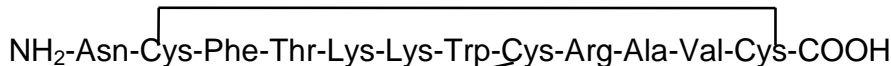
17. a) cyklický peptid

- b) NH₂-Cys-?-?-?-?-Tyr-COOH
 c) tripeptid: NH₂-Glu-?-Lys-COOH
 tetrapeptid: NH₂-Met-Tyr-?-Arg-COOH

sekvence -Glu-Ala-Lys-Met-Tyr-Cys-Arg-

18. thermolysin hydrolyzuje před Leu, Phe, Trp, Tyr, Val
 označení aminokyselin ve štěpech po β-merkapt ethanolu:
 Asn¹-Cys²-Phe³-Thr⁴-Lys⁵-Lys⁶-Trp⁷-Cys⁸-Arg⁹-Ala¹⁰-Val¹¹-Cys¹²
 Cys¹³-Thr¹⁴-Pro¹⁵-Tyr¹⁶-Cys¹⁷-Phe¹⁸-Pro¹⁹-Cys²⁰
 A) NH₂-Val¹¹-Cys¹²-Cys²-Asn¹-COOH
 B) NH₂-Phe³-Thr⁴-Lys⁵-Lys⁶-COOH
 C) NH₂-Trp⁷-Cys⁸-Arg⁹-Ala¹⁰-COOH

- SS
 NH₂-Tyr¹⁶-Cys¹⁷-COOH
 D) NH₂-Phe¹⁸-Pro¹⁹-Cys²⁰-S-S-Cys¹³-Thr¹⁴-Pro¹⁵-COOH
 disulfidické můstky mezi: Cys²-Cys¹²
 Cys⁸-Cys¹⁷
 Cys¹³-Cys²⁰



19. N-konec: Thr
 C-konec: Val-Ile-Leu-Lys-COOH
 hydrolyza chymotrypsinem: NH₂-Phe-Asp-Val-Ile-Leu-Lys-COOH
 sekvence P: NH₂-Thr-Glu-Phe-Asp-Val-Ile-Leu-Lys-COOH
 náboj při pH=6,5: Thr¹⁺-Glu¹⁻-Phe⁰-Asp¹⁻-Val⁰-Ile⁰-Leu⁰-Lys⁰, celkově 1-
 Pokud by byla Glu nahrazena Gln a Asp nahrazena Asn, tak by měl peptid při pH=6,5 náboj 1+, což by nebylo v souladu s podmínkami v zadání úlohy.

20. možné úseky α-šroubovice označeny **silně**:
 - **Leu-Ala-His-Thr-Tyr-Gly-Pro-Phe-Glu-Ala-Ala-Met-Cys-His-**
 - **Glu-Glu-Asp-Pro-Asp-Gly-Met-Gly-Cys-Ala-Phe-His-**
 při poklesu pH pod disociační konstanty karboxylových kyselin:
 - **Leu-Ala-His-Thr-Tyr-Gly-Pro-Phe-Glu-Ala-Ala-Met-Cys-His-**
 - **Glu-Glu-Asp-Pro-Asp-Gly-Met-Gly-Cys-Ala-Phe-His-**

Přesné určení sekundární struktury bílkoviny je úkolem pro počítačové modelování.

21. NH₂-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Phe-COOH
 22. Protein má poměrně hodně hydrofobních skupin, díky kterým může dobře kotvit v cytoplasmatické membráně. K určení sekundární struktury by mohla být využita statistická metoda P.Choua a G.Fasmana (1974). Prvním krokem je simultánní hledání "zárodků" tvorby α- a β-struktur. Tvoří je úseky (penta- až hexapeptidy) obsahující minimálně čtyři (u β-struktur tři) zbytky s velkou tendencí tvořit příslušný typ pravidelné sekundární struktury. Největší snahu tvořit α-helix mají methionin, glutamát, leucin a alanin, v β-strukturách se

vyskytují hlavně valin, isoleucin, fenylalanin a tyrosin. V dalším kroku se "zárodky" rozšiřují na obě strany, dokud průměrný sklon tetrapeptidu k vytváření α -, resp. β -struktury neklesne pod kritickou hodnotu. Posléze se vyhledají oblasti protisměrných ohybů, obsahující především glycin a prolin.

Silně vyznačený úsek bude mít tendenci tvořit α -helix:

Met-Ala-(Leu-Phe-Ala)₃-(Leu-Met-Phe)₃-Pro-Ans-Gly-Met-Leu-Phe

Při nahrazení Leu zbytkem Asp se sníží hydrofobnost proteinu, zřejmě se také sníží schopnost tvořit α -helix.

23. b, c, d

24. a) α -šroubovice: $153 \cdot 0,15 = 22,95 \text{ nm} = 23 \text{ nm}$

β -skládaný list: $153 \cdot 0,36 = 55,08 \text{ nm} = 55,1 \text{ nm}$

b) $a+b=153$

$a \cdot 0,15 + b \cdot 0,36 = 42 \text{ nm}$

$a = 62$ zbytků tvoří α -šroubovici

$b = 91$ zbytků tvoří β -skládaný list

25. počet aminokyselin $= (0,2 \cdot 10^9 \text{ nm}) / 0,15 \text{ nm} = 1,3333 \cdot 10^9$

rychlost syntézy $= 1,3333 \cdot 10^9 / (365 \cdot 24 \cdot 3600) = 42,3$ zbytků/sec

26. hmotnost ribozomálních proteinů $= 25000 \cdot (4/3) \cdot \pi \cdot (9 \cdot 10^{-7} \text{ cm})^3 \cdot 1 \text{ g/cm}^3 \cdot 0,4 = 3,0536 \cdot 10^{-14} \text{ g}$

délka β -šroubovice $= (3,0536 \cdot 10^{-14} / 120) \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 0,36 = 5,5176 \cdot 10^7 \text{ nm} = \underline{0,055 \text{ m}}$

délka jednoho ovinutí $= \pi \cdot 1 = 3,1416 \mu\text{m} = 3141,6 \text{ nm}$

počet ovinutí $= 5,5176 \cdot 10^7 / 3141,6 = \underline{1,76 \cdot 10^4}$ krát

27. $V = \pi \cdot 0,7^2 \cdot 280 = 431,027 \text{ nm}^3 = 4,3103 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$

$m = 3 \cdot 1000 \cdot 120 / (6,023 \cdot 10^{23}) = 5,9771 \cdot 10^{-19} \text{ g}$

$\rho = m/V = 5,9771 \cdot 10^{-19} \text{ g} / 4,3103 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3 = \underline{1,39 \text{ g/cm}^3}$

28. a) 7, b) 1, c) 3, d) 2

B. SACHARIDY

1d

2b

3d

5. 1-O-methylglukosa; 1,2,3,4,6-penta-O-methylgalaktosa;

2,3,4,6-tetra-O-methylgalaktosa

6. glucitol, kys. mannonová, kys. mannarová

7. 2,3,4,6-tetra-O-methylgalaktopyranosa, 2,3,6-tri-O-methylglukopyranosa

9. 2,4,6-tri-O-methyl-D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannopyranosa

10. 2,3,4-tri-O-methyl-D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galaktopyranosa

11. 5-O-galaktosyl-D-ribofuranosa

12. 4-O-galaktosyl-D-fruktofuranosa

D-glukopyranosyl-D-mannopyranosid uronát

13. 1,4,6-tri-O-methyl-D-fruktosa, 2,3,4,6-tetra-O-methylmannopyranosa

C. LIPIDY

1. b) estery

2. d)

4. Pro disociaci první volné –OH skupiny fosfolipidu platí $pK_a=6,8$, pokud je přítomna i poslední –OH skupina v disociovatelné formě, odpovídá její disociační konstanta $pK_3=12,3$.

a) 1-, b) 0, c) 0, d) 1-, e) 2-, f) 2-, g) 1-

6. pH 5: a) 0, b) 1+, c) 1+, d) 0, e) 0, f) 0, g) 0.

pH 8: a) 1-, b) 0, c) 0, d) 1-, e) 2-, f) 2-, g) 1-

7. a) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+tetrabutylamonium hydroxid= glycerolfosfocholin
glycerolfosfocholin+2 palmitoylchlorid= dipalmitoylfosfatidylcholin

b) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+fosfolipáza $A_2=$ 1-palmitoylfosfatidylcholin
1-palmitoylfosfatidylcholin+ stearylchlorid=1-palmitoyl-2-stearylfosfatidylcholin

c) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+ tetrabutylamonium hydroxid= glycerolfosfocholin
glycerolfosfocholin+ stearylchlorid=distearoylfosfatidylcholin

distearoylfosfatidylcholin+ fosfolipáza D=distearoylfosfatidová kyselina

distearoylfosfatidová kyselina+ethanolamin=distearoylfosfatidylethanolamin

D. TERMODYNAMIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

1. $+7,55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-2,85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

2. a) $-30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, b) $-47,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, c) $-53,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

3. $-25,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $7,2\cdot 10^5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

4. $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

5. $+31,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $3,08\cdot 10^4$

6. $+0,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-32,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Hydrolyza difosfátu usnadňuje průběh reakce zleva doprava, posunuje rovnováhu směrem k produktům.

7. $+8,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $0,034$, $+4,41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

8. $\Delta G^0=12,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $6,42\cdot 10^{-3}$

9. $\Delta G^0= -9,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $1,04\cdot 10^{-3}$

10. $\Delta G^0(1)=-29,25 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0=-8,35 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G=241 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$

Glykosidovou vazbu sacharosy lze dle standardní volné energie hydrolyzy považovat za makroergickou vazbu, ale sacharosa se nepovažuje za makroergickou sloučeninu.

11. $\Delta G^0(1)= -16,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\Delta G^0= -\Delta G^0(1)+ +\Delta G^0(2)+\Delta G^0(3)-\Delta G^0(4)$

$\Delta G^0= -1,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Za podmínek zadaných koncentrací je $\Delta G'= -27,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

12. $\Delta G^0(1)= -1,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\Delta G^0(\text{spřažená reakce})= -16,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

E. ÚVOD DO ENZYMOLOGIE

1b

2. a-oxidoreduktasa

triviálně malátdehydrogenasa

systematicky malát :NAD⁺-oxidoreduktasa (u reakcí s NADH jako donorem, či NAD⁺ jako akceptorem se upřednostňuje systematický název donor:NAD⁺-oxidoreduktasa, a ne NADH:akceptor-oxidoreduktasa)

b-transferasa

triviálně alaninaminotransferasa

systematicky L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa

jiný název glutamát-pyruvát transaminasa

c-hydrolasa

triviálně exoamylasa nebo β-amylasa

systematicky 1,4-α-D-glukan-maltohydrolasa

jiné názvy glykogenasa nebo sacharogenamylasa

d- oxidoreduktasa

triviálně methanoldehydrogenasa

systematicky methanol:NAD⁺-oxidoreduktasa

jiný název formaldehydreduktasa

e-transferasa

triviálně hexokinasa

systematicky ATP:fruktosa-fosfotransferasa

f-hydrolasa

triviálně ureasa

systematicky močovina-amidohydrolasa

g-izomerasa

triviálně fosfoglukomutasa

systematicky α-D-glukosa-1,6-fosfomutasa

jiný název glukosafosfomutasa

h-ligasa (syntetasa)

triviálně D-alanin-D-alanin ligasa

systematicky D-alanin:D-alanin-ligasa (tvořící ADP)

jiný název D-alanylalanin syntetasa

3. glukokinasa: $v=1,5 \cdot 10^{-6} \cdot [S]/([S]+10 \cdot 10^{-3})$

hexokinasa: $v=0,1 \cdot 10^{-6} \cdot [S]/([S]+0,1 \cdot 10^{-3})$

μmol.min⁻¹: a) 0,015, 0,05; b) 0,136, 0,0909; c) 0,50, 0,098; d) 1,125, 0,0997

Hexokinasa je při nízkých koncentracích glukosy mnohem výkonnější než glukokinasa, což jí umožňuje zásobovat mozek glukosa-6-fosfátem pro anaerobní glykolýzu i při poklesu hladiny glukosy v krvi. Tím je mozek chráněn proti náhlému nedostatku energie. Glukokinasa v játrech se podílí na regulaci glukosy v krvi tím, že ji při vysokých koncentracích intenzivně převádí na glukosa-6-fosfát jako výchozí sloučeninu pro syntézu glykogenu.

4. 0,00488 μmol.min⁻¹

5. $K_M=9,009 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $v_{lim}=45,045 \text{ μmol.min}^{-1}$

6. kompetitivní inhibici lze zrušit přebytkem substrátu

7. $K_M=1,17 \text{ mmol.l}^{-1}$, $v_{lim}=0,586 \text{ mmol.min}^{-1}$

8. $K_M=0,85 \text{ mmol.l}^{-1}$, $v_{lim}=0,100 \text{ μmol.min}^{-1}$

9. $K_M = 1,76 \text{ mmol.l}^{-1}$, $v_{\text{lim}} = 9,52 \text{ nmol.s}^{-1}$

10. látkové množství enzymu: $6,25 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$
 aktivita = $6,25 \cdot 10^{-13} \cdot 2500 = 1,56 \text{ nkat} = 0,0936 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}$

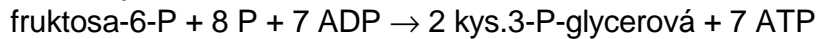
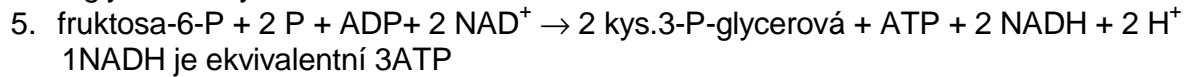
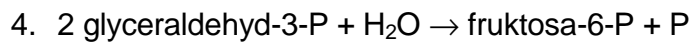
11. látkové množství enzymu: $2,0833 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$
 číslo přeměny = $20 \cdot 10^{-6} / (60 \cdot 2,0833 \cdot 10^{-12}) = 160\,000 \text{ s}^{-1}$

F. GLYKOLÝZA, METABILOSMUS SACHARIDŮ

1. C2 obou trios

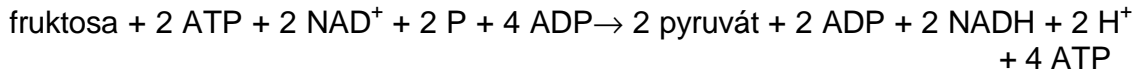
2. 2,5

3. ne

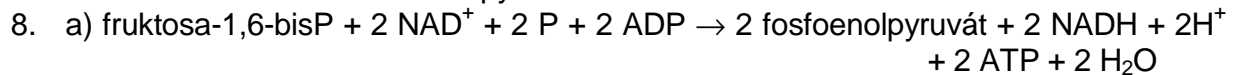
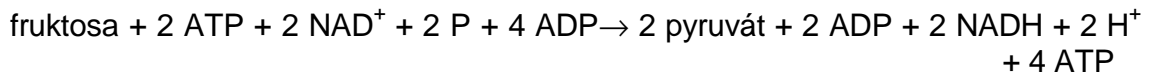


6. pyruvát, laktát, alanin

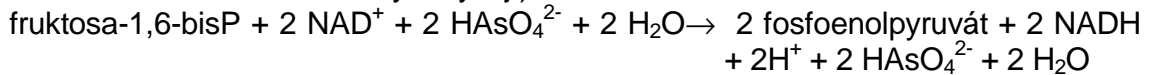
7. a) hexokinasa



b) fruktokinasa



b) neproběhne, nevzniká ATP (arseničan nahrazuje v reakcích fosfát, ale estery s arseničnanem okamžitě hydrolyzují)



9. methylová skupina v obou případech

10. 0,22 GAP a DHAP, 0,78 mM FBF

11. mechanismus aldolové kondenzace

12. odštěpí se jako $^{14}\text{CO}_2$

13. C3, C4

14. i) $\text{fruktosa-1,6-bisP} + \text{ADP} \rightarrow \text{fruktosa-6-P} + \text{ATP}$ NEPROBÍHÁ ($\Delta G^{\circ} = +14,2 \text{ kJ/mol}$)
 ve skutečnosti:

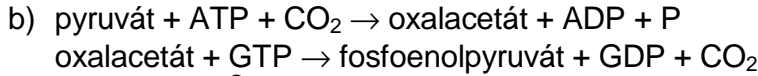


ii) $\text{glukosa-6-P} + \text{ADP} \rightarrow \text{glukosa} + \text{ATP}$ NEPROBÍHÁ ($\Delta G^{\circ} = 16,7 \text{ kJ/mol}$)
 ve skutečnosti:

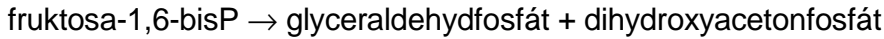


iii) $\text{pyruvát} + \text{ATP} \rightarrow \text{fosfoenolpyruvát} + \text{ADP}$ NEPROBÍHÁ ($\Delta G^{\circ} = +31 \text{ kJ/mol}$)
 ve skutečnosti:

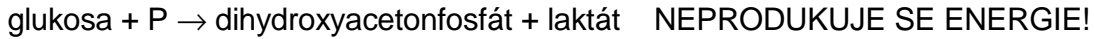
a) fosfoenolpyruvátsynthetasa (bakterie)



Přes nepříznivé ΔG° probíhá reakce:



15. hromadí se dihydroxyacetonfosfát dle výsledné bilanční rovnice:



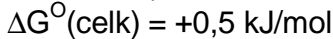
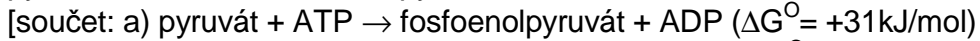
16. LDH srdečního svalu (izoenzym H_4) je vhodnější pro oxidaci laktátu na pyruvát. Pokud by se zde uplatnila LDH kosterního svalu, mohl by se v srdečním svalu hromadit laktát.

LDH kosterního svalu (izoenzym M_4) je lépe uzpůsobena pro oxidaci pyruvátu na laktát, což umožňuje kosternímu svalu pracovat na "kyslíkový dluh". Při nedostatku kyslíku se hromadí NADH vznikající při anaerobní glykolýze a likviduje se redukcí pyruvátu na laktát (únava). Svalové buňky předávají laktát do krve, následně může být v játrech přeměněn na glukosu.

17. I) $\text{pyruvát} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{oxalacetát} + \text{ADP} + \text{P}$

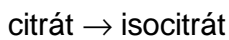


Souhrnná reakce:



G. CITRÁTOVÝ CYKLUS

1. $\text{malát} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{oxalacetát} + \text{NADH} + \text{H}^+$



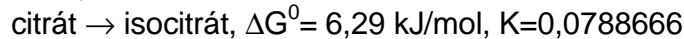
2. b,e

3. a,b

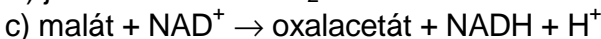
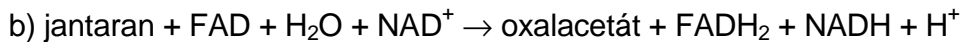
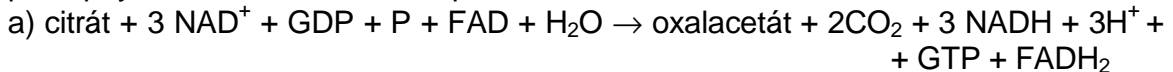
4. $\text{oxoglutarát} + \text{NAD}^+ + \text{GDP} + \text{P} \rightarrow \text{jantaran} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{GTP}$

5. $K_1 = 0,0336397$

$K_2 = 2,3444484$



6. postupným sčítáním reaktantů a produktů dostaneme bilanční rovnice:



7. U tohoto typu úloh se uvažuje pouze první průchod cyklem trikarbonových kyselin, v dalších krocích by se značený ^{14}C objevoval i v jiných pozicích.

a) uvolní se jako $^{14}\text{CO}_2$

b) C1 oxalacetátu

c) C2 a C4 oxalacetátu

10. v citrátu na C2

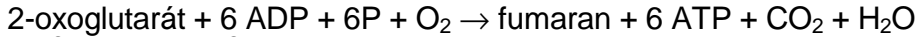
v isocitrátu na C2 a C4

8. reakce s FAD: $\Delta G^{\circ} = 5,98 \text{ kJ/mol}$
 reakce s NAD^{+} : $\Delta G^{\circ} = 67,7 \text{ kJ/mol}$

H. RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC

- jednoelektronové: cyt c, cyt b, cyt a, UQ
 dvouelektronové: NADH
 $\text{NADH} + \text{H}^{+} + \text{UQ} \rightarrow \text{NAD}^{+} + \text{UQH}_2$
 $\text{UQH}_2 + \text{cyt c (ox)} \rightarrow \text{UQH} \cdot + \text{H}^{+} + \text{cyt c (red)}$
 $\text{UQH}_2 + 2 \text{ cyt c (ox)} \rightarrow \text{UQ} + 2\text{H}^{+} + 2 \text{ cyt c (red)}$
 $\text{cyt c (red)} + \text{cyt b (ox)} \rightarrow \text{cyt c (ox)} + \text{cyt b (red)}$
 $2 \text{ cyt a (red)} + 1/2 \text{ O}_2 + 2\text{H}^{+} \rightarrow 2 \text{ cyt a (ox)} + \text{H}_2\text{O}$
 $\text{cyt c (red)} + \text{cyt a (ox)} \rightarrow \text{cyt c (ox)} + \text{cyt a (red)}$
- Ve vzorci $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ}$ se při výpočtu ΔE° odečítá od redoxního potenciálu složky, která vystupuje na levé straně rovnice v oxidované podobě, redoxní potenciál složky, která je zde v podobě redukované.

 - $\text{NADH} + \text{H}^{+} + \text{UQ} \rightarrow \text{NAD}^{+} + \text{UQH}_2$
 $E^{\circ}_{\text{NAD}^{+}} = -0,32\text{V}$
 $E^{\circ}_{\text{UQ}} = +0,10\text{V}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,10 - (-0,32)) = -81,06 \text{ kJ/mol}$
 Kryta energetická spotřeba vzniku dvou ATP.
 - $\text{jantaran} + \text{UQ} \rightarrow \text{fumarát} + \text{UQH}_2$
 $E^{\circ}_{\text{fum}} = 0,031\text{V}$
 $E^{\circ}_{\text{UQ}} = 0,10\text{V}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,10 - 0,031) = -13,317 \text{ kJ/mol}$
 - $2 \text{ cyt b (red)} + 2 \text{ cyt c (ox)} \rightarrow 2 \text{ cyt b (ox)} + 2 \text{ cyt c (red)}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,235 - 0,03) = -39,57 \text{ kJ/mol}$
 Kryta energetická spotřeba vzniku jednoho ATP.
 - $2 \text{ cyt c (red)} + 1/2 \text{ O}_2 + 2\text{H}^{+} \rightarrow 2 \text{ cyt c (ox)} + \text{H}_2\text{O}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,816 - 0,235) = -112,13 \text{ kJ/mol}$
 Kryta energetická spotřeba vzniku tří ATP.
- $\text{NADH} + 1/2 \text{ O}_2 + \text{H}^{+} \rightarrow \text{NAD}^{+} + \text{H}_2\text{O}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,816 - (-0,32)) = -219,25 \text{ kJ/mol}$
 Teoreticky by vzniklo 7,3 molů ATP.
 - $\text{NADH} + 2 [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} \rightarrow \text{NAD}^{+} + \text{H}^{+} + 2 [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$
 $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,36 - (-0,32)) = -131,24 \text{ kJ/mol}$
 Teoreticky by vzniklo 4,4 molů ATP.
- $\text{jantaran} + 2 \text{ ADP} + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{fumarán} + 2 \text{ ATP} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{P}$
 $\text{isocitrát} + 7 \text{ ADP} + 7\text{P} + \text{O}_2 \rightarrow \text{jantaran} + 2 \text{ CO}_2 + 7 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
 $\text{jantaran} + 5 \text{ ADP} + 5\text{P} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{oxalacetát} + 5 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
- Antimycin je inhibítozem komplexu III, zasahuje v místě cytochromu bc₁.
- $\text{fumarán} + 3 \text{ ADP} + 3\text{P} + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{oxalacetát} + 3 \text{ ATP} + \text{H}_2\text{O}$

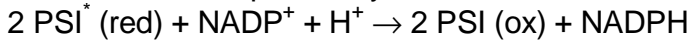


7. $\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (0,03 - (-0,32)) = -67,55 \text{ kJ/mol}$

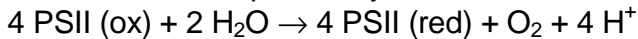
Tato reakce by mohla být využita k syntéze 2,2 molů ATP.

I. FOTOSYNTÉZA

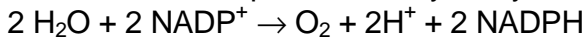
1. souhrnná rovnice pro fotosystém I:



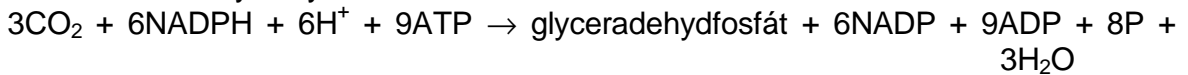
souhrnná rovnice pro fotosystém II:



souhrnná rovnice pro oba fotosystémy:



temná fáze fotosyntézy:



2. $2 \text{ ferredoxin} (\text{red}) + \text{NADP} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ ferredoxin} (\text{ox}) + \text{NADPH}$

$$\Delta G^{\circ} = -21 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta E^{\circ} = 0,106 \text{ V}$$

3. na C1 v prvním případě, na C3 ve druhém případě

4. lokalizace: chloroplasty (NADPH) X cytoplazma (NADH)

5. $2 \text{ fotosystém I} (\text{red}) + \text{NADP} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ fotosystém I} (\text{ox}) + \text{NADPH}$

$$\Delta E^{\circ}_{\text{NADP}} = -0,324 \text{ V}$$

základní stav:

$$\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (-0,324 - 0,46)$$

$$\Delta G^{\circ} = 151,312 \text{ kJ/mol} = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{[\text{fot I} (\text{ox})]^2 \cdot [\text{NADPH}]}{[\text{fot I} (\text{red})]^2 \cdot [\text{NADP}]} \right)$$

$$\frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}]} = 2,995 \cdot 10^{-27}$$

excitovaný stav:

$$\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (-0,324 - (-0,60))$$

$$\Delta G^{\circ} = -53,268 \text{ kJ/mol} = -R \cdot T \cdot \ln K$$

$$\frac{[\text{fot I} (\text{ox})]^2 \cdot [\text{NADPH}]}{[\text{fot I} (\text{red})]^2 \cdot [\text{NADP}]} = 2,175 \cdot 10^9$$

$$\frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}]} = 2,175 \cdot 10^9$$

6. $2 \text{ ferredoxin} (\text{red}) + \text{NADP} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ ferredoxin} (\text{ox}) + \text{NADPH}$

$$\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = -2 \cdot 96500 \cdot (-0,324 - (-0,43)) = -20,46 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{[\text{ferr}(\text{ox})]^2 \cdot [\text{NADPH}]}{[\text{ferr}(\text{red})]^2 \cdot [\text{NADP}]} \right)$$

$$\Delta G = -20460 + 8,31 \cdot 298 \cdot \ln(100) = -9056 \text{ J/mol} \dots \text{samovolný průběh}$$

poměr v rovnováze: $\text{ferr}(\text{ox})/\text{ferr}(\text{red}) = 6,2$

Redukovaný ferredoxin je schopen redukovat NADP, dokud se poměr $\text{ferr}(\text{ox})/\text{ferr}(\text{red})$ nezmění z 1 na 6,2.

7. diuron zasahuje v místě komplexu b_6f

8. Jedná se o zelené sírné bakterie (rod Chlorobium) patřící mezi obligátně fototrofní organismy. Jsou inhibovány vyšší tenzí O_2 .

rovnice fotosyntézy: $2 \text{ H}_2\text{S} + \text{CO}_2 \rightarrow \{\text{CH}_2\text{O}\} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ S}$, kde $\{\text{CH}_2\text{O}\}$ je např. cukr

J. NUKLEOVÉ KYSELINY

2. $A_{260} = [\text{AMP}] \cdot \epsilon_{260}(\text{AMP}) + [\text{GMP}] \cdot \epsilon_{260}(\text{GMP})$
 $A_{280} = [\text{AMP}] \cdot \epsilon_{280}(\text{AMP}) + [\text{GMP}] \cdot \epsilon_{280}(\text{GMP})$
[GMP] = $3,07 \cdot 10^{-5}$ mol/l, [AMP] = $1,90 \cdot 10^{-5}$ mol/l
4. RNA 321, DNA 309
5. a/ UpCpUpApGpA
b/ Up+ CpUpApGpAp, Up+Cp+UpApGpAp, Up+Cp+Up+ApGpAp atd.
c/ UpCpUpApG+pAp, UpCpUpA+pG+pAp, UpCpU+pA+pG+pAp atd.
d/ UpCpUpA+pGpAp
e/ UpCpU+pA+pG+pAp
6. fosfodiesteráza hadího jedu: $^{32}\text{pApCpTpTpA+pG}$, $^{32}\text{pApCpTpT+pA+pG}$,
 $^{32}\text{pApCpT+pT+pA+pG}$, $^{32}\text{pApC+pT+pT+pA+pG}$ (poslední dinukleotid nechá nerozštěpený)
deoxyribonukleáza II: $^{32}\text{pAp+CpTpTpApG}$, $^{32}\text{pApCp+TpTpApG}$, $^{32}\text{pApCpTp+TpApG}$,
 $^{32}\text{pApCpTpTp+ApG}$, $^{32}\text{pApCpTpTpAp+G}$ a další
8. a) pC...je na volném 3' konci RNA
b) pankreatická ribonukleáza rozštěpí polynukleotid (psáno od 5' konce k 3' konci) za U a C
možnosti: ACAGUC
ACGAUC
GAUACC
AGUACC
c) A bude na začátku
možnosti: AGCAUC...vyřazeno z důvodů b)
ACGAUC
AGCACU...nesplňuje podmínku a)
ACGACU...nesplňuje podmínku a)
- řešení: (pApCpGpApUpC)
8. (-ATAGGCTTAGTACCA-)
9. -TCGCATC-, -UCGCAUC-
10. a/ GATCAA palindrom: GATC
CTAGTT CTAG
b/ TGGAAC palindrom není
ACCTTG
c/ GAATTC celé palindrom
CTTAAG
d/ ACGCGT celé palindrom
TGCGCA
e/ CGGCCG celé palindrom
GCCGGC
f/ TACCAT palindrom není
ATGGTA
11. 617,5; $1,82 \cdot 10^6$ Da, $3,02 \cdot 10^{-18}$ g
12. a) $1,43 \cdot 10^{11}$ Da
b) $2,32 \cdot 10^8$ pb, 0,079 m

13. 67,2% G+C, 32,8% A + T, molární poměr purinových a pyrimidinových bazí je 1:1, molární složení: 33,6 % G, 33,6% C, 16,4% A, 16,4% T
14. Phe→Leu, Ala→Thr, Ile→Leu, Pro→Ser-
15. a) 8500 pb
b) rozdíl v molekulové hmotnosti je $5,25 \cdot 10^6$ Da, což je $8,72 \cdot 10^{-18}$ g
c) 2833 kodonů a tedy aminokyselin, což je $3,97 \cdot 10^5$ Da
16. 100 řetězců, průměrná délka 300 bazí (za předpokladu, že polymerace proběhne v obou pokusech stejně)
17. **TTC GAA** pro Phe a Glu,
TTT **GAG ATC TTG GAG CGG CGG** nebo TTT **GAG ATC TTA GAG CGG CGG**
18. a) jednoduchá šroubovice
b) G 19%, T 25%, A 33%, C 23%
c) G 21%, T 29%, A 29%, C 21%
d) nový řetězec DNA
19. frekvence kodonů:
- | | | | |
|-----|--------------|-------|-----|
| UUU | 0,9.0,9.0,9= | 72,9% | Phe |
| UUC | 0,9.0,9.0,1= | 8,1% | Phe |
| UCU | | 8,1% | Ser |
| CUU | | 8,1% | Leu |
| UCC | | 0,9% | Ser |
| CUC | | 0,9% | Leu |
| CCU | | 0,9% | Pro |
| CCC | | 0,1% | Pro |
- Po součtu dostávááme teoretické aminokyselinové složení shodné s experimentálním.
20. frekvence kodonů:
- | | | |
|-----|-------|-----|
| GGG | 12,5% | Gly |
| GAA | 12,5% | Glu |
| AGA | 12,5% | Arg |
| AAG | 12,5% | Lys |
| GGA | 12,5% | Gly |
| GAG | 12,5% | Glu |
| AGG | 12,5% | Arg |
| AAA | 12,5% | Lys |
- Syntezovaný polypeptid bude obsahovat 25% glutamátu.
21. strukturní gen: 750 nukleotidů (+ iniciační a terminační kodony)
serin je v aktivním centru

K. REDOXNÍ REAKCE

1. $E = -0,35$ V
2. doleva, doprava, doleva, doprava
3. Při výpočtu ΔE° odečítá od redoxního potenciálu složky, která vystupuje na levé straně rovnice v oxidované podobě, redoxní potenciál složky, která je zde v podobě redukované.
 $+29,7$ kJ/mol, $6,13 \cdot 10^{-6}$

4. $[\text{laktát}]/[\text{pyruvát}]=1$
 $\Delta E^0 = E^0_{\text{LAK}^-} - E^0_{\text{NAD}} = -0,185 - (-0,32) = 0,135\text{V}$
 $\Delta E^0 = (R \cdot T/n \cdot F) \cdot \ln([\text{laktát}] \cdot [\text{NAD}^+]/[\text{pyruvát}] \cdot [\text{NADH}])$
 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 3,71 \cdot 10^4$
5. $\Delta E^0 = -0,32 - (-0,031) = -0,351\text{V}$
 $\Delta G^0 = 67,7 \text{ kJ/mol}$
 $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln([\text{fumaran}] \cdot [\text{NADH}]/[\text{jantaran}] \cdot [\text{NAD}^+]) = +60,3 \text{ kJ/mol}$
6. $\Delta E^0 = 0,104 - (-0,32) = 0,424\text{V}$
 $\Delta G^0 = -81,8 \text{ kJ/mol}$
 $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln([\text{UQH}_2] \cdot [\text{NAD}^+]/[\text{UQ}] \cdot [\text{NADH}]) = -68,7 \text{ kJ/mol}$
7. $\Delta E^0 = 0,03 - (-0,58) = 0,61\text{V}$
 $\Delta G^0 = -117,7 \text{ kJ/mol}$
Reakce probíhá doprava.
8. $\Delta G^0 = -14,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Reakce probíhá doprava.
9. $\Delta G^0 = -83 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 2-3 molekuly ATP
10. $[\text{alkohol}] = (5/46,0829)/0,1 = 1,0854 \text{ mol/l}$
 $\Delta E^0 = 0,123\text{V}$
 $\Delta G^0 = -23,74 \text{ kJ/mol}$
 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}^+] = 6,71$
11. NAD^+ :
 $\Delta E^0 = 0,26 \text{ V}$, $\Delta G^0 = -50,2 \text{ kJ/mol}$, $\Delta G = -61,6 \text{ kJ/mol}$
FAD:
 $\Delta E^0 = 0,58 \text{ V}$, $\Delta G^0 = 111,9 \text{ kJ/mol}$, $\Delta G = 100,5 \text{ kJ/mol}$