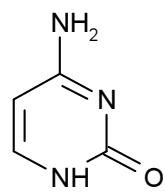
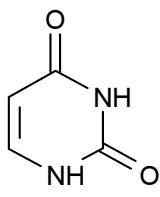
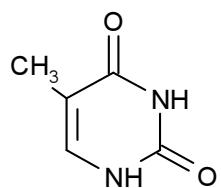
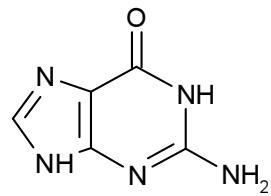
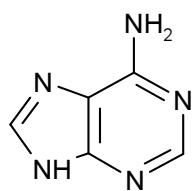


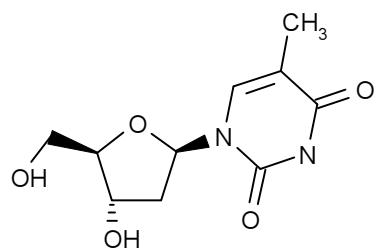
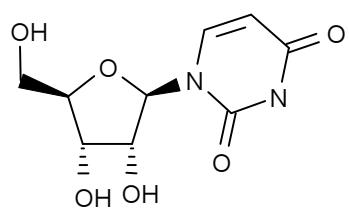
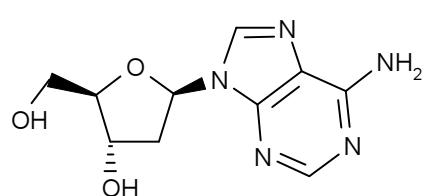
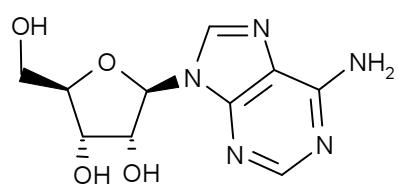
TEORIE A ZADÁNÍ ÚLOH

D NUKLEOVÉ KYSELINY

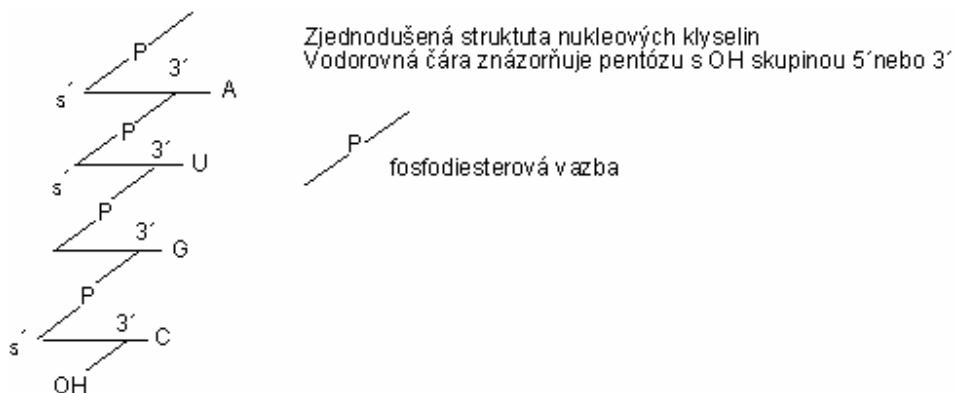
Nukleové baze



Nukleosidy



Primární struktura nukleových kyselin



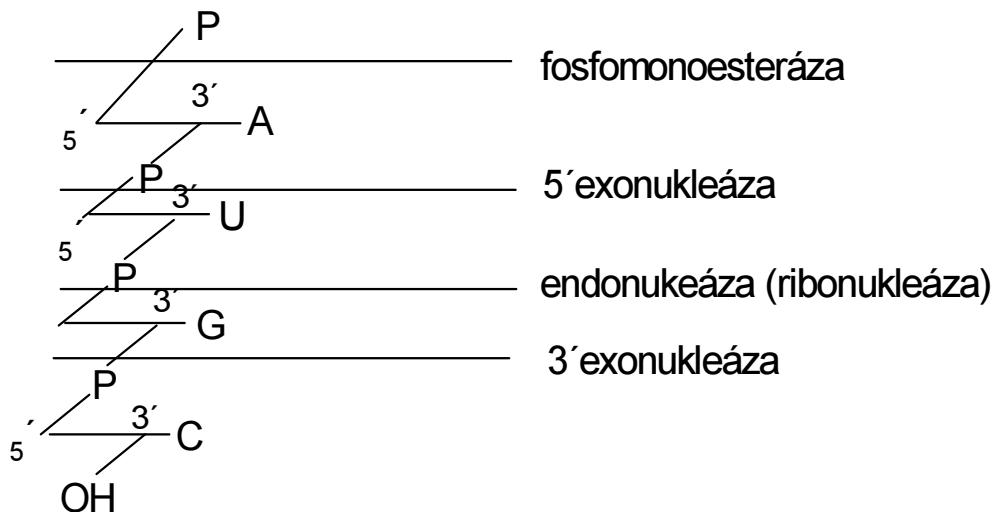
Metody stanovení sekvence nukleových kyselin:

Enzymy hydrolyzující nukleové kyseliny mohou být specifické na DNA, RNA, nebo bez specificity

Fosfomonoesterázy:
hydrolyzují teminální 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 (desoxyribonukleáza, 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 hydrolýza 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 (rychlosť migrace je nepřímo úměrná počtu nukleotidů)
4. Autoradiografie gelu

Sekundární struktura DNA

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

Dvojitá šroubovice obsahuje 10 pb na jednu otáčku a vzdálenost mezi dvěma následujícími pb je 0,34 nm.

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

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

Genetický kód mRNA prokaryontů:

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 absorbanci $A_{260} = 0.652$ 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 desoxyribodinukleotidu 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 hydrolyzy této RNA pomocí následujících enzymů:

- a) fosfomonooesteráza
- b) fosfodiesteráza hadího jedu (3'- exonukleáza)
- c) fosfodiesteráza ze sleziny (5'- exonukleáza)
- d) ribonukleáza T1 (hydrolyza v místě G, vznik 3'P oligonukleotidu)
- e) ribonukleáza U2 (hydrolyza 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

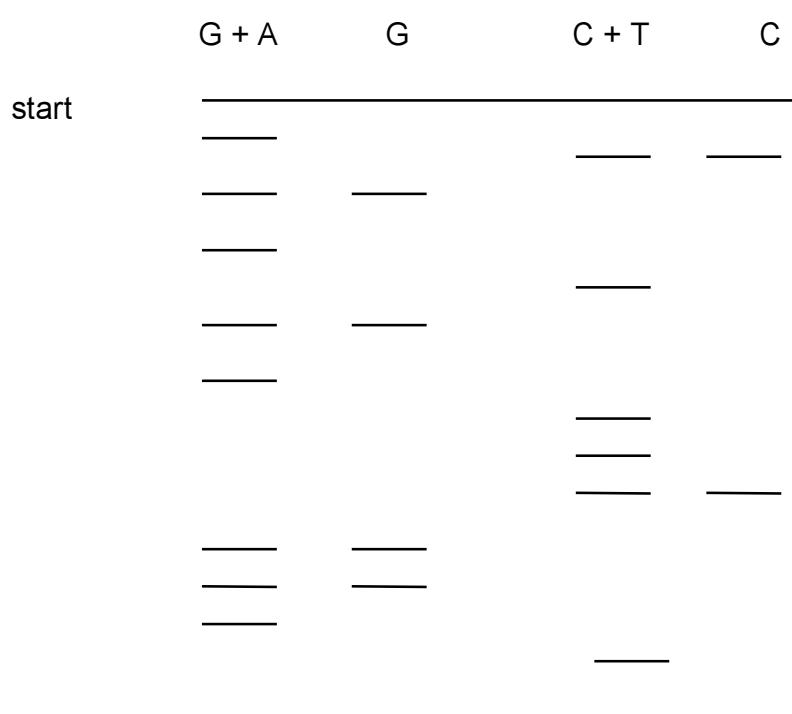
5' terminální nukleotid byl označen ^{32}P . Jaké oligonukleotidy získáme po působení fosfodiesterázy hadího jedu (viz výše). Které z nich budou značeny ^{32}P ? Které oligonukleotidy získáme hydrolýzou pomocí desoxyribonukleázy II a které z nich budou značeny ^{32}P (desoxyribonukleáza II je endonukleáza 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) hydrolýzou pomocí pankreatické ribonukleázy získánme 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) hydrolýzou pomocí ribonukleázy T2 (hydrolýza 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. Po autoradiografii byl získán následující obraz:



9. Při replikaci řetězce DNA --AGCGTAG-- byl vytvořen komplementární řetězec o jaké sekvenci ? Jaká bude sekvence RNA vytvořená při transkripcii.

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

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

11. Vypočítejte molekulovou hmotnost jednoho průměrného páru bazí (molekulová hmotnost A = 135, T = 126, G = 151, C = 111, desoxyribóza 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?

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 baze.

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 mutaci, které by mohly vnést do této sekvence restrikční místo TT/CGAA a jiné restrikční 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 nasyntezované 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?

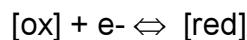
19. Byla provedena syntéza polynukleotidu mRNA *in vitro* za použití 90% UTP a 10% CTP. Tyto polymerní molekuly byly poté použity pro syntézu polypeptidu za přítomnosti všech 20 t-RNA. Syntezované polypeptidy byly hydrolyzovány a jejich celkové aminokyselinové složení bylo následující: 81% Phe, 1% Pro, 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 nahradě jednoho serinu glutamátem. Tento fakt se projevil ztrátou enzymové aktivity. Co z tohoto faktu lze vyvodit?

G REDOXNÍ REAKCE

Základní vztahy:



reduktivní potenciál E (definován při pH 7.0)

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

stand.	aktuální
redox pot.	konzentrace složek

$$F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$$

$$R = 8.31 \text{ J.deg}^{-1}.mol^{-1}$$

reakce mezi dvěma redox systémy:



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

$$E_{01} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_1]}{[\text{red}_1]} = E_{02} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_2]}{[\text{red}_2]}$$

$$E_{01} - E_{02} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}_2][\text{red}_1]}{[\text{red}_2][\text{ox}_1]}$$

$$K = \frac{[\text{ox}_2][\text{red}_1]}{[\text{ox}_1][\text{red}_2]}$$

$$E_{01} - E_{02} = \frac{RT}{nF} \ln K$$

$$\Delta G_\circ = -RT \ln K$$

$$E_{01} - E_{02} = - \frac{\Delta G_\circ}{nF}$$

$$\Delta G_\circ = -nF(E_{01} - E_{02})$$

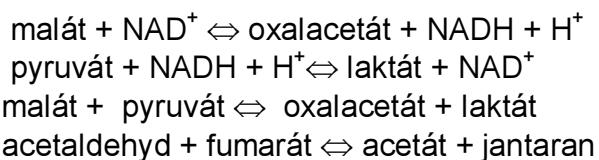
$$\Delta G_\circ = -nF \Delta E_\circ \quad \text{kde } \Delta E_\circ = E_{\circ \text{ ox}} - E_{\circ \text{ red}}$$

Tab.III Hodnoty standartních redox potenciálů některých důležitých redoxních pářů při pH 7

	$E_{\circ} \text{ (V)}$
acetát/acetaldehyd	-0.58
NAD+/NADH	-0.32
NADP+/NADPH	-0.324
acetaldehyd/ethanol	-0.197
pyruvát/laktát	-0.185
oxalacetát/malát	-0.166
ubichinon/ubihydrochinon	+0.10
2cyt b(ox)/2cyt b(red)	+0.03
fumaran/jantaran	+0.031
2cyt c(ox)/2cyt c(red)	+0.235
2cyt a(ox)/2cyt a(red)	+0.385
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 standartních redox potenciálů určete, zda reakce bude mít tendenci probíhat doleva nebo doprava:



3. Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce ze standartního redox potenciálu E_{\circ} (T = 25°C)



4. Vypočítejte, jaký musí být poměr koncentrací NAD/NADH, aby reakce:
 $\text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{laktát} + \text{NAD}^+$

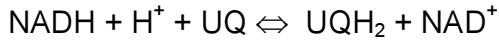
byla při 25°C v rovnováze, je-li poměr koncentrací pyruvát/laktát = 1.

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} , $T = 25^\circ\text{C}$.

6. Vypočítejte ΔG reakce při 25°C :



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

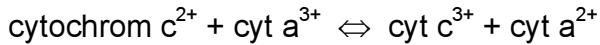
$$E_{\text{UQ}} = +0.104 \text{ V}, E_{\text{NADH}} = -0.32 \text{ V}$$

7. Určete ΔG° reakce:



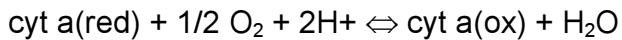
$E^\circ \text{ acetát} = -0.58 \text{ V}$, $E^\circ \text{ fumarát} = 0.03 \text{ V}$. V jakém směru bude reakce probíhat.

8. Určete ΔG° reakce:



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

9. Vypočítejte ΔG° reakce:



$E^\circ (\text{cyt a}) = 0.385 \text{ V}$, $E^\circ (\text{O}_2) = 0.816 \text{ V}$. Je-li ΔG° syntézy ATP z ADP a Pi $+30 \text{ kJ.mol}^{-1}$, kolik molekul ATP může vzniknout při této reakci za standardních podmínek?

10. Vypočítejte, jaký je poměr koncentrací NAD/NADH u alkoholického kvašení v rovnováze, pokud by koncentrace alkoholu byla 5% a koncentrace acetaldehydu $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Hustota roztoku alkoholu = 1 g.ml^{-1} .



$E^\circ \text{ alkohol/aldehyd} = -0,197 \text{ V}$; $E^\circ \text{ NADH/NAD} = -0,32 \text{ V}$.

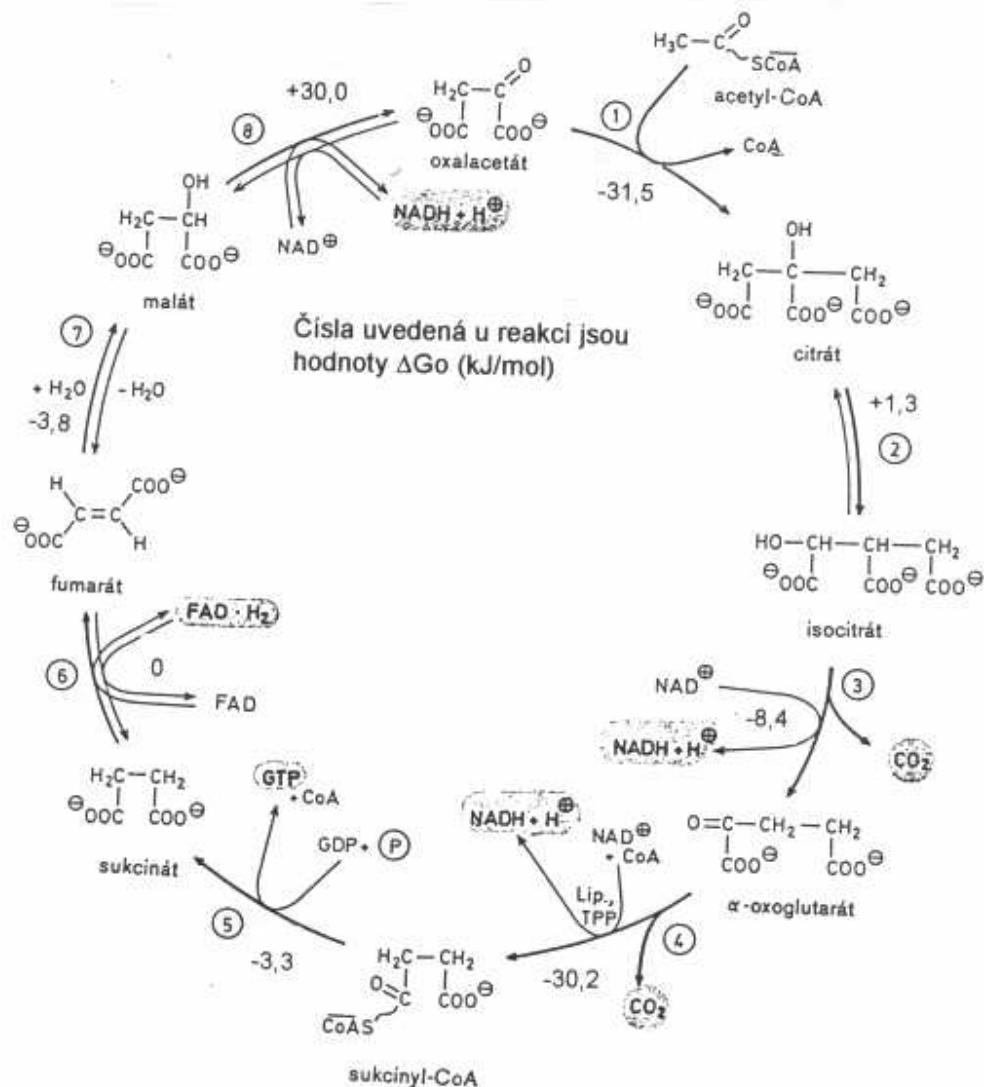
11. Dokažte pomocí výpočtu ΔG , zda při oxidaci acetaldehydu na acetát je vhodnějším koenzymem NAD nebo FAD.

Acetaldehyd + oxid. koenzym → acetát + red. koenzym

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

E° acetaldehyd = -0,58 V, E° NADH = -0,32 V, E° FADH₂ = 0 V

H KREBSUV CYKLUS



1. Srovnejte G° reakcí Krebsova cyklu. Které reakce mají tendenci probíhat obráceným směrem a jakým způsobem dochází k posunu reakcí žádoucím směrem?

2. V kterém místě cyklu trikarbonových kyselin 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 sukcinylKoA

3. V kterém místě cyklu trikarbonových kyselin dochází k oxidaci substrátu

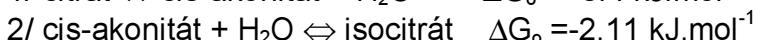
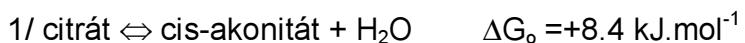
Přeměna

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 jantaran v Krebsově cyklu.

5. Jaké jsou rovnovážné relativní koncentrace isocitrátu, citrátu a cis-akonitátu, je-li ΔG° 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.

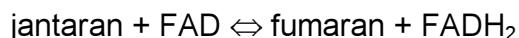
7. Jaká je distribuce uhlíku ^{14}C na oxalacetátu po přidání pyruvátu značeného na a) C1, b) na C2, c) na C3

k enzymům Krebsova cyklu a k pyruvát dekarboxylase?

8 K enzymům Krebsova cyklu byla přidán acetylKoA

značený ^{13}C na methylové skupině. Dokažte, jaká bude distribuce radioaktivity ve vzniklé citrátu a jaká ve vzniklé isocitrátu

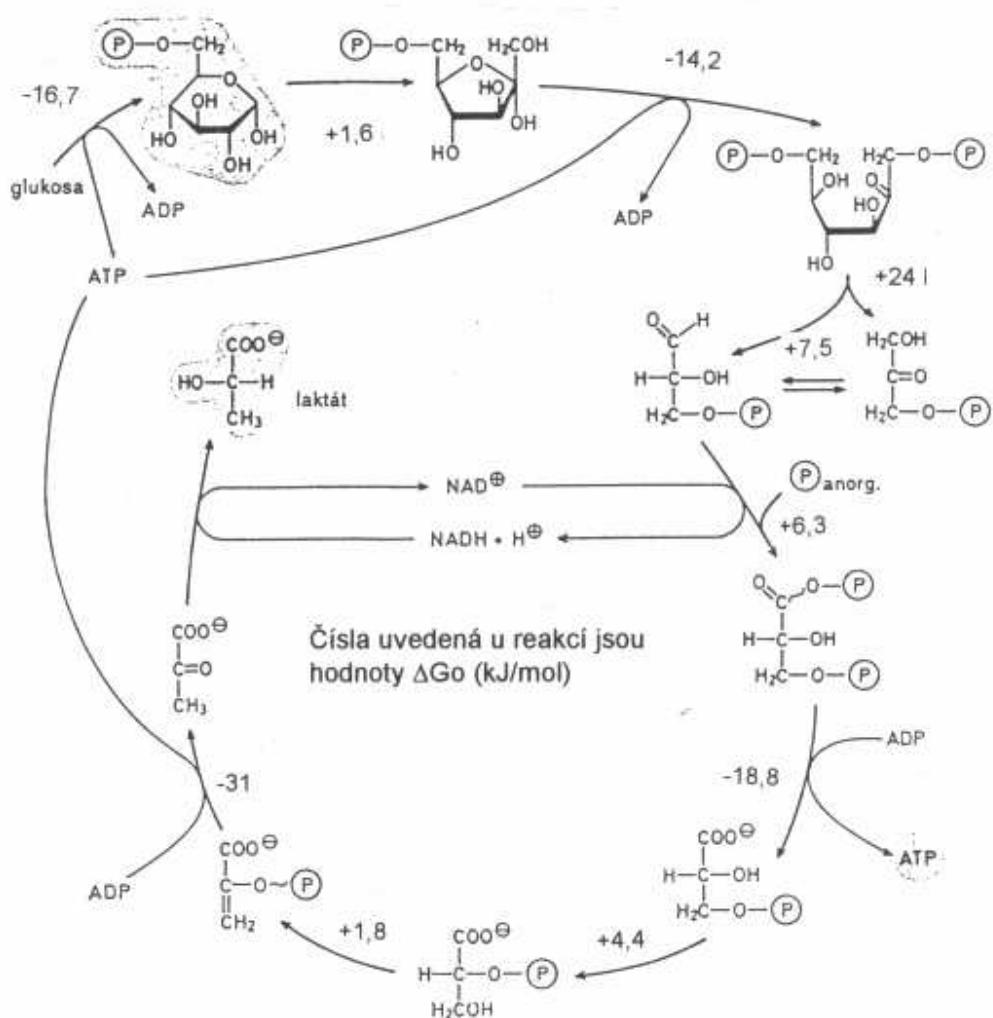
9. Na základě hodnoty G° vypočtené ze standartních redox potenciálů zdůvodněte, proč oxidace jantaranu na fumaran v Krebsově cyklu probíhá za účasti FAD jako koenzymu a nikoliv NAD^+ .



$$(\text{E}_\text{o FAD/FADH}_2 = 0.0 \text{ V})$$

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

I ANAEROBNÍ GLYKOLÝZA



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 glykolysy byla přidána kys. 3P glycerová značená na uhlíku č.2. Zvratem anaerobní glykolysy byl z této kyseliny synthezován 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. Prokážte, 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:

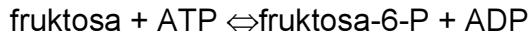


5. Napište bilanční rovnici přeměny fruktosa-6-fosfátu na kys. 3-fosfoglycerovou v procesu anaerobní glykolýzy.



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 glykolysy za předpokladu: a) fosforylace fruktosy hexokinasy



8.. Napište bilanční rovnici přeměny fruktosa-1,6-bisP na fosfoenolpyruvát při anaerobní glykolyse

- a) v přítomnosti NAD, Pi a ADP
- b) v přítomnosti NAD+, ADP, arseničnanu

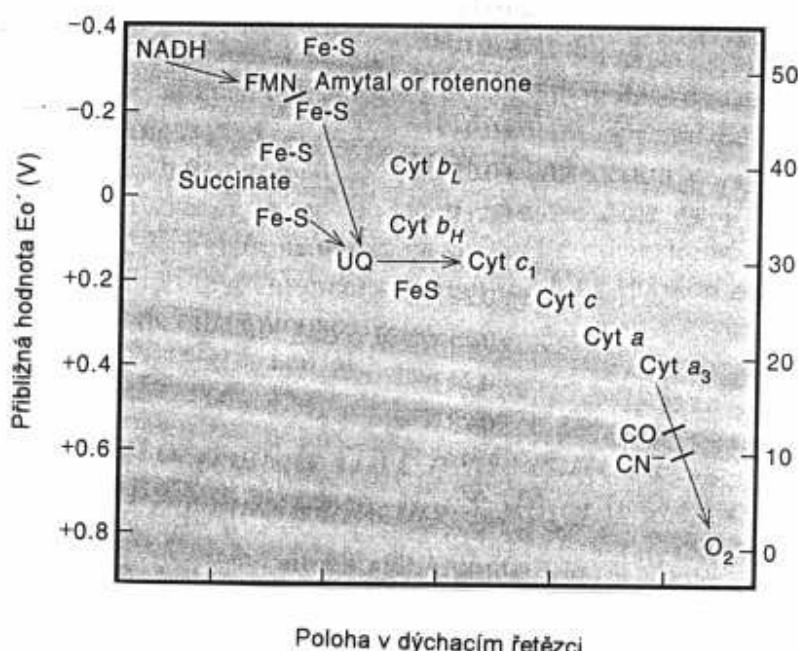
9. Glukosa byla značena ^{14}C . Jaká bude distribuce značeného uhlíku v pyruvátu po přeměně značené glukosy v procesu anaerobní glykolysy.

- a) v případě značení na C1
- b) v případě značení na C6

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

10. Jaká bude rovnovážná koncentrace fruktosa-1,6-bisfosfátu, glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetofosfátu, jestliže fruktosa-1,6-bisfosfát 1 mmol.l^{-1} byl inkubován s aldolasou ($\Delta G_o = + 24 \text{ kJ.mol}^{-1}$).
11. Zdůvodněte, proč při anaerobní glykolyze musí být glukosa-6-fosfát izomerován na fruktosa-6-fosfát. Vezměte v úvahu reakční mechanismus aldolasové 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. 3P glycerová značená na uhlíku karboxylové skupiny. Zvratem anaerobní glykolysy byl z této kyseliny synthezován fruktosa-1,6-bisfosfát. Jaká bude distribuce radioaktivity v tomto fruktosa-1,6-bisfosfátu.
14. Na základě velikosti ΔG_o odhadněte, které reakce nemohou při glukoneogenesi probíhat zvratem anaerobní glykolysy. Jakým způsobem jsou tyto reakce obcházeny? (Jedna z reakcí probíhá přes nepříznivé ΔG_o . 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_o souhrnné reakce. (Předpokládejte, že GTP je termodynamicky ekvivalentní ATP).

J 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⁺.



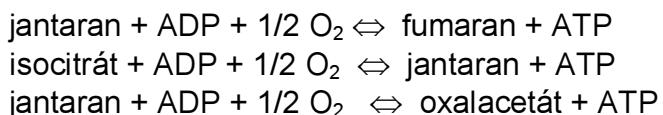
2. Vypočítejte ΔG_o reakce mezi:

- NADH - UQ
- jantaran - UQ
- cyt b(red) - cyt c(ox)
- cyt c(red) - 1/2 O₂

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

3. Vypočítejte G_o oxidace NADH kyslíkem v respiračním řetězci. Kolik molů ATP by teoreticky vzniklo za standartních podmínek ($G_{o\text{ATP}} = -30 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Jestliže namísto kyslíku použijeme umělého akceptoru hexakyanoželezitanu ($E_o = +0,36 \text{ V}$), jaká bude změna standartní volné energie reakce a kolik molů ATP vznikne?

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

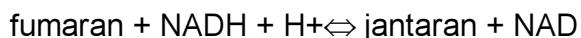


5. Po přídavku inhibitoru respirace antimycinu k systému respiračního řetězce mitochondrií byla zjištěno úplné zredukování ubichinonu, cytochromu b a úplné zoxidování cytochromů c, aa3. Zakreslete místo zásahu tohoto inhibitoru.

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



7. Vypočítejte ΔG_o reakce při 25°C

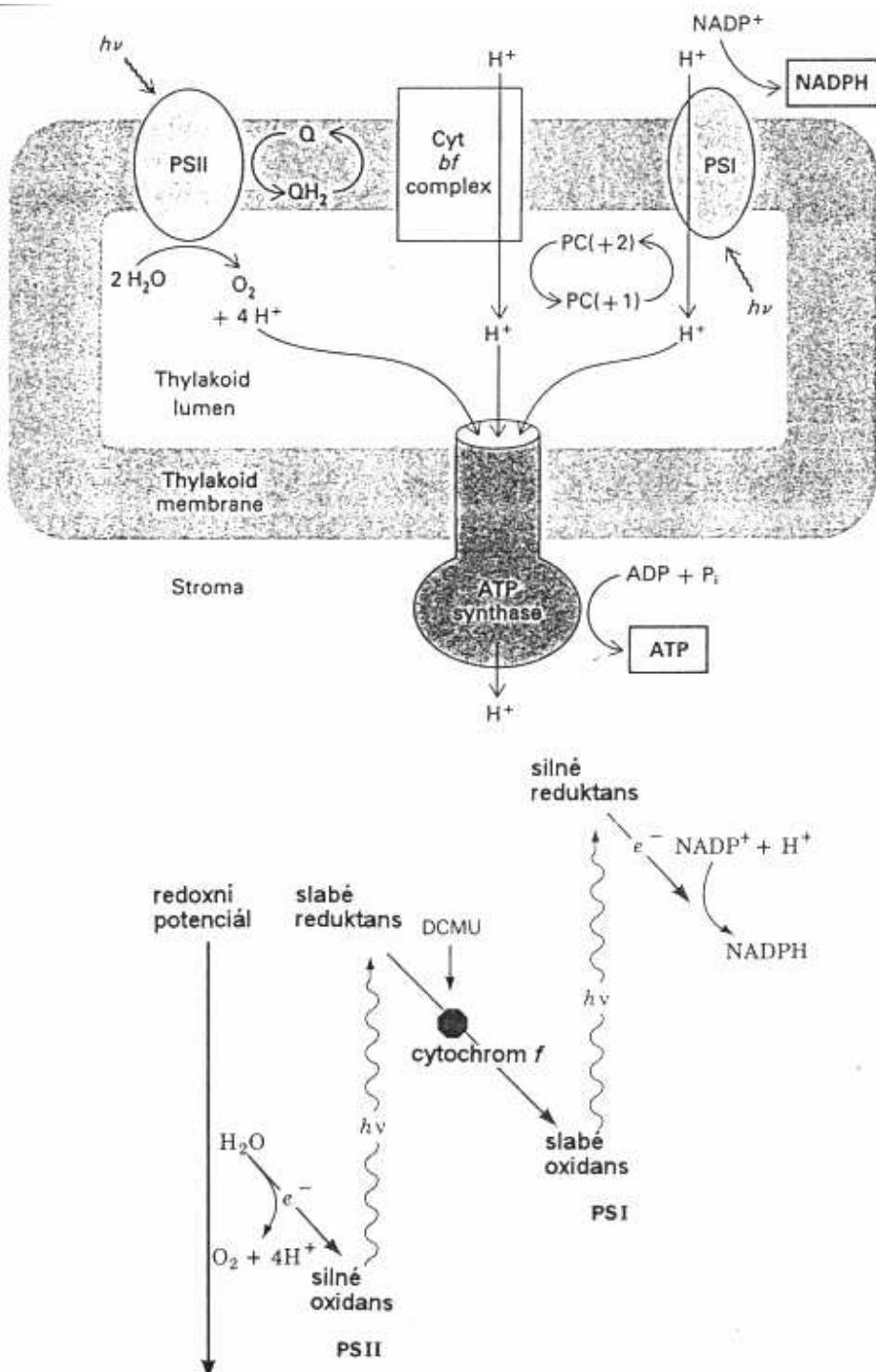


víte-li, že: $E_o \text{ NAD/NADH} = -0.32 \text{ V}$, $E_o \text{ fum/jan} = +0.03 \text{ V}$

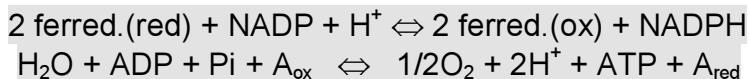
Bylo by možné, aby za standartních podmínek byla tato reakce využita k syntéze ATP? (hydrolýza ATP $\Delta G_o = -30 \text{ kJ/mol}$)

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

K FOTOSYNTÉZA

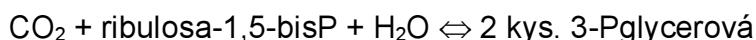


Souhrnná rovnice:



Temná fáze

fixace:



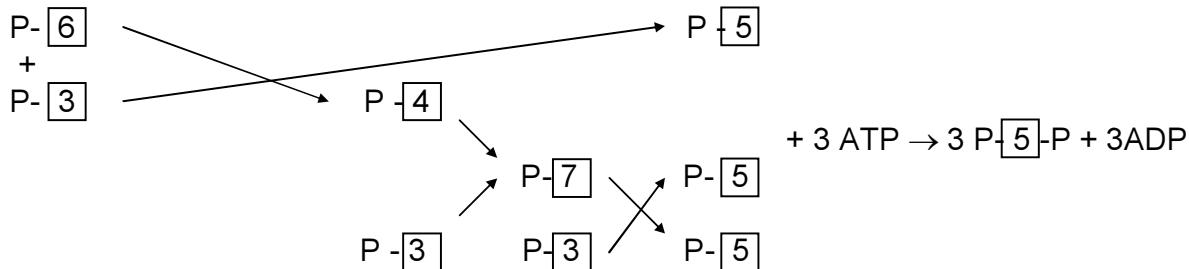
redukce:



syntéza hexózy:



regenerace:

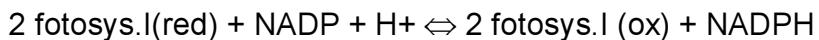


souhrnná rovnice:



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_\circ a ΔG_\circ reakce mezi redukovaným ferredoxinem a NADP při fotosynthesi (E_\circ 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 readioktivity v tomtéž případě, pokud byl přidán neznačený CO_2 a ribulosa-1,5bis fosfát značený na C5?
4. Srovnajte proces redukce kys. 3-fosfoglycerové na glyceraldehyd-3- fosfát při fotosynthesē a vratný proces oxidace glyceraldehyd-3-fosfátu při anaerobní glykolyse. V čem se oba procesy liší?
5. Fotosystém I má v základním stavu standartní redox potenciál $E_\circ = +0,46 \text{ V}$. Po absorpci světelného kvanta se jeho potenciál změní na $E_\circ = -0,60 \text{ V}$. 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 ($E_\circ = -0,43 \text{ V}$) 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.

VÝSLEDKY ÚLOH

D

2. $A_{260} = [AMP] \cdot \epsilon_{260}(\text{AMP}) + [\text{GMP}] \cdot \epsilon_{260}(\text{GMP})$
 $A_{280} = [AMP] \cdot \epsilon_{280}(\text{AMP}) + [\text{GMP}] \cdot \epsilon_{280}(\text{GMP})$
 $[\text{GMP}] = 3,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}, [\text{AMP}] = 1,90 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$
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)
 desoxyribonukleáza II: $^{32}\text{pAp+CpTpTpApG}$, $^{32}\text{pApCp+TpTpApG}$,
 $^{32}\text{pApCpTp+TpApG}$, $^{32}\text{pApCpTpTp+ApG}$, $^{32}\text{pApCpTpTpAp+G}$ a další
6. 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 podmínu a)
 ACGACU... nesplňuje podmínu 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
 TGCAGA
 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 dostáváváme 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

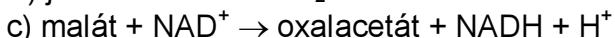
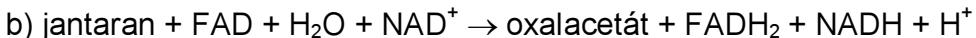
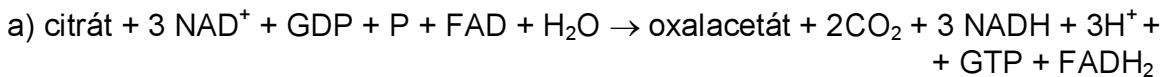
G

1. E=-0,35 V

2. doleva, doprava, doleva, doprava
3. Při výpočtu ΔE^0 odečítá od redoxního potenciálu složky, která vystupuje na levé straně rovnice v oxidované podobě, redoxní potenciál složky, která je zde v podobě redukované.
 $+29,7 \text{ kJ/mol}$, $6,13 \cdot 10^{-6}$
4. $[\text{laktát}]/[\text{pyruvát}] = 1$
 $\Delta E^0 = E_{\text{LAK}}^{0'} - E_{\text{NAD}}^{0'} = -0,185 - (-0,32) = 0,135 \text{ V}$
 $\Delta E^0 = (R \cdot T / n \cdot F) \cdot \ln([laktát] \cdot [NAD^+]/[pyruvát] \cdot [NADH])$
 $[NAD^+]/[NADH] = 3,71 \cdot 10^4$
5. $\Delta E^0 = -0,32 - (-0,031) = -0,351 \text{ V}$
 $\Delta G^0 = 67,7 \text{ kJ/mol}$
 $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln ([fumaran] \cdot [NADH]/[jantaran] \cdot [NAD^+]) = +60,3 \text{ kJ/mol}$
6. $\Delta E^0 = 0,104 - (-0,32) = 0,424 \text{ V}$
 $\Delta G^0 = -81,8 \text{ kJ/mol}$
 $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln ([UQH_2] \cdot [NAD^+]/[UQ] \cdot [NADH]) = -68,7 \text{ kJ/mol}$
7. $\Delta E^0 = 0,03 - (-0,58) = 0,61 \text{ V}$
 $\Delta G^0 = -117,7 \text{ kJ/mol}$
 Reakce probíhá doprava.
8. $\Delta G^0 = -14,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$
 Reakce probíhá doprava.
9. $\Delta G^0 = -83 \text{ kJ.mol}^{-1}$, 2-3 molekuly ATP
10. $[\text{alkohol}] = (5/46,0829)/0,1 = 1,0854 \text{ mol/l}$
 $\Delta E^0 = 0,123 \text{ V}$
 $\Delta G^0 = -23,74 \text{ kJ/mol}$
 $[NAD^+]/[NADH^+] = 6,71$
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:
 $\Delta E^0 = 0,58 \text{ V}$, $\Delta G^0 = 111,9 \text{ kJ/mol}$, $\Delta G = 100,5 \text{ kJ/mol}$

H

- malát + NAD^+ → oxalacetát + $NADH + H^+$
 citrát → isocitrát
- b,e
- a,b
- oxoglutarát + NAD^+ + GDP + P → jantaran + $CO_2 + NADH + H^+ + GTP$
- $K_1 = 0,0336397$
 $K_2 = 2,3444484$
 citrát → isocitrát, $\Delta G^0 = 6,29 \text{ kJ/mol}$, $K = 0,0788666$
 $cis\text{-akonitát}/citrát = 0,0336$, $isocitrát/cis\text{-akonitát} = 2,3444$, $isocitrát/citrát = 0,07887$
 $[citrát] = 1$, $[isocitrát] = 0,07887$, $[cis\text{-akonitát}] = 0,03364$, tedy 0,079:1:0,034
- 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 ¹⁴C objevoval i v jiných pozicích.



2. v citrátu na C2

v isocitrátu na C2 a C4

8. reakce s FAD: ΔG⁰=5,98 kJ/mol

reakce s NAD⁺: ΔG⁰=67,7 kJ/mol

10.

I

1. C2 obou trios

2. 2,5

3. ne

4. 2 glyceraldehyd-3-P + H₂O → fruktosa-6-P + P

5. fruktosa-6-P + 2 P + ADP + 2 NAD⁺ → 2 kys.3-P-glycerová + ATP + 2 NADH + 2 H⁺
1NADH je ekvivalentní 3ATP

fruktosa-6-P + 8 P + 7 ADP → 2 kys.3-P-glycerová + 7 ATP

6. pyruvát, laktát, alanin

7. a) hexokinasa

fruktosa + 2 ATP + 2 NAD⁺ + 2 P + 4 ADP → 2 pyruvát + 2 ADP + 2 NADH + 2 H⁺
+ 4 ATP

fruktosa + 8 ADP + 8 P → 2 pyruvát + 8 ATP

b) fruktokinasa

fruktosa + 2 ATP + 2 NAD⁺ + 2 P + 4 ADP → 2 pyruvát + 2 ADP + 2 NADH + 2 H⁺
+ 4 ATP

fruktosa + 8 ADP + 8 P → 2 pyruvát + 8 ATP

8. a) fruktosa-1,6-bisP + 2 NAD⁺ + 2 P + 2 ADP → 2 fosfoenolpyruvát + 2 NADH + 2H⁺
+ 2 ATP + 2 H₂O

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

fruktosa-1,6-bisP + 2 NAD⁺ + 2 HAsO₄²⁻ + 2 H₂O → 2 fosfoenolpyruvát + 2 NADH
+ 2H⁺ + 2 HAsO₄²⁻ + 2 H₂O

9. methylová skupina v obou případech

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

11. mechanismus aldolové kondenzace

12. odštěpí se jako ¹⁴CO₂

13. C3, C4

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



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



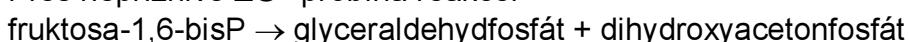
iii) pyruvát + ATP → fosfoenolpyruvát + ADP NEPROBÍHÁ ($\Delta G^\circ = +31 \text{ kJ/mol}$)
ve skutečnosti:

a) fosfoenolpyruvátsynthetasa (bakterie)

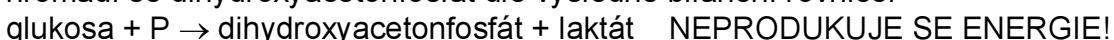
b) pyruvát + ATP + CO₂ → oxalacetát + ADP + P



Přes nepříznivé ΔG° probíhá reakce:



15. hromadí se dihydroxyacetonfosfát dle výsledné bilanční rovnice:



16. LDH srdečního svalu (izoenzym H₄) 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 M₄) 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 (únavu). Svalové buňky předávají laktát do krve, následně může být v játrech přeměněn na glukosu.

17. I) pyruvát + ATP + CO₂ → oxalacetát + ADP + P

II) oxalacetát + GTP → fosfoenolpyruvát + CO₂ + GDP

Souhrnná reakce:



[součet: a) pyruvát + ATP → fosfoenolpyruvát + ADP ($\Delta G^\circ = +31 \text{ kJ/mol}$)

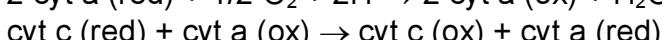
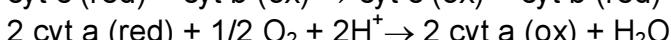
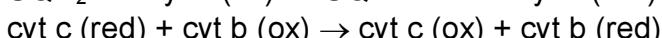
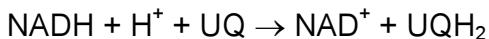
b) ATP = ADP + P ($\Delta G^\circ = -30,5 \text{ kJ/mol}$)]

$$\Delta G^\circ(\text{celk}) = +0,5 \text{ kJ/mol}$$

J

1. jednoelektronové: cyt c, cyt b, cyt a, UQ

dvouelektronové: NADH



2. 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.

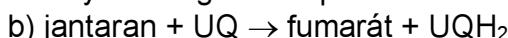


$$\text{E}^\ominus_{\text{NAD}^+} = -0,32\text{V}$$

$$\text{E}^\ominus_{\text{UQ}} = +0,10\text{V}$$

$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,10 - (-0,32)) = -81,06 \text{ kJ/mol}$$

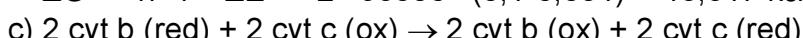
Kryta energetická spotřeba vzniku dvou ATP.



$$\text{E}^\ominus_{\text{fum}} = 0,031\text{V}$$

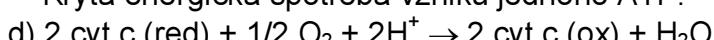
$$\text{E}^\ominus_{\text{UQ}} = 0,10\text{V}$$

$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,10 - 0,031) = -13,317 \text{ kJ/mol}$$



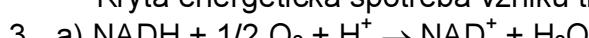
$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,235 - 0,03) = -39,57 \text{ kJ/mol}$$

Kryta energická spotřeba vzniku jednoho ATP.



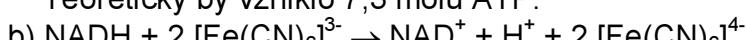
$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,816 - 0,235) = -112,13 \text{ kJ/mol}$$

Kryta energetická spotřeba vzniku tří ATP.



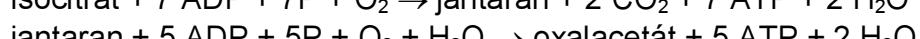
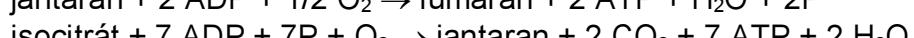
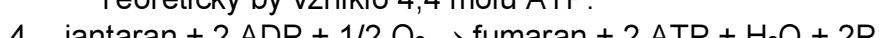
$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,816 - (-0,32)) = -219,25 \text{ kJ/mol}$$

Teoreticky by vzniklo 7,3 molů ATP.

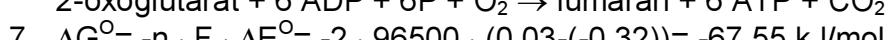
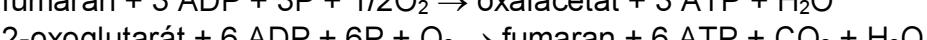
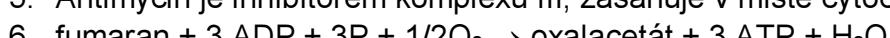


$$\Delta G^\ominus = -n \cdot F \cdot \Delta E^\ominus = -2 \cdot 96500 \cdot (0,36 - (-0,32)) = -131,24 \text{ kJ/mol}$$

Teoreticky by vzniklo 4,4 molů ATP.



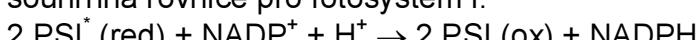
5. Antimycin je inhibitorem komplexu III, zasahuje v místě cytochromu bc₁.



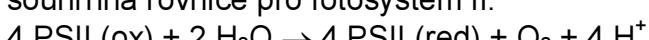
Tato reakce by mohla být využita k syntéze 2,2 molů ATP.

K

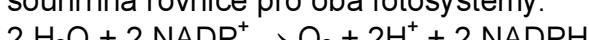
1. souhrnná rovnice pro fotosystém I:



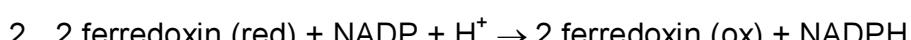
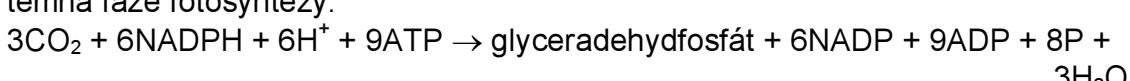
souhrnná rovnice pro fotosystém II:



souhrnná rovnice pro oba fotosystémy:



temná fáze fotosyntézy:



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

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

3. na C1 v prvním případě, na C3 ve druhém případě
4. lokalizace: chloroplasty (NADPH) X cytoplazma (NADH)
5. $2 \text{ fotosystém I (red)} + \text{NADP} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ fotosystém I (ox)} + \text{NADPH}$

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

základní stav:

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

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

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

excitovaný stav:

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

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

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

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

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

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

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

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

poměr v rovnováze: ferr(ox)/ferr(red) = 6,2

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

7. diuron zasahuje v místě komplexu b_6f

8. Jedná se o zelené sirmé 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